

EΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Τσέζου Ασπασία για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο συγκεκριμένο εργαστήριο και να ασχοληθώ με ένα θέμα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον κ. Δήμα Κωνσταντίνο, επιβλέπων καθηγητή, για την τιμή που μου έκανε να με δεχτεί στην ομάδα του, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ με εξαιρετικούς ανθρώπους και επιστήμονες αλλά και για την καθοδήγησή του, την υποστήριξη, τις συμβουλές, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να καταφέρω να ολοκληρώσω την εργασία μου και την πολύτιμη συμβολή του στη συγγραφή και τελική παρουσίαση του κειμένου.

Δε θα μπορούσα να μην εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην κ. Σερέτη Ευαγγελία, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος, για την άψογη συνεργασία που είχαμε, την καλοσύνη της, τις συμβουλές της, την αμέριστη συμπαράστασή της στις όποιες δυσκολίες προέκυψαν, τη συνεχή βοήθεια και υποστήριξη σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, για τη συμβολή της στη συγγραφή του κειμένου αλλά και για όλες τις ώρες που περάσαμε συζητώντας και δουλεύοντας μαζί σχεδόν όλο το 2015.

Ευχαριστώ επίσης, όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για το ζεστό και φιλικό κλίμα και για την βοήθεια που μου έδωσαν με χαρά κάθε στιγμή που την χρειάστηκα, τον κ. Σακελλαρίδη Νικόλαο, διευθυντή του εργαστηρίου, την κ. Τσιμπλούλη Χρυσή, την κ. Βάιου Μαρία, την κ. Ασπροδίνη Ευτυχία, την κ. Ναστούλη Αγγελική, τον κ. Πιτσικά Νικόλαο, την κ. Milosevic Zorica, την κ. Alper Pinar, τον κ. Βαλιάκο Ηλία και τον κ. Μπέγα Ηλία.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τους γονείς μου, Δημοσθένη και Ευτυχία, και τον σύντροφό μου, Γιώργο, για την συνεχή υποστήριξή τους σε ότι έχω κάνει μέχρι τώρα, και την ατελείωτη υπομονή που έχουν δείξει όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Οι sigma υποδοχείς (sigma 1 και sigma 2) είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου των κυττάρων, στις περιοχές αλληλεπίδρασης του δικτύου με τα μιτοχόνδρια. Τα τελευταία χρόνια, βαρύτητα έχει δοθεί στην υπερέκφρασή τους σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως για παράδειγμα τον παγκρεατικό και τον ορθοκολικό.

Σκοπός της ακόλουθης μελέτης είναι να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών (targeted therapies) και η δραστηριότητα των προσδετών τους ως αντικαρκινικά φάρμακα στον καρκίνο του παγκρέατος. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η έκφραση των υποδοχέων σε όγκους και κυτταρικές σειρές *in vitro* με απομόνωση πρωτεϊνών, ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western και στη συνέχεια δοκιμάστηκαν οι προσδέτες με πειράματα κυτταροτοξικότητας σε επιλεγμένες κυτταρικές σειρές: μια πρωτογενή από ασθενή και μια εγκαθιδρυμένη.

Η μελέτη έδειξε ότι στους καρκινικούς όγκους παγκρέατος υπήρξε αυξημένη έκφραση τόσο των σ1 όσο και των σ2 υποδοχέων σε σχέση με φυσιολογικό ιστό από το ίδιο όργανο. Η έκφραση των υποδοχέων ανιχνεύτηκε και στις εγκαθιδρυμένες καρκινικές σειρές AsPC1 και MiaPaca. Τέλος, στην πρωτογενή παγκρεατική καρκινική σειρά 021013 Attached παρατηρείται επίσης έκφραση των δύο υποδοχέων με το σ2 υποδοχέα όμως να εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τον σ1.

Από τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας των σ προσδετών έναντι των δύο κυτταρικών σειρών 021013 Attached και AsPC1, φαίνεται ότι για την κυτταρική σειρά Attached 021013 η ουσία PB-28 (σ2 αγωνιστής) είναι το πιο δραστικό μόριο (GI50: 0,17μM). Σημαντική αντιπολλαπλασιαστική δράση παρουσιάζουν επίσης και οι πειραματικές ουσίες (η ακριβής σχέση τους με τους σ υποδοχείς βρίσκεται υπό μελέτη) P5-NH Maleate και FP5-NH Maleate με GI50 αντίστοιχα 3,73μM και 4,08μM.

Για την κυτταρική σειρά AsPC1, μεγαλύτερη δραστηριότητα παρουσιάζουν τα μόρια P5-NH Maleate, FP5-NH Maleate και PB28 Dichydrochloride με GI50 αντίστοιχα 4,89μM και 4,63μM και 6,29μM.

Μέρος της εργασίας παρουσιάστηκε με τη μορφή αναρτημένης εργασίας στο διεθνές συνέδριο 3rd Anticancer agent development congress (14).

Abstract

Sigma receptors (sigma 1 and sigma 2) are proteins which are located in the mitochondrial associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) of the cells. In recent years, attention has been paid to their overexpression in several types of cancer, such as pancreatic and colorectal.

The purpose of this study was to investigate their potential role in the development of targeted therapies and assessing the activity of sigma ligands as anti-cancer drugs mainly in the pancreatic cancer. Toward this aim, first we studied the expression of sigma receptors in patients' pancreatic tumors and human pancreatic cancer cell lines using techniques such as isolating protein, electrophoresis and Western blotting. Furthermore the ligands were tested in *in vitro* cytotoxicity experiments on selected human pancreatic cancer cell lines: the primary 021013 attached, derived from a patient, and the established AsPC1.

The study showed increased expression for both $\sigma 1$ and $\sigma 2$ in the cancerous pancreatic tumors compared to normal tissue from the same organ. Furthermore, the receptor expression was detected in the established cancer cell lines AsPC1 and MiaPaca. Finally, the expression of both receptors was confirmed also in the primary pancreatic tumor 021013 Attached, where $\sigma 2$ receptor was overexpressed compared to $\sigma 1$ receptor.

After the cytotoxicity study against the two cell lines 021013 Attached and AsPC1, it appears that the substance PB-28 ($\sigma 2$ agonist) is the most active molecule for the cell line 021013 Attached (GI50: 0,17 μ M), whereas the experimental agents (their exact interaction with σ receptors is still under study) P5-NH Maleate and FP5-NH Maleate exhibited also important antiproliferative activity with GI50 respectively 3,73 μ M και 4,08 μ M.

For the cell line AsPC1, greater activity was developed by molecules P5-NH Maleate, FP5-NH Maleate and PB28 Dichydrochloride with GI50 respectively 4,89 μ M και 4,63 μ M and 6,29 μ M.

Part of the experimental work was presented at the international conference 3rd Anticancer agent development congress (**14**).

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	σελ. 6
Κεφάλαιο 1	σελ. 8
1.1. Γενικά για τον καρκίνο	σελ. 8
1.2. Καρκίνος γαστρεντερικού συστήματος	σελ. 13
1.3. Ανατομία –Φυσιολογία παγκρέατος	σελ. 14
1.4. Καρκίνος Παγκρέατος	σελ. 15
1.4.1. Αίτια	σελ. 17
1.4.2. Κλινική εικόνα	σελ. 18
1.4.3. Μέθοδοι διάγνωσης	σελ. 18
1.4.4. Θεραπεία –Επιδημιολογία	σελ. 19
1.4.5. Σύστημα σταδιοποίησης	σελ. 19
1.5. Μονοπάτια καρκινογένεσης	σελ. 24
1.5.1 Το ογκογονίδιο K-Ras	σελ. 24
 Κεφάλαιο 2	σελ. 25
2.1. Sigma υποδοχείς – Γενικές πληροφορίες	σελ. 25
2.2. Sigma -1 υποδοχέας	σελ. 26
2.3 Sigma-2 / PGRMC1 υποδοχέας	σελ. 30
2.4. Έκφραση των σ υποδοχέων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και ιστούς	σελ. 32
2.5. Αγωνιστές – Ανταγωνιστές : Φυσιολογική λειτουργία	σελ. 33
2.6. Sigma -2 ligands ως επαγωγείς απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα (πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες)	σελ. 37
2.7 Κλασσικοί Sigma προσδέτες	σελ. 40

Πειραματικό μέρος	σελ. 43
Σκοπός	σελ. 44
 Κεφάλαιο 3	σελ.45
3.1 Κυτταροκαλλιέργεια	σελ.45
3.2 Λύση όγκων	σελ. 48
3.3 Λύση κυττάρων	σελ.49
3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	σελ.49
3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	σελ. 52
3.6 Κυτταροτοξικότητα	σελ. 60
 Κεφάλαιο 4	
4.1 Αποτελέσματα	σελ. 65
4.2 Συζήτηση – Συμπεράσματα	σελ. 77
4.3 Μελλοντικές προοπτικές	σελ. 80
 Βιβλιογραφία	σελ. 81

Εισαγωγή

Οι sigma υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού δικτύου των κυττάρων, σε διάφορους ιστούς των θηλαστικών. Μέχρι τώρα έχουν συσχετιστεί με διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, της κίνησης και της μνήμης. Τα τελευταία χρόνια όμως, βαρύτητα έχει δοθεί στην υπερέκφρασή τους σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως για παράδειγμα τον παγκρεατικό και τον ορθοκολικό. Σκοπός της μελέτης αυτών των πρωτεϊνών είναι η ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών (targeted therapies) και η αξιολόγηση των προσδετών τους ως αντικαρκινικά φάρμακα στους παραπάνω τύπους καρκίνου.

Έχει ήδη αποδειχτεί, ότι η συγκέντρωσή τους αυξάνεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, από καρκίνο του παγκρέατος αλλά και σε όγκους από ζωομοντέλα. Κανείς όμως δεν έχει αποδείξει κάτι αντίστοιχο σε πρωτογενείς όγκους ασθενών, αλλά ούτε και xenografts από άνθρωπο σε ζώο. Η απόδειξη μιας τέτοιας θεωρίας, θα έφερνε επανάσταση στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος, καθώς τα μόρια αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τόσο για απεικονιστικές μεθόδους όσο και για στοχευμένη θεραπεία, αποφεύγοντας έτσι τις γενικευμένες παρενέργειες της χημειοθεραπείας και αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής των ασθενών.

Ακριβώς επειδή ακόμα δεν έχει βρεθεί με κάποιο τρόπο η αυξημένη συγκέντρωση των σ υποδοχέων σε όγκους ασθενών, μελετήθηκαν πρωτογενείς όγκοι. Μετά από λύση των όγκων απομονώθηκαν οι ολικές του πρωτεΐνες και με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε σ1 και σ2 υποδοχείς. Επίσης, με πειράματα κυτταροτοξικότητας σε επιλεγμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές, εκ των οποίων η μία είναι πρωτογενής, εξετάστηκε η δράση συγκεκριμένων μορίων που προσδέονται επιλεκτικά με σ υποδοχείς, προκειμένου να εξακριβωθεί η φαρμακευτική τους δράση σε συνάρτηση με την χορηγούμενη συγκέντρωσή τους.

Στο πρώτο κεφάλαιο, περιγράφεται αναλυτικά ο καρκίνος και ο καρκίνος του παγκρέατος, η γενετική του βάση και άλλοι προδιαθεσικοί παράγοντες, η μέχρι τώρα τρόποι διάγνωσης και θεραπείας αλλά και το σύστημα σταδιοποίησής του, που σχετίζεται άμεσα με την πρόγνωση. Ακολουθούν πληροφορίες για του σ υποδοχείς και τις κατηγορίες τους, δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία για την έκφρασή τους, τους προσδέτες τους και τις πιθανές χρήσεις τους προς όφελος των ασθενών, στο δεύτερο κεφάλαιο.

Στο τρίτο κεφάλαιο αναλύονται οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, τα αντιδραστήρια και οι τρόποι παραγωγής τους και τέλος στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα και ακολουθούν τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης και οι μελλοντικές προοπτικές των σ υποδοχέων στη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο αλλά και με ορθοκολικό καρκίνο.

Κεφάλαιο 1^ο

1.1 Γενικά για τον καρκίνο

Ως καρκίνος ορίζεται μία ομάδα παθήσεων που περιλαμβάνει πάνω από εκατό ασθένειες. Αν και υπάρχουν πολλά είδη καρκίνου, όλοι οι τύποι έχουν ένα κοινό σημείο έναρξης: Πρόκειται για μη φυσιολογικά κύτταρα τα οποία δεν υπακούν στο κυτταρικό κύκλο (1) και χαρακτηρίζεται από την ανεξέλεγκτη αύξηση και εξάπλωση αυτών. Εάν η κατάσταση αυτή δε γίνει ελεγχόμενη, ο ασθενής οδηγείται στο θάνατο (2).

Στις μέρες μας ο καρκίνος αποτελεί το μεγαλύτερο ίσως πρόβλημα της δημόσιας υγείας, που εμφανίζεται παγκοσμίως, ανεξάρτητα με την οικονομική ανάπτυξη των χωρών (3). Μέχρι τώρα αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου, μετά τα καρδιαγγειακά προβλήματα, αλλά υπολογίζεται ότι τα επόμενα θα αποτελέσει την πρώτη αιτία (4). Σύμφωνα με τον οργανισμό Global, το 2012 υπήρξαν περίπου 14,1 εκατομμύρια νέων περιπτώσεων καρκίνου και 8,2 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως (5). Τα τελευταία χρόνια, σημαντικός αριθμός καρκίνων εμφανίστηκε στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες, με το ποσοστό να αγγίζει το 57% των περιπτώσεων και το 65% των θανάτων παγκοσμίως (4). Μεταξύ των δύο φύλλων, στους άνδρες η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο είναι ο καρκίνος του πνεύμονα ενώ στις γυναίκες ο καρκίνος του στήθους. Άλλοι τύποι καρκίνου με υψηλή θνητότητα στις αναπτυγμένες χώρες είναι του παχέος εντέρου και στα 2 φύλα και του προστάτη για τους άνδρες ενώ στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες είναι του ήπατος και στομάχου για τους άρρενες και του τράχηλου της μήτρας για τις γυναίκες (5).

Παρόλο που στις αναπτυγμένες χώρες τα ποσοστά καρκίνου είναι σχεδόν διπλάσια, η θνητότητα φαίνεται να είναι μόλις 8% έως 15% πιο υψηλή. Αυτή η δυσαναλογία σχετίζεται πιθανά με τα είδη των καρκίνων και συνεπώς με τους αιτιολογικούς παράγοντες, τις μεθόδους διάγνωσης και το είδος της θεραπείας, εφόσον αυτή είναι εφικτή (4).

Cancer	Incidence			Mortality			5-year prevalence		
	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	Prop.
Lip, oral cavity	300373	2.1	4.0	145353	1.8	1.9	702149	2.2	13.5
Nasopharynx	86691	0.6	1.2	50831	0.6	0.7	228698	0.7	4.4
Other pharynx	142387	1.0	1.9	96105	1.2	1.3	309991	1.0	6.0
Oesophagus	455784	3.2	5.9	400169	4.9	5.0	464063	1.4	8.9
Stomach	951594	6.8	12.1	723073	8.8	8.9	1538127	4.7	29.6
Colorectum	1360602	9.7	17.2	693933	8.5	8.4	3543582	10.9	68.2
Liver	782451	5.6	10.1	745533	9.1	9.5	633170	2.0	12.2
Gallbladder	178101	1.3	2.2	142823	1.7	1.7	205646	0.6	4.0
Pancreas	337872	2.4	4.2	330391	4.0	4.1	211544	0.7	4.1
Larynx	156877	1.1	2.1	83376	1.0	1.1	441675	1.4	8.5
Lung	1824701	13.0	23.1	1589925	19.4	19.7	1893078	5.8	36.5
Melanoma of skin	232130	1.7	3.0	55488	0.7	0.7	869754	2.7	16.8
Kaposi sarcoma	44247	0.3	0.6	26974	0.3	0.3	80395	0.2	1.5
Breast	1671149	11.9	43.1	521907	6.4	12.9	6232108	19.2	239.9
Cervix uteri	527624	3.8	14.0	265672	3.2	6.8	1547161	4.8	59.6
Corpus uteri	319605	2.3	8.3	76160	0.9	1.8	1216504	3.7	46.8
Ovary	238719	1.7	6.1	151917	1.9	3.8	586624	1.8	22.6
Prostate	1094916	7.8	30.7	307481	3.7	7.8	3857500	11.9	148.6
Testis	55266	0.4	1.5	10351	0.1	0.3	214666	0.7	8.3
Kidney	337860	2.4	4.4	143406	1.7	1.8	906746	2.8	17.5
Bladder	429793	3.1	5.3	165084	2.0	1.9	1319749	4.1	25.4
Brain, nervous system	256213	1.8	3.4	189382	2.3	2.5	342914	1.1	6.6
Thyroid	298102	2.1	4.0	39771	0.5	0.5	1206075	3.7	23.2
Hodgkin lymphoma	65950	0.5	0.9	25469	0.3	0.3	188538	0.6	3.6
Non-Hodgkin lymphoma	385741	2.7	5.1	199670	2.4	2.5	832843	2.6	16.0
Multiple myeloma	114251	0.8	1.5	80019	1.0	1.0	229468	0.7	4.4
Leukaemia	351965	2.5	4.7	265471	3.2	3.4	500934	1.5	9.6
All cancers excl. non-melanoma skin cancer	14067894	100.0	182.0	8201575	100.0	102.4	32455179	100.0	625.0

***Πίνακας 1 :** Εκτιμώμενη επίπτωση, θνητότητα και πενταετής επιβίωση για τους διάφορους τύπους καρκίνου , και στα δύο φύλα, μόνο για τους ενήλικες για το 2012 .*

Ο καρκίνος είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα. Οι αιτίες που μπορεί να τον προκαλέσουν είναι πολυάριθμες και περιλαμβάνουν γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Ως γενετικό νόσημα, οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων που ελέγχουν την αύξηση και τη διαίρεση των κυττάρων, δηλαδή τον κυτταρικό κύκλο (6). Αυτές οι αλλαγές μπορεί να κληρονομηθούν από τους γονείς, με αυτοσωμικό επικρατή ή υπολειπόμενο τρόπο ή με φυλλοσύνδετο τρόπο (7). Κάθε ανθρώπινος καρκίνος έχει ένα μοναδικό συνδυασμό γενετικών αλλαγών, που αυξάνονται καθώς ο όγκος μεγαλώνει. Ακόμα και στον ίδιο τύπο καρκινικών κυττάρων, υπάρχουν διαφορετικές γενετικές αλλαγές, που είναι σίγουρα περισσότερες από των φυσιολογικών κυττάρων και μπορεί να είναι και αποτέλεσμα του όγκου παρά αιτία (6).

Οι γενετικές αλλαγές επηρεάζουν κυρίως τρεις τύπους γονιδίων :

1) Τα πρωτο-ογκογονίδια

Φυσιολογικά βρίσκονται στα ανθρώπινα κύτταρα και προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη. Αν και από μόνα τους δεν επαρκούν για κακοήγη εξαλλαγή, έχουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη του φαινομένου και μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικές αλλαγές μέσω μεταλλάξεων του ενός μόνο γενετικού αντιγράφου τους. Μετά τη μετάλλαξη, ονομάζονται πλέον ογκογονίδια (8).

2) Τα ογκοκατασταλτικά

Εμπλέκονται στη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Η κρίσιμη μετάλλαξη στην οποία οφείλεται τελικά η κακοήθεια είναι στα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Συνήθως απενεργοποιούνται από σημειακές μεταλλάξεις και ελλείψεις. Ένα σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι το p53, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 η οποία διεγείρει τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς σε περίπτωση βλάβης. Η μετάλλαξη του οδηγεί σε καρκινογένεση (8).

3) Τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA

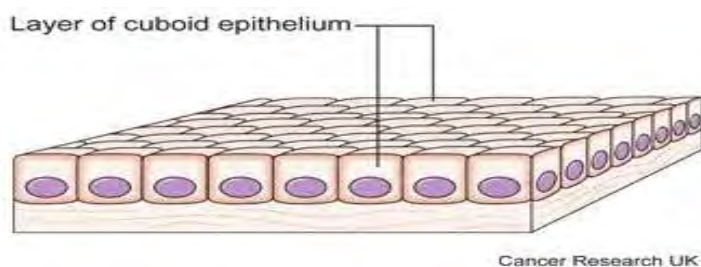
Επιδιορθώνουν βλάβες που συμβαίνουν στο DNA. Κύτταρα που έχουν βλάβες σε αυτά τα γονίδια, τείνουν να έχουν επιπρόσθετες βλάβες και σε άλλα γονίδια. Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, τα κύτταρα γίνονται καρκινικά (6).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο είναι χημικές ουσίες όπως η φορμαλδεύδη, ορμονικοί παράγοντες, όπως η DES (συνθετική μορφή των οιστρογόνων που χορηγούνταν κατά την εγκυμοσύνη), μολυσματικοί παράγοντες όπως οι ιοί HIV, HPV και το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, διάφορες μορφές ακτινοβολίας, το κάπνισμα και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (9). Τέλος, υπάρχουν και παράγοντες που πιθανολογείται ότι αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί . Σε αυτούς περιλαμβάνονται η διατροφή, το αλκοόλ, η φυσική δραστηριότητα και η παχυσαρκία (10).

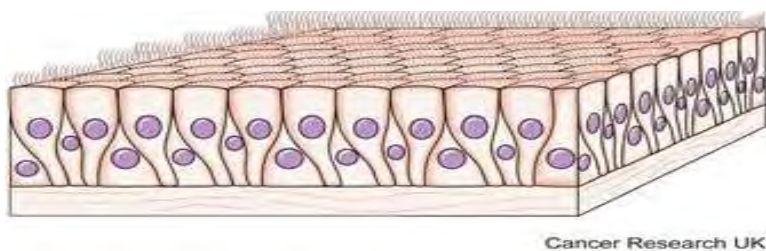
Τύποι καρκινικών κυττάρων

Υπάρχουν πέντε κύριες κατηγορίες (τύποι) κυττάρων, που διακρίνονται ανάλογα με την προέλευσή τους :

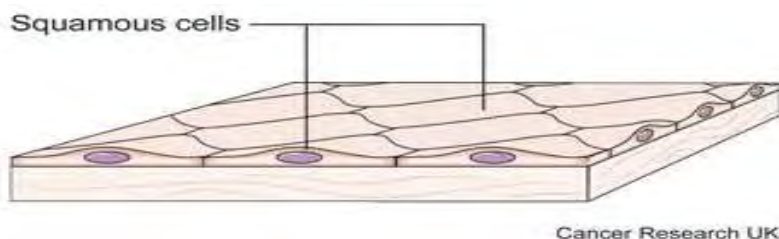
- 1) **Καρκίνωμα** : Πρόκειται για κακόηθες νεόπλασμα επιθηλιακής προέλευσης, δηλαδή εμφανίζεται στο δέρμα ή σε ιστούς που καλύπτουν τα όργανα. Υπάρχουν πολλές υποκατηγορίες, όπως το αδenoκαρκίνωμα, βασικό καρκίνωμα και το πλακώδες καρκίνωμα.



Εικόνα 1 : Φυσιολογικό πλακώδες επιθήλιο



Εικόνα 2: Αδενοκαρκίνωμα



Εικόνα 3 : Πλακώδες καρκίνωμα

- 2) **Σάρκωμα** : Πρόκειται για ένα είδος καρκίνου που ξεκινάει από το συνδετικό ή το στηρικτικό ιστό, όπως τον οστίτη ιστό, το λιπώδη, το μυικό .
- 3) **Λευχαιμία** : Ξεκινάει από το αίμα, σχηματίζοντας μη φυσιολογικά κύτταρα από τον μυελό των οστών που μπαίνουν στην κυκλοφορία των αγγείων .
- 4) **Λέμφωμα και μυέλωμα** : Καρκίνος που αρχίζει από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.
- 5) **Καρκίνος του εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης** : Είναι γνωστοί ως καρκίνοι του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Επίσης, μπορούν να ταξινομηθούν και σύμφωνα με το σημείο του σώματος απ όπου ξεκίνησαν, όπως καρκίνος των πνευμόνων, του παγκρέατος, παχέος εντέρου... **(11)**

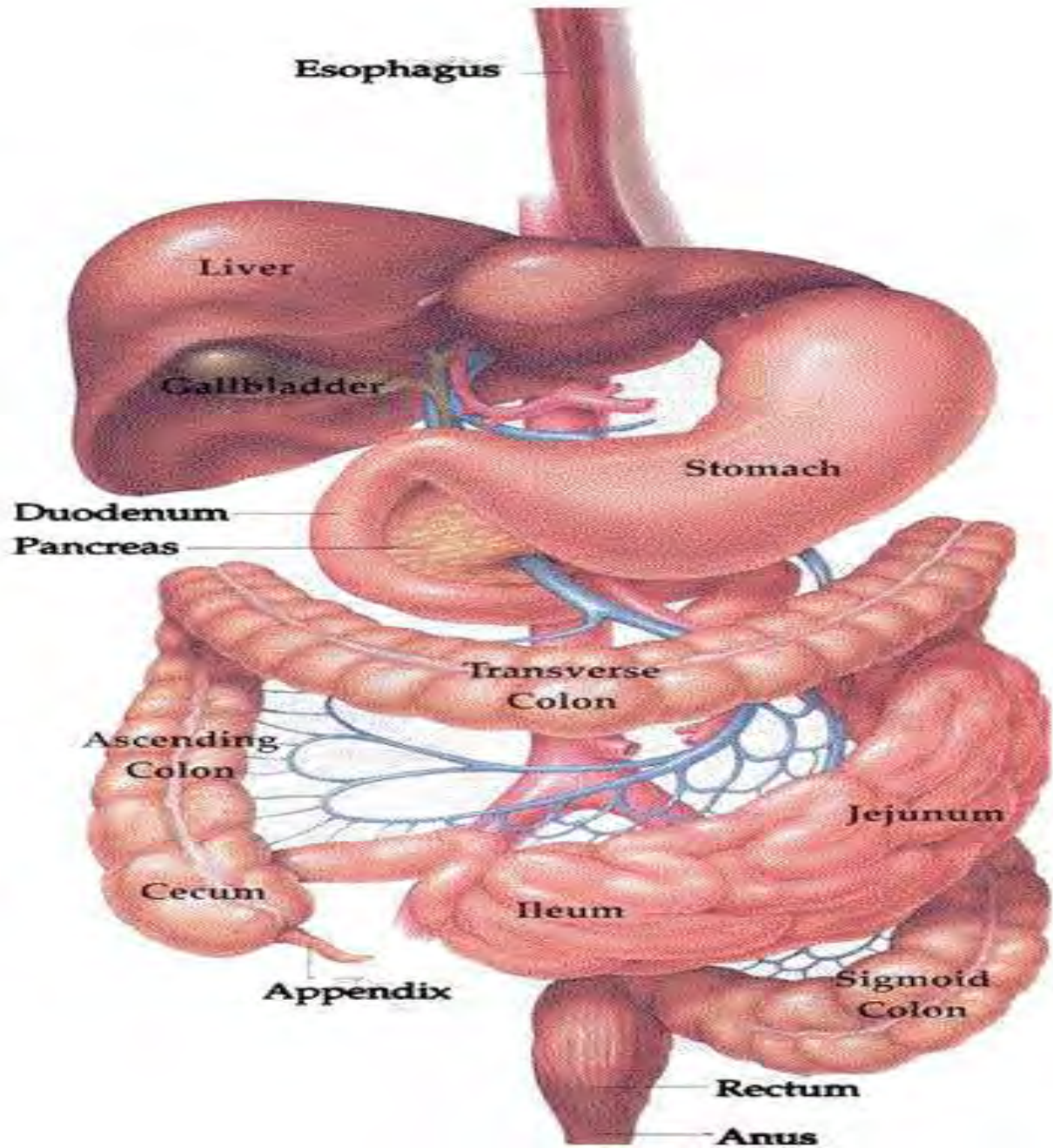
Καθώς ο ορισμός «καρκίνος» αναφέρεται σε μία ομάδα ασθενειών, είναι εύκολο να αντιληφθούμε ότι πρόκειται για μία περίπλοκη νόσο, η αντιμετώπιση της οποίας θα είναι εξίσου περίπλοκη. Υπάρχουν πολλοί τρόποι αντιμετώπισης, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται η χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία, μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων **(12.)** Τελευταία, γίνεται λόγος για στοχευόμενη θεραπεία του καρκίνου, δηλαδή για ουσίες που αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα μόρια των καρκινικών κυττάρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την επιβίωση τους. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η ορμονοθεραπεία, οι αναστολείς μεταγωγής

σήματος, οι διαμορφωτές γονιδιακής έκφρασης, οι επαγωγείς της απόπτωσης, οι αναστολείς της αγγειογένεσης, η ανοσοθεραπεία και τα μονοκλωνικά αντισώματα που μεταφέρουν τοξικά μόρια (13).

1.2 Καρκίνος γαστρεντερικού συστήματος

Ο καρκίνος του γαστρεντερικού συστήματος αποτελεί μία ομάδα καρκίνων που μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε από τα όργανα και τους αδένες του πεπτικού συστήματος, δηλαδή τον οισοφάγο, το στομάχι, το λεπτό και παχύ έντερο, την χοληδόχο κύστη, το ήπαρ, το πάγκρεας και τον πρωκτό . Το 2012 οδήγησε σε θάνατο πάνω από 12.000 ασθενείς, αριθμός που είναι διπλάσιος από τους θανάτους από καρκίνο του μαστού. (20)

Τα συμπτώματα ποικίλλουν ανάλογα με το όργανο στο οποίο αναπτύχθηκε ο όγκος. Συνήθως, δεν γίνεται αντιληπτός στα αρχικά στάδια, παρά μόνο όταν μεγαλώσει αρκετά και σπάνια μπορεί να βρεθεί είτε εάν αναπτυχθεί σε κάποια ιδιαίτερη θέση είτε τυχαία από τον ιατρό λόγω συνεχών παραπόνων του ασθενή από κάποια συμπτώματα, όπως αιμορραγία, κοιλιακός πόνος, οίδημα της κοιλιακής χώρας, ναυτία, εμετός, απώλεια όρεξης, απώλεια βάρους ή δυσκαταποσία (21).



***Εικόνα 4:** Απεικόνιση του πεπτικού συστήματος, όπου παρουσιάζεται το πάγκρεας και οι ανατομικές του σχέσεις με τα άλλα όργανα (22).*

1.3 Ανατομία- Φυσιολογία παγκρέατος

Το πάγκρεας βρίσκεται οπισθίως του στομάχου, στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο της άνω κοιλίας. Εκτείνεται εγκάρσια και εγείρεται ελαφρώς καθώς ξεκινά από τη δωδεκαδακτυλική καμπή προς την σπληνική πύλη. Βρίσκεται εμπρός από την κάτω κοίλη φλέβα, την αορτή, την σπληνική φλέβα και το αριστερό επινεφρίδιο. Διαιρείται σε τέσσερα μέρη: α) τη κεφαλή β) τον αυχένα, γ) το σώμα και δ) την ουρά. Η κεφαλή του παγκρέατος κείται μέσα στην δωδεκαδακτυλική καμπή (23).

Χαρακτηριστικοί είναι οι πόροι του παγκρέατος, όπου περιλαμβάνονται ο μείζων παγκρεατικός πόρος (πόρος του Wirsung), που ξεκινά από την ουρά του παγκρέατος και καταλήγει στο φύμα του Vater και το δωδεκαδάκτυλο και ο επικουρικός πόρος του Santorini, ο οποίος είναι μικρότερος, ξεκινά από τον μείζονα παγκρεατικό πόρο στο ύψος του αυχένα του παγκρέατος και καταλήγει στο έλασσον φύμα, σε απόσταση 2 εκατοστών του μείζονος φύματος του Vater (23).

Πρόκειται για μικτό αδέν, με ενδοκρινή μοίρα, η οποία περιέχει τα νησίδια του Langerhans, και με εξωκρινή μοίρα, που αποτελείται από τα παγκρεατικά λόβια και τους παγκρεατικούς πόρους (23). Ο ρόλος του είναι διττός : παράγει ορμόνες, με σημαντικότερη την ινσουλίνη, η οποία ρυθμίζει τα επίπεδα των σακχάρων στο αίμα, και, παράγει και ένζυμα τα οποία συμμετέχουν την πέψη της τροφής (24).

1.4 Καρκίνος του παγκρέατος

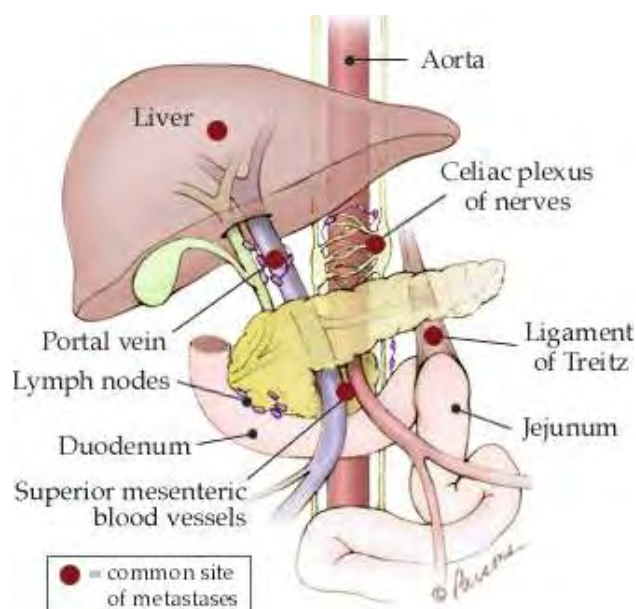
Ο καρκίνος του παγκρέατος αρχίζει από τον πόρο και εξαπλώνεται αργότερα στο σώμα του παγκρέατος, επηρεάζει τα αιμοφόρα αγγεία και τα νεύρα της περιοχής, τον χοληφόρο πόρο και τέλος μπορεί να επεκταθεί στο λεμφικό σύστημα και σε άλλα σημεία του σώματος (25). Περιλαμβάνει τις εξής μεταλλαγές, ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων που πάσχουν (26):

- Κακοήθειες

- 1) Καρκίνωμα παγκρεατικού πόρου (90% των περιπτώσεων)
- 2) Καρκίνωμα αδενοκυψελών
- 3) Κυσταδενοκαρκίνωμα
- 4) Διηθητικό αδενοκαρκίνωμα
- 5) Μικτού τύπου καρκίνωμα (πόρου/ ενδοκρινές /κυψελωτό)
- 6) Βλεννώδεις
- 7) Θηλώδεις νεόπλασμα
- 8) Μικροκυτταρικό
- 9) Αταξινόμητο
- 10) Αδιαφοροποίητο

- Οριακά κακοήθειες

- 1) Ενδοπορικά θηλώδη – βλεννώδη νεοπλάσματα με σοβαρή δυσπλασία
- 2) Συμπαγής ψευδοθηλώδους κυστικός όγκος
- 3) Βλεννώδη κυστικά νεοπλάσματα



Εικ.5: Απεικόνιση των συνηθέστερων σημείων μετάστασης του παγκρεατικού καρκίνου (27).

1.4.1 Αίτια

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι χημειοανθεκτική νεοπλασματική νόσος, που οφείλεται σε γενετικά και βιοχημικά αίτια, με πιο τυπικές μεταλλάξεις στα γονίδια *ras*, **p16^{INK4}**, *P53*, και *Smad4*. Επίσης, ο υποδοχέας *HER2/neu* και ο *EGF-R* αποτελούν θεραπευτικούς στόχους (28).

Το κάπνισμα αποτελεί ίσως έναν από τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες, καθώς οι καπνιστές έχουν 20% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν καρκίνο του παγκρέατος σε σχέση με τους μη καπνίζοντες. Σημαντικό ρόλο εμφανίζουν το οικογενειακό ιστορικό, καθώς και του ιστορικού του ασθενή για παγκρεατίτιδα, παχυσαρκία, διαβήτη, αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ. Διαιτητικοί παράγοντες, όπως η κατανάλωση κόκκινου κρέατος που έχει συσχετιστεί με καρκίνο του παχέος εντέρου και γενικότερα του γαστρεντερικού συστήματος θα μπορούσαν να επηρεάσουν και την εμφάνιση του καρκίνου του παγκρέατος (29).

Ωστόσο, ο καρκίνος του παγκρέατος οφείλεται κατά κύριο λόγο σε μεταλλάξεις του DNA οι οποίες είτε είναι κληρονομήσιμες είτε είναι *de novo* και προκύπτουν κατά τη διάρκεια ζωής λόγω της γήρανσης. (Πάνω από το 80% των περιπτώσεων αφορούν ηλικίες 60 έως 80 ετών) είτε σαν αποτέλεσμα των παραπάνω αιτιών είτε λόγω αδυναμίας επιδιόρθωσης τυχόν βλαβών που προέκυψαν κατά την αντιγραφή του γενετικού υλικού. Συνήθως κληρονομείται ένα παθολογικό γονίδιο και ένα φυσιολογικό, το οποίο, όταν πάθει βλάβη σε κάποιο παγκρεατικό κύτταρο θα οδηγήσει σε καρκίνο (30). Αυξημένο κίνδυνο εμφανίζουν άτομα με σύνδρομο Lynch, ή με μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* (31), στο γονίδιο *Palb2a*, άτομα με σύνδρομο Peutz-Jeghers δηλαδή μετάλλαξη στο γονίδιο *STK11* (30).

Τέλος έρευνες έχουν δείξει ότι και η φυλή μπορεί να είναι ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες, καθώς ο καρκίνος του παγκρέατος είναι πιο κοινός στους αфроαμερικανούς σε σχέση με τη λευκή φυλή, πιθανά λόγω κοινωνικο-οικονομικών συνθηκών .

1.4.2 Κλινική εικόνα

Το μεγαλύτερο πρόβλημα, είναι ότι η συμπτωματολογία είναι σχεδόν ανύπαρκτη στα αρχικά στάδια με συνέπεια να γίνεται αδύνατη η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η ανάπτυξη όγκου κοντά στον χοληφόρο πόρο, που μπορεί να οδηγήσει σε ίκτερο άρα και να αφυπνίσει τον ασθενή. Στην κλινική εικόνα περιλαμβάνονται απώλεια βάρους, ήπια κοιλιακή δυσφορία με πιθανή αντανάκλαση στην πλάτη, και περιστασιακά ανάπτυξη διαβήτη. Σε προχωρημένο στάδιο παρατηρείται έντονος κοιλιακός πόνος συνοδευόμενος από ναυτία και έμετο (31).

1.4.3 Μέθοδοι Διάγνωσης

Ακόμα δεν έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι και screening tests που να αφορούν το γενικό πληθυσμό και σε συνδυασμό με την καθυστερημένη εμφάνιση των συμπτωμάτων, η διάγνωση είναι περίπλοκη. Οι βιοδείκτες έχουν μεγάλη κλινική σημασία σε αυτό το στάδιο, με σημαντικότερο τον CA 19-9, ο οποίος χρησιμοποιείται και την παρακολούθηση της προόδου του ασθενή κατά την θεραπεία αλλά ανιχνεύει το μόνο το 80% των ασθενών. Άλλοι βιοδείκτες που μελετώνται για το σκοπό αυτό είναι ο SPAN-1, ο CA-50, ο DUPAN-2, ο elastase-1, ο tissue polypeptide antigen και tissue polypeptide-specific antigen.

Μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά τη διάγνωση είναι οι αιματολογικές εξετάσεις (όπως για το βιοδείκτη CA 19-9), η μέθοδος της ραδιολογίας που περιλαμβάνει απεικονιστικές τεχνικές όπως η μαγνητική τομογραφία (CT), η αξονική τομογραφία (MRI) και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET), το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα και η βιοψία ιστού (27).

Ελπιδοφόρα προοπτική σε ότι αφορά τη διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου φαίνεται να δίνουν οι σ1 και σ2 υποδοχείς, οι οποίοι υπερεκφράζονται τόσο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και σε ιστούς (32).

1.4.4 Θεραπεία - Επιδημιολογία


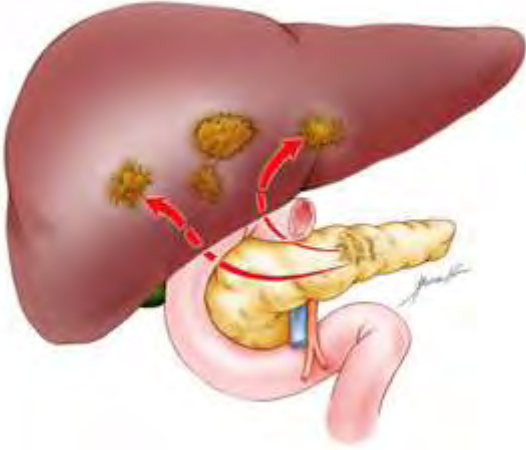
Η μέχρι τώρα θεραπεία αναφέρεται στην ανακούφιση των συμπτωμάτων του ασθενή και στην επιμήκυνση της επιβίωσης του ασθενή και όχι στην καταπολέμηση της νόσου . Περιλαμβάνει μεθόδους όπως η ακτινοβολία, η χημειοθεραπεία και η εγχείρηση, η οποία όμως αναφέρεται σε ποσοστό μικρότερο του 20% των ασθενών, καθώς τα καρκινικά κύτταρα έχουν ήδη δημιουργήσει μεταστάσεις με απομακρυσμένες περιοχές όταν γίνονται αντιληπτά (31).

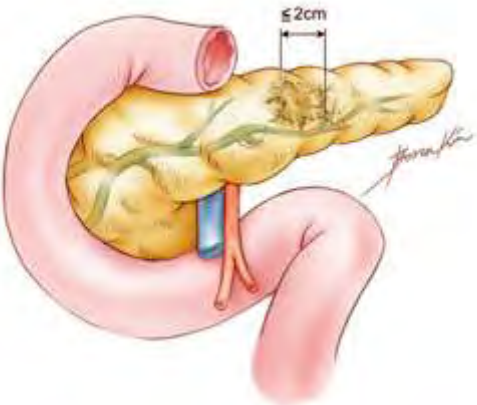
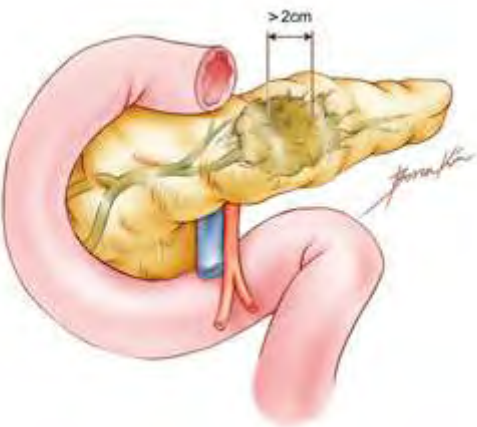
Τα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται από 28% για τον πρώτο χρόνο έως 7% για πενταετή επιβίωση. Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς διαγνώσκονται ότι πάσχουν σε προχωρημένο στάδιο και η πενταετής για αυτούς επιβίωση αγγίζει το 2% ... Κατά τη διάρκεια του έτους 2015 αναμένονται περίπου 40.000 θάνατοι, χωρίς να υπάρχει προτίμηση σε κάποιο από τα δύο φύλλα (31). Εύκολα λοιπόν γίνεται αντιληπτό ότι πρόκειται για έναν από τους πιο θανατηφόρους καρκίνους.


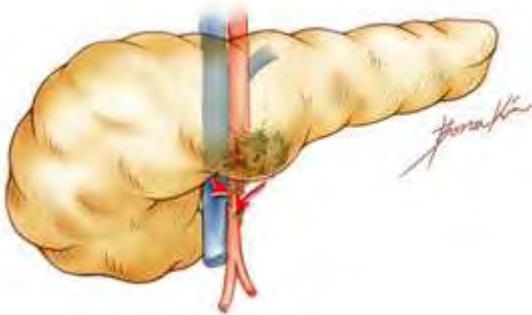
1.4.5 Σύστημα σταδιοποίησης του παγκρεατικού καρκίνου



Η σταδιοποίηση αναφέρεται στη δριμύτητα μιας κακοήθειας, συνήθως βασισμένη στο μέγεθος και την πιθανή μετάσταση του αρχικού όγκου αλλά και στη γνώση για το πώς εξελίσσεται σε όλη τη διάρκεια της νόσου (33).

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα ταξινόμησης είναι το TNM, το οποίο έχει γίνει αποδεκτό από τους οργανισμούς Union for International Cancer Control (UICC) και American Joint Committee on Cancer (AJCC). Περιλαμβάνει το μέγεθος και την έκταση του πρωτογενή όγκου (T), την εξάπλωση του σε κοντινούς λεμφαδένες (N) και την μετάσταση σε απομακρυσμένες περιοχές (M). Δίπλα σε κάθε γράμμα, σημειώνεται ένας αριθμός, ο οποίος υποδεικνύει το μέγεθος κάθε κατάστασης (33).

Stage Grouping for Primary Tumors of the Exocrine Pancreas				
Stage	Tumor	Regional Lymph Nodes	Distant Metastases	
Stage 0	Tis	N0	M0	
Stage IA	T1	N0	M0	
Stage IB	T2	N0	M0	
Stage IIA	T3	N0	M0	
Stage IIB	T1	N1	M0	
	T2	N1	M0	
	T3	N1	M0	
Stage III	T4	any N	M0	
Stage IV	any T	any N	M1	

Definition of Tumor (T)	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	<i>In situ</i> carcinoma
T1	Tumor limited to the pancreas, 2 cm or less in greatest dimension
	 <p>The diagram illustrates the pancreas within the C-loop of the duodenum. A yellowish, irregular mass representing a tumor is shown within the pancreatic parenchyma. A horizontal double-headed arrow above the tumor indicates its greatest dimension, labeled as $\leq 2\text{cm}$. The main pancreatic duct and the duodenum are shown in pink, while the splenic and superior mesenteric vessels are depicted in blue and red respectively.</p>
T2	Tumor limited to the pancreas, more than 2 cm in greatest dimension
	 <p>This diagram is similar to the one for T1, showing the pancreas and its relationship to the duodenum and major vessels. However, the yellowish tumor mass is larger. A horizontal double-headed arrow above the tumor indicates its greatest dimension, labeled as $> 2\text{cm}$.</p>

T3	Tumor extends beyond the pancreas but without involvement of the celiac axis or the superior mesenteric artery	
T4	Tumor involves the celiac axis or superior mesenteric artery (unresectable primary tumor)	

Definition of Regional Lymph Nodes (N)		
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed	
N0	No regional lymph node metastasis	
N1	Regional lymph node metastasis	

Εικόνα 6 : Το σύστημα σταδιοποίησης *TNM*, όπου αναλύεται κάθε πιθανό στάδιο του παγκρεατικό καρκίνου (34).

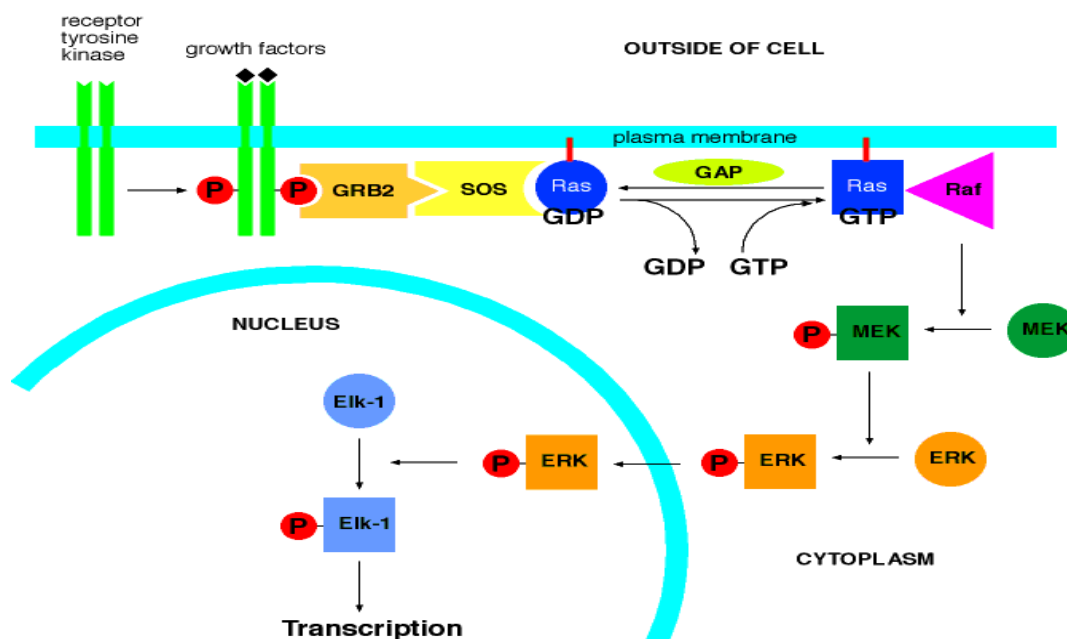
1.5 Μονοπάτια καρκινογένεσης

Τα πιο κοινά μονοπάτια είναι :

1.5.1 Το ογκογονίδιο K- RAS

Οι πρωτεΐνες RAS ανήκουν στην υπεροικογένεια των G πρωτεϊνών (GTPάσες), και εναλλάσσονται μεταξύ ενός ενεργού συμπλέγματος GTP και ενός ανενεργού συμπλέγματος GDP. Οι πρωτεΐνες RAS εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και σε ενδομεμβράνες και λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες για ποικίλα μεταγωγικά μονοπάτια. Κατ'αυτό τον τρόπο ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη γήρανση, την κυτταρική κινητικότητα, την απόπτωση και την επιβίωση.(15)

Η πιο πρώιμη γενετική εκδήλωση, είναι η μεταλλαγή στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου ras, 80-90% των ασθενών. Η μεταλλαγμένη ογκοπρωτεΐνη p21^{ras} προκαλεί συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενεργοποιώντας τους πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και NF-κΒ (16) .



Εικόνα 7 : Σηματοδοτικό μονοπάτι των RAS πρωτεϊνών . (17)

Κεφάλαιο 2

2.1 Sigma υποδοχείς – Γενικές πληροφορίες

Οι σ υποδοχείς, αρχικά προτάθηκαν ως υποκατηγορία των οπιοειδών υποδοχέων (35), ενώ αργότερα υπήρξε σύγχυσή τους με τις θέσεις πρόσδεσης του αναισθητικού phencyclidine (36). Μετά από 26 χρόνια από την ανακάλυψή τους, προσδιορίστηκαν σαν μία ξεχωριστή οντότητα υποδοχέων (37) λόγω της ασυνήθιστης ικανότητάς τους να συνδέονται σε μία μεγάλη ποικιλία φαρμάκων (35). Η αρχικά λανθασμένη ταξινόμησή τους που τους χαρακτήριζε ως υποτύπους των οπιοειδών εμπόδιζε την εισαγωγή των ειδικών προσδετών τους σε κλινικές δοκιμές. Ωστόσο, η κατανόηση της μοριακής λειτουργίας των υποδοχέων έχει βελτιωθεί δραματικά κατά την τελευταία 10 χρόνια.

Υπάρχουν δύο υποκατηγορίες των υποδοχέων αυτών, οι σ1 και οι σ2, εκ των οποίων ο πρώτος κλωνοποιήθηκε από ιστούς ανθρώπου και τρωκτικών, ενώ ο δεύτερος δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα πλήρως (38). Η παρούσα ταξινόμηση τους βασίζεται στην διαφορετική ικανότητα που έχουν να δεσμεύουν κάποια φάρμακα, αλλά και στις ετερογενείς χημικές δομές τους. Έχει προταθεί ότι υπάρχει και ένας τρίτος σ υποδοχέας, ο οποίος συσχετίστηκε με νευροτροποποιητική δραστηριότητα (39). Φαίνεται πως και οι δύο υπερεκφράζονται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που προέρχονται από διάφορους ιστούς.

Πλέον έχει επιβεβαιωθεί ότι είναι μία μη-οπιοειδής πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) και ρυθμίζει μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών, όπως τους διαύλου ιόντων, τη μετατόπιση και ενεργοποίηση κινασών, την κυτταρική οξειδοαναγωγική, την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, την αντίδραση της φλεγμονής, την κυτταρική διαφοροποίηση, και την επιβίωση των νευρώνων (112, 113, 114). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι συμμετέχουν επίσης στο αίσθημα του πόνου, στις ανοσολογικές αντιδράσεις, στη προστασία του ήπατος και στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (114).

Εκτός από τη διαφορετική ιστική κατανομή, παρουσιάζουν και διαφορές ως προς τη φυσιολογική και φαρμακολογική λειτουργία τους (43). Μέχρι τώρα, δεν έχουν βρεθεί ακόμα ενδογενείς προσδέτες που να εμφανίζουν εκλεκτικότητα για αυτούς τους υποδοχείς. Αντιθέτως, έχουν βρεθεί πάρα πολλοί εξωγενείς προσδέτες με μεγάλη χημική ετερογένεια, που παρόλο που έχουν υψηλή συγγένεια προς τους υποδοχείς, συνήθως δεν είναι ιδιαίτερα εκλεκτικοί (85). Προσδέτες για τους σ υποδοχείς, αναμένεται να αποτελέσουν τη νέα γενιά φαρμάκων για ψυχοθεραπεία, σύμφωνα με μελέτες (112, 115).

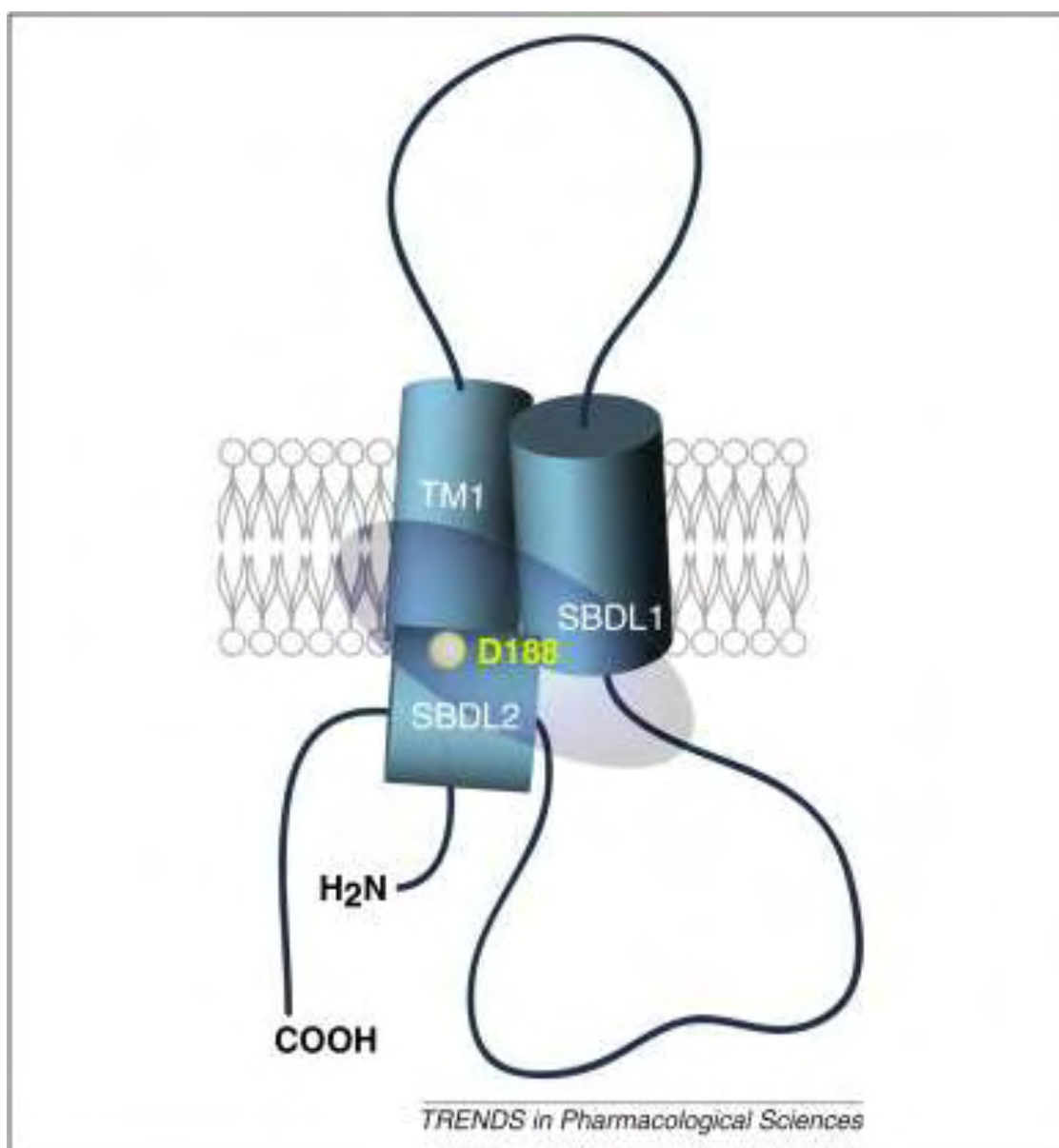
2.2 Sigma -1 υποδοχέας

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον σ1 υποδοχέα έχει κλωνοποιηθεί και φαίνεται να διαφέρει από οποιαδήποτε άλλη γνωστή τάξη υποδοχέων (44). Αρχικά απομονώθηκε η συμπληρωματική DNA βιβλιοθήκη (cDNA) του αντίστοιχου υποδοχέα ποντικών και στη συνέχεια εκφράστηκε σε κύτταρα θηλαστικών και αφού εγκαθιδρύθηκε χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής για απομόνωση γονιδιακών κλώνων από ποντικούς, οι οποίοι περιέχουν ολόκληρο το γονίδιο του σ1 υποδοχέα. Μετά από αλληλούχιση, βρέθηκε ότι πρόκειται για ένα γονίδιο μεγέθους 7 kbp , χωρίς TATA-BOX αλλά με CCAATC και GC BOX, τα οποία ρυθμίζουν την έναρξη της αντιγραφής (45). Στην περιοχή του εκκινητή, υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και πυρηνικών παραγόντων (NF-1/L, NF-GMa, NF-GMb, NF-Kb) (87). Αποτέλεσμα του γονιδίου είναι η παραγωγή μιας πρωτεΐνης μεγέθους 25,300 kDa, μη ομόλογη με οποιαδήποτε γνωστή πρωτεΐνη των θηλαστικών, παρά μόνο με κάποια ισομερή στερολών των μυκήτων, που αποτελείται από 223 αμινοξέα (44). Στον άνθρωπο το γονίδιο αυτό βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9p13 (48).

Η πρωτεΐνη που παράγεται από το παραπάνω γονίδιο, είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που βρίσκεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων (106, 82) και ρυθμίζει μία ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών (116). Αποτελείται από τέσσερα ιντρόνια και τρία εσώνια. Το τρίτο εσώνιο είναι το μικρότερο αλλά πιθανά και το σημαντικότερο, καθώς κοντά σε αυτό βρίσκεται η περιοχή δέσμευσης των προσδετών των σ υποδοχέων, όπως προέκυψε από μία παραλλαγή στο μάτισμα του υποδοχέα, κατά την οποία η έλλειψη του εξωνίου 3, έδειξε αλλαγή της ικανότητας σύνδεσης των προσδετών, όχι όμως και της ποσοτικής παραγωγής της πρωτεΐνης (47). Πιο συγκεκριμένα, τα αμινοξέα D126 και E172 φαίνεται να είναι αυτά που καταργούν τη δέσμευση των προσδετών, και οποιαδήποτε απώλεια αυτών προκαλεί επιπρόσθετα και εμφάνιση χαρακτηριστικών σ2 υποδοχέα (48).

Δείχθηκε ότι έχει δύο διαμεμβρανικά τμήματα, με το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο τους να βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεριά της μεμβράνης (46). Στο N-τελικό άκρο (αμινοξέα 11 - 29) και στο κέντρο της πρωτεΐνης (αμινοξέα 92 -112) βρίσκονται δύο υδρόφοβες αλληλουχίες που περιλαμβάνουν δύο α-έλικες , και οι οποίες εκτείνονται στη μεμβράνη (111). Μια πρόσφατη μελέτη ανακάλυψε ότι το C-τελικό άκρο (αμινοξέα 113 - 223) περιέχει μοριακή δραστηριότητα συνοδού (117). Η ακριβής όμως αλληλουχία

αμινοξέων που είναι απαραίτητη για τη δραστηριότητα του σ1 υποδοχέα ως πρωτεΐνη-συνοδός δεν έχει ακόμη προσδιορισθεί πλήρως.

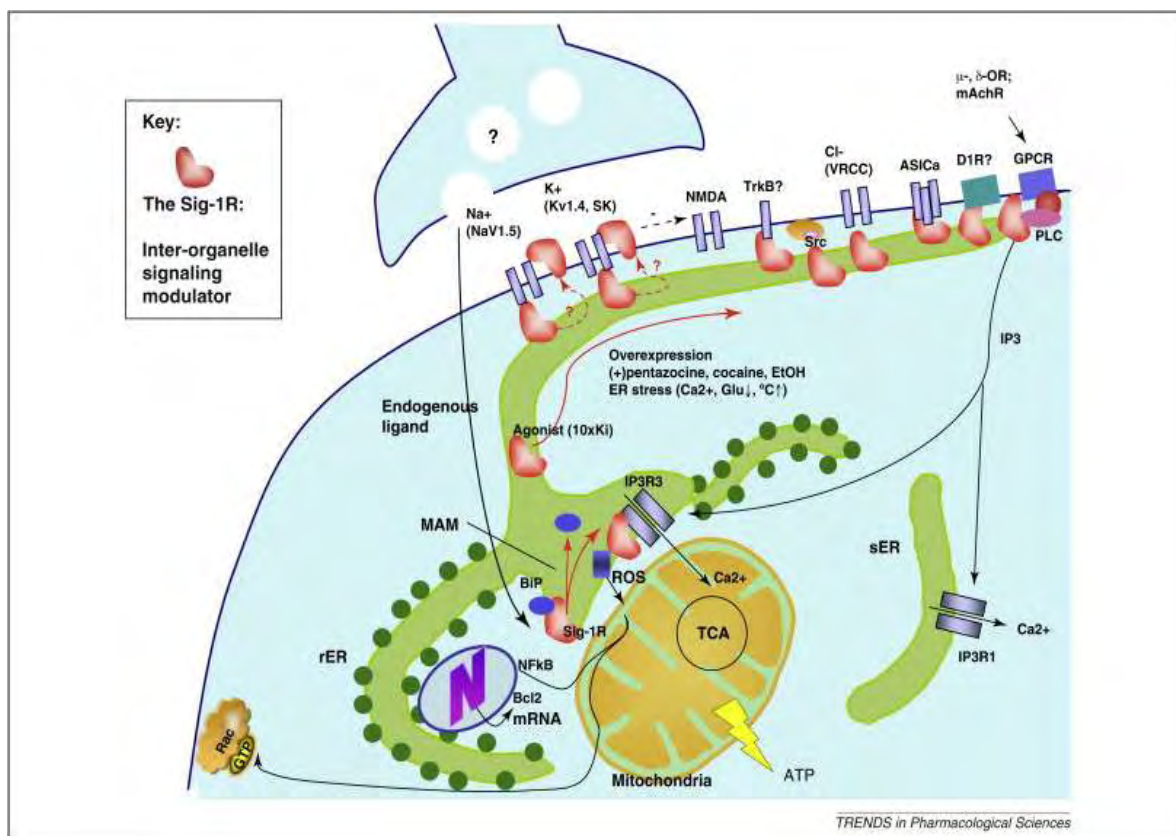


Εικόνα 8 : Το προτεινόμενο δομικό μοντέλο του σ-1 υποδοχέα, με τη θέση σύνδεσης του προσδέτη να τονίζεται από την κυκλική περιοχή. Περιλαμβάνει τρεις υδρόφοβες περιοχές. Οι περιοχές SBDLI και SBDLII ονομάστηκαν έτσι λόγω της ομολογίας της αλληλουχίας τους με τη στερόλη ζύμης (107).

Η κύρια λειτουργία ως μοριακός συνοδός στο ER είναι να προάγει την ομαλή αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών. Επίσης, ρυθμίζει την αποδόμηση των κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μεταφέροντας αυτές στην κατάλληλη περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου (ERAD). Αυτές οι ενέργειες είναι ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα για την πρόληψη της συσσώρευσης τοξικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, προωθώντας έτσι την κυτταρική επιβίωση υπό κυτταρικό στρες (*118*).

Όπως και άλλοι μοριακοί συνοδοί, οι σ1 υποδοχείς και η αύξηση στην έκφρασή τους φαίνεται να καταστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο που προκύπτει από κυτταρικό στρες (*111*).

Άλλη μία σημαντική λειτουργία του σ1 υποδοχέα, είναι η ενδο-οργανιδιακή σηματοδότηση, που παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες. Η σηματοδότηση μιτοχονδρίου-ενδοπλασματικού δικτύου επηρεάζει τα επίπεδα του ενδομιτοχονδριακού ασβεστίου και την ομοιόσταση της κυτταρικής βιοενέργειας. Η σηματοδότηση ενδοπλασματικού δικτύου-πυρήνα εξασθενίζει το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ η σηματοδότηση ενδοπλασματικού δικτύου-κυτταροπλασματικής μεμβράνης ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου της κυτοσόλης. Τέλος, η σηματοδότηση ενδοπλασματικού δικτύου- μιτοχονδρίου-κυτταροπλασματικής μεμβράνης ρυθμίζει το σχηματισμό των δενδριτικών κυττάρων του ιππόκαμπου. Προτείνεται ότι ο σ1 υποδοχέας, ως πρωτεΐνη-συνοδός του ενδοπλασματικού δικτύου, λειτουργεί ως ρυθμιστής σηματοδότησης μεταξύ των οργανιδίων. Συνήθως βρίσκονται στην περιοχή επαφής ενδοπλασματικού δικτύου- μιτοχονδρίου, γνωστή ως MAM (mitochondrion associated ER membrane) και ρυθμίζει τη σηματοδότηση ενδοπλασματικού δικτύου-μιτοχονδρίου και ενδοπλασματικού δικτύου- πυρήνα. Όταν τα κύτταρα διεγείρονται από τους σ-προσδέτες ή βρίσκονται υπό την επίδραση στρες, ο σ1 υποδοχέας μετακινείται από την περιοχή MAM στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου ρυθμίζουν ποικίλες λειτουργικές πρωτεΐνες όπως τους διαύλους ιόντων, άλλους υποδοχείς και τις κινάσες. Έτσι, λειτουργεί ως ρυθμιστής είτε τοπικά στη περιοχή MAM, είτε απομακρυσμένα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αυτή η μοναδική δράση του σ1 υποδοχέα μπορεί να σχετίζεται με ποικίλες φαρμακολογικές επιδράσεις (*107*).



Εικόνα 9: Ο σ1 υποδοχέας ως ενδο-οργανδιακός ρυθμιστής σηματοδότησης. Στη διεπιφάνεια ενδοπλασματικού δικτύου-μιτοχονδρίου (MAM) ο σ1 υποδοχέας με τη βοήθεια των σ1 αγωνιστών μπορεί να αποσυνδεθεί.

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε εγκεφάλους αρουραίων έδειξαν ότι οι σ1 αφθονούν κυρίως στο σχηματισμό του ιππόκαμπου και σε περιοχές που σχετίζονται με τη γνωστική και συναισθηματική λειτουργία και εμπλέκονται στη ρύθμιση των καναλιών καλίου και ασβεστίου, και στη ντοπαμινεργική και σεροτονεργική νευροδιαβίβαση (83). Ωστόσο, έχουν εντοπιστεί και σε άλλα όργανα και ιστούς, όπως η καρδιά, οι νεφροί, το ήπαρ, ο σπλήν, ο πλακούντας καθώς και σε αρχέγονα εμβρυικά κύτταρα σε όλα τα στάδια της εμβρυογένεσης (42).

2.3 Sigma-2 / PGRMC1 υποδοχέας

Οι σ2 υποδοχείς είναι σε υψηλή συγκέντρωση σε περιοχές που σχετίζονται με την κινητικότητα (παρεγκεφαλίδα, στους πυρήνες νευρικών κυττάρων του κρανίου καθώς και στη μέλαινα ουσία) (40). Προκλινικές και κλινικές μελέτες υποδηλώνουν ότι σχετίζονται και με νευροψυχιατρικές διαταραχές, όπως είναι η σχιζοφρένεια, η κατάθλιψη και το Alzheimer (41). Οι σ2 εντοπίζονται κι αυτοί στο νευρικό σύστημα, σε νεφρούς, καρδιά και ήπαρ αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τους σ1, καθώς και στον γαστρεντερικό σωλήνα (87).

Η ταυτοποίηση και κλωνοποίηση του γονιδίου του σίγμα-2 υποδοχέα είναι ακόμα απραγματοποίητη, παρά τις έρευνες που πραγματοποιούνται για πάνω από μία δεκαετία. Πρόσφατα, ο μεμβρανικός υποδοχέας της προγεστερόνης -PGRMC1 -προσδιορίστηκε ως η θεωρούμενη θέση πρόσδεσης του σίγμα-2 υποδοχέα με τη μέθοδο της φωτοσυγγένειας, μέσω δέσμευσης με ένα νέο συνδέτη, τον WC-21 (119). Αυτό το σημαντικό εύρημα θέτει τις βάσεις για μελέτες επικύρωσης της υπερέκφρασης του PGRMC1 /σίγμα-2 υποδοχέα και τη λειτουργία του σε καρκίνο του παγκρέατος.

Παραδοσιακά, PGRMC1 έχει διερευνηθεί για υπερέκφραση σε καρκίνους που εμφανίζουν ευαισθησία στην προγεστερόνη, όπως των ωοθηκών και του μαστού. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η έκφραση του PGRMC1 έχει βρεθεί να ρυθμίζει την ευαισθησία του καρκίνου των ωοθηκών σε χημειοθεραπεία. (120). Όμως, αρχικές μελέτες ανθρώπινων παγκρεατικών όγκων με αδενοκαρκίνωμα έδειξαν υπερέκφραση σε τουλάχιστον το ήμισυ των δειγμάτων με βάση την ανοσοϊστοχημία (121).

Αποτελεί μέρος ενός συγκροτήματος πρωτεϊνών που δεσμεύει στερόλες και είναι γνωστό ότι δεσμεύει την προγεστερόνη, καθώς και άλλες στερόλες. Αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να μην έχει δραστηριότητα ως πυρηνικός ορμονικός υποδοχέας, αλλά μοιράζεται ομολογία με το κυτόχρωμα b5 (122), δεσμεύει την αίμη (123), και αλληλεπιδρά με το σύστημα ενζύμων P450, το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό των φαρμάκων και στη σύνθεση στερολών (27).

Πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας το φάρμακο DTG, που συνδέεται τόσο στον σ1 όσο και στον σ2, έδειξαν δύο μπάντες πρωτεϊνών, μία στα 25,300 kDa και μία στα 21,300 kDa (50). Έχοντας σαν δεδομένο ότι ο σ1 υποδοχέας αντιστοιχεί στα 25,300 kDa, θεωρήθηκε ότι το γονίδιο του σ2 υποδοχέα παράγει μία πρωτεΐνη που αντιστοιχεί στα 21,500 kDa. Επίσης, θεωρήθηκε και ότι ο σ2 υποδοχέας μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφορετικού ματίσματος του m RNA που παράγεται από το γονίδιο που κωδικοποιεί και τον σ1 υποδοχέα (48). Ωστόσο, μελέτες σε σ1 knock out ποντίκια, έδειξαν μείωση στην σύνδεση των ειδικών σ1 φαρμάκων, αλλά όχι μείωση στην πρόσδεση φαρμάκων που δεν διαχωρίζουν τον σ1 και τον σ2 υποδοχέα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο σ2 υποδοχέας δεν επηρεάστηκε (42).

Υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι ο σ2 υποδοχέας, σε φυσιολογικές συνθήκες, εμπλέκεται στα κανάλια ιόντων, ρυθμίζοντας τις ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις από διάφορα ιόντα, όπως ασβέστιο και κάλιο (63), την επιβίωση και τη μορφολογία των κυττάρων (67) αλλά και ότι ίσως έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης (64). Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα, από τους John et.al για την κυτταρική σειρά MCF7 στον καρκίνο του μαστού (65), Wheeler et al σε αδενοκαρκίνωμα ποντικού, Hawkins et al όπου δείχθηκε ότι δεκαπλασιάζεται στα καρκινικά κύτταρα παγκρέατος σε σχέση με τα φυσιολογικά (66).

2.4 Έκφραση των σ υποδοχέων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και ιστούς

Δεδομένα που έχουν συλλεχθεί δείχνουν ότι οι σ υποδοχείς πρόκειται για συντηρημένες πρωτεΐνες, υποδηλώνοντας ότι συμμετέχουν σε πολύ σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων. Η υπερέκφρασή τους σε καρκινικούς ιστούς δείχθηκε αρχικά σε όγκους εγκεφάλου και πιο συγκεκριμένα σε γλοιοβλάστωμα και σε μετάσταση που προήλθε από αδеноκαρκίνωμα του πνεύμονα (88).

Με την έναρξη του ανεξέλεγκτου – καρκινικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η ποσότητα των σ1 υποδοχέων αμέσως αυξάνεται (51) ενώ των σ2 δεκαπλασιάζεται σε ορισμένους τύπους καρκινικών κυττάρων (52). Εμφανίζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του πνεύμονα (53), του παχέος εντέρου (54), του στήθους (55), του προστάτη (56). Αν και η μοριακή τους λειτουργία και οι φυσικοί τους προσδέτες δεν έχουν καθοριστεί πλήρως ακόμα, θεωρείται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογία του καρκίνου (57).

Πλήθος μελετών δείχνει ότι οι σ2 υποδοχείς υπερεκφράζονται επίσης και στον παγκρεατικό καρκίνο, τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε όγκους και ιδιαίτερα στο παγκρεατικό αδеноκαρκίνωμα (89). Η απόδειξη ήρθε με τη χρήση σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα του SW-120, ένα φθορίζον παράγωγο του κυτταροτοξικού προσδέτη SW-43 του σ2 υποδοχέα, που επιβεβαίωσε τον εντοπισμό του υποδοχέα στα μεμβρανικά συστατικά των κυττάρων.

2.5 Αγωνιστές –Ανταγωνιστές : Φυσιολογική λειτουργία

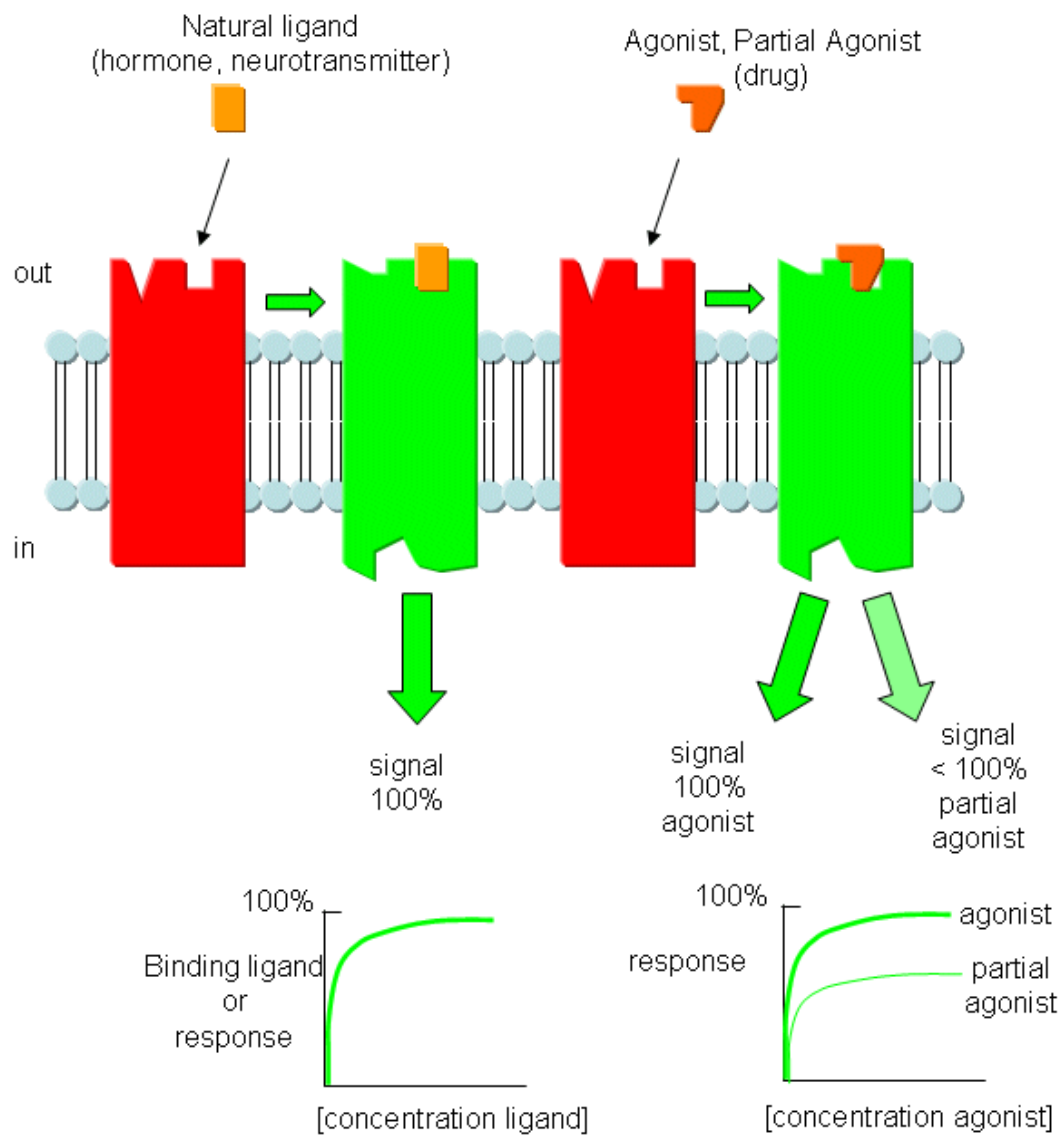
Ως αγωνιστής, ορίζεται μία ουσία η οποία μιμείται τη λειτουργία του φυσιολογικού προσδέτη ενός υποδοχέα και έχει παρόμοιο βιολογικό αποτέλεσμα όταν προσδεθεί στον υποδοχέα αυτό. Απουσία του φυσιολογικού προσδέτη, δεσμεύεται στην ίδια θέση πρόσδεσης και οδηγεί στην ίδια απόκριση, πλήρη ή μερική.

Ως ανταγωνιστής , ορίζεται μία ουσία η οποία αναστέλλει τη σύνδεση του φυσικού προσδέτη(ορμόνη, νευροδιαβιβαστής) ή του αγωνιστή . Υπάρχουν 3 κατηγορίες : (68)

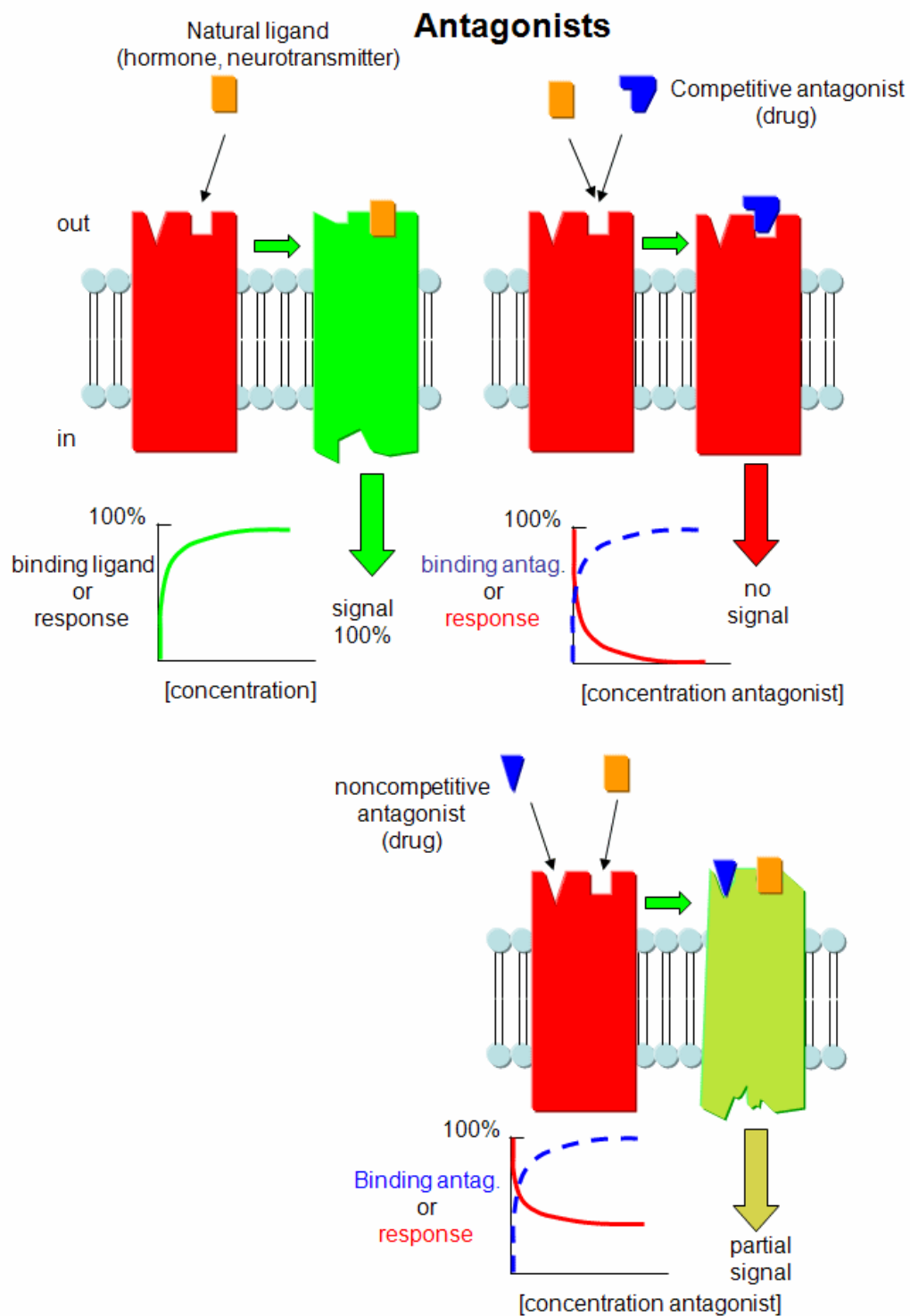
- 1) Συναγωνιστικοί ανταγωνιστές - μη αντιστρεπτοι: Δεσμεύονται στην ίδια θέση με τον φυσικό προσδέτη ή τον αγωνιστή και αναστέλλουν το αποτέλεσμα που θα προέκυπτε από τη σύνδεση.
- 2) Συναγωνιστικοί ανταγωνιστές - Αντιστρεπτοί : Προκύπτουν από ομοιοπολική τροποποίηση του υποδοχέα.
- 3) Μη συναγωνιστικοί ανταγωνιστές : Δεσμεύονται σε διαφορετική θέση από τον φυσικό προσδέτη ή τον αγωνιστή και αναστέλλουν το αποτέλεσμα που θα προέκυπτε από τη σύνδεση (68).

Οι παραπάνω ενώσεις, ανάλογα με το βαθμό συγγένειας που εμφανίζουν με τους υποδοχείς, διακρίνονται ως εκλεκτικοί για τον σ1 ή τον σ2 υποδοχέα ή ως μη εκλεκτικοί που σημαίνει ότι έχουν τον ίδιο βαθμό συγγένειας και με τους δύο. Το μέγεθος που υποδεικνύει την ιδιότητα αυτή αναφέρεται ως K_i και πρόκειται για τη συγκέντρωση του μορίου που απαιτείται προκειμένου να μειωθεί η δράση του υποδοχέα στο μισό. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του K_i , τόσο μικρότερη είναι η φαρμακευτική δόση που απαιτείται για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα και άρα τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια μορίου – υποδοχέα (77).

Agonists



Εικόνα 10: Η δράση των αγωνιστών (77).



Εικόνα 11: Η δράση των ανταγωνιστών (77).

Τα τελευταία 15 χρόνια, έχουν ανακαλυφθεί πολλές χημικές ενώσεις που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα για τους σ υποδοχείς. Κάποιες από αυτές χαρακτηρίστηκαν ως ανταγωνιστές, όπως είναι τα: rimcazole, BMY 14802, NE-100 (78) και τα BD 1047 και BD 1063 με ιδιαίτερη προτίμηση σύνδεσης στον σ_1 , αλλά και στον σ_2 (79). Αντίθετα, το PB 28 εμφάνισε την πιο ισχυρή δράση αγωνιστή για τους σ_2 , σε πείραμα το οποίο πραγματοποιήθηκε παρουσία και των 2 υποδοχέων, στην ουροδόχο κύστη ινδικού χοιριδίου και εμφανίζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση (80).

Προηγούμενες μελέτες της ομάδας του εργαστηρίου, έδειξαν ότι το συνθετικό παράγωγο που κατασκεύασαν, piperazine 2a, εμφανίζει σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα, σε vivo και in vitro πειράματα, με σημαντικότερη δράση έναντι του καρκίνου του παγκρέατος (95).

Ένωση	Λειτουργία εκλεκτικότητα και	Ki
Pregnenolone	Αγωνιστής / σ_1	3000
Progesterone	Ανταγωνιστής / σ_1	200
DHEA	Αγωνιστής / σ_1	3000
DTM	Αγωνιστής / σ_1 κ σ_2	14.750 / 21.710

Πίνακας 2 : Πιθανοί ενδογενείς προσδέτες για τους σ υποδοχείς. (86)

Ένωση	Λειτουργία εκλεκτικότητα και	Ki
DTG	σ Αγωνιστής, μη εκλεκτικός (109)	25
Siramesine	σ2 αγωνιστής (103)	0.12
CB-184	σ2 αγωνιστής (108)	13.4
CB-64D	σ2 αγωνιστής (108)	16.5
Haloperidol	σ1 Ανταγωνιστής (110)	5
Rimcazole	σ1 Ανταγωνιστής (101)	560

Πίνακας 3: Εξωγενείς προσδέτες για τους sigma υποδοχείς (86).

2.6 Sigma -2 ligands ως επαγωγείς απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα (πιθανοι αντικαρκινικοί παράγοντες)

Εκλεκτικοί προσδέτες για τον σ2 υποδοχέα, έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Οι αγωνιστές, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και οδηγούν σε απόπτωση, πιθανά μέσω του μονοπατιού των κασπασών 3, ενώ οι ανταγωνιστές προωθούν την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (69). Ο βαθμός που αναστέλλεται η κυτταρική ανάπτυξη εξαρτάται από παραμέτρους όπως ο βαθμός συγγένειάς του με τον υποδοχέα, η συγκέντρωσή του και ο χρόνος δράσης του (70).

Ένα σημαντικό στοιχείο που τους καθιστά πιθανούς μελλοντικούς αντικαρκινικούς παράγοντες, είναι ότι σε συνδυασμό τους με ήδη υπάρχοντα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η gemcitabine και paclitaxel, αυξάνεται η φαρμακολογική δράση των δευτέρων και παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά απόπτωσης και ενεργότητας των κασπασών 3, τόσο σε in vivo αλλά και σε in vitro πειράματα (71.) Για παράδειγμα, η χρήση του CB-184 (1 Μμ) σε συνδυασμό με doxorubicin (10μM), είχε διπλάσια κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τη χρήση του καθενός ξεχωριστά σε κύτταρα MCF-7 (72) .

Όσο αφορά παγκρεατικές καρκινικές σειρές, ο συνδυασμός gemcitabin με τους εκλεκτικούς σ -2 υποδοχείς SV119, ή SW43 ή siramesine προκάλεσαν αναστολή έως και 92% στις σειρές panc02, panc1, BxPC3, Cfrac και επιπλέον μείωση του όγκου σε ποντικούς (72).

Ο ακριβής μηχανισμός των παραπάνω αποτελεσμάτων δεν έχει γίνει ακόμα πλήρως κατανοητός. Πιθανότατα υπάρχει εμπλοκή των καναλιών ιόντων, του οξειδωτικού στρες, των κασπασών, αλλά και αλληλεπίδραση των ενδοκυττάρων ιόντων με μεμβρανικές πρωτείνες (73). Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ρύθμιση των επιπέδων των σφιγγολιπιδίων και την αλληλεπίδραση με την ανκυρίνη (81). Μελέτες έδειξαν ότι οι αγωνιστές των σ 2 ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, με εξάντληση των μιτοχονδριακών και ενδοπλασματικών αποθηκών ασβεστίου, μειώνουν την P-γλυκοπρωτεΐνη (84). Επιπλέον, το γεγονός ότι ενώ η πρωτεΐνη p53 έχει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση και μεταλλάξεις της οδηγούν σε καρκινογένεση αλλά οι σ 2 προσδέτες CB-184 και CB-64D εμφάνισαν αντικαρκινικά αποτελέσματα σε κύτταρα με μεταλλαγμένη p53, υποδηλώνει ότι η P53 δεν έχει κεντρικό ρόλο στην απόπτωση που μεσολαβείται από σ 2 προσδέτες (71). Ο εκλεκτικός προσδέτης SW-42 φαίνεται να οδηγεί σε απόπτωση των καρκινικών κυττάρων αυξάνοντας τη διαπερατότητα των λυσοσωματικών μεμβρανών και το οξειδωτικό στρες (74). Οι WC-26, SV119, RHM-138 ασκούν τη δράση τους αυξάνοντας τις κασπάσες -3, συμπεριλαμβανομένης της αυτοφαγίας μέσω πολλών ακόμα σηματοδοτικών μονοπατιών, και μειώνοντας την m TOR πρωτεΐνη (75).

Η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων αποτελεί πρόκληση και ταυτόχρονα στόχο για πολλές ανθρώπινες ασθένειες, και ειδικότερα για τον καρκίνο, όπου υπάρχουν πολλές ανεπιθύμητες παρενέργειες τοξικότητας στους υγιείς ιστούς από τις μέχρι τώρα χορηγούμενες θεραπείες (ακτινοβολία, χημειοθεραπεία). Ο σ 2 υποδοχέας αποτελεί ιδανικό μόριο –στόχο για την επίτευξη αυτής της θεωρίας, καθώς υπρεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα, προσδίδοντας τους αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες, ενώ δεν φαίνεται να υπάρχουν τοξικές ενέργειες στα φυσιολογικά κύτταρα, όπου υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις (69).

Σε μία έρευνά τους, οι Mach et all σχεδίασαν πέντε αντικαρκινικές φαρμακευτικές συζεύξεις, που στοχεύουν τον σ 2 υποδοχέα :

- 1) SV119-Bim
- 2) SV119-BimX (ανενεργή μορφή του Bim)
- 3) SV119- CTMP4
- 4) SV119- CTMP4X (ανενεργή μορφή του CTMP4)
- 5) SV119-rapamycin (m TOR αναστολέας)

Τα *in vivo* και *in vitro* αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερα ποσοστά απόπτωσης στη θεραπεία με τα συζευγμένα φάρμακα, σε σχέση με τη θεραπεία που περιελάμβανε τις ανενεργές μορφές (**76**).

Επιπλέον, φαίνεται ότι έχουν την ικανότητα να εσωτερικεύουν τους υποδοχείς τους, κι έτσι οι εκλεκτικοί προσδέτες θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για στοχευμένη μεταφορά κυτταροτοξικών παραγόντων σε στερεούς όγκους.

Η siramesin, άλλη μία αντικαρκινική ουσία, είναι σ2 αγωνιστής που προκαλεί θάνατο σε καρκινικά κύτταρα σε συγκέντρωση άνω των 20μM και αποτελεί δυνητικό αντικαρκινικό παράγοντα *in vivo*. Οι τρόποι δράσης της δεν είναι αποκλειστικά μέσω των σ υποδοχέων αλλά πιθανά και μέσω του συμπλέγματος πρωτεϊνών του κυτοχρώματος c και της εμπλοκής στην ενεργοποίηση των κασπασών (**103**). Φαίνεται πως έχει διακριτές ιδιότητες από τους κλασσικούς σ προσδέτες, και στη βιολογική του δραστηριότητα περιλαμβάνονται η ανοσορύθμιση αλλά και η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η αντικαρκινική δράση της SR31747A έχει δειχθεί τόσο *in vitro*, σε εγκαθυδριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού και προστάτη πειραματοζώων, όσο και *in vivo* με ξενομοσχεύματα σε nude ποντίκια, μετά από εμβολιασμό ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων μαστού ή προστάτη, χωρίς να προκληθεί τοξικότητα. Τέλος, σημαντική είναι η αντι-αγγειογενετική της δράση, όπως επιβεβαιώθηκε στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύων κότας (**107**).

2.7 Κλασσικοί Sigma προσδέτες

1) BD- 1047 dihydrobromide

Αρχικά, χαρακτηρίστηκε σε εγκεφάλους αρουραίων, χρησιμοποιώντας δοκιμασίες δέσμευσης και μελέτες συμπεριφοράς. Σε μελέτες ραδιοσύνδεσης, που πραγματοποιήθηκαν σε εγκεφάλους ινδικών χοιριδίων και ήπαρ αρουραίων,δείχθηκε ότι έχει εκλεκτικότητα για τους σ υποδοχείς 100 φορές πιο πολύ σε σχέση με άλλους εννιά υποδοχείς που μελετήθηκαν ταυτόχρονα, και με τους οποίους το BD- 1047 έχει παρόμοια χημική δομή ή προέρχεται από αυτούς (οπιοειδών, ντοπαμινεργικών, αδρενεργικών). Εξαίρεση εμφάνιση μόνο η σύνδεση του με τον β – αδρενεργικό υποδοχέα. Οι περιοχές αυτές χρησιμοποιήθηκαν καθώς θεωρείται ότι εκφράζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις και οι σ1 και σ2 υποδοχείς αντίστοιχα. Επιπλέον μελέτες, έδειξαν ότι ενώ μπορεί να συνδέεται και με τους δύο υποτύπους των σ υποδοχέων, υπάρχει ιδιαίτερη ικανότητα πρόσδεσης για τον σ2 υποδοχέα και δρα ως ανταγωνιστής, *in vivo* (94).

2) PB-28 dihydrobromide

Αποτελεί σ2 αγωνιστή και σ1 ανταγωνιστή, με εκλεκτικότητα στον σ2 υποδοχέα (97). Εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες σε νευροβλάστωμα και κύτταρα γλοιώματος (96). Επίσης, εμφάνισε αντικαρκινικές ιδιότητες σε δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου του στήθους, τις MCF-7 και MCF7 ADR, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση σ2 υποδοχέων. Προκάλεσε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης μέσα σε 48 ώρες. Σημαντικό είναι το γεγονός της συνέργειας που εμφανίζεται μεταξύ του PB- 28 και της doxorubicin, είτε σε ταυτόχρονη εφαρμογή τους είτε σε διαδοχική. Στις καρκινικές παγκρεατικές σειρές BxPC3 και AsPC1, προκάλεσε κυτταροτοξικότητα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των κασπασών (100). Θα μπορούσε να αποτελέσει έναν σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα από μόνος του ή σε συνεργασία με συμβατικά φάρμακα (97).

3) SM-21 maleate

Πρόκειται για εκλεκτικό ανταγωνιστή με υψηλή συγγένεια για τον σ_2 υποδοχέα. Προκαλεί απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης στις νευρικές συνάψεις και μελετάται επίσης σαν πιθανός αναλγητικός παράγοντας (*104*).

4) Rimcazole

Πρόκειται για σ_1 ανταγωνιστή που αναστέλλει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (*101*), σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως πνευμόνων, στήθους, προστάτη (*102*). Σε πείραμα με κυτταρικές σειρές από καρκίνο στήθους,δείχθηκε ότι η δράση της εξαρτάται από τη δόση της, σε χρονικό διάστημα 5 ημερών. Σε μικρές δόσεις (4 μ M) δεν έδειξε να έχει δραστηριότητα, η οποία εμφανίζεται σε συγκέντρωση από 10 μ M ενώ στα 40 μ M εμφάνισε πλήρη κυτταρικό θάνατο (*101*).

SIGMA LIGAND	Ki (μ M)	Reference
CB-182	σ 1 = 27,3 σ 2 = 35,5	91
Pb -28	σ 1 = 15,2 σ 2 = 0,8	96
BD-1047	σ 1 = 0,93 σ 2 = 47	92
SM -21	σ 1 = > 1000 σ 2 = 67	93

Πίνακας 4: Κάποιοι από τους συνδέτες των σ υποδοχέων με τις αντίστοιχες τιμές Ki.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Πλήθος μελετών αναφέρεται στις λειτουργίες των sigma υποδοχέων σε διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, της κίνησης και της μνήμης. Τα τελευταία χρόνια όμως, πολλές μελέτες συγκεντρώνονται στην υπερέκφρασή τους σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως για παράδειγμα τον παγκρεατικό και τον ορθοκολικό, που όμως ακόμα δεν έχει διαλευκανθεί ο ακριβής ρόλος τους.

Οι sigma υποδοχείς διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες, τον sigma 1 (σ_1) και τον sigma 2 (σ_2). Για τον σ_1 υποδοχέα υπάρχουν αρκετές πληροφορίες, καθώς το γονίδιο του έχει κλωνοποιηθεί, ενώ για τον σ_2 δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα ακόμα. Για κανέναν όμως δεν έχει διαλευκανθεί ο φυσιολογικός του ρόλος στον οργανισμό.

Από τους δύο υποτύπους, φαίνεται πως σημαντικότερη είναι η υπερέκφραση των σ_2 υποδοχέων, οι οποίοι έχουν αρχίσει και να χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και απεικόνιση των όγκων, αλλά και σαν επαγωγείς της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα και αναστολείς της αύξησης του όγκου.

Ο βασικός σκοπός της εργασίας είναι ο ρόλος τους για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών (targeted therapies) και η αξιολόγηση της δραστηρότητας των προσδετών τους σαν αντικαρκινικά φάρμακα κυρίως σε καρκίνο του παγκρέατος και του παχέος εντέρου. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε καταρχήν η έκφραση των υποδοχέων σε όγκους ασθενών και ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και στη συνέχεια δοκιμάστηκαν επιλεγμένοι σίγμα προσδέτες σε επιλεγμένες κυτταρικές σειρές: μια πρωτογενή από ασθενή και μια εγκαθιδρυμένη.

Για την επίτευξη των στόχων της εργασίας διεξάχθηκαν μελέτες που περιλαμβάνουν απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα και όγκους ασθενών, ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western αλλά και in vitro πειράματα κυτταροτοξικότητας σε κυτταρικές σειρές.

Κεφάλαιο 3^ο

Υλικά και μέθοδοι

3.1 Κυτταροκαλλιέργεια

1) Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι :

- Πρωτογενής Attached 021013 από ανθρώπινο παγκρεατικό καρκίνο.
- Εγκαθιδρυμένη AsPC1: Παραλήφθηκαν από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI). Προέρχονται από ανθρώπινο παγκρεατικό καρκίνο.

2) Θρεπτικό υλικό

Χρησιμοποιείται ως μέσο για την καλλιέργεια των κυττάρων και περιέχει συμπληρώματα, για την αποφυγή μόλυνσης των κυττάρων. Σκέτο θρεπτικό υλικό θεωρείται αυτό που δεν περιέχει ορό, ενώ στο πλήρες θρεπτικό υλικό είναι απαραίτητη η παρουσία ορού.

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε RPMI Medium 1640 της εταιρίας Gibco, στο οποίο έγινε προσθήκη 1,2% αντιβιοτικού penicillin/ streptomycin για αποφυγή επιμόλυνσης των κυττάρων, 1,2% L-Glutamine και ορός FBS της εταιρίας Gibco σε περιεκτικότητα 5%, για να βοηθήσει την ανάπτυξη των κυττάρων.

Ο ορός περιέχει αυξητικούς παράγοντες που υποβοηθούν την ανάπτυξη των κυττάρων, παράγοντες που προωθούν την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια ώστε να αυξηθούν και απενεργοποιεί την θρυψίνη .Επίσης είναι πηγή ιχνοστοιχείων, λιπιδίων και ορμονών. Πριν χρησιμοποιηθεί, απενεργοποιείται με θέρμανση στους 56° C για 30 min (60).

3) Διαδικασίες

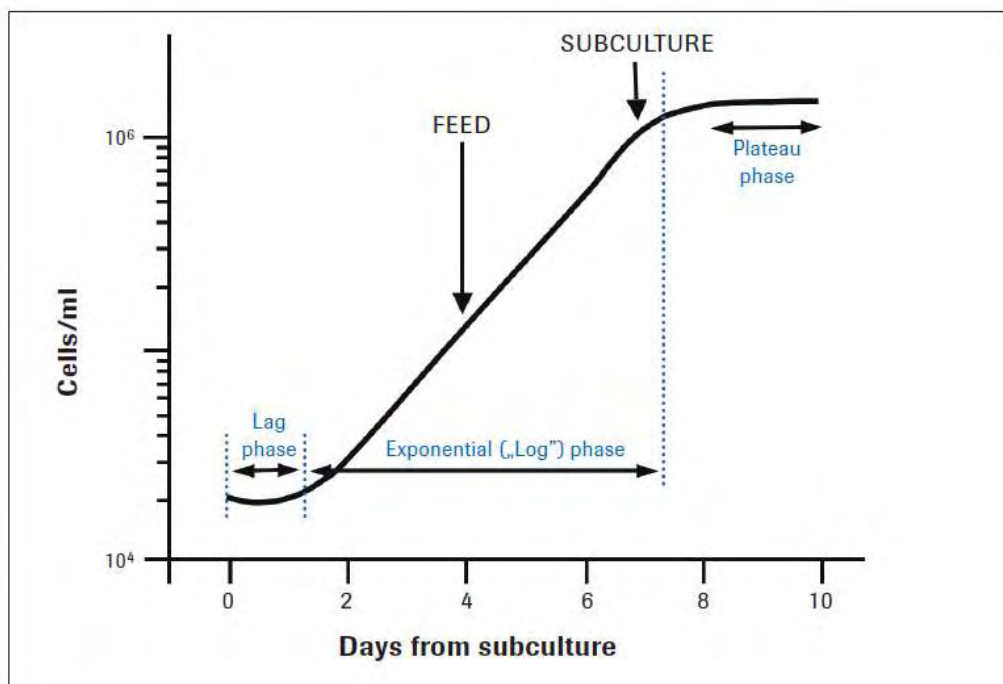
Όλες οι διαδικασίες που αφορούν στα κύτταρα πραγματοποιούνται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

➤ Διαδικασία αποκόλλησης κυττάρων:

Το δοχείο καλλιέργειας κυττάρων, επιφάνεια που αναπτύσσονται τα κύτταρα, περιέχει το παραπάνω εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα.

Προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα, καλλιεργούνται ώστε να έχουν καλύψει σε ποσοστό 80-100% την επιφάνεια στην οποία αναπτύσσονται. Γι' αυτό παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και εφόσον πληρούν αυτή την προϋπόθεση, ακολουθούνται τα εξής :

1. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού με τη βοήθεια πιπέτας.
2. Γίνεται πλύση με προσθήκη 2-3ml PBS και αναρρόφηση αμέσως μετά.
3. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας του ενζύμου τρυψίνη για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα.
4. Επώαση για 2 λεπτά στον κλίβανο (37°C, 5%CO₂).
5. Αφού γίνει έλεγχος στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα έχουν ξεκολλήσει, διακόπτεται η δράση της τρυψίνης με προσθήκη θρεπτικού υλικού (θρεπτικό υλικό που περιέχει ορό, ο οποίος απενεργοποιεί την τρυψίνη).
6. Αφαιρώ το 90% και προσθέτω RPMI μέχρι τον επιθυμητό τελικό όγκο.



Εικόνα 12 : Λογαριθμική καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων όπου απεικονίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο καλλιέργειας . Γίνονται διακριτές η λανθάνουσα φάση, η λογαριθμική – εκθετική φάση ανάπτυξης και το plateau, το οποίο αντιστοιχεί στη χρονική στιγμή που θα πρέπει να γίνει η ανακαλλιέργεια.



Εικόνα 13: Το δοχείο καλλιέργειας των κυττάρων (φλάσκα), στην επιφάνεια του οποίου προσκολλώνται τα κύτταρα.

3.2 Λύση όγκων

Οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα έχουν διττή προέλευση: Είτε από ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του παγκρέατος και του παχέος εντέρου, δηλαδή πρωτογενείς όγκοι, είτε από πειραματόζωα, δηλαδή δευτερογενείς όγκοι – xenografts .

Σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητη η λύση τους , προκειμένου να απομονώσουμε το σύνολο των πρωτεϊνών, η οποία στη συνέχεια θα ηλεκτροφορηθεί. Όλη η διαδικασία που ακολουθήθηκε έγινε σε plate το οποίο ήταν τοποθετημένο σε πάγο, για να αποφευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών.

1) Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν :

➤ *Lysis Buffer*

Είναι Ripa 1X , με προσθήκη pI και pCok .

Περιέχει : 100 μl Ripa 10X

10 μl pCok

10 μl pI

900 μl H₂O

2) Η διαδικασία έχει ως εξής :

- 1) Με τη βοήθεια λαβίδας, τοποθετώ τον όγκο στο plate και κόβω ένα τμήμα του.
- 2) Ζυγίζω τον όγκο και, τον κομματιάζω και τον μεταφέρω σε eppendorf.
- 3) Ανάλογα με τα mg βάρους ,βάζω και τα ανάλογα ml του lysis buffer.
- 4) Ακολουθεί vortex.
- 5) Ομογενοποίηση, ώστε να σπάσει τελείως ο όγκος και να δώσει μεγαλύτερα ποσά πρωτεΐνης, ενώ βοηθά και τη λύση .
- 6) Αφήνω το δείγμα στον πάγο για 30 min και ενδιάμεσα κάνω vortex, ώστε να γίνει η λύση .
- 7) Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C, 13.000 rpm για 10 min.

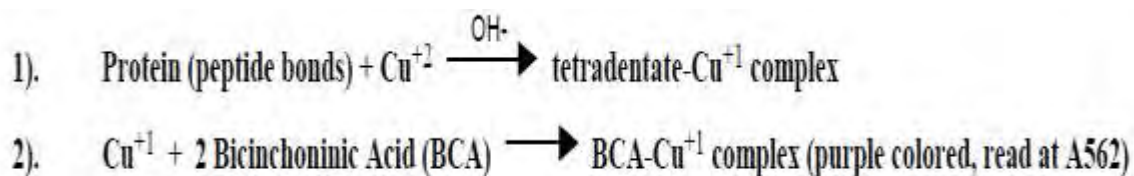
- 8) Μεταφέρω το υπερκείμενο σε νέο eppendorf.
- 9) Ακολουθεί sonication, δηλαδή επεξεργασία του υπερκείμενου με υπέρηχο, που βοηθά στην απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου.
- 10) Φυγοκέντρηση στους 4°C, 13.000 rpm για 20 min.
- 11) Συλλογή του υπερκείμενου για χρήση .

3.3 Λύση κυττάρων

- 1) Αρχικά γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων, και ανάλογα με τον αριθμό τους, τα μεταφέρω σε falcon και προστίθεται lysis buffer .
- 2) Ακολουθεί vortex .
- 3) Τα αφήνω για 30 min και ενδιάμεσα κάνω vortex, ώστε να γίνει η λύση.
- 4) Φυγοκέντρηση στους 4°C, 13.000 rpm για 10 min.
- 5) Συλλογή του υπερκείμενου για χρήση .

3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρίας Thermo. Πρόκειται για μία χρωματομετρική μέθοδο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, που εισήγαγε το 1985 ο Paul K. Smith, et al. .Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή του Cu^{+2} σε Cu^{+1} , σε αλκαλικό μέσο και στην χρωματομετρική ανίχνευση του ανηγμένου χαλκού από το δικιγchonικό οξύ. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την αποσιδήρωση του χαλκού και τη μετατροπή του σε ένα μπλε σύμπλοκο (μέθοδος biuret), από πεπτίδια που περιέχουν δύο ή τρία υπολείμματα αμινοξέων. Στο επόμενο βήμα, το δικιγchonικό οξύ (BCA) αντιδρά με τον ανηγμένο χαλκό που δημιουργήθηκε, σε αναλογία 2:1, και το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή μωβ χρώματος. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 562 nm. (61)



Εικόνα 14: Η μέθοδος Biuret.

1) Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων.

Πρόκειται για διαδοχικές αραιώσεις αλβουμίνης, η οποία περιέχεται στο kit, και γίνονται σύμφωνα με το πρωτόκολλο ως εξής :

Vial	Όγκος διαλύτη (μl)	Όγκος BSA (μl)	Τελική συγκέντρωση BSA (μg/ml)
A	0	300 of stock	2000
B	125	375 of stock	1500
C	325	325 of stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	0	0

Ο διαλύτης των παραπάνω αραιώσεων αλβουμίνης είναι διάλυμα που αποτελείται από 1 μέρος Ripa 1X και 10 μέρη H₂O.

2) Παρασκευή Working Reagent

Αναμιγνύονται 50 μέρη του αντιδραστηρίου Α με 1 μέρος του αντιδραστηρίου Β, που περιλαμβάνονται στο kit. Ο τελικός όγκος που θα παραχθεί, υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

$$(\# \text{ standards} + \# \text{ samples}) \times (\# \text{ replication}) \times (\# \text{ volume of working reagent per sample})$$

3) Αραίωση των δειγμάτων

Στα δείγματα έχει γίνει αραίωση 1/10. Σε ένα 96 well plate βάζω :

- Στην πρώτη στήλη 25μl από κάθε διαδοχική αραίωση των πρότυπων δειγμάτων.
- Στην δεύτερη στήλη 25μl από κάθε αραιωμένο δείγμα .

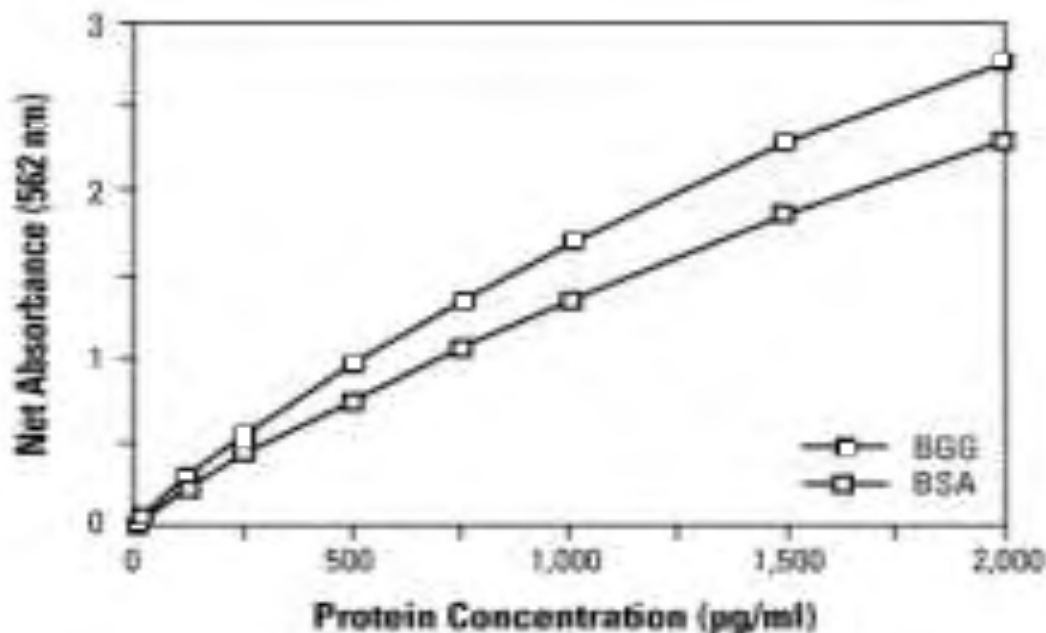
Τέλος , σε κάθε well , προσθέτω από 200μl working reagent.

4) Επώαση στους 37° C για 30 min.

5) Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.

6) Φωτομέτρηση στα 562 nm.

7) Κατασκευή πρότυπης καμπύλης .



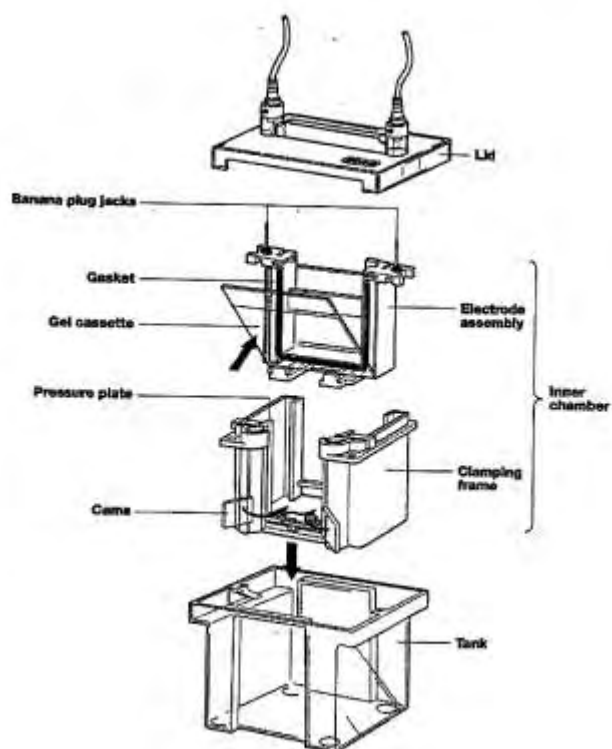
Εικόνα 15: Πρότυπη καμπύλη που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία. (62)

3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να μετακινούνται όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο και σε τιμές pH διαφορετικές από το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ταχύτητα μετατόπισης εξαρτάται από το λόγο του φορτίου που φέρουν προς τη μάζα τους. Επιτυγχάνεται μέσω των πόρων που σχηματίζονται μέσα στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου και λειτουργούν ως μοριακοί ηθμοί. Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στα διαλύματα του πηκτώματος.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS, β-μερκαπτοαιθανόλη). Το SDS (SodiumDodecylSulphate) είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών.

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται είναι η συσκευή Mini-PROTEAN® 3 Cell – BIORAD.



Εικόνα 16 Απεικόνιση της συσκευής ηλεκτροφόρησης. (58)

1) Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

- 1,5 M Tris – Cl, pH = 8,8

Διαλύθηκαν 181,5 gr Tris Base σε 800 ml d H₂O .Ρυθμίστηκε το pH με HCl συγκέντρωσης 12N στο 8,8 . Μετά από 24 h έγινε ξανά μέτρηση του pH και προστέθηκε d H₂O μέχρι τελικό όγκο 1 λίτρου.

- 0,5 M Tris – Cl pH = 6,8

Διαλύθηκαν 60,5 gr Tris Base σε 800 ml d H₂O .Ρυθμίστηκε το pH με HCl συγκέντρωσης 12N στο 6,8 . Μετά από 24 h έγινε ξανά μέτρηση του pH και προστέθηκε d H₂O μέχρι τελικό όγκο 1 λίτρου.

- 1 M Tris – Cl, pH = 7.4

Διαλύθηκαν 121 gr Tris Base σε 800 ml d H₂O .Ρυθμίστηκε το pH με HCl συγκέντρωσης 12N στο 7,4 . Μετά από 24 h έγινε ξανά μέτρηση του pH και προστέθηκε d H₂O μέχρι τελικό όγκο 1 λίτρου.

- APS 10%

Διαλύθηκαν 0,1 gr Ammonium Persulfate σε 1 ml d H₂O.

- Running buffer 10X, pH = 8.3

Διαλύθηκαν 30,3 gr Tris Base, 144 gr Glycine, 10gr SDS σε 800 ml d H₂O .Ρυθμίστηκε το pH με HCl συγκέντρωσης 12N στο 8,3. Μετά από 24 h έγινε ξανά μέτρηση του pH και προστέθηκε d H₂O μέχρι τελικό όγκο 1 λίτρου .

- Running buffer 1X, pH = 8.3

Διαλύθηκαν 100 ml Running buffer 10X, pH = 8.3 σε 900 ml d H₂O.

- Transfer Buffer 10X

Διαλύθηκαν 144 gr Glycine, 30,3 gr Trizma Base, σε d H₂O τελικού όγκου 1 λίτρου .

- Transfer Buffer 1X

Διαλύθηκαν 100 ml Transfer buffer 10X και 200 ml μεθανόλη σε 800 ml d H₂O.

- Stripping Buffer

Διαλύθηκαν 20 ml SDS, 12,5 ml Tris Base 0,5 M και 700 μl B-μερκαπτοαιθανόλη σε d H₂O τελικού όγκου 100 ml.

- TBS (Tris Buffer Saline)

Αναμίχθηκαν 450 ml NaCl 0,9% και 50 ml TrisCl 1M .

- TTBS (Tween Tris Buffer Saline)

Αναμίχθηκαν 500 ml TBS και 500 μl Tween 20 .

- TTBS 5% ορού (FBS ή FCS)

Αναμίχθηκαν 190 ml TTBS και 10 ml ορού.

- 30% Acrylamide Bis

Διαλύθηκαν 29,2 gr Acrylamide και 0,8 gr N,N-methylene-bis-acrylamide σε 60ml d H₂O υπό ανάδευση και προστέθηκε d H₂O μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

- Loading Buffer

Αναμίχθηκαν : 400 μl γλυκερίνη
100 μl Tris 0.5 M
100 μl Bromophenol Blue 0,2%
100 μl 20% SDS
100 μl B- μερκαπτοαιθανόλη

2) Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Μετά το στήσιμο της συσκευής γίνεται η προετοιμασία των πηκτών πολυακρυλαμιδίου. Χρησιμοποιούνται δύο gel με διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου. Η πρώτη πηκτή που τοποθετείται στη συσκευή είναι η πηκτή διαχωρισμού (resolving gel), όπου για τις πρωτεΐνες που εμείς θέλουμε να διαχωρίσουμε έχει συγκέντρωση 10% και σε αυτήν γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος κατά την ηλεκτροφόρηση, υπό την επίδραση σταθερού ηλεκτρικού πεδίου, για τα πρώτα 10 min και 200V για το υπόλοιπο χρονικό διάστημα.

Η δεύτερη πηκτή είναι η πηκτή επιστίβαξης (sticking gel), έχει συγκέντρωση 5% και σε αυτή γίνεται η ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών, ώστε να διαχωριστούν στη συνέχεια ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Η προετοιμασία των πηκτών γίνεται ως εξής :

➤ Resolving gel 10%

4,1 ml d H₂O

3,3 ml acrylamide Bis 30%

2,5 ml Tris 1,5 M pH 8,8

0,1 ml SDS 10%

Στο τέλος, προστίθενται 50 μl APS και 5 μl TEMED, καθώς αυτά θα προκαλέσουν τον πολυμερισμό του gel.

Βάζουμε τα συστατικά σε σωλήνα falcon 50 ml με τη σειρά που αναγράφονται. Αμέσως αποχύνουμε την πηκτή ανάμεσα στα ειδικά τζαμάκια της συσκευής, γιατί αρχίζει ο πολυμερισμός της πολυακρυλαμιδίου. Μετά, αποχύνουμε 2 – 3 ml d H₂O, ώστε να μην έρχεται σε επαφή με τον αέρα η πολυακρυλαμιδίου και να πολυμεριστεί σε ευθεία γραμμή. Αφού γίνει ο πολυμερισμός, πετάμε το d H₂O και χρησιμοποιούμε διηθητικό χαρτί για να απομακρύνουμε καλά το νερό.

➤ Stucking gel 5%

5,7 ml d H₂O

1,7 ml acrylamide Bis 30%

2,5 ml Tris 1,5 M pH 8,8

0,1 ml SDS 10%

Στο τέλος, προστίθονται 50 µl APS και 10 µl TEMED , καθώς αυτά θα προκαλέσουν τον πολυμερισμό του gel.

Αδειάζουμε σιγά – σιγά το stacking gel ανάμεσα στα τζαμάκια, προσέχοντας να μη κάνουμε φυσαλίδες. Χρησιμοποιούμε το κατάλληλο χτενάκι, για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια. Μετά τον πολυμερισμό του stacking gel, αφαιρούμε το χτενάκι.

Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, τοποθετούμε running buffer και βυθίζουμε τον εσωτερικό θάλαμο.

3) Προετοιμασία δειγμάτων

Βγάζουμε τα δείγματα από το ψυγείο των -80°C και τα τοποθετούμε σε πάγο προκειμένου να υγροποιηθούν. Σε eppendorf, βάζουμε την κατάλληλη ποσότητα d H₂O και την κατάλληλη ποσότητα δείγματος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Bradford , ώστε πάντα να φορτώνουμε ίση ποσότητα πρωτεΐνης, δηλαδή 15µg. Στη συνέχεια , βάζουμε loading buffer , σε ποσότητα μισή του τελικού όγκου του δείγματος ,και τα τοποθετούμε σε νερό που βράζει στους 95°C, για 5 min, ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για λίγα δευτερόλεπτα στη μικρο-φυγόκεντρο.

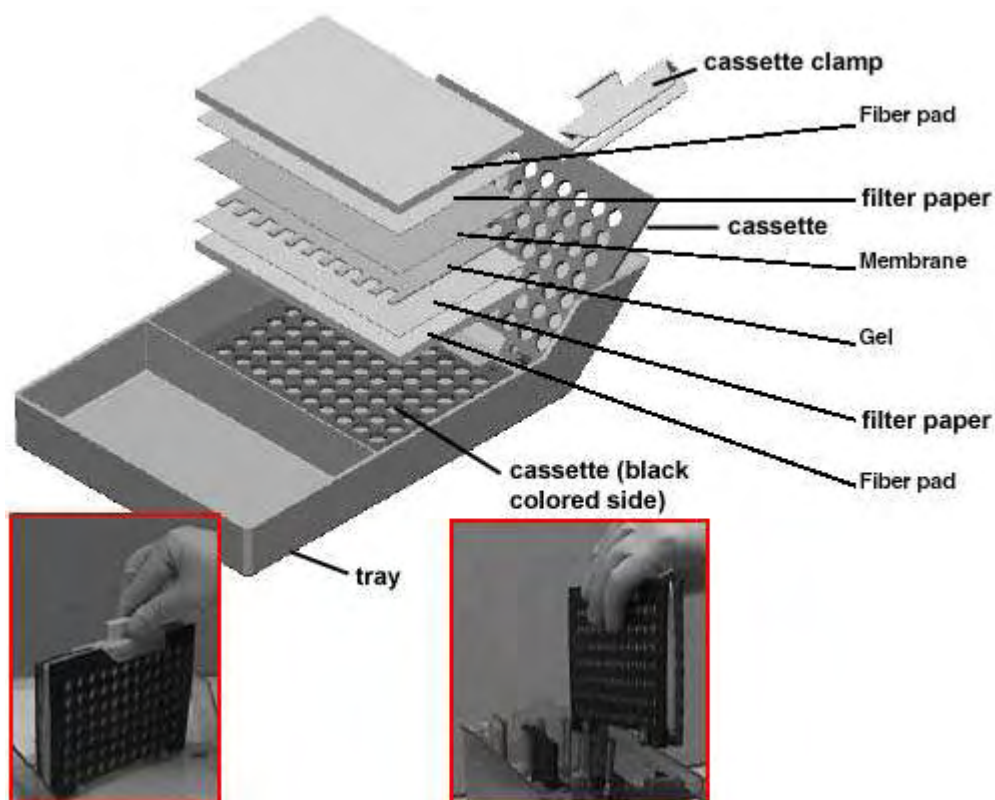
4) Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Αφού τελειώσει η ηλεκτροφόρηση τοποθετούμε την πηκτή στη συσκευή για την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Βάζουμε σε ένα ρηχό δοχείο λίγο transfer buffer 1x και τοποθετούμε τη μαύρη πλαστική επιφάνεια της συσκευής μέσα στο transfer buffer. Τοποθετούμε στη συνέχεια :

- 2 Βρεγμένα σφουγγαράκια εμποτισμένα με transfer buffer
- 1 χαρτί Whitmann, εμποτισμένο με transfer buffer
- Την πηκτή
- Τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- 1 χαρτί Whitmann, εμποτισμένο με transfer buffer
- 1 σφουγγαράκι εμποτισμένο με transfer buffer

Κλείνουμε το gel cassette sandwich και τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης . Εφαρμόζουμε 100 V για 1 h .



Εικόνα 17 : Gell cassette sandwich (59)

5) Ανοσοαποτύπωση

Σκοπός είναι η ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος. Επωάζουμε τη μεμβράνη σε blocking buffer, και συγκεκριμένα 5% TTBS, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, σε πλατφόρμα ανακίνησης. Έτσι, καλύπτονται οι μη ειδικές πρωτεΐνες, ώστε να αποφύγουμε μεταγενέστερα μια μη ειδική σύνδεση του αντισώματος, που θα οδηγούσε σε εσφαλμένα αποτελέσματα.

Το επόμενο βήμα είναι να γίνει επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, για όλη νύχτα, στους 4° C. Την επόμενη ημέρα ακολουθούν 3 εκπλύσεις των δέκα λεπτών με TTBS, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος, και εισαγωγή του δευτερογενούς αντισώματος, με το οποίο θα γίνει επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των δέκα λεπτών με TTBS και τέλος, εμφάνιση της μεμβράνης, μέσω του προγράμματος alliance, με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

Πρωτογενές Αντίσωμα	Αραίωση	Δευτερογενές αντίσωμα	Αραίωση
GAPDH	1/1000	Anti-mouse	1/6000
Actin	1/10000	Anti-mouse	1/6000
Sigma 1	1/ 500	Anti-mouse	1/6000
PFRMC1 (Sigma2)	1/1000	Anti -Rabbit	1/2000

Πίνακας 5: Οι αραιώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Ο διαλύτης είναι 5% TTBS.

3.6 Κυτταροτοξικότητα

Ο όρος κυτταροτοξικότητα , αναφέρεται στη θανάτωση κυττάρων από κάποια χημική ουσία , όπως φαρμακευτικές ουσίες, ή από κύτταρα, χωρίς να προσδιορίζεται κάποιος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου. Η in vitro κυτταροτοξική δράση των υπό εξέταση ουσιών γίνεται με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης (Soulforodamine B, SRB). Η SRB είναι μια ανιοντική πρωτεΐνη που έχει την ιδιότητα να προσδένεται ηλεκτροστατικά στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών κάτω από ελαφρώς όξινες συνθήκες. Αποτελεί δηλαδή έναν ευαίσθητο δείκτη που καθορίζει την περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε έναν κυτταρικό πληθυσμό και συνεπώς υπολογίζει την κυτταροτοξική δράση των ουσιών που προστέθηκαν στην κυτταρική καλλιέργεια. Τα στάδια του πειράματος είναι τα εξής :

- Πρώτη ημέρα

Γίνεται ανανέωση του θρεπτικού υλικού – RPMI.

- Δεύτερη ημέρα

Γίνετε καταμέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια πλάκας Neu Bauer ως εξής :

- 1) Με προσθήκη τρυψίνης, αποκολλήθηκαν τα κύτταρα των κυτταρικών σειρών που αναφέρθηκαν παραπάνω.
- 2) Μεταφέρθηκαν σε falcon, όπου μετά από καλή ανάδευση , 90μl αυτών μεταφέρθηκαν σε erppendorf.
- 3) Προσθήκη 10 μl χρωστικής Tryban Blue .
- 4) Μεταφορά των 100μl σε πλάκα Neu Bauer και μέτρηση στο μικροσκόπιο του αριθμού των κυττάρων.

Ακολουθεί το στρώσιμο των κυττάρων σε 96 well plate, σε συγκέντρωση 5.000 cells/well.

- 1) Με δεδομένο ότι κάθε well χωράει 1 ml διαλύματος, και ότι σε κάθε ml θέλω 5.000 κύτταρα, υπολογίζω την ποσότητα που πρέπει να πάρω από το falcon με τα κύτταρα.
- 2) Την ποσότητα αυτή τη μεταφέρω σε νέο falcon, προσθέτω PBS, και φυγοκεντρώ για 5 min στις 1800 rpm .
- 3) Στη συνέχεια , απορρίπτεται το υπερκείμενο, εναιωρώ το ίζημα σε RPMI και για κάθε κυτταρική σειρά στρώνω 2 plate εκ των οποίων το ένα θα είναι το Tz , που θα λειτουργεί ως μάρτυρας, για την ανάπτυξη των κυττάρων καθώς σε αυτό δεν θα τοποθετηθούν φάρμακα.

- Τρίτη ημέρα

Στο plate Tz , γίνεται το εξής :

1. Προστίθενται 100 ml RPMI.
2. Προστίθενται 50 µl cold TCA 50%. Το TCA προστατεύει τη δομή των κυττάρων και κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες, Ανάλογα με τη συγκέντρωση του, κατακρημνίζονται πρωτεΐνες διαφορετικού μοριακού βάρους, με τις δύο παραμέτρους να έχουν σχέση αντιστρόφως ανάλογη.
3. Αφήνεται στους 4° C για 1 ώρα.
4. Εκπλήσσεις με H₂O βρύσης.
5. Το αφήνω να στεγνώσει.

Στο δεύτερο plate βάζω 100 ml RPMI και στη συνέχεια τα φάρμακα , αφού παρασκευαστούν οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν, με διαδοχικές αραιώσεις. Τα φάρμακα είναι :

- 1) P5-NH Maleate
- 2) FP5-NH Maleate
- 3) PB28 Dichydrochloride
- 4) Rimcazole Dichydrochloride
- 5) SM-21 Maleate
- 6) BD- 1047

Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν προηγουμένως στο εργαστήριο , έχει βρεθεί ότι οι κατάλληλες συγκεντρώσεις είναι οι εξής :

❖ ***P5-NH Maleate και FP5-NH Maleate***

Το stock έχει συγκεντρωση 20μl.

Συγκέντρωση (μl)	Τρόπος παρασκευής
C1 = 100	20 μl stock +1980 μl RPMI
C2= 10	↓ 100 μl + 900 μl RPMI
C3 = 1	↓ 100 μl + 900 μl RPMI
C4 = 0,1	↓ 100μl + 900μl RPMI

❖ ***PB28 Dichydrochloride***

Συγκέντρωση (μl)	Τρόπος παρασκευής
C1 = 100	20 μl stock +1980 μl RPMI
C2 = 50	↓ 500 μl + 500 μl RPMI
C3 = 10	↓ 200 μl + 800 μl RPMI
C4 = 1	↓ 100 μl + 900 μl RPMI
C5 = 0,1	↓ 100 μl + 900 μl RPMI

❖ ***Rimcazole Dichydrochloride***

Συγκέντρωση (μl)	Τρόπος παρασκευής
C1 = 100	40 μl stock +1960 μl RPMI
C2 = 50	↘ 500 μl + 500 μl RPMI
C3 = 10	↘ 200 μl + 800 μl RPMI
C4 = 1	↘ 100 μl + 900 μl RPMI
C5 = 0,1	↘ 100 μl + 900 μl RPMI

❖ ***SM-21***

Συγκέντρωση (μl)	Τρόπος παρασκευής
C1 = 100	16 μl stock +1984 μl RPMI
C2 = 50	↘ 500 μl + 500 μl RPMI
C3 = 10	↘ 200 μl + 800 μl RPMI
C4 = 1	↘ 100 μl + 900 μl RPMI
C5 = 0,1	↘ 100 μl + 900 μl RPMI

❖ ***BD- 1047***

Συγκέντρωση (μl)	Τρόπος παρασκευής
C1 = 100	8 μl stock +1992 μl RPMI
C2 = 50	↘ 500 μl + 500 μl RPMI
C3 = 10	↘ 200 μl + 800 μl RPMI
C4 = 1	↘ 100 μl + 900 μl RPMI
C5 = 0,1	↘ 100 μl + 900 μl RPMI

Τα plate με τα φάρμακα, μπαίνουν στον κλίβανο στους 37° C, για 48 ώρες. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις σε κάθε πείραμα, ενώ συνολικά έγιναν έξι ανεξάρτητα πειράματα, τρία για την πρωτογενή καρκινική σειρά 021013 Attached και τρία για την εγκαθιδρυμένη AsPC1. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DMSO.

- Πέμπτη ημέρα

Στο plate που τοποθετήθηκαν τα φάρμακα, μετά πλέον από 48 ώρες :

1. Προστίθενται 50 μl cold TCA 50%.
2. Αφήνεται στους 4° C για 1 ώρα.
3. Εκπλύσεις με H₂O βρύσης.
4. Το αφήνω να στεγνώσει.

Τέλος, ακολουθεί η χρώση των plate, που μπορεί να γίνει την Πέμπτη ημέρα ή οποιαδήποτε μεταγενέστερη στιγμή. Η χρώση SRB έχει τα εξής στάδια, τα οποία γίνονται ταυτόχρονα τόσο στο plate με τα φάρμακα , όσο και στο Tz :

- 1) Προσθήκη 50μl SRB solution
- 2) Αφήνονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
- 3) Έκπλυση με 1% Acetic Acid
- 4) Αφήνονται να στεγνώσουν
- 5) Προσθήκη 150 μl Trizma Base 10Mm
- 6) Αφήνονται στους 37° C για 10 min
- 7) Ακολουθεί φωτομέτρηση

Κεφάλαιο 4^ο

4.1 Αποτελέσματα

A. Μελέτη της έκφρασης των σ υποδοχέων σε πρωτογενείς όγκους και καρκινικές κυτταρικές σειρές

Η υπερέκφραση των σ υποδοχέων είναι πλέον αποδεδειγμένη σε διάφορους τύπους καρκίνου. Ωστόσο, στην πλειονότητα των μελετών η βασική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τους είναι με τη χρήση ραδιοσημασμένου προσδέτη που χρησιμοποιείται σαν ιχνηθέτης και όχι με απευθείας ανίχνευση και μελέτη των ίδιων των πρωτεϊνών. Επιπλέον, στον καρκίνο του παγκρέατος, οι μελέτες περιορίζονται αποκλειστικά σε εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές ενώ στον ορθοκολικό η βιβλιογραφία φαίνεται να είναι ανεπαρκής στον τομέα αυτό καθώς υπάρχουν ελάχιστα άρθρα που μελετούν όγκους ασθενών (112). Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την έκφραση των υποδοχέων, κυρίως στον καρκίνο του παγκρέατος, προχωρήσαμε στη μελέτη της έκφρασης αυτών των υποδοχέων με την τεχνική του στυπώματος κατά Western τόσο σε πρωτογενείς όγκους ασθενών όσο και σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

1) Πρωτογενείς όγκοι παγκρέατος

Αρχικά, μελετήθηκε η έκφραση των σ υποδοχέων σε πρωτογενείς όγκους παγκρέατος προερχόμενους από ασθενείς. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.8, τα τέσσερα πρώτα δείγματα αντιστοιχούν ανά δύο σε έναν ασθενή και αποτελούν ζεύγη καρκινικού ιστού (Cancer) και παρακείμενου μη καρκινικού ιστού (Normal). Τα υπόλοιπα πέντε δείγματα αντιστοιχούν σε καρκινικό ιστό προερχόμενο από πέντε διαφορετικούς ασθενείς. Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στον πίνακα.6. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν έντεκα ανεξάρτητα πειράματα.

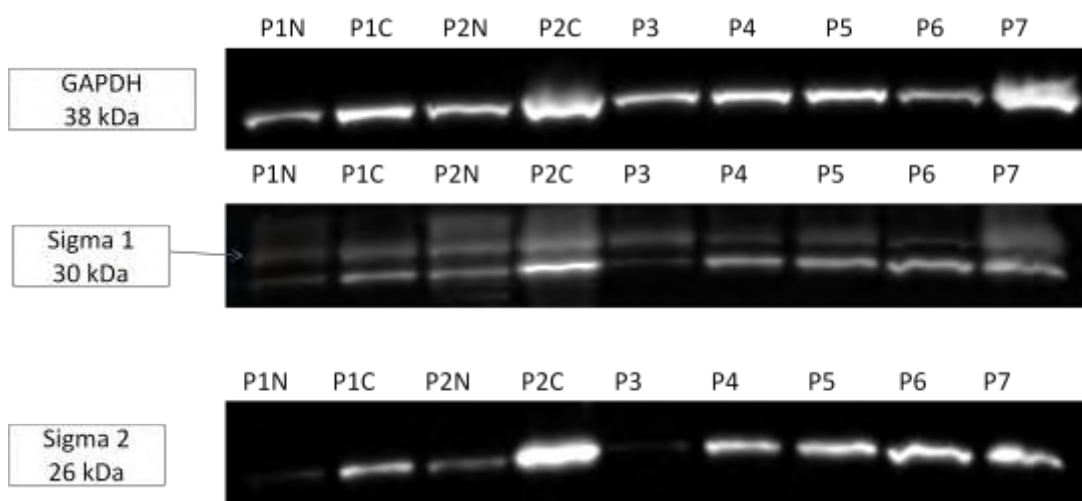
Κωδικό όνομα:	Normal	Cancer
P1: UGHL 011112	P1N	P1C
P2: UGHL 071212	P2N	P2C
P3: UGHL 220213	-	P3C
P4: EANM 270413	-	P4C
P5: EANM 100713	-	P5C
P6: EANM 021013	-	P6C
P7: UGHL 061213	-	P7C

Πίνακας 6: Δείγματα προερχόμενα από όγκους παγκρέατος ασθενών.

Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα της εικόνας 4.8, και μετά από ποσοτικοποίηση με densitometry, στα ζεύγη normal-cancer παρατηρούμε αυξημένη έκφραση τόσο των $\sigma 1$ όσο και των $\sigma 2$ υποδοχέων στα cancer δείγματα. Όλα τα υπόλοιπα cancer δείγματα φαίνεται να έχουν αυξημένη έκφραση των $\sigma 2$ έναντι των $\sigma 1$, με εξαίρεση το δείγμα P3.

GAPDH	P1N	P1C	P2N	P2C	P3	P4	P5	P6	P7
Number	%	%	%	%	%	%	%	%	%
No 1	100,0	198,9	147,4	236,3	138,2	174,3	181,4	112,1	253,3
		0,5	0,7	0,4	0,7	0,6	0,6	0,9	0,4
$\sigma 1$	P1N	P1C	P2N	P2C	P3	P4	P5	P6	P7
Number	%	%	%	%	%	%	%	%	%
No 1	100,0	246,2	331,2	582,2	170,5	79,8	129,0	69,6	347,2
	100,0	123,8	224,7	246,4	123,4	45,8	71,1	62,1	137,0
$\sigma 2$	P1N	P1C	P2N	P2C	P3	P4	P5	P6	P7
Number	%	%	%	%	%	%	%	%	%
No 1	100,0	360,7	256,7	1441,0	94,0	508,0	417,2	735,4	615,4
	100,0	181,4	174,1	609,7	68,0	291,5	229,9	656,2	242,9

Πίνακας 7 : Τα αποτελέσματα του densitometry για την έκφραση των σ υποδοχέων στους παγκρεατικούς όγκους ασθενών.



Εικόνα 18: Η έκφραση των σ υποδοχέων μελετήθηκε στα κύτταρα καρκινικού ιστού παγκρέατος ασθενή P1C, P2C, P3, P4, P5, P6, P7 σε σχέση με τα κύτταρα παρακείμενου μη καρκινικού ιστού P1N και P2N με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Σαν control χρησιμοποιήθηκε η housekeeping πρωτεΐνη GAPDH, προκειμένου να επιβεβαιωθεί το ισοφόρτωμα των δειγμάτων. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές, με παρόμοια αποτελέσματα.

2) Καρκινικές κυτταρικές σειρές παγκρέατος

Η έκφραση των πρωτεϊνών σ1 και σ2 μελετήθηκε στις εξής παγκρεατικές καρκινικές σειρές:

Εγκαθιδρυμένες : AsPC1, MiaPaca 2,

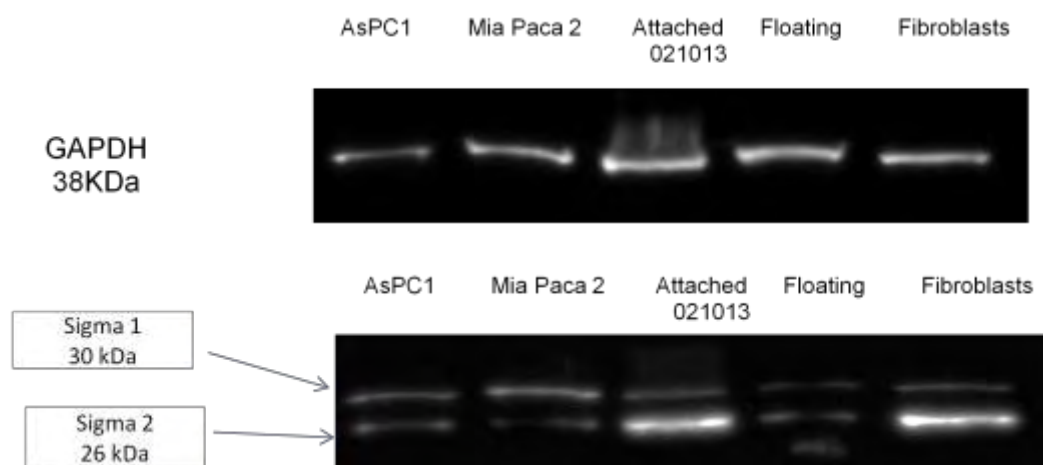
Πρωτογενείς (πρωτότυπες σειρές από όγκους ασθενών): 021013 Attached, 021013 Floating

Οι ινοβλάστες στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα μάρτυρες.

Παρατηρούμε ότι σε όλες τις παγκρεατικές καρκινικές σειρές εκφράζεται τόσο ο σ1 όσο και ο σ2 υποδοχέας. Μέσω ποσοτικοποίησης με densitometry η έκφραση του σ1 υποδοχέα σε σχέση με τους ινοβλάστες εμφανίζεται αυξημένη στις καρκινικές σειρές AsPC1 και MiaPaca. Επίσης, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του σ2 υποδοχέα έναντι του σ1 στα 021013 Attached και στους ινοβλάστες (εικ. 4.7). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα.

Gapdh	AsPC1	MiaPaca2	Attached 021013	Floating	Fibroblasts
Number	%	%	%	%	%
No 1	100	186,3	270,0	246,0	204,4
		0,5	0,4	0,4	0,5
σ1	AsPC1	MiaPaca2	Attached 021013	Floating	Fibroblasts
Number	%	%	%	%	%
No 1	100	199,6	112,3	78,9	131,1
	100	107,2	41,6	32,1	64,2
σ2	AsPC1	MiaPaca2	Attached 021013	Floating	Fibroblasts
Number	%	%	%	%	%
No 1	100	90,0	1090,0	85,8	1265,0
	100	48,3	403,7	34,9	619,0

Πίνακας 8: Τα αποτελέσματα του densitometry για την έκφραση των σ υποδοχέων στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 19: Η έκφραση των σ υποδοχέων μελετήθηκε στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές παγκρέατος AsPC1, Mia Paca2, Attached 021013, Floating 021013 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Fibroblasts. Σαν control χρησιμοποιήθηκε η housekeeping πρωτεΐνη GAPDH, προκειμένου να επιβεβαιωθεί το ισοφόρτωμα των δειγμάτων. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές, με παρόμοια αποτελέσματα.

B. In vitro κυτταροτοξική δράση των σ προσδετών.

Προκειμένου να ελεγχθεί η δράση των σ προσδετών, χρησιμοποιήθηκαν δύο ανθρώπινες καρκινικές παγκρεατικές σειρές: Η attached 021013, που είναι πρωτογενής και αναπτύχθηκε προγενέστερα από την ομάδα του εργαστηρίου, και η AsPC1, που είναι εγκαθιδρυμένη και αγοράστηκε από την ATCC. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα.

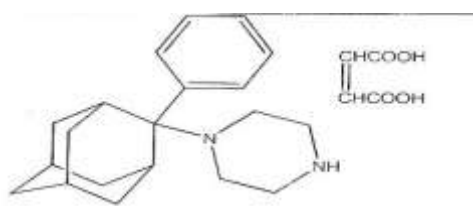
Μετά από επώαση των κυττάρων, συγκέντρωσης 5000 cells/well, με διαδοχικές αραιώσεις των προσδετών P5-NH Maleate, FP5-NH Maleate, PB28 Dichydrochloride, Rimcazole Dichydrochloride, SM-21 Maleate και BD- 1047 υπολογίστηκαν οι τιμές GI50, TGI και LC50.

Η τιμή GI50 (Growth inhibition) αναφέρεται στη συγκέντρωση του φαρμάκου – προσδέτη που απαιτείται για να αναστείλει στο μισό την ανάπτυξη των κυττάρων, δηλαδή να οδηγήσει σε θάνατο τα μισά κύτταρα από τον αρχικό πληθυσμό των κυττάρων.

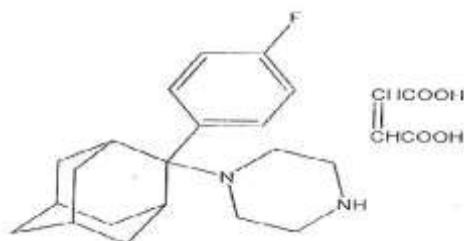
Η τιμή TGI (Total Growth Inhibition) αναφέρεται στη συγκέντρωση του φαρμάκου – προσδέτη που περιορίζει τη συνολική ανάπτυξη των κυττάρων.

Η τιμή LC50 (Lethal Concentration) αναφέρεται στη συγκέντρωση του φαρμάκου – προσδέτη που εκτός του να προκαλεί μείωση της συνολικής ανάπτυξης, προκαλεί επιπλέον και μείωση στο μισό του αρχικού πληθυσμού των κυττάρων. **(105)**

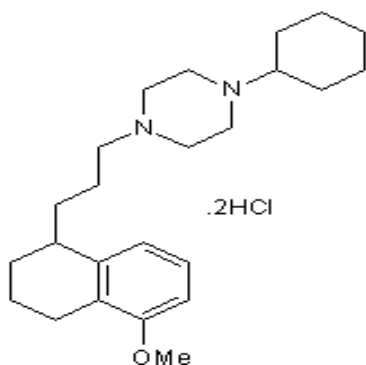
Στην εικόνα 20 φαίνονται οι χημικές δομές των σ προσδετών που μελετήθηκαν (P5-NH Maleate, FP5-NH Maleate, PB28 Dichydrochloride, Rimcazole Dichydrochloride, SM-21 Maleate και BD- 1047).



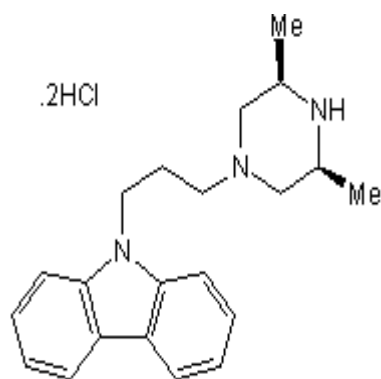
P5-Maleate



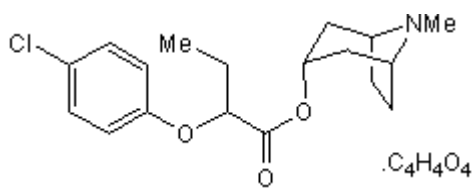
F-P5-Maleate



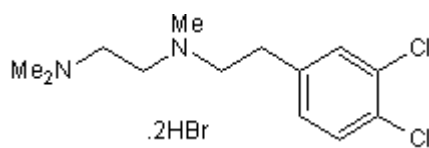
PB28 Dichydrochloride



Rimcazole Dichydrochloride



SM-21 Maleate

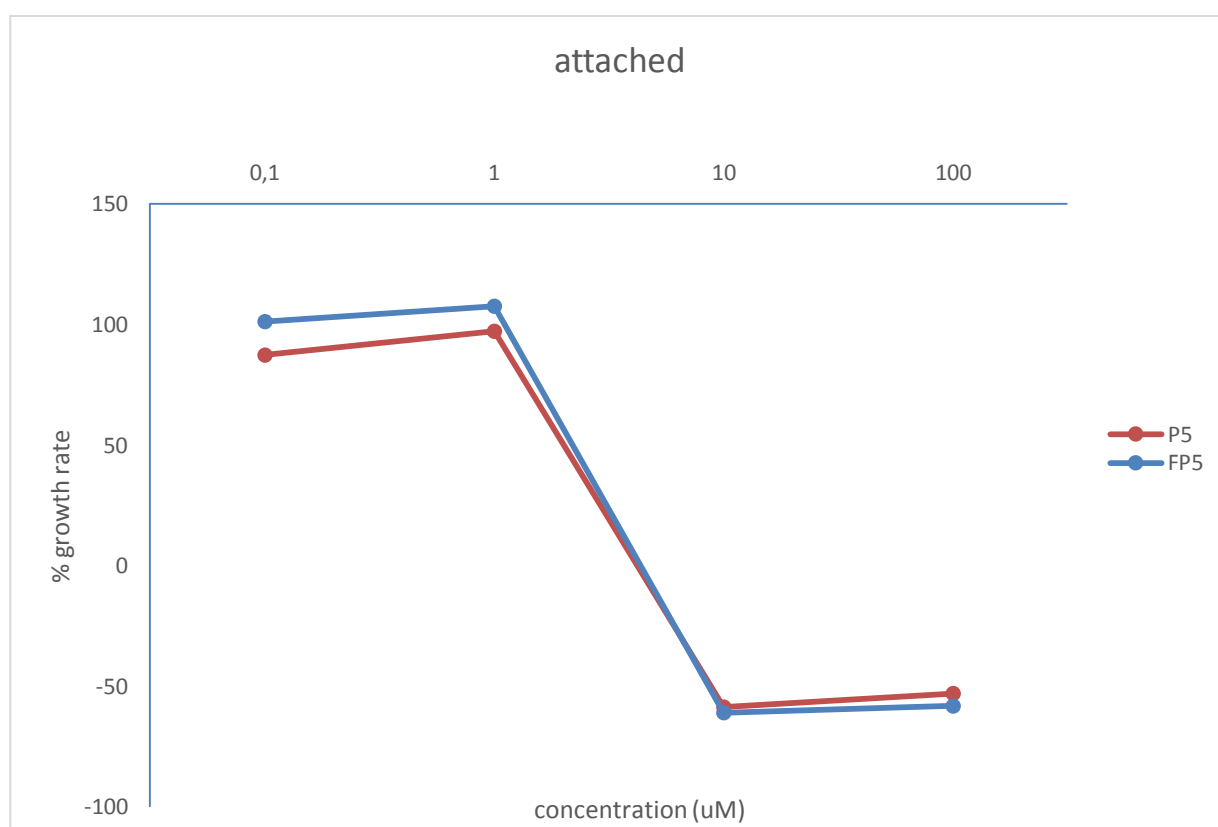


BD-1047

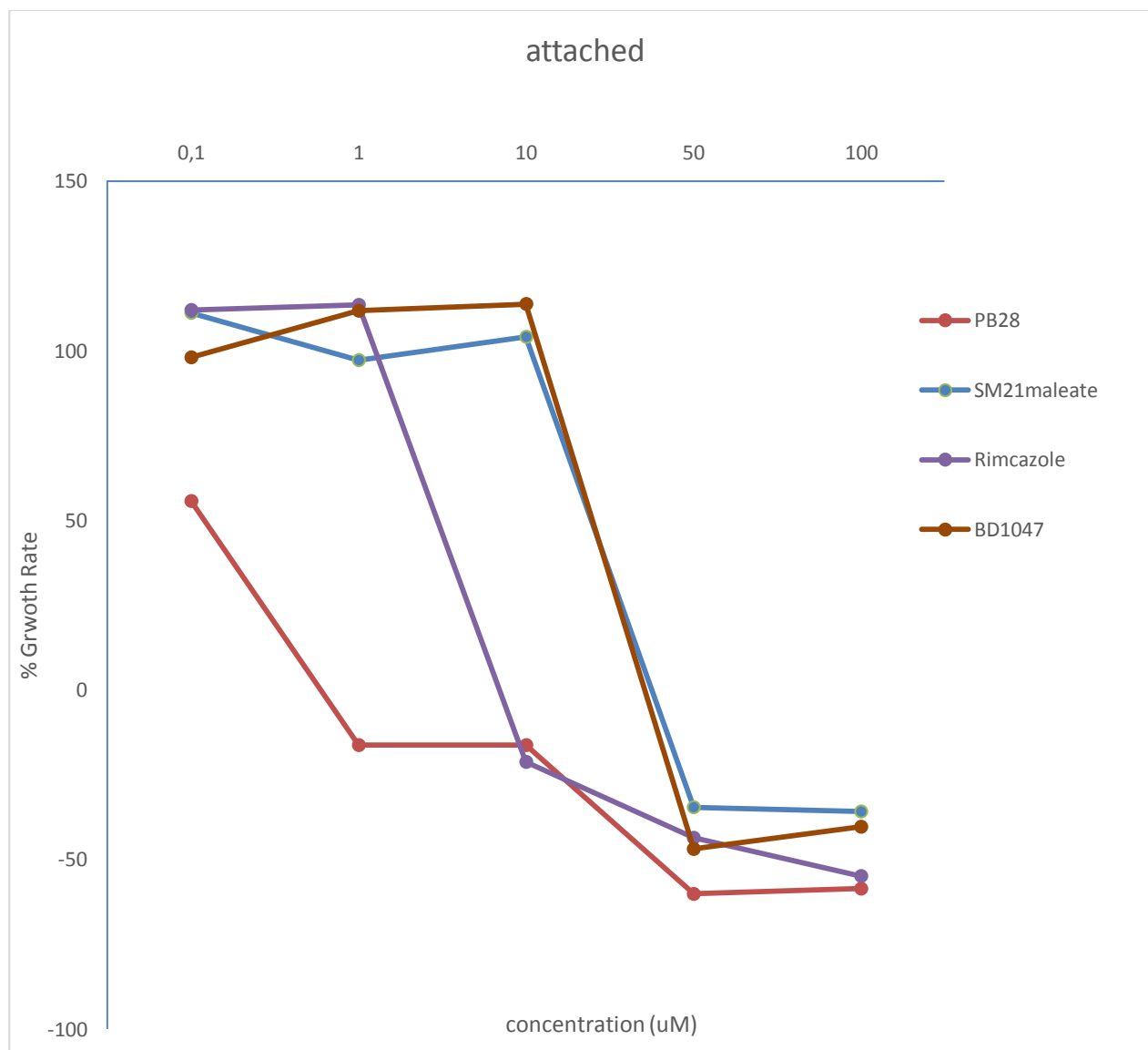
Εικόνα 20 : Οι χημικές δομές των σ προσδετών που μελετήθηκαν.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας των σ προσδετών έναντι των δύο ανθρώπινων κυτταρικών σειρών παρουσιάζονται στους πίνακες 4.1 και 4.2 . Φαίνεται ότι το PB-28 είναι το πιο δραστικό μόριο, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, για την κυτταρική σειρά Attached 021013 (GI50: 0,2μM). Σημαντική κυτταροτοξική δράση παρουσιάζουν επίσης και οι ουσίες P5-NH Maleate και FP5-NH Maleate με GI50 αντίστοιχα 3,7 μM και 4,1 μM.

Για την κυτταρική σειρά AsPC1, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, μεγαλύτερη δραστικότητα παρουσιάζουν τα μόρια P5-NH Maleate, FP5-NH Maleate και PB28 Dichydrochloride με GI50 αντίστοιχα 4,9 μM και 4,6 μM και 6,3 μM.



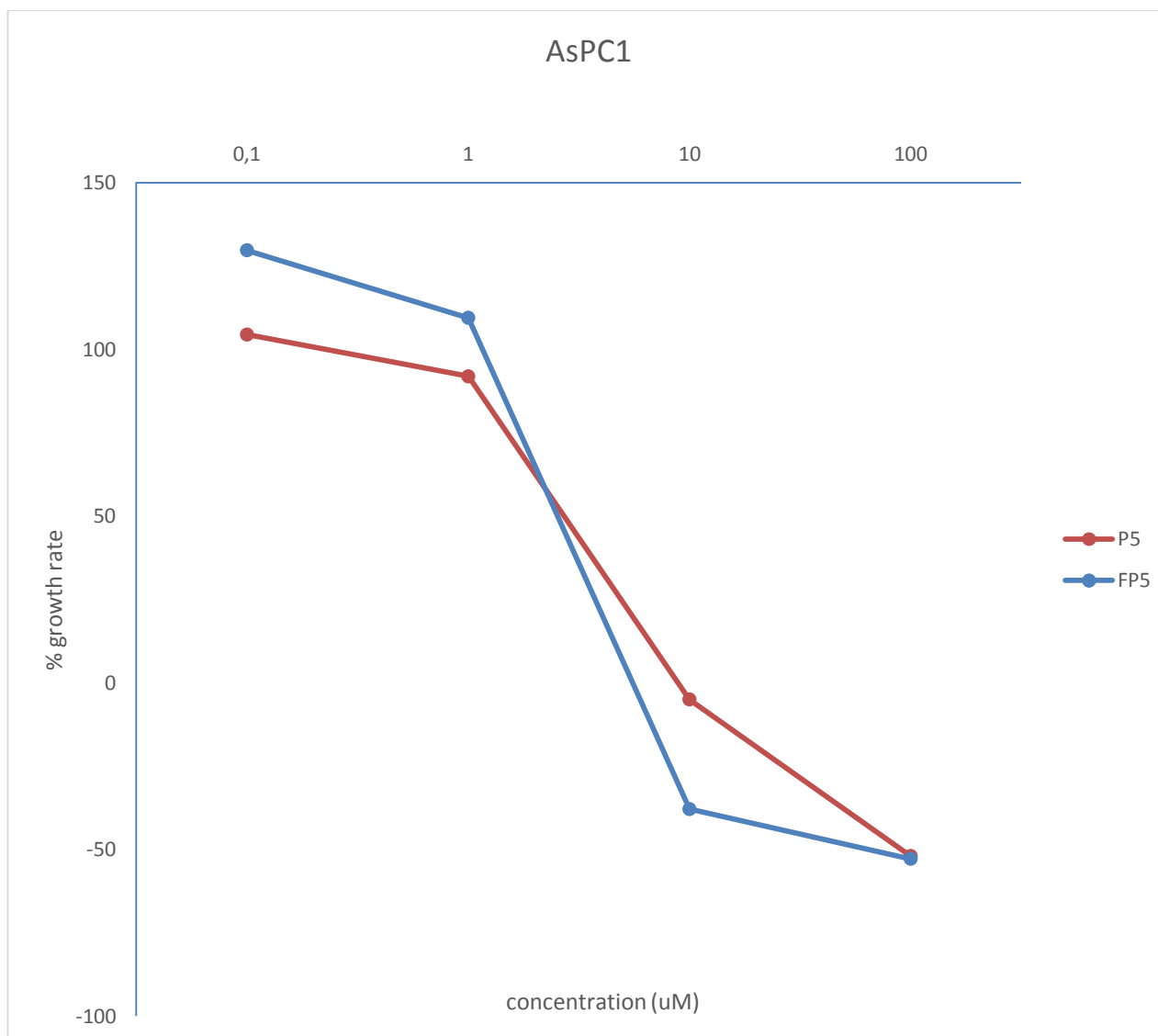
Εικόνα 21: Καμπύλες κυτταρικής αύξησης της πρωτογενούς παγκρεατικής καρκινικής σειράς Attached 021013 μετά από επώαση με τις ουσίες FP5-NH Maleate και P5-NH Maleate . Η υψηλότερη συγκέντρωση ήταν 100μl και η χαμηλότερη 0,1μl. Τα ποσοστά ανάπτυξης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της τεχνικής της σουλφοροδαμίνης-β (SRB). Τα σημεία αποτελούν την μέση τομή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



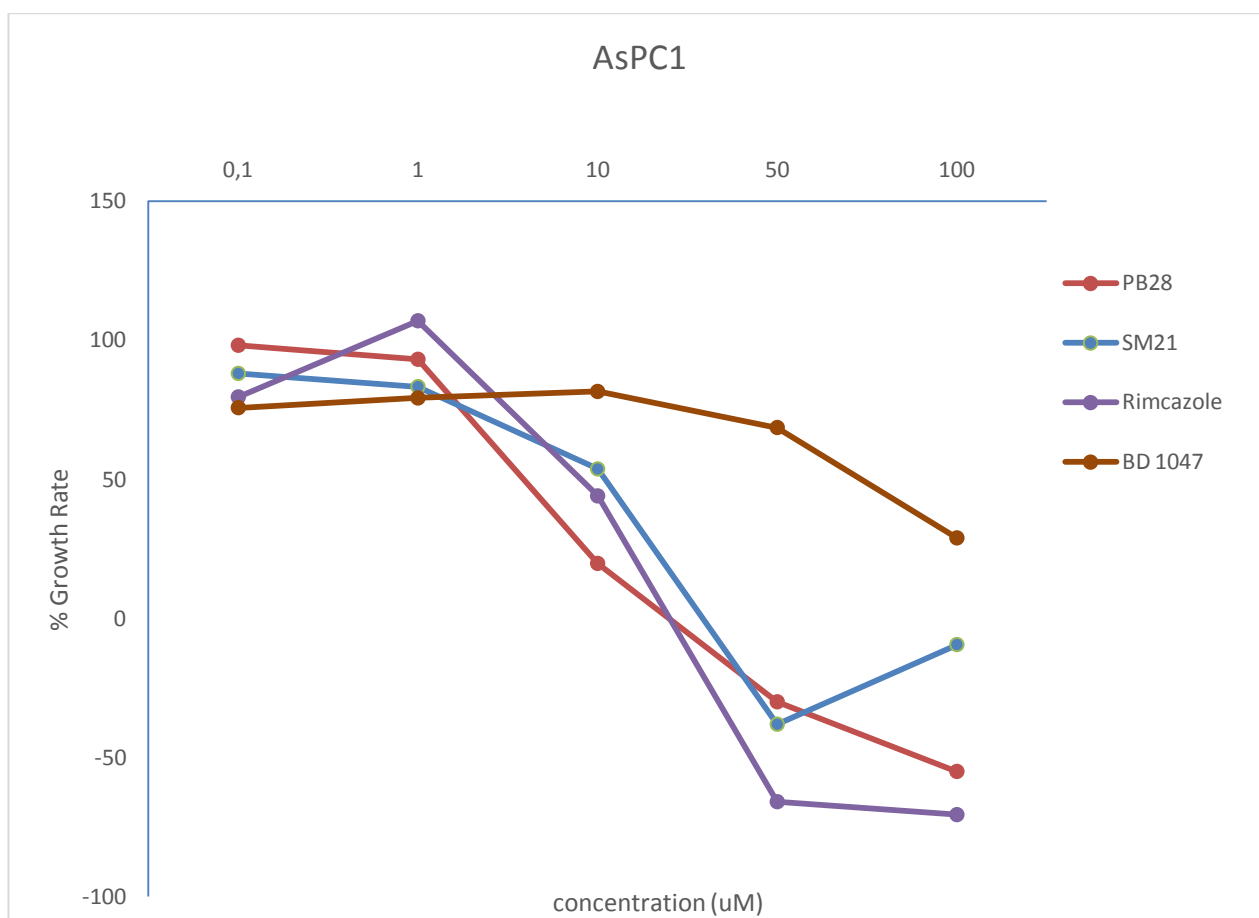
Εικόνα 22: Καμπύλες κυτταρικής αύξησης της πρωτογενούς παγκρεατικής καρκινικής σειράς *Attatced 021013* μετά από επώαση με τις ουσίες *PB28 Dichydrochloride*, *Rimcazole Dichydrochloride*, *SM-21 Maleate* και *BD- 1047*. Η υψηλότερη συγκέντρωση ήταν 100μl και η χαμηλότερη 0,1μl. Τα ποσοστά ανάπτυξης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της τεχνικής της σουλφοροδαμίνης-β (SRB). Τα σημεία αποτελούν την μέση τομή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Προσδέτης	GI50 (μM)	TGI (μM)	LC50 (μM)
P5	3,7	6,6	9,5
FP5	4,1	6,7	9,4
PB-28	0,2	0,8	40,8
Rimcazole	5,2	8,6	78,6
SM-21	25,6	40	54,5
BD-1047	25,9	38,3	50,8

Πίνακας 9: Η *in vitro* αντικαρκινική δράση έξι προσδετών των σ υποδοχέων για την πρωτογενή παγκρεατική καρκινική σειρά Attatced 021013, με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης- β, όπως περιγράφεται από το Εθνικό ίδρυμα καρκίνου (National Cancer Institute, NCI). Υπολογίστηκαν τρεις παράμετροι: αναστολή της ανάπτυξης (GI50), κυτταροστατικότητα (TGI) και κυτταροτοξικότητα(LC50).



Εικόνα 23: Καμπύλες κυτταρικής αύξησης της εγκαθιδρυμένης παγκρεατικής καρκινικής σειράς AsPC1 μετά από επώαση με τις ουσίες P5-NH Maleate και FP5-NH Maleate. Η υψηλότερη συγκέντρωση ήταν 100μl και η χαμηλότερη 0,1μl. Τα ποσοστά ανάπτυξης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της τεχνικής της σουλφοροδαμίνης-β (SRB). Τα σημεία αποτελούν την μέση τομή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 24: Καμπύλες κυτταρικής αύξησης της εγκαθιδρυμένης παγκρεατικής καρκινικής σειράς AsPC1 μετά από επώαση με τις ουσίες PB28 Dichydrochloride, Rimcazone Dichydrochloride, SM-21 Maleate και BD- 1047. Η υψηλότερη συγκέντρωση ήταν 100μl και η χαμηλότερη 0,1μl. Τα ποσοστά ανάπτυξης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της τεχνικής της σουλφοροδαμίνης-β (SRB). Τα σημεία αποτελούν την μέση τομή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Προσδέτης	GI50 (μM)	TGI (μM)	LC50 (μM)
P5	4,9	9,5	96,2
FP5	4,6	7,7	58,8
PB-28	6,3	25,8	89,8
Rimcazole	9,1	26	44,2
SM-21	11,6	33,4	55,2
BD-1047	73,4	>100	>100

Πίνακας 10: Η *in vitro* αντικαρκινική δράση έξι προσδετών των σ υποδοχέων για την εγκαθιδρυμένη παγκρεατική καρκινική σειρά AsPC1, με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης- β, όπως περιγράφεται από το Εθνικό ίδρυμα καρκίνου (National Cancer Institute, NCI). Υπολογίστηκαν τρεις παράμετροι: αναστολή της ανάπτυξης (GI50), κυτταροστατικότητα (TGI) και κυτταροτοξικότητα(LC50).

4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι σ υποδοχείς, αρχικά προτάθηκαν ως υποκατηγορία των οπιοειδών υποδοχέων. Αργότερα, όμως, προσδιορίστηκαν σαν μία ξεχωριστή οντότητα υποδοχέων λόγω της ασυνήθιστης ικανότητάς τους να συνδέονται σε μία μεγάλη ποικιλία φαρμάκων. Σήμερα, είναι γνωστές δύο υποκατηγορίες των υποδοχέων αυτών, οι σ1 και οι σ2. Μελέτες υποδηλώνουν ότι σχετίζονται με νευροψυχιατρικές διαταραχές, όπως είναι η σχιζοφρένεια, η κατάθλιψη και το Alzheimer, αλλά φαίνεται πως και οι δύο υπερεκφράζονται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπου η συγκέντρωση των σ2 δεκαπλασιάζεται. Εμφανίζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μαστού, του προστάτη, και της ουροδόχου κύστεως.

Πλήθος μελετών δείχνει ότι οι σ2 υποδοχείς υπερεκφράζονται επίσης και στον παγκρεατικό καρκίνο, τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε όγκους και ιδιαίτερα στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Η απόδειξη ήρθε με τη χρήση σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα του SW-120, που επιβεβαίωσε τον εντοπισμό του υποδοχέα στα μεμβρανικά συστατικά των κυττάρων.

Μέχρι τώρα όμως κανείς δεν έχει διαπιστώσει υπερέκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος, σε πρωτογενείς όγκους ασθενών ή σε ανθρώπινα ξενομοσχεύματα σε ποντικούς, με οποιαδήποτε μέθοδο in vivo ή in vitro.

Εκτός από τη διαφορετική ιστική κατανομή, οι δύο υποδοχείς παρουσιάζουν και διαφορές ως προς τη φαρμακολογική λειτουργία. Μέχρι τώρα, δεν έχουν βρεθεί ακόμα ενδογενείς προσδέτες που να εμφανίζουν εκλεκτικότητα για αυτούς τους υποδοχείς. Αντιθέτως, έχουν βρεθεί πάρα πολλοί εξωγενείς προσδέτες με μεγάλη χημική ετερογένεια, που παρόλο που έχουν υψηλή συγγένεια προς τους υποδοχείς, συνήθως δεν είναι ιδιαίτερα εκλεκτικοί.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η έκφραση των σ υποδοχέων σε παγκρεατικούς όγκους ασθενών και σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στους καρκινικούς ιστούς παρατηρούμε αυξημένη έκφραση τόσο των σ1 όσο και των σ2 υποδοχέων σε σχέση με τον παρακείμενο μη καρκινικό ιστό, με εξαίρεση το δείγμα P3. Η υπερέκφραση των σ υποδοχέων στους καρκινικούς ιστούς προσδίδει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον στα μόρια

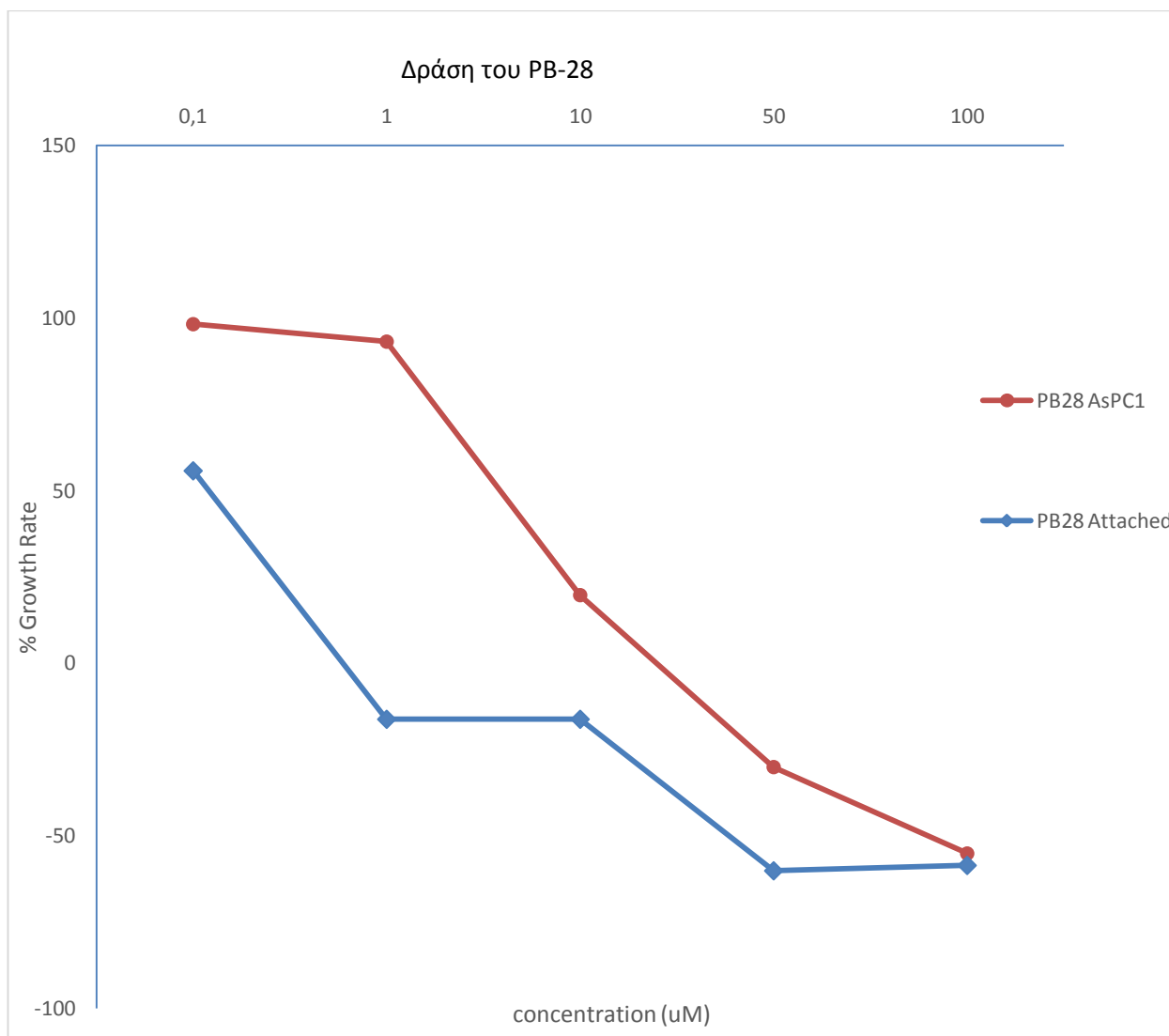
αυτά και τους δίνει σημαντική θέση για τη μελλοντική αντιμετώπιση του καρκίνου. Βέβαια, αυτά είναι τα πρώτα πειράματα και η τελική αξιολόγηση βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη.

Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι σε όλες τις παγκρεατικές καρκινικές σειρές εκφράζεται και ο σ1 και ο σ2 υποδοχέας. Η έκφραση του σ1 υποδοχέα εμφανίζεται αυξημένη στις καρκινικές σειρές AsPC1 και MiaPaca σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα μάρτυρες (ινοβλάστες). Τέλος, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του σ2 υποδοχέα έναντι του σ1 στα 021013 Attached και στους ινοβλάστες.

Ξέρουμε ότι τα Attached και floating προέρχονται από τον ίδιο όγκο, και ξέρουμε επίσης ότι παρουσιάζουν διαφορές στον τρόπο ανάπτυξής τους, άλλα προσκολλώνται στην επιφάνεια ανάπτυξης και άλλα όχι. Αυτό δεν μας κάνει εντύπωση, καθώς είναι γνωστό ότι κανένας όγκος δεν μπορεί να είναι ομοιογενής, αλλά αποτελείται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων ενώ πολλές φορές ακόμα και ο ίδιος τύπος κυττάρων μπορεί να εμφανίσει και τους δύο τρόπους ανάπτυξης (semi-attached). Έχοντας αυτά ως δεδομένο, μας ενδιαφέρει να δούμε αν παρουσιάζουν επιπλέον διαφορά ως προς την έκφραση των σ υποδοχέων. Όντως, τα attached εμφανίζουν αυξημένη έκφραση σ1 (41,6) σε σχέση με τα Floating (32,1) και πολύ πιο αυξημένη έκφραση σ2 (403,7) σε σχέση με τα Floating (34,9) όπως δείχνει ο πίνακας της σελ.66. Επίσης, αφού εκφράζουν διαφορά έκφρασης σε μόρια σημαντικά για μελλοντική θεραπεία, πιθανά τα Floating να αποδειχτεί τελικά ότι είναι πιο ανθεκτικά στη θεραπεία (μικρότερη έκφραση των πρωτεϊνών -στόχων), κάτι που δεν θα μας έκανε εντύπωση καθώς κατά την προσπάθεια ανάπτυξης κυτταρικής σειράς, είναι πιθανό να καταφέρνουν να επιβιώσουν τα πιο ανθεκτικά-επιθετικά κύτταρα και όχι τα πιο "ευαίσθητα".

Οι ουσίες *PB28 Dichydrochloride*, *P5-NH Maleate* και *FP5-NH Maleate* παρουσιάζουν ικανοποιητική κυτταροτοξική δράση, και ανοίγουν ένα νέο ορίζοντα έρευνας στην αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου. Όπως φαίνεται στους πίνακες 9 και 10, το Pb-28 είναι πιο δραστικό για την κυτταρική σειρά Attached σε σχέση με την Floating. Επίσης, φαίνεται ότι εμφανίζει εκλεκτικότητα στον σ2 υποδοχέα (σελ. 38), με K_i για τον σ2= 0,8 και για τον σ1= 27,3 (πίνακας 4). Ήταν αναμενόμενο, λοιπόν, να είναι πιο δραστικό για τα Attached, καθώς αυτά εμφανίζουν μεγαλύτερη έκφραση σ2 υποδοχέα (τετραπλάσια). Επίσης, επιβεβαιώνεται και η βιβλιογραφία για την εκλεκτικότητα, καθώς οι δύο κυτταρικές σειρές έχουν σχεδόν ίδια έκφραση σ1 υποδοχέα, και οποιαδήποτε διαφορά στη δράση της ουσίας οφείλεται αποκλειστικά στον σ2 υποδοχέα. Σίγουρα, όμως, απαιτούνται

πολλές δοκιμές ακόμα σε περισσότερες κυτταρικές σειρές, πριν αποκτήσει κλινική εφαρμογή μια ανάλογη θεραπεία.



Εικόνα 25: Συγκριτικές καμπύλες κυτταρικής αύξησης της εγκαθιδρυμένης παγκρεατικής καρκινικής σειράς AsPC1 και της πρωτογενούς 021013 Attached, μετά από επώαση με την ουσία PB28 Dichydrochloride. Η υψηλότερη συγκέντρωση ήταν 100μl και η χαμηλότερη 0,1μl. Τα ποσοστά ανάπτυξης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της τεχνικής της σουλφοροδαμίνης-β (SRB). Τα σημεία αποτελούν την μέση τομή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.3 Μελλοντικές προοπτικές

Η απόδειξη της υπερέκφρασης των σ υποδοχέων σε καρκινικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος είναι ακόμα σε πρώιμα στάδια και απαιτεί επιπλέον μελέτη. Με την επίτευξη όμως αυτού του στόχου, θα ανοίξουν νέοι δρόμοι για την διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου, καθώς οι σ υποδοχείς θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως μόρια στόχοι για απεικονιστικές μεθόδους (π.χ. PET) είτε ως βιοδείκτες που θα στοχεύουν επίσης στην έγκαιρη διάγνωση αλλά και στην αξιολόγηση της πορείας της νόσου, της θεραπείας και του σταδίου εξέλιξης. Θα μπορέσει συνεπώς να μειωθεί η μεγάλη θνητότητα που παρουσιάζει η νόσος, και οφείλεται στη διάγνωση της όταν είναι ήδη σε προχωρημένο στάδιο.

Πρόκληση αποτελεί η ανάπτυξη νέων φαρμάκων-προσδετών που θα στοχεύουν αποκλειστικά στα καρκινικά κύτταρα, μειώνοντας της γενικευμένες παρενέργειες των τωρινών τρόπων θεραπείας αλλά και ο συνδυασμός των προσδετών με ήδη υπάρχοντα φάρμακα, προκειμένου να βελτιωθεί η ανταπόκριση των ασθενών.

Πολλά από τα παραπάνω βρίσκονται σε εξέλιξη αλλά απαιτείται επιπλέον μελέτη της έκφρασης και του ρόλου των σ υποδοχέων σε περισσότερους τύπους καρκίνου.

Με έμφαση σε καρκίνους με υψηλή συχνότητα και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, όπως ο ορθοκολικός καρκίνος, έχουν ήδη ξεκινήσει εργαστήριο παρόμοιες μελέτες σε όγκους ασθενών. Κάποια προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δείχνουν την υπερέκφραση των σ_2 υποδοχέων σε υψηλά ποσοστά και σε αυτόν τον τύπο καρκίνου.

Τέλος, μελέτες προς την κατεύθυνση της κλινικής χρησιμότητας των προσδετών των υποδοχέων αυτών βρίσκονται σε εξέλιξη τόσο διεθνώς όσο και στο εργαστήριο. Είναι ιδιαίτερης σημασίας να δειχθεί η κλινική χρησιμότητα των ουσιών αυτών, καθώς ο απώτερος σκοπός είναι η ανάπτυξη νέων, πιο δραστικών και με λιγότερη τοξικότητα θεραπευτικών προσεγγίσεων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>***
- 2. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta: American Cancer Society; 2015***
- 3. Torre et al. (2015), CA Cancer J CLIN, 65:87-108***
- 4. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx***
- 5. <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>***
- 6. <http://www.cancer.gov/cancertopics/causesprevention/genetics/genetic-testing-fact-sheet>***
- 7. <http://www.cancer.gov/cancertopics/causes>***
- 8. Kasfikis et al. (2008), ΣTOMA, 36 : 241 – 248***
- 9. http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/prevention/overview/patient/page3#_357***
- 10. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer#main>***
- 11. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/>***

12. <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>
13. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
14. 3rd Anticancer agent development congress, 18-19 May 2015, Development and characterization of patient derived pancreatic adenocarcinoma xenografts, Tsimplouli C., Sereti E., Karagiannelou T., Dimas K.
15. Shi Q et al. (1999), *Clin Cancer Res*, 5(11): 3711-3721
16. <http://gleesonbiology.pbworks.com/w/page/7537859/C9>
17. <http://oregonstate.edu/instruct/bb331/lecture14/ras3.html>
18. <http://www.intechopen.com/books/malignant-mesothelioma/the-role-of-cyclooxygenase-2-epidermal-growth-factor-receptor-and-aromatase-in-malignant-mesotheliom>
19. <https://gicancer.org.au/gi-cancer/what-is-gastro-intestinal-cancer/>
20. <http://www.cancer.org/cancer/gastrointestinalstromaltumorgist/detailedguide/gastrointestinal-stromal-tumor-signs-symptoms>
21. <http://anatomybodyblog.com/7166-digestive-system-tract>
22. Papachristou GI, et al. (2005), *Clin Gastroenterol Hepatol*; 3(5):475-81.
23. <https://gicancer.org.au/gi-cancer/what-is-gastro-intestinal-cancer/>

24. <https://gicancer.org.au/gi-cancer/what-is-gastro-intestinal-cancer/>
25. Warshaw AL et al., (1990) *Ann Surg*, 212 (4): 432-43; discussion 444-5, 1
26. <http://pathology.jhu.edu/pc/DiagStaging.php?area=di>
27. Rohe HJ et al. (2009), *Pharmacol Ther*, 121:14-9.
28. SC Larsson (2012), *British Journal of Cancer*, 106, 603 – 607
29. <http://pathology.jhu.edu/pc/BasicCauses.php?area=ba>
30. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/index>
31. Choi SR, et al. (2001), *Nucl Med Biol*, 28:657–66.
32. <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging/staging-fact-sheet>
33. <http://pathology.jhu.edu/pc/DiagStaging.php?area=di>
34. Martin WR et al. (1976), *J Pharmacol Exp Ther*, 197, 517–532
35. Debonnel G, de Montigny C: (1996) *Life Sci*, , 58, 721–734
36. Skuza G, Wędzony K,(2004), *Pharmacopsychiatry*, 37, Suppl 3, S183–188.
37. Quirion R, et al. (1992), *Trends Pharmacol Sci*, 13, 85–86.
38. Booth RG, Owens et al. (1999), *Brain Res*, 837:95–105
39. Seth P et al. (1998), *J Neurochem*, 70, 22–31.
40. Skuza G, Rogóz Z. (2006) , *pharmacological report*, 626-635.

41. Langa F. et al. (2003), *Eur J Neurosci*, 18:88–2196
42. Colabufo et al. (2004), *Epub* , 370(2):106-13
43. Hanner et al. (1996), *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:8072–7.
44. Pankaj Seth et.al. (1997),*biochemical and biophysical research communications*, 241, 535–540
45. Aydar E, Palmer C, Klachko V, Jackson M. *Sigma receptor as a ligand-modulated auxiliary potassium channel subunit. Neuron* 2002;34:399–410.
46. Seth P et al (2001), *Biochim Biophys Acta*, 1540:59–67.
47. Wang LM et al. (2004), *Cancer Res* , in press
48. Xu J et al. (2011), *Nat Commun*, 2:380
49. Hellewell SB et al. (1994), *Eur J Pharmacol*, 268:9–18
50. Zamora PO et al. (1998), *Life Sci.*, 63:1611–1618.
51. Mach RH et al. (1997), *Cancer Res.*, 57:156–161.
52. John CS et al. (1995), *Life Sci*, 56:2385–92.
53. Bem WT et al. (1991), *Cancer Res*, 51:6558–62.
54. Crawford KW et al. (2002) *Cancer Res*, 62:313–22.
55. Vilner BJ et al. (1995), *Cancer Res*, 55:408–13.

56. Crawford KW, Bowen WD (2002), *Cancer Res*, 62:313–22.
57. http://www.aesociety.org/areas/one_de.php
58. https://www.google.com/search?q=%CF%83%CF%85%CF%83%CE%BA%CE%B5%CF%85%CE%AE+%CE%B7%CE%BB%CE%B5%CE%BA%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CF%8C%CF%81%CE%B7%CF%83%CE%B7%CF%82+%CF%83%CF%84%CE%B7%CF%83%CE%B9%CE%BC%CE%BF&biw=1366&bih=657&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIyM-VgdbHxwIVyrwaCh2cGwjD#tbm=isch&q=gel+electrophoresis+cassette&imgsrc=cTuxrsWvO4Y_vM%3A
59. https://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/manual_apoptosis.pdf
60. https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/colorimetric-protein-assays/bca-protein-assays.html?gclid=CNy5stmIyccCFUWVGwodXLYPng&s_kwid=AL!3652!3!68921977574!b!!g!!%2Bbca%20%2Bassays&ef_id=VYXA6gAAAUyNh3pg:20150827135804:s
61. <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-assay-data-analysis.html>
62. Bertold J. et al. (2000), *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 92:900–911
63. Bertold J. et al. (1995), *The Journal of Neuroscience*, 75(1):117-134
64. John CS et al. (1994), *Med Chem*
65. Kashiwagi et al. (2007), *Molecular Cancer*, 10.1186/1476-4598-6-48
66. Bertold et al. (1995), *The Journal of Neuroscience*, 75(1):117-134

67. http://biowiki.ucdavis.edu/Biochemistry/Transport_and_Kinetics/Enzyme_Inhibition/Agonist_and_Antagonist_of_Ligand_Binding
68. *Sigma receptors in oncology: Therapeutic and diagnostic applications of sigma ligands* Waarde AV, Rybczynska AA, Ramakrishan NK, Ishiwata K, Elsinga PH, Dierckx RACurr Pharmaceut Des, 2010
69. Kashiwagi et al. (2007), Mol Cancer
70. Crawford KW, Bowen WDA(2002), Cancer Res, 62(1):313-22.
71. *Sigma -2 receptor ligands and their perspectives in cancer diagnosis and therapy* , Yunsheng Huang et al , Medicinical Research Reviews
72. *Sigma receptors and cancer: Possible involvement of ion channels* Advar E, Palmer CP, Djamgoz MBA Cancer Res, 2004
73. *The sigma-2 receptor agonist PB28 inhibits calcium release from the endoplasmic reticulum on SK-N-SH neuroblastoma cells* Cassano G, Gasparre G, Contino M, Niso M, Berardi F, Perrone R, Colabufo NA Cell Calcium, 2006
74. *Sigma-2 ligands induce tumour cell death by multiple signaling pathways* Zeng C, Rothfuss J, Zhang J, Chu W, Vangveravong S, Tu Z, Pan F, Chang KC, Hotchkiss R, Mach RH Br J Cancer, 2012
75. *Use of multifunctional sigma-2 receptor ligand conjugates to trigger cancer-selective cell death signaling* Spitzer D, Simon PO, Kashiwagi H, Xu J, Zeng C, Vangveravong S, Zhou D, Chang K, McDunn JE, Hornick JR, Goedegebuure P, Hotchkiss RS, Mach RH, Hawkins WG Cancer Res, 2012
76. http://www.readcube.com/articles/10.1002%2Fmed.21297?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED_NO_CUSTOMER

77. Skuza G, Wêdzony K: *Behavioral pharmacology of sigma-ligands. Pharmacopsychiatry*, 2004, 37, Suppl 3, S183–188.
78. Matsumoto RR, Bowen WD, Tom MA, Vo VN, Truong DD, De Costa BR: *Characterization of two novel sigma receptor ligands: antidystonic effects in rats suggests sigma receptor antagonism. Eur J Pharmacol*, 1995, 280, 301–310.)
79. Nicola Antonio Colabufo et al. *Antiproliferative and cytotoxic effects of some σ_2 agonists and σ_1 antagonists in tumour cell lines Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2004) 370: 106–113
80. Ebru Aydar,; Sigma Receptors and Cancer: Possible Involvement of Ion Channels; *CANCER RESEARCH* 64, 5029–5035, August 1, 2004
81. Hayashi T, Su TP. σ_1 receptors (σ_1 binding sites) from raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:718–25.)
82. Monnet FP, et al. (1992), *J Pharmacol Exp Ther*, 261:123–30.
83. Crawford et al. (2002), *Eur J Pharmacol* , 443:207–9
84. Palmer et al., (2007), *Cancer Res*, 67(23):11166-75.
85. Megalizzi et al. (2010), *Wiley Interscience* , 32(2):410-27
86. *Sigma receptors: Chemistry, cell biology and clinical implications Ganapathy V, Ganapathy ME, Inoue K* 2007
87. Thomas et al. (1990), *Life Sci*

88. Hiroyuki Kashiwagi *et al.* (2009), *Journal of Translational Medicine*, 10.1186/1479-5876-7-24
89. John R. *et al.* (2012), *Surgery*. 152(3 0 1): S152–S156
90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7589164>
91. Rae R. Matsumoto *et al.* (1995), *European Journal of Pharmacology*, 301-310
92. Mach RH, *et al.* (1999), *Life Sci*, 64:PL131-137.
93. Matsumoto *et. All* , (1995), *European journal of pharmacology* 280:301-310
94. Riganas S.*et. all*, 2012 , *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (20)3323-3331
95. <http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=163773#.VebPNZeJp-w>
96. Azzariti *et all*, 2006 , *Molecular Cancer Therapeutics*
97. <http://www.scbt.com/datasheet-204289-sm-21-maleate.html>
98. <http://www.axonmedchem.com/product/1215>
99. <http://www.jeccr.com/content/31/1/41>
100. Mireille Happy *et all* , 2015 , *Biochemical and Biophysical research communications* 456 (683- 688)
101. <http://www.firstwordpharma.com/node/61647#axzz3kZu91CrD>
102. M. Hafner *et al.* (2013) *Cell death & disease* , e818; doi:10.1038/cddis.2013.361
103. <http://www.scbt.com/datasheet-204289-sm-21-maleate.html>

- 104.** *Tong, Frances Poyen (2010), eScholarship University of California,*
- 105.** *Aren van Waarde et all. 2014, Biochimica et Biophysica Acta , BBAMEM-81671; 12; 4C: 4*
- 106.** *Tsung-Ping Su et.all (2010), Trends in pharmacological sciences:557–566*
- 107.** *Pierre Casellas et all. (2004), Anticancer drugs: 15:113–118*
- 108.** *Nicholson H. et all, (2015), Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 15; 354(2). DOI:10.1124/jpet.115.224105*
- 109.** *Slimizu I. (2000), British Journal of pharmacology, 131(3): 610–616*
- 110.** *Michał Skrzycki and Hanna Cieczot (2013), Journal of Receptors and Signal Transduction, 33(5): 313–318*
- 111.** *Teruo Hayashi et al. (2011),Expert Opinion on Therapeutic Targets, 15:5, 557-577*
- 112.** *Maurice T, Su TP.(2009), Pharmacol Ther, 124:195-206*
- 113.** *Hayashi T, Su TP. (2004), CNS Drugs, 18:269-84*
- 114.** *Yao H et al.(2010), Blood, 115:4951-62*
- 115.** *Kulkarni SK, Dhir A. (2009), Expert Rev Neurother, 9:1021-34*
- 116.** *Palmer CP et al.(2007), Cancer Res, 67:11166-75*
- 117.** *Hayashi T, Su TP. (2007), Cell, 131:596-610*

118. *Schroder M, Kaufman RJ. (2005), Annu Rev Biochem, 74:739-89*

119. *Xu J, et al.(2011), Nature Comm, 2:380.*

120. Crudden G et al. (2006), J Pharmacolo Exp Ther , 316:448-55.

121. John R. Hornick et al.(2012), Surgery, 152:S152-6

122. Mifsud W, Bateman A. (2002), Genome Biol, 3:RESEARCH0068

123. Ghosh K. et al. (2005), Biochemistry, 44:16729-36.

124. Rohe HJ et al. (2009), Pharmacol Ther, 121:14-9.