



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**IN VIVO ΚΑΙ IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ
ΑΔΑΜΑΝΤΥΛΟ ΠΙΠΕΡΟΖΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ**

Σταυρούλα Χατήρα

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δήμας Κωνσταντίνος: Επίκουρος Καθηγητής του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία: Επίκουρη Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζωίδης Γρηγόρης: Επίκουρος Καθηγητής του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

Περίληψη

Εισαγωγή: Δύο καινοτόμα 1- (2-αρυλο-2-αδαμαντυλ) παράγωγα πιπεραζίνης συντέθηκαν στη Σχολή Επιστημών Υγείας, στο τομέα της Φαρμακευτικής, τμήμα Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και αξιολογήθηκαν *in vitro* για τις αντικαρκινικές ιδιότητες τους ενάντια σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa , MDA MB 231 που προέρχονται από καρκίνο του μαστού, καρκινικά κύτταρα παγκρέατος MIA PaCa2 και NCI H1975 κύτταρα του μη μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων.

Σκοπός: Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματική κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση των εν λόγω ενώσεων, πραγματοποιήσαμε πειράματα κυτταροτοξικότητας έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών από διαφορετικά είδη καρκίνου. Στη συνέχεια με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν έγινε μία πρώτη προσπάθεια κατάταξης των ενώσεων με βάση τον μηχανισμό δράσης τους, ενώ τέλος προχωρήσαμε στη μελέτη της συγκεντρώσεως σίγμα υποδοχέων στις καρκινικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο οι δύο ενώσεις δρουν ως σίγμα προσδέτες.

Μεθοδολογία: Η αντιπολλαπλασιαστική δράση των δύο ενώσεων ελέγχθηκε με την εφαρμογή πειραμάτων κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β έναντι έντεκα καρκινικών κυτταρικών σειρών. Η εκτίμηση του μηχανισμού δράσης με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τεχνική SRB έγινε με τη χρήση του αλγορίθμου COMPARE. Η μελέτη της παρουσίας ή μη σίγμα υποδοχέων στις μελετώμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές έγινε με τη μέθοδο της ανοσοσύπωσης Western Blot.

Αποτελέσματα: Συγκριτικά η δράση του παράγωγου της 1-(2-αρυλο-2-αδαμαντυλο)πιπεραζίνης(FP5) παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης σε σχέση με της 1- (2-αρυλο-2-αδαμαντυλο)πιπεραζίνης (P5), αφού και στις έντεκα κυτταρικές σειρές η τιμή της παραμέτρου GI50 είναι μικρότερη από 10μΜ. Όμοια με το P5, η κυτταροτοξική δράση του φαρμάκου είναι μέτρια με εξαίρεση τις κυτταρικές καρκινικές σειρές SKmel28 και MB231 όπου σε αυτές παρουσιάζει βελτιωμένη κυτταροτοξική δράση. Η μελέτη της δράσης του P5 με τον αλγόριθμο COMPARE έδειξε παρόμοιο μηχανισμό δράσης με ουσίες που δρουν ως αλκυλιωτικοί παράγοντες, ενώ ο μηχανισμός δράσης του FP5 παρέμεινε ασαφής αφού εμφάνισε ομοιότητα τόσο με ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος, όσο και με ανθρακυκλίνες και αλκυλιωτικούς παράγοντες. Τέλος, η παρουσία σίγμα υποδοχέων δεν φάνηκε υψηλότερη στις καρκινικές σειρές στις οποίες οι ενώσεις εμφανίζουν αποτελεσματικότερη δράση, οπότε η υπόθεση πως τα φάρμακα δρουν ως πιθανοί σίγμα συνδέτες τίθεται υπό αμφισβήτηση.

Abstract

Introduction: Two novel 1-(2-aryl-2-adamantyl)piperazine derivatives have been synthesized at the School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Athens and evaluated in vitro for their antitumor properties against HeLa cervical carcinoma, MDA MB 231 breast cancer, MIA PaCa2 pancreatic cancer, and NCI H1975 non-small cell lung cancer.

Purpose: In order to confirm the effective cytotoxic and cytostatic activity of these compounds, we performed cytotoxicity experiments against cancer cell lines from different types of cancer. Subsequently, based on the results obtained, a first attempt was made to classify the compounds based on their mechanism of action, and finally we studied the concentration of sigma receptors in the cancer series used in the experiment to determine whether the two compounds act as sigma ligands.

Methodology: The antiproliferative activity of the two compounds was tested by cytotoxicity experiments using the sulforhodamine B method against eleven cancer cell lines. The evaluation of the mechanism of action based on the results obtained from the SRB technique was done using the COMPARE algorithm. The study of the presence or non-sigma receptors in the studied cancer cell lines was performed by the Western blot immunoblotting method.

Results: In comparison, the effect of FP5 exhibits greater growth inhibitory capacity than P5, since in all eleven cell lines the GI50 parameter is less than 10 μ M. Similar to P5, the cytotoxic activity of the drug is moderate, with the exception of the SKmel28 and MB231 cell lines in which they show improved cytotoxic activity. The study of P5 activity with the COMPARE algorithm showed a similar mechanism of action with substances acting as alkylating agents while the mechanism of action of FP5 remained unclear since it showed similarity with both folate antagonists and anthracyclines and alkylating agents. Finally, the presence of sigma receptors did not appear to be higher in the cancer sequences in which the compounds show more effective action, so the hypothesis that the drugs act as potential sigma ligands is questioned and further studies need to take place.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	3
Abstract.....	4
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Καρκίνος.....	7
1.1.2 Παθολογία του καρκίνου.....	7
1.1.3 Ταξινόμηση των όγκων.....	8
1.2 Αίτια του καρκίνου.....	8
1.3 Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων.....	9
1.3.1 Διαφορές φυσιολογικών-καρκινικών κυττάρων.....	10
1.4 Γονιδιακή προσέγγιση του καρκίνου.....	11
1.4.1 Ανάπτυξη του καρκίνου.....	12
1.5 Συχνότητα καρκινικών τύπων.....	13
1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου.....	14
2. Σίγμα υποδοχείς-συνδέτες.....	17
2.1 Διάκριση σίγμα υποδοχέων.....	17
2.2 Δομή και φυσιολογικός ρόλος σ1 υποδοχέων.....	18
2.3 Δομή και φυσιολογικός ρόλος σ1 υποδοχέων.....	19
2.4 Υποδοχέας σίγμα 2 και PGRMC1.....	20
2.5 Έκφραση των σίγμα υποδοχέων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και ιστούς.....	21
2.6 Προσδέτες σίγμα για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου.....	22
2.6.1 Οι ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	22
2.6.2 Πιθανός μηχανισμός δράσης.....	23
3. Μέθοδοι και υλικά.....	24
3.1 Χειρισμοί κυττάρων.....	24
3.2 Πείραμα κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β.....	26
3.3 Αλγόριθμος COMPARE.....	31
3.4 Πρωτόκολλο λύσης κυττάρων.....	31
3.5 BRADFORD.....	33
3.6 Western Blot.....	35
3.6.1 Παρασκευή διαλυμάτων.....	35
3.6.2 Ετοιμασία gel.....	37
3.6.3 Ετοιμασία για φόρτωση δειγμάτων.....	39
3.6.4 Στάδιο μεταφοράς της πρωτεΐνης στη μεμβράνη.....	39
3.6.5 Στάδιο του Block.....	40

4. Αποτελέσματα.....	41
4.1 Μελέτη της κυτταροτοξικής και αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των φαρμάκων P5 και FP5 με εφαρμογή του πειράματος κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β.....	41
4.2 Έλεγχος της παρουσίας σ1 και σ2 υποδοχέων στις καρκινικές κυτ/κες σειρές....	44
4.3 Εκτίμηση του μηχανισμού δράσης των φαρμάκων P5 και FP5.....	47
5. Συμπεράσματα.....	50
6. Βιβλιογραφία.....	51

1. Εισαγωγή

1.1 Καρκίνος

Υπάρχει ένα τίμημα για την ικανότητά μας να ανανεώνουμε και να επιδιορθώνουμε το σώμα μας. Οι προσεκτικά ρυθμιζόμενοι μηχανισμοί που ελέγχουν αυτές τις διεργασίες μπορεί να απορυθμιστούν, οδηγώντας σε καταστροφικές συνέπειες. Το σημαντικότερο νόσημα ανανέωσης των ιστών είναι ο καρκίνος. Στην Ευρώπη και στη Β. Αμερική ένας στους τέσσερις ανθρώπους πεθαίνει από καρκίνο. Καρκίνος (cancer), επομένως, μπορεί να προκληθεί από τον μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό οποιουδήποτε είδους κυττάρου του σώματος. Έτσι, υπάρχουν περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου, οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά στην συμπεριφορά τους και στην απόκρισή τους στις θεραπείες. Η ανανέωση των ιστών προϋποθέτει την ύπαρξη περίπλοκων μηχανισμών ελέγχου για τον συντονισμό της συμπεριφοράς κάθε ξεχωριστού κυττάρου με τις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Το κύτταρο πρέπει να διαιρείται όταν χρειάζονται νέα κύτταρα αυτού του είδους και να σταματά να διαιρείται όταν δεν χρειάζονται. Πρέπει να ζει όσο είναι απαραίτητο και να πεθάνει όταν πρέπει να πεθάνει. Πρέπει να διατηρεί τον κατάλληλο εξειδικευμένο χαρακτήρα και να καταλαμβάνει τη σωστή θέση χωρίς να ξεστρατίζει σε άλλες επικράτειες (Alberts et al. 2011).

1.1.2 Παθολογία του καρκίνου

Ένα από τα πιο σημαντικά ζητήματα στην παθολογία του καρκίνου είναι η διάκριση ανάμεσα στους καλοήθεις και τους κακοήθεις όγκους. Όγκος (tumor) ονομάζεται οποιαδήποτε μάζα κυττάρων σχηματίζεται από τον μη φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ένας καλοήθης όγκος (benign tumor), όπως μια κοινή κρεατοελιά, περιορίζεται στην αρχική του θέση, χωρίς να εισβάλλει στους γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς ή να εξαπλώνεται σε άλλες θέσεις του σώματος. Αντίθετα, ένας κακοήθης όγκος (malignant tumor) μπορεί να εισβάλλει στους γειτονικούς ιστούς και να εξαπλώνεται στο σώμα μέσω του κυκλοφορικού ή του λεμφικού συστήματος, φαινόμενο που ονομάζεται μετάσταση (metastasis). Μόνο οι κακοήθεις όγκοι αναφέρονται ως καρκίνοι και είναι επικίνδυνοι εξαιτίας της ικανότητάς τους να προκαλούν μεταστάσεις. Ενώ οι καλοήθεις όγκοι μπορούν να αφαιρεθούν χειρουργικά, η εξάπλωση των κακοήθων όγκων σε άλλες περιοχές του σώματος, μακριά από την αρχική θέση εμφάνισής τους, τους καθιστά ανθεκτικούς σε τοπικές θεραπείες.

1.1.3 Ταξινόμηση των όγκων

Τόσο οι καλοήθειες όσο και οι κακοήθειες όγκοι ταξινομούνται σύμφωνα με τον τύπο των κυττάρων από τα οποία προέρχονται. Οι περισσότεροι καρκίνοι κατατάσσονται σε μία από τις τρεις κύριες κατηγορίες: α) τα καρκινώματα, β) τα σαρκώματα και γ) τις λευχαιμίες και τα λεμφώματα. Τα **καρκινώματα** (carcinomas), στα οποία περιλαμβάνεται το 90% περίπου των καρκίνων του ανθρώπου, είναι κακοήθειες όγκοι επιθηλιακών κυττάρων. Τα **σαρκώματα** (sarcomas), που είναι σπάνια στους ανθρώπους, είναι συμπαγείς όγκοι συνδετικού ιστού των μυών, των οστών, των χόνδρων και ινωδών ιστών. Οι **λευχαιμίες** (leukemias) και τα **λεμφώματα** (lymphomas), που αποτελούν το 8% των κακοήθων όγκων, προέρχονται από κύτταρα του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος αντίστοιχα. Οι όγκοι κατατάσσονται επίσης σύμφωνα με τους ιστούς προέλευσής τους (π.χ. καρκίνωμα του πνεύμονα ή του μαστού) και τους τύπους των κυττάρων που εμπλέκονται. Αν και υπάρχουν πολλά είδη καρκίνου, μόνο λίγα από αυτά εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα. Κάθε χρόνο, στις Ηνωμένες Πολιτείες γίνεται διάγνωση περισσότερων από ένα εκατομμύριο περιπτώσεων καρκίνου και σημειώνονται περισσότεροι από 500.000 θάνατοι από καρκίνο. Οι καρκίνοι που εμφανίζονται στα 11 όργανα συνιστούν το 80% του συνόλου των περιστατικών καρκίνου. Οι τέσσερις πιο κοινοί τύποι καρκίνου, που αποτελούν περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις καρκίνου, είναι του προστάτη, του μαστού, των πνευμόνων και του παχέος εντέρου. Ο καρκίνος των πνευμόνων, ο πλέον θανατηφόρος τύπος καρκίνου, ευθύνεται για το 30% περίπου των θανάτων από καρκίνο (Geoffrey M. Cooper 2009).

1.2 Αίτια του καρκίνου

Η επιδημιολογία αναγνωρίζει αίτια του καρκίνου που μπορεί να προληφθούν. Οι ιοί δεν φαίνεται να παίζουν ρόλο στη μεγάλη πλειονότητα των καρκίνων του ανθρώπου: ο καρκίνος δεν είναι λοιμώδης νόσημα. Η επιδημιολογία, όμως, αποκαλύπτει και άλλους προδιαθεσικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η παχυσαρκία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου και η σχέση μάλλον είναι αιτιολογική. Ωστόσο, το σημαντικότερο περιβαλλοντικό αίτιο του καρκίνου είναι το κάπνισμα. Το κάπνισμα ευθύνεται σχεδόν για όλες τις περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα. Επίσης αυξάνει την επίπτωση αρκετών άλλων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης. Αν σταματούσε το κάπνισμα, οι θάνατοι από καρκίνο θα ελαττώνονταν περίπου κατά 30%. Καμιά άλλη πολιτική ή θεραπεία δεν θα μπορούσε να επηρεάσει τόσο πολύ τη θνητότητα από τον καρκίνο. Ο καρκίνος είναι γενετικό νόσημα: προκύπτει από παθολογικές μεταβολές στις πληροφορίες του DNA. Διαφέρει από άλλα γενετικά νοσήματα κατά το γεγονός ότι οι εμπλεκόμενες μεταλλάξεις είναι σωματικές (somatic mutations), δηλαδή συμβαίνουν σε διάσπαρτα μεμονωμένα κύτταρα του ώριμου σώματος, και διαφέρουν από τις μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς (germ-line mutations), που μεταβιβάζονται από τα γαμετικά κύτταρα από τα οποία αναπτύσσεται ολόκληρος ο πολυκύτταρος

οργανισμός.

Οι περισσότεροι παράγοντες που προδιαθέτουν την ανάπτυξη του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων χημικών καρκινογόνων και της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, είναι μεταλλαξιγόνοι: προκαλούν αλλαγές στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων του DNA. Ωστόσο, ακόμα και σε ένα περιβάλλον χωρίς καπνό, ραδιενέργεια ή άλλα επικίνδυνα εξωγενή μεταλλαξιγόνα, μεταλλάξεις συμβαίνουν αυθόρμητα με συχνότητα περίπου 10^{-6} ή 10^{-7} μεταλλάξεις ανά γονίδιο ανά κυτταρική διαίρεση, μια τιμή που καθορίζεται από τους βασικούς εγγενείς περιορισμούς της ακρίβειας της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA. Σε όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου συμβαίνουν περίπου 10^{16} κυτταρικές διαιρέσεις. Συνεπώς, κάθε γονίδιο του γονιδιώματος ενός ανθρώπου μπορεί να υποστεί μετάλλαξη περίπου σε 10^9 διαφορετικές περιστάσεις. Από αυτή την άποψη, το πρόβλημα του καρκίνου φαίνεται πως είναι όχι γιατί συμβαίνει αλλά γιατί συμβαίνει τόσο σπάνια. Η εξήγηση, η οποία στηρίζεται πλέον σε πολλές αποδείξεις, είναι ότι για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό χρειάζονται περισσότερες από μια μεταλλάξεις. Είναι άγνωστο πόσες ακριβώς μεταλλάξεις απαιτούνται, αλλά σίγουρα είναι πάνω από 2-3. Αυτές οι μεταλλάξεις συμβαίνουν διαδοχικά και όχι ταυτόχρονα, συνήθως μέσα σε χρονική περίοδο πολλών ετών. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα του ανθρώπου δεν περιέχουν απλώς πολλές μεταλλάξεις αλλά επίσης εμφανίζουν και **γενετική αστάθεια**. Η γενετική αστάθεια προκύπτει από μεταλλάξεις οι οποίες (1) παρεμβαίνουν στην πιστή αντιγραφή του γονιδιώματος και έτσι αυξάνουν τη συχνότητα των ίδιων των μεταλλάξεων, (2) ελαττώνουν την αποτελεσματικότητα της επιδιόρθωσης του DNA, ή (3) αυξάνουν την επίπτωση των χρωμοσωμικών θραύσεων και αναδιατάξεων, οδηγώντας σε έναν πολύ διαταραγμένο και ασταθή καρυότυπο.

1.3. Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από δύο κληρονομικές ιδιότητες: αυτά τα ίδια και οι απόγονοί τους (1) αναπαράγονται αψηφώντας τους φυσιολογικούς περιορισμούς και (2) διεισδύουν και αποικίζουν τόπους που κανονικά αποτελούν την επικράτεια άλλων κυττάρων. Ο ιδιαίτερος κίνδυνος του καρκίνου δημιουργείται από το συνδυασμό αυτών των δύο χαρακτηριστικών. Τα κύτταρα που έχουν την πρώτη όχι όμως και την δεύτερη ιδιότητα πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα αλλά παραμένουν συναθροισμένα σε μια ενιαία μάζα και μπορεί να δημιουργήσουν έναν όγκο (ή νεόπλασμα, tumor). Στην περίπτωση αυτή ο όγκος χαρακτηρίζεται ως καλοήθης: συνήθως μπορεί να αφαιρεθεί πλήρως με χειρουργική επέμβαση. Ένας όγκος είναι καρκινικός μόνο αν τα κύτταρά του έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στους περιβάλλοντες ιστούς: στην περίπτωση αυτή ο όγκος χαρακτηρίζεται ως κακοήθης. Τα κακοήθη καρκινικά κύτταρα με τη διεισδυτική ικανότητα μπορεί να εγκαταλείψουν τον πρωτοπαθή όγκο, να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος ή στα λεμφαγγεία και να σχηματίσουν δευτεροπαθείς όγκους, ή αλλιώς μεταστάσεις,

σε άλλες θέσεις του σώματος. Όσο περισσότερο έχει διασπαστεί ο καρκίνος, τόσο δυσκολότερο είναι να αντιμετωπιστεί.

1.3.1 Διαφορές φυσιολογικών-καρκινικών κυττάρων

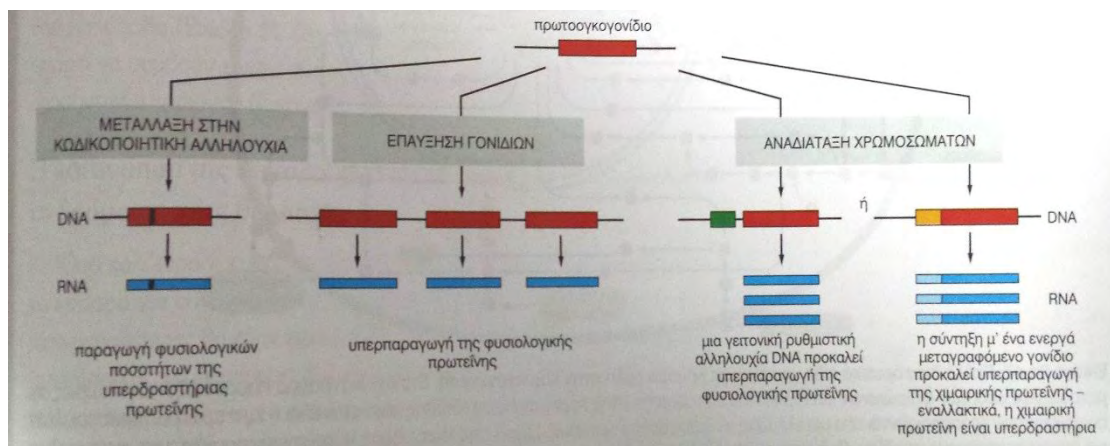
Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ιδιότητες που τους προσδίδουν ένα συναγωνιστικό πλεονέκτημα. Διαφορετικοί καρκίνοι απαιτούν διαφορετικούς συνδυασμούς ιδιοτήτων. Ωστόσο, υπάρχει μια σειρά κρίσιμων χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων που τα διακρίνει από τα φυσιολογικά κύτταρα.

1. Τα καρκινικά κύτταρα βασίζονται λιγότερο σε σήματα από άλλα κύτταρα για την αύξηση, επιβίωση και διαίρεσή τους. Συχνά αυτό συμβαίνει επειδή περιέχουν μεταλλάξεις σε συστατικά των οδών κυτταρικής σηματοδότησης μέσω των οποίων τα κύτταρα απαντούν σε τέτοια «κοινωνικά μηνύματα». Για παράδειγμα, μια μετάλλαξη στο γονίδιο *ras* μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ενός ενδοκυττάριου σήματος για πολλαπλασιασμό παρότι δεν υπάρχει το εξωκυττάριο σήμα το οποίο κανονικά θα ήταν απαραίτητο για την παραγωγή του.
2. Τα καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερο ευπαθή από τα φυσιολογικά κύτταρα σε θάνατο με απόπτωση. Η «αποστροφή προς την αυτοκτονία» συχνά προκαλείται από μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν το ενδοκυττάριο πρόγραμμα θανάτου. Για παράδειγμα, περίπου στο 50% των καρκίνων του ανθρώπου ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο γονίδιο *p53*. Η πρωτεΐνη *p53* κανονικά συμμετέχει σε έναν μηχανισμό ελέγχου που αναγκάζει τα κύτταρα είτε να σταματήσουν να διαιρούνται είτε να πεθάνουν με απόπτωση όταν το DNA τους έχει υποστεί βλάβη. Για παράδειγμα, η θραύση των χρωμοσωμάτων, αν δεν επιδιορθωθεί, γενικά αναγκάζει το κύτταρο να αυτοκτονήσει. Αν όμως το κύτταρο έχει βλάβη στο γονίδιο *p53*, μπορεί να επιβιώσει και να συνεχίσει να διαιρείται παράγοντας πολύ ανώμαλα θυγατρικά κύτταρα που έχουν την δυνατότητα να γίνουν ακόμα πιο κακοήγη.
3. Αντίθετα από τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα συχνά πολλαπλασιάζονται απεριόριστα. Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα του ανθρώπου όταν υποβάλλονται σε καλλιέργεια πραγματοποιούν έναν περιορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων και μετά σταματούν οριστικά, μάλλον επειδή έχουν βραχυνθεί πάρα πολύ τα τελομερίδια στα δύο άκρα τους. Τα καρκινικά κύτταρα παραβιάζουν αυτό το όριο επανενεργοποιώντας την παραγωγή της τελομεράσης, του ενζύμου που διατηρεί το μήκος των τελομεριδίων.
4. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα είναι γενετικώς ασταθή και έχουν πολύ αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων.
5. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν παθολογική διεισδυτικότητα. Αυτό συχνά οφείλεται (εν μέρει) στο γεγονός ότι δεν διαθέτουν ειδικά μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (όπως οι καντερίνες) που συγκρατούν τα φυσιολογικά κύτταρα στη σωστή θέση.
6. Τα καρκινικά κύτταρα συχνά επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται σε ξένους ιστούς δημιουργώντας μεταλλάξεις, ενώ τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα αν

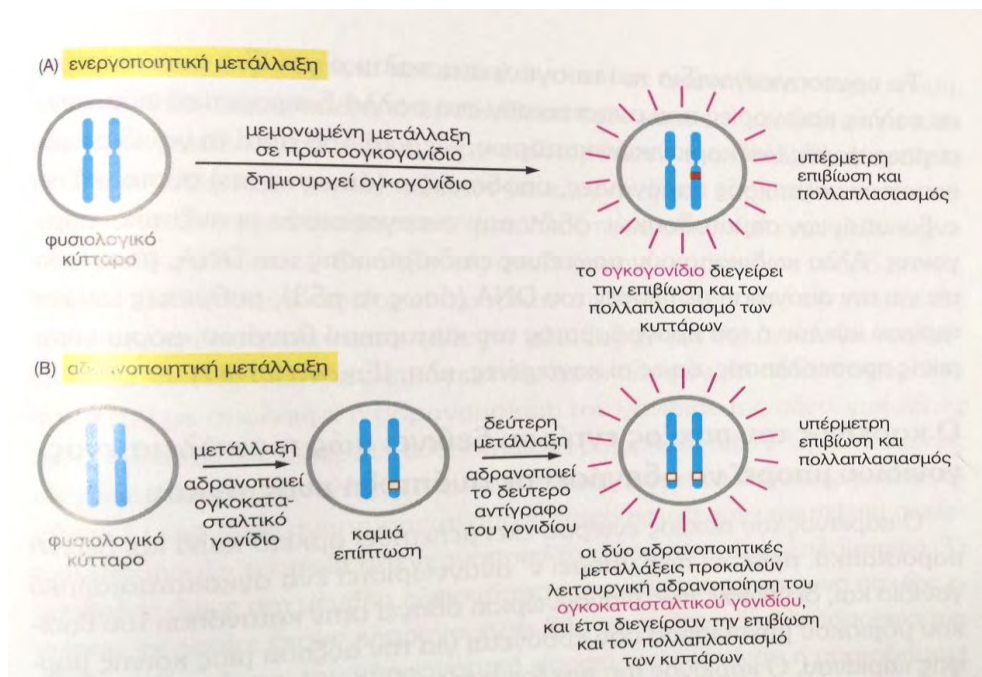
βρεθούν σε έκτοπη θέση πεθαίνουν. Ακόμα δεν γνωρίζουμε πλήρως ποιές μεταλλάξεις προσδίδουν αυτή την ικανότητα (Alberts et al.2011).

1.4 Γονιδιακή προσέγγιση του καρκίνου

Πολλά και ποικίλα είδη γονιδίων έχουν ιδιαίτερη σημασία για τον καρκίνο. Μερικές φορές, οι επικίνδυνες μεταλλάξεις είναι εκείνες που κάνουν το προϊόν του προσβεβλημένου γονιδίου υπερδραστήριο. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν επικρατή δράση-δηλαδή για να προκληθούν προβλήματα αρκεί να μεταλλαχθεί μόνο το ένα αλληλόμορφο του γονιδίου: το μεταλλαγμένο γονίδιο αποκαλείται ογκογονίδιο, ενώ το αντίστοιχο φυσιολογικό γονίδιο αποκαλείται πρωτοογκογονίδιο.



Εικόνα 1: Διάφορες γενετικές αλλαγές μπορεί να μετατρέψουν ένα πρωτοογκογονίδιο σε ογκογονίδιο. Σε κάθε περίπτωση η αλλαγή προκαλεί αύξηση της λειτουργίας του γονιδίου. Για άλλα γονίδια, ο κίνδυνος έγκειται σε μεταλλάξεις που καταστρέφουν τη λειτουργία των γονιδίων. Αυτές οι μεταλλάξεις γενικά είναι υπολειπόμενες-δηλαδή προτού εκδηλωθεί κάποιο αποτέλεσμα πρέπει να χαθούν ή να αδρανοποιηθούν και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου, που αποκαλείται **ογκοκατασταλτικό γονίδιο** (Geoffrey M. Cooper 2009).



Εικόνα 2: Τα γονίδια που έχουν κρίσιμο ρόλο στην καρκινογένεση διακρίνονται σε πρωτοογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Κριτήριο της ταξινόμησης είναι το είδος των επιβλαβών μεταλλάξεων, δηλαδή αν είναι επικρατείς ή υπολειπόμενες. Τα ογκογονίδια δρουν με επικρατή τρόπο: μια ενεργοποιητική μετάλλαξη σε ένα αντίγραφο του πρωτοογκογονιδίου μπορεί να προωθήσει ένα κύτταρο προς τον καρκίνο. Από την άλλη πλευρά, οι μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια γενικά δρουν με υπολειπόμενο τρόπο: για να προωθηθεί ένα κύτταρο προς τον καρκίνο πρέπει να χαθεί η λειτουργία και των δύο αλληλόμορφων του γονιδίου. (Geoffrey M. Cooper 2009).

1.4.1 Η ανάπτυξη του καρκίνου

Στο κυτταρικό επίπεδο, η ανάπτυξη του καρκίνου θεωρείται ότι είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων που βασίζεται στην μεταλλαγή και στην επιλογή των κυττάρων με σταδιακά αυξανόμενη ικανότητα πολλαπλασιασμού, επιβίωσης, διείσδυσης σε ιστούς και τελικά μετάστασης. Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας αυτής, η **έναρξη της ογκογένεσης** (tumor initiation), θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα γενετικών αλλαγών που οδηγούν στον μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό ενός κυττάρου. Στη συνέχεια, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων οδηγεί στην ανάπτυξη ενός πληθυσμού ογκοκυττάρων που σχηματίζουν έναν κλώνο. Η **πρόοδος της ογκογένεσης** (tumor progression) συνεχίζεται καθώς συμβαίνουν επιπρόσθετες μεταλλαγές στα κύτταρα του κλώνου. Ορισμένες από αυτές τις μεταλλαγές δίνουν στο κύτταρο συγκριτικό πλεονέκτημα επιλογής όπως πιο ραγδαίο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Συνεπώς, οι απόγονοι ενός κυττάρου που φέρει μια τέτοια μεταλλαγή κυριαρχούν μέσα στον

πληθυσμό των ογκοκυττάρων. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται επιλογή κλώνου, αφού ένας νέος κλώνος ογκοκυττάρων εξελίσσεται και επικρατεί επειδή έχει αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού ή άλλες ιδιότητες (όπως είναι η επιβίωση, η διείσδυση ή η μετάσταση) οι οποίες παρέχουν συγκριτικό πλεονέκτημα επιλογής. Η επιλογή κλώνου συνεχίζεται κατά την ανάπτυξη του όγκου, ώστε οι όγκοι να συνεχίζουν να αναπτύσσονται πιο γρήγορα και να γίνονται ολοένα πιο κακοήθεις .

1.5 Συχνότητα καρκινικών τύπων

Αυτή η λίστα με τους πιο κοινούς καρκινικούς τύπους περιλαμβάνει καρκίνους που εντοπίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στις Ηνωμένες Πολιτείες:

Καρκίνος της ουροδόχου κύστεως
 Καρκίνος του μαστού
 Καρκίνος του παχέος εντέρου
 Καρκίνος της μήτρας
 Καρκίνος των νεφρών
 Λευχαιμία
 Καρκίνος του ήπατος
 Καρκίνος των πνευμόνων
 Μελάνωμα
 Λέμφωμα Non-Hodgkin
 Καρκίνος του παγκρέατος
 Καρκίνος του προστάτη
 Καρκίνος του θυρεοειδούς

Ο πιο κοινός καρκινικός τύπος είναι ο καρκίνος του μαστού με 255000 νέους ασθενείς να αναμένονται στις Ηνωμένες Πολιτείες μέσα στο 2017. Οι επόμενοι σε συχνότητα είναι ο καρκίνος των πνευμόνων και ο καρκίνος του προστάτη.

Cancer Type	Estimated New Cases	Estimated Deaths
Bladder	79,030	16,870
Breast (Female – Male)	252,710 – 2,470	40,610 – 460
Colon and Rectal (Combined)	135,430	50,260
Endometrial	61,380	10,920
Kidney (Renal Cell and Renal Pelvis) Cancer	63,990	14,400
Leukemia (All Types)	62,130	24,500
Liver and Intrahepatic Bile Duct	40,710	28,920

Lung (Including Bronchus)	222,500	155,870
Melanoma	87,110	9,730
Non-Hodgkin Lymphoma	72,240	20,140
Pancreatic	53,670	43,090
Prostate	161,360	26,730

(<https://www.cancer.gov>)

1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου

Πολλοί τύποι καρκίνου είναι δυνατόν να θεραπευθούν αν διαγνωστούν σε κάποιο πρώιμο στάδιο της ανάπτυξής τους. Οι γενετικές μέθοδοι ταυτοποίησης ατόμων με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση και την αποτελεσματική θεραπεία των ασθενών υψηλού κινδύνου. Μοριακή διάγνωση: Ο εντοπισμός μεταλλαγών στα ογκογονίδια και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι πιθανόν να αποδειχθεί χρήσιμος για τη διάγνωση και την αξιολόγηση της απόκρισης στη θεραπεία. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης όλων των γονιδίων είναι εφικτό να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση των όγκων σε υποκατηγορίες με διαφορετική κλινική πρόγνωση και απόκριση στη θεραπεία.

Υπάρχουν αρκετές θεραπευτικές κατηγορίες για τον καρκίνο. Το είδος της θεραπείας που θα λάβει ο καρκινοπαθής εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου και το στάδιο στο οποίο βρίσκεται.

Οι βασικές κατηγορίες θεραπείας του καρκίνου περιλαμβάνουν:

1) Χειρουργική προσέγγιση: Σε αυτή τη μέθοδο ο γιατρός πραγματοποιεί τομές στο δέρμα, στους μύς, ακόμη και στο κόκαλο για να απομακρύνει τον όγκο. Υπάρχουν χειρουργικές προσεγγίσεις που δεν απαιτούν τομές, όπως:

α)Κρυοχειρουργείο (κρυοθεραπεία): όπου χρησιμοποιείται αυξημένο κρύο το οποίο δημιουργείται με υγρό άζωτο για να καταστρέψει το μη φυσιολογικό ιστό. Η κρυοθεραπεία χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση των πρώιμων σταδίων καρκίνου του δέρματος και στο ρετινοβλάστωμα.

β)Laser: η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται καθώς η αυξημένη ευαισθησία του laser δίνει τη δυνατότητα στόχευσης ακόμη και σε πολύ μικρούς ιστούς. Το laser

χρησιμοποιείται ακόμη για την καταστροφή όγκων που μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο. Η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή στην αντιμετώπιση κυρίως όγκων στην επιφάνεια του δέρματος ή στην επιφάνεια των εσωτερικών οργάνων.

γ)Υπερθερμία: κατά την οποία μικρές περιοχές του σώματος εκτίθενται σε υψηλή θερμοκρασία η οποία μπορεί να βλάψει και να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα ή να τα καταστήσει ευαίσθητα στην ακτινοβολία ή σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα.

δ)Φωτοδυναμική θεραπεία: όπου χρησιμοποιούνται φάρμακα που αντιδρούν με ένα συγκεκριμένο τύπο φωτός. Όταν ο όγκος εκτίθεται σε αυτό το φως, τα φάρμακα ενεργοποιούνται και σκοτώνουν τα παρακείμενα καρκινικά κύτταρα. Η φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιείται κυρίως για την αντιμετώπιση ή την ανακούφιση των συμπτωμάτων του καρκίνου του δέρματος ή του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων.

2)Θεραπεία με ακτινοβολία: Σε υψηλές δόσεις η ακτινοβολία σκοτώνει τα καρκινικά κύτταρα ή ελαττώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, προκαλώντας βλάβη στο DNA τους. Τα καρκινικά κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη στο DNA και δεν επιδέχονται επιδιόρθωση, σταματούν να διαιρούνται και πεθαίνουν. Η ακτινοβολία δεν σκοτώνει τα καρκινικά κύτταρα ευθύς αμέσως, καθώς χρειάζονται ημέρες ή εβδομάδες θεραπείας πριν το DNA τους να καταστραφεί αρκετά ώστε να πεθάνουν. Μετά το πέρας της θεραπείας με ακτινοβολία τα καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν να πεθαίνουν για εβδομάδες ή μήνες.

3)Χημειοθεραπεία: είναι ένας τύπος αντιμετώπισης του καρκίνου όπου γίνεται χρήση φαρμάκων για την αντιμετώπιση του όγκου, έτσι ώστε είτε να σταματήσει, είτε να ελαττωθεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Η χημειοθεραπεία, επομένως, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του καρκίνου, για τη μείωση της πιθανότητας επανεμφάνισής του, καθώς και για να απαλύνει τα καρκινικά συμπτώματα. π.χ. χρησιμοποιείται για τη συρρίκνωση ενός όγκου ο οποίος προκαλεί πόνο.

4)Ανοσοθεραπεία: είναι μία θεραπευτική προσέγγιση κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή ενισχύεται για να αντιμετωπίσει τον καρκίνο. Η ανοσοθεραπεία είναι ένας τύπος βιολογικής θεραπείας όπου χρησιμοποιούνται υποστρώματα από ζωντανούς οργανισμούς για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Στην ανοσοθεραπεία περιλαμβάνονται μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία προσδένονται σε συγκεκριμένους στόχους στο σώμα και μπορούν να επάγουν ανοσολογική αντίδραση, η οποία καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα ή να σημάνουν τα καρκινικά κύτταρα, ώστε να είναι πιο εύκολο να εντοπιστούν και να καταστραφούν και οι κυτοκίνες που είναι πρωτεΐνες οι οποίες παράγονται από ανθρώπινα κύτταρα, ενώ διακρίνονται σε ιντερλευκίνες και ιντερφερόνες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

5)Ορμονική θεραπεία: όπου διακόπτεται ή επιβραδύνεται η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων που χρειάζονται ορμόνες για να αναπτυχθούν. Η ορμονική θεραπεία χρησιμοποιείται κυρίως στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού ή του προστάτη

που είναι συχνά ορμονοεξαρτώμενοι, σε συνδυασμό με κάποια άλλη θεραπευτική προσέγγιση.

6)Μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων: πραγματοποιείται για την αποκατάσταση των διαφόρων πληθυσμών αιμοποιητικών κυττάρων σε άτομα που τα κύτταρα του αίματος τους καταστράφηκαν από υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας ή ακτινοβολίας (National Cancer Institute, NCI).

2. Σίγμα υποδοχείς-συνδέτες

2.1. Διάκριση σίγμα υποδοχέων

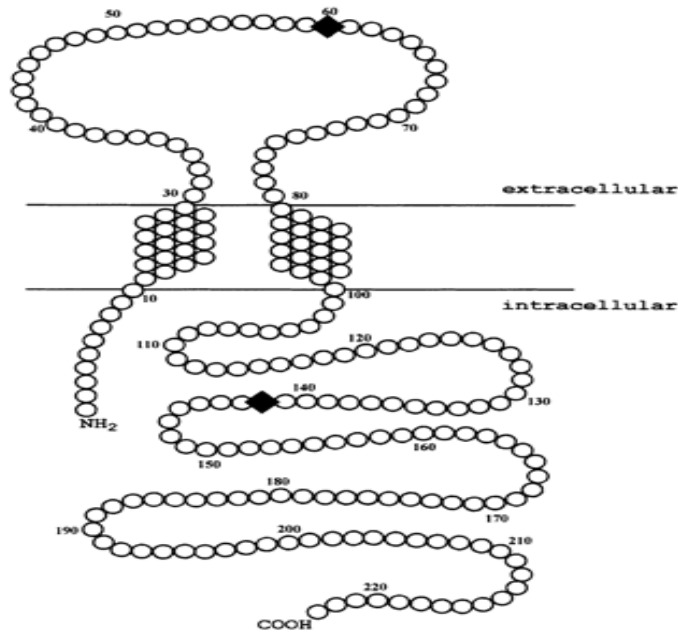
Αρχικά θα αναλυθεί ο βιολογικός και ο φυσιολογικός ρόλος των σίγμα υποδοχέων και ο πιθανός θεραπευτικός τους ρόλος. Οι σίγμα υποδοχείς βρίσκονται σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα καθώς και σε πολλούς περιφερικούς ιστούς. Οι σίγμα υποδοχείς διακρίνονται σε σίγμα-1 και σε σίγμα-2 υποδοχείς και εκφράζονται σε πολυάριθμες περιοχές του εγκεφάλου. Οι σίγμα υποδοχείς θεωρήθηκαν, αρχικά, ως υπότυπος των υποδοχέων οπιοειδών που συμβάλλουν στις παραισθήσεις και στις ψυχώσεις που επάγονται από benzomorphanes όπως ο SKF-10047 και η πενταζοκίνη. Ο ραδιοπροσδέτης πενταζοκίνη συνδέεται επιλεκτικά στον σ1 υποδοχέα σε δοκιμασίες δέσμησης, επειδή έχει υψηλή (~ 3 nM) συγγένεια για 'αυτόν τον υποδοχέα και χαμηλή (> 1000 nM) συγγένεια για τον υποδοχέα σ2. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια επιβεβαίωσαν πως οι σίγμα υποδοχείς δεν είναι υποκατηγορία των υποδοχέων οπιοειδών και πως παίζουν έναν πιο διευρυμένο ρόλο στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση, στην απόπτωση και στη ρύθμιση του μεταβολισμού. Οι σ υποδοχείς είναι μέλη της τάξης των ορφανών υποδοχέων για τους οποίους κανένας ενδογενής προσδέτης δεν είναι γνωστός μέχρι πρόσφατα που διαπιστώθηκε πως η dimethyltryptamine [DMT] είναι ενδογενής προσδέτης. Επίσης συνδέονται με υψηλή συγγένεια σε πολλές τάξεις χημικών προσδετών, όπως τα νευροστεροειδή, neuroleptics, dextrobenzomorphanes [DEX] και διάφορα ψυχοδιεγερτικά όπως η κοκαΐνη και η μεθαμφεταμίνη. Συνεπώς, πιστεύεται ότι οι σRs συμμετέχουν ενεργά στα ανοσοκατασταλτικά, αντιψυχωτικά και νευροπροστατευτικά αποτελέσματα πολλών φαρμάκων.

Αν και οι υποδοχείς σίγμα-1 και σίγμα-2 συνήθως αντιμετωπίζονται ως μέλη μίας κοινής «οικογένειας» υποδοχέα σίγμα και έχουν κοινή συγγένεια για ορισμένους τεχνητούς προσδέτες και στεροειδή όπως η προγεστερόνη, οι δομές των πρωτεϊνικών υποδοχέων σίγμα-1 και σίγμα-2 είναι στην πραγματικότητα άσχετες. Ενώ ο υποδοχέας sigma-2 φαίνεται να ανήκει σε σύμπλοκο υποδοχέα προγεστερόνης, ο υποδοχέας sigma-1 έχει χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνη συνοδός. Η λειτουργία και η ενδοκυτταρική θέση αυτής της πρωτεΐνης μεταβάλλονται από συνδέτες, αλλά η πρωτεΐνη μπορεί να είναι ενεργή ακόμη και απουσία προσδεμάτων. Έτσι, η έννοια των "αγωνιστών" και "ανταγωνιστών", η οποία συνήθως εφαρμόζεται σε προσδέματα υποδοχέα, μπορεί να μην είναι εφαρμόσιμη σε ενώσεις που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς σίγμα-1 (Aren van Waarde et al. 2014).

2.2. Δομή και φυσιολογικός ρόλος σ1-υποδοχέων

Ο σίγμα-1 υποδοχέας έχει προσφάτως κλωνοποιηθεί από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένου του συκωτιού από γουρούνι, του ανθρώπινου εγκέφαλου καθώς και του εγκεφάλου ποντικού και αρουραίου (Hanner M et al. ,1996) Αποτελείται από αλληλουχία 223 αμινοξέων και δε φαίνεται να παρουσιάζει δομική ομολογία με άλλους υποδοχείς οπιοειδών ή υποδοχείς του νευρικού συστήματος. Το γονίδιο για το sigma-1 υποδοχέα εδράζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 9 και στο ποντίκι στο χρωμόσωμα 4, έχει μήκος ~7 kbp και αποτελείται από τέσσερα εξώνια και τρία εσώνια (Prasad et al. 1998). Το εξώνιο 2 κωδικοποιεί μεμβρανικές πρωτεΐνες μεγέθους 25 kDa που εδράζονται στη μοναδική διαμεμβρανική περιοχή που έχει διαπιστωθεί ως τώρα, όμως άλλες δύο υδρόφοβες περιοχές υπάρχουν και μία από αυτές μπορεί πιθανώς να αποτελεί ένα δεύτερο διαμεμβρανικό τομέα.

Οι σ₁Rs είναι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς που δρουν ως πρωτεΐνες συνοδοί οι οποίες ρυθμίζουν τη σηματοδότηση Ca²⁺ στον IP₃ υποδοχέα. Έχουν την ικανότητα να μετακινούνται δυναμικά μέσα στα κύτταρα, επομένως πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Ο υποδοχέας σ₁, στη μεμβράνη ενδοπλασμικού δικτυώματος που συνδέεται με μιτοχόνδρια, είναι υπεύθυνος για τη μεταβολική ρύθμιση των μιτοχονδρίων και προάγει τη μείωση της μιτοχονδριακής ενέργειας και την απόπτωση. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι παίζουν ρόλο και ως ρυθμιστές των διαύλων ιόντων όπως των K⁺ channels, ρυθμίζουν τη λιπιδική μεταφορά, το μεταβολισμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, τη νευρογένεση και τη μυελίνωση στον εγκέφαλο. Οι σ₁- υποδοχείς σχετίζονται ακόμη με την απελευθέρωση Ca²⁺, τη ρύθμιση της συστατικότητας των καρδιακών μυοκυττάρων και μπορεί να έχουν την ικανότητα σύνδεσης με πρωτεΐνες G. Οι σ₁Rs ρυθμίζουν έναν μεγάλο αριθμό διαμεμβρανικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένου του γλουταμινεργικού, του ντοπαμινεργικού, του σεροτονεργικού, του νοραδρενεργικού και του χολονεργικού συστήματος. Καθώς τα συστήματα αυτά εμπλέκονται σε πολλές νευροψυχιατρικές διαταραχές, ο ρόλος των υποδοχέων σίγμα 1 έχει αξιολογηθεί σε μεγάλο αριθμό τέτοιων ασθενειών. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις που υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των σ₁ υποδοχέων στην παθοφυσιολογία των νευροψυχιατρικών διαταραχών, όπως η κατάθλιψη, η αγχώδης διαταραχή και η σχιζοφρένεια. Η αρχική ανάλυση της αλληλουχίας αμινοξέων του σ₁ υποδοχέα πρότεινε ένα μεμονωμένο διαμεμβρανικό τμήμα. Στη συνέχεια, οι Aydar et al. έδειξαν ότι ο σ₁ υποδοχέας έχει δύο διαμεμβρανικά τμήματα που εντοπίζονται στη μεμβράνη του πλάσματος (όταν εκφράζονται σε ωκύτταρα *Xenopus laevis*) με τα άκρα NH₂ και COOH στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης.



Εικόνα 3: Ένα δομικό μοντέλο για τον υποδοχέα σ_1 . Αυτό το μοντέλο περιέχει δύο διαμεμβρανικά τμήματα, όπως καθορίστηκαν από τα TM ομολογίας. Τα άκρα NH_2 και COOH βρίσκονται στην ενδοκυτταρική πλευρά της μεμβράνης, όπως συμπεραίνεται από την αδυναμία προσκόλλησης ετικετών πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης όταν εκφράζεται σε ωκύτταρα *Xenopus*. Στον υποδοχέα σίγμα αρουραίου, το κατάλοιπο 60 είναι αργινίνη. Συνεπώς, οι μόνες πρωτοταγείς αμινομάδες είναι η λυσίνη 142 και η τελική ομάδα NH_2 .

2.3. Δομή και φυσιολογικός ρόλος σ_2 -υποδοχέων

Ο υποδοχέας σ_2 ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε καρκινικά κύτταρα PC12 μία καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από φαιοχρωμοκύτωμα επινεφριδίων αρουραίου και έχει μοριακό βάρος $\sim 21,5$ kDa. Πλούσιες σε υποδοχείς μεμβράνες συλλέγονται συχνά από συκώτι αρουραίου για μελέτες σύνδεσης. Έχει μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 18 έως 21 kDa. Ορισμένοι προσδέτες επιλεκτικής και υψηλής συγγένειας για σ_2 υποδοχείς θέσης είναι τώρα διαθέσιμοι όπως οι 1'-(4-(1-(4-φθοροφαινυλ))-1H-ινδολ-3-υλ)-1-βουτυλ)σπειρο(ισοβενζοφουραν-1-(3H),4'-πιπεριδίνη, N-[2-(3,4-διχλωροφαινυλ)αιθυλ]-N-μεθυλ-2-(1-πυρρολιδινυλ)αιθυλαμίνη. Ο σ_2 φαίνεται επίσης να έχει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των κυτταρικών συγκεντρώσεων Ca^{+2} . Η μοριακή φύση του $\sigma_2\text{R}$ δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί πλήρως. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ανάλυση δομής-συγγένειας και συγκριτική ανάλυση μοριακού πεδίου των προσδεμάτων υποδοχέα $\sigma_2\text{R}$. Μια μελέτη επισήμανσης συγγένειας με τη χρήση DTG αποκάλυψε την ύπαρξη δύο ζωνών πρωτεϊνών με μοριακό βάρος 25000Da και 21500Da. Επειδή ο σ_1 υποδοχέας έχει κλωνοποιηθεί και έχει αποδειχθεί ότι είναι πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 25300Da, έχει υποτεθεί ότι το γονίδιο του σ_2 υποδοχέα

κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη. Διάφοροι ρόλοι έχουν προταθεί για τους σ_2 υποδοχείς, όπως η συμβολή τους στη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων, η ρύθμιση βασικών λειτουργιών, η επαγωγή δυστονίας μετά από επί τόπου χορήγηση στον κόκκινο πυρήνα (97), ρύθμιση της λειτουργίας του ειλεού. Οι θέσεις είναι επίσης σημαντικές στον αποκλεισμό των καναλιών K^+ , ενίσχυση της νευρωνικής απόκρισης σε N-μεθυλο-d-ασπαρτικό [NMDA] στην περιοχή CA3 του ραχιαίου υποκάμπτου αρουραίου (102) ή στην ενεργοποίηση μιας νέας ανεξάρτητης από κασπάση αποπτωτικής οδού που συμμετέχει ο παράγοντας P53 (Robert H. Mach et al.).

2.4. Υποδοχέας σίγμα-2 και PGRMC1

Μέχρι πρόσφατα η ταυτότητα του υποδοχέα σίγμα-2 ήταν άγνωστη και η ύπαρξη αυτού του υποτύπου είχε αποδειχθεί μόνο φαρμακολογικά. Εντούτοις, εντός ενός έτους δημοσιεύθηκε μια μελέτη στην οποία οι υποδοχείς σίγμα-2 σημαδεύτηκαν μη αναστρέψιμα χρησιμοποιώντας WC-21, ένα πρόσδεμα που περιείχε ένα τμήμα αζιδίου για σήμανση φωτο-συγγένειας και μία ομάδα ισοθειοκυανικής φθορεσκεΐνης (FITC) για απεικόνιση της σίγμα-2 πρωτεΐνης. Με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας, η δεσμευμένη σε μεμβράνη πρωτεΐνη η οποία επισημάνθηκε με WC-21 σε ήπαρ αρουραίου ταυτοποιήθηκε ως συστατικό μεμβράνης υποδοχέα προγεστερόνης 1 (PGRMC1). Knockdown της πρωτεΐνης PGRMC1 με ειδικό βραχύ παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA) μείωσε τη δέσμευση ενός ραδιοϊωδιούχου συνδέτη του υποδοχέα σίγμα-2 σε κύτταρα HeLa και ενός φθορίζοντος συνδέτη του υποδοχέα σίγμα-2 σε κύτταρα ανθρώπινου εμβρυονικού νεφρού 293T. Επιπλέον, η καταστροφή του PGRMC1 μείωσε την ικανότητα των αγωνιστών σίγμα-2 να επάγουν την ενεργοποίηση κασπάσης-3 σε κύτταρα HeLa. Η αγωγή των κυττάρων καρκίνου του πνεύμονα A549 με ένα πρόσδεμα PGRMC1 (AG-205) ή ένα πρόσδεμα υποδοχέα σίγμα-2 (WC-26) προκάλεσε παρόμοιες δόσοεξαρτώμενες ρυθμίσεις προς τα πάνω της πρωτεΐνης PGRMC1. Η συνεστιακή μικροσκοπία έδειξε ότι το PGRMC1 και η πρωτεΐνη υποδοχέα σίγμα-2 είχαν τον ίδιο ενδοκυτταρικό εντοπισμό, δηλαδή στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Με βάση αυτές τις συνδυασμένες αποδείξεις, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών PGRMC1 ταυτοποιήθηκε ως η υποθετική θέση δέσμευσης υποδοχέα σίγμα-2. Δεδομένου ότι το PGRMC1 είναι γνωστή πρωτεΐνη, η αλληλουχία cDNA του γονιδίου υποδοχέα σίγμα-2 μπορεί στην πραγματικότητα να έχει ήδη προσδιοριστεί, τόσο στους χοίρους όσο και στους ανθρώπινους ιστούς. Αν και η στενή ταυτότητα του υποδοχέα sigma-2 και του PGRMC1 φαίνεται να έχει τεκμηριωθεί, μερικά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Πρώτον, οι μοριακές μάζες και των δύο πρωτεϊνών φαίνεται να είναι διαφορετικές. Έχουν αναφερθεί τιμές 22 έως 28 kDa για PGRMC1, ενώ έχει καθοριστεί τιμή μόνο 21,5 kDa για την πρωτεΐνη υποδοχέα sigma-2. Αυτές οι διαφορές μπορεί να σχετίζονται με μετα-μεταφραστική επεξεργασία ή παραλλαγές ματίσματος μιας απλής πρωτεΐνης. Δεύτερον, έχει αναφερθεί ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου απαιτεί την αγωνιστική δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων στους υποδοχείς σίγμα-2, αλλά μια ανταγωνιστική δράση στο PGRMC1. Αυτή η αντίθεση μπορεί να είναι πιο εμφανής από την πραγματική, αφού

οι αγωνιστικές ή ανταγωνιστικές δράσεις στους υποδοχείς σίγμα δεν έχουν καθοριστεί καλά. Οι ενώσεις που αρχικά ταξινομήθηκαν ως σίγμα αγωνιστές μπορεί στην πραγματικότητα να είναι ανταγωνιστές και αντίστροφα. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 από συνδέτες του υποδοχέα σίγμα-2 έχει προταθεί ότι χρησιμεύει ως λειτουργική δοκιμασία για τη διαφοροποίηση των αγωνιστών του σίγμα 2 υποδοχέα, σε αγωνιστές και ανταγωνιστές. Τέλος, είναι γνωστό ότι το PGRMC1 δεσμεύεται στο P450 με αποτέλεσμα την διέγερση της δραστηριότητας και της αυξημένης σύνθεσης χοληστερόλης, αλλά για τον υποδοχέα sigma-2 δεν έχει αναφερθεί τέτοια δέσμευση. Η μελλοντική έρευνα σε αυτό το συναρπαστικό πεδίο μπορεί να επιλύσει αυτές τις αποκλίσεις και μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω επιβεβαίωση της ταυτότητας του PGRMC1 και της πρωτεΐνης υποδοχέα σίγμα-2 (J. Xu, C. et al. 2011).

2.5 Έκφραση των σίγμα υποδοχέων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε ιστούς.

Και οι δύο υπότυποι σ υποδοχέα εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από διάφορους ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, καρκίνου των νεφρών, καρκίνου του παχέως εντέρου, του σαρκώματος, των όγκων στον εγκέφαλο, του καρκίνου του μαστού, του μελανώματος, του γλοιοβλαστώματος, του νευροβλαστώματος και του καρκίνου του προστάτη. Πολλές από αυτές τις παρατηρήσεις βασίζονται στη δέσμευση σεσημασμένων φαρμάκων υποδοχέα σ που ωστόσο δεν παρουσιάζουν ειδική δέσμευση για σ-1 ή σ2-υποδοχέα (A. Van Waarde et al. 2010). Μια συγκριτική μελέτη από τους Wheeler et al. 2000 σε αδενοκαρκίνωμα μαστού ποντικού αποκάλυψε ότι τα πολλαπλασιαστικά κύτταρα είχαν 10 φορές περισσότερους σ2 υποδοχείς από ότι τα κύτταρα σε ηρεμία. Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε επίσης ότι οι υποδοχείς σ1 και σ2 ήταν παρόντες σε υψηλή πυκνότητα σε βιοψίες ανθρώπινου όγκου μαστού αλλά ουσιαστικά απουσίαζαν σε φυσιολογικούς ιστούς. Η έκφραση του σ1 υποδοχέα, παρακολουθούμενη ανοσοκυτταροχημικά, έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης για την πρόβλεψη της επιθετικότητας των όγκων του μαστού, ειδικότερα, όπου υπήρχε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του υποδοχέα σ1 και του καθεσώτος του υποδοχέα προγεστερόνης. Οι υψηλές πυκνότητες των θέσεων δέσμευσης σ1 και σ2 στις κυτταρικές σειρές και τους ιστούς του όγκου είναι ενδεικτικές της συμμετοχής τους στην κυτταρική παθοφυσιολογία του καρκίνου και θα μπορούσαν να έχουν διαγνωστικό δυναμικό στην απεικόνιση του όγκου. Πολλές προκλινικές μελέτες έχουν αξιολογήσει τη χρησιμότητα των ραδιοσημασμένων σ φαρμάκων, ως παράγοντες απεικόνισης όγκων στο μελάνωμα, στον καρκίνο του μαστού, στον καρκίνο του προστάτη και στο μη μικροκυτταρικού καρκίνο του πνεύμονα σε καρκινικά μοντέλα ποντικών (S.U. Mir et al. 2011). Γενικά, αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι τα σ φάρμακα θα μπορούσαν να είναι αποτελεσματικά προσδέματα για απεικόνιση όγκων, σε συνδυασμό με τεχνικές όπως η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων ή η αυτοματοποιημένη τομογραφία εκπομπής μονοφωτονίων. Τα περισσότερα από αυτά τα σ φάρμακα δεν είναι επιλεκτικά για τους σ1 και σ2 υποδοχείς, αλλά πιο πρόσφατα σ2-επιλεκτικοί παράγοντες έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται. Παρόλο που υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για τη συμμετοχή των σ

υποδοχέων στη βιολογία του καρκίνου, ο μηχανισμός μέσω των οποίων εμφανίζονται αυτά τα αποτελέσματα δεν έχει πλήρως διακριθεί. Οι σ υποδοχείς έχουν εμπλακεί σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών και η διατύπωση μιας ενοποιητικής υπόθεσης για τη μοριακή φυσιολογία των σ υποδοχέων είναι μια μεγάλη πρόκληση. Λίγες αναφορές υπάρχουν που αφορούν άμεσα τους τρόπους δράσης των σ υποδοχέων. Η ομολογία μεταξύ του υποδοχέα σ1 και της ισομεράσης της στερόλης (ERG2) της ζύμης είναι ενδιαφέρουσα, δεδομένου ότι αμφότεροι ο σ1 υποδοχέας και η ισομεράση της στερόλης έχουν υψηλή συγγένεια για σ1 προσδέματα. Ωστόσο, ο σ1 υποδοχέας δεν έχει αποδειχθεί ποτέ ότι έχει δραστηριότητα ισομεράσης της στερόλης (Jbilo O, Vidal et al. 1997).

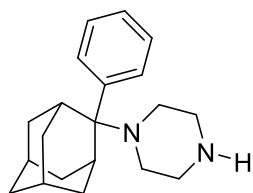
2.6 Προσδέτες Sigma για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου

Δεδομένου ότι οι υποδοχείς σίγμα (ιδιαίτερα ο υποτύπος σίγμα-2) υπερεκφράζονται σε πολλά είδη όγκων, έχουν θεωρηθεί ως ένας ελκυστικός στόχος όχι μόνο για τη διάγνωση του καρκίνου αλλά και για τον αντικαρκινική παράδοση φαρμάκων. Δύο διαφορετικές προσεγγίσεις όσον αφορά τη στόχευση φαρμάκων που βασίζονται σε σίγμα-προσδέτες έχουν εξερευνηθεί. Πρώτον, οι προσδέτες σίγμα συνδέθηκαν με διάφορα νανοσωματίδια, είτε μέσω πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) ή μέσω άμεσης ομοιοπολικής σύνδεσης στο τέλος μιας μακριάς αλκυλικής αλυσίδας του προσδέτη σίγμα. Πριν από την ένεση σε πειραματόζωα, τα νανοσωματίδια γεμίστηκαν με διάφορους κυτταροστατικούς ή κυτταροτοξικούς παράγοντες. Δεύτερον, αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια ή αντινεοπλασματικά πεπτίδια συζεύχθηκαν με προσδέτες σίγμα μέσω άμεσης ομοιοπολικής σύνδεσης και τα υβριδικά μόρια που προκύπτουν χορηγήθηκαν συστηματικά. Οι αρχικές προσπάθειες στόχευσης χρησιμοποίησαν ανισαμίδη και αλοπεριδόλη οι οποίες είναι προσδέτες οι οποίοι συνδέονται με αμφότερους τους υποτύπους των υποδοχέων σίγμα και μπορεί να προσδένονται επιπρόσθετα σε θέσεις δέσμησης νευροδιαβιβαστών (π.χ., ντοπαμίνη D2 και υποδοχείς D3). Πιο πρόσφατες προσπάθειες έχουν χρησιμοποιήσει ενώσεις με υψηλή εκλεκτικότητα για τον υπότυπο υποδοχέα σίγμα-2 (SV119, SW43). Η τελευταία προσέγγιση μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη πρόσληψη εγκεφάλου και μεγαλύτερη πρόσληψη στους όγκους-στόχους, δεδομένου ότι ο σ1 υποδοχέας κατανέμεται ευρέως στον εγκέφαλο, ενώ ο σ2 υποδοχέας συνδέεται με όγκους και ιστό που μπορεί να πολλαπλασιάζεται (S.D. Li, et al. 2006).

2.6.1 Οι ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Τα δύο φάρμακα τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα συντέθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας της Φαρμακευτικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για piperazine-containing 2-aryl-2-dialkylamino adamantanes. Η αδαμάντυλο- ομάδα απαντάται συχνά σε βιολογικά ενεργές ενώσεις και τις αποδίδονται μια σειρά από διαφορετικές φαρμακολογικές δράσεις όπως αντιική, αντιβακτηριακή, και αντικαρκινική. . Επιπλέον, η πιπεραζίνη είναι ένα συχνά

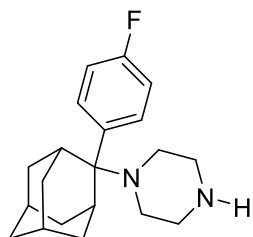
επαναλαμβανόμενο μοτίβο σε ενώσεις που εμφανίζουν βιολογική δραστικότητα, και θεωρείται πως διαθέτει προνομιακή δομή για την κατασκευή βιοδραστικών μορίων. Οι διάφορες φαρμακολογικές ιδιότητες των ενώσεων που περιέχουν πιπεραζίνη περιλαμβάνουν αντιμυκητιακή, αντι-ικκή, αντικαρκινική, αντικαταθλιπτική δράση, και ανταγωνιστική ή αγωνιστική δράση του υποδοχέα σεροτονίνης. Αρχικά σχεδιάστηκε και συντέθηκε η 1- (2-αρυλο-2-αδαμαντύλ) πιπεραζίνη στην οποία η δεύτερη αμινομάδα (NH)θα μπορούσε να λειτουργήσει ως θέση δημιουργίας δεσμών υδρογόνου με άλλο μόριο ή ηλεκτροστατική θέση αλληλεπίδρασης (Εικόνα 4) (Zoidis et al. 2015).



P5

Εικόνα 4: Δομή της 1- (2-αρυλο-2-αδαμαντυλο)πιπεραζίνης (P5).

Για την περαιτέρω ανίχνευση του ρόλου των 1- (2-αρυλο-2-αδαμαντύλ) πιπεραζινών, παρασκευάστηκε μία σειρά N-υποκατεστημένων παραγώγων στα οποία μεθύλιο και διάφορες ακύλομάδες συνδέθηκαν στη θέση N-4 και έτσι προέκυψε η δεύτερη ένωση η οποία μελετήθηκε (Εικόνα 5).



FP5

Εικόνα 5: Δομή του παράγωγου της 1-(2-αρυλο-2-αδαμαντυλο)πιπεραζίνης(FP5).

2.6.2 Πιθανός μηχανισμός δράσης

Μία πρώτη εκτίμηση του μηχανισμού δράσης έγινε από με βάση προηγούμενες δημοσιεύσεις όπου ενώσεις με παρόμοια δομή φάνηκε να δρουν ως σίγμα προσδέτες (Riganas et al. 2012). Επίσης μία από τις ενώσεις που συντέθηκαν μαζί με τις ενώσεις που μελετώνται στην παρούσα εργασία εμφάνισε αυξημένη συγγένεια για σίγμα υποδοχείς. Ωστόσο τα παραπάνω στοιχεία δεν αποδεικνύουν πως οι νεοσυντιθέμενες ενώσεις ταξινομούνται απαραίτητα ως αγωνιστές ή ως ανταγωνιστές των σίγμα υποδοχέων, αφού περαιτέρω μελέτες πρέπει να διεξαχθούν.

3.Μέθοδοι και υλικά:

3.1 Χειρισμοί κυττάρων

1) Ανανέωση(~μέρα παρά μέρα για οποιαδήποτε κυτταρική σειρά):

-απόρριψη του υπερκείμενου.

-προσθήκη 3ml PBS 1x (προκύπτει από αραιώση 1:10 σε water for injection, από PBS 10x)(PBS 10x: gibco by life technologies, Lot 1624085) για τον καθαρισμό της φλάσκας και εκ νέου απόρριψη του.

-προσθήκη 5ml RPMI(5% ,10% ή 20% ανάλογα την κατάσταση της κυτταρικής σειράς).

Για τις καλλιέργειες χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό RPMI όπου προστίθενται: 5% FBS (Hyclone CRA 0277), L-Glutamine (2mM, Sigma, Lot 4SK23141) και αντιβιοτικά (pen/strep, Sigma, 35K2380)

2)Σπάσιμο:

-απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 3ml PBS.

-Στη συνέχεια προστίθεται 1ml θρυψίνη(μικρή φλάσκα) ή 2ml θρυψίνη(μεγάλη φλάσκα)

-τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο για 2-3min, έως ότου ξεκολλήσουν τα κύτταρα(για κυτ/κες σειρές που αναπτύσσονται προσκολλημένες στο πυθμένα της φλάσκας) και έλεγχος των κυττάρων στο μικροσκόπιο.

-Προσθήκη 4ml RPMI και απομάκρυνση περίπου 4-4,5ml του υπερκείμενου το οποίο είτε απορρίπτεται, είτε ακολουθεί η διαδικασία του παγώματος, είτε ίσως χρησιμοποιηθεί σε πείραμα κυτταροτοξικότητας.

-Στο 0,5-1ml που απομένει στη φλάσκα προστίθενται 4ml RPMI.

-Τα κύτταρα ελέγχονται και πάλι στο μικροσκόπιο και τοποθετούνται στον κλίβανο(37°C, 5% CO₂).

3)Μέτρηση κυττάρων στη Neu-Bauer:

Προηγείται η διαδικασία του σπασίματος που περιγράφεται παραπάνω.

-Τα κύτταρα συγκεντρώνονται σε falcon και αναδεύονται διαρκώς με ήπιες κινήσεις.

-Σε erpendorf προστίθενται 10μl χρωστικής Tripan Blue(BIOCHROM Lot 0717A) και 90μl κυτταρικού διαλύματος που περιέχεται μέσα στο falcon.

-Ακολουθεί μέτρηση στο μικροσκόπιο του συνόλου των κυττάρων και από τα τέσσερα τεταρτημόρια της πλάκας Neu-Bauer και έτσι υπολογίζεται ο αριθμός των cells/ml.

4) Πάγωμα:

-Έλεγχος της φλάσκας στο μικροσκόπιο για να εκτιμηθεί η κατάσταση των κυττάρων και απόρριψη του υπερκείμενου.

-Η προσθήκη 3ml PBS ακολουθείται από προσθήκη 1ml τρυψίνη 1x στη μικρή φλάσκα ή 2ml αν πρόκειται για μεγάλη φλάσκα.

-Στη συνέχεια τοποθετείται η φλάσκα στον κλίβανο για 2-3min, έως ότου ξεκολλήσουν τα κύτταρα και στη συνέχεια ελέγχονται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο.

-Προστίθενται 4ml RPMI 5% στη φλάσκα και τα κύτταρα μετρούνται με τη Neu-Bauer(90μl cells+10μl χρωστική Tripan Blue). Για τη διαδικασία του παγώματος χρειάζονται τουλάχιστον 4×10^6 cells.

-Ακολουθεί φυγοκέντρηση 10min στις 1200 στροφές.

-Απορρίπτεται το υπερκείμενο από το falcon.

-Το pellet που έχει σχηματιστεί "σπάει".

-Για κάθε 4000000 cells προστίθεται 1ml freezing medium στο falcon.

-Σε κάθε cryovial προστίθεται 1ml κυτ/κου διαλύματος(κύτταρα μαζί με freezing medium) και στη συνέχεια τοποθετούνται τα cryovials στους -80°C .

Παρασκευή διαλύματος Freezing Medium:

Προσθήκη 90% FBS ορό και 10% DMSO (CALBIOCHEM Lot #D00156985).

Οπότε για την παρασκευή 10ml freezing medium χρησιμοποιούνται 9ml ορού και 1ml DMSO.

5)Ξεπάγωμα:

-τα vials από τους -80°C ή το υγρό άζωτο τοποθετούνται στο υδατόλουτρο (πρέπει να ανακινούνται διαρκώς, τόσο μέσα στο υδατόλουτρο, όσο και πάνω κάτω ώστε το περιεχόμενό τους να υγροποιηθεί πλήρως).

-Τα vials καθαρίζονται εξωτερικά με αιθανόλη για να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις από το υδατόλουτρο και τοποθετούνται στη hood.

-Με μία κίνηση το περιεχόμενο του vial μεταφέρεται στη φλάσκα.

-Προστίθενται 10ml RPMI στη μικρή φλάσκα με ήπιες κινήσεις και την επόμενη μέρα ακολουθεί ανανέωση του θρεπτικού υλικού.

-Εναλλακτικά, στη φλάσκα μπορούν να προστεθούν 5ml RPMI και να ακολουθήσει φυγοκέντρηση στις 900 στροφές για 5min.

-Αφού αποχυθεί το υπερκείμενο και το pellet “σπάει” προστίθενται 5ml RPMI στη μικρή φλάσκα και τοποθετείται στον κλίβανο.

3.2 Πείραμα κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης B(SRB assay)

Καρκινική σειρά	Καρκινικός τύπος	Χρόνος διπλασιασμού	Συγκέντρωση εμβολιασμού (cells/well)
NCI-H23	Non-Small Cell Lung	33.4	5000
NCI-H460	Non-Small Cell Lung	17.8	3000
HCT116	Colon	17.4	4000
HCT15	Colon	20.6	4000
SK-MEL-28	Melanoma	35.1	4000
CAKI-1	Renal	39	5000
SN12C	Renal	29.5	5000
PC-3	Prostate	27.1	4000
DU145	Prostate	32.3	5000
MCF7	Breast	25.4	5000
MDA-MB-231	Breast	41.9	5000

Πίνακας: Στον πίνακα αναγράφονται οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη και ο αριθμός της συγκέντρωσής τους που χρησιμοποιήθηκε για τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης B(SRB).

1η μέρα: Απλή ανανέωση θρεπτικού υλικού και έλεγχος κυττάρων.

Η διαδικασία πραγματοποιείται ακολουθώντας τα βήματα που έχουν περιγραφεί παραπάνω.

2η μέρα: Σπάσιμο κυττάρων και στρώσιμο στο 96-well plate:

-Ανάλογα με το πόσες κυτταρικές σειρές θα χρησιμοποιήθουν στο πείραμα, χρησιμοποιείται αντίστοιχος αριθμός αποστειρωμένων finntips.

π.χ. αν θα υποβληθούν δύο κυτταρικές σειρές σε SRB assay θα χρειαστούν 2 finntips.

-Τα κύτταρα ελέγχονται στο μικροσκόπιο πριν την έναρξη της διαδικασίας και ακολουθούνται τα βήματα του σπασίματος και της μέτρησης των κυττάρων που περιγράφονται παρακάτω συνοπτικά:

- Το υπερκείμενο απομακρύνεται, 3ml PBS προστίθενται τα οποία κατόπιν απορρίπτονται.

-Ακολουθεί η προσθήκη 1ml θρυψίνης (μικρή φλάσκα) ή 2ml θρυψίνης(μεγάλη φλάσκα) και η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο για 2-3min, έως ότου ξεκολλήσουν τα κύτταρα.

-Μετά τα 2-3min (ανάλογα την κυτταρική σειρά), ακολουθεί έλεγχος των κύτταρων στο μικροσκόπιο και προσθήκη 4ml RPMI.

-Τα 4,5ml από το συνολικό όγκο των 5ml τοποθετούνται σε falcon. Στο 0,5ml που παραμένει στη φλάσκα προσθέτονται 4,5ml RPMI. Στη συνέχεια τοποθετείται η φλάσκα στον κλίβανο, αφού πρώτα ελεγχθεί στο μικροσκόπιο.

-Ακολούθως σε αποστειρωμένο erpendorf τοποθετούνται 90ml από το falcon (το οποίο έχει αναδεύτει καλά) και 10ml χρωστικής και μετρώνται στην πλάκα Neu-Bauer ο αριθμός των κυττάρων.

-Αφού διαπιστωθεί με κατάλληλους υπολογισμούς πόσα ml χρειάζονται μεταφέρονται από το falcon σε άλλο falcon και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10min.

- Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο,το pellet των κυττάρων που έχει σχηματιστεί σπάει και RPMI 5% προστίθεται σε κατάλληλη ποσότητα.

-Με την πιπέτα που παίρνει finntips, το falcon αναδεύεται κάθε φορά που λαμβάνεται από εκεί ποσότητα υγρού και έχει ρυθμιστεί κατάλληλα η πιπέτα, ώστε να αφήνει 100μl σε κάθε well του 96-well plate.

Παράδειγμα υπολογισμών δεύτερης μέρας Cytotoxicity:

Έστω ότι έχουμε μία κυτταρική σειρά και ένα φάρμακο να ελέγξουμε σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (100mM, 10mM, 1mM, 0,1Mm). Για κάθε συγκέντρωση του φαρμάκου χρειάζονται τρία κελιά.

Οπότε:

- 3x4=12 wells για τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου.
- συνήθως έχω 10 wells για T-zero και 6 wells για control.

Στα T-zero η ανάπτυξη διακόπτεται κατά την τρίτη μέρα του πειράματος οπότε χρησιμοποιείται για αυτά ένα ξεχωριστό 96-well plate.

Συμπεραίνουμε ότι ο συνολικός αριθμός wells που θα χρησιμοποιήσουμε είναι 28 wells, ωστόσο για να είμαστε βέβαιοι πως σε περίπτωση λάθους θα υπάρχει επαρκής ποσότητα υγρού στο falcon κάνουμε τους υπολογισμούς θεωρώντας πως ο συνολικός αριθμός wells είναι 40 wells. Αφού σε κάθε well θέλουμε 10000 cells και σε κάθε well βάζουμε 100μl χρειάζονται συνολικά 4000μl, δηλαδή 4ml.

Οπότε: 10000 cells ανά 100μl

δηλαδή 100000 cells ανά 1ml

Στο 1ml → 100000 cells
Στα 4ml → X

X=400000 cells

Υπολογίζεται από τη μέτρηση με Neu-Bauer πόσα κύτταρα υπάρχουν ανά ml και έστω πως διαπιστώνεται ότι υπάρχουν 270000 cells/ml.

Σε 1ml → 270000cells
Σε Y ml → 400000cells

Άρα Y=1,48ml

Οπότε αυτά τα 1,48ml μεταφέρονται σε νέο falcon, προστίθεται PBS, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10min κλπ.

3η μέρα: Στρώσιμο φαρμάκων

-Τα φάρμακα παραμένουν για 15-20min στον πάγκο ή στο υδατόλουτρο σε περίπτωση που φυλάσσονται στους 4°C ή στους -20°C, ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.

- Αρχικά στα T-zero:

- προστίθενται 100μl RPMI σε κάθε well και έπειτα
- συμπληρώνονται 50μl TCA, επίσης σε κάθε well και
- το plate των T-zero παραμένει για 1h στο ψυγείο.

Παρασκευή διαλύματος TCA 50%:

Σε μπουκάλι σκουρόχρωμο, αφού το TCA είναι φωτοευαίσθητο προσθέτονται: 100ml TCA 100%(sigma-ALDRICH Lot #BCBL7533V) και 100ml νερό(ultra pure).

- Σε 12-well plate προστίθεται σε κατάλληλες ποσότητες το RPMI στα αντίστοιχα wells των επιμέρους συγκεντρώσεων του φαρμάκου.
- Στη συνέχεια στο πρώτο well προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα φαρμάκου που έχει προκύψει βάση υπολογισμών.
- Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις μεταφέροντας ποσότητα στο από κάτω well με διαφορετικό πάντα tip στην πιπέτα.
- Αφού έχουν προκύψει οι επιμέρους συγκεντρώσεις του φαρμάκου προστίθεται ποσότητα 100μl σε κάθε well του 96-well plate στο οποίο έχει προαποφασιστεί πως θα προστεθεί η συγκεκριμένη συγκέντρωση του φαρμάκου.
- Έπειτα η διαδικασία επαναλαμβάνεται με την επόμενη συγκέντρωση του φαρμάκου. Σε αυτό το στάδιο πρέπει να ανακατεύονται τα φάρμακα με την πιπέτα κάθε φορά που γίνεται λήψη των 100μl.
- Τέλος προστίθενται 100μl RPMI στα control, χωρίς φάρμακα.

Μετά τη 1h παραμονής στους 4°C, το plate των T-zero ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και αφού στεγνώσει, αποθηκεύεται στο ψυγείο μέχρι την 5η μέρα.

Παράδειγμα υπολογισμών τρίτης μέρας cytotoxicity:

Για το φάρμακο P5 ισχύει ότι: $MW=412,512$ και θέλουμε $C_{αρχ}=20mM$, $V_{αρχ}=1ml$.

Οπότε $C=n/V \rightarrow C=m/Mr \cdot V \rightarrow m=C \cdot Mr \cdot V \rightarrow m=20 \cdot 412,512 \cdot 1=8,25mg$

-Επομένως 8,25mg από την ουσία και θα διαλυθούν σε $V_{τελ}=1ml$ με τη χρήση DMSO ως διαλυτικού παράγοντα.

-Γνωρίζουμε, άρα, ότι για το φάρμακο X ισχύει: $C_{αρχ}=20mM$ και $V_{αρχ}=1ml$ και επίσης πως για κάθε μία από τις επιμέρους C που θα δημιουργηθούν, θα πρέπει ο $V_{τελ}=1ml$.

-Οπότε από διαδοχική εφαρμογή του νόμου της αραιώσης προκύπτει η ποσότητα φαρμάκου που θα προστεθεί στα wells με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου, καθώς και η επιμέρους ποσότητες που θα μεταφερθούν στις αμέσως μικρότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου.

4η μέρα: Κενή μέρα

5η μέρα: Μέτρηση απορρόφησης

- Εκτός θαλάμου νηματικής ροής προστίθενται 50μl TCA σε κάθε well, ρίχνοντας το ήπια στα τοιχώματα. Σε αυτό το στάδιο δεν τίθεται ζήτημα μόλυνσης γιατί γίνεται ουσιαστικά μονιμοποίηση των κυττάρων.

-Το 96-well plate παραμένει για μία ώρα στο ψυγείο μετά την προσθήκη του TCA και

κατόπιν ξεπλένεται με απιονισμένο νερό.

-Αφού το plate στεγνώσει, προστίθεται η χρωστική SRB(φυλάσσεται στους 4°C) σε ποσότητα 50μl σε κάθε well και το plate παραμένει για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.

-Ακολουθεί πλύση του plate με CH₃COOH 1% το οποίο στεγνώνει και ακολουθεί η προσθήκη 150μl Trisma-Base σε κάθε well και το plate παραμένει για 10min στους 37°C στον κλίβανο.

-Ακολουθούν 10min στη μπαλαρίνα ώστε να κατανεμηθεί ομοιόμορφα το Trisma-Base σε κάθε well και στη συνέχεια ακολουθεί φωτομέτρηση.

Παρασκευή χρωστικής Sulforhodamine B (SRB):

Η χρωστική Sulforhodamine B(Sigma Life Science, CAS 3520-42-1) έχει τη μορφή σκόνης και παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 0,4% w/v σε 1% Acetic Acid.

Η απορρόφηση που δίνει τελικά το μηχάνημα μετρά την πυκνότητα των κυττάρων. Όσο πιο μικρή αυτή η τιμή, τόσο πιο δραστικό είναι το φάρμακο. Για παράδειγμα: Φάρμακο με απορρόφηση 0,150 παρουσιάζει καλύτερη δραστικότητα σε σχέση με την τιμή 0,750 ενός άλλου φαρμάκου.

Επομένως, χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης που αντικατοπτρίζουν τα κύτταρα την ώρα προσθήκης των ουσιών (Tz), τα κύτταρα μάρτυρες (control) καθώς και τα κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί αντίστοιχη ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας σε κάθε επιθυμητή συγκέντρωση(Ti), καθίσταται εφικτός ο υπολογισμός της ποσοστιαίας ανάπτυξης των κυττάρων για κάθε συγκέντρωση που έχει χρησιμοποιηθεί με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$ για συγκεντρώσεις όπου $Ti \geq Tz$

$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100$ για συγκεντρώσεις όπου $Ti < Tz$

Επίσης με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β δίνεται η δυνατότητα υπολογισμού τριών επιπλέον παραμέτρων:

Growth inhibition 50% (GI50): όπου είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου με την οποία επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50% και δίνεται από τον τύπο: $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$

Total growth inhibition (TGI): όπου είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται 100% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και δίνεται από τον τύπο: $Ti = Tz$

Lethal concentration 50%(LC50): όπου είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επέρχεται θάνατος στο 50% του αρχικού πληθυσμού των κυττάρων.

3.3 Αλγόριθμος COMPARE

Προκειμένου να διαπιστωθεί ο μηχανισμός δράσης των ουσιών χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος COMPARE. Το Developmental Therapeutics Programme του Εθνικού Ινστιτούτου καρκίνου των Ηνωμένων Εθνών δημιούργησε μία βάση δεδομένων που αποτελείται από φυτικές και μη ουσίες, έναντι 60 καρκινικών σειρών από διάφορους καρκινικούς τύπους. Για τη δημιουργία αυτού λαμβάνεται ο μέσος όρος τιμών για μία από τις τρεις παραμέτρους της SRB τεχνικής, ενδείκνυται αυτή της GI50, έναντι όλων των υπό εξέταση καρκινικών κυτταρικών σειρών. Με βάση το μέσο όρο τιμών απεικονίζεται η αντίστοιχη παράμετρος για όλες τις κυτταρικές σειρές σε ένα μέσο γράφημα (mean graph) και είναι χαρακτηριστικό για κάθε ουσία. Για τη δημιουργία του γραφήματος για κάθε καρκινική σειρά υπολογίζεται η διαφορά που προκύπτει από την τιμή της παραμέτρου GI50 αυτής της σειράς και του μέσου όρου τιμών GI50 από όλες τις σειρές που έχουν εξετασθεί. Οι θετικές τιμές επεκτείνονται στα δεξιά του μέσου όρου και εκφράζουν την ευαισθησία των κυτταρικών σειρών στο προϊόν που υπερβαίνουν το μέσο όρο. Οι αρνητικές τιμές επεκτείνονται στα αριστερά του μέσου όρου και εκφράζουν κυτταρικές σειρές που δείχνουν ανοχή στην επώαση με το υπό εξέταση προϊόν. Ο αλγόριθμος COMPARE έχει επομένως ως αποτέλεσμα τη ποσοτικοποίηση της ομοιότητας των mean graphs διαφορετικών ουσιών, προτείνει μέσου αυτού ουσίες που φέρουν την υψηλότερη συσχέτιση και έτσι δίνει τη δυνατότητα να προσδιοριστεί ένας υποθετικός μηχανισμός δράσης για την υπό εξέταση ουσία.

3.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΛΥΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

-Έλεγχος των κυττάρων στο μικροσκόπιο πριν την έναρξη της διαδικασίας και ακολουθούν τα βήματα του σπασίματος και της μέτρησης των κυττάρων στη Neu-Bauer.

-Αν η λύση αφορά ένα συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων και όχι όλα όσα υπάρχουν μέσα στο falcon σκ ακολουθείται η εξής πορεία:

π.χ. Έστω ότι για την κυτταρική σειρά HCT116 βρέθηκε από τη μέτρηση με τη Neu-Bauer ότι υπάρχουν 342.500 cells/ml. Για τη λύση χρειάζονται 3.000.000 κύτταρα, οπότε:

342.500 κύτταρα \longrightarrow 1ml

3.000.000 κύτταρα \longrightarrow X

X=8,75ml

Οπότε αυτά τα 8,75ml θα μεταφερθούν σε άλλο falcon.

-Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 5min.

-Απομάκρυνση του υπερκείμενου, «σπάει» το pellet και προσθέτουμε PBS.

-Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 5min.

-Απομάκρυνση του υπερκείμενου, «σπάει» το pellet και προστίθεται PBS.

-Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 5min.

-Αποχύνεται το υπερκείμενο, ΔΕΝ «σπάει» το pellet, αλλά το falcon τοποθετείται σε καθαρό χαρτί και παραμένει έως ότου στεγνώσει είτε μέσα, είτε έξω από τη hood για 5-10min.

Σε αυτό το στάδιο τα falcon αποθηκεύονται στους -80°C και να πραγματοποιηθεί η υπόλοιπη διαδικασία της λύσης επόμενη ημέρα.

Ισχύει ότι για κάθε 1.000.000 κύτταρα \longrightarrow 60μl RIPA 1x
έστω ότι έχω:

30.000.000 κύτταρα \longrightarrow X

X=1800μl RIPA 1x

-Για την παρασκευή του RIPA 1x χρησιμοποιούνται:

1) RIPA 10x , 2) Protease Inhibitor cocktail(SIGMA, Lot #094M4070V) , 3) Νερό(συνήθως Water for Injection, ή αλλιώς νερό ultra pure)

Παράδειγμα:

Αν θέλουμε να φτιάξουμε RIPA 1x με τελικό όγκο Vτελ=900μl χρειάζονται:

RIPA 10x: 90μl , PI cocktail: 9μl, Νερό:810μl

-Επομένως μέσα σε πάγο τοποθετούνται: τα falcon με το pellet των κυττάρων και το RIPA 1x που παρασκευάστηκε.

-Χρησιμοποιούνται erpendorfs ανάλογα με τον αριθμό των κυτταρικών σειρών οι οποίες προορίζονται για λύση.

-Έστω ότι σε κάθε falcon περιέχονται 3.000.000 κύτταρα, οπότε:

για κάθε 1.000.000 κύτταρα \longrightarrow 60μl RIPA 1x

3.000.000 κύτταρα \longrightarrow X

X=180μl RIPA 1x

Οπότε προστίθενται 180μl RIPA 1x στο falcon, «σπάει» το pellet και μεταφέρεται η ποσότητα στο αντίστοιχο erpendorf.

-Ακολουθεί vortex των erpendorfs για 1/2hr και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στους

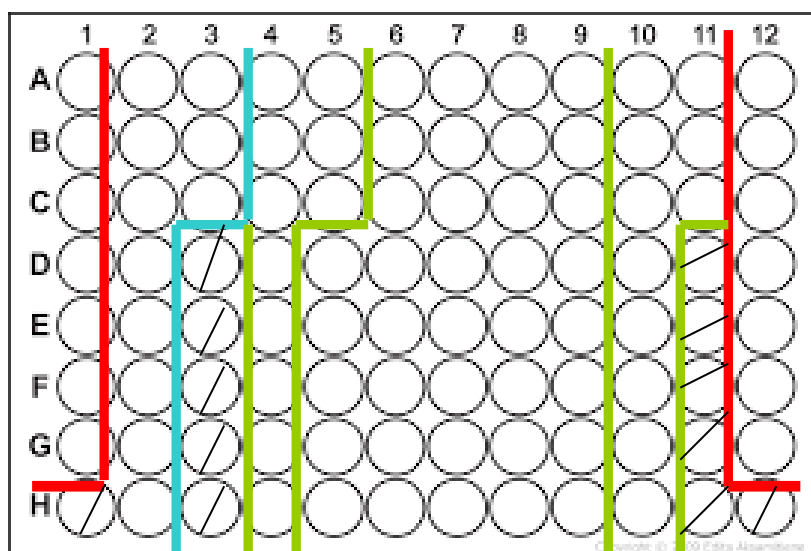
4°C για 20min στις 13000 στροφές.

-Το περιεχόμενο του eppendorf μεταφέρεται σε νέο eppendorf χωρίς όμως να μεταφερθεί με την πιπέτα το ίζημα που έχει κατακαθίσει και ξαναυποβάλλονται σε φυγοκέντρηση στους 4°C για 20min στις 13000 στροφές.

-Δουλεύοντας πάλι στον πάγο μεταφέρεται το περιεχόμενο του eppendorf σε νέο eppendorf και ακολουθεί τελευταία φυγοκέντρηση στους 4°C για 20min στις 13000 στροφές, μετά από την οποία τα eppendorfs αποθηκεύονται στους -80°C.

3.5 BRADFORD

Standards	Αραίωση 1/5	Αραίωση 1/10	Βοηθητικά Αραίωση 1/10	Βοηθητικά Standards
-----------	----------------	-----------------	---------------------------	------------------------



-Έστω ότι τα δείγματα στα οποία θα γίνει ποσοτικοποίηση της εμπριεχομένης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, είναι 12.

-Τα standards θα περιέχουν RIPA 1x αραιώσης 1/5 , γιατί και τα δείγματα είναι αραιωμένα σε RIPA 1x και αφού θα δημιουργηθούν οι αραιώσεις 1/5 και 1/10, παρασκευάζεται για τα standards RIPA 1x αραιώσης 1/5 για να έχουν τις ίδιες συνθήκες (δείγματα με standards).

-Έστω ότι χρειάζονται 200μl RIPA 1x αραιώσης 1/5.

-Παρασκευή RIPA 1x αραιώσης 1/5:

Για το RIPA 1x: 4μl RIPA 10x + 36μl UP water

Στη συνέχεια στα 40μl RIPA 1x προστίθενται 160μl UP water (ή PBS 1x).

-Παρασκευάζονται απευθείας στο ίδιο eppendorf και ακολουθεί vortex.

-Παρασκευή Working Reagent (WR) (ThermoScientific, Prod #23227):

- Για κάθε δείγμα χρειάζονται 200ml WR άρα για τα 12 δείγματα είναι απαραίτητα 2400ml = 2,4ml
- Παρασκευάζεται λίγο παραπάνω WR πχ 5ml.
- Έστω ότι $WR_A/WR_B = 50/1$
- Άρα τοποθετούνται στο falcon 5ml WR_A και 100ml WR_B
- Το falcon τοποθετείται σε σκοτεινό σημείο μέχρι να το χρησιμοποιηθεί.

-Παρασκευή των αραιώσεων 1/5 και 1/10 :

- Στις 1/5 προστίθενται σε όλα : 20ml UP water και στα 1/10 (στις βοηθητικές πίσω θέσεις) βάζω σε όλα : 45ml UP water.
- Στη συνέχεια στις αραιώσεις 1/5 προστίθενται 5ml από το δείγμα.
- Στις αραιώσεις 1/10 προστίθενται 5ml δείγμα στις βοηθητικές πίσω θέσεις.
- Από τις βοηθητικές θέσεις μεταφέρονται στις κύριες θέσεις των αραιώσεων 1/10 μόνο 25ml
- Ακολουθεί vortex πριν πάρουμε το δείγμα για να ανακατευτεί.

Για τα STANDARD χρησιμοποιείται η αλβουμίνη και στις πίσω βοηθητικές θέσεις προστίθενται:

1° well 25ml

2° well 90ml (τα παίρνω από το μπουκάλι και όχι από το 1° well) + 30ml RIPA 1x

3° well 80ml + 40ml RIPA 1x

4° well 75ml + 25ml RIPA 1x

5° well 50ml + 25ml RIPA 1x

6° well 30ml + 30ml RIPA 1x

7° well 20ml + 20ml RIPA 1x

-Προστίθεται πρώτα το RIPA 1x σε όλα τα well.

-Στις κύριες θέσεις μεταφέρονται 25ml.

-Πραγματοποιείται φωτομέτρηση.

Από τις τιμές που προκύπτουν από τη φωτομέτρηση κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη απορρόφησης-συγκεντρώσεων που θα χρησιμεύσει στον υπολογισμό των ποσοτήτων των δειγμάτων που θα φορτωθούν στην ηλεκτροφόρηση.

3.6 Ηλεκτροφόρηση

3.6.1 Παρασκευή διαλυμάτων

1) Running Buffer 10x , pH = 8,3(1Lt)

-Tris Base(Sigma #104K5402) 30,3gr.

-Glycine(Sigma Life Science, Lot #SZBF1530V) 144gr.

-SDS(sigma-ALDRICH, Lot #SLBL3120V) 10gr.

Προστίθεται νερό ultra pure με $V_{\text{τελ}}= 800\text{ml}$ πρώτα , ακολουθεί πεχαμέτρηση και το μπουκάλι παραμένει overnight στο ψυγείο. Την επόμενη μέρα γίνεται η τελική πεχαμέτρηση και αν χρειαστεί συμπληρώνεται νερό έως ότου $V_{\text{τελ}}= 1\text{Lt}$.

2) TrisCl 1M , pH=7,4(1Lt)

-121gr Tris-Base

Προστίθεται νερό ultra pure με $V_{\text{τελ}}= 800\text{ml}$ πρώτα , ακολουθεί πεχαμέτρηση και το μπουκάλι παραμένει overnight στο ψυγείο. Την επόμενη μέρα γίνεται η τελική πεχαμέτρηση και αν χρειαστεί συμπληρώνεται νερό έως ότου $V_{\text{τελ}}= 1\text{Lt}$.

3) Transfer Buffer 1x (1Lt)

-144gr Glycine

-30,3gr Tris-Base

4) TrisCl 1,5M , pH=8,8 (0,5Lt)

-90,75gr Tris-Base

Προστίθεται νερό ultra pure με $V_{\text{τελ}}= 800\text{ml}$ πρώτα , ακολουθεί πεχαμέτρηση και το μπουκάλι παραμένει overnight στο ψυγείο. Την επόμενη μέρα γίνεται η τελική πεχαμέτρηση και αν χρειαστεί συμπληρώνεται νερό έως ότου $V_{\text{τελ}}= 1\text{Lt}$.

5) TrisCl 0,5M , pH=6,8 (0,5Lt)

-30,25g Tris Base

Προστίθεται νερό ultra pure με $V_{\text{τελ}} = 400\text{ml}$ πρώτα , ακολουθεί πεχαμέτρηση και το μπουκάλι παραμένει overnight στο ψυγείο. Την επόμενη μέρα γίνεται η τελική πεχαμέτρηση και αν χρειαστεί συμπληρώνεται νερό έως ότου $V_{\text{τελ}} = 1\text{L}$.

6) SDS 10%

Προστίθενται 10gr SDS σε $V_{\text{τελ}} = 100\text{ml}$
Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

7) SDS 20%

Προστίθενται 20gr SDS σε $V_{\text{τελ}} = 100\text{ml}$
Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

8) Running Buffer 1x

Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται:
-900ml νερό ultra pure
-100ml Running Buffer 10X

9) Transfer Buffer 1x

Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται:
-700ml νερό UP
- 200ml μεθανόλη (sigma-ALDRICH, Lot #STBG0222V)
-100ml Transfer Buffer 10X

10) Ponceau

Παρασκευάζεται 0,1% ponceau σε 5% Acetic acid:

Για το acetic acid 5% χρησιμοποιείται:
-Σε 100ml νερό ultra pure → 5ml acetic acid 100%

Άρα 5ml acetic acid και 95ml νερό ultra pure.

-Σε 100ml acetic acid 5% → 0,1 gr ponceau (AppliChem CAS-No:6226-79-5)

11) TBS (Trisbuffer Saline)

-450ml NaCl 0,9%

-50ml TrisCl 1M

12) TBS 1x

-450ml NaCl 0,9%

-50ml TrisCl 1x

-500ml Tween 20

13) TTBS 5% ορού FBS

-10ml FBS

-190ml TTBS

14) NaCl 0,9% ($V_{\text{τελ}} = 2\text{Lt}$)

-0.9g NaCl στα 100ml UP water

-9g NaCl στα 1000ml UP water

Άρα 18g NaCl στα 2000ml UP water.

3.6.2 ΕΤΟΙΜΑΣΙΑ GEL

-Τα τζαμάκια της ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται στη συσκευή προετοιμασίας gel και με σύριγγα προστίθεται νερό ultra pure στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των τζαμιών για να διαπιστωθεί αν το νερό τρέχει από κάτω και δεν παραμένει μόνο στον ενδιάμεσο χώρο. Τα τζαμάκια παραμένουν με το νερό για 10-15min και κατόπιν το νερό αποχύνεται με μία κίνηση στο νεροχύτη και με διηθητικό χαρτί στεγνώνεται ο ενδιάμεσος χώρος.

-Παρασκευάζονται τα διαλύματα resolving και stalking.

- resolving gel 12%(παρασκευή σε falcon):

1) νερό UP 3,4ml

2) ακρυλαμίδη (BIO-RAD, CATALOG 161-0154) 4ml

3) gel Buffer 2,5ml (TrisCl 1,5M)

4) SDS 10% : 100μl

- stalking gel 5% :

- 1) νερό UP 5,7ml
- 2) ακρυλαμίδη 1,7ml
- 3) gel Buffer 2,5ml (TrisCl 0,5M)
- 4) SDS10%:100ml (κάνω vortex)

Το stalking διάλυμα είναι πάντα 5% . Το resolving εξαρτάται από το MW της pro. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται για τον έλεγχο της έκφρασης sigma1 και sigma2 οι οποίες έχουν μικρό MB. Γι αυτό το λόγο το resolving gel πρέπει να είναι πυκνό, οπότε παρασκευάζεται resolving gel 12%.

Το APS (ammonium persulfate) παρασκευάζεται πάντα τελευταία στιγμή και περιέχει:
 -50mg APS(sigma, Lot 082K1126) που τοποθετούνται σε erpendorf και
 -500ml νερό UP

-Πίσω στο πάγκο εργασίας , προστίθενται: Στο διάλυμα για το resolving gel: 1) 50μl APS, 2) 5μl TEMED(AppliChem, CAS No:11-18-9)-Ακολουθεί vortex στο falcon του διαλύματος resolving και στη συνέχεια προστίθεται μεταξύ των τζαμιών το οποίο πήζει σε περίπου 20min

-Στο διάλυμα για το stalking gel προστίθενται: 1) 50μl APS, 2)10μl TEMED
 -Προστίθεται το stalking gel ανάμεσα στα τζαμάκια και έπειτα τοποθετούνται τα δεντράκια για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια.
 -Τα δεντράκια απομακρύνονται και τα τζαμάκια τοποθετούνται κατάλληλα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, ενώ το running buffer 1x προστίθεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης κατόπιν ανακίνησης.

3.6.3 Ετοιμασία για φόρτωση δειγμάτων

-Τα διαλύματα από τους 4°C που διατηρούνται μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου και τα δείγματα από τους -80°C μετακινούνται στον πάγο.

-Το υδατόλουτρο ανοίγει στους 95°C .

-Παρασκευάζεται το loading buffer(σε erpendorf):

- Loading Buffer

- 1) 400μl Glycerine(ROTH Nr.3783.1) (ενδείκνυται η κοπή της μύτης από το tipp για να τραβιέται πιο εύκολα, επειδή είναι πολύ παχύρρευστη, λόγω υψηλού ιξώδους.)
- 2) 100μl SDS 20%
- 3) 100μl Tris 0,5M
- 4) 100μl Bromophenol Blue 0,2% (AppliChem CAS-No: 34725-61-6)
- 5) 100μl Μερκαπτοαιθανόλη (MERCCK UN2966) (καρκινογόνος ουσία για αυτό προστίθεται στον απαγωγό.)

-Σε στατώ τοποθετούνται erpendorfs ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων με τα οποία θα πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση. Τα erpendorfs αριθμούνται με τον ίδιο

τρόπο που ήταν αριθμημένα τα δείγματα και στη Bradford.

-Προστίθεται σε όλα τα erpendorfs η σωστή ποσότητα από το PBS 1x και η σωστή ποσότητα από το δείγμα, όπως υποδεικνύεται από τη Bradford.

-Στον απαγωγό προστίθενται 100μl μερκαπτοαιθανόλης στο loading buffer και ακολουθεί vortex.

-Προστίθενται loading buffer σε κάθε δείγμα (το μισό της ποσότητας που περιέχεται σε κάθε erpendorf).

-Τα erpendorfs βράζουν για 5min στους 95°C. Το SDS που είναι αποδιατακτικός παράγοντας χρειάζεται θέρμανση για να καταστρέψει την 3^οταγη και 4^οταγη δομή των πρωτεϊνών και έτσι να επανέλθουν στην 1^οταγη δομή τους και να τρέξουν με βάση το MB τους.

-Ακολουθεί spin των δειγμάτων για ~ 5s.

-Στις ακριανές θέσεις του gel προστίθενται 4μl το marker.

-Από τα δείγματα φορτώνεται ποσότητα που καθορίζεται από τη μέθοδο Bradford, πχ. 15μl.

-Το καπάκι τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ξεκινάει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

-Παρασκευή transfer buffer:

1) 700ml νερό ultra pure

2) 200ml μεθανόλη

3) 100ml transfer buffer 10x

Το transfer buffer ετοιμάζεται και τοποθετείται στο ψυγείο μέχρι την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης.

3.6.4 Στάδιο μεταφοράς της πρωτεΐνης στη μεμβράνη

-Στο νεροχύτη αποχύνεται το running buffer 1x.

-Οι μεμβράνες PVDF ενεργοποιούνται με εμβάπτιση για 1min στη μεθανόλη και στη συνέχεια περιστρέφονται στη μπαλαρίνα. Αμέσως μετά ξεπλένονται με transfer buffer πριν τοποθετηθούν στην κασέτα.

-Το gel αποκολλάται ανάμεσα από τα τζάμια. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στον προσανατολισμό του gel.

-Το gel και η μεμβράνη PVDF γίνονται "sandwich" ανάμεσα σε σφουγγαράκια και διηθητικό χαρτί (σφουγγαράκι-σφουγγαράκι-διηθητικό χαρτί-gel-μεμβράνη-διηθητικό χαρτί-σφουγγαράκι) και όλο μαζί το σύστημα τοποθετείται σε κατάλληλες κασέτες προκειμένου να διασφαλιστεί πως δεν υπάρχουν φουσκάλες μεταξύ του gel και της μεμβράνης.

-Η κασέτα εμβαπτίζεται σε transfer buffer και σε κατάλληλη συσκευή στην οποία ασκείται ηλεκτρικό πεδίο.



Εικόνα: ενδεικτική δομή κασέτας.

-Οι μεμβράνες αφαιρούνται προσεκτικά από την κασέτα και εμβαπτίζονται σε μικρή ποσότητα χρωστικής ροnceau 0,1%w/v, ώστε να διαπιστωθεί αν οι προ έχουν περάσει στη μεμβράνη και δεν παρέμειναν κολλημένες στο gel.

3.6.5 Western Blot

-Οι μεμβράνες (που διατηρούνται διαρκώς ενυδατωμένες στο ροnceau κόβονται σε δύο σημεία οπότε και προκύπτουν 3 κομμάτια. Τα σημεία κοπής επιλέγονται με βάση το MW των πρωτεϊνών που εξετάζονται.

-Τα κομμάτια που δεν χρειάζονται αποθηκεύονται στους -20°C τυλιγμένα σε ζελατίνη σε περίπτωση που χρειαστούν για μελλοντική χρήση.

-Τα κομμάτια της μεμβράνης PVDF που θα χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη των πρωτεϊνών επωάζονται για 1h με TTBS 5%.

-Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται overnight με το πρωτογενές αντίσωμα sigma1(sc-166392 Lot #D1013 Santa Cruz Biotechnology) στους 4°C, το οποίο έχει αραιωθεί 1/500 με TTBS 5% ορού FBS.

-Την επόμενη μέρα πραγματοποιούνται 3 πλύσεις της μεμβράνης για 5min η κάθε μία με TTBS 1x.

-Ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα anti-mouse(upstate Lot#29574) για 1h το οποίο είναι αραιωμένο 1/6000 σε TTBS 5% ορού FBS .

-Πραγματοποιούνται και πάλι 3 πλύσεις με TTBS 1x.

-Γίνεται εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

-Αντίστοιχα για τον έλεγχο τον σίγμα 2 υποδοχέων γίνεται επώαση της μεμβράνης όλη τη νύχτα με sigma 2(cell signaling 13856P), αραιωμένο 1/1000 σε TTBS 5% ορού FBS και την επόμενη μέρα μετά από τρεις πλύσεις με TTBS 1x, ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit (SIGMA Lot #SLBP3451V) που έχει αραιωθεί 1/2000 επίσης με TTBS 5% ορού FBS.

4. Αποτελέσματα

4.1 Μελέτη της κυτταροτοξικής και αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των φαρμάκων P5 και FP5 με εφαρμογή του πειράματος κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β.

Τα αποτελέσματα από την μελέτη της κυτταροτοξικής και κυτταροστατικής δράσης των δύο φαρμάκων έναντι των έντεκα διαφορετικών ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1 και Γράφημα 4.1 για το φάρμακο P5, ενώ για το φάρμακο FP5 παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2 και Γράφημα 4.2.

Όσο αφορά τη δράση του P5, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.1, παρουσίασε κατά γενική ομολογία υψηλή ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης όπως φαίνεται από τις τιμές της παραμέτρου GI50, όπου σε επτά από τις έντεκα συνολικά εξεταζόμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές παρουσιάζει τιμή μικρότερη από 10 μ M. Οι τιμές της παραμέτρου LC50 υποδηλώνουν μέτρια κυτταροτοξική δράση, με τις τιμές να κυμαίνονται από 75-100 μ M, με εξαίρεση τις κυτταρικές σειρές SKmel28 και MB231 όπου η κυτταροτοξική δράση είναι αισθητά καλύτερη με τιμές 26,8 μ M και 42,2 μ M αντίστοιχα.

Σχετικά τώρα με τη δράση του FP5, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.2, φαίνεται πως έχει μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης σε σχέση με το P5, αφού και στις έντεκα κυτταρικές σειρές η τιμή της παραμέτρου GI50 είναι μικρότερη από 10 μ M. Όμοια τώρα με το P5, η κυτταροτοξική δράση του φαρμάκου είναι μέτρια με εξαίρεση τις κυτταρικές καρκινικές σειρές SKmel28 και MB231 όπου σε αυτές παρουσιάζει βελτιωμένη κυτταροτοξική δράση.

Η κυτταρική σειρά SKmel28 έδειξε την πιο μεγάλη ευαισθησία απέναντι και στα δύο εξεταζόμενα φάρμακα, ενώ τη σημαντικότερη και πιο αξιόλογη δράση έδειξε το FP5 σε σύγκριση με το P5 παρουσιάζοντας μέση τιμή της παραμέτρου GI50 5,5 μ M. Το FP5 έδειξε επίσης την πιο αξιόλογη κυτταροτοξική δράση αφού η μέση τιμή της παραμέτρου LC50 υπολογίστηκε στα περίπου 70 μ M.

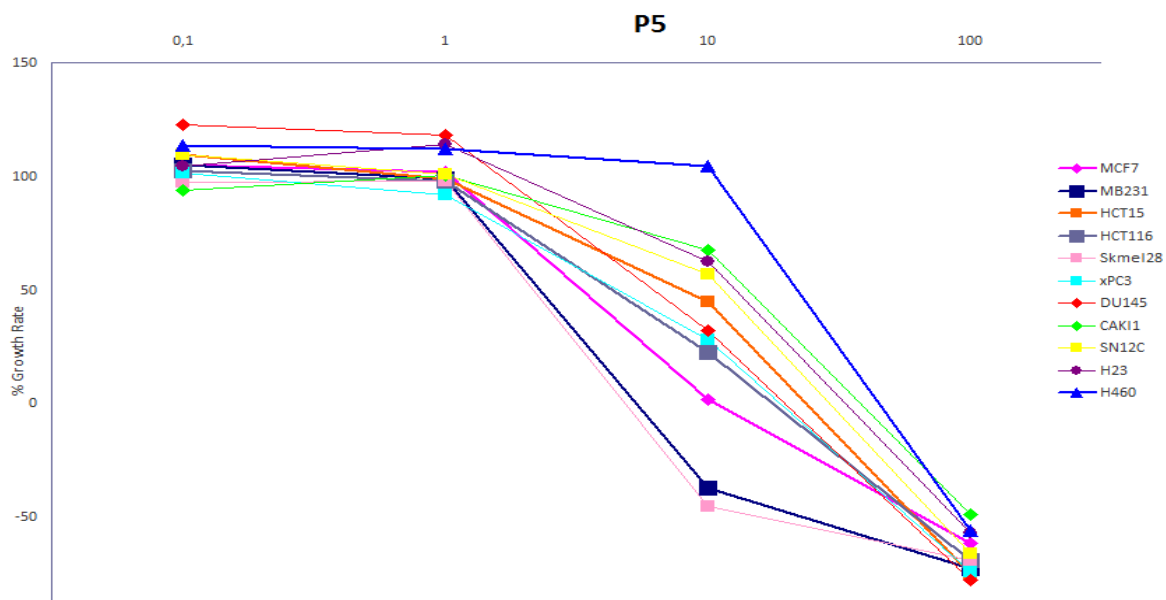
	NCI-H23	NCI-H460	HCT116	HCT15	SK-MEL-28	CAKI-1	SN12C	PC-3	DU145	MCF7	MDA-MB231
GI50	19,3	40,5	6,7	9,1	4	23,6	15	6,9	8,1	5,7	4,2
TGI	56,9	68,5	32,3	43,6	7,1	62,3	51,7	13,9	36,4	12,6	7,5
LC50	94,6	96,6	81,4	81,1	26,8	100,9	88,3	78,8	77,4	83,5	42,2

Πίνακας 4.1: Κυτταροτοξική δράση του P5

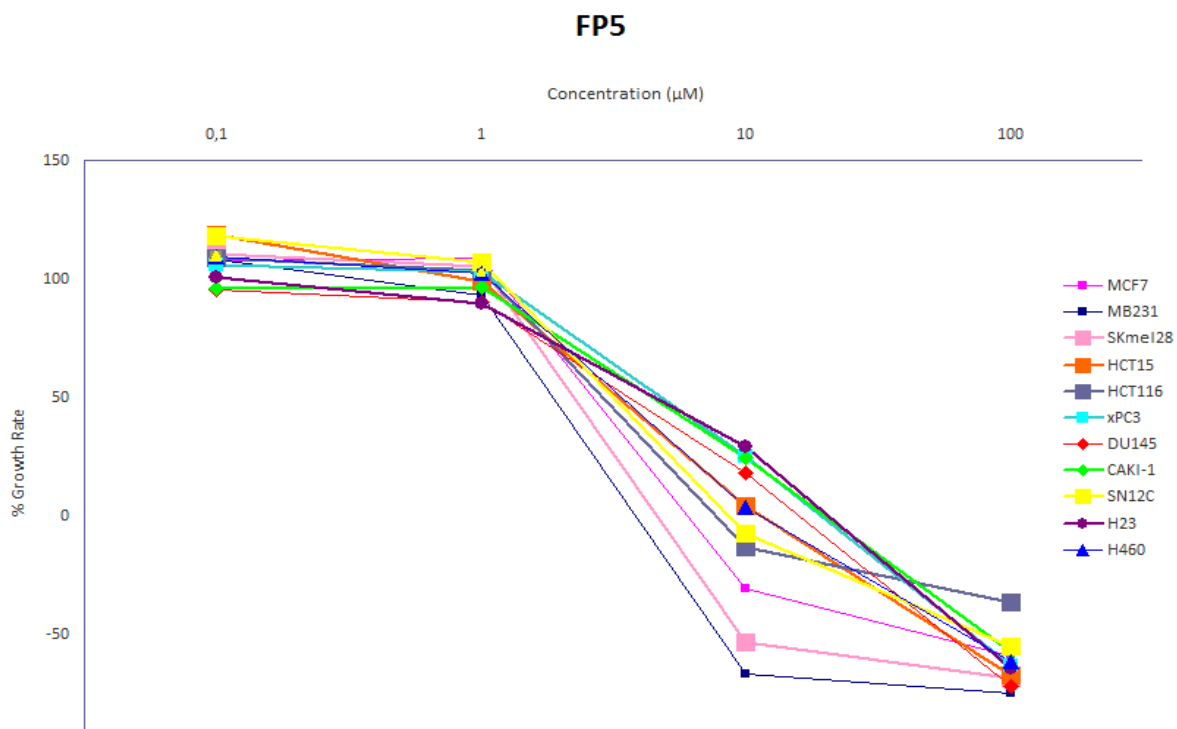
	NCI-H23	NCI-H460	HCT116	HCT15	SK-MEL-28	CAKI-1	SN12C	PC-3	DU145	MCF7	MDA-MB231
GI50	6,9	5,7	5,1	5,6	4,1	6,8	5,5	7,1	6	4,8	3,4
TGI	38	14,5	9	15,1	7	36,9	9,4	35,3	27,9	8	6,2
LC50	85,9	83,9	71,2	77,8	9,8	91,7	89,7	86,3	88	70,6	9,1

Πίνακας 4.2: Κυτταροτοξική δράση του FP5

Τα αποτελέσματα και για τις δύο ενώσεις αποτελούν τη μέση τιμή από τρία ανεξάρτητα πειράματα.



Γράφημα 4.1: Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων ύστερα από επώαση με το P5.



Γράφημα 4.2: Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων ύστερα από επώαση με το FP5.

4.2 Έλεγχος της παρουσίας σ_1 και σ_2 υποδοχέων στις καρκινικές κυτταρικές σειρές

Προκειμένου να διαπιστωθεί η αρχική υπόθεση, ότι δηλαδή τα φάρμακα P5 και FP5 πιθανώς δρουν ως σίγμα προσδέτες πραγματοποιήθηκε η τεχνική των στυπωμάτων (Western blot), ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη σίγμα υποδοχέων στις επιφάνειες των καρκινικών κυττάρων και στη συνέχεια να συσχετισθεί η παρουσία ή η απουσία τους με την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου στην εν λόγω καρκινική κυτταρική σειρά.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το στύπωμα κατά Western συνοψίζονται στην Εικόνα 4.γ και στα Διαγράμματα 4.γ και 4.δ για το υποδοχέα σίγμα 1 και για τον υποδοχέα σίγμα 2.

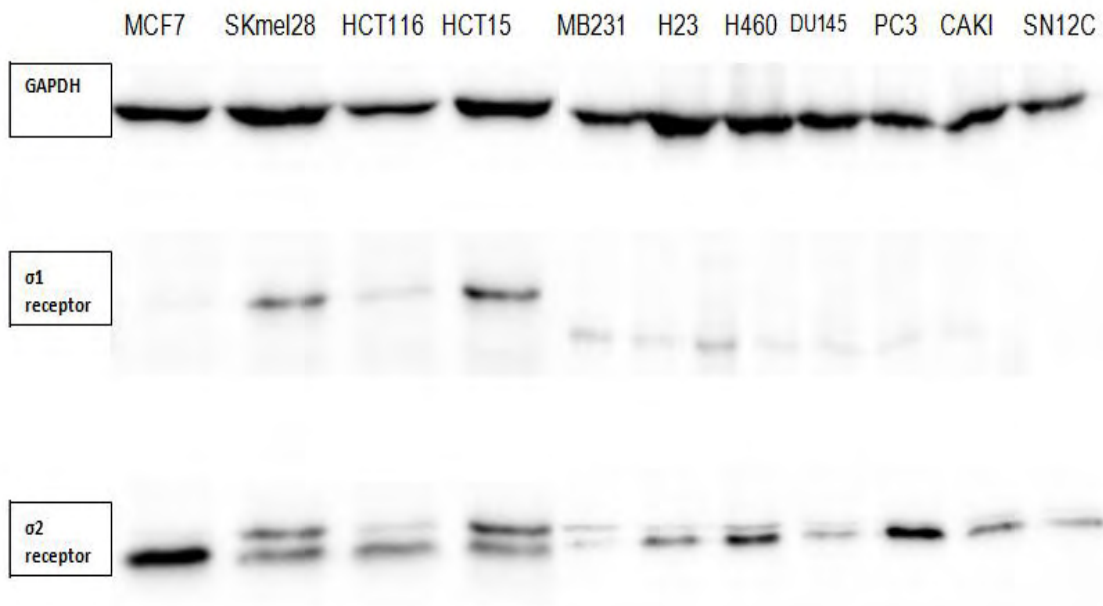
Βάση των αποτελεσμάτων μπορεί κανείς να συμπεράνει πως στην κυτταρική σειρά SKmel28 όπου τα φάρμακα παρουσιάζουν βέλτιστη δράση η παρουσία σίγμα 1 και σίγμα 2 υποδοχέων κυμαίνεται σε ικανοποιητικά επίπεδα συγκριτικά με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές όπου η παρουσία σίγμα 1 υποδοχέων είναι ελάχιστη.

Αντίθετα στην κυτταρική σειρά MB231 στην οποία και τα δύο φάρμακα παρουσιάζουν τη δεύτερη υψηλότερη κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση τους οι συγκεντρώσεις και των δύο σίγμα υποδοχέων είναι αρκετά μικρές.

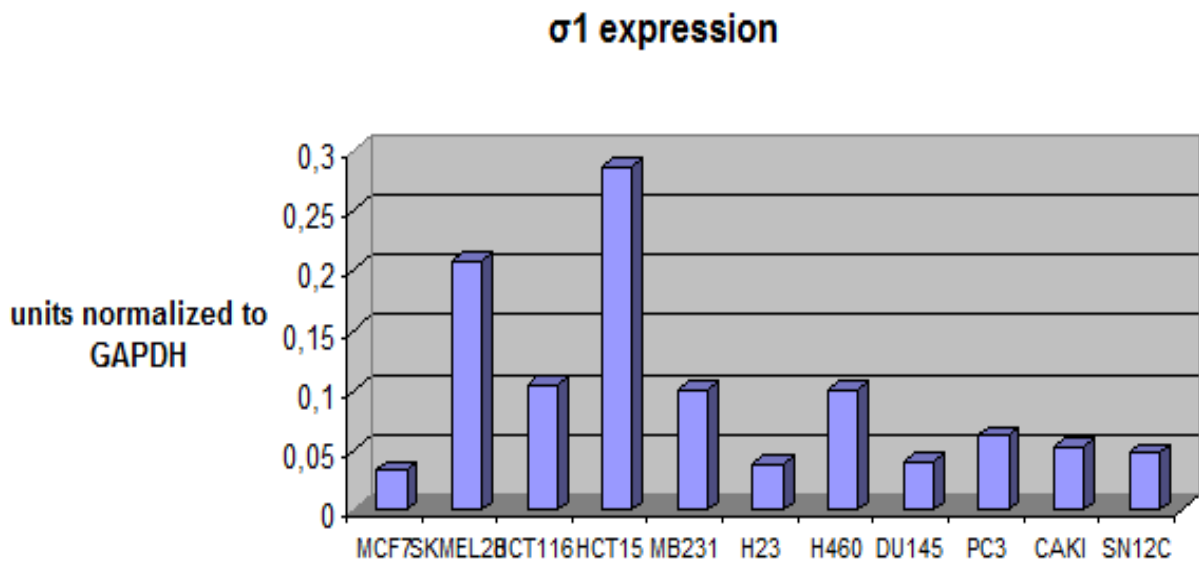
Στις κυτταρικές σειρές, τώρα MCF7 και HCT116 όπου το φάρμακο εμφανίζει καλή κυτταροστατική δράση οι συγκεντρώσεις του σ_1 υποδοχέα είναι πολύ ελάχιστες, ενώ οι συγκεντρώσεις του σ_2 υποδοχέα είναι εμφανώς μεγαλύτερη στην κυτταρική σειρά MCF7.

Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σ_1 υποδοχείς όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα 4.γ παρουσιάζει η κυτταρική σειρά HCT15 για την οποία τα πειράματα κυτταροτοξικότητας και των δύο ενώσεων έδειξαν καλή κυτταροστατική και μέτρια κυτταροτοξική δράση. Η καρκινική κυτταρική σειρά PC3 παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση για σ_2 υποδοχείς και τα πειράματα κυτταροτοξικότητας και των δύο ενώσεων έδειξαν, επίσης, καλή κυτταροστατική και μέτρια κυτταροτοξική δράση.

Γενικότερα η απουσία ενός επαναλαμβανόμενου μοτίβου όσον αφορά την παρουσία ή μη των σίγμα υποδοχέων στις καρκινικές κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν και ιδίως σε αυτές όπου τα φάρμακα παρουσίασαν ικανοποιητική δράση οδηγεί σε επισφαλή συμπεράσματα σχετικά με το κατά πόσο οι ενώσεις P5 και FP5 δρουν ως σίγμα προσδέτες.

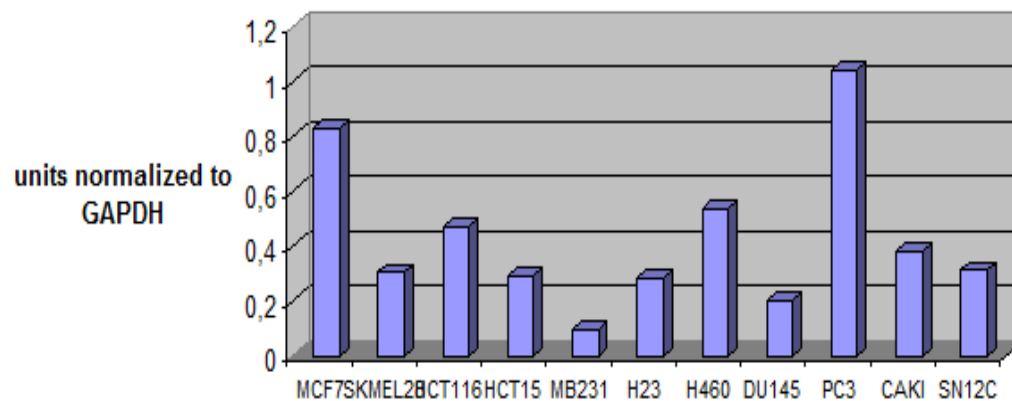


Εικόνα 4.γ: Παρουσιάζεται το αποτέλεσμα του στυπώματος κατά Western για το GAPDH, τους σίγμα1 και τους σίγμα2 υποδοχείς.



Διάγραμμα 4.γ: Παρουσιάζεται ποσοτικά η συγκέντρωση των σίγμα 1 υποδοχέων σε κάθε μία καρκινική κυτταρική σειρά.

σ2 expression



Διάγραμμα 4.δ: Παρουσιάζεται ποσοτικά η συγκέντρωση των σίγμα 2 υποδοχέων σε κάθε μία καρκινική κυτταρική σειρά.

4.3 Εκτίμηση του μηχανισμού δράσης των φαρμάκων P5 και FP5

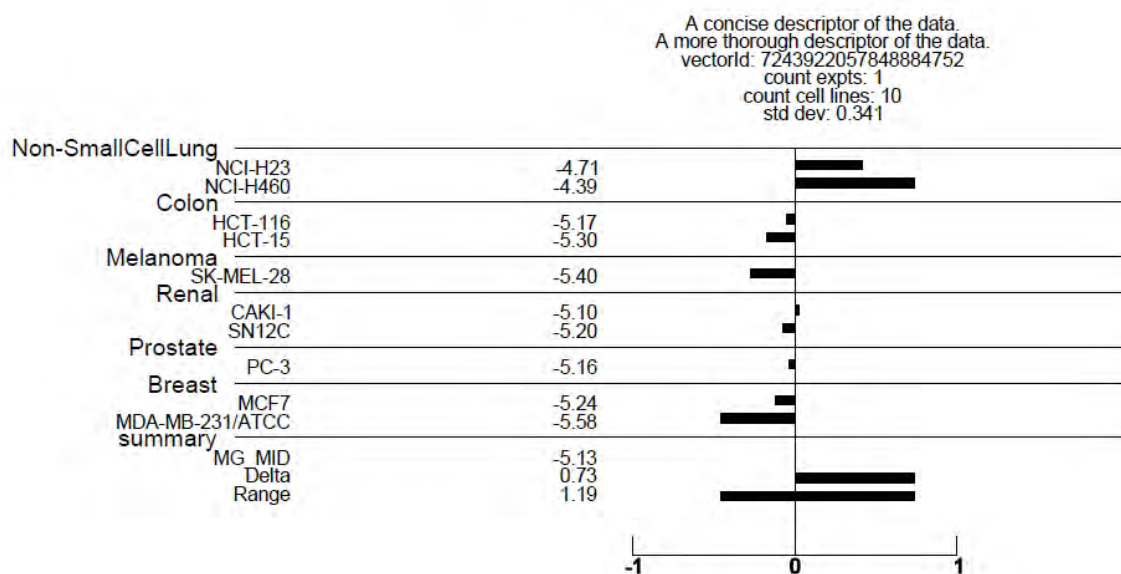
Ο μέσος όρος των τιμών της παραμέτρου GI50 για τις εξεταζόμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία του mean graph για το P5 και το FP5 αντίστοιχα. Με τη χρήση του αλγορίθμου COMPARE η δράση των υπό εξέταση φαρμάκων συγκρίθηκε με αυτές άλλων γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων που υπάρχουν στη βάση δεδομένων του Εθνικού Ιδρύματος Καρκίνου των Ηνωμένων Εθνών και έτσι έγινε επομένως μία πρώτη προσπάθεια εκτίμησης του μηχανισμού δράσης των νέων φαρμάκων.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το P5 παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.α και στο Γράφημα 4.α, ενώ τα αποτελέσματα για το FP5 φαίνονται στην Εικόνα 4.β και στο Γράφημα 4.β.

Το P5 σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον αλγόριθμο COMPARE φαίνεται πως ομοιάζει με γνωστά φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των αλκυλιωτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται ως βασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου. Το πρώτο σε ομοιότητα του μηχανισμού δράσης φάρμακο είναι το AZQ, ακολουθούμενο από τη σισπλατίνη, τη μπλεομυκίνη, την καρβοπλατίνη και το thio-tera. Το AZQ και το thio-tera δρουν ως αλκυλιωτικοί παράγοντες οι οποίοι εκδηλώνουν κυτταροτοξικές ενέργειες μέσω μεταφοράς των αλκυλομάδων τους σε διάφορα κυτταρικά συστατικά. Οι αλκυλίωσεις του DNA εντός του πυρήνα πιθανόν να αντιπροσωπεύουν τις κύριες αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Η σισπλατίνη και η καρβοπλατίνη ανήκουν στην κατηγορία των συγγενών φαρμάκων που ενδεχομένως δρουν ως αλκυλιωτικοί παράγοντες, έχουν δηλαδή μηχανισμούς δράσης που εμπλέκουν την αλκυλίωση. Πιο συγκεκριμένα η σισπλατίνη και όμοια και η καρβοπλατίνη θανατώνει τα κύτταρα σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλει τη βιοσύνθεση του DNA και συνδέεται με το DNA μέσω σχηματισμού ενδοελικοειδών διασταυρούμενων δεσμών.

Για το FP5, όμως, δε φαίνεται να προκύπτει από το COMPARE κάποια ξεκάθαρη εικόνα για το μηχανισμό δράσης του. Το πρόγραμμα προτείνει κατά σειρά ελαττούμενης ομοιότητας δράσης αρχικά το glycohalic acid, τη μεθοτρεξάτη η οποία δρα ως ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος που συνδέεται στη διυδροφυλλική αναγωγή επηρεάζοντας έτσι τη σύνθεση της αναχθείσης μορφής. Η απουσία αυτού του συμπαραγόντα διακόπτει τη σύνθεση του θυμιδυλικού, των πουρινικών νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων σερίνης και μεθειονίνης, τη μπλεομυκίνη η οποία ανήκει στις ανθακυκλίνες και δρα μέσω σύνδεσης με το DNA και οδηγεί σε διασπάσεις της μονής και διπλής έλικας σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες και αναστέλλοντας τη βιοσύνθεση του DNA, το 3HP και το asaley το οποίο δρα ως αλκυλιωτικός παράγοντας. Συμπερασματικά, όλες οι παραπάνω ουσίες φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης και έτσι δεν είναι εφικτό να προταθεί ένας καθολικός τρόπος δράσης του FP5.

Developmental Therapeutics Program Mean Graph
Selected Data Vectors



Γράφημα 4.α: Μέσο γράφημα για το P5

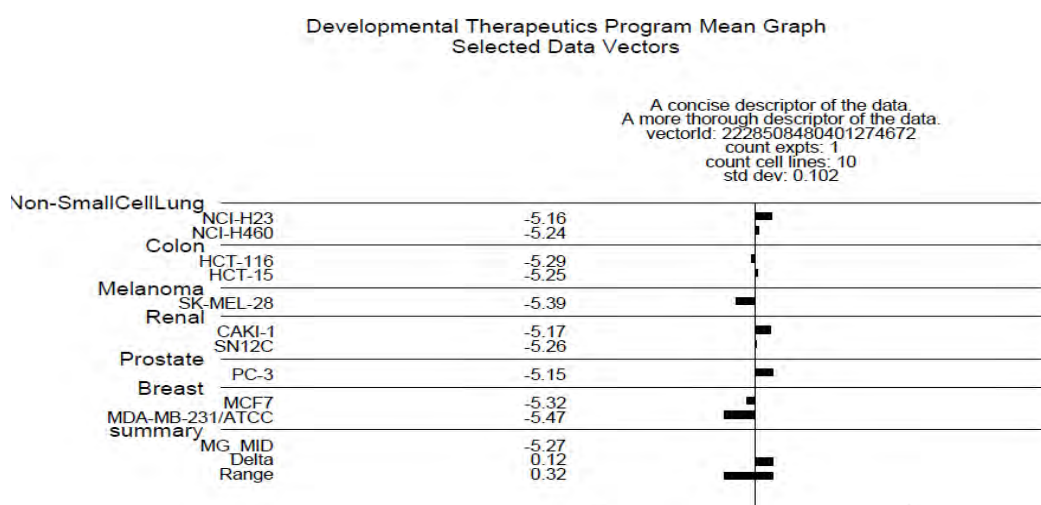
Στο Γράφημα 4.α παρουσιάζεται η ευαισθησία και η αντοχή των κυτταρικών σειρών σε σχέση με την αντιπολλαπλασιαστική δράση του P5. Όσο πιο αριστερά είναι οι ράβδοι μιας σειράς σε σχέση με το μέσο όρο τόσο πιο ευαίσθητη είναι η συγκεκριμένη καρκινική σειρά στη δράση του P5. Αντίθετα όσο πιο δεξιά μετατοπισμένες βρίσκονται οι ράβδοι μιας σειράς τόσο πιο ανθεκτική είναι η συγκεκριμένη σειρά στη δράση του P5.

Rank	Correlation	namecode	Seed Vector ident For Display	Seed Vector descriptor For Display	Target Vector ident For Display	Target Vector descriptor For Display	Count Common Cell Lines	Seed Standard Deviation	Target Standard Deviation
1	0.932	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S182986 Endpt:GI50 Expld:AVGDATA hiConc:-3.5	AZQ	7	0.331	0.425
2	0.93	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S119875 Endpt:GI50 Expld:AVGDATA hiConc:-3.3	cisplatin	10	0.324	0.436
3	0.911	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S125066 Endpt:GI50 Expld:AVGDATA hiConc:-4.5	bleomycin	7	0.331	0.993
4	0.903	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S241240 Endpt:GI50 Expld:AVGDATA hiConc:-3.8	CBDCA (carboplatin)	10	0.324	0.283
5	0.899	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S8398 Endpt:GI50 Expld:AVGDATA hiConc:-4.0	thio-tepa	7	0.331	0.599

Εικόνα 4.α: COMPARE ανάλυση για το P5.

Ο αλγόριθμος COMPARE έχει ως αποτέλεσμα την ποσοτικοποίηση της ομοιότητας των μέσων γραφημάτων διαφορετικών ουσιών. Υπολογίζοντας τη σταθερά συσχέτισης κατά Pearson Correlation Coefficient της υπό εξέταση ουσίας σε σχέση με όλες τις άλλες εγγεγραμμένες ουσίες στη βάση του NCI, προτείνει ουσίες που συσχετίζονται περισσότερο με το εξεταζόμενο φάρμακο και έτσι μπορεί να προκύψει ένα πρώτο συμπέρασμα σχετικά με το μηχανισμό δράσης της ουσίας.

Όμοια προέκυψαν και τα αποτελέσματα για το φάρμακο FP5:



Γράφημα 4.β: Μέσο γράφημα για το FP5.

Rank	Correlation	namecode	Seed Vector ident For Display	Seed Vector descriptor For Display	Target Vector ident For Display	Target Vector descriptor For Display	Count Common Cell Lines	Seed Standard Deviation	Target Standard Deviation
1	0.813	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S267213 Endpt:G150 Expld:AVGDATA hiConc:-2.9	glycolalic acid	10	0.097	0.119
2	0.778	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S740 Endpt:G150 Expld:AVGDATA hiConc:-3.8	methotrexate	10	0.097	1.028
3	0.738	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S125086 Endpt:G150 Expld:AVGDATA hiConc:-4.0	bleomycin	10	0.097	0.773
4	0.734	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S95878 Endpt:G150 Expld:AVGDATA hiConc:-3.0	3HP	10	0.097	0.246
5	0.733	PUBLIC	A concise descriptor of the data.	A more thorough descriptor of the data.	NSC:S167780 Endpt:G150 Expld:AVGDATA hiConc:-4.0	asaley	6	0.077	0.269

Εικόνα 4.β: COMPARE ανάλυση για το FP5.

5. Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψιν το πείραμα κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β διαπιστώνει κανείς πως και οι δύο ενώσεις, και ιδιαίτερα η FP5, παρουσιάζουν ικανοποιητική αντιπολλαπλασιαστική δράση, ενώ οι τιμές της παραμέτρου LC50 υποδηλώνουν μέτρια κυτταροτοξική δράση, με τις τιμές να κυμαίνονται από 75-100μΜ, με εξαίρεση τις κυτταρικές σειρές SKmel28 και MB231 όπου η κυτταροτοξική δράση είναι βελτιωμένη.

Η εκτίμηση του μηχανισμού δράσης των δύο φαρμάκων έγινε με τη χρήση του αλγορίθμου COMPARE όπου η δράση των υπό εξέταση φαρμάκων συγκρίθηκε με αυτές άλλων γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων. Το P5 σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον αλγόριθμο COMPARE φαίνεται πως ομοιάζει με γνωστά φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των αλκυλιωτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται ως βασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου, ενώ για το FP5, δε φαίνεται να προκύπτει από το COMPARE κάποια ξεκάθαρη εικόνα για το μηχανισμό δράσης του.

Η τεχνική των συπυωμάτων αποκάλυψε πως στην κυτταρική σειρά SKmel28 όπου οι ενώσεις παρουσιάζουν βέλτιστη δράση η παρουσία σίγμα 1 και σίγμα 2 υποδοχέων κυμαίνεται σε ικανοποιητικά επίπεδα. Αντίθετα στην κυτταρική σειρά MB231 στην οποία και οι δύο ενώσεις παρουσιάζουν τη δεύτερη υψηλότερη κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση τους οι συγκεντρώσεις και των δύο σίγμα υποδοχέων είναι αρκετά μικρές. Στις κυτταρικές σειρές, τώρα MCF7 και HCT116 όπου το φάρμακο εμφανίζει καλή κυτταροστατική δράση οι συγκεντρώσεις του σ1 υποδοχέα είναι πολύ ελάχιστες, ενώ οι συγκεντρώσεις του σ2 υποδοχέα είναι εμφανώς μεγαλύτερη στην κυτταρική σειρά MCF7.

Εν κατακλείδι, θα ήταν αρκετά ενδιαφέρον να υπάρξει πιο ενδελεχή μελέτη της δραστηριότητας των δύο ενώσεων σε ακόμη περισσότερες καρκινικές κυτταρικές σειρές, καθώς τα ευρήματα της παρούσας εργασίας δείχνουν πως πρόκειται για φερέλπιδα, καινοτόμα φάρμακα με ευρύ πεδίο δράσης. Η μελέτη της, ακόμη, αντικαρκινικής δράσης των δύο ενώσεων και σε in vivo συστήματα βρίσκεται σε εξέλιξη και αναμένεται να δώσει περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό δράσης τους.

6. Βιβλιογραφία

- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης κεφάλαιο 21: Ιστοί και Καρκίνος.
- Aren van Waarde, Anna A. Rybczynska, Nisha K. Ramakrishnan, Kiichi Ishiwata , Philip H. Elsinga, Rudi A.J.O. Dierckx, Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1848(10), Part B, 2703-2714, **2014**.
- Aydar E, Palmer C, Klachko V, Jackson M. Sigma receptor as a ligand-modulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron*, **34**: 399-410, 2002.
- Christos Fytas , Grigoris Zoidis , Andrew Tsotinis , George Fytas , Mohsin A. Khan, Samar Akhtar , Khondaker M. Rahman , David E. Thurston, 2015, Novel 1-(2-aryl-2-adamantyl)piperazine derivatives with antiproliferative activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 93, 281-290, 2015.
- Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman, Το κύτταρο, Μια Μοριακή Προσέγγιση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ, κεφάλαιο 18: Καρκίνος.
- Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus H-G, Striessnig J. Expression of the mammalian sigma-1 binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 8072-7, 1996.
- <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
- Jbilo O, Vidal H, Paul R, et al Purification and characterization of the human SR 31747A-binding protein. A nuclear membrane protein related to yeast sterol isomerase. *J. Biol. Chem.*, **272**: 27107-15, 1997.
- J. Li, Y. Yang, L. Huang, Calcium phosphate nanoparticles with an asymmetric lipid bilayer coating for siRNA delivery to the tumor, *J. Control. Release* 158 (2012)
- J. Xu, C. Zeng, W. Chu, F. Pan, J.M. Rothfuss, F. Zhang, Z. Tu, D. Zhou, D. Zeng, S. Vangveravong, F. Johnston, D. Spitzer, K.C. Chang, R.S. Hotchkiss, W.G. Hawkins, K.T.Wheeler, R.H. Mach, Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site, *Nat. Commun.* 2 (2011)

- Mach RH, Smith CR, al-Nabulsi I, Whirrett BR, Childers SR, Wheeler KT. Sigma-2 receptors as potential biomarkers of proliferation in breast cancer. *Cancer Res*, **57**: 156-61, 1997.
- Prasad PD, Li HW, Fei YJ, et al Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene. *J Neurochem*, **70**: 443-51, 1998.
- S. Riganas, I. Papanastasiou, G.B. Foscolos, A. Tsotinis, G. Serin, J.F. Mirjolet, K. Dimas, V.N. Kourafalos, A. Eleutheriades, V.I. Moutsos, H. Khan, S. Georgakopoulou, A. Zaniou, M. Prassa, M. Theodoropoulou, A. Mantelas, S. Pondiki, A. Vamvakides, New adamantane phenylalkylamines with s-receptor binding affinity and anticancer activity, associated with putative antagonism of neuropathic pain, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10241e10261.
- S.D. Li, S. Chono, L. Huang, Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA, *Mol. Ther.* 16 (2008)
- S.U. Mir, I.S. Ahmed, S. Arnold, R.J. Craven, Elevated PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1)/sigma-2 receptor levels in lung tumors and plasma from lung cancer patients, *Int. J. Cancer* 131 (2011) E1–E9
- Van Waarde A. , A.A. Rybczynska, N. Ramakrishnan, K. Ishiwata, P.H. Elsinga, R.A., Dierckx, Sigma receptors in oncology: therapeutic and diagnostic applications of sigma ligands, *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010)
- Wheeler KT, Wang LM, Wallen CA, et al Sigma-2 receptors as a biomarker of proliferation in solid tumours. *Br J Cancer*, **82**: 1223-32, 2000