



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**IN VITRO ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ ΜΙΚΡΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ: ΒΕΝΖΟΞΑΖΙΝΕΣ**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΛΕΤΣΑ, ΚΥΡΙΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ

**ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΖΩΤΟΥ
Α.Μ. 00037
ΑΘΗΝΑ, 2019**



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



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN
BIOENTREPRENEURSHIP**



MASTER THESIS

**IN VITRO BIOLOGICAL ASSESSMENT OF POTENTIAL ANTICANCER EFFECT OF
SMALL ORGANIC COMPOUNDS: BENZOOXAZINES**

SUPERVISOR: VASILIKI PLETSΑ, SENIOR RESEARCHER

**MARIANNA ZOTOU
R.N. 00037
ATHENS, 2019**

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

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Β. Πλέτσα	Κύρια Ερευνήτρια	
Π. Γεωργιάδης	Κύριος Ερευνητής	
Θ. Καλογεροπούλου	Διευθύντρια Ερευνών	

Στους γονείς μου...

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ	4
ΣΚΟΠΟΣ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 <i>In vitro</i> μελέτες έναντι <i>in vivo</i> μελετών τοξικότητας.....	6
1.2 <i>In vitro</i> βιολογική αποτίμηση ενδεχόμενης αντικαρκινικής δράσης των βενζοξαζινών – Κριτήρια επιλογής.....	7
1.2.1 Χημική δομή-Φαρμακοφόρος.....	7
1.2.2 Βιολογικές δράσεις.....	9
1.3 Επιλογή κυτταρικών σειρών.....	13
1.4 <i>In silico</i> τεχνικές σχεδιασμού φαρμάκων - Ο ρόλος της κινάσης BRAF.....	13
1.5 Μελέτες βιωσιμότητας σε κύτταρα.....	14
1.5.1 Μέθοδος MTT.....	15
1.5.2 Μέθοδος ΧΤΤ.....	16
1.5.3 Μέθοδος LDH.....	17
1.6 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου.....	18
1.6.1 Απόπτωση.....	19
1.6.2 Κασπάσες.....	20
1.6.3 Νέκρωση.....	20
1.6.4 Προγραμματισμένη νέκρωση - Νεκρόπτωση.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1 Χημικά αντιδραστήρια.....	22
2.2 Χημικές ενώσεις.....	23
2.3 Κυτταρικές σειρές.....	24
2.3.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	25
2.4 Μοριακή Πρόσδεση (<i>In Silico</i> Docking).....	26
2.4.1 Επικύρωση μεθόδου μοριακής πρόσδεσης.....	28
2.5 Μεθοδολογία MTT.....	30

2.5.1 Δοκιμασία MTT για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα	30
2.5.2 Δοκιμασία MTT για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα	32
2.6 Μεθοδολογία ΧΤΤ	33
2.6.1 Προετοιμασία του αντιδραστηρίου	33
2.6.2 Δοκιμασία ΧΤΤ για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα.....	33
2.6.3 Δοκιμασία ΧΤΤ για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα.....	35
2.7 Μεθοδολογία LDH	36
2.7.1 Σύνοψη διαδικασίας	36
2.7.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων.....	37
2.7.3 Προσδιορισμός του βέλτιστου αριθμού κυττάρων για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας LDH	37
2.7.4 Δοκιμασία LDH για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα	40
2.7.5 Δοκιμασία LDH για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα	42
2.8 Ανίχνευση πρωτεϊνών-δεικτών κυτταρικού θανάτου με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	44
2.8.1 Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών	44
2.8.2 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.....	44
2.8.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) .	45
2.8.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης	46
2.8.5 Εμφάνιση συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος.....	47
2.8.6 Αντισώματα	48
2.9 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	48
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
3.1 Μοριακή Πρόσδεση (In Silico Docking).....	50
3.2 Σύγκριση <i>in vitro</i> μεθοδολογιών κυτταρικής βιωσιμότητας με πρότυπη ουσία.....	54
3.3 Βιολογική αποτίμηση των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων <i>in vitro</i>	57
3.4 Προσδιορισμός μηχανισμού κυτταρικού θανάτου με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά WESTERN	65
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λόγω της ευρείας γκάμας φαρμακολογικών ιδιοτήτων που εμφανίζουν τα παράγωγα της 1,4-βενζοξαζίνης, κεντρίζουν το ενδιαφέρον για τη σύνθεση και βιολογική αποτίμησή τους με στόχο την ανάπτυξη νέων δυνητικών φαρμάκων. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η ενδεχόμενη αντικαρκινική δράση *in vitro* μιας σειράς 1,4-βενζοξαζινικών παραγώγων σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων παχέος εντέρου (HCT 116), ήπατος (Hep G2), μελανώματος (WM 164), αδενοκαρκινώματος προστάτη (PC-3), αδενοκαρκινώματος μαστού (MDA-MB 231), οστεοσαρκώματος (U2-OS) και πνεύμονα (A 549). Για συγκριτικούς σκοπούς, χρησιμοποιήθηκαν και οι φυσιολογικοί ινοβλάστες ανθρώπινου πνεύμονα εμβρύου HLF-1. Η επίδραση των ενώσεων στην κυτταρική βιωσιμότητα ανιχνεύθηκε με τις δοκιμασίες ΧΤΤ και ΜΤΤ, οι οποίες μετρούν τη μεταβολική ενεργότητα των κυττάρων. Ενώ σε επιλεγμένες ενώσεις ανιχνεύθηκε η κυτταροτοξικότητα μετρώντας την απελευθέρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης από τα λυμένα κύτταρα στο μέσο κυτταροκαλλιέργειας (LDH). Βρέθηκε μία γενικευμένη δραστικότητα όσον αφορά την κυτταροστατική δράση των ενώσεων σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ παράλληλα δεν έδειξαν τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα του πνεύμονα, που αποτελεί μια ένδειξη εκλεκτικότητας των ενώσεων έναντι μόνο των καρκινικών κυττάρων. Οι ενώσεις που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αντι-πολλαπλασιαστική δράση (μικρότερη IC_{50}) ήταν οι TC 321 και TC 419, ενώ μάλιστα η κυτταρική βιωσιμότητα μειωνόταν δραστικά με την προσθήκη μιας μεθόξυ-ομάδας (TC 419). Παράλληλα αποδείχθηκε ότι η ελεύθερη υδροξυλομάδα του τελευταίου βενζολικού δακτυλίου των ενώσεων είναι απαραίτητη για την εμφάνιση της κυτταροστατικής/κυτταροτοξικής δράσης. Τέλος, βρέθηκε ότι η απόπτωση εμπλέκεται στο μηχανισμό κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την ένωση TC 321 στα κύτταρα του ηπατοκαρκινώματος.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:

Βενζοξαζίνες, Ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, Κυτταρική βιωσιμότητα, Κυτταροτοξικότητα, Αντικαρκινική δράση, ΧΤΤ.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η *in vitro* βιολογική αποτίμηση μιας σειράς 1,4-βενζοξαζιλικών παραγώγων, οι οποίες συντέθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας (ΙΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Κατά τη διάρκεια της υλοποίησης της εργασίας στο Πρόγραμμα Χημικής Καρκινογένεσης και Γενετικής Τοξικολογίας, διερευνήθηκε η ενδεχόμενη αντικαρκινική δράση των παραγώγων αυτών σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών προερχόμενων από συμπαγείς όγκους και πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της δομής και της δραστηριότητας των ενώσεων (SAR), με σκοπό τη βελτίωση της κυτταροτοξικής δράσης. Παράλληλα, έγιναν οι πρώτες προσπάθειες αποσαφήνισης του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου που επάγουν επιλεγμένες ενώσεις.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *In vitro* μελέτες έναντι *in vivo* μελετών τοξικότητας

Μέχρι να διαγνωστούν πολλοί κοινοί τύποι καρκίνων είναι ήδη απειλητικοί για τη ζωή και παρόλο που σε πολλές περιπτώσεις η αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου παράγει σημαντικά οφέλη, μπορεί να έχει μικρή ευεργετική επίδραση στο προσδόκιμο ζωής. Από την εισαγωγή των κυτταροτοξικών παραγόντων για συστηματική θεραπεία της νόσου υπήρξε σημαντική βελτίωση της επιβίωσης για πολλούς καρκινοπαθείς. Ωστόσο, οι αριθμοί εξακολουθούν να δείχνουν ότι για πολλούς συμπαγείς όγκους αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει, στην καλύτερη περίπτωση, μια βελτίωση του προσδόκιμου, 2-3 ετών, και το όφελος αυτό πρέπει επίσης να αντισταθμιστεί με τις δυσάρεστες ή ακόμα και επικίνδυνες παρενέργειες. Υπάρχει λοιπόν μια επιτακτική ανάγκη για ανάπτυξη αποτελεσματικότερων και λιγότερο τοξικών θεραπειών για τον καρκίνο.

Ιστορικά, η ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων ήταν σε μεγάλο βαθμό μια εμπειρική διαδικασία, με νέες χημικές ενώσεις να εξετάζονται σε διάφορες κυτταρικές σειρές και πειραματικούς όγκους σε ζώα που αντιστοιχούν σε ανθρώπινους γνωστούς καρκίνους. Η πλειονότητα των παραγόντων που εντοπίστηκαν με αυτή τη διαδικασία ήταν «κυτταροτοξικοί», αλλά είχαν την τάση να είναι ενεργοί στην «μέγιστη ανεκτή δόση». Οι κανονισμοί πάντα απαιτούσαν δοκιμές τοξικότητας πριν από τις κλινικές δοκιμές. Ωστόσο, λόγω των γνωστών κυτταροτοξικών ιδιοτήτων πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων, οι απαιτήσεις για εκτεταμένη προκλινική τοξικολογία στην ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων είναι υπερβολικές, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή κλινική τους χρήση. Παρόλο που υπάρχει κάποια τεκμηρίωση ως προς τον προσδιορισμό της οξείας τοξικότητας και της μέγιστης ανεκτής δόσης ως οδηγό για μια ασφαλή αρχική δόση σε κλινικές δοκιμές, οι μελέτες χρόνιας τοξικότητας είναι πιο δύσκολο να τεκμηριωθούν.

Δεν υπάρχει καμία τεκμηρίωση για τις σημερινές απαιτήσεις για προκλινικές τοξικολογικές δοκιμές αντικαρκινικών παραγόντων χρησιμοποιώντας μη τρωκτικά μοντέλα και εκτεταμένες χρόνιες μελέτες. Διαπιστώθηκε ότι όσον αφορά μια ασφαλή αρχική δόση και τα συνήθη δολογικά όρια τοξικότητας, η τοξικολογία μόνο στα τρωκτικά είδη είναι ένας ασφαλής και γρήγορος τρόπος για να προχωρήσουν νέοι παράγοντες στις κλινικές δοκιμές φάσης Ι. Για

τους μελλοντικούς παράγοντες που θα είναι πιο εκλεκτικοί έναντι των καρκινικών κυττάρων, θα χρειαστεί σοβαρή επανεκτίμηση της σημασίας των προκλινικών δοκιμών τοξικότητας.

Αν δεν υπάρξει αναθεώρηση από τους ρυθμιστικούς φορείς, οι τρέχουσες απαιτήσεις για προκλινική τοξικολογία θα καθυστερούν τη χρήση των νέων θεραπειών στην κλινική πράξη. Πρέπει να είναι ανήθικη η απερισκεψία που αφορά την άσκοπη ταλαιπωρία των ζώων και την άρνηση στους καρκινοπαθείς της πρόσβασης σε πιο αποτελεσματικές θεραπείες. Σε τελική ανάλυση, η αποτελεσματικότητα οποιασδήποτε νέας θεραπείας μπορεί να προσδιοριστεί μόνο στην κλινική πράξη, στο εργαστήριο είναι δυνατή μόνον η προσπάθεια για μοντελοποίηση της κλινικής ασθένειας (Double *et al.*, 2002).

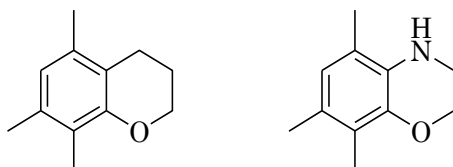
Ποιές είναι όμως οι εναλλακτικές; Υπάρχει μια ιδέα προς τα που κινείται η επιστήμη της τοξικολογίας. Οι δοκιμές σε ζώα παρέχουν προκλινικές πληροφορίες σχετικές με τους δυνητικούς κινδύνους για την υγεία, καθώς και τον καθορισμό μιας ασφαλούς αρχικής δόσης για μελέτες σε ανθρώπους. Το Multicentre Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity programme διαπίστωσε ότι ενώ οι δοκιμές οξείας τοξικότητας σε τρωκτικά ήταν ακριβείς μόνο κατά 65% στην πρόβλεψη των θανατηφόρων συγκεντρώσεων στο αίμα ανθρώπων, ένας συνδυασμός *in vitro* δοκιμών κυτταροκαλλιέργειας από κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης, προέβλεπε την οξεία τοξικότητα με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια. 29 ανεξάρτητα εργαστήρια μελέτησαν ένα σύνολο 50 χημικών ενώσεων με χρήση 61 διαφορετικών *in vitro* δοκιμών, και βρέθηκαν τέσσερις δοκιμές οι οποίες, εάν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό, θα μπορούσαν να προβλέψουν τις θανατηφόρες συγκεντρώσεις στο αίμα με ακρίβεια περίπου 80%. Επομένως, η μετάβαση στις μεθόδους *in vitro* κυτταροκαλλιέργειών και σε άλλες δοκιμές χωρίς χρήση ζώων αποτελεί ιατρική αναγκαιότητα (Barnard *et al.*, 2002).

1.2 *In vitro* βιολογική αποτίμηση ενδεχόμενης αντικαρκινικής δράσης των βενζοξαζινών – Κριτήρια επιλογής

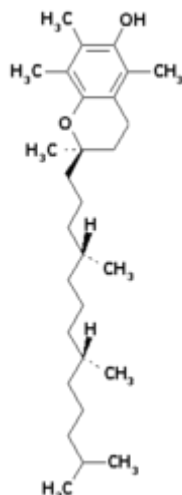
1.2.1 Χημική δομή-Φαρμακοφόρος

Ο 5,7,8-τριμεθυλο-1,4-βενζοξαζινικός δακτύλιος είναι κλασσικό βιοϊσοστερές του 5,7,8-τριμεθυλοχρωμανικού δακτυλίου (Εικόνα 1.1), τμήματος της φαρμακοφόρου ομάδας της βιταμίνης E (Filippou *et al.*, 2011, Koini *et al.*, 2012) (Εικόνα 1.2). Η βιταμίνη E είναι μια μονο-

φαινολική λιπόφιλη ένωση, η οποία δρα ως άμεσο ισχυρό αντιοξειδωτικό. Βιοχημικά, η υδροξυ-ομάδα του μορίου της βιταμίνης E μπορεί να προσφέρει ένα πρωτόνιο και να αποτοξικοποιήσει, για παράδειγμα, το αδέσμευτο ηλεκτρόνιο της πολύ δραστηκής ρίζας υδροξυλίου. Έτσι, αποτρέπει την οξείδωση των υδρογονανθρακικών αλυσίδων των μεμβρανικών λιπιδίων και παρεμποδίζει την ανάπτυξη μιας αλυσιδωτής αντίδρασης οξείδωσής τους. Ωστόσο, το μεγάλο φαρμακολογικό της μειονέκτημα είναι η πολύ περιορισμένη διαπερατότητά της από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

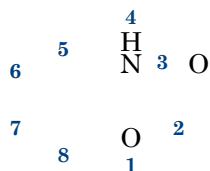


Εικόνα 1.1: Χημική δομή του 5,7,8-τριμεθυλοχρωμανικού δακτυλίου (αριστερά) και του 5,7,8-τριμεθυλο-1,4-βενζοξαζινικού δακτυλίου (δεξιά).

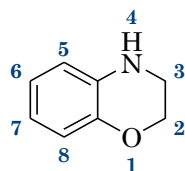


Εικόνα 1.2: Χημική δομή βιταμίνης E.

Οι βενζοξαζίνες αποτελούν γενικά, τάξη ενώσεων με μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων και εφαρμογών και έχουν χαρακτηριστεί ως «προνομιακές ενώσεις» (privileged structures) (Filippou *et al.*, 2011, Koini *et al.*, 2012). Ειδικότερα, οι 3,4-διυδρο-2H-1,4-βενζοξαζίνες (Εικόνα 1.3) έχουν μελετηθεί ευρέως ως σημαντικά ετεροκυκλικά συστήματα για την παρασκευή φυσικών και συνθετικών αναλόγων. Έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των βιολογικών και θεραπευτικών τους ιδιοτήτων και έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά ως κατάλληλοι σκελετοί για το σχεδιασμό βιολογικά ενεργών ενώσεων με μεγάλο εύρος δράσεων.



2H-1,4-βενζοξαζιν-3(4H)-όνη



3,4-διυδρο-2H-1,4-βενζοξαζίνη

Εικόνα 1.3: Χημική δομή 3,4-διυδρο-2H-1,4-βενζοξαζίνης.

1.2.2 Βιολογικές δράσεις

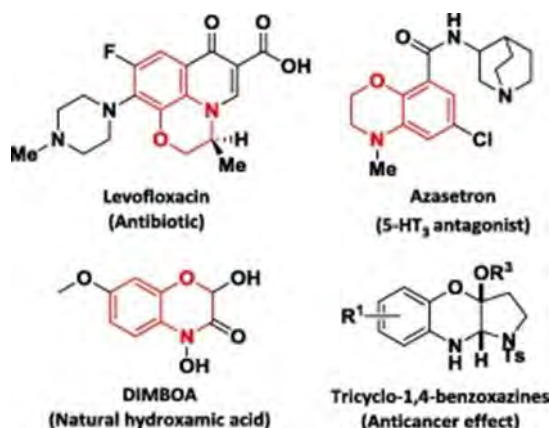
Από την πρώτη απομόνωση της 2,4-διυδροξυ-2H-1,4-βενζοξαζιν-3 (4H)-όνης (DIBOA) και της 2,4-διϋδροξυ-7-μεθοξυ-(2H)-1,4-βενζοξαζιν-3(4H)-όνης (DIMBOA), τα παράγωγα βενζοξαζίνης έχουν προσελκύσει την προσοχή των φυτοχημικών. Μια βιβλιογραφική ανασκόπηση εντόπισε διάφορα παράγωγα βενζοξαζίνης στη φάση ανάπτυξης ως πιθανά νέα φάρμακα. Η ευελιξία του σκελετού της βενζοξαζίνης, εκτός από τη σχετική χημική απλότητα και προσβασιμότητά της, καθιστά αυτές τις χημικές ουσίες μεταξύ των πλέον υποσχόμενων πηγών βιοδραστικών ενώσεων. Αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη μιας ευρείας ποικιλίας ενώσεων που παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον από άποψη βιολογικών ιδιοτήτων (Siddiquia *et al.*, 2010).

Η προέλευση και η ανάπτυξη της χημείας των 1,4-βενζοξαζινών και των 2,3-διυδρο παραγώγων τους δεν έχουν περιγραφεί ακόμα πλήρως στη βιβλιογραφία. Αυτή η κατηγορία ενώσεων έχει προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή λόγω της απάντησής τους στη φύση και των σημαντικών βιολογικών δραστηριοτήτων τους. Η χαρακτηριστική ομάδα αυτών των ετεροκυκλικών δακτυλίων εξυπηρετεί ως δομικό στοιχείο σε διάφορες χρήσιμες συνθέσεις (reviewed Achari *et al.*, 2004).

Το σύστημα 2,3-διϋδρο-1,4-βενζοξαζίνης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως υποδομή διαφόρων βιολογικώς ενδιαφερόντων παραγόντων και γι' αυτό υπάρχει πληθώρα αναφορών στη βιβλιογραφία για τη σύνθεση και τη βιολογική αξιολόγηση των ενώσεων που περιλαμβάνουν αυτόν τον δακτύλιο (Kajino *et al.*, 1991). Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιες δομές 1,4-βενζοξαζινικών παραγώγων σχετιζόμενες με κάποια φαρμακολογική δράση.

Σύμφωνα με τον Guolin Wu και τους συνεργάτες του (reviewed Wu *et al.*, 2017), οι 1,4-βενζοξαζίνες αποτελούν έναν κοινό δομικό σκελετό, που υπάρχει σε ένα μεγάλο αριθμό

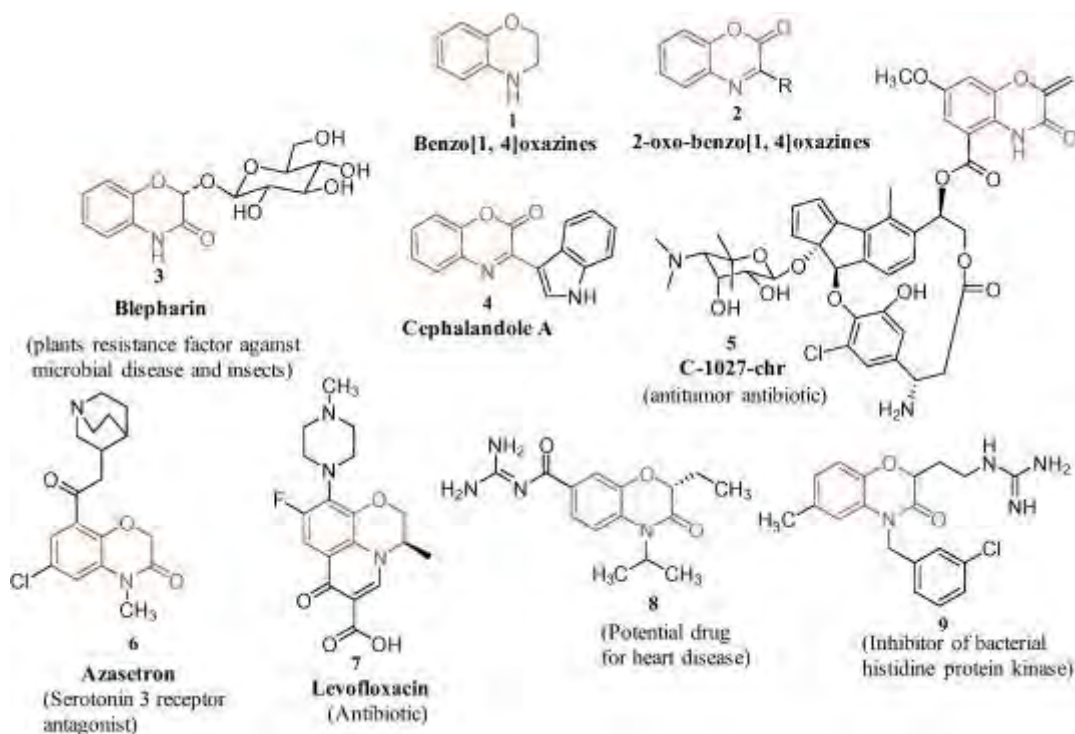
φαρμακολογικών ενώσεων (Achari *et al.*, 2004), οι οποίες εμφανίζουν διάφορες θεμελιώδεις βιολογικές λειτουργίες, οι οποίες περιλαμβάνουν νευροπροστατευτικές, αντινεοπλασματικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές, καθώς και αντιυπερτασικές δράσεις. Ειδικότερα, ορισμένες βενζοξαζίνες έχουν αναπτυχθεί ως αντιβακτηριακοί παράγοντες, αντιψυχωσικοί παράγοντες και καρδιαγγειακά φάρμακα. Ορισμένα παραδείγματα παρουσιάζονται στην *Εικόνα 1.4*. Η λεβοφλοξασίνη, που περιέχει την δομική μονάδα της 1,4-βενζοξαζίνης επιδεικνύει εξαιρετικές αντιβιοτικές δράσεις έναντι ενός φάσματος βακτηριδίων. Παρόμοιο θραύσμα βρίσκεται στον αντιεμετικό παράγοντα αζασετρόνη, ανταγωνιστή του υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT₃. Η 2,4-διυδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (DIMBOA) είναι ένα φυσικώς απαντώμενο υδροξαμικό οξύ που βρίσκεται στον αραβόσιτο, το οποίο έχει την ιδιότητα να τροποποιεί τη συγγένεια δέσμευσης των αυξινών στις θέσεις του υποδοχέα. Τέλος, σε μια προσέγγιση επανατοποθέτησης έχουν συντεθεί παράγωγα της τρικυκλο-1,4-βενζοξαζίνης ως ισχυροί αντικαρκινικοί παράγοντες με αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών.



Εικόνα 1.4: Αντιπροσωπευτικές φαρμακολογικές ενώσεις που περιέχουν τη δομική μονάδα της 1, 4-βενζοξαζίνης.

Κατά τον Pradeep K. Jaiswal και τους συνεργάτες του (reviewed Jaiswal *et al.*, 2017), οι βενζο[1,4]οξαζίνες (δομή 1) και 2-οξο-βενζο[1,4]οξαζίνες (δομή 2) αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ετεροκυκλικών ενώσεων που απαντώνται σε πολλά φυσικά προϊόντα καθώς και σε αρκετά βιολογικά ενεργά και φαρμακευτικά μόρια. Τα φυσικά προϊόντα όπως η βλεφαρίνη (δομή 3), η κεφαλανδόλη Α (δομή 4), το αντινεοπλασματικό αντιβιοτικό C-1027-chr (δομή 5) και άλλα φαρμακευτικά προϊόντα που ενσωματώνουν τη δομική μονάδα της 2H-1,4-βενζοξαζιν-3(4H)-όνης (δομές 6-9), παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως η δυνητική δράση έναντι πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένης της καρ-

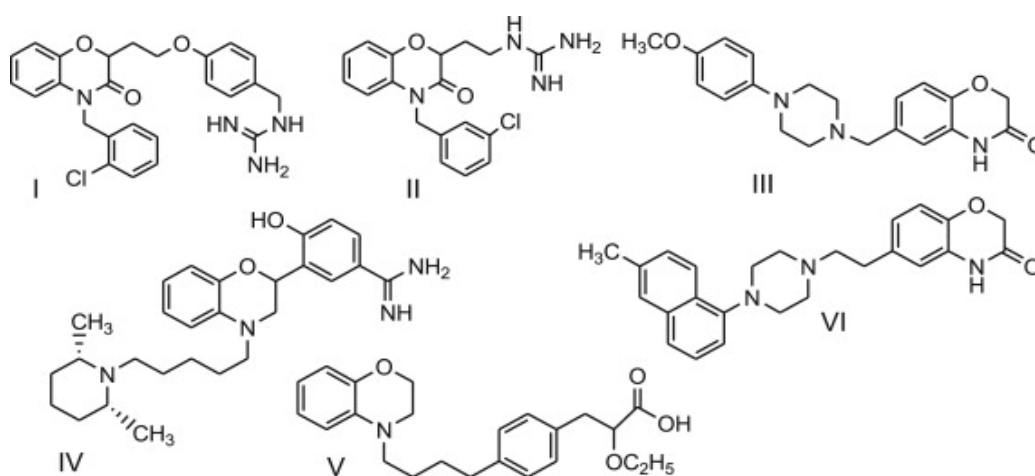
διακής νόσου, ενός αναστολέα της βακτηριακής πρωτεϊνικής κινάσης ιστιδίνης, ανταγωνιστών του υποδοχέα σεροτονίνης-3 (5-HT₃), νευροεκφυλιστικών, αντιυπερτασικών, φλεγμονωδών παραγόντων, αναλγητικών, ανταγωνιστών του υποδοχέα D₂, αντιμυκοβακτηριδικών και αντιμυκητιασικών παραγόντων (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: Δομές ορισμένων φυσικών προϊόντων (3-5) και φαρμακευτικά δραστικών ενώσεων (6-9) που περιέχουν τη δομική μονάδα της 1, 4-βενζοξαζίνης.

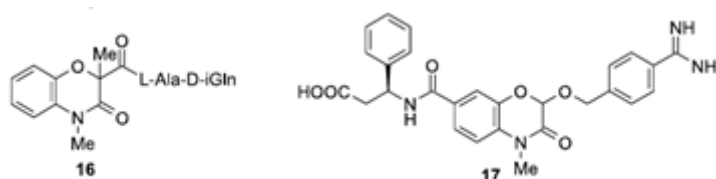
Σύμφωνα με τον Rajitha Bollu και τους συνεργάτες του (reviewed Bollu et al., 2015), οι 3,4-διϋδρο-2H-1,4-βενζοξαζίνες συχνά χρησιμοποιούνται ως κατάλληλα ικρίωματα για το σχεδιασμό βιολογικά δραστικών ενώσεων που έχουν διάφορες ιδιότητες όπως αντιβακτηριακές, ως βακτηριακές πρωτεϊνικές κινάσες ιστιδίνης, για θεραπεία μολύνσεων που προκαλούνται από *Mycobacterium*, για θεραπεία καρδιαγγειακών νοσημάτων, της νέκρωσης του μυοκαρδίου και αρρυθμιών, ως αγωνιστής του υποδοχέα PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) για τη θεραπεία του διαβήτη και της υπερλιπιδαιμίας, ως αναστολείς της συνθάσης νιτρικού οξειδίου (NOS), οι οποίοι είναι πιθανά φάρμακα για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών, φλεγμονωδών, αυτοάνοσων και καρδιαγγειακών διαταραχών, ως αναστολείς της πήξης των σερίνο-πρωτεασών, για θεραπεία του άγχους και της κατάθλιψης.

Όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 1.6*, οι ενώσεις (I) και (II) αποτελούν δυνητικούς αντιβακτηριακούς παράγοντες και επίσης δρουν ως αναστολείς της βακτηριακής πρωτεϊνικής κίνησης ιστιδίνης. Η ένωση (III) δρα ως ανταγωνιστής του υποδοχέα D2 και είναι ένας πιθανός αντιψυχωσικός παράγοντας. Η 1,4-βενζοξαζινόνη (IV) αναστέλλει τον παράγοντα Χα, την θρομβίνη και τον παράγοντα VIIa πήξης του αίματος, και η 1,4-βενζοξαζινόνη (VI) αποτελεί πιθανό παράγοντα για την αντιμετώπιση του άγχους και της κατάθλιψης. Το παράγωγο 1,4-βενζοξαζίνης (V) δρα ως αγωνιστής του υποδοχέα PPAR και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία του διαβήτη, της υπερλιπιδαιμίας και άλλων διαβητικών επιπλοκών (reviewed Bollu et al., 2015).



Εικόνα 1.6: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα βιολογικά ενεργών 1,4-βενζοξαζινικών παραγώγων.

Επίσης, το παράγωγο του 2-μεθυλ-3-οξο-3,4-διυδρο-2H-1,4-βενζοξαζινο-2-καρβοξυλικού οξέος (16) βρέθηκε να είναι ισχυρό ανοσοδιεγερτικό.. Οι 2H-1,4-βενζοξαζινο-3(4H)-όνες, που φέρουν μια καρβοξυλική και μια βενζαμιδινική πλευρική αλυσίδα είναι ανταγωνιστές του υποδοχέα ινωδογόνου κι έτσι η ένωση (17) έχει διπλή αντιθρομβωτική δράση, δρώντας και ως αναστολέας θρομβίνης και ως ανταγωνιστής του υποδοχέα ινωδογόνου (reviewed Ilas et al., 2005) (*Εικόνα 1.7*).



Εικόνα 1.7: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα βιολογικά ενεργών 1,4-βενζοξαζινικών παραγώγων.

Τέλος, μια σειρά νέων παραγώγων της 1, 4-βενζοξαζίνης συντέθηκε και κάποιες ενώσεις έδειξαν δραστικότητα ως ανταγωνιστές ασβεστίου, ανταγωνιστές καλμοδουλίνης και αντι-υπερτασικές ιδιότητες *in vitro*. Ενώ μια σειρά παραγώγων της 2H-1, 4-βενζοξαζίν-3(4H)-όνης συντέθηκε και κάποιες ενώσεις έδειξαν δραστικότητα ως κατασταλτικά του ΚΝΣ, αναλγητικά, α₂-ανταγωνιστές, ανθελμινθικά και αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης (Kajino *et al.*, 1991).

Συνοπτικά, η βιβλιογραφία βρίθει από πηγές που αναφέρονται σε παράγωγα της 1,4-βενζοξαζίνης και καταγράφει μεθόδους σύνθεσης νέων αναλόγων και την βιολογική αποτίμησή τους ως πιθανά βιοενεργά μόρια φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Παράλληλα, οι έρευνες συνεχίζονται προς αυτήν την κατεύθυνση με στόχο το σχεδιασμό και τη σύνθεση μιας βιβλιοθήκης νέων μικρών μορίων με πολύτιμη χημική ποικιλομορφία (Zhao *et al.*, 2006).

1.3 Επιλογή κυτταρικών σειρών

Επιλέχθηκε ένα ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών προερχόμενων από συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένων των πιο κοινών αιτιών θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως (πνεύμονα, ήπατος, παχέος εντέρου, προστάτη, μαστού). Επίσης, για συγκριτικούς σκοπούς επιλέχθηκε και μία φυσιολογική σειρά από ινοβλάστες πνεύμονα.

1.4 *In silico* τεχνικές σχεδιασμού φαρμάκων - Ο ρόλος της κινάσης BRAF

Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί με πειράματα *in silico* docking αν οι φαρμακολογικά ενεργές ακόμα και σε θεραπεία όγκων 1-4 βενζοξαζίνες μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της μεταλλαγμένης BRAF που υπάρχει συχνά σε όγκους του παχέος εντέρου, μελανώματος κ.ά.

Οι *in silico* τεχνικές είναι τεχνικές μοριακού σχεδιασμού με χρήση Η/Υ και βασίζονται σε αρχές και μεθόδους της κβαντικής χημείας. Το κυριότερο πλεονέκτημα τους είναι η ταχεία ανάλυση και αξιοποίηση βιολογικών και ιατρικών δεδομένων, που αντλούνται από διάφορες πηγές. Οι παραπάνω πληροφορίες χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία υπολογιστικών μοντέ-

λων προσομοίωσης. Οι τεχνικές αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή της ένωσης-οδηγού (lead compound), έτσι ώστε να μειωθεί το ποσοστό των αποτυχημένων προσπαθειών κατά τις κλινικές δοκιμές. Η μοριακή πρόσδεση (in silico docking) είναι η υπολογιστική τεχνική που αναφέρεται στον σχετικό προσανατολισμό του προσδέτη σε σχέση με την πρωτεΐνη-στόχο.

Το μονοπάτι σηματοδότησης RAS (rat sarcoma) / RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma) / MEK (mitogen-activated protein) / ERK (extracellular signal-regulated kinase) ελέγχει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Η οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών RAF (ARAF, BRAF και CRAF) επηρεάζει σημαντικά το μονοπάτι αυτό. Η πρόσληψη των RAF κινασών από την μεμβράνη που σχετίζεται με τις πρωτεΐνες RAS ενεργοποιεί το μονοπάτι που οδηγεί σε μία αλληλουχία γεγονότων, η οποία περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση των MEK1 και MEK2 κινασών από τις RAF και την επακόλουθη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των ERK1 και ERK2 κινασών. Το βήμα κλειδί για την ενεργοποίηση των RAF πρωτεϊνών είναι ο σχηματισμός ομοδιμερών και ετεροδιμερών, καθώς τα RAF μονομερή είναι ανενεργά εξ' αιτίας της αυτοαναστολής από τη αμινοτελική περιοχή (N-terminal domain-NTD).

Περισσότερες από 45 ογκογονικές μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί για την BRAF, με την σημειακή μετάλλαξη V600E [η βαλίνη (V) αντικαθίσταται από το γλουταμινικό οξύ (E) στο αμινοξύ 600] να αντιπροσωπεύει περίπου το 90% αυτών. Συνολικά, οι μεταλλάξεις της BRAF είναι παρούσες σε περίπου 8% των ανθρώπινων όγκων. Οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται σε περισσότερους από το 50% των ασθενών με μελάνωμα, καθώς επίσης στο καρκίνωμα παχέος εντέρου (5-10%), θυρεοειδούς (25-45%), στην τριχοκυτταρική λευχαιμία (~100%) και λιγότερο συχνά στις κακοήθειες ωοθηκών και πνεύμονα (reviewed Bogos *et al.*, 2018).

1.5 Μελέτες βιωσιμότητας σε κύτταρα

Οι *in vitro* δοκιμές κυτταροτοξικότητας παρέχουν ένα κρίσιμο μέσο κατάταξης ενώσεων προς εξέταση στην ανακάλυψη φαρμάκων. Για *in vitro* συστήματα κυτταροκαλλιέργειας, μια ένωση ή θεραπεία θεωρείται κυτταροτοξική εάν παρεμποδίζει την κυτταρική προσκόλληση, αλλάζει σημαντικά τη μορφολογία, επηρεάζει δυσμενώς τον ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης ή προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Μια ποικιλία δοκιμών έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της βιωσιμότητας ή κυτταροτοξικότητας *in vitro*. Δυστυχώς, πολλές από αυτές τις με-

θόδους είναι επίπονες, χρονοβόρες, μη ευαίσθητες και επομένως ακατάλληλες για σάρωση υψηλής απόδοσης (High-Throughput Screening). Για το σκοπό αυτό έχουν σχεδιαστεί πιο αποδοτικές σύγχρονες μέθοδοι διαλογής που εξετάζουν και μετρούν ένα ευρύ φάσμα παραμέτρων που σχετίζονται με βιοχημικές διεργασίες, απαραίτητες για τη διατήρηση της βιωσιμότητας, ή με αλλαγές στην ακεραιότητα της μεμβράνης, που οδηγούν σε κυτταρική αποσύνθεση (Niles *et al.*, 2008).

Κάποιες από τις πιο κοινές σύγχρονες μεθόδους αποτίμησης της κυτταροτοξικότητας, άμεσης ή έμμεσης, αποτελούν οι MTT, XTT και LDH. Οι αρχές των μεθόδων αυτών παρουσιάζονται παρακάτω.

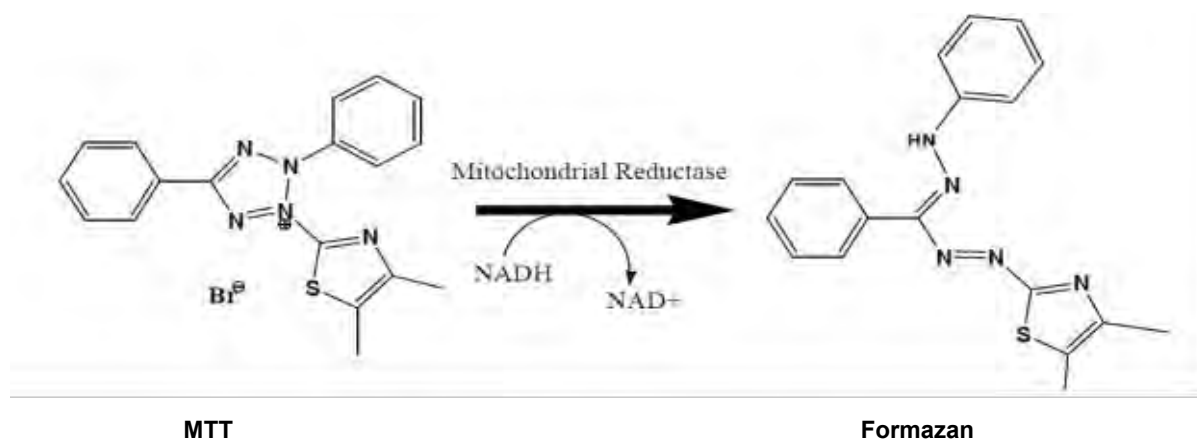


Εικόνα 1.8: Χρήση πολυτιπίετας για την προσθήκη MTT, XTT/PMS και LDH.

1.5.1 Μέθοδος MTT

Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην διάσπαση του κιτρινόχρου διαλύματος MTT [διάλυμα βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου] προς σχηματισμό μίας αδιάλυτης ιώδους φορμαζάνης σε μεταβολικά ενεργά ζωντανά κύτταρα από μιτοχονδριακά ένζυμα, τις αφυδρογονάσες, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1. Αυτή η αδιάλυτη στο νερό φορμαζάνη, μπορεί να διαλυτοποιηθεί χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ή άλλους οργανικούς διαλύτες και το προϊόν που παράγεται μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Η μετρούμενη οπτική απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής. Η διάσπαση και μετατροπή του κιτρινωπού MTT σε ιώδες σύμπλοκο φορμαζάνης έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μίας μεθόδου προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας (cell viability). Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι ότι μόνο τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ενεργές μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες που μπορούν να κάνουν αυτήν

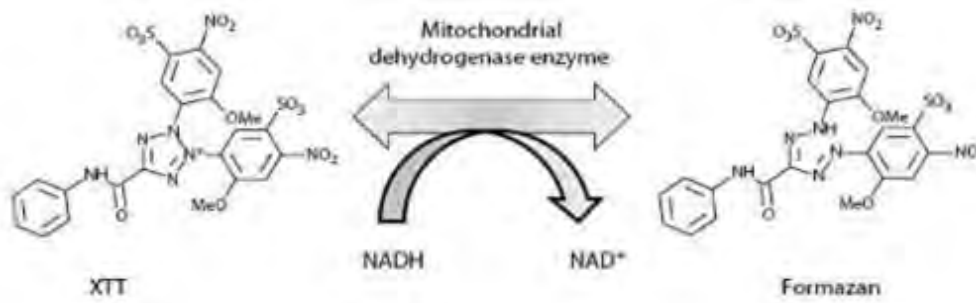
τη μετατροπή, ενώ τα νεκρά κύτταρα όχι. Έτσι, μπορεί να προσδιοριστεί η επίδραση κάποιου παράγοντα στην βιωσιμότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού (growth rate) των κυττάρων και άρα, να αποτιμηθεί η κυτταροτοξικότητά του (cytotoxicity).



Εικόνα 1.9: Η αντίδραση αναγωγής του υδατοδιαλυτού κίτρινόχρουν άλατος MTT σε αδιάλυτη ιώδη φορμαζάνη με τη βοήθεια μιτοχονδριακών αφυδρογονάσεων ζωντανού κυττάρου.

1.5.2 Μέθοδος ΧΤΤ

Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην διάσπαση του κίτρινου ΧΤΤ [άλας της 2,3-δισ-(2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλο)-2H-τετραζολο-5-καρβοξυανιλίνης] προς σχηματισμό μίας πορτοκαλί υδατοδιαλυτής χρωστικής ουσίας φορμαζάνης σε μεταβολικά ενεργά ζωντανά κύτταρα από μιτοχονδριακά ένζυμα, τις αφυδρογονάσεις, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3. Το προϊόν που παράγεται μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Η μετρούμενη οπτική απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής. Η διάσπαση και μετατροπή του κίτρινου ΧΤΤ σε πορτοκαλί υδατοδιαλυτή φορμαζάνη έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μίας μεθόδου προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας (cell viability). Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι ότι μόνο τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ενεργές μιτοχονδριακές αφυδρογονάσεις που μπορούν να κάνουν αυτήν τη μετατροπή, ενώ τα νεκρά κύτταρα όχι. Έτσι, μπορεί να προσδιοριστεί η επίδραση κάποιου παράγοντα στην βιωσιμότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού (growth rate) των κυττάρων και άρα, να αποτιμηθεί η κυτταροτοξικότητά του (cytotoxicity).



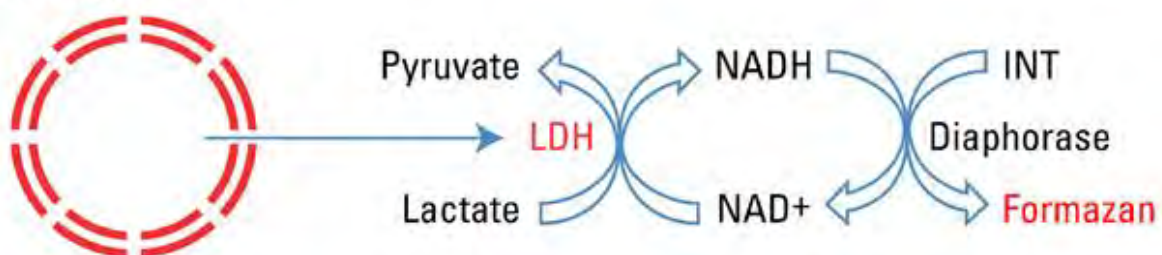
Εικόνα 1.10: Η αντίδραση αναγωγής του κίτρινου άλατος ΧΤΤ σε πορτοκαλί υδατοδιαλυτή φορμαζάνη με τη βοήθεια μιτοχονδριακών αφυδρογονασών ζωντανού κυττάρου.

1.5.3 Μέθοδος LDH

Για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας LDH χρησιμοποιήθηκε το Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit της Thermo Scientific. Αποτελεί μία χρωματομετρική μέθοδο που χρησιμοποιείται σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές για τη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από χημικές ενώσεις.

Η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) είναι ένα ένζυμο του κυτταροπλάσματος που υπάρχει σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυτάρων. Η καταστροφή της πλασματικής μεμβράνης (λύση) απελευθερώνει LDH στο μέσο της κυτταροκαλλιέργειας (θρεπτικό υλικό). Η εξωκυτταρική LDH στο μέσο ποσοτικοποιείται με την συζευγμένη ενζυματική αντίδραση στην οποία η LDH καταλύει τη μετατροπή του γαλακτικού σε πυροσταφυλικό μέσω της αναγωγής του NAD⁺ σε NADH. Στη συνέχεια, η διαφοράση χρησιμοποιεί το NADH για την αναγωγή ενός άλατος του τετραζολίου (INT) σε κόκκινο προϊόν φορμαζάνης, η οποία μετρείται στα 490nm. Το επίπεδο σχηματισμού φορμαζάνης είναι ευθέως ανάλογο με την ποσότητα LDH που απελευθερώνεται στο μέσο, το οποίο είναι ενδεικτικό της κυτταροτοξικότητας.

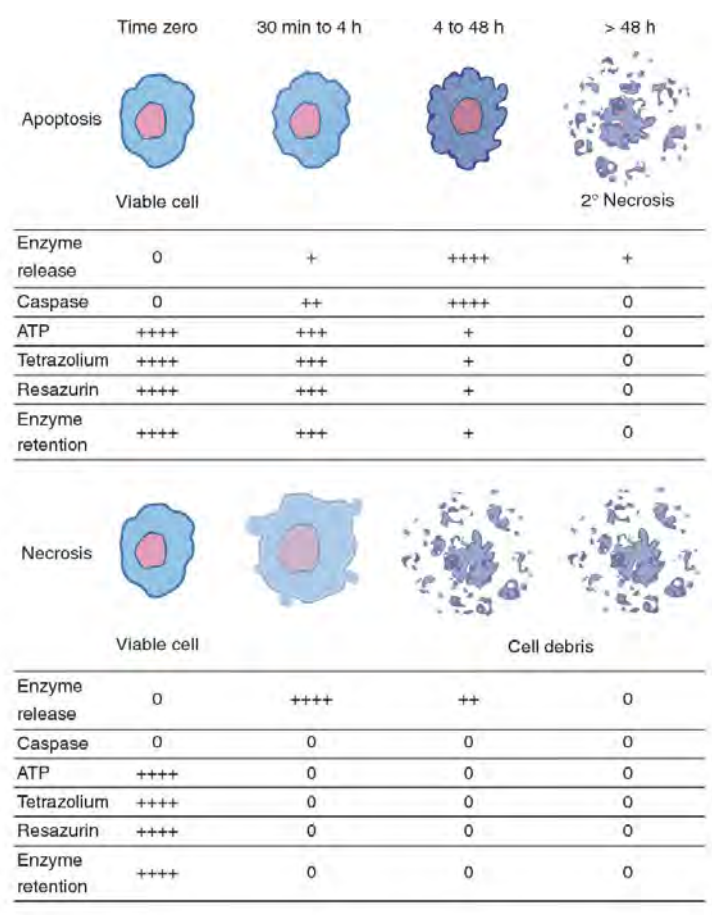
Damaged cells



Σχήμα 1.11: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας LDH.

1.6 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

Η διευκρίνηση του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου είναι αρκετά σημαντική για τις νέες χημικές ενώσεις που προορίζονται για θεραπεία του καρκίνου. Οι ενώσεις που προκαλούν πρωτογενή νέκρωση σε κυτταροκαλλιέργεια μπορεί να φέρουν μη αποδεκτές κυτταροτοξικές συνέπειες, ενώ οι ενώσεις που προκαλούν απόπτωση συνήθως είναι προτιμότερες. Η συγκέντρωση της ουσίας και η κινητική του κυτταρικού θανάτου ποικίλουν, αλλά γενικά η πρωτογενής νέκρωση ή η καταστροφική κυτταρική λύση συμβαίνει πολύ γρήγορα μετά την προσθήκη της ένωσης (2 ώρες ή λιγότερο), ενώ η απόπτωση προχωρά με πιο ομαλό τρόπο (4-48 ώρες) (Σχήμα 1.12) (Niles *et al.*, 2008).



Σχήμα 1.12: Χρονολογική σύγκριση των μετρήσιμων βιοδεικτών βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας κατά τη διάρκεια τυπικών αποπτωτικών ή πρωτογενών νεκρωτικών συμβάντων. Η απόπτωση προκαλεί μια χρονοεξαρτώμενη (τυπικά 4-48 ώρες) μείωση της δραστηριότητας του δείκτη βιωσιμότητας με αντίστοιχη αύξηση της δραστηριότητας του δείκτη κυτταροτοξικότητας. Η πρωτογενής νέκρωση παρουσιάζει παρόμοιο προφίλ, αν και σε πολύ μικρότερο χρονικό πλαίσιο (τυπικά 30 λεπτά έως 4 ώρες). Επομένως, η κινητική της κυτταροτοξικής απόκρισης μπορεί να επηρεάσει ποια χημική δοκιμή είναι πιο κατάλληλη για μια μελέτη.

1.6.1 Απόπτωση

Η απόπτωση ορίζεται ως μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που μπορεί να προκληθεί από ποικίλους φυσιολογικούς και φαρμακολογικούς παράγοντες και περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Kerr *et al* (1972). Χαρακτηρίζεται από ειδικές μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές των κυττάρων που πεθαίνουν. Οι μορφολογικές αλλαγές περιλαμβάνουν διόγκωση της μεμβράνης, συρρίκνωση του κυττάρου, πυρηνική κατάρρευση (πυρηνικός κατακερματισμός, συμπύκνωση της χρωματίνης), το σχηματισμό αποπτωτικού σώματος και τέλος τη λύση του κυττάρου (Kanduc *et al.*, 2002). Οι βιοχημικές αλλαγές περιλαμβάνουν τη διάσπαση του χρωμοσωμικού DNA σε ενδονουκλεοσωμικά θραύσματα, τη μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική κυτταρική επιφάνεια και μία σειρά από διασπάσεις ενδοκυτταρικών υποστρωμάτων μέσω ειδικής πρωτεόλυσης, χαρακτηριστικότερα των οποίων είναι η πρωτεΐνη PARP-1, ο αναστολέας ICAD, οι πυρηνικές λαμίνες και η πηκτωλυματίνη.

Η απόπτωση είναι ο κύριος τύπος κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει όταν η βλάβη του DNA είναι ανεπανόρθωτη. Υπάρχουν δύο κύρια μονοπάτια για την επαγωγή της απόπτωσης: το εξωγενές ή μονοπάτι υποδοχέα θανάτου και το ενδογενές ή μιτοχονδριακό. Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται με δέσμευση του υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης Fas (και άλλων παρόμοιων υποδοχέων όπως του TNFR1 και TRAIL) από τον εξωκυττάριο προσδέτη του, Fas-L. Το σύμπλοκο Fas/Fas-L συνδέεται διαδοχικά με την πρωτεΐνη FADD και την προ-κασπάση-8, έτσι ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλοκο σηματοδότησης DISC. Έπειτα, το σύμπλοκο DISC ενεργοποιεί την προ-κασπάση-8, η οποία με τη σειρά της πρωτεολύει εκλεκτικά την προ-κασπάση-3, το προτελευταίο ένζυμο για την ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας. Το ενδογενές μονοπάτι οδηγεί επίσης σε απόπτωση αλλά υπό τον έλεγχο των μιτοχονδριακών προ-ενζύμων. Και στις δύο περιπτώσεις, οι εξωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες καθίστανται διαπερατές στο κυτόχρωμα c, το οποίο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και στρατολογεί τις πρωτεΐνες Araf-1 και προ-κασπάση-9 για να συγκροτήσει το αποπτώσωμα. Αυτό ενεργοποιεί τον καταρράκτη σηματοδότησης των κασπασών 9 και 3, καταλήγοντας σε απόπτωση. Η μη φυσιολογική έκφραση βασικών ρυθμιστικών παραγόντων της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο.

1.6.2 Κασπάσες

Στα αποπτωτικά μονοπάτια που προκαλούν “κυτταρική αυτοκτονία”, τα πρώτα μοριακά σήματα είναι ανενεργά προένζυμα που ονομάζονται κασπάσες. Η νέκρωση μερικές φορές χρησιμοποιεί κασπάσες, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό ή καθόλου, καθώς το ίδιο το κύτταρο καταστρέφεται με ανεξέλεγκτο τρόπο κατά τη διάρκεια νεκρωτικών συμβάντων.

Έχουν ταυτοποιηθεί έως και 13 κασπάσες, που κατηγοριοποιούνται σε εκκινήτες, τελεστές ή εκτελεστές (αυτοί που προκαλούν άμεσα κυτταρικό θάνατο) και φλεγμονώδεις, οι οποίες αναστέλλουν την φλεγμονή. Καθώς κατά την νέκρωση δεν εμπλέκονται φλεγμονώδεις κασπάσες, η φλεγμονή εμφανίζεται πάντα στον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο.

1.6.3 Νέκρωση

Η νέκρωση περιλαμβάνει διάσπαση της μεμβράνης, αναπνευστικά δηλητήρια και υποξία, που προκαλούν εξάντληση του ATP, μεταβολική κατάρρευση, διόγκωση των κυττάρων και ρήξη που οδηγεί σε φλεγμονή. Έτσι, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο κατά τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και την απομάκρυνση των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη, πράγμα που έχει σημαντικές επιπτώσεις στους κακοήθεις ιστούς.

Κατά τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης διαταράσσεται σε τέτοιο βαθμό, ώστε τελικά τα ενδοκυτταρικά υλικά απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, οδηγώντας σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η επακόλουθη τοπική φλεγμονή μπορεί να προάγει την ανάπτυξη όγκου. Ωστόσο, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να αξιοποιηθεί για την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων.

1.6.4 Προγραμματισμένη νέκρωση - Νεκρόπτωση

Πριν από δεκαετίες, αναφέρθηκε ένας νέος τύπος κυτταρικού θανάτου, στις περιπτώσεις που αναστελλόταν το αποπτωτικό μονοπάτι, ο οποίος εμφάνισε μορφολογικά χαρακτηριστικά τόσο της απόπτωσης όσο και της νέκρωσης και γι' αυτό ονομάστηκε νεκρόπτωση. Η νεκρόπτωση είναι μια προγραμματισμένη μορφή νέκρωσης, η οποία μεσολαβείται από υπο-

δοχείς θανάτου. Χαρακτηρίζεται μορφολογικά από διόγκωση των κυττάρων ακολουθούμενη από ρήξη της πλασματικής μεμβράνης.

Έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή του μορίου της κασπάσης-8 αλλάζει την εξωγενή απόπτωση σε νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο λόγω της ενεργοποίησης των RIPK3 (receptor-interacting protein kinase 3) και MLKL (mixed lineage kinase domain like pseudokinase). Συνεπώς, η νεκρόπτωση αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο κυτταρικού θανάτου όταν το αποπτωτικό μονοπάτι, που εξαρτάται από την κασπάση-8, παρεμποδίζεται. Η έναρξη της νεκρόπτωσης μεσολαβείται από προσδέτες του ανοσοποιητικού, συμπεριλαμβανομένων των Fas, TNF και LPS (λιποπολυσακχαρίτη) , οι οποίοι οδηγούν σε ενεργοποίηση της RIPK3, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την MLKL με φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλιωμένη MLKL μεταφέρεται στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης και διαταράσσει την ακεραιότητα του κυττάρου (Dhuriya *et al.*, 2018).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

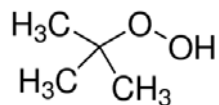
2.1 Χημικά αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων/PBS 10X (σε pH 7,2) (GIBCO, 70013-016), θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle's medium/DMEM (GIBCO, 41966), RPMI 1640 (GIBCO, 21875), ορός εμβρύου βοός/FBS (GIBCO, 10270), L-γλουταμίνη 200mM (GIBCO, 25030081), μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (GIBCO, 15140-122), διάλυμα μη απαραίτητων αμινοξέων 100X (GIBCO, 11140050), θρυψίνη 2,5%-10X (GIBCO, 15090-046), διάλυμα βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου/MTT (Sigma-Aldrich, M5655), sodium dodecyl sulphate/SDS (Biochemical, 44244), άλας της 2,3-δισ-(2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλο)-2H-τετραζολο-5-καρβοξυανιλίνης/XTT (BIOTIUM, 10060 και PanReac AppliChem, A2240), phenazine methosulfate/PMS (Sigma-Aldrich, P9625), Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific, 88953), tert-Butyl hydroperoxide solution 5-6M in decane/TBHP (Sigma-Aldrich, 416665), διμεθυλοσουλφοξείδιο/DMSO (PanReac AppliChem, A3672), Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD, 161-0406), αλβουμίνη ορού βοός/BSA (Sigma-Aldrich, 1076192), διάλυμα λύσης RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay buffer) (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948), φαινυλομεθανο-σουλφονυλοφθορίδιο/PMSF (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948), ορθοβαναδικό νάτριο (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948), μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Santa Cruz Biotechnology, sc24948), ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο 30% (Sigma-Aldrich, A3699), υπερθειικό αμμώνιο/APS 10% (SIGMA, A9164-100G), τετρα-μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη/TEMED (MP Biomedicals, LLC, 805615), Prestained Protein Marker (New England BioLabs, P7708S), χρωστική Ponceau (Sigma-Aldrich, P7170), σκόνη γάλακτος (Regilait, CS 2030971009), Tween 20 (AppliChem, A1389), διαλύματα εμφάνισης ECL (enhanced luminol reagent, oxidizing reagent) (PerkinElmer, NEL120001EA), Apoptosis/Necroptosis Antibody Sampler Kit (Cell Signaling Technology, 92570), Human/Mouse/Rat beta-Actin Antibody (R&D Systems, MAB8929), PARP-1 mouse IgG (BD Pharmingen™, 552933), Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako, PO260), Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (R&D Systems, HAF008).

Όλα τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια γενικής και καθημερινής χρήσης προέρχονταν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Το διπλά απεσταγμένο νερό υψηλής καθαρότητας ελήφθη από το σύστημα καθαρισμού ύδατος Millipore Milli Q Plus.

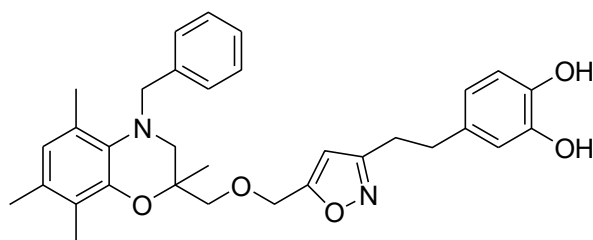
2.2 Χημικές ενώσεις

tert-Butyl hydroperoxide

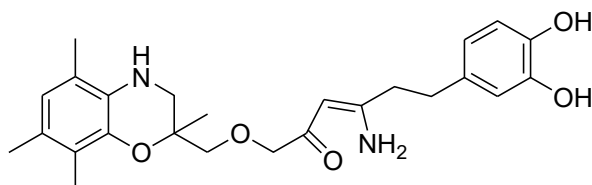


Οι χημικές ενώσεις, που εξετάστηκαν στην παρούσα διπλωματική, συντέθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

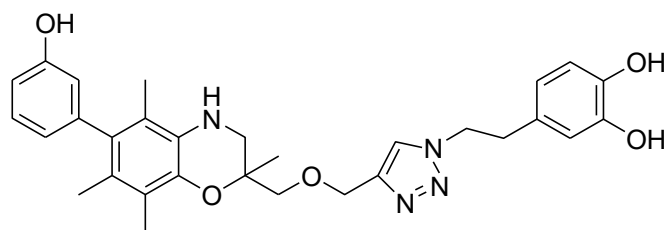
TC 321



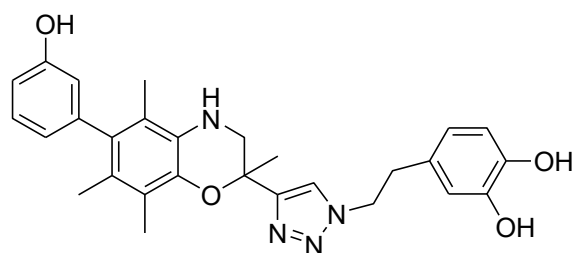
TC 322



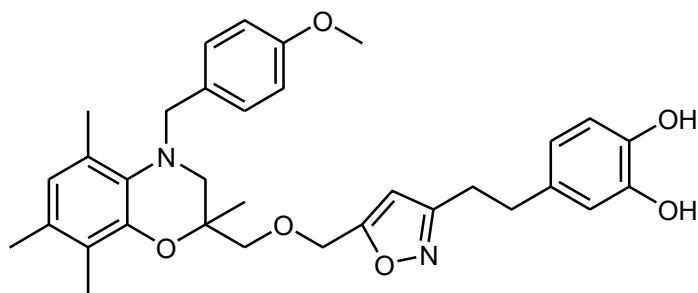
TC 342



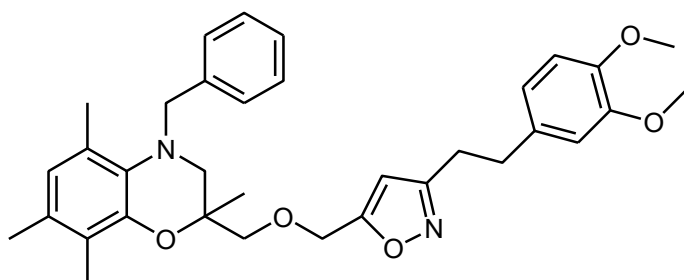
TC 343



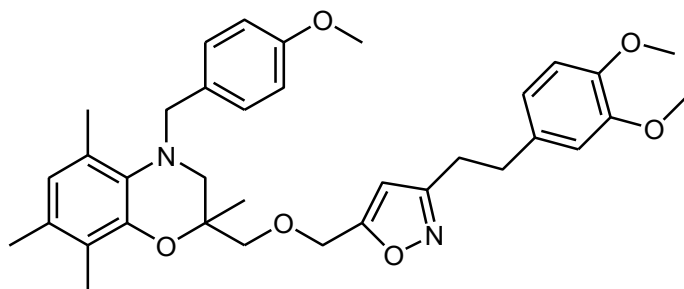
TC 419



TC 432



TC 431



2.3 Κυτταρικές σειρές

Οι ανθρώπινης προέλευσης καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι οι εξής: παχέος εντέρου (HCT 116, Caco-2), ήπατος (Hep G2), μελανώματος (WM 164), αδenoκαρκίνωμα προστάτη (PC-3), αδenoκαρκίνωμα μαστού (MDA-MB 231), οστεοσάρκωμα (U2-OS), πνεύμονα (A 549) και οξείας μονοκυτταρικής λευχαιμίας (U-937). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι φυσιολογικοί ινοβλάστες ανθρώπινου πνεύμονα εμβρύου HLF-1. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37°C με παροχή 5% CO₂. Η κυτταρική σειρά HCT 116 φέρει μεταλλάξεις στα γονίδια CDKN2A, CTNNB1, PIC3CA, KRAS, ACVR2A, BRCA2, EP300 και TGFBR2, η Caco-2 στα TP53, APC, CTNNB1 και SMAD4, η Hep G2 στο NRAS, η WM 164 στο BRAF V600E, η PC-3 στο TP53, η MDA-MB 231 στα BRAF G464V, CDKN2A, KRAS και TP53, η A 549 στα KRAS και STK11 και η U-937 στο PTEN.

<u>Είδος κυττάρων</u>	<u>Τύπος καρκίνου</u>	<u>Γονίδια με μεταλλάξεις</u>
HCT 116	colorectal carcinoma	CDKN2A, CTNNB1, PIC3CA, KRAS, ACVR2A, BRCA2, EP300 TGFBR2
Hep G2	hepatocyte carcinoma	NRAS
WM 164	cutaneous melanoma	BRAF V600E
PC-3	prostate adenocarcinoma	TP53
MDA MB-231	breast adenocarcinoma	BRAF G464V, CDKN2A, KRAS, TP53
U2-OS	osteosarcoma	
A 549	lung carcinoma	KRAS, STK11
Caco-2	epithelial colorectal adenocarcinoma	TP53, APC, CTNNB1, SMAD4
U-937	adult acute monocytic leukemia	PTEN
HLF-1	fetal normal lung	

Πίνακας 2.1: Ταξινόμηση των κυτταρικών σειρών ανά τύπο καρκίνου και αναφορά στις πιο συχνές μεταλλάξεις που εμφανίζονται στα γονίδια των κυττάρων αυτών (Cellosaurus-ExPASy).

2.3.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές HCT 116, Caco-2, Hep G2, WM 164, U2-OS, A-549 και HLF-1 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM 1X, το οποίο περιέχει 4,5 g/L γλυκόζη, L-γλουταμίνη και πυροσταφυλικό, συμπληρωμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Για τις σειρές Caco-2 και WM 164 προστέθηκε επίσης 1% μη-απαραίτητων αμινοξέων. Οι κυτταρικές σειρές PC-3, MDA-MB 231 και U-937 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 1X, συμπληρωμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Όλες οι κυτταρικές σειρές εκτός από τα U-937 προσκολλώνται στην επιφάνεια καλλιέργειας, ενώ τα U-937 αιωρούνται στο θρεπτικό υλικό. Η επώαση των κυττάρων γινόταν σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH.

2.4 Μοριακή Πρόσδεση (In Silico Docking)

Για το σχεδιασμό των βενζοξαζινικών παραγώγων σε δισδιάστατη (2D) μορφή χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **ChemDraw** και οι ενώσεις αποθηκεύτηκαν με τη μορφή αρχείου κειμένου smiles (.smi).

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης είναι το **MAESTRO** της εταιρείας *Schrödinger*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του αρχείου με τις δομές που σχεδιάστηκαν και στη συνέχεια, οι εξεταζόμενες ενώσεις ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά (*Energy Minimization*) και μετατράπηκαν στην τρισδιάστατη (3D) μορφή τους, δηλαδή έλαβαν μία διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας. Ως μέθοδος χρησιμοποιήθηκε η PRCG (Polak-Ribier Conjugate Gradient), ο μέγιστος αριθμός επαναλήψεων ορίστηκε ίσος με 10.000 και το κατώφλι σύγκλισης ίσο με 0.001. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των εξεταζόμενων προσδετών (*Ligand Preparation-LigPrep*) στο βέλτιστο pH της εξεταζόμενης πρωτεΐνης (pH: 7,0±0,5), προκειμένου να παραχθούν όλες οι καταστάσεις ιονισμού τους, χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων OPLS3. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των υπό εξέταση ενώσεων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *QikProp*.

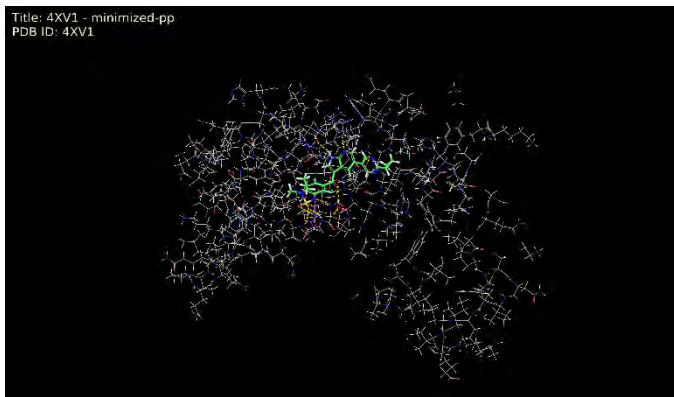
Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση συμπλόκου της πρωτεΐνης-στόχου συγκρασταλλωμένης με έναν προσδέτη-αναστολέα μέσω της βάσης δεδομένων **PDB** (Protein Data Bank). Στην προκειμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε το κρυσταλλικό σύμπλοκο της B-RAF V600E πρωτεΐνης με τον γνωστό αναστολέα PLX7904 (Κωδικός PDB: **4XV1**, Ανάλυση: 2.47 Å).

Ακολούθησε η εισαγωγή των αρχείων PDB στην πλατφόρμα MAESTRO, τα οποία προετοιμάστηκαν μέσω του προγράμματος Protein Preparation Wizard (*Εικόνα 2.1*), ώστε να διορθωθούν τυχόν λάθη κατά την αποθήκευση των αρχείων. Συγκεκριμένα, στα αρχεία PDB οι χημικοί δεσμοί είναι συχνά σε λάθος σειρά και παρουσιάζονται πάντα ως μονοί δεσμοί. Επίσης, στα αρχεία PDB απουσιάζουν τα υδρογόνα.

Επομένως, τα λάθη διορθώνονται με την προετοιμασία της πρωτεΐνης (*Protein Preparation*), η οποία ακολουθεί τρία στάδια:

1. Προεπεξεργασία (*Preprocess*): προσθήκη υδρογόνων, διόρθωση σειράς δεσμών, δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και δεσμών με μέταλλα.

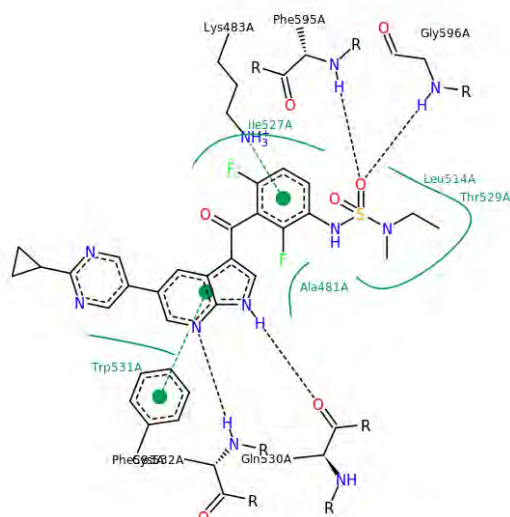
2. Βελτιστοποίηση (*Optimization*): διόρθωση δεσμών υδρογόνου.
3. Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (*Minimization*).



Εικόνα 2.1: Συμπλοκοποιημένη πρωτεΐνη, η οποία προετοιμάστηκε μέσω του προγράμματος Protein Preparation Wizard και προέρχεται από αρχείο με κωδικό PDB: 4XV1.

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, καθώς και από τη μελέτη των κρυσταλλικών συμπλόκων της ογκοπρωτεΐνης B-RAF V600E συμπεραίνεται, ότι κρίσιμες για την πρόσδεση αλληλεπιδράσεις αναπτύσσονται με τα παρακάτω αμινοξέα, τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεΐνη (*Εικόνα 2.2*):

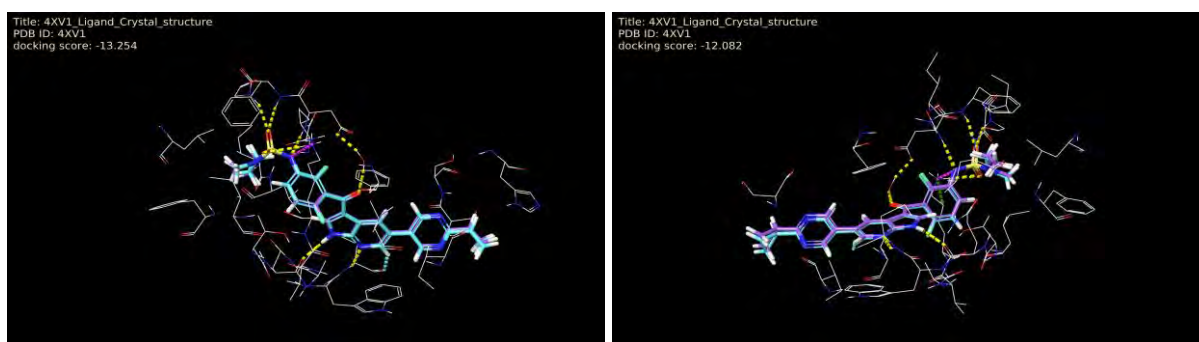
- Lys 483
- Gln 530
- Cys 532
- Asp 594
- Phe 595
- Gly 596



Εικόνα 2.2: Οι κρίσιμες για την πρόσδεση αλληλεπιδράσεις του κρυσταλλικού συμπλόκου της ογκοπρωτεΐνης B-RAF V600E που προέρχεται από αρχείο με κωδικό PDB: 4XV1 σε 2D διαμόρφωση.

2.4.1 Επικύρωση μεθόδου μοριακής πρόσδεσης

Επόμενο στάδιο της μελέτης ήταν η επικύρωση της μεθόδου Μοριακής Πρόσδεσης που θα χρησιμοποιηθεί, δηλαδή η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών και παραμέτρων, ώστε να αναπαραχθεί η κρυσταλλική διαμόρφωση. Η πορεία που χρησιμοποιείται για την επικύρωση αναλύεται παρακάτω (βλ. Ligand docking). Όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 2.3*, οι διαμορφώσεις των προσδετών και οι αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη συμπίπτουν στο σύμπλοκο με χρήση των αλγορίθμων Μοριακής Πρόσδεσης SP (standard precision) και XP (extra precision). Επομένως, η μέθοδος είναι επικυρωμένη.

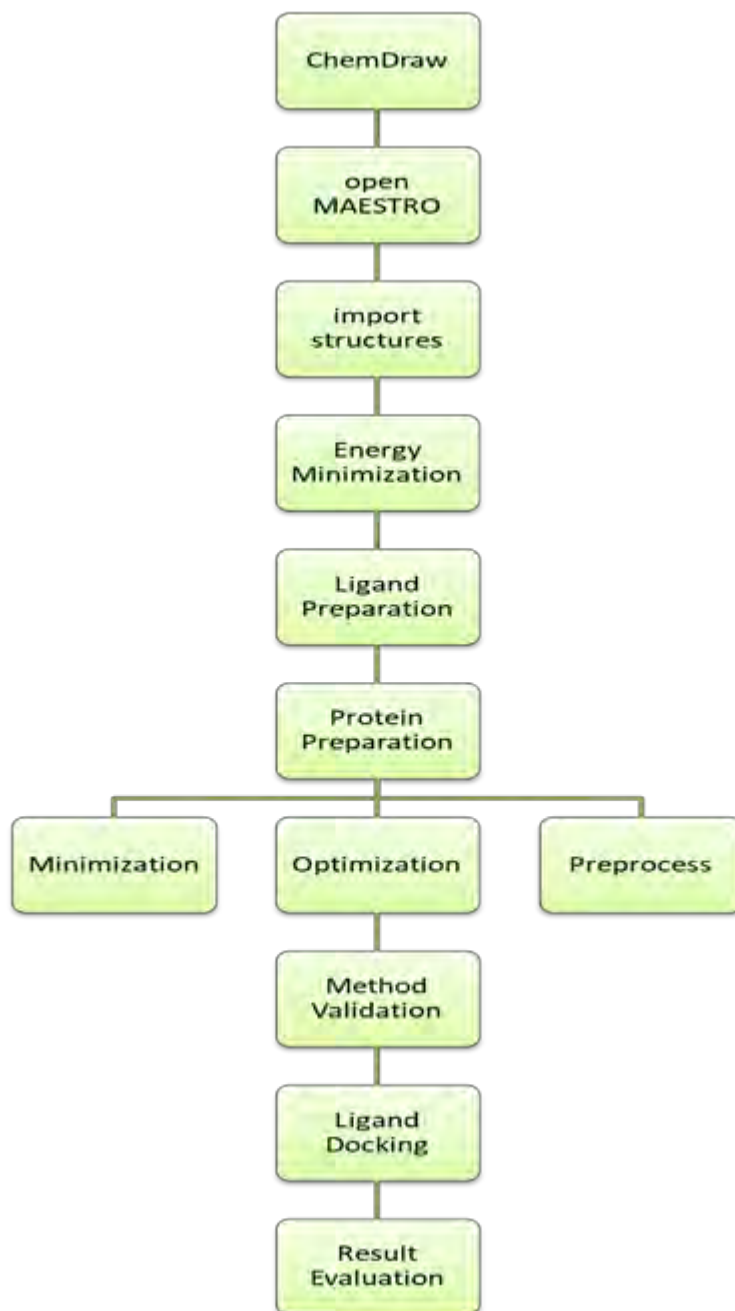


Εικόνα 2.3: Οι διαμορφώσεις των προσδετών και οι αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη συμπίπτουν στο κρυσταλλικό σύμπλοκο που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση των αλγορίθμων Μοριακής Πρόσδεσης SP (αριστερά) και XP (δεξιά).

Μοριακή πρόσδεση είναι η πρόβλεψη της θέσης πρόσδεσης ενός προσδέτη σε μία πρωτεΐνη. Προβλέπει τη 3D διαμόρφωση του προσδέτη και όλες τις δυνατές αλληλεπιδράσεις του με την πρωτεΐνη. Συνήθως, δημιουργούνται αρκετές διαφορετικές “πόζες” (διαμορφώσεις), οι οποίες αξιολογούνται από διαφορετικά αποτελέσματα (*docking scores*), τα οποία δείχνουν πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση προσδέτη-πρωτεΐνης σε κάθε πόζα κι εάν υιοθετούν ευνοϊκές διαμορφώσεις.

Στην παρούσα μελέτη, το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης είναι το **Glide**. Αρχικά, δημιουργείται ένα πλέγμα-κουτί (grid box), το οποίο υποδεικνύει το μέρος της πρωτεΐνης όπου θα προσδεθεί ο ligand. Το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία του πλέγματος (*Receptor Grid Generation*) επιλέγοντας σαν μόριο το ligand, οπότε αυτόματα αποθηκεύεται σαν αρχείο zip, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης (*Ligand Docking*) με τις εξεταζόμενες ενώσεις, αφού αυτές έχουν προετοιμαστεί (ligprep). Ως μέθοδος επιλέγεται είτε η SP (standard precision), είτε η XP (extra precision) και τίθεται ως περιορισμός το

μέγιστο των 10 διαμορφώσεων για τον κάθε προσδέτη. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, εμφανίζονται οι προτεινόμενες πόζες συνοδευόμενες από το docking score τους, όπου μπορούν να προσδιοριστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδέτη και πρωτεΐνης σε κάθε πόζα. Το docking score είναι ένας πρόχειρος υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας δέσμησης του προσδέτη στον υποδοχέα, όσο πιο αρνητικό είναι, τόσο πιο ισχυρή η δέσμευση της πόζας.



Εικόνα 2.4: Μεθοδολογία πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης.

2.5 Μεθοδολογία MTT

2.5.1 Δοκιμασία MTT για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα

Η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας πραγματοποιείται με την προσθήκη θρυψίνης 0.25%, μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται θρυψινοποίηση. Αρχικά τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με κατάλληλο όγκο διαλύματος PBS 1X για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και στη συνέχεια προστίθενται 3mL διαλύματος θρυψίνης (0.25% σε PBS 1X). Η θρυψίνη έχει την ιδιότητα να υδρολύει τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων στην εκάστοτε επιφάνεια σε κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης. Ο χρόνος της θρυψινοποίησης εξαρτάται από την κυτταρική σειρά και διαρκεί συνήθως 5-10 λεπτά, μετά το πέρας των οποίων προστίθεται όγκος θρεπτικού υλικού διπλάσιος από τον όγκο της θρυψίνης (6mL) για να διακοπεί η δράση της.

Τα αποκολλημένα κύτταρα στο διάλυμα θρυψίνης συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αναρροφάται, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1mL θρεπτικού υλικού με τη βοήθεια πιπέτας και προστίθενται άλλα 9mL θρεπτικού υλικού. Από το διάλυμα των 10mL που προκύπτει λαμβάνεται μικρή ποσότητα, περίπου 10μL, η οποία μεταφέρεται σε ειδική πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο), προκειμένου να γίνει η μέτρηση των κυττάρων. Έπειτα, με αναγωγή στον αρχικό όγκο υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που υπήρχαν στην επιφάνεια καλλιέργειας. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων ανά πηγαδάκι σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης (96-well plate) εξαρτάται από το είδος των κυττάρων. Εν συνεχεία, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προσθήκη 100μL θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι μίας πλάκας μικροπιλοδότησης σε τετραπλές ή πενταπλές επαναλήψεις.
- 2) Επώαση των κυττάρων για 24 ώρες σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, ώστε να προσκολληθούν στην επιφάνεια καλλιέργειας.
- 3) Προσθήκη 100μL της ουσίας, αραιωμένης σε θρεπτικό υλικό στις επιθυμητές συγκεντρώσεις, ανά πηγαδάκι.
- 4) Επώαση των κυττάρων όσο χρειάζεται για να δράσει η ουσία.

- 5) Προσθήκη 10μL πυκνού διαλύματος MTT (5mg/ml) σε κάθε πηγαδάκι με πολυπιπέτα με κλειστό το φως του θαλάμου επίπεδης ροής αέρος (laminar air flow hood), καθώς το MTT είναι φωτοευαίσθητο. Η πλάκα μικροπιλοδότησης τυλίγεται με αλουμινόχαρτο.
- 6) Επώαση των κυττάρων για 3 ώρες για να δράσει το αντιδραστήριο.
- 7) Προσθήκη 110μL SDS (10%) σε κάθε πηγαδάκι για να διαλυτοποιηθεί η αδιάλυτη στο νερό φορμαζίνη.
- 8) Ανάδευση της πλάκας μικροπιλοδότησης για 3 ώρες με ταχύτητα 100revs/min για να σπάσουν οι φυσαλίδες που έχουν δημιουργηθεί και να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.
- 9) Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 550nm και στα 690nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 690nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 550nm.

Στην περίπτωση του βουτυλοξειδίου, χρειάζονται περίπου 100.000 κύτταρα Caco-2 ή WM 164 ανά πηγαδάκι. Ύστερα από επώαση των κυττάρων για 24 ώρες, προστίθεται 1μL βουτυλοξειδίου αραιωμένο σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξειδίο) στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM. Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα για να δράσει το βουτυλοξειδίο.

Αντίθετα, στην περίπτωση των εξεταζόμενων χημικών ουσιών, μετά από αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού από την πλάκα μικροπιλοδότησης, προστίθενται 100μL της ουσίας διαλυμένης σε DMSO και αραιωμένης στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 1,5625μM, 3,125μM, 6,25μM, 10μM, 12,5μM, 20μM, 25μM, 50μM, 100μM. Τα κύτταρα επωάζονται για 72 ώρες για να δράσει η χημική ουσία.

Ο οργανικός διαλύτης DMSO αποτελεί τον πιο κοινό διαλύτη για τη χορήγηση ουσιών σε κυτταροκαλλιέργειες, η περιεκτικότητά του οποίου στο θρεπτικό μέσο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1% v/v.

Η ποσότητα των κυττάρων που απαιτείται ανά πηγαδάκι ανά τύπο κυττάρου αναφέρεται παρακάτω: HCT 116: 5.000, Hep G2: 2.000, WM 164: 5.000, PC-3: 5.000, MDA MB-231: 10.000, U2-OS: 5.000, A 549: 2.000, HLF-1: 5.000 κύτταρα.

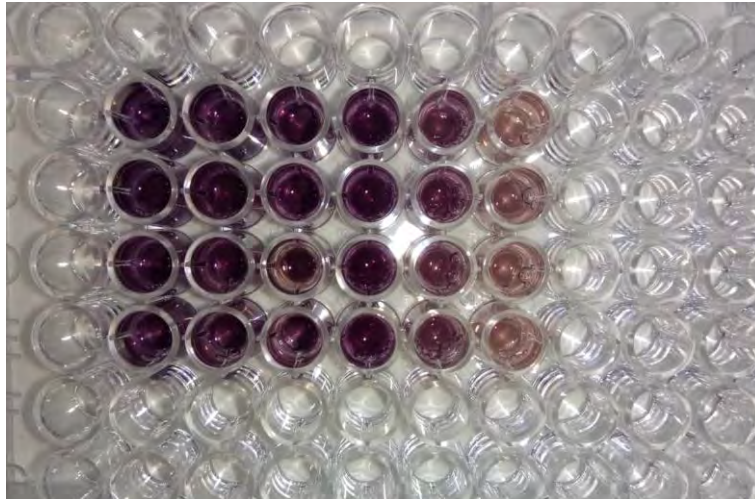
Στην περίπτωση που το θρεπτικό υλικό είναι DMEM, στο τέλος αφαιρείται η τιμή απορρόφησης του θετικού control (θρεπτικό υλικό και MTT και SDS) στα 550nm από τη διαφορά μεταξύ της τιμής απορρόφησης στα 690nm και της τιμής απορρόφησης στα 550nm.

2.5.2 Δοκιμασία MTT για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα

Αρχικά πραγματοποιείται αναρρόφηση του μεγαλύτερου μέρους του θρεπτικού υλικού για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και τα ζωντανά αιωρούμενα κύτταρα, που βρίσκονται στο κάτω μέρος της φλάσκας, συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Η επιθυμητή ποσότητα των κυττάρων U-937 είναι περίπου 100.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης. Εν συνεχεία, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προσθήκη 500μL (περίπου 500.000 κύτταρα U-937) θρεπτικού υλικού σε 6 erpendorfs.
- 2) Επώαση των κυττάρων για 1 ώρα σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να ηρεμήσουν.
- 3) Προσθήκη 5μL βουτυλοξειδίου αραιωμένο σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξειδίο) στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM.
- 4) Επώαση των κυττάρων για 1 ώρα για να δράσει το βουτυλοξειδίο.
- 5) Προσθήκη 100μL από κάθε erpendorf σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης σε τετραπλές επαναλήψεις.
- 6) Προσθήκη 10μL πυκνού διαλύματος MTT (5mg/ml) σε κάθε πηγαδάκι με πολυπιπέτα με κλειστό το φως του θαλάμου επίπεδης ροής αέρος (laminar air flow hood), καθώς το MTT είναι φωτοευαίσθητο. Η πλάκα μικροπιλοδότησης τυλίγεται με αλουμινόχαρτο.
- 7) Επώαση των κυττάρων για 3 ώρες για να δράσει το αντιδραστήριο.
- 8) Προσθήκη 110μL SDS (10%) σε κάθε πηγαδάκι για να διαλυτοποιηθεί η αδιάλυτη στο νερό φορμαζίνη.
- 9) Ανάδευση της πλάκας μικροπιλοδότησης για 3 ώρες με ταχύτητα 100revs/min για να σπάσουν οι φυσαλίδες που έχουν δημιουργηθεί και να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.

10) Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 550nm και στα 690nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 690nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 550nm.



Εικόνα 2.5: Η απεικόνιση της πλάκας μικροπιλοδότησης κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης με χρήση μεθοδολογίας MTT.

2.6 Μεθοδολογία ΧΤΤ

2.6.1 Προετοιμασία του αντιδραστηρίου

Προετοιμάζεται διάλυμα 10mM PMS (Phenazine Methosulfate) σε PBS (Phosphate Buffered Saline) (3mg PMS σε 1mL PBS). Διαλύονται 4mg ΧΤΤ σε 4mL θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας. Το διάλυμα αντίδρασης ΧΤΤ φτιάχνεται αμέσως πριν τη χρήση προσθέτοντας 10μL διαλύματος PMS σε 4mL διαλύματος ΧΤΤ.

2.6.2 Δοκιμασία ΧΤΤ για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα

Η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας πραγματοποιείται με την διαδικασία της θρυψινοποίησης που αναλύθηκε παραπάνω. Τα αποκολλημένα κύτταρα στο διάλυμα θρυψίνης συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων ανά πηγαδάκι σε μία πλάκα

μικροπιλοδότησης εξαρτάται από το είδος των κυττάρων. Εν συνεχεία, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προσθήκη 100μL θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι μίας πλάκας μικροπιλοδότησης (96-well plate) σε τετραπλές ή πενταπλές επαναλήψεις.
- 2) Επώαση των κυττάρων για 24 ώρες σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να προσκολληθούν στην επιφάνεια καλλιέργειας.
- 3) Προσθήκη 100μL της ουσίας, αραιωμένης σε θρεπτικό υλικό στις επιθυμητές συγκεντρώσεις, ανά πηγαδάκι.
- 4) Επώαση των κυττάρων όσο χρειάζεται για να δράσει η ουσία.
- 5) Προσθήκη 25μL διαλύματος ΧΤΤ/PMS σε κάθε πηγαδάκι με πολυτιπέτα με κλειστό το φως του θαλάμου επίπεδης ροής αέρος (laminar air flow hood), καθώς το ΧΤΤ και το PMS είναι φωτοευαίσθητα. Η πλάκα μικροπιλοδότησης τυλίγεται με αλουμινόχαρτο.
- 6) Επώαση των κυττάρων για 3 ώρες για να δράσει το αντιδραστήριο.
- 7) Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 470nm και στα 650nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 650nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 470nm.

Στην περίπτωση του βουτυλοξειδίου, χρειάζονται περίπου 100.000 κύτταρα Caco-2 ή WM 164 ανά πηγαδάκι. Ύστερα από επώαση των κυττάρων για 24 ώρες, προστίθεται 1μL βουτυλοξειδίου αραιωμένο σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξειδιο) στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM. Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα για να δράσει το βουτυλοξείδιο.

Αντίθετα, στην περίπτωση των εξεταζόμενων χημικών ουσιών, μετά από αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού από την πλάκα μικροπιλοδότησης, προστίθενται 100μL της ουσίας διαλυμένης σε DMSO και αραιωμένης στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 1,5625μM, 3,125μM, 6,25μM, 10μM, 12,5μM, 20μM, 25μM, 50μM, 100μM, ή στην περίπτωση του τελευταίου πειράματος στις συγκεντρώσεις 0μM, 0,5μM, 1μM, 2μM, 4μM, 8μM, 12μM, 16μM, 20μM, 25μM. Τα κύτταρα επωάζονται για 72 ώρες για να δράσει η χημική ουσία.

Η ποσότητα των κυττάρων που απαιτείται ανά πηγαδάκι ανά τύπο κυττάρου αναφέρεται παρακάτω: HCT 116: 5.000, Hep G2: 2.000, WM 164: 5.000, PC-3: 5.000, MDA MB-231: 10.000, U2-OS: 5.000, A 549: 2.000, HLF-1: 5.000 κύτταρα.

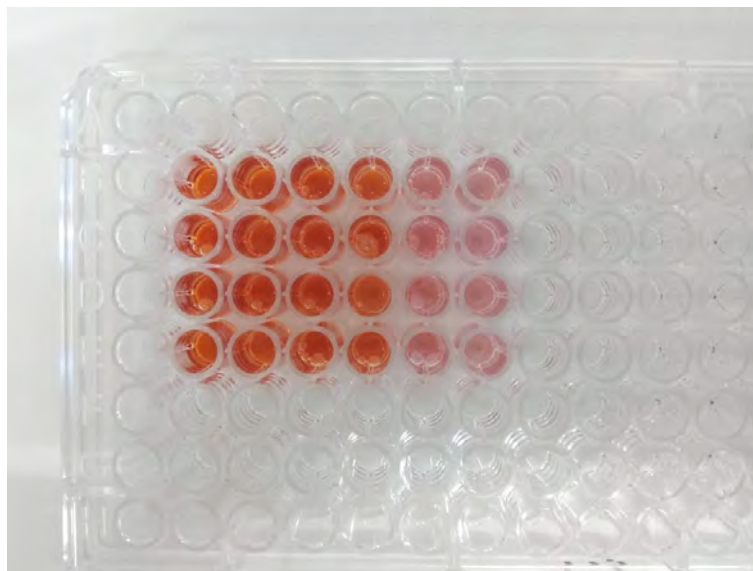
Στο τέλος αφαιρείται η τιμή απορρόφησης του θετικού control (θρεπτικό υλικό και ΧΤΤ) στα 470nm από τη διαφορά μεταξύ της τιμής απορρόφησης στα 650nm και της τιμής απορρόφησης στα 470nm.

2.6.3 Δοκιμασία ΧΤΤ για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα

Αρχικά πραγματοποιείται αναρρόφηση του μεγαλύτερου μέρους του θρεπτικού υλικού για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και τα ζωντανά αιωρούμενα κύτταρα, που βρίσκονται στο κάτω μέρος της φλάσκας, συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων U-937 επίσης είναι περίπου 100.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης. Εν συνεχεία, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προσθήκη 500μL (περίπου 500.000 κύτταρα U-937) θρεπτικού υλικού σε 6 erpendorfs.
- 2) Επώαση των κυττάρων για 1 ώρα σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να ηρεμήσουν.
- 3) Προσθήκη 5μL βουτυλοξειδίου αραιωμένο σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξειδίο) στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM.
- 4) Επώαση των κυττάρων για 1 ώρα για να δράσει το βουτυλοξειδίο.
- 5) Προσθήκη 100μL από κάθε erpendorf σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης (96-well plate) σε τετραπλές επαναλήψεις.
- 6) Προσθήκη 25μL διαλύματος ΧΤΤ/PMS σε κάθε πηγαδάκι με πολυπιπέτα με κλειστό το φως του θαλάμου επίπεδης ροής αέρος (laminar air flow hood), καθώς το ΧΤΤ και το PMS είναι φωτοευαίσθητα. Η πλάκα μικροπιλοδότησης τυλίγεται με αλουμινόχαρτο.
- 7) Επώαση των κυττάρων για 3 ώρες για να δράσει το αντιδραστήριο.

- 8) Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 470nm και στα 650nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 650nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 470nm.

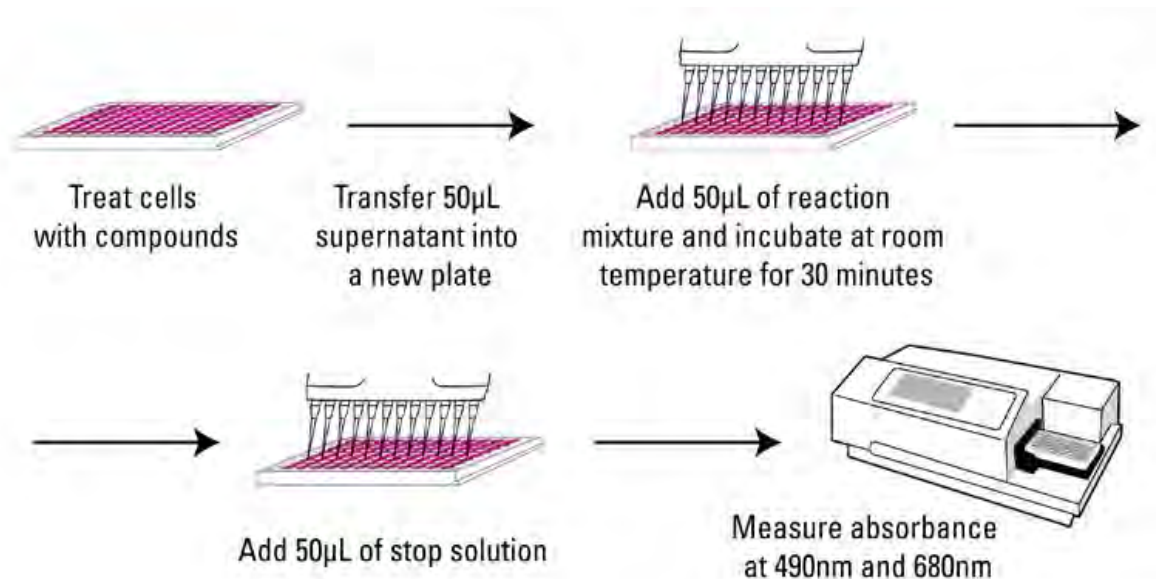


Εικόνα 2.6: Η απεικόνιση της πλάκας μικροπιλοδότησης κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης με χρήση μεθοδολογίας ΧΤΤ.

2.7 Μεθοδολογία LDH

2.7.1 Σύνοψη διαδικασίας

Τα καλλιεργημένα κύτταρα επωάζονται με χημικές ενώσεις, οι οποίες επάγουν κυτταροτοξικότητα (λύση κυττάρων) και ακολούθως, απελευθερώνουν το ένζυμο LDH στο μέσο. Το υπερκείμενο, που περιέχει την απελευθερούμενη ποσότητα LDH, μεταφέρεται σε νέα πλάκα και αναμιγνύεται με το Reaction Mixture. Μετά από 30 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, οι αντιδράσεις σταματούν με την προσθήκη του Stop Solution. Μετράται η απορρόφηση στα 490nm και στα 680nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο ανάγνωσης πλάκας για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της μεθόδου.



Εικόνα 2.7: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας LDH.

2.7.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων

1) Reaction Mixture

Διαλύεται ένα φιαλίδιο του Substrate Mix (λυοφιλοποιημένο) σε 11,4mL απεσταγμένου νερού. Αναμειγνύεται απαλά προς πλήρη διάλυση. Γίνεται απόψυξη ενός φιαλιδίου του Assay Buffer (0,6mL) σε θερμοκρασία δωματίου (προστασία από το φως). Το Reaction Mixture προκύπτει από την ανάμιξη του Assay Buffer (0,6mL) με 11,4mL του Substrate Mix. Απαλή ανάδευση και προστασία από το φως μέχρι τη χρήση. Όσο μίγμα περισσέψει από το πείραμα φυλάσσεται στην κατάψυξη (-20°C) προστατευμένο από το φως για 3-4 εβδομάδες.

2) 1X LDH Positive Control

Αραίωση 1µL από LDH Positive Control σε 10mL από 1% BSA (Bovine Serum Albumin) σε PBS (Phosphate Buffered Saline).

2.7.3 Προσδιορισμός του βέλτιστου αριθμού κυτάρων για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας LDH

Διαφορετικοί τύποι κυτάρων έχουν διαφορετικά επίπεδα δραστικότητας LDH. Για την εξαγωγή βέλτιστων αποτελεσμάτων είναι επιθυμητή η διεξαγωγή ενός προκαταρκτικού πειράματος, ώστε να προσδιοριστεί ο βέλτιστος αριθμός κυτάρων, για να διασφαλιστεί ότι

το σήμα LDH βρίσκεται εντός της γραμμικής περιοχής. Δοκιμάστηκαν οι κυτταρικές σειρές Caco-2 (προσκολλημένα) και U-937 (αιωρούμενα) και χρησιμοποιήθηκαν από 20.000 έως 200.000 κύτταρα (ανά 20.000) στο κάθε πηγαδάκι στην πλάκα μικροπιλοδότησης.

Για τη διαδικασία στα προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προετοιμασία μιας σειράς αραιώσεων από κύτταρα (0-200.000 κύτταρα/100μL θρεπτικού υλικού: DMEM) σε δύο σετ πλακών μικροπιλοδότησης τετραπλών επαναλήψεων. (Συμπεριλαμβάνεται κι ένα control μόνο με θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα για τον προσδιορισμό της γραμμής βάσης της LDH).
- 2) Επώαση των πλακών στον επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για 24 ώρες, για να προσκολληθούν στην επιφάνεια καλλιέργειας.
- 3) Προσθήκη 10μL αποστειρωμένου νερού στη μία πλάκα (**Spontaneous LDH Activity Control**).
- 4) Προσθήκη 10μL Lysis Buffer (10X) στην άλλη πλάκα και ήπια ανάμιξη (**Maximum LDH Activity Control**).
- 5) Επώαση των πλακών στον επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για 45 λεπτά.
- 6) Μεταφορά 50μL υπερκείμενου υγρού όλων των δειγμάτων σε νέες πλάκες μικροπιλοδότησης. (Προαιρετική προσθήκη σε άλλο πηγαδάκι 50μL 1X LDH Positive Control σε τέσσερις επαναλήψεις).
- 7) Προσθήκη 50μL Reaction Mixture σε κάθε δείγμα και ήπια ανάμιξη.
- 8) Επώαση των πλακών σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά προστατευμένες από το φως.
- 9) Προσθήκη 50μL Stop Solution σε κάθε δείγμα και ήπια ανάμιξη. (Διάσπαση τυχόν φυσαλίδων με βελόνα, καθώς εμποδίζουν τις μετρήσεις απορρόφησης.)
- 10) Μέτρηση των απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο Tecan στα 490nm και 680nm. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της LDH, αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 680nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 490nm.

- 11) Σχηματισμός καμπύλης της τιμής απορρόφησης του Maximum LDH Activity Control και της τιμής απορρόφησης του Spontaneous LDH Activity Control προς τον αριθμό κυττάρων για τον προσδιορισμό του βέλτιστου αριθμού κυττάρων για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας LDH.

Για τη διαδικασία στα αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προετοιμασία μιας σειράς αραιώσεων από κύτταρα (0-200.000 κύτταρα/100μL θρεπτικού υλικού: RPMI 1640) σε δύο σετ erpendorfs. (Συμπεριλαμβάνεται κι ένα control μόνο με θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα για τον προσδιορισμό της γραμμής βάσης της LDH).
- 2) Επώαση των erpendorfs στον επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για 24 ώρες, για να ηρεμήσουν.
- 3) Προσθήκη 10μL αποστειρωμένου νερού στο ένα σετ erpendorfs (**Spontaneous LDH Activity Control**).
- 4) Προσθήκη 10μL Lysis Buffer (10X) στην άλλο σετ erpendorfs και ήπια ανάμιξη (**Maximum LDH Activity Control**).
- 5) Επώαση των πλακών στον επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για 45 λεπτά.
- 6) Φυγοκέντρηση στις 1.000 στροφές για μισό λεπτό.
- 7) Μεταφορά 50μL υπερκείμενου υγρού από όλα τα δείγματα σε δύο πλάκες μικροπιλοδότησης. (Προαιρετική προσθήκη σε άλλο πηγαδάκι 50μL 1X LDH Positive Control σε τέσσερις επαναλήψεις).
- 8) Προσθήκη 50μL Reaction Mixture σε κάθε δείγμα με ήπια ανάμιξη.
- 9) Επώαση των πλακών σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά προστατευμένες από το φως.
- 10) Προσθήκη 50μL Stop Solution σε κάθε δείγμα με ήπια ανάμιξη. (Διάσπαση τυχόν φουσαλίδων με βελόνα, καθώς εμποδίζουν τις μετρήσεις απορρόφησης.)
- 11) Μέτρηση των απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο Tecan στα 490nm και 680nm. Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της LDH, αφαιρείται η τιμή απορρόφησης

στα 680nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 490nm.

- 12) Σχηματισμός καμπύλης της τιμής απορρόφησης του Maximum LDH Activity Control και της τιμής απορρόφησης του Spontaneous LDH Activity Control προς τον αριθμό κυττάρων για τον προσδιορισμό του βέλτιστου αριθμού κυττάρων για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας LDH.

2.7.4 Δοκιμασία LDH για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα

- 1) Μετά την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας με την διαδικασία της θρυψινοποίησης που αναλύθηκε παραπάνω, τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε πλάκα Neubauer και την κατάλληλη αραιώση του δείγματος στη βέλτιστη συγκέντρωση, μεταφέρθηκε κατάλληλος αριθμός κυττάρων ανά 100μL θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι σε πλάκα μικροπιλοδότησης σε τέσσερις επαναλήψεις. (Συμπεριλαμβάνεται κι ένα control μόνο με θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα για τον προσδιορισμό της γραμμής βάσης της LDH). Πραγματοποιήθηκε μεταφορά επιπλέον κυττάρων σε τετραπλές επαναλήψεις για τον προσδιορισμό του **Spontaneous LDH Activity Control** (με νερό) και του **Maximum LDH Activity Control** (με 10X Lysis Buffer).
- 2) Επώαση της πλάκας σε επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για 24 ώρες.
- 3) Προετοιμασία δειγμάτων:
 - **Spontaneous LDH Activity Control:** Προσθήκη 10μL αποστειρωμένου νερού σε τέσσερα πηγαδάκια.
 - **Maximum LDH Activity Control:** Καμία προσθήκη ακόμα σε τέσσερα πηγαδάκια.
 - **Χημική ένωση:** Προσθήκη 10μL της χημικής ένωσης αραιωμένης σε θρεπτικό υλικό στις επιθυμητές συγκεντρώσεις ανά τέσσερις επαναλήψεις.
- 4) Επώαση της πλάκας σε επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για όσο χρόνο χρειάζεται.
- 5) Προσθήκη 10μL Lysis Buffer (10X) σε τέσσερα πηγαδάκια για τον προσδιορισμό του Maximum LDH Activity Control, 45 λεπτά πριν τη μεταφορά του υπερκείμενου υγρού. Ακολουθεί ήπια ανάμιξη.

- 6) Επώαση της πλάκας σε επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για 45 λεπτά.
- 7) Μεταφορά 50μL του υπερκείμενου υγρού από κάθε δείγμα σε νέα πλάκα μικροπιλοδότησης.
- 8) Προσθήκη 50μL Reaction Mixture σε κάθε δείγμα και ανάμιξη χρησιμοποιώντας μία πολυπιπέτα.
- 9) Επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά προστατευμένη από το φως.
- 10) Προσθήκη 50μL Stop Solution σε κάθε δείγμα και ήπια ανάμιξη. (Διάσπαση τυχόν φυσαλίδων με βελόνα, καθώς εμποδίζουν τις μετρήσεις απορρόφησης.)
- 11) Μέτρηση των απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο Tecan στα 490nm και 680nm. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της LDH, αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 680nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 490nm πριν τον υπολογισμό της % κυτταροτοξικότητας.
- 12) Για τον υπολογισμό της % κυτταροτοξικότητας, αφαιρείται η ελάχιστη (αυθόρμητη) δραστηριότητα LDH από τη δραστηριότητα LDH του βουτυλοξειδίου, διαιρείται με τη συνολική δραστηριότητα LDH (μέγιστη-ελάχιστη) και πολλαπλασιάζεται με 100, όπως προκύπτει από τον τύπο:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{Compound - treated LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}}{\text{Maximum LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}} \times 100$$

Στην περίπτωση του βουτυλοξειδίου, μεταφέρονται 100.000 κύτταρα Caco-2 ή WM 164 ανά 100μL θρεπτικού υλικού DMEM σε κάθε πηγαδάκι σε πλάκα μικροπιλοδότησης σε τέσσερις επαναλήψεις. Ύστερα από επώαση των κυττάρων για 24 ώρες, προστίθεται 1μL βουτυλοξειδίου αραιωμένο σε DMSO στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM. Τα κύτταρα επωάζονται για 45λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 10μL Lysis Buffer (10X) σε τέσσερα πηγαδάκια 10-15 λεπτά πριν τη μεταφορά του υπερκείμενου υγρού.

Στο τελευταίο πείραμα καλλιεργήθηκαν κύτταρα σε τρυβλία 6 θέσεων, όπου προστέθηκαν 2x10⁵ κύτταρα Hep G2 ανά 2mL θρεπτικού υλικού DMEM σε κάθε πηγαδάκι στο ένα τρυβλίο και 5x10⁵ κύτταρα PC-3 ανά 2mL θρεπτικού υλικού RPMI σε κάθε πηγαδάκι στο άλλο

τρυβλίο. Ύστερα από επώαση των κυττάρων για 24 ώρες και αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού, προστέθηκαν 2mL της χημικής ουσίας διαλυμένης σε DMSO και αραιωμένης στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 5μM, 10μM, 15μM, 20μM, 25μM σε διπλές επαναλήψεις. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 72 ώρες για να δράσει η χημική ουσία.

Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε το υπερκείμενο υγρό, που περιέχει το ένζυμο LDH, σε erpendorfs, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν στις 1.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, και πάλι μεταφέρθηκε το υπερκείμενο υγρό, χωρίς πλέον τα νεκρά κύτταρα, σε νέα erpendorfs, από τα οποία μεταφέρθηκαν 50μL σε διπλές επαναλήψεις σε πλάκα μικροπιλοδότησης 96 θέσεων για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο LDH.

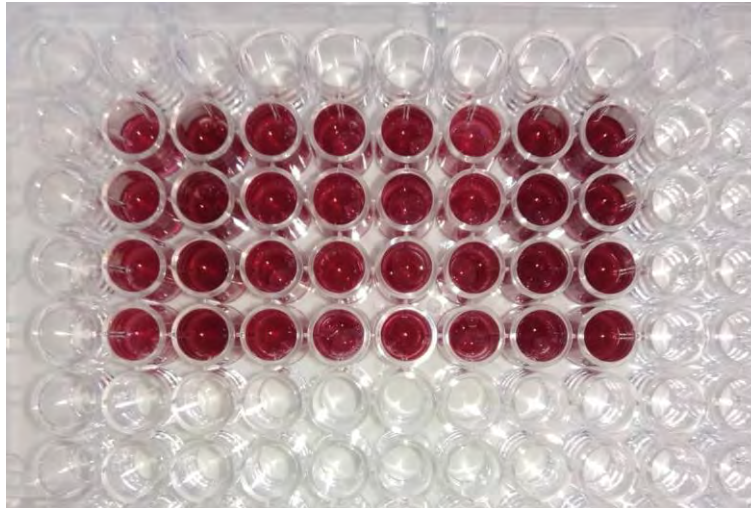
Παράλληλα, στα τρυβλία 6 θέσεων έγινε θρυψινοποίηση, τα αποκολλημένα κύτταρα στο διάλυμα θρυψίνης μεταφέρθηκαν σε falcons, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, αναρροφήθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε κρύο διάλυμα PBS 1X για έκπλυση, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2.000 στροφές/λεπτό στους 4°C για 5 λεπτά και πάλι αναρρόφηση. Τελικά έμεινε το ίζημα των κυττάρων, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών με τη μέθοδο WESTERN, που αναλύεται στο κεφάλαιο 2.8.

2.7.5 Δοκιμασία LDH για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα

- 1) Μετά τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων U-937 σε πλάκα Neubauer και την κατάλληλη αραιώση του δείγματος στη βέλτιστη συγκέντρωση, μεταφέρθηκαν 500.000 κύτταρα ανά 500μL θρεπτικού υλικού RPMI 1640 σε 8 erpendorfs.
- 2) Επώαση των erpendorfs σε επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για 1 ώρα, για να ηρεμήσουν.
- 3) Προετοιμασία δειγμάτων:
 - **Spontaneous LDH Activity Control:** Προσθήκη 50μL αποστειρωμένου νερού σε ένα erpendorf.
 - **Maximum LDH Activity Control:** Καμία προσθήκη ακόμα σε erpendorf.

- **Βουτυλοξειδίο:** Προσθήκη 5μL διαλύματος βουτυλοξειδίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 25, 50, 100, 250, 500μM, που προκύπτουν από κατάλληλες αραιώσεις σε DMSO) σε 6 εppendorfs αντίστοιχα.
- 4) Προσθήκη 50μL Lysis Buffer (10X) σε ένα εppendorf για τον προσδιορισμό του **Maximum LDH Activity Control** σε 10-15 λεπτά περίπου (χρειάζεται 45 λεπτά για να δράσει). Ακολουθεί ήπια ανάμιξη.
 - 5) Επώαση των εppendorfs σε επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για 45 λεπτά. (Σύνολο 1 ώρα από την προσθήκη βουτυλοξειδίου.)
 - 6) Φυγοκέντρηση όλων των εppendorfs στις 1.800 στροφές για 5 λεπτά και μεταφορά 50μL του υπερκείμενου υγρού από κάθε δείγμα σε πλάκα μικροπιλοδότησης ανά τέσσερις επαναλήψεις.
 - 7) Προσθήκη 50μL Reaction Mixture σε κάθε δείγμα και ανάμιξη χρησιμοποιώντας μια πολυπιπέτα.
 - 8) Επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά προστατευμένη από το φως.
 - 9) Προσθήκη 50μL Stop Solution σε κάθε δείγμα και ήπια ανάμιξη. (Διάσπαση τυχόν φυσαλίδων με βελόνα, καθώς εμποδίζουν τις μετρήσεις απορρόφησης.)
 - 10) Μέτρηση των απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο Tecan στα 490nm και 680nm. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της LDH, αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 680nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 490nm πριν τον υπολογισμό της % κυτταροτοξικότητας.
 - 11) Για τον υπολογισμό της % κυτταροτοξικότητας, αφαιρείται η ελάχιστη (αυθόρμητη) δραστηριότητα LDH από τη δραστηριότητα LDH του βουτυλοξειδίου, διαιρείται με τη συνολική δραστηριότητα LDH (μέγιστη-ελάχιστη) και πολλαπλασιάζεται με 100, όπως προκύπτει από τον τύπο:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{Compound - treated LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}}{\text{Maximum LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}} \times 100$$



Εικόνα 2.8: Η απεικόνιση της πλάκας μικροπιλοδότησης κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης με χρήση μεθοδολογίας LDH.

2.8 Ανίχνευση πρωτεϊνών-δεικτών κυτταρικού θανάτου με ανοσοαποτύ-πωση κατά Western

2.8.1 Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών

Η παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών από ίζημα κυττάρων έγινε με χρήση του Radioimmuno-precipitation Assay buffer (RIPA buffer), το οποίο είναι ένα ισχυρό διάλυμα λύσης κυττάρων και ιστών. Στην αρχή γίνεται έκπλυση και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS 1X και μετά φυγοκέντρηση στις 2.000 στροφές/λεπτό στους 4°C για 5 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 100μl RIPA buffer, 1μl ορθοβαναδικό νάτριο (1mM), 1μl PMSF (2mM) και 1μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών (protease inhibitor cocktail) για κάθε 1×10^6 κύτταρα. Ακολουθεί επώαση στον πάγο και φυγοκέντρηση στις 10.400στροφές/λεπτό στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο περιέχει το ολικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών.

2.8.2 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Η μέθοδος Bradford είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη αναλυτική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικροποσοτήτων πρωτεΐνης. Στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική

Coomassie Brilliant Blue G-250 μπορεί να βρεθεί σε δύο χρωματικές καταστάσεις, την ερυθρή και την κυανή. Η ερυθρή μορφή μετατρέπεται στην κυανή όταν η χρωστική αντιδράσει με πρωτεΐνη σε όξινο υδατικό διάλυμα. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο χρωστικής και πρωτεΐνης έχει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm.

Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA). Από τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης, σε συνάρτηση με τη πρωτεϊνική συγκέντρωση (μg/ml) του κάθε δείγματος. Έπειτα, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των άγνωστων πρωτεϊνικών δειγμάτων, προστίθεται 1ml δείγματος σε 799μl ddH₂O και 200μl από το αντιδραστήριο Bradford, και στη συνέχεια φωτομετρούνται στα 595nm. Από την εξίσωση ευθείας της πρότυπης καμπύλης, υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που περιέχεται στα άγνωστα δείγματα.

2.8.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Με την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος, εφόσον γίνεται χρήση SDS (sodium dodecyl sulfate), το οποίο είναι ένα αρνητικά φορτισμένο ιονικό απορρυπαντικό. Το SDS δεσμεύεται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνικών μορίων και προκαλεί τη μετουσίωσή τους. Έτσι τα πρωτεϊνικά μόρια αποσυνδέονται από άλλες πρωτεΐνες ή λιπίδια και γίνονται υδατοδιαλυτά. Οι πρωτεΐνες, με την διαδικασία αυτή, φορτίζονται αρνητικά και η κινητικότητά τους είναι ανάλογη μόνο του μοριακού τους βάρους. Τα πρωτεϊνικά δείγματα αναδιαλύονται σε αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης (SDS sample buffer) το οποίο περιέχει 50μM Tris-HCl pH 6,8, 5M β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS, 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη. Ακολουθεί ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε κάθετο ασυνεχές πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου, το οποίο αποτελείται από δύο τμήματα διαφορετικού pH και συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου: το πήκτωμα επιστοίβαξης (επάνω τμήμα) και το πήκτωμα διαχωρισμού (κάτω τμήμα).

Στο πήκτωμα επιστοίβαξης επιτυγχάνεται η συσσώρευση των πρωτεϊνών σε μια λεπτή στιβάδα, ώστε να έχουν όλες το ίδιο σημείο εκκίνησης και αυτό περιέχει απεσταγμένο νερό,

0,5M Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% w/v, ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο 30%, υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) 10% και τετρα-μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (N,N,N,N'- tetramethylethylenediamine, TEMED). Από την άλλη, το πήκτωμα διαχωρισμού βοηθά ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Αυτό περιλαμβάνει απεσταγμένο νερό, Tris-HCl 1,5M & pH 8,8, SDS 10% w/v, ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο 30%, υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) 10% και τετρα-μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine, TEMED). Η περιεκτικότητά του όμως σε ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο διαφέρει, καθώς αυτή καθορίζει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος και επομένως, ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε, επιλέγουμε την κατάλληλη περιεκτικότητα.

Τα διαλύματα των πηκτωμάτων επιστοιβάξης και διαχωρισμού στοιβάζονται σε κατάλληλη διάταξη και αφήνονται να πήξουν και να στερεοποιηθούν. Στη συνέχεια, μεταφέρονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου γίνεται η προσθήκη των πρωτεϊνικών δειγμάτων που περιέχουν όλα την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης (25 ή 30 mg). Επίσης, προστίθενται και 15μl δεικτική μεγέθους μοριακών βαρών (Prestained Protein Marker). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer: 200mM γλυκίνη, 25mM Tris-HCl pH 8,7 και 0,1% SDS), υπό σταθερή τάση 160V και ένταση ρεύματος 25mA. Οι πρωτεΐνες κινούνται προς την άνοδο λόγω του αρνητικού φορτίου που τους έχει προσδώσει η δέσμευση του SDS.

2.8.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωρισθεί μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (πόρων 0,2μm), μέσω ειδικής συσκευής υγρής μεταφοράς. Το πήκτωμα τοποθετείται προς την κάθοδο και η νιτροκυτταρίνη προς την άνοδο. Οι πρωτεΐνες, που είναι αρνητικά φορτισμένες (λόγω της δράσης του SDS), κατευθύνονται προς τον θετικό πόλο. Το διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) περιέχει 100ml 10X Running buffer, 200ml μεθανόλη και 700ml κρύο απιονισμένο νερό, ενώ η μεταφορά πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση ρεύματος 250mA και τάση περίπου 100V.

Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται σε μικρή ποσότητα διαλύματος της χρωστικής Ponceau 0,1% w/v (0,1g Ponceau σε 5ml οξικό οξύ 5% και 95ml απεσταγμένο

νερό), ώστε να ελεγχθεί η σωστή και πλήρης μεταφορά των πρωτεϊνών. Έπειτα, ξεπλένεται με διάλυμα TBS (10mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl) τρεις φορές. Ύστερα γίνεται επώαση της μεμβράνης με διάλυμα επικάλυψης των μη ειδικών θέσεων (Blocking buffer: TBS buffer 1X, 5% σκόνη γάλακτος Regilait με χαμηλά λιπαρά, 0,1% Tween 20). Έτσι, θα καταληφθούν οι μη ειδικές για τα πρωτογενή αντισώματα θέσεις και θα αυξηθεί η ειδικότητα πρόσδεσης.

Ακολούθως, η μεμβράνη επώαζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο επιλέγεται ανάλογα με την πρωτεΐνη που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, μέσα σε μικρά σακουλάκια ζελατίνης. Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα TBS-Tween (TBS 1X, 0,1% Tween 20) πολλαπλές φορές. Ύστερα, πραγματοποιείται η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο επιλέγεται ανάλογα με τον οργανισμό στον οποίο έχει γίνει η ανοσοποίηση για να παραχθεί το πρωτογενές αντίσωμα, σε συνθήκες σκότους. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλένεται αρχικά με διάλυμα TBS-Tween πολλαπλές φορές και μετά μία φορά με TBS 1X.

2.8.5 Εμφάνιση συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανοσοχημική ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με χρήση συστήματος ECL (Enhanced Chemiluminescent Substrate), το οποίο βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η φωταύγεια είναι εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλυσης ενέργειας από ένα διεγερμένο υπόστρωμα. Στη χημειοφωταύγεια, αυτή η διέγερση προκαλείται από μία χημική αντίδραση. Στην προκειμένη περίπτωση, το δευτερογενές αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση χρένου (Horse Radish Peroxidase HRP), το οποίο καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης. Η λουμινόλη (diacylhydrazide) οξειδώνεται παρουσία HRP παρουσία χημικών ενισχυτών (φαινόλες) σε αλκαλικές συνθήκες και διεγείρεται. Επιστρέφοντας στην κατάσταση ηρεμίας, παράγει φως (μήκος κύματος 428nm), το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί. Με τη βοήθεια των φωτονίων που παράγονται, είναι δυνατός ο εντοπισμός της θέσης του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος.

Το διάλυμα εμφάνισης ECL προκύπτει από την ανάμιξη ίσων όγκων από τα αντιδραστήρια λουμινόλης (Enhanced Luminol reagent) και υπεροξειδίου (Oxidizing reagent). Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται στην πλάκα εμφάνισης του μηχανήματος UVP ChemiDoc-It² Imager. Το διάλυμα εμφάνισης ECL προστίθεται στη μεμβράνη, ώστε να κα-

λύπτει όλη την επιφάνειά της. Ακολουθεί έκθεση της μεμβράνης και καταγραφή των απεικονίσεων σε χρόνους έκθεσης 1, 5 και 10 λεπτά. Έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ζωνών που εμφανίζονται με τον προσδιορισμό του μεγέθους τους, μετά από αντιστοίχιση τους με τις ζώνες του πρωτεϊνικού μάρτυρα.

2.8.6 Αντισώματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πρωτογενή αντισώματα:

- 1) Το μονοκλωνικό mouse της β-ακτίνης (43kDa), πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, αραιωμένο 1:1.000 σε blocking buffer, ως εσωτερικός ποσοτικός μάρτυρας
- 2) Το πολυκλωνικό mouse της PARP-1 (116, 89kDa), αραιωμένο 1:500 σε blocking buffer, ως αποπτωτικός δείκτης
- 3) Το μονοκλωνικό rabbit της phospho-MLKL (54kDa), αραιωμένο 1:500 σε blocking buffer, ως δείκτης νεκρόπτωσης

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δευτερογενή αντισώματα:

- 1) Το πολυκλωνικό rabbit IgG-HRP anti-mouse, αραιωμένο 1:1.000 σε blocking buffer, ώστε να προσδεθεί στα αντισώματα ποντικού
- 2) Το πολυκλωνικό goat IgG-HRP anti-rabbit, αραιωμένο 1:1.000 σε blocking buffer, ώστε να προσδεθεί στα αντισώματα κουνελιού

2.9 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

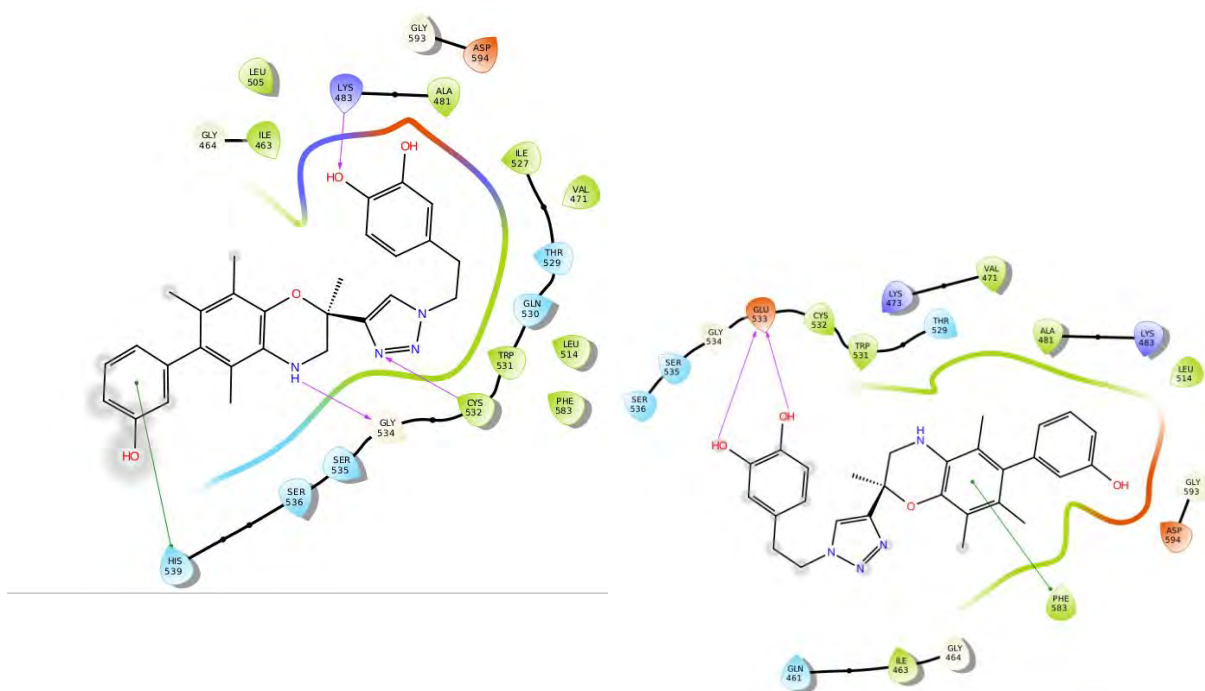
Για τη σύγκριση των διαφόρων χημικών ενώσεων ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών που εξετάζονται, προσδιορίζεται η τιμή IC_{50} για κάθε ένωση. Η τιμή IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) αποτελεί μέτρο της δραστηριότητας μίας ουσίας στην αναστολή μίας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Αυτή η ποσοτική μέτρηση υποδεικνύει την ποσότητα ενός συγκεκριμένου φαρμάκου ή άλλης ουσίας (αναστολέα) που χρειάζεται για να ανασταλεί κατά το ήμισυ μία δεδομένη βιολογική διεργασία (ή συστατικό μίας διεργασίας, δηλαδή ένα ένζυμο, κύτταρο, υποδοχέας κυττάρου ή μικροοργανισμός). Σύμφωνα με τον FDA (Food and Drug Administration), η τιμή IC_{50} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου η οποία απαι-

τείται για 50% αναστολή *in vitro*. Στην περίπτωση της LDH, προσδιορίζεται η τιμή της LC₅₀ (lethal concentration, 50%), η οποία αποτελεί ένδειξη της θνησιμότητας μιας δεδομένης τοξικής ουσίας ή παθογόνου ή τύπου ακτινοβολίας. Στην προκειμένη περίπτωση αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση της ουσίας που απαιτείται για 50% κυτταρικό θάνατο *in vitro*.

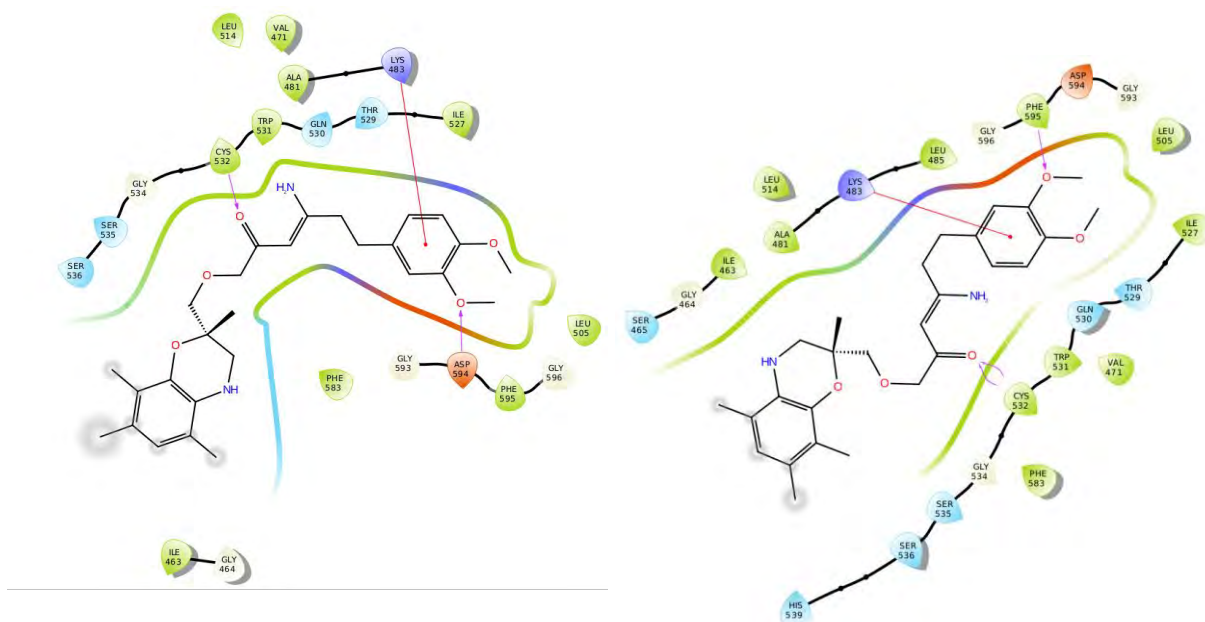
Για τον υπολογισμό των τιμών IC₅₀ και LC₅₀ χρησιμοποιήθηκαν δύο τρόποι:

- 1) Το μοντέλο λογαριθμομονάδας logit. Στην στατιστική, η συνάρτηση logit είναι ο λογάριθμος των πιθανοτήτων $p/(1-p)$, όπου ως p ορίζεται η πιθανότητα. Είναι ένας τύπος συνάρτησης που δημιουργεί έναν χάρτη τιμών πιθανοτήτων από $[0, 1]$ έως $[-\infty, +\infty]$. Στην πράξη, υπολογίζεται η συγκέντρωση της ουσίας που αντιστοιχεί σε $\ln(\text{ζωντανά/πεθαμένα κύτταρα})=0$, δηλαδή όταν έχει ανασταλεί ο πολλαπλασιασμός του 50% των ζωντανών κυττάρων οπότε η συγκέντρωση των ζωντανών κυττάρων είναι ίση με των πεθαμένων [$\ln(1)=0$], από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει από το διάγραμμα $\ln(\text{ζωντανά/πεθαμένα κύτταρα})$ σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό εξέταση ουσίας.
- 2) Το μοντέλο πιθανομονάδας probit. Στην στατιστική, το μοντέλο probit είναι ένα είδος παλινδρόμησης όπου η εξαρτημένη μεταβλητή μπορεί να πάρει μόνο δύο τιμές, π.χ. ναι ή όχι. Η ταξινόμηση των παρατηρήσεων με βάση τις προβλεπόμενες πιθανότητες είναι ένας τύπος δυαδικής ταξινόμησης μοντέλου. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιεί πιο συχνά το πρότυπο υπολογισμού μέγιστης πιθανότητας, και η διαδικασία εκτίμησης ονομάζεται παλινδρόμηση πιθανομονάδας. Αν η μεταβλητή απόκρισης Y είναι δυαδική, τότε μπορεί να έχει μόνο δύο πιθανά αποτελέσματα που θα δηλωθούν ως 1 και 0. Το Y στην προκειμένη περίπτωση εκπροσωπεί την πιθανότητα να εμφανιστεί κυτταροτοξικότητα σε μια δεδομένη συγκέντρωση ουσίας κι εκφράζεται ως υψηλή πιθανότητα ή χαμηλή. Στην πράξη, υπολογίζεται η IC₅₀ ή η LC₅₀ από το διάγραμμα της % κυτταρικής θνησιμότητας σε πιθανομονάδες σε σχέση με το $\log_{10}(\text{συγκέντρωση ουσίας})$.

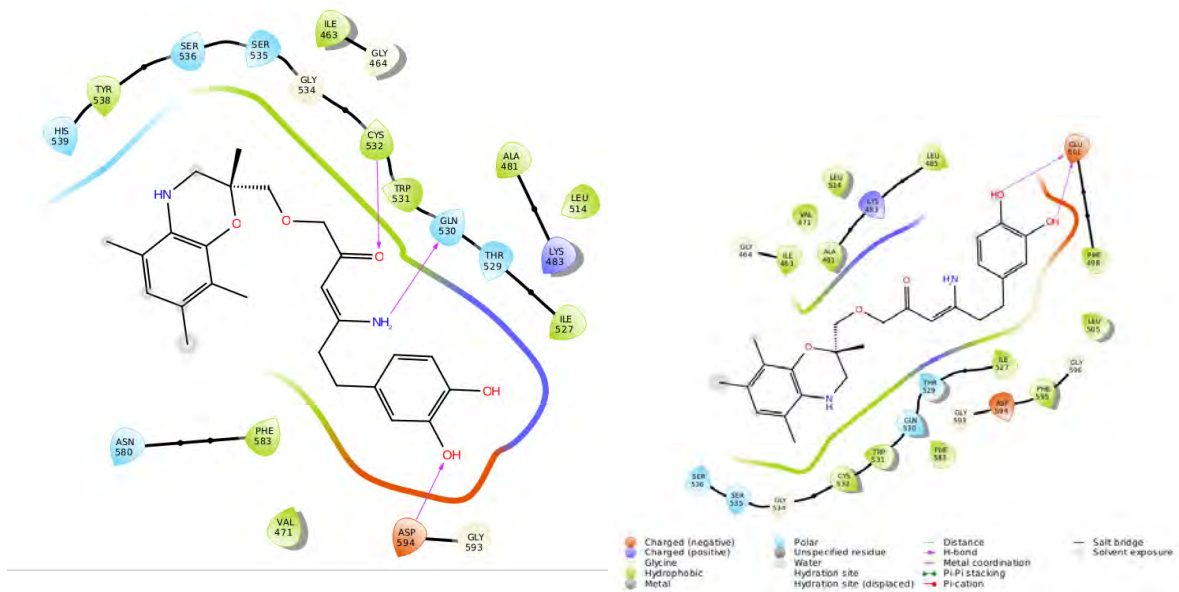
Στις περιπτώσεις που υπάρχουν μόνον υψηλές και χαμηλές τιμές κυτταρικής βιωσιμότητας, η τιμή IC₅₀ προσδιορίζεται γραφικά από το διάγραμμα της σιγμοειδούς καμπύλης της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της υπό εξέταση ουσίας. Στις περιπτώσεις που δεν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα μέχρι τα 100μM, δεν παρουσιάζεται κάποια τιμή IC₅₀. Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις, η τιμή προσδιορίζεται μόνον από 2 σημεία στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (50μM και 100μM).



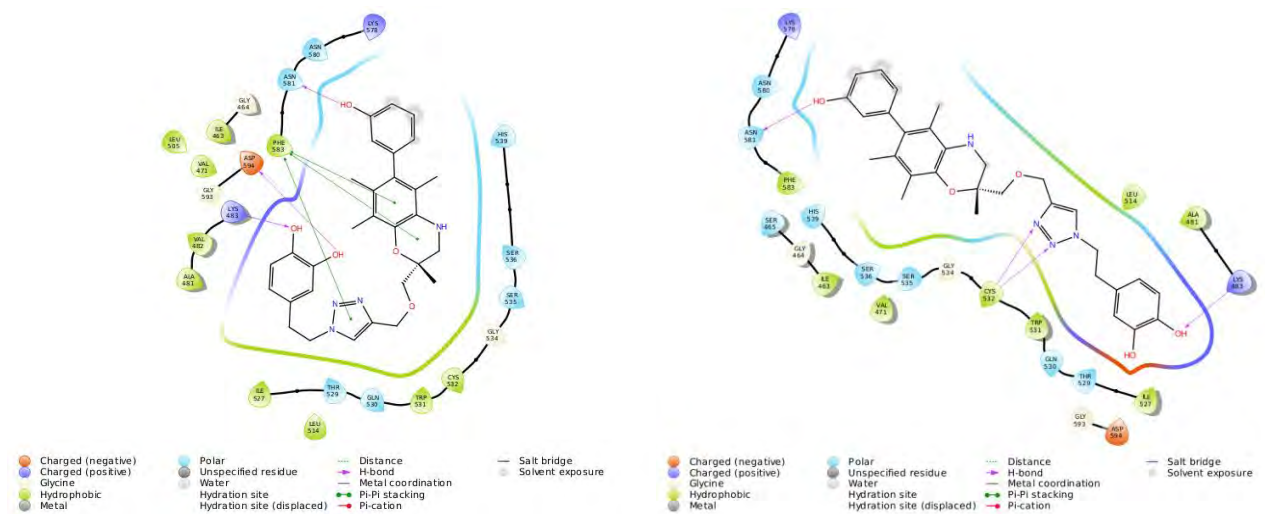
Εικόνα 3.3: Οι αλληλεπιδράσεις των ενώσεων TC343 R (αριστερά) και TC343 S (δεξιά) με τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης SP σε 2D διαμόρφωση.



Εικόνα 3.4: Οι αλληλεπιδράσεις των ενώσεων TC344 R (αριστερά) και 344 S (δεξιά) με τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης SP σε 2D διαμόρφωση.



Εικόνα 3.5: Οι αλληλεπιδράσεις των ενώσεων TC322 R (αριστερά) και TC322 S (δεξιά) με τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης ΧΡ σε 2D διαμόρφωση.

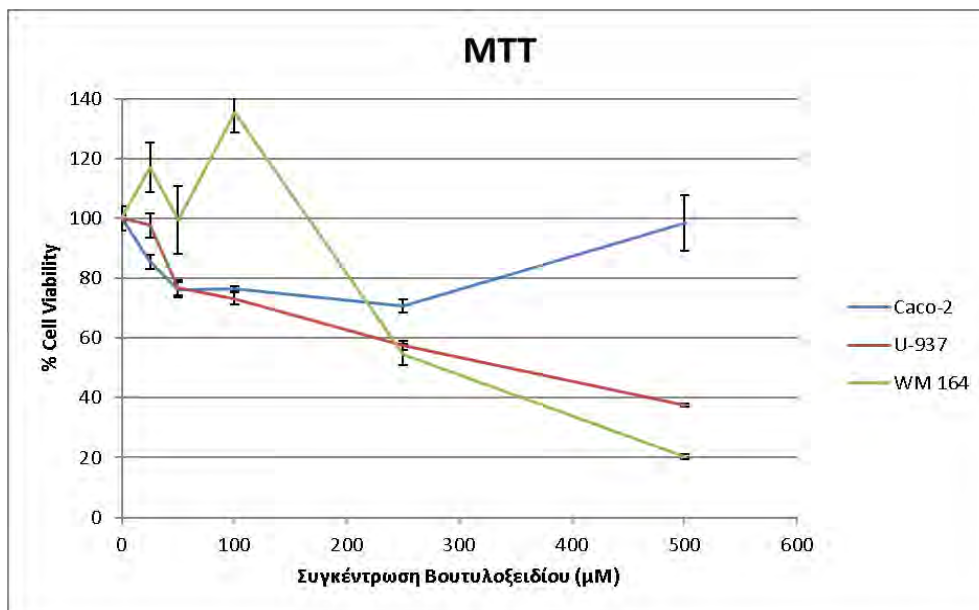


Εικόνα 3.6: Οι αλληλεπιδράσεις των ενώσεων TC342 R (αριστερά) και TC342 S (δεξιά) με τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης ΧΡ σε 2D διαμόρφωση.

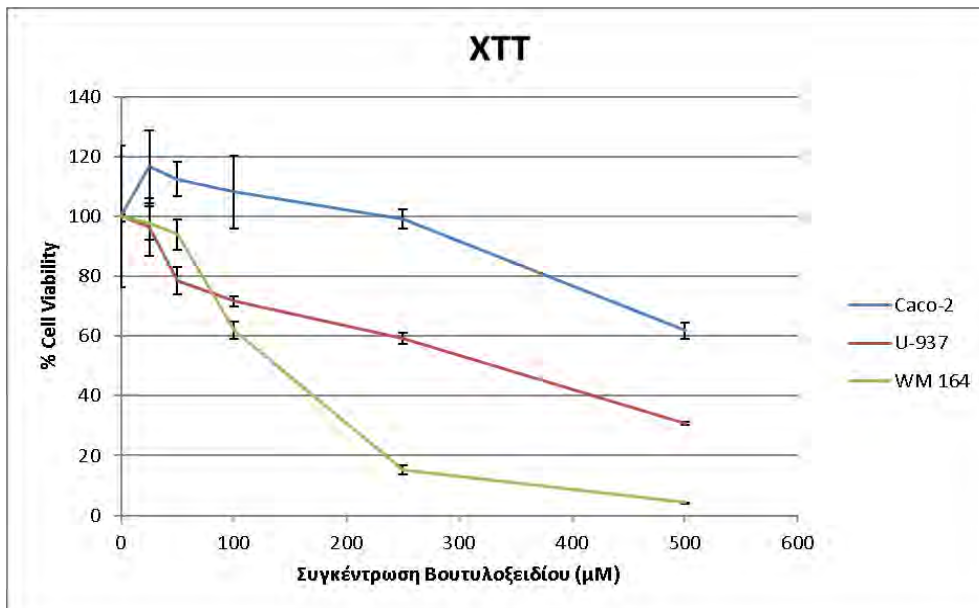
Συγκεκριμένα, αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με τα κρίσιμα αμινοξέα Gln 530, Cys 532 και Asp 594.

3.2 Σύγκριση *in vitro* μεθοδολογιών κυτταρικής βιωσιμότητας με πρότυπη ουσία

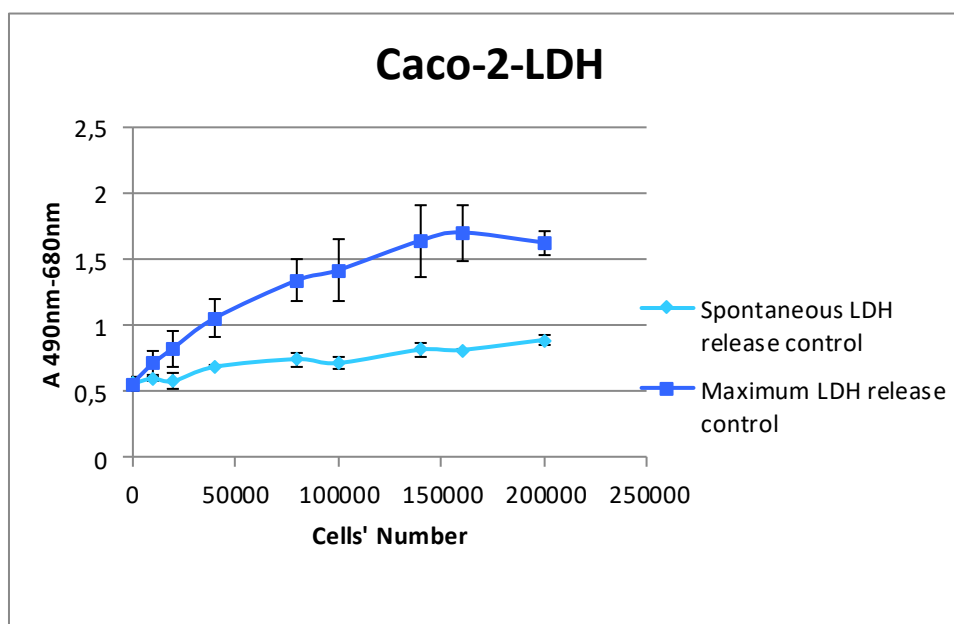
Παρακάτω συγκρίνονται οι μεθοδολογίες κυτταρικής βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας με πρότυπη κυτταροτοξική ουσία το βουτυλοξείδιο, που είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό (Διαγράμματα 3.1-3.5).



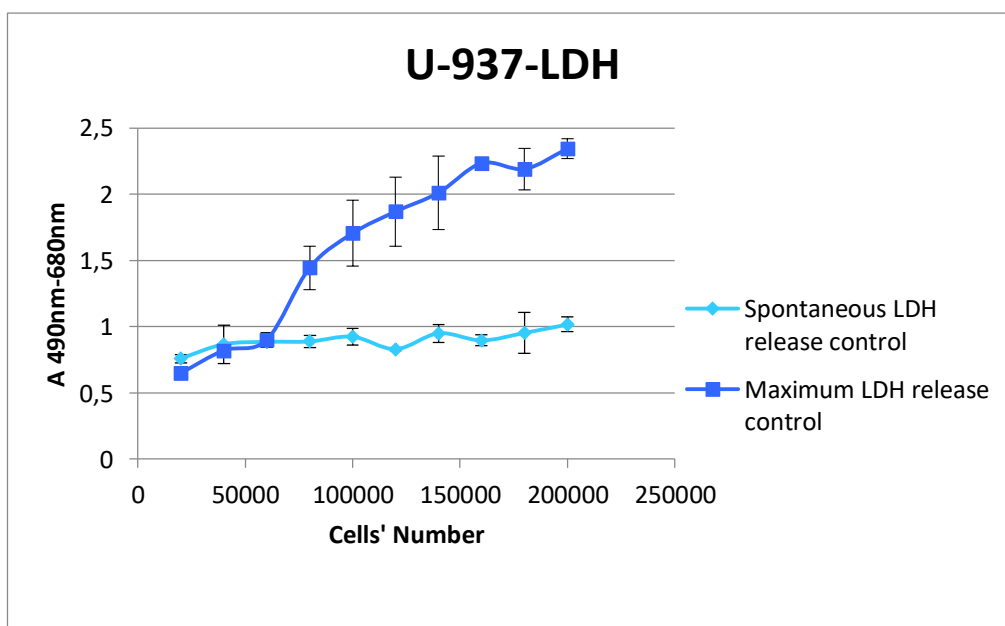
Διάγραμμα 3.1: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 500μM βουτυλοξειδίου με χρήση μεθοδολογίας MTT στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2, U-937 και WM 164 (Errorbars ±SD).



Διάγραμμα 3.2: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 500μΜ βουτυλοξειδίου με χρήση μεθοδολογίας XTT στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2, U-937 και WM 164 (Errorbars \pm SD).

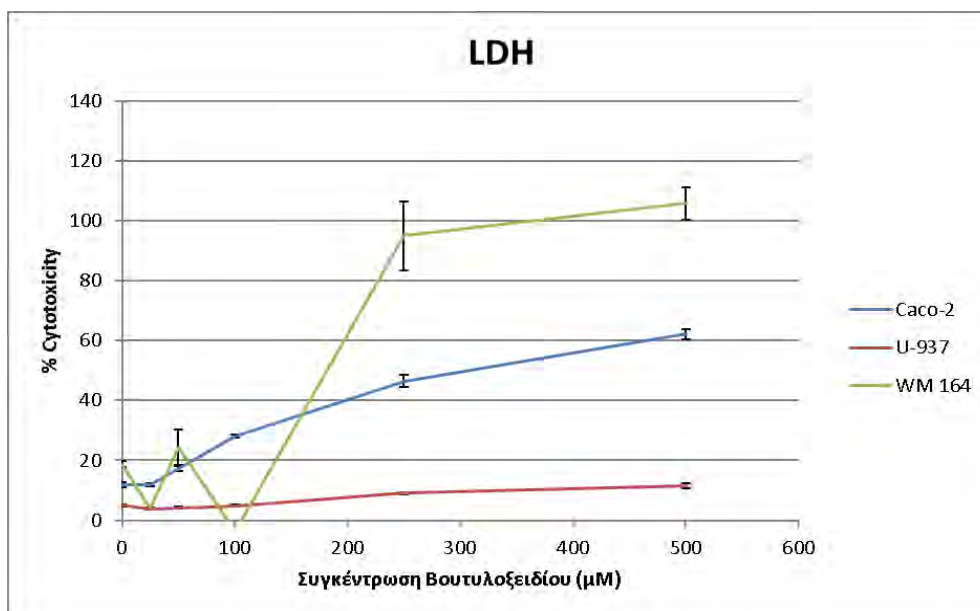


Διάγραμμα 3.3: Οι καμπύλες της LDH δραστικότητας της κυτταρικής σειράς Caco-2 προς τον αριθμό των κυττάρων (Errorbars \pm SD).



Διάγραμμα 3.4: Οι καμπύλες της LDH δραστηριότητας της κυτταρικής σειράς U-937 προς τον αριθμό των κυττάρων (Errorbars \pm SD).

Από τις καμπύλες προκύπτει ότι και στις δύο κυτταρικές σειρές ο βέλτιστος αριθμός κυττάρων είναι γύρω στα 100.000 κύτταρα ανά 100 μ L θρεπτικού υλικού (περίπου στο 1,5 η τιμή της απορρόφησης).



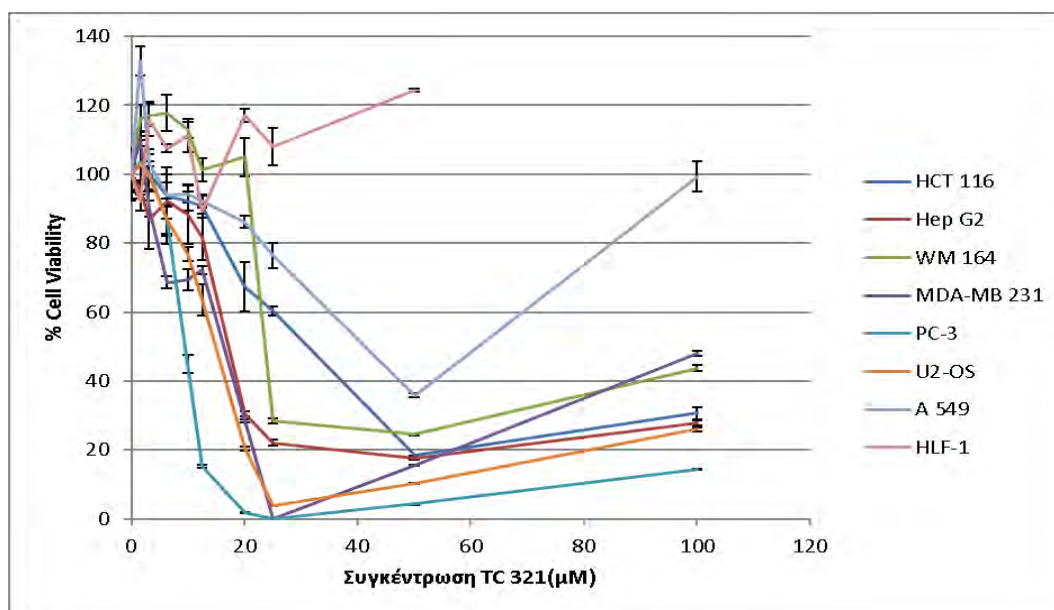
Διάγραμμα 3.5: Οι καμπύλες της % κυτταροτοξικότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 500 μ M βουτυλοξειδίου με χρήση μεθοδολογίας LDH στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2, U-937 και WM 164 (Errorbars \pm SD).

Από τις δοκιμασίες κυτταρικής βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας προκύπτει ότι η μέθοδος ΧΤΤ είναι πιο ευαίσθητη και γρήγορη από την ΜΤΤ, ωστόσο η ΜΤΤ είναι πιο οικονομική. Και

οι δύο μετράνε τη μεταβολική ενεργότητα των ζωντανών κυττάρων, οπότε δίνουν μία εικόνα για την κυτταρική βιωσιμότητα. Αντίθετα, η μέθοδος LDH μετράει την ποσότητα των κυττάρων που έχουν λυθεί εξαιτίας της χημικής ένωσης, το οποίο είναι ενδεικτικό της κυτταροτοξικότητάς της. Είναι, επίσης, αρκετά ευαίσθητη μέθοδος. Αποφασίστηκε στο υπόλοιπο της διπλωματικής να υιοθετηθεί κυρίως η μέθοδος ΧΤΤ ως πιο ευαίσθητη και γρήγορη σε σύγκριση με την ΜΤΤ. Η μέθοδος LDH θα χρησιμοποιηθεί μόνο στις τελικά επιλεγείσες ουσίες για να μας δώσει περισσότερα στοιχεία ως προς το είδος της αναστολής βιωσιμότητας που αυτές προκαλούν.

3.3 Βιολογική αποτίμηση των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων *in vitro*

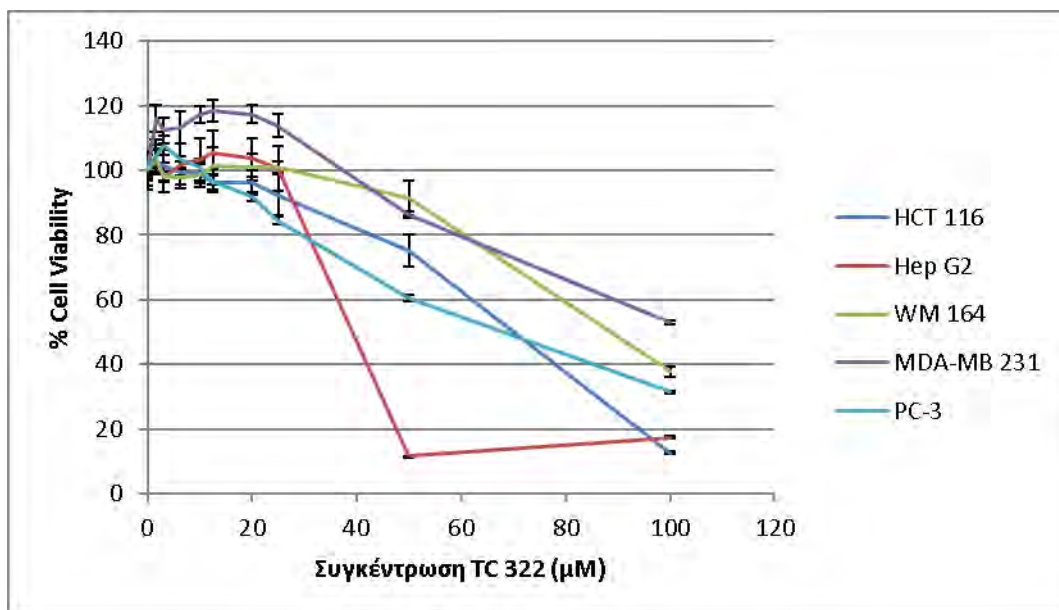
Για την *in vitro* βιολογική αποτίμηση κυτταροτοξικότητας των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν οι μεθοδολογίες ΜΤΤ ή ΧΤΤ, καθώς θεωρούνται ισοδύναμες, αφού βασίζονται στην ίδια αρχή και μετράνε και οι δύο τη μεταβολική ενεργότητα των κυττάρων. Παρακάτω δίνονται τα συγκριτικά, για τις κυτταρικές σειρές, διαγράμματα ανά χημική ένωση (Διαγράμματα 3.6-3.12).



Διάγραμμα 3.6: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM της ουσίας **TC 321** με χρήση μεθοδολογίας ΜΤΤ ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars \pm SD).

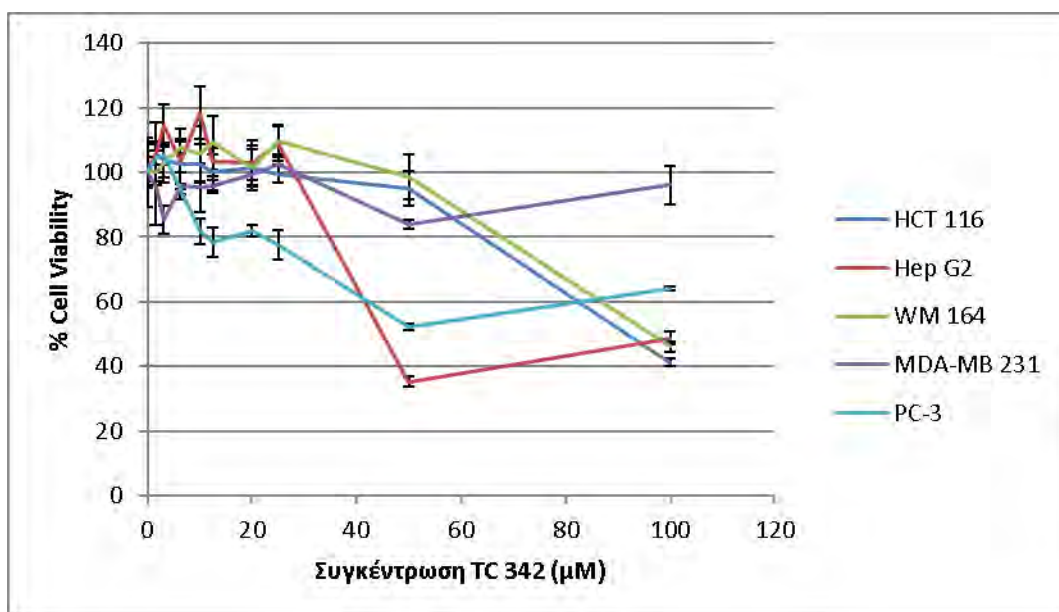
Όπως προκύπτει από το διάγραμμα, η ένωση TC 321 προκαλεί σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε όλες τις κυτταρικές σειρές, κυρίως στις PC-3, U2-OS, MDA-MB 231 και Hep G2, ενώ δεν εμφανίζει καμία τοξικότητα στην φυσιολογική σειρά HLF-1. Στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 100μM παρατηρείται μία αύξηση του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού σε όλους τους τύπους κυττάρων άγνωστης βιολογικής ή τεχνικής αιτιολογίας.



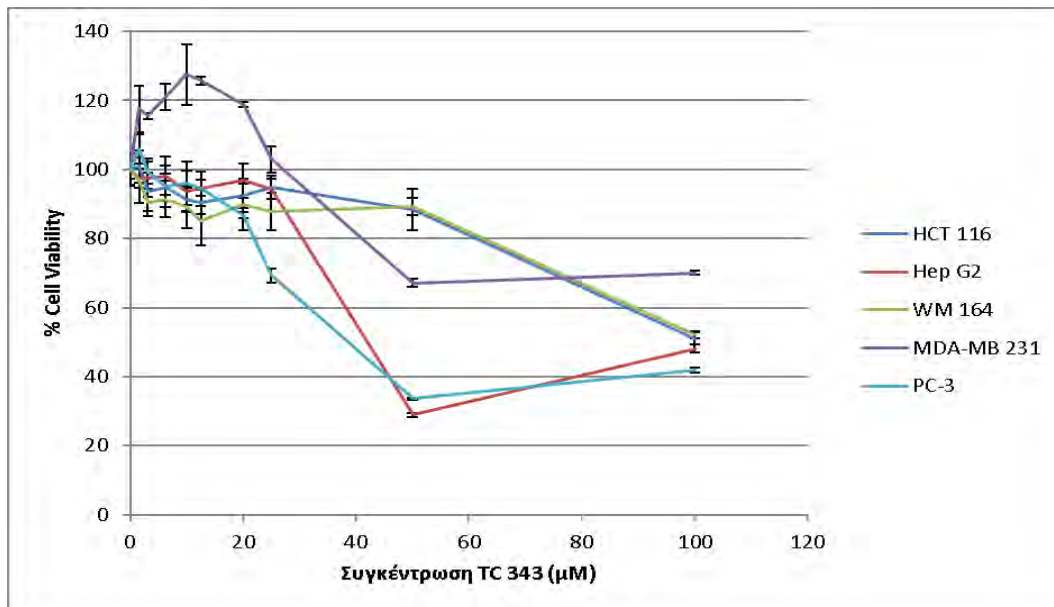
Διάγραμμα 3.7: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM της ουσίας **TC 322** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars ±SD).

Η ένωση TC 322 φαίνεται να είναι δραστική μόνον στα κύτταρα του ηπατοκαρκινώματος, ενώ στους άλλους τύπους κυττάρων, η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται μόνο στις μεγάλες συγκεντρώσεις.



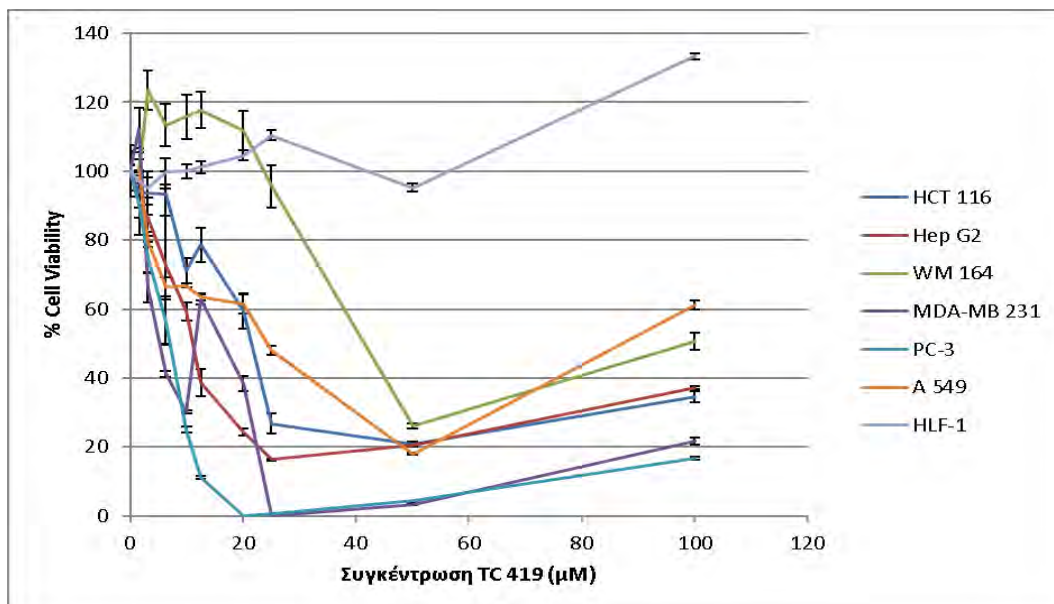
Διάγραμμα 3.8: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM της ουσίας **TC 342** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars ±SD).

Η ένωση TC 342 δεν παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, εκτός από μία μικρή μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα κύτταρα του ήπατος σε αρκετά μεγάλη συγκέντρωση.



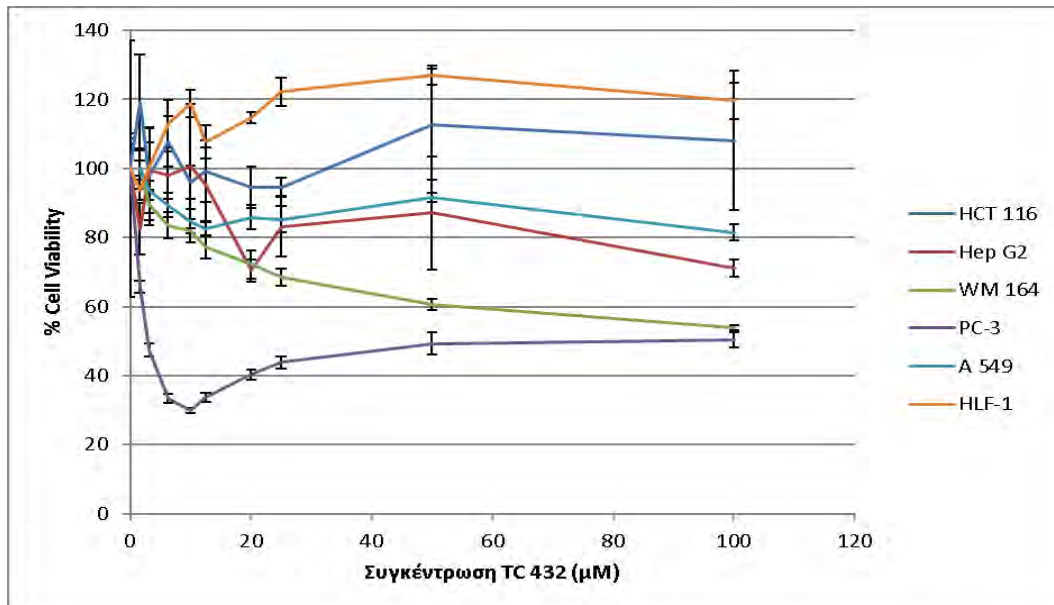
Διάγραμμα 3.9: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μΜ της ουσίας TC 343 με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars ±SD).

Η ένωση TC 343 εμφανίζει μία μικρή δράση έναντι των κυττάρων του προστάτη και του ήπατος σε αρκετά μεγάλη συγκέντρωση.



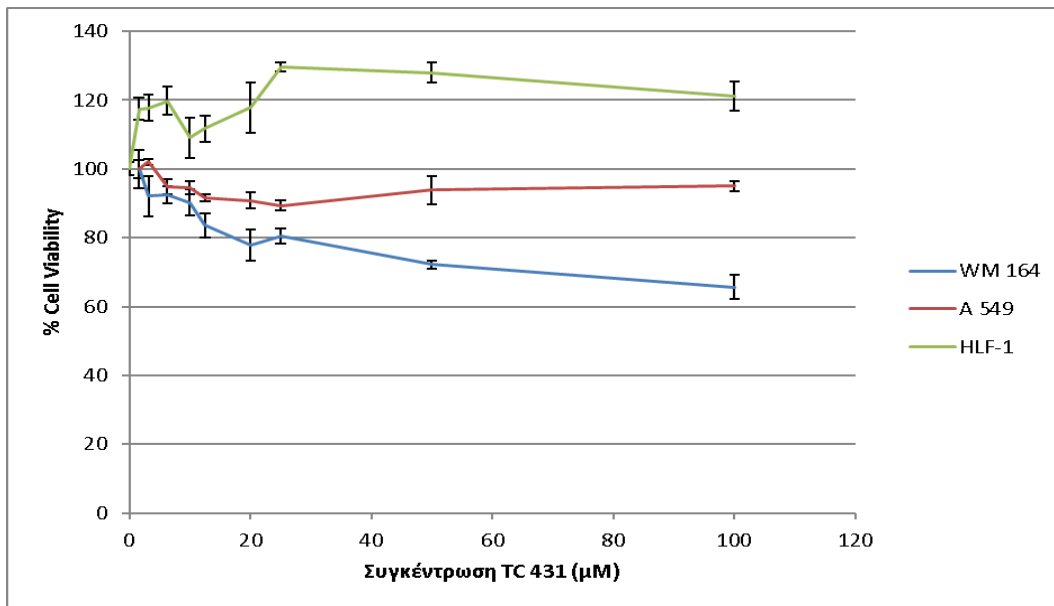
Διάγραμμα 3.10: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μΜ της ουσίας TC 419 με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars ±SD).

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, η ένωση TC 419 εμφανίζει ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον προφίλ κυτταροτοξικότητας σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ παράλληλα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των φυσιολογικών κυττάρων του πνεύμονα παραμένει σταθερός. Πιο ευαίσθητα στην ένωση κύτταρα είναι κατά σειρά τα PC-3, MDA-MB 231, Hep G2 και HCT 116, όπου παρατηρείται κυτταροτοξική δράση σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις παρατηρείται μία μικρή αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε όλους τους τύπους κυττάρων όπως παρατηρήθηκε και στην TC 321.



Διάγραμμα 3.11: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM της ουσίας **TC 432** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars ±SD).

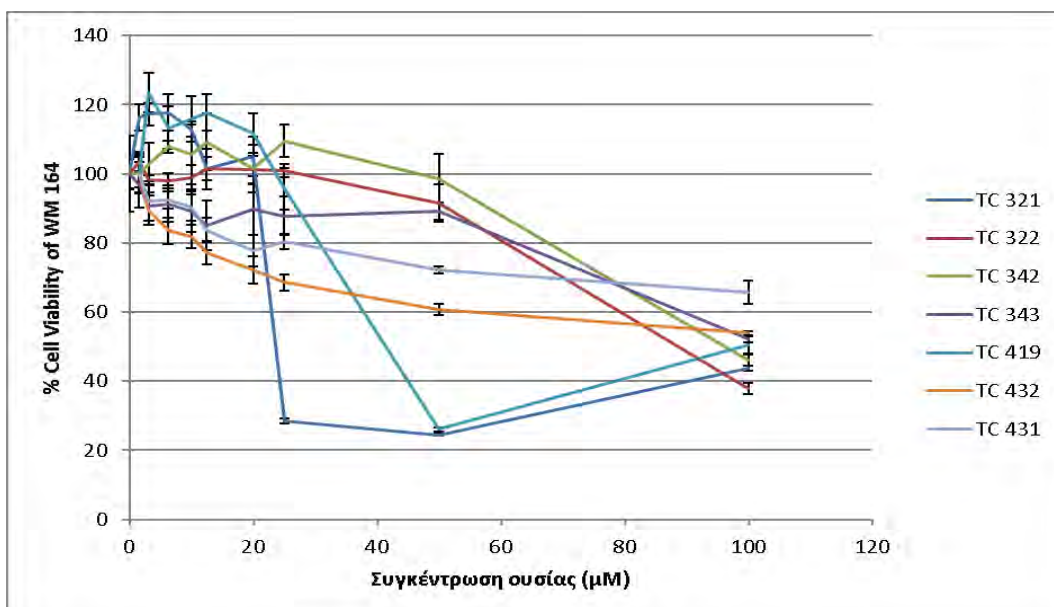
Η ένωση TC 432 φαίνεται να είναι αδρανής τόσο σε καρκινικά όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα, εκτός από τα κύτταρα του προστάτη, όπου εμφανίζεται ιδιαίτερα κυτταροτοξική.



Διάγραμμα 3.12: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM της ουσίας **TC 431** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή XTT σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars \pm SD).

Η ένωση TC 432 δεν επηρεάζει καθόλου τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ούτε των καρκινικών ούτε των φυσιολογικών κυττάρων.

Παρακάτω, δίνεται ένα συγκριτικό, για όλες τις χημικές ενώσεις που εξετάστηκαν, διάγραμμα στην κυτταρική σειρά WM164 (Διάγραμμα 3.13).



Διάγραμμα 3.13: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων με χρήση μεθοδολογίας MTT ή XTT στην καρκινική κυτταρική σειρά **WM 164** (Errorbars \pm SD).

Στα κύτταρα του μελανώματος, εμφανίζουν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας οι ενώσεις TC 321 και TC 419, ενώ δεν έχουν καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό οι ενώσεις TC 432 και TC 431.

Ύστερα από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις που προκαλούν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50% (IC₅₀) και παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.2-3.3.

IC ₅₀ (μM)	HCT 116	Hep G2	WM 164	PC-3	MDA-MB 231	U2-OS	A-549	HFL-1
TC 321	32,1	18,3	*22,5	9,5	16,3	14,6	42,1	X
TC 322	68,2	*36,0	96,9	72,4	~103,7			
TC 342	94,7	*38,0	98,2	51,8	X			
TC 343	~101,0	43,9	~102,1	40,3	53,1			
TC 419	*21,0	11,0	43,6	6,9	5,7		24,4	X
TC 432	X	X	X	3,7			X	X
TC 431			X				X	X

Πίνακας 3.2: Οι τιμές IC₅₀ σε μM που αντιστοιχούν σε κάθε χημική ένωση και κυτταρική σειρά, που υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο **logit**. (Όπου X: πολύ χαμηλή κυτταροτοξικότητα, ~: η τιμή προσδιορίστηκε μόνο από τα 2 τελευταία σημεία στις υψηλότερες συγκεντρώσεις και *: η τιμή προσδιορίστηκε γραφικά.)

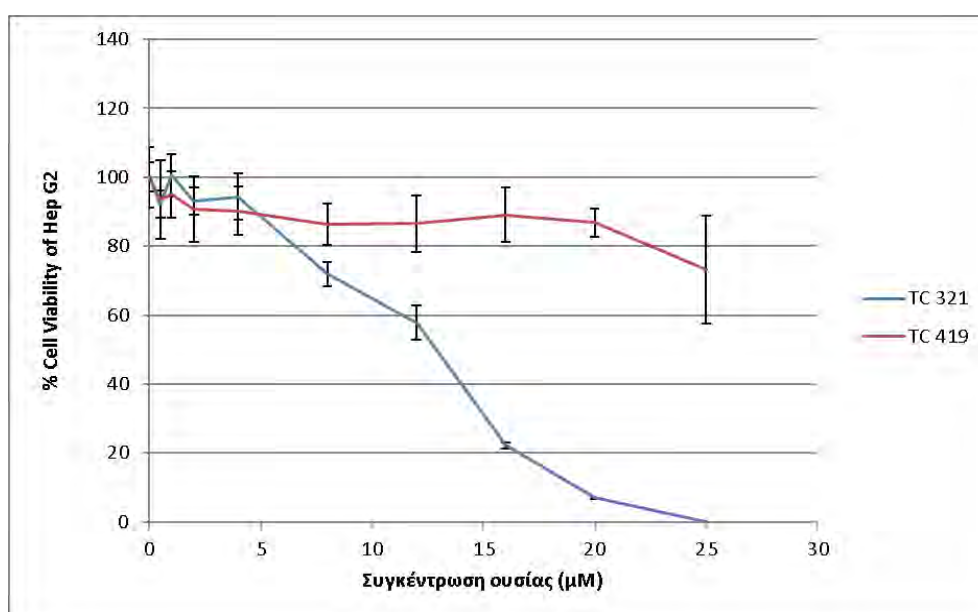
IC ₅₀ (μM)	HCT 116	Hep G2	WM 164	PC-3	MDA-MB 231	U2-OS	A-549	HFL-1
TC 321	28,3	17,6	*22,5	9,2	15,9	13,7	39,7	X
TC 322	64,8	*36	95,4	64,0	~105,4			
TC 342	92,1	*38	97,1	53,4	X			
TC 343	~101,5	41,7	~103,2	37,4	56,5			
TC 419	19,3	11,1	41,4	5,4	5,1		21,7	X
TC 432	X	X	X	3,1			X	X
TC 431			X				X	X

Πίνακας 3.3: Οι τιμές IC₅₀ σε μM που αντιστοιχούν σε κάθε χημική ένωση και κυτταρική σειρά, που υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο **probit**. (Όπου X: πολύ χαμηλή κυτταροτοξικότητα, ~: η τιμή προσδιορίστηκε μόνο από τα 2 τελευταία σημεία στις υψηλότερες συγκεντρώσεις και *: η τιμή προσδιορίστηκε γραφικά.)

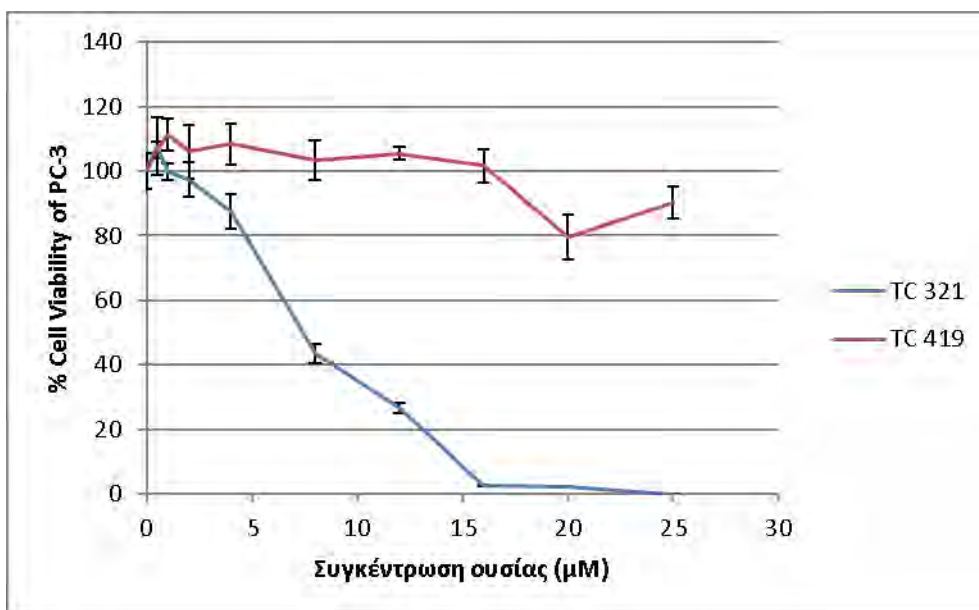
Όπως προκύπτει από τους Πίνακες 3.2 και 3.3, τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα αφορούν τις ενώσεις TC 321 και TC 419. Μάλιστα παρατηρείται στις κυτταρικές σειρές HCT 116, Hep G2 και PC-3 μία μείωση της τιμής IC₅₀ της τάξης του 30-40% της TC 419 από την TC 321. Αυτή η παρατήρηση αποκτά ιδιαίτερη σημασία αν προσέξουμε τις δομές των δύο ενώσεων. Όπως φαίνεται στην ενότητα 2.2, οι δύο ενώσεις έχουν μόνο μία δομική διαφορά, την μεθόξυ-ομάδα του βενζολικού δακτυλίου που ενώνεται με το άζωτο της βενζοξαζίνης μέσω μιας μεθυλομάδας. Επομένως, συμπεραίνεται ότι μία τόσο μικρή διαφορά στη δομή, μπορεί να προκαλέσει σημαντική αύξηση της δραστηριότητας μιας ουσίας. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι οι ενώσεις TC 432 και TC 431 είναι δομικά ανάλογα των TC 321 και TC 419

αντίστοιχα. Διαφέρουν στην μεθυλο-προστασία των υδροξυλίων του τελευταίου βενζολικού δακτυλίου. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η μεθυλο-προστασία των υδροξυλίων προκαλεί απώλεια της δράσης, οπότε οι ελεύθερες υδροξυλομάδες είναι απαραίτητες για την εμφάνιση της κυτταροτοξικότητας.

Στο τέλος, επιλέχθηκαν οι ενώσεις και οι κυτταρικές σειρές, όπου παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση της % κυτταρικής βιωσιμότητας και δοκιμάστηκαν με τις μεθόδους ΧΤΤ και LDH σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις με σκοπό τον προσδιορισμό της τιμής IC₅₀ με μεγαλύτερη ακρίβεια, καθώς και της τιμής LC₅₀. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα *Διαγράμματα 3.14-3.16* και τους *Πίνακες 3.4-3.5*.



Διάγραμμα 3.14: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 25μM των χημικών ενώσεων TC 321 και TC 419 με χρήση μεθοδολογίας ΧΤΤ στην καρκινική κυτταρική σειρά **Hep G2** (Errorbars ±SD).



Διάγραμμα 3.15: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 25μM των χημικών ενώσεων TC 321 και TC 419 με χρήση μεθοδολογίας ΧΤΤ στην καρκινική κυτταρική σειρά **PC-3** (Errorbars ±SD).

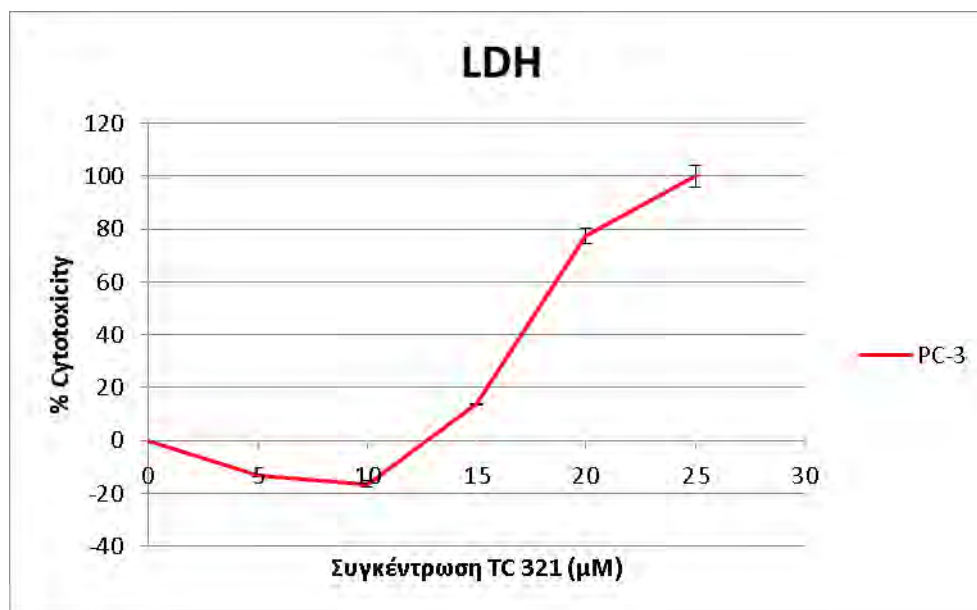
Όπως προκύπτει από τα διαγράμματα, η ένωση TC 321 εμφανίζει κυτταροτοξική δράση σε χαμηλές συγκεντρώσεις τόσο στα Hep G2 όσο και στα PC-3. Η ένωση TC 419 δεν έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, πιθανώς επειδή χρησιμοποιήθηκε καινούργιο stock της ουσίας, η οποία δεν διαλύθηκε επαρκώς στον διαλύτη (DMSO). Το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί.

IC ₅₀ (μM)	Hep G2	PC-3
TC 321	12,0 (18,3)	8,3 (9,5)
TC 419	X (11,0)	X (6,9)

IC ₅₀ (μM)	Hep G2	PC-3
TC 321	11,6 (17,6)	7,4 (9,2)
TC 419	X (11,1)	X (5,4)

Πίνακας 3.4 και 3.5: Οι τιμές IC₅₀ σε μM που αντιστοιχούν σε κάθε χημική ένωση και κυτταρική σειρά, που υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο **logit** (αριστερά) και **probit** (δεξιά) με τη μέθοδο ΧΤΤ. Στις παρενθέσεις παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές από τους Πίνακες 3.2 και 3.3 για λόγους σύγκρισης. (Όπου X: πολύ χαμηλή κυτταροτοξικότητα.)

Στους Πίνακες 3.4 και 3.5, παρουσιάζονται οι ακριβείς τιμές IC₅₀, όπως προέκυψαν από την επανάληψη του πειράματος σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Οι τιμές της ένωσης TC 321 εμφανίζονται ελαφρώς χαμηλότερες, ενώ για την TC 419 δεν προσδιορίστηκαν.



Διάγραμμα 3.16: Η καμπύλη της % κυτταροτοξικότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 25μM της χημικής ένωσης **TC 321** με χρήση μεθοδολογίας LDH στην καρκινική κυτταρική σειρά **PC-3** (Errorbars ±SD).

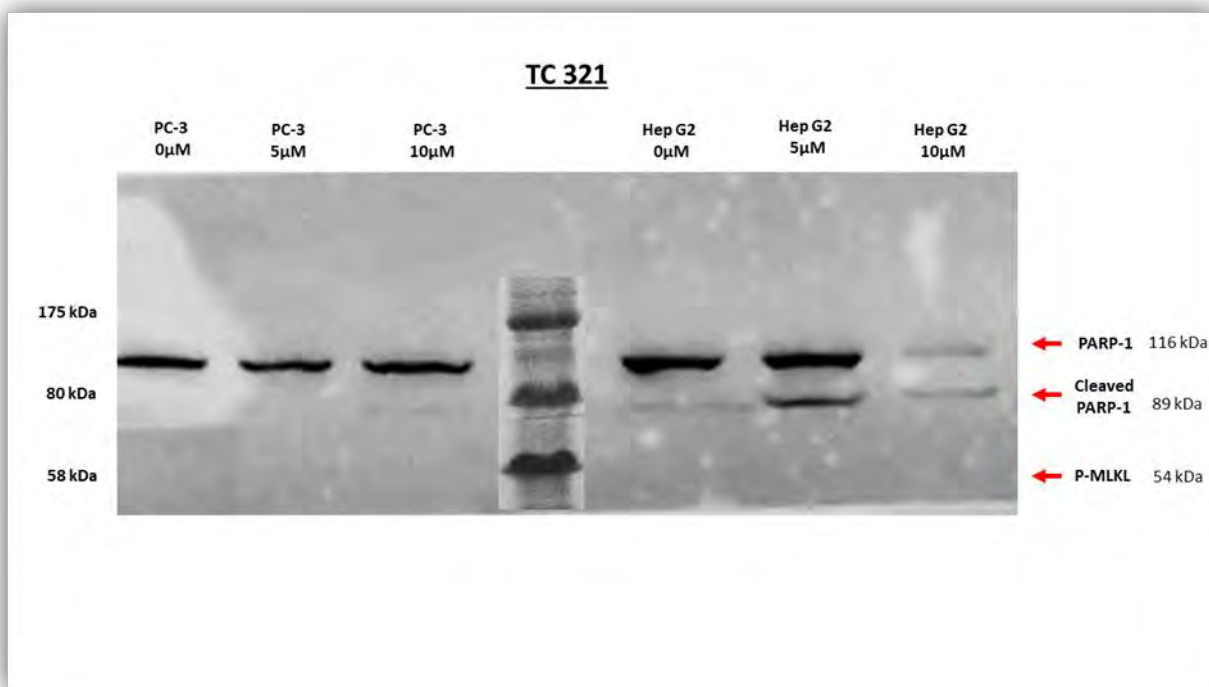
Από το διάγραμμα προκύπτει ότι η ένωση TC 321 αυξάνει την κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα του προστάτη. Ωστόσο το αποτέλεσμα, όπως αναμενόταν με βάση την διαφοροποίηση των μετρούμενων παραμέτρων στις δύο μεθόδους, εμφανίζεται διαφοροποιημένο από το ίδιο πείραμα που διεξήχθη με τη μέθοδο XTT, καθώς σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο η τιμή LC_{50} προσδιορίστηκε ίση με 18 με βάση το μοντέλο logit και ίση με 17,8 με βάση το μοντέλο probit. Αυτό βέβαια είναι λογικό, αφού η LC_{50} προσδιορίζει την συγκέντρωση της ουσίας, στην οποία θανατώνεται το 50% των κυτάρων και όχι αυτή στην οποία αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός κατά 50%.

3.4 Προσδιορισμός μηχανισμού κυτταρικού θανάτου με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά WESTERN

Τέλος, πραγματοποιήθηκε βιοχημικός έλεγχος σε επίπεδο πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ώστε να διερευνηθεί ο μηχανισμός που εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο που προκαλεί η ένωση TC 321 στα κύτταρα PC-3 και Hep G2.

Η πυρηνική πρωτεΐνη πολυμεράση της πολυ(ADP-ριβόζης) 1 (PARP-1, 116kDa) εμπλέκεται σε βασικές κυτταρικές διαδικασίες, με κυριότερη την επιδιόρθωση του DNA, και εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα. Η ειδική πρωτεόλυση της PARP-1 προς ένα θραύσμα 89kDa μέσω ενεργότητας κασπάσης σχετίζεται με την ενεργοποίηση του αποπτωτικού θανάτου και έτσι αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη απόπτωσης.

Η κινάση MLKL ενεργοποιείται (φωσφορυλιώνεται) από την ενεργή κινάση RIPK3 κατά τη διαδικασία της νεκρόπτωσης. Επομένως, η φωσφορυλιωμένη MLKL αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη νεκρόπτωσης.



Εικόνα 3.8: Ανοσοαποτύπωση σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυτάρων PC-3 και Hep G2 με τα αντισώματα anti-PARP-1 και anti-P-MLKL ύστερα από αγωγή με την ένωση TC 321 σε συγκεντρώσεις 0μM, 5μM και 10μM για 72 ώρες.

Η β-ακτίνη έδωσε σήμα σε όλα τα δείγματα, που υποδηλώνει την ύπαρξη πρωτεΐνης σε όλα τα δείγματα.

Στην ανοσοαποτύπωση φαίνεται ότι η ουσία δεν επάγει ούτε αποπτωτικό, ούτε νεκροπρωτικό κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα του προστάτη, αφού η PARP-1 παραμένει ακέραιη (116kDa) και δεν εμφανίζεται καθόλου η P-MLKL. Ωστόσο, στα κύτταρα του ήπατος σε συγκέντρωση 5μM της ουσίας εμφανίζεται το θραύσμα της PARP-1 (89kDa), που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη έχει πρωτεολυθεί από τις ενεργοποιημένες κασπάσες κατά τη διάρκεια του αποπτωτικού θανάτου, όμως σε μεγαλύτερη συγκέντρωση της ουσίας σχεδόν εξαφανίζεται η πρωτεΐνη Parp-1, λόγω κυτταρικής λύσης με νέκρωση. Επομένως, η TC 321 συναρτήσεως της δόσης επάγει απόπτωση και/ή νέκρωση στα Hep G2. Συμπερασματικά, ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που κάθε φορά επάγεται εξαρτάται όχι μόνο από τη χημική ένωση που τον προκαλεί, αλλά και από τον κυτταρικό τύπο.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του αναπτυξιακού ερευνητικού έργου ΣΘΕΝΟΣ-β (2017-2020), «Στοχευμένες Θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά εκφυλιστικών ΝΟΣημάτων, με έμφαση τον καρκίνο και τη γήρανση – Βελτιστοποίηση των στοχοθετημένων βιοδραστικών ενώσεων», που υλοποιεί το Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Στόχος του προγράμματος είναι ο ορθολογικός σχεδιασμός, η σύνθεση και η αποτίμηση νέων βιοδραστικών ενώσεων με αντικαρκινικές και αντιγηραντικές ιδιότητες. Για την ανάπτυξη των νέων ενώσεων εφαρμόζεται μια ολοκληρωμένη προσέγγιση και ένας συνεργιστικός συνδυασμός υπολογιστικής χημείας, συνθετικής φαρμακευτικής χημείας, πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ και βιολογικής αποτίμησης σε πρότυπες κυτταρικές σειρές και ζωικά μοντέλα καρκίνου και γήρανσης. Ο μακροπρόθεσμος σκοπός του έργου είναι η ανάπτυξη εξειδικευμένων θεραπευτικών και χημειοπροστατευτικών προσεγγίσεων κατά εκφυλιστικών νοσημάτων.

Επίσης, στόχος του έργου είναι η εμπορική αξιοποίηση των νέων αντικαρκινικών ενώσεων. Αυτή απαιτεί προκλινικές και αργότερα κλινικές δοκιμές που θα καταστεί δυνατόν να πραγματοποιηθούν με σωστή διαχείριση των πνευματικών δικαιωμάτων και αξιοποίηση των συνεργασιών των ερευνητών του Ινστιτούτου με ελληνικές και ευρωπαϊκές φαρμακευτικές εταιρείες για την παροχή εξειδικευμένων υπηρεσιών. Η εμπορική εκμετάλλευση των νέων ενώσεων αναμένεται να έχει θετική επίδραση στην επιχειρηματικότητα και την ανταγωνιστικότητα της οικονομίας.

Η παραδοσιακή χημειοθεραπεία προσπαθεί να θανατώσει τα καρκινικά κύτταρα βασιζόμενη στην ιδιότητά τους να πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό. Η προσέγγιση αυτή έχει πολλές παρενέργειες, επειδή βλάπτει εξίσου τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα φυσιολογικά κύτταρα. Η τοξικότητα και η ανθεκτικότητα στα παραδοσιακά χημειοθεραπευτικά φάρμακα καθιστά επείγουσα την ανάπτυξη νέων στόχων και νέων φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου. Η στοχευμένη θεραπεία αποσκοπεί στη χορήγηση παραγόντων (κυρίως μικρών μορίων και κυκλικών πεπτιδίων) που παρεμποδίζουν τη δράση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη όγκων. Επίσης, η στοχευμένη θεραπεία προσφέρει μεγάλη αποτελεσματικότητα και μείωση του κόστους εισαγωγής των φαρμάκων στην αγορά.

Τα παράγωγα της 1,4-βενζοξαζίνης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, εμφανίζουν ένα εύρος φαρμακολογικών δράσεων: ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές διαφόρων υποδοχέων, αναστολείς διαφόρων ενζύμων, αντιμικροβιακές, αντι-υπερτασικές, αντιδιαβητικές και άλλες ιδιότητες. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία ως προς την κυτταροστατική τους δράση, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, έδειξαν μία γενικευμένη δραστικότητα σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές, στις οποίες εξετάστηκαν, δηλαδή σχεδόν όλες ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, άλλες σε χαμηλότερες και άλλες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Παράλληλα, δεν έδειξαν καμία τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα του πνεύμονα, που αποτελεί μια ένδειξη εκλεκτικότητας των ενώσεων έναντι μόνο των καρκινικών κυττάρων. Βέβαια, κάποιες κυτταρικές σειρές ήταν πιο ευαίσθητες από άλλες, που σημαίνει πως η επίδραση ορισμένων ουσιών στην κυτταρική βιωσιμότητα εξαρτάται από τον γονότυπο του κυτταρικού τύπου. Αυτό υποδηλώνει και την ύπαρξη διαφορετικού μηχανισμού δράσης ανά κυτταρικό τύπο.

Οι ενώσεις με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, δηλαδή αυτές που ανέστειλαν τη κυτταρική βιωσιμότητα στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ήταν οι TC 321 και TC 419 στα κύτταρα του ήπατος (Hep G2) και του προστάτη (PC-3). Στο τέλος, αυτές εξετάστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και με τη μέθοδο ΧΤΤ, που μετρά τη μεταβολική ενεργότητα των κυττάρων, και με τη μέθοδο LDH, που μετρά απευθείας κυτταροτοξικότητα. Τα αποτελέσματα και των δύο προσεγγίσεων είναι σε συμφωνία. Ύστερα από παρατήρηση της δομής των δύο ενώσεων, διαπιστώθηκε ότι διαφέρουν μόνο σε μία μεθοξυ-ομάδα του βενζολικού δακτυλίου που ενώνεται με το άζωτο της βενζοξαζίνης μέσω μιας μεθυλομάδας. Η ύπαρξη της ομάδας αυτής μείωσε την τιμή IC₅₀ κατά 30-40% τουλάχιστον σε τρεις κυτταρικές σειρές (HCT 116, Hep G2, PC-3). Για τη μελέτη της σχέσης δομής-δράσης, εξετάστηκαν άλλες δύο ενώσεις, οι TC 432 και TC 431, που έμοιαζαν δομικά με τις προηγούμενες, μόνο που το υδροξύλιο του τελευταίου βενζολικού δακτυλίου της κάθε ένωσης ήταν μεθυλο-προστατευμένο. Ωστόσο, οι δύο αυτές ενώσεις δεν έδειξαν καμία κυτταροστατική δράση, που σημαίνει ότι τα ελεύθερα υδροξύλια είναι απαραίτητα για τη δραστικότητα.

Τα αποτελέσματα της *in vitro* βιολογικής αξιολόγησης αυτών των ενώσεων θα δώσουν χρήσιμες πληροφορίες στους χημικούς, ώστε να κάνουν μια σειρά δομικών τροποποιήσεων, με στόχο τη βελτίωση της ισχύος/δραστικότητας του εν δυνάμει φαρμάκου και τη βελτιστοποίηση των «drug-like» ιδιοτήτων του, διατηρώντας παράλληλα την «on target» αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης. Σκοπός είναι η σύνθεση αναλόγων με βελτιωμένες φαρμακολογικές

ιδιότητες, που θα οδηγήσει σε μικρό αριθμό επιλεγμένων ενώσεων-οδηγών (nM δραστικότητα), οι οποίες θα αξιολογηθούν περαιτέρω *in vivo* σε κατάλληλα ζωικά μοντέλα.

Τέλος, θα είχε ενδιαφέρον να διευκρινιστεί ο μοριακός μηχανισμός, με τον οποίο δρουν οι εξεταζόμενες ενώσεις, και τα κρίσιμα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτόν, τα οποία είναι διαφορετικά σε κάθε κυτταρικό τύπο. Έγιναν προκαταρκτικά πειράματα για τον προσδιορισμό του κυτταρικού θανάτου της ένωσης TC 321 και βρέθηκε ότι στα κύτταρα Hep G2 επάγει ταυτόχρονα τόσο απόπτωση όσο και νέκρωση. Σε επόμενο βήμα, θα μπορούσε να επαναληφθεί η ανοσοαποτύπωση κατά Western με πιο προσεκτικούς χειρισμούς, σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων της ουσίας και σε διαφορετικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας και αργότερα να διερευνηθεί περαιτέρω ο μοριακός μηχανισμός δράσης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι η χρήση ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάπτυξη ενός *in vitro* μοντέλου σάρωσης, που στοχεύει στη μελέτη της δράσης διαφόρων κυτταροτοξικών και πιθανά αντικαρκινικών παραγόντων και των μοριακών μονοπατιών που επηρεάζονται από ένα πιθανό νέο φάρμακο. Επίσης, οι *in vitro* μελέτες σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές είναι ένα σημαντικό εργαλείο για το σχεδιασμό μελλοντικών *in vivo* μελετών, καθώς και για την πρόβλεψη του κλινικού αποτελέσματος στον άνθρωπο.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

John Double, Neal D Barnard, (2002) Toxicity testing in the development of anticancer drugs. *The Lancet Oncology*, 3, 438-442.

Panagiota S. Filippou, Eftychia N. Koini, Theodora Calogeropoulou, Panagiota Kalliakmani, Christos A. Panagiotidis, Dimitrios A. Kyriakidis, (2011) Regulation of the Escherichia coli AtoSC two component system by synthetic biologically active 5;7;8-trimethyl-1;4-benzoxazine analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 5061-5070.

Eftychia N. Koini, Nicolaos Avlonitis, Erica S. Martins-Duarte, Wanderley de Souza, Rossiane C. Vommaro, Theodora Calogeropoulou, (2012) Divergent synthesis of 2,6-diaryl-substituted 5,7,8-trimethyl-1,4-benzoxazines via microwave-promoted palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross coupling and biological evaluation. *Tetrahedron*, 68, 10302-10309.

Janez Ilas, Petra Stefanic Anderluh, Marija Sollner Dolenc and Danijel Kikelj, (2005) Recent advances in the synthesis of 2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ones and 3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazines. *Tetrahedron*, 61, 7325–7348.

Rajitha Bollu, Jyothsna Devi Palem, Rajashaker Bantu, Vijayacharan Guguloth, Lingaiah Nagarapu, Sowjanya Polepalli, Nishant Jain, (2015) Rational design, synthesis and anti-proliferative evaluation of novel 1,4-benzoxazine-[1,2,3]triazole hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 138-146.

Guolin Wu, Tingting Lv, Wenhui Mo, Xiping Yang, Yu Gao, Haijun Chen, (2017) One-pot synthesis of tricyclo-1,4-benzoxazines via visible-light photoredox catalysis in continuous flow. *Tetrahedron Letters*, 58, 1395–1398.

Pradeep K. Jaiswal, Vashundhra Sharma, Jaroslav Prikhodko, Irina V. Mashevskaya, Sandeep Chaudhary, (2017) “On water” ultrasound-assisted one pot efficient synthesis of

functionalized 2-oxo-benzo[1,4]oxazines: First application to the synthesis of anticancer indole alkaloid, Cephalandole A. *Tetrahedron Letters*, 58, 2077-2083.

Achari, B., Mandal, S.B., Dutta, P.K., Chowdhury, C, (2004) Perspectives on 1,4-benzodioxins, 1,4-benzoxazines and their 2,3-dihydro derivatives (Review). *Synlett*, 14, 2449-2467.

Masahiro Kajino, Yumiko Shibouta, Kohei Nishikawa, Kanji Meguro, (1991) Synthesis and Biological Activities of New 2-Substituted 1, 4-Benzoxazine Derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39, 2896-2905.

Pei-Fu Jiao Bao-Xiang Zhao, Wei-Wei Wang, Qiu-Xia He, Mao-Sheng Wan, Dong-Soo Shin and Jun-Ying Miao, (2006) Design, synthesis, and preliminary biological evaluation of 2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-1,4-benzoxazine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 2862–2867.

Nadeem Siddiquia, Ruhi Alia, M. Shamsheer Alama, Waquar Ahsana, (2004) Pharmacological Profile of Benzoxazines: A Short Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2010, 2, 309-316.

Bogos Agianian, Evripidis Gavathiotis, (2018) Current Insights of BRAF Inhibitors in Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61, 5775-5793.

Niles AL1, Moravec RA, Riss TL, (2008) Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3, 655-69.

Kanduc D1, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E, (2002) Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *International Journal of Oncology*, 21, 165-70.

Yogesh K. Dhuriya, Divakar Sharma, (2018) Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, 15:199.

Διπλωματική Εργασία, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Νικόλαος Γεωργακόπουλος, (2018) “Νανοδιασπορές ως μέσα μεταφοράς βιοδραστικών ενώσεων. Εφαρμογές στην αντικαρκινική θεραπεία”.

Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Ευτυχία Κρίση, (2017) "Υπολογιστικά εργαλεία για την αναζήτηση νέων βιοδραστικών ενώσεων σε επιλεγμένους πρωτεϊνικούς στόχους".

Ιστοσελίδες:

https://www.diffen.com/difference/Apoptosis_vs_Necrosis

<https://web.expasy.org/cellosaurus/>

<https://en.wikipedia.org/wiki/IC50>

https://en.wikipedia.org/wiki/Median_lethal_dose

<https://en.wikipedia.org/wiki/Logit>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Probit>

[https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%BF%CE%BD%CF%84%CE%AD%CE%BB%CE%BF_%CE%A0%CE%B9%CE%B8%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1%CF%82_\(Probit\)](https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%BF%CE%BD%CF%84%CE%AD%CE%BB%CE%BF_%CE%A0%CE%B9%CE%B8%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1%CF%82_(Probit))