



ΤΜΗΜΑ
**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*<<In vivo μελέτη του μηχανισμού δράσης της
siramesine σε ξενομοσχεύματα παγκρεατικού
καρκίνου>>*

*<< In vivo study of the siramesine' s mechanism of
action in xenografts of pancreatic cancer >>*

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ | Γραμματικού Πασχαλίνα του Θεοδώρου

ΛΑΡΙΣΑ 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Δήμας Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας | Τμήμα Ιατρικής

2. Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας | Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

3. Μπαλατσός Νικόλαος

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας | Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας, στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπον καθηγητή Δήμα Κωνσταντίνο, Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, τόσο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στο εργαστήριο και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα, όσο και για τη καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια της μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους του συναδέρφους που με πολύ χαρά συνεργάστηκα, την Ελισάβετ Καλαϊτσίδου, την Ίριδα, Παπαποστόλου, την Κουτσογιάννη Φανή, τον Κωνσταντίνο Λαφαζάνη και την Ανδρομάχη Λαμπριανίδου. Ήταν ιδιαίτερα σημαντική η συνδρομή τους στην εκπόνηση της μελέτης μου, αλλά και στην συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, οικογένεια και φίλους, που με στήριξαν καθ' όλη την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων.

Η παρούσα εργασία αποτέλεσε μέρος του poster << Siramesine, a sigma-2 receptor agonist induces cell death via induction of both apoptosis and autophagy in a patient derived PDAC model in vivo and in vitro >>, το οποίο παρουσιάστηκε στο 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βασικής και Κλινικής Φαρμακολογίας.

Πίνακας περιεχομένων:

Περίληψη:	6
1. Καρκίνος:	8
1.1 Εισαγωγή στο καρκίνο.....	8
1.2 Αιτίες του καρκίνου.....	10
1.3 Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων	12
1.4 Γονιδιακή προσέγγιση του καρκίνου.....	13
2. Παγκρεατικός καρκίνος:	14
2.1 Περιγραφή και λειτουργία του παγκρέατος.....	14
2.2 Επιδημιολογία παγκρεατικού καρκίνου.....	15
2.3 Παθοφυσιολογία και παράγοντες κινδύνου.....	16
2.4 Διάγνωση και θεραπεία.....	17
3. Siramesine και σίγμα υποδοχείς	19
3.1. Εισαγωγή στους σίγμα υποδοχείς.....	19
3.2 Siramesine και προσδέτες των σίγμα 2 υποδοχέων.....	20
4. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου	23
4.1. Απόπτωση.....	24
4.1.1 Εισαγωγή στην απόπτωση.....	24
4.1.2 Μηχανισμός της απόπτωσης.....	24
4.1.3 Οι οδοί της απόπτωσης.....	25
4.2 Αυτοφαγία.....	27
4.2.1 Εισαγωγή στην αυτοφαγία.....	27
4.2.2 Μηχανισμός της αυτοφαγίας.....	28
4.2.3 Ρύθμιση της αυτοφαγίας μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR.....	29
5. Ανάπτυξη PDX	32
5.1 Μέθοδοι ανάπτυξης PDX.....	32
5.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των PDX.....	33
6. Σκοπός	35

7. Πειραματική Διαδικασία Υλικά και μέθοδοι.....	36
7.1 Απομόνωση πρωτεΐνης από ιστό.....	36
7.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	36
7.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western.....	36
8. Αποτελέσματα:.....	46
8.1 Επίδραση της Siramesine στην ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων.....	46
8.2 Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της Siramesine in vivo.....	48
8.2.1 Επίδραση της Siramesine στην επαγωγή απόπτωσης.....	48
8.2.2 Επίδραση της Siramesine στην επαγωγή αυτοφαγικού θανάτου.....	49
9. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	54
10. Βιβλιογραφία.....	57

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η *in vivo* διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της siramesine (αγωνιστής των σίγμα 2 υποδοχέων) σε ξενομοσχεύματα παγκρεατικού καρκίνου (PDX), τα οποία αναπτύχθηκαν απευθείας από όγκο ασθενούς στο εργαστήριο μας.

Για το σκοπό αυτό, η siramesine χορηγήθηκε σε ζώα, στα οποία είχαν αναπτυχθεί ξενομοσχεύματα παγκρεατικού καρκίνου, είτε ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με την gemcitabine. Παρατηρήθηκε ότι η συνδυαστική χορήγηση siramesine και gemcitabine εμφανίζει αντικαρκινική δράση (Σερέτη Ευαγγελία, διδακτορική διατριβή 2019). Προκειμένου να προσδιοριστεί ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που επάγει η siramesine στα καρκινικά κύτταρα, μελετήθηκε επιλεκτικά η έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην απόπτωση (προ-κασπάση 3), στην αυτοφαγία (Beclin-1 και LC3) και στον μηχανισμό ρύθμισης της αυτοφαγίας μέσω του μονοπατιού mTOR (p70S6K1). Παρατηρήσαμε ότι η siramesine, είτε χορηγείται ως μονοθεραπεία, είτε συνδυαστικά με την gemcitabine μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της προ-κασπάσης 3. Επίσης η συνδυαστική χορήγηση προκαλεί σημαντική αύξηση της έκφρασης της LC3, το οποίο αποτελεί ένδειξη ενεργοποίησης του αυτοφαγικού θανάτου.

Σύμφωνα με αυτά τα πειραματικά δεδομένα, φαίνεται ότι η siramesine επάγει *in vivo* την απόπτωση, ενώ η συνδυαστική χορήγησή της με την gemcitabine επάγει την απόπτωση και την αυτοφαγία. Αυτά τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η siramesine ως μονοθεραπεία και ο συνδυασμός με την gemcitabine θα μπορούσε να αποτελέσει μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου. Ωστόσο απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την λεπτομερή κατανόηση του μηχανισμού δράσης.

Λέξεις - κλειδιά: siramesine, παγκρεατικός καρκίνος, ξενομοσχεύματα, αυτοφαγία, απόπτωση

Abstract

The purpose of this bachelor thesis is the study of siramesine's mechanism of action of (sigma 2 receptor agonist) in pancreatic cancer xenografts, which were developed directly from a patient's tumor in our laboratory (PDX).

Towards this aim siramesine was administrated in animals bearing pancreatic tumors, either as monotherapy or in combination with gemcitabine. It was observed that the combined administration of siramesine and gemcitabine shows a very good anticancer activity (Sereti Euaggelia, PhD thesis 2019). In order to determine the mechanism of tumor cells' death induced by siramesine, the expression of proteins involved in apoptosis (pre-caspase 3), autophagy (Beclin-1 and LC3) and the mechanism of regulation of autophagy via the mTOR pathway (p70S6K1) were studied. We observed that siramesine either as monotherapy or in combination with gemcitabine significantly reduced pro-caspase 3 levels. Co-administration also found to cause a significant increase in LC3 expression suggesting the activation of autophagic cell death as well.

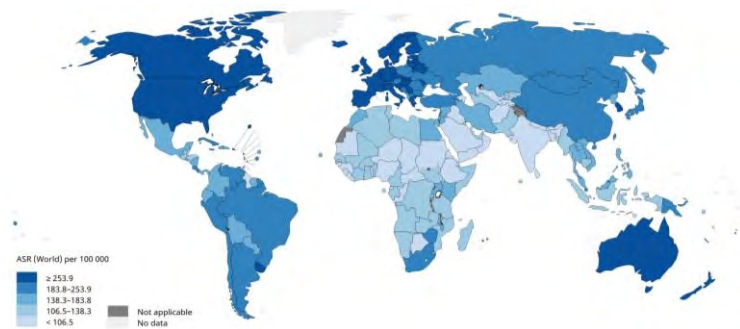
According to these experimental data, siramesine appears to induce apoptosis *in vivo*, while its co-administration with gemcitabine induces both apoptosis and autophagy. These data suggest that siramesine alone or in combination with standards of care like gemcitabine could be a new therapeutic approach for the treatment of pancreatic cancer. However, more studies are needed to understand the mechanism of action in detail.

Keywords: siramesine, pancreatic cancer, xenografts, autophagy, apoptosis

1.ΚΑΡΚΙΝΟΣ

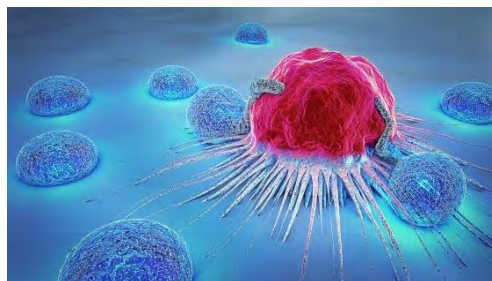
1.1 Εισαγωγή στο καρκίνο

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πιο θανατηφόρες ασθένειες του 21^{ου} αιώνα. Για τις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες αποτελεί την δεύτερη κύρια αιτία θανάτου, μετά τις καρδιοπάθειες (Εικόνα 1). Ωστόσο δεν πρόκειται για ασθένεια που εμφανίστηκε μόνο τον τελευταίο αιώνα, καθώς η πρώτη καταγεγραμμένη περιγραφή του καρκίνου βρέθηκε σε ένα αιγυπτιακό πάπυρο του 1600 π.Χ. Πιστεύεται πως ο πρώτος που εισήγαγε τον όρο <<καρκίνος>> ήταν ο Ιπποκράτης. Μάλιστα υποστήριζε πως το σχήμα των καρκινικών κυττάρων ομοιάζει με τα άκρα του καβουριού και έτσι χρησιμοποίησε τις λέξεις <<καρκίνωμα>> και <<καρκίνος>>, που σημαίνουν κάβουρας. ¹



Εικόνα 1. Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει τα συνολικά κρούσματα όλων των τύπων καρκίνου για το έτος 2018 ²

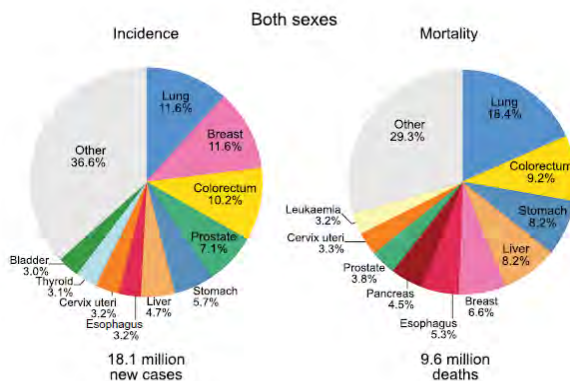
Στα φυσιολογικά κύτταρα, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η επιβίωση ρυθμίζονται μέσω αυστηρών μηχανισμών ελέγχου, ώστε να εξυπηρετούνται οι ανάγκες του οργανισμού με συντονισμένο τρόπο. Στα καρκινικά κύτταρα όμως παρατηρείται απώλεια αυτών των ρυθμιστικών μηχανισμών, με αποτέλεσμα την ανισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής φθοράς, το οποίο οδηγεί σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και διαίρεση κυττάρων και τελικά στον σχηματισμό του όγκου.



Εικόνα 2. Ένα καρκινικό κύτταρο σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα

Ωστόσο είναι σημαντικό να διακρίνεται αν ο όγκος, δηλαδή η ανώμαλη συσσώρευση κυττάρων, είναι καλοήθης ή κακοήθης. Ένας καλοήθης όγκος (benign tumor) περιορίζεται στην αρχική του θέση και δεν εξαπλώνεται στον γειτονικούς ιστούς και σε άλλες θέσεις του σώματος. Συνήθως δεν εκδηλώνουν συμπτώματα εκτός αν ασκούν μηχανική πίεση σε ζωτικά όργανα του ασθενή. Αντιθέτως ένας κακοήθης όγκος (malignant tumor), ο οποίος αναφέρεται και ως καρκινικός, έχει την ικανότητα να εισέρχεται στην κυκλοφορία και να δημιουργεί εστίες σε παρακείμενους ιστούς.³

Υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες καρκίνου: 1) επιθηλιακοί (καρκινώματα), 2) μεσεγχυματικοί- σαρκώματα, 3) αιμοποιητικοί, 4) νευροεκτοδερμικοί. Το επιθήλιο είναι ένα στρώμα κυττάρων που καλύπτει κοιλότητες ή εξωτερικές επιφάνειες (επιδερμίδα). Ορισμένα επιθηλιακά κύτταρα χρησιμεύουν για τη σφράγιση μιας κοιλότητας και για την προστασία των υποκείμενων κυτταρικών πληθυσμών. Όγκοι που προκύπτουν από προστατευτικές στοιβάδες του επιθηλίου ονομάζονται πλακώδη καρκινώματα. Πολλά επιθήλια περιέχουν επίσης κύτταρα που εκκρίνουν ουσίες στις κοιλότητες που σχηματίζουν. Οι εκκριτικές στοιβάδες των επιθηλιακών κυττάρων δημιουργούν αδενοκαρκινώματα.⁴ Τα καρκινώματα αποτελούν τον πιο συχνό τύπο καρκίνου, περίπου το 90%. Τα σαρκώματα είναι συμπαγείς όγκοι που προέρχονται είτε από μεσεγχυματικό ιστό, όπως τα οστά και οι μύες, είτε από συνδετικό ιστό και αποτελούν την πιο σπάνια μορφή καρκινικού όγκου. Οι λευχαιμίες εμφανίζονται σε πρόδρομα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και τα λεμφώματα εμφανίζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.⁵ Ωστόσο επειδή ο καρκίνος μπορεί να προκύψει από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό οποιουδήποτε τύπου κυττάρων, υπάρχουν περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου, οι οποίοι παίρνουν το όνομά τους από τον ιστό προέλευσης π.χ. καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, των ωοθηκών κτλ. Μεταξύ αυτών, οι τέσσερις πιο συχνά διαγνωσμένοι τύποι καρκίνου και στα δύο φύλα είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη, αλλά ο καρκίνος του πνεύμονα οφείλεται για το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτου (Εικόνα 3) ⁶



Εικόνα 3. Οι 10 πιο συχνά διαγνωσμένοι τύποι καρκίνου και για τα δύο φύλα για το 2018 ⁶

1.2 Αίτια του καρκίνου

Η εκδήλωση του καρκίνου δεν οφείλεται σε ένα μοναδικό αίτιο, διότι η ανάπτυξη μιας κακοήθειας είναι μια πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία, οπότε είναι αναμενόμενο να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Το 90-95% των περιστατικών καρκίνου οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, ενώ μόνο το 5-10% οφείλεται σε κληρονομικά αίτια (Εικόνα 4). Επιδημιολογικές μελέτες οδήγησαν στην συλλογή ορισμένων παραγόντων-ουσιών που σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης συγκεκριμένων τύπου καρκίνου, τα οποία ονομάζονται καρκινογόνα.

Σημαντική κατηγορία καρκινογόνων αποτελούν διάφορες συνθετικές αλλά και φυσικές χημικές ενώσεις. Πολλά χημικά μεταλλαξιγόνα θεωρούνται και καρκινογόνα, καθώς προκαλούν αλλοιώσεις του γενετικού υλικού, οι οποίες αποτελεί την μοριακή βάση της ογκογένεσης. Μεταξύ αυτών είναι και τα καρκινογόνα του καπνού του τσιγάρου, στα οποία περιλαμβάνονται το βενζοπυρένιο, νιτροζαμίνες και άλλοι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Το κάπνισμα οφείλεται για το 90% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, ενώ σχετίζεται και με την εκδήλωση άλλων μορφών καρκίνου, όπως τον καρκίνο του φάρυγγα, του λάρυγγα, της στοματικής κοιλότητας κ.ά. Υποστηρίζεται πως η μείωση του καπνίσματος θα προκαλέσει μείωση του ποσοστού θνησιμότητας κατά 30%.

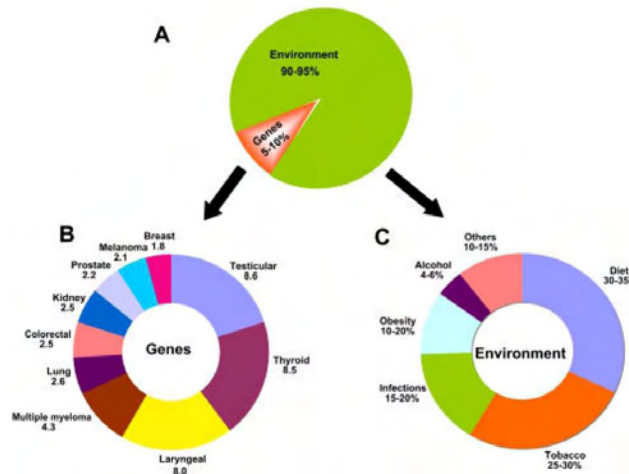
Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που προκαλεί βλάβες στο DNA είναι η ακτινοβολία. Η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) αποτελεί την κύρια αιτία ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος. Η υπεριώδης ακτινοβολία δρα στα κύτταρα με τα οποία έρχεται σε άμεση επαφή σχηματίζοντας διμερή θυμίνης. Τα διμερή θυμίνης είναι μη φυσιολογικοί ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των γειτονικών θυμίνων του ίδιου κλώνου του DNA. Εάν τα διμερή θυμίνης δεν επιδιορθωθούν άμεσα, παρεμποδίζουν την δράση των πολυμερασών, οδηγώντας σε λάθη κατά την διάρκεια της αντιγραφής ή της μεταγραφής. Επίσης οι ιονίζουσες ακτινοβολίες (κοσμική ακτινοβολία, ακτινοβολία τύπου α, β και γ, ακτίνες X) προκαλεί βλάβες στο DNA, μέσω της παραγωγής ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες τροποποιούν τα νουκλεοτίδια, προκαλούν οξειδώσεις και διασπάσεις δεσμών, οπότε προκαλούν θραύσεις στα χρωμοσώματα.

Επιπλέον περίπου το 18% των περιπτώσεων καρκίνου σχετίζονται με μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς. Συνήθως οι λοιμογόνοι παράγοντες είναι διάφορες οικογένειες ιών. Οι ιοί αυτοί ονομάζονται ογκογόνοι ιοί ή ογκοιοί. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (καρκίνος του τραχήλου της μήτρας), οι ιοί της ηπατίτιδας Β και C (καρκίνος του ήπατος), ο ερπητοϊός που σχετίζεται με το σάρκωμα του Kaposi, ο ιός Epstein-Barr (λέμφωμα Burkitt και καρκίνωμα στο ρινοφάρυγγα) και ο λεμφοτρόπος ιός των κυττάρων T (λευχαιμία λεμφοκυττάρων T). Επίσης ορισμένα βακτήρια ανήκουν στους λοιμογόνους παράγοντες, όπως το βακτήριο *Helicobacter pylori*, το οποίο είναι υπεύθυνο για το καρκίνο του στομάχου. Ο λοιμογόνος

παράγοντας προκαλεί συνήθως φλεγμονή, η οποία ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αγγειογένεση και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

Άλλα καρκινογόνα δεν προκαλούν μεταλλάξεις, αλλά προκαλούν την ανάπτυξη όγκου ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτά τα καρκινογόνα είναι γνωστά ως επαγωγείς όγκων. Κάποιες ορμόνες λειτουργούν ως επαγωγείς όγκων. Για παράδειγμα τα οιστρογόνα επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομήτριου, οπότε η έκκριση οιστρογόνων σε υψηλές συγκεντρώσεις αυξάνουν τις πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του ενδομήτριου στις γυναίκες.

Τέλος η παχυσαρκία σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας εξαιτίας διάφορων μορφών καρκίνου, όπως προστάτη, ήπατος, οισοφάγου, καθώς πιστεύεται ότι το αυξημένο σωματικό βάρος και η έλλειψη σωματικής άσκησης αποδυναμώνουν το ανοσοποιητικό και το ενδοκρινικό σύστημα. Ωστόσο είναι δυνατόν να προληφθούν κάποια είδη καρκίνου, εφόσον κάποιος κατά την διάρκεια της ζωής του ακολουθεί μια ισορροπημένη διατροφή, πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και προϊόντα ολικής άλεσης, ασκείται τακτικά και αποφύγει το κάπνισμα και την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ.⁷



Εικόνα 4. Ο συμβολή των γονιδίων και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη του καρκίνου⁷

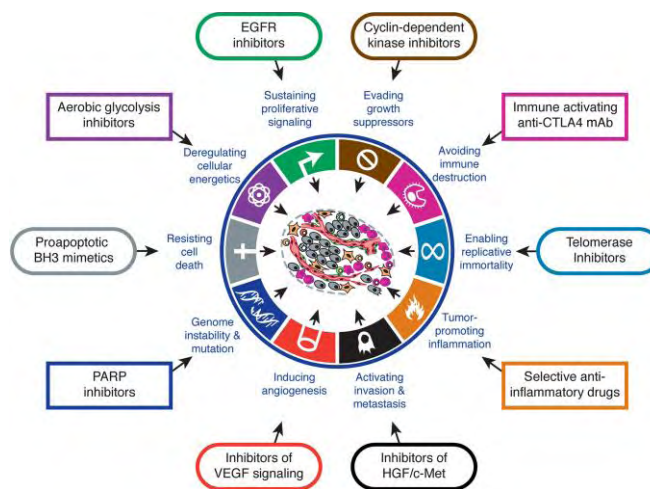
1.3 Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, η ανάπτυξη του καρκίνου δεν είναι αποτέλεσμα μίας μόνο τροποποίησης. Αντιθέτως η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό περιλαμβάνει την απορρύθμιση των μηχανισμών ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, λόγω συσσώρευσης πολλών μεταλλάξεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να εμφανίζουν ορισμένες διαφορετικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (Εικόνα 5). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους D. Hanahan και R.A.Weinberg (2000), τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν έξι ουσιώδεις αλλαγές⁸:

- i. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
- ii. Μη απόκριση σε σήματα αναστολής της κυτταρικής αύξησης
- iii. Αποφυγή απόπτωσης
- iv. Απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού
- v. Συνεχής αγγειογένεση
- vi. Διήθηση και μετάσταση όγκου

Το 2011, η ίδια επιστημονική ομάδα επισήμανε σε μια νέα δημοσίευση τέσσερις επιπρόσθετους παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου⁹:

- i. Απορρύθμιση του μεταβολισμού (Warburg effect)
- ii. Ογκο-επαγόμενη φλεγμονή
- iii. Αποφυγή ανοσοκαταστολής
- iv. Μεταλλάξεις και γενετική αστάθεια



Εικόνα 5. Τα ορόσημα του καρκίνου⁹

1.4 Γονιδιακή προσέγγιση του καρκίνου

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάπτυξη του καρκίνου οφείλεται στην συσσώρευση τροποποιήσεων του γενετικού υλικού, γεγονός το οποίο προκαλεί την απορρύθμιση των μηχανισμών που ελέγχουν την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Με την ανάπτυξη σύγχρονων τεχνολογιών, όπως αλληλούχιση του γονιδιώματος των καρκινικών κυττάρων, εντοπίστηκαν ρυθμιστικά γονίδια, τα οποία συσσωρεύουν μεταλλάξεις και οδηγούν στην καρκινογένεση. Τα γονίδια αυτά κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: α) ογκογονίδια και β) ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Τα γονίδια των φυσιολογικών κυττάρων, από τα οποία προέρχονται τα ογκογονίδια, ονομάζονται πρώτο-ογκογονίδια. Τα πρώτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν για μόρια σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τα πρώτο-ογκογονίδια συνήθως συσσωρεύουν επικρατείς μεταλλάξεις και τελικά μετατρέπονται σε ογκογονίδια. Τα ογκογονίδια είτε εκφράζονται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα πρώτο-ογκογονίδια, ακόμη και σε κύτταρα που φυσιολογικά δεν εκφράζονται τα πρώτο-ογκογονίδια, είτε κωδικοποιούν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, όσον αφορά την δομή και την λειτουργία τους.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο με αντίθετο τρόπο σε σχέση με τα ογκογονίδια. Τα γονίδια αυτά δρουν αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ενισχύοντας τον κυτταρικό θάνατο. Τα πιο καλά μελετημένα ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RB και P53. Η συσσώρευση υπολειπόμενων μεταλλάξεων καταστέλλει την δράση αυτών των γονιδίων. Το αποτέλεσμα είναι το κύτταρο να χάνει την ικανότητα ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης και να οδηγείται σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό.

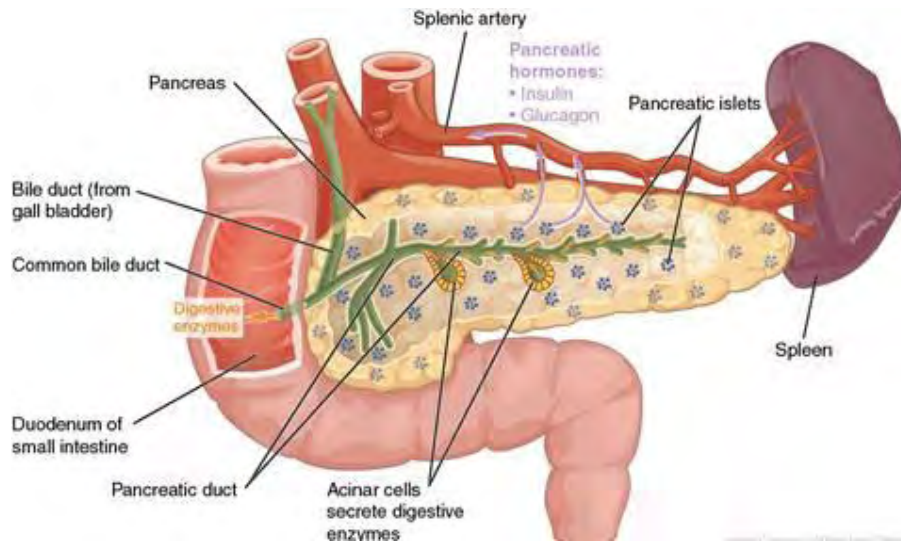
Συνεπώς, ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα γενετικής αστάθειας. Τόσο η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων, όσο και η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, ευνοώντας την καρκινογένεση.^{3,9}

2. ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος του παγκρέατος ελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των επιστημόνων, καθώς σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του 2018 αποτελεί τον έβδομο πιο θανατηφόρο τύπο καρκίνου παγκοσμίως. Η εμφάνιση συμπτωμάτων σε προχωρημένο στάδιο καθιστά τον παγκρεατικό καρκίνο μια από τις πιο επιθετικές μορφές καρκίνου, με ταχεία ανάπτυξη μεταστατικών εστιών και ποσοστό 5ετής επιβίωσης μόνο 9% μετά την διάγνωση της νόσου.¹¹ Η ανάπτυξη διαγνωστικών μεθόδων και κατάλληλων καρκινικών βιοδεικτών, αλλά και η κατανόηση σε μεγαλύτερο βαθμό των αιτιών πρόκλησης καρκίνου του παγκρέατος θα οδηγήσει στην ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών πρόληψης, έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας, με αποτέλεσμα να μειωθούν τα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας.

2.1 Περιγραφή και λειτουργία του παγκρέατος

Το πάγκρεας αποτελεί ένα αδένιο του πεπτικού συστήματος και εντοπίζεται μπροστά από την σπονδυλική στήλη στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο, στο σημείο που τελειώνει το στομάχι και αρχίζει το λεπτό έντερο. Έχει μήκος 12-15cm, κωνικό σχήμα, σαν πεπλατυσμένο αχλάδι και διαιρείται στα εξής τμήματα: α) το διογκωμένο τμήμα που ονομάζεται κεφαλή, η οποία βρίσκεται μέσα στην αγκύλη του δωδεκαδάκτυλου, β) τον αυχένα, γ) το σώμα και δ) την ουρά, η οποία συνδέεται με την σπλήνα μέσω του παγκρεατοσπληνικού συνδέσμου (Εικόνα 6). Το πάγκρεας είναι ένα όργανο που επιτελεί δύο διαφορετικές λειτουργίες. Ο ρόλος του στο πεπτικό σύστημα είναι η έκκριση παγκρεατικού υγρού (εξωκρινής λειτουργία), το οποίο περιέχει ένζυμα που διασπούν τα λίπη, τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες, διευκολύνοντας την απορρόφησή τους από το λεπτό έντερο. Το παγκρεατικό υγρό αποχετεύεται στο δωδεκαδάκτυλο μέσω δύο εκφορητικών πόρων: α) του κύριου παγκρεατικού πόρου, (πόρος του Wirsung), ο οποίος ξεκινάει από την ουρά και καταλήγει στην κεφαλή, όπου συνενώνεται με τον χοληφόρο πόρο και εκβάλλει στο φύμα του Vater, μέσω του σφικτήρα του Oddi και β) του μικρότερου πόρου Santorini, ο οποίος εντοπίζεται επίσης στην κεφαλή του παγκρέατος και αποτελεί διακλάδωση του κύριου παγκρεατικού πόρου. Η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος αποτελείται από συγκεκριμένες δομές, οι οποίες ονομάζονται νησίδια του Langerhans. Τα νησίδια αυτά αποτελούνται από τέσσερις τύπους κυττάρων, καθένα από τα οποία εκκρίνει ένα διαφορετικό προϊόν: 1) α-κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν τη γλυκαγόνη, 2) β-κύτταρα του παγκρέατος, τα οποία εκκρίνουν την ινσουλίνη, 3) τα δ-κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν τη σωματοστατίνη και 4) F-κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο. Η κύρια δράση των παγκρεατικών ορμονών είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων και του σακχάρου του αίματος.¹²

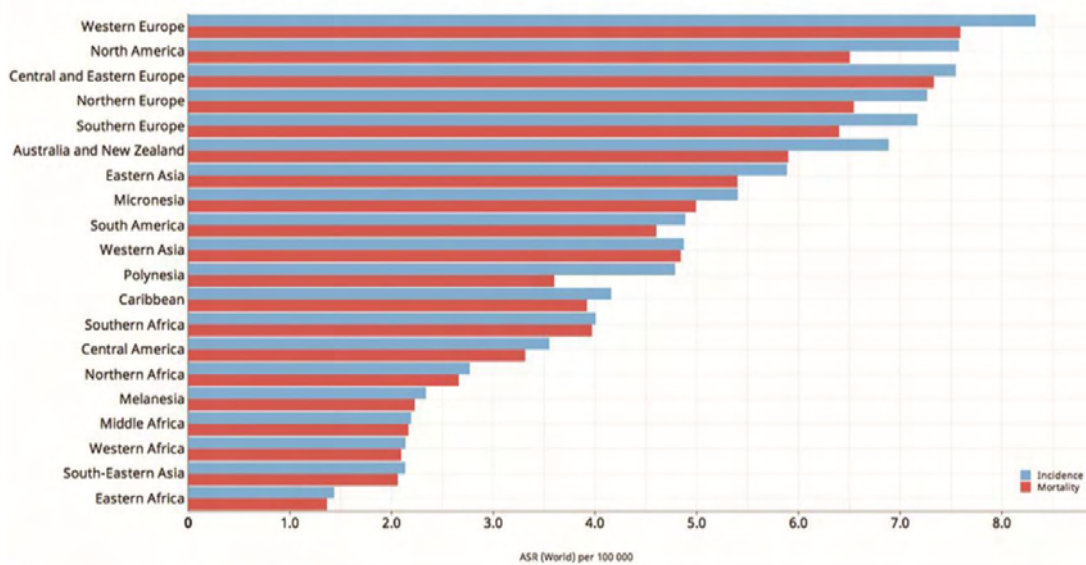


Εικόνα 6. Ιστολογική απεικόνιση του παγκρεατικού αδένος

2.2 Επιδημιολογία παγκρεατικού καρκίνου

Ο παγκρεατικός καρκίνος αποτελεί τον ενδέκατο συχνότερο τύπο καρκίνου παγκοσμίως. Φαίνεται πως η νόσος σχετίζεται με την ηλικία, καθώς συνήθως τα άτομα που νοσούν είναι άνω των 55 ετών. Επίσης τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου είναι ελαφρώς υψηλότερα στον ανδρικό πληθυσμό σε σχέση με τον γυναικείο. Μάλιστα παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση των περιστατικών καρκίνου παγκοσμίως. Πιο συγκεκριμένα, τα υψηλότερα ποσοστά εκδηλώνονται σε χώρες της δυτικής Ευρώπης, ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά σε χώρες της ανατολικής Αφρικής. Αν και τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μείωση του ποσοστού θνησιμότητας από τον καρκίνο γενικά, τα ποσοστά θνησιμότητας εξαιτίας του παγκρεατικού καρκίνου προβλέπεται ότι αυξάνονται όλο και περισσότερο (Εικόνα 7). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η διάγνωση της νόσου γίνεται σε ήδη προχωρημένο στάδιο της νόσου, όταν πλέον δεν είναι δυνατή η χειρουργική εξαίρεση του όγκου, λόγω έλλειψης συμπτωμάτων στα πρώτα στάδια. Οι επιδημιολογικές μελέτες εξυπηρετούν την κατανόηση της αιτιολογίας της νόσου και μελλοντικά την πιο αποτελεσματική πρόληψη της.¹³

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, pancreas, both sexes, all age:



Εικόνα 7. Απεικόνιση του ποσοστού νοσηρότητας (μπλε ράβδος) και θνησιμότητας (κόκκινη ράβδος) του παγκρεατικού καρκίνου παγκοσμίως. ¹³

2.3 Παθοφυσιολογία και παράγοντες κινδύνου

Ο παγκρεατικός καρκίνος εκδηλώνεται με δύο τύπους. Στο 95% των περιπτώσεων παγκρεατικού καρκίνου ο όγκος εντοπίζεται στην εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος. Αυτός ο τύπος παγκρεατικού καρκίνου περιλαμβάνει διάφορους υποτύπους, ο πιο διαδεδομένος, όμως, αφορά το καρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (PDAC). Μόνο στο 5% των περιπτώσεων ο όγκος εντοπίζεται στην ενδοκρινή μοίρα (PanNET).

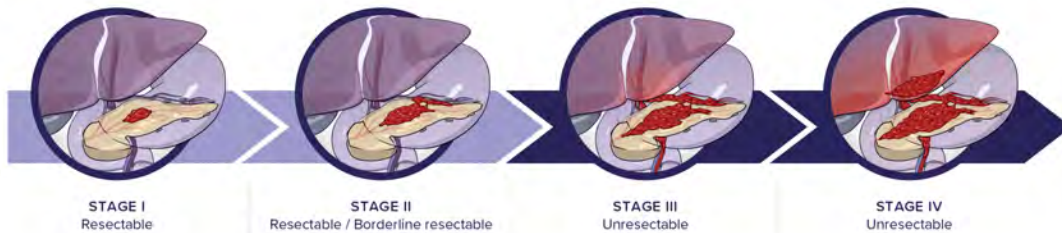
Έχουν σημειωθεί αρκετοί παράγοντες που αυξάνουν την κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παγκρέατος. Μεταξύ αυτών, ο σημαντικότερος θεωρείται ότι είναι το κάπνισμα. Ο κίνδυνος να νοσήσει κάποιος από καρκίνο του παγκρέατος είναι διπλάσιος για έναν καπνιστή σε σχέση με τους μη καπνιστές. Επίσης ο κίνδυνος αυξάνεται με τη χρονική διάρκεια που κάποιος είναι καπνιστής αλλά και με τον αριθμό των τσιγάρων που καπνίζει καθημερινά. Έρευνες υποστηρίζουν ότι ακόμη και μετά την παύση του καπνίσματος, ο κίνδυνος παραμένει υψηλός για τα επόμενα δέκα χρόνια. Μάλιστα αυξάνεται όταν το κάπνισμα συνδυάζεται με άλλους παράγοντες που επιβαρύνουν την υγεία, όπως η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ.¹³ Ακόμη, η παχυσαρκία και οι ανθυγιεινές διατροφικές συνήθειες γενικότερα έχουν συσχετιστεί με την νόσο.¹⁴

Ένας άλλος ανησυχητικός παράγοντας είναι η εμφάνιση διαβήτη, αφενός γιατί τα άτομα που πάσχουν από διαβήτη τύπου δύο για πάνω από 5 χρόνια έχουν 50% μεγαλύτερη πιθανότητα να εκδηλώσουν καρκίνο του παγκρέατος, αφετέρου πιθανόν η εμφάνιση

διαβήτη να εκδηλώνεται ως αρχικό σύμπτωμα της νόσου.¹⁵ Τέλος, κυρίαρχη θέση μεταξύ των παραγόντων κινδύνου έχει και η κληρονομικότητα, καθώς όπως αποδεικνύουν έρευνες, ο παγκρεατικός καρκίνος έχει γενετική βάση. Μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, CDKN2A, APC, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PRSS1 και STK11 σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.¹³

2.4 Διάγνωση και θεραπεία

Η διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου είναι ιδιαίτερα πτωχή, γι' αυτό και το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών ένα χρόνο μετά την διάγνωση είναι 24%. Κατά την ανάπτυξη του όγκου του παγκρέατος διακρίνονται τέσσερα στάδια (Εικόνα 8): στάδιο I, στο οποίο ο όγκος έχει μέγεθος μικρότερο των 2cm, στάδιο II όπου ο όγκος έχει μέγεθος μεγαλύτερο των 4cm και εντοπίζεται στο πάγκρεας και ίσως στους παρακείμενους λεμφαδένες, στάδιο III στο οποίο ο όγκος έχει αρχίσει να εξαπλώνεται στα αιμοφόρα αγγεία και στα νεύρα, αλλά δεν έχει εξαπλωθεί σε άλλα όργανα και στάδιο IV, στο οποίο ο όγκος έχει μετατραπεί σε μεταστατικός και εξαπλώνεται σε άλλους ιστούς.



Εικόνα 8. Στάδια ανάπτυξης παγκρεατικού καρκίνου

Το πρόβλημα είναι ότι στα αρχικά στάδια ανάπτυξης ο παγκρεατικός καρκίνος είναι ασυμπτωματικός και κατά την ανάπτυξή του εκδηλώνονται μη ειδικά συμπτώματα, όπως απώλεια βάρους, ανορεξία, κοιλιακό άλγος, ίκτερο και εντερική δυσλειτουργία. Η διάγνωση της νόσου στο 80-90% των περιπτώσεων γίνεται στο τρίτο ή τέταρτο στάδιο, συνεπώς δεν είναι δυνατή η χειρουργική εξαίρεση του όγκου. Επιπλέον η απουσία αξιόπιστων βιοδεικτών δεν επιτρέπει την έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Χρησιμοποιείται ευρύτατα το καρκινικό αντιγόνο CA19-9, διότι έχει παρατηρηθεί ότι περίπου το 80% των ασθενών έχει αυξημένα επίπεδα CA19-9. Ωστόσο, δεν θεωρείται αξιόπιστος δείκτης γιατί αυξάνεται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Σήμερα είναι διαθέσιμα σύγχρονα διαγνωστικά εργαλεία, όπως μαγνητική τομογραφία (MRI) και ενδοσκοπική υπερηχογραφία.¹³

Όσον αφορά στις θεραπευτικές στρατηγικές που εφαρμόζονται, στοχεύουν πρωτίστως στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων, όπως το έντονο κοιλιακό άλγος, ώστε να

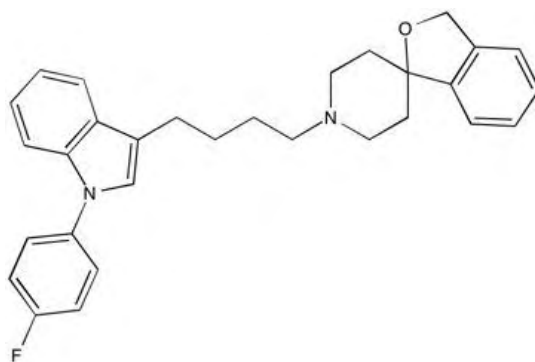
βελτιωθεί η ποιότητα ζωής των ασθενών. Η καταπολέμηση του παγκρεατικού καρκίνου βασίζεται κυρίως στην χημειοθεραπεία, στην ακτινοθεραπεία, σπανίως στην χειρουργική εξαίρεση ή σε συνδυασμό αυτών. Παρόλο που η χειρουργική επέμβαση δεν εφαρμόζεται στην πλειονότητα των περιπτώσεων, πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι η λαπαροσκοπική εξαίρεση του όγκου μειώνει την χρονική διάρκεια της μετεγχειρητικής ανάρρωσης, άρα εφαρμόζεται πιο άμεσα και κάποια άλλη θεραπεία για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Αυτή η μέθοδος ονομάζεται προφυλακτική θεραπεία (adjuvant therapy). Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που έχουν εγκριθεί από τον FDA είναι ABRAXANE (nab-Paclitaxel), GEMZAR (Gemcitabine), 5-FU (Fluorouracil) και ONIVYDE (irinotecan). Η Gemcitabine αποτελεί ένα από τα πιο αποτελεσματικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα πρώτης γραμμής για την καταπολέμηση του μεταστατικού παγκρεατικού αδενωκαρκινώματος, είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλες ουσίες, όπως το ABRAXANE. Επίσης ένας άλλος συνδυασμός χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (5-FU, ιρινοτεκάνης και οξαλιπλατίνη), γνωστό ως FOLFIRINOX, αποδείχθηκε πως είναι ακόμη πιο αποτελεσματικό, ωστόσο προκαλεί αρκετές παρενέργειες. Τέλος, η ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται συνήθως συνεργατικά με την χημειοθεραπεία και στοχεύει στην συρρίκνωση του όγκου και στην μείωση της εξάπλωσης του.¹⁶

3. Siramesine και σίγμα υποδοχείς

Η siramesine αποτελεί έναν αγωνιστή των σίγμα 2 υποδοχέων. Παρασκευάστηκε από την φαρμακευτική εταιρία H. Lundbeck το 2002 και χρησιμοποιήθηκε ως αγωνιστής των σεροτονεργικών υποδοχέων 5-HT_{1A} για τη αντιμετώπιση του άγχους και της κατάθλιψης. Αργότερα, όμως, κέντρισε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω της αντικαρκινικής της δράσης, καθώς αποδείχθηκε ότι οδηγεί σε θάνατο τα καρκινικά κύτταρα.¹⁷

Πίνακας 1. Πληροφορίες για τη Siramesine

Χημικό όνομα	1'-[4-[1-(4-fluorophenyl)-1H-indol-3-yl]butyl]-spiro[isobenzofuran-1(3H),4'-piperidine]
Χημικός τύπος	C ₃₀ H ₃₁ FN ₂ O
Εμπορικό όνομα	Lu 28-179
Μοριακή μάζα	454,59 g/mol



Εικόνα 9. Χημική δομή της Siramesine

3.1 Εισαγωγή στους σίγμα υποδοχείς

Για πάνω από 40 χρόνια οι σίγμα υποδοχείς προσελκύουν το ενδιαφέρον των επιστημόνων, καθώς εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Κατηγοριοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1976 ως ένας από τους τρεις τύπους υποδοχέων οπιοειδών : mu, kappa και sigma. Ωστόσο, αποδείχθηκε άμεσα ότι οι σίγμα υποδοχείς δεν ανήκουν στους υποδοχείς οπιοειδών, διότι δεν εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με τους κλασσικούς προσδέτες των οπιοειδών, όπως η ναλοξόνη, η ετορφίνη

και τα (-) εναντιομέρη των βενζομορφάνων. Αντιθέτως οι σίγμα υποδοχείς έχουν υψηλή προτίμηση στα (+) εναντιομέρη των βενζομορφάνων. Το 1990, οι σίγμα υποδοχείς υποδιαιρέθηκαν σε δύο κατηγορίες, τους σίγμα 1 και σίγμα 2, λόγω της διαφορετικής θέσεις σύνδεσης των προσδετών τους. Προς το παρόν, θεωρούνται ορφανής υποδοχέας, αν και υποστηρίζεται ότι η προγεστερόνη ή και η N,N-dimethyltryptamine (N,N-DMT) αποτελούν ενδογενείς προσδέτες των σίγμα 1 υποδοχέων, ενώ μέχρι τώρα δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιος ενδογενής προσδέτης για τους σίγμα 2.¹⁸

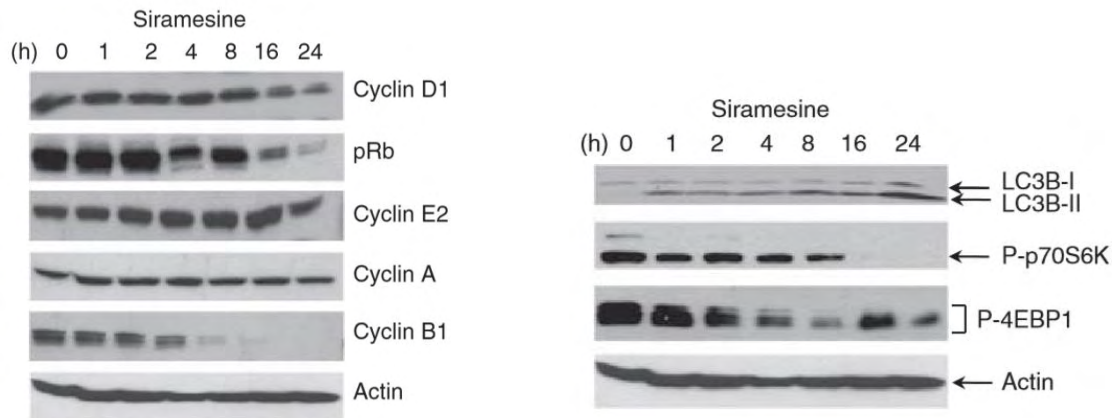
Ο σίγμα 1 υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη συνοδός (chaperone) περίπου 25 kDa και εντοπίζεται στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) που επικοινωνεί με το μιτοχόνδριο, η οποία ονομάζεται MAM (mitochondrion-associated ER membrane). Εκεί εξυπηρετεί την μεταφορά του Ca^{2+} από το ER στο μιτοχόνδριο αυξάνοντας την παραγωγή ATP. Επίσης η σύνδεση κάποιου προσδέτη ή υπό συνθήκες stress, ο σίγμα 1 υποδοχέας μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη όπου ελέγχει διάφορα κανάλια ιόντων, υποδοχείς και κινάσες. Παρόλα αυτά η κατανόηση του ακριβή μηχανισμού δράσης του σίγμα 1, μέσω του οποίου ρυθμίζονται οι παραπάνω διεργασίες, αποτελεί μια πρόκληση.¹⁹ Ο σίγμα 2 είναι ένας υποδοχέας για τον οποίο ελάχιστα είναι γνωστά, δεδομένου ότι το γονίδιο που τον κωδικοποιεί και η κρυσταλλική του δομή παραμένουν ακόμη άγνωστα. Γενικά πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη περίπου 21,5 kDa, με υψηλή έκφραση στο ΚΝΣ (κεντρικό νευρικό σύστημα), στο ήπαρ και στους νεφρούς. Ο σίγμα 2 υποδοχέας εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τη di-o-tolylguanidine (DTG) και την αλοπεριδόλη, αλλά χαμηλότερη συγγένεια για τα (+) εναντιομέρη των βενζομορφάνων. Το 2011, ο σίγμα2 υποδοχέας τακτοποιήθηκε ως ο PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1). Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση του PGRMC1 δεν προκαλεί αύξηση της σύνδεσης των προσδετών στον σίγμα2. Επίσης αποδείχθηκε ότι η αποσιώπηση του PGRMC1 μέσω siRNA ή CRISPR-Cas9 δεν επηρεάζει τα επίπεδα σύνδεσης των προσδετών στον σίγμα2. Με βάση τα παραπάνω, υποστηρίζεται ότι ο σίγμα 2 και ο PGRMC1 είναι δύο διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια. Τελικά το 2017, ο σίγμα2 υποδοχέας ταυτοποιήθηκε από μια ανεξάρτητη ερευνητική ομάδα ως ο TMEM97 (Transmembrane protein 97). Ο υποδοχέας αυτός εντοπίζεται στο ER και στα λυσοσώματα και σχετίζεται με τον μεταβολισμό της χοληστερόλης, διότι ρυθμίζει τον μεταφορέα χοληστερόλης NPC1 (Niemann–Pick disease protein type C1).²⁰

3.2 Siramesine και προσδέτες των σίγμα 2 υποδοχέων

Μελέτες σε διάφορες καρκινικές σειρές υποστηρίζουν ότι και οι δύο τύποι σίγμα υποδοχέων υπερεκφράζονται σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών και στο μελάνωμα. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του σίγμα 2 υποδοχέα είναι δέκα φορές υψηλότερα σε πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με αυτά που βρίσκονται σε ηρεμία.

Συνεπώς οι σίγμα 2 υποδοχείς δύναται να βρουν εφαρμογή ως βιοδείκτες και ως στόχοι για αντικαρκινική θεραπεία.²¹

Μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι οι προσδέτες των σίγμα υποδοχέων, σε συνδυασμό ή ως μονοθεραπεία, αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Κάποιοι προσδέτες, όπως οι WC-26, SV119 and RHM-138 προκαλούν την θραυσματοποίηση του γενετικού υλικού και ενεργοποιούν την απόπτωση, ενώ άλλοι προσδέτες φαίνεται ότι προκαλούν αναστολή του μονοπατιού mTOR και κυτταροσκελετικές αλλοιώσεις που σχετίζονται με την αυτοφαγία. Όσον αφορά στη siramesine, η οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι αγωνιστής των σίγμα 2 υποδοχέων, έχει αποδειχθεί ότι επάγει τον κυτταρικό θάνατο μέσω διαφορετικών μονοπατιών στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι η siramesine δεν προσδέεται αποκλειστικά στους σίγμα 2 υποδοχείς, αλλά και σε άλλους υποδοχείς στο εσωτερικό των κυττάρων. Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με μια μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2012 σε καρκινικά κύτταρα μελανώματος MDA-MB-435, υποστηρίζει ότι η siramesine επάγει την αυτοφαγία και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικόνα 10). Επιπλέον αποδείχθηκε ότι προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου καθώς μειώνει τα επίπεδα της κυκλίνης D1, B1 και της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb). Η επαγωγή της αυτοφαγίας από την siramesine υποστηρίζεται και από άλλη μελέτη σε MCF7 (καρκίνος του μαστού), στην οποία παρατηρήθηκε συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων και αναστολή του συμπλέγματος mTOR (αναστολέας της αυτοφαγίας). Παράλληλα σημειώθηκε συσσώρευση της siramesine στα λυσοσωμάτα, το οποίο προκαλεί την αποδιοργάνωση της λυσοσωμικής μεμβράνης.²²



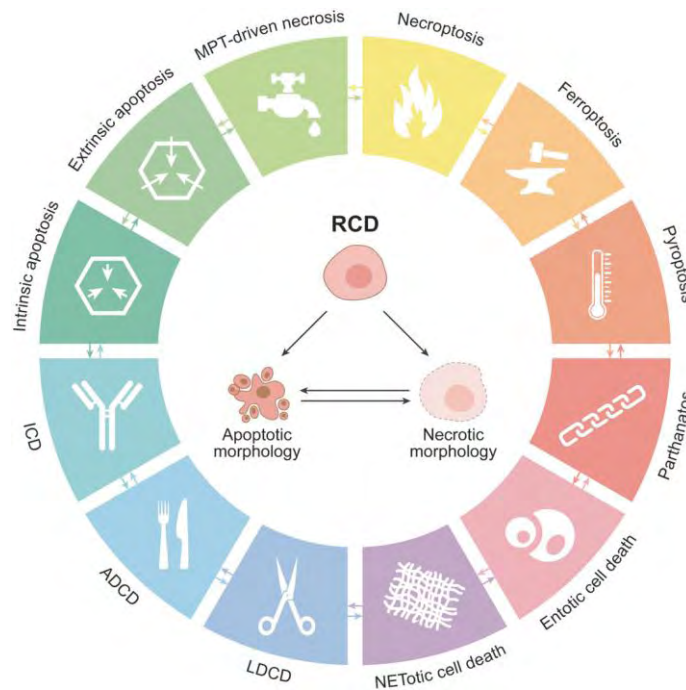
Εικόνα 10. Η siramesine προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου και επάγει την αυτοφαγία και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (Κυκλίνη D1, B1 και Rb → δείκτης κυτταρικού κύκλου, LC3 → δείκτης αυτοφαγίας, S6K και 4EBP1 → ενδιάμεσα του mTOR μονοπατιού)²²

Επίσης σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στις κυτταρικές σειρές MCF7 (καρκίνος του μαστού) και WEHI-S (ινοσάρκωμα) αποδείχθηκε ότι η siramesine προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από τον καταρράκτη κασπασών. Μάλιστα παρατηρήθηκε ότι προκαλεί αυξημένη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης, συρρίκνωση του κυττάρου και συμπύκνωση της χρωματίνης, αποδιοργάνωση της λυσοσωμικής μεμβράνης και αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species). Από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα αυτής της μελέτης είναι η αντικαρκινική δράση της, καθώς βρέθηκε ότι η per os (από του στόματος) χορήγηση της siramesine σε ζώα με ξενομοσχεύματα προκαλεί σημαντική μείωση του μεγέθους του όγκου.²³ Τέλος σε μία δημοσίευση του 2016, υποστηρίζεται ότι ο συνδυασμός siramesine και lapatinib επιτυγχάνει ποσοστό θνησιμότητας περίπου 50% σε κυτταροκαλλιέργειες MDA MB 231 και SkBr3 σε 24 ώρες . Μάλιστα αποδείχθηκε, ότι παρόλο που η ουσία lapatinib ως μονοθεραπεία επάγει την απόπτωση, ο συνδυασμός αυτών των φαρμάκων προκαλεί φερρόπτωση.²⁴ Η φερρόπτωση είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη συσσώρευση ιόντων και υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών.²⁵

Τα φυσιολογικά κύτταρα συνήθως οδηγούνται στο κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα συχνά αντιστέκονται στην σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου, εξαιτίας μεταλλάξεων που εμποδίζουν την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού. Συνεπώς είναι αναγκαία η ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων της απόπτωσης. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης των προσδετών των σίγμα υποδοχέων δεν είναι απόλυτα κατανοητός, τα δεδομένα που υπάρχουν ως σήμερα υποστηρίζουν πως η χρήση αυτής της κατηγορίας φαρμάκων αποτελεί μια νέα θεραπευτική προσέγγιση.

4. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς διατηρείται μια ισορροπία ανάμεσα στο κυτταρικό θάνατο και στην παραγωγή νέων κυττάρων. Η εξισορρόπηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από το κυτταρικό θάνατο είναι ιδιαίτερα σημαντική για την διατήρηση σταθερού αριθμού κυττάρων κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής. Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί ένα αμυντικό μηχανισμό, καθώς απομακρύνει κύτταρα τα οποία είτε έχουν υποστεί βλάβη είτε έχουν μολυνθεί από ιό. Διάφορες ασθένειες σχετίζονται με την απορρύθμιση του κυτταρικού θανάτου. Ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκίνου, ενώ ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός θάνατος σχετίζεται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Parkinson και το Alzheimer. Υπάρχουν πολλοί μοριακοί μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 11).³



Εικόνα 11. Μοριακοί μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου²⁵

Μεταξύ αυτών των μηχανισμών, η απόπτωση είναι η πιο συνηθισμένη και καλά μελετημένη μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο υποστηρίζεται πως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος συμβαίνει και μέσω μη αποπτωτικών μηχανισμών, όπως ο αυτοφαγικός θάνατος. Φυσιολογικά η αυτοφαγία αποτελεί ένα μηχανισμό ανανέωσης των κυτταρικών συστατικών, ενισχύοντας την επιβίωση των

κυττάρων ακόμη και υπό συνθήκες αστικής. Φαίνεται όμως πως η αυτοφαγία αποτελεί υπό ορισμένες συνθήκες και ένα μηχανισμό κυτταρικού θανάτου, καθώς είτε ενεργοποιείται παράλληλα με την απόπτωση, είτε σε περιπτώσεις που το κύτταρο δεν μπορεί να ενεργοποιήσει την διαδικασία της απόπτωσης.³

4.1 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

4.1.1 Εισαγωγή στην απόπτωση

Η απόπτωση, γνωστή και ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μια φυσιολογική διαδικασία που εμπλέκεται τόσο στην ανάπτυξη και την διαμόρφωση διαφόρων ιστών, π.χ. τον σχηματισμών των δαχτύλων, απομακρύνοντας κύτταρα που δεν χρειάζονται, όσο και στη απομάκρυνση κυττάρων που έχουν συσσωρεύσει βλάβες στο γονιδίωμα τους, π.χ. καρκινικά κύτταρα. Κατά την απόπτωση παρατηρούνται συγκεκριμένες μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές. Πιο συγκεκριμένα, η χρωματίνη συρρικνώνεται, το χρωμοσωμικό DNA κατατμείται και ο πυρήνας διασπάται, με αποτέλεσμα το κύτταρο να συρρικνώνεται και να διασπάται σε τμήματα που περιβάλλονται από μεμβράνη, τα οποία ονομάζονται αποπτωτικά σωματίδια. Στην επιφάνεια των αποπτωτικών σωματίων εμφανίζεται η φωσφατιδυλοσερίνη (PE), η οποία φυσιολογικά εντοπίζεται μόνο στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η φωσφατιδυλοσερίνη αποτελεί ένα από τα <<eat-me>> signals, δηλαδή τα ειδικά σήματα που αναγνωρίζουν τα φαγοκύτταρα, ώστε να απομακρύνουν τα αποπτωτικά κύτταρα.^{3,26}

4.1.2 Μηχανισμός της απόπτωσης

Η έναρξη της απόπτωσης σηματοδοτείται από την ενεργοποίηση μιας οικογένειας πρωτεασών, τις κασπάσες. Οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν στο ενεργό τους κέντρο κυστεΐνες και διασπούν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών στόχων μέσω πέψης του καρβοξυτελικού άκρου των καταλοίπων ασπαρτικού οξέος. Οι κασπάσες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) **εναρκτήριες** (κασπάση 8 και 9) και β) **εκτελεστικές** (κασπάση 3 και 7). Αρχικά συντίθενται ως ανενεργά πρόδρομα μόρια και έπειτα από πρωτεολυτική πέψη από άλλη κασπάση μετατρέπονται στην ενεργή τους μορφή. Οι εναρκτήριες κασπάσες, αφού ενεργοποιηθούν ως απόκριση στα διάφορα αποπτωτικά σήματα, πέπτουν και ενεργοποιούν τις εκτελεστικές κασπάσες. Αυτές με την σειρά τους πέπτουν και αποδομούν διάφορες πρωτεΐνες. Οι κασπάσες θεωρούνται κύριοι τελεστές της απόπτωσης, διότι μεταξύ των πρωτεϊνών-στόχων περιλαμβάνονται: α) ο αναστολέας μιας DNάσης (ICAD), οπότε ενεργοποιείται η DNάση και άρα τεμαχίζεται το χρωμοσωμικό DNA, β) πυρηνικές λαμίνες, η πέψη των οποίων οδηγεί στον κατακερματισμό του πυρήνα, γ) πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (ακτίνη, τουμπουλίνη), η πέψη των οποίων έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση του κυτταροσκελετού και τον

κατακερματισμό του κυττάρου. Σημαντικός ρυθμιστής των κασπασών είναι τα μέλη της οικογένειας IAP. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με τις κασπάσες και τις καταστέλλουν.

Εκτός από τις κασπάσες, σημαντικό ρόλο στην έναρξη της απόπτωσης κατέχει και η ισορροπία ανάμεσα στις προαποπτωτικές και στις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Πιο συγκεκριμένα, η οικογένεια Bcl-2 περιλαμβάνει πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση (αντιαποπτωτικές), όπως η Bcl-2, και πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τις κασπάσες και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο (προαποπτωτικές). Οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

α) **προαποπτωτικές πρωτεΐνες <<πολλαπλών επικρατειών>>**, δηλαδή περιλαμβάνουν τρεις επικράτειες BH (Bcl-2 Homology domains), όπως είναι οι Bax και οι Bac

β) **προαποπτωτικές πρωτεΐνες <<BH-3 μόνο>>**, καθώς διαθέτει μόνο την επικράτεια BH-3.

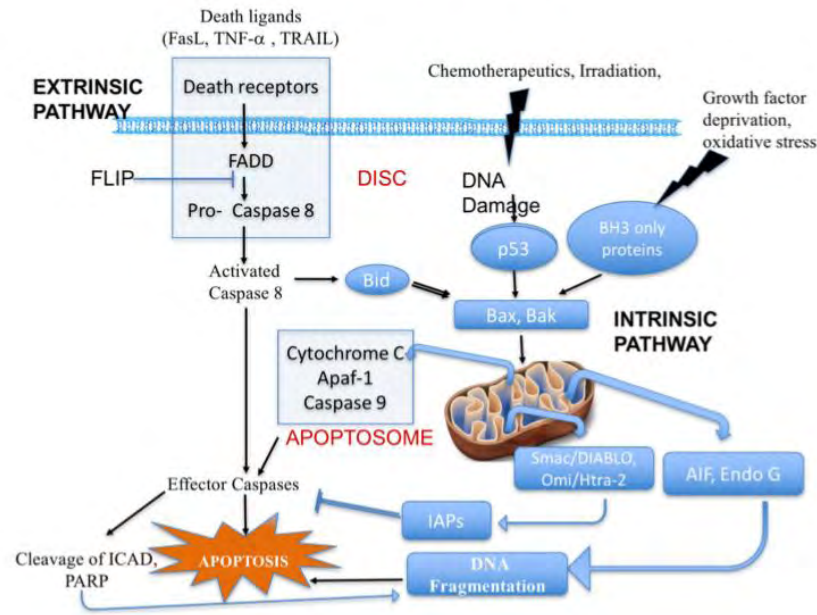
Οι δύο αυτές ομάδες προαποπτωτικών πρωτεϊνών διαφέρουν και ως προς τη λειτουργία τους. Φυσιολογικά οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες <<BH-3 μόνο>> βρίσκονται σε ανενεργή μορφή. Αντιθέτως, οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες <<πολλαπλών επικρατειών>> αναστέλλονται, διότι αλληλοεπιδρούν με μέλη της αντιαποπτωτικής ομάδας πρωτεϊνών. Εφόσον οι πρωτεΐνες <<BH-3 μόνο>> ενεργοποιηθούν από σήματα κυτταρικού θανάτου, αλληλοεπιδρούν με τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες και τις καταστέλλουν. Οπότε οι πρωτεΐνες <<BH-3 μόνο>> επάγουν την ενεργοποίηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών πολλαπλών επικρατειών. Με αυτό το τρόπο επάγεται η απόπτωση μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο συμμετέχουν και τα μιτοχόνδρια. Πιο αναλυτικά, οι ενεργοποιημένες πρωτεΐνες Bax και Bac δρουν ως ολιγομερή στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη επάγοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το κυτόχρωμα c να αλληλεπιδρά με την Araf-1, η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Στην Araf-1 προσδένεται και η εναρκτήρια κασπάση 9. Η ενεργοποιημένη κασπάση 9 με τη σειρά της ενεργοποιεί μέσω πρωτεολυτικής πέψης τις εκτελεστικές κασπάσες.^{3,26, 27}

4.1.2 Οι οδοί της απόπτωσης

Η πορεία που θα ακολουθήσει ένα κύτταρο, κυτταρική επιβίωση ή κυτταρικός θάνατος, καθορίζεται από την ταυτόχρονη δράση διάφορων σηματοδοτικών μορίων, με βάση τις ανάγκες του οργανισμού. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος επιτυγχάνεται μέσω δύο διακριτών οδών, τα οποία διαφέρουν ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν την απόπτωση, την εναρκτήρια κασπάση και τις διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαδικασία. Τα μονοπάτια αυτά διακρίνονται σε ενδογενή (intrinsic) και εξωγενή (extrinsic) (Εικόνα 12).

Το **ενδογενές** μονοπάτι ενεργοποιείται εσωτερικά σήματα, τα οποία μπορεί να οφείλονται σε βλάβες του DNA, σε μόλυνση από ιό ή και στην απουσία αυξητικών παραγόντων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι βλάβες του DNA είναι υπεύθυνες για την μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Συνεπώς καθίσταται αναγκαία η επιδιόρθωσή τους. Πιο αναλυτικά, οι βλάβες του γονιδιώματος ενεργοποιούν τις πρωτεϊνικές κινάσες ATM και Chk2, οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα p53. Μεταξύ των μορίων στόχων που ενεργοποιεί ο παράγοντας p53 είναι ο μεταγραφικός παράγοντας p21. Ο p21 με την σειρά του αναστέλλει τα σύμπλοκα Cdk2/ κυκλίνης E, με αποτέλεσμα την στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, ώστε να δοθεί στο κύτταρο ο απαραίτητος χρόνος για να επιδιορθώσει τις βλάβες. Ωστόσο, ενδέχεται ο μεταγραφικός παράγοντας p53, ταυτόχρονα με την δράση άλλων σημάτων θανάτου που δέχεται το κύτταρο, να επάγει την απόπτωση, π.χ. λόγω εκτεταμένης βλάβης. Η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορες προαποπτωτικές πρωτεΐνες << BH-3 μόνο>>, όπως οι PUMA και Noxa. Ακολουθεί η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Bak και Bax, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και η ενεργοποίηση της κασπάσης 9, όπως περιγράφηκε παραπάνω, οδηγώντας στο κυτταρικό θάνατο.

Όσον αφορά στο **εξωγενές** μονοπάτι, ενεργοποιείται από ορισμένα εκκρινόμενα πολυπεπίδια, τα οποία σηματοδοτούν τον κυτταρικό θάνατο. Τα πολυπεπίδια επάγουν την απόπτωση σε διάφορους τύπους κυττάρων μέσω πρόσδεσης σε ειδικούς υποδοχείς, οι οποίοι εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων, όπως ο επιφανειακός υποδοχέας Fas. Τα πολυπεπίδια αυτά ανήκουν στην οικογένεια των παραγόντων νέκρωσης όγκων (TNF, Tumor Necrosis Factors). Τα πολυπεπίδια, αφού προσδεθούν στον κατάλληλο υποδοχέα, αλληλεπιδρούν με διάφορα μόρια-τελεστές, τα οποία συνδέονται με την εναρκτήρια κασπάση 8 και την ενεργοποιούν. Στην συνέχεια η κασπάση 8 ενεργοποιεί μέσω πρωτεολυτικής πέψης τις εκτελεστικές κασπάσες 3 και 7 και έτσι επιτυγχάνεται η απόπτωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, απαιτείται ενίσχυση του σήματος απόπτωσης, η οποία επιτυγχάνεται μέσω πέψης και ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Bid από την κασπάση 8. Η ενεργοποίηση της Bid αυξάνει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από την μιτοχονδριακή μεμβράνη και έτσι ενεργοποιείται η εναρκτήρια κασπάση 9, οδηγώντας σε ισχυρή επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.^{3,24, 25}



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών της απόπτωσης²⁶

4.2 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

4.2.1 Εισαγωγή στην αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός αποικοδόμησης διάφορων κυτταρικών συστατικών στα λυσοσώματα. Μεταξύ αυτών είναι κυτταρικές πρωτεΐνες, συσσωματώματα πρωτεϊνών, κυτταρικά οργανίδια που έχουν υποστεί βλάβη όπως μιτοχόνδρια, ακόμη και παθογόνα που προσβάλλουν τα κύτταρα. Ο μηχανισμός αυτός είναι αρκετά συντηρημένος μεταξύ των ευκαρυωτών και είναι απαραίτητος για την διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων. Διακρίνονται τρεις τύποι αυτοφαγίας, ανάλογα με το φορτίο και την πορεία αποικοδόμησης: μακροαυτοφαγία, η μικροαυτοφαγία και η chaperone-mediated αυτοφαγία (CMA). Μεταξύ αυτών η μακροαυτοφαγία αναφέρεται απλά και ως αυτοφαγία και είναι ο πιο καλά μελετημένος μηχανισμός αυτοφαγίας.²⁸

Η αυτοφαγία χαρακτηρίζεται και ως μηχανισμός κυτταρικής επιβίωσης, καθώς συμβάλλει στην επιβίωση του κυττάρου υπό στρεσογόνες συνθήκες. Η διατροφική στέρηση, η λοίμωξη από παθογόνο μικροοργανισμό, η υποξία και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) είναι ορισμένοι παράγοντες που δημιουργούν συνθήκες stress και ενεργοποιούν τον μηχανισμό της αυτοφαγία. Μέσω της αποικοδόμησης των κυτταροπλασματικών συστατικών επιτυγχάνεται η αύξηση των αμινοξέων, των λιπιδίων, των υδατανθράκων, δηλαδή όλων των μορίων που είναι απαραίτητα για την σύνθεση νέων μακρομορίων, ώστε να καλύψει τις ενεργειακές του απαιτήσεις.²⁹ Έχει αποδειχθεί

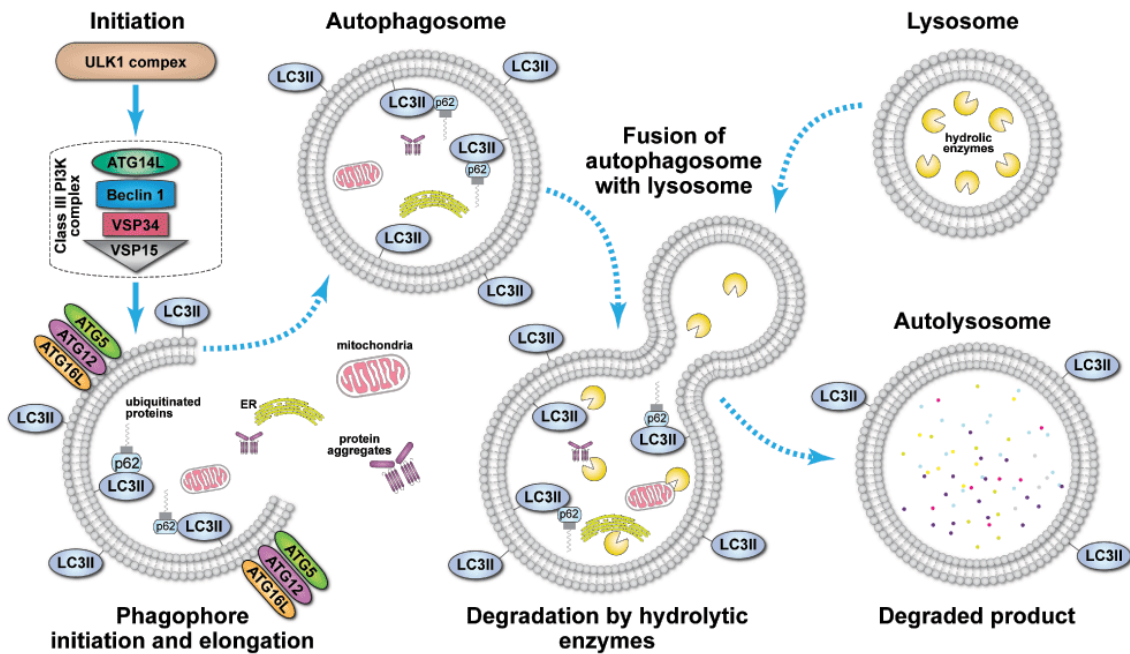
πως η αυτοφαγία εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες όπως η γήρανση και η κυτταρική διαφοροποίηση, αλλά και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις.

4.2.2 Μηχανισμός της αυτοφαγίας

Κατά την διαδικασία της αυτοφαγίας διακρίνονται τέσσερα βασικά στάδια: 1) πυρήνωση, 2) επιμήκυνση, 3) ωρίμανση και 4) αποικοδόμηση. Πρόκειται για ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο μηχανισμό, του οποίου οι τελεστές κωδικοποιούνται από τα γονίδια *AuTophaGy* (Atg). Πιο συγκεκριμένα, κατά την έναρξη της αυτοφαγίας πραγματοποιείται πυρήνωση των κυτταροπλασματικών συστατικών που προορίζονται για αποικοδόμηση από μεμβράνες απομόνωσης (isolation membrane), σχηματίζοντας έτσι μια δομή γνωστή ως φαγοφόρο. Στην ζύμη, η έναρξη της αυτοφαγίας απαιτεί το σχηματισμό PAS (preautophagosomal structure), στο οποίο συγκεντρώνονται όλα τα ένζυμα για την δημιουργία των μεμβρανών απομόνωσης. Η δομή PAS δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί σε κύτταρα θηλαστικών. Για το σχηματισμό του φαγοφόρου απαιτούνται δύο συμπλέγματα πρωτεϊνών. Το πρώτο πρωτεϊνικό σύμπλοκο αποτελείται από : α) την φωσφατιδυλινοσιτόλη-3-κινάση τάξης III *Vps34*, η οποία φωσφορυλιώνει την φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns) σε PtdIns-3-phosphate (PI3P), ένα απαραίτητο βήμα για τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Επίσης αποτελείται από β) *Beclin1* (*Atg6* στην δροσόφιλα και *Atg6/Vps30* στην ζύμη) και γ) *Vps15/p150*³⁰. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν και με άλλα μόρια που έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν θετικούς ρυθμιστές της αυτοφαγίας, όπως η *Ambra1*, *UVRAG* (UV irradiation resistance-associated gene) και η *Barkor* (*Atg14L* στην ζύμη και στην δροσόφιλα)³¹. Το δεύτερο πρωτεϊνικό σύμπλοκο που είναι απαραίτητο για την έναρξη της αυτοφαγίας περιλαμβάνει την κινάση σερίνης /θρεονίνη *ATG1* (*Ulk1* and *2* στα θηλαστικά), η οποία αλληλεπιδρά με άλλες τρεις πρωτεΐνες την *Atg13*, *FIP200* (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa, *Atg17* στην ζύμη) και την *ATG101*.

Στην συνέχεια οι μεμβράνες απομόνωσης επιμηκύνονται, ώστε να σχηματίσουν πολυμεμβρανικά κυστίδια, γνωστά ως αυτοφαγοσώματα. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν δύο συστήματα σύζευξης που ομοιάζουν με αυτό της ουβικιτίνης (ubiquitin-like conjugation pathways), το σύστημα σύζευξης *ATG12* και το σύστημα σύζευξης *ATG8* (*LC3* στα θηλαστικά). Και στα δύο συστήματα συμμετέχει η *ATG7* και δρα ως *E1-LIKE* ένζυμο ενεργοποίησης. Στο πρώτο σύστημα, η *ATG12* μεταφέρεται στη *ATG10*, *E2* ένζυμο, και τελικά συνδέεται ομοιοπολικά με την *ATG5*. Το σύμπλοκο αυτό συνδέεται με την *ATG16* και σχηματίζεται ένα μεγαλύτερο σύμπλοκο, το *ATG12-ATG5-ATG16*. Στο δεύτερο σύμπλοκο, η *LC3* (microtubule-associated protein light chain 3) πέπτεται από την *ATG4*, αφήνοντας ελεύθερο ένα C- τελικό κατάλοιπο γλυκίνης, στο οποίο μπορεί να συνδεθεί η λιπιδική φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE). Έτσι η *LC3* μετατρέπεται στην ενεργή κυτοσολική της μορφή *LC3-I*. Στην συνέχεια η *LC3-I* μετατρέπεται σε *LC3-II* μετά από αλληλεπίδραση με την *PE* και τις *ATG7* και *ATG3*, *E2* ένζυμο του συστήματος.

Η λιπιδίωση της LC3 επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με την μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος, ένα γεγονός απαραίτητο για την ωρίμανσή του. Τα αυτοφαγοσώματα τελικά συντήκονται με τα λυσοσώματα του κυττάρου, σχηματίζοντας τα αυτοφαγολυσοσώματα. Υποστηρίζεται πως τα αυτοφαγοσώματα αρχικά συντήκονται με ενδοσώματα και σχηματίζουν αμφισώματα πριν την σύντηξη με τα λυσοσώματα. Ανεξαρτήτως σχηματισμού αμφισωμάτων, τα εγκλωβισμένα κυτταροπλασματικά συστατικά καταλήγουν στα λυσοσώματα, όπου αποδομούνται από λυσοσωμικά ένζυμα, μεταξύ των οποίων είναι και η LC3. Τα προϊόντα της λύσης, όπως διάφορα αμινοξέα, υδατάνθρακες και λιπίδια, χρησιμοποιούνται για την σύνθεση νέων μακρομορίων³².



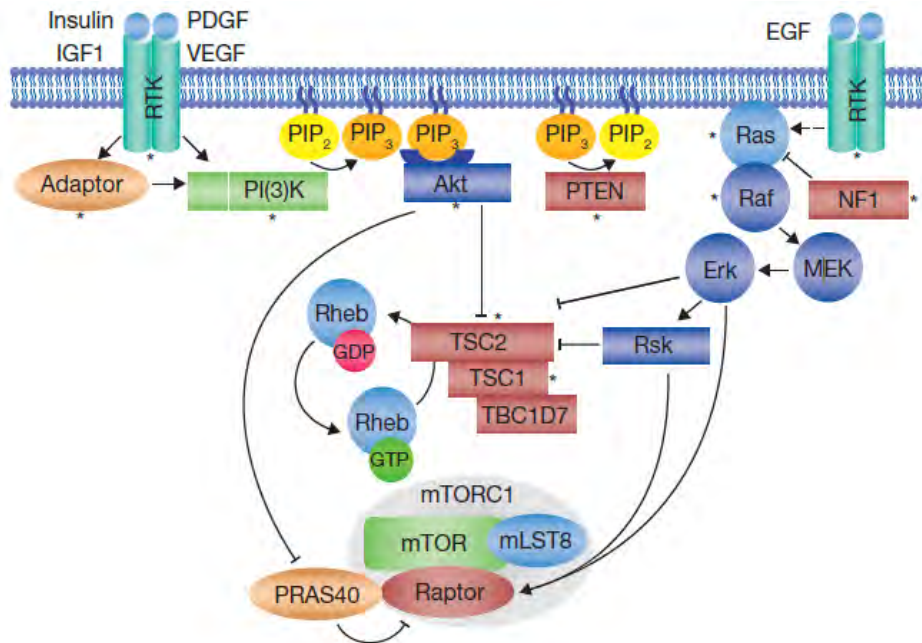
Εικόνα 13. Η διαδικασία της αυτοφαγίας³³

4.2.3 Ρύθμιση της αυτοφαγίας μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR

Το mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, οι οποίες αφορούν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, αλλά και διάφορες στρεσογόνες συνθήκες όπως διατροφική στέρηση και υποξία. Πρόκειται για μια εξελικτικά συντηρημένη κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία αποτελείται από δύο σύμπλοκα mTORC1 και mTORC2, τα οποία έχουν διακριτές λειτουργίες. Μεταξύ των

διάφορων τελεστών που συμμετέχουν στην ρύθμιση της αυτοφαγίας, το σύμπλοκο mTORC1, αλλά όχι το mTORC2, φαίνεται να έχει καταλυτικό ρόλο στην απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες, οι οποίες πυροδοτούν την αυτοφαγία.

Έχει αποδειχθεί πως η αναστολή του μονοπατιού mTOR επάγει την αυτοφαγία, ενώ η ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1 την αναστέλλει. Το σύμπλοκο mTORC1, όπως αναφέρθηκε, δέχεται σήματα από πολλές ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες. Η κύρια ορμόνη που αντιπροσωπεύει την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου είναι η ινσουλίνη. Η ινσουλίνη και οι λοιποί αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν μέσω των υποδοχέων τους δύο μονοπάτια που εμπλέκονται στη ενεργοποίηση του μονοπατιού mTORC1: 1) PI3K–Akt και 2) Ras–Erk. Πιο αναλυτικά, η PI3K ενεργοποιείται και παράγει PIP₃ (τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη), με αποτέλεσμα την στρατολόγηση της AKT (ή αλλιώς PKB – πρωτεϊνική κινάση Β) στην πλασματική μεμβράνη. Παρομοίως, η Ras ενεργοποιεί ένα καταρράκτη κινασών, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της ERK. Η AKT και η ERK φωσφορυλιώνουν το tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), εμποδίζοντας έτσι τον ετεροδιμερισμό με το σύμπλοκο TSC1. Το TSC2 δρα στο mTORC1 μέσω της Rheb. Η Rheb (ομόλογη της Ras κυρίως στον εγκέφαλο) είναι μια μικρή GTPase, η οποία όταν είναι συνδεδεμένη με GTP, ενεργοποιεί το mTORC1. Συνεπώς οι AKT και ERK αναστέλλουν το TSC2, ενισχύοντας την συσσώρευση της Rheb-GTP, και έτσι ενεργοποιείται το mTORC1. Συνεπώς σε συνθήκες διατροφικής στέρησης, όταν δεν εκκρίνεται ινσουλίνη και άλλοι αυξητικοί παράγοντες, το mTORC1 αναστέλλεται και επάγεται η αυτοφαγία.³⁴



Εικόνα 14. Αναστολή του mTORC1 από τα μονοπάτια PI3K–Akt και Ras–Erk.³⁴

Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του mTORC1 μονοπατιού έχει η AMPK (5'-AMP-activated protein kinase), η οποία ενεργοποιείται υπό χαμηλές ενεργειακά συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, υπό συνθήκες έλλειψης γλυκόζης ο λόγος AMP/ATP αυξάνεται με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της AMPK. Η AMPK αναστέλλει το mTORC1 μέσω τριών μηχανισμών: α) φωσφορυλιώνει τη TSC2, αναστέλλοντας τον ετεροδιμερισμό της, β) φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την Raptor, ένα συστατικό του συμπλόκου mTORC1 και γ) φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ULK1 (unc-51-like kinase 1). Και η ULK1 φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την Raptor, με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του mTORC1 και την ενίσχυση της αυτοφαγίας.³⁵ Όσον αφορά στο σύμπλοκο mTORC2, υποστηρίζεται ότι ρυθμίζει με έμμεσο τρόπο την αυτοφαγία, καθώς το PI3K σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιεί το mTORC2, το οποίο φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση AKT. Η κινάση AKT με την σειρά της ενεργοποιεί το mTORC1. Το ενεργοποιημένο mTORC1 φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί το σύμπλοκο ULK1, το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της αυτοφαγίας.

Αντιθέτως, υπό συνθήκες αφθονίας θρεπτικών, το σύμπλοκο mTORC1 ενεργοποιείται, μέσω των μονοπατιών που περιγράφονται παραπάνω, και επάγει διάφορες αναβολικές διεργασίες, π.χ. την σύνθεση των πρωτεϊνών. Το mTORC1 φωσφορυλιώνει συγκεκριμένα τη p70S6K1, μία κινάση σερίνης/ θρεονίνης, η οποία φωσφορυλιώνει την S6 (40S ribosomal protein S6), αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα μετάφρασης. Ένας άλλος στόχος του mTORC1 είναι ο παράγοντας 4EBP1, ο οποίος συνδέεται και αναστέλλει τον παράγοντα έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης eIF4E. Το mTORC1 φωσφορυλιώνει τον παράγοντα 4EBP1, επιτρέποντας έτσι την αποδέσμευσή του από το eIF4E και την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης.³⁶

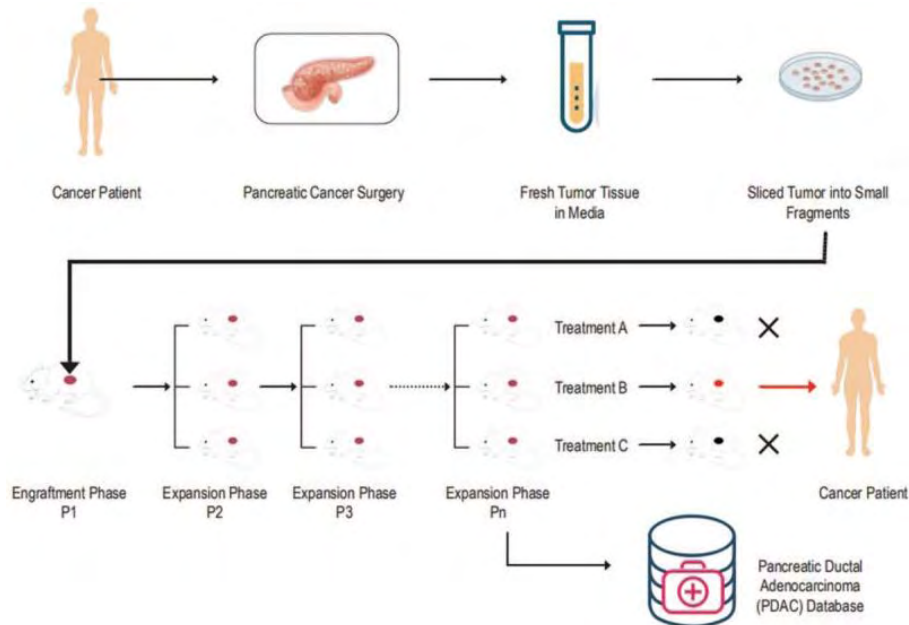
5. Ανάπτυξη PDX

5.1 Μέθοδος ανάπτυξης PDX

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ποσοστό θνησιμότητας εξαιτίας του καρκίνου του παγκρέατος αυξάνεται ραγδαία και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η διάγνωση της νόσου στην πλειονότητα των περιπτώσεων γίνεται σε προχωρημένο στάδιο, όταν πλέον η χειρουργική αφαίρεση του όγκου δεν είναι εφικτή. Ωστόσο, το χαμηλό ποσοστό επιβίωσης είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού τόσο της φτωχής πρόγνωσης όσο και της ανεπαρκούς θεραπευτικής στρατηγικής. Συνεπώς, για την πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση της νόσου, είναι αναγκαία η κατανόηση σε μεγαλύτερο βαθμό της βιολογίας του καρκίνου, η έγκαιρη διάγνωση, η πρόβλεψη για απόκριση σε διάφορα φάρμακα και πιο ασφαλείς θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Τα ξενομοσχεύματα προερχόμενα από ασθενείς (Patient-Derived Xenografts, PDX) αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο προ-κλινικό εργαλείο, διότι προσομοιάζουν σε σημαντικό βαθμό την ετερογένεια και το μικροπεριβάλλον του πρωτεύοντος όγκου. Αν και η μεθοδολογία ανάπτυξης ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς πιθανόν να διαφέρει στις διάφορες ερευνητικές ομάδες, τα βασικά στάδια για την ανάπτυξη τους είναι τα εξής³⁷:

1. Χειρουργική αφαίρεση του πρωτογενούς ή και του μεταστατικού όγκου
2. Τεμαχισμός του όγκου
3. Μεταμόσχευση του όγκου σε ποντίκια ως μικρά κομματάκια ή και εναιώρημα single-cell, είτε μεμονωμένων, είτε αναμειγμένα με ινοβλάστες και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα
4. Αφού σχηματιστεί το ξενομόσχευμα, αφαιρείται ο όγκος και μεταμοσχεύεται σε άλλο ποντίκι (πέραςμα). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου συγκεντρωθεί η απαραίτητη ποσότητα γενετικού υλικού, ώστε να αξιοποιηθεί σε περαιτέρω μελέτες.



Εικόνα 15. Ανάπτυξη των PDX μοντέλων³⁷

Καθοριστική σημασία για την ανάπτυξη των PDX έχει η τοποθεσία της μεταμόσχευσης των καρκινικών κυττάρων. Η μεταμόσχευση γίνεται είτε υποδόρια είτε ορθοτοπικά, δηλαδή στο όργανο από το οποίο προέρχεται ο πρωτογενής όγκος. Αν και η υποδόρια εμφώλευση εφαρμόζεται ευρέως, καθώς εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως η ευκολία της τεχνικής και τα υψηλά ποσοστά επιτυχής ανάπτυξης ξενομοσχευμάτων, έρευνες υποστηρίζουν πως τα ορθοτοπικά καρκινικά μοντέλα είναι πιο αντιπροσωπευτικά των όγκων που αναπτύσσονται στον ανθρώπινο οργανισμό σε σύγκριση με τα καρκινικά μοντέλα που προέκυψαν από υποδόρια μεταμόσχευση. Παρ' όλο που η ορθοτοπική μεταμόσχευση είναι πρακτικά πιο δύσκολη και τα ποσοστά επιτυχής ανάπτυξης ορθοτοπικών ξενομοσχευμάτων χαμηλά, τα ζωικά καρκινικά μοντέλα που προκύπτουν προσομοιάζουν τον καρκινικό πρότυπο του ασθενή, διότι αναπτύσσονται στο ίδιο μικροπεριβάλλον με τον πρωτογενή όγκο, οπότε αναπτύσσονται παρόμοιες αλληλεπιδράσεις, εμφανίζουν τα ίδια μεταστατικά πρότυπα και παρόμοια απόκριση υπό την επίδραση διάφορων αντικαρκινικών φαρμάκων. Επιπλέον, με βάση την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, το γενετικό προφίλ μεταξύ του πρωτογενούς όγκου και το ορθοτοπικού μοντέλου εμφανίζουν ποσοστό ομοιότητας 93%-99%. Σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη PDX έχει και η κατάλληλη επιλογή στελέχους ποντικών, στα οποία θα γίνει η μεταμόσχευση του όγκου. Τα πιο δημοφιλή ανοσοκατασταλμένα στελέχη ποντικών που χρησιμοποιούνται είναι τα ακόλουθα: nude, SCID (severe combined immunodeficiency disorder), (NOD)-SCID (non-obese diabetic) και NSG (NOD/SCID/IL2λ-receptor null). Όσο πιο υψηλός είναι ο βαθμός ανοσοκαταστολής, τόσο μειώνονται οι πιθανότητες να απορριφθεί το μόσχευμα και επίσης αυξάνεται ο ρυθμός ανάπτυξης του ξενομοσχεύματος.³⁸

5.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των PDX

Τα ξενομοσχεύματα προερχόμενα από ασθενείς δεν είναι τα μοναδικά μοντέλα που στοχεύουν στην προσομοίωση του καρκινικού προτύπου. Γενικά, έχουν αναπτυχθεί πολλά ζωικά πρότυπα καρκίνου, όπως αυτά που αναπτύχθηκαν από εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές (CCLs) ή και μοντέλα καρκίνου από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια (GEMMs). Ωστόσο, τα μοντέλα αυτά εμφανίζουν σημαντικά μειονεκτήματα συγκριτικά με τα PDX. Για παράδειγμα, οι εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές σταδιακά διαφοροποιούνται κατά τα διαδοχικά περάσματα, με αποτέλεσμα να έχει μικρή ομοιότητα με τον όγκο από τον οποίο έχουν προέλθει.

Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα των PDX, αναφορικά με τα υπόλοιπα μοντέλα, έχουν ήδη επισημανθεί παραπάνω, όπως το γεγονός ότι διατηρούν την ετερογένεια στο εσωτερικό του όγκου, διότι ο όγκος δεν αποτελείται αποκλειστικά από τα καρκινικά κύτταρα, αλλά περιέχει επίσης ινοβλάστες, αιμοφόρα αγγεία, κύτταρα του ανοσοποιητικού κ.α. Επιπλέον τα PDX διατηρούν τα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του πρωτογενούς όγκου, όπως το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης, το πρότυπο μεταλλάξεων και το μεταστατικό δυναμικό και παραμένουν σταθερά κατά τα διαδοχικά περάσματα από ζώο σε ζώο. Τέλος, υποστηρίζεται ότι τα PDX αποτελούν αποτελεσματικό προ-κλινικό εργαλείο, διότι σύμφωνα με έρευνες παρατηρείται σημαντική ομοιότητα ανάμεσα στην φαρμακολογική απόκριση σε διάφορους θεραπευτικούς παράγοντες και στην κλινική απόκριση του ασθενούς. Το γεγονός αυτό δίνει τη δυνατότητα πρόβλεψης της ευαισθησίας ή της ανθεκτικότητας του ασθενούς σε μία φαρμακευτική αγωγή, με βάση την απόκριση που εκδηλώνουν τα PDX στην ίδια αγωγή, εξυπηρετώντας την εξατομικευμένη θεραπεία. Και έτσι τα PDX μοντέλα συμμετέχουν ταυτόχρονα στην ανίχνευση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.

Παρ' όλο που η έρευνα σχετικά με τα PDX μοντέλα λαμβάνει χώρα περίπου τριάντα χρόνια, υπάρχουν ακόμη μερικοί περιορισμοί, οι οποίοι δεν έχουν αντιμετωπιστεί. Πιο αναλυτικά, το κυριότερο μειονέκτημα των PDX μοντέλων είναι ότι απαιτείται ένα σημαντικό χρονικό διάστημα, περίπου 4-8 μήνες, για την ανάπτυξη του PDX μοντέλου. Το χρονικό αυτό διάστημα είναι ιδιαίτερα κρίσιμο για τους ασθενείς, λαμβάνοντας υπόψιν πως ποσοστό 5ετής επιβίωσης για όσους νοσούν από καρκίνο του παγκρέατος είναι μόνο 9%. Επιπλέον η πιθανότητα αποτυχίας ανάπτυξης ξενομοσχεύματος είναι πολύ υψηλή. Η χρονική καθυστέρηση και αβεβαιότητα ανάπτυξης PDX μοντέλων αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για την αξιοποίηση τους στον τομέα της εξατομικευμένης θεραπείας. Εξίσου σημαντικό μειονέκτημα είναι η χρήση ανοσοκατασταλμένων ζώων. Όπως αναφέρθηκε πρωτίτερα, η χρήση τέτοιων στελεχών εξυπηρετεί την αμεσότερη ανάπτυξη του ξενομοσχεύματος και την μείωση της πιθανότητας απόρριψής του. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά δεν επιτρέπουν την εφαρμογή μια ολόκληρης κατηγορίας φαρμάκων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα,

π.χ. ανοσορυθμιστές και πιθανόν να εμφανίζουν διαφορετική θεραπευτική απόκριση. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η χρήση στελεχών ζώων με ανοσοποιητικό σύστημα παρόμοιο με το ανθρώπινο (εξανθρωπισμένα μοντέλα). Παρόλο που έχει τονιστεί ότι ο όγκος παραμένει σταθερός κατά τα διαδοχικά περάσματα, από ένα πέρασμα και μετά το ανθρώπινο στρώμα σταδιακά αντικαθίσταται από το στρώμα των ζώων, αλλά δεν μπορεί να καθοριστεί με ακρίβεια ο αριθμός των περασμάτων που παραμένει σταθερός. Συνεπώς η απόκριση του όγκου σε θεραπευτικούς παράγοντες που στοχεύουν στο στρώμα, όπως οι αντιαγγειογόνοι παράγοντες, πιθανόν να διαφέρει. Τέλος, η ποσότητα του αρχικού όγκου που μεταμοσχεύεται είναι πολύ μικρή και πιθανόν να μην είναι αντιπροσωπευτική της ετερογένειας του πρωτογενούς όγκου, οπότε είναι απαραίτητο να γίνεται ιδιαίτερα προσεκτική επεξεργασία και ομογενοποίηση του πρωτογενούς όγκου πριν την εμφύτευσή τους στα ζώα.^{38,39}

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, τα μοντέλα PDX αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο της σύγχρονης ογκολογίας, καθώς φαίνεται να έχουν πολλά εφαρμογές, όπως η ανάπτυξη νέων φαρμάκων, η ανάπτυξη βιοδεικτών και η συμμετοχή σε εξατομικευμένες στρατηγικές ιατρικής. Ιδιαίτερα σε επιθετικούς τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του παγκρέατος, για τον οποίο υπάρχουν ελάχιστοι διαθέσιμοι βιοδείκτες και χημικοθεραπευτικοί παράγοντες. Προς το παρόν εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένα κρίσιμα ζητήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν, όπως η ανάπτυξη μοντέλων PDX από διαφορετικούς τύπους καρκίνου, η μείωση του χρόνου ανάπτυξης κ.ά.

6. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι στα πλαίσια της διερεύνησης του μηχανισμού δράσης της siramesine, ενός αγωνιστή των σίγμα 2 υποδοχέων, να μελετήσουμε τον τύπο του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την ουσία σε ξενομοσχεύματα προερχόμενα από πρωτογενή όγκο.

7. Πειραματική διαδικασία | Υλικά και Μέθοδοι

7.1 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από ιστό

Η λύση των όγκων είναι απαραίτητο βήμα για την απομόνωση του συνόλου των πρωτεϊνών στα υπό μελέτη δείγματα, ώστε στην συνέχεια να διαχωριστούν με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Η λύση των ιστών έγινε με διάλυμα πρωτεϊνικής εκχύλισης RIPA (Radioimmunoprecipitation assay - RIPA BUFFER 10X, Cell Signaling #9806S), στο οποίο προστέθηκαν αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών PI (Phosphate inhibitors 100X Cell Signaling, 58725). Η χρήση των αναστολέων των πρωτεασών στοχεύει στο να μην καταστραφούν οι πρωτεΐνες του δείγματος και αντίστοιχα η χρήση των αναστολέων φωσφατασών αφορά τις φωσφορυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: Αρχικά ο ιστός ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας και τεμαχίζεται σε πολύ μικρά κομμάτια. Στην συνέχεια προστίθεται το διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών (lysis buffer). Για κάθε 0,05gr ιστού προστίθεται 400 μl RIPA 1X. Το μίγμα ομογενοποιείται (5 κύκλοι του 1 min/1 min ηρεμία ανάμεσα σε κάθε κύκλο, Wise Stir HS-30E, Witeg). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 min, ενώ ανά πέντε λεπτά απαιτείται περιδίνηση των δειγμάτων. Μετά την επώαση, τα δείγματα υποβάλλονται σε κατεργασία με υπερήχους (40 % amplitude, 10 κύκλοι των 5 sec/1 min ηρεμία ανάμεσα σε κάθε κύκλο, sonicator UP400-S, Hielscher). Καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας ο ιστός διατηρείται σε πάγο. Τέλος γίνεται φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 30 min στους 4°C και συλλέγεται το υπερκείμενο. Οι φυγοκεντρήσεις συνεχίζονται, έως ότου το υπερκείμενο είναι διαυγές και δεν παρατηρείται πλέον ίζημα.

7.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

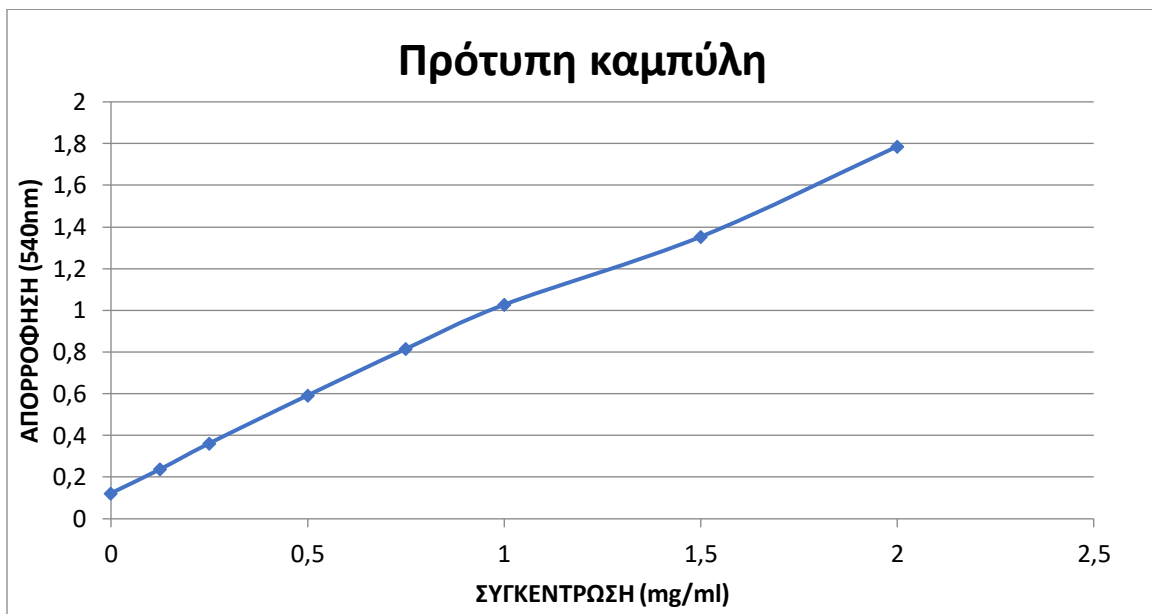
Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των λυμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Γενικά η μέθοδος Bradford αποτελεί μια μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της συνολικής πρωτεΐνης ενός δείγματος. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον σχηματισμό ενός συμπλόκου της πρωτεΐνης του δείγματος και της χρωστικής του αντιδραστηρίου. Εάν δημιουργηθεί αυτό το σύμπλοκο, παρατηρείται αλλαγή χρώματος του αντιδραστηρίου. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης πραγματοποιείται με φωτομέτρηση στα 540 nm.⁴⁰

Αρχικά η διαδικασία περιλαμβάνει την δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης βασισμένη σε διαλύματα πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης, όπως η αλβουμίνη. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε ένα ειδικό kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit της εταιρίας ThermoScientific, Cat.Number 23227). Η αρχική συγκέντρωση αλβουμίνης είναι 2 mg/ml. Σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων γίνονται διαδοχικές αραιώσεις ώστε να προκύψουν οι συγκεντρώσεις 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125 και 0 mg/ml.

Πίνακας 2. Μετρήσεις για Bradford

1o well	2 mg/ml	25μl αλβουμίνη με συγκέντρωση 2mg/ml
2o well	1,5 mg/ml	$C1 * V1 = C2 * V2$ $2\text{mg/ml} * V1 = 1,5 \text{ mg/ml} * 140 \mu\text{l}$ $V1 = 105\mu\text{l}$ άρα 105μl από το stock (αλβουμίνης) και (140-105) 35μl του Lysis Buffer.
3o well	1mg/ml	$1,5\text{mg/ml} * V1 = 1 \text{ mg/ml} * 120 \mu\text{l}$ $V1 = 80\mu\text{l}$ άρα 80μl από το προηγούμενο well και (120-80) 40μl του Lysis Buffer.
4o well	0,75 mg/ml	$1\text{mg/ml} * V1 = 0,75 \text{ mg/ml} * 100 \mu\text{l}$ $V1 = 75\mu\text{l}$ άρα 75μl από το προηγούμενο well και (100-75) 25μl του Lysis Buffer.
5o well	0,5 mg/ml	$0,75\text{mg/ml} * V1 = 0,5 \text{ mg/ml} * 90 \mu\text{l}$ $V1 = 60\mu\text{l}$ άρα 60μl από το προηγούμενο well και (90- 60) 30μl του Lysis Buffer.
6o well	0,25 mg/ml	$0,5\text{mg/ml} * V1 = 0,25 \text{ mg/ml} * 60\mu\text{l}$ $V1 = 30\mu\text{l}$ άρα 30μl από το προηγούμενο well και (60-30) 30μl του Lysis Buffer.
7o well	0,125 mg/ml	$0,25\text{mg/ml} * V1 = 0,125 \text{ mg/ml} * 40 \mu\text{l}$ $V1 = 20\mu\text{l}$ άρα 20μl από το προηγούμενο well και (40-20) 20μl του Lysis Buffer.
8o well	0mg/ml	25μl Lysis Buffer

Οι αραιώσεις γίνονται με PBS 1X. Στην συνέχεια σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 200 μl Working Reagent και πραγματοποιείται καλή ανάδευση. Το Working Reagent παρασκευάζεται με ανάμειξη των διαλυμάτων Reagent A (Cat. Number 23228) και Reagent B (Cat. Number 1859078) που περιέχονται στο kit με αναλογία 50/1. Στην συνέχεια γίνεται επώαση του μικροπλακιδίου 96 θέσεων στους 37°C για 30min, ακολουθεί ανάδευση στην μπαλαρίνα για 5min και τέλος φωτομέτρηση στα 540 nm. Με βάση τις τιμές που λαμβάνουμε από την φωτομέτρηση της αλβουμίνης, δημιουργείται η αντίστοιχη πρότυπη καμπύλη.



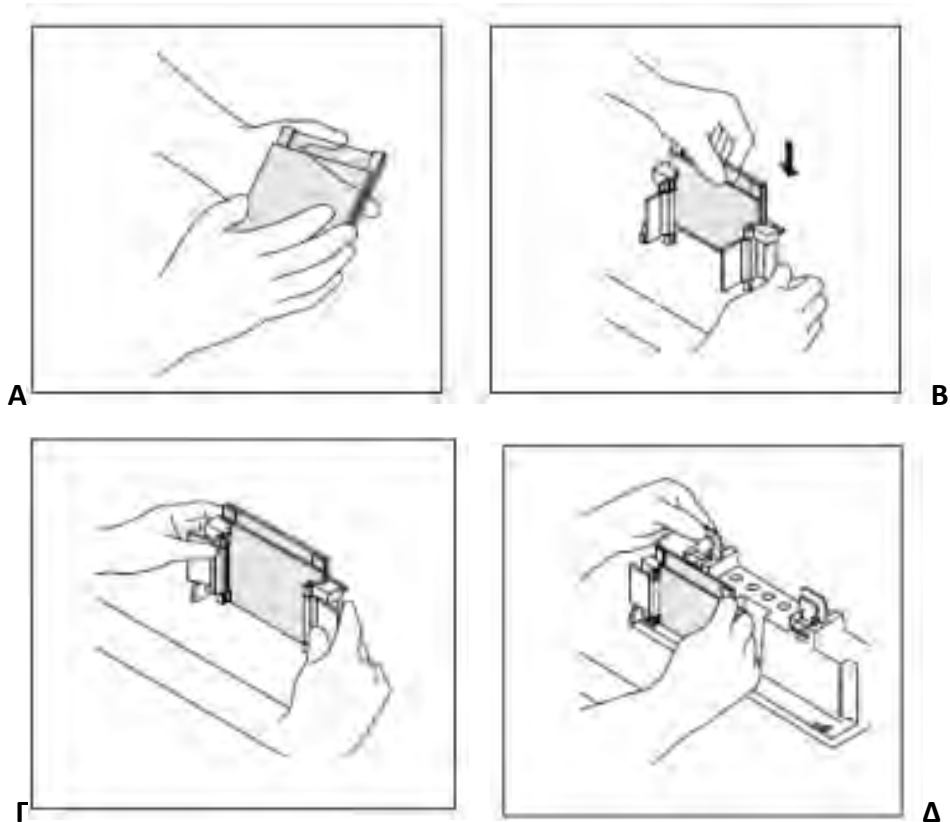
Εικόνα 16. Πρότυπη καμπύλη

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων αρχικά απαιτείται αραιώση των δειγμάτων σε αναλογία 1/5. Η αραιώση γίνεται με PBS 1X, δηλαδή 5μl δείγματος και 20μl PBS 1X. Η διαδικασία που ακολουθείται στην συνέχεια είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται παραπάνω. Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης και των αποτελεσμάτων φωτομέτρησης των δειγμάτων, υπολογίζεται η ποσότητα του δείγματος που αντιστοιχεί σε 25μg πρωτεΐνης.

7.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (western blot) είναι μια ποιοτική και ποσοτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Αρχικά γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης γίνεται με τη χρήση αντισωμάτων. Αρχικά η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, ειδικό για την υπό μελέτη πρωτεΐνη και αφού απομακρυνθεί το ειδικό αντίσωμα προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται στο πρωτογενές αντίσωμα. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της υπό μελέτη πρωτεΐνης.⁴¹ Η διαδικασία που ακολουθήθηκε και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

1. Συναρμολόγηση συσκευής για τα πήκτώματα.



Εικόνα 17. Αναπαράσταση της συναρμολόγησης⁴²

2. Παρασκευή των πηκτωμάτων. Κάθε πήκτωμα αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτώματα. Το ανώτερο πήκτωμα αποτελεί το πήκτωμα επιστοιίβαξης (Stacking) και το κατώτερο τμήμα αποτελεί το πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving). Το πήκτωμα επιστοιίβαξης εξυπηρετεί στην συμπύκνωση των πρωτεϊνών σε μια μικρή ζώνη, ώστε να εισέρχονται ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Η πυκνότητα του πηκτώματος επιστοιίβαξης είναι πάντα 5%, ενώ του πηκτώματος διαχωρισμού εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Η πυκνότητα του πηκτώματος διαχωρισμού αυξάνεται όσο μειώνεται το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Τα υλικά που απαιτούνται για την παρασκευή των πηκτωμάτων φαίνονται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Υλικά για τα πηκτώματα⁴⁰

Percent Gel	DDI H ₂ O (ml)	30% Degassed		*Gel Buffer (ml)	10% w/v SDS (ml)	
		Acrylamide/Bis (ml)				
4%	6.1	1.3		2.5	0.1	
5%	5.7	1.7		2.5	0.1	
6%	5.4	2.0		2.5	0.1	
7%	5.1	2.3		2.5	0.1	
8%	4.7	2.7		2.5	0.1	
9%	4.4	3.0		2.5	0.1	Resolving Gel:
10%	4.1	3.3		2.5	0.1	50 μl 10% APS and 5 μl TEMED
11%	3.7	3.7		2.5	0.1	Stacking Gel:
12%	3.4	4.0		2.5	0.1	50 μl 10% APS and 10 μl TEMED
13%	3.1	4.3		2.5	0.1	
14%	2.7	4.7		2.5	0.1	
15%	2.4	5.0		2.5	0.1	
16%	2.1	5.3		2.5	0.1	
17%	1.7	5.7		2.5	0.1	

* Resolving Gel Buffer - 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

* Stacking Gel Buffer - 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Το APS (Ammonium Persulfate) και το TEMED (N,N,N,N- τετραμέθυλο - 1,2 διαμινο - αιθάνιο - Sigma, BCBV7969) μπαίνουν πάντα τελευταία καθώς επιταχύνουν τον πολυμερισμό.

APS (Serva, 13375.01): 0,1gr APS σε 10ml dH₂O

30% Ακρυλαμίδη (Serva, 10687.01)

Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού και αφού πήξει έπειτα από 20-30 λεπτά προστίθεται το πήκτωμα επιστοιίβαξης. Μόλις προστεθεί το πήκτωμα επιστοιίβαξης τοποθετούνται και τα ειδικά χτενάκια που θα δημιουργήσουν τις θέσεις (πηγαδάκια), όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Στην συνέχεια αφήνεται να πήξει καλά.⁴⁰

3. Προετοιμασία δειγμάτων. Σε μικρά σωληνάκια τοποθετείται η ποσότητα δείγματος ώστε να περιέχονται 25μg πρωτεΐνης, η ανάλογη ποσότητα PBS 1X και διάλυμα φόρτωσης (1/3 του συνολικού όγκου δείγματος). Οι ποσότητες αυτές υπολογίζονται

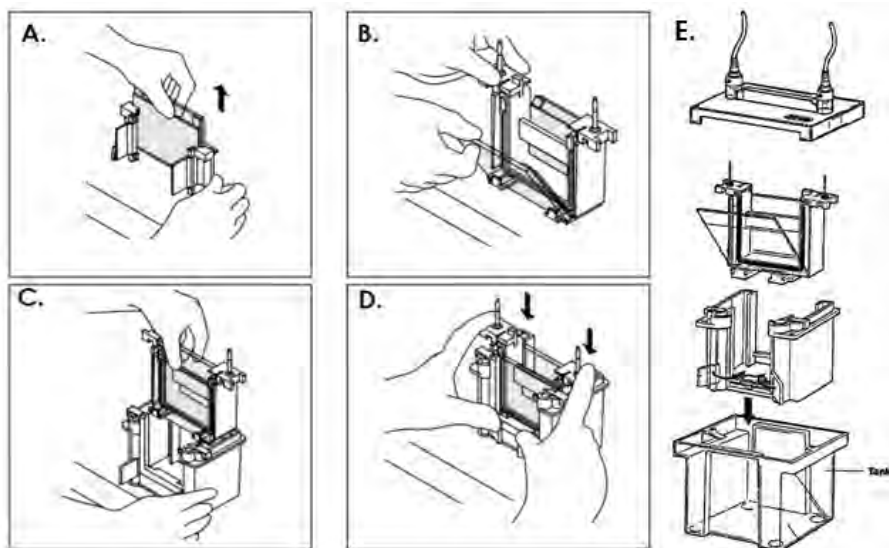
με βάση την πρότυπη καμπύλη. Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την παραγωγή του διαλύματος φόρτωσης φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια για την προετοιμασία των δειγμάτων

Αντιδραστήρια	μl
Γλυκερόλη	400
0,5M Tris-HCl pH 6.8	100
Bromophenol Blue 0,2 w/v	100
SDS 20% w/v	100
B- μερκαπτοαιθανόλη	100

Η γλυκερόλη που περιέχεται στο διάλυμα φόρτωσης είναι παχύρρευστη και βοηθάει τα δείγματα να βυθιστούν στα πηγαδάκια. Το Tris-HCl 0,5M (ChemCruz-Santa Cruz Biotechnology Inc, LOT: A0818) λειτουργεί ως ρυθμιστικό διάλυμα διατηρώντας το pH σταθερό και την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Η χρωστική μπλέ της βρωμοφαινόλης (Bromophenol Blue - SIGMA, B0126-25G) βοηθάει την παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης. Η β-μερκαπτοαιθανόλη (Merck, 2966) διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και το SDS (απορρυπαντικό) αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Αφού τα δείγματα προετοιμαστούν, θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά, προκειμένου να ολοκληρωθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Μετά την θέρμανση τα δείγματα τοποθετούνται στο πάγο για να υγροποιηθούν οι υδρατμοί.⁴⁰

- Εφόσον έχουν πήξει καλά τα πηκτώματα, απομακρύνονται τα ειδικά χτενάκια και η συσκευή του πηκτώματος μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.



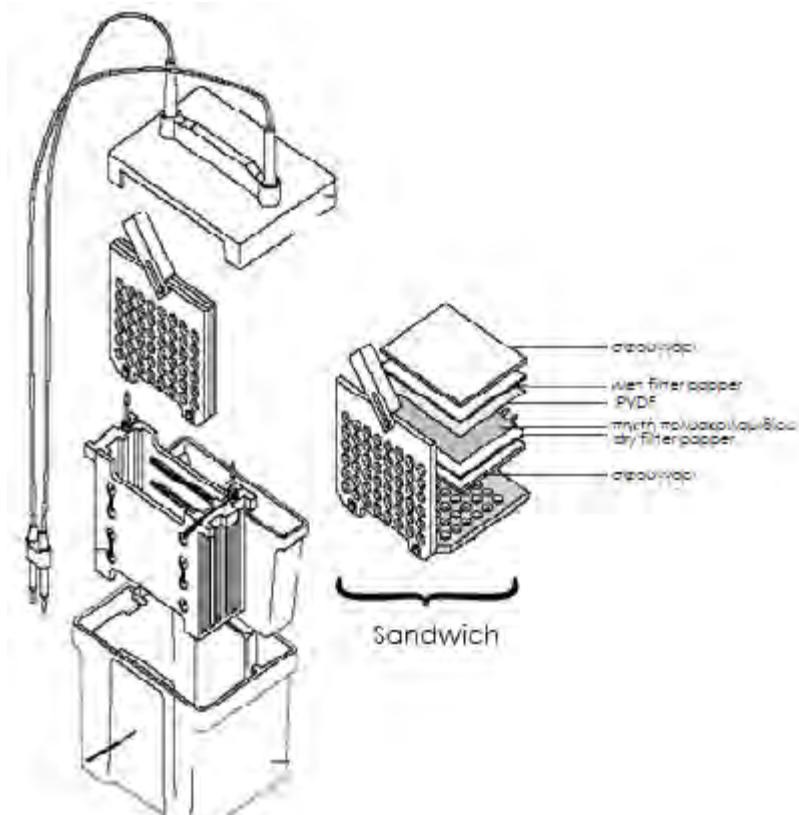
Εικόνα 18. Συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης⁴⁰

Στα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί τοποθετούνται τα δείγματα. Στις ακραίες θέσεις τοποθετείται ο μάρτυρας (marker), ο οποίος περιέχει πρωτεϊνές γνωστού μοριακού βάρους (ProSieve QuadColor Protein Marker, LONZA, Cat No: 00193837). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάθετα υπό τάση 100V όσο τα δείγματα τρέχουν στο πήκτωμα επιστοίβαξης και στην συνέχεια όταν τα δείγματα φτάσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού γίνεται αλλαγή της τάσης στα 200V. Έτσι τα δείγματα μετακινούνται στο ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X (running buffer).⁴⁰

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια για το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Αντιδραστήρια	Running buffer 10X pH 8,3	Running buffer 1X
Tris-Base (g)	30,3	-
Glycine (g) (ROTH, 37831)	144	-
SDS (g)	10	-
ddH ₂ O (ml)	Up to 1000	900
Running buffer 10X (ml)	-	100

- Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη PVDF μεγέθους πόρων 0,22μm (Immobilon-PSQ Transfer Membrane Millipore, ISEQ85R). Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα 1X (transfer buffer). Αρχικά συναρμολογείται το «sandwich» το οποίο αποτελείται από: σφουγγαράκι, στεγνό διηθητικό χαρτί Whatman, πήκτωμα (από το οποίο έχει αφαιρεθεί το πύκτωμα επιστοίβαξης), μεμβράνη PVDF, υγρό διηθητικό χαρτί Whatman και σφουγγαράκι (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Συναρμολόγηση συσκευής για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF⁴⁰

Η PVDF μεμβράνη είναι υδρόφιλη και για να καταστεί υδρόφιλη, απαιτείται ενεργοποίησή της σε μεθανόλη για 15 sec υπό ανάδευση και στην συνέχεια για 5 min σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 1X. Επίσης στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς εμβαπτίζονται όλα τα υλικά που αποτελούν το «sandwich». Στην συνέχεια το «sandwich» τοποθετείται μαζί με μία παγοκύστη και ένα μαγνητάκι στη συσκευή που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 1X. Η παγοκύστη διατηρεί χαμηλή τη θερμοκρασία καθ'όλη την διάρκεια της μεταφοράς των πρωτεϊνών και το μαγνητάκι εξυπηρετεί την συνεχή ανάδευση. Η διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών πραγματοποιείται υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος στα 100V, τα οποία αντιστοιχούν σε 250 mA. Η διαδικασία ολοκληρώνεται έπειτα από αύξηση των mA κατά 100.⁴⁰

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια για το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς

Αντιδραστήρια	Transfer buffer 10X pH 8,3	Transfer buffer 1X
Tris-Base (g)	30,3	-
Glycine (g)	144	-
ddH ₂ O (ml)	Up to 1000	700
Μεθανόλη (ml)	-	200
Transfer buffer 10X (ml)	-	100

Μετά το πέρας τις παραπάνω διαδικασίας, είναι δυνατός ο έλεγχος της μεταφοράς πρωτεϊνών στην μεμβράνη PVDF μέσω χρώσης της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau και στην συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται με ultra pure νερό. Επίσης είναι δυνατή η χρώση του πυκτώματος με την χρωστική κυανό του Coomassie (0,1 w/v Coomassie σε 5% v/v acetic acid και συμπληρώνω με dH₂O), ώστε να γίνουν ορατές οι πρωτεΐνης που παρέμειναν στο πήκτωμα. Στην συνέχεια γίνεται δέσμευση των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης με TTBS 5% FBS ή NFDM ανάλογα με το πρωτόκολλο για μία ώρα υπό ανάδευση.

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια για το TTBS

Αντιδραστήρια	TBS	TTBS 1X
NaCl 0,9 % (ml)	950	-
1M Tris-HCl pH 7,4 (ml)	50	-
Tween 20 (μl) (Fisher scientific, BP337-500)	-	1000
TBS	-	1000

6. Έπειτα η μεμβράνη κόβεται με βάση τα μοριακά βάρη του marker και ακολουθεί ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4°C υπό ανάδευση. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι ειδικό για την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Την επόμενη μέρα συλλέγεται το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί και πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις με TTBS 1X ανά πέντε λεπτά υπό ανάδευση. Ακολουθεί μία ώρα επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση, το οποίο συνδέεται με το πρωτογενές αντίσωμα. Στην συνέχεια γίνονται άλλες τρεις πλύσεις με TTBS 1X ανά πέντε λεπτά υπό ανάδευση.

Πίνακας 8. Αντισώματα

Πρωτεΐνη	1^ο αντίσωμα	2^ο αντίσωμα	MB
Beclin	Beclin-1 (Cell Signaling D4a5) 1/1000 TTBS 1X,5% FBS	Anti- Rabbit IgG 1/6000	60
Lc3 a/b	LC3A/B (Cell Signaling 12741T) 1/1000 TTBS 1X,5% FBS	Anti- Rabbit IgG 1/6000	16,14
Total Caspase3	Caspase-3 (Cell Signaling D3R6Y) 1/1000 TTBS 1X,5% FBS	Anti- Rabbit IgG 1/6000	35
Total P70 S6 kinase	P70 S6 kinase (Cell Signaling 49D7) 1/1000	Anti- Rabbit IgG 1/6000	70

P70 S6 kinase phosphorylated at Thr389	Phospho-P70 S6 kinase (Thr389) (Cell Signaling 108D2) 1/1000 TTBS 1X,5% FBS	Anti- Rabbit IgG 1/6000	70
Actin	Actin (Santa cruz,sc-8432) 1/3000 TTBS 1X,5% FBS	Anti-Rabbit IgG 1/6000	42

7. Αν στην ίδια μεμβράνη είναι αναγκαιο να ανιχνευτεί και άλλη πρωτεΐνη με το ίδιο μοριακό βάρος, αρχικά είναι απαραίτητο να αποδεσμευτεί το πρωτογενές αντίσωμα από την μεμβράνη, πρώτου επωαστεί με το επόμενο πρωτογενές αντίσωμα (stripping). Αφού παρασκευαστεί το stripping buffer, τοποθετείται μαζί με την μεμβράνη σε κωνικό φυαλίδιο. Το φυαλίδιο τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 56 °C για 15 min υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με TBS ανά πέντε λεπτά. Τέλος γίνεται δέσμευση των μη ειδικων θέσεων της μεμβράνης ανάλογα με το πρωτόκολλο του αντισώματος και ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4°C.

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια για το stripping buffer

Αντιδραστήρια	Stripping Buffer
SDS 10% w/v (ml)	20
0,5M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	12.5
B-μερκαπτοαιθανόλη (μl)	700
ddH ₂ O (ml)	66,8

8. Το ανοσοαποτύπωμα των πρωτεϊνών στην μεμβράνη γίνεται εμφανές με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL). Συγκεκριμένα, η μεμβράνη επώαζεται για πέντε λεπτά στο ECL (BIO-RAD, Cat.No:170-5061), το οποίο παρασκευάζεται έπειτα από ανάμειξη των solution A και solution B σε ίση ποσότητα. Τα αποτελέσματα γίνονται ορατά με τη χρήση του λογισμικού UVITECH ALLIANCE 4.7 του μηχανήματος UVITECH CAMBRIDGE. Τέλος, τα αποτελέσματα ποσοτικοποιούνται σε σχέση με την ακτίνη (housekeeping protein) με την χρήση του προγράμματος IMAGE J, μια διαδικασία γνωστή ως πυκνομετρία.

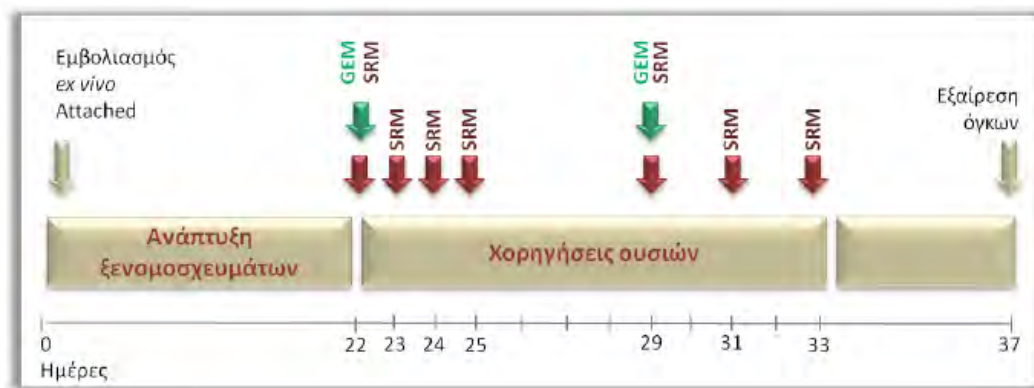
8. Αποτελέσματα

8.1 Επίδραση της Siramesine στην ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων

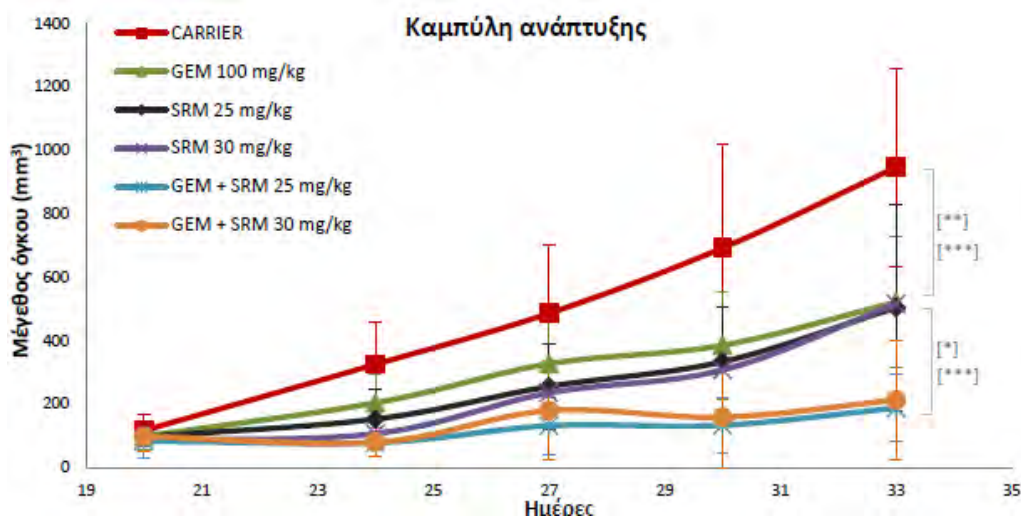
Με σκοπό την μελέτη της δραστικότητας της siramesine σε ζωικό πρότυπο ανθρώπινου καρκίνου αναπτύχθηκαν ξενομοσχεύματα από *ex vivo* καλλιέργεια από πρωτογενή καρκινικό κυτταρικό υποπληθυσμό AT_021013, στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Δρ Ευαγγελίας Σερέτη. Για την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια στελέχους NOD-SCID. Όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε 100m³, τα ζώα χωρίστηκαν σε 6 ομάδες και πραγματοποιήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά οι χορηγήσεις της υπό εξέταση ουσίας. Οι συγκεντρώσεις της Siramesine καθορίστηκαν με βάση πειράματα τοξικότητας που είχαν προηγηθεί. Η Siramesine χορηγήθηκε είτε ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με την Gemcitabine. Η Gemcitabine χορηγήθηκε 1φορά/7 ημέρες, ενώ η Siramesine 1φορά/2 ημέρες. Οι ομάδες διαμορφώθηκαν ως εξής:

- 1) Carrier, φορέας της siramesine [10% HPBCD- (2-hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin]
- 2) Gemcitabine 100 mg/kg
- 3) Siramesine 25 mg/kg
- 4) Siramesine 30 mg/kg
- 5) Siramesine 25 mg/kg και Gemcitabine 100 mg/kg
- 6) Siramesine 30 mg/kg και Gemcitabine 100 mg/kg

Κατά την διάρκεια του πειράματος γινόταν συνεχή καταγραφή του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων και του βάρους των ζώων. Με βάση τα δεδομένα της καταγραφής, φαίνεται πως ο συνδυασμός Siramesine με Gemcitabine οδηγεί σε σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων, ενώ η Siramesine ως μονοθεραπεία εκδηλώνει μέτρια δράση σε σχέση με την ομάδα αναφοράς CARRIER (φορέας της siramesine) (Εικόνα 20).⁴³



Εικόνα 20α. Σχηματική απεικόνιση της *in vivo* πειραματικής διαδικασίας του ελέγχου δραστηρότητας της siramesine.



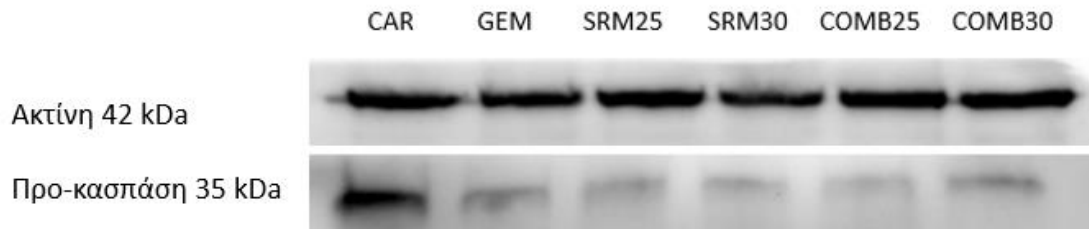
Εικόνα 20b. Έλεγχος της επίδρασης της Siramesine στην ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων από την *ex vivo* καλλιέργεια του πρωτογενούς καρκινικού κυτταρικού υποπληθυσμού AT_021013. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)⁴³

8.2 Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της Siramesine *in vivo*

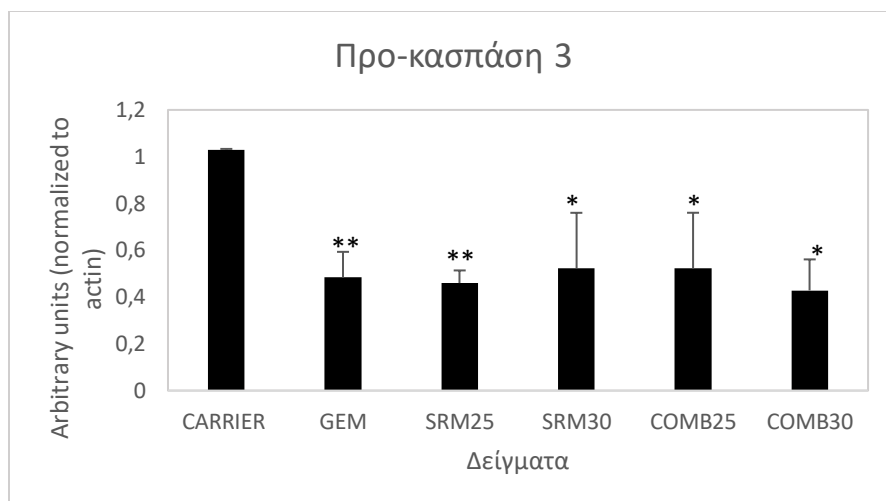
Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου η Siramesine μειώνει τον ρυθμό αύξησης των όγκων στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο καρκίνου ελέγχθηκε η έκφραση, μέσω ανοσοαποτύπωσης western, ορισμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου της απόπτωσης και της αυτοφαγίας.

8.2.1 Επίδραση της Siramesine στην επαγωγή απόπτωσης

Η επαγωγή της απόπτωσης από την Siramesine μελετήθηκε εξετάζοντας τα επίπεδα έκφρασης της προ-κασπάσης 3. Η προ-κασπάση 3 είναι μια από τις εκτελεστικές κασπάσες του μηχανισμού της απόπτωσης. Λειτουργεί ως πρωτεάση, η οποία αποικοδομεί πρωτεΐνες του κυττάρου και οδηγεί στην ολοκληρωτική καταστροφή του. Όπως φαίνεται στην εικόνα 21 και το γράφημα 1, η κασπάση 3 φαίνεται να ενεργοποιείται, καθώς η έκφραση της πρόδρομης μορφής της, της προ-κασπάσης 3, εμφανίζει σημαντική μείωση είτε η gemcitabine χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία, είτε η Siramesine χορηγείται ως μονοθεραπεία, είτε οι δύο αυτές ουσίες σε συνδυασμό, σε σχέση με την ομάδα αναφοράς, δηλαδή την ομάδα CARRIER.



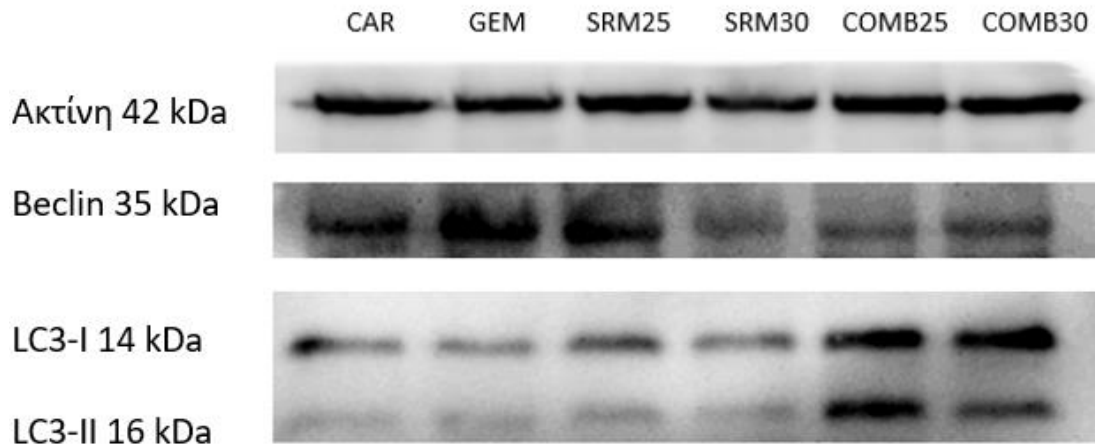
Εικόνα 21. Έκφραση της προ-κασπάσης 3 σε ξενομοσχεύματα, όπου CAR: Carrier, GEM: Gemcitabine 100 mg/kg, SRM25: Siramesine 25 mg/kg, SRM30: Siramesine 30 mg/kg, COMB25: Siramesine 25 mg/kg και Gemcitabine 100 mg/kg και COMB30: Siramesine 30 mg/kg και Gemcitabine 100 mg/kg. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος των δειγμάτων.



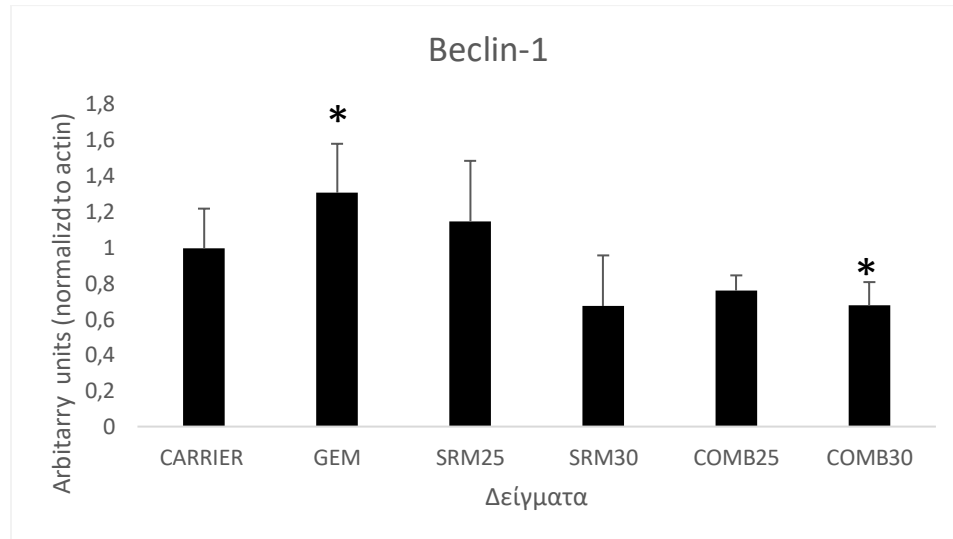
Γράφημα 1. Πυκνομετρία της προ-κασπάσης 3 σε σχέση με την ακτίνη σε ξενομοσχεύματα. Οι ράβδοι δείχνουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

8.2.2 Επίδραση της Siramesine στην επαγωγή αυτοφαγικού θανάτου

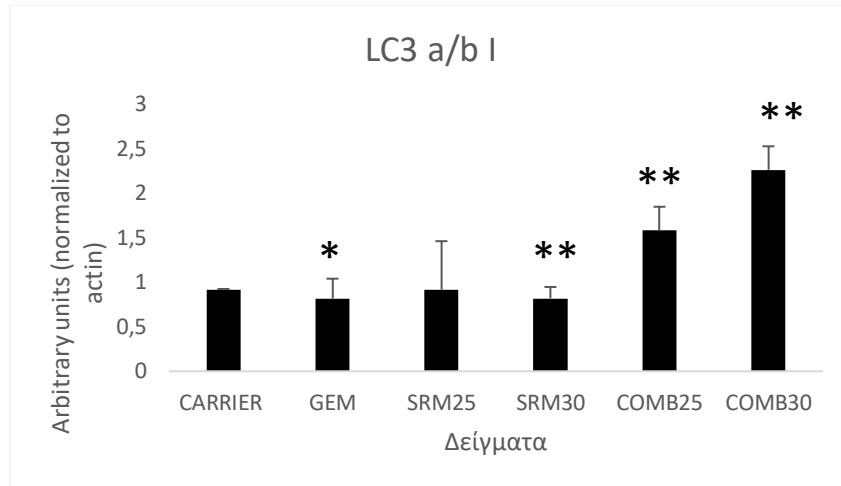
Η επαγωγή της αυτοφαγίας από την Siramesine μελετήθηκε εξετάζοντας τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Beclin-1 και LC3. Και οι δύο πρωτεΐνες έχουν σημαντικό ρόλο στην αυτοφαγία. Συγκεκριμένα, η Beclin-1 συμμετέχει στο σχηματισμό του φαγοφόρου κατά την έναρξη της αυτοφαγίας, ενώ η LC3 συμμετέχει στο σχηματισμό και την ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα 22 και στα γραφήματα 2, 3 και 4, όταν χορηγείται η gemcitabine ως μονοθεραπεία παρατηρείται σημαντική αύξηση της έκφρασης της Beclin, ενώ όταν χορηγείται η siramesine σε συγκέντρωση 25 mg/kg ως μονοθεραπεία παρατηρείται μέτρια αύξηση της έκφρασης της Beclin. Η χορήγηση της siramesine σε συγκέντρωση 30 mg/kg ως μονοθεραπεία δεν προκαλεί σημαντική μεταβολή στην έκφραση των πρωτεϊνών. Τέλος, όταν η siramesine, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωσή της, χορηγείται σε συνδυασμό με τη gemcitabine παρατηρείται σημαντική αύξηση της έκφρασης της LC3 a/b I και LC3 a/b II.



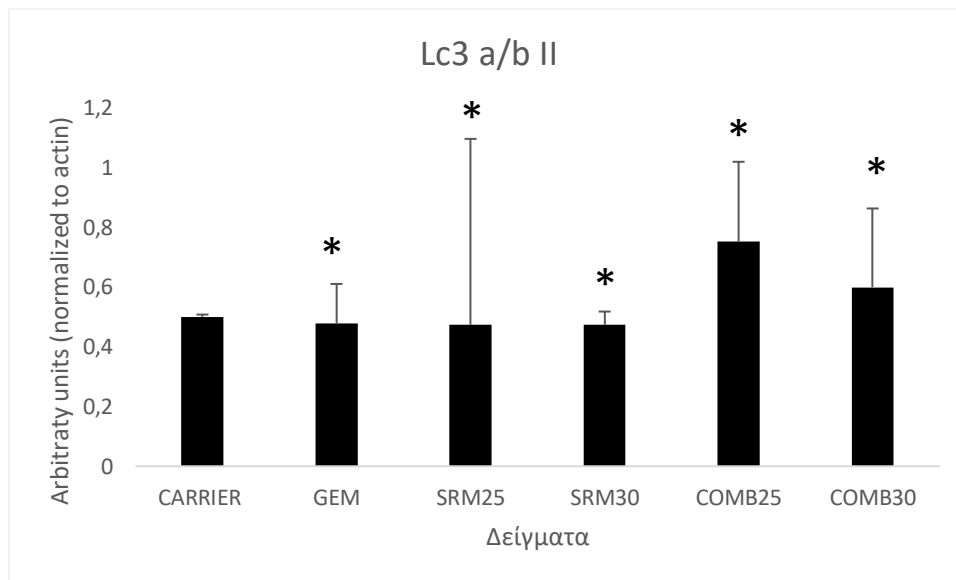
Εικόνα 22. Έκφραση των Beclin-1 και LC3 σε ξενομοσχεύματα, όπου CAR: Carrier, GEM: Gemcitabine 100 mg/kg, SRM25: Siramesine 25 mg/kg, SRM30: Siramesine 30 mg/kg, COMB25: Siramesine 25 mg/kg και Gemcitabine 100 mg/kg και COMB30: Siramesine 30 mg/kg και Gemcitabine 100 mg/kg. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος των δειγμάτων.



Γράφημα 2. Πυκνομετρία της Beclin-1 σε σχέση με την ακτίνη σε ξενομοσχεύματα. Οι ράβδοι δείχνουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

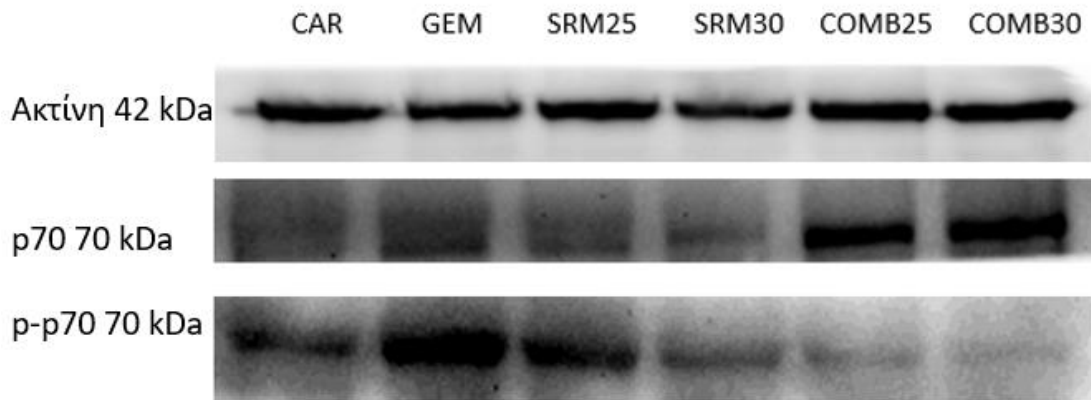


Γράφημα 3. Πυκνομετρία της LC3-I σε σχέση με την ακτίνη σε ξενομοσχεύματα. Οι ράβδοι δείχνουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

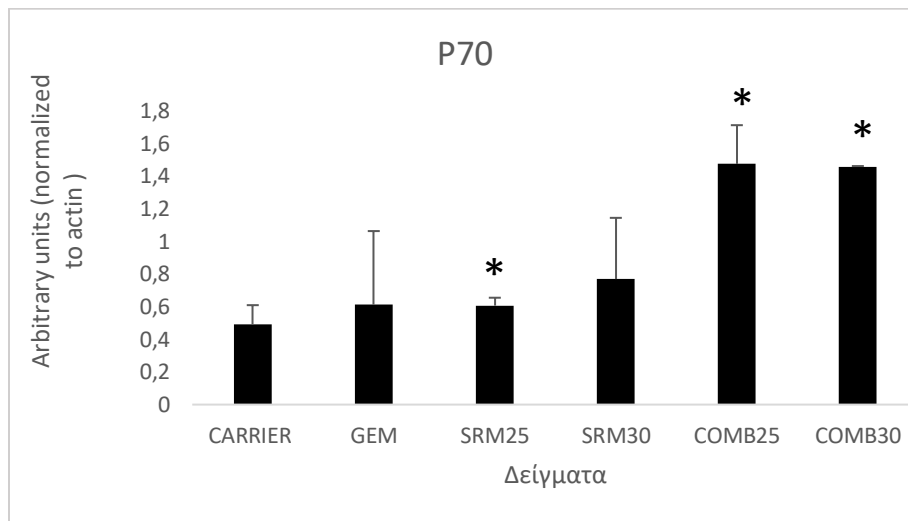


Γράφημα 4. Πυκνομετρία της LC3-II σε σχέση με την ακτίνη σε ξενομοσχεύματα. Οι ράβδοι δείχνουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

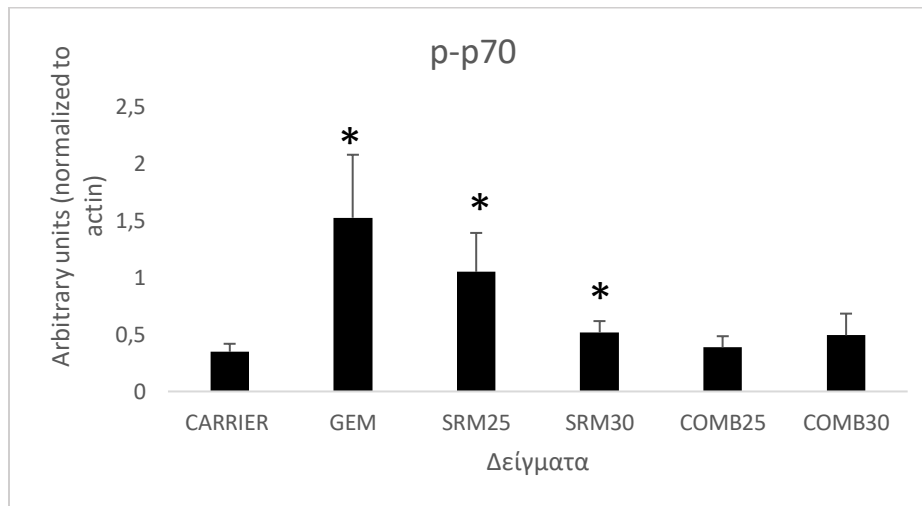
Προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα ο μηχανισμός επαγωγής αυτοφαγικού θανάτου από τη Siramesine, εξετάστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης p70S6K1 και της φωσφορυλιωμένης της μορφής στο Thr389 (ενεργή μορφή). Η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στο μονοπάτι ρύθμισης της αυτοφαγίας μέσω του μονοπατιού mTOR. Όταν το μονοπάτι του mTOR είναι ενεργό, αναστέλλεται η αυτοφαγία. Όπως φαίνεται στην εικόνα 23 και στα γραφήματα 5 και 6, η συνδυαστική χορήγηση Siramesine και Gemcitabine προκαλεί σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της p70S6K1, ενώ τα επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης της μορφής, δηλαδή της ενεργής, είναι χαμηλά.



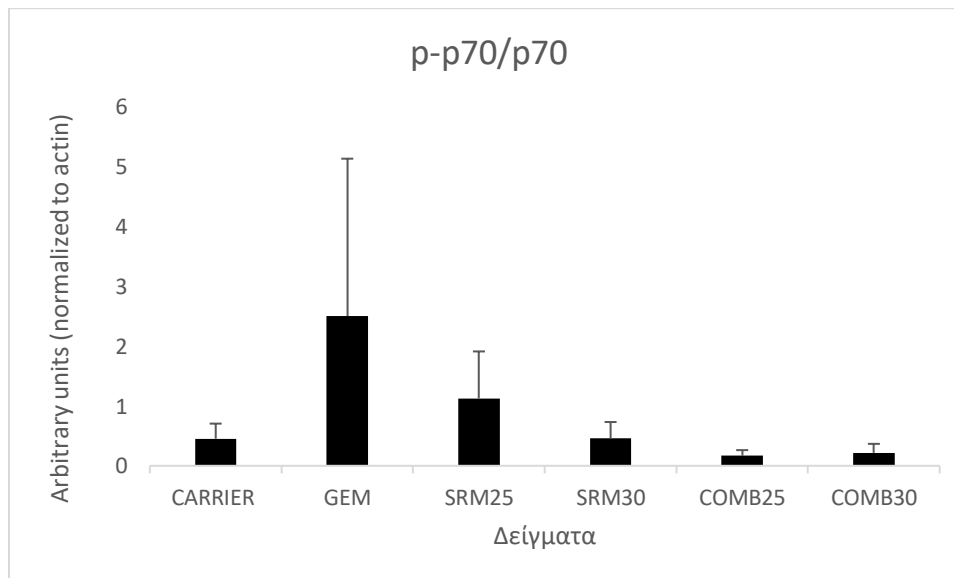
Εικόνα 23. Έκφραση των p70 και p-p70 σε ξενομοσχεύματα, όπου CAR: Carrier, GEM: Gemcitabine 100 mg/kg, SRM25: Siramesine 25 mg/kg, SRM30: Siramesine 30 mg/kg, COMB25: Siramesine 25 mg/kg και Gemcitabine 100 mg/kg και COMB30: Siramesine 30 mg/kg και Gemcitabine 100 mg/kg. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος των δειγμάτων. ($p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$)



Γράφημα 5. Πυκνομετρία της P70 σε σχέση με την ακτίνη σε ξενομοσχεύματα. Οι ράβδοι δείχνουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. ($p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$)



Γράφημα 6. Πυκνομετρία της p-P70 (Thr389) σε σχέση με την ακτίνη σε ξενομοσχεύματα. Οι ράβδοι δείχνουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)



Γράφημα 7. Πυκνομετρία της p-P70 (Thr389)/ P70 σε σχέση με την ακτίνη σε ξενομοσχεύματα. Οι ράβδοι δείχνουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα. ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

9. Συμπεράσματα- Συζήτηση

Ο καρκίνος του παγκρέατος προσελκύει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς αποτελεί έναν από τους πιο επιθετικούς, ασυμπτωματικούς τύπους καρκίνου, με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, πολλές έρευνες επικεντρώνονται στους σίγμα υποδοχείς, καθώς εκδηλώνουν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ αυτών και στον καρκίνο του παγκρέατος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι sigma2 υποδοχείς, καθώς έχουν περίπου 10πλάσια έκφραση σε πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, σε σχέση με αυτά που βρίσκονται σε ηρεμία²¹. Συνεπώς οι προσδέτες των σίγμα υποδοχέων μπορούν να αποτελέσουν νέους θεραπευτικούς παράγοντες ενάντια στο παγκρεατικό καρκίνο. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας *in vitro* μελέτες για διάφορους προσδέτες των sigma 2 υποδοχέων σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Μεταξύ των προσδετών, η siramesine, η οποία αποτελεί αγωνιστή των sigma 2 υποδοχέων, παρουσιάζει έντονη αντιπολλαπλασιαστική, κυτταροστατική και κυτταροτοξική δράση. Για το λόγο αυτό, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε σε αυτήν την ουσία.

Έχει παρατηρηθεί ότι *in vitro* η siramesine οδηγεί σε θάνατο τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιώντας διάφορους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, όπως η αυτοφαγία, ειδικά όταν χορηγείται σε συνδυασμό με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα²⁴. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης της siramesine *in vivo*. Η καινοτομία της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ότι μελετήθηκε για πρώτη φορά ο μηχανισμός δράσης της siramesine σε ξενομοσχεύματα προερχόμενα από ασθενής με καρκίνο του παγκρέατος. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, τα ξενομοσχεύματα που προέρχονται από πρωτογενείς καρκινικούς κυτταρικούς πληθυσμούς εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων προ-κλινικών μοντέλων, όπως η διατήρηση των χαρακτηριστικών του πρωτογενή όγκου και η ομοιότητα στην κλινική απόκριση του ασθενούς σε ένα θεραπευτικό σχήμα. Η δράση της siramesine μελετήθηκε σε ξενομοσχεύματα, στα οποία η siramesine χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά είτε ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο gemcitabine, το οποίο χρησιμοποιείται ευρύτατα στην θεραπεία του παγκρεατικού καρκίνου. Κατά την διάρκεια του πειράματος γινόταν καταγραφή του μεγέθους του όγκου και του βάρους των ζώων κάθε τέσσερις ημέρες. Με βάση τα ευρήματα αυτού του πειράματος, η siramesine ως μονοθεραπεία προκαλεί ήπια αναστολή της ανάπτυξης των όγκων, ενώ ο συνδυασμός siramesine και gemcitabine ενισχύει την αναστολή, υποδεικνύοντας υψηλή αντικαρκινική δράση. Ως συνέπεια αυτών των παρατηρήσεων στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Σερέτη Ευαγγελίας (2019), η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στον καθορισμό του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου που επάγεται από την χορήγηση της siramesine.

Για το καθορισμό του μηχανισμού μέσω του οποίου η siramesine αναστέλλει *in vivo* την ανάπτυξη των όγκων, ελέγχθηκε η έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι του αυτοφαγικού θανάτου και της απόπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, με σκοπό να διαπιστωθεί αν η siramesine επάγει την απόπτωση ελέγχθηκε η έκφραση της προ-κασπάσης 3. Η προ-κασπάση 3 (ανενεργή μορφή) ενεργοποιείται από διάφορα ενδογενή ή εξωγενή σήματα έπειτα από πρωτεολυτική πέψη, λειτουργώντας ως εκτελεστική κασπάση (effector caspase) οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της προ-κασπάσης 3 μειώνεται σημαντικά είτε η siramesine χορηγείται ως μονοθεραπεία, είτε συνδυαστικά με την gemcitabine. Άρα η προ-κασπάση 3 υφίσταται πέψη, οπότε ενεργοποιείται. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η siramesine επάγει την απόπτωση.

Προκειμένου να μελετηθεί η επαγωγή της αυτοφαγίας από την siramesine μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών Beclin και LC3 a/b. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες συμμετέχουν στον σχηματισμό και την ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση της gemcitabine και της siramesine ως μονοθεραπεία σε συγκέντρωση 25 mg/kg αυξάνουν την έκφραση της Beclin. Ωστόσο φαίνεται ότι η συγχορήγηση των δύο ουσιών έχει πολύ πιο ισχυρή αντικαρκινική δράση, καθώς ο συνδυασμός gemcitabine και siramesine αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα των LC3-I και LC3-II. Οι παρατηρήσεις αυτές αποτελούν σημαντικές ενδείξεις ότι ο συνδυασμός siramesine και gemcitabine επάγει την αυτοφαγία. Προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα ο μηχανισμός επαγωγής της αυτοφαγικού θανάτου, ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης p70S6K1 και της φωσφορυλιωμένης της μορφής (Thr389). Η πρωτεΐνη p70S6K1 συμμετέχει στη ρύθμιση της αυτοφαγίας από το μονοπάτι του mTOR. Όταν το μονοπάτι του mTOR είναι ενεργό, αναστέλλεται η αυτοφαγία. Παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός siramesine και gemcitabine μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης p70S6K1 (Thr389), ενώ τα επίπεδα της p70S6K1 είναι αυξημένα. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός αυτών των ουσιών αναστέλλει το μονοπάτι του mTOR και άρα επάγεται η αυτοφαγία.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι siramesine μπορεί να ενισχύσει τη δράση της gemcitabine όταν οι δυο ουσίες συγχορηγηθούν. Επομένως θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι συνδυασμός αυτών των ουσιών πιθανόν να αποτελεί μια νέα, πιο αποτελεσματική, θεραπευτική προσέγγιση για το καρκίνο του παγκρέατος. Ωστόσο απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να γίνουν κατανοητές λεπτομέρειες όσον αφορά στο μηχανισμό δράσης της siramesine, καθώς εγείρονται διάφορα ερωτήματα. Μερικά από αυτά είναι μέσω ποιου μηχανισμού ενεργοποιείται η απόπτωση, η αυτοφαγία, ποια σηματοδοτικά μονοπάτια συμμετέχουν κλπ. Παρ' όλα αυτά, η επαγωγή της απόπτωσης και της αυτοφαγίας από την siramesine σε ξеноμοσχεύματα παγκρεατικού καρκίνου προερχόμενα από ασθενή αποτελούν ένα σημαντικό εύρημα. Να αναφέρουμε στο

σημείο αυτό ότι τα *in vivo* ευρήματα φαίνεται να συμφωνούν με τις *in vitro* μελέτες που πραγματοποιούνται ταυτόχρονα στο εργαστήριό μας.

10. Βιβλιογραφία

1. Hajdu, S. I. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* **117**, 1097–1102 (2011).
2. <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>.
3. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2011), *Το κύτταρο: Μία μοριακή προσέγγιση. Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.*
4. Robert A. Weinberg, (2013), *The cancer biology, 2nd Edition, Garland Science.*
5. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>.
6. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
7. Anand, P. *et al.* Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm. Res.* **25**, 2097–2116 (2008).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
9. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
10. Burton E. Tropp, (2014), *Βασικές αρχές μοριακής βιολογίας. Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.*
11. Ansari, D. *et al.* Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. *Future Oncol.* **12**, 1929–1946 (2016).
12. Sherwood L., (2016) , *Εισαγωγή στην φυσιολογία του ανθρώπου από τα κύτταρα στα συστήματα, Ακαδημαϊκές εκδόσεις.*
13. Rawla, P., Sunkara, T. & Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* **10**, 10–27 (2019).
14. Pothuraju, R. *et al.* Pancreatic cancer associated with obesity and diabetes: an alternative approach for its targeting. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 319 (2018).
15. Khadka, R., Tian, W., Hao, X. & Koirala, R. Risk factor, early diagnosis and overall survival on outcome of association between pancreatic cancer and diabetes mellitus: Changes and advances, a review. *Int. J. Surg.* **52**, 342–346 (2018).
16. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **379**, 2395–2406 (2018).
17. Mach, R. H., Zeng, C. & Hawkins, W. G. The σ_2 Receptor: A Novel Protein for the Imaging and Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **56**, 7137–7160 (2013).
18. Schmidt, H. R. & Kruse, A. C. The Molecular Function of σ Receptors: Past, Present, and Future. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 636–654 (2019).
19. Su, T.-P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S. & Ruoho, A. E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 557–566 (2010).
20. Alon, A. *et al.* Identification of the gene that codes for the σ_2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 7160–7165 (2017).

21. van Waarde, A. *et al.* Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1848**, 2703–2714 (2015).
22. Zeng, C. *et al.* Sigma-2 ligands induce tumour cell death by multiple signalling pathways. *Br. J. Cancer* **106**, 693–701 (2012).
23. Ostenfeld, M. S. *et al.* Effective Tumor Cell Death by σ -2 Receptor Ligand Siramesine Involves Lysosomal Leakage and Oxidative Stress. *Cancer Res.* **65**, 8975–8983 (2005).
24. Ma, S., Henson, E. S., Chen, Y. & Gibson, S. B. Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells. *Cell Death Dis.* **7**, e2307–e2307 (2016).
25. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
26. Mishra, A. P. *et al.* Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. *Mol. Diagn. Ther.* **22**, 281–295 (2018).
27. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D’Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* **8**, 603–619 (2016).
28. Mah, L. Y. & Ryan, K. M. Autophagy and Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a008821–a008821 (2012).
29. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* **21**, 2861–2873 (2007).
30. Badadani, M. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. *ISRN Cell Biol.* **2012**, 1–11 (2012).
31. Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T. & Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* **18**, 571–580 (2011).
32. Anding, A. L. & Baehrecke, E. H. Autophagy in Cell Life and Cell Death. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 114 67–91 (Elsevier, 2015).
33. Ndoye, A. & Weeraratna, A. T. Autophagy- An emerging target for melanoma therapy. *F1000Research* **5**, 1888 (2016).
34. Dibble, C. C. & Manning, B. D. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat. Cell Biol.* **15**, 555–564 (2013).
35. Paquette, M., El-Houjeiri, L. & Pause, A. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers* **10**, 18 (2018).
36. Pópulo, H., Lopes, J. M. & Soares, P. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 1886–1918 (2012).
37. Wang, C.-F. & Shi, X.-J. Generation and application of patient-derived xenograft models in pancreatic cancer research: *Chin. Med. J. (Engl.)* **132**, 2729–2736 (2019).
38. Sereti, E. *et al.* Patient Derived Xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer? *J. Proteomics* **188**, 107–118 (2018).

39. Hidalgo, M. *et al.* Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discov.* **4**, 998–1013 (2014).
40. Kruger, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. 6.
41. Πουλάς Κωνσταντίνος, (2015), *Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών, Συνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.*
42. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006157B.pdf>.
43. Σερέτη Α. Ευαγγελία, (2019), *Σίγμα υποδοχείς: Μελέτη του ρόλου τους στην καρκινογένεση και στην ανάπτυξη νέων έξυπνων στοχευμένων αντικαρκινικών θεραπειών.*