



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ
ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**‘ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ mTOR ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ’**

ΚΟΡΜΕΝΤΖΑ ΕΛΙΣΑΒΕΤ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δήμας Κωνσταντίνος, Αν. Καθ. Φαρμακολογίας, Επιβλέπων

Τραχανά Βαρβάρα, Επικ. Καθ. Κυτταρικής Βιολογίας, Μέλος

Τσέζου Ασπασία, Καθ. Ιατρ. Γενετικής, Μέλος

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

FACULTY OF MEDICINE

LABORATORY OF PHARMACOLOGY

POSTGRADUATE MASTER PROGRAM

‘HUMAN GENETICS-GENETIC COUNSELING’

MASTER THESIS

**‘TARGETING THE mTOR PATHWAY AT BREAST
CANCER’**

KORMENTZA ELISAVET

LARISA, 2021

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, αναπληρωτή καθηγητή της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος φαρμακολογίας, καθώς με την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα έφερα σε πέρας όλα τα πειράματα, ενώ έμαθα αρκετές τεχνικές και προσκόμισα ουσιαστικές γνώσεις. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ασπασία Τσέζου, υπεύθυνη του ΠΜΣ και καθηγήτρια Γενετικής Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αλλά και την κυρία Βαρβάρα Τραχανά, επίκουρη καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας οι οποίες επέβλεπαν παράλληλα με τον κύριο Δήμα τη διεκπεραίωση της εργασίας.

Καθοριστική ήταν και η συμβολή των μελών του εργαστηρίου και ιδιαίτερα της διδακτορικής ερευνήτριας Φανής Κουτσουγιάννη, του διδακτορικού ερευνητή Κωνσταντίνου Λαφαζάνη και των μεταπτυχιακών φοιτητών Απόστολου Κολιού και Νικολέτας Γιοβάνοβιτς. Σημαντική ήταν και η βοήθεια της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Ανδρομάχης Λαμπριανίδου και της διδακτορικής ερευνήτριας Ίριδας Παπαποστόλου, αλλά και του επιστημονικού συνεργάτη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Ηλία Μπέγα. Πάνω από όλα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και όλους μου τους φίλους που κατανοούσαν το άγχος και τις ανησυχίες μου και ήταν δίπλα μου όποτε το χρειαζόμουν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της *in vitro* δραστικότητας αναστολέων που στοχεύουν το mTOR μονοπάτι και της επίδρασής τους στον καρκίνο του μαστού. Από τους αναστολείς που μελετήθηκαν αρχικά (1^{ης}, 2^{ης} γενιάς και αναστολείς που δε στοχεύουν απευθείας το mTOR), έγινε η επιλογή του πιο αποδοτικού με τη μέθοδο της οξείας κυτταροτοξικότητας (SRB). Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση αυτού όσον αφορά τη μεταναστευτική δυνατότητα των κυττάρων και την ικανότητά τους να δημιουργήσουν κλώνους.

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν (MDA-MB231 και MCF7) ήταν αντιπροσωπευτικές των 2 από τις 3 βασικές κατηγορίες καρκίνου του μαστού (Luminal A, B και Triple Negative Breast Cancer). Εξετάστηκαν λοιπόν τα MCF7 κύτταρα που είναι ορμονοευαίσθητα (ER⁺ τύπος) και τα MB231 κύτταρα στα οποία εντοπίζεται απουσία ορμονών (TNBC τύπος) και έγινε σύγκριση της δράσης των αναστολέων στους 2 αυτούς τύπους κυττάρων.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα φάνηκε ότι υπάρχει σημαντική επίδραση, τουλάχιστον του ενός αναστολέα (αναστολέας 2^{ης} γενιάς AZD8055), και στους 2 τύπους. Ωστόσο εντοπίστηκαν διαφορές και ιδιαίτερα όσον αφορά τα MB231 κύτταρα φάνηκε ότι ήταν πιο επιθετικά και δεν ανταποκρίνονταν τόσο καλά όσο τα MCF7. Επομένως ιδιαίτερα τα MB231 κύτταρα χρήζουν πιο εκτεταμένων μελετών, με νέους πιο εξελιγμένους αναστολείς (3^{ης} γενιάς).

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: καρκίνος του μαστού, μονοπάτι mTOR, αναστολείς του mTOR

ABSTRACT

The aim of this current master thesis is the study both of the *in vitro* activity of the inhibitors that have as target the mTOR pathway and their effect on breast cancer. Between the inhibitors we studied (1st, 2nd generation and them that do not target mTOR directly), we found out that the most effective one was AZD8055 through SRB cytotoxic assay. After that we tested AZD8055 effect on the migratory capacity of cells and also their ability to form clones when this inhibitor was prescribed.

In order to accomplish our experiments we used the hormone-sensitive MCF7 cells (ER+ type) and the hormone-deficient MB231 cells (TNBC) and we compared the inhibitors' activity in these two cell types. These cell lines represent Luminal A, B and Triple Negative Breast Cancer types, respectively. So we examined

According to these results, it is shown that there is a more significant effect of the AZD8055 inhibitor in both types. However, differences were identified and especially regards to MB231 cells, which appear to be more aggressive than MCF7. Therefore, MB231 cells and widely the Triple Negative Breast cancer, need more extensive studies with more advanced inhibitors and techniques.

KEY WORDS: breast cancer, mTOR pathway, mTOR pathway inhibitors

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	σελ 4
1.1 Καρκίνος	σελ 4
1.1.1 Ιστορική αναδρομή	σελ 6
1.1.2 Ορόσημα του καρκίνου	σελ 7
1.1.3 Καρκίνος του μαστού	σελ 8
1.1.4 Ορμονοεξαρτώμενος ER ⁺ καρκίνος μαστού	σελ 19
1.1.5 Τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού	σελ 20
1.2 Μονοπάτι mTOR	σελ 21
1.2.1 Μονοπάτι mTOR στον καρκίνο του μαστού	σελ 23
1.2.2 mTOR μονοπάτι στόχος νέων φαρμάκων καρκίνου μαστού	σελ 24
2. Υλικά και μέθοδοι	σελ 33
2.1 Καλλιεργητικά μέσα και συνθήκες	σελ 33
2.2 Καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού MCF7 και MB231.....	σελ 34
2.3 Έλεγχος οξειάς κυτταροτοξικότητας	σελ 38
2.4 Έλεγχος επούλωσης πληγής	σελ 41
2.5 Μέθοδος αναστολής δημιουργίας κλώνων	σελ 43
2.6 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	σελ 43
3. Αποτελέσματα	σελ 44
3.1 Αποτελέσματα ελέγχου κυτταροτοξικότητας μεθόδου SRB.....	σελ 44
3.2 Αποτελέσματα ελέγχου κλωνογένεσης	σελ 47
3.3 Αποτελέσματα επούλωσης πληγής wound healing	σελ 50
4. Συζήτηση	σελ 54
5. Βιβλιογραφία	σελ 57

1.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μία ασθένεια που χαρακτηρίζεται από πολυεπίπεδη ετερογένεια και μαστίζει τη σημερινή κοινωνία. Οι τέσσερις πιο συχνοί τύπου καρκίνου που εντοπίζονται στον πληθυσμό είναι ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του προστάτη και του εντέρου (Bray et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, ο καρκίνος είναι μία πολυπαραγοντική νόσος, καθώς τόσο γενετικοί (η προδιάθεση και το οικογενειακό ιστορικό) όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνισή του. Το ποσοστό βέβαια αυτών των δύο μεταβλητών όσον αφορά την αιτιολογία της νόσου διαφέρει σε μεγάλο βαθμό, αφού μόνο το 10% των περιπτώσεων αφορά γενετικούς παράγοντες. Σχετικά με την γενετική προδιάθεση των καρκινικών τύπων, οι κληρονομικοί τύποι εμφανίζονται ως επί το πλείστον σε μικρότερη ηλικία σε σύγκριση με τις σποραδικές περιπτώσεις, ενώ έχουν και σοβαρότερη έκβαση. Στις περιπτώσεις αυτές ενέχονται συγκεκριμένα γονίδια και έτσι η πρόγνωση, η πρόληψη και η αντιμετώπισή τους καθίστανται πιο αντιμετωπίσιμες (Kentsis et al, 2020). Το υπόλοιπο 90% αφορά εξωγενείς παράγοντες και κυρίως τον τρόπο ζωής του ατόμου (κάπνισμα, κακή διατροφή, έλλειψη άσκησης, κατανάλωση αλκοόλ), ενώ επιβαρύνεται και επηρεάζεται και από την έκθεση του ατόμου σε διάφορους καρκινογόνους παράγοντες (ακτινοβολία, χημικά καθαριστικά, τοξικές ουσίες), η δράση των οποίων λειτουργεί συνήθως συσσωρευτικά με το πέρασ του χρόνου (Zhang et al., 2020). Έχει υπολογισθεί πως 1 στα 3 άτομα θα νοσήσει κάποια στιγμή από αυτήν την ασθένεια, η οποία έχει περισσότερους από 200 διαφορετικούς τύπους και για αυτό αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση κατάλληλης και εξατομικευμένης θεραπείας.

Σε καρκινικό μπορεί να μετατραπεί δυνητικά οποιοδήποτε φυσιολογικό κύτταρο του σώματος, το οποίο έχει υποστεί κάποια ή κάποιες γενετικές βλάβες. Αν το κύτταρο δεν καταφέρει να αντιμετωπίσει αυτό το πρόβλημα με κανέναν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που διαθέτει, το αποτέλεσμα είναι να επέλθει ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Αυτό οφείλεται σε απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και σε ενεργοποίηση των ογκογονιδίων. Από τη μία έχουμε τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως τα p53, BRCA1, BRCA2, APC, και RB1,

όπου πρόκειται για αυτά που φυσιολογικά καταστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου. Από την άλλη τα ογκογονίδια είναι αυτά που υπό φυσιολογικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη του όγκου. Στα ογκογονίδια περιλαμβάνονται αυξητικοί και μεταγραφικοί παράγοντες με τους υποδοχείς τους, όπως και γονίδια που ενέχονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Απενεργοποίηση ενός μόνο αλληλομόρφου ενός ογκογονιδίου μπορεί να προκαλέσει καρκίνο, ενώ όσον αφορά τα ογκοκατασταλτικά απαιτούνται μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα (υπόθεση δύο χτυπημάτων Knudson's) (Lee & Muller, 2010).

Διάκριση καλοήθους κακοήθους όγκου

Σημαντικό σημείο της αξιολόγησης της επικινδυνότητας και αντιμετώπισης των όγκων αποτελεί η διάκρισή τους σε καλοήθεις και κακοήθεις, ανάλογα με την επίδραση που ασκούν στον οργανισμό. Οι καλοήθεις όγκοι αναπτύσσονται με πολύ πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με τους κακοήθεις, ενώ το βασικό χαρακτηριστικό που τους διαχωρίζει είναι ότι δεν έχουν την ικανότητα να διηθήσουν σε γειτονικούς ιστούς και συνεπώς να δώσουν μετάσταση. Σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις θα δημιουργήσουν πρόβλημα στον οργανισμό και θα οδηγήσουν στο θάνατο του ατόμου. Σε αντίθεση με αυτούς, οι κακοήθεις είναι επιθετικοί και μπορούν σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα να οδηγήσουν σε μετάσταση και να προκαλέσουν σοβαρό πρόβλημα στον ασθενή, μέχρι και θάνατο.

Μετάσταση

Σε πάσχοντες από καρκίνο παρατηρούνται στην πλειονότητά τους περιπτώσεις εμφάνισης όγκου σε σημεία του σώματος διαφορετικά της πρωτογενούς εστίας, λόγω μετάστασης. Τα βήματα της μετάστασης από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί ένας όγκος μέχρι ένα κύτταρο να αποικίσει μια νέα περιοχή (ιστό/όργανο) στο σώμα είναι επιγραμματικά τα εξής :

- 1) Εισβολή και διήθηση των κυττάρων σε γειτονικούς ιστούς καθώς υπάρχει έλλειψη χώρου για την ανάπτυξη στο συγκεκριμένο σημείο,
- 2) Απελευθέρωση τους στην κυκλοφορία είτε το καθένα μόνο του, είτε σαν ομάδες κυττάρων,

- 3) Επιβίωση τους στο μέρος αυτό μέσω των ενεργειακών αποθεμάτων που είναι διαθέσιμα,
- 4) Δημιουργία νέων αγγείων,
- 5) Διείσδυση στα νέα αγγεία που δημιουργήθηκαν και μεταφορά σε νέους ιστούς και όργανα (μετάσταση) (Yasir Suhail et al., 2019) .

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Αν και η λέξη καρκίνος χρησιμοποιείται από την εποχή του Ιπποκράτη, τα πρώτα δείγματα σημειώθηκαν ακόμη από την Αρχαία Αίγυπτο. Από την περίοδο εκείνη έχουν ανακαλυφθεί τόσο πάπυροι όπου αναφέρονται περιστατικά ασθενών, όσο και μούμιες που υποδεικνύουν ότι αιτία θανάτου ήταν ο καρκίνος. Περίπου το 1300π.Χ., επικρατούσε η θεωρία των τεσσάρων χυμών που υποστήριζε ότι η πρόκληση καρκίνου οφειλόταν σε διαταραχή της ισορροπίας των τεσσάρων χυμών του σώματος (αίμα, φλέγμα, κίτρινη και μαύρη χολή). Η θεωρία αυτή διατηρήθηκε για πολλούς αιώνες (μέχρι και τον 16^ο αιώνα μ.Χ.) όπου και αντικαταστάθηκε από τη θεωρία της λέμφου. Αυτή βασιζόταν στην άποψη ότι ο καρκίνος οφειλόταν σε αλλαγές στη σύσταση της λέμφου. Μέχρι τότε λόγω θρησκευτικών αντιλήψεων ήταν δύσκολο να γίνουν εκτενέστερες μελέτες, αφού απαγορευόταν η διεξαγωγή νεκροψίας, ενώ δεν υπήρχαν και τα κατάλληλα μέσα.

Τα πράγματα άλλαξαν ριζικά τον 19^ο αιώνα μ.Χ. όταν διαμορφώθηκε ο κλάδος της επιστημονικής ογκολογίας, ενώ είχαν ανακαλυφθεί και τα κατάλληλα μέσα για τη διεξαγωγή των απαραίτητων εξετάσεων. Αρχικά, εκείνη την περίοδο θεωρούνταν ότι ο καρκίνος οφειλόταν σε τραυματισμό, ο οποίος δημιουργούσε εκτεταμένο πρόβλημα. Σήμερα, τον 21^ο αιώνα, γνωρίζουμε ότι όλες αυτές οι αντιλήψεις είναι ξεπερασμένες και λανθασμένες. Πλέον, ο καρκίνος ορίζεται ως η ασθένεια που προκύπτει από μετάλλαξη σε ένα μόνο κύτταρο, το οποίο στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα και οδηγεί στη δημιουργία όγκου [1,3].

1.1.2 Ορόσημα του καρκίνου

Τα ορόσημα του καρκίνου αναφέρονται στα στάδια τα οποία θα περάσει ένα φυσιολογικό κύτταρο από την αρχική λειτουργική του κατάσταση μέχρι να αποκτήσει όλες τις ιδιότητες ενός καρκινικού κυττάρου και να προκαλέσει τον όγκο. Τα πρώτα 6

ορόσημα διατυπώθηκαν αρχικά το 2.000 από τους Hanahan και Weinberg, ενώ οι ίδιοι λίγα χρόνια αργότερα πρόσθεσαν στα ήδη υπάρχοντα κάποια επιπλέον. Η λίστα αυτή ολοκληρώθηκε με το 11^ο ορόσημο το οποίο θεωρήθηκε επίσης ένα σημαντικό κομμάτι στην εξέλιξη της νόσου. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1, τα ορόσημα του καρκίνου επιγραμματικά είναι τα εξής:

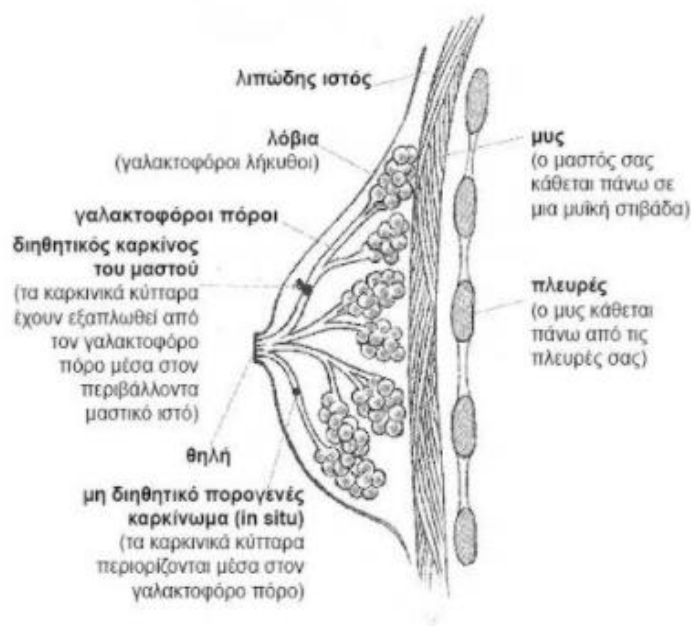


Εικόνα 1 Τα ορόσημα του καρκίνου, (<http://www.gettingtoknowcancer.org/overview.php>)

1. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
2. Ανασθησία σε αντι-αυξητικά σήματα
3. Αποφυγή απόπτωσης
4. Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός
5. Εκ νέου αγγειογένεση
6. Διήθηση και μετάσταση σε νέους ιστούς
7. Γενετική αστάθεια και μεταλλαγές
8. Φλεγμονή που προωθεί τον καρκίνο
9. Απορρύθμιση του μεταβολισμού
10. Αποφυγή ανοσο-καταστροφής
11. Ανώμαλο εναλλακτικό μάτισμα

1.1.3 Καρκίνος μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας από τους πιο ετερογενείς τύπους καρκίνου που αποτελείται από διάφορους υποτύπους. Μπορεί να εντοπιστεί σε διαφορετικά ανατομικά σημεία του εν λόγω οργάνου, και εκφράζει μια ποικιλία διαφορετικών βιοδεικτών, κυρίως ορμονικών υποδοχέων, σε κάθε διαφορετική περίπτωση. Η ανατομία του οργάνου που προσβάλλεται από τη συγκεκριμένη νόσο φαίνεται στην Εικόνα 2.

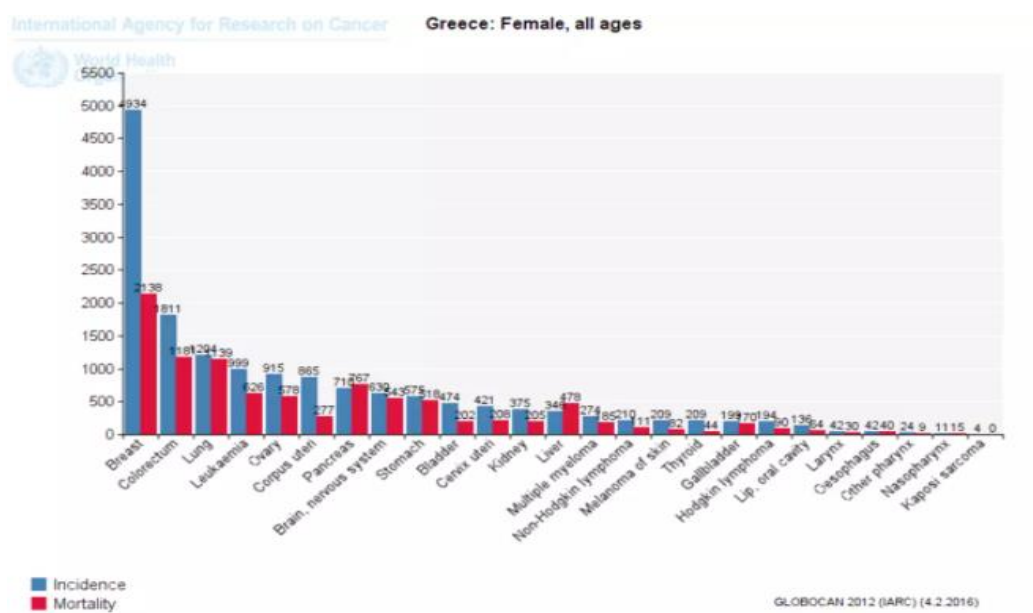


Εικόνα 2 Ανατομία μαστού, (Πληροφορίες Για Γυναίκες Με Πρώιμο Καρκίνο Του Μαστού, 1968)

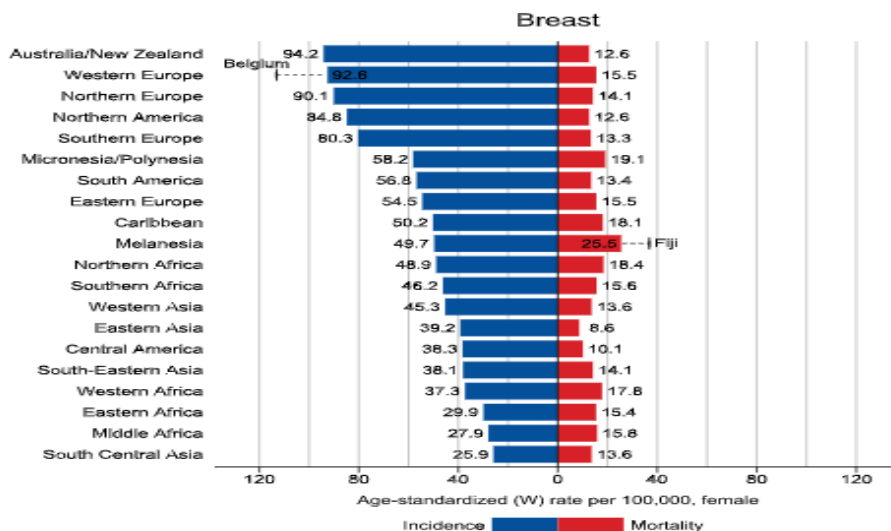
Πιο αναλυτικά, ο μαστός βρίσκεται κάτω από το δέρμα και χωρίζεται από τους θωρακικούς μύες μέσω μίας μεμβράνης. Είναι ένας λιπώδης αδένας που έχει ως βασική λειτουργία την παραγωγή γάλακτος. Αποτελείται από τα λόβια (από τα οποία παράγεται το γάλα) και από τους πόρους (οι οποίοι συμμετέχουν στη μεταφορά του γάλακτος). Λόβια και πόροι συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν τους γαλακτοφόρους πόρους που εκβάλουν τελικά στη θηλή του μαστού. Βασικό αντικείμενο ενδιαφέροντος αποτελούν τα λόβια και οι πόροι γιατί αυτά είναι που επηρεάζονται στη νόσο. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μέγεθος του μαστού και το ποσοστό του λίπους από το οποίο αποτελείται δε συνδέονται με την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου.

Επιδημιολογία της νόσου

Σύμφωνα με το “Globocan Project” της Διεθνούς Υπηρεσίας για την Έρευνα στον Καρκίνο (IARC) του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου για τις γυναίκες στην Ελλάδα και οδηγεί σε πολλούς θανάτους ετησίως (Εικόνα 3). Γνωρίζουμε ωστόσο ότι αυτό ισχύει και σε παγκόσμιο επίπεδο, ενώ παράλληλα ο τύπος αυτός είναι η πρώτη σε συχνότητα αιτία θανάτου από νεοπλασματική ασθένεια. Η γεωγραφική κατανομή της νόσου ωστόσο διαφέρει από χώρα σε χώρα, όπως και τα ποσοστά θανάτου στις αντίστοιχες περιοχές. Αυτό φαίνεται και στην Εικόνα 4 όπου φαίνονται τα ποσοστά του πληθυσμού που έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού ανά 100 χιλιάδες πολίτες, αλλά και τα ποσοστά θανάτων που έχει προκαλέσει σε παγκόσμιο επίπεδο (Momenimovahed & Salehiniya, 2019).



Εικόνα 3 Πιο κοινοί τύποι καρκίνου για τις γυναίκες στην Ελλάδα, (Overview, 2018)(Bray et al., 2018)



Εικόνα 4 Επιπολασμός καρκίνου του μαστού σε παγκόσμια κλίμακα, (Bray et al, 2018). Τα νούμερα για το 2020 δηλώνουν ότι περίπου 8 χιλιάδες άτομα (το 12% των συνολικών περιπτώσεων) προσβλήθηκαν από αυτόν τον τύπο, ενώ το 1/3 από αυτούς κατέληξε. Από υπολογισμούς που έχουν γίνει για τα επόμενα 5 χρόνια φαίνεται πως ο αριθμός των κρουσμάτων δε θα αυξηθεί σημαντικά σε σχέση με τα σημερινά νούμερα (περίπου 30 χιλιάδες νέες περιπτώσεις), χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν πρέπει να υπάρχει επαγρύπνηση, ενημέρωση και πρόληψη για αυτή τη νόσο.

Ενημέρωση, πρόληψη και διάγνωση της νόσου

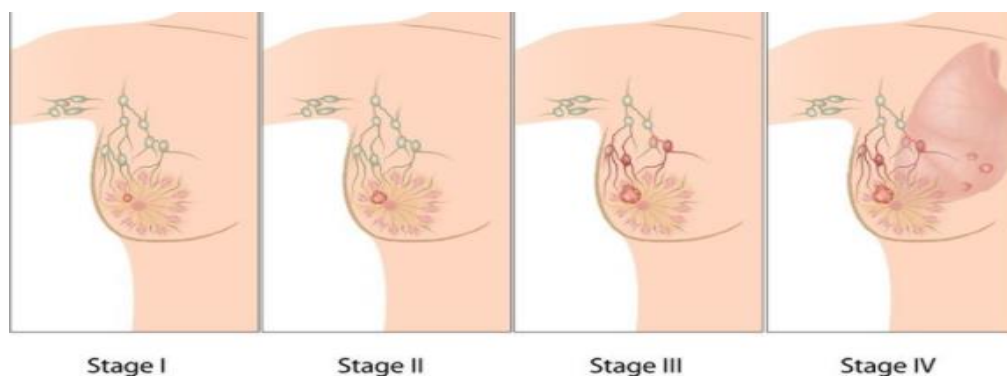
Η ορθή ενημέρωση αναφορικά με τις πιθανότητες που έχει ένα άτομο να εμφανίσει καρκίνο λόγω οικογενειακού ιστορικού, αλλά και η σωστή ενημέρωση για τη συμπτωματολογία της νόσου είναι καταλυτικής σημασίας για την έγκαιρη διάγνωση. Ο χρόνος ο οποίος θα διαγνωσθεί η ασθένεια είναι πολύ σημαντικός, αφού η έγκαιρη διάγνωση μπορεί να έχει μία πιο θετική έκβαση.

Η πρόληψη χρήζει ιδιαίτερης αναγκαιότητας όπως και ενημέρωση για τους παράγοντες κινδύνου που δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν τη νόσο. Σε αυτούς τους παράγοντες συγκαταλέγονται το φύλο, η ηλικία, η ανάπτυξη μετά -εμμηνοπαυσιακής παχυσαρκίας, το βάρος γέννησης, η ύπαρξη μαστογραφίας υψηλού κινδύνου, η έναρξη της έμμηνου ρήσης σε μικρή ηλικία αλλά και η είσοδος στην εμμηνόπαυση σε μεγάλη ηλικία, η ηλικία της πρώτης εγκυμοσύνης όπως και των επόμενων, ο αριθμός των τέκνων, η χρήση αντισυλληπτικών, η κατανάλωση αλκοόλ, η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία κ.λπ. καθώς και γενετικοί παράγοντες όπως τα γονίδια και το οικογενειακό ιστορικό. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι παράγοντες όπως ο θηλασμός, η συστηματική άσκηση, αλλά και διατροφή πλούσια

σε κατανάλωση φρούτων λαχανικών και ελαιόλαδου μπορούν να λειτουργήσουν αποτρεπτικά, ενώ υπάρχουν και παράγοντες όπως η εθνικότητα που εμφανίζουν διαφορετική εκδήλωση της νόσου ανάλογα με τις γεωγραφικές συνθήκες (Kamińska et al., 2015). Ειδικότερα αν υπάρχει η κληρονομική συνιστώσα είναι αναγκαίο το άτομο να εξετάζεται από νεαρή ηλικία αλλά και να εφαρμόζει μέσα (καλή διατροφή και άσκηση) που μπορούν να περιορίσουν, να καθυστερήσουν ή και να αποτρέψουν την εμφάνιση της νόσου. Αν και όλα αυτά ανήκουν στο πλαίσιο της πρόληψης δεν είναι πανάκεια για τη μη ανάπτυξη του καρκίνου. (Akram et al., 2017). Στην περίπτωση συγκεκριμένα του καρκίνου του μαστού, υπάρχει σαν επιλογή η προληπτική μαστεκτομή σε περίπτωση ύπαρξης κάποιου από τα πολύ επιβλαβή καρκινικά γονίδια σε συνδυασμό με βεβαρυμμένο οικογενειακό ιστορικό καρκίνων. Η αύξηση του αριθμού των προληπτικών μαστεκτομών τα τελευταία χρόνια είχε σαν απόρροια την σημαντική μείωση του ποσοστού των γυναικών που δυνητικά θα ανέπτυσαν κάποια στιγμή καρκίνο του μαστού. Για τις γυναίκες ωστόσο χωρίς οικογενειακό ιστορικό είναι σημαντική η αυτοεξέταση μία φορά το μήνα. Με την αυτοεξέταση μπορεί να γίνει αντιληπτός ένας νεοσχηματιζόμενος όγκος τον οποίο αντιλαμβανόμαστε σαν παρείσακτη μάζα ή εξόγκωμα. Εκτός βέβαια από αυτόν σημαντική είναι επιπροσθέτως η παρατήρηση κάποιας αλλαγής στο σχήμα, στο χρώμα ακόμα και στην υφή της θηλής, στοιχεία που υποδεικνύουν κάποια πιθανή ανωμαλία. Η αυτοεξέταση είναι επιθυμητό να ξεκινάει από την ηλικία των 20 ετών, ενώ για γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 40 χρόνων απαραίτητη είναι και η μαστογραφία κάθε 3 με 4 χρόνια.

Στην Εικόνα 5 απεικονίζονται τα στάδια που ακολουθούνται μέχρις ότου ένας φυσιολογικός μαστός να αναπτύξει όγκο κλινικά [12]. Στο πρώτο στάδιο της νόσου τα κύτταρα περιορίζονται στους πόρους όπου και πρωτοεμφανίστηκαν. Στη συνέχεια η διάμετρος του όγκου αυξάνεται χωρίς να ξεπερνάει τα 2 εκατοστά, ενώ κάποια από τα κύτταρα ίσως έχουν καταφέρει να περάσουν στους λεμφαδένες. Στο δεύτερο στάδιο, είτε η διάμετρος παραμένει μικρότερη των 2 εκατοστών με παράλληλη διείσδυση κυττάρων στους λεμφαδένες, είτε έχει μέγεθος από 2 έως 5 εκατοστά, χωρίς να παρατηρείται κάποια μετάσταση των κυττάρων. Στο τρίτο στάδιο ο όγκος εμφανίζεται σε ποικίλα μεγέθη, ενώ εξαπλώνεται στο θωρακικό τοίχωμα, στο υπερκείμενο δέρμα του μαστού, αλλά και σε λεμφαδένες στην περιοχή της μασχάλης, του στέρνου και σε σημεία της κλείδας. Στο τελικό στάδιο ο όγκος έχει προχωρήσει

αρκετά και μπορεί να δώσει μεταστάσεις σε άλλα όργανα με βασικότερα από αυτά τα οστά, τους πνεύμονες, το ήπαρ και τον εγκέφαλο (Tsang & Tse, 2020).



Εικόνα 5 Κλινική εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, (Overview, 2020.)

Κατηγορίες του καρκίνου του μαστού

Μία πρώτη διάκριση του καρκίνου του μαστού σχετίζεται με το ανατομικό σημείο του μαστού που προσβάλλεται και με το αν ο νεοσχηματιζόμενος όγκος προχωράει περαιτέρω στο σώμα. Μπορούν να προσβληθούν τόσο τα λόβια όσο και οι πόροι, αν και σε ένα μεγάλο ποσοστό περίπου 85-90% το καρκίνωμα που προκύπτει είναι πορογενές, δηλαδή προσβάλλει τους πόρους του μαστού. Οι κατηγορίες αυτές είναι:

- α) Ο μη διηθητικός καρκίνος, *in situ*, που αφορά μόνο επιθηλιακές νεοπλασίες στους πόρους ή στα λόβια του μαστού και
- β) Ο διηθητικός καρκίνος, όπου τα καρκινικά κύτταρα έχουν διηθήσει τη βασική μεμβράνη στο παρακείμενο στρώμα [15].

Μία άλλη κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού γίνεται με βάση τις ορμόνες που επηρεάζονται και τους υποδοχείς αυτών. Ειδικότερα, πρόκειται για τους υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης (ER και PR) και για τον HER2 ο οποίος είναι υποδοχέας που ανήκει στην οικογένεια του EGFR. Επιπροσθέτως, κριτήριο στη διάκριση αυτή είναι και η ύπαρξη του παράγοντα Ki67 (δείκτης πολλαπλασιασμού). Οι τύποι που προκύπτουν ανήκουν όλοι στους διηθητικούς και είναι οι εξής (Πίνακας 1) :

- 1) Λοβιακό καρκίνωμα τύπου A (Luminal A), ο πιο συχνός τύπος (περίπου 50%), και σε αυτόν υπάρχει παρουσία των ER και PR και χαμηλό ποσοστό του Ki67, ενώ

παρατηρείται απουσία του HER2. Είναι σχετικά ήπιος τύπος και για αυτό οι ασθενείς έχουν καλύτερη πρόγνωση

2) Λοβιακό καρκίνωμα τύπου B (Luminal B), εντοπίζεται και αυτός σε υψηλό ποσοστό, υπάρχει παρουσία των ER και PR και υψηλότερο ποσοστό του Ki67, ενώ ο HER2 μπορεί είτε να υπάρχει, είτε όχι. Σε αυτόν τον τύπο δίνεται χειρότερη πρόγνωση για αυτούς που τον έχουν

3) Υπερέκφραση HER2 (HER2 enriched), που εντοπίζεται σε περίπου ίδιο ποσοστό με τον προηγούμενο και όπως υποδηλώνει και το όνομα του, υπάρχει έντονη παρουσία HER2 και αρκετά υψηλά επίπεδα του Ki67. Η πρόγνωση είναι ιδιαίτερα κακή για αυτήν την περίπτωση.

4) Τριπλά αρνητικός καρκίνος (Triple Negative Breast Cancer - basal like), που εντοπίζεται σε ένα παρόμοιο ποσοστό ασθενών με τους προηγούμενους δύο τύπους, και στον οποίο υπάρχει μόνο αυξημένη έκφραση του Ki67. Και αυτός ο τύπος δίνει κακή πρόγνωση για τα άτομα που τον φέρουν (Tsang & Tse, 2020).

Πίνακας 1 Σύνοψη των χαρακτηριστικών των 4 τύπων καρκίνου του μαστού

	Luminal A	Luminal B	HER2 enriched	Triple negative
Παρουσία ER-PR	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Παρουσία HER2	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Παράγοντας Ki67	ΧΑΜΗΛΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΜΕΤΡΙΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΥΨΗΛΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΥΨΗΛΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Πρόγνωση	ΚΑΛΗ	ΚΑΚΗ > ΚΑΛΗ	ΚΑΚΗ	ΧΕΙΡΟΤΕΡΗ

Γονίδια που ενοχοποιούνται για τον καρκίνο του μαστού

Στον καρκίνο, είτε αυτός έχει γενετική συνιστώσα είτε είναι επίκτητος, ενέχονται περισσότερα από 170 γονίδια τα οποία υφίστανται κάποια τροποποίηση (μετάλλαξη) με αποτέλεσμα τελικά την ανάπτυξη του όγκου. Όταν υφίσταται γενετική συνιστώσα είναι πιο εύκολο να εντοπιστεί η κακοήθεια και να γίνει έγκαιρη διάγνωση αφού η ύπαρξη περιστατικών στην οικογένεια εφιστά την προσοχή για τους υπολοίπους, ανεξαρτήτως φύλου. Τα περισσότερα από τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για αυτή τη νόσο είναι χαρακτηριστικά και για αυτό πλέον υπάρχουν εξετάσεις τις οποίες μπορεί να πραγματοποιήσει οποιοδήποτε άτομο στην υπόνοια για ανάπτυξη καρκίνου. Στη συνέχεια αναφέρονται κάποια γονίδια, η μετάλλαξη των οποίων μπορεί να προκαλέσει τη νόσο ή να προδιαθέτει το άτομο για αυτή. Αυτά είναι :

-BRCA1,2, PTEN, TP53, STK11, CDH1 τα οποία εντοπίζονται στους κληρονομικούς τύπους και είναι τα πιο διαδεδομένα όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού (μόνο τα BRCA 1 και 2 οφείλονται για το 50-60% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του μαστού)

-HLF, IRF1, PTPN22, RHBDD3 τα οποία παίζουν κάποιο ρόλο στην ανοσία και στη φλεγμονή

-ATM, CHEK2, PALB2 τα οποία είναι γονίδια μετρίου κινδύνου και δεν εντοπίζονται σε μεγάλο ποσοστό

-BARD1, BRIP1, NBN, RAD50, RAD51C, RAD51D, τα οποία είναι γονίδια χαμηλού κινδύνου και ενέχονται και στον καρκίνο των ωοθηκών (Rossing et al., 2019)

Καρκίνος μαστού στους άνδρες

Ο καρκίνος του μαστού δεν προσβάλλει μόνο γυναίκες αλλά έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη περιπτώσεων όπου αρσενικά άτομα προσβάλλονται από αυτό τον τύπο καρκίνου. Αν και ο καρκίνος του μαστού στα θηλυκά άτομα αποτελεί την πιο συχνή μορφή με τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας, στα αρσενικά δε συμβαίνει κάτι αντίστοιχο. Ο καρκίνος του μαστού στους άντρες αποτελεί το 0.2% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου, ενώ οι άντρες συνολικά καταλαμβάνουν μόλις το 1% των

περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Λόγω του μικρού ποσοστού εμφάνισης του ανδρικού καρκίνου του μαστού στον πληθυσμό δεν έχει μελετηθεί αρκετά, ωστόσο οι επιστήμονες μέχρι σήμερα έχουν καταλήξει σε μία λίστα παραγόντων που θεωρούν ότι έχουν αυξημένο ρίσκο για την εμφάνισή του. Σε αυτήν περιλαμβάνονται :

α) Η ηλικία, όσο μεγαλύτερη η ηλικία τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου μαστού για έναν άνδρα,

β) Περιβαλλοντικοί παράγοντες και ακτινοβολία,

γ) Ορμονικοί παράγοντες, μελετάται η ισορροπία στο λόγο οιστρογόνα/ανδρογόνα,

δ) Γενετικοί παράγοντες, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στο σύνδρομο Klinefelter, στις μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA1 και ιδιαίτερα του BRCA2, καθώς και το οικογενειακό ιστορικό

ε) Προβλήματα στο συκώτι, π.χ. κίρρωση του ήπατος,

στ) Προβλήματα που επηρεάζουν τους όρχεις, τραυματισμοί, πρήξιμο, ακόμα και έπειτα από χειρουργική αφαίρεσή τους.

Καθώς εμφανίζεται σε άνδρες μεγαλύτερης ηλικίας (μέσος όρος εμφάνισης τα 67 έτη) έχει τις περισσότερες φορές κακή πρόγνωση, σε αυτό συμβάλλει και η καθυστερημένη διάγνωση. Όσον αφορά τα συμπτώματα που προϋδεάζουν το άτομο για την ύπαρξη της ασθένειας, αλλά και για τον υπότυπο του καρκίνου που θα αναπτυχθεί, οι επιστήμονες επισημαίνουν ότι δεν εντοπίζονται μεγάλες διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα. Για τον ίδιο λόγο, ακολουθείται παρόμοια θεραπευτική γραμμή με τα θηλυκά άτομα, στην οποία περιλαμβάνονται η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων, οι χημειοθεραπείες και ακτινοθεραπείες, ενώ και σε αυτή την περίπτωση μπορεί να χρειαστεί χειρουργική αφαίρεση των μαστών (Darre et al., 2020), (Masci et al., 2015), (Fernanda Servidoni Spreafico et al, 2020). Όσον αφορά την πρόληψη και επειδή ο τύπος αυτός είναι κατά βάση κληρονομικός, άτομα με οικογενειακό ιστορικό πρέπει να ελέγχονται αρχικά για τα συγκεκριμένα γονίδια.

Θεραπεία της νόσου

Μέχρι σήμερα έχουν γίνει σημαντικά βήματα και έχει περιοριστεί αισθητά ο αριθμός των θυμάτων, ενώ έχουν βρεθεί και τρόποι ώστε να είναι οι παρενέργειες των φαρμάκων πιο υποφερτές με αποτέλεσμα να παρατείνεται και η διάρκεια της

θεραπείας. Ο πιο συχνός τρόπος αντιμετώπισης σε πρώιμο στάδιο είναι η μαστεκτομή με χειρουργική επέμβαση. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων ο τρόπος αυτός αναστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου, χωρίς αυτό να είναι ο κανόνας. Σε περιπτώσεις όμως που η/ο ασθενής δε θέλει να προχωρήσει στην επέμβαση αυτή ή όταν δε θα δώσει λύση στο πρόβλημα ακολουθούνται άλλες μέθοδοι προκειμένου να βελτιωθεί η κατάσταση. Σε αυτές περιλαμβάνονται η ραδιοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται μετά τη χειρουργική επέμβαση ώστε οι ακτίνες X να θανατώσουν τυχόν εναπομείναντα κύτταρα. Αν και σαν διαδικασία είναι ανώδυνη μπορεί να έχει επίπονες παρενέργειες όπως πόνος ή αλλοιώσεις στο δέρμα γύρω από το σημείο. Η χημειοθεραπεία αφορά τη λήψη φαρμάκων και χρησιμοποιείται συνδυαστικά με το χειρουργείο, όχι όμως συνήθως με τη ράδιο και την ορμονοθεραπεία. Σε αυτή την περίπτωση τα φάρμακα που θα χορηγηθούν εξαρτώνται από τον τύπο του καρκίνου αλλά και από το κατά πόσο ο κάθε ασθενής ανέχεται τις παρενέργειες. Η διάρκεια αλλά και οι δόσεις χορήγησης διαφέρουν και αυτές από ασθενή σε ασθενή αλλά και από την ανταπόκριση του κάθε οργανισμού (Radecka & Litwiniuk, 2016). Βέβαια αξίζει να σημειωθεί ότι πέρα από όλες αυτές τις μορφές θεραπείας, στο παιχνίδι μπαίνει και η ανοσοθεραπεία, αφού γίνονται έρευνες για την εύρεση εμβολίων που θα μπορέσουν να προλάβουν την ανάπτυξη της νόσου αυτής.

Στις περιπτώσεις των ορμονοευαίσθητων καρκίνων του μαστού (ER⁺, HER2⁺), η ορμονοθεραπεία ανήκει στην πρώτη γραμμή αντιμετώπισης, όπως και η χημειοθεραπεία. Στον ER⁺ τύπο πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται SERMs (selective estrogen receptor modulators) με πιο γνωστή την ταμοξιφαίνη, AIs (aromatase inhibitors) και SERDs (selective estrogen receptor degrader) έτσι ώστε να στοχεύσουν απευθείας τις σηματοδοτικές οδούς των ορμόνες που υπερδραστηριοποιούνται σε αυτόν τον τύπο (Brufsky & Dickler, 2018). Μέχρι τώρα τα πιο συχνά χορηγούμενα φάρμακα τα οποία έχουν πάρει έγκριση από την FDA είναι τα Palbociclib (Ibrance), Ribociclib (Kisqali) και Everolimus (Afinitor) που χορηγούνται σε προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Επίσης έγκριση από τον FDA έχουν πάρει και το Abemaciclib (Verzenio) το οποίο χορηγείται και σε περιπτώσεις πρόληψης επανεμφάνισης της νόσου, αλλά και το Alpelisib (Piqray) το οποίο χορηγείται όταν ανιχνεύεται μετάλλαξη στο γονίδιο PIK3CA. Στην άλλη περίπτωση των ορμονοευαίσθητων καρκίνων (HER2⁺) χορηγούνται διαφορετικές

φαρμακευτικές ουσίες, πιο εξειδικευμένες για αυτόν τον τύπο, που έχουν πάρει και αυτές έγκριση από τον FDA. Αυτές είναι οι Trastuzumab (Herceptin) και Pertuzumab (Perjeta) που χορηγούνται μαζί με χημειοθεραπεία, το Tucatinib (Tukysa) το οποίο σε συνδυασμό με τα Trastuzumab and Capecitabine (Xeloda) χρησιμοποιείται σε όγκους που δεν επιδέχονται εγχείρησης και οι Lapatinib (Tykerb), Neratinib Maleate (Nerlynx) και Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla) [13].

Γενικά, στους ορμονοευαίσθητους τύπους καρκίνου του μαστού, η ορμονοθεραπεία στοχεύει κύτταρα που δεν έχουν ανιχνευθεί ή κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει σε γειτονικούς ιστούς (Kubo et al, 2020). Επειδή στον τύπο αυτό έχουμε την παρουσία ορμονών η πρωταρχική αντιμετώπιση βασίζεται στην ενδοκρινή θεραπεία και στη χρήση των αναστολέων των κινασών 4 και 6. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι ασθενείς εμφανίζουν αντίσταση στη θεραπεία αυτή (χαρακτηρίζεται πρωτογενής ή δευτερογενής και η διάκριση αφορά τον χρόνο εμφάνισης- 6 μήνες). Εξαιτίας του γεγονότος αυτού το ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μελέτη του μονοπατιού PI3K/ Akt/ mTOR. Ειδικά το mTOR μονοπάτι ενεργοποιείται κατά τη δευτερογενή αντίσταση έπειτα και από την απορρύθμιση των κυκλινών 4 και 6 και του Rb (Ρετινοβλάστωμα) μονοπατιού. Με την ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR επάγεται η παραγωγή των οιστρογονικών υποδοχέων και επέρχεται κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Στο συγκεκριμένο στάδιο της θεραπείας λοιπόν, χορηγούνται αναστολείς του PI3K, του Akt, του mTOR, αλλά και συνδυαστικά αναστολείς mTOR και του PI3K.

Πολλές φορές στη θεραπεία αυτών των τύπων (ER⁺, HER2⁺) εντάσσονται 3 ή και περισσότερα φάρμακα και ο γενικός στόχος είναι η καταστολή της παραγωγής των οιστρογόνων ή η καταστροφή των υποδοχέων τους. Ωστόσο όσο περισσότερα φάρμακα χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της νόσου τόσο περισσότερες είναι και οι παρενέργειες. Επομένως είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης ενός φαρμάκου που θα έχει αρκετά από τα οφέλη του κάθε φαρμάκου ξεχωριστά, με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα είναι το Everolimus που είναι αναστολέας της ραπαμυκίνης, αλλά και το Alpelisib το οποίο είναι αναστολέας του PI3K μονοπατιού. Μάλιστα οι (Baselga et al., 2011)) συνδύασαν το Everolimus με αναστολείς της αρωματάσης (εξεμεστάνη) για ασθενείς με αυτόν τον τύπο και διαπίστωσαν ότι μπορεί να αυξήσει το προσδόκιμο ζωής του ασθενούς. Παρ' όλα αυτά, τα συγκεκριμένα φάρμακα έχουν μεγάλη τοξικότητα και

δε γίνονται ανεκτά από τους περισσότερους ασθενείς (Pauline du Rusquec et al, 2020).

Από την άλλη, όσον αφορά την περίπτωση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, οι μέθοδοι που ακολουθούνται στη θεραπεία διαφέρουν κατά βάση από τον προηγούμενο τύπο καθώς χαρακτηρίζεται από απουσία ορμονών και η ενδοκρινή θεραπεία δεν θα είχε κάποιο αποτέλεσμα. Η απουσία των ορμονών αλλά και η υψηλή μεταστατική ικανότητα του τύπου αυτού τον καθιστούν ως αυτόν με τη χειρότερη πρόγνωση. Συνήθως χρησιμοποιούνται οι συμβατικές θεραπείες αν και η χημειοθεραπεία αποτυγχάνει σε ένα ποσοστό 90%. Μάλιστα φαίνεται πως υπάρχει πολύ μεγαλύτερος κίνδυνος υποτροπής μέσα σε 5 χρόνια. Καθώς εμφανίζει ομοιότητες με τον τύπο BRCA1 θεωρείται ότι το κομμάτι αυτό είναι μη λειτουργικό ενώ γενικά στόχος στην περίπτωση αυτή είναι σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα Notch, Hedgehog, Wnt/b catenin και το TGF beta, τα οποία μπλοκάρονται με απώτερο σκοπό να ενεργοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα και να επαχθεί απόπτωση. Επιπλέον χρησιμοποιούνται και αναστολείς των EGFR, PARP και mTOR που συμμετέχουν και αυτοί στην πρόκληση αυτοφαγίας, όπως και φάρμακα που επεμβαίνουν στην EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) μετάβαση. Επιπροσθέτως, και σε αυτόν τον τύπο χρησιμοποιούνται ανταγωνιστές των ανδρογονικών υποδοχέων, καθώς οι υποδοχείς αυτοί εντοπίζονται σε ένα ποσοστό της τάξης του 10%. Από όλα αυτά συμπεραίνουμε ότι στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου του μαστού δεν υπάρχει στοχευμένη θεραπεία (Medina et al., 2020) [13]. Όσον αφορά το μονοπάτι mTOR για το συγκεκριμένο τύπο έχουν γίνει αρκετές μελέτες με διαφορετικού συνδυασμούς φαρμάκων. Οι (Park et al., 2016) μελέτησαν τη δοξορουμπικίνη που επάγει την αυτοφαγία, ενώ οι (Guo & Pei, 2019) μελέτησαν την τετραϊδρίνη που έχει και αυτή την ίδια δράση καθώς αναστέλλει το PI3K/ AKT/ MTOR μονοπάτι. Δεν υπάρχουν εγκεκριμένα από τον FDA φάρμακα για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, όμως τα Sacituzumab govitecan-hziy (Trodelvy) και Pembrolizumab (Keytruda) βρίσκονται σε φάσεις δοκιμών, ενώ παράλληλα χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σχήματα με φάρμακα που χορηγούνται και σε άλλους τύπους καρκίνου.

Κάποια βασικά θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται στον Τριπλά Αρνητικό Καρκίνο του Μαστού είναι τα εξής :

-Taxel/ Docetaxel και Adriamycin και cyclophosphamide (TAC)

- Docetaxel και Cyclophosphamide (TC)
- Adriamycin και Cyclophosphamide (AC)
- Cyclophosphamide και methotrexate και fluorouracil (CMF)
- Cyclophosphamide και Adriamycin και fluorouracil (CAF)
- Cyclophosphamide και Epirubicin και fluorouracil και paclitaxel/docetaxel (CEF-T) (Bergin & Loi, 2019)

Γενικά, αν αποτύχουν ή αν εμφανισθεί αντίσταση σε όλους του παραπάνω διαφορετικούς τρόπους θεραπευτικών σχημάτων δοκιμάζονται νέες πιο εξελιγμένες, αλλά λιγότερο δοκιμασμένες τεχνικές, όπως είναι η υπερθερμία και η φωτοδυναμική θεραπεία, αλλά και τεχνικές με βάση τα νανοσωματίδια και την τεχνητή νοημοσύνη.

1.1.4 Ορμονοεξαρτώμενος ER⁺ καρκίνος μαστού (Luminal A & B)

Ο θετικός στον οιστρογονικό υποδοχέα (ER⁺) καρκίνος του μαστού αποτελεί μία κατηγορία της εν λόγω νόσου που αφορά τους τύπους στους οποίους υπάρχει έντονη η παρουσία των οιστρογονικών υποδοχέων και των υποδοχέων προγεστερόνης (ER⁺, PR⁺). Μάλιστα ο τύπος αυτός καταλαμβάνει περίπου το 70% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του μαστού σε παγκόσμιο επίπεδο (Brufsky & Dickler, 2018).

Υπάρχουν δύο γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή των ER, τα ER-alpha (ESR1) και ER-beta (ESR2). Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού βασικό ρόλο παίζει το ESR1 που ενέχεται σε δύο μονοπάτια, το κλασικό ή πυρηνικό και το εναλλακτικό ή μη πυρηνικό. Στο κλασικό μονοπάτι η αλληλεπίδραση των ER με μόρια του μονοπατιού επάγει τη μεταγραφή παραγόντων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, συμβάλλουν στην απόπτωση και στην αγγειογένεση κ.α. Στο εναλλακτικό μονοπάτι από την άλλη, οι ER συμμετέχουν στη σηματοδότηση ρυθμιστικών παραγόντων και μορίων όπως είναι οι FGFR και HER2, κάποιες κινάσες, τα AKT, mTOR, CDK κ.α.

Ανάλογα με την έκφραση αλλά και το ποσοστό της έκφρασης των ορμονών αυτών και του HER2 παράγοντα, ο τύπος αυτός χωρίζεται σε υποκατηγορίες στις οποίες περιλαμβάνονται:

- α) Luminal A και B,
- β) HER2-enriched,

γ) basal-like και

δ) normal-like

Καθένας από αυτούς τους υποτύπους εμφανίζει διαφορετική μορφολογία και έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά και για αυτό είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τον εκάστοτε υπότυπο του καρκίνου ώστε να δίνεται ειδική και στοχευμένη θεραπεία

1.1.5 Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος μαστού (Triple Negative Breast Cancer)

Ο Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος του Μαστού πήρε το όνομά του από το γεγονός ότι δεν έχει καμία παρουσία ορμονών (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) και αφορά το 15% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Έχει παρατηρηθεί ότι ο τύπος αυτός προσβάλλει κυρίως νεαρές γυναίκες, κάτω των 40 ετών που βρίσκονται πριν την εμμηνόπαυση (Yin et al., 2020). Μάλιστα ο τύπος αυτός εμφανίζεται σε σχεδόν τριπλάσια συχνότητα στις Αφροαμερικανίδες, χωρίς όμως να έχει βρεθεί το αίτιο αυτού του γεγονότος (Chavez et al., 2010). Μιας και εδώ πρόκειται για έναν ορμονοανθεκτικό τύπο καρκίνου, η ορμονοθεραπεία δεν έχει κανένα αποτέλεσμα και δοκιμάζονται εναλλακτικές και εξατομικευμένες θεραπείες και κυρίως, η χημειοθεραπεία (Yin et al., 2020). Ένα μειονέκτημα που ξεχωρίζει αυτόν τον τύπο από τους ορμονοεξαρτώμενους τύπους είναι ότι διακρίνεται από υψηλή διεισδυτικότητα και μεταστατική ικανότητα και έχει εξαιρετικά κακή πρόγνωση, ειδικά αν δε διαγνωσθεί εγκαίρως. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό του τύπου αυτού είναι ότι εμφανίζει υψηλή συγκέντρωση βιμεντίνης (περίπου 35% σε σχέση με τους άλλους τύπους όπου το ποσοστό είναι περίπου 10%) (Chavez et al., 2010). Όσον αφορά τη διάκριση, και αυτός ο τύπος διακρίνεται σε έξι υποκατηγορίες με μεγάλη ετερογένεια:

α) την Basal A που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη κυτοκερατινών και εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα,

β) την Basal B που σχετίζεται κυρίως με την ικανότητα του τύπου αυτού να δίνει μεταστάσεις και χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα πρωτεάσων, κολλαγόνων και άλλους παράγοντες που ενισχύουν αυτόν τον ρόλο,

γ) τον μεσεγχυματικό τύπο (mesenchymal, M) που σχετίζεται και αυτός με τη μετάσταση αλλά και με τη διαφοροποίηση των κυττάρων και σε αυτόν ενέχονται πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το Wnt,

δ) τον μεσεγχυματικό τύπο βλαστικών κυττάρων -(mesenchymal stem-like, MSL), που διαφέρει με τον προηγούμενο στα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων που περιλαμβάνει

ε) τον ανοσορυθμιζόμενο (immunomodulatory, IM) που σχετίζεται με ανοσιακούς μηχανισμούς και διαθέτει όλους τους τύπους κυττάρων που ενέχονται στην ανοσία,

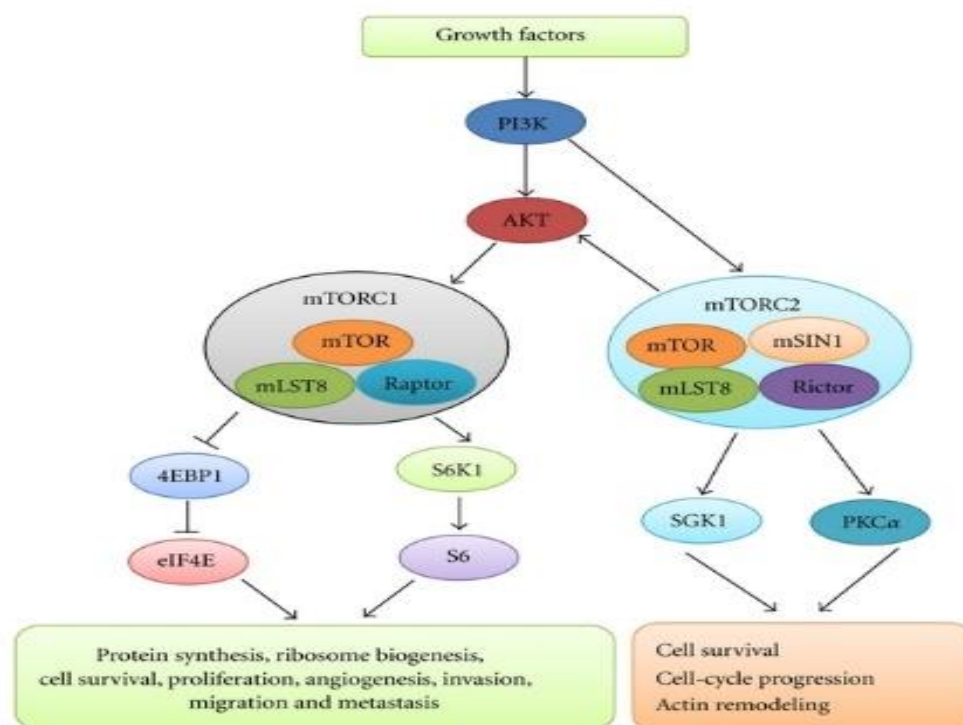
στ) τον luminal androgen receptor (LAR) που εντοπίζεται όταν έχουμε ύπαρξη ανδρογονικών υποδοχέων (σχεδόν δεκαπλάσια συγκέντρωση σε σχέση με τους άλλους πέντε υποτύπους) και είναι ο μοναδικός υπότυπος που διαφέρει σε τόσο μεγάλο βαθμό από όλους τους υπόλοιπους (Yin et al., 2020).

1.2 Μονοπάτι mTOR

Η πρωτεΐνη mTOR, ή αλλιώς mammalian target of rapamycin, είναι μία PI3 κινάση που ενέχεται στην ανάπτυξη του κυττάρου μέσω αναστολής της αυτοφαγίας, ενώ η λειτουργία της βασίζεται στην ύπαρξη θρεπτικών και αυξητικών παραγόντων. Στην ουσία υπάρχουν 2 βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την mTOR, το PI3K/AKT/MTOR που τη ρυθμίζει θετικά και το LKB1/AMPK/MTOR που τη ρυθμίζει αρνητικά. Στην πρώτη περίπτωση του μονοπατιού υπάρχουν 2 βασικά τμήματα που το ρυθμίζουν, τα mTORC1 και mTORC2 (Εικόνα 6,8). Η διάκριση του mTORC1 από το mTORC2 είναι η ύπαρξη της πρωτεΐνης RAPTOR στο πρώτο, ενώ στο δεύτερο του RICTOR αντίστοιχα.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται το mTORC1 οδηγούν στη σύνθεση πρωτεϊνών και ριβοσωμάτων, στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό, ενώ συμβάλλουν και στην αγγειογένεση, την εισχώρηση, τη μετανάστευση και τη μετάσταση των κυττάρων. Επιπροσθέτως, το mTORC1 καθοδικά φαίνεται πως ενεργοποιεί την P70S6K μέσω φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα να πυροδοτείται η έναρξη της μετάφρασης και η σύνθεση των πρωτεϊνών των ριβοσωμάτων αλλά και αυξητικών παραγόντων. Για αυτό και έχει διαπιστωθεί ότι η καταστολή της p70 κινάσης παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή του mTORC1 μονοπατιού και στον περιορισμό κατ' επέκταση της παραγωγής όλων

αυτών των μορίων. Στόχος ουσιαστικά των φαρμάκων της S6K είναι η αποφωσφορυλίωσή της ή εξαρχής η αποφυγή της φωσφορυλίωσης. Γενικότερα φαίνεται πως στο 45% των περιπτώσεων όπου το μονοπάτι mTOR ενέχεται σε έναν τύπο καρκίνου, αυτό οφείλεται στην αυξημένη έκφραση του P70S6K (Sahin et al., 2004).



Εικόνα 6 Το mTOR μονοπάτι (Figure 2 | mTOR Pathway and MTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer, 2012)

Το mTORC2 από την άλλη προωθεί την κυτταρική επιβίωση και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, ενώ βοηθά και στην αναδιαμόρφωση της ακτίνης. Επιπλέον, ενέχεται και στην έκφραση της ινσουλίνης, μέσω της οποίας ρυθμίζεται και ο μεταβολισμός της γλυκόζης και των λιπιδίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο αυτά κομμάτια είναι ανεξάρτητα, δηλαδή η αναστολή του ενός δεν επηρεάζει τη δράση του άλλου.

1.2.1 Το μονοπάτι mTOR στον καρκίνο του μαστού

Η δράση του mTOR συνήθως απορρυθμίζεται στις περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου. Η απορρύθμιση του μονοπατιού αυτού μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις των PI3K, PTEN, AKT, S6K1, 4EBP1 και eIF4E οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα είτε τη

διακοπή είτε την υπερλειτουργία του μονοπατιού. Επιπλέον η ρύθμιση του μονοπατιού αυτού απορρυθμίζεται και από τη μεταβολή της έκφρασης των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων που βρίσκονται ανοδικά του. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των υποδοχέων είναι οι HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) και οι IGFR (insulin-like growth factor receptor) ενώ η μετάλλαξή τους έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή του μονοπατιού και άρα την αναστολή της έκφρασης όλων των μορίων που προκύπτουν από αυτό. Παράλληλα, το ανοδικό κομμάτι του μονοπατιού αυτού επηρεάζεται και από μεταλλάξεις του PI3K και του AKT που οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα. Όσον αφορά το τμήμα του μονοπατιού καθοδικά του mTOR, σε αυτό ενέχονται κυρίως οι S6K1 κινάση, ο eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) και ο 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1) που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και παραγωγή των παραπάνω μορίων μέσω φωσφορυλίωσης. Υπερέκφραση των τελευταίων είναι δείκτης κακής πρόγνωσης για κάθε τύπο καρκίνου αφού έχει ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη παραγωγή των μορίων και των αυξητικών παραγόντων, διευκολύνοντας έτσι και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [14].

Ανεξάρτητο από την αυτοφαγία mTOR μονοπάτι

Παρόλο που ο mTOR είναι άμεσα συνδεδεμένος με την αυτοφαγία, υπάρχει και ένα κομμάτι της στο οποίο αυτός δεν περιλαμβάνεται. Αυτό εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ασβεστίου που είναι διαθέσιμο και το οποίο επάγει την αυτοφαγία. Πιο συγκεκριμένα, το μονοπάτι αυτό ξεκινάει όταν υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση cAMP, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η EPAC (exchange protein directly activated by cAMP). Αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση Cε (PLCε), η οποία ενεργοποιεί στη συνέχεια την ινοσιτόλη Ins(1,4,5)P3R ή τους οιστρογονικούς υποδοχείς (ER). Όλα αυτά οδηγούν στην απελευθέρωση ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου με αποτέλεσμα την αναστολή της αυτοφαγίας (Choi et al., 2016).

1.2.2 Το mTOR μονοπάτι σαν στόχος για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για τον καρκίνο του μαστού

Το μονοπάτι αυτό έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τους ερευνητές όσον αφορά την αντιμετώπιση του καρκίνου και για αυτό γίνεται συνεχής προσπάθεια ανακάλυψης νέων φαρμάκων που επιδρούν σε αυτό. Το πρώτο φάρμακο που βρέθηκε ότι ασκεί δράση στο mTOR μονοπάτι είναι η ραπαμυκίνη, η οποία ανακαλύφθηκε αρχικά μέσω ελέγχου του στελέχους *Streptomyces hygroscopicus*. Φαίνεται ότι δρα αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση του FKBP12 με την mTOR και έτσι αναστέλλει τόσο το mTORC1, όσο και το mTORC2. Μεταλλάξεις στο τμήμα αυτό οδήγησαν στην αναζήτηση νέων ουσιών, παράγωγων της ραπαμυκίνης, που θα έχουν καλύτερη και πιο στοχευμένη δράση (J et al., 2014). Έτσι με την πάροδο του χρόνου γίνονται εκ νέου μελέτες και ανακαλύπτονται συνεχώς νέοι, πιο εξειδικευμένοι αναστολείς. Σήμερα στο «οπλοστάσιο» για τη στόχευση του mTOR ανήκουν αναστολείς πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς που εξελίσσονται σταδιακά.

Αναστολείς πρώτης γενιάς

Στους αναστολείς της κατηγορίας αυτής ανήκουν τα ανάλογα της ραπαμυκίνης (rapalogs), τα οποία στοχεύουν και αυτά απευθείας και τα δύο τμήματα του μονοπατιού (mTORC1 & 2), αν και όχι με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Η βασική διαφορά τους με τη ραπαμυκίνη, είναι ότι σαν ουσίες διαλύονται στο νερό με μεγαλύτερη ευκολία, ενώ είναι πολύ πιο σταθερές όσον αφορά τη δράση τους. Στην κατηγορία αυτή υπάγεται μία πληθώρα φαρμάκων όπως τα CCI-779 (Temozolimum), RAD001 (Everolimum), Deforolimum (Ridaforolimum), NVP-BEZ235, GSK212658, XL765, CC-115, Zotarolimum, Niclosamide, PI-103, PKI-179 και 587, CC-223, OSI027 κ.α. Οι τρεις πρώτοι αναστολείς έχουν μελετηθεί εκτενέστερα και χρησιμοποιούνται ήδη σε μελέτες και θεραπευτικές αγωγές. Επειδή όμως στις περισσότερες περιπτώσεις οι αναστολείς πρώτης γενιάς δεν εμφανίζουν τα επιθυμητά αποτελέσματα, αναζητήθηκε άλλος στόχος ο οποίος θα επιδρά καλύτερα στον ήδη υπάρχοντα αλλά και σε κάποιο άλλο σημείο του μονοπατιού. Έτσι οι επιστήμονες κατέφυγαν στους επονομαζόμενους αναστολείς δεύτερης γενιάς.

Αναστολείς δεύτερης γενιάς

Οι αναστολείς δεύτερης γενιάς επιδρούν καλύτερα στο mTORC2 τμήμα του μονοπατιού (κομμάτι στο οποίο υστερούν της πρώτης), όπως επίσης στοχεύουν και

στο ενεργειακό κομμάτι του μονοπατιού ανταγωνιζόμενοι το ATP. Σαν κατηγορία ονομάζονται και TORKinibs και περιλαμβάνουν τις εξής ουσίες : AZD8055, AZD2014, XL388, MLN0128, PP242, Torin, Samotolisib, ZD1839, KU0063794, PP30, WYE354 κ.α. (Thomson et al., 2016).

Αναστολείς τρίτης γενιάς

Στους αναστολείς τρίτης γενιάς, που είναι και οι πιο σύγχρονοι και λιγότερο μελετημένοι και διαδεδομένοι, ανήκει προς το παρόν μόνο το φάρμακο Rapalink1 για το οποίο οι έρευνες βρίσκονται ακόμα σε πολύ αρχικά στάδια και δεν έχει βγει κάποιο συμπέρασμα. Ουσιαστικά πρόκειται για συνδυαστικό φάρμακο που έχει προκύψει από τη ραπαμυκίνη και τον αναστολέα δεύτερης γενιάς MLN0128 και το οποίο φαίνεται να ασκεί τη δράση του σε πληθώρα μονοπατιών, με πολλή μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. (Kuroshima et al., 2020).

Αναστολείς του mTOR μονοπατιού και του σηματοδοτικού του μονοπατιού που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία

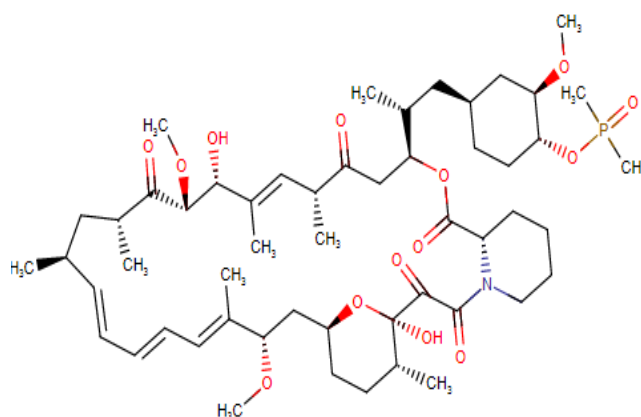
Για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων και προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση τους σε διαφορετικά σημεία του μονοπατιού mTOR, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής αναστολείς:

1. EVEROLIMUS (RAD-001)
2. DEFOROLIMUS (AP23573) – [Ridaforolimus]
3. AZD8055
4. AZD2014 (Vistusetribe)
5. XL388
6. PF4708671

Πιο αναλυτικά :

1. Το Everolimus είναι αναστολέας πρώτης γενιάς και μάλιστα είναι από τους πρώτους που χρησιμοποιήθηκαν ως ανάλογα της ραπαμυκίνης για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Η δράση του αφορά το κομμάτι FKBP12 καθώς και το mLST8 καθοδικά του μονοπατιού mTOR. Είναι ένα κλασικό αντικαρκινικό φάρμακο το οποίο χρησιμοποιείται και στους δύο τύπους καρκίνου που μελετάμε σε αυτή τη σειρά πειραμάτων (τόσο σε ER⁺, όσο και σε τριπλά αρνητικό καρκίνο). Σε αντίθεση με άλλα φάρμακα το Everolimus δρα συνδυαστικά με άλλα φάρμακα με

(Merck et al., 2010). Ιδιαίτερα έχει μελετηθεί η δράση του Ridaforolimus με το Dalotuzumab σε ορμονοευαίσθητους τύπους καρκίνου και έχει διαπιστωθεί ότι ο συνδυασμός αυτός έχει ισχυρή δράση στην καταπολέμηση της ασθένειας αυτής, όταν καμία άλλη θεραπεία δε μπορεί να δώσει λύση (Becker et al., 2016). Λόγω των παρενεργειών της συνδυαστικής δράσης των δύο αυτών φαρμάκων, έγιναν περαιτέρω μελέτες στις οποίες προστέθηκε και το φάρμακο exemestane που είναι ένας αναστολέας της αρωματάσης (Rugo et al., 2017). Σύμφωνα με αυτές λοιπόν, η προσθήκη και αυτού του φαρμάκου είχε πολύ θετικά αποτελέσματα στην έκβαση της ασθένειας, ενώ μειώθηκαν και οι ανεπιθύμητες ενέργειες. Στις κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν χορηγήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των τριών αυτών φαρμάκων και με διαφορετικούς συνδυασμούς έτσι ώστε να βρεθεί το καλύτερο δυνατό πρότυπο θεραπείας. Στο τέλος, αυτό που διαπιστώθηκε ήταν ότι η τριπλή χορήγηση των φαρμάκων είχε πολύ θετικότερα αποτελέσματα συγκριτικά με τη χορήγηση μόνο των δύο πρώτων και έτσι καθιερώθηκε αυτός ο τρόπος θεραπείας για τους ορμονοευαίσθητους τύπους καρκίνου του μαστού (Baselga et al., 2013).

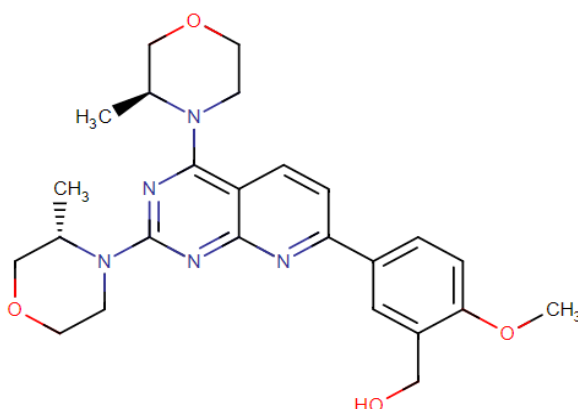


Εικόνα 7(β): Χημική δομή Deforolimus

Το φάρμακο αυτό (Εικόνα 7β) ανήκει στα μακρολίδια και περιλαμβάνει κυκλικές εστερικές ομάδες και κυκλικά αμιδία. Έχει μοριακό βάρος 990.222g/mol και ο μοριακός του τύπος είναι ο $C_{53}H_{84}NO_{14}P$. <https://go.drugbank.com/drugs/DB06233>

3. Το AZD8055 είναι ένας αναστολέας δεύτερης γενιάς με δράση κινάσης που ανταγωνίζεται το ATP στο μονοπάτι του mTOR, ενώ αναστέλλει τόσο το mTORC1 όσο και το mTORC2. Πιο συγκεκριμένα δρα μέσω του P13k και του ATM/ DNA-PK κομματιού του μονοπατιού, και ιδιαίτερα όσον αφορά το mTORC1 στοχεύει στον

P70S6K και 4EBP1, ενώ όσον αφορά το mTORC2 στοχεύει στο AKT. Καθώς είναι αναστολέας δεύτερης γενιάς, άρα πιο καινοτόμο φάρμακο, δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα όσο αυτά της πρώτης γενιάς που βασίζονται στη ραπαμυκίνη. Μία έρευνα που έγινε από τους (Shi et al., 2018), μελέτησε την επίδραση του φαρμάκου αυτού σε άτομα με ER⁺ καρκίνο μαστού, τα οποία είχαν αποκτήσει ανθεκτικότητα στη δράση της ταμοξιφαίνης, που μέχρι τότε ήταν το πιο αποτελεσματικό φάρμακο για αυτόν τον τύπο καρκίνου. Μάλιστα στην έρευνα αυτή μελετήθηκε ιδιαίτερα η κυτταρική σειρά MCF7 που είναι χαρακτηριστική αυτού του τύπου καρκίνου (έτσι ενισχύονται ακόμα περισσότερο τα αποτελέσματα του δικού μας πειράματος) (Shi et al., 2018). Λόγω των καινοτόμων αποτελεσμάτων που δίνει αυτό το φάρμακο σε in vitro έρευνες, πλέον μελετάται και in vivo και μάλιστα βρίσκεται ήδη στη φάση 1 κλινικών δοκιμών για διάφορους τύπους καρκίνου (Naing et al., 2012).



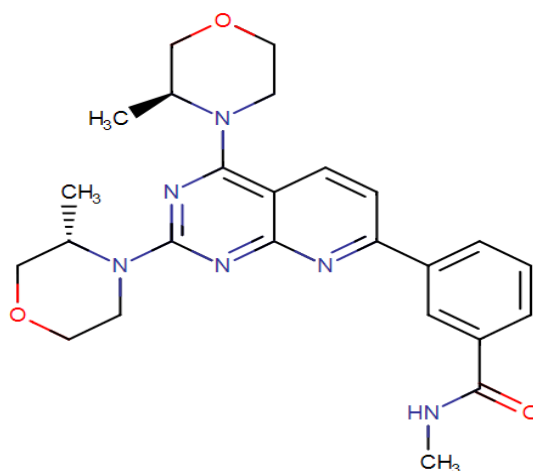
Εικόνα 7(γ): Χημική δομή AZD8055

Το μόριο αυτό ανήκει στην οικογένεια των φαινυλοπυριδινών (Εικόνα 7γ). Τα μόρια αυτά είναι αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν μία φαινυλική ομάδα που συνδέεται με μία πυριδίνη μέσω ενός C-C ή C-N δεσμού. Έχει μοριακό βάρος 465.554g/mol και ο μοριακός του τύπος είναι ο C₂₅H₃₁N₅O₄.

<https://go.drugbank.com/drugs/DB12774>

4. Το AZD2014 έχει παρόμοια δράση με το AZD8055. Είναι και αυτός ένας αναστολέας δεύτερης γενιάς με δράση κινάσης, που ανταγωνίζεται το ATP, ενέχεται στο κομμάτι του P13k και ασκεί τη δράση του τόσο στο mTORC1 όσο και στο mTORC2. Μάλιστα, ο συγκεκριμένος αναστολέας έχει ισχυρότερη επίδραση στην αναστολή του mTORC1 σε σχέση με παρόμοιας στόχευσης φάρμακα. Επιπλέον, άλλη μία προϋπόθεση για να ασκήσει τη δράση του, είναι η κυτταρική σειρά να εμφανίζει αντίσταση στην ορμονοθεραπεία, όπως γίνεται και με το AZD8055. Η

δράση αυτή ασκείται σε όλες τις καρκινικές σειρές καρκίνου μαστού που έχουν μελετηθεί, ωστόσο στα MCF7 κύτταρα, που είναι και ER⁺ αλλά και ανθεκτικά στα κλασικά φάρμακα, έχει καλύτερα αποτελέσματα. Στον συγκεκριμένο αναστολέα, σύμφωνα με τους Sylvie M. Guichard et al, σημαντικό ρόλο στη δράση παίζει τόσο η δόση του φαρμάκου που θα χορηγηθεί, όσο και το χρονικό διάστημα το οποίο θα διαρκέσει η χορήγηση. Για όλους αυτούς του λόγους ο συγκεκριμένος αναστολέας είναι πολλά υποσχόμενος στην αντιμετώπιση αυτού του τύπου καρκίνου, για αυτό και γίνονται συνεχείς μελέτες, ενώ έχει φτάσει και στη φάση 2 των κλινικών δοκιμών (Guichard et al., 2015).



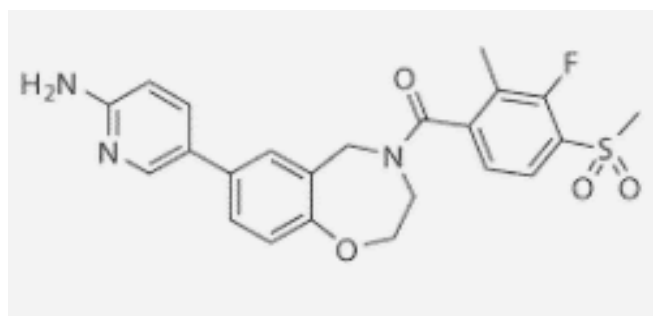
Εικόνα 7(δ): Χημική δομή AZD2014

Ομοίως με το AZD8055 και το μόριο αυτό ανήκει στην οικογένεια των φαινυλοπυριδινών και έχει παρόμοια δομή (Εικόνα 7δ). Το δικό της μοριακό βάρος είναι 462.554g/mol και ο μοριακός τύπος είναι C₂₅H₃₀N₆O₃.

<https://go.drugbank.com/drugs/DB11925>

5. Ο αναστολέας αυτός (XL388) δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα στον καρκίνο του μαστού, αλλά σχετικές έρευνες έχουν γίνει για το γλοίωμα, για τον καρκίνο στον νεφρό κ.α. Από τις μελέτες αυτές φάνηκε ότι αυτός ο αναστολέας δεύτερης γενιάς ασκεί τη δράση του ανταγωνιζόμενος και αυτός τη θέση πρόσδεσης του ATP. Ειδικότερα μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση της p70s6k από τον mTORC1 και του AKT από τον mTORC2 (κυρίως στα MCF7 κύτταρα). Γενικά, το XL388 αναστέλλει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων που στοχεύει, ενώ επιδρά και στον κυτταρικό κύκλο προκαλώντας απόπτωση (Shan Zhong et al., 2020). Μία σημαντική δράση του XL388, η οποία δε σχετίζεται όμως με τον καρκίνο του μαστού, είναι ότι επιδρά και στους παράγοντες υποξίας HIF1a και HIF2a σε RCC

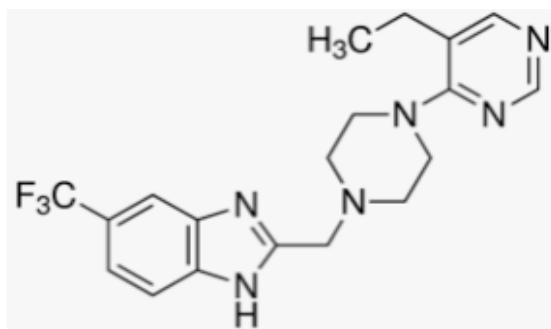
κύτταρα. Η δράση του γενικά φαίνεται ότι είναι πολύ πιο αποτελεσματική συγκριτικά με τους αναστολείς πρώτης γενιάς που αναφέρθηκαν παραπάνω. Σε in vivo πείραμα φάνηκε ότι συνδυαστικά με τη χρήση του αναστολέα MEK162 του EK-ERK μονοπατιού μπορεί να αναστείλει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη RCC κυττάρων (Xiong et al., 2017). Σε μία άλλη μελέτη από τους Songyeon Choi et al, φάνηκε ότι συνδυασμός του XL388 με την Torin είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης των mTOR, E-BP1, p70S6K και PKCα, χωρίς να επηρεάζει το Akt (Songyeon et al., 2020).



Εικόνα 7(ε): Χημική δομή XL388

Έχει μοριακό βάρος 455.50g/mol, ενώ ο μοριακός τους τύπος είναι C₂₃H₂₂FN₃O₄S.

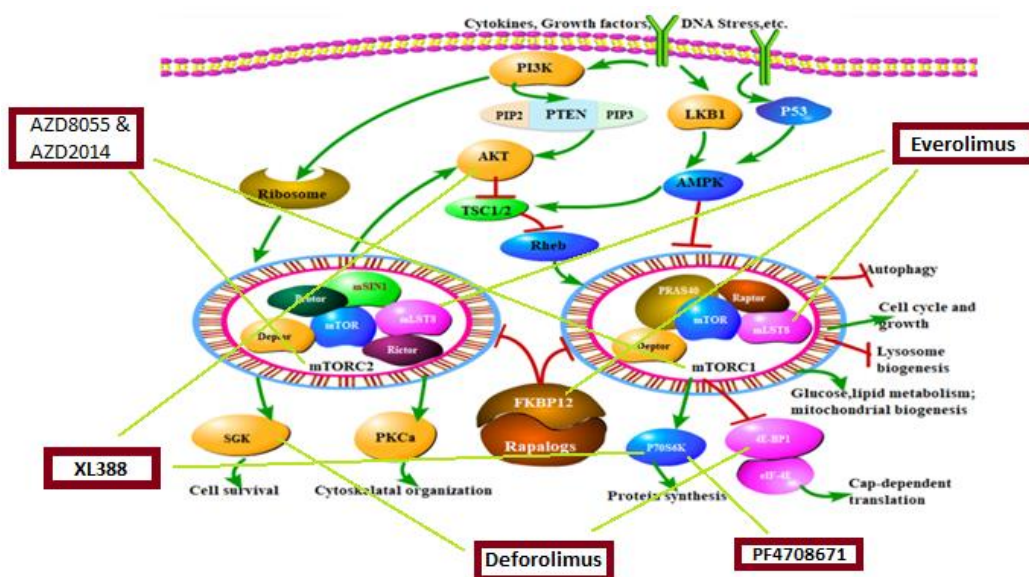
6. Ο αναστολέας αυτός (PF4708671) είναι ο πιο διαφορετικός συγκριτικά με τους προηγούμενους και αυτό συμβαίνει γιατί δεν επηρεάζει άμεσα το μονοπάτι mTOR (ειδικά το mTORC1), αλλά επιδρά στον p70 αναστέλλοντάς τον. Είναι ο πρώτος S6K1 στοχευμένος αναστολέας και για αυτό χρησιμοποιείται ευρύτατα σε διάφορους τύπους καρκίνου. Ο αναστολέας αυτός δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα στον καρκίνο του μαστού, αλλά σε άλλους τύπους, όπως ο παγκρεατικός, του πνεύμονα, αλλά και σε άλλες ασθένειες όπως η οζώδης σκλήρυνση (Koene et al., 2019). Οι (Khotskaya et al., 2014) απέδειξαν ότι η απουσία του αναστολέα αυτού προωθεί τη μετάσταση ειδικά σε τριπλά αρνητικό τύπο καρκίνου και δίνει πολύ κακή πρόγνωση για την εξέλιξη της ασθένειας. Επιπλέον, οι (JIN-AH PAR et al., 2015), απέδειξαν ότι ο αναστολέας αυτός του S6K1 έχει επίπτωση στο ποσοστό απόπτωσης των κυττάρων ως απάντηση στην αναστολή των Bcl-2 και Bcl-xL, λόγω της μείωσης της survivin, ενώ καταλήγουν στο ότι ένας συνδυασμός του PF4708671 με τους αναστολείς των Bcl είναι πολύ ελπιδοφόρος για την εύρεση μιας πιο αποτελεσματικής θεραπείας.



Εικόνα 7(στ): Χημική δομή PF 4708671

Έχει μοριακό βάρος 390.41g/mol και ο μοριακός του τύπος είναι C₁₉H₂₁F₃N₆.

Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνονται συνοπτικά οι στόχοι του κάθε φαρμάκου στο μονοπάτι mTOR.



Εικόνα 8 Μονοπάτι mTOR & στόχος των αναστολέων στο μονοπάτι (H & R, 2004)

Από τους 6 παραπάνω αναστολείς μόνο το Everolimus έχει πάρει έγκριση από τον FDA (Food and Drug Administration) και χορηγείται στους ασθενείς, ενώ οι υπόλοιποι αναστολείς βρίσκονται ακόμα σε στάδιο πειραματικών προκλινικών και κλινικών δοκιμών.

Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπεί στην μελέτη της *in vitro* δραστηριότητας νέων αναστολέων του mTOR μονοπατιού στον καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, μέσω των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν επιχειρήθηκε η μελέτη της διαφορετικής απόκρισης των δύο διαφορετικών τύπων καρκίνου του μαστού (triple negative και ER⁺) στους αναστολείς του μονοπατιού mTOR 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς αλλά και στον αναστολέα ενός σημαντικού τελεστή του mTOR μονοπατιού, της p70 κινάσης (αναστολέας p70SK). Η μελέτη της διαφορετικής απόκρισης σε αυτού του τύπου θεραπεία μεταξύ των ορμονοανθεκτικών και ορμονοευαίσθητων τύπων καρκίνου του μαστού δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και αποτελεί ένα πρώτο βήμα στην σύγκριση και στη διαλεύκανση του πιθανά διαφορετικού ρόλου του σηματοδοτικού μονοπατιού του mTOR και των αναστολέων της νεότερης γενιάς στον ER⁺ και στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού.

2.1 Καλλιεργητικά μέσα και συνθήκες

Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων τα κύτταρα διατηρούνταν σε κλίβανο με συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και 95% υγρασία, ενώ και τα καλλιεργητικά μέσα πρέπει να βρίσκονται περίπου στους 37°C. Όλες οι διαδικασίες γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής με αποστειρωμένες συνθήκες ενώ όλα τα καλλιεργητικά μέσα και οι ουσίες που χρησιμοποιούνται αποθηκεύονται και επεξεργάζονται σε αποστειρωμένο πλαστικό εξοπλισμό.

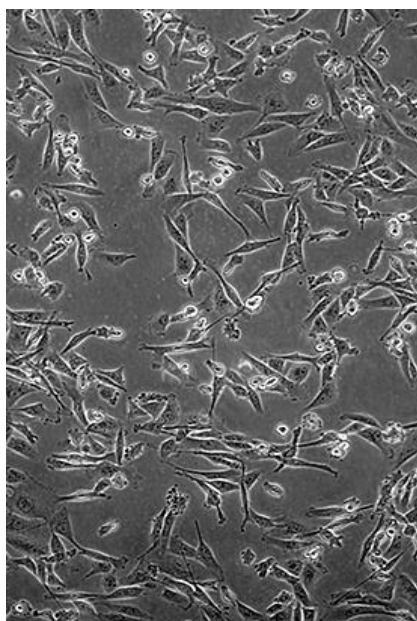
Όσον αφορά τα καλλιεργητικά μέσα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής :

- Θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco, code: 2194780)
- Εμβρυικός ορός μοσχαριού 5% [FBS: Fetal Bovine Serum] PanBiotech
- L- γλουταμίνη (Gibco, code: 2165253)
- Πενικιλίνη / Στρεπτομυκίνη (Gibco, code: 2145465)
- Θρυψίνη (Gibco, code: 15090-046)

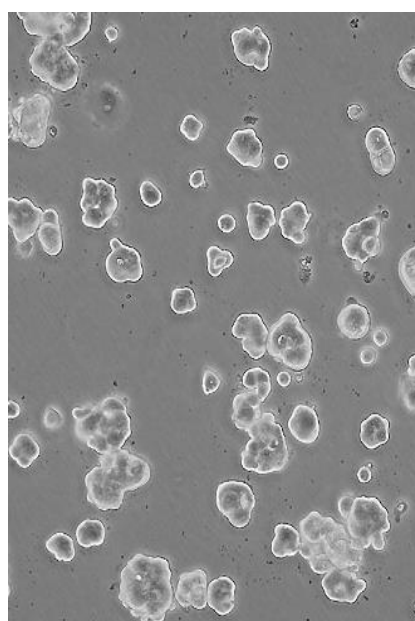
Το πλήρες καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων αποτελείται από το θρεπτικό μέσο (PRMI), από ορό FBS 5%, από L-γλουταμίνη 2mM που χρησιμοποιείται ως εναλλακτική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα και από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη (100 U/ml) και στρεπτομυκίνη (100μg/ml) που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη βακτηριακής μόλυνσης.

Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων αγοράστηκαν από την AdooQ^R Bioscience και επεξεργάστηκαν κατάλληλα ώστε να βρίσκονται στην κατάλληλη μορφή για να χρησιμοποιηθούν για τα πειράματά μας. Καθώς αγοράστηκαν σε μορφή σκόνης, έγινε διάλυσή τους σε DMSO 99.8% ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση 20mM.

2.2 Καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού MCF7 και MB231



Εικόνα 7 MCF7 cell line, ATCC



Εικόνα 8 MB231 cell line, ATCC

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσης διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 2 κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού: η MCF7 και MDA-MB231 (για συντομία MB231). Οι σειρές αυτές χρησιμοποιήθηκαν διότι εμφανίζουν μία σταθερότητα στην ανάπτυξη κάτω από σταθερές συνθήκες, επομένως κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων θα εξασφαλιζόταν η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Ωστόσο είναι αμφιλεγόμενο το αν όντως τα κύτταρα αυτά ανταποκρίνονται όπως ανταποκρίνεται και ο ίδιος ο καρκίνος μέσα στο ανθρώπινο σώμα, ενώ το γεγονός ότι τα περισσότερα από αυτά προέρχονται από καυκάσιους δείχνει ότι δεν έχουμε ένα αντικειμενικό δείγμα για το πώς αντιδρούν οι οργανισμοί σε παγκόσμιο επίπεδο (Alghanem et al., 2020). Τα κύτταρα αυτά ήταν κατεψυγμένα στο εργαστήριο και αποθηκευμένα στους -80°C . Οι εγκαθιδρυμένες αυτές καρκινικές κυτταρικές σειρές προμηθεύτηκαν από την ATCC (American Type Culture Collection). Όσον αφορά τον τύπο του καρκίνου που εκφράζουν, τα MCF7 είναι ER^+ τύπος καρκίνου του μαστού, ενώ τα MB231 από την άλλη ανήκουν στον τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού.

Η επιλογή των κυτταρικών σειρών στην παραπάνω εργασία έγινε με γνώμονα ότι ανήκουν σε δύο διαφορετικούς τύπους καρκίνου του μαστού με σκοπό το διαχωρισμό των θεραπευτικών γραμμών και εύρεση της καλύτερης από αυτές για τον κάθε κυτταρικό τύπο. Μέχρι τώρα έχει μελετηθεί πληθώρα κυτταρικών σειρών και για

τους 2 τύπους και έχουν γίνει έρευνες σε πολλά φάρμακα τόσο σε προκλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο. Παρότι παρατηρούνται διαφορές στη θεραπεία που επιλέγεται κάθε φορά, υπάρχει μία κοινή γραμμή που εφαρμόζεται αρχικά στις κυτταρικές σειρές που υπάγονται σε κάθε καρκινικό τύπο.

Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Προκειμένου τα κύτταρα να είναι σε κατάλληλες συνθήκες για τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα, ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες του ξεπαγώματος, της συντήρησης και της ανακαλλιέργειας, ενώ μέσω της διαδικασίας του παγώματος τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν ξανά και διατηρήθηκαν για μελλοντική χρήση. Πιο συγκεκριμένα:

Ξεπάγωμα κυτταρικών σειρών

Για τη διαδικασία αυτή χρειαζόμαστε το ειδικό πλαστικό φιαλίδιο παγώματος που περιέχει την κυτταρική σειρά και που διατηρείται στους -80°C , πλαστικά σωληνάρια των 15ml, έναν πιπεταδόρο, καλλιεργητικό μέσο, μία φυγόκεντρο και μία φλάσκα στην οποία θα τοποθετήσουμε τα κύτταρά μας. Αρχικά, και αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, τα μεταφέρουμε στο σωληνάριο όπου προσθέτουμε σταδιακά μία ποσότητα από το καλλιεργητικό μας μέσο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 900 στροφές για 5 λεπτά ώστε να ξεπλυθεί το διάλυμα που χρησιμοποιείται για το πάγωμα (freezing medium). Κατόπιν γίνεται απόχυση του υπερκείμενου, κράτημα του ιζήματος που περιέχει τα κύτταρα, προσθήκη εκ νέου καλλιεργητικού μέσου (μέχρι τα 14ml) και μεταφορά τους στη φλάσκα. Τέλος γίνεται ήπια ανάδευση ώστε τα κύτταρα να απλωθούν ομοιόμορφα στον πάτο της φλάσκας. Την επόμενη ημέρα από το ξεπάγωμα είναι απαραίτητη η αλλαγή του καλλιεργητικού μέσου έτσι ώστε να ξεπλυθεί οποιαδήποτε ποσότητα DMSO (Dimethyl sulfoxide) που έχει απομείνει, αλλά και για να απορριφθούν τα νεκρά κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν.

Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Η συντήρηση της κυτταρικής σειράς επιτυγχάνεται με την ανανέωση του καλλιεργητικού μέσου, που είναι ουσιαστικά η τροφή των κυττάρων. Σε κάθε ανανέωση του θρεπτικού υλικού που γίνεται κάθε 2 με 3 ημέρες, γίνεται απόχυση του μέσου και προσθήκη εκ νέου της ίδιας ποσότητας.

Η ανακαλλιέργεια είναι μία διαδικασία που γίνεται όταν χρειαζόμαστε τα κύτταρα για κάποιο πείραμα, ή όταν αυτά έχουν καλύψει το μεγαλύτερο μέρος της φλάσκας και χρειάζονται μια αραιώση, ώστε τα υπόλοιπα να έχουν χώρο να αναπτυχθούν. Ανάλογα με τις απαιτήσεις και την ποσότητα των κυττάρων που χρειάζονται η διαδικασία αυτή γίνεται όταν έχουμε πυκνότητα κυττάρων περίπου 80%. Σε αυτήν την περίπτωση αρχικά γίνεται απόχυση του καλλιεργητικού μέσου, και πλύσεις με φυσιολογικό ορό NaCl 0,9% w/v ή PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) ώστε να απομακρυνθεί ο ορός από τη φλάσκα και να μπορεί η θρυψίνη να δράσει. Κατόπιν προσθέτουμε 2 ml θρυψίνης 1X στη φλάσκα των 75cm² και επωάζουμε έως ότου η θρυψίνη δράσει και τα κύτταρα αποκολληθούν από τον πάτο της φλάσκας (περίπου 3-4 λεπτά). Στη συνέχεια προσθέτουμε ποσότητα καλλιεργητικού μέσου που περιλαμβάνει κανονικά ποσότητα ορού (5%) έτσι ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της θρυψίνης. Ακολούθως γίνεται καλή ανάδευση, μεταφορά των κυττάρων σε ένα σωληνάριο και τέλος ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων τα οποία θα χρησιμοποιήσουμε για τα πειράματά μας. Η διατήρηση των κυττάρων γίνεται στην ίδια φλάσκα με προσθήκη 14ml καλλιεργητικού μέσου ώστε να αναπτυχθούν ξανά για επόμενο πείραμα.

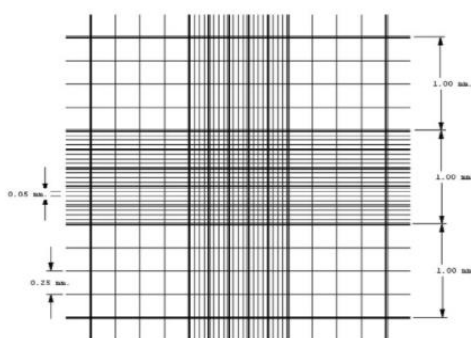
Πάγωμα κυτταρικών σειρών

Μετά το πέρας των πειραμάτων και εφόσον τα κύτταρα βρίσκονται ακόμα σε καλή κατάσταση, ακολουθεί το πάγωμά τους με σκοπό να διατηρηθούν ακέραια για κάποιο χρονικό διάστημα και να μπορέσουν να ξαναχρησιμοποιηθούν για μελλοντικά πειράματα. Η διατήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα γίνεται με αποθήκευση σε υγρό άζωτο. Για τη διαδικασία αυτή ακολουθείται το ίδιο πρωτόκολλο όπως και στην ανακαλλιέργεια μέχρι το σημείο της συλλογής και μέτρησης των κυττάρων. Αφού λοιπόν γίνει η συλλογή και η μέτρηση, ακολουθεί φυγοκέντρηση έτσι ώστε να πάρουμε τα κύτταρα με μορφή ιζήματος. Γίνεται απόχυση του υπερκείμενου και προσθήκη μέσου παγώματος (freezing medium) το οποίο περιέχει 90% FBS (Fetal Bovine Serum) και 10% DMSO. Η ποσότητα του μέσου παγώματος εξαρτάται από την ποσότητα των κυττάρων που έχω μετρήσει. Για 4×10^6 κύτταρα προσθέτω περίπου 1ml μέσου παγώματος. Το FBS είναι ο ορός που χρησιμοποιείται και στο καλλιεργητικό μέσο για την ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ το DMSO είναι ένα χημικό κρυοπροστατευτικό που αποτρέπει τη δημιουργία κρυστάλλων, ενώ είναι τοξικό σε θερμοκρασία δωματίου. Εφόσον γίνει καλή ανάδευση τα κύτταρα μεταφέρονται στο

ειδικό πλαστικό μπουκαλάκι και αποθηκεύονται στους -80°C . Ωστόσο η ψύξη αυτή πρέπει να γίνει σταδιακά για να μη στρεσαριστούν τα κύτταρα και για αυτό τοποθετούνται αρχικά σε ένα δοχείο με ισοπροπανόλη που βοηθάει στη σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας.

Μέτρηση και επίστρωση κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων είναι η πιο βασική διαδικασία πριν την έναρξη κάθε πειράματος γιατί από αυτήν θα εξαρτηθούν και τα αποτελέσματα που θα πάρουμε. Αφού λοιπόν έχει γίνει η συλλογή των κυττάρων και εφόσον είναι καλά αναδεδυμένα μέσα στο καλλιεργητικό, παίρνουμε 10μl από αυτά και τα τοποθετούμε σε ένα φιαλίδιο. Στο ίδιο φιαλίδιο προσθέτουμε και 90μl χρωστικής Trypan Blue (Gibco®, ThermoFisher Scientific) η οποία έχει την ιδιότητα να βάφει τα νεκρά κύτταρα, επιτρέποντάς μας να υπολογίζουμε τα ζωντανά. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνουμε 10 φορές την αραιώση των κυττάρων. Αφού αναδεύσουμε καλά και αφού έχουμε ετοιμάσει την πλάκα Neubauer, τοποθετούμε σε αυτή 20μl από το δείγμα μας και την τοποθετούμε κάτω από το μικροσκόπιο.



Εικόνα 9 Πλάκα Neubauer,

(http://users.teiath.gr/petef/Web_Lessons/Eydojos/Eydojos_Sperm_Analysis_Lab/Sperm_analysis_Lab.pdf)

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9, η μέτρηση αφορά τα 4 τεταρτημόρια γύρω από τον έντονης υπογράμμισης σταυρό που σχηματίζεται. Αφού μετρήσουμε τα ζωντανά – μη χρωματισμένα κύτταρα, σε καθένα από αυτά, βγάζουμε το μέσο όρο. Για να υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων στο 1 ml, κατόπιν πολλαπλασιάζουμε με 10^4 από τον τύπο της Neubauer, και τέλος επί 10 αφού ήδη έχει γίνει αραιώση του δείγματος 10 φορές.

$$\text{Αριθμός κυττάρων ανά ml} = a \times b \times 10^4$$

Όπου: α = μέσος όρος των ζωντανών κυττάρων που μετρήθηκαν στα τεταρτημόρια της πλάκας Neubauer,

b = αραίωση των κυττάρων στο μείγμα της μέτρησης με τη χρωστική (πχ εδώ 10 φορές)

Ανάλογα με την αρχική ποσότητα δείγματος αλλά και την τελική ποσότητα που θέλουμε για το πείραμα μας υπολογίζουμε τον αριθμό των κυττάρων και του καλλιεργητικού που θα χρειαστούμε και κάνουμε την επίστρωση των κυττάρων. Εφόσον στρώσουμε τα κύτταρα μας ελέγχουμε στο μικροσκόπιο αν είναι αυτό που αναμέναμε έτσι ώστε να μπορέσουμε να συνεχίσουμε το πείραμα.

2.3 Έλεγχος οξείας κυτταροτοξικότητας (Cytotoxicity assay, SRB)

Πρόκειται για μία μέθοδο οξείας κυτταροτοξικότητας με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης των φαρμάκων / ουσιών στην ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Πιο συγκεκριμένα, η SRB ή Sulforhodamine B (σουλφοροδαμίνη B), είναι μία ανιονική μικρομοριακή ένωση αμινοξανθίνης έντονου ροζ χρώματος, με δύο σουλφονικές ομάδες όπου σε ελαφρά όξινο περιβάλλον συνδέεται και αντιδρά με τα βασικά αμινοξέα των κυτταρικών πρωτεϊνών και ακολούθως εκχυλίζεται (Voigt et al, 2005).

Πειραματική διαδικασία

Η τεχνική αυτή χρειάζεται 4 ημέρες για να ολοκληρωθεί, ενώ οι διαδικασίες τις 2 πρώτες ημέρες λαμβάνουν χώρο σε θάλαμο νηματικής ροής ώστε να εξασφαλιστούν στείρες συνθήκες. Στο συγκεκριμένο πείραμα έλαβαν χώρα 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις.¹

Ημέρα 0

Την προηγούμενη ημέρα από την έναρξη του πειράματος βεβαιωνόμαστε ότι έχουμε επαρκή ποσότητα κυττάρων, που αυτό σημαίνει ότι έχουμε έναν ικανοποιητικό αριθμό και τα κύτταρα βρίσκονται σε καλή κατάσταση και σε λογαριθμική φάση αύξησης. Ανάλογα με την κυτταρική σειρά που έχουμε αλλάζουν και οι απαιτήσεις μας. Στο δικό μας πείραμα για κάθε κυτταρική σειρά, χρειαζόμαστε 5.000 κύτταρα για κάθε παράμετρο/θέση. Αφού λοιπόν δούμε τα κύτταρα, κάνουμε μία ανανέωση του καλλιεργητικού τους μέσου, ώστε να εξασφαλίσουμε τη μέγιστη απόδοσή τους.

Ημέρα 1^η

Την επόμενη μέρα, και αφού έχουμε εξασφαλίσει τις κατάλληλες συνθήκες για τα κύτταρα ξεκινάμε με τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας. Αφού αποφασίσουμε την ποσότητα των κυττάρων σε κάθε πηγάδι και καταλήξουμε στο συνολικό αριθμό κυττάρων που χρειαζόμαστε, μετράμε τα κύτταρα που έχουμε διαθέσιμα. Σε κάθε πηγαδάκι του πιάτου θα βάλουμε 100μl από τα κύτταρα, επομένως υπολογίζουμε και τη συνολική ποσότητα που θα μας χρειαστεί. Αφού γίνουν όλοι οι απαραίτητοι υπολογισμοί αναδεύουμε καλά και στρώνουμε τα κύτταρα σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων, ανάλογα με το πόσα πηγάδια θα μας χρειαστούν για το πείραμα. Για κάθε συγκέντρωση του ενός φαρμάκου χρειαζόμαστε 3 πηγάδια ώστε να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, ενώ υπολογίζουμε και τα πηγαδάκια ελέγχου που θα στρώσουμε (control) στα οποία δε θα γίνει προσθήκη φαρμάκου. Παράλληλα, σε ένα δεύτερο πιάτο στρώνουμε κύτταρα για να υπολογίσουμε το Tzero, τα οποία και θα μονιμοποιήσουμε τη στιγμή 0 (η στιγμή που θα προστεθούν τα φάρμακα στο άλλο πιάτο). Μετά το τέλος της επίστρωσης των κυττάρων αφήνουμε τα πιάτα τον κλίβανο για 24h.

Ημέρα 2^η

Πριν ξεκινήσουμε οτιδήποτε ελέγχουμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο, ώστε να εξασφαλίσουμε ότι βρίσκονται σε καλή κατάσταση.

α) Όσον αφορά το πιάτο με τα Tzero, προσθέτουμε αρχικά 100μl θρεπτικό πλήρες και έπειτα 50μl TCA (Trichloroacetic acid) 50% (Appllichem, Code: A1431). Το TCA είναι ένα ανάλογο του οξικού οξέος στο οποίο τα 3 άτομα υδρογόνου της μεθυλικής του ομάδας έχουν αντικατασταθεί από άτομα χλωρίνης. Γενικά μπορεί να προκαλέσει και θάνατο των κυττάρων, στη συγκεκριμένη όμως περίπτωση και στη συγκέντρωση που το χρησιμοποιούμε σταματάει την ανάπτυξη και προκαλεί τη μονιμοποίησή τους. Αφού προσθέσουμε και το οξύ, ακολουθεί αναμονή για 1 ώρα στους 4°C και κατόπιν ξέπλυμα με απιονισμένο νερό. Εφόσον ξεπλυθεί καλά το οξύ αφήνουμε να στεγνώσει καλά το πιάτο ώστε να ακολουθήσει η διαδικασία της χρώσης που θα αναφερθεί παρακάτω.

β) Όσον αφορά το πιάτο στο οποίο έχουμε τα δείγματα ελέγχου και στο οποίο θα προστεθούν τα φάρμακα, ακολουθείται η εξής διαδικασία. Αρχικά υπολογίζουμε τις ποσότητες του φαρμάκου στις επιθυμητές συγκεντρώσεις που θέλουμε με πολλή προσοχή. Αυτό εξαρτάται από τη συνολική ποσότητα που χρειαζόμαστε για κάθε

συγκέντρωση αλλά και από την αρχική συγκέντρωση που έχουμε από το κάθε φάρμακο. Πιο αναλυτικά τα παραπάνω υπολογίζονται από τον τύπο της αραιώσης:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2 \quad \text{όπου,}$$

C1: η συγκέντρωση του αρχικού φαρμάκου (εδώ 20mM),

C2: η τελική επιθυμητή συγκέντρωση της εκάστοτε ουσίας,

V1: η αναγκαία ποσότητα από το αρχικό φάρμακο,

V2: ο τελικός όγκος που θα χρειαστούμε συνολικά.

Στο συγκεκριμένο πείραμα οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν είναι για 100, 10, 1 και 0,1μM , ενώ πραγματοποιήθηκαν και άλλοι έλεγχοι ταχείας κυτταροτοξικότητας για μικρότερες συγκεντρώσεις όπου κρίθηκε απαραίτητο. Σε κάθε πηγάδι θέλουμε τελικό όγκο 200μl και εφόσον έχουμε ήδη 100μl, προσθέτουμε άλλα 100μl θρεπτικό στα οποία περιέχεται και το φάρμακο. Στα πηγαδάκια ελέγχου προσθέτουμε 100μl πλήρες θρεπτικό. Αφού έχει ολοκληρωθεί η προσθήκη των φαρμάκων αφήνουμε το πιάτο στον κλίβανο για 48 ώρες.

Ημέρα 3^η

Την ημέρα αυτή δε γίνεται κάποια διαδικασία. Παραμένουν τα πιάτα με το πείραμα στον κλίβανο.

Ημέρα 4^η

Η ημέρα αυτή είναι η τελευταία και το πείραμα ολοκληρώνεται. Όπως και στο πιάτο των T-zero έτσι και σε αυτό προσθέτουμε 50μl TCA σε κάθε πηγάδι και επωάζουμε για 1 ώρα στους 4°C. Στη συνέχεια ξεπλύνουμε καλά με απιονισμένο νερό. Προκειμένου να μετρήσουμε το ρυθμό επιβίωσης των κυττάρων πρέπει να γίνει χρώση με την SRB (sulforhodamine B). Για αυτό και τα 2 πιάτα πρέπει να στεγνώσουν αρκετά καλά ώστε να μην έχουν μείνει υπολείμματα υγρασίας και επηρεάσουν τη χρώση. Αφού λοιπόν στεγνώσουν, προσθέτουμε 50μl διαλύματος 0,04% w/v SRB (SIGMA, Code: S9012) σε 1% οξικό οξύ (Fluka: Code: 45731) και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, γίνεται καλή πλύση με οξικό οξύ 1% ώστε να φύγει η περίσσεια της χρωστικής, και τα πιάτα στεγνώνουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ύστερα, προστίθενται 150μl από Trizma Base σε συγκέντρωση 10mM (το διάλυμα αυτό είναι απαραίτητο για τη φωτομέτρηση) και τα πιάτα επωάζονται για 10 λεπτά στον κλίβανο. Κατόπιν ακολουθεί ανάδευση στη μπαλαρίνα για 5 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιείται

φωτομέτρηση στα 540nm σε συσκευή φωτομετρίας microplate reader Biotek microelisa (Biotek, EI-311). Αφού γίνει η μέτρηση τα αποτελέσματα μεταφέρονται σε αρχείο excel και υπολογίζονται οι εξής παράγοντες :

a) GI₅₀ (growth inhibition 50%), που είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50% και είναι η συγκέντρωση όπου ισχύει ότι : $100 \times (T - T_0)/(C - T_0) = 50$

b) LC₅₀ (lethal concentration 50%), που είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου το οποίο προκαλεί θάνατο στο 50% των κυττάρων και είναι η συγκέντρωση όπου ισχύει ότι : $100 \times (T - T_0)/T_0 = -50$

c) TGI (total growth inhibition), που είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και είναι η συγκέντρωση όπου ισχύει ότι : $100 \times (T - T_0)/(C - T_0) = 0$.

Όπου C, η οπτική πυκνότητα του control μετά από 48h,

T, η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού στο οποίο έχει χορηγηθεί το φάρμακο, και

T₀, η οπτική πυκνότητα τη στιγμή χορήγησης του φαρμάκου.

2.4 Έλεγχος επούλωσης πληγής (Wound healing assay – Scratch assay)

Η διαδικασία ελέγχου επούλωσης πληγής προκύπτει από την φυσιολογική διαδικασία επούλωσης μίας πληγής/τραύματος που συμβαίνει είτε σκόπιμα, είτε κατά λάθος στον άνθρωπο *in vivo*. Φυσιολογικά χρειάζονται τρεις φάσεις προκειμένου να επανέλθει η κατάσταση. Αυτές περιλαμβάνουν αρχικά τους ομοιοστατικούς και φλεγμονώδεις μηχανισμούς που αντιλαμβάνονται το πρόβλημα, ακολουθεί η πολλαπλασιαστική περίοδος όπου γίνεται προσπάθεια να καλυφθεί το κενό, και τέλος η φάση αναδιαμόρφωσης όπου διαμορφώνεται εκ νέου το σημείο της πληγής (PH et al., 2018).

Στην μέθοδο αυτή, δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στο στόχο της *in vitro* καθώς μελετώνται οι παράμετροι (συγκέντρωση μελετώμενης ουσίας και χρόνος επώασης με αυτή) που θα επουλωθεί η πληγή που δημιουργήθηκε σκόπιμα, όπως και το αν θα επέλθουν οι φυσιολογικοί ρυθμοί ανάπτυξης και λειτουργίας των υπόλοιπων κυττάρων. Αυτό μάλιστα παρατηρείται και συγκρίνεται βάσει των συγκεντρώσεων των φαρμάκων που έχουμε προσθέσει αναφορικά με τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης (Cappiello et al., 2018). Στόχος της συγκεκριμένης πειραματικής

διαδικασίας είναι ο έλεγχος του μεταναστευτικού δυναμικού των καρκινικών κυτταρικών σειρών που μελετώνται σε σύγκριση με διάφορες συγκεντρώσεις των αναστολέων που έχουν επιλεγθεί, εστιάζοντας στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε κάθε περίπτωση.

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία αυτή διαρκεί συνήθως 3 ημέρες (3 x 24ώρα). Το πρώτο 24ωρο είναι απαραίτητο για την προσαρμογή των κυττάρων στο νέο τους περιβάλλον, ενώ τις 2 επόμενες ημέρες τα κύτταρα επωάζονται και παρατηρείται η επούλωση της πληγής (24 & 48 ώρες). Είναι σημαντικό το πείραμα αυτό να σταματήσει σε σύντομο χρονικό διάστημα έτσι ώστε το κλείσιμο της πληγής να έχει κλείσει από τη μετανάστευση των κυττάρων και όχι από τον πολλαπλασιασμό τους. Όπως και στην προηγούμενη τεχνική που αναφέρθηκε το πείραμα ξεκινάει με τη συλλογή και στρώσιμο των κυττάρων σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων (96-well plates). Ο αριθμός των κυττάρων που προσθέτουμε σε κάθε θέση για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις που θα μελετήσουμε είναι 20.000 κύτταρα ώστε να επιτύχουμε όσο το δυνατό μεγαλύτερη πληρότητα σε κάθε πηγαδάκι (~80-90% confluence). Παράλληλα θα χρειαστούμε και θέσεις ελέγχου (control), όπως και ένα πιάτο για τα δείγματα ελέγχου Tzero. Την επόμενη ημέρα αν υπάρχει η επιθυμητή πυκνότητα, που σε αυτήν την περίπτωση πρέπει να φτάνει το 90%, γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και με ένα τιπ πιπέτας των 200μl πραγματοποιείται σε κάθε θέση η πληγή με ένα ρύγχος των 200μl. Έχοντας γνωστά πλέον τα όρια της πληγής σε κάθε πηγαδάκι, προστίθενται τα φάρμακα, τα οποία έχουν αραιωθεί στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Πριν από την προσθήκη των φαρμάκων γίνεται πλύση με φυσιολογικό ορό (NaCl) ώστε να φύγουν τα κύτταρα που πιθανόν έχουν μείνει στο πηγάδι έπειτα από τη δημιουργία της γραμμής. Κατόπιν φωτογραφίζεται κάθε πηγάδι ξεχωριστά στο σημείο της πληγής την ίδια στιγμή, έτσι ώστε μετά το πέρας της χρονικής περιόδου που έχει οριστεί να φανεί αν το κενό έχει υποστεί κάποια τροποποίηση. Την επόμενη (ή μετά από 2 ημέρες) φωτογραφίζονται εκ νέου τα πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων προκειμένου να διαπιστωθεί οποιαδήποτε αναστολή πιθανόν προκλήθηκε από τα φάρμακα στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αυτό γίνεται εμφανές από το ποσοστό του κενού που έχει κλείσει στην πληγή που είχαμε δημιουργήσει.

Τερματίζοντας το πείραμα, ακολουθείται μονιμοποίηση με TCA και χρώση με SRB όπως προηγουμένως ώστε να είναι ακόμα πιο διακριτή η διαφορά.ⁱⁱ

2.5 Μέθοδος αναστολής δημιουργίας κλώνων (Clonogenic assay)

Η παραπάνω τεχνική είναι μία μέθοδος βραδείας κυτταροτοξικότητας και αφορά την καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων τα οποία μέσω της ικανότητας αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία του όγκου. Ουσιαστικά ο σκοπός της είναι η εξάλειψη των κυττάρων αυτών με επέκταση τη μη δημιουργία όγκου. Μάλιστα το πώς θα συμπεριφερθούν τα κύτταρα στο πείραμα αυτό σχετίζεται με την πρόγνωση για τον εκάστοτε τύπο καρκίνου (Hoon Kyo Kim et al., 1987).

Πειραματική διαδικασία

Όπως και οι δυο προηγούμενες τεχνικές που αναπτύχθηκαν έτσι και αυτή απαιτεί αρχικά τη συλλογή και το στρώσιμο των κυττάρων, αυτή τη φορά όμως σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 6 θέσεων (6-well plate). Ανάλογα με την κυτταρική σειρά γίνεται επιλογή του κατάλληλου αριθμού κυττάρων στον οποίο έχουμε καταλήξει έπειτα από τιτλοδότηση της. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε 400 κύτταρα ανά πηγαδάκι για τα MCF7 και 200 κύτταρα ανά πηγαδάκι για τα MB231. Την επόμενη ημέρα και αφού εξασφαλισθεί ότι υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες γίνεται προσθήκη των φαρμάκων στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Καθώς η τεχνική αυτή είναι βραδείας κυτταροτοξικότητας, το πιάτο παραμένει στον κλίβανο για 2 εβδομάδες ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση των επιπτώσεων των διάφορων συγκεντρώσεων μακροπρόθεσμα. Τερματίζοντας το πείραμα, ακολουθείται μονιμοποίηση με TCA και χρώση με SRB όπως προηγουμένως ώστε να είναι ακόμα πιο διακριτή η διαφορά και είναι δυνατή η φωτογράφιση των πιάτων.ⁱⁱⁱ

2.6 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test μέσω του Excel της Microsoft, καθώς και το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS®IBM®.

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν τρία (3) ανεξάρτητα πειράματα και παρακάτω παρουσιάζεται ο μέσος όρος αυτών.

3.1 Αποτελέσματα ελέγχου κυτταροτοξικότητας μεθόδου SRB

Με αυτή τη μέθοδο ξεκίνησε το πειραματικό κομμάτι της διπλωματικής εργασίας και είναι η πρώτη που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να γίνει η επιλογή του καταλληλότερου αναστολέα και για τις 2 κυτταρικές σειρές. Αρχικά μελετήθηκαν και οι έξι αναστολείς που αναφέρθηκαν προηγουμένως σε συγκεντρώσεις 0,1μM, 1μM, 10μM και 100μM ώστε να υπολογισθούν οι τιμές GI₅₀, TGI και LC₅₀ που παραθέτονται στον Πίνακα 2 (MCF7) και 3 (MB231) και να γίνει μία πρώτη διαλογή. Ο ορισμός των παραπάνω εννοιών αναλύθηκε περαιτέρω στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Στην συνέχεια, γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα κυτταροτοξικότητας σε διαφορετικές ενότητες για τις δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

MCF7

Στην κυτταρική σειρά MCF7 έγινε μία πρώτη κατηγοριοποίηση και διάκριση των αναστολέων ως προς την καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση τους σε μία γκάμα διαφορετικών συγκεντρώσεων.

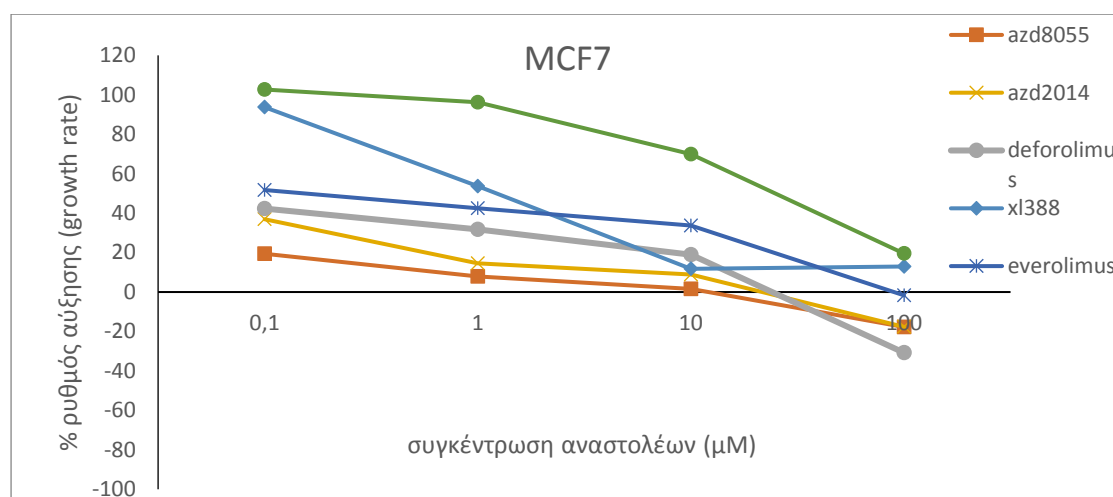
Πίνακας 2 Τιμές GI₅₀, TGI και LC₅₀ από τις SRB των MCF7 κυττάρων

MCF7	AZD8055	AZD2014	XL388	EVEROLIMUS	DEFOROLIMUS	PF4708671
GI ₅₀	<0,1	<0,1	1,7	0,2	<0,1	16,7
TGI	1,6	1,5	12,5	5,1	3,6	33,8
LC ₅₀	>100	>100	23,2	>100	>100	>100

Από τις παραπάνω τιμές (Πίνακας 2) ιδιαίτερη σημασία δίνεται στην τιμή του GI₅₀, που δείχνει ποιοι αναστολείς προκαλούν το 50% της αναστολής στην ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, καλύτερη δράση λαμβάνεται υπόψιν ότι έχουν οι αναστολείς στην ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση. Με βάση αυτό λοιπόν φαίνεται ότι οι τρεις πιο αποδοτικοί αναστολείς στα MCF7 κύτταρα είναι οι AZD8055, AZD2014 και Deforolimus οι οποίοι εμφανίζουν GI₅₀ μικρότερο του 0,1μM, της συγκέντρωσης δηλαδή που ήταν η μικρότερη που μελετήθηκε σε αυτό το σκέλος πειραμάτων. Συγκριτικά με αυτούς τους τρεις αναστολείς, οι υπόλοιποι εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης που απαιτείται για 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων

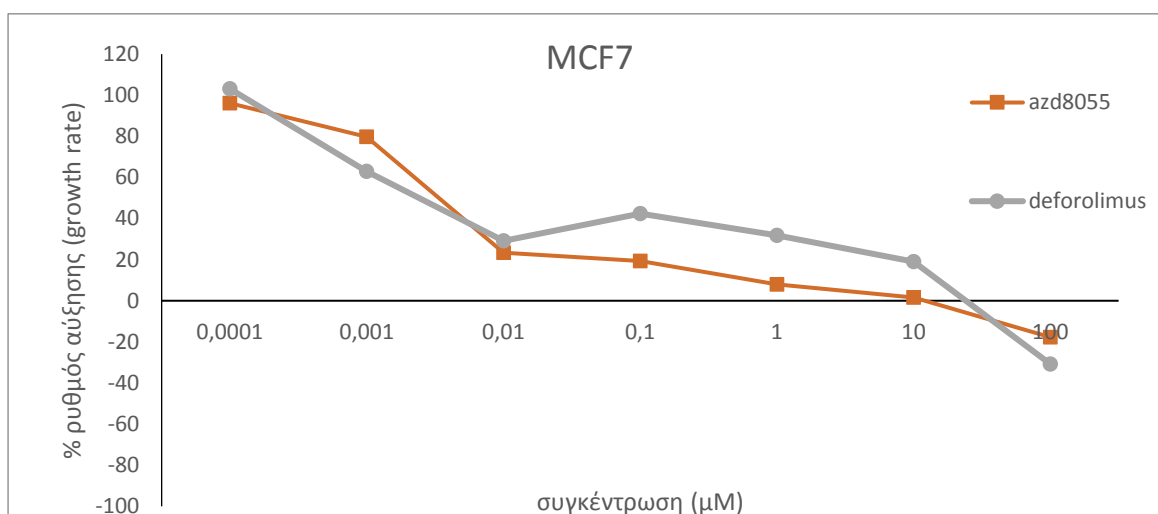
(>0,1 μ M). Ειδικότερα, ο XL388 έχει GI₅₀ στα 1,7 μ M και το Everolimus στα 0,2 μ M, ενώ ο PF4708671 παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη τιμή GI₅₀ στα 16,7 μ M.

Τα παραπάνω δεδομένα συνοδεύονται από το διάγραμμα 1 όπου φαίνεται το ποσοστό (%) του ρυθμού αύξησης των κυττάρων έπειτα από τη χορήγηση των αναστολέων σε συνάρτηση με τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις (100/10/1/0,1 μ M). Παρατηρείται πως όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του αναστολέα (πχ 100 μ M) τόσο μικρότερος είναι ο ρυθμός αύξησης σε όλους τους αναστολείς. Ωστόσο και εδώ διαπιστώνεται ότι καθόλη τη διάρκεια της χορήγησης και σε όλες τις συγκεντρώσεις, οι τρεις αυτοί αναστολείς (AZD8055, AZD2014 και Deforolimus) είναι οι πιο αποδοτικοί, αφού προκαλούν διατηρούν τον ρυθμό ανάπτυξης χαμηλό από τις μικρότερες κιόλας συγκεντρώσεις (0,1 μ M).



Γράφημα 1 Ρυθμός αύξησης για τους 6 αναστολείς στις αρχικές συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν

Για να επιλεγεί ο ένας αναστολέας με τα καλύτερα επιθυμητά αποτελέσματα ακολούθησε μία ακόμα σειρά πειραμάτων ελέγχου κυτταροτοξικότητας SRB για τα MCF7 όπου μελετήθηκαν οι αναστολείς AZD8055, AZD2014 και Deforolimus σε μιας μικρότερης τάξης συγκέντρωσης (10/1/0,1/0,01 μ M). Ο AZD2014 απορρίφθηκε σε αυτό το στάδιο καθώς εμφάνιζε μεγαλύτερο GI₅₀ σε σχέση με τους AZD8055 και Deforolimus. Η τελική επιλογή έγινε μεταξύ των αναστολέων AZD8055 και Deforolimus τα οποία μελετήθηκαν περαιτέρω στις συγκεντρώσεις 0,01 μ M, 0,001 μ M και 0,0001 μ M. Στο γράφημα 2 φαίνεται το % του ρυθμού αύξησης των MCF7 κυττάρων υπό την επίδραση των αναστολέων AZD8055 και Deforolimus σε συγκεντρώσεις 100/10/1/0,1/0,01/0,001 μ M.



Γράφημα 2 Ρυθμός αύξησης των MCF7 κυττάρων με χορήγηση των AZD8055 και Deforolimus

Από το γράφημα 2 φαίνεται ότι ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (100μM), καλύτερη δράση έχει το Deforolimus με μικρής τάξης διαφορά. Όσο μειώνονται οι συγκεντρώσεις και μέχρι τα 0,01μM ο AZD8055 είναι ο πιο αποδοτικός προκαλώντας μεγαλύτερη αναστολή στον ρυθμό αύξησης των MCF7. Αυτό εξακολουθεί να παρατηρείται και σε μικρότερες του 0,1μM συγκεντρώσεις αλλά οι διαφορές μεταξύ των δύο αναστολέων είναι λιγότερο διακριτές. Ενδιαφέρον εδώ παρουσιάζει η συγκέντρωση των 0,001μM όπου το Deforolimus έχει μεγαλύτερη ανασταλτική δράση έναντι των MCF7 σε σύγκριση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στον AZD8055. Η επιλογή έγινε με βάση την μικρότερη συγκέντρωση (0,0001μM) όπως και την συνολική εικόνα που πιθανά αντικατοπτρίζεται η καλύτερη δράση στον AZD8055.

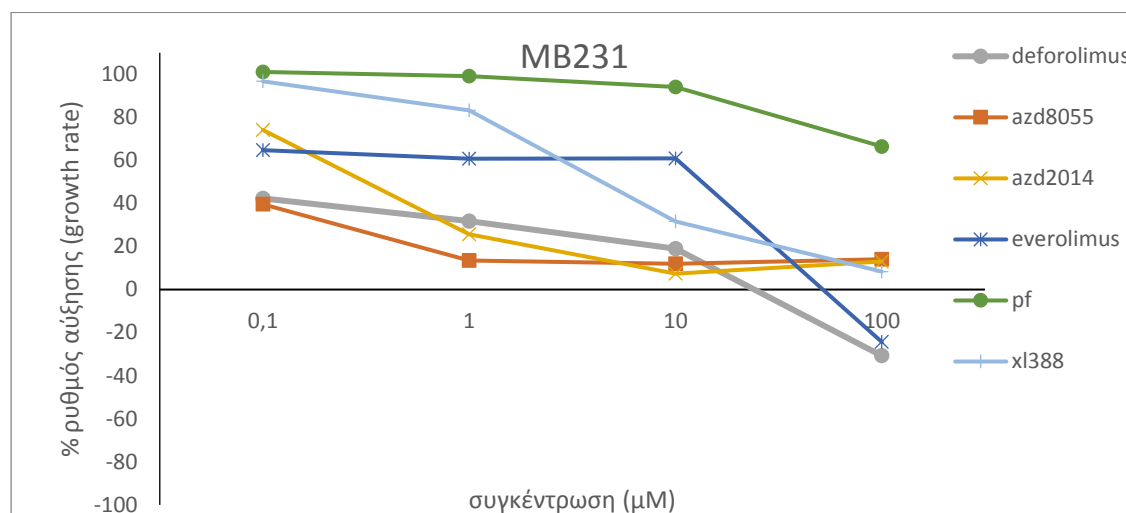
MB231

Στην κυτταρική σειρά MB231 έγινε κατηγοριοποίηση και διάκριση των αναστολέων ως προς την καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση τους σε συγκεντρώσεις 100/10/1/0,1 μM.

Πίνακας 3 Τιμές GI₅₀, TGI και LC₅₀ από τις SRB των MB231 κυττάρων

MB231	AZD8055	AZD2014	XL388	EVEROLIMUS	DEFOROLIMUS	PF4708671
GI ₅₀	<0,1	0,5	6,7	3,4	15,3	>100
TGI	1,4	1,4	15,5	14,9	68,0	>100
LC ₅₀	<0,1	<0,1	>100	>100	>100	>100

Στον Πίνακα 3 φαίνεται από τις τιμές GI₅₀ ότι την καλύτερη δράση την εμφανίζει ο AZD8055, με GI₅₀ μικρότερο του 0,1μM. Η διαφορά είναι αρκετά μεγάλη σε σχέση με τους υπόλοιπους αναστολείς οπότε δεν υπήρχε λόγος για περαιτέρω μελέτη όπως στα MCF7. Τα AZD2014 και Deforolimus εμφανίζουν τιμές GI₅₀ 0,5μM και 15,3μM. Από την άλλη, το Everolimus και το XL388 είναι 3,4μM και 6,7μM, ενώ το PF4708671 είναι >100μM.



Γράφημα 3 Ρυθμός αύξησης των MB231 έπειτα από τη χορήγηση των 6 αναστολέων

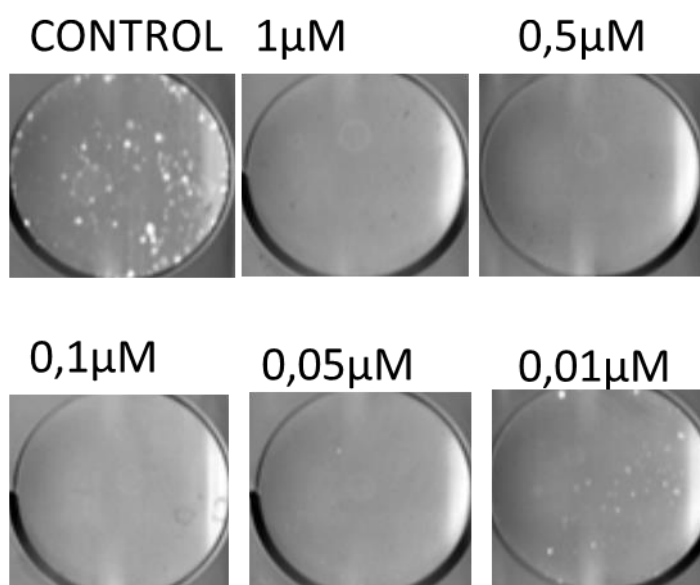
Όσον αφορά το αντίστοιχο διάγραμμα (γράφημα 3), εδώ φαίνεται η δραστηριότητα του AZD8055, κυρίως στις μικρότερες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, με την αύξηση της συγκεντρώσης ιδιαίτερα δραστικά είναι τα Everolimus και Deforolimus. Οι τιμές όμως που δίνουν οι τελευταίοι αναστολείς για το GI₅₀ (>>0,1μM) απέτρεψαν την περαιτέρω μελέτη τους στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Έτσι και για αυτήν την κυτταρική σειρά MB231 καταλήξαμε στον AZD8055 και για αυτό και στα επόμενα πειράματα μελετήσαμε τη δράση μόνο αυτού του αναστολέα.

3.2 Αποτελέσματα ελέγχου κλωνογένεσης

MCF7

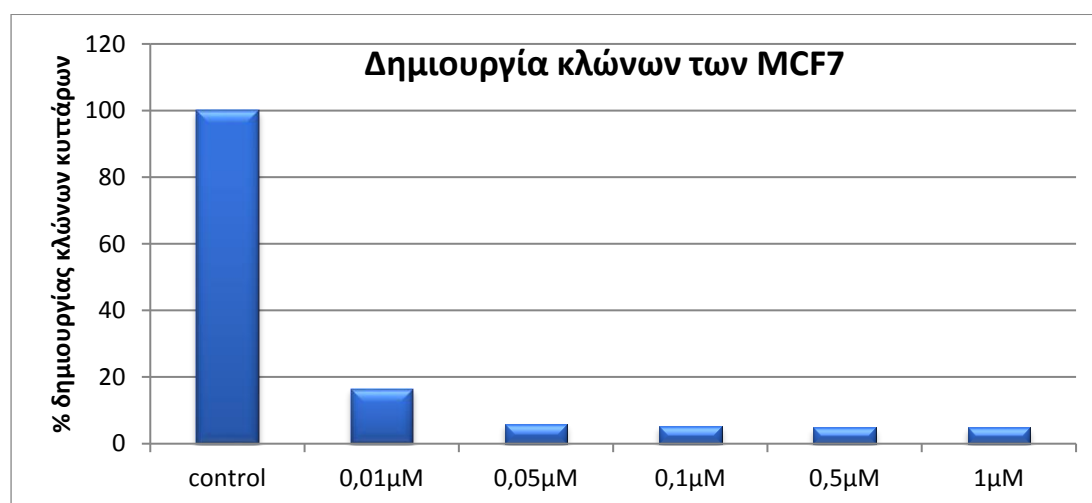
Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 10) φαίνονται οι κλώνοι που δημιουργήθηκαν (στα πηγαδάκια ελέγχου), αλλά και πως επηρεάζεται η δημιουργία κλώνων στα MCF7 έπειτα από την προσθήκη του αναστολέα AZD8055. Η δημιουργία κλώνων στα πηγαδάκια ελέγχου είναι δείγμα της αξιοπιστίας του πειράματος καθώς αυτό σημαίνει

ότι όπου παρατηρείται απουσία ή μικρότερος αριθμός κλώνων έχει δράσει ο αναστολέας και κατ' επέκταση έχει καταστείλει στην δημιουργία κλώνων.



Εικόνα 10 Κλωνογένεση στην MCF7 κυτταρική σειρά

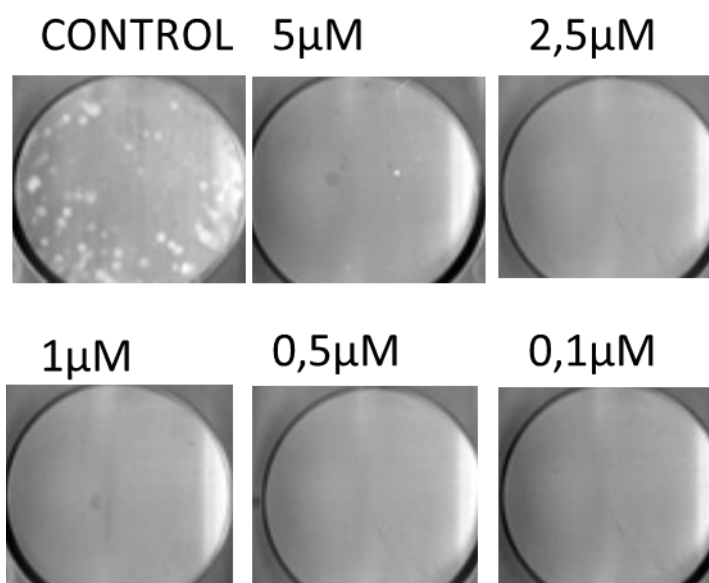
Στο γράφημα 4 αναπαρίστανται τα αποτελέσματα για τα ποσοστά δημιουργίας των κλώνων σε σχέση με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα AZD8055 με την βοήθεια φωτομέτρησης SRB χρωστικής ύστερα από τον τερματισμό του πειράματος της κλωνογένεσης σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Έτσι όταν η συγκέντρωση του AZD8055 είναι 0,01μM η δημιουργία των κλώνων έχει μειωθεί κατά 83,6%. Αντίστοιχα για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις 0,05μM, 0,1μM, 0,5μM και 1μM η δημιουργία των κλώνων μειώθηκε κατά 94,1%, 94,7%, 95,2% και 95,3%.



Γράφημα 4 Κλωνογένεση των MCF7 έπειτα από τη χορήγηση AZD8055

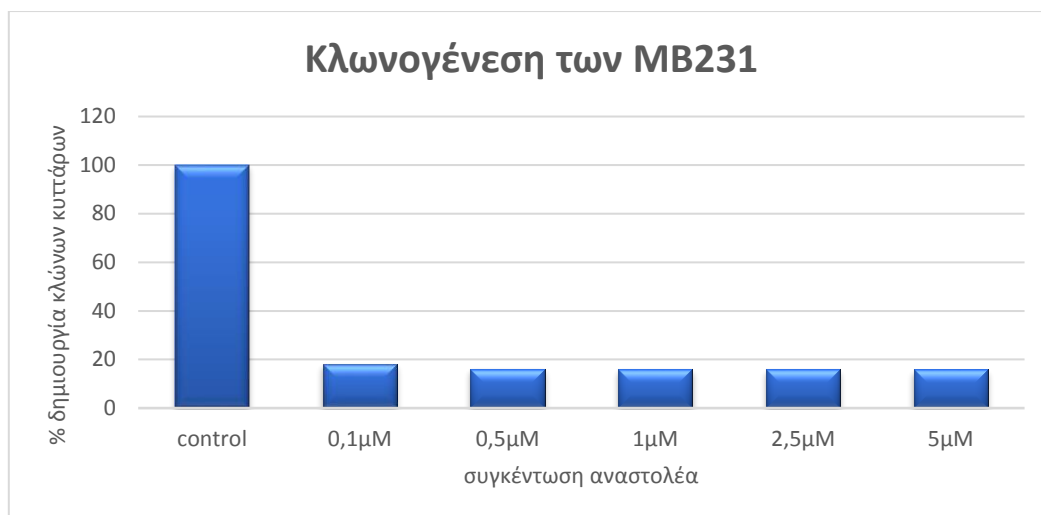
MB231

Στα MB231 τα κύτταρα ελέγχου έδωσαν και εδώ αποικίες όπως προηγουμένως. Η απουσία κλώνων δείχνει ότι ο αναστολέας ήταν δραστικός και ανέστειλε το σχηματισμό τους. Ωστόσο στα συγκεκριμένα κύτταρα φορτώσαμε εξ αρχής το μισό αριθμό κυττάρων και βλέπουμε ότι σε διάστημα 2 εβδομάδων η δημιουργία των κλώνων έφτασε σχεδόν στο επίπεδο των MCF7. Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται με σχεδόν διπλάσιο ρυθμό σε σχέση με τα MCF7 και επομένως είναι πολύ πιο επιθετικά.



Εικόνα 11 Κλωνογένεση στην MB231 κυτταρική σειρά

Μετρώντας και σε αυτήν την περίπτωση την οπτική πυκνότητα μετά από χρώση με SRB όπως και στους ελέγχους κυτταροτοξικότητας, εξάγουμε τα αποτελέσματα για τη επίδραση της ουσίας στη δημιουργία κλώνων. Έτσι συγκρίνοντας με την τελική συγκέντρωση των κλώνων που δημιουργήθηκαν στα control κύτταρα βλέπουμε ότι στις συγκεντρώσεις 0,1μM, 0,5μM, 1μM, 2,5μM και 5μM η δημιουργία των κλώνων μειώθηκε δραματικά, αντίστοιχα κατά 81,8%, 83,8%, 84%, 84,1% και 84,3%, όπως φαίνεται και στο γράφημα 5.

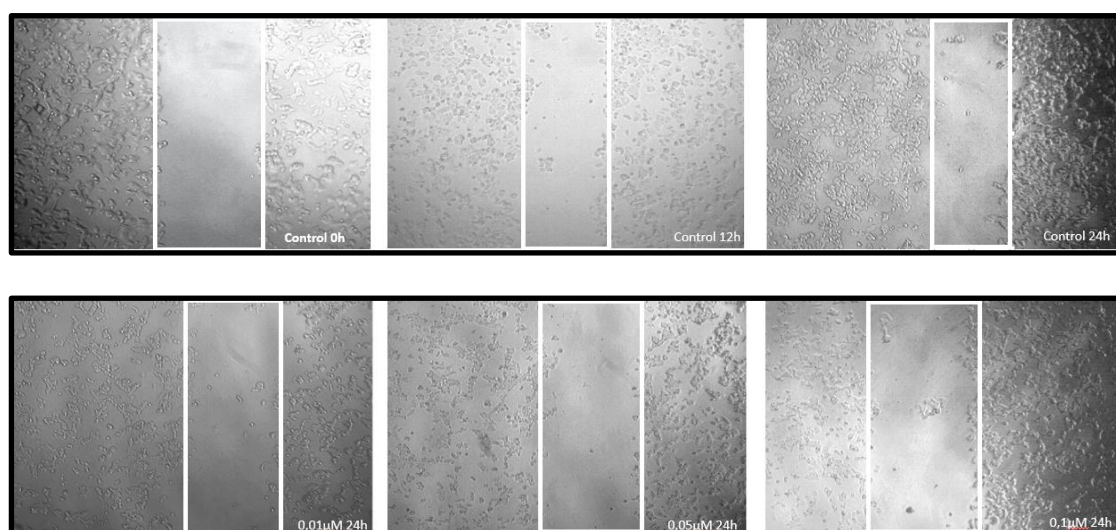


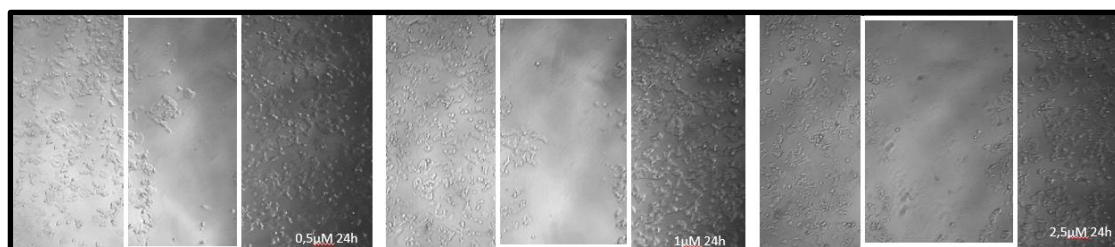
Γράφημα 5 Κλωνογένεση στα MB231 έπειτα από τη χορήγηση του AZD8055

3.3 Αποτελέσματα επούλωσης πληγής (wound healing/scratch assay)

MCF7

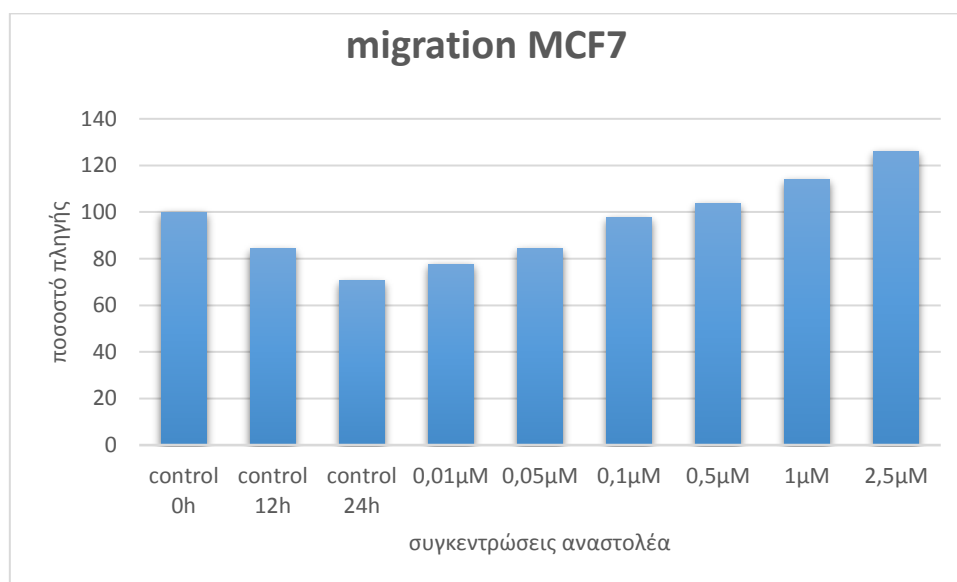
Οι παραπάνω εικόνες είναι τραβηγμένες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και δείχνουν την πρόοδο μετανάστευσης των κυττάρων έπειτα από το πέρας 24h, χωρίς αλλά και έπειτα από την προσθήκη του αναστολέα (AZD8055). Το σημείο '0h' είναι το σημείο όπου προστέθηκε ο αναστολέας ενώ φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 12h και 24h. Η εξαγωγή των τελικών συμπερασμάτων έγινε με τη μελέτη της επίδρασης του AZD8055 έπειτα από 24h συγκριτικά πάντα με την εικόνα των κυττάρων τη χρονική στιγμή 0.





Εικόνα 122 Απεικόνιση της μετανάστευσης των MCF7 κυττάρων έπειτα από τη χορήγηση του AZD8055

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζεται η ικανότητα μετανάστευσης των MCF7 κυττάρων. Για να εξασφαλίσουμε την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας έχουμε τα control κύτταρα από τα οποία βλέπουμε τη μεταναστευτική τους ικανότητα μέσα σε 24h χωρίς την προσθήκη αναστολέα. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται ότι ο αναστολέας έχει αρκετά αποτελεσματική δράση, καθώς όχι μόνο το κενό δεν καταφέρνει να κλείσει, αλλά επιπλέον παρατηρείται και θάνατος των κυττάρων.



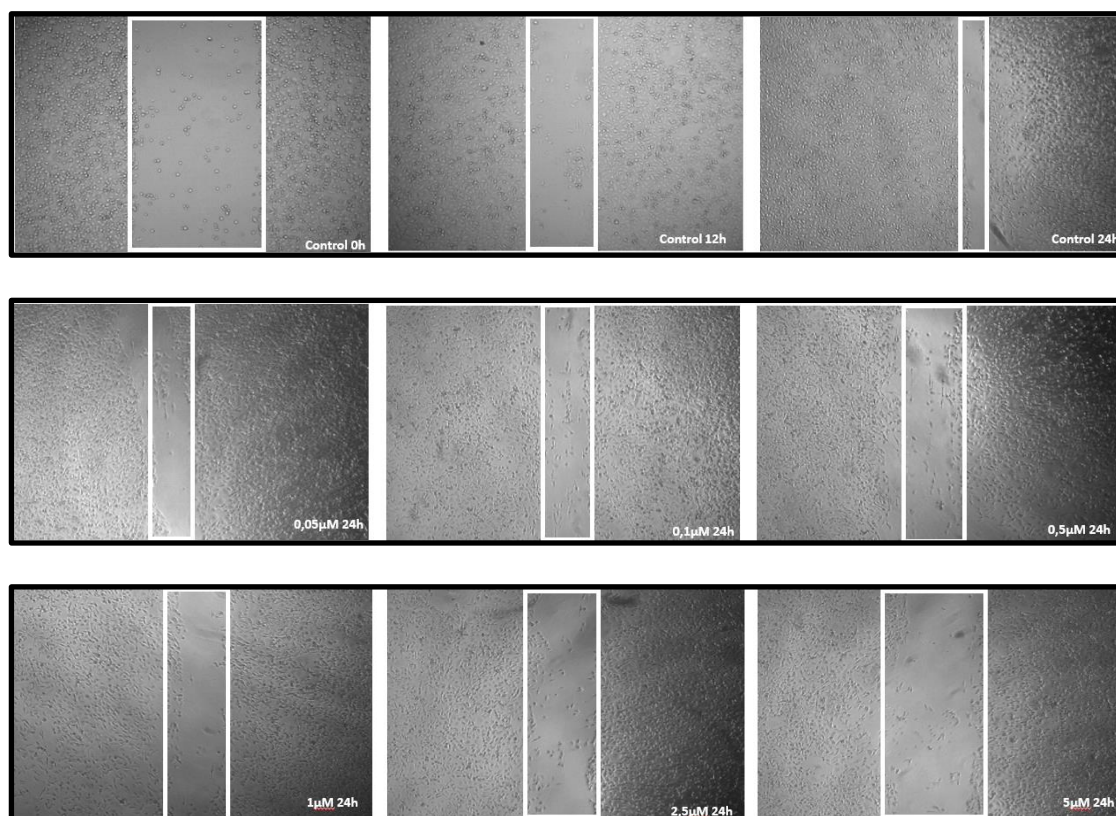
Γράφημα 6 Ποσοστό μετανάστευσης των MCF7 έπειτα από τη χορήγηση του AZD8055

Από το διάγραμμα φαίνεται πως τα κύτταρα χωρίς την παρουσία αναστολέα δεν έχουν τόσο καλή μεταναστευτική ικανότητα, αφού μετά το πέρας των 12 ωρών έχουν μετακινηθεί μόλις κατά 15,6%, ενώ μετά από μία ημέρα η πληγή έχει κλείσει κατά 29,5%. Όσον αφορά τη δράση του αναστολέα φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερα ισχυρός σε αυτήν την κυτταρική σειρά, αφού στις τρεις μικρότερες συγκεντρώσεις (0,01μM, 0,05μM, 0,1μM) προκαλεί πολύ μικρό ποσοστό μετανάστευσης (22,4%, 15,4% και 2,2% αντίστοιχα). Μάλιστα στις τρεις επόμενες συγκεντρώσεις όχι μόνο δεν οδηγεί σε μετανάστευση των κυττάρων, αλλά προκαλεί τον θάνατό τους και διεύρυνση της

πληγής. Πιο συγκεκριμένα στις συγκεντρώσεις 0,5μM, 1μM και 2,5μM το κενό που είχε δημιουργήσει η πληγή αυξάνεται κατά 3,7%, 13,9% και 26% αντίστοιχα.

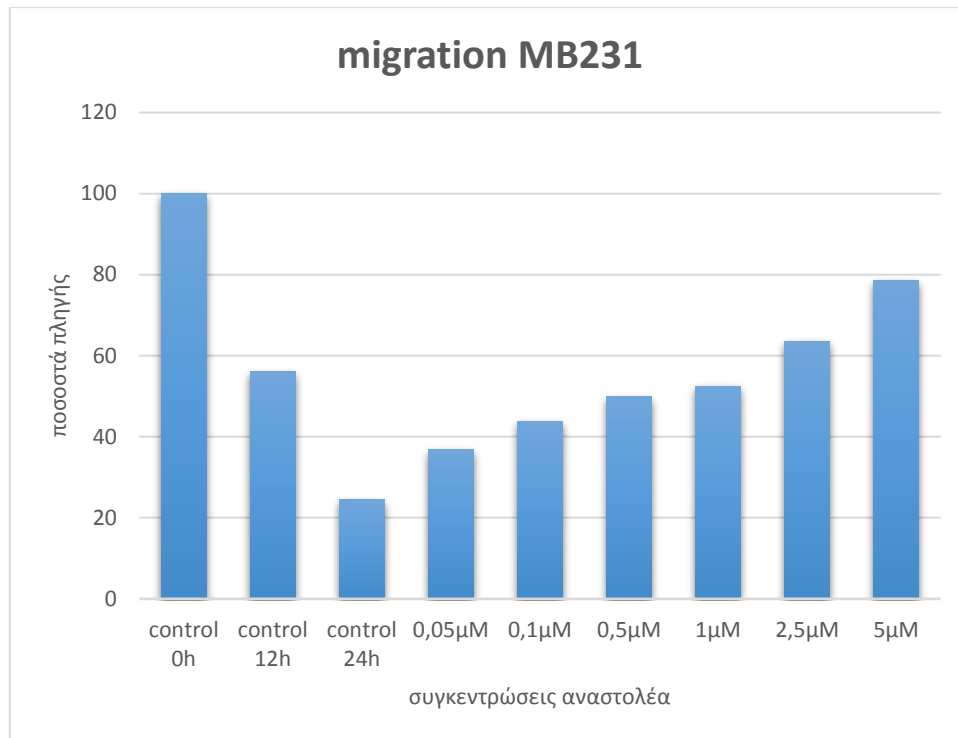
MB231

Ομοίως με τα MCF7 κύτταρα, συγκρίνοντας τα control κύτταρα διαπιστώνουμε ότι τα κύτταρα χωρίς την προσθήκη αναστολέα μεταναστεύουν κανονικά, γεγονός που είναι απαραίτητος δείκτης για την αξιοπιστία του πειράματος. Όσον αφορά τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις φαίνεται ότι στις 24h όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα, τόσο μειώνεται το ποσοστό μετανάστευσης των κυττάρων, ενώ στις μεγάλες συγκεντρώσεις παρατηρείται και μία μικρή αραίωση στον πληθυσμό των κυττάρων γενικά.



Εικόνα 133 Απεικόνιση της μετανάστευσης των MB231 κυττάρων έπειτα από τη χορήγηση του AZD8055

Στις εικόνες αυτές φαίνεται ξεκάθαρα πως τα κύτταρα αυτά είναι πιο επιθετικά, αφού τα control κύτταρα μεταναστεύουν με πολύ γρήγορο ρυθμό, ενώ και εκείνα που έχουν υποστεί τη δράση του φαρμάκου φαίνεται να μην επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό.



Γράφημα 7 Ποσοστό μετανάστευσης των MB231 έπειτα από τη χορήγηση του AZD8055

Πιο αναλυτικά, στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται τα ποσοστά μετανάστευσης των κυττάρων MB231, δηλαδή ο βαθμός που έκλεισε η πληγή που είχαμε δημιουργήσει. Έτσι βλέπουμε ότι στα control κύτταρα μετά τις 12h η πληγή έχει κλείσει κατά 44%, ενώ μετά από μία ημέρα το 75,5%. Όσον αφορά τον αναστολέα που χορηγήσαμε ξεκινώντας από τα 0,05μM φαίνεται ότι το 63,2% της πληγής καλύφθηκε από τα κύτταρα. Ακολούθως για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις 0,1μM, 0,5μM, 1μM, 2,5μM, 5μM το κενό έχει κλείσει κατά 56,3%, 50,1%, 47,6%, 36,5% και 21,5% αντίστοιχα.

Ο καρκίνος του μαστού έχει απασχολήσει εκτενώς την επιστημονική κοινότητα λόγω του υψηλού επιπολασμού του αλλά και της ιδιαίτερα υψηλής θνησιμότητας του. Οι διαφορετικοί υπότυποι στους οποίους διακρίνεται χρήζουν διαφορετικής προσέγγισης. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η θεραπεία του καρκίνου του μαστού διαφέρει από τύπο σε τύπο, όπως και από ασθενή σε ασθενή. Ωστόσο, συμπληρωματικά με την θεραπευτική προσέγγιση, μία ποικιλία παραγόντων όπως η φυσική κατάσταση, το ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και η ψυχολογία του ασθενούς μπορούν να επηρεάσουν την πορεία της αποκατάστασης και επιβίωσής του.

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής αυτής εργασίας επιχειρήθηκε η μελέτη της *in vitro* δραστηριότητας νέων αναστολέων του mTOR μονοπατιού στον καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, μέσω των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν επιχειρήθηκε η μελέτη της απόκρισης δύο διαφορετικών τύπων καρκίνου του μαστού (triple negative και ER+) στους αναστολείς του μονοπατιού mTOR 1ης και 2ης γενιάς αλλά και στον αναστολέα ενός σημαντικού τελεστή του mTOR μονοπατιού, της p70 κινάσης (αναστολέας p70SK).

Για τον σκοπό αυτό καταρχάς έγινε έλεγχος της *in vitro* κυτταροτοξικότητας των έξι διαφορετικών αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προσδιορισθεί ο πιο δραστικός απέναντι στους δυο αυτούς τύπους του καρκίνου του μαστού (triple negative και ER⁺). Από τους έξι αναστολείς που δοκιμάσαμε (Everolimus, Deforolimus, AZD8055, AZD2014, XL388 και PF4708671), φάνηκε ότι ο πιο αποτελεσματικός και για τις 2 κυτταρικές σειρές ήταν ο αναστολέας 2^{ης} γενιάς AZD8055. Από την άλλη, ο αναστολέας που ήταν λιγότερο δραστικός και στα MCF7 και στα MB231 κύτταρα, ήταν ο PF4708671. Ο αναστολέας αυτός ωστόσο φαίνεται στα MCF7 κύτταρα να έχει ελαφρά καλύτερη δράση αν και αυτή δεν φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική. Όσον αφορά τους υπόλοιπους αναστολείς φαίνεται πως οι άλλοι δύο αναστολείς 2^{ης} γενιάς (AZD2014 και XL388) δεν ήταν όσο αποτελεσματικοί αναμενόταν, συγκριτικά και με τους αναστολείς 1^{ης} γενιάς Everolimus και Deforolimus. Τα Everolimus και Deforolimus ήταν δραστικά, ιδιαίτερα στα MB231 κύτταρα, όμως η δράση αυτή εντοπίζεται κυρίως στις πιο υψηλές συγκεντρώσεις (10μM και 100μM). Οι AZD2014 και XL388 βρέθηκαν να

ασκούν ικανοποιητική δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές, χαμηλότερη όμως από του AZD8055. Έτσι η τελική επιλογή ανάμεσα στους έξι αναστολείς, ήταν ο AZD8055, καθώς έδινε τα καλύτερα αποτελέσματα και στις δύο κυτταρικές σειρές και μάλιστα στις μικρότερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Ο AZD8055 επομένως ελέγχθηκε στη συνέχεια ως προς την ικανότητά του να αναστέλλει τη δημιουργία κλώνων στις δυο σειρές και την μεταναστευτική τους ικανότητα, ιδιότητες που σχετίζονται με την επιθετικότητα και την μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων αντίστοιχα.

Από τα πειράματα ελέγχου της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων συμπεραίνουμε αρχικά ότι τα MB231 κύτταρα είναι αρκετά πιο επιθετικά συγκριτικά με τα MCF7. Αυτό φαίνεται κυρίως μέσω της σύγκρισης της ανάπτυξης των κυττάρων-μαρτύρων αφού τα πρώτα καλύπτουν το κενό σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό (σχεδόν η μισή πληγή κλείνει σε διάστημα 12h, ενώ στα MCF7 μετά το πέρας μίας ημέρας η πληγή έκλεισε κατά το 1/3).

Σαν γενική εικόνα φαίνεται υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες στα MCF7 ο αναστολέας να εμφανίζει ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τα MB231 κύτταρα τα οποία ωστόσο δεν έδωσαν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Συνολικά λοιπόν και από τα τρία πειράματα που διεξήχθησαν, συμπεραίνουμε ότι ο αναστολέας δεύτερης γενιάς AZD8055 έχει την καλύτερη δραστηριότητα όσον αφορά την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων που μελετήθηκαν. Τόσο κατά τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας, όσο και στον έλεγχο της ικανότητας του να αναστέλλει τη μετανάστευση και την κλωνογένεση φαίνεται ότι ασκεί ανασταλτική δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η δράση του αυτή φαίνεται να οφείλεται στην τριπλή στόχευση του στους τελεστές του μονοπατιού P70S6K, 4EBP1 και AKT τους οποίους αποφωσφορυλιώνει και άρα απενεργοποιεί.

Σύμφωνα με μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία όπου έχουν δοκιμαστεί οι ίδιοι αναστολείς για τον ίδιο ή διαφορετικούς τύπους καρκίνου φαίνεται ότι όσο πιο εξελιγμένοι είναι οι αναστολείς και όσο πιο στοχευμένη είναι η δράση τους τόσο καλύτερα είναι και τα αποτελέσματα που αυτοί παρουσιάζουν. Επιπλέον, η συνδυαστική δράση τους, ειδικά όσον αφορά τους αναστολείς 1^{ης} γενιάς, φαίνεται ότι δίνει πολύ καλύτερα αποτελέσματα (Hua et al., 2019) (Klumpfen et al., 2010). Λόγω της εξέλιξης της επιστήμης όμως οι αναστολείς αυτοί δε χρησιμοποιούνται πλέον

στον ίδιο βαθμό, αλλά αντικαθίστανται σταδιακά από τους αναστολείς δεύτερης γενιάς που βρίσκονται ακόμα σε πειραματικό στάδιο.

Το Everolimus συγκεκριμένα έχει δοκιμαστεί μαζί με άλλα χημειοθεραπευτικά και παράλληλα με ενδοκρινή θεραπεία, χωρίς όμως να δίνει τα ιδανικά αποτελέσματα αφού η πλειοψηφία των ασθενών αποκτά ανοσία στη συγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή (Baselga et al., 2011). Το Deforolimus από την άλλη χορηγείται και αυτό συνδυαστικά με φάρμακα όπως το Dalotuzumab για περιπτώσεις ER⁺ καρκίνου του μαστού, χωρίς όμως να έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα (Becker et al., 2016).

Καθώς οι αναστολείς 1^{ης} γενιάς δεν έδιναν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, αναπτύχθηκαν πιο εξελιγμένοι αναστολείς που στοχεύουν ακόμα καλύτερα το mTOR μονοπάτι που όμως χρειάζεται να μελετηθούν εκτενέστερα προκειμένου να ξεκινήσει η ασφαλής χορήγησή τους. Τα AZD8055, AZD2014 και XL388 που μελετήσαμε και στην παρούσα διπλωματική εργασία φαίνεται ότι δεν έχουν το ίδιο καλά αποτελέσματα αν και σε προκλινικό επίπεδο φαίνεται πως δίνουν αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα (ιδιαίτερα οι AZD8055 και AZD2014). Άλλες έρευνες που έχουν διεξαχθεί παρουσιάζουν επίσης πολύ θετικά αποτελέσματα. Στη μελέτη των Ruyu et al (Ruyu Pi et al, 2021) οι ερευνητές έδειξαν πόσο αποτελεσματική είναι η χρήση του AZD2014 στον περιορισμό της εξάπλωσης του καρκίνου των ωοθηκών, ενώ και το AZD8055 φάνηκε ότι είναι αποτελεσματικό σε περιπτώσεις όπου η ταμοξιφαίνη δεν έχει κάποιο αποτέλεσμα (Shi et al., 2018). Το XL388 από την άλλη αν και στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού δε φάνηκε να έχει κάποιο ιδιαίτερο αποτέλεσμα, οι (Xiong et al., 2017) έδειξαν ότι είναι ένας πολλά υποσχόμενος παράγοντας για τον νεφρικό καρκίνο. Όσον αφορά τον αναστολέα PF4708671 στην περίπτωση του μαστού ήταν σχεδόν απόλυτα αδρανής και στους 2 κυτταρικούς τύπους. Ο αναστολέας αυτός δεν έχει μελετηθεί στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, ίσως γιατί ο στόχος του βρίσκεται καθοδικά του mTOR και θεωρείται πως δε θα επηρεάσει το συγκεκριμένο μονοπάτι.

Ας ελπίσουμε ότι με την πρόοδο των θεραπειών ο τύπος αυτός καρκίνου που εξακολουθεί να προσβάλλει τόσο μεγάλο ποσοστό γυναικών και με μεγάλη δυστυχώς θνησιμότητα, θα μετατραπεί σε μία «συνηθισμένη» ασθένεια που θα αντιμετωπίζεται πιο εύκολα και θα έχει λιγότερα θύματα. Ωστόσο θα πρέπει να μην ξεχνάμε ότι πάνω και πριν από όλα η καλύτερη θεραπεία είναι η πρόληψη!!!

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <https://www.lifo.gr/culture/arxaiologia/ypirhe-karkinos-stin-arhaiotita><http://www.agsavvas->
2. <https://fyssas.gr/anatomia-mastou/>
3. <http://www.agsavvas-hosp.gr/%CE%9C%CE%AC%CE%B8%CE%B5%CE%B3%CE%B9%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%BD%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%CE%BF/%CE%A0%CE%BB%CE%B7%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%AF%CE%B5%CF%82/%CE%97%CE%B9%CF%83%CF%84%CE%BF%CF%81%CE%AF%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%85%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%CE%BF%CF%85.aspx>
4. <https://mybreastmyhealth.com/breast-cancer-in-men/>
5. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/300-greece-fact-sheets.pdf>
6. <https://www.meganalysis.gr/iatrikos-typos/oncogonidia-kai-oncostaltika-gonidia/>
7. <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>
8. <https://www.xepapadakis.gr/karkinos-tou-mastou/>
9. <http://www.gettingtoknowcancer.org/overview.php>
10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.611690/full>

11. <https://www.vvenizelos.gr/%CF%84%CF%8D%CF%80%CE%BF%CE%B9-%CF%83%CF%84%CE%AC%CE%B4%CE%B9%CE%B1-%CE%BA%CE%B1%CE%BA%CE%BF%CE%AE%CE%B8%CE%B5%CE%B9%CE%B1%CF%82-%CF%84%CE%BF%CF%85-%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%CE%BF%CF%85-%CF%84%CE%BF%CF%85-%CE%BC%CE%B1%CF%83%CF%84%CE%BF%CF%8D>
12. <https://kkarapanagiotis.gr/news/stadia-tou-karkinou-tou-mastou/>
13. <https://www.cancer.gov/types/breast/research>
14. https://en.wikipedia.org/wiki/MTOR_inhibitors#mTOR_signaling_pathway
15. https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%CE%BF%CF%82_%CF%84%CE%BF%CF%85_%CE%BC%CE%B1%CF%83%CF%84%CE%BF%CF%8D

(No Title). (n.d.-a). <https://doi.org/10.1177/1557988320908109>

(No Title). (n.d.-b). <https://doi.org/10.1177/1758835920940939>

(No Title). (n.d.-c). <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8769>

(No Title). (n.d.-d). <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3369>

(No Title). (2020). www.aging-us.com

A, K. (2020). Why do young people get cancer? *Pediatric Blood & Cancer*, 67(7). <https://doi.org/10.1002/PBC.28335>

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. In *Biological Research*. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>

Alghanem, B., Ali, R., Nehdi, A., Al Zahrani, H., Altolayyan, A., Shaibah, H., Baz, O., Alhallaj, A., Moresco, J. J., Diedrich, J. K., Yates Iii, J. R., & Boudjelal, M. (n.d.). *Proteomics Profiling of KAIMRC1 in Comparison to MDA-MB231 and MCF-7*. <https://doi.org/10.3390/ijms21124328>

Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H. A., Rugo, H. S., Sahmoud, T., Noguchi, S., Gnant, M., Pritchard, K. I., Beck, J. T., Ito, Y., Yardley, D., Deleu, I., Perez, A., Bachelot, T., Xu, Z., Mukhopadhyay, P., Lebwohl, D., & Hortobagyi, G. N. (2011). Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer A bs t r ac t. *N Engl J Med*, 366, 520–529. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109653>

Baselga, J., Serafin, •, Morales, M., Awada, •, Ahmad, Blum, J. L., Tan, A. R., Ewertz, M., Cortes, J., Moy, B., Ruddy, K. J., Haddad, T., Eva, •, Ciruelos, M., Vuylsteke, • Peter, Ebbinghaus, S., Im, E., Eaton, • Lamar, Pathiraja, K., Gause, C., ... Rugo, S. (2013). A phase II study of combined ridaforolimus and dalotuzumab compared with exemestane in patients with estrogen receptor-

- positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 163, 535–544.
<https://doi.org/10.1007/s10549-017-4199-3>
- Becker, M. A., Hou, X., Tienchaianada, P., Haines, B. B., Harrington, S. C., Weroha, S. J., Sathyanarayanan, S., & Haluska, P. (n.d.). *Ridaforolimus (MK-8669) synergizes with Dalotuzumab (MK-0646) in hormone-sensitive breast cancer*.
<https://doi.org/10.1186/s12885-016-2847-3>
- Bergin, A. R. T., & Loi, S. (2019). *Open Peer Review Triple-negative breast cancer: recent treatment advances [version 1; peer review: 2 approved]*.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). 394 CA: A Cancer Journal for Clinicians Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*, 68, 394–424.
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brufsky, A. M., & Dickler, M. N. (n.d.). *Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Exploiting Signaling Pathways Implicated in Endocrine Resistance*.
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0423>
- Cappiello, F., Casciaro, B., & Mangoni, M. L. (2018). A Novel In Vitro Wound Healing Assay to Evaluate Cell Migration. *J. Vis. Exp*, 133, 56825.
<https://doi.org/10.3791/56825>
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Disease*, 32(1–2), 35.
<https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- Choi, H., Merceron, C., Mangiavini, L., Seifert, E. L., Schipani, E., Shapiro, I. M., & Risbud, V. (2016). *Hypoxia promotes noncanonical autophagy in nucleus pulposus cells independent of MTOR and HIF1A signaling*.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1192753>
- Darre, T., Tchaou, M., Djiwa, T., Simgban, P., Amavi, A. K., N'timon, B., Amadou, A., Bombonne, M., Sama, B., Amégbor, K., & Napo-Koura, G. (2020). *Male Breast Cancer in Togo: Imaging and Clinicopathological Findings*.
<https://doi.org/10.1155/2020/3056067>
- Figure 2 | *mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer*. (n.d.). Retrieved September 23, 2021, from
<https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/953089/fig2/>
- Guichard, S. M., Curwen, J., Bihani, T., D'cruz, C. M., Yates, J. W. T., Grondine, M., Howard, Z., Davies, B. R., Bigley, G., Klinowska, T., Pike, K. G., Pass, M., Chresta, C. M., Polanska, U. M., Mcewen, R., Delpuech, O., Green, S., & Cosulich, S. C. (2015). *AZD2014, an Inhibitor of mTORC1 and mTORC2, Is Highly Effective in ER + Breast Cancer When Administered Using Intermittent or Continuous Schedules*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0365>
- Guo, Y., & Pei, X. (2019). *Tetrandrine-Induced Autophagy in MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Cell through the Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Signaling*. <https://doi.org/10.1155/2019/7517431>

- H, U., & R, F. (2004). Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(7), 950–955. <https://doi.org/10.1248/BPB.27.950>
- HK, K., H, M., KS, L., HS, M., BS, K., & DJ, K. (1987). Clonogenic assay of gastric adenocarcinoma stem cells--clonogenic assay, stomach cancer. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 2(2), 163–169. <https://doi.org/10.3904/KJIM.1987.2.2.163>
- Hua, H., Kong, Q., Zhang, H., Wang, J., Luo, T., & Jiang, Y. (2019). Targeting mTOR for cancer therapy. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0754-1>
- J, L., SG, K., & J, B. (2014). Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metabolism*, 19(3), 373–379. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2014.01.001>
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., & Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. In *Przegląd Menopauzalny*. <https://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>
- Khotskaya, Y. B., Goverdhan, A., Shen, J., Ponz-Sarvisse, M., Chang, S.-S., Hsu, M.-C., Wei, Y., Xia, W., Yu, D., & Hung, M.-C. (2014). Original Article S6K1 promotes invasiveness of breast cancer cells in a model of metastasis of triple-negative breast cancer. In *Am J Transl Res* (Vol. 6, Issue 4). www.ajtr.org
- Kluˆmpen, H.-J., Kluˆmpen, K., Beijnen, J. H., Gurney, H., & Schellens, J. H. M. (n.d.). *Inhibitors of mTOR; Inhibitors of mTOR*. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0196>
- Koene, L. M. C., Van Grondelle, S. E., Onori, M. P., Wallaard, I., Kooijman, N. H. R. M., Van Oort, A., Schreiber, J., & Elgersma, Y. (2019). Effects of antiepileptic drugs in a new TSC/mTOR-dependent epilepsy mouse model. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 6(7), 1273–1291. <https://doi.org/10.1002/acn3.50829>
- Kubo. *Adjuvant endocrine treatment for ER+/HER2– breast cancer*. (n.d.). <https://doi.org/10.21037/cco-20-125>
- Kuroshima, K., Yoshino, H., Okamura, S., Tsuruda, M., Osako, Y., Sakaguchi, T., Satoshi, |, Shuichi, S. |, Masayuki, T. |, & Hideki Enokida, N. |. (2020). ORIGINAL ARTICLE Potential new therapy of Rapalink-1, a new generation mammalian target of rapamycin inhibitor, against sunitinib-resistant renal cell carcinoma. *Cancer Science*, 111, 1607–1618. <https://doi.org/10.1111/cas.14395>
- Lee, E. Y. H. P., & Muller, W. J. (n.d.). *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>
- Masci, G., Caruso, M., Caruso, F., Salvini, P., Carnaghi, C., Giordano, L., Misericocchi, V., Losurdo, A., Zuradelli, M., Torrisci, R., Di Tommaso, L., Tinterri, C., Testori, A., Garcia-Etienne, C. A., Gatzemeier, W., & Santoro, A. (n.d.). *Clinicopathological and Immunohistochemical Characteristics in Male Breast Cancer: A Retrospective Case Series*. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0243>
- Medina, M. A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L. G., Manuel Hernández Hernández,

- J., Rotello, V. M., & Tapia Ramirez, J. (2020). *Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies*.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17062078>
- Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. In *Breast Cancer: Targets and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>
- Naing, A., Aghajanian, C., Raymond, E., Olmos, D., Schwartz, G., Oelmann, E., Grinsted, L., Burke, W., Taylor, R., Kaye, S., Kurzrock, R., & Banerji, U. (2012). Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD8055 in advanced solid tumours and lymphoma. *British Journal of Cancer*, *107*, 1093–1099. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.368>
- Overview. (n.d.). Retrieved August 17, 2021, from
<http://www.gettingtoknowcancer.org/overview.php>
- Park, J.-H., Kim, K. P., Ko, J.-J., & Park, K.-S. (2016). *PI3K/Akt/mTOR activation by suppression of ELK3 mediates chemosensitivity of MDA-MB-231 cells to doxorubicin by inhibiting autophagy*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.057>
- PH, W., BS, H., HC, H., CC, Y., & YJ, C. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, *81*(2), 94–101.
<https://doi.org/10.1016/J.JCMA.2017.11.002>
- R, P., Y, Y., X, H., H, L., H, S., Y, L., X, W., A, T., T, L., Y, W., X, Z., & X, W. (2021). Dual mTORC1/2 inhibitor AZD2014 diminishes myeloid-derived suppressor cells accumulation in ovarian cancer and delays tumor growth. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2021.09.017>
- Radecka, B., & Litwiniuk, M. (2016). Breast cancer in young women. *REVIEW / GYNECOLOGY Ginekologia Polska*, *87*(9), 659–663.
<https://doi.org/10.5603/GP.2016.0062>
- Ridaforolimus. (n.d.). <http://creativecommons.org>.
- Rossing, M., Sørensen, C. S., Ejlersen, B., & Nielsen, F. C. (2019). *Whole genome sequencing of breast cancer*. <https://doi.org/10.1111/apm.12920>
- Rugo, H. S., Trédan, • Olivier, Ro, • Jungsil, Serafin, •, Morales, M., Campone, M., Musolino, A., Afonso, N., Ferreira, M., Kyong, •, Park, H., Cortes, J., Tan, A. R., Blum, J. L., Eaton, • Lamar, Gause, C. K., Wang, Z., Im, E., David, •, ... Baselga, J. (2017). A randomized phase II trial of ridaforolimus, dalotuzumab, and exemestane compared with ridaforolimus and exemestane in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *165*, 601–609.
<https://doi.org/10.1007/s10549-017-4375-5>
- Sahin, F., Kannangai, R., Adegbola, O., Wang, J., Su, G., & Torbenson, M. (2004). *mTOR and P70 S6 Kinase Expression in Primary Liver Neoplasms*.
- Shi, J.-J., Chen, S.-M., Guo, C.-L., Li, Y.-X., Ding, J., & Meng, L.-H. (2018). The mTOR inhibitor AZD8055 overcomes tamoxifen resistance in breast cancer cells by down-regulating HSPB8. *Acta Pharmacologica Sinica*, *39*, 1338–1346.
www.chinaphar.com
- Thomson, A. W., Waldner, M., Fantus, D., & Solari, M. (2016). *REVIEW-THEMED*

ISSUE New perspectives on mTOR inhibitors (rapamycin, rapalogs and TORKinibs) in transplantation Correspondence Professor.
<https://doi.org/10.1111/bcp.12893>

Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. In *Advances in Anatomic Pathology*.
<https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>

Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, 110, 39–48. <https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:039>

Xiong, Z., Zang, Y., Zhong, S., Zou, L., Wu, Y., Liu, S., Fang, Z., Shen, Z., Ding, Q., & Chen, S. (2017). *The preclinical assessment of XL388, a mTOR kinase inhibitor, as a promising anti-renal cell carcinoma agent.*
www.impactjournals.com/oncotarget

Y, S., MP, C., K, V., PA, K., A, L., R, K., & None, K. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems*, 9(2), 109–127.
<https://doi.org/10.1016/J.CELS.2019.07.003>

Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., & Yu, S.-C. (n.d.). *Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress.* <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>

Zhang, Y. B., Pan, X. F., Chen, J., Cao, A., Zhang, Y. G., Xia, L., Wang, J., Li, H., Liu, G., & Pan, A. (2020). Combined lifestyle factors, incident cancer, and cancer mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *British Journal of Cancer*, 122(7), 1085–1093.
<https://doi.org/10.1038/S41416-020-0741-X>

Πληροφορίες για γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού. (1968). www.nbocc.org.au

i

P value mb231	AZD8055	AZD2014	XL388	EVEROLIMUS	DEFOROLIMUS	PF4708671
AZD8055	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
AZD2014	<0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
XL388	<0,05	<0,05	-	>0,05	<0,05	<0,05
EVEROLIMUS	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05	<0,05
DEFOROLIMUS	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	-	<0,05
PF4708671	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-

P value MCF7	AZD8055	AZD2014	XL388	EVEROLIMUS	DEFOROLIMUS	PF4708671
AZD8055	-			<0,05	>0,05	<0,05

AZD2014	<0,05	-	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
XL388	<0,05	<0,05	-	>0,05	>0,05	<0,05
EVEROLIMUS	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05	<0,05
DEFOROLIMUS	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	-	<0,05
PF4708671	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-

ii

P value MB231	Control 0h	Control 12h	Control 24h	0,05µM	0,1µM	0,5µM	1µM	2,5µM	5µM
control 0h	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
control 12h	<0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
control 24h	<0,05	<0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
0,05µM	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
0,1µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
0,5µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05
1µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05	<0,05
2,5µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05
5µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-

P value MCF7	Control 0h	Control 12h	Control 24h	0,01µM	0,05µM	0,1µM	0,5µM	1µM	2,5µM
control 0h	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05
control 12h	<0,05	-	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
control 24h	<0,05	<0,05	-	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
0,01µM	<0,05	>0,05	>0,05	-	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

0,05µM	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
0,1µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05
0,5µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05	<0,05
1µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	<0,05
2,5µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-

iii

P value MCF7	control	0,01µM	0,05µM	0,1µM	0,5µM	1µM
control	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
0,01µM	<0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
0,05µM	<0,05	>0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05
0,1µM	<0,05	<0,05	>0,05	-	<0,05	
0,5µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	>0,05
1µM	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	-

P value MB231	control	0,1µM	0,5µM	1µM	2,5µM	5µM
control	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
0,1µM	<0,05	-	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
0,5µM	<0,05	<0,05	-	>0,05	>0,05	>0,05
1µM	<0,05	<0,05	>0,05	-	>0,05	
2,5µM	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	-	>0,05
5µM	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	-