



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης αδαμαντυλο-πιπεραζινικών
παραγώγων σε μελάνωμα

Study of the anticancer activity of adamantyl-piperazine derivatives
in melanoma

Αικατερίνη Νιζάμη

Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Δήμας

ΛΑΡΙΣΑ 2018

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κωνσταντίνος Δήμας, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γρηγόριος Ζωίδης, Επίκουρος Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

«Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης αδαμαντυλο-πιπεραζινικών
παραγώγων σε μελάνωμα»

«Study of the anticancer activity of adamantyl-piperazine derivatives
in melanoma»

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων καθηγητή, κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, που μου έδωσε την ευκαιρία να ενταχθώ στο εργαστήριο και να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο ερευνητικό αντικείμενο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Σερέτη για την πολύτιμη βοήθεια της όλο το χρονικό διάστημα που βρισκόμουν στο εργαστήριο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν καθ' όλη τη διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων παρά τις δυσκολίες.

Περιεχόμενα

Περίληψη	8
Abstract.....	9
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ	10
1.1 Γενικά στοιχεία	10
1.2 Αίτια	10
1.3 Στατιστικά	11
2. ΜΕΛΑΝΩΜΑ.....	13
2.1 Γενικά στοιχεία	13
2.2 Συχνότητα εμφάνισης	13
2.3 Παράγοντες κινδύνου.....	13
2.4 Ταξινόμηση του μελανώματος	14
2.5 Θεραπεία ανάλογα με το στάδιο	15
2.6 Χημειοθεραπεία	16
2.7 Ανοσοθεραπεία.....	17
2.8 Στοχεύουσες θεραπείες	19
3. ΣΙΓΜΑ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	20
3.1 Γενικά.....	20
3.2 Προσδέτες των σίγμα υποδοχέων	20
3.3 Σίγμα-1 υποδοχείς	20
3.4 Σίγμα-2 υποδοχείς	23
3.5 Σίγμα υποδοχείς/προσδέτες και καρκίνος	23
3.6 Σίγμα προσδέτες και αυτοφαγία.....	25
4. ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ	27
4.1 mTOR: κύριο σημείο ελέγχου της αυτοφαγίας	27
4.2 Γονίδια που συμμετέχουν στην αυτοφαγία.....	28
5. ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	31
5.1 Μοριακός μηχανισμός της απόπτωσης.....	31
5.2 Ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης	32

5.3 Εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης.....	33
6.ΕΝΩΣΗ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ.....	34
7. ΣΚΟΠΟΣ.....	36
B.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
1.Θρεπτικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια	37
2. Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων	38
2.1 Κυτταρική σειρά.....	38
2.2 Συνθήκες καλλιέργειας.....	38
2.3 Ανανέωση θρεπτικού υλικού.....	38
2.4 Expand.....	38
2.5 Αποθήκευση κυττάρων	38
2.6 Καταμέτρηση κυττάρων	39
2.7 Απόψυξη κυττάρων	39
3. Πείραμα κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης B (SRB Cytotoxicity Assay)	39
4. <i>In vitro</i> μελέτη της κυτταροτοξικότητας μετά από επώαση των κυττάρων xSKMEL28 p1 με FP5 (Treatment).....	41
5. Λύση των κυττάρων.....	43
6. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	43
7. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών - Western blot	44
8. <i>In vivo</i> μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του FP5	47
8.1 Στέλεχος ποντικών που χρησιμοποιήθηκε.....	47
8.2 Δημιουργία των xSKMEL28 p1	47
8.3 Δοκιμές διαλυτότητας της ένωσης FP5.....	47
8.4 Δοκιμασία οξείας τοξικότητας <i>in vivo</i>	48
8.5 <i>In vivo</i> πείραμα για τον έλεγχο της αντικαρκινικής δράσης του FP5	48
Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
1.Μελέτη της κυτταροτοξικής και αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των ενώσεων FP5 και Καρβοπλατίνης με εφαρμογή του πειράματος κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης B.	50
2. <i>In vitro</i> μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του FP5 μετά από επώαση των κυττάρων xSKMEL28 p1 με συγκεντρώσεις 5, 10 και 20μΜ.....	51

3. Έλεγχος της έκφρασης του LCIII και της Κασπάσης 3 μέσω στυπώματος κατά Western.....	56
4. <i>In vivo</i> μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του FP5	58
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

Περίληψη

Ο καρκίνος του μελανώματος αποτελεί την πιο επικίνδυνη μορφή καρκίνου του δέρματος. Έχει βρεθεί ότι οι σίγμα υποδοχείς υπερεκφράζονται στον καρκίνο και ότι οι προσδέτες τους, πιθανών, να έχουν αντικαρκινική δράση. Στο τμήμα Φαρμακευτικής Χημείας της Φαρμακευτικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών συντέθηκαν 1-(2-αρυλ-2-αδαμαντυλ) παράγωγα πιπεραζίνης εκ των οποίων ένα είχε υψηλή συγγένεια για τους σίγμα-υποδοχείς. Σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αξιολογήθηκαν δύο από τα παράγωγα αυτά για τις *in vitro* αντικαρκινικές τους ιδιότητες έναντι έντεκα καρκινικών κυτταρικών σειρών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένα παράγωγο πιπεραζίνης, το FP5, εμφάνισε υψηλή κυτταροτοξική δράση έναντι της κυτταρικής σειράς SKMEL28 η οποία είχε και την υψηλότερη έκφραση σίγμα υποδοχέων. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη καρκινική κυτταρική σειρά στην παρούσα διπλωματική εργασία. Αρχικά, ελέγχθηκε η κυτταροτοξική δράση του FP5 και της καρβοπλατίνης, που αποτελεί γνωστό αντικαρκινικό φάρμακο στη θεραπεία του μελανώματος, έναντι των κυττάρων xSKMEL28 p1 με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε *in vitro* επώαση των xSKMEL28 p1 με FP5 προκειμένου να βρεθεί ο μηχανισμός θανάτου των κυττάρων μέσω στυπώματος κατά Western. Τέλος, μελετήθηκε *in vivo* η αντικαρκινική δράση του FP5 και της καρβοπλατίνης. Βάσει των αποτελεσμάτων, το FP5 φάνηκε να έχει καλύτερη κυτταροτοξική και αντιπολλαπλασιαστική δράση από την καρβοπλατίνη. Η δράση του ήταν χρόνο- και δοσοεξαρτώμενη, ενώ το στύπωμα κατά Western αποκάλυψε ότι το FP5 προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω της αυτοφαγίας. Στο *in vivo* πείραμα δεν φάνηκε να υπάρχει δράση έναντι των καρκινικών όγκων ούτε από το FP5 ούτε από την καρβοπλατίνη, ενώ παρουσιάστηκε τοξικότητα του διαλύτη στα ζώα.

Abstract

Melanoma is the most dangerous form of skin cancer. It has been found that sigma receptors are overexpressed in cancer and that, possibly, their ligands have anti-cancer activity. In the Pharmaceutical Chemistry Department of the Faculty of Pharmacy of the University of Athens 1- (2-aryl-2-adamantyl) piperazine derivatives were synthesized of which one had a high affinity for sigma receptors. In previous studies conducted in the Pharmacology Laboratory of the University of Thessaly two of these derivatives were evaluated for their *in vitro* antitumor properties against eleven cancer cell lines. The results showed that a piperazine derivative, FP5, showed high cytotoxic activity against the SKMEL28 cell line, which had and the highest sigma receptor expression. For this reason, the particular cancer cell line was used in this diploma thesis. Initially, the cytotoxic effect of FP5 and carboplatin, a known anticancer drug in the treatment of melanoma, was tested against xSKMEL28 p1 cells by the sulforhodamine B assay. Then, *in vitro* incubation of xSKMEL28 p1 with FP5 was performed to find the mechanism of cell death via Western blotting. Finally, the antitumor activity of FP5 and carboplatin was studied *in vivo*. Based on the results, FP5 seemed to have better cytotoxic and antiproliferative activity than carboplatin. Its activity was time- and dose-dependent, while Western blotting revealed that FP5 cause cell death via autophagy. *In vivo* experiment did not appear to have activity against tumors either from FP5 or from carboplatin, while solvent toxicity was shown in animals.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1 Γενικά στοιχεία

Ο καρκίνος είναι μία ομάδα ασθενειών που δημιουργούνται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό οποιουδήποτε είδους κυττάρου του σώματος. Φυσιολογικά, τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται προκειμένου να σχηματίσουν νέα κύτταρα τα οποία χρειάζεται ο οργανισμός. Με την πάροδο του χρόνου τα κύτταρα αυτά γερνούν ή καταστρέφονται και οδηγούνται στο θάνατο. Ο καρκίνος δημιουργείται όταν αυτή η διαδικασία διαταράσσεται. Πιο συγκεκριμένα, τα γερασμένα ή κατεστραμμένα κύτταρα επιβιώνουν και δημιουργούνται νέα κύτταρα, περισσότερα από όσα χρειάζεται ο οργανισμός. Τα κύτταρα αυτά διαιρούνται συνεχώς και σχηματίζουν μάζες κυττάρων που ονομάζονται όγκοι (<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>).

Οι όγκοι διακρίνονται σε καλοήθεις και κακοήθεις. Ένας καλοήθης όγκος δεν εξαπλώνεται σε γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς ή σε άλλα σημεία του σώματος αλλά παραμένει στην αρχική του θέση. Αντιθέτως, ένα κακοήθης όγκος είναι ικανός να εισβάλλει τους γειτονικούς ιστούς και μέσω του κυκλοφορικού ή του λεμφικού συστήματος να εξαπλώνεται στο σώμα, προκαλώντας έτσι τη μετάσταση. Μόνο ένα κακοήθης όγκος ονομάζεται καρκίνος και είναι επικίνδυνος λόγω των μεταστάσεων, καθώς είναι ανθεκτικός σε τοπικές θεραπείες.

Οι περισσότεροι καρκίνοι ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προέρχονται : α)τα καρκινώματα, β)τα σαρκώματα και γ) τις λευχαιμίες και τα λεμφώματα. Τα καρκινώματα ,που αποτελούν τον πιο συχνό τύπο καρκίνου, είναι κακοήθεις όγκοι κυττάρων του επιθηλίου. Τα σαρκώματα αποτελούνται από συμπαγείς όγκους του συνδετικού ιστού των οστών, των μυών, των ινωδών ιστών και των χόνδρων. Οι λευχαιμίες προέρχονται από κύτταρα του αίματος, ενώ τα λεμφώματα από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

1.2 Αίτια

Ο καρκίνος είναι μία ασθένεια που έχει απασχολήσει την ανθρωπότητα σε όλη τη διάρκεια της ιστορίας της, ωστόσο αποτελεί κύρια αιτία θανάτου τον τελευταίο αιώνα.

Ουσίες υπεύθυνες για τον καρκίνο ονομάζονται καρκινογόνα. Η ανακάλυψη τους οφείλεται σε μελέτες σε ζωικά μοντέλα και σε επιδημιολογικές παρατηρήσεις που αφορούσαν την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ατόμων (π.χ. αυξημένα περιστατικά καρκίνου των πνευμόνων σε καπνιστές). Η δημιουργία κακοήθειας είναι μία περίπλοκη διαδικασία, καθώς περιλαμβάνει πολλά στάδια, για αυτό και η

εμφάνιση του καρκίνου επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως διάφορα χημικά, ακτινοβολίες αλλά και από κάποιους ιούς.

Παράγοντες, όπως η ακτινοβολία και διάφορα χημικά καρκινογόνα, καταστρέφουν το γενετικό υλικό προκαλώντας μεταλλάξεις. Η υπεριώδης ακτινοβολία αποτελεί το κύριο έναυσμα για την εμφάνιση του καρκίνου του δέρματος. Στα χημικά καρκινογόνα συγκαταλέγεται ο καπνός του τσιγάρου στον οποίο περιέχονται η διμεθυλονιτροζαμίνη, το βενζο(α)πυρενίο και οι ενώσεις νικελίου. Το κάπνισμα ευθύνεται για το 90% των καρκίνων του πνεύμονα, ενώ συμβάλλει στον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα, του λάρυγγα, του οισοφάγου κ.ά. Το ένα τρίτο όλων των θανάτων από καρκίνο έχει προκληθεί από το κάπνισμα – μεγάλο ποσοστό για έναν μόνο καρκινογόνο παράγοντα. Άλλο ένα ισχυρό καρκινογόνο του ήπατος είναι η αφλατοξίνη που βρίσκεται στα αποθηκευμένα φιστίκια και σιτηρά και παράγεται από μύκητες.

Επίσης, υπάρχουν καρκινογόνα που πυροδοτούν την εμφάνιση του καρκίνου πιθανών με την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται επαγωγείς όγκων, καθώς οι κυτταρικές διαιρέσεις που προάγουν επισπεύδουν την αύξηση του πληθυσμού των ογκοκυττάρων στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης. Σε αυτά τα καρκινογόνα ανήκουν κάποιες ορμόνες, όπως τα οιστρογόνα, τα οποία προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομητρίου, για αυτό οι γυναίκες δεν πρέπει να εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα οιστρογόνων, καθώς αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου (Cooper G.M. et al., 2011).

Επιπλέον, υπάρχουν ιοί που ευθύνονται για την καρκινογένεση σε ανθρώπους και πειραματόζωα με πιο συχνούς τον καρκίνο του ήπατος που προκαλείται από τον ιό της ηπατίτιδας Β και C (Ringehan M. et al., 2017) και του τραχήλου της μήτρας που προκαλείται από τον ιό HPV (<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-fact-sheet>). Τέλος, το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού ευθύνεται για την εμφάνιση καρκίνου του στομάχου (Cooper G.M. et al., 2011).

1.3 Στατιστικά

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το 2014, σχεδόν 1,3 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από καρκίνο που αναλογεί στο 26,4% των θανάτων. Στα κράτη-μέλη της ΕΕ το ποσοστό των θανάτων από καρκίνο στο σύνολο των θανάτων ξεπέρασε το 30% στην Ιρλανδία, τη Δανία, τη Σλοβενία και τις Κάτω Χώρες. Αντίθετα, στη Ρουμανία και τη Βουλγαρία λιγότερο από το ένα πέμπτο όλων των θανάτων προκλήθηκαν από καρκίνο (http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cancer_statistics).

Το 2016 στην Αμερική οι τρεις πιο συχνόι τύποι καρκίνου για τους άντρες ήταν ο καρκίνος του προστάτη με 3,306,760 περιστατικά, του παχέος εντέρου και του ορθού(724,690) και του μελανώματος (614,460), ενώ για τις γυναίκες ο καρκίνος του μαστού (3,560,570), του τραχήλου της μήτρας (757,190) και του παχέος εντέρου και του ορθού (727,350) (Miller et al., 2016).

Στην Ελλάδα το 2015, σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Αρχή, τα κρούσματα καρκίνου αναγράφονται στον πίνακα 1:

Τύπος Καρκίνου	Κρούσματα
Κακοήθη νεοπλάσματα των χειλιών, στοματικής κοιλότητας και φάρυγγα	371
Κακοήθη νεοπλάσματα των οργάνων του πεπτικού συστήματος και του περιτοναίου	8.399
Κακοήθη νεοπλάσματα των οργάνων του αναπνευστικού συστήματος και των ενδοθωρακικών οργάνων	7.606
Κακοήθη νεοπλάσματα των οστών, του συνδετικού ιστού, του δέρματος και του μαστού	2.840
Κακοήθη νεοπλάσματα των ουροποιητικών οργάνων	5.023
Κακοήθη νεοπλάσματα άλλων και μη καθορισμένων εντοπίσεων	3.191
Κακοήθη νεοπλάσματα του λεμφικού και αιμοποιητικού ιστού	2.226
Καλοήθη νεοπλάσματα	79
Καρκινώματα in situ	1
Άλλα και μη καθορισμένα νεοπλάσματα	59

Πίνακας 1: Αριθμός περιστατικών καρκίνου ανάλογα με τον τύπο του στην Ελλάδα το 2015 (<http://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPO12/->).

2. ΜΕΛΑΝΩΜΑ

2.1 Γενικά στοιχεία

Το μελάνωμα αποτελεί την πιο επικίνδυνη μορφή καρκίνου του δέρματος. Οι κακοήθεις όγκοι αναπτύσσονται όταν δημιουργείται μία βλάβη στο DNA των κυττάρων του δέρματος που τα οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Τα κύτταρα του δέρματος που είναι ικανά να δημιουργήσουν το μελάνωμα ονομάζονται μελανοκύτταρα και φυσιολογικά παράγουν χρωστικές στο βασικό στρώμα της επιδερμίδας. Συχνά, το μελάνωμα μοιάζει σαν κρεατοελιά. Τα μελανώματα στην πλειοψηφία τους είναι μαύρα ή καφέ, ενώ μπορεί να είναι στο χρώμα του δέρματος, ροζ, λευκά, μπλε, μωβ ή κόκκινα. Οι μεταλλάξεις στα μελανοκύτταρα προκαλούνται κυρίως από την έντονη, περιστασιακή έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ιδιαίτερα σε άτομα που έχουν τη γενετική προδιάθεση να εμφανίσουν τη νόσο.

Η έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση του μελανώματος παίζουν σημαντικό ρόλο στην πορεία της νόσου. Αν δε συμβεί αυτό ο καρκίνος μπορεί να εξαπλωθεί σε άλλες θέσεις του σώματος, όπου είναι δύσκολο να θεραπευτεί και μπορεί αποβεί θανατηφόρος. Παρ' όλο που δεν είναι ο συνηθέστερος καρκίνος του δέρματος προκαλεί του περισσότερους θανάτους (<https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma>).

2.2 Συχνότητα εμφάνισης

Το μελάνωμα παραμένει μέχρι και σήμερα μία θανατηφόρος ασθένεια. Η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνεται παγκοσμίως αποτελώντας ένα σημαντικό κοινωνικοοικονομικό πρόβλημα. Πριν από έναν αιώνα ήταν ένας σπάνιος τύπος καρκίνου, ενώ τα τελευταία χρόνια η εμφάνιση του έχει αυξηθεί, ιδιαίτερα στους Καυκάσιους πληθυσμούς και, έτσι, έχει γίνει ένας από τους πιο συχνούς τύπους καρκίνου σε άτομα με ανοιχτόχρωμο δέρμα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 1973 ως το 2002 η εμφάνιση του μελανώματος αυξήθηκε κατά 270%.

Σύμφωνα με στοιχεία που συλλέχθηκαν κατά την περίοδο 1998-2002 βρέθηκε ότι η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μελανώματος, παγκοσμίως, ήταν στην Αυστραλία, ενώ υψηλή συχνότητα παρατηρήθηκε, επίσης, στη Νέα Ζηλανδία. Τα υψηλότερα ποσοστά στην Ευρώπη παρατηρούνται στην Ελβετία, στις Σκανδιναβικές χώρες, στη Δανία και στη Σουηδία. Γενικά, στις βόρειες χώρες τα ποσοστά είναι υψηλότερα σε σχέση με τις νότιες. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην ανθεκτικότητα στην υπεριώδη ακτινοβολία λόγω του σκουρόχρωμου δέρματος αλλά και στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

2.3 Παράγοντες κινδύνου

Το μελάνωμα είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που εξαρτάται από γενετικούς αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Ο πιο σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισής του είναι η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία λόγω της μεταλλαξιγόνου δράσης της στο γενετικό υλικό.

Όσον αφορά τους γενετικούς παράγοντες, ο κίνδυνος εμφάνισης μελανώματος εξαρτάται από τον αριθμό των μελανοκυτταρικών σπίλων (melanocytic nevi), το οικογενειακό ιστορικό και τη γενετική ευαισθησία. Οι μελανοκυτταρικοί σπίλοι είναι συσσωρευμένα μελανοκύτταρα ή σπιλοκύτταρα τα οποία είναι καλοήθη και είτε υπάρχουν εκ γενετής ή δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Ο συνολικός αριθμός των σπίλων, το μέγεθος και ο τύπος τους καθορίζει το βαθμό επικινδυνότητας. Το 25% των ανθρώπων που εμφανίζουν μελάνωμα είναι επιβαρυσμένοι με έναν προϋπάρχων σπίλο.

Όπως αναφέρθηκε, το οικογενειακό ιστορικό έχει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Μελέτες σε οικογένειες με κληρονομικό μελάνωμα έδειξαν ότι υπάρχει ένας αυτοσωμικός επικρατής τρόπος κληρονόμησης με πολλά μέλη της οικογένειας να επηρεάζονται περισσότερο από την πρώτη γενιά. Η πιο κοινή γενετική ανωμαλία που βρέθηκε σε αυτές τις οικογένειες είναι μεταλλάξεις στον αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 2A (CDKN2A ή p16). Ασθενείς με γενετική προδιάθεση εμφανίζουν σε νεαρή ηλικία πολλαπλά πρωταρχικά μελανώματα ή ιστορικό πρόδρομων αλλοιώσεων, όπως δυσπλαστικούς σπίλους, και είναι πιο πιθανό να έχουν επιφανειακά διηθητικούς όγκους, άρα να έχουν καλύτερη διάγνωση. Επίσης, ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό οποιουδήποτε καρκίνου, έχουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν μελάνωμα.

Τέλος, άτομα με κάποια συγκεκριμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως κόκκινα μαλλιά, φακίδες, ανοιχτό χρώμα δέρματος και ματιών και ευαισθησία στον ήλιο αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος κατά 50%.

2.4 Ταξινόμηση του μελανώματος

Σύμφωνα με κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά το μελάνωμα μπορεί να ταξινομηθεί σε 3 διαφορετικές κατηγορίες:

α) Superficial spreading melanoma: τύπος του μελανώματος που ευθύνεται για το 70% των περιπτώσεων. Δημιουργείται από τη συχνή έκθεση στην ακτινοβολία του ηλίου και συχνά εμφανίζεται στο πίσω μέρος των ποδιών των γυναικών και στις πλάτες των ανδρών. Το μελάνωμα αυτού του τύπου μπορεί να δημιουργηθεί de novo ή σε συνδυασμό με κάποιον προϋπάρχων σπίλο. Από κλινικής άποψης το μελάνωμα παρουσιάζει ποικιλία χρωμάτων, το περίγραμμα του, συνήθως, είναι ακανόνιστο με προεξοχές και η επιφάνεια του μπορεί να είναι απτή ή να είναι οζίδιο που εκτείνεται αρκετά χιλιοστά από την επιφάνεια του δέρματος.

β) Nodular melanoma: ευθύνεται για το 5% των περιπτώσεων, εντοπίζεται στον κορμό και στα άκρα των ασθενών, είναι πιο συχνό στους άνδρες και εμφανίζεται στην πέμπτη με έκτη δεκαετία της ζωής του ατόμου. Δεν εμφανίζει πλευρική φάση ανάπτυξης αλλά μόνο κατακόρυφη που χαρακτηρίζεται από κατακόρυφη αύξηση και υψηλή μεταστατικότητα. Κλινικά, αυτός ο τύπος μελανώματος έχει ένα ομοιόμορφο καφέ, μαύρο ή μπλε-μαύρο χρώμα και εμφανίζεται σαν ένα οζίδιο με ομαλή επιφάνεια, εξελκωμένος πολύποδας ή μπορεί να έχει

υπερυψωμένη επίπεδη επιφάνεια. Στις μισές περιπτώσεις μπορεί να μην εμφανίσει κάποιο χρώμα. Και αυτός ο τύπος σχετίζεται με την έκθεση στον ήλιο.

γ) Lentigo Maligna Melanoma: αυτό το είδος μελανώματος ευθύνεται για το 4-15% των ασθενών και σε αντίθεση με τα δύο προηγούμενα είδη σχετίζεται με μακροπρόθεσμη έκθεση στον ήλιο και με την αύξηση της ηλικίας. Κλινικά, εμφανίζει ποικιλία χρωμάτων, έχει ακανόνιστο περίγραμμα και ο όγκος είναι σχετικά μεγάλος και επίπεδος (Rastrelli M. et al., 2014).

2.5 Θεραπεία ανάλογα με το στάδιο

Ο τύπος της θεραπείας του μελανώματος εξαρτάται από το στάδιο, το σημείο στο οποίο εντοπίζεται αλλά και από τη συνολική υγεία του ασθενούς.

Στάδιο 0

Στο στάδιο 0 το μελάνωμα βρίσκεται μόνο στο ανώτερο στρώμα του δέρματος, την επιδερμίδα, και δεν εξαπλώνεται σε άλλους ιστούς (noninvasive). Για τη θεραπεία του απαιτείται χειρουργική επέμβαση (ευρεία εκτομή) ώστε να αφαιρεθεί το μελάνωμα και μία μικρή περιοχή υγιούς δέρματος γύρω από αυτό. Το δείγμα της υγιούς περιοχής ελέγχεται στο μικροσκόπιο για την ύπαρξη καρκινικών κυττάρων. Αν βρεθούν καρκινικά κύτταρα πιθανών να πραγματοποιηθεί μια επαναληπτική εκτομή στην περιοχή. Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης του μελανώματος σε αυτό το στάδιο είναι η χρήση ακτινοβολίας ή μίας κρέμας με δραστική ουσία την ιμικιμόδη (<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/by-stage.html>).

Σε ευαίσθητες περιοχές του προσώπου για τη θεραπεία του μελανώματος αυτού του σταδίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί η χειρουργική επέμβαση Mohs η οποία επιτρέπει την αφαίρεση όλων των καρκινικών κυττάρων με υψηλότερο ποσοστό θεραπείας, ενώ ταυτόχρονα δεν αφαιρείται υγιής ιστός και δημιουργείται η μικρότερη δυνατή ουλή (<https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/mohs-surgery/>).

Στάδιο 1

Το μελάνωμα στο πρώτο στάδιο έχει εισβάλλει στη στιβάδα κάτω από την επιδερμίδα που ονομάζεται δερμίδα. Οι όγκοι του μελανώματος είναι μικροί και δεν υπάρχει υψηλό ποσοστό κινδύνου εξάπλωσής τους σε κοντινούς λεμφαδένες ή σε άλλες περιοχές. Αντιμετωπίζεται, επίσης, με χειρουργική επέμβαση στην οποία το τμήμα του φυσιολογικού ιστού που θα αφαιρεθεί καθορίζεται από το πάχος και την τοποθεσία του μελανώματος. Κάποιοι γιατροί προτείνουν στους ασθενείς να κάνουν μία βιοψία στους λεμφαδένες (sentinel lymph node biopsy) ώστε αν βρεθούν καρκινικά κύτταρα να αφαιρεθούν οι λεμφαδένες που εντοπίζονται κοντά σε αυτά. Είναι πιθανό να συσταθεί κάποια επικουρική θεραπεία με ιντερφερόνες μετά την επέμβαση.

Στάδιο 2

Στο δεύτερο στάδιο οι όγκοι είναι μεγαλύτεροι και μπορεί να εμφανίζουν χαρακτηριστικά, όπως εξέλκωση, τα οποία υποδεικνύουν μεγάλο κίνδυνο μετάστασης. Η αντιμετώπιση είναι ίδια με το πρώτο στάδιο.

Στάδιο 3

Στο τρίτο στάδιο όταν διαγνωστεί ο καρκίνος έχει κάνει ήδη μετάσταση στους λεμφαδένες. Η χειρουργική θεραπεία απαιτεί συνήθως ευρεία εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου, όπως είδαμε σε προηγούμενα στάδια, μαζί με την εκτομή των λεμφαδένων. Μετά το χειρουργείο, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος επανεμφάνισης του καρκίνου, χρησιμοποιούνται συμπληρωματικές θεραπείες, όπως ανοσοθεραπεία ή στοχεύουσες θεραπείες, και άλλα φάρμακα ή εμβόλια ως μέρος κλινικών δοκιμών. Επιπλέον, μπορεί να γίνει ακτινοθεραπεία στις περιοχές από τις οποίες απομακρύνθηκαν οι λεμφαδένες, ειδικά αν πολλοί από αυτούς περιείχαν καρκινικά κύτταρα. Αν εντοπιστούν μελανώματα σε κοντινά λεμφαγγεία μέσα ή κάτω από το δέρμα πρέπει να αφαιρεθούν, αν αυτό είναι εφικτό. Εναλλακτικά, μπορεί να γίνουν ενέσεις με το εμβόλιο T-VEC, με το Bacille Calmette-Guerin, με ιντερφερόνες ή ιντερλευκίνες-2 απευθείας στο μελάνωμα, ακτινοθεραπεία ή θεραπεία με ιμικιμόδη. Για μελανώματα στο πόδι ή στον βραχίονα μπορεί να διαχυθεί στο άκρο θερμό διάλυμα χημειοθεραπείας.

Στάδιο 4

Τα μελανώματα τέταρτου σταδίου έχουν εξαπλωθεί σε απομακρυσμένους λεμφαδένες ή σε άλλα σημεία του σώματος και για αυτό είναι δύσκολο να θεραπευτούν. Οι όγκοι του δέρματος ή οι διευρυμένοι λεμφαδένες, συνήθως, αφαιρούνται χειρουργικά ή υποβάλλονται σε ακτινοβολία. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι μεταστάσεις σε εσωτερικά όργανα απομακρύνονται, ανάλογα με τον αριθμό τους, την τοποθεσία τους και την πιθανότητα να προκαλέσουν συμπτώματα. Οι μεταστάσεις που προκαλούν συμπτώματα αλλά δεν μπορούν να απομακρυνθούν, αντιμετωπίζονται με ακτινοβολία, ανοσοθεραπεία, στοχεύουσες θεραπείες ή χημειοθεραπεία (<https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/the-stages-of-melanoma>, <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/by-stage.html>).

2.6 Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιεί φάρμακα τα οποία σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα. Τα φάρμακα αυτά χορηγούνται με ενδοφλέβια ένεση ή από το στόμα σαν χάπι. Μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε όλα τα σημεία του σώματος και επιτίθενται σε όλα τα καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν εξαπλωθεί πέρα από το δέρμα. Η χημειοθεραπεία δεν είναι τόσο αποτελεσματική στο μελάνωμα όσο σε άλλους τύπους καρκίνου, αλλά μπορεί να ανακουφίσει από τα συμπτώματα και να παρατείνει την επιβίωση των

ασθενών. Φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του μελανώματος είναι τα εξής:

- ✓ Δακαρβαζίνη: κυτταροστατικό φάρμακο το οποίο ενεργοποιείται από ένζυμα του ήπατος με δύο ταυτόχρονες δράσεις: την αναστολή της σύνθεσης του DNA, όπως οι αντιμεταβολίτες, και τη σύνδεση του με το ήδη υπάρχων DNA, όπως οι αλκυλιωτικοί παράγοντες.
- ✓ Τεμοζολομίδη: μία τριαζίνη η οποία μετατρέπεται στο δραστικό της προϊόν μονομεθυλ-τριαζενοϊμιδαζολο καρβοξαμίδιο (MTIC) σε φυσιολογικό pH. Θεωρείται ότι η MTIC είναι κυτταροτοξική λόγω της αλκυλίωσης στη θέση O6 της γουανίνης με επιπλέον αλκυλίωση στην θέση N7. Οι ακόλουθες βλάβες πιθανών να προκαλούνται από τη λανθασμένη διόρθωση της μεθυλίωσης.
- ✓ Πακλιταξέλη: σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους στα διμερή τουμπουλίνης εμποδίζοντας τον αποπολυμερισμό τους. Έτσι, αναστέλλει τη φυσιολογική δυναμική αναδιοργάνωσης του δικτύου των μικροσωληνίσκων που είναι απαραίτητη για τις ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου.
- ✓ Nab-Paclitaxel (πακλιταξέλη συνδεδεμένη με αλβουμίνη): διευκολύνει τη μεταφορά της πακλιταξέλης στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενός ενδιάμεσου μονοπατιού του υποδοχέα της αλβουμίνης. (http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/Drug%20Index/nab-Paclitaxel_monograph_1Aug2016.pdf)
- ✓ Σισπλατίνη: κυτταροστατικό φάρμακο που αναστέλλει εκλεκτικά τη σύνθεση του DNA.
- ✓ Καρβοπλατίνη: έχει βιοχημικές ιδιότητες παρόμοιες με της σισπλατίνης και δημιουργεί κυρίως εγκάρσιους δεσμούς ανάμεσα στις δύο αλυσίδες του DNA.
- ✓ Βινβλαστίνη: συγκαταλέγεται στα αλκαλοειδή της Vinca και σταματά τη μιτωτική διαίρεση του κυττάρου (<https://www.galinos.gr>).

2.7 Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία στοχεύει στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού ώστε να αναγνωρίσει και να καταστρέψει αποτελεσματικά τα καρκινικά κύτταρα. Το ανοσοποιητικό σύστημα προκειμένου να μην επιτεθεί στα φυσιολογικά κύτταρα του σώματος χρησιμοποιεί «σημεία ελέγχου», δηλαδή πρωτεΐνες που με την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίησή τους ελέγχουν την έναρξη ανοσολογικής απόκρισης. Κάποιες φορές τα κύτταρα του μελανώματος «εκμεταλλεύονται» τις πρωτεΐνες αυτές για να αποφύγουν πιθανή επίθεση από το ανοσοποιητικό. Για το λόγο αυτό έχει δημιουργηθεί μία νέα γενιά φαρμάκων τα οποία αναστέλλουν τα «σημεία ελέγχου» για να αποκατασταθεί η ανοσολογική απόκριση. Οι κατηγορίες των φαρμάκων αυτών είναι οι εξής:

✓ Αναστολείς της PD-1 (Programmed cell death protein 1)

Τα pembrolizumab και nivolumab αναστέλλουν την πρωτεΐνη PD-1 η οποία βρίσκεται στα T-κύτταρα του ανοσοποιητικού και φυσιολογικά αποτρέπει την επίθεση τους σε άλλα κύτταρα του οργανισμού. Η αναστολή αυτή ενισχύει την επίθεση του ανοσοποιητικού συστήματος στα κύτταρα του μελανώματος.

✓ Αναστολείς του CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4)

Το Ipilimumab αναστέλλει το μόριο CTLA-4 προκαλώντας την ίδια δράση με τους αναστολείς την PD-1.

✓ Κυτοκίνες (Ιντερφερόνη – άλφα και Ιντερλευκίνη – 2)

Οι κυτοκίνες είναι πρωτεΐνες που ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Επομένως, η χορήγηση τους βοηθά στην αντιμετώπιση των κυττάρων του μελανώματος.

✓ Ογκολυτική ιική θεραπεία

Ογκολυτικοί ονομάζονται οι γενετικά τροποποιημένοι ιοί οι οποίοι μπορούν να μολύνουν και να σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα. Παράλληλα μπορεί να αποτελέσουν «συναγερμό» για το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να επιτεθεί στα καρκινικά κύτταρα. Ένα εμβόλιο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του μελανώματος και περιέχει τέτοιους ιούς είναι το Talimogene laherparepvec ή αλλιώς T-VEC.

✓ Εμβόλιο Bacille Calmette-Guerin (BCG)

Το BCG είναι ένα μικρόβιο που σχετίζεται με αυτό που προκαλεί τη φυματίωση. Ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίς να προκαλεί σοβαρές ασθένειες. Το εμβόλιο αυτό χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των μελανωμάτων του σταδίου III με ένεση απευθείας στους όγκους (<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/targeted-therapy.html>).

✓ Ημικιμόδη

Η αντικαρκινική δράση της ημικιμόδης βασίζεται στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, με τα πρώτα κύτταρα που αποκρίνονται να είναι τα δερματικά δένδριτικά (Schön M.P et al., 2007). Τα κύτταρα αυτά περιλαμβάνουν τα επιδερμικά κύτταρα του Langerhans (LC), τα ενδιάμεσα/δερματικά (DCC) και τα πλασμοκυτταρικά δένδριτικά κύτταρα (pDC) (Valladeau J. et al., 2005). Μόλις διεγερθούν τα κύτταρα αυτά, ξεκινά μία ανοσολογική απόκριση έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Η ημικιμόδη πιστεύεται ότι είναι αγωνιστής των υποδοχέων TR7 και TR8 οι οποίοι εμπλέκονται στην αναγνώριση των μικροοργανισμών. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα – kappa B (NF-kB), ο οποίος μετατοπίζεται στον πυρήνα και με τη σειρά του ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολλών γονιδίων των οποίων τα προϊόντα είναι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (IFN α), παράγοντες νέκρωσης όγκων (TNF), ιντερλευκίνες 2, 6, 8 και 12 (ILs), χημειοκίνες και γενικότερα πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Επίσης, έχει προταθεί ότι η προφλεγμονώδης δράση της ημικιμόδης αυξάνεται μέσω αναστολής ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης που διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα της αδενοσίνης. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, φαίνεται να οδηγεί σε απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού μονοπατιού (Schön M.P et al., 2007).

2.8 Στοχεύουσες θεραπείες

Τα φάρμακα αυτά στοχεύουν στα χαρακτηριστικά των κυττάρων του μελανώματος που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά κύτταρα σε αντίθεση με τη χημειοθεραπεία που στοχεύει όλα τα κύτταρα που διαιρούνται γρήγορα. Το 50% των μελανωμάτων εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF και παράγουν μια τροποποιημένη πρωτεΐνη που τα βοηθά να αναπτύσσονται. Τα φάρμακα vemurafenib και dabrafenib στοχεύουν τη BRAF πρωτεΐνη απευθείας. Το γονίδιο MEK σχετίζεται με το γονίδιο BRAF, επομένως φάρμακα ,όπως το cobimetinib και το trametinib, που δρουν σαν αναστολείς της πρωτεΐνης MEK δείχνουν να συρρικνώνουν μελανώματα με μεταλλάξεις στο BRAF. Συνήθως οι αναστολείς MEK χορηγούνται μαζί με τους αναστολείς BRAF (<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/targeted-therapy.html>).

3. ΣΙΓΜΑ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

3.1 Γενικά

Οι σίγμα είναι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς που εντοπίζονται σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα και σε πολλούς περιφερικούς ιστούς. Σε κυτταρικό επίπεδο βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και στα υποκυτταρικά οργανίδια, ιδιαίτερα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Maurice T. et al., 2009).

Οι σίγμα υποδοχείς ταυτοποιήθηκαν το 1976 σαν υποδοχείς οπιοειδών. Οι ερευνητές πρότειναν 3 κατηγορίες οπιοειδών υποδοχέων: mu, kappa και sigma, βασιζόμενοι σε συμπεριφορικές μελέτες με τη χρήση μορφίνης, κετοκυκλαζοσίνης και βενζομορφάνης SKF10047. Ανακάλυψαν ότι το οπιοειδές ναλτρεξόνη μπορούσε να ανταγωνιστεί όλους τους υποδοχείς και, έτσι, θεώρησαν ότι οι σίγμα είναι υποδοχείς οπιοειδών. Το 1982, όμως, άλλοι ερευνητές στην προσπάθεια τους να βρουν τις θέσεις στις οποίες συνδέονται τα οπιοειδή, βρήκαν ότι οι σίγμα, ξεκάθαρα, δεν είναι υποδοχείς οπιοειδών. Από τότε βρέθηκαν διάφορες ενώσεις με συγγένεια για τους σίγμα με αποτέλεσμα το 1990 να διαχωριστούν σε σίγμα-1 και σίγμα-2, βάσει μελετών σύνδεσης προσδετών (Kim F.J., 2017).

3.2 Προσδέτες των σίγμα υποδοχέων

Οι σίγμα, μέχρι πρόσφατα, θεωρούνταν ορφανοί υποδοχείς, καθώς δεν είχε ανακαλυφθεί κάποιος ενδογενής προσδέτης τους. Ωστόσο, βρέθηκε ότι η διμεθυλτρυπταμίνη (DMT) δρα σαν ενδογενής αγωνιστής του σίγμα-1 υποδοχέα, ενώ παραμένει ακόμα άγνωστο αν ο σίγμα-2 έχει κάποιο ενδογενή προσδέτη.

Έχουν υψηλή συγγένεια με αρκετούς εξωγενείς προσδέτες, όπως νευροστεροειδή, νευροληπτικά, δεξτροβενζομορφάνες (DEX) και ψυχοδιεγερτικά, όπως κοκαΐνη, μεθαμφεταμίνη, μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη (MDMA) και μεθακαθινόνη. Οι σίγμα-1 υποδοχείς δείχνουν να έχουν υψηλή συγγένεια με DEX σε αντίθεση με τους σίγμα-2. Ενώ, υψηλή συγγένεια και για τους δύο υποδοχείς έχουν οι ενώσεις DTG, preclamol και η αλοπεριδόλη (Rousseaux, C. G. et al., 2015).

3.3 Σίγμα-1 υποδοχείς

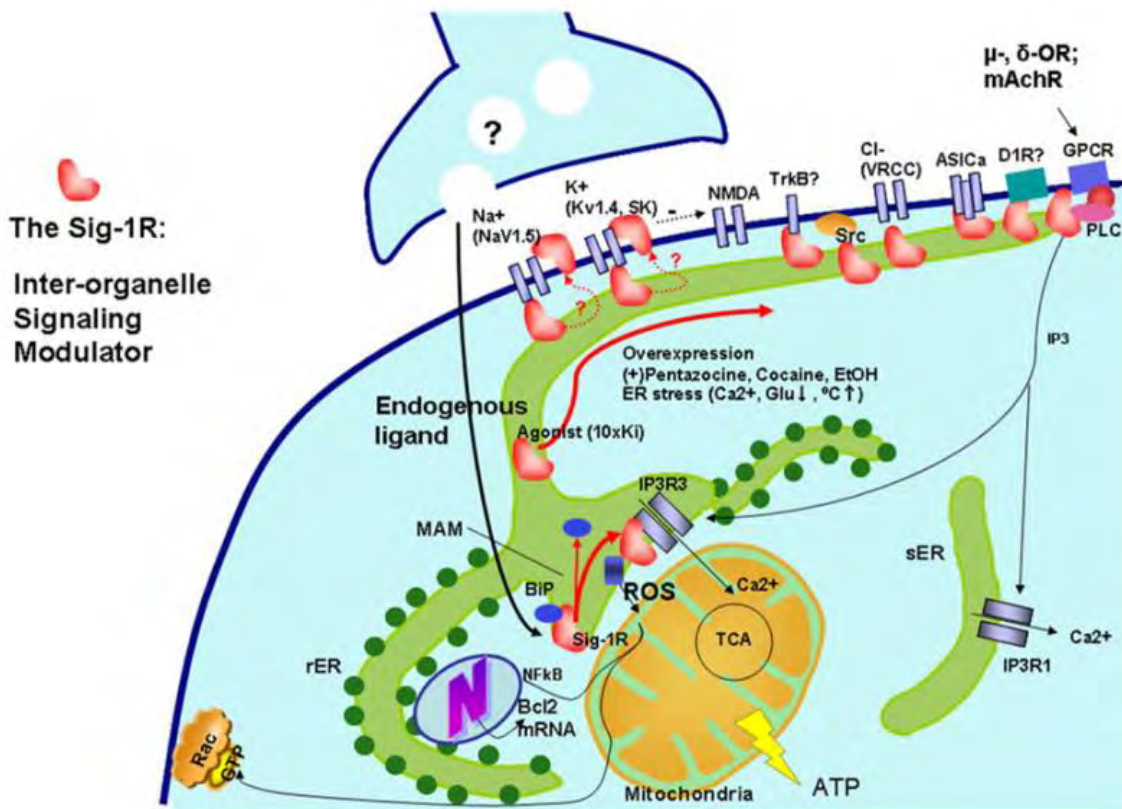
Ο σίγμα-1 υποδοχέας είναι μία πρωτεΐνη 29 kDA που αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον σίγμα-1 υποδοχέα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 2 στα τρωκτικά (Maurice T. et al., 2009).

Βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στην περιοχή που επικοινωνεί με το μιτοχόνδριο, που ονομάζεται MAM (mitochondrion-associated ER

membrane). Στην περιοχή αυτή ο σίγμα-1 υποδοχέας έχει τις εξής φυσιολογικές λειτουργίες (Εικόνα 1):

- ✓ Ρυθμίζει τη σταθερότητα των υποδοχέων της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) προκειμένου να εξασφαλιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση ασβεστίου τόσο στο μιτοχόνδριο όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Με αυτή τη λειτουργία τους μπορούν να αυξήσουν τη ροή ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο μιτοχόνδριο, άρα να αυξηθεί η παραγωγή ATP, συνεπώς η ενέργεια του κυττάρου και η κυτταρική επιβίωση. Όταν αυξηθεί η συγκέντρωση των σίγμα-1 αγωνιστών προάγεται και η επιβίωση του κυττάρου.
- ✓ Ενισχύει τη δημιουργία δενδριτών στους νευρώνες, καθώς ρυθμίζει τα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου, ίσως στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αυξάνοντας τη Rac-GTPase στην πλασματική μεμβράνη.
- ✓ Μέσω των δραστικών μορφών οξυγόνου ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα kappa B, ελέγχοντας την έκφραση του γονιδίου της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στην περιοχή MAM.

Φυσιολογικά, οι σίγμα-1 υποδοχείς βρίσκονται στη λιπιδιακή μεμβράνη της MAM και μεταφέρονται σε άλλα σημεία του κυττάρου είτε μετά από διέγερση από προσδέτες ή μετά από παρατεταμένο κυτταρικό στρες. Σε αυτά τα σημεία συγκαταλέγεται η πλασματική μεμβράνη, όπου αλληλεπιδρούν με διάφορα κανάλια ιόντων, υποδοχείς αλλά και κινάσες (Su, T.-P. et al. 2010)



Εικόνα 1: Στην περιοχή MAM οι σίγμα-1 υποδοχείς συνδέονται με τους αγωνιστές τους, διαχωρίζονται από τη μοριακή συνοδό BiP και δρουν οι ίδιοι σαν μοριακές συνοδοί για τους υποδοχείς IP3, ώστε να ενισχυθεί η ροή ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το μιτοχόνδριο και να αυξηθεί η παραγωγή ATP μέσω του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA). Επιπλέον, οι σίγμα-1 υποδοχείς εξασθενούν τις ελεύθερες ρίζες (ROS), ώστε να αυξήσουν την μεταγραφή του γονιδίου Bcl-2 στον πυρήνα για να προστατευτεί το κύτταρο από τον θάνατο. Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται αυτό είναι ακόμη άγνωστος. Η εξασθένηση των ROS στη MAM συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων ώστε να μην απελευθερωθεί από αυτά το αποπτωτικό κυτόχρωμα c που θα μπορούσε να καταστρέψει τη Rac-GTPase. Οι σίγμα-1 υποδοχείς μπορεί να μεταφερθούν από την MAM στην πλασματική μεμβράνη αν συνδεθούν με κάποιο αγωνιστή τους ή σε περίπτωση κυτταρικού στρες. Εκεί συνδέονται με κανάλια ιόντων (π.χ. Na⁺, K⁺, NMDA, ASIC και τασεοεξαρτώμενα κανάλια χλωρίου (VGCC)), υποδοχείς (π.χ. TrkB, D1R και άλλους GPCRs) ή κινάσες (π.χ. Src). Η δέσμευση των σίγμα-1 υποδοχέων στα μόρια αυτά δεν επηρεάζει τη φυσιολογική τους λειτουργία όσο έχουν σταθερή διαμόρφωση. Αυτό συμβαίνει διότι οι σίγμα-1, που δρουν σαν μοριακές συνοδοί, ασκούν τη δράση τους μόνο όταν οι πρωτεΐνες έχουν κάποιο πρόβλημα με τη δομή τους (Su, T.-P. et al. 2010).

Ύστερα από έρευνες βρέθηκε ότι οι σίγμα-1 υποδοχείς υπερεκφράζονται σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές τόσο σε ανθρώπους όσο και σε τρωκτικά, όπως στον καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα, του προστάτη, του παχέος εντέρου, του μελανώματος, του νευροβλαστώματος και του γλοιώματος. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση των υποδοχέων αυτών αυξανόταν σε υψηλά μεταστατικά κύτταρα υποδηλώνοντας ότι μπορεί να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης τους και της επιθετικότητας του καρκίνου.

Έρευνες δείχνουν ότι τα τασεοεξαρτώμενα κανάλια ιόντων, εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες των καρκινικών κυττάρων, όπως η μίτωση, η μετάσταση, η απόπτωση, η προσκόλληση στην εξωκυτταρική μήτρα, η αγγειογένεση και η αντοχή στα φάρμακα. Δεδομένου ότι οι σίγμα-1 υποδοχείς αλληλεπιδρούν με τα κανάλια αυτά, μπορεί να εμπλέκονται και σε όλες αυτές τις διαδικασίες στον καρκίνο (Crottès D. et al., 2013).

3.4 Σίγμα-2 υποδοχείς

Ο σίγμα-2 υποδοχέας έχει μοριακό βάρος 18-21 kDa και δεν έχει κλωνοποιηθεί ακόμα. Υπάρχουν δύο αντικρουόμενες δημοσιεύσεις σχετικά με την «ταυτότητά» του. Το 2011 μία δημοσίευση ταυτοποιεί τον σίγμα-2 υποδοχέα σαν τον PRGRMC1, υποδοχέας προγεστερόνης (Xu J. et al, 2011), ενώ το 2017 ο σίγμα-2 ταυτοποιείται σαν τον TMEM97, μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ομοιόσταση της χοληστερόλης (Alon A. et al, 2017).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο σίγμα-2 υποδοχέας αλληλεπιδρά με κανάλια ιόντων για τη ρύθμιση της κινητικότητας ενδοκυτταρικών ιόντων, όπως ασβεστίου και καλίου. Άλλες πηγές προτείνουν ότι ο σίγμα-2 παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση, ενώ έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Στα φυσιολογικά κύτταρα ο σίγμα-2 αποτελεί βιοδείκτη της κατάστασης του πολλαπλασιασμού του κυττάρου, ενώ οι σίγμα-2 προσδέτες επάγουν απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα Το εύρημα αυτό αποτέλεσε σημαντικό εργαλείο για τη δημιουργία αντικαρκινικών φαρμάκων με στόχο τον σίγμα-2 υποδοχέα. (Huang Y.S. et al., 2013).

3.5 Σίγμα υποδοχείς/προσδέτες και καρκίνος

Ένα θέμα που απασχολεί τους ερευνητές τα τελευταία χρόνια είναι η μελέτη των σίγμα υποδοχέων αλλά και των προσδετών τους στον καρκίνο. Η ένδειξη ότι υπάρχουν σίγμα-1 και σίγμα-2 υποδοχείς σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές ανοίγει ένα νέο πεδίο έρευνας για τον καρκίνο. Μελέτες σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, έδειξαν ότι ανταγωνιστές των σίγμα-1 υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένης της ριμκαζόλης, της μειωμένης αλοπεριδόλης (μεταβολίτης της αλοπεριδόλης), των BD-1047 και BD1063, οδήγησαν σε μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων χρονο- και δοσοεξαρτώμενη. Περαιτέρω πειράματα με σίγμα-1 αγωνιστές, όπως SKF-10047 και πενταζοσίνη, έδειξαν ότι καταργούν την κατασταλτική δράση των ανταγωνιστών.

Κατά την έρευνα σε ανθρώπινα νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα και καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού βρέθηκε έκφραση σίγμα-1 υποδοχέων και αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων με τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων σίγμα-1 ανταγωνιστών, όπως αλοπεριδόλη, μειωμένη αλοπεριδόλη και προγεστερόνη. Η αναστολή αυτή ήταν χρονοεξαρτώμενη. Λόγω του ότι οι σίγμα-1 υποδοχείς υπερεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού και του ότι η αλοπεριδόλη είναι ένας πιθανός σίγμα-1 προσδέτης, μία έρευνα χρησιμοποίησε μη ανιχνεύσιμα λιποσώματα (stealth liposomes) σαν σφαίρες μεταφοράς γονιδίων αλοπεριδόλης στα καρκινικά κύτταρα. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τα λιποσώματα που ήταν συζευγμένα με αλοπεριδόλη να παράγουν το διαγονίδιο σε 10 φορές υψηλότερα επίπεδα από τα λιποσώματα ελέγχου.

Σε μία πρόσφατη μελέτη που είχε στόχο να επιβεβαιώσει την υπερέκφραση των σίγμα-1 υποδοχέων στον καρκίνο, έλεγξαν τα επίπεδα του mRNA με Real-time PCR και ανίχνευσαν τον σίγμα-1 υποδοχέα με ειδικό αντίσωμα για αυτόν. Τελικά, διαπιστώθηκε ότι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές εξέφραζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα υποδοχέων σίγμα-1 και ότι η αποσιώπηση των υποδοχέων αυτών με siRNA μείωσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Σε μία άλλη μελέτη χρησιμοποίησαν ένα νέο προσδέτη του σίγμα-1 υποδοχέα (4-(N-benzylpiperidine-4-yl)-4-iodobenzamide) και βρήκαν ότι μείωσε την ανάπτυξη των A549 NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) και PC3 κυττάρων του καρκίνου του προστάτη με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ μείωσε σημαντικά την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ανοχή σε φάρμακα, συμπεριλαμβανομένης της συνθάσης της γλυκοζυλοκεραμίδης.

Μία ακόμη ένδειξη που συνδέει τους σίγμα υποδοχείς με τον καρκίνο προήλθε από μελέτες που εξέταζαν την επίδραση των σίγμα-1 αγωνιστών, όπως η κοκαΐνη, στον καρκίνο των πνευμόνων. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι οι αγωνιστές προάγουν την ανάπτυξη των όγκων, με τη δράση τους να αναστέλλεται από σίγμα-1 ανταγωνιστές και από αντίσωμα έναντι της ιντερλευκίνης 10, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση των σίγμα-1 υποδοχέων προάγει την ογκογένεση.

Μία μελέτη που αποτέλεσε έκπληξη για τη σύνδεση των σίγμα-1 υποδοχέων και του καρκίνου ήταν εκείνη των Simony-Lafontaine et al. (2000) που εξέτασαν 95 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και δεν βρήκαν στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των σίγμα-1 υποδοχέων και του μεγέθους των όγκων. Αντίθετα με τις υπόλοιπες έρευνες βρήκαν ότι όσο υψηλότερη έκφραση είχαν οι ασθενείς τόσο περισσότερο επιζούσαν. Προς το παρόν, αυτό το παράδοξο εύρημα δεν συνάδει με όλες τις άλλες έρευνες που δείχνουν ότι οι σίγμα-1 υποδοχείς προάγουν την ογκογένεση (Maurice T. et al., 2009)

Πιστεύεται ότι οι σίγμα-2 αγωνιστές αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και επάγουν την απόπτωση, ενώ οι σίγμα-2 ανταγωνιστές προάγουν την επιβίωσή τους. Σε μία έρευνα βρέθηκε ότι οι προσδέτες των σίγμα-2 υποδοχέων επηρέασαν τη μορφολογία των κυττάρων C6 του γλοιώματος, ανέστειλαν την κυτταρική διαίρεση και οδήγησαν σε κυτταρικό θάνατο. Μάλιστα, ο βαθμός αναστολής ήταν ανάλογος με τη

συγγένεια των σίγμα-2 προσδετών και ήταν χρονο- και δόσοεξαρτώμενος (Huang Y.S. et al., 2013).

3.6 Σίγμα προσδέτες και αυτοφαγία

Τα κύτταρα ενεργοποιούν την αυτοφαγία σε συνθήκες στρες, όπως σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών, σε στρες που προκαλείται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και σε εισβολή από παθογόνο. Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα προσπαθούν να επιβιώσουν, καθώς τα αυτοφαγοσώματα μεταφέρουν τα κυτταρικά συστατικά στα λυσοσώματα για την παραγωγή ενέργειας. Το οξειδωτικό στρες είναι ικανό να καταστρέψει τα μιτοχόνδρια τα οποία μπορούν να είναι, επίσης, «θύμα» της αυτοφαγίας, δηλαδή της μιτοφαγίας. Μόρια, όπως οι υποδοχείς τριφωσφορικής ινοσιτόλης των οποίων το σήμα είναι απαραίτητο για την καταστολή της αυτοφαγίας, πιθανών συνδέουν την περιοχή MAM με την αυτοφαγία. Έλλειψη αυτών των υποδοχέων μείωσε την πρόσληψη ασβεστίου από το μιτοχόνδριο και ενεργοποίησε την αυτοφαγία στο AMPK μονοπάτι. Μέρος της μιτοφαγίας ξεκινάει όταν η PINK1 στρατολογεί την Parkin που στοχεύει στα μιτοχόνδρια, οδηγώντας στην ουβικιτινίωση του τασεοεξαρτώμενου καναλιού ανιόντος 1 (VDAC1) που αναγνωρίζεται από την p62 για αποικοδόμηση. Επίσης, έχει προταθεί ότι η αυτοφαγία προέρχεται από την MAM όπου γίνεται ο εμπλουτισμός της αρχικής μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος με διάφορα οργανίδια (nucleation of isolation membrane). Έτσι, λοιπόν, φαίνεται, ο ρόλος του σίγμα-1 υποδοχέα στην αυτοφαγία. Ο σίγμα-1 ανταγωνιστής 1-(4-iodophenyl)-3-(2-adamantyl)guanidine (IPAG) ή η αλοπεριδόλη διεγείρει το UPR (Unfolded Protein Response: στρες που σχετίζεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο λόγω συσσώρευσης μη ή λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών) και την αυτοφαγική ροή που εξαρτάται από τους σίγμα-1 υποδοχείς. Η επαγωγή του UPR ακολουθήθηκε από το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων και η αναστολή του UPR ή της αυτοφαγίας επιτάχυνε την κυτταρική απόπτωση που επάχθηκε από τους σίγμα-1 ανταγωνιστές. Η αποσιώπηση των σίγμα-1 υποδοχέων προκάλεσε διεύρυνση του ενδοπλασματικού δικτύου, διάλυση των μιτοχονδρίων και ενίσχυση της μιτοφαγίας (Weng, T.-Y. et al., 2017).

Μία έρευνα σε κύτταρα του *Unveal* μελανώματος (μία σπάνια μορφή μελανώματος) αποκάλυψε ότι η πενταζοσίνη (σίγμα-1 αγωνιστής) οδήγησε σε επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ η αλοπεριδόλη και ο μεταβολίτης της (σίγμα-1-ανταγωνιστής και σίγμα-2 αγωνιστής) ανέστειλε την κυτταρική αύξηση. Χαμηλή συγκέντρωση της αλοπεριδόλης (1μM) οδήγησε σε σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε σχέση με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ή με το μεταβολίτη της. Η αλοπεριδόλη εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τους σίγμα υποδοχείς αλλά και για ντοπαμινεργικούς, αδρενεργικούς, σεροτονινεργικούς και ισταμινεργικούς υποδοχείς, ενώ ο μεταβολίτης της έχει υψηλότερη συγγένεια και εκλεκτικότητα για τους σίγμα υποδοχείς. Επομένως, είναι πιθανό σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλοπεριδόλης να υπάρχουν μη ειδικά αποτελέσματα. Η ίδια έρευνα έδειξε ότι οι ενώσεις αυτές αυξάνουν την αυτοφαγία αλλά και την απόπτωση της οποίας το

αποτέλεσμα αυτό ήταν εμφανές σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία σε σύγκριση με την αυτοφαγία. Επίσης, η πενταζοσίνη προκάλεσε αυξημένο αποπτωτικό προφίλ σε αυξημένες συγκεντρώσεις (Longhitano L. et al., 2017).

4.ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Παρ' όλο που η απόπτωση είναι η πιο συνηθισμένη μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι υπάρχουν εναλλακτικοί, μη αποπτωτικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η αυτοφαγία.

Στόχος της αυτοφαγίας είναι η σταδιακή ανανέωση των συστατικών του κυττάρου, δηλαδή η παροχή συστατικών του κυτταροπλάσματος στα λυσοσώματα με αποτέλεσμα την ανακύκλωση των προϊόντων αυτών, όπως λιπίδια, αμινοξέα και υδατάνθρακες που συμμετέχουν στη σύνθεση πρωτεϊνών και οργανιδίων ή μεταβολίζονται για την παροχή ενέργειας. Υπάρχουν τρεις τύποι αυτοφαγίας: η μικροαυτοφαγία, η αυτοφαγία στην οποία διαμεσολαμβάνονται μοριακές συνοδοί και η μακροαυτοφαγία. Ο μηχανισμός της μακροαυτοφαγίας, η οποία θα αναφέρεται ως «αυτοφαγία», είναι ο καλύτερος για την κατανόηση της ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου.

Κατά την αυτοφαγία, συγκεκριμένα κυστίδια, που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα, περικλείουν κυτταρικές πρωτεΐνες ή οργανίδια και συντήκονται με λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Το κύριο πρόβλημα είναι η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η απομόνωση και η αποδόμηση κυτταρικών συστατικών από τα αυτοφαγοσώματα επηρεάζει την απόπτωση και άλλους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου και αντίστροφα πώς η απόπτωση ρυθμίζει την αυτοφαγία. Σε αυτό το σημείο, πρέπει να τονιστεί ότι η αυτοφαγία και η αυτοφαγική ροή είναι δύο διαφορετικές έννοιες. Η αυτοφαγία αναφέρεται στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων, ενώ η αυτοφαγική ροή σημαίνει ότι έλαβε χώρα όλη η διαδικασία και κάποια κυτταρικά συστατικά αποδομήθηκαν. Κάποιοι μηχανισμοί οι οποίοι ρυθμίζουν τον κυτταρικό θάνατο περιλαμβάνουν τα αυτοφαγοσώματα αλλά όχι την αυτοφαγική ροή, ενώ άλλοι περιλαμβάνουν και τα δύο.

Υψηλά επίπεδα αυτοφαγίας μπορεί να αποτελούν ένδειξη ότι το κύτταρο στην προσπάθειά του να επιβιώσει και να αυξήσει την βιοενέργεια του επάγει την αυτοφαγία και ότι όταν αυτό αποτύχει επέρχεται ο θάνατος. Υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις που αναφέρουν ότι τα σήματα θανάτου προκαλούνται από την αυτοφαγία. Μία περίπτωση στην οποία θα μπορούσε η αυτοφαγία να προκαλέσει το θάνατο είναι η αδυναμία να ενεργοποιηθεί η απόπτωση. Άλλες πηγές αναφέρουν ότι υπάρχουν πρωτεΐνες προ-επιβίωσης οι οποίες αν αποικοδομηθούν προκαλείται ο θάνατος. Προς το παρόν είναι άγνωστο το πώς το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο μέσω της αυτοφαγίας.

Τα τελευταία χρόνια έχει διεξαχθεί αξιόλογο ερευνητικό έργο στη σύνδεση αυτοφαγίας και κυτταρικού θανάτου, καθώς ο χειρισμός της αυτοφαγίας μπορεί να βελτιώσει την αντιμετώπιση των ασθενειών στις οποίες θέλουμε να σκοτώσουμε κύτταρα (π.χ. καρκίνος) ή να προάγουμε την κυτταρική επιβίωση (π.χ. νευροεκφυλιστικές νόσοι) (Yonekawa T. et al., 2013)

4.1 mTOR: κύριο σημείο ελέγχου της αυτοφαγίας

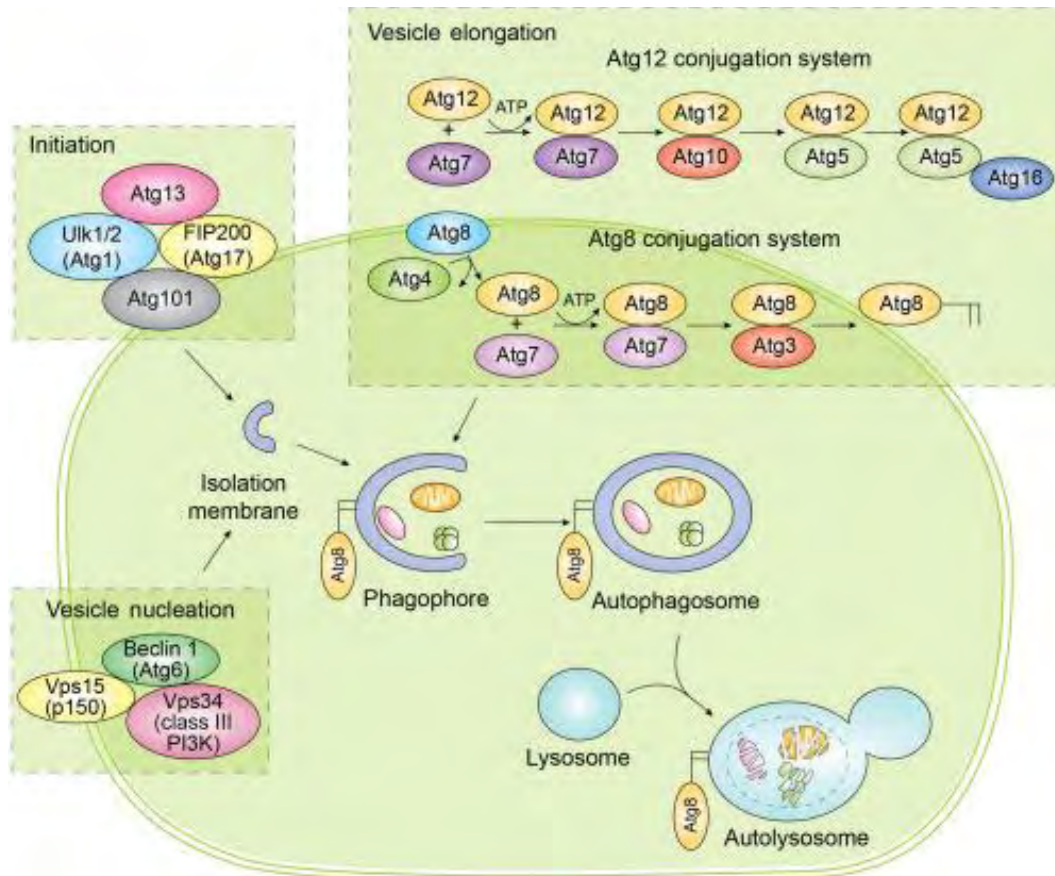
Η αυτοφαγία ρυθμίζεται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία έχουν σαν κύριο σημείο ελέγχου το mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Το mTORC1 ρυθμίζει τη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt και μέσω των επιπέδων ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών, τα οποία ανιχνεύονται από την AMPK (AMP-activated kinase). Ο παράγοντας επιμήκυνσης 4E-BP1 και η κινάση p70S6 είναι οι κύριοι ρυθμιστές του mTORC1. Η αυτοφαγία μειώνεται όταν το ενεργοποιημένο mTORC1 φωσφορυλιώνει ένα σύμπλοκο αυτοφαγικών πρωτεϊνών (ULK1/2), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναστολή του καταρράκτη της αυτοφαγίας. Ένας ακόμα τρόπος για να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR έμμεσα, είναι μέσω ενεργοποίησης της Ras διαμεσολαβούμενη από το σύμπλεγμα GRB2-SOS, της οποίας η μορφή που είναι συνδεδεμένη με GTP ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της P13K, προάγοντας τη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR. Η ενεργοποιημένη Akt αναστέλλει τον ετεροδιμερισμό των TSC1 και TSC2 (tuberous sclerosis protein) μέσω φωσφορυλίωσης της TSC2. Ο διμερισμός είναι υπεύθυνος για την αναστολή της δραστηριότητας της Rheb ως GTPase. (ομόλογη της Ras, κυρίως στον εγκέφαλο). Εφόσον οι δύο πρωτεΐνες δεν ετεροδιμερίζονται η αναστολή αναιρείται και η Rheb που συνδέεται με GTP ενεργοποιεί τα mTORC1 και mTORC2. Η Akt φωσφορυλιώνεται από το mTORC2 και έτσι ενεργοποιείται, συμβάλλοντας στην αναστολή της αυτοφαγίας. Εναλλακτικά, η ενεργοποίηση του mTORC1 μπορεί να προκληθεί με την εισροή βασικών αμινοξέων που επάγει τη μετάφραση των πρωτεϊνών και αύξηση του κυττάρου. Σε χαμηλή ενεργειακή κατάσταση ενεργοποιείται η AMPK από την κινάση σερίνης/θρεϊονίνης LKB1, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την TSC2 για την αναστολή της δραστηριότητας του mTORC1 αυξάνοντας, έτσι, την αυτοφαγία. Επιπλέον, έχειδειχτεί ότι η σηματοδότηση μέσω MEK/ERK ενισχύει την αυτοφαγία που προκαλείται από «ασιτία» και ότι η ενεργοποίηση της ERK που εξαρτάται από ROS μπορεί να αυξήσει την αυτοφαγία και να προκαλέσει το θάνατο των κυττάρων (Janku F. et al., 2011).

4.2 Γονίδια που συμμετέχουν στην αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά στάδια και ρυθμίζεται γενετικά από γονίδια Atg. Ξεκινά με τη δημιουργία της προαυτοφαγοσωματικής δομής (PAS) που χρησιμεύει για το σχηματισμό της μεμβράνης (isolation membrane). Προκειμένου να ξεκινήσει η αυτοφαγία απαιτείται η κινάση σερίνης/θρεϊονίνης Atg1 η οποία ενεργοποιεί την αυτοφαγία όταν έχει λανθασμένη έκφραση. Η Atg1 σχηματίζει σύμπλοκο με την Atg13 και την Atg101 στη μεμβράνη, το οποίο ρυθμίζεται αρνητικά από το mTORC1. Το σύμπλοκο αυτό πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό των αυτοφαγοσωματικών δομών. Η δραστηριότητα της κινάσης Atg1 είναι, επίσης, απαραίτητη για την αυτοφαγία, καθώς είναι γνωστό ότι φωσφορυλιώνει την

Atg9, επιτρέποντας της να αλληλεπιδράσει με την Atg18, παράγοντας κλειδί για την αυτοφαγία, και την Atg8 στην προαυτοφαγοσωματική δομή.

Το σύμπλεγμα Vps34 αποτελείται από τις Vps34 (κλάση III PI3K), Beclin 1 (Atg6 στη δροσόφιλα και Atg6/Vps30 στον μύκητα), Vps15 (που ονομάζεται επίσης p150 ή ird1 στη *Drosophila*) και τα συστατικά Uvrag και Barkor (Atg14L στη ζύμη και τη *Drosophila*), τα οποία είναι επίσης απαραίτητα για το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων. Το Vps34 φωσφορυλιώνει τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns) για να σχηματίσει την PtdIns-3-phosphate (PI3P), ένα σημαντικό βήμα για την έναρξη της βιογένεσης του αυτοφαγοσώματος. Επιπλέον, υπάρχουν δύο μονοπάτια σύζευξης, που μοιάζουν με αυτό της ουβικιτίνης, τα οποία απαιτούνται για την αυτοφαγία και περιλαμβάνουν τις ubiquitin-like πρωτεΐνες Atg8 (LC3 στα θηλαστικά) και Atg12. Και στα δύο μονοπάτια η Atg7 συμπεριφέρεται σαν E1-like ένζυμο ενεργοποίησης. Στο σύστημα Atg12, η Atg12 μεταφέρεται στο E2 ένζυμο, Atg10, και συζεύγνεται με το Atg5. Τελικά, το σύμπλεγμα Atg12–Atg5 προσδένεται στο Atg16, σχηματίζοντας το Atg12–Atg5–Atg16. Στο σύστημα LC3, η Atg3 δρα σαν την E2 και το σύμπλοκο Atg12–Atg5 δρα σαν E3. Έτσι, το LC3 που είναι συζευγμένο με την Atg3 έρχεται κοντά με το υπόστρωμά του, τη λιπιδική φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE). Πριν από την αλληλεπίδρασή του με το Atg7, το Atg8 υφίσταται πέψη από την Atg4, εκθέτοντας ένα C-τελικό κατάλοιπο γλυκίνης στο οποίο μπορεί να συζευχθεί η PE. Η λιπιδίωση του Atg8 διευκολύνει την αλληλεπίδρασή του με την αυτοφαγοσωματική μεμβράνη, οδηγώντας το αυτοφαγόσωμα σε στάδια ωρίμανσης που περιλαμβάνουν τον εμπλουτισμό με διάφορα οργανίδια, την ανάπτυξη και το κλείσιμο του (Eikona 2) (Anding A. et al., 2015).



Εικόνα 2: Για την έναρξη της αυτοφαγίας απαιτείται η Atg1 και τα μόρια που αλληλεπιδρούν με αυτήν. Το σύμπλοκο Vps34 ευθύνεται για τον εμπλουτισμό του αυτοφαγοσώματος με οργανίδια (Vesicle nucleation), το οποίο αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες, όπως οι Atg14L και UVRAG. Η συνέχεια της διαδικασίας ρυθμίζεται από τα σύμπλοκα Atg12 και Atg8 που επιτρέπει την πρόσδεση του Atg8 στη μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος και στον μετέπειτα σχηματισμό του (Anding A. et al., 2015).

5.ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Απόπτωση ονομάζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος προκειμένου να απομακρυνθούν κύτταρα του οργανισμού τα οποία δεν χρειάζεται πλέον, όπως τα προκαρκινικά κύτταρα που έχουν μία ανεξέλεγκτη τάση για πολλαπλασιασμό και αύξηση. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται από μία σειρά συγκεκριμένων κυτταρικών μεταβολών. Αρχικά, επέρχεται κατακερματισμός του DNA ανάμεσα στα νουκλεοσώματα, συμπύκνωση της χρωματίνης και διάσπαση του πυρήνα. Ακολουθεί συρρίκνωση του κυττάρου και τεμαχισμός σε τμήματα περιβαλλόμενα από μεμβράνη που ονομάζονται αποπτωτικά σωμάτια. Έπειτα, τα αποπτωτικά κύτταρα και τα αποπτωτικά σωμάτια υφίστανται φαγοκυττάρωση για τη γρήγορη απομάκρυνση τους από τους ιστούς. Κατά την απόπτωση η φωσφατιδυλοσερίνη εμφανίζεται στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ φυσιολογικά βρίσκεται στην εσωτερική στιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, και αποτελεί ένα από τα σήματα που αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς των φαγοκύτταρων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα φαγοκύτταρα να αναγνωρίσουν και να εγκολπώσουν τα αποπτωτικά κύτταρα αλλά και τα τμήματα τους.

5.1 Μοριακός μηχανισμός της απόπτωσης

Οι κύριοι τελεστές της απόπτωσης είναι οι κασπάσες οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να πέπτουν περισσότερες από 100 διαφορετικές κυτταρικές πρωτεΐνες. Ένας βασικός στόχος των κασπασών είναι ο αναστολέας μίας DNAσης (ICAD) η οποία προκαλεί τον καταμελισμό του πυρηνικού DNA. Επίσης, οι πυρηνικές λαμίνες πέπτονται από τις κασπάσες οδηγώντας στη διάλυση του πυρήνα. Ακόμη, καταστρέφουν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του, την καταστροφή των μεμβρανών και κατ' επέκταση του κυττάρου. Τέλος, είναι υπεύθυνες για την μεταφορά της φωσφατιδυλοσερίνης στην κυτταρική επιφάνεια αν και οι στόχοι που ευθύνονται για αυτή την μετατόπιση είναι άγνωστοι ακόμα.

Οι κασπάσες περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο κυστεΐνες και τέμνουν τις πρωτεΐνες-υποστρώματα τους στο καρβοξυτελικό άκρο των καταλοίπων του ασπαρτικού οξέος του πεπτιδικού δεσμού. Υπάρχουν δύο κατηγορίες κασπασών: οι εναρκτήριες και οι εκτελεστικές και συμμετέχουν σε έναν πρωτεολυτικό καταρράκτη που προκαλεί τα γεγονότα της απόπτωσης. Κάθε κασπάση, αρχικά, παράγεται σαν πρόδρομο ανενεργό μόριο και πρωτεολύεται μέσω μίας άλλης κασπάσης που οδηγεί στη μετατροπή της σε ενεργό μόριο.

Σε κύτταρα των θηλαστικών, δημιουργείται ένα σύμπλοκο, το αποπτώσωμα, το οποίο χρειάζεται το κυτόχρωμα c που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια λόγω των σημάτων που επάγουν την απόπτωση. Το αποπτώσωμα περιλαμβάνει την Araf1 στην οποία προσδένεται η κύρια εναρκτήρια κασπάση, η κασπάση 9. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη κασπάση ενεργοποιεί μέσω πέψης τις εκτελεστικές κασπάσες που δρουν καθοδικά, όπως

οι κασπάσες 3 και 7, οι οποίες με τη σειρά τους πέπτουν κυτταρικές πρωτεΐνες-στόχους προκαλώντας τα γεγονότα που παρατηρούνται στην απόπτωση.

Ο κυτταρικός θάνατος, εκτός από τις κασπάσες, μπορεί να ρυθμιστεί, επίσης, από τα μέλη της οικογένειας Bcl-2. Κάποια μέλη αυτής της οικογένειας, όπως η Bcl-2, είναι αναστολείς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου άρα έχουν αντιαποπτωτική δράση, ενώ άλλα μέλη είναι πρωτεΐνες οι οποίες επάγουν την ενεργοποίηση των κασπασών, άρα προάγουν την απόπτωση και ονομάζονται προαποπτωτικές. Τα προαποπτωτικά μόρια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες «πολλαπλών επικρατειών», καθώς διαθέτουν τρεις επικράτειες BH(BH1, BH2 και BH3), ενώ στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι πρωτεΐνες «BH3-μόνο» διότι διαθέτουν μόνο την BH3 επικράτεια.

Οι δράσεις των προαποπτωτικών και των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών αλληλορυθμίζονται και η ισορροπία τους καθορίζει τη μοίρα του κυττάρου. Τα μόρια «πολλαπλών επικρατειών», όπως οι πρωτεΐνες Bax και Bak, είναι καθοδικοί τελεστές που επάγουν άμεσα τον κυτταρικό θάνατο και αναστέλλονται μέσω αλληλεπίδρασης με τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bcl-2. Οι πρωτεΐνες BH3-μόνο βρίσκονται ανοδικά του καταρράκτη και ρυθμίζονται από σήματα που επάγουν είτε την απόπτωση είτε την κυτταρική επιβίωση. Όταν ενεργοποιηθούν τα μόρια αυτά, ενεργοποιούν τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες πολλαπλών επικρατειών, καθώς ανταγωνίζονται τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες.

Οι ενεργοποιημένες πρωτεΐνες Bax και Bak δρουν σαν ολιγομερή στην εξωτερική μεμβράνη. Μόλις σχηματιστούν τα ολιγομερή προκαλείται η απελευθέρωση του κυτόχρωματος c από το μιτοχόνδριο, είτε με το σχηματισμό πόρων ή με την αλληλεπίδραση με μόρια του εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το κυτόχρωμα c, όπως αναφέρθηκε βρίσκεται στον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο, ενώ οι Araf-1 και η κασπάση 9 εδράζονται στο κυτταρόπλασμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κασπάση 9 να μην μπορεί να ενεργοποιηθεί. Όμως, με την ενεργοποίηση των Bax ή Bak το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, όπου συνδέεται με την Araf-1 και προκαλεί το σχηματισμό του αποπτωσώματος, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9.

Τα μονοπάτια που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο διαχωρίζονται σε ενδογενή(intrinsic) και εξωγενή(extrinsic), ανάλογα με τη συμμετοχή των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και την εμπλεκόμενη εναρκτήρια κασπάση.

5.2 Ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης

Το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης ή αλλιώς μιτοχονδριακό μονοπάτι μπορεί να επαχθεί από διάφορες μορφές κυτταρικού στρες, όπως ιικές μολύνσεις, βλάβες του DNA και στέρηση μεταγραφικών παραγόντων.

Η βλάβη του DNA είναι η απαρχή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ώστε να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση των κυττάρων που φέρουν τις βλαβερές μεταλλάξεις που μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Υπάρχουν πολλά σημεία ελέγχου στον κυτταρικό κύκλο τα οποία αποκρίνονται σε μεταλλάξεις του DNA, προκειμένου να διακόπτεται η πορεία του, έτσι ώστε το

κύτταρο να επιδιορθώνει τις μεταλλάξεις του DNA. Στα κύτταρα των θηλαστικών, ο μεταγραφικός παράγοντας p53 συμβάλλει στο κύριο μονοπάτι που προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στις βλάβες του DNA. Ο p53 φωσφορυλιώνεται και σταθεροποιείται από τις πρωτεϊνικές κινάσες ATM και Chk2, οι οποίες ενεργοποιούνται από τις μεταλλαγές του DNA, οδηγώντας τελικά σε γρήγορη αύξηση της συγκέντρωσης του. Λόγω της αύξησης αυτής, ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων-στόχων που εκφράζουν πρωτεΐνες όπως ο παράγοντας p21, ο οποίος αναστέλλει τα σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E, οδηγώντας σε στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Όμως, η ενεργοποίηση του p53 από βλάβες του DNA μπορεί να προκαλέσει και απόπτωση μέσω ενεργοποίησης γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες PUMA και Noxa, που ανήκουν στην οικογένεια BH3-μόνο αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2. Η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών αυτών προκαλεί την ενεργοποίηση των Bax και Bak, στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9.

5.3 Εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης

Υπάρχουν κάποια εκκρινόμενα πεπτιδία τα οποία σηματοδοτούν τον κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης και είναι μέλη της οικογένειας των παραγόντων νέκρωσης όγκων (TNF, Tumor Necrosis Factors). Οι παράγοντες TNF συγκροτούνται από τρεις όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς με αποτέλεσμα τον τριμερισμό των υποδοχέων αυτών. Οι κυτταροπλασματικές επικράτειες των υποδοχέων αυτών συνδέονται σε μόρια-προσαρμοστές τα οποία συνδέονται με την κασπάση 8 και την ενεργοποιούν. Έπειτα, η κασπάση 8 μπορεί να πρωτεολύσει εκτελεστικές κασπάσες, όπως η κασπάση 3 και η 7 που δρουν καθοδικά. Σε κάποια κύτταρα απαιτείται η ενίσχυση του σήματος που πραγματοποιείται μέσω πέψης και ενεργοποίησης της προαποπτωτικής BH3-μόνο πρωτεΐνης Bid από την κασπάση 8. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9. Έτσι, ενισχύεται ο καταρράκτης κασπασών μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 8.

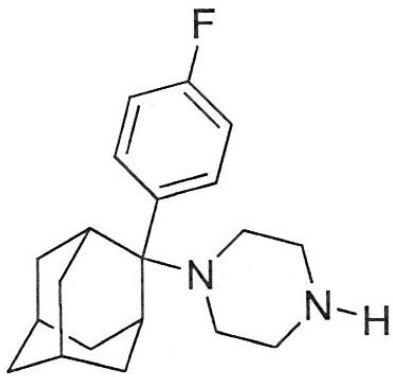
6.ΕΝΩΣΗ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η ένωση που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα συντέθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας της Φαρμακευτικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ομάδα αδαμαντυλίου βρίσκεται συχνά σε βιολογικά δραστικές ενώσεις με διάφορες φαρμακολογικές δράσεις, όπως αντιικές, αντιβακτηριακές, αντικαρκινικές κλπ. Το αδαμαντύλιο έχει τέτοια δομή ώστε να αυξάνει τη λιποφιλικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις και για αυτό αποτελεί πόλος έλξης για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων που το συμπεριλαμβάνουν στη δομή τους. Από την άλλη πλευρά, η πιπεραζίνη βρίσκεται, επίσης, σε βιολογικά δραστικές ενώσεις με αντιμυκητιακές, αντιικές, αντικαρκινικές ιδιότητες ή που λειτουργούν σαν αγωνιστές ή ανταγωνιστές του υποδοχέα της σεροτονίνης.

Σε μία πρόσφατη έρευνα μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα της φαινκυκλιδίνης 1α (1-(1-φαινυλκυκλοεξυλ)πιπεριδίνη, PCP) και των αναλόγων της που φέρουν μία ομάδα αδαμαντυλίου στη θέση του κυκλοεξυλικού δακτυλίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φαινκυκλιδίνη και η αδαμαντυλμορφολίνη 4α ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών και καρκινικών κυτταρικών σειρών σε συγκέντρωση 10μΜ, χωρίς παρενέργειες. Στη συνέχεια της ίδιας έρευνας αναφέρθηκε η αποπρωτική δράση κάποιων θυενυλ-αναλόγων σε καρκινικά κύτταρα και μη.

Η δράση των αναλόγων με αδαμαντύλιο οδήγησαν στη δημιουργία μιας αρχικής δομής 2-aryl-2-dialkylaminoadamantane με σκοπό να βρεθεί η πιθανή αντικαρκινική δράση των παραγώγων της. Έτσι, λοιπόν, εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητα των παραγώγων σε 4 καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε 2 φυσιολογικές και βρέθηκε ότι η 1-(2-αρυλ-2-αδαμαντυλ)πιπεραζίνη (P5) και ένα παράγωγο της (FP5) ήταν πιο δραστικά. Συγκεκριμένα, το P5 ήταν δραστικό ενάντια των HeLa και των MDA MB 231 κυττάρων. Το FP5 ήταν, επίσης, δραστικό στις ίδιες κυτταρικές σειρές και εμφάνισε χαμηλή κυτταροτοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες πρόσδεσης και βρέθηκε ότι ένα παράγωγο από αυτά που δημιουργήθηκαν είχε εκλεκτική συγγένεια πρόσδεσης για τον σίγμα-1 υποδοχέα (25 φορές περισσότερη από ότι για τον σίγμα-2). Το εύρημα αυτό δείχνει ένα πιθανό μηχανισμό δράσης των αναλόγων αυτών, αν και δεν μπορούν ακόμα να ταξινομηθούν σαν αγωνιστές ή ανταγωνιστές των σίγμα υποδοχέων.



FP5

Εικόνα 3: Δομή του παραγώγου της 1-(2-αρυλο-2-αδαμαντυλο) πιπεραζίνης (FP5)

7. ΣΚΟΠΟΣ

Σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τη Χατήρα Σταυρούλα στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας βρέθηκε ότι το FP5 εμφάνισε υψηλή κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα μελανώματος SKMEL28 τα οποία είχαν, επίσης, την υψηλότερη έκφραση των σίγμα υποδοχέων. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, που αποτελεί συνέχεια αυτού του ερευνητικού έργου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταροτοξικότητας του FP5 έναντι κυττάρων xSKMEL28 p1 με σκοπό να βρεθεί αφενός η κυτταροτοξική και αντιπολλαπλασιαστική δράση του FP5 και αφετέρου ο μηχανισμός θανάτου που επάγει μέσω στυπώματος κατά Western. Επίσης, πραγματοποιήθηκε *in vivo* μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του FP5 έναντι των καρκινικών όγκων που προήλθαν από τα ίδια κύτταρα.

B.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.Θρεπτικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια

RPMI

Παρασκευάζεται από την εταιρία Gibco με αριθμό καταλόγου 31870-025. Χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις καλλιέργειες των κυττάρων και ήταν εμπλουτισμένο με:

- ✓ 5% FBS
- ✓ 1% Pen/Strep
- ✓ 1%L-Glu

FBS (Fetal Bovine Serum)

Στις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε ορός είτε της εταιρίας Biochrom με αριθμό καταλόγου S0115 είτε της Hyclone με αριθμό καταλόγου CH30160-03. Πριν τη χρήση του ο ορός απενεργοποιείται στο υδατόλουτρο στους 56°C για 30 λεπτά υπό ανάδευση.

Διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης

Κατασκευάζεται στην εταιρία Biochrom με αριθμό καταλόγου L0022-100.

L-Glutamine

Κατασκευάζεται στην εταιρία Gibco με αριθμό καταλόγου 25030-024.

PBS 10x(Phosphate Buffered Saline)

Χρησιμοποιούνται κάψουλες PBS οι οποίες παρασκευάζονται από την εταιρία Sigma με αριθμό καταλόγου 017K8212 και διαλύονται σε απιονισμένο νερό προκειμένου να παρασκευαστεί το PBS 10x, το οποίο, στη συνέχεια, αραιώνεται σε απιονισμένο νερό ώστε να παρασκευαστεί PBS σε τελική συγκέντρωση 1x που χρειάστηκε για τις καλλιέργειες. Πρόκειται για ένα ισοτονικό διάλυμα που διατηρεί τη ζωτικότητα των κυττάρων της καλλιέργειας, κρατώντας το pH και την οσμωμοριακότητα σε φυσιολογικά επίπεδα. Χρησιμοποιείται για την έκπλυση της φλάσκας καλλιέργειας για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ορού πριν από την επώαση με την τρυψίνη, καθώς η παρουσία του ορού λειτουργεί ανασταλτικά στην δράση της τρυψίνης

Διάλυμα τρυψίνης 10x σε EDTA

Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται από την εταιρία Biochrom με αριθμό καταλόγου L2153. Το διάλυμα αυτό προκειμένου να φτάσει σε τελική συγκέντρωση 1x αραιώνεται σε PBS 1x.

Freezing medium

Αποτελείται από:

- ✓ 90% FBS
- ✓ 10% DMSO

DMSO (Dimethyl Sulfoxide)

Παρασκευάζεται από την εταιρία Calbiochem με αριθμό καταλόγου 317275

Trypan blue

Κατασκευάζεται στην εταιρία Biochrom και έχει αριθμό καταλόγου L6323.

2. Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων

2.1 Κυτταρική σειρά

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία ήταν η xSKMEL28 p1.

2.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε αποστειρωμένες φλάσκες με θρεπτικό υλικό και διατηρούνται στον κλίβανο στους 37°C. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται, πριν την εφαρμογή τους στα κύτταρα, είναι αναγκαίο να προθερμανθούν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Επίσης, όλες οι διαδικασίες που θα αναφερθούν παρακάτω πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται από το θάλαμο νηματικής ροής και όλα τα υλικά πριν την εισαγωγή τους σε αυτόν αλλά και η επιφάνεια εργασίας ψεκάζονται με αιθανόλη 70% για αποφυγή επιμολύνσεων.

2.3 Ανανέωση θρεπτικού υλικού

Αρχικά, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και προστίθεται καινούριο.

2.4 Expand

Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και προστίθεται PBS 1x. Μετά από ήπια ανάδευση με πιπέτα απομακρύνεται το PBS και προστίθεται Trypsin/EDTA 1x. Η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο για 2-3 λεπτά ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια και στη συνέχεια προστίθεται θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, ανάλογα με τις φλάσκες στις οποίες γίνεται expand κατανέμεται και το εναιώρημα κυττάρων με την ανάλογη ποσότητα θρεπτικού υλικού.

2.5 Αποθήκευση κυττάρων

Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και προστίθεται PBS 1x. Μετά από ήπια ανάδευση με πιπέτα απομακρύνεται το PBS και προστίθεται Trypsin/EDTA 1x. Η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο για 2-3 λεπτά ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια και στη συνέχεια προστίθεται θρεπτικό υλικό. Έπειτα, το εναιώρημα μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα του οποίου τα κύτταρα καταμετρούνται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1200 στροφές. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε freezing medium (για κάθε

4.000.000 κύτταρα χρησιμοποιείται 1ml freezing medium) και μεταφέρεται σε cryovial το οποίο τοποθετείται στους -80°C.

2.6 Καταμέτρηση κυττάρων

Ο δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται προκειμένου να μην καθιζάνουν τα κύτταρα και σε erpendorf τοποθετούνται 90μl κυττάρων και 10μl trypan blue. Με πιπέτα μεταφέρονται 50μl αυτού του διαλύματος σε πλάκα Neubauer και τα κύτταρα καταμετρούνται στο μικροσκόπιο.

2.7 Απόψυξη κυττάρων

Αρχικά, το cryovial στο οποίο έχουν αποθηκευτεί τα κύτταρα τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 37°C και το αναδεύουμε ώστε να ξεπαγώσουν γρήγορα τα κύτταρα, καθώς το DMSO σε θερμοκρασία πάνω από 4°C είναι τοξικό (Celis J.E., 2006). Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του cryovial μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο βάζουμε, επίσης, 10ml θρεπτικού υλικού με πιπέτα στα τοιχώματα αργά-αργά καθώς τα κύτταρα σε αυτή τη φάση είναι ευαίσθητα και λόγω του φαινομένου της ώσμωσης μπορεί να διαρρηχθούν. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του δοκιμαστικού σωλήνα και φυγοκέντρηση στις 900 στροφές για 10 λεπτά, στροφές σχετικά χαμηλές λόγω της ευαισθησίας των κυττάρων. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 5ml θρεπτικού υλικού και τοποθετείται σε φλάσκα 25cm².

3. Πείραμα κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης B (SRB Cytotoxicity Assay)

Η δοκιμασία αυτή μας δείχνει την πυκνότητα των κυττάρων και βασίζεται στη μέτρηση του περιεχομένου τους σε πρωτεΐνη. Η σουλφοροδαμίνη B συνδέεται με τις πρωτεΐνες των κυττάρων υπό ήπιες όξινες συνθήκες. Συγκεκριμένα, σχηματίζει ένα ηλεκτροστατικό σύμπλοκο με τα κατάλοιπα των βασικών αμινοξέων τους.

Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η μελέτη της αντιπολλαπλασιαστικής – κυτταροτοξικής δράσης του FP5 και της καρβοπλατίνης σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις 100μM, 50μM, 10μM, 1μM, 0,1μM σε καλλιέργειες κυττάρων xSKMEL28 p1.

1^η ημέρα: Ανανέωση θρεπτικού υλικού

Για την έναρξη του ελέγχου κυτταροτοξικότητας πρέπει να ανανεωθεί το θρεπτικό υλικό στις καλλιέργειες των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν.

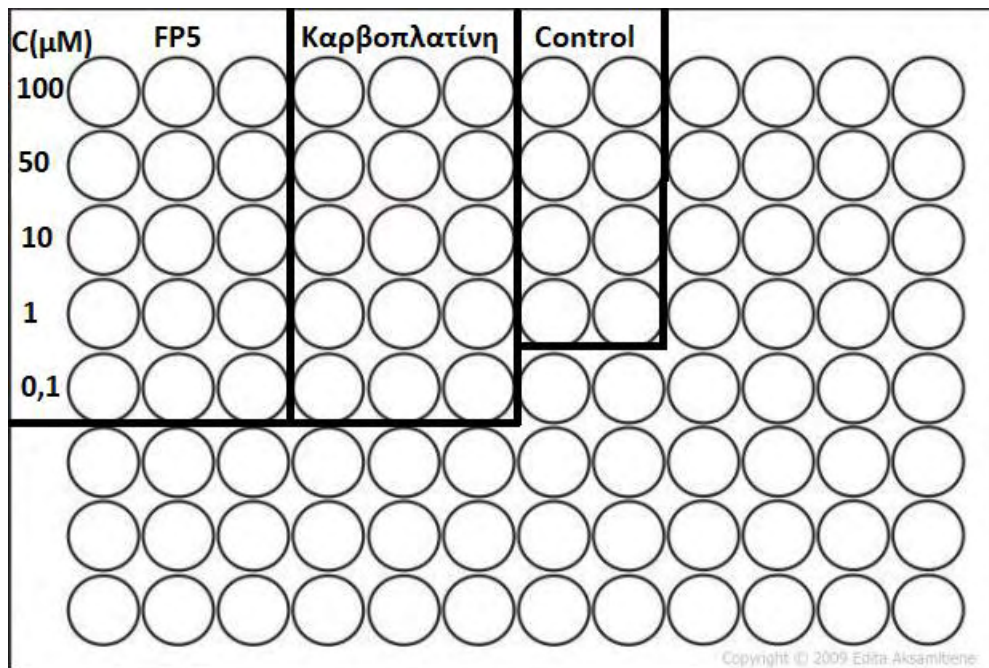
2^η ημέρα: Επιστροφή κυττάρων σε 96-well plate

Αρχικά, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τις φλάσκες. Ακολουθεί ξέπλυμα κάθε φλάσκας με PBS 1x για να απομακρυνθούν υπολείμματα ορού, προστίθεται Trypsin/EDTA 1x και οι φλάσκες παραμένουν στον κλίβανο για 2-3 λεπτά. Έπειτα, ελέγχουμε στο μικροσκόπιο αν έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα

και προσθέτουμε θρεπτικό υλικό σε κάθε φλάσκα για να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη. Στη συνέχεια, όλα τα κύτταρα συλλέγονται σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκεντρώνονται στις 1200 στροφές για 10 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναιωρείται το ίζημα σε θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα καταμετρούνται. Στόχος είναι να έχουμε 5000 κύτταρα ανά 100μl που αντιστοιχούν στην πυκνότητα ενοφθαλμισμού κάθε well. Τέλος, αναδεύουμε τα κύτταρα και σε ένα 96-well plate επιστρώνουμε κύτταρα με τη finntip pipette που θα αποτελέσουν τα control και τα treated. Σε ένα δεύτερο 96-well plate επιστρώνονται κύτταρα υπό τις ίδιες συνθήκες που θα αποτελέσουν τα control T₀. Τα δύο well τοποθετούνται στον κλίβανο.

3^η ημέρα: Προσθήκη φαρμάκων και μονιμοποίηση των control T₀ κυττάρων

Την 3^η μέρα προστίθενται φάρμακα στο 96-well plate όπως φαίνεται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του 96-well plate

Δημιουργία διαλυμάτων συγκεκριμένων συγκεντρώσεων των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν

- ✓ Αρχικά, θέλουμε να φτιάξουμε ένα διάλυμα FP5 με αρχική συγκέντρωση 20mM. Για το λόγο αυτό ζυγίστηκαν 4mg FP5. Είναι γνωστό ότι η μοριακή μάζα του FP5 είναι 430,5 , άρα με τη χρήση του τύπου $n=m/Mr$, όπου $m=4mg$ και $Mr=430,5$ βρίσκουμε ότι $n= 0,00000929mol$. Αντικαθιστώντας, όπου $n=929 \times 10^8 mol$ και $C=20mM$ στον τύπο $C=n/V$ βρίσκουμε ότι ο όγκος του διαλύτη είναι 464μl. Στην προκειμένη περίπτωση ο διαλύτης ήταν το DMSO. Μετά την προσθήκη του διαλύτη ακολουθεί vortex.

- ✓ Η καρβοπλατίνη (Carboplatin Mayne) έχει αρχική συγκέντρωση 10mg/ml. Η τελική συγκέντρωση που φτιάχτηκε ήταν 26,93μM σε dH₂O.

Με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων φτιάχνουμε 200μM, 100μM, 20μM, 2μM, 0,2μM, συγκεντρώσεις διπλάσιες από αυτές που θα χρειαστούμε, καθώς μόλις προστεθούν στο well οι ουσίες θα αραιωθούν στο μισό.

Στα well που έχουν τα κύτταρα control προσθέτουμε 100μl θρεπτικού υλικού.

Στα 96-well plate με τα control T₀ γίνεται μονιμοποίηση. Συγκεκριμένα, προσθέτουμε 100μl TCA (Trichloroacetic acid) 50%(Biochemica, C.No. A1431,1000) και γίνεται επώαση για μία ώρα στους 4°C. Το TCA έχει την ιδιότητα να μονιμοποιεί τα κύτταρα στον πυθμένα των wells και να σταματάει την ανάπτυξή τους. Έπειτα, ξεπλένουμε το plate αρκετές φορές με απιονισμένο νερό. Τέλος, το plate στεγνώνει στον αέρα και αποθηκεύεται στους 4°C.

4^η ημέρα: Κενή

5^η ημέρα: Μονιμοποίηση του 96-well plate με κύτταρα control και treated

Στην ημέρα αυτή γίνεται μονιμοποίηση του 96-well plate στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί καρβοπλατίνη και FP5 και τα κύτταρα control. Η μονιμοποίηση γίνεται με TCA. όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τα κύτταρα control T₀.

Χρώση με SRB

Η διαδικασία που ακολουθείται για τη χρώση των 96-well plate είναι η εξής:

- α) Προσθήκη 50μl SRB solution με finntip pipette σε κάθε well. Το διάλυμα SRB περιέχει 0,4% w/v SRB της εταιρίας SIGMA με αριθμό καταλόγου S9012 σε 1% οξικό οξύ της εταιρίας Fluka με αριθμο καταλόγου 45731.
- β) Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- γ) Έκπλυση των wells 3 φορές με διάλυμα 1% οξικού οξέος.
- δ) Τα plate στεγνώνουν στον αέρα για 10 λεπτά.
- ε) Προσθήκη 150μl διαλύματος Tris 10mM με finntip pipette σε κάθε well. Το Tris παρασκευάζεται στην εταιρία Scharlau με αριθμό καταλόγου TRO4241000.
- φ) Επώαση για 10 λεπτά στον κλίβανο στους 37°C.
- γ) Μπαλαρίνα στο τέρμα για 5 λεπτά.
- η) Φωτομέτρηση των plate στα 540nm.

4. *In vitro* μελέτη της κυτταροτοξικότητας μετά από επώαση των κυττάρων xSKMEL28 p1 με FP5 (Treatment)

Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο το FP5 επάγει τον κυτταρικό θάνατο πραγματοποιήθηκε, αρχικά, *in vitro* μελέτη της κυτταροτοξικότητας σε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων.

Οι συγκεντρώσεις της ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 5, 10 και 20 μ M και τα χρονικά σημεία στα οποία σταματούσε η ανάπτυξη των κυττάρων ήταν οι 24h και οι 48h.

1^η ημέρα: Ανανέωση θρεπτικού υλικού

Για την έναρξη του treatment πρέπει να ανανεωθεί το θρεπτικό υλικό στις καλλιέργειες των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν.

2^η ημέρα: Επίστρωση των κυττάρων σε φλάσκες 75cm².

Αρχικά, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τις φλάσκες. Ακολουθεί ξέπλυμα κάθε φλάσκας με PBS 1x για να απομακρυνθούν υπολείμματα ορού, προστίθεται τρυψίνη 1x και οι φλάσκες παραμένουν στον κλίβανο για 2-3 λεπτά. Έπειτα, ελέγχουμε στο μικροσκόπιο αν έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα και προσθέτουμε θρεπτικό υλικό σε κάθε φλάσκα για να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη. Στη συνέχεια, όλα τα κύτταρα συλλέγονται σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα, ακολουθεί καταμέτρηση τους και φυγοκεντρώνονται στις 1200 στροφές για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται με ποσότητα θρεπτικού υλικού τόση ώστε σε κάθε φλάσκα να υπάρχουν $1,5 \times 10^6$ κύτταρα. Σε κάθε φλάσκα ο συνολικός όγκος θα πρέπει να είναι 12ml.

3^η ημέρα: Προσθήκη FP5 και δημιουργία στεγνού ιζήματος στα control T₀.

Την 3η ημέρα διαλύουμε την ουσία σε θρεπτικό υλικό ώστε να δημιουργήσουμε συγκεντρώσεις 5, 10 και 20 μ M. Η διαλυμένη ουσία περνάει από φίλτρο 0,22mM ώστε να αποστειρωθεί. Τοποθετούμε 3ml διαλυμένης ουσίας σε κάθε φλάσκα ώστε ο συνολικός όγκος να φτάσει 15ml. Στα control τοποθετούνται 3ml θρεπτικού υλικού.

Όσον αφορά τα control T₀, δηλαδή τα κύτταρα των οποίων η ανάπτυξη θα σταματήσει τη στιγμή που θα προστεθεί η ουσία στις άλλες φλάσκες, υφίστανται τρυψινοποίηση και συλλέγονται σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί καταμέτρηση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1200 στροφές. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα επαναιωρείται σε 15ml PBS 1x ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ορού. Πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1200 στροφές, το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο δοκιμαστικός σωλήνας αναποδογυρίζεται προκειμένου το ίζημα να είναι εντελώς στεγνό. Μόλις συμβεί αυτό ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται στους -80°C.

4η ημέρα: Αποθήκευση κυττάρων που προέρχονται από τις φλάσκες με τα 5, 10 και 20 μ M ουσίας και τα control 24h.

Στην 4^η ημέρα, δηλαδή στις 24h από τη στιγμή που προστέθηκε η ουσία στις φλάσκες, ακολουθείται η ίδια διαδικασία για τη δημιουργία στεγνού ιζήματος, όπως αναφέρθηκε. Σε αυτή την ημέρα συλλέγονται κύτταρα από φλάσκες των 5, 10 και 20 μ M καθώς και τα control. Στην προκειμένη περίπτωση συλλέχθηκαν όλα τα κύτταρα από τις φλάσκες με τα 20 μ M ουσίας, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό τους ήταν ήδη νεκρά και βρίσκονταν στο υπερκείμενο.

5η ημέρα: Αποθήκευση κυττάρων που προέρχονται από τις φλάσκες με τα 5 και 10μM ουσίας και σα control 48h.

Στην 5^η ημέρα, δηλαδή στις 48h από τη στιγμή που προστέθηκε η ουσία στις φλάσκες, ακολουθείται η ίδια διαδικασία για τη δημιουργία στεγνού ιζήματος, όπως αναφέρθηκε. Σε αυτή την ημέρα συλλέγονται κύτταρα από φλάσκες των 5 και 10μM καθώς και τα control.

5. Λύση των κυττάρων

Η λύση είναι μία διαδικασία που χρησιμοποιείται για την απομόνωση των πρωτεϊνών από τα κύτταρα. Τα κύτταρα στα οποία έγινε λύση ήταν εκείνα που απομονώθηκαν από το treatment.

Αρχικά, δημιουργήθηκε ένα διάλυμα το οποίο αποτελούνταν από TPER (Thermoscientific, 78510) και αναστολείς πρωτεασών (Sigma, C.No.P8340) σε τελική συγκέντρωση 1x. Σε κάθε 1×10^6 κύτταρα αναλογούν 100μl αυτού του διαλύματος. Το διάλυμα τοποθετείται με πιπέτα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, όπου γίνεται πιπετάρισμα για να επαναιωρηθεί το ίζημα. Κάθε εναιώρημα μεταφέρεται σε erpendorf και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στον πάγο με vortex των δειγμάτων κάθε 5 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13000 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C. Μόλις τελειώσει η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο κάθε δείγματος μεταφέρεται σε καινούριο erpendorf και ακολουθούν επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις έως ότου το δείγμα γίνει διαυγές. Αν δεν συμβεί αυτό τότε γίνονται 3 κύκλοι υπερήχων διάρκειας 10 δευτερολέπτων οι οποίοι ακολουθούνται από φυγοκεντρήσεις για την επίτευξη διαυγούς υπερκειμένου.

Όλη η διαδικασία της λύσης έγινε στον πάγο.

6. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

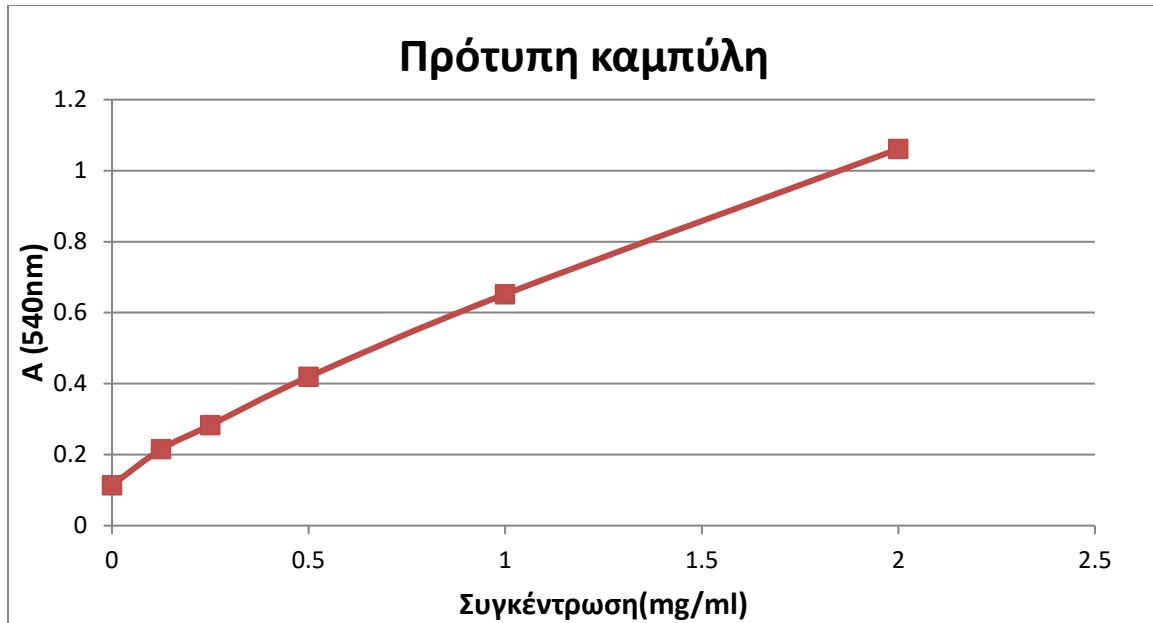
Η Bradford είναι μία μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της συνολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα ή εκχύλισμα, ανεξάρτητα από τη δομή και τη λειτουργία της. Βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου χρωστικής – πρωτεΐνης και αλλαγής χρώματος του αντιδραστηρίου. Συγκεκριμένα, η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν δημιουργήσει σύμπλοκο σε αραιό όξινο διάλυμα σε απορρόφηση 540nm. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να βρεθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα λύματα που προέκυψαν από τη λύση των κυττάρων μετά το treatment.

Χρησιμοποιήθηκε BCA Protein Assay Kit της εταιρίας Thermoscientific με αριθμό καταλόγου 23227.

Η Bradford πραγματοποιήθηκε σε 96-well plate.

Προκειμένου να φτιαχτεί η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκε BSA 2mg/ml(Thermoscientific, C.No. 23209). Έγιναν διαδοχικές αραιώσεις για τη δημιουργία συγκεντρώσεων 1, 0,5, 0,25, 0,125mg/ml στο ίδιο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη λύση των κυττάρων, δηλαδή TPER και αναστολείς

πρωτεασών σε αραίωση 1/2. Στη συνέχεια, τοποθετούμε 10μl από κάθε διαφορετική συγκέντρωση του διαλύματος σε διαφορετικό well και προσθέτουμε 200μl Working reagent με καλή ανάδευση. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με την ανάμειξη των αντιδραστηρίων A (C.No.23228) και B(C.No.1859078) του kit σε αναλογία 50/1. Το Working reagent είναι φωτοευαίσθητο και για αυτό μέχρι τη χρήση του αποθηκεύεται στο σκοτάδι. Ακολουθεί επώαση του 96-well plate στον κλίβανο στους 37°C για 30 λεπτά, ανάδευση στη μπαλαρίνα για 5 λεπτά και φωτομέτρηση στα 540nm.



Γράφημα 1:Πρότυπη καμπύλη

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στα λύματα τοποθετήθηκαν σε well 5μl από κάθε δείγμα και 5μl PBS 1x. Έπειτα, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 200μl Working reagent και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, όπως αναφέρθηκε.

7. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών - Western blot

Το Western blot είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση πρωτεϊνών που βρίσκονται σε ένα πρωτεϊνικό μείγμα (π.χ λύμα κυττάρων). Αρχικά, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση και μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μία μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες προσκολλώνται στη μεμβράνη όπως ακριβώς διαχωρίστηκαν λόγω των αλληλεπιδράσεων των φορτίων. Τότε οι πρωτεΐνες μπορούν να προσδεθούν με ειδικά αντισώματα για αυτές και να ανιχνευθούν.

Ο τύπος ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε είναι SDS-PAGE στην οποία οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται, συνδέονται με το ανιονικό απορρυπαντικό SDS (Sodium dodecyl sulfate), το οποίο καλύπτει τα χημικά φορτία τους ώστε όλες οι πρωτεΐνες να έχουν το ίδιο αρνητικό φορτίο και να διαχωρίζονται μόνο βάσει του μοριακού τους βάρους στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν PVDF (Polyvinylidene difluoride).

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

- i. APS: 0,1% w/v Ammonium Persulfate(Sigma, C.No. A3678) σε dH₂O
- ii. SDS: 10% w/v ή 20% w/v SDS (Sigma, C.No. L4509-5006) σε dH₂O
- iii. Acrylamide/Bis: 29,2% w/v Acrylamide (Serva, C.No. 10675.02) και 0,8% w/v N-N'-Methylenebisacrylamide (Sigma, C.No. M7279-2506) σε dH₂O
- iv. Tris-HCl 1.5M pH 8,8. Χρησιμοποιείται 18,15 w/v Tris base(Sharlau, C.No. TR04241000) σε dH₂O και το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη HCl.
- v. Tris-HCl 0,5M pH 6,8. Χρησιμοποιείται 6,05 w/v Tris base σε dH₂O και το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη HCl.
- vi. Tris-HCl 1M pH 7,4. Χρησιμοποιείται 12,1 w/v Tris base σε dH₂O και το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη HCl.
- vii. Loading buffer 4x: 400μl γλυκερίνη (ROTH, C.No. 3783.1), 100μl Tris 0,5M, 100μl 0,2% w/v Bromophenol Blue, 100μl SDS 20%, 100μl β-μερκαπτοαιθανόλη(Sigma, C.No.60242)
- viii. Running buffer 10x: 3,03% w/v Tris Base, 14,4% w/v γλυκίνη (Chem-Cruz, C.No. SC-29096B) και 1%w/v SDS σε dH₂O.
- ix. Running buffer 1x: Running buffer 10x σε dH₂O.
- x. Transfer buffer 10x: 14,4% w/v γλυκίνη, 3,03%w/v Tris Base.
- xi. Transfer buffer 1x: Transfer buffer 10x σε 20% μεθανόλη και dH₂O.
- xii. TBS: 10% TrisCl 1M, 90% NaCl₂ 0,9%w/v(Sigma, C.No.101766689) σε dH₂O
- xiii. TTBS 1x: 0,1% Tween-20(Fischer Scientific, C.No.EC500-018-3)
- xiv. 5% TTBS: 5% FBS σε TTBS 1x.

Αρχικά, παρασκευάστηκε η πηκτή διαχωρισμού που αποτελούταν από: dH₂O, Acrylamide/Bis, Gel buffer (Tris-HCl 1,5M pH 8,8), 10% w/v SDS, 0,1% w/v APS και TEMED(Sigma, C.No. T-9281) και τοποθετήθηκε στις γυάλινες πλάκες μέχρι να πολυμεριστεί. Έπειτα παρασκευάστηκε η πηκτή επιστοίβαξης που αποτελούταν από dH₂O, Acrylamide/Bis, Gel buffer (Tris-HCl 0,5M pH 6,8), 10% w/v SDS, 0,1% w/v APS και TEMED και τοποθετήθηκε, επίσης, στις γυάλινες πλάκες μαζί με την κτένα δημιουργίας πηγαδιών, πάνω από την πηκτή διαχωρισμού.

Στη συνέχεια, έχοντας εξισώσει τον όγκο των διαφορετικών δειγμάτων με PBS 1x, τοποθετώ σε erpendorf το δείγμα, το PBS 1x και το loading buffer στον απαγωγό καθώς η β-μερκαπτοαιθανόλη είναι τοξική. Η τελική συγκέντρωση του loading buffer στο διάλυμα πρέπει να είναι 1x.

Έπειτα, τα δείγματα τοποθετούνται στους 95°C για 5 λεπτά προκειμένου να διασπαστούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Μετά το βρασμό τα erperdorf μετακινούνται στον πάγο και υφίστανται spin down για να υγροποιηθούν οι υδρατμοί που αποτελούν ποσότητα δείγματος.

Μετά την πήξη της πηκτής επιστοιβάξης η κτένα απομακρύνεται, οι γυάλινες πλάκες ξεπλένονται με νερό και τοποθετούνται στην κασέτα η οποία με τη σειρά της τοποθετείται στο tank το οποίο γεμίζεται με running buffer 1x. Στα πηγαδάκια βάζουμε 20μl από κάθε δείγμα και 3μl marker(Biorad, C.No. 161-0373). Η ηλεκτροφόρηση ξεκινά στα 100V μέχρι το μέτωπο να φτάσει στο τέλος της πηκτής επιστοιβάξης και συνεχίζει στα 200V μέχρι το μέτωπο να μη φαίνεται στην πηκτή διαχωρισμού.

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη. Πρώτα, αφαιρείται από την πηκτή το επάνω μέρος, δηλαδή η πηκτή επιστοιβάξης, και το υπόλοιπο μέρος μεταφέρεται σε transfer buffer 1x, ενώ η μεμβράνη ενεργοποιείται με μεθανόλη (Analytical, C.No. 414816) για 5 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα, η μεμβράνη μεταφέρεται σε transfer buffer 1x για 20 λεπτά υπό ανάδευση για εξισορρόπηση.

Στη συνέχεια, φτιάχνεται το «σάντουιτς». Η σειρά με την οποία είναι τοποθετημένα τα υλικά στο gel holder είναι η εξής: βρεγμένο σφουγγάρι, filter paper for western blotting, πηκτή, μεμβράνη PVDF, βρεγμένο filter paper for western blotting, βρεγμένο σφουγγάρι. Το gel holder τοποθετείται στην κασέτα, η κασέτα στο tank στο οποίο βάζουμε, επίσης, πάγο και η μεταφορά γίνεται overnight στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, γίνεται μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης σε 5% TTBS για 1 ώρα υπό ανάδευση.

Έπειτα, γίνεται overnight επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα το οποίο αραιώνεται σε 5% TTBS. Στο συγκεκριμένο Western blot χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα: Actin σε αραιώση 1/10000(CHEMICON, C.No.MAB1501), Caspase 3 σε αραιώση 1/1000(Sigma, C.No. C9598) και LCIII σε αραιώση 1/1000 (Cell Signaling, C.No. 4108).

Μετά την overnight επώαση με το πρώτο αντίσωμα γίνονται 3 πλύσεις της μεμβράνης με TTBS 1x υπό συνεχή ανάδευση. Η κάθε πλύση διαρκεί 5 λεπτά και έχει στόχο να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος και η μη ειδική πρόσδεση.

Μετά τις πλύσεις γίνεται επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα ειδικό για το πρώτο για 1 ώρα υπό ανάδευση. Το αντίσωμα αυτό μπορεί να είναι anti-Rabbit (Cell Signaling, C.No. 7074P2) ή anti-Mouse (Sigma, C.No. A9044). Στο τέλος της μίας ώρας γίνονται ξανά 3 πλύσεις με TTBS 1x.

Τέλος, γίνεται εμφάνιση σήματος με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Χρησιμοποιείται kit της ThermoScientific - ECL Western blotting Substrate με αριθμό καταλόγου 32106, όπου αναμιγνύουμε σε ίσες ποσότητες το Detection Reagent 1 - Peroxide Solution C.No. 1859701 και το Detection Reagent 2 – Luminol Enhancer Solution C.No. 1859698. Η μεμβράνη καλύπτεται με αυτό το

διάλυμα για 1 λεπτό και στη συνέχεια τοποθετείται στο imager όπου γίνεται εμφάνιση του σήματος.

8. In vivo μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του FP5

8.1 Στέλεχος ποντικών που χρησιμοποιήθηκε

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν ποντίκια στελέχους 1303, γνωστά ως NOD SCID. Τα SCID είναι ποντίκια ομόζυγα για την αυθόρμητη μετάλλαξη που προκαλεί ανοσολογική ανεπάρκεια (*Prkdc^{scid}*). Χαρακτηρίζονται από την απουσία λειτουργικών B και T κυττάρων, λυμφοπενία, υπογαμμασφαιριναιμία και φυσιολογικό αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον. Τα ποντίκια αυτά φέρουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε ελαττωματική επιδιόρθωση του γενετικού υλικού και ανακατάταξη των γονιδίων που κωδικοποιούν αντιγονο-ειδικούς υποδοχείς των λεμφοκυττάρων. Ο θύμος αδένας, οι λεμφαδένες και τα σπληνικά θυλάκια είναι σχεδόν απαλλαγμένα από λεμφοκύτταρα. Τα Scid ποντίκια δέχονται αλλογενή και ξενογενή μοσχεύματα καθιστώντας τα ένα ιδανικό μοντέλο για πειράματα μεταφοράς κυττάρων. Ορισμένοι ποντικοί scid θα αναπτύξουν αυθόρμητα μερική ανοσολογική αναδραστηριότητα (<https://www.jax.org/strain/001303>).

8.2 Δημιουργία των xSKMEL28 p1

Προκειμένου να δημιουργηθεί η κυτταρική σειρά xSKMEL28 p1 πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία:

- Scid ποντίκια εμβολιάστηκαν με κύτταρα μελανώματος SKMEL28.
- Οι όγκοι που προέκυψαν αφαιρέθηκαν από τα ποντίκια.
- Scid ποντίκια εμβολιάστηκαν με τμήματα των όγκων αυτών.
- Από τους νέους όγκους που προέκυψαν δημιουργήθηκε μετά από κατάλληλη διεργασία η κυτταρική σειρά xSKMEL28 p1.

8.3 Δοκιμές διαλυτότητας της ένωσης FP5

Αρχικά, έγιναν κάποιες δοκιμές διαλυτότητας προκειμένου να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης μέσω του οποίου θα χορηγούνταν η ουσία στα πειραματόζωα. Οι διαλύτες που δοκιμάστηκαν είναι οι εξής:

- ✓ 5% Tween-80(Sigma, C.No. P1754) σε dH₂O
- ✓ 10% Tween-80 σε dH₂O
- ✓ 15% Tween-80 σε dH₂O
- ✓ 5% DMSO, 5% Cremophor(Calbiochem, C.No. 61791-12-6) σε dH₂O
- ✓ 5% benzyl alcohol (Sigma, C.No. 100-51-6) σε Safflower oil (Sigma, C.No. S8281)
- ✓ 25% Cremophor σε dH₂O

Η ουσία διαλύθηκε μόνο σε 25% Cremophor σε dH₂O μετά από επώαση στους 65°C και επαναλαμβανόμενες ισχυρές αναδεύσεις.

8.4 Δοκιμασία οξείας τοξικότητας *in vivo*

Η δοκιμασία οξείας τοξικότητας μας δείχνει τις παρενέργειες που μπορεί να έχει μία ουσία, ως συνέπεια μίας ή πολλαπλών εκθέσεων σε αυτή σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Στο συγκεκριμένο πείραμα έγιναν ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις σε 3 scid αρσενικά ποντίκια, μία ένεση ανά ζώο, όπου η κάθε ένεση περιείχε 200mg/kg FP5 σε 500μl διαλύτη. Δέκα μέρες αργότερα επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία και δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια παρενέργεια (https://dtp.cancer.gov/organization/btb/acute_toxicity.htm).

8.5 *In vivo* πείραμα για τον έλεγχο της αντικαρκινικής δράσης του FP5

Αρχικά, τα κύτταρα xSKMEL28 p1 καλλιεργούνταν προκειμένου να φτάσουν τον επιθυμητό αριθμό για να ενεθούν σε ποντίκια. Όταν ο αριθμός ήταν κατάλληλος τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκεντρήθηκαν στις 1200 στροφές για 10 λεπτά. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε τέτοια ποσότητα RPMI ώστε κάθε 100μl να υπάρχουν 900.000 κύτταρα. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετήθηκε στον πάγο και πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.

Την 1^η ημέρα 15 scid ποντίκια εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αυτά. Σε κάθε ποντίκι έγιναν 2 ενέσεις, όπου η κάθε ένεση περιείχε 900.000 κύτταρα.

Την 46^η ημέρα οι όγκοι είχαν φτάσει τα 129mm³, άρα μπορούσαν να ξεκινήσουν οι χορηγήσεις. Τα ποντίκια χωρίστηκαν σε ομάδες των πέντε: Carrier, FP5 και Καρβοπλατίνη. Το αρχικό πλάνο παρουσιάζεται στον πίνακα 2.

Ομάδα ποντικών	Χορηγήσεις/βδομάδα	Όγκος διαλύματος/ένεση	Συγκέντρωση φαρμάκου(mg ουσίας/kg ζώου)
Carrier	3	500μl	-
FP5	3	500μl	200mg/kg
Καρβοπλατίνη	1	200μl	30mg/kg *

*(Witham J. et al., 2007)

Πίνακας 2: Χορηγήσεις των φαρμάκων στα ποντίκια.

Μετά από κάθε χορήγηση FP5 και διαλύτη, τα ποντίκια παρουσίαζαν σημάδια νευροτοξικότητας με παροδική παράλυση των πίσω άκρων. Με τη χορήγηση καρβοπλατίνης δε φάνηκε να έχουν κάποια άμεση τοξικότητα,

ωστόσο την επόμενη μέρα 4/5 ποντίκια εμφάνισαν αίμα στα γεννητικά όργανα αλλά μετά από κάποιες μέρες το ξεπέρασαν. Η αιματουρία είναι μία παρενέργεια της καρβοπλατίνης (<https://www.drugs.com/sfx/carboplatin-side-effects.html>).

Την 53^η ημέρα βρέθηκαν νεκρά ένα ποντίκι από την ομάδα FP5 και ένα από τα Carrier. Έτσι, αποφασίστηκε οι χορηγήσεις να αραιωθούν σε 2/εβδομάδα.

Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.Μελέτη της κυτταροτοξικής και αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των ενώσεων FP5 και Καρβοπλατίνης με εφαρμογή του πειράματος κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β.

Στον πίνακα 3 και στο γράφημα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της κυτταροτοξικής και κυτταροστατικής δράσης του FP5 έναντι των κυττάρων xSKMEL28 p1, ενώ στον πίνακα 4 και στο ίδιο γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την καρβοπλατίνη. Οι παράμετροι που εξετάζονται είναι οι εξής:

GI50: Συγκέντρωση της ουσίας που αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων κατά 50%.

LC50: Συγκέντρωση της ουσίας που σκοτώνει το 50% των κυττάρων.

TGI: Συγκέντρωση της ουσίας που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό όλων των κυττάρων.

Θεραπευτικός δείκτης (Ti): σύγκριση του ποσού που προκαλεί τη θεραπευτική επίδραση στο ποσό που προκαλεί τα τοξικά αποτελέσματα.

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι το FP5 έχει υψηλότερη κυτταροτοξική και αντιπολλαπλασιαστική δράση σε σύγκριση με την καρβοπλατίνη, ενώ ο θεραπευτικός δείκτης είναι μέτριος. Επίσης, φαίνεται ότι η δράση του FP5 είναι δόσοεξαρτώμενη.

	xSKMEL28 p1
GI50	4,3
TGI	7,15
LC50	9,9

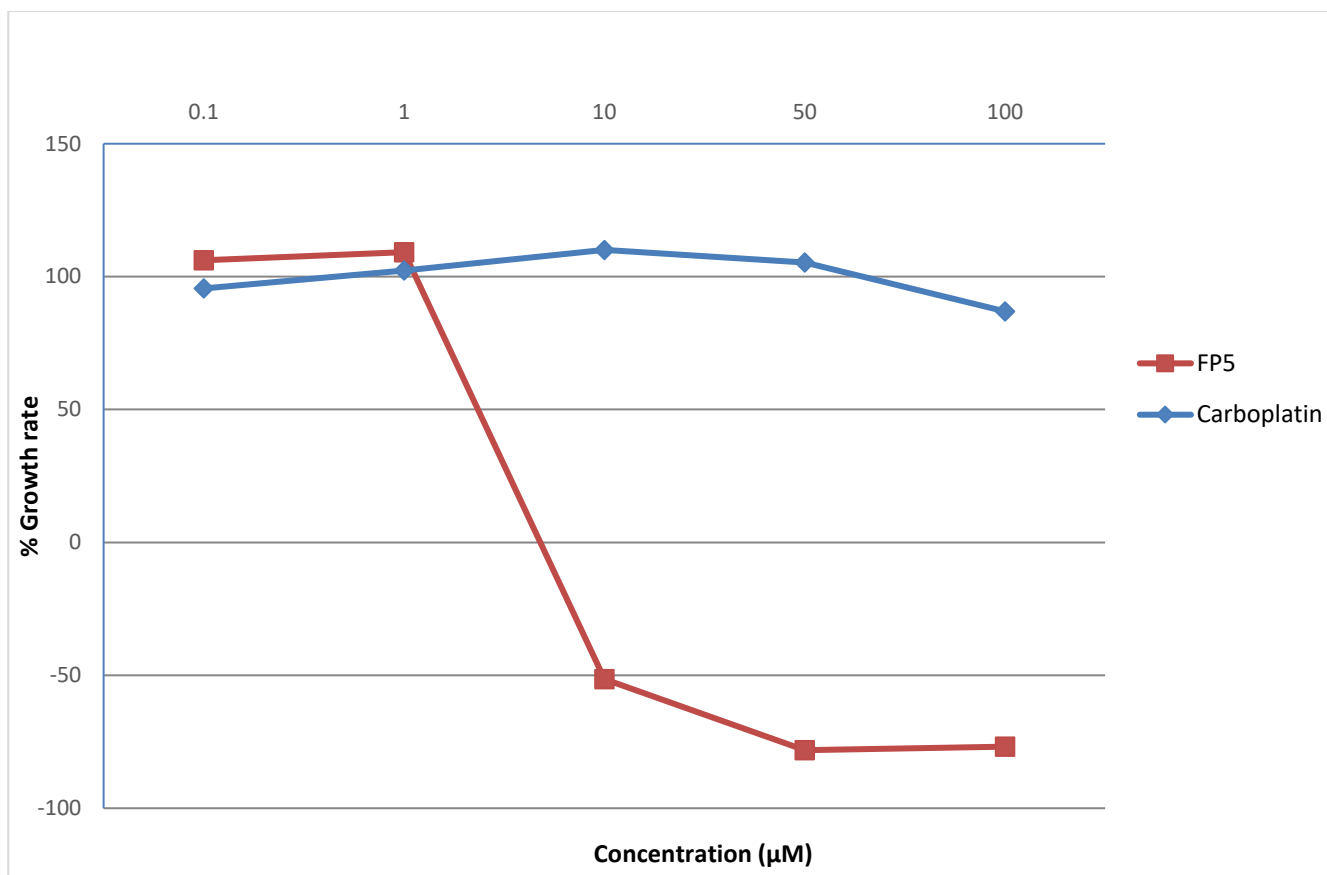
Πίνακας 3: Κυτταροτοξική δράση του FP5

	xSKMEL28 p1
GI50	>100
TGI	>100
LC50	>100

Πίνακας 4: Κυτταροτοξική δράση της Καρβοπλατίνης

$$Ti = LC50/ GI50 = 9,9/4,3 = 2,3.$$

Τα αποτελέσματα αποτελούν τη μέση τιμή από δύο ανεξάρτητα πειράματα.



Γράφημα 2: Καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων xSKMEL28 p1 ύστερα από επώαση 48 ωρών με FP5 και Καρβοπλατίνη.

2. *In vitro* μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του FP5 μετά από επώαση των κυττάρων xSKMEL28 p1 με συγκεντρώσεις 5, 10 και 20μM

Οι εικόνες που πάρθηκαν από την *in vitro* μελέτη της κυτταροτοξικότητας του FP5 μετά από επώασή του με κύτταρα xSKMEL28 p1 είναι οι παρακάτω.

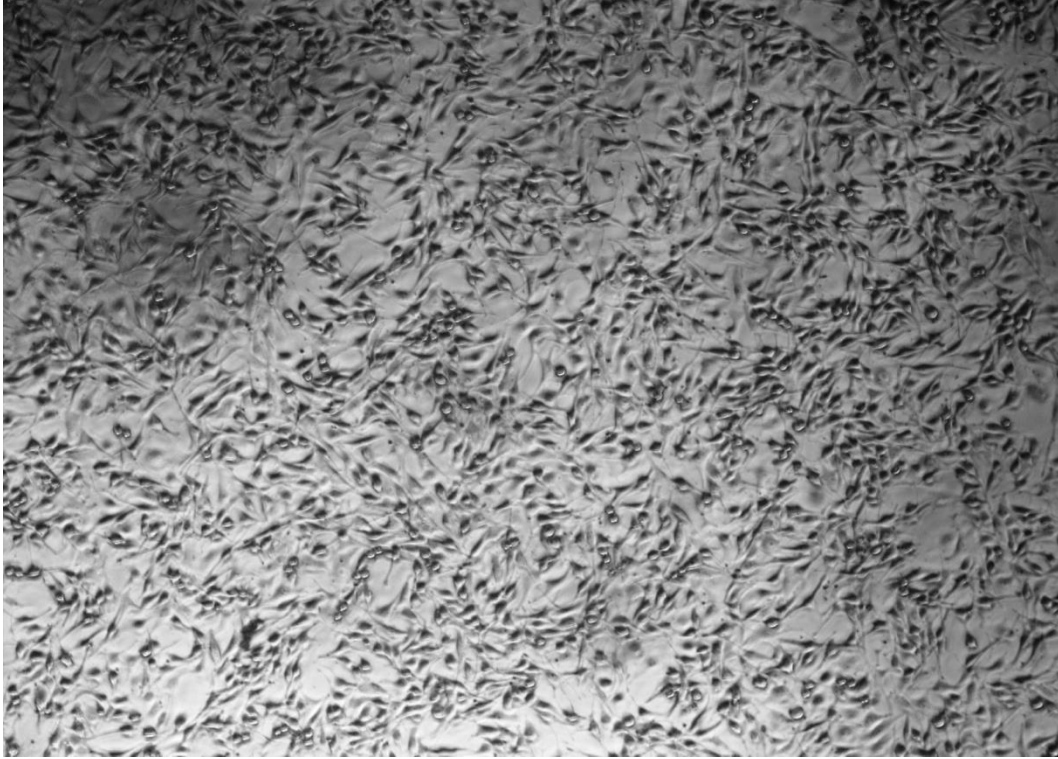
Φαίνεται ότι η δράση του FP5 είναι χρόνο- και δοσοεξαρτώμενη, καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αυξάνεται και η δράση του, ενώ στα 10μM στις 48h υπάρχει μεγαλύτερη δράση από ότι στις 24h.



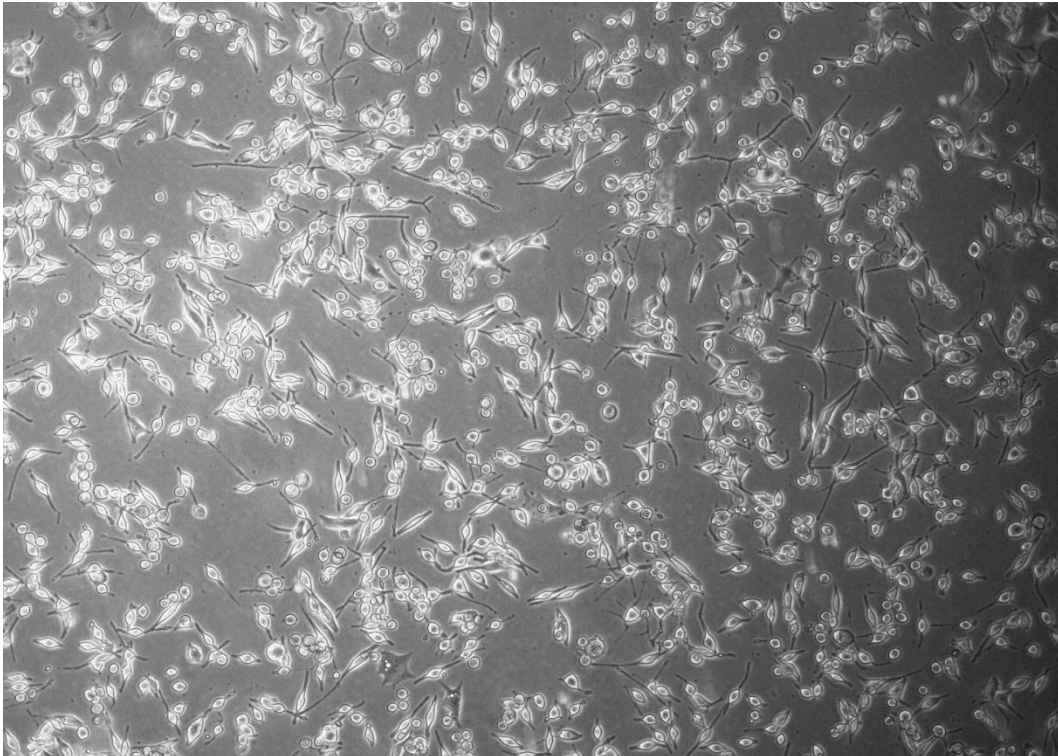
Εικόνα 5: Κύτταρα control σε χρόνο T_0 (η στιγμή που προστέθηκε το FP5 στην καλλιέργεια).



Εικόνα 6: Κύτταρα control 24h μετά την προσθήκη του φαρμάκου.



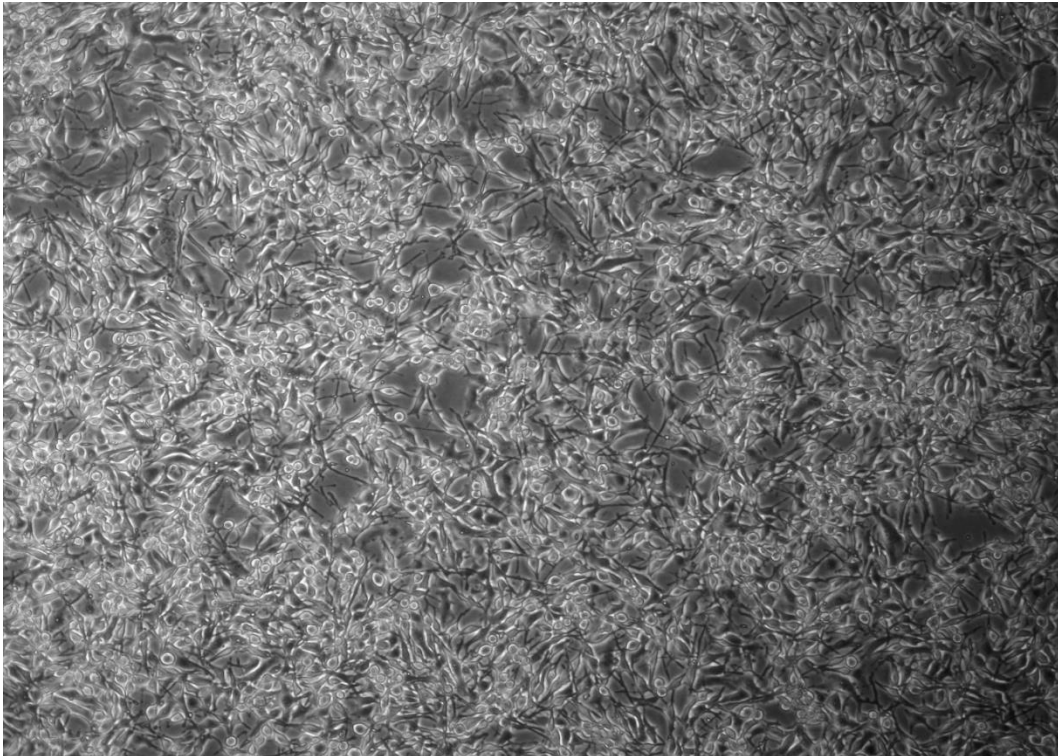
Εικόνα 7: Καλλιέργεια κυτάρων 24h μετά την προσθήκη FP5 συγκέντρωσης 5 μ M.



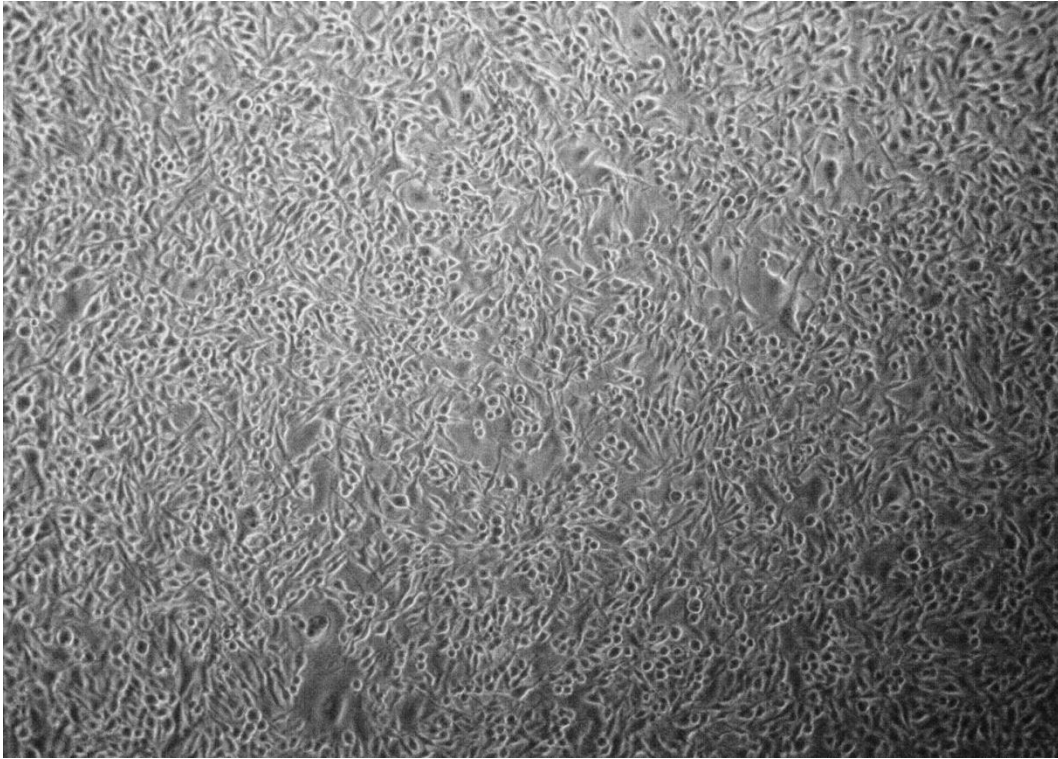
Εικόνα 8: Καλλιέργεια κυτάρων 24h μετά την προσθήκη FP5 συγκέντρωσης 10 μ M.



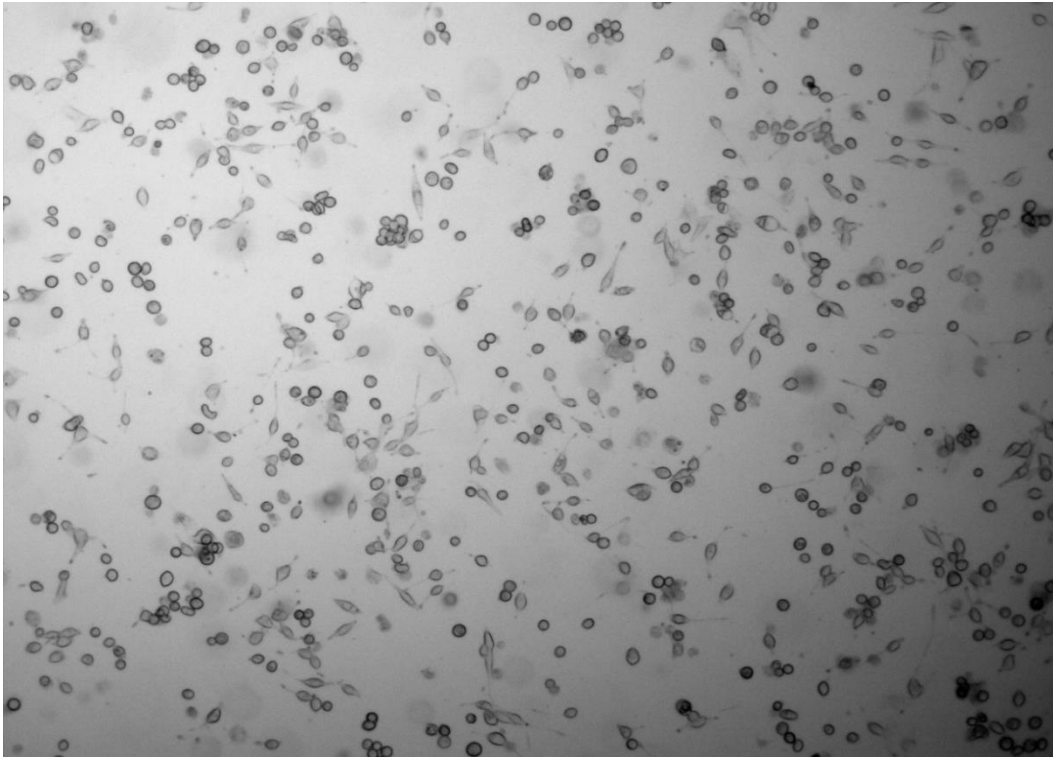
Εικόνα 9: Καλλιέργεια κυτάρων 24h μετά την προσθήκη FP5 συγκέντρωσης 20μM.



Εικόνα 10: Καλλιέργεια κυτάρων control 48h μετά την προσθήκη FP5.



Εικόνα 11: Καλλιέργεια κυττάρων 48h μετά την προσθήκη FP5 συγκέντρωσης 5 μ M.

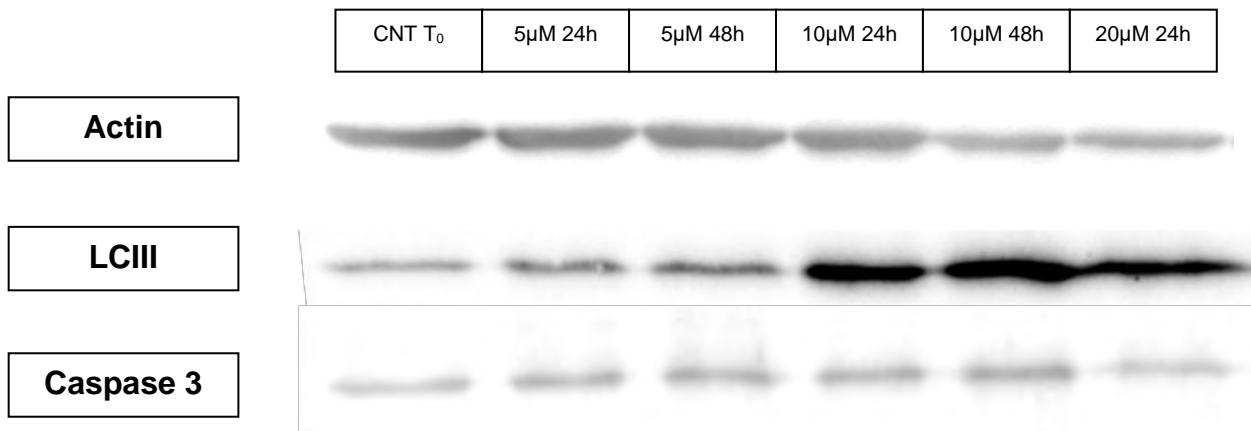


Εικόνα 12: Καλλιέργεια κυττάρων 48h μετά την προσθήκη FP5 συγκέντρωσης 10μM.

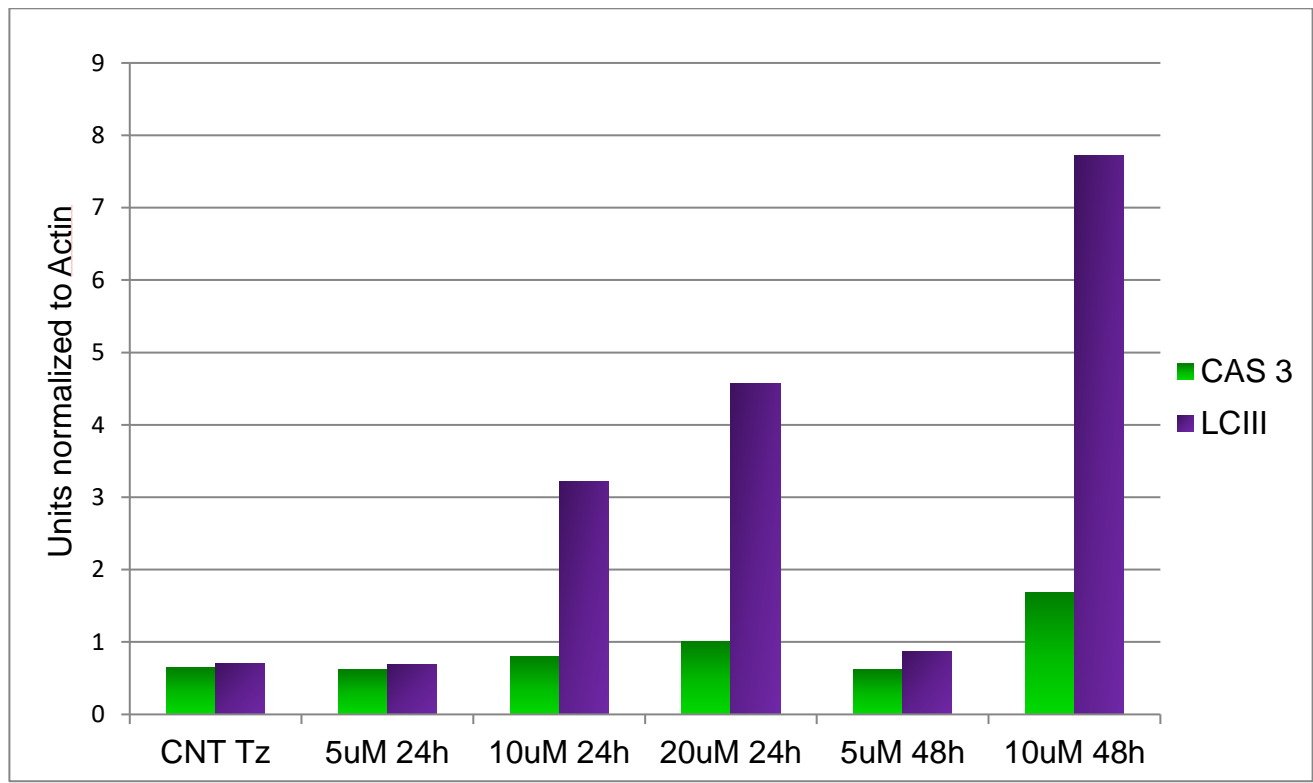
3. Έλεγχος της έκφρασης του LCIII και της Κασπάσης 3 μέσω στυπώματος κατά Western.

Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός θανάτου των κυττάρων αυτών πραγματοποιήθηκε Western blot τα αποτελέσματα του οποίου φαίνονται στην Εικόνα 13 και στο γράφημα 3.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το FP5 φαίνεται να επάγει την αυτοφαγία στις συγκεντρώσεις 10 και 20μM, καθώς υπάρχει αύξηση του LCIII.



Εικόνα 13: Παρουσίαση των αποτελεσμάτων του στυπώματος κατά Western για την ακτίνη, του LCIII και της κασπάσης 3.

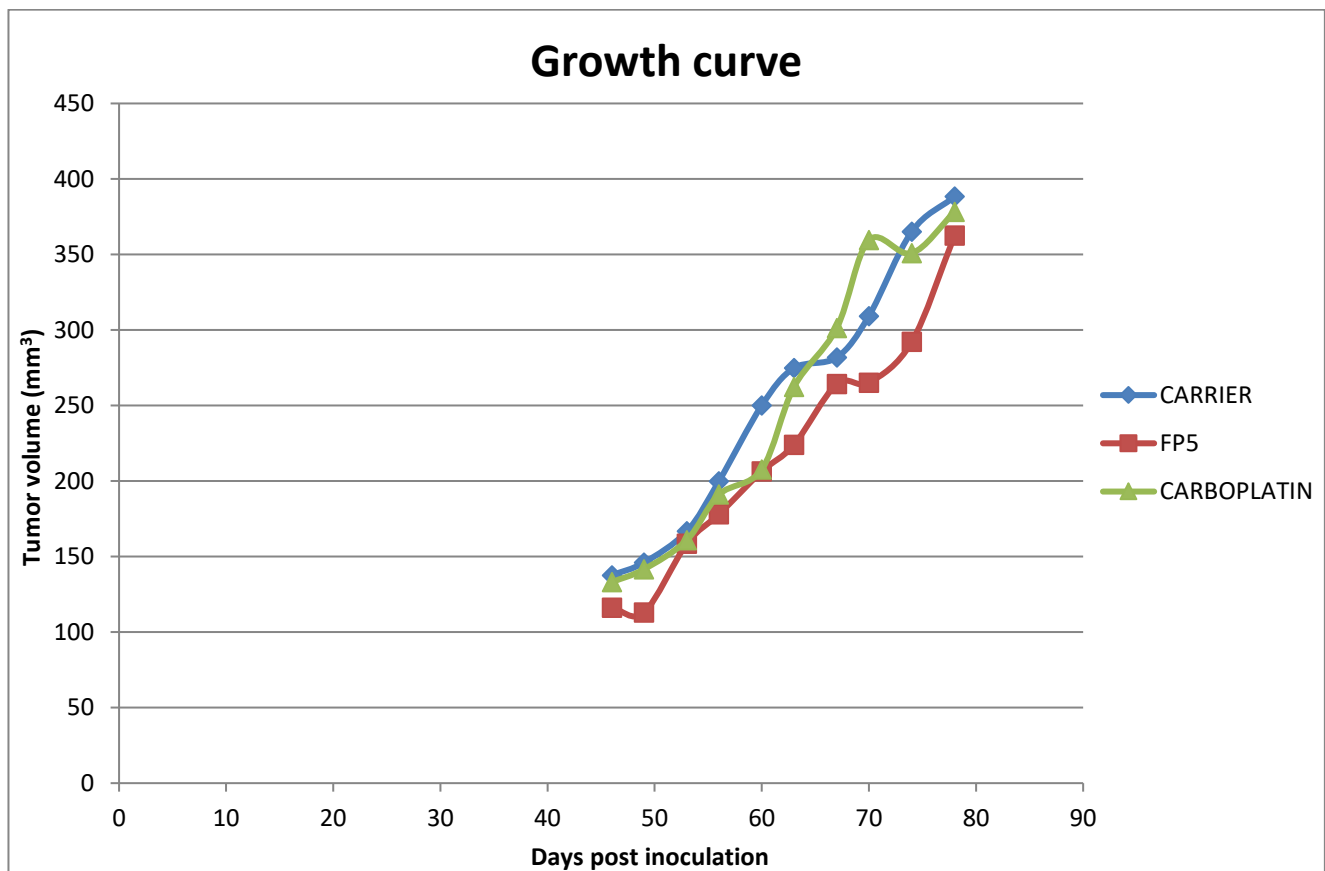


Γράφημα 3: Επίπεδα του LCIII και της κασπάσης 3.

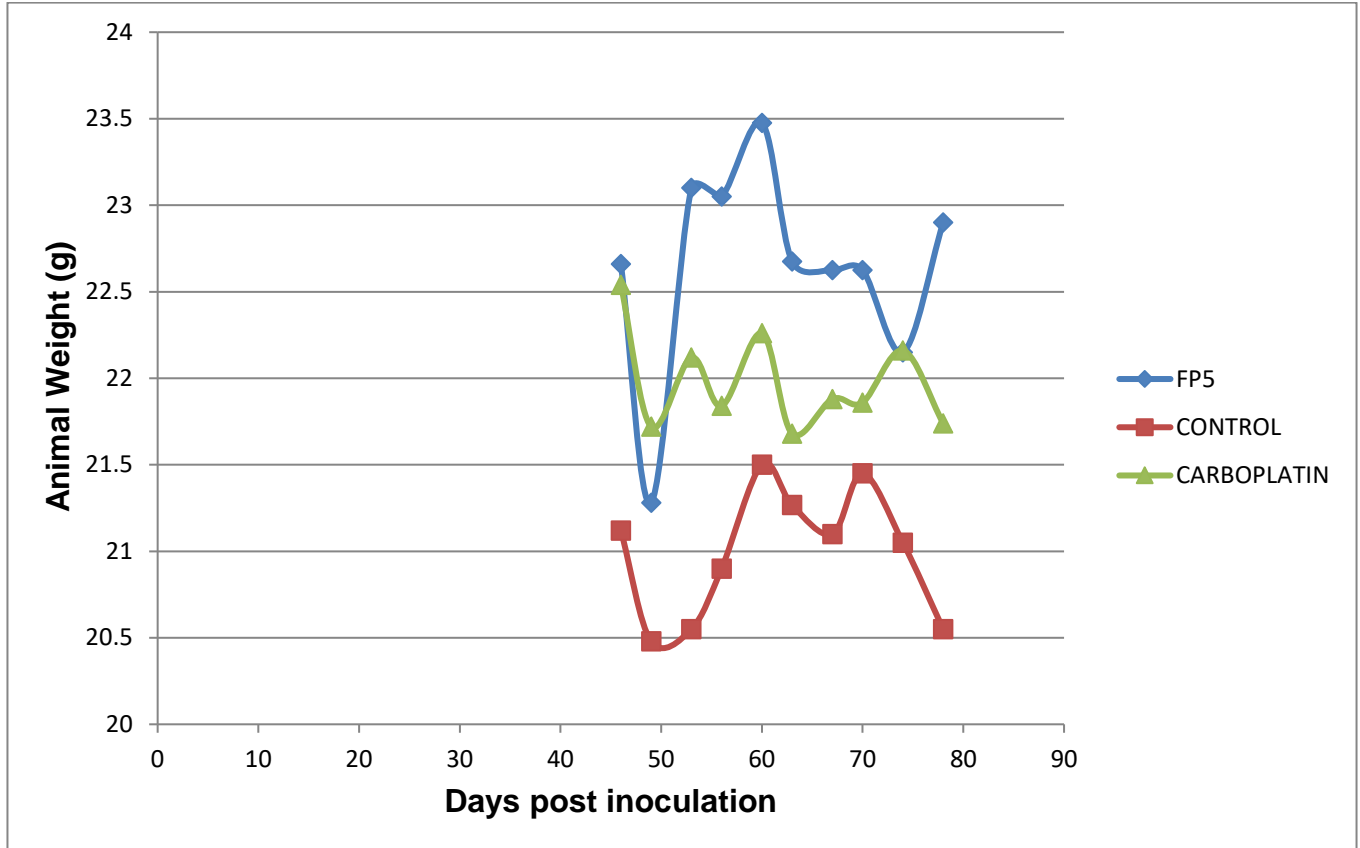
4. *In vivo* μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του FP5

Στο γράφημα 4 παρουσιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης των καρκινικών όγκων στις τρεις ομάδες ζώων, ενώ στο γράφημα 5 φαίνεται η διακύμανση του βάρους των ζώων κατά τη διάρκεια των χορηγήσεων των φαρμάκων. Στον πίνακα 5 παρουσιάζεται η θνησιμότητα των ποντικών κατά τη διάρκεια των χορηγήσεων. Επίσης, στις εικόνες 14, 15 και 16 βλέπουμε τους καρκινικούς όγκους μετά από ευθανασία των ζώων.

Βάσει των αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε ότι δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια αντικαρκινική δράση ούτε του FP5 αλλά ούτε και της Καρβοπλατίνης μετά από χορήγηση στα ζώα, καθώς οι καρκινικοί όγκοι αναπτύσσονταν όπως εκείνοι στην ομάδα Carrier. Επιπλέον, δεν υπήρχε κάποια ιδιαίτερη διακύμανση στο βάρος των ζώων, ενώ φάνηκε να υπάρχει τοξικότητα του διαλύτη, καθώς μέχρι το τέλος του πειράματος είχαν πεθάνει 3 ποντίκια Carrier. Το γεγονός ότι υπήρχαν θάνατοι τόσο από την ομάδα Carrier όσο και από την ομάδα FP5 μας δίνει μία μη αντιπροσωπευτική εικόνα για τη δράση του. Τέλος, μετά την ευθανασία των ζώων και την απομόνωση των όγκων δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους όγκους των 3 ομάδων.



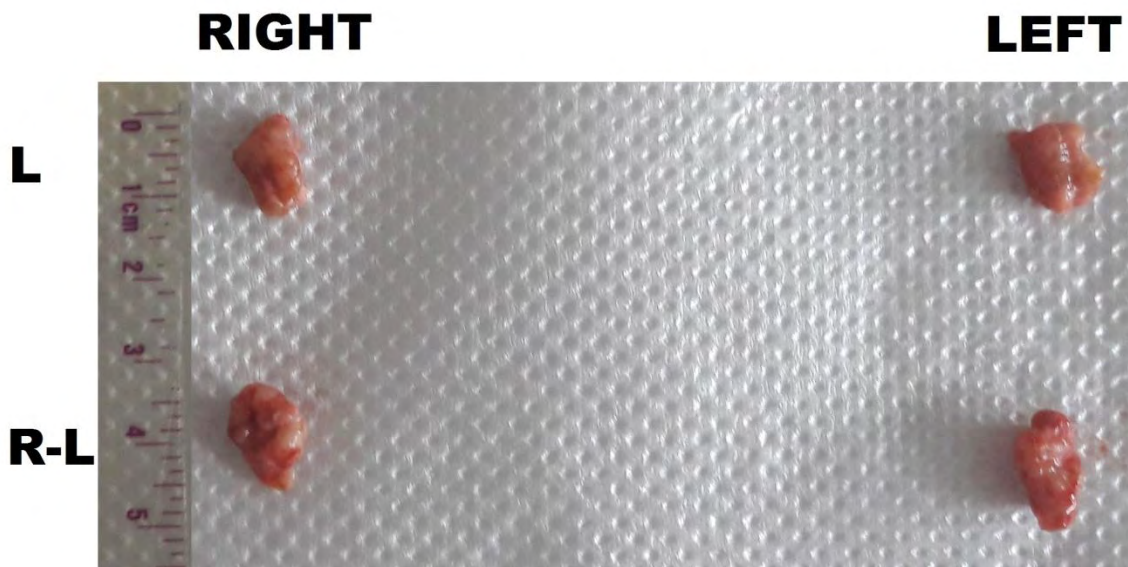
Γράφημα 4: Καμπύλη ανάπτυξης των καρκινικών όγκων κατά τη διάρκεια χορηγήσεων των φαρμάκων.



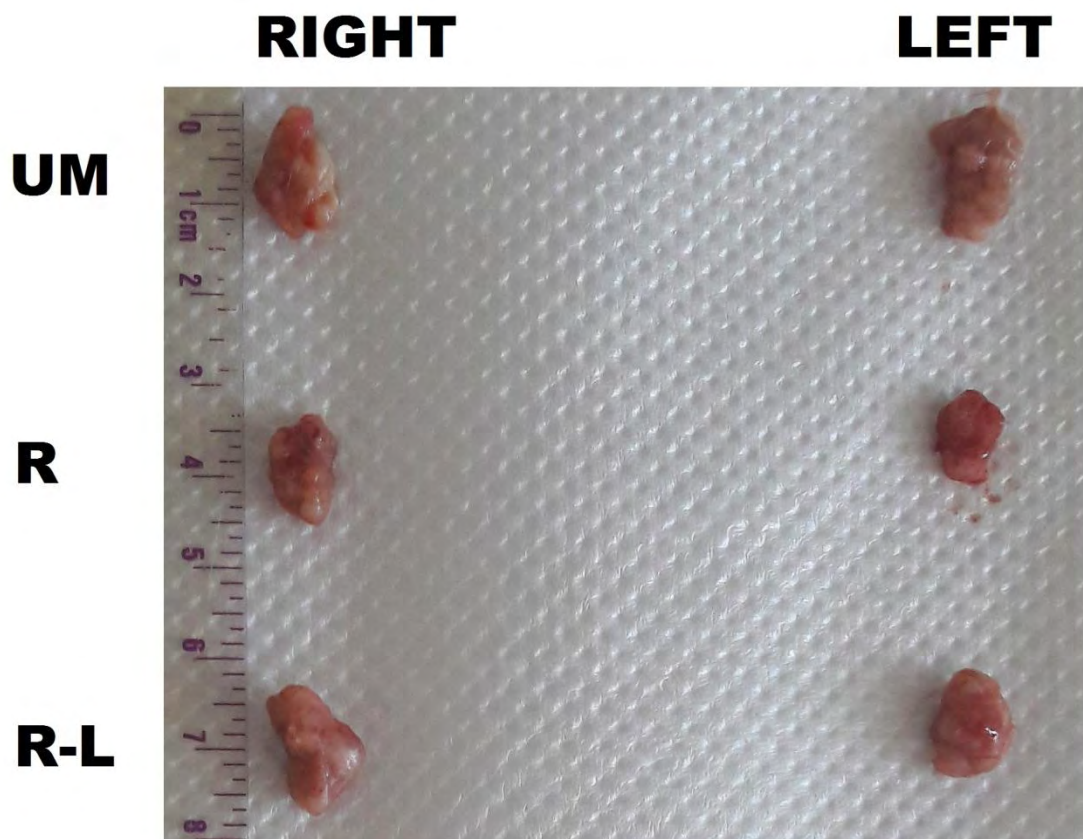
Γράφημα 5: Μεταβολή του βάρους των ζώων κατά τη διάρκεια των χορηγήσεων.

Days post inoculation	Ομάδα	Νεκρά ποντίκια	Χορηγήσεις που είχαν λάβει
53	Carrier	1	3
	FP5	1	3
57	Carrier	1	5
67	Carrier	1	7
77	FP5	1	10

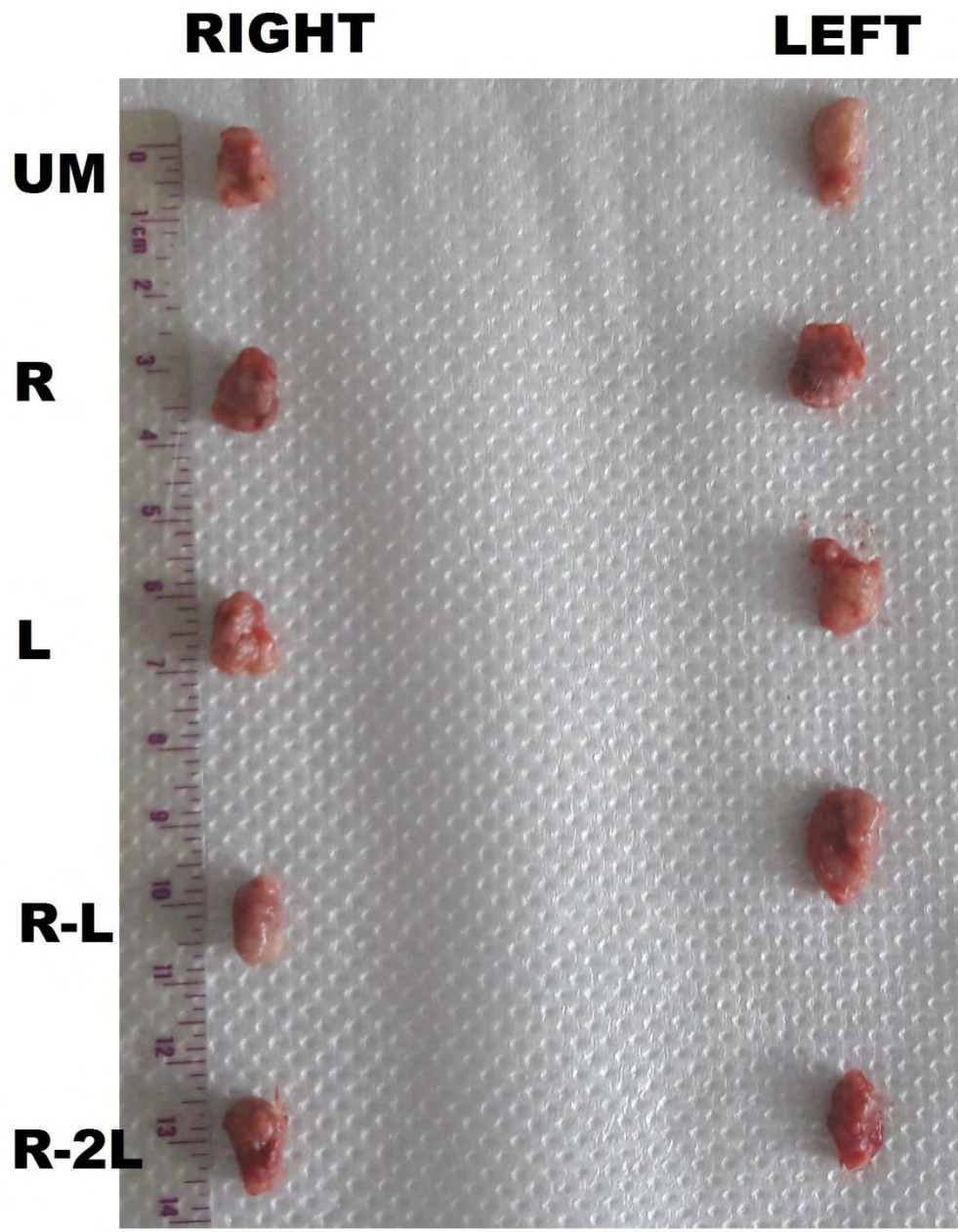
Πίνακας 5: Θνησιμότητα των ζώων κατά τη διάρκεια των χορηγήσεων



Εικόνα 14: Καρκινικοί όγκοι μετά από αφαίρεση τους από την ομάδα carrier.



Εικόνα 15: Καρκινικοί όγκοι μετά από αφαίρεση τους από την ομάδα FP5.



Εικόνα 16: Καρκινικοί όγκοι μετά από αφαίρεση τους από την ομάδα Καρβοπλατίνης.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με το πείραμα κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β διαπιστώνουμε ότι το FP5 έχει καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση σε σύγκριση με την καρβοπλατίνη και ότι η δράση του είναι δόσοεξαρτώμενη. Επιπλέον, μετά την *in vitro* επώαση των κυττάρων με FP5 σε συγκεντρώσεις 5, 10 και 20μM διαπιστώνουμε ότι η δράση του εκτός από δόσοεξαρτώμενη είναι και χρονοεξαρτώμενη. Το στύπωμα κατά Western αποκάλυψε ότι το FP5 σε συγκεντρώσεις 10 και 20μM προάγει τον κυτταρικό θάνατο, πιθανών, μέσω της αυτοφαγίας, καθώς υπάρχει υψηλή έκφραση του LCIII. Στο *in vivo* πείραμα δε φάνηκε να υπάρχει κάποια δράση του FP5 στις υπάρχουσες συνθήκες, ενώ εμφανίστηκε τοξικότητα στο διαλύτη. Επομένως, είναι πιθανό τα αποτελέσματα του *in vivo* να μην είναι αντιπροσωπευτικά.

Εν κατακλείδι, μία πιο ενδελεχής μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του FP5 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* θα ήταν ενδιαφέρουσα. Η *in vitro* μελέτη θα αποκάλυπτε τον πλήρη μηχανισμό με τον οποίο το FP5 προκαλεί το θάνατο των κυττάρων, ενώ η *in vivo* μελέτη θα μας έδινε περισσότερες πληροφορίες για τη δραστηριότητα του σε ζωικά μοντέλα. Σε μελλοντικές *in vivo* μελέτες θα μπορούσαν να γίνουν οι εξής αλλαγές:

- ✓ Καθημερινή χορήγηση FP5 στα ζώα της μέγιστης ανεκτής δόσης που είναι 75mg/kg σύμφωνα με τη δοκιμασία οξείας τοξικότητας.
- ✓ Αλλαγή του διαλύτη καθώς φάνηκε ότι αυτός που χρησιμοποιήθηκε ήταν τοξικός.
- ✓ Δοκιμασία υποξείας τοξικότητας ώστε να βρεθεί αν υπάρχει τοξικότητα στα ζώα μετά από επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις.
- ✓ Δοκιμασία οξείας τοξικότητας με συγκέντρωση φαρμάκου διπλάσια από αυτή που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή 400mg/kg, ώστε να διαπιστωθεί αν μπορούν να χορηγηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις FP5 από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fytas, F., Zoidis, G., Tsotinis, A., Fytas, G., Khan M. A., Akhtar, S., Rahman, K. M., Thurston, D. E. (2015). Novel 1-(2-aryl-2-adamantyl)piperazine derivatives with antiproliferative activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 93, 281-290
2. Singh, S., Davis, R., Alamanda, V., Pireddu R., Pernazza, D., Sebti, S., Lawrence, N., Chellappan S. (2010). Rb–Raf-1 Interaction Disruptor RRD-251 Induces Apoptosis in Metastatic Melanoma Cells and Synergizes with Dacarbazine. *Molecular Cancer Therapeutic*, 9(12), 3103-3310.
3. Witham, J., Valenti, M.R., De-Haven-Brandon, A.K, Vidot, S., Eccles, S.A, Kaye, S.B., Richardson, A. (2007). The Bcl-2/Bcl-XL family inhibitor ABT-737 sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin. *Clinical Cancer Research*, 13(23), 7191-7198.
4. Alon, A., Schmidt, H. R., Wood, M. D., Sahn, J. J., Martin, S. F., & Kruse, A. C. (2017). Identification of the gene that codes for the σ_2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27), 7160–7165.
5. Xu, J., Zeng, C., Chu, W., Pan, F., Rothfuss, J.M., Zhang, F., Tu Z., Zhou, D., Zeng, D., Vangveravorg, S., Johnston, F., Spitzer, D., Chang, K.C., Hotchkiss, R.S., Hawkins, W.G., Wheeler, K.T., Mach, R.H. (2011). Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site, *Nature Communications*, 2, 380.
6. Miller, K.D., Siegel, R.L., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Kramer, J.L., Rowland, J.H., Stein, K.D., Alteri, R., Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, *A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4), 271-289.
7. Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C.R., Alaibac, M. (2014). Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification”, *In vivo*, 28(6), 1005-1011
8. Maurice, T., & Su, T.-P. (2009). The Pharmacology of Sigma-1 Receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(2), 195–206.
9. Rousseaux, C. G., & Greene, S. F. (2015). Sigma receptors [σ Rs]: biology in normal and diseased states. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 36(4), 327–388.

10. Huang, Y.S., Lu, H.L., Zhang, L.J., Wu, Z. (2013). Sigma-2 Receptor Ligands and Their Perspectives in Cancer Diagnosis and Therapy. *Medicinal Research Reviews*, 34(3), 532-566.
11. Schön M.P., Schön M. (2007). Imiquimod: mode of action. *British Journal of Dermatology*, 157(2), 8-13
12. Valladeau J., Saeland S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Seminars in Immunology*, 17(4), 273-283
13. Ringehan, M., McKeating, J. A., Protzer, U. (2017). Viral hepatitis and liver cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732).
14. Celis J.E. (2006). Cell biology: a laboratory handbook. *Boston : Elsevier Academic*
15. Yonekawa, T., & Thorburn, A. (2013). Autophagy and Cell Death. *Essays in Biochemistry*, 55, 105–117.
16. Kim, F. J. (2017). Introduction to Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 244, 1-11.
17. Su, T.-P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., & Ruoho, A. E. (2010). The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(12), 557–566.
18. Crottès, D., Guizouarn, H., Martin, P., Borgese, F., & Soriani, O. (2013). The sigma-1 receptor: a regulator of cancer cell electrical plasticity? *Frontiers in Physiology*, 4, 175.
19. Weng, T.-Y., Tsai, S.-Y. A., & Su, T.-P. (2017). Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases. *Journal of Biomedical Science*, 24, 74.
20. Longhitano, L., Castracani, C. C., Tibullo, D., Avola, R., Viola, M., Russo, G., Volti, G. L., Prezzavento, O., Marrazzo, A., Amata, E., Reibaldi, M., Longo, A., Parrinello N.L., (2017). Sigma-1 and Sigma-2 receptor ligands induce apoptosis and autophagy but have opposite effect on cell proliferation in uveal melanoma. *Oncotarget*, 8(53), 91099–91111.
21. Anding, A., Baehrecke, E. (2015). Autophagy in Cell Life and Cell Death. *Current Topics in Developmental Biology*, Volume 114, 2015, Pages 67-91.

22. Ishitsuka, A., Fujine, E., Mizutani, Y., Tawada, C., Kanoh, H., Banno, Y., & Seishima, M. (2014). FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *International Journal of Molecular Medicine*, 34, 1169-1174
23. Fuggetta, M.P., D'Atri, S., Lanzilli, G., Tricarico, M., Cannavò, E., Zambruno, G., Falchetti, R., Ravagnan, G. (2004). *In vitro* antitumour activity of resveratrol in human melanoma cells sensitive or resistant to temozolomide. *Melanoma Research*, 14(3), 189-196
24. Campos, F.C., Victorino V.J., Martis-Pinge, C.M., Cecchini, A.L., Panis, C., Cecchini, R. (2014). Systemic toxicity induced by paclitaxel *in vivo* is associated with the solvent cremophor EL through oxidative stress-driven mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 78-86
25. Janku, F., McConkey, D.J., Hong, D.S., Kurzrock, R.(2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8, 528-539.
26. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2011). Το κύτταρο: Μία μοριακή προσέγγιση. *Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.*
27. https://dtp.cancer.gov/organization/btb/acute_toxicity.htm
28. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
29. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-fact-sheet>
30. <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/by-stage.html>
31. <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/mohs-surgery>
32. http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/Drug%20Index/nab-Paclitaxel_monograph_1Aug2016.pdf
33. <https://www.drugs.com/sfx/carboplatin-side-effects.html>
34. <https://www.galinos.gr/>
35. <https://www.jax.org/strain/001303>