



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ SIRAMESINE ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ»

ΚΟΥΤΣΟΥΓΙΑΝΝΗ ΦΑΝΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1) ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας
Παν/μίου Θεσσαλίας, Επιβλέπων καθηγητής
- 2) ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Παν/μίου Θεσσαλίας
- 3) ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας
Παν/μίου Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2020



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS
«SIRAMESINE INDUCED AUTOPHAGY IN PANCREATIC CANCER»**

**NAME
KOUTSOUGIANNI FANI**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την διεκπεραίωση της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος Φαρμακολογίας, τόσο για την πολύτιμη βοήθειά του, όσο και την καθοδήγηση και γνώση που μου προσέφερε κατά την διάρκεια όλη της συνεργασίας μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το ΜΠΣ και όλους τους συναδέλφους που είχα την χαρά να παρακολουθήσω την διδασκαλία τους, και ειδικά την υπεύθυνη κυρία Ασπασία Τσέζου, καθηγήτρια Γενετικής Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς την κυρία Βαρβάρα Τραχανά, Επίκουρη καθηγήτρια Κυτταρικής βιολογίας που είχα την τιμή να ολοκληρώνουν την Τριμελή επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.

Μνείας χρήζει η ιδιαίτερη και ξεχωριστή αναφορά στην πολύτιμη συνδρομή των συναδέλφων μου στο εργαστήριο, την Ίριδα Παπαποστόλου, την Ελισάβετ Καλαϊτσίδου, την Πασχαλίνα Γραμματικού, τον Κωνσταντίνο Λαφαζάνη, όπως και την Ανδρομάχη Λαμπριανίδου και την Ευαγγελία Σερέτη. Επιπλέον, σημαντική ήταν η συμβολή του κυρίου Ηλία Μπέγα, επιστημονικού συνεργάτη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους για όλη την κατανόηση και την πολύτιμη συμπαράστασή τους σε κάθε προσπάθειά μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της πτυχιακής αυτής ήταν η μελέτη της δράσης της σιραμεσίνης στην επαγωγή αυτοφαγικού και αποπτωτικού θανάτου, χρησιμοποιώντας για πρώτη φορά καρκινικά κύτταρα από παγκρεατικό καρκίνο που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο μας *ex vivo* από ξενομοσχεύματα που δημιουργήθηκαν απευθείας από τον όγκο ασθενούς (Ευαγγελία Σερέτη, διδακτορική διατριβή 2019).

Μετά από επώαση των κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις σιραμεσίνης (5, 10 και 20 μ M) και για διάφορα χρονικά διαστήματα (3, 6, 24 και 48 ώρες) αναλύθηκε η επίδραση της στη βιωσιμότητα των κυττάρων με τη μέθοδο του trypan blue. Στη συνέχεια για να προσδιορίσουμε τον τύπο του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την ουσία μελετήσαμε με WB την έκφραση πρωτεϊνών-κλειδιών για την επαγωγή αυτοφαγικού και αποπτωτικού θανάτου (beclin-1 και LC3 a/b και caspase 3 αντίστοιχα). Παρατηρήσαμε ότι στις μεγάλες συγκεντρώσεις της σιραμεσίνης και στους μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης των κυττάρων σε αυτή υπήρξε αξιοσημείωτη αύξηση της LC3 και αντίστοιχη μείωση της Beclin-1. Από την άλλη, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της Caspase 3 με αισθητή τη μείωσή της στην συγκέντρωση των 10 μ M (στις 48 ώρες) και των 20 μ M (στις 24 ώρες), ενώ παράλληλα βρέθηκε αυξημένη η K18 στα αντίστοιχα αυτά σημεία.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η σιραμεσίνη φαίνεται να προκαλεί με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο την επαγωγή της αυτοφαγίας και της απόπτωσης. Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη η Σιραμεσίνη βρέθηκε να έχει αντικαρκινική δράση εναντίον των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων που μελετήσαμε. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης της χρήζει περαιτέρω αναλύσεων.

Λέξεις- Κλειδιά: Σιραμεσίνη, $\sigma 2$ αγωνιστής, παγκρεατικός καρκίνος, αυτοφαγικός θάνατος, απόπτωση

ABSTRACT

The purpose of this current master thesis, is the study of siramesine's action in the induction of autophagic and apoptotic death, using for first time primary cancer cells from pancreatic cancer that were developed in our laboratory *ex vivo* by xenografts and they were patient-derived (Euaggelia Sereti, PhD thesis 2019).

After cells' incubation in different concentrations (5, 10 and 20 μ M) and times (3, 6, 24 and 48 hours) on Siramesine, was analyzed the viability of cells through Trypan blue method. Moreover, to determine the exact type of cell deaths through Siramesine, we studied with Western Blot the expression of autophagic and apoptotic death key-proteins (beclin-1 & LC3 a/b and Caspase 3, respectively). We observed that the higher the concentration of Siramesine and the longer the exposure on it, there were a gradual decrease of Beclin-1 and a subsequent increase of LC3 a/b. Also, it was observed the activation of Caspase 3, that it was decreased on the concentration of 10 μ M (48 hours) and 20 μ M (24 hours) of Siramesine, while K18 levels were quite high there.

These data show that under the *in vitro* experimental conditions that had been tested, Siramesine can induce autophagic cell death and moreover is capable to induce apoptosis. To conclude, the results of this *in vitro* study could suggest in primary patient-derived pancreatic cancer cells that siramesine causes in a time-dependent and dose-dependent manner the induction both of autophagy and apoptosis. Our data suggest that Siramesine is an inducer of two considerable cell death ways both of autophagy and apoptosis, and shows a potent antiproliferative and anticancer activity in these certain patient derived pancreatic cancer cells.

Key words: Siramesine, $\sigma 2$ agonist, pancreatic cancer, autophagic death, apoptosis

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	2
<u>ABSTRACT</u>	3
<u>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	6
1.1 Καρκίνος του παγκρέατος	6
1.1.1. Καρκίνος γενικά	6
1.1.2. Τι είναι ο παγκρεατικός καρκίνος	8
1.1.2.1. Επιδημιολογία	8
1.1.2.2. Παράγοντες κινδύνου	10
1.1.2.3. Διάγνωση	11
1.1.2.4. Θεραπεία	13
1.2 Καρκινικός κυτταρικός θάνατος	15
1.2.1. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου	15
1.2.2. Αυτοφαγία και καρκίνος.....	16
1.2.2.1. Αυτοφαγία – Αυτοφαγικός θάνατος	16
1.2.2.2. Το ανεξάρτητο από το m-TOR σηματοδοτικό μονοπάτι στην αυτοφαγία	19
1.2.2.3. Το m-TOR/PI3K/Akt εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι στην αυτοφαγία	19
1.2.3. Απόπτωση	21
1.2.4. Ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο	22
1.3 Siramesine και καρκίνος	23
1.3.1. Σιραμεσίνη	23
1.3.2. σ2 υποδοχείς και προσδέτες γενικά	25
1.3.3. σ2 υποδοχείς, προσδέτες και σιραμεσίνη στον καρκίνο	26

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά.....	28
2.2 Κυτταροκαλλιέργειες	29
2.3 Έκθεση των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων στην Siramesine και μέτρηση βιωσιμότητας.....	29
2.4 Μέτρηση της Κυτοκερατίνης 18 (CytoKeratin 18) από τα «ΑΤ-021013».....	31
2.5 Ανάλυση και ανίχνευση πρωτεϊνών.....	32
2.5.1. Λύματα κυττάρων	32
2.5.2. Μέθοδος Bradford : Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	32
2.5.3. Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	33
2.5.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	34
2.5.5. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.....	35
2.5.6. Western Blot: Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	35
2.6 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία αποτελεσμάτων	37

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιωσιμότητα ύστερα από έκθεση των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων στη Siramesine	39
3.2 Επίδραση της Σιραμεσίνη στην επαγωγή αυτοφαγικού θανάτου στα «ΑΤ- 021013».....	44
3.3 Επίδραση της Σιραμεσίνη στην επαγωγή απόπτωσης στα «ΑΤ-021013»	47

4 .ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ 50

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ55

1.Εισαγωγή

1.1. Καρκίνος του Παγκρέατος

1.1.1. Καρκίνος - Γενικά:

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πιο θανατηφόρες ασθένειες του 21^{ου} αιώνα. Σήμερα πλήττει παγκοσμίως τους ανθρώπους με έναν εκθετικά αυξανόμενο τρόπο (Roy and Saikia 2016) σε σχέση με το παρελθόν λόγω του καθολικά πιο επιβλαβούς τρόπου ζωής, όπως και του νέου μεγαλύτερου προσδόκιμου ζωής. Αυτό συμβαίνει μιας και πέραν του νέου τρόπου ζωής μας, του περιβάλλοντος διαβίωσής μας και των συνηθειών μας, ο καρκίνος έχει συσχετισθεί με την ηλικία των ανθρώπων κι θα μπορούσε να περιγραφεί και ως μία ηλικιο-εξαρτώμενη ασθένεια κατά την οποία όσο μεγαλύτερη ηλικία έχεις τόσο πιθανότερο να νοσήσεις (National Cancer Institute, NCI).

Τα φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, χωρίς δραματικές αποκλίσεις από μία ισορροπία κατά την οποία επιτυγχάνεται η διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI), ο όρος «καρκίνος» αναφέρεται σε μία ομάδα συσχετιζόμενων ασθενειών κατά τις οποίες τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και έχουν τη δυνατότητα να προσβάλλουν οποιοδήποτε σημείο του σώματος μέσω της διασποράς τους σε κάθε πιθανό ιστό. Οι ιδιότητές τους αυτές προκύπτουν από την απορρύθμιση των φυσιολογικών μηχανισμών ελέγχου του φυσιολογικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, και γενικότερα της ανάπτυξής τους, έτσι ώστε να έχουν ένα αναπτυξιακό πλεονέκτημα μετατρεπόμενα σε καρκινικά (Vogelstein et al. 2013). Παρόλα αυτά, ο καρκίνος δεν είναι αποτέλεσμα ενός και μόνο γενετικού «σφάλματος», αλλά πολλών και διάφορων γονιδιακών μεταλλάξεων που στοχεύουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά και στον κυτταρικό θάνατο (programmed cell death). Στην όλη διαδικασία της καρκινογένεσης εμπλέκονται αλλαγές που οδηγούν στην απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων (Mabeta 2018).

Τα ανιχνεύσιμα «συσσωματώματα» που αποτελούνται από τον πληθυσμό των λεγόμενων καρκινικών κυττάρων, αποτελούν έναν όγκο (ή αλλιώς, νεόπλασμα

καλοήθες ή κακοήθες), και κατά την ανάπτυξη του όγκου αυτού τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν νέες ιδιότητες με αποτέλεσμα να καθιστούν τον καρκίνο μία ιδιαίτερα πολύπλοκη νόσο (Tsodikov, Asselain, and Yakovlev 1997). Έτσι, κατά την διάρκεια της διαδικασίας της ογκογένεσης, οι νέες δυνατότητες που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα ονομάζονται «Ορόσημα του Καρκίνου» (Hanahan and Weinberg 2011) (Πίνακας 1). Εδώ, μνείας χρήζει η αναφορά στα πλεονεκτήματα των καρκινικών κυττάρων, ενός φαινομένου γνωστό ως φαινόμενο Warburg (Warburg effect) σχετικά με: α) τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους, όπου τα καρκινικά κύτταρα μέσω της αερόβιας γλυκόλυσης μπορούν και συνθέτουν τα απαραίτητα βιομόρια για την διευκόλυνση της παραγωγής νέων κυττάρων, β) την επιβίωσή τους κάτω από υποξικές συνθήκες μέσω της παραγωγής ενέργειάς του κάτω από αναερόβιες συνθήκες, γ) την αποφυγή της ανοσοκαταστροφής μέσω της ικανότητας της αποφυγής των καρκινικών κυττάρων της ανοσοεπιτήρησης του οργανισμού και κατ'επέκταση την επίτευξη της επιβίωσής τους, και τέλος δ) την αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος (pH) πράγμα που λειτουργεί βοηθητικά κατά την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και τελικά την μετάσταση των όγκων (Schwartz, Supuran, and Alfarouk 2017).

Πίνακας 1: Επιγραμματικά τα «ορόσημα του καρκίνου» με βάση τις παρατηρήσεις των Hanahan & Weinberg (2011)

Βασικά	i. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
	ii. Αντοχή ενάντια σε αντι-αυξητικά σήματα
	iii. Αποφυγή απόπτωσης
	iv. Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός
	v. Αγγειογένεση
	vi. Διήθηση και μετάσταση όγκου
Δευτερεύοντα	vii. Γενετική αστάθεια
	viii. Φλεγμονώδεις αντιδράσεις
	ix. Αλλαγή μεταβολισμού

Εν κατακλείδι, ο καρκίνος δεν αντικατοπτρίζεται από μία και μοναδική νόσο και από έναν μοναδικό τύπο, αλλά όπως προαναφέρθηκε, αφορά μία ομάδα ασθενειών (και συγκεκριμένα περισσότερων των 100 τύπων ασθενειών), οι οποίες μπορεί να διαφοροποιούνται βάση διαφορετικού τρόπου ζωής, διατροφικών συνηθειών, έκθεση

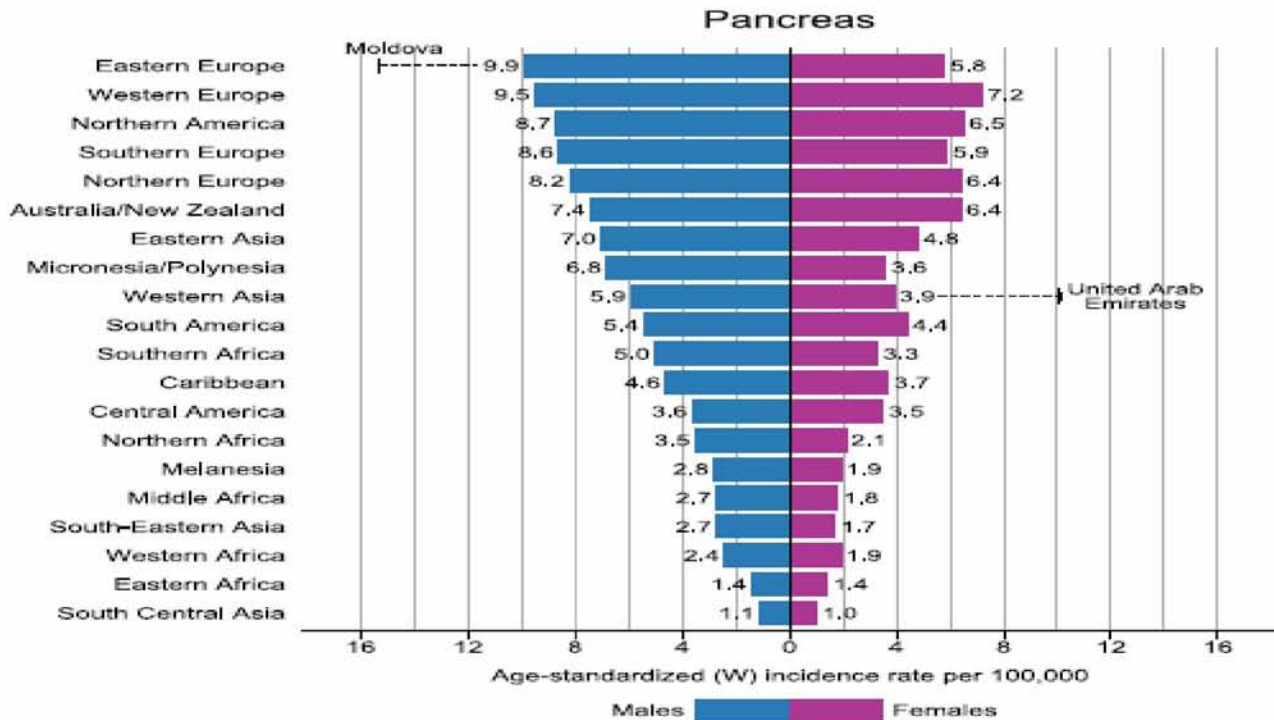
σε καρκινογόνους παράγοντες, την γενετική σύσταση, τη συμπτωματολογία της νόσου και την εξέλιξή της, αλλά και την κατάληξή της. Ακόμη, δεν είναι γνωστή αυτή καθαυτή η αιτιολογία της νόσου σε κάθε περίπτωση. Μόνο το 10-15% των διάφορων τύπων καρκίνων οφείλονται σε κληρονομικά αίτια και είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά την εξέλιξη του όγκου σημαντικό ρόλο παίζουν οι διάφορες επιγενετικές αλλαγές που πραγματοποιούνται στο γενετικό υλικό με διαφορετικό και καθοριστικό τρόπο σε εκάστοτε περίπτωση μέσω μεθυλίωσης των ιστονών του DNA, αλλαγής δομής χρωματίνης κ.αλ. (Jones and Baylin 2002).

1.1.2. Τί είναι ο παγκρεατικός καρκίνος

Το πάγκρεας αποτελεί έναν αδένα ο οποίος βρίσκεται ανάμεσα από το λεπτό έντερο και τα νεφρά και αποτελεί μέρος του πεπτικού μας συστήματος. Η βασική λειτουργία του είναι να εμπλέκεται στην πέψη διευκολύνοντάς της, παράγοντας διάφορα ένζυμα και ορμόνες. Ο παγκρεατικός καρκίνος ανήκει στις πιο επιθετικές μορφές καρκίνου σήμερα με μικρότερο από 10% το ποσοστό 3ετούς επιβίωσης (Zhang, Qin, and Sun 2018). Χαρακτηρίζεται από μεγάλη επίπτωση και θνησιμότητα στον πληθυσμό, ταχείες μεταστάσεις και εν μέρει κακή και όχι γρήγορη πρόγνωση (Ercan, Karlitepe, and Ozpolat 2017). Αυτό οφείλεται από την μία στην έλλειψη ειδικών προγνωστικών τεστ και ειδικών καρκινικών βιοδεικτών, και από την άλλη στον πολύ ταχύ σχηματισμό μεταστατικών εστιών. Έτσι, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί ιδιαίτερος στις διάφορες τεχνικές διάγνωσης αλλά και στις προσπάθειες πιθανής θεραπείας του.

1.1.2.1. Επιδημιολογία παγκρεατικού καρκίνου

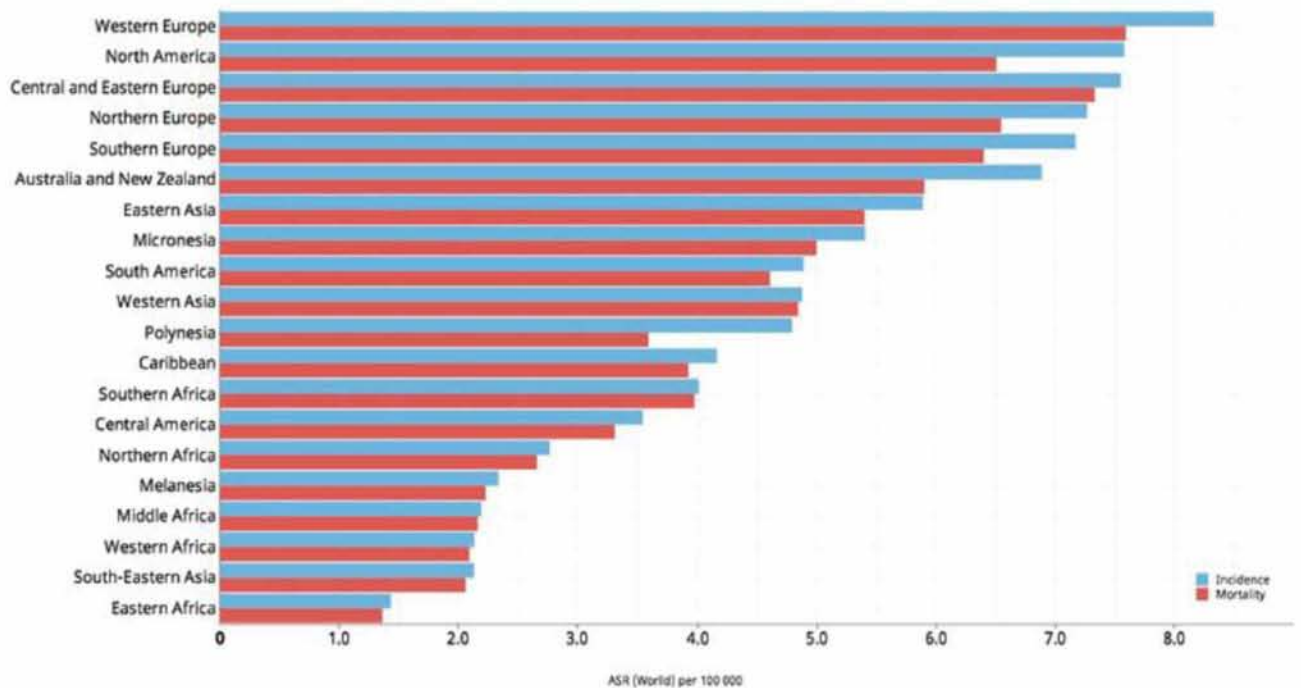
Σύμφωνα με την GLOBOCAN (2018), ο παγκρεατικός καρκίνος αποτελούσε την 7^η πιο θανατηφόρα μορφή καρκίνου παγκοσμίως, ενώ την ίδια χρονική περίοδο στην Ελλάδα κατείχε την 4^η θέση στην κατάσταση των θανάτων (Bray et al. 2018; Ilic and Ilic 2016; Rawla, Sunkara, and Gaduputi 2019). Παρά την τόσο υψηλή θέση της στην κατηγορία των πιο θανατηφόρων μορφών καρκίνου, ο καρκίνος του παγκρέατος παγκοσμίως κατέχει την 13^η θέση όσον αφορά τη συχνότητά της, πράγμα που μπορεί να αντικατοπτρίσει και τη σοβαρότητα της εξέλιξης της συγκεκριμένης νόσου.



Εικόνα (1): Ραβδόγραμμα φθίνουσας απεικόνισης της επίπτωσης εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου ανά τοποθεσία παγκοσμίως ανά φύλο (μπλε → αρσενικά & μωβ → θηλυκά) (GOLBOCAN, 2018)

Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των δύο φύλων, εμφανίζουν κάποιες αποκλίσεις, με τους άντρες να υπερτερούν των πιθανοτήτων να νοσήσουν με καρκίνο του παγκρέατος έναντι των γυναικών (Εικόνα 1). Επιπλέον, είναι σημαντικό να εντοπισθεί και η διαφορετική συχνότητα εμφάνισης, αλλά και θνησιμότητας του παγκρεατικού καρκίνου στις διάφορες τοποθεσίες του κόσμου ανεξαρτήτων φύλου και ηλικίας (Εικόνα 2).

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, pancreas, both sexes, all ages



Εικόνα (2): Ραβδόγραμμα που αναπαριστά τα εκτιμώμενα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας (Incidence and mortality rates- ASR) εξαιτίας του παγκρεατικού καρκίνου (age-standardized), σε διάφορες περιοχές ανά τον κόσμο, για τα δύο φύλα και για όλες τις ηλικίες. (μπλε→ επίπτωση & κόκκινο → θνησιμότητα) - (GOLBOCAN, 2018)

1.1.2.2. Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες κινδύνου του καρκίνου του παγκρέατος περιλαμβάνουν τόσο κάποια βασικά κοινά χαρακτηριστικά κινδύνου όσο και κάποια πιο ειδικά άμεσα συσχετιζόμενα με τον συγκεκριμένο αδένα. Αρχικά, όπως φαίνεται και στις Εικόνες 1 και 2, η εμφάνιση του παγκρεατικού καρκίνου σχετίζεται με το περιβάλλον/τοποθεσία που διαμένει άτομο, όπως και με το φύλο του (αρσενικό ή θηλυκό). Επιπλέον, ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου είναι η ηλικία του ασθενούς, όπως και το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ. Συγκεκριμένα, αλλάζοντας την συνήθεια του καπνίσματος, ο ασθενής μπορεί να ωφεληθεί και με κατά 27% μείωση του κινδύνου (Khadka et al. 2018), πράγμα που υποδηλώνει και την σημαντικότητα της επίδρασης του καπνίσματος επί των ασθενών.

Εν συνεχεία, δύο πολύ καθοριστικοί παράγοντες στον καρκίνο του παγκρέατος αποτελούν η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης (Pothuraju et al. 2018)(Cascetta

et al. 2018). Έχει δειχθεί ότι η συσχέτιση μεταξύ παγκρεατικού καρκίνου με αυτές τις δύο μεταβολικές νόσους (παχυσαρκία και διαβήτη) έγκειται στο γεγονός ότι διάφοροι βιοχημικοί και άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται σε παχυσαρκία και διαβήτη, εμπλέκονται επίσης και στην ανάπτυξη του παγκρεατικού καρκίνου αλλά με διαφορετικούς μηχανισμούς και αλλάζοντας τα μεταβολικά μονοπάτια. Σχετικά με την παχυσαρκία, θεωρείται ένας εναρκτήριοι παράγοντας εμφάνισης και ανάπτυξης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου, ενώ όσον αφορά το διαβήτη η σχέση μοιάζει να είναι πιο έμμεση και ίσως αντίστροφη, κατά την οποία έχει δειχθεί ο παγκρεατικός καρκίνος να ευθύνεται για την εκδήλωση του διαβήτη και έτσι ο διαβήτης τελικά να αποτελεί μια πρόωμη εκδήλωση του παγκρεατικού καρκίνου με στόχο την πιο έγκαιρη διάγνωση της νόσου.

Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζει η συσχέτιση μεταξύ κληρονομικότητας και καρκίνου του παγκρέατος. Συγκεκριμένα, μελέτη που πραγματοποιήθηκε στις Η.Π.Α. το 2018, συσχέτισε τον παγκρεατικό καρκίνο με την κληρονομική αυτοσωμική επικρατή χρόνια παγκρεατίτιδα, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί μία από τις πιο βαριές επιπλοκές της συγκεκριμένης νόσου σε ποσοστό 18,8% - 40% σε άτομα ηλικίας γύρω στα 70 έτη (Langner 2017). Παρόλα αυτά, δεν πρέπει να υποβαθμιστεί ο ρόλος του ισχυρού γενετικού υποβάθρου στον παγκρεατικό καρκίνου που ωθεί η εμφάνισή του κυρίως στο να οφείλεται είτε σε κληρονομήσιμους είτε σε *de novo* μεταλλάξεις σε ογκοσυσχετιζόμενα γονίδια (Goral 2015), κατά τις οποίες κληρονομείται ένα φυσιολογικό και ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, και στην πορεία το φυσιολογικό μεταλλάσσεται αντιστοίχως, οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση του καρκίνου.

1.1.2.3. Διάγνωση

Ως επί το πλείστο, η διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου είναι εφικτή όταν ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου βρίσκεται ήδη σε αρκετά προχωρημένο στάδιο, καθιστώντας την πρόγνωση του ιδιαίτερα κακή και πτωχή (Zhang, Qin, and Sun 2018) με αποτέλεσμα ο παγκρεατικός καρκίνος να κατέχει την 1^η θέση μεταξύ ασυμπτωματικών καρκίνων (Takeda et al. 2017). Ωστόσο, υπάρχουν χαρακτηριστικά συμπτώματα τα οποία μπορούν να εγείρουν υποψίες ότι οι φορείς τους μπορεί να εμφανίσουν παγκρεατικό καρκίνο. Κάποια από αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Κάποια ενδεικτικά βασικά συμπτώματα που συνδέονται με την ύπαρξη παγκρεατικού καρκίνου.

• Ίκτερος, απώλεια σωματικού βάρους και κοιλιακό άλγος
• Συμπτώματα ανορεξίας, κνησμός, γενική αδυναμία και εντερική δυσλειτουργία
• Διαβήτης (συνήθως ΣΔ τύπου II), και γενικά αύξηση επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και ινσουλινοαντίσταση
• Συνυπάρχουσα παχυσαρκία
• Διόγκωση παγκρέατος
• Απότομη μεταβολή διαμετρήματος παγκρέατος και παρεγχυματική ατροφία
• Αλλαγή στο χρώμα κοπράνων (καθίστανται πλέον ανοιχτόχρωμα) πιθανών λόγω κακής απορρόφησης από το πάγκρεας των θρεπτικών συστατικών από τον οργανισμό που προσλαμβάνονται από τις τροφές

Πίνακας 3: Απεικονιστικές & ενδοσκοπικές μέθοδοι που συνδράμουν στην διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου

• Αξονική τομογραφία (CT scan)
• Μαγνητική τομογραφία (MRI)
• Διαδερμική & ενδοσκοπική υπερηχογραφία (TUS & EUS)
• Ενδοσκοπική παγκρεατο-χολαγγειογραφία (ERCP)
• Αγγειογραφία κ.αλ.

Μιας και δεν υπάρχουν ειδικοί βιοδείκτες ανίχνευσης του παγκρεατικού καρκίνου, σημαντικό ρόλο έχει φανεί να διαδραματίζουν τα επίπεδα του CA 19-9 (carbohydrate Antigen), ενός σιαλοποιημένου ολιγοσακχαρίτη της κυκλοφορούμενης βλεννίνης καρκινοπαθών. Στις περιπτώσεις αυτές το καρκινικό αντιγόνο CA 19-9 αναπτύσσει υψηλές τιμές σε ποσοστό 75-80% (>100U/mL, συνδεδεμένο με καρκίνο παγκρεατικής προέλευσης), αλλά δυστυχώς δεν αποτελεί 100% αξιόπιστο δείκτη διάγνωση κακοήθους καρκίνου του παγκρέατος λόγω χαμηλής ευαισθησίας. Πολλές είναι οι περιπτώσεις καλοήθειας στις οποίες αυξάνεται επίσης το CA 19-9, όπως και υπάρχει ένα 10-15% των ασθενών που έχουν απουσία του CA 19-9. Το καρκινικό αντιγόνο CA 19-9 σε συνδυασμό με τα επίπεδα IL-6 (interleukin 6) και YKL-40, σε κάποιες περιπτώσεις κακής πρόγνωσης επιτρέπει την ανίχνευση και τον προσδιορισμό

κάποιων ασθενών σε πρώιμα και προεγχειρητικά στάδια ανάπτυξης του καρκίνου του παγκρέατος (Palmquist et al. 2020). Έχει παρατηρηθεί ότι μείωση των επιπέδων του CA 19-9 μετά από εγχείρηση ή θεραπεία προτείνει ανταπόκριση της νόσου στη θεραπεία, ενώ ενδεχόμενη αύξηση συνοδεύεται με επιδείνωση της νόσου αυτής.

Τέλος, πέραν των βασικών συμπτωμάτων και την ανάλυση κάποιων καρκινικών βιοδεικτών, η διάγνωση μπορεί να επιτευχθεί με κάποιες απεικονιστικές ή ενδοσκοπικές μεθόδους όπως φαίνονται στον Πίνακα 3.

1.1.2.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η θεραπεία γενικά των διαφόρων ειδών του καρκίνου γίνεται ολοένα και πιο αποτελεσματικά ευεργετική, με απόρροια την όλο και μεγαλύτερη επιβίωση των ασθενών και την μείωση των διάφορων παρενεργειών που υφίστανται. Για τον παγκρεατικό καρκίνο όμως, δεν έχει βρεθεί αυτή καθεαυτή η θεραπεία για την νόσο και υστερεί όσον αφορά την θεραπευτική αντιμετώπιση που υπάρχει μέχρι στιγμής. Η συγκεκριμένη νόσος, όπως ήδη αναφέρθηκε, γενικά χαρακτηρίζεται από αργή διάγνωση (λόγω απουσίας συμπτωμάτων σε πρώιμα στάδιά της) αλλά και ταχύτατη εξέλιξη (μεταστάσεις) και αντίσταση στη χημειοθεραπεία (Lohse and Brothers 2020). Η διάγνωση και η ανάγκη για θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος έγκειται κατά κύριο λόγο στη μεγάλη γκάμα συμπτωματολογίας που εμφανίζει η νόσος, με κυρίαρχο το υπέρμετρο και μη υποφερτό κοιλιακό άλγος των ασθενών στο 75-80% των περιπτώσεων. Η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων αυτών συνήθως αντιμετωπίζεται εύκολα με την βοήθεια φαρμακευτικών σκευασμάτων. Πρώτη κίνηση βελτίωσης της ποιότητας ζωής των ασθενών που υποφέρουν από παγκρεατικό καρκίνο αποτελεί η φαρμακοθεραπεία που βασίζεται σε οπιοειδή σε συνδυασμό με διάφορα φάρμακα προφυλακτικής (adjuvant) θεραπείας (όπως αντικαταθλιπτικά, γλυκοκορτικοειδή κλπ) και έχει ως βασικό στόχο την ελάττωση του πόνου (Radbruch and Nauck 2002).

Τα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται στην προσπάθεια θεραπείας του καρκίνου συνεχώς υπόκεινται αξιολόγησης τόσο προ-κλινικά όσο και σε κλινικό επίπεδο, σε απώτερο σκοπό την ελάττωση έως και την εξάλειψη της τοξικότητας που παρουσιάζεται από τις υπάρχουσες θεραπείες. Το βασικότερο μέσο θεραπευτικής αντιμετώπισης του παγκρεατικού καρκίνου είναι η χειρουργική αφαίρεση του όγκου όπου είναι δυνατό, η οποία στη συνέχεια ακολουθείται από την έναρξη

συντηρητικής/προφυλακτικής (adjuvant) θεραπείας για την καταπολέμηση τυχόν υπολειμμάτων και την ελάττωση των πιθανοτήτων ανάπτυξης εκ νέου του όγκου όπως και πιθανών μεταστάσεων. Αυτή η προφυλακτική θεραπεία μπορεί να γίνει με την χορήγηση είτε Γεμισιταμπίνης (Gemzar, Gemcitabine) είτε Φθοριουρακίλης (5 FU). Σε προχωρημένα στάδια της νόσου, όπου κατά πάσα πιθανότητα έχει επεκταθεί η κακοήθεια μέσω διασποράς των εστιών του όγκου και δεν θα ωφελούσε η χειρουργική επέμβαση, το κυριότερο μέσο θεραπείας αποτελούν τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία κάποιες φορές για επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου. Το μεγάλο αρνητικό της χημειοθεραπείας είναι οι παρενέργειες τις οποίες θα υποστεί ο ασθενής και περιλαμβάνουν πυρετό, ναυτία, διάρροια, ανοσοκαταστολή, ηπατική τοξικότητα, μυοκαρδιακά, αλωπεκία κλπ. Κάποια από τα πιο κοινά χημειοθεραπευτικά φάρμακα σήμερα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Τα πιο κοινά χημειοθεραπευτικά φάρμακα/σχήματα για την αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου (Adamska et al. 2018):

• Gemzar [®] [Gemcitabine/ Γεμισιταμπίνη]
• 5-FU [Fluorouracil/ Φθοριουρακίλη]
• ABRAXANE [®] [nab-Paclitaxel/ Πλακιταξέλη συνδεδεμένη με λευκοματίνη]
• FOLFIRINOX [®] [συνδυασμός της FU-5 & leucovorin (λευκοβορίνη), oxaliplatin (Οξαλιπλατίνη), irinotecan (ιρινοτεκάνη)]

Αυτά τα φάρμακα (Πίνακας 4) στοχεύουν στην βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με προχωρημένο παγκρεατικό καρκίνο, τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά (Adamska et al. 2018). Μέσω μελετών (Conroy, T. et al., 2018), έχουν φανεί αποτελεσματικοί διάφοροι συνδυασμοί φαρμάκων σε αρκετά προχωρημένο και μεταστατικό στάδιο της νόσου, όπως είναι το FOLFIRINOX[®] και ο συνδυασμός ABRAXANE[®]/Gemzar[®] (Zeng et al. 2019) με αποτελεσματικότερο αυτό με το FOLFIRINOX[®], ακόμη και ως προφυλακτική (adjuvant) θεραπεία (T. Conroy et al. 2018)(Thierry Conroy et al. 2011), παρά τις περισσότερο τοξικές παρενέργειές του.

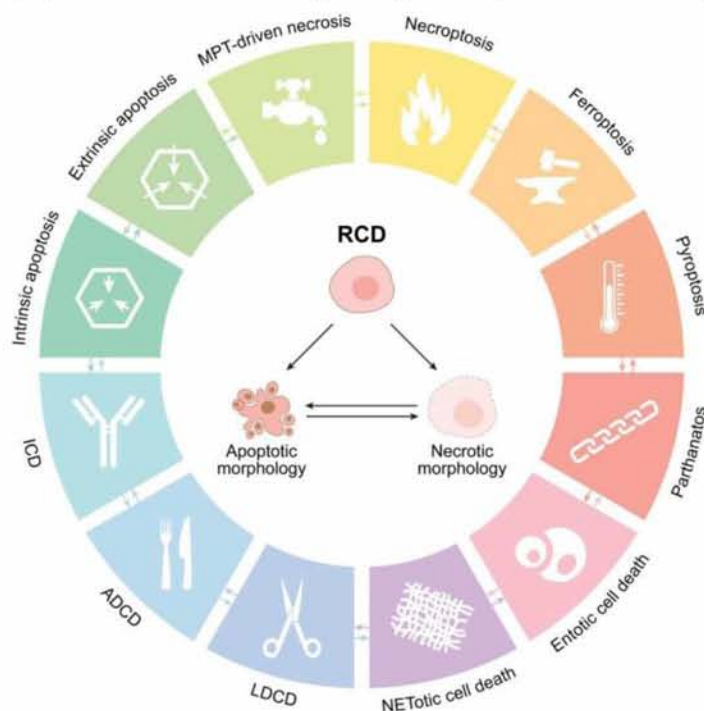
Πέραν των παραπάνω μεθόδων θεραπείας, τα τελευταία χρόνια με σκοπό την αποφυγή της ανοσοκαταστολής του ασθενούς από τις χημειοθεραπείες, γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης βιολογικών θεραπειών συμπεριλαμβανομένης της χρήσης ογκολυτικών ιών (Oncolytic Viruses, OV) και της ανοσοθεραπείας (Schirmacher

2019). Αν και μέχρι σήμερα δεν είναι ακόμη ευρέως χρησιμοποιούμενη σαν μέθοδος, η βιολογική θεραπεία στοχεύει μέσω την ανοσοθεραπείας αρχικά στη δημιουργία επίκτητης ανοσιακής μνήμης του ασθενούς σε αντίθεση με τα χημειοθεραπευτικά μέσα, στην ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος έναντι του καρκίνου με πολύ λιγότερες παρενέργειες λόγω των διαφόρων μηχανισμών ανθεκτικότητας του ανοσολογικού συστήματος και τέλος, με την βοήθεια ογκολυτικών ιών να ενεργοποιηθούν μονοπάτια έμφυτη ανοσιακής απάντησης του οργανισμού.

1.2. Καρκινικός κυτταρικός θάνατος

1.2.1. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

Παλαιότερα, ο όρος του κυτταρικού θανάτου συγγέονταν και με την λογικά επακόλουθη συνέπεια και κατάληξη της κυτταρικής ζωής. Πλέον, στις μέρες μας ως κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται ο «ρυθμιζόμενος» κυτταρικός θάνατος (Regulated Cell Death, RCD) (Galluzzi et al. 2018a), όπως αναπαρίσταται και στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3: Μοριακοί μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου (recommendations of Nomenclature Committee on Cell Death 2018)(Galluzzi et al. 2018a).

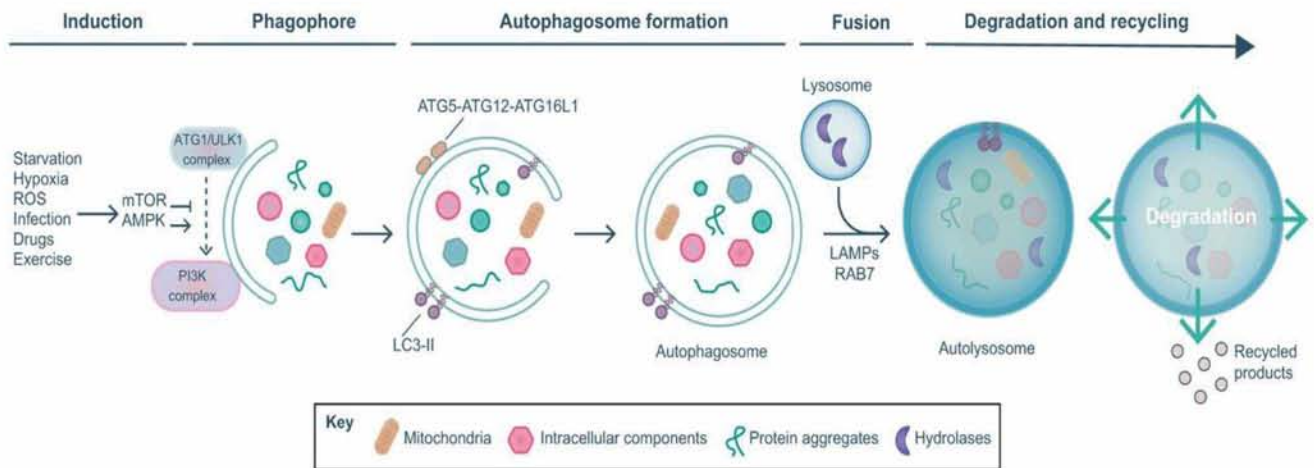
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3, ο «ρυθμιζόμενος» κυτταρικός θάνατος αποτελείται από 12 μοριακούς μηχανισμούς κατά τους οποίους μπορεί να ακολουθήσει το κύτταρο, με κυριότερους την απόπτωση και την αυτοφαγία, που έχει δειχθεί ότι δύναται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με στόχο την ρύθμιση της

αποικοδόμησης (D’Arcy 2019). Χρήζει αναφοράς εδώ, το γεγονός ότι με τον κυτταρικό θάνατο δεν επέρχεται απαραίτητα και θάνατος με την ουσιαστική και ρεαλιστική έννοια της λέξης, δηλαδή δεν αποτελεί καθοριστικό συμβάν ώστε να καταστεί ένα κύτταρο νεκρό, αλλά να καταστεί ως θνήσκο και πρόκειται για αναστρέψιμη διαδικασία. Τελευταία επικρατεί το εξής “Die and Let live”, καθιστώντας τον κυτταρικό θάνατο ως αναγκαία λειτουργία για διατήρηση ισορροπίας και φυσιολογικής ανάπτυξης των κυττάρων και κατ’έκταση του οργανισμού ολόκληρου.

1.2.2. Αυτοφαγία

1.2.2.1. Αυτοφαγία – Αυτοφαγικός θάνατος

Ο αυτοφαγικός θάνατος, ή αλλιώς «Type II cell death» όπως περιγράφηκε από τον φαινότυπο του Clark το 1990, αποτελεί ένα μηχανισμό κυτταρικού θανάτου με διττή αποτελεσματικότητα. Κατά την αυτοφαγία τα κύτταρα μπορούν και να προστατευτούν αλλά και να θανατωθούν τα κύτταρα που έχουν υποστεί στρες (D’Arcy 2019). Πρόκειται για μία διαδικασία κατά την οποία τα ίδια τα κύτταρα κατατρώγουν τα μακρομόριά τους (οργανίδια και κυτταρικά συστατικά) με την βοήθεια των λυσοσωμάτων με σκοπό την ανακύκλωση των αναγκαίων αυτών συστατικών τους σε στρεσογόνους ενεργειακούς περιορισμούς. Η αυτοφαγία σε φυσιολογικά επίπεδα μπορεί να είναι κυτταροπροστατευτική και κυτταροωφέλιμη και να έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης, την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό (Boya, Codogno, and Rodriguez-Muela 2018) ως ανταπόκριση σε μία μεγάλη γκάμα στρεσογόνων καταστάσεων, όπως είναι η υποξία, η πείνα, η μιτοχονδριακές βλάβες και οι λοιμώξεις (Liu and Levine 2015). Ωστόσο, αυτό σε περιπτώσεις ανεξέλεγκτων επιπέδων αυτοφαγίας, όταν ξεπεραστούν κάποια φυσιολογικά όρια, η αυτοφαγία μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (autophagy-dependent cell death). Φαίνεται ότι κατά κύριο λόγο η επαγόμενη από το στρες αυτοφαγία (stress-induced autophagy) εξασφαλίζει κυτταροπροστασία, ενώ συχνά η επαγόμενη από την ανάπτυξη αυτοφαγία (development-induced autophagy) μεσολαβεί για τον ονομαζόμενο κυτταρικό θάνατο μέσω αυτοφαγίας (autophagic cell-death) (Bialik, Dasari, and Kimchi 2018).



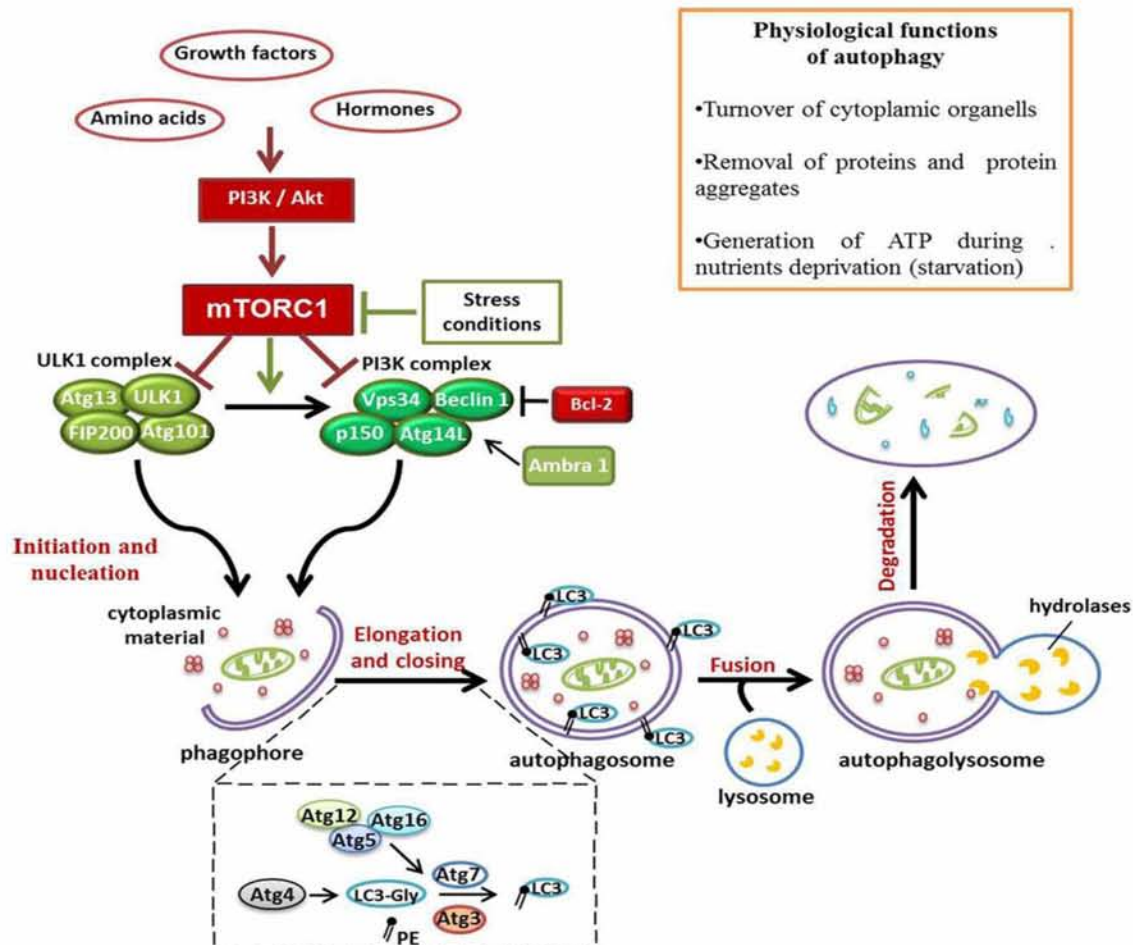
Εικόνα 4: Τα βήματα της αυτοφαγίας. Διαδικασία σχηματισμού και ωρίμανσης αυτοφαγοσώματος σε κύτταρα θηλαστικών από τα φαγοφόρα (Boya, Codogno, and Rodriguez-Muela 2018).

Κάποια πολύ βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της αυτοφαγίας είναι α) η ακεραιότητα του πυρήνα του κυττάρου στο οποίο ενεργοποιείται η αυτοφαγία (και κατ'επέκταση όχι συμπύκνωση χρωματίνης) και β) η δημιουργία χαρακτηριστικών αυτοφαγικών κενотоπιών τα οποία χαρακτηρίζονται ως «αυτοφαγοσώματα». Τα αυτοφαγοσώματα χαρακτηρίζονται από διπλή μεμβράνη και αποτελούνται από εκφυλισμένα μακρομόρια. Η διαδικασία της αυτοφαγίας (Εικόνα 4) ξεκινάει με κάποιο στρεσογόνο αρχικό ερέθισμα τον σχηματισμό μίας μεμονωμένης μεμβράνης που ονομάζεται φαγοφόρο (phagophore), το οποίο διευρύνεται σιγά σιγά και σχηματίζει το αυτοφαγόσωμα (autophagosome). Μέσα στο ώριμο πλέον αυτοφαγόσωμα εγκλείονται διάφορα ενδοκυτταρικά συστατικά όπως είναι τα μιτοχόνδρια, πρωτεΐνες, μικροοργανισμοί κ.α. Στη συνέχεια, γίνεται συγχώνευση του λυσοσώματος και του αυτοφαγοσώματος και σχηματίζεται έτσι το αυτοφαγολυσόσωμα (autophagolysosome/ autolysosome) του οποίου και το περιεχόμενο τελικά αποικοδομείται από λυσοσωμικές πρωτεάσες/υδρολάσες.

Η διαδικασία σχηματισμού του αυτοφαγολυσόσωματος ναί μεν φαίνεται σχετικά απλή (Εικόνα 4), αλλά πρόκειται για μία ιδιαίτερα αυστηρά ελεγχόμενη και πολλών μορίων διαμεσολαβούμενη διαδικασία (Εικόνα 5). Το mTOR complex 1 (mTORC₁) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους αυτοφαγικούς ρυθμιστές των κυττάρων ρυθμιζόμενο από σήματα που λαμβάνει από τις κινάσες PI3K (phosphoinositide-3-kinase) και Akt. Στην παρουσία αυξητικών παραγόντων και

ορμονών το mTORC₁ αναστέλλει την διαδικασία της αυτοφαγίας ενώ στην παρουσία στρεσογόνων καταστάσεων ικανών να προωθήσουν την αυτοφαγία, το mTORC₁ επιτρέπει την έναρξη σχηματισμού του φαγοφόρου από το ULK1 complex που ενεργοποιείται και το PI3K complex που ενεργοποιεί την Beclin 1 (με καταστολή την Bcl-2). Με την βοήθεια αυτών των συμπλεγμάτων ξεκινάει το φαγοφόρο τον σχηματισμό του και τα κυτταροπλασματικά μακρομόρια περικλείονται σιγά σιγά. Κατά την διεύρυνση του φαγοφόρου και κατά την ολοκλήρωση και ωρίμανση του αυτοφαγώματος (πολυμεμβρανικό κυστίδιο) καταλυτικό ρόλο παίζει το σύστημα Atg, και συγκεκριμένα τα Atg5-Atg12-Atg16L, όπως και το LC3 το οποίο συνδέεται με το λιπίδιο PE (LC3-PE) ώστε να προλάβει να μπει στο εσωτερικό του σχεδόν ολοκληρωμένου αυτοφαγώματος και να αλληλεπιδράσει με το p26. η LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) πέπτει από την ATG4, αφήνοντας ελεύθερο ένα C- τελικό κατάλοιπο γλυκίνης, στο οποίο μπορεί να συνδεθεί η λιπιδική φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE). Έτσι η LC3 μετατρέπεται στην ενεργή κυτοσολική της μορφή LC3-I. Στην συνέχεια η LC3-I μετατρέπεται σε LC3-II μετά από αλληλεπίδραση με την PE. Η λιπιδίωση της LC3 επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με την μεμβράνη του αυτοφαγώματος, ένα γεγονός απαραίτητο για την ωρίμανσή του. Έτσι, γίνεται η σύντηξη του ώριμου αυτοφαγώματος με το λυσόσωμα σχηματίζοντας τελικά το αυτοφαγολυσόσωμα, το οποίο και αποικοδομεί με την βοήθεια των λυσοσωμικών πρωτεασών το εσωτερικό του φορτίο με απώτερο σκοπό την ανακύκλωση των συστατικών του (Vomero et al. 2018; Ravanan, Srikumar, and Talwar 2017).

Μπορούν να διακριθούν τρεις (3) διαφορετικοί τύποι αυτοφαγίας οι οποίοι είναι: α) μακροαυτοφαγία (Macroautophagy), β) μικροαυτοφαγία (Microautophagy) και γ) Chaperon-mediated αυτοφαγία (CMA). Το βασικό αυτοφαγικό μονοπάτι είναι η μακροαυτοφαγία κατά την οποία ισχύει το προαναφερθέν μοτίβο με την αποικοδόμηση των μακρομορίων από τα λυσοσώματα με την μεσολάβηση του αυτοφαγώματος και του αυτοφαγολυσώματος. Κατά την μικροαυτοφαγία δεν έχουμε αυτού του είδους την διαμεσολάβηση, και το κυτταροπλασματικό φορτίο οδηγείται και απελευθερώνεται απευθείας στα λυσοσώματα. Τέλος, στο CMA γίνεται απευθείας μεταφορά κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με την βοήθεια πρωτεϊνών συνοδών που αναγνωρίζονται από την λυσοσωμική μεμβράνη (LAMP- receptor) και έτσι η μεταφορά γίνεται απευθείας (Ravanan, Srikumar, and Talwar 2017).



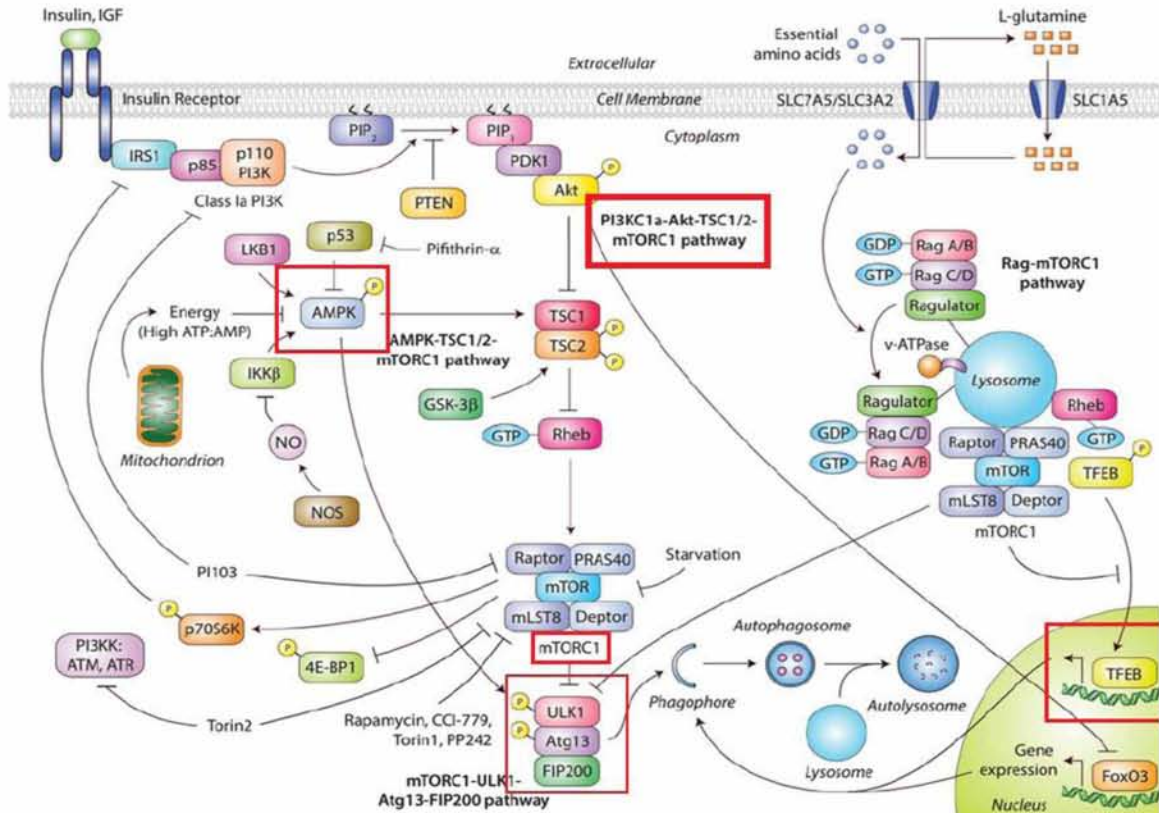
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν στην πολυδιάσταση ρύθμιση της αυτοφαγίας (Vomero et al. 2018)

1.2.2.2. Το ανεξάρτητο από το m-TOR σηματοδοτικό μονοπάτι στην αυτοφαγία

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το mTOR αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της αυτοφαγίας. Ωστόσο, υπάρχει ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην αυτοφαγία και είναι ανεξάρτητο της κινάσης mTOR. Αυτό το μονοπάτι σχετίζεται με την υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP (κυκλική μονοφωσφοτική αδενοσίνη). Όταν η εκδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP είναι υψηλή, τελικός της στόχος είναι ο υποδοχέας ινοσιτόλης [Ins(1,4,5)P3R] στο ενδοπλασματικό δίκτυο, που με αυτό τον τρόπο οδηγείται σε αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης του ασβεστίου (Ca) με τελικό αποτέλεσμα και την έναρξη της αυτοφαγίας (Sarkar 2013).

1.2.2.3. Το PI3K/Akt /m-TOR εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι στην αυτοφαγία

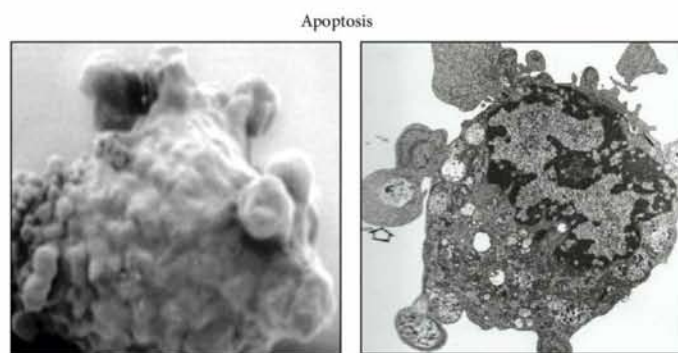
Η κινάση mTOR παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αυτοφαγία. Πρόκειται για μία κινάση που εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην ανάπτυξη και στην πρωτεϊνοσύνθεση. Ας αναφερθεί πάλι ότι στο ενδεχόμενο που το mTOR είναι ενεργό συνεπάγεται και αναστολή της αυτοφαγίας, αλλά και την παραμονή μεταγραφικών παραγόντων (όπως ο pTFEB) στο κυτταρόπλασμα φωσφορυλιώνοντάς τους. Αρχικά, με μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων γλυκόζης, ενεργοποιείται η AMPK κινάση (πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το AMP) που ακολούθως ενεργοποιεί το ULK1 complex που οδηγεί στην αυτοφαγία όπως προαναφέρθηκε. Στο σηματοδοτικό μονοπάτι της αυτοφαγίας που είναι εξαρτώμενο από το mTOR (Εικόνα 6), ο ρόλος είναι διττός. Η μείωση της γλυκόζης μπλοκάρει το mTOR, καθώς και ενεργοποιεί περαιτέρω κινάσες που ενισχύουν αυτή την αναστολή του mTOR. Με αυτή την αναστολή της δράσης του mTOR, ο μεταγραφικός παράγοντας TFEB μετατοπίζεται στον πυρήνα και επάγει την αυτοφαγία (Ravanan, Srikumar, and Talwar 2017; Sarkar 2013).



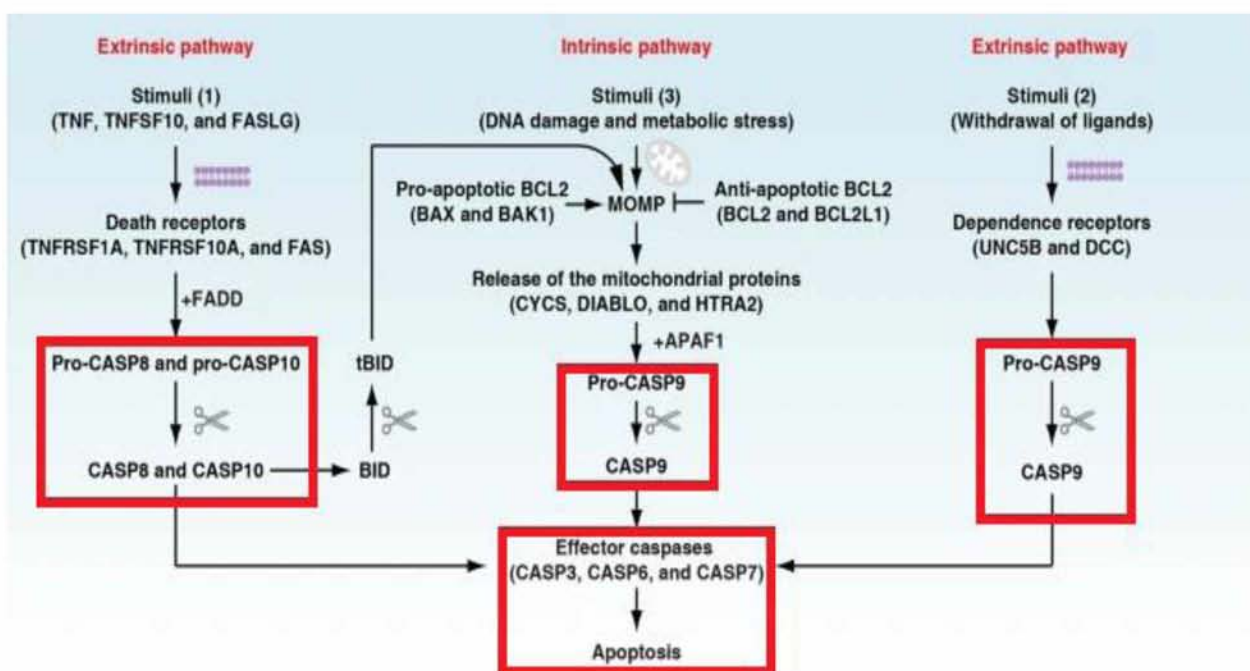
Εικόνα 6: Μονοπάτι αυτοφαγίας εξαρτώμενο των PI3K/Akt/ mTOR (PI3K/Akt/mTOR-dependent pathway) (Sarkar 2013)

1.2.3. Απόπτωση

Η απόπτωση αποτελεί έναν άλλο τύπο κυτταρικού θανάτου, γνωστό και ως «Type I cell death» και αποτελεί μία απόλυτα φυσική διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Κατά την πραγματοποίησή της λαμβάνει χώρα η γενική συρρίκνωση του κυττάρου και της χρωματίνης (συμπύκνωση), και κατακερματίζεται ο πυρήνας (Galluzzi et al. 2018b; Tang et al. 2019; Kroemer et al. 2009) χωρίς να διαταραχθεί η ακεραιότητα του κυττάρου. Αυτή είναι και μία βασική διαφορά της αυτοφαγίας με την απόπτωση. Το κύτταρο που στην ουσία διαταράσσεται η ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης και αποκτά μία χαρακτηριστική μορφή που εμφανίζεται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7: Χαρακτηριστική μορφή αποπτωτικού κυττάρου (membrane blebbing) (Belizário, Vieira-Cordeiro, and Enns 2015) με εμφανιση φυσαλίδων στην επιφάνειά του.



Εικόνα 8: Το ενδογενές και εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης (Tang et al. 2019)

Πιο απλά, θα μπορούσε να περιγραφεί η απόπτωση σαν μια εσωτερική αποδιοργάνωση και κατακερματισμός, αλλά χωρίς διαταραχή της ακεραιότητας του κυττάρου. Ο κατακερματισμός και η συρρίκνωση της χρωματίνης προηγείται του κατακερματισμού του κυττάρου. Σιγά σιγά και ελεγχόμενα καταλήγει στο να δημιουργηθούν κυστίδια που περιέχουν χρωματίνη και περιβάλλονται από πλασματική μεμβράνη και ονομάζονται αποπτωτικά σωματίδια. Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από την διαρροή του μιτοχονδριακού περιεχομένου στο κυτταρόπλασμα και κατ'επέκταση από αναστολή λειτουργίας μιτοχονδρίων και απελευθέρωση κυτοχρώματος C (Tang et al. 2019).

Πολύ βασικό κομμάτι της απόπτωσης είναι και η ενεργοποίηση των κασπασών. Οι κασπάσες είναι μία οικογένεια πρωτεϊνών με δράση πρωτεασών που η δράση τους εξαρτάται από την παρουσία ασβεστίου. Στην απόπτωση διακρίνονται α) σε εκκινητές (initiators), οι οποίες πρέπει να προ-ενεργοποιηθούν ώστε να ενεργοποιήσουν τις κασπάσες τελεστές (όπως είναι η Caspase 8/9/10..) και β) σε εκτελεστές (effectors) οι οποίες προ-υπάρχουν σαν διμερή στο κύτταρο και ενεργοποιούνται μετά (όπως η Casp 3/6/7...). Η ενεργοποίηση των κασπασών που προαναφέρθηκαν συνεπάγει την δημιουργεί τετραμερών από τα προϋπάρχοντα διμερή. Οι κασπάσες είναι το κομβικό σημείο των τριών αποπτωτικών οδών που υπάρχουν, οι οποίες κάποιες φορές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι τρεις αποπτωτικοί οδοί είναι:

- i) Εξωγενής οδός μέσω ενός ειδικού υποδοχέα θανάτου (TNF-Rs, TRAILs etc), στην οποία είναι ενεργή η κασπάση 8 (Caspase 8)
- ii) Ενδογενής οδός μέσω μιτοχονδρίων, όπου είναι ενεργή η Caspase 9
- iii) Απόπτωση μέσω ΕΔ.

Οι κασπάσες 8 και 9 έχουν σαν αποτέλεσμα στην συνέχεια με σκοπό την επαγωγή της απόπτωσης να ενεργοποιήσουν και την Caspase 3 η οποία είναι στην πραγματικότητα και ο εκτελεστής της απόπτωσης τελικά (Εικόνα 8).

1.2.4. Ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο

Η αυτοφαγία όπως παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και στο θάνατο του κυττάρου, αντίστοιχα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και καταστολή του καρκίνου, μιας και τα περισσότερα ρυθμιστικά γονίδια της αυτοφαγίας είναι ογκοκατασταλτικά και ογκογονίδια (Ravanan, Srikumar, and Talwar 2017). Έτσι, αναμένεται και ότι η αυτοφαγία συνδέεται με κάποια νοσήματα και πρέπει να

προωθηθεί και σε κάποιες άλλες πρέπει να κατασταλεί. Η αυτοφαγία έχειδειχθεί ότι κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης απορρυθμίζεται (είτε θετικά είτε αρνητικά). Η αυτοφαγία μπορεί να προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα αλλά επίσης μπορεί να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα που αντιστέκονται στην χημειοθεραπεία (Li et al. 2017). Σήμερα, έχειδειχθεί ότι το mTOR και κατ'επέκταση η αυτοφαγία αποτελεί σημαντικό στόχο νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, μιας και ο mTOR είναι από τους κυριότερους τελεστές μονοπατιών που είναι υπερενεργοποιημένα σε διάφορα είδη καρκίνου, όπως το Ras/PI3K, κ.α. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ραπαμυκίνη (Sirolimus©) που έχει ως στόχο την mTOR κινάση εφόσον είναι συνδεδεμένη με το FKBP12 (ανοσοφιλίνη) και οδηγεί σε ανοσοκαταστολή, αλλά και τα Temsirolimus© και Everolimus© τα οποία στοχεύουν στην αναστολή του mTOR και την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Σε πολλές περιπτώσεις, η αυτοφαγία που επάγεται από αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση και μονοπατιών απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Li et al. 2017).

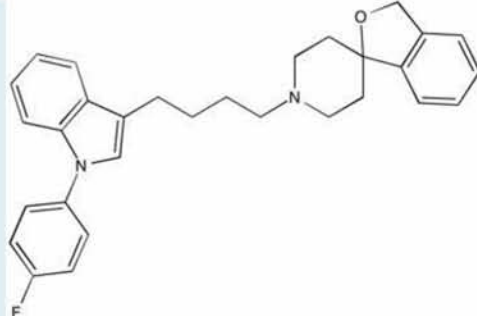
1.3. Siramesine και καρκίνος

1.3.1. Σιραμεσίνη

Η σιραμεσίνη (siramesine) αποτελεί έναν σ_2 επιλεκτικό αγωνιστή (σ_2 selective agonist) και φαίνεται να παρουσιάζει πιθανή αντικαρκινική δράση. Αναπτύχθηκε από την H Lundbeck με σκοπό την αντιμετώπιση και τη θεραπεία του άγχους (Heading 2001), μπαίνοντας σε κλινικές δοκιμές φάσης II και III, το 2000 και 2002, αντίστοιχα, αλλά και σε δοκιμές για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη. Η σιραμεσίνη θεωρείται το βασικό πρότυπο των σ_2 αγωνιστών λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητάς της για τον σ_2 υποδοχέα. Έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλέσει προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε μεγάλη ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών μέσω αύξησης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και της λυσοσωμικής διαρροής με αύξηση της ραγδαίας αύξησης του λυσοσωμικού pH και επακολούθως της λυσοσωμικής μεμβρανικής διαπερατότητας (Olsen et al. 2008; Ostefeld et al. 2008), αλλά και την αντιπολλαπλασιαστική δράση και να έχει κυτταροτοξικές επιδράσεις (Colabufo et al. 2004). Ωστόσο, πιθανόν στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την σιραμεσίνη

η εμπλοκή του λυσοσώματος να έχει να κάνει με τον εκάστοτε τύπο καρκίνου που μελετάται (Česen et al. 2013).

Πίνακας 5: Βασικά χαρακτηριστικά της σιραμεσίνης (Heading 2001):

Χημικό όνομα	1'-[4-[1-(4-Fluorophenyl)indol-3-yl]butyl]spiro[1H-2-benzofuran-3,4'-piperidine	 <p>Μοριακή απεικόνιση σιραμεσίνης (Heading 2001)</p>
Μοριακό Βάρος	454,59 g/mol	
Μοριακός τύπος	C ₃₀ H ₃₁ FN ₂ O	
θ°C αποθήκευσης	-20° C	
Διαλυτότητα	Διαλυόμενο σε DMSO (έως τουλάχιστον 25mg/ml)	
Φυσικές ιδιότητες	Λευκό στερεό	

Επιπλέον, αργότερα, το 2013, δείχθηκε η ικανότητα της σιραμεσίνης να επεμβαίνει και να διαταράσσει την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων προκαλώντας τον θάνατο (κυρίως απόπτωση) των καρκινικών κυττάρων μέσω της πτώσης του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού MMP (Mitochondrial Membrane Potential) (Česen et al. 2013). Τέλος, η σιραμεσίνη έχει συσχετισθεί και με την φερρόπτωση (άλλο είδος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) κατά την οποία επιτυγχάνεται μεγάλη συσσώρευση ελευθέρων ριζών οξυγόνου και έτσι η κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων οδηγείται σε οξειδωτική αποικοδόμηση (Ma et al. 2017a). Το 2017, βρέθηκε και ότι συνδυασμός σιραμεσίνης με το Lapatinib (αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης- dual tyrosine kinase inhibitor) οδηγούσε και στον κυτταρικό θάνατο αρχικά οδηγώντας σε φερρόπτωση και ύστερα σε αυτοφαγία μετά από ένα 24ωρο (Ma et al. 2017a). Κάποια από τα βασικά χαρακτηριστικά της σιραμεσίνης φαίνονται στον Πίνακα 5.

Τέλος, ένας άλλος βασικός χαρακτηρισμός για την σιραμεσίνη είναι ότι δρα και σαν αποσταθεροποιητής των λυσοσωμάτων, προκαλώντας εκροή του

λυσοσωμικού αποθέματος και τον σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων και στηρίζοντας τον εξαρτώμενο από καθειψίνες (cathepsin) καρκινικό κυτταρικό θάνατο (Olsen et al. 2008), (Villalpando-Rodriguez et al. 2019).

1.3.2. σ 2 υποδοχείς και προσδέτες γενικά (σ 2 receptors and ligands)

Οι sigma (σ receptors) υποδοχείς πρωτοπεριγράφηκαν πριν από περίπου 45 χρόνια, το 1976, ως μέλη της οικογένειας των υποδοχέων των οπιοειδών, όπως και οι mu (μ) και οι kappa (κ), διαφέροντας όσον αφορά τη θέση πρόσδεσής τους (Martin et al. 1976). Η διάκριση των σ υποδοχέων πραγματοποιήθηκε πριν από 30 χρόνια περίπου, τα 1990, όπου διακρίθηκαν στους δύο υπότυπους, που είναι αποδεκτοί ως και σήμερα, που ονομάστηκαν σ 1 και σ 2 βάση των διαφορετικών προτύπων πρόσδεσης των σίγμα προσδετών τους (σ ligands). Πιο ειδικά, η διαφορά αυτή εντοπίζεται στην μεγάλη συγγένεια των σ 1 υποδοχέων ως προς τις βενζομορφάνες, όπου στους σ 2 υποδοχείς η συγγένεια αυτή είναι μηδενική. Παρ' όλα αυτά, και οι δύο υπότυποι σ 1 και σ 2 εμφανίζουν εξίσου υψηλή συγγένεια για τους προσδέτες: διτολυλγουανιδίνη (DTG, Ditolylguanidine) και αλοπεριδόλη (haloperidol).

Οι σ 2 υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μοριακού βάρους (MB) 18-22 kDa. Αρχικά οι σ 2 υποδοχείς θεωρούνταν ταυτόσημοι με τον PGRMC1 υποδοχέα (progesterone receptor component 1) (Abate et al. 2015), αλλά στην συνέχεια αυτό καταρρίφθηκε και επικράτησε η ταυτοποίηση των σ 2 υποδοχέων ως μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την TMEM97 (Transmembrane protein 97) (Schmidt and Kruse 2019) η οποία εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και στα λυσοσώματα, εστιάζει στη ρύθμιση της πρωτεΐνης Niemann-Pick (NPC1) και δεσμεύεται με τη χοληστερόλη. Οι προσδέτες των σ 2 υποδοχέων που εμφανίζουν συγγένεια με τους σ 2 υποδοχείς αναφέρονται ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές βάση το αν ενεργοποιούν ή αν αδρανοποιούν, αντιστοίχως, την φαρμακολογική τους απόκριση (Abate, Perrone, and Berardi 2012; Colabufo et al. 2004). Έτσι, αντίστοιχα η σιραμεσίνη που ανήκει και στους αγωνιστές των σ υποδοχέων ενεργοποιεί και ενισχύει την φαρμακολογική απόκριση.

1.3.3. σ2 υποδοχείς, προσδέτες και σιραμεσίνη στον καρκίνο

Τα τελευταία χρόνια, ο σ2/TMEM97 υποδοχέας και οι προσδέτες του, όπως και ο αγωνιστής σιραμεσίνη, έχουν εγείρει το ενδιαφέρον για τον ρόλο τους ως δυνητικοί θεραπευτικοί στόχοι για τον καρκίνο (Ostenfeld et al. 2008; Mach, Zeng, and Hawkins 2013; Collina et al. 2017) και ως εκλεκτικοί μεταφορείς αντικαρκινικών φαρμάκων στην περιοχή του όγκου. Η υπερέκφραση του σ2/TMEM97 έχει συσχετισθεί με την μικρότερη επιβίωση των ασθενών με καρκίνο, την μεγαλύτερη πιθανότητα επανεμφάνισής του και ίσως και το μεγαλύτερο μέγεθος του στερεού όγκου, συσχετίζοντας έτσι και την ποσότητά τους στους όγκους με το στάδιο του καρκίνου στο οποίο πιθανόν βρίσκεται εκάστοτε ασθενής (Pati et al. 2018a; Oyer, Sanders, and Kim 2019). Οι σ υποδοχείς έχουν αποκτήσει σημαντική θέση στην έρευνα για την θεραπεία του καρκίνου λόγω της συμμετοχής του γενικά, στην βιολογία του καρκίνου και ειδικά, λόγω της υπερέκφρασής τους στα καρκινικά κύτταρα (Tesei et al. 2019; Megalizzi, Le Mercier, and Decaestecker 2012). Οι σ2 προσδέτες προτάθηκαν ως αντικαρκινικά φάρμακα είτε συνδυαστικά είτε ως μονοθεραπεία. Τελικός στόχος τους είναι ο κυτταρικός θάνατος ο οποίος και επιτυγχάνεται από τους σ2 προσδέτες που απορρυθμίζουν τα κανάλια του ενδοπλασματικού δικτύου και κατ'επέκταση την εσωτερική κυτταρική ομοιόσταση.

Κατά καιρούς, έχουν υπάρξει διάφορες μελέτες που αφορούν τον ρόλο της σιραμεσίνης συγκεκριμένα στον καρκίνο και το πώς δρα σε διάφορους τύπους καρκίνου. Ειδικά, το 2008 έγινε και μία μελέτη σχετικά με την σιραμεσίνη και την σύνδεσή της με την διαδικασία της αυτοφαγίας ως αντικαρκινική προσέγγιση (Ostenfeld et al. 2008), όπου βρέθηκε ταχεία συσσώρευση της στα λυσοσώματα των καρκινικών κυττάρων και την αποσταθεροποίησή τους, όπως επίσης βρέθηκε ότι επηρεάζει την εξαρτώμενη από Atg6 και Atg7 συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων πράγμα που σχετίζεται με την αναστολή του στόχου του συμπλέγματος 1 της ραπαμυκίνης (rapamycin complex 1; mTORC1, αναστολέας αυτοφαγίας. Έτσι, και σε μελέτες με άλλους σ2 προσδέτες (SV119, WC-26 & RHM-138) με αναστολή του mTOR μονοπατιού και αύξηση των επιπέδων LC3 (a/b) που αποτελεί και δείκτη αυτοφαγίας, επιτεύχθηκε η διέγερση της αυτοφαγίας (Sarkar 2013) προτείνοντας έτσι και κυτταροπροστατευτική δράση. Αργότερα, το 2018 (Pati et al. 2018b) σε μελέτες που έγιναν πιο ειδικά στον παγκρεατικό καρκίνο, οι ερευνητές έδειξαν ότι η στόχευση

με σ2 προσδέτες, όπως παραδείγματος χάρη η σιραμεσίνη οδηγεί στην ενεργοποίηση διαφόρων μηχανισμών κυτταρικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά τους μεν με λιγότερες παρενέργειες δε, σε σύγκριση με τις ίδιες θεραπευτικές προσεγγίσεις αλλά χωρίς τη στόχευση των σ2 υποδοχέων (Kashiwagi et al. 2007).

Στα πλαίσια αυτά ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εμβάθυνση στην κατανόηση της δράσης της σιραμεσίνης, ενός σ2 αγωνιστή, εστιάζοντας κυρίως στον τύπο του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την ουσία αυτή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε για πρώτη φορά ως μοντέλο καρκινικό κυτταρικό πληθυσμό που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας απευθείας από όγκο παγκρέατος από ασθενή. Η εργασία επικεντρώθηκε κυρίως στην επαγωγή του αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου αλλά και στη διαδικασία της απόπτωσης μέσω την μελέτης πρωτεϊνών ειδικών για τον κάθε τύπο.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Γενικά

Για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας, προκειμένου να ολοκληρωθεί το πειραματικό κομμάτι έπρεπε να πραγματοποιηθεί μία διαδοχή τεχνικών και αναλύσεων αποτελεσμάτων. Αρχικά, πρώτο στάδιο ήταν η απομόνωση και η καλλιέργεια των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Πρόκειται για κύτταρα που αποτελούν *ex vivo* πρωτογενείς παγκρεατικούς καρκινικούς κυτταρικούς πληθυσμούς που απομονώθηκαν απευθείας από ασθενή και εγκαθιδρύθηκαν στο εργαστήριό μας ήδη και στα οποία δόθηκε και η ονομασία «AT-021013» (Διδακτορική Διατριβή, Ευαγγελία Α. Σερέτη). Στην συνέχεια, ακολούθησε η διαδικασία της επώασης των κυττάρων AT-021013 με Siramesine. Η Siramesine που χρησιμοποιήθηκε είναι ευγενική χορηγία της εταιρίας Lundbeck (Heading 2001; Σερέτη Ευαγγελία, 2019). Η Siramesine μελετήθηκε στα κύτταρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (5μM, 10μM και 20μM) και διάφορες χρονικές στιγμές, οι οποίες φάνηκε σκόπιμο να επιλεγούν μετά από προκαταρκτικές μελέτες (Σερέτη Ευαγγελία, 2019). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από κύτταρα AT-021013 που επώαστηκαν με την Siramesine ώστε να μελετηθούν οι αλλαγές σημαντικών πρωτεϊνών-τελεστών για το μονοπάτι της αυτοφαγίας στις διάφορες συγκεντρώσεις και χρονικά σημεία.

Πίνακας 6: Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες:

Θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco, code: 2194780)
Εμβρυϊκός ορός μοσχαριού 5% [FBS: Fetal Bovine Serum] i) (Biosera, code: 1001G) ii) (Biowest, 500D810008)
L- γλουταμίνη (Gibco, code: 2165253)
Πενικιλίνη / Στρεπτομυκίνη (Gibco, code: 2145465)
Κλίβανος επώασης στους 37° C, ατμόσφαιρας 5% CO ₂ και 95% υγρασία
Θρυψίνη (Gibco, code: 15090-046)

2.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταροκαλλιέργειες αποτελούν μία εργαστηριακή μέθοδο ανάπτυξης κυττάρων (είτε ευκαρυωτικών είτε προκαρυωτικών) σε συνθήκες *in vitro* που να προσομοιάζουν όσο το δυνατόν γίνεται τις φυσιολογικές συνθήκες (Segeritz, 2017). Όπως αναφέρθηκε, τα κύτταρα που αποτέλεσαν το κέντρο της μελέτης ήταν παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα από ασθενή (AT-021013). Τα κύτταρα αυτά, καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με ορό 5% (FBS), 1% L- γλουταμίνη (2mM), 1% πενικιλίνη (100 U/ml) και στρεπτομυκίνη (100μg/ml), όπως αναγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 6, σε συγκεκριμένες συνθήκες επώασης.

Κατά κύριο λόγο, χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες T75 (75cm² επιφάνειας) σε καθεμία από τις οποίες συμπληρώνονταν ο συνολικός τελικός όγκος των 14-15ml σε 5% FBS/RPMI. Οι φλάσκες και ο πλαστικός εξοπλισμός γενικά προμηθεύτηκε από την εταιρία Thermo Scientific. Κάθε φορά επιλεγόταν και κρατούνταν ο κυτταρικός πληθυσμός που ήταν προσκολλημένος στην επιφάνεια της φλάσκας (attached cells) και όχι αυτός ο οποίος αιωρούταν (floating cells).

2.3 Επώαση των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων με Siramesine

Σύμφωνα με το Thermo Fisher, η πυκνότητα έναρξης καλλιέργειας (seeding density) ορίζεται στα $\sim 2 \times 10^6$ κύτταρα ανά φλάσκα καλλιέργειας (Useful Numbers for Cell Culture | Thermo Fisher Scientific - GR n.d.). Αρχικά, τοποθετήθηκε σε κάθε φλάσκα T75 ο εναρκτήριο πληθυσμός κυττάρων που προαναφέρθηκε ($\sim 2 \times 10^6$ κύτταρα) και κρατήθηκαν στον κλίβανο επώασης στις συνθήκες που αναφέρθηκαν για 24 περίπου ώρες. Ύστερα από 24 ώρες έγινε η προσθήκη του φαρμάκου της Σιραμεσίνης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν να μελετηθούν. Αναλυτικά στον Πίνακα 7, αναγράφονται οι συγκεντρώσεις (5, 10 και 20μM) της ουσίας και οι καθορισμένες χρονικές στιγμές στις οποίες σταματούσε και η έκθεση των κυττάρων σε αυτή. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα επώασης με σιραμεσίνη.

Στο τέλος κάθε επώασης με την ουσία, συλλεγόταν τα κύτταρα που υπήρχαν και στο υπερκείμενο και αυτά που ήταν προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας. Κατά τη διαδικασία αυτή, ύστερα από την απομάκρυνση του φαρμάκου, έγινε

συλλογή των κυττάρων για περαιτέρω ανάλυσή τους. Για την διαδικασία της Western Blot τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν με PBS (phosphate-buffered saline, pH=7,4) 1X 3φορές στις 1200 στροφές (rpm) για 5 λεπτά, και τα κυτταρικά ιζήματα που προέκυψαν διατηρήθηκαν στους -80°C . Το PBS που χρησιμοποιήθηκε παρασκευάστηκε με χλωριούχο Νάτριο (NaCl), χλωριούχο κάλιο (KCl), όξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) και δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) βάση της eLABProtocols (Bio-Tech product). Μετά, πραγματοποιήθηκε λήψη φωτογραφιών για εκάστοτε χρονική ώρα επώασης και συγκέντρωσης με απώτερο σκοπό την οπτική παρατήρηση των οποιοδήποτε διαφορών προέκυψαν μεταξύ τους. Οι λήψεις έγιναν με τη βοήθεια του μικροσκοπίου Axionvert 40 CFL της εταιρίας Zeiss μέσω της κάμερας της ίδιας εταιρίας AxionCam ERc5s και σε μεγέθυνση 5X.

Πίνακας 7: Πίνακας που αναγράφονται οι χρονικές περιόδοι επώασεων ανά συγκέντρωση Σιραμεσίνης (με «X» σημειώνονται όσες ώρες επώασης/συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν και με «-» όσες δεν πραγματοποιήθηκαν) με ένα δείγμα ελέγχου στην ώρα μηδέν και στις 24 ώρες.

<u>Siramesine</u>	5 μM	10 μM	20 μM
Ωρες επώασης / Συγκέντρωση			
3 ώρες	-	X	X
6 ώρες	X	X	X
24 ώρες	X	X	X
48 ώρες	X	X	-

Προκειμένου να γίνει υπολογισμός της βιωσιμότητας για τα διαφορετικά χρονικά σημεία και συγκεντρώσεις επώασης με τη Σιραμεσίνη χρειάστηκε η μέτρηση τόσο των ζωντανών όσο και των νεκρών κυττάρων κατά το πέρας του πειράματος. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της Trypan blue (Gibco®, ThermoFisher Scientific), μία χρωστική η οποία βάφει επιλεκτικά μόνο τα νεκρά και όχι τα ζωντανά κύτταρα. Στην μέθοδο της Trypan Blue, χρησιμοποιήσαμε μία ποσότητα από το δείγμα των κυττάρων (90 μl) και μία ποσότητα της χρωστικής (10 μl). Από το μείγμα αυτό τοποθετήθηκαν 10-12 μl στην πλάκα Neubauer όπου μετρήθηκαν τα ζωντανά κύτταρα στα 4 διαφορετικά τεταρτημόρια της πλάκας. Ωστόσο, ο υπολογισμός των ζωντανών κυττάρων ανά ml δόθηκε από τον τύπο (1):

$$\text{Ζωντανά κύτταρα ανά ml} = a \times \beta \times 10^4 \quad (1)$$

Όπου: a = Μέσος όρος του αριθμού των ζωντανών κυττάρων που μετρήθηκαν στη Neubauer και β = συντελεστής αραιώσης των κυττάρων στο μείγμα μέτρησης.

Έτσι, είναι δυνατή με αυτόν τον τρόπο η καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων με την πλάκα Neubauer. Η βιωσιμότητα υπολογίστηκε από τον τύπο (2) και αποσκοπούσε στο να δώ πόσα κύτταρα επιβίωσαν σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που είχα τοποθετήσει σε φλάσκες κάθε χρονικού σημείου και διαφορετικής συγκέντρωσης Σιραμεσίνης.

$$\% \text{Βιωσιμότητας} = \frac{\text{ζωντανά κύτταρα}}{\text{συνολικός αριθμός κυττάρων}} \times 100\% \quad (2)$$

2.4 Μέτρηση της Κυτοκερατίνης 18 (K18) από τα “AT-021013”

Η K18 είναι μία ενδοκυττάρια πρωτεΐνη (Camuzcuoğlu et al. 2019; Cummings et al. 2008) που όταν ανιχνεύεται εξωκυττάρια αποτελεί δείκτη του αποπτωτικού αλλά και του νεκρωτικού θανάτου. Κατά την διάρκεια της νέκρωσης, η απώλεια της συνοχής της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην απελευθέρωση της K18. Στην απόπτωση που αναπαριστά έναν ενεργό τύπο κυτταρικού θανάτου, αρχικά υπάρχει διάρρηξη της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης και ύστερα ακολουθείται από δευτερογενή νέκρωση όπου απελευθερώνονται ενδοκυττάρια συστατικά συμπεριλαμβανομένης και της K18. Η K18 στοχεύεται από τις κασπάσες κατά την διαδικασία της απόπτωσης.

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης της εκκρινόμενης Κυτοκερατίνης 18 (K18) από τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα ασθενούς χρησιμοποιήθηκε ένα kit της Reviva, που ονομάζεται M65 EpiDeath® ELISA kit. Η M65 EpiDeath ELISA είναι μία διαδικασία ενζυμικής στερεής φάσης μορφής «sandwich» (solid-phase sandwich enzyme immunoassay) και χρησιμοποιεί δύο ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού (M5, IgG2b & M6, IgG2a) για διαφορετικό επίτοπο της K18. Το M5 βρίσκεται στον πάτο των μικροπλακιδίων ενώ το M6 είναι προσδεδεμένο με το HRP (Horseradish Peroxidase). Το M65 EpiDeath® ELISA μπορεί να εντοπίσει ειδικά τον

καρκινικό κυτταρικό θάνατο που λαμβάνει χώρα στα ποντίκια που φέρουν ανθρώπινα ξενομοσχεύματα.

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης αυτής χρειάστηκε η συλλογή υπερκειμένου/δείγματος από την διαδικασία της έκθεσης των κυττάρων στην Σιραμεσίνη που περιγράφηκε παραπάνω. Σκοπός της είναι, έχοντας 8 δείγματα αναφοράς και δημιουργώντας μία πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων, να βρούμε ακριβώς την συγκέντρωση της K18 στα δείγματα μας. Η συγκέντρωση αυτή εκφράζεται σε Unit per Litre (U/L).

Αρχικά χρησιμοποιήσαμε 25μL από τα δείγματά μας (τα οποία είναι cell-free supernatant) στο οποίο προστέθηκε το μείγμα αντιδραστηρίων με τα αντισώματα M65 (75 μl) σε θερμοκρασία δωματίου και επώαστηκε για 4 ώρες. Στην συνέχεια, έγιναν πλύσεις με ειδικό καθαριστικό διάλυμα του Kit. Ύστερα, προστέθηκε το υπόστρωμα με το χρωμογόνο (TMB υπόστρωμα) με το οποίο τα μικροπλακίδια επώαστηκαν σε σκοτάδι για 20 λεπτά ώστε να δράσει το χρωμογόνο. Τέλος, τερματίστηκε η αντίδραση με διάλυμα θειϊκού οξέος (stop buffer) και έγινε φωτομέτρηση των δειγμάτων μας αλλά και των δειγμάτων αναφοράς σε μήκος κύματος 450nm (single wave).

2.5 Ανάλυση και ανίχνευση πρωτεϊνών

2.5.1. Λύματα κυττάρων

Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν προηγουμένως για την διαδικασία της Western blot, προκειμένου να μπορέσουν να ηλεκτροφορηθούν οι πρωτεΐνες του κάθε δείγματος, προηγήθηκε η λύση τους. Η λύση, πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια ενός διαλύματος πρωτεϊνικής εκχύλισης που ονομάζεται RIPA (RIPA Buffer 10X, Cell signaling #9806S) στο οποίο προστέθηκαν αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών (Phosphate/Protease Inhibitors, pI, Cell signaling #5872S) που όλο μαζί το μείγμα είναι γνωστό και ως «Lysis Buffer». Η αντιστοιχία της ποσότητας του διαλύματος αυτού ήταν 60μL ανά 10^6 κύτταρα. Ο ρόλος των αναστολέων των πρωτεασών έγκειται στο να μην καταστρέφονται οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο μείγμα, και αντίστοιχα ο ρόλος των αναστολέων φωσφατασών αφορά τις φωσφορυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών.

Κάθε δείγμα επωάστηκε για 30 λεπτά στον πάγο με συχνή και καλή ανάδευσή τους σε εργαστηριακό Vortex με σκοπό την όσο καλύτερη επίτευξη της ομοιογένειάς τους αλλά και την επιτυχή δράση των ενζύμων που έχουν προστεθεί. Ακολούθησε φυγοκέντρησή τους στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4° C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τουλάχιστον άλλες δύο φορές έως ότου το δείγμα (πρωτεϊνικό λύμα) να γίνει όσο το δυνατόν πιο διαυγές γίνεται και σε κάποιες περιπτώσεις για καλύτερο αποτέλεσμα επιλέγεται η χρήση υπερήχων (sonication).

Πίνακας 8: Σύνθεση πηκτωμάτων πακεταρίσματος και διαχωρισμού:

	Πήκτωμα πακεταρίσματος	Πήκτωμα διαχωρισμού
	5%	12%
ddH ₂ O	5,7 ml	3,4 ml
30% ακρυλαμίδη	1,7 ml	4 ml
1,5M Tris Base, pH= 8,8	-	2,5 ml
0,5M Tris Base, pH= 6,8	2,5 ml	-
20% SDS	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	50μl	50μl
TEMED	5μl	5μl

2.5.2. Μέθοδος Bradford : Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Αφού ολοκληρωθεί η λύση των κυττάρων, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, προκειμένου να μπορέσει να ολοκληρωθεί ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του κάθε λύματος, πραγματοποιείται η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή προϋποθέτει την χρήση ενός ειδικού kit [Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo, 23227)] και βασίζεται στη δημιουργία μίας πρότυπης καμπύλης βασισμένης σε γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνη, την αλβουμίνη. Η μέτρηση γίνεται έμμεσα μέσω φωτομέτρησης σε μήκος κύματος 540nm (single wave) σε φωτόμετρο της Bio-Tek Instruments (Microplate reader, EL311S), με υπολογισμό των συγκεντρώσεων τον υπό μελέτη πρωτεϊνών με την βοήθεια του Microsoft Excel 2010. Λόγω κάποιων μικρών ποσοτήτων δείγματος, επιλέχθηκαν ως ποσότητα επιθυμητής πρωτεΐνης τα 19μg. Κατά την διαδικασία της Bradford χρησιμοποιούνται 96-well plates, όπου σε κάθε πηγαδάκι που θα χρησιμοποιήσουμε θα προστεθούν 5μl του εκάστοτε δείγματος, 20μl PBS 1X

και τέλος 200μl του αντιδραστηρίου AB. Η αναλογία για την κατάλληλη παρασκευή του μίγματος του αντιδραστηρίου είναι A:B=50:1.

2.5.3. Προετοιμασία πήκτωματος πολυακρυλαμίδης

Αναφορικά με το πήκτωμα που χρησιμοποιείται στην μέθοδο αυτή, πρόκειται για ένα ασυνεχές πήκτωμα SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Electrophoresis Gel) στο οποίο τελικώς θα διαχωριστούν οι πρωτεΐνες βάση μεγέθους τους (μοριακό βάρος). Αυτό αποτελείται από ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel, 5%) και ένα διαχωρισμού (resolving gel, 12%). Το πήκτωμα διαχωρισμού εξαρτάται από τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που θα μελετηθούν, με αντιστρόφως ανάλογη σχέση (όσο μικρότερα τα προς μελέτη μοριακά βάρη, τόσο μεγαλύτερο και το ποσοστό του πηκτώματος διαχωρισμού).

Η παρασκευή των δύο πηκτωμάτων, όπως αναγράφεται στον πίνακα 8, γίνεται με τη χρήση ddH₂O, 30% ακρυλαμίδη (Serva, 10687.01), ρυθμιστικό διάλυμα (Tris Base), 20% SDS (ανιονικό απορρυπαντικό που συνδράμει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και την αρνητική τους φόρτιση) , 10% υπερθειικό αμμώνιο APS (Ammonium peroxodisulfate, Serva, 13375.01) και TEMED (Sigma, BCBV7969). Ο σχηματισμός του πηκτώματος οφείλεται στους δύο παράγοντες πολυμερισμού, το APS και το TEMED, με το τελευταίο να καταλύει τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών από το πρώτο. Σημαντικό ρόλο επίσης, παίζει το pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων τα οποία πρέπει να μετρώνται κάθε φορά.

2.5.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών μέσω της μετακίνησής τους στο ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται (Thermo Fisher - GR n.d.). Ο ρόλος του SDS μέσα στη γέλη πολυακρυλαμίδης παίζει καταλυτικό ρόλο στην διαδικασία αυτή, προσδίδοντας αρνητική φόρτιση στις πρωτεΐνες που μελετώνται και προωθώντας τις στο να κινηθούν κατά μήκος του ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης που δημιουργείται και του θετικά φορτισμένου ηλεκτροδίου. Οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους κινούνται γρηγορότερα σε σχέση με αυτές μεγαλύτερου.

Για την διεκπεραίωση των ηλεκτροφορήσεων για την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαδοχικά πήκτωμα διαφορετικών συγκεντρώσεων, προσδίδοντας και τον ασυνεχή τρόπο ηλεκτροφόρησης. Πιο ειδικά, το πήκτωμα πακεταρίσματος είναι αυτό στο οποίο εισάγονται οι πρωτεΐνες και εξυπηρετεί το «πακετάρισμα» των πρωτεϊνών συμπυκνώνοντάς τες σε μία μικρή ζώνη με σκοπό την ταυτόχρονη είσοδό τους στο πήκτωμα διαχωρισμού. Από την άλλη, το πήκτωμα διαχωρισμού βρίσκεται ακριβώς από κάτω, και σε αυτό διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες βάση του μοριακού τους βάρους.

Η μέθοδος πραγματοποιείται, αφού πρώτα έχουν υπολογιστεί οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων με ίση και συνολική ποσότητα πρωτεΐνης στα 19μg. Προκειμένου να φορτωθούν τα δείγματα στα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, θα πρέπει να προστεθεί σε αυτά ένα διάλυμα φορτώσεως, γνωστό και ως «loading buffer», το οποίο απαρτίζεται από: ρυθμιστικό διάλυμα Tris base (0,5 M & pH= 6,8), 0,2% μπλε της βρωμοφαινόλης, 20% SDS, γλυκερόλη και β-μερκαπτοαιθανόλη. Αφού προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα δείγματος, προστίθεται αντίστοιχα και κατάλληλη ποσότητα PBS 1X ώστε να επιτευχθεί ο συνολικός όγκος που έχει επιλεγεί, και τέλος η κατάλληλη ποσότητα του Loading buffer. Στην συνέχεια, προκειμένου να επιτευχθεί η αποδιάταξη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι αναγκαία η θέρμανση σε 95oC για 5 λεπτά, και κατόπιν η τοποθέτηση σε πάγο ώστε να υγροποιηθούν οι υδρατμοί που δημιουργήθηκαν και να μην χαθεί ποσότητα δείγματος. Στην συνέχεια, γίνεται η φόρτωση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής των πηκτωμάτων, προσθέτοντας σε ακραίες θέσεις έναν μάρτυρα (marker) με γνωστό μοριακό βάρος (Lonza, ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker, 00193837). Η τάση υπό την οποία θα ηλεκτροφορηθούν τα δείγματα είναι σταθερή στα 100V μέσα στο πήκτωμα πακεταρίσματος μέχρι και την αρχή του πηκτώματος διαχωρισμού, και στη συνέχεια γίνεται αλλαγή της τάσης στα 200V μέχρι και το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

2.4.5. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF (Transfer)

Καταλυτικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας είναι η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη PVDF (διφθοριούχου πολυβινυλιδίνης) μεγέθους πόρων 0,22 μm (Immobilon-PSQ Transfer Membrane Millipore, ISEQ85R). Το διάλυμα το οποίο συνδράμει σημαντικά στην διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών ονομάζεται «Transfer Buffer», το οποίο αποτελείται από γλυκίνη,

μεθανόλη 20% και ρυθμιστικό διάλυμα (Tris-Base) 25mM. Αρχικά πραγματοποιείται ενεργοποίηση της μεμβράνης για 15 δευτερόλεπτα σε καθαρή μεθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και κατόπιν ξεπλένεται σε καθαρό νερό (ultra pure) και ύστερα τοποθετείται σε transfer buffer για την εξισορρόπησή της. Το transfer buffer είναι αυτό μέσα στο οποίο θα πραγματοποιηθεί και η μεταφορά των πρωτεϊνών, με τη βοήθεια ηλεκτρικού ρεύματος τάσης 100V έντασης περίπου 250mA, σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα και 15 λεπτά (ως ότου αυξηθούν κατά 100 τα mA, δηλαδή από 250 να γίνει 350mA). Πριν την διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών από πήκτωμα, κρατήθηκε για 10-15 λεπτά το πήκτωμα μέσα στο transfer buffer 1X.

2.4.6. Western Blot: Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η τεχνική της Western Blot, αποτελείται από τρία σημαντικά στοιχεία τα οποία εν τάχει είναι α) ο διαχωρισμός βάσει μεγέθους, β) μεταφορά σε σταθερό υπόστρωμα (μεμβράνη) και γ) η στόχευση της επιθυμητής πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας το κατάλληλο πρωταρχικό και δευτερεύον αντίσωμα με σκοπό την οπτικοποίηση τελικά του αποτελέσματος (Mahmood and Yang 2012).

Πίνακας 9: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην Western Blot

	<u>Αντισώματα</u>	<u>Εταιρία / Κωδικός</u>
<u>Πρωταρχικά</u> (primary) αντισώματα 1:1000	Beclin-1 (D40C5)	Cell Signaling / #3495
	proCaspase-3 (D3R6Y)	Cell Signaling/ #9915
	LC3 I/II (D304C)	Cell Signaling/ #12741
<u>Δευτερεύοντα</u> (secondary) αντισώματα 1:8000	Anti-Rabbit	Cell Signaling/ #7074

Στο συγκεκριμένο πείραμα, ύστερα της μεταφοράς πρωτεϊνών στην μεμβράνη, γίνεται επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ένα κατάλληλο διάλυμα που περιείχε ορό, το οποίο έχει ως ειδικότητα να δεσμεύει τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης. Το είδος αυτού του διαλύματος, γνωστό και ως «blocking buffer» συνήθως διαφέρει μεταξύ των διαφόρων αντισωμάτων και ορίζεται από το

πρωτοκόλλο του εκάστοτε αντισώματος. Ύστερα, προστίθενται τα πρώτα αντισώματα στις μεμβράνες τα οποία και επωάζονται ολονύκτια στους 4 °C. Τα πρώτα αντισώματα χρησιμοποιούνται σε αραίωση 1/1000 και αναγράφονται στον Πίνακα 9. Στην συνέχεια, απομακρύνθηκε το πρώτο αντίσωμα , έγιναν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TTBS 1X (Tris-Buffered Saline, 0,1% TWEEN® 20 Detergent) και προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα. Στις προκειμένες περιπτώσεις ήταν το Anti-Rabbit (για κάθε αντίσωμα το δεύτερο αντίσωμα ορίζεται από το ειδικό πρωτόκολλο κάθε αντισώματος) και η αραίωσή του ήταν 1/6000. Τέλος, με σκοπό τελικά την απεικόνιση, χρησιμοποιήθηκε ένα υπόστρωμα ενίσχυσης της χημειοφωταύγειας που ονομάζεται ECL (Biorad, Clarity™ Western ECL Substrate, 170-5060) με το οποίο κάθε μεμβράνη πριν την απεικόνισή της επώαστηκε για 5 λεπτά. Η απεικόνιση πραγματοποιείται μέσω χημειοφωταύγειας του μηχανήματος Uvitec Cambridge σε συνδυασμό με το λογισμικό Alliance (Version 16.06).

Η διαδικασία της Western Blot πραγματοποιήθηκε από δύο φορές για κάθε διαφορετικό και ανεξάρτητο πείραμα επώασης με σιραμεσίνη.

Η ποσοτικοποίηση της απεικόνισης των αποτελεσμάτων σε σχέση με την ακτίνη (housekeeping protein) έγινε με τη χρήση του προγράμματος Image J, μία διαδικασία γνωστή και ως «πυκνομετρία». Με αυτόν τον τρόπο, ήταν εφικτή και η συνέχιση της ανάλυσης πέραν της απεικονιστικής σύγκρισης, στην σύγκριση της πυκνότητας των μπαντών που αναπαριστούσε το κάθε αντίσωμα σε κάθε συγκέντρωση και χρονικό σημείο. Με την βοήθεια του Image J, αρχικά έγινε η μέτρηση της ακτίνης (actin) η οποία και αποτέλεσε το αντίσωμα αναφοράς (House keeping gene) και όριζε το ισοφόρτωμα των δειγμάτων (προϋπόθεση αποτελεί το ισοφόρτωμα των δειγμάτων). Στην συνέχεια, έγινε μέτρηση αντίστοιχη με της ακτίνης και για τα υπόλοιπα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (Beclin-1, Casp3 και LC3 a/b).

2.6 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγιναν με τη βοήθεια του excel Microsoft 2010 και του λογισμικού της SPSS®/IBM® έχοντας δεδομένα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Αρχικά, για κάθε συγκέντρωση στα διαφορετικά χρονικά σημεία έγινε στατιστική σύγκρισή τους με το δείγμα ελέγχου που είχαμε. Σκοπός ήταν η κατάληξη

σε ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, κατά το οποίο η τιμή p (p -value) θα έπρεπε να είναι $< 0,05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την διαδικασία της πυκνομετρίας επεξεργάστηκαν με το Excel Microsoft 2010, όπου διαιρέθηκε σε κάθε περίπτωση το αντίσωμα μελέτης με την ακτίνη, δηλαδή: Beclin-1/actin, Casp3/actin, LC3-I/actin και LC3-II/actin. Από τις διαιρέσεις αυτές προέκυψε και το τελικό νούμερο πυκνότητας για κάθε δείγμα και για κάθε αντίσωμα. Με τα αποτελέσματα αυτά δημιουργήθηκαν ιστογράμματα στα οποία φαίνεται η συμπεριφορά της πορείας της έκφρασης καθεμίας πρωτεΐνης όσο αυξάνει η συγκέντρωση και ο χρόνος έκθεσης στη Σιραμεσίνη σε σχέση πάντοτε με ένα δείγμα ελέγχου που υπάρχει σε κάθε περίπτωση (Γραφήματα 2,3,4).

Οι τιμές που προέκυψαν από την πυκνομετρία, με την βοήθεια του SPSS IBM, αναλύθηκαν εφαρμόζοντας independent t-tests, ώστε να βρεθούν και οι p -values που θα βοηθήσουν στην τελική τεκμηρίωση για το αν τα αποτελέσματα αυτά όντως διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (control).

3. Αποτελέσματα

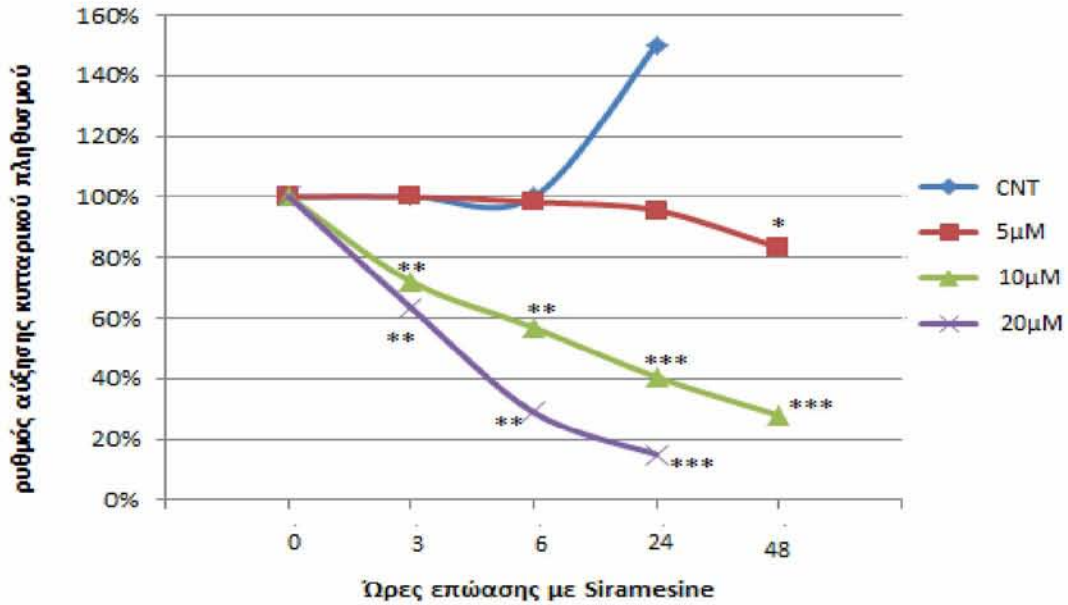
3.1 Βιωσιμότητα ύστερα από έκθεση των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων στη Siramesine

Κατά την έκθεση των «AT-021013» στη Σιραμεσίνη παρατηρήθηκε έντονος κυτταρικός θάνατος που αύξανε ανάλογα με τη συγκέντρωση και το χρόνο επώασης στην ουσία (Εικόνα 9). Στην εικόνα 9 είναι εμφανής η αύξηση του κυτταρικού θανάτου με το πέρασμα του χρόνου αλλά και με την αύξηση της συγκέντρωσης της Σιραμεσίνης. Έτσι, με την μέθοδο της χρώσης των νεκρών κυττάρων με Trypan Blue καταφύγαμε στην μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων που επώαστηκαν με σιραμεσίνη στις διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρονικά διαστήματα. Έτσι, δημιουργήσαμε και τα Γραφήματα 1α και 1β. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν να συμβαδίζουν με την οπτική παρατήρηση σε μικροσκόπιο (Εικόνα 9).

Αρχικά, και όπως φαίνεται στα Γραφήματα 1α και 1β, στη συγκέντρωση της Σιραμεσίνης στα 5μM και σχεδόν σε όλους τους χρόνους επώασης, ο κυτταρικός πληθυσμός παραμένει σε σχετικά σταθερά επίπεδα σε σχέση με τον αρχικό κυτταρικό πληθυσμό των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Όπως φαίνεται για τα χρονικά σημεία των 3,6 και 24 ωρών δεν αλλάζει σημαντικά ο κυτταρικός πληθυσμός ($p>0,05$), ενώ μετά τις 24 ώρες αρχίζει μία πτώση ως και τις 48 ώρες ($p<0,05$). Μια παρατήρηση που μπορεί να γίνει σε αυτό το σημείο είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στην συγκέντρωση των 5μM. Στο δείγμα ελέγχου παρατηρείται αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού κατά τις 24 ώρες, ενώ σε αντίθεση στη συγκέντρωση των 5μM Σιραμεσίνης μέχρι εκείνη τη χρονική στιγμή ο κυτταρικός πληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός. Έτσι, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η συγκέντρωση των 5μM μέχρι κάποιο χρονικό διάστημα επώασης των κυττάρων σε αυτή (24 ώρες) δρα κυτταροστατικά αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

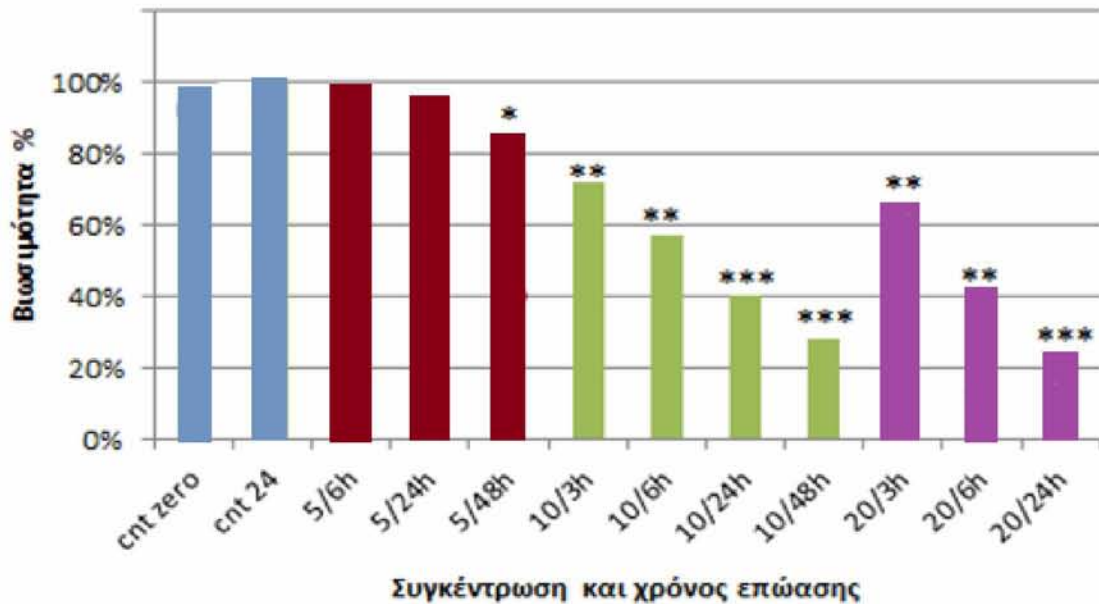
Στη συγκέντρωση των 10μM Σιραμεσίνης παρατηρείται εμφανώς μεγαλύτερος κυτταρικός θάνατος από αυτόν της 5μM (Γράφημα 1α και 1β). Ο κυτταρικός θάνατος στην συγκέντρωση της 10μM σε όλα τα χρονικά σημεία εμφανίζει στατιστική σημαντικότητα. Όπως απεικονίζεται και στα γραφήματα, ο κυτταρικός πληθυσμός «AT-021013» μειώνεται κατά το ήμισυ στις 6 μόλις ώρες επώασης με 10μM Σιραμεσίνη. Με την αύξηση του χρόνου επώασης, ο καρκινικός κυτταρικός

πληθυσμός μειώνεται κατά πολύ φτάνοντας τελικά σε περίπου 20% βιωσιμότητα με μεγάλη στατιστική σημαντικότητα.



Γράφημα 1α: Αναπαράσταση της αύξησης και της μείωσης του κυτταρικού πληθυσμού σε ποσοστό, σε σχέση με τον αρχικό κυτταρικό πληθυσμό.

*; P<0,05, **; p<0,01 και ***; p<0,001 στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα

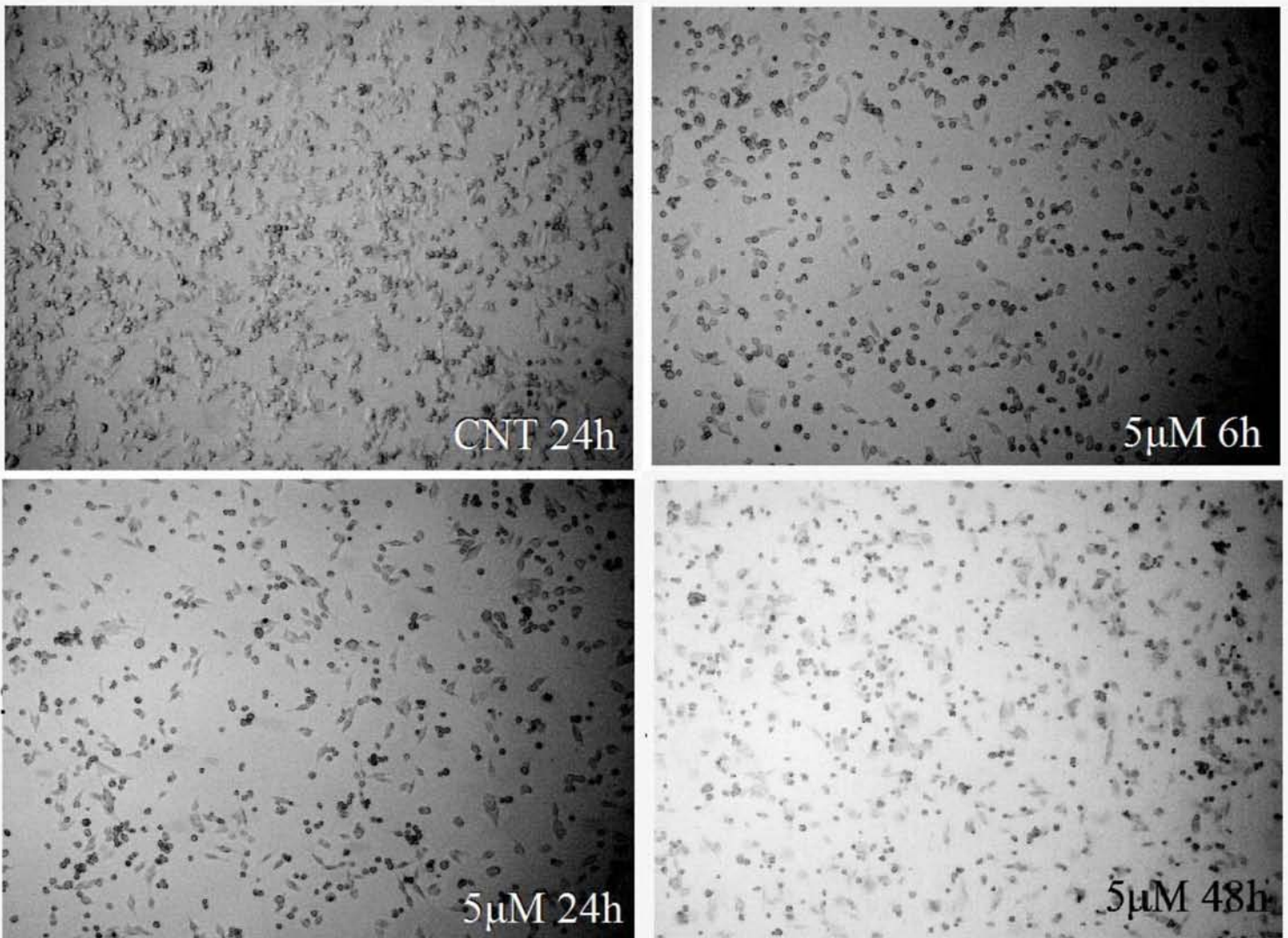


Γράφημα 1β: Ιστόγραμμα αναπαράστασης βιωσιμότητας με μορφή ποσοστού σε σχέση με τον αρχικό κυτταρικό πληθυσμό.

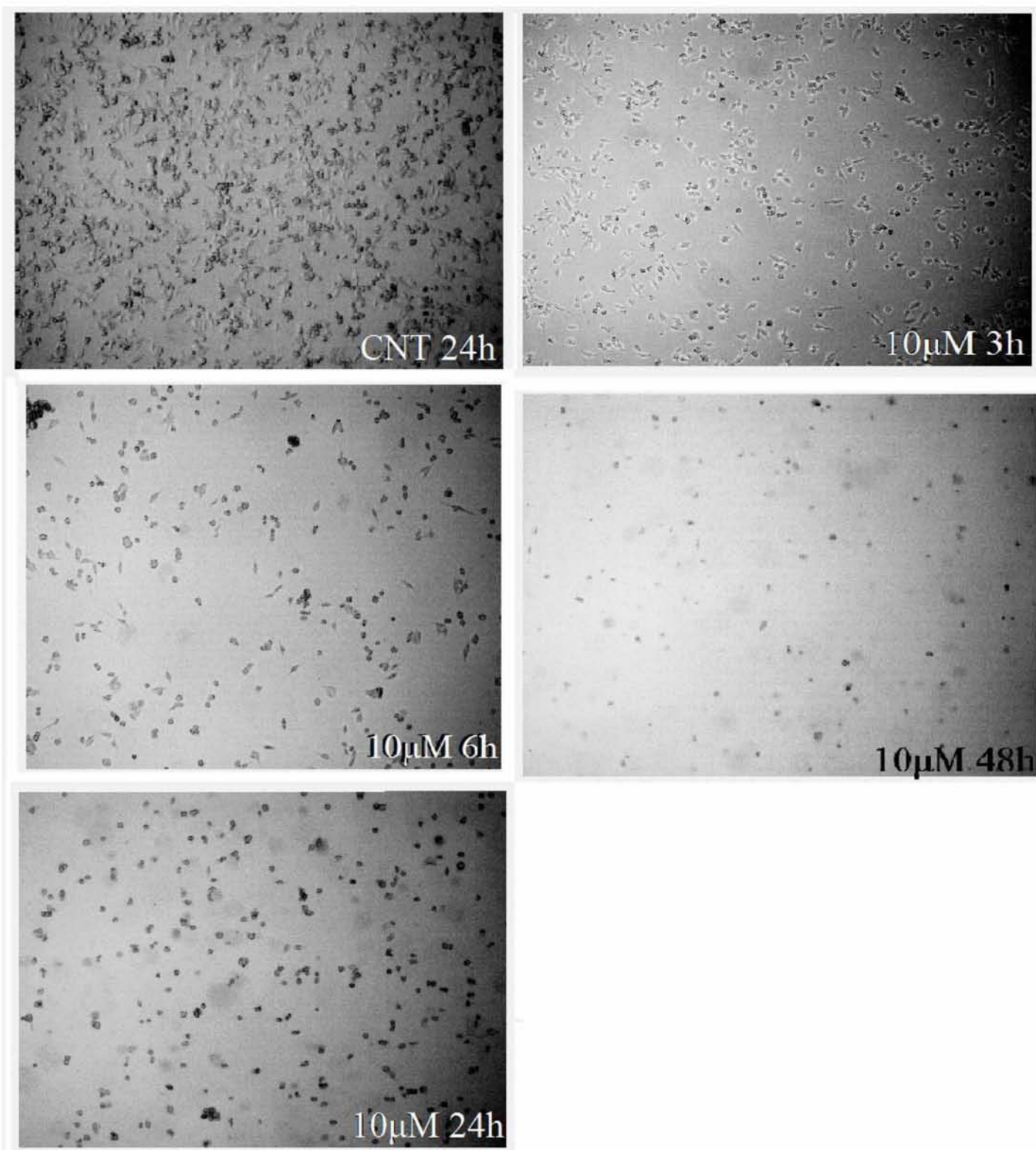
*; P<0,05, **; p<0,01 και ***; p<0,001 στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα

Τέλος, στη συγκέντρωση των 20μM Σιραμεσίνης, ο κυτταρικός θάνατος ξεκινά από πολύ νωρίς με τον κυτταρικό θάνατο να πέφτει σε πολύ χαμηλά επίπεδα με μεγάλη στατιστική σημαντικότητα. Πιο ειδικά, έντονη πτώση της βιωσιμότητας διακρίνεται από τις 3 πρώτες ώρες έκθεσης στην ουσία της Σιραμεσίνης. Στο χρονικό σημείο των 6 ωρών η βιωσιμότητα των κυττάρων αγγίζει το 30% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό. Τέλος, μετά από χρονική επώαση των κυττάρων για 24 ώρες σε αυτή τη συγκέντρωση, η βιωσιμότητα έπεσε κάτω από το 20%.

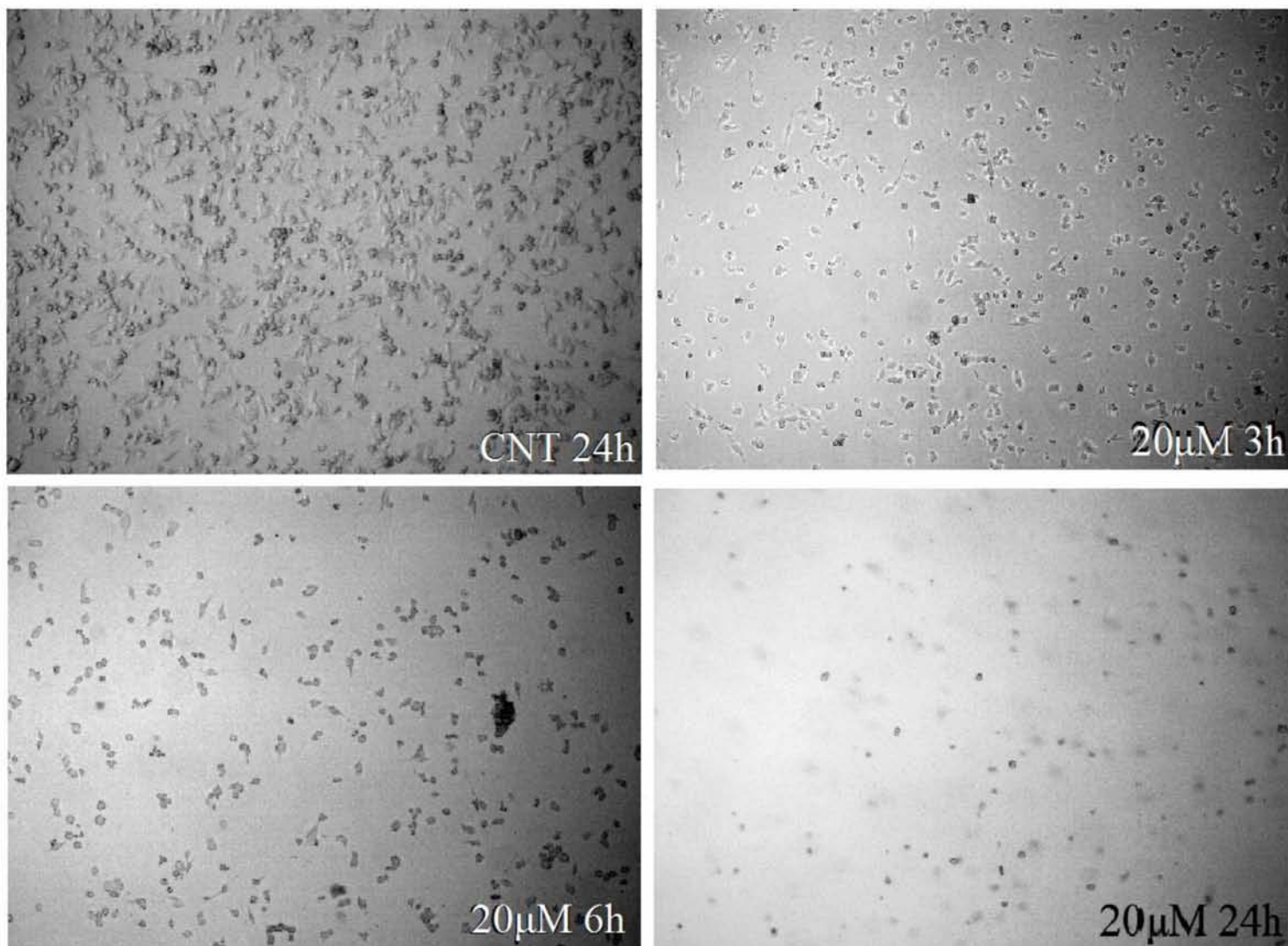
Στατιστικά σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζεται επίσης και μεταξύ των βιωσιμοτήτων στις συγκεντρώσεις των 10μM και των 20μM μεταξύ τους (στο πέρας του χρόνου με $p\text{-value} = 0,0009$ ($p \lll 0,05$) και όχι μόνο συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου.



(a)



(b)

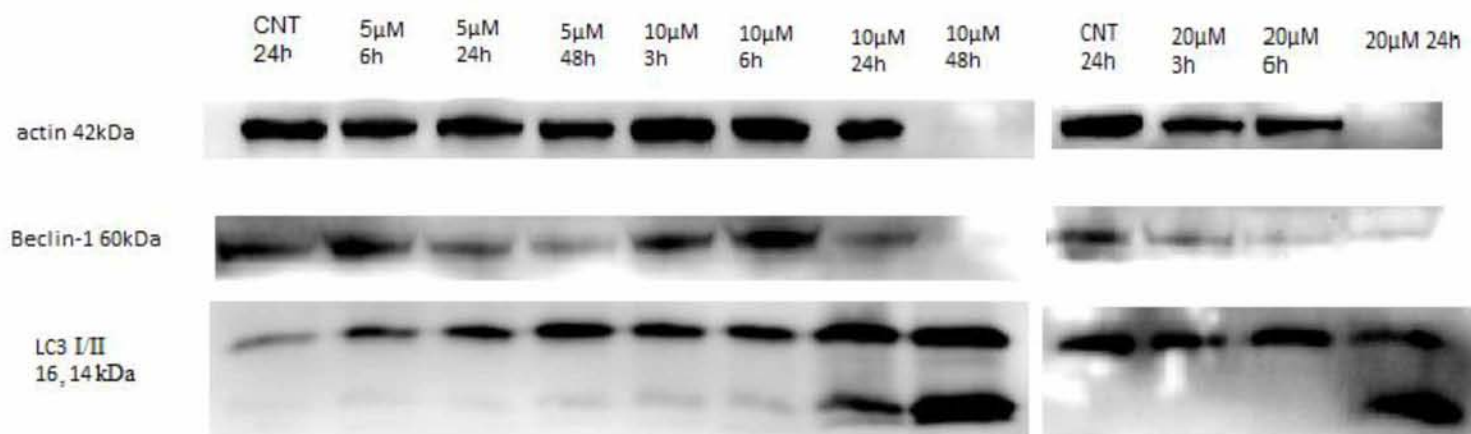


(c)

Εικόνα 9: Φωτογραφίες των «AT-021013» κυττάρων κατά την επώαση με Σιραμεσίνη. Πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του μικροσκοπίου Axionvert 40 CFL της εταιρίας Zeiss και της κάμερας της ίδιας εταιρίας AxionCam ERc5s, σε μεγέθυνση 5X. a) 5μM Σιραμεσίνη σε 6, 24 και 48 ώρες, b) 10μM Σιραμεσίνη σε 3, 6, 24 και 48 ώρες και c) 20μM Σιραμεσίνη σε 3, 6 και 24 ώρες.

3.2 Επίδραση της Σιραμεσίνη στην επαγωγή αυτοφαγικού θανάτου στα «AT-021013»

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η επίπτωση της Σιραμεσίνης στην επαγωγή του αυτοφαγικού θανάτου. Συγκεκριμένα, εστίασαμε στην έκφραση της Beclin-1 και της LC3 I/II σε διάφορους χρόνους επώασης και συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης.

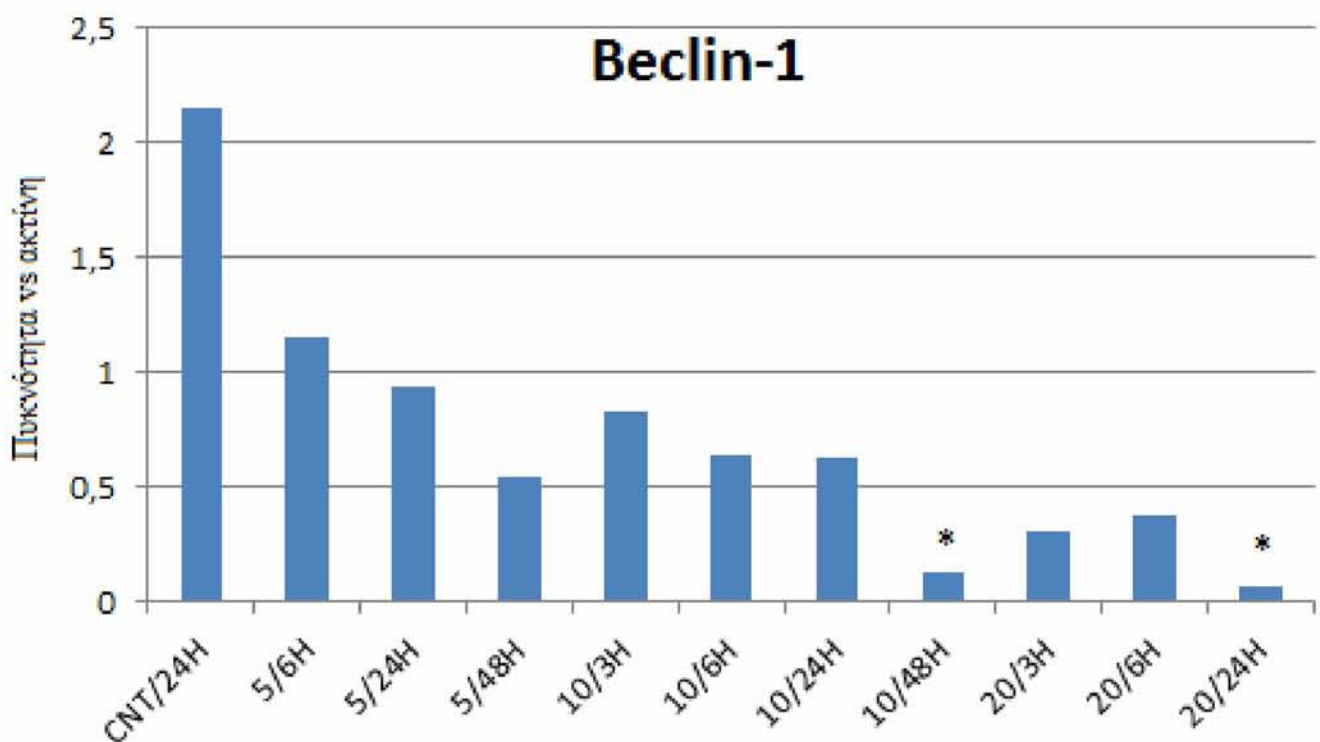


Εικόνα 10: Έκφραση των Beclin-1 και LC3 I/II σε κύτταρα AT-021013 τα οποία επωάστηκαν με σιραμεσίνη για διάφορους χρόνους και με διάφορες συγκεντρώσεις. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος των δειγμάτων.

Η Beclin-1 είναι μία πρωτεΐνη, που όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, είναι βασική για το σχηματισμό του φαγοφόρου κατά την έναρξη της αυτοφαγίας. Στην Εικόνα 10, φαίνεται η σταδιακή πτώση της Beclin-1 όσο αυξάνουν οι συγκεντρώσεις και οι χρόνοι επώασης με την Σιραμεσίνη. Οι μικρότερες συγκεντρώσεις της Beclin-1 εμφανίζονται στη συγκέντρωση των 10μM στις 24 και 48 ώρες και στη συγκέντρωση των 20μM στις 6 και 24 ώρες. Ωστόσο, στατιστικά σημαντικό ενδιαφέρον εμφανίζεται στις 48 ώρες στην συγκέντρωση των 10μM Σιραμεσίνης και στις 24 ώρες των 20μM (Γράφημα 2).

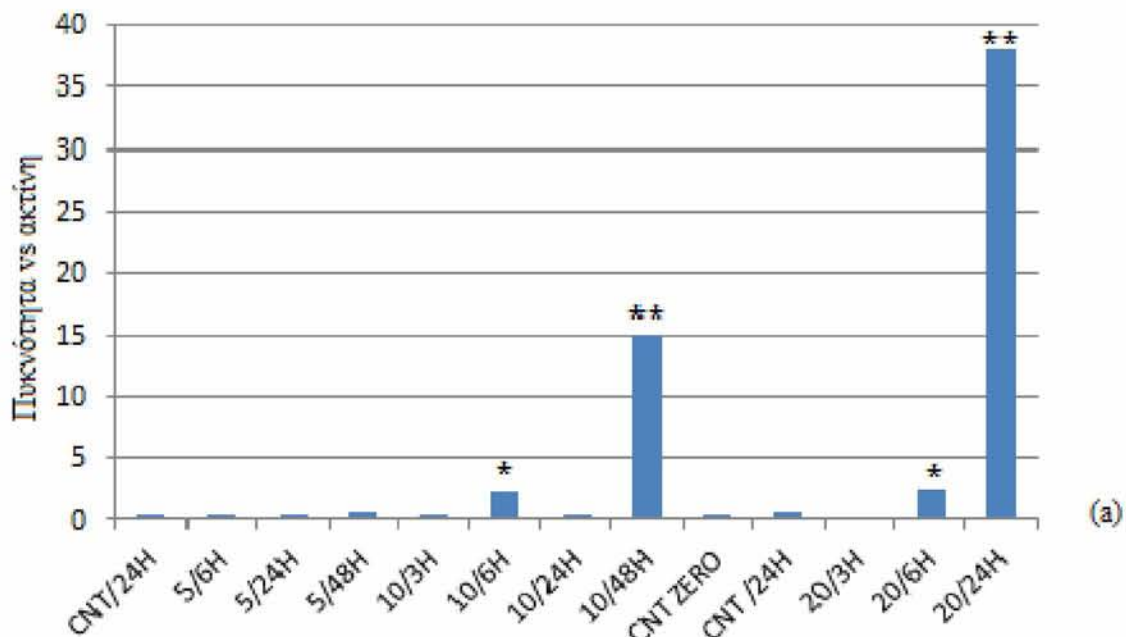
Η LC3 είναι μία βασική πρωτεΐνη κατά τη διαδικασία της αυτοφαγίας, η οποία σηματοδοτεί τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος και αντανakλά προχωρημένα επίπεδα αυτοφαγίας (McLeland, Rodriguez, and Stern 2011 etc). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 10, η συμπεριφορά της LC3 ακολουθεί μία ανοδική πορεία, σε αντίθεση με αυτή της Beclin-1. Η LC3 φαίνεται να αυξάνει όσο αυξάνουν οι συγκεντρώσεις και οι

χρόνοι έκθεσης στη Σιραμεσίνη, προσδίδοντας ένα δοσο- και χρονο- εξαρτώμενο τρόπο επαγωγής της αυτοφαγίας. Κοιτώντας ξεχωριστά την LC3 I και LC3 II σύμφωνα με το Γράφημα 3, ιδιαίτερη αύξηση έχει η LC3 I στην συγκέντρωση των 10μM στις 48 ώρες και στη συγκέντρωση των 20μM στις 24 ώρες ($p<0,01$). Από την άλλη, μεγαλύτερη αύξηση της II από την I εμφανίζεται στην συγκέντρωση των 20μM στις 24 ώρες απεικονίζοντας την αντιστροφή της LC3 I με την II όσον αφορά την συγκέντρωσή τους ($p<0,01$).

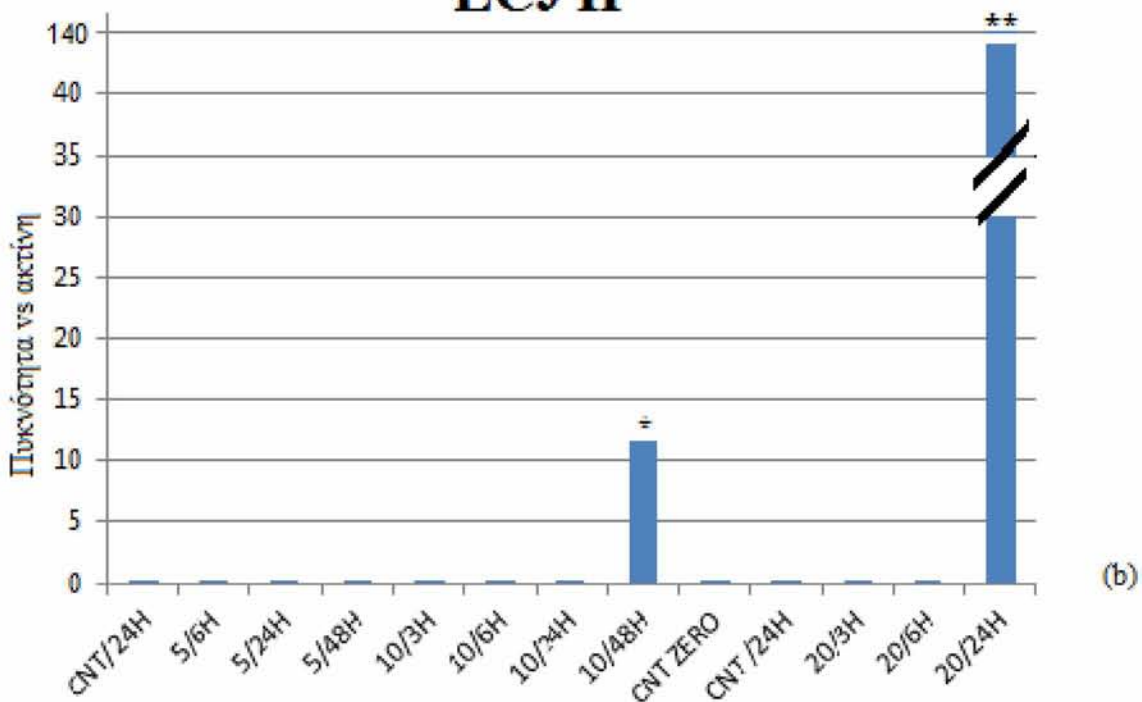


Γράφημα 2: Πυκνομετρία της έκφρασης της Beclin-1 σε σχέση με την actin σε κύτταρα που επωάσθηκαν με διαφορετικές συγκέντρωσης και για διαφορετικούς χρόνους με σιραμεσίνη. Οι ράβδοι δείχνουν τα μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα.
 *; $P<0,05$, **; $p<0,01$ και ***; $p<0,001$ στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

LC3 I



LC3 II

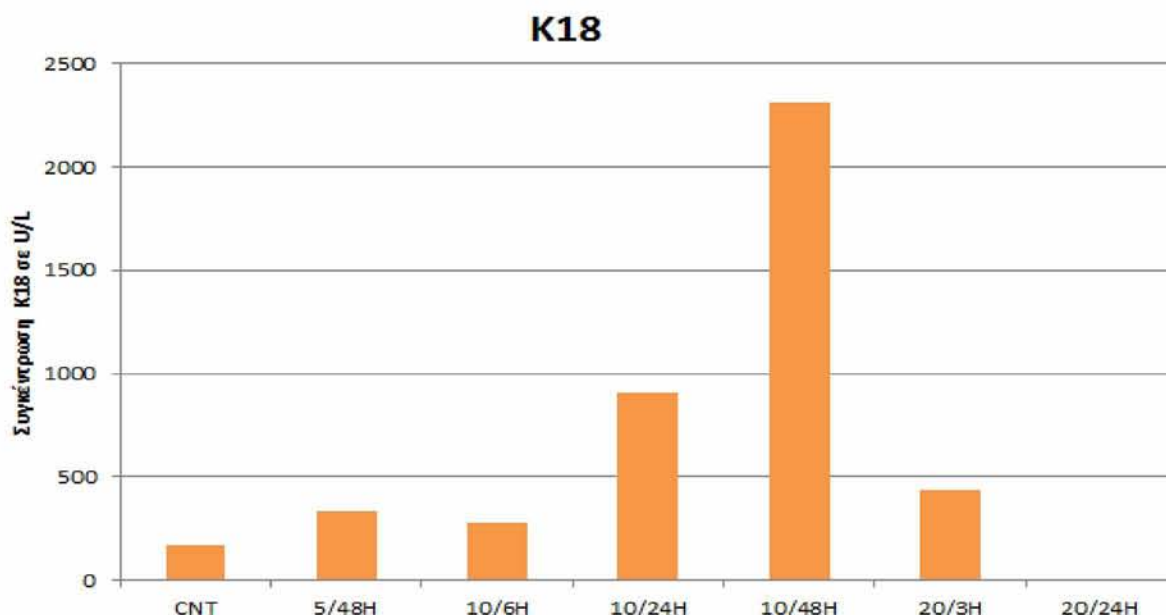


Γράφημα 3a & b: Πυκνομετρία της έκφρασης της LC3 I και II σε σχέση με την ακτίνη σε κύτταρα που επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις και για διαφορετικούς χρόνους με σιραμεσίνη. Οι ράβδοι δείχνουν τα μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

*; $P < 0,05$, **; $p < 0,01$ και ***; $p < 0,001$ στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

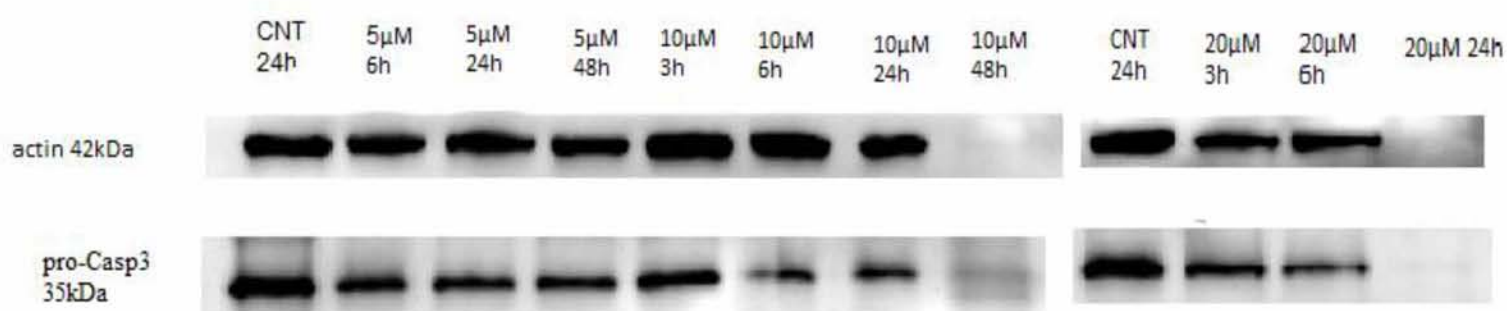
3.3 Επίδραση της Σιραμεσίνη στην επαγωγή απόπτωσης στα «AT-021013»

Ένας τρόπος μέτρησης του κυτταρικού θανάτου μπορεί να πραγματοποιηθεί ύστερα από την μέτρηση της εκκρινόμενης Κυτοκερατίνης 18 (K18). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η K18 είναι μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη από κύτταρα τα οποία βρίσκονται είτε σε απόπτωση είτε σε νέκρωση. Για την μελέτη και την ανάλυση των αποτελεσμάτων αναφορικά με την K18, κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη από τα δείγματα αναφοράς του kit και στην συνέχεια βρέθηκε και η συγκέντρωση στα δείγματά μας σε Unit per Litre (U/L). Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 4, φαίνεται και εδώ η σταδιακή ανοδική πορεία της συγκέντρωσης της ΚυτοΚερατίνης 18 με την αύξηση της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης στην Σιραμεσίνη. Πιο ειδικά, η μεγαλύτερη συγκέντρωση της K18 είναι στη συγκέντρωση των 10 μ M- στις 48 ώρες, η οποία είναι περίπου ίση και με το μεγαλύτερο δείγμα ελέγχου που είχαμε. Τέλος, όσον αφορά την συγκέντρωση της εκκρινόμενης K18 στην συγκέντρωση των 20 μ M Σιραμεσίνης παρουσιάζει ένα διαφορετικό μοτίβο. Μπορούμε να δούμε στο γράφημα 5 υψηλά επίπεδα της K18 στην επώαση των 3 ωρών, ενώ στην επώαση των 24 ωρών η έκκριση της K18 δείχνει να μηδενίζεται.

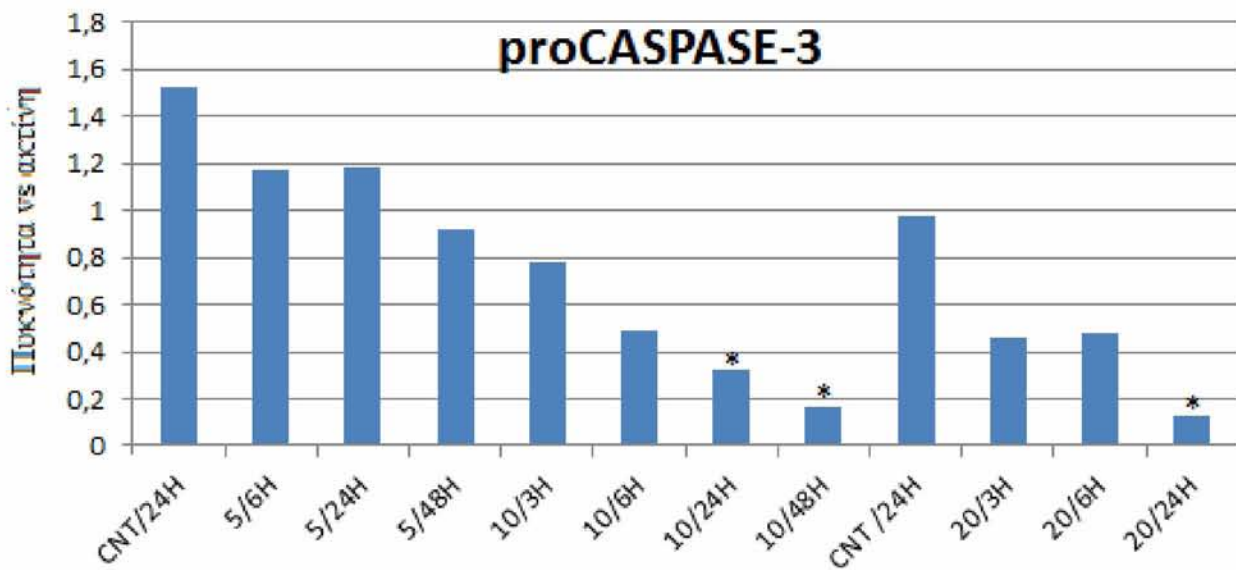


Γράφημα 4: Ιστόγραμμα μέτρησης της έκφρασης της εκκρινόμενης K18 σε κύτταρα που επώασθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις και για διαφορετικούς χρόνους με σιραμεσίνη. Οι ράβδοι δείχνουν τα μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα και αναπαριστούν τις συγκεντρώσεις της K18 σε U/L (M65 EpiDeath® ELISA).

Προκειμένου να διακριθεί εάν υπάρχει ενεργοποίηση της απόπτωσης μετά από επώαση των κυττάρων με σιραμεσίνη, μιας και η K18 μετράει και τον κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από νέκρωση και από απόπτωση. Η επαγωγή της απόπτωσης από την σιραμεσίνη είναι κάτι το οποίο δεν έχει μελετηθεί και πόσο μάλλον σε πρωτογενή καρκινικά κύτταρα και για αυτό το σκοπό προχωρήσαμε στην μελέτη της έκφρασης της pro-Caspase 3, μίας βασικής πρωτεΐνης που παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι της απόπτωσης. Έτσι, η επαγωγή της απόπτωσης από την σιραμεσίνη μελετήθηκε εξετάζοντας την συμπεριφορά της proCaspase-3 στις διάφορες συγκεντρώσεις και χρονικά σημεία του πειράματος. Σύμφωνα με την Εικόνα 11 και το Γράφημα 5, φαίνεται η ενεργοποίηση της Caspase3, βλέποντας την proCaspase-3 να μειώνεται όσο αυξάνει η συγκέντρωση και ο χρόνος έκθεσης στην Σιραμεσίνη. Ιδιαίτερη ενεργοποίηση με στατιστικά σημαντικό ενδιαφέρον εμφανίζεται στη συγκέντρωση των 10μM στις 24 και 48 ώρες και στην συγκέντρωση των 20μM στις 24 ώρες. Πιο καθαρά αυτό φαίνεται στο Γράφημα 5, όπου είναι εμφανής η σταδιακή μείωση της proCaspase-3 οπτικά και άρα ενεργοποίηση της απόπτωσης. Ένα σημείο που αξίζει να τονισθεί στα πιο πάνω αποτελέσματα είναι ότι η ενεργοποίηση της Caspase-3 γίνεται πριν την αύξηση της συγκέντρωσης της LC3 I/II. Παρατηρώντας τις Εικόνες 10 και 11, μπορούμε να δούμε συγκεκριμένα την έναρξη της ενεργοποίησης της Caspase-3 στην συγκέντρωση των 10μM στις 6 ώρες να προηγείται την έναρξης της υπέρμετρης αύξησης της LC3 (10μM στις 24 ώρες).



Εικόνα 11: Έκφραση της pro-Caspase 3 σε κύτταρα AT-021013 τα οποία επώασθηκαν με σιραμεσίνη για διάφορους χρόνους και με διάφορες συγκεντρώσεις. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος των δειγμάτων.



Γράφημα 5: Πυκνομετρία της έκφρασης της pro Caspase 3 σε σχέση με την actin σε κύτταρα που επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις και για διαφορετικούς χρόνους με σιραμεσίνη. Οι ράβδοι δείχνουν τα μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. *, $P < 0,05$, **, $p < 0,01$ και ***, $p < 0,001$ στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορεί να ενισχυθεί η άποψη της έναρξης αλλά και προοδευτικά αυξανόμενου κυτταρικού θανάτου αλλά και πιο συγκεκριμένα, της επαγωγής πέραν της αυτοφαγίας και της απόπτωσης. Και στην απόπτωση, όπως παρατηρήθηκε και κατά την επαγωγή του αυτοφαγικού θανάτου, μπορούμε να πούμε ότι έχουμε επαγωγή της από την Σιραμεσίνη με δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο (dose- & time- dependent).

Συζήτηση – Συμπεράσματα

Η σιραμεσίνη είναι ένας σ^2 αγωνιστής που παρουσιάζει έντονη αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση (Colabufo et al. 2004) και έχει μελετηθεί σε συνδυασμό με διάφορα αντικαρκινικά φάρμακα όσον αφορά το ρόλο της στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου, όπως η αυτοφαγία. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το 2008 πραγματοποιήθηκε μία μελέτη σχετικά με την σιραμεσίνη και την σύνδεσή της με την διαδικασία της αυτοφαγίας στον καρκίνο (Ostenfeld et al. 2008). Από αυτό, βρέθηκε ταχεία συσσώρευση της σιραμεσίνης στα λυσοσώματα των καρκινικών κυττάρων και την αποσταθεροποίησή τους, όπως και ότι επηρεάζει την συσσώρευση των αυτοφαγοσωμάτων. Το 2018 (Pati et al. 2018b) σε μελέτες που έγιναν ειδικά στον παγκρεατικό καρκίνο, οι ερευνητές έδειξαν ότι η στόχευση με σ^2 προσδέτες γενικά, όπως είναι και η σιραμεσίνη, οδηγεί στην ενεργοποίηση διάφορων μηχανισμών κυτταρικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα και με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Μια από τις πιο σημαντικές μελέτες ήταν αυτή των Ma et al. 2017b, που παρατήρησαν σε κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού να επάγεται κυτταρικός θάνατος από τον συνδυασμό της Σιραμεσίνη και της Λαπατινίμπης (Siramesine and Lapatinib), και συγκεκριμένα, η φερρόπτωση αλλά και η αυτοφαγία.

Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η επίδραση της σιραμεσίνης σε πρωτογενή παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα προερχόμενα απευθείας από ασθενή. Τα κενά στη μελέτη του μηχανισμού δράσης της σιραμεσίνης όσον αφορά την επαγωγή κυτταρικού θανάτου εξακολουθούν να είναι σημαντικά καθώς δεν έχει μελετηθεί καθόλου ο ρόλος της στην επαγωγή της διαδικασίας της απόπτωσης. Στα πλαίσια αυτά στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε για πρώτη φορά η δράση της σιραμεσίνης σε πρωτογενή καρκινικό παγκρεατικό κυτταρικό πληθυσμό που αναπτύχθηκε απευθείας από καρκινικό όγκο παγκρέατος από ασθενή τον οποίο ονομάσαμε AT-021013. Μελετήσαμε την επίδραση της Σιραμεσίνης στην βιωσιμότητα των AT-021013 η οποία φάνηκε να μειώνεται σημαντικά και ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης στη Σιραμεσίνη. Ως συνέπεια της πιο πάνω παρατήρησης, σημαντικό κομμάτι της μελέτης μας αποτέλεσε το είδος του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την ουσία στα πρωτογενή καρκινικά

κύτταρα και ειδικότερα, η δράση της σιραμεσίνης στην επαγωγή της αυτοφαγίας και της απόπτωσης.

Προκειμένου να μελετηθεί ο αυτοφαγικός θάνατος εστίασαμε στην μελέτη της έκφρασης της Beclin-1 και της LC3 I/II. Η Beclin-1 είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι με την επαγωγή της αυτοφαγίας αναμένεται να παρατηρηθεί και μείωση της έκφρασης της Beclin-1. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας τα οποία παρουσιάζουν την Beclin-1 να μειώνεται τόσο όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της Σιραμεσίνης όσο και ο χρόνος επώασης των κυττάρων σε αυτή. Από την άλλη, η LC3 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος. Εδώ, αξίζει να αναφερθεί ότι η έκφραση της Beclin-1 προηγείται της LC3 I/II στην διαδικασία της αυτοφαγίας. Όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Chen et al. 2008), ο αυξημένος σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων και η προχωρημένη αυτοφαγία συνοδεύονται και με αυξημένη έκφραση της LC3 I/II. Αυτό ακριβώς παρατηρήσαμε και εμείς στη μελέτη μας, όπου η LC3 ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στις μεγάλες συγκεντρώσεις και στους χρόνους επώασης με Σιραμεσίνη. Κάποια ενδιαφέροντα συμπεράσματα μπορούν να προκύψουν από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων της έκφρασης της Beclin-1 και της LC3 I/II. Αρχικά, σημαντική είναι η παρατήρηση της σταδιακής μείωσης της Beclin-1 ενώ την ίδια στιγμή παρατηρούνται σταδιακή αύξηση της LC3 όσο αύξανε η συγκέντρωση και ο χρόνος επώασης στη Σιραμεσίνη. Η επαγωγή της αυτοφαγίας στον πρωτογενή καρκινικό κυτταρικό πληθυσμό «AT-021013» ενισχύεται και από άλλα ευρήματα της παρούσας εργασίας. Βασικό στοιχείο πέραν της παρατήρησης της ιδιαίτερης αύξησης της LC3 I/II (με I > II) αποτελεί τελικά η αντιστροφή της (II > I) στην συγκέντρωση των 10μM στις 48 ώρες και στην συγκέντρωση των 20μM στις 24 ώρες. Το γεγονός ότι παρατηρείται αντιστροφή της LC3 I με την LC3 II, όπου η II εκφράζεται σε μεγαλύτερα επίπεδα από της I, θεωρείται ένα στοιχείο προχωρημένης αυτοφαγίας (McLeland, Rodriguez, and Stern 2011; Huang et al. 2013). Από τα παραπάνω, μπορούμε και να καταλήξουμε στο συμπέρασμα της επαγωγής του αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου από την Σιραμεσίνη με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο στον πρωτογενή καρκινικό κυτταρικό πληθυσμό που μελετούμε.

Όπως αναφέραμε πιο πάνω, ο ρόλος της σιραμεσίνης στη διαδικασία της απόπτωσης δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία. Η μελέτη της επαγωγής της απόπτωσης πραγματοποιήθηκε έχοντας ως αφορμή την ανίχνευση της

εκκρινόμενης Κυτοκερατίνης 18, μίας πρωτεΐνης που συνδέεται με τον κυτταρικό θάνατο. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της K18 από το M65 ELISA EpiDeath kit μας έδειξαν ότι υπήρχε κυτταρικός θάνατος ο οποίος αφορά την απόπτωση αλλά και την νέκρωση. Η K18 έχει περιγραφεί ως μία πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα αποτελώντας σημαντικό δείκτη επαγωγής κυτταρικού θανάτου και αντικαρκινικής δραστηριότητας (Cummings et al. 2008b; Ku et al. 2016; Turk et al. 2020). Αξίζει να αναφερθεί εδώ ότι σε προηγούμενες μελέτες έχει γίνει αναφορά στα αυξημένα επίπεδα του K18 ως ένα δείκτη της αποτελεσματικότητας μιας αντικαρκινικής θεραπείας όπου μετρώνται τα επίπεδα του κυτταρικού καρκινικού θανάτου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σχετικά με τα επίπεδα της εκκρινόμενης K18 παρατηρούμε και στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δική μας μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκέντρωση των 10μM στις 48 ώρες και των 20μM στις 24 ώρες. Σε αυτά τα σημεία ενώ υπάρχει και στα δύο πολύ μεγάλη έκφραση της LC3 I/II κατά την ανοσοαποτύπωση με Western Blot, στην συγκέντρωση των 20μM τα επίπεδα της K18 δείχνουν μηδενικά. Αυτό μπορεί να αποδοθεί πιθανά στην εξ ολοκλήρου επαγωγή της αυτοφαγίας στην συγκέντρωση των 20μM και με αυτόν τον τρόπο ίσως υπήρξε παντελής καταστροφή και μη ύπαρξη πλέον της πρωτεΐνης K18. Σε επόμενο επίπεδο, θα ήταν χρήσιμος ο προσδιορισμός της εκκρινόμενης K18 και σε ορό ζώων ύστερα από την έκθεσή τους σε σιραμεσίνη με σκοπό την μέτρηση του κυτταρικού θανάτου και την μελέτη τόσο της απόπτωσης όσο και της νέκρωσης που πιθανά να επάγονται σε ζωντανά *in vivo* μοντέλα.

Με σκοπό να εντοπίσουμε αν προκαλείται η επαγωγή της απόπτωσης από την σιραμεσίνη ειδικά, στραφήκαμε στην μελέτη της έκφρασης της proCaspase-3 η οποία είναι μία κασπάση-τελεστής της απόπτωσης και η οποία ενεργοποιείται ύστερα από πρωτεολυτική πέψη επάγοντας την απόπτωση. Πιο ειδικά, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ενεργοποίηση της Caspase 3 όσο αυξανόταν ο χρόνος επώασης αλλά και η συγκέντρωση της Σιραμεσίνης. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η σιραμεσίνη επάγει τον αποπτωτικό θάνατο. Για ενίσχυση του συμπεράσματος αυτού κομβικό σημείο αποτελεί η συγκέντρωση των 10μM όπου η K18 αυξάνεται αντίστοιχα με την ενεργοποίηση της Caspase 3, ενισχύοντας το συμπέρασμα της επαγωγής της απόπτωσης. Η επαγωγή της απόπτωσης με ενεργοποίηση της Caspase 3 από την σιραμεσίνη και η παρατήρηση της αύξησης της K18 μπορεί να συνδυαστεί με την μελέτη των Godin et al. 2015, οι οποίοι μελέτησαν την επαγωγή της απόπτωσης σε ασθενείς με καρκίνο του ήπατος οι οποίοι χορηγούνταν Sorafenib και χρησιμοποίησαν

σαν βιοδείκτη της απόπτωσης την M65 ELISA EpiDeath. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα της παρούσης μελέτης, καθώς παρατηρείται αύξηση της K18 όπως στους ασθενείς που χορηγούνταν Sorafenib, έτσι και στην καρκινική σειρά που προήλθε απευθείας από ασθενή με παγκρεατικό καρκίνο στη δική μας μελέτη. Παρόλα αυτά, όλα τα παραπάνω αποτελούν ισχυρό εναρκτήριο λάκτισμα και επιδέχονται περαιτέρω ανάλυση.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη που αφορά τη δράση της σιραμεσίνης στα πρωτογενή καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα «AT-021013» προκύπτει μία σειρά από πρωτότυπα ευρήματα. Αρχικά, παρατηρήθηκε η επαγωγή της αυτοφαγίας για πρώτη φορά σε πρωτογενή καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα. Μιας και στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την δράση της σιραμεσίνης στην αυτοφαγία που αφορά κυτταρικές σειρές, αποτελεί εξέχον συμπέρασμα η επαγωγή της αυτοφαγίας από σιραμεσίνη σε *ex vivo* πρωτογενή καρκινικό κυτταρικό πληθυσμό ο οποίος και έχει το πλεονέκτημα να προσομοιάζει περισσότερο με την πραγματική κλινική εικόνα που δεν έχει ξαναμελετηθεί.

Ωστόσο, εγείρεται επιπλέον μία σειρά από πολλά περισσότερα ερωτήματα και επομένως η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες προς απάντησή τους. Αρχικά, ένα σημείο στο οποίο αξίζει να σταθούμε είναι η ενεργοποίηση της Caspase 3 πριν από τη σημαντική αύξηση της LC3. Αυτό οδηγεί σε διάφορες υποθέσεις και ερωτήματα. Μία από αυτές είναι ότι η επαγωγή της απόπτωσης πιθανά προηγείται της επαγωγής της αυτοφαγίας, ή ότι η απόπτωση πιθανά να ενεργοποιεί την αυτοφαγία. Ένα ακόμη πολύ σημαντικό ενδεχόμενο είναι η πρόκληση των δύο διαφορετικών τύπων κυτταρικού θανάτου να είναι ανεξάρτητη μεταξύ τους. Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματά μας –και σημαντικά- δεν εμβαθύνουν στον μηχανισμό πίσω από τον επαγόμενο αυτοφαγικό και αποπτωτικό θάνατο. Ειδικά για την απόπτωση που επάγεται από την σιραμεσίνη, δεν υπάρχει εκτενής μελέτη και έτσι χρήζει σημασίας η εύρεση τόσο του μονοπατιού που ενεργοποιείται (ενδογενές, εξωγενές, στρες/ενδοπλασματικό) όσο και του ακριβούς μηχανισμού δράσης της, όπως για παράδειγμα της σηματοδοτικής οδού. Για τον σκοπό αυτό, βρίσκονται σε εξέλιξη από το εργαστήριό μας περαιτέρω μελέτες, για την διεξαγωγή μιας πιο εμπειριστατωμένης και πλήρους μελέτης. Άλλος ένας προβληματισμός σχετίζεται με το τι μπορεί να συμβαίνει στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σιραμεσίνης, μιας και στη συγκέντρωση των 20μM παρατηρείται αποκλειστικά αυτοφαγικός θάνατος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εγείρεται για το είδος της αυτοφαγίας που επάγεται. Μία υπόθεση αποτελεί το γεγονός ότι ανάλογα τη δόση της

σιραμεσίνης θα μπορούσε να ενεργοποιείται και διαφορετικό είδος αυτοφαγικού θανάτου (πχ chaperone-mediated autophagy, microautophagy or macroautophagy).

Εν κατακλείδι, η επαγωγή της αυτοφαγίας και της απόπτωσης από σιραμεσίνη για πρώτη φορά σε καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα προερχόμενα από ασθενή αποτελεί πρωτοπορία, μιας και οι πρωτογενείς καρκινικοί κυτταρικοί πληθυσμοί βρίσκονται πιο κοντά στην πραγματική κλινική εικόνα. Η εργασία αυτή ανοίγει δρόμους για μελλοντικές μελέτες όσον αφορά την πιθανή χρήση της ουσίας αυτής ως έναν νέο ενισχυτικό αντικαρκινικό παράγοντα για την θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος, ενός ασυμπτωματικού και επιθετικού τύπου καρκίνου με υψηλή θνησιμότητα. Πηγαίνοντας ένα βήμα παραπέρα θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί και αντίστοιχη μελέτη σε ζωικά πρότυπα ανθρώπινου καρκίνου (ξενομοσχεύματα) για τον έλεγχο της δράσης της σε συνθήκες που είναι σαφέστατα ακόμη πιο κοντά στην κλινική πραγματικότητα. Για αυτό το λόγο, αποτελεί σημαντικό εύρημα η επαγωγή της αυτοφαγίας και της απόπτωσης σε κύτταρα που προήλθαν από ex vivo ξενομοσχεύματα από παγκρεατικό όγκο ασθενούς υπό την επίδραση της Σιραμεσίνης. Έτσι, η σιραμεσίνη θα μπορούσε μελλοντικά να αποτελέσει έναν πολλά υποσχόμενο αντιπολλαπλασιαστικό και γιατί όχι, και αντικαρκινικό παράγοντα.

****Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος του poster **“Siramesine, a sigma-2 receptor agonist induces cell death via induction of both apoptosis and autophagy in a patient derived PDAC model *In vitro* and *In vivo*”**

Sereti E, Koutsougianni F, Grammatikou P, Dervenis C, Zacharoulis D, Pešić M, Dinic J, Rankov Divac , Ilkay-Armutak E, Üvez A, Dimas K

11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βασικής και Κλινικής Φαρμακολογίας, Αλεξ/πολη 2020

Βιβλιογραφία

- Abate, Carmen et al. 2015. “Elements in Support of the ‘non-Identity’ of the PGRMC1 Protein with the $\Sigma 2$ Receptor.” *European Journal of Pharmacology* 758: 16–23.
- Abate, Carmen, Roberto Perrone, and Francesco Berardi. 2012. “Classes of Sigma2 (σ2) Receptor Ligands: Structure Affinity Relationship (SAfiR) Studies and Antiproliferative Activity.” *Current Pharmaceutical Design* 18(7): 938–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288411> (April 23, 2020).
- Adamska, Aleksandra et al. 2018. “Molecular and Cellular Mechanisms of Chemoresistance in Pancreatic Cancer.” *Advances in Biological Regulation* 68: 77–87.
- Belizário, José, Luiz Vieira-Cordeiro, and Sylvia Enns. 2015. “Necroptotic Cell Death Signaling and Execution Pathway: Lessons from Knockout Mice.” *Mediators of Inflammation* 2015.
- Bialik, Shani, Santosh K. Dasari, and Adi Kimchi. 2018. “Autophagy-Dependent Cell Death - Where, How and Why a Cell Eats Itself to Death.” *Journal of Cell Science* 131(18). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30237248> (April 18, 2020).
- Boya, Patricia, Patrice Codogno, and Natalia Rodriguez-Muela. 2018. “Autophagy in Stem Cells: Repair, Remodelling and Metabolic Reprogramming.” *Development (Cambridge, England)* 145(4).
- Bray, Freddie et al. 2018. “Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68(6): 394–424.
- Camuzcuoğlu, Aysun, Burak Sezgin, Hakim Çelik, and Hakan Camuzcuoğlu. 2019. “Evaluation of Serum M30 and M65 Activity in Patients with Stage-I Endometrial Cancer.” *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 39(8): 1112–16. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31177876/> (September 9, 2020).
- Cascetta, Priscilla et al. 2018. “Pancreatic Cancer and Obesity: Molecular Mechanisms of Cell Transformation and Chemoresistance.” *International Journal of Molecular Sciences* 19(11). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30366466> (April 13, 2020).
- Česen, M Hafner, U Repnik, V Turk, and B Turk. 2013. “Siramesine Triggers Cell

- Death through Destabilisation of Mitochondria, but Not Lysosomes.” *Cell death & disease* 4(10): e818. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24091661> (April 26, 2020).
- Chen, Y. et al. 2008. “Oxidative Stress Induces Autophagic Cell Death Independent of Apoptosis in Transformed and Cancer Cells.” *Cell Death and Differentiation* 15(1): 171–82. www.nature.com/cdd (August 25, 2020).
- Colabufo, Nicola Antonio et al. 2004. “Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Some $\Sigma 2$ Agonists and $\Sigma 1$ Antagonists in Tumour Cell Lines.” *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 370(2): 106–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322732> (April 23, 2020).
- Collina, Simona et al. 2017. “Are Sigma Modulators an Effective Opportunity for Cancer Treatment? A Patent Overview (1996-2016).” *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 27(5): 565–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28051882> (April 23, 2020).
- Conroy, T. et al. 2018. “FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer.” In *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society, 2395–2406.
- Conroy, Thierry et al. 2011. “FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer.” *New England Journal of Medicine* 364(19): 1817–25.
- Cummings, Jeffrey et al. 2008a. “Preclinical Evaluation of M30 and M65 ELISAs as Biomarkers of Drug Induced Tumor Cell Death and Antitumor Activity.” *Molecular Cancer Therapeutics* 7(3): 455–63. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18347133/> (September 9, 2020).
- . 2008b. “Preclinical Evaluation of M30 and M65 ELISAs as Biomarkers of Drug Induced Tumor Cell Death and Antitumor Activity.” *Molecular Cancer Therapeutics* 7(3): 455–63. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18347133/> (September 28, 2020).
- D’Arcy, Mark S. 2019. “Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy.” *Cell Biology International* 43(6): 582–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30958602> (April 18, 2020).
- Ercan, Gulinnaz, Ayfer Karlitepe, and Bulent Ozpolat. 2017. “Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches.” *Anticancer Research* 37(6): 2761–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28551612> (April 13, 2020).
- Galluzzi, Lorenzo et al. 2018a. “Molecular Mechanisms of Cell Death:

- Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.” *Cell Death and Differentiation* 25(3): 486–541.
- . 2018b. “Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.” *Cell Death and Differentiation* 25(3): 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4> (September 10, 2020).
- Godin, Corinne et al. 2015. “Biomarkers of Apoptosis and Necrosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma Treated with Sorafenib.” *Anticancer Research* 35(3): 1803–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25750346/> (September 10, 2020).
- Goral, Vedat. 2015. “Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16(14): 5619–24.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell* 144(5): 646–74.
- Heading, C. 2001. “Siramesine H Lundbeck.” *Current Opinion in Investigational Drugs* 2(2): 266–70.
- Huang, An Cheng et al. 2013. “Tetrandrine Induces Cell Death in SAS Human Oral Cancer Cells through Caspase Activation-Dependent Apoptosis and LC3-I and LC3-II Activation-Dependent Autophagy.” *International Journal of Oncology* 43(2): 485–94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23695424/> (August 25, 2020).
- Ilic, Milena, and Irena Ilic. 2016. “Epidemiology of Pancreatic Cancer.” *World Journal of Gastroenterology* 22(44): 9694–9705.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27956793> (April 8, 2020).
- Jones, Peter A., and Stephen B. Baylin. 2002. “The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer.” *Nature Reviews Genetics* 3(6): 415–28.
- Kashiwagi, Hiroyuki et al. 2007. “Selective Sigma-2 Ligands Preferentially Bind to Pancreatic Adenocarcinomas: Applications in Diagnostic Imaging and Therapy.” *Molecular Cancer* 6.
- Khadka, Ramesh, Weijun Tian, Xin Hao, and Rakshya Koirala. 2018. “Risk Factor, Early Diagnosis and Overall Survival on Outcome of Association between Pancreatic Cancer and Diabetes Mellitus: Changes and Advances, a Review.” *International Journal of Surgery* 52: 342–46.
- Kroemer, G. et al. 2009. “Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.” *Cell Death and Differentiation* 16(1): 3–11. [/pmc/articles/PMC2744427/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19311111/) (September 10, 2020).

- Ku, Nam On, Pavel Strnad, Heike Bantel, and M. Bishr Omary. 2016. “Keratins: Biomarkers and Modulators of Apoptotic and Necrotic Cell Death in the Liver.” *Hepatology* 64(3): 966–76. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26853542/> (September 28, 2020).
- Langner, C. 2017. “Hereditäres Magen- Und Pankreaskarzinom.” *Pathologe* 38(3): 164–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28484856> (April 13, 2020).
- Li, Ying Jie et al. 2017. “Autophagy and Multidrug Resistance in Cancer.” *Chinese journal of cancer* 36(1): 52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28646911> (April 18, 2020).
- Liu, Y., and Beth Levine. 2015. “Autosis and Autophagic Cell Death: The Dark Side of Autophagy.” *Cell Death and Differentiation* 22(3): 367–76.
- Lohse, Ines, and Shaun P. Brothers. 2020. “Pathogenesis and Treatment of Pancreatic Cancer Related Pain.” *Anticancer research* 40(4): 1789–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32234867> (April 11, 2020).
- Ma, Shumei et al. 2017a. “Ferroptosis and Autophagy Induced Cell Death Occur Independently after Siramesine and Lapatinib Treatment in Breast Cancer Cells.” *PLoS ONE* 12(8).
- . 2017b. “Ferroptosis and Autophagy Induced Cell Death Occur Independently after Siramesine and Lapatinib Treatment in Breast Cancer Cells.” *PLoS ONE* 12(8). [/pmc/articles/PMC5565111/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32234867) (August 25, 2020).
- Mabeta, Peace. 2018. “Oncosuppressors and Oncogenes: Role in Haemangioma Genesis and Potential for Therapeutic Targeting.” *International Journal of Molecular Sciences* 19(4). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29652858> (April 12, 2020).
- Mach, Robert H., Chenbo Zeng, and William G. Hawkins. 2013. “The $\Sigma 2$ Receptor: A Novel Protein for the Imaging and Treatment of Cancer.” *Journal of Medicinal Chemistry* 56(18): 7137–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23734634> (April 23, 2020).
- Mahmood, Tahrin, and Ping Chang Yang. 2012. “Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting.” *North American Journal of Medical Sciences* 4(9): 429–34. [/pmc/articles/PMC3456489/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23734634) (August 19, 2020).
- Martin, W R et al. 1976. “The Effects of Morphine- and Nalorphine- like Drugs in the Nondependent and Morphine-Dependent Chronic Spinal Dog.” *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 197(3): 517–32.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/945347> (April 23, 2020).
- McLeland, Christopher B., Jamie Rodriguez, and Stephan T. Stern. 2011. "Autophagy Monitoring Assay: Qualitative Analysis of MAP LC3-I to II Conversion by Immunoblot." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 697: 199–206.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21116969/> (August 25, 2020).
- Megalizzi, Véronique, Marie Le Mercier, and Christine Decaestecker. 2012. "Sigma Receptors and Their Ligands in Cancer Biology: Overview and New Perspectives for Cancer Therapy." *Medicinal Research Reviews* 32(2): 410–27.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20687157> (April 23, 2020).
- Olsen, Ole D. et al. 2008. "54Anti-Cancer Agent Siramesine Induces Selective Cathepsin Induced Cell Death ." *APMIS* 116(5): 439–439.
- Ostenfeld, Marie Stampe et al. 2008. "Anti-Cancer Agent Siramesine Is a Lysosomotropic Detergent That Induces Cytoprotective Autophagosome Accumulation." *Autophagy* 4(4): 487–99.
- "Overview of Electrophoresis - GR." [//www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-electrophoresis.html](http://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-electrophoresis.html) (August 19, 2020).
- Oyer, Halley M., Christina M. Sanders, and Felix J. Kim. 2019. "Small-Molecule Modulators of Sigma1 and SiGma2/TMEM97 in the Context of Cancer: Foundational Concepts and Emerging Themes." *Frontiers in Pharmacology* 10.
- Palmquist, Camilla et al. 2020. "Prediction of Unresectability and Prognosis in Patients Undergoing Surgery on Suspicion of Pancreatic Cancer Using Carbohydrate Antigen 19-9, Interleukin 6, and YKL-40." *Pancreas* 49(1): 53–61.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31856080> (April 15, 2020).
- Pati, Maria Laura et al. 2018a. "Multifunctional Thiosemicarbazones and Deconstructed Analogues as a Strategy to Study the Involvement of Metal Chelation, Sigma-2 (Σ 2) Receptor and P-Gp Protein in the Cytotoxic Action: In Vitro and in Vivo Activity in Pancreatic Tumors." *European journal of medicinal chemistry* 144: 359–71.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29287249> (April 20, 2020).
- . 2018b. "Multifunctional Thiosemicarbazones and Deconstructed Analogues as a Strategy to Study the Involvement of Metal Chelation, Sigma-2 (Σ 2) Receptor and P-Gp Protein in the Cytotoxic Action: In Vitro and in Vivo Activity in Pancreatic Tumors." *European Journal of Medicinal Chemistry* 144: 359–71.

- Pothuraju, Ramesh et al. 2018. "Pancreatic Cancer Associated with Obesity and Diabetes: An Alternative Approach for Its Targeting." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 37(1): 319.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30567565> (April 13, 2020).
- Radbruch, Lukas, and F. Nauck. 2002. "Morphin Und Andere Opiode in Der Tumorschmerztherapie: Die Empfehlungen Der EAPC." *Schmerz* 16(3): 186–93.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077678> (April 18, 2020).
- Ravanan, Palaniyandi, Ida Florance Srikumar, and Priti Talwar. 2017. "Autophagy: The Spotlight for Cellular Stress Responses." *Life Sciences* 188: 53–67.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28866100> (April 18, 2020).
- Rawla, Prashanth, Tagore Sunkara, and Vinaya Gaduputi. 2019. "Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors." *World Journal of Oncology* 10(1): 10–27.
- Roy, P. S., and B. J. Saikia. 2016. "Cancer and Cure: A Critical Analysis." *Indian Journal of Cancer* 53(3): 441–42.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28244479> (April 6, 2020).
- Sarkar, Sovan. 2013. "Regulation of Autophagy by MTOR-Dependent and MTOR-Independent Pathways: Autophagy Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Therapeutic Application of Autophagy Enhancers." *Biochemical Society Transactions* 41(5): 1103–30.
<https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/41/5/1103/66275/Regulation-of-autophagy-by-mTORdependent-and> (April 20, 2020).
- Schirmacher, Volker. 2019. "From Chemotherapy to Biological Therapy: A Review of Novel Concepts to Reduce the Side Effects of Systemic Cancer Treatment (Review)." *International Journal of Oncology* 54(2): 407–19.
- Schmidt, Hayden R., and Andrew C. Kruse. 2019. "The Molecular Function of σ Receptors: Past, Present, and Future." *Trends in Pharmacological Sciences* 40(9): 636–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31387763> (April 20, 2020).
- Schwartz, Laurent, Claudiu Supuran, and Khalid Alfarouk. 2017. "The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 17(2): 164–70.
- Takeda, Yoshinori et al. 2017. "Asymptomatic Pancreatic Cancer: Does Incidental Detection Impact Long-Term Outcomes?" *Journal of Gastrointestinal Surgery* 21(8): 1287–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28397027> (April 17,

- 2020).
- Tang, Daolin et al. 2019. “The Molecular Machinery of Regulated Cell Death.” *Cell Research* 29(5): 347–64. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5> (September 10, 2020).
- Tesei, Anna et al. 2019. “Anti-Tumor Efficacy Assessment of the Sigma Receptor Pan Modulator RC-106. A Promising Therapeutic Tool for Pancreatic Cancer.” *Frontiers in Pharmacology* 10(MAY): 490. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31156430> (April 23, 2020).
- Tsodikov, A D, B Asselain, and A Y Yakovlev. 1997. “A Distribution of Tumor Size at Detection: An Application to Breast Cancer Data.” *Biometrics* 53(4): 1495–1502. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9423264> (April 11, 2020).
- Turk, H. Mehmet et al. 2020. “Usefulness of Serum M30 and M65 Levels to Predict Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Cancer.” *Current Problems in Cancer* 44(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31371034/> (September 9, 2020).
- “Useful Numbers for Cell Culture | Thermo Fisher Scientific - GR.” <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html> (July 7, 2020).
- Villalpando-Rodriguez, Gloria E., Anna R. Blankstein, Carmen Konzelman, and Spencer B. Gibson. 2019. “Lysosomal Destabilizing Drug Siramesine and the Dual Tyrosine Kinase Inhibitor Lapatinib Induce a Synergistic Ferroptosis through Reduced Heme Oxygenase-1 (HO-1) Levels.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31636810/> (August 25, 2020).
- Vogelstein, Bert et al. 2013. “Cancer Genome Landscapes.” *Science* 340(6127): 1546–58.
- Vomero, Marta et al. 2018. “Autophagy and Rheumatoid Arthritis: Current Knowledges and Future Perspectives.” *Frontiers in Immunology* 9(JUL): 1577.
- Zeng, Siyuan et al. 2019. “Chemoresistance in Pancreatic Cancer.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(18). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31514451> (April 18, 2020).
- Zhang, Zhenjun, Wenjie Qin, and Yuling Sun. 2018. “Contribution of Biomarkers for Pancreatic Cancer-Associated New-Onset Diabetes to Pancreatic Cancer Screening.” *Pathology Research and Practice* 214(12): 1923–28.

