



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Νανοδιασπορές ως μέσα μεταφοράς βιοδραστικών ενώσεων

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Δρ. Βασιλική Πλέτσα
Κύρια Ερευνήτρια ΙΧΒ-ΕΙΕ

Ράγιας Παντελεήμων

A.M. 00026

Αθήνα, 2019



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION

INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF
POSTGRADUATE STUDIES

IN

BIOENTREPRENEURSHIP



MASTER THESIS

Nanodispersions as carriers of bioactive compounds

SUPERVISOR:

Dr. Vasiliki Pletsa

Senior researcher, Institute of Chemical Biology

National Hellenic Research Foundation

Ragias Panteleimon

A.M. 00026

Athens, 2019

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Βασιλική Πλέτσα	Κύρια Ερευνήτρια-ΕΙΕ	
Βασιλική Παπαδημητρίου	Κύρια Ερευνήτρια-ΕΙΕ	
Αλέξανδρος Πίντζας	Διευθυντής ΙΧΒ-ΕΙΕ	

Ευχαριστίες

Η εργασία εκπονήθηκε στο ΙΧΒ-ΕΙΕ κατά την ακαδημαϊκή περίοδο 2017-2018 και υποστηρίχτηκε από το έργο «ΣΘΕΝΟΣ» (Δράση «ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ- ΚΡΗΠΙΣ» Ε.Υ. Δρ. Α. Πίντζας, Διευθυντής ΙΧΒ). Ειδικότερα, εντάχθηκε στο πλαίσιο της υλοποίησης της ΕΕ5 όπου προβλεπόταν η μελέτη της αποτελεσματικότητας των μικρογαλακτωμάτων ελαίου-σε-νερό (oil-in-water microemulsions) ως ενεργών μεταφορέων βιοδραστικών ενώσεων σε βιολογικά συστήματα-στόχους.

Με την περάτωση της παρούσας διπλωματικής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Δρ. Α. Πίντζα που μου έδωσε αυτή την ευκαιρία στο πλαίσιο των σπουδών μου στο «ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ» και δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής επίβλεψης.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Δρ. Βασιλική Παπαδημητρίου (Πρόγραμμα Βιομηχανικής & Νανοτεχνολογίας) για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Βασιλική Πλέτσα (Πρόγραμμα Χημικής Καρκινογένεσης & Γενετικής Τοξικολογίας) για την καθοδήγηση, τις υποδείξεις, το ενδιαφέρον και την επιμονή της από την αρχή μέχρι το τέλος.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Θεοχάρη για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την άριστη συνεργασία που είχαμε στο εργαστηριακό μέρος της διπλωματικής, καθώς και για τη συμβολή της στο κομμάτι των μικρογαλακτωμάτων της παρούσας διπλωματικής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κυρία Ειρήνη Κολοντή για τη στήριξη και τις συμβουλές της στην κυτταροκαλλιέργεια, διαδικασία καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή έκβαση της διπλωματικής μου.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για τη στήριξη και την υπομονή τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Summary.....	9
Εισαγωγή.....	10
1.1 Νανοτεχνολογία.....	10
1.2 Μικρο/νανο – γαλακτώματα.....	11
1.3 Καρκίνος.....	16
1.4 Κυτταρικός Κύκλος.....	18
1.5 Χρήση νανοτεχνολογίας στην αντικαρκινική θεραπεία.....	20
1.6 Κυτταρικός θάνατος και Καρκίνος.....	23
Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας.....	28
Υλικά και μέθοδοι.....	29
Κατάλογος χημικών.....	29
Κυτταρικές σειρές.....	29
Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων και ενθυλάκωση DPS-2.....	30
Καλλιέργεια κυττάρων.....	31
Συνεστιακή Μικροσκοπία.....	32
Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων.....	32
Προσδιορισμός του ποσοστού νεκρών κυττάρων με Trypan Blue.....	33
Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω MTT.....	33
Κυτταρομετρία ροής.....	34
Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών.....	36
Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών (Μέθοδος Bradford).....	36
Western blotting.....	36
iii. Εμφάνιση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος.....	38
Αποτελέσματα.....	39
Συνεστιακή Μικροσκοπία.....	39
Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT assay).....	40
Κυτταρομετρία ροής.....	42
Western blotting.....	44
Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

Περίληψη

Η νανοτεχνολογία έχει πλέον εισέλθει σε όλους τους τομείς της σύγχρονης πραγματικότητας και προσφέρεται σε πολλές πτυχές της υγειονομικής περίθαλψης. Σημαντικά νανοτεχνολογικά συστήματα για τον τομέα της υγείας αποτελούν τα μικρογαλακτώματα ως μεταφορείς φαρμάκων. Εκτός των πολλών πλεονεκτημάτων έναντι των συμβατικών μεταφορέων βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου και δεν είναι τοξικά. Και καθώς προβλέπεται ότι το 2019, στις Ηνωμένες Πολιτείες θα εμφανιστούν 1.762.450 νέες περιπτώσεις καρκίνου και 606.880 θάνατοι από καρκίνο, τα μικρογαλακτώματα αποτελούν σπουδαία μέσα για την πρόληψη του καρκίνου και την αντικαρκινική θεραπεία.

Δύο παράμετροι-κλειδιά σε αυτό το εγχείρημα είναι οι αρχές του φυσικοχημικού σχεδιασμού και ο σχεδιασμός των κλινικών δοκιμών. Μετά την είσοδο του στον οργανισμό, το νανοφάρμακο πρέπει να ξεπεράσει πολλά εμπόδια που μπορούν να επηρεάσουν τη συνολική ποσότητα που θα φθάσει στον όγκο. Μέσω βελτιστοποίησης των παραμέτρων (επικάλυψη με πολυαιθυλενο-γλυκόλη, έξοδος από το αγγειακό σύστημα στο μικροπεριβάλλον του όγκου) τα εμπόδια αυτά μπορούν να ξεπεραστούν. Συχνά συνδυάζεται αυτή η προσέγγιση με την ανοσοθεραπεία που είναι το αναδυόμενο μοντέλο θεραπείας του καρκίνου. Υπάρχουν όμως σημαντικές προκλήσεις στις οποίες η ανοσοθεραπεία οφείλει να απαντήσει.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, περιγράφονται οι τεχνικές και οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την *in vitro* αποτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης μιας ένωσης με ενδεχόμενη αντικαρκινική δράση και παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα για τη δραστική ουσία (DPS-2), ανάλογο του βενζοθειοφαινίου, όταν ενθυλακωθεί σε δομές μικρογαλακτώματος και επιδράσει σε τρεις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές εντερικού, πνευμονικού επιθηλίου και μελανώματος (Caco-2, A549 και WM164). Προσδιορίζεται η κυτταροτοξικότητα της και χαρακτηρίζεται η επιτυχής ενθυλάκωση της στο μικρογαλάκτωμα. Στην προσπάθεια που έγινε να διερευνηθούν αρχικά οι μηχανισμοί δράσης της DPS-2, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η ενθυλάκωση σε βιοσυμβατούς φορείς όπως τα μικρογαλακτώματα αποδίδει αποτελεσματικά την ένωση στο εσωτερικό του κυττάρου όπου δρα

προκαλώντας στάση του κυτταρικού κύκλου στην S φάση και επακόλουθα νεκρωτικό θάνατο.

Λέξεις κλειδιά: Μικρογαλακτώματα, Αντικαρκινική θεραπεία, Νανοδιασπορές

Summary

Nanotechnology has already entered all areas of modern world and can be applied to many aspects of healthcare. Microemulsions, as carriers of drugs, are important nanotechnological systems for the health sector. In addition to the many advantages over conventional carriers, they improve the bioavailability of the drug and are non-toxic. While it is predicted that by the year 2019, 1,762,450 new cases of cancer and 606,880 cancer deaths will occur in the United States, microemulsions are considered important tools for cancer prevention and cancer treatment.

Two key parameters in this project are the principles of physicochemical design and the design of clinical trials. Once it enters the body, the nanodrug must overcome many obstacles that may affect the total amount that will reach the tumor. By optimizing the parameters (polyethylene glycol coating, exit from the vascular system to the tumor microenvironment) these obstacles can be overcome. This approach is often combined with immunotherapy, which is the emerging model of cancer treatment. There are, however, significant challenges to which immunotherapy must respond.

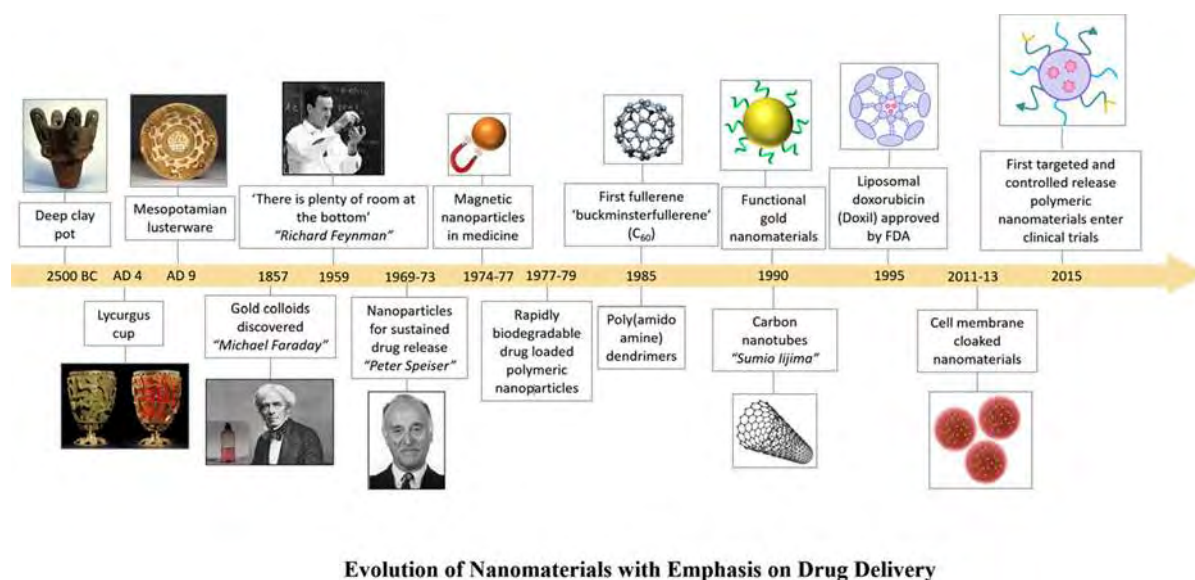
In the present thesis, the techniques and methods used for the *in vitro* evaluation of the cytotoxic effect of a compound with potential anticancer activity are described and indicative results for the active substance (DPS-2), analogous to benzothiophene, when encapsulated in microemulsion structures and affect three human cancerous intestinal, pulmonary epithelial and melanoma cell lines (Caco-2, A549 and WM164) are presented. Its cytotoxicity is determined and its successful encapsulation in the microemulsion is characterized. In an attempt to initially investigate the mechanisms of action of DPS-2, it was concluded that encapsulation in biocompatible vectors such as microemulsions effectively renders the compound within the cell where it acts by inducing cell cycle arrest in the S phase following necrotic death.

Keywords: Microemulsions, Cancer Therapy, Nanodispersions

Εισαγωγή

1.1 Νανοτεχνολογία

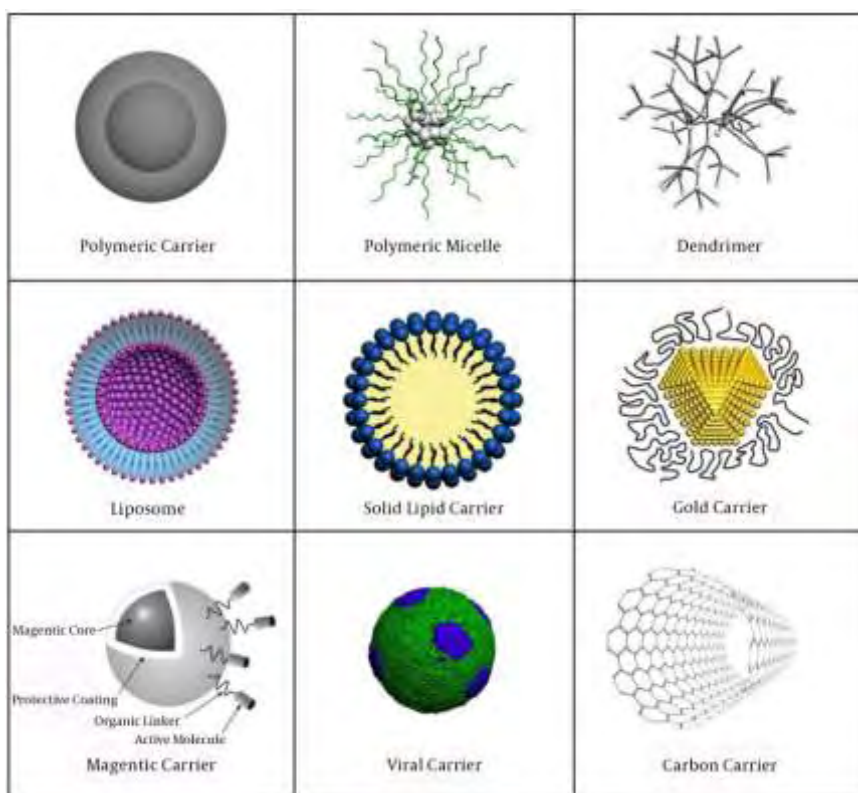
Η νανοτεχνολογία ασχολείται με την ανάπτυξη, μελέτη και χρήση λειτουργικών δομών εξαιρετικά μικρών διαστάσεων (1-100nm) και έχει ήδη εισχωρήσει σε κάθε τομέα της σύγχρονης πραγματικότητας, βρίσκοντας εφαρμογές σε ένα μεγάλο αριθμό πεδίων. Αντίστοιχα και ο πρόσφατα εισαχθείς όρος 'νανοεπιστήμη' αναφέρεται στην επιστήμη που μελετά φαινόμενα στη νανοκλίμακα, εύρος διαστάσεων όπου ανέκαθεν δούλευαν η βιολογία και η χημεία (Εικόνα 1.1). Η εξέλιξη της ικανότητας της επιστήμης και της τεχνολογίας, ώστε να εργάζονται με όλο και μικρότερες διαστάσεις, έφερε σαν γενικό όρο την νανοτεχνολογία. Είναι μια αναδυόμενη και πολλά υποσχόμενη τεχνολογία με μεγάλο εύρος εφαρμογών σε διάφορους τομείς. Αυτοί περιλαμβάνουν τα νανοϋλικά και τις βιομηχανικές διαδικασίες, την ενέργεια, την ηλεκτρονική, την βιομηχανία τροφίμων και κυρίως την υγεία.



Εικόνα 1.1 Εξέλιξη νανοϋλικών στη μεταφορά φαρμάκων (2017) (Shabir Hassan, 2017)

Η νανοτεχνολογία προσφέρεται σε πολλούς τομείς στο χώρο της υγείας. Ανάμεσα στις εφαρμογές είναι τα *in vitro* διαγνωστικά (νανοβιοαισθητήρες και

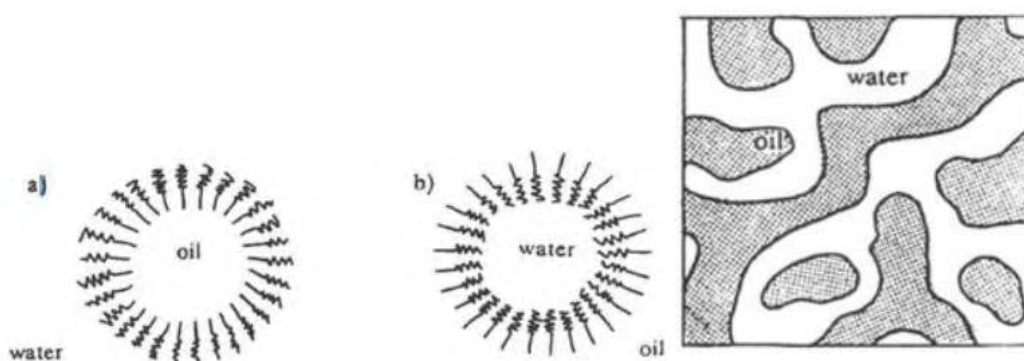
νανοπλατφόρμες), η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου (νανοφορείς) και τεχνητά όργανα για τη μελέτη της σημασίας παραλλαγών του γονιδιώματος (νανοδομές). Οι νέες μέθοδοι και τα αποτελέσματα φέρουν σημαντική μείωση του κόστους και απλοποιημένη παροχή υγειονομικής περίθαλψης, ενώ η νανοδιαγνωστική μπορεί να παρέχει με ακρίβεια τα εργαλεία διάγνωσης ασθενειών σε πρώιμο στάδιο. Η *in-vitro* νανοδιαγνωστική ήδη εντοπίζει σπάνιες ασθένειες, με πολλές νανοσυσκευές να έχουν εμφανιστεί με επιτυχία τις τελευταίες δεκαετίες (Maria Sofia Falzarano et al., 2018). Οι νανοφορείς αντιπροσωπεύουν μια αναδυόμενη προσέγγιση στην παροχή φαρμάκων και τη θεραπεία για διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι μολυσματικές ασθένειες, οι καρδιαγγειακές διαταραχές και οι νευρολογικές παθολογικές καταστάσεις (Εικόνα 1.2). Οι τεχνητοί ιστοί έχουν πολύτιμη συνεισφορά στην αντικατάσταση μολυσμένων οργάνων, παρέχοντας έτσι μοναδικές ευκαιρίες για τη διερεύνηση παθογόνων μηχανισμών καθώς και νέων στόχων φαρμάκων σε ένα εξατομικευμένο πλαίσιο (Ennio Tasciotti et al., 2017).



Εικόνα 1.2 Διαφορετικά είδη νανομεταφορών που χρησιμοποιήθηκαν στη μεταφορά φαρμάκου (Hamid Zahednasab, 2016).

1.2 Μικρο/νανο – γαλακτώματα

Τα μικρογαλακτώματα είναι συστήματα χαμηλού ιξώδους που αποτελούνται από νερό, έλαιο και επιφανειοενεργές ουσίες. Τα συστήματα αυτά είναι οπτικά ισότροπα και θερμοδυναμικά σταθερά, ενώ τα διεσπαρμένα νανοσωματίδια έχουν μέγεθος από 5 έως 50 nm. Σε αντίθεση με τα μακρο-γαλακτώματα, τα μικρογαλακτώματα σχηματίζονται αυθόρμητα με ανάμιξη όλων των συστατικών σε σταθερή θερμοκρασία. Είναι διαυγείς διασπορές, αποτελούμενες από δύο υγρές φάσεις: την υδατική και τη λιπαρή (Hidalgo and Alaiz 2002). Τα μικρογαλακτώματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν γενικά σε: νερό-σε-έλαιο (w/o), έλαιο-σε-νερό (o/w) και τα δισυνεχή που αποτελούν ενδιάμεσες μορφές που μπορούν να εναλλάσσονται αντιστρεπτά η μία στην άλλη (bicontinuous) (Εικόνα 1.3). Τα -έλαιο-σε-νερό- μικρογαλακτώματα χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση και τη μεταφορά λιπόφιλων ενώσεων, ενώ τα -νερό-σε-έλαιο- μικρογαλακτώματα χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση και τη μεταφορά υδρόφιλων ενώσεων. Ο όρος "έλαιο" περιγράφει οποιοδήποτε υγρό αδιάλυτο στο νερό.



Εικόνα 1.3 Απεικόνιση τύπων μικρογαλακτωμάτων (α) Μικρογαλακτώματα ελαίου-σε-νερό (o/w), (β) Μικρογαλακτώματα νερού-σε-έλαιο (w/o) και (γ) Δισυνεχείς διασπορές (Lawrence et al, 1994).

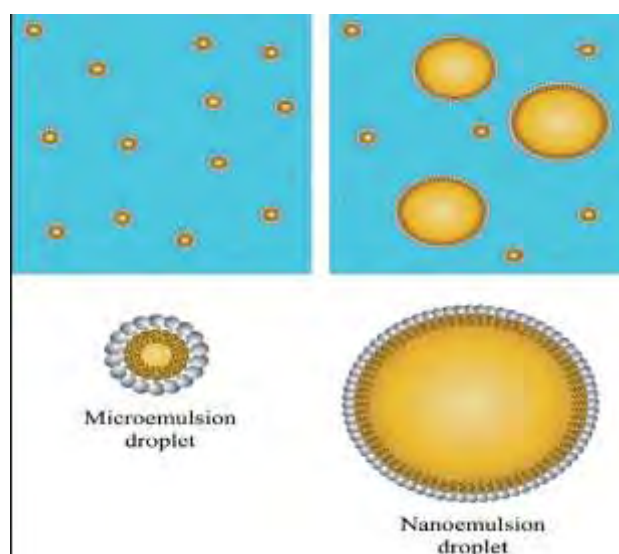
Οι επιφανειοενεργές ουσίες είναι αμφίφιλα μόρια, που διαθέτουν τόσο υδρόφοβες όσο και υδρόφιλες ομάδες. Η μη πολική ουρά τους διεισδύει στην υδρόφοβη περιοχή του ελαίου, ενώ η υδρόφιλη κεφαλή τους προσανατολίζεται προς την υδατική φάση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, για την αύξηση της σταθερότητας των μικρογαλακτωμάτων απαιτείται η προσθήκη συν-επιφανειοδραστικών ουσιών (π.χ. γλυκερόλη, 1,2-προπανοδιόλη) (Ravi TPU, 2011). Οι επιφανειοδραστικές ή/και συν-επιφανειοδραστικές ουσίες (co-surfactants) συγκεντρώνονται στη διεπιφάνεια (νερού-ελαίου) των σχηματιζόμενων νανοσταγονιδίων (μικκύλια). Ελαττώνουν, έτσι, την

διεπιφανειακή τάση μεταξύ νερού / ελαίου, επιτρέποντας την αμοιβαία διαλυτότητα των δύο υγρών (Benichou et al. 2004). Τα συστήματα αυτά επιτρέπουν τη διαλυτοποίηση συστατικών διαφορετικής πολικότητας. Τα λιπόφιλα συστατικά συγκεντρώνονται στη μη πολική φάση, τα υδρόφιλα στην πολική, ενώ τα αμφιφιλικά στη διεπιφάνεια των σχηματιζόμενων μικκυλίων (Hidalgo and Zamora, 2006).

Η δυναμική των μικρογαλακτωμάτων είναι μεγάλη και μελετάται η χρήση τους σε διάφορους τομείς. Διερευνώνται ευρέως στον τομέα των καλλυντικών για την παραγωγή προϊόντων προσωπικής φροντίδας με βελτιωμένα χαρακτηριστικά όπως η αποτελεσματικότητα, η σταθερότητα και η εμφάνιση. Είναι κατάλληλα για την παραγωγή διαφόρων καλλυντικών που χρησιμοποιούνται ως ενυδατικά, καταπραϋντικά, αντιηλιακά, αντιδρωτικά και ως παράγοντες καθαρισμού σώματος (Adnan Azeem, 2008). Στον τομέα των τροφίμων η εφαρμογή μικρογαλακτωμάτων περιορίζεται από τη χρήση κατάλληλων επιφανειοενεργών ουσιών. Πολλές απαγορεύονται στα τρόφιμα και ακόμα περισσότερες επιτρέπονται μόνο σε μικρές σχετικά συγκεντρώσεις (John Flanagan, Harjinder Singh, 2006). Μελετάται η χρήση μικρογαλακτωμάτων στην ένταξη γεύσης, θρεπτικών ουσιών, αρώματος, χρώματος και σταθερότητας στα τρόφιμα (Sabine Schetzberg, Progress and first milestones in formulating food-grade microemulsions 2011), ενώ πραγματοποιείται έρευνα και για την παρασκευή μικρογαλακτωμάτων ελεύθερα από επιφανειοδραστικές ουσίες (Zhenbo Xu. et al., 2016). Τα μικρογαλακτώματα βρίσκουν χρήσεις και στην εξαγωγή ελαίου από ελαιώδεις σπόρους έναντι της συμβατικής μεθόδου (Ashish D. Gathave, Jyotsna T. Waghmare, 2014). Πλέον σημαντική είναι η μελέτη βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων στον τομέα των αντικαρκινικών φαρμακευτικών προϊόντων.

Ένα νανογαλάκτωμα μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ένα συμβατικό γαλάκτωμα που περιέχει πολύ μικρά σωματίδια (T. G. Mason, 2006) (T. Tadros, 2004). Τα νανογαλακτώματα μπορεί να είναι τύπου έλαιο-σε νερό (O / W) ή νερό-σε έλαιο (W / O) ανάλογα με το εάν το έλαιο διασκορπίζεται ως σταγονίδια εντός του νερού ή το αντίθετο. Ένα έλαιο-σε νερό γαλάκτωμα ορίζεται ως μια θερμοδυναμικώς ασταθής κολλοειδής διασπορά αποτελούμενη από δύο μη αναμίξιμα υγρά, με ένα από τα δύο υγρά να διασκορπίζεται ως μικρές σφαιρικές σταγόνες ($r < 100$ nm) μέσα στο άλλο υγρό. Με βάση αυτή την αρχή, ένα νανογαλάκτωμα θα μπορούσε να σχηματιστεί από έλαιο και νερό χωρίς τη χρήση επιφανειοδραστικού. Στην πράξη όμως, αυτό το

σύστημα θα ήταν εξαιρετικά ασταθές και έτσι απαιτείται επιφανειοδραστική ουσία για να διευκολύνει το σχηματισμό του νανογαλακτώματος και να εξασφαλίσει την κινητική του ικανότητα κατά την αποθήκευση (D. J. McClements, 2005). Μερικές φορές χρησιμοποιείται συνδυασμός επιφανειοδραστικών ουσιών και όχι μεμονωμένες για το σχηματισμό και σταθεροποίηση των νανογαλακτωμάτων. Κατά συνέπεια ένα νανογαλάκτωμα παρασκευάζεται συνήθως χρησιμοποιώντας τα ίδια συστατικά με ένα μικρογαλάκτωμα: έλαιο, νερό, επιφανειοενεργή ουσία και πιθανώς μία συνεπιφανειοενεργή ουσία. Η δομή των διάσπαρτων σταγονιδίων σε ένα νανογαλάκτωμα είναι παρόμοια με αυτά που βρίσκονται σε ένα μικρογαλάκτωμα: π.χ. στην περίπτωση νανογαλακτώματος ο/w οι μη πολικές ουρές των επιφανειοενεργών μορίων προεξέχουν στον υδρόφοβο πυρήνα που σχηματίζεται από τη φάση του ελαίου, ενώ οι πολικές ομάδες-κεφαλές των επιφανειοενεργών μορίων προσανατολίζονται προς τη συνεχή υδατική φάση. Η διάκριση μεταξύ ενός νανογαλακτώματος και ενός μικρογαλακτώματος είναι επομένως η θερμοδυναμική σταθερότητα τους: τα νανογαλακτώματα είναι ασταθή θερμοδυναμικά, ενώ τα μικρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά σταθερά (McClements, D. J. (2012).



Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση δομών νανοσταγόνων μικρογαλακτώματος και νανογαλακτώματος αντίστοιχα (Mc Clements et al, 2012).

Τα νανογαλακτώματα έχουν ποικίλες εφαρμογές στη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών, αγροχημικών και τροφίμων (Gupta A et al., 2016). Λόγω των περιορισμών στη σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων, παλαιότερες επιστημονικές εργασίες που προτείνουν νέες εφαρμογές δήλωναν ότι τα νανογαλακτώματα πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν τη χρήση τους (Gutiérrez et

al., 2008). Σε αγροχημικές εφαρμογές, προτείνεται η χρήση νανογαλακτωμάτων για τη διαλυτοποίηση αδιάλυτων στο νερό παρασιτοκτόνων και φυτοπροστατευτικών ουσιών (Wang L et. al, 2007, Kalaitzaki et al., 2015). Στον τομέα της τεχνολογίας τροφίμων η χρήση νανογαλακτωμάτων φαίνεται να κερδίζει έδαφος. Η ενθυλάκωση βιταμινών και άλλων μικροθρεπτικών συστατικών, αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών ουσιών σε νανογαλακτώματα βελτιώνει τη διαλυτότητα, τη βιοδιαθεσιμότητα και τη σταθερότητα των ουσιών αυτών στο τρόφιμο (Nedovic V et. al., 2011, Li, Y., et. Al 2017). Μελετάται επίσης η ενθυλάκωση προβιοτικών (Rijkers et al., 2011) και κάποιων οφέλιμων στη διατροφή λιπιδίων (ωμεγα-3) (McClements DJ,2011). Το πεδίο των φαρμάκων αποτελεί το κέντρο πιο άμεσων εφαρμογών των νανογαλακτωμάτων. Το πρόβλημα της μη σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων μπορεί να λυθεί με τη χρήση τους αμέσως μετά την παρασκευή τους. Τέτοια νανογαλακτώματα έχουν περιγραφεί για παρεντερική και στοματική χρήση (Gutiérrez et al., 2008).

Νάνο- και μικρο- γαλακτώματα παρουσιάζουν διαφορές και ομοιότητες στη σύνθεση, στη δομή, στην παρασκευή και στις ιδιότητες. Είναι εφικτή η παρασκευή νάνο- και μικρο- γαλακτωμάτων με ακριβώς τα ίδια υλικά, αλλά με διαφορετικές αναλογίες. Ο όρος 'μικρο-' συνήθως σημαίνει 10^{-6} και ο όρος 'νάνο-' 10^{-9} που θα σήμαινε ότι τα νανογαλακτώματα περιέχουν μικρότερες δομές από ότι τα μικρογαλακτώματα. Στην πραγματικότητα συμβαίνει το αντίθετο και τα σωματίδια των μικρογαλακτωμάτων είναι μικρότερα από αυτά των νανογαλακτωμάτων. Ο λόγος για αυτή τη σύγχυση στην ορολογία είναι η ιστορική ανάπτυξη του πεδίου των κολλοειδών διασπορών. Η διαφορά αυτή στο μέγεθος επηρεάζει τις οπτικές ιδιότητες και τη σταθερότητα, ενώ αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα λιπόφιλων συστατικών όταν εμπεριέχονται σε δομές κάτω των 100nm (McClements, D. J. 2012). Αν και τα μικρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά σταθερά συστήματα έναντι των νανογαλακτωμάτων που δεν είναι, απαιτούν και τα δύο παροχή ενέργειας ώστε να ξεπεραστούν εμπόδια κινητικής ενέργειας και να παρασκευαστούν. Ένα μικρογάλακτωμα μπορεί να μείνει θεωρητικά κινητικά σταθερό για πάντα, όταν βέβαια δεν αλλάξουν οι συνθήκες στις οποίες παρασκευάστηκε. Στην πράξη μπορεί να γίνει ασταθές αν τα συστατικά του υποβληθούν σε χημικές αλλαγές κατά την αποθήκευση ή αλλάξουν οι περιβαλλοντικές συνθήκες και το σύστημα δεν είναι πια θερμοδυναμικά σταθερό. Από την άλλη το ασταθές θερμοδυναμικά νανογαλάκτωμα θα αλλοιώνεται με το χρόνο εξαρτώμενο από τις ενεργειακές διαφορές του νανογαλακτώματος των δύο καταστάσεων (σχηματισμένο-διαχωρισμένο νανογαλάκτωμα) (McClements, D. J. 2012).

Ένας ιδανικός νανοφορέας πρέπει να είναι ικανός να ενθυλακώσει το βιοενεργό μόριο σε αποτελεσματική ποσότητα και να είναι σχεδιασμένος βάσει των βιολογικών και φυσικοχημικών αρχών. Επιπροσθέτως, η επιλογή υλικών για τη σύσταση του νανομεταφορέα θα πρέπει να γίνει προσεκτικά, έτσι ώστε να είναι βιοσυμβατός ή/και βιοαπικοδομήσιμος, ενώ παράλληλα να έχει και χαμηλά κόστη.

Οι πρόσφατα αναδυόμενοι νανοφορείς αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση της αντικαρκινικής θεραπείας. Παρόλο που η θεραπεία του καρκίνου έχει βελτιωθεί με την πάροδο των χρόνων, ακόμη πολλά μεταστατικά σημεία δεν είναι προσβάσιμα εξαιτίας του μικρού μεγέθους κακοήθων συσσωματωμάτων κυττάρων και χαμηλής χημειοευαισθησίας (Schroeder A et al., 2012). Τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, που είναι σήμερα διαθέσιμα, είναι αδιάλυτα στο νερό. Αυτή η μειωμένη διαλυτότητα των φαρμάκων οδηγεί σε αυξημένες δοσολογίες και κατά συνέπεια σε τοξικές παρενέργειες. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει η απαίτηση να βελτιωθεί η διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητά τους μέσω του σχεδιασμού και της ανάπτυξης νανοφορέων μελετώντας τους σχετικούς μηχανισμούς μεταφοράς (Farokhzad OC et al, 2009).

1.3 Καρκίνος

Στα περισσότερα όργανα και ιστούς ενός ώριμου οργανισμού επικρατεί, συνήθως, μία ισορροπία μεταξύ της κυτταρικής ανανέωσης και του κυτταρικού θανάτου. Οι διάφοροι τύποι ώριμων κυττάρων έχουν συγκεκριμένη διάρκεια ζωής και καθώς τα κύτταρα πεθαίνουν, νέα κύτταρα ίδιου τύπου, που προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων, τα αντικαθιστούν. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή νέων κυττάρων ρυθμίζεται έτσι ώστε ο συνολικός αριθμός κυττάρων ενός συγκεκριμένου τύπου να παραμένει σταθερός. Περιστασιακά, όμως, ένας αυξανόμενος κυτταρικός πληθυσμός είναι δυνατόν να μην αποκρίνεται στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη. Από αυτόν τον πληθυσμό, προκύπτουν κλώνοι που αναπτύσσονται σε μεγάλη κλίμακα, δημιουργώντας έναν όγκο. Ένας όγκος που αυξάνεται διαρκώς και γίνεται

προοδευτικά διηθητικός είναι κακοήθης. Ο όρος καρκίνος αναφέρεται ειδικά σε έναν κακοήθη όγκο. Εκτός από τη διαρκή και ανεξέλεγκτη αύξηση, οι κακοήθεις όγκοι εμφανίζουν μεταστάσεις. Στο πλαίσιο αυτής της διαδικασίας, μικρές ομάδες καρκινικών κυττάρων αποκόπτονται από τον κύριο όγκο και, μέσω του περιφερικού αίματος ή των λεμφικών αγγείων μεταφέρονται σε άλλους ιστούς όπου και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται (μετάσταση). Με αυτόν τον τρόπο ένας πρωτογενής όγκος μπορεί να δημιουργήσει ένα δευτερογενή όγκο σε μία διαφορετική ανατομική θέση (Βιολογία Κυττάρου, 4^η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας).

Ενώ οι καλοήθεις όγκοι μπορούν συνήθως να απομακρυνθούν χειρουργικά, η εξάπλωση των κακοηθών όγκων σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος τους καθιστά συχνά ανθεκτικούς σε τέτοια τοπική θεραπεία. Φαίνεται επίσης ότι η λύση της χειρουργικής επέμβασης μπορεί να οδηγήσει από μόνη της σε μετάσταση (Samer Tohme, 2017).

Τόσο οι καλοήθεις όσο και οι κακοήθεις όγκοι ταξινομούνται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου από τον οποίο προκύπτουν. Οι περισσότεροι καρκίνοι εμπίπτουν σε μία από τις τρεις κύριες κατηγορίες: καρκινώματα, σαρκώματα και λευχαιμίες ή λεμφώματα. Τα καρκινώματα, τα οποία περιλαμβάνουν περίπου το 90% των ανθρώπινων καρκίνων, είναι κακοήθειες των επιθηλιακών κυττάρων. Τα σαρκώματα, τα οποία είναι σπάνια στους ανθρώπους, είναι συμπαγείς όγκοι συνδετικών ιστών, όπως μυών, οστών, χόνδρων και ινώδους ιστού. Οι λευχαιμίες και τα λεμφώματα, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 8% των ανθρώπινων κακοηθειών, προκύπτουν από τα κύτταρα του αίματος και από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αντίστοιχα. Οι όγκοι ταξινομούνται περαιτέρω σύμφωνα με τον ιστό προέλευσης (π.χ. καρκινώματα πνευμόνων ή μαστών) και τον τύπο του κυττάρου που εμπλέκεται. Για παράδειγμα, ινοσαρκώματα προκύπτουν από ινοβλάστες και ερυθροειδείς λευχαιμίες από προδρόμους ερυθροκυττάρων (ερυθρά αιμοσφαίρια) (Βιολογία Κυττάρου, 4^η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας).

Το 2019, στις Ηνωμένες Πολιτείες προβλέπεται ότι θα εμφανιστούν 1.762.450 νέες περιπτώσεις καρκίνου και 606.880 θάνατοι από καρκίνο. Κατά την τελευταία δεκαετία, η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου (2006-2015) ήταν σταθερή στις γυναίκες και μειώθηκε περίπου κατά 2% ετησίως στους άνδρες, ενώ ο θάνατος από καρκίνο (2007-2016) μειώθηκε ετησίως κατά 1,4% και 1,8% αντίστοιχα. Το συνολικό ποσοστό

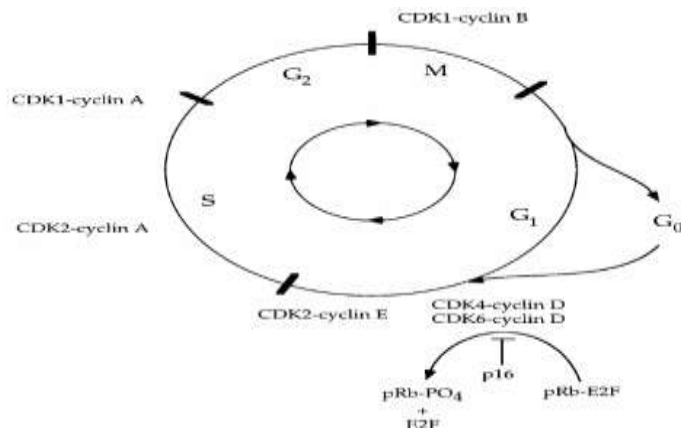
θνησιμότητας από καρκίνο μειώθηκε συνεχώς από το 1991 έως το 2016 κατά 27% συνολικά, που μεταφράζεται σε περίπου 2.629.200 λιγότερους θανάτους από καρκίνο από ό, τι θα αναμενόταν αν τα ποσοστά θνησιμότητας παρέμειναν στο αποκορύφωμά τους (Rebecca L. Siegel, Cancer Statistics, 2019).

1.4 Κυτταρικός Κύκλος

Με τον όρο 'κυτταρικός κύκλος' αποδίδεται η διαδικασία με την οποία ένα κύτταρο οποιουδήποτε οργανισμού διέρχεται μέσω διαφόρων λειτουργικών φάσεων έως ότου τελικά να διαιρεθεί σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Η φάση κατά την οποία λαμβάνουν χώρα η προετοιμασία, ο έλεγχος και η «λήψη αποφάσεων» για το αν το κύτταρο θα προχωρήσει σε διαίρεση καθώς και ο διπλασιασμός του DNA, ονομάζεται μεσόφαση. Τα περισσότερα κύτταρα τελικά διαιρούνται μέσω μίας διαδικασίας που είναι γνωστή ως μίτωση και η οποία περιλαμβάνει διάφορες φάσεις συνήθως κοινές για όλα τα κύτταρα.

Η μεσόφαση είναι πολύ πιο εκτεταμένη χρονικά σε σχέση με τη μίτωση και διαιρείται σε τρία επιμέρους στάδια. Το πρώτο στάδιο, που ακολουθεί την μίτωση, είναι το G1 (Gap 1). Διαρκεί 30-40% της μεσόφασης. Είναι μια έντονη μεταβολικά περίοδος, όπου το κύτταρο αυξάνεται, πρωτεϊνοσυνθέτει, αναπνέει έντονα, με άλλα λόγια διπλασιάζει το περιεχόμενο του, εκτός του γενετικού υλικού. Παρεμπόδιση του σταδίου αυτού με παρεμποδιστές της αναπνοής (KCN) ή της πρωτεϊνοσύνθεσης, έχει σαν αποτέλεσμα την αποτυχία της κυτταρικής διαίρεσης.

Την φάση G1 ακολουθεί η φάση S (synthesis). Η φάση αυτή διαρκεί το 30-50% της μεσόφασης. Εδώ όλο το DNA διπλασιάζεται. Παρεμποδιστές του διπλασιασμού του DNA παρεμποδίζουν τελικά την κυτταρική διαίρεση. Ακολουθεί η φάση G2 (Gap 2). Διαρκεί 10-20% της μεσόφασης. Παρεμβάλεται μεταξύ του τέλους της S φάσης και της αρχής της μίτωσης. Χαρακτηρίζεται από μικρή έκταση πρωτεϊνοσύνθεσης. Με το τέλος της G2 φάσης το κύτταρο μπαίνει σε μίτωση (Βιολογία-Η μελέτη της ζωής Β' έκδοση). Εκτός από τις παραπάνω φάσεις, ένα κύτταρο που είτε μόνιμα είτε παροδικά δεν διαιρείται, βρίσκεται σε ένα στάδιο πριν από το διπλασιασμό του DNA. Το κύτταρο αυτό βρίσκεται στη φάση G0 (κατάσταση ηρεμίας).



Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση κυτταρικού κύκλου (Kathleen Collins et al., PNAS 1997).

Η μετάβαση στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου πυροδοτείται από την ενεργοποίηση μιας σειράς κινάσων. Οι εν λόγω κινάσες αποτελούνται από δύο υπομονάδες. Μια ρυθμιστική υπομονάδα που αποτελεί ένα μέλος της οικογένειας των κυκλινών (Cyc, cyclin) και μια καταλυτική υπομονάδα που είναι μια κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση (Cdk, Cyclin dependent kinase). Παράλληλα κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα είναι δυνατόν να επισημάνουν, είτε κάποιους ειδικούς αναστολείς των διαφόρων γεγονότων του κυτταρικού κύκλου είτε τις ίδιες τις κυκλίνες προωθώντας έτσι την αποδόμησή τους από το πρωτεάσωμα. Η διαδικασία αυτή αποτελεί έναν εναλλακτικό μηχανισμό ρύθμισης της ενεργότητας των Cyc-Cdk συμπλόκων αφού όταν η συγκέντρωση της Cyc είναι χαμηλή, η Cdk λόγω απώλειας της Cyc είναι ανενεργή και ενεργοποιείται μόνο όταν η συγκέντρωση της Cyc υπερβεί κάποια όρια (Βιολογία Κυττάρου, 4η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας).

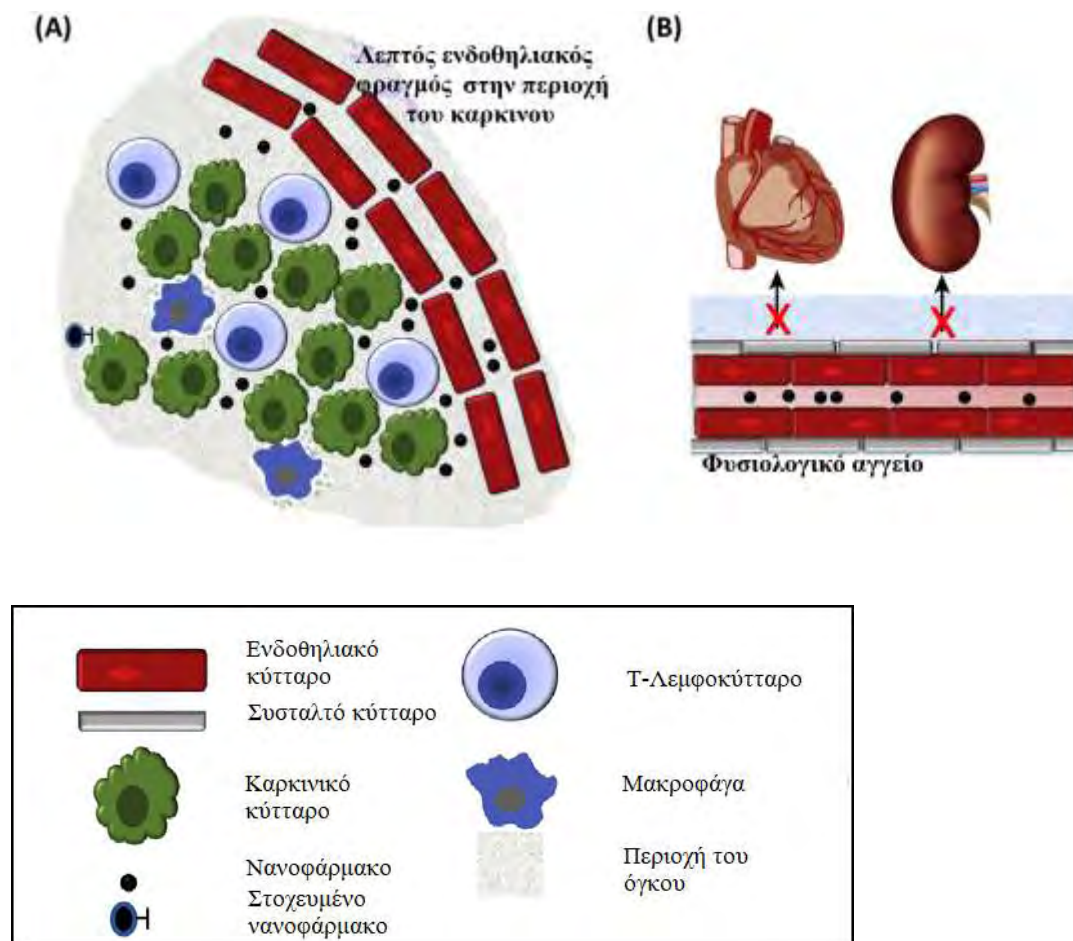
Ειδικότερα οι ενεργότητες κινάσης που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο εστιάζονται κυρίως σε δύο σημεία. Τα σημεία αυτά είναι η μετάβαση μεταξύ των φάσεων G₁ και S και μεταξύ των φάσεων G₂ και M. Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου σε καθένα από τα σημεία αυτά απαιτεί την παροδική ενεργοποίηση μιας Cdk από μια ειδική Cyc. Σε κάθε φάση, η ενεργοποίηση οδηγεί στη φωσφορυλίωση μιας σειράς υποστρωμάτων. Για παράδειγμα, στο σημείο μετάβασης G₁-S φωσφορυλιώνονται κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες απαραίτητοι για την αντιγραφή του DNA. Αντίθετα στο σημείο μετάβασης G₂-M φωσφορυλιώνονται κάποιοι άλλοι παράγοντες (Βιολογία Κυττάρου, 4η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας) .

1.5 Χρήση νανοτεχνολογίας στην αντικαρκινική θεραπεία

Η καρκινική νανοτεχνολογία βαδίζει σήμερα παράλληλα με την καρκινική ανοσοθεραπεία, έτσι και οι δύο, τις τελευταίες δεκαετίες, βρίσκονται στο προσκήνιο της θεραπείας του καρκίνου. Είναι απαραίτητο να δοθεί προσοχή σε επιτυχίες και αποτυχίες του παρελθόντος για μελλοντικές εφαρμογές της καρκινικής νανοτεχνολογίας. Δύο παράμετροι-κλειδιά σε αυτό το εγχείρημα είναι οι αρχές του φυσικοχημικού σχεδιασμού και ο σχεδιασμός των κλινικών δοκιμών (Shiladitya Sengupta, 2017). Μαθαίνοντας από τις αρχές σχεδιασμού που καθόρισαν την επιτυχία σε καρκινικά νανοσκευάσματα μπορούν να ξεπεραστούν οι προκύπτουσες προκλήσεις της αντικαρκινικής ανοσοθεραπείας.

Μετά την είσοδο του στον οργανισμό, το νανοφάρμακο αντιμετωπίζει διάφορα εμπόδια που μπορούν να περιορίσουν την συνολική ποσότητα που φτάνει στον όγκο, το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει το αποτέλεσμα (Εικόνα 1.6). Για παράδειγμα, τα μακροφάγα που βρίσκονται σε όργανα, όπως το συκώτι, ο σπλήνας, οι πνεύμονες, οι λεμφαδένες και το δέρμα, μπορούν να φαγοκυτταρώσουν και να αποδομήσουν την νανοδομή (Wilhelm S., 2016). Η φαγοκυττάρωση ενισχύεται αν τα νανοσωματίδια είναι συνδεδεμένα με πρωτεΐνες του ορού, έχουν συσσωματωθεί, είναι μεγάλα σε μέγεθος ή είναι επιφανειακά θετικά φορτισμένα (Wilhelm S., 2016) (Blanco et al., 2015). Για να αντιμετωπιστούν αυτές οι προκλήσεις και για να ξεφύγουν από τα μακροφάγα, τα νανοσωματίδια επικαλύπτονται με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), που δεν διεγείρει τα μακροφάγα και δρα σαν προστατευτικός μανδύας γύρω από το νανοσωματίδιο (Owens, 2006). Ο πολυαιθυλενογλυκολικός μανδύας έχει δείξει ότι αυξάνει τη ζωή της νανοδομής μέσα στην κυκλοφορία και βελτίωση του, μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην περιοχή του όγκου (Jokerst, 2011). Ένα άλλο εμπόδιο που πρέπει το φάρμακο να υπερκεράσει είναι το αγγειακό σύστημα που υπό φυσιολογικές συνθήκες σταματά την εξαγγείωση νανοσωματιδίων. Το αγγειακό σύστημα όμως στο μικροπεριβάλλον ενός όγκου χαρακτηρίζεται από ένα λεπτό ενδοθηλιακό φραγμό που στερείται υποστήριξης από συστατικά κύτταρα, διαταραγμένη μεμβράνη και ενδοθηλιακά κενά μεγέθους μέχρι 500 nm (Wilhelm S., 2016). Έτσι ένα νανοφάρμακο που μπορεί να μείνει σημαντικό χρονικό διάστημα στην κυκλοφορία προσδίδει ένα πλεονέκτημα ασφάλειας έναντι

άλλων και ευκολότερα εξάγεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου μέσω του ανώμαλου αγγειακού συστήματος των όγκων (Maeda, 2000). Αυτά είναι κάποια εμπόδια που μέσω βελτιστοποίησης παραμέτρων σχεδιασμού ξεπεράστηκαν (Stefanick, 2013). Είναι όμως γεγονός ότι μόνο το 1% της νανοδομής που εισέρχεται στον οργανισμό φτάνει τελικά στον όγκο και υπάρχει ανάγκη για συστηματική προσέγγιση των εμποδίων που περιορίζουν την μεταφορά της νανοδομής στον όγκο (Wilhelm S., 2016).



Εικόνα 1.6 Παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν την επιτυχία των αντικαρκινικών νανοφορέων (Shiladitya Sengupta, 2017).

Υπάρχουν ήδη επιτυχημένες νανοδομές κατά του καρκίνου που έχουν εγκριθεί και βγει στην αγορά. Τέτοιες είναι τα Doxil και Abraxane, νανοδομές μεταφοράς φαρμάκου, καθώς και άλλες δομές που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές απεικόνισης (Yingchoncharoen, 2016) (Gradishar, 2006) (Jiang, 2004). Όπως είπαμε οι νανοδομές χαρακτηρίζονται από εύρος μεγέθους 1-100 nm, έτσι ένα σύμπλοκο φαρμάκου αντισώματος (ADC) που περίπου είναι της τάξης μεγέθους των 10 nm (Jiang, 2004), συμπεριλαμβάνεται στην κατηγορία του νανοφαρμάκου. Τα ADCs είναι δομές, όπου ένα 'φορτίο' υψηλής τοξικότητας συνδέεται σε ένα αντίσωμα που με τη σειρά του μπορεί προσεγγίσει συγκεκριμένα αντιγόνα που εκφράζονται από καρκινικά κύτταρα (Diamantis, 2016). Έχει υπολογιστεί ότι το ποσοστό του, εισερχόμενου στον οργανισμό, αντισώματος που μπορεί να φτάσει στον όγκο είναι κατά μέσο όρο 1-2% (Teicher, 2011). ADCs όπως το T-DM1 (Kadcyla) και brentuximab vedotin (Adcetris) έχουν εγκριθεί από τον FDA για κλινική χρήση (Diamantis, 2016). Η συγκέντρωση του φαρμάκου που αντιδρά στον όγκο μέσω του μεταφορέα είναι συχνά 2 με 4 φορές της συγκέντρωσης που επιτυγχάνεται μέσω των συμβατικών σχεδιασμών του ίδιου φαρμάκου (Sengupta, 2012) (Barenholz, 2012).

Η ανοσοθεραπεία του καρκίνου είναι το αναδυόμενο μοντέλο της αναζήτησης θεραπείας για τον καρκίνο. Η κατανόηση των διαφόρων μηχανισμών που αποτελούν τη βάση της ανοσοκαταστολής σημαίνει ότι μπορούμε να ενεργοποιήσουμε φαρμακολογικά την ανοσοαπόκριση κατά του καρκίνου. Ο ενθουσιασμός γύρω από την ανοσοθεραπεία έχει προκαλέσει μια έκρηξη έρευνας στην εφαρμογή της νανοϊατρικής στην ανοσο-ογκολογία (Karadia, 2015) (Shao, 2015). Υπάρχουν όμως σημαντικές προκλήσεις στις οποίες η ανοσοθεραπεία οφείλει να απαντήσει, κυρίως λόγω της πίεσης που υπάρχει στην καρκινική νανοϊατρική. Τέτοιες προκλήσεις είναι η συνδυαστική θεραπεία, οι τεχνικές απεικόνισης της αποτελεσματικότητας των παραγόντων ανοσοθεραπείας και η εξατομικευμένη ανοσοθεραπεία. Και αυτό γιατί παρά την υπόσχεση της ανοσοθεραπείας, μόνο ένα κλάσμα των ασθενών παρουσιάζει μακροχρόνια αντίδραση στους επί του παρόντος εγκεκριμένους παράγοντες ανοσοθεραπείας (Shiladitya Sengupta, 2017). Η συνδυαστική θεραπεία μπορεί να φέρει σημαντικά αποτελέσματα, ενώ μέσω τις εξατομικευμένης θεραπείας μελετώνται η έννοια του εμβολιασμού και της μακροχρόνιας μνήμης στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

Η ανάπτυξη βιοσυμβατών νανοδομών, ως μεταφορείς φαρμάκων ή μορίων με φαρμακολογικό ενδιαφέρον, είναι μία νέα τεχνολογία, η χρήση της οποίας προσφέρει πληθώρα εφαρμογών. Η χρήση των δομών αυτών, για βελτιωμένη μεταφορά, βασισμένη στη νανοτεχνολογία, είναι ένα πολύ σημαντικό πεδίο. Τις τελευταίες δεκαετίες μεταφορείς φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων των νανοδιασπορών όπως μικρογαλακτώματα, νανογαλακτώματα, νανολιποσώματα, δενδριμερή, στερεά νανοσωματίδια κλπ. βρίσκονται στο κέντρο του ενδιαφέροντος πολλών ερευνητικών ομάδων.

Μέχρι 1200 δημοσιεύσεις αναφέρουν βιοϊατρικές εφαρμογές μεταφοράς φαρμάκων μέσω των μικρογαλακτωμάτων (Theochaḡi,2017). Ως προς την οδό χορήγησης η στοματική προτείνεται σε περισσότερες από το 42% των δημοσιεύσεων ακολουθούμενες από δερματική / τοπική χορήγηση (> 30%) και παρεντερική (14,25%). Ωστόσο, η ανάπτυξη συνθέσεων για ρινική (3,3%), οφθαλμική (3%) και εγκεφαλική χορήγηση (1,2%) έχει αποκτήσει μεγαλύτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Λόγω της διαφάνειας και των μικρών μεγεθών των σταγονιδίων, τα μικρογαλακτώματα εμφανίζονται πιο ελκυστικά για ρινικές και οφθαλμικές εφαρμογές (Callender SP, 2017).). Τα μικρογαλακτώματα, ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων, έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών και κατά την τελευταία δεκαετία πολλές ομάδες έχουν επανεξετάσει τις βιοϊατρικές τους εφαρμογές, που σχετίζονται με διαφορετικές οδούς χορήγησης (Fanun M,2012),(Gupta S, 2008).

1.6 Κυτταρικός θάνατος και Καρκίνος

Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκληθεί είτε από εξωτερικούς παράγοντες, όπως μια μόλυνση ή ένα τραύμα, μέσω της διαδικασίας της νέκρωσης, είτε από εσωτερικούς προγραμματισμούς, και σε αυτήν την περίπτωση καλείται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Εκτός όμως από την κατηγοριοποίηση αυτή, βάσει της προέλευσης των παραγόντων που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, υπάρχουν και οι κατηγοριοποιήσεις με βάση ενζυμολογικά κριτήρια (με ή χωρίς την εμπλοκή νουκλεασών, ή διακεκριμένων κατηγοριών πρωτεασών όπως κασπάσες, καλπαίνες, καθεψίνες και τρανσγλουταμινάσες), λειτουργικές πτυχές του κυτταρικού

θανάτου (προγραμματισμένες ή τυχαίες, φυσιολογικές ή παθολογικές) ή ανοσολογικά χαρακτηριστικά (πρόκληση ή μη ανοσολογικής απόκρισης).

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (ΠΚΘ) μπορεί να εξισορροπεί τον κυτταρικό θάνατο με την επιβίωση των φυσιολογικών κυττάρων. Η ισορροπία διαταράσσεται και ο ΠΚΘ παίζει βασικό ρόλο στις τελικές αποφάσεις της τύχης των καρκινικών κυττάρων (Hanahan,2011). Οι τρεις κύριες μορφές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι η απόπτωση, η αυτοφαγία και η προγραμματισμένη νέκρωση που διακρίνονται λόγω των μορφολογικών και βιοχημικών τους διαφορών (Tan ML, 2009).

Η απόπτωση, ή ο τύπος I ΠΚΘ χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης συρρίκνωσης των κυττάρων, πυρηνικής συμπύκνωσης και κατακερματισμό, δημιουργία ακανόνιστων κυτταροπλασματικών προεκβολών και απώλεια μεσοκυττάρων συνδέσεων ή συνδέσεων με εξωκυτταρικό δίκτυο (Nishida K,2008). Οι βιοχημικές αλλαγές περιλαμβάνουν διάσπαση χρωμοσωμικού DNA σε ενδονουκλεοσωματικά θραύσματα, μεταφορά φωσφατιδυλοσερίνης από την εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης στην εξωτερική και αποδιοργάνωση πλήθους ενδοκυτταρικών υποστρωμάτων με ειδική πρωτεόλυση (Martin SJ,1995).

Η αυτοφαγία ή ο ΠΚΘ τύπου II είναι μια εξελικτικά διατηρημένη καταβολική διαδικασία που αρχίζει με το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων, δομές με διπλή μεμβράνη γύρω από κυτταροπλασματικά μακρομόρια και οργανίδια, που προορίζονται για ανακύκλωση (Liu JJ,2011), (Huett A,2010). Γενικά, η αυτοφαγία παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση του κυττάρου, στην κυτταρική ομοιόσταση, που απαιτείται κατά τη διάρκεια περιόδων πείνας ή στρες που οφείλονται σε έλλειψη αυξητικού παράγοντα (He C,2009). Ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία ότι αυτοφαγικά κύτταρα μπορεί να αυτοκτονήσουν μέσω του κυτταρικού θανάτου για την αντιμετώπιση υπερβολικού στρες, το οποίο διαφέρει από την απόπτωση και την προγραμματισμένη νέκρωση (Eisenberg-Lerner A,2009) . Ως πρωταρχικό ρόλο, η αυτοφαγία ελέγχει μια μυριάδα φυσιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της πείνας, της κυτταρικής διαφοροποίησης, της κυτταρικής επιβίωσης και θανάτου (Liu B, 2010).

Εκτός από την απόπτωση και την αυτοφαγία, υπάρχει ο ΠΚΘ τύπου III που ονομάζεται προγραμματισμένη νέκρωση, η οποία περιλαμβάνει διόγκωση κυττάρων, δυσλειτουργία οργανιδίων και λύση του κυττάρου (Wu W, 2012) . Η νέκρωση είχε θεωρηθεί ως ο σχεδόν «τυχαίος» κυτταρικός θάνατος, μια τυχαία, ανεξέλεγκτη διαδικασία. Με την ανακάλυψη βασικών μεσολαβητών νεκρωτικού θανάτου όπως RIP κινάσες και PARP, η έννοια της προγραμματισμένης νέκρωσης έχει κερδίσει πρόσφατα έδαφος. Οι κινάσες - πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς - RIP, η poly (ADPριβόζη) πολυμεράση-1 (PARP1), οι NADPH οξειδάσες και οι ασβέστο-εξαρτώμενες πρωτεάσες έχουν αναγνωρισθεί ως πιθανά σηματοδοτικά στοιχεία της προγραμματισμένης νέκρωσης (Galluzzi L,2008), (Golstein P, 2007). Όταν τα κύτταρα υποβάλλονται σε κυτταρικό θάνατο με αυτόν τον τρόπο, η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης διακόπτεται και τα ενδοκυτταρικά υλικά απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον, οδηγώντας σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις από ανοσοκύτταρα. Η πρόκληση τοπικής φλεγμονής από προγραμματισμένη νέκρωση μπορεί να προωθήσει ανάπτυξη όγκου. Ωστόσο, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να ερευνηθεί για την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων (Zong WX,2004), (Agostinis P,2004).

Αυτές οι τρεις μορφές κυτταρικού θανάτου μπορούν να αποφασίσουν από κοινού για την τύχη κυττάρων κακοήθων νεοπλασμάτων. Η απόπτωση και η προγραμματισμένη νέκρωση οδηγεί σταθερά στον κυτταρικό θάνατο, ενώ η αυτοφαγία μπορεί να έχει ρόλο είτε στην επιβίωση είτε στο θάνατο του κυττάρου.

Ο καρκίνος, μια σύνθετη γενετική ασθένεια που προκύπτει από τη μετάλλαξη των ογκογονιδίων ή των γονιδίων καταστολής όγκων, μπορεί να αναπτυχθεί λόγω αλλαγής των ατροπών σηματοδότησης. Είναι γνωστό ότι έχει μεγάλη σχέση με τον ΠΚΘ (Amelio I, 2011). Η απόπτωση (τύπος I ΠΚΘ) είναι ο κύριος τύπος κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει όταν η βλάβη του DNA είναι ανεπανόρθωτη. Υπάρχουν δύο κύριες οδοί για να προκληθεί η απόπτωση, η εξωγενής - οδός του αποπτωτικού υποδοχέα και η ενδογενής – μιτοχονδριακή οδός (Eum KH,2011). Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται με τη σύνδεση του Fas (και άλλων παρόμοιων υποδοχέων όπως ο tumour necrosis 1 και οι συγγενικοί του) υποδοχέα πλασματικής μεμβράνης με τον εξωκυτταρικό συνδέτη του, Fas-L. Όταν πραγματοποιηθεί το ερέθισμα, ο Fas-L συνδέεται με τον Fas για να σχηματίσει ένα σύμπλεγμα. Το σύμπλεγμα Fas / Fas-L συνδέεται με την πρωτεΐνη FADD και την προ-κασπάση-8, σχηματίζοντας το σύμπλοκο σηματοδότησης κυτταρικού θανάτου

DISC. Κατά συνέπεια, το σύμπλοκο αυτό ενεργοποιεί την προ-κασπάση-8, η οποία ενεργοποιεί την προ-κασπάση-3, το τελεστικό ένζυμο για την εκτέλεση της αποπτωτικής διαδικασίας (Kerr JFR, 1972). Το ενδογενές μονοπάτι οδηγεί επίσης σε απόπτωση αλλά υπό τον έλεγχο των μιτοχονδριακών προ-ενζύμων. Και στις δύο περιπτώσεις, αν σε ένα κύτταρο εφαρμοστεί είτε εξωτερικό ερέθισμα είτε κάποιο ενδοκυτταρικό σήμα, οι εξωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες καθίστανται διαπερατές στο κυτόχρωμα c, το οποίο στη συνέχεια απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c προσλαμβάνει την Araf-1 και την προ-κασπάση 9 για να συντεθεί το αποπτώσωμα, το οποίο ενεργοποιεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων κασπάσης 9/3, με αποκορύφωμα (όπως καταλήγει και το εξωγενές μονοπάτι) στην απόπτωση (Ghobrial IM,2005). Στοιχεία έχουν δείξει ότι αυτή η ανώμαλη έκφραση ορισμένων βασικών κανονιστικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο, υποδεικνύοντας τις περίπλοκες σχέσεις μεταξύ απόπτωσης και καρκίνου.

Κατά την ανάλυση των σχέσεων μεταξύ αυτοφαγίας και καρκίνου, αποτελεί κοινή πρόκληση να προσδιοριστεί εάν η αυτοφαγία προστατεύει την επιβίωση των κυττάρων ή συμβάλλει στον κυτταρικό θάνατο. Η αυτοφαγία είναι αποδεκτό ότι είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των κυττάρων κάτω από ακραίες συνθήκες, και η αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών μακρομορίων παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για την ελάχιστη λειτουργία των κυττάρων όταν τα θρεπτικά συστατικά είναι σπάνια (White E, 2012). Συνεπώς, αυτοφαγική ενεργοποίηση μπορεί να διαδραματίσει προστατευτικό ρόλο στα αρχικά στάδια του καρκίνου (Kundu M, 2008). Από την άλλη πλευρά, ωστόσο, η αυτοφαγία μπορεί να ενεργήσει ως καταστολέας όγκου ενεργοποιώντας προ-αυτοφαγικά γονίδια και να απενεργοποιήσει αντι-αυτοφαγικά γονίδια στην ογκογένεση. Η αυτοφαγία μπορεί επίσης να παίξει τον αντίστροφο ρόλο - έναν προ-όγκου ρόλο στην καρκινογένεση - με τη ρύθμιση ενός πλήθους οδών που περιλαμβάνουν Beclin-1, Bcl-2, Class III και I PI3K, mTORC1 / C2 και p53 (Kundu M, 2008).

Απόπτωση, αυτοφαγία και προγραμματισμένη νέκρωση παρόλο που φέρουν διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά και φυσιολογικές διαδικασίες εξακολουθούν να συνδέονται από περίπλοκες αλληλεξαρτήσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η απόπτωση και η αυτοφαγία μπορούν να έχουν συνεργιστικά αποτελέσματα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί αυτοφαγία μόνο όταν καταστείλει η απόπτωση (Gonzalez-Polo RA, 2005). Ένας αριθμός από μελέτες

καταδείχνουν ότι η αυτοφαγία μπορεί να ενεργεί είτε ως προστάτης είτε ως εκτελεστής, ανάλογα με το στάδιο της καρκινογένεσης, του κυτταρικού περιβάλλοντος ή τις θεραπευτικές παρεμβάσεις (Galluzzi L, 2008). Η προγραμματισμένη νέκρωση είναι ένας -ανεξάρτητος από κασπάσες- κυτταρικός θάνατος και ενεργοποιείται πάντα ως εφεδρικός μηχανισμός απόπτωσης όταν οι κασπάσες αδρανοποιούνται (Degterev A, 2005). Υπό ορισμένες συνθήκες, απόπτωση και προγραμματισμένη νέκρωση προκαλούνται ταυτόχρονα και η ανεπάρκεια τόσο της απόπτωσης όσο και της νέκρωσης μπορεί να παρατηρηθεί σε μερικά καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, η προγραμματισμένη νέκρωση συνοδεύεται από την αυτοφαγία, αλλά η μεταξύ τους σχέση παραμένει ένα αίνιγμα (Degterev A,2005).

Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά στις μεθοδολογικές προσεγγίσεις που απαιτούνται και εφαρμόζονται σε εργαστηριακό/ερευνητικό επίπεδο (*in vitro*) για τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης χημικών ενώσεων με ενδεχόμενη αντικαρκινική δράση σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο. Οι προσεγγίσεις που εφαρμόστηκαν ήταν συζευγμένες με μεθοδολογίες νανοτεχνολογίας, σε μια προσπάθεια ενίσχυσης την κυτταροτοξικότητας των ενώσεων αυτών στην προοπτική της ανάπτυξής τους σε φαρμακευτικά σκευάσματα και στόχευσης της χορήγησής τους σε συγκεκριμένους ιστούς-στόχους. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε το ανάλογο βενζοθειοφαινίου DPS-2, ένωση που έχει συντεθεί στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του ΕΙΕ και αποδειχθεί ισχυρά κυτταροτοξική σε πλήθος καρκινικών κυτταρικών σειρών. Περιγράφονται τα βήματα που ακολουθούνται από το σημείο της ενθυλάκωσης της DPS-2 σε μικρογαλακτώματα, της επίδρασής της σε καρκινικές κυτταρικές σειρές εντερικού και πνευμονικού επιθηλίου (Caco-2, A549) καθώς και μελανώματος (WM164) και διερεύνησης του μηχανισμού κυτταροτοξικότητας. Στόχος της Διπλωματικής Εργασίας είναι να απεικονίσει, μέσω ενός πραγματικού παραδείγματος δραστικής ουσίας (DPS2), τη διαδικασία που ακολουθείται κατά τη διάρκεια της *in vitro* αποτίμησης μιας δραστικής ένωσης ώστε να προσδιοριστεί σε εργαστηριακό επίπεδο η δυναμική της να εξελιχθεί σε αντικαρκινικό φάρμακο με συνεισφορά της νανοτεχνολογίας.

Η εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του ΕΙΕ σε συνεργασία με το Πρόγραμμα Χημικής Καρκινογένεσης & Γενετικής Τοξικολογίας και το Πρόγραμμα Βιομηχανικής & Νανοβιοτεχνολογίας στο πλαίσιο της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής της κ. Ιωάννας Θεοχάρη την οποία και ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγηση και υποστήριξη κυρίως σε ό,τι αφορά το εργαστηριακό μέρος.

Υλικά και μέθοδοι

Κατάλογος χημικών

- * Υλικά κυτταροκαλλιέργειας: Θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (life technologies,41966), MEM NEAA (Non-Essential Amino Acids) 100X (GIBCO,11140-035), PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.2 10X (GIBCO,70013-016), FBS (Fetal bovine serum) (GIBCO,10270), πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (GIBCO, 15140-122), θρυψίνη-EDTA 0,25%
- * Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma - Aldrich , D8418)
- * Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD,161-0406)
- * TEMED (Tetramethylethylenediamine) (MP Biomedicals,LLC, CAT.NO.805615)
- * APS (Ammonium persulfate) (SIGMA, A9164-100G)
- * RIPA Lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, sc- 24948)
- * MTT (Sigma - Aldrich , M5655)
- * Trypan Blue (Sigma - Aldrich , T8154)

Κυτταρικές σειρές

- * Caco2 - human epithelial colorectal adenocarcinoma cells

Μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές ορθοκολικού καρκίνου. Φέρουν μετάλλαξη στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC, το οποίο είναι μεταλλαγμένο και ανενεργό στη μεγάλη πλειονότητα των κολο-ορθικών καρκίνων στον άνθρωπο. Το γονίδιο APC βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 και εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος (θέση 5q21–q22) ενώ αποτελείται από 15 εξώνια. Επίσης μεταλλαγμένο είναι και το p53 καθώς και η β-κατενίνη. Η ανώμαλη ενεργοποίηση της οδού της β-κατενίνης προκαλεί τη συσσώρευση της στον πυρήνα και προάγει τη μεταγραφή πολλών ογκογονιδίων όπως c-Myc και CyclinD-1. Ως

αποτέλεσμα, συμβάλλει στην καρκινογένεση και την πρόοδο του όγκου αρκετών καρκίνων.

- * WM164 – skin melanoma cells

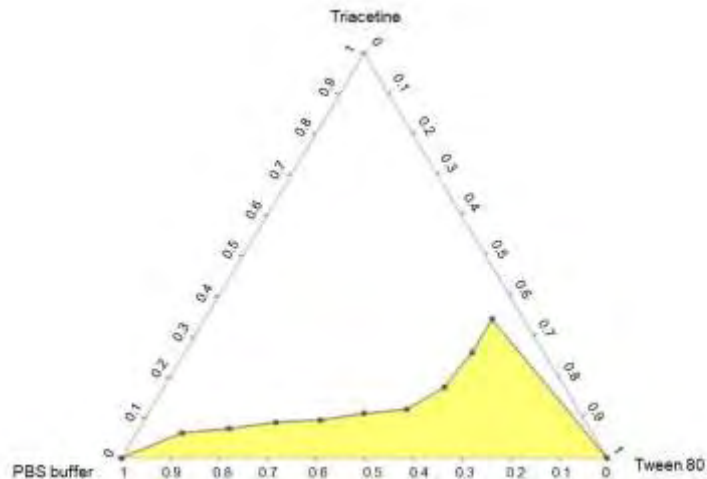
Αποτελεί μία μεταστατική ανθρώπινη κυτταρική σειρά μελανώματος που εδραιώθηκε από μεταστατική περιοχή, αρσενικού ατόμου 22 ετών με βαθμό 4 επιφανειακής εξάπλωσης μελάνωμα. Αυτή η κυτταρική σειρά φέρει τη συγκεκριμένη V600E (Val600Glu) μετάλλαξη στο κωδικόνιο 600 στο BRAF γονίδιο. Αυτή η μετάλλαξη προκαλεί συνεχή δραστηριότητα ενεργής κινάσης και ενεργοποίηση των μονοπατιών των MEK και ERK.

- * A549 - adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells

Σειρά καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων που έχουν απομονωθεί από ανθρώπινο πνεύμονα. Φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο K-RAS που ενεργεί σαν διακόπτης ενεργοποίησης/απενεργοποίησης στην κυτταρική σηματοδότηση. Όταν λειτουργεί κανονικά, ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Όταν μεταλλαχθεί, διακόπτεται η αρνητική σηματοδότηση. Έτσι, τα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται συνεχώς και συχνά αναπτύσσονται σε καρκίνο. Επίσης φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο CDKN2A που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες p16 και p14ARF.

Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων και ενθυλάκωση DPS-2

Τα ο/ω μικρογαλακτώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση του DPS-2 αποτελούνταν από τριακετίνη για την ελαιώδη φάση, PBS για την υδατική φάση και Tween 80 ως επιφανειοενεργή ουσία. Η σύνθεση των μικρογαλακτωμάτων ήταν 81,5% w/w PBS, 10,6% w/w Tween 80 και 7,9% w/w τριακετίνη. Η συγκεκριμένη σύνθεση επιλέχθηκε μεταξύ άλλων, και περιγράφηκε στο τριαδικό διάγραμμα φάσης.



Διάγραμμα 2.1 Τριαδικό διάγραμμα φάσης του ο/w μικρογαλακτώματος αποτελούμενο από ρυθμιστικό διάλυμα PBS ως υδατική φάση, τριακετίνη ως ελαιώδη φάση και Tween 80 ως επιφανειοενεργή ουσία (Ioanna Theochari et al., 2018 *Supplementary Materials: Oil - In - Water Microemulsions as Hosts for Benzothiophene - Based Cytotoxic Compounds: An Effective Combination*).

Αρχικά προστέθηκε καθαρή αιθανόλη στο DPS-2 για να σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα αιθανόλης (6,6 mM). Μετά την εξάτμιση της αλκοόλης το ο/w μικρογαλάκτωμα προστέθηκε στο σωλήνα και αφέθηκε μία μέρα σε υδατόλουτρο (25 °C) για να επιτραπεί η διαλυτοποίηση του φαρμάκου στην ελαιώδη φάση του μικρογαλακτώματος.

Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM, το οποίο περιέχει τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα τους. Το διάλυμα DMEM περιέχει γλυκόζη, L-γλουταμίνη, πυροσταφιλικό οξύ, ενώ προστέθηκε 1% αντιβιοτικών (πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη) και 10% FBS. Η επώαση έγινε σε επωαστικό θάλαμο με 5% CO₂, στους 37 °C.

Για να αποκολληθούν τα κύτταρα από τα τοιχώματα του φιαλιδίου καλλιέργειας (T25/T75 flasks) ή και από τις πλάκες 6-πηγαδιών πραγματοποιείται θρυψινοποίηση. Γίνεται αναρρόφηση του υλικού που υπάρχει στη φλάσκα και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS (1-5 ml ανάλογα με την επιφάνεια της καλλιέργειας). Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα θρυψίνης (0,25% σε EDTA) 0,5-2 ml ανάλογα με την επιφάνεια. Με ήπιες κινήσεις επιδιώκεται όλα τα κύτταρα να διαβρέχονται από

θρυψίνη. Η θρυψίνη είναι πρωτεολυτικό ένζυμο και υδρολύει τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση τόσο των κυττάρων στην επιφάνεια του φιαλιδίου όσο και μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM (4 φορές τον όγκο της θρυψίνης που προστέθηκε).

Συνεστιακή Μικροσκοπία

Με χρήση Συνεστιακού Μικροσκοπίου και χρώση των κυττάρων με φθορίζουσα χρωστική γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση, φθορίζόντων βιολογικών δομών, ενδοκυτταρικών δομών όπως μεμβράνες, κυτταροσκελετό, χρωματίνη, λυσοσώματα κ.ά.. Επίσης γίνεται εύκολος ο ακριβής εντοπισμός μακρομορίων στο κύτταρο.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων απλώνεται κατάλληλος αριθμός κυττάρων ($0,5-1 \times 10^5$) σε καλυπτρίδα και επωάζονται για 24 ώρες σε επωαστικό θάλαμο, μέσα σε θρεπτικό υλικό ώστε να προσκολληθούν. Στη συνέχεια χορηγείται η ουσία, της οποίας η επίδραση μελετάται, και μετά από το επιθυμητό χρονικό διάστημα, η καλυπτρίδα ξεπλένεται με PBS. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται με κρύα μεθανόλη για 10 λεπτά στους -20°C . Η μεθανόλη αφαιρείται και ακολουθεί ξέπλυμα με PBS. Κατόπιν προστίθεται η φθορίζουσα χρωστική και γίνεται επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιούνται 2-3 ξεπλύματα με PBS, διάρκειας 5 λεπτά το καθένα, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Η καλυπτρίδα τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, χρησιμοποιώντας κατάλληλο μέσο επικόλλησης αποφεύγοντας το σχηματισμό φυσαλίδων αέρα. Το δείγμα παρατηρήθηκε στο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica 626 TCS SPE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Το πρόγραμμα απεικόνισης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το LAS AF (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany).

Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων

Συλλέγεται το υπερκείμενο της καλλιέργειας σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου. Στη συνέχεια ξεπλένεται με PBS, αλλά το ξέπλυμα προστίθεται στον

πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου. Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση(0,5-2 ml ανάλογα με το μέγεθος του φιαλιδίου). Προστίθεται θρεπτικό μέσο DMEM για να σταματήσει η θρυψινοποίηση και γίνεται συλλογή DMEM-κυττάρων-θρυψίνης. Ακολουθείται φυγοκέντρωση στις 1800-2000 στροφές/λεπτό για 10'. Συλλέγεται το ίζημα, το οποίο αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού. Από το διάλυμα αυτό λαμβάνεται μικρή ποσότητα (περίπου 50μl) ώστε να γίνει καταμέτρηση σε ειδική πλάκα Neubauer.

Προσδιορισμός του ποσοστού νεκρών κυττάρων με Trypan Blue

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά κύτταρα φέρουν ακέραιες κυτταρικές μεμβράνες που δεν αφήνουν την είσοδο στο κύτταρο συγκεκριμένων διαλυμάτων χρώσεων, όπως την Trypan Blue. Ενώ από την άλλη τα νεκρά κύτταρα αφήνουν. Ένας πληθυσμός κυττάρων μπορεί επωαστεί με τη χρώση και μετά να ελεγχθεί οπτικά, ώστε να παρατηρηθεί αν η χρωστική εισέρχεται στα κύτταρα ή όχι.

Τα κύτταρα συλλέγονται με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (βλ. μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων). Λαμβάνονται 200 μl από το φιαλίδιο που περιέχει που περιέχει τα θρυψινοποιημένα κύτταρα και αναμιγνύονται με 200 μl διαλύματος Trypan Blue (0,4%). Μετά από περίπου 10 λεπτά, λαμβάνεται μικρή ποσότητα (περίπου 50 μl) και γίνεται καταμέτρηση, όπως στη μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων, τόσο των νεκρών όσο και του συνόλου των κυττάρων. Το % ποσοστό των νεκρών κυττάρων ορίζεται ως ο αριθμός των νεκρών κυττάρων προς τον αριθμό του συνόλου.

Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω MTT

Το MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl Blue) είναι ένα υδατοδιαλυτό τετραζόλιο άλας το οποίο παράγει ένα κιτρινόροον διάλυμα όταν βρεθεί σε θρεπτικό μέσο ή διάλυμα από όπου απουσιάζει η χρωστική ερυθρό της φαινόλης. Το διαλυμένο MTT μετατρέπεται σε ένα αδιάλυτο ιώδες φορμαζάνιο λόγω της διάσπασης του δακτυλίου του τετραζολίου από διυδρογενάσες. Αυτό το αδιάλυτο στο νερό φορμαζάνιο, μπορεί να διαλυτοποιηθεί

χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη,) ή άλλους διαλύτες και να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής.

Οι ενεργές μιτοχονδριακές διυδρογενάσες των ζωντανών κυττάρων είναι αυτές που προκαλούν αυτή την μετατροπή. Τα νεκρά κύτταρα δεν μπορούν να προκαλέσουν αυτή την αλλαγή. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να υπολογιστεί η ενεργότητα της ιντερλευκίνης-2, η κυτταροτοξικότητα ουσιών, καθώς και ο απλός υπολογισμός ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο πρωτόκολλο της εταιρείας (Sigma–Aldrich; M5655). Η % βιωσιμότητα για κάθε σημείο προκύπτει από τουλάχιστον πέντε επαναλήψεις.

Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη κυτταρικών πληθυσμών μέσω ανάλυσης της σκέδασης του φωτός από τα κύτταρα καθώς και της εκπομπής φθορισμού από αυτά. Τα κύτταρα περνάνε ένα ένα μπροστά από μία δέσμη laser. Η σκέδαση και ο φθορισμός καταγράφονται από τη συσκευή και αναλύονται κατάλληλα. Οι μετρήσεις γίνονται καθώς τα κύτταρα ρέουν ενώ βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος σε ένα διάλυμα. Παρέχονται πληροφορίες για το μέγεθος και το είδος των κυττάρων με ταχύτητα μέχρι δεκάδες χιλιάδες κύτταρα το δευτερόλεπτο.

Με την κυτταρομετρία ροής παρέχεται η δυνατότητα να προσδιοριστεί σε ένα πληθυσμό κυττάρων το επί τοις εκατό ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή στη G0/G1, S, G2/M. Έτσι, μπορεί να προσδιοριστεί σε ποια φάση του κυτταρικού κύκλου μια χημική ένωση ασκεί τοξική δράση αν συγκριθεί το ποσό των κυττάρων που βρίσκεται στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου μιας κυτταροκαλλιέργειας στην οποία έχει προστεθεί η συγκεκριμένη χημική ένωση με μια κυτταροκαλλιέργεια μάρτυρα στην οποία δεν έχει προστεθεί η χημική ένωση. Ο προσδιορισμός βασίζεται στη διαφορετική ποσότητα του DNA που υπάρχει στα κύτταρα της κάθε φάσης.

Στα κύτταρα προστίθεται μια φθορίζουσα χρωστική (π.χ. propidium iodide) που μπορεί και συνδέεται με το DNA. Για να μπορέσει η χρωστική να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου γίνεται επεξεργασία των κυττάρων με κάποιο απορρυπαντικό, έτσι ώστε να δημιουργηθούν ανοίγματα στην κυτταρική και την πυρηνική μεμβράνη μέσα από τα οποία θα περάσει η χρωστική. Μετά τη χρώση γίνεται ανάλυση κυτταρικού κύκλου στο κυτταρόμετρο ροής FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) και η απεικόνιση και επεξεργασία πραγματοποιείται με τα προγράμματα CellQuest (BD Biosciences) και ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME, USA) . Από την ανάλυση προκύπτει ένα ιστόγραμμα όπου διακρίνονται 3 τιμές φθορισμού. Μία ελάχιστη τιμή που αντιστοιχεί στα κύτταρα της φάσης G₀/G₁ που έχουν και τη μικρότερη ποσότητα DNA, μία μέγιστη τιμή που αντιστοιχεί στα κύτταρα των φάσεων G₂/M που έχουν τη μεγαλύτερη ποσότητα DNA (οι δύο αυτές φάσεις δεν μπορούν να διακριθούν γιατί στα κύτταρα και των δύο η ποσότητα του DNA είναι ίδια), και ενδιάμεσες τιμές που αντιστοιχούν στα κύτταρα της φάσης S στα οποία έχει ξεκινήσει ο διπλασιασμός του DNA.

i. Μονιμοποίηση κυττάρων για κυτταρομετρία ροής

Φυλάσσεται το υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας και το PBS/θρυψίνη που χρησιμοποιούνται για το ξέπλυμα/αποσύνδεση των κυττάρων από τα τοιχώματα αντίστοιχα. Γίνεται προσδιορισμός του κυτταρικού πληθυσμού σε πλάκα Neubauer. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 1800 στροφές/λεπτό στους 4°C για 10 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και γίνει ξέπλυμα με 2 ml PBS. Επαναλαμβάνεται το τελευταίο βήμα με ξέπλυμα με 1 ml PBS. Γίνεται ανακίνηση σε χαμηλή ταχύτητα και προστίθεται σταγόνα σταγόνα 1-1,5 ml αιθανόλης 100% (20°C). Τα μονιμοποιημένα δείγματα φυλάσσονται στους 4°C.

ii. Χρώση με ιωδιούχο προπίδιο

Η διαδικασία περιλαμβάνει φυγοκέντριση των κυττάρων, απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη επιθυμητής ποσότητας της χρώσης. Η ανάλυση πρέπει να γίνει μέσα σε μισή ώρα από τη χρήση της χρώσης. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων είναι οι εξής: PI 50μg/ml, Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, MgCl₂ 5 mM, RNase A 10 μg/ml.

Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών

Για την απομόνωση του εκχυλίσματος πρωτεϊνών πραγματοποιείται αρχικά φυγοκέντριση των κυττάρων στις 1800 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση του ιζήματος με PBS 1X (1ml) και επαναφυγοκέντριση στους 4°C στις 1800 στροφές/λεπτό. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθονται RIPA 1 ml, PMSF 10 μl, ορθοβαναδικό νάτριο (1 mM) 10 μl και μίγμα αναστολέων πρωτεασών 10 μl/ 1,5x 10⁶ κύτταρα. Πραγματοποιείται ήπια επαναιώρηση με πιπέτα και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30min, με ήπια ανάμιξη κάθε 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντριση των δειγμάτων στους 4°C στις 10000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Φυλάσσεται το υπερκείμενο στους -20°C, καθώς περιέχει τις πρωτεΐνες.

Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών (Μέθοδος Bradford)

Η μέθοδος Bradford είναι μία αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ποσότητας των πρωτεϊνών που βρίσκεται σε ένα διάλυμα και βασίζεται στη χρήση χρωστικής. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-- 250 σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm όταν είναι μόνη της στο διάλυμα (κόκκινη) και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595 nm όταν είναι προσδεμένη σε πρωτεΐνη (μπλε). Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595 nm.

Western blotting

- i. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυμιλιδίου

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Η μέθοδος περιλαμβάνει αποδιάταξη των πρωτεϊνών με το δωδεκυλθειικό νάτριο (SDS) και τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος για να τα τραβήξει διαμέσου του πολυακρυλαμιδίου. Το SDS δεσμεύεται έντονα στις πρωτεΐνες ανεξάρτητα από την πρωτεϊνική αλληλουχία και προκαλεί την αποδιάταξη τους. Έτσι αποσυνδέονται από τυχόν άλλες πρωτεΐνες και λιπίδια και γίνονται υδατοδιαλυτές. Οι πρωτεΐνες αποκτούν ένα αρνητικό φορτίο σε αναλογία προς το μοριακό τους μέγεθος και έτσι ταξιδεύουν στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου σύμφωνα με τα μοριακά τους μεγέθη. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος της τρέχουσας πρωτεΐνης, τόσο ταχύτερα ταξιδεύει μέσα από τους πόρους του πηκτώματος.

Οι πρωτεΐνες αναμιγνύονται με το αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης (SDS sample buffer) το οποίο περιέχει 50μM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη, 5M β-μερκαπτοαιθανόλη και επωάζονται στους 95°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε κάθετο ασυνεχές πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου το οποίο χωρίζεται σε δύο τμήματα διαφορετικού pH και συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου, το πήκτωμα συμπύκνωσης (επάνω τμήμα) και το πήκτωμα διαχωρισμού.

Οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται στο πήκτωμα συμπύκνωσης σε μία λεπτή στιβάδα. Η σύστασή του είναι η εξής : 0,125mM Tris-HCl pH 6,8, 4% ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο, 0,1% SDS, 0,07% υπερθειικό αμμώνιο (APS) και 0,07% τετραμεθυλεθυλενεδιαμίνη (TEMED). Στη συνέχεια γίνεται ο διαχωρισμός τους βάση του μοριακού τους βάρους. Αυτό συμβαίνει στο πήκτωμα διαχωρισμού του οποίου η σύσταση είναι η εξής : 0,375mM Tris-HCl pH 8,8, X % ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο, 0,1% SDS, 0,07% υπερθειικό αμμώνιο (APS) και 0,07% τετραμεθυλεθυλενεδιαμίνη (TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος καθορίζονται από την περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο. Ανάλογα με το μέγεθος των προς διαχωρισμό πρωτεϊνών επιλέγεται και η κατάλληλη περιεκτικότητα. Πηκτώματα που έχουν περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 10% έχουν μικρούς πόρους και έτσι χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με μικρό μοριακό βάρος. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα διαχωρισμού 10% .

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer : 400mM γλυκίνη, 50mM Tris-HCl pH 8,9 και 0,1% SDS), υπό σταθερή τάση 150 Volts. Οι πρωτεΐνες κινούνται προς την άνοδο, λόγω του αρνητικού φορτίου που τους έχει προσδώσει η δέσμευση του SDS. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 45

λεπτά, μέχρι το μέτωπο της χρωστικής να φτάσει στο κάτω άκρο του πήκτωματος διαχωρισμού.

ii. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση

Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωρισθεί στο πήκτωμα μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,2μm πόρων) μέσω ειδικής συσκευής μεταφοράς. Το πήκτωμα τοποθετείται προς την κάθοδο και η νιτροκυτταρίνη στην πλευρά της ανόδου. Οι πρωτεΐνες που είναι αρνητικά φορτισμένες, λόγω της επίδρασης του SDS, μεταφέρονται στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης καθώς κατευθύνονται προς το θετικό πόλο. Το διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) περιέχει 100ml 10X Running buffer, 200ml μεθανόλη και 700ml απιονισμένο νερό, ενώ η μεταφορά πραγματοποιείται στα 330 mA για 90'.

Μόλις τελειώσει η μεταφορά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται με TBS (0,5M Tris-HCl pH 7,4, 2M NaCl) για 10'. Στη συνέχεια γίνεται επώαση (2-3h) της μεμβράνης υπό ήπια ανάδευση με διάλυμα Zeller (10mM Tris-HCl pH7,5 , 0,1M MgCl₂ , 5% γάλα χαμηλό σε λιπαρά, 0,5% Tween 20 , 0,1% Triton) έτσι ώστε να επιτευχθεί μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων και να αποφευχθεί σύνδεση των αντισωμάτων με αυτές. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα υπό ήπια ανάδευση, είτε για 90' σε θερμοκρασία δωματίου είτε κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4⁰C. Η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα Zeller (2x10', 1x15', 3x5') και ακολουθεί η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, η οποία διαρκεί 90' σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα Zeller (2x10'1x15', 3x5') και TBS (2x10').

iii. Εμφάνιση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανοσοχημική ανίχνευση των πρωτεϊνών, βασίζεται στην αρχή της χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescent Substrate). Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο της ραφανιδικής υπεροξειδάσης (Horse Radish Peroxidase HRP) το οποίο καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης. Κατά την οξειδωση παράγονται φωτόνια τα οποία φανερώνουν τη θέση συμπλόκου-αντιγόνου. Προετοιμάζονται δύο διαλύματα εκ των οποίων το πρώτο περιέχει κουμαρικό οξύ (Coumaric acid), λουμινόλη (Luminol), και ρυθμιστικό Tris pH 8,5, ενώ το δεύτερο 30% H₂O₂ και Tris pH 8,5. Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται σε αυτά για 1'. Μετά από έκθεση σε φιλμ

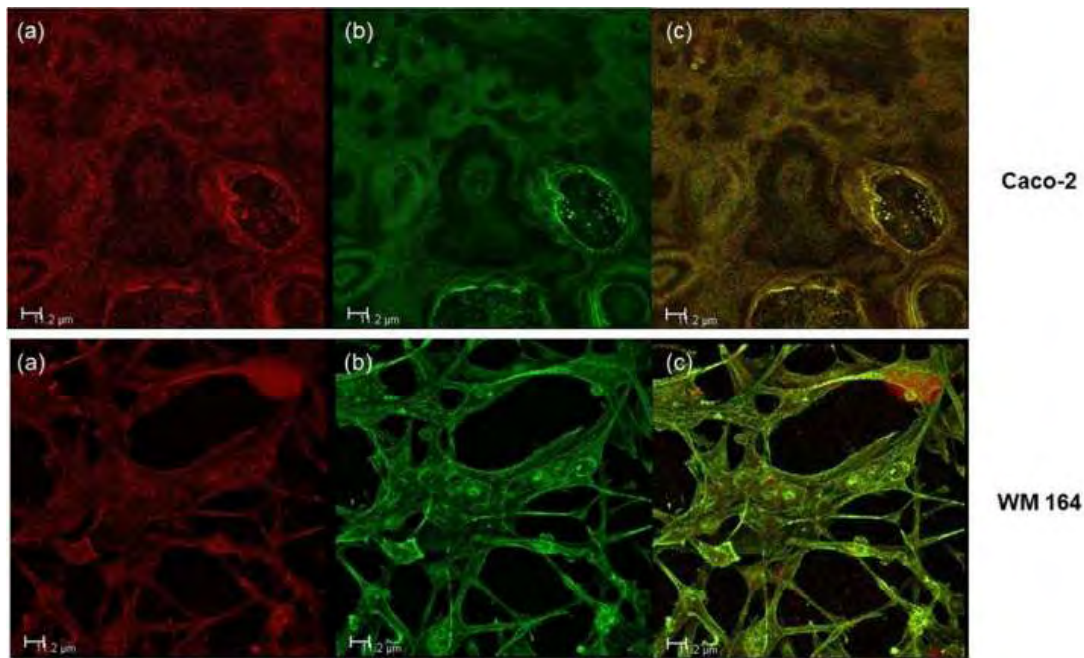
αυτοραδιογραφίας (X-ray film), ακολουθεί εμφάνιση σε σκοτεινό θάλαμο, με την βοήθεια των κατάλληλων διαλυμάτων εμφάνισης και μονιμοποίησης (Developer και Fixer). Τέλος πραγματοποιείται αντιστοίχιση των ζωνών που εμφανίζονται στο φιλμ με τις ζώνες του μάρτυρα ώστε να προσδιοριστεί το μέγεθος των πρωτεϊνών και να γίνει η ταυτοποίηση τους.

Παρακάτω παρατίθενται τα αντισώματα καθώς και οι αραιώσεις με τις οποίες αυτά χρησιμοποιήθηκαν : αντι-PARP (BD Pharmingen [™] , 551025) 1: 500, αντι-cleaved PARP (Cell Signaling Technology, Asp214) 1:700, αντι-cdc25a 1:1000 (Cell Signaling technology), αντι-β-ακτίνη 1:20000 (RD systems MAB8929), αντι-mouse Igs/HRP 1:1000 (Dako P0161), αντι-rabbit Igs/HRP 1:1000 (RD systems HAF008).

Αποτελέσματα

Συνεστιακή Μικροσκοπία

Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Χρησιμοποιήθηκε φθορίζον δεύτερο αντίσωμα που δεσμεύεται στο πρώτο αντίσωμα της β-ακτίνης ώστε να σημανθεί με πράσινο χρώμα ο κυτταροσκελετός και κόκκινη χρωστική Nile red που δεσμεύεται στην ελαιώδη φάση του μικρογαλακτώματος. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε κατά πόσο το μικρογαλάκτωμα εισέρχεται επιτυχώς στις κυτταρικές σειρές που επώαστηκαν με αυτό. Η ανίχνευση έγινε ύστερα από επώαση 72 ωρών. Τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 3.1



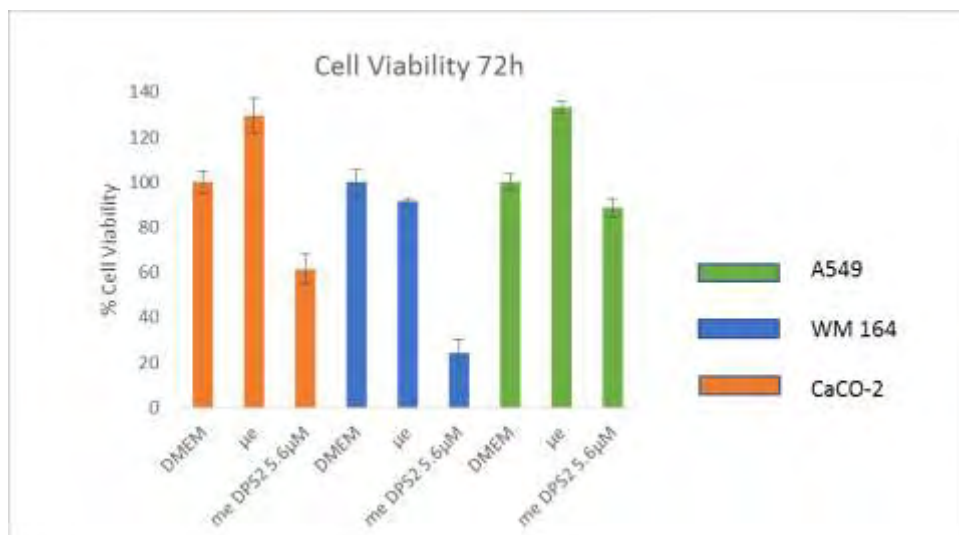
Εικόνα 3.1 Συνεντοπισμός κυτταροσκελετού και ελαιώδους φάσης στις δύο κυτταρικές σειρές Caco-2 και WM164, ύστερα από επώαση 72 ωρών. (a) κόκκινο: Η χρώση Nile Red βάφει την ελαιώδη φάση. (b) πράσινο: φθορίζον δεύτερο αντίσωμα προσδένεται στο αντίσωμα της β-ακτίνης και βάφει πράσινο τον κυτταροσκελετό. (c) κίτρινο: συνένωση του (a) και (b). κλίμακα: 11,2 μm. (*Theoxari et al., 2018, Oil-In-Water Microemulsions as Hosts for Benzothiophene-Based Cytotoxic Compounds: An Effective Combination*)

Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε επιτυχώς και εντοπίστηκε τόσο το πράσινο που φανερώνει την παρουσία του κυτταροσκελετού όσο και το κόκκινο που βάφει την ελαιώδη φάση. Από το συνεντοπισμό των δύο ειδικών χρώσεων προκύπτει ότι το μικρογαλάκτωμα εισέρχεται στο κύτταρο και αποδίδει επιτυχώς το περιεχόμενο της ελαιώδους φάσης.

Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT assay)

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων των τριών κυτταρικών σειρών (WM164, A549 και Caco2) μετά από επώαση σε τρεις διαφορετικές συνθήκες για 72h. Η κάθε κυτταρική σειρά επώαστηκε με θρεπτικό DMEM (μάρτυρας/control), με άδειο μικρογαλάκτωμα και με μικρογαλάκτωμα όπου είχε ενθυλακωθεί DPS-2 (5,6μM), ξεχωριστά. Η % βιωσιμότητα για κάθε σημείο προκύπτει από πέντε επαναλήψεις. Ο μέσος όρος των απορροφήσεων, για την κάθε κυτταρική σειρά όταν καλλιεργείται, σε

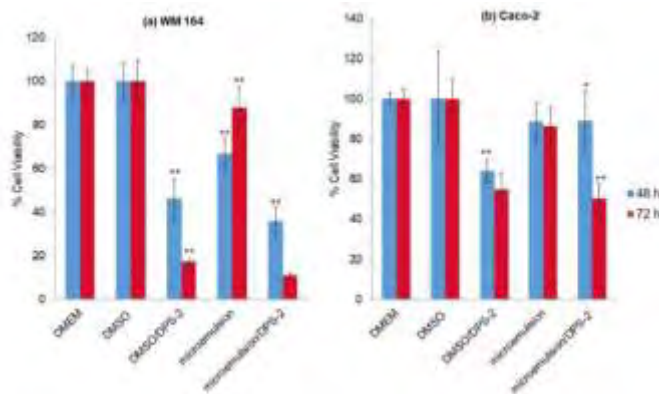
θρεπτικό μέσο DMEM αποτέλεσε το 100% της βιωσιμότητας. Βάσει του μέσου όρου της απορρόφησης στο DMEM υπολογίστηκαν τα ποσοστά βιωσιμότητας και στις υπόλοιπες περιπτώσεις.



Διάγραμμα 3.2 Διάγραμμα κυτταρικής βιωσιμότητας ύστερα από επώαση με i) θρεπτικό DMEM, ii) με μικρογαλάκτωμα (με) και iii) DPS-2 ενθυλακωμένο στο μικρογαλάκτωμα.

Παρατηρήθηκε εμφανής μείωση της βιωσιμότητας ως αποτέλεσμα της δράσης του DPS-2, στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και WM164. Οριακή μείωση παρατηρήθηκε στην κυτταρική σειρά A549. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο παραπάνω διάγραμμα είναι ενδεικτικά για τις 72 ώρες χορήγησης.

Στο διάγραμμα 3.3 παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας (Theoxari et al., 2018), μετά από σύγκριση χορήγησης DPS-2 ενθυλακωμένου σε μικρογαλάκτωμα, έναντι της χορήγησης στην ίδια συγκέντρωση μέσω οργανικού διαλύτη (DMSO). Από τη σύγκριση επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα του μικρογαλακτώματος να λειτουργεί ως μεταφορέας του DPS-2 στα ανθρώπινα κύτταρα. Είναι επίσης σημαντικό ότι η ενθυλάκωση του DPS-2 στο μικρογαλάκτωμα δεν προκάλεσε αυξημένη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τη συμβατική χορήγηση με DMSO (Theoxari et al., 2018).



Διάγραμμα 3.3

Διάγραμμα κυτταρικής βιωσιμότητας (a) WM164 και (b) Caco-2 κυτταρικών σειρών μετά από 48 και 72 ώρες επώαση με: DMEM, DMSO, DPS-2 διαλυμένο με DMSO, 'άδειο μικρογαλάκτωμα' και μικρογαλάκτωμα με DPS-2. (I. Theoxari et al., 2018 Supplementary Materials: Oil-In-Water Microemulsions as Hosts for Benzothioephene-Based Cytotoxic Compounds: An Effective Combination, Fig.5)

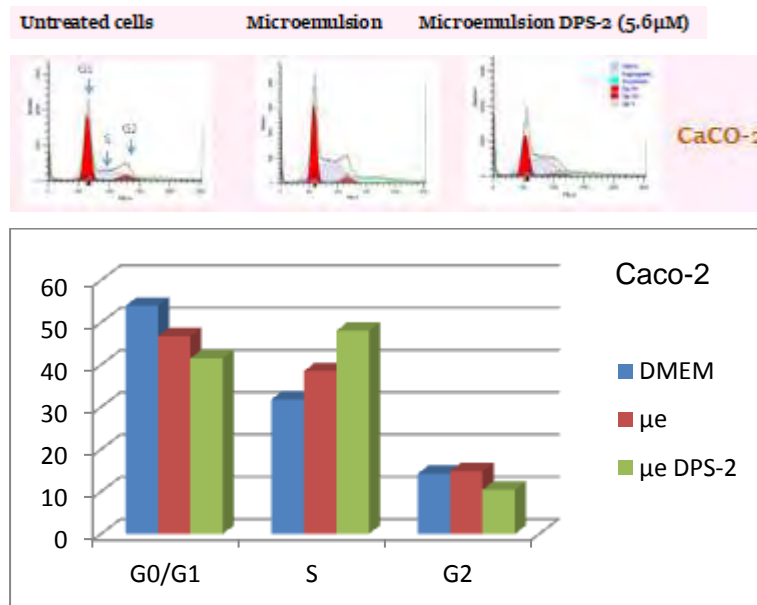
Κυτταρομετρία ροής

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κυτταρικού κύκλου και στις τρεις κυτταρικές σειρές με κυτταρομετρία ροής. Έπειτα από χρώση των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο, το οποίο βάφει το DNA, αναλύθηκε η ποσότητα του γενετικού υλικού που έφεραν τα κύτταρα. Προκύπτει, έτσι, ένα ιστόγραμμα όπου διακρίνονται 3 τιμές φθορισμού. Μία ελάχιστη τιμή που αντιστοιχεί στα κύτταρα της φάσης G0/G1 που έχουν και τη μικρότερη ποσότητα DNA, μία μέγιστη τιμή που αντιστοιχεί στα κύτταρα των φάσεων G2/M που έχουν τη μεγαλύτερη ποσότητα DNA (οι δύο αυτές φάσεις δεν μπορούν να διακριθούν γιατί στα κύτταρα και των δύο η ποσότητα του DNA είναι ίδια), και ενδιάμεσες τιμές που αντιστοιχούν στα κύτταρα της φάσης S στα οποία έχει ξεκινήσει ο διπλασιασμός του DNA.

Ένα χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι ο θρυμματισμός του DNA, ο οποίος οδηγεί σε μείωση του γενετικού υλικού όταν τα κύτταρα είναι διαπερατά. Για παράδειγμα διαπερατά κύτταρα, ύστερα από επίδραση με 70% αιθανόλη, χάνουν θρυμματισμένα τμήματα DNA 182 bp, καθώς εξέρχονται από το κύτταρο. Αν τα κύτταρα 'βαφτούν' με ιωδιούχο προπίδιο και αναλυθούν σε συσκευή κυτταρομετρίας ροής, τότε τα αποπτωτικά κύτταρα θα αντιπροσωπεύονται από τη μέτρηση που εμφανίζεται αριστερά από την G0/G1 κορυφή στο διάγραμμα της συσκευής. Παρόλα αυτά για να βρεθεί ένα αποπτωτικό κύτταρο στην Sub-G1 περιοχή πρέπει να έχει

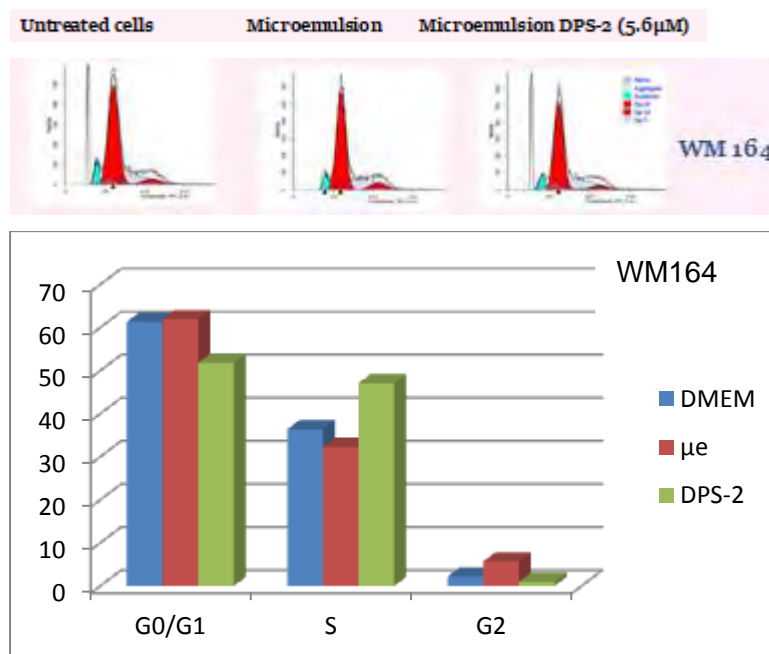
χάσει αρκετή ποσότητα DNA. Έτσι αν ένα κύτταρο μπει σε απόπτωση κατά την S ή G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου, δεν θα εμφανίζεται στην Sub-G1 κορυφή.

Για κάθε κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί πληθυσμοί κυττάρων, που επώαστηκαν με το μικρογαλάκτωμα με ενθυλακωμένη τη δραστική ουσία, με άδειο μικρογαλάκτωμα καθώς και πληθυσμοί-μάρτυρες που επώαστηκαν μόνο με θρεπτικό μέσο DMEM.



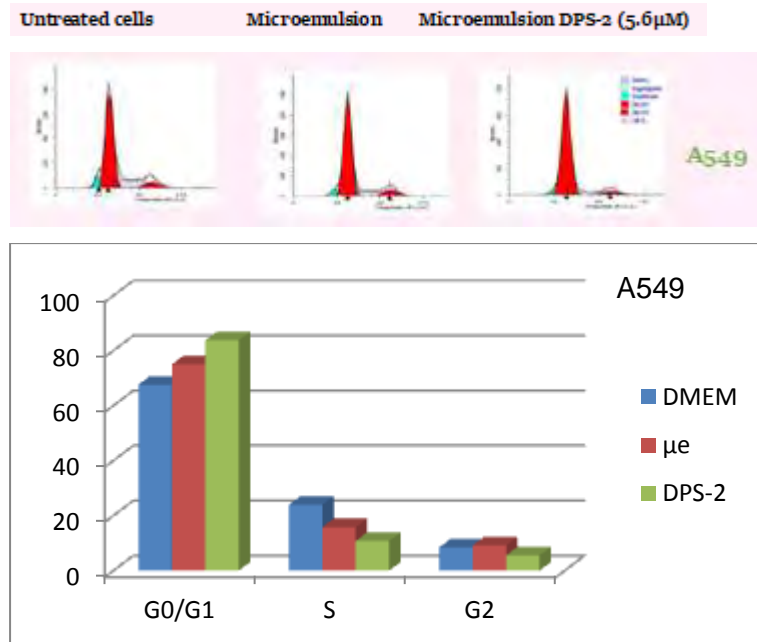
Διάγραμμα 3.4

Στα ιστογράμματα απεικονίζονται τα ποσοστά των κυττάρων CaCo-2 του κάθε πληθυσμού (επώαση με μικρογαλάκτωμα με DPS2, επώαση με 'άδειο' μικρογαλάκτωμα, επώαση με θρεπτικό DMEM) ανάλογα με την ποσότητα DNA που φέρουν (άρα και τη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκονται) μετά από επώαση 72 ωρών. Πάνω απεικονίζεται η ανάλυση της συσκευής της κυτταρομετρίας ροής (Theohari et al., 2017, *Nano bio&med* 2017).



Διάγραμμα 3.5

Στα ιστογράμματα απεικονίζονται τα ποσοστά των κυττάρων WM164 του κάθε πληθυσμού (επώαση με μικρογαλάκτωμα με DPS2, επώαση με 'άδειο' μικρογαλάκτωμα, επώαση με θρεπτικό DMEM) ανάλογα με την ποσότητα DNA που φέρουν (άρα και τη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκονται) μετά από επώαση 72 ωρών. Πάνω απεικονίζεται η ανάλυση της συσκευής της κυτταρομετρίας ροής (Theohari et al., 2017, *Nano bio&med* 2017).



Διάγραμμα 3.6

Στα ιστογράμματα απεικονίζονται τα ποσοστά των κυττάρων A549 του κάθε πληθυσμού (επώαση με μικρογαλάκτωμα με DPS2, επώαση με 'άδειο' μικρογαλάκτωμα, επώαση με θρεπτικό DMEM) ανάλογα με την ποσότητα DNA που φέρουν (άρα και τη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκονται) μετά από επώαση 72 ωρών. Πάνω απεικονίζεται η ανάλυση της συσκευής κυτταρομετρίας ροής (Theohari *et al.*, 2017, *Nano bio&med* 2017)

Η ανάλυση κυτταρομετρίας ροής κατέδειξε ότι η DPS-2 δεν επάγει αποπτωτικό θάνατο. Στην κυτταρική σειρά A549 (p53^{wt}) που είναι και η μόνη που φέρει λειτουργικό p53, παρατηρήθηκε αύξηση του κλάσματος των κυττάρων στη φάση G1 μετά τη χορήγηση DPS-2. Αντίθετα, στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και WM164 αυξάνεται σημαντικά το κλάσμα των κυττάρων στη φάση S μετά τη χορήγηση DPS-2, πράγμα που παραπέμπει σε κυτταροτοξική δράση μέσω εμπλοκής στον αναδιπλασιασμό του DNA. Η απουσία απόπτωσης καθώς και η καθυστέρηση στην S φάση διερευνήθηκαν περαιτέρω σε μοριακό επίπεδο στις δυο παραπάνω κυτταρικές σειρές με ανοσοαποτύπωση κατά Western αντίστοιχων μοριακών δεικτών.

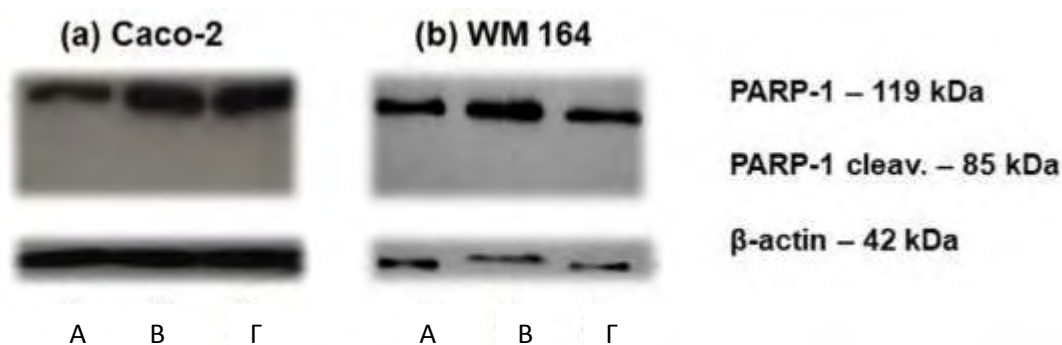
Western blotting

Παρασκευάστηκε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου 10%, όπου τοποθετήθηκαν τα δείγματα ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες σύμφωνα με το

μοριακό τους βάρος. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπου έγινε επώαση με τα αντισώματα ώστε να γίνει ανίχνευση των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν. Τέλος γίνεται αποτύπωση, των πρωτεϊνών που ανιχνεύτηκαν, σε φίλμ. Η εμφάνιση ζώνης δηλώνει την παρουσία της πρωτεΐνης που ανιχνεύσαμε και η ένταση της, τον βαθμό έκφρασης της στα κύτταρα. Εκτός από τα αντισώματα των μορίων που μας ενδιαφέρουν, χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρας μοριακού βάρους 7-175 kDa και αντίσωμα β-ακτίνης ως εσωτερικός μάρτυρας αναφοράς για ποσοτικοποίηση της έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την πρωτεΐνη PARP, η οποία εμφανίζεται σε μέγεθος 116 kDa. Η ενζυμική ενεργότητα της PARP1 αυξάνεται σε μη αποπτωτικά κύτταρα ύστερα από βλάβη στο DNA, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση της φυσιολογικής απόκρισης του κυττάρου στην επιδιόρθωση των θραύσεων δίκλωνης αλυσίδας (double strand breaks). Πρωτεολύεται σε θραύσματα των 85 kDa και 25 kDa από τις κασπάσες κατά την ενεργοποίηση της απόπτωσης. Έτσι χωρίζεται στο αμινοτελικό άκρο που είναι υπεύθυνο για την πρόσδεσή της στο DNA και στο καρβοξυτελικό άκρο που περιλαμβάνει την καταλυτική της περιοχή, με αποτέλεσμα την παύση της λειτουργίας της. Η πρωτεόλυση της PARP1 από την κασπάση 3 είναι πρώιμος δείκτης απόπτωσης και άρα η ανίχνευση του πρωτεολυτικού θραύσματος 85 kDa υποδηλώνει αποπτωτικό θάνατο.

Στην Εικόνα 3.7 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western ως προς την πρωτεόλυση της PARP1 στις παραπάνω κυτταρικές σειρές. Επιβεβαιώθηκε η απουσία απόπτωσης δεδομένου ότι σε καμία περίπτωση δεν ανιχνεύεται πρωτεολυτικό θραύσμα της PARP1.

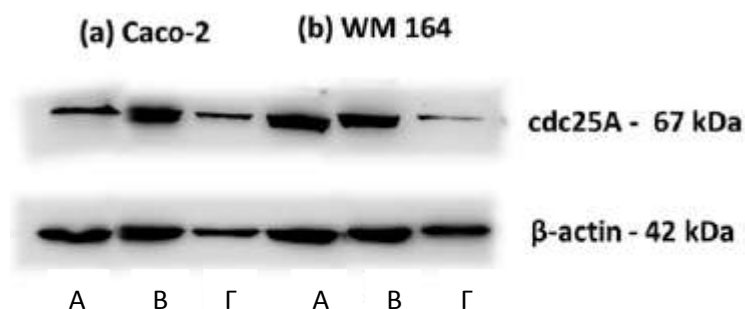


Εικόνα 3.7 Ανοσοαποτύπωση της PARP-1 (119 kDa) και του κομματιού της, PARP-1 cleavage (85 kDa) για την κυτταρική σειρά (a) Caco-2 και (b) WM164 μετά από

επώαση 72 ωρών με: Α. DMEM, Β. άδειο μικρογαλάκτωμα, Γ. μικρογαλάκτωμα με DPS-2.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν η έκφραση της *cdc25A* της οποίας η αποδόμηση είναι δείκτης καθυστέρησης στην S φάση και ανασχεσης του πολλαπλασιασμού του DNA (Theochari et al., Biomimetics) Η *cdc25A* παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S και από την φάση G2 στη φάση της μίτωσης (Malumbres M, 2001).

Στην Εικόνα 3.8 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western ως προς την αποδόμηση της *cdc25A*. Παρατηρήθηκε αποδόμηση της *cdc25A* στα κύτταρα που επώαστηκαν με DPS-2, πράγμα που ενισχύει την υπόθεση ότι η DPS-2 ασκεί την κυτταροτοξική της δράση μέσω ανασχεσης του διπλασιασμού του DNA.



Εικόνα 3.8 Ανοσοαποτύπωση της *cdc25A* (67 kDa) για την κυτταρική σειρά (a) Caco-2 και (b) WM164 μετά από επώαση 72 ωρών με: Α. DMEM, Β. άδειο μικρογαλάκτωμα, Γ. μικρογαλάκτωμα με DPS-2.

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε, *in vitro*, η δράση της ένωσης DPS-2, συνθετικού αναλόγου του βενζοθειοφαινίου, μετά από ενθυλάκωσή της σε μικρογαλακτώματα σε τρεις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η DPS-2, ένωση που έχει συντεθεί στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του ΕΙΕ, έχει αποδειχθεί ισχυρά κυτταροτοξική σε πλήθος καρκινικών κυτταρικών σειρών μέχρι στιγμής (Goulielmaki et al, Translational Oncology 2019/ Theochari et al. 2017). Στόχος της εργασίας ήταν να αποτιμηθεί αρχικά *in vitro* η βιολογική δράση της ένωσης στο πλαίσιο της ενδεχόμενης αξιοποίησής της στην αντικαρκινική θεραπεία με χρήση γαλακτωμάτων ως μέσων διασποράς. Η πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε αποτελεί το πρώτο βήμα στην πορεία αξιολόγησης μιας ένωσης που έχει σχεδιαστεί αρχικά για φαρμακευτική δράση. Εφόσον μια τέτοια ένωση αποδειχθεί δραστική *in vitro*, ακολουθεί *in vivo* βιολογική αποτίμηση σε πειραματόζωα (προ-κλινικές μελέτες) και τελικά κλινικές μελέτες πριν αποδοθεί προς εμπορική αξιοποίηση στη φαρμακοβιομηχανία. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα διερευνήθηκε επιπροσθέτως η σκοπιμότητα της χρήσης μικρογαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (o/w) ως βιοσυμβατών φορέων χορήγησης σε μια προσπάθεια στόχευσης και βελτιστοποίησης της αντικαρκινικής θεραπείας (Theochari et al. 2017,2018). Οι νανομεταφορείς εν γένει αντιπροσωπεύουν μια αναδυόμενη προσέγγιση στην παροχή φαρμάκων και τη θεραπεία ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, οι μολυσματικές ασθένειες, οι καρδιαγγειακές διαταραχές και οι νευρολογικές παθολογικές καταστάσεις. Κατά τη διάρκεια των πέντε τελευταίων χρόνων, ερευνητές έχουν δημοσιεύσει υποσχόμενα αποτελέσματα για την ανάπτυξη φαρμακευτικά αποδεκτών μικρογαλακτωμάτων (o/w) ως μεταφορείς λιπόφιλων φαρμάκων για τοπική ή από το στόμα χορήγηση. Συγκεκριμένα, η εκλεκτική μεταφορά χημειοθεραπευτικών σε καρκινικά κύτταρα, ένα βασικό θέμα στην αντικαρκινική έρευνα παγκοσμίως, απαιτεί την ανάπτυξη αποτελεσματικών βιοσυμβατών νανοφορέων όπως τα μικρογαλακτώματα (Callender et al, 2017) (Qi, J. Et al., 2011).

Όσο σημαντικός είναι ο σχεδιασμός ενός νανομεταφορέα από φυσικοχημική άποψη, άλλο τόσο σημαντική είναι και η κατανόηση των μηχανισμών που πυροδοτεί η είσοδος μιας δραστικής ουσίας στο κύτταρο. Τόσο ο φυσικοχημικός σχεδιασμός του μικρογαλακτώματος όσο και ο σχεδιασμός των τεχνικών που πραγματοποιούνται για τη μελέτη της δράσης του ενθυλακωμένου μικρογαλακτώματος αποτελούν παραμέτρους-κλειδιά για την επιτυχία

προκαταρκτικών αποτελεσμάτων. Η χρήση τεχνικών με επαναληψιμότητα και συσχέτιση αποτελεσμάτων με άλλες είναι σημαντικοί παράγοντες ώστε να οδηγηθεί κανείς σε ασφαλή συμπεράσματα. Επομένως, οι μεθοδολογικές προσεγγίσεις που εφαρμόστηκαν ήταν οι ακόλουθες: (α) συνεστιακή μικροσκοπία προκειμένου να διερευνηθεί εάν το βιοσυμβατό μικρογαλάκτωμα εισέρχεται επιτυχώς στα κύτταρα των τριών διαφορετικών καρκινικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν και αποδίδει την ενθουλακωμένη ένωση στο εσωτερικό τους, (β) μελέτη της επίδρασης του μικρογαλακτώματος άδειου αλλά και με ενθουλακωμένη την ένωση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της μεθόδου MTT, (γ) ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής και (δ) ανοσοαποτύπωση κατά Western πρωτεϊνών-δεικτών κυτταροτοξικότητας.

Ως εκ τούτου, μετά τον χαρακτηρισμό της δομής, το μικρογαλάκτωμα, τόσο άδειο όσο και με DPS-2 ενθουλακωμένο, υποβλήθηκε σε *in vitro* βιολογική αξιολόγηση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές εντερικού και πνευμονικού επιθηλίου (Caco-2, A549) καθώς και μελανώματος (WM164). Η κυτταρική σειρά A549 είναι η μόνη που διαθέτει λειτουργική p53 και χρησιμοποιήθηκε παράλληλα για λόγους σύγκρισης. Διερευνήθηκε περαιτέρω ο μηχανισμός κυτταροτοξικότητας απουσία λειτουργικής p53 στην MW164 κυτταρική σειρά μελανώματος και στην Caco-2 κυτταρική σειρά ανθρώπινου επιθηλιακού ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος. Η επιλογή αυτών των κυτταρικών σειρών δικαιολογείται από την χρήση μικρογαλακτωμάτων για διαδερμική και από το στόμα χορήγηση (Callender et al., 2017) (Kogan et al., 2006) (Erdal et al., 2016) (Chen et al., 2018).

Μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας αποδείχτηκε ότι ο ελαιώδης πυρήνας των έλαιο-σε νερό (o/w) βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων, που αναπτύχθηκαν, είναι αποτελεσματικός μεταφορέας λιπόφιλων μορίων στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Επιπροσθέτως, η ενθουλακωμένη σε συγκέντρωση 5.6 μM δραστική ουσία DPS-2, ανέστειλε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των MW164 και των Caco-2 κυτάρων στη δοκιμή κυτταρικής βιωσιμότητας. Παρόλο που το άδειο μικρογαλάκτωμα φάνηκε να αναστέλει παροδικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η διαδικασία επανήλθε στα αναμενόμενα επίπεδα μετά από 48 ώρες (Διάγραμμα 3.3), δείχνοντας αποκατάσταση του ρυθμού πολλαπλασιασμού μετά από παροδική ανασχεση (Bartek, J. et al., 2004). Στην κυτταρική σειρά MW164, η κυτταροτοξική επίδραση του DPS-2, εμφανίστηκε νωρίτερα (Διάγραμμα 3.3), αντικατοπτρίζοντας τη διαφορά των κυτταρικών σειρών στους χρόνους επώασης (48 ώρες της MW 164 έναντι 72 ώρες της Caco-2). Και στις δύο κυτταρικές σειρές, η κυτταροτοξική

επίδραση ήταν σημαντική στις 72 ώρες επώασης. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την κυτταροτοξική δυναμική της ένωσης που παρατηρείται όταν αυτή χορηγηθεί με το συμβατικό τρόπο μέσω του οργανικού διαλύτη (DMSO) (Theochari et al., 2017).

Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου, διαπιστώθηκε ότι η DPS-2 προκάλεσε καθυστέρηση της S φάσης 48 ώρες μετά την χορήγηση (Διάγραμμα 3.4-3.6), ενώ ανιχνεύθηκε αποικοδόμηση της cdc25A μέσω του Western blotting στις 72 ώρες και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.8). Φαίνεται ότι η DPS-2 είναι ένας εν δυνάμει κυτταροτοξικός παράγοντας, ικανός να καθυστερεί την αντιγραφή στην ξεδιπλωμένη φουρκέτα του DNA, ενεργοποιώντας το σημείο ελέγχου αντιγραφής της S φάσης, το οποίο είναι ανεξάρτητο του p53 (Bartek et al., 2004). Καθώς οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη είναι p53^{null}, για να ερευνηθεί ο ρόλος της λειτουργικής p53 στο μηχανισμό δράσης της DPS-2, χρησιμοποιήθηκε η σειρά A549 (p53^{wt}) κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες ώστε να γίνει η σύγκριση. Η DPS-2 οδήγησε σε στάση στην φάση G1 μετά από 72 ώρες επώασης. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε μόνο μία μικρή αύξηση κυτταροτοξικότητας στο ίδιο σημείο, καθώς η λειτουργική p53 φαίνεται να υποστηρίζει τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA, προστατεύοντας την ακεραιότητα του DNA και προλαμβάνοντας την πρόκληση βλαβών (Klusmann, I., 2016).

Συμπερασματικά, στο πλαίσιο αυτής της μελέτης καταδείχτηκε η βιοσυμβατότητα των μικρογαλακτωμάτων ο/w που είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί και χαρακτηριστεί, καθώς και η δυνατότητά τους να ενθυλακώνουν και να αποδίδουν αποτελεσματικά στο εσωτερικό του κυτάρου δραστικές ενώσεις. Ειδικότερα, η ένωση DPS-2 που ενθυλακώθηκε σε κατάλληλες συγκεντρώσεις απεδείχθη ισχυρά κυτταροτοξική όταν χορηγείται μέσω των μικρογαλακτωμάτων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές εντερικού επιθηλίου και μελανώματος που στερούνται λειτουργικής p53. Η DPS-2 ασκεί την κυτταροτοξική της δράση μέσω παρεμπόδισης της φάσης S του κυτταρικού κύκλου και άρα της αντιγραφής του DNA, προκαλώντας τελικά νέκρωση. Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για την *in vitro* βιολογική αποτίμηση αποδείχτηκε κατάλληλη για τη μελέτη και αξιολόγηση ανάλογων ο/w νανοδιασπορών ως φορέων βιοδραστικών, εν δυνάμει αντικαρκινικών, λιπόφιλων ενώσεων που μπορούν να ενθυλακώσουν κατάλληλες, κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Η μελέτη συνεχίζεται με στόχο την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της DPS-2 αλλά και την *in vivo* βιολογική αποτίμηση της δράσης της σε κατάλληλους ιστούς-στόχους, στην προοπτική αξιοποίησης της ένωσης και των συγκεκριμένων νανοφορέων στην αντικαρκινική θεραπεία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adnan Azeem, Mohammad Rizwan, Farhan J. Ahmad, Zeenat I. Khan, Roop K. Khar, Mohammed Aqil and Sushama Talegaonkar. Emerging Role of Microemulsions in Cosmetics. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 2008, 2, 275-289.
- Agostinis P, Buytaert E, Breyskens H, Hendrickx N (2004) Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 721–729.
- Amelio I, Melino G, Knight RA (2011) Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 277-281.
- Ashish D. Gathave, Jyotsna T. Waghmare. A SHORT REVIEW ON MICROEMULSION AND ITS APPLICATION IN EXTRACTION OF VEGETABLE OIL, *IJRET*, volume: 03 Issue: 09 Sep-2014
- Barenholz, Y. (2012) Doxil1 – the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J. Control. Release* 160, 117–134
- Bartek, J.; Lukas, C.; Lukas, J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 5, 792–804.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 29–41. doi:10.1016/j.cis.2003.10.013
- Bera, D., Lahiri, D., & Nag, A. (2006). Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. *Journal of Food Engineering*, 74(4), 542–545. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.03.042
- Blanco, E. et al. (2015) Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* 33, 941–951
- Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. Cdc25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat. Rev. Cancer.* 2007;7:495–507.
- Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, Wettig SD. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *Int J Pharm.* 2017;526(1- 2):425-442. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.005
- Chen, X.Q.; Ziemba, T.; Huang, C.; Chang, M.; Xu, C.; Qiao, J.X.; Wang, T.C.; Finlay, H.J.; Salvati, M.E.; Adam, L.P.; et al. Oral delivery of highly

lipophilic, poorly water-soluble drugs: Self-emulsifying drug delivery systems to improve oral absorption and enable high dose toxicology studies of a cholesteryl ester transfer protein inhibitor in preclinical species. *J. Pharm. Sci.* 2018, 107, 1352–1360.

- Collins, K., Jacks, T., & Pavletich, N. P. (1997). *The cell cycle and cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 2776–2778. doi:10.1073/pnas.94.7.2776
- D. J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*, CRC Press, Boca Raton, 2005.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N et al. (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 1,112–119.
- Diamantis, N. and Banerji, U. (2016) Antibody-drug conjugates –an emerging class of cancer treatment. *Br. J. Cancer* 114, 362–367
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A (2009) Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* 16, 966–975.
- Ennio Tasciotti, Fernando J. Cabrera, Michael Evangelopoulos, Jonathan O. Martinez, Usha R. Thekkedath, Malgorzata Kloc, Rafik M. Ghobrial, Xian C. Li, Alessandro Grattoni, and Mauro Ferrari. The emerging role of nanotechnology in cell and organ transplantation. *Transplantation*. 2016 Aug; 100(8): 1629–1638.
- Erdal, M.S.; Özhan, G.; Mat, M.C.; Özsoy, Y.; Güngör, S. Colloidal nanocarriers for the enhanced cutaneous delivery of naftifine: Characterization studies and in vitro and in vivo evaluations. *Int. J. Nanomed.* 2016, 11, 1027–1037.
- Eum KH, Lee M (2011) Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-rastransformed fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 348, 61–68.
- Fanun M. Microemulsions as delivery systems. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2012;17(5):306-313. doi:10.1016/j.cocis.2012.06.001
- Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano.* 2009;3(1):16-20. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nn900002m>.
- Galluzzi L, Kroemer G (2008) Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 135, 1161–1163.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA (2005) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Cancer J. Clin.* 55, 178–194.

- Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32, 37–43.
- Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S et al. (2005) The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J. Cell Sci.* 118, 3091–3102.
- Goulielmaki, M., Assimomytis, N., Rozanc, J., Taki, E., Christodoulou, I., Alexopoulos, L. G., Zoumpourlis V., Pintzas A., Papahatjis, D. (2019). DPS-2: A Novel Dual MEK/ERK and PI3K/AKT Pathway Inhibitor with Powerful Ex Vivo and In Vivo Anticancer Properties. *Translational Oncology*, 12(7), 932–950.
- Gradishar, W.J. (2006) Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin. Pharmacother.* 7, 1041–1053
- Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. *Soft Matter.* 2016;12(11):2826-2841
- Gupta S, Moulik SP. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. *J Pharm Sci.* 2008;97(1):22-45. doi:10.1002/jps.21177
- Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C. M., & Nolla, J. (2008). Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 245–251.
- Hamid Zahednasab, Nanocarriers Usage for Drug Delivery in Cancer Therapy - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Different-Types-of-Nanocarriers-Have-Used-for-Drug-Delivery_fig1_301509565 [accessed 27 Aug, 2019]
- Han W, Xie J, Li L, Liu Z, Hu X (2009) Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis. *Apoptosis* 14, 674–686.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93.
- Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2006). Peptides and proteins in edible oils: Stability, allergenicity, and new processing trends. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 56–63. doi:10.1016/j.tifs.2005.10.006
- Hidalgo, F. J., Alaiz, M., & Zamora, R. (2001). Determination of Peptides and Proteins in Fats and Oils. *Analytical Chemistry*, 73(3), 698–702. doi:10.1021/ac000876o
- Huett A, Goel G, Xavier RJ (2010) A systems biology viewpoint on autophagy in health and disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 302–309.

- Ioanna Theochari, Aristotelis Xenakis, Vassiliki Papadimitriou, Nanocarriers for effective drug delivery, 2017
- Ioanna Theochari, Maria Goulielmaki, Dganit Danino, Vassiliki Papadimitriou, Alexandros Pintzas, Aristotelis Xenakis. Drug nanocarriers for cancer chemotherapy based on microemulsions: The case of Vemurafenib analog PLX4720, 2017 *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 154 (2017) 350–356
- Ioanna Theochari, Vassiliki Papadimitriou, Demetris Papahatjis, Nikos Assimomytis, Efthimia Pappou, Harris Pratsinis, Aristotelis Xenakis and Vasiliki Pletsa. Oil-In-Water Microemulsions as Hosts for Benzothioephene-Based Cytotoxic Compounds: An Effective Combination, *Biomimetics* 2018, 3, 13
- Ioanna Theoxari, Oil-in-water microemulsions as carriers of novel cytotoxic compounds – Applications in chemotherapeutics, nano bio&med 2017
- Jiang, W. et al. (2004) Semiconductor quantum dots as contrast agents for whole animal imaging. *Trends Biotechnol.* 22, 607–609
- John Flanagan, Harjinder Singh. Microemulsions: A Potential Delivery System for Bioactives in Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:221–237 (2006)
- Jokerst, J.V. et al. (2011) Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 6, 715–728
- Kapadia, C.H. et al. (2015) Nanoparticulate immunotherapy for cancer. *J. Control. Release* 219, 167–180
- Kalaitzaki, A., Papanikolaou, N. E., Karamaouna, F., Dourtoglou, V., Xenakis, A., & Papadimitriou, V. (2015). Biocompatible Colloidal Dispersions as Potential Formulations of Natural Pyrethrins: A Structural and Efficacy Study. *Langmuir*, 31(21), 5722–5730.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Klusmann, I.; Rodewald, S.; Müller, L.; Friedrich, M.; Wienken, M.; Li, Y.; Schulz-Heddergott, R.; Dobbstein, M. p53 activity results in DNA replication fork processivity. *Cell Rep.* 2016, 17, 1845–1857.
- Kogan, A.; Garti, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2006, 123, 369–385.
- Kundu M, Thompson CB (2008) Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 427–455.

- L. Ouyang, Z. Shi, S. Zhao, F.-T. Wang, T.-T. Zhou, B. Liu and J.-K. Bao, Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Prolif.*, 2012, 45, 487–498
- Laubenbacher R, Hower V, Jarrah A, Torti SV, Shulaev V, Mendes P et al. (2009) A systems biology view of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1796, 129–139.
- Leisser C, Rosenberger G, Maier S, Fuhrmann G, Grusch M, Strasser S, Huettnerbrenner S, Fassel S, Polgar D, Krieger S, Cerni C, Hofer-Warbinek R, deMartin R, Krupitza G. Subcellular localisation of Cdc25A determines cell fate. *Cell Death Differ.* 2004;11:80–89.
- Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2,589–598.
- Li, Y., Yokoyama, W., Xu, S., Zhu, S., Ma, J., & Zhong, F. (2017). Formation and stability of W/O microemulsion formed by food grade ingredients and its oral delivery of insulin in mice. *Journal of Functional Foods*, 30, 134–141.
- Liu B, Cheng Y, Liu Q, Bao JK, Yang JM (2010) Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 1154–1164.
- Liu JJ, Lin M, Yu JY, Liu B, Bao JK (2011) Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett.* 300, 105–114.
- Maeda, H. et al. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release* 65, 271–284
- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2001;1:222–231.
- Maria Sofia Falzarano, Cristina Flesia, Roberta Cavalli, Caterina Guiot, and Alessandra Ferlini. Nanodiagnostics and Nanodelivery Applications in Genetic Alterations. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24, 1717-1726
- Martin SJ, Green DR (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82, 349–352.
- McCall K (2010) Genetic control of necrosis – another type of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 882–888.
- McClements DJ, Rao J. Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2011;51(4):285-330
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719–1729. doi:10.1039/c2sm06903b
- Mensink RP, Katan MB. (1992) Effect of dietary fatty acids on serum

lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb.* 1992 Aug;12(8):911-9.

- Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science.* 2011;1:1806-1815
- Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K (2008) Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ. Res.* 103, 343–351.
- Owens, D.E., 3rd and Peppas, N.A. (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93–102
- Qi, J.; Zhuang, J.; Wu, W.; Lu, Y.; Song, Y.; Zhang, Z.; Jia, J.; Ping, Q. Enhanced effect and mechanism of water-in-oil microemulsion as an oral delivery system of hydroxysafflor yellow A. *Int. J. Nanomed.* 2011, 6, 985–991.
- Ravi TPU, Padma T. Nanoemulsions for drug delivery through different routes. *Res Biotechnol.* 2011;2(3):1-13
- Rijkers GT, de Vos WM, Brummer RJ, Morelli L, Corthier G, Marteau P. Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing. *The British Journal of Nutrition.* 2011;106(9):1291-1296
- Rodriguez, P.L. et al. (2013) Minimal 'self' peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles. *Science* 339, 971–975
- Sabine Schetzberg, Progress and first milestones in formulating food-grade microemulsions 2011
- Samer Tohme, Richard L Simmons, and Allan Tsung. Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases, *Cancer Res.* 2017 Apr 1; 77(7): 1548–1552.
- Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(1):39-50. doi:10.1038/nrc3180
- Sengupta, P. et al. (2012) Cholesterol-tethered platinum II-based supramolecular nanoparticle increases antitumor efficacy and reduces nephrotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11294–11299
- Sengupta, S. (2017). Cancer Nanomedicine: Lessons for Immuno-Oncology. *Trends in Cancer*, 3(8), 551–560. doi:10.1016/j.trecan.2017.06.006
- Shabir Hassan, Gyan Prakash, Ayca Bal Ozturk, Saghi Saghadzadeh, Muhammad Farhan Sohail, Jungmok Seo, Mehmet Remzi Dokmeci, Yu Shrike Zhang, Ali Khademhosseini, Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials, *Nano Today* 15 (2017) 91–106
- Shao, K. et al. (2015) Nanoparticle-based immunotherapy for cancer. *ACS Nano* 9, 16–30

- Shiladitya Sengupta, *Cancer Nanomedicine: Lessons for Immuno-Oncology*, Trends in Cancer, August 2017, Vol. 3, No. 8
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. doi:10.3322/caac.21551
- Stefanick, J.F. et al. (2013) Enhanced cellular uptake of peptide-targeted nanoparticles through increased peptide hydrophilicity and optimized ethylene glycol peptide-linker length. *ACS Nano* 7, 8115–8127
- T. G. Mason, J. N. Wilking, K. Meleson, C. B. Chang and S. M. Graves, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2006, 18, R635–R666.
- T. Tadros, R. Izquierdo, J. Esquena and C. Solans, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2004, 108–109, 303–318
- Tan ML, Ooi JP, Ismail N, Moad AI, Muhammad TS (2009) Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharmacol. Res.* 26, 1547–1560.
- Teicher, B.A. and Chari, R.V. (2011) Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clin. Cancer Res.* 17, 6389–6397
- Theochari, I.; Goulielmaki, M.; Danino, D.; Papadimitriou, V.; Pintzas, A.; Xenakis, A. Drug nanocarriers for cancer chemotherapy based on microemulsions: The case of Vemurafenib analog PLX4720. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2017, 154, 350–356.
- Wang L, Li X, Zhang G, Dong J, Eastoe J. Oil in water nano-emulsions for pesticide formulations. *Journal of Colloid and Interface Science* 2007;314:230–5. Specific self nano-emulsifying formulation proposed for its utilization as pesticide.
- Wang SY, Yu QJ, Zhang RD, Liu B (2011) Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1263–1266
- White E (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 12, 401–410.
- Wilhelm, S. (2016) Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Rev. Mat.* 1, 16014
- Wu W, Liu P, Li J (2012) Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 82, 249–258.
- Xu, Z., Jin, J., Zheng, M., Zheng, Y., Xu, X., Liu, Y., & Wang, X. (2016). Co-surfactant free microemulsions: Preparation, characterization and stability evaluation for food application. *Food Chemistry*, 204, 194–200.

- Yingchoncharoen, P. et al. (2016) Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come. *Pharmacol. Rev.* 68, 701–787
- Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB (2004) Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 18, 1272–1282.
- Βιολογία Κυττάρου 4^η έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
- Βιολογία-Η μελέτη της ζωής Β' έκδοση, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΑΘ. ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ.