

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των αλάτων λιθίου πολυακόρεστων λιπαρών
οξέων του μύκητα *Cunninghamella elegans* σε φυσιολογικές και καρκινικές
ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΔΙΠΛΩΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΤΙΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ: ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Γεώργιος Καλαμπούνιας
Βιολόγος

ΠΑΤΡΑ, Μάρτιος 2023



ΕΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΥΠΟΓΡΑΦΕΣ

Τα μέλη
Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Κατσώρης Παναγιώτης
Αφυπηρετήσας Καθηγητής
Τμήμα Βιολογίας
Πανεπιστήμιο Πατρών
.....

Ροσμαράκη Ελευθερία
Επίκουρη Καθηγήτρια
Τμήμα Βιολογίας
Πανεπιστήμιο Πατρών
.....

Καλλέργη Γαλάτεια
Επίκουρη Καθηγήτρια
Τμήμα Βιολογίας
Πανεπιστήμιο Πατρών
.....

Ο Επιβλέπων Καθηγητής

Κατσώρης Παναγιώτης
Αφυπηρετήσας Καθηγητής
Τμήμα Βιολογίας
Πανεπιστήμιο Πατρών
.....

Η έγκριση της διατριβής για την απόκτηση Διπλώματος Μεταπτυχιακών σπουδών από το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

N. 5343/1392, άρθρο 2023

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
Εισαγωγή	8
Καρκίνος και χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων	8
Το οξειδωτικό στρες και ο ρόλος του στον καρκίνο.....	12
Η διατροφή και ο ρόλος της στην πρόληψη και στην θεραπεία του καρκίνου.....	14
Η σύνθεση, αποθήκευση και ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων.....	15
Κυτταροτοξικές δράσεις των PUFAς στα καρκινικά κύτταρα: Η απόπτωση και η φερρόπτωση.....	23
Το μικροβιακό λίπη και ο οργανισμός <i>Cunninghamella elegans</i>	29
Σκοπός	32
Υλικά και Μέθοδοι.....	33
Παραγωγή αλάτων λιθίου πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (FALS)	33
Κυτταρικές σειρές	34
Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	34
Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	36
Κρυοσυντήρηση κυττάρων	38
Απόψυξη κυττάρων.....	39
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης απορρόφησης κυττάρων	40
Χρώση των κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες και υπολογισμός του αριθμού τους.....	42
Επίστρωση κυττάρων σε μικροπλακίδια.....	43
Επώαση κυττάρων με FALS	44
Μέθοδος επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay/Scratch Test)	46
Boyden/Transwell Chambers	48
Κυτταρομετρία ροής - Χρώση με τις φθορίζουσες χρωστικές Nile Red, BODIPY™)....	50
Κυτταρομετρία ροής - Annexin V/PI.....	52

Κυτταρομετρία ροής - Χρώση LIVE/DEAD και H ₂ DCFDA	53
Επίστρωση κυττάρων σε καλυπτρίδες και προετοιμασία δείγματος για συνεστιακή μικροσκοπία/μικροσκοπία φθορισμού	55
Χρώση λιπιδίων με φθορίζουσες χρωστικές και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο/μικροσκόπιο φθορισμού.....	57
Χρώση μεμβρανικών δομών και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο	58
Αποτελέσματα	60
Υπολογισμός της IC ₅₀ - Μελέτη βιωσιμότητας/πολλαπλασιασμού	60
Υπολογισμός της δράσης του ελευθέρου λιθίου.....	63
Συνεχής καλλιέργεια κυττάρων σε θρεπτικό μέσο πλούσιο σε FALS.....	64
Μελέτη της αποπτωτικής δραστηριότητας	64
Μελέτη του χημειοτακτισμού	67
Μελέτη της ικανότητας επούλωσης πληγών.....	69
Μορφολογικές διαφορές κυττάρων επωασμένων με FALS	71
Παρατήρηση της δομής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.....	74
Οπτικοποίηση της συσσώρευσης λιπιδίων	75
Ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης λιπιδίων	80
Χορήγηση FALS και οξειδωτικό στρες	83
Συζήτηση	86
Βιβλιογραφία	89

Ευχαριστίες

Πριν ξεκινήσω την παράθεση επιστημονικών πληροφοριών και αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους άμεσα ή έμμεσα συντέλεσαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Καταρχάς, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο δάσκαλό μου, Αφυπηρετήσαντα Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας κύριο Παναγιώτη Κατσώρη που υπήρξε δίπλα μου σε κάθε στάδιο της εκπαίδευσής μου -από προπτυχιακός φοιτητής ακόμα- και μου δίδαξε όσα σήμερα γνωρίζω, αλλά και τις βάσεις για να μάθω και κυρίως να καταλάβω περισσότερα. Σας ευχαριστώ πολύ δάσκαλε, σας ευχαριστώ πολύ κύριε Κατσώρη και νιώθω τιμή που υπήρξα φοιτητής σας και μέλος του Εργαστηρίου σας.

Στη συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω τις κυρίες Ελευθερία Ροσμαράκη και Γαλάτεια Καλλέργη, Επίκουρες Καθηγήτριες του Τμήματος Βιολογίας και μέλη της Τριμελούς Επιτροπής μου για την καθοδήγησή τους και τη βοήθειά τους. Θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητή του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και την κυρία Αυγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια του ίδιου Τμήματος για την εξαιρετική συνεργασία μας και βοήθειά τους στην εκπόνηση αυτής της εργασίας. Παράλληλα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας κύριο Γιώργο Αγγελή και στα μέλη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας, για την παροχή γνώσεων αλλά και υλικών πάνω σε θέματα που πραγματεύεται η κείμενη εργασία όπως και τον κύριο Ηλία Καζάνη για την παροχή μικροσκοπίων, συμβουλών και κάθε φύσεως βοήθεια.

Θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Σωτήρη Τσάκα, μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Βιολογίας για την πολύτιμη βοήθειά του σε όλη την πορεία μου ως φοιτητής, τους Υποψήφιους Διδάκτορες Πόπη Ζαφειροπούλου και Σπύρο Αλέξη για την βοήθειά τους, την φιλία και συνεργασία μας. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Ευαγγελία Πανταζάκα για την καθοδήγηση και βοήθειά της αλλά και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας που συνέβαλαν στην εργασία αυτή και συνεργάστηκαν μαζί μου δημιουργώντας ένα ευχάριστο ακαδημαϊκό κλίμα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξή της σε όλα τα φοιτητικά μου χρόνια και κυρίως την αδερφή μου στην οποία εύχομαι καλή σταδιοδρομία στις επερχόμενες σπουδές της και καλή πρόοδο. Κλείνοντας, θέλω από καρδιάς να ευχαριστήσω τη συνάδελφο και σύντροφό μου, τη γυναίκα που με στηρίζει στα βήματά μου και την οποία θαυμάζω και ευχαριστώ για τη συμβολή της σε ό,τι καταπιάνομαι και με την οποία εύχομαι να διάγουμε μια ευτυχισμένη και αρμονική ζωή...

Μάρτιος 2023

Περίληψη

Η ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας έχει επιτρέψει την καλλιέργεια μικροοργανισμών σε υποστρώματα που μέχρι πρότινος κατατάσσονταν ως παραπροϊόντα της βιομηχανίας. Η γλυκερόλη είναι μία κλασική περίπτωση τέτοιας ουσίας, που ως πηγή άνθρακα μπορεί να υποστηρίξει την αύξηση του μύκητα *Cunninghamella elegans*, ο οποίος -όντας ελαιογόνος- είναι σε θέση να τη μετατρέψει σε αποθεματικά λιπίδια. Μελέτες της σύστασης του συσσωρευθέντος λίπους κατέδειξαν σημαντική παρουσία «σπανίων» πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) των ομάδων ω-3 και ω-6, τα οποία, -πέραν της αυξημένης διατροφικής αξίας που έχουν- σχετίζονται με πιθανές αντικαρκινικές βιολογικές δράσεις. Βέβαια, περιορισμός στην μέχρι τώρα μελέτη τους και ενδεχόμενη αξιοποίησή τους από τις φαρμακοβιομηχανίες, αποτελούσε το υψηλό κόστος παραγωγής και απομόνωσής τους. Η χρήση της βιοτεχνολογίας οδηγεί στη διάνοιξη ενός νέου πεδίου έρευνας - εντός του οποίου κινείται και η παρούσα εργασία- αξιολογώντας τη χορήγηση των PUFAs υπό τη μορφή αλάτων λιθίου (FALS) σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα σε in-vitro συνθήκες και μελέτης των βιολογικών τους δράσεων. Βασικές παράμετροι όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η απόπτωση αλλά και το οξειδωτικό στρες αξιολογούνται, ενώ παράλληλα αναπτύσσεται μία μέθοδος οπτικοποίησης και ποσοτικοποίησης των συσσωρευμένων λιπιδίων. Η χορήγηση των FALS δείχνει να ακολουθείται από αύξηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες, ενώ η επίδραση στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τον κυτταρικό θάνατο εμφανίζει ένα δοσοεξαρτώμενο πρότυπο. Ο μηχανισμός δράσης των αλάτων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, παρόλο που σε πρώτο πλάνο δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται μία πιο μακροπρόθεσμη δράση τους σε επίπεδο οργανισμού.

Abstract

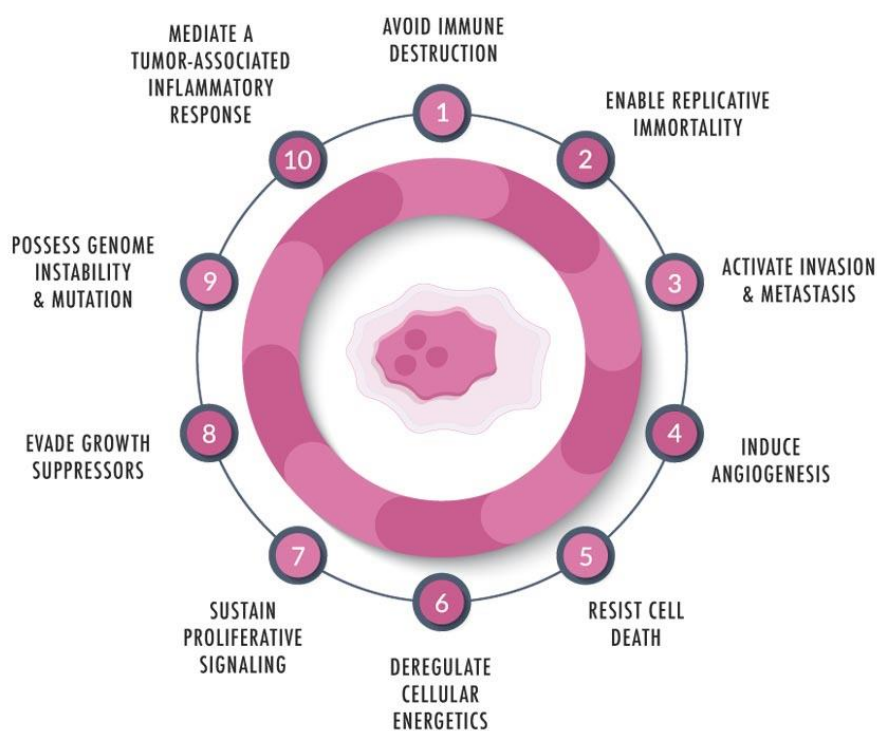
The development of Biotechnology has allowed the culture of microorganisms on substrates upon recently considered unwanted byproducts. Glycerol is a classic case of such a substance, which as a carbon source is sufficient for the proliferation of *Cunninghamella elegans* a single-cell oleogenic fungus able to convert it into reserve fats. Studies on the accumulated fat's composition indicated an augmented presence of "rare" polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the ω -3 and ω -6 groups, which, beyond their nutritional value, are correlated to possible anticancer biological actions. The high production and isolation cost was certainly a limitation to their study and potential utilization from pharmaceutical companies. The biotechnological applications lead to a creation of a new research field -within which also lies this study- assessing the in vitro administration of PUFAs, as fatty acid lipid salts (FALS), to normal and cancer cells and studying the effects on the main biological functions. Key parameters like cell proliferation, migration, apoptosis as well oxidative stress are assayed, while a method for accumulated lipids' visualization and quantification is being developed. The administration of FALS seemingly provokes elevated oxidative stress levels and exhibits dose-response effects on cell proliferation migration and cell death. The mechanism of action requires further investigation whilst in the first place no statistically significant differences between the two groups were observed. However, a long-term mode of action on an organism level cannot be dismissed.

Εισαγωγή

Καρκίνος και χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων

Ο καρκίνος είναι μία γενετική νόσος που πλήττει τον άνθρωπο (και άλλους πολυκύτταρους οργανισμούς) οφειλόμενη σε αλλαγές σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η εμφάνιση του καρκίνου δεν είναι αμιγώς κληρονομικό φαινόμενο (παρότι υπάρχουν γονίδια συσχετισμένα με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισή του) αλλά μία πολύπλευρη αλληλεπίδραση περιβάλλοντος και γονοτύπου που εξελίσσεται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ατόμου. Ο καρκίνος οφείλεται σε μεταλλαγές που συσσωρεύουν τα σωματικά κύτταρα και ένεκα αυτών, ο έλεγχος τους από τον οργανισμό εκλείπει και τότε μέσα από μία σειρά φαινομένων φυσικής επιλογής προκύπτει ένα συσσωμάτωμα κυττάρων που ονομάζεται πρωτοπαθής όγκος ή νεόπλασμα. Οι όγκοι μπορούν να αυξάνονται απεριόριστα -εάν υπάρχει άφθονη ροή ενέργειας και θρεπτικών ουσιών στην περιοχή σχηματισμού τους- συχνά συμπιέζοντας όργανα του ασθενή και προκαλώντας δευτερογενή θέματα υγείας στον ασθενή ενώ ελλοχεύει ο κίνδυνος διασποράς τους κα στο υπόλοιπο σώμα, μια διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση (Μαρμάρας, 2013).

Παρότι, τα ώριμα καρκινικά κύτταρα δεν είναι αρχικά μεταστατικά, η συσσώρευση μεταλλαγών σε αυτά μπορεί να τους επιτρέψει να αποκτήσουν την δυνατότητα τόσο να αποκολληθούν από τον πρωτοπαθή όγκο όσο και να διεισδύουν σε άλλους ιστούς και να εγκαθίστανται εκεί. Ο πρωτοπαθής όγκος είναι προορισμένος να νεκρωθεί εάν δεν εξελιχθεί, εάν δε βρεθεί τρόπος να εξασφαλίσει τροφή και οξυγόνο και να αποφύγει το ανοσοποιητικό σύστημα, τα κύτταρά του δε θα καταφέρουν να διαιρεθούν, ο μεταβολισμός τους θα μειωθεί και βαθμιαία θα τα οδηγηθεί σε θάνατο. Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη πορεία πολλαπλασιασμού που έχει το καρκινικό κύτταρο, σε συνδυασμό με τη μειούμενη αποτελεσματικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, οδηγούν στη δημιουργία μεγάλου αριθμού κυττάρων με μεγαλύτερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης τα οποία συνιστούν το ιδανικό περιβάλλον γένεσης κλώνων με πιο «επιθετικά χαρακτηριστικά». Ποια είναι όμως εν τέλει τα χαρακτηριστικά ενός καρκινικού κυττάρου (Μαρμάρας 2013);

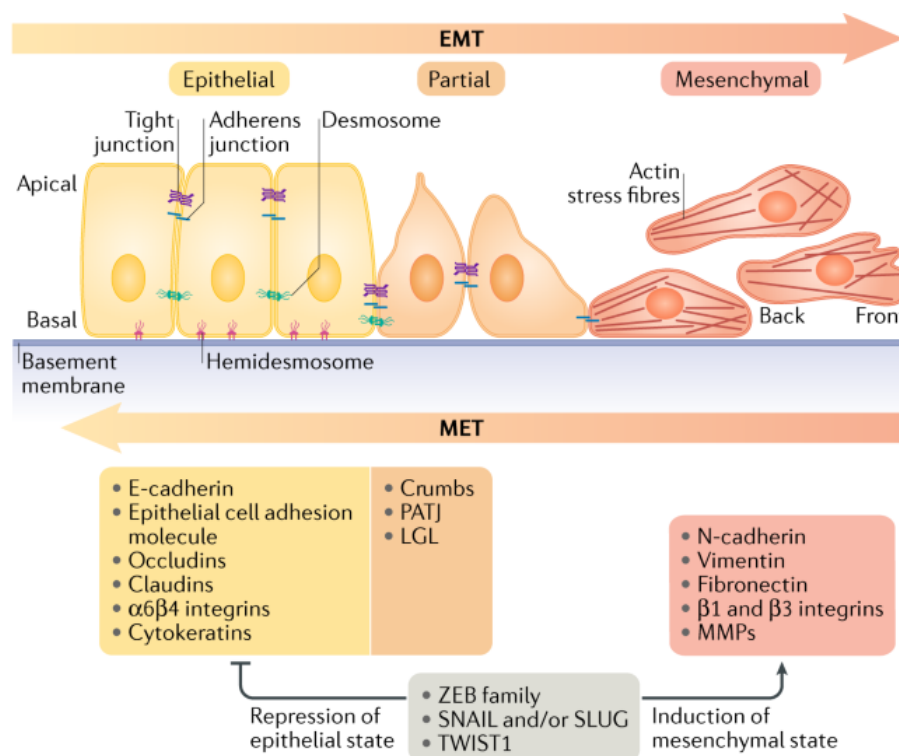


Εικόνα 1 Τα χαρακτηριστικά του καρκινικού κυττάρου (Πηγή: <https://www.technologynetworks.com/cancer-research/articles/cancer-cells-vs-normal-cells-307366>).

Τα καρκινικά κύτταρα καταφέρνουν και επιβιώνουν επειδή συγκεντρώνουν ορισμένα χαρακτηριστικά ανεξαρτητοποίησης από το υπόλοιπο σώμα και διαφυγής των μηχανισμών ελέγχου και θανάτωσης (Εικόνα 1). Το πρώτο βήμα είναι και αυτό που χαρακτηρίζει ένα κύτταρο ως καρκινικό αφορά στην αθανатоποίηση τους και την ικανότητα αέναων κυτταρικών διαιρέσεων. Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα τελομερασών (που στους ιστούς των ενηλίκων είναι μειωμένη), απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αλλά και μετατροπή πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια, οι μεταγραφικοί παράγοντες που στα φυσιολογικά κύτταρα είναι αυστηρά ελεγχόμενα από τον οργανισμό αλλά και από ενδογενείς μηχανισμούς του κυττάρου, στα καρκινικά κύτταρα παρατηρούνται ενεργοποιημένα και αυτοτροφοδοτούμενα. Τα φυσιολογικά κύτταρα κατά το πλείστο της ζωής τους βρίσκονται σε αδράνεια όσον αφορά στη μιτωτική τους δραστηριότητα και η κινητοποίηση τους (ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου) γίνεται με εξωγενή μιτογόνα σήματα. Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρούνται αρκετές παραλλαγές αυτού του μηχανισμού. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, το κύτταρο μπορεί να κρατάει ενεργό ένα σήμα που δόθηκε για διαίρεση πέραν του φυσιολογικού ενώ σε πιο επιθετικές μορφές καρκίνου παρατηρείται και αυτοκρινής ενεργοποίηση των μονοπατιών πολλαπλασιασμού. Φυσικά, οι ομοιοστατικές άμυνες του οργανισμού διαθέτουν μηχανισμούς παύσης της μίτωσης, εάν ανιχνευτεί ανεξέλεγκτη δραστηριότητα, η αποφυγή τους όμως είναι ένα άλλο χαρακτηριστικό που συναντάται στα κύτταρα των όγκων (Guterres and Villanueva 2020), (Μαρμάρας 2013) .

Η αποφυγή αντιμιτογόνων μηνυμάτων αλλά και η αποφυγή της απόπτωσης δρα ενισχυτικά στην ικανότητα του καρκινικού κύτταρου να συνεχίζει να διαιρείται ανενόχλητο. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η απόπτωση, που στα φυσιολογικά κύτταρα θα ενεργοποιηθεί εάν το κύτταρο πρέπει να πεθάνει, στα κύτταρα των όγκων είναι αδρανοποιημένη. Τα καρκινικά κύτταρα μειορρυθμίζουν την έκφραση υποδοχέων των μονοπατιών της απόπτωσης ή έχουν μεταλλαγμένες και συνάμα ανενεργές τις πρωτεΐνες-τελεστές της (McKenzie and Kyprianou 2006). Παράλληλα, η αθανатоποίηση τους αλλά και η άφθονη ροή θρεπτικών συστατικών έρχεται να αποκατασταθεί μέσω επαγωγής της αγγειογένεσης. Στο εσωτερικό του όγκου επικρατούν συνθήκες υποξίας, έλλειψης γλυκόζης και βιταμινών αλλά και αυξημένη συγκέντρωση μεταβολιτών που στους φυσιολογικούς ιστούς απομακρύνει το φλεβικό αίμα. Η έκκριση παραγόντων αγγειογένεσης από τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό αγγείων εντός του όγκου, τα οποία εξασφαλίζουν στον πρωτοπαθή όγκο μια αστείρευτη πηγή θρεπτικών και οξυγόνου. Ένας όγκος με αγγείωση είναι ζήτημα χρόνου να διογκωθεί, να αποκτήσουν τα κύτταρά του μεταστατικές ιδιότητες και να εκτραπεί σε κακοήγη (Viallard and Larrivée 2017).

Η ικανότητα αποκόλλησης από τον πρωτοπαθή, μητρικό όγκο, η ικανότητα επιβίωσης στην κυκλοφορία και τέλος η ικανότητα διείσδυσης σε άλλους ιστούς και ρίζωσης στη νέα θέση δίνουν στο κύτταρο την ικανότητα μετάστασης. Για να γίνει ένα κύτταρο μεταστατικό πρέπει να συγκεντρώσει εάν σύνολο χαρακτηριστικών που του δίνουν μεσεγχυματικό χαρακτήρα, ένα φαινόμενο που ονομάζεται EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Το φαινόμενο της EMT (Dongre and Weinberg 2019).

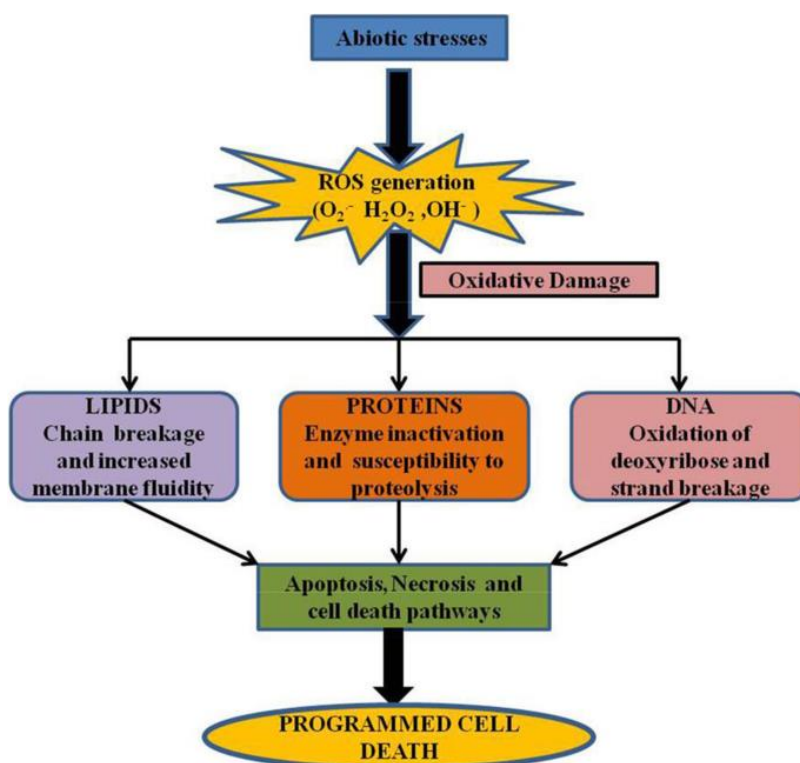
Θα πρέπει να αλλάξει το πρότυπο των εξωκυττάρων γλυκοπρωτεϊνών που ρυθμίζουν την πρόσδεση στην εξωκυττάρια μήτρα, θα πρέπει να εκφράζει μεταλλοπρωτεϊνάσες για να διαρρηγνύει τις διακυτταρικές συνδέσεις και να διεισδύει σε παρακείμενους ιστούς και τέλος θα μπορεί να κυκλοφορεί στο αίμα ή στη λέμφο χωρίς να κινητοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα και να το ενεργοποιεί εις βάρος του. Τα καρκινικά κύτταρα που αποκολλώνται από τους ιστούς και κυκλοφορούν σε βιολογικά υγρά, καλούνται κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα και αποφεύγουν την άμυνα του οργανισμού με ποικίλους τρόπους. Ένας μηχανισμός είναι η μετακίνηση σε συστάδες με άλλα κύτταρα του αίματος ώστε να αποφεύγεται η πρόσδεση αντιγόνων της επιφανείας τους με υποδοχείς κυτταροτοξικών κυττάρων ή η επικάλυψη τους με αιμοπετάλια για τον ίδιο σκοπό. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ακόμα και έκφραση ανοσοκατασταλτικών μορίων όπως αυτά στην επιφάνεια των Tregs. Άπαξ και βρεθεί στην κυκλοφορία, το καρκινικό κύτταρο μπορεί να παραμείνει εκεί σε κατάσταση σχετικής αδράνειας ή να «αγκυροβολήσει» σε ένα λεμφικό ή τριχοειδές αγγείο. Η αγκυροβολήση είναι πιο εύκολη στα τυφλά άκρα του λεμφικού συστήματος ενώ η διαδικασία αυτή ομοιάζει με την επιστράτευση των λευκών αιμοσφαιρίων κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Ο μεσεγχυματικός φαινότυπος του κυκλοφορούντος καρκινικού κυττάρου στη συνέχεια θα το διευκολύνει να διαπηδήσει τα τοιχώματα του αγγειακού ενδοθηλίου και να εγκατασταθεί επιτυχώς στη νέα θέση. Η μετάσταση έχει ολοκληρωθεί και το κύτταρο είναι πλέον ασταθές, πολυδύναμο, και θα δώσει γένεση σε έναν νέο όγκο διασπείροντας έτσι το πρόβλημα (De Wever et al. 2008), (Μαρμάρας 2013).

Τα καρκινικά κύτταρα για να υποστηρίξουν όλον αυτόν τον κυκεώνα δαρβινικών απαιτήσεων εμφανίζουν διαταραγμένες πολλές μεταβολικές και εν γένει βιοχημικές τους διεργασίες σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Οι απαιτήσεις σε πηγές άνθρακα και αζώτου είναι αυξημένες και έτσι ο μεταβολισμός των αμινοξέων και οι καταβολικές οδοί στα μιτοχόνδρια -με κυριότερη την οξειδωτική φωσφορυλίωση- είναι υπερφορτωμένες. Η μεταβολική υπερδιέγερση των καρκινικών κυττάρων τα καθιστά διψασμένα για ενέργεια αλλά και ευάλωτα στην έλλειψή της, ενώ η κατεύθυνση της ενέργειας στη βιοσύνθεση γίνεται σε βάρος του ποιοτικού ελέγχου των νεοσυντιθέμενων βιομορίων που οδηγεί αφενός στη συσσώρευση μη λειτουργικών πρωτεϊνών και αφετέρου σε αυξημένα λάθη στην αντιγραφή του DNA. Τα κακοφτιαγμένα μόρια αυξάνουν τα επίπεδα στρες εντός των κυττάρων και η γενετική αστάθεια που προκύπτει από τις μεταλλάξεις λειτουργεί ως δίκτοπο μαχαίρι εντείνοντας την εξελικτική πίεση που δέχονται τα καρκινικά κύτταρα και που οδηγούν στην επικράτηση του αρμοστικότερου και συνεπώς του πιο επικίνδυνου για τον οργανισμό που στην προκειμένη περίπτωση μπορεί να χαρακτηριστεί ως ξενιστής. Η αύξηση στην κατανάλωση οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα, ανεβάζει ακόμα τα επίπεδα οξειδωτικού στρες, με τη δημιουργία και τη

συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου που προξενούν βλάβες στα βιομόρια του κυττάρου είτε αυτά είναι πρωτεΐνες, είτε νουκλεϊκά οξέα είτε λιπίδια (Arfin et al. 2021).

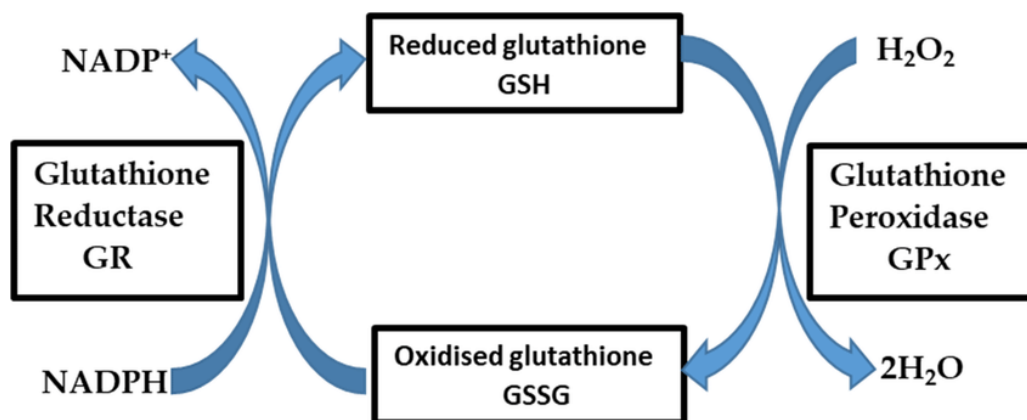
Το οξειδωτικό στρες και ο ρόλος του στον καρκίνο

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η απορρύθμιση της ισορροπίας ανάμεσα στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών μέσα στα κύτταρα και στους μηχανισμούς εξουδετέρωσής τους. Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται χαρακτηρίζονται είτε ως δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), είτε ως δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) και οφείλουν την δραστικότητά τους στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο που έχουν. Η πλειονότητα των ROS δημιουργείται στα μιτοχόνδρια ως αποτέλεσμα της αναπνευστικής αλυσίδας, μπορούν όμως να μετακινούνται μέσω διάχυσης σε όλο το κύτταρο, να διαπερνούν μεμβράνες και να φτάνουν ακόμα και στον πυρήνα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι βραχύβιες μέσα στο κύτταρο, καθώς άμεσα αντιδρούν με τα βιομόρια και ως συνέπεια τα καταστρέφουν. Οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια αλλά και τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να αντιδράσουν με τις ελεύθερες ρίζες με απόρροια την απώλεια της βιοενεργότητάς τους, την διατάραξη της δομής τους και την απώλεια γενετικής πληροφορίας αντίστοιχα. Με σκοπό τα επίπεδα οξειδωτικού στρες να ελεγχθούν και να παραμείνουν σε χαμηλά επίπεδα, τα κύτταρα διαθέτουν πλειάδα μηχανισμών αφενός για την άμεση εξουδετέρωση των ROS και αφετέρου για την επιδιόρθωση των βλαβών στα βιομόρια (Εικόνα 3) (Schieber and Chandel 2014).



Εικόνα 3 Οι κύριες καταπονήσεις του κυττάρου οφειλόμενες στο οξειδωτικό στρες (Qamer et al. 2021).

Ο κυριότερος αντιοξειδωτικός μηχανισμός είναι το σύστημα της γλουταθειόνης (Εικόνα 4) αλλά και οι αντιοξειδωτικές ενώσεις βιταμίνη C, βιταμίνη E και τα καροτενοειδή, ουσίες που αντιδρούν άμεσα με τις σχηματισθείσες ελεύθερες ρίζες και εμποδίζουν την αλυσιδωτή εξάπλωσή τους (Yang et al. 2021), (Diaz-Vivancos et al. 2015).



Εικόνα 4 Το αντιοξειδωτικό σύστημα προστασίας της γλουταθειόνης (Alamu et al. 2020).

Οι ROS ενεργοποιούν ή καταστέλλουν μονοπάτια μεταγωγής σήματος εντός του κυττάρου που σχετίζονται τόσο με την καταστροφή τους, όσο και με τη ρύθμιση του μεταβολισμού εφόσον η παραγωγή τους είναι στενά συνδεδεμένη με αυτόν. (Schieber and Chandel 2014), (Reuter et al. 2010). Στα καρκινικά κύτταρα αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι διαταραγμένες και παρατηρείται μία διαφορετική ισορροπία, ένεκα των αυξημένων μεταβολικών αντιδράσεων. Το οξειδωτικό στρες στα καρκινικά κύτταρα είναι πιο υψηλό σε σχέση με τα φυσιολογικά, γεγονός που επηρεάζει ενισχυτικά τόσο την αστάθεια τους γενετικά και βιοχημικά. (Cairns, Harris, and Mak 2011)(Schieber and Chandel 2014). Η δημιουργία και συσσώρευση των ROS εντός των κυττάρων αλληλοεπιδρά παράλληλα με μονοπάτια μεταγωγής σήματος σχετιζόμενα με τον πολλαπλασιασμό τους(Klaunig, Kamendulis, and Hockevar 2010), (Matsuzawa and Ichijo 2008)και έχει αποδειχθεί πως οι γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που επιφέρουν μπορούν μακροπρόθεσμα να επάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις και εν τέλει καρκινογένεση (Murata et al. 2012).

Στον καρκίνο, η δράση των ROS είναι πολυεπίπεδη και ούσα προέκταση μίας χρόνιας προ-φλεγμονώδους δράσης, είναι σε θέση να επηρεάζει πολλά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων τρέποντας τα σε πιο «επιθετικά» (Reuter et al. 2010). Πέραν της επαγωγής μονοπατιών επιβίωσης και πολλαπλασιασμού, οι ROS έχει βρεθεί ότι αυξάνουν το ρυθμό διείσδυσης και μετανάστευσης, καταστέλλοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης και επάγοντας την έκφραση πρωτεϊνών συσχετιζόμενων με την κυτταρική κινητικότητα (Roebuck 1999). Παράλληλα, οι ROS -όπως και η υποξία- είναι σημαντικοί επαγωγείς των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Η θετική ανατροφοδότηση του συστήματος με ROS που προκύπτει από την αυξημένη

βιοχημική αστάθεια, επάγει την σύνθεση και τη σταθεροποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο HIF-1α που εν τέλει θα οδηγήσουν στην έκφραση παραγόντων όπως ο VEGF με αγγειογενετική δράση (North, Moenner, and Bikfalvi 2005), (Bergers and Benjamin 2003), (Chandel et al. 1998). Επιπλέον, η αύξηση του οξειδωτικού στρες συνδέεται με φαινόμενα αυξημένης αντίστασης σε χημειοθεραπείες αλλά και ραδιοθεραπείες (Reuter et al. 2010).

Ωστόσο, παρότι το οξειδωτικό στρες είναι στενά συνδεδεμένο με τη διαδικασία της καρκινογένεσης, η παρέμβαση στην ισορροπία που το ρυθμίζει στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο προστατευτικά, όσο και θεραπευτικά. Οι ήδη υψηλές συγκεντρώσεις ROS στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων που συμβάλλουν θετικά στην επιβίωση και εξάπλωσή τους αποτελούν μία πολύ λεπτά ρυθμιζόμενη κατάσταση που εξυπηρετείται από ενισχυμένη αντιοξειδωτική άμυνα. Στοχεύοντας επομένως την άμυνα αυτή και ουσιαστικά την ήδη καταπονημένη τους ικανότητα να αποσοβούν το οξειδωτικό στρες, ίσως κατέχουμε στα χέρια μας ένα θεραπευτικό εργαλείο (Sesti et al. 2012). Πολλές υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν αποδειχθεί να δρουν και μέσω πρόκλησης ανεξέλεγκτου οξειδωτικού στρες στα καρκινικά κύτταρα μεταξύ των οποίων χημειοθεραπείες, οι ακτινοβολίες, αναστολείς του πρωτεασώματος αλλά και απευθείας παρεμπόδιση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Kim, Kim, and Seo 2019) (Gorrini, Harris, and Mak 2013). Τέλος, ανεξάρτητα ή και συνδυαστικά με τις προαναφερθείσες θεραπείες, εξαιρετικά σημαντικός παράγοντας τόσο στην πρόληψη όσο και στην καταπολέμηση του καρκίνου διαδραματίζει η διατροφή (Barreira 2021).

Η διατροφή και ο ρόλος της στην πρόληψη και στην θεραπεία του καρκίνου

Η διατροφή είναι ο κυριότερος τρόπος με τον οποίο το ανθρώπινο σώμα αλληλεπιδρά χημικά με το περιβάλλον του. Η επαναλαμβανόμενη και σωρευτική φύση της, παρότι φαντάζει οριακά ασήμαντη σε ένα φαινόμενο όπως η καρκινογένεση, στην πραγματικότητα είναι ένας από τους δεσπόζοντες παράγοντες στην θωράκιση του οργανισμού αλλά και στην προσπάθεια ίασης του. Ορισμένες τροφές έχουν συνδεθεί τόσο με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου, όσο και με αυτοάνοσα νοσήματα και αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτές οι τροφές συνήθως αφορούν σε επεξεργασμένα τρόφιμα, συχνά χαμηλής διατροφικής αξίας και πλούσια μόνο σε σάκχαρα ή κορεσμένα λίπη (Gonzalez and Riboli 2006), (Barreira 2021).

Ωστόσο, κάποιες κατηγορίες λιπιδίων που «σπανίζουν» στη σώμα, τα λεγόμενα απαραίτητα λιπαρά οξέα (Essential Fatty Acids, EFAs) έχουν συνδεθεί με αντικαρκινικές δράσεις σε πληθυσμιακές μελέτες που έγιναν, με πιο τυπική την περίπτωση των Εσκιμώων που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες ψαριών και τροφών πλούσιων σε απαραίτητα λιπαρά οξέα και εμφανίζουν αρκετά χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου σε σχέση με άλλους πληθυσμούς. (Anon 1975), (Jiang,

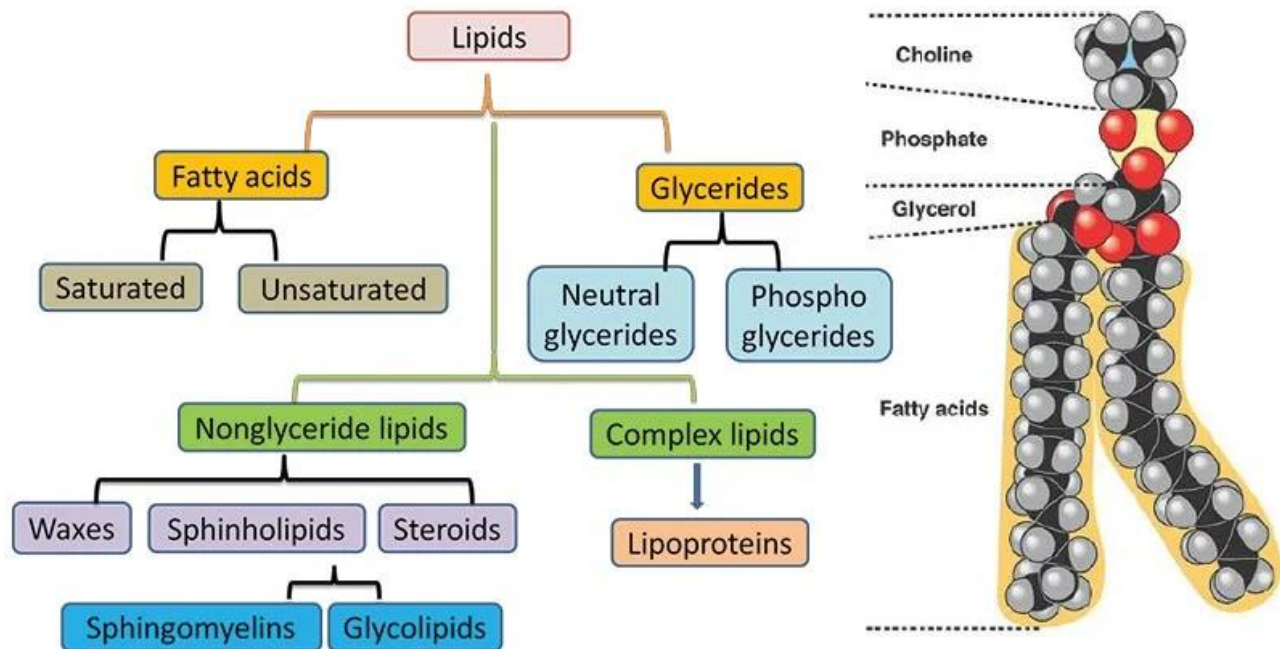
Bryce, and Horrobin 1998). Παράλληλα, σε μελέτες που έγιναν με χορήγηση EFAs σε καρκινικές σειρές, πειραματικά μοντέλα (Karmali, Marsh, and Charles 1984), αλλά και σε πληθυσμιακές μελέτες (Carroll 1975), φάνηκε αυξημένη κυτταροτοξικότητα σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού αλλά και σε άλλα καρκινώματα με «πρωταγωνιστές» στη δράση αυτή, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs) των ομάδων ω -3 και ω -6 (Begin et al. 1986). Η εν δυνάμει θεραπευτική δράση των παραπάνω ουσιών σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδραση τους με τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος εντός του κυττάρου που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την επιδιόρθωση βλαβών στο DNA και τον μεταβολισμό όσο και με την τομή των τριών προσεγγίσεων που αφορά στο οξειδωτικό στρες (Chen et al. 2021).

Μια άλλη κατηγορία τροφίμων με τεράστια πιθανά αντικαρκινικά οφέλη είναι οι αντιοξειδωτικές τροφές (Swick and Baumann 1951). Τα τρόφιμα αυτά συμβάλλουν στην μείωση του οξειδωτικού στρες το οποίο συνδέεται με καταπόνηση πολλών ομοιοστατικών μηχανισμών και συνεπώς με αυξημένες βλάβες στο DNA αλλά και δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε κλινικές μελέτες έχει γίνει προσπάθεια συσχετισμού της ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής άμυνας με την πρόληψη του καρκίνου. Παρόλα τα αποδεδειγμένα οφέλη των αντιοξειδωτικών σε περιπτώσεις χρόνιων φλεγμονών, στην καθυστέρηση της γήρανσης αλλά και στη γενική ευεξία του οργανισμού, η άμεση αντικαρκινική ή έστω προστατευτική δράση και ο μηχανισμός τους δεν έχουν επικυρωθεί (Athreya and Xavier 2017). Σε γενικές γραμμές, η αντικαρκινικές θεραπείες αξιοποιούν το οξειδωτικό στρες ως μέθοδο έμμεσης άμεσης θανάτωσης των κυττάρων, οπότε η χορήγηση και κατανάλωση αντιοξειδωτικών είναι μία αρκετά αντιφατική ιδέα (Conklin 2000). Η αύξηση του οξειδωτικού στρες συνήθως συνεπάγεται με επιβράδυνση των ρυθμών πολλαπλασιασμού, τόσο φυσιολογικών όσο και καρκινικών κυττάρων, γεγονός που μειώνει δραστικά την αποτελεσματικότητα των θεραπειών που στοχεύουν τη διαδικασία της μίτωσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η χρήση αντιοξειδωτικών, εμφανίζει ενθαρρυντικά αποτελέσματα αναιρώντας τη δράση των ROS και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (Chapman, Hunter, and Drisko 2003), (Athreya and Xavier 2017).

Η σύνθεση, αποθήκευση και ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων

Στη συνέχεια θα γίνει μια σύντομη αναφορά στις κατηγορίες και στη μεταβολική τύχη των λιπιδίων εντός του κυττάρου, καθώς και περεταίρω ανάλυση των μηχανισμών δράσης τους με έμφαση στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) (Moss, Smith, and Tavernier 1995). Τα λιπαρά οξέα είναι μόρια μεγάλης χρησιμότητας στα κύτταρα ως πηγές ενέργειας, ως δομικά συστατικά των μεμβρανών τους, αλλά και ως σηματοδοτικά μόρια. Στα κύτταρα συναντώνται διάφορες ομάδες λιπιδίων με τρεις τις κυριότερες τάξεις: τα ουδέτερα λίπη, τα φωσφολιπίδια και τα στεροειδή, ενώ με

μία πιο αναλυτική μορφή ταξινόμησης διακρίνονται τέσσερις τύποι λιπιδίων: τα λιπαρά οξέα (τα κορεσμένα και τα ακόρεστα) τα γλυκερίδια (εστέρες των λιπαρών οξέων με γλυκερόλη), μη γλυκεριδικά λιπίδια (όπως τα σφιγγολιπίδια, τα στεροειδή και οι κήροι) και τα σύνθετα λιπίδια (όπως τα γλυκολιπίδια και οι λιποπρωτεΐνες) (Εικόνα 5).



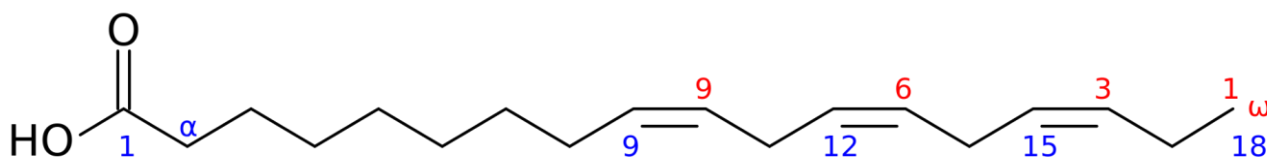
Εικόνα 5 Οι κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων (Πηγή: <https://microbenotes.com/wp-content/uploads/2018/08/Lipids-Properties-Structure-Classification-and-Functions.jpg>).

Το χαρακτηριστικό τους είναι ότι αποτελούνται από μεγάλες αλυσίδες άνθρακα που τους δίνουν υδρόφοβο ή αμφιφιλικό χαρακτήρα, ενώ σε σχέση με άλλα βιομόρια (όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) είναι μικρά μόρια. Από όλες αυτές τις ομάδες λιπιδίων, η παρούσα εργασία εστιάζει στις ιδιότητες των ακόρεστων λιπαρών οξέων, και δη στην υποομάδα αυτών που φέρει πολλαπλούς διπλούς δεσμούς και είναι γνωστή ως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs) (Trumbo et al. 2023)

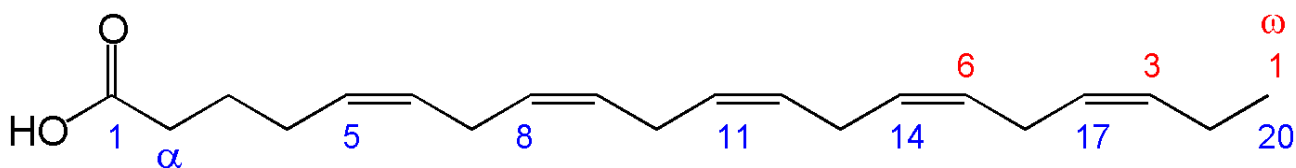
Τα PUFAs είναι μία ομάδα λιπιδίων που στην αλειφατική τους αλυσίδα έχουν τουλάχιστον 2 διπλούς δεσμούς. Οι διπλοί δεσμοί, ένεκα της τριγωνικής γεωμετρίας του sp^2 υβριδισμού των ατόμων C, επιτρέπουν την ύπαρξη μορίων είτε με cis είτε με trans ισομέρεια. Η συντριπτική πλειοψηφία όμως των λιπαρών οξέων που παρατηρούνται στη φύση, εξαιτίας των ενζύμων που τα βιοσυνθέτουν, έχουν cis γεωμετρία. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε επιμέρους υποομάδες ανάλογα με τη θέση των διπλών δεσμών, με τις κυριότερες και τις πιο σημαντικές βιολογικά να είναι αυτές των ω -3 και των ω -6 λιπαρών (Trumbo et al. 2023).

Τα κυριότερα ω -3 λιπαρά οξέα

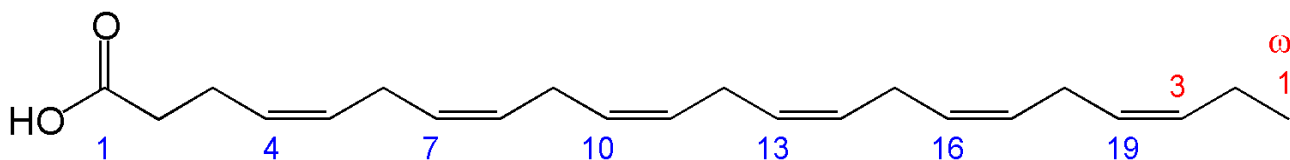
Τα ω-3 λιπαρά οξέα είναι μία ομάδα λιπιδίων που χαρακτηρίζονται από έναν διπλό δεσμό, που βρίσκεται 3 άτομα πριν την τελική μεθυλομάδα. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι της ομάδας αυτής είναι το α-λινολενικό οξύ (ALA), το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το εικοσιδυοεανοϊκό οξύ (DHA). Το ALA συντίθεται στους φυτικούς οργανισμούς ενώ το EPA και το DHA σε μικροφύκη. Τα ψάρια και γενικότερα τα θαλασσινά δεν είναι σε θέση να βιοσυνθέσουν αυτά τα λιπαρά οξέα, τα προσλαμβάνουν όμως μέσω της τροφικής αλυσίδας όπως ακριβώς τα παραλαμβάνει και ο άνθρωπος. Τα θηλαστικά δεν μπορούν να συνθέσουν de novo ω-3 λιπαρά οξέα, αλλά μπορούν να τροποποιήσουν λιπίδια που έχουν ήδη αφομοιώσει μέσω της τροφής. Το ALA (Εικόνα 6) δεν μπορεί να βιοσυντεθεί παρά μόνο να αφομοιωθεί ενώ ποσότητες EPA (Εικόνα 7) και DHA (Εικόνα 8) είναι σε θέση να παραχθούν με επιμήκυνση και προσθήκη διπλών δεσμών στο ALA (Shahidi and Ambigaipalan 2018).



Εικόνα 6 ALA



Εικόνα 7 EPA



Εικόνα 8 DHA

Τα κυριότερα ω-6 λιπαρά οξέα

Τα ω-6 λιπαρά οξέα είναι η τάξη λιπαρών οξέων που χαρακτηρίζονται από ύπαρξη διπλού δεσμού στον έκτο άνθρακα από την τελευταία μεθυλομάδα του μορίου. Τα λιπαρά οξέα αυτά συντίθενται στους χλωροπλάστες των φυτικών οργανισμών και είναι απαραίτητα για την υγεία και την ανάπτυξη του ανθρώπου. Τα κυριότερα ω-6 λιπαρά οξέα είναι το λινολενικό οξύ (LA), το γ-λινολενικό οξύ (GLA), το διόμο-λινολενικό ύ (DGLA) και το αραχιδονικό οξύ (AA) (Björklund 2016), (Simopoulos 2002).

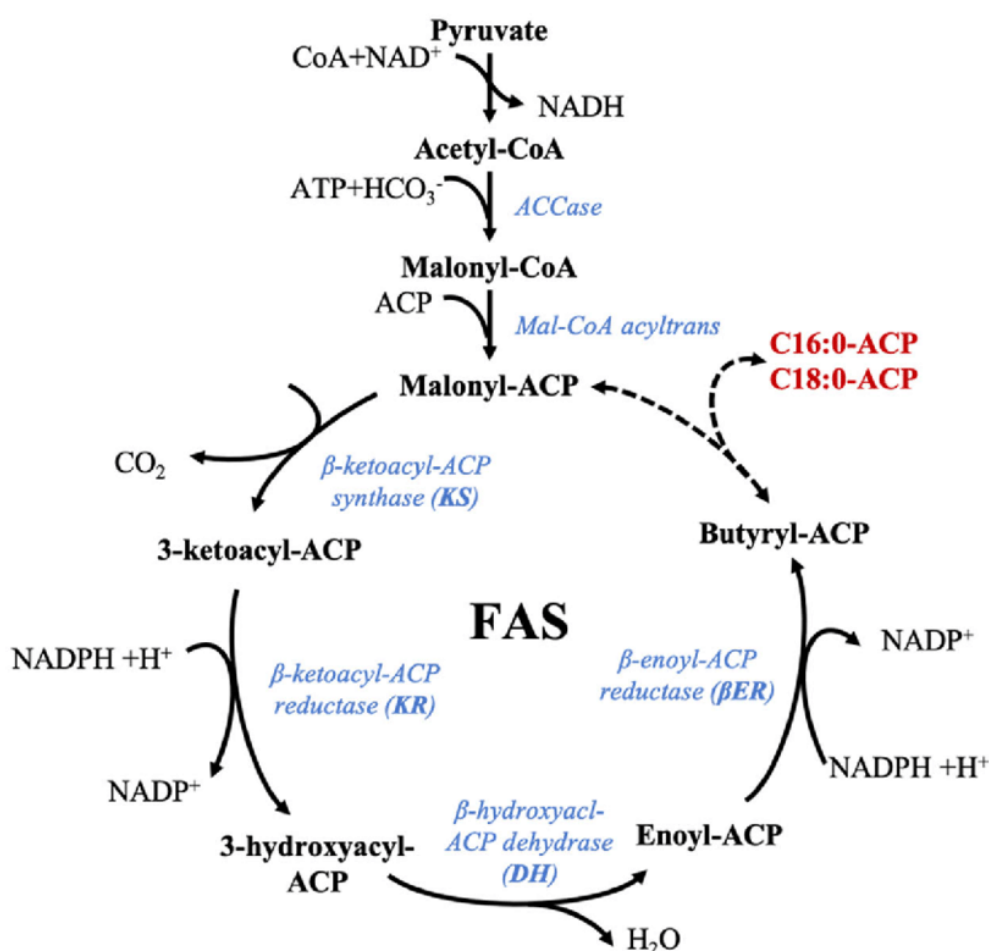
Πίνακας 1 Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων (Trumbo et al. 2023).

ω-6 λιπαρά οέα			ω-3 λιπαρά οέα		
Linoleic acid	LA	18:2n-6	α-Linolenic acid	ALA	18:3n-3
γ-Linolenic acid	GLA	18:3n-6	Stearidonic acid	SDA	18:4n-3

Dihomo- γ -linolenic acid	DGLA	20:3n-6	Eicosatetraenoic acid	ETA	20:4n-3
Arachidonic acid	AA	20:4n-6	Eicosapentaenoic acid	EPA	20:5n-3
Adrenic acid		22:4n-6	Docosapentaenoic acid	DPA (n-3)	22:5n-3
Tetracosatetraenoic acid		24:4n-6	Tetracosapentaenoic acid		24:5n-3
Tetracosapentaenoic acid		24:5n-6	Tetracosahexaenoic acid		24:6n-3
Docosapentaenoic acid	DPA (n-6)	22:5n-6	Docosahexaenoic acid	DHA	22:6n-3

Οι ελαιογόνοι οργανισμοί και η σύνθεση λιπαρών οξέων

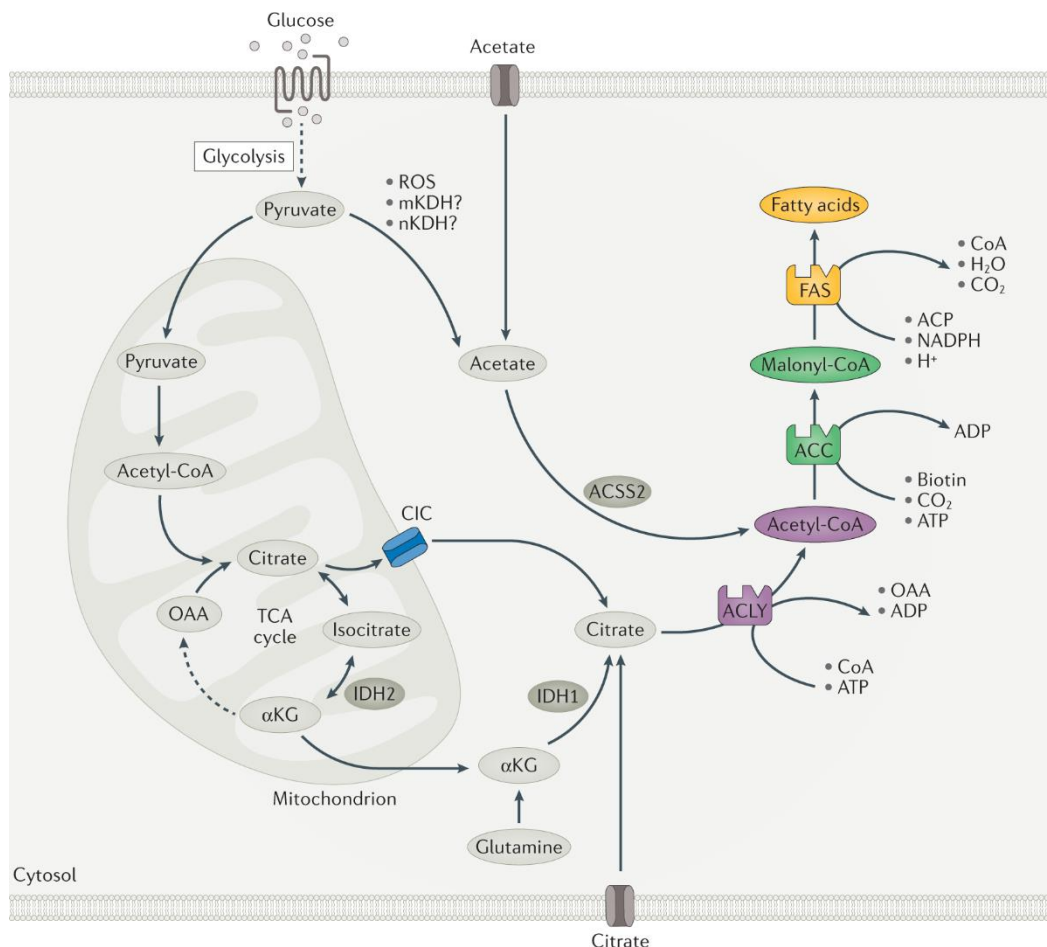
Τα λιπίδια είναι απαραίτητα βιομόρια για την λειτουργία όλων των γνωστών μορφών ζωής και όλοι οι οργανισμοί διαθέτουν ένζυμα τόσο για τον καταβολισμό τους, όσο και για τη βιοσύνθεσή τους ή τη μετατροπή τους σε άλλους μεταβολίτες. Η σύνθεση λιπιδίων είναι απαραίτητη βιολογική λειτουργία και γίνεται στο κυτταρόπλασμα, ούσα κατά βάση μία διαδικασία επιμήκυνσης μίας αλειφατικής αλυσίδας ξεκινώντας με το (προερχόμενο πυροσταφυλικό οξύ)ακέτυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) που καρβοξυλιώνεται προς μηλόνυλο-συνένζυμο Α (malonyl-CoA) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9 Η κλασική οδός σύνθεσης λιπαρών οξέων με αρχικό υπόστρωμα το πυροσταφυλικό οξύ του κυτταροπλάσματος (Remize et al. 2021).

Μερικοί οργανισμοί ωστόσο, τόσο προκαρυωτικοί όσο και ευκαρυωτικοί, είναι σε θέση να βιοσυνθέτουν και να συσσωρεύουν λιπίδια σε μεγάλες ποσότητες σε αντίθεση με την πλειοψηφία των άλλων μορφών ζωής και αυτοί οι οργανισμοί είναι γνωστοί ως ελαιογόνοι. Η ειδοποιός διαφορά

μεταξύ ελαιογόνων και μη οργανισμών είναι η ύπαρξη του ενζύμου που μετατρέπει το μιτοχονδριακής προέλευσης κιτρικό οξύ σε acetyl-CoA και ονομάζεται ATP εξαρτώμενη κιτρική λυάση (Εικόνα 10).



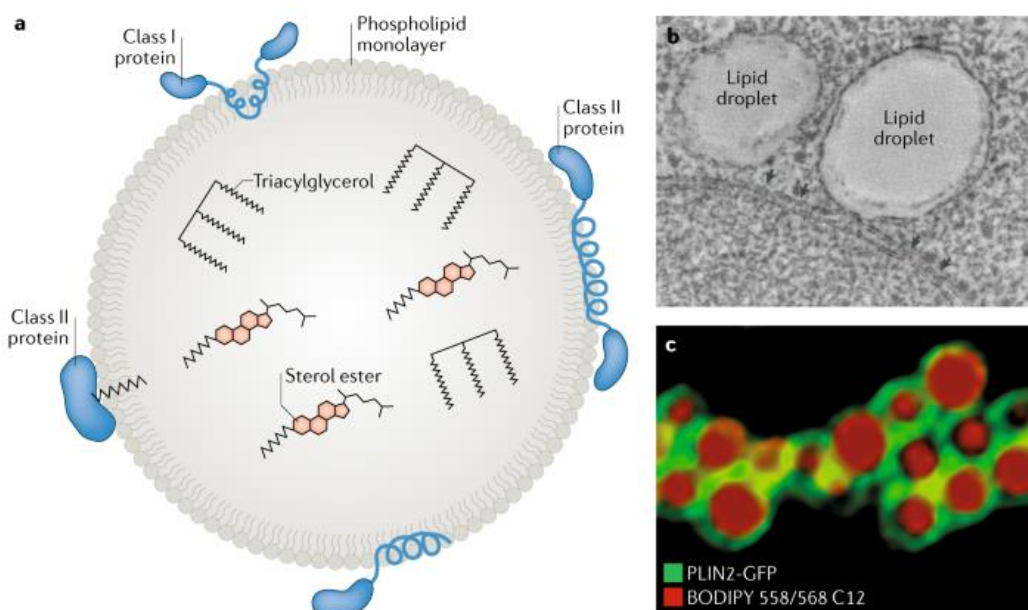
Εικόνα 10 Η σύνθεση λιπαρών οξέων στους ελαιογόνους οργανισμούς με το ένζυμο ACL (Batchuluun, Pinkosky, and Steinberg 2022).

Το κιτρικό οξύ αποτελεί μεταβολίτη του κύκλου του Krebs και μέσω ειδικού συστήματος μεταφοράς, είναι σε θέση να μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου το ένζυμο ATP-κιτρική λυάση (ACL) το τρέπει σε Acetyl-CoA. Επόμενο στάδιο στη σύνθεση τους είναι η σύνθεση του μηλονικού-συνενζύμου-A (malonyl-CoA) από δύο μόρια acetyl-CoA, που γίνεται από το ενζυμικό σύμπλοκο συνθάση των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Synthase, FAS) και η επιμήκυνση της νεοσχηματισθείσας αλειφατικής αλυσίδας καταλύεται από την ελονγκάση των λιπαρών οξέων (ELOVL).



Αποθήκευση των λιπαρών οξέων

20



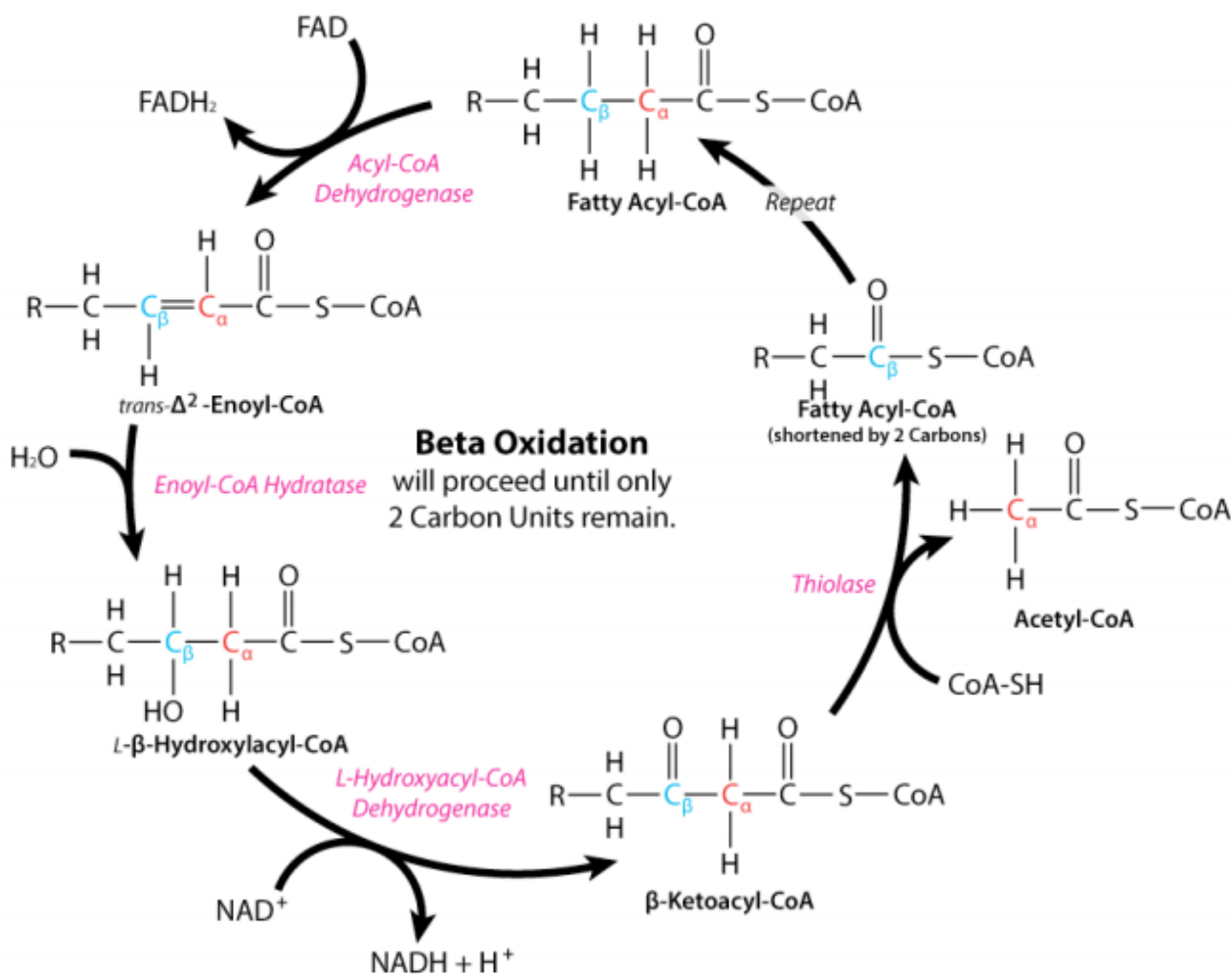
Εικόνα 12 Η δομή των λιπιδικών σταγόνων (lipid droplets) (Olzmann and Carvalho 2019).

Οι δομές αυτές δυναμικά οργανίδια που περιβάλλονται από μονοστιβάδα φωσφολιπιδίων και λιποπρωτεϊνών και κατά βάση αποτελούν απολήξεις του λείου ενδοπλασματικού δικτύου (Martin and Parton 2006), (Bozza and Viola 2010). Αλληλεπιδρούν με τα υπεροξειδιοσώματα, τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα, δρώντας ως αποθήκες ενέργειας ενώ έχουν και άλλους λειτουργικούς ρόλους (Guo et al. 2009), (Petan, Jarc, and Jusović 2018). Συγκεντρώνονται σε περιοχές που έχει διαταραχτεί η κυτταροπλασματική μεμβράνη εμποδίζοντας τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο αλλά αποτελούν και ρυθμιστή της διαδικασίας της φερρόπτωσης. Η παροχή λιπαρών οξέων στη μεταβολική οδό της β-οξείδωσης επάγει το σχηματισμό υπεροξειδίων και τον επαγόμενο από αυτά κυτταρικό θάνατο ενώ παράλληλα, προκειμένου το κύτταρο να αποφύγει τη φερρόπτωση, μπορεί να επάγει το σχηματισμό τους και όχι τη διάσπασή τους, ουσιαστικά επιβραδύνοντας το μεταβολικό ρυθμό του (Chen et al. 2021)(Yang and Stockwell 2016).

Καταβολισμός των λιπαρών οξέων – β-οξείδωση

Το κύτταρο είναι σε θέση να αξιοποιεί την αποθηκευμένη χημική ενέργεια στους δεσμούς των λιπαρών οξέων με το να τα διασπά και να παράγει acetyl-CoA και τα συνένζυμα NADH και FADH₂. Το acetyl-CoA εισέρχεται στον κύκλο του Krebs παράγοντας περαιτέρω ενέργεια υπό τη μορφή NADH και FADH₂ αλλά και GTP (που τρέπεται σε ATP) και εν τέλει τροφοδοτείται η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο καταβολισμός των λιπιδίων ξεκινά με διαχωρισμό ενός σύνθετου λιπιδίου στα συστατικά του με πιο κλασική την διάσπαση των τρι-ακυλο-γλυκεριδίων (TAGs) και των φωσφογλυκεριδίων στα συστατικά τους. Τα ένζυμα που καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις καλούνται λιπάσες και φωσφολιπάσες αντίστοιχα και παράγουν ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων λαμβάνει χώρα στο μιτοχόνδριο, αφού πρώτα το

λιπαρό οξύ συζευχτεί με συνένζυμο A και μεταφερθεί στο εσωτερικό του, με μία μεταβολική οδό που ονομάζεται β-οξείδωση (Εικόνα 13) (Houten and Wanders 2010).



Εικόνα 13 Η μεταβολική οδός της β-οξείδωσης (Πηγή:

https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_and_Easy_%28Ahern_and_Rajagopal%29/06%3A_Metabolism_I_-_Oxidative_Reductive_Processes/6.11%3A_Fatty_Acid_Oxidation).

Κατά τη β-οξείδωση, που είναι μία κυκλική οδός, αποσπώνται δύο άτομα άνθρακα υπό τη μορφή του ακετυλο-συνενζύμου A, έως ότου να παραμείνουν μόνο 4 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα τα οποία με τη σειρά τους θα διασπαστούν σε δύο μόρια ακετυλο-συνενζύμου A. Το ακετυλο-συνένζυμο A που παράγει η β-οξείδωση διοχετεύεται στον κύκλο του γλυοξυλικού οξέος προς περαιτέρω καταβολική αποικοδόμηση. Η β-οξείδωση απελευθερώνει την τεράστια ποσότητα ενέργειας που είχε αποθηκευτεί στους δεσμούς των ανθράκων. Οι διπλοί δεσμοί άνθρακα έχουν περισσότερη ενέργεια από τους απλούς δεσμούς, και αυτός είναι και ένας από τους λόγους που συναντάμε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ως αποθεματικά μόρια, αφού η συνολική ενέργεια ανά μόριο είναι υψηλότερη από αυτή των κορεσμένων (Houten and Wanders 2010).

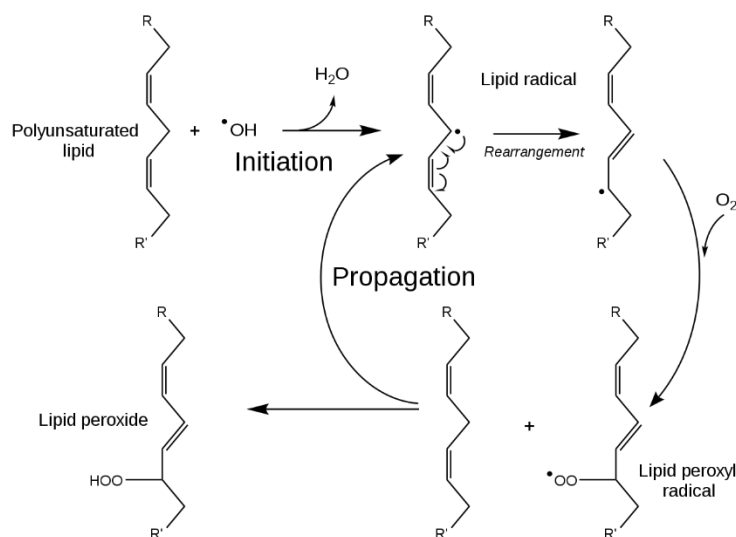
Κυτταροτοξικές δράσεις των PUFAς στα καρκινικά κύτταρα: Η απόπτωση και η φερρόπτωση

Από τη δεκαετία του 1980 τα EFAs και πιο συγκεκριμένα τα PUFAς, έχουν συνδεθεί με κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα, με παράλληλη μειωμένη ή απύουσα δράση στα φυσιολογικά (Jiang et al. 1998). Λιπίδια και των δύο ομάδων (ω -3 και ω -6) έχουν καταδειχθεί ως τα πιο δραστικά, με το GLA και το DGLA από τα ω -6 να εκδηλώνουν την πιο έντονη και κυτταροτοξικότητα, ενώ το ALA και το EPA έχουν την ίδια δράση στον κλάδο των ω -3. Πολλοί παράγοντες σε in vitro συνθήκες δείχνουν να εμπλέκονται στην εκδήλωση αυτών των δράσεων αλλά και στην έντασή τους, με πολύ χαρακτηριστικές τη διάρκεια επώασης, τον κυτταρικό τύπο, το εύρος των συγκεντρώσεων αλλά και άλλες συνθήκες της κυτταροκαλλιέργειας όπως η παρουσία ή απουσία ορού (Sagar and Das 1995). Οι μηχανισμοί δράσης ποικίλουν με κυριότερους τη θανάτωση μέσω υπεροξειδωσής (ουσιαστικά μέσω οξειδωτικού στρες) την πρόκληση απόπτωσης, τη ρύθμιση της βιωσιμότητας μέσω αλληλεπίδρασης με της κυτταροκίνες, τη ρύθμιση έκφρασης ογκογονιδίων αλλά και την αλληλεπίδρασή τους με άλλες θεραπείες όπως οι ακτινοθεραπείες και οι χημειοθεραπείες (Jiang et al. 1998).

Η πρόκληση υπεροξειδωσής και ο φερροπρωτικός θάνατος

Η χορήγηση των PUFAς έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που μπορούν να αντιδράσουν με τους διπλούς δεσμούς στις αλειφατικές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων, δημιουργώντας υπεροξειδία. Οι ομάδες υπεροξειδίων στις υδρόφοβες αλυσίδες δεν χάνουν την ενεργότητα μίας ελεύθερης ρίζας, αλλά είναι σε θέση να αντιδράσουν με τις γειτνιάζουσες αλυσίδες και να δημιουργήσουν νέες ομάδες υπεροξειδίου εκκινώντας μία αλυσιδωτή αντίδραση. (Arfin et al. 2021), (Yang and Stockwell 2016), (Chen et al. 2021).

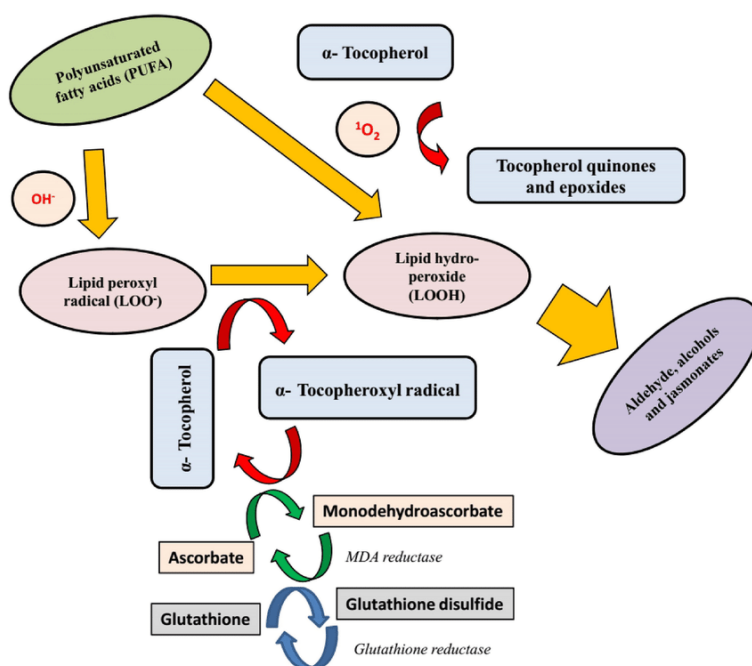
Η διαδικασία της υπεροξειδωσής (Εικόνα 14) εξελίσσεται σε 3 στάδια, με πρώτο το στάδιο έναρξης, όπου η ελεύθερη ρίζα ($\text{OH}\cdot$) θα αφαιρέσει ένα άτομο υδρογόνου και θα σχηματίσει μία γέφυρα μεταξύ των δύο διαδοχικών διπλών δεσμών και την ύπαρξη ασύζευκτου ηλεκτρονίου στον κεντρικό άνθρακα ($\text{L}\cdot$). Η ελεύθερη ρίζα (πάνω στο λιπαρό οξύ πλέον), μπορεί να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο, σχηματίζοντας μη ρίζα υπεροξειδίου ($\text{LOO}\cdot$) και μία ελεύθερη ρίζα σουπεροξειδίου του οξυγόνου, επιτρέποντας την αέναη ύπαρξη υποστρώματος για την εξέλιξη αντιδράσεων ελευθέρων ριζών (Pratt, Tallman, and Porter 2011).



Εικόνα 14 Τα στάδια της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (Πηγή:

[https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FLipid_peroxidation&psig=AOvVa_w05rZfuP0SSCbFFbU7c0wGB&ust=1680294984210000&source=images&cd=vfe&ved=0CBAQjRxqFwoTCJiczd_AhP4CFQAAAAAdAAAAABAE\).](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FLipid_peroxidation&psig=AOvVa_w05rZfuP0SSCbFFbU7c0wGB&ust=1680294984210000&source=images&cd=vfe&ved=0CBAQjRxqFwoTCJiczd_AhP4CFQAAAAAdAAAAABAE).)

Στο στάδιο επέκτασης -όπως ονομάζεται- η ρίζα του υπεροξειδίου ($\text{LOO}\cdot$) θα αντιδράσει με άτομα υδρογόνου από ένα διπλανό λιπαρό οξύ, προκαλώντας το σχηματισμό νέας ρίζας ($\text{L}\cdot$) που ανατροφοδοτεί τη διαδικασία. Η επέκταση του φαινομένου οδηγεί την μεμβρανική δομή σε απώλεια της λειτουργίας της, αποδιοργάνωσής της και εν τέλει στο θάνατο του κυττάρου (Dianzani 1993). Το φαινόμενο της υπεροξειδωσής πολλαπλασιάζεται δραματικά παρουσία δισθενών μετάλλων και κυρίως σιδήρου Fe(II) με μία αντίδραση δημιουργίας ελευθέρων ριζών που ονομάζεται αντίδραση Fenton (Pratt et al. 2011), (Chen et al. 2021).

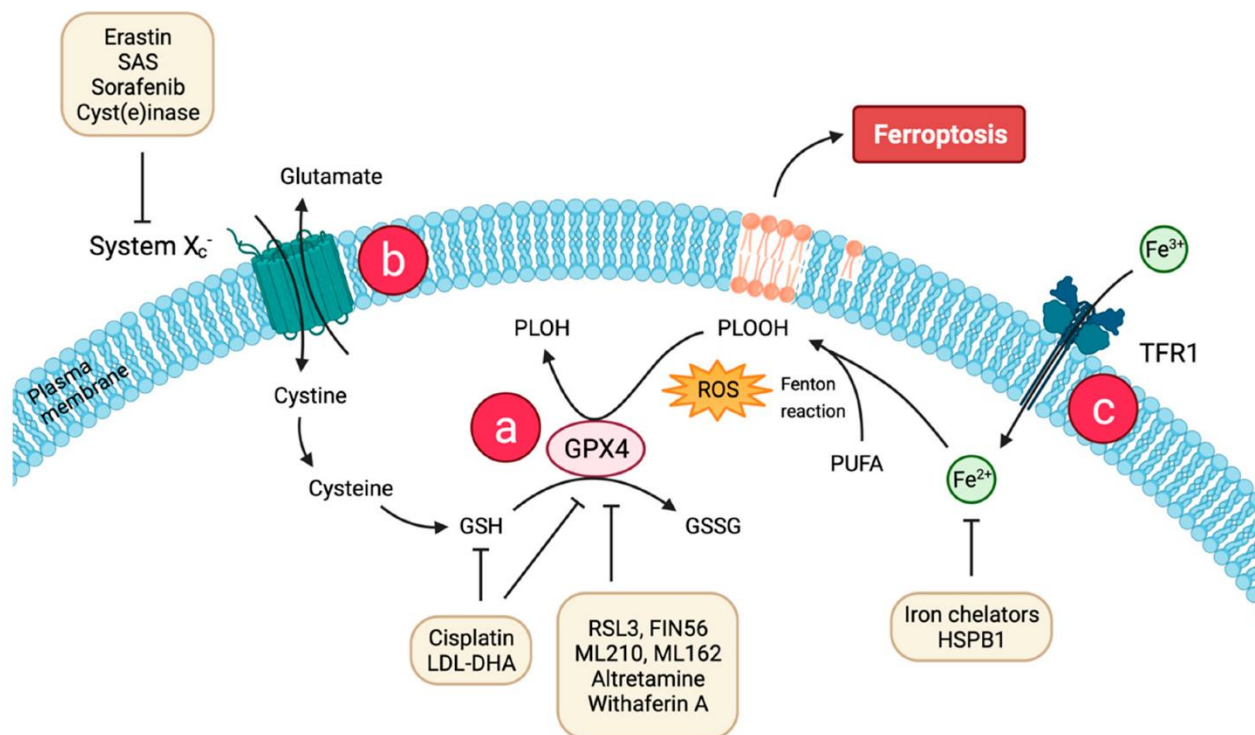


Εικόνα 15 Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E (Sadiq et al. 2019).

Αναστολέας του φαινομένου αυτού είναι πρωτίστως η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) (Εικόνα 15) αλλά και τα καροτενοειδή, λιπόφιλες ενώσεις με αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά που εμποδίζουν την εξέλιξη της αλυσιδωτής καταστροφής της μεμβράνης οδηγώντας το τελικό στάδιο την υπεροξειδωση, το στάδιο λήξης. Η υπερφόρτωση ή η αποτυχία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ωστόσο, ενεργοποιεί μία μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται φερρόπτωση και είναι εξαρτώμενη από ιόντα σιδήρου (Chen et al. 2021).

Η φερρόπτωση

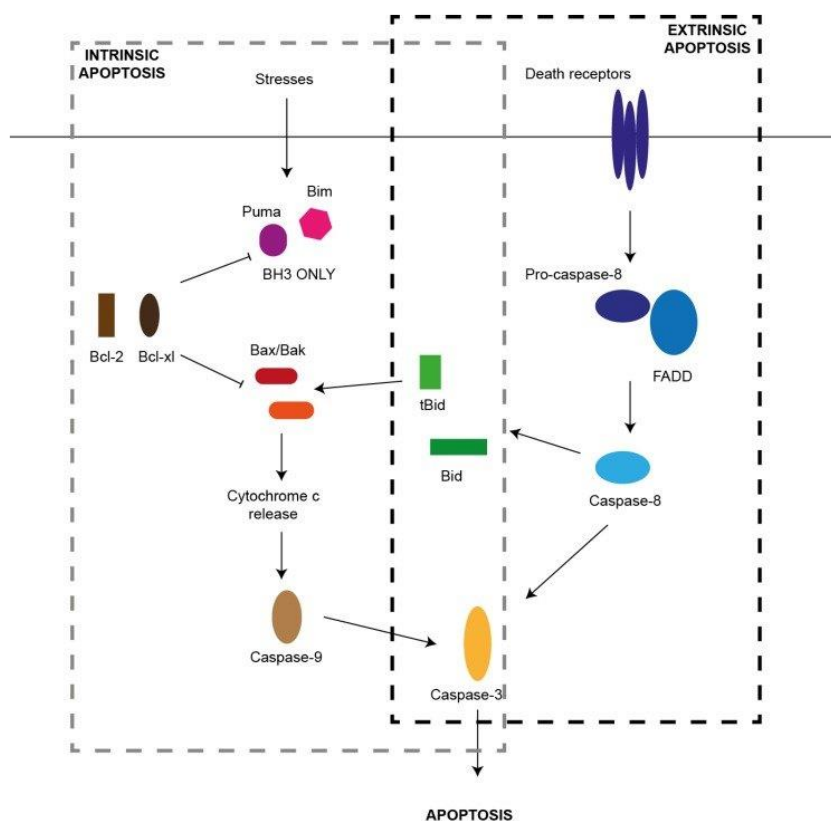
Η φερρόπτωση ενεργοποιείται όταν το κύτταρο δεν καταφέρει να ελέγξει την παραγωγή υπεροξειδωμένων φωσφολιπιδίων και εξαντληθεί το σύστημα οξειδωτικής προστασίας της γλουταθειόνης με κυρίαρχη την υπεροξειδάση 4 της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPX4), αλλά και την πρόσφατα αναγνωρισμένη οξειδοαναγωγή FSP1 (Bersuker et al. 2019) (Εικόνα 16). Κατά τη φερρόπτωση, το κύτταρο αρχικά διογκώνεται και τα lipid droplets συγκεντρώνονται στην περιφέρειά του. Στο στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντική η δράση του σιδήρου, που δρα ως επαγωγέας των σηματοδοτικών διεργασιών αλλά και ως συμπάραγοντας ενζύμων-τελεστών. Έπειτα ακολουθεί συρρίκνωση και ελεγχόμενος κατακερματισμός των ενδοκυτταρικών δομών, ενώ τέλος γίνεται παύση της μεταβολικής δραστηριότητας και επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος. (Yang and Stockwell 2016).



Εικόνα 16 Η διαδικασία της φερρόπτωσης (Kusnick et al. 2022).

Η απόπτωση

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία στην οποία εισέρχονται τα κύτταρα αν λάβουν τη αντίστοιχη «εντολή» από ενδογενή ή εξωγενή μηνύματα. Το κύτταρο βρίσκεται διαρκώς σε μία ισορροπία μηνυμάτων που αφορούν τόσο σε επιβίωση όσο και σε απόπτωση, όταν όμως τα δεύτερα υπερκεράσουν τα πρώτα, η μοίρα του κυττάρου είναι να αποπέσει. Ένα αποπτωτικό κύτταρο συρρικνώνεται και συμπυκνώνει τα περιεχόμενά του, αυξάνει τα επίπεδα ασβεστίου του στο κυτταρόπλασμα, αλλάζει η σύσταση της κυτταροπλασματικής του μεμβράνης και αποδιοργανώνει τον πυρήνα του, αφού πρώτα κατακερματίσει το γενετικό του υλικό και μειώσει δραστικά το μεταβολικό του ρυθμό. Τις ενέργειες αυτές ακολουθεί ο σχηματισμός του αποπτωτικού σώματος, μία δομής αποτελούμενης από πολλά κυστίδια τα οποία στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται από τα παρακείμενα κύτταρα (Böhm and Schild 2003).



Εικόνα 17 Ενδογενής και εξωγενής ενεργοποίηση της απόπτωσης (Wali, Masters, and Thomas 2013).

Οι λόγοι που μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε απόπτωση ποικίλουν και περιλαμβάνουν την καταστροφή ή ανεπανόρθωτη βλάβη του DNA λόγω ακτινοβολιών ή χημικών ουσιών, τη συσσώρευση μη-λειτουργικών πρωτεϊνών αλλά και την αύξηση του οξειδωτικού στρες εντός του κυττάρου. Παράλληλα, μηνυματοφόρα μόρια από το περιβάλλον του κυττάρου μπορούν να την επάγουν στο πλαίσιο της εύρυθμης λειτουργίας του οργανισμού. Η απόπτωση είναι μια φυσιολογική

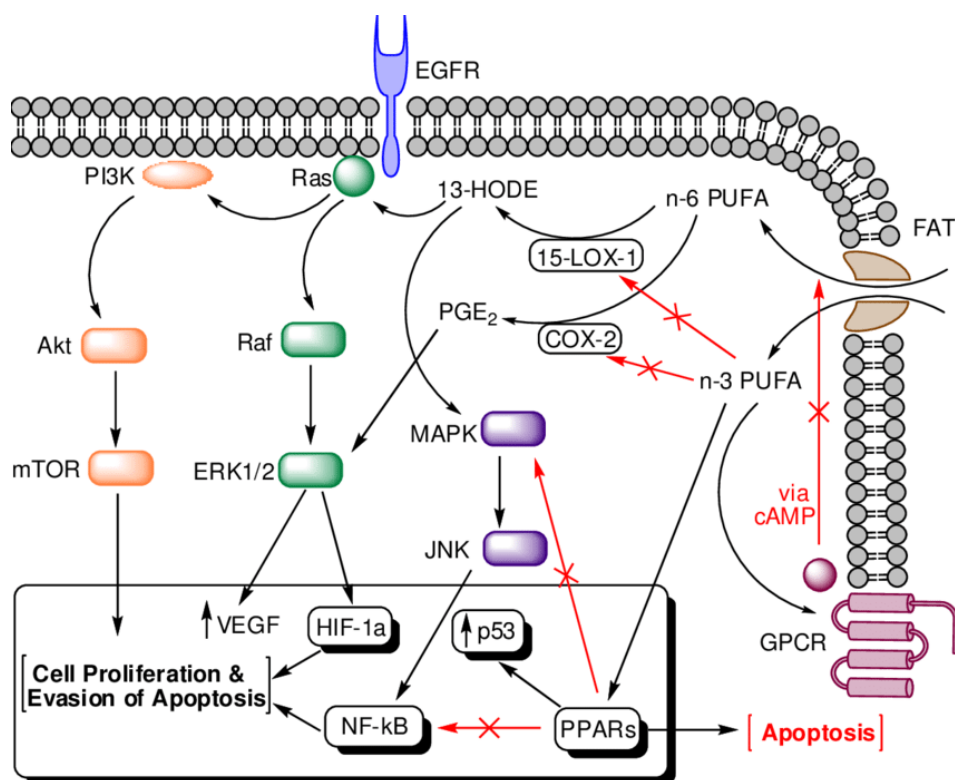
διεργασία κατά την οποία θανατώνονται κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες, κύτταρα μολυσμένα με ιούς και κύτταρα με μεταλλαγμένο γονιδίωμα μεταξύ των οποίων και τα καρκινικά αλλά και κύτταρα που απομακρύνονται κατά την ανάπτυξη για να σχηματιστούν νέες λειτουργικές δομές όπως τα δάχτυλα και το νευρικό σύστημα. (Böhm and Schild 2003). Τα καρκινικά κύτταρα συχνά αναπτύσσουν μηχανισμούς αποφυγής της απόπτωσης οι οποίοι φυσιολογικά θα ενεργοποιούνταν τόσο από τα ενδογενή σήματα ανεξέλεγκτης μιτωτικής δραστηριότητας, όσο και από εξωγενή σήματα από παρακείμενους ιστούς, φάρμακα ή το από το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα (Goldar et al. 2015) (Εικόνα 17).

Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί ενδογενώς όταν τα προαποπτωτικά σήματα επικρατήσουν των αντιαποπτωτικών και τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα να εκκινήσει ένας καταρράκτης μεταγωγής σήματος που καταλήγει στα μιτοχόνδρια και επάγει την απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c. Το κυτταρόχρωμα c θα ενεργοποιήσει με τη σειρά του μία ομάδα ενζύμων-τελεστών της απόπτωσης που ονομάζονται κασπάσες και ως πεπτιδάσες θα υδρολύσουν όλες τις ενδοκυττάρειες δομές. Η εξωγενής ενεργοποίηση της απόπτωσης εμπλέκει μια σειρά υποδοχέων που ονομάζονται υποδοχείς θανάτου (πιο κλασικοί ο TNF και ο Fas) και οι οποίοι όταν ενεργοποιηθούν, εκκινούν μεταγωγή σήματος που επίσης καταλήγει στα μιτοχόνδρια και στην απελευθέρωση του κυτταροχρώματος c. Εξαίρεση αποτελεί ένα τρίτο εξωγενές μονοπάτι, αυτό που εκκινείται από τον παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης (Apoptosis Inducing Factor, AIF) ο καταρράκτης μεταγωγής σήματος του οποίου δεν έχει ως μόρια τελεστές τις κασπάσες, αλλά ξεκινάει από τα μιτοχόνδρια και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου επάγει την άμεση καταστροφή του DNA και τον συνεπακόλουθο θάνατο του κυττάρου (Böhm and Schild 2003).

Η απόπτωση είναι μία διαδικασία στενά συνδεδεμένη με τα μιτοχόνδρια και βλάβες στα οργανίδια αυτά εντός ενός κυττάρου την κινητοποιούν άμεσα. Τόσο τα ενδογενή μονοπάτια ενεργοποίησής της, όσο και το εξωγενές μονοπάτι περνούν υποχρεωτικά από το μιτοχόνδριο και επηρεάζονται από την κατάσταση του (Jiang et al. 1998).

Η επαγωγή της απόπτωσης από τα PUFA's

Η υψηλή συγκέντρωση PUFA's σε μικροπεριβάλλοντα όγκων έχει δειχθεί μέσα από πολλές μελέτες να επάγουν την αποπτωτική δραστηριότητα (Εικόνα 18), αλλά και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, επάγοντας έτσι τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια θανάτου.



Εικόνα 18 Επαγωγή της απόπτωσης μέσω χορήγησης PUFAs (Wang et al. 2012).

Το κύριο μόριο που έχει συσχετιστεί με τέτοιες δράσεις είναι το γ-λινολενικό οξύ το οποίο προκαλεί επαγωγή θραύση του DNA τόσο σε ηπατικές σειρές καρκίνου όσο και σε κύτταρα HeLa (Minotti and Aust 1992), (Jiang et al. 1998).

Αλληλεπίδραση με κυτταροκίνες, χημειοθεραπευτικά φάρμακα και έκφραση ογκογονιδίων

Η χορήγηση των PUFAs, πέρα από την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου και την πρόκληση βλαβών μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, έχει συσχετιστεί με αύξηση στην ευπάθεια των καρκινικών κυττάρων έναντι ακτινοβολιών, αλλά και την αύξηση στις ευαισθησίας σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Τα μόρια με τις περισσότερες τέτοιες δράσεις φαίνεται πως είναι το GLA και το DHA. Το DHA έδειξε να είναι σε θέση να μειώσει το ρυθμό πολλαπλασιασμού επιβραδύνοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και επάγοντας την έκφραση του p53 ενώ το GLA και το EPA σε in vitro συνθήκες φάνηκαν να αλληλεπιδρούν με την οικογένεια υποδοχέων επαγωγής του πολλαπλασιασμού από τα υπεροξειδιοσώματα (Peroxisome proliferator activated receptors, PPARs) μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε κύτταρα όγκων (Jiang et al. 1998).

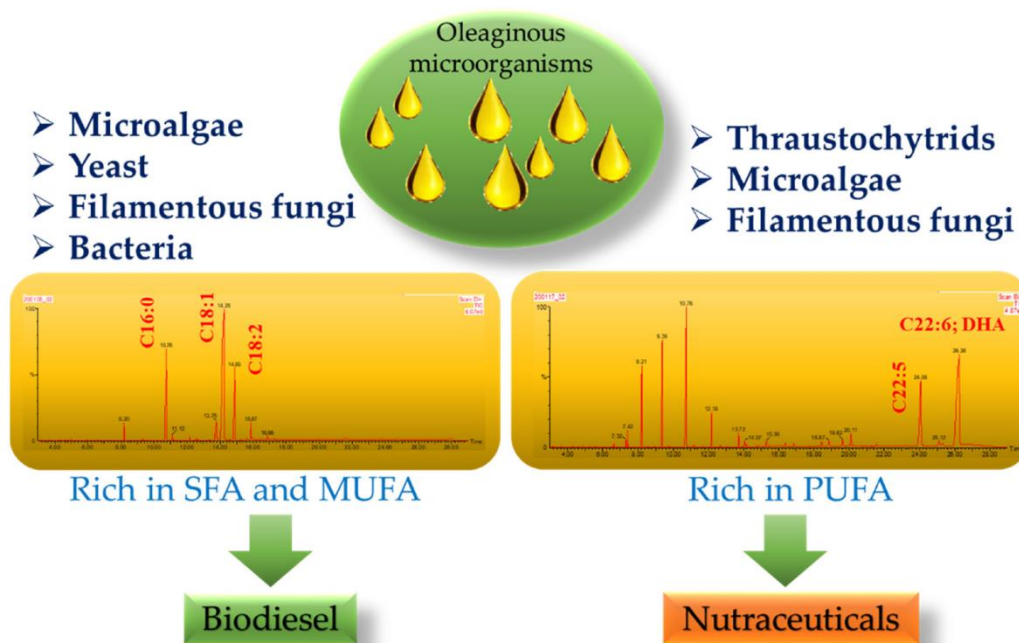
Χρήση των PUFAs στην αντιμετώπιση του καρκίνου

Τόσο οι πληθυσμιακές όσο και οι in vitro μελέτες δείχνουν ότι τα PUFAs μπορούν να λειτουργήσουν ως εν δυνάμει αντικαρκινικά φάρμακα και να αξιοποιηθούν κλινικά σε διάφορα θεραπευτικά

σχήματα. (Bellou et al. 2016), (Sayegh et al. 2016), (Alakhras et al. 2015). Περιοριστικός παράγοντας της μέχρι σήμερα χρήσης του ήταν το κόστος παραγωγής τους, καθώς ο μοναδικός τρόπος συλλογής τους ήταν είτε από το λίπος των ψαριών και των θαλασσινών είτε από τα έλαια φυτών και καρπών. Ωστόσο, η βιοτεχνολογία σήμερα έρχεται να καλύψει αυτό το κενό, με την ανακάλυψη και ευρεία διάδοση των μικροβιακών ελαίων.

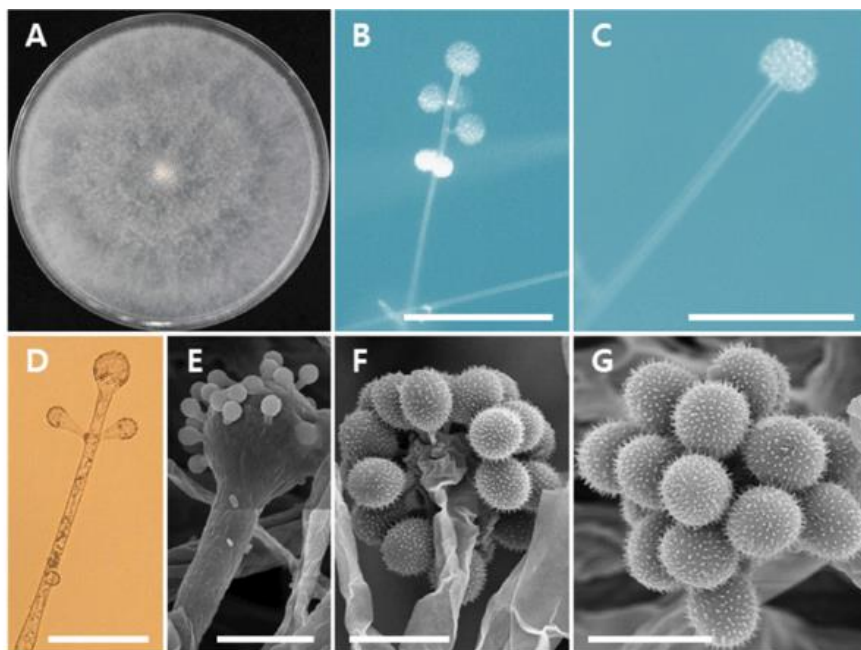
Το μικροβιακό λάιη και ο οργανισμός *Cunninghamella elegans*

Το μικροβιακό έλαιο ή μικροβιακό λίπος (single cell oil) είναι όρος που αναφέρεται σε οποιοδήποτε λιπιδικό σκεύασμα απομονώνεται από μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί είναι μία ομάδα μορφών ζωής με τεράστια ετερογένεια και ποικιλομορφία, κάτι που αποτυπώνεται οικολογικά, μορφολογικά, γενετικά και βιοχημικά. Το μικροβιακό έλαιο έλκει το ενδιαφέρον πολλών τομέων ανάμεσα στις οποίες και η φαρμακοβιομηχανία, καθώς η σύστασή του μπορεί να είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ανάλογα με το είδος (ή ακόμα και το στέλεχος) του μικροοργανισμού που καλλιεργείται και φυσικά ανάλογα με τις συνθήκες αύξησής του. Λιπαρά οξέα που μέχρι πρότινος έφταναν στον άνθρωπο μέσω συγκεκριμένων πηγών τροφής και το κόστος απομόνωσης τους ήταν τεράστιο, με τις σύγχρονες εφαρμογές της βιοτεχνολογίας μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες και να αξιοποιηθούν είτε ως τρόφιμο είτε ως καύσιμο (Αγγελής 2017).



Εικόνα 19 Εφαρμογές του μικροβιακού ελαίου (single cell oil) (Patel et al. 2020).

Ο οργανισμός *Cunninghamella elegans* είναι ένας μύκητας που βρίσκεται στο χώμα και ανήκει στην τάξη των Ζυγομυκωτών, μυκήτων που είναι προσαρμοσμένοι σε χερσαία περιβάλλοντα και πολλαπλασιάζονται αγενώς με το σχηματισμό σποριοαγγειοσπορίων (Εικόνα 20). Ο μύκητας αυτός σχηματίζει γκρίζες υφές και μπορεί να καλλιεργηθεί σε βιοαντιδραστήρες βιομηχανικής κλίμακας σε μία πληθώρα υποστρωμάτων (Nguyen, Choi, and Lee 2017).

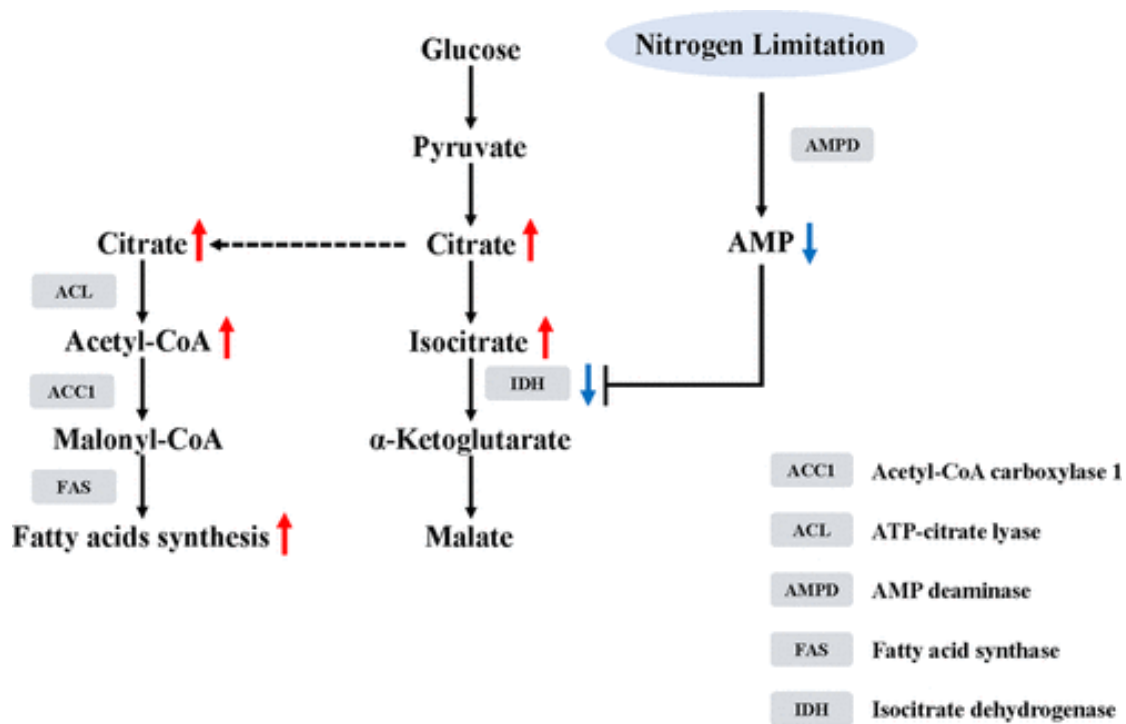


Εικόνα 20 Η μορφολογία των αποικιών, των υφών και των σπορίων του μύκητα *C. elegans* (Nguyen et al. 2017).

Οι μύκητες συνήθως δεν απαιτούν πολύπλοκα υποστρώματα για την ανάπτυξή τους. Αρκεί μία πηγή άνθρακα ικανή να διασπάται από τα υδρολυτικά τους ένζυμα και μία πηγή βιοδιαθέσιμου αζώτου. Η καλλιέργεια του *C. elegans* έχει πολλές βιομηχανικές εφαρμογές από την διάσπαση φαινολικών ενώσεων και εντομοκτόνων μέχρι την αξιοποίηση της για τη συσσώρευση μικροβιακού ελαίου καθώς ανήκει στους ελαιογόνους μύκητες (Alakhras et al. 2015), (Αγγελής 2017).

Η συσσώρευση των μικροβιακών ελαίων δεν είναι μία διαδικασία που ο οργανισμός θα εκδήλωνε στη φύση, τουλάχιστον όχι στις συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται στο εσωτερικό των βιοαντιδραστήρων. Οι μικροοργανισμοί συσσωρεύουν αποθεματικά λιπίδια όταν στερούνται πηγής αζώτου. Επομένως, η καλλιέργεια του *C. elegans* σε ένα περιβάλλον φτωχό σε άζωτο αναμένεται να τον οδηγήσει αφενός να απορροφήσει άνθρακα από το θρεπτικό του μέσο και αφετέρου να τον συσσωρεύσει υπό τη μορφή αποθεματικών λιπιδίων TAGs, με χαρακτηριστικό προφίλ πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, το οποίο είναι χαρακτηριστικό του εκάστοτε στελέχους.

Η εξαρτώμενη από το άζωτο συσσώρευση αποθεματικών λιπιδίων στον ελαιογόνους μύκητες είναι μία αρκετά μελετημένη βιοχημική διεργασία.



Εικόνα 21 Η μείωση του AMP λόγω στέρησης αζώτου και η επίδραση στον κύκλο του Krebs (Chang et al. 2019).

Το μηνυματοφόρο μόριο που θα καθορίσει το εάν το κύτταρο θα καταναλώσει τον άνθρακα στις καταβολικές οδούς ή εάν θα τον αποθηκεύσει για να δεσμεύσει ενέργεια στους δεσμούς του είναι το AMP (Εικόνα 21). Η μονοφωσφορική αδενοσίνη είναι ένα μόριο πρόδρομο του ATP και σε περιόδους στέρησης αζώτου, απαμινώνεται για να προσφέρει αμμωνιακά ιόντα στο κύτταρο. Η απαμίνωση του AMP αναπόφευκτα αυξάνει το λόγο ATP/AMP και η περίσσεια ATP παρεμποδίζει την εξέλιξη του κύκλου του Krebs μέσω αναστολής του ενζύμου αφυδρογονάση του ισοκιτρικού οξέος. Η συσσώρευση ισοκιτρικού οδηγεί και στη συνεπακόλουθη συσσώρευση του κιτρικού οξέος το οποίο παραμένει μέσα στο μιτοχόνδριο μέχρις ότου αυτό να κορεστεί και να το αποβάλει στο κυτταρόπλασμα όπου θα διασπαστεί σε οξαλοξικό οξύ και ακετυλο-συνένζυμο Α με το δεύτερο να τροφοδοτεί τη βιοσυνθετική οδό παραγωγής λιπαρών οξέων που στη συνέχεια αποθηκεύονται στα lipid droplets ως TAGs και παραμένουν εκεί όσο και οι δυσμενείς για την αύξηση συνθήκες. Τα αποθέματα σε άνθρακα θα καταναλωθούν μόνο σε περίπτωση έλλειψης του εν λόγω θρεπτικού στοιχείου (Αγγελής 2017).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των αντικαρκινικών δράσεων των αλάτων λιθίου των λιπιδίων του μικροοργανισμού *Cunninghamella elegans* που καλλιιεργήθηκε σε υπόστρωμα γλυκερόλης.

Η χορήγηση των αλάτων λιθίου των λιπαρών οξέων στις κυτταρικές σειρές σε αυτή την εργασία δεν έχει σκοπό να μιμηθεί τις ακριβείς συνθήκες βιοδιαθεσιμότητας στο ανθρώπινο σώμα, παρά γίνεται μία προσπάθεια να εκτιμηθεί η *in vitro* δράση τους σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις και χρόνους παραμονής εντός της καλλιέργειας. Η προσέγγιση αυτή αναμένεται να υπερτονίσει τα σημεία δράσης των αλάτων και να αποτελέσει στόχο μελλοντικών ερευνών. Επομένως, σε ένα πρωταρχικό στάδιο μελέτης, η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στις βασικές κυτταρικές λειτουργίες του πολλαπλασιασμού, της ικανότητας των κυττάρων για μετάσταση και στην χημειοτακτική επαγωγή της, στην επίδραση των αλάτων στην αποπτωτική δραστηριότητα αλλά και στην διερεύνηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες, παραμέτρου στενά συνδεδεμένης τόσο με τον καταβολισμό των λιπιδίων όσο και με τις συνθήκες που επικρατούν εντός των όγκων.

Παράλληλα, θεωρείται αρκετά σημαντική η καθιέρωση μίας μεθόδου οπτικοποίησης της συσσώρευσης λιπιδίων μέσα στο κύτταρο η οποία επιχειρείται με χρήση των λιπόφιλων χρωστικών Nile Red και BODIPY™. Η βελτιστοποίηση μίας μεθόδου ζωντανής απεικόνισης των σταγονιδίων λίπους (lipid droplets) και ο συσχετισμός τους με εστίες αυξημένου οξειδωτικού στρες, αποτελεί ιδανικό στόχο αυτής της εργασίας καθώς ο κυριότερος μηχανισμός που θεωρείται υπεύθυνος για την αλληλεπίδραση των PUFAs με την κυτταρική σηματοδότηση είναι η απόκριση του κυττάρου στο προκαλούμενο στρες.

Υλικά και Μέθοδοι

Παραγωγή αλάτων λιθίου πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (FALS)

Η καλλιέργεια του μύκητα *Cunninghamella elegans* έγινε σε βιοαντιδραστήρες του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, με υπεύθυνο καθηγητή τον κύριο Σεραφείμ Παπανικολάου. Ο μύκητας καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με βάση τη βιομηχανική γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα για 120 ώρες και στη συνέχεια ακολούθησε συλλογή της βιομάζας.

Η απομόνωση των λιπιδίων του οργανισμού πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά έγινε εκχύλιση των λιπιδίων από την ξηρή βιομάζα της καλλιέργειας με διάλυμα μεθανόλης-χλωροφορμίου όπως περιγράφεται στη μέθοδο κατά Folch (FOLCH, LEES, and SLOANE STANLEY 1957). Στο πρώτο στάδιο το ολικό λίπος σαπωνοποιήθηκε με χρήση 1 N KOH ώστε να μετατραπούν τα τριακυλογλυκερίδια (TAGs) σε ελεύθερα άλατα καλίου των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Potassium Salts, FAPS). Με επίδραση υδροχλωρικού οξέος (4 N HCl) τα άλατα τρέπονται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (Free Fatty Acids, FFAs) και στη συνέχεια εκχυλίζονται τα λιπαρά οξέα με τη χρήση εξανίου και συμπυκνώνονται. Σε αυτή τη φάση γίνεται ο προσδιορισμός της σύστασης του εκχυλίσματος με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass spectrometry, GC-MS) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Η σύσταση σε λιπαρά οξέα του λιπιδικού εκχυλίσματος του *C. elegans*

h	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 22:1
48		19,8		10,48	47,71	12,2	9,72	
72	0,73	23,54	0,89	8,06	47,36	11,84	7,27	0,32
96	0,97	27,18	1,24	6,62	47,13	10,95	5,59	0,32
120	1,02	25,48	1,02	7,82	46,91	11,37	6,35	
192	0,74	21,41		7,44	48,76	11,92	9,73	
240		23,3		7,61	48,83	11,4	8,82	
360	0,77	19,43	1,47	5,19	53,49	14,8	4,82	

Στο δεύτερο στάδιο, τα FFAs μετατρέπονται σε άλατα λιθίου (Fatty Acid Lithium Salts, FALS) που είναι υδατοδιαλυτά με τη χρήση 1 N LiOH, ενώ ακολουθείται συμπύκνωση υπό κενό, εξουδετέρωση των αλκαλικών συνθηκών με διάλυμα φωσφορικού οξέος H_3PO_4 μέχρι τελικής τιμής pH = 7. Η διαδικασία που περιεγράφηκε έγινε στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων και Ανάλυσης

του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με υπεύθυνη καθηγήτρια την κυρία Χρυσανγή Γαρδέλη.

Κυτταρικές σειρές

Το εκχύλισμα των λιπιδίων, ζυγίστηκε για να υπολογιστεί η πυκνότητά του και στη συνέχεια χορηγήθηκε σε κυτταρικές σειρές ανθρωπίνων κυττάρων, τόσο καρκινικών (K1, TPC-1, PC-3, DU-145) όσο και φυσιολογικής κυτταρικής σειράς θυρεοειδούς (Nthy-Ori 3-1). Τα πειράματα στις κυτταρικές σειρές, που αποτελούν το σκελετό της κείμενης εργασίας, έγιναν στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών με υπεύθυνο καθηγητή τον κύριο Παναγιώτη Κατσώρη.

Η κυτταρική σειρά Nthy-Ori 3-1 είναι μία ανθρώπινη κυτταρική σειρά θυρεοειδικού επιθηλίου που έχει προκύψει με αθανатоποίηση θυρεοκυττάρων έπειτα από διαμόλυνση με τον ιό SV40. Χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο του θυρεοειδούς και στην παρούσα εργασία αποτελεί μοντέλο φυσιολογικού επιθηλιακού κυττάρου (Lemoine et al. 1989). Οι κυτταρικές σειρές K1 και TPC-1 προέρχονται από θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς που είναι μία μορφή διαφοροποιημένου καρκινώματος (Papillary Thyroid Carcinoma, PTC) και έχουν επιθηλιακό φαινότυπο κατέχοντας όμως τα τυπικά χαρακτηριστικά ενός καρκινικού κυττάρου (Challeton et al. 1997), (Liebert et al. 2007). Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές PC-3 και DU-145 προέρχονται από καρκίνο του προστάτη αδένος και αποτελούν δύο από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα στην *in vitro* έρευνα κατά του καρκίνου (Wang et al. 2019)(Stone et al. 1978). Όλες οι προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές απαιτούν κατάλληλη επιφάνεια για την προσκόλληση και την μετέπειτα ανάπτυξή τους και καλλιεργούνται σε επωαστικό θάλαμο με 5% CO₂ και απόλυτη υγρασία ως συνθήκες αύξησης.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα που διαβιούν και πολλαπλασιάζονται σε *in vitro* συνθήκες καταναλώνουν τα θρεπτικά συστατικά του μέσου ενώ παράλληλα ο μεταβολισμός τους παράγει ενώσεις οι οποίες συσσωρεύονται στο τρυβλίο και έχουν τοξική δράση. Επιπλέον, όταν η κάλυψη του δαπέδου περάσει το 80-90%, λόγω έλλειψης χώρου, γίνεται βαθμιαία αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (contact inhibition) και επηρεάζεται η ικανότητα πρόσδεσης, η μεταβολική δραστηριότητα αλλά η βιωσιμότητα των κυττάρων. Για να αποφευχθεί κάτι τέτοιο, απαιτείται ανακαλλιέργεια, η αποκόλληση δηλαδή των κυττάρων από το αρχικό τρυβλίο και η μεταφορά μίας ποσότητας αυτών σε ένα νέο. Η αποκόλληση μπορεί να γίνει με χρήση χημικών ουσιών, με εφαρμογή μηχανικής δύναμης ή με ενζυμική δράση. Η χρήση διαλύματος τρυψίνης είναι η πιο συνήθης και εύχρηστη μέθοδος εξ αυτών, με την τρυψίνη να διασπά τους διακυτταρικούς δεσμούς αλλά και τις ενώσεις με το δάπεδο του τρυβλίου οδηγώντας στην αποκόλληση των κυττάρων.

Υλικά και διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH= 7,2-7,4

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Σύσταση</i>
NaHPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM
NaCl	4 mM

- Διάλυμα τρυψίνης (trypsin) 0,25% σε HBSS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (L0931-100 Biowest, Nuaille, France)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό (RPMI 1640 ή DMEM)
 - 90% v/v RMPI ή DMEM αντίστοιχα με σταθερή γλουταμίνη (L0498-500 Biowest, Nuaille, France) / (L0103-500 Biowest, Nuaille, France)
 - 10% v/v ορός νεογέννητου βοός (FBS Fetal Bovine Serum) (S1810-500 Biowest, Nuaille, France)
 - Διάλυμα αντιβιοτικών (L0022-100 Biowest, Nuaille, France)
 - Πενικιλίνη 100 units/ml
 - Στρεπτομυκίνη 100 µg/ml
- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon® (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)
- Τρυβλία κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες (TC treated) (10568862 Fisher Scientific, Landsmeer, Netherlands)

Πειραματική πορεία

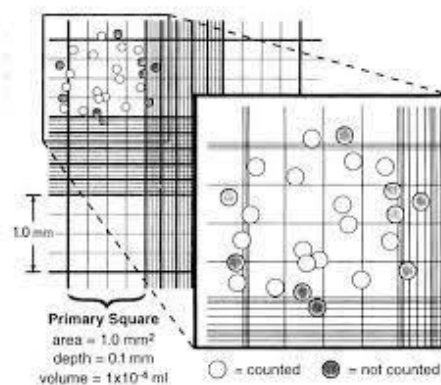
- Μεταφορά του τρυβλίου από τον επωαστικό θάλαμο (incubator) σε ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο προς παρατήρησή του. Τα επιπλέοντα κύτταρα θεωρούνται νεκρά ενώ τα προσκολλημένα ζωντανά. Κάλυψη επιφανείας μεγαλύτερη ή ίση με 80-90% επιβάλλει ανακαλλιέργεια.
- Τοποθέτηση του τρυβλίου σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar hood) εφόσον απαιτούνται στείρες συνθήκες.
- Αναρρόφηση υπερκειμένου με γυάλινη πιπέτα Pasteur υπό κενό.
- Έκπλυση δύο με τρεις φορές με διάλυμα PBS προς απομάκρυνση νεκρών κυττάρων, μεταβολιτών και αναστολέων της τρυψίνης.

- Προσθήκη 1 ml διαλύματος τρυψίνης στο τρυβλίο (τρυβλίο διαμέτρου 10,0 cm) και ανακίνηση για την ρήξη των συνδέσεων των κυττάρων.
- Μεταφορά του τρυβλίου στον επωαστικό θάλαμο και επώαση στους 37°C για 2-3 min. Παρατεταμένη παρουσία του ενζύμου οδηγεί σε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων.
- Εκ νέου παρατήρηση του τρυβλίου στο μικροσκόπιο για έλεγχο της προόδου της αποκόλλησης. Αναδεύσεις κατά αυτήν την ώρα ενισχύουν την αποκόλληση. Τα αποκολλημένα κύτταρα ή συσσωματώματα επιπλέουν.
- Μεταφορά τρυβλίου στο θάλαμο νηματικής ροής και αραίωση της τρυψίνης με διπλάσιο όγκο (2 ml) πλήρους θρεπτικού υλικού. Το πλήρες θρεπτικό μέσο περιέχει 10% v/v ορό νεογέννητου βοός, στον οποίο φυσιολογικά περιέχονται αναστολείς της τρυψίνης. Το τρυβλίο βρίσκεται υπό κλίση για να συγκεντρωθούν όλα τα κύτταρα σε ένα σημείο.
- Επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις του θρεπτικού μέσου με τα αποκολλημένα κύτταρα και με τη βοήθεια αυτόματης μικροπιπέτας και πλύση του δαπέδου του τρυβλίου.
- Συλλογή του εναιωρήματος των κυττάρων που προκύπτει (~3 ml) με πιπέτα και μετάγγιση σε αποστειρωμένο σωληνάριο falcon® των 15 ml.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Επιστροφή του σωληναρίου στο θάλαμο νηματικής ροής και αναρρόφηση του υπερκειμένου με γυάλινη πιπέτα Pasteur.
- Επαναιώρηση του ιζήματος με τη χρήση πιπέτας σε 1 ml πλήρες θρεπτικό μέσο.
- Μεταφορά 10 μl εναιωρήματος σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer για υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων.
- Μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των κυττάρων, μεταφορά επιθυμητής ποσότητας αυτών σε νέο τρυβλίο και συμπλήρωση 10 ml θρεπτικού υλικού.
- Αναγραφή πάνω στο τρυβλίο της κυτταρικής σειράς, της γενιάς (passage) των κυττάρων, του θρεπτικού μέσου, και της ημερομηνίας.
- Παρατήρηση τρυβλίου στο μικροσκόπιο και μεταφορά στον επωαστικό θάλαμο.

Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μία ειδική αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες (Εικόνα 22). Σε καθεμία υπάρχει ένα ανάγλυφο πλέγμα μέτρησης των κυττάρων, το οποίο υποδιαιρείται σε 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Τα τετράγωνα αυτά, χωρίζονται σε μικρότερα τετράγωνα, ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση μονηρών κυττάρων. Τα 4 μεγάλα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα κάθε πλέγματος, υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετραγωνίδια με μήκος πλευράς 0,25 mm. Το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο υποδιαιρείται σε 25 μικρά

τετραγωνίδια με μήκος πλευράς 0,02 mm. Το επίπεδο των πλεγμάτων βρίσκεται 0,1 mm χαμηλότερα απ' ότι το επίπεδο στήριξης της καλυπτρίδας και επομένως, μεταξύ πλέγματος και καλυπτρίδας δημιουργείται ένας χώρος, ύψους 0,1 mm, στον οποίο εισέρχεται το εναιώρημα των κυττάρων και απλώνεται εξαιτίας τριχοειδικών φαινομένων. Έτσι ο αριθμός των κυττάρων, θα ισούται με: το μέσο όρο των κυττάρων που μετρήθηκαν πάνω στο πλέγμα επί τον όγκο του χώρου που έχει πληρωθεί με εναιώρημα (10^4 mm^3 [$0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$] από τις διαστάσεις του αιμοκυτταρόμετρου) επί το συντελεστή αραιώσης, σε περίπτωση που το δείγμα είναι πολύ πυκνό και γίνει αραιώση.



Εικόνα 22 Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και ο τρόπος μέτρησης των κυττάρων. (Πηγή:https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQQqhNNOv2HE8w51tkk-MSPCt2uYymZsCqB2vszm2c6flUc3I2FpYfHWvVW_XbKhxUh2UE&usqp=CAU)

Υλικά και διαλύματα

- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- Καλυπτρίδες
- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf® 1,5 ml (Z606340 Merck, Darmstadt, Germany)
- H₂O

Πειραματική πορεία

- Διεξαγωγή των βημάτων της ανακαλλιέργειας έως την του ιζήματος σε 1 ml πλήρες θρεπτικό.
- Μεταφορά κατάλληλης ποσότητας κυτταρικού εναιωρήματος ανάλογα με την επιθυμητή αραιώση σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf® και προσθήκη θρεπτικού έως όγκου 1 ml.
- Τοποθέτηση σταγόνας νερού (~10 μl) στις πλαϊνά του αιμοκυτταρόμετρου με σκοπό τη στερέωση της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο.
- Φόρτωση 10 μl από το αραιωμένο δείγμα σε καθεμιά από τις δύο θέσεις εναπόθεσης.

- Μέτρηση κυττάρων στο ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο σε όλα τα τετράγωνα (9) και στα δύο πλέγματα του αιμοκυτταρόμετρου.
- Για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων στο αρχικό δείγμα, ο αριθμός που προέκυψε από τη μέτρηση, διαιρείται με το πλήθος των τετραγώνων (18), και πολλαπλασιάζεται με 10^4 που είναι οι διαστάσεις του αιμοκυτταρόμετρου και έπειτα με το συντελεστή της αραίωσης.

Κρυοσυντήρηση κυττάρων

Για να διατηρηθούν τα κύτταρα για μεγάλα χρονικά διαστήματα, είναι αναγκαία η κατάψυξή τους σε ατμούς υγρού αζώτου ή υγρό άζωτο (Liquid Nitrogen Gas, LNG) σε θερμοκρασίες από -135°C μέχρι -196°C. Η επιτυχία της απόψυξης, έγκειται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν την κατάψυξη, για αυτό συλλέγονται στην εκθετική φάση αύξησης (κάλυψη τρυβλίου 80-90%). Για την αποφυγή σχηματισμού παγοκρυστάλλων καθώς και την επακόλουθη της ψύξης διάρρηξη των κυττάρων, τα κύτταρα ψύχονται βαθμιαία (1°C/h) μέχρι τους -80°C και παρουσία διμέθυλο-σουλφοξειδίου (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) σε χαμηλή συγκέντρωση (10% v/v) που δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας. Απαιτούνται ασηπτικοί και γρήγοροι χειρισμοί για να αποφευχθούν τόσο η μόλυνση, όσο και η θανάτωση κυττάρων από το DMSO που σε θερμοκρασία δωματίου είναι κυτταροτοξικός παράγοντας. Η βαθμιαία ψύξη επιτυγχάνεται με την αξιοποίηση της ισοπροπανόλης η οποία επιτρέπει μία πιο αργή και ομαλή διάχυση της θερμότητας από τη θερμοκρασία δωματίου στους -80° C (Lines and Morris 1995).

Υλικά και διαλύματα

- Πλήρες θρεπτικό μέσο (Biowest, Nuaille, France)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- Διάλυμα τρυψίνης (trypsin) 0,25% σε HBSS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (L0931-100 Biowest, Nuaille, France)
- Ορός νεογέννητου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) (S1810-500 Biowest, Nuaille, France)
- Διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) κατάλληλο για κυτταροκαλλιέργειες (C6164 Merck, Darmstadt, Germany)
- Φιαλίδια κατάψυξης κυττάρων (cryovials) (11777939 Fisher Scientific, Landsmeer, Netherlands)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon® όγκου 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)
- Δοχείο ψύξης κυττάρων με ισοπροπανόλη Mr. Frosty™ Freezing Container (C1562 Merck, Darmstadt, Germany)

Πειραματική πορεία

- Τοποθέτηση του τρυβλίου σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar hood) εφόσον απαιτούνται στείρες συνθήκες.
- Αναρρόφηση υπερκειμένου με γυάλινη πιπέτα Pasteur.
- Ξέπλυμα 2-3 φορές με διάλυμα PBS προς απομάκρυνση νεκρών κυττάρων, μεταβολιτών και αναστολέων της τρυψίνης.
- Προσθήκη 1 ml διαλύματος τρυψίνης στο τρυβλίο και ανακίνηση.
- Επώση στους 37°C για 2-3 min. Περισσότερος χρόνος συνεπάγεται με μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας.
- Εκ νέου παρατήρηση του τρυβλίου στο μικροσκόπιο για έλεγχο της προόδου της αποκόλλησης. Αναδεύσεις κατά αυτήν την ώρα ενισχύουν την αποκόλληση. Τα αποκολλημένα κύτταρα ή συσσωματώματα επιπλέουν.
- Μεταφορά τρυβλίου στο θάλαμο νηματικής ροής και αραίωση της τρυψίνης με διπλάσιο όγκο (2 ml) πλήρους θρεπτικού υλικού (για να ανασταλεί η δράση της).
- Συλλογή του εναιωρήματος των κυττάρων που προκύπτει (3 ml) με πιπέτα και μετάγγιση σε σωληνάριο falcon® όγκου 15 ml.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Επιστροφή του σωληναρίου στο θάλαμο νηματικής ροής και αναρρόφηση του υπερκειμένου με γυάλινη πιπέτα Pasteur.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 0,9 ml FBS.
- Μεταφορά του όγκου σε cryovial που περιέχει 0,1 ml DMSO (τελική συγκέντρωση DMSO 10% v/v επί του τελικού όγκου). Πραγματοποίηση γρήγορης και αποτελεσματικής ανάδευσης με πιπέτα για ομοιόμορφη κατανομή του DMSO.
- Αναγραφή στο cryovial της κυτταρικής σειράς, της γενιάς που θα έχουν τα κύτταρα όταν ξεπαγώσουν, του θρεπτικού μέσου, της ημερομηνίας ψύξης και του αριθμού κυττάρων.
- Τοποθέτηση των κυττάρων σε σύστημα σταδιακής, ελεγχόμενης ψύξης με ισοπροπανόλη και ψύξη μέχρι τους -80°C για 24 h.
- Τοποθέτηση των κυττάρων σε δοχείο με υγρό άζωτο μέχρι να ξαναχρησιμοποιηθούν.

Απόψυξη κυττάρων

Κύτταρα που έχουν ψυχθεί σε υγρό άζωτο (Liquid Nitrogen Gas, LNG) ακόμα και για χρόνια, μετά από απόψυξή τους μπορούν να καλλιεργηθούν ξανά κανονικά σε τρυβλία. Η διαδικασία

απόψυξης γίνεται σε θάλαμο νηματικής ροής και απαιτεί ταχύτητα για να ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος έκθεσης στο κυτταροτοξικό DMSO (Lines and Morris 1995).

Υλικά και διαλύματα

- Θρεπτικό μέσο RPMI 1640 ή DMEM (σκέτο και πλήρες) (Biowest, Nuaille, France)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια falcon® των 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)
- Τρυβλία κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες (10568862 Fisher Scientific, Landsmeer, Netherlands)

Πειραματική πορεία

- Μεταφορά 9 ml θρεπτικού σε σωληνάριο falcon® .
- Αφαίρεση του επιθυμητού cryovial από το δοχείο LNG και επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C με ανακίνηση για 1-1,5 min.
- Μεταφορά των κυττάρων από το cryovial στα 9 ml RPMI 1640 και γρήγορη ανάδευση.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου με πιπέτα Pasteur.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 5 ml RPMI 1640.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκειμένου με πιπέτα Pasteur.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου.
- Μεταφορά κυττάρων στο νέο τρυβλίο. Αναγραφή κυτταρικής σειράς, της γενιάς που έγγραφε το cryovial, του θρεπτικού μέσου και της ημερομηνίας.
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο και μεταφορά σε επωαστικό θάλαμο.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης απορρόφησης κυττάρων

Η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης είναι μία ευθεία που αντιστοιχίζει γνωστές συγκεντρώσεις μίας ουσίας/χρωστικής με τιμές οπτικής πυκνότητας, όπως αυτές λαμβάνονται από ένα φασματοφωτόμετρο. Στην περίπτωση που χρειάζεται ο προσδιορισμός συγκέντρωσης κυττάρων, γίνεται μεταφορά διάφορων γνωστών ποσοτήτων κυττάρων σε μικροκυψελίδες πλακιδίου ειδικού για κυτταροκαλλιέργεια, και στη συνέχεια, μετά από την προσκόλληση των κυττάρων, γίνεται η χρώση τους με κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) και εν συνεχεία εκχύλιση και μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής. Η φασματοφωτομέτρηση γίνεται στο μήκος κύματος που απορροφά μέγιστα η χρωστική (595 nm) και οι τιμές που λαμβάνονται συσχετίζονται με τις αρχικές

συγκέντρωσης κυττάρων στο λογισμικό Microsoft Office Excel® (ή οποιοδήποτε άλλο λογισμικό κατασκευής γραφημάτων). Οι επιθυμητές συγκεντρώσεις κυττάρων παρασκευάζονται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, ξεκινώντας από ένα εναιώρημα κυττάρων με συγκέντρωση 10^5 κυττάρων/ml και καταλήγοντας στην συγκέντρωση $6,25 \times 10^3$ κύτταρα/ml.

Υλικά και διαλύματα

- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640 ή DMEM (Biowest, Nuaille, France)
- Πλακίδιο 48 μικροκυψελίδων Greiner CELLSTAR® TC Treated (M8937 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- Καλυπτρίδες
- Αποστειρωμένα σωληνάρια falcon® των όγκου 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)

Πειραματική πορεία

- Διεξαγωγή των βημάτων της ανακαλλιέργειας έως την επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 ml πλήρες θρεπτικό.
- Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και υπολογισμός του όγκου του εναιωρήματος στο οποίο περιέχονται 4×10^5 κύτταρα.
- Λήψη της υπολογισθείσας ποσότητας εναιωρήματος, μεταφορά σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο των 15 ml και συμπλήρωση πλήρους θρεπτικού μέσου μέχρι τελικό όγκο 4 ml. Αναγραφή πάνω στο σωληνάριο της ένδειξης συγκέντρωσης των κυττάρων (10^5 κύτταρα/ml).
- Προετοιμασία 5 σωληναρίων falcon® όγκου 15 ml με 2 ml πλήρες θρεπτικό μέσο και αναγραφή των ακόλουθων συγκεντρώσεων (Πίνακας 3).

Πίνακας 3 Οι συγκεντρώσεις κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης

Σωληνάριο	Ένδειξη Συγκέντρωσης
Αρχικό Falcon®	10^5 κύτταρα/ml
2 ^ο falcon®	5×10^4 κύτταρα/ml
3 ^ο falcon®	$2,5 \times 10^4$ κύτταρα/ml
4 ^ο falcon®	$1,25 \times 10^4$ κύτταρα/ml
5 ^ο falcon®	$6,25 \times 10^3$ κύτταρα/ml
6 ^ο falcon®	0 κύτταρα/ml

- Με χρήση μικροπιπέτας, μεταφορά 2 ml από το αρχικό σωληνάριο με το εναιώρημα (όγκου 4 ml) στο δεύτερο σωληνάριο (όγκου 2 ml) και καλή ανάμειξη των δύο υγρών.
- Επανάληψη της διαδικασίας λαμβάνοντας 2 ml από το δεύτερο σωληνάριο ύστερα από επίμονη επαναιώρηση και μεταγγίζοντάς τα στο τρίτο.
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος μέχρις ότου ετοιμαστούν όλες οι επιθυμητές συγκεντρώσεις.
- Σε πλακίδιο 48 μικροκυψελίδων αναγραφή στο κάλυμμα των συγκεντρώσεων κυττάρων τα οποία θα μεταφερθούν. Για την κάθε τιμή αραίωσης χρήση τριών ταυτόσημων μικροκυψελίδων (triplicates).
- Μεταφορά 0,5 ml εναιωρήματος γνωστής συγκέντρωσης κυττάρων στην ανάλογη προσημασμένη μικροκυψελίδα.
- Μεταφορά του πλακιδίου στον επωαστικό θάλαμο και επώαση στους 37°C για 12-24 h για να εξασφαλιστεί προσκόλληση των κυττάρων.
- Χρώση των κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες.

Χρώση των κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες και υπολογισμός του αριθμού τους

Η χρωστική κρυσταλλικό ιώδες είναι μία κατιονική χρωστική που προσδένεται μη ειδικά στα αρνητικά φορτισμένα βιομόρια. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα κύτταρα ενός κυτταρικού κλώνου έχουν ουσιαστικά ίδιο μέγεθος και σύσταση, γίνεται αντιληπτό ότι η προσδεδεμένη χρωστική ανά κύτταρο είναι μία σταθερή ποσότητα. Επομένως, μία εκχύλιση της χρωστικής αυτής είναι επαρκής συνθήκη για να αντιστοιχιστούν γνωστοί αριθμοί κυττάρων με ποσότητες χρωστικής που προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά (Feoktistova, Geserick, and Leverkus 2016).

Υλικά και διαλύματα

- Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS, pH 7,2-7,4
- Μεθανάλη 3,7% v/v σε PBS
- Διάλυμα Κρυσταλλικού Ιώδους 2,5% w/v (61135-100G Merck, Darmstadt, Germany)

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Σύσταση</i>
Μεθανόλη	30% v/v
Αιθανοϊκό οξύ	10% v/v
dH ₂ O	60% v/v
Crystal Violet	0,5% w/v

- Αιθανοϊκό οξύ 30% v/v σε dH₂O

Πειραματική πορεία

- Λήψη του πλακιδίου από τον επωαστικό θάλαμο και άδειασμα με γυάλινη πιπέτα Pasteur του περιεχομένου των μικροκυψελίδων.
- Πλύση των κυψελίδων με διάλυμα PBS προς απομάκρυνση νεκρών κυττάρων (προσθήκη 1 ml PBS/ μικροκυψελίδα).
- Απομάκρυνση του PBS και προσθήκη 1 ml διαλύματος μεθανάλης ανά μικροκυψελίδα. Η μεθανάλη δρα ως μονιμοποιητική ουσία στα κύτταρα αφού διασυνδέει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες με ομοιοπολικούς δεσμούς (protein cross-linking). Έτσι, ενισχύεται η μεταξύ τους προσκόλληση, όσο και η παραμονή τους στο δάπεδο του πλακιδίου.
- Επώαση για 15 min με τη μεθανάλη σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα απόχυση του μονιμοποιητικού διαλύματος.
- Πλύση των κυψελίδων με απιοντισμένο νερό και αποστράγγιση με διηθητικό χαρτί.
- Προσθήκη 200 μl διαλύματος χρωστικής κρυσταλλικού ιώδους και επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόχυση της χρωστικής.
- Πλύσεις με νερό έως ότου απομακρυνθεί όλη η μη προσδεδεμένη χρωστική (απαιτούνται περίπου τρεις με τέσσερις επαναλήψεις).
- Αποστράγγιση του πλακιδίου με διηθητικό χαρτί .
- Προσθήκη 600 μl διαλύματος αιθανοϊκού οξέος, του οποίου το pH ευνοεί την εκχύλιση της δεσμευμένης στα κύτταρα χρωστικής.
- Επώαση για 20 min στο διάλυμα εκχύλισης, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ήπια ανάδευση.
- Λήψη 200 μl από την κάθε μικροκυψελίδα και μεταφορά σε ανάλογη μικροκυψελίδα πλακιδίου ELISA.
- Προετοιμασία φασματοφωτομέτρου κατάλληλου για πλακίδια και φωτομέτρηση στα 595 nm, στο μήκος κύματος δηλαδή που απορροφάει κατά μέγιστο το κρυσταλλικό ιώδες.

Επίστρωση κυττάρων σε μικροπλακίδια

Η μεταφορά κυττάρων από τα τρυβλία στις κυψελίδες μικροπλακιδίων είναι απαραίτητο βήμα προκειμένου να ελεγχθούν διαφορετικές πειραματικές παράμετροι ανά κυψελίδα. Ο αριθμός

των κυττάρων υπολογίζεται κατά την επίστρωση με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και στη συνέχεια τα κύτταρα κατανέμονται στις κυψελίδες και αφήνονται να προσκολληθούν και να διαιρεθούν.

Υλικά και διαλύματα

- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640 ή DMEM (Biowest, Nuaille, France)
- Πλακίδιο 24 / 48 μικροκυψελίδων Greiner CELLSTAR® TC Treated (M8812 / M8937 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- Καλυπτρίδες
- Αποστειρωμένα σωληνάρια falcon® των όγκου 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)

Πειραματική πορεία

- Υπολογισμός του αριθμού κυττάρων και του όγκου του θρεπτικού ανά μικροκυψελίδα. Σε πλακίδια των 24 μικροκυψελίδων μπορούν να καλλιεργηθούν έως $2,4 \times 10^5$ κύτταρα ανά κυψελίδα ενώ σε πλακίδια 48 μικροκυψελίδων μπορούν να καλλιεργηθούν μέχρι $1,2 \times 10^5$ κύτταρα. (<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>)
- Διεξαγωγή των βημάτων της ανακαλλιέργειας έως την επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 ml πλήρες θρεπτικό.
- Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, όπως έχει περιγραφεί η διαδικασία και υπολογισμός του όγκου του εναιωρήματος στον οποίο περιέχεται ο προβλεπόμενος αριθμός κυττάρων.
- Μεταφορά της υπολογισθείσας ποσότητας κυττάρων σε σωληνάριο falcon® και συμπλήρωση θρεπτικού μέσου μέχρι να επιτευχθεί η συγκέντρωση κυττάρων που θα διαμοιραστεί στις κυψελίδες.
- Μεταφορά του πλακιδίου στον επωαστικό θάλαμο και επώαση στους 37°C για 12-24 h για να εξασφαλιστεί προσκόλληση των κυττάρων.

Επώαση κυττάρων με FALS

Η επίδραση των PUFAs υπό τη μορφή αλάτων λιθίου (FALS) στη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό είναι το αντικείμενο αυτής της μελέτης, επομένως, με σκοπό να διερευνηθεί το παραπάνω ερώτημα, σε πλακίδια που έχουν μεταφερθεί κύτταρα γίνεται προσθήκη των αλάτων και

με το πέρας των 48 ωρών επώασης από την προσθήκη, γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων και σύγκριση των ομάδων μεταξύ τους.

Υλικά και διαλύματα

- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640 ή DMEM (Biowest, Nuaille, France)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- FALS (εκχύλισμα 1,6 g/ml) σε πλήρες θρεπτικό

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Σύσταση</i>
FALS σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640/DMEM	0,16 g/ml

Πειραματική πορεία

- Προετοιμασία του θρεπτικού υλικού. Παρασκευάζονται πανομοιότυπα θρεπτικά υλικά με μοναδική διαφορά τη συγκέντρωση FALS. Οι επιθυμητές συγκεντρώσεις των λιπιδικών αλάτων που θέλουμε να επιτύχουμε στις διαφορετικές μικροκυψελίδες παρουσιάζονται στον Πίνακα 4:

Πίνακας 4 Οι συγκεντρώσεις PUFAs (mg/ml) που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα βιωσιμότητας-πολλαπλασιασμού.

<i>Συγκέντρωση FALS (mg/ml)</i>	
1 ^ο falcon®	3,66
2 ^ο falcon®	3,416
3 ^ο falcon®	3,172
4 ^ο falcon®	2,928
5 ^ο falcon®	2,684
6 ^ο falcon®	2,44
7 ^ο falcon®	2,196
8 ^ο falcon®	1,952
9 ^ο falcon®	1,708
10 ^ο falcon®	1,464
11 ^ο falcon®	1,22
12 ^ο falcon®	0,976
13 ^ο falcon®	0,732

14° falcon®	0,488
15° falcon®	0,244
16° falcon®	0

Καθεμία από τις παραπάνω συγκεντρώσεις θα υπάρξει σε τρεις όμοιες μικροκυψελίδες προκειμένου το πείραμα να διεξαχθεί σε τριπλότυπες κυψελίδες (triplicates) για να ελαχιστοποιηθεί το πειραματικό σφάλμα.

Επομένως γίνεται παρασκευή ελάχιστου θρεπτικού υλικού με βάση τον παρακάτω πίνακα (όγκοι υπολογισμένοι για 2 ml: 3 μικροκυψελίδες x 0,5 ml / μικροκυψελίδα + 0,5 ml θρεπτικού επιπλέον για ασφάλεια = 2 ml).

- Λήψη του πλακιδίου από τον επωαστικό θάλαμο και μεταφορά σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar hood).
- Απομάκρυνση παλαιού θρεπτικού υλικού με πιπέτα Pasteur υπό κενό.
- Πλύση των μικροκυψελίδων με διάλυμα PBS.
- Προσθήκη 0,5 ml θρεπτικού υλικού ανά μικροκυψελίδα.
- Επαναφορά του πλακιδίου στον επωαστικό θάλαμο και επώαση στους 37°C για 48 h.

Μέθοδος επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay/Scratch Test)

Η μέθοδος Wound Healing είναι μία προσομοίωση της ικανότητας των κυττάρων να επουλώνουν πληγές μέσω πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης στην περιοχή του τραυματισμού. Το πείραμα γίνεται σε κυψελίδες όπου -όταν κύτταρα φτάσουν σε πλήρη κάλυψη του δαπέδου- με αποστειρωμένο αιχμηρό αντικείμενο, γίνεται απόξεση κυττάρων σχηματίζοντας μία σταυροειδή ή άλλου σχήματος πληγή. Έπειτα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου μέσα στις κυψελίδες και προσθήκη της προς μελέτη ουσίας. Το μικροπλακίδιο φωτογραφίζεται ε σε συγκεκριμένα χρονικά ορόσημα και στις φωτογραφίες παρατηρείται η ταχύτητα επούλωσης της πληγής (Vang Mouritzen and Jenssen 2018),(Martinotti and Ranzato 2020).

Υλικά και διαλύματα

- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640 ή DMEM (Biowest, Nuaille, France)
- Πλακίδιο 24 μικροκυψελίδων Greiner CELLSTAR® TC Treated (M8812 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- Καλυπτρίδες

- Αποστειρωμένα σωληνάρια falcon® των όγκου 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)
- Αποστειρωμένα πλαστικά ακροφύσια πιπετών
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- FALS/FAPS (εκχύλισμα 1,6 g/ml) σε πλήρες θρεπτικό

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Σύσταση</i>
FALS σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640/DMEM	0,16 g/ml

Πειραματική πορεία

- Υπολογισμός του αριθμού κυττάρων και του όγκου του θρεπτικού ανά μικροκυψελίδα: σε πλακίδια των 24 μικροκυψελίδων μπορούν να καλλιεργηθούν έως $2,4 \times 10^5$ κύτταρα ανά κυψελίδα. (<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>)
- Διεξαγωγή των βημάτων της ανακαλλιέργειας έως την επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 ml πλήρες θρεπτικό.
- Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, όπως έχει περιγραφεί η διαδικασία και υπολογισμός του όγκου του εναιωρήματος στον οποίο περιέχεται ο προβλεπόμενος αριθμός κυττάρων.
- Μεταφορά της υπολογισθείσας ποσότητας κυττάρων σε σωληνάριο falcon® και συμπλήρωση θρεπτικού μέσου μέχρι να επιτευχθεί η συγκέντρωση κυττάρων που θα διαμοιραστεί στις κυψελίδες.
- Μεταφορά του πλακιδίου στον επωαστικό θάλαμο και επώαση στους 37°C για 12-24 h για να εξασφαλιστεί προσκόλληση των κυττάρων και παραμονή στον επωαστικό μέχρι την επίτευξη πλήρους κάλυψης του δαπέδου.
- Προετοιμασία του θρεπτικού υλικού. Παρασκευάζονται πανομοιότυπα θρεπτικά υλικά με μοναδική διαφορά τη συγκέντρωση FALS.
- Σχηματισμός της πληγής με αιχμηρό αντικείμενο. Κατά προτίμηση χρήση αποστειρωμένου πλαστικού ακροφύσιου, για πιπέτα P200.
- Απομάκρυνση παλαιού θρεπτικού με γυάλινη πιπέτα Pasteur υπό κενό.
- Πλύση της κάθε κυψελίδας με διάλυμα PBS.

- Πλήρωση των κυψελίδων με το νέο θρεπτικό μέσο.
- Λήψη φωτογραφιών και μεταφορά στον επωαστικό θάλαμο.
- Λήψη φωτογραφιών στα ορισθέντα χρονικά ορόσημα και σύγκριση των φωτογραφιών.

Boyden/Transwell Chambers

Η επίδραση των PUFAs υπό τη μορφή αλάτων λιθίου (FALS) στη χημειοτακτική κίνηση των κυττάρων αλλά και η δράση τους ως χημειοελκυστικοί παράγοντες, μπορεί να διαπιστωθεί με τη χρήση της πειραματικής διάταξης των Boyden/Transwell Chambers. Τα κύτταρα τοποθετούνται εντός ενός ενθέματος με πορώδη πάτο, τον οποίο μπορούν να διασχίσουν μόνο με ενεργό τρόπο. Η ύπαρξη χημειοτακτικών παραγόντων ή αναστολέων της μετανάστευσης εκατέρωθεν της μεμβράνης, μεταβάλλει τη συμπεριφορά τους με τρόπο μετρήσιμο. Με τη λήξη του χρόνου επώασης, τα κύτταρα που έχουν διέλθει από τον πάτο-φίλτρο και όσα βρίσκονται σε πορεία διάσχισης, μπορούν να μονιμοποιηθούν, να βαφτούν και να μετρηθούν (Chen 2005).

Υλικά και διαλύματα

- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640 ή DMEM (Biowest, Nuaille, France)
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- FALS (εκχύλισμα 1,6 g/ml) σε πλήρες θρεπτικό

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Σύσταση</i>
FALS σε θρεπτικό μέσο	0,16 g/ml
RPMI 1640/DMEM	

- Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS, pH =7,2-7,4
- Πλακίδιο 24 μικροκυψελίδων Greiner CELLSTAR® TC Treated (M8812 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- Καλυπτρίδες
- Αποστειρωμένα σωληνάρια falcon® των όγκου 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)
- Απόλυτη μεθανόλη
- Μεθανάλη 3,7% v/v σε PBS
- Διάλυμα Κρυσταλλικού Ιώδους 2,5% w/v (61135-100G Merck, Darmstadt, Germany)

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Σύσταση</i>
Μεθανόλη	30% v/v
Αιθανοϊκό οξύ	10% v/v
dH ₂ O	60% v/v
Crystal Violet	0,5% w/v

Πειραματική πορεία

- Υπολογισμός του αριθμού κυττάρων (2×10^4 κύτταρα) και του όγκου του θρεπτικού ανά ένθεμα (250 μ l).
- Διεξαγωγή των βημάτων της ανακαλλιέργειας έως την επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 ml θρεπτικού χωρίς FBS.
- Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, όπως έχει περιγραφεί η διαδικασία και υπολογισμός του όγκου του εναιωρήματος στον οποίο περιέχεται ο προβλεπόμενος αριθμός κυττάρων.
- Μεταφορά της υπολογισθείσας ποσότητας κυττάρων σε σωληνάριο falcon® και συμπλήρωση θρεπτικού μέσου μέχρι να επιτευχθεί η συγκέντρωση κυττάρων που θα διαμοιραστεί στα ενθέματα.
- Μεταφορά στις κυψελίδες του μικροπλακιδίου πλήρους θρεπτικού μέσου, στην ποσότητα που αναγράφεται στις συνοδευτικές οδηγίες του συστήματος Boyden Chamber (500 μ l).
- Μεταφορά των κυττάρων στα ενθέματα.
- Προσθήκη του υπό μελέτη παράγοντα στο ένθεμα (πάνω διαμέρισμα) ή στην κυψελίδα (κάτω διαμέρισμα).
- Ανάδευση με τη βοήθεια μικροπιπέτας και τοποθέτηση του ενθέματος στην κυψελίδα.
- Μεταφορά του πλακιδίου στον επωαστικό θάλαμο και παραμονή για τον απαιτούμενο για τη μετανάστευση χρόνο (6-24 h).
- Αφαίρεση των ενθεμάτων από τις κυψελίδες και απομάκρυνση των περιεχομένων τους.
- Πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Επώση με διάλυμα απόλυτης μεθανόλης για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Επώση με διάλυμα μεθανόλης σε 3,7% σε PBS για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Χρώση με διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση με απιοντισμένο νερό.

- Μικροσκοπική παρατήρηση των μεμβρανών των ενθεμάτων και λήψη φωτογραφιών.

Κυτταρομετρία ροής - Χρώση με τις φθορίζουσες χρωστικές Nile Red, BODIPY™)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική τόσο ανάλυσης, όσο και μέτρησης κυτταρικών χαρακτηριστικών που βασίζεται στη σκέδαση του φωτός όταν αυτό περάσει μέσα από τα κύτταρα όσο και στο εκπεμπόμενο φως ένεκα του φαινομένου του φθορισμού. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διέλευση ενός κυτταρικού εναιωρήματος μέσα από ένα τριχοειδή σωλήνα, με τα κύτταρα να περνούν μέσα από μία ακτίνα laser η οποία εν μέρει απορροφάται και εν μέρει σκεδάζεται. Η πρόσθια σκέδαση της ακτίνας αυτής σχετίζεται με το μέγεθος του σωματιδίου που διέρχεται έμπροσθεν του ανιχνευτή ενώ η πλάγια σκέδαση οφείλεται στην πολυπλοκότητα του υπό διερεύνηση κυττάρου. Τα δύο χαρακτηριστικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση κυττάρων που ανήκουν σε διαφορετικούς πληθυσμούς εφόσον κύτταρα με παρόμοια μοτίβα πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης ομαδοποιούνται από τον αναλυτή και εμφανίζονται στην οθόνη του οργάνου ως κοκκία σε ένα διάγραμμα δύο διαστάσεων.

Εκτός από το μέγεθος και την πολυπλοκότητα, η χρήση μονοχρωματικών laser που δύνανται να εκπέμπουν φωτόνια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διεγείρει φθοριοχρώματα και μετρώντας την εκπεμφθείσα ακτινοβολία να υπολογιστεί η συγκέντρωσή τους. Με μία σύζευξη φθοριοχρώματος με αντίσωμα ή με τη χρήση φθοριοχρώματος που προσδένεται σε συγκεκριμένα κυτταρικά στοιχεία, καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός και η ποσοτικοποίηση χαρακτηριστικών όπως βιοδείκτες ή άλλα βιομόρια.

Η κυτταρομετρία ροής παρέχει δεδομένα αξιοποιώντας ελάχιστη ποσότητα αρχικού βιολογικού υλικού και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό χαρακτηριστικών που μπορεί να είναι σπάνια και ετερογενή σε ένα σύνολο κυττάρων, όπως να διαχωρίσει τα κύτταρα ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται ή πορεία της απόπτωσης (McKinnon 2018).

Η χρωστική Nile Red είναι μια λιπόφιλη ένωση που φθορίζει έντονα όταν βρεθεί σε υδρόφοβο περιβάλλον. Σε υδατικά διαλύματα, το Nile Red δεν φθορίζει λόγω quenching, ιδιότητα που το καθιστά εξαιρετικό φθοριόχρωμα. Ανάλογα με τα μόρια πάνω στα οποία προσδένεται, μπορεί να διεγερθεί από φωτεινή ακτινοβολία 490-560 nm και να εκπέμψει στα 570-650 nm. Τα ουδέτερα λίπη και οι στερόλες φθορίζουν στα 570-590 nm κυρίως ενώ σε μεγαλύτερα μήκη κύματος 600-650 ανιχνεύονται τα φωσφολιπίδια (Greenspan, Mayer, and Fowler 1985).

Η χρωστική BODIPY™ 505/515 είναι μία λιπόφιλη χρωστική με υψηλότερη διαπερατότητα σε σχέση με το Nile Red και πολύ πιο βραχύ φάσμα εκπομπής. Διεγείρεται στα 488 nm και εκπέμπει στα 515 nm σημαίνοντας την παρουσία λιπών με πράσινο χρώμα. Σε σχέση με το Nile Red είναι πιο

σταθερή και ανθεκτική σε αλλαγές της θερμοκρασίας και του pH ενώ εμφανίζει και αυξημένη ειδικότητα στα ουδέτερα λίπη σε σχέση με το Nile Red που προσδένεται και σε άλλα βιομόρια με υδρόφοβες επικράτειες (Koreivienė 2020).

Υλικά και διαλύματα

- Διάλυμα Nile Red 1mg/ml σε DMSO (72485 Merck, Darmstadt, Germany)
- Διάλυμα BODIPY™ 505/515 1 mg/ml σε DMSO (D3921 Thermo Fisher Scientific, California, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- RPMI 1640/DMEM (Biowest, Nuaille, France)
- Διάλυμα τρυψίνης (trypsin) 0,25% σε HBSS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (L0931-100 Biowest, Nuaille, France)
- Διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) κατάλληλο για κυτταροκαλλιέργειες (C6164 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon® όγκου 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf® 1,5 ml (Z606340 Merck, Darmstadt, Germany)
- Σωληνάρια κυτταρομετρίας
- Κυτταρομετρητής ροής BD FACS Calibur™

Πειραματική πορεία

- Συλλογή των προς ανάλυση κυττάρων με τη χρήση διαλύματος τρυψίνης.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου με γυάλινη πιπέτα Pasteur και επαναιώρηση του ιζήματος με τη χρήση πιπέτας σε πλήρες θρεπτικό μέσο.
- Υπολογισμός του τίτλου χρωστικής που θα χρησιμοποιηθεί για τη χρώση:
 - Για το Nile Red η βέλτιστη συγκέντρωση για $1-2 \times 10^6$ κύτταρα προσδιορίστηκε σε 1 $\mu\text{g/ml}$.
 - Για BODIPY™ η βέλτιστη συγκέντρωση προσδιορίστηκε σε 1 $\mu\text{g/ml}$.
- Προετοιμασία stock διαλύματος των χρωστικών σε DMSO σε συγκέντρωση 1 mg/ml.
- Προσθήκη 1 μl χρωστικής σε 1 ml εναιωρήματος κυττάρων και μεταφορά σε αδιαφανή περιέκτη.
- Επώαση στους 37°C για 15 min.

- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκλειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Μεταφορά του δείγματος σε σωληνάριο κυτταρομετρίας.
- Ανάλυση με τον κυτταρομετρητή ροής BD FACS Calibur™.
- Επεξεργασία των δεδομένων στο λογισμικό BD FlowJo™.

Κυτταρομετρία ροής - Annexin V/PI

Η πρωτεΐνη αννεξίνη έχει την ιδιότητα να προσδένεται ισχυρά στα φωσφολιπίδια με μία αντίδραση εξαρτώμενη από ιόντα Ca^{2+} και εμφανίζει υψηλή ειδικότητα στη φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphatidylserine, PS) η οποία φυσιολογικά υπάρχει στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης ωστόσο τα αποπτωτικά κύτταρα ανιχνεύεται και στην εξωτερική πλευρά του κυττάρου. Επομένως, συζευγμένη με το φθοριόχρωμα FITC μπορεί να σημάνει τα αποπτωτικά κύτταρα αλλά και όσα διαθέτουν οπές και μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό τους. Τα ζωντανά κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες δεν έχουν PS στην περιφέρεια τους, ούτε οπές. Επομένως, η ύπαρξη θετικού σήματος σε ένα κύτταρο μπορεί να σημαίνει είτε ότι το κύτταρο έχει εισέλθει σε απόπτωση, είτε ότι έχει υποστεί νεκρωτικό θάνατο. Ο διαχωρισμός των δύο καταστάσεων μπορεί να γίνει με τη χρωστική Propidium iodide (PI) η οποία προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα του κυττάρου χωρίς ωστόσο να μπορεί να διέλθει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ο συνδυασμός των δύο χρώσεων επομένως διαχωρίζει 4 κυτταρικούς πληθυσμούς: α) τα διπλά αρνητικά κύτταρα που αντιστοιχούν στο σύνολο των ζωντανών, β) τα θετικά για αννεξίνη που είναι αυτά που έχουν εισέλθει στην απόπτωση, γ) τα θετικά για PI που είναι νεκρωτικά κύτταρα και δ) τα διπλά θετικά κύτταρα που είναι κύτταρα σε προχωρημένο στάδιο της απόπτωσης.

Υλικά και διαλύματα

- Αννεξίνη V συζευγμένη με FITC (AB_2665412, BD Biosciences New Jersey, USA)
- Διάλυμα δέσμευσης της Αννεξίνης (#6592 Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)
- Διάλυμα Propidium Iodide (PI) (#6592 Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- RPMI 1640/DMEM (Biowest, Nuaille, France)
- Διάλυμα τρυψίνης (trypsin) 0,25% σε HBSS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (L0931-100 Biowest, Nuaille, France)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon® όγκου 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)

- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf® 1,5 ml (Z606340 Merck, Darmstadt, Germany)
- Σωληνάρια κυτταρομετρίας
- Κυτταρομετρητής ροής BD FACS Calibur™

Πειραματική πορεία

- Συλλογή των προς ανάλυση κυττάρων με τη χρήση διαλύματος τρυψίνης.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκλειμένου με γυάλινη πιπέτα Pasteur και επαναιώρηση του ιζήματος με τη χρήση πιπέτας σε πλήρες θρεπτικό μέσο.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκλειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 90 μl ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης αννεξίνης.
- Προσθήκη 5 μl αννεξίνης και 5 μl PI στο εναιωρήματος κυττάρων.
- Μεταφορά σε αδιαφανή περιέκτη.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min σε συνθήκες έλλειψης φωτός.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκλειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης αννεξίνης.
- Μεταφορά του δείγματος σε σωληνάριο κυτταρομετρίας.
- Ανάλυση με τον κυτταρομετρητή ροής BD FACS Calibur™.
- Επεξεργασία των δεδομένων στο λογισμικό BD FlowJo™.

Κυτταρομετρία ροής - Χρώση LIVE/DEAD και H₂DCFDA

Ο σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου εντός των κυττάρων προκαλεί βλάβες στα βιομόρια αλλοιώνοντάς τα χημικά και παρεμβαίνοντας στη λειτουργία τους προκαλώντας μία κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό στρες. Η κυριότερες και πιο δραστικές μορφές εντός των κυττάρων είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου του οξυγόνου και η υδρόξυλ- ρίζα. Με σκοπό να μετρηθούν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες εντός των κυττάρων χρησιμοποιείται το μόριο DCF το οποίο αντιδρά με την ρίζα υδροξυλίου και παράγει προϊόν που φθορίζει έντονα στα 515 nm όταν διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 488 nm το οποίο όμως δε μπορεί να διέλθει την πλασματική μεμβράνη ενός ζωντανού κυττάρου. Η ουσία H₂DCFDA μπορεί μέσω διάχυσης να εισέρχεται στο κύτταρο, ωστόσο οι εστεράσες εντός του κυττάρου απομακρύνουν την διακετυλική ομάδα και μένει η μορφή DCF που αφενός εγκλωβίζεται στο κυτταρόπλασμα και αφετέρου είναι σε

θέση να αντιδρά με τη ρίζες υδροξυλίου και να παράγεται η έντονα φθορίζουσα μορφή του (Gardiner et al. 2020).

Παράλληλα, χρησιμοποιείται η χρωστική LIVE/DEAD της Invitrogen™ η οποία προσδένεται πάνω στις ελεύθερες αμινομάδες και δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη. Τα ζωντανά κύτταρα θα δώσουν ένα ασθενές σήμα στα 570 nm, ενώ τα νεκρά ένα πολύ πιο έντονο (50 φορές πιο έντονο), κάνοντας εύκολο τον διαχωρισμό τους. Με αυτόν τον τρόπο, το υποσύνολο των κυττάρων που μελετάται ως προς τα επίπεδα οξειδωτικού στρες εξασφαλίζεται ότι είναι αυτό των ζωντανών κυττάρων (L34959 Thermo Fisher Scientific, California, USA).

Υλικά και διαλύματα

- LIVE/DEAD® staining kit (L34959 Thermo Fisher Scientific, California, USA)
- Διάλυμα H₂DCFDA (D399 Thermo Fisher Scientific, California, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- RPMI 1640/DMEM (Biowest, Nuaille, France)
- Διάλυμα τρυψίνης (trypsin) 0,25% σε HBSS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (L0931-100 Biowest, Nuaille, France)
- Διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) κατάλληλο για κυτταροκαλλιέργειες (C6164 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon® όγκου 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf® 1,5 ml (Z606340 Merck, Darmstadt, Germany)
- Σωληνάρια κυτταρομετρίας
- Κυτταρομετρητής ροής BD FACS Calibur™

Πειραματική πορεία

- Συλλογή των προς ανάλυση κυττάρων με τη χρήση διαλύματος τρυψίνης.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου με γυάλινη πιπέτα Pasteur και επαναιώρηση του ιζήματος με τη χρήση πιπέτας σε πλήρες θρεπτικό μέσο.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Προσθήκη 1 μl LIVE DEAD® σε 1 ml εναιωρήματος κυττάρων και μεταφορά σε αδιαφανή περιέκτη.

- Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά σε συνθήκες έλλειψης φωτός.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Προσθήκη 1 μ l H₂DCFDA.
- Επώαση στους 37°C για 30 min σε συνθήκες έλλειψης φωτός.
- Φυγοκέντριση στα 500 g για 4 min.
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Μεταφορά του δείγματος σε σωληνάριο κυτταρομετρίας.
- Ανάλυση με τον κυτταρομετρητή ροής BD FACS Calibur™.
- Επεξεργασία των δεδομένων στο λογισμικό BD FlowJo™.

Επίστρωση κυττάρων σε καλυπτρίδες και προετοιμασία δείγματος για συνεστιακή μικροσκοπία/μικροσκοπία φθορισμού

Με σκοπό τα κύτταρα να επωαστούν με χρωστικές και να παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού, θα πρέπει πρώτα να προσκολληθούν σε μία γυάλινη επιφάνεια η οποία θα τοποθετηθεί στην τράπεζα του μικροσκοπίου και θα επιτρέπει τόσο τη διέλευση του φωτός όσο και την μέτρηση του εκπεμπόμενου σήματος φθορισμού. Η ενδεδειγμένη επιφάνεια είναι η γυάλινη καλυπτρίδα η οποία τοποθετείται εντός μικροκυψελίδας και ούσα αποστειρωμένη επιτρέπει την αύξηση των κυττάρων ενώ παράλληλα καθίσταται δυνατή η χρήση του χώρου της κυψελίδας για επώαση των κυττάρων στις επιθυμητές συνθήκες.

Υλικά και διαλύματα

- Γυάλινες καλυπτρίδες
- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640 ή DMEM (Biowest, Nuaille, France)
- Πλακίδιο 24 / 48 μικροκυψελίδων Greiner CELLSTAR TC Treated (M8812 / M8937 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αιθανόλη 96°
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS με 0,1% Triton™ X-100
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS με 0,05% NaN₃
- Διάλυμα μεθανάλης 3,7% σε PBS
- Διάλυμα τρυψίνης (trypsin) 0,25% σε HBSS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (L0931-100 Biowest, Nuaille, France)

- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon® όγκου 15 ml (T1943-1000EA Merck, Darmstadt, Germany)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf® 1,5 ml (Z606340 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αποστειρωμένη λαβίδα

Πειραματική πορεία

- Αποστείρωση των καλυπτρίδων με τη χρήση αυτοκαύστου ή αιθανόλης. Στη δεύτερη περίπτωση ξήρανση των καλυπτρίδων πριν τη χρήση.
- Με τη χρήση λαβίδας, μεταφορά των καλυπτρίδων σε μικροκυψελίδες.
- Υπολογισμός του αριθμού κυττάρων και του όγκου του θρεπτικού ανά μικροκυψελίδα. Σε πλακίδια των 24 μικροκυψελίδων μπορούν να καλλιεργηθούν έως $2,4 \times 10^5$ κύτταρα ανά κυψελίδα ενώ σε πλακίδια 48 μικροκυψελίδων μπορούν να καλλιεργηθούν μέχρι $1,2 \times 10^5$ κύτταρα (<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>).
- Διεξαγωγή των βημάτων της ανακαλλιέργειας έως την επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 ml πλήρες θρεπτικό.
- Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, όπως έχει περιγραφεί η διαδικασία και υπολογισμός του όγκου του εναιωρήματος στον οποίο περιέχεται ο προβλεπόμενος αριθμός κυττάρων.
- Μεταφορά της υπολογισθείσας ποσότητας κυττάρων σε σωληνάριο falcon® και συμπλήρωση θρεπτικού μέσου μέχρι να επιτευχθεί η συγκέντρωση κυττάρων που θα διαμοιραστεί στις κυψελίδες.
- Μεταφορά του πλακιδίου στον επωαστικό θάλαμο και επώαση στους 37°C για 12-24 h για να εξασφαλιστεί προσκόλληση των κυττάρων.
- Επώαση με τις κατάλληλες συνθήκες για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα.
- Αναρρόφηση του θρεπτικού με γυάλινη πιπέτα Pasteur υπό κενό.
- Πλύση των κυψελίδων με διάλυμα PBS (1 ml ανά κυψελίδα).
- Εάν προβλέπεται, προσθήκη διαλύματος μεθανάλης ως μονιμοποιητικό μέσο και επώαση για 15 λεπτά στους 37°C.
- Πλύση των κυψελίδων με διάλυμα PBS.
- Εάν προβλέπεται, προσθήκη διαλύματος PBS με Triton™ X-100 ως διάλυμα διαπερατοποίησης και επώαση για τον προβλεπόμενο χρόνο (από το πρωτόκολλο χρώσης).

- Αναρρόφηση των περιεχομένων των κυψελίδων και προσθήκη PBS με NaN_3 που χρησιμεύει ως βακτηριοστατικός παράγοντας.
- Χρώση και παρατήρηση των κυψελίδων ή συντήρηση στους 4°C .

Χρώση λιπιδίων με φθορίζουσες χρωστικές και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο/μικροσκόπιο φθορισμού

Υλικά και διαλύματα

- Διάλυμα Nile Red 1mg/ml σε DMSO (72485 Merck, Darmstadt, Germany)
- Διάλυμα BODIPY™ 505/515 1 mg/ml σε DMSO (D3921 Thermo Fisher Scientific, California, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- MOWIOL® 4-88 mounting medium (81381 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες
- Αποστειρωμένη λαβίδα
- Διηθητικό χαρτί

Πειραματική πορεία (για μονιμοποιημένα κύτταρα)

- Χρήση καλυπτρίδων που δεν έχουν επωαστεί με απορρυπαντικά (Triton™ X-100, Tween-20®).
- Αναρρόφηση περιεχομένων της κυψελίδας και αντικατάσταση με φρέσκο PBS.
- Προσθήκη χρωστικής σε τελική συγκέντρωση $1 \mu\text{g/ml}$.
- Επώαση για 15 min στους 37°C σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού
- Αναρρόφηση διαλύματος χρώσης με γυάλινη πιπέτα Pasteur.
- Πλύση με PBS εις διπλούν.
- Τοποθέτηση $15 \mu\text{l}$ Mowiol® mounting medium πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Αναρρόφηση του PBS με μικροπιπέτα.
- Λήψη της καλυπτρίδας, αποστράγγιση σε διηθητικό χαρτί και τοποθέτηση πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Η πλευρά που φέρει τα κύτταρα να βρίσκεται πλήρως εμβαπτισμένη στο Mowiol®.
- Άφεση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού με σκοπό την πήξη του Mowiol®.
- Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο/μικροσκόπιο φθορισμού.

Πειραματική πορεία (για ζωντανά κύτταρα)

- Προσθήκη χρωστικής μέσα στο medium σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml.
- Επώαση για 15 λεπτά στους 37°C σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού.
- Αναρρόφηση διαλύματος χρώσης με γυάλινη πιπέτα Pasteur.
- Πλύση με PBS εις διπλούν.
- Προσθήκη διαλύματος μεθανάλης ως μονιμοποιητικό μέσο και επώαση για 15 min στους 37°C.
- Πλύση των κυψελίδων με διάλυμα PBS.
- Τοποθέτηση 15 µl Mowiol® mounting medium πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Αναρρόφηση του PBS με μικροπιπέτα.
- Λήψη της καλυπτρίδας, αποστράγγιση σε διηθητικό χαρτί και τοποθέτηση πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Η πλευρά που φέρει τα κύτταρα να βρίσκεται πλήρως εμβαπτισμένη στο Mowiol®.
- Άφεση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού με σκοπό την πήξη του Mowiol®.
- Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο/μικροσκόπιο φθορισμού.

Χρώση μεμβρανικών δομών και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο

Υλικά και διαλύματα

- Διάλυμα CellMask™ Green Invitrogen™ 1.000X (C37608 Thermo Fisher Scientific, California, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- MOWIOL® 4-88 mounting medium (81381 Merck, Darmstadt, Germany)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες
- Αποστειρωμένη λαβίδα
- Διηθητικό χαρτί

Πειραματική πορεία

- Προσθήκη χρωστικής μέσα στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας σε αραιώση 1:1000.
- Επώαση για 30 min στους 37°C σε συνθήκες έλλειψης φωτός.
- Αναρρόφηση διαλύματος χρώσης με γυάλινη πιπέτα Pasteur.
- Πλύση των κυψελίδων με διάλυμα PBS εις διπλούν.

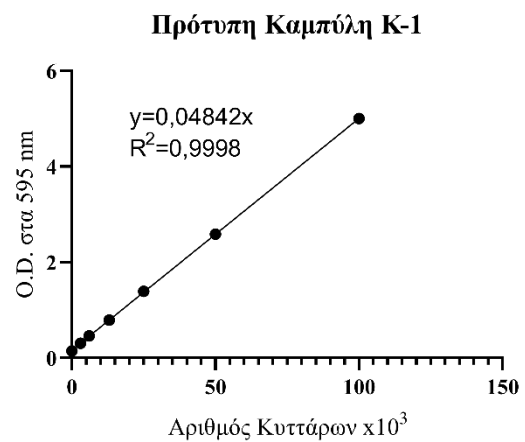
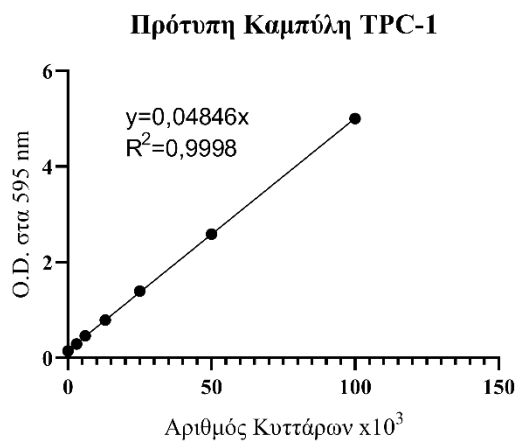
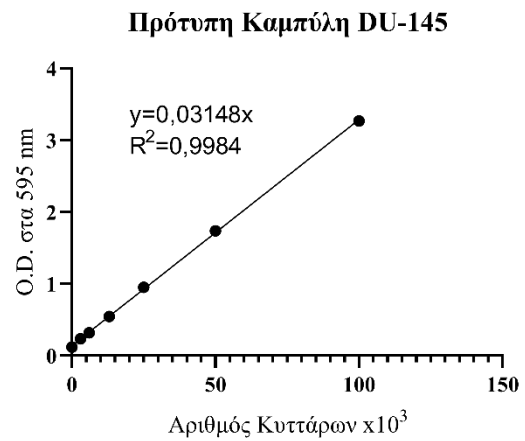
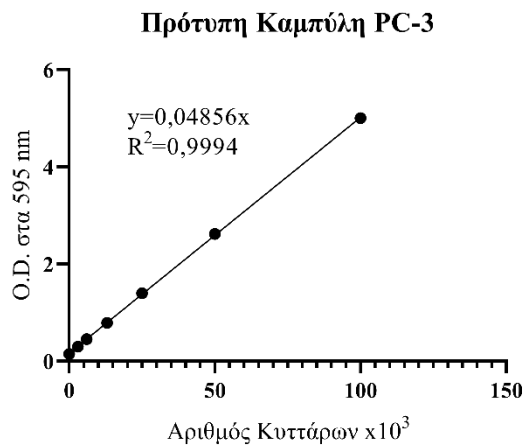
- Τοποθέτηση 15 μ l Mowiol® mounting medium πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Αναρρόφηση του PBS με μικροπιπέτα.
- Λήψη της καλυπτρίδας, αποστράγγιση σε διηθητικό χαρτί και τοποθέτηση πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Η πλευρά που φέρει τα κύτταρα να βρίσκεται πλήρως εμβαπτισμένη στο Mowiol®.
- Άμεση παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο/μικροσκόπιο φθορισμού.

Αποτελέσματα

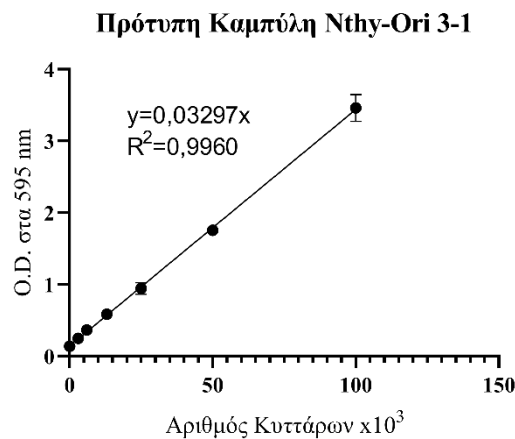
Υπολογισμός της IC_{50} - Μελέτη βιωσιμότητας/πολλαπλασιασμού

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης, γίνεται ο υπολογισμός της IC_{50} των αλάτων στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων των αλάτων, συγκεκριμένα αυτών που υπερέβαιναν τα 2,5 mg/ml είχαν ως αποτέλεσμα άμεση αποκόλληση των κυττάρων από το δάπεδο του τρυβλίου. Δεδομένης της σαπωνοειδούς φύσεως των FALS, η παρατηρούμενη -άμεση- αποκόλληση, αποδόθηκε στην επιφανειοδραστική τους δραστηριότητα έναντι της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων. Επομένως, προκειμένου να εκδηλωθεί οποιαδήποτε βιολογική δράση, θα έπρεπε να αξιοποιηθούν συγκεντρώσεις της ουσίας που δε θα διατάρασσαν σε σημαντικό βαθμό τις μεμβρανικές δομές του κυττάρου προκαλώντας το σχηματισμό οπών και την συνεπακόλουθη άμεση νέκρωση.

Με σκοπό να υπολογιστεί η IC_{50} , στα μικροπλακίδια καλλιεργήθηκαν ίσοι αριθμοί κυττάρων και επωάστηκαν για 48 ώρες με διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις των αλάτων (Εικόνα 25, 26). Τα προσκολλημένα κύτταρα μετρήθηκαν έπειτα από 48 ώρες με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους και η τιμή οπτικής πυκνότητας που προέκυψε ένεκα της φασματοφωτομετρικής φύσεως της μεθόδου, αντιστοιχίστηκε με αριθμό κυττάρων, κάνοντας χρήση πρότυπων καμπύλων (Εικόνα 23,24). Ο προσδιορισμός της IC_{50} γίνεται υπολογιστικά με το λογισμικό GraphPad Prism 8®.



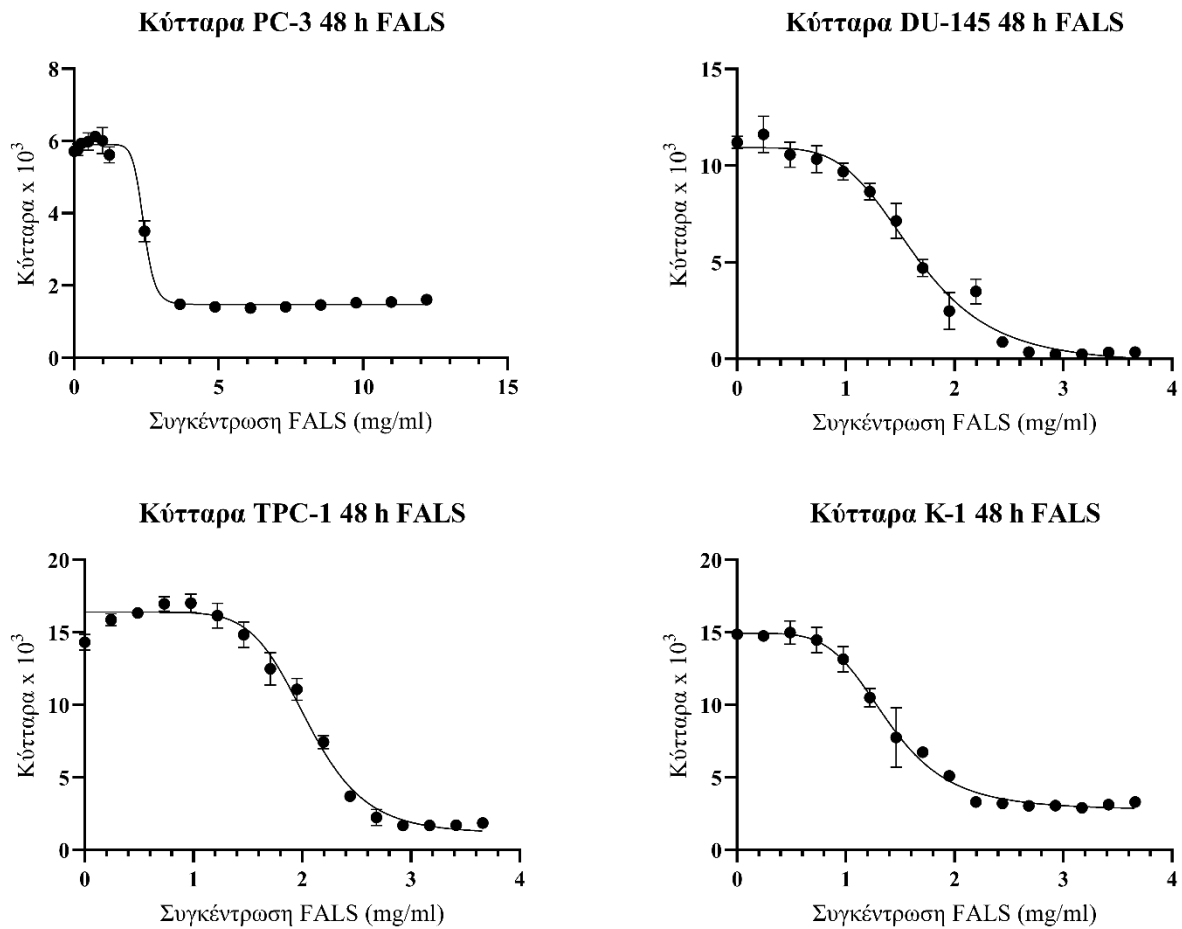
Εικόνα 23 Οι πρότυπες καμπύλες των καρκινικών κυτταρικών σειρών (PC-3, DU-145, TPC-1, K-1).



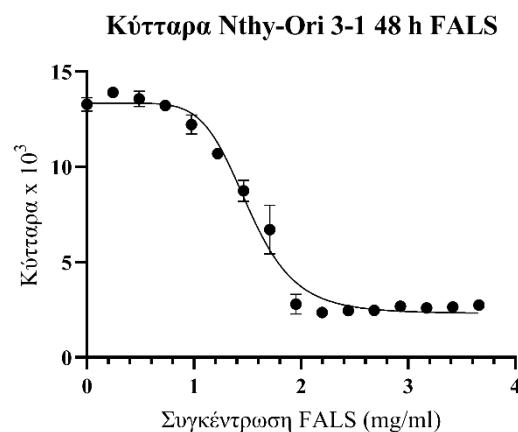
Εικόνα 24 Πρότυπη καμπύλη της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς Nthy-Ori 3-1.

Ο προσδιορισμός των IC_{50} και η πιθανή διαφορά ανάμεσα σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα θα υποστήριζε την ύπαρξη θεραπευτικού «παραθύρου» υποδεικνύοντας παράλληλα έναν πιο ειδικό τρόπο δράσης. Η 48-ωρη επώαση με μία υποψήφια κυτταροτοξική ουσία σε μία

ασυγχρόνιστη καλλιέργεια θα δώσει αποτελέσματα που θα αφορούν στη συνισταμένη δράσης των ουσιών πάνω στη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό.

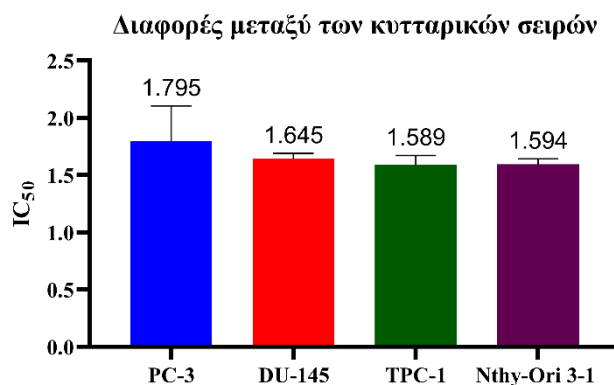


Εικόνα 25 Καμπύλες βιωσιμότητας-πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυτταρικών σειρών (PC-3, DU-145, TPC-1, K-1).



Εικόνα 26 Καμπύλη βιωσιμότητας-πολλαπλασιασμού των κυττάρων Nthy-Ori 3-1.

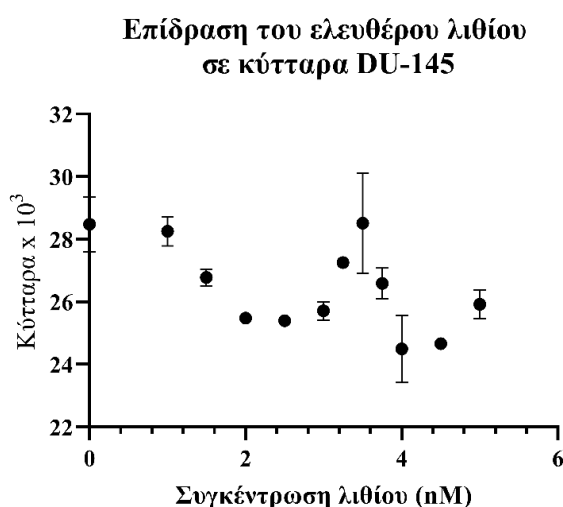
Οι IC₅₀ των κυτταρικών σειρών που ελέγχθηκαν δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 27). Η μέση IC₅₀ των κυτταρικών σειρών προσδιορίστηκε στα 1,66±0,1 mg/ml και αυτή η τιμή χρησιμοποιήθηκε για την τέλεση των πειραμάτων που περιείχαν επώαση με FALS σε βάθος 48 h. Η ομοιομορφία στην απόκριση των κυττάρων καταδεικνύει έναν γενικό κυτταροτοξικό μηχανισμό δράσης παρά αυξημένη ευαισθησία των καρκινικών ή φυσιολογικών κυττάρων ένεκα υποκείμενων μοριακών μηχανισμών.



Εικόνα 27 Σύγκριση των IC₅₀ μεταξύ των κυτταρικών σειρών.

Υπολογισμός της δράσης του ελευθέρου λιθίου

Ανεξάρτητα από την δράση των FALS ως υποψήφιοι κυτταροτοξικοί παράγοντες, έγινε μία προσπάθεια να αξιολογηθεί η δράση του ελευθέρου λιθίου που θα μπορούσε να περιέχεται στο εκχύλισμα ένεκα σαπωνοποίησης με LiOH. Ένα εύρος συγκεντρώσεων που αναλογούσε στην χαμηλότερη απόδοση σαπωνοποίησης εφαρμόστηκε στα κύτταρα για 48 ώρες και στη συνέχεια ακολουθήθηκε μονιμοποίηση και χρώση με το κρυσταλλικό ιώδες (Εικόνα 28).



Εικόνα 28 Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων DU-145 στις συγκεντρώσεις λιθίου που επικρατούν στην καλλιέργεια.

Δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση του λιθίου, τόσο στη βιωσιμότητα όσο και στον πολλαπλασιασμό, κάτι αναμενόμενο φυσικά εφόσον η ποσότητα λιθίου ανήκε στην τάξη των nmols. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, το λίθιο έχει βρεθεί να αλληλοεπιδρά με τις αντλίες νατρίου και άλλων ιόντων και να μεταβάλλει έτσι τις αποκρίσεις τους σε διάφορα σήματα. (Bojja et al. 2022)

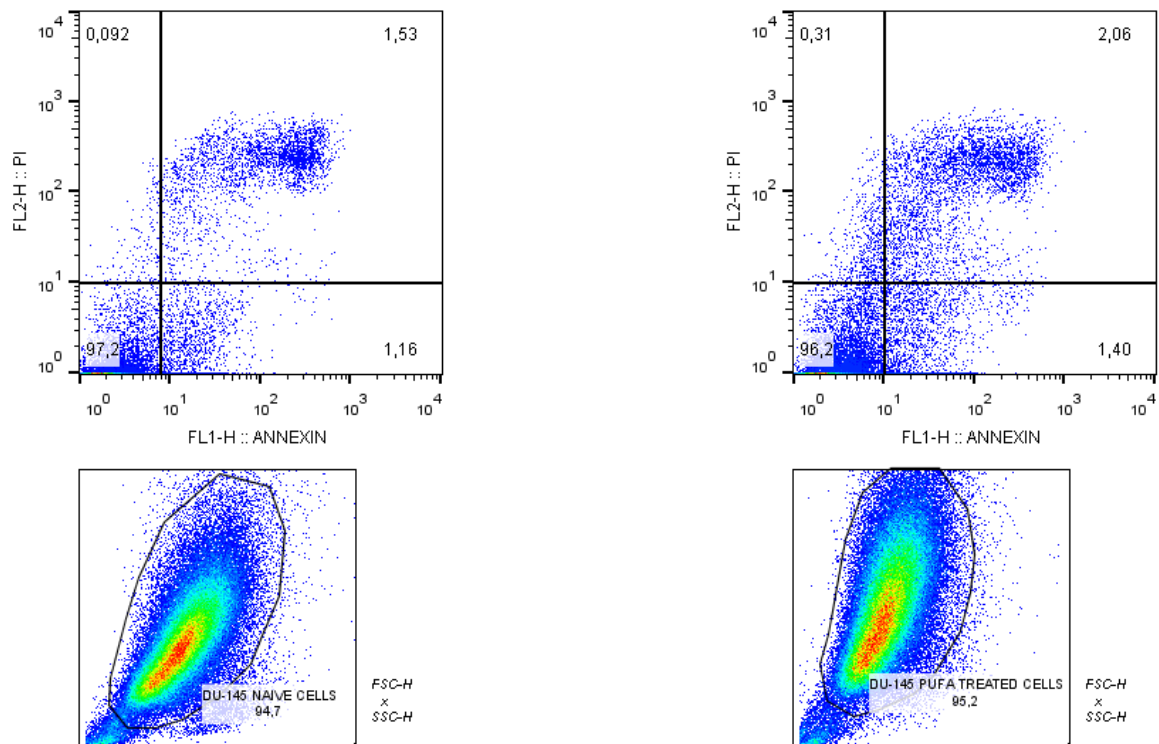
Συνεχής καλλιέργεια κυττάρων σε θεραπευτικό μέσο πλούσιο σε FALS

Με σκοπό την διερεύνηση πιθανών μακροπρόθεσμων επιδράσεων των αλάτων στη βιωσιμότητα, μορφολογία ή/και λειτουργία των κυττάρων, κλώνοι των κυτταρικών σειρών DU-145 και PC-3 καλλιεργήθηκαν παρουσία μέτριας συγκέντρωσης FALS (1,5-1,8 mg/ml) για χρονικό διάστημα 2 μηνών. Κατά τη διάρκεια αυτού του διαστήματος, το θεραπευτικό των κυττάρων ανανεώνονταν κάθε 2-3 ημέρες και FALS προστίθονταν ώστε να εξασφαλιστεί η αφθονία τους. Η συγκέντρωση που εφαρμόστηκε καθ' όλο αυτό το διάστημα ήταν παραπλήσια της IC₅₀, η οποία εξασφάλιζε τη μέγιστη ανεκτή δόση σε ένα τρυβλίο καλλιέργειας και οι κυτταρικοί κλώνοι που καλλιεργούνταν παρουσία των αλάτων ονομάστηκαν fattened ή παχυμένοι .

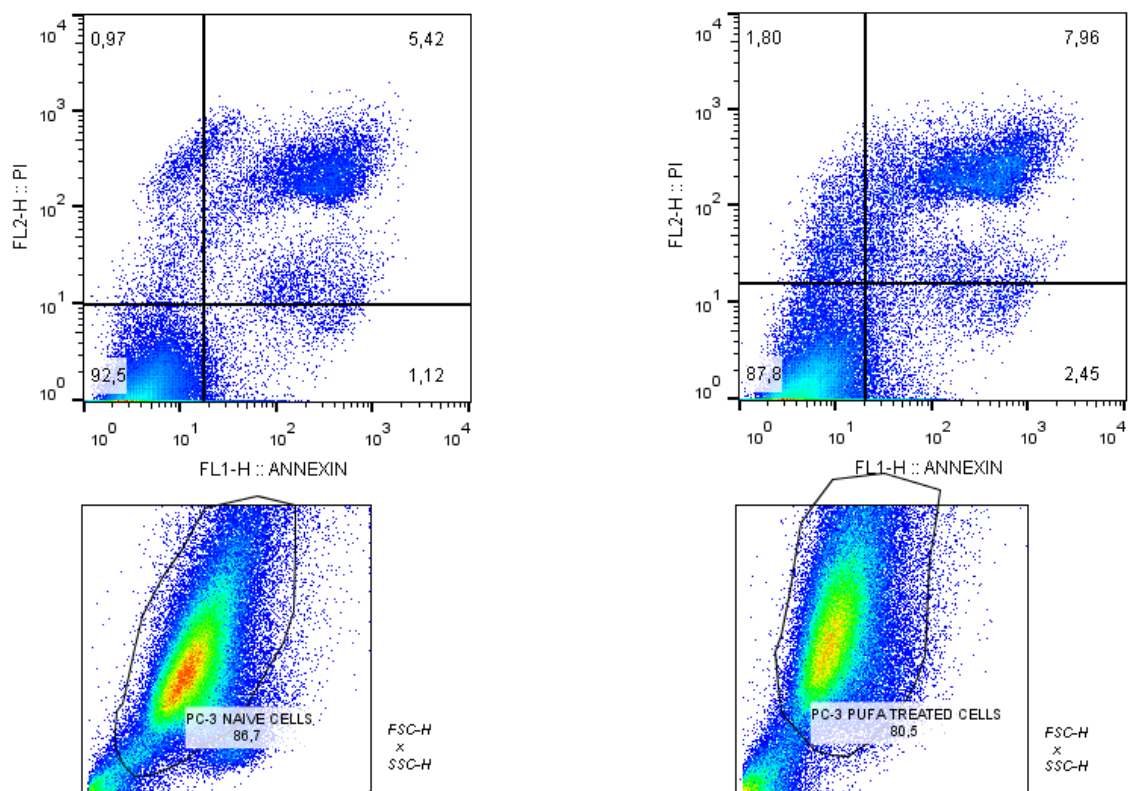
Μελέτη της αποπτωτικής δραστηριότητας

Στη συνέχεια, στο πλαίσιο της μελέτης της επίδρασης των FALS στη βιωσιμότητα των κυττάρων, προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής η αποπτωτική τους κατάσταση. Η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων των αλάτων είχε βρεθεί να προκαλεί άμεση αποκόλληση και θάνατο των κυττάρων. Επομένως, η κινητοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος, αναμενόταν να οδηγήσει σε ένα εύρος 24 h σε αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα που θα ήταν άμεσα μετρήσιμη με τη χρήση της αννεξίνης προσδιορισμένη κυτταρομετρικά.

Σε πρώτη φάση ελέγχθηκε η επίδραση στην απόπτωση στις κυτταρικές σειρές DU-145 (Εικόνα 29) και PC-3 (Εικόνα 30) τόσο στη βασική κατάσταση των κυττάρων (απουσία FALS, 10% FBS) όσο και έπειτα από μία επώαση 24 h με μέτρια συγκέντρωση των αλάτων (1,5-1,8 mg/ml).



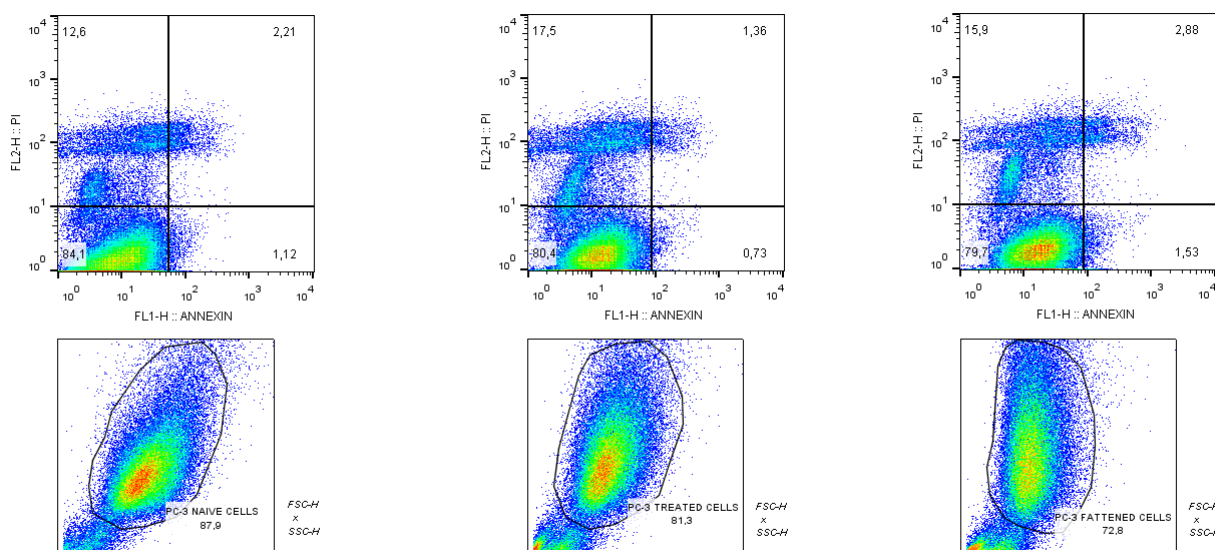
Εικόνα 29 Κυτταρομετρική ανάλυση της απόπτωσης με τους δείκτες Annexin V, PI στην κυτταρική σειρά DU-145. Στα αριστερά παρουσιάζονται τα κύτταρα της ομάδας control (DU-145 naive cells) και στα δεξιά οι επωασμένοι κλώνοι (DU-145 PUFA treated).



Εικόνα 30 Κυτταρομετρική ανάλυση της απόπτωσης με τους δείκτες Annexin V, PI στην κυτταρική σειρά PC-3. Στα αριστερά παρουσιάζονται τα κύτταρα της ομάδας control (PC-3 naive cells) και στα δεξιά οι επωασμένοι κλώνοι (PC-3 PUFA treated).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων δεν παρατηρήθηκαν σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές. Τα διπλά αρνητικά κύτταρα (Annexin V-FITC (-)/PI (-) αντιστοιχούν στον υποπληθυσμό των ζωντανών κυττάρων και αποτελούσαν ~90% του εκάστου δείγματος. Τα θετικά για Annexin V- FITC κύτταρα αφορούν στον υποπληθυσμό των κυττάρων σε πρόιμη απόπτωση και αποτελούσαν το 1-2%. Τα διπλά θετικά κύτταρα (Annexin V-FITC (+)/PI (+) βρίσκονταν σε προχωρημένη απόπτωση και αποτελούσαν το 1-2% στα κύτταρα DU-145 (Εικόνα 29) και το 5-8% στα PC-3 (Εικόνα 30). Δεδομένου ότι η κυτταρική σειρά PC-3 (και η ομάδα ελέγχου και τα παχυμένα κύτταρα) εμφάνισε υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης σε σχέση με τα DU-145 σε όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν, το αποτέλεσμα (άνοδος 3%) δεν αποδόθηκε στην χορήγηση των FALS αλλά στις συνθήκες καλλιέργειας και χειρισμών του κυτταρικού κλώνου.

Στην πορεία, ελέγχθηκε η αποπτωτική κατάσταση των παχυμένων κυττάρων. Οι παχυμένοι κλώνοι των DU-145 και PC-3 (Εικόνα 31) αντίστοιχα, συγκρίθηκαν με άθικτα DU-145 και PC-3 καθώς και με κύτταρα που επωάστηκαν για πρώτη φορά με FALS μέτριας συγκέντρωσης (1,8 mg/ml) για 24 h.



Εικόνα 31 Κυτταρομετρική ανάλυση της απόπτωσης με τους δείκτες Annexin V, PI στην κυτταρική σειρά PC-3. Στα αριστερά παρουσιάζονται τα κύτταρα της ομάδας control (DU-145 naive cells) στο κέντρο οι επωασμένοι κλώνοι (DU-145 PUFA treated) και στα δεξιά οι παχυμένοι κλώνοι (PC-3 fattened).

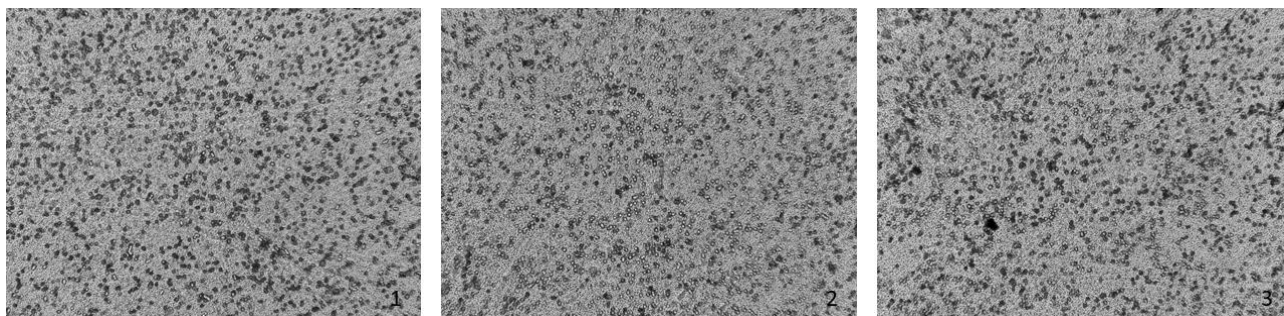
Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων στην κυτταρική σειρά PC-3 (Εικόνα 31) , ενώ παρόμοια εικόνα εμφάνισε και η κυτταρική σειρά DU-145. Η συγκέντρωση που χορηγήθηκε σε όλους τους τύπους τέτοιων πειραμάτων, χαρακτηρίζεται η μέγιστη ανεκτή, καθώς μεγαλύτερες δόσεις των αλάτων οδηγούσαν σε άμεση αποκόλληση (εντός των 6 πρώτων ωρών) και νεκρωτικό θάνατο παρά αποπτωτικό, όπως χαρακτηρίστηκε από τη άμεση χρώση με trypan blue που εμφάνιζαν τα αποκολληθέντα κύτταρα.

Μελέτη του χημειοτακτισμού

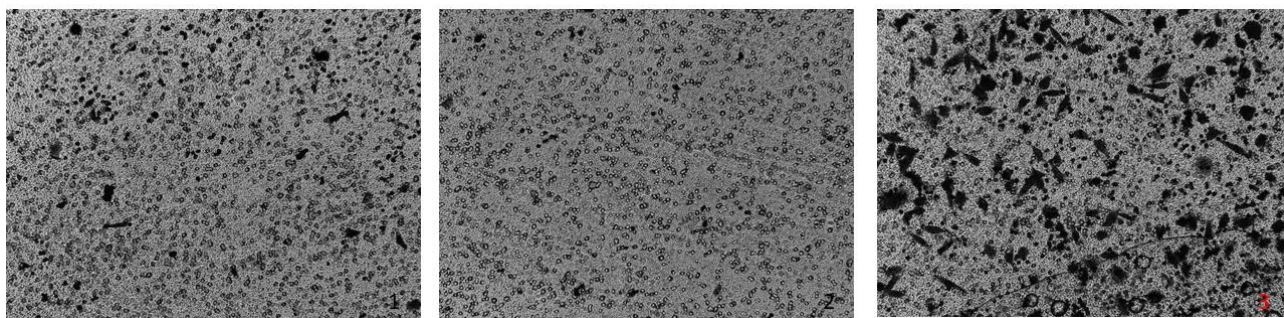
Με τη χρήση των Boyden chambers ελέγχθηκε πιθανή χημειοτακτική δράση των FALS. Οργανώθηκαν διάφοροι τύποι πειραμάτων, αποσκοπώντας στην αποσαφήνιση του ενδεχόμενου θετικού ή αρνητικού χημειοτακτισμού καθώς και στην ικανότητα κινητοποίησης των κυττάρων να εκδηλώσουν/αυξήσουν την μεταναστευτική τους δραστηριότητα ένεκα διέγερσης με FALS. Για αυτούς τους σκοπούς, επώαστηκαν κύτταρα για μεγάλο χρονικό διάστημα (~2 μήνες) με FALS στο θρεπτικό τους μέσο και στη συνέχεια μελετήθηκε πιθανή αλλαγή στην ικανότητα μετανάστευσης.

Ο χημειοτακτισμός στα κύτταρα control

Η επίδραση των FALS σε naïve κύτταρα αξιολογήθηκε με δύο τρόπους ή πειραματικές διατάξεις. Στην πρώτη διάταξη, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν εντός ενθεμάτων (Boyden Chambers) πορώδους δαπέδου με οπές 8 μm και επώαστηκαν για 24 h με σκέτο θρεπτικό μέσο παρουσία ή απουσία των αλάτων. Τα κύτταρα επώαστηκαν με μέτριες (1,5-2,0 mg/ml) (Εικόνες 32.2, 33.2) αλλά και με πιο χαμηλές συγκεντρώσεις (0,8-1,0 mg/ml) (Εικόνες 32.3, 33.3) των FALS στο εύρος συγκεντρώσεων που τα πειράματα πολλαπλασιασμού και βιωσιμότητας δεν έδειχναν κάποια στατιστικώς σημαντική κυτταροτοξική επίδραση. Στη μικροκυψελίδα είχε τοποθετηθεί πλήρες θρεπτικό μέσο το οποίο ένεκα των αυξητικών παραγόντων του ορού λειτουργεί ως χημειοελκυστικός παράγοντας (chemoattractant). Η παρουσία των αλάτων στο θρεπτικό μέσο θα μπορούσε να ενισχύει ή να καταστέλλει την μετανάστευση των κυττάρων, παράμετρος που ελέγχθηκε με τα πειράματα αυτά.



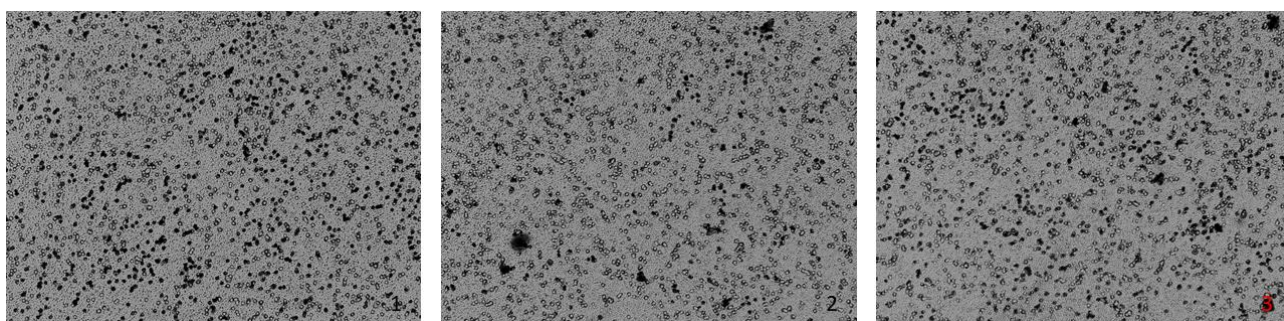
Εικόνα 32 Πειραματική διάταξη των Boyden Chambers σε κύτταρα DU-145. Στα αριστερά βρίσκεται η κυψελίδα ελέγχου όπου το πάνω διαμέρισμα έχει θρεπτικό μέσο χωρίς ορό και το κάτω έχει FBS 10%. Στην κεντρική εικόνα, το πάνω διαμέρισμα έχει 1,8 mg/ml FALS σε σκέτο θρεπτικό μέσο και το κάτω έχει FBS 10%. Στα δεξιά, το πάνω διαμέρισμα έχει 0,9 mg/ml FALS σε σκέτο θρεπτικό μέσο και το κάτω FBS 10%.



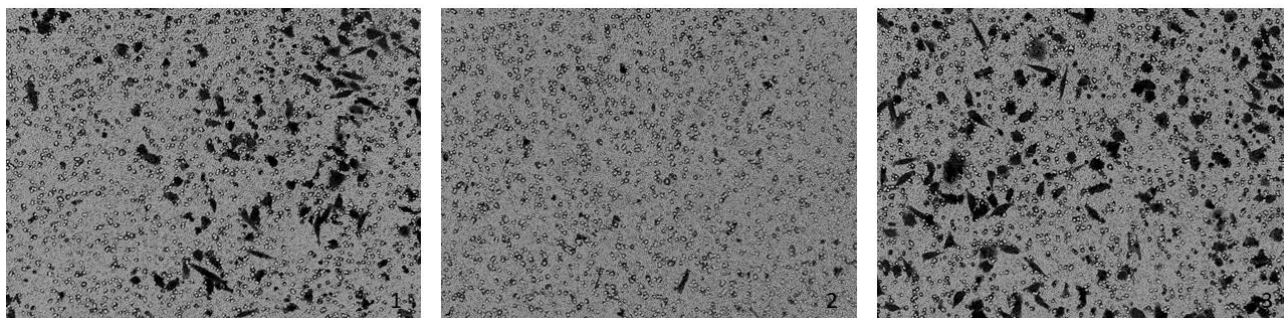
Εικόνα 33 Πειραματική διάταξη των Boyden Chambers σε κύτταρα PC-3. Στα αριστερά βρίσκεται η κυψελίδα ελέγχου όπου το πάνω διαμέρισμα έχει θρεπτικό μέσο χωρίς ορό και το κάτω έχει FBS 10%. Στην κεντρική εικόνα, το πάνω διαμέρισμα έχει 1,8 mg/ml FALS σε σκέτο θρεπτικό μέσο και το κάτω έχει FBS 10%. Στα δεξιά, το πάνω διαμέρισμα έχει 0,9 mg/ml FALS σε σκέτο θρεπτικό μέσο και το κάτω FBS 10%.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (~1,0 mg/ml) (Εικόνες 32.3, 33.3) τα FALS έδειξαν να ενισχύουν την τάση των κυττάρων να διαπεράσουν το πορώδες φίλτρο τόσο στην καρκινική σειρά PC-3 (Εικόνα 33) όσο και στα κύτταρα DU-145 (Εικόνα 32). Η χρήση υψηλότερων συγκεντρώσεων έδειξε ανασταλτική δράση (~1,5-2,0 mg/ml), φαινόμενο που ήταν σε απόλυτη συμφωνία με τη αρνητική επίδραση τους στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα σε ανάλογες ποσότητες.

Στη δεύτερη διάταξη, εντός των ενθεμάτων υπήρχε μόνο απλό (χωρίς FBS) θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα. Τα FALS προστέθηκαν στο κάτω διαμέρισμα και με αυτόν τον τρόπο ελέγχθηκε η δράση των ίδιων των αλάτων ως χημειοελκυστικοί παράγοντες.



Εικόνα 34 Πειραματική διάταξη των Boyden Chambers σε κύτταρα DU-145. Στα αριστερά βρίσκεται η κυψελίδα ελέγχου όπου το πάνω διαμέρισμα έχει θρεπτικό μέσο χωρίς ορό και το κάτω έχει FBS 10%. Στην κεντρική εικόνα, το κάτω διαμέρισμα έχει 1,8 mg/ml FALS σε πλήρες θρεπτικό μέσο και το πάνω έχει σκέτο θρεπτικό μέσο. Στα δεξιά, το κάτω διαμέρισμα έχει 0,9 mg/ml FALS σε πλήρες θρεπτικό μέσο και το πάνω σκέτο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 35 Πειραματική διάταξη των Boyden Chambers σε κύτταρα DU-145. Στα αριστερά βρίσκεται η κυψελίδα ελέγχου όπου το πάνω διαμέρισμα έχει θρεπτικό μέσο χωρίς ορό και το κάτω έχει FBS 10%. Στην κεντρική εικόνα, το κάτω διαμέρισμα

έχει 1,8 mg/ml FALS σε πλήρες θρεπτικό μέσο και το πάνω έχει σκέτο θρεπτικό μέσο. Στα δεξιά, το κάτω διαμέρισμα έχει 0,9 mg/ml FALS σε πλήρες θρεπτικό μέσο και το πάνω σκέτο θρεπτικό μέσο.

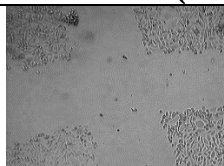
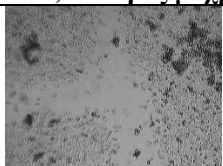
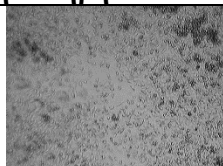
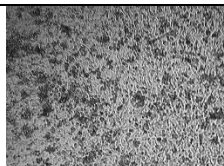
Η παρουσία των αλάτων σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Εικόνες 34.2, 35.2) έδειξε να ενισχύει ελαφρώς την μετανάστευση δρώντας ως θρεπτικό στοιχείο ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις είχε ανασταλτικό αποτέλεσμα (Εικόνες 34.3, 35.3). Τα αποτελέσματα παρουσίασαν ομοιομορφία μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών.

Ο χημειοτακτισμός στα παχυμένα κύτταρα

Παράλληλα, αξιολογήθηκε πιθανή επίδραση των αλάτων στη μεταναστευτική ικανότητα των παχυμένων κυττάρων. Η εφαρμογή των δύο διατάξεων εφαρμόστηκε και εδώ και η συγκέντρωση αλάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή στην οποία καλλιεργούνταν επί μονίμου βάσεως τα παχυμένα κύτταρα. Μεταξύ των 2 ομάδων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις σε καμία από τις 2 ελεγχθείσες κυτταρικές σειρές με την εικόνα να είναι όμοια με αυτή των επωασμένων κυττάρων για 24 h. Υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούσαν αναστολή ενώ χαμηλές και μέτριες συγκεντρώσεις είχαν παρόμοια ή ελαφρώς ενισχυτική επίδραση με αυτή του ορού.

Μελέτη της ικανότητας επούλωσης πληγών

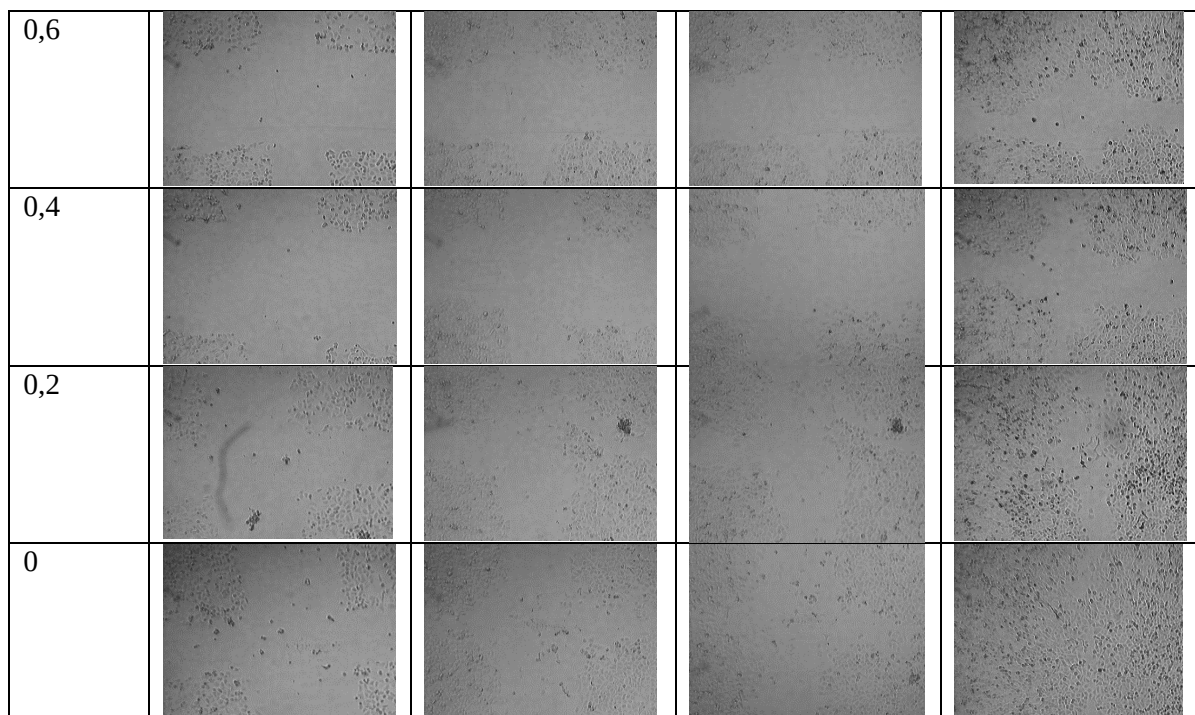
Στη πορεία ελέγχθηκε παρουσία των αλάτων, η ικανότητα των κυττάρων να διαιρούνται και να μεταναστεύουν επουλώνοντας πληγές. Η προσομοίωση της επουλωτικής δραστηριότητας γίνεται με τη μέθοδο wound healing, η οποία βασίζεται στη απόξεση κυττάρων από πλήρη μονοστιβάδα (monolayer) και επώαση με την προς διερεύνηση ουσία. Τα πειράματα διενεργήθηκαν σε ένα χρονικό πλαίσιο 72 ωρών ενώ πέρα από το εύρος συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν, αξιολογήθηκε και η δράση του ορού. Σε δοκιμές απουσία ορού ή σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (1-2,5%) τα κύτταρα (παρουσία και απουσία των FALS) δεν κάλυψαν τις σχηματισθείσες πληγές. Εν τέλει η διάταξη βελτιστοποιήθηκε σε ποσοστό 10% και έγινε λήψη φωτογραφιών τόσο κατά τις πρώτες ώρες ώστε να μελετηθεί αμιγώς το φαινόμενο της μετανάστευσης όσο και σε πιο αραιά χρονικά σημεία για μία συνδυαστική μελέτη μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού στις παρυφές του τραύματος.

[FALS] (mg/ml)	0 h	12 h	24 h	48 h
PC3 (FBS 10 %, 48 ώρες μέχρι την πλήρη επούλωση)				
2,0				

1,5				
1,0				
0,8				
0,4				
0				

Εικόνα 36 Προσομοίωση της ικανότητας επούλωσης πληγών στην κυτταρική σειρά PC-3.

[FALS] (mg/ml)	0 h	12 h	24 h	48 h
DU-145 (FBS 10 %, 48 ώρες μέχρι την πλήρη επούλωση)				
2,0				
1,5				
1,0				
0,8				

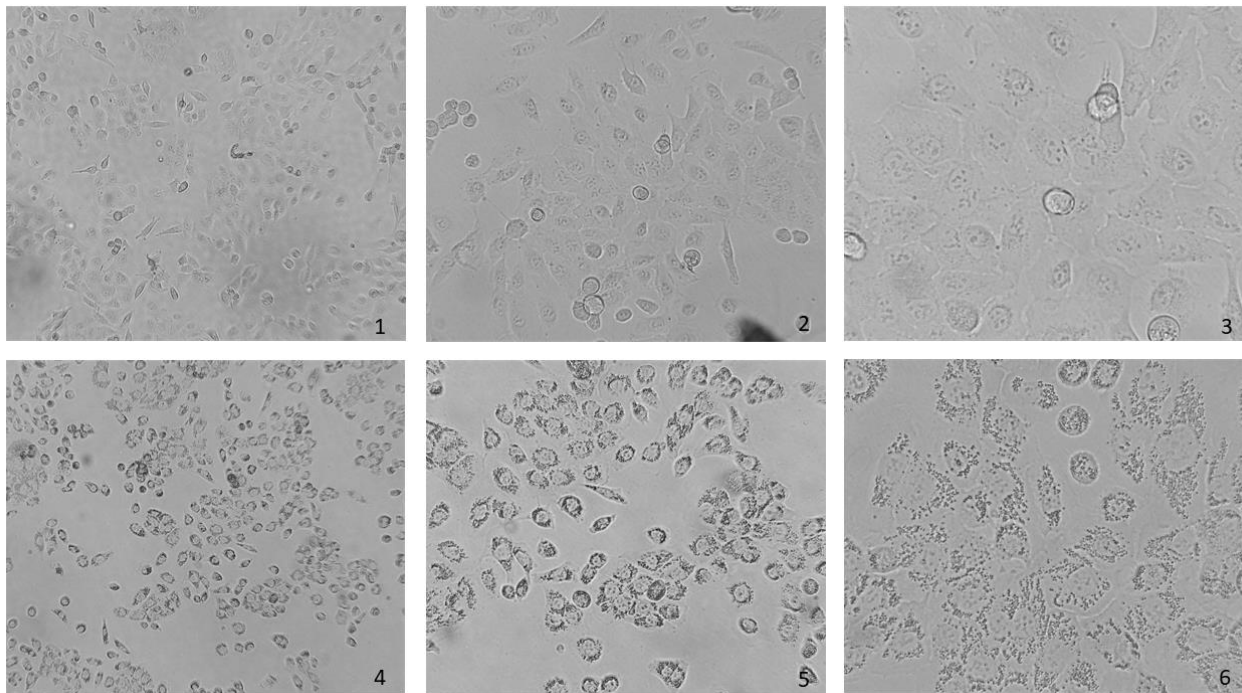


Εικόνα 37 Προσομοίωση της ικανότητας επούλωσης πληγών στην κυτταρική σειρά DU-145.

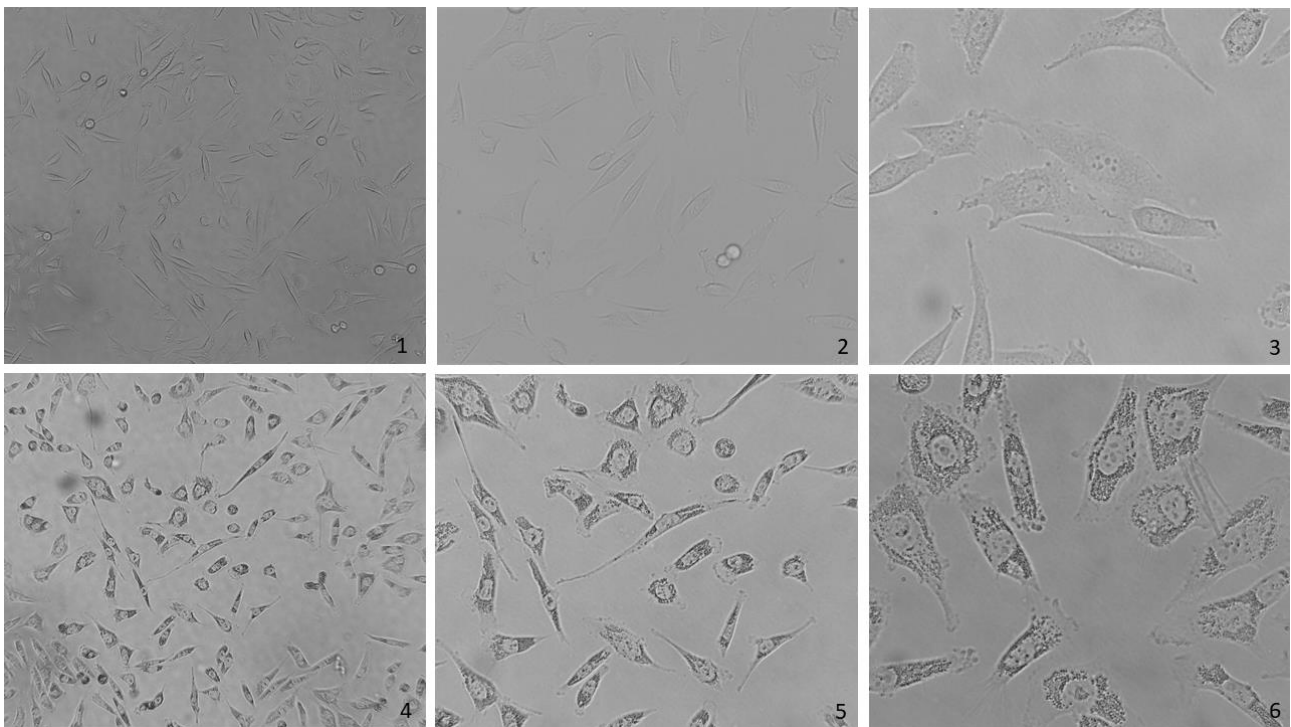
Αυτό που παρατηρήθηκε τόσο στη φυσιολογική σειρά Nthy-Ori 3-1 όσο και στις καρκινικές TPC-1, K1, DU-145 (Εικόνα 37) και PC-3 (Εικόνα 36), ήταν μία δόσοεξαρτώμενη επίδραση των FALS στην επουλωτική ικανότητα των κυττάρων. Διαφορές μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων, δεν παρατηρήθηκαν και η επίδραση των αλάτων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις φάνηκε να είναι επιτρεπτική της μετανάστευσης όπως ένα απλό θρεπτικό στοιχείο.

Μορφολογικές διαφορές κυττάρων επωασμένων με FALS

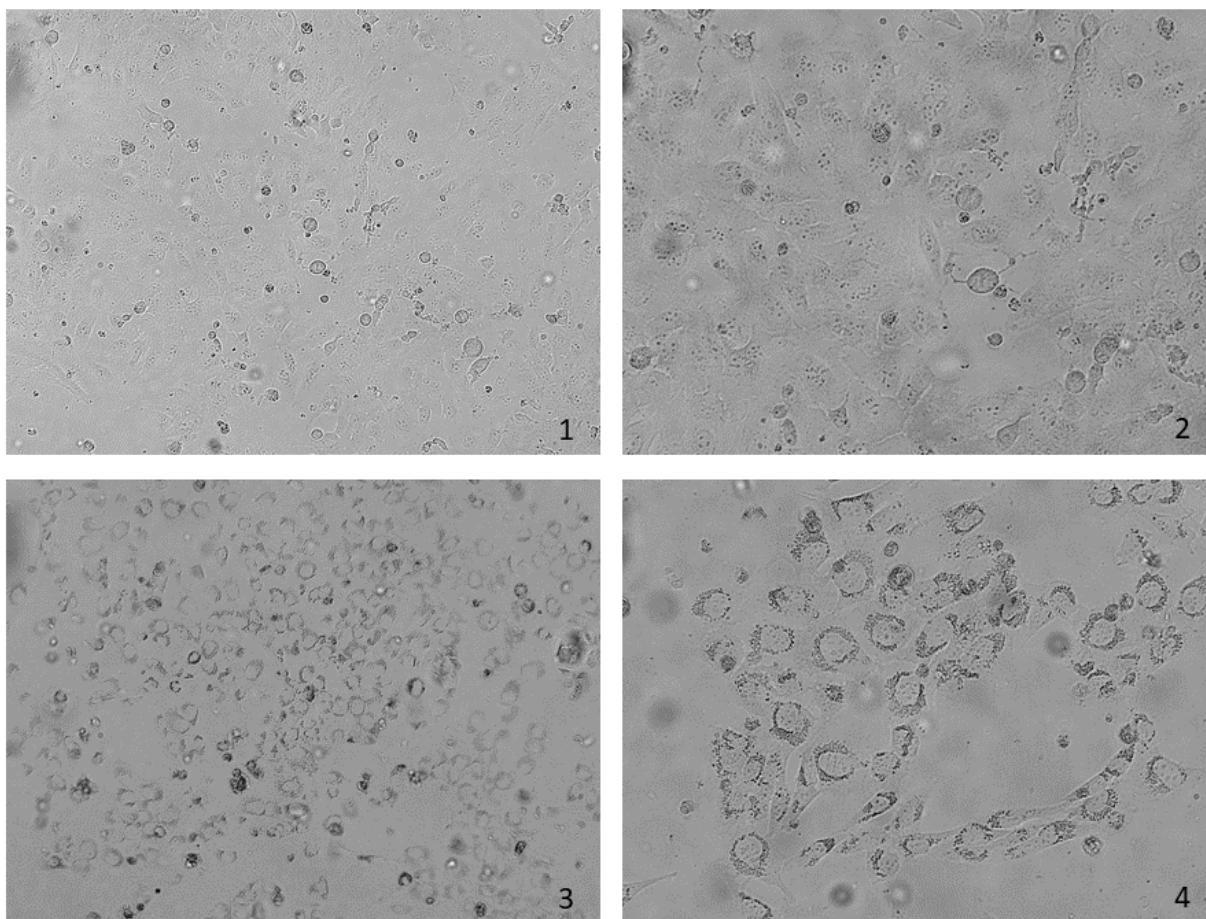
Η αθρόα χορήγηση PUFAs υπό τη μορφή αλάτων λιθίου σε μέτριες προς υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε -πρωτίστως στο φωτονικό μικροσκόπιο- ότι μεταβάλλει τη μορφολογία των επωασμένων κυττάρων.



Εικόνα 38 Τα κύτταρα DU-145 σε φωτονικό μικροσκόπιο. Οι εικόνες 1-3 αφορούν σε παίνε κύτταρα, ενώ οι εικόνες 4-6 σε κύτταρα επωασμένα με FALS για 24 h. Εικόνες 1,4 μεγέθυνση x100, εικόνες 2,5 μεγέθυνση x200, εικόνες 3,6 μεγέθυνση x400.

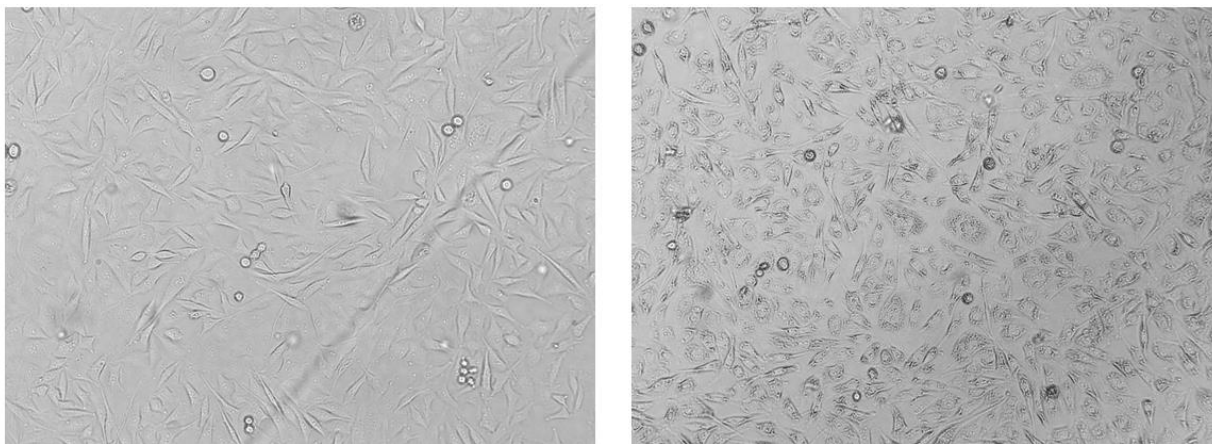


Εικόνα 39 Τα κύτταρα PC-3 σε φωτονικό μικροσκόπιο. Οι εικόνες 1-3 αφορούν σε παίνε κύτταρα, ενώ οι εικόνες 4-6 σε κύτταρα επωασμένα με FALS για 24 h. Εικόνες 1,4 μεγέθυνση x100, εικόνες 2,5 μεγέθυνση x200, εικόνες 3,6 μεγέθυνση x400.



Εικόνα 40 Τα κύτταρα Nthy-Ori 3-1 σε φωτονικό μικροσκόπιο. Οι εικόνες 1, 2 αφορούν σε παύε κύτταρα, ενώ οι εικόνες 3, 4 σε κύτταρα επωασμένα με FALS για 24 h. Εικόνες 1,3 μεγέθυνση x100, εικόνες 2,4 μεγέθυνση x200.

Τα επωασμένα κύτταρα είχαν αυξημένο μέγεθος, και έντονη κοκκίωση τόσο στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU-145 (Εικόνα 38) και PC-3 (Εικόνα 39) όσο και στα κύτταρα Nthy-Ori 3-1 (Εικόνα 40). Οι κοκκιώδεις δομές αφορούσαν σε lipid droplets που ήταν σχηματισμένα εντός των κυττάρων ένεκα της απορρόφησης των λιπιδίων. Τα κυστίδια αυτά εξαφανίζονταν 48-72 ώρες μετά την άρση χορήγησης FALS και η μορφολογία τόσο των κυττάρων που είχαν επωαστεί για πρώτη φορά με FALS όσο και των πεπαχυμένων κυττάρων επανέρχονταν στην τυπική κατάσταση.

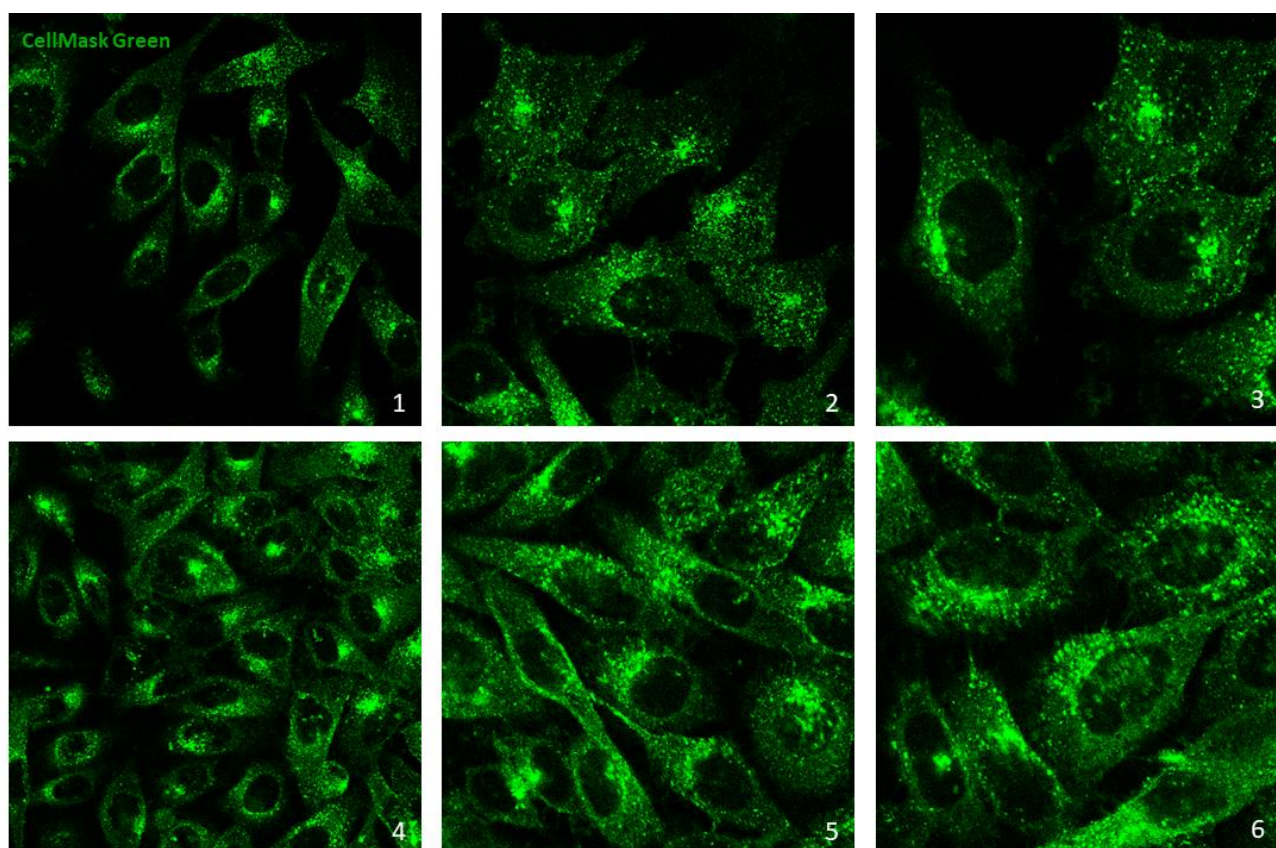


Εικόνα 41 Κύτταρα PC-3 (σε φωτονικό μικροσκόπιο) εν επώσει με χαμηλή συγκέντρωση των αλάτων για 24 h, μεγέθυνση x100.

Τα παχυμένα κύτταρα, ανάλογα με την εφαρμοσθείσα δόση εμφάνιζαν κυμαινόμενο βαθμό κοκκίωσης ενώ η παρατεταμένη καλλιέργεια παρουσία των αλάτων προκαλούσε την αύξηση του μεγέθους και της ποικιλομορφίας, μεγεθών που περιγράφονται καλύτερα με τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής.

Παρατήρηση της δομής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Με τη χρωστική CellMask™ Green (Thermo Fisher Scientific) έγινε χρώση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου προκειμένου να διαπιστωθούν πιθανές ορατές ανωμαλίες έπειτα από χορήγηση των FALS. Κύτταρα control (Εικόνα 42.1-3) αλλά και παχυμένα (Εικόνα 42.4-6) επώστηκαν με τη χρωστική και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8.



Εικόνα 42 Εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου από χρώση με CellMask™ σε κύτταρα PC-3. Στις εικόνες 1-3 φαίνονται τα κύτταρα control σε μεγέθυνση x630 και σε τιμές ψηφιακού zoom 1x, 1,5x και 2x.

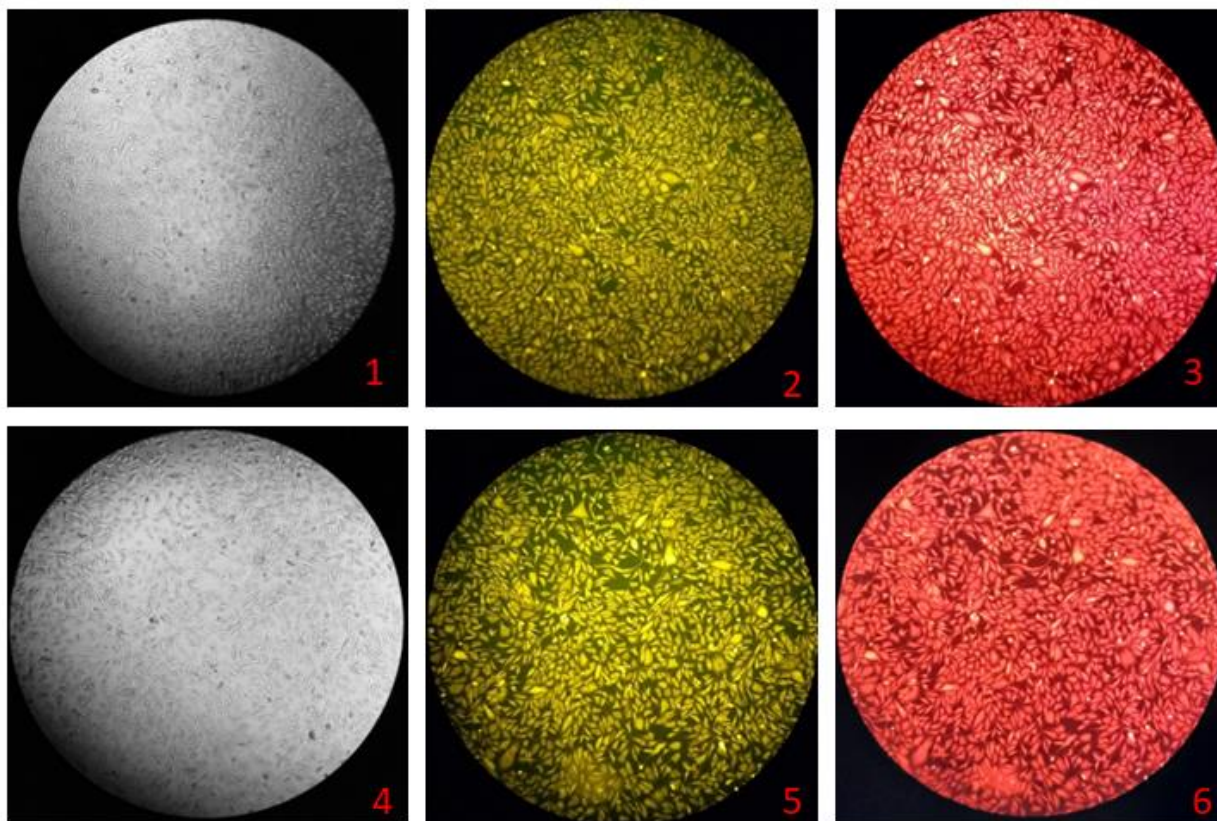
Δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στη μορφολογία τους με την παραπάνω μέθοδο, κάτι που ωστόσο θα μπορούσε να υπάρχει αλλά να μην ήταν ορατό στο εύρος διακριτότητας της εφαρμοσθείσας μεθόδου.

Οπτικοποίηση της συσσώρευσης λιπιδίων

Οι μορφολογικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στο φωτονικό μικροσκόπιο επαληθεύτηκαν ως σχηματισμός lipid droplets με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Η φθορίζουσα χρωστική Nile Red είναι μία ένωση που προσδένεται σε λιπόφιλες ενώσεις και φθορίζει έντονα στο πορτοκαλί χρώμα ή κόκκινο, ανάλογα με το μόριο πάνω στο οποίο έχει προσδεθεί. Τα ουδέτερα λίπη (τριγλυκερίδια και στερόλες) εμφανίζουν μέγιστη εκπομπή στα 565-590 nm ενώ σε μεγαλύτερα μήκη κύματος ~630 nm εντοπίζονται τα φωσφολιπίδια. Σε μικροσκόπιο φθορισμού και με χρήση του ανάλογου μονοχρωματικού φίλτρου (585 nm και 650 nm) έγινε μία πρώτη εκτίμηση της συσσώρευσης ενώ πιο ειδικά αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP8 που κατέστη δυνατή η λεπτομερής παρατήρηση των lipid droplets και των μεμβρανικών δομών. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική BODIPY™ 505/515 ως εναλλακτικός δείκτης των λιπιδίων καθώς έχει

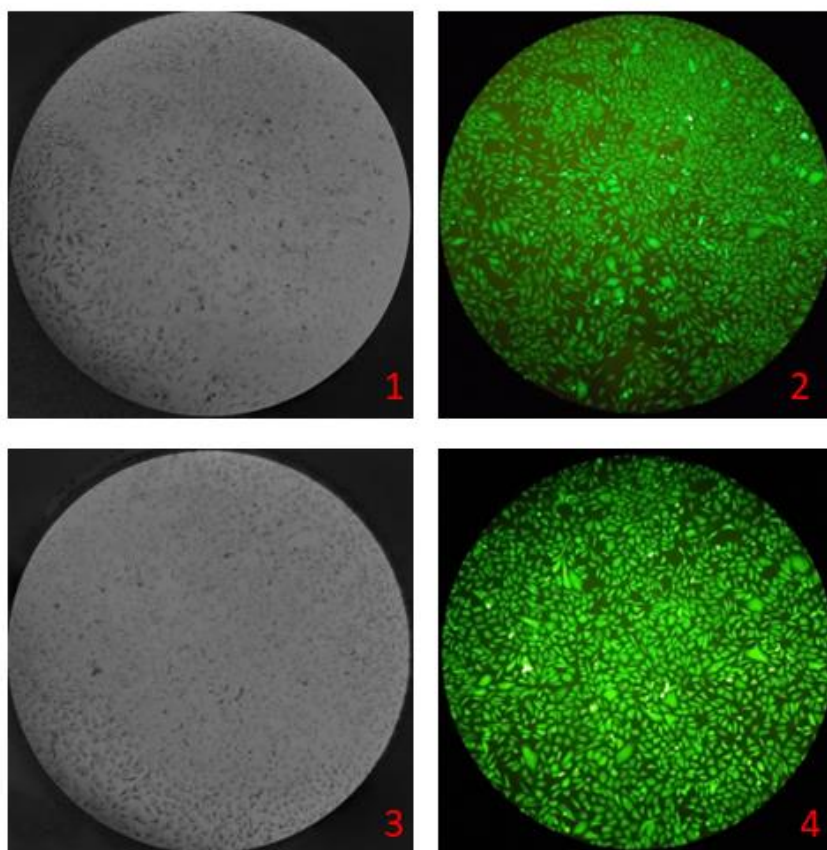
το πλεονέκτημα να προσδένεται ειδικά στις αλειφατικές αλυσίδες των λιπαρών οξέων αποφεύγοντας το ψευδώς θετικό σήμα που προκύπτει από την μη-ειδική πρόσδεση του Nile Red.

Μικροσκοπία φθορισμού



Εικόνα 43 Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού με χρώση με Nile Red σε κύτταρα PC-3. Οι εικόνες 1-3 παρουσιάζουν τα κύτταρα control και οι εικόνες 4-6 τα επωασμένα κύτταρα. Οι εικόνες 1,4 είναι από λήψη φωτεινού πεδίου, οι εικόνες 2,5 προέκυψαν με χρήση του φίλτρου 585 nm και οι εικόνες 3,6 με χρήση του φίλτρου 650 nm. Όλες οι φωτογραφίες είναι σε μεγέθυνση x100.

Οι εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού δείχνουν μία σαφή διαφορά στην ένταση του κίτρινου χρώματος (ουδέτερα λίπη και στερόλες)(Εικόνες 43.2, 43.5) ανάμεσα στα μη επεξεργασμένα κύτταρα (control) (πάνω σειρά) και στα επωασμένα (κάτω σειρά). Ο κόκκινος φθορισμός (φωσφολιπίδια) φαίνεται πιο έντονος στα κύτταρα μάρτυρες (Εικόνα 43.3) σε σχέση με τα επωασμένα (Εικόνα 43.6).

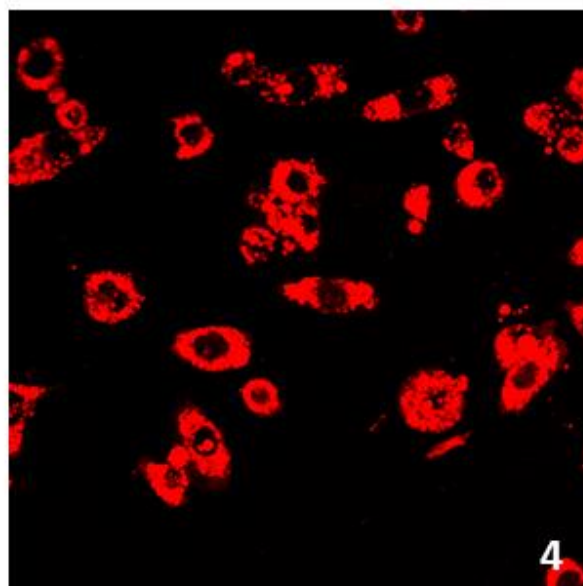
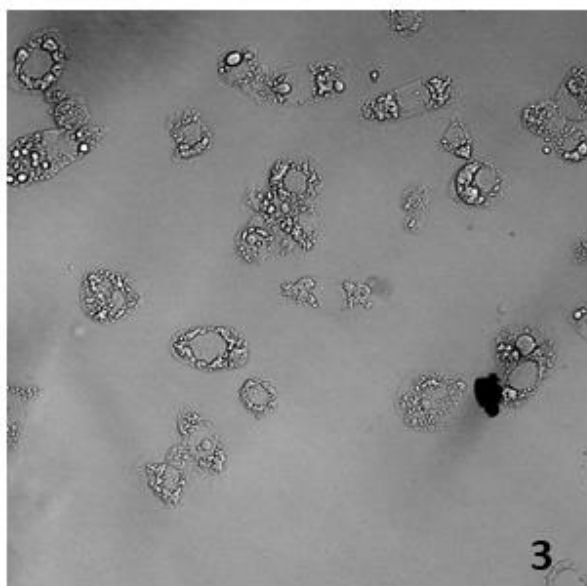
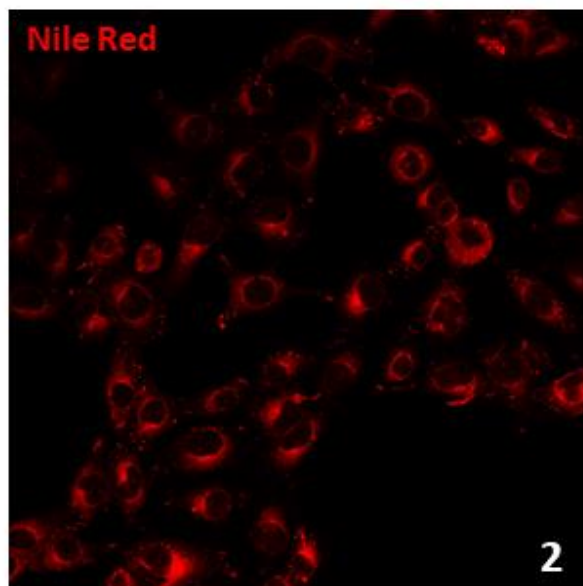
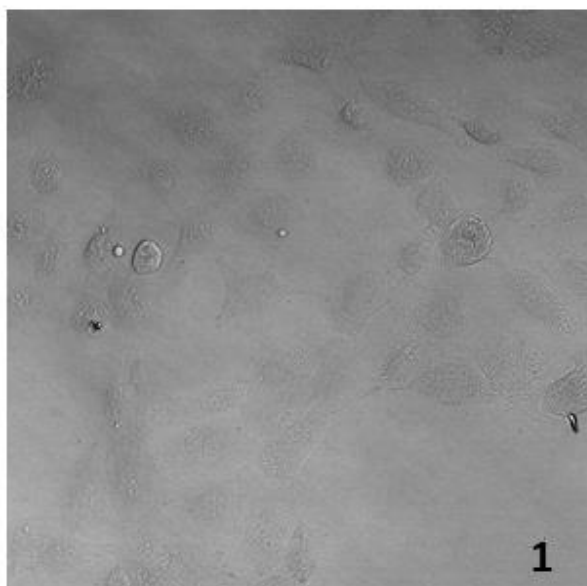


Εικόνα 44 Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού με χρώση με BODIPY™ 505/515 σε κύτταρα PC-3. Οι εικόνες 1,2 παρουσιάζουν τα κύτταρα control και οι εικόνες 3,4 τα επωασμένα κύτταρα. Οι εικόνες 1,3 είναι από λήψη φωτεινού πεδίου, οι εικόνες 2,4 προέκυψαν με χρήση του φίλτρου 515 nm. Όλες οι φωτογραφίες είναι σε μεγέθυνση x100.

Η διαφορά μεταξύ control (Εικόνα 44.2) και επωασμένων κυττάρων (Εικόνα 44.4) γίνεται εμφανής και με τη χρήση του BODIPY™ 505/515 με τα δείγματα επωασμένων PC-3 κυττάρων να έχουν εντονότερη χρώση από την άθικτη σειρά.

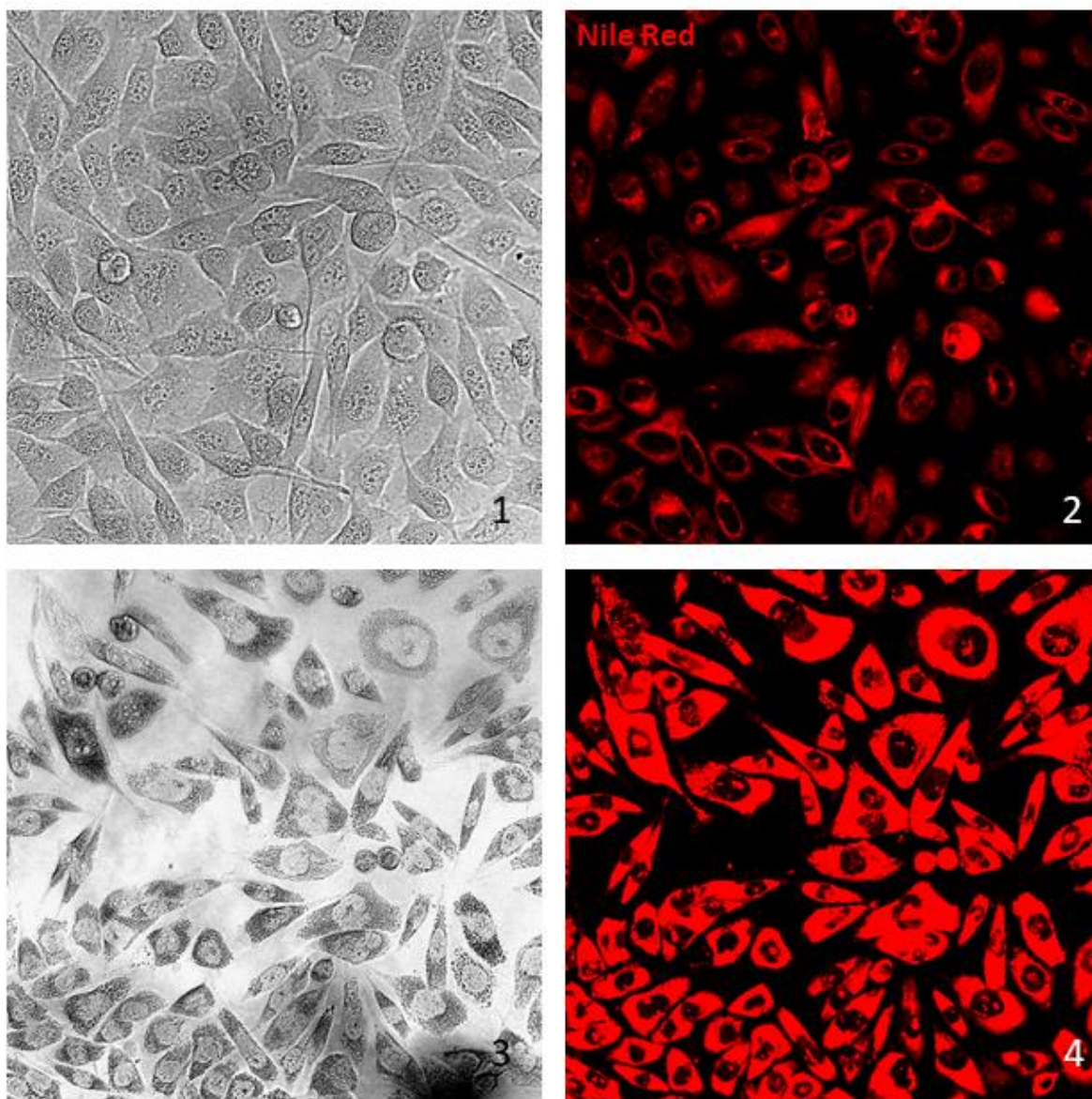
Συνεστιακή μικροσκοπία

Στη συνέχεια, με σκοπό την καλύτερη απεικόνιση των κυτταρικών δομών και την συλλογή ημιποσοτικών δεδομένων μεγαλύτερης ακρίβειας, προετοιμάστηκαν δείγματα για συνεστιακή μικροσκοπία με τη χρωστική Nile Red, τόσο στην κυτταρική σειρά PC-3 όσο και στα κύτταρα DU-145. Ακολουθούν φωτογραφίες τόσο φωτεινού όσο και σκοτεινού πεδίου και οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων είναι εμφανείς. Το σήμα από τις διαφορετικές αλληλουχίες διέγερσης/εκπομπής του συνεστιακού μικροσκοπίου, δεν το διαχωρίζουμε στις εικόνες που ακολουθούν και τα δεδομένα ποσοτικού χαρακτήρα παρουσιάζονται πιο έντονα με την κυτταρομετρία ροής.



Εικόνα 45 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας με χρώση με Nile Red σε κύτταρα DU-145. Οι εικόνες 1,2 παρουσιάζουν τα κύτταρα control και οι εικόνες 3,4 τα επωασμένα κύτταρα. Οι εικόνες 1,3 είναι από λήψη φωτεινού πεδίου, οι εικόνες 2,4 προέκυψαν με χρήση υβριδικού ανιχνευτή στα 585 nm. Όλες οι φωτογραφίες είναι σε μεγέθυνση x400.

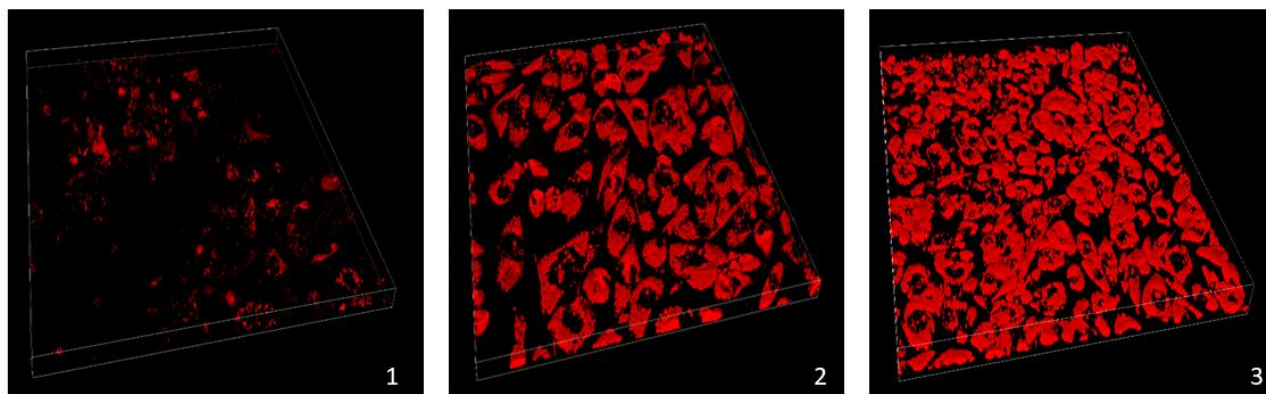
Η καρκινική κυτταρική σειρά DU-145 επώαστηκε για 24 h σε μέτρια συγκέντρωση FALS (1,8 mg/ml) και στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν με τον Nile Red, μονιμοποιήθηκαν και ελήφθησαν φωτογραφίες σε μεγέθυνση x400. Τα συσσωρευθέντα λιπίδια στις Εικόνες 45.3 και 45.4 είναι εμφανή καθώς και οι σφαιρικές δομές στις οποίες εντοπίζεται ο φθορισμός του Nile Red, στα lipid droplets.



Εικόνα 46 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας με χρώση με Nile Red σε κύτταρα PC-3. Οι εικόνες 1,2 παρουσιάζουν τα κύτταρα control και οι εικόνες 3,4 τα επωασμένα κύτταρα. Οι εικόνες 1,3 είναι από λήψη φωτεινού πεδίου, οι εικόνες 2,4 προέκυψαν με χρήση υβριδικού ανιχνευτή στα 585 nm. Όλες οι φωτογραφίες είναι σε μεγέθυνση x400.

Ανάλογη εικόνα παρουσίασε και η κυτταρική σειρά PC-3 (Εικόνα 46). Οι σφαιρικές δομές, ανήκουσες σε πολλά επίπεδα δίνουν μία πιο διάχυτη εικόνα φθορισμού στα επωασμένα κύτταρα ενώ οι διαφορές μεταξύ των ομάδων είναι πασιφανείς. Η ισχύς των φωτοδίοδων (laser) καθώς και οι ρυθμίσεις των ανιχνευτών είναι κοινές για τις δύο ομάδες επομένως η διαφορά στη φωτεινότητα οφείλεται εξ ολοκλήρου στην συσσώρευση αυτή καθαυτή και όχι σε προσαρμογή του οργάνου.

Στη συνέχεια, με σκοπό να απεικονιστεί καλύτερα η δομή των lipid droplets αλλά και ο συνολικός φθορισμός ανά κύτταρο, κατασκευάστηκαν τρισδιάστατες εικόνες των κυττάρων με λήψη και υπέρθεση φωτογραφιών ανά 500 nm στο συνεστιακό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση x400 (Εικόνα 47). Η ανακατασκευή της τρισδιάστατης δομής έγινε με το λογισμικό LAS® X της Leica®.



Εικόνα 47 Τρισδιάστατες εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας με χρώση με Nile Red σε κύτταρα DU-145. Η εικόνα 1 παρουσιάζει τα κύτταρα control, η εικόνα 2 τα επωασμένα κύτταρα και η εικόνα 3 τα παχυμένα κύτταρα. Οι φωτογραφίες για τη σύνθεση της τρισδιάστατης απεικόνισης, ελήφθησαν σε μεγέθυνση x400.

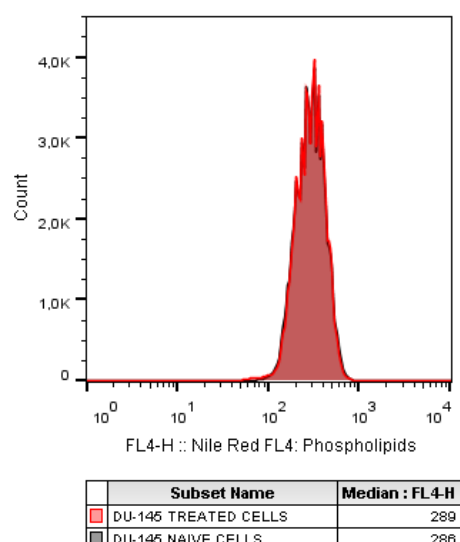
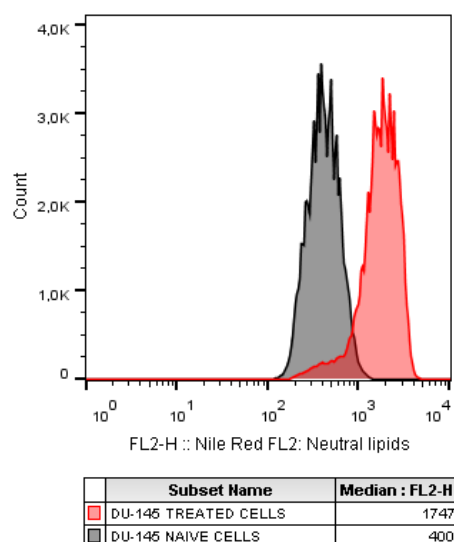
Ο πιο έντονος φθορισμός παρατηρήθηκε στη παχυμένη ομάδα κύτταρων PC-3 (Εικόνα 47.3) και όπως ήταν φυσικό η επωασμένη για 24 h ομάδα έπονταν αμέσως μετά (Εικόνα 47.2). Ο συνολικός φθορισμός των άθικτων PC-3 κυττάρων ήταν αρκετά χαμηλός (Εικόνα 47.1) και αντιστοιχούσε στην βασική συσσώρευση λιπιδίων ως αποθεματική πηγή άνθρακα των επιθηλιακών κυττάρων στο ενδοπλασματικό τους δίκτυο αλλά και στον φθορισμό των φωσφολιπιδίων των μεμβρανικών δομών.

Ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης λιπιδίων

Σε συνδυασμό με τα δεδομένα μικροσκοπίας, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μίας μεθόδου ποσοτικοποίησης της συσσώρευσης FALS στο εσωτερικό των κυττάρων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Ανάλογες ποσοτικοποιήσεις αποθεματικών λιπιδίων έχουν γίνει σε μικροοργανισμούς, τόσο σε προκαρυωτικά φύκη και βακτήρια όσο και σε μύκητες και ευκαρυωτικά φύκη. Ωστόσο, η χορήγηση FALS σε κύτταρα θηλαστικών είναι μία πρωτοπόρα ιδέα και ακριβείς τεχνικές μέτρησης δεν έχουν ακόμα αναπτυχθεί. Στην παρούσα εργασία αξιοποιείται η χρωστική Nile Red και ως επαλήθευση η χρωστική BODIPY™ 505/515. Το Nile Red μετριέται με τον κυτταρομετρητή ροής FACS Calibur™ της BD Biosciences™ και λαμβάνονται μετρήσεις σε 2 κανάλια. Το κανάλι 2 (FL2) ανιχνεύει φθορισμό οφειλόμενο σε ουδέτερα λίπη καθώς είναι ευαίσθητο στο κίτρινο-πορτοκαλί φως, ενώ το κανάλι 4 (FL4) ανιχνεύει κόκκινο φως και οι μετρήσεις του αντιστοιχίστηκαν στην παρουσία φωσφολιπιδίων.

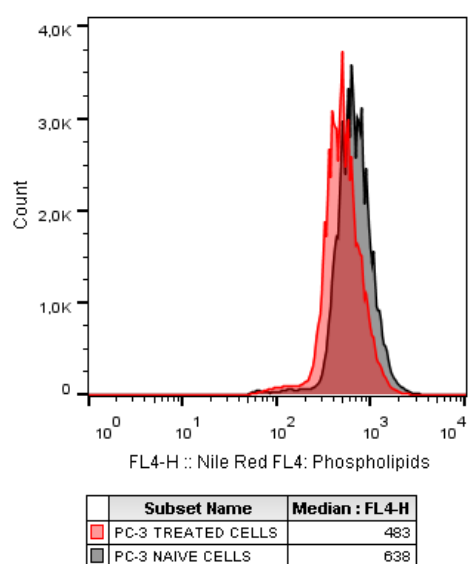
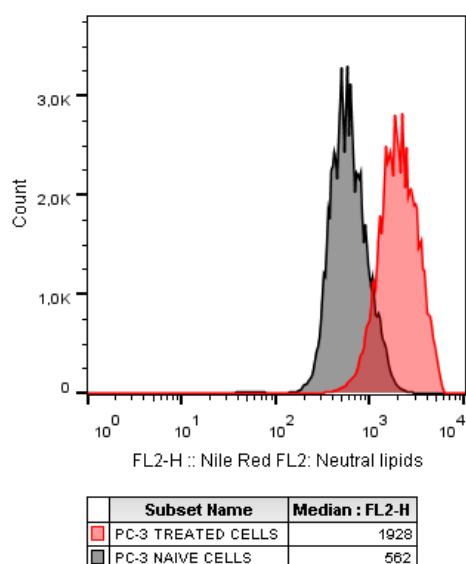
Συσσώρευση στα κύτταρα control

Οι μετρήσεις συσσώρευσης έγιναν στις κυτταρικές σειρές DU-145 και PC-3 από τις οποίες είχαν ετοιμαστεί 3 κλώνοι: α) κύτταρα στη βασική τους κατάσταση/ομάδα ελέγχου που ονομάζονται Naïve, β) κύτταρα που τους χορηγήθηκαν FALS συγκέντρωσης 1,8 mg/ml για 24 h και γ) παχυμένα κύτταρα που για 2 μήνες καλλιεργούνταν συνεχώς με 1,5-1,8 mg/ml FALS .



Εικόνα 48 Κυτταρομετρική ανάλυση της συσσώρευσης λιπιδίων με τη χρώση Nile Red σε κύτταρα DU-145. Το κανάλι FL2 αντιστοιχεί στο μήκος κύματος εκπομπής των ουδέτερων λιπιδίων ενώ το κανάλι FL4 στο μήκος κύματος εκπομπής των φωσφολιπιδίων.

Όπως προκύπτει και από τα ιστογράμματα (Εικόνα 48), τα επωασθέντα κύτταρα εμφάνισαν αυξημένο σήμα στο κανάλι 2 το οποίο αντιστοιχεί σε μήκος κύματος βιβλιογραφικά αντιστοιχισμένο στα ουδέτερα λίπη. Στο κανάλι 4, οι μέση τιμή φθορισμού ανά κύτταρο (MFI) προσδιορίστηκε να είναι εξαιρετικά παρόμοια μεταξύ DU-145 Naïve και επωασμένων κυττάρων στο πρώτο εικοσιτετράωρο, δείχνοντας ότι η λιπιδική σύσταση του κυττάρου μεταβάλλεται μόνο ως προς τα ουδέτερα, αποθεματικά λίπη και όχι ως προς την βιοσύνθεση μεμβρανικών δομών.

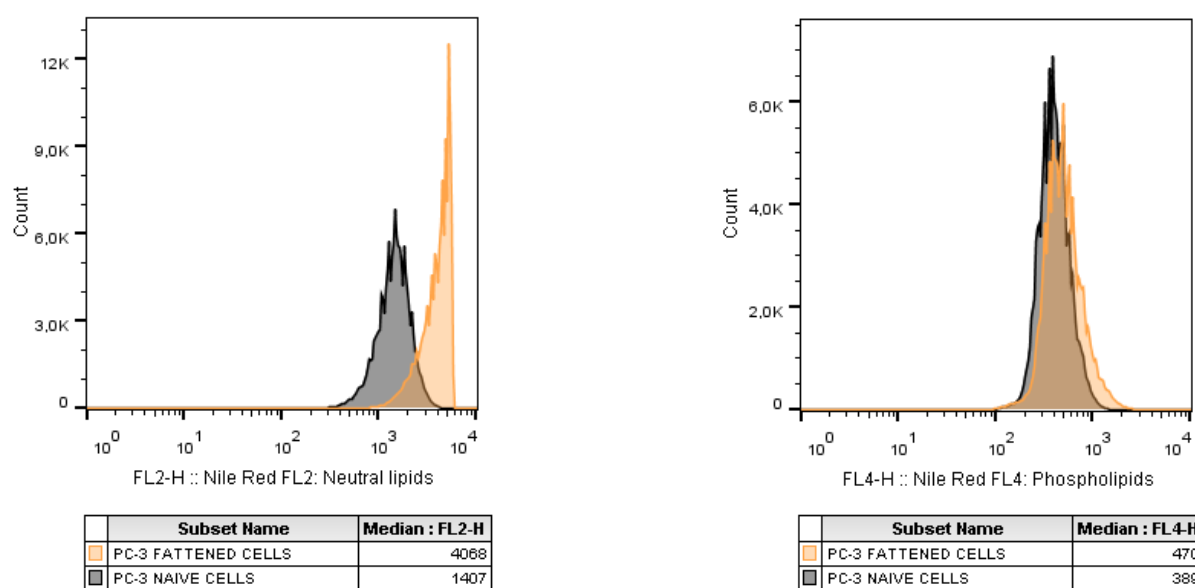


Εικόνα 49 Κυτταρομετρική ανάλυση της συσσώρευσης λιπιδίων με τη χρώση Nile Red σε κύτταρα PC-3. Το κανάλι FL2 αντιστοιχεί στο μήκος κύματος εκπομπής των ουδέτερων λιπιδίων ενώ το κανάλι FL4 στο μήκος κύματος εκπομπής των φωσφολιπιδίων.

Τίδια εικόνα δε λαμβάνεται και από την κυτταρική σειρά PC-3 (Εικόνα 49) με τις τιμές στα ουδέτερα λίπη να είναι αισθητά ανεβασμένες έπειτα από μία επώαση 24 h. Στο φωσφολιπίδια εμφανίστηκε μία μικρή πτώση στα επωασμένα κύτταρα,, ωστόσο δεδομένου του σφάλματος της μεθόδου (off-target προσδέσεις του Nile Red) μία απόκλιση τέτοιου μεγέθους θεωρείται αμελητέα ή οφείλεται στο στάδιο κυτταρικού κύκλου των κυττάρων που θα μπορούσε να επικρατεί η βιοσύνθεση μεμβρανών στην σειρά control ένεκα ραγδαίας κυτταρικής διαίρεσης.

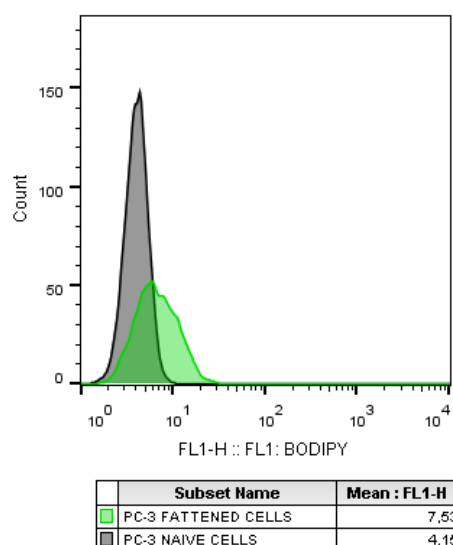
Συσσώρευση στα παχυνμένα κύτταρα

Ακολούθησε προετοιμασία παχυνμένων κυττάρων και στη συνέχεια έγινε ανάλυση των δειγμάτων για να αποκαλυφθεί τυχούσα αλλαγή στη σύσταση των λιπιδικών αποθεμάτων με τη μακροπρόθεσμη επίδραση των FALS.



Εικόνα 50 Κυτταρομετρική ανάλυση της συσσώρευσης λιπιδίων με τη χρώση Nile Red σε πεπαχυνμένα κύτταρα PC-3. Το κανάλι FL2 αντιστοιχεί στο μήκος κύματος εκπομπής των ουδέτερων λιπιδίων ενώ το κανάλι FL4 στο μήκος κύματος εκπομπής των φωσφολιπιδίων.

Η χρώση με Nile Red έδειξε ξανά ότι ο λόγος των φωσφολιπιδίων μεταξύ των επωασμένων και άθικτων κυττάρων παραμένει σταθερός και άρα η περίσσεια λιπαρών οξέων δεν αποθηκεύεται σε μεμβρανικές δομές. Τα αποτελέσματα συσσώρευσης που προέκυψαν με τη χρήση του καναλιού FL2 στο Nile Red επαληθεύτηκαν με τη χρωστική BODIPY™ 505/515 η οποία προσδέεται σε πάσης φύσεως αλειφατική αλυσίδα και φθορίζει ισχυρά.



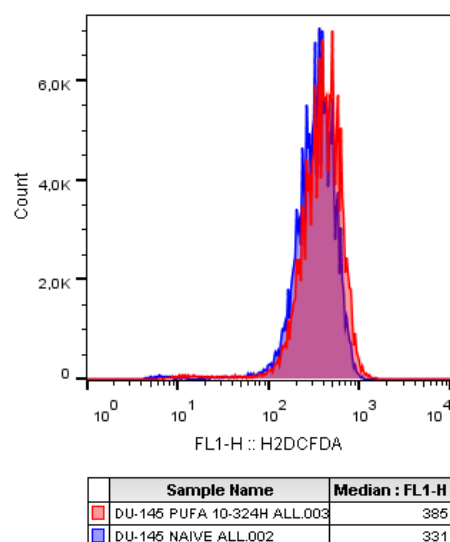
Εικόνα 51 Κυτταρομετρική ανάλυση της συσσώρευσης λιπιδίων με τη χρώση BODIPY™ 505/515 σε κύτταρα PC-3.

Ο μέσος φθορισμός στα πεπαχυμένα κύτταρα ήταν σχεδόν διπλάσιος από αυτόν των άθικτων PC-3 κυττάρων (Εικόνα 51), δεδομένο που επαλήθευσε την χρήση του Nile Red δείκτη της συσσώρευσης.

Χορήγηση FALS και οξειδωτικό στρες

Στο τελικό στάδιο της μελέτης αυτής, έγινε μία πρώτη προσέγγιση ενδοκυτταρικών φαινομένων/αλλαγών που επιφέρει η χορήγηση των FALS και που θα μπορούσαν να εξηγήσουν οποιαδήποτε αλλαγή στις βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Η πρώτη παράμετρος που ελέγχθηκε ήταν η αύξηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες ένεκα της χορήγησης λιπιδίων, η οποία θεωρείται συνδεδεμένη με τον καταβολισμό των λιπιδίων. Ο δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για αυτό το σκοπό είναι η ένωση H₂DCFDA και η ανάλυση έγινε στον κυτταρομετρητή ροής FACS Calibur™. Το υποσύνολο των κυττάρων που εξετάζονται είναι αυτά που χαρακτηρίστηκαν ως ζωντανά με τη χρώση LIVE/DEAD®.

Μέτρηση οξειδωτικού στρες σε επωασμένα κύτταρα

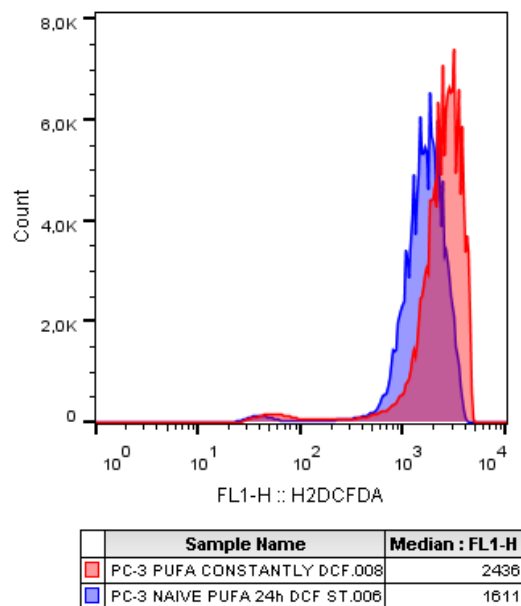


Εικόνα 52 Κυτταρομετρική ανάλυση του οξειδωτικού στρες με τη χρώση H₂DCFDA σε επωασμένα κύτταρα DU-145.

Η πρώτη σειρά πειραμάτων διεξήχθη σε κύτταρα που για πρώτη φορά επωάστηκαν με μία μέτρια συγκέντρωση FALS (1,8 mg/ml) καθώς και στην ομάδα control (Εικόνα 52). Τα επίπεδα οξειδωτικού στρες εμφανίστηκαν αυξημένα στην ομάδα επωασμένων κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όπως φαίνεται και στο ιστόγραμμα από τη μέση τιμή φθορισμού ανά κύτταρο σε κάθε δείγμα (Εικόνα 52). Παρόμοια αποτελέσματα και πάντα υψηλότερες τιμές DCF παρατηρούνταν σε κάθε επανάληψη του πειράματος, σε όλες τις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν (DU-145, PC-3, Nthy-Ori 3-1).

Μέτρηση οξειδωτικού στρες σε παχυμένα κύτταρα

Στο τελικό στάδιο αυτής της μελέτης, θέλαμε να δείξουμε εάν τα κύτταρα που βρίσκονται μόνιμα σε περιβάλλον πλούσιο σε FALS θα εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες ή εάν οι ενδοκυτταρικοί ομοιοστατικοί μηχανισμοί θα αποσοβούσαν το φαινόμενο. Χρησιμοποιήθηκε επομένως οι παχυμένοι κλώνοι των κυτταρικών σειρών PC-3 και DU-145 ως μοντέλα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ιστόγραμμα.



Εικόνα 53 Κυτταρομετρική ανάλυση του οξειδωτικού στρες με τη χρώση H2DCFDA σε παχυμένα κύτταρα DU-145.

Τα πειράματα κατέδειξαν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες ακόμα και στα διαρκώς παχυμένα κύτταρα, χωρίς όμως να αποκλείεται η ενίσχυση των αντιοξειδωτικών τους μηχανισμών ως αντίμετρο για την προστασία των βιομορίων τους.

Συζήτηση

Η χορήγηση των FALS σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και γενικά η *in vitro* χορήγησή τους, είναι ένα νέο πεδίο έρευνας που συνδράμει στην κατανόηση απορρόφησης των λιπιδίων από τα κύτταρα και στην αποσαφήνιση της δράσης τους. Ενδείξεις για πολλαπλά οφέλη και πιθανή αντικαρκινική δράση υπάρχουν εδώ και αρκετά χρόνια για τις εν λόγω ουσίες (Alakhras et al. 2015), ωστόσο, ζητήματα όπως οι χρόνοι έκθεσης, η ακριβής σύσταση σε λιπαρά οξέα αλλά και οι μηχανισμοί δράσης των PUFAs απέχουν αρκετά από την πλήρη διαλεύκανση. Τα λιπίδια έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για την αύξηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες εντός των κυττάρων και την συνεπακόλουθη θανάτωσή τους, εάν οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας αποτύχουν. Η πρόκληση στρες είναι κατά πάσα πιθανότητα υπεύθυνη για την πλειονότητα των καταγεγραμμένων βιολογικών δράσεων (Pratt et al. 2011), με το άλλο μεγάλο κομμάτι να είναι η απευθείας εμπλοκή των PUFAs και η αλληλεπίδρασή τους με μόρια μονοπατιών μεταγωγής σήματος (Bozza and Viola 2010). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με αρκετές σηματοδοτικές οδούς που είναι σημαντικές για το ρυθμό πολλαπλασιασμού του κυττάρου, την ικανότητα μετανάστευσης του αλλά και την επαγωγή της αγγειογένεσης. Οι αυξημένοι μεταβολικοί ρυθμοί των καρκινικών κυττάρων τα καθιστούν πιο ευάλωτα σε καταπονήσεις όπως το οξειδωτικό στρες ή η έλλειψη οξυγόνου και ενέργειας επιτρέποντας παράλληλα την φαρμακευτική στόχευση των παραπάνω διεργασιών.

Η παρούσα εργασία εισήγαγε την έννοια της ποσοτικοποίησης των απορροφημένων FALS με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών Nile Red και BODIPY™ 505/515, ανοίγοντας το δρόμο για μία πιο ελεγχόμενη χορήγησή τους και συσχετισμό της δόσης τους με ορατά αποτελέσματα. Η επαλήθευση σχηματισμού και η χρώση των lipid droplets εντός των κυττάρων θα επιτρέψει την ανάπτυξη μεθόδων απεικόνισης οι οποίες αν συνδυαστούν με φθορίζοντες δείκτες σχετικούς με το οξειδωτικό στρες, θα μπορούσαν να καταδείξουν μία χωρική κατανομή του φαινομένου και μία αδιάρρηκτη μεταξύ τους σύνδεση. Τα επωασμένα κύτταρα αλλά και τα παχυμένα, με τις μεθόδους μέτρησης που αναπτύχθηκαν, έδειξαν σημαντική συσσώρευση λιπιδίων στο εσωτερικό τους. Το παράδοξο ήταν ότι το συσσωρευθέν λίπος στα παχυμένα κύτταρα δεν εμφάνισε πρότυπο αποθήκευσης ως φωσφολιπίδιο, αλλά παρέμεινε αποθηκευμένο στα lipid droplets ως TAG. Τα PUFAs, ειδικά τα EFAs, λόγω της υψηλής τους σημασίας για το κύτταρο, δεν προτιμώνται στις οδούς διάσπασης παρά αποθηκεύονται ως φωσφολιπίδια σε μεμβρανικές δομές. Η κατάσταση αυτή, εάν αρχίσει να επηρεάζει κυτταρικές λειτουργίες, ονομάζεται φωσφολιπίδωση και θα μπορούσαμε να είχαμε ενδείξεις για κάτι τέτοιο εάν η συσσώρευση φωσφολιπιδίων στον παχυμένο κλώνο ήταν αυξημένη. Φυσικά, η παρούσα ερευνητική εργασία, μελέτησε τις πιο γενικές κυτταρικές λειτουργίες

όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η απόπτωση, ενώ η διαπίστωση της φωσφολιπίδωσης και άλλων λεπτών μορφολογικών επιδράσεων απαιτεί πιο λεπτομερείς τεχνικές όπως ηλεκτρονική μικροσκοπία και ανάλυση των λιπιδίων των μεμβρανών.

Η επίδραση των λιπιδίων ήταν κυτταροστατική και κυτταροτοξική σε όλες τις ελεγχθείσες κυτταρικές σειρές, τόσο τις καρκινικές όσο και την φυσιολογική σειρά που χρησιμοποιήθηκαν. Παρατηρήθηκαν παραπλήσια -αν όχι ίδια- πρότυπα κυτταροτοξικότητας, χωρίς όμως η εικόνα να είναι αντιπροσωπευτική όλων των τύπων κακοήθων ή φυσιολογικών ιστών. Διαφορετικοί τύποι κυττάρων παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα ευπάθειας στις αντικαρκινικές θεραπείες, γεγονός σχετιζόμενο με τις μεταβολικές και γενετικές τους ιδιαιτερότητες. Η χορήγηση των FALS μπορεί να μην αποτελεί μορφή θεραπείας, ωστόσο, η είσοδός τους στο μεταβολισμό του κυττάρου ακολουθείται από μια πλειάδα σημάτων που θα μπορούσαν να τροποποιήσουν την απόκρισή του σε άλλα φάρμακα ή στα φυσιολογικά σήματα αναστολής.

Μελετώντας την επίδραση των FALS στην ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν επουλώνοντας πληγές, παρατηρήθηκε ένα δόσοεξαρτώμενο πρότυπο, το οποίο ήταν σύμφωνο με τις επιδράσεις των FALS στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Δεν παρατηρήθηκαν όμως διαφορές μεταξύ των καρκινικών κυτταρικών σειρών που δοκιμάστηκαν και τη φυσιολογικής σειράς. Παράλληλα, ελέγχθηκε η χημειοτακτική δράση των αλάτων αλλά και πιθανή επαγωγική τους δράση στην διαδικασία της μετανάστευσης. Σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία παράμετρο, ούτε εκδηλώθηκε κάποιας μορφής διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, γεγονός το οποίο αποδόθηκε στην δράση των FALS ως απλές πηγές άνθρακα για τα κύτταρα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, η δράση των αλάτων ##### ήταν κατασταλτική σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Δοκιμάστηκαν διάφοροι χρόνοι για την εκδήλωση μεταναστευτικής δραστηριότητας, καταλήγοντας στις 24 ώρες ως τελικό σημείο, ωστόσο, σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν σε κανένα εύρος συγκεντρώσεων. Φυσικά, σημαντική παράμετρος που μένει να ελεγχθεί είναι η ικανότητα διείσδυσης των κυττάρων στην εξωκυττάρια μήτρα, καθώς η ύπαρξη των FALS σε μία περιοχή πλούσια σε πρωτεΐνες της ECM θα μπορούσε να εμφανίσει διαφορετικά αποτελέσματα.

Αξιοσημείωτα ήταν τα αποτελέσματα της απόπτωσης, στα οποία δεν παρατηρήθηκε κάποια επαγωγή του φαινομένου στις καλλιεργητικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν, ενδεχομένως υποδεικνύοντας ένα εναλλακτικό τρόπο εκδήλωσης της κυτταροτοξικής τους δράσης, με κύριο υποψήφιο τον φερροπρωτικό θάνατο (Kusnick et al. 2022). Η μελέτη της απόπτωσης έγινε σε ένα πλαίσιο 24 ωρών, στο χρόνο που είχαμε και την εκδήλωση κυτταρικού θανάτου ένεκα χορήγησης των FALS. Ο αποπτωτικός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε, η φωσφατιδυλοσερίνη, αναμένεται να δείξει πιθανό αποπτωτικό θάνατο που έχει επαχθεί τόσο μέσω του ενδογενούς όσο και του εξωγενούς

μονοπατιού, ωστόσο, στα πειράματα μας κανένα από τα δύο μονοπάτια δεν φάνηκε ενεργοποιημένο στα επωασμένα κύτταρα σε βαθμό που να διαφέρει από τη ομάδα ελέγχου. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος επέρχεται μέσω φερρόπτωσης παρά απόπτωσης. Η επαγωγή της φερρόπτωσης είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την αύξηση του οξειδωτικού στρες μέσω της προκαλούμενης υπεροξειδωσής στα φωσφολιπίδια, και συνεπώς θα μπορούσε να εξηγήσει τον θάνατο των κυττάρων (Yang and Stockwell 2016), (Chen et al. 2021).

Η ανάλυση του οξειδωτικού στρες έδειξε μία σαφή επαγωγή του φαινομένου στα επωασμένα και στα παχυμένα κύτταρα, αποτέλεσμα που μένει να διερευνηθεί με ειδικούς δείκτες υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Η χωροταξική διερεύνηση των εστιών οξειδωτικού στρες μέσα στο κύτταρο με συνεστιακή μικροσκοπία, αναμένεται να καταδείξει την περιοχή γύρω από τα lipid droplets ως πιο δραστήρια, ωστόσο, η πρόκληση οξειδωτικών βλαβών και σε άλλα οργάνδια μεταξύ των οποίων και ο πυρήνας θα επαλήθευσε την άμεση επαγωγή του κυτταρικού θανάτου. Η χορήγηση αντιοξειδωτικών -σε συνδυασμό με τα FALS- αναμένεται να μειώσει επίσης τα επίπεδα οξειδωτικού στρες, ωστόσο, θα πρέπει σε μεγάλο βαθμό να βελτιστοποιηθούν τόσο οι δόσεις χορήγησης των αλάτων όσο και μία μέθοδος απεικόνισής τους σε πραγματικό χρόνο, προκειμένου να μελετηθεί εις βάθος το βραχύβιο, πλην όμως καταστροφικό, αποτέλεσμα της δημιουργίας ελευθέρων ριζών.

Η δοκιμή FALS διαφορετικής σύστασης και περιεκτικότητας σε ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα είναι επίσης μία πρόκληση, καθώς οι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να συνθέτουν ένα ευρύ φάσμα μιγμάτων των παραπάνω ουσιών με ανεξερεύνητη μέχρι στιγμής δράση, τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* συνθήκες. Η μελέτη της επίδρασης των μικροβιακών λιπιδίων αναμένεται να ανοίξει το δρόμο για μία νέα κατηγορία σκευασμάτων υψηλού διατροφικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, καθώς η προστατευτική τους δράση έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου αλλά και η πιθανή *per se* αντικαρκινική δράση τους θα επιτρέψει το συνδυασμό τους με χημειοθεραπευτικά σχήματα και θα συμβάλει δραστικά στη μάχη κατά του καρκίνου.

Βιβλιογραφία

Άρθρα σε επιστημονικά περιοδικά

- Alakhras, Raghdha, Stamatia Bellou, Grammatiki Fotaki, Georgia Stephanou, Nikos A. Demopoulos, Seraphim Papanikolaou, and George Aggelis. 2015. “Fatty Acid Lithium Salts from Cunninghamella Echinulata Have Cytotoxic and Genotoxic Effects on HL-60 Human Leukemia Cells.” *Engineering in Life Sciences* 15(2):243–53. doi: 10.1002/elsc.201400208.
- Alamu, Olufemi, Mariam Rado, Okobi Ekpo, and David Fisher. 2020. “Differential Sensitivity of Two Endothelial Cell Lines to Hydrogen Peroxide Toxicity: Relevance for In Vitro Studies of the Blood-Brain Barrier.” *Cells* 9(2):1–14. doi: 10.3390/cells9020403.
- Anon. 1975. “Eskimo Diets and Diseases Territory . From Then on , White Whalers and Explorers ,.” 1139–41.
- Arfin, Saniya, Niraj Kumar Jha, Saurabh Kumar Jha, Kavindra Kumar Kesari, Janne Ruokolainen, Shubhadeep Roychoudhury, Brijesh Rathi, and Dhruv Kumar. 2021. “Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism.” *Antioxidants* 10(5):1–28. doi: 10.3390/antiox10050642.
- Athreya, Kanthi, and Marin F. Xavier. 2017. “Antioxidants in the Treatment of Cancer.” *Nutrition and Cancer* 69(8):1099–1104. doi: 10.1080/01635581.2017.1362445.
- Barreira, João Vasco. 2021. “The Role of Nutrition in Cancer Patients.” *Nutrition and Cancer* 73(11–12):2849–50. doi: 10.1080/01635581.2020.1839519.
- Batchuluun, Battsetseg, Stephen L. Pinkosky, and Gregory R. Steinberg. 2022. “Lipogenesis Inhibitors: Therapeutic Opportunities and Challenges.” *Nature Reviews Drug Discovery* 21(4):283–305. doi: 10.1038/s41573-021-00367-2.
- Begin, M. E., G. Ells, U. N. Das, and D. F. Horrobin. 1986. “Differential Killing of Human Carcinoma Cells Supplemented with N-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids.” *Journal of the National Cancer Institute* 77(5):1053–62.
- Bellou, Stamatia, Irene Eva Triantaphyllidou, Dimitra Aggeli, Ahmed Mohammed Elazzazy, Mohammed Nabih Baeshen, and George Aggelis. 2016. “Microbial Oils as Food Additives: Recent Approaches for Improving Microbial Oil Production and Its Polyunsaturated Fatty Acid Content.” *Current Opinion in Biotechnology* 37:24–35. doi: 10.1016/j.copbio.2015.09.005.
- Bergers, Gabriele, and Laura E. Benjamin. 2003. “Tumorigenesis and the Angiogenic Switch.” *Nature Reviews Cancer* 3(6):401–10. doi: 10.1038/nrc1093.
- Bersuker, Kirill, Joseph M. Hendricks, Zhipeng Li, Leslie Magtanong, Breanna Ford, Peter H. Tang, Melissa A. Roberts, Bingqi Tong, Thomas J. Maimone, Roberto Zoncu, Michael C. Bassik, Daniel K. Nomura, Scott J. Dixon, and James A. Olzmann. 2019. “The CoQ Oxidoreductase FSP1 Acts Parallel to GPX4 to Inhibit Ferroptosis.” *Nature* 575(7784):688–92. doi:

10.1038/s41586-019-1705-2.

- Björklund, Tomas. 2016. "Chapter 3 Expression of Multiple Functional RNAs." 1382(January 2016):41–56. doi: 10.1007/978-1-4939-3271-9.
- Böhm, Ingrid, and Hans Schild. 2003. "Apoptosis: The Complex Scenario for a Silent Cell Death." *Molecular Imaging and Biology* 5(1):2–14. doi: 10.1016/S1536-1632(03)00024-6.
- Bojja, Sree Lalitha, Neha Singh, Kiran Kumar Kolathur, and Chamallamudi Mallikarjuna Rao. 2022. "What Is the Role of Lithium in Epilepsy?" *Current Neuropharmacology* 20(10):1850–64. doi: 10.2174/1570159x20666220411081728.
- Bozza, Patricia T., and João P. B. Viola. 2010. "Lipid Droplets in Inflammation and Cancer." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 82(4–6):243–50. doi: 10.1016/j.plefa.2010.02.005.
- Cairns, Rob A., Isaac S. Harris, and Tak W. Mak. 2011. "Regulation of Cancer Cell Metabolism." *Nature Reviews Cancer* 11(2):85–95. doi: 10.1038/nrc2981.
- Carroll, Kenneth K. 1975. "Experimental Evidence of Dietary Factors and Hormone-Dependent Cancers." *Cancer Research* 35:3374–83.
- Challeton, Cécile, Felicia Branea, Martin Schlumberger, Nadine Gaillard, Florent De Vathaire, Christophe Badie, Patrick Antonini, and Claude Parmentier. 1997. "Biology Contribution AND RADIOSENSITIVITY AT HIGH OR LOW DOSE." *Radiation Oncology* 37(September 1996):163–69.
- Chandel, N. S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C. E. Mathieu, M. C. Simon, and P. T. Schumacker. 1998. "Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Induced Transcription." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(20):11715–20. doi: 10.1073/pnas.95.20.11715.
- Chang, Lulu, Xin Tang, Hengqian Lu, Hao Zhang, Yong Q. Chen, Haiqin Chen, and Wei Chen. 2019. "Role of Adenosine Monophosphate Deaminase during Fatty Acid Accumulation in Oleaginous Fungus *Mortierella Alpina*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(34):9551–59. doi: 10.1021/acs.jafc.9b03603.
- Chapman, Julia, Verda J. Hunter, and Jeanne A. Drisko. 2003. "The Use of Antioxidants with First-Line Chemotherapy in Two Cases of Ovarian Cancer." *Journal of the American College of Nutrition* 22(2):118–23. doi: 10.1080/07315724.2003.10719284.
- Chen, Hong Chen. 2005. "Boyden Chamber Assay." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 294:15–22. doi: 10.1385/1-59259-860-9:015.
- Chen, Xin, Jingbo Li, Rui Kang, Daniel J. Klionsky, and Daolin Tang. 2021. "Ferroptosis: Machinery and Regulation." *Autophagy* 17(9):2054–81. doi: 10.1080/15548627.2020.1810918.

- Conklin, K. A. 2000. "Dietary Antioxidants during Cancer Chemotherapy: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness and Development of Side Effects." *Nutrition and Cancer* 37(1):1–18. doi: 10.1207/S15327914NC3701_1.
- Dianzani, Mario Umberto. 1993. "Lipid Peroxidation and Cancer." *Critical Reviews in Oncology and Hematology* 15(2):125–47. doi: 10.1016/1040-8428(93)90052-6.
- Diaz-Vivancos, Pedro, Ambra De Simone, Guy Kiddle, and Christine H. Foyer. 2015. "Glutathione - Linking Cell Proliferation to Oxidative Stress." *Free Radical Biology and Medicine* 89:1154–64. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.023.
- Dongre, Anushka, and Robert A. Weinberg. 2019. "New Insights into the Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition and Implications for Cancer." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20(2):69–84. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4.
- Feoktistova, Maria, Peter Geserick, and Martin Leverkus. 2016. "Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells." *Cold Spring Harbor Protocols* 2016(4):343–46. doi: 10.1101/pdb.prot087379.
- FOLCH, J., M. LEES, and G. H. SLOANE STANLEY. 1957. "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues." *The Journal of Biological Chemistry* 226(1):497–509. doi: 10.1016/s0021-9258(18)64849-5.
- Gardiner, Bryan, Julie A. Dougherty, Devasena Ponnalagu, Harpreet Singh, Mark Angelos, Chun-An Chen, and Mahmood Khan. 2020. "Measurement of Oxidative Stress Markers In Vitro Using Commercially Available Kits." 39–60. doi: 10.1007/978-3-030-47318-1_4.
- Goldar, Samira, Mahmoud Shekari Khaniani, Sima Mansoori Derakhshan, and Behzad Baradaran. 2015. "Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16(6):2129–44. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.6.2129.
- Gonzalez, Carlos A., and Elio Riboli. 2006. "Diet and Cancer Prevention: Where We Are, Where We Are Going." *Nutrition and Cancer* 56(2):225–31. doi: 10.1207/s15327914nc5602_14.
- Gorrini, Chiara, Isaac S. Harris, and Tak W. Mak. 2013. "Modulation of Oxidative Stress as an Anticancer Strategy." *Nature Reviews Drug Discovery* 12(12):931–47. doi: 10.1038/nrd4002.
- Greenspan, Phillip, Eugene P. Mayer, and Stanley D. Fowler. 1985. "Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets." *Journal of Cell Biology* 100(3):965–73. doi: 10.1083/jcb.100.3.965.
- Guo, Yi, Kimberly R. Cordes, Robert V. Farese, and Tobias C. Walther. 2009. "Lipid Droplets at a Glance." *Journal of Cell Science* 122(6):749–52. doi: 10.1242/jcs.037630.
- Guterres, Adam N., and Jessie Villanueva. 2020. "Targeting Telomerase for Cancer Therapy."

- Oncogene* 39(36):5811–24. doi: 10.1038/s41388-020-01405-w.
- Houten, Sander Michel, and Ronald J. A. Wanders. 2010. “A General Introduction to the Biochemistry of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation.” *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33(5):469–77. doi: 10.1007/s10545-010-9061-2.
- Jiang, Wen G., Richard P. Bryce, and David F. Horrobin. 1998. “Essential Fatty Acids: Molecular and Cellular Basis of Their Anti- Cancer Action and Clinical Implications.” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 27(3):179–209. doi: 10.1016/S1040-8428(98)00003-1.
- Karmali, Rashida A., Jane Marsh, and Fuchs Charles. 1984. “Effect of Omega-3 Fatty Acids on Growth of a Rat Mammary Tumor.” *Journal of the National Cancer Institute* 73(2):457–61. doi: 10.1093/jnci/73.2.457.
- Kim, Su Ji, Hyun Soo Kim, and Young Rok Seo. 2019. “Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019(Figure 1). doi: 10.1155/2019/5381692.
- Klaunig, James E., Lisa M. Kamendulis, and Barbara A. Hocevar. 2010. “Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis.” *Toxicologic Pathology* 38(1):96–109. doi: 10.1177/0192623309356453.
- Koreivienė, Judita. 2020. “Microalgae Lipid Staining with Fluorescent BODIPY Dye.” *Methods in Molecular Biology* 1980:47–53. doi: 10.1007/7651_2017_101.
- Kusnick, Johanna, Alix Bruneau, Frank Tacke, and Linda Hammerich. 2022. “Ferroptosis in Cancer Immunotherapy—Implications for Hepatocellular Carcinoma.” *Immuno* 2(1):185–217. doi: 10.3390/immuno2010014.
- Lee, Je Min, Hyungjae Lee, Seok Beom Kang, and Woo Jung Park. 2016. “Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances.” *Nutrients* 8(1):1–13. doi: 10.3390/nu8010023.
- Lemoine, N. R., E. S. Mayall, T. Jones, D. Sheer, S. McDermid, P. Kendall-Taylor, and D. Wynford-Thomas. 1989. “Characterisation of Human Thyroid Epithelial Cells Immortalised in Vitro by Simian Virus 40 DNA Transfection.” *British Journal of Cancer* 60(6):897–903. doi: 10.1038/bjc.1989.387.
- Liebert, Ann, Ana Margarida Meireles, Ana Preto, Ana So, Ana Paula Rebocho, and Valdemar Ma. 2007. “Molecular and Genotypic Characterization of Human Thyroid Follicular Cell Carcinoma–Derived Cell Lines.” *Thyroid* 17(8).
- Lines, Human Cell, and B. Morris. 1995. “CHAPTER 18 Cryopreservation of Animal.” 38(7):179–87.
- Martin, Sally, and Robert G. Parton. 2006. “A Dynamic Organelle.” *Molecular Cell* 7(May):373–78.

- Martinotti, Simona, and Elia Ranzato. 2020. "Scratch Wound Healing Assay." *Methods in Molecular Biology* 2109:225–29. doi: 10.1007/7651_2019_259.
- Matsuzawa, Atsushi, and Hidenori Ichijo. 2008. "Redox Control of Cell Fate by MAP Kinase: Physiological Roles of ASK1-MAP Kinase Pathway in Stress Signaling." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1780(11):1325–36. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.12.011.
- McKenzie, Shaun, and Natasha Kyprianou. 2006. "Apoptosis Evasion: The Role of Survival Pathways in Prostate Cancer Progression and Therapeutic Resistance." *Journal of Cellular Biochemistry* 97(1):18–32. doi: 10.1002/jcb.20634.
- McKinnon, Katherine M. 2018. "Flow Cytometry: An Overview." *Current Protocols in Immunology* 2018(February):5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40.
- Minotti, Giorgio, and Steven D. Aust. 1992. "Redox Cycling of Iron and Lipid Peroxidation." *Lipids* 27(3):219–26. doi: 10.1007/BF02536182.
- Moss, G. P., P. A. S. Smith, and D. Tavernier. 1995. "Glossary of Class Names of Organic Compounds and Reactive Intermediates Based on Structure (IUPAC Recommendations 1995)." *Pure and Applied Chemistry* 67(8–9):1307–75. doi: 10.1351/pac199567081307.
- Murata, Mariko, Raynoo Thanan, Ning Ma, and Shosuke Kawanishi. 2012. "Role of Nitrate and Oxidative DNA Damage in Inflammation-Related Carcinogenesis." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012(Figure 1). doi: 10.1155/2012/623019.
- Nguyen, Thuong T. T., Young Joon Choi, and Hyang Burm Lee. 2017. "Isolation and Characterization of Three Unrecorded Zygomycete Fungi in Korea: *Cunninghamella Bertholletiae*, *Cunninghamella Echinulata*, and *Cunninghamella Elegans*." *Mycobiology* 45(4):318–26. doi: 10.5941/MYCO.2017.45.4.318.
- North, Sophie, Michel Moenner, and Andreas Bikfalvi. 2005. "Recent Developments in the Regulation of the Angiogenic Switch by Cellular Stress Factors in Tumors." *Cancer Letters* 218(1):1–14. doi: 10.1016/j.canlet.2004.08.007.
- Olzmann, James A., and Pedro Carvalho. 2019. "Dynamics and Functions of Lipid Droplets." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20(3):137–55. doi: 10.1038/s41580-018-0085-z.
- Patel, Alok, Dimitra Karageorgou, Emma Rova, Petros Katapodis, Ulrika Rova, Paul Christakopoulos, and Leonidas Matsakas. 2020. "An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries." *Microorganisms* 8(3). doi: 10.3390/microorganisms8030434.
- Petan, Toni, Eva Jarc, and Maida Jusović. 2018. "Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World." *Molecules* 23(8):11–15. doi: 10.3390/molecules23081941.
- Pratt, Derek A., Keri A. Tallman, and Ned A. Porter. 2011. "Free Radical Oxidation of

- Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks.” *Accounts of Chemical Research* 44(6):458–67. doi: 10.1021/ar200024c.
- Qamer, Zainab, Muhammad Tanees Chaudhary, Xiongming Du, Lori Hinze, and Muhammad Tehseen Azhar. 2021. “Review of Oxidative Stress and Antioxidative Defense Mechanisms in *Gossypium Hirsutum* L. in Response to Extreme Abiotic Conditions.” *Journal of Cotton Research* 4(1). doi: 10.1186/s42397-021-00086-4.
- Remize, Marine, Yves Brunel, Joana L. Silva, Jean Yves Berthon, and Edith Filaire. 2021. “Microalgae N-3 PUFAs Production and Use in Food and Feed Industries.” *Marine Drugs* 19(2):1–29. doi: 10.3390/MD19020113.
- Reuter, Simone, Subash C. Gupta, Madan M. Chaturvedi, and Bharat B. Aggarwal. 2010. “Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked?” *Free Radical Biology and Medicine* 49(11):1603–16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- Roebuck, K. A. 1999. “Oxidant Stress Regulation of IL-8 and ICAM-1 Gene Expression: Differential Activation and Binding of the Transcription Factors AP-1 and NF-KappaB (Review).” *International Journal of Molecular Medicine* 4(3):223–30. doi: 10.3892/ijmm.4.3.223.
- Sadiq, Muhammad, Nudrat Aisha Akram, Muhammad Ashraf, Fahad Al-Qurainy, and Parvaiz Ahmad. 2019. “Alpha-Tocopherol-Induced Regulation of Growth and Metabolism in Plants Under Non-Stress and Stress Conditions.” *Journal of Plant Growth Regulation* 38(4):1325–40. doi: 10.1007/s00344-019-09936-7.
- Sagar, P. Sangeetha, and U. N. Das. 1995. “Cytotoxic Action of Cis-Unsaturated Fatty Acids on Human Cervical Carcinoma (HeLa) Cells in Vitro.” *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 53(4):287–99. doi: 10.1016/0952-3278(95)90129-9.
- Sayegh, Fotoon, Ahmed Elazzazy, Stamatia Bellou, Anna Moustogianni, Ayman I. Elkady, Mohammed N. Baeshen, and George Aggelis. 2016. “Production of Polyunsaturated Single Cell Oils Possessing Antimicrobial and Anticancer Properties.” *Annals of Microbiology* 66(3):937–48. doi: 10.1007/s13213-015-1176-0.
- Schieber, Michael, and Navdeep S. Chandel. 2014. “ROS Function in Redox Signaling.” *Current Biology* 24(10):453–62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.ROS.
- Sesti, Fabiola, Ourania E. Tsitsilonis, Athanassios Kotsinas, and Ioannis P. Trougakos. 2012. “Oxidative Stress-Mediated Biomolecular Damage and Inflammation in Tumorigenesis.” *In Vivo* 26(3):395–402.
- Shahidi, Fereidoon, and Priyatharini Ambigaipalan. 2018. “Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits.” *Annual Review of Food Science and Technology* 9:345–81. doi: 10.1146/annurev-food-111317-095850.

- Simopoulos, A. P. 2002. "The Importance of the Ratio of Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acids." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56(8):365–79. doi: 10.1016/S0753-3322(02)00253-6.
- Stone, Kenneth R., Don D. Mickey, Heidi Wunderli, George H. Mickey, and David F. Paulson. 1978. "Isolation of a Human Prostate Carcinoma Cell Line (DU 145)." *International Journal of Cancer* 21(3):274–81. doi: 10.1002/ijc.2910210305.
- Swick, R. W., and C. A. Baumann. 1951. "Tocopherol in Tumor Tissues and Effects of Tocopherol on the Development of Liver Tumors." *Cancer Research* 11(12):948–53.
- Trumbo, Paula, Sandra Schlicker, Alison Yates, and Mary Poos. 2023. "Dietary Reference Intakes for Energy." *Dietary Reference Intakes for Energy*.
- Vang Mouritzen, Michelle, and Håvard Jenssen. 2018. "Optimized Scratch Assay for in Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera." *Journal of Visualized Experiments* 2018(138):1–6. doi: 10.3791/57691.
- Viallard, Claire, and Bruno Larrivée. 2017. "Tumor Angiogenesis and Vascular Normalization: Alternative Therapeutic Targets." *Angiogenesis* 20(4):409–26. doi: 10.1007/s10456-017-9562-9.
- Wali, Jibran A., Seth L. Masters, and Helen E. Thomas. 2013. "Linking Metabolic Abnormalities to Apoptotic Pathways in Beta Cells in Type 2 Diabetes." *Cells* 2(2):266–83. doi: 10.3390/cells2020266.
- Wang, Jianhong, Tianwei Luo, Shaobin Li, and Jin Zhao. 2012. "The Powerful Applications of Polyunsaturated Fatty Acids in Improving the Therapeutic Efficacy of Anticancer Drugs." *Expert Opinion on Drug Delivery* 9(1):1–7. doi: 10.1517/17425247.2011.618183.
- Wang, Ruoxiang, Gina C. Y. Chu, Xudong Wang, Jason B. Wu, Peizhen Hu, Asha S. Multani, Sen Pathak, Haiyen E. Zhau, and Leland W. K. Chung. 2019. "Establishment and Characterization of a Prostate Cancer Cell Line from a Prostatectomy Specimen for the Study of Cellular Interaction." *International Journal of Cancer* 145(8):2249–59. doi: 10.1002/ijc.32370.
- De Wever, Olivier, Patrick Pauwels, Bram De Craene, Michèle Sabbah, Shahin Emami, Gérard Redeuilh, Christian Gispach, Marc Bracke, and Geert Berx. 2008. "Molecular and Pathological Signatures of Epithelial-Mesenchymal Transitions at the Cancer Invasion Front." *Histochemistry and Cell Biology* 130(3):481–94. doi: 10.1007/s00418-008-0464-1.
- Yang, Chung S., Philip Luo, Zishuo Zeng, Hong Wang, Mokenge Malafa, Nanjoo Suh, The State, Biological Sciences, and New Brunswick. 2021. "HHS Public Access." 59(4):365–89. doi: 10.1002/mc.23160.Vitamin.
- Yang, Wan Seok, and Brent R. Stockwell. 2016. "Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation." *Trends in Cell Biology* 26(3):165–76. doi: 10.1016/j.tcb.2015.10.014.

Επιστημονικά Συγγράμματα

- Μαρμάρας Βασίλειος, Λαμπροπούλου-Μαρμάρα Μαρία. 2013. “Βιολογία Κυττάρου Μοριακή Προσέγγιση” *Επανέκδοση 2013. Εκδόσεις Typorama*. ISBN: 978-960762013-2
- Αγγελής Γεώργιος. 2017. “Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία” 2^η Έκδοση. *Εκδόσεις Unibooks*. ISBN: 978-618-5304-12-6

Ιστοσελίδες

- https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQQqhNNOv2HE8w51tkk-MSPCt2uYymZsCqB2vszm2c6flUc3I2FpYfHWvVW_XbKhxUh2UE&usqp=CAU
- <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>