



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη των σίγμα υποδοχέων στο μελάνωμα»

Παπαποστόλου Ίριδα

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Τριμελής επιτροπή:

Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Δήμας, Αναπληρωτής Καθηγητής
Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Τραχανά Βαρβάρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Λάρισα, 2019-2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING

MASTER’S THESIS

«Study of sigma receptors in melanoma»

Papapostolou Irida

Biochemist-Biotechnologist

Larissa, 2019-2020

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Κωνσταντίνο Δήμα, για την δυνατότητα που μου προσέφερε για ακόμη μια χρονιά, να συνεχίσω να κάνω πειράματα πάνω σε ένα αντικείμενο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον αλλά και για την υπομονή του και την καθοδήγησή του καθόλη τη διάρκεια αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο, Καλαϊτζίδου Ελισάβετ, Γραμματικού Πασχαλίνα, Κουτσουνγιάννη Φανή και Λαφαζάνη Κωνσταντίνο για την συνεργασία μας και τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην δόκτωρ Ευαγγελία Σερέτη που ακόμη και από απόσταση, με συμβούλευε και με βοηθούσε καθόλη τη διάρκεια αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους που είναι πάντα δίπλα μου για να με στηρίξουν σε όλα μου τα βήματα.

Περίληψη

Το μελάνωμα αποτελεί μια μορφή καρκίνου που συναντάται σε μεγάλη συχνότητα, τόσο στον παγκόσμιο όσο και στον ελληνικό πληθυσμό (“Μελάνωμα,” n.d.). Οι σίγμα υποδοχείς έχει βρεθεί από μελέτες πως παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες μορφές καρκίνου, όπως και το μελάνωμα (Sereti, 2019). Επομένως, η μελέτη ουσιών που στοχεύουν αυτούς τους υποδοχείς, χρήζει ιδιαίτερης σημασίας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τα ανάλογα της 1-(2-αρυλ-2-αδαμάντυλ)πιπεραζίνης, FP5 και P5 που στοχεύουν τους σίγμα υποδοχείς και συντέθηκαν από τον *Fytas* και τους συνεργάτες του (Fytas et al., 2015). Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η καρκινική σειρά αμελανωτικού μελανώματος MDA-MB435. Έπειτα από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και αφόρουσαν την κυτταροτοξικότητα των ουσιών FP5 και P5 με τη χρήση της Sulforhodamine B, φάνηκε πως η ουσία FP5 είναι πιο δραστική από την ουσία P5. Έτσι, τα υπόλοιπα πειράματα αφορούσαν την επίδραση της ουσίας FP5 στη βιωσιμότητα των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue, καθώς και της ικανότητάς της να αναστέλλει τον σχηματισμό κλώνων με τη μέθοδο clonogenic. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης western blot, προκειμένου να εξακριβωθεί ο τύπος κυτταρικού θανάτου που επάγεται όταν τα κύτταρα MDA-MB435 επωαστούν με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις της ουσίας FP5, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Η μέθοδος M65 Epideath ELISA, που ανιχνεύει τα επίπεδα της K18 στο εξωκυττάριο υγρό έπειτα από απόπτωση που υφίστανται τα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε και αυτή ως μέθοδος για την επαλήθευση της παρουσίας της απόπτωσης στα κύτταρα MDA-MB435 όταν αυτά επωαστούν με την ουσία FP5. Τα αποτελέσματα αυτών των μεθόδων έδειξαν πως η ουσία FP5 προκαλεί κυτταρικό θάνατο κυρίως μέσω αυτοφαγίας και έπειτα μέσω απόπτωσης στα κύτταρα MDA-MB435 και η δράση της εξαρτάται και από τη συγκέντρωση της αλλά και από το χρόνο επώασης των κυττάρων MDA-MB435 με αυτήν.

Λέξεις-κλειδιά: Μελάνωμα, Σίγμα υποδοχείς, αυτοφαγία, απόπτωση

Abstract

Melanoma is a significant type of cancer, found often in the Greek population but also all around the world (“Μελάνωμα,” n.d.). The sigma receptors play a distinct role in many different types of cancer, including melanoma (Sereti, 2019). Thus, it’s of great importance to study the role of substances targeting these receptors in different types of melanoma. In the present thesis, a series of experiments was conducted in order to study the effect of two 1-(2-aryl-2-adamantyl) piperazine derivatives, FP5 and P5, that target the sigma receptors and were synthesized by *Fytas* and his colleagues (Fytas et al., 2015). The melanoma cell line used was MDA-MB435, a type of amelanotic melanoma. The cytotoxic studies against MDA-MB435 cells with FP5 and P5 showed that FP5 is more cytotoxic than P5. Thus we decided to use this compound for further experiments and study its effect on the viability of the cells. Towards this aim we used the Trypan blue dye, the M65 Epideath ELISA to study the conditions under which FP5 induces cell death and tested its ability to prevent the formation of colonies in a clonogenic assay. Western blot was used to assess the type of cell death induced in MDA-MB435 after the incubation with specific concentrations of FP5 for different incubation times. The results of this study indicate that the FP5 triggers cell death in MDA-MB435 cells mainly through autophagy and later on through apoptosis and that its effect is dependent on its concentration and on the incubation time with the cells.

Key words: Melanoma, Sigma receptors, apoptosis, autophagy

Περιεχόμενα

<u>Εισαγωγή</u>	9
A.1 Τι είναι ο Καρκίνος.....	9
A.2 Ογκογένεση.....	9
B. Μελάνωμα.....	9
B.1 Συμπτώματα.....	10
B.2 Είδη Μελανώματος.....	10
B.3 Παράγοντες που προκαλούν Μελάνωμα.....	12
B.4 Σταδιοποίηση του Μελανώματος.....	15
B.5 Θεραπεία.....	16
Γ. Σίγμα Υποδοχείς.....	17
Γ.1 Υπότυποι των σίγμα υποδοχέων.....	17
Γ.2 Υποδοχέας σ1.....	17
Γ.3 Υποδοχέας σ2.....	18
Γ.4 Οι Σίγμα υποδοχείς και ο καρκίνος.....	19
Δ. Σηματοδοτικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου.....	20
Δ.1 Απόπτωση.....	20
Δ.2 Η απόπτωση στον καρκίνο.....	24
Δ.3 Αυτοφαγία.....	25
Δ.4 Η αυτοφαγία στον καρκίνο.....	26
Ε. Ανάλογα της 1-(2-αρυλ-2-αδαμάντυλ)πιπεραζίνης.....	26
ΣΤ. Σκοπός.....	28
1. Υλικά και Μέθοδοι.....	29
1.1 Υλικά.....	29
1.2 Μέθοδοι.....	32
1.2.1 Τα κύτταρα MDA-MB435.....	32
1.2.2 Τα κύτταρα SK-MEL-28.....	32
1.2.3 1.1 Συνθήκες των κυτταροκαλλιιεργειών.....	33

1.2.4	Ανακαλλιέργεια των κυττάρων.....	33
1.2.5	Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων.....	34
1.2.6	Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο SRB.....	35
1.2.7	Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue.....	38
1.2.8	Ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση Western blot.....	41
1.2.9	Μέθοδος κλωνογένεσης (Clonogenic assay).....	45
1.2.10	M65 Epideath ELISA.....	47
2.	Αποτελέσματα.....	49
2.1.	Μελέτη της κυτταροτοξικότητας και της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των ουσιών FP5 και P5.....	50
2.2.	Αποτελέσματα της επίδρασης της ουσίας FP5 στη βιωσιμότητα των κυττάρων με τη χρήση του Trypan Blue.....	51
2.3	Μελέτη της επίδρασης της ουσίας FP5 στη δημιουργία κλώνων των MDA- MB435.....	54
2.4	Αποτελέσματα του M65 Epideath ELISA assay.....	55
2.5.	Επίδραση της ουσίας FP5 στον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο των κυττάρων MDA-MB435.....	56
2.6	Επίδραση της ουσίας FP5 στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο των κυττάρων MDA-MB435.....	58
3.	Συζήτηση	60
4.	Βιβλιογραφία.....	65

Εισαγωγή

A.1 Τι είναι ο Καρκίνος

Ο όρος καρκίνος χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις κακοήθεις μορφές νεοπλασίας, δηλαδή μιας διαδικασίας που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός όγκου/μιας μάζας που ονομάζεται νεόπλασμα. Τα νεοπλάσματα προκαλούν μεταστάσεις και προσβάλλουν και άλλες περιοχές του σώματος, εκτός της πρωταρχικής εστίας. Βέβαια, δεν είναι όλοι οι όγκοι κακοήθεις. Υπάρχουν και καλοήθεις όγκοι που δεν προκαλούν μεταστάσεις αλλά μπορεί το μέγεθός τους και ο εντοπισμός τους να προξενούν προβλήματα στον ασθενή. Διακρίνονται τρεις κατηγορίες καρκίνου: α) τα σαρκώματα, όπου έχουμε την ανάπτυξη όγκου από μεσεγχυματικούς ιστούς, π.χ. οστά, β) τα καρκινώματα, που προέρχονται από ενδοθηλιακούς ιστούς, για παράδειγμα κύτταρα του εντέρου και γ) οι αιμοποιητικές και οι λεμφοειδείς κακοήθεις νεοπλασίες όπως η λευχαιμία και το λέμφωμα (Thompson, 2011).

A.2 Ογκογένεση

Ως ογκογένεση χαρακτηρίζεται το αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε γονίδια υπεύθυνα για τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Τα γονίδια που υφίστανται αυτές τις μεταλλάξεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα ογκογονίδια (Thompson, 2011).

B. Μελάνωμα

Το μελάνωμα είναι ένα είδος καρκίνου του δέρματος, το οποίο μπορεί και επεκτείνεται και σε άλλα όργανα του σώματος (“symptoms of melanoma - NHS,” n.d.). Υπεύθυνα για τη δημιουργία του είναι άτυπα μελανοκύτταρα, τα οποία προκαλούν την παραγωγή της χρωστικής του δέρματος, των μαλλιών και των ματιών καθώς και τη δημιουργία των σπίλων (Βλάσση et al., n.d.)

B.1 Συμπτώματα

Το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η εμφάνιση ενός καινούργιου σπίλου στο σώμα ή η αλλαγή στην εμφάνιση ενός προϋπάρχοντος σπίλου. Το σύνηθες σημείο εμφάνισης στους άνδρες είναι η πλάτη, ενώ στις γυναίκες τα πόδια. Σπανίως, μελανώματα εμφανίζονται κάτω από τα νύχια, στα πέλματα, στη στοματική κοιλότητα και στα γενετικά όργανα. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα μελανώματα έχουν ακανόνιστο σχήμα και παραπάνω του ενός χρώματα. Επιπλέον, ο σπίλος μπορεί να έχει μέγεθος μεγαλύτερο του φυσιολογικού, να προκαλεί κνησμό ή/και να αιμορραγεί (“symptoms of melanoma - NHS,” n.d.).

Ο “χρυσός” κανόνας του ABCDE για τη διάκριση ενός φυσιολογικού σπίλου από το μελάνωμα (“symptoms of melanoma - NHS,” n.d.):

1. **A**symmetrical: τα μελανώματα έχουν συνήθως δύο διαφορετικά μισά και ακανόνιστο σχήμα.
2. **B**order – τα μελανώματα συνήθως έχουν οδοντωτό ή τραχύ περίγραμμα.
3. **C**olours – τα μελανώματα είναι μείξη δύο ή και παραπάνω χρωμάτων.
4. **D**iameter – τα μελανώματα στην πλειονότητά τους έχουν διάμετρο μεγαλύτερη των 6mm.
5. **E**nlargement or elevation – ένας σπίλος που αλλάζει μέγεθος με το πέρασμα του χρόνου, πιθανότατα αποτελεί μελάνωμα

B.2 Είδη του μελανώματος

Υπάρχουν διάφορα είδη μελανώματος ανάλογα με την εμφάνιση. Τα σπουδαιότερα είδη είναι τα εξής:

1. Οζώδες/κονδυλώδες μελάνωμα: συναντάται στο 15-30% των περιπτώσεων και εμφανίζεται σαν μαύρο-μπλε, μπλε-κόκκινο ή/και αμελανωτικό οζίδιο (Ιωαννίδης Χαρίλαος, n.d.). Είναι μια ταχέως αναπτυσσόμενη μορφή μελανώματος που αν δεν αφαιρεθεί εγκαίρως μπορεί να εισβάλει σε βαθύτερες στιβάδες του δέρματος και να προσβάλλει άλλα όργανα. Συνήθως παρατηρείται στην κεφαλή, στο λαιμό ή στην πλάτη και συναντάται σε άτομα κοντά στην ηλικία των 50 ετών.

- Χαρακτηριστικό του είναι η αιμορραγία (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.) (“Types of melanoma | Cancer Research UK,” n.d.).
2. Επιφανειακά εξαπλώμενο: αποτελεί τη συχνότερη μορφή μελανώματος (70% των περιπτώσεων) και προσομοιάζει με καφέ ή καφέ-μαύρη πλάκα με ανώμαλο περίγραμμα (Ιωαννίδης Χαρίλαος, n.d.). Συναντάται κυρίως σε άτομα με χλωμή επιδερμίδα και φακίδες παρά σε άτομα με σκούρο δέρμα. Συνήθως μεγαλώνει εξωτερικά, αλλά σε περίπτωση που αρχίσει να μεγαλώνει σε βαθύτερες στιβάδες του δέρματος, μπορεί να προσβάλλει και άλλα όργανα (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.). Οι ηλικίες των ασθενών προσδιορίζονται κυρίως ανάμεσα στα 30 με 50 έτη. Αναπτύσσεται σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος, στους άνδρες όμως συναντάται πρωτίστως στον κορμό και στις γυναίκες στα πόδια (“Types of melanoma | Cancer Research UK,” n.d.). Στην *εικόνα 1* απεικονίζεται ένα επιφανειακά εξαπλώμενο μελάνωμα (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.).
 3. Μελάνωμα lentigo: αυτή η μορφή μελανώματος παρατηρείται κυρίως σε μεγάλης ηλικίας ανθρώπους, ιδίως σε αυτούς που περνούν πολλές ώρες σε εξωτερικό περιβάλλον. Η ανάπτυξή του εξελίσσεται με τα χρόνια σε περιοχές του σώματος που εκτίθενται στον ήλιο, όπως το πρόσωπο. Το μελάνωμα αυτό προσομοιάζει με φακίδες αλλά είναι πιο σκούρο, μεγαλύτερο και ξεχωρίζει περισσότερο απ’ότι μια φακίδα. Σταδιακά είναι δυνατή η αλλαγή στο μέγεθός του και στο σχήμα του. Υπάρχει πιθανότητα εξάπλωσής του σε εσωτερικές στιβάδες του δέρματος με αποτέλεσμα την δημιουργία οζιδίων (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.). Παρατηρείται στο 5 με 15% των περιπτώσεων μελανώματος και προσβάλλει άτομα στην ηλικία των 60 ετών (“Types of melanoma | Cancer Research UK,” n.d.).
 4. Acral lentiginous μελάνωμα: αποτελεί μια σπάνια μορφή μελανώματος που αναπτύσσεται συνήθως στις παλάμες και στα πέλματα. Ενίοτε παρατηρείται στα νύχια, κυρίως στον αντίχειρα ή στο μεγάλο δάκτυλο του ποδιού (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.).
 5. Αμελανωτικό μελάνωμα: αυτή η μορφή μελανώματος δεν εμφανίζει κάποιο χρωματισμό ή αν εμφανίζει είναι συνήθως ροζ, ερυθρού χρώματος με γκρι ή ανοιχτές καφέ απολήξεις (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.). Συναντάται στο 8% των περιπτώσεων ασθενών με μελάνωμα καθώς η απουσία χρωματισμού

- καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη τη διάγνωση του και εύκολη τη συσχέτισή του με άλλες δερματικές παθήσεις (“Types of melanoma | Cancer Research UK,” n.d.). Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 50 έτη και η αναλογία μεταξύ ανδρών/γυναϊκών ποικίλει από 0,5 έως 4 (Gong et al., 2019). Παράδειγμα άχρωμου μελανώματος απεικονίζεται στην *εικόνα 2* (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.).
6. Βλεννογόνο μελάνωμα: μορφή μελανώματος που αναπτύσσεται σε εσωτερικές επιφάνειες του σώματος όπως η στοματική κοιλότητα και ο κόλπος. Πιθανές εστίες ανάπτυξης αυτής της μορφής μελανώματος αποτελούν α) ο πρωκτός, β) ο κόλπος, γ) το αιδοίο και δ) η στοματική κοιλότητα (“Types of melanoma | Cancer Research UK,” n.d.).
 7. Μία ακόμη δυσεύρετη μορφή μελανώματος αποτελεί το μελάνωμα του οφθαλμού, που παράγεται από τα μελανοκύτταρα. Πιο συχνά συναντάται στο ραγοειδή χιτώνα και στον χοριοειδή χιτώνα και μεγαλώνει στο οπίσθιο μέρος του οφθαλμού. Στις πιο σπάνιες μορφές του παρατηρείται στον επιπεφυκότα ή στην ίριδα (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.; “Types of melanoma | Cancer Research UK,” n.d.). Αλλαγές στην ικανότητα όρασης ή η εμφάνιση μαύρης κηλίδας στην όραση μπορεί να προμηνύει την ύπαρξη μελανώματος, αν και είναι πιο πιθανό να γίνει διάγνωση σε απλή εξέταση από τον οφθαλμίατρο (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.).

B.3 Παράγοντες που προκαλούν μελάνωμα

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μελανώματος. Ο κυριότερος από αυτούς είναι η ηλιακή ακτινοβολία. Η ηλιακή ακτινοβολία υπάρχει σε τρεις μορφές, την UVA, την UVB και την UVC. Η πιο επικίνδυνη είναι η UVC αλλά μπλοκάρεται από τη στοιβάδα του όζοντος. Οι ακτινοβολίες UVA και UVB προκαλούν βλάβες στις ανοιχτόχρωμες επιδερμίδες με πιθανό αποτέλεσμα την ανάπτυξη μελανώματος με το πέρασμα του χρόνου. Είναι επιβεβαιωμένο πως η ακτινοβολία UVB οδηγεί στην εμφάνιση μελανώματος αλλά για την ακτινοβολία UVA δεν υπάρχει κάτι επιβεβαιωμένο. Πηγές τεχνητού φωτός όπως οι λάμπες ήλιου και το τεχνητό μαύρισμα μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση μελανώματος. Ένας άλλος παράγοντας εμφάνισης μελανώματος είναι και οι σπίλοι.

Άτομα με μεγάλο αριθμό σπύλων στο σώμα τους έχουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν μελάνωμα, ιδίως όταν οι σπύλοι έχουν ακανόνιστο σχήμα και ξεπερνούν το μέγεθος των 5mm. Γι'αυτό το λόγο, είναι άκρως σημαντική η παρατήρηση των σπύλων για τυχόν αλλαγές στο μέγεθός τους και στο σχήμα τους και η ελαχιστοποίηση της έκθεσής τους στον ήλιο (“causes of melanoma - NHS,” n.d.). Αναφορικά άλλοι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μελανώματος είναι οι εξής:

1. Οικογενειακό ιστορικό εμφάνισης μελανώματος. Οι πιθανότητες εμφάνισης μελανώματος είναι 50% (“causes of melanoma - NHS,” n.d.)(Βλάσση et al., n.d.).
2. Άτομα με μπλε απόχρωση ματιών (“causes of melanoma - NHS,” n.d.)(Ιωαννίδης Χαρίλαος, n.d.).
3. Άτομα με ξανθά ή κόκκινα μαλλιά (“causes of melanoma - NHS,” n.d.).
4. Άτομα με ανοιχτόχρωμη επιδερμίδα, επιρρεπή σε εγκαύματα από την ηλιακή ακτινοβολία (“causes of melanoma - NHS,” n.d.).
5. Ύπαρξη πολλών φακίδων (“causes of melanoma - NHS,” n.d.).
6. Άτομα που έχουν προηγουμένως προκαλέσει φθορές στην επιδερμίδα τους μέσω εγκαυμάτων από την ηλιακή ακτινοβολία ή από ακτινοθεραπεία (“causes of melanoma - NHS,” n.d.).
7. Προηγούμενη διάγνωση με καρκίνο του δέρματος (“causes of melanoma - NHS,” n.d.).
8. Ύπαρξη πάθησης που καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα (πχ διαβήτη) ή η λήψη φαρμακευτικής αγωγής που καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα (“causes of melanoma - NHS,” n.d.).
9. Γονιδιακό προφίλ. Μεταλλάξεις στα γονίδια *BRAF* και *P53* έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση μελανώματος (Βλάσση et al., n.d.).

Η συχνότητα εμφάνισης μελανώματος δεν είναι σταθερή σε ολόκληρο τον κόσμο. Μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης παρατηρείται σε περιοχές κοντά στον Ισημερινό, όπως η Νέα Ζηλανδία και η Αυστραλία. Χαμηλή συχνότητα εμφάνισης παρατηρείται στην Νότια Ευρώπη (Ιωαννίδης Χαρίλαος, n.d.).



Εικόνα 1: Απεικόνιση επιφανειακά εξαπλωμένου μελανώματος (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.).



Εικόνα 2: Απεικόνιση αμελανωτικού μελανώματος (“melanoma skin cancer - NHS,” n.d.).

B.4 Σταδιοποίηση των μελανωμάτων

Οι επαγγελματίες υγείας σταδιοποιούν το μελάνωμα σύμφωνα με το σύστημα AJCC προκειμένου να προσδιορίσουν το βαθμό αύξησης του μελανώματος στο δέρμα και την πιθανή εξάπλωσή του. Η επιλογή θεραπείας βασίζεται στην ταξινόμηση του μελανώματος κάθε ασθενή (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.). Τα στάδια είναι τα εξής:

- 1) Στάδιο 0 - το μελάνωμα βρίσκεται στην επιφάνεια του δέρματος (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).
- 2) Στάδιο 1A - το μελάνωμα είναι μικρότερο από 1 mm (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).
- 3) Στάδιο 1B - το μελάνωμα έχει μέγεθος 1-2 mm ή λιγότερο από 1 mm και το δέρμα έχει ανοιχτές πληγές ή τα κύτταρα του πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα από το φυσιολογικό (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).
- 4) Στάδιο 2A - το μελάνωμα έχει μέγεθος 2-4 mm ή 1-2 mm με ανοιχτές πληγές (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).
- 5) Στάδιο 2B - το μελάνωμα έχει μέγεθος μεγαλύτερο των 4 mm ή 2-4 mm με ανοιχτές πληγές (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).
- 6) Στάδιο 2C - το μελάνωμα είναι μεγαλύτερο από 4 mm με ανοιχτές πληγές (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).
- 7) Στάδιο 3A - το μελάνωμα έχει προσβάλλει 1 με 3 παρακείμενους λεμφαδένες οι οποίοι όμως δεν είναι διογκωμένοι. Το μελάνωμα δεν παρουσιάζει ανοιχτές πληγές και δεν έχει επεκταθεί περαιτέρω (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).
- 8) Στάδιο 3B - το μελάνωμα προκαλεί ανοιχτές πληγές και έχει προσβάλλει 1 με 3 παρακείμενους λεμφαδένες, οι οποίοι όμως δεν είναι διογκωμένοι ή το μελάνωμα δε προκαλεί ανοιχτές πληγές, έχει προσβάλλει 1 με 3 παρακείμενους λεμφαδένες και είναι διογκωμένοι ή το μελάνωμα έχει επεκταθεί και σε άλλες μικρές περιοχές του δέρματος ή στο λεμφαγγειακό σύστημα χωρίς να έχει προσβάλλει όμως παρακείμενους λεμφαδένες (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).

9) Στάδιο 3C - το μελάνωμα προκαλεί ανοιχτές πληγές και έχει προσβάλλει 1 με 3 παρακείμενους λεμφαδένες που είναι διογκωμένοι ή το μελάνωμα έχει προσβάλλει πάνω από τέσσερις παρακείμενους λεμφαδένες (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).

10) Στάδιο 4 - τα κύτταρα του μελανώματος έχουν εξαπλωθεί και σε άλλες περιοχές του σώματος, όπως οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος ή σε άλλες περιοχές του δέρματος (“diagnosis of melanoma - NHS,” n.d.).

B.5 Θεραπεία:

Κύρια μορφή θεραπευτικής αντιμετώπισης του μελανώματος αποτελεί η χειρουργική επέμβαση. Υπάρχει συνεργασία ειδικών (δερματολόγος, ογκολόγος κλπ.) οι οποίοι θα κρίνουν ανάλογα με την κλινική εικόνα του ασθενούς, την κατάλληλη θεραπευτική μέθοδο. Ο τύπος μελανώματος σαφώς επηρεάζει την θεραπευτική οδό που θα ακολουθήσουν οι ειδικοί. Για μελάνωματα 1^{ου} και 2^{ου} σταδίου γίνεται χειρουργική αφαίρεση του μελανώματος και ενός μικρού τμήματος της τριγύρω περιοχής. Ορισμένες φορές, μετά την χειρουργική αφαίρεση, υπάρχει πιθανότητα επανεμφάνισης αλλά δεν απαιτείται άλλη χειρουργική παρέμβαση (“treatment for melanoma - NHS,” n.d.). Κατά την χειρουργική αφαίρεση του μελανώματος, υπάρχει δυνατότητα ελέγχου του φρουρού λεμφαδένα. Αν η βιοψία δείξει προσβολή του λεμφαδένα αυτού, τότε ακολουθεί χειρουργική αφαίρεση των λεμφαδένων και των προσβεβλημένων οργάνων σε συνδιασμό με χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορεί να εφαρμοστεί και ανοσοθεραπεία (μελάνωμα 4^{ου} σταδίου) (“treatment for melanoma - NHS,” n.d.) (Βλάσση et al., n.d.). Η ανοσοθεραπεία έχει ως σκοπό τη στοχοποίηση και καταστροφή των κυττάρων μελανώματος από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Υπάρχουν διάφορα φάρμακα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα (μονοθεραπεία) ή σε συνδιασμό με άλλα (συνδυαστική θεραπεία) στην ανοσοθεραπεία όπως τα 1) ipilimumab, 2) nivolumab, 3) pembrolizumab και 4) talimogene laherparepvec (“treatment for melanoma - NHS,” n.d.). Όπως προαναφέρθηκε, ένα από τα γονίδια που έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση μελανώματος είναι το γονίδιο *BRAF*. Μετάλλαξη σε αυτό το γονίδιο συναντάται στον 1 από τους 2 ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί με μελάνωμα. Η μετάλλαξη του γονιδίου οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων. Διατίθενται

φάρμακα τα οποία στοχεύουν συγκεκριμένα αυτή τη μετάλλαξη και επιβραδύνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ονομαστικά τέτοια φάρμακα είναι τα: 1) vemurafenib, 2) dabrafenib και 3) trametinib.

Γ. Σίγμα υποδοχείς

Οι σίγμα υποδοχείς είναι γνωστοί περίπου τέσσερις δεκαετίες. Η ανακάλυψή τους ουσιαστικά πραγματοποιήθηκε με την μελέτη των οπιοειδών υποδοχέων. Πιο συγκεκριμένα, το 1976 φαρμακολογικές μελέτες των οπιοειδών υποδοχέων και των οπιούχων προσδετών τους, διαχώρισαν τους υποδοχείς αυτούς σε τρεις ομάδες, α) στους μι (mu), β) στους κάππα (kappa) και γ) στους σίγμα (sigma) υποδοχείς. Τα ονόματα των υποδοχέων προέκυψαν από τα αρχικά των αγωνιστών τους, μορφίνη, κετοκυκλαζοκίνη και την SKF10047 βενζομορφάνη αντιστοίχως (Sereti, 2019; Longhitano et al., 2017; Smith and Su, 2017; Oyer et al., 2019). Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν πως η λειτουργία των σίγμα υποδοχέων δε σχετίζεται με τη λειτουργία των οπιοειδών υποδοχέων (Fytas et al., 2015).

Γ.1 Υπότυποι των σίγμα υποδοχέων

Με τα χρόνια, η μελέτη των σίγμα υποδοχέων οδήγησε στο διαχωρισμό τους σε δύο υπότυπους, τους σ1 υποδοχείς και τους σ2 υποδοχείς. Ο διαχωρισμός τους βασίστηκε στην παρατήρηση του διαφορετικού τρόπου σύνδεσης των προσδετών τους σε αυτούς (Sereti, 2019; Oyer et al., 2019).

Γ.2 Υποδοχέας σ1

Ο υποδοχέας σ1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο πολλών τύπων κυττάρων, όπως κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος, της καρδιάς, του πλακούντα, των όρχεων, των νεφρών, του παγκρέατος, του ήπατος και των ωοθηκών. Υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης του υποδοχέα εντοπίζονται και σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα στο στάδιο της εμβρυογένεσης (Sereti, 2019; Smith and Su, 2017).

Η κλωνοποίηση του σ1 αποκάλυψε πως η δομή του δε προσομοιάζει με κανένα άλλο γνωστό ανθρώπινο υποδοχέα. Το 2007 εισήχθη η έννοια της πρωτεΐνης συνοδού για τη

λειτουργία του σ1 και λίγα χρόνια αργότερα πως τη λειτουργική του δομή αποτελεί η ολιγομερής δομή του υποδοχέα (Sereti, 2019;Oyer et al., 2019).

Γ.3 Υποδοχέας σ2

Οι γνώσεις για τον υποδοχέα σ2 είναι αρκετά πιο περιορισμένες σε σχέση με αυτές για τον υποδοχέα σ1. Ανακαλύφθηκε το 1990 και χαρακτηρίστηκε ως μια θέση του σ υποδοχέα που εμφάνιζε υψηλή συγγένεια για το DTG και την αλοπεριδόλη, όχι όμως για τις βενζομορφάνες. Ο σ2 υποδοχέας είναι μια ενδοκυττάρια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 18-22 kDa. Η γονιδιακή αποσιώπηση του σ1 υποδοχέα υπέδειξε πως η πρωτεΐνη του σ2 προέρχεται από διαφορετικό γονιδιακό τόπο, και πρόσφατα ανακαλύφθηκε και το γονίδιο που την κωδικοποιεί. Η έλλειψη γνώσης του γονιδίου αυτού παρεμπόδιζε τη μελέτη της βιολογίας του σ2 και συνεπώς και της λειτουργίας του. Για αυτό, ακόμη και σήμερα αυτός ο υποδοχέας δεν είναι εξίσου καλά φαρμακολογικά χαρακτηρισμένος σε σχέση με άλλους γνωστούς υποδοχείς (Sereti, 2019).

Προτού ανακαλυφθεί το γονίδιο του σ2 επικρατούσε η άποψη πως η θέση πρόσδεσης του σ2 εντοπίζεται στη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα της προγεστερόνης PGRMC1 (Progesterone Receptor Component 1). Βέβαια, αυτή η υπόθεση δε μπορούσε να υποστηριχθεί από κάποια δεδομένα, όπως το διαφορετικό μοριακό βάρος που εμφανίζουν οι δύο πρωτεΐνες και ο εντοπισμός του σ2 μέσω ραδιοσημασμένων προσδετών σε PGRMC1 knock down κύτταρα. Αυτό αποδεικνύεται καθώς, μελέτες αποσιώπησης του PGRMC1 με τη χρήση siRNA και CRISPR/Cas9, σε ανθρώπους και ποντίκια, δεν προκάλεσαν μεταβολή στην πρόσδεση των σ2 προσδετών στον σ2 υποδοχέα (Sereti, 2019). Εν τέλη, το 2017, ο σ2 ταυτοποιήθηκε ως η πρωτεΐνη TMEM97 (Transmembrane protein 97) με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας (Sereti, 2019;Oyer et al., 2019). Πιο αναλυτικά, στη στήλη ακινητοποιήθηκε ένας σ2 προσδέτης και με την διοχέτευση πρωτεϊνών από ήπαρ μοσχαριού έγινε εκλεκτική σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών. Ακολούθησε φασματοσκοπία μάζας για τις πρωτεΐνες που συνδέθηκαν με τον προσδέτη και προσδιορισμός τους. Επιπλέον, ακολούθησαν δοκιμές με τη χρήση ενός ραδιοσημασμένου προσδέτη του σ2 υποδοχέα, [³H]DTG, σημαντικού παράγοντα για τον φαρμακολογικό προσδιορισμό του σ2 υποδοχέα. Από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, μόνο ο υπερεκφρασμένος TMEM97 εμφάνισε αυξημένη πρόσδεση με τον [³H]DTG, ενώ

όταν ο PGRMC1 υπερεκφραζόταν δεν επηρεαζόταν η πρόσδεση του [³H]DTG. Κύτταρα τα οποία εκφράζουν τον TMEM97 αλλά όχι τον σ2, εμφάνισαν πρόσδεση των σ2 προσδετών και η αποσιώπηση του TMEM97 προκάλεσε μείωση στα επίπεδα πρόσδεσης των σ2 προσδετών. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την άποψη πως ο σ2 ταυτίζεται με τον υποδοχέα TMEM97 (Sereti, 2019).

Γ.4 Οι σίγμα υποδοχείς και ο καρκίνος

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν τη συμμετοχή του σ1 υποδοχέα σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Αρχικά, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης του σ1 σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές με τη χρήση ραδιοσημασμένων προσδετών. Τα αποτελέσματα έδειξαν την υπερέκφραση του υποδοχέα σε διάφορες ανθρώπινες και ποντικίσιες καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα, μαστού, προστάτη, γλοιώματος, μελανώματος και παχέος εντέρου. Όμως, οι προσδέτες που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν εκλεκτικοί για έναν από τους δύο υπότυπους των σίγμα υποδοχέων, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατος ο προσδιορισμός του υποδοχέα με τον οποίο γίνεται η πρόσδεση (Sereti, 2019).

Η χρήση ειδικού αντισώματος για ανίχνευση του σ1 υποδοχέα, έδειξε πως ο υποδοχέας ανιχνεύεται υπερεκφρασμένος σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, πνεύμονα και προστάτη, ενώ η έκφρασή του είναι χαμηλή σε φυσιολογικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, η πυκνότητα του σ1 βρέθηκε αυξημένη σε κύτταρα με υψηλή μεταστατική δράση, γεγονός που συσχετίζει τα επίπεδα έκφρασης του σ1 υποδοχέα με την επιθετικότητα του καρκίνου (Sereti, 2019).

Επιπλέον, έχουν διεξαχθεί μελέτες για τη συσχέτιση του σ2 υποδοχέα με τον καρκίνο. Αυτές έχουν δείξει πως ο υποδοχέας αυτός σχετίζεται με το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδά του εντοπίζονται αυξημένα σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με έντονους ρυθμούς. Άλλες μελέτες έχουν επίσης συσχετίσει τα επίπεδα του υποδοχέα με το στάδιο του καρκίνου. Αξίζει να σημειωθεί όμως πως τα διαθέσιμα δεδομένα για τον τρόπο δράσης του σ2 υποδοχέα βασίζονται σε πειράματα με προσδέτες του υποδοχέα (Sereti, 2019).

Αξίζει να σημειωθεί πως πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την επίδραση των σίγμα υποδοχέων στη λειτουργία διάφορων καναλιών ιόντων των κυττάρων. Για παράδειγμα, η λειτουργία των καναλιών Na⁺ μπορεί να ρυθμιστεί από τον σίγμα1 υποδοχέα και αυτά στη συνέχεια να επηρεάσουν την προσκόλληση, τη μετάσταση και την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Fytas et al., 2015).

4. Σηματοδοτικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μια φυσιολογική διαδικασία που συμβαίνει σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Είναι μια διαδικασία που κρατά σε ισορροπία τη δημιουργία και την καταστροφή των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο διατηρείται σταθερός ο αριθμός των κυττάρων σε ιστούς με συνεχή ικανότητα ανανέωσης, για παράδειγμα το αίμα. Επίσης, μέσω του κυτταρικού θανάτου μπορούν και απομακρύνονται βλαβερά κύτταρα από τον οργανισμό. Αυτά τα κύτταρα επηρεάζουν την ομαλή και φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Τέτοια παραδείγματα κυττάρων αποτελούν κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ένα παθογόνο, όπως ένας ιός, καθώς και κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί μεταλλάξεις που διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία τους και μπορούν να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος παρατηρείται και στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης ενός οργανισμού, για παράδειγμα, κατά την εμβρυογένεση (Sherwood, 2016; Cooper and Hausman, 2009).

Υπάρχουν πολλές οδοί που μπορεί να ακολουθήσει ένα κύτταρο προκειμένου να οδηγηθεί στον κυτταρικό θάνατο. Τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για το ποιο μονοπάτι θα ενεργοποιηθεί (Cooper and Hausman, 2009).

4.1 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι ένα μονοπάτι προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Αρχικά, στην απόπτωση το DNA σπάει σε τμήματα, η χρωματίνη συρρικνώνεται και ο πυρήνας κατακερματίζεται. Τελικά, το κύτταρο συρρικνώνεται και διασπάται σε τμήματα που περιβάλλονται από μεμβράνη. Αυτά τα τμήματα ονομάζονται αποπτωτικά σωμάτια (apoptotic bodies). Τα αποπτωτικά σωμάτια και τα αποπτωτικά κύτταρα απομακρύνονται άμεσα από τους ιστούς από μακροφάγα και γειτονικά κύτταρα με τη διαδικασία της

φαγοκυττάρωσης. Υπάρχουν σήματα που ουσιαστικά βοηθούν στην φαγοκυττάρωση. Ένα τέτοιο σήμα είναι η φωσφατιδυλοσερίνη. Φυσιολογικά, η φωσφατιδυλοσερίνη εντοπίζεται στο εσωτερικό τμήμα της πλασματικής μεμβράνης. Στην απόπτωση όμως μετατοπίζεται στο εξωτερικό της τμήμα. Έτσι, τα μακροφάγα εντοπίζουν τα αποπτωτικά σωματίδια και τα απομακρύνουν (Cooper and Hausman, 2009;Voet et al., n.d.;Sherwood, 2016).

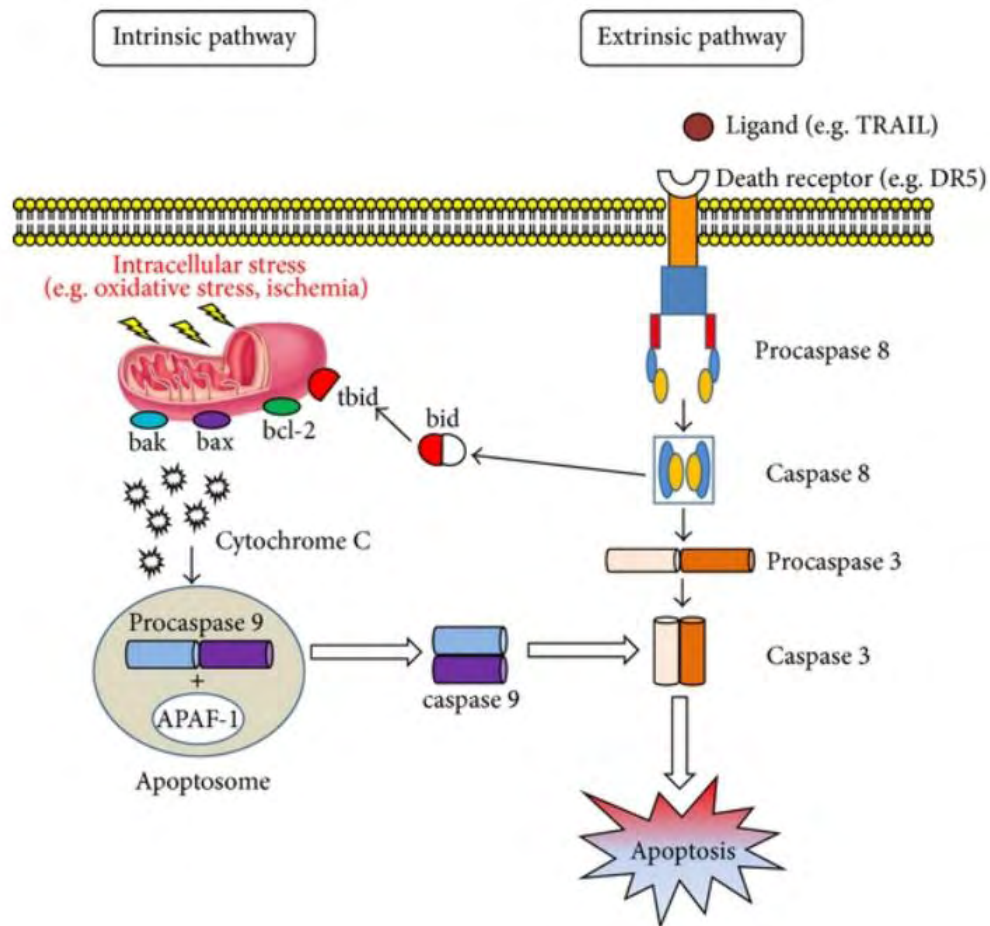
Τα κύρια ένζυμα της διαδικασίας της απόπτωσης είναι οι κασπάσες. Οι κασπάσες είναι κυστεϊνοπρωτεάσες και οδηγούν στην πέψη περισσότερων από εκατό διαφορετικών πρωτεϊνών-στόχων. Κάποιοι βασικοί στόχοι των κασπασών είναι οι ακόλουθοι:

- 1) Αναστολείς DNάσης. Με την πέψη των αναστολέων, γίνεται ενεργοποίηση της DNάσης και τελικά κατακερματισμός του πυρηνικού DNA.
- 2) Πυρηνικές λαμίνες. Η πέψη τους οδηγεί σε κατακερματισμό του πυρήνα.
- 3) Πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Με την πέψη διάφορων πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού γίνεται αποδόμηση του κυτταροσκελετού, οι μεμβράνες αποδιατάσσονται και το κύτταρο κατακερματίζεται.
- 4) Η φωσφατιδυλοσερίνη. Οι κασπάσες έχει βρεθεί πως συμβάλλουν στη μεμβρανική μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός ακόμη (Cooper and Hausman, 2009;Voet et al., n.d.).

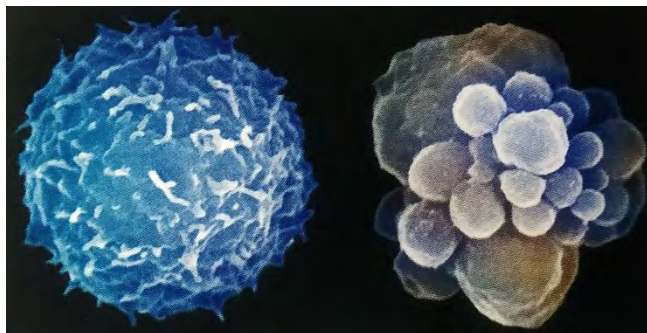
Η απόπτωση ξεκινά με κάποιο σήμα για κυτταρικό θάνατο. Μέσω του σήματος, οι πρωτεΐνες bax/bak συνδέονται στις πρωτεΐνες bcl-2 που βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Η σύνδεση αυτή, οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από το εσωτερικό των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, απελευθερώνονται αναστολείς των IAP, αναστολέων της απόπτωσης. Το κυτόχρωμα c συνδέεται με το αποπτώσωμα, που αποτελεί σύμπλοκο της Κασπάσης 9, κύριας κασπάσης της απόπτωσης, και της πρωτεΐνης Araf-1. Η σύνδεση του κυτοχρώματος c στο σύμπλοκο αυτό, οδηγεί στην ενεργοποίηση της Κασπάσης 9. Η Κασπάση 9 είναι κασπάση εκκινήτης, δηλαδή, ενεργοποιείται με αυτοκατάλυση και στη συνέχεια κόβει κασπάσες εκτελεστές και τις ενεργοποιεί. Μία κασπάση που ενεργοποιείται από την Κασπάση 9 είναι η Κασπάση 3. Στα θηλαστικά, έχει βρεθεί επιπλέον να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία και η p53. Πιο συγκεκριμένα, η p53 ανταποκρίνεται σε βλάβες στο DNA οδηγώντας σε στάση του κυτταρικού κύκλου. Φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται

από τις κινάσες ATM και Chk2. Με αυτό τον τρόπο αυξάνονται τα επίπεδα της p53 και γίνεται μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων της. Στόχο της p53 αποτελεί και το γονίδιο της p21, η οποία αναστέλει το σύμπλοκο Cdk2/κυκλίνη E με αποτέλεσμα τη στάση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1. Παρόλα αυτά, η p53 συμμετέχει και στην απόπτωση, όπως προαναφέρθηκε. Πιο αναλυτικά, η p53 ενεργοποιεί τα γονίδια των PUMA και Noxa, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των προαποπτωτικών bcl-2 πρωτεϊνών. Η υψηλή έκφραση αυτών των πρωτεϊνών, ενεργοποιεί τις bax/bak, αυτές με τη σειρά τους οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση της Κασπάσης 9. Αν θα γίνει παύση του κυτταρικού κύκλου ή αν θα οδηγηθεί το κύτταρο σε απόπτωση εξαρτάται από την σοβαρότητα και τον αριθμό των βλαβών που έχει υποστεί το DNA, το βαθμό επαγωγής της p53 και από σήματα επιβίωσης ή θανάτου που δέχεται το κύτταρο (Cooper and Hausman, 2009; Voet et al., n.d.; Sherwood, 2016).

Στα εξωκυτταρικά σήματα που μπορούν να οδηγήσουν σε απόπτωση ανήκουν και οι παράγοντες νέκρωσης όγκων-TNF. Οι παράγοντες αυτοί αποτελούνται από τρεις όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η σύνδεσή τους στους υποδοχείς τους οδηγεί στη σύνδεση ενδοκυτταρικά πρωτεϊνών προσαρμοστών στους υποδοχείς τους. Οι προσαρμοστές με τη σειρά τους συνδέονται με την Κασπάση 8 και την ενεργοποιούν. Η Κασπάση 8 οδηγεί με μερική πρωτεόλυση στην ενεργοποίηση κασπασών εκτελεστών όπως οι κασπάσες 3 και 7. Σε ορισμένα κύτταρα, αυτά τα βήματα του μονοπατιού είναι αρκετά προκειμένου να προκληθεί απόπτωση. Σε άλλα κύτταρα όμως γίνεται ενίσχυση του σήματος. Η ενίσχυση επιτυγχάνεται με πέψη της πρωτεΐνης bid από την Κασπάση 8, η bid ενεργοποιείται και οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων και στην ενεργοποίηση της Κασπάσης 9 (Cooper and Hausman, 2009; Voet et al., n.d.). Στην *εικόνα 3* αναπαριστάται συνοπτικά η διαδικασία της απόπτωσης και στην *εικόνα 4* γίνεται σύγκριση μεταξύ ενός φυσιολογικού και ενός αποπτωτικού κυττάρου.



Εικόνα 3: Συνοπτική απεικόνιση του μονοπατιού της απόπτωσης (Loreto et al., 2014).



Εικόνα 4: Στην εικόνα αριστερά απεικονίζεται ένα φυσιολογικό κύτταρο, ενώ στα δεξιά φαίνεται ένα κύτταρο που υφίσταται απόπτωση (Sherwood, 2016).

4.2 Η απόπτωση στον καρκίνο

Όπως προαναφέρθηκε, η απόπτωση φυσιολογικά αποτελεί μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η οποία λαμβάνει χώρα όταν το κύτταρο έχει δεχθεί εκτεταμένες βλάβες. Όμως, υπερβολική ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης έχει συνδεθεί με εκφυλιστικές νόσους και η αναστολή της απόπτωσης έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση νεοπλασιών. Οι τρόποι που τα καρκινικά κύτταρα καταφέρνουν και διαφεύγουν της απόπτωσης ποικίλουν. Συχνά παρατηρείται υπερέκφραση των αντιαποπτωτικών bcl-2 πρωτεϊνών και μεταγραφική ή μετα-μεταγραφική αναστολή των προαποπτωτικών bcl-2 πρωτεϊνών. Επιπλέον, η αναστολή κάποιων μεταγραφικών παραγόντων, όπως της p53, συμβάλλει στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (Matsuura et al., 2016).

Αξίζει να σημειωθεί πως τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν διαφορετικό μεταβολικό πρότυπο σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Οι αλλαγές στον μεταβολισμό συνδράμουν στην αναστολή του μονοπατιού της απόπτωσης. Τα καρκινικά κύτταρα συνηθίζουν να μετατρέπουν τη γλυκόζη που λαμβάνουν, σε γαλακτικό οξύ μέσω αναερόβιας γλυκόλυσης. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε αρχικά από τον Warburg τη δεκαετία του 1920, για αυτό είναι γνωστό και ως φαινόμενο Warburg. Με αυτόν τον τρόπο, τα κύτταρα καταφέρνουν να ξεφύγουν της απόπτωσης και να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται (Matsuura et al., 2016; Stryer et al., 2015).

4.3 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία αποτελεί έναν μηχανισμό κυτταρικής επιβίωσης και επιλεκτικής αποικοδόμησης. Πιο αναλυτικά, στην αυτοφαγία, σε περιπτώσεις έλλειψης συστατικών, θα ανακυκλωθούν πρωτεΐνες και οργανίδια προκειμένου το κύτταρο να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες. Οι πρωτεΐνες και τα οργανίδια περικλείονται σε κυστίδια, τα οποία ονομάζονται αυτοφαγοςώματα, και συντήκονται με τα λυσοσώματα. Παρόλα αυτά, η αυτοφαγία συνιστά μια ακόμη μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όταν έχει ανασταλεί η διαδικασία της απόπτωσης. Στην αυτοφαγία δεν είναι απαραίτητη η δράση των κασπασών (Cooper and Hausman, 2009; Li et al., 2017).

Η αυτοφαγία ξεκινά από τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου με το σχηματισμό του ωμεγασώματος (omegasome). Στη συνέχεια σχηματίζεται το φαγοφόρο, για το οποίο είναι σημαντική η συμβολή όλων των κυτταρικών διαμερισμάτων (Li et al., 2017). Η ομάδα του *Li Yu* και των συνεργατών του (Yu et al., 2018), υποστηρίζει πως η αλληλεπίδραση μεταξύ φαγοφόρου και λοιπών οργανιδίων μπορεί να επιτυγχάνεται με παροδική διαμεμβρανική αλληλεπίδραση καθώς και με την ανταλλαγή πρωτεϊνών και λιπιδίων (Yu et al., 2018).

Όταν το φαγοφόρο τελικά κλείσει, σχηματίζεται το ώριμο αυτοφαγοςώμα που τελικά συνδέεται με τα λυσοσώματα για αποικοδόμηση του περιεχομένου του (Yu et al., 2018; Li et al., 2017).

Μία από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι της αυτοφαγίας είναι και η LC3. Η LC3 παίζει ρόλο στο σχηματισμό του αυτοφαγοςώματος. Σύμφωνα με πρόσφατη βιβλιογραφία, υπάρχουν διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης αυτής και η ενδοκυτταρική τοποθέτηση κάθε ισομορφής μπορεί να διαφέρει σε κάθε κυτταρική σειρά (Koukourakis et al., 2015).

4.4 Η αυτοφαγία στον καρκίνο

Παρόλο που η αυτοφαγία φυσιολογικά συμβάλλει στην ανακύκλωση κυτταρικών συστατικών για την επιβίωση του κυττάρου ή οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, στον καρκίνο διαδραματίζει διττό ρόλο συμβάλλοντας τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην καταστολή του. Για αυτό, σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι αμφίβολο αν μια αντικαρκινική ουσία θα πρέπει να είναι αναστολέας ή ενισχυτής του μονοπατιού της αυτοφαγίας. Σε πρώρες κακώσεις έχει δειχθεί πως ενισχυτές της αυτοφαγίας μπορούν να αναστείλουν την καρκινογένεση. Αντιθέτως, σε προχωρημένες μορφές καρκίνου, χρησιμοποιούνται τόσο ενισχυτές όσο και αναστολείς της αυτοφαγίας ως αντικαρκινική θεραπεία (Levy et al., 2017; Li et al., 2017).

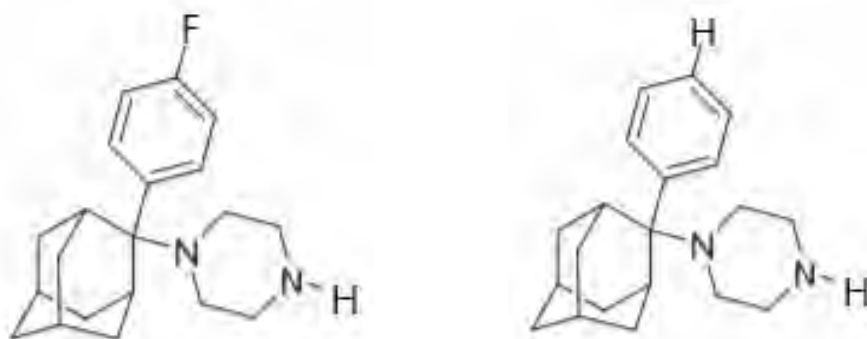
E. Ανάλογα της 1-(2-αρυλ-2-αδαμάντυλ)πιπεραζίνης

Οι ουσίες που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν στο τμήμα Φαρμακευτικής Χημείας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, σε συνεργασία με το ινστιτούτο Φαρμακευτικών επιστημών του King's College στο Λονδίνο. Αυτές οι ουσίες ανήκουν χημικά στις 1-(2-αρυλ-2-αδαμάντυλ)πιπεραζίνες.

Η πιπεραζίνη αποτελεί κατάλληλη χημική δομή για το σχεδιασμό και την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών. Διάφορες χημικές ενώσεις που έχουν παραχθεί με βάση την πιπεραζίνη έχουν αντιμυκητιακές, αντιϊκές, αντικαρκινικές και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες. Μπορούν επίσης να δράσουν ως ανταγωνιστές ή αγωνιστές των σεροτονεργικών υποδοχέων (Fytas et al., 2015).

Η δομή αδαμαντυλίου συναντάται συχνά σε χημικά ανάλογα με διάφορες φαρμακολογικές δράσεις, όπως αντιϊκές, αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές. Η παρουσία αυτής της δομής σε μία ουσία την καθιστά ιδιαίτερα λιπόφιλη. Η ομάδα του Fytas και των συνεργατών του πρόσφατα ανέλυσε την αντιπολλαπλασιαστική δράση ενός αναλόγου της αδαμαντίνης (Fytas et al., 2015). Η δράση του αναλόγου αυτού βασίζεται στην συγγένεια του για τους σίγμα υποδοχείς και για την ικανότητά του να προσδένεται στα κανάλια Na⁺. Με βάση αυτή την παρατήρηση συνέθεσαν την 1(2-αρυλ-2-αδαμαντυλ)πιπεραζίνη και ανάλογα αυτής, προκειμένου να μελετήσουν τις αντικαρκινικές της ιδιότητες στοχεύοντας

συγκεκριμένα στους σίγμα υποδοχείς. Διεξήγαγαν πειράματα που όντως αποδεικνύουν πως τα ανάλογα της 1(2-αρυλ-2-αδαμαντυλ)πιπεραζίνης μπορούν και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων καρκινικών κυττάρων, όπως τα MDA-MB231, Mia Paca2, NCI H1975 και HeLa. Τα ανάλογα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική αναφέρονται ως FP5 και P5 (Fytas et al., 2015) και ο χημικός τους τύπος απεικονίζεται στην *εικόνα 5*.



Εικόνα 5: Χημικές δομές των ουσιών FP5 και P5 που μελετήθηκαν. Στα αριστερά διακρίνεται η δομή της ουσίας FP5, ενώ στα δεξιά της ουσίας P5 (Fytas et al., 2015).

ΣΤ. Σκοπός

Το μελάνωμα αποτελεί μια συχνή μορφή καρκίνου τόσο στον παγκόσμιο όσο και στον ελληνικό πληθυσμό, γι' αυτό χρήζει ιδιαίτερης σημασίας η μελέτη του και η μελέτη ουσιών που θα βοηθήσουν στην καταπολέμηση του ("Μελάνωμα," n.d.). Οι σίγμα υποδοχείς έχει βρεθεί να παίζουν ιδιαίτερο ρόλο σε διάφορες μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του μελανώματος. Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη της δράσης των αναλόγων της 1-(2-αρυλ-2-αδαμάντυλ)πιπεραζίνης, FP5 και P5, ουσιών που στοχεύουν τους σίγμα υποδοχείς σε κύτταρα αμελανωτικού μελανώματος, MDA-MB435.

1. Υλικά και Μέθοδοι

1.1 Υλικά

Στον πίνακα 1 αναγράφονται οι εταιρείες και οι κωδικοί όλων των υλικών και προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την διπλωματική εργασία, ενώ στον πίνακα 2 αναλύεται η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 1: Στον πίνακα καταγράφονται όλα τα υλικά/προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η εταιρεία και ο κωδικός κάθε προϊόντος.

Υλικά/προϊόντ	Εταιρεία
Φλάσκες 25cm ²	Corning, 430372
Φλάσκες 75cm ²	Thermo Scientific, Nunc, 156499
RPMI 1640	Gibco, 31870-025
Fetal Bovine Serum-FBS	Biowest, 51810-500
1% L-glutamine 100X	Gibco, 25030-024
1% Penicillin-Streptomycin 100X	Gibco, 15140-122
θρυψίνης 10X	Gibco, 15090-046
Sulforhodamine B	Sigma, S9012-5G
Μικροπλακίδια 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα	Thermo Scientific, 167008
Μικροπλακίδια 6 θέσεων	Thermo Scientific, 140685
Κωνικό φιαλίδιο 15ml	Thermo Scientific, 339650
Κωνικό φιαλίδιο 50ml	Corning, 430291
Eppendorf των 1,5ml	Axygen MCT-150-L-C
Trypan Blue 0.5% w/v	Biochrom L6323
RIPA 10X	Cell Signaling, 98066
PI 100X	Cell Signaling, 58725
Glycine 100%	ROTH, 37831
B-Μερκαπτοαιθανόλη	Merck, 2966
Μπλε της Βρομοφαινόλης	SIGMA, B0126-25G

Tween 20	Fisher scientific, BP337-500
Tris Base	ChemCruz-Santa Cruz Biotechnology Inc, LOT: A0818
DMSO (Dimethylsulfoxide 99.8%)	PAN Biotech, P60-36720100
Trichloroacetic acid-TCA	Applichem, A1431,1000
ECL (enhanced chemiluminescence)	Biorad, 170-50G
Φίλτρο 0,45μm	BIOFIL, FPE-404-125
Bradford kit	Thermo Sciebtific, 23227
30% bis-acrylamide	Serva, 10687.01
Tris-Glycine Transfer Buffer 25X	Novex, #LC3675
kit M65 Epideath ELISA	Diapharma, # P10020
Μεμβράνη PVDF	Immobilon-PSQ Transfer Membrane Millipore, ISEQ85R
ProSieve QuadColor Protein Marker	Lonza, #00193837

Πίνακας 2: Στον πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση των διαφόρων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

Διαλύματα πειραμάτων	Σύσταση διαλυμάτων
PBS 10X	Το PBS 10X αποτελείται από 800ml ddH ₂ O συμπληρωμένα με 1) 80g of NaCl 2) 2.0g of KCl 3) 14.4g of Na ₂ HPO ₄ 4) 2.4g of KH ₂ PO ₄ Το pH του PBS 10X ρυθμίζεται στο 7,4 και το διάλυμα συμπληρώνεται με ddH ₂ O μέχρι το 1L.

	Στη συνέχεια γίνεται αποστείρωση του διαλύματος. Το PBS 1X προκύπτει από την αρραίωση PBS 10X με ddH ₂ O.
Lysis Buffer	<ol style="list-style-type: none"> 1) RIPA 1X, από stock 10X 2) PI 1X (Protease and Phosphatase inhibitors) από stock 100X 3) ddH₂O για την αρραίωση των παραπάνω
Διάλυμα φόρτωσης-Loading Buffer	<ol style="list-style-type: none"> 1) Glycine 100%, 400μl 2) SDS 20% 100μl 3) Tris Cl 0,5M pH 6,8 100μl 4) B-Μερκαπτοαιθανόλη 100μl 5) Μπλε της Βρομοφαινόλης, διάλυμα 0,2% 100μl
TTBS 1X 1L	<ol style="list-style-type: none"> 1) Tween 20 (Πολυσορβικό 20, απορρυπαντικό και γαλακτωματοποιητής) 1ml 2) TBS 1X 1L
TBS 1X 1L	<ol style="list-style-type: none"> 1) NaCl 0,9% w/v 950ml 2) Tris Cl 1M pH 7,4 50ml
Tris Cl 0,5M pH 6,8	<ol style="list-style-type: none"> 1) Tris Base 60,5gr 2) ddH₂O 800ml <p>Το pH προσαρμόζεται με τη προσθήκη HCl και το διάλυμα συμπληρώνεται αν απαιτείται με ddH₂O μέχρι το 1 L.</p>
Tris Cl 1M pH 7,4	<ol style="list-style-type: none"> 1) Tris Base 121gr και 2) ddH₂O 800ml <p>Το pH του διαλύματος προσαρμόζεται με την προσθήκη HCl και το διάλυμα συμπληρώνεται αν απαιτείται με ddH₂O μέχρι το 1L.</p>

Transfer Buffer 1X	Το transfer buffer 1X προκύπτει από την αραιώση του transfer buffer 25X σε 1L διαλύματος που θα περιέχει 20% μεθανόλη.
TCA 50%	Προκύπτει από την αραιώση διαλύματος TCA 100%, που προέκυψε από διάλυση σκόνης TCA σε ddH ₂ O.

1.2 Μέθοδοι

1.2.1 Τα κύτταρα MDA-MB 435

Η ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά μελανώματος που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αυτής της διπλωματικής εργασίας ονομάζεται MDA-MB 435 και η προμήθειά της έγινε από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των Η.Π.Α. [NCI: National Cancer Institute, (Bethesda, MD, USA)]. Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν αρχικά από μεταστατική υπεζωκοτική συλλογή ασθενούς με καρκίνο του μαστού. Για αυτό το λόγο, μέχρι πρότινος, αυτή η κυτταρική σειρά χαρακτηριζόταν ως καρκινική σειρά μαστού. Μετέπειτα αναλύσεις όμως απέδειξαν πως αποτελεί κυτταρική σειρά μελανώματος και πιο συγκεκριμένα κατηγοριοποιούνται ως αμελανωτικό μελάνωμα.

1.2.2 Τα κύτταρα SK-MEL-28

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου πραγματοποιήθηκαν πειράματα στην ανθρώπινη καρκινική σειρά επιφανειακά εξαπλώμενου μελανώματος, SK-MEL-28, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των ουσιών FP5 και P5 στην ανάπτυξη και στην επιβίωση των κυττάρων. Η προμήθεια των κυττάρων έγινε από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των Η.Π.Α. [NCI: National Cancer Institute, (Bethesda, MD, USA)]. Τα κύτταρα αρχικά απομονώθηκαν από έναν ασθενή 51 ετών (“Cellosaurus SK-MEL-28 (CVCL_0526),” n.d.).

1.2.3 Συνθήκες των κυτταροκαλλιιεργειών

Τα κύτταρα MDA-MB435 και SK-MEL-28 καλλιεργούνται σε συγκεκριμένες συνθήκες. Πιο αναλυτικά, απαιτείται η παρουσία 5% CO₂, 95% υγρασίας και θερμοκρασίας 36,6 °C. Αυτές οι συνθήκες επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικού κλιβάνου επώασης. Τα κύτταρα αυτά μεγαλώνουν προσκολλημένα μέσα σε ειδικά δοχεία καλλιέργειας κυττάρων (φλάσκες). Οι φλάσκες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν επιφάνεια 25cm² ή 75cm². Ο μέγιστος αριθμός κυττάρων που μπορεί να αναπτυχθεί σε κάθε δοχείο καλλιέργειας είναι περιορισμένος. Για την καλλιέργεια μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών διαμέτρου 150mm. Όλες οι διαδικασίες που αφορούν την καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούνται κάτω από στείρες συνθήκες εντός ειδικού θαλάμου κάθετης νηματικής ροής (laminar flow hood biosafety class II).

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για να παρέχει τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά για την καλλιέργεια των κυττάρων ήταν το RPMI 1640 και συμπληρωνόταν με 5% εμβρυικό ορό μοσχαριού (Fetal Bovine Serum, FBS), που παρέχει θρεπτικά στοιχεία στα κύτταρα για την ανάπτυξη τους, 1% L-glutamine, απαραίτητο αμινοξύ για την ανάπτυξη των κυττάρων και 1% Penicillin-Streptomycin για την αποφυγή επιμόλυνσης των κυτταροκαλλιιεργειών από βακτήρια.

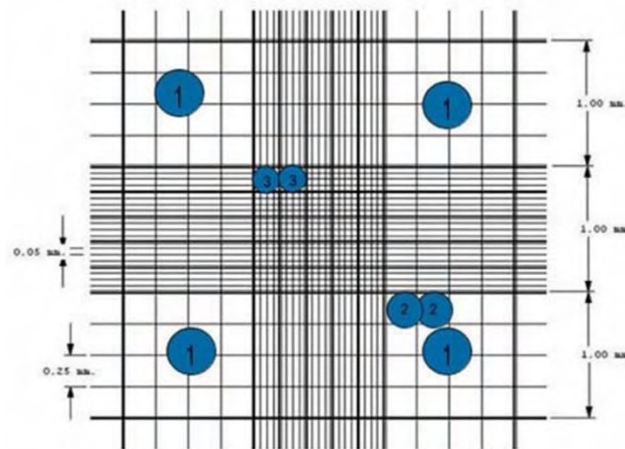
1.2.4 Ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Μόλις ο αριθμός των κυττάρων σε κάποιο δοχείο καλλιέργειας φθάσει το 80-90%, απαιτείται να γίνει ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση, αφού απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό, γίνονται πλύσεις των κυττάρων με PBS 1X, η σύσταση του οποίου αναλύεται στον πίνακα 1. Έπειτα, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ενός πρωτεολυτικού ενζύμου, της θρυψίνης, προκειμένου να διασπαστούν οι πρωτεΐνες που κρατούν προσκολλημένα τα κύτταρα στην επιφάνεια των δοχείων καλλιέργειας. Η ποσότητα της θρυψίνης που θα χρησιμοποιηθεί είναι συγκεκριμένη. Σε φλάσκες των 25cm² προστίθεται 1ml θρυψίνης 1X, ενώ σε φλάσκες των 75cm² και σε dish 150mm προστίθενται 2ml. Πραγματοποιείται επώαση με τη θρυψίνη διάρκειας από 2 έως 5 λεπτά σε θερμοκρασία 36,6°C. Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι να ανασηκωθούν όλα τα κύτταρα από την επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας. Για να το διαπιστώσουμε αυτό, παρατηρούμε τα κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο. Ακολούθως, γίνεται προσθήκη

θρεπτικού υλικού εντός του δοχείου καλλιέργειας των κυττάρων, καθώς ο ορός που περιέχει εξουδετερώνει τη δράση της θρυψίνης, η οποία έπειτα από κάποια χρονική περίοδο, μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Στο σημείο αυτό γίνεται καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου, διαδικασία που θα αναλυθεί στη συνέχεια. Γνωρίζοντας τον ολικό αριθμό των κυττάρων, μπορούμε να επιλέξουμε τον αριθμό των κυττάρων που θα ανακαλλιεργήσουμε.

1.2.5 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων

Προκειμένου να προσδιορίσουμε τον αριθμό των κυττάρων, όταν τα κύτταρα έχουν ανασηκωθεί από το δοχείο καλλιέργειας και έχουν μεταφερθεί σε κωνικά φιαλίδια, όπως αναλύθηκε προηγουμένως, μεταφέρεται ποσότητα 90μl του κυτταρικού εναιωρήματος σε Eppendorf των 1,5ml και προστίθενται 10μl χρωστικής Trypan Blue 0.5% w/v, μιας χρωστικής που βάφει μπλε μόνο τα νεκρά κύτταρα. Η δράση της χρωστικής βασίζεται στην ικανότητά της να εισέρχεται σε κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί ρήξη και να προσδίδει μπλε χρώμα στο κυτταρόπλασμα (Strober, 2015). Η μέτρηση γίνεται με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου ή αλλιώς πλάκας Neubauer. Στην εικόνα 6 αναπαριστάται η επιφάνεια της πλάκας Neubauer όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο.



Εικόνα 6: Τα κύτταρα μόλις επιστρωθούν στην πλάκα Neubauer καταλαμβάνουν όλη την επιφάνεια της. Τα κύτταρα που μετρούνται βρίσκονται στα τέσσερα τεταρτημόρια, που προσδιορίζονται με τον αριθμό 1 γύρω από τον κεντρικό σταυρό. Κάθε τεταρτημόριο αποτελείται από ένα εμβασμόν 16 μικρότερων τετραγώνων. Ένα τετράγωνο του τεταρτημορίου αναπαριστάται με τον αριθμό 2 (“Neubauer Haemocytometry,” n.d.).

Μόλις μετρηθούν τα κύτταρα με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου, χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος προκειμένου να βρεθεί ο αριθμός των κυττάρων/ml. Αυτός ο τύπος είναι ο εξής: $\frac{\chi}{4} \times 10^4 = \text{αριθμός κυττάρων στο } 1\text{ml}$

Όπου χ ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν στα τέσσερα τεταρτημόρια της πλάκας Neubauer (“Neubauer Haemocytometry,” n.d.). Το αποτέλεσμα που θα προκύψει πολλαπλασιάζεται στη συνέχεια με τον τελικό όγκο του διαλύματος που περιέχει τα κύτταρα. Αν για παράδειγμα ο τελικός όγκος είναι 7ml, τότε ο αριθμός των κυττάρων στο 1ml πολλαπλασιάζεται με το 7.

1.2.6 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο SRB

Η μέθοδος της Sulforhodamine B (SRB) χρησιμοποιείται για την *in vitro* εκτίμηση της αντιπολλαπλασιαστικής και κυτταροτοξικής δράσης ουσιών. Γι’ αυτό, επιλέχθηκε και στην παρούσα διπλωματική εργασία για τη μελέτη της δράσης των ουσιών FP5 και P5. Τα βήματα της μεθόδου αναλύονται στη συνέχεια (Orellana and Kasinski, 2016).

1^η Μέρα

Τη 1η μέρα του πειράματος γίνεται επίστρωση των κυττάρων σε μικροπλακίδια κυτταροκαλλιέργειών 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα. Τα βήματα που ακολουθούνται για να ανασηκωθούν τα κύτταρα από τη φλάσκα καλλιέργειας είναι τα ίδια με αυτά που περιγράφηκαν στην ενότητα ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Τα κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν για την πειραματική διαδικασία βρίσκονται στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξής τους και καταλαμβάνουν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας. Από τον αρχικό αριθμό κυττάρων που υπήρχαν στην καλλιέργεια, μεταφέρεται σε κωνικά φιαλίδια ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για το πείραμα. Στη συνέχεια, επιστρώνονται 4.000 κύτταρα/θέση σε θρεπτικό υλικό ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε θέση είναι 100μl πλήρους θρεπτικού υλικού καλλιέργειας. Αυτός ο αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε με βάση τον φυσιολογικό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων MDA-MB435 έτσι ώστε στο τέλος του πειράματος τα κύτταρα να βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους.

Οι ουσίες FP5 και P5 μελετήθηκαν στις συγκεντρώσεις των 20, 10, 5 και 2,5μM έκαστη. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις ανά πείραμα. Σημαντική

είναι και η χρήση κυττάρων μαρτύρων για να συγκριθεί η ανάπτυξη αυτών των κυττάρων με την ανάπτυξη των κυττάρων που θα επωαστούν με τις εξεταζόμενες ουσίες καθώς και τα κύτταρα Tzero. Τα Tzero επιστρώνονται σε ξεχωριστό μικροπλακίδιο από τα υπόλοιπα κύτταρα καθώς η ανάπτυξη τους τερματίζεται νωρίτερα από αυτή των υπόλοιπων καλλιιεργειών.

Τα κύτταρα τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση, σε θερμοκρασία 36,6°C και παρουσία 5% CO₂ για 24 ώρες.

2^η Μέρα

Μετά το πέρας των 24 ωρών οι οποίες είναι και ο χρόνος προσαρμογής των κυττάρων μετά την προσθήκη τους στα μικροπλακίδια, γίνεται η προσθήκη των προς μελέτη ουσιών. Την ίδια χρονική στιγμή τα κύτταρα Tzero μονιμοποιούνται και αποθηκεύονται μέχρι το τέλος του πειράματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την μονιμοποίηση τους χρησιμοποιώντας κρύο TCA 50% v/v (Trichloroacetic acid), η σύσταση του οποίου αναγράφεται στον *πίνακα 1*. Τα stock των ουσιών FP5 και P5 βρίσκονται σε αρχική συγκέντρωση 20mM σε θερμοκρασία δωματίου.

Σημαντικό βήμα αποτελεί η μονιμοποίηση των κυττάρων την ίδια χρονική στιγμή που γίνεται η προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών στα υπόλοιπα κύτταρα (Tzero). Τα κύτταρα Tzero αντιπροσωπεύουν την κατάσταση των κυττάρων (αριθμητικά και μορφολογικά) κατά την προσθήκη των ουσιών που μελετούνται. Έτσι, σε κάθε θέση του μικροπλακιδίου των κυττάρων Tzero αρχικά προστίθενται 100μl RPMI 1640 εμπλουτισμένου με 5% FBS (τελικός όγκος 200μl), προστίθενται 50μl TCA 50% v/v και τα κύτταρα τοποθετούνται στους 4°C για μία ώρα. Μετα το πέρας της επώασης, ακολουθούν εκπλύσεις του TCA με ddH₂O και τα κύτταρα αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις το μικροπλακίδιο είναι στεγνό αποθηκεύεται στους 4°C. Στα υπόλοιπα κύτταρα προστίθενται οι υπό μελέτη συγκεντρώσεις των ουσιών (100μl), ενώ στα κύτταρα μάρτυρες γίνεται προσθήκη 100μl RPMI. Έτσι σε κάθε θέση ο τελικός όγκος είναι 200μl.

Το μικροπλακίδιο με τα κύτταρα τοποθετείται ξανά στον κλίβανο για επώαση, σε θερμοκρασία 36,6°C και παρουσία 5% CO₂ για 48 ώρες.

Αξίζει να σημειωθεί πως όλες οι διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε στείρες συνθήκες με τη χρήση θαλάμου κάθετης νηματικής ροής.

Τερματισμός επώασης

Μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων με τις υπό εξέταση ουσίες, σταματά η ανάπτυξη των κυττάρων με την προσθήκη 50μl TCA 50% v/v σε κάθε θέση του μικροπλακιδίου. Το μικροπλακίδιο τοποθετείται στους 4°C για μία ώρα. Μετά το πέρας της μίας ώρας το μικροπλακίδιο ξεπλένεται με ddH₂O και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου στεγνώσει πλήρως. Μόλις το μικροπλακίδιο στεγνώσει, μπορεί να γίνει η προσθήκη 50μl διαλύματος Sulforhodamine B 0.4% (w/v) σε 1% οξικό οξύ σε όλα τα κύτταρα. Η Sulforhodamine B είναι μία χρωστική που προσδένεται στοιχειομετρικά υπό όξινες συνθήκες με άλλες πρωτεΐνες και μπορεί να απομακρυνθεί υπό βασικές συνθήκες (Orellana and Kasinski, 2016). Η επώαση με την Sulforhodamine B διαρκεί 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα η χρωστική απομακρύνεται με τη χρήση οξικού οξέος 1% και τα μικροπλακίδια στεγνώνουν σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις τα μικροπλακίδια έχουν στεγνώσει γίνεται προσθήκη 150μl Tris Base 10mM και τα μικροπλακίδια τοποθετούνται για 10 λεπτά στους 36,6°C. Το Tris Base 10mM βοηθά στην αποδέσμευση της χρωστικής SRB από τα κύτταρα και την διαλυτοποίηση της στο διάλυμα Tris Base. Μετά τα 10 λεπτά στους 36,6°C τα μικροπλακίδια αναδεύονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540nm σε φωτόμετρο BioTek microelisa (Biotek, EI-311). Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση, τόσο περισσότερη χρωστική έχει προσδεθεί με το Tris Base (Orellana and Kasinski, 2016).

Προκειμένου να βρεθεί το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης σε κάθε συγκέντρωση των FP5 και P5 χρησιμοποιείται ο εξής τύπος για τις απορροφήσεις:

$$\frac{(T_i - T_z)}{(T_c - T_z)} * 100$$

Όπου T_i η απορρόφηση κάθε συγκέντρωσης της κάθε ουσίας μετά από 48ωρη επώαση, T_z η απορρόφηση των κυττάρων Tzero και T_c η απορρόφηση των κυττάρων μαρτύρων μετά από 48ωρη επώαση, για απορροφήσεις όπου T_i ≥ T_z.

Όταν $T_i < T_z$, τότε ισχύει:

$$\frac{T_i - T_z}{T_z} * 100$$

Η τιμή που θα προκύψει από τις παραπάνω εξισώσεις υποδεικνύει την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων ή τον κυτταρικό θάνατο.

Από τις καμπύλες δόσης-απόκρισης υπολογίζονται και τρεις βασικές παράμετροι:

- 1) GI50 (Growth Inhibition 50): Αυτή η παράμετρος είναι η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων κατά 50%, $[(T_i - T_z)/(T_c - T_z)] * 100 = 50$.
- 2) TGI (Total Growth Inhibition): Αυτή η παράμετρος είναι η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί αναστολή στην ανάπτυξη όλων των κυττάρων, $T_i = T_z$.
- 3) LC50 (Lethal Concentration 50): Αυτή η παράμετρος είναι η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί κυτταρικό θάνατο στο 50% των κυττάρων, $[(T_i - T_z)/T_z] * 100 = -50$.

1.2.7 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue

1η Μέρα

Την πρώτη μέρα του πειράματος γίνεται αποκόλληση των κυττάρων MDA-MB435 από τις φλάσκες καλλιέργειας. Τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξής τους και να καταλαμβάνουν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, αρχικά απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Στη συνέχεια γίνονται πλύσεις των κυττάρων με PBS 1X, έτσι ώστε να απομακρυνθεί οποιαδήποτε περίσσεια FBS που μπορεί να αδρανοποιήσει τη θρυψίνη. Αφού ολοκληρωθούν οι πλύσεις, προστίθενται 2ml θρυψίνης 1X σε κάθε φλάσκα. Τα κύτταρα τοποθετούνται στους 36,6°C έως ότου αποκολληθούν από την επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας. Έπειτα, προστίθενται μέσα σε κάθε καλλιέργεια 5ml θρεπτικού υλικού για να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη 1X. Προκειμένου να προσδιορίσουμε τον αριθμό των κυττάρων που διαθέτουμε, μεταφέρουμε 90μl εναιωρήματος από το κωνικό φιαλίδιο με τα κύτταρα σε eppendorf των 1,5ml και προσθέτουμε 10μl της χρωστικής

Trypan Blue 0.5% (w/v). Η χρωστική αυτή, όπως σημειώθηκε παραπάνω, προσδίδει μπλε χρώμα μόνο στα νεκρά κύτταρα.

Για τη μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε πλάκα Neubauer.

Στον πίνακα 3 αναγράφονται οι συγκεντρώσεις της ουσίας FP5 και οι χρόνοι στους οποίους μελετήθηκαν.

Πίνακας 3: Στον πίνακα αναγράφονται οι συγκεντρώσεις της ουσίας FP5 που μελετήθηκαν καθώς και οι ώρες που μελετήθηκε κάθε συγκέντρωση.

Συγκεντρώσεις ουσίας FP5	Time Points
20μM	6, 12 και 24 ώρες
10μM	24 και 48 ώρες
5μM	24 και 48 ώρες

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Tzero, δηλαδή κύτταρα των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται τη χρονική στιγμή που γίνεται η προσθήκη των συγκεντρώσεων της υπό μελέτη ουσίας στα υπόλοιπα κύτταρα, καθώς και κύτταρα μάρτυρες (τα οποία αφήνονται ελεύθερα να αναπτυχθούν χωρίς προσθήκη κάποιας ουσίας) για λόγους σύγκρισης με τα κύτταρα που επωάζονται με την ουσία FP5.

Αφού προστέθηκε ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων σε κάθε φλάσκα (1×10^5 κύτταρα), τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο, στους $36,6^\circ\text{C}$ και παρουσία CO_2 5% για επώαση περίπου 24 ωρών.

2^η Μέρα

Την δεύτερη μέρα της διαδικασίας γίνεται η προσθήκη της ουσίας FP5 στα κύτταρα.

Το stock της ουσίας έχει συγκέντρωση 20mM και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Το θρεπτικό υλικό κάθε καλλιέργειας απορρίπτεται και γίνεται προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού που θα εμπεριέχει τις προς μελέτη συγκεντρώσεις της ουσίας FP5. Σε κάθε καλλιέργεια ο τελικός όγκος θα είναι 15ml. Το διάλυμα της ουσίας που παρασκευάστηκε αποστειρώθηκε μέσω διήθησης με φίλτρο αποστείρωσης με πόρους διαμέτρου 0,45μm, πριν την προσθήκη στις καλλιέργειες των κυττάρων.

Πριν την προσθήκη του θρεπτικού υλικού με την ουσία FP5, αναστέλλεται η ανάπτυξη των κυττάρων Tzero. Πιο αναλυτικά, συλλέγεται το θρεπτικό της καλλιέργειας σε κωνικό φιαλίδιο των 50ml και γίνονται πλύσεις με PBS 1X για να απομακρυνθεί οποιαδήποτε περίσσεια FBS. Μετά από κάθε πλύση συλλέγεται και το PBS 1X στο κωνικό φιαλίδιο των 50ml καθώς είναι απαραίτητη και η συλλογή των νεκρών κυττάρων που βρίσκονται στο υπερκείμενο. Έπειτα, προστίθενται 2ml θρυψίνης 1X έως ότου αποκολληθούν όλα τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας. Στη συνέχεια, προστίθεται θρεπτικό υλικό με σκοπό να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη και όλο το υπερκείμενο συλλέγεται στο κωνικό φιαλίδιο των 50ml. Ακολούθως πραγματοποιούνται πλύσεις με PBS 1X με σκοπό να συλλέξουμε κύτταρα που έχουν απομείνει στη φλάσκα καλλιέργειας. Το υπερκείμενο κάθε φορά συλλέγεται στο αρχικό κωνικό φιαλίδιο με τα υπόλοιπα κύτταρα. Παρατηρούμε τη φλάσκα στο μικροσκόπιο για να διαπιστώσουμε αν έχουν απομείνει κύτταρα στο εσωτερικό της φλάσκας. Σε περίπτωση που υπάρχουν ακόμα κύτταρα, πραγματοποιούμε ξανά πλύσεις με PBS 1X.

Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 1.200 στροφές για 7 λεπτά και συλλέγεται 0,5ml του υπερκειμένου σε Eppendorf των 1,5ml και τοποθετείται είτε στους -20°C είτε στους 4°C αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί άμεσα για τη μέθοδο M65 epideath ELISA, η οποία αναλύεται στη συνέχεια. Αφού συλλέξουμε αυτή την ποσότητα, γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων στο διάλυμα.

Επόμενο βήμα αποτελεί η καταμέτρηση τόσο των ζωντανών όσο και των νεκρών κυττάρων που έχουμε συλλέξει. Είναι σημαντικό να γίνει καταμέτρηση και των δύο πληθυσμών κυττάρων, έτσι ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό % της βιωσιμότητας των κυττάρων. Συλλέγουμε 90μl του διαλύματος σε Eppendorf 1,5ml και προσθέτουμε 10μl της χρωστικής Trypan Blue 0.5% (w/v). Με τη χρήση πλάκας Neubauer, προσδιορίζεται ο αριθμός τόσο των ζωντανών όσο και των νεκρών κυττάρων που έχουμε συλλέξει. Στόχος στη συνέχεια είναι να πραγματοποιηθεί ανοσοαποτύπωση κατά western blot. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 1.200rpm για 5 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται PBS 1X προκειμένου να γίνει πλύση των κυττάρων. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1.200rpm και έπειτα απορρίπτεται το υπερκείμενο. Συνολικά πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις. Μετά τις πλύσεις, το pellet των

κυττάρων αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά τα κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C . Αφού ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, γίνεται η προσθήκη των υπό μελέτη συγκεντρώσεων της ουσίας FP5 στις υπόλοιπες καλλιέργειες. Μόλις ολοκληρωθούν οι χρόνοι επώασης για κάθε συγκέντρωση, όπως συνοψίζονται στον πίνακα 2, καθώς και η επώαση των κυττάρων μαρτύρων, πραγματοποιείται η διαδικασία που περιγράφηκε για τα κύτταρα Tzero.

1.2.8 Ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση Western blot

Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης της ουσίας FP5, πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφόρηση και western blot.

Προκειμένου να ηλεκτροφορηθούν όλες οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, καθώς και τα κύτταρα μάρτυρες, αρχικά είναι σημαντική η λύση των κυττάρων για να απομονωθεί η ολική τους πρωτεΐνη και κατόπιν η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης, βάση της οποίας θα υπολογίσουμε την ποσότητα πρωτεΐνης που εμπεριέχεται σε κάθε δείγμα.

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση του διαλύματος λύσης (Lysis Buffer), η σύσταση του οποίου αναλύεται στον πίνακα 1. Η διαδικασία είναι σημαντικό να πραγματοποιείται σε πάγο έτσι ώστε να μη δράσουν πρωτεολυτικά ένζυμα και καταστρέψουν τις πρωτεΐνες. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 60μl διαλύματος λύσης ανά 1×10^6 ζωντανών κυττάρων και γίνεται vortex κάθε 5 λεπτά επί μισή ώρα. Μετά το vortex, τα δείγματα τοποθετούνται ξανά σε πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στα 13.000g για 20 λεπτά στους 4°C . Μόλις τελειώσει η φυγοκέντρηση, παρατηρείται το υπερκείμενο κάθε δείγματος. Αν το υπερκείμενο είναι θολό, τότε γίνεται μεταφορά του σε νέο Eppendorf και ξαναγίνεται φυγοκέντρηση. Το παλιό Eppendorf απορρίπτεται. Όταν το υπερκείμενο είναι διαυγές, τότε γίνεται μεταφορά του σε νέο Eppendorf και τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4°C εφόσον η περαιτέρω επεξεργασία τους θα πραγματοποιηθεί άμεσα.

Επόμενο βήμα αποτελεί η διαδικασία της Bradford για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Blue G-

250 στις πρωτεΐνες για τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε ένα δείγμα (Sapan et al., 1999).

Σε ένα μικροπλακίδιο 96 θέσεων, σε μία στήλη γίνεται η προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας κάθε δείγματος ανά θέση και αυτή συμπληρώνεται με PBS 1X, έτσι ώστε τελικά όλα τα δείγματα να βρίσκονται στον ίδιο τελικό όγκο. Σε μια δεύτερη στήλη γίνεται η προσθήκη συγκεκριμένων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης προτύπου, της αλβουμίνης. Έπειτα γίνεται προσθήκη 200μl/θέση διαλύματος το οποίο αποτελείται από τα αντιδραστήρια A και B, τα οποία ουσιαστικά εμπεριέχουν και τη χρωστική Coomassie Blue G-250 που θα προσδεθεί με τις πρωτεΐνες. Η αναλογία για τα αντιδραστήρια αυτά είναι A:B=50:1.

Στη συνέχεια το μικροπλακίδιο τοποθετείται για επώαση στους 37°C για μισή ώρα, ακολουθεί ανάδευση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα η μέτρηση της απορρόφησης κάθε δείγματος στα 540nm (Biotek, EI-311). Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται από τις απορροφήσεις των διαφόρων συγκεντρώσεων της αλβουμίνης. Με βάση την πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται η συγκέντρωση πρωτεΐνης που υπάρχει σε κάθε δείγμα. Η επιθυμητή ποσότητα πρωτεΐνης για την ηλεκτροφόρηση είναι τα 25μg για κάθε δείγμα. Έτσι, υπολογίζεται ο όγκος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί από κάθε δείγμα για να ηλεκτροφορηθούν 25μg πρωτεΐνης.

Απαραίτητο για την ηλεκτροφόρηση είναι το διαλυμα φόρτωσης (loading buffer, 4X), το οποίο αποδιατάσει τις πρωτεΐνες στην πρωτοταγή δομή τους μέσω της β-μερκαπτοαιθανόλης που περιέχει. Επιπλέον συμβάλλει στο καλύτερο τρέξιμο των πρωτεϊνών στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και στο να παρατηρούμε το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης, δηλαδή σε ποιο σημείο βρίσκονται τα δείγματα ενώ γίνεται η ηλεκτροφόρηση. Η σύσταση του διαλύματος φόρτωσης 4X αναγράφεται στον *πίνακα 1*.

Μόλις γίνει η προσθήκη της επιθυμητής ποσότητας διαλύματος φόρτωσης 4X, τα δείγματα τοποθετούνται στους 95°C για 5 λεπτά ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες. Όταν περάσει αυτός ο χρόνος, τα δείγματα μεταφέρονται αμέσως σε πάγο έτσι ώστε να γίνει η υγροποίηση των υδρατμών. Τα δείγματα έπειτα φυγοκεντρώνονται για λίγα δευτερόλεπτα στη μικροφυγόκεντρο (spin centrifuge) και είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση.

Ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που επιθυμούμε να μελετήσουμε, επιλέγουμε την πυκνότητα του πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Για την παρούσα διπλωματική εργασία παρασκευάστηκε πήκτωμα διαχωρισμού (resolving) πυκνότητας 12% ακρυλαμίδης 30%. Η φάση stacking, δηλαδή η φάση του πηκτώματος όπου γίνεται η επιστοίβαξη των πρωτεϊνών προκειμένου να αρχίσουν να διαχωρίζονται ταυτόχρονα στην φάση διαχωρισμού (resolving), αποτελείται από 5% ακρυλαμίδα.

Όταν το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι έτοιμο, μπορούν να φορτωθούν τα δείγματα. Για κάθε ηλεκτροφόρηση είναι απαραίτητη η χρήση και ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή είναι ο ProSieve QuadColor Protein Marker της Lonza (πίνακας 2).

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκινά στα 100V, έως ότου το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης περάσει στη φάση resolving, όπου η τάση αυξάνεται στα 200V. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διαρκεί περίπου 40 λεπτά.

Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μεταφέρεται προσεκτικά σε ειδική κασέτα transfer, έτσι ώστε να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πύκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF (διφθοριούχου πολυβινυλιδίνης). Η μεμβράνη προτού χρησιμοποιηθεί, πρέπει να ενεργοποιηθεί. Η ενεργοποίηση απαιτεί την επώαση της μεμβράνης για 15sec σε μεθανόλη 100%, έπειτα επώαση σε ddH₂O για 5 λεπτά υπό ανάδευση και τέλος επώαση με διάλυμα Transfer buffer 1X για 5 λεπτά υπό ανάδευση. Μόλις ετοιμαστεί η κασέτα του transfer, μπορεί να ξεκινήσει η διαδικασία του transfer. Η συσκευή παροχέτευσης ρεύματος ρυθμίζεται στα 200V και όταν ξεκινήσει η διαδικασία του transfer σημειώνονται τα αντίστοιχα mAmp. Μόλις τα mAmp αυξηθούν κατά 100, γεγονός που απαιτεί περίπου μία ώρα, τότε ολοκληρώνεται η διαδικασία του transfer.

Μετά την ολοκλήρωση του transfer, η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική Ponceau S ώστε να διαπιστώσουμε αν έγινε επιτυχώς η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη. Επιπλέον, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου βάφεται με Coomassie blue ώστε να επιβεβαιώσουμε αν πραγματοποιήθηκε η μεταφορά πρωτεϊνών στη μεμβράνη.

Ακολουθεί το block της μεμβράνης. Το block αποτελείται από διάλυμα TTBS 1X, συμπληρωμένο με 5% FBS ή 5% NFDM (Non-Fat Dry Milk), ανάλογα με τις οδηγίες που δίνονται για κάθε αντίσωμα. Με τη διαδικασία αυτή μπλοκάρονται οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος, δηλαδή με το block βοηθάμε στην πιο ειδική πρόσδεση του πρωτογενούς αντισώματος. Το block πραγματοποιείται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση.

Μετά το block προστίθενται τα πρωτογενή αντισώματα. Όλα τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαλυμένα σε TTBS 1X με 5% FBS. Οι αραιώσεις των πρωτογενών αντισωμάτων αναγράφονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Στον πίνακα αναγράφονται οι αραιώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία western blot.

Αντίσωμα	Αραίωση αντισώματος
B-ακτίνη (santa cruz, sc-8432)	1μl αντισώματος:3.000μl TTBS 1X, 5% FBS
Κασπάση 3 (cell signaling, #14220)	1μl αντισώματος:1.000 μl TTBS 1X, 5% FBS
LC3 a/b (cell signaling, #12741)	1μl αντισώματος:1.000 μl TTBS 1X, 5% FBS

Η επώαση κάθε μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα διαρκεί overnight, υπό ήπια ανάδευση, στους 4°C.

Μετά την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις με TTBS 1X. Κάθε πλύση γίνεται με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και διαρκεί 5 λεπτά.

Έπειτα γίνεται η προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος, είτε anti-mouse, είτε anti-rabbit (cell signaling #7074S), ανάλογα με τη φύση του πρωτογενούς αντισώματος. Η αραιωση όλων των δευτερογενών αντισωμάτων είναι 1μl αντισώματος : 8.000 μl TTBS 1X, 5% FBS, εκτός από το δευτερογενές αντίσωμα για την ακτίνη όπου η αραιωση είναι 1μl αντισώματος: 10.000 μl TTBS 1X, 5% FBS.

Η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα διαρκεί μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση.

Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με TTBS 1X υπό ανάδευση.

Μετά τις πλύσεις γίνεται η απεικόνιση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του μηχανήματος Imager-UVITEC CAMBRIDGE και τη διαδικασία της χημειοφωταύγειας με τη χρήση υποστρώματος ενίσχυσης χημειοφωταύγειας ECL (enhanced chemiluminescence).

Το ECL αφήνεται για επώαση πάνω σε κάθε μεμβράνη για 5 λεπτά, στο σκοτάδι. Έπειτα η μεμβράνη τοποθετείται στην ειδική θέση του μηχανήματος για απεικόνιση με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού Alliance Software (Version 16.06).

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την πυκνομετρία χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα ImageJ και Photoshop.

1.2.9 Μέθοδος κλωνογένεσης (Clonogenic assay)

Με τη μέθοδο clonogenic αποσκοπούμε να μελετήσουμε τη συγκέντρωση μιας ουσίας που αναστέλλει τον σχηματισμό αποικιών-colonies μιας καρκινικής κυτταρικής σειράς. Τα κύτταρα τα οποία σχηματίζουν κλώνους αποτελούν και τα πιο επιθετικά του κυτταρικού πληθυσμού και κατ'επέκταση αυτά που είναι πιο πιθανό να οδηγήσουν στην δημιουργία όγκων in vivo (Pandelidou et al., 2011). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η δράση της ουσίας FP5 στο σχηματισμό αποικιών των κυττάρων MDA-MB435 στις συγκεντρώσεις 5, 2,5 και 1μM. Οι συγκεντρώσεις βασίστηκαν στα πειράματα SRB και trypan blue για την ουσία FP5.

1η Μέρα

Την πρώτη μέρα, απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και πραγματοποιούνται πλύσεις στα κύτταρα με PBS 1X. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρυψίνης 1X, έτσι ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από το δοχείο καλλιέργειας. Μόλις έχουν αποκολληθεί όλα τα κύτταρα, γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού RPMI για να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη 1X και το θρεπτικό μαζί με τα κύτταρα μεταφέρονται σε κωνικό φιαλίδιο των 15ml. Από εκεί, μεταφέρεται ποσότητα 90μl σε Eppendorf των 1,5ml και προστίθενται 10μl της χρωστικής Trypan Blue. Τα κύτταρα μετρούνται στο μικροσκόπιο με τη βοήθεια πλάκας Neubauer και ο αριθμός τους

στο κωνικό φιαλίδιο υπολογίζεται με τον ίδιο τρόπο που αναλύθηκε προηγουμένως. Για τη μέθοδο κλωνογένεσης, επιστρώθηκαν 400 κύτταρα/θέση σε μικροπλακίδιο 6 θέσεων. Σε κάθε θέση προστέθηκε 1ml εναιωρήματος. Κάθε συγκέντρωση μελετήθηκε σε δύο επαναλήψεις ανά πείραμα. Επιπλέον, προστέθηκαν κύτταρα μάρτυρες σε δύο θέσεις ανά πείραμα. Από το κωνικό φιαλίδιο που περιέχει τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων, μοιράζουμε σε κάθε θέση 1ml, αφού πραγματοποιηθεί καλή ανάδευση των κυττάρων. Μόλις ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία, τα κύτταρα τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο, στους 36,6°C, παρουσία 5% CO₂ και 95% υγρασίας για επώαση. Όλες οι διεργασίες διεξάγονται σε στείρες συνθήκες, εντός θαλάμου κάθετης νηματικής ροής (Pandelidou et al., 2011).

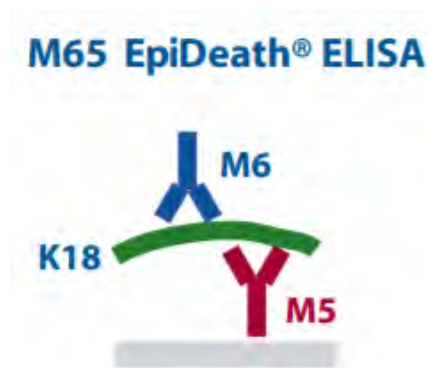
2η Μέρα

Την επόμενη μέρα της επίστρωσης, μετά από 24 ώρες επώασης των κυττάρων προκειμένου αυτά να επανέλθουν στη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους, γίνεται προσθήκη των συγκεντρώσεων της υπό μελέτης ουσίας στα κύτταρα. Στην προκειμένη περίπτωση μελετήθηκε η ουσία FP5 στις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Σε κάθε θέση γίνεται η προσθήκη 1ml κάθε συγκέντρωσης, ενώ στα κύτταρα μάρτυρες προστίθεται 1ml θρεπτικού υλικού. Μετά το τέλος αυτής της διαδικασίας τα κύτταρα τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση. Το πείραμα διαρκεί 15 μέρες και το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται μία φορά κάθε 7 μέρες. Στις θέσεις όπου γίνεται προσθήκη των συγκεντρώσεων της ουσίας FP5, στην ανανέωση αφού απομακρυνθεί προσεκτικά το παλιό υπερκείμενο, γίνεται προσθήκη 2ml της κάθε συγκέντρωσης σε κάθε θέση. Μετά το πέρας των 15 ημερών, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με την προσθήκη 0,5ml TCA 50% v/v σε κάθε θέση και τα κύτταρα τοποθετούνται για μία ώρα στους 4°C. Μετά την μία ώρα μονιμοποίησης, τα μικροπλακίδια ξεπλένονται με ddH₂O και αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού στεγνώσουν, γίνεται προσθήκη 1ml της χρωστικής SRB σε κάθε θέση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα μικροπλακίδια ξεπλένονται με οξικό οξύ 1% και αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις τα μικροπλακίδια στεγνώσουν, ακολουθεί η φωτογράφιση των αποικιών που έχουν δημιουργηθεί και τέλος, γίνεται προσθήκη 1ml/θέση Tris Base 10mM, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί φωτομέτρηση στα 540nm, όπως και στη μέθοδο SRB. Για τη φωτομέτρηση, μεταφέρθηκαν

300μl από κάθε θέση σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων, με επίπεδο πυθμένα (Pandelidou et al., 2011).

1.2.10 M65 EpiDeath ELISA

Το kit M65 EpiDeath ELISA της Diapharma χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της CK18-κυτοκερατίνης 18 (K18) στο υπερκείμενο καλλιέργειας των πειραμάτων μελέτης της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue. Τα επίπεδα της CK18 αντανακλούν τα επίπεδα επιθηλιακού κυτταρικού θανάτου λόγω της απόπτωσης ή της νέκρωσης που υφίστανται τα κύτταρα. Έπειτα από κυτταρικό θάνατο η κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων επέρχεται ρήξεις με αποτέλεσμα την έκκριση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, όπως η κυτοκερατίνη 18 στο εξωκυττάριο υγρό (“M65 EpiDeath ELISA - Diapharma,” n.d.). Η τεχνική βασίζεται στη μεθοδολογία της sandwich Elisa, όπου το μονοκλωνικό αντίσωμα M5, το οποίο βρίσκεται προσκολλημένο σε κάθε θέση του ειδικού μικροπλακιδίου που εμπεριέχεται στο kit, αναγνωρίζει και προσδένεται με την πρωτεΐνη K18. Στη συνέχεια, ένα δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα, το M6, προσδεδεμένο με HRP (Horseradish peroxidase) αναγνωρίζει και προσδένεται σε διαφορετικό επίτοπο της K18, όπως αναπαριστάται και στην εικόνα 7.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας του kit M65 EpiDeath ELISA (“M65 EpiDeath ELISA - Diapharma,” n.d.).

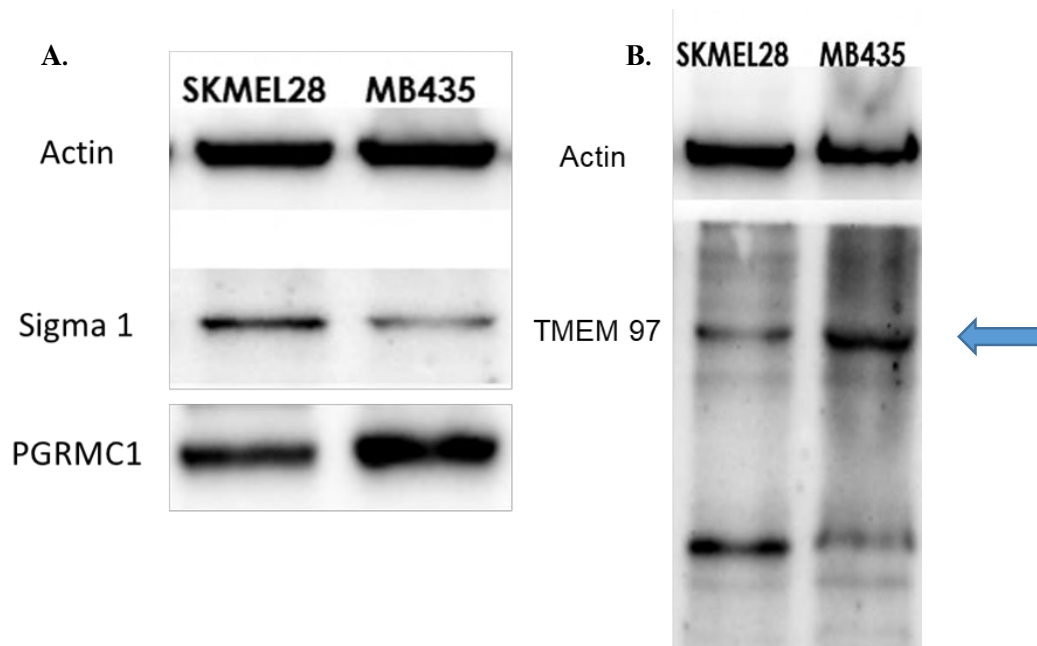
Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μελέτης της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue, συλλέχθηκε δείγμα από το υπερκείμενο κάθε καλλιέργειας ελεύθερο κυττάρων.

Στη συνέχεια, σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων κατάλληλο για ELISA προστέθηκαν 25μl ανά θέση από κάθε δείγμα που συλλέχθηκε. Σε αυτά προστέθηκαν 75μl του M65 EpiDeath Conjugate solution που εμπεριείχε το δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα M6. Το μικροπλακίδιο έπειτα σφραγίστηκε και τέθηκε υπό ανάδευση για 4 ώρες. Μετά την τετράωρη ανάδευση, πραγματοποιήθηκαν πέντε πλύσεις με ειδικό διάλυμα που εμπεριέχεται στο kit. Σε επόμενο βήμα γίνεται η προσθήκη 200μl/θέση διαλύματος που εμπεριέχει το TMB (3,3',5,5-Tetramethylbenzidine), υπόστρωμα της υπεροξειδάσης που είναι συνδεδεμένη με το αντίσωμα M6. Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για περίπου 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου με αποτέλεσμα τη μετατροπή του άχρωμου διαλύματος σε έγχρωμο. Τέλος, προστίθενται 50μl διαλύματος τερματισμού της ενζυμικής αντίδρασης (H₂SO₄) σε κάθε θέση για να εξασφαλιστεί η μίξη με το TMB και το μικροπλακίδιο αναδεύεται για 5-10 δευτερόλεπτα. Τέλος, το μικροπλακίδιο αφήνεται να ηρεμήσει για 5 λεπτά πριν τη μέτρηση της απορρόφησης, που πραγματοποιείται σε λ=450nm (Biotek, El 311).

Με βάση την αναφορά του προμηθευτή η ευαισθησία της μεθόδου είναι τα 25 Units/L, που ορίζεται ως η συγκέντρωση της K18 που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που απέχει δύο Standard deviations από την απορρόφηση του προτύπου A (0 Units/L), που χρησιμοποιείται μαζί με άλλα 6 πρότυπα διαλύματα του kit για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης.

2. Αποτελέσματα

Οι σίγμα υποδοχείς έχει αναφερθεί πως εκφράζονται σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων και κυτταρικών σειρών μελανώματος (Sereti, 2019). Για να επιβεβαιώσουμε προηγούμενες μελέτες προχωρήσαμε εκ νέου στην μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων σίγμα σε κύτταρα μελανώματος. Σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριο (KalaitSIDOU, 2019) επιβεβαιώθηκε η παρουσία των σίγμα υποδοχέων σ1, PGRMC1 και TMEM97 σε κυτταρικές σειρές μελανώματος όπως φαίνεται και στην εικόνα 8. Με το βέλος σημειώνεται η πρωτεϊνική ζώνη που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος που προτείνει η εταιρεία που προμήθευσε το αντίσωμα του TMEM97, όμως είναι προφανές πως προέκυψαν και κάποια αποτελέσματα σε μικρότερα μοριακά βάρη (KalaitSIDOU, 2019). Από τα αποτελέσματα της εικόνας 8 προκύπτει πως υπάρχει μια διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων στις δύο κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 8: **A.** Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται η έκφραση του υποδοχέα σίγμα 1 και του PGRMC1 μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών μελανώματος SK-MEL-28 και MDA-MB435. **B.** Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται η έκφραση της πρωτεΐνης TMEM97 στα κύτταρα SK-MEL-28 και MDA-MB435.

2.1 Μελέτης της κυτταροτοξικής και αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των ουσιών FP5 και P5

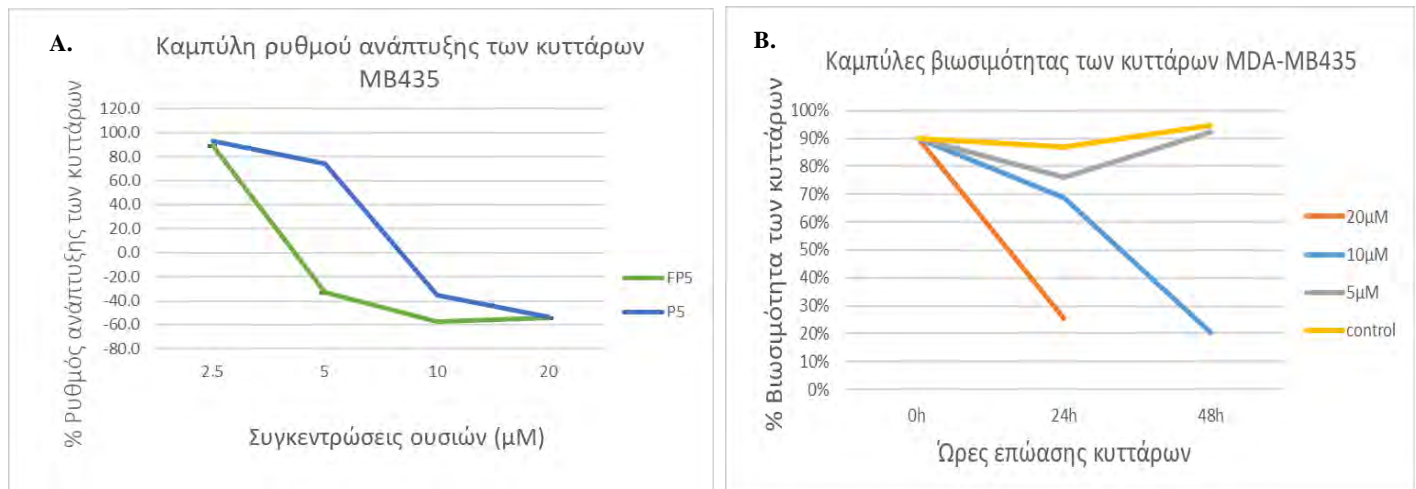
Τα πειράματα κυτταροτοξικότητας με τη χρήση της μεθόδου SRB, οδήγησαν στα παρακάτω αποτελέσματα της εικόνας 9A και του πίνακα 5. Από την εικόνα 9A προκύπτει πως η επίδραση της ουσίας FP5 στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων MDA-MB435 που επώαστηκαν με αυτήν είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την επίδραση της ουσίας P5 στο ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Η συγκέντρωση των 5μM της ουσίας FP5 φαίνεται να προκαλεί κυτταρικό θάνατο, σε σύγκριση με την συγκέντρωση 5μM της ουσίας P5 η οποία φαίνεται να επηρεάζει μόνο το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, χωρίς να προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Από την γραφική παράσταση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων MDA-MB435 προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις κάθε ουσίας που προκαλούν αναστολή κατά 50% (GI50) και 100% (TGI) στα κύτταρα, καθώς και κυτταρικό θάνατο στο 50% αυτών (LC50) (πίνακας 5). Από αυτά τα αποτελέσματα προκύπτει πως στις πειραματικές συνθήκες που έλαβε χώρα η μελέτη, η ουσία FP5 έχει μεγαλύτερη αντιπολλαπλασιαστική, κυτταροστατική και κυτταροτοξική δράση από την ουσία P5 σε ανθρώπινα, καρκινικά κύτταρα αμελανωτικού μελανώματος MDA-MB435. Έτσι όπως φαίνεται και στον πίνακα 5, η συγκέντρωση της ουσίας FP5 που απαιτείται για να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά 50% είναι τα 3,3μM, ενώ για την ουσία P5 τα 6,1μM. Για την πλήρη αναστολή της αύξησης των κυττάρων (κυτταροστατική δράση, TGI) απαιτούνται 4,3μM της ουσίας FP5 και 8,4μM της ουσίας P5 ενώ τέλος για να επέλθει κυτταρικός θάνατος στο 50% του κυτταρικού πληθυσμού (κυτταροτοξική δράση, LC50) , απαιτούνται 8,5μM της ουσίας FP5 έναντι 18μM για την ουσία P5.

Πίνακας 5: Από τις καμπύλες του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων υπολογίστηκαν οι τιμές των GI50, TGI, και LC50 για τις ουσίες FP5 και P5 μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων MDA-MB435 με συγκεντρώσεις 2,5, 5, 10 και 20μM για κάθε ουσία.

	FP5	P5
GI50	3,3μM	6,1μM
TGI	4,3μM	8,4μM
LC50	8,5μM	18μM

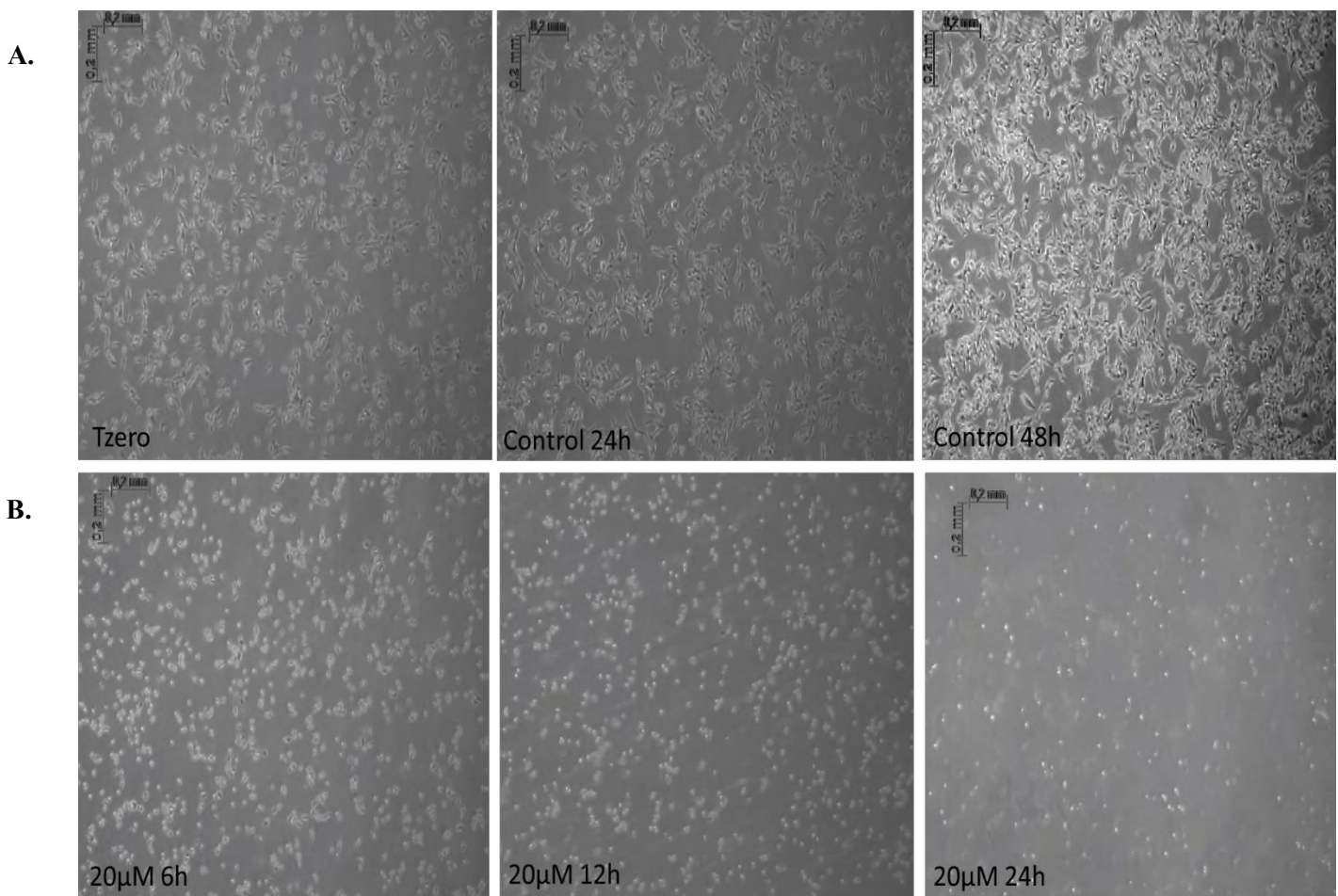
2.2 Αποτελέσματα της επίδρασης της ουσίας FP5 στη βιωσιμότητα των κυττάρων με τη χρήση του Trypan Blue

Με τη μέθοδο SRB προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις της ουσίας FP5 που προκαλούν αναστολή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά 50% και 100%, καθώς και κυτταρικό θάνατο στο 50% του κυτταρικού πληθυσμού. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της χρωστικής Trypan Blue προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της ουσίας και με βάση το χρόνο επώασης των κυττάρων με αυτή. Από αυτά τα πειράματα προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις εικόνες 9B ως 11. Στην εικόνα 9B το διάγραμμα παριστάνει το % ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων που επώαστηκαν με 5μM της ουσίας FP5 για 24 και 48 ώρες, με 10μM για 24 και 48 ώρες καθώς και 20μM για 6,12 και 24 ώρες. Από τα πειράματα αυτά και όπως φαίνεται και στο αντίστοιχο διάγραμμα (εικόνα 9B) προκύπτει πως η επίδραση της ουσίας FP5 στη βιωσιμότητα των κυττάρων εξαρτάται όχι μόνο από τη συγκέντρωση της ουσίας αλλά και από το χρόνο επώασης των κυττάρων με αυτήν. Οι συγκεντρώσεις των 10 και 20μM με την πάροδο του χρόνου προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο σε μεγαλύτερο αριθμό των κυττάρων. Η συγκέντρωση των 5μM φαίνεται να επιδρά στη βιωσιμότητα των κυττάρων στις 24 ώρες επώασης, αλλά τελικά στις 48 ώρες τα κύτταρα επανέρχονται στο 100% της βιωσιμότητάς τους.

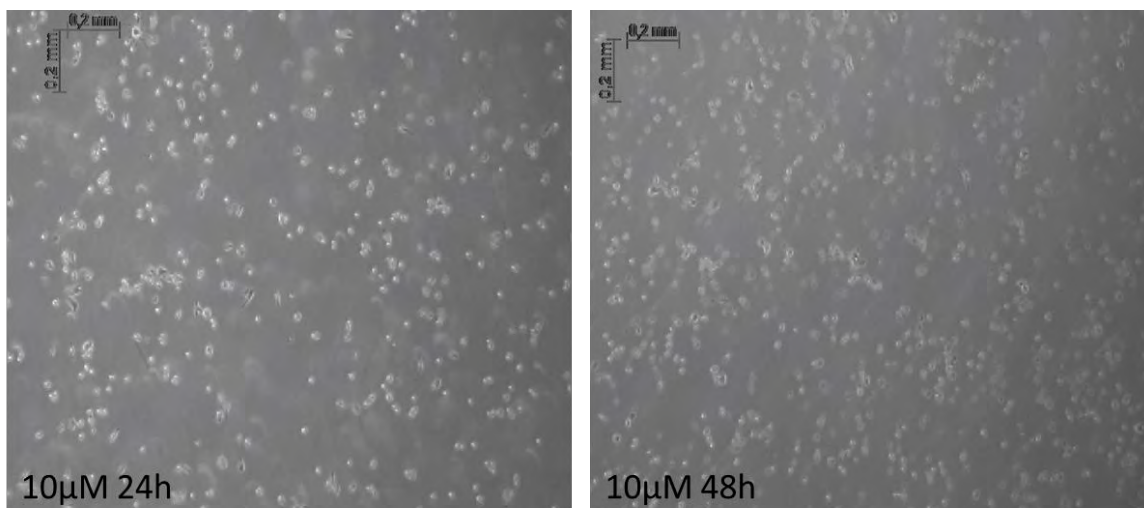


Εικόνα 9: **A.** Στην εικόνα αυτή φαίνεται η επίδραση κάθε συγκέντρωσης των ουσιών FP5 και P5 στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων MDA-MB435 με τη χρήση της Sulforhodamine B μετά από 48 ώρες επώασης. **B.** Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η επίδραση των επιλεγμένων συγκεντρώσεων της ουσίας FP5 στη βιωσιμότητα των κυττάρων MDA-MB435 με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue μετά από διαφορετικούς χρόνους επώασης.

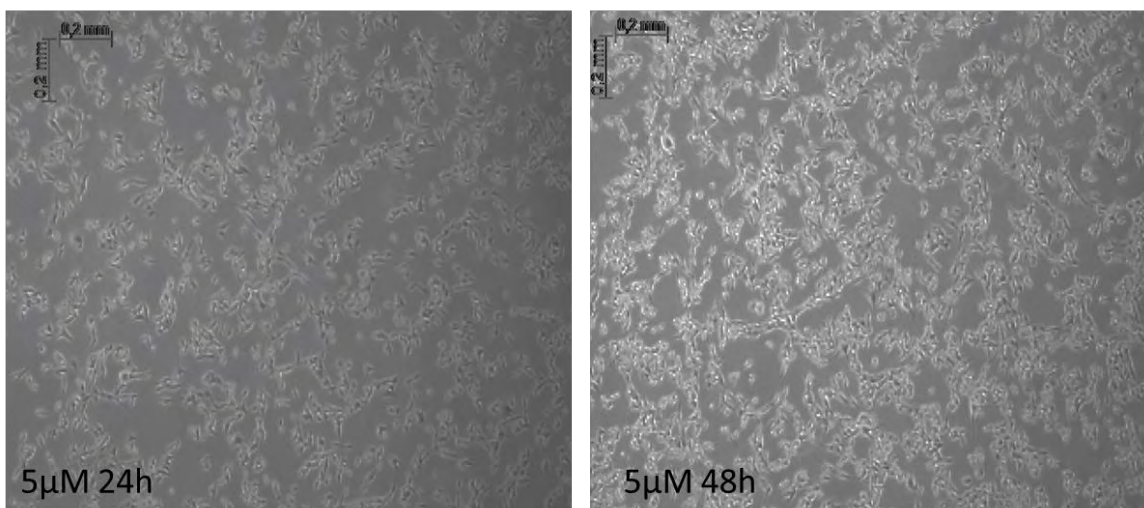
Για κάθε συγκέντρωση της ουσίας FP5 που μελετήθηκε, με τη χρήση κάμερας AxionCam ERc5s που προσαρμόστηκε σε οπτικό μικροσκόπιο, ελήφθησαν φωτογραφίες των κυττάρων με σκοπό την οπτική αξιολόγηση της κυτταρικής ανάπτυξης. Οι φωτογραφίες παρατίθενται στην *εικόνα 10*. Σύμφωνα με τις φωτογραφίες στην *εικόνα 10*, η συγκέντρωση των 20μM της ουσίας FP5 φαίνεται να οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο έναν μεγάλο αριθμό των κυττάρων, από τις 6 πρώτες ώρες επώασης της ουσίας με αυτά. Η συγκέντρωση των 10μM φαίνεται να είναι και αυτή αρκετά δραστική από τις 24 ώρες επώασης με τα κύτταρα. Αντιθέτως, η ανάπτυξη των κυττάρων, όταν αυτά επωαστούν με τη συγκέντρωση των 5μM, προσομοιάζει την ανάπτυξη των κυττάρων μαρτύρων.



Γ.

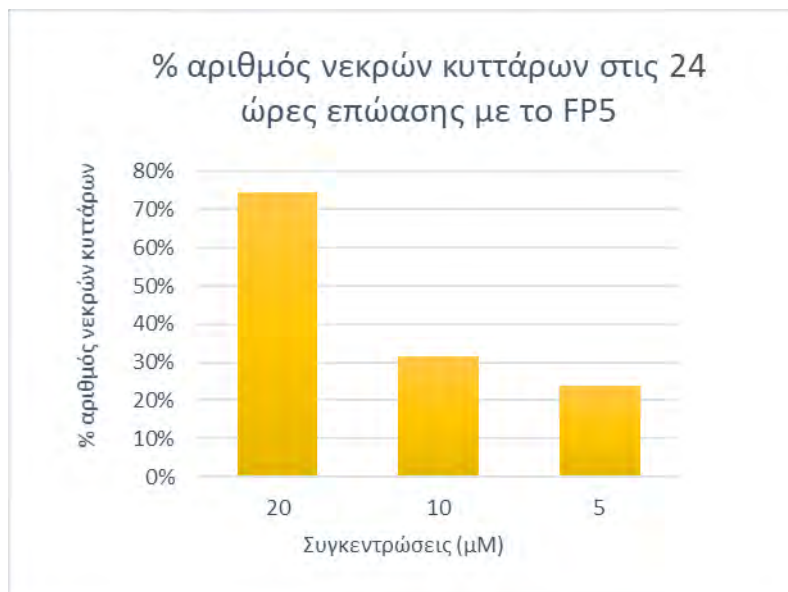


Δ.



Εικόνα 10: **A.** Στις φωτογραφίες αυτές φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων Tzero και των κυττάρων μαρτύρων. **B.** Σε αυτές τις φωτογραφίες φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων που έχουν επωαστεί με 20μM της ουσίας FP5 για 6, 12 και 24 ώρες. **Γ.** Απεικονίζονται τα κύτταρα που έχουν επωαστεί με 10μM της ουσίας FP5 για 24 και 48 ώρες και στο **Δ.** φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων μετά από 24 και 48 ώρες επώασης με 5μM της ουσίας FP5.

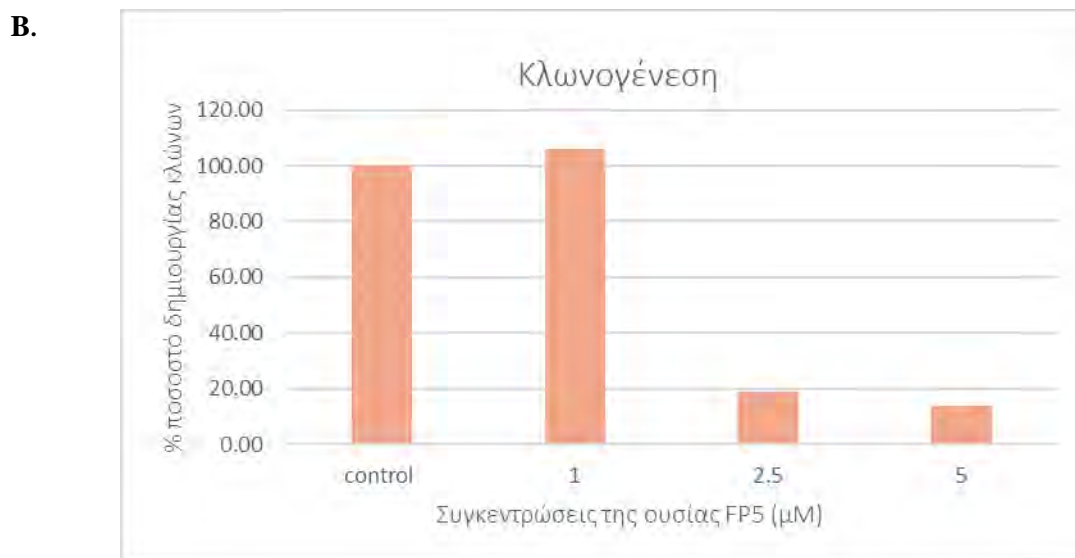
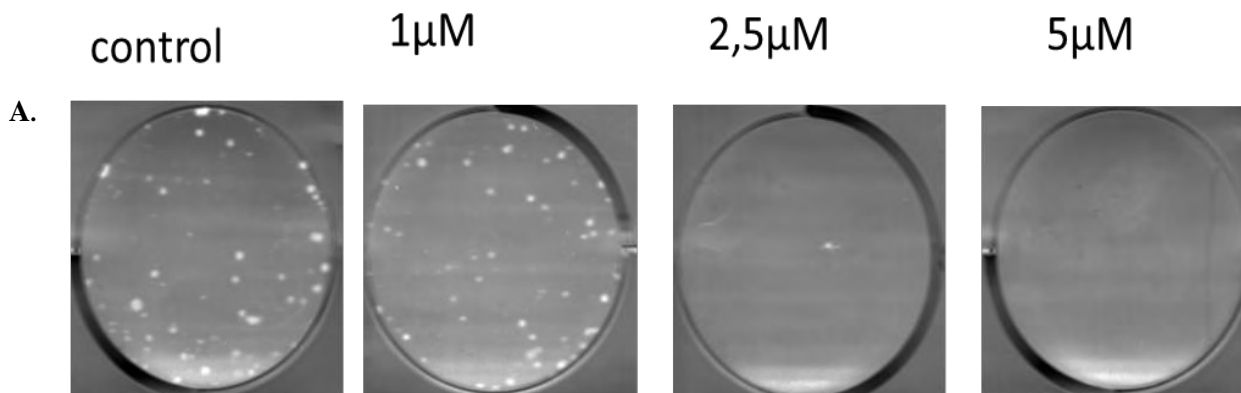
Στην *εικόνα 11* απεικονίζεται το % ποσοστό των νεκρών κυτάρων στο συνολικό κυτταρικό πληθυσμό μετά από 24 ώρες επώασης τους με τις συγκεντρώσεις 5, 10 και 20μM της ουσίας FP5.



Εικόνα 11: Στην εικόνα απεικονίζεται το % ποσοστό των νεκρών κυττάρων MDA-MB435 όταν επωαστούν για 24 ώρες με συγκεντρώσεις 5, 10 και 20μΜ της ουσίας FP5.

2.3 Μελέτη της επίδρασης της ουσίας FP5 στη δημιουργία κλώνων των κυττάρων MDA-MB435

Από τη μέθοδο της κλωνογένεσης όπου έγινε η επώαση των κυττάρων MDA-MB435 με τις συγκεντρώσεις της ουσίας FP5 που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κλώνων στη συγκέντρωση 1μΜ της ουσίας FP5, σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις 5μΜ και 2,5μΜ όπου δε παρατηρείται ο σχηματισμός κάποιας αποικίας κυττάρων. Τα αποτελέσματα της μεθόδου φαίνονται στην *εικόνα 12A*. Επιπλέον, στην *εικόνα 12B*, παρουσιάζονται τα ποσοτικά αποτελέσματα της μεθόδου ως ποσοστό επί των κλώνων που δημιουργήθηκαν από τα κύτταρα μάρτυρες (δλδ τα κύτταρα που δεν έλαβαν καμία θεραπεία στο ίδιο χρονικό διάστημα επώασης). Η συγκέντρωση του 1μΜ της ουσίας FP5 συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις 2,5 και 5μΜ δεν φαίνεται να αναστέλλει τη δημιουργία κλώνων.

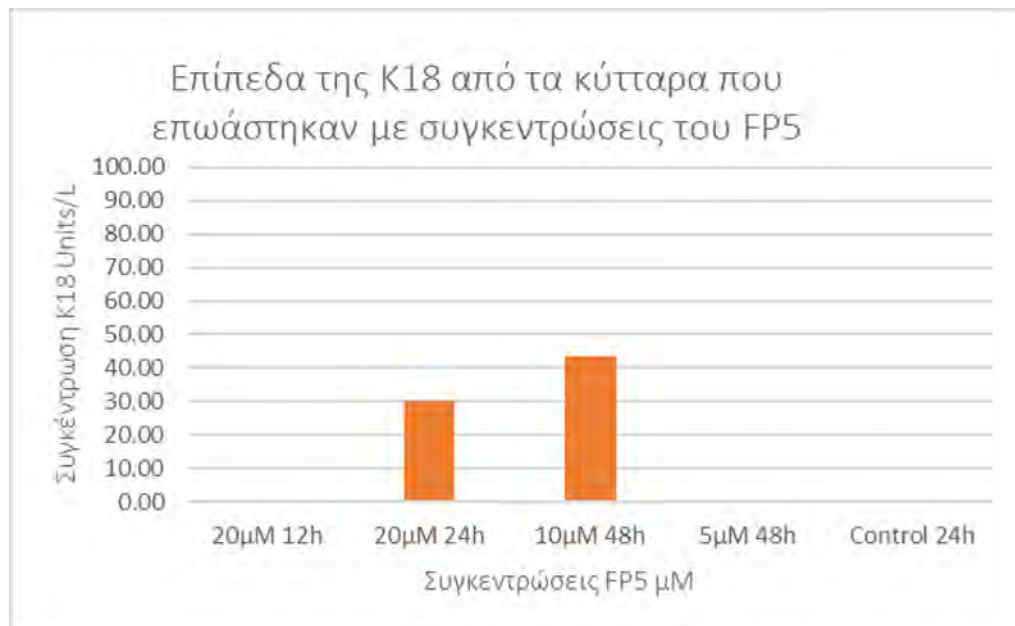


Εικόνα 12: A. Στην εικόνα αυτή, από τα αριστερά προς τα δεξιά, φαίνεται ο σχηματισμός κλώνων στα κύτταρα μάρτυρες, που επωάστηκαν με RPMI και στα κύτταρα που επωάστηκαν με 1μM της ουσίας FP5, ενώ η επώαση με συγκεντρώσεις των 2,5μM και 5μM της ουσίας, παρεμπόδισε το σχηματισμό κλώνων. *B.* Στο ραβδόγραμμα απεικονίζεται το ποσοστό % των κλώνων σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Κάθε ράβδος απεικονίζει το μέσο όρο από δύο ανεξάρτητα πειράματα που έγιναν το καθένα εις διπλούν.

2.4 Αποτελέσματα του M65 Epideth ELISA assay

Όπως αναλύθηκε στα υλικά-μέθοδοι, το M65 Epideth ELISA assay χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των επιπέδων της K18 που απελευθερώνεται στο εξωκυττάριο υγρό λόγω του κυτταρικού θανάτου που υφίστανται τα κύτταρα. Οι συγκεντρώσεις της ουσίας FP5 που μελετήθηκαν με αυτή την μέθοδο ήταν τα 20μM στις 12 ώρες και 24 ώρες, τα 10μM στις 48 ώρες και τα 5μM στις 48 ώρες, καθώς από τα αποτελέσματα των πειραμάτων με την χρωστική Trypan blue φάνηκε πως η ουσία FP5 σε αυτές τις συγκεντρώσεις, τις

συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, προκαλεί τα μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Τα αποτελέσματα φαίνονται και στο διάγραμμα της εικόνας 13 και όπως είναι φανερό στις συγκεντρώσεις των 10 και 20μM στις 48 και 24 ώρες επώασης αντίστοιχα, φαίνεται να υπάρχουν μικρά επίπεδα της K18 που έχει απελευθερωθεί από τα κύτταρα στα οποία πιθανά έχει ενεργοποιηθεί η διαδικασία της απόπτωσης. Αντίθετα, παρατηρούνται μηδενικά επίπεδα K18 στο υπερκείμενο από κύτταρα μάρτυρες αλλά και από κύτταρα που έχουν επωασθεί είτε με 20μM για 12 ώρες είτε με 5μM για 48 ώρες.

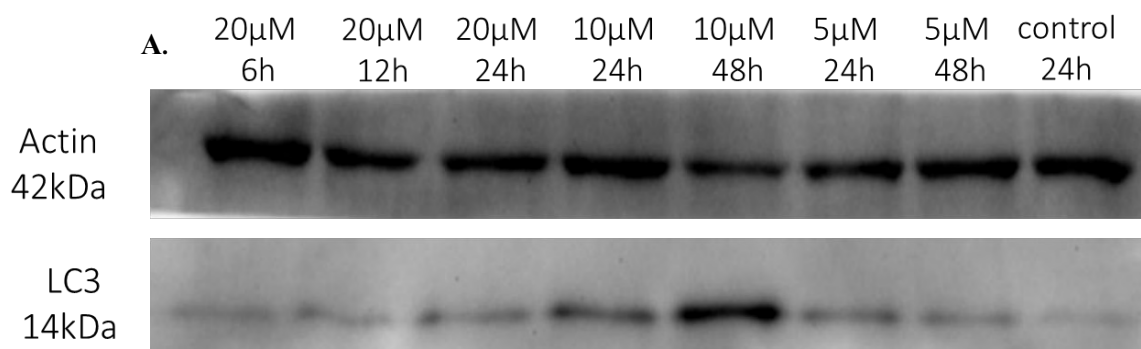


Εικόνα 13: Στην εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα από το M65 Epideath ELISA assay kit, για τις συγκεντρώσεις 5, 10 και 20μM της ουσίας FP5 σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές επώασης των κυττάρων με αυτές.

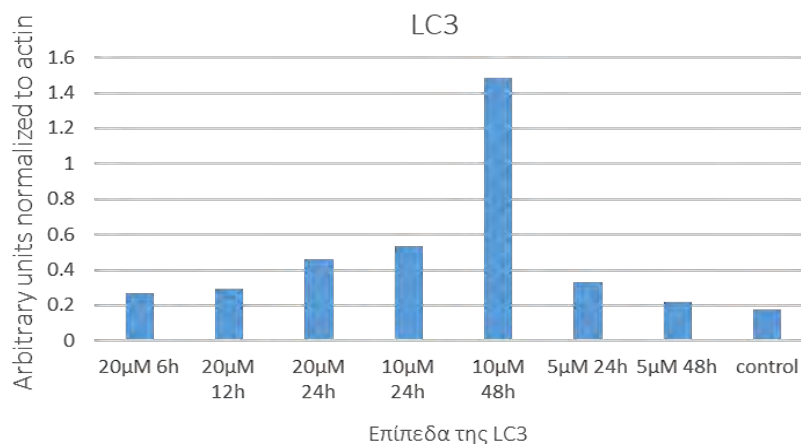
2.5 Επίδραση της ουσίας FP5 στον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο των κυττάρων MDA-MB435

Από τα αποτελέσματα της μεθόδου M65 Epideath ELISA, φάνηκε πως υπάρχει επαγωγή κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα MDA-MB435 που επωάζονται με συγκεντρώσεις των 10 και 20μM της ουσίας FP5 για 48 και 24 ώρες αντίστοιχα. Κρίθηκε όμως απαραίτητη και η διεξαγωγή πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά western blot, προκειμένου να εξακριβωθεί ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που επάγεται. Οι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου που μελετήθηκαν με αυτή τη μέθοδο ήταν η αυτοφαγία και η απόπτωση.

Για την αυτοφαγία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης LC3. Η πρωτεΐνη αυτή παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της αυτοφαγίας καθώς συμμετέχει στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Πιο αναλυτικά, η πρωτεΐνη LC3 (~30kDa) αρχικά πέπτεται από την πρωτεΐνη Atg4 με αποτέλεσμα το σχηματισμό της πρωτεΐνης LC3-I (16 kDa). Στη συνέχεια, η LC3-I πέπτεται από τις πρωτεΐνες Atg7 και Atg3 με αποτέλεσμα το σχηματισμό της πρωτεΐνης LC3-II (14 kDa), η οποία συμβάλλει στο σχηματισμό της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά western blot για την πρωτεΐνη LC3 φαίνονται στην *εικόνα 14*. Βρέθηκε πως τα επίπεδα της LC3 αυξάνονται δραματικά όταν τα κύτταρα MDA-MB435 επωαστούν με 10μM της ουσίας FP5 για 24 και 48 ώρες. Αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης LC3 παρατηρήθηκαν και στις 24 ώρες επώασης των κυττάρων με 20μM της ουσίας FP5. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις δείχνουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης LC3 με τα κύτταρα μάρτυρες. Η εμφάνιση μιας πρωτεϊνικής ζώνης για την LC3 στα 14kDa υποδηλώνει την παρουσία της LC3-II και επομένως το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος.



B.



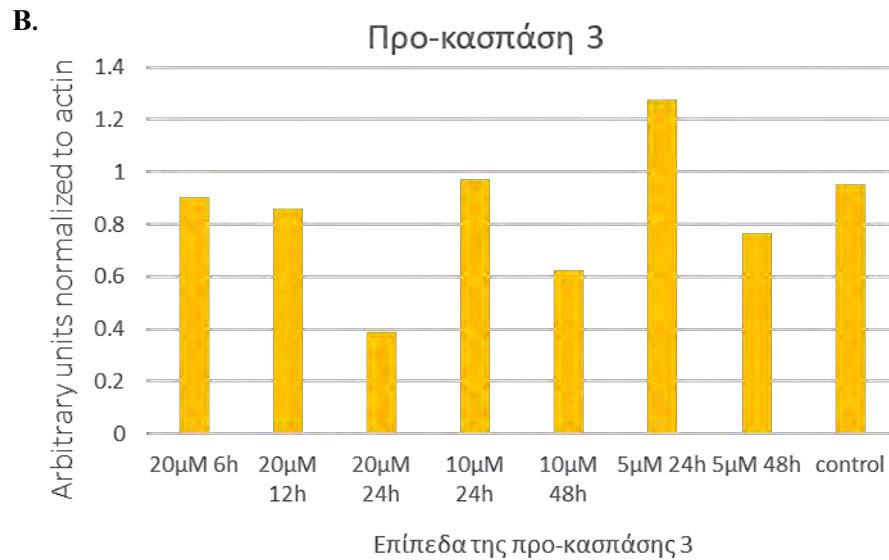
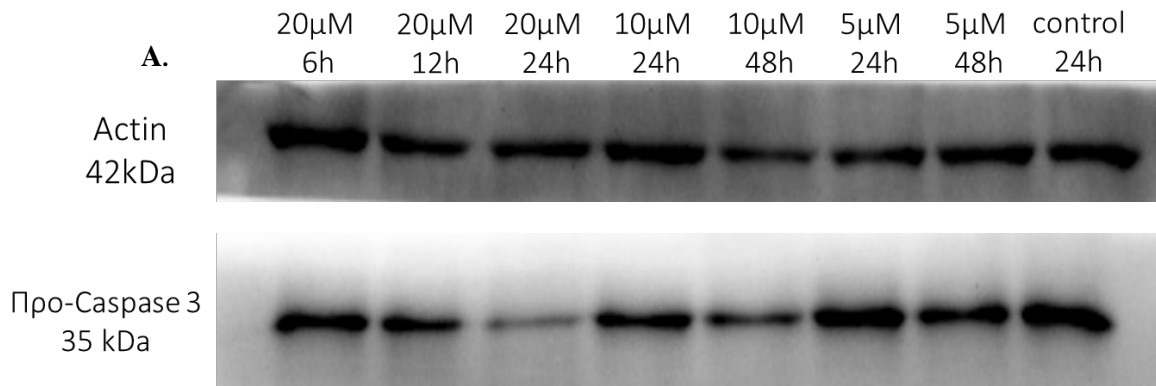
Εικόνα 14: Α. Στην εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά western blot για την έκφραση της πρωτεΐνης LC3 σε σχέση με την ακτίνη στα κύτταρα MDA-MB435 που επώαστηκαν με 20μM της ουσίας FP5 για 6, 12 και 24 ώρες, με 10μM για 24 και 48 ώρες και με 5μM για 24 και 48 ώρες, καθώς και στα κύτταρα μάρτυρες στις 24 ώρες επώασης. Β. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης LC3 στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με τις συγκεντρώσεις 5, 10 και 20μM της ουσίας FP5 στους χρόνους που μελετήθηκαν.

2.6 Επίδραση της ουσίας FP5 στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο των κυττάρων MDA-MB435

Εκτός από την μελέτη της επαγωγής της αυτοφαγίας στα κύτταρα MDA-MB435 που επώαστηκαν με συγκεντρώσεις των 5, 10 και 20μM της ουσίας FP5, κρίθηκε σημαντική και η μελέτη της επαγωγής της διαδικασίας της απόπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης προ-κασπάση 3.

Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά western blot (*εικόνα 15*), φάνηκε πως τα επίπεδα της προ-κασπάσης 3 μειώνονται όταν τα κύτταρα επωαστούν με 10μM της ουσίας FP5 για 48 ώρες και με 20μM για 24 ώρες σε σχέση με τα επίπεδα της πρωτεΐνης στα κύτταρα μάρτυρες. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης δε φαίνεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερες διαφορές στα κύτταρα που επώαστηκαν με 5μM της ουσίας FP5 για 24 και 48 ώρες, με 10μM για 24 ώρες και με 20μM για 6 και 12 ώρες σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Επομένως, από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται πως η επαγωγή της απόπτωσης είναι

επακόλουθο της αύξησης του χρόνου επώασης των κυττάρων με συγκεντρώσεις των 10 και 20μM της ουσίας FP5.



Εικόνα 15: A. Στην εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά western blot για την έκφραση της πρωτεΐνης προ-κασπάση 3 σε σχέση με την ακτίνη στα κύτταρα MDA-MB435 που επώαστηκαν με 20μM της ουσίας FP5 για 6, 12 και 24 ώρες, με 10μM για 24 και 48 ώρες και με 5μM για 24 και 48 ώρες, καθώς και στα κύτταρα μάρτυρες στις 24 ώρες επώασης. **B.** Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης προ-κασπάση 3 στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με τις συγκεντρώσεις 5, 10 και 20μM της ουσίας FP5 στους χρόνους που μελετήθηκαν.

3. Συζήτηση

Το μελάνωμα αποτελεί μια θανατηφόρα νόσο που μαστίζει τόσο τον παγκόσμιο, όσο και τον ελληνικό πληθυσμό. Το 2018 καταγράφηκαν παγκοσμίως 287.000 νέα περιστατικά μελανώματος, με περίπου 60.000 θανάτους (“Μελάνωμα,” n.d.). Αυτοί οι υποδοχείς έχει βρεθεί να συμμετέχουν σε διαδικασίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο, όπως η απόπτωση (Georgiadis et al., 2017). Πρόσφατα η ερευνητική ομάδα του *Fytas* και των συνεργατών του ανέπτυξε δύο ανάλογα της 1(2-αρυλ-2-αδαμαντυλ)πιπεραζίνης που εν συντομία αναφέρονται ως FP5 και P5 (Fytas et al., 2015). Αυτές οι ουσίες αποτελούν προσδέτες των σίγμα υποδοχέων και τα αποτελέσματα *in vitro* μελετών για την επίδραση αυτών των ουσιών στην ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως οι MDA-MB231, Mia Paca2, NCI H1975 και HeLa, απέδειξαν πως αυτές οι ουσίες μπορούν να δράσουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Επειδή στο μελάνωμα φαίνεται ότι εκφράζονται οι σίγμα υποδοχείς, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη αυτών των ουσιών σε καρκινικές σειρές μελανώματος.

Από *in vitro* πειράματα μελέτης της κυτταροτοξικότητας των FP5 και P5 ουσιών στις πειραματικές συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η μελέτη προέκυψε το συμπέρασμα πως και για τις δύο ουσίες οι συγκεντρώσεις των 10 και 20μM είναι ιδιαίτερα τοξικές, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο. Αντιθέτως, στην συγκέντρωση των 5μM, παρατηρήθηκε πως η ουσία FP5 προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε αντίθεση με την ουσία P5 όπου παρατηρείται μόνο αναστολή στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Αυτές οι παρατηρήσεις αντικατοπτρίζονται και από τις τιμές των GI50, TGI και LC50 και για τις δύο ουσίες. Το GI50 της ουσίας FP5, δηλαδή η συγκέντρωση που αναστέλλει τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50%, είναι 3,3μM ενώ για την ουσία P5 είναι 6,1μM. Επομένως απαιτείται σχεδόν διπλάσια ποσότητα του P5 σε σχέση με το FP5 για να ανασταλεί η ανάπτυξη στο 50% των κυττάρων. Επιπλέον, το TGI, η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων 100% , για την ουσία FP5 είναι 4,3μM και η συγκέντρωση που προκαλεί θάνατο στο 50% των κυττάρων (LC50) είναι 8,5μM, ενώ το TGI της ουσίας P5 είναι 8,4μM και το LC50 18μM. Πάλι, χρειάζεται σχεδόν διπλάσια ποσότητα του P5 προκειμένου να ανασταλεί η ανάπτυξη όλων των κυττάρων ή να επέλθει κυτταρικός θάνατος στο 50% αυτών, σε σχέση με την ουσία FP5. Συμπερασματικά, με τη μέθοδο της Sulforhodamine B, φαίνεται και οι δύο ουσίες να έχουν

σημαντική *in vitro* αντικαρκινική δράση με την ουσία FP5 ωστόσο να έχει καλύτερη τόσο αντιπολλαπλασιαστική όσο και κυτταροστατική και κυτταροτοξική δράση από την ουσία P5.

Στη συνέχεια και στη βάση των αποτελεσμάτων της μεθόδου SRB, επιλέχθηκε η ουσία FP5 για μια πιο ενδελεχή μελέτη της δράσης της. Για να εξακριβωθεί αν η δράση της ουσίας πέρα από δόσοεξαρτώμενη είναι και χρονοεξαρτώμενη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τη μέθοδο της χρωστικής Trypan blue, όπου μελετάται η επίδραση της ουσίας στη βιωσιμότητα των κυττάρων για διαφορετικές χρονικές περιόδους επώασης σε τρεις επιλεγμένες συγκεντρώσεις κοντά στις αντίστοιχες τιμές των GI50, TGI και LC50 δηλαδή, στις συγκεντρώσεις των 5, 10 και 20 μ M. Από αυτές τις μελέτες προέκυψε πως η συγκέντρωση των 20 μ M της ουσίας FP5 έχει μεγάλη επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο στο 80% του κυτταρικού πληθυσμού μετά από 24 ώρες επώασης με τα κύτταρα. Ακολουθεί η συγκέντρωση των 10 μ M, η οποία φαίνεται να έχει έντονη επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων έπειτα από 24 ώρες επώασης με αυτά και πως στις 48 ώρες επώασης επάγει τον κυτταρικό θάνατο στο 80% του κυτταρικού πληθυσμού. Από το διάγραμμα που αφορά τον % αριθμό νεκρών κυττάρων μετά από 24 ώρες επώασης με τις συγκεντρώσεις των 5, 10 και 20 μ M της ουσίας FP5, φαίνεται πως όλες οι συγκεντρώσεις προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Όμως παρατηρήθηκε πως οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι περισσότερο κυτταροτοξικές, οδηγώντας μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων σε θάνατο.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων κλωνογένεσης (clonogenic assay), μιας μεθόδου που βασίζεται στην ικανότητα μιας ουσίας να αποτρέπει το σχηματισμό κλώνων από τα επιθετικά κύτταρα ενός καρκινικού πληθυσμού, δείχνουν πως οι συγκεντρώσεις των 2,5 και 5 μ M της ουσίας FP5 αποτρέπουν τη δημιουργία κλώνων των κυττάρων. Όμως, η συγκέντρωση 1 μ M δίνει περίπου τον ίδιο αριθμό κλώνων με τα κύτταρα μάρτυρες και το % ποσοστό του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων και των κυττάρων που έχουν επωαστεί με 1 μ M της ουσίας FP5 αγγίζει περίπου το 100%. Επομένως, η αύξηση του χρόνου επώασης των κυττάρων MDA-MB435 με την ουσία FP5 οδήγησε σε βελτιστοποίηση της δραστηριότητας της ουσίας καθώς οδήγησε στην αναστολή σχηματισμού αποικιών από τα επιθετικά κύτταρα του κυτταρικού πληθυσμού των MDA-MB435 κυττάρων και τελικά

τον κυτταρικό θάνατο. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι τα κύτταρα αυτά θεωρούνται επίσης ως τα κύτταρα με τις μεγαλύτερες ογκογόνες ικανότητες, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η ουσία μπορεί να έχει αντικαρκινική δράση και σε *in vivo* μοντέλα καρκίνου γεγονός που έχει ξεκινήσει να ελέγχεται ήδη στο εργαστήριο σε *in vivo* μελέτες με ξενομοσχεύματα.

Στη συνέχεια θέλαμε να επαληθεύσουμε την επαγωγή κυτταρικού θανάτου μετά την επώαση των κυττάρων MDA-MB435 με την ουσία FP5. Προς την κατεύθυνση αυτή χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο M65 Epideath ELISA. Σε αυτή τη μέθοδο ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα της K18 που εκκρίνουν τα κύτταρα στο εξωκυττάριο υγρό όταν τα κύτταρα πεθαίνουν (είτε από νέκρωση είτε από απόπτωση). Πράγματι, η πρωτεΐνη K18 ανιχνεύθηκε στο υπερκείμενο κυττάρων τα οποία είχαν επωασθεί με 10 και 20μM για 48 και 24 ώρες αντίστοιχα με τα κύτταρα. Επειδή με τη μέθοδο αυτή δε μπορεί να γίνει ακριβής προσδιορισμός του τύπου του κυτταρικού θανάτου που επάγεται στα κύτταρα, ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western, έτσι ώστε να προσδιοριστεί και ο τύπος του κυτταρικού θανάτου που επάγεται στα κύτταρα. Από αυτά τα πειράματα και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από το M65 Epideath ELISA, προέκυψε πως τα επίπεδα της προ-κασπάσης 3 μειώνονται αισθητά όταν τα κύτταρα MDA-MB435 επωαστούν με 20μM της ουσίας FP5 για 24 ώρες και με 10μM της ουσίας FP5 για 48 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει την επαγωγή της διαδικασίας της απόπτωσης. Εκτός από την απόπτωση, μελετήθηκε και η εμπλοκή της ουσίας στην πιθανή επαγωγή της διαδικασίας της αυτοφαγίας ως πιθανός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου καθώς άλλοι προσδέτες των σίγμα υποδοχέων έχει βρεθεί να σχετίζονται με αυτό τον τύπο κυτταρικού θανάτου (Ostenfeld et al., 2008). Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης LC3 που αποτελεί δείκτη επαγωγής αυτοφαγίας. Έτσι τα επίπεδα της πρωτεΐνης LC3 εμφανίζονται αυξημένα στις συγκεντρώσεις των 10μM στις 24 και 48 ώρες επώασης και 20μM στις 24 ώρες επώασης των κυττάρων με την ουσία. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να συγκριθούν και με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που αφορούν την επίδραση της ουσίας FP5 στην βιωσιμότητα των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

Σε κάποιες μελέτες έχει αναφερθεί η αλληλεπίδραση της αυτοφαγίας και της απόπτωσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μελανώματος, καθώς και μια ετερογένεια στο σχηματισμό

αυτοφαγοσωμάτων όσον αφορά την πρωτεΐνη LC3 στο κυτταρόπλασμα επιφανειακά εξαπλώμενων μελανωμάτων, σε σύγκριση με φυσιολογικά μελανοκύτταρα. Η επαγωγή της αυτοφαγίας λόγω της επώασης των κυττάρων μελανώματος με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως το Esomeprazole, ενός αναστολέα αντλιών πρωτονίων, καθυστέρησε τον κυτταρικό θάνατο των κυττάρων (Liu et al., 2013). Επιπλέον, έχει βρεθεί σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού και εγκεφάλου, πως τα αυτοφαγοσώματα που σχηματίζονται από την πρωτεΐνη LC3A είναι διαφορετικά από τα αυτοφαγοσώματα που περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη LC3B. Επίσης, ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των δύο πρωτεϊνών είναι διαφορετικός, με την LC3A να εντοπίζεται κυρίως γύρω από τον πυρήνα, ενώ η LC3B εμφανίζεται σε όλες τις περιοχές του κυτταροπλάσματος (Koukourakis et al., 2015). Οι ερευνητές κατέληξαν επίσης πως είναι σημαντική η χρήση αντισώματος που θα εντοπίζει συγκεκριμένα την πρωτεΐνη LC3A ή LC3B, καθώς η χρήση αντισώματος και για τις δύο πρωτεΐνες, δε μπορεί να διακρίνει ποιά από τις δύο πρωτεΐνες παίζει ρόλο στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων, όταν τα κύτταρα υφίστανται αυτοφαγία. Επιπλέον, αναφέρεται πως αρχικά στα κύτταρα υπάρχει μία προ-LC3 πρωτεΐνη ~30kDa, η οποία πέπτεται από την πρωτεΐνη Atg4 με αποτέλεσμα το σχηματισμό της LC3-I. Στη συνέχεια η LC3-I πέπτεται από τις Atg7 και Atg3 και τελικά σχηματίζεται η πρωτεΐνη LC3-II, η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος (Koukourakis et al., 2015). Το γεγονός πως από τα πειράματα αυτής της διπλωματικής εργασίας προέκυψε μία πρωτεϊνική ζώνη για την LC3, στα 14 kDa, δείχνει ότι εντοπίζεται η πρωτεΐνη LC3A-II ή η LC3B-II, γεγονός που υποδηλώνει πως έχει σχηματιστεί το αυτοφαγόσωμα στα κύτταρα MDA-MB435 μετά από επώαση με συγκεντρώσεις της ουσίας FP5. Απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ακριβώς ποια από τις δύο πρωτεΐνες εντοπίζεται.

Συμπερασματικά, οι ουσίες FP5 και P5, που αποτελούν ανάλογα της 1-(2-αρυλ-2-αδαμάντυλ)πιπεραζίνης, στοχεύουν τους σίγμα υποδοχείς και τα κανάλια Na⁺ και φαίνεται πως και οι δύο έχουν υποσχόμενη *in vitro* αντικαρκινική δράση. Ωστόσο, η ουσία FP5 φαίνεται να είναι πιο δραστική από την ουσία P5 στα κύτταρα αμελανωτικού μελανώματος MDA-MB435 που ελέγχθηκαν εδώ. Η δράση της συγκεκριμένης ουσίας φάνηκε να εξαρτάται και από τη συγκέντρωσή της καθώς και από τον χρόνο επώασης των κυττάρων με αυτήν. Υπό την επίδραση της ουσίας FP5 φαίνεται να επάγονται ως μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου τόσο η αυτοφαγία, όσο και η διαδικασία της απόπτωσης. Τα

αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ουσία FP5 μπορεί να έχει μια σημαντική αντικαρκινική δράση ωστόσο είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη τόσο του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου που επάγεται σε κύτταρα μελανώματος όσο και ο μηχανισμός δράσης της ουσίας (πχ σηματοδοτικά μονοπάτια, επίδραση στον κυτταρικό κύκλο, *in vivo* δραση).

4.Βιβλιογραφία:

causes of melanoma - NHS [WWW Document], n.d. URL

<https://www.nhs.uk/conditions/melanoma-skin-cancer/causes/> (accessed 5.30.20).

Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2009. *The Cell: a molecular approach*, II volume, 5th ed. ASM Press, Washington D.C.

diagnosis of melanoma - NHS [WWW Document], n.d. URL

<https://www.nhs.uk/conditions/melanoma-skin-cancer/diagnosis/> (accessed 5.30.20).

Fytas, C., Zoidis, G., Tsotinis, A., Fytas, G., Khan, M.A., Akhtar, S., Rahman, K.M., Thurston, D.E., 2015. Novel 1-(2-aryl-2-adamantyl)piperazine derivatives with antiproliferative activity. *Eur. J. Med. Chem.* 93, 281–290.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.021>

Georgiadis, M.O., Karoutzou, O., Foscolos, A.S., Papanastasiou, I., 2017. Sigma receptor (σ R) ligands with antiproliferative and anticancer activity. *Molecules*.

<https://doi.org/10.3390/molecules22091408>

Gong, H.Z., Zheng, H.Y., Li, J., 2019. Amelanotic melanoma. *Melanoma Res.* 29, 221–230. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000571>

Koukourakis, M.I., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Zois, C.E., Sivridis, E., Pouliliou, S., Mitrakas, A., Gatter, K.C., Harris, A.L., 2015. Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines. *PLoS One* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137675>

Levy, J.M.M., Towers, C.G., Thorburn, A., 2017. Targeting autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 17, 528–542. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>

Li, Y.J., Lei, Y.H., Yao, N., Wang, C.R., Hu, N., Ye, W.C., Zhang, D.M., Chen, Z.S., 2017. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin. J. Cancer*.

<https://doi.org/10.1186/s40880-017-0219-2>

Liu, H., He, Z., Simon, H.U., 2013. Targeting autophagy as a potential therapeutic

approach for melanoma therapy. *Semin. Cancer Biol.* 23, 352–360.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.06.008>

Longhitano, L., Castracani, C.C., Tibullo, D., Avola, R., Viola, M., Russo, G.,
Prezzavento, O., Marrazzo, A., Amata, E., Reibaldi, M., Longo, A., Russo, A.,
Parrinello, N.L., Li Volti, G., 2017. Sigma-1 and Sigma-2 receptor ligands induce
apoptosis and autophagy but have opposite effect on cell proliferation in uveal
melanoma. *Oncotarget* 8, 91099–91111. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19556>

Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S.,
Ralph, D.J., Celtek, S., Musumeci, G., Giunta, S., Djinovic, R., Basic, D.,
Sansalone, S., 2014. The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and
Progression in Peyronie’s Disease. *Biomed Res. Int.* 2014, 616149.
<https://doi.org/10.1155/2014/616149>

M65 EpiDeath ELISA - Diapharma [WWW Document], n.d. URL
[https://diapharma.com/product/nep/kidney/cytokeratin-18-keratin-18-ck18-k18-
kidney/m65-epideath-elisa/](https://diapharma.com/product/nep/kidney/cytokeratin-18-keratin-18-ck18-k18-kidney/m65-epideath-elisa/) (accessed 9.7.20).

Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W., Kurokawa, M., 2016. Metabolic Regulation of
Apoptosis in Cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 327, 43–87.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.06.006>

melanoma skin cancer - NHS [WWW Document], n.d. URL
<https://www.nhs.uk/conditions/melanoma-skin-cancer/> (accessed 5.30.20).

Neubauer Haemocytometry [WWW Document], n.d. URL
<https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/68052-14.aspx>
(accessed 8.31.20).

Orellana, E., Kasinski, A., 2016. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to
Investigate Cell Proliferation. *BIO-PROTOCOL* 6.
<https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1984>

Ostenfeld, M.S., Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Fehrenbacher, N., Olsen, O.D., Groth-
Pedersen, L., Puustinen, P., Kirkegaard-Sørensen, T., Nylandsted, J., Farkas, T.,

- Jäättelä, M., 2008. Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent that induces cytoprotective autophagosome accumulation. *Autophagy* 4, 487–499.
<https://doi.org/10.4161/auto.5774>
- Oyer, H.M., Sanders, C.M., Kim, F.J., 2019. Small-molecule modulators of sigma1 and SiGma2/TMEM97 in the context of cancer: Foundational concepts and emerging themes. *Front. Pharmacol.* <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01141>
- Pandelidou, M., Dimas, K., Georgopoulos, A., Hatziantoniou, S., Demetzos, C., 2011. Preparation and characterization of lyophilised EGG PC liposomes incorporating curcumin and evaluation of its activity against colorectal cancer cell lines. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 1259–1266. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3093>
- Sapan, C. V, Lundblad, R.L., Price, N.C., Boulevarde, C., Raton, B., Healthcare, B., Immuno, H., Fk, S., 1999. REVIEW Colorimetric protein assay techniques
 Christine. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 108, 99–108.
- Sereti, E., 2019. SIGMA RECEPTORS: STUDY OF THEIR ROLE IN CANCER AND THE DEVELOPMENT OF NOVEL TARGETED ANTICANCER THERAPIES.
 Thessaly University.
- Sherwood, L., 2016. Introduction to Human Physiology, 8th ed. Ακαδημαϊκές εκδόσεις Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Smith, S.B., Su, T.-P., 2017. Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets (*Advances in Experimental Medicine and Biology*) 133–152.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-50174-1>
- Strober, W., 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 111, A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Stryer, L., J. Gatto, G., Tymoczko, J.L., 2015. Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- symptoms of melanoma - NHS [WWW Document], n.d. URL
<https://www.nhs.uk/conditions/melanoma-skin-cancer/symptoms/> (accessed 5.30.20).

Thompson, T.&, 2011. Genetics in Medicine, 7th ed. Broken Hill.

treatment for melanoma - NHS [WWW Document], n.d. URL

<https://www.nhs.uk/conditions/melanoma-skin-cancer/treatment/> (accessed 5.30.20).

Types of melanoma | Cancer Research UK [WWW Document], n.d. URL

<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/melanoma/stages-types/types>
(accessed 5.30.20).

Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W., n.d. Fundamentals of Biochemistry:Life at the
Molecular Level, 5th Edition, 5th ed. John Wiley and Sons, Inc.

Yu, L., Chen, Y., Tooze, S.A., 2018. Autophagy pathway: Cellular and molecular
mechanisms. Autophagy. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838>

Βλάχση, Ι., Πανουτσοπούλου, Ι., Κουζανίδη, Ν., n.d. Μελάνωμα: Στάδια και Εικόνες
[WWW Document]. URL <https://www.doctoranytime.gr/p/melanoma> (accessed
5.30.20).

Ιωαννίδης Χαρίλαος, n.d. Κακόηθες μελάνωμα: Διάγνωση και αντιμετώπιση - Όμιλος
ΙΑΣΩ [WWW Document]. URL [https://www.groupiaso.gr/item/338-κακόηθες-
μελάνωμα-διάγνωση-και-αντιμετώπιση](https://www.groupiaso.gr/item/338-κακόηθες-μελάνωμα-διάγνωση-και-αντιμετώπιση) (accessed 5.30.20).

Μελάνωμα [WWW Document], n.d. URL

https://www.msd.gr/our_work/oncology/melanoma/ (accessed 8.30.20).