



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
***“In vitro αντικαρκινική δράση σ2 αγωνιστών προσδετών στον καρκίνο  
του παγκρέατος”***

**ΓΙΟΒΑΝΟΒΙΤΣ ΝΙΚΟΛΕΤΑ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2022**



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCE**  
**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

LABORATORY OF PHARMACOLOGY  
DEPARTMENT OF MEDICINE

**MASTER PROGRAM**  
**«TOXICOLOGY»**

**MASTER THESIS**  
***“In vitro anticancer activity of  $\sigma_2$  agonist ligands in pancreatic cancer”***

**NIKOLETA GIOVANOVITS**  
MASTER STUDENT  
BIOCHEMIST-BIOTECHNOLOGIST

**LARISSA, 2022**

*ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:*

Δήμας Κωνσταντίνος (Επιβλέπων καθηγητής):

Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κουρέτας Δημήτριος:

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βεσκούκης Αριστείδης:

Επίκουρος Καθηγητής Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διατροφολογίας και Διαιτολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

---

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Αρχικά για την διεξαγωγή της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Δήμα Κωνσταντίνο, αναπληρωτή καθηγητή της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος της φαρμακολογίας για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και δυνατότητα που μου έδωσε να αποτελέσω μέρος του εργαστηρίου και της ερευνητικής ομάδας του, δίνοντας μου την ευκαιρία να προσκομίσω απαραίτητες γνώσεις, με μεγάλη προθυμία και καθοδήγηση. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κουρέτα Δημήτριο, υπεύθυνο του ΠΜΣ της Τοξικολογίας και καθηγητή Φυσιολογίας ζωικών οργανισμών και Τοξικολογίας του τμήματος της Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, καθώς και τον κύριο Βεσκούκης Αριστείδης Επίκουρο Καθηγητή Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας της Διατροφής και της Άσκησης, του τμήματος Διατροφολογίας και Διαιτολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του μεταπτυχιακού της Τοξικολογίας για τη διδασκαλία και τις γνώσεις που μου προσέφεραν.

Θα ήθελα, εξίσου, να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου και συγκεκριμένα στη Φανή Κουτσογιάννη, την Ανδρομάχη Λαμπριανίδου, τον Κωνσταντίνο Λαφαζάνη καθώς και στις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Δήμητρα Αλεξοπούλου και Ελισάβετ Κορμέντζα, οι οποίοι παρείχαν αμέριστη αρωγή σε οποιαδήποτε δυσκολία διατηρώντας ένα ευχάριστο κλίμα συνεργασίας. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ηλία Μπέγα, επιστημονικό συνεργάτη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την αμέριστη κατανόηση και υποστήριξη τους.

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Ο παγκρεατικός καρκίνος είναι ένας από τους πιο θανατηφόρους τύπους καρκίνου με πολύ χαμηλά ποσοστά επιβίωσης τα οποία φτάνουν στην καλύτερη των περιπτώσεων τα 5 έτη. Η πενταετής επιβίωση αφορά μόλις το 10% των ασθενών. Έρευνες έχουν δείξει πως οι σίγμα-2 υποδοχείς σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου. Η έκφραση των σίγμα-2 υποδοχέων διαφέρει ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου καθώς επίσης μεταξύ των σταδίων του όγκου. Έχει βρεθεί ότι η σιραμεσίνη η οποία αποτελεί έναν σίγμα-2 αγωνιστή προσδέτη εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα *in vitro* καθώς και *in vivo*.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της *in vitro* δραστηριότητας της σιραμεσίνης στην καρκινική παγκρεατική σειρά PANC-01. Συγκεκριμένα έγινε έλεγχος της κυτταροτοξικής δράσης της σιραμεσίνης, της επίδρασης της ουσίας στην ικανότητα μεμονωμένων κυττάρων να δημιουργούν κλώνους και της επίδρασης της στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων. Επιπλέον, ελέγχθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία σιραμεσίνης καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής με σκοπό να ελεγχθεί η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία δρα η σιραμεσίνη.

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα φάνηκε πως η σιραμεσίνη εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση στην παγκρεατική καρκινική σειρά που μελετήθηκε, επιδρά στην ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν και να δημιουργούν αποικίες. Όσον αφορά τη φάση του κυτταρικού κύκλου φάνηκε πως η σιραμεσίνη δρα στη φάση S ή/και G2, καθώς τόσο τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας όσο και της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν αυξημένη επιβίωση των κυττάρων τα οποία βρίσκονται στην G1 φάση. Ωστόσο, η αντικαρκινική δράση καθώς και ο μηχανισμός δράσης της σιραμεσίνης, ιδιαίτερα όσον αφορά τις ιδιότητες της που μελετήθηκαν εδώ, χρήζει πιο εμπειριστωμένων μελετών ώστε να συλλεχθούν απαραίτητες πληροφορίες με σκοπό ο σίγμα-2 αγωνιστής να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινική θεραπεία για τον παγκρεατικό καρκίνο.

**Λέξεις- Κλειδιά:** Σιραμεσίνη, σ2 αγωνιστής, σ2 υποδοχέας, παγκρεατικός καρκίνος, κυτταρικός κύκλος

---

## ABSTRACT

---

Pancreatic cancer is one of most lethal malignancies. It is usually detected at an advanced stage and most treatments are ineffective. The survival rates are under five years. The general 5-year survival rate for people with pancreatic cancer is 10%. Studies have shown that  $\sigma_2$  receptors are related with cancer. The expression of  $\sigma_2$  receptors differs between the cancer cell lines and the cancer's stage. Siramesine, is a  $\sigma_2$  agonist that has antiproliferative and cytotoxic activity in tumour cell in vitro as well as in vivo

The aim of this current master thesis is the study of the in vitro activity of siramesine in the pancreatic cell line PANC-01. Specifically, with the experiments that took place we aimed to examine the cytotoxic activity of siramesine, the ability of single cells to make clones and the ability of cells to migrate. Furthermore, we analysed the viability of cells treated with siramesine and studied, through flow cytometry, the effect of the compound on the cell cycle in order to investigate if the activity of siramesine is cell cycle phase specific.

The results that arose from this study, confirmed that siramesine has a strong antiproliferative and cytotoxic activity under the experimental conditions that has been tested. Moreover, siramesine found to inhibit the ability of single cells to create clones and to migrate. The results of cells' viability and flow cytometry suggest that siramesine may act mainly on the fraction of cells in the S or G2 phase of the cell cycle. However, the anticancer activity as well as the mechanism of action of siramesine especially regarding the features of the compound tested herein need more thorough studies to shed more light in the potential of this sigma-2 agonist as an anticancer drug for the treatment of pancreatic cancer.

**Key Words:** Siramesine,  $\sigma_2$  agonist,  $\sigma_2$  receptor, pancreatic cancer, cell cycle

---

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
A.1 Καρκίνος.....	9
A.1.1 Τα ορόσημα του καρκίνου.....	10
A.1.2 Κατηγορίες όγκων.....	11
A.2 Καρκίνος του παγκρέατος.....	12
A.2.1 Ιστορική Αναδρομή.....	12
A.2.2 Παθοφυσιολογία της νόσου.....	13
A.2.3 Επιδημιολογία.....	14
A.2.4 Παράγοντες Κινδύνου.....	16
A.2.5 Διάγνωση.....	19
A.2.6 Θεραπεία.....	20
A.3. Σιραμεσίνη και καρκίνος.....	21
A.3.1 Σίγμα υποδοχείς.....	21
A.3.2 $\Sigma 2$ υποδοχείς.....	23
A.3.2.1 Ταυτοποίηση $\sigma 2$ υποδοχέων.....	23
A.3.2.2 Ο ρόλος των $\sigma 2$ υποδοχέων.....	24
A.3.2.3 Επίπεδα έκφρασης των $\sigma 2$ υποδοχέων.....	25
A.3.3 $\Sigma 2$ προσδέτες.....	26
A.3.4 Σιραμεσίνη.....	28
A.4 Σκοπός.....	30
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
B.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	31
B.2 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας- SRB.....	36
B.3 Μέθοδος αναστολής δημιουργίας κλώνων.....	37
B.4 Έλεγχος επούλωσης πληγής (Wound healing assay – Scratch assay).....	38
B.5 Ανάλυση και ανίχνευση $\sigma 1/\sigma 2$ υποδοχέων μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.....	39
B.5.1 Απομόνωση πρωτεϊνών-Λύματα κυττάρων.....	39
B.5.2 Μέθοδος Bradford: Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	39

B.5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου- SDSPAGE.....	40
B.5.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.....	41
B.5.5 Western Blot- Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	42
B.5.6 Αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων.....	43
B.5.7 Ποσοτικοποίηση της απεικόνισης των αποτελεσμάτων.....	43
B.6 Κυτταρικός κύκλος.....	44
B.7 Κυτταρομετρία ροής.....	45
B.8 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	48
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
Γ.1 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας ύστερα από έκθεση σε σιραμεσίνη.....	49
Γ.2 Αποτελέσματα ελέγχου κλωνογένεσης.....	50
Γ.3 Αποτελέσματα ελέγχου επούλωσης πληγής- wound healing.....	52
Γ.4 Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western.....	54
Γ.5 Βιωσιμότητα της καρκινικής παγκρεατικής σειράς PANC-01 ύστερα από έκθεση στη Σιραμεσίνη.....	55
Γ.6 Αποτελέσματα Κυτταρομετρίας Ροής.....	57
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65



### **A.1 Καρκίνος**

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ασθένειες του 21<sup>ου</sup> αιώνα. Τον προηγούμενο αιώνα δεν ήταν τόσο συχνός, ωστόσο ο σύγχρονος τρόπος ζωής, το περιβάλλον και η αύξηση του προσδόκιμου ζωής καθιστούν πλέον τον καρκίνο μία από τις πιο συχνές και θανατηφόρες ασθένειες. Κάθε χρόνο προσβάλλονται από καρκίνο περίπου 14 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως. (Roy and Saikia 2016) Το κάπνισμα, η έλλειψη γυμναστικής και η μη υγιεινή διατροφή καθώς και η ρύπανση του περιβάλλοντος αποτελούν ορισμένους από τους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Η όλο και αυξανόμενη έκθεση σε καρκινογόνα, όπως η ακτινοβολία, τα πρόσθετα τροφίμων, τα γεωργικά φάρμακα οι ιοί και διάφοροι μικροοργανισμοί συμβάλλουν στον διαρκώς αυξανόμενο ρυθμό εμφάνισης του καρκίνου. Υπολογίζεται ότι 1 στα 3 άτομα θα διαγνωστούν με καρκίνο κατά τη διάρκεια της ζωής τους. (Y. B. Zhang et al. 2020)

Ο καρκίνος είναι η απόκλιση από το φυσιολογικό στην ανάπτυξη των κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία και στη συνέχεια να μεταναστεύσουν σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος. Κανονικά τα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με σκοπό το σχηματισμό νέων κυττάρων όταν τα ήδη υπάρχοντα πεθαίνουν, με σκοπό την αντικατάστασή τους. Ορισμένες όμως φορές η ικανότητα αυτή διαταράσσεται με αποτέλεσμα μη φυσιολογικά ή κύτταρα με βλάβες να συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Αυτά τα κύτταρα μπορεί να δημιουργήσουν όγκους, δηλαδή μάζες κυττάρων. Στη συνέχεια οι καρκινικοί όγκοι διαχέονται ή εισβάλλουν σε παρακείμενους ιστούς, όπου μετ' έπειτα μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία, μέσω της ρήξης της βασικής μεμβράνης η οποία φυσιολογικά διαχωρίζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα των εσωτερικών επενδύσεων των αγγείων από το στρώμα κυττάρων λείου μυός και να δημιουργήσουν νέες απομακρυσμένες εστίες, τις μεταστάσεις. (What Is Cancer? - National Cancer Institute n.d.)

Το κρίσιμο σημείο στην καρκινογένεση φαίνεται να είναι η αδυναμία του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίσει και να καταστρέψει ένα κύτταρο με αποκλίσεις από τη φυσιολογική ανάπτυξη, στα πρώιμα στάδια.

Οι περισσότεροι όγκοι είναι συμπαγείς, με εξαίρεση τις λευχαιμίες. Όσον αφορά την ανίχνευση ο όγκος πρέπει να έχει το μέγεθος ενός εκατοστού ή να αποτελείται από περίπου 1 εκατομμύρια κύτταρα. Διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες τους καλοήθεις και τους κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι αναπτύσσονται με πιο αργό ρυθμό, είναι οριοθετημένοι, δεν έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι επιβλαβείς για την υγεία του ανθρώπου. Αντίθετα οι κακοήθεις όγκοι αναπτύσσονται ταχύτητα και έχουν την ικανότητα να διηθούν σε γειτονικούς ιστούς και να μεταναστεύουν, αποτελώντας σημαντικό

κίνδυνο για την υγεία του ασθενούς, που μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατο. (Hausman 2019)

Ο καρκίνος είναι μία γενετική, πολυπαραγοντική ασθένεια που οφείλεται σε αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης και λειτουργίας γονιδίων που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Οι γενετικές αλλαγές μπορεί να αφορούν λάθη που γίνονται κατά τη διαίρεση των κυττάρων, καταστροφή του DNA που μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες ή να έχουν κληροδοτηθεί από τους γονείς.

Οι γενετικές αλλαγές που μπορούν να οδηγήσουν σε εμφάνιση καρκίνου αφορούν κυρίως 3 είδη γονιδίων, τα πρωτογονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις ή η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης τους μπορεί να οδηγήσει στην μετατροπή τους σε ογκογονίδια, επιτρέποντας την επιβίωση των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους. Στη συνέχεια είναι τα γονίδια καταστολής όγκων τα οποία ελέγχουν την ανάπτυξη των κυττάρων, εμποδίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Είναι απαραίτητη η αποσιώπηση και των δύο αλληλομόρφων για την ανάπτυξη όγκου, καθώς η παρουσία ενός μόνο φυσιολογικού αλληλομόρφου είναι αρκετή για την καταστολή της καρκινογένεσης. Τέλος, είναι τα γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια προκαλούν επιπλέον μεταλλάξεις στα χρωμοσώματα οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στη μετατροπή των κυττάρων σε καρκινικά. (Cell Cycle Control, Oncogenes, Tumor Suppressors | Learn Science at Scitable n.d.)

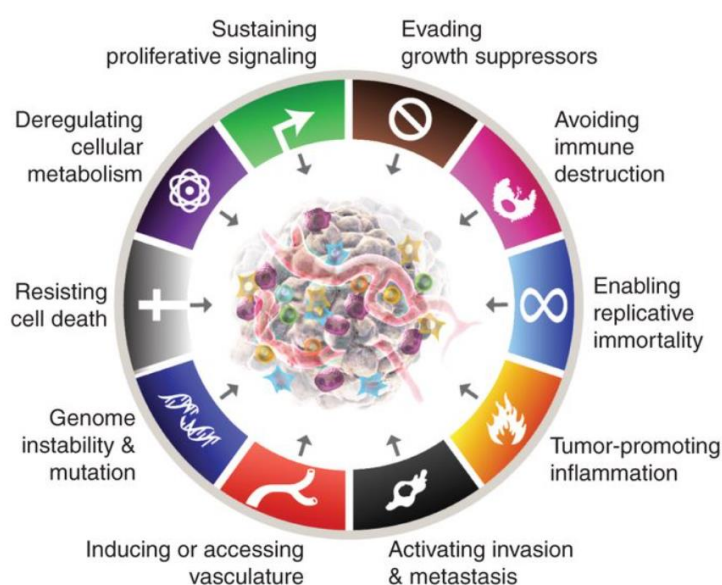
### **A.1.1 Τα ορόσημα του καρκίνου**

Τα ορόσημα του καρκίνου αποτελούν μία αρχή για την αιτιολόγηση των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στην ανάπτυξη ενός καρκινικού όγκου. Περιλαμβάνουν 6 βιολογικές διεργασίες. (Hanahan and Weinberg 2000)

Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 ακόμα ορόσημα τα οποία φαίνεται να σχετίζονται με την παθογένεση πολλών μορφών καρκίνου και πιθανόν όλων. Το ένα περιλαμβάνει την ικανότητα διαφοροποίησης του κυτταρικού μεταβολισμού ώστε τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται με ταχύτερους ρυθμούς και το άλλο την δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων να ξεφεύγουν από την καταστροφή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ωστόσο επειδή η ικανότητα τους αυτή δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί αυτά τα δύο ορόσημα χαρακτηρίστηκαν ως αναδυόμενα «emerging». Επιπλέον εισήχθησαν άλλα δύο χαρακτηριστικά. Η γενομική αστάθεια και η μεταλλακτικότητα που οδηγεί στην εξέλιξη του όγκου και η φλεγμονή που προωθεί τον όγκο (Hanahan and Weinberg 2011)

Τα 10 ορόσημα είναι τα εξής:

- Διατήρηση σηματοδότησης πολλαπλασιασμού
- Αποφυγή καταστολών ανάπτυξης
- Ενεργοποίηση διήθησης και μετάστασης
- Πολλαπλασιαστική αθανασία
- Νεο-αγγειογένεση
- Αντίσταση στην απόπτωση
- Απορρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού
- Αποφυγή καταστροφής μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος
- Γενομική αστάθεια και μεταλλάξεις
- Φλεγμονή που προωθεί τους όγκους



Εικόνα 1: Τα 10 ορόσημα του καρκίνου

(Hanahan and Weinberg 2000)

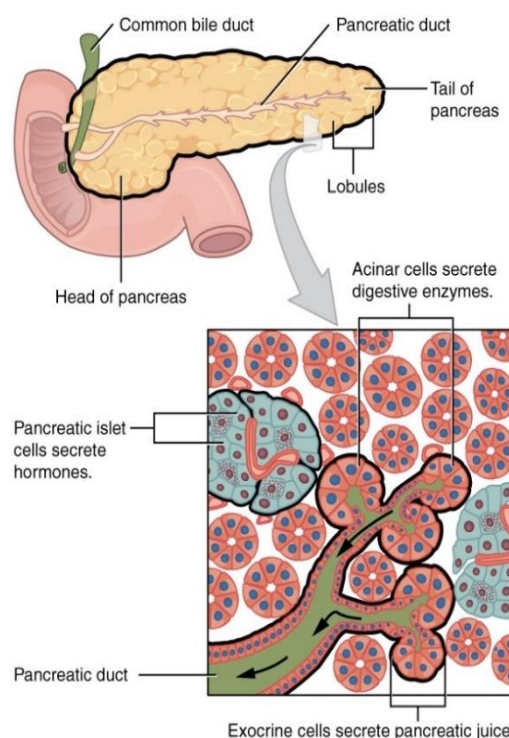
### **A.1.2 Κατηγορίες όγκων**

Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες κακοηθών όγκων. Οι όγκοι επιθηλιακής προέλευσης και οι όγκοι μη επιθηλιακής προέλευσης. Όσον αφορά τους όγκους επιθηλιακής προέλευσης διακρίνονται στα πλακώδη καρκινώματα, τα οποία αφορούν επιθηλιακά κύτταρα που χρησιμεύουν για την κάλυψη κοιλότητων και έχουν προστατευτικό ρόλο και τα αδenoκαρκινώματα τα οποία αφορούν επιθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν εκκριτική ικανότητα. Αντίθετα οι όγκοι μη επιθηλιακής προέλευσης διακρίνονται σε σαρκώματα, τα οποία είναι μεσεγχυματικής προέλευσης όπως οι ινοβλάστες, τα μυοκύτταρα και τα λιποκύτταρα, οι νευροεκτοδερμικοί καρκίνοι που αφορούν κύτταρα του νευρικού

συστήματος, τα μελανώματα και οι καρκίνοι του αιμοποιητικού συστήματος. (What Is Cancer? - National Cancer Institute n.d.)

## **2.1 Καρκίνος του παγκρέατος**

Το πάγκρεας είναι ένας σύνθετος, μεικτός αδένας δηλαδή εμφανίζει ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα. Βρίσκεται κεντρικά, στο επάνω μέρος της κοιλίας πίσω από το στομάχι, ενώ συνδέεται μέσω ενός πόρου με το δωδεκαδάκτυλο. Έχει δύο βασικές λειτουργίες, να παράγει ένζυμα που βοηθούν στην πέψη των τροφών και ορμόνες που βοηθούν στο μεταβολισμό. Όπως προαναφέρθηκε το πάγκρεας αποτελείται από ενδοκρινή και εξωκρινή κύτταρα. Τα ενδοκρινή τα οποία ονομάζονται νησίδες του Langerhans κύτταρα παράγουν πολλές ορμόνες όπως η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη και η αυξητική ορμόνη. Αντίθετα τα κύτταρα με εξωκρινή μοίρα παράγουν ένζυμα που σχετίζονται με την πέψη. Αποτελείται από τέσσερα ανατομικά τμήματα, την κεφαλή, τον αυχένα, το σώμα και την ουρά. Οι πόροι σχηματίζουν τον κύριο πόρο ο οποίος ενώνεται με τον χοληδόχο πόρο και εκβάλλουν στο δωδεκαδάκτυλο. (Ercan, Karlitepe, and Ozrolat 2017)



Εικόνα 2: Ανατομία του παγκρέατος

(Pancreas Functions, Location & Disease | Columbia Surgery n.d.)

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι μία από τις πιο θανάσιμες κακοήθειες, εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα, ενώ ανιχνεύεται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο καθιστώντας τη θεραπεία ως αναποτελεσματική.

### **A.2.1 Ιστορική Αναδρομή**

Η πρώτη περιγραφή ασθενούς με καρκίνο του παγκρέατος αναφέρεται από τον Giovanni Battista Morgagni το 1761 στη δημοσίευση του 'de Sedibus Et Causis Morborum Per Anatomen Indagatis Libri Quinque'

Ωστόσο η έλλειψη μικροσκοπιακής αξιολόγησης εκείνης της εποχής καθιστά αβέβαιη την ορθή διάγνωση και συνεπώς την επιβεβαίωση ότι επρόκειτο για

παγκρεατικό καρκίνο. Το 1858 ο Jacob Mendez Da Costa μελέτησε εκ νέου τη δουλειά του Morgagni και περιέγραψε την πρώτη μικροσκοπική διάγνωση αδενοκαρκινώματος επιβεβαιώνοντας πως ο παγκρεατικός καρκίνος πρόκειται για μία υπαρκτή ασθένεια. (On the morbid anatomy and symptoms of cancer of the pancreas - Digital Collections - National Library of Medicine n.d.)

Όσον αφορά το πρώτο χειρουργείο αφαίρεσης της κεφαλής του παγκρέατος έγινε το 1898 από τον Ιταλό χειρουργό Alessandro Codivilla, ωστόσο ο ασθενής απεβίωσε. (Schnelldorfer and Sarr 2009) Ο William Stewart Halsted από το νοσοκομείο Johns Hopkins εκτέλεσε την πρώτη πετυχημένη χειρουργική αφαίρεση περιληκυθικών όγκων αφαιρώντας τμήματα του παγκρέατος και του δωδεκαδάκτυλου. Η πρώτη πετυχημένη αφαίρεση παγκρέατος-δωδεκαδάκτυλου έγινε σε δύο στάδια από τον Γερμανό χειρουργό Walther Carl Eduard Kausch, ενώ η πρώτη πετυχημένη αφαίρεση αδενώματος του παγκρεατικού πόρου σε ένα στάδιο έλαβε χώρα το 1914 από τον Georg Hirschel. (Torphy, Fujiwara, and Schulick 2020)

Ο Allen Oldfather Whipple εκτέλεσε συνολικά 37 εκτομές του αδενώματος του παγκρεατικού πόρου, με τεχνικές ενός σταδίου η οποία παραμένει γνωστή μέχρι και σήμερα φέροντας το όνομα του. Το 1937, ο Alexander Brunschwig εκτέλεσε την πρώτη πετυχημένη εκτομή παγκρεατικού αδενώματος του πόρου σε ασθενή με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Στη σημερινή εποχή οι εγχειρήσεις που αφορούν το πάγκρεας αποτελούν μία ασφαλή διαδικασία και εμφανίζουν επιτυχία σε ποσοστό 97%, με πιθανότητα θανάτου κατά τη διάρκεια της επέμβασης 3%. Ωστόσο αν και έχουν γίνει μεγάλα άλματα από την εποχή του Whipple στον τομέα των εγχειρήσεων η μακροχρόνια επιβίωση των ασθενών είναι σπάνια. Η επιβίωση έως 5 χρόνια των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος έχει μείνει στάσιμη από το 1960 και αφορά κάτω από το 10% των ασθενών. (Ansari et al. 2014)

#### **A.2.2 Παθοφυσιολογία της νόσου**

Οι όγκοι του παγκρέατος διακρίνονται σε δύο κατηγορίες αυτούς που προέρχονται από κύτταρα εξωκρινούς μοίρας και αυτούς που προέρχονται από κύτταρα ενδοκρινούς μοίρας. Τόσο τα εξωκρινή όσο και τα ενδοκρινή κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία όγκων, οι όγκοι που προκύπτουν από κύτταρα με ενδοκρινή μοίρα είναι λιγότερο συχνά. (Hajj and Goodman 2015) Σύμφωνα με μελέτες το 95% των όγκων αφορούν εξωκρινή επιθηλιακά κύτταρα, ενώ μόνο το 5% αφορά κύτταρα ενδοκρινούς μοίρας.

Οι όγκοι της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος είναι γνωστοί και ως όγκοι των νησιδίων του Langerhans, όπως είναι το ινσουλίνωμα το οποίο αφορά καρκινογένεση στα κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη και νευροενδοκρινείς όγκοι όπως το γαστρίνωμα που αφορά κύτταρα που παράγουν γαστρίνη. (Ercan, Karlitepe, and Ozpolat 2017)

Όσον αφορά τους όγκους της εξωκρινούς μοίρας διακρίνονται σε καλοήθεις και σε κακοήθεις. Ορισμένοι από τους καλοήθεις παγκρεατικούς καρκίνους είναι το αδένωμα, το λίπωμα, το κυσταδένωμα κ.α. Όσον αφορά τους κακοήθεις όγκους ο πιο κοινός είναι το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου. Όταν ο όγκος προέρχεται από κύτταρα που παράγουν τα παγκρεατικά ένζυμα τότε ονομάζεται καρκίνωμα των κυψελοειδών κυττάρων και αφορά το 1-2% των καρκίνων εξωκρινούς μοίρας. Επιπλέον σπάνιοι τύποι καρκίνου είναι το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων, το αδеноπλακώδες καρκίνωμα και το κολλοειδές ή αλλιώς βλεννώδες καρκίνωμα το οποίο διασπείρεται πιο δύσκολα και εμφανίζει καλύτερη απόκριση σε θεραπείες. (Pancreatic Cancer Types | Johns Hopkins Medicine n.d.)

Πιο αναλυτικά, ο παγκρεατικός καρκίνος που αφορά την εξωκρινή μοίρα όπως προαναφέρθηκε διακρίνεται σε ορισμένους υπότυπους. Ο πιο διαδεδομένος αναφέρεται ως αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (Pancreatic ductal adenocarcinoma- PDAC), καθώς προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα του πόρου και αποτελεί το 90% των περιπτώσεων, τόσο των καρκίνων με ενδοκρινή όσο και με εξωκρινή μοίρα, ενώ αναπτύσσεται κυρίως στην κεφαλή του παγκρέατος. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται κυρίως από την παρουσία ενός πυκνού στρώματος ινοβλαστών και κυττάρων φλεγμονής (Jaster 2004)

Οι παγκρεατικές ενδο-επιθηλιακές νεοπλασίες (Pancreatic intraepithelial neoplasia- PanIN) αποτελούν τις πιο κοινές πρόδρομες βλάβες του αδενοκαρκινώματος του παγκρεατικού πόρου, οι οποίες δημιουργούνται λόγω φλεγμονής του παγκρέατος και αποτελούν μικροσκοπικές μη διηθητικές βλάβες σε μικρούς παγκρεατικούς πόρους. (Schwartz and Henson 2007) Επιπλέον πρόδρομες νεοπλασματικές βλάβες αποτελούν: τα βλενώδη κυστικά νεοπλάσματα τα οποία αφορούν παγκρεατικά κυστίδια (Mucinous cystic neoplasm- MCN), και τα ενδοπορικά θηλώδη-βλενώδη νεοπλάσματα (Intraductal papillary mucinous neoplasm- IPMN) τα οποία σχετίζονται με άλλους υπότυπους παγκρεατικού καρκίνου. (Hruban, Maitra, and Goggins 2008)

Περίπου στο 90% των PDAC καθώς και σχεδόν σε όλες τις νεοπλασίες είναι εμφανής η μετάλλαξη του γονιδίου KRAS. Παρόλο που οι μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου είναι απαραίτητες για την καρκινογένεση καθώς και για τη διατήρηση του μεταγενέστερου όγκου, δεν είναι επαρκείς για την μετατροπή της νεοπλασίας σε όγκο. (Bardeesy et al. 2006) Αντιθέτως απαιτούνται επιπλέον μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια καθώς και σε γονίδια που σχετίζονται με το αποπτωτικό μονοπάτι, τη σηματοδότηση WNT και NOTCH. (Hezel et al. 2006)

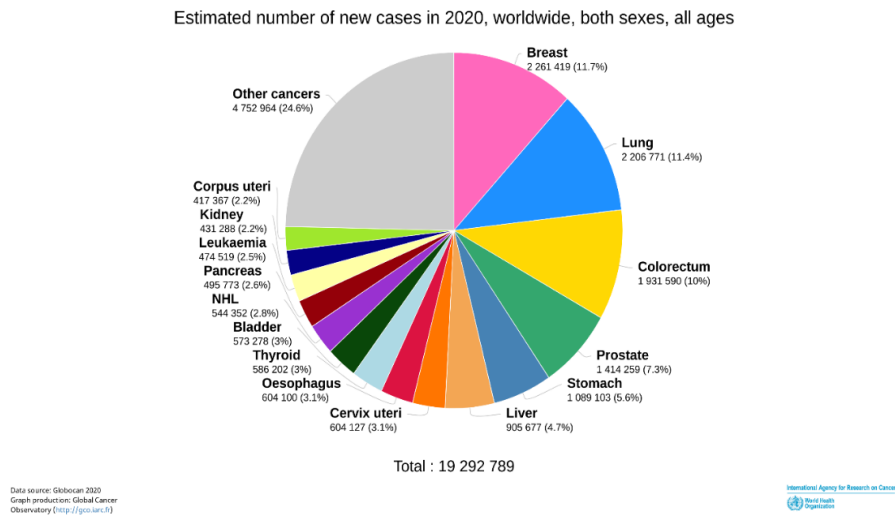
Χρειάζονται περίπου 10 χρόνια από τη μετάλλαξη μέχρι το σχηματισμό του πρωταρχικού όγκου και άλλα 10 μέχρι το θάνατο του ασθενούς.

### **A.2.3. Επιδημιολογία**

Σύμφωνα με την GLOBOCAN (2020) ο καρκίνος του παγκρέατος κατείχε το 2020 παγκοσμίως την 12<sup>η</sup> θέση, ενώ στην Ελλάδα την 7<sup>η</sup> θέση. Παγκοσμίως αποτελεί την

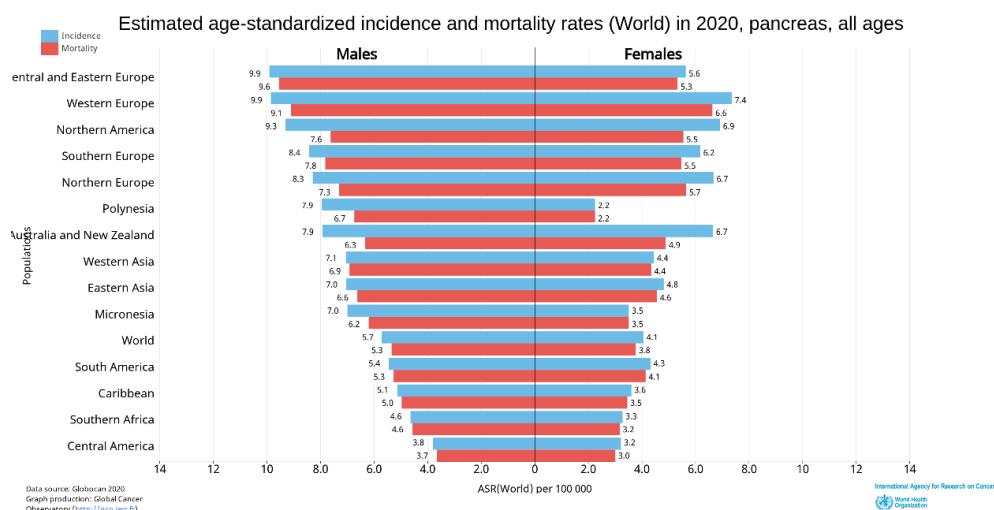
8<sup>η</sup> αιτία θανάτου από καρκίνο ενώ στην Ελλάδα την 4<sup>η</sup>. Παρατηρείται μία αύξηση όσον αφορά τους θανάτους σε σχέση με τη συχνότητα εμφάνισης του, κάτι το οποίο υποδηλώνει την σοβαρότητα της νόσου και κυρίως την αδυναμία αντιμετώπισης της. Όπως είναι εμφανές και στο γράφημα πίτας εκτιμάται ότι το έτος 2022 διαγνώστηκαν 495.773 άτομα με καρκίνο του παγκρέατος, αποτελώντας το 2,6% των νέων υποθέσεων καρκίνου (εικόνα 3).

Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος είναι 1.46% το οποίο αντιστοιχεί περίπου σε 1 στα 67 άτομα.



Εικόνα 3: Γράφημα πίτας στο οποίο απεικονίζονται οι νέες υποθέσεις εμφάνισης καρκίνου το 2020, παγκοσμίως σε όλες τις ηλικίες και στα δύο φύλα

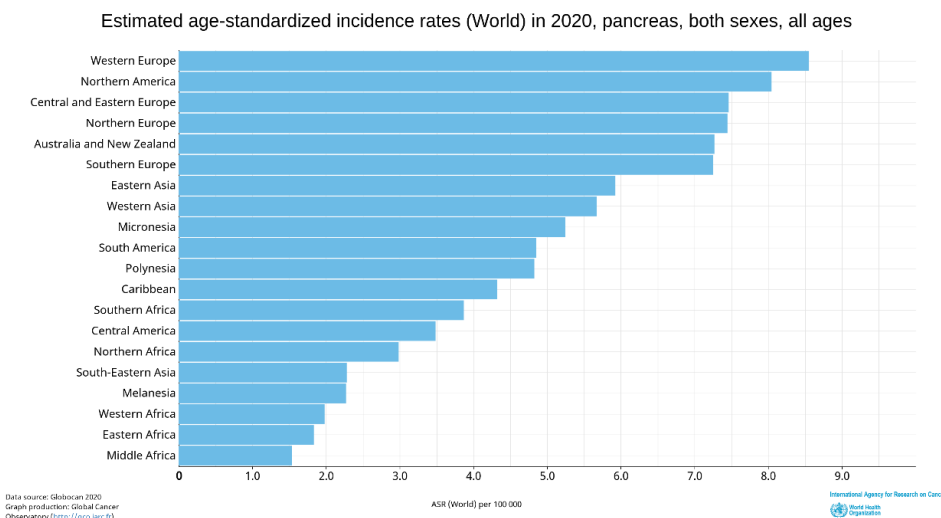
GLOBOCAN 2020



Εικόνα 4: Ραβδόγραμμα απεικόνισης της συχνότητας εμφάνισης(μπλε) του παγκρεατικού καρκίνου και θανάτου(κόκκινο) σε φθίνουσα σειρά ανά τοποθεσία παγκοσμίως. Στην αριστερή πλευρά απεικονίζονται οι άντρες ενώ στη δεξιά οι γυναίκες

GLOBOCAN 2020





Εικόνα 5: Ραβδόγραμμα απεικόνισης της εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου και στα δύο φύλα σε όλες τις ηλικίες ανά τοποθεσία για το έτος 2020

GLOBOCAN 2020

Ο παγκρεατικός καρκίνος αφορά κυρίως άτομα ηλικιών μεταξύ 70-80 ετών, η εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου σε άτομα νεαρά είναι πολύ σπάνια και συνήθως σχετίζεται με την κληρονομικότητα. Όσον αφορά τα δύο φύλα, μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσουν έχουν οι άντρες, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν είναι τόσο μεγάλη. (Εικόνα 4) Επιπλέον η συχνότητα εμφάνισης του παγκρεατικού καρκίνου είναι πιο αυξημένη στο δυτικό κόσμο όπως στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής κάτι που αντικατοπτρίζει και τη πιθανή συσχέτιση του καρκίνου με τον τρόπο ζωής και τη διατροφή. (Εικόνα 5)

### **A.2.3 Παράγοντες κίνδυνου**

Οι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση του παγκρεατικού καρκίνου είναι το κάπνισμα, η ηλικία, η κληρονομικότητα, ο διαβήτης και η παχυσαρκία.

Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου αποτελεί το κάπνισμα ενώ δεύτερος έρχεται η παχυσαρκία. Το κάπνισμα αποτελεί από τους πιο σημαντικούς παράγοντες καθώς έχει βρεθεί ότι η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου καπνίζοντα είναι κατά 75% μεγαλύτερη. (Iodice et al. n.d.) (Samokhvalov, Rehm, and Roerecke 2015)

Η κληρονομικότητα είναι άλλος ένας σημαντικός παράγοντας εμφάνισης



παγκρεατικών όγκων και αφορά περίπου το 10% των περιπτώσεων. Κατά κύριο λόγο τα γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση του κληρονομικού καρκίνου του παγκρέατος είναι ογκοκατασταλτικά και γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA. Ο καρκίνος του παγκρέατος χαρακτηρίζεται από λανθασμένη ρύθμιση σε διάφορα μονοπάτια όπως στα TGF- $\beta$ , Wnt/Notch και hedgehog. Περίπου 63 γενετικές μεταλλάξεις μαζί με βλάβες σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η απόπτωση, ο κυτταρικός κύκλος, ο έλεγχος και η ρύθμιση της διήθησης των κυττάρων αφορούν κάθε όγκο

Το 80% των περιπτώσεων καρκίνου του παγκρέατος οφείλεται κυρίως σε σποραδικές μεταλλάξεις στα γονίδια K-RAS, CDKN2A (P16), TP53, SMAD4, BRCA2, BRCA1, το STK11 το οποίο υπάρχει στο σύνδρομο Peutz-Jeghers, το SPINK1 και το PRSS1. (Landi 2009) Για παράδειγμα σε ότι αφορά το ογκογονίδιο K-RAS, παρατηρούνται μεταλλάξεις τουλάχιστον στο 90% των καρκίνων του παγκρέατος, οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε συστατική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras που οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. (Zhao and Liu 2020)

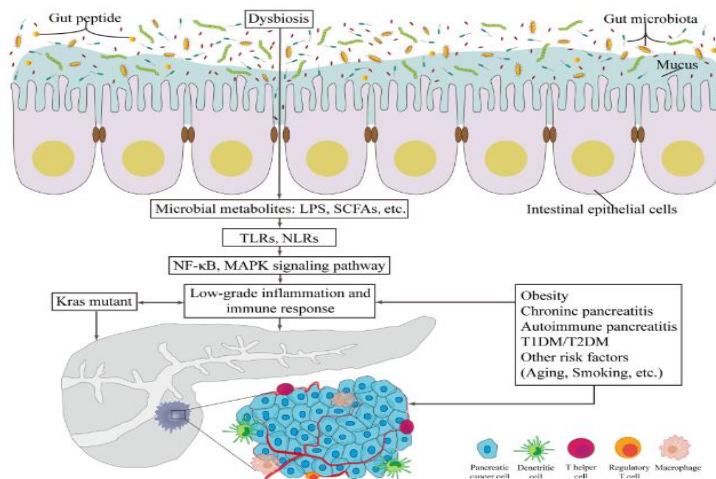
Η χρόνια παγκρεατίτιδα αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου. Είναι μία φλεγμονή του παγκρέατος που οδηγεί σε ίνωση του παγκρέατος και απώλεια των νησίδων του Langerhans. Πιο συγκεκριμένα η χρόνια παγκρεατίτιδα μπορεί να εξελιχθεί και να οδηγήσει σε ανεπάρκεια της εξωκρινούς ή/και ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος με απόρροια τη μη φυσιολογική παραγωγή ενζύμων. Παράλληλα μπορεί να διαταράξει το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια καθώς και τα λυσοσώματα των παγκρεατικών κυττάρων οδηγώντας σε καταστροφή του DNA, χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τέλος ενεργοποίηση των ογκογονιδίων. (Dhar, Kalghatgi, and Saraf n.d.)

Έρευνες έχουν επιβεβαιώσει τη σύνδεση του παγκρεατικού καρκίνου με το διαβήτη, έχει βρεθεί ότι τα άτομα με διαβήτη τύπου I που νοσούν για μία τουλάχιστον δεκαετία έχουν 5-10% περισσότερη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου, με τη πιθανότητα να αυξάνεται όσο αυξάνονται τα χρόνια νόσησης με διαβήτη. (Zhao and Liu 2020)

Όσον αφορά τη συσχέτιση του παγκρεατικού καρκίνου με την παχυσαρκία, μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με κοιλιακή παχυσαρκία έχουν 50% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου. Ωστόσο δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί η σχέση ανάμεσα στις δύο αυτές ασθένειες. Στην παχυσαρκία ο λιπώδης ιστός απελευθερώνει ελεύθερα λιπαρά οξέα τα οποία στη συνέχεια εισέρχονται στην κυκλοφορία και συσσωρεύονται σε μη λιπώδη ιστό όπως το συκώτι και το πάγκρεας. (M. Xu et al. n.d.) Παράλληλα, είναι πλέον γνωστό ότι το λίπος μπορεί να μετατρέψει τα καρκινικά κύτταρα σε πιο ανθεκτικές μορφές καθώς η βιοσύνθεση και η οξειδωση των λιπιδίων σχετίζεται με την επιβίωση των κυττάρων. Έρευνες έχουν δείξει ότι σε άτομα με παχυσαρκία τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων οδηγούν σε αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των λιποκυττάρων. Οι λιπώδεις ιστοί φαίνεται να είναι μεταβολικά ενεργοί παράγοντας λεπτίνη και αδιπονεκτίνη. Τόσο η λεπτίνη όσο και η αδιπονεκτίνη μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή

κυτοκινών IL-6 και TNF-alpha συμβάλλοντας στην εξέλιξη του όγκου, μέσω επιδράσεων που έχουν στην αγγειογένεση, την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σύμφωνα με έρευνες, μαζί με τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, οι αδιποκίνες αλλοιώνουν το μικροβίωμα του εντέρου. Συμπερασματικά, η αύξηση των επιπέδων των αδιποκυτοκινών, οι τροποποιήσεις στο μικροβίωμα του εντέρου και οι φλεγμονές συμβάλλουν στην εξέλιξη του παγκρεατικού καρκίνου μέσω αγνώστων, έως σήμερα, μηχανισμών. (Bracci 2012)

Τέλος, το μικροβίωμα το οποίο αποτελεί το σύνολο των μικροοργανισμών βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα και των ιών τα οποία κατοικούν στο εσωτερικό του οργανισμού καθώς και στην επιδερμίδα και παίζουν σημαντικό ρόλο για την υγεία καθώς και για την εμφάνιση ασθενειών στον άνθρωπο. Έχει βρεθεί ότι το ίδιο το μικροβίωμα, καθώς και μεταβολίτες που παράγει, κυρίως του στόματος, του παγκρέατος και του εντέρου συμβάλλουν στην ανάπτυξη παγκρεατικού καρκίνου. Έρευνες έχουν δείξει ότι το μικροβίωμα του εντέρου πυροδοτεί την ανοσολογική απόκριση η οποία σχετίζεται με το σχηματισμό του όγκου. (Memba et al. 2017) Συγκεκριμένα διαταραχές του μικροβιώματος του εντέρου μειώνει τοπικά το πάχος της εντερικής βλέννης και των εντερικών πεπτιδίων που βρίσκονται στον αυλό του εντέρου. Στη συνέχεια οι μεταβολίτες των μικροοργανισμών όπως λιποπολυσακχαρίτες και λιπαρά οξέα μικρών αλυσίδων εισέρχονται στα εντερικά κύτταρα και προκαλούν ανοσολογική απόκριση η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και NF-κB. Η ενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτοκινών και την περαιτέρω στρατολόγηση προφλεγμονώδων παραγόντων που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου. (Y. Xu et al. 2020)



Εικόνα 6: Διαταραχές του μικροβιώματος οδηγούν στην καρκινογένεση

(Y. Xu et al. 2020)

### **A.2.5 Διάγνωση**

Η πρόωρη διάγνωση είναι δύσκολη καθιστώντας τον παγκρεατικό καρκίνο έναν από τους πιο θανατηφόρους τύπους καρκίνου. Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι δύσκολο να ανιχνευτεί σε πρώιμα στάδια, τις περισσότερες των περιπτώσεων η ανίχνευση γίνεται αφού ήδη έχουν λάβει χώρα μεταστάσεις. Μόνο το 10% των διαγνώσεων αφορούν παγκρεατικούς καρκίνους όπου δεν έχει συμβεί ακόμα μετάσταση. (L. Zhang, Sanagaralli, and Stoita 2018)

Οι περισσότεροι ασθενείς δεν έχουν διακριτά συμπτώματα, τα οποία να εμφανίζονται μόνο στον παγκρεατικό καρκίνο, κατά τη διάρκεια την ανάπτυξης, της εξέλιξης καθώς και της προχωρημένης μετάστασης. Το 70-80% των ασθενών εμφανίζουν έντονο επιγαστρικό πόνο. Ο πόνος αφορά κυρίως την περιοχή του στομάχου και ορισμένες φορές επεκτείνεται και στο πίσω μέρος. Επίσης εμφανίζουν ίκτερο, σε περίπτωση που ο όγκος φράζει το σημείο εισόδου της χολής στο δωδεκαδάκτυλο, μειωμένη όρεξη, απώλεια βάρους και ορισμένες φορές διάρροια. Συνεπώς γίνεται αντιληπτή η αδυναμία πρόωρης διάγνωσης του καρκίνου, ωστόσο εάν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό τότε υπάρχουν πιθανότητες για πρώιμη διάγνωση, μέσω προληπτικών εξετάσεων.

Παράλληλα με την συμπτωματολογία, υπάρχουν και απεικονιστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και επιβεβαίωση του παγκρεατικού καρκίνου. Τέτοιες μέθοδοι είναι το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS), το οποίο μπορεί να συνδυαστεί με παρακέντηση με λεπτή βελόνα με σκοπό τη λήψη κυττάρων του όγκου για βιοψία (EUS-FNA), η μαγνητική τομογραφία (MRI) και η μαγνητική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (MRCP) η οποία αποτελεί έναν υπότυπο της μαγνητικής τομογραφίας και εξειδικεύεται στην εξέταση του παγκρέατος, της χοληφόρου κύστης και των χοληδόχων πόρων δίνοντας πιο λεπτομερείς εικόνες. Μια άλλη μέθοδος που πλέον αποτελεί εξέταση ρουτίνας είναι η αξονική τομογραφία multidetector computed tomography (MDCT). (Unger et al. 2018)

Ένας άλλος τρόπος διάγνωσης είναι η χρήση καρκινικών βιοδεικτών. Ορισμένοι από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του παγκρεατικού καρκίνου είναι τα αντιγόνα υδατανθράκων CA19-9, CA242, CA125 και το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο (CEA), με τον πιο εξειδικευμένο το CA19-9, (Haglund et al. 1994). Έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων καρκινικών δεικτών αυξάνει την ευαισθησία της διάγνωσης. Ωστόσο δεν είναι τόσο αξιόπιστοι καθώς εμφανίζουν αυξημένες τιμές και σε άλλες παγκρεατικές και ηπατικές ασθένειες, με αποτέλεσμα την πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. (Marrelli et al. 2009)

Συνεπώς για την ορθή και έγκαιρη αξιολόγηση είναι απαραίτητος ο συνδυασμός εξέτασης καρκινικών δεικτών και εφαρμογής απεικονιστικής μεθόδου.

### A.2.6 Θεραπεία

Έρευνες έχουν δείξει ότι η πρόωρη διάγνωση έχει θετική επίδραση στη μακροχρόνια επιβίωση των ασθενών. Ωστόσο καθώς ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί μια πολύ επιθετική μορφή καρκίνου και παράλληλα η πρόωρη διάγνωση είναι φτωχή, οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται ήδη με μεταστάσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η επιβίωση των ασθενών να είναι κατά μέσο όρο οι 6 μήνες, ενώ ένα ποσοστό κάτω του 10% να φτάνει τα 5 έτη, κυρίως όσοι διαγιγνώσκονται σε πρωταρχικό στάδιο (Takeda et al. 2017)

Όλοι οι παγκρεατικοί καρκίνοι ταξινομούνται με βάση το TNM σύστημα σταδίων το οποίο βασίζεται στην αξιολόγηση του πρωταρχικού όγκου, την κατάσταση των λεμφαδένων και την παρουσία μετάστασης. Ο παγκρεατικός καρκίνος ομαδοποιείται σε 4 στάδια, με το 4<sup>ο</sup> το πιο προχωρημένο. Η κατηγοριοποίηση αυτή γίνεται με σκοπό να δοθεί στον ασθενή η κατάλληλη θεραπεία. Οι παράμετροι που ελέγχονται είναι το μέγεθος του όγκου T (Tumour), η διασπορά καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες N (Node) και η διασπορά του όγκου σε κάποιο άλλο όργανο M (Metastasis). (Brierley 2006)

Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου αποτελεί έναν από τους τρόπους διαχείρισης του παγκρεατικού καρκίνου. Θεωρείται η βέλτιστη θεραπευτική προσέγγιση όταν ο όγκος είναι αφαιρέσιμος και δεν υπάρχουν μεταστάσεις. Η επέμβαση, όταν είναι εφικτή, από μόνη της αυξάνει το προσδόκιμο ζωής στους 11-20 μήνες. Επειδή, όπως προαναφέρθηκε, η διάγνωση είναι συνήθως αργοπορημένη και ο παγκρεατικός καρκίνος είναι έντονα μεταστατικός, το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών εμφανίζουν ήδη μετάσταση με αποτέλεσμα η επέμβαση να μην είναι αποτελεσματική. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός προεγχειρηματικής θεραπείας (neoadjuvant) και επέμβασης αυξάνουν το προσδόκιμο επιβίωσης του ασθενούς και βελτιώνουν την ποιότητα ζωής. Σκοπός της προεγχειρηματικής θεραπείας είναι να περιορίσει μικρομεταστάσεις και να συρρικνώσει τον όγκο που πρέπει να αφαιρεθεί, καθιστώντας ευκολότερη την επέμβαση. Ωστόσο, οι προεγχειρηματικές θεραπείες, ορισμένες φορές μπορεί να δημιουργήσουν επιπλοκές καθυστερώντας ή καθιστώντας μη εφικτή την εκτομή του όγκου, έχοντας εν τέλει αντίθετα αποτελέσματα. Παράλληλα η ενισχυτική θεραπεία (adjuvant) μετά από εκτομή του όγκου βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση του ασθενούς. (Motoi and Unno n.d.)

Η χημειοθεραπεία θεωρείται άλλη μία θεραπευτική προσέγγιση, κύρια, σε περίπτωση που ο παγκρεατικός καρκίνος έχει δημιουργήσει απομακρυσμένες εστίες. Ένα σχήμα φαρμάκων που χρησιμοποιείται συχνά είναι η χορήγηση λευκοβουρίνης σε συνδυασμό με 5-φλουουρακίλη, ιρινοτεκάνη και οξαλιπλατίνης (FOLFIRINOX). Σε περίπτωση που ο ασθενής δεν μπορεί να δεχτεί συνδυασμό φαρμάκων, η πρώτη επιλογή είναι η γεμισταβίνη. (Chin et al. 2018) Τόσο η γεμισταβίνη όσο και η 5-φλουουρακίλη έχει βρεθεί ότι είναι αποδοτικές για τον παγκρεατικό καρκίνο, με την γεμισταβίνη να είναι αποτελεσματικότερη και να έχει λιγότερες παρενέργειες. Από το 1997 η γεμισταβίνη θεωρείται θεραπεία

πρώτης γραμμής. Έρευνες έδειξαν ότι αύξησε το χρόνο επιβίωσης κατά 1 μήνα σε σχέση με την 5-φλουουροουρακίλη, φτάνοντας τους 5,6 μήνες. Επίσης το 18% των ασθενών έφταναν μέχρι τον ένα χρόνο επιβίωσης. Συνδυασμός άλλων φαρμάκων με την γεμισιταβίνη, δεν έδειξε να βελτιώνει την επιβίωση των ασθενών. (Adamska, Domenichini, and Falasca n.d.)

Το 2011 μία έρευνα έδειξε ότι ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου που λάμβαναν FOLFIRINOX εμφάνιζαν μέσο όρο επιβίωσης τους 11,3 μήνες, ενώ παράλληλα είχαν πιο ποιοτική ζωή σε σχέση με όσους λάμβαναν μονοθεραπεία με γεμισιταβίνη. (Mohammed et al. 2014) Μια άλλη θεραπευτική προσέγγιση αφορά το Nab-paclitaxel, το οποίο είναι ένα νανοσωματίδιο προσδεδεμένο σε αλβουμίνη albumin-bound με paclitaxel που αναπτύχθηκε με σκοπό την αποφυγή των αντιδράσεων που προκαλούνται από τους διαλύτες στους οποίους διαλύονται οι αντικαρκινικοί παράγοντες, καθώς το paclitaxel είναι δυσδιάλυτο και μεταφέρεται δύσκολα στο στόχο. Σε κλινικές δοκιμές βρέθηκε ότι ο συνδυασμός του paclitaxel και της γεμισιταβίνης αύξανε τα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τη μονοθεραπεία με γεμισιταβίνη (Mohammed et al. 2014).

Τέλος ως θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ραδιοθεραπεία κατά την οποία χρησιμοποιούνται ακτίνες Χ με σκοπό την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Όσον αφορά την ανοσοθεραπεία, φαίνεται πως δεν είναι αποτελεσματική έως σήμερα καθώς ο παγκρεατικός καρκίνος δεν αποτελεί ανοσογενικό immunogenic τύπο καρκίνου και το μικροπεριβάλλον των όγκων θεωρείται ότι δημιουργεί μία ανοσοκαταστολή η οποία δεν επιτρέπει την επιτυχημένη ανοσοθεραπεία (Springfeld et al. 2019).

Συμπερασματικά, η χειρουργική εκτομή, όταν αυτή είναι δυνατή, ο συνδυασμός της με προεγχειρηματικές και ενισχυτικές θεραπείες και η χρήση γεμισιταβίνης, FOLFIRINOX και Nab-paclitaxel αποτελούν τις βασικές θεραπευτικές προσεγγίσεις, οι οποίες έως σήμερα δεν έχουν καταφέρει να αντιμετωπίσουν τον παγκρεατικό καρκίνο, αλλά βελτιώνουν και αυξάνουν, σε μικρό βαθμό, την επιβίωση των ασθενών.

### **A.3 Σιραμεσίνη και καρκίνος**

#### **A.3.1 Σίγμα υποδοχείς**

Οι σίγμα υποδοχείς είναι πρωτεΐνες οι οποίες απασχολούν τους επιστήμονες τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της ποικιλομορφίας τους, της διαφορικής έκφρασης τους σε πλήθος καρκινικών κυτταρικών σειρών καθώς και των δυνητικά θεραπευτικών προσδετών τους. (Jaster 2004)

Το 1976 φαρμακολογικές μελέτες των οπιοειδών και διαφόρων οπιούχων ενώσεων οδήγησαν στην εύρεση 3 διαφορετικών υποτύπων οπιοειδών υποδοχέων. Στους  $\mu$  ( $\mu$ ) τους  $\kappa$  ( $\kappa$ ) και τους  $\sigma$  ( $\sigma$ ). Συνεπώς, αρχικά θεωρούταν ότι οι σίγμα υποδοχείς ανήκουν στην ομάδα των οπιοειδών υποδοχέων. Ωστόσο πειράματα με ραδιοσημασμένους προσδέτες έδειξαν ότι τα σημεία πρόσδεσης των  $\sigma$  υποδοχέων διέφεραν από τους υποδοχείς των οπιοειδών, εισάγοντάς τους σε μία ξεχωριστή ομάδα υποδοχέων. (Gilbert and Martin 1976)

Οι  $\sigma$  υποδοχείς δεν προσδένονται σε κλασικούς οπιοειδείς προσδέτες όπως η ναλοξόνη, η ετορφίνη και οι (-)βενζομορφίνες. Αντιθέτως εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για τις (+)βενζομορφίνες καθώς και για άλλα μικρά μόρια με παρόμοιες δομές (HR and AC 2019). Η χρήση του ραδιοσημασμένου  $\sigma$  προσδέτη [ $^3\text{H}$ ](+)-πενταζοσίνη (pentazocine) οδήγησε στην ταυτοποίηση δυο ξεχωριστών θέσεων πρόσδεσης των σίγμα υποδοχέων. Η πρώτη θέση ονομάστηκε  $\sigma_1$  και η δεύτερη  $\sigma_2$ . Σίγηση του γονιδίου του  $\sigma_1$  υποδοχέα έδειξε ότι ο  $\sigma_2$  υποδοχέας προέρχεται από διαφορετικό γονίδιο (Colabufo et al. 2006) Βρέθηκε ότι και οι δύο θέσεις εμφάνιζαν υψηλή συγγένεια για τη διτολυλγουανιδίνη (ditolylguanidine - DTG) και την αλοπεριδόλη (haloperidol), όμως ο  $\sigma_2$  υποδοχέας δεν συνδεόταν με τις (+)βενζομορφίνες. (MS et al. 2008) Επίσης προσδιορίστηκε μία φαρμακοφόρος δομή προσδετών (Pharmacophore: η χημική δομή που είναι υπεύθυνη για τις εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις) η οποία βρέθηκε να εμφανίζει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης στο σίγμα 1 υποδοχέα. (RA 2005) (Hellewell and Bowen 1990)

Όσον αφορά τον υποδοχέα  $\sigma_1$ , αποτελεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 26 kDa η οποία εντοπίζεται κυρίως στη μεμβράνη ΕΔ που σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια (mitochondrion-associated membrane- MAM) των κυττάρων σε πληθώρα ιστών όπως της καρδιάς, του ήπατος, του παγκρέατος και του κεντρικού νευρικού συστήματος. (Miserocchi et al. 2017) Ο  $\sigma_1$  υποδοχέας δρα ως πρωτεΐνη-συνοδός (chaperone) σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα με την ανοσογλοβίνη πρωτεΐνη-συνοδό (BiP) και φαίνεται πως ο ρόλος της είναι να προστατεύει το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται μέσω του ΕΔ. (Schmidt and Kruse 2019)

Ο σίγμα 1 υποδοχέας θεωρείται δυνητικός θεραπευτικός στόχος για τη διαχείριση του πόνου, για διάφορες νευρολογικές παθήσεις όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, ασθένειες του αμφιβληστροειδούς, ισχαιμικό εγκεφαλικό και εθισμό στο αλκοόλ και τα ναρκωτικά, καθώς και για τον καρκίνο. (Schmidt and Kruse 2019) Οι προσδέτες των σίγμα υποδοχέων βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία του νευροπαθητικού πόνου λόγω χημειοθεραπειών, της νόσου Alzheimer και του ισχαιμικού εγκεφαλικού. (Davidson et al. 2017)

### **A.3.2 Σ2 υποδοχείς**

#### **A.3.2.1 Ταυτοποίηση σ2 υποδοχέων**

Οι σ2 υποδοχείς ανακαλύφθηκαν το 1990 κατά τη διάρκεια σκιαγράφησης καρκινικών κυτταρικών σειρών και προσδιορίστηκαν ως θέσεις πρόσδεσης με υψηλή συγγένεια για το DTG και την αλοπεριδόλη, όχι όμως για τις (+) βενζομορφίνες. Από τότε αποτελούν ερευνητικό ενδιαφέρον ως θεραπευτικός στόχος για τον καρκίνο και νευρολογικές ασθένειες.

Αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μοριακού βάρους 18-22 kDa, όμως μέχρι πρόσφατα το γονίδιο που τις κωδικοποιεί παρέμενε άγνωστο. (Georgiadis et al. n.d.) Συγκεκριμένα, το 2011 ο σ2 υποδοχέας προσδιορίστηκε ως υποδοχέας της προγεστερόνης PGRMC1 (membrane-associated progesterone receptor membrane component). (J. Xu et al. 2011). Η έρευνα αυτή βασιζόταν σε δύο βασικά στοιχεία. Το πρώτο ήταν ότι ένας σημασμένος σ2 προσδέτης, ο SW120, είχε την ικανότητα να προσδέεται μη αντιστρεπτά με τον υποδοχέα PGRMC1 στο ήπαρ αρουραίων και το δεύτερο ότι ο σ2 προσδέτης SW120 συνεντοπίζονταν με τον PGRMC1 στο ΕΔ και στα μιτοχόνδρια σε κύτταρα HeLa. Η υπόθεση ότι ο PGRMC1 είναι ο υποδοχέας σ2 ενισχύθηκε με πειράματα όπου χρησιμοποιούταν ραδιοσημασμένοι προσδέτες σε κύτταρα με που υπερέκφραση ή αποσιώπηση του γονιδίου *prgmc1*. Έτσι, παρά τις κάποιες ασάφειες μεταγενέστερες μελέτες λάμβαναν τον PGRMC1 ως σ2 υποδοχέα. (Abatematteo et al. 2021)

Μετ' έπειτα μελέτες κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου *prgmc1* με τεχνικές siRNA και CRSPR/Cas9 καθώς και η υπερέκφραση του, αναίρεσαν τα παραπάνω αποτελέσματα και οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η πρόσδεση του [<sup>3</sup>H]-DTG στους σίγμα 2 υποδοχείς PGRMC1 δεν επηρεάζεται, δηλώνοντας ότι ο υποδοχέας της προγεστερόνης δεν ανήκει στους σ2 υποδοχείς. (Chu et al. 2015)

Το 2017 οι σ2 υποδοχείς ταυτοποιήθηκαν ως η διαμεμβρανική πρωτεΐνη 97 (TMEM97 ή αλλιώς MAC30). Συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός του TMEM97 έγινε μέσω χρωματογραφίας συγγένειας, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένας ειδικός για τους σ2 υποδοχείς προσδέτης, ο [<sup>3</sup>H]-DTG με σκοπό την απομόνωση των συγγενικών πρωτεϊνών από το ήπαρ μοσχαριού. Έπειτα οι υποψήφιες πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν μέσω φασματοσκοπίας μαζών, υπερεκφράστηκαν και παρατηρήθηκε η πρόσδεση τους στον ραδιοσημασμένο προσδέτη DTG. Μόνο η υπερέκφραση της TMEM97 οδήγησε σε αυξημένη πρόσδεση του προσδέτη, ενώ η αποσιώπηση του μείωνε την πρόσδεση αντίστοιχα. Αντιθέτως αλλαγές στην έκφραση της PGRMC1 δεν επηρέαζε την πρόσδεση του DTG, επιβεβαιώνοντας ότι η πρωτεΐνη TMEM97 και ο σ2 υποδοχέας είναι ταυτόσημοι. (Alon et al. 2017)

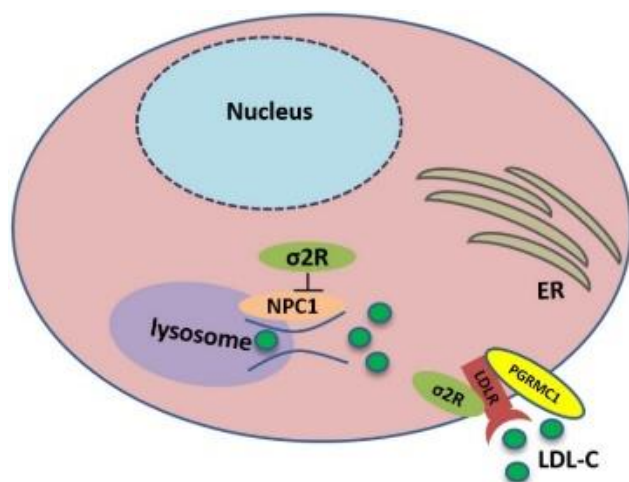
Με σκοπό την ταυτοποίηση των θέσεων του σ2 υποδοχέα οι οποίες συνδέονται με τους προσδέτες, ο Alon και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν πειράματα στα οποία





Στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα η σύνθεση της χοληστερόλης είναι αυξημένη, με σκοπό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κυρίως αυξάνεται η πρόσληψη χοληστερόλης και όχι τόσο η de novo σύνθεση της, κάτι που απαιτεί λιγότερη κατανάλωση σε ATP. Ωστόσο η δράση της φαίνεται να είναι αρκετά πολύπλοκη, καθώς σε ορισμένους καρκινικούς τύπους φαίνεται να συμβάλει στην εξέλιξη του καρκίνου ενώ σε άλλους έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων μέσω των προ-αποπτωτικών επιδράσεων λόγω της υπερέκφρασης των ROS και της αύξησης ασβεστίου. (Yang et al. 2020)

Ένας δεύτερος ρόλος του  $\sigma 2$  υποδοχέα, βάσει ερευνών, αναφέρει ότι ο TMEM97 είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται με την πρωτεΐνη Niemann-pick C1 (NPC1), η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταφορά της χοληστερόλης εκτός των λυσοσωμάτων. (Bartz et al. 2009) Η αποσιώπηση του TMEM97 φάνηκε να οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της NPC1 μειώνοντας της συσσώρευση της χοληστερόλης και αποκαθιστώντας έτσι τη μεταφορά της εκτός των λυσοσωμάτων. (Ebrahimi-Fakhari et al. 2016)



Εικόνα 8: Ο ρόλος των  $\sigma 2$  υποδοχέων

(Yang et al. 2020)

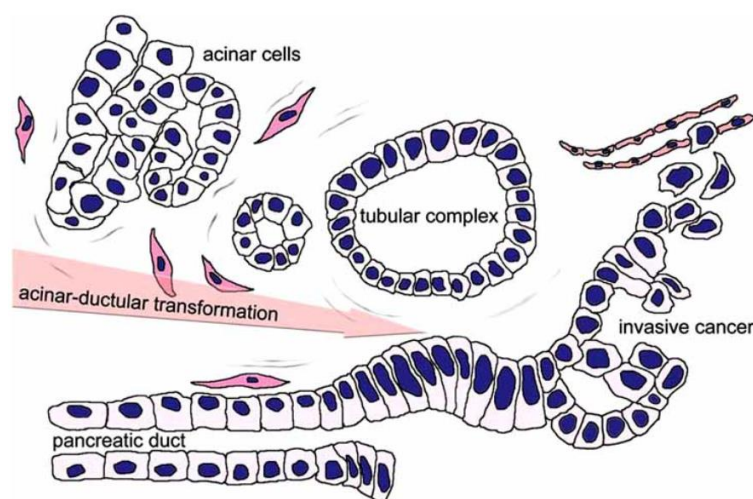
### **A.3.2.3 Επίπεδα έκφρασης των $\sigma 2$ υποδοχέων**

Έχει βρεθεί ότι οι σίγμα υποδοχείς εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες σε πλήθος καρκινικών κυτταρικών σειρών, καθιστώντας τους πιθανούς θεραπευτικούς στόχους καθώς και δείκτες διάγνωσης.

Ο TMEM97 εκφράζεται τόσο σε φυσιολογικά κύτταρα όσο και σε καρκινικά, έχει βρεθεί ότι σε καρκίνους του μαστού, του οισοφάγου, των πνευμόνων, του προστάτη εμφανίζει αυξημένη έκφραση ενώ στο μελάνωμα, στον παγκρεατικό και νεφρικό καρκίνο η έκφραση είναι μειωμένη. (Kayed et al. 2004) Συγκεκριμένα τα πρώτα καρκινικά κύτταρα στα οποία βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα έκφραση σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά ήταν του μελανώματος. Επίσης, παρατηρήθηκε

ότι οι  $\sigma 2$  υποδοχείς εκφράζονται σε υψηλότερο βαθμό στα καρκινικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ή είναι μεταστατικά σε σχέση με αυτά που είναι αδρανή. (Zeng, Weng, Schneiderjr, et al. 2019)

Όσον αφορά τους παγκρεατικούς καρκίνους, είναι γνωστό ότι ο αυξητικός παράγοντας TGF- $\beta$  υπερεκφράζεται. Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι στα διαφορετικά ήδη παγκρεατικού καρκίνου ο TGF- $\beta$  ρυθμίζει διαφορετικά την έκφραση του TMEM97, για παράδειγμα στην καρκινική σειρά PANC-01 η έκφραση του μειώνεται. Επίσης στους ιστούς του παγκρεατικού καρκίνου ο TMEM97 εκφράζεται έντονα σε σωληνοειδή σύμπλοκα (tubular complexes) – δομή πλακωειδών ή κυβοειδών κυττάρων που δημιουργούν μία κοιλότητα όπως φαίνεται και στην (Εικόνα 9) και δημιουργούνται κατά τον τραυματισμό του παγκρέατος, ενώ η έκφραση του είναι ελάχιστη σε κύτταρα του πρωταρχικού όγκου καθώς και σε μεταστάσεις. (Riad et al. 2018), (Wang, Rosenberg, and Scott 2005)



Εικόνα 9: Δομή σωληνοειδών συμπλόκων

(Progression model of PDAC development from pancreatic intraepithelial... | Download Scientific Diagram n.d.)

Συνεπώς, βγαίνει το συμπέρασμα πως τα επίπεδα έκφρασης του TMEM97 εξαρτώνται από τον τύπο του καρκίνου αλλά και από το στάδιο, ενώ τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσουν σε συσχέτιση με την εμφάνιση, την ανάπτυξη του όγκου ή/και τη μετάσταση.

### **A.3.3 $\Sigma 2$ προσδέτες**

Μεγάλο είναι το ενδιαφέρον των επιστημόνων για τους  $\sigma 2$  υποδοχείς ως ενδεχόμενοι θεραπευτικοί στόχοι για τον καρκίνο καθώς και διαγνωστικοί δείκτες. Οι  $\sigma 2$  προσδέτες φαίνεται ότι μπορούν να μειώσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να καταστείλουν την ανάπτυξη του όγκου και να προκαλέσουν θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Προσδέτες των  $\sigma 2$  υποδοχέων φαίνεται να είναι οι μορφίνες, οι βενζαμίδες, οι κυκλοεξυλ-πιπεραζίνες και οι ινδόλες (σιραμεσίνη και

παρόμοιες ενώσεις). Παρ' αυτά η φαρμακολογική δράση των  $\sigma_2$  προσδετών παραμένει άγνωστη. (Abatematteo et al. 2021)

Δεν έχουν βρεθεί ενδογενείς προσδέτες ούτε των  $\sigma_1$  ούτε των  $\sigma_2$  υποδοχέων. Παρ' όλα αυτά έχουν αναπτυχθεί αρκετοί προσδέτες των  $\sigma_2$  υποδοχέων, ωστόσο ο προσδιορισμός τους ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές δεν είναι ξεκάθαρος. Οι αγωνιστές και οι ανταγωνιστές των  $\sigma_2$  υποδοχέων προκαλούν διαφορετικά αποτελέσματα. Ο Zeng και η ομάδα του πιστεύουν ότι ως αγωνιστές θεωρούνται οι προσδέτες που εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα. (Zeng et al. 2014a). Οι αγωνιστές έχουν αντιπολλαπλασιαστικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες σε καρκινικά κύτταρα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Εγείρουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω πληθώρας διαφορετικών μονοπατιών όπως του εξαρτώμενου από την κασπάση, της παραγωγής ROS και της αυτοφαγίας.

Όσον αφορά τους  $\sigma_2$  ανταγωνιστές δεν είναι γνωστός ούτε ο ρόλος τους αλλά ούτε και το κριτήριο διαχωρισμού τους από τους αγωνιστές. Ωστόσο ο Zeng και η ομάδα τους κάνουν τη διάκριση με βάση την κυτταροτοξικότητα που προκαλούν συγκριτικά με τη σιραμεσίνη, τον ισχυρότερο  $\sigma_2$  αγωνιστή προσδέτη. Έτσι προκύπτει ότι αν η κυτταροτοξικότητα του προσδέτη εμφανίζει >90% ομοιότητα με αυτή της σιραμεσίνης τότε ο προσδέτης θεωρείται αγωνιστής. Αν η κυτταροτοξικότητα είναι μεταξύ 10%-90% ο προσδέτης θεωρείται μερικώς αγωνιστής, ενώ αν η κυτταροτοξικότητα είναι <10% ο προσδέτης θεωρείται ανταγωνιστής (Zeng et al. 2014b)

Ως προς τη φαρμακολογική τους δράση, θεωρείται ότι οι  $\sigma_2$  προσδέτες στοχεύουν στην ομοίωση της χοληστερόλης με σκοπό την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων.

Επιπρόσθετα, είναι γνωστό, ότι στα καρκινικά κύτταρα η χοληστερόλη μπορεί να δημιουργήσει λιπιδικές σχεδίες και να ενεργοποιήσει πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών προωθώντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Οι λιπιδικές σχεδίες έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την ρευστότητα της μεμβράνης καθώς και να επηρεάζουν την μεταγωγή σήματος. Οι σιγμα2 προσδέτες μπορούν να αποδιοργανώσουν τις λιπιδικές σχεδίες μέσω μετατόπισης των μορίων χοληστερόλης, η μείωση της χοληστερόλης από τις λιπιδικές σχεδίες ενισχύει τον αποπτωτικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων. (Riad et al. 2018) Γενικά, έχει βρεθεί ότι η κυτταροτοξικότητα των  $\sigma_2$  προσδετών συνδέεται με ενεργοποίηση κασπασών, παραγωγή μιτοχονδριακών υπεροξειδίων και την ενεργοποίηση κασπασών καθώς και ενεργοποίηση των μη εξαρτώμενων από το p53 και την κασπάση αποπτωτικών μονοπατιών. (Abatematteo et al. 2021)

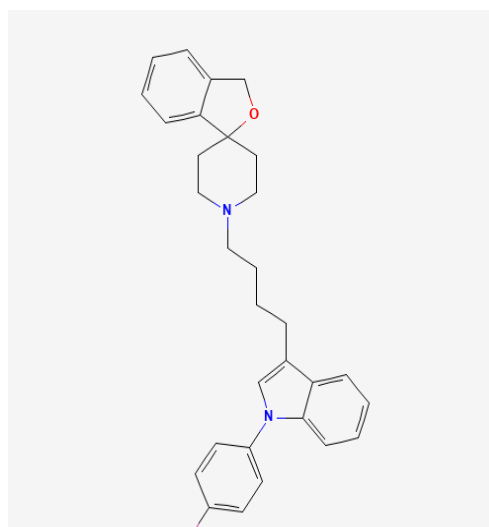
Ένα παράδειγμα κυτταροτοξικής δράσης  $\sigma_2$  προσδετών αφορά τον SW43. Συγκεκριμένα, χορηγήθηκε σε εγκαθιδρυμένες ανθρώπινες παγκρεατικές καρκινικές σειρές BxPC3, AsPC1, Cfrac, Panc1, and MiaPaCa-2 σε συνδυασμό με την ήδη χρησιμοποιούμενη γεμισταβίνη και βρέθηκε να αυξάνει τα επίπεδα απόπτωσης σε σχέση με μονοθεραπεία. Όσον αφορά *in vivo* πειράματα, συγχορήγηση

γεμισταβίνης με τον σ2 προσδέτη SW43 έδειξε να μειώνει το μέγεθος του όγκου σε αρουραίους. Ενώ παράλληλα μέσω παθολογικής και ιστολογικής εξέτασης οργάνων των αρουραίων βρέθηκε ότι οι σ2 προσδέτες εμφανίζουν ελάχιστη τοξικότητα. (Hornick et al. 2010) Συμπερασματικά μέσω των μελετών αυτών, οι οποίες δείχνουν την ικανότητα των σ2 προσδετών να επάγουν το θάνατο καρκινικών κυττάρων αλλά παράλληλα να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα, καθιστά τους προσδέτες αυτούς εν δυνάμει αντικαρκινικές θεραπείες.

Όπως προαναφέρθηκε, έρευνες έχουν δείξει ότι οι σ2 προσδέτες έχουν αντικαρκινική δράση πυροδοτώντας τον καρκινικό θάνατο μέσω λυσοσωμικής και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, παραγωγής ROS και γεγονότων εξαρτώμενων και μη του μονοπατιού της κασπάσης. Ωστόσο δεν είναι γνωστό πως αλληλεπιδρούν με τους σ2 υποδοχείς. Πρόσφατα ο Zeng και η ομάδα του απέδειξαν ότι η αποσιώπηση των TMEM97 και PGRMC1 δεν επηρεάζει την κυτταροτοξικότητα των σ2 προσδετών. Δηλαδή ότι η κυτταροτοξική δράση των σ2 προσδετών δεν μεσολαβείται αποκλειστικά από τους σ2 υποδοχείς. (Zeng, Riad, and Mach 2020)

#### **A.3.4 Σιραμεσίνη**

Η σιραμεσίνη (Lu 28–179) αρχικά σχεδιάστηκε ως αγωνιστής του υποδοχέα 5-HT1A της σεροτονίνης για τη θεραπεία αγχώδων διαταραχών και της κατάθλιψης. Όμως οι κλινικές δοκιμές ακυρώθηκαν λόγω της έλλειψης αποτελεσματικότητας στους ανθρώπους, ωστόσο βρέθηκε ότι έχει την ικανότητα να προσδένεται σε μικρό βαθμό στους σ2 υποδοχείς. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναλόγων σιραμεσίνης τα οποία είχαν μεγαλύτερη συγγένεια και επιλεκτικότητα στους σ2 υποδοχείς. Πλέον η σιραμεσίνη αποτελεί έναν σ2 αγωνιστή σ2 υποδοχέων ο οποίος βρέθηκε ότι έχει αντικαρκινική δράση σε ποντικούς. (Ostenfeld, Fehrenbacher, Hoyer-Hansen, et al. 2005)



Εικόνα 9: Σιραμεσίνη η Siramesine η Lu 28–179 (10-[4-[1-(4-fluorophenyl)-1H-indol-3-yl]-1-butyl]-spiro[isobenzofuran-1(3H),40-piperidine])

Ο Ostenfeld και η ομάδα του, το 2005 ανακάλυψε ότι η σιραμεσίνη προκαλούσε αποπτωτικό θάνατο ανεξάρτητο της κασπάσης, με πρώτο γεγονός την συμπύκνωση της χρωματίνης και έπειτα τη διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης, σε εγκαθιδρυμένες καρκινικές σειρές του μαστού (MCF7) και στην καρκινική σειρά HeLa. Παρατήρησαν ότι η σιραμεσίνη πυροδοτεί την απελευθέρωση καθεψινών στο κυτοσόλιο οδηγώντας στον θάνατο του κυττάρου. Παράλληλα οδήγησε στην

αποσταθεροποίηση της μεμβράνης των λυσοσωμάτων και εν τέλει στη λύση των κυττάρων όπου συμμετέχουν και οι ελεύθερες ρίζες ROS οι οποίες παράγονται σε άλλα διαμερίσματα του κυττάρου. (Ostenfeld, Fehrenbacher, Høyer-Hansen, et al. 2005)

Το 2013 ο Cesen και η ομάδα του έδειξαν ότι η σιραμεσίνη προκαλεί αποσταθεροποίηση των μιτοχονδριακών μεμβρανών και κατ' επέκταση λύση των μιτοχονδρίων οδηγώντας στο θάνατο των καρκινικών κυττάρων, σε πληθώρα καρκινικών σειρών όπως HeLa, MCF-7, U-87MG, HaCat. Πιο συγκεκριμένα η σιραμεσίνη προκαλεί ταχεία απώλεια του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ROS καθώς σε αυτά πραγματοποιείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση με σκοπό την παραγωγή ATP. Έτσι η αποσταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο των ROS και του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα προκαλώντας οξειδωτικό στρες και οδηγώντας το κύτταρο σε θάνατο. Συμπερασματικά θεώρησαν ότι η σιραμεσίνη δεν οδηγεί η ίδια σε παραγωγή των ROS, αλλά αυτή προκαλείται λόγω της αποσταθεροποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης. (Hafner et al. 2013).

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα του Jaattela και της ομάδας του, τα οποία αναφέρουν ότι στις καρκινικές σειρές MCF-7 και U2OS (human osteosarcoma) η σιραμεσίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω της αποσταθεροποίησης της λυσοσωμικής μεμβράνης η οποία προκαλείται από την αύξηση του λυσοσωμικού pH λόγω της συσσώρευσης της σιραμεσίνης στα λυσοσώματα. (Ostenfeld, Fehrenbacher, Høyer-Hansen, et al. 2005)

Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο  $\sigma^2$  προσδέτης σιραμεσίνη προκαλεί θάνατο ορισμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού μέσω φερόπτωσης, λόγω της διατάραξης της μεταφοράς σιδήρου που οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή ROS (Ma et al. 2016)

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη της *in vitro* αντικαρκινικής δράσης της σιραμεσίνης, ενός σ2 αγωνιστή προσδέτη των σ2 υποδοχέων στον καρκίνο του παγκρέατος. Στόχος των πειραμάτων που έλαβαν χώρα ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της σιραμεσίνης στην εγκαθιδρυμένη παγκρεατική καρκινική σειρά PANC-01, καθώς επίσης και η εύρεση της φάσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία αυτή δρα.

### **B.1 Κυτταροκαλλιέργειες**

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες (ή φλάσκες) εμβαδού 25 cm<sup>2</sup> ή 75cm<sup>2</sup>, ώσπου να δημιουργήσουν μονόστιβο ταπήτιο και να καλύψουν το 80% της επιφάνειάς τους, παρουσία:

- θρεπτικού υλικού RPMI 1640 (Gibco, code: 2194780)
- 5% αδρανοποιημένου ορού εμβρύου βοοειδούς (Fetal bovine serum,) PanBiotech
- 1% αντιβιοτικών πενικιλίνης- στρεπτομυκίνης (Pen-Strep) (Gibco, code: 2145465)
- 1% L-γλουταμίνης (L-glutamine 200mM, Gibco, code: 2145465).

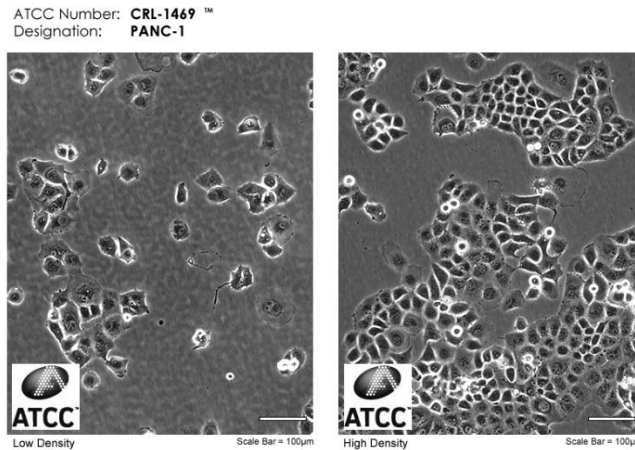
Το πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας φυλάσσεται στους 4 °C.

Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και η επώασή τους έγινε σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας, 37°C, με σταθερή παροχή CO<sub>2</sub> 5%.

#### **Παγκρεατική καρκινική σειρά PANC-01**

Η καρκινική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση της παρούσης εργασίας είναι η παγκρεατική καρκινική κυτταρική σειρά PANC-01 η οποία προμηθεύτε από την ATCC (American Type Culture Collection). (Εικόνα 10) και διατηρείται αποθηκευμένη στο εργαστήριο στους -80 °C. Η σειρά αυτή απομονώθηκε από έναν καυκάσιο άνδρα ηλικίας 56 ετών με αδenoκαρκίνωμα στη κεφαλή του παγκρέατος το οποίο είχε διηθήσει το τοίχωμα του δωδεκαδακτύλου. Συμπερασματικά αποτελεί μια κυτταρική σειρά αδenoκαρκινώματος του πόρου και αφορά την εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος. (Deer et al. 2010)

Πιο ειδικά, τα PANC-01, μετά από αλληλούχηση του γονιδιώματος τους βρέθηκε να φέρουν ορισμένες μεταλλάξεις με μία από αυτές να αφορά το γονίδιο K-RAS μια ετερόζυγη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 (p.G12D; GGT > GAT) (Gradiz et al. 2016). Επιπροσθέτως, η εγκαθαρδυμένη καρκινική σειρά PANC-01 εμφανίζει μία σταθερότητα στην ανάπτυξη της ακόμα και σε μικρό αριθμό κυττάρων καθιστώντας την ιδανική για τη χρήση της σε πληθώρα πειραματικών μεθόδων.



Εικόνα 10: Φωτογραφίες από κυτταρική καλλιέργεια της παγκρεατικής καρκινικής σειράς PANC-01, σε μικρή συγκέντρωση κυττάρων (αριστερά) και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση κυττάρων (δεξιά) (PANC-1 | ATCC n.d.)

Η παγκρεατική καρκινική σειρά PANC-01 μαζί με κάποιες άλλες καρκινικές παγκρεατικές σειρές, εμφάνισαν απόκριση στην σιραμεσίνη ύστερα από μελέτες του εργαστηρίου μας.

### Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Αποτελεί μία διαδικασία κατά την οποία απομακρύνεται ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων όταν η πυκνότητα μιας φιάλης καλλιέργειας κυττάρων προσέγγιζε 80% της χωρητικότητάς της, τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται για να αποφευχθεί η αναστολή του ρυθμού του πολλαπλασιασμού. Η αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φιάλης καλλιέργειας γινόταν με επίδραση του ενζύμου θρυψίνης (0,025% Trypsin/EDTA, Gibco, Life technologies). Η διαδικασία θρυψινοποίησης που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από τη φιάλη καλλιέργειας
2. Πλύση των κυττάρων με φυσιολογικό ορό NaCl 0,9% w/v με σκοπό την απομάκρυνση του μέσου ώστε να δράσει η θρυψίνη
3. Προσθήκη 1-2 ml διαλύματος θρυψίνης και επώαση για 5' εντός του κλιβάνου ή μέχρι να γίνει πλήρης αποκόλληση των κυττάρων
4. Προσθήκη 2 ml θρεπτικού μέσου που περιέχει ορό ( για απενεργοποίηση της θρυψίνης).
5. Επανεπιλημμένη αναρρόφηση για τη διάσπαση των συσσωματωμάτων.
6. Καταμέτρηση κυττάρων. Για κάθε ανακαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν περίπου 100.000 κύτταρα ανά ml πλήρους θρεπτικού μέσου, εκτός από τις περιπτώσεις που τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε ειδικά πειράματα.



7. Τοποθέτηση της φιάλης καλλιέργειας στον κλίβανο-επωαστήρα (incubator). Μετά από 24 ώρες γίνεται έλεγχος της καλλιέργειας στο μικροσκόπιο και παρακολούθηση ανάπτυξης μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

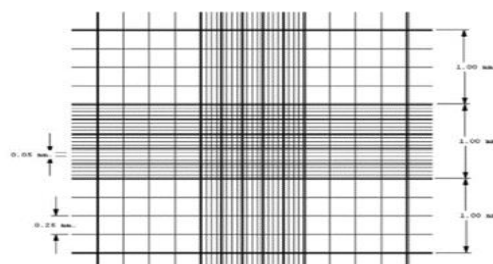
#### Μέτρηση πλήθους κυττάρων / ποσοστού βιωσιμότητας κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έγινε με χρήση αιμοκυτταρομέτρου (haemocytometer) NEUBAUER και ανάστροφου μικροσκοπίου. Ο εντοπισμός των νεκρών κύτταρων έγινε με χρήση της χρωστικής κυανού του τρυπανίου. Γενικά, αποκλείονται από την χρώση τα ζωντανά κύτταρα και βάζονται αυτά των οποίων έχει διαρραγεί η κυτταροπλασματική τους μεμβράνη (trypan blue dye exclusion).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Αποκόλληση κυττάρων από την φιάλη καλλιέργειας με διάλυμα θρυψίνης, απενεργοποίηση της δράσης της θρυψίνης με θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό, φυγοκέντρηση των κυττάρων και απόχωση υπεκειμένου.
2. Επαναιώρηση κυττάρων σε 2ml θρεπτικού μέσου.
3. Λήψη δείγματος κυττάρων και προσθήκη σε διάλυμα χρωστικής κυανού του τρυπανίου (10μl trypan blue + 90 μl ελαιωρήματος κυττάρων). Χρόνος αναμονής:5'.
4. Τοποθέτηση ποσότητας 20μl του διαλύματος των κυττάρων και της χρωστικής, ύστερα από καλή ανάδευση, για καταμέτρηση μεταξύ του αιματοκυτταρομέτρου Neubauer και της καλυπτρίδας.
5. Καταμέτρηση των κυττάρων του δείγματος με χρήση μικροσκοπίου.

Η πλάκα Neubauer αποτελείται από 4 τεταρτημόρια που περιβάλλονται από μία έντονη γραμμή και έναν κεντρικό σταυρό. Η μέτρηση αφορά τα κύτταρα που βρίσκονται μέσα στα τεταρτημόρια αυτά. Έπειτα βγαίνει μέσος όρος των κυττάρων από τα 4 τεταρτημόρια που μετρήθηκαν. Για να γίνει υπολογισμός κυττάρων σε 1μl δείγματος που προέκυψε από την ανακαλλιέργεια ο αριθμός που βρέθηκε πολλαπλασιάζεται με το  $10^4$  από τον τύπο του και πολλαπλασιάζεται με το 10 λόγω της αραιώσης του δείγματος 10:1 δείγμα προς χρωστική.



Εικόνα 11 Πλάκα Neubauer

([http://users.teiath.gr/petef/Web\\_Lessons/Eydojos/Eydojos\\_Sperm\\_Analysis\\_Lab/Sperm\\_analysis\\_Lab.pdf](http://users.teiath.gr/petef/Web_Lessons/Eydojos/Eydojos_Sperm_Analysis_Lab/Sperm_analysis_Lab.pdf))

Τα ζωντανά κύτταρα φαίνονται στο μικροσκόπιο "στρογγυλά και φωτεινά" ενώ το κυτταρόπλασμα των νεκρών κυττάρων βάφεται μπλε. Το πλήθος των κυττάρων ανά ml προκύπτει από την χρήση του τύπου:

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων/ml} = N * K * 10^4,$$

όπου N: ο μέσος όρος κυττάρων που μετρήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο

K: η αραιώση δείγματος κυττάρων με την χρωστική ουσία.

Η βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού του δείγματος υπολογίζεται ως εξής:  
Βιωσιμότητα % = (συνολικός αριθμός αχρωμάτιστων- ζωντανών κυττάρων/ συνολικός αριθμός κυττάρων) x 100 .

### Κατάψυξη κυττάρων

Η μακροπρόθεσμη διατήρηση των κυττάρων είναι δυνατή με την ψύξη τους, σε θερμοκρασίες μεταξύ  $-80^{\circ}\text{C}$  και  $-175^{\circ}\text{C}$ . Με στόχο να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων, καταψύχονται παρουσία διμέθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO το οποίο δρα ως κρυοπροστατευτικό).

Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Αποκόλληση κυττάρων από την φιάλη καλλιέργειας με διάλυμα θρυψίνης, απενεργοποίηση δράσης θρυψίνης με θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό, φυγοκέντρηση κυττάρων και απόχρηση υπερκειμένου.
2. Επαναιώρηση κυττάρων σε 10% DMSO + 90% FBS το οποίο αποτελεί το θρεπτικό μέσο
3. Μεταφορά του διαλύματος κυττάρων σε αποστειρωμένα φιαλίδια κατάλληλα για υψηλή κατάψυξη (cryovials).
4. Αποθήκευση των κυττάρων στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , αφού πρώτα τοποθετηθούν σε δοχείο ισοπροπανόλης ώστε να αποφευχθεί η απότομη ψύξη που θα οδηγούσε τα κύτταρα σε στρες και κατ' επέκταση θάνατο.

### Απόψυξη κυττάρων

Όπως προαναφέρθηκε το πρώτο βήμα για την διεκπεραίωση των πειραμάτων ήταν η μεταφορά της κυτταρικής σειράς από τις συνθήκες αποθήκευσης ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Πιο συγκεκριμένα η διαδικασία του απόψυξης των κυττάρων είναι η εξής:

1. Απομάκρυνση τους από το ειδικό φιαλίδιο (cryovial), όπου φυλάσσονται τα κύτταρα, από την κατάψυξη

2. Προσθήκη ποσότητας καλλιεργητικού μέσου, με προσοχή, μόλις ξεπαγώσουν τα κύτταρα
3. Φυγοκέντρηση στις 900 στροφές για 5 λεπτά
4. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
5. Προσθήκη 14ml καλλιεργητικού μέσου στο ίζημα και επαναιώρηση
6. Μεταφορά στη φλάσκα T75 (75cm<sup>2</sup> επιφάνειας)

Απομάκρυνση του θρεπτικού, την επόμενη μέρα και προσθήκη εκ νέου, με σκοπό την απομάκρυνση οποιασδήποτε ποσότητας DMSO καθώς και νεκρών κυττάρων που δεν προσκολλήθηκαν στη φλάσκα.

Το DMSO αποτελεί το μέσο το οποίο χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία παγώματος των κυττάρων. Πραγματοποιούταν ανανέωση του καλλιεργητικού μέσου κάθε 2-3 ημέρες με απομάκρυνση του παλιού μέσου και προσθήκη νέου ίδιας ποσότητας.

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραματικών διεργασιών είναι τα εξής:

- DMSO (Dimethyl Sulfoxide for cell culture) (PanReac Applichem, code: A3672,0250)
- SRB (Sulforhodamine B) (SIGMA, code: S9012)
- Διάλυμα NaCl (DEMO ABEE, code:2107757)
- Απιονισμένο νερό (DEMO ABEE, code:2006777)
- Trypan Blue (Gibco®, ThermoFisher Scientific, code:15250-061)
- TCA (Trichloroacetic acid) (Applichem, Code: A1431)
- Οξικό οξύ (Fluka: Code: 45731)
- Trizma Base (Sigma, code: T1503-1KG)

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αναλώσιμα:

- Φλάσκες T25 (Thermo Scientific, Code:169389)
- Πιπέτες 5 ml και 10 ml (Corning Incorporated Costar, Code: 4051)
- Ρύγχοι πιπετών (Diamod, Code:SGBC9/13623)
- Πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 6 θέσεων (Thermo Scientific, Code:171393)
- Πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων (Corning Incorporated Costar, Code: 3599)
- Φιαλίδια (falcon) (Corning code:430921)
- Φιαλίδια του 1,5 ml (Thermo scientific, code:3456)
- Φιαλίδια κατάψυξης (Cryovial) (Corning, code: 430487)

## **B.2 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας με Σουλφοροδαμίνη Β**

Η πρώτη πειραματική διαδικασία που έλαβε χώρα προκειμένου να μελετηθεί η κυτταροτοξικότητα της σιραμεσίνης στα καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα PANC-01 είναι ο έλεγχος κυτταροτοξικότητας. Στη συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται έλεγχος της επίδρασης-τοξικότητας ουσιών σε μικρό χρονικό διάστημα (48 ώρες;).

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής SRB (σουλφοροδαμίνη Β) που είναι μία φθορίζουσα χρωστική να προσδένεται στοιχειομετρικά σε βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών των κυττάρων κάτω από ελαφρώς όξινες συνθήκες. Έτσι η ποσότητα της προσδεδεμένης χρωστικής μπορεί να δώσει πληροφορίες για την πυκνότητα των κυττάρων και κατά συνέπεια για την ανάπτυξη τους. (Voigt 2005) (Vichai and Kirtikara 2006)

### **Πειραματική διαδικασία**

Γίνεται χρήση δύο πιάτων κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Στο πρώτο πιάτο τα κύτταρα επωάζονται με τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου (100/10/1/0,1 μΜ) triplicates ώστε να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Στο ίδιο πιάτο αναπτύσσονται δείγματα ελέγχου τα οποία αφορούν μόνο κύτταρα και το θρεπτικό υλικό απουσία της σιραμεσίνης. Σε ένα δεύτερο πιάτο αναπτύσσονται κύτταρα για τον υπολογισμό TZERO, όπου το πείραμα ολοκληρώνεται τη στιγμή που τοποθετούνται τα φάρμακα στο πρώτο πιάτο, δηλαδή τη χρονική στιγμή 0.

Σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων (96 wells) αναπτύσσονται 5000 κύτταρα / θέση και τοποθετούνται στον κλίβανο για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών και αφού έχουν ελεγχθεί στο μικροσκόπιο

A) προστίθενται τα φάρμακα σε κάθε πηγαδάκι στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

**$C1 \times V1 = C2 \times V2$**  όπου,

C1: η συγκέντρωση του αρχικού φαρμάκου

C2: η τελική επιθυμητή συγκέντρωση της εκάστοτε ουσίας,

V1: η αναγκαία ποσότητα από το αρχικό φάρμακο,

V2: ο τελικός όγκος που θα χρειαστούμε συνολικά.

Οι συγκεντρώσεις προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις από το πιο πυκνό διάλυμα. Στο συγκεκριμένο πείραμα οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 100μΜ, 10μΜ, 1μΜ, 0,1μΜ και 0,01μΜ. Σε κάθε πηγαδάκι γίνεται προσθήκη 100μl της αντίστοιχης συγκέντρωσης της ουσίας ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200μl. Στα δείγματα ελέγχου χρησιμοποιείται 100μl καλλιεργητικού μέσου που δεν φέρει καθόλου ποσότητα φαρμάκου. Στη συνέχεια το πιάτο τοποθετείται στον κλίβανο για 48 ώρες.

B) Όσον αφορά το πιάτο που φέρει τα δείγματα ελέγχου για τη χρονική στιγμή μηδέν (TZERO), αρχικά προστίθενται 100 μl θρεπτικού και απευθείας 50 μl TCA

(Trichloroacetic acid) 50% (Applichem, Code: A1431) το οποίο χρησιμοποιείται για την παύση την ανάπτυξης των κυττάρων- την μονιμοποίηση τους. Μετά την προσθήκη του TCA ακολουθεί επώαση στους 4°C για μία ώρα. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται πλύσεις με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση του και αφού στεγνώσει γίνεται η χρώση.

Αφού περάσουν οι 48 ώρες:

1. Προστίθενται 50μl TCA, όπως έγινε και στα T-ZERO.
2. Γίνεται η χρώση των δύο πιάτων, με την προσθήκη 50μl διαλύματος 0,04% w/v SRB (SIGMA, Code: S9012) σε 1% οξικό οξύ (Fluka: Code: 45731)
3. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Στη συνέχεια ακολουθεί πλύση με οξικό οξύ για την πλήρη απομάκρυνση της χρωστικής.
5. Τα πιάτα αφήνονται να στεγνώσουν καλά
6. Προσθήκη 150 μl από Trizma Base ρυθμιστικού διαλύματος σε συγκέντρωση 10mM
7. Τοποθέτηση των πιάτων για 10 λεπτά στον κλίβανο και για ακόμα 5 λεπτά υπό ανάδευση στην μπαλαρίνα.
8. Μετά το πέρας των 5 λεπτών ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450-540nm σε συσκευή φωτομετρίας microplate reader Biotek microelisa (Biotek, EI-311).

### **B.3 Μέθοδος αναστολής δημιουργίας κλώνων (Clonogenic assay)**

Η μέθοδος αναστολής δημιουργίας κλώνων είναι μία *in vitro* δοκιμή επιβίωσης βραδείας κυτταροτοξικότητας, κατά την οποία γίνεται εκτίμηση του θανάτου των κυττάρων βασιζόμενη στην ικανότητα ενός κυττάρου να αναπτυχθεί και να δώσει μία αποικία. Αναπτύχθηκε το 1950 από τους Ruck and Marcus και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αναπαραγωγικής ικανότητας των κυττάρων. Συγκεκριμένα, προσομοιάζει ισχυρά καρκινικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε έναν οργανισμό καθώς αυτά τα μεμονωμένα και ανθεκτικά κύτταρα σχετίζονται συχνά με την ανοχή στις αντικαρκινικές ουσίες, την ικανότητα τους να δημιουργούν δευτερογενείς όγκους και την επανεμφάνιση του καρκίνου ύστερα από θεραπείας. Η μαθηματική ανάλυση των δεδομένων στηρίζονται στην ικανότητα της πλειονότητας των κυττάρων να δώσει μία αποικία σε περίοδο 10-14 (Backer, Backer, and Chinnaiyan 2011)

#### **Πειραματική διαδικασία**

Αρχικά πραγματοποιείται συλλογή και στρώσιμο κυττάρων όπως στη διαδικασία της SRB. Αυτή τη φορά χρησιμοποιούνται πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 6 θέσεων. Σε κάθε θέση τοποθετούνται 400 κύτταρα. Την πρώτη μέρα πραγματοποιείται το στρώσιμο των κυττάρων με θρεπτικό σε ποσότητα 1ml ανά θέση. Την επόμενη μέρα προστίθεται άλλο 1 ml το οποίο περιέχει την εκάστοτε συγκέντρωση καθώς και από

1 ml καλλιεργητικού μέσου για τα control. Οι συγκεντρώσεις της ουσίας που χρησιμοποιούνται είναι (0,1μM ,0,5μM, 1μM, 5μM και 10μM). Τα πιάτα επωάζονται για μία εβδομάδα στον κλίβανο και στη συνέχεια γίνεται ανανέωση του θρεπτικού με πλήρη απομάκρυνση του παλιού και προσθήκη νέου και στα δείγματα ελέγχου και στα κύτταρα με τις διάφορες συγκεντρώσεις της σιραμεσίνης. Τα πιάτα τοποθετούνται εκ νέου στον κλίβανο για άλλη μια εβδομάδα. Με τον τερματισμό του πειράματος γίνεται μονιμοποίηση με TCA και χρώση με SRB ώστε να γίνουν διακριτές οι αποικίες στη φωτογράφιση των πιάτων, αλλά και με σκοπό την φωτομέτρησή τους για ποσοτικοποίηση των αποικιών που δημιουργήθηκαν.

#### **B.4 Έλεγχος επούλωσης πληγής (Wound healing assay – Scratch assay)**

Η μέθοδος του ελέγχου επούλωσης πληγής αποτελεί μία *in vitro* μέθοδο μελέτης της μετανάστευσης των κυττάρων, δηλαδή της ικανότητα των κυττάρων να μετακινούνται από ένα σημείο σε ένα άλλο. Η μετανάστευση των κυττάρων λαμβάνει χώρα σε πολλές φυσιολογικές συνθήκες όπως κατά την εμβρυονική ανάπτυξη, την επούλωση πληγών, κ.α. ωστόσο συμβαίνει και σε παθοφυσιολογικές συνθήκες όπως κατά την μετάσταση του καρκίνου. (JE et al. 2014)

Αρχικά προκαλείται μία πληγή, εφαρμόζεται ο εκάστοτε υπό μελέτη παράγοντας και παρακολουθείται η μετακίνηση των κυττάρων προς την πληγή αυτή. (Liang, Park, and Guan 2007)

Ωστόσο η διαδικασία χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, καθώς η πληγή πρέπει να κλείνει λόγω μετανάστευσης και όχι λόγω υπερπληθυσμού των κυττάρων, απόρροια του οποίου μπορεί να είναι η διεξαγωγή ψευδών αποτελεσμάτων.

#### **Πειραματική διαδικασία**

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με τη συλλογή και το στρώσιμο των κυττάρων όπως στις διαδικασίες που αναφέρθηκαν. Σε αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιούνται πιάτα 96 θέσεων και σε κάθε θέση τοποθετούνται 20.000 με σκοπό να επιτευχθεί η καλύτερη και αποτελεσματικότερη πληρότητα σε κάθε πηγαδάκι χωρίς όμως τα κύτταρα να αναπτύσσονται το ένα πάνω στο άλλο. Για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιούνται 3 πηγαδάκια ώστε να επιτευχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου, ενώ παράλληλα χρησιμοποιούνται πηγαδάκια για τα δείγματα ελέγχου. Μετά το πέρας 24 ωρών από το στρώσιμο των κυττάρων, χρόνος απαραίτητος για την προσαρμογή των κυττάρων και την προσκόλληση τους στον πυθμένα των πηγαδιών, σε κάθε θέση πραγματοποιείται πληγή με ένα ρύγχος των 200μl. Στη συνέχεια, πολύ προσεκτικά ώστε να μην μετακινηθούν τα κύτταρα και καταστρέψουν την πληγή, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούνται από 2 πλύσεις με χλωριούχο νάτριο ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που

αποκολλήθηκαν κατά το σχηματισμό της πληγής. Έπειτα προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι η σιραμεσίνη στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (0,1μM, 0,5μM, 1μM, 5μM και 10 μM) και φωτογραφίζεται η κάθε θέση. Μετά το πέρας 24 ωρών και 48 ωρών φωτογραφίζονται τα πηγαδάκια εκ νέου και παρατηρούνται οι διαφορές ανάμεσα στις πληγές, από την έναρξη του πειράματος έως την λήξη.

## **B.5 Ανάλυση και ανίχνευση σιραμεσίνης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western**

### **B.5.1 Απομόνωση πρωτεϊνών-Λύματα κυττάρων**

Το πρώτο βήμα πριν την έναρξη της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western είναι η απομόνωση των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος μέσω λύσης των κυττάρων.

#### **Διαδικασία**

1. Προσθήκη του διαλύματος lysis buffer, 60μl για κάθε  $10^6$  κύτταρα.  
Το διάλυμα αυτό αποτελείται από RIPA (RIPA Buffer 10X, Cell signaling #9806S) και αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών. (Phosphate/Protease Inhibitors, pi, Cell signaling #5872S). Οι αναστολείς των πρωτεασών είναι απαραίτητοι ώστε να μην καταστραφούν οι πρωτεΐνες κατά τη λύση των κυττάρων ενώ οι αναστολείς φωσφατασών να μην καταστραφούν οι φωσφορυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών.
2. Επάση δειγμάτων για 30 λεπτά στον πάγο και παράλληλα αναδεύσεις στο vortex κάθε 5 λεπτά ώστε να δράσουν τα ένζυμα που προστέθηκαν.
3. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.
4. Διαλογή του υπερκείμενου και εκ νέου φυγοκέντρηση άλλες 2-3 φορές έως ότου το δείγμα να γίνει πλήρως διαυγές

### **B.5.2 Μέθοδος Bradford: Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης**

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μία χρωματομετρική μέθοδο και βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (PIERCE, code: 20278) να προσδένεται σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και κυρίως στην αργινίνη, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος. Η μέγιστη απορρόφηση όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm όταν παρατηρηθεί αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες. Η ποσότητα της μπλε μορφής είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της ποσότητας μιας πρωτεΐνης και κατ' επέκταση τη κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τη χρήση γνωστών συγκεντρώσεων μιας πρωτεΐνης και κατά κύριο λόγο η αλβουμίνη ορού βόως BSA ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση πρωτεϊνών του άγνωστου δείγματος.

### Διαδικασία κατασκευής πρότυπης καμπύλης

- Διάλυση ποσοτήτων αλβουμίνης από ορό βοός (Bovine Serum Albumine, BSA) από 1μg έως 20μg σε 800 μl ddH<sub>2</sub>O
- Προσθήκη 200 μl χρωστικής Coomassie Brilliant BlueG-250 σε κάθε δείγμα
- Επώαση μείγματος (5 λεπτά, 25 °C)
- Ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
- Μεταφορά των δειγμάτων σε 96 well plate
- Φωτομέτρηση δειγμάτων στα 595 nm
- Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με βάση τις τιμές απορρόφησης των διάφορων συγκεντρώσεων

### B.5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDSPAGE

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιείται με σκοπό τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες με μικρότερο μοριακό βάρος μετακινούνται πιο γρήγορα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος ενώ αυτές που έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος μετακινούνται πιο αργά.

Είναι μία ασυνεχής διαδικασία δηλαδή λαμβάνει χώρα σε δύο διαδοχικά πηκτώματα. Το πρώτο είναι το πήκτωμα πακεταρίσματος, στο οποίο τοποθετούνται οι πρωτεΐνες αποδιατεταγμένες. Εκεί οι πρωτεΐνες πακετάρονται σε μία μικρή ζώνη ώστε όλες να φτάσουν την ίδια χρονική στιγμή στο πήκτωμα διαχωρισμού.

Στο πήκτωμα διαχωρισμού πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού μεγέθους.

	Πηκτώματος πακεταρίσματος 5%	Πηκτώματος διαχωρισμού 10%
ddH <sub>2</sub> O	5,7 ml	3,4 ml
30% ακρυλαμίδα (Serva, 10687.01)	1,7 ml	4 ml
0,5M Tris Base, pH= 6,8 (PanRean AppliChem, code: A1086,1000)	2,5 ml	-
1,5M Tris Base, pH= 8,8 (PanRean AppliChem, code: A1086,1000)	-	2,5 ml
20% SDS (Sigma, BCBV7969)	0,1 ml	0,1 ml
10% APS (Ammonium peroxodisulfate, Serva, 13375.01)	50μl	50μl
TEMED (Sigma, BCBV7969)	5μl	5μl



Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα λόγω του ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται.

Αρχικά υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

Στα δείγματα προστίθεται loading buffer το οποίο αποτελείται από:

- 100μl Tris 0,5M (PanReac AppliChem, code: 0M013429)
- 100μl SDS 20% (Sodium Dodecyl Sulfate) (PanReac AppliChem, code: L4509-500G)
- 400μl γλυκερόλη (PanReac AppliChem, code: 1Y012739)
- 100μl από το διάλυμα της βρωμοφαινόλης (Sigma, code: B0126-5G)
- 100μl Β-μερκαπτοαιθανόλη (Gibco, code: 1403948)
- Ποσότητα PBS 1X (Phosphate Buffered Saline 10X) (BioSera, code: MS00HR100N)

Έπειτα τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά σε νερό που βρίσκεται στους 95 °C βαθμούς, ώστε να αποδιαταχθούν οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Μετά το πέρας των 5 λεπτών τα δείγματα τοποθετούνται απευθείας στον πάγο ώστε να υγροποιηθούν οι ατμοί και να μην υπάρξει κάποια απώλεια δείγματος. Έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται στο spin για 5 δευτερόλεπτα.

Παράλληλα έλαβε χώρα το στήσιμο της ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης

1. Προσθήκη ορισμένης ποσότητας διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running buffer 1X) στη συσκευή
2. Τοποθέτηση του gel πολυακρυλαμίδιου
3. Προσθήκη της υπόλοιπης ποσότητας Running Buffer 1X
4. Φόρτωση δειγμάτων για 25μg πρωτεΐνης ανά περίπτωση

Κάθε δείγμα τοποθετείται σε μία θέση υποδοχής των πήκτωμάτων αντίστοιχα. Στις ακραίες θέσεις εισάγεται ο μάρτυρας (Lonza, ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker, 00193837), του οποίου είναι γνωστό το μοριακό βάρος.

Η τάση στην οποία ηλεκτροφορούνται τα δείγματα ήταν σταθερά στα 100Volt μέσα στο πήκτωμα πακεταρίσματος μέχρι το πέρας της διαδικασίας.

#### **B.5.4 Μεταφορά πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF**

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση πρέπει να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το πήκτωμα στη μεμβράνη PVDF (διφθοριούχου πολυβινυλιδίνης) μεγέθους πόρων 0,22μm (Immobilon-PSQ Transfer Membrane Millipore, ISEQ85R).

Αρχικά η μεμβράνη τοποθετείται σε καθαρή μεθανόλη για 15 δευτερόλεπτα υπό ανάδευση και ξεπλένεται με καθαρό νερό με σκοπό να ενεργοποιηθεί. Έπειτα προστίθεται το διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer), μέσα στο οποίο πραγματοποιείται η μεταφορά των πρωτεϊνών.

Αυτό αποτελείται από γλυκίνη, μεθανόλη 20% και ρυθμιστικό διάλυμα (Tris-Base) 25mM.

Παράλληλα πραγματοποιείται το στήσιμο της διάταξης στην οποία λαμβάνει χώρα η μεταφορά των πρωτεϊνών. Στο ειδικό καλούπι που διαθέτει η συσκευή τοποθετούνται τα εξής υλικά με συγκεκριμένη σειρά:

1. Τα σφουγγαράκια
2. Ένα χαρτάκι Whittman
3. Η ενεργοποιημένη μεμβράνη PVDF
4. Το gel πολυακρυλαμιδίου
5. Ένα επιπλέον, χαρτάκι Whittman
6. Ένα ακόμα σφουγγαράκι.

Η δομή αυτή προσομοιάζει τη δομή ενός sandwich.

Το sandwich τοποθετείται στην ειδική συσκευή που στήθηκε και κουμπώθηκε προσεκτικά, έπειτα ενεργοποιείται η συσκευή και εφαρμόζεται τάση στα 100V έντασης 250 mA για 75 λεπτά με σκοπό την μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμίδης στην μεμβράνη PVDF. Μετά το πέρας του χρόνου η συσκευή ανοίγεται, το sandwich αποσυναρμολογείται και παραλαμβάνεται προσεκτικά η μεμβράνη PVDF στην οποία περιμένουμε να έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες

Για την επιβεβαίωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών πραγματοποιείται χρώση με Ponceau, μια κόκκινη χρωστική που θα εμφανίσει τις «μπάντες» των πρωτεϊνών στην μεμβράνη. Επιπλέον λαμβάνει χώρα και χρώση του gel με την χρωστική Coomassie με σκοπό τον έλεγχο παρουσίας ορισμένης ποσότητας πρωτεϊνών στο gel.

Τέλος, ακολουθεί τριπλή πλύση της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης (TBS-T) για 10 λεπτά υπό ανάδευση, το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται με σκοπό να απομακρυνθούν διάφορες ουσίες καθώς και αντισώματα από τις μεμβράνες

Το διάλυμα πλύσης αποτελείται από:

- TBS (950ml NaCl 0,9% + 50ml TrisCl 1M με pH)
- 100ml από το TBS
- 1ml Tween 20 (Fisher BioReagents, code: BP337-500)

### **B.5.5 Western Blot- Ανοσοαποτύπωση κατά Western**

Αφού ολοκληρώθηκε η μεταφορά των πρωτεϊνών, η μεμβράνη τοποθετείται στο διάλυμα μπλοκαρίσματος (blocking buffer) για μια ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται ώστε να δεσμευτούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης με σκοπό να μπορέσει κάθε αντίσωμα να προσδεθεί ειδικά στις αντίστοιχες θέσεις του.

Έπειτα πραγματοποιείται η προσθήκη των πρώτων αντισωμάτων του PGRMC1 XP, του SIGMAR2/TMEM97 και του Sigma Receptor (F-9) γνωστός και ως σ1 υποδοχέας σε αραιώση 1:1000 σε 1% FBS-ΤΤΒS 1X. στους 4°C ολονύκτια. Στη συνέχεια τα αντισώματα απομακρύνονται και γίνονται 3 πλύσεις. Η κάθε πλύση είναι υπό ανάδευση και διαρκεί 5 λεπτά. ΤΤΒS 1X (Tris-Buffered Saline, 0,1% TWEEN® 20 Detergent). Μετά τις πλύσεις, ακολουθεί η προσθήκη του δευτέρου αντισώματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιείται το anti-rabbit IgG σε αραιώση 1:10.000 σε 1% FBS-ΤΤΒS 1X. Το οποίο επώζεται για μία ώρα και στη συνέχεια απομακρύνεται με 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε υψηλές στροφές.

Πρωτοταγή αντισώματα	Δευτεροταγή αντισώματα
PGRMC1 XP #13856, 1:1000 dilution, [Cell Signaling Technology]	Anti-rabbit, #7074 1:10000 dilution, [Cell Signaling Technology]
SIGMAR2/TMEM97 #62790, 1:1000 dilution, [Cell Signaling Technology]	Anti-rabbit, #7074 1:10000 dilution, [Cell Signaling Technology]
Sigma Receptor (F-9) code:sc_166392, 1:1000 dilution, [Santa Cruz Biotechnology]	Anti-rabbit, #7074 1:10000 dilution, [Cell Signaling Technology]

#### **B.5.6 Αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων**

Η εμφάνιση των μεμβρανών γίνεται με χημειοφωταύγεια. Αρχικά, προστίθεται το ECL (Biorad, Clarity™ Western ECL Substrate, 170-5060), το οποίο αποτελείται από δύο αντιδραστήρια σε αναλογία 1:1. Η μεμβράνη επώζεται για 5 λεπτά.

Συγκεκριμένα τα συζευγμένα με το δευτερογενές αντίσωμα ένζυμα μετατρέπουν το άχρωμο υπόστρωμα σε έγχρωμο ίζημα, το οποίο σημαίνει τις θέσεις που κατέχει το δευτερεύον αντίσωμα. Τέλος η απεικόνιση πραγματοποιείται μέσω χημειοφωταύγειας του μηχανήματος Uvitec Cambridge σε συνδυασμό με το λογισμικό Alliance (Version 16.06) Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα (UVITEC Alliance) το οποίο μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή δίνει το σήμα των αντισωμάτων.

#### **B.5.7 Ποσοτικοποίηση της απεικόνισης των αποτελεσμάτων**

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της πυκνομετρίας, με τη βοήθεια του προγράμματος Image J. Η ποσοτικοποίηση γίνεται σε σχέση με την β-ακτίνη η οποία είναι ένα γονίδιο αναφοράς το οποίο εκφράζεται σε όλους τους τύπους των ευκαρυωτικών κυττάρων και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων στην ηλεκτροφόρηση. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την

πυκνομετρία επεξεργάστηκαν με το Excel Microsoft 2010, συγκεκριμένα διαιρέθηκε το κάθε αντίσωμα που μελετήθηκε με την β-ακτίνη. Έτσι προέκυψε η τιμή της πυκνότητας κάθε δείγματος και για κάθε αντίσωμα σε σχέση με την β-ακτίνη.

## **B.6 Κυτταρικός κύκλος**

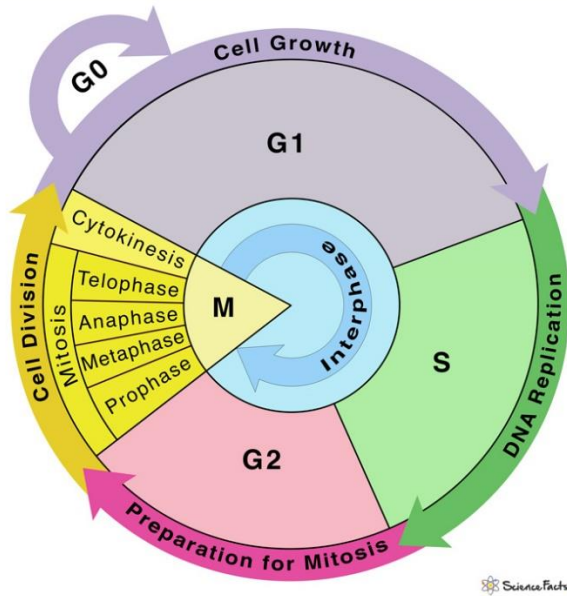
Η αναπαραγωγή των κυττάρων συμβαίνει μέσω της διαίρεσης. Κατά την οποία από ένα κύτταρο προκύπτουν δύο θυγατρικά, στη συνέχεια τα θυγατρικά κύτταρα αυξάνονται σε μέγεθος και διαιρούνται με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κυτταρικού πληθυσμού ο οποίος προέκυψε από ένα αρχικό κύτταρο. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από 4 πλήρως συντηρημένες και ρυθμιζόμενες φάσεις διαδικασίες, την κυτταρική αύξηση όπου μεγαλώνει το κύτταρο σε μέγεθος, την αντιγραφή του DNA όπου διπλασιάζεται το γενετικό υλικό, το διαχωρισμό των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα, και την κυτταρική διαίρεση κατά την οποία τα δύο κύτταρα που προκύπτουν διαχωρίζονται πλήρως.

Ο κυτταρικός κύκλος διακρίνεται σε δύο βασικές φάσεις τη μίτωση και την μεσόφαση. Το 95% του κύκλου αφορά τη μεσόφαση, ενώ η μίτωση και η κυτταροκίνηση αποτελούν μόνο το 5% της διαδικασίας αυτής. (Schafer 1998) Η μίτωση είναι το πιο σημαντικό στάδιο του κύκλου, σχετίζεται με το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων και ολοκληρώνεται με την κυτταρική διαίρεση-κυτοκίνηση. Αποτελείται από 4 φάσεις οι οποίες διαδέχονται η μία την άλλη χωρίς διακοπή. Αυτές είναι η πρόφαση, η μετάφαση, η ανάφαση και η τελόφαση.

Πιο αναλυτικά η μεσόφαση είναι το διάστημα κατά το οποίο λαμβάνει χώρα η κυτταρική αύξηση και η αντιγραφή του γενετικού υλικού. Μετά τη μίτωση ακολουθεί η φάση G1 ή αλλιώς φάση του 1<sup>ου</sup> μεσοδιαστήματος η οποία αφορά το διάστημα μεταξύ της μίτωσης και την αντιγραφής του DNA, στη φάση αυτή το κύτταρο αυξάνει σε μάζα και είναι μεταβολικά ενεργό. Έπειτα ακολουθεί η φάση S ή αλλιώς φάση σύνθεσης κατά την οποία λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA. Τέλος ακολουθεί η φάση G2 ή αλλιώς φάση 2<sup>ου</sup> μεσοδιαστήματος κατά την οποία συνεχίζεται η αύξηση του κυττάρου και γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση ενώ το κύτταρο ετοιμάζεται για τη μίτωση. Επιπλέον τα κύτταρα μπορούν να εισέλθουν σε μία 4<sup>η</sup> φάση γνωστή ως G0 κατά την οποία το κύτταρο παραμένει αδρανές, παύει δηλαδή να διαιρείται, ή προορίζεται για απόπτωση. (The Eukaryotic Cell Cycle - The Cell - NCBI Bookshelf n.d.) (Murray 1994)

Οι περισσότεροι πληθυσμοί κυττάρων είναι ασύγχρονοι, δηλαδή μέσα σε έναν ιστό σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή τα κύτταρα βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις.

## Cell Cycle



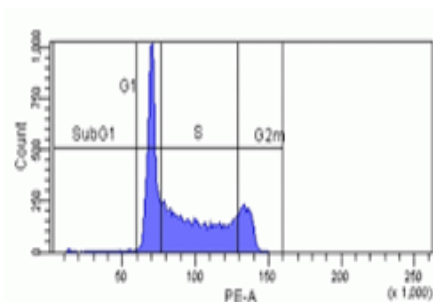
Εικόνα 12: Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου

(Cell Cycle: Definition, Phases, and Diagram n.d.)

### **B.7 Κυτταρομετρία ροής**

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία ταχεία μέθοδο ανάλυσης πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα σε κυτταρικούς πληθυσμούς. Με την κυτταρομετρία ροής μετράται το μέγεθος, η εσωτερική πολυπλοκότητα και η ένταση του φθορισμού ενός κυττάρου. Κάθε κυτταρόμετρο μπορεί να έχει περισσότερες από μία πηγές ακτινοβολίας, με διάφορα μήκη κύματος, οι οποίες παράγουν σκεδασμένο και φθορίζων φωτεινό σήμα το οποίο ανιχνεύεται από ανιχνευτές. Πιο συγκεκριμένα, κατάλληλοι φακοί και πρίσματα κατευθύνουν την δέσμη λέιζερ στα κύτταρα. Κάθε φορά που ένα κύτταρο διέρχεται από τη δέσμη λέιζερ πραγματοποιείται ένα συμβάν και τότε η ακτινοβολία σκεδάζεται σε δύο κατευθύνσεις ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα και φθορισμός της ακτινοβολίας. Έτσι προκύπτει, ο εμπρόσθιος σκεδασμός, του οποίου η κατεύθυνση είναι σχεδόν παράλληλη με την κατεύθυνση της αρχικής ακτινοβολίας (Forward Scatter or FSC) και σχετίζεται με το μέγεθος του κυττάρου και ο πλευρικός σκεδασμός με κατεύθυνση  $90^\circ$  μοιρών σε σχέση με την αρχική (Side Scatter or SSC), ο οποίος σχετίζεται με την πολυπλοκότητα του κυττάρου. Ο σκεδασμός του φωτός είναι ανεξάρτητος του φθορισμού. Στη συνέχεια τα σήματα αυτά μετατρέπονται σε ηλεκτρονικά και αναλύονται μέσω υπολογιστή. Έτσι οι κυτταρικοί πληθυσμοί μπορούν να αναλυθούν με βάση το φθορισμό τους ή το σκεδασμό του φωτός. Η κυτταρομετρία ροής είναι μία μέθοδος που βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανοσολογία, την ιολογία, την μοριακή βιολογία κ.α. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου. (McKinnon 2018) (Givan 2011) (Darzynkiewicz, Bedner, and Smolewski 2001)

Η εικόνα από την ανάλυση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου προσομοιάζει με την εικόνα που ακολουθεί:



Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου βασίζεται στην ένταση φθορισμού των κυττάρων, η οποία συσχετίζεται με την ποσότητα DNA που περιέχουν. Η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται κατά την S φάση, στην G<sub>2</sub>/M έχει ήδη διπλασιαστεί ενώ στην G<sub>1</sub> φάση είναι η μισή. Η απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου γίνεται σε ιστόγραμμα (μονοπαραμετρικό διάγραμμα). Παρουσιάζεται το πλήθος των κυττάρων συναρτήσει της έντασης της χρώσης.

### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιείται στρώσιμο της παγκρεατικής καρκινικής σειράς PANC-01 σε φλάσκες T25. Συγκεκριμένα κάθε φλάσκα περιέχει περίπου 500.000 κύτταρα. Στη συνέχεια οι φλάσκες επάζονται σε κλίβανο παρουσία θρεπτικού υλικού 5% FBS για 24 ώρες. Με σκοπό να γίνει έλεγχος σε ποιο στάδιο του κυτταρικού κύκλου δρα η σιραμεσίνη. Διεξάγονται 2 διαφορετικά πειράματα. Στο πρώτο, η κυτταρομετρία πραγματοποιείται σε συγχρονισμένα κύτταρα απουσία σιραμεσίνης με σκοπό να γίνει έλεγχος του κυτταρικού κύκλου της συγκεκριμένης σειράς. Το δεύτερο πείραμα αφορά συγχρονισμένα κύτταρα στην φάση G<sub>1</sub> του κυτταρικού κύκλου παρουσία σιραμεσίνης. Πιο αναλυτικά:

#### A) Κυτταρομετρία σε συγχρονισμένα κύτταρα απουσία σιραμεσίνης

Στόχος αυτού του πειράματος είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου των PANC-01 ύστερα από συγχρονισμό τους στην G<sub>1</sub> φάση

### Διαδικασία

Μετά το πέρας του 24ώρου απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, η φλάσκα ξεπλένεται 2 φορές με NaCl με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του θρεπτικού. Στη συνέχεια προστίθεται plain RPMI το οποίο δεν περιέχει ορό για 48 ώρες, ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν στην G<sub>1</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου. Την επόμενη μέρα στο plain RPMI προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα ορού FBS ώστε η περιεκτικότητά του στο διάλυμα να είναι 5% και γίνεται συλλογή κυττάρων ανά

συγκεκριμένες ώρες. Οι ώρες που μελετήθηκαν ήταν 0h, 30min, 60min, 90min, 120min, 3h, 4h, 6h, 9h, 12h, 24h, 26h, 27h, 28h, 30h, 32h και 48h.

#### B) Κυτταρομερία σε συγχρονισμένα κύτταρα παρουσία σιραμεσίνης

Αφού προσδιοριστούν οι ώρες του κυτταρικού κύκλου τις οποίες χρειάζονται τα κύτταρα ώστε να περάσουν από την μία φάση στην επόμενη ( $G1 \rightarrow S \rightarrow G2$ ) επιλέγονται οι χρονικές στιγμές στις οποίες θα μελετηθεί η δράση της σιραμεσίνης. Επιλέχθηκαν χρονικά διαστήματα έως 24 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με ορό.

Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, αρχικά τα κύτταρα παραμένουν στον κλίβανο για 48 ώρες απουσία ορού, την επόμενη μέρα προστίθενται θρεπτικό υλικό με ορό και σιραμεσίνη σε συγκέντρωση 10 $\mu$ M και 20 $\mu$ M. Έπειτα πραγματοποιείται συλλογή κυττάρων τις αντίστοιχες ώρες.

#### Διαδικασία συλλογής και μονιμοποίησης κυττάρων

Όσον αφορά τη συλλογή των κυττάρων:

1. Συλλογή του θρεπτικού της φλάσκας σε ένα φιαλίδιο ώστε να μη χαθούν κύτταρα τα οποία πιθανό να μην είναι κολλημένα στον πάτο της φλάσκας.
2. Κάθε φλάσκα ξεπλένεται με NaCl και προστίθεται 1 ml θρυψίνης
3. Τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο για 5 λεπτά.
4. Προσθήκη RPMI με σκοπό να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και τα κύτταρα συλλέγονται στο φιαλίδιο.
5. Μέτρηση των κυττάρων με τη διαδικασία που αναφέρθηκε και προηγουμένως και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 10 λεπτά.
6. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και ακολουθεί πλύση με NaCl και φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για επιπλέον 10 λεπτά.
7. Αφού απομακρυνθεί το NaCl γίνεται σπάσιμο των κυττάρων ώστε να απομακρυνθούν τα συσσωματώματα κυττάρων
8. Προσθήκη αιθανόλης 90% στάγδην και υπό ανάδευση στο vortex.
9. Τέλος αποθήκευση των κυττάρων στους -20°C.

#### Προετοιμασία δειγμάτων για κυτταρομετρία

Αρχικά στα δείγματα προστίθενται 2ml ορού και στη συνέχεια 10ml PBS 1X και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1600 στροφές για 10 λεπτά. Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται στο ίζημα το μείγμα που χρησιμοποιείται για τη χρώση των κυττάρων, σε 1 εκατομμύριο κύτταρα αντιστοιχούν 300 $\mu$ l μείγματος.

Το μείγμα αποτελείται από:

- Κιτρικό οξύ- Sodium citrate (Sigma, code:71402-100G), λειτουργεί ως ρυθμιστικό διάλυμα
- Ιοδιούχο προπίδιο- PI (Propidium Iodide) (Sigma, code: BCCB3059)
- RNAase (DNAase free), το οποίο χρησιμοποιείται για να καταστρέψει το RNA

Τα δείγματα τοποθετούνται για 30 λεπτά στον κλίβανο στους 37 °C. Μετά το πέρας των 30 λεπτών τα δείγματα εισάγονται στο κυτταρόμετρο, αφού πρώτα πραγματοποιηθεί επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση με χρήση αυτόματης πιπέτας ώστε να διαχωριστούν όλα τα κύτταρα πριν την ανάλυση.

### **B.8 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν μέσω του excel Microsoft 2010 και του λογισμικού της SPSS®HBM® έχοντας δεδομένα, τουλάχιστον, τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων. Η στατιστική σημασία προσδιορίστηκε με τη χρήση της δοκιμασίας t-test. Για κάθε συγκέντρωση φαρμάκου στα διάφορα χρονικά διαστήματα έλαβε χώρα στατιστική σύγκριση τους με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου. Στόχος ήταν ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας, όπου η τιμή p-value θα έπρεπε να είναι <0,05 ώστε το κάθε αποτέλεσμα να θεωρηθεί στατιστικώς σημαντικό. Η σημαντικότητα στα γραφήματα επισημαίνεται με το σύμβολο \*=p< 0,05; \*\*=p <0,01; \*\*\*=p <0,001; \*\*\*\*=p<0,0001.



### **Γ.1 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας ύστερα από έκθεση σε σιραμεσίνη**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης της σιραμεσίνης σε βραχυπρόθεσμο διάστημα στην ανάπτυξη την παγκρεατικής κυτταρικής σειράς PANC-01. Η σιραμεσίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 0,1μM, 1μM, 10μM και 100μM και υπολογίστηκαν οι τιμές GI<sub>50</sub>, TGI και LC<sub>50</sub>.

Πιο αναλυτικά όσον αφορά τις παραμέτρους αυτές:

a) GI<sub>50</sub> (growth inhibition 50%), είναι η συγκέντρωση της ουσίας μέσω της οποίας επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50% και είναι η συγκέντρωση όπου ισχύει ότι :  **$100 \times (T - T_0)/(C - T_0) = 50$**

b) LC<sub>50</sub> (lethal concentration 50%), είναι η συγκέντρωση της ουσίας η οποία προκαλεί θάνατο στο 50% των κυττάρων και είναι η συγκέντρωση όπου ισχύει ότι :  **$100 \times (T - T_0)/T_0 = -50$**

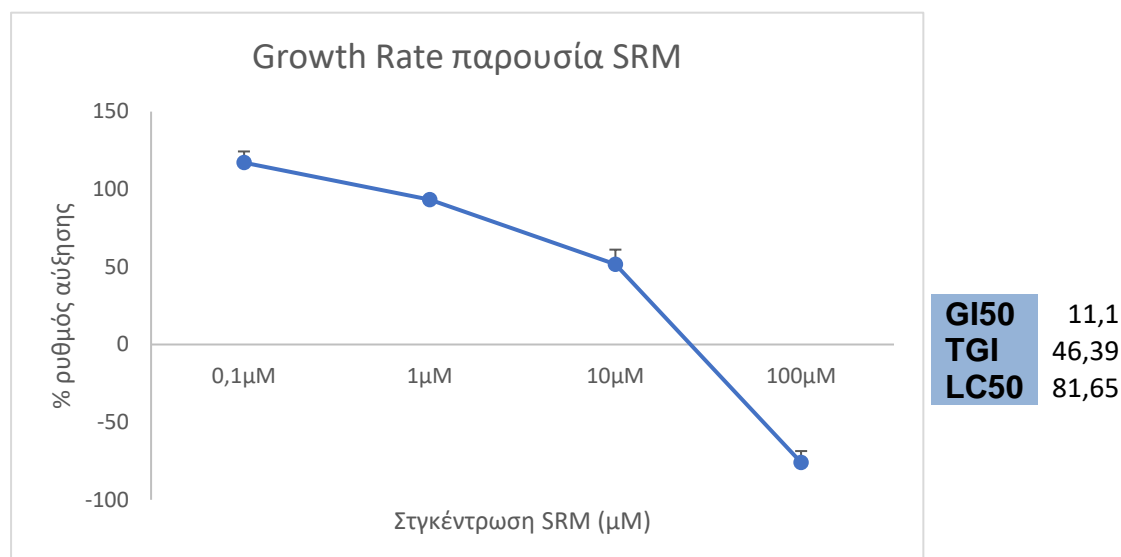
c) TGI (total growth inhibition), είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και είναι η συγκέντρωση όπου ισχύει ότι :  **$100 \times (T - T_0)/(C - T_0) = 0$** .

Όπου C, η οπτική πυκνότητα του δείγματος ελέγχου μετά από 48h,

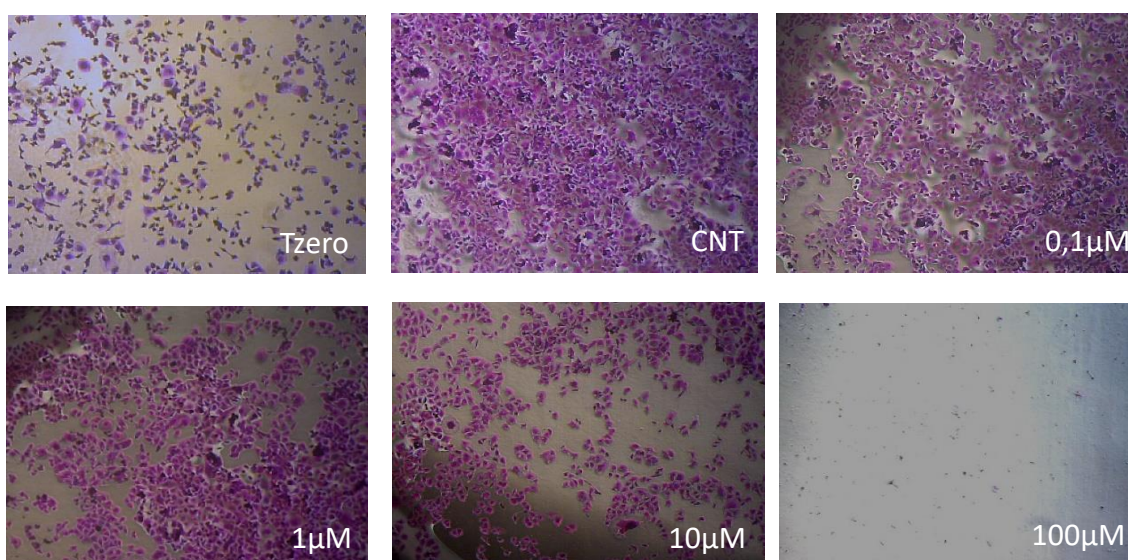
T, η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού στο οποίο έχει χορηγηθεί της ουσίας, και

T<sub>0</sub>, η οπτική πυκνότητα τη στιγμή χορήγησης της ουσίας.

Σύμφωνα με το γράφημα 1 στο οποίο απεικονίζεται το ποσοστό (%) του ρυθμού αύξησης των κυττάρων έπειτα από χορήγηση σιραμεσίνης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις 0,1μM, 1μM, 10μM και 100μM παρατηρήθηκε πως όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της ουσίας, τόσο μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων. Επίσης, όπως φαίνεται και στον πίνακα 1 βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων είναι 11,1μM , ενώ η συγκέντρωση που προκαλεί ολική αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων είναι 46,39μM. Όσον αφορά τη συγκέντρωση της ουσίας που προκαλείται 50% θάνατος των κυττάρων, αυτή είναι 81,65μM.



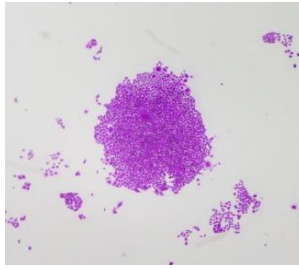
Γράφημα 1: Αναπαράσταση του % ρυθμού αύξησης της κυτταρικής σειράς PANC-01 παρουσία σιραμεσίνης αυξανόμενης συγκέντρωσης



Εικόνα 14: Φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο Axionvet 40 CFL, της εταιρίας Zeiss, σε μεγέθυνση 5X των PANC-01 κυττάρων απουσία (δείγμα ελέγχου) και παρουσία σιραμεσίνης αυξανόμενης συγκέντρωσης ύστερα από επώαση 48 ωρών. Δείγμα Tzero το οποίο επωάζεται απουσία σιραμεσίνης για 24 ώρες

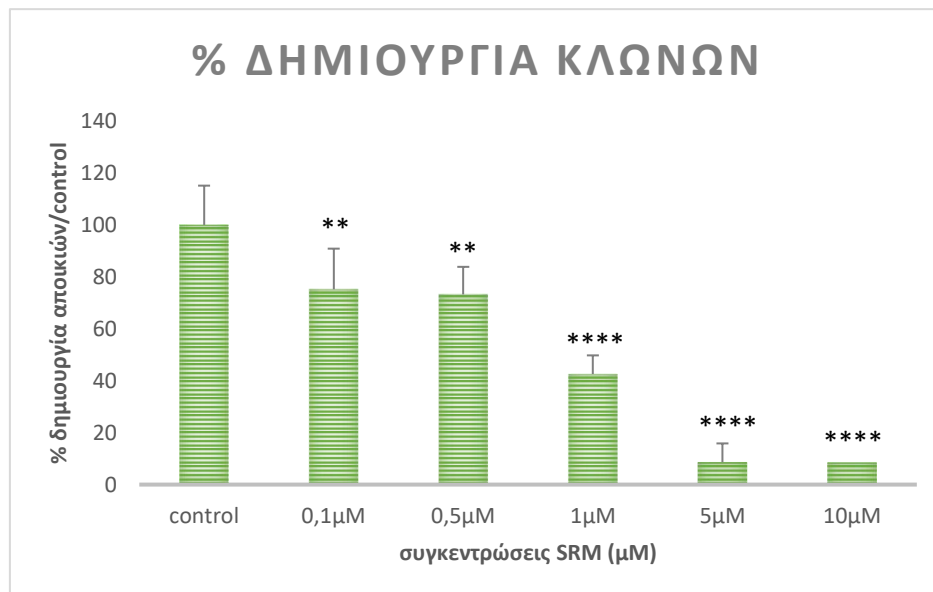
## Γ.2 Αποτελέσματα ελέγχου κλωνογένεσης

Η μέθοδος του ελέγχου δημιουργίας κλώνων πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον προσδιορισμό της ικανότητας μεμονωμένων κυττάρων και άρα των πιο ισχυρών να δημιουργούν αποικίες παρουσία της σιραμεσίνης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 14, ο όρος αποικία αναφέρεται σε μία ομάδα άνω των 50 κυττάρων.



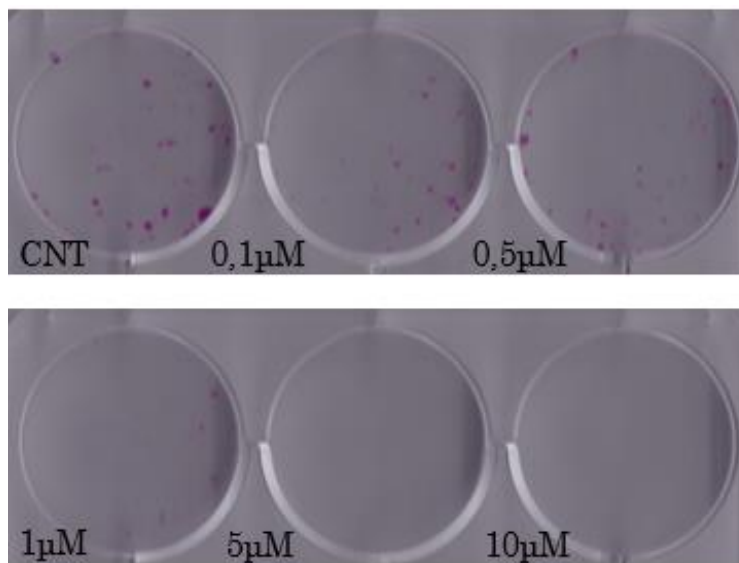
Εικόνα 14: Αποικία κυττάρων. Κάθε αποικία αποτελείται από τουλάχιστον 50 κύτταρα

Στο παρακάτω γράφημα 2 φαίνεται το ποσοστό της δημιουργίας αποικιών σε σχέση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις σιραμεσίνης. Παρατηρήθηκε ότι σε συγκέντρωση 0,1  $\mu\text{M}$  της ουσίας η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες είναι 76,1% δηλαδή έχει μειωθεί κατά 23,9% σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας τόσο μειώνεται και η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν κλώνους, δηλαδή σε συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{M}$  η ικανότητα δημιουργίας αποικιών είναι 71,8%, σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{M}$  είναι 39,7% ενώ στις συγκεντρώσεις 5 $\mu\text{M}$  και 10 $\mu\text{M}$  είναι 9,2% και 9,1% αντίστοιχα.



Γράφημα 2: Αναπαράσταση του % δημιουργίας αποικιών της κυτταρικής σειράς PANC-01 παρουσία σιραμεσίνης αυξανόμενης συγκέντρωσης

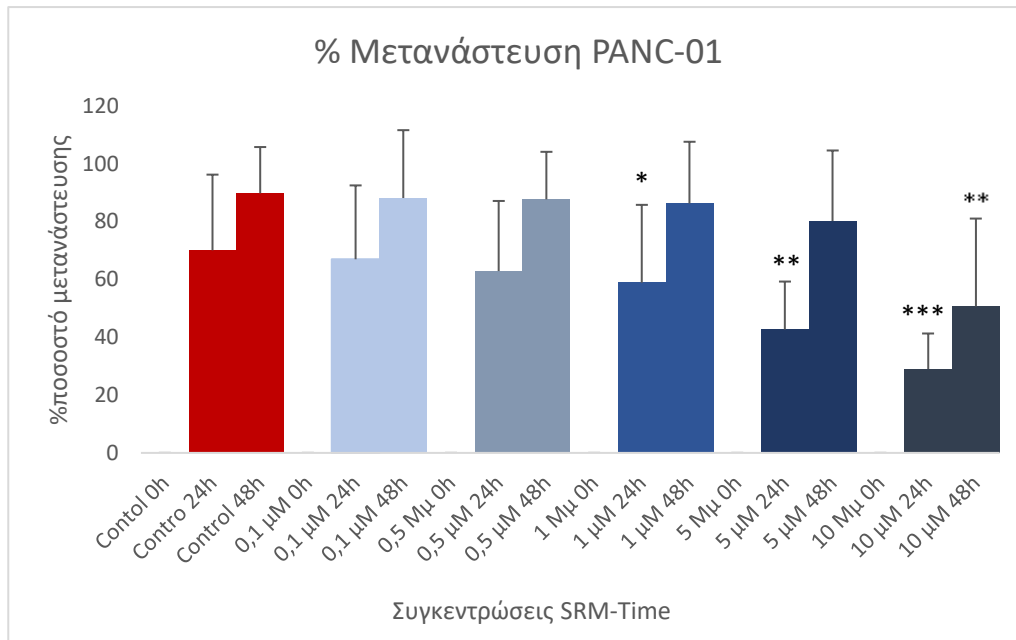
Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο παραπάνω γράφημα, συνάδουν με τη φωτογραφία που ακολουθεί στην οποία φαίνονται οι αποικίες των κυττάρων απουσία σιραμεσίνης και σε αυξανόμενη συγκέντρωση σιραμεσίνης. Είναι εμφανές ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας τόσο μειώνεται και ο αριθμός των αποικιών. Ενώ στο δείγμα ελέγχου, παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός αποικιών.



Εικόνα 15: Απεικόνιση αποικιών απουσία και παρουσία σιραμεσίνης σε στερεοσκόπιο

### **Γ.3 Αποτελέσματα ελέγχου επούλωσης πληγής- wound healing**

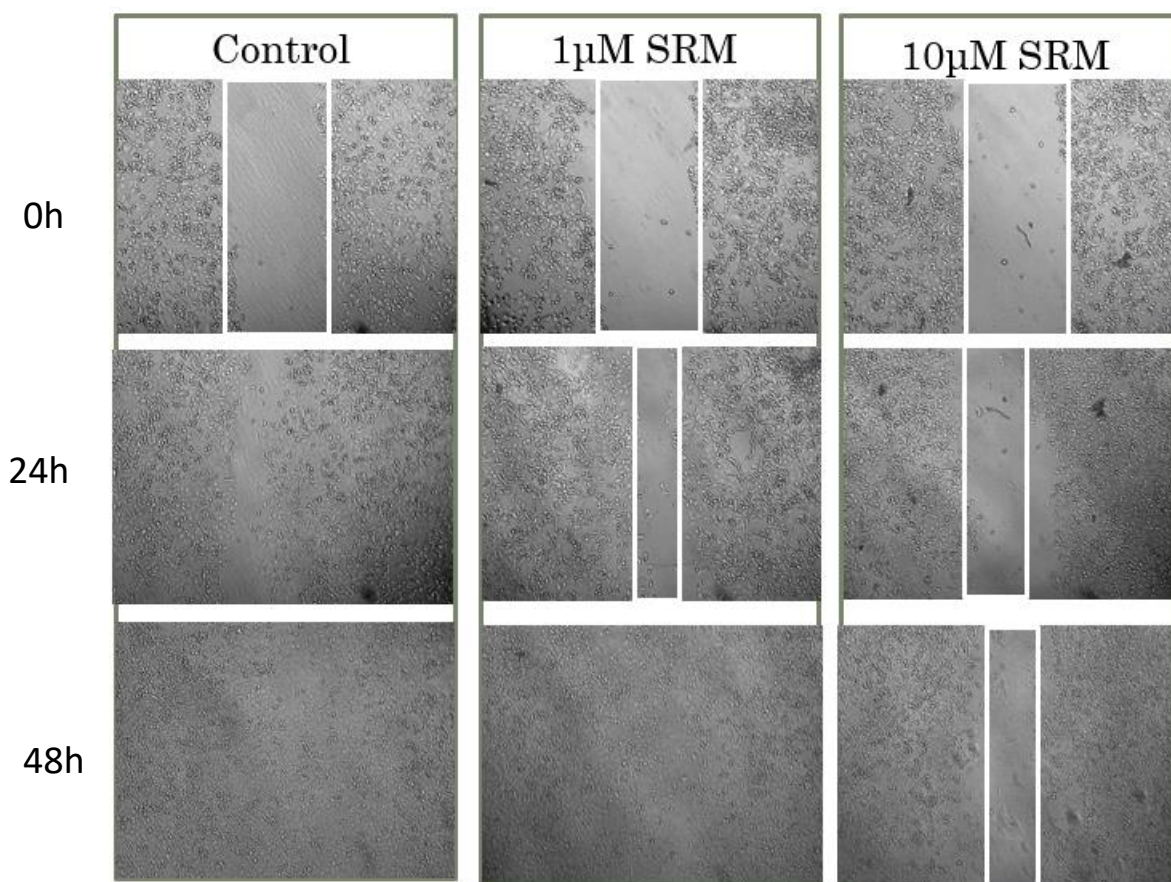
Η μέθοδος επούλωσης πληγής πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της ικανότητας των κυττάρων να μεταναστεύουν στο σημείο όπου πραγματοποιήθηκε η πληγή. Στο γράφημα 3 παρατίθεται το % ποσοστό της μετανάστευσης των κυττάρων έπειτα από το πέρας 24 ωρών και 48 ωρών, απουσία και παρουσία σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 0,1μM, 0,5μM, 1μM, 5μM και 10μM. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε λήψη φωτογραφιών και μετρήθηκε το εμβαδόν της πληγής τη χρονική στιγμή 0, δηλαδή τη στιγμή που χορηγήθηκε η ουσία και έπειτα στις 24 και 48 ώρες. Η σύγκριση στην επούλωση των πληγών έγινε ανάμεσα στη χρονική στιγμή 0 και στις 24 και 48 ώρες στην αντίστοιχη συγκέντρωση. Παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση της μετανάστευσης των κυττάρων παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων σιραμεσίνης τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Έντονη γίνεται η μείωση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων στις συγκεντρώσεις 5μM και 10μM όπου στις 24 ώρες η μετανάστευση των κυττάρων είναι μικρότερη του 50% ενώ στις 48 ώρες στη συγκέντρωση 10μM η μετανάστευση των κυττάρων είναι κοντά στο 50%, μικρότερη από την μετανάστευση των κυττάρων απουσία σιραμεσίνης στις 24 ώρες.



Γράφημα 3: Αναπαράσταση του % μετανάστευσης της κυτταρικής σειράς PANC-01 παρουσία σιραμεσίνης αυξανόμενης συγκέντρωσης τις χρονικές στιγμές 24 και 48 ώρες

Έπειτα παρατίθενται ενδεικτικά ορισμένες φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο που δείχνουν την πρόοδο μετανάστευσης των κυττάρων έπειτα από το πέρας 24 ωρών και 48 ωρών, απουσία και παρουσία σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 1μM και 10μM. Όπως φαίνεται και στις φωτογραφίες στις 24 ώρες η πληγή είναι μεγαλύτερη στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της σιραμεσίνης σε σχέση με την συγκέντρωση 1μM και με το δείγμα ελέγχου, ενώ στις 48 ώρες η πληγή έχει σχεδόν κλείσει στο δείγμα ελέγχου και στη συγκέντρωση 1μM ενώ στη συγκέντρωση 10μM παραμένει ανοιχτή.

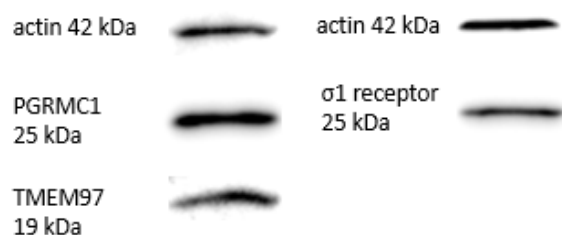




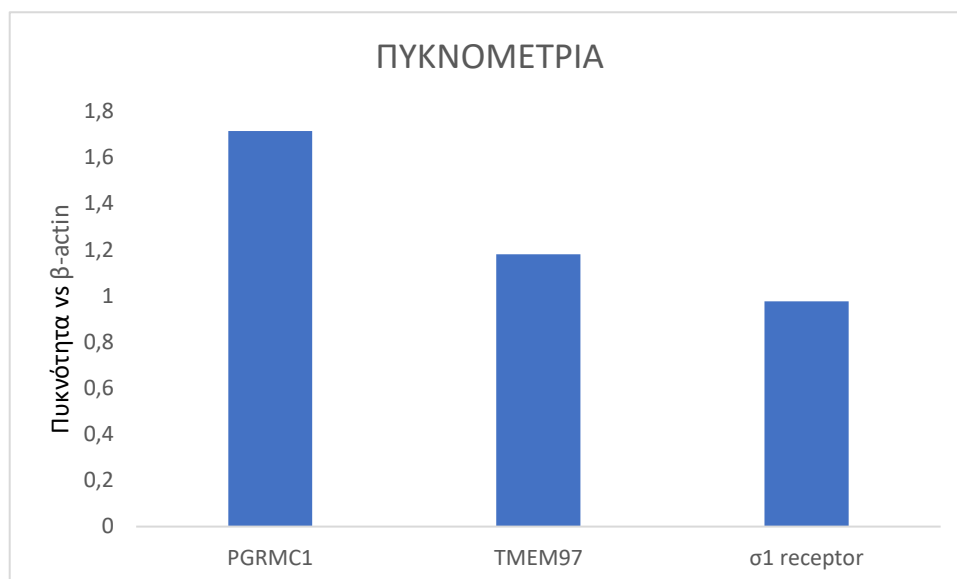
Φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο όπου παρατηρείται η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων τις χρονικές στιγμές 0h, 24h και 48h σε δείγμα ελέγχου και παρουσία σιραμεσίνης συγκέντρωσης 1µM και 10µM.

#### **Γ.4 Αποτελέσματα Ανοσοαποτύπωσης κατά Western**

Δεδομένης της σχέσης μεταξύ της σιραμεσίνης, σ2 αγωνιστή και των σ2 υποδοχέων επιχειρήσαμε να ελέγξουμε εάν ο σ2 υποδοχέας εκφράζεται στην κυτταρική σειρά PANC-01, ώστε στη συνέχεια να μελετηθεί εάν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στη δράση της σιραμεσίνης και των σ2 υποδοχέων. Όπως φαίνεται και στη φωτογραφία, υπάρχει έκφραση των σ1 υποδοχέων, της πρωτεΐνης της προγεστερόνης PGRMC1 καθώς επίσης και του TMEM97 ο οποίος θεωρείται ο σ2 υποδοχέας.



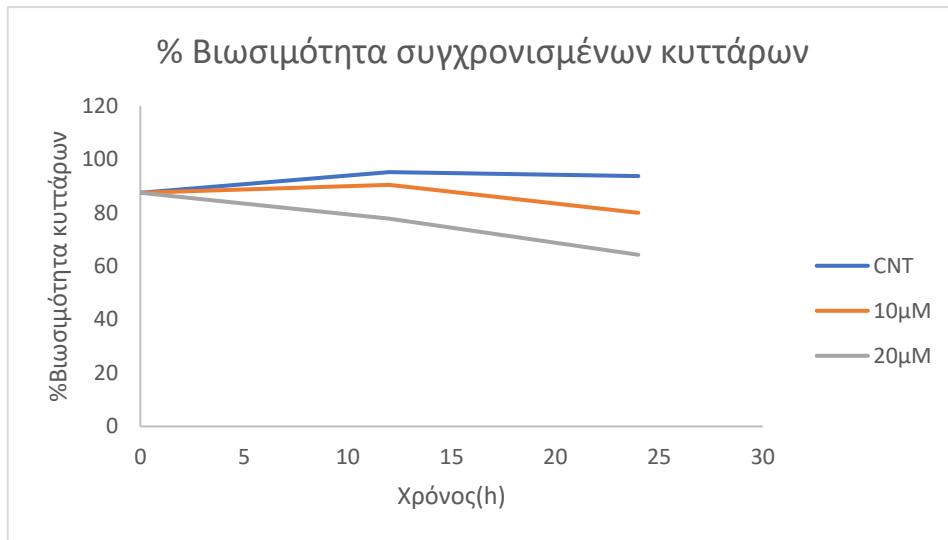
Εικόνα 16 : Ανοσοαποτύπωμα κατά Western όπου απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του σ2 υποδοχέα TMEM97, του σ1 υποδοχέα και της PGRMC1 σε κύτταρα PANC-01. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος των δειγμάτων



Γράφημα 4 : Πυκνομετρία- Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων του σ2 υποδοχέα TMEM97, του σ1 υποδοχέα και της PGRMC1. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ImageJ και για τη σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη

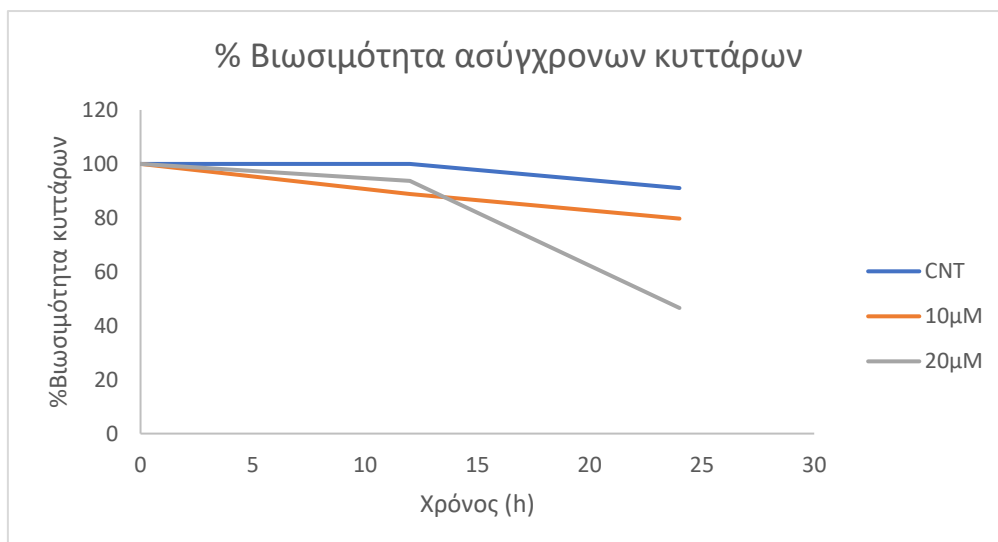
### **Γ.5 Βιωσιμότητα της καρκινικής παγκρεατικής σειράς PANC-01 ύστερα από έκθεση στη σιραμεσίνη**

Σύμφωνα και με προηγούμενα πειράματα παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των PANC-01 σε σιραμεσίνη οδηγεί σε έντονο κυτταρικό θάνατο, που σχετίζεται τόσο με το χρόνο έκθεσης όσο και με τη συγκέντρωση της ουσίας. Μέσω της μελέτης της βιωσιμότητας θέλαμε να ελέγξουμε τον κυτταρικό θάνατο, μέσω μέτρησης των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων απουσία και παρουσία σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 10μM και 20μM στις 12 και 24 ώρες. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας έγινε τόσο σε ασύγχρονο πληθυσμό κυττάρων όσο και σε συγχρονισμένο πληθυσμό (G1 φάση του κυτταρικού κύκλου). Όπως φαίνεται στο γράφημα 5 που παρατίθεται παρακάτω. Στο πρώτο διάγραμμα το οποίο αφορά συγχρονισμένο πληθυσμό στην G1 φάση παρατηρείται, τις πρώτες 12 ώρες τόσο στα δείγματα ελέγχου όσο και στη συγκέντρωση 10μM, μία μικρή αύξηση στη βιωσιμότητα του πληθυσμού, ενώ στη συγκέντρωση 20μM παρατηρείται μία μικρή μείωση. Όσον αφορά τις 24 ώρες η βιωσιμότητα στα δείγματα ελέγχου δε φαίνεται να μεταβάλλεται ενώ παρουσίας σιραμεσίνης η βιωσιμότητα μειώνεται, κυρίως στη μεγαλύτερη συγκέντρωση όπου παρατηρείται μείωση της βιωσιμότητας κατά 23,2%, καθώς η βιωσιμότητα στις 24 ώρες είναι 64,3%, ενώ στις 0 ώρες είναι 87,5%.



Γράφημα 5: Αναπαράσταση της % βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς PANC-01 στη φάση G1 παρουσία σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 10μΜ και 20μΜ τις χρονικές στιγμές 12h και 24h.

Το παρακάτω γράφημα 6 αφορά κύτταρα τα οποία είναι ασύγχρονα, δηλαδή πληθυσμούς κυττάρων τα οποία βρίσκονται σε διαφορετική φάση του κυτταρικού κύκλου την ίδια χρονική στιγμή, κάτι που προσομοιάζει τις πραγματικές συνθήκες. Από το διάγραμμα φαίνεται ότι από τις 12 κιόλας ώρες παρατηρείται μία μείωση στη βιωσιμότητα παρουσία σιραμεσίνης και στις 2 συγκεντρώσεις. Ενώ στις 24 ώρες η μείωση αυτή γίνεται πιο έντονη και κυρίως στη συγκέντρωση 20μΜ όπου η βιωσιμότητα των κυττάρων έχει μειωθεί κατά 53,4%.

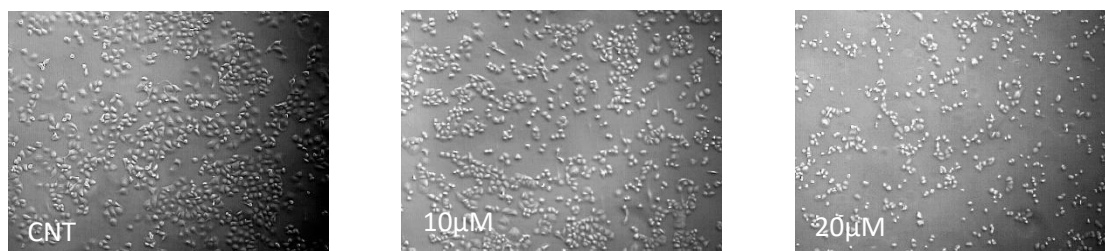


Γράφημα 6: Αναπαράσταση της % βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς PANC-01 σε ασύγχρονο πληθυσμό παρουσία σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 10μΜ και 20μΜ τις χρονικές στιγμές 12h και 24h.

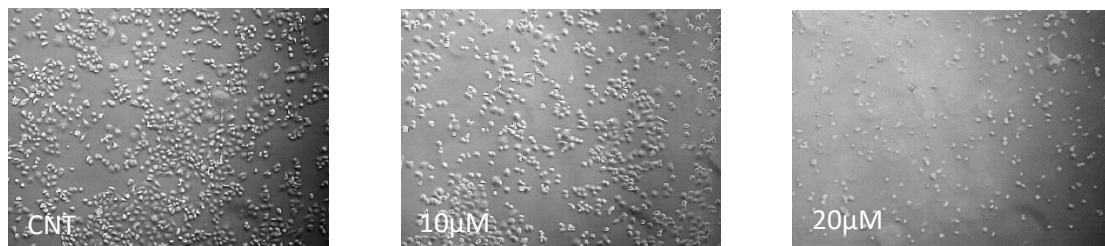


Συγκριτικά, όπως είναι εμφανές και στις φωτογραφίες που παρατίθενται παρακάτω, ύστερα από επώαση των κυττάρων με σιραμεσίνη για 24 ώρες, παρατηρείται περισσότερος κυτταρικός θάνατος καθώς και αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων στον ασύγχρονο πληθυσμό σε σχέση με τον πληθυσμό ο οποίος βρίσκεται στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Η διαφορά αυτή είναι εμφανής και στις δύο συγκεντρώσεις της σιραμεσίνης που χρησιμοποιήθηκαν και κυρίως στη συγκέντρωση 20μM.

#### **Συγχρονισμένος πληθυσμός στην G1 φάση (a)**



#### **Ασύγχρονος πληθυσμός (b)**



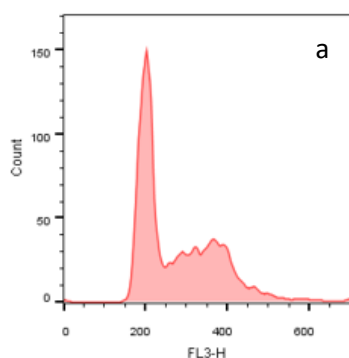
Φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο Axionvet 40 CFL, της εταιρίας Zeiss, σε μεγέθυνση 5X των PANC-01 κυττάρων απουσία και παρουσία σιραμεσίνης ύστερα από επώαση 24 ωρών. Η λήψη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κάμερας AxionCam ERc5s. a) κύτταρα στην G1 φάση (δείγμα ελέγχου, 10μM και 20μM). b) ασύγχρονος πληθυσμός κυττάρων (δείγμα ελέγχου, 10μM και 20μM)

### **Γ.6 Αποτελέσματα Κυτταρομετρίας Ροής**

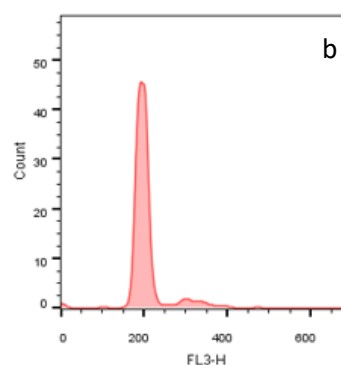
Όπως προαναφέρθηκε το πρώτο πείραμα που αφορούσε την κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε με σκοπό να προσδιοριστεί το χρονικό διάστημα κατά το οποίο η καρκινική σειρά PANC-01 βρίσκεται στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου ύστερα από συγχρονισμό τους στην φάση G1. Η εικόνα 17α που προέκυψε από την κυτταρομετρία ροής, απεικονίζει τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στις οποίες βρίσκεται ένας ασύγχρονος πληθυσμός. Η πρώτη κορυφή αφορά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, στην οποία δεν έχει γίνει διπλασιασμός του DNA, στη συνέχεια ακολουθεί η φάση S και η επόμενη μικρότερη κορυφή αφορά κύτταρα που βρίσκονται στη G2 φάση όπου έχει διπλασιαστεί το

DNA. Παρατηρείται ότι στον ασύγχρονο πληθυσμό υπάρχουν κύτταρα τα οποία βρίσκονται και στις 3 φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Στην εικόνα 17b απεικονίζονται κύτταρα στα οποία έγινε συγχρονισμός των κυττάρων στη G1 φάση με επώαση των κυττάρων απουσία ορού για 48 ώρες (starvation). Παρατηρείται ότι, πράγματι σχεδόν όλος ο πληθυσμός έχει συγχρονιστεί στη φάση G1.

Asynchronous cell population

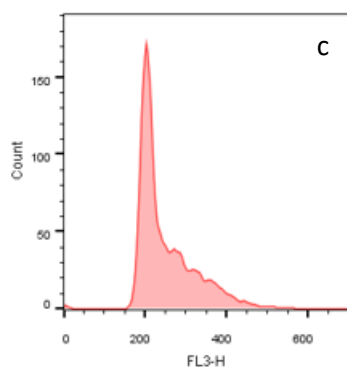


Synchronous Tz

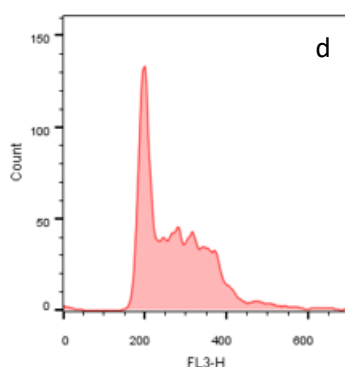


Στη συνέχεια αφού επετεύχθη ο συγχρονισμός μετά από 48 ώρες., προστέθηκε ορός με σκοπό τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου. Όπως φαίνεται και από τις παρακάτω εικόνες τα κύτταρα ξεκινούν να εισέρχονται στη φάση S ύστερα από επώαση με ορό για 24 ώρες (εικόνα 17c). Στη συνέχεια στις 27- 28 ώρες τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση S (εικόνα 17d-e). μετά το πέρας των 30 ωρών από επώαση με ορό παρατηρείται ότι τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση G2 (εικόνα 17f-g).

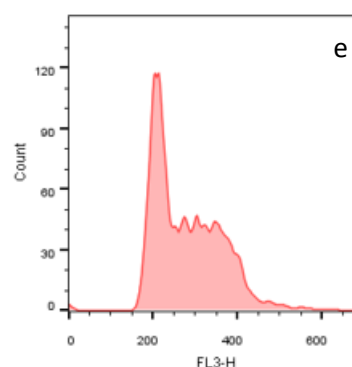
Synchronous 24hr post release

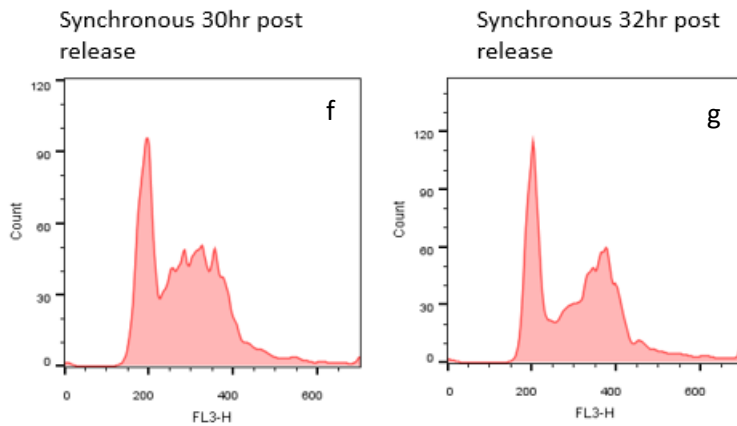


Synchronous 27hr post release



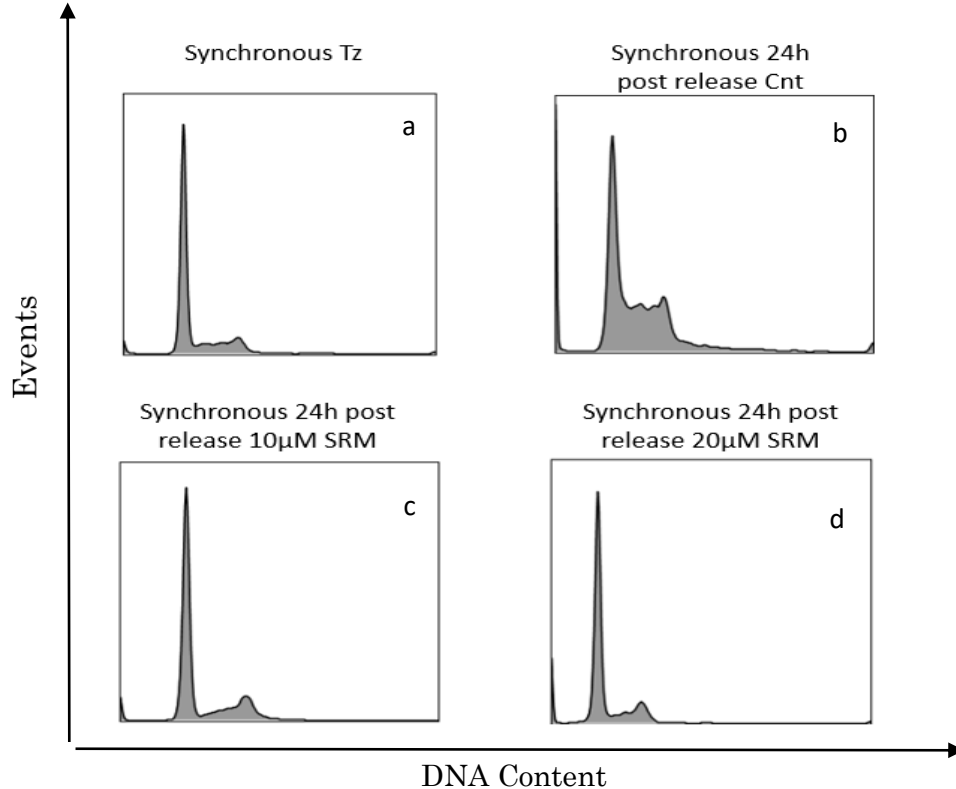
Synchronous 28hr post release





Εικόνες 17: Απεικόνιση ιστογραμμάτων που προέκυψαν από ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής με το πρόγραμμα modfitlt Version 5 σε κυτταρικούς πληθυσμούς ύστερα από το συγχρονισμό στην G1 φάση και στη συνέχεια προσθήκη ορού για 24 έως 32 ώρες σε δείγματα ελέγχου. Σε κάθε κυτταρομετρία μελετήθηκαν 5.000 κύτταρα

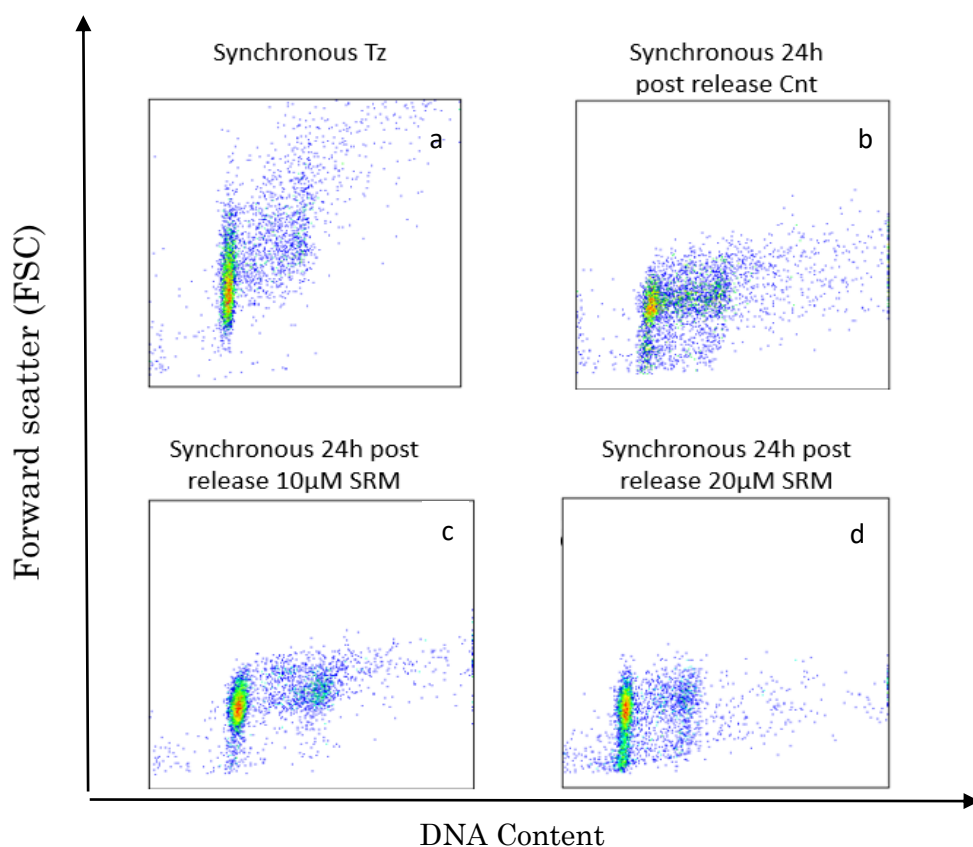
Στη συνέχεια παρεντίθενται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής που αφορά συγχρονισμένα κύτταρα στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, όπως προαναφέρθηκε ο συγχρονισμός επιτευχθεί με επώαση των κυττάρων απουσία ορού για 48 ώρες και στη συνέχεια προσθήκη θρεπτικού μέσου παρουσία ορού και σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 10 $\mu$ M και 20 $\mu$ M.



Εικόνες 18: Απεικόνιση ιστογραμμάτων που προέκυψαν από ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής με το πρόγραμμα modfitlt Version 5 σε κυτταρικούς πληθυσμούς ύστερα από το συγχρονισμό στην G1 φάση και στη συνέχεια προσθήκη ορού για 24 ώρες απουσία και παρουσία σιραμεσίνης. Σε κάθε κυτταρομετρία μελετήθηκαν 5.000 κύτταρα

Στην πρώτη εικόνα 18a απεικονίζονται ο κυτταρικός πληθυσμός μετά από συγχρονισμό στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, όπου σχεδόν όλα τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση αυτή. Έπειτα στην εικόνα 18b απεικονίζεται ο κυτταρικός κύκλος σε δείγμα ελέγχου ύστερα από 24 ώρες παρουσία ορού, αφού πρώτα επετεύχθη συγχρονισμός στην G1 φάση. Παρατηρείται πως τα κύτταρα φεύγουν από την G1 φάση του κύκλου και εισέρχονται στις φάσεις S και G2. Όσον αφορά την εικόνα 18c απεικονίζεται ο κυτταρικός κύκλος παρουσία σιραμεσίνης 10μM ύστερα από 24 ώρες επώασης με ορό αφού και πάλι πρώτα πραγματοποιήθηκε συγχρονισμός στην G1 φάση, παρατηρείται ότι ο κυτταρικός πληθυσμός βρίσκεται στη φάση G1, με την εικόνα να είναι όμοια με την εικόνα 18a. Σχεδόν ίδια είναι και τα αποτελέσματα της εικόνας 18d, όπου τα κύτταρα έχουν επωαστεί με σιραμεσίνη σε συγκέντρωση 20μM.

Στη συνέχεια παρατίθενται τα ίδια αποτελέσματα με πριν, με τη μορφή διαγραμμάτων dot plot, όπου και πάλι είναι εμφανές ότι στις 24 ώρες τα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με σιραμεσίνη (19c-d) έχουν παρόμοιο κυτταρικό κύκλο με αυτά που βρίσκονται σε συγχρονισμό στην G1 φάση τη χρονική στιγμή 0. (εικόνα 19a). Επίσης στις δύο εικόνες 19c-d όπου τα κύτταρα έχουν επωαστεί με σιραμεσίνη φαίνεται ότι απουσιάζει κυτταρικός πληθυσμός από τη φάση S. Ενώ κυρίως στη συγκέντρωση 20μM φαίνεται ότι το μέγεθος των κυττάρων είναι αρκετά μικρότερο σε σχέση με τα κύτταρα του δείγματος control.



Εικόνες 19: Απεικόνιση dot plot γραφημάτων που προέκυψαν από ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής με το πρόγραμμα modfitlt Version 5 σε κυτταρικούς πληθυσμούς ύστερα από το συγχρονισμό στην G1 φάση και στη συνέχεια προσθήκη ορού για 24 ώρες απουσία και παρουσία σιραμεσίνης. Σε κάθε κυτταρομετρία μελετήθηκαν 5.000 κύτταρα

Ο καρκίνος του παγκρέατος απασχολεί εκτενώς την επιστημονική κοινότητα λόγω της όλο και αυξανόμενης εμφάνισης του και της υψηλής θνησιμότητας του, εξ' αιτίας της μη έγκαιρης διάγνωσης και της εξαιρετικά έντονης μεταστατικής τους ιδιότητας. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών είναι 6 μήνες, ενώ ποσοστό μικρότερο του 10% των ασθενών επιβιώνει έως και τα 5 έτη. (Roy and Saikia 2016)

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η *in vitro* δράση της σιραμεσίνης η οποία αποτελεί ένα σ2 προσδέτη αγωνιστή των σ2 υποδοχέων στην παγκρεατική καρκινική σειρά PANC-01. Η έκφραση των σ2 υποδοχέων διαφέρει ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου καθώς επίσης μεταξύ των σταδίων του όγκου. (Zeng, Weng, Schneiderjr, et al. 2019).

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι η σιραμεσίνη εμφανίζει κυτταροτοξική δράση σε διάφορες καρκινικές σειρές, όπως και στην PANC-01. Τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής συνέβαλλαν και στην επιλογή, για τη μελέτη στην παρούσα πτυχιακή, της συγκεκριμένης καρκινικής σειράς, καθώς τα ευρήματα έδειξαν ότι η σιραμεσίνη εμφανίζει βέλτιστη δράση στις παγκρεατικές καρκινικές σειρές σε σχέση με σειρές άλλων καρκινικών τύπων που μελετήθηκαν. (Sereti et al. 2021) Στην παρούσα πτυχιακή, επιβεβαιώθηκε η κυτταροτοξική δράση της σιραμεσίνης η οποία είναι δοσοεξαρτώμενη. Πιο ειδικά, βρέθηκε ότι η σιραμεσίνη σε συγκέντρωση 11,1μM προκαλεί 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων.

Εκτός από την κυτταροτοξική δράση, για πρώτη φορά, μελετήθηκε η ικανότητα μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων να δημιουργούν αποικίες. Με τη μέθοδο αυτή μελετήθηκε η ικανότητα επιβίωσης των ανθεκτικότερων κυττάρων τα οποία μπορούν και προσομοιάζουν ένα *in vivo* πείραμα καθώς τα κύτταρα αυτά μπορούν να εμφανίσουν ανοχή σε θεραπείες, να οδηγήσουν σε δημιουργία δευτερογενών όγκων καθώς και σε επανεμφάνιση του καρκίνου. Η μέθοδος δημιουργίας κλώνων έδειξε τη δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ σιραμεσίνης και της ικανότητας δημιουργίας αποικιών. Συγκεκριμένα αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας οδηγούσε σε μείωση της ικανότητας των κυττάρων να δημιουργήσουν αποικίες, δηλώνοντας έτσι την ικανότητα της σιραμεσίνης να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των πιο ισχυρών καρκινικών κυττάρων.

Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της σιραμεσίνης στην ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων. Η μέθοδος wound healing, η οποία αποτελεί μία δυσδιάστατη μέθοδο της ικανότητας των κυττάρων να μετακινούνται, έδειξε πως η σιραμεσίνη μείωνε την ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν. Η ικανότητα τους αυτή φάνηκε ξανά να εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας, καθώς όσο αυξανόταν η δόση της ουσίας τόσο μειωνόταν η ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων.

Από τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής, παρατηρήθηκε ότι προσθήκη σιραμεσίνης σε συγκέντρωση 10μΜ και 20μΜ σε κυτταρικοί πληθυσμοί στους οποίους πραγματοποιήθηκε συγχρονισμός στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου για 48 ώρες προκάλεσε παραμονή των κυττάρων στην φάση G1 (G1 arrest). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με σιραμεσίνη για 24 ώρες, εμφάνιζαν το ίδιο πρότυπο κυτταρικού κύκλου με αυτά που είχαν συγχρονιστεί στη φάση G1. Αντίθετα το δείγμα ελέγχου το οποίο δεν περιείχε σιραμεσίνη, στις αντίστοιχες ώρες-24ώρες παρουσία ορού, εμφάνιζε εντελώς διαφορετικό πρότυπο, με τα κύτταρα να εισέρχονται στις φάσεις S και G2. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η σιραμεσίνη, πιθανόν, δρα στη φάση S ή/και G2 καθώς κύτταρα που βρίσκονται στην G1 φάση παραμένουν ζωντανά μη μπορώντας να εισέλθουν στις επόμενες φάσεις. Ωστόσο όσον αφορά την G2 φάση του κυτταρικού κύκλου δεν μπορούμε να γνωρίζουμε εάν τα κύτταρα πεθαίνουν σε αυτή τη φάση ή εάν παραμένουν ζωντανά και μπαίνουν εκ νέου στη φάση G1.

Η υπόθεση ότι η σιραμεσίνη δρα στην S ή/και G2 φάση του κυτταρικού κύκλου ενισχύεται και με τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από την επίδραση της σιραμεσίνης στον έλεγχο της βιωσιμότητας της καρκινικής σειράς PANC-01. Παρατηρήθηκε ότι η δράση της σιραμεσίνης σχετίζεται με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρισκόταν τα κύτταρα καθώς τα πειράματα διεξήχθησαν σε συγχρονισμένο στην G1 φάση και ασύγχρονο πληθυσμό κυττάρων. Συγκεκριμένα κύτταρα τα οποία βρισκόταν στην G1 φάση του κύκλου εμφάνιζαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην ουσία, υποδηλώνοντας, πιθανόν, ότι η σιραμεσίνη δεν δρα όσο τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση αυτή αλλά δρα στη φάση S ή G2 προκαλώντας, ίσως, καταστροφή του DNA. Αυτό είναι και μία πιθανή αιτία για τον θάνατο του 56% ασύγχρονου πληθυσμού κυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία σιραμεσίνης σε συγκέντρωση 20μΜ για 24 ώρες.

Με τη μελέτη της βιωσιμότητας της καρκινικής σειράς PANC-01, παρατηρήθηκε παράλληλα πως η σιραμεσίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ επίσης έχει και κυτταροτοξική δράση οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Η παρατήρηση αυτή προέκυψε μέσω μέτρησης των νεκρών κυττάρων με τη μέθοδο Trypan Blue, όπου όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση της σιραμεσίνης τόσο μεγαλύτερος ήταν ο αριθμός των νεκρών κυττάρων που παρατηρήθηκε. Από τα συγκεκριμένα πειράματα φάνηκε να σχετίζεται η δράση της σιραμεσίνης τόσο με τη συγκέντρωση της ουσίας, εμφάνιζε δηλαδή δόσοεξαρτώμενη δράση, όπως φάνηκε και από τη μέθοδο srb, αλλά και με το χρόνο έκθεσης των κυττάρων στην ουσία, δηλαδή χρονοεξαρτώμενη δράση, καθώς όσο περνούσε η ώρα επώασης των κυττάρων με σιραμεσίνη τόσο αυξανόταν ο αριθμός των νεκρών κυττάρων.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η δράση των σ2 προσδετών μπορεί να μη μεσολαβείται από την παρουσία των σ2 υποδοχέων. Συγκεκριμένα αποσιώπηση των σ2 υποδοχέων σε καρκινικές σειρές HeLa η δράση της σιραμεσίνης δεν επηρεάστηκε. (Zeng, Weng, Schneider, et al. 2019) Με την ανοσοαποτύπωση κατά western θελήσαμε να δούμε αρχικά εάν όντως εκφράζονται οι σ2 υποδοχείς. Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι εκφράζονται οι σ1 υποδοχείς, ο υποδοχέας της προγεστερόνης ο οποίος ταυτοποιήθηκε αρχικά ως ο σ2 υποδοχέας καθώς και η διαμεμβρανική πρωτεΐνη TMEM97 η οποία θεωρείται πλέον σ2 υποδοχέας. Τα επίπεδα έκφρασης του σ1 υποδοχέα ήταν χαμηλότερα σε σχέση με τον PGRMC1 και τον TMEM97, ο υποδοχέας τη χοληστερόλης PGRMC1 φάνηκε να έχει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης, ενώ ήταν εμφανής και η έκφραση της TMEM97 πρωτεΐνης. Συνεπώς δεν είναι εφικτό να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι η δράση της σιραμεσίνης στη σειρά PANC-01, δε διαμεσολαβείται από την παρουσία των σ2 υποδοχέων. Πιο συγκεκριμένα, χρήζει απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη για τη συσχέτιση της δράσης της σιραμεσίνης με τους σ2 υποδοχείς, καθώς ο Zeng και η ομάδα του μελέτησαν διαφορετική καρκινική κυτταρική σειρά, συνεπώς μπορεί η σύνδεση των σ2 υποδοχέων και της δράσης της σιραμεσίνης να διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών καρκινικών σειρών. Επιπρόσθετα, από τα παραπάνω ευρήματα σε συνδυασμό, με τις μελέτες του Zeng μπορεί να προκύψει το συμπέρασμα ότι η σιραμεσίνη ή κάποιος μεταβολίτης έχει την ικανότητα να προκαλεί κυτταρικό θάνατο ο οποίος δε σχετίζεται με την πρόσδεση της ουσίας στους σ2 υποδοχείς, αλλά μέσω άλλων μηχανισμών όπως καταστροφή του DNA, το οποίο ενισχύεται και με τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής.

Με βάση την βιβλιογραφία έχει βρεθεί ήδη ότι η σιραμεσίνη παρουσιάζει έντονη αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση σε διάφορες καρκινικές σειρές καθώς επίσης και σε *in vivo* πειράματα σε ποντικούς. Παράδειγμα αποτελεί το πείραμα του Česen και της ομάδας του οι οποίοι βρήκαν πως η σιραμεσίνη πυροδοτεί των κυτταρικό θάνατο έπειτα από δύο ημέρες σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 15μM στην κυτταρική σειρά HaCaT. (Hafner et al. 2013)

Οι μελέτες, όπως προκύπτει στην παγκόσμια βιβλιογραφία, για τη επίδραση της σιραμεσίνης σε καρκινικά κύτταρα είναι περιορισμένες. Οι περισσότερες αφορούν το μηχανισμό δράσης και τους στόχους σε κυτταρικό επίπεδο μέσω των οποίων η σιραμεσίνη οδηγεί στα κυτταροτοξικά αποτελέσματα, όπως για παραδειγμα μέσω της αποσταθεροποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης, της λυσοσωμικής μεμβράνης και της φερρόπτωσης (Hafner et al. 2013) (Ma et al. 2016) Έως τώρα, δεν έχει μελετηθεί εάν η σιραμεσίνη εμφανίζει άλλη επίδραση σε καρκινικά κύτταρα εκτός από την κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον οι μελέτες οι οποίες αφορούν παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι ελάχιστες, οι περισσότερες αφορούν καρκινικές σειρές του μαστού και τα καρκινικά κύτταρα HeLa . (Ostenfeld, Fehrenbacher, Høyer-Hansen, et al. 2005)

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη η οποία αφορά τη δράση της σιραμεσίνης στην παγκρεατική καρκινική σειρά PANC-01 προέκυψαν μια σειρά ευρημάτων τα οποία δεν έχουν αναφερθεί έως τώρα. Είναι γνωστό ότι η σιραμεσίνη προκαλεί κυτταροτοξικότητα σε καρκινικές σειρές όπως και επιβεβαιώθηκε στην υπό μελέτη καρκινική σειρά στην παρούσα πτυχιακή. Ωστόσο στη δική μας μελέτη σε *in vitro* πειράματα βρέθηκε για πρώτη φορά ότι η σιραμεσίνη μειώνει την ικανότητα ανθεκτικών κυττάρων να δημιουργούν αποικίες καθώς και την ικανότητα των

κυττάρων να μεταναστεύουν. Επίσης έγινε, μία πρώτη προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού μέσω του οποίου προκαλούνται όλα όσα προαναφέρθηκαν. Πρωτοπόρα είναι τα ευρήματα της παρούσας πτυχιακής, πως η σιραμεσίνη πιθανό να δρα στη φάση S ή/και G2 του κυτταρικού κύκλου, γιατί παρουσία της ουσίας σε συγχρονισμένο πληθυσμό κυττάρων παρατηρήθηκε G1 arrest ενώ σε ασύγχρονο πληθυσμό κυτταρικός θάνατος.

Χρήζει περαιτέρω μελέτη της δράσης της σιραμεσίνης. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την κυτταρομετρία ροής, πρέπει να μελετηθεί η δράση της σιραμεσίνης σε χρονικά διαστήματα μετά το πρώτο 24ωρο παρουσία ορού και σιραμεσίνης, τουλάχιστον για περαιτέρω 12 ώρες, καθώς από το πείραμα που πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διατριβή προκύπτει πως τα περισσότερα κύτταρα βρίσκονται στη φάση G2 μετά τις 30 ώρες παρουσία ορού ύστερα από συγχρονισμό. Επίσης εκτός από συγχρονισμό των κυττάρων στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου πρέπει να πραγματοποιηθεί πείραμα όπου τα κύτταρα θα συγχρονιστούν στην G2 φάση, ώστε να ελεγχθεί εάν η σιραμεσίνη δρα μόνο στη φάση S ή/ και στη φάση G2. Ενώ απαραίτητο κρίνεται από τα αποτελέσματα και η χρώση του πυρήνα για τον έλεγχο της καταστροφή του DNA που πιθανόν οδηγεί στο θάνατο των κυττάρων.

Επιπρόσθετα, σε μετ' έπειτα πειράματα μπορεί να πραγματοποιηθεί αποσιώπηση των  $\sigma 2$  υποδοχέων και να μελετηθεί εκ νέου η δράση της σιραμεσίνης, ώστε να δούμε εάν όντως η δράση της σιραμεσίνης σχετίζεται με την παρουσία των  $\sigma 2$  υποδοχέων. Επιπλέον, χρήσιμο θα ήταν να μελετηθούν εάν υπάρχουν μεταβολίτες της σιραμεσίνης και πως δρουν αυτοί.

Συνοψίζοντας, η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί τη βάση για μελλοντικές πιο λεπτομερείς μελέτες όσον αφορά τη σιραμεσίνη οι οποίες πιθανό να οδηγήσουν στην κατανόηση των μηχανισμών δράσης καθώς και της επίδρασης της ως αντιπολλαπλασιαστικός και αντιμεταστατικός παράγοντας ιδιαίτερα σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα ώστε να αποδειχθεί η χρησιμότητα της σαν ένας νέος πιο δραστικός αντικαρκινικό παράγοντα για τη θεραπεία του παγκρεατικού καρκίνου.



---

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Abatematteo, Francesca Serena, Mauro Niso, Enza Lacivita, and Carmen Abate. 2021. "Molecules Review  $\sigma$  2 Receptor and Its Role in Cancer with Focus on a MultiTarget Directed Ligand (MTDL) Approach." <https://doi.org/10.3390/molecules26123743>.
- Adamska, Aleksandra, Alice Domenichini, and Marco Falasca. "Molecular Sciences Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies." [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms).
- Alon, Assaf et al. 2017. "Identification of the Gene That Codes for the  $\Sigma$  2 Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(27): 7160–65. <https://www.pnas.org/content/114/27/7160> (November 10, 2021).
- — —. "Identification of the Gene That Codes for the  $\sigma$  2 Receptor." [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1705154114](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1705154114).
- Ansari, Daniel et al. 2014. "Pancreaticoduodenectomy--the Transition from a Low- to a High-Volume Center." *Scandinavian journal of gastroenterology* 49(4): 481–84. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24255988/> (January 31, 2022).
- Backer, Marina V., Joseph M. Backer, and Prakash Chinnaiyan. 2011. "Targeting the Unfolded Protein Response in Cancer Therapy." *Methods in Enzymology* 491: 37–56.
- Bardeesy, Nabeel et al. 2006. *Both P16 Ink4a and the P19 Arf-P53 Pathway Constrain Progression of Pancreatic Adenocarcinoma in the Mouse*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601273103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601273103).
- Bartz, Fabian et al. 2009. "Identification of Cholesterol-Regulating Genes by Targeted RNAi Screening." *Cell metabolism* 10(1): 63–75. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19583955/> (January 22, 2022).
- Bracci, Paige M. 2012. "IN PERSPECTIVE Obesity and Pancreatic Cancer: Overview of Epidemiologic Evidence and Biologic Mechanisms." *MOLECULAR CARCINOGENESIS* 51: 53–63.
- Brierley, James. 2006. "The Evolving TNM Cancer Staging System: An Essential Component of Cancer Care." *CMAJ : Canadian Medical Association Journal* 174(2): 155. [/pmc/articles/PMC1329448/](http://pmc/articles/PMC1329448/) (February 5, 2022).
- Cash, Timothy P et al. 2020. "Induction of Lysosome Membrane Permeabilization as a Therapeutic Strategy to Target Pancreatic Cancer Stem Cells." *Cancers* 12: 1790. [www.mdpi.com/journal/cancers](http://www.mdpi.com/journal/cancers).
- "Cell Cycle: Definition, Phases, and Diagram." <https://www.sciencefacts.net/cell->

- cycle.html (January 21, 2022).
- “Cell Cycle Control, Oncogenes, Tumor Suppressors | Learn Science at Scitable.” <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-cycle-control-by-oncogenes-and-tumor-14191459/> (February 5, 2022).
- Chin, Venessa et al. 2018. “Chemotherapy and Radiotherapy for Advanced Pancreatic Cancer.” *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018(3). /pmc/articles/PMC6494171/ (February 5, 2022).
- Chu, Uyen B. et al. 2015. “The Sigma-2 Receptor and Progesterone Receptor Membrane Component 1 Are Different Binding Sites Derived From Independent Genes.” *EBioMedicine* 2(11): 1806–13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26870805/> (January 22, 2022).
- Colabufo, Nicola Antonio et al. 2006. “Is the Sigma2 Receptor a Histone Binding Protein?” *Journal of medicinal chemistry* 49(14): 4153–58. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16821775/> (January 6, 2022).
- Darzynkiewicz, Zbigniew, Elzbieta Bedner, and Piotr Smolewski. 2001. “Flow Cytometry in Analysis of Cell Cycle and Apoptosis.” *Seminars in hematology* 38(2): 179–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11309699/> (January 31, 2022).
- Davidson, Michael et al. 2017. “Efficacy and Safety of MIN-101: A 12-Week Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of a New Drug in Development for the Treatment of Negative Symptoms in Schizophrenia.” *The American journal of psychiatry* 174(12): 1195–1202. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28750582/> (January 6, 2022).
- Deer, Emily L. et al. 2010. “Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines.” *Pancreas* 39(4): 425. /pmc/articles/PMC2860631/ (January 3, 2022).
- Dhar, Puneet, S Kalghatgi, and Vivek Saraf. “Pancreatic Cancer in Chronic Pancreatitis.”
- Ebrahimi-Fakhari, Darius et al. 2016. “Reduction of TMEM97 Increases NPC1 Protein Levels and Restores Cholesterol Trafficking in Niemann-Pick Type C1 Disease Cells.” *Human Molecular Genetics* 25(16): 3588–99. <https://academic.oup.com/hmg/article/25/16/3588/2525822>.
- Ercan, Gulinnaz, Ayfer Karlitepe, and Bulent Ozpolat. 2017. “Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches.” *Anticancer research* 37(6): 2761–75. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28551612/> (November 21, 2021).
- Georgiadis, Markos-Orestis, Olga Karoutzou Id, Angeliki-Sofia Foscolos, and Ioannis Papanastasiou. “Molecules Sigma Receptor ( $\Sigma$ R) Ligands with Antiproliferative and Anticancer Activity.” [www.mdpi.com/journal/molecules](http://www.mdpi.com/journal/molecules).
- Gilbert, Paul E., and William R. Martin. 1976. “Sigma Effects of Nalorphine in the Chronic Spinal Dog.” *Drug and Alcohol Dependence* 1(6): 373–76.
- Givan, Alice L. 2011. “Flow Cytometry: An Introduction.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 699: 1–29. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21116976/>

(January 31, 2022).

- Gradiz, Rui et al. 2016. "MIA PaCa-2 and PANC-1-Pancreas Ductal Adenocarcinoma Cell Lines with Neuroendocrine Differentiation and Somatostatin Receptors OPEN." [www.nature.com/scientificreports/](http://www.nature.com/scientificreports/).
- Hafner, M et al. 2013. "Siramesine Triggers Cell Death through Destabilisation of Mitochondria, but Not Lysosomes." *Cell Death and Disease* 4. [www.nature.com/cddis](http://www.nature.com/cddis).
- Haglund, C., J. Lundin, P. Kuusela, and P. J. Roberts. 1994. "CA 242, a New Tumour Marker for Pancreatic Cancer: A Comparison with CA 19-9, CA 50 and CEA." *British journal of cancer* 70(3): 487–92. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8080735/> (January 3, 2022).
- Hajj, Carla, and Karyn A. Goodman. 2015. "Pancreatic Cancer and SBRT: A New Potential Option?" *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* 20(5): 377–84. <https://journals.viamedica.pl/rpor/article/view/73642> (January 3, 2022).
- Han, Kai Yu et al. 2013. "Overexpression of MAC30 Is Associated with Poor Clinical Outcome in Human Non-Small-Cell Lung Cancer." *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34(2): 821–25. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23229099/> (January 6, 2022).
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100(1): 57–70. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10647931/> (December 31, 2021).
- . 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144(5): 646–74. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/> (December 31, 2021).
- Hausman, Daniel M. 2019. "What Is Cancer?" *Perspectives in Biology and Medicine* 62(4): 778–84. <https://doi.org/10.1353/pbm.2019.0046><https://muse.jhu.edu/article/740322> (December 31, 2021).
- Hellewell, Susan B., and Wayne D. Bowen. 1990. "A Sigma-like Binding Site in Rat Pheochromocytoma (PC12) Cells: Decreased Affinity for (+)-Benzomorphans and Lower Molecular Weight Suggest a Different Sigma Receptor Form from That of Guinea Pig Brain." *Brain research* 527(2): 244–53. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2174717/> (January 6, 2022).
- Hezel, Aram F et al. 2006. "Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/> (January 3, 2022).
- Hornick, John R et al. 2010. 9 Molecular Cancer *The Novel Sigma-2 Receptor Ligand SW43 Stabilizes Pancreas Cancer Progression in Combination with Gemcitabine*. <http://www.molecular-cancer.com/content/9/1/298>.
- HR, Schmidt, and Kruse AC. 2019. "The Molecular Function of  $\sigma$  Receptors: Past, Present, and Future." *Trends in pharmacological sciences* 40(9): 636–54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31387763/> (September 1, 2021).

- Hruban, Ralph H, Anirban Maitra, and Michael Goggins. 2008. "Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia." *Int J Clin Exp Pathol* 1: 306–16. [www.ijcep.com/IJCEP709011](http://www.ijcep.com/IJCEP709011) (February 5, 2022).
- Iodice, Simona, Sara Gandini, Patrick Maisonneuve, and Albert B Lowenfels. "Tobacco and the Risk of Pancreatic Cancer: A Review and Meta-Analysis." <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>.
- Jaster, Robert. 2004. "Molecular Regulation of Pancreatic Stellate Cell Function." *Molecular Cancer* 3(1): 1–8. <https://link.springer.com/articles/10.1186/1476-4598-3-26> (January 3, 2022).
- JE, Jonkman et al. 2014. "An Introduction to the Wound Healing Assay Using Live-Cell Microscopy." *Cell adhesion & migration* 8(5): 440–51. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25482647/> (September 1, 2021).
- Kayed, H. et al. 2004. "Expression Analysis of MAC30 in Human Pancreatic Cancer and Tumors of the Gastrointestinal Tract." *Histology and histopathology* 19(4): 1021–31. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15375745/> (January 22, 2022).
- Landi, Stefano. 2009. "Genetic Predisposition and Environmental Risk Factors to Pancreatic Cancer: A Review of the Literature." *Mutation research* 681(2–3): 299–307. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19150414/> (February 22, 2022).
- Liang, Chun Chi, Ann Y. Park, and Jun Lin Guan. 2007. "In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro." *Nature Protocols* 2:2 2(2): 329–33. <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.30> (January 4, 2022).
- Ma, S, E S Henson, Y Chen, and S B Gibson. 2016. "Ferroptosis Is Induced Following Siramesine and Lapatinib Treatment of Breast Cancer Cells." *Cell Death and Disease* 7. [www.nature.com/cddis](http://www.nature.com/cddis).
- Marrelli, Daniele et al. 2009. "CA19-9 Serum Levels in Obstructive Jaundice: Clinical Value in Benign and Malignant Conditions." *American journal of surgery* 198(3): 333–39. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19375064/> (January 3, 2022).
- McKinnon, Katherine M. 2018. "Flow Cytometry: An Overview." *Current protocols in immunology* 120: 5.1.1-5.1.11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29512141/> (January 31, 2022).
- Memba, Robert et al. 2017. "The Potential Role of Gut Microbiota in Pancreatic Disease: A Systematic Review." *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 17(6): 867–74. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28935288/> (January 3, 2022).
- Miserocchi, Giacomo et al. 2017. "Management and Potentialities of Primary Cancer Cultures in Preclinical and Translational Studies." *Journal of translational medicine* 15(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29116016/> (February 5, 2022).
- Mohammed, Somala, George Van Buren, William E Fisher, and William E Fish-Er. 2014. "Pancreatic Cancer: Advances in Treatment." *World J Gastroenterol*

- 20(28): 9354–60.  
<http://www.wjgnet.com/esps/HelpDesk>:[http://www.wjgnet.com/esps/helpdesks.aspx:9354-9360](http://www.wjgnet.com/esps/helpdesks.aspx?9354-9360)Availablefrom:URL:<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i28/9354.htm>DOI:<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9354>.
- Motoi, Fuyuhiko, and Michiaki Unno. “Adjuvant and Neoadjuvant Treatment for Pancreatic Adenocarcinoma.” *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2020(5): 483–89. <https://academic.oup.com/jjco/article/50/5/483/5742660>.
- MS, Ostenfled et al. 2008. “Anti-Cancer Agent Siramesine Is a Lysosomotropic Detergent That Induces Cytoprotective Autophagosome Accumulation.” *Autophagy* 4(4): 487–99. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18305408/> (September 1, 2021).
- Murray, Andrew. 1994. “Cell Cycle Checkpoints.” *Current opinion in cell biology* 6(6): 872–76. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7880536/> (January 31, 2022).
- “On the Morbid Anatomy and Symptoms of Cancer of the Pancreas - Digital Collections - National Library of Medicine.” <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-101172702-bk> (January 31, 2022).
- Ostenfeld, Marie Stampe, Nicole Fehrenbacher, Maria Høyer-Hansen, et al. 2005. “Effective Tumor Cell Death by S-2 Receptor Ligand Siramesine Involves Lysosomal Leakage and Oxidative Stress.” [www.aacrjournals.org](http://www.aacrjournals.org).
- Ostenfeld, Marie Stampe, Nicole Fehrenbacher, Maria Hoyer-Hansen, et al. 2005. “Effective Tumor Cell Death by Sigma-2 Receptor Ligand Siramesine Involves Lysosomal Leakage and Oxidative Stress.” *Cancer research* 65(19): 8975–83. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16204071/> (January 23, 2022).
- “Overview.”
- “PANC-1 | ATCC.” <https://www.atcc.org/products/crl-1469> (January 21, 2022).
- “Pancreas Functions, Location & Disease | Columbia Surgery.” <https://columbiasurgery.org/pancreas/pancreas-and-its-functions> (January 31, 2022).
- “Pancreatic Cancer Types | Johns Hopkins Medicine.” <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/pancreatic-cancer/pancreatic-cancer-types> (January 19, 2022).
- RA, Glennon. 2005. “Pharmacophore Identification for Sigma-1 (Sigma1) Receptor Binding: Application of the ‘Deconstruction-Reconstruction-Elaboration’ Approach.” *Mini reviews in medicinal chemistry* 5(10): 927–40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16250835/> (January 22, 2022).
- Riad, Aladdin et al. 2018. “Sigma-2 Receptor/TMEM97 and PGRMC-1 Increase the Rate of Internalization of LDL by LDL Receptor through the Formation of a Ternary Complex.” *Scientific reports* 8(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30443021/> (January 23, 2022).

- Roy, P. S., and B. J. Saikia. 2016. "Cancer and Cure: A Critical Analysis." *Indian Journal of Cancer* 53(3): 441. <https://www.indianjcancer.com/article.asp?issn=0019-509X;year=2016;volume=53;issue=3;spage=441;epage=442;aulast=Roy> (December 31, 2021).
- Samokhvalov, Andriy V., Jürgen Rehm, and Michael Roerecke. 2015. "Alcohol Consumption as a Risk Factor for Acute and Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and a Series of Meta-Analyses." *EBioMedicine* 2(12): 1996–2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26844279/> (February 5, 2022).
- Schafer, K. A. 1998. "The Cell Cycle: A Review." *Veterinary pathology* 35(6): 461–78. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9823588/> (January 31, 2022).
- Schmidt, Hayden R, and Andrew C Kruse. 2019. "The Molecular Function of  $\sigma$  Receptors: Past, Present, and Future HHS Public Access." *Trends Pharmacol Sci* 40(9): 636–54.
- Schnelldorfer, Thomas, and Michael G. Sarr. 2009. "Alessandro Codivilla and the First Pancreatoduodenectomy." *Archives of Surgery* 144(12): 1179–84. <https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/fullarticle/405587> (January 3, 2022).
- Schwartz, Arnold M., and Donald E. Henson. 2007. "Familial and Sporadic Pancreatic Carcinoma, Epidemiologic Concordance [4]." *American Journal of Surgical Pathology* 31(4): 645–46.
- Sereti, Evangelia et al. 2021. "Study of the Relationship between Sigma Receptor Expression Levels and Some Common Sigma Ligand Activity in Cancer Using Human Cancer Cell Lines of the NCI-60 Cell Line Panel." <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010038>.
- Springfeld, Christoph et al. 2019. "Chemotherapy for Pancreatic Cancer." *La Presse Médicale* 48(3): e159–74.
- Takeda, Yoshinori et al. 2017. "Asymptomatic Pancreatic Cancer: Does Incidental Detection Impact Long-Term Outcomes?" *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 21(8): 1287–95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28397027/> (February 5, 2022).
- "The Eukaryotic Cell Cycle - The Cell - NCBI Bookshelf." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/> (November 28, 2021).
- Torphy, Robert J, Yuki Fujiwara, and Richard D Schulick. 2028. "Pancreatic Cancer Treatment: Better, but a Long Way to Go." *Surgery Today* 50: 1117–25. <https://doi.org/10.1007/s00595-020-02028-0>.
- Unger, Keith et al. 2018. "Metabolomics Based Predictive Classifier for Early Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Oncotarget* 9(33): 23078. [/pmc/articles/PMC5955422/](https://pmc/articles/PMC5955422/) (January 3, 2022).
- Vichai, Vanicha, and Kanyawim Kirtikara. 2006. "Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening." *Nature Protocols* 2006 1:3 1(3): 1112–16. <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.179> (January 4, 2022).

- Voigt, Wieland. 2005. "Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity." *Methods in molecular medicine* 110: 39–48. <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-869-2:039> (January 4, 2022).
- "What Is Cancer? - National Cancer Institute." <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (January 31, 2022).
- Xu, Jinbin et al. 2011. "Identification of the PGRMC1 Protein Complex as the Putative Sigma-2 Receptor Binding Site." *Nature communications* 2(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21730960/> (January 22, 2022).
- Xu, Mu et al. "Obesity and Pancreatic Cancer: Overview of Epidemiology and Potential Prevention by Weight Loss."
- Xu, Yi et al. 2020. "Gut Microbiota: Its Potential Roles in Pancreatic Cancer." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org) 10: 572492. [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org).
- Yang, Kai et al. 2020. "Sigma-2 Receptor—A Potential Target for Cancer/Alzheimer's Disease Treatment via Its Regulation of Cholesterol Homeostasis." *Molecules* 25(22). [/pmc/articles/PMC7699687/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3541420/) (January 17, 2022).
- Zeng, Chenbo et al. 2014a. "Functional Assays to Define Agonists and Antagonists of the Sigma-2 Receptor." *Analytical Biochemistry* 448(1): 68–74.
- . 2014b. "Functional Assays to Define Agonists and Antagonists of the Sigma-2 Receptor." *Analytical biochemistry* 448(1): 68. [/pmc/articles/PMC3923374/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2493374/) (February 22, 2022).
- Zeng, Chenbo, Chi-Chang Weng, Mark E Schneiderjr, et al. 2019. "TMEM97 and PGRMC1 Do Not Mediate Sigma-2 Ligand-Induced Cell Death." *Cell Death Discovery* 5: 58. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0141-2>.
- Zeng, Chenbo, Chi Chang Weng, Mark E. Schneider, et al. 2019. "TMEM97 and PGRMC1 Do Not Mediate Sigma-2 Ligand-Induced Cell Death." *Cell Death Discovery* 5(1).
- Zeng, Chenbo, Aladdin Riad, and Robert H. Mach. 2020. "The Biological Function of Sigma-2 Receptor/TMEM97 and Its Utility in PET Imaging Studies in Cancer." *Cancers* 12(7): 1–13. [/pmc/articles/PMC7409002/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3541420/) (January 17, 2022).
- Zhang, Lulu, Santosh Sanagapalli, and Alina Stoita. 2018. "Challenges in Diagnosis of Pancreatic Cancer." *World Journal of Gastroenterology* 24(19): 2047. [/pmc/articles/PMC5960811/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3170811/) (December 27, 2021).
- Zhang, Yan Bo et al. 2020. "Combined Lifestyle Factors, Incident Cancer, and Cancer Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies." *British journal of cancer* 122(7): 1085–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32037402/> (December 31, 2021).
- Zhao, Zhi Yu, and Wei Liu. 2020. "Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment." *Technology in cancer research & treatment* 19. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33357065/> (December 27, 2021).

