

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΙΓΜΑ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ
ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΕΞΥΠΝΩΝ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ Α. ΣΕΡΕΤΗ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**



ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ | Νικόλαος Σακελλαρίδης

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Ευαγγελία Α. Σερέτη | Βιολόγος, M.Sc.

**ΣΙΓΜΑ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ
ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΕΞΥΠΝΩΝ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ**

**SIGMA RECEPTORS: STUDY OF THEIR ROLE IN CANCER
AND THE DEVELOPMENT OF NOVEL TARGETED
ANTICANCER THERAPIES**

Υποβλήθηκε για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων
για την απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα | 2019

© 2019 ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Ευαγγελία Α. Σερέτη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Ευαγγελία Α. Σερέτη

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρηματοδοτήθηκε μέσω του προγράμματος «ΑΡΙΣΤΕΙΑ» με τίτλο «SYNTHESIS OF MULTIFUNCTIONAL AMPHIPHILIC HYBRID POLYPEPTIDES THAT FORM SMART DRUG AND GENE DELIVERY NANOCONSTRUCTS AGAINST PANCREATIC CANCER».



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Δεμέτζος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Φαρμακευτικής Τεχνολογίας | Τμήμα Φαρμακευτικής | Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

2. Δήμας Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας | Τμήμα Ιατρικής | Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Ζαχαρούλης Δημήτρης

Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής | Τμήμα Ιατρικής | Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4. Ιατρού Ερμόλαος

Καθηγητής Βιομηχανικής Χημείας | Τμήμα Χημείας | Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

5. Πιτσίκας Νικόλαος

Καθηγητής Φαρμακολογίας | Τμήμα Ιατρικής | Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6. Πουλτσίδα Αντιγόνη

Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Χειρουργικής | Τμήμα Ιατρικής | Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7. Σακελλαρίδης Νικόλαος

Καθηγητής Φαρμακολογίας | Τμήμα Ιατρικής | Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**ΤΙΤΛΟΣ | ΣΙΓΜΑ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ
ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΕΞΥΠΝΩΝ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Ευαγγελία Α. Σερέτη | Βιολόγος

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας | Τμήμα Ιατρικής | 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Δήμας Κωνσταντίνος | Επιβλέπων καθηγητής**
Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας | Τμήμα Ιατρικής | Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2. Σακελλαρίδης Νικόλαος | Διευθυντής Εργαστηρίου Φαρμακολογίας**
Καθηγητής Φαρμακολογίας | Τμήμα Ιατρικής | Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3. Ιατρού Ερμόλαος**
Καθηγητής Βιομηχανικής Χημείας | Τμήμα Χημείας | Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, Δρ. Κωνσταντίνου Δήμα.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στο δάσκαλό μου, επιβλέποντα της Διδακτορικής μου Διατριβής, Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας Δρ. Κωνσταντίνο Δήμα. Η αμέριστη υποστήριξή του, η καθοδήγησή του και η εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου υπήρξαν για μένα πραγματικά πολύτιμα εφόδια. Χωρίς τη δική του ουσιαστική συνεισφορά και στήριξη, σε όλα τα επίπεδα, η πορεία μου θα ήταν σίγουρα πολύ διαφορετική. Στο πρόσωπό του είχα την τύχη να βρω πέρα από έναν εξαίρετο επιστήμονα και έναν εξαιρετικό άνθρωπο.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στον Δρ. Νίκο Σακελλαρίδη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας και Καθηγητή Φαρμακολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για το αμείωτο ενδιαφέρον που επέδειξε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Διδακτορικής μου Διατριβής, τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και τον ιδιαίτερα θετικό και αισιόδοξο τρόπο σκέψης που μου μετέδωσε και αποτέλεσε πρόσφορο έδαφος τόσο επιστημονικών όσο και πιο ανθρώπινων συζητήσεων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το τρίτο μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Δρ. Ερμόλαο Ιατρού, Καθηγητή Βιομηχανικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την άρτια συνεργασία μας και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε συμπεριλαμβάνοντας με στην ερευνητική του ομάδα στο πλαίσιο των προγραμμάτων «ΑΡΙΣΤΕΙΑ» και «PANHYDROMED».

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στον Δρ. Κωνσταντίνο Δεμέτσο, Καθηγητή Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς στο Εργαστήριό του πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της λιποσωμιακής μορφής της ουσίας που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή. Τον ευχαριστώ επίσης και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα στο πλαίσιο του προγράμματος «NANOGLIO»

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Δρ. Νικόλαο Πιτσικά, Καθηγητή Φαρμακολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ηθική και ουσιαστική του υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Διδακτορικής μου Διατριβής. Η ευγενική του φυσιογνωμία μου υπενθύμιζε πάντα πως η επιστήμη δεν χρειάζεται να φωνάζει όταν είναι αληθινή.

Ευχαριστίες εκφράζονται επίσης, στον Δρ. Δημήτρη Ζαχαρούλη, Καθηγητή Γενικής Χειρουργικής, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευχάριστη και εύρυθμη συνεργασία μας, καθώς και για την προσφορά δειγμάτων ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο.

Επίσης, ευχαριστώ την Δρ. Αντιγόνη Πουλτσίδη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Χειρουργικής, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την άψογη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που υπήρξε μεταξύ μας, καθώς και για την προσφορά δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη φίλη και εργαστηριακή συνεργάτη Δρ. Χρυσήδα Τσιμπλούλη για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Η καθοδήγηση, η ενθάρρυνσή της και οι γνώσεις της που τόσο πρόθυμα μου μετέδωσε αποτέλεσαν για μένα πολύτιμα στοιχεία που ενισχύθηκαν από το πρόσχαρο και αυθόρμητο του χαρακτήρα της και δημιούργησαν ένα κλίμα συνεργασίας μοναδικό.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω και στον καλό εργαστηριακό συνεργάτη και φίλο Δρ. Νίκο Ναζίρη. Η συνεισφορά του στη σύνθεση της λιποσωματικής μορφής της ουσίας που μελετήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ήταν καταλυτική. Πέρα από αυτό, τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για το φιλικό μεταξύ μας κλίμα, το οποίο αποτελούσε πάντα μια ευχάριστη ανάπαυλα.

Ευχαριστίες εκφράζονται επίσης σε όλους τους συνεργάτες που με τον τρόπο τους συντέλεσαν στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Συγκεκριμένα, για τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας ευχαριστώ την Dr. Elif ilkay İkitimur Armutak, Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου της Κων/πολης, την Ayca Uvez, συνεργάτη στο Τμήμα Ιστολογίας και Εμβρυολογίας του Πανεπιστημίου της Κων/πολης και την παθολογοανατόμο Δρ. Κ. Παπαπαρασκευά του Κωνσταντοπούλειου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών. Για τα πειράματα τοξικότητας σε ζωικό μοντέλο Zebrafish ευχαριστώ τη Dr. Milica Pesic του Τμήματος Νευροβιολογίας (IBISS), του Πανεπιστημίου του Βελιγραδίου, τη Dr. Jelena Dinic, του Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών «Siniša Stanković» του Βελιγραδίου και τη Dr. Aleksandra Divac Rankov, του Ινστιτούτου Μοριακής Γενετικής και Γενετικής Μηχανικής του Βελιγραδίου. Για τη φιλοξενία στο εργαστήριο Βιοχημείας, της Ιατρικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Istinye της Κων/πολης στο πλαίσιο της δράσης COST, CM1407, (STSM), και την πολύτιμη βοήθεια για την εκπόνηση μέρους των πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ευχαριστώ θερμά τον Dr. Engin Ulukaya, και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Buse Cevatemre του Κέντρου Ερευνών Μεταφραστικής Ιατρικής της Κων/πολης.

Επίσης, ευχαριστώ την εταιρεία Lundbeck S.A. (Copenhagen, Denmark) για την ευγενική χορηγία της ουσίας που μελετήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. Ηλία Μπέγα, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθειά του σε ό,τι κι αν προέκυπτε στο εργαστήριο, για τις γνώσεις του, που ήταν πάντα πρόθυμος να μοιραστεί, και προπάντων για την ευχάριστη παρουσία του που έκανε τα πάντα να μοιάζουν λίγο πιο εύκολα.

Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Ηλία Βαλιάκο, ΕΔΙΠ Φαρμακολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο και κυρίως για τις πολύτιμες συμβουλές που τόσο πρόθυμα μου έδινε και που αποτελούσαν ένα ευχάριστο και δημιουργικό διάλειμμα.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τη φίλη και εργαστηριακή συνεργάτη Καραγιανέλλου Θεοδοσία, για την πολύτιμη συνεισφορά της στο εργαστήριο και κυρίως για όλες τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μέσα και έξω από αυτό, και που αποτελούν πια ευχάριστες αναμνήσεις. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη και εργαστηριακή συνεργάτη Κοτσώνη Ιωάννα, για την ουσιαστική της προσφορά στο εργαστήριο, κυρίως όμως για τη θετική ενέργεια που μας

μετέδιδε, αλλά και την αισιοδοξία της. Ένα πραγματικό ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω και σε όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας με τα οποία συνεργάστηκα αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ίριδα Παπαποστόλου για τη θετική της διάθεση και για την ουσιαστική συνεισφορά της στο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το φίλο και γραφίστα Κώστα Κωνσταντόπουλο, για το σχεδιασμό και την επιμέλεια του εξωφύλλου, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις του που διέδιδαν τη βάση της οπτικής επικοινωνίας κειμένου-αναγνώστη στην παρούσα εργασία.

Στο παρασκήνιο όλων των προσπαθειών κρύβονται πάντα οι πιο σπουδαίοι συντελεστές, η οικογένειά μας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον πατέρα μου, Θανάση, που έχει στηρίξει με κάθε τρόπο όλες μου τις επιλογές και στέκεται πάντα διακριτικά στο πλευρό μας. Ευχαριστώ το μεγάλο μου αδερφό Κώστα, για όλες τις φορές που με ενθάρρυνε να προχωρήσω, για τη δύναμη που παίρνω απ' τη στάση του και την αισιοδοξία του απέναντι στη ζωή και για το ότι μου αποδεικνύει καθημερινά ότι οι αποστάσεις μεταξύ των ανθρώπων, που οι καρδιές τους βρίσκονται κοντά, είναι σχετικές. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να εκφράσω και στη μικρή μου αδερφή Νικολέτα, που βρίσκεται πάντα δίπλα μου και έχει τον τρόπο να μου δείχνει πως όλα είναι εφικτά όταν δεν τα παρατάς. Ήταν και θα είναι πάντα το στήριγμά μου σε όλες μου τις αποφάσεις και όλες τις κρυφές μου σκέψεις. Ευχαριστώ, επίσης, το σύντροφό μου Νίκο για την ουσιαστική του συμμετοχή στη συγγραφή της διατριβής, αλλά κυρίως για το ότι βρίσκεται δίπλα μου, συνοδοιπόρος σε ό,τι η ζωή φέρνει στο δρόμο μας. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της οικογένειας, το Μάκη και τη Μαρία, που στέκονται δίπλα στα αδέρφια μου και σ' εμένα, κάνοντας πράξη την αγάπη που όταν μοιράζεται πολλαπλασιάζεται. Για το τέλος, άφησα το νεότερο μέλος της οικογένειας μας, το Θανασάκη, που ήρθε και γέμισε με χαρά τα μάτια μας και την καρδιά μας.

Την προσπάθεια αυτή αφιερώνω στη μνήμη της μητέρας μου Ιωάννας που στήριζε με όλες της τις δυνάμεις, κάθε μας μικρό ή μεγάλο βήμα. Έφυγε, αλλά έμεινε ακόμα εδώ η έγνοια της, που έκρυβε στο γαλανό της βλέμμα, να μας νοιάζεται και να μας συντροφεύει...

Οκτώβριος 2019 | **Ευαγγελία Α. Σερέτη**



Στη μνήμη της μητέρας μου
που έφυγε νωρίς...

Όταν οι πυροσβέστες τελείωσαν με το σβήσιμο της φωτιάς, το θέμα συζήτησης όλων ήταν το ίδιο:

- Πώς μπόρεσε αυτό το τόσο μικρό παιδί να σπάσει με την κρεμάστρα το τζάμι και μετά τη σήτα;
- Πώς μπόρεσε να φορτώσει το μωρό στο σακίδιο;
- Πώς μπόρεσε να περπατήσει στο περβάζι κουβαλώντας σημαντικό βάρος και να κατέβει από το δέντρο;
- Πώς μπόρεσε να σώσει τη ζωή του αδερφού του και τη δική του;

Ο ηλικιωμένος πυροσβέστης, άνθρωπος σοφός που όλοι σέβονταν, τους έδωσε την απάντηση:

«Ο μικρός Πάντσο ήταν μόνος. Δεν είχε κανέναν να του πει ότι δεν θα μπορούσε...»

Χόρχε Μπουκάι, «Ιστορίες να σκεφτείς»

Οι σίγμα υποδοχείς έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς έχουν προταθεί ως θεραπευτικοί στόχοι για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων, μεταξύ των οποίων και ορισμένοι τύποι καρκίνου. Αποτελούνται από δύο υπότυπους, σίγμα-1 (σ_1) και σίγμα-2 (σ_2), ωστόσο, η ταυτοποίηση του σ_2 βρίσκεται υπό διερεύνηση. Μέχρι πρόσφατα σχετιζόνταν με τον υποδοχέα PGRMC1 ενώ μεταγενέστερη θεωρία τον ταυτίζει με τον υποδοχέα TMEM97. Επίσης, ορισμένοι σ προσδέτες επιδεικνύουν σημαντική αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης τόσο των σίγμα υποδοχέων όσο και των προσδετών τους παραμένει αδιευκρίνιστος και μένει να αποσαφηνιστεί.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων (σ_1 , σ_2 /PGRMC1 και σ_2 /TMEM97) σε ανθρώπινες εγκαθιδρυμένες και πρωτογενείς καρκινικές κυτταρικές σειρές. Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, πραγματοποιήθηκε ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα σ_1 και των υποδοχέων σ_2 /TMEM97 και σ_2 /PGRMC1. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η *in vitro* αντικαρκινική δράση κάποιων ευρέως χρησιμοποιούμενων σ_1 και σ_2 προσδετών, έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου. Η δραστηριότητά τους συγκρίθηκε υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες και διερευνήθηκε ο πιθανός μηχανισμός δράσης τους. Τέλος, ο σ προσδέτης που επέδειξε την καλύτερη *in vitro* αντιπολλαπλασιαστική δράση (Siramesine), μελετήθηκε εκτενέστερα σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές και ξενομοσχεύματα προερχόμενα από ασθενείς (PDX).

Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των σ υποδοχέων πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η αντιπολλαπλασιαστική δράση των σ προσδετών μελετήθηκε με τη χρήση της μεθόδου SRB. Ο αλγόριθμος COMPARE χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του μηχανισμού δράσης των σ προσδετών. Ο έλεγχος της δράσης της Siramesine (μονοθεραπεία ή συνδυαστικά με τη Gemcitabine) έγινε σε ζωικά πρότυπα καρκίνου προερχόμενα από ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος (PDX), που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό μας.

Από την παρούσα μελέτη δεν προκύπτει κάποια άμεση συσχέτιση των υποδοχέων σ_1 και σ_2 με το είδος αλλά και την επιθετικότητα του όγκου. Φαίνεται ότι οι ουσίες που δοκιμάστηκαν, ακόμη κι αν έχουν σημαντική *in vitro* αντικαρκινική δράση ασκούν τη δράση αυτή μέσω μηχανισμών στους οποίους δεν εμπλέκονται οι σ υποδοχείς. Από τις ουσίες που δοκιμάστηκαν, η Siramesine φάνηκε να είναι η περισσότερη υποσχόμενη. Οι μελέτες της, σε ξενομοσχεύματα όγκων από ασθενείς, που για πρώτη φορά έγιναν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής (PDX), επιβεβαίωσαν την καλή αντικαρκινική της δράση. Επίσης, τα πειραματικά μας δεδομένα δείχνουν ότι η ουσία μπορεί να συνδυασθεί με άλλα χημειοθεραπευτικά ώστε να βελτιωθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Το βασικό μειονέκτημα της ουσίας φαίνεται να είναι η κάποια αυξημένη τοξικότητά της που όμως μπορεί να ξεπεραστεί, όπως έδειξε η αντίστοιχη μελέτη με τη χρήση νανοφορέων ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων, όπως είναι τα λιποσώματα.

Sigma receptors have attracted research interest as they have been proposed as therapeutic targets for the treatment of various diseases and pathological conditions, including some types of cancer. They consist of two subtypes, sigma-1 (σ_1) and sigma-2 (σ_2), however, the identification of σ_2 is under investigation. Until recently it was related to the PGRMC1 receptor while a later theory identifies it with the TMEM97 receptor. Also, some ligands exhibit significant antiproliferative and cytotoxic activity in various types of cancer. However, the precise mechanism of action of both sigma receptors and their ligands remains unclear and remains to be elucidated.

In the present doctoral thesis, the levels of σ receptor expression (σ_1 , σ_2 /PGRMC1 and σ_2 /TMEM97) in human established and primary cancer cell lines were investigated. For the first time in the literature, the simultaneous determination of the expression levels of the σ_1 receptor and the σ_2 /TMEM97 and σ_2 /PGRMC1 receptors was performed simultaneously. Subsequently, the in vitro anticancer activity of some widely used σ_1 and σ_2 ligands against various types of cancer was studied. Their activity was compared under the same experimental conditions and their possible mechanism of action was investigated. Finally, the ligand that exhibited the best in vitro antiproliferative activity (Siramesine) was more extensively studied in primary patient-derived xenografts (PDX).

The expression levels of the σ receptors were determined by Western blot. The antiproliferative activity of the ligands against 24 cancer cell lines was studied using the sulforodamine B (SRB) assay. The COMPARE algorithm was used for the estimation of the mechanism of action of the ligands. The efficacy of Siramesine (monotherapy or in combination with Gemcitabine) was tested on cancer animal models derived from patients with pancreatic cancer (PDX) that were developed in our laboratory.

From the present study there is no direct correlation between the σ_1 and σ_2 receptors with cancer type and tumor aggression. In addition, it seems that the substances tested here, even though they have significant in vitro anticancer activity, exert this effect through mechanisms that do not involve the receptors. Among the tested σ ligands, Siramesine appeared to be the most promising. Studies of Siramesine, in tumor xenografts derived from patients (PDX) that were held for the first time under the present thesis confirmed its good anticancer activity. Also, our experimental data show that Siramesine can be combined with other chemotherapeutics to improve the therapeutic effect. The major disadvantage of the substance appears to be some of its increased toxicity but it can be overcome, as the corresponding study using controlled release drug nanoparticles such as liposomes, has shown.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Καρκίνος	11
1.1. Γενικά	11
1.1.1. Ετυμολογία και ιστορική αναδρομή στο «μυστήριο» του καρκίνου.....	11
1.1.2. Τι είναι ο καρκίνος;	12
1.1.3. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	12
1.2. Βιολογία του καρκίνου	13
1.2.1. Τύποι καρκίνου	13
1.2.2. Ορόσημα του καρκίνου	13
<i>Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα</i>	14
<i>Αντοχή ενάντια στα αντι-αυξητικά σήματα</i>	15
<i>Αποφυγή απόπτωσης:</i>	15
<i>Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός:</i>	15
<i>Αγγειογένεση:</i>	16
<i>Διήθηση όγκου και μετάσταση:</i>	16
1.2.3. Προϋποθέσεις για την ανάπτυξη του καρκίνου	17
<i>Μεταλλάξεις και γενετική αστάθεια:</i>	17
<i>Φλεγμονώδεις καταστάσεις:</i>	17
<i>Αλλαγές στο μεταβολισμό:</i>	17
1.3. Μοριακά γεγονότα που συμβάλλουν στην καρκινογένεση	18
1.3.1. Ογκογονίδια	19
1.3.2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια	19
1.4. Παγκρεατικός καρκίνος.....	20
1.4.1. Χαρακτηριστικά και μορφολογική περιγραφή του αδένος	20
1.4.2. Ιστολογική περιγραφή του αδένος.....	21
1.4.3. Εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου	22
1.4.4. Παράγοντες κινδύνου	22
1.4.5. Παθοφυσιολογία της νόσου	23
1.4.6. Διάγνωση και σταδιοποίηση του παγκρεατικού καρκίνου	24

1.4.7. Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	24
1.5. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου.....	26
1.5.1. Γενικά.....	26
1.5.2. Εισαγωγή στην αυτοφαγία.....	27
1.5.3. Το mTOR σηματοδοτικό μονοπάτι στην αυτοφαγία.....	29
1.5.4. Ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Σίγμα Υποδοχείς.....	30
2.1. Οι σίγμα (σ) υποδοχείς.....	30
2.1.1. Η φαρμακολογία των σ υποδοχέων που οδήγησε στην ταυτοποίησή τους.....	30
2.1.2. Οι σ υποδοχείς διαχωρίζονται σε δύο διακριτούς υπότυπους.....	31
2.1.3. Οι προσδέτες των σ υποδοχέων.....	31
2.2. Ο υποδοχέας σ1.....	32
2.2.1. Ταυτοποίηση και δομικά στοιχεία του υποδοχέα σ1.....	32
2.2.2. Κρυσταλλική δομή του σ1.....	33
2.2.3. Ολιγομερισμός του σ1 υποδοχέα.....	33
2.2.4. Η δράση του σ1 ως πρωτεΐνη-συνοδός (chaperone).....	35
2.3. Ο υποδοχέας σ2.....	37
2.3.1. Γενικά στοιχεία για τον σ2.....	37
2.3.2. Ταυτοποίηση του υποδοχέα σ2.....	37
2.4. Τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων στον καρκίνο.....	39
2.4.1. Η έκφραση του σ1 στον καρκίνο.....	39
2.4.2. Η έκφραση του PGRMC1 στον καρκίνο.....	41
2.4.3. Η έκφραση του TMEM97 στον καρκίνο.....	42
2.4.4. Η έκφραση των σ υποδοχέων στη βάση δεδομένων «The Human Atlas».....	42
2.5. Οι σ υποδοχείς ως θεραπευτικοί στόχοι.....	45
2.6. Ο ρόλος των σ υποδοχέων στον καρκίνο.....	45
2.7. Ο ρόλος των σ προσδετών στον καρκίνο.....	46
2.7.1. Οι σ1 προσδέτες στον καρκίνο.....	47
2.7.1α. Οι σ1 προσδέτες ως αντικαρκινικά φάρμακα (μονοθεραπεία ή συνδυαστικά).....	47
2.7.1β. Οι σ1 προσδέτες για τη μεταφορά άλλων φαρμάκων.....	47
2.7.1γ. Οι σ1 προσδέτες ως επαγωγείς ανοσίας.....	48
2.7.1δ. Οι σ1 προσδέτες στη διαγνωστική απεικόνιση του καρκίνου.....	48
2.7.2. Οι σ2 προσδέτες στον καρκίνο.....	49
2.7.2α. Οι σ2 προσδέτες ως αντικαρκινικά φάρμακα (μονοθεραπεία ή συνδυαστικά).....	49

2.7.2β. Οι σ2 προσδέτες ως παράγοντες μεταφοράς φαρμάκων	50
2.7.2γ. Οι σ2 προσδέτες στη διαγνωστική απεικόνιση του καρκίνου	51
2.7.3. Οι παν-σίγμα προσδέτες στον καρκίνο	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Ανάπτυξη PDX	53
3.1. Ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (PDX)	53
3.1.1. Σύντομη εισαγωγή στη μεθοδολογία ανάπτυξης των PDX	54
3.2. Τα PDX στις προκλινικές μελέτες	55
3.2.1. Η συνεισφορά των PDX στην προσπάθεια ανακάλυψης νέων βιοδεικτών για PDAC	55
3.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των PDX	57
3.3.1. Πλεονεκτήματα από τη χρήση των PDX.....	57
3.3.2. Μειονεκτήματα από τη χρήση των PDX.....	59
3.4. Μελλοντικές προοπτικές.....	62
Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής	63
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	69
ΕΝΟΤΗΤΑ 1 <i>In vitro</i> μεθοδολογία	69
1.1. Κυτταροκαλλιέργειες	69
1.2. Μελέτη αντιπολλαπλασιαστικής δράσης ουσιών μέσω της μεθόδου SRB.....	70
1.3. Ο αλγόριθμος COMPARE.....	72
1.4. Ανάπτυξη <i>ex vivo</i> πρωτογενών κυτταρικών πληθυσμών.....	74
1.4.1. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας.....	74
1.5. Εγκαθίδρυση πρωτογενούς κυτταρικής σειράς.....	75
1.5.1. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας.....	75
1.6. Ανάλυση και ανίχνευση πρωτεϊνών.....	76
1.6.1. Απομόνωση πρωτεϊνικού λύματος από κύτταρα ή ιστό	76
1.6.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (μέθοδος Bradford).....	76
1.6.3. Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου	77
1.6.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	77
1.6.4α. Γενικά	77
1.6.4β. Περιγραφή της μεθόδου	78
1.6.5. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF	78
1.6.6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	79
1.7. Εγκλωβισμός της Siramesine σε νανοδομές στοχευόμενης μεταφοράς φαρμάκου (λιποσώματα)...	79
1.7.1. Μέθοδος ενυδάτωσης λεπτής μεμβράνης (TFHM)	79
1.7.2. Υπέρηχοι.....	80

1.7.3. Σκέδαση φωτός σε χιμαιρικούς νανοφορείς	80
ΕΝΟΤΗΤΑ 2 <i>In vivo</i> μεθοδολογία	81
2.1 Γενικά.....	81
2.2. Ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (PDX)	81
2.3. Χαρακτηρισμός των προερχόμενων από ασθενείς καρκινικών ξενομοσχευμάτων.....	82
2.4. Μελέτες τοξικότητας σε ζωικά πειραματικά μοντέλα	82
2.4.1. Έλεγχος της τοξικότητας της Gemcitabine	82
2.4.2. Έλεγχος της τοξικότητας της Siramesine	82
2.4.3. Έλεγχος τοξικότητας της Siramesine ^L σε ζωικό μοντέλο Zebrafish	83
2.5. Μελέτες δραστηριότητας σε ζωικά πρότυπα καρκίνου	84
2.5.1. Αξιολόγηση της δραστηριότητας της Gemcitabine σε ζωικό πρότυπο καρκίνου:.....	84
2.5.2. Αξιολόγηση της δραστηριότητας της Siramesine σε ζωικό πρότυπο καρκίνου	85
2.6. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση	86
ΕΝΟΤΗΤΑ 3 Στατιστική ανάλυση	87
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	93
ΕΝΟΤΗΤΑ 1 <i>In vitro</i> μελέτες	93
1.1. Επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων σ1, σ2/PGRMC1 και σ2/TMEM97 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60	93
1.2. Επίδραση επιλεγμένων σ προσδετών στην κυτταρική ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών της λίστας NCI-60.....	96
1.2.1.Μελέτη της επίδρασης σ προσδετών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60	96
1.2.2. Χάρτες συσχέτισης θερμού χρώματος (heatmaps) των παραμέτρων GI50, TGI, LC50 μεταξύ των σ προσδετών που μελετήθηκαν	102
1.3. Συσχέτιση της δραστηριότητας των επιλεγμένων σ προσδετών με τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων	104
1.4. Εκτίμηση μηχανισμού δράσης των σ προσδετών με τη χρήση του αλγόριθμου COMPARE.....	108
1.5. Μελέτη των σ υποδοχέων και των προσδετών τους στον καρκίνο του παγκρέατος.....	110
1.5.1. Χαρακτηρισμός ξενομοσχεύματος προερχόμενου από ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος.....	111
1.5.2. Χαρακτηρισμός <i>ex vivo</i> πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών υποπληθυσμών....	111
1.5.3. Επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων σ1, σ2/PGRMC1 και σ2/TMEM97 σε πρωτογενείς και εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές κυτταρικές σειρές.....	113
1.5.4. Επίδραση των επιλεγμένων σ προσδετών σε πρωτογενείς και εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές κυτταρικές σειρές.....	114
ΕΝΟΤΗΤΑ 2 <i>In vivo</i> μελέτες	115
2.1. Έλεγχος της τοξικότητας της Gemcitabine σε ζωικά πειραματικά μοντέλα	115
2.2. Έλεγχος της τοξικότητας της δράσης της Siramesine σε ζωικά πειραματικά μοντέλα.....	117

2.2.1. Οξεία τοξικότητα της δράσης της Siramesine ^L	118
2.2.2. Υποξεία τοξικότητα της δράσης της Siramesine ^L	118
2.2.3. Μελέτη της τοξικότητας της Siramesine ^L σε ζωικό μοντέλο Zebrafish	120
2.3. Έλεγχος της δραστικότητας της Siramesine ^B σε ζωικό πρότυπο καρκίνου προερχόμενου από ασθενή	123
2.4. Έλεγχος μηχανισμού δράσης της Siramesine ^B στο ζωικό πειραματικό πρότυπο καρκίνου	124
2.5. Έλεγχος της δραστικότητας της Siramesine ^L σε ζωικό πρότυπο καρκίνου προερχόμενου από ασθενή	126
2.6. Έλεγχος τοξικότητας και δραστικότητας της λιποσωμιακής Siramesine ^L	127
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	133
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	143



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Εισαγωγή

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 | Καρκίνος

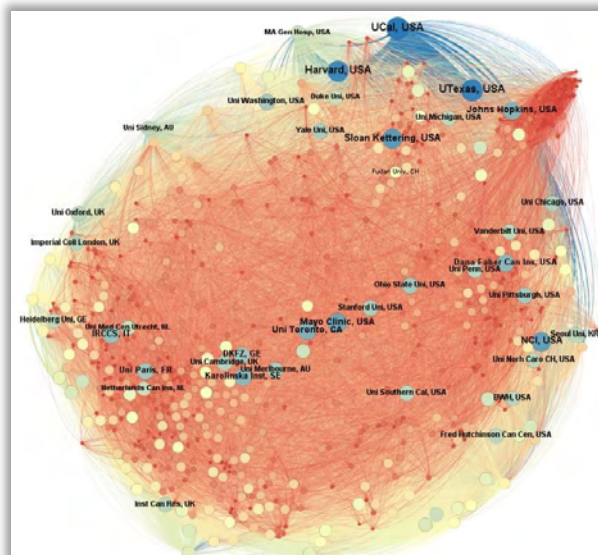
1.1. Γενικά

1.1.1. Ετυμολογία και ιστορική αναδρομή στο «μυστήριο» του καρκίνου

Στην πρώιμη ιατρική ορολογία, οι όροι που χρησιμοποιούνταν για να περιγράψουν την ασθένεια του καρκίνου μοιράζονταν μια σαφή αναφορά. Τα πιο κοινά ονόματα ήταν «cancer», «canker», «kanke» και «chancre» προερχόμενα από την ίδια ετυμολογική ρίζα: την ελληνική λέξη «karkinos» (καρκίνος) (1). Η λέξη καρκίνος προέρχεται από μια παρατήρηση του Ιπποκράτη πριν από 2300 χρόνια. Συγκεκριμένα, ανέφερε ότι οι καρκινικοί όγκοι του μαστού με το φλεβικό σύστημα που τους συνοδεύει μοιάζουν με τα άκρα του καβουριού (καρκίνος). Από την παρατήρηση αυτή προήλθε ο όρος καρκίνωμα (carcinoma) στα ελληνικά και αργότερα ο όρος καρκίνος (cancer) στα λατινικά (2). Παρότι οι γνώσεις σχετικά με τον καρκίνο και τα αίτια που τον προκαλούν ήταν ελάχιστες, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την ασθένεια αυτή ολοένα και αυξανόταν. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το βιβλίο του Marjo Kaartinen, με τίτλο «Ο καρκίνος του μαστού κατά τη διάρκεια του 18^{ου} αιώνα», που περιγράφει την προσέγγιση των γιατρών της εποχής η οποία ήταν εστιασμένη στην καταγραφή των συμπτωμάτων της νόσου. Ενδεικτικό είναι το γεγονός πως από τις 124 σελίδες του βιβλίου μόνο οι 4 αφιερώνονται για να περιγράψουν τον ορισμό και τις μεθόδους διάγνωσης του καρκίνου, ενώ το

υπόλοιπο βιβλίο εστιάζεται στην καταγραφή των συμπτωμάτων της νόσου με βάση τις περιγραφές των ασθενών (3).

Το 1950, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας χρηματοδότησε ένα διεθνές συμπόσιο για τον καρκίνο όπου αναδείχθηκαν οι δραματικές διακυμάνσεις των διαφόρων τύπων καρκίνου που βρέθηκαν σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Οι ερευνητές απέδειξαν πως άνθρωποι που μεταναστεύουν, αναπτύσσουν τύπους καρκίνου κοινών στις χώρες διαβίωσης τους και όχι στις πατρίδες τους αφήνοντας να εννοηθεί πως οι περισσότεροι καρκίνοι σχετίζονται με το περιβάλλον και όχι με κληρονομικούς ή γενετικούς παράγοντες. Το συμπόσιο οδήγησε στη δημιουργία του Διεθνούς Οργανισμού Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC: International Agency for Research on Cancer) το 1965, ώστε να διενεργηθούν άμεσα διεπιστημονικές έρευνες για την διαλεύκανση των αιτιών που έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση του καρκίνου (4).

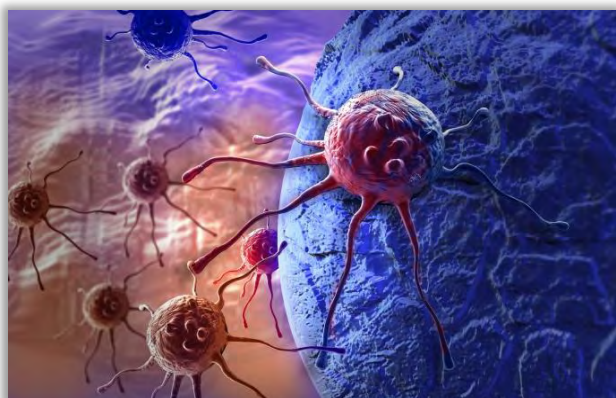


Εικόνα 1. Δίκτυο αλληλεπίδρασης οργανισμών, παγκοσμίως, με δημοσιεύσεις που σχετίζονται με τον καρκίνο.

Σήμερα, ο «χάρτης» της επιστημονικής έρευνας που σχετίζεται με τον καρκίνο αντικατοπτρίζεται από τον συνεχόμενο αυξανόμενο ρυθμό των επιστημονικών δημοσιεύσεων με σκοπό την αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση της νόσου καθώς και τους τρόπους αντιμετώπισής της. Στην Εικόνα 1 απεικονίζεται το δίκτυο που προκύπτει από την αλληλεπίδραση οργανισμών, σε παγκόσμιο επίπεδο, με δημοσιεύσεις που σχετίζονται με τον καρκίνο (5).

1.1.2. Τι είναι ο καρκίνος;

Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI: National Cancer Institute) ο γενικός όρος «καρκίνος» περιγράφει ένα σύνολο διαταραχών που χαρακτηρίζονται από ταχέως αναπτυσσόμενα κύτταρα που διαιρούνται ανεξέλεγκτα και εξαπλώνονται σε παρακείμενους ιστούς (6) (Εικόνα 2). Η αναζήτηση και διαλεύκανση όλων των παραγόντων που έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του καρκίνου έχει απασχολήσει την ερευνητική κοινότητα και τον άνθρωπο γενικότερα για δεκαετίες (4).



Εικόνα 2. Καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν σε παρακείμενους ιστούς.

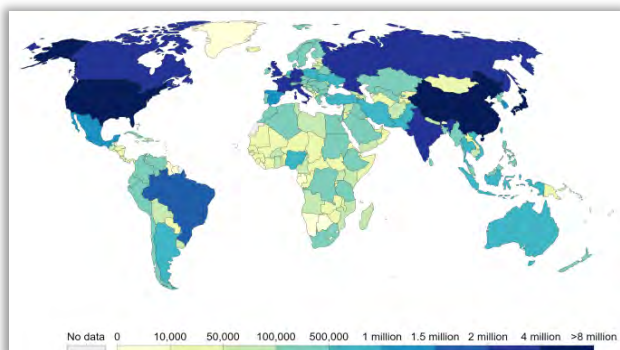
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ανθρώπινα κύτταρα έχουν την ικανότητα να

αναπτύσσονται και να διαιρούνται ελεγχόμενα ακολουθώντας αυστηρούς μηχανισμούς ελέγχου, ώστε να ανταποκρίνονται στις ανάγκες του οργανισμού και να διατηρείται η ομοιοστάσή του (7). Η εμφάνιση του καρκίνου σηματοδοτείται από την απορρύθμιση των μηχανισμών ελέγχου ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού προσδίδοντας στα καρκινικά κύτταρα αυξημένο αναπτυξιακό πλεονέκτημα (8). Για ποιο λόγο όμως ένα κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό; Πριν από κάποιες δεκαετίες δεν υπήρχε μια ικανοποιητική απάντηση σε αυτό το ερώτημα. Οι επιστήμονες γνώριζαν πως ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων πιθανώς οφείλονταν σε παράγοντες όπως η έκθεση σε χημικά, ακτινοβολία ή ιούς. Τις τελευταίες 3 δεκαετίες και μέσω κυρίως της ραγδαίας ανάπτυξη των τεχνικών μοριακής βιολογίας, η κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης του καρκίνου εμφανίζει μια συνεχή εξέλιξη και σήμερα γνωρίζουμε πως ο καρκίνος είναι μία πολυπαραγοντική νόσος, αποτέλεσμα γονιδιακών και μοριακών μεταβολών.

1.1.3. Επιδημιολογικά στοιχεία

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO: World Health Organization) οι μη μεταδοτικές ασθένειες (NCDs: Non-communicable diseases) έχουν πλέον την κύρια ευθύνη για την πλειοψηφία των θανάτων σε παγκόσμιο επίπεδο και ο καρκίνος αναμένεται να καταταχθεί ως η κύρια αιτία θανάτου και το σημαντικότερο εμπόδιο για την αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε κάθε χώρα του κόσμου τον 21^ο αιώνα (9). Το Σεπτέμβριο του 2018, ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον

Καρκίνο (IARC) δημοσίευσε τα τελευταία στατιστικά στοιχεία για τα περιστατικά καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με αυτά, ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος μεταξύ των γυναικών. Αξίζει να σημειωθεί πως η Ελλάδα βρίσκεται στην κορυφή της λίστας των χωρών στις οποίες παρατηρήθηκε ο μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης των περιστατικών καρκίνου του μαστού μεταξύ 2012-2016. Στο σύνολο του πληθυσμού, ο πιο συχνά εμφανιζόμενος καρκίνος είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού και του προστάτη (10). Εκτιμάται ότι 100 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο είχαν διαγνωστεί με διάφορες μορφές καρκίνου το 2017. Ο αριθμός αυτός έχει υπερδιπλασιαστεί από το 1990 όταν ο αντίστοιχος αριθμός νοσούντων ήταν 45 εκατομμύρια (11) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει το συνολικό αριθμό των ανθρώπων, όλων των ηλικιών, που νόσησαν από οποιοδήποτε τύπο καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των δύο φύλων, το έτος 2017. Πηγή: IHME (Institute of Health Metrics and Evaluation), *Global Burden Of Disease*.

1.2. Βιολογία του καρκίνου

1.2.1. Τύποι καρκίνου

Υπάρχουν περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου οι οποίοι

διαφοροποιούνται ως προς τη γενετική τους σύσταση, την αιτιολογία, τα κλινικά τους χαρακτηριστικά, την εξέλιξη, καθώς και την κατάληξή τους. Οι διάφοροι καρκινικοί τύποι, συχνά, παίρνουν το όνομά τους από το όργανο ή το ιστολογικό σύστημα όπου κάνουν, αρχικά, την εμφάνισή τους. Οι κύριοι τύποι καρκίνου είναι το καρκίνωμα, το σάρκωμα, το μελάνωμα, το λέμφωμα και η λευχαιμία. Το καρκίνωμα, ο πιο συχνά διαγνωσμένος τύπος καρκίνου, διακρίνεται στους ακόλουθους τύπους: αδenoκαρκίνωμα, βασικό καρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα. Το σάρκωμα αφορά συμπαγείς καρκινικούς όγκους που κάνουν την εμφάνισή τους σε ποικίλους τύπους μεσεγχυματικών κυττάρων όπως ινοβλάστες, λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, μυοκύτταρα κ.λπ.. Τα σαρκώματα αποτελούν περίπου το 1% των διαγνωσμένων καρκίνων (12). Το μελάνωμα εμφανίζεται στα κύτταρα του επιδερμικού ιστού. Το λέμφωμα εμφανίζεται στα Β ή τα Τ λεμφοκύτταρα. Η λευχαιμία εμφανίζεται σε πρόδρομα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και σχηματίζει στερεούς καρκινικούς όγκους. Διακρίνεται, ανάλογα με το ρυθμό εξέλιξης, σε οξεία και χρόνια και σε λεμφοβλαστική ή μυελοειδή, ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων που αφορά.

1.2.2. Ορόσημα του καρκίνου

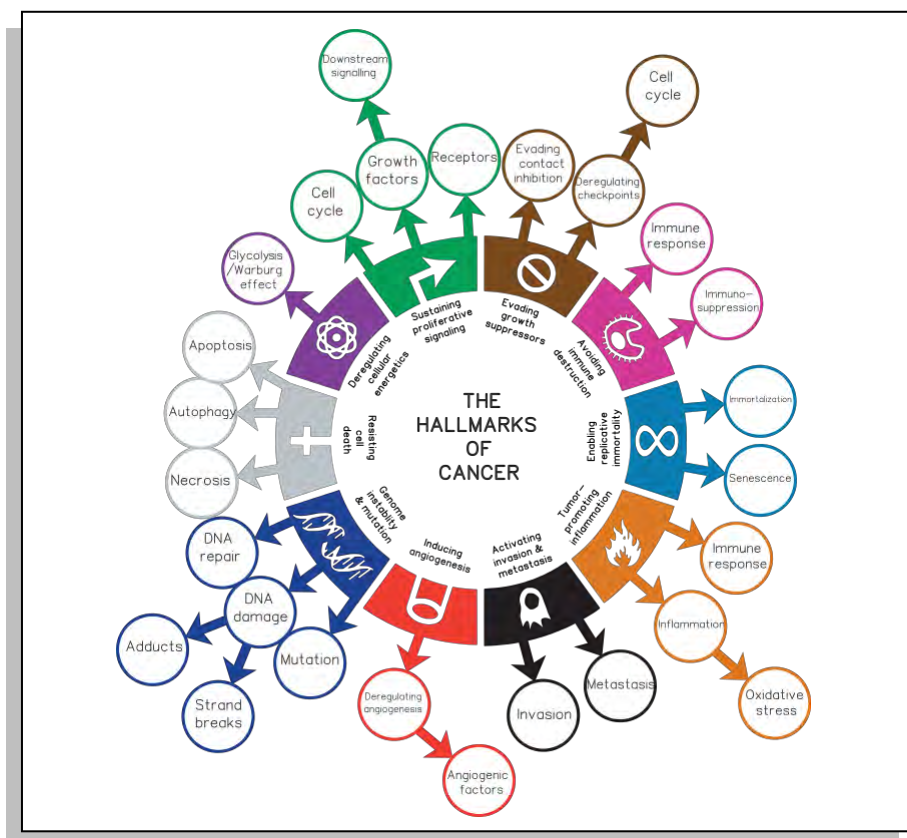
Καθώς αναπτύσσονται οι όγκοι, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία και δικαιολογούν την πολυπλοκότητα της νόσου. Συγκεκριμένα, η πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων υφίστανται έξι βασικές αλλαγές στη φυσιολογία τους, οι οποίες περιγράφηκαν

από τους Hanahan D και Weinberg (13) και είναι οι παρακάτω (Εικόνα 4):

Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα: Βασικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Αντίθετα, στα φυσιολογικά κύτταρα ελέγχεται η παραγωγή και απελευθέρωση αυξητικών σημάτων, μέσα σε έναν αυστηρά ρυθμισμένο κυτταρικό κύκλο, με τρόπο ώστε να ολοκληρώνεται με επιτυχία το σχέδιο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται η ομοιόσταση και, έτσι, η διατήρηση της αρχιτεκτονικής και της λειτουργίας των διάφορων ιστών και οργάνων. Όμως, είναι κοινώς αποδεκτό ότι στα καρκινικά κύτταρα τα αναπτυξιακά μονοπάτια φέρουν μία ή περισσότερες κρίσιμες μεταλλάξεις, οι

οποίες τους προσδίδουν πλεονέκτημα επιβίωσης. Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται είτε με προσδέτες που αφορούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είτε με τους υποδοχείς των προσδετών είτε με άλλα κυττοσολικά σηματοδοτικά μόρια (8).

Ο πιο περίπλοκος μηχανισμός μέσω του οποίου τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν αυτάρκεια στα αυξητικά σήματα, σχετίζεται με αλλαγές σε σηματοδοτικά μόρια που βρίσκονται καθοδικά των υποδοχών αυξητικών παραγόντων και μεταβιβάζουν το σήμα ενδοκυττάρια. Η διαβίβαση των αυξητικών σημάτων πραγματοποιείται κυρίως μέσω των RAS πρωτεϊνών (ομάδα που αποτελείται από μονομερείς GTPάσες) και συγκεκριμένα μέσω του μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK. Έχει βρεθεί ότι στο 25% των ανθρώπινων καρκίνων οι RAS πρωτεΐνες είναι δομικά αλλαγμένες, με αποτέλεσμα τη



Εικόνα 4. Τα ορόσημα του καρκίνου.

συνεχή μεταγωγή σήματος στον κυτταρικό πυρήνα (14).

Αντοχή ενάντια στα αντι-αυξητικά σήματα:

Τα αντι-αυξητικά σήματα οδηγούν στην ενεργοποίηση μονοπατιών που καταλήγουν στην έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τα οποία εμποδίζουν την είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο. Η διαβίβαση της πλειονότητας των αντιπολλαπλασιαστικών σημάτων γίνεται κυρίως μέσω της πρωτεΐνης RB (Retinoblastoma Protein). Το γονίδιο *Rb* ήταν το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που περιγράφηκε. Έχει βρεθεί ότι η RB πρωτεΐνη διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή ποικίλων σημάτων από ένδο- και εξωκυττάριας πηγές, με αποτέλεσμα την κανονική λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Όταν η πρωτεΐνη αυτή είναι υποφωσφορυλιωμένη είναι ενεργή, βρίσκεται σε σύμπλοκο με το μεταγραφικό παράγοντα E2F και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όμως, η φωσφορυλίωση της RB την καθιστά ανενεργή και, έτσι, ο E2F ενεργοποιείται. Στον καρκίνο μεταλλάξεις, είτε στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RB είτε στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P16, απενεργοποιούν τη δράση της RB, με αποτέλεσμα ο E2F να είναι συνεχώς ενεργός και να προκαλεί ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση (15).

Αποφυγή απόπτωσης: Η ικανότητα επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων δεν εξαρτάται μόνο απ' το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, αλλά και απ' το βαθμό της φθοράς που αυτά υφίστανται. Κύτταρα με πολλές φθορές, όπως για παράδειγμα συσσωρευμένες βλάβες στο

γονιδίωμά τους υπόκεινται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που καλείται «απόπτωση». Ο μηχανισμός της απόπτωσης αφορά την πλειονότητα των κυττάρων και περιλαμβάνει μια καθορισμένη σειρά διαδικασιών. Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να ξεπεράσουν το μηχανισμό της απόπτωσης προκειμένου να επιβιώσουν. Η αποφυγή της μπορεί να λάβει χώρα ποικιλοτρόπως. Ο πλέον συχνός είναι μέσω μεταλλάξεων στο γονίδιο *P53*. Στα καρκινικά κύτταρα το μεταλλαγμένο *P53* δεν μπορεί να οδηγήσει κύτταρα με βλάβες σε απόπτωση, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να διαιρούνται και να συσσωρεύουν όλο και περισσότερες βλάβες. Το γονίδιο *P53* είναι το συχνότερα μεταλλαγμένο γονίδιο στους διάφορους τύπους καρκίνους.

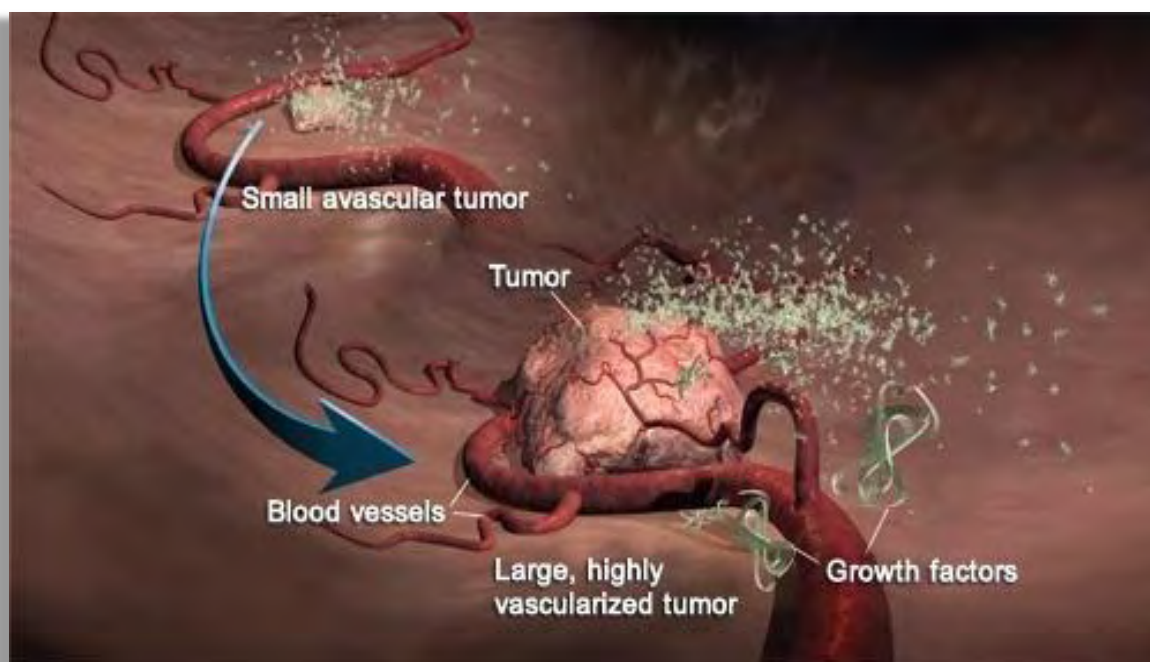
Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός: Ακόμη ένα εμπόδιο το οποίο καλούνται να ξεπεράσουν τα καρκινικά κύτταρα είναι ο μηχανισμός ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Κάθε κύτταρο έχει πεπερασμένο δυναμικό αντιγραφής, κάτι το οποίο σημαίνει ότι μετά από κάποιο συγκεκριμένο αριθμό αντιγραφών παύει να διαιρείται και εισέρχεται στη φάση της κυτταρικής γήρανσης. Σε κάθε κύτταρο το κρίσιμο αυτό σημείο καθορίζεται από το μήκος των τελομερών. Τα τελομερή είναι αλληλουχίες DNA που εντοπίζονται στα άκρα κάθε χρωμοσώματος, όπως μαρτυρά και το όνομά τους. Το μήκος των αλληλουχιών των τελομερικών περιοχών μειώνεται μετά από κάθε κύκλο αντιγραφής του DNA, κι αυτό διότι στα ακραία αυτά τμήματα δεν υπάρχει αρκετός χώρος για το σχηματισμό εκκινητών κατά τη διαδικασία της αντιγραφής. Μετά από κάποιο συγκεκριμένο αριθμό κύκλων

αντιγραφής τα τελομερή αποκτούν ένα ελάχιστο μήκος και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σταματά. Επέρχεται, έτσι, αναδιπλασιαστική γήρανση. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα δεν εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης. Αντιθέτως, εισέρχονται σε κατάσταση αθανοτοποίησης, λόγω της ενεργοποίησης του ενζύμου τελομεράση η οποία και προσθέτει τα τελομερή στα άκρα των μορίων DNA. Η ενεργοποίηση της τελομεράσης στα καρκινικά κύτταρα δεν αποτελεί ένα πρωτογενές γεγονός σε έναν καρκίνο, αλλά μια δευτερογενή κατάσταση η οποία συνδέεται άρρηκτα με την ικανότητα της επιβίωσής τους.

Αγγειογένεση: Η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων εξαρτάται άμεσα από τη συνεχή παροχή οξυγόνου, καθώς και θρεπτικών συστατικών από το αγγειακό σύστημα. Έτσι, οι αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις των

καρκινικών κυττάρων επάγουν την αγγειογένεση πλησίον της περιοχής του όγκου. Η κατάσταση αυτή προϋποθέτει την ενεργοποίηση κάποιων προ-αγγειογενετικών παραγόντων - όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ο FGF1, ο FGF2 (Fibroblast Growth Factors 1 & 2) κ.ά. - οι οποίοι σηματοδοτούν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και, επομένως, του αγγειακού συστήματος που περιβάλλει τον αναπτυσσόμενο όγκο (Εικόνα 5).

Διήθηση όγκου και μετάσταση: Μετάσταση ή και δευτεροπαθής εντόπιση, ονομάζεται η απόσπαση καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή καρκινικό όγκο και η μεταφορά τους σε άλλα μέρη του σώματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταστατικού όγκου (Εικόνα 6). Τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να αποκτήσουν ικανότητα διήθησης και μετάστασης, υπόκεινται σε μια σειρά αλλαγών που σχετίζονται με μόρια



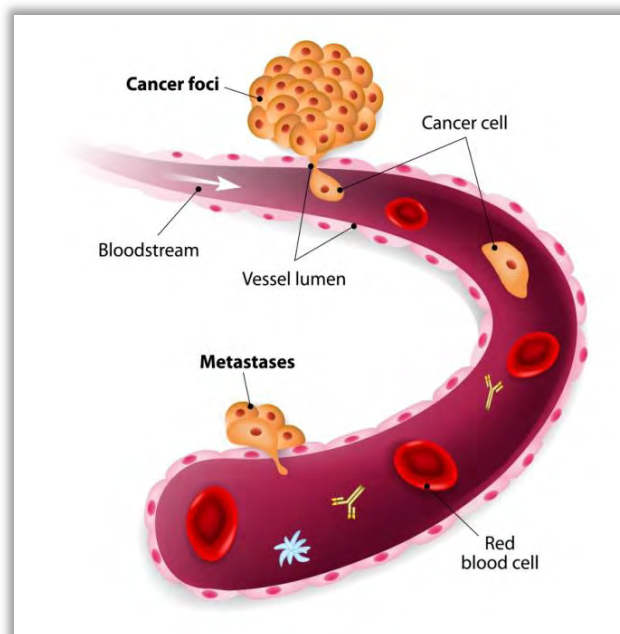
Εικόνα 5. Τρισδιάστατη απεικόνιση της αγγειογένεσης σε αναπτυσσόμενο καρκινικό όγκο.

που είναι υπεύθυνα για τις διακυτταρικές συνδέσεις και τις αλληλεπιδράσεις κυττάρων-εξωκυττάριας ουσίας και αλλαγές που αφορούν στις εξωκυτταρικές πρωτεάσες. Αναφορικά με τα μόρια των διακυτταρικών συνδέσεων στον καρκίνο παρατηρείται απώλεια της λειτουργικότητας της E-καντερίνης, κάτι που έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την απώλεια σύνδεσης και επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων. Επιπρόσθετα, σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, η λειτουργία των πρωτεασών διαταράσσεται με τέτοιο τρόπο, ώστε η εξωκυττάρια ουσία να χάνει τα βιοχημικά και δομικά της χαρακτηριστικά και έτσι τελικά να διευκολύνεται η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων σε άλλους υγιείς ιστούς.

1.2.3. Προϋποθέσεις για την ανάπτυξη του καρκίνου

Οι βασικές προϋποθέσεις (13) που αφορούν την ανάπτυξη του καρκίνου είναι:

Μεταλλάξεις και γενετική αστάθεια: Τα φυσιολογικά κύτταρα πριν εισέλθουν στη μιτωτική φάση διασφαλίζουν τη γενετική τους σταθερότητα με μια σειρά κρίσιμων σημείων ελέγχου στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Σε περιπτώσεις εντοπισμού αλλοιώσεων στο γενετικό υλικό, ενεργοποιούνται οι κατάλληλοι μηχανισμοί επιδιόρθωσης. Όμως, μεταλλάξεις στα επιδιορθωτικά γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία επιδιόρθωσης λαθών στο γενετικό υλικό των κυττάρων και τη συσσώρευση ζημιογόνων μεταλλάξεων που οδηγούν στη γένεση καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 6. Διήθηση και μετάσταση καρκινικών κυττάρων.

Φλεγμονώδεις καταστάσεις: Σε αρκετούς όγκους παρατηρείται εκτεταμένη διήθηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτές οι ανοσολογικές αποκρίσεις αντανακλούν την προσπάθεια του ανοσοποιητικού συστήματος να καταστείλει ή και να περιορίσει την ανάπτυξη του όγκου (Εικόνα 7). Ωστόσο, τα φλεγμονώδη κύτταρα του όγκου προάγουν την ογκογένεση, τη διήθηση και τη μετάσταση, μεταβάλλοντας σημαντικά το μικροπεριβάλλον του όγκου.

Αλλαγές στο μεταβολισμό: Ο Warburg παρατήρησε πρώτος ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των μεταβολικών διεργασιών των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, στα καρκινικά κύτταρα παρατηρήθηκε μετάπτωση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση ή την αερόβια αναπνοή, σε διαδικασίες παραγωγής ενέργειας εκτός των μιτοχονδρίων, σε συνθήκες αναερόβιες, στο κυτταρόπλασμα. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως φαινόμενο Warburg (Warburg effect) και

προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα μια σειρά σημαντικών πλεονεκτημάτων που αφορούν:

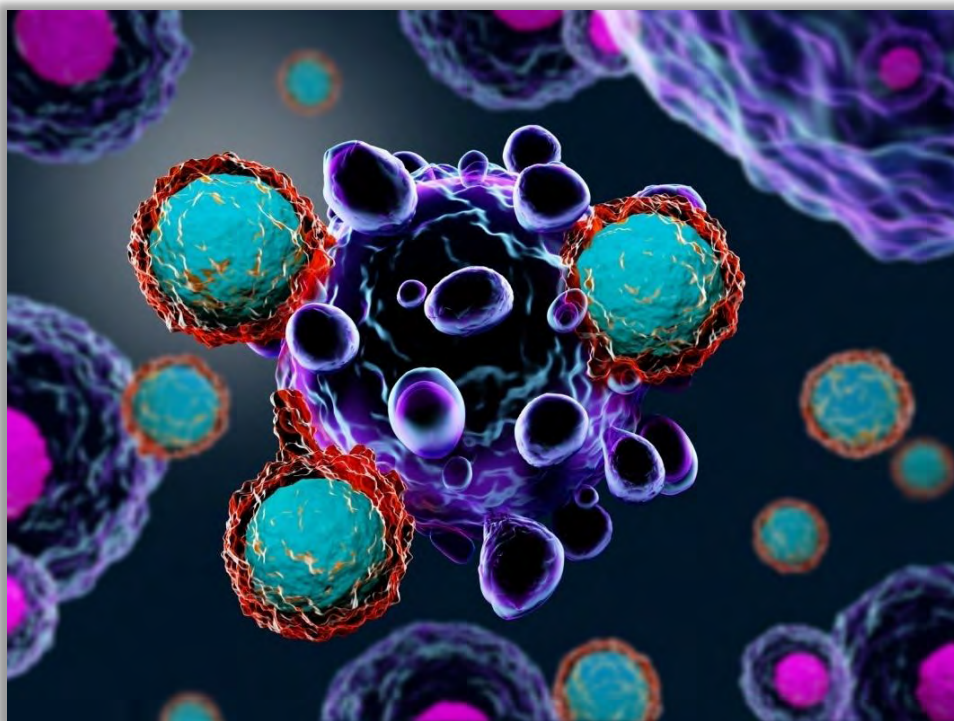
- *Τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό:* Η αυξημένη αερόβια γλυκόλυση οδηγεί σε αύξηση της σύνθεσης σημαντικών βιομορίων (αμινοξέα, νουκλεοτίδια κ.λπ.), κάτι που βοηθά στη δημιουργία νέων κυττάρων
- *Την επιβίωση κάτω από συνθήκες υποξίας:* Η παραγωγή ενέργειας κάτω από αναερόβιες συνθήκες αποτελεί ένα προσαρμοστικό μηχανισμό των καρκινικών κυττάρων ενάντια στις συνθήκες χαμηλής οξυγόνωσης
- *Την αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (pH) :* Η παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά τη γλυκόλυση οδηγεί σε πτώση των επιπέδων του pH στο μικροπεριβάλλον του όγκου, κάτι που έχει αποδειχθεί πως ευνοεί τη μετακίνηση και τη μετάσταση των

καρκινικών κυττάρων (16)

- *Την αποφυγή της ανοσοκαταστροφής:* Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ανθίστανται στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, φαινόμενο το οποίο χαρακτηρίζεται ως ανοσοεπιτήρηση. Παρόλα αυτά, τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν μηχανισμούς αποφυγής της εγειρόμενης σ' αυτά αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος (ανοσοαπάντηση), κάτι που τους δίνει ένα σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης.

1.3. Μοριακά γεγονότα που συμβάλλουν στην καρκινογένεση

Ο καρκίνος είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση γενετικής ασθένειας η οποία δεν είναι το



Εικόνα 7. Τ-λεμφοκύτταρα επιτίθενται σε καρκινικό κύτταρο

αποτέλεσμα μιας μόνο γενετικής δυσλειτουργίας. Αντίθετα, είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς γονιδιακών μεταλλάξεων που απορυθμίζουν είτε τον κυτταρικό κύκλο-πολλαπλασιασμό είτε τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ειδικότερα, η διαδικασία της καρκινογένεσης εμπλέκει πολλά στάδια τα οποία περιλαμβάνουν από τη μία την ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων και από την άλλη την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (17). Οι μεταλλάξεις αυτές συσσωρεύονται σταδιακά και δίνουν στα καρκινικά κύτταρα σημαντικό πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα φυσιολογικά.

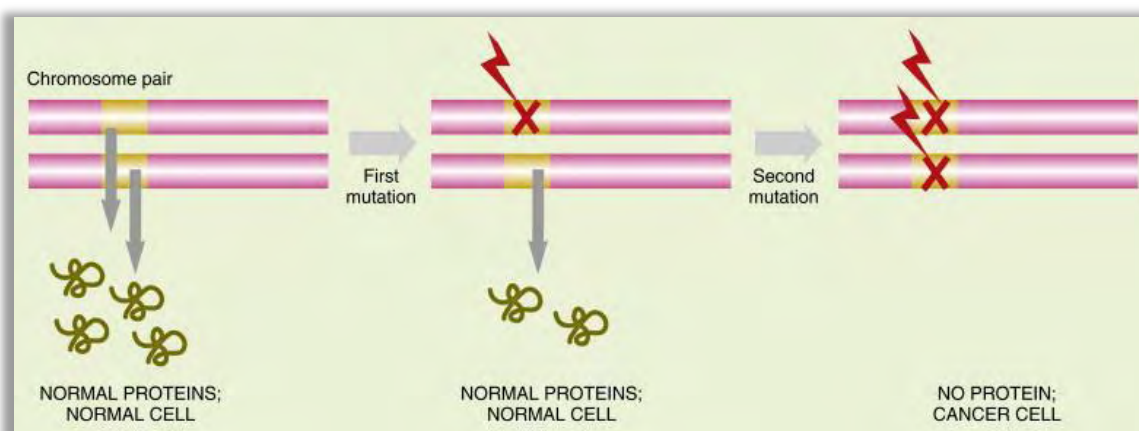
1.3.1. Ογκογονίδια

Τα προϊόντα των ογκογονιδίων είναι, κυρίως, είτε ενεργοποιητές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είτε αναστολείς της απόπτωσης. Οι μεταλλάξεις σ' αυτά τα γονίδια μπορεί να προκληθούν από μεταλλαξιογόνους παράγοντες και να μετατρέψουν τα πρωτο-ογκογονίδια σε ογκογονίδια. Τελικά, αυτές οι διαδικασίες

οδηγούν τα κύτταρα σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό (18). Οι μεταλλάξεις των πρωτο-ογκογονιδίων είναι συνήθως επικρατείς, σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Οι κυριότερες γενετικές αλλοιώσεις που μπορούν να μετατρέψουν ένα πρωτο-ογκογονίδιο σε ογκογονίδιο, αφορούν σημειακές μεταλλάξεις, επαύξηση γονιδίων ή ακόμη και χρωμοσωμική αναδιάταξη (19). Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο τα πρωτο-ογκογονίδια συμμετέχουν στο μηχανισμό δράσης των διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος, διακρίνονται σε έξι βασικές κατηγορίες: στους αυξητικούς παράγοντες, στους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, στα σηματοδοτικά μόρια, στους μεταγραφικούς παράγοντες, στους παράγοντες αναδιάταξης της χρωματίνης και τέλος στους ρυθμιστές του μηχανισμού της απόπτωσης.

1.3.2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση με αντίθετο τρόπο σε σχέση μ' αυτόν των πρωτο-ογκογονιδίων.



Εικόνα 8. Οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων στα ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα προϊόντα της συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων είναι πρωτεΐνες-ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και του μηχανισμού της απόπτωσης. Έτσι, η αναστολή της δράσης των γονιδίων αυτών καθιστά αδύνατο τον έλεγχο των μηχανισμών πολλαπλασιασμού, κάτι που έχει ως συνεπακόλουθο την καρκινογένεση. Οι μεταλλάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι κυρίως υπολειπόμενες. Οι κληρονομήσιμες μεταλλάξεις σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο προδιαθέτουν γενετικά ένα άτομο για την εμφάνιση κάποιας μορφής καρκίνου, καθώς μία μόνο επιπλέον μετάλλαξη αρκεί για την πλήρη απώλεια της λειτουργικότητας του γονιδίου (Εικόνα 8) (καρκίνοι κληρονομικής βάσης). Η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να συμβεί μέσω σημειακών μεταλλάξεων, μέσω απαλοιφών χρωμοσωμικών περιοχών ή μέσω επιγενετικών αλλοιώσεων του υποκινητή τους.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια περιλαμβάνουν γονίδια ελέγχου των βλαβών του DNA και γονίδια επιδιόρθωσής του, γονίδια καταστολής του κυτταρικού κύκλου, αλλά και γονίδια επαγωγής του μηχανισμού της απόπτωσης. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που έχουν μελετηθεί ευρέως είναι αυτά που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RB και P53 (20). Η πρωτεΐνη RB αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστικό παράγοντα του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1, G1/S ή S. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη P53 ευθύνεται για τον έλεγχο της ακεραιότητας του DNA (21). Σε περίπτωση παρουσίας αλλοιώσεων του DNA, η P53 προκαλεί τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Η απώλεια της λειτουργικής δράσης του συγκεκριμένου γονιδίου, λόγω μεταλλάξεων, είναι κοινό

χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών τύπων καρκίνου (22, 23).

1.4. Παγκρεατικός καρκίνος

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) που δημοσίευσε η Eurostat (179/2014-25 November 2014) ο καρκίνος του παγκρέατος έχει ανέβει στην 4^η θέση των θανατηφόρων καρκίνων στην ΕΕ (24). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο παγκρεατικός καρκίνος είναι ένας από τους πλέον επιθετικούς τύπους καρκίνου με σημαντικά αυξημένη θνησιμότητα, αυξημένη ανθεκτικότητα στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα, κακή πρόγνωση (25), έλλειψη εξειδικευμένων καρκινικών βιοδεικτών (26) και ταχεία ανάπτυξη μεταστατικών εστιών (27) γίνεται κατανοητό ο προσανατολισμός του ερευνητικού ενδιαφέροντος στην έρευνα της βιολογίας του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου.

1.4.1. Χαρακτηριστικά και μορφολογική περιγραφή του αδένου

Μετά το ήπαρ, το πάγκρεας αποτελεί το δεύτερο σε μέγεθος αδένου του πεπτικού συστήματος. Εντοπίζεται πίσω από το στομάχι, στον ενδοπεριτοναϊκό χώρο της άνω κοιλίας. Το πάγκρεας έχει κωνικό σχήμα και εκτείνεται απ' την αγκύλη του δωδεκαδάχτυλου μέχρι και το σπλήνα. Ο παγκρεατικός αδένου περιλαμβάνει τρία κύρια μέρη: την κεφαλή, τον αυχένα ή σώμα και την ουρά. Το τμήμα του παγκρεατικού αδένου το οποίο βρίσκεται μπροστά από την άνω μεσεντέρια φλέβα, ορίζεται ως αυχένου του αδένου. Η κεφαλή του εντοπίζεται στα

δεξιά του αυχένα - μέσα στα όρια της αγκύλης του δωδεκαδακτύλου - και εμπεριέχει την προέκταση που προέρχεται από το κοιλιακό πάγκρεας που καλείται αγκιστροειδής απόφυση. Η αγκιστροειδής απόφυση προεκτείνεται πίσω από την περιοχή της μεσεντέριας φλέβας, καταλήγοντας στο δεξί όριο της άνω μεσεντέριας αρτηρίας. Το σώμα του παγκρέατος εντοπίζεται στην αριστερή πλευρά του αυχένα, ενώ η ουρά του αδένος προεκτείνεται στα αριστερά του σώματος, μέσα στο σπλήνα (28).

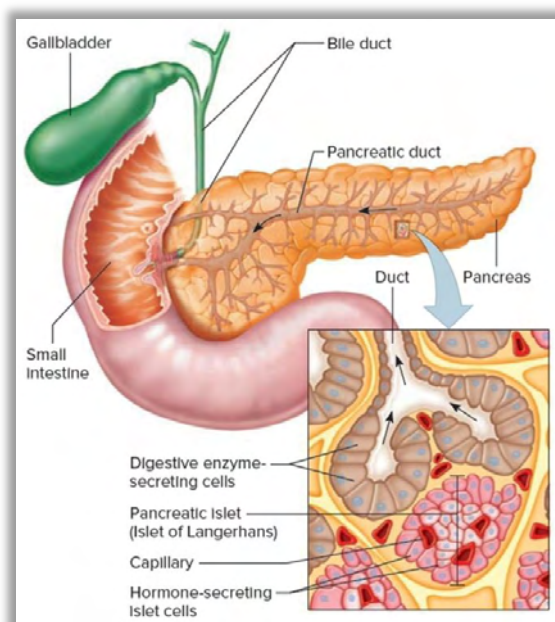
1.4.2. Ιστολογική περιγραφή του αδένος

Ο παγκρεατικός αδένος περιβάλλεται από ένα καψίδιο συνδετικού ιστού και περιλαμβάνει την ενδοκρινή και την εξωκρινή μοίρα. Η εξωκρινής παγκρεατική μοίρα αποτελείται από τα παγκρεατικά λοβία και τους παγκρεατικούς πόρους. Κάθε λόβιο αποτελείται από αθροίσεις σφαιρικών δομών εκκριτικών εξωκρινών κυττάρων, τις αδενοκυψέλες. Η αδενοκυψέλη περιλαμβάνει έναν ενδοκυψελιδικό χώρο, μέσα στον οποίο συγκεντρώνεται το περιεχόμενο των εκκριτικών κοκκίων. Τα παγκρεατικά λοβία αποτελούν την πλειονότητα των κυττάρων του παγκρεατικού αδένος. Στα κύτταρα των παγκρεατικών λοβίων πραγματοποιείται η σύνθεση του μεγαλύτερου μέρους των πεπτικών ενζύμων, με τη μορφή προ-ενζύμων, που καλούνται ζυμογόνα. Επίσης, στα κύτταρα των παγκρεατικών λοβίων συνθέτονται πρωτεΐνες που δεν προορίζονται για έκκριση, αλλά για ενδοκυτταρική χρήση, όπως για παράδειγμα οι δομικές πρωτεΐνες των κυττάρων και οι υδρολάσες των λυσοσωμάτων. Η έκκριση

πρωτεϊνών στα παγκρεατικά λοβία είναι μια διαδικασία που υπόκειται τόσο σε ορμονική όσο και σε νευρική ρύθμιση (29).

Τα κύτταρα των παγκρεατικών πόρων αποτελούν μόλις το 5% της παγκρεατικής μάζας. Έχουν κυλινδρικό σχήμα και εμπεριέχουν κοκκία βλέννης. Βάσει του μεγέθους των παγκρεατικών πόρων, από τους μεγαλύτερους προς τους μικρότερους πόρους των λοβίων, το σχήμα του επιθηλίου μεταβάλλεται, αντίστοιχα, από κυλινδρικό σε κυβικό, χωρίς κοκκία βλέννης. Ο μεγαλύτερος σε μέγεθος παγκρεατικός πόρος (πόρος του Wirsung) ξεκινά από την ουρά του παγκρέατος καταλήγοντας στο φύμα του Vater και το δωδεκαδάκτυλο, ενώ ο μικρότερος σε μέγεθος επικουρικός πόρος (πόρος του Santorini) ξεκινά από το μείζονα παγκρεατικό πόρο, στο ύψος του αυχένα, καταλήγοντας στο έλασσον φύμα.

Το ενδοκρινικό τμήμα του παγκρεατικού αδένος αποτελείται από δομές που ονομάζονται νησίδια του Langerhans, τα οποία βρίσκονται διάσπαρτα στην



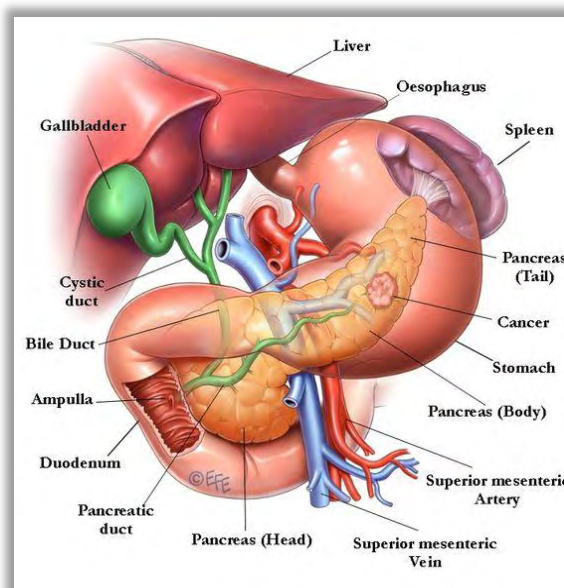
Εικόνα 9. Ιστολογική απεικόνιση του παγκρέατος

παγκρεατική μάζα και κυρίως στην ουρά του παγκρέατος. Τα νησίδια αποτελούνται από σφαιρικά ενδοκρινικά κύτταρα τα οποία διακρίνονται σε α και β-κύτταρα. Τα α-κύτταρα εντοπίζονται περιφερειακά των νησίδων και εκκρίνουν γλυκαγόνη. Τα β-κύτταρα εντοπίζονται κεντρικά των νησίδων και παράγουν ινσουλίνη. Εκτός από τα α-κύτταρα, στην περιφέρεια των νησίδων εντοπίζονται, σε διασπορά, τα δ-κύτταρα τα οποία παράγουν σωματοστατίνη (30) (Εικόνα 9).

1.4.3. Εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου

Πρόκειται για έναν τύπο καρκίνου με αυξημένη ανθεκτικότητα στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα, όπως χημειοθεραπείες, ραδιοθεραπείες και μοριακές θεραπείες. Όλοι οι προαναφερθέντες λόγοι καθιστούν τον παγκρεατικό καρκίνο έναν από τους πλέον επιθετικούς τύπους καρκίνου, με σημαντικά αυξημένη θνησιμότητα. Ειδικότερα, στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών είναι κάτω του 7%, με εξαίρεση τους ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική εξαίρεση όπου το ποσοστό κυμαίνεται στο 15-25% (31-33). Ένας βασικός λόγος για τον οποίο ο παγκρεατικός καρκίνος (Εικόνα 10) εμφανίζει κακή πρόγνωση είναι η έλλειψη ειδικών συμπτωμάτων στον πάσχοντα, με αποτέλεσμα η διάγνωση να λαμβάνει χώρα σε αρκετά προχωρημένο στάδιο. Μερικοί ακόμη παράγοντες που ενοχοποιούνται για την κακή πρόγνωση της νόσου είναι η έλλειψη εξειδικευμένων καρκινικών βιοδεικτών, αλλά και γενικά κάποιου αποτελεσματικού αιματολογικού ή άλλου ειδικού ελέγχου, καθώς και η ικανότητα του

συγκεκριμένου τύπου καρκίνου να σχηματίζει μεταστατικές εστίες ταχύτατα, λόγω της μεγάλης περινευρικής και αγγειακής ανάπτυξης που εμφανίζεται στην περιοχή του οργάνου. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως παρά τη μείωση που έχει σημειωθεί στα ποσοστά θνησιμότητας από καρκίνο, γενικά, τις τελευταίες δεκαετίες, τα ποσοστά θνησιμότητας απ' τον παγκρεατικό καρκίνο παρουσιάζουν σημαντική αύξηση (24).



Εικόνα 10. Καρκινικός όγκος στον παγκρεατικό αδένα.

1.4.4. Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου είναι: το κάπνισμα, η ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό χρόνιων παγκρεατίτιδων, ο διαβήτης και η παχυσαρκία (31). Ο διαβήτης αποτελεί τόσο παράγοντα κινδύνου για τη εμφάνιση της νόσου, αφού διπλασιάζει τον κίνδυνο ανάπτυξής της, όσο και συνέπεια αυτής. Ειδικότερα, η εμφάνιση διαβήτη μπορεί να αποτελέσει ένα αρχικό σύμπτωμα του παγκρεατικού καρκίνου σε

ηλικιωμένους ασθενείς. Η εμφάνιση της νόσου φαίνεται να έχει σε κάποιο βαθμό και φυλετική βάση, αφού οι αυτόχθονες πληθυσμοί της αμερικανικής ηπείρου παρουσιάζουν ελαφρώς αυξημένες πιθανότητες να νοσήσουν από παγκρεατικό καρκίνο. Αντιστοίχως, αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου έχει παρατηρηθεί και σε ανθρώπους με καταγωγή από την αφρικανική ήπειρο, με πιθανότητες εμφάνισης της νόσου αυξημένες από 30 έως 70% (34)

Το κάπνισμα έχει αξιολογηθεί ως ο πλέον σημαντικός παράγοντας πρόκλησης παγκρεατικού καρκίνου, με την αύξηση του κινδύνου να ανέρχεται στο 20%. Έχει βρεθεί πως οι καπνιστές εμφανίζουν δύο έως τρεις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παγκρέατος σε σχέση με τους μη καπνιστές (31).

Ο ρόλος που κατέχει στην εμφάνιση της νόσου η κληρονομικότητα είναι σημαντικός, αφού αφορά περίπου το 10% των ασθενών (31). Έτσι, οι συγγενείς πρώτου βαθμού των ατόμων με παγκρεατικό καρκίνο παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου έως και 9 φορές, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (35).

Πραγματικά, ο καρκίνος του παγκρέατος έχει ισχυρή γενετική βάση, αφού η εμφάνισή του οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις είτε κληρονομήσιμες είτε *de novo*. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, συνήθως, κληρονομείται ένα μεταλλαγμένο γονίδιο και ένα φυσιολογικό. Εάν το τελευταίο υποστεί κάποια αλλοίωση, τότε μπορεί να προκληθεί καρκινογένεση, αφού το συγκεκριμένο γονίδιο θα απολέσει πλήρως τη λειτουργικότητά του. Τα γονίδια που σχετίζονται με τον κληρονομικό παγκρεατικό καρκίνο είναι κυρίως ογκοκατασταλτικά, καθώς και γονίδια που

εμπλέκονται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Πολλά γενετικά σύνδρομα παρουσιάζουν κάποιο βαθμό συσχέτισης με την ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος, όπως το σύνδρομο Peutz-Jeghers. Μεταλλάξεις σε γονίδια όπως *Brca2*, *Brca1*, *Cdkn2a*, *Atm*, *Stk11*, *Prss1*, *Mlh1* και *Palb2*, έχουν συσχετιστεί με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου, με το καθένα απ' αυτά τα μεταλλαγμένα γονίδια, ωστόσο, να έχει διαφορετική επίδραση στο βαθμό επικινδυνότητας (31).

1.4.5. Παθοφυσιολογία της νόσου

Το 60% των καρκίνων του παγκρεατικού αδένου εντοπίζεται στην κεφαλή, το 15% εντοπίζεται στο σώμα και το 5% στην ουρά του αδένου. Η πλειοψηφία των παγκρεατικών καρκίνων εντοπίζονται στην εξωκρινή μοίρα του αδένου -και ιδιαιτέρως στο αδενικό επιθήλιο- και καλούνται αδενοκαρκινώματα. Αντίθετα, ένα μικρό μέρος των κρουσμάτων παγκρεατικού καρκίνου, μόλις το 5%, αφορά όγκους στην ενδοκρινή μοίρα του αδένου.

Ο παγκρεατικός καρκίνος που αφορά την εξωκρινή μοίρα του αδένου, διακρίνεται σε δύο ιστολογικούς υπότυπους. Ο πρώτος υπότυπος αφορά το καρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου και αποτελεί τον πλέον διαδεδομένο τύπο παγκρεατικού καρκίνου, με τα ποσοστά εμφάνισης να ανέρχονται έως και το 90%. Αυτό ο καρκινικός υπότυπος προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του πόρου. Υπερπλαστικές αλλοιώσεις, γνωστές και ως παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (PanIN), προηγούνται της ανάπτυξης του καρκινικού όγκου και προέρχονται από διάφορα προγονικά βλαστοκύτταρα. Έτσι, δημιουργείται κλωνική ετερογένεια, κάτι που δικαιολογεί και την

ετερογένεια που εμφανίζει ο παγκρεατικός καρκίνος (36).

1.4.6. Διάγνωση και σταδιοποίηση του παγκρεατικού καρκίνου

Τα κυριότερα συμπτώματα που παρουσιάζουν οι ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο είναι ίκτερος, λόγω της συμπίεσης του χοληφόρου αγωγού στην κεφαλή του παγκρεατικού αδένος, απώλεια σωματικού βάρους και κοιλιακό άλγος. Επίσης, οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν συμπτώματα ανορεξίας, κνησμό, γενική αδυναμία και εντερική δυσλειτουργία.

Η κακή πρόγνωση του καρκίνου του παγκρέατος, καθώς και η δυσκολία διάγνωσής του, οφείλεται, μεταξύ άλλων, και στην έλλειψη καρκινικών βιοδεικτών υψηλής ευαισθησίας. Ωστόσο, το καρκινικό αντιγόνο CA 19-9 (ένας σιαλοποιημένος ολιγοσακχαρίτης που συναντάται συνήθως στις κυκλοφορούσες βλεννίνες των καρκινοπαθών), έχει βρεθεί πως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη της ασθένειας και στη θεραπευτική απόκριση. Φυσιολογικά, το αντιγόνο CA 19-9 είναι παρόν στα κύτταρα του χοληφόρου δένδρου και μπορεί να αυξηθεί στην οξεία ή τη χρόνια νόσο των χοληφόρων. Περίπου το 10 με 15% των ασθενών δεν έχουν το ένζυμο που σχετίζεται με την παραγωγή του CA 19-9. Στους ασθενείς αυτούς, με χαμηλό ή απόντα τίτλο του CA 19-9, η παρακολούθηση της νόσου καθίσταται αδύνατη με το συγκεκριμένο βιοδείκτη. Το 75 με 85% των πασχόντων από παγκρεατικό καρκίνο έχουν αυξημένα επίπεδα CA 19-9.

Ωστόσο, αυτός ο βιοδείκτης δεν μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο για τον παγκρεατικό καρκίνο, αφού

παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, καθώς μπορεί να αυξηθεί και σε πολλές περιπτώσεις καλοήθειας (32, 33, 37).

Η σταδιοποίηση του παγκρεατικού καρκίνου γίνεται σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης TNM (Tumor, Number of nodes, Metastasis) (Πίνακας 1). Το συγκεκριμένο σύστημα είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο και εξετάζει τις εξής τρεις παραμέτρους (38):

- *T (Tumor)*: αναφέρεται στο μέγεθος του όγκου
- *N (Number of nodes)*: αναφέρεται στον αριθμό των λεμφαδένων οι οποίοι έχουν προσβληθεί
- *M (Metastasis)*: αναφέρεται στην παρουσία μετάστασης σε γειτονικούς ή απομακρυσμένους ιστούς

1.4.7. Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Στον παγκρεατικό καρκίνο η θεραπευτική στόχευση αφορά κυρίως στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και όχι στην καταπολέμηση της νόσου, κυρίως λόγω του ασυμπτωματικού χαρακτήρα της νόσου που την καθιστά ανιχνεύσιμη σε προχωρημένα στάδια (39). Η χημειοθεραπεία είναι ο κύριος τύπος συστηματικής θεραπείας που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου. Υπάρχουν επί του παρόντος τέσσερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα εγκεκριμένα από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), για τη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος: ABRAXANE® (πακλιταξέλη συνδεδεμένη με λευκωματίνη), Gemzar® (γεμισιταμπίνη) (Εικόνα 11), 5-FU (φλουοουρακίλη) και ONIVYDE®

Πίνακας 1. Σταδιοποίηση του καρκίνου του παγκρέατος με το σύστημα ταξινόμησης TNM.

Σύμβολο: (●) οποιοδήποτε | Συντομογραφίες: (μ.δ.) μέγιστη διάσταση

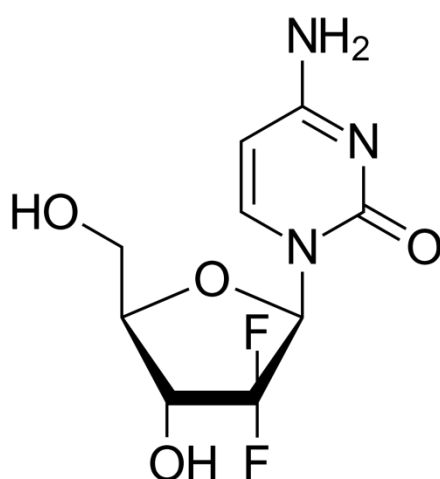
Στάδιο	TNM	Περιγραφή
0	Tis, N0, M0	Tis: Καρκίνος <i>in situ</i>
IA	T1, N0, M0	T1: Όγκος περιοριζόμενος στο πάγκρεας, μ.δ. ≤ 2 cm
IB	T2, N0, M0	T1: Όγκος περιοριζόμενος στο πάγκρεας, μ.δ. 2 > cm
IIA	T3, N0, M0	T3: Ο όγκος εκτείνεται πέρα από το πάγκρεας, αλλά χωρίς να έχει επηρεάσει τον κοιλιακό άξονα ή την άνω μεσεντέρια αρτηρία
IIB	T1, N1, M0 T2, N1, M0 T3, N1, M0	N1: Λεμφαδενικές μεταστάσεις
III	T4, N●, M0	T4: Ο όγκος έχει επηρεάσει τον κοιλιακό άξονα ή την άνω μεσεντέρια αρτηρία (μη εξαιρέσιμος πρωτογενής όγκος)
IV	T●, N●, M1	M1: Απομακρυσμένες μεταστατώσεις

(λιποσώμακή ιρινοτεκάνη). Το Gemzar® εγκρίθηκε το 1996 για τη θεραπεία του μη εξαιρέσιμου παγκρεατικού καρκίνου. Μελέτες έχουν δείξει ότι προκύπτουν οφέλη από τη χρήση του Gemzar® μετά από χειρουργική επέμβαση. Αυτό καλείται προφυλακτική θεραπεία (adjuvant therapy). Πριν από το Gemzar®, χρησιμοποιήθηκε 5-FU ως πρότυπη θεραπεία για μη ανιχνεύσιμο καρκίνο του παγκρέατος. Και τα δύο αυτά φάρμακα εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται έως σήμερα.

Το Σεπτέμβριο του 2013, το ABRAXANE® εγκρίθηκε για χρήση σε συνδυασμό με το Gemzar®, ως θεραπεία πρώτης γραμμής για το μεταστατικό παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, τον πιο συνηθισμένο τύπο παγκρεατικού καρκίνου. Το ONIVYDE®, σε συνδυασμό με το 5-FU και λευκοβορίνη, εγκρίθηκε τον Οκτώβριο του 2015 ως θεραπεία για μεταστατικό παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, μετά την αποτυχία της θεραπείας με γεμισιταμίνη. Εκτός από τα τέσσερα φάρμακα που έχουν εγκριθεί από

την FDA, το FOLFIRINOX, ένας συνδυασμός τριών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (5-FU/λευκοβορίνη, ιρινοτεκάνη και οξαλιπλατίνη) χρησιμοποιείται, συνήθως, στη θεραπεία του μεταστατικού παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Το 2010, μια κλινική δοκιμή φάσης III έδειξε θετικά αποτελέσματα για ασθενείς που έλαβαν FOLFIRINOX. Λόγω των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης, το FOLFIRINOX θεωρείται μια ακόμη επιλογή θεραπείας για ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παγκρέατος. Ωστόσο, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με FOLFIRINOX μπορεί να εμφανίσουν πιο σοβαρές παρενέργειες από εκείνους που υποβάλλονται σε θεραπεία με Gemzar®, οπότε αυτός ο συνδυασμός συνήθως χορηγείται σε ασθενείς που είναι σε αρκετά καλή κατάσταση (high performance status), ώστε να μπορέσουν να ανταπεξέλθουν στις πιθανές παρενέργειες. Άλλες χημειοθεραπείες για τον καρκίνο του παγκρέατος εξακολουθούν να αποτελούν αντικείμενο έρευνας και βρίσκονται σε φάση κλινικών δοκιμών.

Η ανοσοθεραπεία χρησιμοποιείται περιστασιακά. Η ακτινοθεραπεία - συνδυαστικά με τη χημειοθεραπεία- επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου. Σε πολλές περιπτώσεις δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρουργική εξαίρεση, διότι έχουν δημιουργηθεί εστίες μετάστασης με μεγάλη διασπορά. Ακόμη, όμως, και σε περιπτώσεις που είναι δυνατή η πραγματοποίηση χειρουργικής εξαίρεσης, ο μέσος χρόνος επιβίωσης μετά την επέμβαση είναι μικρότερος των 20 μηνών, με εξαίρεση ένα 20% των ασθενών που μπορεί να επιβιώσει έως και 5 έτη (40). Γενικά, οι πάσχοντες από καρκίνο του παγκρέατος χρειάζονται συνεχή παρακολούθηση και έλεγχο (41).



Εικόνα 11. Χημική δομή της γεμισιταμπίνης.

1.5. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

1.5.1. Γενικά

Η αυτοφαγία αποτελεί ένα μηχανισμό κυτταρικής επιβίωσης που περιλαμβάνει την αποδόμηση και ανακύκλωση παρωχημένων,

κατεστραμμένων ή επιβλαβών μακρομοριακών δομών. Η απόπτωση είναι ένας κανονικά προγραμματισμένος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου. Έχει αποδειχθεί ότι οι μηχανισμοί της αυτοφαγίας και της απόπτωσης αλληλεπιδρούν μέσω διαφόρων αλληλοσυνδεόμενων μοριακών κόμβων, επιτρέποντας τη συντονισμένη ρύθμιση των διεργασιών αποικοδόμησης. Κανονικά, τόσο η αυτοφαγία όσο και η απόπτωση είναι μηχανισμοί καταστολής όγκων. Η αυτοφαγία εκπληρώνει αυτόν το ρόλο δεδομένου ότι διευκολύνει την αποικοδόμηση των ογκογόνων μορίων, εμποδίζοντας την ανάπτυξη καρκίνων, ενώ η απόπτωση εμποδίζει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, ελαττωματικά ή ανεπαρκή επίπεδα είτε αυτοφαγίας είτε απόπτωσης μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Ωστόσο, η αυτοφαγία φαίνεται ότι έχει διπλό ρόλο στον καρκίνο, καθώς έχει αποδειχθεί ότι διευκολύνει, επίσης, την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε στρεσογόνες συνθήκες, όπως υποξικές καταστάσεις ή καταστάσεις διατροφικής πείνας. Παρακάτω αναλύονται οι πολλαπλοί μοριακοί μηχανισμοί συντονισμού της αυτοφαγίας και της απόπτωσης, καθώς και του ρόλου που διαδραματίζουν στον καρκίνο οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτή την διαδραστική αλληλεπίδραση των δύο αυτών μηχανισμών κυτταρικού θανάτου. Μια βαθιά κατανόηση της διασύνδεσης της αυτοφαγίας και της απόπτωσης θα υπηρετήσει ουσιαστικά το στόχο της ανάπτυξης αποτελεσματικών θεραπειών έναντι του καρκίνου (42).

1.5.2. Εισαγωγή στην αυτοφαγία

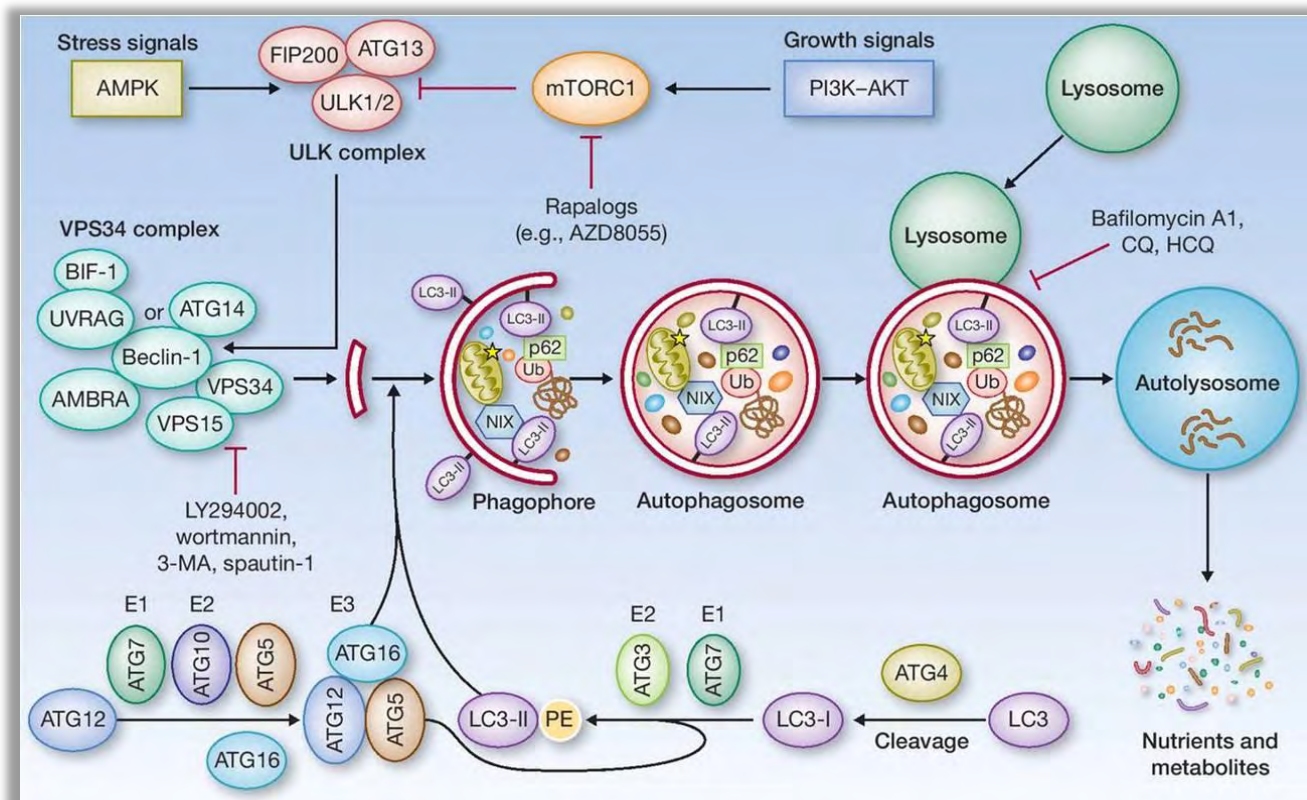
Η αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός κυτταρικής επιβίωσης που διατηρείται σε όλους τους ευκαρυώτες οργανισμούς. Περιλαμβάνει την επιλεκτική αποικοδόμηση κυτταρικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων μακρόβιων πρωτεϊνών, πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, κυτταροπλασματικών οργανιδίων που έχουν υποστεί βλάβη και ενδοκυτταρικών παθογόνων, με αποτέλεσμα την ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών και την παραγωγή ενέργειας (43). Τα βασικά επίπεδα αυτοφαγίας είναι απαραίτητα για την κυτταρική ομοιόσταση. Η αυτοφαγία πυροδοτείται υπό συνθήκες στρες, συμπεριλαμβανομένου του εξωκυττάριου στρες - όπως η διατροφική στέρηση, η υποξία και οι λοιμώξεις - και του ενδοκυττάριου στρες, όπως αυτό που προκαλείται από τη συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και οργανιδίων, καθώς και υψηλές βιοενεργειακές απαιτήσεις. Επιτρέπει στις κατώτερους ευκαρυώτες να επιβιώνουν σε συνθήκες διατροφικής στέρησης, ενώ στα θηλαστικά, πιστεύεται ότι εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων των μηχανισμών αντιγήρανσης, τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη, την ανοσία και την αντιμετώπιση των μικροοργανισμών (44, 45).

Η αυτοφαγία είναι ένας αυστηρά ρυθμιζόμενος μηχανισμός (Εικόνα 12) που ενεργοποιείται από εξειδικευμένους τελεστές, πολλοί από τους οποίους είναι

γνωστοί ως πρωτεΐνες ATG (43, 46, 47). Το πρώτο βήμα της αυτοφαγίας είναι η πυρήνωση κυστιδίων, όπου τα μακρομοριακά συγκροτήματα που επιλέγονται για αποικοδόμηση περιβάλλονται από μεμβράνες απομόνωσης που ονομάζονται φαγοφόρα. Η διαδικασία της πυρήνωσης κυστιδίων εκτελείται από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών του οποίου ο πυρήνας περιλαμβάνει: α) τη φωσφατιδυλνιανοσιτόλη-3-κινάση τάξης III (PI3Kc3 ή VPS34) που καταλύει τη φωσφορυλίωση της φωσφατιδυλνιανοσιτόλη προς 3-φωσφορική φωσφατιδυλνιανοσιτόλη, β) τη PI3Kc3 ρυθμιστική υπομονάδα (p150 ή VPS15), μια μυριστυλιωμένη κινάση σερίνης/θρεονίνης που φωσφορυλιώνει την PI3Kc3 και την οδηγεί στη μεμβράνη, και γ) την πρωτεΐνη BCL-2 (Beclin 1 ή ATG6), η οποία φαίνεται να είναι πρωτεΐνη του κόμβου αλληλεπίδρασης. Πρόσφατα, η Ambra 1, που αναγνωρίστηκε ως ένας θετικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας που αλληλεπιδρά με τη Beclin 1, αποδείχτηκε ότι αποτελεί μέρος του προαναφερόμενου πρωτεϊνικού συμπλόκου (48). Επιπλέον, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο συνδέεται με διάφορες άλλες πρωτεΐνες, όπως η ATG14, η πρωτεΐνη του γονιδίου αντίστασης στην υπεριώδη ακτινοβολία (UVRAG), η πρωτεΐνη 1 μεμβράνης κενοτοπίου (Vmp1), η ενδοφιλίνη B1 (Bif-1) και η συσχετιζόμενη με τη Beclin 1 πρωτεΐνη Rubicon (που περιλαμβάνει την εξελικτικά συντηρημένη περιοχή RUN). Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες σχηματίζουν σύμπλοκα που έχουν διακριτές λειτουργίες στη ρύθμιση της αυτοφαγίας (49, 50).

Οι μεμβράνες που περιβάλλουν το αρτιγενές φαγοφόρο μεγεθύνονται και στη συνέχεια τήκονται στις άκρες τους για να σχηματίσουν πολυστρωματικά κυστίδια, που καλούνται αυτοφαγοσώματα. Δύο συστήματα σύζευξης εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία (51-54). Στο ένα σύστημα, η ATG12, μια πρωτεΐνη τύπου ουβικουιτίνης, είναι ομοιοπολικά συζευγμένη με την ATG5. Το σύμπλοκο αυτό σχηματίζει έπειτα ένα μεγαλύτερο πολυμερικό σύμπλεγμα με TG16. Στο δεύτερο σύστημα, μια άλλη πρωτεΐνη που μοιάζει με ουβικουιτίνη, η κυτοσολική ATG8/LC3-I, είναι συζευγμένη με φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και σχηματίζει το σύμπλοκο LC3-II, το οποίο αλληλεπιδρά με τη μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων. Τα αυτοφαγοσώματα τελικά συγχωνεύονται με

τα λυσοσώματα του κυττάρου σχηματίζοντας αυτοφαγολυσοσώματα, στο εσωτερικό των οποίων τα εγκλωβισμένα συστατικά αποικοδομούνται από τις λυσοσωμικές υδρολάσες (συμπεριλαμβανομένης της LC3-II). Συνεπώς, η LC3-II αποτελεί δείκτη των αυτοφαγοσωμικών μεμβρανών και αλλαγές στα επίπεδά της συνδέονται με την πυροδότηση της αυτοφαγίας. Ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της LC3-I και LC3-II μέσω τεχνικών ανίχνευσης, όπως η ανοσοαποτύπωση Western, αποτελεί μια αξιόπιστη προσέγγιση για τον έλεγχο της αυτοφαγίας και των σχετιζόμενων με αυτή κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου (55, 56).



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αυτοφαγίας.

1.5.3. Το mTOR σηματοδοτικό μονοπάτι στην αυτοφαγία

Το mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) σηματοδοτικό μονοπάτι σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το στρες και την ανάπτυξη του καρκίνου (57). Το mTOR αποτελείται από δύο σύμπλοκα, το mTORC1 και το mTORC2, καθένα από τα οποία παρουσιάζει διακριτές λειτουργίες και εντοπισμό (58-60). Το ενεργοποιημένο mTORC1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη φωσφορυλίωση της σχετιζόμενης με την αυτοφαγία πρωτεΐνης (ATG) και οδηγεί στην αναστολή της αυτοφαγίας. Όταν το mTORC1 μονοπάτι αναστέλλεται υπό διάφορες στρεσογόνες συνθήκες, όπως η διατροφική στέρηση και οι βλάβες οργανιδίων, η αυτοφαγία ενισχύεται. Το mTORC1 μονοπάτι ρυθμίζεται από την ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση (AMPK) και η αναστολή του mTORC1 και η αύξηση του AMPK επάγει το μηχανισμό της αυτοφαγίας (61, 62). Ωστόσο, ο ρόλος του mTORC1 στην αυτοφαγία δεν έχει αποσαφηνιστεί (63).

Όταν αναστέλλεται το mTORC1, το σύμπλοκο ULK (Unc-51-like autophagy-activating kinase) αποφωσφορυλιώνεται και μ' αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται (64). Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο ULK εντοπίζεται στο φαγόφορο και ενεργοποιεί την PI3Kc3 (65). Η Beclin-1 δεσμεύει πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ωρίμανση και επιμήκυνση του αυτοφαγοσώματος (66). Η επιμήκυνση του αυτοφαγοσωμικού σχηματισμού ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες της ομάδας ATG. Τα σύμπλοκα ATG5-ATG12/ATG16L δεσμεύουν την πρωτεΐνη LC3-I και συνδέονται με την επέκταση του φαγοφόρου (67, 68). Στη συνέχεια, η LC3-I οδηγεί στην επιμήκυνση του φαγοφόρου.

Η πρόδρομη LC3 πρωτεΐνη μετατρέπεται στην ενεργή κυτοσολική ισομορφή LC3-I με ATG4B. Στη συνέχεια, η LC3-I μετατρέπεται σε LC3-II με αλληλεπίδραση με φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, ATG3 και ATG7. Η LC3-II βρίσκεται στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος, επιτρέποντάς της να δεσμεύεται σε αποικοδομημένα υποστρώματα (69-72).

1.5.4. Ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο

Στη βιολογία του καρκίνου, η αυτοφαγία παίζει διπλό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη του καρκινικού όγκου όσο και στην καταστολή του (73, 74). Ορισμένα αντικαρκινικά φάρμακα μπορούν να ρυθμίσουν την αυτοφαγία. Επομένως, οι χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις που βασίζονται στην αυτοφαγία μπορεί να εμπλέκονται στην επιβίωση ή τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων (75, 76). Επιπλέον, η ρύθμιση της αυτοφαγίας συμβάλλει στην έκφραση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών ή ογκογονιδίων. Οι παράγοντες καταστολής των όγκων είναι αρνητικά ρυθμιζόμενοι από το mTOR και την AMPK, με αποτέλεσμα την επαγωγή αυτοφαγίας και την καταστολή της καρκινογένεσης (77). Αντίθετα, τα ογκογονίδια μπορούν να ενεργοποιηθούν από το mTOR, την PI3Kc1 και την AKT, με αποτέλεσμα την καταστολή της αυτοφαγίας και την ενίσχυση του σχηματισμού καρκινικών όγκων (78).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 | Σίγμα Υποδοχείς

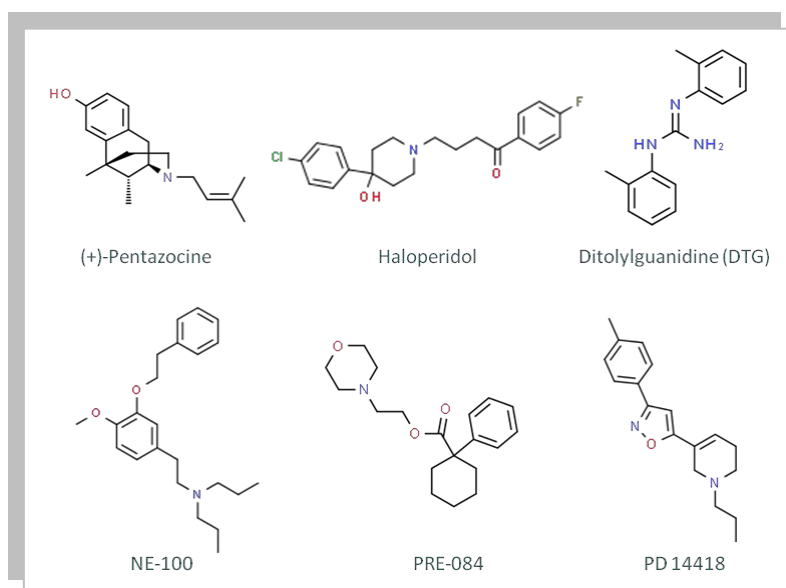
2.1. Οι σίγμα (σ) υποδοχείς

2.1.1. Η φαρμακολογία των σ υποδοχέων που οδήγησε στην ταυτοποίησή τους

Το αίνιγμα της ταυτότητας των σίγμα υποδοχέων έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα τουλάχιστον κατά τη διάρκεια των τελευταίων τεσσάρων δεκαετιών. Η ιστορία των σίγμα υποδοχέων έχει υποστεί πολλές ανατροπές και σχεδόν κάθε δεκαετία από την αρχική τους ανακάλυψη, σημαντικές νέες εξελίξεις επιχειρούν να επαναπροσδιορίσουν το πεδίο. Το 1976, φαρμακολογικές μελέτες σε οπιοειδείς και οπιούχες ενώσεις, οδήγησαν στη πρόταση για την ύπαρξη τριών διακριτών υπότυπων υποδοχέων των οπιοειδών: μ ι (μ), κ άππα (κ) και σίγμα (σ) από τα αρχικά των αγωνιστών τους μορφίνη, κετοκυκλαζοκίνη και την SKF10047

βενζομορφάνη αντίστοιχα. Οι ερευνητές υποστήριξαν πως ο ανταγωνιστής των οπιοειδών, ναλοξόνη, ανέστειλε τη δράση και των τριών υποδοχέων, γεγονός που "εισήγαγε" τους σίγμα (σ) υποδοχείς σαν μέλη της οικογένειας των οπιοειδών (79). Ωστόσο, πειράματα σύνδεσης με ραδιοσημασμένους προσδέτες αποκάλυψαν ότι η θέση πρόσδεσης του υποδοχέα σ δεν είχε καμία ομοιότητα με τη θέση πρόσδεσης των άλλων υποδοχέων των οπιοειδών. Συγκεκριμένα, ο σ υποδοχέας δεν εμφάνιζε συγγένεια πρόσδεσης με τους κλασικούς οπιοειδείς προσδέτες όπως η ναλοξόνη, η ετορφίνη και οι (-)βενζομορφάνες. Αντ' αυτού, ο σ υποδοχέας εμφάνιζε υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα μόνο για τα (+)στερεοϊσομερή των βενζομορφανών καθώς και για πολλά άλλα μικρά μόρια με μικρή δομική ομολογία μεταξύ τους (Εικόνα 13).

Το ασυνήθιστο φαρμακολογικό προφίλ του υποδοχέα προσέλκυσε το ενδιαφέρον των φαρμακολόγων καθ' όλη τη δεκαετία του '80



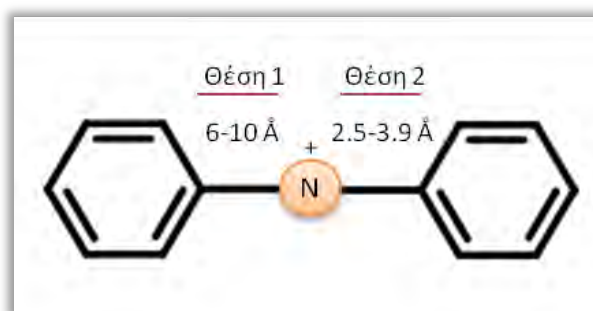
Εικόνα 13. Χημικές δομές αντιπροσωπευτικών σ προσδετών

και του '90. Ωστόσο, το σύμμικτο αυτό προφίλ πρόσδεσης σήμαινε ότι υπήρχαν λίγοι εκλεκτικοί προσδέτες, περιπλέκοντας τις προσπάθειες ώστε να μπορέσουν να αποδοθούν σαφείς φαρμακολογικές αποκρίσεις οφειλόμενες ξεκάθαρα στη δράση του σ υποδοχέα (80).

2.1.2. Οι σ υποδοχείς διαχωρίζονται σε δύο διακριτούς υπότυπους

Καθώς όλο και περισσότερα μόρια με διαφορετικούς βαθμούς συγγένειας για τους σ υποδοχείς προσδιορίζονταν, το 1990 οι σ υποδοχείς υποδιαιρέθηκαν σε δύο διακριτούς υπότυπους οι οποίοι ονομάστηκαν σίγμα 1 (σ1) και σίγμα 2 (σ2). Ο διαχωρισμός των υπότυπων βασίστηκε κυρίως στα παρατηρούμενα διαφορετικά πρότυπα πρόσδεσης των σίγμα προσδετών. Η κατηγοριοποίηση αυτή επιτεύχθηκε μέσω της χρήσης της (3^H)(+)-πενταζοσίνης (pentazocine) η οποία συνεπικούρησε σε δύο σημαντικές προόδους στη φαρμακολογία του σ υποδοχέα (81). Αρχικά, επέτρεψε την αναγνώριση δύο διαφορετικών σημείων πρόσδεσης στον σ υποδοχέα. Η πρώτη θέση πρόσδεσης ονομάστηκε σ1 και αντιστοιχεί, σε μεγάλο βαθμό, στον κλασικό υποδοχέα σ, όπως είχε αρχικά περιγραφεί (82), ενώ η δεύτερη θέση πρόσδεσης ονομάστηκε σ2 και παρουσιάζει, όπως και ο σ1, υψηλή συγγένεια για τους προσδέτες, διτολυλγουανιδίνη (DTG: Ditolylguanidine) και αλοπεριδόλη (haloperidol). Ωστόσο, σε αντίθεση με τον σ1, ο σ2 υποδοχέας δεν εμφανίζει κανένα βαθμό συγγένειας για τις βενζομορφάνες (81). Η δεύτερη σημαντική πρόοδος μέσω της χρήσης της (3^H)(+)-πενταζοσίνης ήταν η

ταυτοποίηση της φαρμακοφόρου δομής* των σ1 προσδετών, μιας δομικά συντηρημένης περιοχής μεταξύ των σ1 προσδετών υψηλής συγγένειας. Η φαρμακοφόρος δομή των σ1 προσδετών περιλαμβάνει ένα θετικά φορτισμένο άτομο αζώτου που πλαισιώνεται από δύο υδρόφοβες ή αρωματικές περιοχές μήκους 6-10 Å και 2,5-3,9 Å (Εικόνα 14). Όλοι οι γνωστοί προσδέτες με υψηλή συγγένεια για τον σ1 υποδοχέα ($K_d < 50$ nM) φέρουν τη δομή αυτή (83).



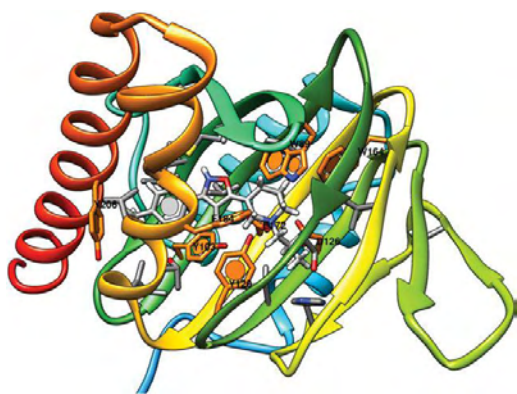
Εικόνα 14. Φαρμακοφόρος δομή των σ1 προσδετών

2.1.3. Οι προσδέτες των σ υποδοχέων

Παρά τις επιτακτικές αποδείξεις ότι οι σ υποδοχείς δεν αποτελούν υποδοχείς με την παραδοσιακή έννοια του όρου, μικρομοριακές ενώσεις που εμφανίζουν υψηλό βαθμό συγγένειας με τους σ υποδοχείς συνεχίζουν να περιγράφονται ως αγωνιστές και ανταγωνιστές, με βάση την ικανότητά τους να ενεργοποιούν ή να αδρανοποιούν τη φαρμακολογική τους απόκριση αντίστοιχα (79, 84, 85).

*Φαρμακοφόρος δομή: όρος που αποδίδεται στον Γερμανό Νομπελίστα Paul Ehrlich για να περιγράψει το σύνολο των υπεύθυνων στερεοχημικών και ηλεκτρονιακών χαρακτηριστικών για πρόκληση ενός συγκεκριμένου βιολογικού αποτελέσματος.

Η κατηγοριοποίηση αυτή βασίστηκε σε μελέτες που είχαν αποδείξει πως οι συνθετικοί σ1 προσδέτες DTG και BD1052 προκαλούσαν επιδείνωση των σπασμών και της κινητικής δραστηριότητας που επάγονταν από κοκαΐνη και ταξινομήθηκαν ως αγωνιστές (86). Βασιζόμενοι σε αυτή την παρατήρηση, άλλοι συνθετικοί σ1 προσδέτες όπως οι BD1008, BD1047, BD1063 και LR172 ταξινομήθηκαν ως ανταγωνιστές επειδή εξασθενούσαν τους επαγόμενους από κοκαΐνη σπασμούς, τη μη φυσιολογική υπερκινητικότητα και τη θνησιμότητα σε *in vivo* πειράματα σε ποντίκια (87). Μεταγενέστερες μελέτες, κατηγοριοποίησαν τους σ1 προσδέτες ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές του σ1 υποδοχέα με βάση την ικανότητά τους να αναπαράγουν τα αποτελέσματα της γονιδιακής αποσιώπησης του σ1 υποδοχέα σε ζωικά μοντέλα (85). Προσδέτες που μιμούνταν την γονιδιακή αποσιώπηση του σ1 θεωρήθηκαν σ1 ανταγωνιστές. Μέχρι σήμερα οι όροι αγωνιστές και ανταγωνιστές για το χαρακτηρισμό των σίγμα προσδετών προκαλούν αρκετή σύγχυση και αρχίζουν να αντικαθίστανται από τους ερευνητές με το γενικότερο όρο «ρυθμιστές» των σίγμα υποδοχέων (88, 89).



Εικόνα 15. Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ του σ1 ανθρώπινου υποδοχέα με τον προσδέτη του PD144418.

2.2. Ο υποδοχέας σ1

2.2.1. Ταυτοποίηση και δομικά στοιχεία του υποδοχέα σ1

Γνωρίζουμε πλέον ότι ο υποδοχέας σ1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους (26 kDa). Σε υποκυτταρικό επίπεδο, εντοπίζεται κυρίως στο ER διαφόρων τύπων κυττάρου σε ένα εύρος ιστών, συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), της καρδιάς, των ωοθηκών, των νεφρών, των όρχεων, του ήπατος, του παγκρέατος και του πλακούντα. Υψηλά επίπεδα έκφρασης του σ1 έχουν επίσης βρεθεί σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα κατά τη διάρκεια διαφόρων σταδίων της εμβρυογένεσης (90, 91).

Η κλωνοποίηση του (92), ήταν ένα σημαντικό ορόσημο που αποκάλυψε πως ο σ1 δεν εμφάνιζε καμία σημαντική ομολογία με κανέναν άλλο παραδοσιακό υποδοχέα και γενικότερα με καμία άλλη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Με την πρόοδο της έρευνας, άρχισε να γίνεται σαφές πως ο σ1 δεν ταιριάζει στην παραδοσιακή έννοια του όρου «υποδοχέας», παρόλο που συνέχισε και συνεχίζει να ονομάζεται έτσι. Το 2007, εισήχθη για πρώτη φορά η έννοια της πρωτεΐνης-συνοδού (chaperone) για να περιγράψει τη λειτουργία του σ1 (93), και λίγα χρόνια αργότερα προτάθηκε πως η λειτουργική δομή του σ1 είναι μια ολιγομερής δομή του υποδοχέα (94). Το τρισδιάστατο μοντέλο του σ1 προσδιορίστηκε και παρουσιάστηκε το 2011 (95) ενώ η τοπολογία της διαμεμβρανικής αρχιτεκτονικής του, παρέμενε ασαφής για πολύ καιρό.

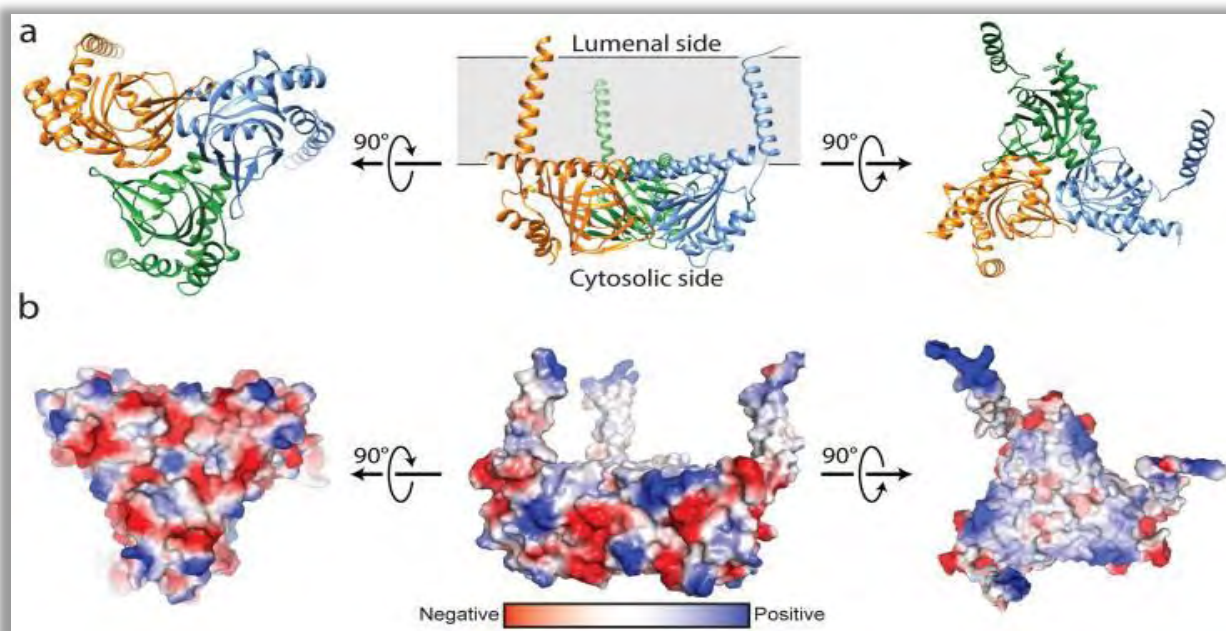
2.2.2. Κρυσταλλική δομή του σ1

Η κρυσταλλική δομή του σ1 υποδοχέα δημοσιεύθηκε πολύ πρόσφατα (Εικόνα 15) (96), αποκαλύπτοντας μια ασυνήθιστη τριμερή αρχιτεκτονική, αποτελούμενη από τρία πρωτομερή μόρια το καθένα από τα οποία περιλαμβάνουν μια διαμεμβρανική περιοχή. Σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη πως η διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα διαπερνούσε δύο φορές την κυτταρική μεμβράνη, η κρυσταλλική του δομή αποκαλύπτει σαφώς την ύπαρξη μιας μόνο διαμεμβρανικής περιοχής σε κάθε πρωτομερές, η οποία βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα. Η καρβοξυτελική περιοχή του υποδοχέα σχηματίζει μια επίπεδη, στενά συνδεδεμένη

με την κυτοσολική επιφάνεια της μεμβράνης του ER περιοχή, στο κέντρο της οποίας βρίσκεται η υδρόφοβη περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα (Εικόνα 16). Η θέση αυτή πρόσδεσης επιδεικνύει εκπληκτική πλαστικότητα στην αναγνώριση και πρόσδεση των σ1 προσδετών καθώς και δομική ευελιξία η οποία συμφωνεί με το χαρακτηρισμό του σ1 υποδοχέα ως μιας πρωτεΐνης-συνοδού, ικανής να αλληλεπιδρά με ποικίλους προσδέτες.

2.2.3. Ολιγομερισμός του σ1 υποδοχέα

Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν πως ο υποδοχέας σ1 λειτουργεί σχηματίζοντας μια ολιγομερή δομή, με ρύθμιση της κατάστασης ολιγομερισμού του μέσω

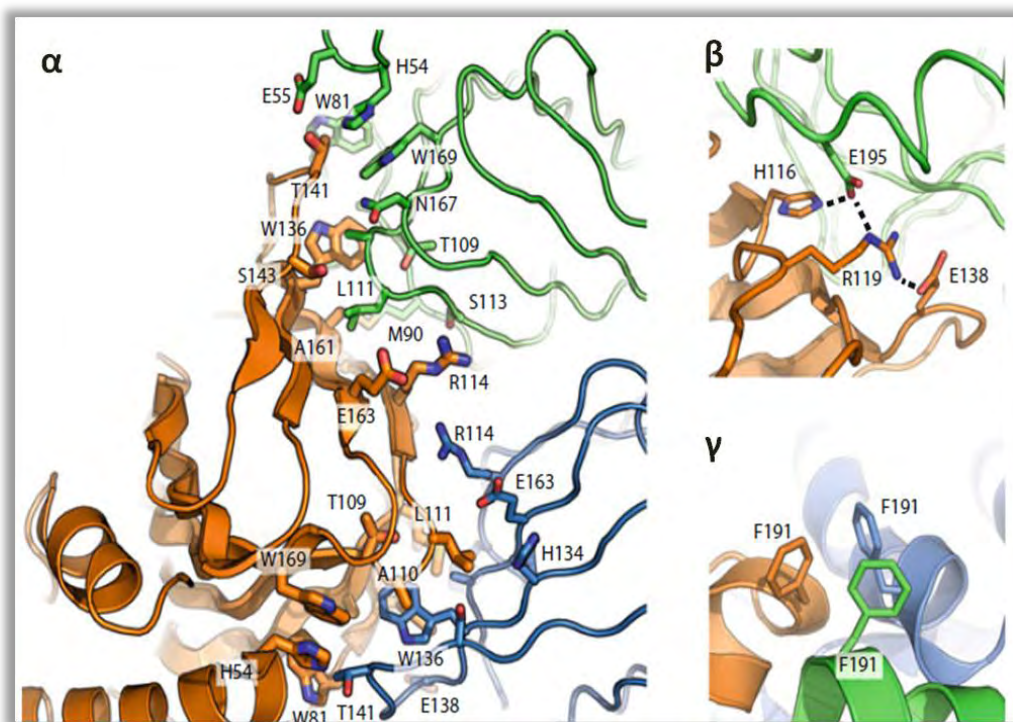


Εικόνα 16. Πολυδιάστατη απεικόνιση του σ1 υποδοχέα.

α) Κατοπτρική απεικόνιση προς το επίπεδο της μεμβράνης. Φαίνεται η τριγωνική δομή του σ1 που αποτελείται από τρία στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους μονομερή, που το καθένα περιλαμβάνει μια διαμεμβρανική υδρόφοβη περιοχή. Η παρακείμενη πλευρική όψη αποκαλύπτει μια επίπεδη περιοχή στενά προσκείμενη στην πλασματική μεμβράνη. β) Έγχρωμη απεικόνιση του ηλεκτροστατικού δυναμικού αποκαλύπτει μια πολική κυτοσολική επιφάνεια (αριστερά) και μια μη-πολική περιοχή που αλληλεπιδρά με τη μεμβράνη που πλαισιώνεται από θετικά φορτία υποδηλώνοντας πως βρίσκεται εν μέρει βυθισμένη στη μεμβράνη (97).

προσδεμάτων μικρών μορίων (94, 98). Η κρυσταλλική δομή του σ1 ενισχύει αυτές τις ενδείξεις, αποδεικνύοντας την ύπαρξη μιας τριμερούς δομής, οφειλόμενης στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρβοξυτελικών άκρων των πρωτομερών. Η αλληλεπιδρώσα περιοχή είναι αρκετά εκτεταμένη και περιλαμβάνει περισσότερα από 30 αμινοξικά κατάλοιπα κυρίως κατά μήκος των, παρακείμενων στην περιοχή πρόσδεσης, β βρόγχων (Εικόνα 17α). Τα αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν τη διεπαφή αυτή είναι κυρίως υδρόφοβα αν και υπάρχουν και κάποια υδρόφιλα αμινοξέα στην περιφέρεια της διεπαφής. Εντός της διεπαφής ολιγομερισμού, η Trp136 είναι μεταξύ των πλέον εμπλεκόμενων αμινοξικών καταλοίπων και βρίσκεται ενσωματωμένη στο εσωτερικό της υδρόφοβης περιοχής πρόσδεσης που περιλαμβάνει επίσης τα αμινοξέα Phe83,

Ala110, Leu111 και Trp169. Ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου με κεντρικό αμινοξικό κατάλοιπο την Arg119 συμμετέχει επίσης στη σύνδεση των πρωτομερών (Εικόνα 17β) όπως επίσης και μια τριπλή συμμετρική αλληλεπίδραση μεταξύ των αρωματικών αμινοξικών υπολειμμάτων Phe191 (Εικόνα 17γ). Αξίζει να σημειωθεί πως η διεπαφή ολιγομερισμού είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή πιστοποιώντας τη λειτουργική σημασία της στη δράση του σ1 υποδοχέα (97). Η βιολογική απόκριση του υποδοχέα μετά την πρόσδεση των σ1 προσδετών ίσως μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις ιδιότητες ολιγομερισμού του. Το μηχανιστικό μοντέλο που προτείνεται (98, 99) υποστηρίζει πως ο υποδοχέας αλλάζει την κατάσταση ολιγομερισμού του μετά την σύνδεση των προσδετών του, οι οποίοι φαίνεται πως σταθεροποιούν διαφορετικές καταστάσεις ολιγομερισμού ανάλογα με τις



Εικόνα 17. Ο σ1 στη λειτουργική, ολιγομερή του κατάσταση. Φαίνονται οι πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών του καταλοίπων στην περιοχή διεπαφής των πρωτομερών.

ανάγκες του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, οι διμερείς και μονομερείς δομές του σ1 υποδοχέα φαίνεται πως είναι οι λειτουργικές δομές του, ενώ τα υψηλότερα ολιγομερικά σύμπλοκα μπορεί να δρουν ως αποθήκες που εξασφαλίζουν τη διαθεσιμότητα των μονομερών. Η ισορροπία του σ1 μεταξύ των διαφορετικών καταστάσεων ολιγομερισμού του, δηλαδή, μονομερή, διμερή ή ανώτερες ολιγομερικές μορφές, μπορεί να εξηγήσει τις πολλαπλές του αλληλεπιδράσεις με έναν τόσο μεγάλο αριθμό ετερογενών, μεταξύ τους, πρωτεϊνών (88).

2.2.4. Η δράση του σ1 ως πρωτεΐνη-συνοδός (chaperone)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο σ1 υποδοχέας εντοπίζεται κυρίως στο ER των κυττάρων και πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή της μεμβράνης του ER που σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια και είναι γνωστή ως MAM (Mitochondria Associated Membrane). Πρόκειται για μια διεπαφή που δρα ως ιδιότυπη «σήραγγα» για τη μεταφορά λιπιδίων και τη σηματοδότηση μέσω ιοντικών καναλιών μεταξύ ER και μιτοχονδρίου (25, 93, 97).

Ο εντοπισμός του σ1 στη διεπαφή MAM φαίνεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για το κύτταρο καθώς λειτουργεί ως «φύλακας» της κυτταρικής επιβίωσης που ελέγχει το προκαλούμενο, μέσω ER, κυτταρικό στρες. Ποιοι παράγοντες όμως προκαλούν ER στρες στο κύτταρο; Ορισμένες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, καθώς και μια ποικιλία φαρμακολογικών παραγόντων, είναι ικανές να διαταράξουν τη

σωστή λειτουργία του ER και να προκαλέσουν ER στρες (100).

Υπό συνθήκες ER στρες, τα επίπεδα των ιόντων Ca^{2+} πέφτουν στο εσωτερικό του και ο σ1 δρα ως πρωτεΐνη-συνοδός. Αποδεσμεύεται από την πρωτεΐνη BiP (Binding Immunoglobulin Protein) και εξερχόμενος από την αδρανή του κατάσταση, προσδένεται στον υποδοχέα της τριφωσφορικής ινοσιτόλης τύπου 3, IP3 (Inositol triphosphate type 3), επαναφέροντας τη σωστή σηματοδότηση από το ER στα μιτοχόνδρια, με σκοπό τη διατήρηση της κυτταρικής επιβίωσης (93).

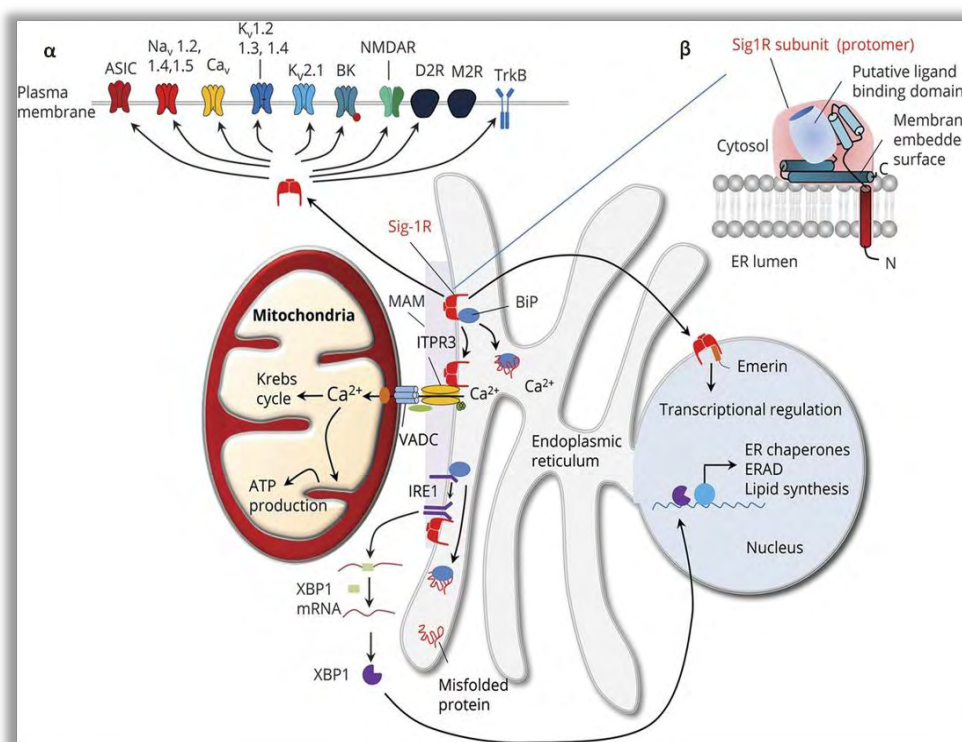
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ER αποτελεί ένα μοναδικό περιβάλλον για τη διατήρηση τόσο της σωστής τριτοταγούς διαμόρφωσης των συντιθέμενων πρωτεϊνών όσο και καθεαυτής της λειτουργίας της σύνθεσής τους, καθώς τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που συντίθενται στο κύτταρο διατηρούνται σε μια δυναμική ισορροπία μεταξύ σύνθεσης και αποδόμησης ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου (101). Υπό συνθήκες ER στρες, πρωτεΐνες με λανθασμένη αναδίπλωση συσσωρεύονται στο εσωτερικό του ER και το κύτταρο αντιδρά με την έναρξη μιας αμυντικής διαδικασίας η οποία αναφέρεται ως απόκριση στις μη ορθά αναδιπλούμενες πρωτεΐνες, Unfolded Protein Response (UPR). Ακολουθεί η ενεργοποίηση των κατάλληλων κυτταρικών μηχανισμών που στοχεύουν στην προσαρμογή του κυττάρου και τη διασφάλιση της κυτταρικής του επιβίωσης (102). Πιο συγκεκριμένα, ενεργοποιείται το εξαρτώμενο από την ινοσιτόλη ένζυμο 1, IRE1 (Inositol related enzyme 1), που αποτελεί έναν ευαίσθητο αισθητήρα του ER στρες και συντελεί στη διατήρηση της σωστής σηματοδότησης

μεταξύ ER και πυρήνα προς όφελος της κυτταρικής επιβίωσης. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως σε περιπτώσεις ER στρες, ο υποδοχέας σ1 δρα ως πρωτεΐνη-συνοδός, προσδένεται στο ένζυμο IRE1 το σταθεροποιεί και εξασφαλίζει τη σωστή λειτουργία του και συνεπώς την κυτταρική επιβίωση (101). Επιπλέον, η ρύθμιση της IRE1 από τον σ1 υποδοχέα επιβεβαιώνεται και *in vivo* καθώς βρέθηκε πως η αποσιώπηση του σ1 οδήγησε σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του ενζύμου IRE1 σε ένα προκλινικό μοντέλο σηπτικού σοκ (Εικόνα 18) (103).

Όσον αφορά όμως τα καρκινικά κύτταρα ο προστατευτικός αυτός UPR κυτταρικός μηχανισμός οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους. Πράγματι, πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει

υψηλή ενεργοποίηση του μηχανισμού UPR σε αρκετούς ανθρώπινους συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του στομάχου, του οισοφάγου και του ήπατος (27, 104, 105). Αυτό δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε δυσμενή περιβάλλοντα που χαρακτηρίζονται από συνθήκες υποξίας, χαμηλού pH, υψηλών επιπέδων ROS και ανεπαρκών αποθεμάτων γλυκόζης και αμινοξέων, στοιχεία που συμμετέχουν στη διαδικασία λανθασμένης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών (106).

Πέρα από τον εντοπισμό του σ1 στο ER, ο υποδοχέας εντοπίζεται επίσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, σε άλλα ενδοκυτταρικά μεμβρανώδη οργανίδια και στον πυρηνικό φάκελο, όπου ασκεί τη



Εικόνα 18. Δομή και λειτουργία του σ1 υποδοχέα. α) Απεικονίζεται ο εντοπισμός του στην περιοχή MAM του ER καθώς και η μετακίνησή του στον πυρηνικό φάκελο και την πλασματική μεμβράνη αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες και ιοντικά κανάλια ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. β) λεπτομέρεια της θέσης του σ1 υποδοχέα στη μεμβράνη του ER. Διακρίνεται η διαμεμβρανική περιοχή στο αμινοτελικό άκρο καθώς και η θέση πρόσδεσης των σ1 προσδετών στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα (107).

ρυθμιστική του δράση. Παρουσία σ_1 προσδετών ή κάποιου στρεσογόνου παράγοντα, ο σ_1 μετατοπίζεται από το ER στην πλασματική μεμβράνη και αλληλεπιδρά με στοιχεία μεταγωγής σήματος ρυθμίζοντας τη λειτουργία υποδοχέων νευροδιαβιβαστών και ιοντικών καναλιών, συμπεριλαμβανομένων διαύλων ιόντων K^+ και Ca^{2+} , υποδοχέων NMDAR (N-Methyl-D-Aspartate Receptors), οπιοειδείς υποδοχείς και κινάσες (99).

Έχει επίσης αποδειχθεί, ότι ο σ_1 υποδοχέας μετατοπίζεται από το ER στην πυρηνική μεμβράνη όπου αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη εμερίνη του πυρηνικού περιβλήματος, στρατολογώντας μια σειρά παραγόντων αναδιάταξης της χρωματίνης ρυθμίζοντας περαιτέρω τη γονιδιακή μεταγραφή ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου (108).

Συνολικά, αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι ο σ_1 υποδοχέας αποτελεί πιθανά εκπρόσωπο μιας νέας τάξης μακρομορίων με δράση μεταξύ πρωτεΐνης-συνοδού και ενεργοποιητή άλλων υποδοχέων, με σκοπό την ενεργοποίηση μηχανισμών προς όφελος της κυτταρικής επιβίωσης. Ενεργοποιείται μόνο σε συνθήκες κυτταρικού στρες με σκοπό την προστασία του κυττάρου ενώ παραμένει «σιωπηλός» σε υγιή όργανα (109).

2.3. Ο υποδοχέας σ_2

2.3.1. Γενικά στοιχεία για τον σ_2

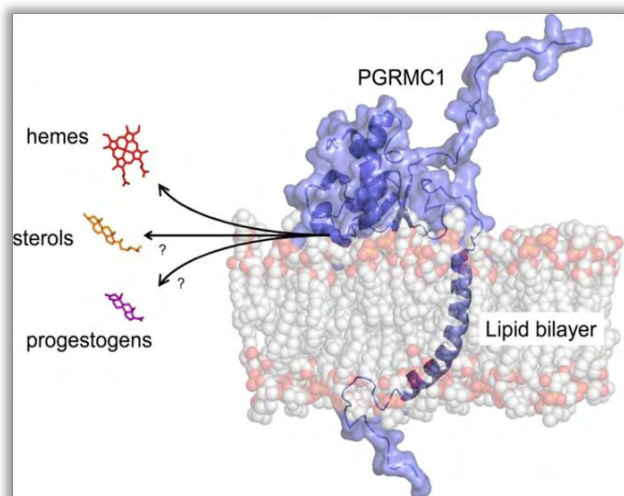
Σε αντίθεση με τον υποδοχέα σ_1 , πολύ λιγότερα είναι γνωστά σχετικά με τη μοριακή ταυτότητα του σ_2 και το βιολογικό του ρόλο στη λειτουργία του κυττάρου. Ο υποδοχέας σ_2 ανακαλύφθηκε το 1990 και

προσδιορίστηκε ως μια θέση δέσμευσης του σ υποδοχέα που εμφάνιζε υψηλή συγγένεια για την πρόσδεση του DTG και της αλοπεριδόλης αλλά όχι για τις βενζομορφάνες, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Πρόκειται για μια ενδοκυττάρια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 18-22 kDa (81). Μέσω γονιδιακής αποσιώπησης του σ_1 υποδοχέα, αποκαλύφθηκε ότι ο σ_2 υποδοχέας προέρχεται από έναν εντελώς διαφορετικό γονιδιακό τύπο. Ωστόσο, το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα σ_2 δεν ήταν γνωστό μέχρι πρόσφατα που έγινε η ταυτοποίησή του (6). Αυτό αποτελούσε ένα σημαντικό εμπόδιο στη μελέτη της βιολογίας του υποδοχέα σ_2 και, ως εκ τούτου, στην κατανόηση της λειτουργίας του η οποία παραμένει ακόμα περιορισμένη σε σχέση με εκείνη άλλων καλά φαρμακολογικά χαρακτηρισμένων υποδοχέων.

2.3.2. Ταυτοποίηση του υποδοχέα σ_2

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γονίδιο που κωδικοποιεί τον σ_2 παρέμενε άγνωστο παρά τις πολυάριθμες προσπάθειες για την ταυτοποίησή του (11, 19). Μέχρι πρότινος, η επικρατούσα αντίληψη σχετικά με την ταυτότητα του σ_2 υποδοχέα, πρότεινε πως η θέση πρόσδεσης του εντοπίζεται στο εσωτερικό της θέσης πρόσδεσης του υποδοχέα της προγεστερόνης PGRMC1, (Progesterone Receptor Component 1), αφήνοντας να εννοηθεί πως ο σ_2 είναι ταυτόσημος με τον υποδοχέα PGRMC1 (Εικόνα 19) (19). Παρόλα αυτά, η υπόθεση αυτή εμφάνιζε ορισμένες ανακολουθίες, καθώς οι δύο πρωτεΐνες εμφάνιζαν διαφορετικό μοριακό βάρος (24) και, επίσης, ο σ_2 υποδοχέας ανιχνεύονταν, με τη χρήση

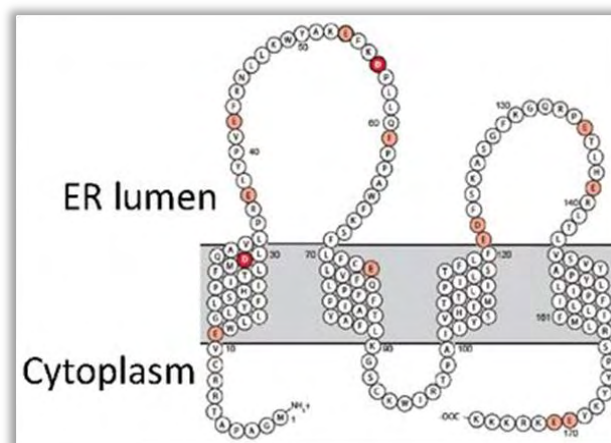
ραδιοσημασμένων προσδετών, σε κύτταρα που στερούνταν της έκφρασης του PGRMC1.



Εικόνα 19. Απεικόνιση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης PGRMC1 και των προσδετών της (αίμη, στερόλες, προγεσταγόνα) (110).

Πράγματι, μελέτες έδειξαν πως η αποσιώπηση του PGRMC1, μέσω τεχνικών siRNA (111) και CRISPR (112), σε ανθρώπους και ποντίκια, δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στο προφίλ πρόσδεσης των σ2 προσδετών. Τελικά, το 2017 ο σ2 ταυτοποιήθηκε ως η διαμεμβρανική πρωτεΐνη 97, TMEM97 (Transmembrane protein 97) (Εικόνα 20) μέσω μιας προσέγγισης με χρωματογραφία συγγένειας όπου ένας σ2 εκλεκτικός προσδέτης ακινητοποιήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας και χρησιμοποιήθηκε για την εκλεκτική πρόσδεση και απομόνωση, συγγενικών του πρωτεϊνών από ήπαρ μοσχαριών (6). Οι πρωτεΐνες αυτές στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν, με φασματομετρία μάζας, υπερεκφράστηκαν και εξετάστηκαν ως προς την πρόσδεση ενός ραδιοσημασμένου σ2 προσδέτη [^3H]DTG που αποτελεί σημείο κλειδί για τον φαρμακολογικό προσδιορισμό του σ2 υποδοχέα. Μεταξύ των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν μόνο η υπερέκφραση του

TMEM97 οδήγησε σε αυξημένη πρόσδεση του [^3H]DTG. Αντίθετα, η υπερέκφραση του PGRMC1 δεν επηρέασε την πρόσδεση του [^3H]DTG. Επιπλέον, σε κύτταρα που εκφράζουν τον TMEM97 αλλά όχι τον σ2 παρατηρήθηκε πρόσδεση των σ2 προσδετών και η αποσιώπηση του TMEM97 μείωσε κατ'αντιστοιχία την παρατηρούμενη αυτή πρόσδεση [86], παρέχοντας μια επιπλέον επιβεβαίωση πως ο TMEM97 και ο υποδοχέας σ2 είναι ταυτόσημοι (6, 111). Μέχρι πρόσφατα, λίγα ήταν γνωστά για την πρωτεΐνη TMEM97, εκτός από το ότι βρίσκεται στο ER και στα λυσοσώματα, όπου δεσμεύεται με τη χοληστερόλη (113) και ρυθμίζει τη δράση της πρωτεΐνης Niemann-Pick (NPC1) (114). Το ενδιαφέρον για τον υποδοχέα σ2/TMEM97 έχει επικεντρωθεί γύρω από το ρόλο του ως δυνητικού θεραπευτικού στόχου για τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου (115), καθώς και για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας (116) και τη νόσο Alzheimer (117).



Εικόνα 20. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη TMEM97 (118).

Ωστόσο, η έλλειψη ενός γνωστού γονιδίου για τον σ2 είχε δυσχεράνει την έρευνα που θα μπορούσε να προσδιορίσει εάν τα

παρατηρούμενα αποτελέσματα από τη δράση των προσδετών του σ2 υποδοχέα είναι διαμεσολαβούμενα από την πρόσδεσή τους στους σ2 υποδοχείς ή όχι, καθώς ήταν αδύνατο να αποσιωπηθεί ή να υπερεκφραστεί το γονίδιο που τον κωδικοποιεί. Ήδη έχει δημοσιευτεί η πρώτη έρευνα που δείχνει πως η αντικαρκινική δράση ορισμένων σ2 προσδετών, που μέχρι πρόσφατα η δράση τους θεωρούνταν ότι οφείλεται στην πρόσδεσή τους στον σ2 υποδοχέα, οφείλεται τελικά σε ανεξάρτητους των σ2 υποδοχέων μηχανισμούς (119).

2.4. Τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων στον καρκίνο

Ο καρκίνος είναι μια νόσος που, μεταξύ άλλων, χαρακτηρίζεται από σημαντική ετερογένεια που μεταφράζεται τόσο σε γενετικό όσο και σε επιγενετικό επίπεδο. Η ετερογένεια αυτή εκφράζεται με ποικίλα μορφολογικά και φαινοτυπικά προφίλ που περιλαμβάνουν διαφορές στην κυτταρική μορφολογία, τοιγονιδιακή έκφραση, το μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό και το μεταστατικό δυναμικό του καρκίνου. Το φαινόμενο αυτό συναντάται τόσο μεταξύ διαφορετικών όγκων (inter-tumor) όσο και μέσα στον ίδιο όγκο (intra-tumor). Στο πλαίσιο αυτό κρίνεται επιτακτική η ανάγκη εντοπισμού διαφορών μεταξύ των καρκινικών από τα υγιή κύτταρα με σκοπό την αποτελεσματική διάγνωση και αντιμετώπιση του καρκίνου. Δεν αποτελεί λοιπόν έκπληξη η προσανατολισμένη ερευνητική δραστηριότητα στον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των σ υποδοχέων στον καρκίνο. Παρακάτω

παρατίθενται τα δεδομένα για την έκφραση του σ1 και του σ2/TMEM97 υποδοχέα, αλλά και του PGRMC1 καθώς μέχρι πρότινος θεωρούνταν ότι ταυτίζεται με τον σ2 υποδοχέα ενώ μια πρόσφατη μελέτη συνδέει τις δύο αυτές πρωτεΐνες αναφέροντας ότι σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλοκο με την LDLR, η οποία είναι υπεύθυνη για την ταχεία εσωτερίκευση της LDL σε κύτταρα HeLa (112).

2.4.1. Η έκφραση του σ1 στον καρκίνο

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων είναι αυξημένα σε πολλούς τύπους καρκίνου. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των σ υποδοχέων στη βιβλιογραφία είναι ο προσδιορισμός μέσω ανοσοϊστοχημείας, η ραδιοσήμανση, ο ποσοτικός προσδιορισμός μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και η ανοσοαποτύπωση κατά western.

Πιο συγκεκριμένα, μέχρι σήμερα υπάρχουν τέσσερις δημοσιευμένες μελέτες που προσδιορίζουν τα επίπεδα έκφρασης του σ1 υποδοχέα με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας σε δείγματα ασθενών. Στις δύο από αυτές μελετάται η έκφραση του σ1 υποδοχέα σε 153 συνολικά, δείγματα ασθενών με καρκίνο μαστού και 58 φυσιολογικά δείγματα μαστού. Η έρευνα αυτή δεν καταλήγει σε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (μέγεθος όγκου, σταδιοποίηση της νόσου, ρυθμός πολλαπλασιασμού του όγκου, ηλικία ασθενούς) (120). Αντίθετα, μεταγενέστερη μελέτη σε 18 δείγματα ασθενών με καρκίνωμα οισοφάγου κατέληξε σε

σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του σ1 με τη σταδιοποίηση της νόσου και το μέγεθος του όγκου (121). Επίσης, στην πιο πρόσφατη μελέτη, μεταξύ των δειγμάτων καρκίνου και φυσιολογικού ιστού 92 ασθενών με χολαγγειοκαρκίνωμα εμφανίστηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του σ1 και του βαθμού διαφοροποίησης του καρκίνου, καθώς και της ύπαρξης λεμφαδενικών μεταστάσεων (122).

Μια άλλη συχνά χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των σ1 υποδοχέων είναι ο προσδιορισμός τους μέσω ραδιοσήμανσης των σ1 προσδετών τους. Στην περίπτωση αυτή, η ανίχνευση των προσδεδεμένων ραδιοσημασμένων προσδετών αποτελεί έμμεση ένδειξη της πρόσδεσης στον υποδοχέα και συνεπώς καταλήγει στον έμμεσο προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων. Μια από τις πρώτες μελέτες χρησιμοποίησε τον σ1 ραδιοσημασμένο προσδέτη [³H]DTG και παρατήρησε αυξημένη πρόσδεση η οποία μεταφράστηκε σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του σ1 υποδοχέα σε 15 από τα 16 ανθρώπινα δείγματα γλοιοβλαστώματος που μελετήθηκαν (123). Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα όγκων από 2 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, 6 ασθενείς με καρκίνο του νεφρού και έναν με σάρκωμα, καθώς και οι παρακείμενοι φυσιολογικοί ιστοί τους. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αυξημένη πρόσδεση του σ1 ραδιοσημασμένου προσδέτη [³H]DTG στον καρκίνο σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό (124).

Μια ακόμη τεχνική για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των σ1 υποδοχέων είναι η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης

πολυμεράσης (RT-PCR). Σε μια τέτοια μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των μεταγράφων του σ1 γονιδίου σε 14 δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού και βρέθηκε πως το 64% των δειγμάτων εμφάνιζε αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου σ1 στον καρκίνο σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό (125). Σε άλλη μελέτη, μέσω ημιποσοτικής RT-PCR προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγραφής του σ1 σε δείγματα 30 ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου (18 πρωτοπαθείς και 12 μεταστατικοί). Βρέθηκε πως τα αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του σ1 συσχετίζονται άμεσα με το στάδιο της νόσου, τη μετάσταση και την ηλικία των ασθενών (126).

Οι μελέτες στις οποίες έγινε αναφορά παραπάνω αφορούσαν στα επίπεδα έκφρασης του σ1 υποδοχέα σε δείγματα ασθενών. Ακολουθως, γίνεται αναφορά σε μελέτες προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των σ1 υποδοχέων σε εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές μέσω ανοσοαποτύπωσης και ραδιοσήμανσης. Ο Aydar και οι συνεργάτες του επιβεβαίωσαν την πρωτεϊνική έκφραση του σ1, με ανοσοαποτύπωση, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα (H69, H209, H510), μαστού (MDA-MB-231, MCF-7) και προστάτη (PC-3, LNCaP) και σε μια φυσιολογική για κάθε έναν από τους τύπους καρκίνου: φυσιολογική κυτταρική σειρά πνεύμονα (HBE140), μαστού (MCF-10A) και προστάτη (PNT2). Τα παρατηρούμενα επίπεδα έκφρασης του σ1 στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν κατά φθίνουσα τάξη είναι: H209 > H510 > H69 > PC-3 > MDA-MB-231 = MCF-7 = LNCaP > HBE140 = MCF-10A = PNT2 (119). Σε επόμενη μελέτη η έκφραση του σ1 επιβεβαιώθηκε στις

κυτταρικές σειρές MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-435, MCF-7 και BT20. Τα MCF-7 αρχικά είχαν χαρακτηριστεί ως αρνητικά ως προς την έκφραση του σ1 (127), παρόλα αυτά πιο πρόσφατες μελέτες απέδειξαν πως τα MCF-7 εκφράζουν τον σ1 υποδοχέα (119, 128-130). Ο Kim και οι συνεργάτες του επιβεβαίωσαν επίσης μέσω ανοσοαποτύπωσης την πρωτεϊνική έκφραση του σ1 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη (LAPC4, LNCaP, C4-2, 22Rv1, VCaP, PC3, DU145), μαστού (T47D, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SKBR3, BT474), παγκρέατος (Panc1), ήπατος (HepG2) και νευροβλαστώματος (SK-N-BE(2)C) (129-131). Μέχρι σήμερα καμία κυτταρική σειρά με μηδενική έκφραση για τον σ1 υποδοχέα δεν έχει προσδιοριστεί.

Τα επίπεδα έκφρασης του σ1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές έχουν επίσης προσδιοριστεί με την τεχνική της ραδιοσήμανσης. Οι περισσότερες τέτοιες μελέτες χρησιμοποιούν τους σημασμένους προσδέτες [3H](+)-pentazocine, [3H](+)-SKF10047 και [3H]DTG. Υψηλά επίπεδα του σ1 έχουν προσδιοριστεί με τον τρόπο αυτό σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη, γλοιοβλαστώματος, μελανώματος (127), μαστού (128, 130, 132), παχέος εντέρου, σαρκώματος, νεφρού (124), πνεύμονα (133), ουροδόχου κύστης (134), εγκεφάλου (123) και πολλαπλού μυελώματος (135).

2.4.2. Η έκφραση του PGRMC1 στον καρκίνο

Παρότι η πρωτεΐνη PGRMC1 δεν ταυτίζεται με τον υποδοχέα σ2 όπως αποδεικνύουν τα πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα, τα επίπεδα έκφρασής της είναι αυξημένα στον καρκίνο και φαίνεται πως έχει κάποιο ρόλο στην

ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του. Πολυάριθμες μελέτες αποδεικνύουν πως τα επίπεδα έκφρασής του αυξάνονται σε πολλούς τύπους καρκίνου όπως στον καρκίνο των ωοθηκών, της μήτρας, του μαστού, του προστάτη και του πνεύμονα (136-139). Μια πρόσφατη μελέτη σε 89 ζεύγη καρκινικού και φυσιολογικού ιστού ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο, έδειξε ότι η έκφραση του PGRMC1 ήταν αυξημένη στο 89,9% των δειγμάτων. Επίσης, η αποσιώπηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον PGRMC1 ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων *in vitro*, ενώ η υπερέκφραση τον κατέστειλε (140).

Σε μία κλινική μελέτη, τα επίπεδα έκφρασης του PGRMC1 σε δείγματα από 15 ασθενείς με πλακώδη καρκίνο του πνεύμονα και στα αντίστοιχα φυσιολογικά, προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση και εμφανίστηκαν αυξημένα επίπεδα PGRMC1 σε 12 από τα 15 δείγματα που εξετάστηκαν. Τα αυξημένα επίπεδα συσχετίστηκαν επίσης με το βαθμό διαφοροποίησης των όγκων και βρέθηκε πως αυξημένα επίπεδα PGRMC1 σχετίζονται με χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης. Στην ίδια μελέτη, σε δείγματα 15 ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και τα αντίστοιχα φυσιολογικά, τα η έκφραση του PGRMC1 ήταν επίσης αυξημένη σε 6 από τα 15 δείγματα καρκίνου σε σχέση με τα φυσιολογικά (137).

Επίσης, ο ρόλος των επιπέδων του PGRMC1 προσδιορίστηκε με ανοσοϊστοχημεία, σε 109 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση στα δείγματα καρκίνου σε σχέση με τον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό (141).

2.4.3. Η έκφραση του TMEM97 στον καρκίνο

Η πρωτεΐνη TMEM97, που ονομάζεται επίσης MAC30, έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου. Το 2004, 30 ιστοί καρκίνου του παγκρέατος από ασθενείς μετά από εξαίρεση όγκου και 19 μη καρκινικοί παγκρεατικοί ιστοί από υγιείς εθελοντές δότες, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του TMEM97 στον καρκίνο του παγκρέατος τόσο σε επίπεδο mRNA μέσω RT-qPCR όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο μέσω ανοσοϊστοχημείας. Το 50% των δειγμάτων καρκίνου του παγκρέατος που μελετήθηκαν εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα mRNA του TMEM97 σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς, το 20% των καρκινικών ιστών βρέθηκαν στα ίδια επίπεδα με τους φυσιολογικούς και το 30% παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα του TMEM97. Τα αποτελέσματα αυτά κατέδειξαν μεγάλη μεταβλητότητα όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του TMEM97 στον καρκίνο του παγκρέατος. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η ανάλυση παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών (AsPC-1, BxPc-3, Capan-1, Colo-357, T3M4, Mia-PaCa-2 και Panc-1) στις οποίες παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του TMEM97 (142). Η έκφραση του TMEM97 μελετήθηκε επίσης με ανοσοϊστοχημεία, σε 20 δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και βρέθηκε ότι το 65% εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα TMEM97 σε σχέση με παρακείμενους υγιείς ιστούς προερχόμενους από τον ίδιο ασθενή. Η έκφραση του TMEM97 έχει συσχετιστεί με μικρό βαθμό διαφοροποίησης και βραχύτερη επιβίωση των ασθενών (143).

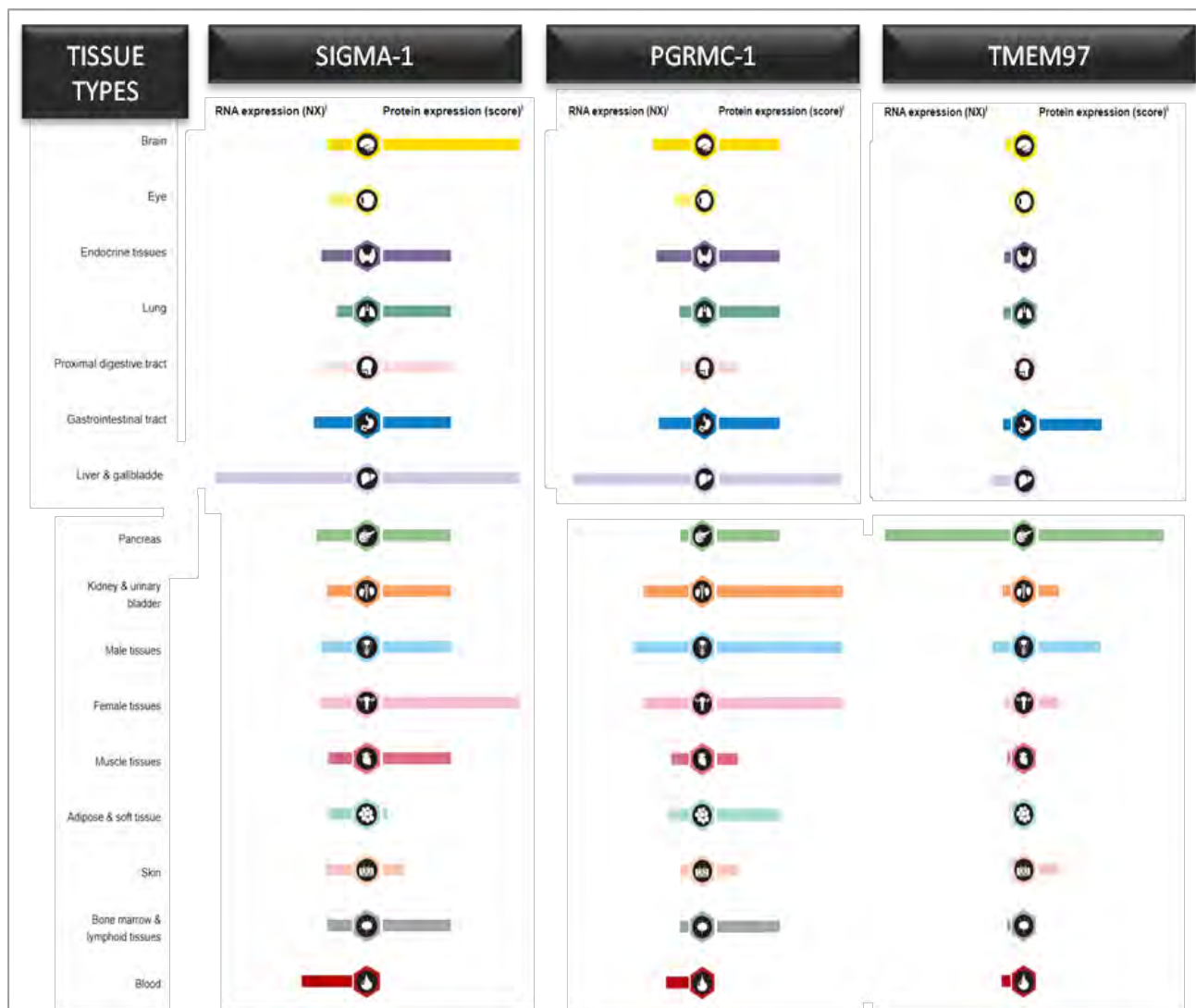
Μια παρόμοια μελέτη που αφορά στον καρκίνο του πνεύμονα (SQCLC: Squamous cell lung cancer) έδειξε υπερέκφραση του TMEM97, με qRT-PCR, σε 26 από τα 32 δείγματα όγκων σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μη νεοπλασματικούς ιστούς. Όμοια με πριν, η υπερέκφραση του TMEM97 συσχετίστηκε με μικρή διαφοροποίηση του όγκου και μικρότερη συνολική επιβίωση των ασθενών (144). Μια άλλη μελέτη για τον καρκίνο του μαστού αποκάλυψε ότι το 59,7% των δειγμάτων όγκου που μελετήθηκαν εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του TMEM97, με ανοσοϊστοχημεία, σε σύγκριση με τον υγιή ιστό και ότι αυτή η υπερέκφραση συσχετίζεται με μεγαλύτερο μέγεθος όγκου και επανεμφάνιση του καρκίνου (145).

2.4.4. Η έκφραση των σ υποδοχέων στη βάση δεδομένων «The Human Atlas»

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας είναι έκδηλο το έντονο ενδιαφέρον που υπάρχει σχετικά με την εξακρίβωση του ρόλου των σ υποδοχέων, με έμφαση στη βιολογία του καρκίνου. Ένα πρώτο βήμα που χρήζει διαλεύκανσης είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των σ υποδοχέων τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε καρκινικούς ιστούς. Έχει ήδη παρατεθεί η σχετική βιβλιογραφία όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων τα οποία όμως δεν είναι ιδιαίτερα ξεκάθαρα καθώς α) αποτελούν ερευνητικά ευρήματα μέσω διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού, β) δεν προσδιορίζονται ταυτόχρονα, στα ίδια δείγματα και στις ίδιες πειραματικές συνθήκες τα επίπεδα του σ1, του PGRMC1 και του TMEM97 και γ) η ταύτιση του σ2 με τον TMEM97 είναι πολύ πρόσφατη και ως εκ

τούτου δεν υπάρχουν ακόμη αρκετά δεδομένα σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης του TMEM97 στον καρκίνο. Για τους παραπάνω λόγους, θεωρήθηκε σκόπιμη η παράθεση πληροφοριών που ανακτήθηκαν

από τη βάση δεδομένων «The Human Protein Atlas» και σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα σ1, του PGRMC1 και του TMEM97 σε φυσιολογικούς (Εικόνα 21) και καρκινικούς ιστούς (Εικόνα 22) (113).



Εικόνα 21. Επίπεδα έκφρασης mRNA και πρωτεϊνών των υποδοχέων σίγμα 1, PGRMC-1 και TMEM97 διαφορετικών φυσιολογικών ιστολογικών συστημάτων



Εικόνα 22. Επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των υποδοχέων σίγμα 1, PGRMC-1 και TMEM97, κατά φθίνουσα τάξη σε διάφορους τύπους καρκίνου. Επισημαίνεται η πρωτεϊνική έκφραση του σίγμα 1 και του PGRMC1 στον παγκρεατικό καρκίνο. Η έκφραση του TMEM97 ήταν αρνητική σε 11 δείγματα που ελέγχθηκαν.

2.5. Οι σ υποδοχείς ως θεραπευτικοί στόχοι

Και οι δύο υποδοχείς έχουν προταθεί ως θεραπευτικοί στόχοι για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Ο υποδοχέας σ1 και οι προσδέτες του θεωρούνται πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι για τη διαχείριση του πόνου (146) καθώς και την αντιμετώπιση νευρολογικών παθήσεων όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis), η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson (85, 147), η νόσος του αμφιβληστροειδούς, τα εγκεφαλικά επεισόδια (85) και ο εθισμός από την κοκαΐνη και το αλκοόλ (148). Επιπλέον, υπάρχει ενδιαφέρον για τη χρήση των σ προσδετών τόσο για τη θεραπεία του καρκίνου (115) όσο και για τη χρήση τους σε απεικονιστικές μεθόδους για τη διάγνωσή του (149). Αυτή τη στιγμή, ορισμένοι σ1 προσδέτες βρίσκονται στη φάση κλινικών δοκιμών για την αντιμετώπιση του προκαλούμενου από χημειοθεραπεία νευροπαθητικού πόνου (150), την ασθένεια Alzheimer (151) και το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (152). Επίσης, ένας σ2 προσδέτης έδειξε πρόσφατα αποτελεσματικότητα συμπτώματα της σχιζοφρένειας σε μια κλινική δοκιμή φάσης II (116) και ένας άλλος ήταν καλά ανεκτός σε κλινική δοκιμή φάσης I για τη νόσο Alzheimer και εισέρχεται τώρα στη φάση II των κλινικών δοκιμών (117). Παρά το έντονο θεραπευτικό ενδιαφέρον, πολλές από τις μοριακές λεπτομέρειες των λειτουργιών των υποδοχέων σ1 και σ2 παραμένουν ασαφείς. Τα τελευταία 5 χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στη γενετική του υποδοχέα σ, τη δομική βιολογία και τη

βιοχημεία του, αλλά υπάρχουν ερωτήματα που παραμένουν αναπάντητα.

2.6. Ο ρόλος των σ υποδοχέων στον καρκίνο

Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν ότι ο υποδοχέας σ1 εμπλέκεται σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Την τελευταία δεκαετία, ο σ1 υποδοχέας έχει μελετηθεί εκτενώς στα καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας σε υποθέσεις σχετικές με τη λειτουργία του στην βιολογία του καρκίνου με σκοπό τη διερεύνηση της χρήσης του ως θεραπευτικού παράγοντα (139, 153, 154).

Αρχικά, το ενδιαφέρον εστιάστηκε στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα στον καρκίνο, και μέσω μελετών με ραδιοσημασμένους προσδέτες, ανιχνεύθηκε η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων του σ1 σε ανθρώπινες και ποντικίστιες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, πνεύμονα, προστάτη, παχέος εντέρου, μελανώματος και γλοιώματος (91, 127). Ωστόσο, οι περισσότεροι σίγμα προσδέτες που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν εκλεκτικοί για έναν από τους δύο υπότυπους των σ υποδοχέων και έτσι ήταν αδύνατο να προσδιοριστεί με σαφήνεια σε ποιόν από τους δύο οφείλεται η αυξημένη πρόσδεση σε κάθε μια από τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Με τη χρήση ενός ειδικού αντισώματος για τον σ1, υψηλή έκφραση του σ1 υποδοχέα ανιχνεύθηκε σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, πνεύμονα και προστάτη ενώ χαμηλά ήταν τα επίπεδα σε φυσιολογικά κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί πως η πυκνότητα του σ1 ήταν αυξημένη σε καρκινικά κύτταρα με υψηλό μεταστατικό

δυναμικό προτείνοντας μια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του σ1 και του βαθμού επιθετικότητας του καρκίνου (119). Πράγματι, η υπερέκφραση του σ1 έχει συσχετιστεί με έναν επιθετικό και μεταστατικό φαινότυπο σε πολλούς ανθρώπινους τύπους καρκίνου, ενώ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του σ1 υποδοχέα χαρακτηρίζουν τα φυσιολογικά κύτταρα (119, 128, 154, 155). Η ίδια παρατήρηση επιβεβαιώνεται και από μια *in vivo* μελέτη στην οποία η υπερέκφραση του σ1 οδήγησε σε αύξηση της επιθετικότητας του όγκου ενισχύοντας τη διήθηση και την αγγειογένεση (156).

Όπως έχει ήδη σημειωθεί, αρκετές μελέτες επιβεβαιώνουν πως οι δίαυλοι ιόντων αποτελούν μια από τις κύριες οικογένειες πρωτεϊνών που υπόκειται σε ρύθμιση μέσω του υποδοχέα σ1 (88). Ποια όμως είναι η σχέση των ιοντικών καναλιών με τον καρκίνο; Τα ιοντικά κανάλια εμπλέκονται σε βασικές πτυχές της εξέλιξης του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της μίτωσης, της μετανάστευσης, της απόπτωσης, της αγγειογένεσης και της ανθεκτικότητας στα φάρμακα (157-159). Μέσω της δράσης των ιοντικών καναλιών, τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να προσαρμόζονται στις δυσμενείς μεταβολικές συνθήκες του όγκου και να επιβιώνουν συνεχίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους (160, 161). Παρότι οι μηχανισμοί ρύθμισης της λειτουργίας των διαύλων ιόντων σε καρκινικά κύτταρα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί, τα κανάλια ιόντων έχουν χαρακτηριστεί ως "ογκογονικές" πρωτεΐνες, καθώς εμφανίζουν αποκλίνουσα έκφραση σε καρκίνους σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς και προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα χαρακτηριστικά όπως, δυνατότητα

μεταβολικού επαναπρογραμματισμού, απεριόριστο πολλαπλασιαστικό δυναμικό, αντοχή στην απόπτωση, διέγερση της νεοαγγειογένεσης καθώς και μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα (162). Συνεπώς, η ρυθμιστική δράση που ασκεί ο σ1 υποδοχέας στη λειτουργία των ιοντικών καναλιών είναι κομβικής σημασίας και για την εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου.

Όπως ο σ1 έτσι και ο σ2 εκφράζεται επίσης σε μεγάλο βαθμό σε πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, ενώ παρατηρείται χαμηλή έκφραση σε κύτταρα που βρίσκονται σε «ηρεμία», προτείνοντας ότι ο σ2 υποδοχέας αποτελεί σημαντικό βιοδείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (11, 163). Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει πως η πυκνότητα των σ2 υποδοχέων έχει συσχετιστεί άμεσα και με το στάδιο του καρκίνου. Τα δεδομένα που είναι επί του παρόντος διαθέσιμα σχετικά με το μηχανισμό δράσης του σ2, προέρχονται κυρίως από φαρμακολογικά πειράματα που αποσκοπούν στην αξιολόγηση της επίδρασης των σ2 προσδετών στην βιολογία του καρκίνου. Οι παρατηρήσεις αυτές, οδήγησαν στην ανάγκη ανάπτυξης συνθετικών σ2 προσδετών με σκοπό τη χρήση τους τόσο ως μοριακούς δείκτες για τη διάγνωση στέρεων τύπων καρκίνου, όσο και ως δυνητικούς θεραπευτικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση του (164).

2.7. Ο ρόλος των σ προσδετών στον καρκίνο

Μια ανασκόπηση στην πρόσφατη βιβλιογραφία αποδεικνύει πως το ενδιαφέρον για τους σ υποδοχείς και προσδέτες έχει αυξηθεί σημαντικά με την

πάροδο των ετών, όπως τεκμηριώνεται από την πληθώρα των σχετικών ερευνητικών εργασιών και ανασκοπήσεων (89, 115), καθώς επίσης και από το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον που έχουν προσελκύσει από τις φαρμακευτικές βιομηχανίες (Accugenix, Anavex Corp.) καθιστώντας τους σίγμα προσδέτες εν δυνάμει υπό ανάπτυξη θεραπευτικούς και διαγνωστικούς παράγοντες (88).

2.7.1. Οι σ1 προσδέτες στον καρκίνο

2.7.1α. Οι σ1 προσδέτες ως αντικαρκινικά φάρμακα (μονοθεραπεία ή συνδυαστικά)

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν πως μια εναλλακτική προσέγγιση στην έρευνα για την ανάπτυξη νέων σ1 προσδετών με αντικαρκινική δράση θα ήταν η επαναξιολόγηση των ήδη καλά χαρακτηρισμένων σ1 προσδετών όπως είναι η ριμκαζόλη, η αλοπεριδόλη κ.α'. (130). Στο πλαίσιο αυτό, διάφοροι σ1 προσδέτες έχουν εξεταστεί για τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως χημειοθεραπευτικά φάρμακα είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα. Αρχικά, αποδείχθηκε ότι ο σ1 προσδέτης 4-IBP (4-(N-βενζυλοπιπεριδιν-4-υλο)-4-ιωδοβενζαμίδιο) ενίσχυσε την *in vivo* αντικαρκινική δράση των χημειοθεραπευτικών τεμοζολομιδη και ιρινοτεκάνη σε ζωικό πρότυπο γλοιοβλαστώματος (84). Άλλος ένας εκλεκτικός σ1 προσδέτης, που χρησιμοποιείται ήδη για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας, βρέθηκε πρόσφατα πως εμφανίζει εκλεκτική αντικαρκινική δράση μέσω μιας διεργασίας που συμπεριλαμβάνει τον HIF-1α και βρίσκεται σε διαδικασία

αξιολόγησης για τη δυνητική χρήση του ως αντικαρκινικού παράγοντα. Παρομοίως, το Donezepil, ένας άλλος σ1 προσδέτης για τη θεραπεία της νόσου του Alzheimer, χρησιμοποιείται ως χημειοθεραπευτικό για την αντιμετώπιση του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα αλλά και σαν προφυλακτική θεραπεία σε καρκίνους του εγκεφάλου (165). Η αλοπεριδόλη, γνωστό αντιψυχωτικό φάρμακο και σ1 ανταγωνιστής, επάγει τον κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της φερρόπτωσης σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο (166).

2.7.1β. Οι σ1 προσδέτες για τη μεταφορά άλλων φαρμάκων

Μια πρώτη προσέγγιση αφορά τη χρήση των σ1 προσδετών στη στοχευόμενη μεταφορά φαρμάκων στον καρκίνο. Υπό το πρίσμα αυτό, σχεδιάστηκε ο σ1 προσδέτης ¹²⁵I-IPAB(¹²⁵I-[2-πιπεριδινυλαμινοαιθυλ]-4-ιωδοβενζαμίδιο) και ενσωματώθηκε σε λιποσώματα με εγκλωβισμένη δοξορουβικίνη, ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται ήδη στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση του καρκίνου, με σκοπό τη στοχευμένη μεταφορά του φαρμάκου στην κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη DU145. Η συζευγμένη με τον σ1 προσδέτη, λιποσωματική δοξορουβικίνη επέδειξε σημαντικά υψηλότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι των κυττάρων DU-145, σε σχέση με τη μη συζευγμένη της μορφή σε *in vitro* μελέτες, καθώς επίσης και καλύτερη *in vivo* συσσώρευση στον όγκο σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό σε ζωικά πρότυπα καρκίνου. Αναφορικά με την *in vivo* αντιπολλαπλασιαστική δράση του φαρμάκου, η ενδοφλέβια χορήγηση της

συζευγμένης δοξορουβικίνης επέδειξε σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των ξеноμοσχευμάτων της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς DU-145, μειώνοντας παράλληλα και την εμφάνιση της οφειλόμενης στο φάρμακο τοξικότητας (167). Στην ίδια βάση, μεταγενέστερη μελέτη αφορούσε τη χρήση νανοσωματιδίων, που περιείχαν τον σ1 προσδέτη ¹²³I-IDAB, για να στοχεύσουν τη μεταφορά αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων και siRNA σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα *in vitro* και *in vivo* (168, 169). Τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια και το siRNA αποτελούν μια γονιδιακή θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη και βρίσκονται σε φάση κλινικών δοκιμών (π.χ. aparatosen για τη στόχευση της Hsp27 για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη και του παγκρέατος) (170).

2.7.1γ. Οι σ1 προσδέτες ως επαγωγείς ανοσίας

Πρόσφατα προτάθηκε ότι ο σ1 εμπλέκεται και στους μηχανισμούς ανοσίας του οργανισμού ενάντια στον καρκίνο που διαμεσολαβείται από το PD-1/PD-L1 μονοπάτι ελέγχου. Οι πρωτεΐνες PD-1 και PD-L1 (PD-1: Programmed cell death protein 1, PD-L1: Programmed cell death ligand 1), αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την κυτταρική ανοσία. Έχουν σχέση υποδοχέα-προσδέτη και η πρόσδεση της PD-L1 στον υποδοχέα της, PD-1, έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης του κυττάρου που επιτρέπει στα κύτταρα του όγκου να ξεφεύγουν της επιτήρησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Η μελέτη απέδειξε πως ο σ1 υποδοχέας προσδένεται

φυσικά στην PD-L1 και παρουσία ενός σ1 αναστολέα, του μορίου IPAG (1-(4-ιωδοφαινυλ)-3-(2-αδαμαντυλ)γουανιδίνη), μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της PD-L1 στην επιφάνεια του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, η έκθεση καρκινικών κυττάρων μαστού και προστάτη στη δράση του σ1 αναστολέα IPAG προκάλεσε την εκλεκτική αποικοδόμηση του PD-L1 μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας. Αυτό υποδηλώνει ότι οι σ1 προσδέτες θα μπορούσαν να αποτελέσουν δυνητικούς θεραπευτικούς παράγοντες σε στρατηγικές που θα στοχεύουν στην επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης ενάντια στα καρκινικά κύτταρα (171).

2.7.1δ. Οι σ1 προσδέτες στη διαγνωστική απεικόνιση του καρκίνου

Οι σ1 προσδέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη διαγνωστική απεικόνιση του καρκίνου με τη χρήση PET ή SPECT. Η χρήση τους ως διαγνωστικά εργαλεία βασίζεται τόσο στην υπερέκφραση των σ υποδοχέων σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου όσο και στην ικανότητα των υποδοχέων να οδηγούν σε ενδοκυττάρωση τους προσδέτες τους. Επιπλέον, αρκετοί σ προσδέτες περιέχουν ένα άτομο ιωδίου ή φθορίου στη χημική τους δομή, το οποίο μπορεί εύκολα να υποκατασταθεί με το αντίστοιχο ραδιοϊσότοπο (172-174). Αρκετές προκλινικές μελέτες αξιολόγησαν τη δυνατότητα χρήσης ραδιοσημασμένων σίγμα προσδετών ως παραγόντων απεικόνισης στο μελάνωμα, στον καρκίνο του μαστού, στον καρκίνο του προστάτη και στον καρκίνο του πνεύμονα. Τα κακοήγη μελανώματα ανιχνεύθηκαν με 87% ακρίβεια και 64% ευαισθησία ως προς τη θέση της

βλάβης, με τη χρήση του ραδιοσημασμένου σ1 προσδέτη $^{123}\text{I-IDAB}$ ($^{123}\text{I-N-[2-δισυλαμινοαιθυλ]-4-ιωδοβενζαμίδιο}$) (175). Στον καρκίνο του μαστού, ο σ1 προσδέτης $^{123}\text{I-IMBA}$ ($^{123}\text{I-N-[2-(1'-πιπεριδινυλ)-αιθυλ]-3-ιωδο-4-μεθοξυβενζαμίδιο}$), συσσωρεύεται *in vivo* στους καρκινικούς όγκους σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς, στην πλειονότητα των ασθενών που μελετήθηκαν (176).

2.7.2. Οι σ2 προσδέτες στον καρκίνο

2.7.2α. Οι σ2 προσδέτες ως αντικαρκινικά φάρμακα (μονοθεραπεία ή συνδυαστικά)

Παρότι πολλά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του υποδοχέα σ2 παραμένουν αδιευκρίνιστα υπάρχουν ενδείξεις για τη χρήση τους ως φάρμακα κατά του καρκίνου.

Μια αρχική προσέγγιση είναι η απορρύθμιση των καναλιών ιόντων του ER από τους σ2 προσδέτες και η διαταραχή της ομοιόστασης στο εσωτερικό του κυττάρου με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Πράγματι, μελέτη αποδεικνύει πως οι σ2 προσδέτες CB-64D και CB-184 απορρυθμίζουν τη λειτουργία των ιοντικών καναλιών Ca^{2+} του ER και προκαλούν ταχεία απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} με αποτέλεσμα την επαγωγή κυτταρικού θανάτου μέσω κασπασών σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού (132). Η ίδια μελέτη αναφέρεται στην ικανότητα των σ2 προσδετών να ρυθμίζουν το μεταβολικό καταρράκτη των σφιγγολιπιδίων. Τα σφιγγολιπίδια είναι απαραίτητα μόρια στη διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης

και η βλάβη της βιοσυνθετικής τους οδού μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση. Πράγματι, βρέθηκε πως ο σ2 προσδέτης CB-184 οδήγησε σε απόπτωση μέσω απορρύθμισης της σύνθεσης των σφιγγολιπιδίων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού.

Πιο πρόσφατες μελέτες σε κυτταρικές σειρές μαστού, παγκρέατος και μελανώματος απέδειξαν ότι ορισμένοι σ2 προσδέτες (SV119, WC-26 και RHM-138), εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις επάγοντας απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης κασπασών ή μέσω αποδόμησης του DNA. Βρέθηκε επίσης ότι αύξησαν τη σύνθεση της πρωτεΐνης LCIIIa/b που όπως αναφέρθηκε είναι δείκτης αυτοφαγίας, και μείωσαν τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών του μονοπατιού mTOR, (p70S6K και 4EBP1), προτείνοντας ότι οι προσδέτες αυτοί επάγουν κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας, αναστέλλοντας το μονοπάτι mTOR (177, 178).

Αρκετές ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει τη δράση του σ2 αγωνιστή σιραμεσίνη, που θεωρείται το χρυσό πρότυπο των σ2 αγωνιστών, λόγω της μεγάλης του εκλεκτικότητας για τον σ2 υποδοχέα, (179-181). Ο Jaatela και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η σιραμεσίνη συσσωρεύεται στα λυσοσώματα, επάγει ταχεία αύξηση του λυσοσωμικού pH, προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας της λυσοσωμικής μεμβράνης και κυτταρικό θάνατο σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές (179). Ο Česen και οι συνεργάτες του το 2013 έδειξαν ότι η σιραμεσίνη προκαλεί το θάνατο των καρκινικών κυττάρων μέσω αποσταθεροποίησης των μιτοχονδρίων. Εν συντομία, η σιραμεσίνη επάγει την ταχεία

πτώση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού MMP (Mitochondrial Membrane Potential). Το μιτοχόνδριο είναι η κύρια πηγή παραγωγής ROS κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ATP για τις ανάγκες του κυττάρου. Η πτώση του MMP από τη δράση της σιραμεσίνης επάγει την παραγωγή ROS και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτοσόλιο, μιας διαδικασίας που ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο του καρκινικού κυττάρου μέσω αποπτωτικών μηχανισμών. Σε αντίθεση με τον Jaatela που προαναφέρθηκε η μελέτη αυτή δείχνει πως η δράση της σιραμεσίνης δεν φαίνεται να σχετίζεται με τα λυσοσώματα στην κυτταρική σειρά HaCaT που μελετήθηκε. Ίσως η εμπλοκή του λυσοσώματος στον προκαλούμενο από τη σιραμεσίνη κυτταρικό θάνατο να σχετίζεται με τον τύπο καρκίνου που μελετάται (182).

Πρόσφατες μελέτες εισάγουν και έναν άλλο τύπο κυτταρικού θανάτου απαγόμενου από τη σιραμεσίνη, τη φερρόπτωση. Πρόκειται για έναν τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που εξαρτάται από το σίδηρο και χαρακτηρίζεται από συσώρευση ελεύθερων ριζών οξυγόνου ROS. Παρουσία ROS τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης αποικοδομούνται οξειδωτικά με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Βρέθηκε πως η σιραμεσίνη σε συνδυασμό με τη λαπατινίμη (αναστολέας τυροσίνης) δρουν συνεργιστικά και προκαλούν κυτταρικό θάνατο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού (183), γλοιώματος και πνεύμονα (181).

Πέραν της αυτόνομης αντικαρκινικής δράσης τους μελετάται και η χρήση των σ2 προσδετών για την ενίσχυση της ευαισθησίας άλλων χημειοθεραπευτικών

φαρμάκων. Το 2010, ο Hornick χρησιμοποίησε τον συνθετικό σ2 προσδέτη SW43 σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο γεμισιταμίνη και παρατήρησε πως ο συνδυασμός αυτός οδήγησε σε αυξημένα ποσοστά απόπτωσης σε *in vitro* μελέτες καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος. Στο ζωικό μοντέλο, η συνδυαστική χορήγηση του SW43 με τη γεμισιταμίνη οδήγησε σε σημαντική μείωση του όγκου σε σχέση με τη χορήγηση του SW43 ή της γεμισιταμίνης ως μονοθεραπεία (97).

Όλες αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι οι σ2 προσδέτες μπορούν να αποτελέσουν νέες αντικαρκινικές θεραπείες οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο μέσω πολλαπλών οδών, οι οποίες εξαρτώνται τόσο από τον προσδέτη όσο και από τον τύπο του καρκίνου που μελετάται.

2.7.2β. Οι σ2 προσδέτες ως παράγοντες μεταφοράς φαρμάκων

Στην ίδια λογική της ραδιοσήμανσης και χρήσης των σ1 προσδετών, ραδιοσημασμένοι σ2 προσδέτες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη διαγνωστική απεικόνιση του καρκίνου. Ο σ2 ραδιοσημασμένος προσδέτης SW120, ενδοκυτταρώνεται ταχέως στα καρκινικά κύτταρα και εντοπίζεται σε πολλαπλά μεμβρανικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα και το ER (184). Αυτό υποδεικνύει πως οι σ2 προσδέτες μπορούν επιτυχώς να μεταφέρουν αντικαρκινικά φάρμακα εκλεκτικά στην περιοχή του όγκου. Η στρατηγική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εκλεκτική μεταφορά αποπτωτικών πεπτιδίων αλλά και νανοσωματιδίων που φέρουν αντικαρκινικά φάρμακα. Πιο

συγκεκριμένα, ο σ2 προσδέτης SV119 συζεύχθηκε με δύο διαφορετικά πολυπεπτίδια (Bim και CTMP) (96) τα οποία είχε προηγουμένως αποδειχτεί πως προκαλούσαν κυτταρικό θάνατο (177, 185). Παρατηρήθηκε πως και τα δύο σύμπλοκα, SV119-Bim και SV119-CTMP, προκάλεσαν ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές απ' ό,τι ο προσδέτης SV119 ή τα πεπτίδια όταν χρησιμοποιήθηκαν μόνα τους. Επίσης, σε *in vivo* ζωικά πρότυπα παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος το σύμπλοκο SV119-Bim μείωσε σημαντικά το μέγεθος των όγκων και εμφάνισε περιορισμένα σημάδια τοξικότητας.

Ακόμα μια προσέγγιση είναι η σύζευξη των σ2 προσδετών με τις πρωτεΐνες Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase) που απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια και επάγουν απόπτωση (186). Ο σ2 προσδέτης SW43 σε σύζευξη με το πεπτίδιο Smac SW-IV-52s, σχημάτισαν το σύμπλοκο SW-III-123 που επέδειξε ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση σε κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών απ' ό,τι ο σ2 προσδέτης ή το πεπτίδιο μόνα τους.

Τέλος, τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNCs) αποτελούν μια καινούρια ομάδα φωτοθερμικών παραγόντων για τη διάγνωση του καρκίνου. Τα νανοσωματίδια αυτά προκαλούν μια φωτοθερμική αντίδραση και προκαλούν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων μέσω υπερθερμίας. Στο εσωτερικό τους μπορούν να φέρουν άλλα αντικαρκινικά φάρμακα η αποτελεσματικότητα των οποίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων που φτάνουν στον όγκο. Η τροποποίηση των μεμβρανών των νανοσωματιδίων με

προσδέτες που στοχεύουν τον καρκίνο, αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική για την επίτευξη της στοχευμένης κυτταροτοξικότητας. Υπό το πρίσμα αυτό, όταν ο σ2 προσδέτης SV119 ενσωματώθηκε στη μεμβράνη νανοσωματιδίων χρυσού οδήγησε σε σημαντική αύξηση της κυτταρικής πρόσληψης των νανοσωματιδίων σε σχέση με αυτή των ελεύθερων, προτείνοντας ότι ο σ2 προσδέτης μετέφερε επιτυχώς το νανοσωματίδιο στο εσωτερικό του κυττάρου. Η ίδια προσέγγιση δοκιμάστηκε με νανοσωματίδια τα οποία έφεραν στο εσωτερικό τους το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη. Το νέο σύμπλοκο εμφάνισε σημαντική μείωση της δυνατότητας πολλαπλασιασμού των βλαστοκυττάρων που δημιουργήθηκαν από καρκινικά κύτταρα MDA-MB435 (187, 188).

2.7.2γ. Οι σ2 προσδέτες στη διαγνωστική απεικόνιση του καρκίνου

Οι σ2 προσδέτες έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία 20 χρόνια ως ραδιοσημασμένοι και φθορίζοντες ανιχνευτές παρέχοντας δομικές πληροφορίες για τους υποδοχείς καθώς επίσης και ως βιοδείκτες σημαίνοντας συμπαγείς όγκους (164, 189). Ο σ2 ραδιοσημασμένος προσδέτης [³H]DTG είναι ο ευρύτερα διαδεδομένος για τη μελέτη του σ2 υποδοχέα. Το [³H] αζιδο-DTG ήταν ένα σημαντικό ανάλογο στον χαρακτηρισμό του μοριακού βάρους των σ1 και σ2 υποδοχέων (190). Διάφορα διαμορφωτικά εύκαμπτα βενζαμίδια αποτελούν εκλεκτικούς ραδιοϊχνηθέτες για την *in vivo* απεικόνιση του ρυθμού πολλαπλασιασμού όγκων με τη χρήση PET (81, 191). Μελέτες απεικόνισης MicroPET χρησιμοποιούν τον σ2 προσδέτη [¹⁸F]ISO-1

σε ζωικό μοντέλο καρκίνου του μαστού και τον [^{18}F]RHM-4 σε ζωικό μοντέλο καρκίνου του εγκεφάλου (192). Από τους ραδιοσημασμένους σ2 προσδέτες που έχουν αναπτυχθεί ο [^{18}F]ISO-1 βρίσκεται σε κλινική δοκιμή Φάσης Ι για την απεικόνιση συμπαγών όγκων με PET για πρωτοπαθή και μεταστατικό καρκίνο του μαστού και για λέμφωμα (115)

2.7.3. Οι παν-σίγμα προσδέτες στον καρκίνο

Μια καινοτόμος στρατηγική που εφαρμόστηκε με επιτυχία στην περίπτωση των σ υποδοχέων και θα μπορούσε να αποτελέσει αποτελεσματική αντικαρκινική θεραπεία είναι η χρήση μορίων διπλού στόχου. Δεδομένου του υψηλού δυναμικού της θεραπευτικής αυτής προσέγγισης, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ταυτοποίηση ουσιών με διττό προφίλ σ1 ανταγωνιστή /σ2 αγωνιστή, των επονομαζόμενων «παν-σίγμα προσδετών», (180). Ο Marrazzo, ο εμπνευστής της χρήσης των παν-σίγμα προσδετών, έδειξε ότι ένας μεταβολίτης της αλοπεριδόλης, ο HP-mII εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστική δράση ελαττώνοντας τα επίπεδα Ca^{2+} στις ενδοπλασματικές και μιτοχονδριακές αποθήκες επάγοντας με τον τρόπο αυτό την απόπτωση σε διάφορους τύπους καρκίνου (μελάνωμα, καρκίνος παχέος εντέρου). Ο αποπτωτικός μηχανισμός που επάγεται σχετίζεται τόσο με τον σ1 όσο και με τον σ2 υποδοχέα (193) και προκαλεί μια μέτρια αντιπολλαπλασιαστική δράση σε LNCaP και PC3 καρκινικά κύτταρα προστάτη και σε C6 κύτταρα γλοιώματος αρουαίου (177, 194). Πρόσφατα, ο HP-mII συντέθηκε πλήρως και ενεργοποιήθηκε με 4-φαινυλοβουτανοΐλιο(R)-(C)-MRJF4. Αυτό το

μόριο εμφανίζει βελτιωμένη ικανότητα να επηρεάσει το ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα) και να επάγει το θάνατο κυττάρων γλοιώματος C6 σε σχέση με την προγενέστερη ουσία HP-mII (195). Άλλη μια ουσία που ανήκει στους παν-σίγμα προσδέτες, η RC-106, αξιολογήθηκε πρόσφατα έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών παγκρέατος, μαστού, προστάτη και γλοιοβλαστώματος και έδειξε κυτταροτοξική δράση σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (180).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 | Ανάπτυξη PDX

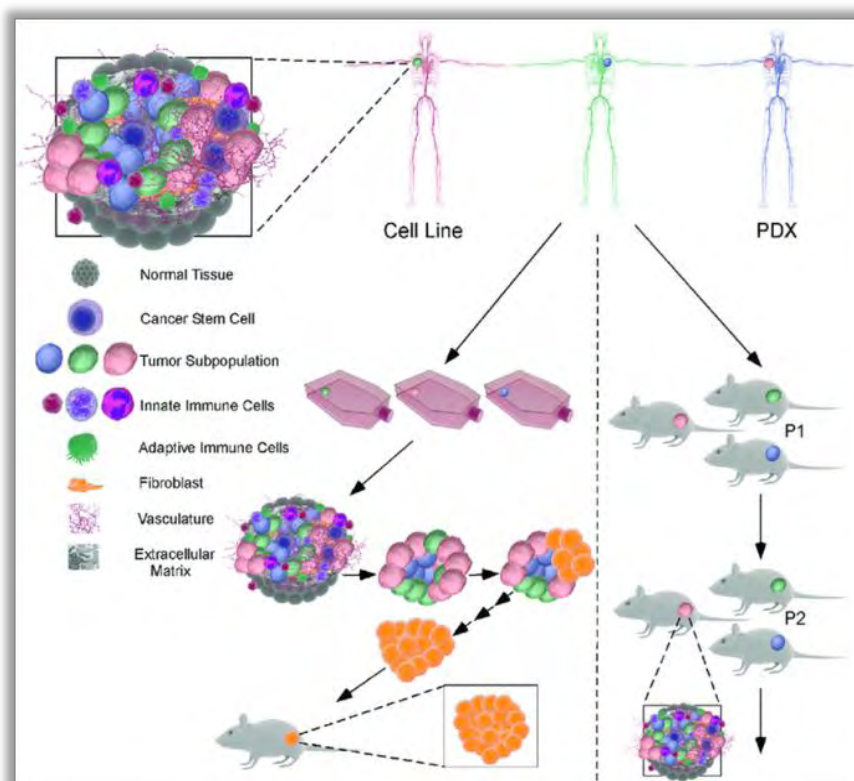
3.1. Ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (PDX)

Το θέμα της ανάπτυξης των PDX, καθώς και των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων που προκύπτουν από τη χρήση τους, έχει παρουσιασθεί και συζητηθεί εκτενώς σε ένα κριτικό άρθρο ανασκόπησης, που έχει πρόσφατα δημοσιευθεί από την ομάδα μας (86).

Οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και τα ζωικά πρότυπα καρκίνου που προέρχονται από αυτές (xenografts: ξενομοσχεύματα) χρησιμοποιούνται ευρέως στη μεταφραστική έρευνα για τον καρκίνο.

Ωστόσο, οι καρκινικές κυτταρικές σειρές δεν αντικατοπτρίζουν την πραγματική κλινική εικόνα του όγκου και του μικροπεριβάλλοντος του, την ετερογένεια

στο εσωτερικό του και τις ιδιότητες του στρώματός του (196), παράμετροι που επηρεάζουν σημαντικά τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων (197), τη μετανάστευσή τους (198), την υποτροπή της ασθένειας (199) και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντικαρκινικά φάρμακα (200). Μια εναλλακτική προσέγγιση προς την κατεύθυνση επίλυσης αυτών των αδυναμιών είναι η ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (PDX: Patient Derived Xenografts), με την απευθείας εμφύτευση όγκων ασθενών σε ανοσοκατασταλμένα στελέχη ποντικών, ως νέα προκλινικά εργαλεία που θα μπορούσαν να έχουν μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα με τον καρκίνο του ανθρώπου, να προσομοιάσουν την ετερογένεια του όγκου και το μικροπεριβάλλον του και να υπηρετήσουν αποτελεσματικότερα την εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση (201, 202).



Εικόνα 23. Ανάπτυξη των PDX μοντέλων

3.1.1. Σύνοψη εισαγωγή στη μεθοδολογία ανάπτυξης των PDX

Η εγκαθίδρυση, σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, ξеноμοσχευμάτων προερχόμενων από όγκους ασθενών (PDX) (Εικόνα 23), είτε πρωτοπαθών είτε μεταστατικών, περιγράφονται εκτενώς στη βιβλιογραφία (201, 203, 204). Παρόλο που ορισμένες ομάδες ερευνητών έχουν αναπτύξει ειδικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις, η βασική μεθοδολογία ανάπτυξης των PDX είναι κοινή.

Συνοπτικά, αναφέρεται ότι φρέσκα κομμάτια ιστού πρωτογενών ή μεταστατικών συμπαγών όγκων συλλέγονται με χειρουργική εξαίρεση ή με διαδικασίες βιοψίας (205, 206). Οι όγκοι εμφωλεύονται σε ποντίκια ως μικρά τεμάχια όγκου (207) ή σε εναιωρήματα μονήρων κυττάρων είτε μεμονωμένων είτε αναμεμιγμένα με ειδικά υποστρώματα όπως Matrigel® (203, 208). Διάφορα στελέχη ανοσοκατασταλμένων ποντικών, με διαφορετικό βαθμό ανοσοκαταστολής, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μεταμόσχευση όγκων ασθενών. Τα στελέχη ποντικών που προτιμώνται για την ανάπτυξη των PDX είναι τα περισσότερο ανοσοκατασταλμένα, όπως το NOD / SCID (NOD.CB17-Prkdcscid/J) ή το NOD/SCID/IL2g-receptor null (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, περισσότερο γνωστό ως NSG). Αυτά τα στελέχη είναι καλύτερα για την ανάπτυξη PDX, καθώς λόγω του μεγαλύτερου βαθμού ανοσοκαταστολής επιτρέπουν τον ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης των ξеноμοσχευμάτων (209).

Για την ανάπτυξη των PDX, η εμφώλευση μπορεί να πραγματοποιείται είτε υποδόρια είτε στο ίδιο όργανο με αυτό του πρωτογενούς όγκου (ορθοτοπικά). Παρόλο

που τα υποδόρια μοντέλα PDX είναι πολύ πιο εύκολο να αναπτυχθούν, πιο δημοφιλή είναι τα ορθοτοπικά τα οποία αντιπροσωπεύουν τον αρχικό όγκο και σε μεγάλο βαθμό δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον παρόμοιο με αυτό του πρωτογενούς όγκου. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ορθοτοπική εμφώλευση μπορεί να οδηγήσει σε ζωικά πρότυπα καρκίνου εγγύτερα στην κλινική εικόνα των ασθενών. Για παράδειγμα, σε μια πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ότι τα ζωικά πρότυπα καρκίνου τα οποία προέκυψαν με ορθοτοπική εμφώλευση όγκων, παρουσίασαν παρόμοια απόκριση στη γεμισιταμπίνη συγκριτικά με τον πρωτογενή παγκρεατικό όγκο των ασθενών, σε αντίθεση με τα ζωικά πρότυπα καρκίνου τα οποία προέκυψαν με υποδόρια εμφώλευση (210). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι σε υποδόρια ζωικά πρότυπα καρκίνου του παγκρέατος δεν υπήρχε διατηρημένο πρότυπο μετάστασης και απώλεια μυϊκής μάζας σχετιζόμενης με τον καρκίνο, σε αντίθεση με τα ορθοτοπικά ζωικά πρότυπα (211). Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι η ορθοτοπική εμφύτευση δίνει το πλεονέκτημα ότι ο όγκος αναπτύσσεται στο ίδιο μικροπεριβάλλον και, έτσι, το ορθοτοπικό ζωικό πρότυπο καρκίνου διατηρεί κρίσιμες πτυχές της νόσου του ανθρώπου, όπως το δεσμοπλαστικό μικροπεριβάλλον, την παρόμοια μεταστατική εξάπλωση και τη σχετιζόμενη με τον καρκίνο καχεξία (212, 213). Οι διαφορές ανάμεσα στα υποδόρια και τα ορθοτοπικά ζωικά πρότυπα καρκίνου υπογραμμίζονται και από μία ακόμη μελέτη, του Hoover και των συνεργατών του, η οποία αναδεικνύει σημαντικές διαφορές στο γενετικό προφίλ μεταξύ αυτών των δύο

διαφορετικών ζωικών προτύπων (214). Σε μία άλλη μελέτη, ο Hiroshima και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι σε μια περίπτωση καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, το ορθοτοπικό μοντέλο διατήρησε με μεγαλύτερη ακρίβεια το μεταστατικό δυναμικό του πρωτογενούς όγκου της ασθενούς (215).

Μετά την επιτυχή ανάπτυξη του ξενομοσχεύματος, οι όγκοι εμφωλεύονται διαδοχικά σε άλλα ποντίκια (διαδοχικά «περάσματα») και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου αφενός να αποκτηθεί επαρκής αριθμός ομάδων για περαιτέρω μελέτη και αφετέρου οι όγκοι να αποκτήσουν κάποια σταθερά χαρακτηριστικά όπως πχ ο ρυθμός διπλασιασμού. Όγκοι από πρωτογενή ξενομοσχεύματα χρησιμοποιούνται επίσης για την ανάπτυξη πρωτογενών καρκινικών κυτταρικών σειρών. Σε μια πρόσφατη μελέτη ο Noll και οι συνεργάτες του σύγκριναν πρωτογενή ξενομοσχεύματα με τις αντίστοιχες πρωτογενείς κυτταρικές σειρές και έδειξαν διατήρηση ιστομορφολογικών χαρακτηριστικών και έκφρασης RNA (216). Ανάλογα με τον τύπο καρκίνου, ο ρυθμός ανάπτυξης του ξενομοσχεύματος παρουσιάζει ποικιλομορφία και σχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου, τον ιστολογικό του τύπο, το μέγεθος του εμφωλευμένου ιστού και τη θέση εμφώλευσης (217). Σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος ο Garrido-Laguna και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι ένα επιτυχημένο ξενομόσχευμα δημιουργήθηκε στο 61% αυτών και ότι η επιτυχής ανάπτυξή του συνδέθηκε με τη μειωμένη βιωσιμότητα των ασθενών (210). Οι μελέτες οι οποίες σχετίζονται με τις μεθόδους εμφύτευσης και την επιτυχή ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων

είναι πολύ περιορισμένες. Συνεπώς, απαιτούνται πρόσθετες μελέτες για τη βελτίωση των μεθόδων αυτών, προκειμένου να προσδιοριστούν σταθερά πρότυπα ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων, καθώς και να δημιουργηθούν μοντέλα από καρκινικούς τύπους που δύσκολα αναπτύσσουν ξενομοσχεύματα, ειδικά όταν οι συγκεκριμένοι καρκινικοί τύποι πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο της εξατομικευμένης θεραπείας.

3.2. Τα PDX στις προκλινικές μελέτες

3.2.1. Η συνεισφορά των PDX στην προσπάθεια ανακάλυψης νέων βιοδεικτών για PDAC

Οι βιοδείκτες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έρευνα και τη θεραπεία του καρκίνου γενικά, καθώς μπορούν να βοηθήσουν σε πολλούς διαφορετικούς τομείς όπως η διάγνωση, η πρόγνωση, η παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία και η εκτίμηση της υποτροπής ή αξιολόγηση της φαρμακοδυναμικής, της φαρμακοκινητικής και της ανάπτυξης θεραπευτικών στόχων. Ειδικά η διάγνωση του καρκίνου του παγκρέατος είναι πολύ δύσκολη. Οι ασθενείς παρουσιάζουν συνήθως μη ειδικά συμπτώματα και κατά τη στιγμή της διάγνωσης το 80% από αυτούς εμφανίζουν ήδη την ασθένεια σε προχωρημένο στάδιο (218). Ακόμη και αποτελέσματα που λαμβάνονται από διάφορες τεχνικές απεικόνισης ή από κυτταρολογική εξέταση μπορεί να είναι, συχνά, ασαφή (219). Λαμβάνοντας υπόψη τη δυσκολία στην πρόγνωση του PDAC και το γεγονός ότι δεν υπάρχει αποτελεσματική μέθοδος διάγνωσης, καθίσταται επιτακτική

η ανάγκη να βρεθούν νέοι πιο εξειδικευμένοι και ευαίσθητοι βιοδείκτες για την παρακολούθηση ασθενών υψηλού κινδύνου, την επιβεβαίωση της διαφορικής διάγνωσης, καθώς και την πρόβλεψη τόσο της θεραπευτικής απόκρισης όσο και της προόδου της νόσου. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν τη χρήση των PDX στην ανάπτυξη περισσότερο αξιόπιστων βιοδεικτών για τον καρκίνο του παγκρέατος. Στο πλαίσιο της ανάπτυξης μιας μεθόδου για καλύτερη πρόγνωση της ασθένειας, μια κλινική δοκιμή που χρησιμοποίησε PDX πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Hidalgo (210) το 2011. Συνολικά 94 ασθενείς με PDAC υποβλήθηκαν σε χειρουργική εξαίρεση των όγκων και 69 από αυτούς τους όγκους εμφωλεύθηκαν σε μύες του στελέχους nude, με τους ασθενείς από τους οποίους αναπτύχθηκαν οι όγκοι να παρουσιάζουν μικρή συνολική επιβίωση. Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των microarrays και την GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) προκειμένου να ελέγξουν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης, οι ερευνητές ανέλυσαν περαιτέρω την ύπαρξη ενός προτύπου γονιδιακής έκφρασης σχετιζόμενου με την εμφάνιση μετάστασης από 4 πρωτογενείς όγκους και 2 διαφορετικά περάσματα των αντίστοιχων ξενομοσχευμάτων τους. Διαπιστώθηκε ότι οι όγκοι των συγκεκριμένων ξενομοσχευμάτων, αν και δεν ήταν ταυτόσημοι με τους πρωτογενείς, παρουσίασαν σημαντική ομοιότητα στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης με τα αντίστοιχα των πρωτογενών όγκων (5 από τα 8 γονίδια υπερεκφράστηκαν και 4 από τα 9 υποεκφράστηκαν και στις δύο ομάδες όγκων). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η πτώση των επιπέδων της πρωτεΐνης SMAD4, η οποία

φαίνεται να σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση της ασθένειας και υψηλό μεταστατικό δυναμικό (220), ήταν στατιστικά υψηλότερη στους ασθενείς των οποίων οι όγκοι αναπτύχθηκαν σε σχέση με τους ασθενείς των οποίων οι όγκοι δεν αναπτύχθηκαν. Όλα αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν τους ερευνητές στο να καταλήξουν ότι η ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων μπορεί να είναι δείκτης κακής πρόγνωσης της ασθένειας.

Στο ίδιο πλαίσιο, δηλαδή προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης ενός καλύτερου εργαλείου με μεγαλύτερη ακρίβεια στην κατηγοριοποίηση των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο, ο Bian και οι συνεργάτες του (221) ανέπτυξαν μια στρατηγική βασισμένη στην πρωτεΐνη c-MYC, περιγράφοντας τα PDX σε μοριακό επίπεδο μέσω του ελέγχου των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης, με τη χρήση της τεχνολογίας των microarrays. Η ομάδα ανέπτυξε 55 PDX και ανέλυσε το προφίλ των μεταγράφων (transcriptomics) των ξενομοσχευμάτων («ομάδα αναφοράς»), ενώ χρησιμοποιήθηκαν άλλα 16 PDX για την περαιτέρω επικύρωση των ευρημάτων της «ομάδας αναφοράς». Στη βάση αυτής της ανάλυσης καθορίστηκε ένα πρότυπο γονιδιακής έκφρασης της πρωτεΐνης c-MYC που περιελάμβανε 16 γονίδια τα οποία επέτρεπαν τη έλεγχο των διαφορετικών υπότυπων παγκρεατικού καρκίνου, ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του c-MYC. Τα κύτταρα που προέρχονταν από ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης του c-MYC εμφάνισαν ευαισθησία σε θεραπευτικές προσεγγίσεις με τον JQ1 BET (Bromodomain and Extra-Terminal) αναστολέα, που θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση για την

ανάπτυξη μιας καινούργιας θεραπευτικής προσέγγισης.

Σε μελέτη που διενεργήθηκε πρόσφατα αναπτύχθηκε μια *in vivo* πλατφόρμα που επιτρέπει την αναγνώριση των απαραίτητων ογκογόνων μεταλλάξεων για τη συντήρηση του όγκου στα PDX (222). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές χρησιμοποιώντας την GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) ταυτοποίησαν γονίδια που εμπλέκονται στον έλεγχο της αντιγραφής του DNA και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, αναφέρουν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ του γονιδίου WDR5 (βασικό μέλος του συμπλόκου histone H3-Lys4 methyltransferase) και της πρωτεΐνης MYC ρυθμίζει το σημείο ελέγχου της αντιγραφής του DNA, δίνοντας το έναυσμα περαιτέρω διερεύνησης του WDR5 αναστολέα στην κλινική αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου.

3.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των PDX

Τα ζωικά πρότυπα καρκίνου που βασίσθηκαν σε εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές αποτέλεσαν τη βάση της μεταφραστικής έρευνας στον καρκίνο των τελευταίων δεκαετιών. Οι εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές έχουν μικρή ομοιότητα με τον όγκο απ' τον οποίο προέκυψαν, λόγω των πολλών περασμάτων, αλλά και της μακράς περιόδου συντήρησης. Τα PDX χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στην έρευνα για τον καρκίνο και θεωρούνται πολύτιμα εργαλεία στη μάχη έναντι του καρκίνου. Τα *in vitro* ευρήματα των PDX, που υποστηρίζονται και από *in vivo* αποτελέσματα, στοχεύουν στην αποσαφήνιση της βιολογίας του καρκίνου, την ανάπτυξη βιοδεικτών και τον έλεγχο

φαρμάκων υπό το πρίσμα της ανάπτυξης εξατομικευμένων στρατηγικών θεραπείας του καρκίνου. Αυτά τα ζωικά πρότυπα καρκίνου προερχόμενα από ασθενείς είναι στενά συνδεδεμένα τόσο με ορισμένα πλεονεκτήματα όσο και περιορισμούς, σχετικά με την ανάπτυξη καρκίνου, την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φάρμακα, τις καρκινικές μεταστάσεις κ.λπ. (Πίνακας 2) (223).

3.3.1. Πλεονεκτήματα από τη χρήση των PDX

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των PDX είναι ότι αυτά διατηρούν την ετερογένεια στο εσωτερικό του όγκου, γεγονός που αντικατοπτρίζει την ποικιλομορφία του πρωτογενούς όγκου. Αντιθέτως, τα ξενομοσχεύματα που προέρχονται από εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές δέχονται την επίδραση επιλογικών δυνάμεων και, έτσι, παρουσιάζουν περιορισμένη ετερογένεια η οποία αυξάνει την απόσταση από τα χαρακτηριστικά των πρωτογενών όγκων των ασθενών (223). Τα PDX αντιπροσωπεύουν σε ικανοποιητικό βαθμό το βιολογικό χαρακτήρα των πρωτογενών όγκων των ασθενών διατηρώντας τα βασικά χαρακτηριστικά των όγκων, όπως την ιστολογική κατάσταση, το προφίλ των μεταλλάξεων, τη δυναμική της γονιδιακής έκφρασης, την πρωτεϊνική έκφραση και τη διατήρηση της δυναμικής των βιοδεικτών. Επιπλέον, τα PDX παραμένουν βιολογικά σταθερά κατά τη διάρκεια διαδοχικών περασμάτων (206, 224, 225). Από την άποψη αυτή, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι τα μοντέλα PDX έχουν τη δυνατότητα να προσομοιάζουν ιδιαίτερα τη βιολογία του καρκίνου του ανθρώπου, να προβλέπουν

την απόκριση των ασθενών στις θεραπείες και, ως εκ τούτου, να προσφέρουν προοπτικές εξατομικευμένης θεραπείας (226, 227).

Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του όγκου στη βιολογία του καρκίνου. Σύμφωνα με το NCI (National Cancer Institute) το μικροπεριβάλλον είναι «τα φυσιολογικά κύτταρα, τα μόρια και τα αιμοφόρα αγγεία που περιβάλλουν και τροφοδοτούν ένα κύτταρο όγκου. Ένας όγκος μπορεί να αλλάξει το μικροπεριβάλλον του, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τον τρόπο με τον οποίο αυτός αναπτύσσεται και εξαπλώνεται» (114). Στον καρκίνο του παγκρέατος, το μικροπεριβάλλον συνίσταται κυρίως από καρκινικούς ινοβλάστες (cancer associated fibroblast, CAF), κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, εξωκυττάρια ουσία και πολλά άλλα δευτερογενή στοιχεία (στρώμα) (228, 229). Στον PDAC, η πυκνή ίνωση του στρώματος του όγκου είναι ένα σημαντικό εμπόδιο στη θεραπευτική παρέμβαση (230). Στο πλαίσιο αυτό, ένα βασικό πλεονέκτημα των PDX είναι ότι διατηρούν, σε κάποιο βαθμό, το μικροπεριβάλλον του ανθρώπινου όγκου, ειδικά για τα πρώτα περάσματα (231, 232). Μετά από έναν αριθμό επόμενων περασμάτων το ανθρώπινο στρώμα αντικαθίσταται από κύτταρα στρώματος των μυών, ωστόσο, ο χρόνος που συμβαίνει αυτό το γεγονός δεν έχει προσδιοριστεί (223).

είναι ότι. Ένα άλλο βασικό πλεονέκτημα είναι η υψηλή συσχέτιση που επανειλημμένα αναφέρεται να υπάρχει μεταξύ της φαρμακολογικής απόκρισης στα PDX και της κλινικής απόκρισης σε ασθενείς, υπογραμμίζοντας ότι τα PDX

αντικατοπτρίζουν το προφίλ της ευαισθησίας των φαρμάκων και δείχνοντας ταυτόχρονα την υψηλή προγνωστική τους αξία, αναφορικά με την ανίχνευση δραστικών αντικαρκινικών παραγόντων τόσο σε προκλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο (233). Πράγματι, τα PDX έχουν χρησιμοποιηθεί στην προκλινική αξιολόγηση φαρμάκων - υποδεικνύοντας τα βασικά χαρακτηριστικά των τελευταίων όπως την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και τη δοσολογία (206, 234, 235) όπως αυτή διαμορφώνεται μέσω μιας ογκολογικής προσέγγισης βασισμένης στα PDX (201). Επιπλέον, τα μοντέλα PDX είναι χρήσιμα εργαλεία για τον εντοπισμό μηχανισμών ανθεκτικότητας σε αντικαρκινικές θεραπείες (236). Ασθενείς που έχουν παρουσιάσει ανθεκτικότητα σε πολλές θεραπείες, συνήθως, έχουν πολλαπλές μεταστατικές αλλοιώσεις που δεν μπορούν να εξαιρεθούν και, ίσως, υποκρύπτουν διαφορετικούς μηχανισμούς ανάπτυξης ανθεκτικότητας στις διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Ερευνητές αποκάλυψαν ότι οι μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα PDX είναι ταυτόσημοι με αυτούς των ασθενών απ' τους οποίους αυτά προήλθαν (237) και, επίσης, κλινικά ανθεκτικοί όγκοι ήταν επίσης ανθεκτικοί στις θεραπείες όταν αναπτύχθηκαν ως PDX (238). Επομένως, τα μοντέλα PDX μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ασθενών ανθεκτικών στη χημειοθεραπεία (239) και προχωρώντας ακόμη ένα βήμα παραπέρα, να καθορίσουν τη συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας στα φάρμακα και των γενετικών μεταλλάξεων (240).

Ένα ακόμη πλεονέκτημα των μοντέλων PDX είναι ότι μπορούν να παρέχουν απεριόριστες ποσότητες ανθρώπινων

καρκινικών κυττάρων για *in vivo* και *ex vivo* αξιολόγηση αντικαρκινικών φαρμάκων (241) καθώς είναι γεγονός ότι όλες αυτές οι μελέτες χρειάζονται μεγάλες ποσότητες βιολογικού υλικού.

Τέλος, σημαντική είναι και η χρησιμότητά των PDX στην ανάπτυξη και μελέτη μεταστατικών μοντέλων καρκίνου. Αν και η υποδόρια εμφύτευση πρωτογενών όγκων ασθενών σε μοντέλα PDX δεν αναπαράγει μεταστατικά πρότυπα που μπορεί να παρατηρούνται στους συγκεκριμένους ασθενείς, η ορθοτοπική εμφύτευση πρωτογενών όγκων σε μοντέλα PDX αναφέρεται ότι οδηγεί σε τοπική ανάπτυξη

όγκων και μεταστάσεων και μάλιστα με τρόπο που να προσομοιάζει το μεταστατικό δυναμικό των ασθενών (213, 242).

3.3.2. Μειονεκτήματα από τη χρήση των PDX

Παρά τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα μοντέλα PDX παρουσιάζουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Ένας σημαντικός περιορισμός των μοντέλων PDX είναι η εγγενής δυσκολία του προσδιορισμού της ποσότητας του όγκου που εμφωλεύεται και της αντιπροσώπευσης της εσωτερικής του ετερογένειας εντός του

Πίνακας 2. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των PDX.

Πλεονεκτήματα των PDX	Περιορισμοί των PDX
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Διατήρηση των χαρακτηριστικών του πρωτογενή όγκου και της εσωτερικής του ετερογένειας (243) ▪ Διατήρηση των γενετικών και ιστολογικών χαρακτηριστικών του ασθενούς κατά τη διάρκεια διαδοχικών περασμάτων [20,73,74] ▪ Η ορθοτοπική μεταμόσχευση οδηγεί σε τοπική ανάπτυξη όγκων και μεταστάσεων, παρόμοιων με το μεταστατικό δυναμικό του ασθενούς [29,90] ▪ Συσχέτιση μεταξύ απόκρισης σε μοντέλα PDX και κλινικής απόκρισης ασθενών. Πρόβλεψη απόκρισης των ασθενών στις θεραπείες με στόχο την εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπευτικών πρακτικών [75,76] ▪ Εισαγωγή ανθρώπινου στρώματος του όγκου στα PDX μοντέλα, αν και δεν είναι σαφές για πόσο διάστημα διατηρείται σ' αυτά το συγκεκριμένο πρότυπο [67,81] ▪ Αντανάκλαση του προφίλ ευαισθησίας των φαρμάκων και υψηλή προγνωστική αξία από την άποψη της ανίχνευσης αντικαρκινικών παραγόντων [84] ▪ Παροχή απεριόριστων πηγών ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων για <i>in vivo</i> και <i>ex vivo</i> αξιολόγηση αντικαρκινικών φαρμάκων ▪ Απαιτείται μικρή ποσότητα βιολογικού υλικού [86] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Έλλειψη τυποποίησης της μεθόδου λόγω διαφορετικών τεχνικών εμφώλευσης και χρήσης διαφορετικών στελεχών ζωικών μοντέλων ▪ Περιορισμένα ποσοστά επιτυχίας ανάπτυξης όγκων (243) ▪ Αργή ανάπτυξη που επηρεάζει την εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπειών σε πραγματικό χρόνο [92] ▪ Αρνητική επίδραση στην ισχύ των φαρμάκων που στοχεύουν το στρώμα και τον όγκο, λόγω του ότι το ανθρώπινο στρώμα αντικαθίσταται από στρώμα ποντικού μετά από διαδοχικά περάσματα [93]. ▪ PDX που προέρχεται από ανθεκτικούς σε θεραπείες όγκους μπορεί να απολέσει την ανθεκτικότητά του και να γίνει ξανά ευαίσθητο [96,97] ▪ Μικρή ποσότητα βιολογικού υλικού μπορεί να οδηγήσει σε ένα μη αντιπροσωπευτικό ξενομόσχευμα, όσον αφορά την ετερογένεια του πρωτογενούς όγκου [86] ▪ Η έλλειψη λειτουργικού ανοσοποιητικού συστήματος των PDX έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μοντέλων που δεν αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια την πρόοδο της νόσου και τη θεραπευτική απόκριση. Επίσης, περιορίζεται ο αριθμός των φαρμάκων που μπορούν να αξιολογηθούν, όπως ανοσορρυθμιστές ή παράγοντες που δρουν ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα [98,99]

ζωικού προτύπου. Ένας άλλος σημαντικός περιορισμός είναι η ανάπτυξη διαφορετικών μεθόδων και χρησιμοποιούμενων υλικών, μεταξύ των διαφόρων ερευνητικών εργαστηρίων και φορέων. Τόσο οι διαφορετικές τεχνικές εμφύτευση όσο και τα διαφορετικά στελέχη ζώων που χρησιμοποιούνται, έχουν αντίκτυπο στο παραγόμενο αποτέλεσμα (209). Στην πραγματικότητα, όπως αναφέρεται και σε μία σχετική ερευνητική εργασία (244), η επιτυχής ανάπτυξη των εμφωλευμένων όγκων βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ NOD/SCID και nu/nu στελεχών. Στη συγκεκριμένη μελέτη περιελήφθησαν τρεις διαφορετικές κατηγορίες ανοσοκατασταλμένων στελεχών, nu/nu, NOD/SCID και NSG, αυξάνοντας, έτσι, τη μεθοδολογική ετερογένεια και δημιουργώντας έναν συγκεκριμένο περιορισμό.

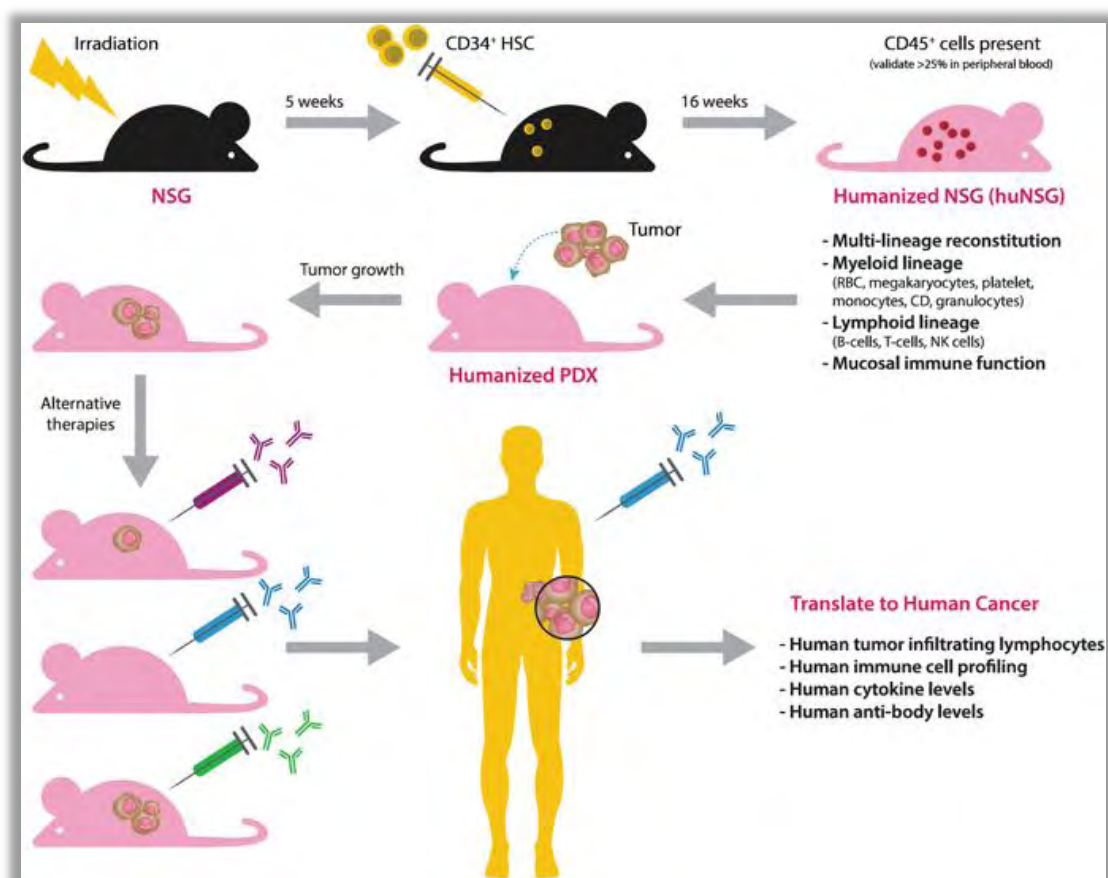
Η επιτυχία ανάπτυξης των PDX μοντέλων δεν είναι πάντοτε εφικτή και η αποτυχία της εμφώλευσης παραμένει υψηλή για ορισμένους τύπους καρκίνου. Η επιτυχής ανάπτυξη όγκων στα PDX μοντέλα είναι χαμηλή, συνήθως κάτω από 20% για υποδόριες εμφωλεύσεις πρωτογενών όγκων. Το ποσοστό αυτό πρέπει να ανέλθει σ' ένα αποδεκτό επίπεδο της τάξης του 60-70%, με στόχο την εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών (209). Ένα άλλο ζήτημα που πρέπει να εξεταστεί είναι ο χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξη ενός PDX μοντέλου, δεδομένου ότι συνήθως χρειάζονται 4 έως 8 μήνες για αυτό το σκοπό, διάστημα το οποίο είναι περιοριστικό για πολλούς ασθενείς. Η χρονική καθυστέρηση από την εμφύτευση πρωτογενών όγκων στα ζωικά μοντέλα μέχρι την επιτυχή ανάπτυξη των PDX είναι ένας περιοριστικός

παράγοντας για την εφαρμογή, σε πραγματικό χρόνο, εξατομικευμένης θεραπείας (245). Επιπλέον, η αντικατάσταση του ανθρώπινου στρώματος του όγκου από αυτό των ποντικών, μετά από διαδοχικά περάσματα, είναι ένα σημαντικό μειονέκτημα των PDX, αφού η ισχύς των φαρμάκων που στοχεύουν στον όγκο και το στρώμα αυτού, όπως οι αντιαγγειογόνοι παράγοντες, μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά (246).

Η ανάπτυξη των PDX χρειάζεται μια μικρή ποσότητα βιολογικού υλικού, ωστόσο, αυτό μπορεί να έχει ως αντίκτυπο τη χαμηλή αντιπροσώπευση της ετερογένειας του πρωτογενούς όγκου στο PDX μοντέλο. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη πολλαπλών υποκλώνων (δηλαδή διαφορετικών γενετικών και/ή επιγενετικών αλλαγών) μέσα σε έναν όγκο και, έτσι, το μικρό δείγμα είναι πιθανό να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός PDX μοντέλου που δεν αντιπροσωπεύει την ετερογένεια του όγκου του ασθενούς (237). Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός, οι ετερογενείς όγκοι μπορούν να αναμιχθούν πριν από την εμφύτευσή τους και έπειτα να ενεθούν ως εναιωρήματα απλών κυττάρων (247). Ένα πλεονέκτημα των PDX μοντέλων που αναφέρθηκε παραπάνω είναι ότι διατηρούν το προφίλ ευαισθησίας των φαρμάκων σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του όγκου του ασθενούς (236, 248, 249), εντούτοις, PDX μοντέλα από ανθεκτικούς σε θεραπείες όγκους μπορεί να χάσουν την ανθεκτικότητά τους και να γίνουν ξανά ευαίσθητα. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται «drug holiday». Απουσία φαρμάκου κάποιοι μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι αναστρέψιμοι, όπως φαίνεται για το μελάνωμα (250) και το πνευμονικό αδενοκαρκίνωμα (251). Για το

λόγο αυτό, σε περιπτώσεις ανθεκτικών PDX μοντέλων, η θεραπεία θα πρέπει να ξεκινά αμέσως μετά την εμφώλευση των όγκων. Ένας άλλος θεμελιώδης περιορισμός στα μοντέλα PDX είναι η ανάγκη χρήσης ανοσοκατασταλμένων στελεχών ποντικών για την εμφώλευση και την ανάπτυξη όγκων. Αυτά τα ποντίκια στερούνται κυττάρων του ανοσοποιητικού τους συστήματος προκειμένου να μην απορρίψουν τον εμφωλευμένο ανθρώπινο όγκο. Όμως, αυτή η κατάσταση περιορίζει τον αριθμό των φαρμάκων που μπορούν να αξιολογηθούν, όπως οι ανοσορυθμιστές ή παράγοντες που δρουν μέσω της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος (252, 253). Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στο ρυθμό ανάπτυξης του όγκου και στη

θεραπεία υπογραμμίζονται μέσω πολλών πρόσφατων μελετών που σχετίζονται με τον καρκίνο και την ανοσοθεραπεία (254). Επομένως, τα μοντέλα PDX δεν μπορούν να αναπαράξουν τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του όγκου, του στρώματός του και του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος (255). Για το λόγο αυτό είναι ανάγκη να καθιερωθούν PDX μοντέλα με ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα («εξανθρωπισμένα μοντέλα») (Εικόνα 24), προκειμένου να επιτραπεί η προκλινική αξιολόγηση των ανοσολογικών θεραπευτικών προσεγγίσεων στον καρκίνο (233). Μια στρατηγική για την παραγωγή εξανθρωπισμένων PDX μοντέλων είναι μέσω της μεταμόσχευσης ολικού μονοπύρηνου περιφερικού αίματος (PBMCs):



Εικόνα 24. Ανάπτυξη εξανθρωπισμένων (humanized) μοντέλων PDX.

Peripheral Blood Mononuclear Cells) από υγιείς δότες ή ασθενείς (μοντέλα PBMC) ή μέσω έγχυσης λεμφοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο (TILs: Tumor Infiltrating Lymphocytes) σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια. Μια δεύτερη μέθοδος είναι να αναπτυχθούν εξανθρωπισμένα PDX μοντέλα με την εμφώλευση huCD34+ κυττάρων από τον μυελό των οστών, το ήπαρ και το θύμο αδένά του δότη (το λεγόμενο μοντέλο NOD/SCID-hu BLT) (256). Ωστόσο, και οι δύο προσεγγίσεις μπορούν να προκαλέσουν νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GvHD: Graft versus-Host Disease) που περιορίζει την αξία αυτών των μελετών (199, 257, 258). Εναλλακτικά, μια άλλη μέθοδος περιλαμβάνει τη μεταμόσχευση ανθρωπινών αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων CD34+ (HSCs: Hematopoietic Stem Cells) ή πρόδρομων κυττάρων που απομονώνονται από αίμα ομφάλιου λώρου, μυελό των οστών και περιφερικό αίμα (259). Η μεταμόσχευση HSCs προκαλεί την ανάπτυξη διαφόρων αιμοποιητικών κυτταρικών πληθυσμών ανθρώπινης προέλευσης που οδηγεί σε μια πλήρη αιμοποιητική ανασύσταση και λιγότερες GvHD περιπτώσεις (245). Η ιδανική πηγή HSCs είναι ο ίδιος ασθενής από τον οποίο το PDX έχει αναπτυχθεί, προκειμένου να αποφευχθούν οι ανοσολογικές αντιδράσεις που προκαλούνται από την αναντιστοιχία του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (HLA: Human Leukocyte Antigen). Εντούτοις, η απομόνωση HSCs από τους ασθενείς με καρκίνο είναι αποθαρρυντική, επειδή βιοψίες μυελού των οστών σε εξασθενημένα άτομα είναι δύσκολο να πραγματοποιηθούν και, επίσης, η απόδοση των HSCs που λαμβάνονται από ασθενείς με

καρκίνο είναι εξαιρετικά χαμηλή, γεγονός που περιορίζει τον αριθμό των ποντικών που μπορούν να εξανθρωπιστούν (Πίνακας 1) (260).

3.4. Μελλοντικές προοπτικές

Πάρα τα σημαντικά τους μειονεκτήματα που σε συντομία παρουσιάστηκαν πιο πάνω και συζητώνται εκτενέστερα στη δημοσίευση της ομάδας μας (86) τα μοντέλα PDX είναι μια πολύ ελπιδοφόρα νέα προσέγγιση που βοηθούν στο να αξιολογηθούν οι περιορισμοί που αφορούν κυρίως τη διατήρηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και της ετερογένειάς του (196), ειδικά στην έρευνα PDAC, δεδομένου του μικρού αριθμού των διαθέσιμων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και βιοδεικτών. Η έλλειψη ενός λειτουργικού ανοσοποιητικού συστήματος παραμένει ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα του PDX μοντέλου ειδικά σε μια εποχή που η ανοσοθεραπεία στον καρκίνο γνωρίζει τεράστια έξαρση και επομένως υπάρχουν και τεράστιες ανάγκες στο χώρο. Εντούτοις, οι μελέτες συνεχίζονται για να ξεπεραστεί αυτό εμπόδιο (261). Όλα τα παραπάνω υπογραμμίζουν τη δυναμική της διευρυμένης χρήσης των PDX στη σύγχρονη ογκολογία, αλλά και την ανάγκη για πρόσθετες μελέτες αξιολόγησης της εφαρμογής των PDX στην έρευνα για τον PDAC. Ιδανικά, αυτές θα μπορούσαν να είναι μεταφραστικές μελέτες που περιλαμβάνουν τράπεζες δεδομένων που θα συσχετίζουν τα ζωικά πρότυπα καρκίνου με τα κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Οι σίγμα υποδοχείς αποτελούν αντικείμενο εντατικής φαρμακολογικής έρευνας καθώς έχουν προταθεί ως θεραπευτικοί στόχοι για διάφορες ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ των οποίων και διάφοροι τύποι καρκίνου. Η οικογένεια των σίγμα υποδοχέων αποτελείται από δύο υπότυπους τους υποδοχείς σίγμα-1 ($\sigma 1$) και σίγμα-2 ($\sigma 2$). Ωστόσο, η ταυτοποίηση του $\sigma 2$ εξακολουθεί να βρίσκεται υπό διερεύνηση καθώς αρχικά είχε προταθεί πως ο $\sigma 2$ μοιράζεται μια κοινή θέση πρόσδεσης με τον υποδοχέα της προγεστερόνης PGRMC1 αλλά η μεταγενέστερη επικρατούσα θεωρία τον ταυτίζει με τον υποδοχέα TMEM97. Επίσης, πολλές ανεξάρτητες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένοι σ προσδέτες επιδεικνύουν σημαντική αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης τόσο των σίγμα υποδοχέων όσο και των προδεδωμένων τους, με έμφαση στη βιολογία του καρκίνου, παραμένει αδιευκρίνιστος και μένει να αποσαφηνιστεί.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι:

- Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων $\sigma 1$, $\sigma 2$ /PGRMC1 και $\sigma 2$ /TMEM97, με ανοσοαποτύπωση κατά Western, σε 19 ανθρώπινες εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60, που χρησιμοποιείται ευρέως για *in vitro* δοκιμές ουσιών με πιθανή αντικαρκινική δράση
- Η διερεύνηση της *in vitro* αντικαρκινικής δράσης κάποιων ευρέως χρησιμοποιούμενων $\sigma 1$ και $\sigma 2$ προσδεδωμένων, έναντι των 19 ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών της λίστας NCI-60 και η σύγκριση της δραστηρότητάς τους υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες
- Ο συσχετισμός της δραστηρότητάς των σίγμα προσδεδωμένων με τα επίπεδα έκφρασης των $\sigma 1$ και $\sigma 2$ υποδοχέων στις 19 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60
- Η διερεύνηση του πιθανού μηχανισμού δράσης των σ προσδεδωμένων μέσω της χρήσης του αλγόριθμου του NCI, COMPARE
- Η εκτενέστερη μελέτη του σ προσδέτη, που επιδεικνύει την καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση, σε ζωικά πρότυπα καρκίνου από ασθενείς (PDX) ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με εγκαθιδρυμένες αντικαρκινικές θεραπείες



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Υλικά και Μέθοδοι

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΝΟΤΗΤΑ 1 | *In vitro* μεθοδολογία

1.1. Κυτταροκαλλιέργειες

Η καλλιέργεια κυττάρων (ή αλλιώς κυτταροκαλλιέργεια) είναι η διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα διατηρούνται και αναπτύσσονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες, εκτός του φυσικού τους περιβάλλοντος. Αφού τα κύτταρα απομονωθούν από ζωντανό ιστό, μπορούν στη συνέχεια να καλλιεργηθούν σε τεχνητό περιβάλλον αυστηρά καθορισμένων συνθηκών.

Οι χρήσεις των κυτταροκαλλιεργειών είναι πολλαπλές. Αποτελούν ευρέως διαδεδομένα μοντέλα, αφού χρησιμοποιούνται εκτενώς σε βιοχημικές και φαρμακολογικές μελέτες. Οι *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες παρέχουν στο πεδίο της έρευνας μια σειρά από πλεονεκτήματα, τα οποία συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Η προμήθεια των εγκαθιδρυμένων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών της λίστας του NCI-60 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έγινε από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των Η.Π.Α. [NCI: National Cancer Institute, (Bethesda, MD, USA)]. Στον Πίνακα 2 παραθέτονται οι 19 κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και συμπεριλαμβάνονται στη λίστα των καρκινικών κυτταρικών σειρών του NCI [NCI-60 Panel (Βλέπε ΠΛΑΙΣΙΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ¹)]. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 2 πρωτογενείς κυτταρικοί πληθυσμοί προερχόμενοι από ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος, που απομονώθηκαν στο εργαστήριο μας και 4 εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές τις οποίες προμηθευτήκαμε από την ATCC (American Type Culture Collection) (Πίνακας 3).

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco®, Code: 31870025) συμπληρωμέν με 5% εμβρυικό ορό μοσχαριού [FBS: Fetal Bovine Serum,

Πίνακας 1. Βασικά πλεονεκτήματα των κυτταροκαλλιεργειών.

Σημείωση: • Διαδοχικές κυτταρικές καλλιέργειες (sub-cultures)

Πλεονεκτήματα κυτταροκαλλιεργειών

- Οι καλλιέργειες μπορούν να εκτεθούν σε διάφορα αντιδραστήρια, όπως για παράδειγμα φάρμακα, σ' ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων
- Τα χαρακτηριστικά των κυττάρων μπορούν να διατηρηθούν για πολλές γενεές (passages)•, διατηρώντας υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό
- Οι πειραματικές μελέτες διενεργούνται σε σταθερό περιβάλλον χωρίς τις διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται σε *in vivo* συστήματα
- Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες κυτταρικές σειρές, κάτι που παρέχει ευελιξία στον πειραματικό σχεδιασμό

(Biosera, Code: 1001G)], 2 mM L-γλουταμίνη (Biosera, Code: XO-T1715), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη (Biosera, Code: XO-A4122). Οι κυτταροκαλλιέργειες διατηρούνται σε κλίβανο επώασης, στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95% υγρασία.

Πίνακας 2. Οι 19 εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές που συμπεριλαμβάνονται στη λίστα του NCI-60 Panel.

Σημείωση: • ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Τύπος καρκίνου	Κυτταρικές σειρές
Πνεύμονα	A549/ATCC NCI-H23 NCI-H460
Παχέος εντέρου	HCT-116 HCT-15
ΚΝΣ•	SF-268 SF-295
Μελανώματος	MDA-MB-435 SK-MEL-28
Ωοθηκών	OVCAR-3 OVCAR-5 NCI/ADR-RES
Νεφρού	CAKI-1 SN12C
Προστάτη	PC-3 DU-145
Μαστού	MCF-7 MDA-MB-231 T-47D

Πίνακας 3. Δύο πρωτογενείς κυτταρικοί υποπληθυσμοί προερχόμενοι από ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος και 4 εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Σημείωση: • Η ανάπτυξή τους αναλύεται στην § 1.4

Τύπος καρκίνου	Κυτταρικές σειρές	
Πάγκρεας	ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ •	AT-021013 FL-021013
	ΕΓΚΑΘΙΔΡΥΜΕΝΕΣ	AsPC-1 BxPC-3 MIA PaCa-2 PANC-1

1.2. Μελέτη αντιπολλαπλασιαστικής δράσης ουσιών μέσω της μεθόδου SRB

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση διαφόρων ουσιών ελέγχθηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου της σουλφοροδαμίνης Β (SRB: Sulforhodamine B). Η SRB είναι μια ανιονική μικρομοριακή ένωση που προσδένεται στοιχειομετρικά στα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνικών αλυσίδων, υπό ελαφρώς όξινες συνθήκες, και ακολούθως εκχυλίζεται, υπό βασικές συνθήκες (265). Συνεπώς, η χρωστική SRB μπορεί να αποτελέσει ένα δείκτη για τον υπολογισμό της βιομάζας μιας καλλιέργειας και επομένως και της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης διαφόρων χημικών ενώσεων σε *in vitro* συνθήκες (265, 266).

Η κυτταροτοξική δράση 5 σίγμα προσδετών (sigma ligands), συγκεκριμένα της Siramesine (χορηγία της εταιρείας H. Lundbeck A/S)], του PB28 dihydrochloride (Santa Cruz Biotechnology, Code: sc-204834), της Rimcazole dihydrochloride (TOCRIS, Code:

1497), του BD1047 dihydrobromide (TOCRIS, Code: 0956) και του SM-21 maleate (Santa Cruz Biotechnology, Code: sc-204289), προσδιορίστηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου SRB, σε 24 καρκινικές κυτταρικές σειρές (βλ. Πίνακα 2 & 3). Η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε στην αρχή κάθε πειράματος με τη μέθοδο αποκλεισμού χρωστικής trypan blue και ήταν πάντοτε μεγαλύτερη από 97%. Τα κύτταρα ενοφθαλμίστηκαν σε πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα (με πυκνότητα 5.000 κύτταρα ανά θέση) και επώαστηκαν για 24 ώρες σε κλίβανο επώασης, στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95% υγρασία, προκειμένου να επανέλθουν στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Μετά το πέρας 24 ωρών, έγινε η προσθήκη των ουσιών, των οποίων μελετήθηκε η αντιπρολλαπλασιαστική δράση, ενώ τα κύτταρα σε ορισμένες θέσεις, αφέθηκαν για ανάπτυξη χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα (κύτταρα ελέγχου, C). Οι σίγμα προσδέτες διαλύθηκαν σε DMSO (Dimethyl Sulfoxide) και αραιώθηκαν διαδοχικά σε θρεπτικό μέσο, προκειμένου να αποκτήσουν τις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις. Κάθε ουσία ελέγχθηκε σε τέσσερις λογαριθμικές συγκεντρώσεις με μέγιστη συγκέντρωση τα 100μM. Η τελική συγκέντρωση του DMSO σε κάθε κυτταροκαλλιέργεια δεν ήταν υψηλότερη από 0,1%. Ένας αριθμός θέσεων από κάθε κυτταρική σειρά σε κάθε πείραμα μονιμοποιήθηκε με κρύο διάλυμα 50% v/v TCA (Trichloroacetic Acid) (Applichem, Code: A1431), για 1 ώρα, στους 4 °C, με στόχο την αντιπροσώπευση της κυτταρικής καλλιέργειας στη φάση της προσθήκης των ουσιών (Tz). Μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων με τους σίγμα προσδέτες τα

κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, με ήπια προσθήκη 50% v/v TCA σε κάθε θέση του πλακιδίου κυτταροκαλλιέργειας, για 1 ώρα, στους 4 °C. Έπειτα, τα κύτταρα πλύθηκαν με προσοχή, 3 φορές, με απιονισμένο νερό, απομακρύνθηκε η περίσσεια ύδατος και τα πλακίδια αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα, σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα κύτταρα βάφτηκαν με διάλυμα 0,04% w/v SRB (SIGMA, Code: S9012) σε 1% acetic acid (Fluka, Code: 45731), για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνθηκε με επανειλημμένες εκπλύσεις με 1% v/v acetic acid και οι κυτταρικές μονοστιβάδες αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα 10 mM Tris base και τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 37 °C. Σ' αυτές τις συνθήκες η συνδεδεμένη με πρωτεΐνη χρωστική απελευθερώνεται στο ελαφρώς βασικό διάλυμα Tris base. Για κάθε συγκέντρωση της ουσίας που μελετάται, μετράται η οπτική απορρόφηση στα 540nm (Ti), σε συσκευή φωτομετρίας BioTek microelisa (Biotek, EI-311).

Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης των κυττάρων την ώρα της προσθήκης των ουσιών (Tz), των κυττάρων ελέγχου (C), καθώς και των κυττάρων υπό την επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών, υπολογίζεται η ποσοστιαία ανάπτυξη των κυττάρων (% Growth Rate) με τη χρήση του παρακάτω τύπου: $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$, για συγκεντρώσεις όπου $Ti \geq Tz$ και $[(Ti-Tz)/Tz] \times 100$, για συγκεντρώσεις όπου $Ti < Tz$

Από τις προκύπτουσες καμπύλες δόσης-απόκρισης προσδιορίζονται οι παράμετροι GI50, TGI και LC50 (Πίνακας 5). Με σκοπό τον προσδιορισμό της σχετικής ασφάλειας

μιας ουσίας εισάγεται η έννοια του θεραπευτικού δείκτη TI (Therapeutic Index), ως ο λόγος της δόσης της ουσίας που προκαλεί τοξικότητα προς τη δόση της ουσίας που προκαλεί θεραπευτικό αποτέλεσμα ($TI=LC50/GI50$). Γενικά, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του TI τόσο περισσότερο ασφαλής καθίσταται η χρήση μιας ουσίας.

Πίνακας 5. Περιγραφή των παραμέτρων GI50, TGI και LC50.

Παράμετρος	Περιγραφή
(GI50) Growth Inhibition 50%	είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50%
(TGI) Total Growth Inhibition	είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων
(LC50) Lethal Concentration 50%	είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιφέρεται θάνατος στο 50% του κυτταρικού πληθυσμού

1.3. Ο αλγόριθμος COMPARE

Ο προσδιορισμός του Μηχανισμού Δράσης (ΜΔ) μιας ουσίας είναι μια σημαντική, παρότι δύσκολη και συχνά χρονοβόρα, συνιστώσα στο πεδίο της ανάπτυξης των φαρμάκων. Είναι σημαντικό να αναπτύσσονται ταχείες και αποτελεσματικές μέθοδοι ικανές να αναλύουν ένα μεγάλο όγκο *in vitro* δεδομένων και να παρέχουν πληροφορίες σχετικές με το ΜΔ υπό μελέτη ουσιών. Συγκρίνοντας *in vitro* δεδομένα σχετικά με τη φαρμακολογική απόκριση ουσιών με γνωστό ΜΔ, είναι δυνατή η

πρόβλεψη του ΜΔ μιας ουσίας της οποίας η δράση βρίσκεται υπό διερεύνηση. Μια τέτοια μέθοδος είναι ο αλγόριθμος COMPARE του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου των ΗΠΑ, (NCI: National Cancer Institute). Μέσω του προγράμματος Developmental Therapeutics Program (DTP) του NCI δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων, που συνεχώς εμπλουτίζεται, με στόχο τον έλεγχο της αντιπροπλασιαστικής δράσης ενός μεγάλου αριθμού φυσικών και συνθετικών ουσιών, έναντι 60 εγκαθιδρυμένων κυτταρικών σειρών διαφόρων καρκινικών τύπων του Ινστιτούτου (87). Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο κυτταροτοξικότητας SRB ελέγχεται η δράση για κάθε μία χημική ουσία της βάσης δεδομένων στις 60 κυτταρικές σειρές της λίστας NCI60 και προσδιορίζονται οι παράμετροι GI50, LC50 και TGI, με δεσπόζουσα τη θέση του παράγοντα GI50. Ο χρήστης της βάσης δεδομένων, εισάγοντας τον αρνητικό λογάριθμο των τιμών GI50 ($-\log GI50$) που έχουν προκύψει από τη μελέτη κυτταροτοξικότητας, μιας άγνωστης ουσίας, σε κυτταρικές σειρές που περιλαμβάνονται στη λίστα του NCI-60, μπορεί να ανακτήσει από τη βάση δεδομένων ένα γράφημα (Mean Graph, MG) που αποτελεί το «αποτύπωμα» της ουσίας. Η βάση αυτού του γραφήματος περιλαμβάνει το μέσο όρο των τιμών GI50 της υπό εξέταση ουσίας, για κάθε μία από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές με τις οποίες αυτή επώαστηκε. Για τη δημιουργία του γραφήματος για κάθε καρκινική κυτταρική σειρά, υπολογίζεται η διαφορά που προκύπτει από την τιμή της παραμέτρου GI50 αυτής της σειράς και του μέσου όρου των τιμών GI50 από όλες τις σειρές που έχουν εξετασθεί. Το σύνολο αυτών των διαφορών απεικονίζεται στη

ΠΛΑΙΣΙΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ¹

NCI-60 λίστα καρκινικών κυτταρικών σειρών

Η λίστα NCI-60 περιλαμβάνει 60 διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και απέκτησε την πλήρως λειτουργική της μορφή το 1990. Χρησιμοποιεί τις διαφορετικές κυτταρικές σειρές με στόχο την ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό νέων ενώσεων που επάγουν την αναστολή ανάπτυξης ή τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Έχει σχεδιαστεί για να ελέγχει μέχρι 3.000 μικρά μόρια (συνθετικά ή φυσικής προέλευσης) ανά έτος για πιθανή αντικαρκινική δράση. Η λίστα αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο φάσμα καρκινικών τύπων όπως, λευχαιμίας, μελανώματος, πνεύμονα, παχέος εντέρου, εγκεφάλου, ωοθηκών, μαστού, προστάτη και νεφρών.

συνέχεια με τη μορφή γραφήματος, μέσα από το οποίο μπορεί να γίνει ταυτοποίηση των καρκινικών σειρών που εμφανίζουν ευαισθησία ή αντοχή στην υπό εξέταση ουσία (89). Πιο συγκεκριμένα, το MG εκφράζει αρνητικές και θετικές τιμές προς τα δεξιά και αριστερά του μέσου όρου του GI50 που ονομάζονται τιμές δέλτα (deltas) και εκφράζουν την ευαισθησία των κυτταρικών σειρών έναντι της εξεταζόμενης ουσίας. Θετικές τιμές εκτείνονται προς τα δεξιά και εκφράζουν κυτταρικές σειρές ευαίσθητες στην εξεταζόμενη ουσία ενώ οι αρνητικές τιμές προβάλλονται προς τα αριστερά του μέσου γραφήματος και εκφράζουν ανθεκτικότητα στην υπό εξέταση ουσία.

Στη συνέχεια ο αλγόριθμος αυτός χρησιμοποιεί το MG για σύγκριση με τα αντίστοιχα γραφήματα ουσιών με γνωστό μηχανισμό δράσης που βρίσκονται στην επιλεγμένη βάση δεδομένων του NCI. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι ουσίες με παρόμοια MG εμφανίζουν και μεγάλη ομοιότητα στους

μηχανισμούς της *in vitro* αντικαρκινικής δράσης τους.

Η ομοιότητα μιας ουσίας σε σχέση με τις εγγεγραμμένες και ελεγμένες ουσίες της βάσης δεδομένων, εκφράζεται ποσοτικά με το συντελεστή συσχέτισης Pearson Correlation Coefficient (PCC). Όσο πιο μεγάλη η ομοιότητα των δύο ουσιών τόσο η τιμή PCC προσεγγίζει την τιμή 1. Έτσι, ο αλγόριθμος COMPARE προτείνει τις μελετημένες ουσίες που φέρουν την υψηλότερη συσχέτιση με την άγνωστη. Συνεπώς, παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού ενός υποθετικού μηχανισμού δράσης για μια άγνωστη, υπό εξέταση, ουσία ή η δυνατότητα ανίχνευσης ενός μοναδικού προτύπου απόκρισης, το οποίο δεν προσομοιάζει κάποιο από αυτά των ουσιών που είναι εγγεγραμμένες στη βάση δεδομένων του NCI.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος COMPARE με σκοπό μια πρώτη προσπάθεια διαλεύκανσης του μηχανισμού

της αντικαρκινικής δράσης των εξεταζόμενων σ προσδετών siramesine, PB28 dihydrochloride, Rimcazone dihydrochloride και BD1047 dihydrobromide.

1.4. Ανάπτυξη *ex vivo* πρωτογενών κυτταρικών πληθυσμών

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση πρωτογενών καρκινικών κυτταρικών σειρών προερχόμενων από ασθενείς έχει αυξηθεί σε προκλινικές δοκιμές, έναντι των εγκαθιδρυμένων (90). Οι πρωτογενείς καρκινικοί κυτταρικοί πληθυσμοί αποτελούν *ex vivo* κυτταρικούς πληθυσμούς που ανακτώνται απευθείας από φρέσκα δείγματα ανθρώπινων ή άλλης προέλευσης ζωικών καρκινικών ιστών που έχουν προέλθει από χειρουργική εξαίρεση (91). Ακολουθώντας, απομονώνονται με τη χρήση χημικών, ενζυμικών και μηχανικών μεθόδων και επιχειρείται η ανάπτυξή τους κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας. Η απευθείας προέλευσή τους από ένα ζωντανό οργανισμό τις καθιστά ένα καλό μιμικό πρότυπο, αντιπροσωπευτικό της ετερογένειας του ιστού απ' τον οποίο προέρχονται. Η ετερογένεια των καρκινικών όγκων συσχετίζεται με τη διαφορετική απόκριση των ασθενών στα εφαρμοζόμενα θεραπευτικά σχήματα, καθώς, επίσης, και με χαρακτηριστικά με της ανάπτυξης του καρκίνου, όπως η εξέλιξη, η διήθηση και το μεταστατικό δυναμικό του (92, 93). Οι εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως σε προκλινικές δοκιμές, δεν μπορούν να προβλέψουν την πραγματική συμπεριφορά του καρκίνου (94). Για το λόγο αυτό οι πρωτογενείς καρκινικοί κυτταρικοί

πληθυσμοί αποτελούν εξαιρετικά *ex vivo* μοντέλα, επιτρέποντας την πιστή αναπαραγωγή του όγκου, και αποτελούν έγκυρα εργαλεία για τη μελέτη της βιολογίας του καρκίνου και την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων (95).

1.4.1. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας

Αμέσως μετά τη χειρουργική εξαίρεση, το δείγμα του όγκου πρέπει να υποστεί τους κατάλληλους χειρισμούς προκειμένου να απομονωθούν οι πρωτογενείς καρκινικοί κυτταρικοί πληθυσμοί. Αρχικά, το δείγμα εκπλένεται με PBS 1x και τεμαχίζεται μηχανικά σε μικρά κομμάτια διαμέτρου 1-3 mm. Στη συνέχεια επωάζεται σε ενζυμικό διάλυμα διάσπασης ιστών (TDS: Tissue Dissociation Solution), για 10 λεπτά (ή μέχρι να παρατηρηθεί η διάσπαση του ιστού σε μονήρη κύτταρα), στους 37 °C, σε αναλογία 1 ml διαλύματος/100 g ιστού. Το TDS είναι ένα μείγμα που περιλαμβάνει τα ένζυμα: υαλουρονιδάση (Sigma, Code: H3506) σε συγκέντρωση 1 mg/ml, κολλαγενάση IV (Sigma, Code: C5138) σε συγκέντρωση 1 mg/ml, DNάση (Sigma, Code: DN-25) σε συγκέντρωση 50 µg/ml. Τα ένζυμα διαλύονται σε διάλυμα HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Thermo, Code: SH30588.01), εμπλουτισμένο με 10% FBS. Μετά την επώαση, το εναιώρημα που περνάει από σύριγγα διαμέτρου 16G απομονώνεται, φυγοκεντρείται (1.400 rpm, 10 min) και εκπλένεται με διάλυμα HBSS (1.200 rpm, 10 min, x2). Στο εναιώρημα περιλαμβάνονται μονήρη κύτταρα, συσσωματώματα κυττάρων καθώς και κομμάτια όγκου τα οποία δεν έχουν υποστεί

πλήρη πέψη. Με τον τρόπο αυτό, το δείγμα διατηρεί ένα ικανοποιητικό ποσοστό της κυτταρικής του επιβίωσης και περιορίζεται η απώλεια των συστατικών του στρώματος και άλλων στοιχείων της αρχιτεκτονικής του όγκου. Ένα ποσοστό του παραπάνω εναιωρήματος προορίζεται για εγκαθίδρυση πρωτογενούς καρκινικής κυτταρικής σειράς και το υπόλοιπο για την ανάπτυξη ξενομοσχεύματος (PDX). Ο ανακτώμενος αριθμός των ζωντανών κυττάρων του εναιωρήματος εξαρτάται τόσο από το μέγεθος και την κατάσταση του καρκινικού ιστού όσο και από την αποτελεσματικότητα της ενζυμικής διάσπασης.

1.5. Εγκαθίδρυση πρωτογενούς κυτταρικής σειράς

Η διαδικασία εγκαθίδρυσης μιας πρωτογενούς καρκινικής κυτταρικής σειράς και η ανάπτυξη ενός αθανатоποιημένου φαινοτύπου είναι μια διαδικασία με μη προβλέψιμα αποτελέσματα. Η επιτυχία της μεθόδου και η ικανότητα ανάπτυξης των πρωτογενών κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας ποικίλει και εξαρτάται από παράγοντες όπως ο τύπος του καρκίνου, η επιθετικότητά του, η επεξεργασία του ιστού κ.ά. (90). Η εγκαθίδρυση μιας πρωτογενούς κυτταρικής σειράς περιλαμβάνει τρία σημεία κλειδιά: α) την επιλογή των καρκινικών κυττάρων από τα στρωματικά, β) την κυτταρική αθανатоποίηση και γ) το μορφολογικό και μοριακό χαρακτηρισμό της κυτταρικής σειράς. Ένα σύνηθες πρόβλημα που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας είναι ο γρήγορος πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών που ευνοείται από τους αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνουν τα καρκινικά κύτταρα. Καθώς

οι ινοβλάστες εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην τρυψίνη από ότι τα καρκινικά κύτταρα, απομακρύνονται από την καλλιέργεια με επιλεκτική τρυψινοποίηση (90).

1.5.1. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας

Από έναν ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος απομονώθηκαν κύτταρα, έπειτα από χειρουργική εξαίρεση, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Σε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας εισάγονται περίπου 100.000 ζωντανά κύτταρα/cm² σε 100 μl θρεπτικού μέσου κυτταροκαλλιέργειας, εμπλουτισμένου με 20% FBS. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα το θρεπτικό μέσο ανανεώνονταν και η ανάπτυξη της κυτταροκαλλιέργειας παρατηρούνταν στο μικροσκόπιο. Στην προκειμένη περίπτωση, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα αναπτύσσονταν είτε προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας κυτταροκαλλιέργειας είτε στο υπερκείμενο, σε συσσωματώματα. Οι δύο αυτοί κυτταρικοί πληθυσμοί κρίθηκε σκόπιμο να θεωρηθούν διακριτοί και να μελετηθούν ξεχωριστά. Για το λόγο αυτό η καλλιέργειά τους διαχωρίστηκε στον κυτταρικό υποπληθυσμό που αναπτύσσονταν προσκολλημένος στην επιφάνεια της φλάσκας και ονομάστηκε Attached_021013 (AT_021013) και στον κυτταρικό υποπληθυσμό που αναπτύσσονταν στο υπερκείμενο και ονομάστηκε Floating_021013 (FL_021013). Από την καλλιέργεια του κυτταρικού υποπληθυσμού AT_021013 απομακρύνονταν τα κύτταρα του υποπληθυσμού FL_021013 και αντίστροφα. Οι δύο αυτοί κυτταρικοί υποπληθυσμοί

χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω ως προς το βαθμό διαφοροποίησης, τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης και τον τρόπο ανάπτυξής τους σε ζωικά πρότυπα καρκίνου.

1.6. Ανάλυση και ανίχνευση πρωτεϊνών

1.6.1. Απομόνωση πρωτεϊνικού λύματος από κύτταρα ή ιστό

Προκειμένου να απομονωθεί το σύνολο των πρωτεϊνών από τα προς μελέτη δείγματα (κύτταρα ή ιστούς), ώστε να αναλυθούν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, είναι απαραίτητη η διαδικασία της λύσης των κυττάρων/ιστών. Η λύση τόσο των κυττάρων όσο και των ιστών πραγματοποιήθηκε με διάλυμα πρωτεϊνικής εκχύλισης TPER (Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo, 78510), στο οποίο είχε προστεθεί 1% διαλύματος αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών (Cell Signaling, 5872).

Κύτταρα:

Τα κύτταρα συλλέγονται μέσω φυγοκέντρησης και πλένονται με κρύο διάλυμα PBS 1X (1200rpm, 5min, x3). Στο κυτταρικό ίζημα προστίθεται διάλυμα TPER (100μl διαλύματος ανά 106 κύτταρα) και το κυτταρικό εναίωρημα επωάζεται σε πάγο για 30 λεπτά. Η δράση του διαλύματος λύσης επικουρείται με μηχανικούς τρόπους, όπως η ανά τακτά διαστήματα περιδίνηση των δειγμάτων και η εξαναγκασμένη ροή του εναίωρηματος μέσα από βελόνα διαμέτρου 27 G. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 στροφές ανά λεπτό (rpm), για 30 λεπτά, στους 4 °C. Η διαδικασία αυτή

επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές ή μέχρι το υπερκείμενο (πρωτεϊνικό λύμα) να είναι διαυγές, και συλλέγονται τα υπερκείμενα.

Ιστοί ασθενών και ξενομοσχεύματα:

Μετά την εξαίρεση του, ο ιστός πλένεται με κρύο διάλυμα PBS 1X ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη αίματος, ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας και τεμαχίζεται σε όσο το δυνατόν μικρότερα κομμάτια. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ο ιστός διατηρείται σε πάγο. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα πρωτεϊνικής εκχύλισης TPER (200μl διαλύματος σε 10mg ιστού) και το μίγμα ομογενοποιείται (5 κύκλοι του 1min/1min σε ηρεμία ο κάθε κύκλος) (WiseStir HS-30E, Witeg) και επωάζεται σε πάγο για 30 λεπτά. Η δράση του διαλύματος λύσης επικουρείται με μηχανικούς τρόπους, όπως η ανά τακτά διαστήματα περιδίνηση των δειγμάτων και η εξαναγκασμένη ροή του εναίωρηματος μέσα από βελόνα διαμέτρου 27 G. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, τα δείγματα κατεργάζονται με υπερήχους (40% amplitude, 10 κύκλοι των 5sec κατεργασία/1min σε ηρεμία ο κάθε κύκλος) (sonicator UP400-S, Hielscher). Κατά τη διάρκεια της κατεργασίας με υπερήχους τα κύτταρα διατηρούνται σε πάγο. Τέλος, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό (rpm), για 30 λεπτά, στους 4 °C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές ή μέχρι το υπερκείμενο (πρωτεϊνικό λύμα) να είναι διαυγές, και συλλέγονται τα υπερκείμενα.

1.6.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (μέθοδος Bradford)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης βασίσθηκε στη μέθοδο Bradford

και πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού kit [Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227)]. Συνοπτικά, η διαδικασία περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης δειγμάτων αλβουμίνης, γνωστής συγκέντρωσης, βάσει της οποίας προσδιορίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση των προς ανάλυση δειγμάτων.

1.6.3. Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ασυνεχές πήκτωμα SDS-PAGE. Η παρασκευή του πηκτώματος πακεταρίσματος (5%) και του πηκτώματος διαχωρισμού (8-12%), ανάλογα με τα μοριακά βάρη των προς μελέτη πρωτεϊνών, αναφέρεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Σύνθεση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου

	Πήκτωμα πακεταρίσματος ($V_{\text{τελ.}}=10 \text{ ml}$)	Πήκτωμα διαχωρισμού ($V_{\text{τελ.}}=10 \text{ ml}$)	
Πυκνότητα πηκτώματος	5%	8%	12%
ddH ₂ O	5,7 ml	2,7 ml	3,4 ml
30% Acrylamide	1,7 ml	3,2 ml	4 ml
1,5 M Tris base (pH 8,8)	-	2,5 ml	2,5 ml
0,5 M Tris base (pH 6,8)	2,5 ml	-	-
20% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	50 μl	50 μl	50 μl
TEMED	10 μl	10 μl	10 μl

1.6.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

1.6.4α. Γενικά

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο υπό σταθερή τάση. Η ηλεκτροφορητική διαδικασία προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) της πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f) και δίνεται από τη σχέση $u = Ez/f$.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σε πήκτωμα, λόγω του ότι αυτό λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας, έτσι, ευκολότερο το διαχωρισμό μορίων κι επιπλέον καταστέλλοντας τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, συνθήκες απαραίτητες για σωστό διαχωρισμό των μορίων. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενοδισ-ακρυλαμίδης (MBA). Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ενδείκνυται για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών διότι σχηματίζεται εύκολα από χημικά ουδέτερες ενώσεις. Επίσης, το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και MBA. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο παραγόντων πολυμερισμού: του υπερθειικού αμμωνίου (APS: Ammonium

Persulfate,) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS.

Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση το μοριακό τους βάρος. Αρχικά, το μίγμα των πρωτεϊνών διαλύεται σε διάλυμα SDS, ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Επίσης, προστίθεται μερκαπτοαιθανόλη, που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που υφίστανται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η διαδικασία της αποδιάταξης ολοκληρώνεται με θέρμανση. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης.

Στην παρούσα μελέτη η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ασυνεχή τρόπο (discontinuous). Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαδοχικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, διαφορετικών συγκεντρώσεων: ένα πηκτώμα πακεταρίσματος (stacking gel) στο οποίο εισάγονταν τα δείγματα και ένα πηκτώμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel), ακριβώς κάτω από το πηκτώμα πακεταρίσματος, μέσα στο οποίο οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Το πηκτώμα πακεταρίσματος δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες, αλλά τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα εισέλθουν

ταυτόχρονα στο κυρίως πηκτώμα διαχωρισμού.

1.6.4β. Περιγραφή της μεθόδου

Σύμφωνα με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος, ετοιμάζονται δείγματα με ίση συνολική ποσότητα πρωτεΐνης (20 µg) για ηλεκτροφόρηση. Στα δείγματα προστίθεται διάλυμα φορτώσεως [loading buffer, το οποίο περιέχει: β-mercaptoethanol, ρυθμιστικό διάλυμα Tris base (συγκέντρωσης 0,5 M και pH 6,8), 0,2% bromophenol blue, 20% SDS και γλυκερόλη]]. Ακολούθως, τα δείγματα τοποθετούνται σε νερό θερμοκρασίας 95 °C για πέντε λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος και η φόρτωση, στις δύο αντιδιαμετρικές ακραίες θέσεις, του προτύπου δείγματος με προεπιλεγμένες πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους που θα χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες. Τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής και ηλεκτροφορούνται υπό τάση 100V μέσα στο πηκτώμα πακεταρίσματος και υπό τάση 200 V μέσα στο πηκτώμα διαχωρισμού. Κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία οι αναγωγικές συνθήκες προσδίδουν στις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο, κάτι που τις ωθεί προς την άνοδο και τις διαχωρίζει με βάση το μοριακό τους βάρος.

1.6.5. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Η επόμενη φάση της πειραματικής διαδικασίας αφορά στη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πηκτώμα

πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδίνης (PVDF), με μέγεθος πόρων 0,22 μm (Immobilon-PSQ Transfer Membrane, Millipore, ISEQ85R). Προαπαιτείται η ενεργοποίηση της μεμβράνης, η οποία επιτυγχάνεται με επώασή της για 30 λεπτά, σε μεθανόλη, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί η εξισορρόπηση της μεμβράνης σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer, το οποίο περιέχει: 129 mM γλυκίνη, 25 mM Tris base και 20% μεθανόλη) για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση. Τέλος, η μεταφορά πραγματοποιείται σε transfer buffer, με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος (τάσης 100 V και εντάσεως 250 mA), για 60 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

1.6.6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Το ανοσοαποτύπωμα (ή ανοσοστύπωμα) πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος η οποία περιλαμβάνει τόσο τη μεταφορά των ηλεκτροφορητικά κλασματοποιημένων πρωτεϊνών από το διαχωριστικό μέσο, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, προς ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης όσο και την ανίχνευσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης Western (Western blotting).

Μετά το τέλος της διαδικασίας μεταφοράς των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επωάζονται για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με το κατάλληλο διάλυμα δέσμευσης των μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης - σύμφωνα με το ειδικό πρωτόκολλο αντισώματος - και κατόπιν επωάζονται ολονυκτίως στους 4 °C είτε με

αντίσωμα κουνελιού anti-SIGMA1 [της εταιρείας Cell Signaling, (Code: 61994)] είτε με αντίσωμα κουνελιού anti-PGRMC1 [της εταιρείας Cell Signaling, Code: 13856)] είτε με αντίσωμα κουνελιού anti-TMEM97 [της εταιρείας Novus Biologicals, Code: NBP1-30436)]. Όλα τα αντισώματα χρησιμοποιούνται σε αραίωση 1/1000. Ακολούθως, οι μεμβράνες επωάζονται με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit [της εταιρείας Cell Signaling, (Code: 7074)] συζευγμένο με υπεροξειδάση horseradish σε αραίωση 1/6000, που αναπτύσσεται με υπόστρωμα ενίσχυσης χημειοφωταύγειας (ECL) [Clarity™ Western ECL Substrate (της εταιρείας Biorad, Code: 170-5060)] και ανιχνεύεται με σύστημα απεικόνισης χημειοφωταύγειας Uvitec Cambridge με τη βοήθεια του Alliance Software (Ver 16.06) (Uvitec Cambridge, Cambridge, UK).

1.7. Εγκλωβισμός της Siramesine σε νανοδομές στοχευόμενης μεταφοράς φαρμάκου (λιποσώματα)

Λιποσώματα φωσφολιπιδίων, χοληστερόλης και της ουσίας Siramesine αναπτύχθηκαν με τη χρήση της μεθόδου ενυδάτωσης λεπτής μεμβράνης (TFHM: Thin-Film Hydration Method). Η μείωση του μεγέθους των κυστιδίων που σχηματίστηκαν, μέσω της ενυδάτωσης της λεπτής μεμβράνης, επιτεύχθηκε με υπερέχους.

1.7.1. Μέθοδος ενυδάτωσης λεπτής μεμβράνης (TFHM)

Κατάλληλες ποσότητες L- α -φωσφατιδυλοχολίνης (Egg, Chicken) (EggPC) (Avanti Polar Lipids, Inc.), 1,2-διολεοϋλο-3-τριμεθυλαμώνιο-προπάνιο (DOTAP) (Avanti

Polar Lipids, Inc.), χοληστερόλη (Sigma-Aldrich) και η ουσία Siramesine διαλύθηκαν σε χλωροφόρμιο, σε μοριακή αναλογία 100:25:5 μεταξύ των λιπιδίων και 100:10 μεταξύ λιπιδίων και της Siramesine και μεταφέρθηκαν σε στρογγυλή φιάλη. Η φιάλη συνδέθηκε σε περιστροφικό εξατμιστή (Laborota 4000, Heidolph, Schwabach, Germany), εφαρμόστηκε κενό (-1 atm) και οι λεπτές μεμβράνες σχηματίστηκαν με βραδεία απομάκρυνση του διαλύτη στους 40 °C. Έπειτα, διατηρήθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες για 30 λεπτά και υπό κενό για τουλάχιστον 24 ώρες σε ξηραντήρα, προκειμένου να απομακρυνθούν πιθανά ίχνη διαλύτη. Στη συνέχεια, ενυδατώθηκαν με PBS 0,15 M (pH=7,4) υπό βραδεία ανάδευση για 1 ώρα σε υδατόλουτρο, πάνω από τη θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) του περιέχοντος φωσφολιπίδιου (35 °C). Η τελική συγκέντρωση της Siramesine ήταν 2,34 mg/mL (5,15 mM). Τα προκύπτοντα σωματίδια τύπου Multi-lamellar Vehicles (MLVs) υποβλήθηκαν σε μέθοδο μείωσης μεγέθους και ομογενοποίησης μέσω υπερήχων.

1.7.2. Υπέρηχοι

Τα σωματίδια τύπου Multi-Lamellar Vehicles (MLVs) που αναπτύχθηκαν μέσω TFHM, υποβλήθηκαν σε δύο κύκλους υπερήχων διάρκειας 5 λεπτών ο ένας (amplitude 70%) που διακόπτονταν από περίοδο ανάπαυσης 5 λεπτών (UP 200S, dr. Hielscher GmbH, Berlin, Germany). Οι προκύπτουσες νανοδομές (Small Unilamellar liposome Vesicle: SUV) αφέθηκαν για εξισσορόπηση για 30 λεπτά πριν τη μέτρηση τους με σκέδαση φωτός.

1.7.3. Σκέδαση φωτός σε χημεικούς νανοφορείς

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που προσδιορίστηκαν ήταν το μέγεθος (Dh: Hydrodynamic Diameter), η κατανομή (PDI: Polydispersity Index) και το zeta δυναμικό (Zeta potential) μέσω των τεχνικών DLS (Dynamic Light Scattering) και ELS (Electrophoretic Light Scattering) με χρήση φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (PCS) (Zetasizer 3000HSA ή Zetasizer Nano-ZS). Για τη μελέτη της σκέδασης φωτός DLS και ELS, κλάσματα αραιώθηκαν 30 φορές σε ύδωρ βαθμού HPLC. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν υπό γωνία ανίχνευσης 90° στους 25 °C και αναλύθηκαν με τη μέθοδο CONTIN (λογισμικό MALVERN).

ΕΝΟΤΗΤΑ 2 | *In vivo* μεθοδολογία

2.1 Γενικά

Η προμήθεια των στελεχών ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε από το Jackson Laboratory (The Jackson Laboratory 600 Main Street Bar Harbor, Maine 04609 USA). Όλα τα ζώα διατηρήθηκαν υπό συνθήκες ελεύθερες παθογόνων [specific pathogen free (SPF) conditions] σε κλωβούς τύπου ILL, στην πειραματική μονάδα του εργαστηρίου Φαρμακολογίας (EL42-BIO_Exp03, άδεια πρωτοκόλλου 5542/22806-30/11/2015) σε κλιματικά ρυθμιζόμενο περιβάλλον (21±1 °C, 50-55% σχετική υγρασία) και φωτοπερίοδο 12h/12h (κύκλοι φωτός/σκότους διάρκειας 12 ωρών) με ελεύθερη κατανάλωση νερού και φαγητού. Όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί των ζώων ήταν σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία (PD 56/2013, εγκύκλιος 2215/117550/2013), καθώς επίσης και τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2013/63/EU). Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη ποντικών: το NOD.CB17-Prkdcscid/J, γνωστό με το όνομα NOD-SCID και το NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ γνωστό με το όνομα NOD scid gamma (NSG™).

Στο στέλεχος NOD-SCID, η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος έχει προκληθεί μέσω ομόζυγης μετάλλαξης του γονιδίου Prkdc, που προκαλεί σοβαρό βαθμό ανοσοκαταστολής (Severe Combined Immunodeficiency). Το συγκεκριμένο στέλεχος δημιουργήθηκε με επαγωγή της μετάλλαξης που φέρουν τα άτομα του στελέχους SCID σε μη-παχύσαρκα, διαβητικά ποντίκια (NOD: Non Obese Diabetic). Παρουσιάζει καταστολή μυελογενούς ανάπτυξης, μειωμένη παρουσία αντιγόνων

(συγκριτικά με άλλα SCID στελέχη), μειωμένη δραστηριότητα των κυττάρων φυσικού φονέα (NKs: natural killer cells), ανενεργά λεμφοειδή T και B κύτταρα, αλλά και αρκετά μειωμένη πιθανότητα εκφύλισής τους (αντίθετα με τα υπόλοιπα SCID στελέχη). Χρησιμοποιούνται συχνά για την ανάπτυξη ξеноμοσχευμάτων ορισμένων τύπων καρκίνου, καθώς και για μελέτες αξιολόγησης της αντικαρκινικής δράσης διαφόρων παραγόντων.

Τα ποντίκια του στελέχους NOD scid gamma δεν εκφράζουν το γονίδιο Prkdc ούτε το γονίδιο Il2rg, είναι ανεπαρκή σε ώριμα B και T λεμφοκύτταρα και η κυτταροτοξική δραστηριότητα κυττάρων φυσικού φονέα (NKs: Natural Killers) απουσιάζει. Αυτά τα ποντίκια αντιπροσωπεύουν ένα μοντέλο κατάλληλο για μελέτες που χρησιμοποιούν στρατηγικές ανάπτυξης ξеноμοσχευμάτων από κύτταρα και όγκους.

2.2. Ανάπτυξη ξеноμοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (PDX)

Για την ανάπτυξη των PDX χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια του στελέχους NOD scid gamma (NSG™). Πιο συγκεκριμένα, εναίωρημα που είχε απομονωθεί έπειτα από επεξεργασία όγκου προερχόμενου από ασθενή, εμφυτεύθηκε υποδόρια, στις δύο μαχαλιαίες πλευρές των πίσω άκρων ανοσοκατεσταλμένων NSG ποντικών (γένους αντίστοιχου με το γένος του ασθενούς από τον οποίο προέρχεται ο όγκος). Μετά την επιτυχή ανάπτυξη των ξеноμοσχευμάτων (F0) οι όγκοι εξαιρέθηκαν, επεξεργάστηκαν και εμφυτεύθηκαν εκ νέου σε ποντίκια στελέχους NSG (F1). Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές

(F2, F3). Στο σημείο αυτό η εγκαθίδρυση του ξενομοσχεύματος θεωρήθηκε επιτυχής.

2.3. Χαρακτηρισμός των προερχόμενων από ασθενείς καρκινικών ξενομοσχευμάτων

Οι δύο πρωτογενείς κυτταρικοί υποπληθυσμοί AT_021013 και FL_021013 χαρακτηρίστηκαν ως προς την ανάπτυξή τους σε ποντίκια του στελέχους NSG™. Χρησιμοποιήθηκαν 5 ποντίκια για κάθε κυτταρικό υποπληθυσμό, ηλικίας 6 έως 8 εβδομάδων και μέσου βάρους 20 g. Από κάθε κυτταρικό υποπληθυσμό εμβολιάστηκαν υποδόρια 10^6 κύτταρα/ένεση, στις δύο μασχαλιαίες πλευρές των πίσω άκρων. Όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 200 mm^3 ξεκίνησε η παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξής τους. Οι μετρήσεις του μεγέθους των όγκων πραγματοποιούνταν κάθε 4 ημέρες και το μέγεθος του όγκου υπολογίζεται από τον τύπο $(\alpha \times \beta^2)/2$, όπου α και β αντιστοιχούν στο μήκος και το πλάτος του όγκου (σε mm). Το πείραμα τερματίστηκε όταν το μέγιστο μέγεθος των όγκων ανήλθε σε 1.200 mm^3 . Ακολούθησε ευθανασία των ζώων και εξαίρεση των όγκων.

2.4. Μελέτες τοξικότητας σε ζωικά πειραματικά μοντέλα

2.4.1. Έλεγχος της τοξικότητας της Gemcitabine

Μελετήθηκε η οξεία τοξικότητα της Gemcitabine (Gemsar VL7501, Farmaserve Lilly), ενός φαρμάκου εκλογής για την αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου

στην κλινική πράξη, που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Η Gemcitabine χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικές δοκιμές ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες με σκοπό την ενίσχυση της θεραπευτικής απόκρισης (105).

Έλεγχος οξείας τοξικότητας της Gemcitabine

Η Gemcitabine χορηγήθηκε, σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου τοξικότητας του NCI (NCI, NIH, USA) (267) στο ανοσοκατεσταλμένο στέλεχος ποντικών NOD-SCID, σε τρεις διαφορετικές δόσεις (400, 200 και 100 mg/kg) μέσω δύο οδών χορήγησης (ενδοπεριτοναϊκά, υποδόρια). Ένα ζώο χρησιμοποιήθηκε για την κάθε συνθήκη και ακολούθησε καθημερινή παρακολούθηση και καταγραφή πιθανών τοξικών επιδράσεων για δύο εβδομάδες.

Έλεγχος υποξείας τοξικότητας της Gemcitabine

Η τοξικότητα της Gemcitabine μελετήθηκε περαιτέρω, σύμφωνα με το σχήμα χορήγησης που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, τρία ζώα έλαβαν από δύο χορηγήσεις της Gemcitabine το καθένα, με απόσταση μιας εβδομάδας μεταξύ των ενέσεων (ενδοπεριτοναϊκά ή υποδόρια). Μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 200, 100 και 50 mg/kg και καταγράφηκαν πιθανά σημάδια τοξικότητας για δύο εβδομάδες.

2.4.2. Έλεγχος της τοξικότητας της Siramesine

Η μελέτη της οξείας και υποξείας τοξικότητας της Siramesine πραγματοποιήθηκε επίσης, σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου τοξικότητας του

NCI (NCI, NIH, USA) (267) στο ανοσοκατεσταλμένο στέλεχος ποντικών NOD-SCID.

Έλεγχος οξείας τοξικότητας της Siramesine

Αρχικά ελέγχθηκε η οξεία τοξικότητα της Siramesine που προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Biochempartner (Siramesine^B) (Shanghai, China). Χορηγήθηκαν 55 mg/kg σωματικού βάρους, σε μία δόση, σε 3 ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Η Siramesine^B διαλύθηκε σε 5% DMSO, 5% Cremophor EL (συγκέντρωση 2,2 mg/ml) και καταγράφηκαν σημάδια τοξικότητας για μία εβδομάδα.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε έλεγχο οξείας τοξικότητας της ουσίας Siramesine που προμηθευτήκαμε από την εταιρεία, που την προμηθεύει/παρασκευάζει επίσημα, Η. Lundbeck A/S (Siramesine^L). Αρχικά δοκιμάσαμε το ίδιο σχήμα που είχε δοκιμαστεί και για την Siramesine^B, και χορηγήθηκαν 55 mg/kg Siramesine^L, σε μία δόση, σε 3 ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια στελέχους NOD/SCID. Ο φορέας στην περίπτωση αυτή ήταν υδατικό διάλυμα 10% HPBCD ([2-hydroxypropyl]-beta-cyclodextrin).

Ακολούθησε περαιτέρω έλεγχος οξείας τοξικότητας της Siramesine^L. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση μίας μόνο δόσης της Siramesine^L, στις συγκεντρώσεις 55 mg/kg, 45 mg/kg και 40 mg/kg σε υδατικό διάλυμα 10% HPBCD ([2-hydroxypropyl]-beta-cyclodextrin).

Έλεγχος υποξείας τοξικότητας της Siramesine^L

Στη συνέχεια, με σκοπό τον έλεγχο της υποξείας τοξικότητας της Siramesine^L, 45 mg/kg, 40 mg/kg και 35 mg/kg χορηγήθηκαν επαναλαμβανόμενα κάθε δεύτερη ημέρα

για μία εβδομάδα και τα σημάδια τοξικότητας καταγράφηκαν για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας. Βασιζόμενοι στις παρατηρήσεις αυτές, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ο έλεγχος των τοξικών επιδράσεων της Siramesine^L στις συγκεντρώσεις 35 mg/kg, 30 mg/kg και 20 mg/kg. Το σχήμα που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τη χορήγηση της Siramesine^L, κάθε δεύτερη ημέρα, για 6 δόσεις (Q2Dx6). Ο φορέας της Siramesine (10% HPBCD) χορηγήθηκε αντίστοιχα σε μια ομάδα ζώων η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς. Το συνολικό χρονικό διάστημα των χορηγήσεων ήταν 2 εβδομάδες κατά το οποίο καταγράφηκαν πιθανά σημάδια τοξικότητας, καθώς και η μεταβολή του σωματικού βάρους των ζώων.

2.4.3. Έλεγχος τοξικότητας της Siramesine^L σε ζωικό μοντέλο Zebrafish

Οι τοξικές επιδράσεις της Siramesine^L μελετήθηκαν και στο ζωικό μοντέλο Zebrafish και πιο συγκεκριμένα στην επίδρασή της στην εμβρυογένεση. Στο σύνολο των πειραμάτων που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκαν zebrafish αγρίου τύπου Tübingen (*Danio rerio*). Η εκτροφή τους έγινε σε ειδικό για ψάρια θρεπτικό μέσο (2 mM CaCl₂, 0,5 mM MgSO₄, 0,7 mM NaHCO₃, 0,07 mM KCl) (268), σε θερμοκρασία 27±1 °C υπό συνεχή αερισμό και φιλτράρισμα του νερού, με τεχνητό φωτισμό και φωτοπερίοδο 14:10 h (σκότος διάρκειας 14 ωρών και φως διάρκειας 10 ωρών). Τα θηλυκά και αρσενικά άτομα εκτρέφονταν πάντοτε χωριστά και η παροχή τροφής γινόταν, κανονικά, δύο φορές ημερησίως με ξηρή τροφή σε μορφή νιφάδων (TetraMin™ flakes, Tetra Melle, Germany)

εμπλουτισμένη με *Artemia nauplii* (είδος υδρόβιων καρκινοειδών). Την ημέρα πριν από την αναπαραγωγή τα αρσενικά και τα θηλυκά τοποθετούνταν, χωριστά, σε διαιρούμενη δεξαμενή αναπαραγωγής, σε αναλογία 2:1, πριν την έναρξη της περιόδου σκότους, και αφήνονταν ανενόχλητα κατά τη διάρκεια αυτής. Κατά την έναρξη της περιόδου του φωτός, τα πάνελ διαχωρισμού αφαιρούνταν απ' τις δεξαμενές αναπαραγωγής. Μετά από 30 λεπτά, τα αυγά συλλέγονταν, εκπλένονταν δύο φορές από τα διάφορα κατάλοιπα με τη χρήση ειδικού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης εμβρύων (Instant ocean) και μεταφέρονταν σε τρυβλία Petri που περιείχαν το προαναφερθέν ειδικό θρεπτικό μέσο.

Μέσα σε μιάμιση ώρα μετά τη γονιμοποίηση (hpf: h post-fertilization), επιλέγονταν γονιμοποιημένα αυγά με διόφθαλμο στερεομικροσκόπιο (PXS-VI, Optica) και μεταφέρονταν σε πλακίδια 24 οπών. Δώδεκα έμβρυα τοποθετούνταν σε κάθε οπή, σε 2 ml θρεπτικού μέσου και υποβάλλονταν σε αγωγή με siramesine σε συγκεντρώσεις 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM και 20 μM . Έμβρυα σε θρεπτικό μέσο μαζί με 0,1% DMSO χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα έμβρυα κατόπιν επωάζονταν στους $28 \pm 0,5$ °C. Κάθε πείραμα επαναλαμβάνονταν τρεις φορές.

Οι δοκιμές τοξικότητας σε έμβρυα ιχθύων πραγματοποιούνταν εάν τα ποσοστά γονιμοποίησης ήταν $\geq 90\%$. Μια δοκιμή θεωρούνταν έγκυρη εάν η συνολική επιβίωση των εμβρύων σε αρνητικούς μάρτυρες ήταν $\geq 90\%$ μέχρι την εκκόλαψη. Η αξιολόγηση της θνησιμότητας και της τερατογένεσης έγινε 24, 48 και 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση με τη χρήση

ανεστραμμένου μικροσκοπίου (CKX41, Olympus, Tokyo, Japan).

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εμβρύων ελέγχθηκαν σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (269). Οι θανατηφόρες και τερατογόνες επιδράσεις καταγράφηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του ΟΟΣΑ (OECD 236) για τη δοκιμή χημικών ουσιών. Η θνησιμότητα καθορίστηκε μετρώντας τα έμβρυα με έναν ορατό καρδιακό παλμό σε κάθε χρονικό σημείο. Οι τερατογόνες επιδράσεις καταγράφηκαν εάν εμφανίζονταν σε τουλάχιστον 50% όλων των εμβρύων της κάθε ομάδας και εάν υπήρχε σχέση δόσης-απόκρισης.

2.5. Μελέτες δραστικότητας σε ζωικά πρότυπα καρκίνου

2.5.1. Αξιολόγηση της δραστικότητας της Gemcitabine σε ζωικό πρότυπο καρκίνου:

Για την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων, εκθετικά αναπτυσσόμενες καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων παγκρεατικού καρκίνου (AsPC-1) ενέθηκαν υποδόρια (10^6 κύτταρα/ένεση, 1 ένεση/ζώο) στη μασχαλιαία περιοχή των πίσω άκρων αρσενικών ανοσοκατεσταλμένων ποντικών στελέχους NOD/SCID, ηλικίας 8 εβδομάδων. Όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 200 mm^3 τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 3 ομάδες (7 ζώα/ομάδα) και ξεκίνησαν οι χορηγήσεις. Οι ομάδες των ζώων διαμορφώθηκαν ως εξής: 1) ομάδα αναφοράς στην οποία δεν χορηγήθηκε τίποτα, 2) 100 mg/kg Gemcitabine ενδοπεριτοναϊκά και 3) 100 mg/kg Gemcitabine υποδόρια κοντά στον όγκο. Η χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν μία φορά/7 ημέρες για 2 εβδομάδες. Οι μετρήσεις του μεγέθους των όγκων

πραγματοποιούνταν κάθε 4 ημέρες και υπολογιζόταν από τον τύπο $(\alpha \times \beta 2)/2$, όπου α και β αντιστοιχούν στο μήκος και το πλάτος του όγκου (σε mm). Ταυτόχρονα στα ίδια χρονικά διαστήματα καταγράφονταν και οι μεταβολές στο σωματικό βάρος των ζώων. Το πείραμα τερματίστηκε όταν το μέγεθος των όγκων, στην ομάδα αναφοράς, ανήλθε στα 1.600 mm^3 και η καμπύλη ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο.

2.5.2. Αξιολόγηση της δραστηριότητας της Siramesine σε ζωικό πρότυπο καρκίνου

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της Siramesine της εταιρείας Biochempartner (Siramesine^B) σε ζωικό πρότυπο ανθρώπινου καρκίνου ελέγχθηκε ως εξής: Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια, στελέχους NOD-SCID, ηλικίας 6 έως 8 εβδομάδων και μέσου βάρους 25 g. Πρωτογενή κύτταρα του υποπληθυσμού Floating_021013 (10^6 κύτταρα/ένεση) εμβολιάστηκαν υποδόρια στις δύο μασχαλιαίες πλευρές των πίσω άκρων. Όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 100 mm^3 τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 5 ομάδες, ξεκίνησαν οι χορηγήσεις των υπό εξέταση ουσιών και ο ρυθμός ανάπτυξης των όγκων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο. Η δόση της Siramesine^B (55 mg/kg), χορηγήθηκε τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με την Gemcitabine, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς. Η δόση της Gemcitabine που επιλέχθηκε ήταν τα 100 mg/kg. Οι ομάδες των ζώων διαμορφώθηκαν ως εξής:

- 1) CARRIER, φορέας της Siramesine^B (5% DMSO, 5% Cremophor EL σε dH₂O)
- 2) Gemcitabine 100 mg/kg

3) Siramesine^B 55mg/kg

4) Siramesine^B 55mg/kg σε συνδυασμό με Gemcitabine 100 mg/kg

Σε κάθε περίπτωση οι χορηγήσεις έγιναν ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) και το σχήμα των χορηγήσεων ήταν (Q2D3)x2, με κενό διάστημα 3 ημερών μεταξύ των 2 επαναλήψεων. Η Gemcitabine χορηγήθηκε εφάπαξ στην αρχή του σχήματος.

Οι μετρήσεις του μεγέθους των όγκων πραγματοποιούνταν κάθε 4 ημέρες και υπολογιζόταν από τον τύπο $(\alpha \times \beta 2)/2$, όπου α και β αντιστοιχούν στο μήκος και το πλάτος του όγκου (σε mm). Ταυτόχρονα στα ίδια χρονικά διαστήματα τα ζώα ζυγίζονταν και τα βάρη τους καταγράφονταν για την εμφάνιση τυχόν ενδείξεων τοξικότητας. Το πείραμα τερματίστηκε όταν το μέγεθος των όγκων, στην ομάδα Carrier, ανήλθε σε 1.400 mm^3 . Ακολούθησε ευθανασία των ζώων και εξαίρεση των όγκων.

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της Siramesine της εταιρείας Lundbeck S.A. (Siramesine^L) σε ζωικό πρότυπο ανθρώπινου καρκίνου ελέγχθηκε ως εξής: Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια, στελέχους NOD-SCID, ηλικίας 6 έως 8 εβδομάδων και μέσου βάρους 25 g. Πρωτογενή κύτταρα του υποπληθυσμού Attached_021013 (10^6 κύτταρα/ένεση) εμβολιάστηκαν υποδόρια στις δύο μασχαλιαίες πλευρές των πίσω άκρων. Όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 100 mm^3 τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 6 ομάδες (των 8 ζώων η κάθε μία) και ξεκίνησαν οι χορηγήσεις των υπό εξέταση ουσιών και η παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων. Οι ομάδες που δημιουργήθηκαν ήταν: α) Carrier (ο διαλύτης της siramesine ήταν 10% HPBCD), β) Gemcitabine συγκέντρωσης 100 mg/kg, γ) Siramesine

συγκέντρωσης 25 mg/kg, δ) Siramesine συγκέντρωσης 30 mg/kg, ε) Gemcitabine συγκέντρωσης 100 mg/kg και Siramesine συγκέντρωσης 25 mg/kg και στ) Gemcitabine συγκέντρωσης 100 mg/kg και Siramesine συγκέντρωσης 30 mg/kg. Όσον αφορά το σχήμα των χορηγήσεων, η Gemcitabine χορηγήθηκε μία φορά/7 ημέρες για δύο χορηγήσεις και η Siramesine μία φορά/2 ημέρες, για τρεις χορηγήσεις, σύμφωνα με τα αντίστοιχα πειράματα τοξικότητας και δραστηριότητας της Gemcitabine και τοξικότητας της Siramesine. Οι μετρήσεις του μεγέθους των όγκων πραγματοποιήθηκαν κάθε 4 ημέρες και υπολογίστηκαν από τον τύπο $(\alpha \times \beta^2)/2$, όπου α και β αντιστοιχούν στο μήκος και το πλάτος του όγκου (σε mm). Ταυτόχρονα στα ίδια χρονικά διαστήματα τα ζώα ζυγίζονταν και τα βάρη τους καταγράφονταν για την εμφάνιση τυχόν ενδείξεων τοξικότητας. Το πείραμα τερματίστηκε όταν το μέγεθος των όγκων, στην ομάδα Carrier, ανήλθε σε 1.000 mm³. Ακολούθησε ευθανασία των ζώων και εξαίρεση των όγκων. Κατά τη διάρκεια του πειράματος μελετήθηκαν, επίσης, ενδείξεις επικείμενης τοξικότητας των ουσιών στις συνθήκες του πειράματος όπως απώλεια σωματικού βάρους, αλλαγές στη συμπεριφορά, στις διατροφικές συνήθειες και στην εμφάνισή τους (τραχύ τρίχωμα).

2.6. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Η τεχνική της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης ανιχνεύει πρωτεΐνες σε ιστό, ο οποίος έχει εγκλειστεί σε μπλοκ παραφίνης και τηθεί σε υπέρλεπτες τομές πάχους 4 μm. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι κρατά άθικτη τη σύσταση του ιστού, κάτι που επιτρέπει την ανίχνευση

πρωτεϊνών με τη χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων.

Στην αρχή, πραγματοποιείται αφυδάτωση του ιστού, καθώς αυτός περνάει, διαδοχικά, από διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης αύξουσας συγκέντρωσης (70%, 80%, 96% και 100%). Ακολουθεί η διαύγαση του ιστού, η οποία πραγματοποιείται με την επώασή του σε ξυλόλη, για 2 ώρες. Έπειτα, γίνεται η έγκληση του ιστού σε παραφινικό μπλοκ. Σ' αυτή την κατάσταση ο ιστός μπορεί να διατηρηθεί αναλλοίωτος για μεγάλο χρονικό διάστημα, μέχρις ότου χρησιμοποιηθεί.

Τομές πάχους 4 μm επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη συνέχεια γίνεται αποπαραφίνωση των τομών σε θερμαινόμενη πλάκα και ενυδάτωσή τους με τη χρήση διαλυμάτων ξυλόλης και αιθυλικής αλκοόλης (σε συγκεντρώσεις φθίνουσες). Αμέσως μετά την έκπλυση των ιστών με dH₂O, τα πλακίδια τοποθετούνται σε kopling jars, πληρωμένα με διάλυμα steamer antigen retrieval, προκειμένου να αποκαλυφθούν οι αντιγονικοί επίτοποι των ιστών. Για να συμβεί αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης των ιστών, τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου, για 10 λεπτά, σε συνθήκες σκότους. Έπειτα, τα πλακίδια τοποθετούνται σε διάλυμα protein blocking, για 20 λεπτά, σε συνθήκες υψηλής υγρασίας, έτσι ώστε να αποφευχθεί η σύνδεση του πρωτογενούς αντισώματος σε μη ειδικές θέσεις. Όσον αφορά τις αραιώσεις των πρωτογενών αντισωμάτων, αυτές γίνονται σε ειδικό διάλυμα (antibody diluent), στους 4 °C, ολονυκτίως. Την επόμενη μέρα, οι τομές εκπλένονται με διάλυμα PBS-Tween 0,1% και επωάζονται με το δευτερογενές αντίσωμα. Η χρήση του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης

προσδιορίζει τις θέσεις προσκόλλησης των αντισωμάτων επί των τομών, ενώ αυτές γίνονται ορατές κάνοντας χρήση του υποστρώματος διαμινοβενζινιδίνης (DAB). Το υπόστρωμα DAB, παρουσία υπεροξειδάσης, πολυμερίζεται και σχηματίζει σταθερό προϊόν με καφέ χρωματισμό.

Ο καθορισμός των υπόλοιπων μορφολογικών χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων είναι εφικτός με την εμβάπτιση των τομών σε αιματοξυλίνη και στη συνέχεια με έκπλυση και αφυδάτωσή τους με διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης αύξουσας συγκέντρωσης. Η αφυδάτωση των τομών ολοκληρώνεται με εμβάπτισή τους σε διάλυμα ξυλόλης, ολονυκτίως. Τέλος, πραγματοποιείται η μονιμοποίηση των τομών σε mountant DPX και η τοποθέτηση καλυπτρίδας με σκοπό την ασφαλή φύλαξή τους. Ο ιστός που αντιστοιχεί στην ομάδα αναφοράς, χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της δραστηριότητας των αντισωμάτων.

Υπολογίζεται από τον τύπο:

$$z=(x-\mu)/\sigma$$

όπου x είναι η τιμή ενός σημείου, μ είναι ο μέσος όρος των τιμών και σ είναι η τυπική τους απόκλιση.

ΕΝΟΤΗΤΑ 3 | Στατιστική ανάλυση

Στην παρούσα μελέτη, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Student's t-test.

Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του υπολογισμού της παραμέτρου z-score. Η τιμή z-score είναι μια μαθηματική τροποποίηση η οποία για κάθε τιμή ενός συνόλου τιμών αφαιρεί το μέσο όρο τους και διαιρεί με την τυπική τους απόκλιση, κανονικοποιώντας το εύρος κατανομής. Μπορεί να τοποθετηθεί σε μία καμπύλη κανονικής κατανομής με εύρος από -3 έως +3.



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Αποτελέσματα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΝΟΤΗΤΑ 1 | *In vitro* μελέτες

1.1. Επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων σ1, σ2/PGRMC1 και σ2/TMEM97 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60

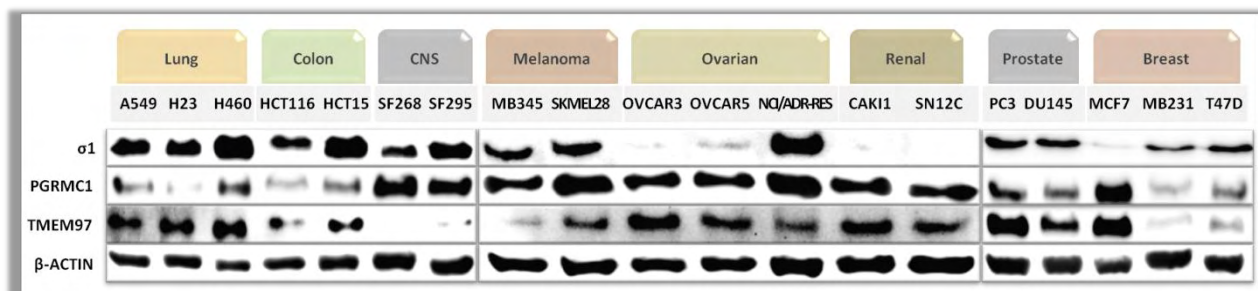
Στην αρχική φάση της παρούσας μελέτης προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων σ1, σ2/PGRMC1 και σ2/TMEM97 με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε 19 ανθρώπινες εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60, που αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικούς τύπους καρκίνου (Εικόνα 1). Δεδομένου ότι δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως η ταυτότητα του σ2 υποδοχέα, κρίθηκε σκόπιμη η ταυτόχρονη διερεύνηση τόσο του TMEM97, που βάσει της πρόσφατης βιβλιογραφίας φαίνεται να ταυτίζεται με τον υποδοχέα σ2, όσο και του PGRMC1, του υποδοχέα που μέχρι πρόσφατα ταυτιζόταν με τον σ2.

Όπως προκύπτει, και οι τρεις υποδοχείς εκφράζονται στο σύνολο των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν, εμφανίζοντας όμως διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, ο σ1 υποδοχέας (Εικόνα 2Α) εμφανίζει πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης

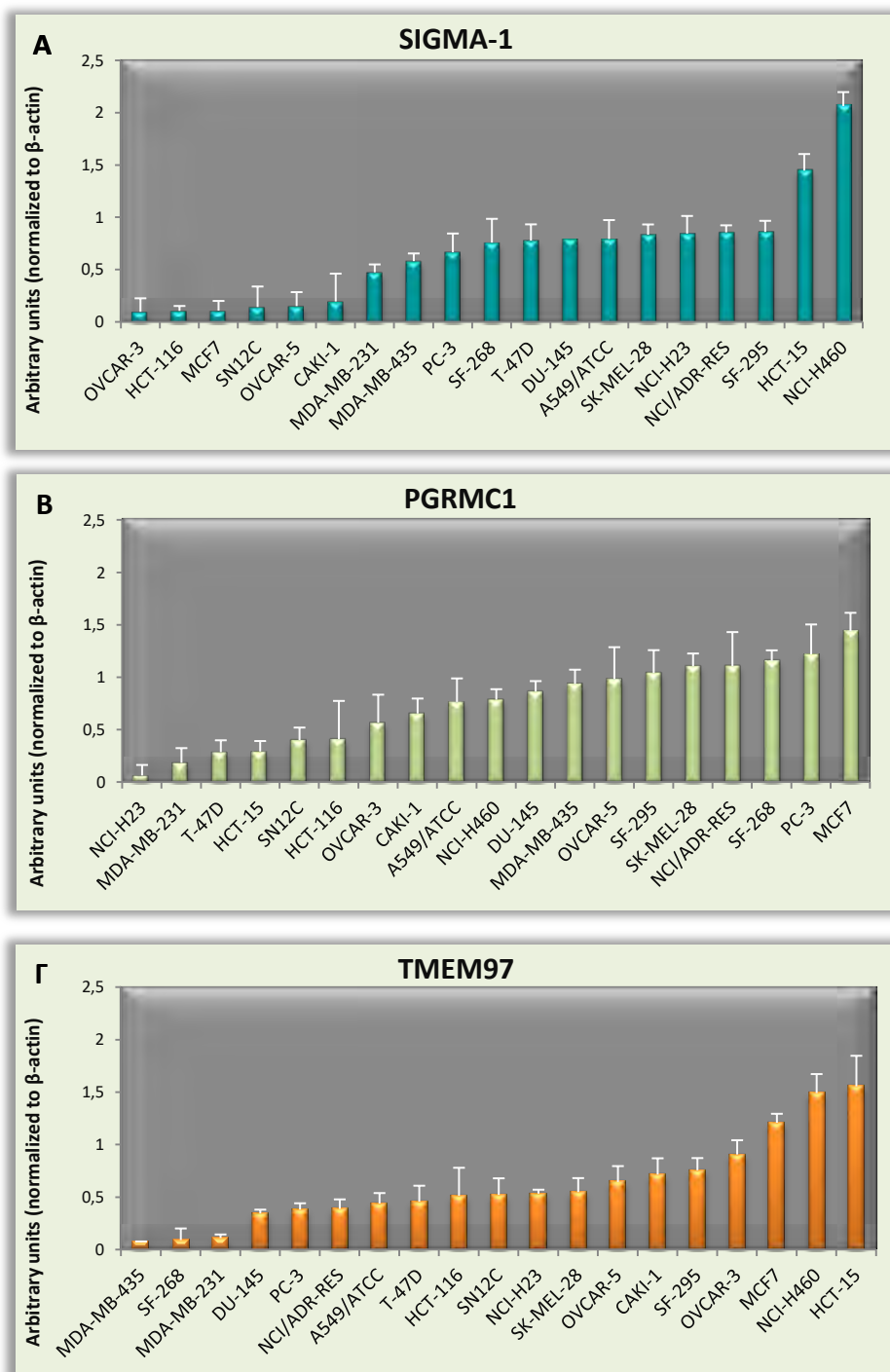
στις κυτταρικές σειρές CAKI-1, SN12C (καρκίνος του νεφρού), OVCAR-3, OVCAR-5 (καρκίνος των ωοθηκών), HCT-116 (καρκίνος του παχέος εντέρου) και MCF7 (καρκίνος του μαστού). Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του σ1 υποδοχέα εμφανίζονται στις κυτταρικές σειρές NCI-H460 (καρκίνος του πνεύμονα) και HCT-15 (καρκίνος του παχέος εντέρου).

Όσον αφορά τον υποδοχέα σ2/PGRMC1 (Εικόνα 2Β), τα χαμηλότερα επίπεδα εκφράζονται στις κυτταρικές σειρές NCI-H23 (καρκίνος του πνεύμονα), HCT15, HCT116 (καρκίνος του παχέος εντέρου) και MDA-MB-231 (τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού), T-47D (καρκίνος του μαστού). Αντίθετα, στην κυτταρική σειρά MCF-7 (καρκίνος του μαστού) εμφανίζονται τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα σ2/PGRMC1.

Επιπλέον, σχετικά με τον υποδοχέα σ2/TMEM97 (Εικόνα 2Γ), τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης εμφανίζονται στις κυτταρικές σειρές MDA-MB-435 (μελάνωμα), SF268 (καρκίνος του ΚΝΣ) και MDA-MB-231 (καρκίνος του μαστού). Αντίθετα, πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα σ2/TMEM97 παρουσιάζονται στις κυτταρικές σειρές HCT-15 (καρκίνος του παχέος εντέρου), NCI-H460 (καρκίνος του πνεύμονα) και MCF7 (καρκίνος του μαστού).



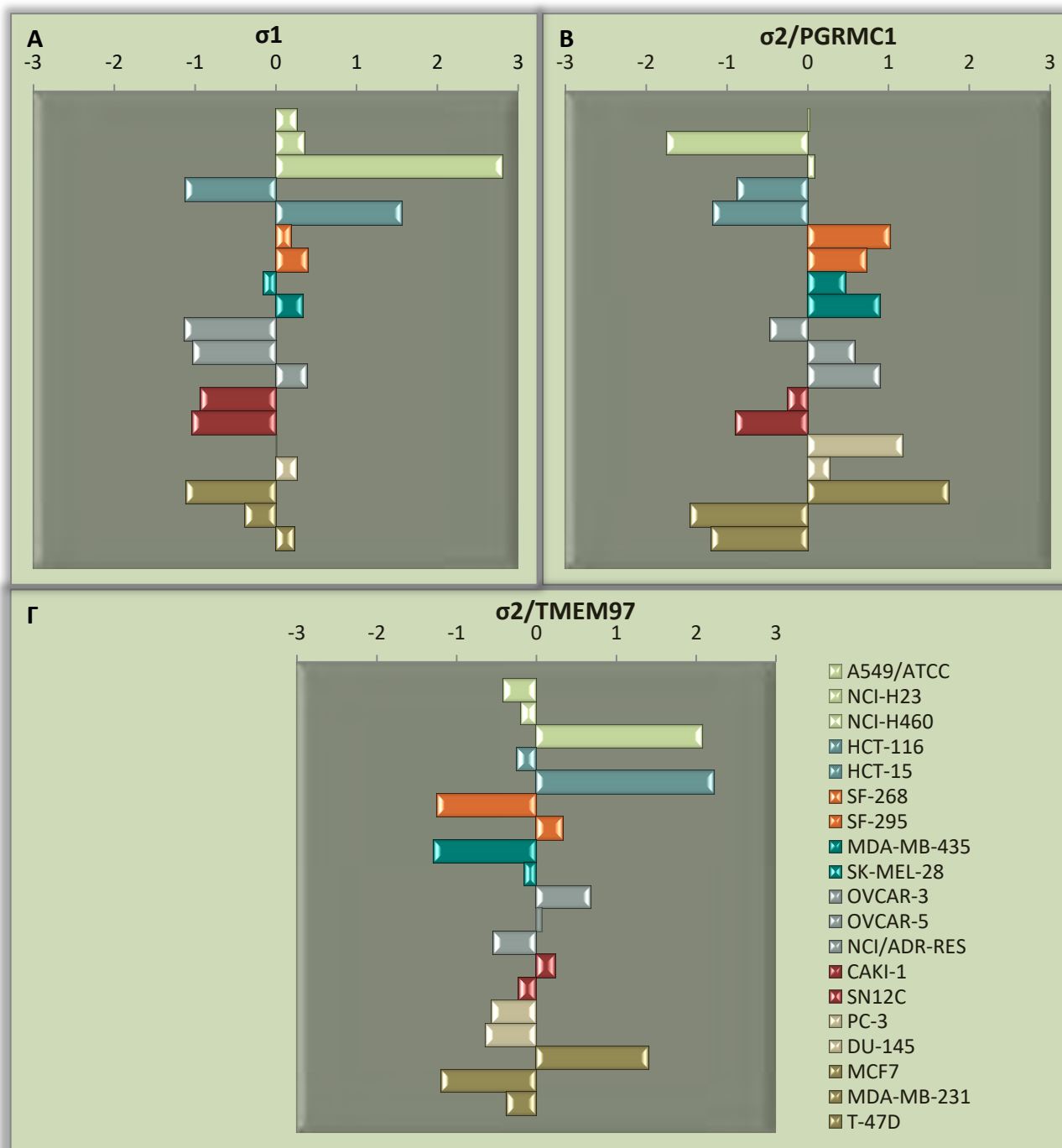
Εικόνα 1. Ανάλυση κατά Western για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων σ1, σ2/PGRMC1, σ2/TMEM97 σε 19 ανθρώπινες εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60.



Εικόνα 2. Διαγραμματική απεικόνιση, κατά αύξουσα σειρά, των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων $\sigma 1$ (A), $\sigma 2$ /PGRMC1 (B) και $\sigma 2$ /TMEM97 (Γ), σε 19 ανθρώπινες εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60. Τα απεικονιζόμενα επίπεδα έκφρασης προέκυψαν έπειτα από κανονικοποίηση ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης της β -ακτίνης

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση της στατιστικής παραμέτρου z-score και ομαδοποιήθηκαν ανά τύπο καρκίνου (Εικόνα 3). Σε καθένα από τα διαγράμματα ο

κεντρικός κάθετος άξονας αφορά στο μέσο όρο της κανονικής κατανομής των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων $\sigma 1$, $\sigma 2/\text{PGRMC1}$ και $\sigma 2/\text{TMEM97}$, αντίστοιχα. Η κανονικοποίηση των τιμών και η



Εικόνα 3. Τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων $\sigma 1$, $\sigma 2/\text{PGRMC1}$ και $\sigma 2/\text{TMEM97}$ κανονικοποιημένα με τη χρήση της στατιστικής παραμέτρου z-score.

παράμετρος z-score, αντικατοπτρίζει την απόκλισή τους από το μέσο όρο, σε όρους τυπικής απόκλισης. Για παράδειγμα, μια κυτταρική σειρά με τιμή z-score 2, απέχει 2 τυπικές αποκλίσεις από το μέσο όρο του συνόλου τιμών των επιπέδων έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, προς τα δεξιά εκτείνονται οι κυτταρικές σειρές με επίπεδα έκφρασης έως 3 τυπικές αποκλίσεις πάνω από τη μέση τιμή, ενώ προς τα αριστερά εκτείνονται οι κυτταρικές σειρές με επίπεδα έκφρασης έως 3 τυπικές αποκλίσεις χαμηλότερα από τη μέση τιμή.

Η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των σ υποδοχέων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να ομαδοποιηθούν οι κυτταρικές σειρές ανά τύπο καρκίνου και να διερευνηθεί η ύπαρξη κάποιου προτύπου έκφρασης πάνω ή κάτω από τη μέση τιμή.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3, η διακύμανση των επιπέδων έκφρασης των σ υποδοχέων πάνω και κάτω από τη μέση τιμή εμφανίζει ποικιλομορφία στις κυτταρικές σειρές και κατ' επέκταση στους τύπους καρκίνου που μελετήθηκαν. Στην περίπτωση των επιπέδων έκφρασης του σ1 υποδοχέα, επίπεδα πάνω από τη μέση τιμή εμφανίζονται στον καρκίνο του πνεύμονα, του ΚΝΣ και του προστάτη, ενώ επίπεδα χαμηλότερα από τη μέση τιμή στον καρκίνο του νεφρού (Εικόνα 3Α). Όσον αφορά στον σ2/PGRMC1 υποδοχέα, υψηλότερα της μέσης τιμής επίπεδα έκφρασης εμφανίζουν ο καρκίνος του ΚΝΣ, του προστάτη και το μελάνωμα, ενώ χαμηλότερα ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του νεφρού (Εικόνα 3Β). Ο υποδοχέας σ2/TMEM97, στον καρκίνο του προστάτη και στο μελάνωμα εμφανίζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τη μέση τιμή ενώ δεν υπάρχει κάποιος τύπος καρκίνου που να

εμφανίζει επίπεδα έκφρασης πάνω από τη μέση τιμή στην περίπτωση αυτή (Εικόνα 3Γ).

1.2. Επίδραση επιλεγμένων σ προσδετών στην κυτταρική ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών της λίστας NCI-60

Για τις 19 ανθρώπινες εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60, στις οποίες μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων, διερευνήθηκε περαιτέρω η επίδραση 5 επιλεγμένων σ προσδετών (Εικόνα 4) στην ανάπτυξή τους. Δεδομένου ότι από τους σ υποδοχείς, ο υποδοχέας σ2 είναι ο λιγότερο μελετημένος, ελέγχθηκε η δράση των εκλεκτικών σ2 ανταγωνιστών Siramesine (SRM) και PB28 dihydrochloride (PB28), ενός εκλεκτικού σ2 ανταγωνιστή SM21 maleate (SM21) και συγκρίθηκε με τη δράση του σ1/σ2 ανταγωνιστή Rimcazole dihydrochloride (RIM) και του εκλεκτικού σ1 ανταγωνιστή BD1047 dihydrobromide (BD1047) (Πίνακας 1). Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, η κατάταξη των σ προσδετών σε αγωνιστές και ανταγωνιστές, βασίζεται στην προσομοίωση του φαινοτύπου υπερέκφρασης ή γονιδιακής αποσιώπησης των σ υποδοχέων αντίστοιχα

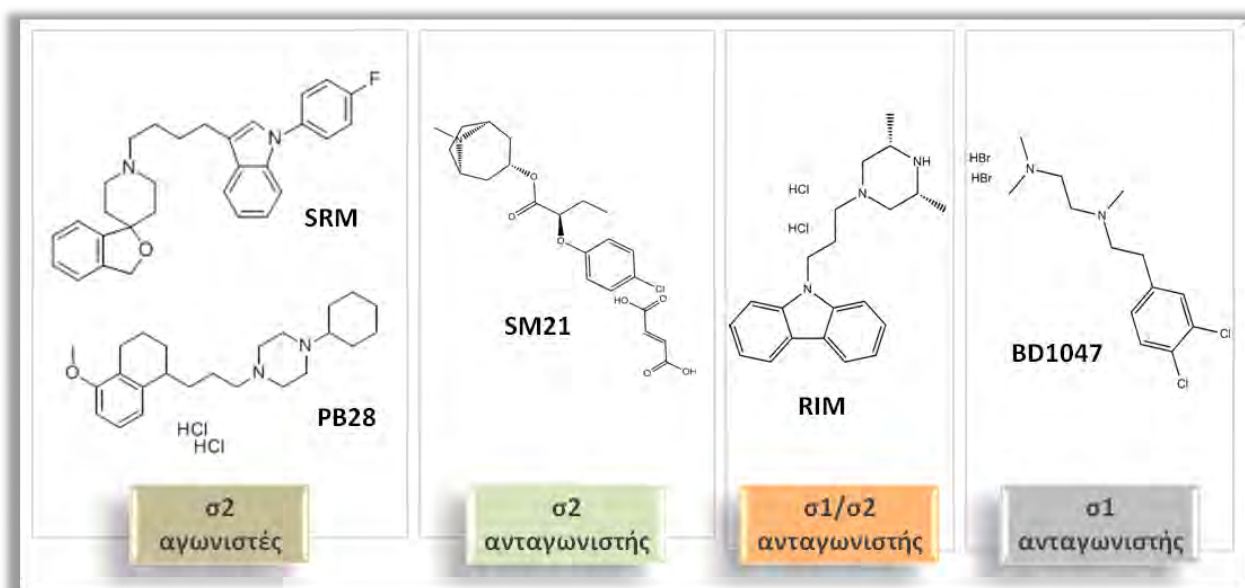
1.2.1. Μελέτη της επίδρασης σ προσδετών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60

Υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων των επιλεγμένων σ προσδετών (τέσσερις λογαριθμικές συγκεντρώσεις με μέγιστη συγκέντρωση τα 100 μΜ) τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες και τα ποσοστά ανάπτυξης τους

υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β (SRB). Στην Εικόνα 5 φαίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης των 19 κυτταρικών σειρών. Κάθε σημείο αποτελεί τη μέση τιμή τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

Από τις προκύπτουσες καμπύλες δόσης-απόκρισης προσδιορίζονται οι παράμετροι GI50, TGI και LC50, ενδεικτικές της αντιπολλαπλασιαστικής, κυτταροστατικής

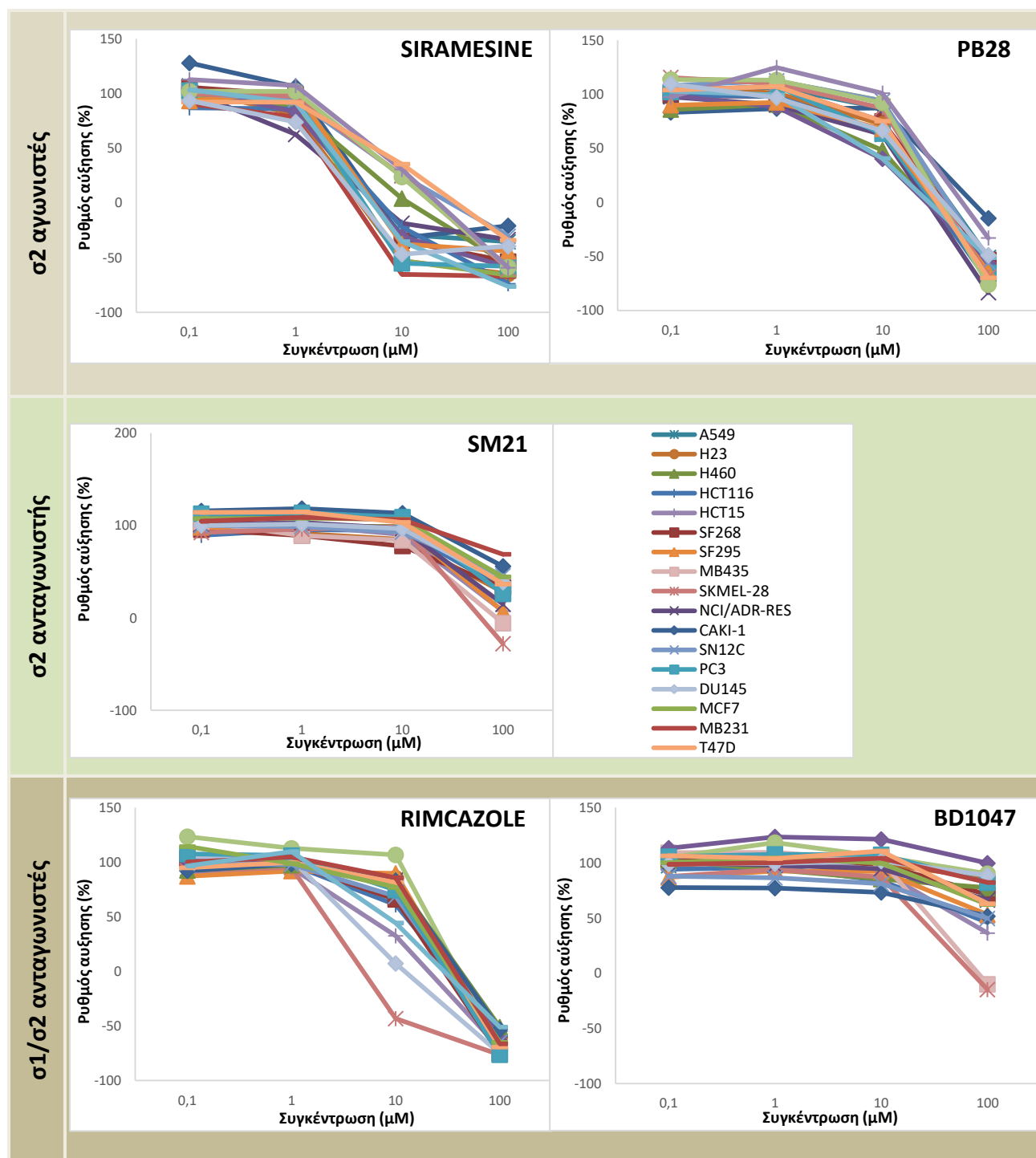
και κυτταροτοξικής δράσης των επιλεγμένων σ προσδετών αντίστοιχα. Επιπλέον, υπολογίζεται ο θεραπευτικός δείκτης TI, ως ο λόγος των παραμέτρων GI50 προς LC50 (Πίνακας 2). Χαμηλές τιμές των παραμέτρων GI50, TGI και LC50 υποδηλώνουν ευαισθησία των κυττάρων στη δράση μιας ουσίας και υψηλές τιμές TI (>10) καθιστούν ασφαλή τη χρήση της ουσίας.



Εικόνα 4. Οι χημικές δομές των σ προσδετών των οποίων η αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση μελετήθηκε έναντι των 19 ανθρώπινων εγκαθιδρυμένων καρκινικών κυτταρικών σειρές της λίστας NCI-60.

Πίνακας 1. Ο βαθμός συγγένειας των επιλεγμένων σ προσδετών, ως προς την πρόσδεσή τους στους σ υποδοχείς, και η κατάταξή τους ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές με βάση τη βιβλιογραφία.

Σίγμα προσδέτης (σI)	Σίγμα υποδοχέας (σR)		Αγωνιστής/Ανταγωνιστής	Αναφορά
	σ1R	σ2R		
	K _i (nM)			
Siramesine	17	0,12	σ2 αγωνιστής	(262)
PB28 dihydrochloride	13	0,28	σ2 αγωνιστής/σ1 ανταγωνιστής	(263)
BD1047 dihydrobromide	0,93±0,14	47±0,6	σ1 ανταγωνιστής	(264)
SM21 maleate	>1.000	67,5±8	σ2 ανταγωνιστής	(265)
Rimcazole dihydrochloride	1.480	386	σ1/σ2 ανταγωνιστής	(266)



Εικόνα 5. Καμπύλες ανάπτυξης των 19 εγκαθιδρυμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών της λίστας του NCI-60 υπό την επίδραση τεσσάρων συγκεντρώσεων (0,1, 1, 10, 100 μΜ) των επιλεγμένων σ προσοδίων για 48 ώρες .

Πίνακας 2. Οι παράμετροι GI50, TGI, LC50 και TI όπως υπολογίστηκαν για κάθε μία από τις 19 εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60 υπό την επίδραση των σ προσδετών Siramesine, PB28, SM21, Rimcazole και BD1047. Κάθε τιμή είναι το αποτέλεσμα τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. Τιμές μεγαλύτερες από τη μέγιστη συγκέντρωση των προσδετών που ελέγχθηκε, αναφέρονται ως >100.

Σημείωση: • Δεν εξετάστηκε, ■ Ο μέσος όρος για κάθε μια από τις παραμέτρους ανά σ προσδέτη

CANCER TYPE	CELL LINES	SIRAMESINE				PB28				SM21				RIMCAZOLE				BD1047			
		GI50	TGI	LC50	TI	GI50	TGI	LC50	TI	GI50	TGI	LC50	TI	GI50	TGI	LC50	TI	GI50	TGI	LC50	TI
NSCL	A549	3,6	7,7	11,7	3,3	34,2	66,8	99,3	2,9	84,2	>100	>100	2,5	29,2	61,0	92,7	3,2	>100	>100	>100	2,7
	H23	4,7	7,9	11,2	2,4	42,9	87,0	>100	3,1	65,2	>100	>100	3,4	31,9	62,8	93,7	2,9	>100	>100	>100	3,0
	H460	4,3	7,7	83,1	19,3	27,5	62,6	97,7	3,6	88,9	>100	>100	2,8	31,6	63,6	95,6	3,0	>100	>100	>100	2,9
Colon	HCT116	5,0	15,9	90,5	18,1	9,6	48,0	87,4	9,1	74,5	>100	>100	2,9	18,5	57,5	96,5	5,2	89,9	>100	>100	3,6
	HCT15	2,4	7,9	13,5	5,6	17,9	48,6	79,4	4,4	53,7	>100	>100	3,0	7,5	38,5	82,1	10,9	77,8	>100	>100	3,1
CNS	SF268	3,1	6,4	9,8	3,2	24,0	55,5	86,9	3,6	65,5	>100	>100	4,0	20,1	51,9	83,7	4,2	>100	>100	>100	3,8
	SF295	4,0	8,2	58,6	14,7	19,9	52,5	85,0	4,3	57,7	>100	>100	2,7	31,9	59,4	86,9	2,7	>100	>100	>100	3,2
Melanoma	MB435	2,8	5,9	9,0	3,2	25,6	56,6	87,7	3,4	44,0	94,2	>100	3,3	6,0	10,7	72,5	12,1	51,7	91,9	>100	2,6
	SKMEL28	3,6	6,7	9,8	2,7	33,4	59,9	86,3	2,6	44,6	80,1	>100	2,6	3,9	7,2	28,4	7,2	42,6	86,8	>100	3,1
Ovarian	OVCAR3	3,6	7,6	71,9	20,0	8,2	47,5	94,0	11,5	•	•	•	•	28,8	61,3	93,8	3,3	>100	>100	>100	3,1
	OVCAR5	3,8	6,7	9,7	2,6	19,5	54,4	89,3	4,6	•	•	•	•	38,7	64,0	89,2	2,3	>100	>100	>100	2,4
	NCI/ADR-RES	4,3	7,6	178,3	41,5	22,3	56,3	90,2	4,0	86,3	>100	>100	1,7	32,4	65,9	99,3	3,1	>100	>100	>100	2,8
Kidney	CAKI-1	6,8	50,7	131,7	19,4	36,4	66,5	96,5	2,7	>100	>100	>100	2,4	31,8	64,8	97,8	3,1	>100	>100	>100	4,9
	SN12C	6,9	36,2	89,3	13,0	31,5	60,2	89,0	2,8	91,9	>100	>100	3,1	22,6	56,3	90,0	4,0	98,5	>100	>100	3,9
Prostate	PC3	7,0	35,9	90,5	12,9	32,5	59,3	86,0	2,6	73,9	>100	>100	2,5	24,6	31,2	84,3	3,4	>100	>100	>100	2,7
	DU145	7,7	40,6	90,8	11,8	44,3	77,9	>100	2,5	82,3	>100	>100	2,9	28,8	58,7	88,5	3,1	>100	>100	>100	2,9
Breast	MCF7	4,0	7,5	42,3	10,7	8,6	49,8	98,8	11,5	91,8	>100	>100	2,6	27,1	58,8	90,5	3,3	>100	>100	>100	2,9
	MB231	7,7	55,9	120,6	15,7	31,3	62,3	93,4	3,0	>100	>100	>100	2,7	31,2	60,8	90,4	2,9	>100	>100	>100	2,8
	T47D	2,8	6,5	10,2	3,6	22,8	61,8	>100	4,4	81,8	>100	>100	2,6	9,2	51,9	99,1	10,8	>100	>100	>100	2,5
MEAN ■		4,6	17,3	59,6	11,8	25,9	59,7	94,2	4,6	78,9	>100	>100	2,8	24,0	51,9	87,1	4,8	>100	>100	>100	3,1

Τόσο από τις καμπύλες ανάπτυξης όσο και από τα δεδομένα του Πίνακα 2 φαίνεται πως η ουσία με την καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν είναι η Siramesine, όπως υποδηλώνεται από τις τιμές της παραμέτρου GI50, οι οποίες δεν ξεπερνάνε τα 8 μ M. Ακολουθούν οι σ προσδέτες Rimcazole και PB28 με μέση τιμή GI50 24 μ M και 25,9 μ M αντίστοιχα, που επιδεικνύουν συνολικά μια μέτρια ικανότητα αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Αντίθετα οι σ προσδέτες SM21 και BD1047 δεν εμφάνισαν σημαντική ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων στις συνθήκες του πειράματος. Το ίδιο συμβαίνει και με την κυτταροστατική και κυτταροτοξική δράση των σ προσδετών που μελετήθηκαν, καθώς η Siramesine επιδεικνύει και πάλι την καλύτερη δράση και ακολουθούν οι σ προσδέτες Rimcazole και PB28. Όπως και πριν, οι σ προσδέτες SM21 και BD1047 δεν εμφάνισαν κυτταροστατική ή κυτταροτοξική δράση στις συνθήκες του πειράματος. Αξιολογώντας την ευαισθησία των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν ως προς τον κάθε προσδέτη χωριστά, αξίζει να αναφερθεί πως οι κυτταρικές σειρές HCT15 (καρκίνος παχέος εντέρου), MB435 (μελάνωμα) και T47D (καρκίνος μαστού) επέδειξαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία, έναντι της δράσης του σ 2 αγωνιστή Siramesine. Επίσης, οι κυτταρικές σειρές HCT116 (καρκίνος παχέος εντέρου), OVCAR3 (καρκίνος ωοθηκών) και MCF7 (καρκίνος μαστού) επέδειξαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία, έναντι της δράσης του σ 2 αγωνιστή PB28. Επιπλέον, τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση του σ 1/ σ 2 ανταγωνιστή Rimcazole επέδειξαν οι κυτταρικές σειρές HCT15 (καρκίνος παχέος

εντέρου), MB435, SKMEL28 (μελάνωμα) και T47D (καρκίνος μαστού). Θα πρέπει να αναφερθεί πως οι πιο ευαίσθητες κυτταρικές σειρές στη δράση των προσδετών PB28 και Rimcazole που αναφέρθηκαν παραπάνω, διαφοροποιούνται αρκετά από το μέσο όρο και εμφανίζουν πολύ καλή αντιπολλαπλασιαστική δράση (GI50<10).

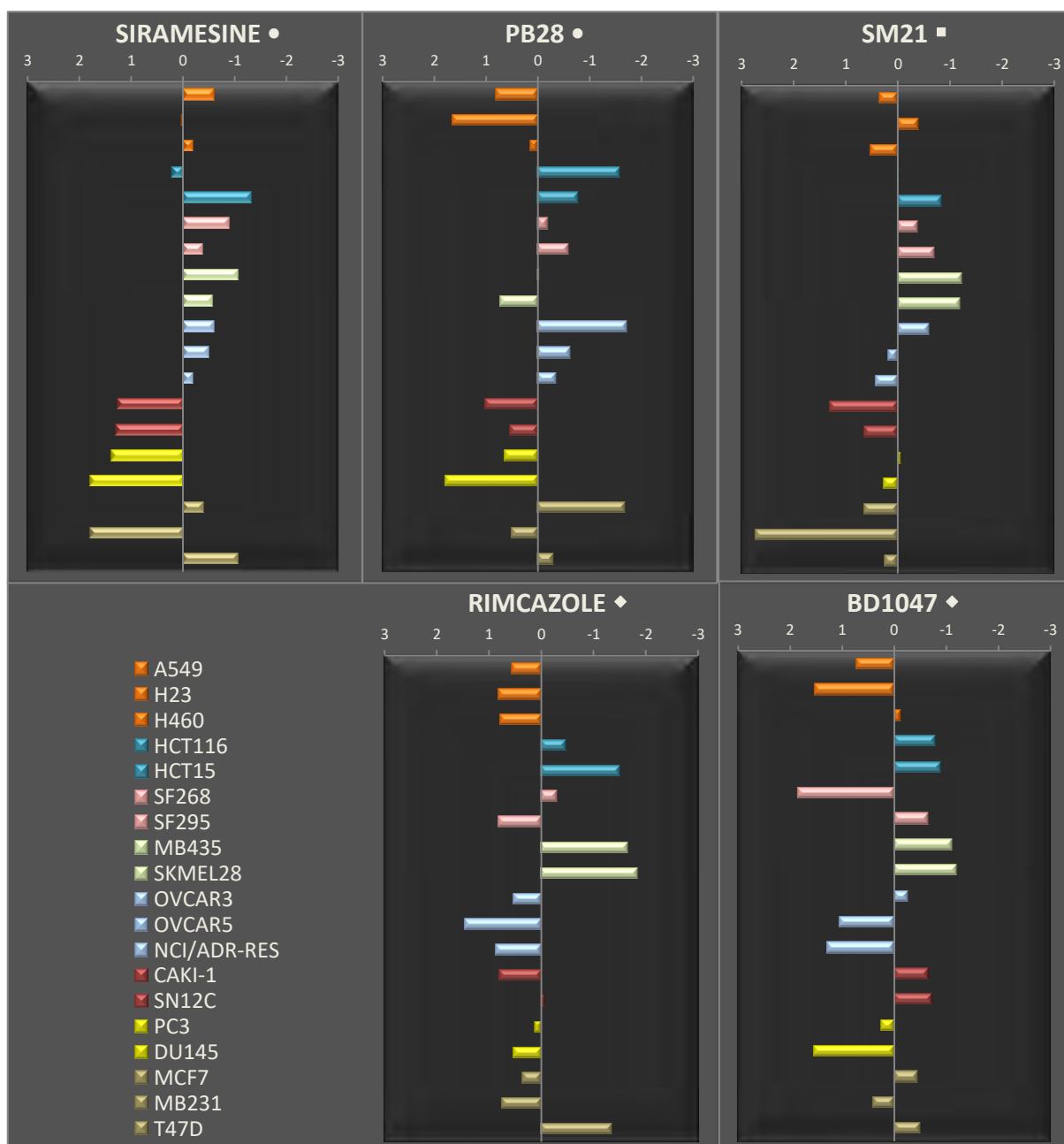
Με σκοπό να προσδιοριστούν οι κυτταρικές σειρές που εμφανίζουν ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στη δράση των σ προσδετών που μελετήθηκαν, οι τιμές της παραμέτρου GI50 κανονικοποιήθηκαν με τη χρήση της στατιστικής παραμέτρου z-score και ομαδοποιήθηκαν ανά τύπο καρκίνου (Εικόνα 6). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η κανονικοποίηση των τιμών και η παράμετρος z-score, αντικατοπτρίζει την απόκλισή τους από το μέσο όρο, σε όρους τυπικής απόκλισης. Πιο συγκεκριμένα, προς τα δεξιά εκτείνονται οι κυτταρικές σειρές που εμφανίζουν ευαισθησία, ενώ προς τα αριστερά εκτείνονται οι κυτταρικές σειρές που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη δράση των επιλεγμένων σ προσδετών.

Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του ΚΝΣ που μελετήθηκαν εμφανίζουν ευαισθησία έναντι της δράσης των σ 2 προσδετών και πιο συγκεκριμένα της Siramesine, του PB28 (σ 2 αγωνιστές) και του SM21 (σ 2 ανταγωνιστής). Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών που μελετήθηκαν εμφανίζουν ευαισθησία έναντι της δράσης της Siramesine και του PB28 (σ 2 αγωνιστές) και ανθεκτικότητα έναντι της δράσης της Rimcazole (σ 1 ανταγωνιστής).

Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του νεφρού που μελετήθηκαν εμφανίζουν ευαισθησία έναντι της δράσης του BD1047 (σ 1 ανταγωνιστής) και ανθεκτικότητα έναντι της

δράσης της Siramesine και του PB28 (σ2 αγωνιστές) και του SM21 (σ2 ανταγωνιστής). Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη που μελετήθηκαν εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι της δράσης της Siramesine και του PB28 (σ2 αγωνιστές), της Rimcazole (σ1 ανταγωνιστής) και του BD1047 (σ1 ανταγωνιστής).

Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου που μελετήθηκαν εμφανίζουν ευαισθησία έναντι της δράσης του PB28 (σ2 αγωνιστής), του SM21 (σ2 ανταγωνιστής), της Rimcazole (σ1 ανταγωνιστής) και του BD1047 (σ1 ανταγωνιστής).



Εικόνα 6. Η παράμετρος GI50 κανονικοποιημένη με τη χρήση της στατιστικής παραμέτρου z-score. Προς τα δεξιά εκτείνονται οι ευαίσθητες, ενώ προς τα αριστερά οι ανθεκτικές κυτταρικές σειρές στην επίδραση των επιλεγμένων προσοδευτών. Σημείωση: • σ2 αγωνιστές, ■ σ2 ανταγωνιστής, ♦ σ1/σ2 ανταγωνιστές

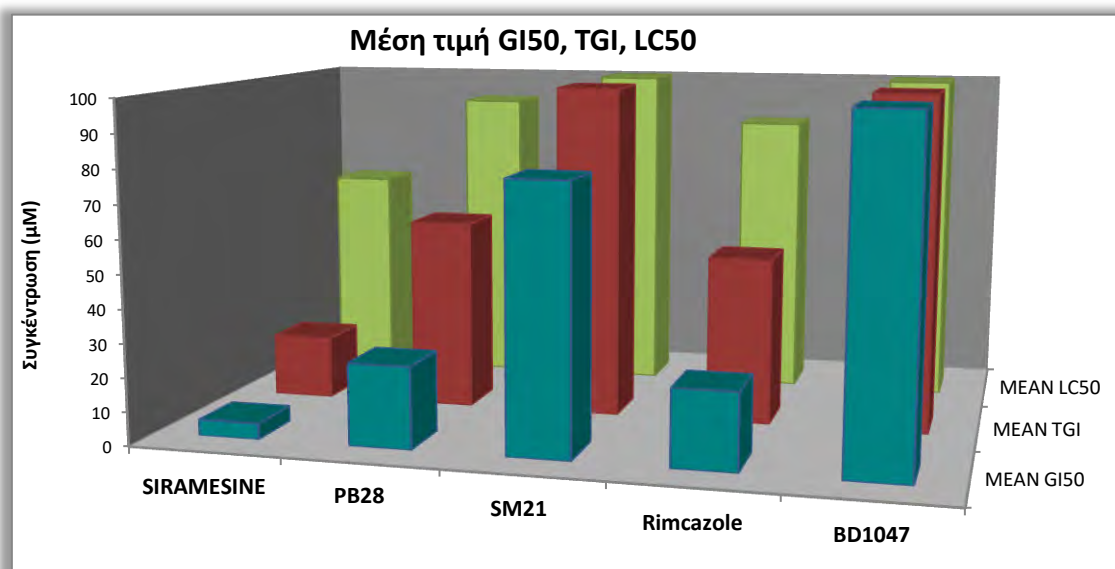
Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα που μελετήθηκαν εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι της δράσης του PB28 (σ2 αγωνιστής) και της Rimcazole (σ1 ανταγωνιστής).

Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που μελετήθηκαν εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι της δράσης του SM21 (σ2 ανταγωνιστής).

Οι κυτταρικές σειρές μελανώματος που

μελετήθηκαν εμφανίζουν ευαισθησία έναντι της δράσης της Siramesine (σ2 αγωνιστής), του SM21 (σ2 ανταγωνιστής), της Rimcazole (σ1 ανταγωνιστής) και του BD1047 (σ1 ανταγωνιστής).

Στην Εικόνα 7 συνοψίζεται η μέση τιμή των παραμέτρων GI50, TGI και LC50 των σ προσδετών στο σύνολο των καρκινικών κυτταρικών σειρών που εξετάστηκαν.



Εικόνα 7. Η μέση τιμή των παραμέτρων GI50, TGI και LC50 των σ προσδετών, επί του συνόλου των κυτταρικών καρκινικών σειρών που εξετάστηκαν.

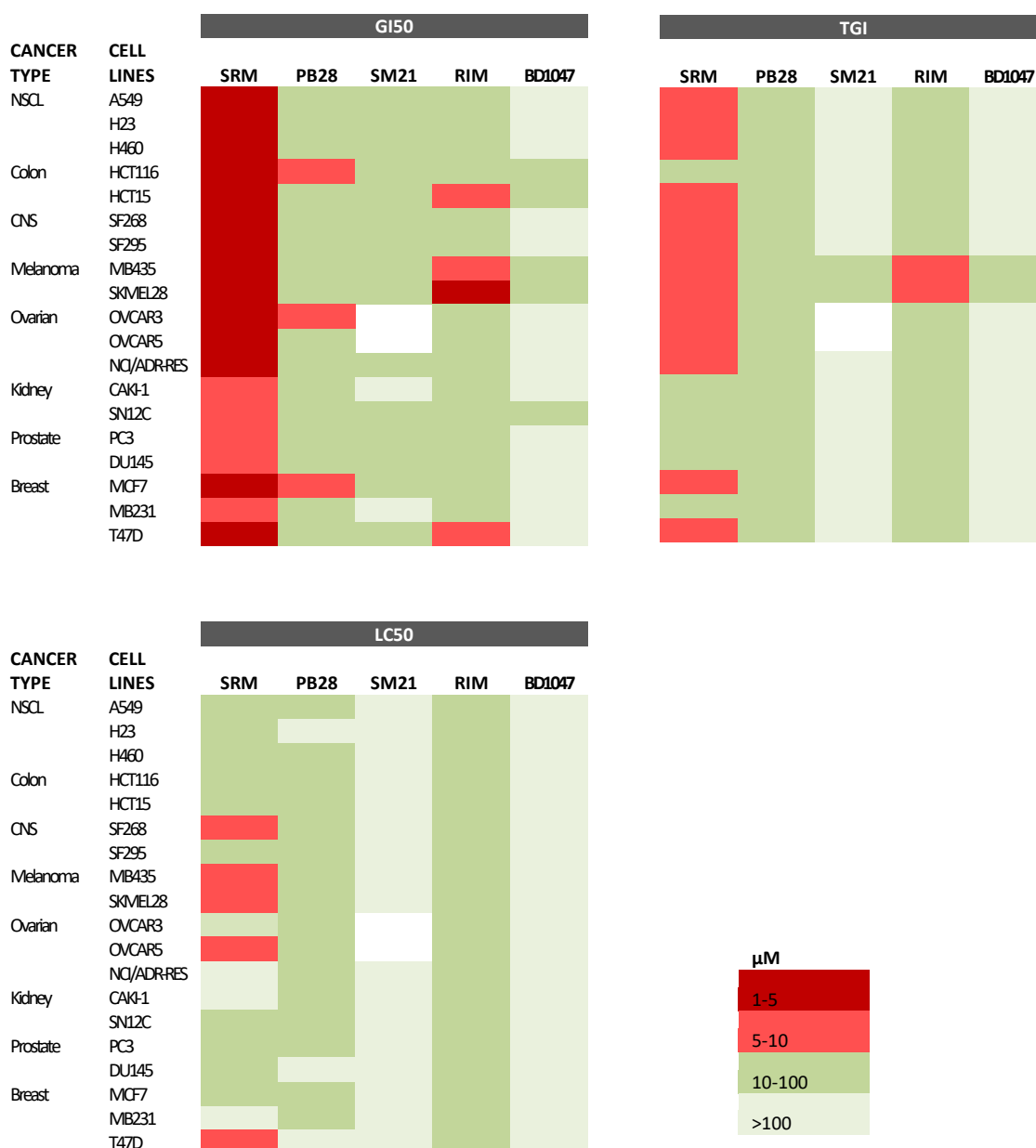
1.2.2. Χάρτες συσχέτισης θερμού χρώματος (heatmaps) των παραμέτρων GI50, TGI, LC50 μεταξύ των σ προσδετών που μελετήθηκαν

Οι τιμές των παραμέτρων GI50, TGI και LC50, των επιλεγμένων σ προσδετών έναντι των 19 εγκαθιδρυμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών της λίστας NCI-60 (Πίνακας 2), οπτικοποιήθηκαν στη μορφή χαρτών συσχέτισης θερμού χρώματος (Εικόνα 8). Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές της κάθε μίας παραμέτρου κωδικοποιήθηκαν σε μια χρωματική κλίμακα, στην οποία το θερμότερο χρώμα αντιστοιχεί στις

χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ το ψυχρότερο στις υψηλότερες. Με την αντιστοίχιση αυτή δίνεται έμφαση (μέσω των θερμότερων χρωμάτων της κλίμακας) στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των παραμέτρων που υποδηλώνουν καλύτερη δράση των σ προσδετών. Όπως προκύπτει από τη χρωματική συσχέτιση για τις παραμέτρους GI50, TGI και LC50, μεταξύ των σ προσδετών που μελετήθηκαν, ο σ2 αγωνιστής Siramesine παρουσιάζει την καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική, κυτταροστατική και κυτταροτοξική δράση. Συγκεκριμένα, η παράμετρος GI50 της Siramesine βρίσκεται, σε όλες τις κυτταρικές

σειρές που μελετήθηκαν, στη θερμή περιοχή της χρωματικής κλίμακας (κόκκινο, ανοιχτό κόκκινο), σε αντίθεση με τους υπόλοιπους προσδέτες που στην πλειοψηφία τους βρίσκονται στην περιοχή των ψυχρών χρωμάτων (πράσινο, ανοιχτό πράσινο).

Το ίδιο προκύπτει και για τις παραμέτρους TGI και LC50, καθώς η Siramesine βρίσκεται στη θερμή περιοχή της χρωματικής κλίμακας σε αρκετές κυτταρικές σειρές, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους προσδέτες.



Εικόνα 8. Χάρτες συσχέτισης θερμού χρώματος (heatmaps) των παραμέτρων GI50, TGI, LC50 μεταξύ των προσδετών που μελετήθηκαν έναντι των 19 εγκαθιδρυμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών της λίστας NCI-60. Από το θερμότερο χρώμα προς το ψυχρότερο (κόκκινο, ανοιχτό κόκκινο, πράσινο, ανοιχτό πράσινο) αντιστοιχούν οι συγκεντρώσεις 1-5 μM, 5-10 μM, 10-100 μM, >100 μM.

Σημείωση: στο λευκό χρώμα της κλίμακας αντιστοιχούν κυτταρικές σειρές στις οποίες η δράση του SM21 δεν εξετάστηκε

Ίδια ήταν και η προσέγγιση όσον αφορά την τιμή TI των επιλεγμένων σ προσδετών η οποία αποτελεί δείκτη της ασφάλειας μιας ουσίας και υπολογίζεται από το λόγο LC50 προς GI50. Η παράμετρος TI υπολογίστηκε και οπτικοποιήθηκε στη μορφή χάρτη συσχέτισης θερμού χρώματος (Εικόνα 9). Στην περίπτωση αυτή, το θερμότερο χρώμα αντιστοιχίστηκε σε τιμές TI >10, ενώ το ψυχρότερο στις τιμές TI <3. Με την αντιστοίχιση αυτή δίνεται έμφαση (μέσω του θερμού χρώματος της κλίμακας) στις

τιμές TI >10 οι οποίες υποδηλώνουν σχετική ασφάλεια στη χρήση της ουσίας. Όπως φαίνεται από το χάρτη θερμικής συσχέτισης η Siramesine εμφανίζει πολύ καλό θεραπευτικό δείκτη στην πλειοψηφία των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν.

Συνοψίζοντας, φαίνεται πως ο $\sigma 2$ αγωνιστής Siramesine εμφανίζει την καλύτερη δράση σε συνδυασμό με τον καλύτερο θεραπευτικό δείκτη σε σχέση με τους υπόλοιπους σ προσδέτες που μελετήθηκαν.



Εικόνα 9. Χάρτης συσχέτισης θερμού χρώματος (heatmap) της παραμέτρου TI μεταξύ των σ προσδετών που μελετήθηκαν έναντι των 19 εγκαθιδρυμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών της λίστας NCI-60. Από το θερμότερο χρώμα προς το ψυχρότερο (κόκκινο, πράσινο, ανοιχτό πράσινο) αντιστοιχούν τιμές TI >10, 3-10, 1-3.

Σημείωση: στο λευκό χρώμα της κλίμακας αντιστοιχούν κυτταρικές σειρές στις οποίες η δράση του SM21 δεν εξετάστηκε

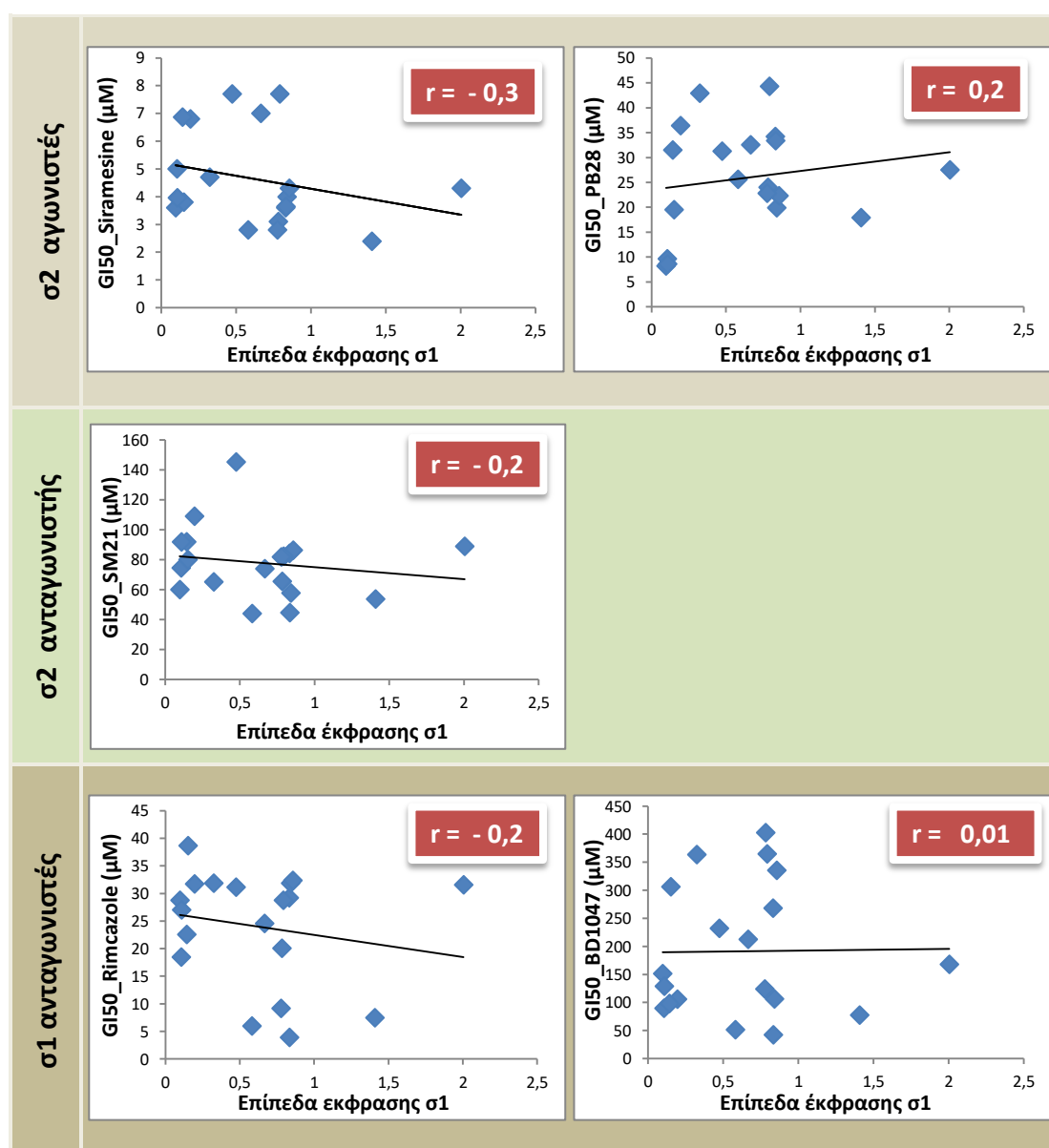
1.3. Συσχέτιση της δραστηριότητας των επιλεγμένων σ προσδετών με τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων

Προκειμένου να διερευνηθεί η φύση και η ένταση της συσχέτισης μεταξύ της δραστηριότητας των επιλεγμένων σ

προσδετών και των επιπέδων έκφρασης των σίγμα (σ) υποδοχέων, κατασκευάστηκαν διαγράμματα διασποράς (scatter plots) και υπολογίστηκε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης Pearson (r). Ο συντελεστής r αποτελεί μέτρο του μεγέθους της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ δύο μεταβλητών. Παίρνει τιμές στο κλειστό διάστημα $[-1, 1]$ και εάν $r = \pm 1$ υπάρχει τέλεια γραμμική συσχέτιση. Το

πρόσημο του r καθορίζει το είδος της συσχέτισης (θετική ή αρνητική). Θετική συσχέτιση σημαίνει ότι η σχέση μεταξύ δύο μεταβλητών είναι ευθέως ανάλογη, ενώ αρνητική συσχέτιση ότι είναι αντιστρόφως ανάλογη. Αν $-0,3 \leq r < 0,3$ δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση. Αν $-0,5 < r \leq -$

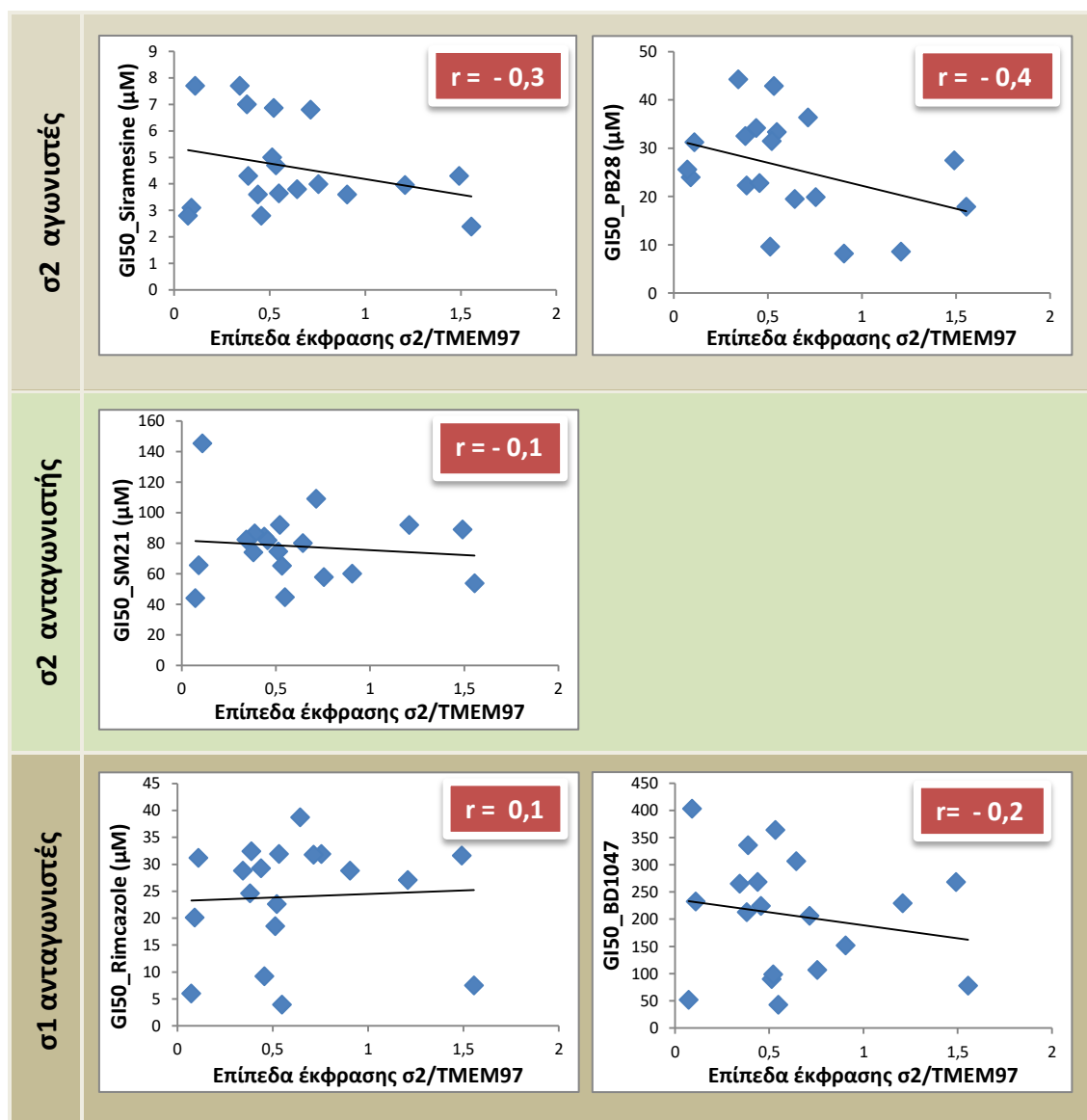
$0,3$ ή $0,3 \leq r < 0,5$ υπάρχει ασθενής γραμμική συσχέτιση. Αν $-0,7 < r \leq -0,5$ ή $0,5 \leq r < 0,7$ υπάρχει μέση γραμμική συσχέτιση. Αν $-0,8 < r \leq -0,7$ ή $0,7 \leq r < 0,8$ υπάρχει ισχυρή γραμμική συσχέτιση. Αν $-1 < r \leq -0,8$ ή $0,8 \leq r < 1$ υπάρχει πολύ ισχυρή γραμμική συσχέτιση.



Εικόνα 10. Διαγράμματα διασποράς (scatter plots) που συσχετίζουν τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα σ_1 με την αντιπολλαπλασιαστική δράση των επιλεγμένων σ προσδετών. Φαίνονται οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης r .

Με σκοπό να συσχετιστούν τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων σ_1 , σ_2 /TMEM97 και σ_2 /PGRMC1 με την αντιπολλαπλασιαστική των επιλεγμένων σ προσδετών, κατασκευάστηκαν διαγράμματα διασποράς που συσχετίζουν την παράμετρο GI50 των σ προσδετών με τα επίπεδα

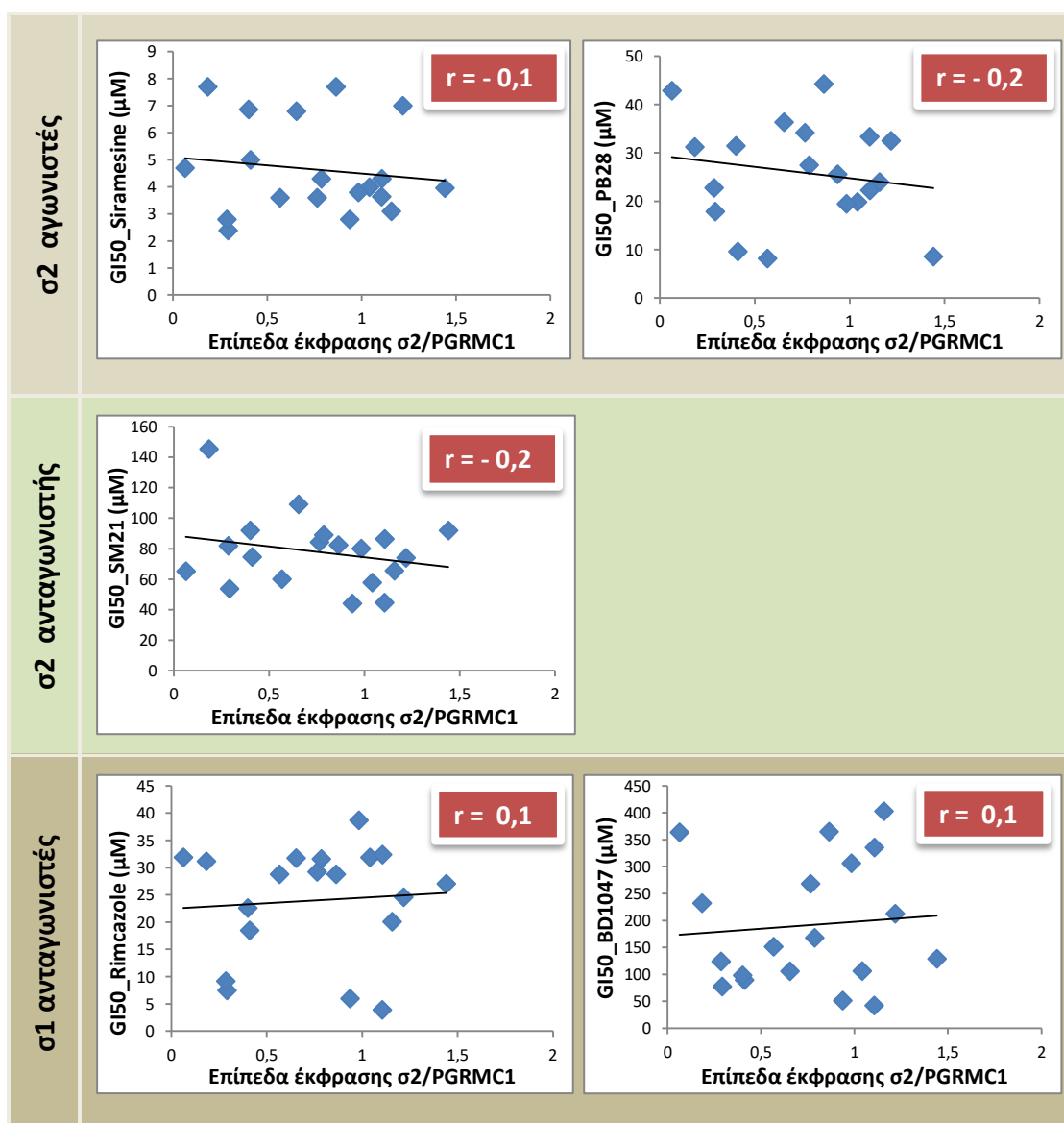
έκφρασης των σ υποδοχέων. Από την Εικόνα 10 προκύπτει ότι η δράση των σ προσδετών που μελετήθηκαν δεν εμφανίζει γραμμική συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης του σ_1 υποδοχέα, με εξαίρεση τη δράση της Siramesine η οποία εμφανίζει ασθενή αρνητική συσχέτιση.



Εικόνα 11. Διαγράμματα διασποράς (scatter plots) που συσχετίζουν τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα σ_2 /TMEM97 με την αντιπολλαπλασιαστική δράση των επιλεγμένων σ προσδετών. Φαίνονται οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης r .

Όσον αφορά τον υποδοχέα $\sigma 2$ /TMEM97, η δράση των $\sigma 2$ αγωνιστών (Siramesine και PB28) εμφανίζει ασθενή αρνητική γραμμική συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα $\sigma 2$ /TMEM97. Οι υπόλοιποι σ προσδέτες που μελετήθηκαν δεν

εμφανίζουν καμία συσχέτιση (Εικόνα 11). Τέλος, η αντιπολλαπλασιαστική δράση των σ προσδετών που μελετήθηκαν, δεν εμφανίζει καμία συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα $\sigma 2$ /PGRMC1 (Εικόνα 12).

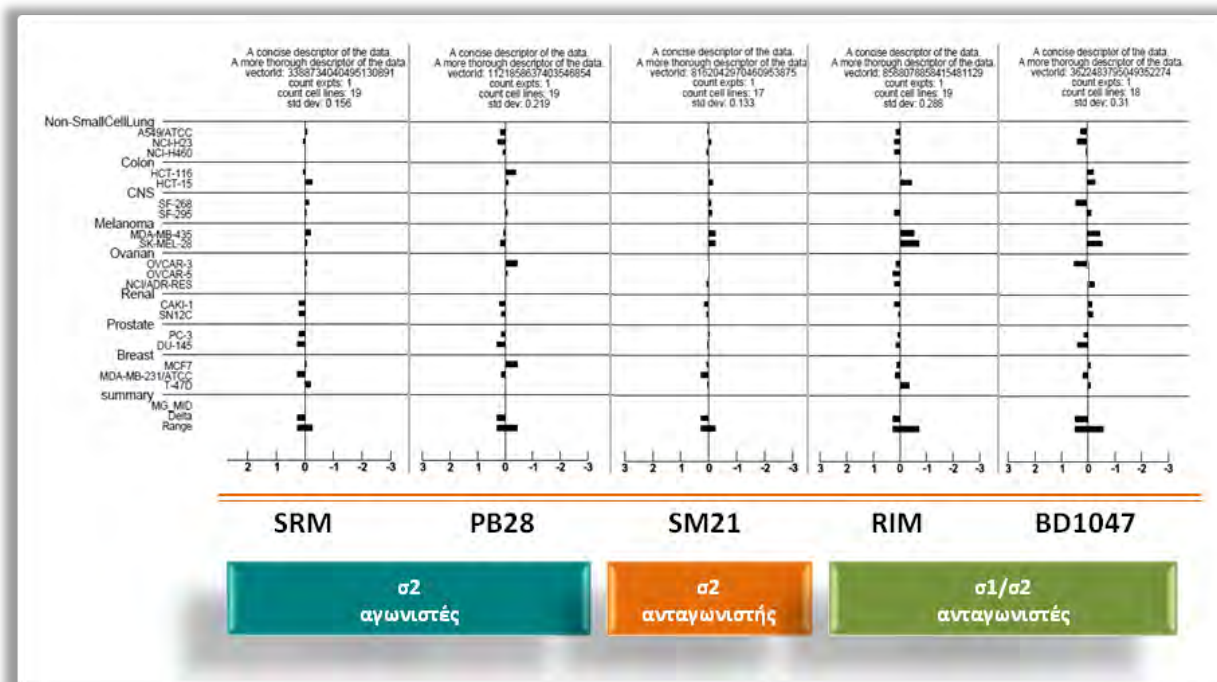


Εικόνα 12. Διαγράμματα διασποράς (scatter plots) που συσχετίζουν τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα $\sigma 2$ /PGRMC1 με την αντιπολλαπλασιαστική δράση των επιλεγμένων σ προσδετών. Φαίνονται οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης r .

1.4. Εκτίμηση μηχανισμού δράσης των σ προσδέτων με τη χρήση του αλγόριθμου COMPARE

Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο πιθανός μηχανισμός δράσης (ΜΔ) μέσω του οποίου οι επιλεγμένοι σ προσδέτες επιφέρουν την αντιπολλαπλασιαστική τους ικανότητα. Για να γίνει αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος COMPARE της βάσης δεδομένων του NCI. Πιο συγκεκριμένα, ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της παραμέτρου GI50 ($-\log GI50$), που έχει προκύψει από τη μελέτη κυτταροτοξικότητας στις 19 εγκαθιδρυμένες καρκινικών κυτταρικών σειρών που συμπεριλαμβάνονται στη λίστα του NCI-60, για καθέναν από τους σ προσδέτες, εισάγεται στη βάση δεδομένων του NCI και ανακτάται ένα μέσο γράφημα (Mean Graph, MG) που αποτελεί το «αποτύπωμα» των σ προσδετών.

Για τους σ προσδέτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, τα MG που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων του NCI φαίνονται στην Εικόνα 13. Το κέντρο του κάθε γραφήματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο των τιμών GI50 και προς τα δεξιά εκτείνονται οι ευαίσθητες κυτταρικές σειρές στη δράση του εκάστοτε προσδέτη, ενώ προς τα αριστερά οι ανθεκτικές. Φαίνεται ότι, τα MG των $\sigma 2$ αγωνιστών (Siramesine, PB28) παρουσιάζουν ομοιότητα ως προς το πρότυπο ευαισθησίας-ανθεκτικότητας των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν. Επίσης, ομοιότητα στο πρότυπο ευαισθησίας-ανθεκτικότητας παρουσιάζεται και μεταξύ των $\sigma 1/\sigma 2$ ανταγωνιστών (Rimcazole, BD1047). Τα γραφήματα MG των σ προσδετών, συγκρίνονται μέσω του αλγόριθμου COMPARE, με τα αντίστοιχα γραφήματα ουσιών με γνωστό μηχανισμό δράσης στην επιλεγμένη βάση δεδομένων του NCI.



Εικόνα 13. Γραφήματα (Mean Graphs) για τους επιλεγμένους σ προσδέτες, που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων του NCI. Δεξιά εκτείνονται οι ευαίσθητες κυτταρικές σειρές στη δράση των σ προσδετών και αριστερά οι ανθεκτικές.

Ουσίες με παρόμοια MG εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στους μηχανισμούς της αντικαρκινικής δράσης τους *in vitro*.

Η ομοιότητα αυτή εκφράζεται ποσοτικά με το συντελεστή συσχέτισης Pearson Correlation Coefficient (PCC).

Πίνακας 3. Παρατίθενται οι πέντε ουσίες που παρουσιάζουν τον υψηλότερο βαθμό συσχέτισης (PCC) για καθέναν από τους επιλεγμένους σ προσδέτες, όπως ανακτώνται από τη βάση δεδομένων του NCI, καθώς και οι μηχανισμοί δράσης τους, όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία

Σίγμα Προσδέτης	Συντελεστής Συσχέτισης κατά Pearson	Συσχετιζόμενη Ουσία	Μηχανισμός Δράσης (ΜΔ)
Siramesine	0,601	dihydro-5-azacytidine	Πρόκληση βλαβών στο DNA (267)
	0,519	cyanomorpholino-ADR	Αλκυλιωτικός παράγοντας (268)
	0,507	cytembena	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης και DNA (269)
	0,487	anguidine	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (267)
	0,475	cytembena	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης και DNA (269)
PB28 dihydrochloride	0,724	pibenzimol hydrochloride	Παρεμπόδιση αντιγραφής DNA (267)
	0,573	pibenzimol hydrochloride	Παρεμπόδιση αντιγραφής DNA (267)
	0,561	cytembena	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης και DNA (269)
	0,514	chloroquinoxaline sulfonamide	Πρόκληση βλαβών στο DNA (267)
	0,502	pibenzimol hydrochloride	Παρεμπόδιση αντιγραφής DNA (267)
SM21 maleate	0,585	anguidine	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (267)
	0,523	caracemide	Αναστολή σύνθεσης DNA (267)
	0,490	rhizoxin	Αναστολή πολυμερισμού μικροσωληνίσκων (267)
	0,485	tetrocarcin A sodium salt	Αναστολή λειτουργίας των μιτοχονδρίων (270)
	0,466	didemnin B	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (267)
Rimcazole dihydrochloride	0,884	thalicarpine	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης, DNA και RNA (271)
	0,687	spirogermanium	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (272)
	0,573	spirogermanium	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (272)
	0,541	caracemide	Αναστολή σύνθεσης DNA (267)
	0,537	thalicarpine	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης, DNA και RNA (271)
BD1047 dihydrobromide	0,618	spirogermanium	Αναστολή σύνθεσης DNA, RNA, πρωτεϊνών (272)
	0,618	tamoxifen	Αναστολή σύνθεσης DNA (267)
	0,575	chloroquinoxaline sulfonamide	Πρόκληση βλαβών στο DNA (267)
	0,566	thalicarpine	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης, DNA και RNA (271)
	0,543	flavoneacetic acid	Πρόκληση αλλαγών στην αγγείωση του όγκου (267)

Η μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ δύο ουσιών εκφράζεται με τιμή PCC που προσεγγίζει την τιμή 1. Στον Πίνακα 3, ο οποίος ανακτάται από τη βάση δεδομένων του NCI μέσω του αλγόριθμου COMPARE, προτείνονται ουσίες που παρουσιάζουν την υψηλότερη συσχέτιση με τους επιλεγμένους σ προσδέτες. Ο γνωστός μηχανισμός δράσης των ουσιών με τη μεγαλύτερη ομοιότητα, δίνει τη δυνατότητα μιας πρώτης εκτίμησης του πιθανού μηχανισμού δράσης των επιλεγμένων σ προσδετών.

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα του Πίνακα 3, οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης των ουσιών με το μεγαλύτερο βαθμό συσχέτισης, για όλους τους σ προσδέτες που μελετήθηκαν, εμφανίζουν αρκετή ποικιλομορφία. Ωστόσο, οι μηχανισμοί δράσης που εμφανίζονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και η αναστολή της σύνθεσης του DNA. Αξίζει να σημειωθεί πως εξαίρεση αποτελεί η Siramesine η οποία φαίνεται ότι φέρει το μεγαλύτερο βαθμό συσχέτισης με ουσίες που δρουν είτε μέσω πρόκλησης βλαβών στο DNA (dihydro-5-azacytidine) είτε αποτελούν αλκυλιωτικούς παράγοντες (cyanomorpholino-ADR).

Μεταξύ των σ2 αγωνιστών (Siramesine, PB28) στις πέντε ουσίες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα, εμφανίζεται η κοινή ουσία cytembena με μηχανισμό δράσης την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και της σύνθεσης του DNA. Επίσης, μεταξύ των σ1/σ2 ανταγωνιστών (Rimcazole, BD1047) εμφανίζονται οι κοινές ουσίες spirogermanium και thalicarpine, με κοινό μηχανισμό δράσης την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, της σύνθεσης του DNA και της σύνθεσης του RNA.

1.5. Μελέτη των σ υποδοχέων και των προσδετών τους στον καρκίνο του παγκρέατος

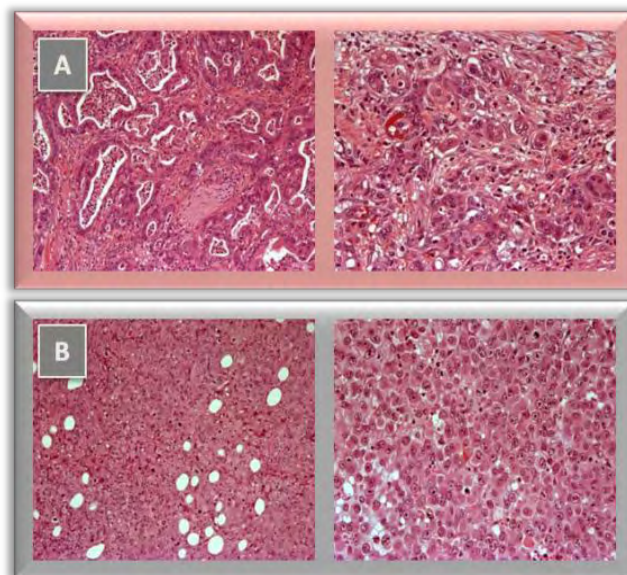
Προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης των επιλεγμένων σ προσδετών, η μέχρι τώρα μελέτη αφορούσε στον έλεγχο της δράσης τους, έναντι 19 ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών που επιλέχθηκαν από τη λίστα NCI-60. Ωστόσο, στη λίστα αυτή δεν περιλαμβάνεται ο παγκρεατικός καρκίνος. Όμως, λόγω του έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος γύρω από το ρόλο των σ υποδοχέων και των προσδετών τους στη βιολογία του καρκίνου του παγκρέατος, κρίθηκε σκόπιμη η διεύρυνση της μελέτης και προς αυτό τον τύπο καρκίνου. Όλο και περισσότερες μελέτες διερευνούν την έκφραση των σ υποδοχέων στον καρκίνο του παγκρέατος (25, 98), και αναφέρουν σημαντική κυτταροτοξική δράση των σ προσδετών έναντι του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου (96-98, 100, 273). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο παγκρεατικός καρκίνος είναι ένας από τους πλέον επιθετικούς τύπους καρκίνου με σημαντικά αυξημένη θνησιμότητα, αυξημένη ανθεκτικότητα στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα, κακή πρόγνωση (25), έλλειψη εξειδικευμένων καρκινικών βιοδεικτών (26) και ταχεία ανάπτυξη μεταστατικών εστιών (27), η μελέτη μας στράφηκε στην διερεύνηση του ρόλου των σ υποδοχέων και των προσδετών τους στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Στο εργαστήριό μας προϋπήρχε έντονη ερευνητική δραστηριότητα που αφορούσε στον καρκίνο του παγκρέατος και πιο συγκεκριμένα στην ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο (PDX),

αλλά και στην ανάπτυξη *ex vivo* πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών. Μοντέλων δηλαδή που προσομοιώνουν την κλινική εικόνα του ασθενούς. Μέσα από αυτή την προσπάθεια επιτεύχθηκε η ανάπτυξη ενός σημαντικού αριθμού PDX, καθώς και η απομόνωση δύο διακριτών πρωτογενών *ex vivo* καρκινικών παγκρεατικών κυτταρικών υποπληθυσμών. Κρίθηκε λοιπόν σκόπιμη, η μελέτη του ρόλου των σ υποδοχέων και των προσδετών τους στα κλινικά αυτά μοντέλα προερχόμενα από ασθενείς. Διερευνήθηκε λοιπόν η έκφραση των σ υποδοχέων και η δράση των επιλεγμένων σ προσδετών τους τόσο σε εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές καρκίνου του παγκρέατος όσο και στους δυο *ex vivo* πρωτογενείς καρκινικούς παγκρεατικούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς που απομονώθηκαν στο εργαστήριο μας. Η ανάπτυξη των PDX και των *ex vivo* πληθυσμών μας προσφέρει ένα σημαντικό πλεονέκτημα καθώς επιτρέπει την εγγύτητα στην κλινική εικόνα του ασθενούς.

1.5.1. Χαρακτηρισμός ξενομοσχεύματος προερχόμενου από ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Βλ. Υλικά και Μέθοδοι, § 1.4), έπειτα από χειρουργική εξαίρεση όγκου, ασθενούς με καρκίνο του παγκρέατος, ο ιστός επεξεργάστηκε κατάλληλα και αναπτύχθηκε το ξενομόσχευμά του. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση του πρωτογενούς όγκου του ασθενούς (Εικόνα 14Α) και του ξενομοσχεύματος που αναπτύχθηκε (Εικόνα 14Β), ανέδειξε διαφορές ως προς το βαθμό διαφοροποίησής τους. Πιο συγκεκριμένα, ο πρωτογενής όγκος του ασθενούς εμφάνιζε

μέτρια διαφοροποίηση, με περιοχές μικρής διαφοροποίησης σε ποσοστό 10%. Αντίθετα, το αντίστοιχο ξενομόσχευμα που αναπτύχθηκε, εμφάνιζε στο σύνολό του μικρή διαφοροποίηση.

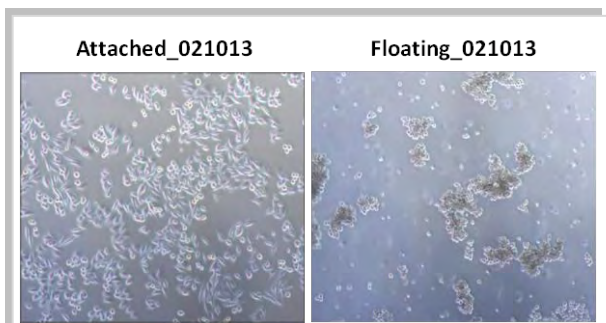


Εικόνα 14. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση του πρωτογενούς όγκου ασθενούς με καρκίνο του παγκρέατος (Α) και του ξενομοσχεύματος που αναπτύχθηκε (Β).

1.5.2. Χαρακτηρισμός *ex vivo* πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών υποπληθυσμών

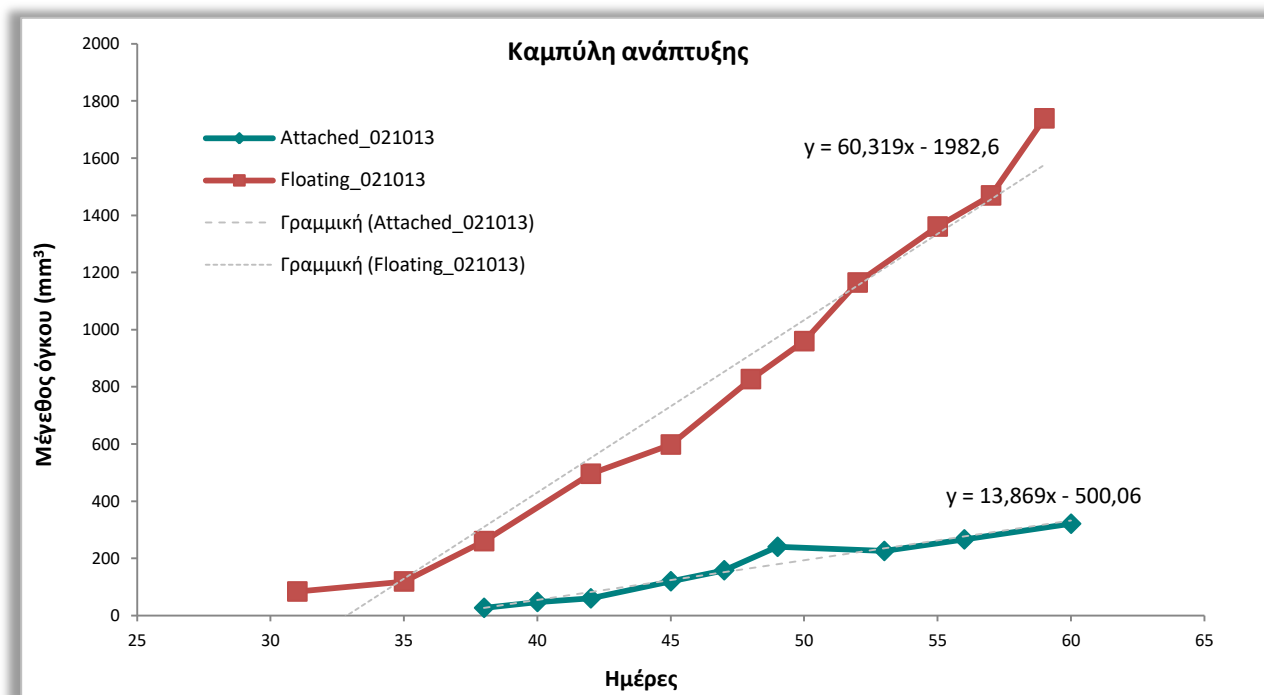
Στη συνέχεια, από την *ex vivo* καλλιέργεια του ξενομοσχεύματος του ασθενούς με καρκίνο του παγκρέατος απομονώθηκαν δύο πρωτογενείς υποπληθυσμοί, καθώς παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα αναπτύσσονταν είτε προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας κυτταροκαλλιέργειας είτε στο υπερκείμενο, σε συσσωματώματα (Εικόνα 15). Οι δύο αυτοί κυτταρικοί υποπληθυσμοί κρίθηκε σκόπιμο να θεωρηθούν διακριτοί και να μελετηθούν ξεχωριστά. Για το λόγο αυτό, η καλλιέργειά τους διαχωρίστηκε στον κυτταρικό υποπληθυσμό που

αναπτύσσονταν προσκολλημένος στην επιφάνεια της φλάσκας και ονομάστηκε Attached_021013 (AT_021013) και στον κυτταρικό υποπληθυσμό που αναπτύσσονταν στο υπερκείμενο και ονομάστηκε Floating_021013 (FL_021013).



Εικόνα 15. Εικόνα μικροσκοπίου αντίθετης φάσης (phase contrast photos) των δύο διακριτών πρωτογενών κυτταρικών υποπληθυσμών Attached_021013 και Floating_021013, που απομονώθηκαν από την *ex vivo* καλλιέργεια ξενομοσχεύματος προερχόμενου από ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος.

Οι δύο πρωτογενείς κυτταρικοί υποπληθυσμοί Attached_021013 και Floating_021013 χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω ως προς την ανάπτυξή των ξενομοσχευμάτων τους σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια του στελέχους NSG™. Από κάθε κυτταρικό υποπληθυσμό εμβολιάστηκαν υποδόρια 10^3 κύτταρα/ένεση και το μέσο μέγεθος των όγκων (mm^3) υπολογίζεται και παρουσιάζεται γραφικά σε συνάρτηση με το χρόνο (ημέρες) για τον προσδιορισμό του ρυθμού ανάπτυξης των δύο υποπληθυσμών (Εικόνα 16). Όπως προκύπτει, οι δύο υποπληθυσμοί αναπτύσσονται με διαφορετικό ρυθμό, με τον υποπληθυσμό Floating_021013 να είναι περισσότερο επιθετικός παρουσιάζοντας περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τον υποπληθυσμό



Εικόνα 16. Καμπύλες ανάπτυξης ξενομοσχευμάτων των πρωτογενών καρκινικών κυτταρικών υποπληθυσμών Attached_021013 και Floating_021013, σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια του στελέχους NSG™.

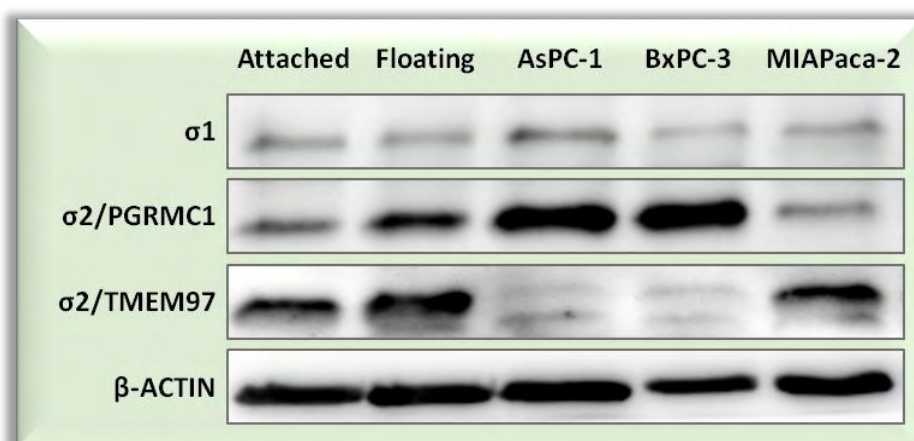
Attached_021013, όπως φαίνεται και από τις κλίσεις των γραμμών τάσης. Η παρατηρούμενη αυτή διαφορά στην επιθετικότητα, μεταξύ των πρωτογενών κυτταρικών υποπληθυσμών, είναι ενδεικτική της ετερογένειας του αρχικού όγκου του ασθενούς

1.5.3. Επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων σ1, σ2/PGRMC1 και σ2/TMEM97 σε πρωτογενείς και εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές κυτταρικές σειρές

Τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων σ1, σ2/PGRMC1 και σ2/TMEM97 προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western στους δύο πρωτογενείς υποπληθυσμούς (Attached_021013, Floating_021013) και στις εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (AsPC-1, BxPC-3, MIAPaca-2).

Όπως προκύπτει, οι σ υποδοχείς εμφανίζουν τόσο διαφορετικά επίπεδα όσο και

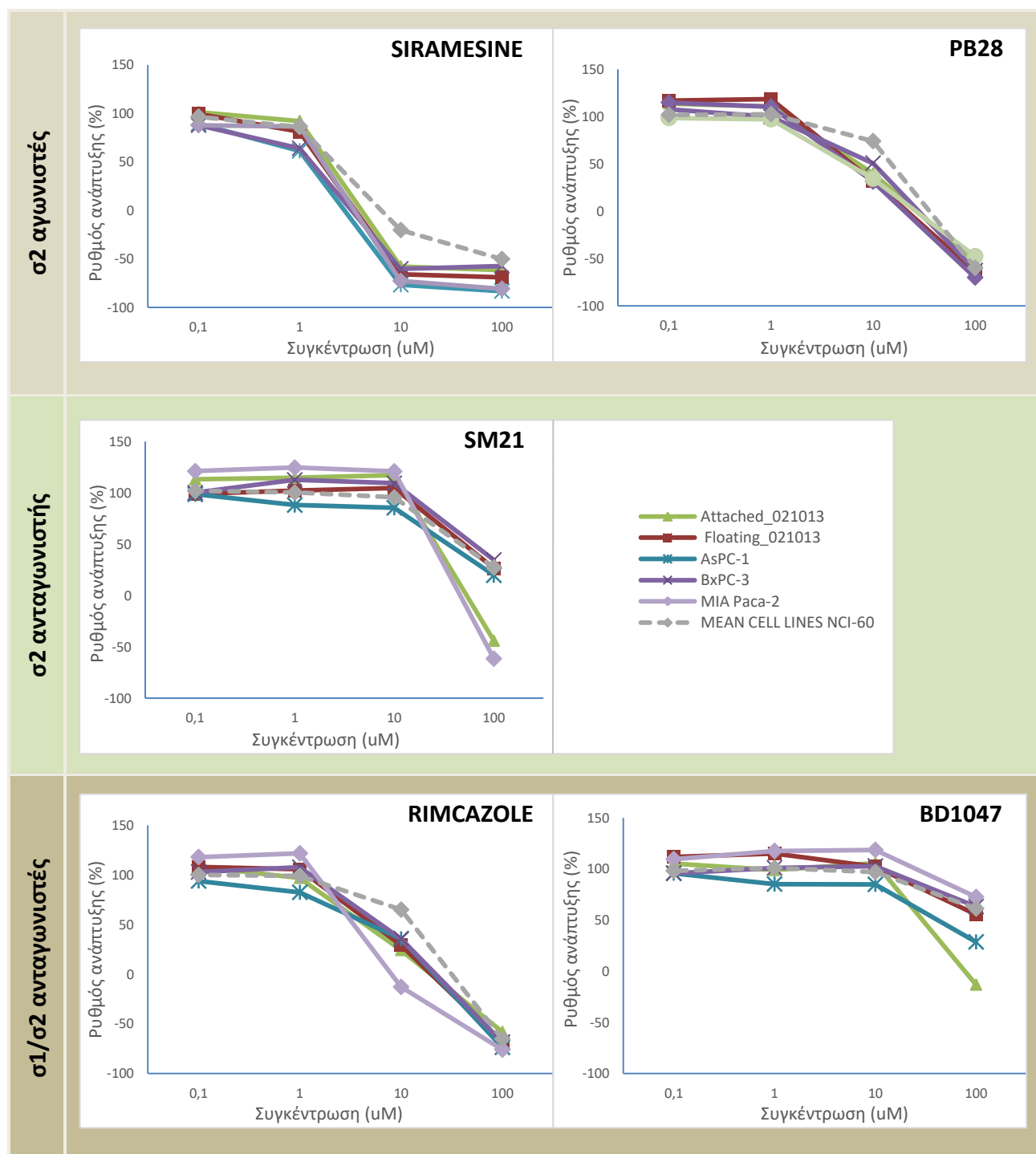
διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, ο σ1 υποδοχέας εμφανίζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης, σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, σε σχέση με τους υποδοχείς σ2/PGRMC1 και σ2/TMEM97. Όσον αφορά τον υποδοχέα σ2/PGRMC1 τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του παρατηρούνται στις εγκαθιδρυμένες καρκινικές σειρές AsPC-1 και BxPC-3. Μεταξύ των πρωτογενών κυτταρικών υποπληθυσμών, ο υποπληθυσμός Floating_021013 παρουσιάζει περίπου διπλάσια επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τον Attached_021013. Τέλος, ο υποδοχέας σ2/TMEM97 εμφανίζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης στους δύο πρωτογενείς υποπληθυσμούς (Attached_021013, Floating_021013) και στην καρκινική κυτταρική σειρά MIAPaca-2, ενώ πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης παρουσιάζουν οι καρκινικές σειρές AsPC-1 και BxPC-3 (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Ανάλυση κατά Western για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων σ1, σ2/PGRMC1, σ2/TMEM97 σε πρωτογενείς (Attached, Floating) και εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (AsPC-1, BxPC-3, MIAPaca-2).

1.5.4. Επίδραση των επιλεγμένων σ προσδετών σε πρωτογενείς και εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές κυτταρικές σειρές

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των επιλεγμένων σ προσδετών στις πρωτογενείς και εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές καρκινικές σειρές, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες με



Εικόνα 18. Καμπύλες ανάπτυξης των παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών υπό την επίδραση τεσσάρων συγκεντρώσεων (0.1, 1, 10, 100 μM) των επιλεγμένων σ προσδετών για 48 ώρες .

Σημείωση: η γκρι διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο της ανάπτυξης των 19 εγκαθιδρυμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών της λίστας NCI-60, υπό την επίδραση των αντίστοιχων σ προσδετών.

την αντίστοιχη μελέτη στις 19 εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60. Στην Εικόνα 18 φαίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων υπό την επίδραση των σ προσδετών, ενώ για συγκριτικούς λόγους παρατίθεται και ο μέσος όρος του ρυθμού ανάπτυξης των 19 κυτταρικών σειρών της λίστας NCI-60 για καθένα σ προσδέτη. Κάθε σημείο αποτελεί τη μέση τιμή τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. Φαίνεται πως, μεταξύ των σ προσδετών που μελετήθηκαν, η Siramesine επιδεικνύει την καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση. Επίσης, προκύπτει ότι ο καρκίνος του παγκρέατος εμφανίζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση της Siramesine, συγκριτικά με όλους τους άλλους καρκινικούς τύπους της λίστας NCI-60 που μελετήθηκαν. Τέλος, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στην ευαισθησία των πρωτογενών συγκριτικά με τις εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές σειρές που μελετήθηκαν για κανέναν από τους επιλεγμένους σ προσδέτες.

ΕΝΟΤΗΤΑ 2 | *In vivo* μελέτες

2.1. Έλεγχος της τοξικότητας της Gemcitabine σε ζωικά πειραματικά μοντέλα

Έλεγχος οξείας τοξικότητας της Gemcitabine:

Η Gemcitabine χορηγήθηκε σε τρεις διαφορετικές δόσεις (400, 200 και 100 mg/kg) μέσω δύο οδών χορήγησης (ενδοπεριτοναϊκά, υποδόρια) και ακολούθησε παρακολούθηση και καταγραφή τοξικών επιδράσεων. Τα ζώα που έλαβαν 400 mg/kg Gemcitabine βρέθηκαν νεκρά την επόμενη ημέρα των χορηγήσεων. Τα ζώα που έλαβαν 200 mg/kg Gemcitabine εμφάνισαν κάποια σημάδια τοξικότητας και βρέθηκαν νεκρά την 4^η ημέρα μετά τη χορήγηση. Τα ζώα που έλαβαν 100 mg/kg Gemcitabine δεν εμφάνισαν σημαντικά σημάδια τοξικότητας.

Έλεγχος υποξείας τοξικότητας της Gemcitabine:

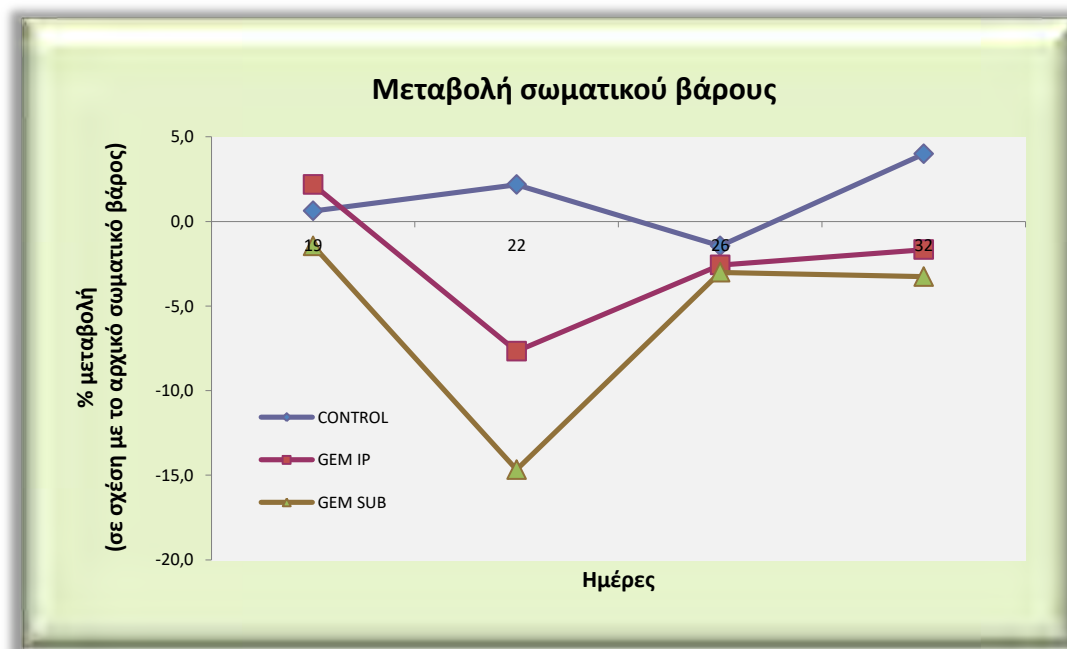
Για τις επιδράσεις της υποξείας τοξικότητας της Gemcitabine χορηγήθηκαν δύο δόσεις των 200, 100 και 50 mg/kg με απόσταση μιας εβδομάδας μεταξύ των χορηγήσεων (ενδοπεριτοναϊκά ή υποδόρια). Η δόση 50 mg/kg ήταν καλά ανεκτή, χωρίς σημάδια τοξικότητας. Στη δόση των 100 mg/kg παρατηρήθηκε απώλεια βάρους μετά την πρώτη χορήγηση, ωστόσο τα ζώα ανέκαμψαν πλήρως και επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα του σωματικού τους βάρους. Τέλος, στη δόση 200 mg/kg τα ζώα εμφάνισαν τοξικότητα και βρέθηκαν νεκρά την 3^η ημέρα του πειράματος.

Έλεγχος δραστηριότητας της Gemcitabine σε ζωικό πρότυπο καρκίνου:

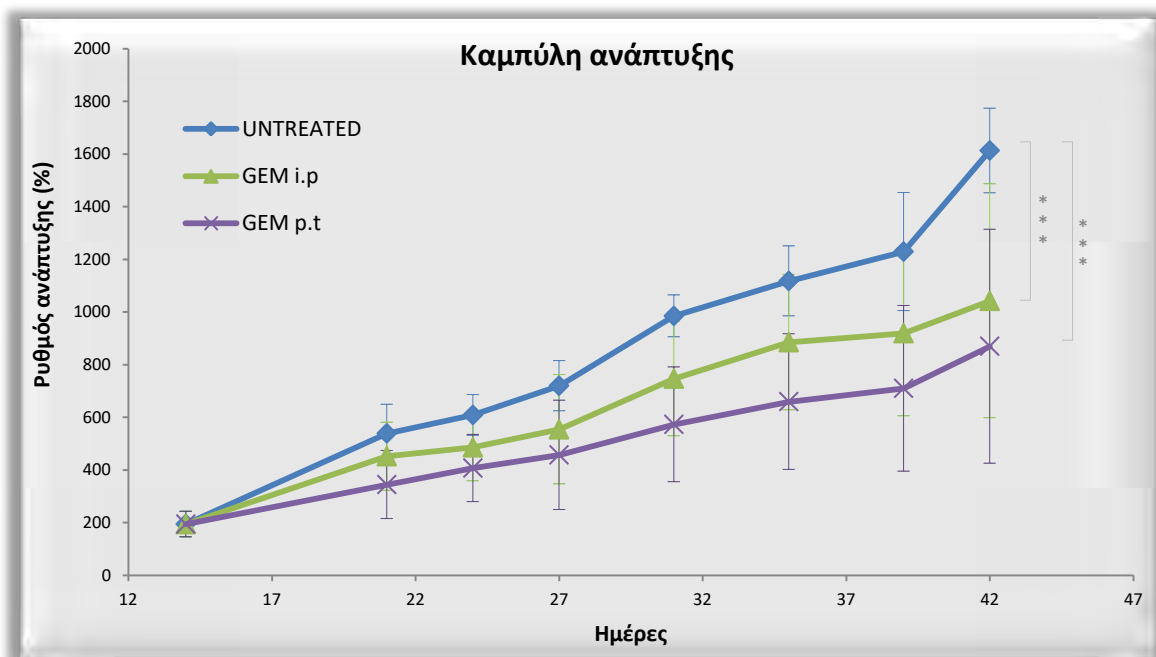
Η επίδραση της Gemcitabine μελετήθηκε στην ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων ανθρώπινων κυττάρων παγκρεατικού καρκίνου (AsPC-1) σε ζώα στελέχους NOD/SCID. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Βλ. Υλικά και Μέθοδοι, § 2.5.1) όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 200 mm³ τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 3 ομάδες (7 ζώα/ομάδα) και ξεκίνησαν οι χορηγήσεις. Σε μία ομάδα δεν χορηγήθηκε τίποτα και χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς, στη δεύτερη ομάδα χορηγήθηκαν 100 mg/kg Gemcitabine ενδοπεριτοναϊκά και στην Τρίτη ομάδα χορηγήθηκαν 100 mg/kg Gemcitabine υποδόρια κοντά στον όγκο. Η χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν μία φορά/7 ημέρες για 2 εβδομάδες και ταυτόχρονα, καταγράφηκαν οι μεταβολές στο σωματικό

βάρος των ζώων (Εικόνα 19). Τα ζώα εμφάνισαν μια απώλεια βάρους που έφτασε μέχρι το 15% στην περίπτωση της υποδόριας χορήγησης και το 8% στην ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση των 100mg/kg Gemcitabine, από την οποία όμως τα ζώα ανέκαμψαν πλήρως πολύ σύντομα και επανήλθαν στα φυσιολογικά τους επίπεδα χωρίς να εμφανιστεί κάποιο άλλο σημάδι τοξικότητας. Το πείραμα τερματίστηκε όταν το μέγεθος των όγκων, στην ομάδα αναφοράς, ανήλθε στα 1.600 mm³ και η καμπύλη ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 20, η συγκέντρωση της Gemcitabine που μελετήθηκε, στις δύο οδούς χορήγησης εμφανίζει καλή αντιπολλαπλασιαστική δράση σε σχέση με την ομάδα αναφοράς, η οποία είναι στατιστικά σημαντική στο τέλος του πειράματος (106).



Εικόνα 19. Καμπύλες % μεταβολής του σωματικού βάρους των ζώων στην ομάδα αναφοράς (CONTROL), στην ομάδα χορήγησης 100 mg/kg της Gemcitabine ενδοπεριτοναϊκά (GEM IP) και υποδόρια (GEM SUB).



Εικόνα 20. Καμπύλες ανάπτυξης ξενομοσχευμάτων ανθρώπινων κυττάρων παγκρεατικού καρκίνου (AsPC-1) υπό την επίδραση 100 mg/kg Gemcitabine χορηγούμενη ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) και υποδόρια κοντά στον όγκο (p.t.).

Σημείωση: * $p < 0,05$ | ** $p < 0,01$ | *** $p < 0,001$

2.2. Έλεγχος της τοξικότητας της δράσης της Siramesine σε ζωικά πειραματικά μοντέλα

Με σκοπό τη μελέτη της δράσης της Siramesine σε ξενομοσχεύματα του κυτταρικού υποπληθυσμού Floating_021013, ελέγχθηκε αρχικά η τοξικότητα της σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια στελέχους NOD/SCID. Η προμήθεια της Siramesine πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Biochempartner (Siramesine^B) (Shanghai, China) και χορηγήθηκαν 55 mg/kg σωματικού βάρους, σε μία δόση, σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια στελέχους NOD/SCID (n=3). Ως φορέας της Siramesine^B επιλέχθηκε ο 5% DMSO, 5% Cremophor EL. Η δόση που χορηγήθηκε επιλέχθηκε από βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς βρέθηκε πως η δόση αυτή της Siramesine είχε ήδη

χρησιμοποιηθεί σε ζωικά πρότυπα καρκίνου και είχε επιδείξει καλή αντιπολλαπλασιαστική δράση (97). Μετά τη χορήγηση τα ζώα ήταν νωχελικά τις πρώτες 24 ώρες αλλά στη συνέχεια επανήλθαν και κανένα σημάδι τοξικότητας δεν εμφανίστηκε για μία εβδομάδα.

Με σκοπό τη μελέτη της δράσης της Siramesine σε ξενομοσχεύματα του κυτταρικού υποπληθυσμού Attached_021013, η απαιτούμενη ποσότητα της Siramesine μας χορηγήθηκε, έπειτα από αίτημά μας, από την εταιρεία που την παρασκευάζει επίσημα (H Lundbeck A/S). Βασιζόμενοι στα δεδομένα του ελέγχου οξείας τοξικότητας της Siramesine της εταιρείας Biochempartner (Siramesine^B), επαναλάβαμε τον έλεγχο οξείας τοξικότητας της Siramesine της εταιρείας Lundbeck (Siramesine^L), στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Χορηγήθηκαν 55 mg/kg

σωματικού βάρους, σε μία μόνο δόση, σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια στελέχους NOD/SCID. Σε αντίθεση με το προηγούμενο πείραμα, στην περίπτωση αυτή όλα τα ζώα βρέθηκαν νεκρά στις επόμενες 48 ώρες από τη χορήγηση. Κρίθηκε λοιπόν απαραίτητος ο έλεγχος της οξείας και υποξείας τοξικότητας της Siramesine^L αφού όπως φαίνεται δεν ακολουθεί το ίδιο πρότυπο τοξικότητας με τη Siramesine^B

2.2.1. Οξεία τοξικότητα της δράσης της Siramesine^L

Ο έλεγχος της οξείας τοξικότητας της δράσης της Siramesine^L πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου οξείας τοξικότητας του NCI (NCI, NIH, USA στο ανοσοκατεσταλμένο στέλεχος ποντικών NOD-SCID. Μελετήθηκε η επίδραση μίας μόνο δόσης της Siramesine^L, στις συγκεντρώσεις 55 mg/kg, 45 mg/kg και 40 mg/kg. Ο φορέας της Siramesine ήταν υδατικό διάλυμα 10% HPBCD ([2-hydroxypropyl]-beta-cyclodextrin) (104). Ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι σχετικές παρατηρήσεις αναφέρονται στον Πίνακα 4. Φαίνεται πως οι συγκεντρώσεις 55 mg/kg και 45 mg/kg είναι τοξικές καθώς προκάλεσαν το θάνατο της πλειοψηφίας των ζώων μετά από 24 ή

48 ώρες. Στη συγκέντρωση 40 mg/kg τα ζώα εμφάνισαν νωχελικότητα για τις πρώτες 48 ώρες από τη χορήγηση της Siramesine^L, αλλά ανέκαμψαν πλήρως από την τρίτη ημέρα και μετά (Πίνακας 4).

2.2.2. Υποξεία τοξικότητα της δράσης της Siramesine^L

Στη συνέχεια, με σκοπό τον έλεγχο της υποξείας τοξικότητας, 45 mg/kg, 40 mg/kg και 35 mg/kg Siramesine^L χορηγήθηκαν επαναλαμβανόμενα κάθε δεύτερη ημέρα για μία εβδομάδα. Ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν και τα σημάδια τοξικότητας καταγράφηκαν για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας και φαίνονται στον Πίνακα 5. Από τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, η χορήγηση της Siramesine σε συγκέντρωση 45mg/kg εμφάνισε σημαντική τοξικότητα καθώς τη δεύτερη ημέρα, έπειτα από τη χορήγηση, παρατηρήθηκε απώλεια βάρους 14 % σε όλα τα ζώα, τα οποία απομακρύνθηκαν και θανατώθηκαν. Στη συγκέντρωση 40 mg/kg η Siramesine^L προκάλεσε νωχελικότητα και αδρό τρίχωμα στα ζώα μέχρι την δεύτερη ημέρα καθώς επίσης και το θάνατο ενός εκ των 3 ζώων έπειτα από τη δεύτερη χορήγηση. Τέλος, η χορήγηση της συγκέντρωσης 35 mg/kg, δεν εμφάνισε σημάδια τοξικότητας στα ζώα που μελετήθηκαν.

Πίνακας 4. Οξεία τοξικότητα της δράσης της Siramesine^L

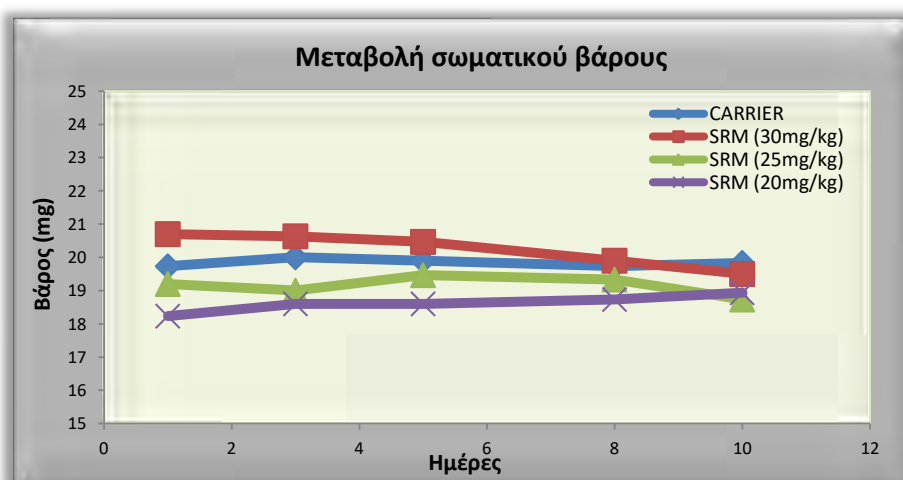
Συγκέντρωση Siramesine (mg/kg)	Αριθμός ζώων	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4	Ημέρα 5
55	16	6 νεκρά	7 νεκρά	-	-	3 νεκρά
45	3	1 νεκρό	2 νεκρά	-	-	
40	3	Νωχελικά/ αδρό τρίχωμα	Νωχελικά/ αδρό τρίχωμα	-	-	Χωρίς σημάδια τοξικότητας

Πίνακας 5. Υποξεία τοξικότητα της δράσης της Siramesine^L

Συγκέντρωση Siramesine (mg/kg)	Αριθμός ζώων	Ημέρα 1	Ημέρα 2 (2 ^η χορήγηση)	Ημέρα 3	Ημέρα 4 (3 ^η χορήγηση)
45	3	Σημάδια πόνου/ αδρό τρίχωμα	10% απώλεια βάρους	14% απώλεια βάρους ΕΥΘΑΝΑΣΙΑ	-
40	3	Νωχελικά/ αδρό τρίχωμα	Νωχελικά/ αδρό τρίχωμα	-	1 νεκρό
35	8	Χωρίς σημάδια τοξικότητας	-	-	Χωρίς σημάδια τοξικότητας

Βασιζόμενοι στις παρατηρήσεις αυτές και προκειμένου να προσδιοριστεί ένα ασφαλές σχήμα χορήγησης (δοσολογία και συχνότητα χορηγήσεων), πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των τοξικών επιδράσεων της Siramesine^L στις συγκεντρώσεις 35 mg/kg, 30 mg/kg και 20 mg/kg. Το σχήμα που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τη χορήγηση της Siramesine^L, κάθε δεύτερη ημέρα, για 6 δόσεις (Q2Dx6). Ο φορέας (CARRIER) της Siramesine (10% HPBCD) χορηγήθηκε αντίστοιχα σε μια ομάδα ζώων η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς. Το συνολικό χρονικό διάστημα των χορηγήσεων ήταν 2 εβδομάδες κατά το οποίο καταγράφηκαν σημάδια τοξικότητας και η μεταβολή του

σωματικού βάρους. Δεν παρατηρήθηκε κανένα σημάδι τοξικότητας από τη δράση της Siramesine^L στις συγκεντρώσεις αυτές και καμία σημαντική μεταβολή στο σωματικό βάρος των ζώων κατά τη διάρκεια των χορηγήσεων (Εικόνα 21). Τέλος, ελέγχθηκε η τοξικότητα της καθημερινής χορήγησης της Siramesine^L στη συγκέντρωση 35 mg/kg, σε έξι ζώα στελέχους NOD/SCID, για μία εβδομάδα (Q1DX5) και καταγράφηκαν σημάδια τοξικότητας. Δεν παρατηρήθηκε κανένα σημαντικό σημάδι τοξικότητας από τη δράση της Siramesine^L στη συγκέντρωση αυτή και καμία σημαντική μεταβολή στο σωματικό βάρος των ζώων κατά τη διάρκεια των χορηγήσεων.



Εικόνα 21. Καμπύλες μεταβολής σωματικού βάρους κατά τη διάρκεια των χορηγήσεων του φορέα (CARRIER) και της Siramesine^L στις συγκεντρώσεις 30 mg/kg, 25 mg/kg και 20 mg/kg.

2.2.3. Μελέτη της τοξικότητας της Siramesine^L σε ζωικό μοντέλο Zebrafish

Ο έλεγχος της τοξικότητας της Siramesine^L πραγματοποιήθηκε σε έμβρυα ιχθύων (Zebrafish) και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εμβρύων ελέγχθηκαν σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (Εικόνα 22). Οι θανατηφόρες και τερατογόνες επιδράσεις καταγράφηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του ΟΟΣΑ (Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης) (OECD 236) για

τη δοκιμή χημικών ουσιών. Η αξιολόγηση της θνησιμότητας και της τερατογένεσης έγινε υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Siramesine^L (1μM, 2μM, 5μM, 10μM, 20μM) σε 24, 48 και 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Η θνησιμότητα καθορίστηκε μετρώντας τον ορατό καρδιακό παλμό των εμβρύων σε κάθε χρονικό σημείο (Πίνακας 6). Οι τερατογόνες επιδράσεις καταγράφηκαν, εάν εμφανίζονταν, τουλάχιστον στο 50% όλων των εμβρύων της κάθε ομάδας και εάν υπήρχε σχέση δόσης-απόκρισης (Πίνακας 7).

Πίνακας 6. Επαγόμενη από τη Siramesine^L εμβρυϊκή θνησιμότητα. Παρατίθενται τα αποτελέσματα τριών πειραματικών επαναλήψεων.

Σημείωση: hpf[°] : ώρες μετά τη γονιμοποίηση, Σύνολο νεκρών εμβρύων[■] : για χρονικό διάστημα πέραν των 72 ωρών.

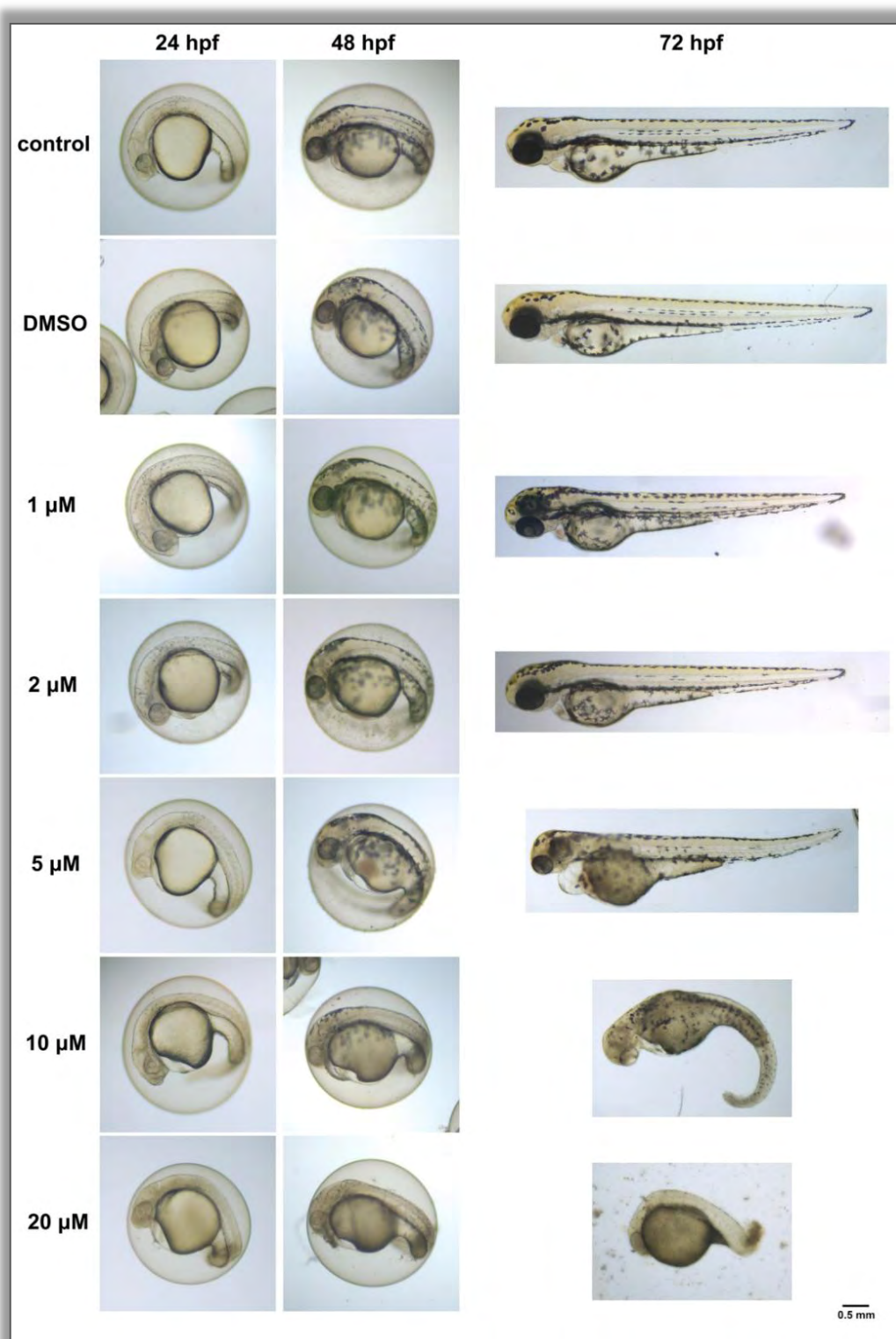
Θνησιμότητα	24 hpf [°]			48 hpf [°]			72 hpf [°]			Σύνολο νεκρών εμβρύων [■]		
	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ
Control	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
DMSO	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1 μM	3	2	3	0	0	0	0	1	0	3	3	3
2 μM	2	1	3	0	0	0	1	2	1	3	3	4
5 μM	1	2	2	4	5	6	0	1	0	5	8	8
10 μM	2	1	3	5	5	1	3	4	8	10	10	12
20 μM	3	3	4	7	6	7	26	27	25	36	36	36

Πίνακας 7. Εμβρυϊκές ανωμαλίες προκαλούμενες από 24ωρη επώαση με σιραμεσίνη. Παρατίθενται τα αποτελέσματα τριών πειραματικών επαναλήψεων.

Ανωμαλίες	1 μM			2 μM			5 μM			10 μM			20 μM		
	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ
Αυθόρμητη κίνηση	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι (<10%)	Όχι	Ναι (10%)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
Δυσμορφίες κρόκου	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι (20%)	Ναι (20%)	Ναι (20%)	Ναι	Ναι	Ναι (10%)	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι

Η Siramesine^L σε συγκεντρώσεις 1 μM και 2 μM προκαλεί 10% συνολική θνησιμότητα των εμβρύων, σε συγκεντρώσεις 5 μM και 10 μM επάγει 15% και 30% συνολική

θνησιμότητα, αντίστοιχα, ενώ η συγκέντρωση 20 μM εμφάνισε πολύ υψηλά επίπεδα τοξικότητας προκαλώντας τη θνησιμότητα του συνόλου των εμβρύων.



Εικόνα 22. Αξιολόγηση της θνησιμότητας και της τερατογένεσης σε έμβρυα Zebrafish 24, 48 και 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hpf, hours post-fertilization), με τη χρήση ανεστραμμένου μικροσκοπίου. **Control:** Έμβρυα σε θρεπτικό μέσο | **DMSO:** Έμβρυα σε θρεπτικό μέσο με 0,1% dimethylsulfoxide | Έμβρυα σε θρεπτικό μέσο υπό την επίδραση siramesine σε συγκεντρώσεις **1 μ M**, **2 μ M**, **5 μ M**, **10 μ M** και **20 μ M**. Οι δοκιμές τοξικότητας ιχθύων πραγματοποιούνταν εάν τα ποσοστά γονιμοποίησης ήταν $\geq 90\%$.

Πίνακας 8. Εμβρυϊκές ανωμαλίες προκαλούμενες από 72 ώρες επώαση με Siramesine^L. Παρατίθενται τα αποτελέσματα τριών πειραματικών επαναλήψεων

Υπόμνημα: Δ.Π. (Δεν Παρατηρήθηκε), Κ. (Κανονικό/Κανονική), Μ.Κ. (Μη κανονική), Υ. (Υποχρωματισμός), Δ.Α. [Δεν αξιολογήθηκε (διότι δεν ολοκληρώθηκε η εκκόλαψη)],

● Μειώθηκε κατά 10%

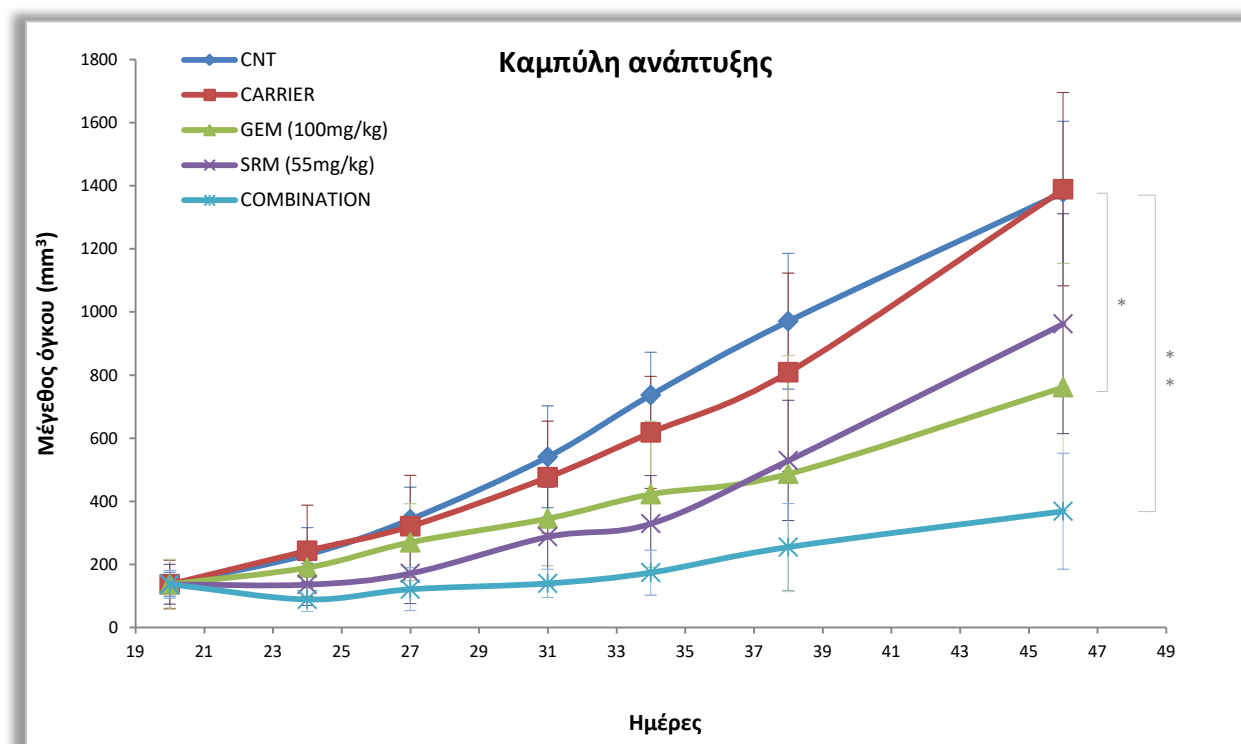
Ανωμαλίες	1 μΜ			2 μΜ			5 μΜ			10 μΜ			20 μΜ		
	Α	Β	Γ	Α	Β	Γ	Α	Β	Γ	Α	Β	Γ	Α	Β	Γ
Οίδημα κρόκου	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι (30%)	Ναι (30%)	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
Επιμήκυνση καρδιακού κόλπου	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι (10%)	Ναι (10%)	Δ.Π.	Ναι (20%)	Ναι (20%)	Ναι (20%)	Ναι (2)	Όχι	Όχι
Δυσμορφία της ουράς	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
Δυσμορφία του ουριαίου άκρου	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι (25%)	Ναι (20%)	Ναι (20%)	Ναι (60%)	Ναι (50%)	Ναι (40%)	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Όχι	Όχι	Όχι
Σκολίωση	Ναι (2)	Όχι	Όχι	Ναι (20%)	Ναι (15%)	Ναι (15%)	Ναι (40%)	Ναι (50%)	Ναι (60%)	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι (2)	Όχι	Όχι
Δυσμορφία καρδιακών θαλάμων	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι (10%)	Ναι (10%)	Ναι (10%)	Ναι (30%)	Ναι (30%)	Ναι (30%)	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Όχι	Όχι	Όχι
Παραμόρφωση κρόκου	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι (10%)	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
Επιβράδυνση ανάπτυξης	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
Μήκος σώματος	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Ναι ●	Ναι ●	Ναι	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Κ.	Κ.	Κ.
Αυθόρμητη κίνηση	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι
Απόκριση αφής	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι
Χρώση σώματος	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Μ.Κ./Υ.	Μ.Κ./Υ.	Μ.Κ./Υ.	Κ.	Κ.	Κ.
Χρώση αμφιβληστροειδούς επιθηλίου	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ.	Κ./Υ.	Κ./Υ.	Κ./Υ.	Υ.	Υ.	Υ.	Κ.	Κ.	Κ.
Βραδυκαρδία/Αρρυθμία	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
Περικαρδιακό οίδημα	Ναι (2)	Όχι	Όχι	Ναι (30%)	Ναι (40%)	Ναι (30%)	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι (10%)	Ναι (10%)	Ναι (20%)	Ναι (2)	Όχι	Όχι
Εκκόλαψη	12/12	11/12	12/12	11/12	10/12	11/12	12/31	12/28	10/28	9/26	8/26	10/24	12/12	11/12	12/12
Αίμα στο περικάρδιο ή τον κρόκο	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι

2.3. Έλεγχος της δραστικότητας της Siramesine^B σε ζωικό πρότυπο καρκίνου προερχόμενου από ασθενή

Προκειμένου να μελετηθεί η δραστικότητα της Siramesine^B σε ζωικό πρότυπο ανθρώπινου καρκίνου, χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια στελέχους NOD-SCID στα οποία αναπτύχθηκαν ξενομοσχεύματα από την *ex vivo* καλλιέργεια του προερχόμενου από ασθενή πρωτογενούς καρκινικού κυτταρικού υποπληθυσμού Floating_021013. Όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 100 mm³ τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 5 ομάδες, ξεκίνησαν οι χορηγήσεις των υπό εξέταση ουσιών και ο ρυθμός ανάπτυξης των όγκων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο. Η δόση της

Siramesine^B (55 mg/kg), χορηγήθηκε τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με την Gemcitabine, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς. Η δόση της Gemcitabine που επιλέχθηκε ήταν τα 100 mg/kg, όπως προσδιορίστηκε από τον έλεγχο της τοξικότητας και δραστικότητάς της. Οι ομάδες των ζώων διαμορφώθηκαν ως εξής:

- 1) CARRIER^B, φορέας της Siramesine^B (5% DMSO, 5% Cremophor EL)
- 2) Gemcitabine 100 mg/kg
- 3) Siramesine^B 55mg/kg
- 4) Siramesine^B 55mg/kg σε συνδυασμό με Gemcitabine 100 mg/kg Σε κάθε περίπτωση οι χορηγήσεις έγιναν ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) και το σχήμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στην Εικόνα 24.



Εικόνα 23. Έλεγχος της επίδρασης της Siramesine^B στην ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων από την *ex vivo* καλλιέργεια του πρωτογενούς κυτταρικού υποπληθυσμού Floating_021013.

Σημείωση: * $p < 0,05$ | ** $p < 0,01$

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 23 η μονοθεραπεία με Siramesine^B (55 mg/kg) εμφανίζει μέτρια αντιπολλαπλασιαστική δράση. Ωστόσο, ο συνδυασμός της με τη

Gemcitabine (100 mg/kg) εμφανίζει σημαντική ενίσχυση της αντιπολλαπλασιαστικής της δράσης.



Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της *in vivo* πειραματικής διαδικασίας του ελέγχου δραστηριότητας της Siramesine^B. Το σχήμα των χορηγήσεων ήταν (Q2D3)x2, με κενό διάστημα 3 ημερών μεταξύ των 2 επαναλήψεων. Η Gemcitabine χορηγήθηκε εφάπαξ στην αρχή του σχήματος.

2.4. Έλεγχος μηχανισμού δράσης της SiramesineB στο ζωικό πειραματικό πρότυπο καρκίνου

Προκειμένου να μελετηθεί η αντιπολλαπλασιαστική δράση της Siramesine^B στο *in vivo* πειραματικό μοντέλο καρκίνου, μετά το τέλος του πειράματος οι όγκοι εξαιρέθηκαν, επεξεργάστηκαν κατάλληλα και ελέγχθηκε, μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών του mTOR σηματοδοτικού μονοπατιού (total mTOR, p-mTOR(S2448), p-mTOR(S2448), Rictor, Raptor), καθώς και κάποιων πρωτεϊνών ενδεικτικών των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου της απόπτωσης (caspase 3) και της αυτοφαγίας (Beclin, LCIIIa/b). Όπως προκύπτει από την Εικόνα 25 η έκφραση του Raptor εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη στην ομάδα που λάμβανε συνδυαστική χορήγηση (COMB), υποδηλώνοντας ενεργοποίηση του mTORC-1 συμπλόκου, το

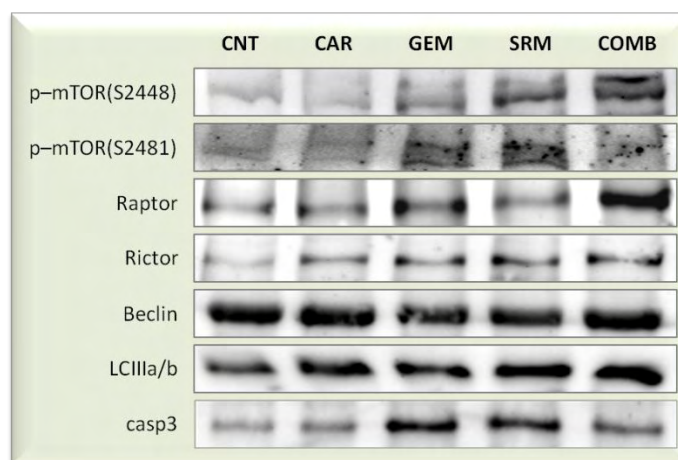
οποίο φαίνεται και από τα αυξημένα επίπεδα της αντίστοιχης φωσφορυλίωσης p-mTOR(S2448). Η ενεργοποίηση του mTORC-1 συμπλόκου συνδέεται με φωσφορυλίωση στη Ser2448 (109).

Στη συνέχεια, μέσω ανοσοϊστοχημείας μελετήθηκε η έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 (Εικόνα 26) και του δείκτη απόπτωσης c-PARP (Εικόνα 27). Φαίνεται πως οι ομάδες που έλαβαν Gemcitabine (G3) και Siramesine^B (G4) ως μονοθεραπεία εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης Ki67 συγκριτικά με τις ομάδες αναφοράς (G1: CNT, G2: UNTR). Η συνδυαστική χορήγηση τους (G5) ενισχύει την αντιπολλαπλασιαστική δράση και εμφανίζει τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67.

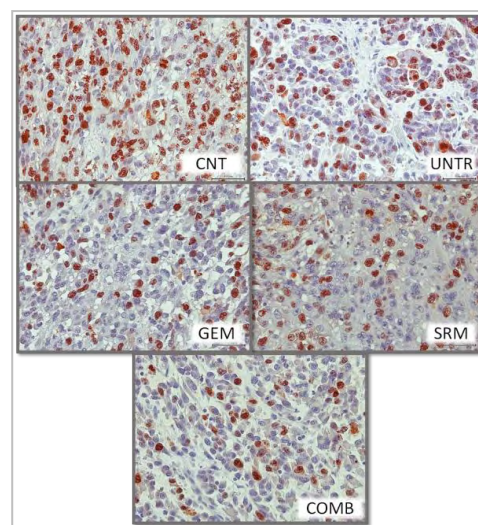
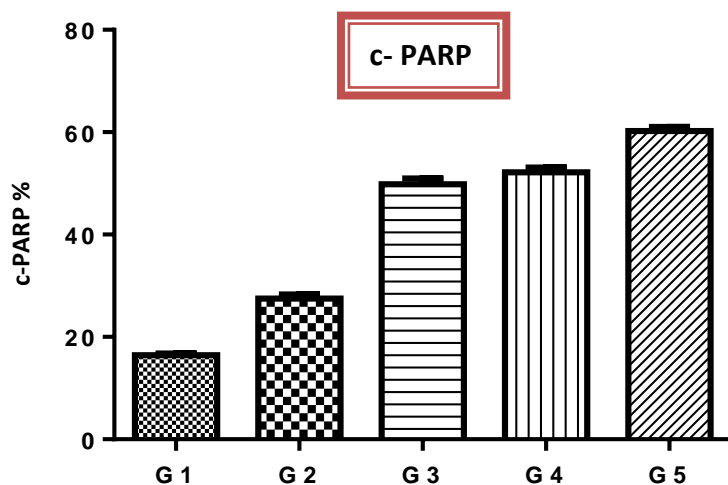
Επίσης, όσον αφορά το δείκτη απόπτωσης c-PARP, οι ομάδες που έλαβαν Gemcitabine (G3) και Siramesine^B (G4) ως μονοθεραπεία εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης

συγκριτικά με τις ομάδες αναφοράς (G1: CNT, G2: UNTR). Η συνδυαστική χορήγησή τους (G5) ενισχύει την αποπτωτική δράση

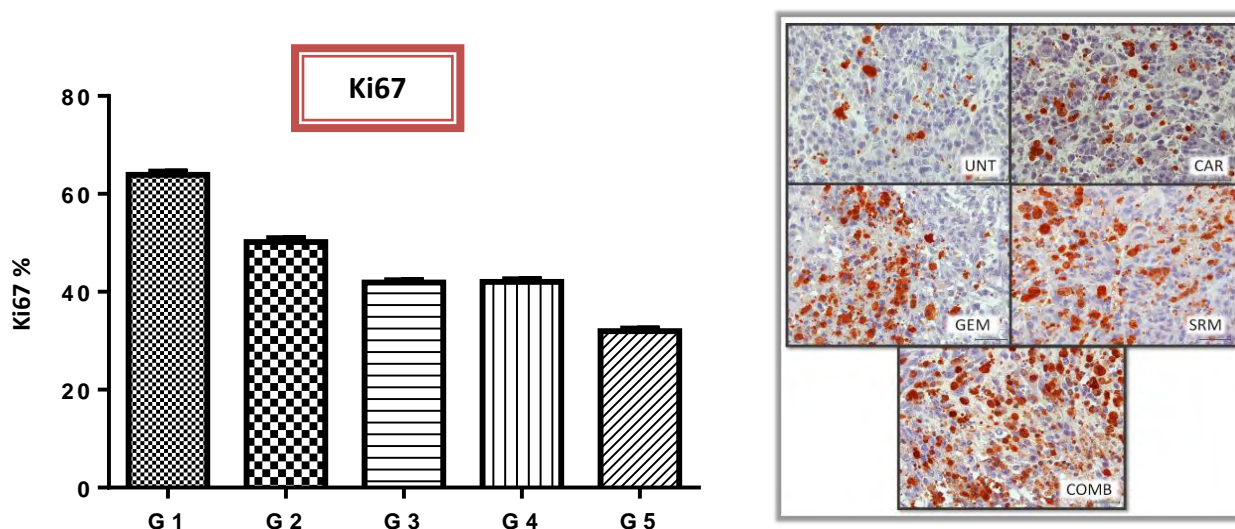
και εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του δείκτη απόπτωσης c-PARP.



Εικόνα 25. Ανάλυση κατά Western για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών total mTOR, p-mTOR(S2448), p-mTOR(S2481), Rictor, Raptor, Beclin, LCIIIa/b, Caspase 3, στο *in vivo* πειραματικό μοντέλο καρκίνου. **Σημείωση:** CNT: ομάδα αναφοράς, CAR: φορέας Siramesine, GEM: Gemcitabine 100 mg/kg, SRM: Siramesine 55mg/kg, COMB: ομάδα συνδυαστικής χορήγησης.



Εικόνα 26. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση επιπέδων έκφρασης του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 στο *in vivo* πειραματικό μοντέλο καρκίνου. Αριστερά απεικονίζεται διαγραμματικά η έκφραση του Ki67 και δεξιά παρατίθεται η εικόνα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης.

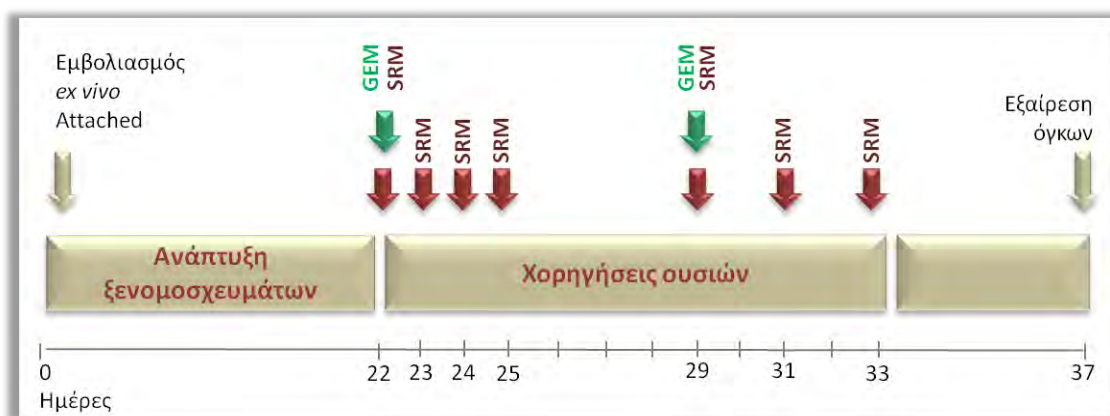


Εικόνα 27. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση επιπέδων έκφρασης του δείκτη απόπτωσης c-PARP στο *in vivo* πειραματικό μοντέλο καρκίνου. Αριστερά απεικονίζεται διαγραμματικά η έκφραση του c-PARP και δεξιά παρατίθεται η εικόνα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης.

2.5. Έλεγχος της δραστικότητας της Siramesine^L σε ζωικό πρότυπο καρκίνου προερχόμενου από ασθενή

Προκειμένου να μελετηθεί η δραστικότητα της Siramesine^L σε ζωικό πρότυπο ανθρώπινου καρκίνου, χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια στελέχους NOD-SCID στα οποία αναπτύχθηκαν ξеноμοσχεύματα από την *ex vivo* καλλιέργεια του προερχόμενου από ασθενή πρωτογενούς καρκινικού κυτταρικού υποπληθυσμού AT_021013.

Όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 100 mm³ τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 6 ομάδες, ξεκίνησαν οι χορηγήσεις των υπό εξέταση ουσιών και ο ρυθμός ανάπτυξης των όγκων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο. Με βάση τα πειράματα προσδιορισμού της τοξικότητας της Siramesine^L επιλέχθηκε να μελετηθεί η δραστικότητα των συγκεντρώσεων 30 mg/kg και 25 mg/kg Siramesine^L τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με την Gemcitabine, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς. Η



Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση της *in vivo* πειραματικής διαδικασίας του ελέγχου δραστικότητας της Siramesine^L. Το σχήμα των χορηγήσεων της Siramesine^L ήταν αρχικά Q1Dx4, ακολούθησε κενό διάστημα 4 ημερών και συνεχίστηκε με το σχήμα Q2Dx3. Το σχήμα χορηγήσεων της Gemcitabine ήταν Q7Dx2.

δόση της Gemcitabine που επιλέχθηκε ήταν τα 100 mg/kg, όπως προσδιορίστηκε από τον έλεγχο της τοξικότητας και δραστηριότητάς της. Οι ομάδες των ζώων διαμορφώθηκαν ως εξής:

- 1) CARRIER, φορέας της Siramesine^L (10% HPBCD)
- 2) Gemcitabine 100 mg/kg
- 3) Siramesine^L 25mg/kg
- 4) Siramesine^L 30mg/kg
- 5) Siramesine^L 25mg/kg σε συνδυασμό με Gemcitabine 100 mg/kg
- 6) Siramesine^L 30mg/kg σε συνδυασμό με Gemcitabine 100 mg/kg

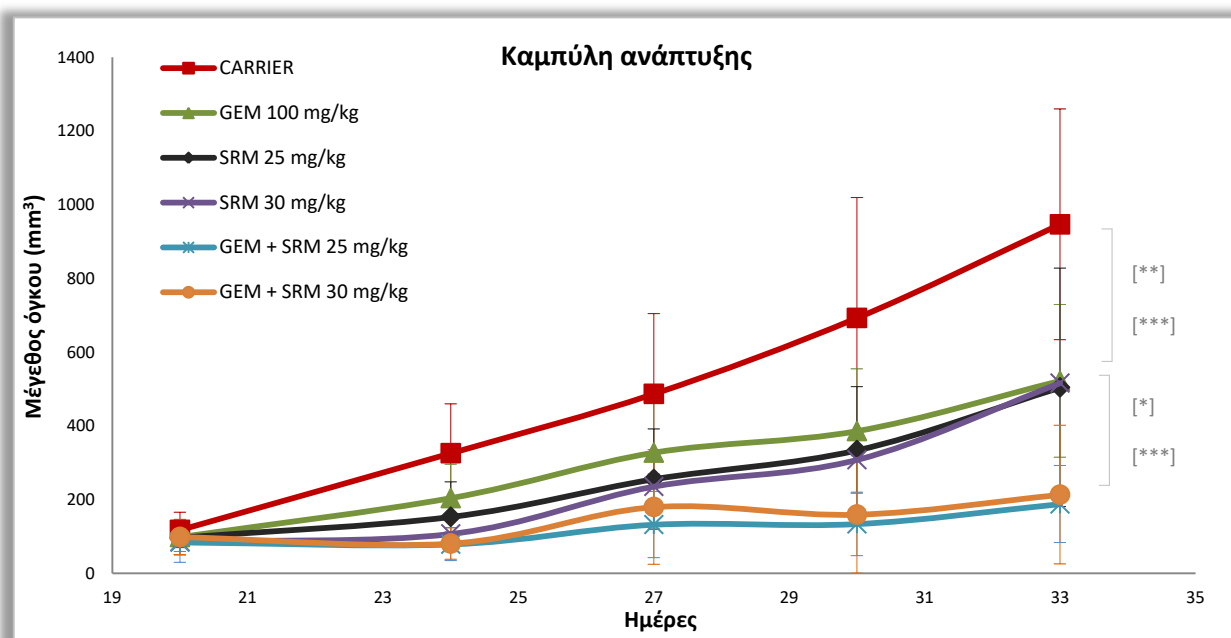
Σε κάθε περίπτωση οι χορηγήσεις έγιναν ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) και το σχήμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στην Εικόνα 28.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29 η μονοθεραπεία με Siramesine^L (25mg/kg, 30mg/kg) εμφανίζει μέτρια αντιπολλαπλασιαστική δράση, στατιστικά

σημαντική σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (CARRIER), την τελευταία ημέρα του πειράματος. Ωστόσο, ο συνδυασμός της με τη Gemcitabine (100 mg/kg) εμφανίζει σημαντική ενίσχυση της αντιπολλαπλασιαστικής της δράσης. Η συνδυαστική αυτή δράση είναι παρόμοια και στις δύο εξεταζόμενες συγκεντρώσεις και στατιστικά σημαντική σε σχέση με τη μονοθεραπεία και την ομάδα αναφοράς, την τελευταία ημέρα του πειράματος.

2.6. Έλεγχος τοξικότητας και δραστηριότητας της λιποσωμιακής Siramesine^L

Στη συνέχεια, προκειμένου να αυξηθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα από τη δράση της Siramesine^L και ταυτόχρονα να μειωθεί η προκαλούμενη τοξικότητα, ακολουθήθηκε η



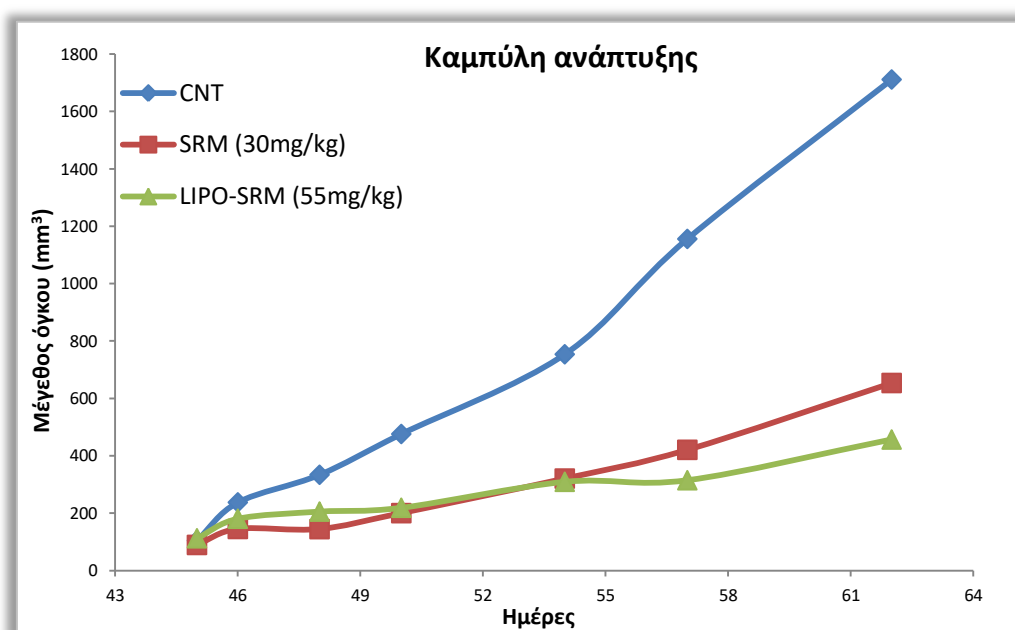
Εικόνα 29. Έλεγχος της επίδρασης της Siramesine^L στην ανάπτυξη ξеноμοσχευμάτων από την *ex vivo* καλλιέργεια του πρωτογενούς κυτταρικού υποπληθυσμού AT_021013 (* $p < 0,05$ | ** $p < 0,01$ | *** $p < 0,001$).

Σημείωση: 1) SRM 35 mg/kg + GEM 100 mg/kg vs SRM 35 mg/kg [*], 2) SRM 25 mg/kg + GEM 100 mg/kg vs SRM 25 mg/kg [*], 3) SRM 35 mg/kg + GEM 100 mg/kg vs GEM 100 mg/kg [*], 4) SRM 25 mg/kg + GEM 100 mg/kg vs GEM 100 mg/kg [***], 5) SRM 35 mg/kg vs CARRIER [***], 6) SRM 25 mg/kg vs CARRIER [***], 7) GEM 100 mg/kg vs CARRIER [***]

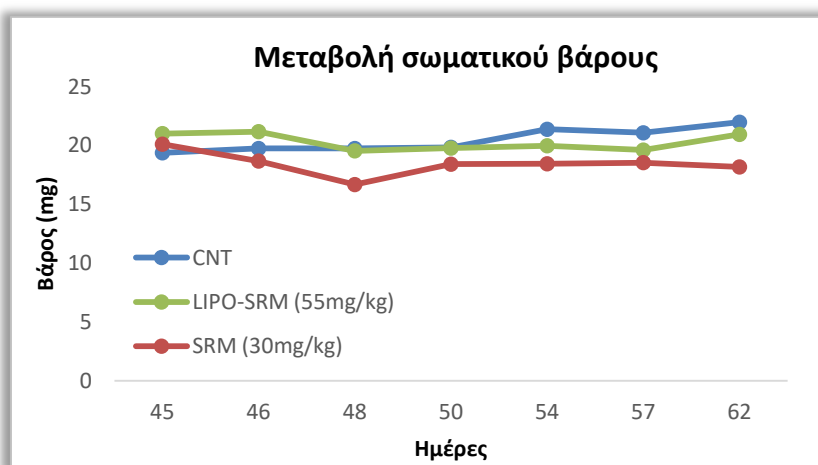
προσέγγιση εγκλωβισμού της σε δομές στοχευόμενης μεταφοράς φαρμάκων. Για το σκοπό αυτό η Siramesine^L εγκλωβίστηκε στο εσωτερικό λιποσωμάτων, που έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν φαρμακευτικές ουσίες εκλεκτικά στον καρκίνο.

Πράγματι, η τροποποίηση αυτή επέτρεψε την αύξηση της χορηγούμενης δόσης της Siramesine^L μέχρι τα 55 mg/kg και βελτίωσε

την αντιπολλαπλασιαστική της δράση (Εικόνα 30). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ελεύθερη μορφή της Siramesine^L στη δόση αυτή (55 mg/kg) ήταν εξαιρετικά τοξική. Αντίθετα, η χορήγηση της λιποσωματικής της τροποποίησης, στην ίδια δόση, δεν εμφάνισε κάποιο αξιοσημείωτο σημάδι τοξικότητας (Εικόνα 31).



Εικόνα 30. Συγκριτική μελέτη της επίδρασης της ελεύθερης και λιποσωματικής Siramesine^L στην ανάπτυξη ξеноμοσχευμάτων από την *ex vivo* καλλιέργεια του πρωτογενούς κυτταρικού υποπληθυσμού Attached_021013.



Εικόνα 31. Καμπύλες μεταβολής σωματικού βάρους κατά τη διάρκεια των χορηγήσεων της ελεύθερης και λιποσωματικής Siramesine^L



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Συμπεράσματα -Συζήτηση

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι σίγμα υποδοχείς έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικής φαρμακολογικής έρευνας από την ανακάλυψή τους, το 1976. Από τότε έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια. Είναι πλέον γνωστό ότι η οικογένεια των σίγμα υποδοχέων αποτελείται από δύο υπότυπους, τους υποδοχείς σίγμα-1 (σ_1) και σίγμα-2 (σ_2), που, ωστόσο, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Μεταξύ των δύο σίγμα υποδοχέων ο σ_1 έχει διερευνηθεί εκτενώς και είναι ευρέως αποδεκτό ότι είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας, μια πρωτεΐνη-συνοδός με πολλαπλές λειτουργίες στο κύτταρο. Ωστόσο, η ταυτοποίηση του σ_2 εξακολουθεί να αποτελεί θέμα συζήτησης. Πρόσφατα προτάθηκε ότι η θέση πρόσδεσης των σ_2 υποδοχέων περιλαμβάνεται στη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα PGRMC1, ενώ μεταγενέστερες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο υποδοχέας σ_2 είναι στην πραγματικότητα ταυτόσημος με τον TMEM97, κάτι που αποτελεί την επικρατούσα θεωρία, σχετικά με τη φύση των σ_2 υποδοχέων.

Αρκετές μελέτες αναφέρουν υπερέκφραση των σ υποδοχέων στον καρκίνο, ωστόσο, από τους δύο υπότυπους μόνο για τον σ_1 υπάρχουν επαρκή ερευνητικά δεδομένα. Οι μελέτες αυτές αφορούν κυρίως πειράματα έμμεσης ανίχνευσης των σ υποδοχέων, μέσω ραδιοπρόσδεσης των εκλεκτικών ιχνηθετημένων σ προσδετών τους. Είναι ενδιαφέρον ότι και οι δύο υπότυποι των σίγμα υποδοχέων έχουν προταθεί ως θεραπευτικοί στόχοι για διάφορες ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ των οποίων και διάφοροι τύποι καρκίνου. Παρά το γεγονός ότι πολλές ανεξάρτητες μελέτες

έδειξαν αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση κάποιων προσδετών των σ_1 και σ_2 υποδοχέων, ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους αποτελεί θέμα συζήτησης και μένει να αποσαφηνιστεί.

Στο πλαίσιο αυτό κρίθηκε σκόπιμος ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των σ υποδοχέων μέσω άμεσης ανίχνευσης της πρωτεϊνικής έκφρασης, με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων διερευνήθηκαν σε 19 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60, που αντιπροσωπεύουν 8 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα σ_1 και των υποδοχέων σ_2 /TMEM97 και σ_2 /PGRMC1. Δεδομένου ότι δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως η ταυτότητα του σ_2 υποδοχέα κρίθηκε σκόπιμη η παράλληλη διερεύνηση των δύο τελευταίων αυτών πρωτεϊνών, που βάσει της πρόσφατης βιβλιογραφίας έχουν συσχετιστεί με την ταυτότητα του σ_2 υποδοχέα. Όπως προκύπτει από την παρούσα εργασία και οι τρεις υποδοχείς εκφράζονται στο σύνολο των καρκινικών κυτταρικών σειρών στις οποίες μελετήθηκαν, εμφανίζοντας όμως διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του σ_1 υποδοχέα εμφανίζουν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-15 (καρκίνος παχέος εντέρου, MDR πολυανθεκτικός φαινότυπος (274) και NCI-H460 (καρκίνος πνεύμονα) ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα οι κυτταρικές σειρές OVCAR-3 (καρκίνος των ωοθηκών), HCT-116 (καρκίνος παχέως εντέρου) και MCF-7 (καρκίνος μαστού). Τα αποτελέσματα αυτά

επιβεβαιώνονται και από βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αναφέρουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στου υποδοχέα σ1 στον καρκίνο του πνεύμονα και χαμηλά επίπεδα στην κυτταρική σειρά MCF-7 (119). Αξίζει να σημειωθεί πως και για τον υποδοχέα σ2/TMEM97, τα υψηλότερα επίπεδα εμφανίζονται στις ίδιες δύο κυτταρικές σειρές στις οποίες υπερεκφράζεται και ο σ1 (HCT-15, NCI-H460). Τέλος, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα σ2/PGRMC1 εμφανίζει η καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (139). Σε γενικές γραμμές δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια προφανής συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των σ υποδοχέων με κάποιο φαινότυπο (MDR φαινότυπος), με κάποιο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου ή με το βαθμό επιθετικότητας του καρκίνου.

Με βάση λοιπόν, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων που προσδιορίστηκαν στις περισσότερες από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, ανακύπτει το ερώτημα της δυνατότητας της χρήσης των σ προσδετών ως θεραπευτικών παραγόντων (μονοθεραπεία ή συνδυαστικά με γνωστά αντικαρκινικά φάρμακα) για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Έτσι, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η αντιπολλαπλασιαστική δράση επιλεγμένων σ προσδετών (αγωνιστών και ανταγωνιστών) στις ίδιες 19 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60, στις οποίες προσδιορίστηκαν και τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων. Ο πειραματικός αυτός σχεδιασμός αποσκοπεί περαιτέρω, στη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των σ

υποδοχέων και της προκύπτουσας δράσης των σ προσδετών τους.

Δεδομένου ότι από τους σ υποδοχείς ο υποδοχέας σ2 είναι ο λιγότερο μελετημένος, επιλέχθηκε να ελεγχθεί η δράση των εκλεκτικών σ2 αγωνιστών Siramesine και PB28, του εκλεκτικού σ2 ανταγωνιστή SM21, του σ1/σ2 ανταγωνιστή Rimcazole και του εκλεκτικού σ2 αγωνιστή BD1047. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να υπογραμμισθεί ότι η κατάταξη των σ προσδετών σε αγωνιστές και ανταγωνιστές υιοθετήθηκε με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η κατηγοριοποίησή τους βασίζεται στην προσομοίωση του φαινοτύπου υπερέκφρασης ή γονιδιακής αποσιώπησης των σ υποδοχέων, αντίστοιχα (85). Όσον αφορά τα πρότυπα ευαισθησίας-ανθεκτικότητας των καρκινικών κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν έναντι των σ προσδετών, παρατηρείται ποικιλομορφία η οποία δε φαίνεται να σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων. Εξαιρέση αποτελούν οι σ2 αγωνιστές Siramesine και PB28, η δράση των οποίων εμφανίζει μία ασθενή αρνητική γραμμική συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα σ2/TMEM97, η οποία όμως δεν αξιολογείται ως σημαντική. Επίσης, τα αποτελέσματα δείχνουν μία σαφή υπεροχή της αντιπολλαπλασιαστικής, κυτταροστατικής και κυτταροτοξικής δράσης του σ2 αγωνιστή Siramesine, στο σύνολο των καρκινικών κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν.

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου οι επιλεγμένοι σ προσδέτες ασκούν την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση στις 19 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60, συγκρίνονται τα

γραφήματα (Mean Graphs, MG) που ανακτώνται από τη βάση δεδομένων του NCI και αποτελούν το «αποτύπωμα» της δράσης των σ προσδετών. Φαίνεται ότι μεταξύ των $\sigma 2$ αγωνιστών (Siramesine και PB28), καθώς και μεταξύ των $\sigma 1/\sigma 2$ ανταγωνιστών (Rimcazole και BD1047) εμφανίζεται μια σχετική ομοιότητα των MG, δηλαδή του προτύπου ευαισθησίας-ανθεκτικότητας των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν. Από τα γραφήματα (MG) των σ προσδετών, μέσω του αλγόριθμου COMPARE του NCI, προτείνονται ουσίες με γνωστό μηχανισμό δράσης, που παρουσιάζουν την υψηλότερη συσχέτιση για τους επιλεγμένους σ προσδέτες. Μεταξύ των 5 ουσιών με τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης, που προτείνονται για καθέναν από τους σ προσδέτες που μελετήθηκαν, εμφανίζονται κάποιες κοινές ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, μεταξύ των $\sigma 2$ αγωνιστών (Siramesine και PB28) εμφανίζεται μία κοινή ουσία (cytembena) και μεταξύ των $\sigma 1/\sigma 2$ ανταγωνιστών (Rimcazole και BD1047) εμφανίζονται δύο κοινές ουσίες (spirogermanium και thalicarpine). Ωστόσο, παρά τις κάποιες ομοιότητες, οι σ αγωνιστές ή ανταγωνιστές δε φαίνεται να μοιράζονται κάποιο κοινό φαρμακολογικό πρότυπο ως προς τις συσχετιζόμενες ουσίες που προτείνεται μέσω του αλγόριθμου COMPARE.

Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι στη λίστα NCI-60 δεν περιλαμβάνονται κυτταρικές σειρές παγκρεατικού καρκίνου. Ωστόσο, λόγω του έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος γύρω από το ρόλο των σ υποδοχέων και τη δράση των σ προσδετών, στον καρκίνο του παγκρέατος, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου αποτελεί,

ένα «σιωπηλό» ασυμπτωματικό τύπο, με αυξημένη επιθετικότητα και αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας, κρίθηκε σκόπιμος ο προσανατολισμός της παρούσας μελέτης και προς αυτό τον τύπο καρκίνου.

Στο πλαίσιο αυτό, αξιοποιώντας την ερευνητική δραστηριότητα του εργαστηρίου μας στην ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο, και στη βάση της παρατήρησης ότι η Siramesine είναι πλέον αξιόλογη από όλες τις ουσίες που μελετήθηκαν αποφασίσαμε η μελέτη να επικεντρωθεί στην ουσία αυτή. Έτσι η δράση της διερευνήθηκε περαιτέρω σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές και ξενομοσχεύματα προερχόμενα από ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο μας. Πιο συγκεκριμένα, από έναν ασθενή με παγκρεατικό καρκίνο, απομονώθηκαν *ex vivo* δύο διακριτοί πρωτογενείς κυτταρικοί υποπληθυσμοί (Attached_021013 και Floating_021013). Οι πρωτογενείς αυτοί υποπληθυσμοί αποτέλεσαν κομβικό σημείο της παρούσας εργασίας. Κι αυτό διότι συγκριτικά με τα καρκινικά ξενομοσχεύματα από εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές και όπως συζητείται και στην εισαγωγή, τα ξενομοσχεύματα που αναπτύσσονται από τις πρωτογενείς πληθυσμούς όπως οι δύο που αναφέρονται πιο πάνω, εμφανίζουν μια σειρά πλεονεκτήματα, όπως η προσομοίωση των χαρακτηριστικών του πρωτογενούς όγκου και η εγγύτητα στην κλινική εικόνα του ασθενούς. Η απομόνωση των δύο αυτών υποπληθυσμών, με διαφορετικό πρότυπο *in vitro* ανάπτυξης, αποτέλεσε μια πρώτη ένδειξη της διατήρησης χαρακτηριστικών ετερογένειας του αρχικού όγκου με

αποτέλεσμα να θεωρεί σκόπιμο να μελετηθούν περαιτέρω ως προς το πρότυπο ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων τους. Βρέθηκε πράγματι, ότι τα ξενομοσχευμάτά τους αναπτύσσονται με διαφορετικό ρυθμό, με τον υποπληθυσμό Floating_021013 να εμφανίζεται τέσσερις φορές πιο επιθετικός, σε σχέση με τον υποπληθυσμό Attached_021013.

Έτσι, προχωρήσαμε στη διερεύνηση της έκφρασης των σ υποδοχέων και της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των επιλεγμένων σ προσδετών στους πρωτογενείς κυτταρικούς υποπληθυσμούς (Attached_021013 και Floating_021013) αλλά και, για συγκριτικούς λόγους, σε εγκαθιδρυμένες, εμπορικά διαθέσιμες, κυτταρικές σειρές παγκρεατικού καρκίνου. Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία πραγματοποιείται ταυτόχρονα η διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων σ1, σ2/PGRMC1 και σ2/TMEM97, με τη χρήση μεθόδου άμεσης ανίχνευσης της πρωτεϊνικής έκφρασης (ανοσοαποτύπωση κατά Western), σε εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές κυτταρικές σειρές και σε κλινικά δείγματα προερχόμενα από ασθενείς με αυτό τον τύπο καρκίνου. Παρατηρήθηκε ότι, ο σ1 υποδοχέας εμφάνισε, γενικά, χαμηλά επίπεδα έκφρασης στο σύνολο των καρκινικών σειρών που μελετήθηκαν. Μεταξύ των πρωτογενών υποπληθυσμών, ο πιο επιθετικός (Floating_021013) εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης τόσο του υποδοχέα σ2/PGRMC1 όσο και του σ2/TMEM97. Επίσης, όσον αφορά τις εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές, όπου παρατηρούνται υψηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα σ2/PGRMC1, ο σ2/TMEM97 εμφανίζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης και αντίστροφα. Πιο συγκεκριμένα, ο υποδοχέας

σ2/TMEM97 εμφανίζει πολύ χαμηλά επίπεδα στις κυτταρικές σειρές AsPC-1 και BxPC-3, παρατήρηση η οποία έχει επιβεβαιωθεί και από τη βιβλιογραφία μέσω προσδιορισμού των επιπέδων mRNA.

Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης των επιλεγμένων σ προσδετών στην ανάπτυξη των πρωτογενών και εγκαθιδρυμένων παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών από την οποία φαίνεται ότι και σ' αυτό τον τύπο καρκίνου, η Siramesine επιδεικνύει την καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική, κυτταροστατική και κυτταροτοξική δράση. Επίσης, ο καρκίνος του παγκρέατος εμφανίζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση της Siramesine σε σχέση με τους υπόλοιπους καρκινικούς τύπους της λίστας NCI-60 που μελετήθηκαν. Γενικά, δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση της δράσης της Siramesine με τα επίπεδα έκφρασης των σ υποδοχέων καθώς η Siramesine εμφανίζει καθολικά την καλύτερη δράση σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν.

Στη συνέχεια, η δράση της Siramesine κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί σε ζωικά πρότυπα καρκίνου προερχόμενα από ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος με σκοπό να ελέγξουμε αν σε πραγματικές συνθήκες εμφανίζει ικανή αντικαρκινική δράση (proof of principle). Η δράση της Siramesine ελέγχθηκε είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο εκλογής για την αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου, Gemcitabine. Η μονοθεραπεία με Siramesine έδειξε μέτρια δράση στην αύξηση των καρκινικών όγκων, η οποία όμως ενισχύθηκε σημαντικά όταν συνδυάσθηκε με τη Gemcitabine. Μια πρώτη μελέτη σχετικά με τον μηχανισμό της δράσης της ουσίας έδειξε ότι αυτή μπορεί

να είναι αποτέλεσμα δύο μηχανισμών, της αυτοφαγίας και της απόπτωσης. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός δράσης χρειάζεται να διαλευκανθεί περαιτέρω.

Σ' αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι η χορηγούμενη δόση της Siramesine προσδιορίστηκε μέσω πειραμάτων τοξικότητας. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε τεχνικά καθαρή μορφή της ουσίας, προερχόμενη από δύο διαφορετικές προμηθεύτριες/παρασκευάστριες εταιρείες. Οι ουσίες διαφορετικής προέλευσης επέδειξαν σημαντικά διαφορετικό προφίλ τοξικότητας. Γενικά, φάνηκε πως η τοξικότητα της Siramesine αποτελεί ένα βασικό περιοριστικό παράγοντα στη χρήση της, καθώς η θεραπευτική της δόση φαίνεται ότι βρίσκεται κοντά στα κατώφλι τοξικότητας (μικρός θεραπευτικός δείκτης). Επιπλέον φαίνεται ότι εξαιτίας αυτής της τοξικότητας αλλά και της τοξικότητας που στις μελέτες μας φαίνεται ότι έχει η Gemcitabine, η συνδυαστική της χορήγηση στις επιλεγμένες θεραπευτικές δόσεις επιτείνει το πρόβλημα της τοξικότητάς του συνολικού χημειοθεραπευτικού σχήματος. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία καθώς μία ερευνητική ομάδα υποστηρίζει πως χορήγησε τη Siramesine σε δόση πολύ μεγαλύτερη της μέγιστης ανεκτής δόσης χωρίς να αναφέρει σημάδια τοξικότητας ούτε όμως και ποσοστά επιβίωσης των ζώων.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, προκειμένου να αυξηθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα και ταυτόχρονα να μειωθούν τα επίπεδα τοξικότητας της Siramesine, ακολουθήθηκε η προσέγγιση εγκλωβισμού της σε νανοδομές στοχευόμενης μεταφοράς φαρμάκου όπως είναι τα λιποσώματα. Έτσι,

επιχειρήθηκε εγκλωβισμός της Siramesine στο εσωτερικό λιποσωματικών δομών, που έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών, στοχευόμενα, στον καρκίνο. Η τροποποίηση αυτή επέτρεψε τη σημαντική αύξηση της χορηγούμενης δόσης της Siramesine σε ζωικό πρότυπο καρκίνου και ταυτόχρονα βελτίωσε την αντιπολλαπλασιαστική της δράση χωρίς να προκαλέσει κανένα αξιοσημείωτο σημάδι τοξικότητας.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι, από την παρούσα μελέτη δεν προκύπτει κάποια άμεση συσχέτιση των υποδοχέων σ1 και σ2 με το είδος αλλά και την επιθετικότητα του όγκου. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι ουσίες που δοκιμάσθηκαν εδώ ακόμη κι αν έχουν σημαντική *in vitro* αντικαρκινική δράση ασκούν τη δράση αυτή μέσω μηχανισμών στους οποίους δεν εμπλέκονται οι σ υποδοχείς. Από τις ουσίες που δοκιμάσθηκαν, η Siramesine φάνηκε να είναι η περισσότερη υποσχόμενη. Οι μελέτες της Siramesine, σε ξενομοσχεύματα όγκων από ασθενείς, που για πρώτη φορά έγιναν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής (PDX), επιβεβαίωσαν την καλή αντικαρκινική της δράση. Επίσης, τα πειραματικά μας δεδομένα δείχνουν ότι η ουσία μπορεί να συνδυασθεί με άλλα χημειοθεραπευτικά ώστε να βελτιωθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Το βασικό μειονέκτημα της ουσίας φαίνεται να είναι η κάποια αυξημένη τοξικότητά της που όμως μπορεί να ξεπερασθεί, όπως έδειξε η αντίστοιχη μελέτη με τη χρήση νανοφορέων ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων, όπως είναι τα λιποσώματα. Προφανώς, η παρούσα εργασία είναι μόνο η αρχή και

απαιτούνται πιο λεπτομερείς μελέτες για τη βελτιστοποίηση του αποτελέσματος αλλά και για την κατανόηση του/των μηχανισμών δράσης.



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Βιβλιογραφία

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Skuse A. What Was Cancer? Definition, Diagnosis and Cause. 2015;Chapter 1.
2. National Institutes of Health (US) N. Understanding Cancer, Biological Sciences Curriculum Study. 2007.
3. Skuse A. Constructions of Cancer in Early Modern England: Ravenous Natures. What Was Cancer? . Definition, Diagnosis and Cause. 2015;Chapter 1.
4. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. World journal of clinical oncology. 2016;7(1):54-86.
5. Cabral BP, da Graça Derengowski Fonseca M, Mota FB. The recent landscape of cancer research worldwide: a bibliometric and network analysis. Oncotarget. 2018;9(55):30474-84.
6. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>.
7. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. Am J Cancer Res. 2017;7(5):1016-36.
8. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science (New York, NY). 2013;339(6127):1546-58.
9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 2018;68(6):394-424.
10. http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1.
11. Naghavi M. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. GLOBAL HEALTH METRICS. 2017;390(10100):10100.
12. Cormier JN, Pollock RE. Soft tissue sarcomas. CA: a cancer journal for clinicians. 2004;54(2):94-109.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
14. Medema RH, Bos JL. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. Critical reviews in oncogenesis. 1993;4(6):615-61.
15. Amin ARMR, Karpowicz PA, Carey TE, Arbiser J, Nahta R, Chen ZG, et al. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. Seminars in Cancer Biology. 2015;35:S55-S77.
16. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Cell metabolism. 2016;23(1):27-47.
17. Weinberg RA. Oncogenes. CA: a cancer journal for clinicians. 1983;33(5):300-6.
18. Shortt J, Johnstone RW. Oncogenes in cell survival and cell death. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2012;4(12).
19. Lodish H BA, Zipursky SL. Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. Molecular Cell Biology. 2000;4th edition.
20. Park BH BV. The p53 Gene. 2003;Cancer Medicine. 6th edition.
21. Priestman DA, van der Spoel AC, Butters TD, Dwek RA, Platt FM. N-butyldeoxynojirimycin causes weight loss as a result of appetite suppression in lean and obese mice. Diabetes, obesity & metabolism. 2008;10(2):159-66.
22. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Human mutation. 2007;28(6):622-9.
23. Cooper GM. The cell: A molecular approach. Washington, DC: ASM Press. 2000.
24. <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/2995521/6131615/3-25112014-BP-EN/aab2c2d3-aed9-430a-a561-e188b8ef49d8>.
25. Tesei A, Cortesi M, Pignatta S, Arienti C, Dondio GM, Bigogno C, et al. Anti-tumor Efficacy Assessment of the Sigma Receptor Pan Modulator RC-106. A Promising Therapeutic Tool for Pancreatic Cancer. Front Pharmacol. 2019;10:490.
26. Hasan S, Jacob R, Manne U, Paluri R. Advances in pancreatic cancer biomarkers. Oncol Rev. 2019;13(1):410-.
27. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, et al.

The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467(7319):1109-13.

28. Skandalakis LJ, Rowe JS, Jr., Gray SW, Skandalakis JE. Surgical embryology and anatomy of the pancreas. *The Surgical clinics of North America*. 1993;73(4):661-97.

29. Yamada T. *Textbook of Gastroenterology*. Copyright © 2009 Blackwell Publishing Ltd. 2008.

30. Papachristou GI, Whitcomb DC. Predictors of severity and necrosis in acute pancreatitis. *Gastroenterology clinics of North America*. 2004;33(4):871-90.

31. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2:16022.

32. Goral V. Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015;16(14):5619-24.

33. Oberstein PE, Olive KP. Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? *Therapeutic advances in gastroenterology*. 2013;6(4):321-37.

34. Scarton L, Yoon S. Pancreatic Cancer Related Health Disparities: A Commentary. 2018;10(7).

35. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)*. 2011;378(9791):607-20.

36. Deeb A, Haque SU, Olowokure O. Pulmonary metastases in pancreatic cancer, is there a survival influence? *Journal of gastrointestinal oncology*. 2015;6(3):E48-51.

37. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(33):5313-27.

38. Brierley J. The evolving TNM cancer staging system: an essential component of cancer care. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2006;174(2):155-6.

39. Takeda Y, Saiura A, Takahashi Y, Inoue Y, Ishizawa T, Mise Y, et al. Asymptomatic Pancreatic Cancer: Does Incidental Detection Impact Long-Term Outcomes? *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2017;21(8):1287-95.

40. Griffin JF, Poruk KE, Wolfgang CL. Pancreatic cancer surgery: past, present, and future. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*. 2015;27(4):332-48.

41. Freelove R, Walling AD. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *American family physician*. 2006;73(3):485-92.

42. Su M, Mei Y, Sinha S. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. *J Oncol*. 2013;2013:102735-.

43. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*. 2004;6(4):463-77.

44. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(10):767-77.

45. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.

46. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & development*. 2007;21(22):2861-73.

47. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation*. 2005;12 Suppl 2:1542-52.

48. Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*. 2007;447(7148):1121-5.

49. He C, Levine B. The Beclin 1 interactome. *Current opinion in cell biology*. 2010;22(2):140-9.

50. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2011;18(4):571-80.

51. Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *The EMBO journal*. 1999;18(14):3888-96.

52. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000;408(6811):488-92.

53. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(3):211-6.

54. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(9):741-52.

55. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2008;445:77-88.
56. Tanida I, Yamaji T, Ueno T, Ishiura S, Kominami E, Hanada K. Consideration about negative controls for LC3 and expression vectors for four colored fluorescent protein-LC3 negative controls. *Autophagy*. 2008;4(1):131-4.
57. Yun CW, Lee SH. The Roles of Autophagy in Cancer. 2018;19(11).
58. Dibble CC, Manning BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nature cell biology*. 2013;15(6):555-64.
59. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(2):1886-918.
60. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(1):25-32.
61. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*. 2011;13(2):132-41.
62. Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental cell*. 2004;7(2):167-78.
63. Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*. 2012;8(6):903-14.
64. Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S. Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. 2016;17(11):1552-64.
65. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(12):5360-72.
66. Maiuri MC, Ciriollo A, Kroemer G. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *The EMBO journal*. 2010;29(3):515-6.
67. Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, et al. Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature*. 2015;522(7556):359-62.
68. Carlsson SR, Simonsen A. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *Journal of cell science*. 2015;128(2):193-205.
69. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*. 2000;19(21):5720-8.
70. Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature cell biology*. 2014;16(6):495-501.
71. Wild P, McEwan DG, Dikic I. The LC3 interactome at a glance. *Journal of cell science*. 2014;127(Pt 1):3-9.
72. Thurston TL, Boyle KB, Allen M, Ravenhill BJ, Karpiyevich M, Bloor S, et al. Recruitment of TBK1 to cytosol-invading *Salmonella* induces WIPI2-dependent antibacterial autophagy. 2016;35(16):1779-92.
73. Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(1):a011247.
74. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: impact on the aging process. *Ageing research reviews*. 2013;12(2):520-34.
75. Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*. 2011;32(7):955-63.
76. Gewirtz DA. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy. *Cancer research*. 2014;74(3):647-51.
77. Comel A, Sorrentino G, Capaci V, Del Sal G. The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities. *FEBS letters*. 2014;588(16):2600-9.
78. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *The New England journal of medicine*. 2013;368(7):651-62.
79. Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1976;197(3):517-32.
80. Bowen WD dCB, Hellewell SB, Walker JM, and Rice KC. [3H]-(+)-Pentazocine: A potent and highly selective benzomorphan-based probe for sigma-1 receptors. *Mol Neuropharmacol* 3. 1993:117-26.

81. Hellewell SB, Bowen WD. A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain. *Brain research*. 1990;527(2):244-53.
82. Tam SW. Naloxone-inaccessible sigma receptor in rat central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(21):6703-7.
83. Glennon RA. Pharmacophore Identification for Sigma-1 (σ1) Receptor Binding: Application of the "Deconstruction - Reconstruction - Elaboration" Approach. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2005;5(10):927-40.
84. Megalizzi V, Mathieu V, Mijatovic T, Gailly P, Debeir O, De Neve N, et al. 4-IBP, a sigma1 receptor agonist, decreases the migration of human cancer cells, including glioblastoma cells, in vitro and sensitizes them in vitro and in vivo to cytotoxic insults of proapoptotic and proautophagic drugs. *Neoplasia*. 2007;9(5):358-69.
85. Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee SA, Cavendish JZ, Robson MJ, Scandinaro AL, et al. Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *Journal of pharmacological sciences*. 2015;127(1):17-29.
86. Sereti E, Karagianellou T, Kotsoni I, Magouliotis D, Kamposioras K, Ulukaya E, et al. Patient Derived Xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer? *Journal of proteomics*. 2018;188:107-18.
87. Paull KD, Shoemaker RH, Hodes L, Monks A, Scudiero DA, Rubinstein L, et al. Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(14):1088-92.
88. Tesei A, Cortesi M, Zamagni A, Arienti C, Pignatta S, Zanoni M, et al. Sigma Receptors as Endoplasmic Reticulum Stress "Gatekeepers" and their Modulators as Emerging New Weapons in the Fight Against Cancer. *Front Pharmacol*. 2018;9:711-.
89. Holbeck SL. Update on NCI in vitro drug screen utilities. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2004;40(6):785-93.
90. Miserocchi G, Mercatali L, Liverani C, De Vita A, Spadazzi C, Pieri F, et al. Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *Journal of translational medicine*. 2017;15(1):229.
91. Leithner K, Wohlkoenig C, Stacher E, Lindenmann J, Hofmann NA, Gallé B, et al. Hypoxia increases membrane metallo-endopeptidase expression in a novel lung cancer ex vivo model - role of tumor stroma cells. *BMC Cancer*. 2014;14:40-.
92. Hirata E, Sahai E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017;7(7).
93. Bremnes RM, Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, et al. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011;6(1):209-17.
94. Gillet JP, Varma S, Gottesman MM. The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(7):452-8.
95. Hamacher R, Bauer S. Preclinical models for translational sarcoma research. *Current opinion in oncology*. 2017;29(4):275-85.
96. Spitzer D, Simon PO, Jr., Kashiwagi H, Xu J, Zeng C, Vangveravong S, et al. Use of multifunctional sigma-2 receptor ligand conjugates to trigger cancer-selective cell death signaling. *Cancer research*. 2012;72(1):201-9.
97. Hornick JR, Xu J, Vangveravong S, Tu Z, Mitchem JB, Spitzer D, et al. The novel sigma-2 receptor ligand SW43 stabilizes pancreas cancer progression in combination with gemcitabine. *Mol Cancer*. 2010;9:298-.
98. Kashiwagi H, McDunn JE, Simon PO, Jr., Goedegebuure PS, Xu J, Jones L, et al. Selective sigma-2 ligands preferentially bind to pancreatic adenocarcinomas: applications in diagnostic imaging and therapy. *Mol Cancer*. 2007;6:48-.
99. Chu UB, Ruoho AE. Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. *Molecular pharmacology*. 2016;89(1):142-53.
100. Kashiwagi H, McDunn JE, Simon PO, Jr., Goedegebuure PS, Vangveravong S, Chang K, et al. Sigma-2 receptor ligands potentiate conventional chemotherapies and improve

- survival in models of pancreatic adenocarcinoma. *Journal of translational medicine*. 2009;7:24.
101. Mori T, Hayashi T, Hayashi E, Su TP. Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PloS one*. 2013;8(10):e76941.
 102. Schonthal AH. Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica*. 2012;2012:26.
 103. Rosen DA, Seki SM, Fernandez-Castaneda A. Modulation of the sigma-1 receptor-IRE1 pathway is beneficial in preclinical models of inflammation and sepsis. 2019;11(478).
 104. Paivandy A, Sandelin M, Igelström H, Landelius P, Janson C, Melo FR, et al. Induction of Human Lung Mast Cell Apoptosis by Granule Permeabilization: A Novel Approach for Targeting Mast Cells. *Front Immunol*. 2017;8:1645-.
 105. van Mackelenbergh MG, Stroes CI, Spijker R, van Eijck CHJ, Wilmink JW, Bijlsma MF, et al. Clinical Trials Targeting the Stroma in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5):588.
 106. Bilalis P, Skoulas D, Karatzas A, Marakis J, Stamogiannos A, Tsimblouli C, et al. Self-Healing pH- and Enzyme Stimuli-Responsive Hydrogels for Targeted Delivery of Gemcitabine To Treat Pancreatic Cancer. 2018;19(9):3840-52.
 107. Benarroch EE. Sigma-1 receptor and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2018;91(16):743-7.
 108. Dimas K, Vlassopoulos D, Iatrou H. *Biomacromolecules*.
 109. Copp J, Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer research*. 2009;69(5):1821-7.
 110. Cahill MA, Medlock AE. Thoughts on interactions between PGRMC1 and diverse attested and potential hydrophobic ligands. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;171:11-33.
 111. Abate C, Niso M, Infantino V, Menga A, Berardi F. Elements in support of the 'non-identity' of the PGRMC1 protein with the sigma2 receptor. *Eur J Pharmacol*. 2015;758:16-23.
 112. Riad A, Zeng C, Weng C-C, Winters H, Xu K, Makvandi M, et al. Sigma-2 Receptor/TMEM97 and PGRMC-1 Increase the Rate of Internalization of LDL by LDL Receptor through the Formation of a Ternary Complex. *Sci Rep*. 2018;8(1):16845-.
 113. <https://www.proteinatlas.org/>.
 114. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor-microenvironment>.
 115. Georgiadis MO, Karoutzou O, Foscolos AS, Papanastasiou I. Sigma Receptor (sigmaR) Ligands with Antiproliferative and Anticancer Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2017;22(9).
 116. Davidson M, Saoud J, Staner C, Noel N, Luthringer E, Werner S, et al. Efficacy and Safety of MIN-101: A 12-Week Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of a New Drug in Development for the Treatment of Negative Symptoms in Schizophrenia. *The American journal of psychiatry*. 2017;174(12):1195-202.
 117. Grundman M, Morgan R, Lickliter JD, Schneider LS, DeKosky S, Izzo NJ, et al. A phase 1 clinical trial of the sigma-2 receptor complex allosteric antagonist CT1812, a novel therapeutic candidate for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia (New York, N Y)*. 2019;5:20-6.
 118. Alon A, Schmidt HR, Wood MD, Sahn JJ, Martin SF, Kruse AC. Identification of the gene that codes for the σ_{2} receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(27):7160-5.
 119. Aydar E, Onganer P, Perrett R, Djamgoz MB, Palmer CP. The expression and functional characterization of sigma (sigma) 1 receptors in breast cancer cell lines. *Cancer letters*. 2006;242(2):245-57.
 120. Simony-Lafontaine J, Esslimani M, Bribes E, Gourgou S, Lequeux N, Lavail R, et al. Immunocytochemical assessment of sigma-1 receptor and human sterol isomerase in breast cancer and their relationship with a series of prognostic factors. *British journal of cancer*. 2000;82(12):1958-66.
 121. Xu Q-X, Li E-M, Zhang Y-F, Liao L-D, Xu X-E, Wu Z-Y, et al. Overexpression of sigma1 receptor and its positive associations with pathologic TNM classification in esophageal squamous cell carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(6):457-66.
 122. Xu D, Yi W, Chen Y, Ma L, Wang J, Yu G. Overexpression of Sig1R is closely associated with tumor progression and poor outcome in patients with hilar cholangiocarcinoma. *Medical*

oncology (Northwood, London, England). 2014;31(12):261.

123. Thomas GE, Szucs M, Mamone JY, Bem WT, Rush MD, Johnson FE, et al. Sigma and opioid receptors in human brain tumors. *Life sciences*. 1990;46(18):1279-86.

124. Bem WT, Thomas GE, Mamone JY, Homan SM, Levy BK, Johnson FE, et al. Overexpression of sigma receptors in nonneural human tumors. *Cancer research*. 1991;51(24):6558-62.

125. Wang B, Rouzier R, Albarracin CT, Sahin A, Wagner P, Yang Y, et al. Expression of sigma 1 receptor in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;87(3):205-14.

126. Skrzycki M, Czczot H. Altered expression level of Sigma1 receptor gene in human colorectal cancer. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2013;33(5):313-8.

127. Vilner BJ, de Costa BR, Bowen WD. Cytotoxic effects of sigma ligands: sigma receptor-mediated alterations in cellular morphology and viability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(1 Pt 1):117-34.

128. Spruce BA, Campbell LA, McTavish N, Cooper MA, Appleyard MV, O'Neill M, et al. Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and inhibit tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer research*. 2004;64(14):4875-86.

129. Kim FJ, Schrock JM, Spino CM, Marino JC, Pasternak GW. Inhibition of tumor cell growth by Sigma1 ligand mediated translational repression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;426(2):177-82.

130. Schrock JM, Spino CM, Longen CG, Stabler SM, Marino JC, Pasternak GW, et al. Sequential cytoprotective responses to Sigma1 ligand-induced endoplasmic reticulum stress. *Molecular pharmacology*. 2013;84(5):751-62.

131. Thomas JD, Longen CG, Oyer HM, Chen N, Maher CM, Salvino JM, et al. Sigma1 Targeting to Suppress Aberrant Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer. *Cancer research*. 2017;77(9):2439-52.

132. Crawford KW, Bowen WD. Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. *Cancer research*. 2002;62(1):313-22.

133. Moody TW, Leyton J, John C. Sigma ligands inhibit the growth of small cell lung cancer cells. *Life sciences*. 2000;66(20):1979-86.

134. Schepmann D, Lehmkuhl K, Brune S, Wunsch B. Expression of sigma receptors of human urinary bladder tumor cells (RT-4 cells) and development of a competitive receptor binding assay for the determination of ligand affinity to human sigma(2) receptors. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011;55(5):1136-41.

135. Brune S, Schepmann D, Lehmkuhl K, Frehland B, Wunsch B. Characterization of ligand binding to the sigma(1) receptor in a human tumor cell line (RPMI 8226) and establishment of a competitive receptor binding assay. *Assay and drug development technologies*. 2012;10(4):365-74.

136. Cahill MA, Jazayeri JA, Catalano SM, Toyokuni S, Kovacevic Z, Richardson DR. The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2016;1866(2):339-49.

137. Mir SU, Ahmed IS, Arnold S, Craven RJ. Elevated progesterone receptor membrane component 1/sigma-2 receptor levels in lung tumors and plasma from lung cancer patients. *International journal of cancer*. 2012;131(2):E1-9.

138. Ahmed IS, Rohe HJ, Twist KE, Mattingly MN, Craven RJ. Progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1): a heme-1 domain protein that promotes tumorigenesis and is inhibited by a small molecule. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;333(2):564-73.

139. Neubauer H, Adam G, Seeger H, Mueck AO, Solomayer E, Wallwiener D, et al. Membrane-initiated effects of progesterone on proliferation and activation of VEGF in breast cancer cells. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2009;12(3):230-9.

140. Tsai HW, Ho CL, Cheng SW, Lin YJ, Chen CC, Cheng PN, et al. Progesterone receptor membrane component 1 as a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*. 2018;24(10):1152-66.

141. Zhang D, Xia X, Wang X, Zhang P, Lu W, Yu Y, et al. PGRMC1 Is a Novel Potential Tumor Biomarker of Human Renal Cell Carcinoma Based

- on Quantitative Proteomic and Integrative Biological Assessments. *PloS one*. 2017;12(1):e0170453-e.
142. Kaye H, Kleeff J, Ding J, Hammer J, Giese T, Zentgraf H, et al. Expression analysis of MAC30 in human pancreatic cancer and tumors of the gastrointestinal tract. *Histology and histopathology*. 2004;19(4):1021-31.
 143. Han KY, Gu X, Wang HR, Liu D, Lv FZ, Li JN. Overexpression of MAC30 is associated with poor clinical outcome in human non-small-cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013;34(2):821-5.
 144. Ding H, Gui XH, Lin XB, Chen RH, Cai HR, Fen Y, et al. Prognostic Value of MAC30 Expression in Human Pure Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2016;17(5):2705-10.
 145. Xiao M, Li H, Yang S, Huang Y, Jia S, Wang H, et al. Expression of MAC30 protein is related to survival and clinicopathological variables in breast cancer. *Journal of surgical oncology*. 2013;107(5):456-62.
 146. Romero L, Merlos M, Vela JM. Antinociception by Sigma-1 Receptor Antagonists: Central and Peripheral Effects. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)*. 2016;75:179-215.
 147. Weng TY, Tsai SA, Su TP. Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases. *Journal of biomedical science*. 2017;24(1):74.
 148. Skuza G. Ethanol withdrawal-induced depressive symptoms in animals and therapeutic potential of sigma1 receptor ligands. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(6):1681-7.
 149. van Waarde A, Rybczynska AA, Ramakrishnan NK, Ishiwata K, Elsinga PH, Dierckx RA. Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1848(10 Pt B):2703-14.
 150. Bruna J, Videla S, Argyriou AA, Velasco R, Villoria J, Santos C, et al. Efficacy of a Novel Sigma-1 Receptor Antagonist for Oxaliplatin-Induced Neuropathy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase IIa Clinical Trial. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2018;15(1):178-89.
 151. Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimers Dis*. 2019;67(3):779-94.
 152. Urfer R, Moebius HJ, Skoloudik D, Santamarina E, Sato W, Mita S, et al. Phase II trial of the Sigma-1 receptor agonist cutamesine (SA4503) for recovery enhancement after acute ischemic stroke. *Stroke*. 2014;45(11):3304-10.
 153. Crottès D, Guizouarn H, Martin P, Borgese F, Soriani O. The sigma-1 receptor: a regulator of cancer cell electrical plasticity? *Front Physiol*. 2013;4:175-.
 154. Kim FJ. Introduction to Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors. *Handbook of experimental pharmacology*. 2017;244:1-11.
 155. Gueguinou M, Crottès D, Chantome A, Rapetti-Mauss R, Potier-Cartereau M, Clarysse L, et al. The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca(2+) homeostasis. *Oncogene*. 2017;36(25):3640-7.
 156. Crottès D, Rapetti-Mauss R, Alcaraz-Perez F, Tichet M, Gariano G, Martial S, et al. SIGMAR1 Regulates Membrane Electrical Activity in Response to Extracellular Matrix Stimulation to Drive Cancer Cell Invasiveness. *Cancer research*. 2016;76(3):607-18.
 157. Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, et al. Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(13):8680-91.
 158. Becchetti A, Munaron L, Arcangeli A. The role of ion channels and transporters in cell proliferation and cancer. *Front Physiol*. 2013;4:312-.
 159. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pillozzi S, Becchetti A. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Current medicinal chemistry*. 2009;16(1):66-93.
 160. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(3):107-21.
 161. Arcangeli A. Ion channels and transporters in cancer. 3. Ion channels in the tumor cell-microenvironment cross talk. *American journal of physiology Cell physiology*. 2011;301(4):C762-71.

162. Peruzzo R, Biasutto L, Szabo I, Leanza L. Impact of intracellular ion channels on cancer development and progression. *European biophysics journal* : EBJ. 2016;45(7):685-707.
163. Wheeler KT, Wang LM, Wallen CA, Childers SR, Cline JM, Keng PC, et al. Sigma-2 receptors as a biomarker of proliferation in solid tumours. *British journal of cancer*. 2000;82(6):1223-32.
164. Mach RH, Zeng C, Hawkins WG. The σ 2 Receptor: A Novel Protein for the Imaging and Treatment of Cancer. *Journal of medicinal chemistry*. 2013;56(18):7137-60.
165. Achison M, Boylan MT, Hupp TR, Spruce BA. HIF-1 α contributes to tumour-selective killing by the sigma receptor antagonist rimcazone. *Oncogene*. 2007;26(8):1137-46.
166. Bai T, Wang S, Zhao Y, Zhu R, Wang W, Sun Y. Haloperidol, a sigma receptor 1 antagonist, promotes ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;491(4):919-25.
167. Banerjee R, Tyagi P, Li S, Huang L. Anisamide-targeted stealth liposomes: a potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. *International journal of cancer*. 2004;112(4):693-700.
168. Li SD, Huang L. Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide and small interference RNA into lung cancer cells. *Molecular pharmaceutics*. 2006;3(5):579-88.
169. Li SD, Chono S, Huang L. Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008;16(5):942-6.
170. Yu EY, Ellard SL, Hotte SJ, Gingerich JR, Joshua AM, Gleave ME, et al. A randomized phase 2 study of a HSP27 targeting antisense, apatonsen with prednisone versus prednisone alone, in patients with metastatic castration resistant prostate cancer. *Investigational new drugs*. 2018;36(2):278-87.
171. Maher CM, Thomas JD, Haas DA, Longen CG, Oyer HM, Tong JY, et al. Small-Molecule Sigma1 Modulator Induces Autophagic Degradation of PD-L1. *Molecular cancer research* : MCR. 2018;16(2):243-55.
172. Akhtar MJ, Ahamed M, Alhadlaq HA, Alrokayan SA, Kumar S. Targeted anticancer therapy: overexpressed receptors and nanotechnology. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2014;436:78-92.
173. Pati ML, Groza D, Riganti C, Kopecka J, Niso M, Berardi F, et al. Sigma-2 receptor and progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) are two different proteins: Proofs by fluorescent labeling and binding of sigma-2 receptor ligands to PGRMC1. *Pharmacological research*. 2017;117:67-74.
174. Colabufo NA, Abate C, Contino M, Inglese C, Niso M, Berardi F, et al. PB183, a sigma receptor ligand, as a potential PET probe for the imaging of prostate adenocarcinoma. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2008;18(6):1990-3.
175. Everaert H, Flamen P, Franken PR, Verhaeghe W, Bossuyt A. Sigma-receptor imaging by means of I123-IDAB scintigraphy: clinical application in melanoma and non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 1997;17(3b):1577-82.
176. Caveliers V, Everaert H, John CS, Lahoutte T, Bossuyt A. Sigma receptor scintigraphy with N-[2-(1'-piperidinyl)ethyl]-3-(123)I-iodo-4-methoxybenzamide of patients with suspected primary breast cancer: first clinical results. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2002;43(12):1647-9.
177. Kashiwagi H, McDunn JE, Simon PO, Jr., Goedegebuure PS, Xu J, Jones L, et al. Selective sigma-2 ligands preferentially bind to pancreatic adenocarcinomas: applications in diagnostic imaging and therapy. *Mol Cancer*. 2007;6:48.
178. Zeng C, Rothfuss J, Zhang J, Chu W, Vangveravong S, Tu Z, et al. Sigma-2 ligands induce tumour cell death by multiple signalling pathways. *British journal of cancer*. 2012;106(4):693-701.
179. Ostenfeld MS, Fehrenbacher N, Hoyer-Hansen M, Thomsen C, Farkas T, Jaattela M. Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. *Cancer research*. 2005;65(19):8975-83.
180. Rui M, Rossi D, Marra A, Paolillo M, Schinelli S, Curti D, et al. Synthesis and biological evaluation of new aryl-alkyl(alkenyl)-4-benzylpiperidines, novel Sigma Receptor (SR) modulators, as potential anticancer-agents.

European journal of medicinal chemistry. 2016;124:649-65.

181. Villalpando-Rodriguez GE, Blankstein AR, Konzelman C, Gibson SB. Lysosomal Destabilizing Drug Siramesine and the Dual Tyrosine Kinase Inhibitor Lapatinib Induce a Synergistic Ferroptosis through Reduced Heme Oxygenase-1 (HO-1) Levels. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:14.

182. Cesen MH, Repnik U, Turk V, Turk B. Siramesine triggers cell death through destabilisation of mitochondria, but not lysosomes. *Cell death & disease*. 2013;4:e818.

183. Ma S, Henson ES, Chen Y, Gibson SB. Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells. *Cell death & disease*. 2016;7:e2307.

184. Zeng C, Vangveravong S, Jones LA, Hyrc K, Chang KC, Xu J, et al. Characterization and evaluation of two novel fluorescent sigma-2 receptor ligands as proliferation probes. *Mol Imaging*. 2011;10(6):420-33.

185. Simon PO, Jr., McDunn JE, Kashiwagi H, Chang K, Goedegebuure PS, Hotchkiss RS, et al. Targeting AKT with the proapoptotic peptide, TAT-CTMP: a novel strategy for the treatment of human pancreatic adenocarcinoma. *International journal of cancer*. 2009;125(4):942-51.

186. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33-42.

187. Sun T, Wang Y, Wang Y, Xu J, Zhao X, Vangveravong S, et al. Using SV119-gold nanocage conjugates to eradicate cancer stem cells through a combination of photothermal and chemo therapies. *Advanced healthcare materials*. 2014;3(8):1283-91.

188. Wang Y, Xu J, Xia X, Yang M, Vangveravong S, Chen J, et al. SV119-gold nanocage conjugates: a new platform for targeting cancer cells via sigma-2 receptors. *Nanoscale*. 2012;4(2):421-4.

189. Zeng C, McDonald ES, Mach RH. Molecular Probes for Imaging the Sigma-2 Receptor: In Vitro and In Vivo Imaging Studies. *Handbook of experimental pharmacology*. 2017;244:309-30.

190. Walker JM, Bowen WD, Walker FO, Matsumoto RR, De Costa B, Rice KC. Sigma receptors: biology and function. *Pharmacological reviews*. 1990;42(4):355-402.

191. Chu W, Xu J, Zhou D, Zhang F, Jones LA, Wheeler KT, et al. New N-substituted 9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3alpha-yl phenylcarbamate analogs as sigma2 receptor ligands: synthesis, in vitro characterization, and evaluation as PET imaging and chemosensitization agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2009;17(3):1222-31.

192. Tu Z, Xu J, Jones LA, Li S, Dumstorff C, Vangveravong S, et al. Fluorine-18-labeled benzamide analogues for imaging the sigma2 receptor status of solid tumors with positron emission tomography. *Journal of medicinal chemistry*. 2007;50(14):3194-204.

193. Dichiara M, Amata E, Rescifina A, Prezzavento O, Floresta G, Parenti C, et al. Synthesis and evaluation of haloperidol metabolite II prodrugs as anticancer agents. *Future medicinal chemistry*. 2017;9(15):1749-64.

194. Marrazzo A, Fiorito J, Zappala L, Prezzavento O, Ronsisvalle S, Pasquinucci L, et al. Antiproliferative activity of phenylbutyrate ester of haloperidol metabolite II [(+/-)-MRJF4] in prostate cancer cells. *European journal of medicinal chemistry*. 2011;46(1):433-8.

195. Sozio P, Fiorito J, Di Giacomo V, Di Stefano A, Marinelli L, Cacciatore I, et al. Haloperidol metabolite II prodrug: asymmetric synthesis and biological evaluation on rat C6 glioma cells. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;90:1-9.

196. Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(8):473-83.

197. Isella C, Terrasi A, Bellomo SE, Petti C, Galatola G, Muratore A, et al. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. 2015;47(4):312-9.

198. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*. 2013;19(11):1423-37.

199. Alderton GK. Tumour microenvironment: Driving relapse. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(4):195.

200. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501(7467):346-54.

201. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug

development. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(6):338-50.

202. Toolan HW. Growth of human tumors in cortisone-treated laboratory animals: the possibility of obtaining permanently transplantable human tumors. *Cancer research*. 1953;13(4-5):389-94.

203. Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nature protocols*. 2009;4(11):1670-80.

204. Siolas D, Hannon GJ. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer research*. 2013;73(17):5315-9.

205. Rajeshkumar NV, Tan AC, De Oliveira E, Womack C, Wombwell H, Morgan S, et al. Antitumor effects and biomarkers of activity of AZD0530, a Src inhibitor, in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(12):4138-46.

206. Rubio-Viqueira B, Jimeno A, Cusatis G, Zhang X, Iacobuzio-Donahue C, Karikari C, et al. An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(15):4652-61.

207. Damhofer H, Ebbing EA, Steins A, Welling L, Tol JA, Krishnadath KK, et al. Establishment of patient-derived xenograft models and cell lines for malignancies of the upper gastrointestinal tract. *Journal of translational medicine*. 2015;13:115.

208. Roife D, Dai B, Kang Y, Perez MVR, Pratt M, Li X, et al. Ex Vivo Testing of Patient-Derived Xenografts Mirrors the Clinical Outcome of Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(24):6021-30.

209. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinska E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer discovery*. 2014;4(9):998-1013.

210. Garrido-Laguna I, Uson M, Rajeshkumar NV, Tan AC, de Oliveira E, Karikari C, et al. Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma- related gene pathways predict poor

survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(17):5793-800.

211. Gomez-Rubio P, Zock JP, Rava M, Marquez M, Sharp L, Hidalgo M, et al. Reduced risk of pancreatic cancer associated with asthma and nasal allergies. *Gut*. 2017;66(2):314-22.

212. Go KL, Delitto D, Judge SM, Gerber MH, George TJ, Jr., Behrns KE, et al. Orthotopic Patient-Derived Pancreatic Cancer Xenografts Engraft Into the Pancreatic Parenchyma, Metastasize, and Induce Muscle Wasting to Recapitulate the Human Disease. *Pancreas*. 2017;46(6):813-9.

213. Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(8):451-2.

214. Hoover M, Adamian Y, Brown M, Maawy A, Chang A, Lee J, et al. A novel method for RNA extraction from FFPE samples reveals significant differences in biomarker expression between orthotopic and subcutaneous pancreatic cancer patient-derived xenografts. *Oncotarget*. 2017;8(4):5885-94.

215. Hiroshima Y, Maawy A, Zhang Y, Zhang N, Murakami T, Chishima T, et al. Patient-derived mouse models of cancer need to be orthotopic in order to evaluate targeted anti-metastatic therapy. *Oncotarget*. 2016;7(44):71696-702.

216. Noll EM, Eisen C, Stenzinger A, Espinet E, Muckenhuber A, Klein C, et al. CYP3A5 mediates basal and acquired therapy resistance in different subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. 2016;22(3):278-87.

217. Marangoni E, Poupon MF. Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development. *Current opinion in oncology*. 2014;26(6):556-61.

218. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;362(17):1605-17.

219. Canto MI, Harinck F, Hruban RH, Offerhaus GJ, Poley JW, Kamel I, et al. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut*. 2013;62(3):339-47.

220. Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, et al. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal

- adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(12):4115-21.
221. Bian B, Bigonnet M, Gayet O, Loncle C, Maignan A, Gilibert M, et al. Gene expression profiling of patient-derived pancreatic cancer xenografts predicts sensitivity to the BET bromodomain inhibitor JQ1: implications for individualized medicine efforts. 2017;9(4):482-97.
222. Carugo A, Genovese G, Seth S, Nezi L, Rose JL, Bossi D, et al. In Vivo Functional Platform Targeting Patient-Derived Xenografts Identifies WDR5-Myc Association as a Critical Determinant of Pancreatic Cancer. *Cell reports*. 2016;16(1):133-47.
223. Kopetz S, Lemos R, Powis G. The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(19):5160-2.
224. Fichtner I, Rolff J, Soong R, Hoffmann J, Hammer S, Sommer A, et al. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(20):6456-68.
225. Schmidt KF, Ziu M, Schmidt NO, Vaghasia P, Cargioli TG, Doshi S, et al. Volume reconstruction techniques improve the correlation between histological and in vivo tumor volume measurements in mouse models of human gliomas. *Journal of neuro-oncology*. 2004;68(3):207-15.
226. Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, Pocard M, Goere D, Mariani P, et al. Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(19):5314-28.
227. Walters DM, Stokes JB, Adair SJ, Stelow EB, Borgman CA, Lowrey BT, et al. Clinical, molecular and genetic validation of a murine orthotopic xenograft model of pancreatic adenocarcinoma using fresh human specimens. *PloS one*. 2013;8(10):e77065.
228. Dauer P, Nomura A, Saluja A, Banerjee S. Microenvironment in determining chemoresistance in pancreatic cancer: Neighborhood matters. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2017;17(1):7-12.
229. Melstrom LG, Salazar MD, Diamond DJ. The pancreatic cancer microenvironment: A true double agent. *Journal of surgical oncology*. 2017;116(1):7-15.
230. Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, Jacobetz MA, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*. 2011;60(6):861-8.
231. Stebbing J, Paz K, Schwartz GK, Wexler LH, Maki R, Pollock RE, et al. Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma. *Cancer*. 2014;120(13):2006-15.
232. Sanz L, Cuesta AM, Salas C, Corbacho C, Bellas C, Alvarez-Vallina L. Differential transplantability of human endothelial cells in colorectal cancer and renal cell carcinoma primary xenografts. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2009;89(1):91-7.
233. Lai Y, Wei X, Lin S, Qin L, Cheng L, Li P. Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):106.
234. Fiebig HH, Schuler J, Bausch N, Hofmann M, Metz T, Korrat A. Gene signatures developed from patient tumor explants grown in nude mice to predict tumor response to 11 cytotoxic drugs. *Cancer genomics & proteomics*. 2007;4(3):197-209.
235. Jin K, Li G, Cui B, Zhang J, Lan H, Han N, et al. Assessment of a novel VEGF targeted agent using patient-derived tumor tissue xenograft models of colon carcinoma with lymphatic and hepatic metastases. *PloS one*. 2011;6(12):e28384.
236. Cottu P, Bieche I, Assayag F, El Botty R, Chateau-Joubert S, Thuleau A, et al. Acquired resistance to endocrine treatments is associated with tumor-specific molecular changes in patient-derived luminal breast cancer xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(16):4314-25.
237. Kemper K, Krijgsman O, Cornelissen-Steijger P, Shahrabi A, Weeber F, Song JY, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts. *EMBO molecular medicine*. 2015;7(9):1104-18.

238. Kemper K, Krijgsman O, Kong X, Cornelissen-Steijger P, Shahrabi A, Weeber F, et al. BRAF(V600E) Kinase Domain Duplication Identified in Therapy-Refractory Melanoma Patient-Derived Xenografts. *Cell reports*. 2016;16(1):263-77.
239. Dobbin ZC, Katre AA, Steg AD, Erickson BK, Shah MM, Alvarez RD, et al. Using heterogeneity of the patient-derived xenograft model to identify the chemoresistant population in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014;5(18):8750-64.
240. Lohse I, Borgida A, Cao P, Cheung M, Pintilie M, Bianco T, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations sensitize to chemotherapy in patient-derived pancreatic cancer xenografts. *British journal of cancer*. 2015;113(3):425-32.
241. Sugimoto S, Komatsu H, Morohoshi Y, Kanai T. Recognition of and recent issues in hereditary diffuse gastric cancer. *Journal of gastroenterology*. 2015;50(8):831-43.
242. Du Q, Jiang L, Wang XQ, Pan W, She FF, Chen YL. Establishment of and comparison between orthotopic xenograft and subcutaneous xenograft models of gallbladder carcinoma. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(8):3747-52.
243. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=561725>.
244. Brown KM, Xue A, Mittal A, Samra JS, Smith R, Hugh TJ. Patient-derived xenograft models of colorectal cancer in pre-clinical research: a systematic review. *Oncotarget*. 2016;7(40):66212-25.
245. Byrne AT, Alferez DG, Amant F, Annibali D, Arribas J, Biankin AV, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nature reviews Cancer*. 2017;17(4):254-68.
246. Konstantinopoulos PA, Matulonis UA. Current status and evolution of preclinical drug development models of epithelial ovarian cancer. *Frontiers in oncology*. 2013;3:296.
247. Eirew P, Steif A, Khattra J, Ha G, Yap D, Farahani H, et al. Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution. *Nature*. 2015;518(7539):422-6.
248. Zhang X, Claerhout S, Prat A, Dobrolecki LE, Petrovic I, Lai Q, et al. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer research*. 2013;73(15):4885-97.
249. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(13):3989-98.
250. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*. 2014;508(7494):118-22.
251. Stewart EL, Tan SZ, Liu G, Tsao MS. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. *Translational lung cancer research*. 2015;4(1):67-81.
252. Hylander T, Latif L, Petersson-Westin U, Cardell LO. Intralymphatic allergen-specific immunotherapy: an effective and safe alternative treatment route for pollen-induced allergic rhinitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(2):412-20.
253. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, NY)*. 2011;331(6024):1565-70.
254. Bhardwaj N. Harnessing the immune system to treat cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1130-6.
255. Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, et al. Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells. *Cancer science*. 2005;96(7):387-93.
256. Melkus MW, Estes JD, Padgett-Thomas A, Gatlin J, Denton PW, Othieno FA, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nature medicine*. 2006;12(11):1316-22.
257. Holzapfel BM, Wagner F, Thibadeau L, Levesque JP, Huttmacher DW. Concise review: humanized models of tumor immunology in the 21st century: convergence of cancer research and tissue engineering. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2015;33(6):1696-704.
258. King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J, et al. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-

- versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clinical and experimental immunology*. 2009;157(1):104-18.
259. Drake AC, Chen Q, Chen J. Engineering humanized mice for improved hematopoietic reconstitution. *Cellular & molecular immunology*. 2012;9(3):215-24.
260. Voloshin T, Gingis-Velitski S, Bril R, Benayoun L, Munster M, Milsom C, et al. G-CSF supplementation with chemotherapy can promote revascularization and subsequent tumor regrowth: prevention by a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2011;118(12):3426-35.
261. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):786-98.
262. Perregaard J, Moltzen EK, Meier E, Sanchez C. Sigma ligands with subnanomolar affinity and preference for the sigma 2 binding site. 1. 3-(omega-aminoalkyl)-1H-indoles. *Journal of medicinal chemistry*. 1995;38(11):1998-2008.
263. Azzariti A, Colabufo NA, Berardi F, Porcelli L, Niso M, Simone GM, et al. Cyclohexylpiperazine derivative PB28, a sigma2 agonist and sigma1 antagonist receptor, inhibits cell growth, modulates P-glycoprotein, and synergizes with anthracyclines in breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(7):1807-16.
264. Matsumoto RR, Nguyen L, Kaushal N, Robson MJ. Sigma (sigma) receptors as potential therapeutic targets to mitigate psychostimulant effects. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)*. 2014;69:323-86.
265. Mach RH, Wu L, West T, Whirrett BR, Childers SR. The analgesic tropane analogue (+/-)-SM 21 has a high affinity for sigma2 receptors. *Life sciences*. 1999;64(10):PI131-7.
266. Gilmore DL, Liu Y, Matsumoto RR. Review of the pharmacological and clinical profile of rimcazole. *CNS drug reviews*. 2004;10(1):1-22.
267. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug>.
268. Wilson JJ, Lippard SJ. In vitro anticancer activity of cis-diammineplatinum(II) complexes with β -diketonate leaving group ligands. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(11):5326-36.
269. Jackson RCAT, Glenn R. A Harrap, Kenneth R. , , . Aspects of the biochemical pharmacology of cytembena. *Neoplasma*. 1975;22 3:259-68.
270. Fang J, Zhang Y, Huang L, Jia X, Zhang Q, Zhang X, et al. Cloning and Characterization of the Tetrocarcin A Gene Cluster from *Micromonospora chalicea* NRRL 11289 Reveals a Highly Conserved Strategy for Tetrionate Biosynthesis in Spirotetronate Antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(17):6014-25.
271. Isah T. Anticancer Alkaloids from Trees: Development into Drugs. *Pharmacogn Rev*. 2016;10(20):90-9.
272. Slavik M, Blanc O, Davis J. Spirogermanium: a new investigational drug of novel structure and lack of bone marrow toxicity. *Investigational new drugs*. 1983;1(3):225-34.
273. Hornick JR, Spitzer D, Goedegebuure P, Mach RH, Hawkins WG. Therapeutic targeting of pancreatic cancer utilizing sigma-2 ligands. *Surgery*. 2012;152(3 Suppl 1):S152-6.
274. Iwahashi T, Okochi E, Ono K, Sugawara I, Tsuruo T, Mori S. Establishment of multidrug resistant human colorectal carcinoma HCT-15 cell lines and their properties. *Anticancer research*. 1991;11(3):1309-12.



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Βιογραφικό Σημείωμα

PERSONAL INFORMATION

Evangelia A. Sereti, M.Sc.

Biologist | Ph.D. candidate | Faculty of Medicine, University of Thessaly

📍 63-65, Zoodochou Pigis st., Larisa, 41 447, Greece

☎ +30 2410 685522 📠 +30 6939 253 203

✉ sereti_e@yahoo.gr

Sex: Female | Date of birth: 27/05/1983 | Nationality: Greek

EDUCATION

2013 - today**Ph.D. Candidate**

University of Thessaly | Greece
School of Health Sciences | Faculty of Medicine
Department of Pharmacology

Subject

Sigma receptors: Study of their role in cancer and the development of novel targeted anticancer therapies

2007 - 2010**Master of Science (MSc) in Clinical Biochemistry and Immunology-Microbial Biotechnology**

University of Ioannina | Greece
School of Sciences | Department of Chemistry

Subject

Development and use of a peptide with branched architecture for intracellular transport of bioactive molecules. Applications to the inhibition of platelet aggregation
Grade: 10.00/10.00 ("Excellent")

2001 - 2007**Bachelor degree**

University of Ioannina | Greece
School of Health Sciences | Department of Biological Applications and Technology
Grade: 6.71/10.00 ("Good")

2006 - 2007 Graduation Thesis

University of Ioannina | Greece

School of Health Sciences | Department of Biological Applications and Technology

Laboratory of biotechnology

Subject

Biocatalytic conversion of new antioxidants with applications to food and medicine

Grade: 10.00/10.00 ("Excellent")

PERSONAL SKILLS

Native language Greek**Other language** English | Level C2 | [Certificate of Proficiency in English, University of Michigan](#)**SCHOLARSHIPS**

2019 Scholarship for the participation to the Workshop on Surgical Techniques in the Laboratory Mouse | The Jackson Laboratory

Four day-intensive hands-on Workshop for practical training in Surgical Techniques for the Laboratory Mouse co-organized by The Jackson Laboratory and Sorbonne University

Sorbonne University | Paris, France

2018 Scholarship for the participation to the 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR25)

Amsterdam, Holland

10-01-2017 to 10-03-2017 Scholarship for the participation to the Short Term Scientific Missions (STSM) from COST Action CM1407

During the scholarship a part of my PhD Thesis experiments was performed at the laboratory of Biochemistry

Medical School, Istinye University | Istanbul, Turkey

2016 Scholarship for the participation to the 1st Training School in the context of COST Action CM1407

Belgrade, Serbia

AWARDS

2018 Best oral presentation award in the field of experimental research

31st Panhellenic Surgery Congress, Athens, Greece

Development of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patient –derived xenografts as platforms for novel therapeutic approaches. . **E. Sereti**, D. Magouliotis, T. Karagianellou, N. Sakellaris, D. Zacharoulis, K. Dimas

2016 Best oral presentation award

1st Training School, COST ACTION CM1407, Belgrade, Serbia

Sigma Receptors [sRs]: Study of their role in cancer and the development of new targeted anticancer therapies. **E. Sereti**, C. Tsimplouli, T. Karagiannelou, A. Tsezou, N. Sakellaris, K. Dimas. Abstract book: page 37 (P22).

2016 Best oral presentation award

6th Multidisciplinary Cancer Research Congress, Konya, Turkey

The Plant-Derived Triterpenoid Pristimerin is a Potent Anticancer Agent Due to Its Cytotoxic Activity on Breast Cancer in vitro and in vivo. B. Cevatemre, M. Erkisa, N. Aztopal, Didem Karakaş, P. Alper, C. Tsimplouli, **E. Sereti**, K. Dimas, E. I. Ikitimur Armutak, E. Gurel Gurevin, A. Uvez, M. Mori, S. Berardozi, C. Ingallina, B. Botta, E. Ulukaya. Abstract book: Page 50 (S-005).

PAPERS IN INTERNATIONAL SCIENTIFIC JOURNALS WITH REVIEWERS

- [1] Sereti E, Karagianellou T, Kotsoni I, Magouliotis D, Kamposioras K, Sakellaris N, Zacharoulis D, Dimas K. *Patient Derived Xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer?* Journal of Proteomics (2018), S1874-3919(18)30043-5, I.F. 3,9
- [2] Bilalis P, Skoulas D, Karatzas A, Marakis J, Stamogiannos A, Tsimblouli C, **Sereti E**, Stratikos E, Dimas K, Vlassopoulos D, Iatrou H. Self-Healing pH- and Enzyme Stimuli-Responsive Hydrogels for Targeted Delivery of Gemcitabine to Treat Pancreatic Cancer. Biomacromolecules, 2018, 19 (9), pp 3840–3852, I.F. 5,7
- [3] Milosevic Z, Bankovic J, Dinic J, Tsimplouli C, **Sereti E**, Dragoj M, Paunovic V, Milovanovic Z, Stepanovic M, Tanic N, Dimas K, Pesic M. *Potential of the dual mTOR kinase inhibitor AZD2014 to overcome paclitaxel resistance in anaplastic thyroid carcinoma.* Cellular Oncology (2018), pp 1-18, I.F. 5

- [4] Cevatemre B, Erkisa M, Aztopal N, Karakas D, Alper P, Tsimplouli C, Sereti E, Dimas K, Armutak El, Gurevin EG, Uvez A, Mori M, Berardozi S, Ingallina C, D'Acquarica I, Botta B, Ozpolat B, Ulukaya E. *A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells in vitro and xenografts in vivo through apoptosis and an incomplete autophagy in breast cancer.* Pharmacol Res. (2018), 129:500-514, I.F. 4,4
- [5] Liarou E, Varlas S, Skoulas D, Tsimblouli C, Sereti E, Dimas K, Iatrou H. Smart polymersomes and hydrogels from polypeptide-based polymer systems through amino acid N-carboxyanhydride ring-opening polymerization. From chemistry to biomedical applications. Progress in Polymer Science (2018), pp 28-78, I.F. 26,4
- [6] Yiallouris A, Patrikios I, Johnson E.O, Sereti E, Dimas K, De Ford C, Fedosova N. U, Graier W. F, Sokratous K, Kyriakos K, Stephanou A. Annonacin promotes selective cancer cell death via NKA-dependent and SERCA- dependent pathways. Cell Death and Disease (2018), 9:764, I.F. 8,2
- [7] Dragoj M, Bankovic J, Sereti E, Stojanov SJ, Dimas K, Pesic M, Stankovic T. Anti-invasive effects of CXCR4 and FAK inhibitors in non-small cell lung carcinomas with mutually inactivated p53 and PTEN tumor suppressors. Invest New Drugs (2017), 35(6):718-732, I.F. 2,7

PARTICIPATION IN CONFERENCES (ORAL PRESENTATION)

2018 10th Panhellenic Congress of Hellenic Society of Basic and Clinical Pharmacology
Ioannina, Greece

Sigma receptors expression in pancreatic cancer and efficacy evaluation of their ligands using COMPARE algorithm and Patient Derived Xenografts (PDX)

PARTICIPATION IN CONFERENCES (POSTER PRESENTATION)

2018 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research | Amsterdam, Holland

Sigma Receptors: Their role in cancer and the development of targeted therapies for the treatment of pancreatic cancer using Patient Derived Xenograft (PDX) models. **Sereti E, Tsimplouli C, Karagianellou T, Sakellaridis N, Dimas K.**

2018 10th Panhellenic Congress of Hellenic Society of Basic and Clinical Pharmacology | Ioannina, Greece

Toxicity study of graphene-coated Poly(methyl methacrylate) membranes on the brain cortex of rats. Tsianaka E, **Sereti E**, Papacharalambous C, Ioannou M, Pitsikas N, Dimoulas A, Sakellaridis N, Fountas K, Dimas K.

2017 5th International Multithematic Scientific Bio-Medical Congress | Nicosia, Cyprus

Tripterygium wilfordii promotes selective cell death via a novel Na/K ATP-ase pathway. Patrikios I, Yiallouris A, De ford C, Fedosova N, Graier W.F, Dimas K, **Sereti E**, Stephanou A.

2017 5th International Multithematic Scientific Bio-Medical Congress | Nicosia, Cyprus

Amygdalin extract promotes selective cell death. Patrikios I, Yiallouris A, De ford C, Fedosova N, Graier W.F, Dimas K, **Sereti E**, Socratous K, Stephanou A.

2017 5th International Multithematic Scientific Bio-Medical Congress | Nicosia, Cyprus

Annonasin from Graviola extract promotes selective cancer cell death in vitro and in vivo via NKA and SERCA downregulation pathway. Yiallouris A, Patrikios I, Johnson E. O, Dimas K, **Sereti E**, De ford C, Fedosova N, Graier W.F, Socratous K, Stephanou A.

2016 1st Training School, COST ACTION CM1407 | Belgrade, Serbia

Sigma Receptors [sRs]: Study of their role in cancer and the development of new targeted anticancer therapies. **Sereti E**, Tsimplouli C, Karagiannelou T, Tsezou A, Sakellaridis N, Dimas K.

2016 6th Multidisciplinary Cancer Research Congress | Konya, Turkey

The Plant-Derived Triterpenoid Pristimerin is a Potent Anticancer Agent Due to Its Cytotoxic Activity on Breast Cancer in vitro and in vivo. Cevatemre B, Erkisa M, Aztopal N, Karakaş D, Alper P, Tsimplouli C, **Sereti E**, Dimas K, Armutak E.I, Gurevin E.G, Uvez A, Mori M, Berardozzi S, Ingallina C, Botta B, Ulukaya E.

2016 67th Panhellenic Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology | Ioannina, Greece

Graviola Extract: A non- toxic Compound that Promotes cell death in Cancer Cells. Patrikios I, Yiallouris A, De ford C, Fedosova N, Graier W.F, Dimas K, **Sereti E**, Socratous K, Stephanou A.

2016 67th Panhellenic Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology
| Ioannina, Greece

Targeting mTOR complexes and ribosomal s6 kinases for the development of novel therapies for thyroid cancer. Kotsoni I, Tsesmelis M, Tsimplouli C, **Sereti E**, Sakellaris N, Tsezou A, Dimas K.

2015 EACR-Sponsored 3rd ANTICANCER AGENT | Izmir, Turkey

Patient-derived models of human pancreatic cancer in immunocompromised mice for preclinical drug development. Tsimplouli C, **Sereti E**, Papaparaskeva P, Derveniz C, Zacharoulis D, Karagiannelou T, Tsezou A, Perez S.A, Mahaira G.L, Sakellaris N, Dimas K.

2007 2nd Hellenic Association of Lipids | Ioannina, Greece

Biocatalytic synthesis of derivatives of phenolic compounds with antioxidant action. Katsoura M, Kitsou C, Phillipides A, **Sereti E**, Tsironis L, Tselepis A, Voutsas E, Kolitsis P, Stamatis C.

OTHER CONFERENCES

2006 58th Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology | Ioannina, Greece

2004 56th Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology | Ioannina, Greece

PARTICIPATION IN SCIENTIFIC ASSOCIATIONS

Ambassador of the European Association for Cancer Research (EACR)

PARTICIPATION IN SCIENTIFIC PROGRAMS

2019 - today Novel hydrogels for the active targeting and successful delivery of chemotherapeutics for the treatment of pancreatic cancer (**PANHYDROMED**) | Senior investigator: Ermolaos Iatrou, Professor, Department of Chemistry | National and Kapodistrian University, Athens, Greece

2018 - 2019 EuroNanoMed 2, **NANOGLIO: Nanotechnology Based Immunotherapy for Glioblastoma** | Senior investigator: Costas Demetrios, Professor in Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy | National and Kapodistrian University, Athens, Greece

- 2016 - 2017** **Growth factor and neuropeptide induced intracellular steroidogenesis as a possible resistant mechanism to abiraterone in prostate cancer** | Senior investigator: Papandreou Christos M.D., Ph.D., | Financed by Janssen Pharmaceutical NV
- 2014- 2015** **ARISTEIA 2011 – PANNANOMED** | **Synthesis of multifunctional amphiphilic hybrid polypeptides that form smart drug and gene delivery nanoconstructs against pancreatic cancer** | Senior investigator: Ermolaos Iatrou, Associate Professor, Department of Chemistry | National and Kapodistrian University, Athens, Greece
- 2009** **In vivo investigation of antithrombotic activity of potent peptide inhibitors of platelet aggregation** | Senior investigator: Basilios Tsikaris, Professor, Department of Chemistry | University of Ioannina, Greece

ACADEMIC EDUCATIONAL EXPERIENCE

- 2016 - 2019** Teaching Pharmacology courses to the Postgraduate Master of Science Program titled "Primary Health Care"
Faculty of Medicine | University of Thessaly
- 2014 - 2019** Teaching Pharmacology I & II courses to the Undergraduate medical students
Faculty of Medicine | University of Thessaly
- 2011** Teaching Clinical Chemistry I & III courses to the Undergraduate students
Department of Medical laboratory | Technological Educational Institute of Thessaly
- 2009** Teaching laboratory Organic Chemistry to the Undergraduate students
Department of Chemistry | University of Ioannina

LABORATORY TECHNIQUES

- Cell culture techniques of primary and established cancer cell lines
- Establishment of primary patient derived cancer cell lines
- Anticancer drug screening methodologies (SRB, MTT, ATP assays)
- Western Blotting
- Flow Cytometry
- Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)
- Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS)

- Management and maintenance of immunosuppressed and conventional mouse strains
- Mice handling and restraining
- Orthotopic (pancreas, breast, kidney) and subcutaneous tumor transplantation
- Patient Derived Xenografts (PDX) development
- *In vivo* toxicity and efficacy studies in cancer animal models
- Intraperitoneal and intravenous (tail vein) compound administrations
- Blood collection by submandibular method and cardiac puncture
- Anesthetic and Analgesic preparation
- Surgical procedures in laboratory mice: vasectomy, castration, adrenalectomy, nephrectomy, splenectomy, thymectomy, ovariectomy, ovarian transplantation, jugular vein catheterization



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Δημοσιεύσεις

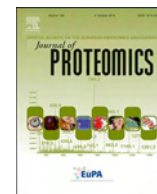
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Ευαγγελία Α. Σερέτη

Παρατίθεται η πρώτη σελίδα για κάθε μία από τις συνολικά 7 δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες σε διεθνή περιοδικά με κριτές, που προέκυψαν απ' την παρουσία μου στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, ως Υποψήφιας Διδάκτορα.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Patient Derived Xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer?

Sereti Evangelia^a, Karagianellou Theodosia^a, Kotsoni Ioanna^a, Magouliotis Dimitrios^{a,b}, Kamposioras Konstantinos^c, Ulukaya Engin^d, Sakellaridis Nikos^a, Zacharoulis Dimitrios^b, Dimas Konstantinos^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece

^b Department of Surgery, University Hospital of Larissa, Larissa, Greece

^c Department of Medical Oncology, The Mid Yorkshire Hospitals NHS Trust, Wakefield, United Kingdom

^d Istinye University, Faculty of Medicine, Department of Clinical Biochemistry, Istanbul, Turkey

ARTICLE INFO

Keywords:

Pancreatic ductal adenocarcinoma
Patient Derived Xenografts
Biomarkers
Drug discovery
Personalized medicine

ABSTRACT

The prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the eighth most lethal cancer for men and ninth for women worldwide, remains dismal. The increasing rates of deaths by PDAC indicate that the overall management of the disease in 21st century is still insufficient. Thus it is obvious that there is an unmet need to improve management of PDAC by finding new biomarkers to screen high risk patients, confirm diagnosis, and predict response to treatment as well more efficacious and safer treatments. Patient Derived Xenografts (PDX) have been developed as a new promising tool in an effort to mirror genetics, tumor heterogeneity and cancer micro-environment of the primary tumor. Herein we aim to give an updated overview of the current status and the perspectives of PDX in the search for the identification of novel biomarkers and improved therapeutic outcomes for PDAC but also their use as a valuable tool towards individualized treatments to improve the outcome of the disease. Furthermore, we critically review the applications, advantages, limitations, and perspectives of PDX in the research towards an improved management of PDAC.

Significance: This review provides a comprehensive overview of the current status and the potential role as well as the challenges of PDX in the road to fight one of the most lethal cancers in the developed countries, pancreatic ductal adenocarcinoma.

1. Introduction

Pancreatic cancer is the eighth most common cause of cancer death for men and ninth for women worldwide [1] with an incidence of approximately 1–10/100.000 men and women per year. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) represents 85% of all cases of pancreatic cancer [2]. Smoking cessation, diabetes mellitus, obesity along with genetic predisposition are certain risk factors incriminated for the development of PDAC [3–6]. Despite the constant efforts to develop novel diagnostic tools and treatment approaches, it is projected that PDAC will rise to second most common cause of cancer death by 2030 [7].

Transcriptional profiling of pancreatic tumor tissues revealed the existence of three subtypes of PDAC termed classical, quasimesenchymal (QM-PDA) and exocrine-like with therapeutic response differences between them [8]. However, screening a large panel of pancreatic cell lines, researchers identify the existence only of classical and QM-PDA

subtypes suggesting an inadequately representation of the PDAC heterogeneity by the currently used PDAC cell lines [9].

Human cancer cell lines and animal cancer models derived from these cell lines (xenografts) are widely used in translational research. Among other pitfalls, they show limited potential to mirror the actual tumor microenvironment, intratumoral clonal heterogeneity and human stromal properties [10], parameters that greatly affect tumor invasion [11], tumor migration [12], recurrence [13] and drug resistance [14]. As an alternative, Patient Derived Xenografts (PDX) developed by the engraftment of patients' excised tumors directly into immune-deficient animal models have been developed as novel pre-clinical tools that could achieve greater resemblance to human cancer genetics, tumor heterogeneity and microenvironment [15,16]. As the number of studies assessing the feasibility of PDX increases, it is necessary to examine whether these preclinical models are more reliable and efficient compared to traditional methods. Thus, the purpose of this

* Corresponding author.

E-mail address: kdimas@med.uth.gr (K. Dimas).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.01.012>

Received 15 October 2017; Received in revised form 10 January 2018; Accepted 19 January 2018
1874-3919/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

Article

Self-Healing pH- and Enzyme Stimuli-Responsive Hydrogels for Targeted Delivery of Gemcitabine to Treat Pancreatic Cancer

Panayiotis Bilalis, Dimitrios Skoulas, Anastasios Karatzas, John Marakis, Athanasios Stamogiannos, Chrisida Tsimblouli, Evangelia Sereti, Efstratios Stratikos, Konstantinos Dimas, Dimitris Vlassopoulos, and Hermis Iatrou

Biomacromolecules, **Just Accepted Manuscript** • DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00959 • Publication Date (Web): 10 Aug 2018

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on August 11, 2018

Just Accepted

"Just Accepted" manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides "Just Accepted" as a service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. "Just Accepted" manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. "Just Accepted" manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are citable by the Digital Object Identifier (DOI®). "Just Accepted" is an optional service offered to authors. Therefore, the "Just Accepted" Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the "Just Accepted" Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these "Just Accepted" manuscripts.



ACS Publications

is published by the American Chemical Society, 1155 Sixteenth Street N.W., Washington, DC 20036

Published by American Chemical Society. Copyright © American Chemical Society.

However, no copyright claim is made to original U.S. Government works, or works produced by employees of any Commonwealth realm Crown government in the course of their duties.

ARTICLE

Open Access

Annonacin promotes selective cancer cell death via NKA-dependent and SERCA-dependent pathways

Andreas Yiallouris^{1,2}, Ioannis Patrikios¹, Elizabeth O. Johnson^{1,2}, Evangelia Sereti³, Konstantinos Dimas³, Cristian De Ford⁴, Natalia U. Fedosova⁵, Wolfgang F. Graier⁶, Kleitos Sokratous⁷, Kyriakos Kyriakou⁷ and Anastasis Stephanou¹

Abstract

In the healthcare sector, phytochemicals are known to be beneficial by contributing or alleviating a variety of diseases. Studies have demonstrated the progressive effects of phytochemicals on immune-related diseases and to exhibit anticancer effects. *Graviola* tree is an evergreen tree with its extracts (leaves and seeds) been reported having anticancer properties, but the precise target of action is not clear. Using an in silico approach, we predicted that annonacin, an *Acetogenin*, the active agent found in *Graviola* leaf extract (GLE) to potentially act as a novel inhibitor of both sodium/potassium (NKA) and sarcoplasmic reticulum (SERCA) ATPase pumps. We were able to validate and confirm the in silico studies by showing that GLE inhibited NKA and SERCA activity in intact cells. In the present study, we also demonstrated the antiproliferative and anticancer effects of GLE in a variety of cancer cell lines with limited toxic effects on non-transformed cells. Moreover, our results revealed that known inhibitors of both NKA and SERCA pumps could also promote cell death in several cancer cell lines. In addition, a mouse xenograft cancer model showed GLE as able to reduce tumor size and progression. Finally, bioprofiling studies indicated a strong correlation between overexpression of both NKA and SERCA gene expression vs. survival rates. Overall, our results demonstrated that GLE can promote selective cancer cell death via inhibiting NKA and SERCA, and thus can be considered as a potential novel treatment for cancer. After molecular analysis of GLE by liquid chromatography–mass spectrometry and ESI–QTOF–MS analysis, it was found that the MS spectrum of the high abundant chromatographic peak purified sample highly consisted of annonacin.

Introduction

Graviola, *Soursop*, *Guanabana*, *Brazilian Paw Paw*, and *Annona muricata* are names of an evergreen tree comprising 130 genera and 2300 species^{1,2} discovered in South and North America's rainforest³. The specific *Graviola* tree extracts from leaves and/or native population to treat various diseases and illnesses have used seeds. The molecules

extracted from *Graviola* tree leaves and/or seeds, known as *Acetogenins* are molecules with approximately 35–37 carbon atoms that have been described to be associated with anticancer properties against various cancer cell lines, including multidrug-resistant cancer cell lines^{4–6}. The exact cellular targets and the way of action of *Acetogenins* are still unclear. Recent studies show that annonacin, an *Acetogenin*, promotes cytotoxicity via a pathway inhibiting the mitochondrial complex I⁷. Others have reported that the anti-tumor activity of *Graviola* leaf extract (GLE) may be attributed to the downregulation of the epidermal growth factor receptor^{8–10}. GLE has also been reported to inhibit multiple metastatic and signaling pathways and to induce

Correspondence: Ioannis Patrikios (i.patrikios@euc.ac.cy) or Anastasis Stephanou (a.stephanou@euc.ac.cy)

¹School of Medicine, European University Cyprus, Nicosia, Cyprus

²School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Full list of author information is available at the end of the article.

Edited by G. Melino

© The Author(s) 2018



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



Smart polymersomes and hydrogels from polypeptide-based polymer systems through α -amino acid *N*-carboxyanhydride ring-opening polymerization. From chemistry to biomedical applications

Evelina Liarou^a, Spyridon Varlas^a, Dimitrios Skoulas^a, Chrisida Tsimblouli^b,
Evangelia Sereti^b, Konstantinos Dimas^b, Hermis Iatrou^{a,*}

^a University of Athens, Department of Chemistry, Panepistimiopolis, Zografou, 15771, Athens, Greece

^b University of Thessaly, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, 41500, Larissa, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2017

Received in revised form 3 April 2018

Accepted 7 May 2018

Available online 9 May 2018

ABSTRACT

The synthesis of smart stimuli-responsive polymeric materials for nanomedicine applications has attracted the interest of a large number of scientists that focuses on the effective encapsulation of pharmaceutical compounds and control of their biodistribution. The development of multifunctional polymeric materials is mainly guided by the goal of achieving active compounds which selectively target the

Abbreviations: ADSCs, adipose derived stem cells; AFM, atomic force microscopy; AG, L/DL-allylglycine; AIBN, 2,2'-azobisisobutyronitrile; Ala, alanine; ATR-FTIR, attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy; ATRP, atom transfer radical polymerization; α -CD, α -cyclodextrin hydrate; BLG-NCA, γ -benzyl-L-glutamate *N*-carboxyanhydride; BLL, *tert*-butyloxycarbonyl-L-lysine; BOC, *tert*-butyloxycarbonyl; BLL-NCA, Boc-L-lysine *N*-carboxyanhydride; BpyNiCOD, 2,2'-bipyridyl-Ni(1.5-cyclooctadiene); BSA, bovine serum albumin; CA4, hydrophobic combretastatin A4; CDDP, cisplatin (*cis*-diammine dichloridoplatinum(II)); CGC, critical gelation concentration; CL, ϵ -caprolactone; CLSM, confocal laser scanning microscopy; CMC, critical micelle concentration; CP, cloud point; CPT, camptothecin; CS, chitosan; Cys, cysteine; DBTDL, di-*n*-butyltin dilaurate; DCC, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide; DCH, diblock copolypeptide hydrogels; DDS, drug delivery systems; DHBC, double hydrophilic block copolymers; DIPA, diisopropyl amine; DLS, dynamic laser scattering; DMF, *N,N*-dimethyl formamide; DMPA, 2,2'-dimethoxy-2-phenylacetonephenone; DMSO, dimethyl sulfoxide; DOC, docetaxel; DOPA, 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine; DOPC, dioleoylphosphatidylcholine; DOX, doxorubicin; DOX-HCl, doxorubicin hydrochloride; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGFRs, epidermal growth factor receptors; ELG, γ -ethyl-L-glutamate; E₆₀L₂₀, poly(L-glutamic acid)-*b*-poly(L-leucine); FA, folic acid; FITC-albumin, albumin-fluorescein isothiocyanate conjugate; FMO, fluorenylmethyloxycarbonyl chloride; FTIR, fourier transform infrared spectroscopy; Gly, glycine; GSH, glutathione; HEMA, 2-hydroxyethyl methacrylate; hGH, human growth hormone; HMDI, hexamethylene diisocyanate; HMDS, hexamethyldisilazane; ¹H NMR, proton nuclear magnetic resonance; HYA, hyaluronan; HPLC, high-performance liquid chromatography; HPR, horseradish peroxidase; IL-15, interleukin-15; K_xL_y, poly(L-lysine)-*b*-poly(L-leucine); L-EG₂Glu NCA, γ -(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-L-glutamate *N*-carboxyanhydride; LCST, low critical solution temperature; LSCM, laser scanning confocal microscopy; Leu, leucine; LL, Lysine; MALDI-TOF MS, matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; MMP-12, matrix metalloproteinase-12; MNPs, magnetic nanoparticles; mPEG-NH₂, α -methoxy- ω -amino poly(ethylene glycol); mPEG-*b*-PLAF, methoxy poly(ethylene glycol)-*block*-poly(L-alanine-co-L-phenylalanine); MRI, magnetic resonance imaging; MSA, methanesulfonic acid; MSR, methionine sulfoxide reductase A and B; NCA, *N*-carboxyanhydride; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; NSCLC, non-small cell lung cancer; Npx, naproxen; OEG, monomethoxy oligo(ethylene glycol); PA, poly(alanine); PLAF, poly(alanine)-*b*-poly(phenylalanine); P(AA), poly(L-aspartic acid); pDNA, plasmid DNA; PAMA, poly(2-aminoethyl methacrylate hydrochloride); PB_n-*b*-PLGA_p, poly(butadiene)-*b*-poly(glutamic acid); PBLG-*b*-HYA, poly(γ -benzyl-L-glutamate)-*b*-hyaluronan; PBS, phosphate-buffered saline; PCL, poly(ϵ -caprolactone); PDA, 1,3-propane diamine; PDI, polydispersity index; PDMAEMA, poly(dimethylaminoethyl methacrylate); PEG, poly(ethylene glycol); mPEGA, poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate; PEG-ASG, PEG-amide succinimidyl glutarate; PEG-DOX, poly(ethylene glycol)-doxorubicin conjugate; PEG-MA, poly(ethylene glycol) methacrylate; PEG-*b*-PAF, poly(ethylene glycol)-*b*-poly(alanine-co-phenyl alanine); PEG(SH)₄, star PEG-thiol; PEG-SS-P(Asp), poly(ethylene glycol)-SS-poly(L-aspartic acid); PEG-SS-P(Asp(DET)), poly(ethylene glycol)-SS-poly([N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]- α , β -aspartamide); PELG, poly(γ -ethyl-L-glutamate); PGA, poly(glycolic acid); PGLY, poly(glycine); Phe, phenylalanine; PHEG, poly[N5-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine]; Pht-Lys, phthaloyl-L-lysine; PICmicelle, polyion complex-based micelle; PICsome, polyion complex-based vesicle; PLA, polylactic acid; PLeu, poly(L-leucine); PLH, poly(L-lysine)-*g*-hexanoyl; PLHG, poly(L-lysine)-*g*-hexanoyl-*g*-lactobionolactone; PLGA, poly(L-glutamic acid); PLL, poly(L-lysine); PLL-CA, cholate grafted poly(L-lysine); PMLG, poly(γ -methyl L-glutamate); P(MPC), poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine); PMPI, 4-(maleinimido)phenyl isocyanate; PNBL, poly(o-nitrobenzyloxycarbonyl-L-lysine); PNIPAM, poly(*N*-isopropylacrylamide); PNIPAM-*b*-PZLL, poly(*N*-isopropylacrylamide)-*b*-poly(Z-L-lysine); POPS, palmityloleoyl phosphatidylserine; PPLG, poly(γ -propargyl-L-glutamate); PPO-PK, poly(propylene oxide)-*b*-poly(L-lysine); PTMC-*b*-PLGA, poly(trimethylene carbonate)-*b*-poly(glutamic acid); PTX, paclitaxel; PLT, Poly(L-tyrosine); PVCL, poly(*N*-vinylcaprolactam); PVGLIG, proline-valine-glycine-leucine-isoleucine-glycine; RGD, arginylglycylaspartic acid; ROP, ring-opening polymerization; SANS, small angle neutron scattering; SAXS, small-angle X-ray scattering; SCFT, self-consistent field theory; SEC, size-exclusion chromatography; SEM, scanning electron microscopy; siRNA, small interfering RNA *s*-*tert*-butylmercapto-L-cysteine STBM-L-cysteine; TA, tyramine; TBDMS, *tert*-butyldimethylsilane; TEM, transmission electron microscopy; Tf, transferrin; TMPS, 1,1,1-trimethyl-*N*-2-propenylsilanamine; TMSCs, tonsil tissue-derived mesenchymal stem cells; Tyr, tyrosine; USANS, ultra small angle neutron scattering; Ver, verapamil; VP, 1-vinyl-2-pyrrolidone; VS, divinyl sulfone; UV-vis, ultra-violet/visible light; WAXS, wide-angle X-ray scattering; Z, azobenzene; Z protecting group, carboxybenzyl protecting group; ZLL, ϵ -benzyloxycarbonyl-L-lysine.

* Corresponding author.

E-mail address: iatrou@chem.uoa.gr (H. Iatrou).



Potential of the dual mTOR kinase inhibitor AZD2014 to overcome paclitaxel resistance in anaplastic thyroid carcinoma

Zorica Milošević¹ · Jasna Banković¹ · Jelena Dinić¹ · Chrsiida Tsimplouli² · Evangelia Sereti² · Miodrag Dragoj¹ · Verica Paunović³ · Zorka Milovanović⁴ · Marija Stepanović¹ · Nikola Tanić¹ · Kostantinos Dimas² · Milica Pešić¹ 

Accepted: 23 April 2018
© International Society for Cellular Oncology 2018

Abstract

Purpose Anaplastic thyroid carcinoma (ATC) is an aggressive, chemo-resistant malignancy. Chemo-resistance is often associated with changes in activity of the RAS/MAPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways and/or a high expression of ATP binding cassette (ABC) transporters, such as P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP). To assess the therapeutic efficacy in ATC of a combination of the dual mTOR kinase inhibitor vistusertib (AZD2014) and paclitaxel (PTX), we generated a new cell line (Rho-) via the selection of human thyroid carcinoma 8505C cells that exhibit a low accumulation of rhodamine 123, which serves as a P-gp and BCRP substrate.

Methods Immunohistochemistry was used for P-gp and BCRP expression analyses in primary ATC patient samples. Spheroid formation and immunodeficient NSG mice were used for performing in vitro and in vivo tumorigenicity assays, respectively. MTT, flow-cytometry, fluorescent microscopy, cell death and proliferation assays, as well as migration, invasion and gelatin degradation assays, were used to assess the potential of AZD2014 to enhance the effects of PTX. ATC xenografts in SCID mice were used for evaluating in vivo treatment efficacies.

Results Rho- cells were found to be 10-fold more resistant to PTX than 8505C cells and, in addition, to be more tumorigenic. We also found that AZD2014 sensitized Rho- cells to PTX by inhibiting proliferation and by inducing autophagy. The combined use of AZD2014 and PTX efficiently inhibited in vitro ATC cell migration and invasion. Subsequent in vivo xenograft studies indicated that the AZD2014 and PTX combination effectively suppressed ATC tumor growth.

Conclusions Our data support results from recent phase I clinical trials using combinations of AZD2014 and PTX for the treatment of solid tumors. Such combinations may also be employed for the design of novel targeted ATC treatment strategies.

Keywords Anaplastic thyroid carcinoma · mTOR · AZD2014 · Paclitaxel · Chemo-resistance · Targeted therapy

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13402-018-0380-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Milica Pešić
camala@ibiss.bg.ac.rs

- ¹ Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade, Despota Stefana 142, Belgrade 11060, Serbia
- ² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, 41110 Larissa, Greece
- ³ Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Belgrade, Dr. Subotića 1, Belgrade 11000, Serbia
- ⁴ Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, Belgrade 11000, Serbia

1 Introduction

Anaplastic thyroid carcinoma (ATC), one of the most aggressive human malignancies, has a very poor prognosis. The overall median survival is limited to months [1]. Although ATC accounts for only 0.8% of all thyroid cancers, its disease-specific mortality approaches 100% [2, 3]. It has been found that surgery, radiotherapy and chemotherapy fail to significantly improve the survival of patients [4]. Current chemotherapy protocols include doxorubicin (DOX) and paclitaxel (PTX), whereas cisplatin (CpT) has been removed from them [5]. To improve the clinical outcome, it is important to explore more thoroughly the molecular mechanisms underlying ATC development. As more of these data become available, more targeted drugs may be considered for therapy. To this end,

Accepted Manuscript

Title: A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells *in vitro* and xenografts *in vivo* through apoptosis and an incomplete autophagy in breast cancer



Authors: Buse Cevatemre, Merve Erkisa, Nazlihan Aztopal, Didem Karakas, Pinar Alper, Chrsiida Tsimplouli, Evangelia Sereti, Konstantinos Dimas, Elif I. Ikitimur Armutak, Ebru Gurel Gurevin, Ayca Uvez, Mattia Mori, Simone Berardozzi, Cinzia Ingallina, Ilaria D'Acquarica, Bruno Botta, Bulent Ozpolat, Engin Ulukaya

PII: S1043-6618(17)30993-3
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.027>
Reference: YPHRS 3742


To appear in: *Pharmacological Research*

Received date: 5-8-2017
Revised date: 22-11-2017
Accepted date: 22-11-2017

Please cite this article as: Cevatemre Buse, Erkisa Merve, Aztopal Nazlihan, Karakas Didem, Alper Pinar, Tsimplouli Chrsiida, Sereti Evangelia, Dimas Konstantinos, Armutak Elif I Ikitimur, Gurevin Ebru Gurel, Uvez Ayca, Mori Mattia, Berardozzi Simone, Ingallina Cinzia, D'Acquarica Ilaria, Botta Bruno, Ozpolat Bulent, Ulukaya Engin. A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells *in vitro* and xenografts *in vivo* through apoptosis and an incomplete autophagy in breast cancer. *Pharmacological Research* <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.027>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Anti-invasive effects of CXCR4 and FAK inhibitors in non-small cell lung carcinomas with mutually inactivated p53 and PTEN tumor suppressors

Miodrag Dragoj¹ · Jasna Bankovic¹ · Evangelia Sereti² · Sofija Jovanovic Stojanov¹ · Konstantinos Dimas² · Milica Pesic¹ · Tijana Stankovic¹ 

Received: 10 May 2017 / Accepted: 13 July 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Summary Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) is the most common type of lung cancer. At the time of diagnosis, a large percentage of NSCLC patients have already developed metastasis, responsible for extremely high mortality rates. CXCR4 receptor and focal adhesion kinase (FAK) are known to regulate such invasive cancer behavior. Their expression is downregulated by p53 and PTEN tumor suppressors which are commonly co-inactivated in NSCLC patients and contribute to metastasis. Therefore, targeting CXCR4 or FAK seems to be a promising strategy in suppressing metastatic spread of p53/PTEN deficient NSCLCs. In this study, we first examined the invasive characteristics of NSCLC cells with suppressed p53 and PTEN activity using wound healing, gelatin degradation and invasion assays. Further, changes in the expression of CXCR4 and FAK were evaluated by RT-qPCR and Western Blot analysis. Finally, we tested the ability of CXCR4 and FAK inhibitors (WZ811 and PF-573228, respectively) to suppress the migratory and invasive potential of p53/PTEN deficient NSCLC cells, in vitro and in vivo using metastatic models of human NSCLC. Our results showed that cells with mutually inactive p53 and PTEN have significantly increased invasive potential associated with hyperactivation of CXCR4 and FAK signaling pathways. Treatments with WZ811 and

PF-573228 inhibitors significantly reduced migratory and invasive capacity in vitro and showed a trend of improved survival in vivo. Accordingly, we demonstrated that p53/PTEN deficient NSCLCs have extremely invasive phenotype and provided a rationale for the use of CXCR4 or FAK inhibitors for the suppression of NSCLC dissemination.

Keywords CXCR4 · FAK · PTEN · p53 · Invasion · Non-small cell lung carcinoma

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide with less than 18% 5-year patient survival rate [1]. At the time of diagnosis, about 70% of lung cancer patients are already at the advanced stage with metastases [2]. Even when diagnosed at the earliest stage, most of the patients already have micro-metastases [3]. Such frequent presence of lung cancer metastases significantly affects efficiency of conventional therapies and it is a major cause of treatment failure and high mortality rate associated with lung cancer [4]. Therefore, in the era of developing personalized cancer treatments, special efforts are focused on identifying novel targeted NSCLC therapies that could also interfere with the process of metastasis [5].

Cancer cells with higher ability to metastasize are often characterized by altered expression of different marker proteins involved in adhesion, migration and invasion, such as CXCR4, FAK, and their related signaling molecules [6]. Chemokine receptor, CXCR4, is highly overexpressed in NSCLC and plays an important role in its pathogenesis, as well as in metastasis [7, 8]. CXCR4 exerts its biological effects, at least partially, by activating downstream phosphorylation of FAK, one of the key molecules in regulating cell

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10637-017-0494-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Tijana Stankovic
tijana.andjelkovic@ibiss.bg.ac.rs

¹ Department of Neurobiology, University of Belgrade, Institute for Biological Research “Sinisa Stankovic”, Bulevar Despota Stefana 142, Belgrade 11060, Serbia

² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, 41110 Larissa, Greece

