



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Τοξικολογία»

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:
**«Μελέτη της δράσης της δοξορουβικίνης
σε συνδυασμό με το διχλωροξικό οξύ
επί της βιοενεργητικής των ερυθρολευχαιμικών κυττάρων»**

Εργαστήριο Φαρμακολογίας,
Τμήμα Φαρμακευτικής
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
2021

Βασιλική Τσικλή
Πτυχιούχος Βιοχημικός - Βιοτεχνολόγος



University of Thessaly
Faculty of Medical Sciences
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Master of Science
«Toxicology»

Thesis Title:

«Study of the anticancer role of Doxorubicin in combination with dichloroacetate acid on the bioenergetics of myeloid cancer cells»

Laboratory of Pharmacology,
Aristotle University of Thessaloniki

Vasiliki Tsikli
Biochemist - Biotechnologist

Τριμελής Επιτροπή

Λευκοθέα Χ. Παπαδοπούλου: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ.
Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Ιωάννης Σ. Βιζιριανάκης: Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας
και Φαρμακογονιδιοματικής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ.

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών –
Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Three-member committee

Lektothea Papadopoulou: Associate Professor, Pharmacology, School
of Pharmacy, AUTH
Supervisor

Ioannis Vizirianakis Associate Professor, Pharmacology and
Pharmacogenomics, School of Pharmacy, AUTH

Dimitrios Kpuretas Professor, Animal Physiology – Toxicology,
Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Εισαγωγή στον Καρκίνο.....	8
1.1.1 Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης	8
1.1.2 Μεταλλάξεις	9
1.2 Ορόσημα του Καρκίνου	11
1.2.A Αυτάρκεια σε σήματα υπέρ της ανάπτυξης (Self-Sufficiency in Growth Signals)	11
1.2.B Μειωμένη ευαισθησία σε σήματα αναστολής της ανάπτυξης (Insensitivity to Antigrowth Signals).....	12
1.2.Γ Αυτονομία πολλαπλασιασμού (Limitless Replicative Potential)	14
1.2.Δ Αποφυγή απόπτωσης (Evading Aporptosis)	14
1.2.E Εισβολή και Μετάσταση σε άλλους ιστούς (Invasion and Metastasis)	15
1.2.ΣΤ Αγγειογένεση (Sustained Angiogenesis)	16
1.2.Z Απορρύθμιση κυτταρικών μονοπατιών παραγωγής ενέργειας (Deregulating Cellular Energetics)	18
1.2.H Ανθεκτικότητα ενάντια στο ανοσοποιητικό σύστημα (Avoiding Immune Destruction)	19
1.2.1 Χαρακτηριστικά που υποβοηθούν την εμφάνιση των ορόσημων	20
1.2.1.A Γενωμική αστάθεια και Μετάλλαξη	20
1.2.1.B Φλεγμονή που επάγει την ογκογένεση	20
1.3 Οδοί Παραγωγή ενέργειας	21
1.3.1 Γλυκόλυση	21
1.3.2 Κύκλος του Krebs	23
1.3.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	24
1.4 Φαινόμενο Warburg στον καρκίνο.....	26
1.5 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία	27
1.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις ενάντια στη ΧΜΛ	32
1.6.1 Θεραπεία πριν την Ιματινίβη.....	32
1.6.2 Αναστολείς κινασών τυροσίνης: Ιματινίβη και αντίσταση	33
1.6.3 Δοξορουβικίνη και καρκίνος.....	34
1.6.4 Αναστολείς γλυκόλυσης / οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.....	36
1.6.5 Διχλωρο-ακετοξικό (Dichloroacetate, DCA).....	38
1.7 Παράγοντες με εν δυνάμει ρόλο στη βιοενεργητική των κυττάρων.....	40
1.7.1 Stem cell factor (SCF).....	40

1.7.2 Sco2	41
1.7.3 Γαλακτική αφυδρογονάση (LDHA)	41
1.7.4 Παράγοντας p53	41
2. Σκοπός	43
3. Υλικά και Μέθοδοι	44
3.1 Υλικά	44
3.1.1 Κυτταρικές Σειρές	44
3.1.2 Θρεπτικό υλικό	44
3.1.3 Φαρμακευτικές ουσίες	44
3.1.4 Αντισώματα	45
3.2 Μέθοδοι	45
3.2.1 Απόψυξη κυττάρων από το υγρό άζωτο.....	45
3.2.2 Κρυοδιατήρηση κυττάρων στο υγρό άζωτο	45
3.2.3 Μέτρηση του ρυθμού βιωσιμότητας και του κυτταρικού	46
3.2.4 Μέθοδος προσδιορισμού IC50 φαρμάκων	46
3.2.5 Λύση κυττάρων με RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay	47
3.2.6 Λύση κυττάρων με τη χρήση MITO Buffer, συλλογή και.....	47
3.2.7 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο «Bradford».....	48
3.2.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών τύπου «WESTERN» (WESTERN BLOT).....	48
3.2.8.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	48
3.2.8.2 Ηλεκτρομεταφορά της πηκτής σε μεμβράνη PVDF (Transfer Method)	48
3.2.8.3 Ανοσοανίχνευση τύπου Western	48
3.2.9 Ανίχνευση πρωτεϊνικών επιπέδων με Κυτταρομετρία ροής	49
3.2.10 Προσδιορισμός ελεύθερων ριζών με τη χημική ουσία DCFDA με Κυτταρομετρία ροής	50
3.2.11 Στατιστική ανάλυση	50
4. Αποτελέσματα	51
4.1 Κινητική κυττάρων	51
4.2 Προσδιορισμός IC50 των DCA, Doxorubicin	53
4.3 Επώαση K-562 κυττάρων με τις φαρμακευτικές ουσίες	58
4.4 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών με τις μεθόδους «Western Blot».....	60
4.5 Ανίχνευση ελευθέρων ριζών (ROS).....	71
5. Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	73
6. Παράρτημα.....	76
Βιβλιογραφία	79

Περίληψη

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία αποτελεί ένα τύπο καρκίνου του αίματος της ευρύτερης κατηγορίας των λευχαιμιών. Η ασθένεια διακρίνεται σε 3 (τρία) στάδια, και οι ήπιες περιπτώσεις αντιμετωπίζονται με ειδική αγωγή. Οι υπάρχουσες φαρμακευτικές θεραπείες έναντι της ΧΜΛ έχουν βασιστεί σε μια μοριακή ανωμαλία που παρατηρείται στο μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων που πάσχουν. Συγκεκριμένα, στα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζεται μια αντιμετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης Bcr-Abl με αυξημένη δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό έχουν σχεδιαστεί μόρια που δρουν ως αναστολείς της κινάσης τυροσίνης. Παρά την αρχική αποτελεσματικότητά τους, η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε έναντι των αναστολέων κινάσης τυροσίνης, οδήγησε σε μια νέα πειραματική θεραπευτική προσέγγιση που περιλαμβάνει τη συνδυαστική χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων για την ενίσχυση της δράσης. Η προοπτική αυτής της νέας θεραπευτικής οδού για την αντιμετώπιση της ΧΜΛ οδήγησε στην παρούσα διπλωματική εργασία, η οποία βασίζεται στην συνδυασμένη χορήγηση δυο φαρμάκων που δρουν με διαφορετικό τρόπο και στην μελέτη της αντικαρκινικής δράσης τους σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ΧΜΛ. Το πρώτο φάρμακο ανήκει στην κατηγορία των ανθρακυκλινών, είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο ευρέως δράσεως και συνήθως χορηγείται σε συμπαγείς όγκους, αλλά και σε περιπτώσεις λευχαιμίας, και ονομάζεται Δοξορουβικίνη. Η Δοξορουβικίνη ασκεί πλειοτροπική δράση, μεταξύ των οποίων πρόκληση βλαβών στο DNA, αλλά και παραγωγή ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που ενεργοποιεί τους αποπτωτικούς μηχανισμούς των καρκινικών κυττάρων. Η δεύτερη ουσία που εξετάζεται είναι το διχλωροακετοξικό οξύ (DCA), που ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων της γλυκόλυσης και συγκεκριμένα ενισχύει την παραγωγή του ακετυλο-CoA που θα εισέλθει στον κύκλο του κιτρικού οξέος και θα οδηγήσει σε παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σε πρώτο στάδιο είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης των παραπάνω ουσιών που θα χρησιμοποιηθεί για τη χορήγηση στα ερυθρολευχαιμικά K-562 κύτταρα. Στη συνέχεια, η μελέτη της δράσης των φαρμάκων θα γίνει με απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων και με ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων σημαντικών πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν τόσο σε αναπτυξιακά μονοπάτια είτε σε μονοπάτια για την παραγωγή ενέργειας. Από τα πειράματα της μελέτης φάνηκε πως ο συνδυασμός των δυο φαρμάκων δεν μεταβάλλει δραματικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Όσον αφορά τις αλλαγές στα επίπεδα των πρωτεϊνών, η επώαση των K-562 κυττάρων με τη δοξορουβικίνη οδηγεί σε τάση για ενίσχυση του Warburg effect και μειωμένη ενεργότητα της αναπνευστικής αλυσίδας. Τα μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης Sco2 που παρατηρήθηκαν μέσω της κυτταρομετρίας ροής φαίνεται να ενισχύουν το Warburg effect. Από την άλλη, η ταυτόχρονη επώαση με δοξορουβικίνη και DCA δεν οδηγεί σε τόσο δραματική αλλαγή του μεταβολισμού της γλυκόζης σε σύγκριση με την επώαση των κυττάρων με δοξορουβικίνη $2 \cdot 10^{-8} \text{M}$. Επομένως, είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση και μελέτη πρωτεϊνών στόχων που συμμετέχουν σε μονοπάτια παραγωγής ενέργειας, αλλά και του κυτταρικού κύκλου. Μια πρώτη προσέγγιση των επιπέδων ROS έδειξε αύξηση υπό την επίδραση και της δοξορουβικίνης και, μάλλον, ακόμα περισσότερο υπό την επίδραση του DCA, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στην κυτταροτοξική δράση των ουσιών αυτών.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος, Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ), Φαινόμενο Warburg, Δοξορουβικίνη, Διχλωροακετοξικό οξύ

Abstract

Chronic Myelogenous Leukemia is a type of blood cancer, and it belongs in the group of leukemias. The disease is divided into three stages, and the treatable cases are handled with specialized medication. The existed treatments are based on drugs that are designed on a molecular deficit that characterizes a big percentage of patient's cancer cells. Specifically, in these cancer cells a translocation between the 9th and 22nd chromosome, which leads to a formation of a chimeric protein Bcr-Abl with an increased activity of a tyrosine kinase, is observed. Based on this trait, specific molecules have been designed that act as tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Despite the promising results that were observed at first, the developed tolerance against the drugs leads to new experimental therapeutic plans, which involve the combinational administration of anticancer drugs for a better clinical effect.

The perspective of the new therapeutic scheme for the CML treatment led to the present thesis, which is based on the combined administration of two differentially acting agents and the study of its potential increased anticancer activity on a CML cell line, K-562. The first drug belongs to the group of anthracyclines, is a wide range anticancer drug and it is usually administered to solid tumors but also to leukemia cases and is called Doxorubicin. Doxorubicin exerts a pleiotropic mechanism of action, like DNA lesions and production of free oxygen radicals that activate the apoptotic path of the cancer cells. The second agent used is a member of the glycolysis' inhibitors group and it enhances the acetyl-CoA production that is metabolized in the citric cycle and then, leads to energy production through the Oxidative Phosphorylation.

The determination of the drug's suitable concentration that will be administered to the K-562 cells is the first necessary step for the experiments. Next, the activity of the drugs will be examined by the protein extraction of the cells after the drug administration and the quantitative determination of important proteins that are involved in either developmental or energy production pathways.

The experimental data showed that the combination of the two drugs doesn't change the cell viability in a dramatic way. As far as the protein level changes, the incubation of the K-562 cells with doxorubicin leads to increase Warburg effect and lower the respiratory chain rate. The reduced levels of the Sco2 protein that were shown by flow cytometry, indicated an induction of Warburg effect. On the other hand, the simultaneous incubation with doxorubicin and DCA doesn't change dramatically the glucose metabolism as opposed to doxorubicin $2 \times 10^{-8} \text{M}$ by itself. Therefore, it is necessary to investigate further the protein levels of important molecules that are participated in energy metabolism pathways, but also cell cycle. Furthermore, the induction of ROS levels not only by doxorubicin but probably by DCA too, may suggest the cytotoxic action of those molecules.

Key words: Cancer, Chronic Myelogenous Leukemia (CML), Warburg effect, Doxorubicin, Dichloroacetic acid (DCA).

1. Εισαγωγή

1.1 Εισαγωγή στον Καρκίνο

Ο όρος «**καρκίνος**» αναφέρεται σε ένα φάσμα ασθενειών και συγκεκριμένα σε **κακοήθη νεοπλάσματα** που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και εξάπλωση των κυττάρων σε γειτονικούς ιστούς. Οι κύριοι τύποι καρκίνου διακρίνονται με βάση την προέλευση των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν σε καρκινικά. Το **καρκίνωμα** χαρακτηρίζει καρκίνους που ξεκινούν από την επιδερμίδα ή από ιστούς που επενδύουν το εσωτερικό των οργάνων, δηλαδή αφορά όγκους επιθηλιακών κυττάρων. Το **σάρκωμα** είναι ο καρκίνος που ξεκινά από τα κόκαλα, το λίπος, τους μύες, τα αγγεία ή γενικότερα από κύτταρα συνδετικού ιστού. Η **λευχαιμία** και το **λέμφωμα** αποτελούν τύπους καρκίνου που επηρεάζουν το αιμοποιητικό σύστημα. Οι λευχαιμίες ξεκινούν από ανωμαλίες κυττάρων του μυελού των οστών, ενώ τα λεμφώματα οφείλονται σε μη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και των λεμφαδένων. Τέλος, ο καρκίνος του κεντρικού νευρικού συστήματος ξεκινά από κύτταρα είτε-στον εγκέφαλο είτε στο νωτιαίο μυελό [1].

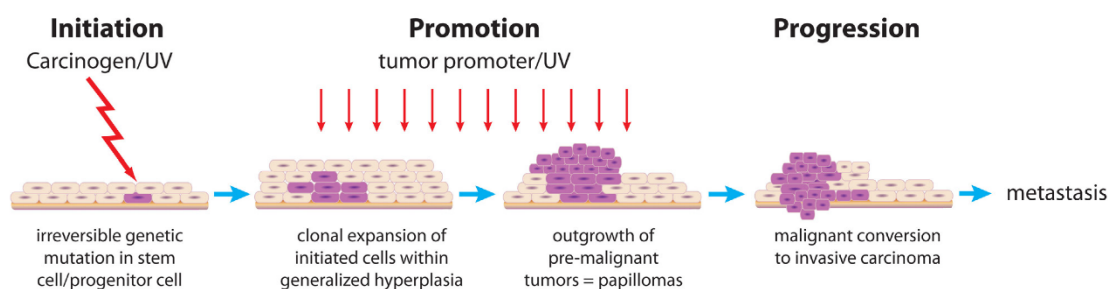
1.1.1 Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης

Η μετάβαση ενός κυττάρου από το φυσιολογικό φαινότυπο σε έναν καρκινικό αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία με στάδια που κάθε ένα συμβάλλει σημαντικά στην αλλαγή κύριων χαρακτηριστικών του.

Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης συνιστάται από τρία (3) στάδια, την έναρξη (initiation), την προαγωγή (promotion) και την πρόοδο (progression) και περιγράφει την πορεία μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, εφόσον σε αυτό έχει επιδράσει ένας παράγοντας καρκινογένεσης, όπως για παράδειγμα οι χημικές καρκινογόνες ουσίες (**Εικόνα 1**) [2]. Πιο αναλυτικά:

1. Η **έναρξη (initiation)** περιλαμβάνει την μη αναστρέψιμη αλλαγή του DNA μετά τη δράση του καρκινογόνου. Σε περίπτωση που η βλάβη δεν αποκατασταθεί από επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου οδηγεί στη δημιουργία του «αρχικού κυττάρου». Οι μεταλλάξεις που γίνονται κατά την έναρξη, εντοπίζονται σε πρωτο-ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας την έκφρασή τους, αντίστοιχα, γεγονός που οδηγεί στην εγγενή ικανότητα για αυτόνομη ανάπτυξη του «αρχικού κυττάρου». Ωστόσο, αυτό το κύτταρο φαινοτυπικά είναι όμοιο με τα υπόλοιπα και παράλληλα όσο πολλαπλασιάζεται μεταφέρει τη βλάβη και στα θυγατρικά του κύτταρα, που και αυτά μετατρέπονται σε «αρχικά κύτταρα» [3].
2. Το στάδιο της **προαγωγής (promotion)** συμβαίνει σε ένα «αρχικό κύτταρο» υπό την επίδραση ενός προαγωγέα που προκαλεί είτε επιπρόσθετες μεταλλάξεις στο DNA είτε επιγενετικές αλλαγές, μεταβάλλοντας τη γονιδιακή έκφραση. Οι παραπάνω αλλαγές συμμετέχουν στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του κυττάρου, το οποίο επεκτείνεται κλωνικά σε μία καλοήγη ή προνεοπλασματική μάζα.
3. Η **πρόοδος (progression)** αφορά τις αλλαγές που υφίσταται μια καλοήγη ή προνεοπλασματική μάζα, ώστε να μετατραπεί σε έναν καρκινικό όγκο. Αποτελεί το πιο μακροχρόνιο στάδιο, γιατί περιλαμβάνει ιδιομορφίες στον καρυότυπο, σοβαρές αλλαγές στη γενετική σταθερότητα, συσσώρευση μεταλλάξεων, αλλαγές που σχετίζονται είτε με τη μορφολογία των κυττάρων είτε με βιοχημικά μονοπάτια. Τελικά, όλα αυτά οδηγούν σε εισβολή και μετάσταση των όγκων σε

γειτονικούς ιστούς που καθιστούν κρίσιμα σοβαρή την κατάσταση του ασθενούς, λόγω της μη αναστρεψιμότητας του 3^{ου} σταδίου της καρκινογένεσης [4].



Εικόνα 1: Τα στάδια της καρκινογένεσης [5]

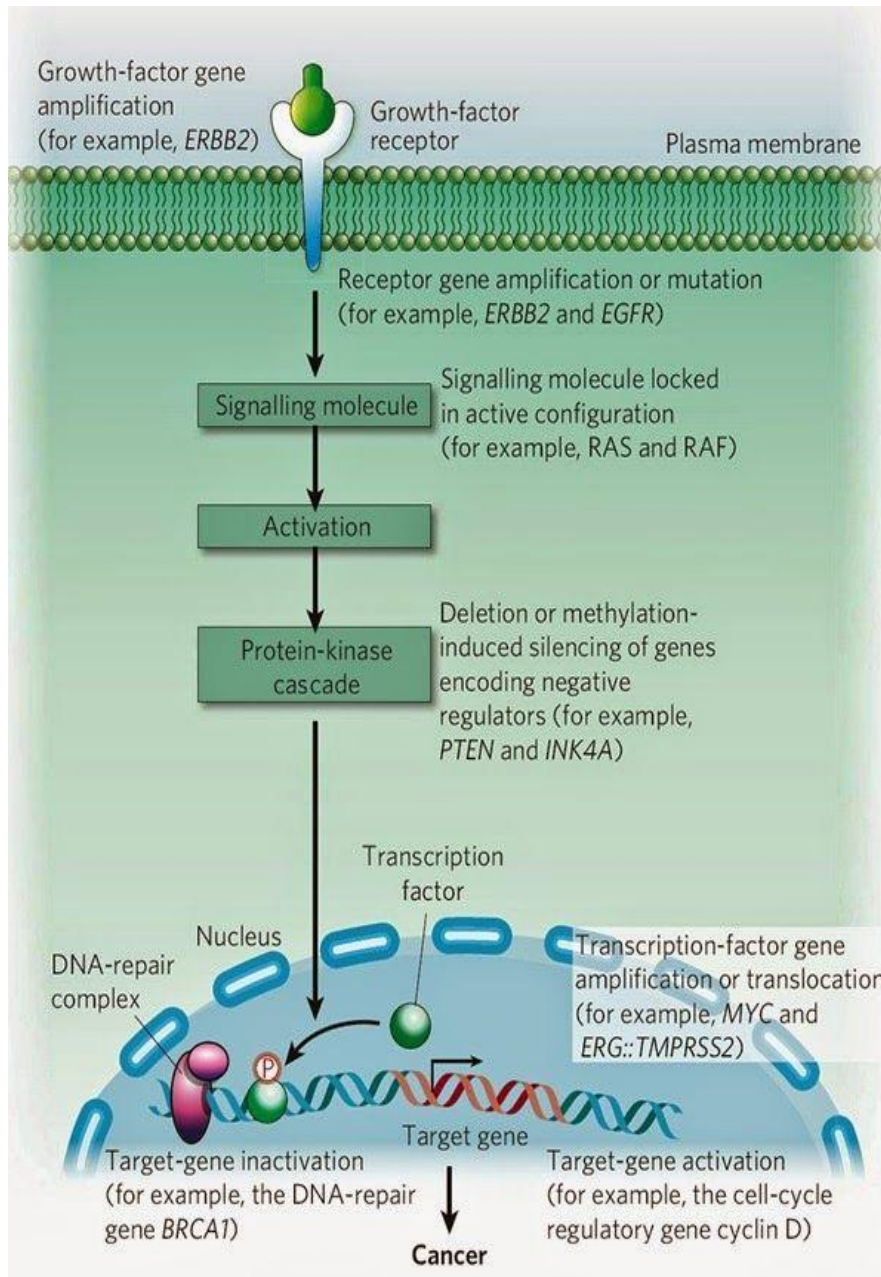
1.1.2 Μεταλλάξεις

Οι βλάβες του DNA που δεν επιδιορθώνονται από ενδογενείς κυτταρικούς μηχανισμούς διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος τους και επηρεάζουν είτε ένα γονίδιο (**γονιδιακές μεταλλάξεις**), είτε ένα ολόκληρο χρωμόσωμα (**χρωμοσωμικές μεταλλάξεις**). Οι μεταλλάξεις που αφορούν έναν γονιδιακό τόπο, αλλάζουν τον αριθμό των νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία του DNA με προσθήκη ή αφαίρεσή τους ή προκαλούν αλλαγές στη σύσταση του DNA, με αντικατάσταση των βάσεων του με διαδικασίες όπως η **μεταστροφή - αντικατάσταση** (πουρίνη ↔ πυριμιδίνη) και η **μετάπτωση** (πουρίνη ↔ πουρίνη, πυριμιδίνη ↔ πυριμιδίνη).

Το αποτέλεσμα των παραπάνω μεταλλάξεων είναι συνήθως ορατό στο γονιδιακό προϊόν, όταν η αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεΐνης μεταβάλλεται τόσο, ώστε να αλλάζει δραματικά η τριτοταγής και η τεταρτοταγής δομή της και συνεπώς και η λειτουργικότητά της. Από την άλλη, οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν μεγαλύτερο τμήμα του DNA και γίνονται ορατές με την παρατήρηση του καρυότυπου. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στον καρυότυπο είναι **αριθμητικές**, να αλλάζει δηλαδή ο αριθμός των χρωμοσωμάτων, ή **δομικές** κατά τις οποίες τμήματα μεγάλου μοριακού μεγέθους διπλασιάζονται (duplication), αφαιρούνται (deletion, αναστρέφονται (inversion) ή μετατίθενται (translocation) [1].

Ενώ υπάρχουν πολλά είδη μεταλλάξεων που οδηγούν στην εκδήλωση του καρκίνου, οι περισσότερες έχουν ένα κοινό, τα **πρωτο-ογκογονίδια** και τα **ογκοκατασταλτικά γονίδια**. Τα πρωτο-ογκογονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, αφού συμβάλλουν στην κυτταρική ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό. Ωστόσο, η υπερβολική και μη ελεγχόμενη δράση τους μέσω μεταλλάξεων μπορεί να πυροδοτήσει την αρχή της καρκινογένεσης, και τα μεταλλαγμένα γονίδια αναφέρονται ως ογκογονίδια. Τα πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν κυτταρικούς υποδοχείς, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροπλασματικές κινάσες και μεταγραφικούς παράγοντες.

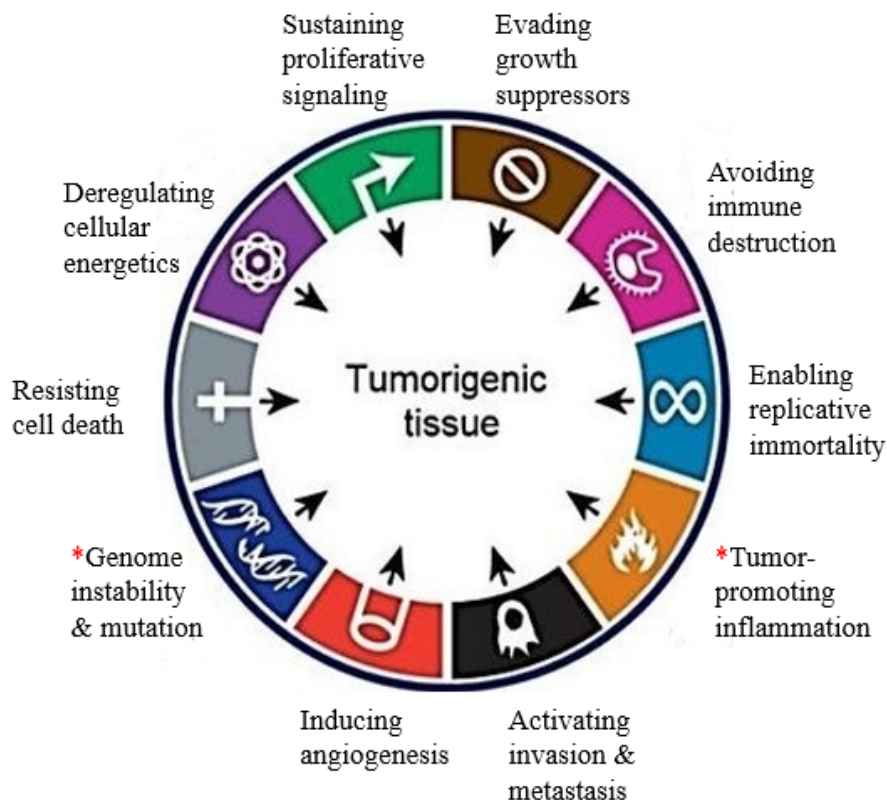
Λειτουργικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες δρουν αναστέλλοντας τις ογκοεπαγωγικές ιδιότητες των παραπάνω προϊόντων, διατηρώντας μια ισορροπία στην κυτταρική διαίρεση (**Εικόνα 2**). Μεταλλάξεις που διαταράσσουν την αρμονία μεταξύ της προώθησης και της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δημιουργούν κύτταρα επιρρεπή σε κυτταρικές βλάβες, με πιθανή έκβαση τον καρκίνο [6].



Εικόνα 2: Οι λειτουργίες των πρώτο-ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου [7].

1.2 Ορόσημα του Καρκίνου

Παρά τις μακροχρόνιες μελέτες από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα, υπάρχουν πολλά αβέβαια στοιχεία γύρω από τον καρκίνο. Όμως, στις αρχές κιάλας του 21^{ου} αιώνα προτάθηκαν έξι (6) χαρακτηριστικά (ορόσημα του καρκίνου), τα οποία μοιράζονται οι περισσότεροι τύποι καρκίνου. Στη συνέχεια, οι Hanahan & Weinberg εμπλούτισαν την αρχική τους λίστα με ακόμα δύο (2) ορόσημα του καρκίνου που συνεισφέρουν στην παθογένεια της νόσου αλλά πρόσθεσαν και δύο (2) επιπλέον απαραίτητα χαρακτηριστικά που διευκολύνουν την απόκτηση των ορόσημων του καρκίνου (**Εικόνα 3**) [8].



Εικόνα 3: Τα οκτώ (8) ορόσημα του καρκίνου. Με κόκκινο αστερίσκο φαίνονται τα χαρακτηριστικά που προδιαθέτουν την εμφάνιση των οροσήμων [9].

1.2.A Αυτάρκεια σε σήματα υπέρ της ανάπτυξης (Self-Sufficiency in Growth Signals)

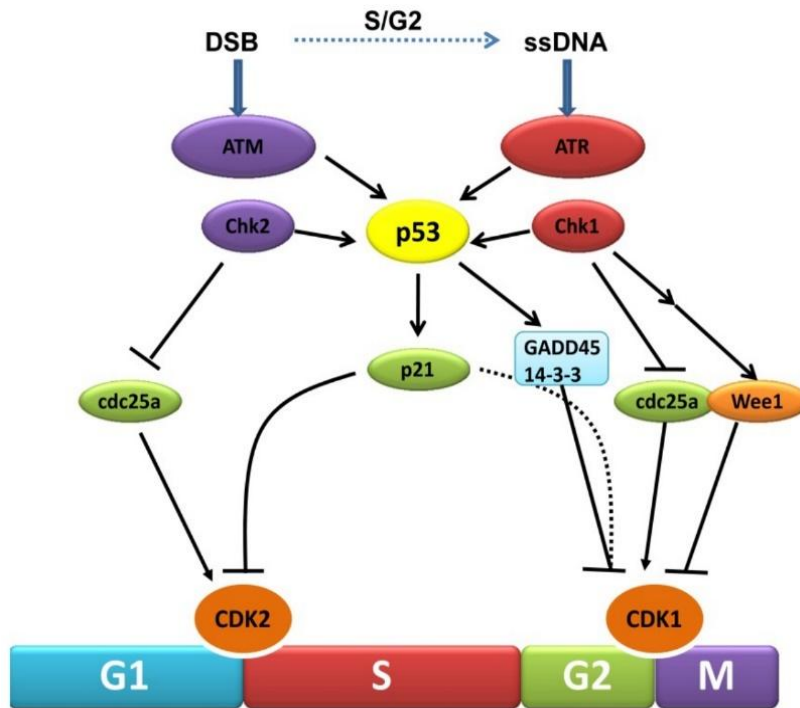
Τα φυσιολογικά κύτταρα εισέρχονται στη φάση διαίρεσης μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που πυροδοτούνται από μιτογόνους αυξητικούς παράγοντες. Οι μιτογόνοι αυξητικοί παράγοντες είναι εξωκυτταρικά σήματα που μετά από την αλληλεπίδραση τους με μεμβρανικούς υποδοχείς, συνήθως κινάσες τυροσίνης, σημαίνουν την έναρξη μιας μεταγωγής σήματος που οδηγεί στην αύξηση και τελικά παραγωγή δύο θυγατρικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς, με τους οποίους να βρίσκονται συνεχώς σε μια κατάσταση ενεργοποίησης του κυτταρικού κύκλου από αυξητικούς παράγοντες.

- a) Ένας τρόπος με τον οποίον τα καρκινικά κύτταρα δεν εξαρτώνται από εξωτερικά σήματα για την επαγωγή της μίτωσης είναι η έκκριση αυξητικών παραγόντων, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν την δική τους σηματοδότηση με αντικρινή τρόπο.
- b) Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να στέλνουν σήματα στα γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα και να τα ρυθμίζουν έτσι ώστε να συνθέτουν αυξητικούς παράγοντες, που θα εκκριθούν από τα φυσιολογικά κύτταρα και θα προσδεθούν στους υποδοχείς των καρκινικών κυττάρων.
- c) Εκτός από τους μηχανισμούς που αφορούν το σήμα, μεταλλάξεις στους κυτταρικούς υποδοχείς ή ακόμα και στα ενδοκυτταρικά συστατικά που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι είναι ικανές να αυξήσουν την ευαισθησία του κυττάρου σε ιστογόνα σήματα [10].

1.2.B Μειωμένη ευαισθησία σε σήματα αναστολής της ανάπτυξης (Insensitivity to Antigrowth Signals)

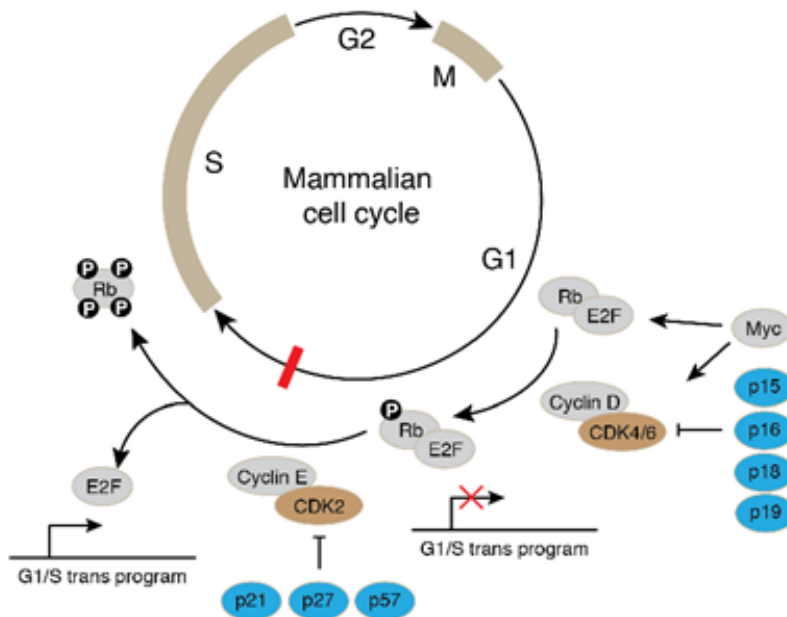
Όπως ενεργοποιείται η παραγωγή των μιτογόνων σημάτων που θα θέσουν το κύτταρο σε μια πορεία κυτταρικής διαίρεσης, πρέπει να υπάρχουν μόρια και σήματα τα οποία να καταστέλλουν τα παραπάνω, προκειμένου να εμποδιστεί ένας ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Ενδογενείς και εξωκυτταρικοί αναστολείς της κυτταρικής ανάπτυξης συναντώνται σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου, τα γνωστά σημεία ελέγχου, και είναι υπεύθυνοι είτε για την έξοδο του κυττάρου από την ενεργή κυτταρική διαίρεση στην φάση G_0 , είτε για την παύση του κυτταρικού κύκλου, όταν το κύτταρο δεν ικανοποιεί τις προϋποθέσεις για να ακολουθήσει στην επόμενη φάση. Γνωστοί αρνητικοί ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης που απορρυθμίζονται στα καρκινικά κύτταρα είναι η p53 και η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb) [11].

- Η **p53** πρωτεΐνη συμμετέχει σε δύο (2) σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου: μετά την G1 ελέγχει την είσοδο στην S φάση, και μετά την G2 ελέγχει την είσοδο στη φάση της μίτωσης. Όταν η p53 ανιχνεύσει βλάβες στο DNA ενεργοποιεί αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, όπως τον αναστολέα p21 που θα αλληλεπιδράσει με την CDK2/1, με σκοπό να σταματήσει σε αυτό το σημείο ο κύκλος και μόνο αφού γίνει επιδιόρθωση των βλαβών να εισέλθει στην επόμενη φάση (**Εικόνα 4**). Τα καρκινικά κύτταρα, συνήθως, εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* που οδηγεί σε μη ενεργή-λειτουργική p53 πρωτεΐνη και συνεπώς κύτταρα, τα οποία έχουν συσσωρεύσει πλήθος μεταλλάξεων, θα ξεφύγουν της ρύθμισης και θα διαιρεθούν, μεταφέροντας τις βλάβες τους σε νέα κύτταρα [12].



Εικόνα 4: Η p53 εμπλέκεται στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και G2, επηρεάζοντας την κατάσταση κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών που προωθούν την πρόοδο της διαίρεσης [13].

- Η **pRb** πρωτεΐνη αποτελεί σημαντικό μόριο στον έλεγχο των κυτάρων που θα περάσουν στη φάση αντιγραφής του DNA. Στη μη-φωσφορυλιωμένη της μορφή αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2Fs, οι οποίοι ελέγχουν τη μεταγραφή γονιδίων που εμποδίζουν τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S. Η pRb απενεργοποιείται μετά από φωσφορυλίωσή της από κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες του κυττάρου, το οποίο σηματοδοτεί την άρση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου και την εισαγωγή του κυττάρου στην φάση S (**Εικόνα 5**) [14].



Εικόνα 5: Η φωσφορυλίωση της pRb στο τέλος της G1 επιτρέπει τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην είσοδο του κυττάρου στην φάση S [15].

1.2.Γ Αυτονομία πολλαπλασιασμού (Limitless Replicative Potential)

Αναμφισβήτητη ιδιότητα των φυσιολογικών κυττάρων είναι ο περιορισμένος χρόνος ζωής. Ωστόσο, κάποιοι τύποι κυττάρων έχουν μικρότερο χρόνο ζωής από άλλους, για παράδειγμα τα κύτταρα της εξωτερικής στοιβάδας του δέρματος ανανεώνονται κάθε δύο εβδομάδες, τα λευκά αιμοσφαίρια ζουν από μερικές ημέρες μέχρι μερικές εβδομάδες (ανάλογα τον τύπο), ενώ τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής που φτάνει περίπου τους τέσσερις (4) μήνες. Τα κύτταρα του ήπατος ανανεώνονται έτσι ώστε το ήπαρ να αναγεννάται πλήρως σε ένα διάστημα ενός με ενάμιση χρόνο, ενώ από την άλλη τα περισσότερα κύτταρα του νευρικού συστήματος διατηρούνται ζωντανά για πάρα πολλά χρόνια και δεν αναγεννούνται.

Ο χρόνος ζωής των διαιρούμενων κυττάρων εξαρτάται από τμήματα DNA που εντοπίζονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων και ονομάζονται τελομερή (telomeres). Τα τελομερή αποτελούνται από χιλιάδες επαναλαμβανόμενα τμήματα ~ 6 bps (5-8), τα οποία μετά από κάθε διαίρεση του κυττάρου μικραίνουν σε μήκος. Συγκεκριμένα, 50-100 bps από κάθε τελομερές χάνεται, επειδή η DNA πολυμεράση δεν είναι ικανή να αντιγράψει πλήρως το 3' άκρο από κάθε αλυσίδα του DNA. Όταν μετά από κάποιες διαιρέσεις του κυττάρου τα τελομερή χάνονται πλήρως, τότε η απουσία τους έχει σημαντικές επιδράσεις στη βιωσιμότητα του κυττάρου. Τα επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA προσφέρουν προστασία στο χρωμοσωμικό DNA, καθώς όταν τα άκρα του είναι εκτεθειμένα, τότε παρατηρούνται συνδέσεις μεταξύ άκρων διαφορετικών χρωμοσωμάτων και αταξία του καρυότυπου που τελικά οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο [16, 17].

Τα καρκινικά κύτταρα αγνοούν τον παραπάνω μηχανισμό, συνήθως εξαιτίας μεταλλάξεων ενισχυμένης δράσης στο γονίδιο της τελομεράσης, μια αντίστροφη μεταγραφάση που φυσιολογικά συνθέτει τα τελομερή, αποκαθιστώντας την χρωμοσωμική ακεραιότητα και την επιβίωση του κυττάρου [18].

1.2.Δ Αποφυγή απόπτωσης (Evading Apoptosis)

Βλάβες στο DNA προκαλούνται είτε από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό διμερών πυριμιδινών, είτε από λάθη της DNA πολυμεράσης κατά την ενσωμάτωση των βάσεων κατά την αντιγραφή του DNA που οδηγούν σε μεταλλάξεις. Παρόλα αυτά, το ποσοστό λάθους της DNA πολυμεράσης είναι 1 στα 10^{10} νουκλεοτίδια, εξαιρετικά μικρό για το ανθρώπινο γονιδίωμα που συνιστάται από περίπου $3 \cdot 10^9$ bps. Ακόμα και σε περίπτωση λάθους, η DNA πολυμεράση διαθέτει δραστηριότητα εξωνουκλεάσης, που κατά την πορεία της αντιγραφής της επιτρέπει να απομακρύνει λίγα νουκλεοτίδια και να τα ξανά-ενσωματώσει στην αλυσίδα, διορθώνοντας το λάθος. Επιπλέον, κατά το πέρας της αντιγραφής ειδικά επιδιορθωτικά ένζυμα αναλαμβάνουν να επιδιορθώσουν βλάβες που δεν "τακτοποιήθηκαν" από τις DNA πολυμεράσες. Εκτός από αυτά, ενδοκυτταρικά εντοπίζεται ένα πλούσιο σύστημα διαφορετικών επιδιορθωτικών μηχανισμών, είτε πρόκειται για μεταλλάξεις είτε για βλάβες στη δομή του DNA, που τελικά ελαχιστοποιούν τα περιθώρια διατήρησης βλαβών στο DNA [19].

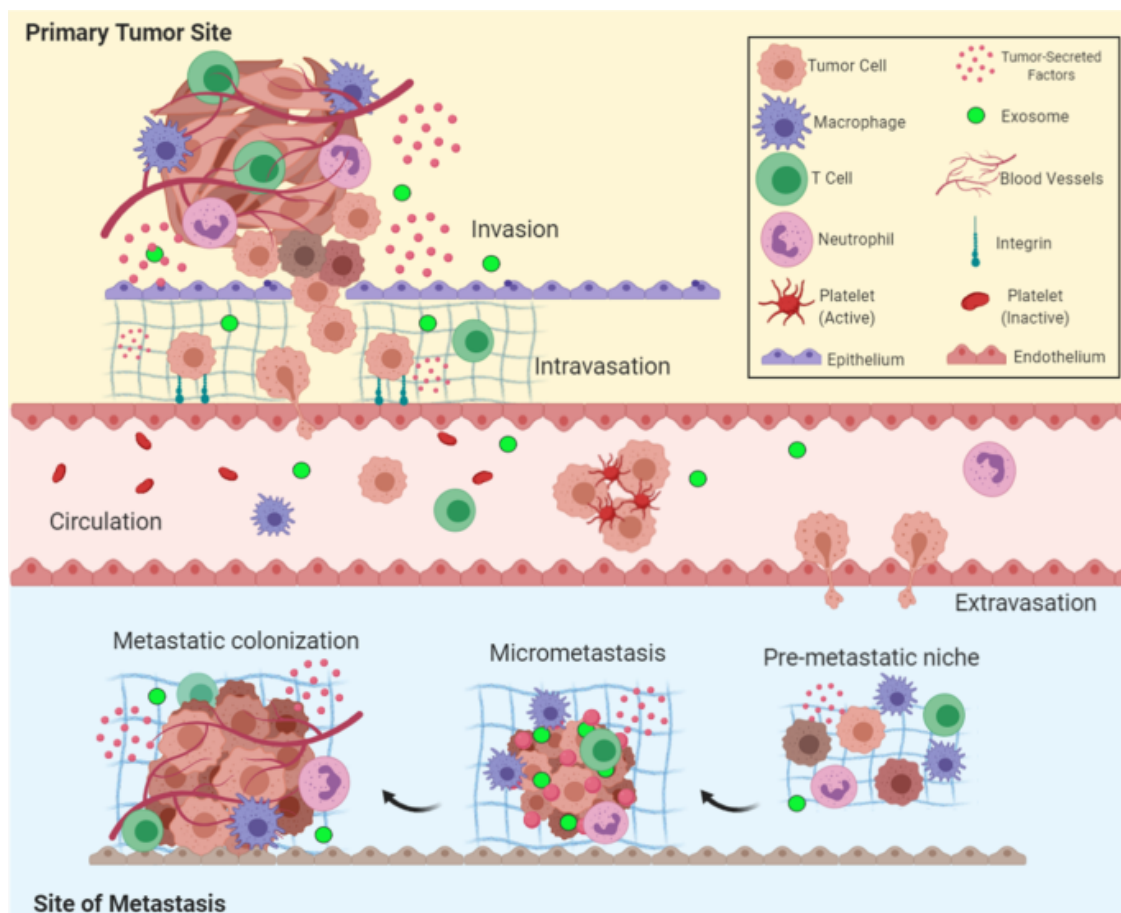
Σε περίπτωση που ανιχνευθεί κάποια βλάβη που δεν είναι δυνατόν να επιδιορθωθεί από τους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης, τότε ενεργοποιείται το μονοπάτι της απόπτωσης, ή αλλιώς ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Η απόπτωση είναι ένα ενεργητικό και οργανωμένο μονοπάτι που συμβαίνει φυσιολογικά

στον οργανισμό και είναι απαραίτητο, καθώς παίζει ρόλο στην διατήρηση του αριθμού των κυττάρων στο σώμα. Συνοπτικά, η διαδικασία της απόπτωσης ξεκινά με την ενεργοποίηση κυτταρικών παραγόντων (κασπάσες), που θα διασπάζουν το DNA σε μικρότερα θραύσματα (DNA ladder). Παράλληλα, το κύτταρο συρρικνώνεται και σχηματίζονται τα αποπτωτικά σωματίδια που θα αποικοδομηθούν πλήρως από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (φαγοκύτταρα). Αυτός ο μηχανισμός εμποδίζει την περαιτέρω επιβίωση κυττάρων που έχουν συσσωρεύσει βλάβες ή που δεν έχουν τελομερή στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Και οι δύο αυτές κατηγορίες κυττάρων είναι επικίνδυνες, όταν εξακολουθούν να διαιρούνται, καθώς αποτελούν πηγές καρκινικών κυττάρων [20].

1.2.E Εισβολή και Μετάσταση σε άλλους ιστούς (Invasion and Metastasis)

Η αποκοπή καρκινικών κυττάρων από τον αρχικό όγκο, η μετανάστευσή τους σε γειτονικούς υγιείς ιστούς και ο πολλαπλασιασμός τους, που οδηγεί στην ανάπτυξη νέου όγκου ίδιας δομής με τον αρχικό, προκαλούν κατάρρευση των οργάνων και τελικά ευθύνεται για μεγάλο ποσοστό των θανάτων από καρκίνο. Η μετάσταση είναι ένα πολυσταδιακό και περίπλοκο στάδιο της καρκινογένεσης που προϋποθέτει:

- **τοπική εισβολή** (local invasion) των καρκινικών κυττάρων, που επιτυγχάνεται με την εξασθένιση της συνεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων από το στρώμα του όγκου. Έχει παρατηρηθεί αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης διαφόρων μορίων σε όγκους με μεταστατικές ιδιότητες. Βασικότερο κυτταρικό συστατικό, που συμβάλλει στην προσκόλληση και αλληλεπίδραση των κυττάρων, είναι η E-cadherin η οποία στα καρκινικά κύτταρα εμφανίζει μειωμένα επίπεδα δράσης, λόγω μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας και επιτρέπει την αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων. Ακόμα, οι μεταστατικοί όγκοι επηρεάζουν την έκκριση εξωκυτταρικών πρωτεασών από τα μακροφάγα του στρώματος, με σκοπό την εκμετάλλευσή τους από τα καρκινικά κύτταρα για εισβολή [21].
- **ενδαγγείωση** (intravasation), κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και σε αγγεία του λεμφικού συστήματος, μέσω των οποίων θα μεταφερθούν σε νέα «τοποθεσία».
- **εξαγγείωση** (intravasation), που περιλαμβάνει την έξοδο των κυττάρων από το αγγειακό σύστημα και την είσοδό τους στο παρέγχυμα του ιστού, όπου αρχικά θα σχηματίσουν **μικρομεταστάσεις** (micrometastases).
- Τελικά, τον **εποικισμό** (colonization) των καρκινικών κυττάρων στο περιβάλλον του ιστού (**Εικόνα 6**) [22].



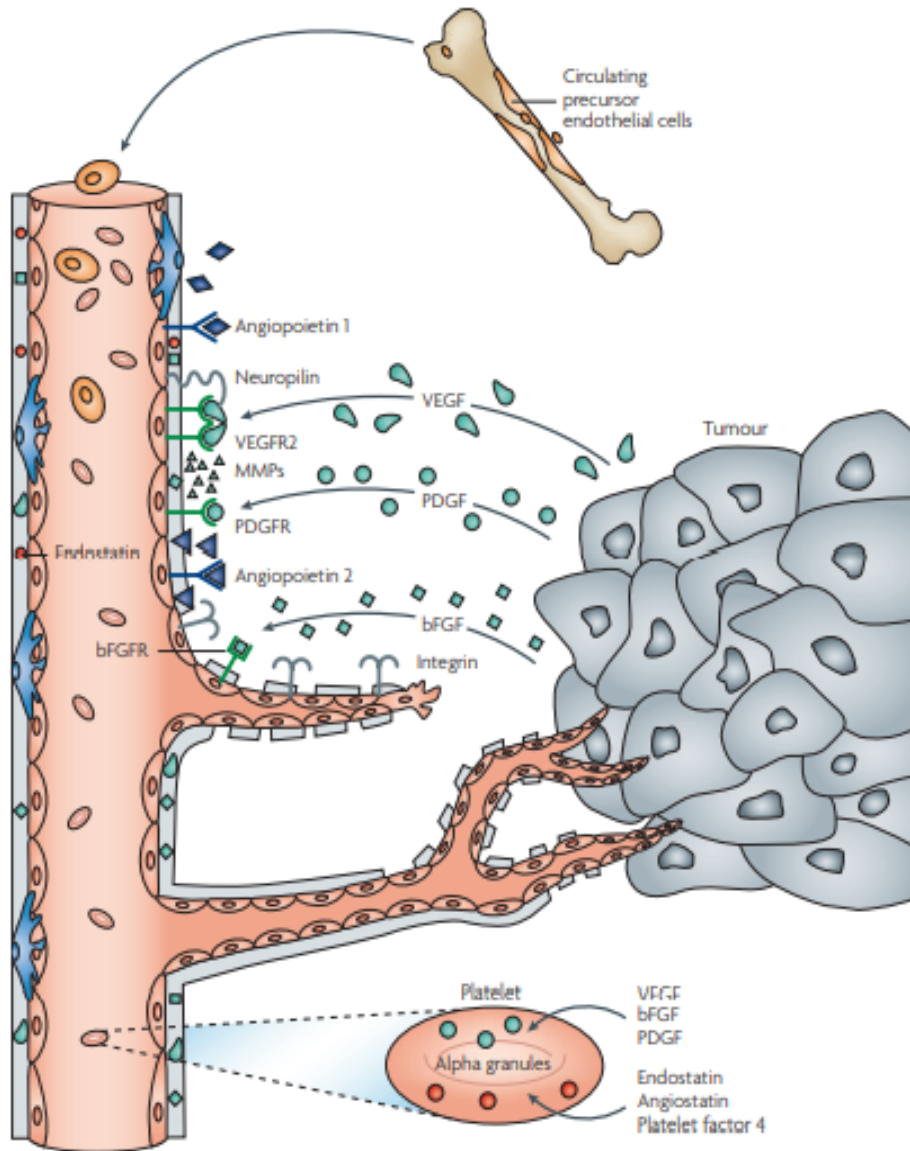
Εικόνα 6: Απεικόνιση των βασικών σταδίων που οδηγούν στην μετάσταση του όγκου [23]

Ο μηχανισμός εισβολής περιγράφεται από διάφορα μοντέλα, με πιο διαδεδομένο το **EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition)**, το οποίο περιλαμβάνει την αλλαγή του προφίλ έκφρασης των κυττάρων (επιθηλιακών ή μη), ώστε να αποκτήσουν μεσεγχυματικό φαινότυπο και να μεταναστεύσουν σε γειτονικούς ιστούς. Το EMT μοντέλο παρατηρείται και κατά διαδικασίες, όπως την οργανογένεση κατά την εμβρυογένεση ή την επούλωση πληγών σε όλη τη διάρκεια της ζωής. Αφού τα μεσεγχυματικά κύτταρα εγκατασταθούν στο μικροπεριβάλλον του νέου ιστού, υποστηρίζεται πως με την αντίστροφη διαδικασία **MET (Mesenchymal-Epithelial Transition)** θα αποκατασταθεί το προφίλ έκφρασης και θα αποκτήσουν πάλι τα καρκινικά χαρακτηριστικά [24].

1.2.ΣΤ Αγγειογένεση (Sustained Angiogenesis)

Η νέο-αγγειογένεση περιγράφει τη διαδικασία, κατά την οποία σχηματίζονται αιμοφόρα αγγεία από αντίστοιχα αγγεία που προ-υπάρχουν. Είναι σημαντική για διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, κατά την επούλωση πληγών, σε διάφορα στάδια του αναπαραγωγικού κύκλου της γυναίκας και κατά την εμβρυογένεση. Στις παραπάνω περιπτώσεις, οι αγγειογενετικές διαδικασίες ενεργοποιούνται με μεταγωγικά μονοπάτια που ξεκινούν με την επαγωγή των VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) και FGFs (fibroblast growth factors) και την πρόσδεσή τους σε υποδοχείς κίνησης τυροσίνης ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο έλεγχος των επιπέδων των αυξητικών παραγόντων και η αναστολή της σηματοδότησης αποκαθιστούν την ισορροπία στην

αγγειογενετική πορεία [25]. Ακόμα, η έκφραση μορίων που σχετίζονται με την συνεκτικότητα των κυττάρων υποστηρίζουν την ισχυρή επαφή των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων για τον αποτελεσματικό σχηματισμό νέων αγγείων. Μόρια των οικογενειών των ιντεγκρινών, κατχερινών και ανοσοσφαιρινών τείνουν να υπερ-εκφράζονται σε καταστάσεις ανάγκης δημιουργίας νέων αγγείων (**Εικόνα 7**). Μεταλλάξεις που μεταβάλλουν τα επίπεδα των παραπάνω κυτταρικών συστατικών είναι υπεύθυνες για την αγγειογενετική ικανότητα των όγκων. Τα καρκινικά κύτταρα τείνουν να υπερ-εκφράζουν τους ενισχυτές της αγγειογένεσης, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται συνεχώς νέα αγγεία γύρω από τον όγκο στον οποίο θα παρέχουν συνεχώς θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο για την ανάπτυξή του [26, 27].



Εικόνα 7: Η αγγειογένεση ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα (π.χ. FGF, PDGF, VEGF), καθώς και από άλλα μόρια όπως αγγειοποιητίνες, μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) και ιντεγκρίνες [28].

1.2.Z Απορρύθμιση κυτταρικών μονοπατιών παραγωγής ενέργειας (Deregulating Cellular Energetics)

Το μονοπάτι για την παραγωγή ενέργειας που ακολουθούν τα φυσιολογικά κύτταρα περιλαμβάνει τη διάσπαση της γλυκόζης μέσω γλυκόλυσης, παραγωγή ακετυλο-CoA μέσω του κύκλου του Krebs, και παραγωγή μορίων ATP στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η παραπάνω ακολουθία γεγονότων στοχεύει σε παραγωγή υψηλών επιπέδων ενέργειας, για την κατάλυση αντιδράσεων απαραίτητων όχι μόνο για τη βιωσιμότητα του κυττάρου αλλά και για τη διεκπεραίωση των σηματοδοτικών μονοπατιών ενός φυσιολογικά λειτουργικού κυττάρου.

Όταν γίνεται αναφορά σε ένα καρκινικό κύτταρο, είναι πια επιβεβαιωμένο ότι η οδός που εξασφαλίζει την ενέργειά του είναι διαφορετική από το κλασικό. Τα καρκινικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, δεν χρειάζονται μεγάλα ποσά ενέργειας για να εκτελέσουν ενεργειακά δαπανηρές διαδικασίες, όμως το μόνο που έχει σημασία είναι η επιβίωση, η ανάπτυξη και η κυτταρική διαίρεση. Για να εξασφαλίσουν τα παραπάνω, τα καρκινικά κύτταρα «θυσιάζουν» την ενέργεια με δομικά συστατικά, όπως αμινοξέα και στοιχεία του DNA για τη σύνθεση μακρομορίων και οργανιδίων που θα παρέχει στα θυγατρικά του κύτταρα. Επομένως, τα άτομα άνθρακα της γλυκόζης, αντί να ανακυκλώνονται μέσω του κύκλου του Krebs, χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό του γαλακτικού οξέος και έτσι διατίθενται σε μονοπάτια βιοσύνθεσης αμινοξέων και πουρινών – πυριμιδινών [29].

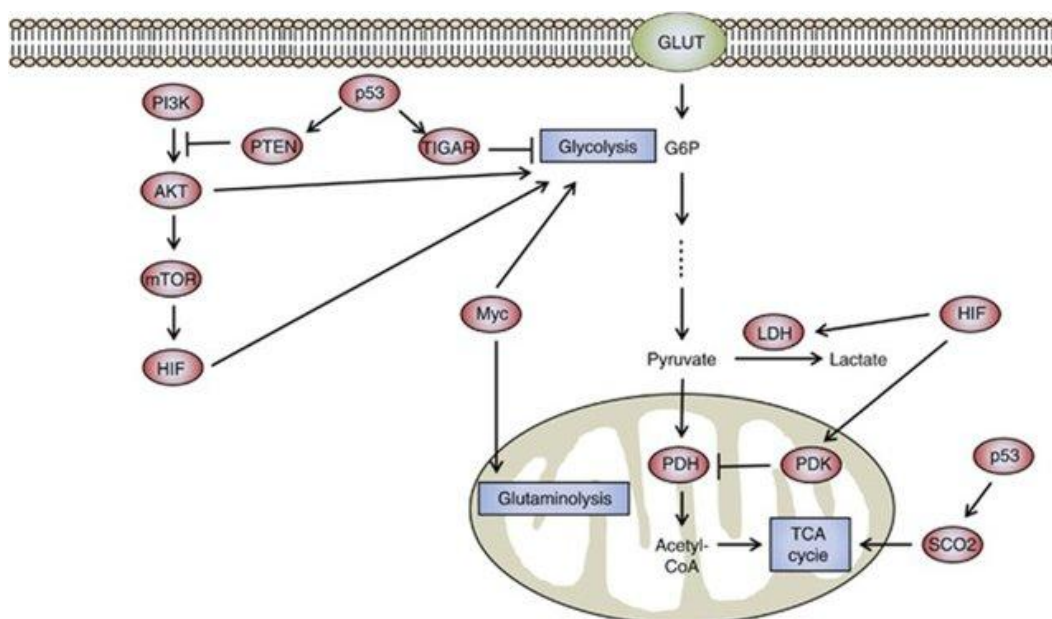
Η ενισχυμένη γλυκόλυση και η παράκαμψη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επιλέγεται από τα καρκινικά κύτταρα μέσω αυξημένης γλυκόλυσης που επάγεται από σημαντικά ογκογονίδια, όπως η Ras πρωτεΐνη η οποία κατά την καρκινογένεση αυξάνει τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα Hif-1α, ο οποίος ακολουθώντας ενισχύει τις γλυκολυτικές οδούς στο κυτταρόπλασμα.

Για την αυξημένη γλυκόλυση, ωστόσο, είναι απαραίτητη και η αντίστοιχα ενισχυμένη πρόσληψη των πηγών άνθρακα και αζώτου του κυττάρου, κυρίως γλυκόζης και γλουταμίνης, αντίστοιχα. Μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας στα γονίδια των μεταφορέων αυτών των υδατανθράκων επιτρέπουν αρχικά την είσοδο μεγάλων ποσοτήτων γλυκόζης και γλουταμίνης, που στη συνέχεια θα μεταβολιστούν από το κύτταρο [30].

Η ρύθμιση και η ενεργοποίηση της έκφρασης των μεταφορέων και των συστατικών που θα συμβάλλουν στην πρόσληψη των πηγών ενέργειας από το κύτταρο γίνεται είτε από εξωκυτταρικά σήματα, είτε σήματα από την αλληλεπίδραση του κυττάρου με το εξωκυτταρικό περιβάλλον.

- Η πρώτη περίπτωση αναφέρεται σε αυξητικούς παράγοντες, μόρια που προσδένονται σε κυτταροπλασματικούς υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, που πυροδοτούν μια σειρά σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών (RAS-ERK, PI3K-Akt) με τελικό αποτέλεσμα τη ρύθμιση μεταγραφής γονιδίων που θα προάγουν τον κυτταρικό κύκλο. Αυτό προϋποθέτει τη διαθεσιμότητα των δομικών συστατικών και των μακρομορίων του κυττάρου σε τέτοια ποσά, ικανά να υποστηρίξουν την παραγωγή δύο νέων κυττάρων.
- Η συνεκτικότητα και η αλληλεπίδραση των κυττάρων με το εξωκυτταρικό περιβάλλον έχει αποδειχθεί αναγκαία για την ελεγχόμενη ανάπτυξη των κυττάρων. Συγκεκριμένα, πειράματα σε καρκινικά κύτταρα θηλαστικών, τα οποία δεν έρχονται σε επαφή με τα γειτονικά τους, έχουν υποδείξει ότι προσλαμβάνουν μεγαλύτερα ποσά γλυκόζης που κατευθύνει το κύτταρο σε αυξημένη γλυκόλυση και ενίσχυση των μονοπατιών του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού, λόγω επάρκειας των πρώτων υλών [28, 31].

Αλλαγές σε γονιδιακούς τόπους που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (GLUT1, RTK, PI3K, Akt, RAS, c-myc κ.α.) με σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της πρόσληψης και του μεταβολισμού των πηγών ενέργειας, ευθύνονται για την αλλαγή του μεταβολικού προφίλ των κυττάρων. Η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό οδηγεί σε αλλαγές των ενεργειακών του αναγκών και προκειμένου να επιβιώσει και να διατηρήσει ένα αυξημένο βαθμό διαίρεσης προσαρμόζονται ανάλογα και τα μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας (**Εικόνα 8**) [32, 33].



Εικόνα 8: Ο μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων ρυθμίζεται από μονοπάτια που συμμετέχουν τόσο πρωτο-ογκογονίδια όσο και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου, το γονίδιο TP53 είναι απενεργοποιημένο, οπότε η μη ενεργή p53 επάγει τη γλυκόλυση μέσω του ενεργού HIF-1α [34]

1.2.Η Ανθεκτικότητα ενάντια στο ανοσοποιητικό σύστημα (Avoiding Immune Destruction)

Το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού είναι το σύστημα που καλείται να αναγνωρίσει τα ξένα κύτταρα και να τα απαλείψει από το σώμα. Η αναγνώριση των απειλών εκτελείται από μια ομάδα κυττάρων που ονομάζονται **αντιγονοπαρουσιαστικά** (APC) και συνιστώνται από δενδριτικά και μακροφάγα. Αυτή η ομάδα κυττάρων έχει ως ρόλο την “έκθεση” των αντιγόνων στη μεμβράνη τους, ώστε να ενεργοποιήσουν τα Τ-λεμφοκύτταρα και την ανοσολογική απόκριση ενάντια στο αντιγόνο. Η διαδικασία αυτή ξεκινά από την ενδοκυττάρωση διάφορων αντιγόνων του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Αυτά στη συνέχεια πρωτεολύονται και διασπώνται σε μικρότερα τμήματα στα λυσοσώματα. Τα μικρότερα θραύσματα των αντιγόνων κατευθύνονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου διεκπεραιώνεται ο σχηματισμός του **κύριου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας** (Major Histocompatibility Complex, **MHC**). Το MHC αποτελεί μια ομάδα πολυπεπτιδικών αλυσίδων (που κωδικοποιούνται από στενά συνδεδεμένα γονίδια), που σχηματίζουν ετεροδιμερή και εντοπίζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Όταν το θραύσμα του αντιγόνου μετακινηθεί στο

ενδοπλασματικό δίκτυο, θα αποτελέσει τμήμα του MHC και θα σχηματιστεί ένα υβρίδιο MHC-αντιγονικό θραύσμα, το οποίο στη συνέχεια θα μεταφερθεί στην πλασματική μεμβράνη. Υποδοχείς TCR των T-λεμφοκυττάρων αλληλεπιδρούν με το τμήμα του MHC που φέρει το τμήμα του αντιγόνου και ξεκινά η ανοσολογική απάντηση [35, 36].

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία της αναγνώρισης.

Αρχικά, η αποφυγή των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα διευκολύνεται από μεταλλάξεις που οδηγούν στην υπερκέρωση μιας δια-μεμβρανικής γλυκο-πρωτεΐνης CD47 στη λιπιδική διπλοστοιβάδα τους. Η CD47 ανήκει στην ομάδα των ανοσοσφαιρινών, εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και δρα ως προσδέτης σε υποδοχείς SIRPα (Signal Regulatory Protein α) των φαγοκυττάρων. Η αλληλεπίδραση του CD47 με τον SIRPα οδηγεί σε καταστολή των διεργασιών που αποφέρουν φαγοκύτωση, καθώς τα κύτταρα που παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους την CD47 θεωρούνται φυσιολογικά [37, 38].

Ωστόσο, σε περίπτωση που τα καρκινικά κύτταρα δεν υπερ-εκφράζουν την CD47, αποκτούν ένα άλλο πλεονέκτημα ενάντια στο ανοσοποιητικό σύστημα, αποτρέποντας την έκφραση του MHC από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Επομένως, δεν είναι δυνατή η αντιγονοπαρουσίαση που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και την καταστροφή του ξένου εισβολέα.

1.2.1 Χαρακτηριστικά που υποβοηθούν την εμφάνιση των ορόσημων

1.2.1.A Γενωμική αστάθεια και Μετάλλαξη

Τα ορόσημα, δηλαδή τα χαρακτηριστικά που διαθέτουν όλα τα κύτταρα ενός καρκινικού όγκου, αφορούν την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είτε ενισχύοντας είτε αποφεύγοντας τη διακοπή του, την αλλαγή των επικοινωνιακών μηχανισμών με τα γειτονικά κύτταρα και των ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Όλα τα παραπάνω είναι αποτέλεσμα της αλλαγής του μεταγραφώματος και του πρωτεώματος των καρκινικών κυττάρων, γεγονός που προϋποθέτει αλλαγές στην αλληλουχία του γενετικού υλικού [13]. Το κύτταρο είναι ευαίσθητο στη συσσώρευση μεταλλάξεων, όταν τα συστήματα που διατηρούν τη γενωμική σταθερότητα και την ακεραιότητα του DNA είναι ελλατωματικά. Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν κυτταρικά συστατικά, σημαντικά για την αναγνώριση των βλαβών, προσέλκυση και συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων που επιδιορθώνουν λάθη στο DNA, αυξάνουν την επιρρέπεια των κυττάρων και τη δεκτικότητα σε μεταλλάξεις. Με αυτό τον τρόπο το κύτταρο χάνει τους απαραίτητους μηχανισμούς ελέγχου και διατήρησης της ακεραιότητας του DNA και το καθιστά ευάλωτο σε μεταλλάξεις, μέσω των οποίων αποκτά σταδιακά τα ορόσημα του καρκινικού κυττάρου [20].

1.2.1.B. Φλεγμονή που επάγει την ογκογένεση

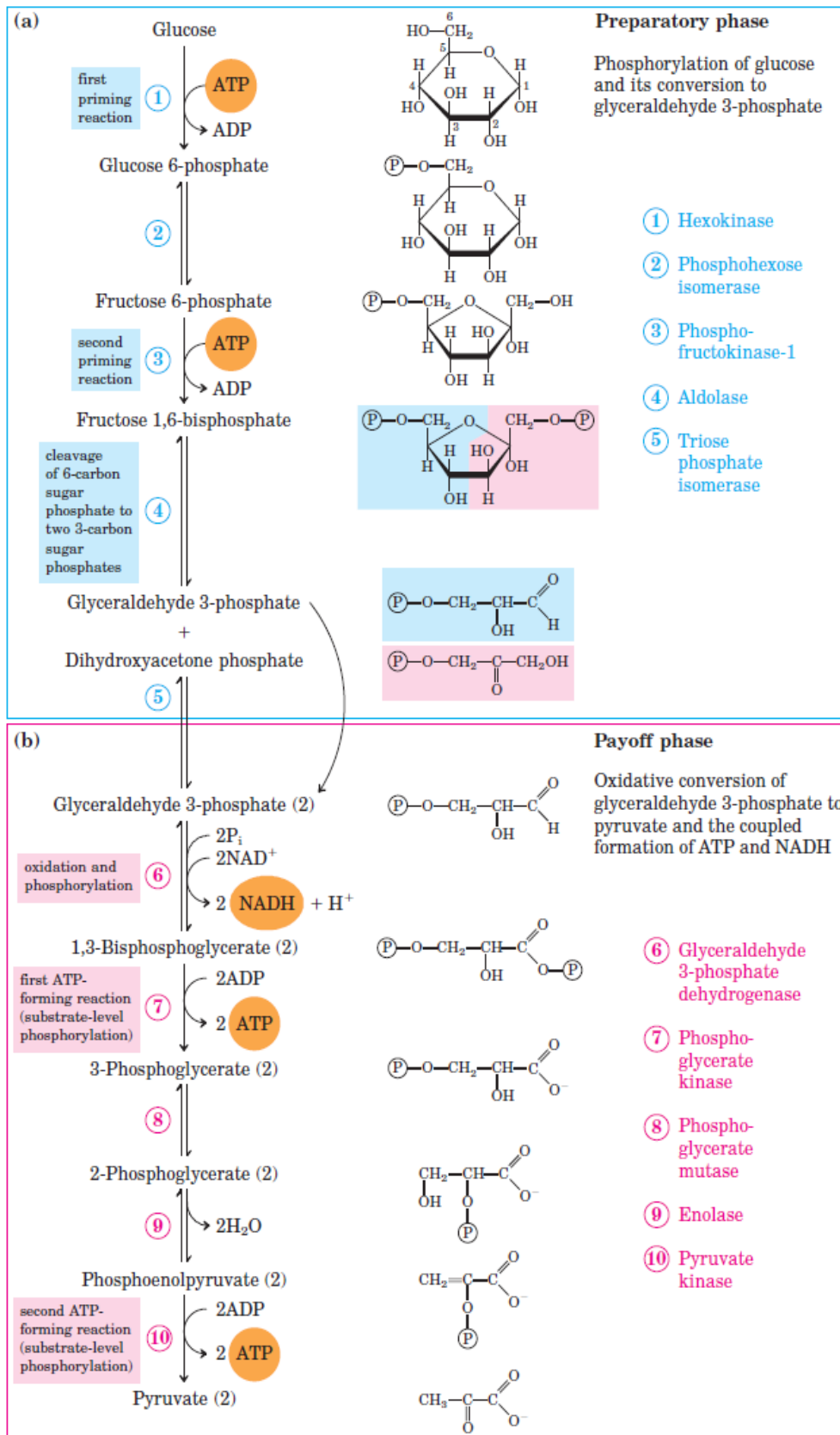
Μια κακοήθης νεοπλασία διακρίνεται σε δύο μέρη: τα καρκινικά κύτταρα που συνιστούν το λεγόμενο παρέγχυμα, και το στρώμα που περιλαμβάνει μια ομάδα από μη κακοήθη κύτταρα, T- και B-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες, λιποκύτταρα, κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου. Αυτά μαζί με τα κακοήθη κύτταρα δημιουργούν το

μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor-MicroEnvironment, TME). Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος συγκεντρώνονται σε περιοχές φλεγμονής προκειμένου να καταπολεμήσουν μια μόλυνση. Σε περιπτώσεις οξείας φλεγμονής τα κύτταρα εντοπίζονται περιστασιακά στο συγκεκριμένο σημείο, ενώ σε χρόνιες φλεγμονές παραμένουν στο σημείο της μόλυνσης, το οποίο έχει συσχετιστεί και με την προώθηση της καρκινογένεσης [39]. Η έκκριση μιας πληθώρας σηματοδοτικών μορίων από τα ανοσοποιητικά κύτταρα, όπως τον Epithelial Growth Factor (EGF), τον Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), χυμοκίνες, κυτταροκίνες, πρωτεάσες και ελεύθερες ρίζες, οδηγεί σε ενίσχυση της κυτταρικής ανάπτυξης, σε αποφυγή του κυτταρικού θανάτου, αγγειογενετικές διαδικασίες, την εισβολή και τη μετάσταση που χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα. Η συσχέτιση της καρκινογένεσης με παθολογικές καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής περιγράφηκε το 1863 από τον Rudolf Virchow, και σήμερα είναι γνωστό πως χρόνια μόλυνση με το *Helicobacter pylori* αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στο στόμαχο, και ότι η μόλυνση με κάποιον ιό από την οικογένεια των ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Viruses) ευθύνεται για μεγάλο ποσοστό εμφάνισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [8, 40].

1.3 Οδοί Παραγωγή ενέργειας

1.3.1 Γλυκόλυση

Οι οργανισμοί, προκαρυωτικοί και ευκαρυωτικοί, διακρίνονται σε αερόβιους και αναερόβιους που εξαρτάται από την ανάγκη ή μη αντίστοιχα σε οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας. Ως πηγή ενέργειας χρησιμοποιούνται σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη, που οι αυτότροφοι οργανισμοί συνθέτουν μέσω της φωτοσύνθεσης, ενώ οι ετερότροφοι οργανισμοί προσλαμβάνουν μέσω της τροφής. Η παρουσία γλυκόζης στο κύτταρο ενεργοποιεί μια διαδικασία καταβολισμού που ονομάζεται γλυκόλυση, αναερόβια, αφού γίνεται χωρίς την παρουσία οξυγόνου, πορεία που χρησιμοποιείται από πληθώρα οργανισμών. Η γλυκόλυση αποτελείται από 10 διαδοχικές αντιδράσεις που εκτελούνται στο κυτταρόπλασμα και οδηγούν σε μετατροπή ενός μορίου γλυκόζης (με 6 άτομα C) σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος (με 3 άτομα C). Στις αντιδράσεις της εξοκίνησης και της φωσφοφρουκτοκινάσης καταναλώνονται 2 μόρια ATP, ενώ στη συνέχεια η κινάση του φωσφογλυκερικού και η κινάση του πυροσταφυλικού παράγουν 4 μόρια ATP, που σημαίνει πως τελικά παράγονται καθαρά 2 μόρια ATP (**Εικόνα 9**).



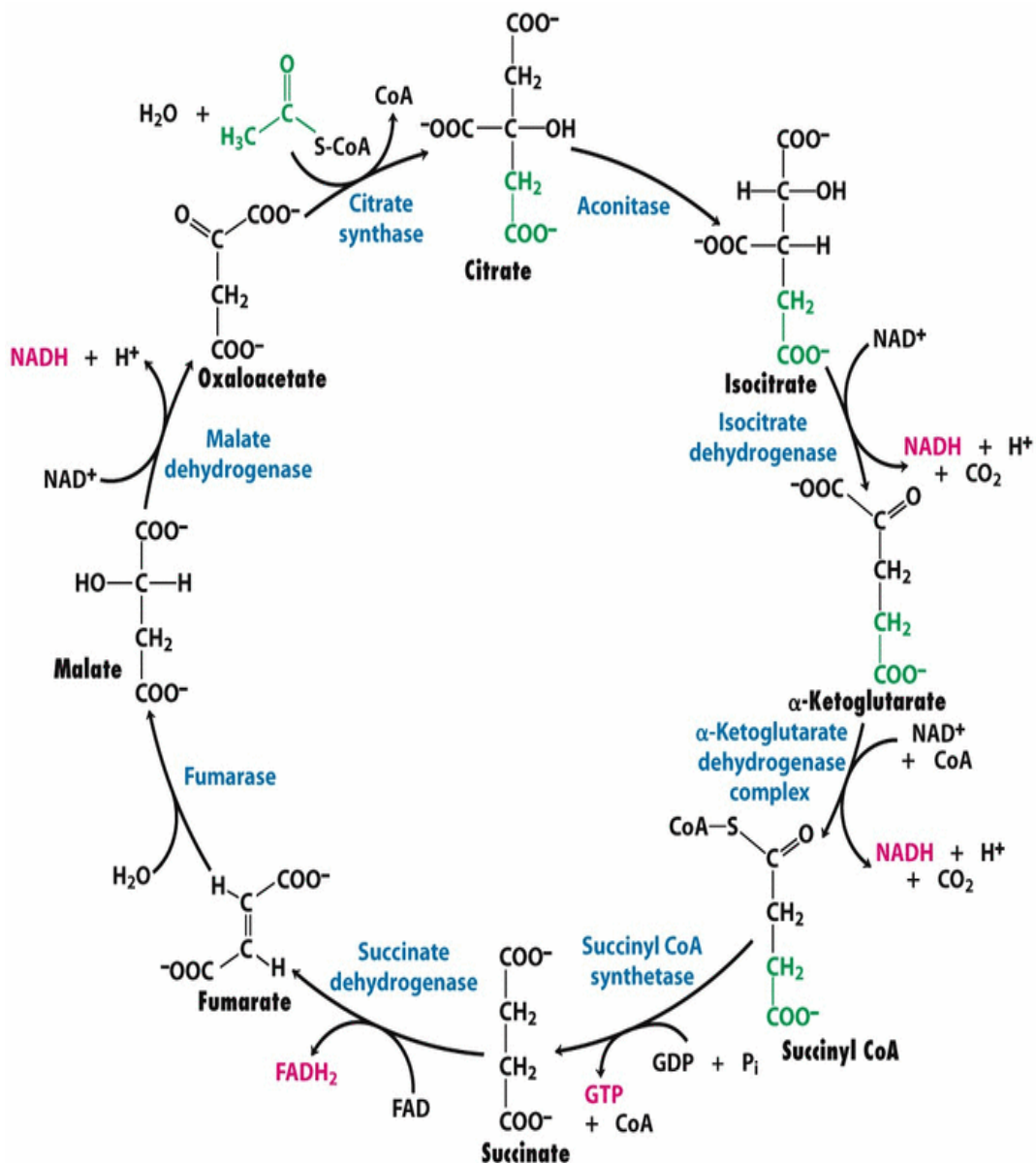
Εικόνα 9: Τα στάδια του καταβολισμού ενός μορίου γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος περιλαμβάνει 10 ενζυμικές αντιδράσεις. Στην πρώτη φάση αντιδράσεων (μπλε πλαίσιο) γίνεται κατανάλωση μορίων ATP, ενώ στις αντιδράσεις 6-10 (ροζ πλαίσιο) γίνεται παραγωγή μορίων ATP [41].

Η γλυκολυτική πορεία διαθέτει σημεία ελέγχου, στις μη αντιστρεπτές αντιδράσεις των οποίων η κατάλυση ρυθμίζεται από την αναλογία ATP προς AMP. Η σημαντικότερη θέση ελέγχου είναι η φωσφοφρουκτοκινάση, η οποία αναστέλλεται από υψηλά επίπεδα ATP. Ακόμα, το πρώτο βήμα που καταλύεται από την εξοκινάση αναστέλλεται από τη διαθεσιμότητα της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Τέλος, η κινάση του πυροσταφυλικού χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το φωσφο-ενολοπυροσταφυλικό και σχηματίζει το πυροσταφυλικό με μη αντιστρεπτό τρόπο, όταν τα επίπεδα ATP είναι χαμηλότερα από το AMP, ενώ παράλληλα γίνεται έκλυση ATP.

Το πυροσταφυλικό στη συνέχεια έχει διαφορετικές εναλλακτικές οδούς που επηρεάζονται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Σε αναερόβιους οργανισμούς, όπως οι ζυμομύκητες και άλλοι, το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε αιθανόλη με δύο αντιδράσεις που συνιστούν την αλκοολική ζύμωση. Υπό συνθήκες απουσίας ή χαμηλών επιπέδων οξυγόνου, εκτελείται η γαλακτική ζύμωση μέσω μιας αντίδρασης σχηματισμού του γαλακτικού οξέος από το πυροσταφυλικό. Τέλος, σε αερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στο οργανίδιο των μιτοχονδρίων και από εκεί αντιδρά με το συνένζυμο A (CoA) και με τη δράση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού σχηματίζεται το ακέτυλο-CoA. Στην τελευταία περίπτωση, η διαδικασία παραγωγής ενέργειας δεν σταματά στο ακέτυλο-CoA, αλλά συνεχίζεται με τον κύκλο του κιτρικού οξέος ή κύκλο του Krebs [41, 42].

1.3.2 Κύκλος του Krebs

Μετά την μετατροπή της γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος και την αερόβια αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού, ακέτυλο-CoA εισέρχεται σε έναν κύκλο αντιδράσεων που διεξάγεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Ο κύκλος του Krebs δεν απαιτεί την παρουσία οξυγόνου, όμως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από αναερόβιους οργανισμούς, καθώς δεν υφίσταται δυνατός ο σχηματισμός του ακέτυλο-CoA. Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που γίνονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή δυο μορίων CO₂, ένα μόριο GTP καθώς και παραγωγή των NADH και FADH₂. Παρόλο που με αυτό τον τρόπο δεν γίνεται άμεσα η παραγωγή μεγάλων ποσών ενέργειας ATP, παράγονται ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας μέσω των NADH, FADH₂ που θα αποτελέσουν κινητήρια ενέργεια για την παραγωγή του ATP (**Εικόνα 10**). Εκτός από αυτά, ο κύκλος του Krebs αποτελεί μια πηγή πρόδρομων μορίων που συμβάλλουν στη σύνθεση σημαντικών βιομορίων του κυττάρου. Το κιτρικό οξύ λειτουργεί ως ενδιάμεσο στη σύνθεση λιπαρών οξέων και στερολών, το α-κετογλουταρικό συμμετέχει στη σύνθεση αμινοξέων αλλά μπορεί να οδηγήσει και στη σύνθεση των πουρινών του DNA, ενώ το οξαλοξικό αναγεννά την γλυκόζη αλλά μετατρέπεται και σε ασπαραγινικό, από το οποίο είναι δυνατή η παραγωγή άλλων αμινοξέων και των αζωτούχων βάσεων του DNA [35, 43].

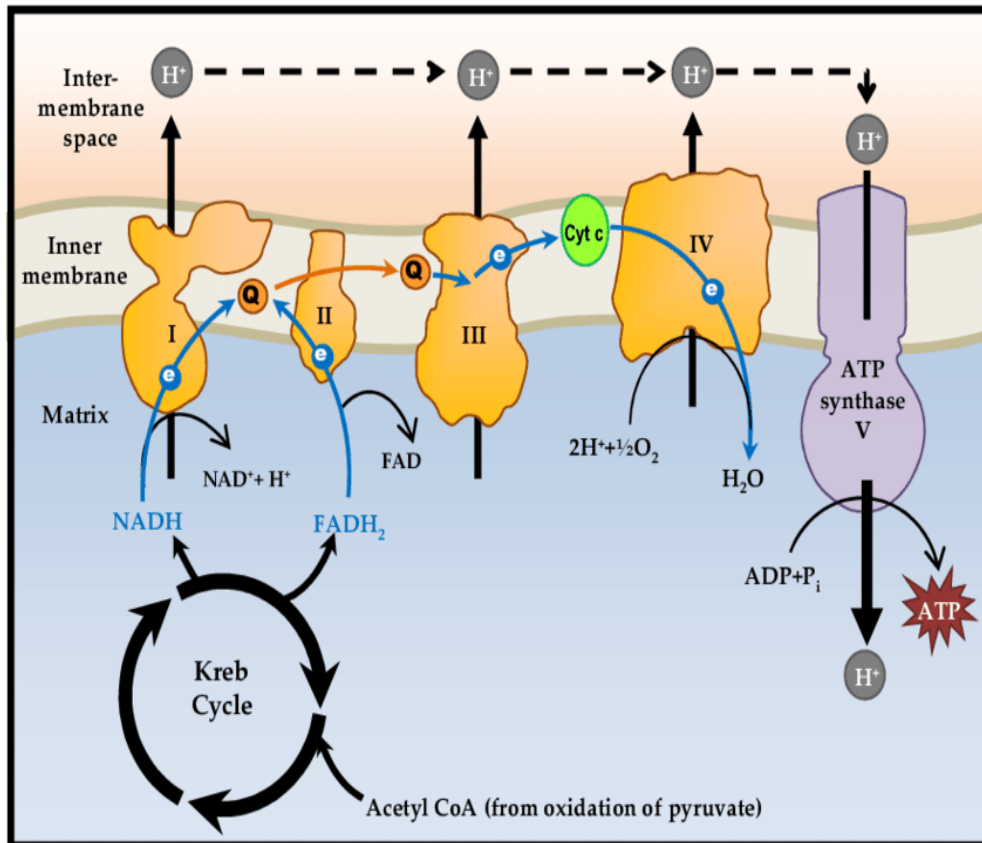


Εικόνα 10: Ο κύκλος του κιτρικού οξέος [41].

1.3.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Από τη μήτρα του μιτοχονδρίου μεταφερόμαστε στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου εντοπίζονται 4 πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία πραγματοποιούν την μεταφορά ηλεκτρονίων που είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας. Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις [που καταλύονται από το σύμπλοκο της αναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I), την ηλεκτρική αφυδρογονάση (Σύμπλοκο II), το σύμπλοκο αναγωγής του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο III) και το σύμπλοκο της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV)] καθοδηγούν μια **αλυσιδωτή μεταφορά ηλεκτρονίων**. Το επόμενο και τελευταίο στάδιο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης περιλαμβάνει τη δράση της διαμεμβρανικής συνθάσης της ATP (Εικόνα 11). Η συνθάση της ATP αποτελείται από 2 επικράτειες με διακριτές λειτουργίες που συνδέονται φυσικά. Η καταλυτική επικράτεια (F_1) είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του ATP χρησιμοποιώντας ADP και P_i και εντοπίζεται στην εσωτερική

μιτοχονδριακή μεμβράνη, στραμμένη προς την μήτρα. Το διαμεμβρανικό τμήμα της συνθάσης (F_0) λειτουργεί ως αντλία πρωτονίων από το διαμεμβρανικό χώρο που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της F_1 επικράτειας. Η βαθμίδωση της συγκέντρωσης των πρωτονίων καθορίζεται από την αναπνευστική αλυσίδα και την μεταφορά ηλεκτρονίων κατά τη δράση των Συμπλόκων I-IV, από τα οποία το Σύμπλοκο I, III, IV μεταφέρουν πρωτόνια από τη μιτοχονδριακή μήτρα προς το-διαμεμβρανικό χώρο [44].



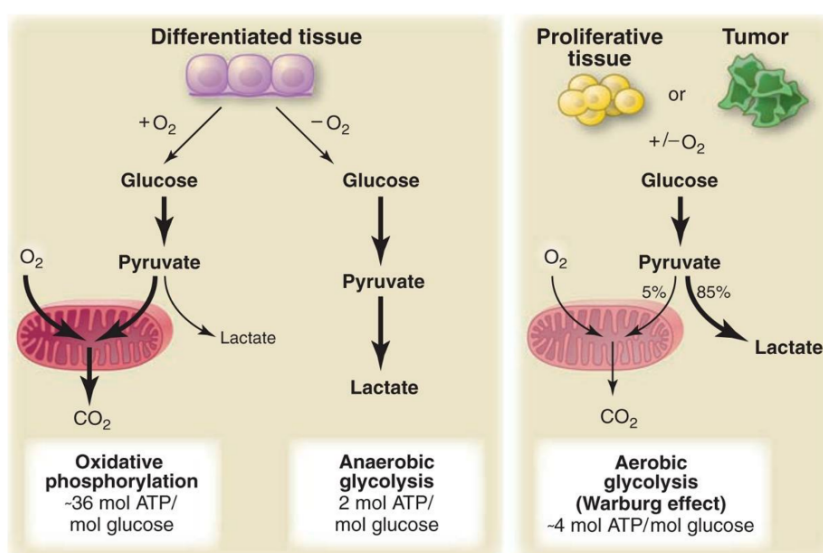
Εικόνα 11: Στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη φαίνονται στη σειρά τα Σύμπλοκα I-IV που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αξιοποιούν τα $NADH$ και $FADH_2$ από τον κύκλο του Krebs και δημιουργούν μια διαβάθμιση πρωτονίων που θα ορίσει τη λειτουργία της συνθάσης του ATP [45].

Το τελικό αποτέλεσμα, η παραγωγή του ενεργειακού νομίσματος του κυττάρου, προϋποθέτει το μεταβολισμό της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα, την παραγωγή $NADH$, $FADH_2$ στη μήτρα των μιτοχονδρίων, τη ροή των ηλεκτρονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και τη ροή των πρωτονίων προς τον διαμεμβρανικό χώρο που επάγει την αντίδραση της παραγωγής του ATP. Ως αποτέλεσμα, παράγονται 2 μόρια ATP από τη γλυκόλυση, 2 μόρια ATP από τον κύκλο του κιτρικού οξέος και ~26 μόρια ATP κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, που συνολικά αντιστοιχούν σε ~30 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης [46].

1.4 Φαινόμενο Warburg στον καρκίνο

Ασυνήθιστη είναι η συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων όσον αφορά την οδό για την παραγωγή ενέργειας σε σύγκριση με την προαναφερθείσα πορεία που ακολουθούν φυσιολογικά κύτταρα. Μόλις το 1924, ο **Otto Warburg** παρατήρησε πως τα καρκινικά κύτταρα δεν χρειάζονται για την επιβίωσή τους οξυγόνο, παρόλο που είναι επαρκές στο περιβάλλον που αναπτύσσονται. Λίγα χρόνια μετά, το 1931, ο Warburg έγινε κάτοχος του βραβείου *Nobel*, εξαιτίας αυτής της ανακάλυψης που άλλαξε τον τρόπο μελέτης του κυτταρικού μεταβολισμού και της αναπνοής. Σήμερα είναι γνωστό πως τα καρκινικά κύτταρα προσλαμβάνουν εξωκυτταρικά μεγάλα ποσά γλυκόζης, την οποία μεταβολίζουν σε γαλακτικό οξύ, πραγματοποιούν λοιπόν μια διαδικασία που ονομάστηκε «**αερόβια γλυκόλυση**» (Εικόνα 12) [47].

Μελέτες έχουν δείξει πως η αποφυγή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την παραγωγή ATP δεν οφείλεται μόνο σε βλάβες των μιτοχονδρίων που ενδεχομένως θα παρεμπόδιζαν διαδικασίες, όπως τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την αναπνευστική αλυσίδα. Απεναντίας, τα καρκινικά κύτταρα επιλέγουν να διαφεύγουν στην αερόβια γλυκόλυση αντί για την οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγοντας αισθητά λιγότερα μόρια ATP, 2 μόρια στην πρώτη περίπτωση, ενώ ~30 στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Έτσι, τα μόρια γλυκόζης αντί να μετατρέπονται σε μόρια CO₂ και ATP, αξιοποιούνται ως πηγές άνθρακα σε αναβολικές διαδικασίες του κυττάρου, όπως σύνθεση αμινοξέων, λιπαρών οξέων και νουκλεοτιδίων. Η αυξημένη σύνθεση δομικών συστατικών του κυττάρου επιτρέπει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Ακόμα, ο σχηματισμός γαλακτικού οξέος δημιουργεί ένα όξινο περιβάλλον που οδηγεί σε μειωμένη προσκόλληση με τα γειτονικά κύτταρα, γεγονός που διευκολύνει την εισβολή και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [48].



Εικόνα 12: Τα διαφοροποιημένα κύτταρα (αριστερά εικόνα) σε παρουσία οξυγόνου μετατρέπουν τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια στα μιτοχόνδρια παράγονται μεγάλες ποσότητες ATP με τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Όταν τα επίπεδα του οξυγόνου δεν είναι επαρκή, τα κύτταρα ακολουθούν αναερόβια γλυκόλυση, μεταβολίζονται το πυροσταφυλικό οξύ σε γαλακτικό οξύ που οδηγεί σε παραγωγή αισθητά λιγότερων μορίων ATP. Από την άλλη, τα καρκινικά κύτταρα ή τα κύτταρα με υψηλό δυναμικό διαίρεσης (δεξιά εικόνα) είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου μετατρέπουν το μεγαλύτερο ποσοστό του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό και πολύ μικρό ποσοστό χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [47].

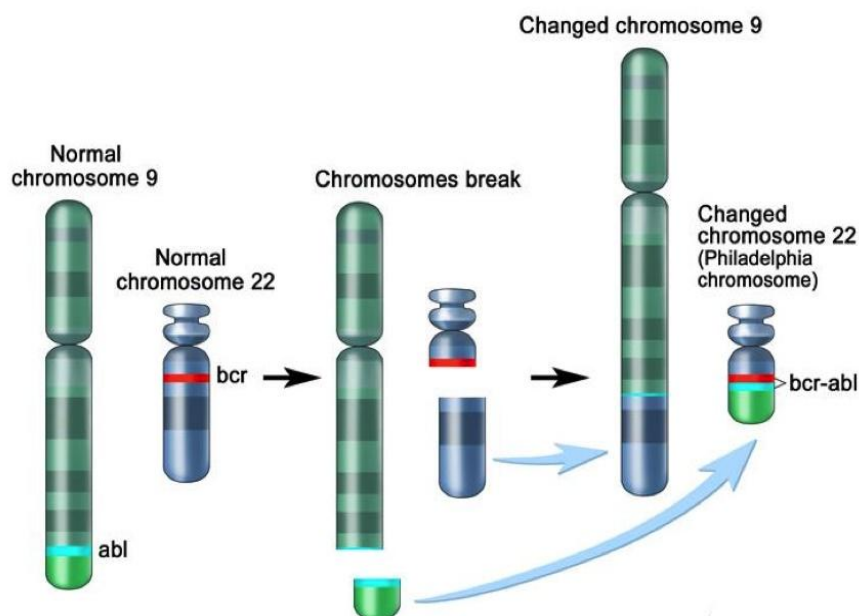
1.5 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (**Chronic Myelogenous Leukemia, CML**) αποτελεί μια νεοπλασματική νόσο που χαρακτηρίζεται από αυξημένη επιβίωση και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό αιμοποιητικών κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών (bone marrow). Το 15% των συνολικών λευχαιμιών, που καταγράφονται, αναφέρονται σε περιστατικά CML [49]. Ο επιπολασμός της νόσου ανέρχεται στα 2 ανά 100.000 άτομα το χρόνο παγκοσμίως, με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε δυτικούς πολιτισμούς. Ο κίνδυνος εμφάνισης είναι σχετιζόμενος με την ηλικία, ενώ σπάνια παρατηρείται σε παιδιά. Έχει παρατηρηθεί υψηλότερο ποσοστό ανδρών παρά γυναικών ασθενών, οι οποίοι συνήθως είναι ασυμπτωματικοί και η διάγνωσή τους γίνεται τυχαία μέσω τυπικών αιματολογικών εξετάσεων κατά το πρώτο από τα 3 στάδια της ανάπτυξης της νόσου [50, 51]. Αυτές οι φάσεις χαρακτηρίζονται από τον αριθμό των «βλαστών» στο περιφερικό αίμα ή στο μυελό των οστών. Οι «βλάστες» ή «βλαστοκύτταρα» αναφέρονται σε πρόδρομα αδιαφοροποίητα κύτταρα, τα οποία φυσιολογικά ωριμάζουν σε διαφοροποιημένα αιματοκύτταρα (κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος). Υψηλότερα ποσοστά αδιαφοροποίητων κυττάρων σχετίζονται με τη σοβαρότητα του σταδίου της ασθένειας.

1. Η πρώτη φάση, η χρόνια (**chronic phase, CP**), χαρακτηρίζεται από πολύ μικρό αριθμό βλαστών, λιγότερο από 10% στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών. Ακόμα, είναι η λιγότερο επικίνδυνη και η πιο σταθερή περίοδος της ασθένειας που διαρκεί 5 έως 6 χρόνια. Η διάγνωση, στην συντριπτική πλειοψηφία, συμβαίνει σε αυτό το στάδιο όπου οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί, όμως στις περιπτώσεις ήπιων συμπτωμάτων αντιμετωπίζονται με κατάλληλη θεραπεία.
2. Η επιταχυνόμενη φάση (**accelerated phase, AP**) διακρίνεται από αύξηση των βλαστών σε ποσοστό 10-19% σε σχέση με το σύνολο των λευκών αιμοσφαιρίων. Περίπου τα 2/3 των ασθενών περνάνε από την ενδιάμεση φάση και έχουν μέσο χρόνο επιβίωσης 1 έως 2 χρόνια.
3. Η τελευταία και πιο κρίσιμη φάση κατά την CML είναι γνωστή ως βλαστική κρίση (**blast phase, BP**) και περιλαμβάνει τουλάχιστον 30% βλάστες, καθώς και αθροίσεις των βλαστών στο μυελό των οστών. Αποτελεί μια πιο επιθετική μορφή της λευχαιμίας, έχει παρόμοια συμπεριφορά με την οξεία λευχαιμία και συνήθως δεν υποχωρεί με τεχνικές χημειοθεραπείας. Η βλαστική φάση οδηγεί σε γρήγορη επιδείνωση της υγείας του ασθενούς που καταλήγει σε θάνατο κατά μέσο όρο σε 3 έως 6 μήνες [50].

Παρόλο που δεν έχουν περιγραφεί περιβαλλοντικοί ή γενετικοί παράγοντες που αυξάνουν ειδικά τον κίνδυνο εμφάνισης CML, το 1962 οι Nowell και Hungerford σε συνεργασία με άλλους ερευνητές της εποχής κατέληξαν σε μια ανακάλυψη που θα άλλαζε ριζικά την αντιμετώπιση της νόσου [52]. Αυτό που παρατήρησαν με απεικόνιση του καρυοτύπου των ασθενών ήταν μια αντιμετάθεση (translocation) μεταξύ του 9^{ου} και του 22^{ου} χρωμοσώματος (**Εικόνα 13**). Σήμερα είναι γνωστό ότι περισσότεροι από το 90% των ατόμων που πάσχουν από CML και 20-30% των ατόμων που πάσχουν από οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL), παρουσιάζουν αυτή τη δομική χρωμοσωμική ανωμαλία.

Η ρήξη και η επανένωση των χρωμοσωμάτων 9 και 22 οδηγεί στο σχηματισμό δύο χιμαιρικών πρωτεϊνών. Η νεοσυντιθέμενη ABL/BCR πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9 δε φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο στο φαινότυπο της ασθένειας, ενώ η αλληλουχία στο χρωμόσωμα 22, που κωδικοποιεί τη χιμαιρική ογκοπρωτεΐνη **BCR-ABL**, έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη της CML. Το μικρότερου μήκους χρωμόσωμα 22, που προκύπτει μετά τη μετάθεση **t(9;22)(q34;q11)**, ονομάστηκε χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (**Philadelphia chromosome, Ph**) από την πόλη στην οποία ανακαλύφθηκε (Nowel) και αποτελεί ορόσημο της CML [49].

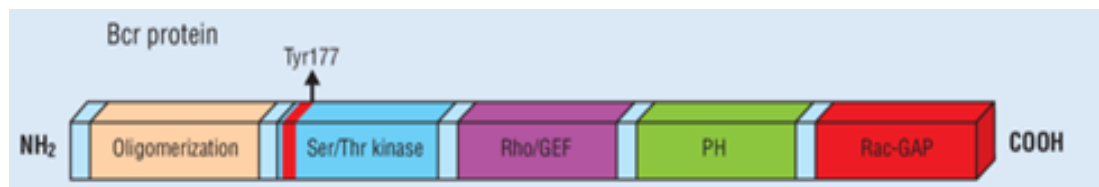


Εικόνα 13: Το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια σχηματίζεται από τη ρήξη των γονιδιακών τόπων *abl* και *bcr* και τη συνένωση των χρωμοσωμάτων 9 και 22, αντίστοιχα. Στο υβριδικό χρωμόσωμα εντοπίζεται νέος γονιδιακός τύπος *bcr-abl* που συμμετέχει στην εμφάνιση της ΧΜΛ [53]

Η BCR (**Bcr**) πρωτεΐνη (**Breakpoint Cluster Region protein**) κωδικοποιείται από τον γονιδιακό τόπο *bcr* που καταλαμβάνει μία περιοχή μήκους 137,673 bps στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 22 [chr22(q11.23)]. Το *BCR* γονίδιο αποτελείται από 23 εξόνια που μετά τη μετάφραση αντιστοιχούν σε 4 επικράτειες μιας πρωτεΐνης, η οποία συμμετέχει σε μεγάλο αριθμό κυτταρικών μονοπατιών (**Εικόνα 14**). Οι λειτουργίες της BCR πρωτεΐνης δεν έχουν αποσαφηνιστεί, όμως με βάση τις επικράτειές της:

- Η αμινο-τελική επικράτεια ολιγομερισμού (coiled-coil) παρέχει τη δυνατότητα στην BCR να αλληλεπιδράσει με άλλες επικράτειες πρωτεϊνών.
- Μια εσωτερική δραστικότητα κινάσης Σερίνης/Θρεονίνης (Ser/Thr) εντοπίζεται στο NH₂-άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας, με εσωτερικές περιοχές που συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση με τα μόρια-στόχους.
- Η επικράτεια DH επιτρέπει την αντικατάσταση του GDP με GTP και επομένως λειτουργεί ως GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors). Το GTP υδρολύεται στη συνέχεια από τις G πρωτεΐνες, μικρά μόρια με σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών εντός του κυττάρου.
- Παράλληλα, η BCR δρα και ως GAP (GTPase Activating Protein) που ενισχύει την υδρόλυση του GTP από τις G πρωτεΐνες και οδηγεί σε ενεργοποίησή τους.

- Η επικράτεια Pleckstrin-homology (PH) παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με φωσφοϊνοσιτίδια, μόρια απαραίτητα για τη σηματοδότηση, και συνήθως και άλλα μόρια-στόχους [54].

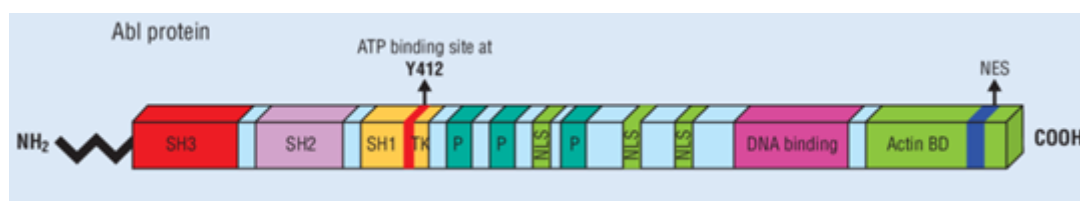


Εικόνα 14: Η πρωτεΐνη Bcr αποτελείται από διακριτές λειτουργικές επικράτειες. Από αριστερά (αμινο-τελικό άκρο) προς τα δεξιά (καρβοξυτελικό άκρο) φαίνονται οι επικράτειες ολιγομερισμού, κινάσης Σερίνης/Θρεονίνης, δραστικότητα ως GEF (Rho/GEF), επικράτεια αλληλεπίδρασης με φωσφοϊνοσιτίδια και πρωτεΐνες-στόχους (PH) και επικράτεια δραστικότητα GAP. Το κατάλοιπο Tyr177 παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση με πρωτεΐνες που ενισχύουν την πρόοδο-εξέλιξη της ΧΜΛ [55]

Το δεύτερο μέρος της χμαιρικής πρωτεΐνης προέρχεται από μέλος της οικογένειας των κυτταροπλασματικών κινάσων τυροσίνης **Abl** (Abelson). Η Abl1 κωδικοποιείται από το ογκογονίδιο *ABL1*, ένα γονίδιο 11 εξονίων, μήκους 173,795 bps της περιοχής q34.12 του χρωμοσώματος 9 [chr9(q34.12)]. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Abl έχουν παρόμοια δομή και αποτελούνται κυρίως από περιοχές αλληλεπίδρασης με άλλα πρωτεϊνικά μόρια (SH2 & SH3 domains) και την επικράτεια κινάσης.

Υποκυτταρικά, η Abl1 τοποθετείται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, συμμετέχοντας σε διαφορετικά μονοπάτια, που συμμετέχουν στην μεταγωγή σημάτων από υποδοχείς αποκρινόμενοι σε αυξητικούς παράγοντες. Έτσι, συμμετέχει σε διεργασίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση, ενώ μεταφέρει σήματα από υποδοχείς προσκόλλησης ρυθμίζοντας την κυτταρική προσκόλληση, η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και των ινιδίων ακτίνης (**Εικόνα 15**).

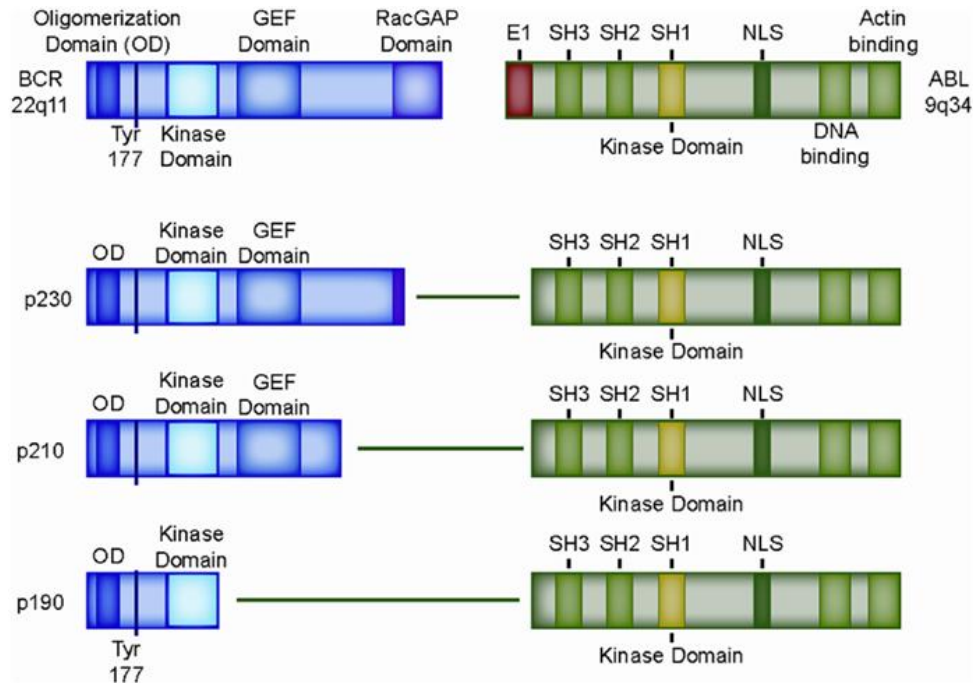
Η αυξημένη λειτουργία της Abl1 απορρυθμίζει τα παραπάνω μονοπάτια και προκαλεί όγκο-επαγωγικές ιδιότητες στα κύτταρα που φυσιολογικά παρεμποδίζονται από τις επικράτειες SH2 & SH3 που αναστέλλουν τη δραστικότητα κινάσης τυροσίνης [56].



Εικόνα 15: Η Abl πρωτεΐνη αποτελείται στο άμινο-τελικό άκρο από SH3, SH2 και SH1 περιοχές για την αλληλεπίδραση με περιοχές άλλων μορίων, από μια επικράτεια κινάσης τυροσίνης (TK), από σήματα εντοπισμού στον πυρήνα (Nuclear Localization Signal) και σήματα εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal), επικράτεια πρόσδεσης στο DNA και με τα ινίδια ακτίνης [55].

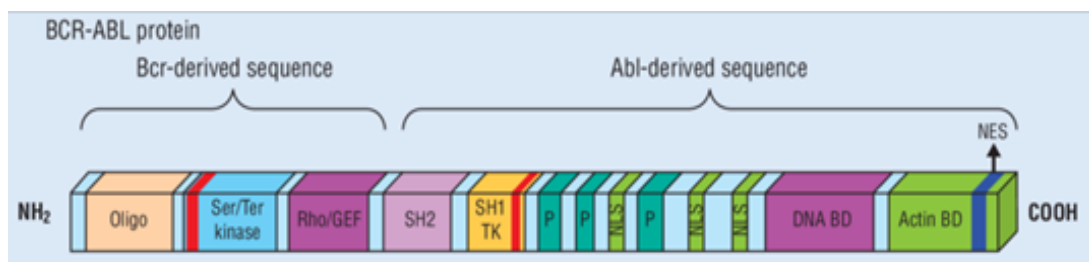
Η παθολογική BCR/ABL1 πρωτεΐνη προκύπτει από 3 διαφορετικά μετάγραφα, ανάλογα με το σημείο της ρήξης στο *BCR* γονίδιο. Όλα τα *BCR/ABL1* γονίδια περιέχουν τα εξόνια 2-11 του *ABL* γονιδίου που κωδικοποιούν το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, και διαφορετικά τμήματα του *BCR* γονιδίου που κωδικοποιούν το άμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Το πιο συχνό μετάγραφο περιλαμβάνει την περιοχή από το 1^ο εξόνιο έως το 13^ο ή το 14^ο του *BCR* και κωδικοποιεί μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 210kDa, p210^{BCR/ABL} που είναι υπεύθυνη για τον κακοήθη μετασχηματισμό

των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, καθώς και για τις φαινοτυπικές ανωμαλίες της χρόνιας φάσης του CML. Πιο σπάνια, το σταθερό καρβοξυ-τελικό άκρο της ABL συνδέεται με την περιοχή του BCR που κωδικοποιείται από τα εξόνια 1 ή εξόνια 1-19, με αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών τελικού μοριακού βάρους 190(p190^{BCR/ABL}) και 230(p230^{BCR/ABL}) kDa, αντίστοιχα (**Εικόνα 16**) [57, 58].



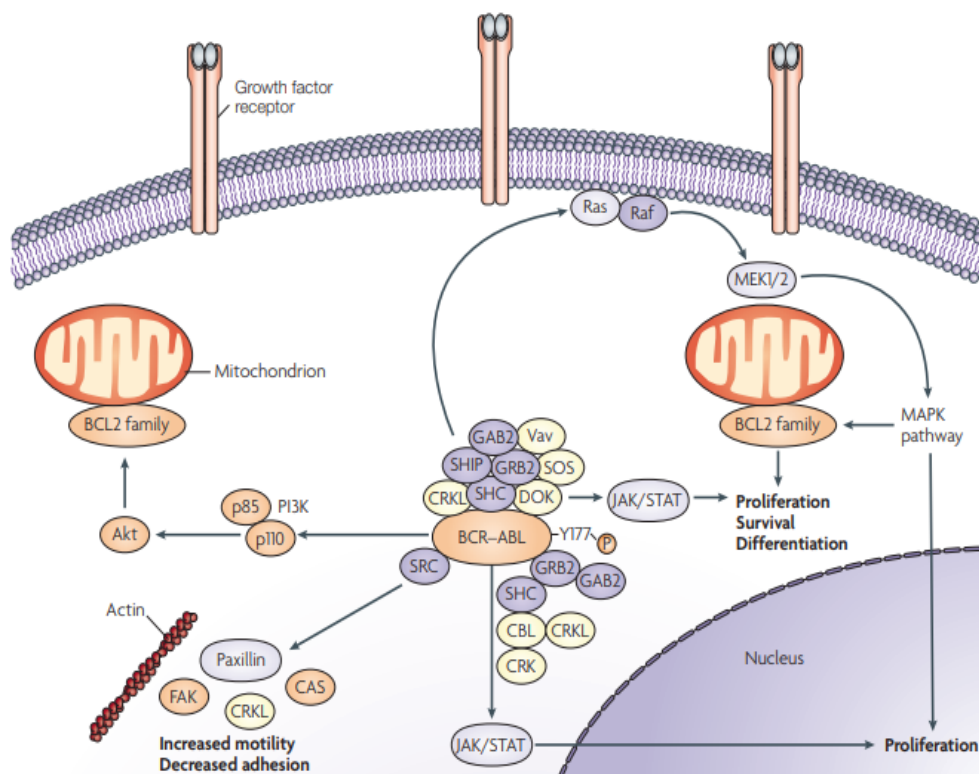
Εικόνα 16: Οι επικράτειες των BCR, ABL πρωτεϊνών. Υπάρχουν 3 διαφορετικές ισομορφές της BCR-ABL, που διαφέρουν μόνο στο μέγεθος της BCR που συμμετέχει στη νέα πρωτεΐνη, η p230, p210 και p190 [54].

Η BCR/ABL πρωτεΐνη που παρατηρείται τους ασθενείς με CML διατηρεί κάποιες από τις επικράτειες των φυσιολογικών πρωτεϊνών. Από την BCR παραμένει λειτουργική, μεταξύ άλλων, η περιοχή ολιγομερισμού που από ερευνητικές εργασίες υποδεικνύεται ότι συμμετέχει στο σχηματισμό ομοδιμερών που ενισχύουν τη δράση κινάσης τυροσίνης στη CML. Ακόμα, πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η περιοχή ολιγομερισμού σε συνδυασμό με συγκεκριμένα κατάλοιπα της κινάσης Σερίνης/Θρεονίνης, όπως η Tyr177, ενεργοποιούν μονοπάτια που προωθούν την καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλιωμένη Tyr177 παρουσιάζει μια θέση πρόσδεσης με τους Gab2 και GRB2, των οποίων η δράση σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση. Οι σταθερές επικράτειες της ABL1 περιλαμβάνουν τα SH2 & SH3 στοιχεία, την επικράτεια κινάσης τυροσίνης, την περιοχή αλληλεπίδρασης με τα ινίδια ακτίνης και τα σήματα για μετακίνηση εντός και εκτός του πυρήνα (**Εικόνα 17**) [56].



Εικόνα 17: Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη BCR-ABL p230 και οι περιοχές που την αποτελούν [55]

Οι επικράτειες της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που επιτρέπουν την αλληλεπίδρασή της με άλλα κυτταρικά σηματοδοτικά μόρια την καθιστούν ένα μόριο που εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό κομβικών μονοπατιών και οδηγεί σε ενισχυμένο πολλαπλασιασμό, παύση της διαφοροποίησης των κυτάρων και σε μειωμένη ευαισθησία σε αποπτωτικές διαδικασίες (Εικόνα 18). Κάποια από τα βιοχημικά μονοπάτια που διαταράσσονται, λόγω της αυξημένης δραστηριότητας κινάσης της BCR/ABL1, είναι τα εξής:



Εικόνα 18: Η παθολογική BCR-ABL αλληλεπιδρά με πλήθος παραγόντων και εμπλέκεται σε μονοπάτια που προάγουν την καρκινική συμπεριφορά των κυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ενισχύεται από την σηματοδότηση JAK/STAT και Ras-Raf-MEK-ERK, οι μιτοχονδριακοί αποπτωτικοί μηχανισμοί αναστέλλονται με τη σηματοδότηση PI3K/AKT, και η κινάση Src επιδρά στον κυτταροσκελετό και διαταράσσει τη συνεκτικότητα των κυττάρων που οδηγεί σε αυξημένη κινητικότητα [59].

- Το **Ras-Raf-MEK-ERK** μονοπάτι

Ένα από τα πιο γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια εξασφάλισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι το **Ras-Raf-MEK-ERK** μονοπάτι, κατά το οποίο η Ras G πρωτεΐνη ενεργοποιείται σε απόκριση εξωκυτταρικών ερεθισμάτων μέσω υποδοχών GPCR. Στη συνέχεια, το σήμα μεταφέρεται μέσω φωσφορυλίωσης από κινάσες (RAF, MEK, ERK) στον πυρήνα, όπου ρυθμίζεται η έκφραση γονιδίων-στόχων για την ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πέραν των ενδογενών μηχανισμών ρύθμισης του μονοπατιού για την αποφυγή του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, στην περίπτωση της CML έχει διαπιστωθεί πως περιοχή του BCR ευνοεί την αλληλεπίδραση της BCR/ABL1 με την πρωτεΐνη GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2) που οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιασμού μέσω ενεργοποίησης του RAS μονοπατιού [60].

- Το **JAK/STAT** μονοπάτι

Η πρόσδεση κυτοκινών ή αυξητικών παραγόντων σε μεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάση τυροσίνης επάγει τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση μελών της οικογένειας JAK (Janus kinases) που στοχεύουν σε μεταγραφικούς παράγοντες STAT. Η φωσφορυλίωση των STAT οδηγεί στο διμερισμό τους και στη μεταφορά του διμερούς από το κυτταρόπλασμα στο εσωτερικό του πυρήνα. Μέσω της επικράτειας πρόσδεσης στο DNA, η STAT προσδένεται σε ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων, ελέγχοντας τη μεταγραφή γονιδιακών τόπων με σκοπό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [61].

- Το **PI3K/AKT** μονοπάτι

Το μονοπάτι PI3K/Akt ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες και έχει ως στόχο την κυτταρική επιβίωση. Η κινάση Akt ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση από την PDK1/2 και στη συνέχεια ρυθμίζει παράγοντες που εμπλέκονται σε αποπτωτικούς μηχανισμούς των μιτοχονδρίων. Αυτοί οι παράγοντες είναι μέλη της οικογένειας Bcl-2 και χωρίζονται σε 3 ομάδες, ανάλογα με τη θετική ή αρνητική δράση στην απόπτωση και στον αριθμό των επικρατειών ομολογίας που περιέχουν. Τα πιο διαδεδομένα στοιχεία είναι η Bcl-2 που δρα αντι-αποπτωτικά, και οι Bax, Bak πρωτεΐνες που δρουν ως προ-αποπτωτικά μόρια. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι Bax και Bak εντοπίζονται ανενεργές στο κυτταρόπλασμα σε ένα σύμπλοκο με άλλες αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες, μια κατάσταση όπου επικρατεί η επιβίωση του κυττάρου. Όταν παρουσιάζονται βλάβες, η μη φωσφορυλιωμένη Akt επιτρέπει την αποσυναρμολόγηση του συμπλόκου και οι Bax και Bak κατευθύνονται προς τα μιτοχόνδρια. Στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων σχηματίζουν πόρους, από τους οποίους θα εξέλθει το κυτόχρωμα c και θα πυροδοτήσει την ενεργοποίηση μια σειράς κασπασών που θα οδηγήσει σε απόπτωση του κυττάρου. Στην περίπτωση της CML, η δράση της κινάσης ενισχύει την ενεργοποίηση της Akt και αναστέλλεται η κασπασο-εξαρτώμενη απόπτωση των κυττάρων [62].

1.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις ενάντια στη ΧΜΛ

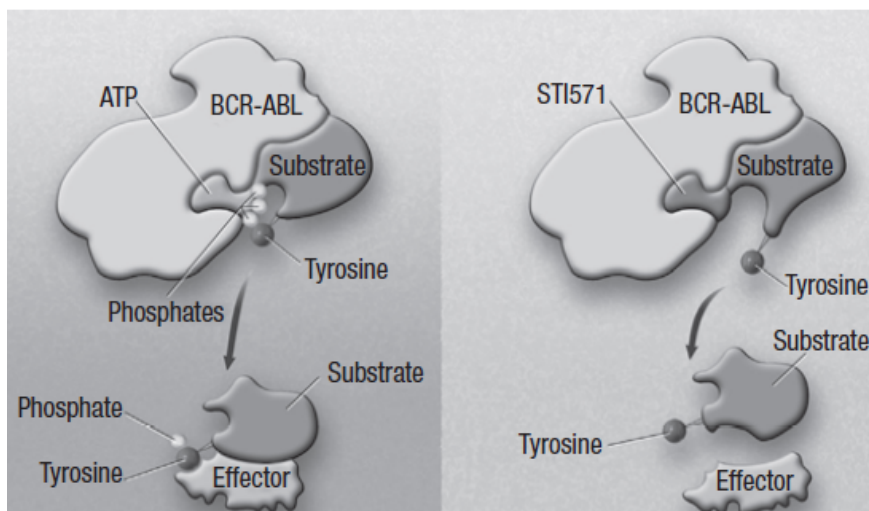
1.6.1 Θεραπεία πριν την Ιματινίβη

Χρόνια πριν τις ιατρικές επεμβάσεις και τη σύνθεση συνθετικών φαρμάκων, φυσικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνταν για την καταπολέμηση ασθενειών. Από τα αρχαία χρόνια θεραπείες για πολλές ασθένειες, όπως η ψωρίαση και η σύφιλη, περιλάμβαναν ενώσεις αρσενικού. Η λευχαιμία και συγκεκριμένα η ΧΜΛ από τον 17^ο αιώνα αντιμετωπιζόταν με ενώσεις αρσενικού. Τον 18^ο αιώνα ο Thomas Fowler ανακάλυψε ένα διάλυμα, που στη συνέχεια πήρε το όνομα του, και χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Το διάλυμα του Fowler περιείχε 1% τριοξειδίο του αρσενικού, διαλυμένο σε όξινο ανθρακικό κάλιο (KHCO₃), και πλέον η χρήση του έχει απαγορευτεί από πολλές χώρες. Η ανακάλυψη των ακτίνων X έφερε την ακτινοβόληση ως συμπληρωματικό θεραπευτικό μέσο αντιμετώπισης της ΧΜΛ μέχρι τα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Πιο σύγχρονες τεχνικές θεραπείας ενάντια στον καρκίνο συναντάμε μετά το 1950 με τη χημειοθεραπεία και φαρμακευτικές ουσίες, όπως η υδροξουρία και το busulfan, να είναι κυρίαρχες για αρκετές δεκαετίες, ενώ χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα [63].

1.6.2 Αναστολείς κινάσων τυροσίνης: Ιματινίβη και αντίσταση

Με την ανακάλυψη του χρωμοσώματος Philadelphia, ερευνητικές ομάδες επικεντρώθηκαν στην εξερεύνηση χημικών μορίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ανταγωνιστές της χιμαιρικής πρωτεΐνης BCR-ABL με σκοπό την θεραπεία της ΧΜΛ. Το 2001, εγκρίθηκε η κυκλοφορία της ιματινίβης (imatinib, STI-571), του πρώτου εκλεκτικού αναστολέα κινάσων τυροσίνης, και η οποία χορηγήθηκε για τη θεραπεία της Χρόνιας Μυελογενούς λευχαιμίας αλλά και άλλων τύπων λευχαιμιών και για κακοήθεις όγκους του γαστρεντερικού συστήματος. Κλινικές μελέτες για τον έλεγχο και την ασφάλεια της ιματινίβης έδειξαν πως παρέχει υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε ασθενείς ΧΜΛ που βρίσκονται στη χρόνια φάση της ασθένειας, ενώ για την επιβίωση των ασθενών στη βλαστική φάση είναι μη αποτελεσματική [64].

Η ιματινίβη συγκεκριμένα προσδένεται στην περιοχή πρόσδεσης του ATP της κινάσης τυροσίνης και εμποδίζει τη μεταφορά φωσφορικής ομάδας από το ATP στο υποστρώμα (**Εικόνα 19**). Η φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης, σερίνης και θρεονίνης αποτελεί ίσως την πιο σημαντική μεταμεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών και παίζει κυρίαρχο ρόλο στην αλληλεπίδραση ή μη μεταξύ μορίων που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου. Τα μονοπάτια που αναφέρθηκαν στην ενότητα 1.4 δείχνουν την πολυπλοκότητα και τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου, όπου εμπλέκεται η παθολογική BCR-ABL και παράλληλα παρεμποδίζονται από την ιματινίβη. Αυτά ανέδειξαν την ιματινίβη ως το φάρμακο πρώτης γραμμής για την αντιμετώπιση της ΧΜΛ για τα επόμενα χρόνια [65].



Εικόνα 19: Ο μηχανισμός δράσης της ιματινίβης στην κινάση BCR-ABL. Η αριστερή εικόνα δείχνει την λειτουργία κινάσης με την πρόσδεση του ATP στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης του υποστρώματος, το οποίο στη συνέχεια αλληλεπιδρά με άλλα μόρια με στόχο μια βιολογική απόκριση. Στη δεξιά εικόνα φαίνεται η «κατάληψη» του ενεργού κέντρου από την ιματινίβη (STI571), που εμποδίζει τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος και τη συμμετοχή του στο σηματοδοτικό μονοπάτι [66].

Ωστόσο, κλινικές μελέτες που διεξάγονταν για την αξιολόγηση της μακροπρόθεσμης αποτελεσματικότητας και ασφάλειας της ιματινίβης ως αντινεοπλασματικό φάρμακο, αποκάλυψαν σημαντικά ποσοστά αντίστασης απέναντι στο φάρμακο.

Η **ανθεκτικότητα στην ιματινίβη** χωρίστηκε σε δυο μεγάλες κατηγορίες:

πρωταρχική (primary) που αφορά τις περιπτώσεις των ασθενών που δεν παρουσίασαν καμία βελτίωση λόγω της αγωγής, και δευτερογενή (secondary) που περιλαμβάνει τις περιπτώσεις των ασθενών που αποκρίνονταν αρχικά στην θεραπεία αλλά στη συνέχεια εμφάνισαν ανθεκτικότητα [67].

Μια δεύτερη κατηγοριοποίηση αφορά το μοριακό μηχανισμό που οδηγεί στην ανθεκτικότητα και περιλαμβάνει από τη μία τους μηχανισμούς που εξαρτώνται από την BCR-ABL, και από την άλλη τους μηχανισμούς που είναι ανεξάρτητοι από την BCR-ABL. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται η υπερέκφραση του *BCR-ABL* γενετικού τόπου και μεταλλάξεις που έχουν αντίκτυπο στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με την ιματινίβη. Η πιο διαδεδομένη μετάλλαξη της BCR-ABL που εμποδίζει την αλληλεπίδραση με την ιματινίβη είναι η T315I, δηλαδή η μετατροπή του 315^{ου} αμινοξέος από θρεονίνη σε ισολευκίνη. Οι μηχανισμοί, οι ανεξάρτητοι με την BCR-ABL, μπορεί να περιλαμβάνουν μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια που είτε ενισχύουν την εκροή του φαρμάκου από το κύτταρο είτε απενεργοποιούν χημικά τη δράση της ιματινίβης [68, 69].

Αυτά τα δεδομένα οδήγησαν στη σύνθεση και ανακάλυψη αναστολέων κινασών τυροσίνης με μεγαλύτερη δραστικότητα από την ιματινίβη, ενώ παράλληλα οι αναστολείς αυτοί να διατηρούν τη λειτουργικότητά τους απέναντι στις κυριότερες μεταλλάξεις, που προσδίδουν ανθεκτικότητα ενάντια στην ιματινίβη. Έτσι, η nilotinib, η dasatinib και η bosutinib ως αναστολείς κινασών τυροσίνης 2^{ης} γενιάς, και η rostatinib από την κατηγορία της 3^{ης} γενιάς TKIs (Tyrosine Kinase Inhibitors) ελέγχονται και επιλέγονται ως εναλλακτική μορφή θεραπείας ανάλογα με την απόκριση του κάθε ασθενή.

Ακόμα, για την θεραπεία της ΧΜΛ και άλλων κακοηθειών πραγματοποιούνται έρευνες για την αποτελεσματικότητα προσεγγίσεων που περιλαμβάνουν την συνδυαστική χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων και μορίων [70].

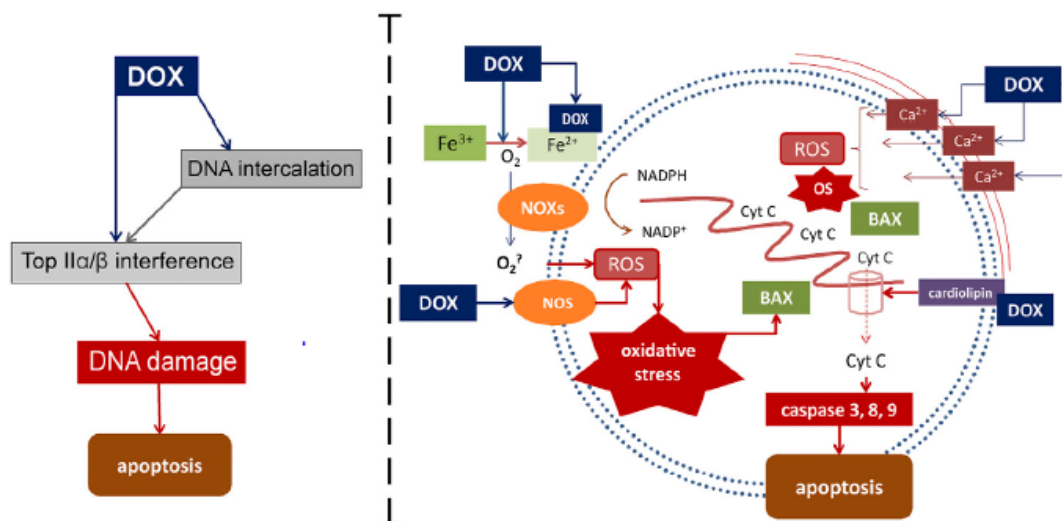
1.6.3 Δοξορουβικίνη και καρκίνος

Συνήθης είναι η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων ευρέως φάσματος για τη θεραπεία διαφορετικών ειδών καρκίνου. Η πιο γνωστή ομάδα τέτοιων φαρμάκων είναι οι ανθρακυκλίνες, οι οποίες προέρχονται είτε από την απομόνωσή τους από βακτήρια είτε από την συνθετική παραγωγή τους. Η δοξορουβικίνη, ή αδριαμυκίνη, απομονώνεται από το βακτήριο *Streptomyces peucetius var. Caesius* και έχει ισχυρές αντινεοπλασματικές ιδιότητες, οι οποίες το καθιστούν σημαντικό φάρμακο έναντι λευχαιμιών, σαρκωμάτων και συμπαγών όγκων. Η χορήγησή της γίνεται ενδοφλέβια, προσδένεται αντιστρεπτά με πρωτεΐνες του πλάσματος και εισέρχεται με παθητική διάχυση στα κύτταρα στόχους [71].

Στο κυτταρόπλασμα η δοξορουβικίνη προσδένεται στην υπομονάδα 20S του πρωτεασώματος και μεταφέρεται στο εσωτερικό του πυρήνα. Εκεί, λόγω της μεγαλύτερης συγγένειας με το DNA, παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, εμποδίζοντας τη διέλευση κυρίως της DNA αλλά και της RNA πολυμεράσης και τελικά παρεμβαίνει στις διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA. Με τον παραπάνω τρόπο καθίσταται αδύνατη η διαθεσιμότητα γενετικού υλικού και πρωτεϊνών για τα θυγατρικά κύτταρα, άρα διακόπτεται η διαίρεση του κυττάρου. Ωστόσο, αυτός δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης της δοξορουβικίνης [72].

Επίσης, η δοξορουβικίνη στον πυρήνα προσδένεται με τις τοποϊσομεράσες I και II, οι οποίες δημιουργούν ρήξεις στο υπερελικωμένο DNA, ώστε να γίνει προσβάσιμο από την DNA πολυμεράση. Η αναστολή των τοποϊσομερασών εμποδίζει τη διεξαγωγή της διαδικασίας της αντιγραφής και κατά συνέπεια ενεργοποιούνται μονοπάτια απόπτωσης σε στάδια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου [73].

Παρόλα αυτά, η δοξορουβικίνη έχει ρόλο και εκτός του πυρήνα. Στο κυτταρόπλασμα η δοξορουβικίνη οξειδώνεται σε ημικινόνη (semiquinone), η οποία συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών (Reactive Oxygen Species: ROS). Υψηλά επίπεδα ROS στο εσωτερικό του κυττάρου προκαλούν βλάβες στο DNA, στα λιπίδια της μεμβράνης διαταράσσοντας την ακεραιότητά της, αλλά και σε πρωτεΐνες που ελέγχουν σημαντικές διεργασίες του κυττάρου [74]. Η AMPK (AMP-activated Protein Kinase) ενεργοποιείται από το οξειδωτικό στρες που επάγεται από τη δοξορουβικίνη και κατ'επακόλουθο επηρεάζει πολλά καθοδικά μόρια με τελικό στόχο την αναστολή της ανάπτυξης. Η δοξορουβικίνη επηρεάζει αρνητικά το μονοπάτι mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) που υποστηρίζει την ανάπτυξη και την κυτταρική βιωσιμότητα, ενώ πειράματα έχουν δείξει πως ενισχύει ογκοκατασταλτικά μονοπάτια. Η JNK (c-JunN-terminal Kinase) και η p53 ενεργοποιούνται από την AMPK και επάγουν την κασπασο-εξαρτώμενη αποπτωτική διαδικασία. Συγκεκριμένα, η δοξορουβικίνη αναστέλλει την αντιαποπτωτική δράση της Bcl-2, απελευθερώνεται το κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια και θα ακολουθήσει ένας καταρράκτης ενεργοποίησης προ-κασπασών και κασπασών που θα οδηγήσουν στον κυτταρικό θάνατο (**Εικόνα 20**) [75].



Εικόνα 20: Τρόποι δράσης της δοξορουβικίνης (DOX). Άμεση αλληλεπίδραση με το DNA ή έμμεση πρόκληση βλαβών μέσω αλληλεπίδρασης με τοπιοϊσομεράσες (TOP II) οδηγούν σε απόπτωση (αριστερή εικόνα). Παραγωγή ελεύθερων ριζών ROS μέσω της οξειδάσης του NADPH (NOX) και της συνθάσης του NO (NOS) ενεργοποιούν την κασπασο-εξαρτώμενη απόπτωση (δεξιά εικόνα) [73].

Η πολύπλευρη στόχευση της αναστολής της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων με τους παραπάνω τρόπους δικαιολογεί την κυριαρχία της δοξορουβικίνης και την κατηγορία των ανθρακυκλινών ως τα πιο αποτελεσματικά και χρησιμοποιούμενα αντινεοπλασματικά φάρμακα έναντι διαφορετικών τύπων καρκίνων. Ωστόσο, στο μεγαλείο της δράσης του εντοπίζεται ένα, αλλά σημαντικό, μειονέκτημα που προκαλεί ανησυχία για την ασφάλεια της χρήσης του, την καρδιοτοξικότητα.

Όπως όλα τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, οι ανθρακυκλίνες δεν έχουν εκλεκτική δράση επί των καρκινικών κυττάρων, γι αυτό και οδηγούν και σε μυελοκαταστολή, στοχεύοντας τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος στο μυελό των οστών, που έχουν μεγάλο δυναμικό αναπαραγωγής.

Παράλληλα, όμως, έχουν αναφερθεί πολλά περιστατικά καρδιοτοξικότητας και καρδιακής δυσλειτουργίας από τη χρήση δοξορουβικίνης, γεγονός που έχει οδηγήσει σε περιορισμένη χρήση της [76, 77].

Ερευνητικές εργασίες πρόσθεσαν στη λίστα με τους στόχους της δοξορουβικίνης ακόμα ένα μονοπάτι που σχετίζεται με την εμφάνιση τοξικότητας. Το σύστημα Fas/FasL είναι γνωστό για την αποπτωτική του δράση και φυσιολογικά συναντάται για να περιορίσει τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, ώστε να μην εξαπλωθεί η ανοσολογική απόκριση. Πειράματα που διεξήχθησαν σε καρδιομυοκύτταρα (*in vitro*) και σε αρουραίους (*in vivo*) συσχετίζουν τη δοξορουβικίνη με αύξηση των Fas, FasL και επαγωγή της απόπτωσης μέσω των κασπασών [78, 79].

Σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα (K-562) σε *in vitro* πειράματα, η δοξορουβικίνη οδηγεί τα κύτταρα σε θάνατο, καθώς και μεταβολές στη μορφολογία των κυττάρων και έντονο κατακερματισμό του DNA (εμφάνιση *ladder*) σε συγκέντρωση δοξορουβικίνης 3×10^{-8} M. Ακόμα, η δράση της δοξορουβικίνης περιλαμβάνει και αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, αναστέλλοντας την οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX), που έχει δείχθει πως αποτελεί από τα σημαντικά συστατικά του κυττάρου που καθορίζουν την βιωσιμότητα. Συγκεκριμένα, η δοξορουβικίνη επηρεάζει αρνητικά την έκφραση δύο (2) υπομονάδων του COX συμπλόκου, το πυρηνικό COXIV γονίδιο και το γονίδιο COXII που εκφράζεται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Αυτό έχει σημαντική επίπτωση στο σχηματισμό του ολοενζύμου, μια διαδικασία η οποία δεν γίνεται ορθά σε παρουσία δοξορουβικίνης. Η COX αποτελεί το σύμπλοκο IV της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία συζεύγνυται με το σύμπλοκο V (οξειδωτική φωσφορυλίωση) για την παραγωγή ATP, προκειμένου τα κύτταρα να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες. Γίνεται φανερό πως η δράση της δοξορουβικίνης εμπλέκεται στην αναπνευστική αλυσίδα και εμποδίζει το μονοπάτι παραγωγής ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία αιμίνης (hemin) αναστέλλει μερικώς τη δράση της δοξορουβικίνης, δηλαδή μειώνει τον κυτταρικό θάνατο και η πυρηνική υπομονάδα COXIV είναι λιγότερο ευαίσθητη στη δράση της δοξορουβικίνης. [80, 81].

1.6.4 Αναστολείς γλυκόλυσης / οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Η διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων ως προς το μονοπάτι παραγωγής ενέργειας έφερε στο φως της προσπάθειας για την καταπολέμηση του καρκίνου νέα μόρια που στοχεύουν είτε την γλυκολυτική οδό είτε τα ενζυμικά σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Πειράματα σε κυτταρικές σειρές διαφόρων τύπων καρκίνου έχουν δείξει πως η εξωγενώς προκαλούμενη αλλαγή στο μονοπάτι μεταβολισμού της γλυκόζης μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, εμφανίζοντας έτσι αντικαρκινική δράση.

Η βασική ιδέα είναι,

- Σε καρκινικούς τύπους οι οποίοι συμπεριφέρονται σύμφωνα με το Warburg effect, δηλαδή στρέφονται προς την αερόβια γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας, να γίνεται χορήγηση αναστολέων της γλυκόλυσης. Έτσι, παρεμποδίζεται αυτή η οδός και εξαναγκάζονται τα κύτταρα να χρησιμοποιήσουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αν είναι δυνατόν, για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι σημαντικό να παρατηρηθεί αν τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν στον ίδιο βαθμό όταν διακόπτεται η βασική οδός για τον μεταβολισμό των πηγών ενέργειας [82].
- και αντίστοιχα, σε καρκινικούς τύπους που στηρίζονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση να διακοπεί αυτό το μονοπάτι με τη χρήση ειδικών

αναστολέων των συμπλόκων, ενισχύοντας τη γλυκόλυση, ώστε να παρατηρηθεί αν τα επίπεδα της βιωσιμότητάς τους μειώνονται [83].

Τα καρκινικά κύτταρα προσλαμβάνουν ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες γλυκόζης, το μεγαλύτερο ποσοστό της οποίας μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αερόβια γλυκόλυση ή Warburg effect. Η διακοπή αυτής της οδού παραγωγής ATP θεωρείται τον τελευταίο καιρό ότι μπορεί να αποτελέσει βασικό στόχο αντικαρκινικής θεραπείας. Αρχικό στάδιο για την διακοπή της γλυκόλυσης αποτελεί ο περιορισμός της διαθεσιμότητας της πηγής που καταβολίζεται, στην συγκεκριμένη περίπτωση της γλυκόζης. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα πρόσληψης γλυκόζης μέσω των μεταφορέων GLUT. Αναστολείς των μεταφορέων GLUT σε καρκινικά κύτταρα οδηγούν σε μείωση των επιπέδων γλυκόζης ενδοκυτταρικά, με συνέπεια τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και οδηγούνται σε απόπτωση [82].

Ακόμα, μόρια-αναστολείς σημαντικών ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις της γλυκόλυσης έχουν αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Η εξοκινάση, η φωσφοφρουκτοκινάση και η κινάση του πυροσταφυλικού οξέος ως τα ένζυμα που εντοπίζονται στα σημεία ελέγχου της γλυκόλυσης, αποτελούν και τους στόχους των αναστολέων για την παρεμπόδιση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Η **2-δέοξυ-D-γλυκόζη(2-DG)** ως αναστολέας της εξοκινάσης (HK) διακόπτει τη γλυκόλυση από το πρώτο στάδιο της, τα επίπεδα ATP μειώνονται δραστικά και το κύτταρο αδυνατώντας να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες οδηγείται σε θάνατο μέσω απόπτωσης. Παρόλο που η 2-DG φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες και δοκιμάζεται η χρήση της μέσω κλινικών μελετών, η μη ειδική δράση της θέτει σε κίνδυνο κύτταρα του φυσιολογικού ιστού [84]. Η φωσφοφρουκτοκινάση (PFK) αποτελεί το κυριότερο σημείο ελέγχου της γλυκόλυσης και αναστέλλεται από ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς, όπως τα υψηλά επίπεδα ATP και τα επίπεδα της 2-διφωσφορικής φρουκτόζης(F2-6BP). Το μικρό μόριο **3PO** (chalcone-like 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propene-1-one) αναστέλλει αποτελεσματικά την δράση της PFK και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε *in vivo* πειράματα. Η παραγωγή ATP από τα κύτταρα καθορίζεται και από τη δραστηριότητα της κινάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PKM), η οποία υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Για την PKM δεν έχει περιγραφεί κάποιο μόριο υπεύθυνο για την αναστολή της δράσης της, ωστόσο μέσω της καταστολής του HIF-1 καταστέλλονται και οι στόχοι του, μέσα στους οποίους συγκαταλέγεται και η PKM, όμως και η LDH και η PDK [85].

Εκτός από τα παραπάνω ένζυμα, μόρια που στοχεύουν καθοδικά μόρια της γλυκόλυσης περιλαμβάνονται στις εναλλακτικές για την αρνητική στόχευση της γλυκόλυσης. Η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος παράγει ακέτυλο-CoA από το πυροσταφυλικό οξύ που προέρχεται από την γλυκόλυση. Η ενίσχυση της μετατροπής αυτής με τη δράση του **διχλωροακετοξικού οξέος (DCA)** οδηγεί σε ενίσχυση της οξειδωσης της γλυκόζης που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και παράλληλα καταστέλλει την παραγωγή του γαλακτικού οξέος και την αερόβια γλυκόλυση [86]. Από την άλλη, το μόριο **FX11** αναστέλλει την μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό, που καταλύεται από την γαλακτική αφυδρογονάση (LDH). Κατά συνέπεια, το οξειδωτικό στρες αυξάνεται και μειώνεται το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, με συνέπεια το θάνατο των καρκινικών κυττάρων [87].

Παρόλο που το Warburg effect έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις πως τα καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένη λειτουργία της γλυκόλυσης και αξιοποιούν σε χαμηλότερο βαθμό την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Μελέτες έχουν δείξει πως κάποιοι τύποι καρκίνου, όπως κάποια λεμφώματα, λευχαιμίες και ο καρκίνος του παγκρέατος, παρουσιάζουν αυξημένη λειτουργικότητα

της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης παρά την ενεργή γλυκόλυση. Μόρια που δρουν ως αναστολείς της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικοί παράγοντες στους παραπάνω τύπους καρκίνου [83].

Η αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επιτυγχάνεται κυρίως μέσω μορίων που στοχεύουν το σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας.

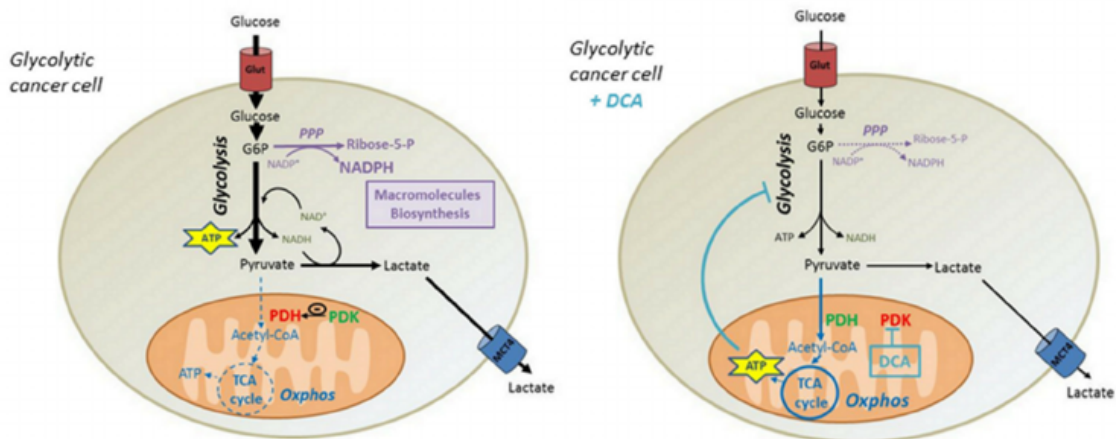
Η **ροτενόνη** (αναστολέας του συμπλόκου I της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης) σε καρκινική κυτταρική σειρά μαστού, κάτω από καθορισμένη διαθεσιμότητα σε γλυκόζη, οδήγησε σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο, παρατηρήσεις που σημειώθηκαν και με άλλους αναστολείς της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Piericidin A, Capsaicin) [88].

Κύτταρα οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (AML) είναι εξαρτημένα από την οξειδωτική φωσφορυλίωση για την επιβίωσή τους και τον καρκινικό τους φαινότυπο. Η ανακάλυψη του μορίου **IACS-010759** και η δράση του ως αναστολέα του μιτοχονδριακού συμπλόκου I βοήθησε πολύ στην μελέτη της αντικαρκινικής του δράσης. Συγκεκριμένα, η χορήγηση του IACS-010759 σε καρκινική σειρά AML περιόρισε το μέγεθος του όγκου, το οποίο αποδείχθηκε στη συνέχεια και σε *in vivo* καρκινικά μοντέλα, όπου αυξήθηκε σημαντικά το προσδόκιμο ζωής. Το IACS-010759 στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε στην επόμενη φάση μελετών για να δοκιμαστεί σε ασθενείς με AML ή με συμπαγείς όγκους [89].

1.6.5 Διχλωρο-ακετοξικό (Dichloroacetate, DCA)

Το διχλωρο-ακετοξικό είναι ένα μικρό υδατοδιαλυτό μόριο οξέος, 150Da, και αποτελεί αναστολέα της γλυκόλυσης, στα τελικά στάδιά της. Το DCA άμεσα αναστέλλει την PDK (Protein 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) κινάση, η οποία αναστέλλει τη δράση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (Pyruvate dehydrogenase, PDH) (**Εικόνα 21**). Η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος καταλύει την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-CoA, το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και συμμετέχει στην παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επομένως, το DCA επάγει το σχηματισμό του ακέτυλο-CoA και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Το DCA έχει χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση της χρόνιας και οξείας γαλακτικής οξέωσης, εγγενών βλαβών του μεταβολισμού μέσω των μιτοχονδρίων και του διαβήτη [86, 90].

Ωστόσο, μελετάται η δυνατότητα το DCA να δράσει και ως εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο, επηρεάζοντας τη μεταβολική οδό των καρκινικών κυττάρων. Το DCA στοχεύει αποτελεσματικά τα κακοήθη κύτταρα που επιλέγουν για την επιβίωση και εξάπλωσή τους την αερόβια γλυκόλυση. Έτσι, παρεμποδίζεται η γλυκόλυση, ένα πλεονέκτημα που έχουν αναπτύξει τα καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 21: Τρόπος δράσης του DCA. Τα καρκινικά κύτταρα από τη γλυκόλυση σε μεγάλο ποσοστό παράγουν γαλακτικό οξύ και σε μικρότερο βαθμό το πυροσταφυλικό εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος για την παραγωγή ATP (αριστερή εικόνα). Το DCA αναστέλλει την γλυκόλυση μέσω επαγωγής της μετατροπής του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-CoA και το καρκινικό κύτταρο αναγκάζεται να στραφεί στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (δεξιά εικόνα) [91].

Υποσχόμενη φαίνεται η **συνδυαστική χορήγηση** ενός αντικαρκινικού φαρμάκου με το DCA για την πιθανή μείωση των δυσμενών επιπτώσεων σε πολλούς καρκίνους [91, 92].

Για τον καρκίνο του ήπατος γίνεται μελέτη της συνδυαστικής χορήγησης του DCA με τον αντικαρκινικό παράγοντα **Curcumin** (φυσική φαινόλη με εν δυνάμει αντικαρκινική δράση), όπου φαίνεται πως η δράση των δύο ουσιών οδηγεί σε αυξημένα ποσοστά θανάτου συγκριτικά με τη μεμονωμένη δράση τους [93].

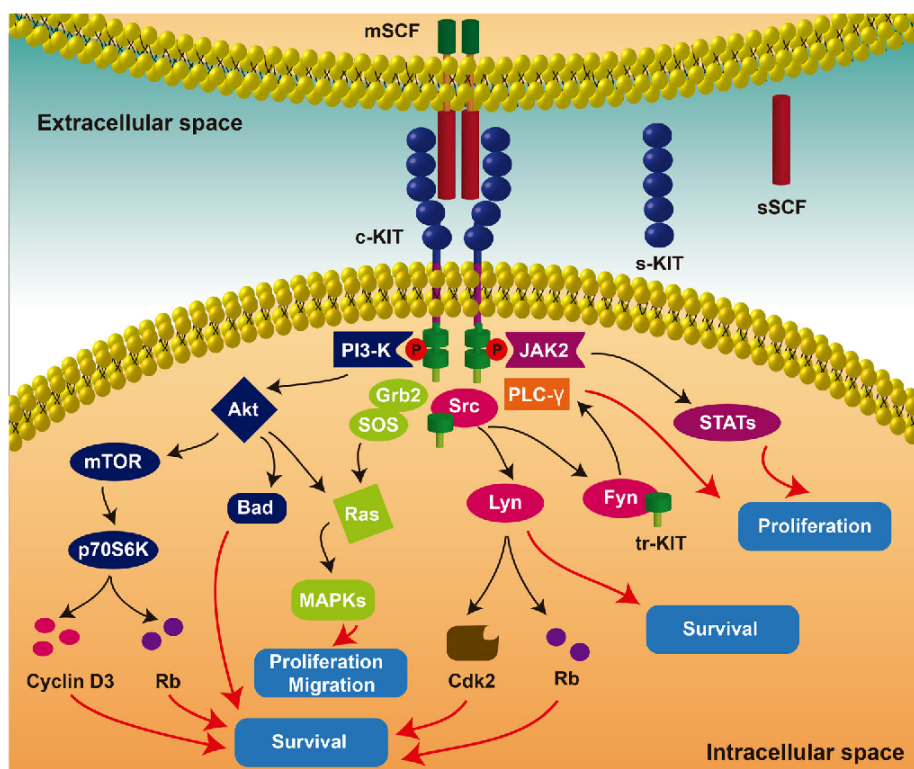
Ακόμα, δυο καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου εξετάστηκαν ως προς τη συνδυαστική δράση του DCA με την **Salinomycin** (αντιμικροβιακή ουσία με εν δυνάμει αντικαρκινική δράση) και το αποτέλεσμα ήταν η ενισχυμένη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης [94].

Επίσης, το DCA έχει μελετηθεί και για την πιθανή μείωση των δυσμενών επιπτώσεων που εμφανίζονται από αντικαρκινικά φάρμακα. Χαρακτηριστική περίπτωση είναι το **Cisplatin**, ένα αποτελεσματικό αντικαρκινικό που χρησιμοποιείται για την θεραπεία διαφορετικών τύπων καρκίνου, όπως της ουροδόχου κύστης, του οισοφάγου και του πνεύμονα. Ωστόσο, το Cisplatin προκαλεί νεφροτοξικότητα που δημιουργεί ανησυχία για την χρήση του. *In vivo* μελέτη σε ποντίκια έδειξε όχι μόνο ότι το DCA ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο του καρκινικού πληθυσμού, αλλά και ότι προσφέρει προστασία έναντι της νεφροτοξικότητας που παρατηρείται λόγω του Cisplatin [95].

1.7 Παράγοντες με εν δυνάμει ρόλο στη βιοενεργητική των κυττάρων.

1.7.1 Stem cell factor (SCF)

Ο SCF ανήκει στην κατηγορία αυξητικών παραγόντων, εκφράζεται σε ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και παίζει ρόλο στην επιβίωση, μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση αιμοποιητικών και γαμετικών κυττάρων. Ο SCF εντοπίζεται στο κύτταρο σε δύο (2) ισομορφές, τη διαμεμβρανική και τη διαλυτή. Και στις δυο του ισομορφές προσδένεται στον c-Kit και ενεργοποιεί την δράση κινάσης τυροσίνης. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται καθοδικά συμβάλλουν στην προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού και φαίνονται αναλυτικά στην **εικόνα 22**. Το γονίδιο για το c-Kit έχει χαρακτηριστεί ως πρωτο-ογκογονίδιο και μεταλλάξεις είτε στον ίδιο τον υποδοχέα είτε στον προσδέτη του, που οδηγούν σε αύξηση δραστηριότητας, παρουσιάζονται σε ασθένειες, όπως ο καρκίνος [96].



Εικόνα 22: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μετά από πρόσδεση του SCF στον υποδοχέα c-KIT. Φαίνονται τα μονοπάτια PI3-K/Akt και Src που συμμετέχουν στην επιβίωση των κυττάρων, και τα Ras/MAPKs, JAK/STATs που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [97].

Η αυξημένη δράση του c-Kit έχει παρατηρηθεί σε τύπους καρκίνου, όπως λευχαιμίες, καρκίνους του γαστρεντερικού σωλήνα και σε καρκίνους των γαμετικών κυττάρων. Αντικαρκινικά φάρμακα που δρουν ως αναστολείς κινάσων στοχεύουν επίσης το c-Kit. Ωστόσο, μεταλλάξεις στον γονιδιακό τόπο του c-Kit οδηγούν στην παραγωγή ενός υποδοχέα, ο οποίος εμφανίζει αντίσταση στα παραπάνω φάρμακα [98].

1.7.2 Sco2

Η πρωτεΐνη Sco2 κωδικοποιείται από γονιδιακό τόπο του πυρηνικού γονιδιώματος στο χρωμόσωμα 22. Μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή, chr22 (q13.33), έχουν συνδεθεί με ασθένειες, όπως και η θανατηφόρα βρεφική κάρδιοεγκεφαλομυοπάθεια (Fatal Infantile Cardioencephalomyopathy) η μυωπία 6. Η απομόνωση και ταυτοποίηση του γονιδίου, έγινε από την κ. Παπαδοπούλου και την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Eric Schon στο πανεπιστήμιο Columbia της Νέας Υόρκης.

Κατατέθηκε στην «τράπεζα δεδομένων GenBank» ως εξής:

Nucleotide: GenBank Accession number:	F177385
Protein: GenBank Accession number:	AAF05313
OMIM:	##604377 [99]

Η πρωτεΐνη Sco2 ανήκει στις μεταλλοπρωτεάσες και εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Συμμετέχει στη διαμόρφωση του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας, δηλαδή της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, COX, και συγκεκριμένα, παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση και την ωρίμανση της υπομονάδας II του συμπλόκου. Οι θέσεις πρόσδεσης μετάλλων και συγκεκριμένα του χαλκού Cu καθορίζουν τη λειτουργικότητα της ως πρωτεΐνη μεταφοράς ιόντων χαλκού στην υπομονάδα II (Cox2) του COX [100, 101].

1.7.3 Γαλακτική αφυδρογονάση (LDHA)

Απαραίτητο στάδιο στο μονοπάτι παραγωγής ενέργειας των καρκινικών κυττάρων, τόσο σε συνθήκες υποξίας όσο και σε περιπτώσεις αερόβιας γλυκόλυσης, είναι η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την γαλακτική αφυδρογονάση A (LDHA). Η LDHA ανήκει στην ομάδα των ενζύμων που εξαρτώνται από NAD⁺ και σχηματίζεται από τον συνδυασμό δύο υπομονάδων, M και H. Τα γονίδια στα οποία εντοπίζεται η πληροφορία για την κωδικοποίηση των παραπάνω υπομονάδων, ονομάζονται *LDHA* και *LDHB* και κωδικοποιούν την M και H υπομονάδα αντίστοιχα [102]. Η υπερέκφραση του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσών γαλακτικού οξέος και NAD⁺, ενώ παράλληλα οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα πυροσταφυλικού οξέος παρεμποδίζοντας το μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης. Ο ρόλος της LDHA σε καρκίνους, όπως γλοιοβλάστωμα και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, τον κατατάσσει ως πιθανό στόχο σε αντικαρκινικές θεραπείες [103, 104].

1.7.4 Παράγοντας p53

Το *TP53* γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17, αποτελείται από 11 εξόνια και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Στο γονιδίωμα των περισσότερων τύπων καρκίνου που έχουν χαρακτηριστεί, εντοπίζεται το γονίδιο σε μεταλλαγμένη μορφή, που συνήθως έχει ως αποτέλεσμα της αλλαγής της λειτουργίας της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης, p53. Φυσιολογικά η p53 ενεργοποιείται από συνθήκες οξειδωτικού στρες και από βλάβες στο DNA και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, ή όταν δεν είναι δυνατό, στον κυτταρικό θάνατο. Επίσης, εντοπίζεται σε δυο σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (φάση G1 → φάση S και φάση G2 → φάση M) επιτρέποντας ή αποτρέποντας την μετάβαση του κυττάρου από την μια φάση στην επόμενη [105].

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* που οδηγούν σε παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης p53 εντοπίζονται σε καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα την απορρύθμιση μονοπατιών που σχετίζονται τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και με τον μεταβολισμό της γλυκόζης για την παραγωγή ενέργειας. Συγκεκριμένα, σε αυτές τις περιπτώσεις ενισχύεται η γλυκόλυση, ενώ η οξειδωτική φωσφορυλίωση παρουσιάζει δραματικά μειωμένη δραστηριότητα [106]. Τα παραπάνω είναι αποτέλεσμα της αλλαγής της έκφρασης σημαντικών γονιδίων που ελέγχουν την μεταφορά γλυκόζης μέσα στο κύτταρο, ένζυμα που εμπλέκονται στην διάσπαση της γλυκόζης και πρωτεΐνες που οδηγούν το πυροσταφυλικό οξύ είτε προς την αερόβια είτε αναερόβια οδό για την τελική οδό παραγωγής ATP. Βλάβες στην p53 οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα οξυγόνου στα καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα ο μεταβολισμός τους να κατευθύνεται προς την αερόβια γλυκόλυση παρά προς την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αυτό ενισχύεται και από άλλες αλλαγές που είναι αποτέλεσμα του ενεργού παράγοντα Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) στα καρκινικά κύτταρα. Ενώ σε φυσιολογικά κύτταρα, σε συνθήκες υποξίας ενεργοποιείται ο παράγοντας HIF-1, ο οποίος συμβάλλει στην σταθεροποίηση της p53, στα καρκινικά η μη λειτουργική p53 ενεργοποιεί τον HIF-1 ο οποίος ασκεί επιρροή σε πληθώρα κυτταρικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, επηρεάζει θετικά την έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης GLUT που εξασφαλίζουν την διαθεσιμότητα γλυκόζης εντός του κυττάρου, και προωθεί τον καταβολισμό της μέσω υπερέκφρασης ενζύμων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση (PFK2, PKM2, PDK1) [107]. Εκτός, από την γλυκόλυση, η p53 επηρεάζει και την πορεία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μέσω της έκφρασης της Sco2. Η αγρίου τύπου p53 ενεργοποιεί την έκφραση της Sco2 και διευκολύνεται η παραγωγή ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου που χαρακτηρίζονται από μεταλλαγμένη μορφή p53, παρουσιάζουν μειωμένη λειτουργικότητα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και παράλληλα μειωμένα επίπεδα Sco2 που αποτελεί σημαντικό συστατικό για τον σχηματισμό του συμπλόκου IV [108, 109].

Σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K-562 η ένθεση ενός νουκλεοτιδίου στο εξόνιο 5 του γονιδίου *TP53* και συγκεκριμένα μεταξύ του κωδικονίου 135 και 136 στο μετάγραφο αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης. Η μετάλλαξη οδηγεί σε δημιουργία ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης, 36 βάσεις καθοδικά της θέσης ένθεσης. Σε επίπεδο πρωτεΐνης, η μετάλλαξη προκαλεί την παραγωγή μιας μη λειτουργικής p53 148aa έναντι 393aa [110].

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της μεμονωμένης αλλά και συνδυαστικής δράσης της δοξορουβικίνης και διχλωροακετοξικού οξέος (DCA) σε K-562 ερυθρολευχαιμικά κύτταρα. Η δοξορουβικίνη ασκεί πλειοτροπική δράση, προκαλώντας βλάβες στο DNA και ενεργοποιώντας την απόπτωση μέσω οξειδωτικού στρες, και το DCA αναστέλλει τη γλυκολυτική διαδικασία, από την οποία στηρίζονται τα K-562 κύτταρα για την παραγωγή ενέργειας και επιβίωσή τους. Συγκεκριμένα, σε πρώτο στάδιο θα προσδιοριστεί η κατάλληλη των φαρμάκων-ουσιών που θα χρησιμοποιηθεί για τη χορήγηση στα κύτταρα. Στη συνέχεια, η μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των φαρμάκων θα γίνει με μέτρηση του αριθμού των κυττάρων, απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων και με ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων σημαντικών πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν τόσο σε αναπτυξιακά μονοπάτια όσο και σε μονοπάτια για την παραγωγή ενέργειας. Αυτό θα συντελέσει στο να ανιχνευθούν πιθανές σημαντικές αλλαγές στην καρκινική συμπεριφορά των κυττάρων από την επίδραση των δύο ουσιών, που θα μπορούσε να υποδείξει ιδανικά την υποχώρηση του καρκινικού φαινοτύπου των κυττάρων.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Κυτταρικές Σειρές

- ✘ Η κυτταρική σειρά **K-562** (ATCC® CCL243™) αφορά ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μυελού των οστών που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας (ΧΛΛ). Τα κύτταρα έχουν απομονωθεί από θηλυκό άτομο ηλικίας 53 ετών, με ΧΛΛ σε βλαστική κρίση, και αναπτύσσονται σε εναιώρημα κυττάρων, ενώ παράλληλα απαιτείται εξοπλισμός βιοασφάλειας επιπέδου 1 [111]. Τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία θρεπτικού υλικού RPMI με 10% περιεκτικότητα σε «Fetal Bovine Serum» και 1% περιεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Τα κύτταρα αραιώνονται κάθε 2-3 ημέρες και αναπτύσσονται μεταξύ των συγκεντρώσεων $1-10 \cdot 10^5$ κύτταρα/ml.
- ✘ Η κυτταρική σειρά **K562-r** αναφέρεται σε κύτταρα K-562, τα οποία έχουν επωαστεί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αντικαρκινικού φαρμάκου ιματινίβη, με συνέπεια να παρουσιάζουν αντίσταση στη δράση του φαρμάκου. Επίσης, αναπτύσσονται σε μορφή εναιωρήματος κυττάρων και για την ανάπτυξή τους απαιτείται συνεχής έκθεση σε ιματινίβη η οποία προστίθεται στο θρεπτικό υλικό. Στο πλήρες θρεπτικό RPMI (μετά από προσθήκη 10% FBS και 1% αντιβιοτικά) Τα K562-r κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία θρεπτικού υλικού RPMI με 10% περιεκτικότητα σε «Fetal Bovine Serum» και 1% περιεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Σε 50ml πλήρους RPMI προστίθεται 500μl Γλουταμίνη και 1,83μl Ιματινίβη αρχικής συγκέντρωσης 0,029M. Η αραιώση των κυττάρων κάθε 2-3 ημέρες και αναπτύσσονται με αρχική συγκέντρωση $2 \cdot 10^5$ κύτταρα/ml.

3.1.2 Θρεπτικό υλικό

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το RPMI 1640 Medium, σε μορφή σκόνης (Gibco™, REF 31800-089), το οποίο παρασκευάζεται με την ανάμειξη 31,22gr RPMI σκόνης και 6gr NaHCO₃ σε 3lt milli-Q αποστειρωμένο H₂O και ρύθμιση του pH 6,9-7 με την προσθήκη HCl. Το διάλυμα, στη συνέχεια, διηθείται μέσω φίλτρου με πόρους διαμέτρου 0,22μm και αποθηκεύεται σε μπουκάλια στους 4°C. Για την χρήση του θρεπτικού υλικού είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός του με Fetal Bovine Serum 10% τελική συγκέντρωση και με μείγμα αντιβιοτικών Πενικιλίνης-Στρεπτομυκίνη (1% συγκέντρωση στο τελικό όγκο του θρεπτικού).

3.1.3 Φαρμακευτικές ουσίες

- ✘ **Doxorubicin** σε μορφή σκόνης από την Pfizer (50mg Doxorubicin Hydrochloride) μετατράπηκε σε διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-3} M με την διαλυτοποίηση 0,003538g σε 1ml milli-Q αποστειρωμένο H₂O από το οποίο έγιναν και όλες οι απαραίτητες αραιώσεις για τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.
- ✘ **Dichloroacetic acid** σε μορφή διαλύματος από την εταιρία Sigma Aldrich (Cat.: D5,470-2, Lot.: S65139-029) με συγκέντρωση 12,12M. Ως πυκνό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το DCA σε συγκέντρωση 1,212 M από το οποίο έγιναν και όλες οι απαραίτητες αραιώσεις για τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

3.1.4 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μελετούμενων πρωτεϊνών με την μέθοδο ανοσοαπώπωσης κατά WESTERN φαίνονται στον Πίνακα 1. Στις πληροφορίες κάθε αντισώματος περιλαμβάνεται και η αραιώση του που χρησιμοποιείται σε διάλυμα 5 ή 4 ml PBST 1X και BSA 3%. Ακόμα, στην δεύτερη στήλη φαίνεται το μοριακό μέγεθος κάθε πρωτεΐνης, το οποίο διαπιστώνεται και στην μεμβράνη από την WESTERN Blot με την βοήθεια ενός πρωτεϊνικού μάρτυρα με διαφορετικά μοριακά μεγέθη. Στην τρίτη και τελευταία στήλη του πίνακα παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με την πηγή παραγωγής του αντισώματος (κουνέλι ή ποντικό), καθώς και για την κλωνικότητα του (πολυκλωνικό - μονοκλωνικό).

Πίνακας 1: Λίστα με τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαπώπωση κατά WESTERN.

Πρωτογενές αντίσωμα	Μοριακή Μάζα	Δευτερογενές αντίσωμα
Anti-b actin (1:1000)	45kDa	Mouse monoclonal IgG1
Anti-SCF (1:4000)	37kDa	Rabbit monoclonal IgG
Anti-Frataxin (1:200)	18kDa	Rabbit polyclonal IgG
Anti-Sco2 (1:500)	26kDa	Rabbit polyclonal IgG
Anti-LDHA (1:500)	36kDa	Rabbit polyclonal IgG

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Απόψυξη κυττάρων από το υγρό άζωτο

Η απόψυξη των κυττάρων K562 περιλαμβάνει

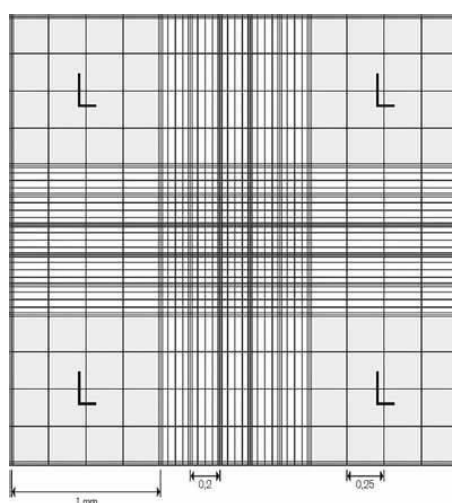
1. τη θέρμανση του ειδικού φιαλιδίου *cryovial* σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, χωρίς να ξεπαγώσει ολοκληρωτικά το περιεχόμενο
2. απόρριψη του περιεχομένου του *cryovial* σε σωληνάριο *falcon* με 5ml RPMI
3. φυγοκέντρηση για 5min σε 1100rpm
4. απόρριψη του υπερκειμένου
5. διαλυτοποίηση των κυττάρων σε 5ml RPMI
6. μεταφορά του διαλύματος σε *non-treated cell culture plate*, το οποίο περιέχει ήδη 5ml RPMI
7. το πιάτο τοποθετείται στον επωαστήρα με συνθήκες 37°C και συγκέντρωση CO₂ 5%

3.2.2 Κρυοδιατήρηση κυττάρων στο υγρό άζωτο

Τα κύτταρα K562 διατηρούνται στο υγρό άζωτο σε αριθμό ~ 4*10⁶ κύτταρα. Αφού γίνει μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων της καλλιέργειας με την πλάκα «Neubauer», υπολογίζεται ο όγκος της καλλιέργειας που να αντιστοιχεί σε 4*10⁶ κύτταρα. Ο όγκος της καλλιέργειας μεταφέρεται σε *falcon*, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά και 1100gcf, απόρριψη του υπερκειμένου και διαλυτοποίηση των κυττάρων σε 1,8ml RPMI. Το εναιώρημα μεταφέρεται στο *cryovial* και προστίθεται 200μl DMSO. Τα κύτταρα παγώνουν σταδιακά στο ψυγείο -80°C στην ειδική συσκευή ισοπροπανόλης για ένα βράδυ και, στη συνέχεια, τοποθετούνται στο υγρό άζωτο για πλήρη ψύξη.

3.2.3 Μέτρηση του ρυθμού βιωσιμότητας και του κυτταρικού θανάτου των κυττάρων με τη χρωστική ουσία «Trypan Blue»

Ο υπολογισμός του ρυθμού διπλασιασμού των κυττάρων περιλαμβάνει τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε διάφορες χρονικές στιγμές (0, 24, 48, 96 ώρες). Η μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων μέσω της πλάκας *Neubauer* προϋποθέτει τη σωστή ανάδευση της καλλιέργειας και λαμβάνονται 9μl, τα οποία τοποθετούνται σε κάθε θέση μεταξύ του κενού που διαχωρίζει την πλάκα και την καλυπτρίδα. Μετρούνται τα κύτταρα εντός των τετραγώνων L και στους 2 (δύο) σταυρούς της πλάκας (**Εικόνα 23**). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά, ώστε οι μετρήσεις να αντιστοιχούν σε συνολικά 16 τετράγωνα. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται με τον αριθμητικό μέσο όρο, ο οποίος αντιστοιχεί σε $\cdot 10^4$ κύτταρα/ml.



Εικόνα 23: Κάθε πλάκα «Neubauer» αποτελείται από 2 (δύο) σταυρούς από τους οποίους μετρούνται τα κύτταρα που εντοπίζονται στα τμήματα L.

Ο κυτταρικός θάνατος προσδιορίζεται μέσω της μέτρησης των βαμμένων “μπλε” κυττάρων μέσω της πλάκας *Neubauer*. Γι’ αυτό, χρειάζονται 15μl κυττάρων σε εναιώρημα, τα οποία αναμειγνύονται με 15μl *Trypan blue* για 5 λεπτά. Έπειτα τοποθετούνται 9μl από το μείγμα σε κάθε θέση της πλάκας και μετρούνται συνολικά 300 κύτταρα ανά θέση. Το νούμερο των νεκρών κυττάρων ως προς τα συνολικά 300 κύτταρα μετατρέπεται σε ποσοστό % των νεκρών κυττάρων.

3.2.4 Μέθοδος προσδιορισμού IC50 φαρμάκων

Για τον προσδιορισμό της τιμής IC50 των DCA και Doxorubicin στα K562 κύτταρα, εξετάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις DCA και Doxorubicin:

Για το **DCA**: 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5 και 5mM

Για την **Doxorubicin**: 0, $1 \cdot 10^{-9}$, $5 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$ M.

Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων ήταν $1 \cdot 10^5$ cells/ml σε καλλιέργεια 2ml. Καταγράφηκε η ανάπτυξη (με την πλάκα *Neubauer*) και το ποσοστό θανάτου (με *Trypan blue*) των κυττάρων παρουσία των παραπάνω συγκεντρώσεων των ουσιών στις 24, 48 και 72 ώρες επώασης. Τα αποτελέσματα στηρίζονται σε μετρήσεις 3 επαναλήψεων των πειραμάτων.

☐ Για τα επόμενα πειράματα που στηρίχτηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν για την δοξορουβικίνη οι συγκεντρώσεις $2 \cdot 10^{-8}$ M,

$2 \cdot 10^{-6} \text{M}$ και για το DCA η συγκέντρωση 4mM , ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκαν και πειράματα με ταυτόχρονη επώαση του DCA σε συνδυασμό με κάθε εξεταζόμενη συγκέντρωση για την δοξορουβικίνη.

3.2.5 Λύση κυττάρων με RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay buffer), συλλογή και απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

1. Συλλογή των κυττάρων
2. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά, 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
3. Προσθήκη 1ml PBS 1X, Φυγοκέντρηση 5 λεπτά, 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
4. Επανάληψη πλύσης με PBS 1X
5. Προσθήκη $135 \mu\text{l}$ RIPA (Teknova, #R3792) (4°C) και $15 \mu\text{l}$ Protease Inhibitors (-20°C) σε κάθε ειδικό σωληνάριο *ependorf tube*
6. Ανάδευση και επώαση στον πάγο 15 λεπτά
7. Λύση των κυττάρων με σύριγγα ινσουλίνης
8. Φυγοκέντρηση 4°C 12000rpm 15 λεπτά
9. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο *ependorf tube*
10. Αποθήκευση στους -20°C

3.2.6 Λύση κυττάρων με τη χρήση MITO Buffer, συλλογή και απομόνωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών

1. Συλλογή των κυττάρων
2. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
3. Προσθήκη 1ml PBS 1X, Φυγοκέντρηση 5 λεπτά 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
4. Επανάληψη πλύσης με PBS 1X
5. Προσθήκη $300 \mu\text{l}$ MITO Buffer και $3 \mu\text{l}$ PI
6. Ψύξη του δείγματος στους -20°C για 5 λεπτά
7. Επώαση του δείγματος στους 4°C για 5 λεπτά
8. Επανάληψη κύκλου επώασης και ψύξης του δείγματος
9. Χρήση σύριγγας ινσουλίνης - φυγοκέντρηση 5 λεπτά, 4°C , 1000rcf
10. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο *ependorf tube* (2) στον πάγο
11. Στο ίζημα γίνεται προσθήκη $80 \mu\text{l}$ MITO Buffer + $1,5 \mu\text{l}$ PI
12. Δείγμα από σύριγγα - φυγοκέντρηση 5 λεπτά, 4°C , 1000rcf
13. Μεταφορά υπερκείμενου στο *ependorf tube* (2) φυγοκέντρηση 8000rcf , 10 λεπτά, 4°C
14. Απόρριψη υπερκείμενου (σε νέο *ependorf tube*)
15. Προσθήκη στο ίζημα $1500 \mu\text{l}$ MITO storage και $1,5 \mu\text{l}$ PI - φυγοκέντρηση 10000rcf , 10 λεπτά, 4°C
16. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε $65 \mu\text{l}$ MITO Storage Buffer (Qiagen. Lot.133213619) + $1,5 \mu\text{l}$ PI
17. Αποθήκευση στους -20°C .

3.2.7 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο «Bradford»

- ▣ Για την πρότυπη καμπύλη: προετοιμασία των *ependorf tube* με τις αντίστοιχες ποσότητες BSA, NaCl και *διαλύματος Bradford*.
 - Επώαση για 5 λεπτά υπό σκοτάδι

- Προσθήκη σε *96-well plate* 200μl σε 2 *wells* από κάθε δείγμα των βιολογικών επαναλήψεων
 - Μέτρηση της απορρόφησης στα 600nm.
- ☒ Για τα δείγματα: 5μl από κάθε δείγμα σε 45μl NaCl και 500μl B.S
- ☒ Χρειάζεται και ένα δείγμα τυφλό, το οποίο αντί για δείγμα περιέχει 5μl RIPA Buffer ή MITO Storage Buffer.

3.2.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών τύπου «WESTERN» (WESTERN BLOT)

3.2.8.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

- Για τα πειράματα παρασκευάστηκαν πηκτές SDS/πολυ-ακρυλαμιδίου με συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 15% η φάση διαχωρισμού (*separating gel*) και 5% η φάση στοιβάγματος (*stacking gel*) . Η χωρητικότητα κάθε θέσης εκφόρτωσης είναι 40μl και από κάθε πρωτεϊνικό δείγμα φορτώνονται 30μl που αντιστοιχούν σε πάνω από 20μg συνολικής πρωτεΐνης. Για κάθε 30μl δείγματος, αναμειγνύονται με 7,5μl *Loading dye* / β-μερκαπτοαιθανόλη (5%). Απαραίτητη είναι η θέρμανση του δείγματος με την χρωστική για 5 λεπτά στους 95°C πριν την μεταφορά του στις θέσεις φόρτωσης *της πηκτής*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν 3μl από τον πρωτεϊνικό μάρτυρα της εταιρίας NIPPON Genetics (Cat. No. MWP02) ανά πηκτή. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν για 30 λεπτά σε 80V, και για 1 ώρα και 30 λεπτά σε 125V.

3.2.8.2 Ηλεκτρομεταφορά της πηκτής σε μεμβράνη PVDF (Transfer Method)

- Στη συνέχεια, ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά (*wet transfer*) του περιεχόμενου του *πηκτής* σε μεμβράνη PVDF η οποία ενεργοποιείται με μεθανόλη για 1 λεπτό. Οι συνθήκες μεταφοράς ήταν 0,3 Ampere για 1 ώρα και 30 λεπτά.
- Μετά την μεταφορά, το *πηκτής* επωάζεται με διάλυμα χρώσης και αποχρωματίζεται για την οπτικοποίηση των μη μεταφερόμενων πρωτεϊνών.
- Η μεμβράνη βάφεται με διάλυμα χρώσης *Ponceau* για την οπτικοποίηση των μεταφερόμενων πρωτεϊνών. Στην συνέχεια ξεπλένεται με PBST 1X και ακολουθεί η πλύση (1 ώρα και 15 λεπτά) της με διάλυμα *blocking* 4% PBST 1X- γάλα σε σκόνη για τον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισωμάτων.

3.2.8.3 Ανοσοανίχνευση τύπου Western

- Η επώαση της μεμβράνης με τα πρωτογενή αντισώματα γίνεται O/N σε 4°C. Τα πρωτογενή αντισώματα είναι διαλυμένα σε 5ml PBST 1X- 3% Albumin Fraction V (AppliChem), εκτός από την Sco2 που είναι διαλυμένη σε 4ml PBST 1X - 2% γάλα σκόνη.

- Η επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα γίνεται για 1 ώρα και 15 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δευτερογενή αντισώματα (συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση) είναι διαλυμένα σε PBST - 2% γάλα σε σκόνη.

Τα δευτερογενή αντισώματα παραγόμενα σε ποντικό anti-Mouse IgG 1μl σε 4ml PBST 1X , ενώ τα δευτερογενή αντισώματα παραγόμενα σε κουνέλι «anti-Rabbit IgG» 2μl σε 5ml PBST 1X.

- Μετά την αφαίρεση κάθε αντισώματος ακολουθούν πλύσεις με PBST 1X υπό ανάδευση (1x 10ml 15 λεπτά, 3x 5ml 5 λεπτά).
- Πριν την ενζυμική εμφάνιση με αλκαλική φωσφατάση προηγούνται πλύσεις της μεμβράνης με *ρυθμιστικό διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης* υπό ανάδευση
- (1x 10ml 15 λεπτά, 3x 5ml 5 λεπτά).

Για την εμφάνιση του αντισώματος, 17,6μl NBT (nitro blue tetrazolium)/ 13,3μl BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) σε 4ml *ρυθμιστικό διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης*

3.2.9 Ανίχνευση πρωτεϊνικών επιπέδων με Κυτταρομετρία ροής

1. Συλλογή των κυττάρων
2. Φυγοκέντρηση 5min 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
3. Προσθήκη 1ml PBS 1X, Φυγοκέντρηση 5min 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
4. Επανάληψη πλύσης με PBS 1X
5. Προσθήκη 400μl Fixable Viability Stain 660 (FVS660, BD Horizon 564405) σε αραιώση 1:4000 με mili-Q H₂O ή Zombie Red™ Fixable Viability Kit (Biolegend 423109) σε αραιώση 1:5000 με PBS 1X.
6. Επώαση 15min, θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι
7. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά, 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
8. Προσθήκη 400μl 1% FBS/PBS 1X
9. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά, 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
10. Προσθήκη 150μl *Fixation/Permeabilization Solution* 1X (BD Biosciences Lot 8218709)
11. Επώαση 20min, 4°C στο σκοτάδι
12. Φυγοκέντρηση 5min, 2000rcf και απόρριψη υπερκείμενου
13. Προσθήκη 200μl BD *Perm/Wash* 1X, φυγοκέντρηση 5min, 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
14. Επανάληψη πλύσης με 200μl BD *Perm/Wash* 1X και αφήνω ~50μl μετά την απόρριψη του υπερκείμενου
15. Προσθήκη 1^ογενούς αντισώματος (εκτός από το *αρνητικό* δείγμα ελέγχου), ισχυρή ανάδευση με *vortex* και επώαση για 1 ώρα, 4°C, στο σκοτάδι
16. Προσθήκη 200μl BD *Perm/Wash* 1X, φυγοκέντρηση 5min, 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
17. Επανάληψη πλύσης με 200μl BD *Perm/Wash* 1X (BD Biosciences Lot 8218706) και αφήνω ~50μl μετά την απόρριψη του υπερκείμενου
18. Προσθήκη 0,5μl *δευτερογενές αντίσωμα, παραγόμενο από κουνέλι anti-Rabbit IgG*, συζευγμένο με FITC αντισώματος, ισχυρή ανάδευση με *vortex* και επώαση για 30min, 4°C, στο σκοτάδι
19. Προσθήκη 200μl BD *Perm/Wash* 1X, φυγοκέντρηση 5min, 1100rcf και απόρριψη υπερκείμενου
20. Προσθήκη 1ml PBS 1X
21. Ισχυρή ανάδευση με *vortex* και μέτρηση δείγματος

3.2.10 Προσδιορισμός ελεύθερων ριζών με τη χημική ουσία DCFDA με Κυτταρομετρία ροής

1. Συλλογή των κυττάρων
2. Φυγοκέντρηση 5min 1100rcf και απόρριψη υπερκειμένου
3. Προσθήκη 1ml PBS 1X, Φυγοκέντρηση 5min 1100rcf και απόρριψη υπερκειμένου
4. Επανάληψη πλύσης με PBS 1X

Τα K-562 κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως δείγμα ελέγχου (χωρίς την χορήγηση φαρμάκου) μοιράζονται σε 4 erpendorf tubes, από τα οποία

- a. το ένα (1) θα χρησιμοποιηθεί ως θετικό δείγμα ελέγχου (προσθήκη H₂O₂ και DCFDA),
 - b. δυο (2) θα αποτελέσουν τα αρνητικά δείγματα ελέγχου για το πείραμα
 - ο K-562 κύτταρα διαλυτοποιημένα σε 1ml PBS 1X
 - ο K-562 κύτταρα διαλυτοποιημένα σε 1ml PBS 1X, αφού επωαστούν με H₂O₂
 - c. K-562 κύτταρα διαλυτοποιημένα σε 1ml PBS 1X, αφού επωαστούν με DCFDA, όπως και οι υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες.
5. Επώαση K-562 κύτταρα με H₂O₂ σε 1ml PBS 1X για 30 λεπτά, στους 37°C, στο σκοτάδι
 6. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά, 1200rcf και απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 1ml PBS 1X
 7. Επώαση δειγμάτων και θετικού δείγματος ελέγχου με DCFDA (τελική συγκέντρωση 3μM από διάλυμα αρχικής συγκέντρωσης 1mM) 30 λεπτά, στους 37°C, στο σκοτάδι.
 8. Φυγοκέντρηση 5 λεπτά, 1200rcf και απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 1ml PBS 1X

Το φθορίζον προϊόν μετά την αλληλεπίδραση του DCFDA και των ελεύθερων ριζών των κυττάρων, απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 488nm και εκπέμπει ακτινοβολία μήκους κύματος 530nm.

3.2.11 Στατιστική ανάλυση

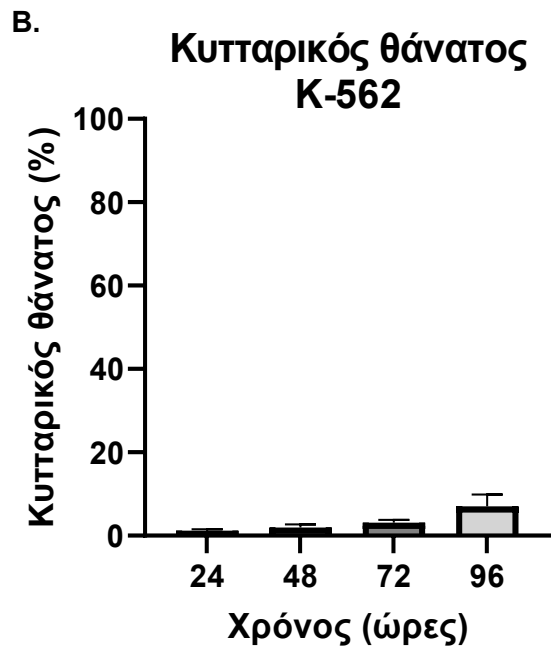
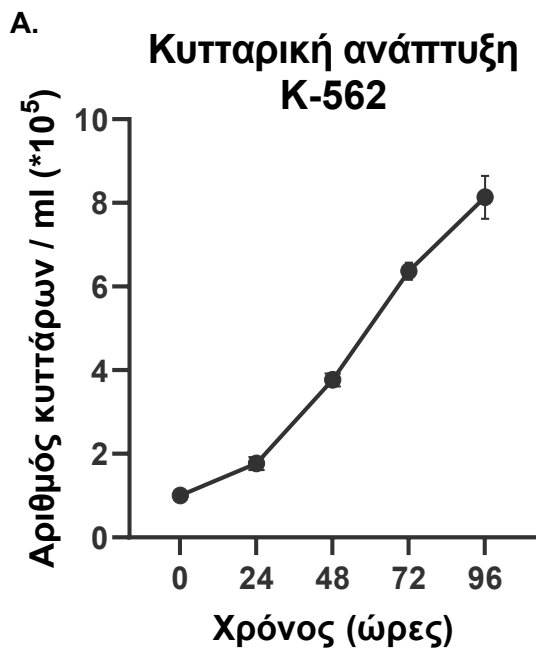
- ☐ Οι τιμές IC₅₀ των χημικών ουσιών προσδιορίστηκαν μέσω του προγράμματος *GraphPad Prism 9*.
- ☐ Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από την «*Western blot*» έγινε με το πρόγραμμα *ImageJ*, και με την βοήθεια του *MS Excel* έγινε η κανονικοποίηση των τιμών που αντιπροσωπεύουν την ποσότητα της πρωτεΐνης, και η ενσωμάτωση τους στα αντίστοιχα διαγράμματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *GraphPad Prism 9* με την στατιστική δοκιμασία *t-test (parametric)*.
- ☐ Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής έγιναν μέσω του προγράμματος *FlowJo*.

4. Αποτελέσματα

4.1 Κινητική κυττάρων

Αρχικό βήμα στις μελέτες αποτέλεσε η μελέτη της ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών K-562 και K562-r που χρησιμοποιήθηκαν. Τα K-562 ερυθρολευχαιμικά κύτταρα αφορούν μια καρκινική κυτταρική σειρά του μυελού των οστών, ιδανική για μελέτες που αφορούν τη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία. Από την άλλη, τα K562-r κύτταρα προέρχονται μεν από τα K-562, αλλά είναι ανθεκτικά στη δράση της ιματινίβης, τον κύριο αναστολέα της Bcr-Abl κινάσης τυροσίνης. Και οι δυο κυτταρικές σειρές χαρακτηρίζονται από την παρουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια και από ενισχυμένη δραστικότητα της Bcr-Abl κινάσης τυροσίνης.

Για τη μελέτη της ανάπτυξης και του θανάτου των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με την πλάκα *Neubauer*, καθώς και ο προσδιορισμός του ποσοστού του κυτταρικού θανάτου με χρώση των κυττάρων με *Trypan Blue*. Οι παραπάνω μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 0, 24, 48, 72 και 96 ώρες σε καλλιέργεια κυττάρων 3ml, με αρχική συγκέντρωση κυττάρων $1 \cdot 10^5$ κύτταρα/ml για τα K-562, ενώ για τα K562-r η αρχική συγκέντρωση ήταν $2 \cdot 10^5$ κύτταρα/ml. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα αντιστοιχούν σε μετρήσεις τριών (3) βιολογικών επαναλήψεων. Από τα διαγράμματα φαίνεται πως για την κυτταρική ανάπτυξη και των δυο κυτταρικών σειρών ισχύει η εκθετική αύξηση του αριθμού των κυττάρων έως και τις 72 ώρες, ενώ έπειτα παρατηρείται σταδιακή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και προσέγγιση στο σημείο της στατικής φάσης ανάπτυξης. Αντίστοιχα, το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου των κυττάρων αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Για τον υπολογισμό του χρόνου διπλασιασμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις της κυτταρικής ανάπτυξης και το πρόγραμμα «doubling time cell calculator» (https://www.doubling-time.com/compute_more.php), του οποίου τα αποτελέσματα φαίνονται στα μωβ πλαίσια κάτω από τα διαγράμματα της κυτταρικής ανάπτυξης και θανάτου για την κάθε κυτταρική σειρά. Με βάση αυτά αποδεικνύεται πως οι κυτταρικές σειρές K-562 και K562-r έχουν χρόνο διπλασιασμού γύρω στις 24 ώρες, ενώ ο κυτταρικός θάνατος αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου.



Γ.

Doubling Time = $26.83 = \ln(2) / 0.0258$

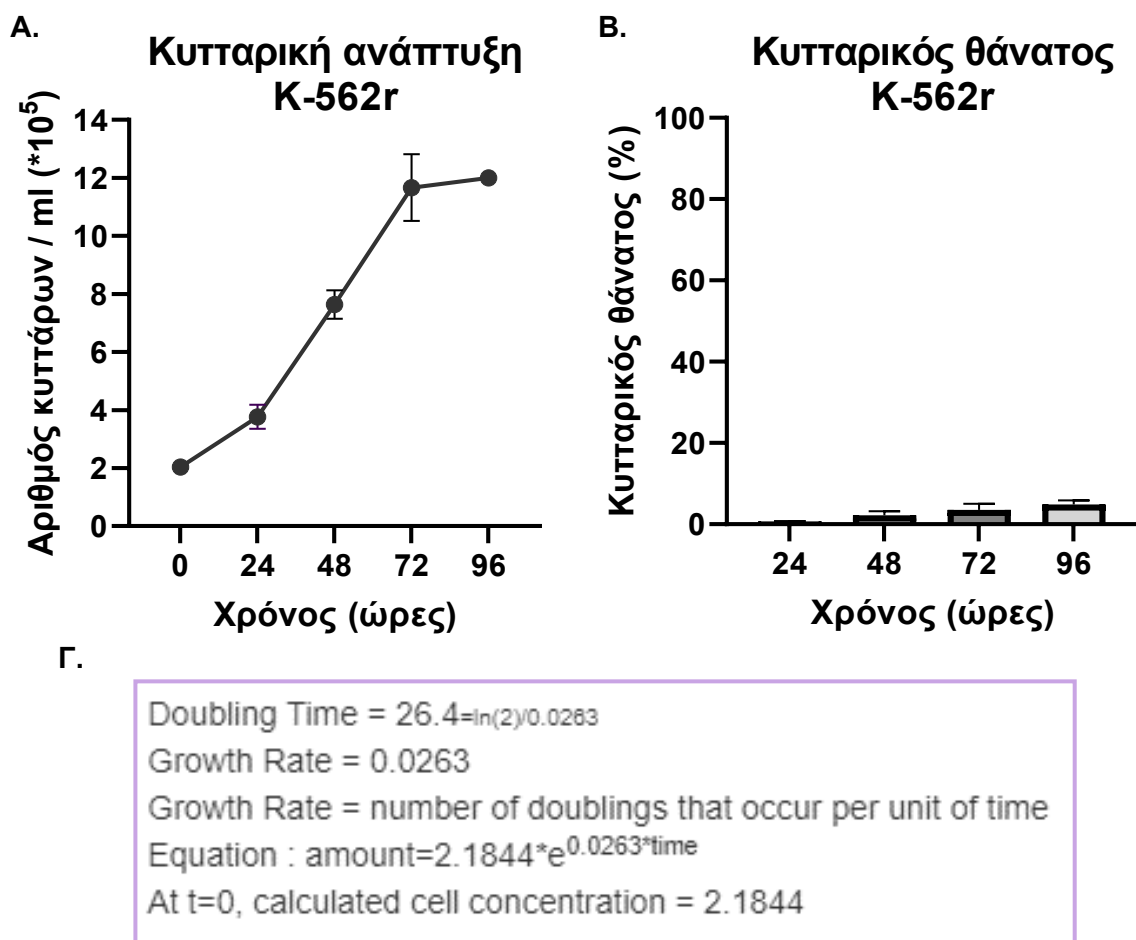
Growth Rate = 0.0258

Growth Rate = number of doublings that occur per unit of time

Equation : $\text{amount} = 1.0121 * e^{0.0258 * \text{time}}$

At t=0, calculated cell concentration = 1.0121

Εικόνα 24: (A): Διάγραμμα για τον ρυθμό της ανάπτυξης των K-562 κυττάρων σε συνάρτηση με τον χρόνο. (B): Διάγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου των K-562 κυττάρων σε διαφορετικούς χρόνους. (Γ) Πληροφορίες για το διπλασιασμό των K-562 κυττάρων από το πρόγραμμα «doubling time cell calculator».

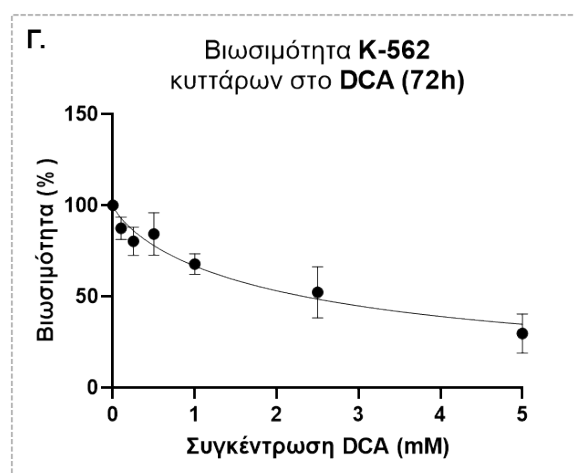
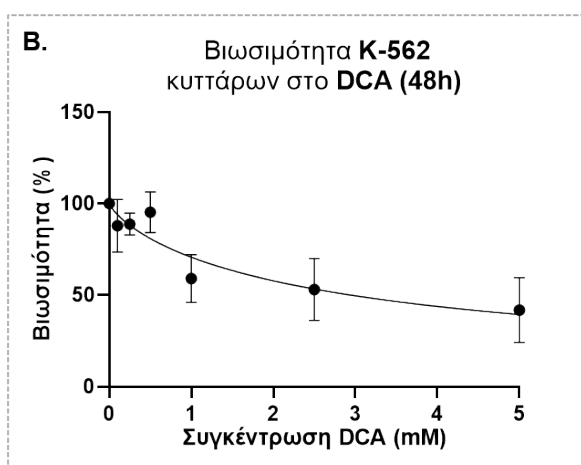
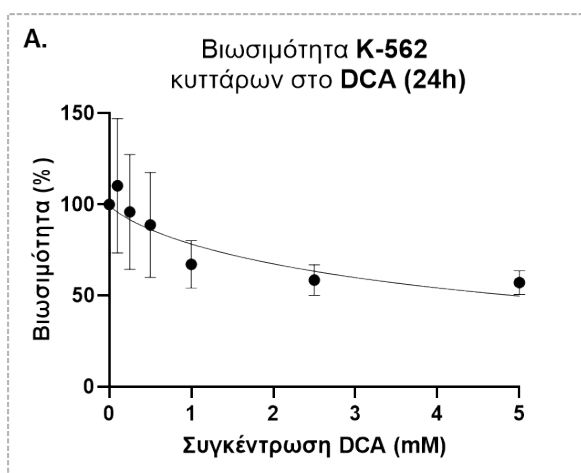


Εικόνα 25: (A): Διάγραμμα για τον ρυθμό της ανάπτυξης των K562-r κυττάρων σε συνάρτηση με τον χρόνο. (B): Διάγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου των K562-r κυττάρων σε διαφορετικούς χρόνους. (Γ) Πληροφορίες για τον διπλασιασμό των K562-r κυττάρων από το πρόγραμμα «doubling time cell calculator».

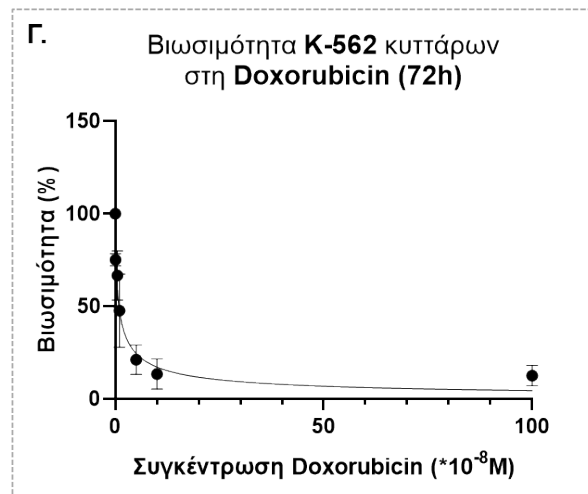
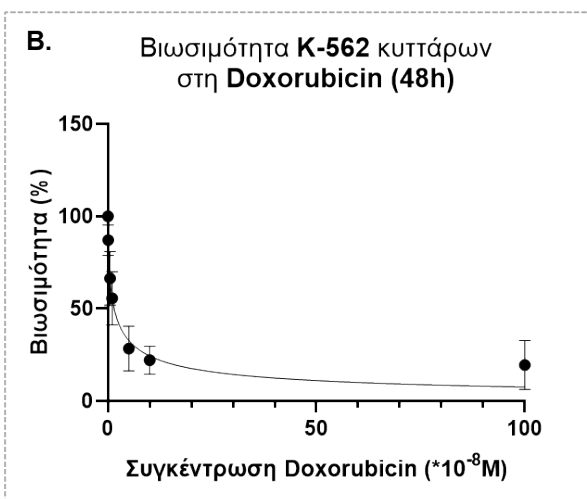
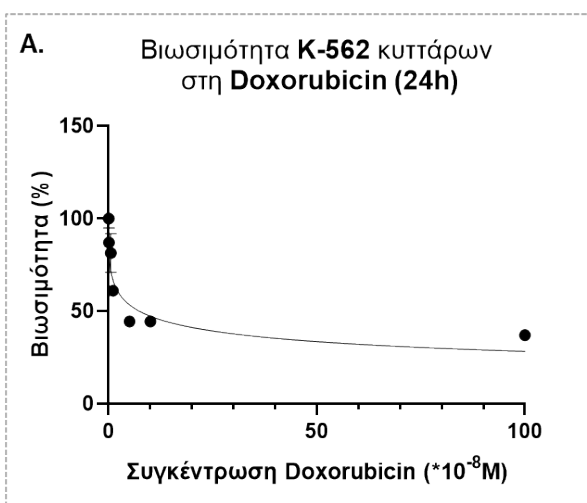
4.2 Προσδιορισμός IC₅₀ των DCA, Doxorubicin

Σημαντικό στάδιο για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι ο προσδιορισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης των εξεταζόμενων ουσιών στις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές. Αυτό έγινε μέσω του προσδιορισμού της τιμής IC₅₀ για την Δοξορουβικίνη και το Διχλωροακετοξικό οξύ. Η IC₅₀ (Inhibitory Concentration) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση της ουσίας ή του φαρμάκου, στην οποία παρατηρείται μείωση του πληθυσμού των κυττάρων κατά 50%. Αυτή η τιμή είναι συγκεκριμένη για κάθε διαφορετική ουσία αλλά και για κάθε κυτταρική σειρά, η οποία επωάζεται με την αντίστοιχη ουσία. Η πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό της IC₅₀ πραγματοποιήθηκε σε τρεις (3) επαναλήψεις και περιελάμβανε τη μέτρηση της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού θανάτου σε απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των φαρμάκων σε 0, 24, 48, και 72 ώρες. Οι μετρήσεις έγιναν σε καλλιέργεια όγκου 2ml και με αρχική συγκέντρωση 1*10⁵ κύτταρα/ml για τα K-562 κύτταρα, ενώ για τα K562-r η αρχική συγκέντρωση ήταν 2*10⁵ κύτταρα/ml. Στη

συνέχεια, οι τιμές της κυτταρικής ανάπτυξης εκφράστηκαν ως η ποσοστιαία βιωσιμότητα των κυττάρων, που σημαίνει ότι η συγκέντρωση των κυττάρων εκφράστηκε ως το ποσοστό της συγκέντρωσης των κυττάρων στη συνθήκη ελέγχου που δεν είχε επωαστεί με κάποια ουσία. Ο προσδιορισμός της τιμής IC_{50} έγινε με το *GraphPad Prism* και τα διαγράμματα που απεικονίζουν τις λογαριθμικές καμπύλες της βιωσιμότητας των κυττάρων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φαρμάκων φαίνονται παρακάτω (Εικόνες 26-29).



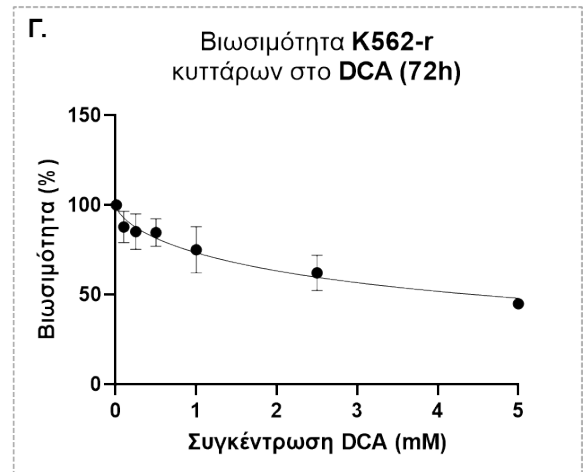
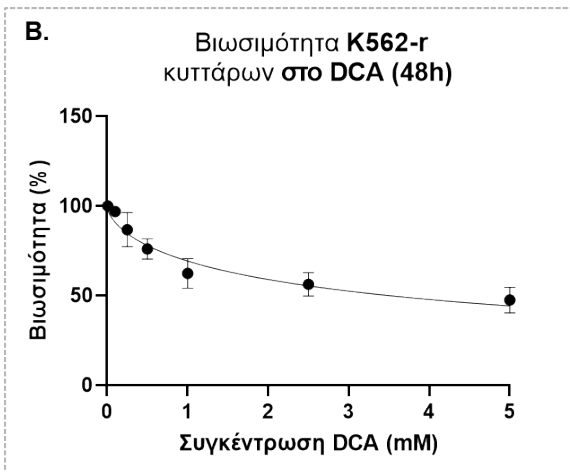
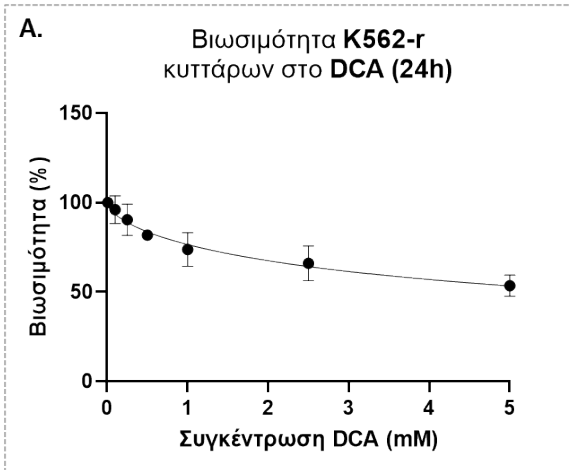
Εικόνα 26: Διαγράμματα που απεικονίζουν την ποσοστιαία μείωση του πληθυσμού των K-562 κυττάρων σε σύγκριση με την επώαση ή μη διαφορετικών συγκεντρώσεων του DCA σε 24 ώρες (A), 48 ώρες (B) και 72 ώρες (Γ) επώασης



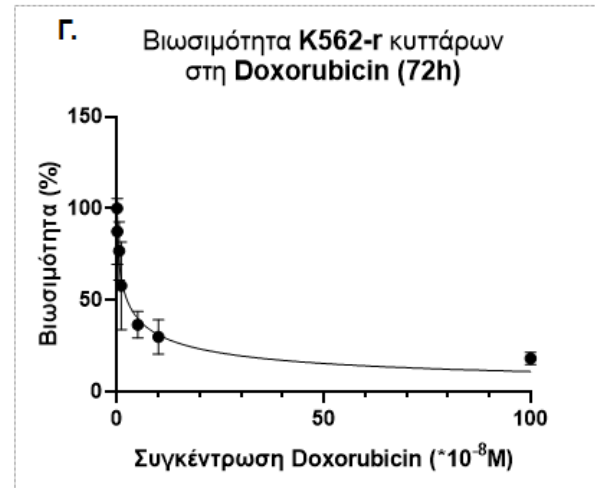
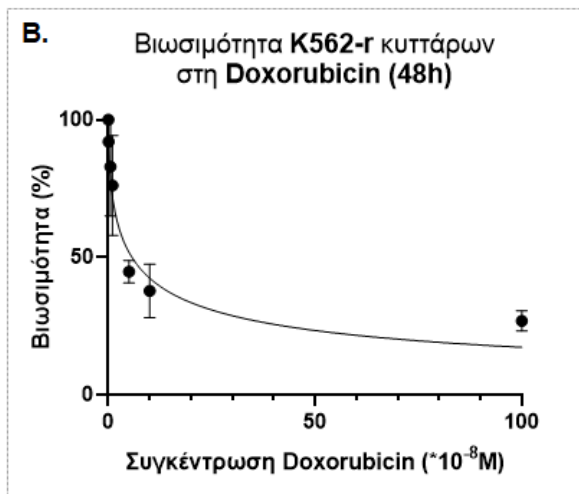
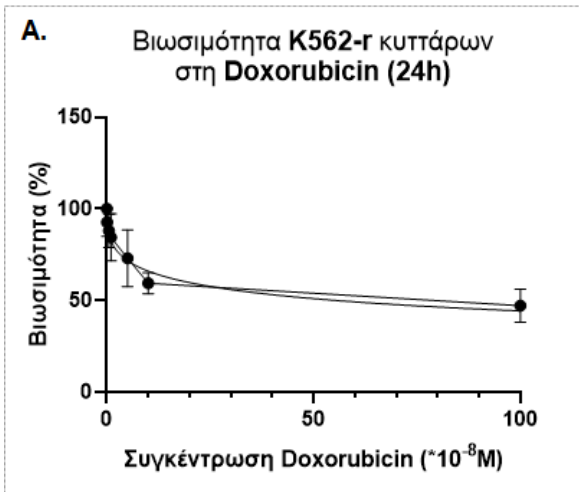
Εικόνα 27: Διαγράμματα που απεικονίζουν την ποσοστιαία μείωση του πληθυσμού των K-562 κυττάρων σε σύγκριση με την επώαση ή μη διαφορετικών συγκεντρώσεων της Doxorubicin σε 24 ώρες (A), 48 ώρες (B) και 72 ώρες (Γ) επώασης.

Πίνακας 2: Τιμές IC₅₀ των φαρμακευτικών ουσιών DCA και Doxorubicin για την κυτταρική σειρά K-562.

	K-562	
	DCA (mM)	Doxorubicin (*10 ⁻⁸ M)
24h	4,952	7,402
48h	2,951	1,507
72h	2,336	0,891



Εικόνα 28: Διαγράμματα που απεικονίζουν την ποσοστιαία μείωση του πληθυσμού των K562-r κυττάρων σε σύγκριση με την επώαση ή μη διαφορετικών συγκεντρώσεων του DCA σε 24 ώρες (A), 48 ώρες (B) και 72 ώρες (Γ) επώασης



Εικόνα 29: Διαγράμματα που απεικονίζουν την ποσοστιαία μείωση του πληθυσμού των K562-r κυττάρων σε σύγκριση με την επώαση ή μη διαφορετικών συγκεντρώσεων της Doxorubicin σε 24 ώρες (A), 48 ώρες (B) και 72 ώρες (Γ) επώασης.

Πίνακας 3: Τιμές IC₅₀ των φαρμακευτικών ουσιών DCA και Doxorubicin για την κυτταρική σειρά K562-r.

	K562-r	
	DCA (mM)	Doxorubicin (*10 ⁻⁸ M)
24h	6,162	55,58
48h	3,514	5,745
72h	4,470	2,435

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας για τις τιμές IC₅₀ για τις ουσίες DCA, Doxorubicin στις κυτταρικές σειρές K-562 και K562-r.

	K-562		K562-r	
	DCA (mM)	Doxorubicin (*10 ⁻⁸ M)	DCA (mM)	Doxorubicin (*10 ⁻⁸ M)
24h	4,952	7,402	6,162	5,558
48h	2,951	1,507	3,514	5,745
72h	2,336	0,891	4,470	2,435

Από αυτά υποδεικνύεται πως με την αύξηση του χρόνου επώασης των κυττάρων με τις ουσίες, τόσο μειώνεται και η τιμή της IC_{50} , δηλαδή για να μειωθεί ο αριθμός των κυττάρων κατά 50% απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση της ουσίας.

Συγκριτικά με τις κυτταρικές σειρές, τα K562-r κύτταρα απαιτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση της ίδιας ουσίας για να επιτευχθεί παρόμοια μείωση του πληθυσμού σε σχέση με τα K-562, που σημαίνει πως η κυτταρική σειρά K-562-r είναι και πιο ανθεκτική στις εξεταζόμενες ουσίες. Αναφορικά με τη δοξορουβικίνη, στις 24 ώρες επώασης, η τιμή της IC_{50} αυξήθηκε κατά ~ 10 φορές.

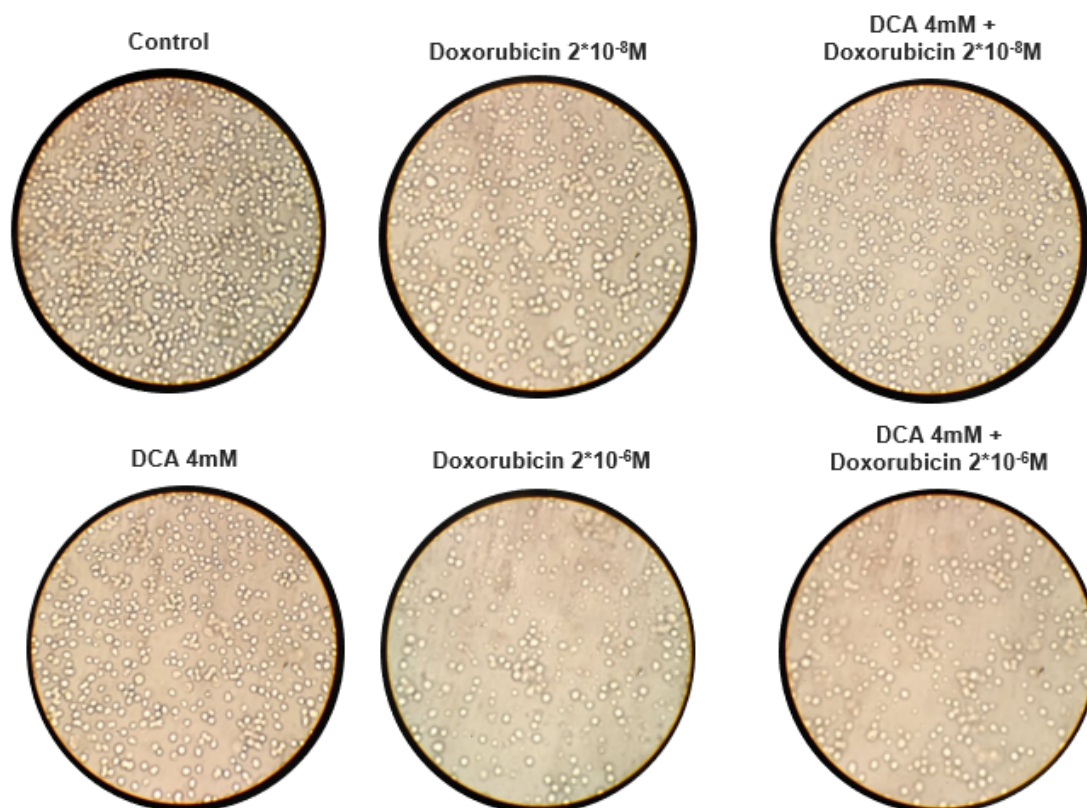
4.3 Επώαση K-562 κυττάρων με τις φαρμακευτικές ουσίες

Για τα πειράματα που θα διεξαχθούν στην συνέχεια, επιλέχθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις για την επώαση των κυττάρων: για το **DCA 4mM**, και για την **Doxorubicin $2 \cdot 10^{-8}M$** και **$2 \cdot 10^{-6}M$** . Η επιλογή της συγκέντρωσης του DCA έγινε σε συνδυασμό με προηγούμενες διπλωματικές εργασίες του εργαστηρίου Φαρμακολογίας, και για τη Doxorubicin χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-8}M$ που είναι κοντά στην IC_{50} που υπολογίστηκε και στην παρούσα διπλωματική αλλά και σε προηγούμενη ερευνητική εργασία της κα. Παπαδοπούλου [80], αλλά και η μεγαλύτερη συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-6}M$, για να επιβεβαιωθεί ότι οι αλλαγές που θα παρατηρηθούν θα οφείλονται στην δράση του φαρμάκου και όχι σε άλλους παράγοντες και ότι οι όποιες αλλαγές είναι δόσοεξαρτούμενες. Ακόμα, ο χρόνος επώασης των κυττάρων με τις ουσίες ορίστηκε στις 72 ώρες, ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται ακόμα στην εκθετική φάση ανάπτυξης και να μην έχουν μπει στην στατική φάση αλλά και να έχει δοθεί χρόνος για να παρατηρηθούν κάποιες αλλαγές.

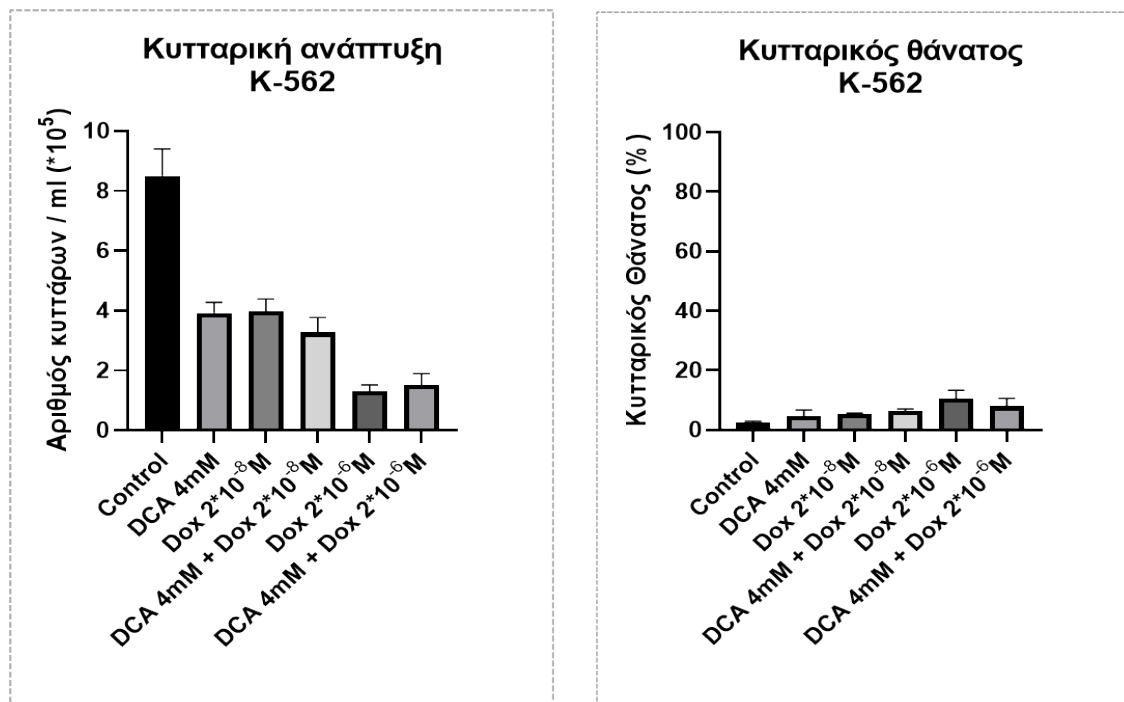
Για τα πειράματα απαιτούνται καλλιέργειες κυττάρων, τα οποία θα επωαστούν απουσία και παρουσία των DCA και Doxorubicin, τόσο ξεχωριστά όσο και σε συνδυασμό στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Ακόμα, οι καλλιέργειες K-562 που θα χρησιμοποιηθούν για απομόνωση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών είναι όγκου 10ml, ενώ οι καλλιέργειες για απομόνωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών έχουν όγκο 15ml.

Στην **Εικόνα 30** φαίνονται εικόνες των κυττάρων K-562 στις 72 ώρες επώασης με τις εξεταζόμενες ουσίες, και παρατηρείται τόσο η διαφορά στον αριθμό όσο και στο μέγεθος των κυττάρων. Σε αυτό το σημείο των 72 ωρών, ακολούθησε μέτρηση των συνολικών αλλά και νεκρών κυττάρων με την πλάκα *Neubauer*, και με βάση τα αποτελέσματα της **Εικόνας 31** αποδεικνύεται ότι τόσο η χορήγηση DCA 4mM όσο και η χορήγηση Doxorubicin $2 \cdot 10^{-8}M$ προκαλεί μείωση του αριθμού των κυττάρων K-562 σχεδόν στο μισό, χωρίς όμως να παρατηρείται κάποια συνέργεια και εξ αυτής στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη μείωση μετά από την ταυτόχρονη χορήγηση των δύο ουσιών. Η επώαση των κυττάρων με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση Doxorubicin ($2 \cdot 10^{-6}M$) οδηγεί σε ακόμα υψηλότερη μείωση του κυτταρικού πληθυσμού, ενώ η παράλληλη χορήγηση DCA 4mM δεν φαίνεται να ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 30: Εικόνες των K-562 κυτάρων στις 72 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη και DCA. (Ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο, μεγέθυνση X40).

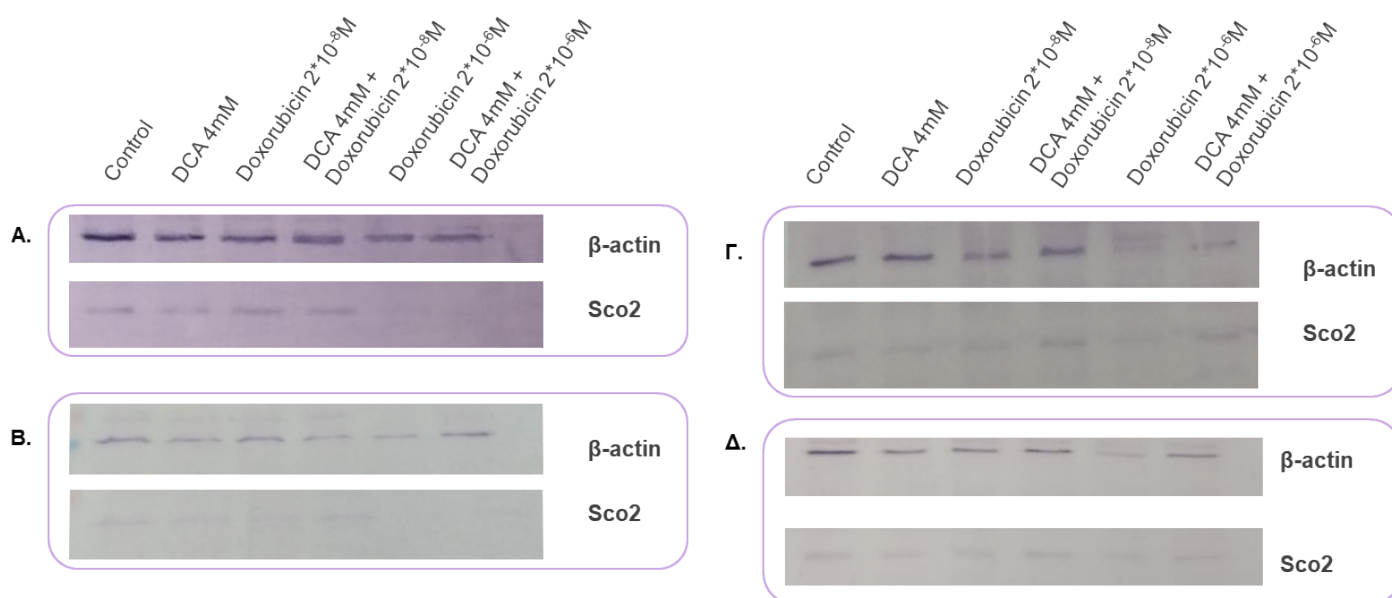


Εικόνα 31: Διαγράμματα που υποδεικνύουν τον αριθμό των K-562 κυττάρων (αριστερή εικόνα), καθώς και το αντίστοιχο ποσοστό θανάτου (δεξιά εικόνα) στις 72 ώρες επώασης με τις ουσίες DCA και Doxorubicin (Dox).

4.4 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών με τις μεθόδους «Western Blot» και Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)

➤ Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων Sco2 με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανίχνευση των επιπέδων της Sco2 έγινε με απομόνωση του μιτοχονδριακού εκχυλίσματος πρωτεϊνών των κυττάρων K-562 σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Οι εικόνες των μεμβρανών PVDF, όπου φαίνονται η β-actin (ως ιδιοστατική πρωτεΐνη) και η Sco2 μετά από τέσσερις (4) βιολογικές επαναλήψεις, συνοψίζονται στην **Εικόνα 32**. Η β-actin εμφανίζεται στο ύψος της μεμβράνης που αντιστοιχεί στα 45kDa, ενώ η ώριμη Sco2 πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 26kDa.



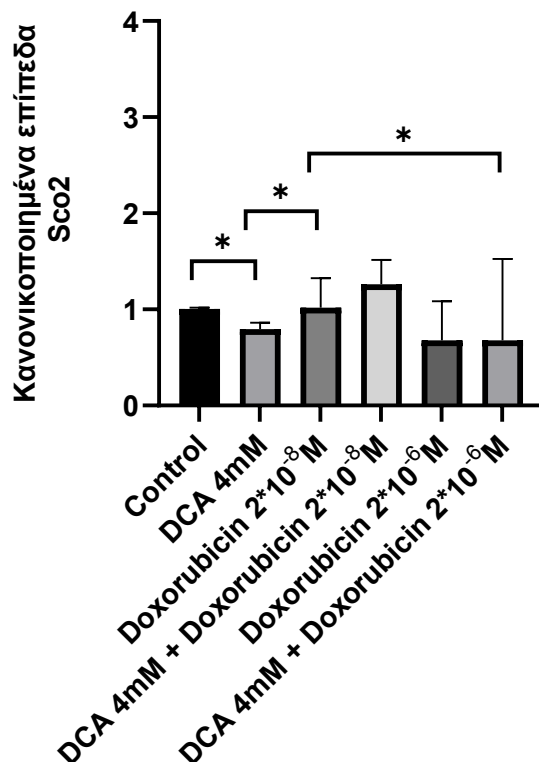
Εικόνα 32: Μεμβράνες PVDF από WESTERN Blot για τις πρωτεΐνες β-actin και Sco2. Κάθε ζεύγος εικόνων αναφέρεται σε διαφορετική βιολογική επανάληψη.

Η διακύμανση των επιπέδων της Sco2 στις πειραματικές συνθήκες φαίνεται στην **Εικόνα 33**, και οι στατιστικώς σημαντικές αλλαγές παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**. Πιο αναλυτικά, από την **Εικόνα 33** φαίνεται πως, η χορήγηση του DCA 4mM προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων Sco2. Γενικά, υπάρχουν κάποιες διακυμάνσεις, αλλά είναι δύσκολο να εξαχθεί κάποιο ουσιαστικό συμπέρασμα.

Από τις βιολογικές επαναλήψεις A και B (**Εικόνα 32**) θα μπορούσε κάποιος να συμπεράνει ότι στη μεγάλη συγκέντρωση δοξορουβικίνης παρατηρείται πτώση των

επιπέδων της Sco2 πρωτεΐνης, κάτι όμως που δεν επαναλήφθηκε στις βιολογικές επαναλήψεις Γ και Δ.

Επίπεδα Sco2 σε K-562 κύτταρα (Western Blot)



Εικόνα 33: Κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης της Sco2 (ως προς β-actin) από τέσσερις(4) βιολογικές επαναλήψεις. Φαίνονται οι γραμμές σφάλματος, καθώς και η στατιστική σημαντικότητα (p value <0,05) μεταξύ των δειγμάτων.

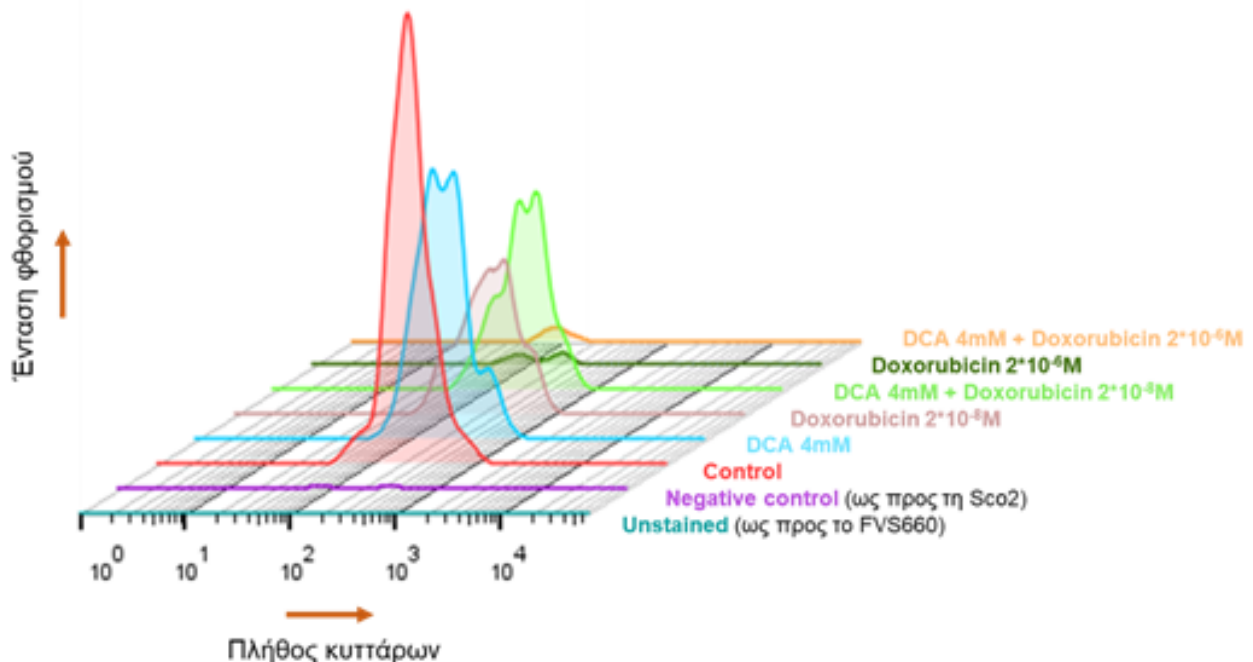
Πίνακας 5: Στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων που απεικονίζονται στην εικόνα 35.

Δείγματα που συγκρίνονται	Βαθμός διαφοράς των πρωτεϊνικών επιπέδων	Στατιστική σημαντικότητα ($P < 0.05$)
Control vs DCA 4mM	(-) 0,21	*
DCA 4mM vs Dox 2*10 ⁻⁸ M	(+) 0,27	*
Dox 2*10 ⁻⁸ M vs DCA 4mM + Dox 2*10 ⁻⁶ M	(-) 0,33	*

➤ Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων Sco2 με κυτταρομετρία ροής

Καλλιέργειες μικρού όγκου (4ml) K-562 κυττάρων επώαστηκαν με τις ίδιες συγκεντρώσεις DCA, Doxorubicin και μετά από 72 ώρες έγινε συλλογή των κυττάρων και εκτέλεση του πρωτοκόλλου, όπως περιγράφεται στην υπό ενότητα 3.2.9 της ενότητας Υλικά και Μέθοδοι. Το πρωτογενές αντίσωμα που στοχεύει ειδικά την Sco2 δεν διαφέρει από το αντίστοιχο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοαποτύπωση κατά *western*. Αντιθέτως, το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την κυτταρομετρία ροής είναι συζευγμένο με Φλουορεσκεΐνη (FITC), μια οργανική ένωση η οποία εκπέμπει ακτινοβολία συγκεκριμένου εύρους μηκών κύματος (μέγιστη εκπομπή 525nm), όταν αυτή διεγερθεί με μονοχρωματική δέσμη φωτός μήκους κύματος 649nm. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την FITC στη συνέχεια κατευθύνεται και αναλύεται από τον ανιχνευτή FL1 του κυτταρόμετρου ροής.

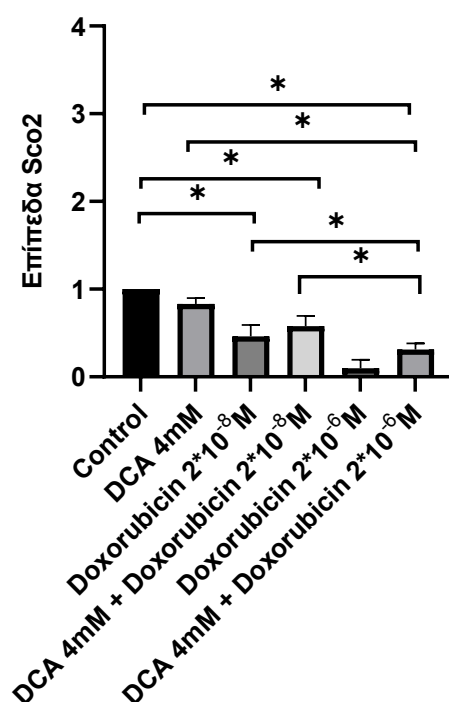
Ωστόσο, της επώασης των κυττάρων με τα αντίστοιχα αντισώματα για την ανίχνευση της Sco2, προηγείται η επώαση με μια άλλη φθορίζουσα χρωστική ουσία, το FVS660. Το FVS660 χρησιμοποιείται για τη διάκριση των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα, δεισιδύοντας διαμέσου της διαπερατής κυτταρικής μεμβράνης των νεκρών κυττάρων και προσδενόμενη στις υψηλές συγκεντρώσεις αμινών που τα κύτταρα περιέχουν. Η χρωστική απορροφά μονοχρωματική δέσμη φωτός μήκους κύματος 488nm και εκπέμπει μέγιστη ακτινοβολία μήκους κύματος 660nm που ανιχνεύεται από τον FL4 ανιχνευτή του κυτταρόμετρου ροής. Η χρώση των νεκρών κυττάρων του δείγματος συμβάλλει στην ανάλυση των αποτελεσμάτων, οπότε, αφού «αφαιρεθούν» τα νεκρά κύτταρα, τα επίπεδα Sco2 που παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (**Εικόνα 34**) αφορούν το σήμα φθορισμού της FITC που εκπέμπουν τα ζωντανά κύτταρα.



Εικόνα 34: Διάγραμμα που απεικονίζεται η ένταση του φθορισμού στον κατακόρυφο άξονα, και το αυξανόμενο πλήθος των κυττάρων K-562 στον οριζόντιο άξονα μετά από ανάλυση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής για τον προσδιορισμό των επιπέδων της Sco2.

Καμπύλες με διαφορετικό χρώμα περιγράφουν την συμπεριφορά διαφορετικής πειραματικής συνθήκης.

Επίπεδα **Sco2** σε **K-562** κύτταρα
(Κυτταρομετρία ροής)



Εικόνα 35: Επίπεδα έκφρασης *Sco2* σε ζωντανά κύτταρα *K-562* από τρεις (3) βιολογικές επαναλήψεις σε κυτταρομετρία ροής. Φαίνονται οι γραμμές σφάλματος, καθώς και η στατιστική σημαντικότητα (p value $<0,05$) μεταξύ των δειγμάτων.

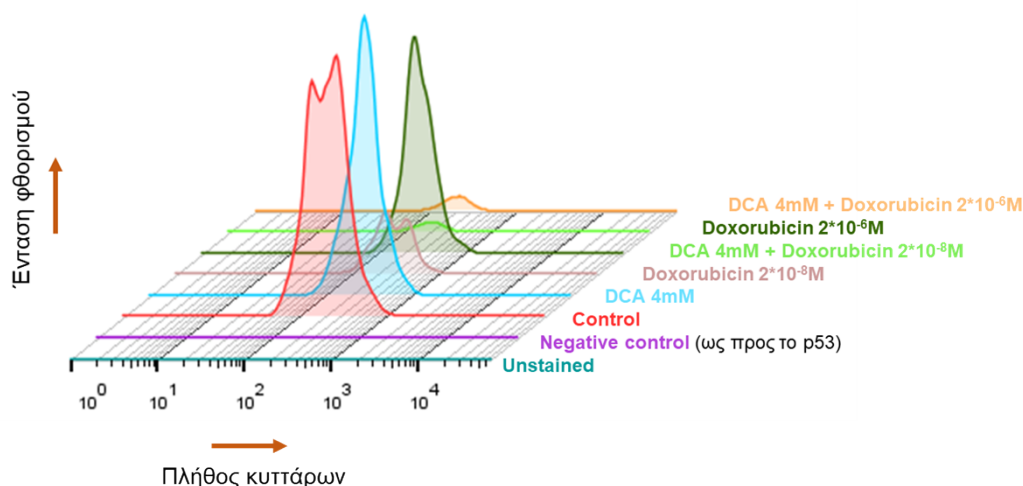
Πίνακας 6: Στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων που απεικονίζονται στην **Εικόνα 35**.

Δείγματα που συγκρίνονται	Βαθμός διαφοράς των πρωτεϊνικών επιπέδων	Στατιστική σημαντικότητα ($P < 0.05$)
Control vs Dox 2*10 ⁻⁸ M	(-) 0,54	*
Control vs DCA 4mM + Dox 2*10 ⁻⁸ M	(-) 0,43	*
Control vs DCA 4mM + Dox 2*10 ⁻⁶ M	(-) 0,69	*
DCA 4mM + Dox 2*10 ⁻⁶ M vs DCA 4mM	(+) 2,66	*
DCA 4mM + Dox 2*10 ⁻⁶ M vs Dox 2*10 ⁻⁸ M	(+) 1,48	*
DCA 4mM + Dox 2*10 ⁻⁶ M vs DCA 4mM + Dox 2*10 ⁻⁸ M	(+) 1,85	*

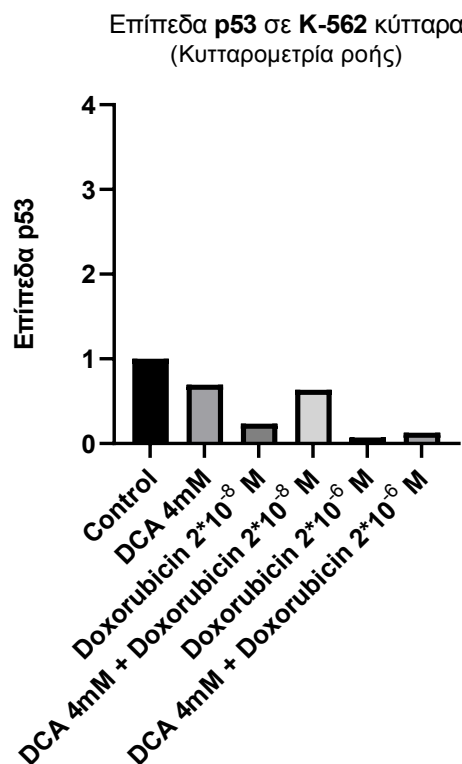
Σε αντίθεση με την ανοσοαποτύπωση κατά *Western*, τα αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής, χαρακτηρίζουν ως στατιστικά σημαντικές τις αλλαγές στα επίπεδα της *Scd2* μεταξύ των περισσότερων περιπτώσεων χορήγησης των φαρμάκων. Από τις αλλαγές που φαίνονται στο διάγραμμα της **Εικόνας 35**, φαίνεται πως τα επίπεδα της *Scd2* μειώνονται όταν χορηγείται Δοξορουβικίνη στην συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-8} \text{M}$, ενώ η ταυτόχρονη χορήγηση DCA οδηγεί σε μικρότερη μείωση των επιπέδων, αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική. Παράλληλα, η συνδυαστική χορήγηση των φαρμάκων επιφέρει πιο έντονη μείωση στη *Scd2*, όταν χρησιμοποιείται η υψηλή συγκέντρωση της Δοξορουβικίνης. Η μείωση αυτή είναι πολύ πιθανόν να οδηγεί σε μειωμένη ενεργότητα του τετάρτου συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας, της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, και άρα και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

➤ Προσδιορισμός p53 με κυτταρομετρία ροής

Καλλιέργειες μικρού όγκου (4ml) K-562 κυτάρων επώαστηκαν με τις ίδιες συγκεντρώσεις DCA, Doxorubicin και μετά από 72 ώρες έγινε συλλογή των κυττάρων και εκτέλεση του πρωτοκόλλου, όπως περιγράφεται στην υπό ενότητα 3.2.9 της ενότητας Υλικά και Μέθοδοι. Το πρωτογενές αντίσωμα που στοχεύει ειδικά την p53 δεν διαφέρει από το αντίστοιχο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοαποτύπωση κατά *western*. Αντιθέτως, το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την κυτταρομετρία ροής είναι συζευγμένο με Φλουορεσκεΐνη (FITC). Η χρωστική ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την διάκριση των νεκρών από τα ζωντανά κύτταρα σε αυτό το πείραμα λέγεται *Zombie*, και εφαρμόζεται σε αραιώση 1:5000. Η χρωστική είναι διαπερατή στις μεμβράνες των νεκρών κυττάρων, απορροφά μονοχρωματική δέσμη φωτός μήκους κύματος 488nm και εκπέμπει μέγιστη ακτινοβολία μήκους κύματος 624nm που ανιχνεύεται από τον FL4 ανιχνευτή του κυτταρόμετρου ροής.



Εικόνα 36: Διάγραμμα που απεικονίζεται η ένταση του φθορισμού στον κατακόρυφο άξονα, και το αυξανόμενο πλήθος των κυττάρων K-562 στον οριζόντιο άξονα μετά από ανάλυση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής για τον προσδιορισμό των επιπέδων της p53. Καμπύλες με διαφορετικό χρώμα περιγράφουν την συμπεριφορά διαφορετικής πειραματικής συνθήκης.



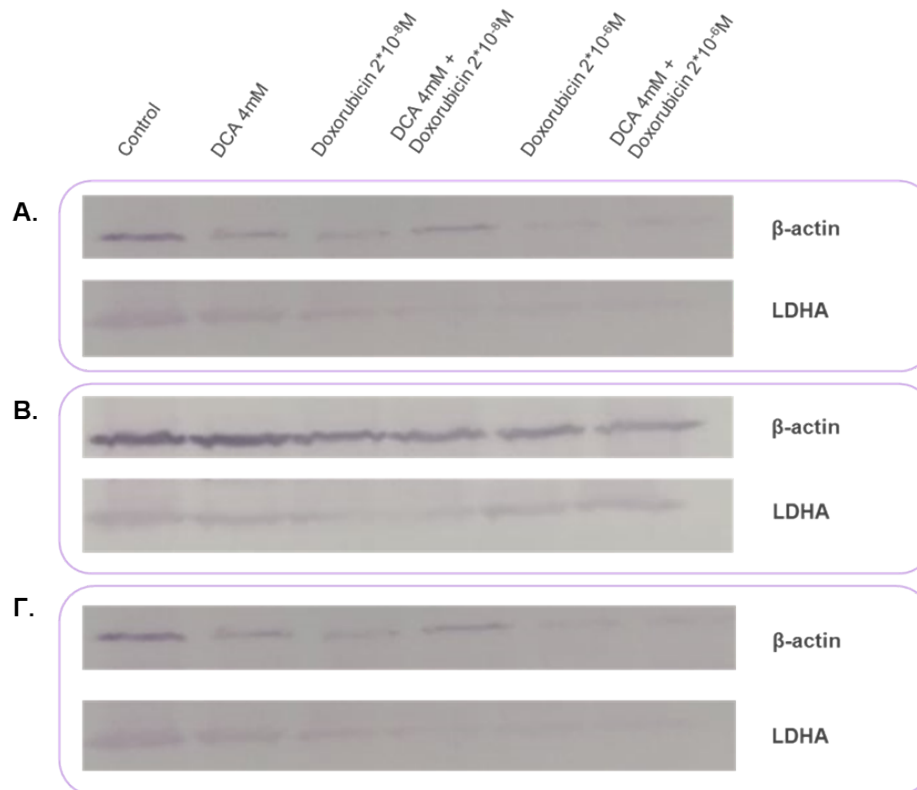
Εικόνα 37: Επίπεδα έκφρασης p53 σε ζωντανά κύτταρα K-562, από μία βιολογική επανάληψη σε κυτταρομετρία ροής.

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης p53, όπως φαίνονται στις παραπάνω εικόνες (**Εικόνες 36,37**), παρουσιάζουν μια παρόμοια συμπεριφορά με τα επίπεδα της πρωτεΐνης Sco2 (**Εικόνες 34,35**). Αν και ακολούθησε 2^η βιολογική επανάληψη, η επώαση των K562 κυττάρων με τη δοξορουβικίνη οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Sco2, ενώ φαίνεται να είναι και δόσοεξαρτώμενη η μείωση. Η επώαση των κυττάρων με DCA, απουσία είτε παρουσία της δοξορουβικίνης, δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης Sco2.

Όπως αναφέρεται και σε αντίστοιχη βιβλιογραφία [112, 113], ο μεταγραφικός παράγοντας p53 προσδένεται στα στοιχεία του υποκινητή του SCO2 γονιδίου και ελέγχει θετικά την μεταγραφή του. Ως συνέπεια, η παραγόμενη Sco2 πρωτεΐνη συμμετέχει στη συγκρότηση του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, διασφαλίζοντας την ομαλή διεκπεραίωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η συσχέτιση των p53 και Sco2 διαπιστώνεται και από την παρόμοια αλλαγή των επιπέδων τους, παρουσία των ουσιών DCA και Doxorubicin, η οποία παρατηρήθηκε και από τα παραπάνω πειράματα.

➤ Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων LDHA με ανοσοαποτύπωση κατά *Western*

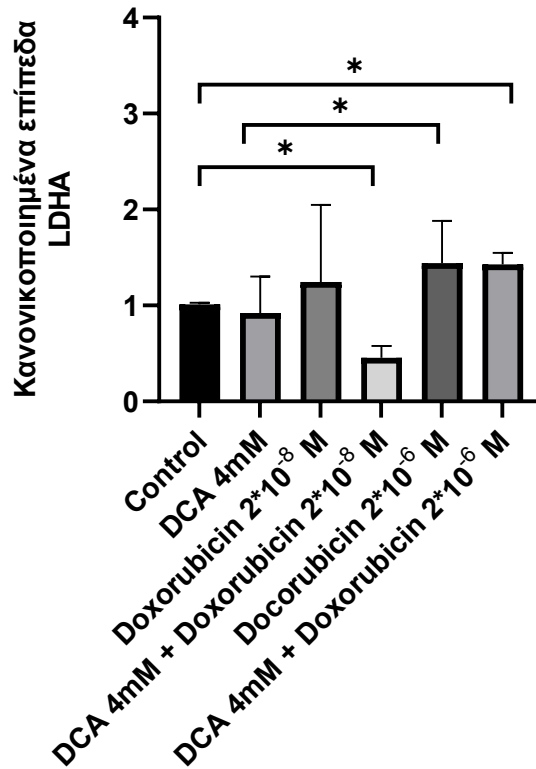
Η ανίχνευση των επιπέδων της LDHA έγινε με απομόνωση του ολικού κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών των κυττάρων K-562 σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Οι εικόνες των μεμβρανών PVDF όπου φαίνονται η β -actin και η LDHA σε τρεις (3) βιολογικές επαναλήψεις, συνοψίζονται στην **Εικόνα 38**. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών παρά τη μικρή διαφορά στο μοριακό βάρος (45kDa για την β -actin, ενώ 36kDa για την LDHA), έγινε αποτελεσματικά με πηκτική 15% περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδα.



Εικόνα 38: Μεμβράνες PVDF από *western blot* για τις πρωτεΐνες β -actin και LDHA. Κάθε ζεύγος εικόνων αναφέρεται σε διαφορετική βιολογική επανάληψη.

Η διακύμανση των επιπέδων της LDHA στις πειραματικές συνθήκες φαίνεται στην **Εικόνα 39**, και οι στατιστικώς σημαντικές αλλαγές παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**. Πιο αναλυτικά, η ταυτόχρονη χορήγηση DCA 4mM και Doxorubicin $2 \cdot 10^{-8}$ M προκαλεί μείωση των επιπέδων LDHA σε σχέση με το control, ενώ όταν στην παραπάνω συνθήκη χρησιμοποιείται πιο υψηλή συγκέντρωση Doxorubicin ($2 \cdot 10^{-6}$ M), τότε τα επίπεδα της LDHA παρουσιάζουν μια αύξηση σε σύγκριση με το control δείγμα.

Επίπεδα LDHA σε K-562 κύτταρα
(Western Blot)



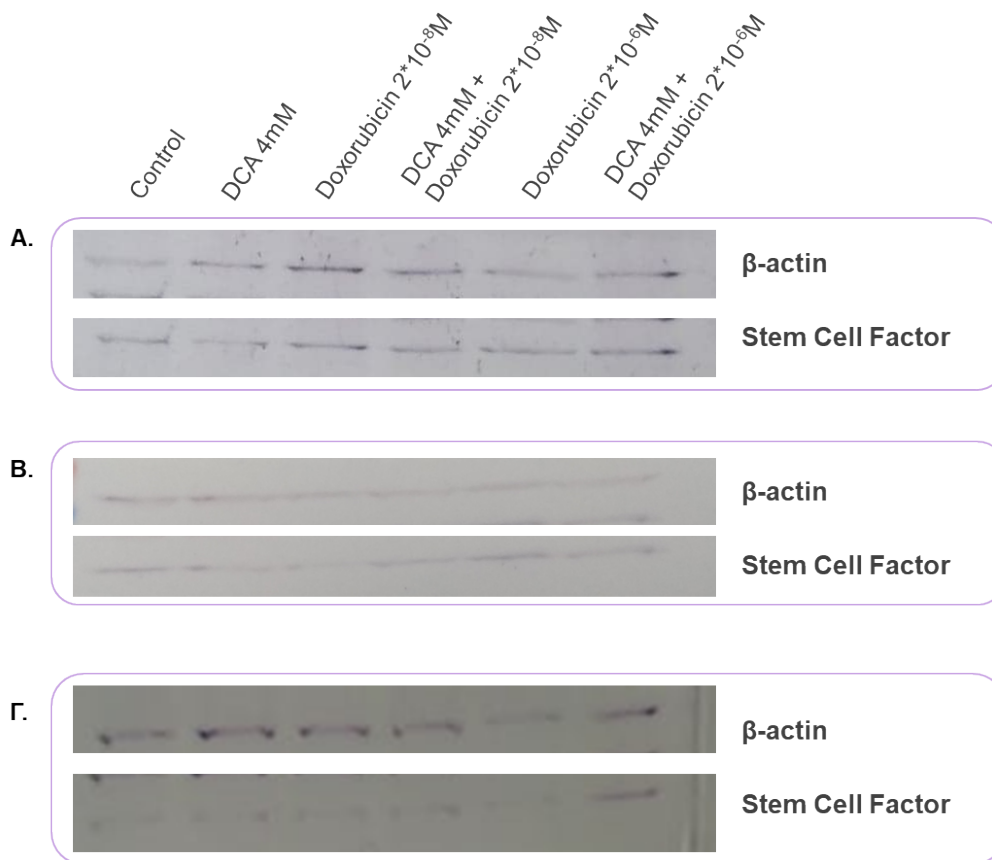
Εικόνα 39: Κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης της LDHA (ως προς β-actin) από τρεις (3) βιολογικές επαναλήψεις. Φαίνονται οι γραμμές σφάλματος, καθώς και η στατιστική σημαντικότητα (p value <0,05) μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 7: Στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων που απεικονίζονται στην εικόνα 36

Δείγματα που συγκρίνονται	Βαθμός διαφοράς των πρωτεϊνικών επιπέδων	Στατιστική σημαντικότητα (P < 0.05)
Control vs DCA 4mM + Dox 2*10 ⁻⁸ M	(-) 0,55	*
Control vs DCA 4mM + Dox 2*10 ⁻⁶ M	(+) 0,42	*
DCA 4mM vs Dox 2*10 ⁻⁶ M	(+) 0,52	*

➤ Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων SCF με ανοσοαποτύπωση κατά *Western*

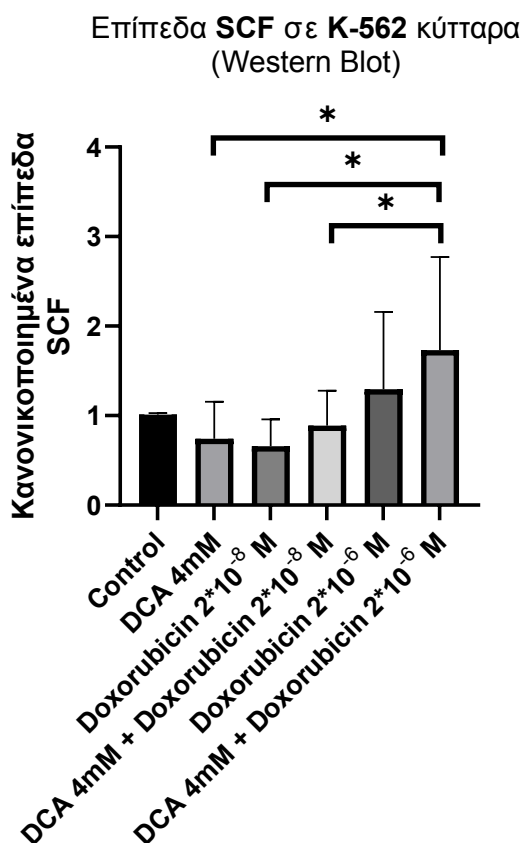
Ανοσοαποτύπωση κατά *western* έγινε σε κυτταροπλασματικό εκχύλισμα πρωτεϊνών από τις πειραματικές συνθήκες K-562 κυττάρων που περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα. Τα επίπεδα της ιδιοσυστατικής κυτταρικής πρωτεΐνης β -actin χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των επιπέδων των εξεταζόμενων πρωτεϊνών. Στην **Εικόνα 40** συνοψίζονται οι εικόνες από PVDF μεμβράνες από τρεις (3) βιολογικές επαναλήψεις για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων του SCF. Ο SCF αποτελεί μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, επομένως για την ανοσοαποτύπωση κατά *Western* χρησιμοποιήθηκε κυτταροπλασματικό εκχύλισμα πρωτεϊνών των κυττάρων μετά την επώαση με τις φαρμακευτικές ουσίες.



Εικόνα 40: Μεμβράνες PVDF από WESTERN Blot για τις πρωτεΐνες β -actin και SCF. Κάθε ζεύγος εικόνων αναφέρεται σε διαφορετική βιολογική επανάληψη.

Μετά από επεξεργασία και κανονικοποίηση αυτών των αποτελεσμάτων, συνοψίζεται στην **Εικόνα 41** η ποσοτική μεταβολή των επιπέδων του SCF σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (control), ενώ στον **Πίνακα 8** παρουσιάζονται οι στατιστικώς σημαντικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, τα K-562 που επωάστηκαν με DCA 4mM + Dox 2×10^{-6} M υπερεκφράζουν στατιστικώς σημαντικά τον παράγοντα SCF σε σχέση με τα K-562 που επωάστηκαν μόνο με DCA 4mM. Ακόμα, η επώαση των K-562 κυττάρων με υψηλή συγκέντρωση Dox (2×10^{-6} M) και DCA 4mM ενισχύει τα επίπεδα SCF σε σύγκριση με την μικρή συγκέντρωση Dox (2×10^{-8} M). Τέλος, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η υψηλή συγκέντρωση Dox (2×10^{-6} M) οδηγεί

στην αύξηση των επιπέδων SCF στα K-562 σε σχέση με την μικρή συγκέντρωση Dox (2×10^{-8} M), όταν γίνεται ταυτόχρονη χορήγηση DCA 4mM και στις δυο (2) περιπτώσεις.



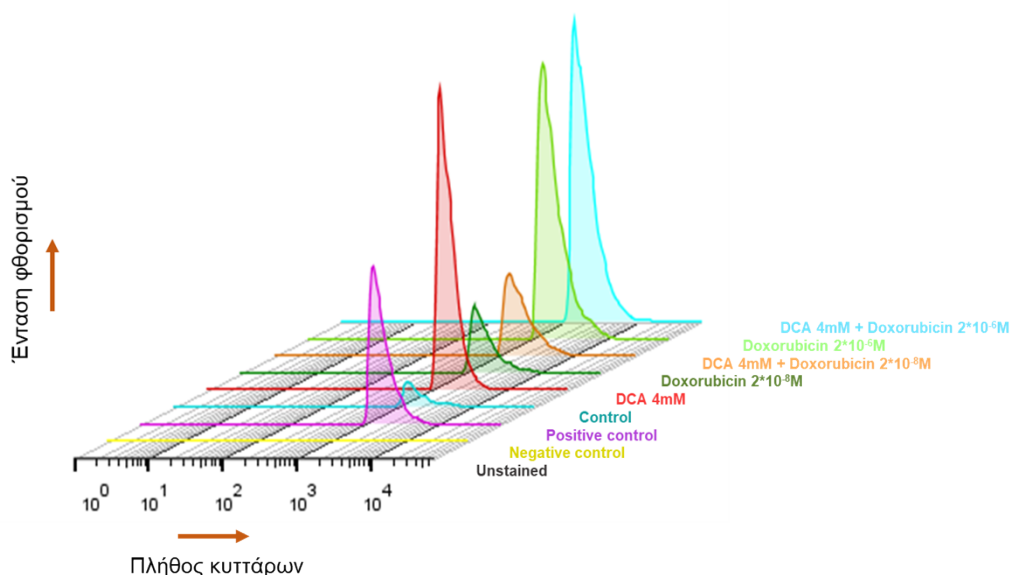
Εικόνα 41: Κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του SCF (ως προς β -actin) από τρεις (3) βιολογικές επαναλήψεις. Φαίνονται οι γραμμές σφάλματος, καθώς και η στατιστική σημαντικότητα (p value $< 0,05$) μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 8: Στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων που απεικονίζονται στην εικόνα 33.

Δείγματα που συγκρίνονται	Βαθμός διαφοράς των πρωτεϊνικών επιπέδων	Στατιστική σημαντικότητα ($P < 0.05$)
DCA 4mM vs DCA 4mM + Dox 2×10^{-6} M	(+) 2,33	*
Doxorubicin 2×10^{-8} M vs DCA 4mM + Dox 2×10^{-6} M	(+) 2,62	*
DCA 4mM + Dox 2×10^{-8} M vs DCA 4mM + Dox 2×10^{-6} M	(+) 1,94	*

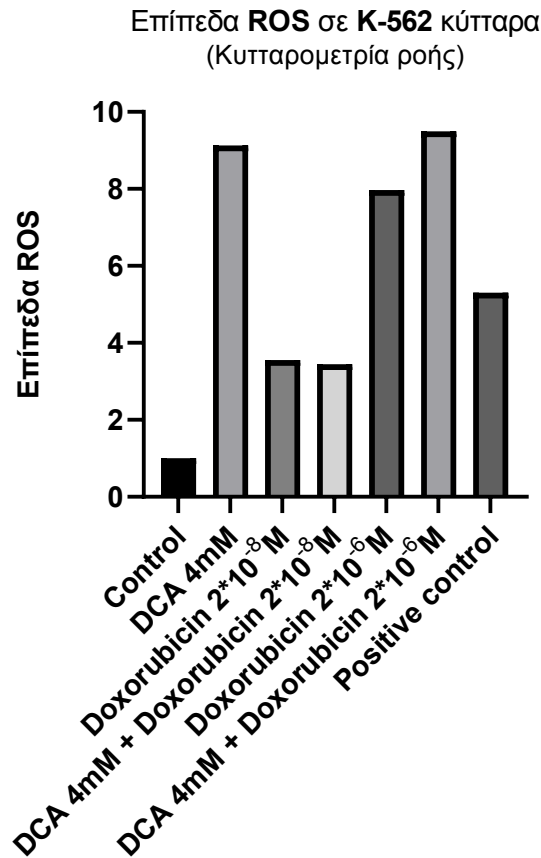
4.5 Ανίχνευση ελευθέρων ριζών (ROS)

Καλλιέργειες μικρού όγκου (3ml) K-562 κυττάρων επωάστηκαν με τις ίδιες συγκεντρώσεις DCA, Doxorubicin και μετά από 72 ώρες έγινε συλλογή των κυττάρων και εκτέλεση του πρωτοκόλλου, που περιγράφεται στην υπό ενότητα 3.2.10 της ενότητας Υλικά και Μέθοδοι. Οι ελεύθερες ρίζες των κυττάρων ανιχνεύονται έπειτα από επώαση των κυττάρων με μια χρωστική, την 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma, D6883) η οποία διαπερνά τη μεμβράνη των κυττάρων. Στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, η απακετυλίωσή της από κυτταρικές εστεράσες οδηγεί σε σχηματισμό ενός ενδιάμεσου προϊόντος, το οποίο δεν φθορίζει. Έπειτα, οι ελεύθερες ρίζες ROS οξειδώνουν το ενδιάμεσο προϊόν και τελικά σχηματίζεται η φθορίζουσα ουσία 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Το DCF απορροφά μονοχρωματική ακτινοβολία μήκους κύματος 488nm και με βάση το φάσμα εκπομπής της εκπέμπει μέγιστη ακτινοβολία μήκους κύματος 530nm που ανιχνεύεται από τον FL1 ανιχνευτή του κυτταρόμετρου ροής. Επομένως, το πλήθος των ROS στο εσωτερικό του κυττάρου είναι ανάλογο του φθορισμού που παρατηρείται από την μετατροπή του DCF-DA σε DCF.



Εικόνα 42: Διάγραμμα που απεικονίζεται η ένταση του φθορισμού στον κατακόρυφο άξονα, και το αυξανόμενο πλήθος των κυττάρων K-562 στον οριζόντιο άξονα, μετά από ανάλυση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής για τον προσδιορισμό των επιπέδων των ελεύθερων ριζών ROS.

Καμπύλες με διαφορετικό χρώμα περιγράφουν την συμπεριφορά διαφορετικής πειραματικής συνθήκης.



Εικόνα 32: Επίπεδα ελεύθερων ριζών ROS σε κύτταρα K-562 από μία βιολογική επανάληψη σε κυτταρομετρία ροής.

Με βάση τα αποτελέσματα, όπως παρουσιάζονται στις **Εικόνες 42 και 43**, αν και δεν ακολούθησε βιολογική επανάληψη, τόσο η επώαση των K-562 κυττάρων με DCA όσο και με Doxorubicin οδηγεί σε άνοδο των επιπέδων των ελευθέρων ριζών. Η αύξηση του ποσοστού των ελευθέρων ριζών από την επίδραση της δοξορουβικίνης φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη.

5. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας είναι μια από τις προκλήσεις που καλείται να αντιμετωπίσει η σύγχρονη ιατρική. Παρά την εφαρμογή θεραπευτικών προσεγγίσεων, η ανθεκτικότητα που παρατηρείται σε περιπτώσεις ασθενών δημιουργεί εμπόδια στην ολοκληρωτική αντιμετώπιση της νόσου. Για αυτό το λόγο, άμεση προτεραιότητα είναι η εύρεση νέων συνδυασμών αντικαρκινικών φαρμάκων που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για τη καταπολέμηση της.

Στα πειράματα που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια αυτής της διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε η φαρμακευτική ουσία DCA (η οποία δρα ως έμμεσος αναστολέας της γλυκόλυσης, και έχει ευρείες εργαστηριακές εφαρμογές), καθώς και η Doxorubicin (βασικό συστατικό πρωτοκόλλων χημειοθεραπείας του καρκίνου - δρα ως αντινεοπλασματικός γενετοξικός παράγοντας με ευρεία χρήση σε θεραπευτικές προσεγγίσεις).

Σε πρώτο βήμα, έγιναν πειράματα για τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} των ουσιών, ώστε να οριστούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις χορήγησης στην κυτταρική σειρά K-562. Την επώαση των κυττάρων με τις χημικές ουσίες ξεχωριστά, αλλά και σε συνδυασμό, ακολούθησε απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, με σκοπό την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες.

Για να ελεγχθεί η απόκριση των κυττάρων στη χορήγηση αυτών των 2 φαρμάκων μελετήθηκαν αρχικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Sco2, πρωτεΐνη συγκρότησης της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και άρα με κύριο ρόλο στην ολοκλήρωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι αναλύσεις που έγιναν έδειξαν ότι παρουσία μιας ή και των δυο φαρμακευτικών ουσιών ήταν αρκετή για πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Sco2. Μάλιστα, το φαινόμενο αυτό είναι δόσοεξαρτώμενο και γίνεται ακόμα πιο έντονο παρουσία των πολύ υψηλών συγκεντρώσεων Doxorubicin ($2 \cdot 10^{-6}$). Η ταυτόχρονη χορήγηση DCA δεν επιφέρει κάποια περαιτέρω πτώση στα επίπεδα της Sco2. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι χρήση αυτών των φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει σε Sco2-εξαρτώμενη πτώση των επιπέδων λειτουργίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα καρκινικά κύτταρα. Απαραίτητη είναι και η μελέτη μορίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν αλλαγές στην γενικότερη αντιμετώπιση του καρκίνου.

Ωστόσο, πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω αυτή η αρχική παρατήρηση, καθώς οι δυο διαφορετικές μέθοδοι (ανοσοαποτύπωση κατά *western* και κυτταρομετρία ροής) που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της Sco2, δεν συμφωνούν απόλυτα με τα παραπάνω αποτελέσματα. Είναι αναγκαίο να ληφθούν υπόψιν η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της κάθε μεθόδου για να βγει ένα κοινό συμπέρασμα. Η υψηλή τυπική απόκλιση που παρατηρείται στα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης, αλλά και τα αρκετά στάδια επεξεργασίας του δείγματος έως την λήψη του αποτελέσματος αποτελούν χαρακτηριστικά τα οποία θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν. Από την άλλη, η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν με την κυτταρομετρία ροής, αλλά και η ελάχιστη παρέμβαση στα δείγματα μέσω του πρωτοκόλλου, ορίζουν τα αποτελέσματα ως πιο «εμπιστεύσιμα», αν και δεν έχουν γίνει οι απαραίτητες βιολογικές επαναλήψεις.

Η μελέτη των επιπέδων της p53 μέσω της κυτταρομετρίας ροής, έδειξε μια τάση για πτώση της πρωτεΐνης σε όλες τις συνθήκες επώασης με τα εξεταζόμενα φάρμακα.

Συγκεκριμένα, η συμπεριφορά της p53 ταυτιζόταν με την αντίστοιχη της Sco2, η οποία ελέγχεται μεταγραφικά από την p53, όπως έχει αποδειχθεί από ερευνητικές μελέτες. Η δοξορουβίνη προκαλεί υψηλότερη πτώση των επιπέδων p53 και Sco2 που υποδηλώνουν μειωμένη λειτουργικότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Ακόμα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της LDHA, η οποία έχει άμεσο ρόλο στην ενίσχυση του φαινομένου Warburg, αφού συμμετέχει στην μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ. Η πιο αποτελεσματική συνθήκη ήταν η ταυτόχρονη χορήγηση DCA και Doxorubicin ($2 \times 10^{-8} \text{M}$), η οποία οδήγησε σε πτώση των επιπέδων της LDHA. Πτώση των επιπέδων της LDHA θα μπορούσε να οδηγήσει σε σημαντική αναστολή του φαινομένου Warburg, το οποίο όμως πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Παράλληλη πτώση και της γλυκόλυσης και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μπορεί να οδηγήσει σε αδυναμία κάλυψης των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων και πιθανόν στο θάνατό τους.

Για να ελεγχθεί περαιτέρω η απόκριση των κυττάρων στη χορήγηση αυτών των 2 φαρμάκων, έγινε έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων του SCF, ο οποίος έχει βρεθεί ότι δρα ενισχύοντας την ικανότητα επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων αυτού του τύπου ως απάντηση σε στρεσογόνους παράγοντες. Παρατηρήθηκε ότι παράλληλη χορήγηση και των δυο φαρμακευτικών ουσιών επιφέρει (στατικώς σημαντική) αύξηση των επιπέδων του SCF, σε σύγκριση με την χορήγηση μονάχα μιας εκ των φαρμακευτικών ουσιών (παρατήρηση με βάση και τις 2 συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν). Αυτή η παρατήρηση συνάδει με την αρχική υπόθεση, δηλαδή ότι παρουσία των φαρμακευτικών ουσιών, τα καρκινικά κύτταρα σε μια προσπάθεια να επιβιώσουν παρουσία στρες παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα SCF.

Έχει περιγραφεί πως μία από τις σοβαρότερες ανεπιθύμητες δράσεις της Doxorubicin θεωρείται η καρδιοτοξικότητα που εκδηλώνεται σε ασθενείς που λαμβάνουν το φάρμακο για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Πειράματα ερευνητικών ομάδων έχουν δείξει πως αυτή η καρδιοτοξικότητα σχετίζεται σε ένα σημαντικό ποσοστό στα αυξημένα επίπεδα ROS στα καρδιομυοκύτταρα που προκαλείται από τη δράση της Doxorubicin [79, 114].

Η επώαση των K-562 κυττάρων, τόσο με Doxorubicin όσο και με το DCA, παρουσίασε τάση για αύξηση των επιπέδων ελεύθερων ριζών. Η επίδραση που έχει το DCA, όταν χορηγείται μόνο του, επιτυγχάνεται και σε παρουσία Doxorubicin $2 \times 10^{-8} \text{M}$ είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό. Επίσης, αν και η Doxorubicin προκαλεί τάση για ενίσχυση των επιπέδων ROS, δεν προσεγγίζει το βαθμό της επίδρασης του DCA μεμονωμένα. Ωστόσο, τα παραπάνω αναφέρονται σε μια τάση των κυττάρων παρουσία των φαρμάκων και όχι σε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα. Αυτό το γεγονός καθιστά απαραίτητη την περαιτέρω διερεύνηση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται, όχι μόνο με τον προσδιορισμό των ελεύθερων ριζών, αλλά και με την μελέτη των επιπέδων των αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών.

Σε επόμενο στάδιο, θα μπορούσε να γίνει μελέτη χορήγησης της DCA και της Doxorubicin (οι οποίες έχουν γενικευμένη δράση) σε συνδυασμό και με τη φαρμακευτική ουσία Imatinib. Η Imatinib αποτελεί τη πρώτη αποτελεσματική χημική ουσία που χορηγείται για την εξειδικευμένη θεραπεία της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας. Ο ρόλος της είναι να αναστείλει την λειτουργία της BCL-ABL κινάσης τυροσίνης, η οποία εμφανίζεται απορρυθμισμένη στο υψηλότερο ποσοστό των ασθενών με αυτόν τον τύπο καρκίνου. Μια τέτοια μελέτη θα μπορούσε να διευκρινίσει το εάν θα ήταν ωφέλιμη η συνδυαστική χορήγηση αυτών των ουσιών

και στη κλινική πράξη. Επιπρόσθετα, καθώς έχουν εμφανιστεί υπότυποι αυτού του καρκίνου ανθεκτικοί στην Imatinib, θα πρέπει να γίνει μια μελέτη της δράσης της DCA και της Doxorubicin σε κύτταρα ανθεκτικά σε χορήγηση Imatinib. Μια τέτοια μελέτη θα τόνιζε περαιτέρω την αξία της χρήσης αυτών των φαρμάκων για τη καταπολέμηση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας. Σε μετέπειτα στάδιο, θα μπορούσε να γίνει και μια αντίστοιχη μελέτη απόκρισης των καρκινικών κυττάρων σε αντικαρκινικά φάρμακα δεύτερης ή τρίτης γενιάς παρουσία και αυτών των φαρμακευτικών ενώσεων γενικής δράσης, προκειμένου να βρεθεί ο βέλτιστος συνδυασμός για την αντιμετώπισή τους.

Ακόμη μια προσέγγιση σε επίπεδο βασικής έρευνας που μπορεί να αξιοποιηθεί είναι η περαιτέρω διαλεύκανση του τρόπου δράσης αυτών των αντικαρκινικών φαρμάκων σε επίπεδο έκφρασης κάποιων πρωτεϊνών. Μια τέτοια προσέγγιση θα ήταν η διερεύνηση του προφίλ έκφρασης των διαφορετικών ισομορφών των υποψήφιων γονιδίων στόχων (άμεσων και έμμεσων). Ακόμη, σκόπιμη θα ήταν η μελέτη και άλλων βασικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού, καθώς και βασικών ρυθμιστών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού που βρίσκονται απορυθμισμένοι στην Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία. Απόρροια μιας τέτοιας συνδυαστικής έρευνας θα μπορούσε να ήταν μια νέα, καινοτόμα θεραπευτική προσέγγιση, με ενδεχομένως περιορισμένες παρενέργειες για τον ασθενή.

Προκειμένου όμως να είναι εφικτή η χρήση των προτεινόμενων συνδυασμών αντικαρκινικών φαρμάκων σε πρωτόκολλα θεραπευτικών προσεγγίσεων, θα πρέπει να γίνουν καρκινικά *xenografts* σε ποντίκια. Κάτι τέτοιο θα παρείχε τις απαραίτητες ενδείξεις για τη θεραπευτική αξία του συνδυασμού φαρμάκων σε ένα ζωντανό οργανισμό.

6. Παράρτημα

Πίνακας 5: : Αντιδραστήριο MITO Buffer

Αντιδραστήρια	C _{ΤΕΛΙΚΗ} (mM)
EDTA	0,2
Sucrose	0,25
Tris-HCl	10
Το pH ρυθμίζεται στο 7,8 Αποστειρώνεται και αποθηκεύεται στους 4°C	

Πίνακας 6: Αντιδραστήριο Bradford

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Coomassie Brilliant Blue G-250	10mg
Phosphoric acid 80%	10ml
Ethanol 99%	5ml
ddH ₂ O	-100ml

Το διάλυμα αναδεύεται για 15λεπτά και στην συνέχεια διηθείται με διπλό πτυχωτό ηθμό και αναδεύεται για 10 λεπτά ακόμα. Αποθηκεύεται στους 4°C σε σκουρόχρωμο μπουκάλι λόγω της φωτοευαίσθητης φύσης του.

Πίνακας 7: Ποσότητες για παρασκευή 15% gel acrylamide για SDS-PAGE

Separating gel (15%)	Αντιδραστήρια	Stacking gel (5%)
2,3ml	H ₂ O	2,7ml
5ml	30% Bis acrylamide	670μl
2,5ml	1,5M Tris-HCl pH 8,8	500μl
100μl	10% SDS	40μl
100μl	APS	40μl
4μl	TEMED	4μl

Πίνακας 8: Παρασκευή 30% Bis acrylamide

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Acrylamide	29,2g
Bis	0,8g
ddH ₂ O	-100ml
Αποθηκεύεται στους 4°C	

Πίνακας 9: Παρασκευή διαλυμάτων Tris-HCl

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	
	1M pH 6,8	1,5M pH 8,8
Tris	24,228g	36,342g
H ₂ O	-200ml	-200ml
Το pH ρυθμίζεται με HCl Αποστειρώνονται και αποθηκεύονται στους 4°C		

Πίνακας 10: Loading Dye 5X

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
1M Tris-HCl pH 6,8	1,25ml
SDS	0,5g
Bromophenol Blue	0,0063g
10% Glycerol	2,5ml
ddH ₂ O	-5ml
Φυλάσσεται στους 4°C	

Πίνακας 11: Παρασκευή Running και Transfer Buffer

Running Buffer 1X	Αντιδραστήρια	Transfer Buffer 1X
14,4g	Glycine	14,4g
3g	Tris	3,03g
1g	SDS Methanol	200ml
-1000ml	H₂O	-1000ml
Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου (R/T)		Αποθηκεύεται στους 4°C

Πίνακας 12: Staining solution

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Coomassie Brilliant Blue	120mg
Ammonium sulfate	10gr
Phosphoric acid	11,7ml
Methanol	20ml
ddH ₂ O	-100ml
Φυλάσσεται σε R/T σε σκοτεινό μέρος	

Πίνακας 13:

PBST 1X	
Tween 10%	2ml
PBS 1X	198ml
Αποθηκεύεται σε R/T	

Πίνακας 14

NaCl 5M	
NaCl	29,22g
ddH ₂ O	-100ml
Αποστειρώνεται και αποθηκεύεται σε R/T	

Πίνακας 15

MgCl ₂ 1M	
MgCl ₂	20,33g
ddH ₂ O	-100ml
Αποστειρώνεται και αποθηκεύεται σε R/T	

Πίνακας 16

AP Buffer	
Tris-HCl 1M pH9,5	40ml
NaCl 5M	8ml
MgCl ₂ 1M	30ml
ddH ₂ O	-400ml
Αποθηκεύεται σε R/T	

Πίνακας 17

PBS 10X	
Αντιδραστήρια	Ποσότητες
NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	14,4g
KH ₂ PO ₂	2,4g
ddH ₂ O	-1000ml
Αποθηκεύεται σε R/T	

Βιβλιογραφία

1. Thompson, T., *Ιατρική Γενετική*. 2nd ed. 2011: ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ. p. 689.
2. Moolgavkar, S.H. and E.G. Luebeck, *Multistage carcinogenesis and the incidence of human cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **38**(4): p. 302-6.
3. Siddiqui, I.A., et al., *Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1348**(1): p. 20-31.
4. Oliveira, P.A., et al., *Chemical carcinogenesis*. An Acad Bras Cienc, 2007. **79**(4): p. 593-616.
5. Rundhaug, J.E. and S.M. Fischer, *Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion*. Cancers (Basel), 2010. **2**(2): p. 436-82.
6. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 220-8.
7. Chin, L. and J.W. Gray, *Translating insights from the cancer genome into clinical practice*. Nature, 2008. **452**(7187): p. 553-63.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
9. Hanahan D, W.R., *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000 Jan 7. **100**(1): p. 57-70.
10. Feitelson, M.A., et al., *Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S25-S54.
11. Gordon, E.M., et al., *Cell cycle checkpoint control: The cyclin G1/Mdm2/p53 axis emerges as a strategic target for broad-spectrum cancer gene therapy - A review of molecular mechanisms for oncologists*. Mol Clin Oncol, 2018. **9**(2): p. 115-134.
12. Subramanian, M., M.F. Jones, and A. Lal, *Long Non-Coding RNAs Embedded in the Rb and p53 Pathways*. Cancers (Basel), 2013. **5**(4): p. 1655-75.
13. Joaquin, A. and O. Fernandez-Capetillo, *Signalling DNA Damage*, in *Protein Phosphorylation in Human Health*. 2012.
14. Giacinti, C. and A. Giordano, *RB and cell cycle progression*. Oncogene, 2006. **25**(38): p. 5220-7.
15. Rocca, A., et al., *Palbociclib (PD 0332991) : targeting the cell cycle machinery in breast cancer*. Expert Opin Pharmacother, 2014. **15**(3): p. 407-20.
16. Shawi, M. and C. Autexier, *Telomerase, senescence and ageing*. Mech Ageing Dev, 2008. **129**(1-2): p. 3-10.
17. Victorelli, S. and J.F. Passos, *Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not*. EBioMedicine, 2017. **21**: p. 14-20.
18. Shay, J.W., *Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer*. Cancer Discov, 2016. **6**(6): p. 584-93.
19. Klinakis, A., D. Karagiannis, and T. Rampias, *Targeting DNA repair in cancer: current state and novel approaches*. Cell Mol Life Sci, 2020. **77**(4): p. 677-703.
20. Van Opdenbosch, N. and M. Lamkanfi, *Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease*. Immunity, 2019. **50**(6): p. 1352-1364.
21. Canel, M., et al., *E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 2): p. 393-401.
22. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
23. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 28.
24. Singh, M., et al., *EMT: Mechanisms and therapeutic implications*. Pharmacol Ther, 2018. **182**: p. 80-94.

25. D'Andrea, L.D., et al., *Peptides targeting angiogenesis related growth factor receptors*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(21): p. 2414-29.
26. Duro-Castano, A., et al., *Modulating angiogenesis with integrin-targeted nanomedicines*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017. **119**: p. 101-119.
27. Somanath, P.R., N.L. Malinin, and T.V. Byzova, *Cooperation between integrin α v β 3 and VEGFR2 in angiogenesis*. *Angiogenesis*, 2009. **12**(2): p. 177-85.
28. Folkman, J., *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* *NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY*, 2007. **6**: p. 273-286.
29. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. *Cell Metab*, 2008. **7**(1): p. 11-20.
30. Bose, S. and A. Le, *Glucose Metabolism in Cancer*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1063**: p. 3-12.
31. Ancey, P.B., C. Contat, and E. Meylan, *Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment*. *FEBS J*, 2018. **285**(16): p. 2926-2943.
32. Cluntun, A.A., et al., *Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity*. *Trends Cancer*, 2017. **3**(3): p. 169-180.
33. Mulukutla, B.C., et al., *Regulation of Glucose Metabolism - A Perspective From Cell Bioprocessing*. *Trends Biotechnol*, 2016. **34**(8): p. 638-651.
34. Jang, M., S.S. Kim, and J. Lee, *Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets*. *Exp Mol Med*, 2013. **45**: p. e45.
35. Couture, A., et al., *HLA-Class II Artificial Antigen Presenting Cells in CD4(+) T Cell-Based Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1081.
36. Duraes, F.V., et al., *Macroautophagy in Endogenous Processing of Self- and Pathogen-Derived Antigens for MHC Class II Presentation*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 459.
37. Hayat, S.M.G., et al., *CD47: role in the immune system and application to cancer therapy*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020. **43**(1): p. 19-30.
38. Zhao, H., et al., *CD47 Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 29719.
39. Landskron, G., et al., *Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 149185.
40. Khansari, N., Y. Shakiba, and M. Mahmoudi, *Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer*. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2009. **3**(1): p. 73-80.
41. Jeremy M. BergJohn L. TymoczkoGregory J. Gatto, J.L.S., *Biochemistry*. 2017 ed. 2017: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ. p. 1296.
42. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson, *The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism*. *Cell Metab*, 2016. **23**(1): p. 27-47.
43. Luengo, A., D.Y. Gui, and M.G. Vander Heiden, *Targeting Metabolism for Cancer Therapy*. *Cell Chem Biol*, 2017. **24**(9): p. 1161-1180.
44. Garrido-Perez, N., et al., *Oxidative Phosphorylation Dysfunction Modifies the Cell Secretome*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(9).
45. Mohamed Yusoff, A.A., *Understanding Mitochondrial DNA in Brain Tumorigenesis*. 2015. p. 3-27.
46. Szabo, L., A. Eckert, and A. Grimm, *Insights into Disease-Associated Tau Impact on Mitochondria*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(17).
47. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
48. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* *Trends Biochem Sci*, 2016. **41**(3): p. 211-218.

49. Alvarez, R.H., H. Kantarjian, and J.E. Cortes, *The biology of chronic myelogenous leukemia: implications for imatinib therapy*. Semin Hematol, 2007. **44**(1 Suppl 1): p. S4-14.
50. Burke, V.P. and J.M. Startzell, *The leukemias*. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2008. **20**(4): p. 597-608.
51. Hoglund, M., F. Sandin, and B. Simonsson, *Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update*. Ann Hematol, 2015. **94** Suppl 2: p. S241-7.
52. Nowell, P.C., *Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2033-5.
53. Sholikah, T.A., *Fusion Gene Bcr-Abl : From Etiopathogenesis to the Management of Chronic Myeloid Leukemia*. Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia, 2017. **8**(1).
54. Bernt, K.M. and S.P. Hunger, *Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 54.
55. Hazlehurst, L.A., et al., *Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation*. Cancer Control, 2009. **16**(2): p. 100-7.
56. Hantschel, O., *Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer*. Genes Cancer, 2012. **3**(5-6): p. 436-46.
57. Quintas-Cardama, A. and J. Cortes, *Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1619-30.
58. Salesse, S. and C.M. Verfaillie, *BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia*. Oncogene, 2002. **21**(56): p. 8547-59.
59. Weisberg, E., et al., *Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(5): p. 345-56.
60. Kang, Z.J., et al., *The Philadelphia chromosome in leukemogenesis*. Chin J Cancer, 2016. **35**: p. 48.
61. Helgason, G.V., M. Karvela, and T.L. Holyoake, *Kill one bird with two stones: potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2035-43.
62. O'Hare, T., et al., *Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(2): p. 212-21.
63. Santos, F.P., et al., *Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia*. Cancer J, 2011. **17**(6): p. 465-76.
64. Jabbour, E. and H. Kantarjian, *Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring*. Am J Hematol, 2020. **95**(6): p. 691-709.
65. Iqbal, N. and N. Iqbal, *Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer*. Chemother Res Pract, 2014. **2014**: p. 357027.
66. Fausel, C., *Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure*. J Manag Care Pharm, 2007. **13**(8 Suppl A): p. 8-12.
67. Hochhaus, A., *Chronic myelogenous leukemia (CML): resistance to tyrosine kinase inhibitors*. Ann Oncol, 2006. **17** Suppl 10: p. x274-9.
68. Kantarjian, H.M., et al., *Important therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(4): p. 1089-97.
69. Massimino, M., et al., *ABL1-Directed Inhibitors for CML: Efficacy, Resistance and Future Perspectives*. Anticancer Res, 2020. **40**(5): p. 2457-2465.
70. Saglio, G. and E. Jabbour, *First-line therapy for chronic phase CML: selecting the optimal BCR-ABL1-targeted TKI*. Leuk Lymphoma, 2018. **59**(7): p. 1523-1538.
71. Meredith, A.M. and C.R. Dass, *Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism*. J Pharm Pharmacol, 2016. **68**(6): p. 729-41.

72. Tacar, O., P. Sriamornsak, and C.R. Dass, *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. J Pharm Pharmacol, 2013. **65**(2): p. 157-70.
73. Podyacheva, E.Y., et al., *Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician*. Frontiers in Pharmacology, 2021. **12**.
74. Songbo, M., et al., *Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Toxicol Lett, 2019. **307**: p. 41-48.
75. Kardami, N.K.E., *Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity.pdf*>. Oncotarget, 2017. **8**: p. 46663-46680.
76. Santos, D.S.d. and R.C.d.S. Goldenberg, *Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Mechanisms to Development of Efficient Therapy*, in *Cardiotoxicity*. 2018.
77. Wenningmann, N., et al., *Insights into Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: Molecular Mechanisms, Preventive Strategies, and Early Monitoring*. Mol Pharmacol, 2019. **96**(2): p. 219-232.
78. Shati, A.A., *Doxorubicin-induces NFAT/Fas/FasL cardiac apoptosis in rats through activation of calcineurin and P38 MAPK and inhibition of mTOR signalling pathways*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020. **47**(4): p. 660-676.
79. Zhao, L. and B. Zhang, *Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44735.
80. Lefkothea Papadopoulou, A.T., *Effects of Hemin on Apoptosis, Suppression of Cytochrome C Oxihase Gene Expression and Toxicity Induced by Doxorubicin Bone-Marrow (Adriamycin)* Biochemical Pharmacology, 1996. **52**: p. 713-722
81. Lefkothea C. Papadopoulou, G.T., George N. Thomopoulos and Asterios S. Tsiftoglou, *Structural and Functional Impairment of Mitochondria in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in Mice: Suppression of Cytochrome c Oxidase II Gene Expression* Biochemical Pharmacology, 1999. **57**: p. 481–489.
82. Gill, K.S., et al., *Glycolysis inhibition as a cancer treatment and its role in an anti-tumour immune response*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1866**(1): p. 87-105.
83. Ashton, T.M., et al., *Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(11): p. 2482-2490.
84. Pelicano, H., et al., *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4633-46.
85. Alves, A.P., et al., *Glycolysis Inhibition as a Strategy for Hepatocellular Carcinoma Treatment? Curr Cancer Drug Targets*, 2019. **19**(1): p. 26-40.
86. Tataranni, T. and C. Piccoli, *Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 8201079.
87. Le, A., et al., *Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(5): p. 2037-42.
88. Palorini, R., et al., *Mitochondrial complex I inhibitors and forced oxidative phosphorylation synergize in inducing cancer cell death*. Int J Cell Biol, 2013. **2013**: p. 243876.
89. Molina, J.R., et al., *An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability*. Nat Med, 2018. **24**(7): p. 1036-1046.
90. Kankotia, S. and P.W. Stacpoole, *Dichloroacetate and cancer: new home for an orphan drug? Biochim Biophys Acta*, 2014. **1846**(2): p. 617-29.
91. De Preter, G., et al., *Inhibition of the pentose phosphate pathway by dichloroacetate unravels a missing link between aerobic glycolysis and cancer cell proliferation*. Oncotarget, 2016. **7**(3): p. 2910-20.

92. El Sayed, S.M., et al., *Dichloroacetate is an antimetabolite that antagonizes acetate and deprives cancer cells from its benefits: A novel evidence-based medical hypothesis*. Med Hypotheses, 2019. **122**: p. 206-209.
93. Kan, P.C., et al., *Coupling Dichloroacetate Treatment with Curcumin Significantly Enhances Anticancer Potential*. Anticancer Res, 2018. **38**(11): p. 6253-6261.
94. Skeberdyte, A., et al., *Dichloroacetate and Salinomycin Exert a Synergistic Cytotoxic Effect in Colorectal Cancer Cell Lines*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 17744.
95. Galgamuwa, R., et al., *Dichloroacetate Prevents Cisplatin-Induced Nephrotoxicity without Compromising Cisplatin Anticancer Properties*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(11): p. 3331-3344.
96. Lennartsson, J. and L. Ronnstrand, *Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications*. Physiol Rev, 2012. **92**(4): p. 1619-49.
97. Cardoso, H.J., M.I. Figueira, and S. Socorro, *The stem cell factor (SCF)/c-KIT signalling in testis and prostate cancer*. J Cell Commun Signal, 2017. **11**(4): p. 297-307.
98. Abbaspour Babaei, M., et al., *Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells*. Drug Des Devel Ther, 2016. **10**: p. 2443-59.
99. Papadopoulou, L.C., et al., *Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene*. Nat Genet, 1999. **23**(3): p. 333-7.
100. Rebelo, A.P., et al., *SCO2 mutations cause early-onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease associated with cellular copper deficiency*. Brain, 2018. **141**(3): p. 662-672.
101. McKnight, C.L., et al., *Modelling Mitochondrial Disease in Human Pluripotent Stem Cells: What Have We Learned?* Int J Mol Sci, 2021. **22**(14).
102. Urbanska, K. and A. Orzechowski, *Unappreciated Role of LDHA and LDHB to Control Apoptosis and Autophagy in Tumor Cells*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(9).
103. Du, P., et al., *ANXA2P2/miR-9/LDHA axis regulates Warburg effect and affects glioblastoma proliferation and apoptosis*. Cell Signal, 2020. **74**: p. 109718.
104. Yu, H., et al., *Targeting lactate dehydrogenase A (LDHA) exerts antileukemic effects on T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Commun (Lond), 2020. **40**(10): p. 501-517.
105. Lacroix, M., et al., *Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer*. Mol Metab, 2020. **33**: p. 2-22.
106. Wang, P., et al., *Modeling the regulation of p53 activation by HIF-1 upon hypoxia*. FEBS Lett, 2019. **593**(18): p. 2596-2611.
107. Moldogazieva, N.T., I.M. Mokhosoev, and A.A. Terentiev, *Metabolic Heterogeneity of Cancer Cells: An Interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK*. Cancers (Basel), 2020. **12**(4).
108. Matoba, S., et al., *p53 regulates mitochondrial respiration*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1650-3.
109. Kruse, J.P. and W. Gu, *p53 aerobics: the major tumor suppressor fuels your workout*. Cell Metab, 2006. **4**(1): p. 1-3.
110. John C. Law, M.K.R., Jack C. Yalowich, Gerd H. Leder, Robert E. Ferrell, *Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line*. Leukemia Research, 1993. **17**(12): p. 1045-1050.
111. Klein, E., et al., *Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia*. Int J Cancer, 1976. **18**(4): p. 421-31.
112. Madan, E., et al., *Regulation of glucose metabolism by p53: emerging new roles for the tumor suppressor*. Oncotarget, 2011. **2**(12): p. 948-57.
113. Nakamura, H., et al., *p53 promotes cardiac dysfunction in diabetic mellitus caused by excessive mitochondrial respiration-mediated reactive oxygen species generation and lipid accumulation*. Circ Heart Fail, 2012. **5**(1): p. 106-15.

114. Kalyanaraman, B., Joseph, J., Kalivendi, S. et al., *Doxorubicin-induced apoptosis: Implications in cardiotoxicity*. 2002. **234**: p. 119-124.