



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η επίδραση του αναστολέα της PDK1, GSK2334470, στην ενδοκυττάρια
σηματοδότηση σε παγκρεατικό καρκίνο»

Μασούρα Χαρίκλεια – Ραφαέλα, του Ιωάννη

Λάρισα, 2023



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

BACHELOR THESIS

«The effects of PDK1 inhibitor, GSK2334470, on intracellular signaling in
pancreatic cancer»

Masoura Charikleia - Rafaela

Larissa, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δήμας Κωσταντίνος, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
(Επιβλέπων)

Ψαρρά Άννα – Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συνεπιβλέπουσα)

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Καρκίνος	9
1.2 Ορόσημα καρκίνου	10
1.3 Παγκρεατικός καρκίνος.....	11
1.3.1 Πάγκρεας	11
1.3.2 Τύποι παγκρεατικού καρκίνου	13
1.3.3 Επιδημιολογία παγκρεατικού καρκίνου.....	13
1.3.4 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου	16
1.3.5 Διάγνωση και θεραπεία παγκρεατικού καρκίνου	21
1.4 PDK1 και καρκίνος.....	24
1.4.1 PDK1	24
1.4.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται η PDK1.....	26
1.4.3 Αναστολείς της PDK1	32
1.4.4 GSK2334470	33
1.5 Σκοπός.....	35
2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
2.1 Αναλώσιμα	36
2.2 Κυτταρική σειρά.....	38
2.3 Συνθήκες καλλιέργειας.....	38
2.4 Κανόνες υγιεινής	40
2.5 Ανανέωση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας	40
2.6 Ανακαλλιέργεια – Θρυψινοποίηση	40
2.7 Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων.....	42
2.8 Απόψυξη κυττάρων.....	43

2.9 Κατάψυξη κυττάρων	43
2.10 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής	44
2.10.1 Κυτταρικός κύκλος	44
2.10.2 Κυτταρομετρία ροής	46
2.11 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)	50
2.11.1 Αρχή της μεθόδου	50
2.11.2 Διαδικασία	51
2.12 Μέθοδος κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB (SRB assay)	62
2.13 Στατιστική ανάλυση	65
3.1 Αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής	67
3.2 Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western	70
3.3 Αποτελέσματα της μεθόδου κυτταροτοξικότητας με SRB (SRB assay) ..	72
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φαρμακολογίας, κ. Δήμα Κωνσταντίνου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δήμα που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, αλλά και για την ανάθεση του παρόντος θέματος και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και της εκπόνησης της διπλωματικής μου. Οι οδηγίες και οι συμβουλές του υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία και τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο, Επίκουρους Καθηγητές Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που δέχθηκαν να γίνουν μέλη της τριμελούς μου επιτροπής και για τη συνεργασία τους.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, η βοήθεια και η συνεργασία των οποίων, υπήρξαν πολύτιμες. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα, Αλεξοπούλου Δήμητρα, που με καθοδήγησε από την πρώτη στιγμή. Η μεγάλη βοήθεια και οι συμβουλές της συνέβαλαν σημαντικά στην ομαλή διεξαγωγή των πειραμάτων της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ για τον χρόνο που διέθεσε και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα και τους υποψήφιους διδάκτορες, Κουτσουγιάννη Φανή και Λαφαζάνη Κωνσταντίνο, που μου προσέφεραν τις δικές τους χρήσιμες συμβουλές. Αρμονική και ευχάριστη υπήρξε, επίσης, η συνεργασία μου με τον μεταπτυχιακό φοιτητή, Πολυχρόνη Θάνο, τον οποίο και ευχαριστώ.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και σε όλους τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν, όχι μόνο κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των τεσσάρων ετών της φοίτησής μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής είναι η *in vitro* μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του GSK2334470 έναντι του παγκρεατικού καρκίνου. Πρόκειται για μια ινδαζόλη που δρα ως αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης PDK1. Όλα τα πειράματα διενεργήθηκαν σε κύτταρα της παγκρεατικής καρκινικής κυτταρικής σειράς PANC-1. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων έγινε επώαση των κυττάρων, παρουσία του αναστολέα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων αυτών μέσω της κυτταρομετρίας ροής, με σκοπό να διαπιστωθεί η επίδραση του αναστολέα στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, διενεργήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western, μετά από τη λύση των κυττάρων και τη συλλογή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων τους, προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα του GSK2334470 να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση κινασών των μονοπατιών PI3K/AKT/mTOR και RAS/MAPK, στα οποία συμμετέχει και η PDK1. Τέλος, έγινε σύγκριση της δραστηριότητας του GSK2334470 με αυτές δυο άλλων αναστολέων της PDK1, των BX-517 και BX-912, μέσω της μεθόδου SRB. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι τρεις αναστολείς ως προς την επίδραση τους στον ρυθμό ανάπτυξης των PANC-1.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν πως ο GSK2334470 αποτρέπει τη μετάβαση από την φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, προκαλώντας G1 arrest. Επιπλέον, φάνηκε πως ο αναστολέας αναστέλλει επιτυχώς, τόσο τη φωσφορυλίωση της PDK1, όσο και τη φωσφορυλίωση της GSK3α, η οποία συμμετέχει επίσης στα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια. Επιπλέον, η χορήγηση του αναστολέα στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων της κυκλίνης D1, οι οποία είναι στόχος της GSK3α και αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της μετάβασης από την G1 στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Όσον αφορά τη σύγκριση του GSK2334470 με τους BX-517 και BX-912, τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο GSK2334470 παρουσιάζει εμφανώς καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση, υπερέχοντας έναντι των BX-517 και BX-912, στην καρκινική κυτταρική σειρά PANC-1. Επομένως, ο GSK2334470 είναι μια ουσία με αρκετά ισχυρή αντικαρκινική δράση, που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω λεπτομερών μελετών μελλοντικά, για την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού δράσης του, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός θεραπευτικός παράγοντας έναντι του παγκρεατικού καρκίνου.

Λέξεις – κλειδιά: GSK2334470, PDK1, παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, αναστολείς της PDK1, σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR, σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/MAPK, αναστολή κυτταρικού κύκλου, κυτταρική σειρά PANC-1

ABSTRACT

The aim of this thesis is to study the *in vitro* anticancer activity of GSK2334470 against pancreatic cancer. GSK2334470 is an indazole that acts as an inhibitor of PDK1 protein kinase. All experiments were performed in PANC-1 cells. Flow cytometry and Western blotting were performed, in order to determine the effect of the inhibitor on cell cycle progression and study the ability of GSK2334470 to inhibit the phosphorylation of kinases involved in PI3K/AKT/mTOR and RAS/MAPK signaling pathways. Finally, the activity of GSK2334470 was compared to that of two other PDK1 inhibitors, BX-517 and BX-912, via SRB assay.

The obtained results showed that GSK2334470 prevents the transition from G1 to S cell cycle phase, inducing G1 arrest. Furthermore, it was shown that GSK2334470 successfully inhibits both the phosphorylation of PDK1 and the phosphorylation of GSK3 α , a protein kinase also involved in the signaling pathways previously mentioned. In addition, use of the inhibitor results in a reduction in the levels of cyclin D1, a GSK3 α target and the main regulator of G1-S transition. Regarding the comparison of the three inhibitors, the results suggested that GSK2334470 exhibits the greatest antiproliferative activity in PANC-1 cancer cells. In conclusion, GSK2334470 is a substance with anti-cancer activity, inhibiting the proliferation and growth of pancreatic adenocarcinoma cancer cells. However, further future studies are needed, in order to determine its mechanism of action.

Key words: GSK2334470, PDK1, pancreatic ductal adenocarcinoma, PDK1 inhibitors, PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, RAS/MAPK signaling pathway, cell cycle arrest, PANC-1 cells

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος

Ο όρος «καρκίνος» περιγράφει ένα σύνολο από περισσότερες από εκατό ασθένειες που σχετίζονται με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των σωματικών κυττάρων. Ο καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιονδήποτε ιστό του σώματος και κάθε τύπος καρκίνου έχει τα δικά του ξεχωριστά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, οι βασικές διαδικασίες που έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκίνου είναι παρόμοιες σε όλες τις μορφές της ασθένειας [1].

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μεταβολές στη σηματοδότηση και τον μεταβολισμό, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων [2]. Η ανάπτυξή του μπορεί να οφείλεται σε επιγενετικές τροποποιήσεις (όπως μεθυλίωση και υδροξυμεθυλίωση του DNA, μεθυλίωση και ακετυλίωση των ιστονών) περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, χρωμοσωμικές μεταβολές, αλλά και μεταλλάξεις [3].

Σε γονιδιακό επίπεδο, έχει βρεθεί πως ο καρκίνος αναπτύσσεται σταδιακά, μετά από τη συσσώρευση πολλών γενετικών αλλαγών. Φαίνεται πως δύο είναι οι κυριότερες κατηγορίες γονιδίων που παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα γονίδια αυτά ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και κατ' επέκταση την ανάπτυξη και τη διαίρεση των κυττάρων. Πρόκειται για τα πρωτο-ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα πρώτα προάγουν την διαίρεση του κυττάρου, ενώ τα δεύτερα την αναστέλλουν [1].

Μεταλλάξεις στα πρωτο-ογκογονίδια έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε ογκογονίδια, τα οποία προάγουν την ανεξέλεγκτη διαίρεση των κυττάρων, μέσω της υπεραυξημένης παραγωγής πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη διαίρεση των κυττάρων (π.χ. παράγοντες ανάπτυξης) [1]. Από την άλλη, μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους, μειώνοντας έτσι την αναγκαία αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης η οποία, σε φυσιολογικές συνθήκες, αποτρέπει την υπερβολική ανάπτυξη των κυττάρων. Συλλογικά, μεταλλάξεις και στις δύο αυτές κατηγορίες γονιδίων είναι υπεύθυνες για την ανεξέλεγκτη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και κυτταρική διαίρεση, αλλά και για την απενεργοποίηση αντιπροσωπικών μηχανισμών, γεγονότα που αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά των ανθρώπινων καρκίνων [1].

Οι κακοήθεις όγκοι που δημιουργούνται αποκτούν την ικανότητα μετάστασης, η οποία οφείλεται κυρίως στην αυξορρόθμιση υποδοχέων που αυξάνουν την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και τη μειορρόθμιση υποδοχέων που είναι απαραίτητοι για την ιστοειδική σύνδεση μεταξύ κυττάρων [3].

Όσον αφορά την επιδημιολογία του καρκίνου, αυτός είναι υπεύθυνος για έναν στους έξι θανάτους παγκοσμίως [5]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 2019 ο καρκίνος ήταν η πρώτη ή η δεύτερη κυριότερη αιτία θανάτου πριν την ηλικία των 70 ετών σε 112 από 183 χώρες, ενώ ήταν η τρίτη ή τέταρτη κυριότερη αιτία θανάτου σε άλλες 23 χώρες. Μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης, σύμφωνα με στοιχεία του 2020, παρουσιάζουν οι καρκίνοι του μαστού, των πνευμόνων και του προστάτη, ενώ μεγαλύτερα ποσοστά θανάτου εμφανίζονται στον καρκίνο των

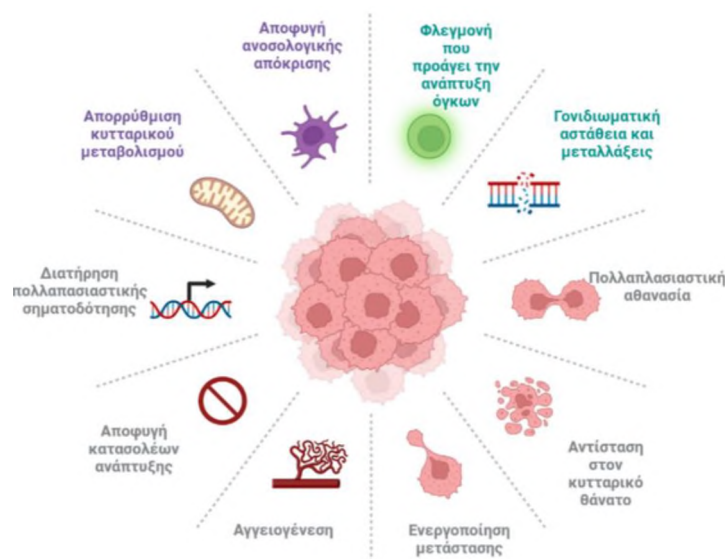
πνευμόνων [4]. Το ίδιο έτος καταγράφηκαν 19,3 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου και συνολικά 10 εκατομμύρια θάνατοι από καρκίνο παγκοσμίως [5].

Για τη θεραπεία του καρκίνου, η πιο συμβατική προσέγγιση περιλαμβάνει την χειρουργική εξαγωγή των όγκων, καθώς και τη ραδιοθεραπεία με ακτίνες X και/ή τη χημειοθεραπεία. Η πρώτη είναι περισσότερο αποτελεσματική στα αρχικά στάδια της νόσου, ενώ οι δεύτερες είναι πιθανό να προκαλέσουν βλάβες και σε υγιή κύτταρα και ιστούς. Επιπλέον, συχνή είναι και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων έναντι σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [5].

1.2 Ορόσημα καρκίνου

Τα ορόσημα του καρκίνου αρχικά προτάθηκαν ως ένα σύνολο λειτουργικών ικανοτήτων που αποκτούν τα ανθρώπινα κύτταρα καθώς μεταβαίνουν από την φυσιολογική κατάσταση στην δημιουργία κακοηθών όγκων. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για ικανότητες απαραίτητες για την ανάπτυξη καρκίνου που είναι κοινές σε όλους τους τύπους καρκινικών κυττάρων. Αρχικά, το 2000 διατυπώθηκε η ύπαρξη έξι τέτοιων ικανοτήτων, ενώ το 2011 προστέθηκαν σε αυτές άλλες δύο. Τέλος, το ίδιο έτος προστέθηκαν στον κατάλογο δύο ακόμα ικανότητες, οι οποίες οι ερευνητές θεώρησαν πως ήταν απαραίτητες για την ενεργοποίηση των υπόλοιπων οκτώ και κατ' επέκταση την ανάπτυξη των όγκων. Επομένως, σήμερα θεωρείται πως υπάρχουν συνολικά 10 τέτοιες ικανότητες-ορόσημα (Εικόνα 1) [6]. Αναλυτικότερα, αυτές είναι οι εξής:

- Διατήρηση πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης (sustaining proliferative signaling)
- Αποφυγή καταστολών ανάπτυξης (evading growth suppressors)
- Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο (resisting cell death)
- Πολλαπλασιαστική αθανασία (enabling replicative immortality)
- Αγγειογένεση (inducing/accessing vasculature)
- Ενεργοποίηση μετάστασης (activating invasion and metastasis)
- Απορρύθμιση κυτταρικού μεταβολισμού (reprogramming cellular metabolism)
- Αποφυγή ανοσολογικής απόκρισης (avoiding immune destruction)
- Φλεγμονή που προάγει την ανάπτυξη όγκων (tumor-promoting inflammation)
- Γονιδιωματική αστάθεια και μεταλλάξεις (genome instability and mutations)



Εικόνα 1. Ορόσημα του καρκίνου. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.

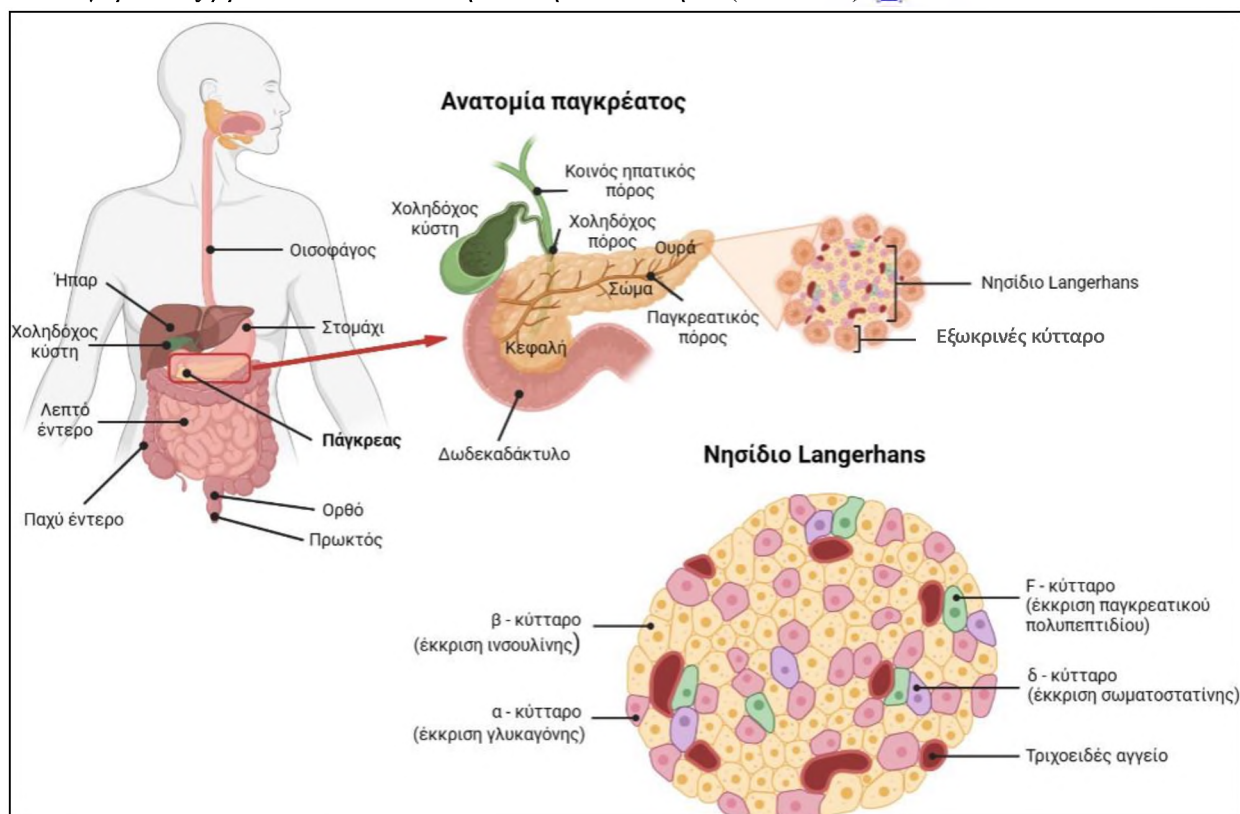
Ωστόσο, οι επιστήμονες σημειώνουν πως αυτές οι ικανότητες-ορόσημα από μόνες τους αδυνατούν να καλύψουν την πολυπλοκότητα της παθογένεσης του καρκίνου και να προσδιορίσουν τους ακριβείς μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς που επιτρέπουν στα κύτταρα να αποκτούν αυτές τις ικανότητες κατά την ανάπτυξη κακοηθών όγκων [6].

1.3 Παγκρεατικός καρκίνος

1.3.1 Πάγκρεας

1.3.1.1 Δομή

Το πάγκρεας είναι ένας μικτός αδένας με ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα. Στον μέσο ενήλικο υγιή άνθρωπο, το πάγκρεας ζυγίζει περίπου 100 gr, ενώ το μήκος του κυμαίνεται από 14 έως 25 cm και ο όγκος του είναι περίπου $72,4 \text{ cm}^3 (\pm 25,8)$ [7]. Αποτελεί μέρος του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και έκκριση πεπτικών ενζύμων, αλλά και ορμονών για τον έλεγχο του μεταβολισμού και της αποθήκευσης της ενέργειας στο σώμα [8]. Το σχήμα του είναι ταυτόχρονα λοβώδες και επίμηκες και είναι τοποθετημένο πλαγίως πίσω από οπίσθιο και άνω κοιλιακό τοίχωμα. Όσον αφορά την ανατομία του, χωρίζεται σε τρία κύρια μέρη): την κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Υπάρχει, επίσης, και η αγκιστροειδής απόφυση, στη βάση της κεφαλής, αλλά και ο αυχένας που βρίσκεται μεταξύ κεφαλής και σώματος [7]. Η κεφαλή του παγκρέατος βρίσκεται κάτω από τη χοληδόχο κύστη και εφάπτεται στο δωδεκαδάκτυλο, ενώ το σώμα και η ουρά του εκτείνονται ως τον σπλήνα [7]. Αναλυτικότερα, πίσω από τον αυχένα του παγκρέατος βρίσκεται η μεσεντέριος αρτηρία και φλέβα, ενώ πίσω από το σώμα του παγκρέατος βρίσκεται η αορτή, η μεσεντέριος αρτηρία, τα νεφρικά αγγεία, καθώς και το αριστερό νεφρό. Τέλος, η ουρά του παγκρέατος βρίσκεται κοντά στην πύλη του σπλήνα (Εικόνα 2) [7].



Εικόνα 2. Ανατομία παγκρέατος. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.

1.3.1.2 Λειτουργίες

Πρόκειται για έναν αδένα που επηρεάζει τη λειτουργία ολόκληρου του σώματος. Έχει δύο κύριες και πολύ σημαντικές λειτουργίες: την ενδοκρινή και την εξωκρινή. Η ενδοκρινής λειτουργία του σχετίζεται με την παραγωγή ορμονών που ρυθμίζουν τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα και την έκκριση ουσιών από τους αδένες, ενώ η εξωκρινής με την πέψη [9].

Η ενδοκρινής λειτουργία εκτελείται από τα νησίδια Langerhans και περιλαμβάνει την παραγωγή ορμονών όπως η ινσουλίνη, η προΐνσουλίνη, η αμυλίνη, το πεπτίδιο C, η σωματοστατίνη, το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο και η γλυκαγόνη. Η ινσουλίνη συμβάλλει στην ελάττωση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα, ενώ η γλυκαγόνη προκαλεί αύξηση των επιπέδων αυτών [9]. Στον άνθρωπο, 40-60% των ενδοκρινών κυττάρων στα νησίδια Langerhans είναι β κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν την ινσουλίνη. Υπάρχουν επίσης τα α κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή γλυκαγόνης, τα δ που παράγουν τη σωματοστατίνη, τα F κύτταρα (ή κύτταρα παγκρεατικού πολυπεπτιδίου), τα οποία εκκρίνουν το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο και τα κύτταρα που παράγουν την γκρελίνη. Ωστόσο, η αναλογία αυτών των διαφορετικών τύπων ενδοκρινικών κυττάρων μέσα στο νησίδιο μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία του ατόμου, το μέγεθος του κάθε νησιδίου αλλά και με την τοποθεσία του νησιδίου μέσα στο πάγκρεας. Έχει βρεθεί πως τα μικρότερα νησίδια περιέχουν κυρίως β κύτταρα, ενώ τα μεγαλύτερα έχουν σχεδόν ίδιο αριθμό α και β κυττάρων [7].

Η εξωκρινής λειτουργία, από την άλλη, περιλαμβάνει την παραγωγή ενζύμων που είναι απαραίτητα για την πέψη της τροφής. Τα εξωκρινή κύτταρα αποτελούν το 85% του παγκρέατος και παράγουν τα ενζυμικά συστατικά του παγκρεατικού υγρού, το οποίο στη συνέχεια οδηγείται στο δωδεκαδάκτυλο μέσω των παγκρεατικών πόρων. Έτσι, το παγκρεατικό υγρό περιλαμβάνει ένζυμα απαραίτητα για την πέψη και αποικοδόμηση πρωτεϊνών, λιπών, υδατανθράκων και νουκλεϊκών οξέων, αλλά και ηλεκτρολύτες και μια μικρή ποσότητα βλέννας. Στα πρωτεολυτικά ένζυμα του παγκρεατικού υγρού περιλαμβάνονται η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη, η καρβοξυπεπτιδάση και η ελαστάση. Οι δύο πρώτες εκκρίνονται υπό τη μορφή των προενζύμων θρυψινογόνο και χυμοθρυψινογόνο. Επιπλέον, για την αποικοδόμηση των λιπών εκκρίνονται ένζυμα όπως η λιπάση, η φωσφολιπάση και η εστεράση, ενώ τα γλυκολυτικά ένζυμα που εκκρίνονται είναι κυρίως η λακτάση και η αμυλάση. Τέλος, όσον αφορά την διάσπαση των νουκλεϊκών οξέων, εκκρίνεται στο παγκρεατικό υγρό η ριβονουκλεάση και δεοξυριβονουκλεάση, οι οποίες διασπούν τα νουκλεϊκά οξέα σε μονο- και ολιγονουκλεοτίδια [9].

Η έκκριση του παγκρεατικού υγρού ρυθμίζεται από διάφορες ορμόνες, αλλά και από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Αναλυτικότερα, όταν η τροφή εισέρχεται στο δωδεκαδάκτυλο, ενδοκρινή κύτταρα στο εσωτερικό του εκκρίνουν ορισμένες ορμόνες (π.χ. σεκρετίνη) στην κυκλοφορία του αίματος, οι οποίες με τη σειρά τους δίνουν το ερέθισμα στο πάγκρεας να παράγει και να εκκρίνει μεγάλες ποσότητες νερού, διττανθρακικού και πεπτικών ενζύμων, απαραίτητων για την πέψη της τροφής που εισέρχεται στο λεπτό έντερο [7]. Έτσι, το πάγκρεας εκκρίνει περίπου ένα έως τέσσερα λίτρα παγκρεατικού υγρού ημερησίως, ποσότητα που μεταβάλλεται ανάλογα με την πρόσληψη τροφής [9].

1.3.2 Τύποι παγκρεατικού καρκίνου

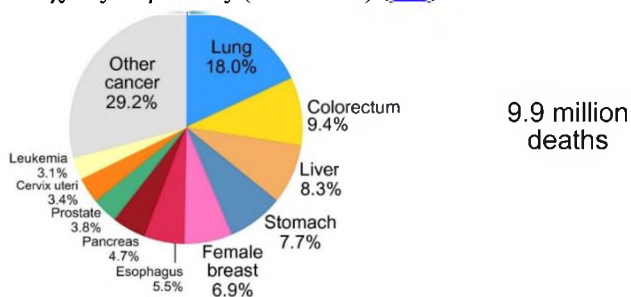
Ο καρκίνος του παγκρέατος χωρίζεται κυρίως σε δύο τύπους: το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (ή παγκρεατικό πορώδες αδενοκαρκίνωμα – pancreatic ductal adenocarcinoma – PDAC) το οποίο είναι το πιο συχνό (90% των ασθενών) και αναπτύσσεται στην εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος και τον παγκρεατικό νευροενδοκρινή όγκο (pancreatic neuroendocrine tumor - PanNET), ο οποίος είναι λιγότερο συχνός (λιγότερο από 5% των ασθενών) και αναπτύσσεται στον ενδοκρινή ιστό του παγκρέατος [10]. Γενικά, οι όγκοι των ενδοκρινών κυττάρων του παγκρέατος είναι πιο σπάνιοι και είναι γνωστοί και ως όγκοι κυττάρων νησιδίων Langerhans.

Το 60-70% των παγκρεατικών αδενοκαρκινωμάτων εμφανίζεται στην κεφαλή του παγκρέατος, ενώ το υπόλοιπο 30% εμφανίζεται στο σώμα και την ουρά του παγκρέατος. Επιπλέον, υπάρχουν αρκετοί υπότυποι του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά, αλλά και την πρόγνωσή τους. Μερικοί από αυτούς είναι το κολλοειδές καρκίνωμα, το οποίο σχετίζεται με την υπερέκκριση εξωκυττάριας βλέννας από τα κύτταρα, αλλά και το ηπατοειδές καρκίνωμα [11].

Όσον αφορά την ανάπτυξη του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος, πρόκειται για μια σειρά από σταδιακές μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβών και την ανάπτυξη κακοήθους όγκου. Πιο συγκεκριμένα, ως πρόδρομοι του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος έχουν χαρακτηριστεί η παγκρεατική ενδοθηλιακή νεοπλασία (pancreatic intraepithelial neoplasia - PanIN), τα ενδοπορικά θηλώδη βλεννώδη νεοπλάσματα (intraductal papillary mucinous neoplasms - IPMN) και τα βλεννώδη κυστικά νεοπλάσματα (mucinous cystic neoplasms - MCN). Η πρώτη είναι βλάβη των μικρών, συνήθως, παγκρεατικών πόρων, ενώ τα δεύτερα αναπτύσσονται κυρίως στον κύριο παγκρεατικό πόρο [11].

1.3.3 Επιδημιολογία παγκρεατικού καρκίνου

Παρά τη ραγδαία πρόοδο της σύγχρονης ιατρικής και την αύξηση των ποσοστών επιβίωσης πολλών τύπων καρκίνου, ο παγκρεατικός καρκίνος παραμένει ένας εξαιρετικά θανατηφόρος γαστρεντερικός καρκίνος με ένα χαμηλό ποσοστό πενταετούς επιβίωσης και με δυσκολία στην πρόωρη διάγνωση. Σήμερα, τα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητάς του αυξάνονται κάθε χρόνο παγκοσμίως, ανεξάρτητα από τη γεωγραφική περιοχή, ενώ το 2050 η πιθανότητα εμφάνισης αναμένεται να αυξηθεί σε 18,6 στα 100.000 άτομα, με μέση ετήσια αύξηση 1,1%, γεγονός που σημαίνει πως ο παγκρεατικός καρκίνος θα αποτελέσει σημαντικό ζήτημα για τη δημόσια υγεία [12]. Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, συγκεκριμένα, παρουσιάζει πολύ κακή πρόγνωση, αφού μετά τη διάγνωση, μόνο το 24% των ασθενών επιβιώνουν για έναν χρόνο, ενώ το 9% ζουν έως και πέντε επιπλέον χρόνια [10]. Εξαιτίας αυτών των χαμηλών ποσοστών επιβίωσης, το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα αποτελεί το 7^η κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως, παρά το γεγονός ότι είναι ο 10^{ος} πιο συχνός καρκίνος (Εικόνα 3) [12].

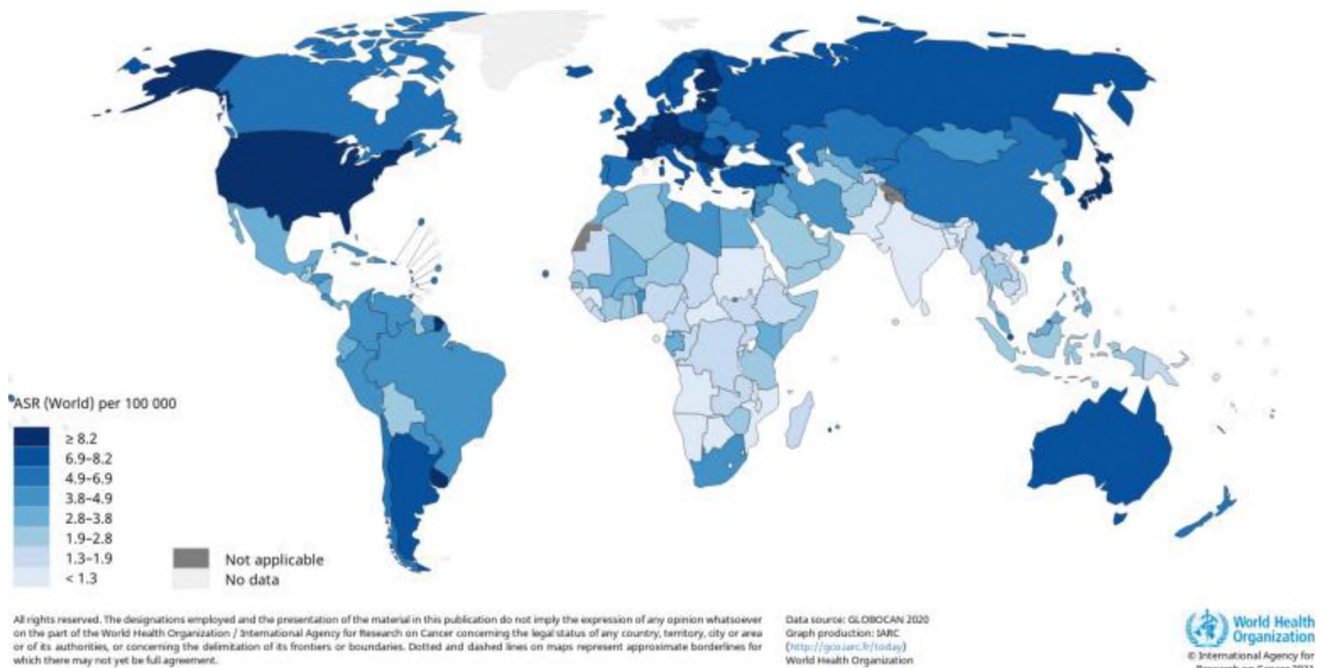


Εικόνα 3. Ποσοστά θανάτων διάφορων τύπων καρκίνου παγκοσμίως. GLOBOCAN 2020.

Σύμφωνα με παγκόσμια στατιστικά του 2018, φάνηκε πως συνολικά διαγνώστηκαν 458.918 νέοι ασθενείς και σημειώθηκαν 432.242 θάνατοι από καρκίνο του παγκρέατος το 2018 στον κόσμο, ενώ οι θάνατοι αποτελούσαν το 94,2% των συνολικών διαγνώσεων. Στοιχεία του 2020, δείχνουν πως τη χρονιά αυτή διαγνώστηκαν 495.773 νέοι ασθενείς, ενώ οι θάνατοι ανέρχονταν στους 466.003, με τα ποσοστά εμφάνισης, να είναι ίδια σχεδόν με τα ποσοστά θνησιμότητας στον πληθυσμό. Περαιτέρω αναλύσεις του 2017 έδειξαν πως ο αριθμός των νέων ασθενών και των θανάτων από καρκίνο του παγκρέατος ετησίως αυξήθηκε 2,3 φορές, από 195.000 ασθενείς και 196.000 θανάτους κατά τη διάρκεια του έτους 1990, σε 448.000 ασθενείς και 441.000 θανάτους κατά τη διάρκεια του 2017 παγκοσμίως [12].

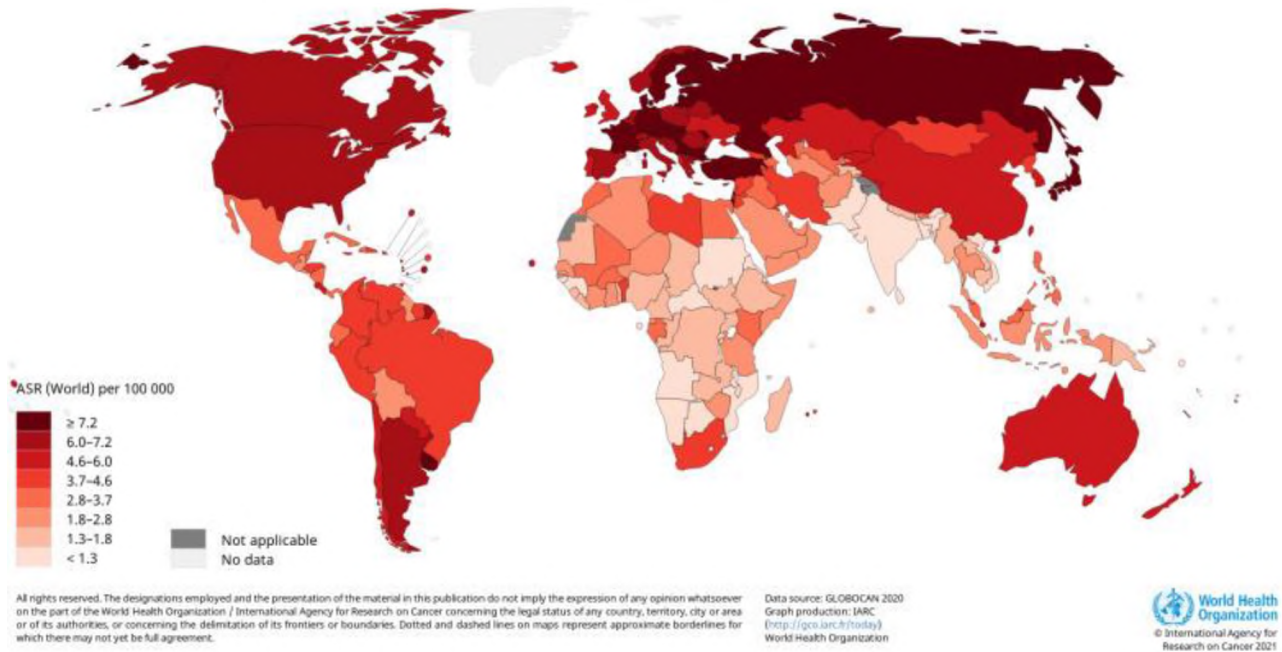
Η συχνότητα εμφάνισης και τα ποσοστά θνησιμότητας του παγκρεατικού καρκίνου διαφέρουν ανάμεσα στις χώρες (Εικόνες 4 και 5). Οι 6 χώρες με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου, σύμφωνα με στοιχεία του έτους 2020, είναι η Ουγγαρία (11,2 ασθενείς στα 100.000 άτομα του συνολικού πληθυσμού), η Ουρουγουάη (10,7 στα 100.000 άτομα), η Ιαπωνία (9,9 στα 100.000 άτομα), η Σλοβακία (9,6 στα 100.000), η Τσεχία (9,5 στα 100.000 άτομα) και η Αυστρία (9 στα 100.000 άτομα). Επιπλέον, ένα σύνολο από 21 χώρες παρουσίασε μια συχνότητα εμφάνισης μεταξύ 8,1 και 8,9 ασθενών στα 100.000 άτομα. Όσον αφορά τα ποσοστά θνησιμότητας του καρκίνου του παγκρέατος, αυτά ήταν μεγαλύτερα στην Ουγγαρία και την Ουρουγουάη (10,2 θάνατοι στα 100.000 άτομα του συνολικού πληθυσμού). Φαίνεται πως τα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας του παγκρεατικού καρκίνου ήταν τριπλάσια ή ακόμα και τετραπλάσια σε χώρες με υψηλότερο δείκτη ανθρώπινης ανάπτυξης (Human Development Index – HDI, λαμβάνει υπόψιν παράγοντες όπως το προσδόκιμο ζωής και την εκπαίδευση των ατόμων κάθε χώρας) [12].

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, pancreas, both sexes, all ages



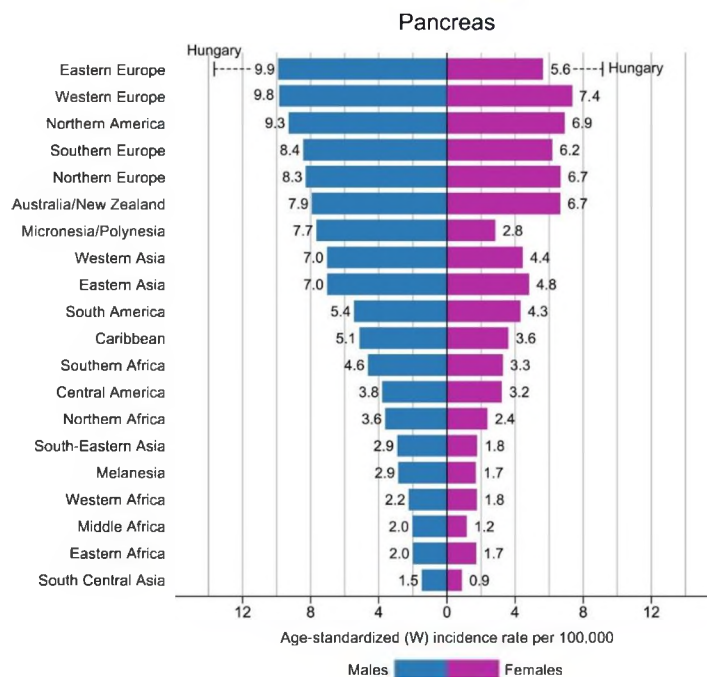
Εικόνα 4. Συχνότητα εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας [Cancer Today \(iarc.fr\)](http://cancer-today.iarc.fr)

Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, pancreas, both sexes, all ages

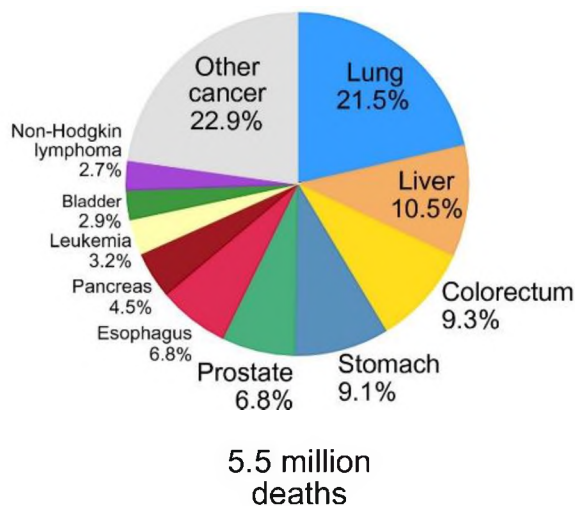


Εικόνα 5. Ποσοστά θνησιμότητας του παγκρεατικού καρκίνου. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας [Cancer Today \(iarc.fr\)](http://gco.iarc.fr/today)

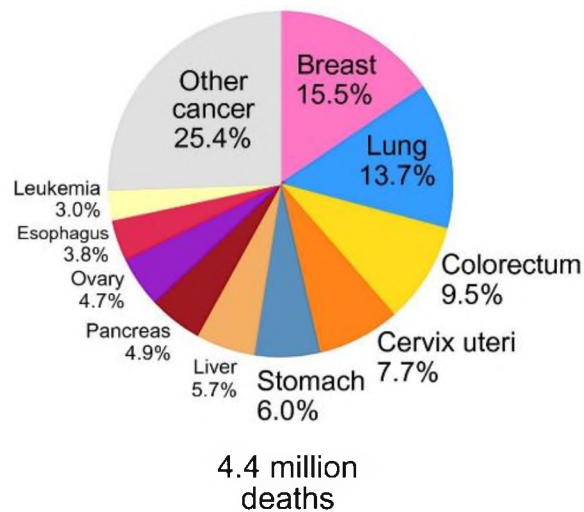
Ωστόσο, παρατηρούνται διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης του παγκρεατικού καρκίνου μεταξύ των δύο φύλων, με τους άντρες να παρουσιάζουν ελάχιστα υψηλότερα ποσοστά (Εικόνα 6). Αντίθετα, τα ποσοστά θνησιμότητας από παγκρεατικό καρκίνο φαίνεται να είναι υψηλότερα στις γυναίκες, με πολύ μικρή όμως διαφορά (Εικόνες 7 και 8) [4].



Εικόνα 6. Συχνότητα εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου σε άνδρες και γυναίκες, ανά περιοχή. GLOBOCAN 2020.



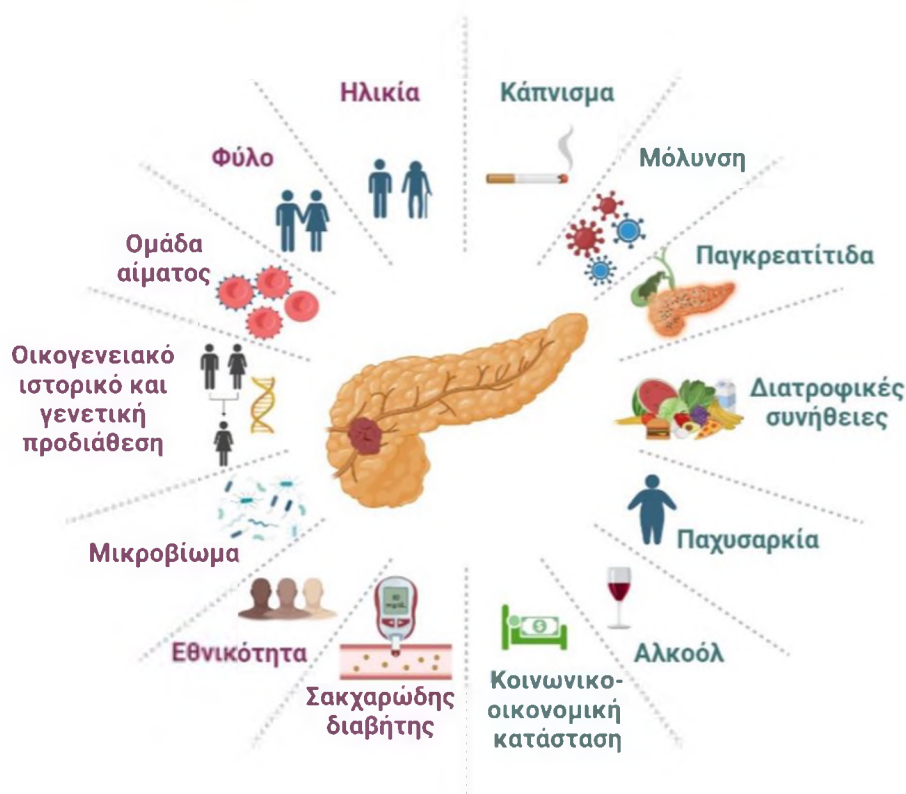
Εικόνα 7. Ποσοστά θανάτων διάφορων τύπων καρκίνου, σε άνδρες παγκοσμίως. GLOBOCAN 2020.



Εικόνα 8. Ποσοστά θανάτων διάφορων τύπων καρκίνου, σε γυναίκες παγκοσμίως. GLOBOCAN 2020.

1.3.4 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου

Προκειμένου να αποφευχθεί η εμφάνιση και η ανάπτυξη του παγκρεατικού καρκίνου, είναι απαραίτητο να βρεθούν και να καταγραφούν οι παράγοντες αυτοί που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισής του. Έτσι, παρά το γεγονός ότι τα ακριβή αίτια εμφάνισης είναι μέχρι και σήμερα άγνωστα, έχει γίνει συσχέτιση μεταξύ ορισμένων παραγόντων και της ανάπτυξης του παγκρεατικού καρκίνου. Οι παράγοντες αυτοί χωρίζονται σε μη περιβαλλοντικούς και περιβαλλοντικούς (Εικόνα 9) [12].



Εικόνα 9. Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.

Αναλυτικότερα, οι παράγοντες αυτοί είναι οι εξής:

Μη περιβαλλοντικοί παράγοντες:

- Ηλικία

Τόσο το 89,4% των νέων διαγνωσθέντων με παγκρεατικό καρκίνο, όσο και το 92,6% των θανόντων είναι άτομα άνω των 55 ετών στις ΗΠΑ, ενώ νέες διαγνώσεις συνήθως γίνονται σε άτομα ηλικιών 65-74, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 70 έτη. Παράλληλα, στην Κίνα, ο ανδρικός πληθυσμός με παγκρεατικό καρκίνο ηλικίας άνω των 60 ετών εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας. Σε παγκόσμιο επίπεδο, επιπλέον, είναι πολύ σπάνιο να διαγνωστεί ο παγκρεατικός καρκίνος πριν από την ηλικία των 30 ετών. Επομένως, θεωρείται πως ο παγκρεατικός καρκίνος είναι μια ασθένεια που προσβάλλει μεγαλύτερα σε ηλικία άτομα και, έτσι, είναι απαραίτητη η εξέταση του πληθυσμού μετά από μια συγκεκριμένη ηλικία, προκειμένου για γίνει έγκαιρη διάγνωση [12].

- Φύλο

Σε παγκόσμιο επίπεδο, το 2018 καταγράφηκαν 243.033 νέες διαγνώσεις καρκίνου του παγκρέατος σε άνδρες και 215.885 διαγνώσεις σε γυναίκες, ενώ οι θάνατοι ήταν 226.910 και 205.332 αντίστοιχα. Το ίδιο έτος, η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του παγκρέατος και θανάτου εξαιτίας της ασθένειας αυτής πριν τα 74 έτη υπολογιζόταν σε 0,65% και 0,59% αντίστοιχα για τους άνδρες, ενώ για της γυναίκες υπολογίζονταν σε 0,45% και 0,41%. Επομένως, παγκοσμίως, η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος και η θνησιμότητα φαίνεται πως είναι υψηλότερες μεταξύ ανδρών [12].

- Ομάδα αίματος

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες έρευνες αποδεικνύουν πως οι ομάδες αίματος μπορεί να σχετίζονται με την καρκινογένεση ή την πρόοδο του παγκρεατικού καρκίνου. Αναλυτικότερα, έχει δείχθει πως οι ομάδες A, AB και B σχετίζονται με μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου, σε σύγκριση με την ομάδα 0, ενώ υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν πως άτομα με ομάδα αίματος A κινδυνεύουν περισσότερο να αναπτύξουν παγκρεατικό καρκίνο. Επιπλέον, αποδείχθηκε πως υπάρχει σημαντικά υψηλότερος κίνδυνος εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου σε Κινέζους ασθενείς με ομάδες αίματος A ή AB, σε σύγκριση με τα άτομα με ομάδα αίματος 0. Επομένως, ο κίνδυνος ανάπτυξης παγκρεατικού καρκίνου σε άτομα με ομάδα αίματος 0 είναι σημαντικά μικρότερος. Ωστόσο, όσον αφορά την ομάδα αίματος A, μόνο το A1 αλληλόμορφο έχει συσχετιστεί με τον παγκρεατικό καρκίνο, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση πως η δραστηριότητα της γλυκοζυλοτρανσφεράσης της A ομάδας αίματος παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση [12].

- Εθνικότητα

Ευρήματα ερευνών έχουν δείξει πως η συχνότητα εμφάνισης εξωκρινών παγκρεατικών ασθενειών, όπως ο παγκρεατικός καρκίνος, η παγκρεατίτιδα και οι παγκρεατικές κύστες διαφέρει μεταξύ διαφορετικών εθνικοτήτων και οι Αφροαμερικανοί και ορισμένοι αυτόχθονες πληθυσμοί παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης των ασθενειών αυτών. Συγκεκριμένα, έχει

παρατηρηθεί πως οι Αφροαμερικανοί έχουν 20% μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου σε σύγκριση με τους Αμερικανούς με καταγωγή από ευρωπαϊκές χώρες. Επίσης, έρευνες κατέδειξαν τη σημαντικότητα της επίδρασης που μπορεί να έχει η εθνικότητα στις σωματικές μεταλλάξεις των ασθενών με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα [12].

- Μικροβίωμα

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει την άμεση σχέση μεταξύ των στοματικών και εντερικών μικροβιωμάτων και του παγκρεατικού καρκίνου. Αναλυτικότερα, όσον αφορά το στοματικό μικροβίωμα, μελέτες έχουν δείξει, πως τα επίπεδα δύο βακτηρίων – βιοδεικτών (*Neisseria elongate* και *Streptococcus mitis*), ήταν χαμηλότερα σε ασθενής με παγκρεατικό καρκίνο σε σύγκριση με τα υγιή άτομα [12].

Όσον αφορά το εντερικό μικροβίωμα, αυτό έχει συσχετιστεί με γνωστούς παράγοντες κινδύνου εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου, όπως είναι η παχυσαρκία και ο διαβήτης τύπου II [12].

Τέλος, αρκετά σημαντικό φαίνεται να είναι και το μικροβίωμα του παγκρέατος, αφού έρευνες έχουν δείξει πως η μικροβιακή του σύσταση μπορεί να σχετίζεται με τον παγκρεατικό καρκίνο. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί πως η παρουσία βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* ήταν περιορισμένη σε παγκρεατικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος, σε σύγκριση με άτομα χωρίς καρκίνο [12].

- Οικογενειακό ιστορικό και γενετική προδιάθεση

Ο παγκρεατικός καρκίνος που σχετίζεται με κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα ή με οικογενή παγκρεατικό καρκίνο, αποτελεί περίπου το 10% των συνολικών περιπτώσεων παγκρεατικού καρκίνου. Η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού παγκρεατικού καρκίνου έχει συνδεθεί με την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισής του, με τον κίνδυνο εμφάνισης να είναι μεγαλύτερος όταν δύο ή περισσότεροι συγγενείς πρώτου βαθμού πάσχουν από καρκίνο του παγκρέατος [12]. Γενετικά αίτια όπως μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1, BRCA2, και APC συνδέονται με την εμφάνιση του κληρονομικού καρκίνου του παγκρέατος, με τις μεταλλάξεις συγκεκριμένα στα BRCA1/2 να είναι οι πιο συχνές. Ωστόσο, το ίδιο σημαντικές είναι οι σποραδικές μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο KRAS2, οι οποίες συναντώνται σε συχνότητα 90-95% στον παγκρεατικό καρκίνο [10].

- Σακχαρώδης διαβήτης

Σύμφωνα με σχετική έρευνα, σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς σακχαρώδη διαβήτη, αυτοί που διαγνώστηκαν πρόσφατα με διαβήτη παρουσιάζουν ως και 7 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης παγκρεατικού καρκίνου. Επιπλέον, στο 80% των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο έχει βρεθεί υπογλυκαιμία ή διαβήτης, ενώ γηραιότεροι ασθενείς με πρόσφατη εμφάνιση διαβήτη έχουν ως και 8 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν παγκρεατικό καρκίνο σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Επομένως, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II αποτελεί παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος, αλλά και το ίδιο το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα μπορεί να αποτελέσει αιτία εμφάνισης του διαβήτη [12].

Η υπερινσουλιναμία, και ιδιαίτερα η ενδοπαγκρεατική, που οφείλεται στην παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη σε ασθενείς με προδιαβήτη ή πρώιμο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II,

μπορεί να είναι αυτή που τελικά οδηγεί στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Αναλυτικότερα, τα υψηλά επίπεδα των ορμονών των νησιδίων στο αίμα φτάνουν σε ομάδες εξωκρινών κυττάρων του παγκρέατος και κυττάρων του παγκρεατικού πόρου. Εκεί, δρουν σε υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptors) προάγοντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών [12].

Περιβαλλοντικοί παράγοντες:

- Κάπνισμα

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει πως το κάπνισμα είναι αυτό που έχει τη μεγαλύτερη συσχέτιση με την αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης παγκρεατικού καρκίνου, ενώ ο κίνδυνος αυτός είναι διπλάσιος στους καπνιστές σε σύγκριση με τα μη καπνίζοντα άτομα του πληθυσμού. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο που κάπνιζαν πριν τη διάγνωσή τους, είχαν περίπου 40% μεγαλύτερη πιθανότητα θανάτου από άτομα που δεν κάπνιζαν. Γενικά, αναλύσεις έχουν επιβεβαιώσει πως το κάπνισμα μεγάλης έντασης και διάρκειας σχετίζεται με περαιτέρω αύξηση του κινδύνου εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου, ενώ αντιθέτως η διακοπή του καπνίσματος οδηγεί σε μείωση του κινδύνου αυτού. Το κάπνισμα, επίσης, αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό του καρκίνου αυτού. Επομένως, η διακοπή του καπνίσματος φαίνεται πως μπορεί να είναι ωφέλιμη για τη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο, αλλά και για την πρόληψη έναντι στον καρκίνο αυτό [12].

- Κατανάλωση αλκοόλ

Σύμφωνα με πολλές μελέτες, αναμφίβολα, η αύξηση του κινδύνου εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την υψηλή κατανάλωση αλκοόλ (περισσότερα από τρία ποτά την ημέρα), ωστόσο, καμία συσχέτιση δεν έχει βρεθεί μεταξύ χαμηλής και φυσιολογικής κατανάλωσης και του κινδύνου για καρκίνο. Αναλυτικότερα, έχειδειχθεί πως η υψηλή κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου στους άνδρες, αλλά όχι στις γυναίκες. Έτσι, το αλκοόλ μπορεί να είναι και ο λόγος για τον οποίο ο καρκίνος αυτός έχει μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και υψηλότερα ποσοστά θανάτων στους άνδρες [12].

- Διατροφικές συνήθειες

Φαίνεται πως μια δίαιτα υψηλή σε φρούτα, λαχανικά και άλλες φυτικές τροφές μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο ανάπτυξης παγκρεατικού καρκίνου, ενώ δίαιτες πλούσιες σε κρέας και ζωικά προϊόντα αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου. Συγκεκριμένα, η πρόσληψη κρέατος, και ιδιαίτερα κόκκινου κρέατος και κρέατος ψημένου σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά και ετεροκυκλικών αμινών που σχετίζονται με το κρέας, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη εξωκρινούς παγκρεατικού καρκίνου [12].

- Παγκρεατίτιδα

Η οξεία και χρόνια παγκρεατίτιδα και ο παγκρεατικός καρκίνος αποτελούν τις κυριότερες παθήσεις του εξωκρινούς ιστού του παγκρέατος. Όσον αφορά την οξεία παγκρεατίτιδα, πρόκειται για μια φλεγμονώδη ασθένεια που σχετίζεται με τον τραυματισμό και τη νέκρωση του παγκρεατικού ιστού και φαίνεται να αποτελεί πρώιμο σύμπτωμα του παγκρεατικού καρκίνου [12].

Η χρόνια παγκρεατίτιδα είναι επίσης μια φλεγμονώδης ασθένεια που προκαλεί την αντικατάσταση του παρεγχυματικού ιστού του παγκρέατος από ινώδη ιστό και κατ' επέκταση την απώλεια των εξωκρινών κυττάρων και των κυττάρων των νησιδίων Langerhans [12].

Έρευνες έχουν δείξει πως ασθενείς με οξεία παγκρεατίτιδα είχαν 0,4% κίνδυνο να εμφανίσουν παγκρεατικό καρκίνο, ενώ ασθενείς με χρόνια παγκρεατίτιδα είχαν έως και 9 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο. Γενικά, η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου αυξάνεται μετά από την οξεία παγκρεατίτιδα και μειώνεται σταδιακά με το πέρασμα του χρόνου εάν η παγκρεατίτιδα αυτή δεν εξελιχθεί σε χρόνια. Ωστόσο, αύξηση του αριθμού των επαναλαμβανόμενων επεισοδίων οξείας παγκρεατίτιδας έχει συσχετιστεί με αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης του καρκίνου, ενώ 10% των περιπτώσεων αυτών εξελίσσονται σε χρόνια παγκρεατίτιδα [12].

- Παχυσαρκία

Η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με την αυξημένη συχνότητα του παγκρεατικού καρκίνου, αλλά και με τη χειρότερη πορεία της ασθένειας. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει πως συνδέεται με αυξημένη θνησιμότητα, ανεξάρτητα από τις τιμές του δείκτη μάζας σώματος, ενώ φαίνεται πως όταν κάποιος είναι υπέρβαρος ή παχύσαρκος στην πρώιμη ενήλικη ζωή, αυξάνεται ο κίνδυνος θανάτου του από παγκρεατικό καρκίνο [12].

Η παχυσαρκία είναι ρητά συνδεδεμένη με την πρόκληση φλεγμονής μέσω της αύξησης της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα υπερτροφικά κύτταρα του λιπώδους ιστού, η οποία μπορεί μακροπρόθεσμα να προκαλέσει μεταβολές στο μικροπεριβάλλον του ιστού, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση και την αγγειογένεση. Επιπλέον, η παχυσαρκία σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω [12].

- Μόλυνση

Το ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori* - *H. pylori*) βρίσκεται κυρίως στο στομάχι και είναι ένα Gram-αρνητικό μικροαερόφιλο παθογόνο που μολύνει έως και το 50% του πληθυσμού του πλανήτη. Η μόλυνση από το *H. pylori* έχει συσχετιστεί με πλήθος κακοηθειών, όπως ο γαστρικός καρκίνος, η ατροφική γαστρίτιδα, το γαστρικό λέμφωμα, ο ορθοκολικός καρκίνος, ο λарυγγικός καρκίνος, αλλά και ο παγκρεατικός καρκίνος. Υπολογίζεται πως το βακτήριο αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί υπεύθυνο για το 4-25% των περιπτώσεων παγκρεατικού καρκίνου στις Δυτικοποιημένες χώρες [12].

- Κοινωνικοοικονομική κατάσταση και ασφάλιση

Η κοινωνικοοικονομική κατάσταση παίζει σημαντικό ρόλο όσον αφορά την πρόληψη και την πρόγνωση του παγκρεατικού καρκίνου. Μελέτη έχει δείξει πως οι Αφροαμερικανοί και οι

πληθυσμοί της Λατινικής Αμερικής είχαν χαμηλότερα ποσοστά χειρουργείων και περιορισμένη πρόσβαση σε εξειδικευμένη θεραπεία, ενώ όσοι υποβλήθηκαν σε χειρουργικές επεμβάσεις, αυτές πραγματοποιήθηκαν από λιγότερο καταρτισμένους γιατρούς. Επιπλέον, ασθενείς χωρίς ασφάλιση συνήθως λάμβαναν λιγότερο αποτελεσματικές θεραπείες [12].

1.3.5 Διάγνωση και θεραπεία παγκρεατικού καρκίνου

1.3.5.1 Συμπτωματολογία και διάγνωση

Μέχρι τη στιγμή της διάγνωσης τους, τα περισσότερα παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα έχουν ήδη εξαπλωθεί πέρα από το πάγκρεας. Εξαιτίας της θέσης του παγκρέατος, η ανάπτυξη του παγκρεατικού καρκίνου διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, όταν δηλαδή υπάρχουν προφανή κλινικά συμπτώματα [11]. Τα συμπτώματα αυτά, ωστόσο, δεν είναι ειδικά για τον παγκρεατικό καρκίνο, δυσχεραίνοντας περαιτέρω τη διάγνωσή του. Για τον λόγο αυτό, γίνονται προσπάθειες για έλεγχο πριν από την εμφάνιση συμπτωμάτων σε άτομα με προδιάθεση για ασθένειες όπως οι παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες και τα βλεννώδη κυστικά νεοπλάσματα που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο, αλλά και σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του παγκρέατος [14]. Έχει βρεθεί πως υπάρχει μια περίοδος 10 περίπου ετών από την έναρξη της ανάπτυξης του παγκρεατικού καρκίνου έως την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων. Έτσι, σε περίπτωση οικογενειακού ιστορικού καρκίνου, συστήνεται η έναρξη ελέγχου του ατόμου από ηλικία ίση με 10 χρόνια μικρότερη από την ηλικία στην οποία διαγνώστηκε ο νεότερος συγγενής που πάσχει από παγκρεατικό καρκίνο [13].

Όσον αφορά την κλινική εικόνα και τα συμπτώματα του παγκρεατικού καρκίνου, η βαρύτητά τους εξαρτάται από το στάδιο της ασθένειας και από την τοποθεσία του αρχικού καρκινικού όγκου. Πιο αναλυτικά, όταν ο όγκος αναπτύσσεται στην κεφαλή του παγκρέατος (στην πλειονότητα, δηλαδή, των περιπτώσεων) παρατηρείται επιγαστρικός πόνος στην πάνω-δεξιά πλευρά (79%), ίκτερος (56%), ναυτία ή εμετός μετά από απόφραξη της γαστρικής εξόδου (51%), διάρροια (43%) και στεατόρροια λόγω παγκρεατικής ανεπάρκειας (25%). Επιπλέον, η εμφάνιση ή η επιδείνωση του σακχαρώδους διαβήτη μπορεί να θεωρηθεί ανησυχητική. Ο έντονος πόνος στη μέση, επιπλέον, (49%) μπορεί να είναι σημάδι όγκου στο σώμα ή στην ουρά του παγκρέατος. Τέλος, συχνά παρατηρείται και αύξηση του σωματικού βάρους, ανορεξία και φλεβική θρομβοεμβολή [13].

Μετά από την εμφάνιση των πρώτων ύποπτων συμπτωμάτων, τα βήματα που ακολουθούνται για τη διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου είναι τα εξής. Αρχικά, πραγματοποιείται μια γενική εξέταση αίματος, με την οποία προσδιορίζεται ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων, αλλά και η τιμή του αιματοκρίτη και η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης. Επιπλέον, προσδιορίζονται τα ηπατικά ένζυμα, καθώς και οι τιμές της γλυκόζης νηστείας και της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης που σχετίζονται με την ανάπτυξη διαβήτη. Σε ασθενείς με ίκτερο ή κοιλιακό πόνο πραγματοποιείται, επίσης, κοιλιακό υπερηχογράφημα που ακολουθείται από υπολογιστική (ή αξονική) τομογραφία (computed tomography - CT). Εναλλακτικά, πραγματοποιείται μαγνητική τομογραφία (magnetic resonance imaging - MRI) και σπανιότερα ενδοσκοπική παλίνδρομη χολάγγειο-παγκρεατογραφία (Endoscopic retrograde cholangiopancreatography - ERCP). Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις και όταν η διάγνωση δεν είναι ξεκάθαρη, πραγματοποιείται ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα ή ακόμα και βιοψίες. Γενικά, η

πιθανή διάγνωση και ο προσδιορισμός του σταδίου του παγκρεατικού καρκίνου γίνεται κυρίως με αξονική τομογραφία, η οποία έχει ευαισθησία που αγγίζει το 89-96% και εξειδίκευση που αγγίζει το 95%. Μέσω αυτής προσδιορίζεται, επίσης, ο προσανατολισμός του όγκου σε σχέση με τα περιβάλλοντα όργανα και αγγεία [13].

Για τη διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου χρησιμοποιούνται, επιπλέον, βιοδείκτες. Ο CA19-9 είναι ο μόνος βιοδείκτης που έχει πάρει έγκριση από τον FDA και χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της προόδου και της απόκρισης στη θεραπεία της ασθένειας. Πρόκειται για έναν υδατάνθρακα που παράγεται από το πάγκρεας και χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου. Ωστόσο η ευαισθησία (69-98%) και η εξειδίκευσή (46-98%) του καθιστούν αδύνατη τη διάγνωση ασυμπτωματικών ασθενών, ενισχύοντας το γεγονός ότι ο καρκίνος αυτός διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, μετά από την εμφάνιση συμπτωμάτων. Άλλοι συμβατικοί βιοδείκτες, όπως ο CA125, που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών και το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο (CEA), που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση πολλών τύπων καρκίνων, έχουν δείξει περιορισμένη αποτελεσματικότητα στη διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου σε πρώιμα στάδια [52].

1.3.5.2 Θεραπεία

Για τη διαχείριση του παγκρεατικού καρκίνου είναι απαραίτητη μια ομάδα ειδικών που αποτελείται από ογκολόγους, χειρουργούς, ραδιολόγους, γαστρεντερολόγους, παθολόγους και διαιτολόγους. Πρόκειται για μια ασθένεια που παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια σε μοριακό, παθολογικό και κλινικό επίπεδο, ενώ η ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η βιολογία του καρκίνου του και η πρόοδος της ασθένειάς του [14].

Αναλυτικότερα, η πρόοδος του παγκρεατικού καρκίνου χωρίζεται στα εξής κλινικά στάδια:

- **Στάδιο IA:** Όγκος μικρότερος των 2 cm που περιορίζεται στο πάγκρεας
- **Στάδιο IB:** Όγκος μεγαλύτερος των 2 cm που περιορίζεται στο πάγκρεας
- **Στάδιο IIA:** Ο όγκος εκτείνεται πέρα από το πάγκρεας, χωρίς εμπλοκή της κοιλιακής ή της μεσεντερίου αρτηρίας
- **Στάδιο IIB:** Τοπική μετάσταση στους λεμφαδένες
- **Στάδιο III:** Ο όγκος περιλαμβάνει την κοιλιακή ή τη μεσεντέριο αρτηρία
- **Στάδιο IV:** Μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα [13, 14]

Ο παγκρεατικός καρκίνος, ανάλογα με το κλινικό στάδιο τη στιγμή της διάγνωσης χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία, ανήκουν οι όγκοι των σταδίων IA-IIB οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως αφαιρέσιμοι (resectable), στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι όγκοι των σταδίων IIA και IIB που χαρακτηρίζονται ως οριακά αφαιρέσιμοι (borderline resectable), ενώ στην τρίτη κατηγορία ανήκουν οι όγκοι που βρίσκονται στα στάδια III και IV. Στα στάδια αυτά είναι αδύνατη η εκτομή του όγκου, αφού έχουν πραγματοποιεί μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα [13, 14].

Περίπου το 20% των ασθενών είναι υποψήφιοι για χειρουργική επέμβαση (στάδια IA-IIB), αφού δεν παρουσιάζουν μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα και ο κύριος όγκος δεν συνδέεται με την

κοιλιακή, την ηπατική και τη μεσεντέριο αρτηρία. Στην περίπτωση των οριακά αφαιρέσιμων όγκων (στάδια ΙΑ και ΙΒ), πραγματοποιείται χειρουργική επέμβαση μόνο εάν είναι δυνατή η ολική εκτομή του όγκου. Το είδος της χειρουργικής επέμβασης που επιλέγεται εξαρτάται από την τοποθεσία του όγκου που πρόκειται να αφαιρεθεί. Έτσι, για όγκους της κεφαλής και του αυχένα του παγκρέατος επιλέγεται η παγκρεατοδωδεκαδακτυλεκτομή ή αλλιώς επέμβαση Whipple, για όγκους του σώματος ή της ουράς του παγκρέατος επιλέγεται η περιφερική παγκρεατεκτομή, ενώ μπορεί να επιλεγεί και η ολική παγκρεατεκτομή αν οι όγκοι βρίσκονται σε πολλές περιοχές του παγκρέατος. Κοινές μετεγχειρητικές επιπλοκές αποτελούν η καθυστερημένη γαστρική κένωση (5-45%) και οι παγκρεατικές αναστομωτικές διαφυγές (0-13%), δηλαδή έκκριση υγρού πλούσιου σε αμυλάση από το πάγκρεας. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των τιμών της γλυκόζης του αίματος μετά από την επέμβαση κάθε 3-6 μήνες, αφού αναπτύσσεται διαβήτης σε περισσότερο από 50% των ασθενών που υποβάλλονται σε περιφερική παγκρεατεκτομή [13]. Ωστόσο, τα ποσοστά θανάτου εξαιτίας αυτών των χειρουργικών επεμβάσεων είναι χαμηλά στα περισσότερα ιατρικά κέντρα [14].

Σημαντικές για τη θεραπεία του παγκρεατικού καρκίνου είναι και η χημειοθεραπεία και η ραδιοθεραπεία. Αναλυτικότερα, όσον αφορά τη χημειοθεραπεία, αυτή είναι είτε επικουρική, είτε νέο-επικουρική. Η επικουρική θεραπεία προτείνεται για όλους τους ασθενείς (και όσους υποβλήθηκαν σε παγκρεατεκτομές) σύμφωνα με αποτελέσματα δοκιμών και αναλύσεων. Τόσο η γεμισιταβίνη (gemcitabine), όσο και η 5-φθοριοουρακίλη (5-fluorouracil) παρατείνουν τον μέσο χρόνο επιβίωσης των ασθενών κατά τρεις μήνες. Ωστόσο, η γεμισιταβίνη προτείνεται ως φαρμακευτικός παράγοντας πρώτης γραμμής εξαιτίας του χαμηλότερου τοξικολογικού της προφίλ, σε σύγκριση με την 5-φθοριοουρακίλη, σε κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν από την ευρωπαϊκή ομάδα μελέτης για τον παγκρεατικό καρκίνο (European Study Group for Pancreatic Cancer - ESPAC). Όσον αφορά τις παρενέργειες της γεμισιταβίνης, οι συχνότερες είναι η μυελοκαταστολή, η ηπατοτοξικότητα, η ναυτία, ο εμετός και η διάρροια, ενώ η 5-φθοριοουρακίλη μπορεί να προκαλέσει στοματίτιδα, ναυτία ή εμετό και μυελοκαταστολή [13].

Τα οφέλη της ραδιοθεραπείας, από την άλλη, δεν είναι σαφή, σύμφωνα με τα αποτελέσματα δοκιμής που πραγματοποιήθηκε από την ESPAC (δοκιμή ESPAC-1). Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία και ραδιοθεραπεία ταυτόχρονα (13,9 μήνες), ήταν παρόμοιος με αυτόν των ασθενών χωρίς θεραπεία (16,9 μήνες), ενώ αυξάνονταν όταν η χημειοραδιοθεραπεία ακολουθούσαν από χημειοθεραπεία (19,9 μήνες). Ωστόσο, μεγαλύτερος φαίνεται πως ήταν ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών που υποβλήθηκαν αποκλειστικά και μόνο σε επικουρική χημειοθεραπεία (21,6 μήνες). Παρά τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής, η επικουρική ραδιοθεραπεία εφαρμόζεται από ορισμένα ινστιτούτα σήμερα, σε περιορισμένο βαθμό. Οι παρενέργειες της ραδιοθεραπείας, ωστόσο, περιλαμβάνουν δερματίτιδα, ναυτία, εμετό, διάρροια και μυελοκαταστολή [13].

Όσον αφορά τη νέο-επικουρική θεραπεία (όπως αυτή που χορηγείται προεγχειρητικά), τα οφέλη της είναι αμφιλεγόμενα. Θεωρητικά, τα πλεονεκτήματά της περιλαμβάνουν την προεγχειρητική εξάλειψη των μικρομεταστάσεων, την ελάττωση του μεγέθους του όγκου για την ευκολότερη εκτομή του, καθώς και την καλύτερη αιμάτωση των ιστών γύρω από τον όγκο πριν από τη χειρουργική επέμβαση. Ωστόσο, από κλινικές μελέτες φάσης Ι και ΙΙ φάνηκε πως η μέση επιβίωση των ασθενών που υποβλήθηκαν σε νέο-επικουρική θεραπεία ήταν 23,3 μήνες, ενώ τα ποσοστά

θησιμότητας κατά τη διάρκεια τη χειρουργικής επέμβασης και της μετέπειτα ανάρρωσης ανέρχονταν σε 5,3%. Οι αριθμοί αυτοί μπορούν να συγκριθούν με τους αντίστοιχους από τη χορήγηση επικουρικής θεραπείας αποκλειστικά μετεγχειρητικά, όμως δεν έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές δοκιμές φάσης III για να γίνει πλήρης σύγκριση μεταξύ νέο-επικουρικής και επικουρικής θεραπείας. Επομένως, τα περισσότερα ιατρικά κέντρα δεν χρησιμοποιούν τη νέο-επικουρική θεραπεία σήμερα [13].

Οι ασθενείς σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου, που δεν είναι δυνατό να υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση για την εξαγωγή των όγκων (στάδια III και IV), εμφανίζουν μέσο χρόνο επιβίωσης χωρίς θεραπεία, 2 με 3 μήνες. Ωστόσο, η χρήση χημειοθεραπείας στους ασθενείς αυτούς φαίνεται πως επιτείνει την επιβίωσή τους, με τη γεμισιταβίνη και την 5-φθοριοουρακίλη να έχουν παρόμοια αποτελέσματα. Επίσης, θετικά αποτελέσματα φαίνεται να έχει και η συνδυαστική χρήση χημειοθεραπείας και ραδιοθεραπείας. Στην περίπτωση μεταστάσεων σε άλλα όργανα πέραν του παγκρέατος, η χορήγηση γεμισιταβίνης φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα από τη χορήγηση 5-φθοριοουρακίλης, ενώ έχει μελετηθεί και η συνδυαστική χρήση γεμισιταβίνης και διαφόρων κυτταροτοξικών παραγόντων (συνδυαστική χημειοθεραπεία) [13].

Συμπερασματικά, περιορισμοί όπως η αδυναμία έγκαιρης διάγνωσης, η περιορισμένη χρησιμότητα των βιοδεικτών, και, κυρίως, η πολύ μικρή πρόοδος, η χαμηλή αποτελεσματικότητα και οι παρενέργειες των τρεχουσών θεραπειών, τονίζουν την ανάγκη για ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου.

1.4 PDK1 και καρκίνος

1.4.1 PDK1

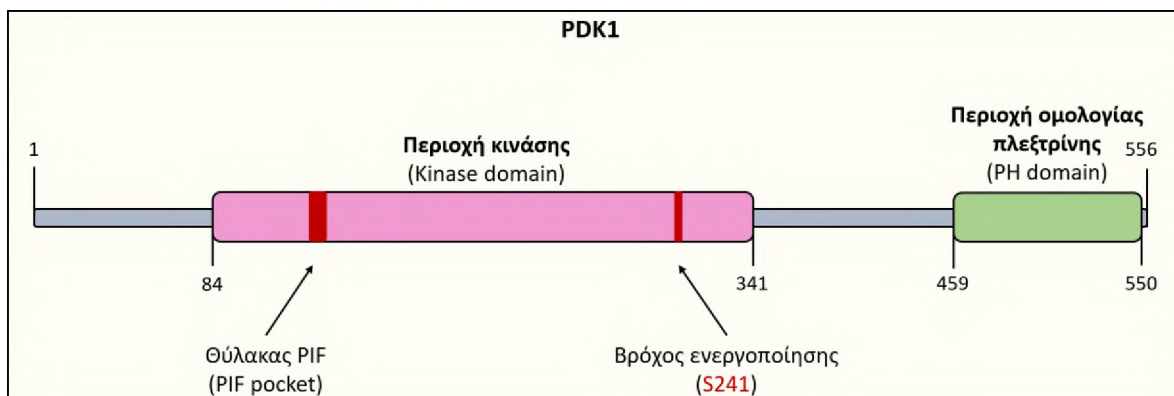
1.4.1.1 Γενικές πληροφορίες

Η PDK1 (3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1/πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από την 3-φωσφοϊνοσιτίδη-1) είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης – θρεονίνης 556 αμινοξέων που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1997 από σκελετικούς μύες κουνελιού [15]. Έχει σημαντικό ρόλο σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, αφού φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί κινάσες της AGC οικογένειας, μια οικογένεια 63 κινασών, στην οποία ανήκει και η ίδια. Τέτοιες κινάσες – στόχοι της PDK1 είναι η πρωτεϊνική κινάση B (PKB ή Akt), η p70 κινάση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 (S6K) και η 90kDa κινάση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 (RSK) [16]. Το γεγονός ότι έχει τόσες πολλές πρωτεΐνες ως υποστρώματα καθιστά την PDK1 κεντρικό ρυθμιστή του κυτταρικού μεταβολισμού, αλλά και της ανάπτυξης και θανάτου των κυττάρων [17].

1.4.1.2 Δομή

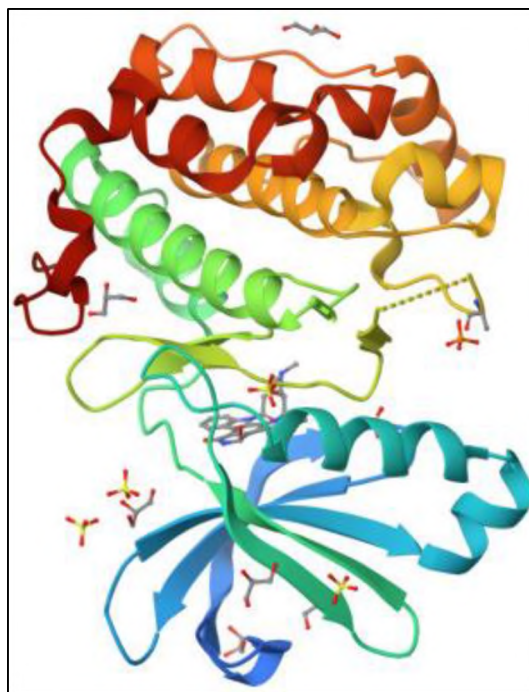
Η PDK1 έχει μια αμινοτελική καταλυτική περιοχή κινάσης και μια καρβοξυτελική περιοχή ομολογίας πλεξτρίνης (pleckstrin homology – PH). Η πρώτη βρίσκεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 84 και 341, ενώ η δεύτερη τοποθετείται μεταξύ των καταλοίπων 459 και 550 και είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της PDK1 με τη διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (3,4)

(PIP₂) και τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (3,4,5) (PIP₃), μόρια απαραίτητα για τη λειτουργία της (Εικόνα 10)) [16].



Εικόνα 10. Δομή της PDK1. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του PowerPoint.

Όπως και οι περισσότερες κινάσες, παρουσιάζει δίλοβη αναδίπλωση στην καταλυτική της περιοχή, ενώ η δομή της φαίνεται να είναι παρόμοια με αυτή της PKA, η οποία είναι μια άλλη πρωτεΐνη της οικογένεια AGC, της οποίας η δομή έχει προσδιοριστεί. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται πως ο αμινοτελικός λοβός της καταλυτικής της περιοχής αποτελείται κυρίως από β-πτυχωτά φύλλα, ενώ ο καρβοξυτελικός λοβός της περιέχει κυρίως α-έλικες (Εικόνα 11) [16].



Εικόνα 11. Δομή της PDK1. Protein Data Bank.

Η θέση δέσμευσης ATP βρίσκεται ανάμεσα στους δύο λοβούς (Εικόνα 11). Στον μικρό αμινοτελικό λοβό της καταλυτικής περιοχής της PDK1, επίσης, εντοπίζεται ένας “θύλακας” (PIF pocket - PDK1 interacting fragment). Η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της PDK1 με ορισμένα υποστρώματά της όπως η S6K και η πρωτεϊνική κινάση C (Εικόνα 10) [16].

1.4.1.3 Λειτουργία

Είναι γνωστό πως για την ενεργοποίηση της PDK1 είναι απαραίτητη η αυτοφωσφορυλίωσή της σε ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο σερίνης (Ser241) στο βρόχο ενεργοποίησής της. Είναι μια συστατικά ενεργή κινάση, ωστόσο, προκειμένου να φωσφορυλιώσει ορισμένα από τα υποστρώματά της, είναι απαραίτητη η αλληλεπίδρασή της με την τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (3,4,5) (PIP₃), που αποτελεί προϊόν της 3 κινάσης της φωσφοϊνοσιτιδής (phosphoinositide 3-kinase – PI3K). Για παράδειγμα, προκειμένου να φωσφορυλιωθεί η PKB, η τριφωσφορική φωσφατιδυλιννοσιτόλη συνδέεται στις περιοχές ομολογίας πλεξτρίνης των δύο κινασών με αποτέλεσμα αυτές να τοποθετούνται μαζί στην ίδια περιοχή της πλασματικής μεμβράνης. Έτσι, η PDK1 έχει τη δυνατότητα να φωσφορυλιώσει την PKB [16].

Σε αντίθεση με τη φωσφορυλίωση της PKB, η φωσφορυλίωση των υπολοίπων υποστρωμάτων της PDK1 φαίνεται να ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων σε συγκεκριμένα κατάλοιπα στο καρβοξυτελικό άκρο της καταλυτικής τους περιοχής (υδρόφοβο μοτίβο), είναι αυτή που επιτρέπει στην PDK1, με τη σειρά της, να τις φωσφορυλιώσει. Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται μετά από την αλληλεπίδραση των υδρόφοβων μοτίβων των υποστρωμάτων με την περιοχή PIF της PDK1, ενώ οι κινάσες που φωσφορυλιώνουν αρχικά το υδρόφοβο μοτίβο είναι άγνωστες. Ωστόσο, είναι πιθανό η φωσφορυλίωση αυτή να εξαρτάται από την ενεργοποίηση της PI3K, αφού, *in vivo*, φαίνεται πως ρυθμίζεται από την τριφωσφορική φωσφατιδυλιννοσιτόλη [16].

1.4.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται η PDK1

1.4.2.1 Μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR και ο ρόλος του στον καρκίνο

Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt και αυτό του mTOR είναι δύο μονοπάτια εξίσου σημαντικά για την ανάπτυξη και την επιβίωση των κυττάρων, τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές συνθήκες. Είναι τόσο αλληλένδετα, που σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να θεωρηθούν ένα μοναδικό μονοπάτι, το οποίο αλληλεπιδρά σε μεγάλο βαθμό με πολλά διαφορετικά μονοπάτια [18]. Έχει βρεθεί πως το μονοπάτι αυτό είναι ένα από τα συχνότερα απορρυθμισμένα μονοπάτια στον καρκίνο και παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, η υπερενεργοποίησή του, οδηγεί στην αυξημένη επιβίωση και ανάπτυξη των κυττάρων, αλλά και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους [19].

Όσον αφορά την ενεργοποίηση του μονοπατιού αρχικά, η PI3K (phosphoinositide 3-kinase/3 κινάσης της φωσφοϊνοσιτιδής) μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη, όπου εξαιτίας εξωκυτταρικών αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών, ενεργοποιείται από υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) ή από υποδοχείς συνδεδεμένους με G-πρωτεΐνες. Έπειτα από την ενεργοποίηση της καταλύει τη μετατροπή της διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (3,4) (PIP₂) σε τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (3,4,5) (PIP₃). Η PI3K ανήκει σε μια οικογένεια κινασών που χωρίζεται σε τρεις τάξεις, με βάση τη δομή, το μηχανισμό ρύθμισης και τη συγγένεια με το υπόστρωμα της κάθε κινάσης. Η τάξη I των PI3K περιλαμβάνει τις PI3K α , PI3K β , PI3K δ (τάξη IA) και PI3K γ (τάξη IB). Οι κινάσες αυτές περιέχουν μια p85 ρυθμιστική υπομονάδα και μια p110 καταλυτική υπομονάδα. Η πρώτη συνδέεται με τον υποδοχέα, ενώ η δεύτερη είναι αυτή που μετατρέπει την PIP₂ σε PIP₃ [20]. Ωστόσο, φωσφατάσες όπως η PTEN, μετατρέπουν την PIP₃ σε

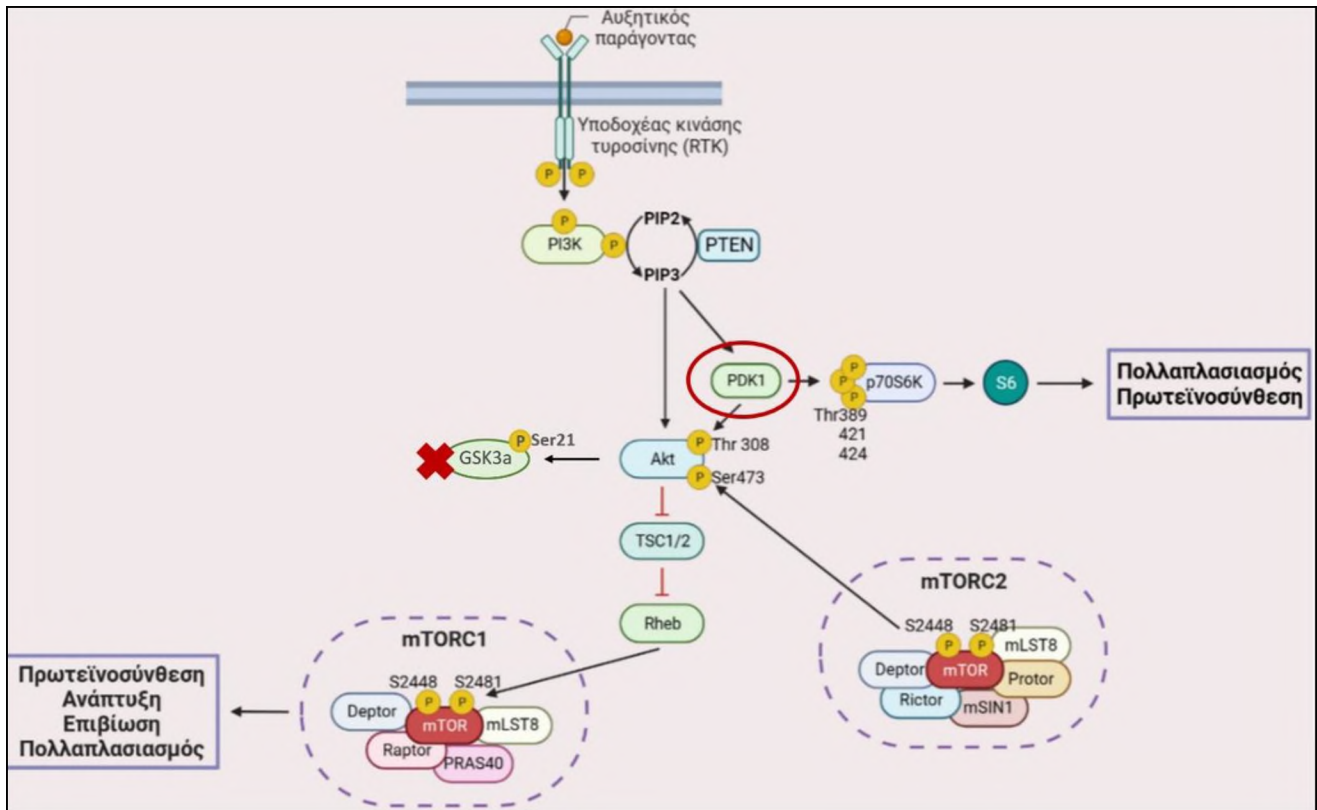
PIP₂, και δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές του μονοπατιού, αποτρέποντας έτσι την ανάπτυξη των κυττάρων και αυξάνοντας την ευαισθησία στην απόπτωση. Επομένως, δρουν ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες [18].

Επομένως, η παραγόμενη πλέον PIP₃ δρα ως δεύτερος αγγελιαφόρος και, αφού αλληλεπιδράσει με τις περιοχές ομολογίας πλεξτρίνης (PH domains) των PDK1 και Akt (PKB), οι δύο κινάσες έρχονται σε επαφή στην πλασματική μεμβράνη [16]. Έτσι, η PDK1 φωσφορυλιώνει την Akt σε ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr308). Ταυτόχρονα, η Akt φωσφορυλιώνεται από το σύμπλοκο mTORC2 σε ένα κατάλοιπο σερίνης (Ser473) [20]. Πρόκειται για ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τις πρωτεΐνες mTOR (mammalian target of rapamycin/στόχος ραπαμυκίνης των θηλαστικών), Rictor (Rapamycin – insensitive companion of mammalian target of rapamycin), Sin1 (stress – activated protein kinase – interacting protein) και mLST8 (MTOR Associated Protein LST8 Homolog) [18]. Η ενεργοποίησή του ρυθμίζεται από ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες [19]. Η PDK1, επίσης, φωσφορυλιώνει απευθείας και ενεργοποιεί την p70 κινάση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 (S6K) σε ένα κατάλοιπο θρεονίνης, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης και την ανάπτυξη των κυττάρων [21].

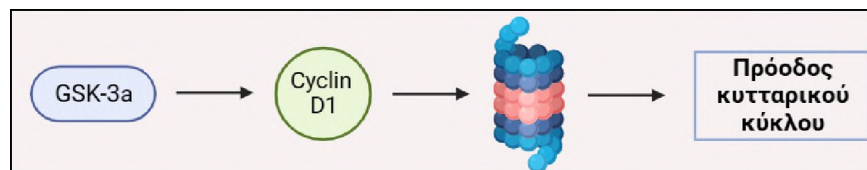
Όσον αφορά την Akt, αυτή επάγει την επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων μέσω της φωσφορυλίωσης πολλών πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα, στοχεύει στην πρωτεΐνη TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2), η φωσφορυλίωση της οποίας σταματά την κατασταλτική δράση που έχει η πρωτεΐνη στην GTPάση Rheb. Έτσι, η Rheb οδηγεί το σύμπλοκο mTORC1 στο λυσόσωμα, όπου και ενεργοποιείται [20]. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται, όπως και το mTORC1, από τις πρωτεΐνες mTOR, Raptor, mLST8, και επιπλέον από την PRAS40 (Proline – Rich Akt Substrate of 40 kDa) [18]. Η ενεργοποίηση του mTORC1 προάγει την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω της φωσφορυλίωσης της S6K, αλλά και την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της φωσφορυλίωσης της 4E-BP1 (πρωτεΐνη σύνδεσης στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 1). Επιπλέον, συμβάλει στη σύνθεση νουκλεοτιδίων, αυξάνει τη σύνθεση λιπιδίων και καταστέλλει την αυτοφαγία (Εικόνα 12) [20].

Ένας άλλος στόχος της Akt και έμμεσα της PDK1, είναι και η GSK3α/β (Glycogen synthase kinase-3/κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3), η οποία απενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser21 και Ser9 των GSK3a και GSK3b αντίστοιχα. Πρόκειται για μια συστατικά ενεργή κινάση σερίνης/θρεονίνης (μετά από αυτοφωσφορυλίωση όπως Tyr216) που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, ρυθμίζοντας τη σταθερότητα και την παραγωγή πρωτεϊνών που συμβάλουν στη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S όπως είναι η κυκλίνη D1.

Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της κυκλίνης D1 από την GSK3 έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώρισή της από την E3 λιγάση της ουβικουιτίνης και την αποικοδόμησή της στο πρωτεάσωμα. Αυτό οδηγεί στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση S, όπου δρουν άλλες κυκλίνες (Εικόνα 13) [19]. Η παρούσα διπλωματική εστιάζει στην GSK3α, ενώ παρακάτω αναφέρονται περισσότερα για τον κυτταρικό κύκλο και τη ρύθμισή του από κυκλίνες (2.10.1).



Εικόνα 12. Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.



Εικόνα 13. Φωσφορύλιση της κυκλίνης D1 από την GSK3a. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.

1.4.2.2 Μονοπάτι RAS/MAPK και ο ρόλος του στον καρκίνο

Το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/MAPK, ή αλλιώς RAS/RAF/MEK/ERK, είναι ένα συντηρημένο μονοπάτι που παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η απορρύθμιση του μονοπατιού αυτού προάγει την ανάπτυξη όγκων. Περίπου το 33% των όγκων παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RAS, ενώ το 8% παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RAF. Από τις 4 ισομορφές της RAS, η KRAS ισομορφή είναι αυτή που συναντάται συχνότερα σε όλους τους ανθρώπινους καρκίνους [22]. Επίσης, έχει βρεθεί πως στη συντριπτική πλειοψηφία των παγκρεατικών αδενοκαρκινωμάτων παρουσιάζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS. Επομένως, υπάρχει σύνδεση μεταξύ των μεταλλάξεων στο πρωτο-ογκογονίδιο KRAS και της ανάπτυξης του παγκρεατικού καρκίνου [23]. Για τον λόγο αυτό, έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για τη

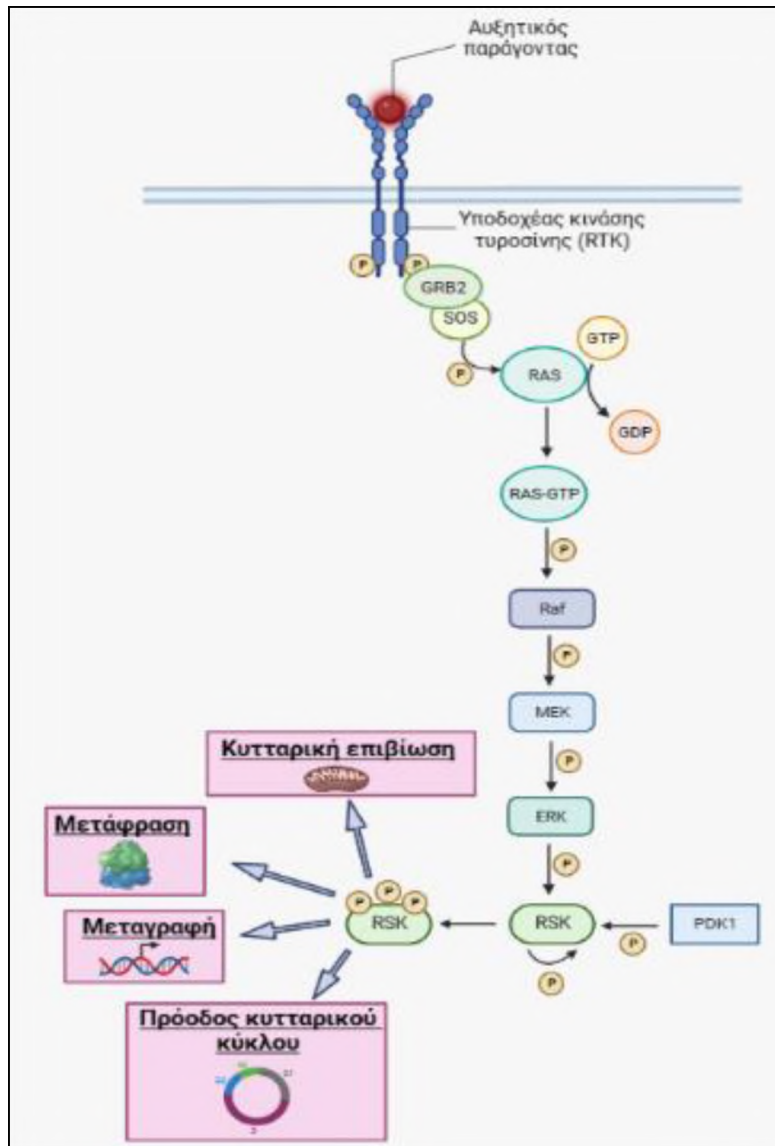
στόχευση του μονοπατιού αυτού για τη θεραπεία του καρκίνου, και ιδιαίτερα του παγκρεατικό καρκίνο [22].

Όσον αφορά την ενεργοποίηση του μονοπατιού, αυτή πραγματοποιείται όταν ενεργοποιούνται οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) μετά από την πρόσδεση αυξητικών παραγόντων. Η πυροδότηση των υποδοχέων από κάποιο αυξητικό σήμα οδηγεί στη δημιουργία συμπλόκων μεταξύ των παραγόντων, GRB2 (growth factor receptor bound protein 2/συνδεδεμένη με τον υποδοχέα αυξητικών παραγόντων πρωτεΐνη 2) και SOS (son of sevenless), όπου από το κυτταρόπλασμα, μεταφέρονται στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Το SOS είναι ένας σημαντικός παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine nucleotide Exchange Factor – GEF) που μεταφέρει το σήμα από τους RTKs στη RAS. Η RAS λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης, προσδένοντας GTP και GDP. Με τη βοήθεια του SOS, η RAS-GDP μορφή μετατρέπεται σε RAS-GTP που είναι και η ενεργή μορφή της κινάσης. Η εν λόγω κινάση απενεργοποιείται όταν η RAS-GTPάση υδρολύει το RAS-GTP σε ανενεργό RAS-GDP με τη βοήθεια πρωτεϊνών που ενεργοποιούν GTPάσες (GTPase-activating proteins/GAPs) [22].

Αμέσως μετά από την ενεργοποίηση της RAS, πραγματοποιείται στρατολόγηση και φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης RAF. Προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι RAF πρωτεΐνες, είναι απαραίτητο να προηγηθεί ο διμερισμός τους. Συγκεκριμένα, η ενεργοποιημένη RAS προκαλεί τον ετεροδιμερισμό των ισομορφών CRAF και BRAF, ο οποίος εξαρτάται από ένα κατάλοιπο σερίνης της CRAF (Ser621) [22].

Η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της RAF ακολουθείται από τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση των MEK1 και MEK2 κινάσων (MAPK-ERK Kinases). Οι MEK1 και MEK2 στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν τις ERK1 και ERK2 (ή MAPK/Mitogen-activated protein kinase/πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνο), τόσο σε κατάλοιπα τυροσίνης, όσο και σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης. Ωστόσο, μεταλλάξεις στο γονίδιο των MEK έχουν ως αποτέλεσμα τον διμερισμό των MEK1 και τη φωσφορυλίωση των ERK και από τη RAF [22].

Τέλος οι καθοδικοί τελεστές του μονοπατιού, ERK1/2 φωσφορυλιώνουν εκατοντάδες υποστρώματα, όπως μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεϊνικές κινάσες, τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα. Στο κυτταρόπλασμα φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν και τις RSK (p90 κινάση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6) (Εικόνα 14) [22].

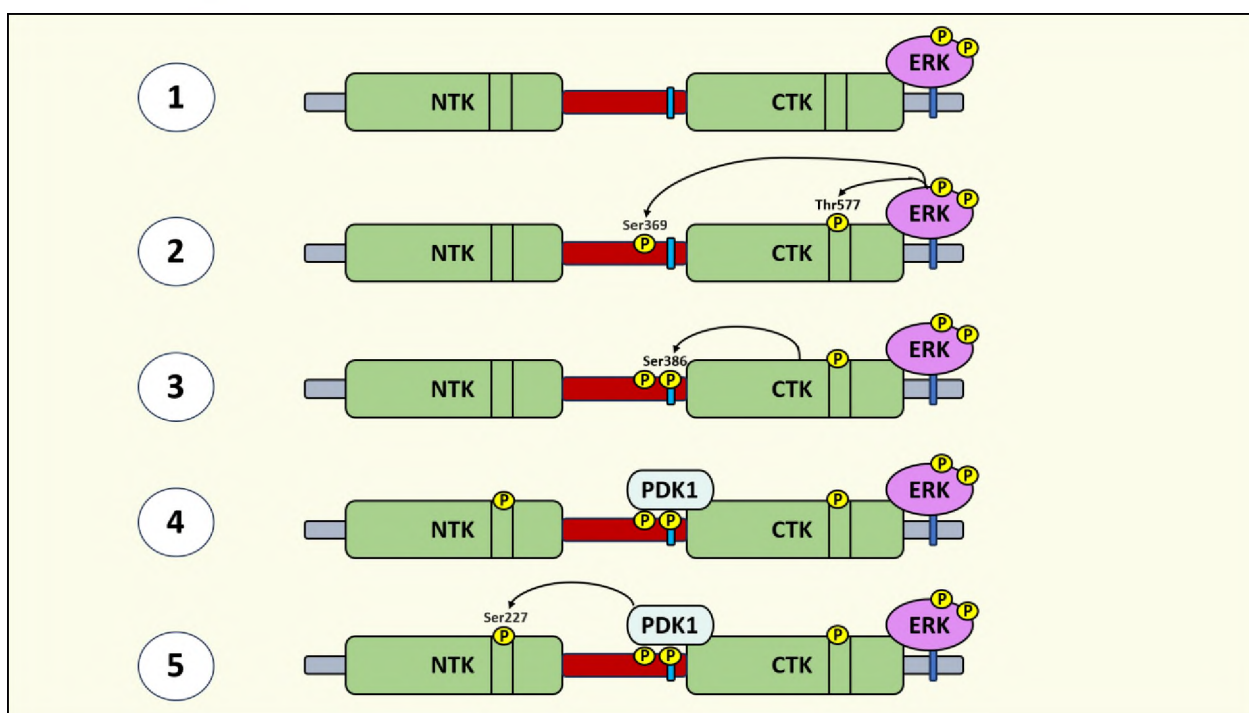


Εικόνα 14. Σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/MAPK. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.

Ενεργοποίηση και λειτουργίες της RSK

Οι RSK είναι κινάσες Ser/Thr μοριακού βάρους 90 kDa και αποτελούνται από 4 ισομορφές (RSK1-4). Όλες οι ισομορφές διαθέτουν δύο περιοχές κινάσης που συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας ρυθμιστικής αμινοξικής αλληλουχίας - συνδέτη. Συγκεκριμένα, η αμινοτελική περιοχή κινάσης (N-terminal kinase domain/NTK) ανήκει στην AGC οικογένεια κινασών και είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων (Εικόνα 15), ενώ η καρβοξυτελική περιοχή κινάσης (C-terminal kinase domain/CTK) ανήκει στην οικογένεια CAMK δρα ρυθμιστικά οδηγώντας στην ενεργοποίηση της NTK περιοχής. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης της RSK περιλαμβάνει φωσφορυλίωση σε τέσσερα κύρια σημεία. Αρχικά, η ενεργοποιημένη ERK, συνδέεται σε ένα σημείο σύνδεσης στην καρβοξυτελική περιοχή της RSK (περιοχή KIM ή D

domain), φωσφορυλιώνοντας τη Thr577 που βρίσκεται στο βρόχο ενεργοποίησης της CTK (σύμφωνα με την αρίθμηση των αμινοξέων στην ανθρώπινη RSK2) φωσφορυλιώνοντας παράλληλα και τη ρυθμιστική ενδιάμεση αλληλουχία – συνδέτη σε ένα κατάλοιπο σερίνης (Ser369). Η φωσφορυλίωση της Thr577 είναι αυτή που ενεργοποιεί την CTK, η οποία με τη σειρά της αυτό-φωσφορυλιώνει τη Ser386 που βρίσκεται μέσα σε ένα υδρόφοβο μοτίβο αρωματικών καταλοίπων στην ενδιάμεση αλληλουχία – συνδέτη. Η φωσφορυλίωση της Ser386, ακολούθως, δημιουργεί ένα σημείο πρόσδεσης που στρατολογεί την PDK1 επιτρέποντάς της να φωσφορυλιώσει την NTK στη Ser227 στον βρόχο ενεργοποίησης, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της NTK και εν τέλει στην πλήρη ενεργοποίηση της κινάσης. Έτσι, σε αυτήν την περίπτωση, η PDK1 δεν χρειάζεται την ενεργοποίηση της PI3K για να ενεργοποιήσει την RSK. Επομένως, η PDK1 διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην ενεργοποίηση των RSK κινάσων μέσω του μονοπατιού MAPK/ERK [24].



Εικόνα 15. Ενεργοποίηση της RSK. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του PowerPoint.

Όσον αφορά τις RSK αυτές προάγουν την κυτταρική επιβίωση μέσω της φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (όπως BAD και DAPK), ή μέσω της φωσφορυλίωσης της GSK3. Μέσω των κινάσων GSK3α και GSK3β και του μεταγραφικού παράγοντα ERα, αλλά και άλλων πρωτεϊνών, η RSK, έχει βρεθεί πως συμβάλει στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Προάγει, επιπλέον τη σύνθεση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ανάπτυξη του κυττάρου στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου [24].

1.4.3 Αναστολείς της PDK1

Πολλές πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν πως οι αναστολείς της PDK1 μπορούν να προσφέρουν νέες ευκαιρίες για την ανάπτυξη θεραπευτικών παραγόντων. Έτσι, τα τελευταία χρόνια γίνονται όλο και περισσότερες προσπάθειες για την ανάπτυξη και την εύρεση νέων πιθανών αναστολέων [25]. Η πλειοψηφία των αναστολέων που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία θεωρούνται ως τύπου Ι αναστολής πρωτεϊνικής κινάσης, ανταγωνιστές του ATP. Επομένως, συνδέονται στη θέση πρόσδεσης του ATP της PDK1. Ωστόσο, βιοχημικά και δομικά δεδομένα για το μηχανισμό δράσης της PDK1 αποκάλυψαν δύο επιπλέον περιοχές οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς στόχους αναστολέων: τον θύλακα PIF (PIF rocket) και την περιοχή ομολογίας πλεξτρίνης (PH domain) [26].

Αναστολείς που στοχεύουν στη θέση πρόσδεσης του ATP

Στην πρώτη κατηγορία αναστολέων, που στοχεύουν στη θέση πρόσδεσης του ATP, ανήκουν αναστολείς όπως οι OSU-03012 και OSU-03013. Πρόκειται για παράγωγα του celecoxib, που αποτελεί αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και είναι ένα πιθανό μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο. Το celecoxib φαίνεται πως προάγει την απόπτωση σε πολλές καρκινικές σειρές παρεμποδίζοντας τη σηματοδότηση στο μονοπάτι PDK1/Akt. Το παράγωγο του OSU-03012 έχει βρεθεί πως αναστέλλει την ανάπτυξη και προάγει την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, καρκίνου του θυροειδούς, γλοιοβλαστώματος, παγκρεατικού καρκίνου και καρκίνου του μαστού μεταξύ άλλων [27]. Το OSU03013 προσδένεται στην περιοχή πρόσδεσης του ATP της PDK1, οδηγώντας στην απενεργοποίησή της. Έχει χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού και εμφανίζει υψηλότερη κυτταροτοξικότητα, ιδιαίτερα στα καρκινικά κύτταρα μαστού που εμφανίζουν υπερέκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα HER-2 [28].

Οι αναστολείς BX-320, BX-795, BX-517 και BX-912, στοχεύουν επίσης στη θέση πρόσδεσης του ATP. Ο πρώτος, έχει βρεθεί πως αναστέλλει την ανάπτυξη όγκων σε μελάνωμα πνευμόνων ποντικών, αλλά και την ανάπτυξη κυττάρων της σειράς MDA-468 από καρκίνο του μαστού και της σειράς HCT-116 καρκίνου του παχέος εντέρου. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η χρήση των άλλων αναστολέων στην κυτταρική σειρά MDA-468, ενώ φάνηκε πως και προάγουν την απόπτωση στα κύτταρα αυτά [29]. Αν και αρχικά περιγράφηκαν ως ειδικοί αναστολείς της PDK1, αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει πως αναστέλλουν αποτελεσματικά τη δράση και άλλων κινασών [30].

Άλλος ένας αναστολέας της κατηγορίας αυτής είναι και ο BAG956, ο οποίος λειτουργεί ως αναστολέας τόσο της PDK1, όσο και της PI3K. Έχει βρεθεί πως αναστέλλει την πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ανθρώπινα κύτταρα λευχαιμίας (κυτταρικές σειρές AML, ALL, και CML μεταξύ άλλων) [31].

Ένας εξαιρετικά ειδικός αναστολέας της PDK1 που στοχεύει στην περιοχή πρόσδεσης του ATP, είναι και ο GSK2334470, ο οποίος αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη χρήση του συγκεκριμένου αναστολέα παρατίθενται παρακάτω.

Αναστολείς που στοχεύουν στην περιοχή ομολογίας πλεξτρίνης (PH domain)

Ο PHT-427 είναι ένας αναστολέας της PDK1, αλλά και της Akt. Προσδένεται στις περιοχές ομολογίας πλεξτρίνης των κινασών αυτών και έχει βρεθεί πως έχει μεγάλη αντικαρκινική δραστηριότητα όταν εφαρμόζεται σε όγκους κυτταρικών σειρών καρκίνου του παγκρέατος και του μαστού. Επίσης, σε καρκίνους μαστού και πνεύμονα, προάγει την απόπτωση και εμφανίζει ακόμα μεγαλύτερη αντικαρκινική δραστηριότητα όταν χορηγείται συνδυαστικά με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μοντέλα ποντικών [32].

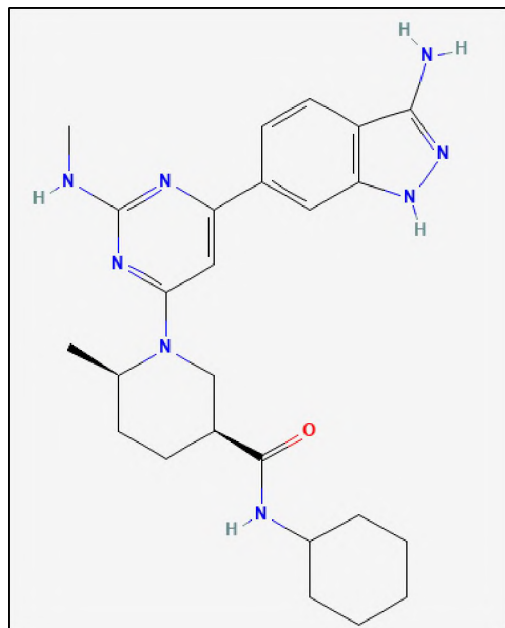
Αναστολείς που στοχεύουν στον θύλακα PIF (PIF pocket)

In vitro, ο PS210 είναι ένας πιθανός ενεργοποιητής της PDK1 που έχει βρεθεί πως προκαλεί το κλείσιμο της περιοχής κινάσης της PDK1. Ωστόσο, σε κυτταρικό επίπεδο, φαίνεται πως το προφάρμακο του PS210, PS423, λειτουργεί ως ένα ειδικός αναστολέας της PDK1, αποτρέποντας τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της S6K, αλλά όχι της Akt [33].

1.4.4 GSK2334470

(3S,6R)-1-[6-(3-amino-1H-indazol-6-yl)-2-(methylanino)-4-pyrimidinyl]-N-cyclohexyl-6-methyl-3-piperidinecarboxamide

C₂₅H₃₄N₈O



Εικόνα 16. Δομή GSK2334470. PubChem.

Ο GSK2334470 αναπτύχθηκε από την εταιρία GlaxoSmithKline, από τα αρχικά την οποίας και ονομάστηκε. Είναι ένας αναστολέας της PDK1 που την αναστέλλει αποτελεσματικά, ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, έχει βρεθεί πως δεν καταστέλλει τη δράση 93 άλλων πρωτεϊνικών κινασών, μεταξύ των οποίων και 13 κινάσες της AGC οικογένειας. Το γεγονός αυτό τον καθιστά έναν εξαιρετικά ειδικό αναστολέα της PDK1 [34].

Η πλήρης ονομασία του κατά IUPAC είναι (3S,6R)-1-[6-(3-αμινο-1H-ινδαζολ-6-υλ)-2-(μεθυλαμινο)-4-πυριμιδινυλ]-N-κυκλοεξυλ-6-μεθυλ-3-πεπεριδινό καρβοξαμίδιο και ανήκει στις ινδαζόλες [35].

Η συγκεκριμένη ουσία επιλέχθηκε ως αντικείμενο μελέτης για την παρούσα διπλωματική διατριβή, διότι σε προγενέστερα πειράματα που διενεργήθηκαν στο

εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, φάνηκε πως παρουσιάζει σημαντική αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι της παγκρεατικής καρκινικής σειράς

PANC-1, η οποία μελετάται, επίσης, στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Επιπλέον, στα ίδια πειράματα, έχει παρατηρηθεί πως η συγκεκριμένη ουσία αναστέλλει τη δημιουργία αποικιών και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Σημαντική, επίσης, φαίνεται πως είναι και η επίδρασή της στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, αφού βρέθηκε πως προκαλεί G1 arrest και εμποδίζει τα κύτταρα να εισέλθουν στις επόμενες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, ο αναστολέας GSK2334470 είναι μια πολλά υποσχόμενη χημική ουσία με αντικαρκινική δράση, που θα μπορούσε να συμβάλει στην αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου.

1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής διατριβής είναι η περαιτέρω *in vitro* διερεύνηση της επίδρασης του αναστολέα της πρωτεϊνικής κινάσης PDK1, GSK2334470, στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος, και συγκεκριμένα σε κύτταρα της εγκαθιδρυμένης κυτταρικής σειράς PANC-1. Επιπλέον, στόχο αποτελεί και η μελέτη της επίδρασης της ουσίας αυτής στην πιθανή αναστολή της φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/AKT/mTOR και RAS/MAPK, τα οποία έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του καρκίνου και στα οποία συμμετέχει και η PDK1.

2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αναλώσιμα

Αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των PANC-1	Προέλευση
Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640	Gibco, κωδικός: 2194780
Αδρανοποιημένος ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS: Fetal bovine serum)	PanBiotec, κωδικός: P30-3306
L-γλουταμίνη	Gibco, κωδικός: 2165253
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη	Gibco, κωδικός: 2145465
Θρυψίνη	Gibco, κωδικός: 15090-046

Πίνακας 1. Αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των PANC-1.

Πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν	Προέλευση
Φλάσκες T75 (επιφάνειας 75 cm ²)	Thermo Scientific, κωδικός: 169389
Πιπέτες των 5 ml	Corning Costar Incorporated, κωδικός: 4051
Φιαλίδια των 10 ml (Falcon)	Corning, κωδικός: 430921
Φιαλίδια του 1,5 ml (Eppendorfs)	Thermo Scientific, κωδικός: 3456
Φιαλίδια κατάψυξης (cryovials)	Corning, κωδικός: 430487
Σύριγγες των 5 ml	Bio Medical Distribution Integrity, κωδικός: 2021031005
Πιάτο 96 θέσεων	Corning Costar Incorporated, κωδικός: 4051
Πιάτα καλλιέργειας	Greiner Bio-One, κωδικός: E220435K

Πίνακας 2. Πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν.

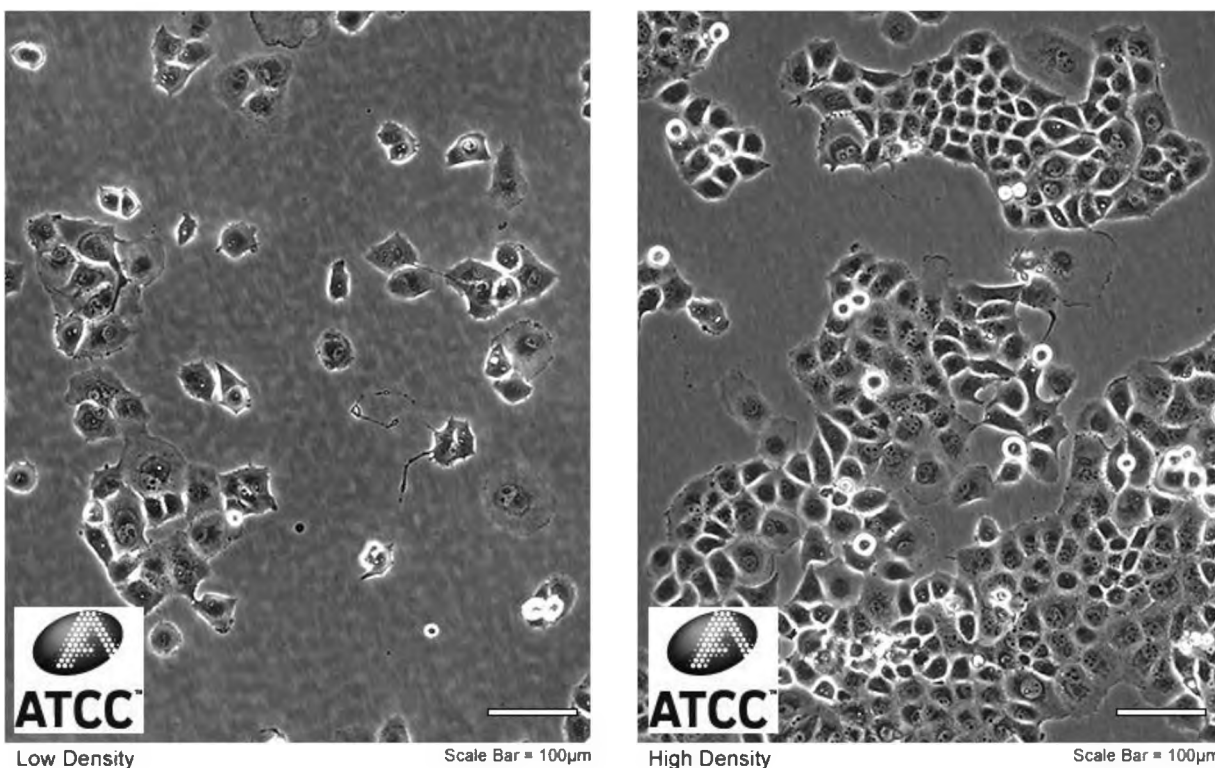
Επιπλέον αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων	Προέλευση
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	ThermoFisher Scientific, κωδικός: 0N013586
GSK2334470	MedChem Express
Διάλυμα NaCl	Demo ABEE, κωδικός: 2107757
Απιονισμένο H ₂ O	Demo ABEE, κωδικός: 2006777
Trypan Blue	Gibco, ThermoFisher Scientific, κωδικός: 15250-061
PBS 1X	bioSera, κωδικός: MS00HR100N
Κιτρικό	SIGMA, κωδικός: BCBF2311V
PI	SIGMA, κωδικός: BCCB3059
RNase A	Macherey-Nagel, κωδικός: 740505.50

RIPA	Cell signaling, κωδικός: 9806S
Protease Inhibitor	Cell signaling, κωδικός: 5872S
Αλβουμίνη	Thermo, κωδικός: 23227
Pierce™ BCA Protein Assay kit	Thermo, κωδικός: 23227
Μάρτυρας (ProSieve QuadColor Protein Marker)	Lonza, κωδικός: 00193837
Acrylamide	Serva, κωδικός: 10687.01
Triton X-100	AppliChem, κωδικός: 56897
APS 10% (Ammonium peroxodisulfate)	Serva, κωδικός: 131055
TEMED	Sigma, κωδικός: BCBV7969
Tris (0,5M), pH=6,8	PanReac AppliChem, κωδικός: 0M013429
SDS 20% (sodium dodecyl sulfate)	PanReac AppliChem, κωδικός: 1H012254
Γλυκερόλη	PanReac AppliChem, κωδικός: 1Y012251
Μπλε βρωμοφαινόλης	Sigma, κωδικός: B0124-5G
ακρυλαμίδιο (30%)	Serva, κωδικός: 10687.01
SDS 10% (sodium dodecyl sulfate)	Sigma, κωδικός: SLBL3120V
Μεθανόλη	HPLC grade, κωδικός: CLOO.1363.2500
Tween 20 0,1%	Fisher Scientific, κωδικός: 126796
TrisBase (Trizma Base)	SIGMA, κωδικός: SLBZ6109
Γλυκίνη	Applichem, κωδικός: OEO11237
Μεμβράνη PVDF (Immobilon-PSQ Transfer Membrane)	Merck Millipore, κωδικός: ISEQ85R
Ponceau	AppliChem, κωδικός: 5J003858
Coomasie Brilliant Blue G	Acros Organics, κωδικός: A019889501
Acetic acid	Fluka, κωδικός: 45731
Clarity Western ECL Substrate	Biorad, κωδικός: 170-5060
SRB	SIGMA, κωδικός: S9012
Οξικό οξύ	Fluka, κωδικός: 45731

Πίνακας 3. Επιπλέον αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

2.2 Κυτταρική σειρά

ATCC Number: **CRL-1469**™
Designation: **PANC-1**



Εικόνα 17. Κυτταρική σειρά PANC-1. ATCC.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα της κυτταρικής σειράς PANC-1. Πρόκειται για κύτταρα που απομονώθηκαν από την κεφαλή του παγκρέατος 56χρονου Καυκάσιου άνδρα με παγκρεατικό καρκίνο μετά από παγκρεατοδωδεκαδακτυλεκτομή. Ο αρχικός όγκος που απομονώθηκε ήταν κοντά στο δωδεκαδάκτυλο και εισέβαλλε στο τοίχωμά του, ωστόσο θεωρείται πως το καρκίνωμα προέρχονταν από τα κύτταρα του παγκρεατικού πόρου. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρουσιάζει χρόνο διπλασιασμού 52 ώρες και χρωμοσωμικές έρευνες έδειξαν την ύπαρξη 63 χρωμοσωμάτων στην πλειονότητα των κυττάρων [37]. Τα κύτταρα της σειράς PANC-1 έχουν ικανότητα μετάστασης και χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη του αδενοκαρκινώματος του παγκρεατικού πόρου *in vitro*, λόγω του σχετικά μικρού χρόνου διπλασιασμού τους και της σταθερότητας της ανάπτυξής τους, υπό τις κατάλληλες συνθήκες.

2.3 Συνθήκες καλλιέργειας

Τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς PANC-1 καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες (φλάσκες) εμβαδού 25 cm² ή 75 cm², μέχρι την κάλυψη του 80% της επιφάνειας των φιαλών. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων περιείχε τα παρακάτω:

Συστατικά Θρεπτικού Μέσου
RPMI
5% FBS
1% Pen-Strep
1% L-γλουταμίνη

Πίνακας 4. Συστατικά θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.

Το RPMI είναι ένα θρεπτικό μέσο που περιέχει συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη των κυττάρων, όπως ο αναγωγικός παράγοντας γλουταθειόνη, αλλά και βιταμίνες όπως η βιοτίνη, η βιταμίνη B12 και το παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA), οι οποίες δεν περιέχονται σε άλλα θρεπτικά μέσα. Επίσης, περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις των βιταμινών ινositόλη και χολίνη, ενώ μέσω του διττανθρακικού νατρίου που περιέχει, επιτρέπει τη διατήρηση του φυσιολογικού pH σε περιβάλλον με 5-10% CO². Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο έχει βρεθεί πως είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια διάφορων κυττάρων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρικών σειρών HeLa, MCF-7, PC12, PBMC και γενικά πολλών καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως και η PANC-1. Ωστόσο, το RPMI δεν περιέχει πρωτεΐνες, λιπίδια ή αυξητικούς παράγοντες και γι' αυτό είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη χρήση αδρανοποιημένου ορού εμβρύου βοοειδούς για τη σωστή ανάπτυξη των κυττάρων [38].

Ο αδρανοποιημένος ορός εμβρύου βοοειδούς (Fetal Bovine Serum – FBS) χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπλήρωμα στις καλλιέργειες κυττάρων και ιστών. Περιέχει ένα σύνολο παραγόντων που είναι απαραίτητοι για την προσκόλληση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των περισσότερων τύπων κυττάρων, τόσο των ανθρώπινων, όσο και αυτών που προέρχονται από ζώα και έντομα. Μελέτες έχουν δείξει ότι στον ορό αυτό περιλαμβάνονται, κατά προσέγγιση, 1.800 πρωτεΐνες και περισσότεροι από 4.000 μεταβολίτες [39].

Η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη είναι αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στις κυτταροκαλλιέργειες *in vitro*, για την αποφυγή τυχόν μολύνσεων τους από μύκητες ή βακτήρια που θα παρεμπόδιζαν τη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων [40].

Τέλος, η L-γλουταμίνη είναι ένα σημαντικό αμινοξικό συμπλήρωμα που προστίθεται συχνά σε θρεπτικά μέσα για την καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών. Δρα ως επικουρική πηγή ενέργειας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που τα κύτταρα διαιρούνται με ταχείς ρυθμούς. Επίσης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή νουκλεοτιδίων, αμινοξέων, γλουταθειόνης, L-γλουταμικού και άλλων αμινοξέων, καθώς και στην πρωτεϊνοσύνθεση και την παραγωγή γλυκόζης στα κύτταρα [41].

Το θρεπτικό μέσο, μετά την προσθήκη των συμπληρωμάτων και των αντιβιοτικών φυλάσσεται στους 4°C και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο πριν από την προσθήκη του στις καλλιέργειες των κυττάρων.

Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο, στις βέλτιστες δυνατές συνθήκες για την επιβίωση και την ανάπτυξή τους. Συγκεκριμένα, σε σταθερή θερμοκρασία 37°C, με σταθερή παροχή CO₂ 5% και υγρασία 95%. Οι συνθήκες αυτές είναι ιδανικές, καθώς παρομοιάζουν τις συνθήκες που επικρατούν στο ανθρώπινο σώμα, από το οποίο προέρχονται τα συγκεκριμένα κύτταρα.

2.4 Κανόνες υγιεινής

Πριν από τη διενέργεια οποιουδήποτε πειράματος είναι απαραίτητη η μέριμνα για την εφαρμογή κανόνων υγιεινής, ώστε να εξασφαλίζεται, τόσο η προστασία του εργαστηριακού προσωπικού, όσο και η ομαλή διεξαγωγή των πειραμάτων. Έτσι, πριν από κάθε πείραμα, έγινε λήψη των απαραίτητων μέτρων ατομικής προστασίας (χρήση εργαστηριακής ποδιάς και γαντιών), αλλά και καθαρισμός όλων των επιφανειών του εργαστηρίου και των εργαστηριακών πάγκων με διάλυμα αιθανόλης 70%. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος αποστειρώνονταν, επίσης, πριν από κάθε πείραμα, αλλά και μετά το πέρας του κάθε πειράματος, με τη χρήση υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας. Επιπλέον, εξασφαλίστηκε η καθαριότητα του επωαστικού κλίβανου και των υπόλοιπων συσκευών που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά. Όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν, όπως οι πλάκες Neubauer και η ηλεκτρική πιπέτα, απολυμαίνονταν με διάλυμα αιθανόλης 70% πριν χρησιμοποιηθούν και μετά τη διενέργεια των πειραμάτων, ενώ οι φλάσκες, οι πιπέτες, τα multi-well plates και τα λοιπά πλαστικά φιαλίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και για μία χρήση. Αποφεύχθηκαν, έτσι τυχόν επιμολύνσεις των κυτταροκαλλιεργειών.

2.5 Ανανέωση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των κυττάρων είναι απαραίτητο να ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο μετά το πέρας κάποιων ημερών από την έναρξη της καλλιέργειας. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να αποφευχθεί η πλήρης εξάντληση των θρεπτικών στοιχείων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της καλλιέργειας, αλλά και για να απομακρυνθούν ανεπιθύμητα προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στη θανάτωσή τους. Επομένως, εξασφαλίζεται πως τα κύτταρα αναπτύσσονται στις καλύτερες δυνατές συνθήκες. Τα βήματα που ακολουθούνται για την ανανέωση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε φιάλη (φλάσκα) εμβαδού 75 cm² είναι τα εξής:

- Απόχυση θρεπτικού μέσου από τη φλάσκα
- Προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut)

2.6 Ανακαλλιέργεια – Θρυψινοποίηση

Όταν τα κύτταρα της καλλιέργειας καλύψουν πάνω από το 80% της επιφάνειας της φλάσκας (πυκνότητα – confluency), είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια των κυττάρων με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να μειωθεί ο αριθμός των κυττάρων που υπάρχουν στη φλάσκα, και να αποφευχθεί η παύση ανάπτυξης και η θανάτωσή τους λόγω συναγωνισμού για τα θρεπτικά συστατικά, έλλειψης χώρου και συσσώρευσης ανεπιθύμητων προϊόντων του μεταβολισμού τους.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, είναι απαραίτητη η θρυψίνη. Πρόκειται για ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που χρησιμοποιείται με σκοπό να αποκολληθούν τα προσκολλημένα κύτταρα των κυτταροκαλλιεργειών. Η συγκεκριμένη παγκρεατική πρωτεάση δρα στο καρβοξυτελικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη, διασπώντας πρωτεΐνες που είναι

υπεύθυνες για την προσκόλληση των κυττάρων σε αγγεία [42]. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4°C και πριν τη χρήση της θερμαίνεται σε υδατόλουτρο.

Ανάλογα με το χρόνο διπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς, η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ή μικρότερη συχνότητα. Αναλυτικότερα, τα βήματα που ακολουθούνται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας σε φλάσκα 75 cm² είναι τα εξής:

- Αρχικά, γίνεται απόχυση θρεπτικού μέσου από τη φλάσκα.
- Ακολουθεί πλύση της φλάσκας με 2-4 ml NaCl, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα FBS που απενεργοποιεί τη θρυψίνη.
- Προσθήκη στη φλάσκα 2 ml θρυψίνης 1X και ήπια ανακίνηση, ώστε η θρυψίνη να καλύψει όλη την επιφάνεια των προσκολλημένων κυττάρων.
- Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώάζονται σε κλίβανο για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 37°C προκειμένου να αποκολληθούν όσο το δυνατόν περισσότερα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας. Ο χρόνος επώασης μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την κυτταρική σειρά και είναι σημαντικό να τηρείται ο προβλεπόμενος/κατάλληλος χρόνος κάθε φορά. Εάν η επώαση διαρκέσει λιγότερο, τα κύτταρα δεν αποκολλώνται από τη φλάσκα, ενώ εάν διαρκέσει περισσότερο, υπάρχει κίνδυνος θανάτου των κυττάρων, αφού η θρυψίνη προκαλεί τη γήρανσή τους.
- Ακολουθεί απόσυρση της φλάσκας από τον κλίβανο, ήπια χτυπήματα στα τοιχώματά της προκειμένου να ξεκολλήσουν όσα κύτταρα παρέμειναν προσκολλημένα, παρατήρηση της φλάσκας στο μικροσκόπιο, ώστε να διαπιστωθεί εάν έχουν αποκολληθεί όλα τα κύτταρα. Εάν υπάρχουν εναπομείναντα προσκολλημένα κύτταρα, ακολουθεί επώαση στον κλίβανο για ένα λεπτό επιπλέον.
- Στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, προστίθενται στη φλάσκα 4 ml RPMI που περιέχει ορό, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η δράση της θρυψίνης. Γίνεται ανάδευση με πιπέτα, ώστε το θρεπτικό μέσο να καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας και να απενεργοποιηθεί πλήρως η θρυψίνη.
- Ύστερα, ακολουθεί συλλογή του εναιωρήματος στο εσωτερικό της φλάσκας (6 ml) σε φιαλίδιο των 10 ml (falcon) και φυγοκέντρωση (1.200 rpm για 6 λεπτά), προκειμένου να μεταφερθούν στο υπερκείμενο τυχόν κατάλοιπα θρυψίνης και να απομακρυνθούν.
- Μετά από τη φυγοκέντρωση, γίνεται απόχυση υπερκειμένου, επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος με την προσθήκη 6 ml RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) και ανάδευση στο vortex. Ωστόσο η αραίωση που γίνεται μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την κυτταρική σειρά και το χρόνο διπλασιασμού της.
- Στη συνέχεια, προστίθενται 1 ml από το επαναδιαλυτοποιημένο ίζημα στη φλάσκα. Η ποσότητα αυτή μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με την εκάστοτε κυτταρική σειρά, τον ρυθμό ανάπτυξής της και τον αριθμό των κυττάρων.
- Τέλος, γίνεται προσθήκη 14 ml θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) στη φλάσκα, ώστε να επιτευχθεί τελικός συνολικός όγκος 15 ml και η φλάσκα τοποθετήθηκε στον κλίβανο.

2.7 Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων

Για την, όσο το δυνατόν, πιο ομαλή διεξαγωγή των πειραμάτων και τα, όσο το δυνατόν, ακριβέστερα αποτελέσματα, είναι απαραίτητη η καταμέτρηση τόσο των ζωντανών, όσο και των νεκρών κυττάρων, στα διάφορα στάδια των πειραμάτων. Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer είναι το βασικό εργαλείο για την καταμέτρηση αυτή. Πρόκειται για μια γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα διαστάσεων 30 mm × 70 mm και πάχους 4 mm που περιλαμβάνει μια κεντρική περιοχή στην οποία γίνεται η μέτρηση των κυττάρων. Η περιοχή αυτή έχει διαστάσεις 3 mm × 3mm και χωρίζεται σε 9 τετράγωνα πλάτους 1 mm. Για την καταμέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιούνται 4 από αυτά τα τετράγωνα, και πιο συγκεκριμένα τα 4 που βρίσκονται στις γωνίες της περιοχής μέτρησης. Η διαδικασία μέτρησης των κυττάρων με την πλάκα Neubauer περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Αρχικά, γίνεται συλλογή των κυττάρων σε φιαλίδιο των 10 ml (falcon) μετά από τη διαδικασία της θρυψινοποίησης.
- Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και μεταφορά 10 μl ή 90 μl από το ελαιώρημα των κυττάρων σε φιαλίδιο του 1,5 ml (eppendorf) με πιπέτα 200 μl. Η ποσότητα εξαρτάται από την πυκνότητα του δείγματος σε κύτταρα. Στην περίπτωση πυκνού δείγματος λαμβάνονται 10 μl και στην περίπτωση του αραιού, 90 μl.
- Στη συνέχεια, προστίθενται 90 μl ή 10 μl αντίστοιχα της χρωστικής Trypan Blue στο φιαλίδιο. Η χρωστική αυτή δίνει μπλε χρώμα στα νεκρά κύτταρα, αφού διαπερνά τη μεμβράνη τους και φτάνει στο κυτταρόπλασμα, και βοηθά στη διάκρισή τους από τα ζωντανά, τα οποία φαίνονται με έντονο άσπρο προς κίτρινο χρώμα.
- Τοποθέτηση καλυπτρίδας στην πλάκα Neubauer, πάνω από την περιοχή στην οποία γίνεται η καταμέτρηση
- Ακολούθως, γίνεται ανάδευση του φιαλιδίου στο vortex, συλλογή 20 μl δείγματος με πιπέτα 20 μl και εισαγωγή του στην περιοχή μέτρησης μέσω μιας εισδοχής που δημιουργείται μεταξύ της πλάκας και της καλυπτρίδας.
- Τέλος, μετρούνται τα κύτταρα που υπάρχουν στις 4 περιοχές που προαναφέρθηκαν.

Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων γίνεται με τον εξής μαθηματικό τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = X/4 \times (10^4 \text{ ή } 10^5)^* \times Y$$

Όπου: X: το άθροισμα των κυττάρων που μετρήθηκαν και στα 4 τετράγωνα

Y: τα συνολικά ml του δείγματος

* Χρησιμοποιείται το 10^4 ή 10^5 ανάλογα με την αραιώση του δείγματος. Για 90 μl δείγματος και 10 μl χρωστικής χρησιμοποιείται το 10^4 , ενώ για 10 μl δείγματος και 90 μl χρωστικής (αραιώση 1/10) χρησιμοποιείται το 10^5 .

2.8 Απόψυξη κυττάρων

Προκειμένου να καλλιεργηθούν κύτταρα που είναι αποθηκευμένα στους -80°C , είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η απόψυξή τους. Η απόψυξη αυτή διενεργείται με συγκεκριμένη μέθοδο, έτσι ώστε η μετάβαση των κυττάρων από τους -80°C στους 25°C , που είναι η θερμοκρασία δωματίου, να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο ομαλή, για να αποφευχθεί ο θάνατός τους και να συνεχίσουν να αναπτύσσονται φυσιολογικά στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Για την ομαλή απόψυξη των κυττάρων διενεργούνται τα παρακάτω:

- Γίνεται, αρχικά, ανάδευση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο, στους 37°C ώστε να αποκρυσταλλωθεί το περιεχόμενο του φιαλιδίου κατάψυξης (cryovial).
- Στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, το δείγμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 10 ml (falcon).
- Στη συνέχεια, προστίθενται 7 ml θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) σε σταγόνες και στα τοιχώματα του φιαλιδίου, ώστε να μην είναι απότομη η μεταβολή της θερμοκρασίας.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (800 rpm για 8 λεπτά), απόχυση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 5 ml RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut).
- Μεταφορά σε φλάσκα εμβαδού 75 cm^2 και προσθήκη επιπλέον θρεπτικού μέσου, ώστε να επιτευχθεί τελικός συνολικός όγκος 15 ml.
- Τέλος, η φλάσκα μεταφέρεται στον κλίβανο, στους 37°C και σε συνθήκες που προαναφέρθηκαν, προκειμένου να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα.

2.9 Κατάψυξη κυττάρων

Στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η αποθήκευση των κυττάρων, αυτή είναι απαραίτητο να γίνει σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Τα κύτταρα είναι δυνατόν να αποθηκευτούν για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, αφού, όμως, προηγηθεί η παρακάτω διαδικασία κατά την οποία:

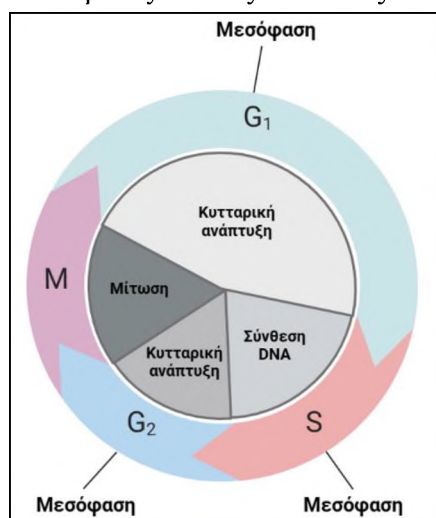
- Παρασκευάζεται ειδικό μέσο – διάλυμα συντήρησης (freezing medium) σε φιαλίδιο που περιέχει 90% FBS και 10% DMSO (dimethylsulfoxide - κρυοπροστατευτικός παράγοντας που αποτρέπει τον θάνατο των κυττάρων στην ακραία θερμοκρασία). Συνολικά, χρειάζεται 1 ml διαλύματος για κάθε 1 με 2 εκατομμύρια κύτταρα, επομένως πρέπει να έχει προηγηθεί καταμέτρηση των κυττάρων για να είναι γνωστός ο αριθμός τους.
- Στη συνέχεια, ακολουθεί συλλογή των κυττάρων σε φιαλίδιο των 10 ml (falcon) με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης.
- Μετά από τη φυγοκέντρηση που περιγράφεται στη διαδικασία της θρυψινοποίησης, γίνεται απόχυση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με το διάλυμα συντήρησης (1 ml διαλύματος για κάθε 1 με 2 εκατομμύρια κύτταρα).
- Τέλος, το εναιώρημα μεταφέρεται σε ειδικά φιαλίδια (cryovials) με την προσθήκη 1 ml στο καθένα.
- Η φύλαξη του δείγματος γίνεται στους -80°C .

2.10 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής

2.10.1 Κυτταρικός κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος είναι ένα σύνολο διαδικασιών με κύριο στόχο τον ακριβή διπλασιασμό της μεγάλης ποσότητας του DNA των χρωμοσωμάτων και τον διαχωρισμό των αντιγράφων που προκύπτουν σε δύο θυγατρικά κύτταρα που είναι γενετικά πανομοιότυπα. Οι διαδικασίες αυτές χωρίζονται σε δύο κύριες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, τη φάση S (synthesis) και τη φάση M (mitosis). Ο διπλασιασμός του DNA πραγματοποιείται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (synthesis) και απαιτούνται 10 με 12 ώρες για την ολοκλήρωσή του. Έτσι, η φάση αυτή καταλαμβάνει περίπου τη μισή από τη συνολική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα των θηλαστικών [43].

Μετά το πέρας της φάσης S, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων και η διαίρεση του κυττάρου πραγματοποιούνται στη φάση M, η οποία διαρκεί λιγότερο από τη φάση S (λιγότερο από μία ώρα σε κύτταρα θηλαστικών). Η φάση αυτή περιλαμβάνει μια σειρά γεγονότων που ξεκινούν με τη διαίρεση του πυρήνα, ή αλλιώς μίτωση. Η μίτωση, συγκεκριμένα, ξεκινά με το στάδιο της πρόφασης και τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων: οι διπλασιασμένες αλυσίδες του DNA (αδελφές χρωματίδες) είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους και συμπυκνώνονται σε πιο συμπαγή χρωμοσώματα, προκειμένου να διαχωριστούν. Στη συνέχεια, ο πυρηνικός φάκελος σπάει και τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα, που περιέχει το καθένα από δύο αδελφές χρωματίδες, συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου. Στο στάδιο της μετάφασης, ακολούθως, τα χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται στον ισημερινό της μιτωτικής ατράκτου και προετοιμάζονται για τον διαχωρισμό. Στην αρχή του σταδίου της ανάφασης, πραγματοποιείται διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων, κατά τη διάρκεια του οποίου τα χρωμοσώματα μεταφέρονται στις αντίθετους πόλους της ατράκτου, όπου και αποσυμπυκνώνονται και δημιουργούνται νέοι πυρήνες. Τέλος, ακολουθεί ο διαχωρισμός του κυτταροπλάσματος στο στάδιο της κυτταροκίνησης και η μίτωση ολοκληρώνεται [43]. Ο κυτταρικός κύκλος απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 18).

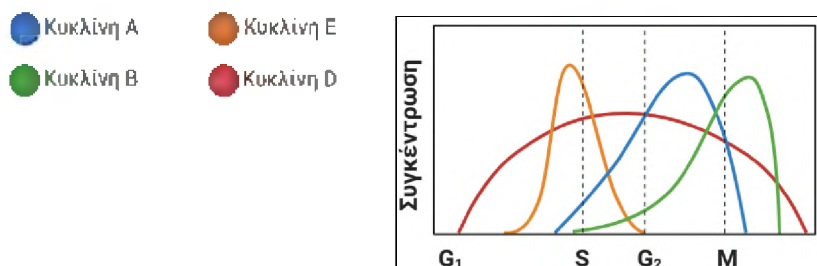


Εικόνα 18. Κυτταρικός κύκλος. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.

Τα περισσότερα κύτταρα χρειάζονται πολύ περισσότερο χρόνο για να διπλασιάσουν τις πρωτεΐνες και τα οργανίδια τους, απ' ό,τι χρειάζονται για να διπλασιάσουν το DNA τους. Έτσι, προκειμένου να υπάρχει περισσότερος διαθέσιμος χρόνος για ανάπτυξη, στους περισσότερους κυτταρικούς

κύκλους προστίθενται και ενδιάμεσες φάσεις. Η φάση G1 τοποθετείται μεταξύ των φάσεων M και S και η φάση G2 τοποθετείται μεταξύ της φάσης S και της μίτωσης. Έτσι, ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων χωρίζεται σε 4 φάσεις: G1, S, G2, και M. Οι φάσεις G1, S και G2 μαζί ονομάζονται μεσόφαση και σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων μπορεί να καταλαμβάνουν τις 23 από τις 24 ώρες ενός 24ωρου κύκλου, με τη φάση M να καταλαμβάνει 1 μόνο ώρα [43].

Η ομαλή πρόοδος του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης μιας οικογένειας πρωτεϊνών, γνωστών ως κυκλίνες (Εικόνα 19). Η πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν τις κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (cyclin-dependent kinases – Cdk), οι οποίες στοχεύουν σε υποστρώματα που σχετίζονται με σημαντικές διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου. Ανάμεσα στα πολυάριθμα μέλη της οικογένειας των κινάσων των θηλαστικών, μόνο μερικές από αυτές, εκ των οποίων οι κυκλίνες A, B, C, D και E έχει βρεθεί πως διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα, οι κυκλίνες C και D ελέγχουν την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο μετά από την αδράνεια και την πρόοδο στη φάση G1, οι κυκλίνες E και D1 ελέγχουν την είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, οι κυκλίνες A ελέγχουν τον διπλασιασμό του DNA και την πρόοδο στη φάση G2 και οι κυκλίνες B είναι σημαντικοί ρυθμιστές της εισόδου στη μίτωση και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων [44].



Εικόνα 19. Έκφραση κυκλινών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.

Η κυκλίνη D1 είναι μια πρωτεΐνη 125 αμινοξέων που ρυθμίζει τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S φάση, μέσω της πρόσδεσής της στην CDK4/6. Η CDK4/6 μετά από την πρόσδεση αυτή, φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb), που είναι συνδεδεμένη με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F. Μετά από τη φωσφορυλίωσή της, η pRb απελευθερώνει τον E2F, ο οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν στον διπλασιασμό του DNA στη φάση S [50]. Η κυκλίνη D1 έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου και έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση και τη μετάσταση. Έλλειψη κυκλίνης D1 μπορεί να προκαλέσει G1 arrest σε ορισμένους τύπους κυττάρων [51]. Ωστόσο, η ελάττωσή της (για παράδειγμα, μέσω φωσφορυλίωσης από την GSK που οδηγεί στην αποικοδόμησή της, όπως αναφέρεται παραπάνω), είναι απαραίτητη στη φάση S, όπου αυξάνεται η έκφραση άλλων κυκλινών, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο διπλασιασμός του DNA.

Στην παρούσα διπλωματική μελετάται η έκφραση της κυκλίνης D1 στα καρκινικά κύτταρα της κυτταρικής σειράς PANC-1, μετά από τη χορήγηση του αναστολέα της PDK1, GSK2334470, με μεθόδους που αναλύονται παρακάτω.

2.10.2 Κυτταρομετρία ροής

2.10.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry) είναι μια μέθοδος που παρέχει ταχεία, πολύ-παραμετρική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων σε διάλυμα. Χρησιμοποιεί πηγές φωτός (laser) για την παραγωγή σημάτων σκεδασμένου φωτός και φθορισμού, τα οποία καταλήγουν σε ανιχνευτές όπως οι φωτοδιόδοι ή οι σωλήνες φωτοπολλαπλασιαστή. Τα σήματα αυτά μετατρέπονται σε ηλεκτρονικά σήματα που, στη συνέχεια, αναλύονται από υπολογιστή. Οι πληθυσμοί των κυττάρων μπορούν να αναλυθούν και/ή να καθαριστούν με βάση τον φθορισμό τους ή την ικανότητά τους να σκεδάζουν το φως [45].

Αναλυτικότερα, μέσω της κυτταρομετρίας ροής γίνεται ανάλυση κυττάρων ή άλλων μικροσωματιδίων όταν αυτά διέρχονται ένα-ένα μέσα από μια ή περισσότερες δέσμες φωτός (laser), ενώ είναι διαλυμένα σε αλκαλικό διάλυμα. Κάθε κύτταρο σκεδάζει το προσπίπτον φως ή παρουσιάζει φθορισμό, μετά από τη χρήση ορισμένων φθορίζοντων αντιδραστηρίων. Η σκέδαση του φωτός μετριέται σε δύο διαφορετικές κατευθύνσεις, την πρόσθια κατεύθυνση (πρόσθιος σκεδασμός - Forward Scatter – FSC), η οποία δίνει πληροφορίες για το μέγεθος του κυττάρου και την πλάγια κατεύθυνση (πλάγιος σκεδασμός – Side Scatter – SSC) που δίνει πληροφορίες για την εσωτερική πολυπλοκότητα του κάθε κυττάρου. Η σκέδαση του φωτός μετριέται ανεξάρτητα από τον παραγόμενο φθορισμό [45].

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων για την κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιούνται διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, όπως αυτές που προσδένονται στο DNA των κυττάρων. Μία τέτοια χρωστική είναι και το Propidium Iodide (PI), το οποίο χρησιμοποιείται στην παρούσα διπλωματική. Πρόκειται για μια χρωστική που δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και, επομένως, εισέρχεται μόνο στα νεκρά κύτταρα, όπου προσδένεται στο DNA. Παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA ή του RNA και εκπέμπει κόκκινο φθορισμό. Για τη διέγερση και την ενεργοποίησή του απαιτείται φως με μήκος κύματος 535 nm, ενώ εκπέμπει φθορισμό στα 617 nm [46].

Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί ένα εξαιρετικά σημαντικό και χρήσιμο εργαλείο που βρίσκει εφαρμογή στην ανοσολογία, τη μοριακή βιολογία, τη βακτηριολογία, την ιολογία, τη βιολογία του καρκίνου και την παρατήρηση μολυσματικών ασθενειών [45].

Όσον αφορά την παρατήρηση του κυτταρικού κύκλου με την εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής, αυτή πραγματοποιείται μέσω της μέτρησης της περιεκτικότητας των κυττάρων σε DNA. Έτσι, μετρώντας την περιεκτικότητα κάθε κυττάρου σε DNA σε ένα χρονικό σημείο, αποτυπώνεται ένα στιγμιότυπο, στο οποίο φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G0/G1 (2n), S (2n-4n) και G2/M (4n).

2.10.2.2 Διαδικασία

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής σε ασύγχρονα κύτταρα της παγκρεατικής καρκινικής σειράς PANC-1, στα οποία χορηγήθηκε ο ειδικός αναστολέας της PDK1, GSK2334470 σε συγκέντρωση 10μM. Συγκεκριμένα, έγινε παρατήρηση των κυττάρων σε διάφορες χρονικές στιγμές (6, 12, 24, 48 ώρες

μετά τη χορήγηση του φαρμάκου) και σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά των κυττάρων ελέγχου, στα οποία δεν χορηγήθηκε φάρμακο. Κύριος στόχος του πειράματος ήταν να διαπιστωθεί εάν η χρήση του αναστολέα επηρεάζει ή παρεμποδίζει την πρόοδο του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου, και κατ' επέκταση την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Αναλυτικά, αυτά που διενεργήθηκαν κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου πειράματος περιγράφονται παρακάτω.

Ημέρα 1^η

Έλεγχος κυττάρων, ανανέωση θρεπτικού μέσου, θρυψινοποίηση

- Έλεγχος των κυττάρων, που αναπτύσσονται σε μεγάλες φλάσκες εμβαδού 75 cm², για τυχόν επιμολύνσεις, διασφάλιση πως αναπτύσσονται σωστά και στις κατάλληλες συνθήκες
- Ανανέωση θρεπτικού μέσου και θρυψινοποίηση, αν η πυκνότητα των κυττάρων είναι μεγάλη και είναι απαραίτητο, με μεθόδους που αναλύθηκαν παραπάνω (2.5, 2.6)

Ημέρα 2^η

Ανακαλλιέργεια κυττάρων και διαμοιρασμός σε πιάτα καλλιέργειας

Προκειμένου να γίνει χορήγηση του φαρμάκου στα κύτταρα και να πραγματοποιηθεί η παρατήρηση του κυτταρικού κύκλου σε διάφορες χρονικές στιγμές (6, 12, 24 και 48 ώρες μετά την προσθήκη του φαρμάκου), είναι απαραίτητο να γίνει διαμοιρασμός των κυττάρων σε 9 πιάτα καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται τα παρακάτω:

- Αρχικά, πραγματοποιείται αποκόλληση των κυττάρων από την αρχική φλάσκα καλλιέργειας μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης, όπως περιγράφεται και παραπάνω (2.6).
- Μετά από την επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων μετά την φυγοκέντρηση που περιγράφεται στην διαδικασία της θρυψινοποίησης, γίνεται ανάδευση στο vortex.
- Ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, όπως αναφέρεται παραπάνω (2.7).
- Τέλος, υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων και της ποσότητας του εναιωρήματος που απαιτείται, ώστε να μεταφερθούν τελικά 500.000 κύτταρα σε κάθε πιάτο καλλιέργειας και να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή ανάπτυξη των κυττάρων.

Συνολικά, χρησιμοποιούνται 9 πιάτα καλλιέργειας που περιέχουν τα εξής κύτταρα:

- Ένα πιάτο που περιέχει κύτταρα ελέγχου, στα οποία δεν έγινε προσθήκη φαρμάκου και τα οποία μονιμοποιήθηκαν τη χρονική στιγμή 0, δηλαδή τη στιγμή που έγινε η προσθήκη των φαρμάκων σε άλλα κύτταρα (tzero κύτταρα).
- Τέσσερα πιάτα που περιέχουν κύτταρα ελέγχου, στα οποία δεν γίνεται προσθήκη φαρμάκου και τα οποία μονιμοποιήθηκαν στις απαιτούμενες χρονικές στιγμές (6, 12, 24 και 48 ώρες μετά από την προσθήκη φαρμάκου). Είναι απαραίτητα προκειμένου να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής τους με αυτά των κυττάρων που επώαστηκαν με GSK2334470.

- Τέσσερα πιάτα με κύτταρα τα οποία επωάζονται με συγκεκριμένη ποσότητα φαρμάκου και μονιμοποιούνται 6, 12, 24 και 48 ώρες μετά από την προσθήκη αυτή.
 - Συλλέγεται η απαιτούμενη ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος σε φιαλίδιο των 10 ml (falcon) και φυγοκεντρήθηκε (1.200 rpm για 6 λεπτά).
 - Στη συνέχεια, γίνεται απόχυση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut). Υπολογίζεται η απαιτούμενη ποσότητα RPMI, ώστε να υπάρχουν τελικά 500.000 σε 3 ml.
 - Ανάδευση στο vortex και προσθήκη 3 ml από το δείγμα σε κάθε πιάτο
 - Τα πιάτα αφήνονται στον κλίβανο, προκειμένου αναπτυχθούν τα κύτταρα για 24 ώρες.

Ημέρα 3η

Προσθήκη GSK2334470 και μονιμοποίηση των κυττάρων τις χρονικές στιγμές 0, 6 και 12

Αφού τα κύτταρα επωαστούν για 24 ώρες στις ιδανικές συνθήκες, ώστε να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν, προστίθεται σε ορισμένα πιάτα το φάρμακο που μελετάται στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ο αναστολέας της PDK1, GSK2334470. Η ουσία αυτή διαλύεται σε RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) και προστίθεται σε 4 από τα 9 πιάτα καλλιέργειας, έτσι ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 10 μ M στο καθένα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

- Αρχικά, υπολογίζεται η απαιτούμενη ποσότητα του αναστολέα GSK2334470 (αρχική συγκέντρωση 20.000 μ M) και του θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) που απαιτούνταν να αναμειχθούν, ώστε μετά από την προσθήκη 3 ml του διαλύματος αυτού στα πιάτα, ο GSK2334470 να έχει τελική συγκέντρωση ίση με 10 μ M σε κάθε πιάτο.
- Ακολουθεί προσθήκη των ποσοτήτων του RPMI και του GSK που υπολογίστηκαν σε falcon και ανάδευση στο vortex.
- Προστίθενται από 3 ml του μείγματος σε 4 πιάτα.
- Προστίθενται, επίσης, από 3 ml RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) στο καθένα από τα 4 πιάτα που περιέχουν τα κύτταρα ελέγχου.
- Τέλος, τα 8 πιάτα τοποθετούνται στον κλίβανο για 6, 12, 24, 48 ώρες, μέχρι τη μονιμοποίησή τους για την παρατήρηση του κυτταρικού κύκλου.

Αμέσως μετά από την προσθήκη του φαρμάκου πραγματοποιείται μονιμοποίηση των κυττάρων ελέγχου που αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή 0. Μετά το πέρας 6 ωρών, μονιμοποιούνται τα κύτταρα άλλων 2 πιάτων (ένα με κύτταρα ελέγχου και ένα με κύτταρα που επώαστηκαν με το φάρμακο) και το ίδιο συμβαίνει 12 ώρες μετά από την προσθήκη του φαρμάκου. Όλες οι μονιμοποιήσεις των κυττάρων πραγματοποιούνται με την ίδια διαδικασία, η οποία, για κάθε πιάτο καλλιέργειας, είναι η παρακάτω:

- Αρχικά, γίνεται συλλογή του εναιωρήματος από το πιάτο σε falcon των 15 ml.
- Ακολουθεί πλύση του πιάτου με 2 ml NaCl 2 φορές με τη χρήση πιπέτας του 1 ml.
- Έπειτα, προστίθεται 1 ml θρυψίνης 1X και τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για 5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν.

- Μετά το πέρας των 5 λεπτών, το πιάτο αποσύρεται από τον κλίβανο και προστίθενται σε αυτό 2 ml ελαιωρήματος από το falcon, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη, γίνεται ανάδευση με την πιπέτα, συλλογή και επιστροφή της ποσότητας στο falcon.
- Στη συνέχεια, γίνεται πλύση του πιάτου με 1 ml NaCl με πιπέτα, συλλογή της ποσότητας και προσθήκη στο falcon, για να μειωθεί όσο είναι δυνατόν η απώλεια κυττάρων.
- Του πιάτο ελέγχεται στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί εάν έγινε συλλογή όλων των κυττάρων που αποκολλήθηκαν.
- Με τη χρήση σύριγγας των 5 ml, στη συνέχεια, γίνεται ανάδευση, προκειμένου να διασπαστούν τυχόν συσσωματώματα και τα κύτταρα να είναι μονήρη. Μόνο τα μονήρη κύτταρα μπορούν να περάσουν διαμέσου της βελόνας και είναι απαραίτητο τα κύτταρα να είναι σε μονήρη κατάσταση, προκειμένου να γίνει σωστά η ανάλυσή τους.
- Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (2.7).
- Γίνεται ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση (1.400 rpm για 10 λεπτά)
- Μετά από τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 5 ml NaCl.
- Πραγματοποιείται για άλλη μία φορά ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση (1.400 rpm για 10 λεπτά).
- Μετά από τη φυγοκέντρηση, γίνεται απόρριψη υπερκειμένου και πάλι και πολύ καλή ανάδευση στο vortex, προκειμένου να διαλυθεί το ίζημα και να υπάρχουν όσο το δυνατόν λιγότερα συσσωματώματα.
- Ακολουθεί προσθήκη 2 ml αιθανόλης 90% στάγδην υπό στροβιλισμό στο vortex.
- Γίνεται αποθήκευση στους -20°C.

Ημέρα 4^η – 5^η

Μονιμοποίηση των υπόλοιπων κυττάρων

Μετά το πέρας 24 και 48 ωρών από την προσθήκη του φαρμάκου, μονιμοποιούνται τα κύτταρα των υπόλοιπων πιάτων καλλιέργειας, όπως αναλύθηκε παραπάνω.

Ημέρα 6^η

Τελική προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυσή τους

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων είναι απαραίτητη η προετοιμασία τους. Χρησιμοποιείται ένα διάλυμα υποτονικής λύσης και για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται τα εξής:

- Γίνεται απόσυρση κυττάρων από τους -20°C.
- Προστίθενται 2 ml RPMI με ορό στο δείγμα.
- Επίσης, προστίθενται 10 ml PBS 1X (Phosphate-buffered saline – αλκαλικό διάλυμα).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος (1.600 rpm για 10 λεπτά) για να απομακρυνθεί η αιθανόλη.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, γίνεται απόχυση του υπερκειμένου και ανάδευση στο vortex.

- Τέλος, προστίθενται τα παρακάτω:
 - 568 μl διαλύματος κιτρικού νατρίου (sodium citrate)
 - 30 μl Propidium Iodide: χρωστική που προσδένεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω
 - 6 μl RNase: υδρολυτικό ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του RNA των κυττάρων, προκειμένου να αποφευχθεί η πρόσδεση του PI σε αυτό.
- Τα δείγματα επωάζονται στον κλίβανο για τουλάχιστον 30 λεπτά.

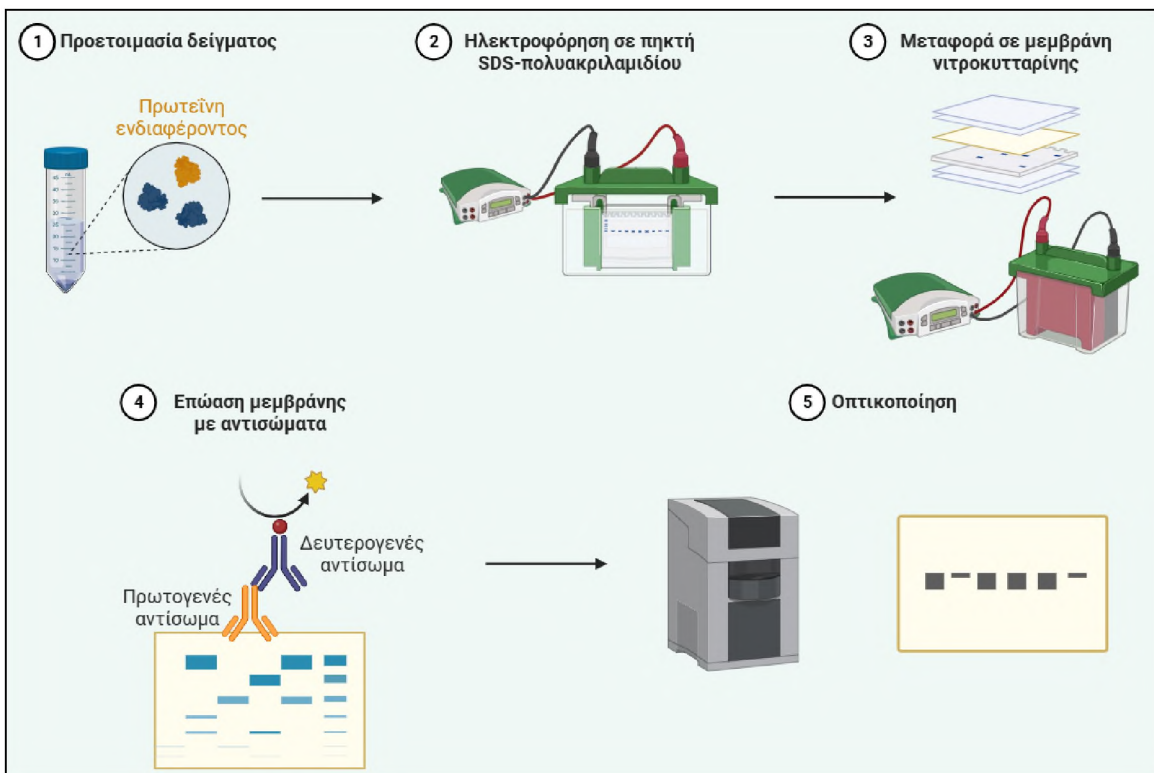
Ακολουθεί ανάλυση των δειγμάτων και παρατήρηση του κυτταρικού κύκλου.

2.11 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

2.11.1 Αρχή της μεθόδου

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting) είναι μια σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία. Με την εφαρμογή της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα από ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα που εξάγεται από κύτταρα. Συγκεκριμένα, αυτό επιτυγχάνεται μέσω:

- Διαχωρισμού των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους
- Μεταφοράς των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη
- Χρήσης πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων, που στοχεύουν σε πρωτεΐνες, για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων (Εικόνα 20)



Εικόνα 20. Ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.

Αναλυτικότερα, μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής, οι πρωτεΐνες του κάθε δείγματος, αρχικά, διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου (SDS-Polyacrylamide gel). Στη συνέχεια, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, η οποία τελικά επωάζεται με πρωτογενή αντισώματα που στοχεύουν στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος και δευτερογενή αντισώματα που στοχεύουν στα πρωτογενή και είναι συζευγμένα με ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις παραγωγής χημειοφωταύγειας. Τέλος, γίνεται οπτικοποίηση των συνδεδεμένων αντισωμάτων, μετά από την επαγωγή της αντίδρασης χημειοφωταύγειας. Παρατηρείται μια “μπάντα”- ζώνη στην περιοχή της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, το πάχος της οποίας είναι ανάλογο της ποσότητας της πρωτεΐνης στο δείγμα [47].

2.11.2 Διαδικασία

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων της κυτταρικής σειράς PANC-1, στα οποία χορηγήθηκε ο ειδικός αναστολέας τις PDK1, GSK2334470. Συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία αυτή, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων ύστερα από 24 και 48 ώρες επώασης με το συγκεκριμένο φάρμακο και λήψη των πρωτεϊνικών τους εκχυλισμάτων. Στόχος της διαδικασίας αυτής είναι να διαπιστωθεί εάν το φάρμακο αυτό αποτρέπει/αναστέλλει τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση κινασών των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/AKT/mTOR και RAS/MAPK που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου, όπως αναφέρεται παραπάνω (**1.4.2.1, 1.4.2.2**). Μελετήθηκε συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση που καθιστά ενεργή την PDK1, και η φωσφορυλίωση που καθιστά ανενεργή την κινάσης GSK3a, η οποία αποτελεί στόχο τόσο του PI3K μονοπατιού όσο και των RSKs στο μονοπάτι RAS/MAPK, όπως αναφέρεται παραπάνω (**1.4.2.2**). Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται πρωτογενή αντισώματα που στοχεύουν ειδικά στις φωσφορυλιωμένες μορφές των κινασών αυτών (p-PDK1 και p-GSK3a αντίστοιχα), προκειμένου να γίνει οπτικοποίηση των ποσοτήτων τους στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με αυτά μετά από τη χρήση αντισωμάτων για τις μη φωσφορυλιωμένες μορφές των κινασών.

Επιπλέον, προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή επίδραση του αναστολέα στην πρόοδο κυτταρικού κύκλου και σε συνέχεια του προηγούμενου πειράματος (**2.10.2.2**), μελετήθηκε η έκφραση της κυκλίνης D1, η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ελέγχεται από τον GSK3a (**2.10.1**). Έτσι, χρησιμοποιείται ειδικό αντίσωμα για τον δικό της εντοπισμό/ποσοτικοποίηση στα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε GSK2334470.

Οι ίδιες διαδικασίες ακολουθούνται και για την ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων ελέγχου, στα οποία δεν χορηγείται φάρμακο, και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων σε κάθε περίπτωση. Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν και οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

Ημέρα 1^η

Έλεγχος κυττάρων, ανανέωση θρεπτικού μέσου, θρυψινοποίηση

- Έλεγχος των κυττάρων, που αναπτύσσονται σε μεγάλες φλάσκες εμβαδού 75 cm², για τυχόν επιμολύνσεις, διασφάλιση πως αναπτύσσονται σωστά και στις κατάλληλες συνθήκες
- Ανανέωση θρεπτικού μέσου και θρυψινοποίηση, αν η πυκνότητα των κυττάρων είναι μεγάλη και είναι απαραίτητο, με μεθόδους που αναλύθηκαν παραπάνω (2.5, 2.6)

Ημέρα 2^η

Ανακαλλιέργεια κυττάρων και διαμοιρασμός σε πιάτα καλλιέργειας

Προκειμένου να γίνει χορήγηση του φαρμάκου στα κύτταρα και να πραγματοποιηθεί η ανοσοατύπωση κατά Western, με τη χρήση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από διάφορες χρονικές στιγμές (24 και 48 ώρες μετά την προσθήκη του φαρμάκου), είναι απαραίτητο να γίνει διαμοιρασμός των κυττάρων σε 3 πιάτα καλλιέργειας. Συγκεκριμένα:

- Αρχικά, πραγματοποιείται αποκόλληση των κυττάρων από την αρχική φλάσκα καλλιέργειας μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης, όπως περιγράφεται και παραπάνω (2.6).
- Μετά από την επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση που περιγράφεται στη διαδικασία της θρυψινοποίησης, ακολουθεί ανάδευση στο vortex.
- Στη συνέχεια, γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, όπως αναφέρεται παραπάνω (2.7).
- Υπολογίζεται, ακολούθως ο συνολικός αριθμός των κυττάρων και της ποσότητας του εναιωρήματος που απαιτείται, ώστε να μεταφερθούν τελικά 500.000 κύτταρα σε κάθε πιάτο καλλιέργειας και να επιτευχθεί η βέλτιστη δυνατή ανάπτυξη των κυττάρων.

Συνολικά, χρησιμοποιούνται 3 πιάτα καλλιέργειας που περιέχουν τα εξής κύτταρα:

- Ένα πιάτο που περιέχει κύτταρα ελέγχου, στα οποία δεν έγινε προσθήκη φαρμάκου. Είναι απαραίτητα προκειμένου να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αυτά των κυττάρων που επώαστηκαν με GSK2334470.
- Δύο πιάτα με κύτταρα τα οποία επωάζονται με συγκεκριμένη ποσότητα φαρμάκου.
 - Στη συνέχεια συλλέγεται η απαιτούμενη ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος σε φιαλίδιο των 15 ml (falcon) και φυγοκεντρείται (1.200 rpm για 6 λεπτά).
 - Ύστερα από τη φυγοκέντρηση, ακολουθεί απόχυση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut). Υπολογίζεται η απαιτούμενη ποσότητα RPMI, ώστε να υπάρχουν τελικά 500.000 σε 3 ml.
 - Τέλος, γίνεται ανάδευση στο vortex και προσθήκη 3 ml από το δείγμα σε κάθε πιάτο.
 - Τα πιάτα επωάζονται στον κλίβανο, προκειμένου αναπτυχθούν τα κύτταρα για 24 ώρες.

Ημέρα 3^η

Προσθήκη GSK2334470 στα πιάτα κυτταροκαλλιέργειας

Αφού τα κύτταρα επωαστούν για 24 ώρες στις ιδανικές συνθήκες, ώστε να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν, προστίθενται σε ορισμένα πιάτα το φάρμακο που μελετάται στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ο αναστολέας της PDK1, GSK2334470. Η ουσία αυτή διαλύεται σε RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) και προστίθεται σε 2 από τα 4 πιάτα κυτταροκαλλιέργειας, έτσι ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 10 μ M στο καθένα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

- Υπολογίζεται, αρχικά η απαιτούμενη ποσότητα του αναστολέα GSK2334470 (αρχική συγκέντρωση 20.000 μ M) και του θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) που απαιτείται, ώστε μετά από την προσθήκη 3 ml του διαλύματος αυτού στα πιάτα, ο GSK2334470 να έχει τελική συγκέντρωση ίση με 10 μ M σε κάθε πιάτο.
- Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη των ποσοτήτων του RPMI και του GSK που υπολογίστηκαν σε falcon και ανάδευση στο vortex.
- Προστίθενται από 3 ml του μείγματος σε 2 πιάτα.
- Επίσης, προστίθενται από 3 ml RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) στο πιάτο που περιείχε τα κύτταρα ελέγχου.
- Τα πιάτα τοποθετούνται, τελικά, στον κλίβανο για 24 και 48 ώρες.

Ημέρα 4η

Συλλογή κυττάρων και προετοιμασία για λύση

Προκειμένου να γίνει η συλλογή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των κυττάρων, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η λύση τους, δηλαδή η διάσπαση την κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων και η απελευθέρωση του περιεχομένου τους. Πριν από τη λύση των κυττάρων, προηγείται μια διαδικασία συλλογής και καθαρισμού των κυττάρων. Αρχικά, μετά από 24 ώρες επώασης με το φάρμακο γίνεται συλλογή των κυττάρων από 2 πιάτα (ένα που περιέχει κύτταρα ελέγχου, στα οποία δεν χορηγήθηκε φάρμακο και ένα που περιέχει κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε ο GSK2334470). Αναλυτικά, η διαδικασία για κάθε πιάτο αναφέρεται παρακάτω:

- Πρώτα συλλέγεται το εναιώρημα από το πιάτο, σε falcon των 15 ml.
- Γίνεται πλύση του πιάτου με 2 ml NaCl 2 φορές με τη χρήση πιπέτας του 1 ml.
- Προστίθεται 1 ml θρυψίνης 1X και ακολουθεί επώαση στον κλίβανο για 5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα.
- Μετά το πέρας των 5 λεπτών, το πιάτο αποσύρεται από τον κλίβανο και προστίθενται σε αυτό 2 ml εναιωρήματος από το falcon στο, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη, ακολούθως, γίνεται ανάδευση με την πιπέτα, συλλογή και επιστροφή της ποσότητας στο falcon.
- Στη συνέχεια, γίνεται πλύση του πιάτου με 1 ml NaCl με πιπέτα, συλλογή της ποσότητας και προσθήκη στο falcon, για να μειωθεί όσο είναι δυνατόν η απώλεια κυττάρων.
- Ακολούθως το πιάτο ελέγχεται στο μικροσκόπιο, για να διαπιστωθεί εάν έχε γίνει συλλογή όλων των κυττάρων που αποκολλήθηκαν.
- Στη συνέχεια, τα κύτταρα μετρούνται με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (2.7).
- Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση (1.400 rpm για 10 λεπτά).

- Μετά από τη φυγοκέντρωση, γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 5 ml NaCl στο ίζημα.
- Ακολουθεί άλλη μια φυγοκέντρωση (1.400 rpm για 10 λεπτά).
- Τέλος, μετά από τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα αποθηκεύεται στους -80°C, μέχρι να ολοκληρωθεί η προετοιμασία και των υπόλοιπων δειγμάτων.

Ημέρα 5^η

Συλλογή και προετοιμασία των υπόλοιπων κυττάρων για λύση

Μετά το πέρας 48 ωρών από την προσθήκη του φαρμάκου, γίνεται συλλογή των κυττάρων και από το τελευταίο πιάτο καλλιέργειας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Λύση των κυττάρων και παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος (lysis buffer). Η διαδικασία γίνεται καθ' όλη τη διάρκεια σε πάγο και είναι η εξής:

- Μετά από την καταμέτρηση των κυττάρων στα προηγούμενα στάδια του πειράματος, υπολογίζονται οι κατάλληλες ποσότητες των συστατικών για την παρασκευή του lysis buffer. Για κάθε 1 εκατομμύριο κυττάρων αντιστοιχούν 60 µl lysis buffer, το οποίο περιείχε τα παρακάτω συστατικά:

Συστατικά Lysis Buffer
RIPA 1X
PI 1X
Απιονισμένο H ₂ O

Πίνακας 5. Συστατικά Lysis Buffer.

- PI (protease inhibitor): συμβάλει στην αναστολή της λειτουργίας των πρωτεασών που υπάρχουν στα κυτταρικά δείγματα, αποτρέποντας την αποδιάταξη των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.
- RIPA: συμβάλει στη διατήρηση σταθερού pH και στην αποδιάταξη της κυτταρικής μεμβράνης, εξαιτίας των παρακάτω συστατικών:

Συστατικά RIPA Buffer
50 mM Tris-HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
1% Triton X-100
0,5% SDC (sodium deoxycholate)
0,1% SDS
5mM EDTA

Πίνακας 6. Συστατικά RIPA Buffer.

- NaCl: συμβάλει στη διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης σε φυσιολογικά επίπεδα.

- Triton X, SDC: απορρυπαντικά που αποτρέπουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών.
 - SDS (sodium dodecyl sulfate): ανιονικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο.
 - EDTA: δεσμεύει μέταλλα (δισθενή), οδηγώντας στην αναστολή μεταλλοπρωτεασών.
- Μετά από την παρασκευή του lysis buffer, ακολουθεί ανάδευση στο vortex.
 - Στη συνέχεια, γίνεται απόσυρση των δειγμάτων από τους -80°C και απόχυση τυχόν ποσότητας NaCl που έχει απομείνει.
 - Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα lysis buffer σε κάθε δείγμα, μετά από υπολογισμούς.
 - Γίνεται πολύ καλή ανάδευση με πιπέτα, προκειμένου να διασπαστούν τα συσσωμάτωμα των κυττάρων.
 - Ακολουθώς, πραγματοποιείται μεταφορά της ποσότητας από κάθε falcon σε φιαλίδια erpendorf, στον πάγο, με τη χρήση πιπέτας.
 - Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά στον πάγο.
 - Ακολουθεί ανάδευση στο vortex κάθε 5 λεπτά, για 30 λεπτά, ώστε να δράσουν τα ένζυμα και τα περιεχόμενα των φιαλιδίων να γίνουν διαυγή.
 - Μετά το πέρας των 30 λεπτών, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 rpm για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C.
 - Μετά από τη φυγοκέντρωση, γίνεται μεταφορά των υπερκειμένων σε νέα erpendorf με τη χρήση πιπέτας.
 - Τα 2 τελευταία βήματα επαναλαμβάνονται έως ότου τα δείγματα είναι πλήρως διαυγή (2-3 φορές).

Δοκιμασία Bradford

Η δοκιμασία Bradford είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνών, η οποία βασίζεται στη μεταβολή του μέγιστου απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, από 465 nm στα 595 nm, όταν αυτή συνδέεται με πρωτεΐνες σε ένα διάλυμα [48]. Είναι σημαντικό να υπολογίζεται πάντα η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα, προκειμένου να γίνει ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών στην ηλεκτροφόρηση και να φανούν οι πραγματικές διαφορές στη μεταξύ τους έκφραση, στο τέλος του πειράματος. Ο υπολογισμός αυτός, για κάθε δείγμα, γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης. Αναλυτικότερα, διενεργούνται τα εξής:

- Σε πιάτο 96 θέσεων προστίθενται τα δείγματα μετά από τη λύση των κυττάρων κατά σειρά. Συγκεκριμένα, σε κάθε θέση του πιάτου προστίθενται 5 μl δείγματος και 20 μl PBS 1X (αραίωση 1:5), με τη χρήση πιπέτας, με διαφορετικό τιπ κάθε φορά, ενώ προηγείται ανάδευση του κάθε δείγματος.
- Σε μια δεύτερη στήλη του πιάτου προστίθενται γνωστές συγκεντρώσεις της πρότυπης πρωτεΐνης αλβουμίνης, με βάση της οποίας γίνεται ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων κάθε αγνώστου δείγματος.

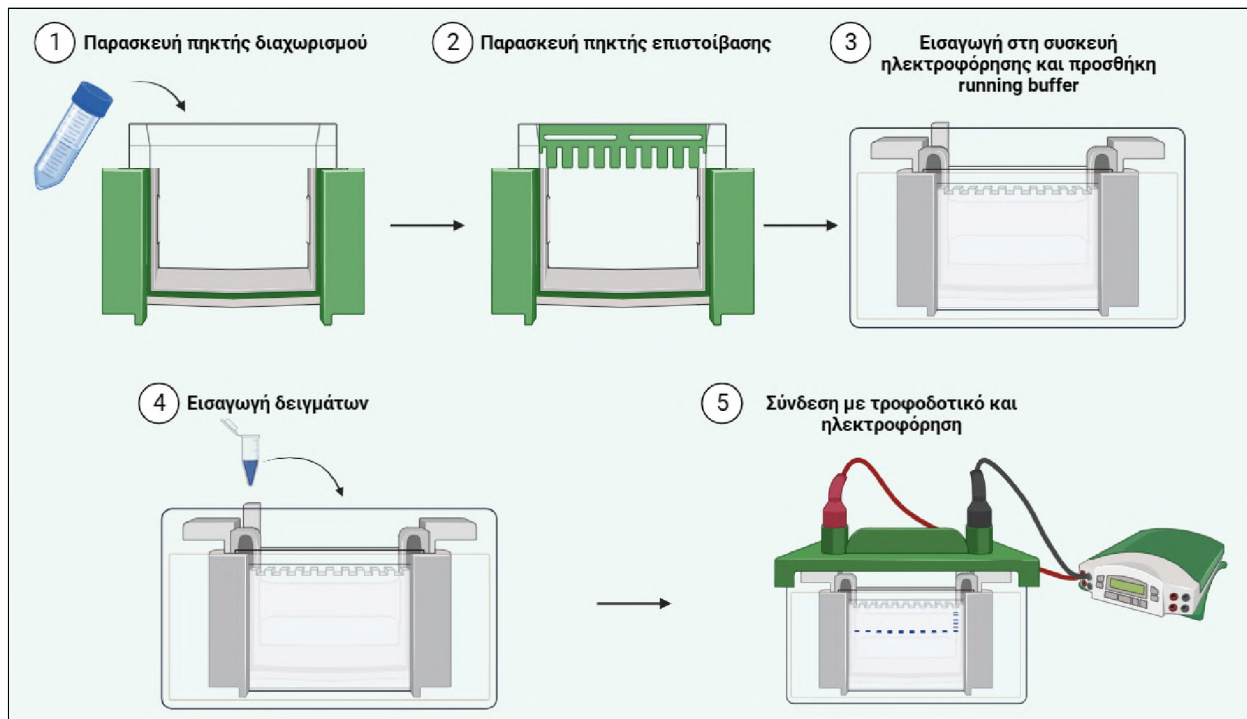
- Στη συνέχεια, ακολουθεί υπολογισμός των ποσοτήτων των αντιδραστηρίων Α και Β, ώστε σε κάθε θέση του πιάτου να προστεθούν 200 μl του αντιδραστηρίου και ο λόγος της συγκέντρωσης του Α προς τη συγκέντρωση του Β να είναι ίσος με 50:1. Πρόκειται για αντιδραστήρια ενός κιτ (Pierce™ BCA Protein Assay kit) που περιέχουν και τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue.
- Μετά από την προσθήκη των δειγμάτων και του PBS, ακολουθεί προσθήκη συνολικής ποσότητας 200 μl από τα αντιδραστήρια σε κάθε θέση του πιάτου.
- Γίνεται χρήση της πιπέτας, προκειμένου να σπάσουν τυχόν φυσαλίδες που δημιουργούνται και το πιάτο μεταφέρεται στην κλίβανο για 30 λεπτά.
- Τελικά, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 540 nm και υπολογισμός των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα, μέσω της πρότυπης καμπύλης.

Ημέρα 6η

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους (μοριακό βάρος). Η διαδικασία περιλαμβάνει την παρασκευή δύο πηκτών (gels), την πηκτική διαχωρισμού (running gel) και την πηκτική επιστοιβάσης (stacking gel). (Εικόνα 21)

Στην πηκτική επιστοιβάσης δημιουργούνται κάποιες εσοχές-“πηγαδάκια” όπου φορτώνονται τα δείγματα, τα οποία, κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, διέρχονται από την πηκτική διαχωρισμού (κινούνται από την κάθοδο προς την άνοδο), με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή, η οποία συνδέεται με τροφοδοτικό, μέσα σε ένα δοχείο με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (running buffer).



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτική SDS-ακρυλαμίδιον. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, έγινε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων PANC-1, στα οποία είχε χορηγηθεί φάρμακο, αλλά και των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων ελέγχου. Αναλυτικότερα, μετά από την παρασκευή των εκχυλισμάτων και τον υπολογισμό τις συγκέντρωσης των πρωτεϊνών τους, πραγματοποιούνται τα εξής:

- Πρώτα, οι πλάκες στις οποίες πραγματοποιείται ο πολυμερισμός των πηκτών καθαρίζονται πολύ καλά με αιθανόλη και κλείνονται σε ειδική βάση, ανά δύο, δημιουργώντας έναν ενδιάμεσο χώρο μεταξύ τους.
- Γίνεται έλεγχος για τυχόν διαρροές με την προσθήκη απιονισμένου H₂O στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των πλακών, το οποίο στη συνέχεια αποχύνεται. Είναι σημαντικό να μην υπάρχουν διαρροές, προκειμένου να σχηματιστούν σωστά οι δύο πηκτές.
- Στη συνέχεια, σε ένα φιαλίδιο (falcon) των 50 ml, παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού. Η πυκνότητα της πηκτής διαχωρισμού που παρασκευάζεται κάθε φορά μπορεί να μεταβάλλεται, ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Εάν οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος έχουν υψηλότερα μοριακά βάρη, παρασκευάζεται πηκτή χαμηλότερης πυκνότητας, και αντίστροφα. Στο συγκεκριμένο πείραμα, παρασκευάστηκαν πηκτές διαχωρισμού 8% και 10%, οι οποίες περιείχαν τα παρακάτω συστατικά:

Συστατικά πηκτών διαχωρισμού	8%	10%
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 1,5M, pH=8,8	2,5 ml	2,5 ml
Ακρυλαμίδιο 30%	2,7 ml	3,3 ml
SDS 10%	100 μl	100 μl
Απιονισμένο H ₂ O	4,7 ml	4,1 ml
APS 10%	50 μl	50 μl
TEMED	5 μl	5 μl

Πίνακας 7. Συστατικά πηκτών διαχωρισμού.

- Αρχικά, προστίθενται στο falcon το απιονισμένο H₂O, το ακρυλαμίδιο (έχει νευροτοξική δράση) και το ρυθμιστικό διάλυμα Tris που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση σταθερού pH. Μετά από την προσθήκη του SDS (απορρυπαντικό που συμβάλλει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών), προστίθενται τελευταία τα APS (Ammonium peroxodisulfate) και TEMED, τα οποία συμβάλουν στην έναρξη του πολυμερισμού. Το πρώτο δρα ως πηγή ελεύθερων ριζών, ενώ το δεύτερο καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου.
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση και προσθήκη του μείγματος στη διάταξη της ηλεκτροφόρησης, στον χώρο μεταξύ των δύο πλακών, με τη χρήση πιπέτας.
- Το μείγμα καλύπτεται με απιονισμένο νερό και η πηκτή αφήνεται να πήξει για 30 λεπτά.
- Μετά το πέρας των 30 λεπτών, το νερό αποχύνεται και ξεκινά η διαδικασία παρασκευής της πηκτής επιστοίβασης. Η πηκτή αυτή έχει πάντα την ίδια πυκνότητα, είναι πάντα 5% και περιείχε τα παρακάτω:

Συστατικά πηκτής επιστοίβασης	Ποσότητες
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0,5M, pH 6,8	2,5 ml
Ακρυλαμίδιο 30%	1,7 ml
Απιονισμένο H ₂ O	5,7 ml
SDS 10%	100 μl
APS 10%	50 μl
TEMED	5 μl

Πίνακας 8. Συστατικά πηκτής επιστοίβασης.

- Τα συστατικά αυτά προστίθενται σε falcon, με την ίδια σειρά όπως και στην παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού.
- Ακολουθεί και πάλι ανάδευση και προσθήκη του μείγματος πάνω από την πηκτή διαχωρισμού με τη χρήση πιπέτας. Μεταξύ των πλακών τοποθετείται ειδική συσκευή, η οποία βοηθά στον σχηματισμό πηγαδιών, στα οποία φορτώνονται τα δείγματα.
- Στη συνέχεια, γίνεται προετοιμασία των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, προστίθενται στο κάθε ένα από αυτά 7 ml loading buffer και PBS. Η ποσότητα του PBS που προστίθεται υπολογίζεται ξεχωριστά για κάθε δείγμα, λαμβάνοντας υπόψη τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος, η οποία υπολογίζεται με τη δοκιμασία Bradford. Στόχος είναι τα δείγματα τελικά να έχουν ίδιες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, προκειμένου να γίνει ισόποσο φόρτωμα. Το loading buffer περιέχει τα παρακάτω συστατικά:

Συστατικά Loading Buffer	Ποσότητες
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0,5 M, pH=6,8	100 μl
SDS 20%	100 μl
Γλυκερόλη	400 μl
μπλε της βρωμοφαινόλης 0,2% (w/v)	100 μl
B-μερκαπτοαιθανόλη	100 μl

Πίνακας 9. Συστατικά Loading Buffer.

- Ακολουθεί ολιγόλεπτη φυγοκέντρωση των δειγμάτων και στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά στους 95°C, προκειμένου οι πρωτεΐνες που περιέχουν να μετουσιωθούν. Μετά το πέρας των 5 λεπτών τα δείγματα τοποθετούνται απευθείας στον πάγο.
- Αφού η πηκτή επιστοίβασης πήξει, αφαιρείται η ειδική συσκευή για τον σχηματισμό των εσοχών, και οι πλάκες που περιέχουν τις πηκτές μεταφέρονται στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Στη συσκευή, μετά, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, το λεγόμενο running buffer, που έχει pH 8,3 και περιέχει τα εξής:

Συστατικά Running Buffer 10X	Ποσότητες
Tris Base, pH=8,3	30,3 gr
Γλυκίνη	144 gr

Απιονισμένο H ₂ O	1.000 ml
SDS	10 gr

Πίνακας 10. Συστατικά Running Buffer.

Γίνεται αραιώση με απιονισμένο νερό, προκειμένου η συγκέντρωσή του να είναι 1X.

- Ο μάρτυρας και τα δείγματα των πρωτεϊνών φορτώνονται στα πηγαδάκια με τη χρήση πιπέτας (περίπου 20-30 μl δείγματος σε κάθε πηγαδάκι).
- Τέλος, αφού προστίθεται επιπλέον running buffer, ώστε να καλύπτονται πλήρως οι πηκτές, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με το τροφοδοτικό, το οποίο ρυθμίζεται στα 100 Volt.
- Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου μία ώρα.

Μεταφορά σε μεμβράνη PVDF

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, γίνεται μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών, από την πηκτή, σε μεμβράνη PVDF (polyvinylidene difluoride), προκειμένου να ακολουθήσει επώαση με αντισώματα. Τα βήματα της διαδικασίας είναι τα παρακάτω:

- Πρώτα, γίνεται απόχυση του running buffer και αφαίρεση της πηκτής από τις πλάκες.
- Στη συνέχεια, σε ειδική συσκευή, τοποθετούνται κατά σειρά, το ένα πάνω από το άλλο τα εξής:
 - 2 Σφουγγάρια
 - Χαρτί Whatman
 - Πηκτή
 - Μεμβράνη PVDF
 - Χαρτί Whatman
 - 2 Σφουγγάρια

Προηγουμένως, τα σφουγγάρια και τα χαρτιά Whatman διαποτίζονται με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, το transfer buffer 1X, ενώ η μεμβράνη μεταφέρεται αρχικά από μεθανόλη ώστε να ενεργοποιηθεί, σε απιονισμένο H₂O για να ξεπλυθεί και τελικά στο transfer buffer, όπου παραμένει για 5 λεπτά. Το transfer buffer περιέχει τα παρακάτω συστατικά:

Συστατικά Transfer Buffer 10x	Ποσότητες
Tris Base, pH 8,5	30,3 gr
Γλυκίνη	144 gr

Πίνακας 11. Συστατικά Transfer Buffer.

Σε 100 ml transfer buffer 10X προστίθενται 200 ml μεθανόλης και 700 ml απιονισμένου νερού, ώστε η συγκέντρωση να γίνει 1X.

- Είναι σημαντικό μεταξύ των στρώσεων να μην υπάρχουν φυσαλίδες, προκειμένου να γίνει σωστή μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Αυτό εξασφαλίζεται με τη χρήση ράβδου που τις απομακρύνει.

- Μετά από τον σχηματισμό της παραπάνω διάταξης, αυτή μεταφέρεται σε ειδική συσκευή μεταφοράς, στην οποία προστίθεται επιπλέον ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.
- Τέλος, η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό, το οποίο ρυθμίστηκε στα 400 mA σταθερά και ξεκινά η μεταφορά των πρωτεϊνών που διαρκεί περίπου 90 λεπτά.
- Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, γίνεται χρώση της με τη χρωστική Ponceau S., προκειμένου να γίνουν εμφανείς οι ζώνες που σχηματίστηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών και χρώση της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Blue, για να φανεί εάν η μεταφορά όλων των πρωτεϊνών ήταν επιτυχής.
- Ακολουθεί πλύση της μεμβράνης υπό ανάδευση, με διάλυμα TBST 1X, που περιέχει τα εξής:

Συστατικά TBST 1X	Ποσότητες
Υδατικό διάλυμα NaCl 0,9% (w/v)	950 ml
Tris-Cl 1 M, pH=7,4	50 ml
TWEEN 20 0,1%	1 ml

Πίνακας 12. Συστατικά TBST 1X.

- Στη συνέχεια, προκειμένου να αποκλειστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης της μεμβράνης, αυτή επωάζεται με διάλυμα TBST 1X που περιέχει FBS σε περιεκτικότητα 5%. Η επώαση διαρκεί 60 λεπτά και πραγματοποιείται υπό ανάδευση σε χαμηλές στροφές (45 rpm).
- Ακολουθεί πλύση της μεμβράνης με TBST 1X για 10 λεπτά, υπό ανάδευση στις 70 rpm.

Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα

Ύστερα από τη μεταφορά των πρωτεϊνών και τις απαραίτητες πλύσεις της μεμβράνης, πραγματοποιείται επώαση με πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο προσδένεται συγκεκριμένα στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα, η μεμβράνη επωάζεται με το αντίσωμα ολονύκτια, υπό ανάδευση (45 rpm), σε θερμοκρασία 4°C.

Ημέρα 7η

Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα

Το δευτερογενές αντίσωμα συνδέεται ειδικά με το πρωτογενές, ενώ είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο που καταλύει μια αντίδραση παραγωγής χημειοφωταύγειας (HRP - Horseradish Peroxidase). Έτσι, είναι απαραίτητο, προκειμένου να γίνει η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Σε αυτό το στάδιο, εκτελούνται τα παρακάτω:

- Μετά από τη συλλογή και την αποθήκευση του πρωτογενούς αντισώματος, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις της μεμβράνης με TBST 1X, υπό ανάδευση (70 rpm, για 5 λεπτά).

- Στη συνέχεια, προστίθενται το δευτερογενές αντίσωμα, η προέλευση του οποίου εξαρτάται από το πρωτογενές αντίσωμα και γίνεται επώαση της μεμβράνης για 70 λεπτά υπό ανάδευση (45 rpm).
- Μετά το πέρας των 70 λεπτών, πραγματοποιείται απόχυση του αντισώματος και ακολουθούν 4 πλύσεις των 10 λεπτών με TBST 1X, υπό ανάδευση (70 rpm).

Τόσο τα πρωτογενή, όσο και τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιούνται για τις επωάσεις τις μεμβράνης, προηγουμένως αραιώνονται σε διάλυμα που περιέχει 1% FBS, TBST 1X και το συντηρητικό θυμεροζάλη. Γίνονται οι απαραίτητοι υπολογισμοί των απαιτούμενων ποσοτήτων του κάθε συστατικού κάθε φορά. Όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, καθώς και οι οργανισμοί προέλευσης, οι αραιώσεις και οι στόχοι τους, αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

Πρωτογενές αντίσωμα	Οργανισμός προέλευσης	Αραίωση	Εταιρία
anti-PDK1	κουνέλι	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 13037
anti-phospho-PDK1 (Ser241)	κουνέλι	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 3438
anti-GSK3a	κουνέλι	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 4337
anti-phospho-GSK3a (Ser21)	κουνέλι	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 9316
anti-cyclin D1	κουνέλι	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology, κωδικός: C2804
anti-actin β	ποντίκι	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 3700

Πίνακας 13. Πρωτογενή αντισώματα.

Δευτερογενές αντίσωμα	Οργανισμός προέλευσης	Αραίωση	Εταιρία
anti-Rabbit	αίγα	1:10.000	Cell Signaling, κωδικός: 7074
anti-Mouse	άλογο	1:10.000	Cell Signaling, κωδικός: 7893

Πίνακας 14. Δευτερογενή αντισώματα.

Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων

Μετά από τις απαραίτητες πλύσεις της μεμβράνης, πραγματοποιείται οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western μέσω της μεθόδου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced chemiluminescence – ECL). Χρησιμοποιούνται ειδικά αντιδραστήρια (ECL reagents A και B), τα οποία περιέχουν λουμινόλη (υπόστρωμα της αντίδρασης χημειοφωταύγειας), H_2O_2 (λειτουργεί ως δότης O_2) και κουμαρικό οξύ (ενισχυτής αντίδρασης). Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται οξείδωση της λουμινόλης από την HRP, παρουσία H_2O_2 και παράγεται ένα προϊόν (3-aminophthalate), το οποίο εκπέμπει φως μήκους κύματος 425 nm [49]. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η αντίδραση και να γίνει οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, εκτελούνται τα παρακάτω:

- Σε ένα φιαλίδιο τύπου eppendorf γίνεται προσθήκη και ανάμιξη με πιπέτα 750 μl αντιδραστήριου A και 750 μl αντιδραστήριου B.
- Στη συνέχεια, γίνεται επώαση της μεμβράνης στο παραπάνω διάλυμα, για 5 λεπτά στο σκοτάδι, αφού η λουμινόλη είναι φωτοευαίσθητη.
- Τέλος, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα (Imager Uvitec Cambridge) και με τη χρήση ειδικού λογισμικού (Alliance, Version 16.06) πραγματοποιείται η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Μετά από την οπτικοποίηση, φαίνονται στη μεμβράνη ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, ο μάρτυρας που προστίθεται κινείται, όπως και οι πρωτεΐνες, από την κάθοδο προς την άνοδο, δημιουργώντας ζώνες. Οι ζώνες αυτές βοηθούν στον προσδιορισμό (κατά προσέγγιση) των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών. Στο συγκεκριμένο πείραμα, οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, έχουν τα παρακάτω μοριακά βάρη:

Πρωτεΐνη	Μοριακό βάρος
PDK1	48 kDa
p-PDK1 (Ser241)	48 kDa
GSK3a	51 kDa
p-GSK3a (Ser21)	51 kDa
Κυκλίνη D1	37 kDa
Ακτίνη	45 kDa

Πίνακας 15. Πρωτεΐνες και μοριακά βάρη.

Η ζώνη της κάθε πρωτεΐνης εμφανίζεται κοντά στο σημείο που αντιστοιχεί στο μοριακό της βάρος (η PDK1 δίνει ζώνη μεταξύ 58 και 68 kDa). Η ακτίνη, χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene), για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, αφού εκφράζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Ακολουθεί ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, μέσω του προγράμματος Image J. Με το πρόγραμμα αυτό έγινε μέτρηση της πυκνότητας των ζωνών που εμφανίστηκαν στη μεμβράνη, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως πυκνομετρία. Σε κάθε περίπτωση, η ποσοτικοποίηση του κάθε δείγματος γίνεται σε σχέση με την ακτίνη. Κατά την πυκνομετρία των δειγμάτων, χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Microsoft Excel, για τους κατάλληλους υπολογισμούς, τη στατιστική ανάλυση και τη δημιουργία ραβδογραμμάτων.

2.12 Μέθοδος κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB (SRB assay)

Η μέθοδος σουλφοροδαμίνης B (SRB) πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό της κυτταρικής πυκνότητας, με βάση τη μέτρηση του κυτταρικού περιεχομένου σε πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η χρωστική SRB προσδένεται στις πρωτεΐνες των κυττάρων, τα οποία πρώτα έχουν μονιμοποιηθεί με τριχλωροακετοξικό οξύ TCA. Η χρωστική αυτή προσδένεται σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών και κάτω από ήπιες όξινες συνθήκες αποσυνδέεται. Η ποσότητα χρωστικής που εξάγεται από τα μονιμοποιημένα κύτταρα, αντικατοπτρίζει την κυτταρική μάζα και η οπτική πυκνότητα μετρείται στα 540nm. Η διαδικασία περιγράφεται ως εξής:

Ημέρα 1^η

Ανανέωση θρεπτικού μέσου και έλεγχος κυττάρων

Σε αυτό το στάδιο γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου, όπως περιγράφεται παραπάνω (2.5).

Ημέρα 2^η

Ανακαλλιέργεια κυττάρων και στρώσιμο σε πιάτο 96 θέσεων

Σε πρώτο στάδιο, γίνεται ο ενοφθαλμισμός των κυττάρων σε πιάτα 96 θέσεων με την εξής διαδικασία:

- Αρχικά, γίνεται αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα καλλιέργειας. Η διαδικασία περιγράφεται παραπάνω (2.6).
- Στο στάδιο όπου συλλέγεται το εναιώρημα των κυττάρων με το θρεπτικό μέσο, αφήνεται η κατάλληλη ποσότητα στη φλάσκα για τη συνέχιση της ανάπτυξης των κυττάρων.
- Το υπόλοιπο εναιώρημα συλλέγεται σε σωληνάριο.
- Σε αυτό, γίνεται καλή ανάδευση με vortex, ώστε να υπάρχει αντιπροσωπευτικός αριθμός κυττάρων και να σπάσει οποιοδήποτε συσσωμάτωμα έχει δημιουργηθεί.
- Ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων (2.7).
- Γίνεται υπολογισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων, και υπολογίζεται η ποσότητα κυττάρων που χρειάζονται, ώστε σε κάθε πηγαδάκι να υπάρχει ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων όπως ορίζεται για κάθε ξεχωριστή καρκινική κυτταρική σειρά (εδώ είναι 5000 κύτταρα ανά πηγαδάκι).

Συνολικά χρειάζονται πηγαδάκια τα οποία θα περιέχουν:

- Κύτταρα που θα επωαστούν με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις φαρμάκων.
 - Κύτταρα ελέγχου χωρίς την προσθήκη ουσιών, ώστε να υπάρχει σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης των φυσιολογικών έναντι των εκτιθέμενων στις ουσίες κυττάρων.
 - Κύτταρα ελέγχου που αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή μηδέν, χωρίς την προσθήκη φαρμάκων και τα οποία μονιμοποιούνται την ημέρα που προστίθενται οι υπο μελέτη ουσίες, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση των φαρμάκων, από την ημέρα έκθεσης των κυττάρων σε αυτά έως τη λήξη του πειράματος.
-
- Αφού συλλεχθεί ο τελικός αριθμός κυττάρων που χρειάζονται γίνεται προσθήκη θρεπτικού μέσου υπολογίζοντας για κάθε πηγαδάκι να αντιστοιχεί σε 100μl.
 - Γίνεται πολύ καλή ανάδευση και vortex ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή κυττάρων στην επιφάνεια κάθε πηγαδιού.
 - Μεταφέρονται 100 μl εναιωρήματος σε κάθε πηγαδάκι.

Με την παρακάτω διαδικασία προκύπτουν δύο πιάτα 96 θέσεων όπου στο ένα υπάρχουν κύτταρα όπου θα επωασθούν με τα φάρμακα και τα δείγματα ελέγχου και άλλο ένα στο οποίο προστίθενται τα δείγματα ελέγχου τη χρονική στιγμή μηδέν.

Ημέρα 3^η

Προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών

24 ώρες μετά από το στρώσιμο των κυττάρων στα πιάτα των 96 θέσεων, γίνεται η προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών και η μονιμοποίηση των κυττάρων ελέγχου τη χρονική στιγμή μηδέν. Συγκεκριμένα, οι ουσίες που μελετώνται στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι ο GSK, ο BX-517 και ο PS210 όσον αφορά την επίδρασή τους στην παγκρεατική καρκινική σειρά PANC-1, σε συγκεντρώσεις 100, 10, 1 και 0,1 μM . Οι τελικές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται από ένα αρχικό stock των 20mM μετά από αραιώσεις με τις κατάλληλες ποσότητες θρεπτικού υλικού.

Αφού λοιπόν, ετοιμασθούν οι αραιώσεις ακολουθούνται τα εξής:

- Καλή ανάδευση του περιεχομένου με vortex
- Προσθήκη 100 μl από κάθε συκέντρωση του κάθε φαρμάκου στα αντίστοιχα πηγαδάκια
- Στα δείγματα ελέγχου, προσθήκη 100 μl θρεπτικού μέσου RPMI 5%
- Επώαση στον κλίβανο για 48 ώρες

Μονιμοποίηση των δειγμάτων ελέγχου τη χρονική στιγμή μηδέν (Tzero)

Η διαδικασία μονιμοποίησης των δειγμάτων ελέγχου τη χρονική στιγμή μηδέν περιγράφεται συνοπτικά:

- Προσθήκη 100 μl από το TCA, 20% σε κάθε πηγαδάκι
- Επώαση για 1 ώρα στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4 °C
- Απομάκρυνση του ο περιεχομένου των πιάτων με απότομη και κάθετη κίνηση
- Πλύση 3 φορές με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθούν υπολείμματα TCA, θρεπτικού μέσου RPMI και διαφόρων μεταβολίτων χαμηλού μοριακού βάρους.
- Το πιάτο αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να χρωματομετρηθεί.

Ημέρα 4^η

Παρατήρηση

Γίνεται απλή παρατήρηση στο μικροσκόπιο, του πρώτου πιάτο με τα κύτταρα ελέγχου και αυτών που επωάζονται με τις ουσίες, ώστε να ελεγχθεί η πορεία του πειράματος.

Ημέρα 5^η

Λήξη του πειράματος με μονιμοποίηση των κυττάρων

Μετά από 48 ώρες από την έναρξη του πειράματος, ακολουθείται η διαδικασία της μονιμοποίησης που περιεγράφηκε για τα δείγματα ελέγχου τη χρονική στιγμή 0 (T-zero).

Χρώση με Σουλφοροδαμίνη Β (Sulforhodamine B,SRB)

Το στάδιο αυτό είναι και το τελευταίο για τη λήξη του πειράματος. Αφού τα δυο πιάτα έχουν στεγνώσει πολύ καλά ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Προσθήκη 50 μl 0,4% w/v SRB σε 1% οξικό οξύ
- Επώση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολουθούν 3 πλύσεις του περιεχομένου των πιάτων με 1% οξικό οξύ, ώστε να απομακρυνθεί η χρωστική που δεν κατάφερε να δεσμευθεί σε κυτταρικές πρωτεΐνες.
- Τα πιάτα, αφήνονται να στεγνώσουν καλά.
- Προσθήκη σε αυτά 150 μl Trizma base σε συγκέντρωση 10mM, το οποίο είναι ρυθμιστικό διάλυμα ελαφρώς βασικό και βοηθά στην απελευθέρωση της δεσμευμένης χρωστικής από τα κύτταρα, ώστε στη συνέχεια να γίνει ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας.
- Επώση για 10 λεπτά στον κλίβανο στους 37 °C
- Ήπια ανάδευση για 10 λεπτά στις 30 στροφές
- Μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 540 nm σε φωτόμετρο microplate reader Biotek microelisa (Biotek, El-311), αυτοματοποιημένο για πιάτο 96 θέσεων Elisa

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων επεξεργάζονται στο πρόγραμμα EXCEL με σκοπό να υπολογισθούν οι εξής παράμετροι, για κάθε υπό εξέταση ουσία:

- 1. GI50 (Growth Inhibition of 50%):** είναι η συγκέντρωση της ουσίας που μειώνει κατά 50% την ανάπτυξη των κυττάρων σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αυτής ισχύει ο τύπος:

$$100 \times (*T - **T0)/(***Tc - T0) = 50$$

- 2. TGI (Total Growth Inhibition):** είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που προκαλεί ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αυτής χρησιμοποιείται ο τύπος

$$100 \times (T - T0)/T0 = -50$$

- 3. LC50 (Lethal Concentration of 50%):** είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που προκαλεί 50% κυτταρικό θάνατο. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αυτής ο τύπος ορίζεται ως:

$$100 \times (T - T0)/(Tc - T0) = 0.$$

Όπου: T = η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού έπειτα από χορήγηση του φαρμάκου

T0 = η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού τη στιγμή προσθήκης του φαρμάκου

Tc = η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού δείγματος ελέγχου control μετά από 48 ώρες

2.13 Στατιστική ανάλυση

Μετά από το τέλος των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Excel και η δοκιμασία T-test. Μέσω του T-test, υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα (p-value) για τα αποτελέσματα κάθε

πειραματικής διαδικασίας. Έγινε στατιστική σύγκριση κάθε φορά και για κάθε δείγμα, σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Κάθε αποτέλεσμα, θεωρούνταν στατιστικά σημαντικό, εάν το p-value ήταν μικρότερο της τάξεως του 0,05 ($p\text{-value} < 0,05$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

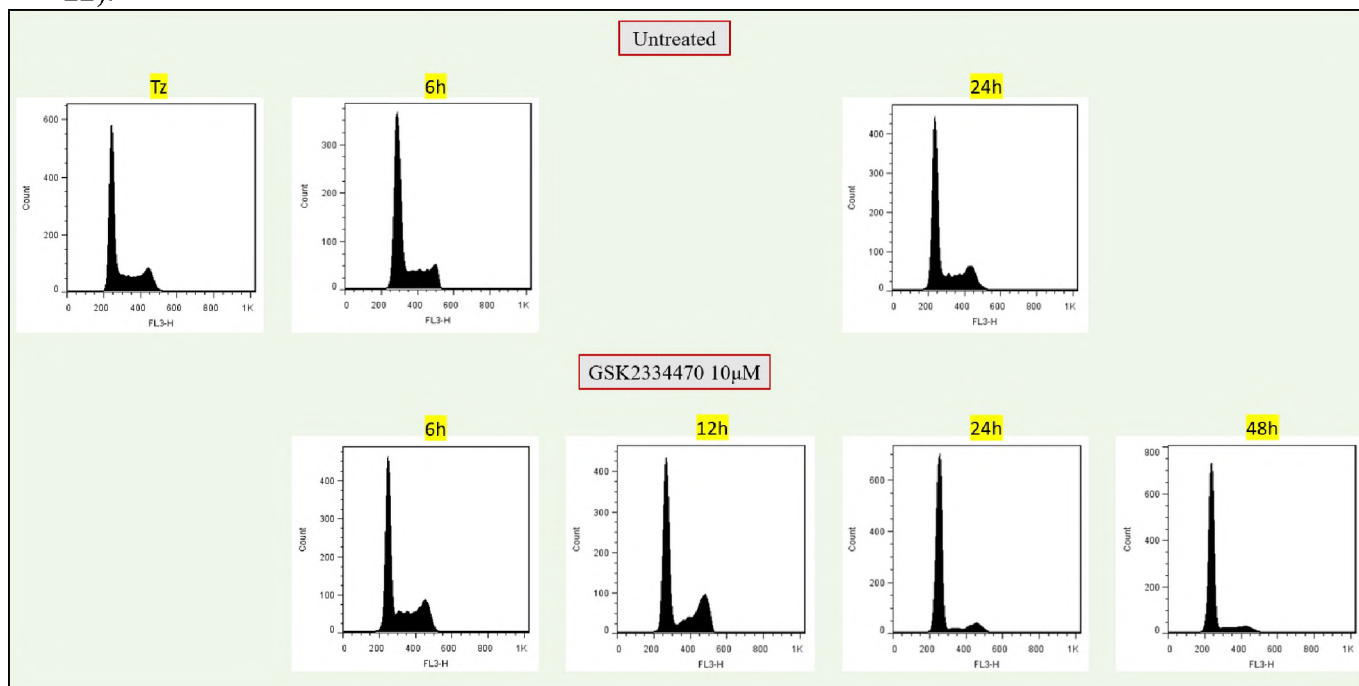
3.1 Αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής

Η ανάλυση των κυττάρων της παγκρεατικής καρκινικής σειράς PANC-1, μέσω της κυτταρομετρίας ροής, διενεργήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή επίδραση της του αναστολέα GSK2334470 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και κατ' επέκταση στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Όπως αναφέρθηκε, πρόκειται για έναν αναστολέα, ο οποίος προσδένεται ειδικά στη θέση πρόσδεσης του ATP της κινάσης PDK1, που συμμετέχει στα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K/AKT/mTOR και RAS/MAPK. Η υπερενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του καρκίνου (1.4.2). Επομένως, η αναστολή της PDK1 και κατ' επέκταση των δύο αυτών μονοπατιών, από τον GSK2334470, αναμένεται να επιφέρει θετικά αποτελέσματα, όσον αφορά τον περιορισμό της ανάπτυξης και της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων.

Πράγματι, προηγούμενα πειράματα κυτταρομετρίας ροής του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας σε κύτταρα PANC-1 που είχαν συγχρονιστεί στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, έδειξαν πως η χρήση του αναστολέα εμπόδιζε τα κύτταρα αυτά να εισέλθουν στη φάση S, δηλαδή προκαλούσε G1 arrest.

Στην παρούσα διπλωματική, πραγματοποιήθηκε ανάλυση PANC-1 κυττάρων, τα οποία δεν είχαν συγχρονιστεί, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο αναστολέας θα επηρεάσει με τον ίδιο τρόπο την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα που βρίσκονται στον φυσιολογικό τους κύκλο. Τα αποτελέσματα μετά από δύο επαναλήψεις του πειράματος αυτού, φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 22).



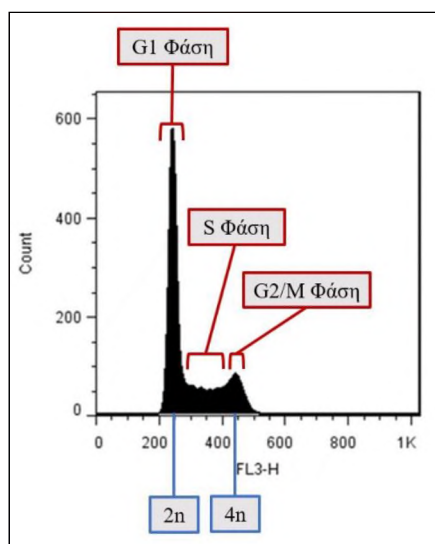
Εικόνα 22. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής κυττάρων ελέγχου και κυττάρων στα οποία χορηγήθηκε GSK2334470. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα των κυττάρων ελέγχου και των κυττάρων που επωάστηκαν για 6, 12, 24 και 48 ώρες με GSK2334470 σε συγκέντρωση 10 μM.

Στην εικόνα αυτή (Εικόνα 22), φαίνονται 5 ιστογράμματα. Το πρώτο ιστόγραμμα αντιστοιχεί στην ανάλυση των κυττάρων ελέγχου, στα οποία δεν χορηγήθηκε GSK2334470, ενώ τα υπόλοιπα 4 αντιστοιχούν σε κύτταρα που επωάστηκαν με τον αναστολέα GSK2334470 συγκέντρωσης 10 μ M, για 6, 12, 24 και 48 ώρες.

Στον οριζόντιο άξονα του κάθε ιστογράμματος (άξονας x'x) φαίνεται η ένταση του εκπεμπόμενου από τα κύτταρα φθορισμού (Fluorescence intensity), που αντικατοπτρίζει την ποσότητα του Propidium Iodide που εντοπίζεται στα κύτταρα και κατ' επέκταση, την ποσότητα DNA των κυττάρων. Στον κάθετο άξονα (άξονας y'y) φαίνεται ο αριθμός των κυττάρων. Ο εντοπισμός των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, γίνεται ως εξής:

- Ένταση φθορισμού κοντά στο 200 (πρώτη μεγάλη κορυφή) αντιστοιχεί σε διπλοειδή κύτταρα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί διπλασιασμός του DNA ($2n$ – φάση G1 του κυτταρικού κύκλου).
- Ένταση φθορισμού κοντά στο 400 (δεύτερη κορυφή) αντιστοιχεί σε κύτταρα στα οποία έχει ολοκληρωθεί ο διπλασιασμός του DNA ($4n$ – φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου).
- Ενδιάμεσα, εντοπίζεται η ένταση φθορισμού κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση, στα οποία ξεκινά ο διπλασιασμός του DNA ($2n-4n$).

Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου φαίνονται στην παρακάτω εικόνα του ιστογράμματος των κυττάρων ελέγχου.



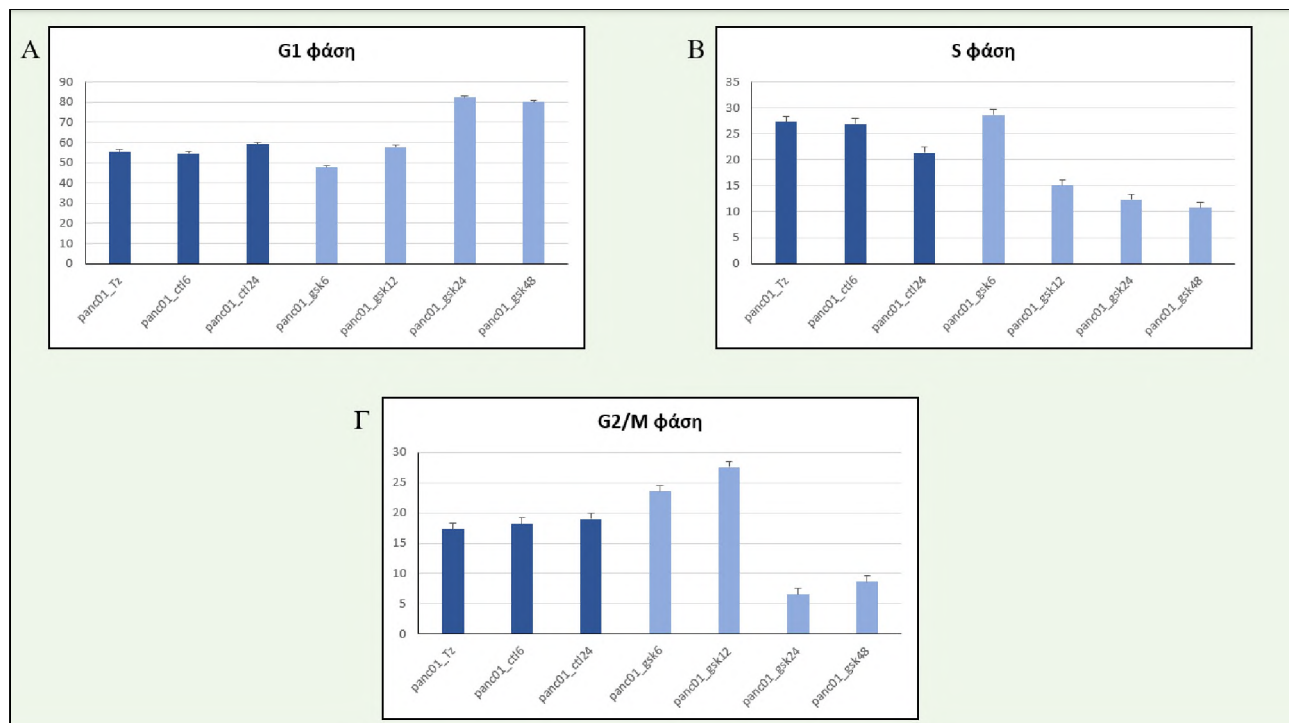
Εικόνα 23. Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου στο ιστόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα της ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου, διαπιστώνεται ότι:

- Τα κύτταρα ελέγχου παρουσιάζουν μια φυσιολογική εικόνα, με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου να πραγματοποιείται κανονικά με τα κύτταρα να είναι κατανομημένα και στις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Φαίνεται πως γίνεται κανονικά η μετάβαση από τη μία φάση του κύκλου στην άλλη.
- Παρόμοια είναι η εικόνα και στα κύτταρα που επωάστηκαν για 6 ώρες με τον αναστολέα.

- Μετά από 12 ώρες επώασης, παρουσία του αναστολέα σε συγκέντρωση 10 μ M, παρατηρείται πως έχει ελαττωθεί ο αριθμός των κυττάρων που μεταβαίνουν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.
- Μετά από 24 ώρες επώασης, παρουσία του αναστολέα σε συγκέντρωση 10 μ M, φαίνεται πως έχει ελαττωθεί σημαντικά ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται, τόσο στη φάση S, όσο και στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου. Στη μεγαλύτερη πλειοψηφία τα κύτταρα, επομένως, παραμένουν στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Μετά από 48 ώρες επώασης, παρουσία του αναστολέα σε συγκέντρωση 10 μ M, παρατηρείται πως ελάχιστα κύτταρα μετέβησαν στις φάσεις S και G2/M, συνεχίζοντας να παραμένουν στη φάση G1.

Τα ραβδογράμματα της παρακάτω εικόνας (Εικόνα 24), στα οποία απεικονίζονται τα ποσοστά των κυττάρων κάθε δείγματος που βρίσκονται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου, επιβεβαιώνουν όσα φαίνονται παραπάνω.



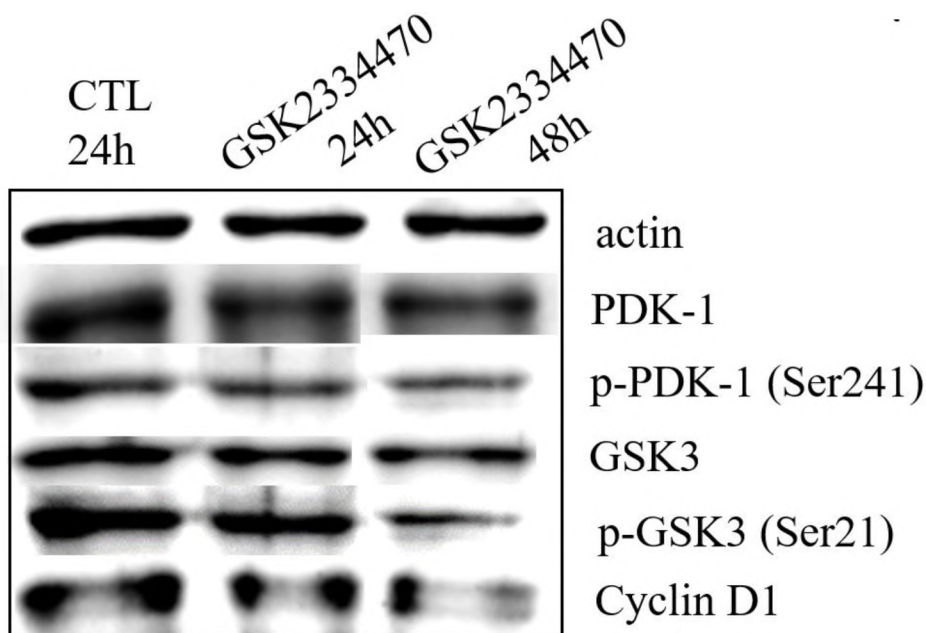
Εικόνα 24. Ραβδογράμματα που απεικονίζουν (Α): το ποσοστό των κυττάρων κάθε δείγματος που βρίσκεται στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, (Β): το ποσοστό των κυττάρων κάθε δείγματος που βρίσκεται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και (Γ): το ποσοστό των κυττάρων κάθε δείγματος που βρίσκεται στις G2/M φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Φαίνεται πως το ποσοστό των κυττάρων που μετέβησαν στη φάση S και G2/M είναι σημαντικά μικρότερο, 24 και 48 ώρες μετά από την επώαση των κυττάρων με τον αναστολέα, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

Είναι ξεκάθαρο, πως ο GSK23334470 εμποδίζει τη μετάβαση των κυττάρων από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, προκαλεί δηλαδή, G1 arrest. Το φαινόμενο αυτό γίνεται φανερό από τις 12 ώρες επώασης, παρουσία GSK, ενώ κορυφώνεται στις 24 και 48 ώρες επώασης.

3.2 Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western εφαρμόστηκε σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα PANC-1, στα οποία χορηγήθηκε ο αναστολέας της PDK1, GSK2334470. Κύριος στόχος αυτού του πειράματος ήταν να ελεγχθούν τα επίπεδα φωσφορυλιώσεων που καθιστούν ενεργή την PDK1 (p-PDK1) και ανενεργό τον GSK3a (p-GSK3a/ Ser21) παρουσία του εν λόγω αναστολέα έπειτα από επώαση των κυττάρων για 24 και 48 ώρες συγκεντρώσεως 10μM. Οι εν λόγω κινάσες συμμετέχουν ενεργά στα κομβικά για την πρόοδο του παγκρεατικού καρκίνου μονοπάτια PI3K/AKT/mTOR και RAS/MAPK. Παράλληλα ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των ανενεργών μορφών των PDK1 και GSK3a. Επιπρόσθετα, προκειμένου να διαπιστωθεί ο μηχανισμός με τον οποίον ο GSK2334470 προκαλεί G1 arrest, όπως φάνηκε στα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 η οποία είναι κύριος ρυθμιστής της μετάβασης των κυττάρων από τη φάση G1 στην S. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 25) και αποτελούν επαναλήψεις από δυο ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 25. Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Φαίνονται τα επίπεδα των PDK1, GSK3a, p-PDK1(Ser241), p-GSK3a(Ser21), κυκλίνη D1, και ακτίνη, σε κύτταρα ελέγχου και σε κύτταρα που επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες με GSK2334470 σε συγκέντρωση 10 μM.

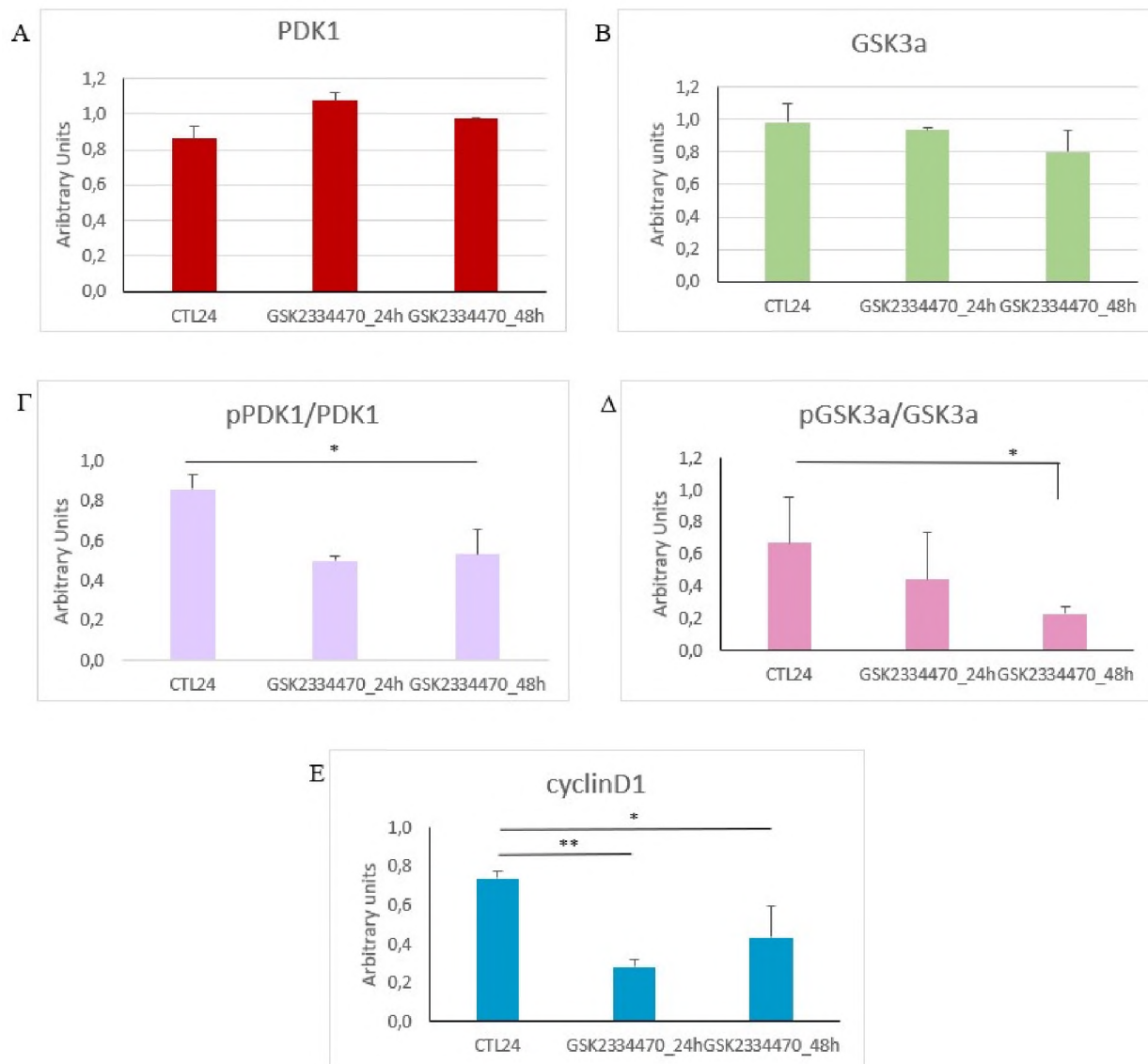
Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι:

- Οι ζώνες ίδιου πλάτους της ακτίνης και στα τρία δείγματα, επιβεβαιώνουν πως έγινε ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών, αφού η ακτίνη λειτουργεί σαν γονίδιο αναφοράς.
- Παρατηρείται πως η έκφραση της ανενεργής PDK1 μειώνεται 24 ώρες μετά από την επώαση με τον αναστολέα (συγκέντρωση 10 μM), σε σύγκριση με την έκφραση στα κύτταρα ελέγχου, ενώ 48 ώρες μετά από τη χορήγηση του αναστολέα, η έκφραση φαίνεται

να ελαττώνεται περισσότερο. Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των τριών δειγμάτων δεν είναι στατιστικά σημαντικές σύμφωνα με την πυκνομετρία (Εικόνα 25), δείχνοντας ότι τα επίπεδα της ανενεργής PDK1 παραμένουν ανεπηρέαστα.

- Ομοίως, μικρή μείωση της έκφρασης, 24 και 48 ώρες μετά από τη χορήγηση του αναστολέα, παρατηρείται και στην περίπτωση του ανενεργού GSK3α, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές.
- Όσον αφορά τη φωσφορυλίωση της PDK1, αυτή φαίνεται να μειώνεται αρκετά στις 24 ώρες επώασης, παρουσία αναστολέα, αφού ελαττώνεται η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης, συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου, αλλά και με τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης ($p < 0,05$). Ακόμα μεγαλύτερη μείωση της φωσφορυλίωσης παρατηρείται στις 48 ώρες επώασης, με στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα δείγματα ελέγχου ($p < 0,05$).
- Αντίστοιχα είναι και τα αποτελέσματα, στην περίπτωση της φωσφορυλίωσης της GSK3α. Φαίνεται να ελαττώνεται στις 24 ώρες επώασης με τον αναστολέα, ενώ στις 48 ώρες επώασης έχει περιοριστεί σε μεγάλο βαθμό ($p < 0,05$).
- Τέλος, είναι φανερό και η ελάττωση της κυκλίνης D1, 24 ώρες μετά από τη χορήγηση του αναστολέα. Ωστόσο, παρατηρείται μικρή αύξηση της έκφρασής στις 48 ώρες επώασης των κυττάρων με την παρουσία του αναστολέα, αύξηση όμως που δε θεωρείται στατιστικά σημαντική μεταξύ των δύο δειγμάτων. Συνολικά παρατηρείται χρονοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1 στα κύτταρα που επώασθηκαν με τον αναστολέα συγκριτικά με τα δείγματα ελέγχου ($p < 0,05$).

Όσα φαίνονται στις παραπάνω εικόνες επιβεβαιώνονται και από τα παρακάτω ραβδογράμματα, στα οποία απεικονίζεται η πυκνότητα των επιπέδων έκφρασης των PDK1, GSK3α και κυκλίνη D1 σε συνάρτηση με την πυκνότητα των επιπέδων έκφρασης της ακτίνης. Επιπλέον, φαίνεται πώς μεταβάλλονται οι λόγοι $p\text{-PDK1/PDK1}$ και $p\text{-GSK3a/GSK3a}$ στα 3 δείγματα. Όπως προαναφέρθηκε, η μέτρηση των πυκνοτήτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Image J.



Εικόνα 26. Ραβδογράμματα πυκνομετρίας των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών σε σχέση με την ακτίνη σε κύτταρα που επωάστηκαν με GSK2334470 σε συγκέντρωση 10 μ M για 24 και 48 ώρες: (Α): Πυκνότητα PDK1, (Β): Πυκνότητα GSK3a, (Γ): Λόγος p-PDK1(Ser241)/PDK1, (Δ): Λόγος p-GSK3a(Ser21)/GSK3a, (Ε): Πυκνότητα κυκλίνης D1. (* $p < 0,05$ και ** $p < 0,01$)

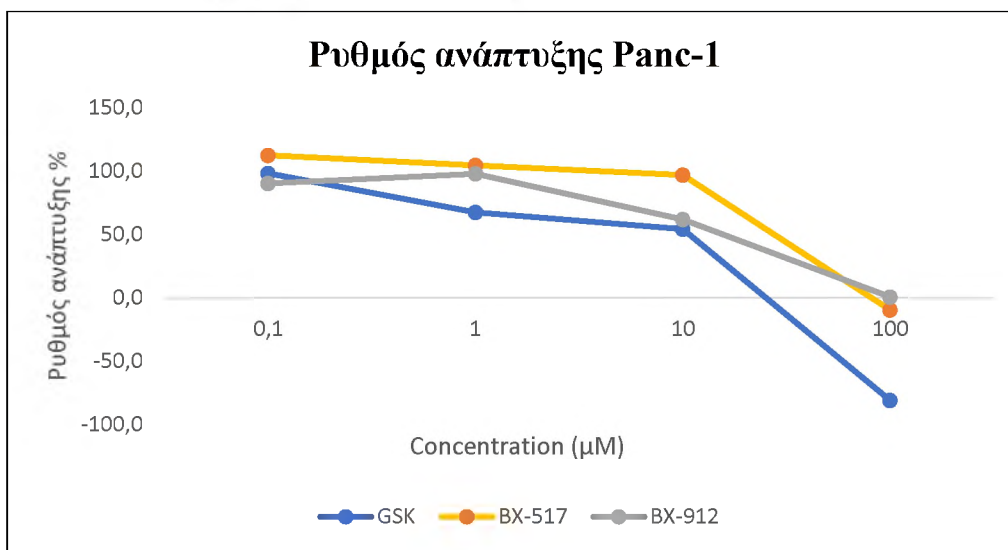
3.3 Αποτελέσματα της μεθόδου κυτταροτοξικότητας με SRB (SRB assay)

Αφού ελέγχθηκε ο μηχανισμός δράσης του GSK2334470 στον κυτταρικό κύκλο και στα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται η PDK1, επιχειρήθηκε να γίνει η σύγκριση του εν λόγω αναστολέα με δυο γνωστούς αναστολείς της PDK1. Οι BX-517 και BX-912 όπως και ο GSK2334470 αναστέλλουν τη θέση πρόσδεσης με το ATP της PDK1 (1.4.3), και έτσι επιχειρήσαμε να ελέγξουμε την ειδικότητα του GSK έναντι αυτών των αναστολέων. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι τρεις αναστολείς σε συγκεντρώσεις 0,1/1/10 και 100 μ M ως προς την επίδραση

τους στον ρυθμό ανάπτυξης των PANC-1. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα υπολογίσθηκαν οι παράμετροι GI50, TGI και LC50 (3.12).

Ρυθμός αύξησης των PANC-1 ύστερα από επίδραση με τους αναστολείς

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 1) φαίνεται η επίδραση της κάθε ουσίας για κάθε διαφορετική συγκέντρωση που εξετάστηκε ως προς τον ρυθμό αύξησης της παγκρεατικής καρκινικής σειράς PANC-1, καθώς και οι παράμετροι που εξετάστηκαν για κάθε αναστολέα (Πίνακας 16).



Γράφημα 1. Ρυθμός αύξησης των PANC-1 υπό την επίδραση των 3 αναστολέων.

Σύμφωνα με το Γράφημα, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων φαίνεται να επηρεάζεται διαφορετικά ανάλογα με τον αναστολέα που δοκιμάζεται. Συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση 100 μM για τον BX517 ο ρυθμός ανάπτυξης έχει ελαφρώς αρνητική τιμή (-9%) ενώ για τις συγκεντρώσεις 10/1 και 0,1 μM η τιμή κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα (100%) χωρίς να επηρεάζουν ιδιαίτερα το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Αναφορικά με τον BX-912, παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα, εκτός από τη συγκέντρωση 100 μM όπου η τιμή του ρυθμού ανάπτυξης έχει θετική τιμή (0,5%), ενώ στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις παρατηρείται το ίδιο μοτίβο με τον BX-517 και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Διαφορετικά, ωστόσο, αποτελέσματα παρατηρούνται για τον GSK2334470, όπου στη συγκέντρωση των 100 μM ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων έχει αρνητική τιμή που έχει μεγάλη απόκλιση συγκριτικά με τους άλλους δυο αναστολείς (-80%). Ακόμα και στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν οι τιμές διαφέρουν, καθώς στη συγκέντρωση 10 μM του GSK2334470 η τιμή κυμαίνεται στο 55%, στη συγκέντρωση 1 μM αυξάνεται ελαφρώς (66%) και στη χαμηλότερη συγκέντρωση ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων φαίνεται πως δεν επηρεάζεται καθόλου από αυτή (97%).

Με βάση το ρυθμό ανάπτυξης υπολογίσθηκαν οι παρακάτω παράμετροι για τους τρεις αναστολείς ξεχωριστά (Πίνακας 16):

PANC-1	GSK2334470	BX-517	BX-912
GI50	12,5	49	26,5
TGI	46	91,7	>100
LC50	80	>100	>100

Πίνακας 16. Κυτταροτοξική δράση των 3 αναστολέων έναντι των PANC-1.

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, αναφορικά με την τιμή GI50, η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, φαίνεται ότι ο GSK2334470 εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή σε σχέση με τους άλλους δύο αναστολείς. Μάλιστα, η τιμή αυτή για τους BX-517 και BX-912 είναι σχεδόν τετραπλάσια και διπλάσια αντίστοιχα σε σχέση με αυτή του GSK2334470. Όσον αφορά τις τιμές TGI, που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί ολική αναστολή της ανάπτυξης, και LC50, που αντιστοιχεί στην κυτταροτοξική δράση, οι BX-517 και BX-912 παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλές τιμές (>100) σε σχέση με τον GSK2334470 όπου οι τιμές αυτές είναι 46 μ M και 80 μ M αντίστοιχα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σήμερα, ο παγκρεατικός καρκίνος, και συγκεκριμένα το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, αποτελεί έναν εξαιρετικά θανατηφόρο τύπο καρκίνου, με δυσκολία στην πρόωρη διάγνωση και πολύ κακή πρόγνωση, αφού μόνο το 24% των ασθενών επιβιώνουν για έναν χρόνο, ενώ το 9% ζουν έως και πέντε επιπλέον χρόνια μετά από την αρχική διάγνωση. Η συχνότητα εμφάνισης, αλλά και τα ποσοστά θνησιμότητας του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος αυξάνονται κάθε χρόνο σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές. Ως αποτέλεσμα όλων αυτών, το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα θεωρείται ο 10^{ος} συχνότερος καρκίνος, αλλά και η 7^η κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως [10, 12].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση της ουσίας GSK2334470. Πρόκειται για μία ινδαζόλη που δρα ως ειδικός αναστολέας της κινάσης PDK1 (1.4.4). Η PDK1 συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως τα PI3K/AKT/mTOR και RAS/MAPK (1.4.2). Η απορρύθμιση και υπερενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του παγκρέατος. Στα μονοπάτια αυτά, εκτός από την PDK1 συμμετέχει και η κινάση GSK3α, η οποία είναι συστατικά ενεργή, απενεργοποιείται μετά από τη φωσφορυλίωσή της από την κινάση Akt και στοχεύει στην κυκλίνη D1, η οποία αποτελεί κύριο ρυθμιστή της μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (1.4.2.1).

Πιο συγκεκριμένα, σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η *in vitro* διερεύνηση της επίδρασης του αναστολέα στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα της κυτταρικής σειράς PANC-1. Επιπλέον, στόχο αποτέλεσε και η μελέτη της επίδρασης της ουσίας αυτής στην αναστολή της φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/AKT/mTOR και RAS/MAPK, στα ίδια κύτταρα. Συνολικά, εξετάστηκε η ικανότητα του GSK2334470 να περιορίζει τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Συμπληρωματικά, ο GSK2334470 εξετάστηκε ως προς την ειδικότητα της δράσης του, συγκριτικά με δυο ακόμα γνωστούς PDK1 αναστολείς τους BX-912 και BX-517.

Προκειμένου να επιτευχθούν τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε αρχικά χορήγηση του GSK2334470 σε ασύγχρονα κύτταρα PANC-1 σε συγκέντρωση 10 μ M και ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Από τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος, φάνηκε πως, παρουσία του αναστολέα, τα κύτταρα παραμένουν στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και δεν προχωρούν στις επόμενες φάσεις με το φαινόμενο να ξεκινάει ήδη από τις 12 και να κορυφώνεται στις 24 και 48 ώρες. Προκαλείται, δηλαδή, G1 arrest με χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Αντιθέτως, στα κύτταρα ελέγχου, στα οποία δεν είχε χορηγηθεί αναστολέας, παρατηρήθηκε φυσιολογική πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, όπως ήταν αναμενόμενο. Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να συμφωνούν με την περιορισμένη βιβλιογραφία, όπου μελέτες έδειξαν ότι ο GSK2334470 επάγει G1 arrest σε κύτταρα νευροβλαστώματος [53]. Περαιτέρω, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν απόλυτα με προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακολογίας,

του τμήματος Ιατρικής, όπου ο GSK2334470 βρέθηκε να προκαλεί G1 arrest σε κύτταρα PANC-1 συγχρονισμένα στη φάση G1 με τον ίδιο μηχανισμό.

Στα πλαίσια των πειραμάτων αυτής της διπλωματικής, στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων ελέγχου και κυττάρων που επωάστηκαν με την υπό μελέτη ουσία σε συγκέντρωση 10 μ M. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο αναστολέας αποτρέπει αφενός τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης PDK1 και αφετέρου την απενεργοποίηση του GSK3 α οδηγώντας στην ελάττωση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1, η οποία ρυθμίζει τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S φάση. Όσον αφορά τη φωσφορυλίωση της PDK1, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η χρήση του GSK2334470 έχει βρεθεί πως την αναστέλλει και σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος [54].

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως ο GSK2334470 οδηγεί τα κύτταρα σε G1 arrest με τον εξής πιθανό μηχανισμό. Φαίνεται πως η αναστολή της ενεργοποίησης της PDK1, έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της Akt, που αποτελεί έναν από τους κυριότερους στόχους της. Έτσι, περιορίζεται η φωσφορυλίωση της GSK3 α , με αποτέλεσμα η κινάση αυτή να παραμένει ενεργή, και να φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D1 σε μεγαλύτερο βαθμό, οδηγώντας στην αποικοδόμηση της από το πρωτεάσωμα. Η αύξηση της αποικοδόμησης της κυκλίνης D1 είναι αυτή που οδηγεί στο G1 arrest και αποτρέπει τα κύτταρα από το να εισέλθουν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου.

Τέλος, συμπληρωματικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν ως προς την ειδικότητα του εν λόγω αναστολέα, επιχειρώντας να συγκριθεί η δράση του με δυο ακόμα γνωστούς αναστολείς της PDK1 τους BX-517 και BX-912. Με βάση τα αποτελέσματα, ο GSK2334470 επέδειξε εμφανώς καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση υπερέχοντας έναντι των BX-517 και BX-912 απέναντι στην καρκινική κυτταρική σειρά PANC-1. Τα παραπάνω ευρήματα είναι πρωτότυπα, καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί έως τώρα μια τέτοιου είδους σύγκριση των εν λόγω αναστολέων με τον GSK2334470 στον παγκρεατικό καρκίνο. Ωστόσο, εν μέρει μπορούν να εξηγηθούν με βάση την περιορισμένη υπάρχουσα βιβλιογραφία, καθώς οι BX-517 και BX-912 πιθανολογείται πως δεν είναι τόσο ειδικοί για την PKD1 αλλά μπορεί να αναστέλλουν και άλλους είδους κινάσες [30]. Επιπλέον, ακόμα μια εξήγηση μπορεί να έγκειται στο γεγονός ότι και οι τρεις αναστολείς έχουν διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά, ανήκοντας όλοι στις ινδαζόλες αλλά με την ύπαρξη διαφορετικών υποκαταστατών στη δομή τους. Τέλος, το γεγονός ότι, σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας πτυχιακής, ο GSK2334470 φάνηκε πως αναστέλλει τη φωσφορυλίωση στο βρόχο ενεργοποίησης (Ser241) της PDK1, ενώ οι άλλοι αναστολείς, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ανταγωνίζονται τη θέση πρόσδεσης στο ATP binding pocket, πιθανώς επιβεβαιώνει την υπεροχή του GSK2334470 έναντι των BX-517 και BX-912.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτής της πτυχιακής εργασίας, αποδεικνύουν πως ο GSK2334470, με την αποτελεσματική αναστολή των δύο μονοπατιών, οδηγεί στον περιορισμό της ανάπτυξης, της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Επομένως, ο αναστολέας αυτός παρουσιάζει σημαντική αντικαρκινική δράση και μπορεί να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο και χρήσιμο εργαλείο στις προσπάθειες για την αντιμετώπιση του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος.

Μελλοντικά, ιδιαίτερα σημαντικές θα ήταν οι μελέτες της δράσης του συγκεκριμένου φαρμάκου *in vivo*, σε ζωικά πρότυπα καρκίνου με ξενομοσχεύματα ανθρώπινων όγκων (PDX). Επιπλέον, χρήσιμη θα ήταν και η κατανόηση των μηχανισμών της πιθανής δράσης της ουσίας αυτής καθώς και η διαλεύκανση της σχέσης δομής και δραστηριότητας του εν λόγω αναστολέα. Ο GSK2334470 και οι μελέτες γύρω από αυτόν μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων, καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων, με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και λιγότερες παρενέργειες.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Understanding Cancer*. (2007). NIH Curriculum Supplement Series - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
2. Upadhyay, A. (2021, September 1). *Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead*. Genes and Diseases; Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.09.002>
3. Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013, October 21). *Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview*. International Journal of Molecular Sciences; MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>
4. Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71: 209- 249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
5. Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021, January 1). *New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives*. Sage Open Medicine; SAGE Publishing. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
6. Hanahan, D. (2022, January 1). *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discovery; American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>
7. Atkinson, M. A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I., & Kaestner, K. H. (2020, September 7). *Organisation of the human pancreas in health and in diabetes*. Diabetologia; Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05203-7>
8. Longnecker, Daniel S. 2021. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2021.01
9. Karpińska, M., & Czauderna, M. (2022, March 30). *Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism*. Frontiers in Physiology; Frontiers Media. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.807632>
10. Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019, January 1). *Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors*. World Journal of Oncology. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
11. McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R., Jones, C., Coleman, H., & McCain, R. S. (2018, November 21). *Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes*. World Journal of Gastroenterology; Baishideng Publishing Group. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
12. Hu, J., Zhao, C., WenBiao, C., Liu, Q., Li, Q. W., Lin, Y., & Gao, F. (2021, July 21). *Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors*. World Journal of Gastroenterology; Baishideng Publishing Group. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i27.4298>
13. Kanji, Z., & Gallinger, S. (2013, April 22). *Diagnosis and management of pancreatic cancer*. Canadian Medical Association Journal; Canadian Medical Association. <https://doi.org/10.1503/cmaj.121368>
14. Vincent, A., Herman, J. M., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011, August 1). *Pancreatic cancer*. The Lancet; Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)62307-0)
15. Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D., Gaffney, P. R. J., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A., & Bownes, M. (1997, October 1). *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase*. Current Biology; Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00336-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00336-8)
16. Biondi, R. M., Komander, D., Thomas, C. C., Lizcano, J. M., Deak, M., Alessi, D. R., & Van Aalten, D. M. F. (2002, August 15). *High resolution crystal structure of the human PDK1*

- catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site*. The EMBO Journal; Nature Portfolio. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf437>
17. Ditttrich, A. C. N., & Devarenne, T. P. (2012, June 1). *Perspectives in PDK1 evolution*. Plant Signaling & Behavior; Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4161/psb.20038>
 18. Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014, April 14). *Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer*. Frontiers in Oncology; Frontiers Media. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064>
 19. Peng, Y., Wang, Y., Zhang, C., Mei, W., & Zeng, C. (2022, March 24). *PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway?* Frontiers in Oncology; Frontiers Media. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.819128>
 20. Yu, L., Wei, J., & Liu, P. (2022, October 1). *Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer*. Seminars in Cancer Biology; Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.019>
 21. Artemenko, M., Zhong, S. S., To, S. K. Y., & Wong, A. S. (2022, June 1). *p70 S6 kinase as a therapeutic target in cancers: More than just an mTOR effector*. Cancer Letters; Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215593>
 22. Song, Y., Bi, Z., Liu, Y., Lai, Y., Wei, Y., & Wei, X. (2023, January 1). *Targeting RAS–RAF–MEK–ERK signaling pathway in human cancer: Current status in clinical trials*. Genes and Diseases; Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.006>
 23. Santarpia, L., Lippman, S. M., & El-Naggar, A. K. (2012, January 1). *Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy*. Expert Opinion on Therapeutic Targets; Informa. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>
 24. Hauge, C., & Frödin, M. (2006, August 1). *RSK and MSK in MAP kinase signalling*. Journal of Cell Science; The Company of Biologists. <https://doi.org/10.1242/jcs.02950>
 25. Barile, E., De, S. K., & Pellicchia, M. (2012, May 1). *PDK1 inhibitors*. Pharmaceutical Patent Analyst; Future Science Ltd. <https://doi.org/10.4155/ppa.12.17>
 26. Jesús R. Medina. Selective 3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 (PDK1) Inhibitors: Dissecting the Function and Pharmacology of PDK1 Miniperspective, *Journal of Medicinal Chemistry* **2013** 56 (7), 2726-2737. DOI: 10.1021/jm4000227
 27. Zhang, S., Suvannasankha, A., Crean, C. D., White, V. L., Johnson, A. J., Chen, C. S., & Farag, S. S. (2007, August 15). *OSU-03012, a Novel Celecoxib Derivative, Is Cytotoxic to Myeloma Cells and Acts through Multiple Mechanisms*. Clinical Cancer Research; American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-0136>
 28. Tan, Y., Lee, K. H., Lin, T., Sun, Y., Hsieh-Li, H. M., Juan, H. F., & Wang, Y. C. (2008, March 15). *Cytotoxicity and Proteomics Analyses of OSU03013 in Lung Cancer*. Clinical Cancer Research; American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-1806>
 29. Richard I. Feldman, James M. Wu, Mark A. Polokoff, Monica J. Kochanny, Harald Dinter, Daguang Zhu, Sandra L. Biroc, Bruno Alicke, Judi Bryant, Shendong Yuan, Brad O. Buckman, Dao Lentz, Mike Ferrer, Marc Whitlow, Marc Adler, Silke Finster, Zheng Chang et al. (20 May 2005). Novel Small Molecule Inhibitors of 3-Phosphoinositide-dependent Kinase-1*. *Journal of Biological Chemistry*. DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M501367200>
 30. Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S. C., Alessi, D. R., & Cohen, P. (2007, November 28). *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. Biochemical Journal; Portland Press. <https://doi.org/10.1042/bj20070797>
 31. Weisberg, E., Banerji, L., Wright, R. D., Barrett, R., Ray, A., Moreno, D., Catley, L., Jiang, J., Hall-Meyers, E., Maira, S. M., Stone, R., Galinsky, I., Fox, E. A., Kung, A. L., & Griffin, J. D. (2008, April 1). *Potentiation of antileukemic therapies by the dual PI3K/PDK-1 inhibitor, BAG956: effects on BCR-ABL– and mutant FLT3-expressing cells*. Blood; American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-114454>

32. Meuillet, E. J., Zhang, S., Lemos, R., Ihle, N. T., Kingston, J., Watkins, R., Moses, S. A., Zhang, S., Du-Cuny, L., Herbst, R. S., Jacoby, J. J., Zhou, L., Ahad, A. M., Mash, E. A., Kirkpatrick, D., & Powis, G. (2010, March 1). *Molecular Pharmacology and Antitumor Activity of PHT-427, a Novel Akt/Phosphatidylinositol-Dependent Protein Kinase 1 Pleckstrin Homology Domain Inhibitor*. Molecular Cancer Therapeutics; American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-09-0985>
33. Busschots, K., Lopez-Garcia, L. A., Lammi, C., Stroba, A., Zeuzem, S., Piiper, A., Alzari, P. M., Neimanis, S., Arencibia, J. M., Engel, M., Schulze, J. O., & Biondi, R. M. (2012, September 1). *Substrate-Selective Inhibition of Protein Kinase PDK1 by Small Compounds that Bind to the PIF-Pocket Allosteric Docking Site*. Chemistry & Biology; Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.017>
34. Yang, C., Huang, X., Liu, H., Xiao, F., Wei, J., You, L., & Qian, W. (2017, March 29). *PDK1 inhibitor GSK2334470 exerts antitumor activity in multiple myeloma and forms a novel multitargeted combination with dual mTORC1/C2 inhibitor PP242*. Oncotarget; Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16642>
35. P. (n.d.). (3S,6R)-1-[6-(3-Amino-1H-indazol-6-yl)-2-(methylamino)-4-pyrimidinyl]-N-cyclohexyl-6-methyl-3-piperidinecarboxamide. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/46215815>
36. PANC-1 - CRL-1469 | ATCC. (n.d.). <https://www.atcc.org/products/crl-1469>
37. Lieber, M. M., Mazzeita, J., Nelson-Rees, W. A., Kaplan, M., & Todaro, G. J. (1975, May 15). *Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. International Journal of Cancer; Wiley. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910150505>
38. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media/rpmi.html?ef_id=CjwKCAjw3oqoBhAjEiwA_UaLtjbZtSYErrlNCLKSs62-3ldS3bJpTbabrlyw59UtOXvjt2mp3zL9RoC7aAQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!596250123588!e!!g!!rpmi%25201640%2520formulation!1759362858!66460961501&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con&gclid=CjwKCAjw3oqoBhAjEiwA_UaLtjbZtSYErrlNCLKSs62-3ldS3bJpTbabrlyw59UtOXvjt2mp3zL9RoC7aAQAvD_BwE
39. Gstraunthaler, G., Lindl, T., & Van Der Valk, J. (2013, August 22). *A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media*. Cytotechnology; Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9633-8>
40. Ryu, A. H., Eckalbar, W. L., Kreimer, A., Yosef, N., & Ahituv, N. (2017, August 8). *Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation*. Scientific Reports; Nature Portfolio. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07757-w>
41. L-Glutamine and GlutaMAX Supplement | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/media-supplements/glutamax-media.html#:~:text=L%2Dglutamine%20is%20an%20important,when%20cells%20are%20rapidly%20dividing.>
42. Cell Dissociation and Trypsin for Cell Culture | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/cell-dissociation.html#:~:text=Trypsin%2C%20a%20proteolytic%20enzyme%2C%20is,easy%20resuspension%20during%20cell%20harvesting.>
43. Alberts, B. (2002). *An Overview of the Cell Cycle*. Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>

44. Martínez-Alonso, D., & Malumbres, M. (2020, November 1). *Mammalian cell cycle cyclins*. Seminars in Cell & Developmental Biology; Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.03.009>
45. McKinnon, K. (2018, January 1). *Flow Cytometry: An Overview*. Current Protocols in Immunology; Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
46. *Propidium Iodide Ready Flow™ Reagent*. (n.d.). https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R37169?ef_id=CjwKCAjwgZCoBhBnEiwAz35RwtXjaUm_odyqkKpaJx68nN68l6_34M3ER4bjlA6QKZWwXX081AXWsxoCmjoQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!603662664166!e!!g!!propidium%20iodide%20staining!924717350!75094258071&cid=bid_pca_frg_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con&gclid=CjwKCAjwgZCoBhBnEiwAz35RwtXjaUm_odyqkKpaJx68nN68l6_34M3ER4bjlA6QKZWwXX081AXWsxoCmjoQAvD_BwE#/R37169
47. Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012, January 1). *Western blot: Technique, theory, and trouble shooting*. North American Journal of Medical Sciences; Medknow. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
48. Kielkopf, C. L., Bauer, W. R., & Urbatsch, I. L. (2020, April 1). *Bradford Assay for Determining Protein Concentration*. CSH Protocols; Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
49. *Chemiluminescent Western Blotting | Thermo Fisher Scientific - IE*. (n.d.). <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html#:~:text=Chemiluminescent%20reaction%20of%20HRP%20substrate%2D%20luminol.&text=The%20oxidation%20of%20luminol%20by,by%20releasing%20photons%20of%20light>
50. Huang, W., & Wang, H. (2021, April 30). Potential biomarkers of resistance to CDK4/6 inhibitors: a narrative review of preclinical and clinical studies. Potential Biomarkers of Resistance to CDK4/6 Inhibitors: A Narrative Review of Preclinical and Clinical Studies - Huang - Translational Breast Cancer Research. <https://doi.org/10.21037/tbcr-20-52>
51. Masamha, C. P., & Benbrook, D. M. (2009, August 12). *Cyclin D1 Degradation Is Sufficient to Induce G1 Cell Cycle Arrest despite Constitutive Expression of Cyclin E2 in Ovarian Cancer Cells*. Cancer Research; American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-0913>
52. Zhang, X. (2018). *Circulating biomarkers for early diagnosis of pancreatic cancer: facts and hopes*. PubMed Central (PMC). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5883088/>
53. Qi, L., Toyoda, H., Xu, D. Q., Zhou, Y., Sakurai, N., Amano, K., Kihira, K., Hori, H., Azuma, E., & Komada, Y. (2015). PDK1-mTOR signaling pathway inhibitors reduce cell proliferation in MK2206 resistant neuroblastoma cells. *Cancer cell international*, 15, 91. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0239-4>
54. Zhang, J., Yang, C., Zhou, F., & Chen, X. (2018, April 12). *PDK1 inhibitor GSK2334470 synergizes with proteasome inhibitor MG-132 in multiple myeloma cells by inhibiting full AKT activity and increasing nuclear accumulation of the PTEN protein*. Oncology Reports; Elsevier BV. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6369>

