

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

Τίτλος Διπλωματικής εργασίας

**«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ
ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΗ 2-ΔΕΟΞΥΓΛΥΚΖΗ ΚΑΙ ΤΟ ΔΙΧΛΩΡΟ-
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ, ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΛΥΣΗΣ ΣΕ
ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»**

Χριστίνα Δαμιανίδου
Φαρμακοποιός

Εργαστήριο Φαρμακολογίας,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Φεβρουάριος 2023

University of Thessaly
School of Health Sciences
Department of Biochemistry & Biotechnology
Postgraduate Program of Studies
"Toxicology"

Thesis Title

**"EVALUATION OF THE EFFECT OF ANTI-CANCER
SUBSTANCES IN COMBINATION WITH 2-DEOXYGLUCOSE
AND DICHLOROACETIC ACID AS GLYCOLYSIS INHIBITORS
IN CELL CULTURES"**

Christina Damianidou
Pharmacist

Pharmacology Laboratory,
Aristotle University of Thessaloniki
February 2023

Τίτλος Διπλωματικής εργασίας

**«Αξιολόγηση της επίδρασης αντικαρκινικών ουσιών
σε συνδυασμό με τη 2-δέοξυ-γλυκόζη και το διχλωρο-οξικό οξύ, ως αναστολείς
της γλυκόλυσης, σε κυτταροκαλλιέργειες»**

Επιβλέπων: Λευκοθέα Παπαδοπούλου, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Α.Π.Θ

Τριμελής επιτροπή :

Λευκοθέα Παπαδοπούλου, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Α.Π.Θ_

Ιωάννης Βιζιριανάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας Α.Π.Θ

Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας-Τοξικολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος και ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ Τοξικολογία του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη της κ. Παπαδοπούλου Λευκοθέας, καθηγήτριας Φαρμακολογίας του τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Λευκοθέα Παπαδοπούλου καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, ειδικά την Βάσω Τσικλή, κάτοχο του μεταπτυχιακού διπλώματος της Τοξικολογίας, για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους, την τριμελή επιτροπή, και τον κ. Νικολάου Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας, για τη χημική ένωση που μας παραχώρησε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη στήριξη και την ενθάρρυνσή τους όλο αυτό το διάστημα.

Περίληψη

Ένα από τα αναδυόμενα χαρακτηριστικά του καρκίνου είναι η απορρύθμιση της βιοενεργητικής των κυττάρων. Σε πολλά καρκινικά κύτταρα έχει παρατηρηθεί η τάση να προτιμάται η γλυκόλυση ως τρόπος παραγωγής ATP, αντί της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυτό, παρέχει μια βιοχημική βάση για το σχεδιασμό θεραπευτικών στρατηγικών για την επιλεκτική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της αναστολής της γλυκόλυσης. Στην παρούσα εργασία, δοκιμάζουμε την επίδραση δύο αναστολέων της γλυκόλυσης, της 2-δεοξυ-γλυκόζης (2-DG) και του διχλωροοξικού οξέος (DCA), σε καρκινικά κύτταρα, όταν χορηγούνται μόνοι τους όσο και σε συνδυασμό με δοξορουβικίνη και *rhein-amide tropolone*. Η *rhein-amide tropolone* είναι ένα παράγωγο τροπολόνης που έχει σχεδιαστεί για να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η επίδρασή του στα καρκινικά κύτταρα μελετάται επίσης σε αυτή την έρευνα. Οι τέσσερις ενώσεις και οι συνδυασμοί δοξορουβικίνης-2DG, δοξορουβικίνης DCA, *rhein-amide tropolone* - 2-DG και *rhein-amide tropolone* -DCA δοκιμάστηκαν σε κυτταρικές καλλιέργειες της κυτταρικής σειράς K562 που αναπτύχθηκε σε RPMI. Μετρήσαμε τη συγκέντρωση των κυττάρων καθώς και το ποσοστό των νεκρών κυττάρων με τη μέθοδο *trypan blue* στις 72 ώρες για τις 2-DG και DCA και στις 24, 48 και 72 ώρες για τις και *rhein-amide tropolone* προκειμένου να υπολογίσουμε το ic50 τους και να εκτιμήσουμε την πιθανή επίδρασή τους στον κυτταρικό θάνατο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η *rhein-amide tropolone* μπορεί πράγματι να είναι σε θέση να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το DCA φαίνεται επίσης να έχει ανασταλτική δράση και να αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη, καθώς και την επίδραση της *rhein-amide tropolone*. Η 2-DG, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, φάνηκε να έχει ελαφρά ανασταλτική επίδραση όταν χορηγείται μόνη της και καμία αξιοσημείωτη επίδραση στη δράση είτε της δοξορουβικίνης είτε της *rhein-amide tropolone*.

Abstract

One of the emerging hallmarks of cancer is the deregulation of cellular energetics. A tendency to favor glycolysis as a way to produce ATP, instead of oxidative phosphorylation has been observed in many cancer cells. This, provides a biochemical foundation for the design of therapeutic strategies to selectively kill cancer cells by inhibiting glycolysis. In this essay, we test the effect of two glycolysis inhibitors, 2-deoxy-glucose (2-DG) and dichloroacetate (DCA), on cancer cells, on their own as well as in combination with doxorubicin and *rhein-amide tropolone*. *Rhein-amide tropolone* is a *tropolone* derivative that has been designed to have antiproliferative abilities. Its effect on cancer cells is also being studied in this research. All four of the compounds and the combinations of doxorubicin-2-DG, doxorubicin DCA, *rhein-amide tropolone*- 2-DG and *rhein-amide tropolone*-DCA were tested in cell cultures of K562 cell line grown in RPMI. We counted the concentration of cells as well as the percentage of dead cells with the method of *trypan blue* at 72 hours for 2-DG and DCA and at 24, 48 and 72 hours for and *rhein-amide tropolone* in order to calculate their ic50 and to estimate their potential effect in cell death. The results indicate that *rhein-amide tropolone* may indeed be able to inhibit cellular proliferation. DCA also seems to have an inhibitory effect and to increase doxorubicin-induced cell death as well as the effect of *rhein-amide tropolone*. 2-DG, in the concentrations used, seemed to have a slight inhibiting effect when administered on its own and no notable effect in the activity of either doxorubicin or *rhein-amide tropolone*.

Συντομογραφίες

ATP: Adenosine triphosphate
ADP: Adenosine diphosphate
NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide
FADH₂: Flavin adenine dinucleotide
CoA: Coenzyme A
HK: Hexokinase
DNA: Deoxyribonucleic acid
mtDNA: mitochondrial DNA
2-DG: 2-Deoxyglucose
DCA: Dichloroacetate
PDK: Pyruvate dehydrogenase kinase
PDH: Pyruvate dehydrogenase
HIF: Hypoxia-induced Factor

1. Εισαγωγή

1.1 Μεταβολισμός των κυττάρων

Βιοενεργητική

Τα κύτταρα απαιτούν συνεχή παροχή ενέργειας για να διατηρήσουν την λειτουργία τους. Η ενέργεια αυτή παρέχεται από τη χημική ενέργεια των δεσμών μορίων, όπως οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες μέσω της οξειδωσής τους (Alberts B. et al. 2002).

Η διαδικασία οξειδωσης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερης ενέργειας που μπορεί να αποθηκευτεί σε «δεσμούς υψηλής ενέργειας» φωσφοανυδρίνης μέσα σε μόρια όπως οι διφωσφορικοί και τριφωσφορικοί νουκλεοζίτες, όπως η 5'διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και η 5'τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), το φωσφοενολοπυρουβικό, το καρβαμοϋλοφωσφορικό, το 2,3-διφωσφογλυκερικό και άλλα φωσφαγόνα όπως η φωσφοαργινίνη ή η φωσφοκρεατίνη. Μεταξύ αυτών, το ATP είναι ο συνδετικός κρίκος μεταξύ της παραγωγής ενέργειας και των απαιτητικών διεργασιών που απαιτούν κατανάλωση ενέργειας οι οποίες σχετίζονται με τον σχηματισμό και την υδρόλυση ή μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας.

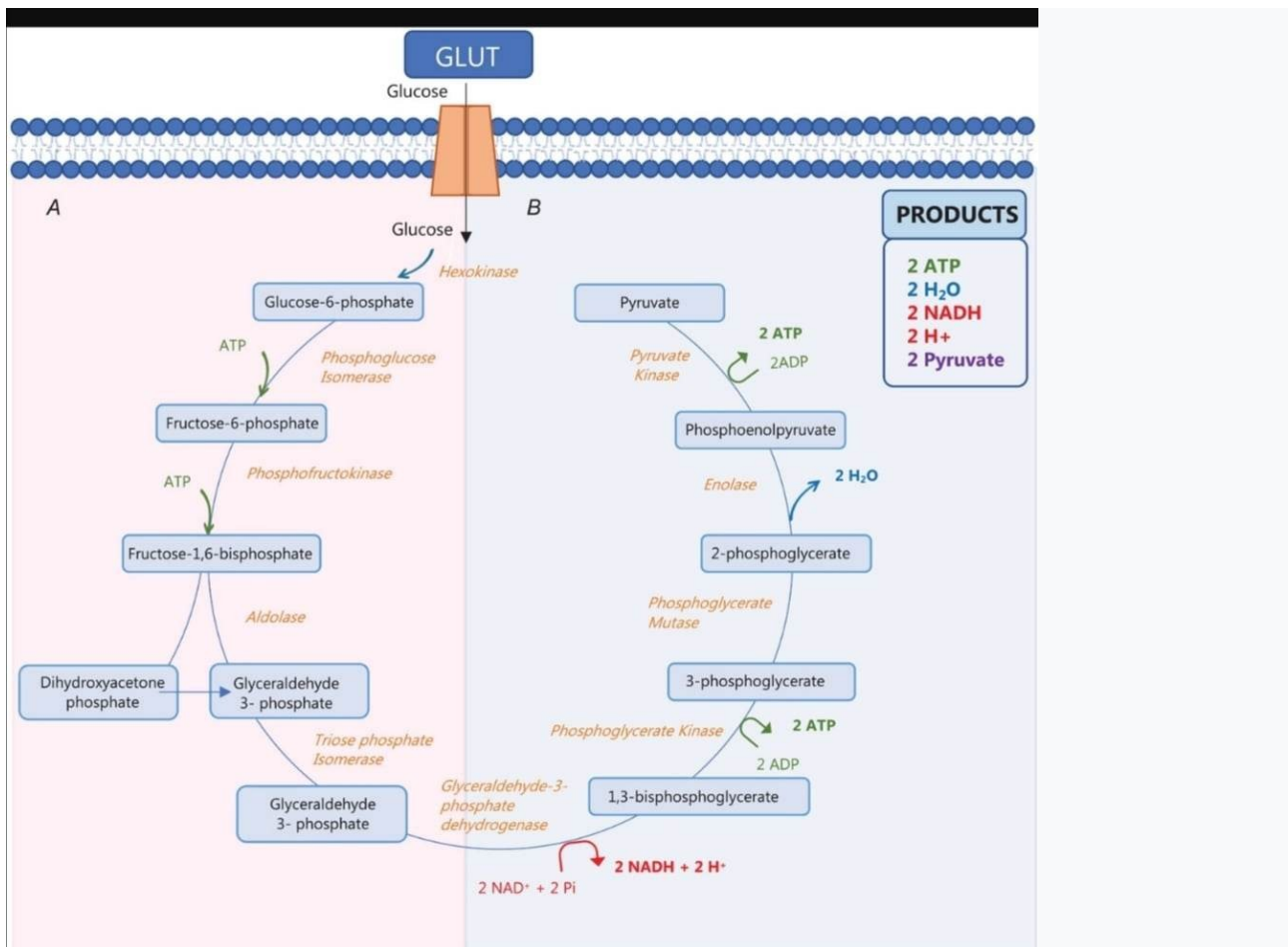
Η κύρια πηγή ενέργειας των κυττάρων είναι η γλυκόζη, η οποία καταβολίζεται μέσω τριών διεργασιών οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή ATP: γλυκόλυση, κύκλος τρικαρβοξυλικού οξέος (κύκλος TCA ή Krebs) και οξειδωτική φωσφορυλίωση (Bonora M et al. 2012).

Γλυκόλυση

Με την διαδικασία της γλυκόλυσης ένα μόριο γλυκόζης διασπάται και μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού μέσω μιας σειράς αντιδράσεων οι οποίες πραγματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από δέκα μεταβολικά ένζυμα, τα οποία αποτελούν την γλυκολυτική οδό, και οδηγούν στην παραγωγή δύο μορίων NADH και τεσσάρων μορίων ATP (S. J. Kierans and C. T. Taylor 2021). Ωστόσο, οι αντιδράσεις αυτές, απαιτούν και την κατανάλωση δύο μορίων ATP, άρα η τελική απόδοση της γλυκόλυσης είναι δύο μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης (Bonora M et al. 2012).

Η οξειδωση της γλυκόζης πραγματοποιείται χωρίς την κατανάλωση μοριακού οξυγόνου, για αυτόν τον λόγο η γλυκόλυση αποτελεί την κύρια μέθοδο παραγωγής ενέργειας σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (Alberts B. et al. 2002).

Ο ρυθμός της γλυκόλυσης εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα και το ρυθμό πρόσληψης της γλυκόλυσης καθώς και από την δραστηριότητα συγκεκριμένων ενζύμων. Η πρόσληψη της γλυκόζης επιτυγχάνεται μέσω δύο οδών : της ενεργού μεταφοράς της γλυκόζης, μέσω των εξαρτώμενων από το νάτριο μεταφορέων γλυκόζης (SGLT), ή της διευκολυνόμενης διάχυσης μέσω μεταφορέων γλυκόζης (GLUT) που βρίσκονται εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Τα ένζυμα της γλυκολυτικής οδού που καθορίζουν τον ρυθμό είναι η εξοκινάση (HK), η κινάση της φωσφορικής φρουκτόζης και η κινάση του πυροσταφυλικού οξέος (Kierans S. J and Taylor C.T. 2021).



Εικόνα 1 Η γλυκολυτική οδός (Kierans S. J and Taylor C.T. 2021)

Η πρώτη αντίδραση είναι η φωσφορυλίωση της υδροξυλομάδας του C-6 της γλυκόζης από την εξοκινάση (HK) με τη χρήση ενός μορίου ATP. Με τον τρόπο αυτό παραμένει στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς η 6-φωσφορική γλυκόζη που σχηματίζεται δεν μπορεί εξέλθει από το κύτταρο. Στη συνέχεια η 6-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται από την ισομεράση της 6 φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική φρουκτόζη η οποία στο επόμενο στάδιο φωσφορυλιώνεται σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη από την κινάση της φωσφορικής φρουκτόζης με παράλληλη μετατροπή ενός μορίου ATP σε ADP (Alberts B. et al. 2002). Η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη διασπάται έπειτα από την αλδολάση σε φωσφορική διυδροξυακετόνη (DHAP) και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (GAP). Η DHAP στη συνέχεια μετατρέπεται σε GAP από την ισομεράση της φωσφορικής τριόζης. Κάθε μόριο GAP οξειδώνεται από την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) και φωσφορυλιώνεται από την ανόργανη φωσφατάση σε 1,3-διφωσφορικό γλυκερικό οξύ. Η GAPDH χρησιμοποιεί ως συνένζυμο το νικοτιναμινοαδενινο νουκλεοτίδιο (NAD⁺). Για κάθε μόριο GAP ένα μόριο NAD⁺ μετατρέπεται σε NADPH το οποίο χρησιμοποιείται στην αναπνευστική αλυσίδα ως δότης ηλεκτρονίων. (Bonora M et al. 2012)

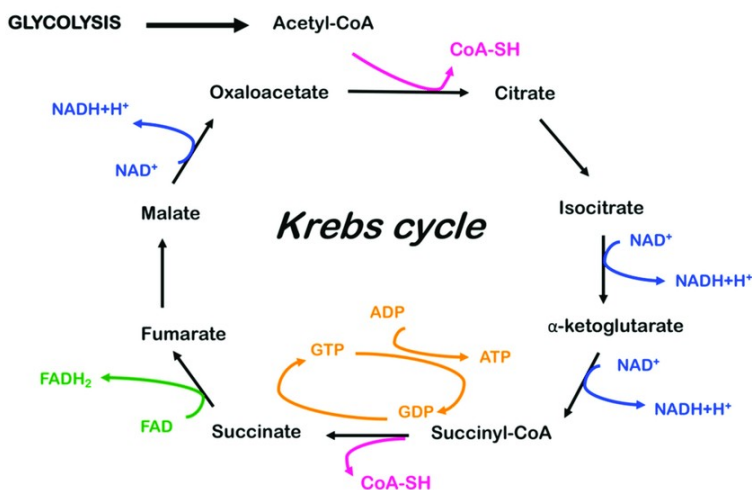
Το 1,3-διφωσφογλυκερικό οξύ μετατρέπεται σε 3-φωσφογλυκερικό οξύ μέσω της δράσης του ενζύμου κινάση του φωσφογλυκερικού (PGK) οδηγώντας στην παραγωγή ενός μορίου ATP από ADP. Το 3-φωσφογλυκερικό ισομεριώνεται από το ένζυμο φωσφογλυκερινομουτάση σε 2-φωσφογλυκερικό, που στη συνέχεια αφυδατώνεται προς φωσφοένολπυροσταφυλικό οξύ από το ένζυμο ενολάση. Η τελευταία αντίδραση της γλυκολυτικής οδού είναι η μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το φωσφοένολπυροσταφυλικό οξύ στο ADP με αποτέλεσμα τον σχηματισμό

πυροσταφυλικού οξέος και ATP και καταλύεται από την κινάση του πυροσταφυλικού οξέος. Το πυροσταφυλικό οξύ στη συνέχεια μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια όπου χρησιμοποιείται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Γεωργιάτσου Ι.Γ. 2013).

Κύκλος του κιτρικού οξέος

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια. Οι αντιδράσεις αυτές αποτελούν βασικό τμήμα της αερόβιας κυτταρικής αναπνοής. Ο καταβολισμός των διαφόρων θρεπτικών συστατικών, όπως τα λιπίδια, οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες, οδηγεί στην παραγωγή μικρότερων μονάδων και μεταβολιτών, οι οποίοι συγχωνεύονται στο επίπεδο του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA). Ενώ υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι για την είσοδο των μεταβολιτών στον κύκλο TCA, τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά συνήθως συγκλίνουν στην παραγωγή του ακετυλο-CoA μέσω διάφορων οδών. Στην περίπτωση της γλυκόζης, προέρχεται από το πυροσταφυλικό που παράγεται κατά τη γλυκόλυση μέσω της δραστηριότητας του συμπλόκου πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης το οποίο καταλύει την οξείδωση του πυροσταφυλικού σε ακετυλο συνένζυμο-A και διοξειδίο το άνθρακα με παράλληλη αναγωγή ενός μορίου NAD σε NADH. Συνολικά, κατά τη διάρκεια του κύκλου του Krebs παράγονται τρία μόρια NADH και ένα μόριο FADH₂ που στη συνέχεια χρησιμοποιούνται στην αναπνευστική αλυσίδα και ένα μόριο ATP ή GTP.

Η πρώτη αντίδραση του κύκλου του κιτρικού οξέος είναι η καταλυόμενη από την κιτρική συνθάση συμπύκνωση ενός μορίου ακετυλο-CoA και ενός μορίου οξαλοξικού για τη δημιουργία κιτρικού, το οποίο στην επόμενη αντίδραση μετατρέπεται σε ισοκιτρικό. Η δεύτερη αντίδραση είναι αντιστρεπτή και καταλύεται από την ακονιτάση.



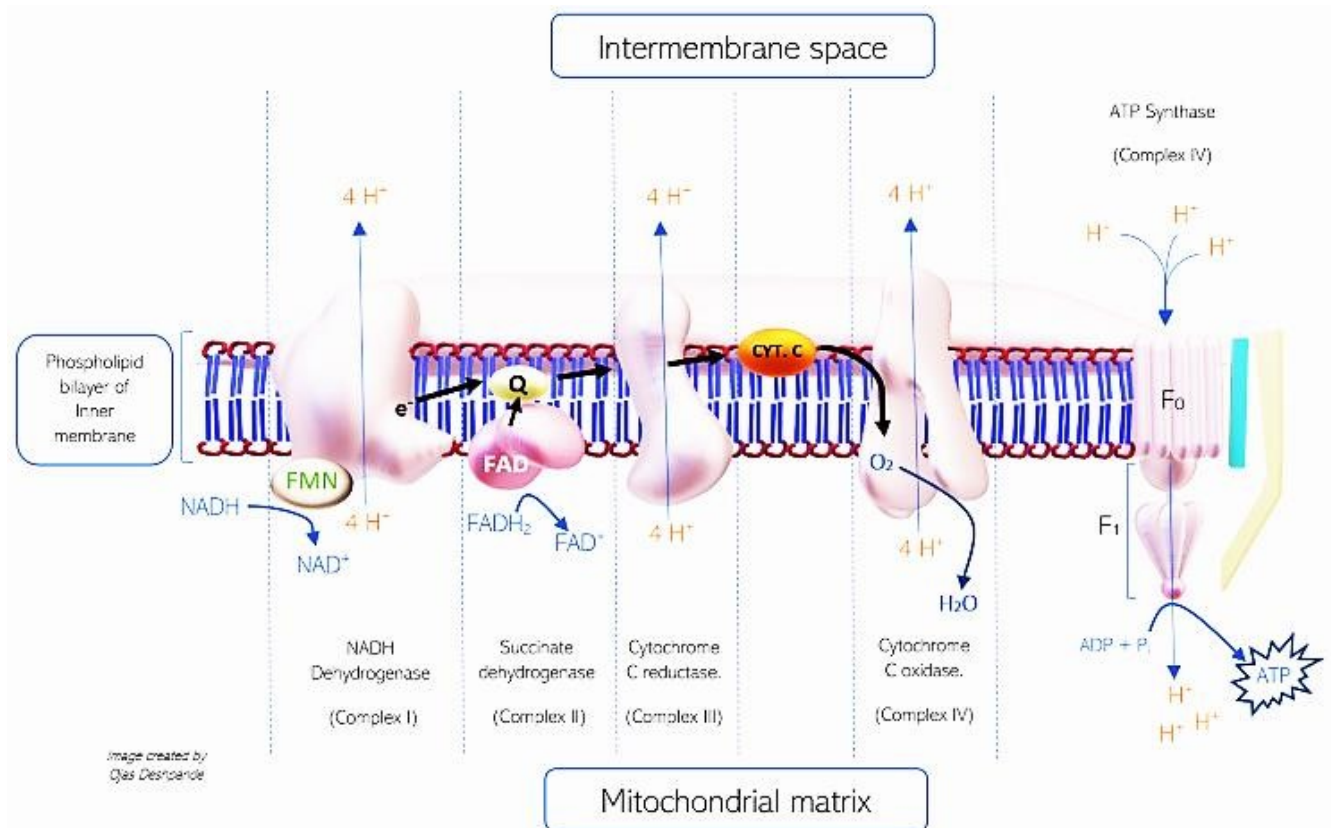
Εικόνα 2 Κύκλος του κιτρικού οξέος (Protasoni M., Zeviani M. 2021)

Στο τρίτο στάδιο του κύκλου του κιτρικού οξέος το ισοκιτρικό μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό από το ένζυμο δεϋδρογονάση του ισοκιτρικού. Το α-κετογλουταρικό αποκαρβοξυλιώνεται από την δεϋδρογονάση του α-κετογλουταρικού σε σουκινυλ-CoA με παράλληλη αναγωγή ενός μορίου NAD σε NADH. Στο επόμενο βήμα, που καταλύεται από τη συνθετάση του σουκινυλ-Coa, απομακρύνεται CoA και η ενέργεια που παράγεται χρησιμοποιείται για την φωσφορυλίωση του GDP, ή του ADP, σε GTP, ή ATP. Η εκλεκτικότητα για το νουκλεοτίδιο προσδιορίζεται από το

εμπλεκόμενο ισοένζυμο. Το ηλεκτρικό οξύ στη συνέχεια οξειδώνεται σε φουμαρικό από την ηλεκτρική δεϋδρογονάση. Κατά την διάρκεια αυτής της αντίδρασης ένα μόριο FAD ανάγεται σε FADH₂. Το φουμαρικό οξύ έπειτα, μέσω της δράσης της υδράσης του φουμαρικού, μετατρέπεται σε μηλικό οξύ, το οποίο τελικά οξειδώνεται σε οξαλοξικό οξύ. Η τελευταία αντίδραση καταλύεται από την δεϋδρογονάση του L-μηλικού οξέος και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μορίου NADH (Bonora M et al. 2012).

Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Ως οξειδωτική φωσφορυλίωση ορίζεται η κυτταρική διαδικασία που αξιοποιεί την αναγωγή οξυγόνου μέσω της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων για την δημιουργία φωσφορικών δεσμών υψηλής ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) (Deshpande O.A, . Mohiuddin S.S 2021). Πραγματοποιείται σε αερόβιες συνθήκες στα μιτοχόνδρια. Σε αυτή την διαδικασία εμπλέκονται τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας και η ATP συνθάση. Η αναπνευστική αλυσίδα αποτελείται από τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα: την NADH- εξαρτώμενη οξειδοαναγωγή της ουβικινόνης (σύμπλοκο 1), την δεϋδρογονάση του ηλεκτρικού (σύμπλοκο 2), την οξειδοαναγωγή της ουβικινόνης/κυτοχρώματος c (σύμπλοκο 3) και την οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο 4), και δύο μεταφορείς ηλεκτρονίων: την ουβικινόνη και το κυτόχρωμα c. Η μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω των συμπλόκων I, III και IV προκαλεί άντληση πρωτονίων και δημιουργεί διαφορά συγκέντρωσης πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, η οποία προωθεί την λειτουργία της ATP συνθάσης. Η ATP συνθάση αποτελείται από την F₀, που επιτρέπει την μεταφορά πρωτονίων και την F₁ υπομονάδα, η οποία καταλύει την φωσφορυλίωση του ADP σε ATP.



Εικόνα 3 Λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. (Deshpande O.A, . Mohiuddin S.S 2021)

Ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH μέσω του σύμπλοκου 1 και από το ηλεκτρικό οξύ μέσω FAD με τη συμβολή του συμπλόκου 2 στην ουβικινόνη. Η ανηγμένη ουβικινόνη στη συνέχεια μεταφέρει ηλεκτρόνια στο σύμπλοκο 3, τα οποία έπειτα μεταφέρονται μέσω διαφόρων ομάδων αίμης στο κυτόχρωμα c, που βρίσκεται στον διαμεμβρανικό χώρο, και από εκεί στη συνέχεια στο σύμπλοκο 4. Στο σύμπλοκο 4 τα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c συσσωρεύονται σε κέντρα Cu και στη συνέχεια μεταφέρονται μέσω ομάδων αίμης στο οξυγόνο οδηγώντας στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό.

Για κάθε δύο ηλεκτρόνια που αφαιρούνται από ένα μόριο NADH στο διαμεμβρανικό χώρο ελευθερώνονται: τέσσερα πρωτόνια από το σύμπλοκο I και το σύμπλοκο III και δύο από το σύμπλοκο IV. Αυτό προκαλεί την δημιουργία ηλεκτρικού δυναμικού 180-200 mV και διακύμανση του pH περίπου 0,75. Αυτό οδηγεί σε κίνηση πρωτονίων προς το εσωτερικό του μιτοχόνδριου μέσω ενός καναλιού που βρίσκεται στην F_0 υπομονάδα. Διαβίβαση πρωτονίων από την F_0 υπομονάδα οδηγεί σε αλλαγές στη διαμόρφωση της F_1 υπομονάδας. Η ροή των πρωτονίων προκαλεί περιστροφή της F_0 υπομονάδας η κίνηση αυτή μεταφέρεται στην F_1 υπομονάδα μέσω μιας γ υπομονάδας η οποία τις συνδέει. Η F_1 έχει τριμερή διαμόρφωση και αποτελείται από $\alpha\beta$ διμερή. Αυτό επιτρέπει την υιοθέτηση τριών διαφορετικών μορφολογικών καταστάσεων, οι οποίες είναι ικανές να δεσμεύουν ADP + Pi, ATP ή να παραμένουν αδέσμευτες. Οι διαδοχικές αλλαγές οδηγούν στη δέσμευση των υποστρωμάτων, τη φωσφορυλίωση του ADP σε ATP και τέλος στην απελευθέρωση του ATP. Για τη σύνθεση και απελευθέρωση ενός μορίου ATP απαιτούνται συνολικά τέσσερα πρωτόνια, άρα για κάθε μόριο NADH που συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα παράγονται 2,5 μόρια ATP (Bonora M et al. 2012). Το συνολικό ενεργειακό κέρδος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι περίπου 36 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης.

Υπό αερόβιες συνθήκες, τα φυσιολογικά κύτταρα βασίζονται στη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες ευνοείται η γλυκόλυση και το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γαλακτικό στο κυτταρόπλασμα (Bonora M et al. 2012). Αυτός ο επαγόμενος από την υποξία επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού είναι το κλειδί για την ικανοποίηση των κυτταρικών ενεργειακών απαιτήσεων κατά τη διάρκεια του οξέος υποξικού στρες. Σε μεταγραφικό επίπεδο, αυτή η μεταβολική μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορα μονοπάτια, όπως ο επαγωγίμος από την υποξία παράγοντας-1 α (HIF-1 α) ο οποίος επάγει αυξημένη έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων και μεταφορέων γλυκόζης, ενώ παράλληλα οδηγεί σε καταστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Ο HIF-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση πολλών διαφορετικών γονιδίων όπως τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα, τον αυξητικό παράγοντα- β , και τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT1 σε περίπτωση απουσίας επαρκούς οξυγόνου στο κυτταρικό περιβάλλον. Για τον λόγο αυτό επηρεάζει κυτταρικές δραστηριότητες όπως η αγγειογένεση, η γλυκόλυση και η κυτταρική επιβίωση. Επίσης, ο HIF-1 ενεργοποιεί τις κινάσες της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PKDs), αδρανοποιώντας έτσι την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού και εμποδίζοντας τη ροή του πυροσταφυλικού στον κύκλο TCA. Η μειωμένη μεταφορά του πυροσταφυλικού στα μιτοχόνδρια μειώνει το ρυθμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της κατανάλωσης οξυγόνου (Jang M et al 2013, Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A 2019). Ο HIF-1 μπορεί επίσης να προκαλέσει μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων ανά κύτταρο, λόγω επαγωγής του MXI1, ενός ανταγωνιστή του Myc, ο οποίος ρυθμίζει τη βιογένεση των μιτοχονδρίων. Ένας τρίτος μηχανισμός, με τον οποίο ο HIF-1 επηρεάζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία, είναι η μεταβολή της δραστηριότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A 2019) Ο HIF είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από μια υπομονάδα α ευαίσθητη στο οξυγόνο και μια υπομονάδα β . Από τα τρία ομόλογα του HIF α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) που

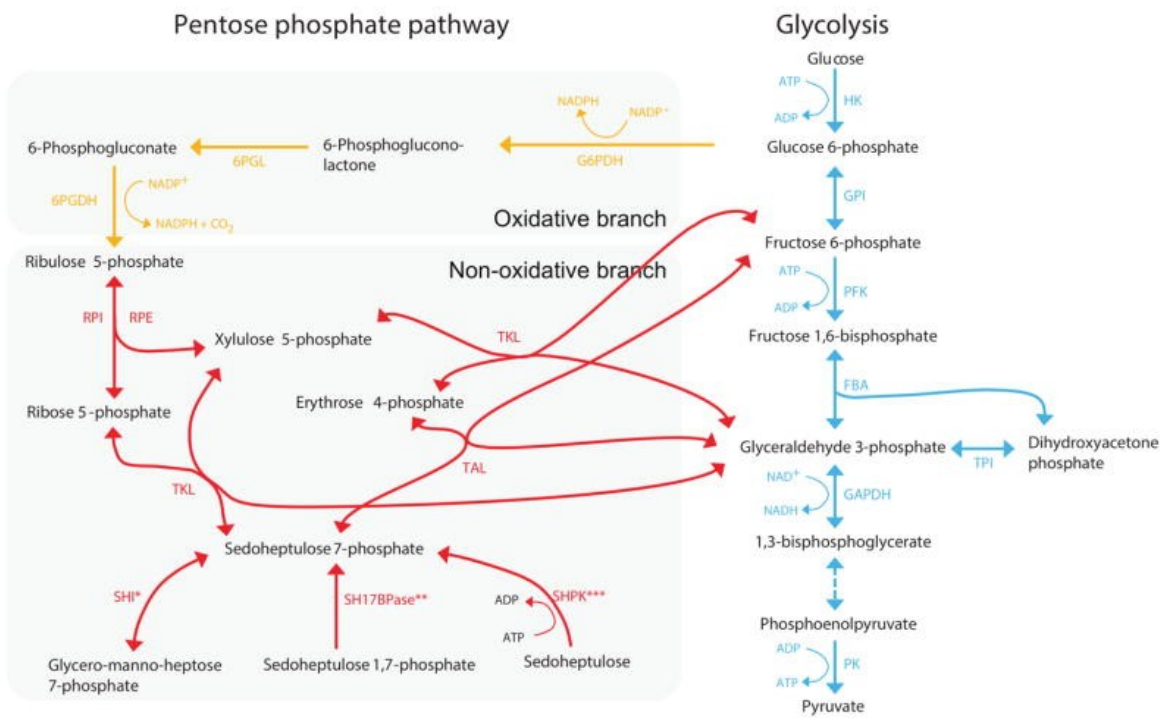
έχουν ταυτοποιηθεί, ο HIF-1α είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση της γλυκόλυσης σε απόκριση στην υποξία. Υπό συνθήκες επαρκούς παροχής οξυγόνου ο HIF αποικοδομείται ταχέως ως αποτέλεσμα της οξυγονοεξαρτώμενης υδροξυλίωσης υπολοίπων προλίνης της α υπομονάδας από μέλη της οικογένειας της προλυλικής υδροξυλάσης (PHD).

Ενώ αυτή η αύξηση της γλυκολυτικής ροής είναι ευεργετική για τη διατήρηση της βιοενεργειακής ομοιόστασης κατά τη διάρκεια της υποξίας, οι οδοί που διαμεσολαβούν την αύξηση αυτή μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν από τα καρκινικά κύτταρα για την προώθηση της επιβίωσης και της ανάπτυξης του όγκου (S. J. Kierans and C. T. Taylor 2021).

Άλλα μεταβολικά μονοπάτια:

Οδός των φωσφορικών πεντοζών

Μια εναλλακτική οδός μεταβολισμού της γλυκόζης είναι η οδός των φωσφορικών πεντοζών, γνωστή επίσης ως οδός του φωσφογλυκονικού ή παρακαμπτήρια οδός της μονοφωσφορικής εξόζης. Λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και στους περισσότερους ιστούς λειτουργεί παράλληλα με την γλυκόλυση (I.G. Γεωργιάτσου 2013). Η οδός αυτή είναι σημαντική για τη διατήρηση της ανθρακικής ομοιόστασης και την βιοσύνθεση αμινοξέων και νουκλεοτιδίων. Χωρίζεται στο οξειδωτικό και στο μη οξειδωτικό κομμάτι. Το πρώτο είναι υπεύθυνο για την μετατροπή της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε διοξείδιο του άνθρακα, 5-φωσφορική ριβουλόζη και NADPH και το δεύτερο μεταβολίζει τα γλυκολυτικά ενδιάμεσα προϊόντα 6-φωσφορική φρουκτόζη και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη καθώς και σάκχαρα σεδοεπτουλόζης, αποδίδοντας 5-φωσφορική ριβόζη για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και πρόδρομες ενώσεις φωσφορικών σακχάρων για τη σύνθεση αμινοξέων. Ανάλογα με τις βιοχημικές απαιτήσεις του κυττάρου, το μη οξειδωτικό κομμάτι μπορεί να τροφοδοτεί τη γλυκόλυση με ενδιάμεσα προϊόντα που προέρχονται από την 5-φωσφορική ριβόζη και αντίστροφα (A. Stincone et.al 2015).



Εικόνα 4 Η οδός των φωσφορικών πεντοζών και η σύνδεση της με την γλυκόλυση (Stincone A et.al 2015)

Η πρώτη αντίδραση είναι η οξείδωση της 6-φωσφορικής γλυκόζης από το ένζυμο δεϋδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης με αναγωγή του συνενζύμου NADP^+ . Η 6-φωσφογλυκονολακτόνη που σχηματίζεται από αυτή την αντίδραση υδρολύεται από το ένζυμο λακτονάση προς 6-φωσφογλυκονικό οξύ το οποίο στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται οξειδωτικά από την δεϋδρογονάση του 6-φωσφογλυκονικού οξέος με παράλληλη αναγωγή ενός μορίου NADP^+ . Η αντίδραση αυτή σηματοδοτεί το τέλος του οξειδωτικού μέρους της μεταβολικής οδού και έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό NADPH , CO_2 , και 5-φωσφορικής ριβουλόζης. Συνολικά, ένα μόριο 5-φωσφορικής ριβουλόζης και δύο μόρια NADPH παράγονται από ένα μόριο γλυκόζης. Η 5-φωσφορική ριβουλόζη ισομεριώνεται τελικά σε 5-φωσφορική ριβόζη (Ι.Γ. Γεωργάτσου 2013).

Οι κυτταρικές απαιτήσεις για NADPH είναι πολύ μεγαλύτερες από ότι οι αντίστοιχες για πεντόζες. Η περίσσεια φωσφορικών πεντοζών μέσω μιας σειράς αντιδράσεων που καταλύονται από τα ένζυμα τρανσκετολάση και τρανσαλδολάση χρησιμοποιείται για την αναγέννηση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Στις αντιδράσεις αυτές εισέρχονται και μόρια 6-φωσφορική φρουκτόζης και 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδης που παράγονται κατά την γλυκόλυση, καθώς και σάκχαρα σεδοεπτουλόζη (Γεωργάτσου Ι.Γ. 2013, Stincone A et.al 2015).

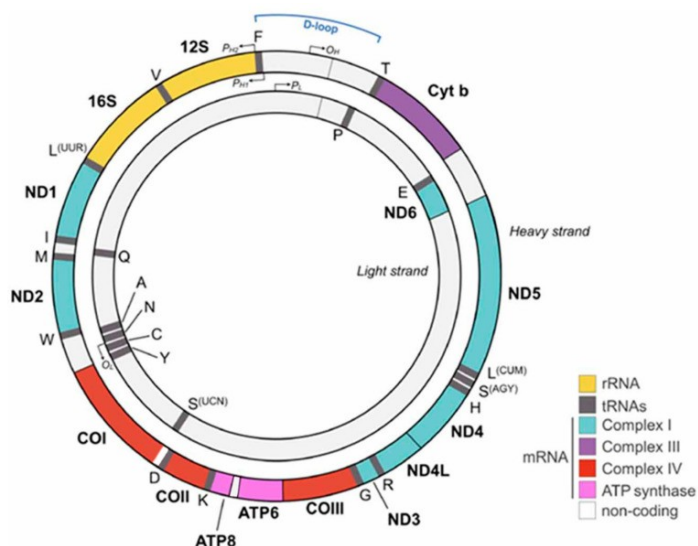
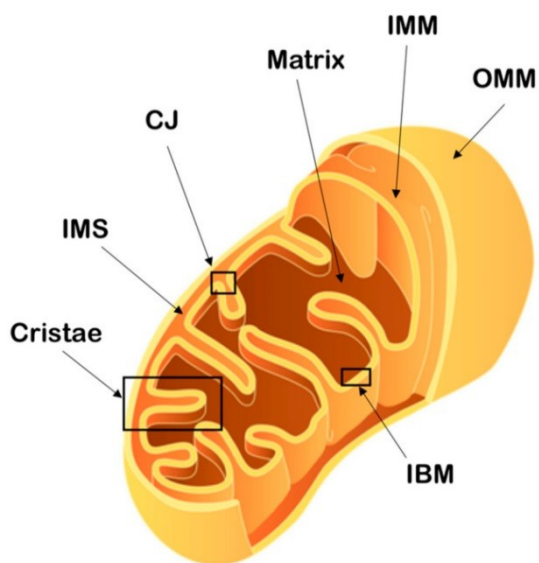
1.2 Μιτοχόνδρια

Βασικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας του κυττάρου διαδραματίζουν τα μιτοχόνδρια. Αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής κυτταρικού ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), καθώς και το μέρος του κυττάρου στο οποίο τα ένζυμα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) παράγουν φορείς ηλεκτρονίων, συμπεριλαμβανομένων του νικοτιναμιδίου αδενινουκλεοτιδίου (NADH) και του φλαβινικού αδενινουκλεοτιδίου (FADH₂) που με τη σειρά τους δίνουν ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα.

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιавтоνομα οργανίδια που προέρχονται από βακτήρια τα οποία έχουν εξελιχθεί μαζί με τον ξενιστή τους μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως ενδοσυμβίωση. Περιέχουν το δικό τους γενετικό υλικό, το **mtDNA**, το οποίο διατηρεί τα τυπικά χαρακτηριστικά του βακτηριακού DNA: είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο 16.569 ζευγών βάσεων (bp) που δεν περιέχει ιντρόνια. Όσον αφορά τη δομή τους, περιβάλλονται από δύο φωσφολιπιδικές μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οι οποίες χωρίζουν το οργανίδιο σε δύο χώρους, την μήτρα και τον διαμεμβρανικό χώρο. Η εσωτερική μεμβράνη σχηματίζει πτυχώσεις στις οποίες βρίσκονται ενσωματωμένες πολλές πρωτεΐνες, όπως τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Οι πτυχώσεις αυτές έχουν την ικανότητα να αναδιοργανώνονται και να γίνονται περισσότερο ή λιγότερο συμπαγείς ως απάντηση σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως διάφορα αποπτωτικά σήματα (Protasoni M, Zeviani M 2021).

Τα μιτοχόνδρια συμβάλλουν και σε πολλές άλλες σημαντικές διεργασίες του κυττάρου πέραν της παραγωγής ενέργειας. Μία από αυτές είναι η ρύθμιση των διαφόρων μορφών κυτταρικού θανάτου, όπως η απόπτωση και η νέκρωση. Οι δύο κύριοι τύποι απόπτωσης είναι η εξωγενής και η ενδογενής οδός. Στην εξωγενή οδό, η πρόσδεση εξωκυττάρων παραγόντων σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου, συμπεριλαμβανομένων των CD95 και TNFR1, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του σηματοδοτικού συμπλέγματος επαγωγής θανάτου (DISC), το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8. Η κασπάση-8 στη συνέχεια ενεργοποιεί άλλες κασπάσες, συμπεριλαμβανομένης της κασπάσης-3 που στοχεύει αρκετές εκατοντάδες υποστρώματα οδηγώντας σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Τα μιτοχόνδρια συμβάλλουν στην εξωγενή απόπτωση μέσω ανατροφοδότησης και ενίσχυσης των σημάτων. Η ενδογενής απόπτωση ενεργοποιείται όταν σήματα όπως η βλάβη του DNA και το οξειδωτικό στρες δρουν στο επίπεδο των μιτοχονδρίων, και διεγείρουν το άνοιγμα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Αυτό οδηγεί σε επακόλουθη απελευθέρωση προαποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα c, μια απαραίτητη πρωτεΐνη της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, που μόλις απελευθερωθεί στο κυτταρόλυμα μπορεί να συγκεντρωθεί με τον Araf-1, την προ-κασπάση-9 και το dATP, για να πυροδοτήσει την ενεργοποίηση διαφόρων κασπασών μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-9. Η νέκρωση χαρακτηρίζεται από διόγκωση των μιτοχονδρίων, διαταραχές στη λειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και μειωμένη παραγωγή ATP, ταυτόχρονα με απελευθέρωση αποπτωτικών πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια. Τα γεγονότα αυτά εμποδίζουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο λόγω ενεργειακής ανεπάρκειας (H. Vakifahmetoglu-Norberg et al 2017).

Τα μιτοχόνδρια επίσης συμμετέχουν στην βιοσύνθεση διάφορων βασικών κυτταρικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, λιπαρών οξέων, νουκλεοτιδίων, συμπλόκων Fe/S και της αίμης, την απομάκρυνση ή τη χρησιμοποίηση μεταβολικών παραπροϊόντων και την ρύθμιση των κυτταρικών επιπέδων Ca⁺². (Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. 2018).



Εικόνα 5 Δομή του μιτοχονδρίου (αριστερά) και χάρτης του ανθρώπινου μιτοχονδριακού DNA (δεξιά) (Protasoni M, Zeviani M 2021)

1.3 Καρκίνος

Ο όρος “καρκίνος” χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια κατηγορία νόσων που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την διασπορά στο σώμα ανώμαλων μορφών κυττάρων του ίδιου του οργανισμού (Rang H.P et. Al 2013, Ok C.Y et al. 2018). Βασικό μορφολογικό

χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η απώλεια διαφοροποίησης σε βαθμό που ποικίλει ανάλογα με τον όγκο. Συνήθως, μικρότερος βαθμός διαφοροποίησης συνεπάγεται χειρότερη πρόγνωση (Rang H.P et. Al 2013). Ο βαθμός διαφοροποίησης καθορίζεται με παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του όγκου και σύγκριση με τα αντίστοιχα του ιστού από τον οποίο προέρχεται. Ένας υψηλός βαθμός διαφοροποίησης σημαίνει ότι η νεοπλασία μοιάζει μορφολογικά με το εγγενές όργανο, σχηματίζοντας νεοπλασματικές οργανοειδείς δομές, ενώ το αντίθετο ισχύει για ένα χαμηλό στάδιο διαφοροποίησης, όπου τα κύτταρα χάνουν σταδιακά την ικανότητα δομικής οργάνωσης και αρχίζουν να εμφανίζουν μειωμένη συνοχή (Jögi A et al. 2012) . Όσο πιο φυσιολογικά φαίνονται τα κύτταρα, τόσο λιγότερο επιθετικός είναι ο καρκίνος και τόσο πιο αργά αναπτύσσεται και εξαπλώνεται. Από την άλλη πλευρά, όσο πιο ανώμαλα φαίνονται τα κύτταρα, τόσο πιο επιθετικός είναι ο καρκίνος και τόσο πιο γρήγορα είναι πιθανό να αναπτυχθεί και να εξαπλωθεί (National Cancer Institute 2022). Τα κύτταρα αυτά ανταγωνίζονται τα φυσιολογικά για θρεπτικές ουσίες οδηγώντας τα τελικά σε θάνατο από αστία, καθώς λόγω του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού τους απαιτούν μεγάλο μέρος των θρεπτικών συστατικών του οργανισμού (Hall J.E 2013).

Οι κύριες αιτίες είναι οι ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια ή/και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Rang H.P et. al 2013). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε χρωμοσωμικές θραύσεις, διαταραχή της ικανότητας επιδιόρθωσης και πιστής αντιγραφής του DNA, ρήξη αλυσίδων DNA κ.α (Hall J.E. 2013, Alberts B et. al. 2011). Παράγοντες που συμβάλουν στην εμφάνιση αυτών των βλαβών είναι η δράση ορμονών (Rang H.P et. Al 2013), διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (Alberts B. et. al. 2011). ερεθιστικοί παράγοντες που προκαλούν ιστικές βλάβες, αυξάνοντας την ταχύτητα μιτωτικής αντικατάστασης και την πιθανότητα μεταλλάξεων καθώς και ήδη υπάρχουσες μεταλλάξεις σε 1 ή περισσότερα γονίδια (Hall J.E. 2013)

Κύρια χαρακτηριστικά του καρκίνου

1. Διαρκής πολλαπλασιασμός: Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα δημιουργώντας πρωτεΐνες που ενθαρρύνουν την εκρηκτική τους ανάπτυξη (Hanahan D, Weinberg R.A 2011).
2. Μη ανταπόκριση στα σήματα που αντιτίθενται στην ανάπτυξη: Για να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει με κάποιο τρόπο να αποσυνδεθούν από τα πολλά σήματα που υπάρχουν για την επιβράδυνση της κυτταρικής ανάπτυξης (Ruhul Amin A.R.M. et al. 2015). Τα καρκινικά κύτταρα συχνά εμφανίζουν την ικανότητα να εκκινούν σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε μίτωση καθώς και να μην επηρεάζονται από σήματα αναστολής της ανάπτυξης (Ok C.Y et al. 2018).
3. Αποφυγή της απόπτωσης: Τα φυσιολογικά κύτταρα αυτοκαταστρέφονται όταν εντοπίζουν ένα σφάλμα που δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, αλλά τα καρκινικά κύτταρα ευδοκιμούν παρά τα σφάλματα αυτά. Πολλές από τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου αφορούν γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού θανάτου. Απενεργοποίηση ή διαταραχή της έκφρασης αυτών των γονιδίων οδηγεί σε μη ελεγχόμενη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σε αντίσταση στην απόπτωση (. Hall J.E 2013 Rang, H.P et. Al 2013, Alberts B et. al. 2011, Ok C.Y et al. 2018).

Παραδείγματα περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που συνήθως ενεργοποιούνται σε πολλές φυσιολογικές αποκρίσεις, όπως οι κινάσες τυροσίνης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων (RTKs, π.χ. ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, EGFR), μικρές GTPάσες (π.χ. Ras), κινάσες σερίνης/θρεονίνης (π.χ. Raf και Akt), κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης (π.χ. Src και Abl), λιπιδικές κινάσες (π.χ. φωσφοϊνοσιτιδίο-3-κινάσες, PI3Ks), καθώς και πυρηνικοί υποδοχείς (π.χ. ο υποδοχέας οιστρογόνων, ER). Ένα άλλο πολύ σημαντικό παράδειγμα είναι η ογκοκατασταλτική p53 πρωτεΐνη, που ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τα σήματα στρες, όπως η απόπτωση και οι αποκρίσεις σε βλάβες του DNA. Αδρανοποίηση ή μειωμένη έκφραση του γονιδίου *TP53* έχει παρατηρηθεί σε πολλούς καρκίνους (Sever R, Brugge JS 2015).

4. Αναπαραγωγική αθανασία: Τα φυσιολογικά κύτταρα πεθαίνουν μετά από έναν ορισμένο αριθμό διαιρέσεων. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα είναι αθάνατα. (Hanahan D, Weinberg R.A 2011).

5. Διαρκής αγγειογένεση: Τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να ενορχηστρώσουν τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων για την τροφοδοσία τους με το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Μετά την επέκταση ενός όγκου, τα κύτταρα που βρίσκονται στον πυρήνα του όγκου χάνουν την πρόσβαση σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Τα νέα αιμοφόρα αγγεία την αποκαθιστούν (Sever R, Brugge JS 2015).

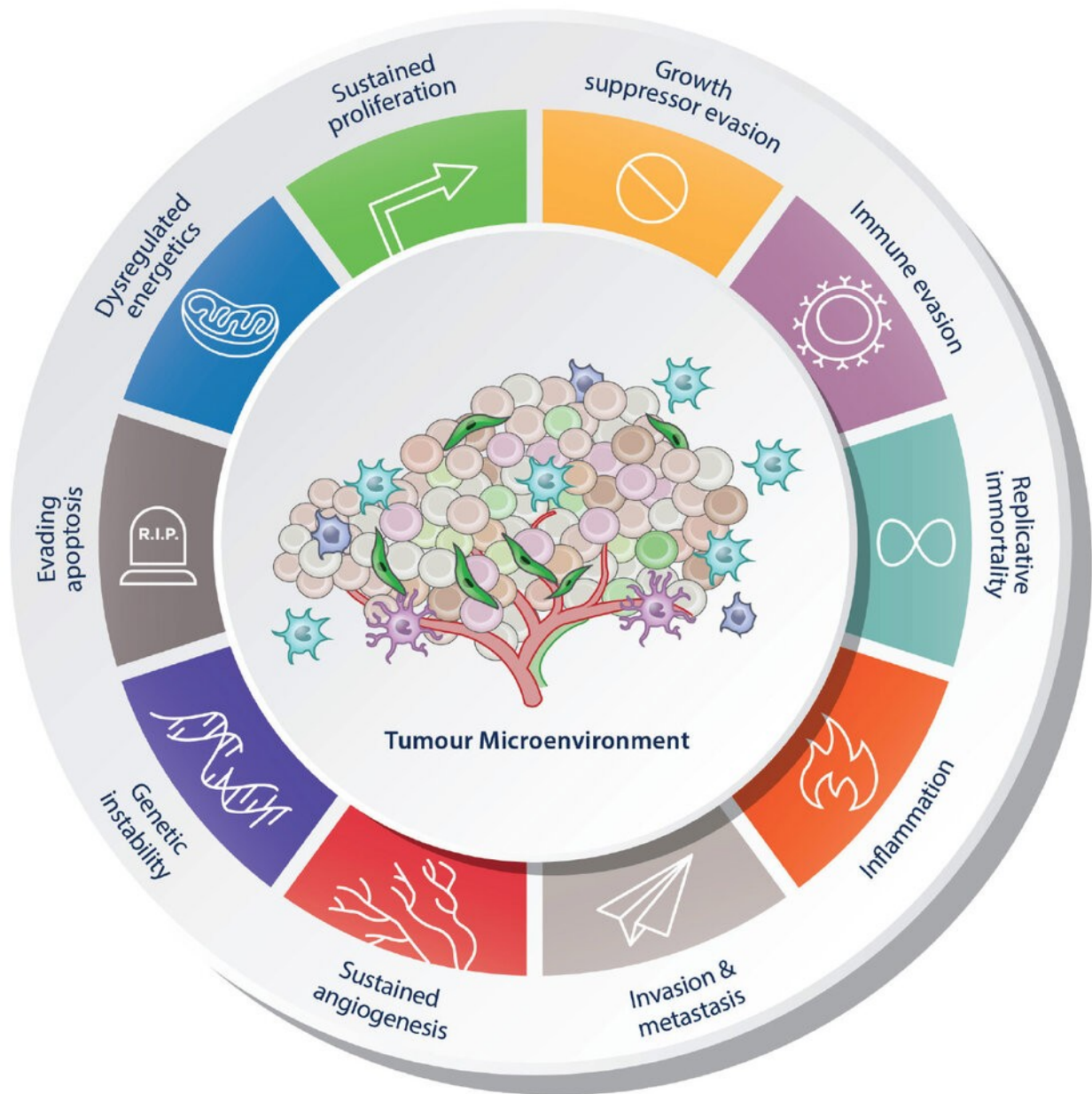
6. Δυνατότητα μετάστασης: Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εξαπλωθούν σε άλλα σημεία του σώματος όπου ο χώρος, το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά είναι πιο άφθονα. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, μπορούν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν αν βρεθούν σε άλλη θέση. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μικρότερη προσκόλληση μεταξύ τους με αποτέλεσμα να μπορούν να διεισδύσουν εύκολα σε άλλους ιστούς (Hall J.E 2013, Rang H.P et. Al 2013, Alberts B et. al. 2011).

7. Διαταραγμένη βιοενεργητική: Τα καρκινικά κύτταρα μεταβάλλουν τη μέθοδο παραγωγής ενέργειας και αυξάνουν το μεταβολικό τους ρυθμό προκειμένου να διατηρήσουν την ταχεία ανάπτυξη. Η παραγωγή ενέργειας φαίνεται να γίνεται κυρίως μέσω αερόβιας γλυκόλυσης αντί μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι αλλαγές αυτές αναφέρονται ως φαινόμενο *Warburg* και ενδεχομένως συνδέονται με ανωμαλίες στη δομή και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (T.N Seyfried et al. 2014).

1. Διαφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος: Τα καρκινικά κύτταρα καταστέλλουν τη λειτουργία βασικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων φυσικών δολοφόνων (NK), ενώ παράλληλα αποφεύγουν τα συστήματα επιτήρησης του ανοσοποιητικού συστήματος (Hanahan D, Weinberg R.A 2011).

2. Φλεγμονή: Οι όγκοι ενεργοποιούν μια φλεγμονώδη αντίδραση που μπορεί να αυξήσει την πρόσβασή τους σε αυξητικούς παράγοντες και την παροχή αίματος. Διάφορες μελέτες αποδίδουν έναν αυξανόμενο κατάλογο σηματοδοτικών μορίων που απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα και προάγουν την ανάπτυξη του όγκου. Σε αυτά περιλαμβάνονται ο αυξητικός παράγοντας του όγκου *EGF*, ο αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας *VEGF*, άλλοι προαγγειογενετικοί παράγοντες όπως ο *FGF2*, χημεικίνες και κυτταροκίνες που ενισχύουν τη φλεγμονώδη κατάσταση- επιπλέον, τα κύτταρα αυτά μπορεί να παράγουν προαγγειογενετικά και/ή προδιεισδυτικά ένζυμα αποικοδόμησης της μήτρας, όπως η *MMP-9* και άλλες μεταλλοπρωτεΐνάσες της μήτρας, πρωτεάσες της κυστεϊνικής καθεψίνης και η ηπαράναση (Hanahan D, Weinberg R.A 2011).

3. Γενετική αστάθεια: Σχεδόν όλα τα καρκινικά κύτταρα έχουν ελαττώματα στην ικανότητά τους να επιδιορθώνουν το DNA, επιτρέποντας την αναπαραγωγή μεταλλαγμένων κυττάρων. Πολλές από τις μεταλλάξεις που παρατηρούνται σε καρκινικά κύτταρα προκαλούν διαταραχή της ικανότητας επιδιόρθωσης και πιστής αντιγραφής του DNA ή αύξηση της επίπτωσης χρωμοσωμικών θραύσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία γενετικής αστάθειας η οποία πιστεύεται ότι συμβάλλει στην περαιτέρω ανάπτυξη του καρκίνου (B. Alberts et. al. 2011). Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά λανθασμένου διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων από τα φυσιολογικά διπλοειδή κύτταρα, ένας φαινότυπος που ονομάζεται χρωμοσωμική αστάθεια. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς, όπως παροδικές ατέλειες της γεωμετρίας της ατράκτου, διαταραχές των μικροσωληνίσκων, ανώμαλη αντιγραφή των κεντροσωμάτων κ.α. (Nicholson J. M., Cimini D 2013). Ως αποτέλεσμα αυτού συχνά τα καρκινικά κύτταρα είναι ανευπλοειδή. Η ανευπλοειδία στη συνέχεια προκαλεί περαιτέρω αποσταθεροποίηση λόγω ανισορροπίας των ομάδων πρωτεϊνών που διαχωρίζουν, συνθέτουν και επιδιορθώνουν τα χρωμοσώματα. Αυτός είναι ένας από τους λόγους που τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν επιπλέον δομική αστάθεια των χρωμοσωμάτων, δηλαδή υψηλή συχνότητα εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών, όπως μετατοπίσεις, διαγραφές, διπλασιασμοί κ.λπ. Σταδιακά, τέτοιες εξελίξεις οδηγούν στη δημιουργία νέων καρκινογόνων καρυότυπων. (Nicholson J. M, Cimini D 2013, Nicholson J.M., Duesberg P 2009).

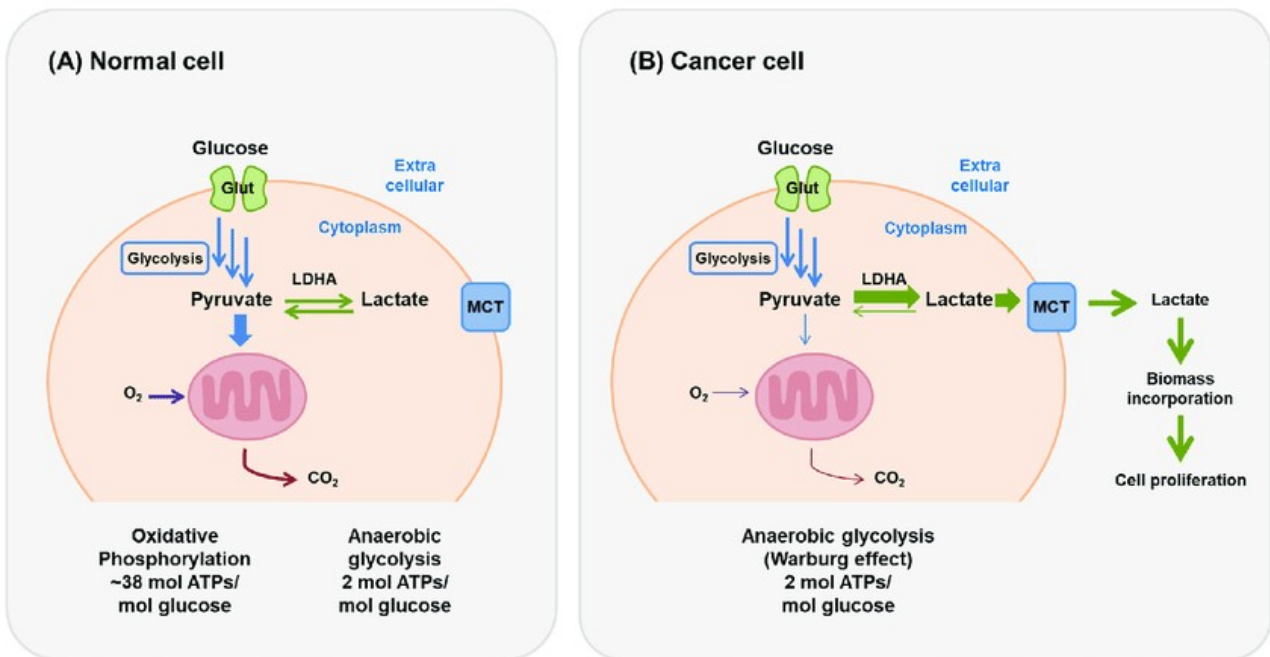


Εικόνα 6 Χαρακτηριστικά του καρκίνου (Hanahan D., Weinberg R.A 2011)

1.4 Βιοενεργητική καρκινικών κυττάρων

Φαινόμενο *Warburg*

Έχει παρατηρηθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και μετατροπή της σε γαλακτικό οξύ, ακόμα και παρουσία οξυγόνου και λειτουργικών μιτοχονδρίων. Τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία οξειδώνουν πλήρως το πυροσταφυλικό σε CO₂ και νερό για παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ενώ στα καρκινικά κύτταρα μετατρέπεται μέσω αναγωγής σε γαλακτικό. (Εικόνα 7) Η προτίμηση αυτή των καρκινικών κυττάρων να παράγουν ενέργεια μέσω αερόβιας γλυκόλυσης αντί της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης ονομάστηκε φαινόμενο Warburg (Liberti M.V, Locasale J.W 2016). Το φαινόμενο *Warburg* παρατηρείται στο 70-80% των ανθρώπινων καρκίνων, και προκύπτει από την αλληλεπίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα *HIF-1*, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, η απώλεια λειτουργίας ογκοκατασταλτικών παραγόντων και η αλληλεπίδραση με συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, μερικές φορές σε συνδυασμό με επιγενετικούς μηχανισμούς (Vaupe P, Multhoff G 2020).



Εικόνα 7 Διαφορές στην βιοενεργητική φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων (Kim, S-H & Baek, K-H 2021)

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που επηρεάζουν τον ενεργειακό μεταβολισμό και συνεπώς συμβάλλουν στο φαινόμενο *Warburg*. Ένας από αυτούς είναι η μειωμένη ή ανώμαλη λειτουργία των μιτοχονδρίων και επομένως της αναπνευστικής αλυσίδας. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν ανωμαλίες τόσο στο περιεχόμενο όσο και στη σύνθεση και λειτουργία των μιτοχονδρίων

τους. Η παραγωγή *ROS* κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η μικρότερη προστασία και ικανότητα επιδιόρθωσης καθιστούν το μιτοχονδριακό DNA πιο ευαίσθητο σε μεταλλάξεις από το πυρηνικό. Το μεγαλύτερο μέρος του mtDNA αποτελεί δομική γονιδιακή αλληλουχία χωρίς εσώνια, με αποτέλεσμα να είναι μεγάλη η πιθανότητα μια μετάλλαξη να επηρεάσει την λειτουργία των μιτοχονδρίων (Pelicano H et al. 2006). Ενδείξεις μορφολογικών, πρωτεομικών και λιπιδιομικών ανωμαλιών, όπως βλάβη σε οποιαδήποτε μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, φλεγμονή λιπιδίων, έχουν βρεθεί στα μιτοχόνδρια πολλών τύπων καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, ορισμένα καρκινικά κύτταρα περιέχουν λίγα ή καθόλου μιτοχόνδρια. Η γλυκόλυση και η γαλακτική ζύμωση θα πρέπει να ρυθμιστούν προς τα πάνω σε αυτά τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να αντισταθμιστεί η απουσία οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η ενέργεια μέσω της γλυκόλυσης αντισταθμίζει σταδιακά την ανεπαρκή ενέργεια μέσω της αναπνοής (Liberti M.V, Locasale J.W 2016, Seyfried T.N et al. 2014). Επιπλέον, διαταραχές στη λειτουργικότητα ορισμένων μεταβολικών ενζύμων που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια οδηγεί σε αύξηση στα επίπεδα μεταβολιτών που προωθούν το φαινόμενο *Warburg* καθώς και την εξέλιξη του καρκίνου. Παραδείγματα είναι τα ένζυμα του κύκλου *Krebs* (TCA), η σουκκινική αφυδρογονάση (SDH), η φουμαρική υδρατάση (FH) και η ισοκιτρική αφυδρογονάση (IDH). Η απώλεια της λειτουργίας της *SDH* και της *FH* οδηγεί σε συσσώρευση φουμαρικού και σουξινικού οξέος, προκαλώντας μια κατάσταση "ψευδοϋποξίας" μέσω της σταθεροποίησης του *HIF-1α*. Η αύξηση της λειτουργίας της *IDH* οδηγεί σε 2-υδροξυγλουταρικό. Και οι τρεις μεταβολίτες δρουν ως ογκομεταβολίτες και ενισχύουν την ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του φαινομένου *Warburg* (Vaupel P., Multhoff G. 2020).

Μια δεύτερη πιθανή αιτία είναι η προσαρμογή στο υποξικό περιβάλλον που συχνά παρατηρείται σε καρκινικούς ιστούς, ειδικά σε συμπαγείς όγκους όταν η μάζα του όγκου φτάσει σε συγκεκριμένο μέγεθος και η διείσδυση οξυγόνου περιορίζεται. Κάτω από τέτοιες συνθήκες, η οξειδωτική φωσφορυλίωση δεν μπορεί να προχωρήσει κανονικά λόγω ανεπαρκούς οξυγόνου, ακόμη και αν τα μιτοχόνδρια δεν έχουν δομικά ελαττώματα (Pelicano H et al. 2006). Μείωση των επιπέδων οξυγόνου οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα του επαγόμενου από υποξία παράγοντα-1 (*HIF-1*) το οποίο, μεταξύ άλλων επιδράσεων στην λειτουργία του κυττάρου, προκαλεί ενίσχυση της γλυκόλυσης και μείωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (S. J. Kierans and C. T. Taylor 2021).

Διάφορα ογκογονίδια φαίνεται να προωθούν επίσης την γλυκόλυση. Μελέτες σε κύτταρα τρωκτικών έδειξαν ότι η διαμόλυνση με ογκογονίδια *RAS* ή *SRC* οδήγησε σε αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης, συνοδευόμενη από αύξηση της έκφρασης του μεταφορέα γλυκόζης τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης. Σε εμβρυϊκά κύτταρα, η πρωτεΐνη *H-ras* αποδείχθηκε ότι διεγείρει τη γλυκόλυση και αναστέλλει την κατανάλωση οξυγόνου. Το ογκογονίδιο *BCR-ABL* έχει επίσης φανεί να παίζει ρόλο στη γλυκόλυση και η αναστολή της πρωτεΐνης *bcr-abl* από την ιματινίβη (Gleevec) φαίνεται να αναστρέφει το φαινόμενο *Warburg* μεταβάλλοντας το μεταβολισμό της γλυκόζης από γλυκόλυση σε οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η οδός σηματοδότησης 3-κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης (*PI3K*)/Akt, η οποία προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, έχει επίσης αποδειχθεί ότι ενισχύει την αερόβια γλυκόλυση και καθιστά τα κύτταρα εξαρτημένα από τη γλυκόλυση για την επιβίωση. (Pelicano H et al. 2006)

Η ενεργοποίηση της *PI3K* έχει ως αποτέλεσμα την επακόλουθη ενεργοποίηση της *AKT* και τη σταθεροποίηση του επαγωγίμου παράγοντα υποξίας (*HIF*)-1. Το ίδιο το ένζυμο *PI3K* ανταγωνίζεται τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα *PTEN* η απώλεια του οποίου αυξάνει τη γλυκόλυση μέσω της ενεργοποίησης του *AKT* και του *HIF-1*. Το *AKT* διεγείρει τη γλυκόλυση αυξάνοντας την έκφραση και τη μεμβρανική μετατόπιση των μεταφορέων γλυκόζης, καθώς και μέσω της φωσφορυλίωσης γλυκολυτικών ενζύμων, όπως η εξακινάση (*HK*) και η φωσφοφρουκτοκινάση (*PFK*). Επιπλέον, η *AKT* ενεργοποιεί τον υποδοχέα *mTOR*, ο οποίος επηρεάζει έμμεσα άλλα μεταβολικά μονοπάτια ενεργοποιώντας τον *HIF-1*, ακόμη και υπό νορμοξικές συνθήκες (Pelicano H. et al. 2006)

Η απώλεια της δραστηριότητας του *p53*, που παρατηρείται σε πολλούς όγκους, φαίνεται επίσης να παίζει ρόλο. Ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας *p53* είναι ένας κύριος ρυθμιστής της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της γήρανσης και της διαφοροποίησης και, ως εκ τούτου, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση, τον κυτταρικό θάνατο και την επιβίωση. Ο *p53* ρυθμίζει τον ενεργειακό μεταβολισμό μέσω επίδρασης τόσο στη γλυκόλυση όσο και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Από τη μία πλευρά, ρυθμίζει αρνητικά τη γλυκόλυση μέσω της ενεργοποίησης της *TIGAR* (αναστολέας της φρουκτόζης-2,6-διφωσφορικής) και της διαμεσολάβησης της επαγόμενης από την *AMP* κινάση αναστολής της ανάπτυξης, η οποία έμμεσα περιορίζει την κατανάλωση γλυκόζης σε συνθήκες πείνας. Από την άλλη πλευρά, ρυθμίζει θετικά την οξειδωτική φωσφορυλίωση μέσω αύξησης της έκφρασης της *SCO2*, ενός μέλους του συγκροτήματος *COX-2* που συμμετέχει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Wanka, C et al 2012, Du W, et al 2016).

Το φαινόμενο αυτό προσδίδει ορισμένα πλεονεκτήματα όσον αφορά την κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη. Παρότι αυτός ο τρόπος μεταβολισμού της γλυκόζης παράγει λιγότερα μόρια *ATP* ανά μόριο γλυκόζης σε σύγκριση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ο ρυθμός μεταβολισμού είναι πολύ υψηλότερος. Θεωρητικοί υπολογισμοί υποστηρίζουν ότι τα κύτταρα με υψηλότερο ρυθμό, αλλά χαμηλότερη απόδοση, παραγωγής *ATP* ενδεχομένως έχουν επιλεκτικό πλεονέκτημα όταν ανταγωνίζονται για κοινούς και περιορισμένους ενεργειακούς πόρους. Πράγματι, το μικροπεριβάλλον ενός όγκου έχει περιορισμένη διαθεσιμότητα γλυκόζης και υφίστανται ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά με τα στρωματικά και τα ανοσοποιητικά κύτταρα. Τα υψηλά ποσοστά γλυκόλυσης περιορίζουν επίσης τη διαθεσιμότητα της γλυκόζης στα *TILs* (tumor-infiltrating lymphocytes) τα οποία απαιτούν επαρκή γλυκόζη για τις τελεστικές λειτουργίες τους. (Liberti M.V, Locasale J.W 2016).

Πέρα από την παραγωγή ενέργειας, η ενίσχυση της γλυκολυτικής οδού οδηγεί επίσης σε αύξηση της παραγωγής μορίων που χρησιμοποιούνται σε διάφορα βιοσυνθετικά μονοπάτια. Διάφορα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης αποτελούν πρόδρομα μόρια ή συμμετέχουν στην βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων, αμινοξέων και λιπιδίων. Η 6-φωσφορική γλυκόζη χρησιμοποιείται στην οδό των φωσφορικών πεντοζών για την δημιουργία ριβονουκλεοτιδίων. Η 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη και η φωσφορική διυδροξυακετόνη αποτελούν πρόδρομα μόρια για την βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων και τριγλυκερολών της κυτταρικής μεμβράνης. Τα μη απαραίτητα αμινοξέα σερίνη και γλυκίνη προέρχονται από το ενδιάμεσο 3-φωσφογλυκερικό οξύ. Ο οξειδωτικός κλάδος του μονοπατιού της πεντόζης-φωσφορικού άλατος που προέρχεται από το γλυκολυτικό ενδιάμεσο προϊόν της φωσφορικής γλυκόζης-6 παράγει επίσης *NADPH* που χρησιμοποιείται για την αναγωγή της γλουταθειόνης (*GSH*). Σε συνδυασμό με τη μείωση της παραγωγής *ROS*, που προκύπτει από

την ελαχιστοποίηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αυτό οδηγεί στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, στην προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης και στην αύξηση της ανθεκτικότητας στην ακτινοβολία (Vaupel P, Multhoff G, 2020). Επιπλέον, η αυξημένη παραγωγή και έκκριση γαλακτικού οξέος από τα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε μείωση του pH του περιβάλλοντος τους. Τα πιθανά οφέλη της οξέωσης στα καρκινικά κύτταρα είναι πολλαπλά. Ένα παράδειγμα αποτελεί η αύξηση της διεισδυτικότητας λόγω μεταβολής της διεπαφής όγκου-στρώματος εξαιτίας της επίδρασης των ιόντων H^+ (Liberti M.V, Locasale J.W 2016). Πέρα από την πρόκληση οξέωσης το γαλακτικό οξύ συμβάλλει επιπλέον στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων λόγω της ικανότητας νορμοξικών καρκινικών κυττάρων να το χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας καθώς και της αλληλεπίδρασης του με τον υποδοχέα GPR81 που οδηγεί σε ενεργοποίηση της οδού *PI3K-Akt-mTOR* και σταθεροποίηση του *HIF-1* (Vaupel P, . Multhoff G 2020).

1.5 Αναστολείς Γλυκόλυσης

Η αυξημένη εξάρτηση μεγάλου ποσοστού καρκινικών κυττάρων από τη γλυκολυτική οδό για την παραγωγή ATP παρέχει μια βιοχημική βάση για το σχεδιασμό θεραπευτικών στρατηγικών για την εκλεκτική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω αναστολής της γλυκόλυσης. Επειδή η παραγωγή ATP μέσω της γλυκόλυσης είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματική από ό,τι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τα καρκινικά κύτταρα καταναλώνουν πολύ περισσότερη γλυκόζη από ό,τι τα φυσιολογικά για να εξασφαλίσουν επαρκή παροχή ATP για την λειτουργία και τον πολλαπλασιασμό τους. Ως εκ τούτου, η διατήρηση υψηλού επιπέδου γλυκολυτικής δραστηριότητας είναι απαραίτητη για την επιβίωση και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Υποστηρίζεται ότι η μεταβολική προσαρμογή από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση καθιστά τα καρκινικά κύτταρα ιδιαίτερα εθισμένα και εξαρτημένα από τη γλυκολυτική οδό και ευάλωτα στην αναστολή της γλυκόλυσης. Τα φυσιολογικά κύτταρα όταν αναστέλλεται η γλυκόλυση, χρησιμοποιούν εναλλακτικές πηγές ενέργειας, όπως τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα, για να παράγουν μεταβολικά ενδιάμεσα προϊόντα που διοχετεύονται στον κύκλο TCA για την παραγωγή ATP μέσω της αναπνοής. Ως εκ τούτου, αναμένεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα σε παράγοντες που αναστέλλουν τη γλυκόλυση (Pelicano H et al 2006).

Η στρατηγική που συνήθως χρησιμοποιείται είναι η μείωση ή ο πλήρης αποκλεισμός της αυξημένης γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα μέσω της μείωσης της ενζυμικής δραστηριότητας τριών γλυκολυτικών ενζύμων: εξοκινάσης (HK), φωσφοροφρουκτοκινάσης (PFK) και της κινάσης του πυροσταφυλικού (PK), τα οποία ρυθμίζουν μη αναστρέψιμα και καθοριστικά βήματα για το ρυθμό της γλυκόλυσης.

Οι αναστολείς της γλυκόλυσης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί παρουσία δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων ή υποξίας, συνθήκες οι οποίες συχνά συνδέονται με την αντίσταση των κυττάρων στα συμβατικά αντικαρκινικά φάρμακα και την ακτινοθεραπεία. Επειδή η αυξημένη αερόβια γλυκόλυση παρατηρείται συνήθως σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκίνων και η υποξία είναι

παρούσα στο μικροπεριβάλλον των περισσότερων όγκων, η ανάπτυξη νέων αναστολέων της γλυκόλυσης ως νέα κατηγορία παραγόντων με ρόλο στην αντικαρκινική θεραπεία είναι πιθανό να έχει ευρείες θεραπευτικές εφαρμογές (Pelicano H et al 2006).

Δοκιμές σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και κύτταρα λεμφώματος σε υποξικό περιβάλλον στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλή γλυκολυτική δραστηριότητα και μειωμένη ευαισθησία σε κοινούς αντικαρκινικούς παράγοντες έδειξαν θετικά αποτελέσματα (Xu RH et al 2005).

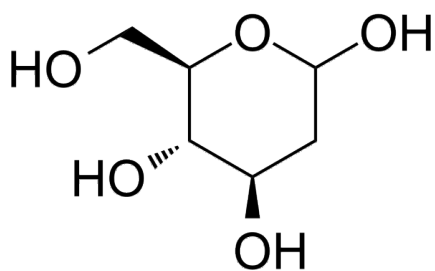
Έχει παρατηρηθεί ότι η αυξημένη γλυκόλυση σχετίζεται άμεσα με την αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή και την αποτυχία της θεραπείας στην παιδική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Η αναστολή της γλυκόλυσης με χορήγηση **2-δεοξυγλυκόζης (2-DG)** (Εικόνα 8), **3-βρωμοπυρουβικού οξέος (3-BrPA)** (Εικόνα 9) ή **λονιδαμίνης (LON)** (Εικόνα 10) αυξάνει την επαγόμενη από την πρεδνιζολόνη τοξικότητα στα λευχαιμικά κύτταρα μειώνοντας με αυτό τον τρόπο το πρόβλημα της ανθεκτικότητας (Jang M. et al 2013).

Έχουν προκύψει αρκετά μικρά μόρια που παρουσιάζουν υποσχόμενη αντικαρκινική δράση *in vitro* και *in vivo*, ως μεμονωμένοι παράγοντες ή σε συνδυασμό με άλλες θεραπευτικές μεθόδους. Το οξαμικό, ένας ειδικός αναστολέας της *LDH*, έχει δείξει, όταν χρησιμοποιείται σε συνδυαστική θεραπεία με πακλιταξέλη, συνεργιστική ανασταλτική δράση στα ανθεκτικά στην πακλιταξέλη καρκινικά κύτταρα του μαστού προάγοντας την απόπτωση. Η *LDH* καταλύει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό. Αυτό το στάδιο αναγωγής είναι απολύτως απαραίτητο για την αναγέννηση του *NAD⁺*, το οποίο απαιτείται για τη συνέχιση της γλυκόλυσης. (Jang M et al 2013) Η λονιδαμίνη, έχει αντικαρκινική δράση μέσω της αναστολής της *HK2*. Αυτός ο παράγοντας έχει εισέλθει τώρα σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία του καρκίνου. Τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών έδειξαν ότι η λονιδαμίνη σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως η δοξορουβικίνη, είχε καλύτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα για τη θεραπεία όγκων του μαστού, του προστάτη, του μελανώματος, του εγκεφάλου και των ωοθηκών (Chen X.S, et al 2016). Ένα άλλο παραδείγμα αντιστοιχίας ενωσης αποτελεί ο αναστολέας της *HK*, 3-BrPA που προκαλεί εξάντληση του *ATP* στα καρκινικά κύτταρα, ιδίως σε εκείνα με ατέλειες στο μιτοχονδριακό DNA και ελαττώματα στην κυτταρική αναπνοή, οδηγώντας σε μαζικό κυτταρικό θάνατο.

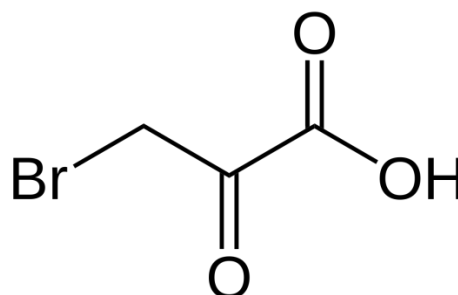
Ο συνδυασμός της 2-DG με αδριαμυκίνη ή πακλιταξέλη είχε επίσης ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της θεραπευτικής δραστηριότητας *in vivo* σε ζωικά μοντέλα όγκων που έφεραν ξενομοσχεύματα οστεοσαρκώματος ή μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Maschek et al., 2004). Είναι ενδιαφέρον ότι μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα κύτταρα που χρησιμοποιούν την αερόβια γλυκόλυση για την υποστήριξη της βιοενεργειακής τους λειτουργίας υφίστανται ταχεία εξάντληση του *ATP* και νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο ως απόκριση στην ενεργοποίηση της πολυ(ADP-ριβόζης) πολυμεράσης (*PARP*) όταν υποβάλλονται σε θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες του DNA. Η ενεργοποίηση της *PARP* από παράγοντες που βλάπτουν το DNA οδηγεί σε ταχεία κατανάλωση του *NAD*, το οποίο είναι ένας συμπαράγοντας απαραίτητος για μία από τις γλυκολυτικές αντιδράσεις. Έτσι, οποιαδήποτε βλάβη του DNA που ενεργοποιεί την *PARP* θα ανέστειλε έμμεσα τη γλυκόλυση. Επιπλέον, δεδομένου ότι η επιδιόρθωση του DNA απαιτεί *ATP* ως πηγή ενέργειας, η αναστολή της παραγωγής *ATP* μέσω της καταστολής της γλυκολυτικής οδού θα έθετε σε σοβαρό κίνδυνο την κυτταρική ικανότητα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Έτσι, ο συνδυασμός αναστολέων της γλυκολυτικής οδού και παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA φαίνεται να αποτελεί μια ελκυστική θεραπευτική στρατηγική για την αποτελεσματική εξόντωση των καρκινικών κυττάρων.

Ο συνδυασμός αναστολέων της γλυκολυτικής οδού και της οδού της φωσφορικής πεντόζης έχει επίσης δοκιμαστεί ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν ακτινοευαισθητοποίηση. Ο συνδυασμός **2-DG** και **6-αμινονικοτιναμίδης (6-AN)** (αναστολέας του **G6PD** που καταλύει το ρυθμοπεριοριστικό βήμα της οδού της πεντόζης) προκάλεσε βαθιά μείωση της κυτταρικής περιεκτικότητας σε γλουταθειόνη και ενίσχυσε τη βλάβη από την ακτινοβολία, οδηγώντας σε μιτωτικό και αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο

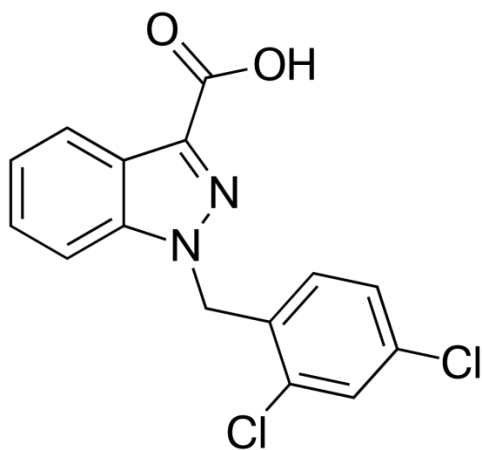
Ωστόσο, η αναστολή της γλυκόλυσης από μόνη της μπορεί να μην επαρκεί για την αποτελεσματική εξόντωση των κακοήθων κυττάρων. Έχει προταθεί ότι η εξάντληση του ATP θα πρέπει να φτάσει ορισμένα όρια προκειμένου να προκληθεί κυτταρικός θάνατος μέσω διαδικασιών απόπτωσης ή νέκρωσης, με μια εξάντληση 25-70% ATP να οδηγεί σε απόπτωση και μια εξάντληση πάνω από 85% ATP να προκαλεί νέκρωση. Δεδομένου ότι όλα τα καρκινικά κύτταρα περιέχουν μιτοχόνδρια, κάποιος βαθμός παραγωγής ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης εξακολουθεί να είναι δυνατός όταν αναστέλλεται η γλυκόλυση. Ένας τρόπος για να επιτευχθεί υψηλό επίπεδο εξάντλησης του ATP και να βελτιωθεί η θεραπευτική δραστηριότητα είναι ο συνδυασμός πολλαπλών παραγόντων εξάντλησης του ATP με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι ο συνδυασμός **N-(φωσφονακετυλο)-ασπαρτικού (PALA)**, **ριβοσιδίου της 6-μεθυλομερκαπτοπουρίνης (MMPR)** και **6-AN** είναι ένα αποτελεσματικό σχήμα που μειώνει την ATP και αυξάνει την αντικαρκινική δράση της ακτινοβολίας, της αδριαμυκίνης ή της ταξόλης (Pelicano H et al 2006).



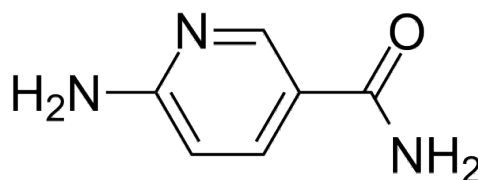
Εικόνα 8 2-δεόξυγλυκόζη (2-DG)



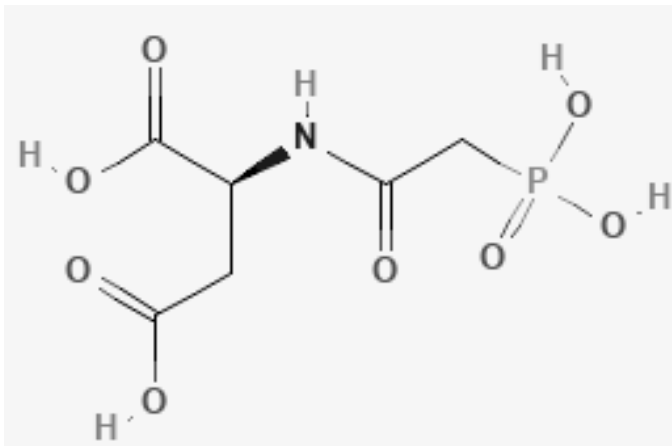
Εικόνα 9 3-Βρωμοπυρουβικό οξύ (3-BrPa)



Εικόνα 10 Λονιδαμίνη (LON)

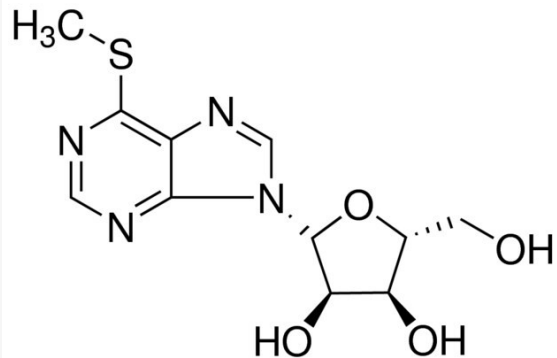


Εικόνα 11 6-Αμινονικοτιναμίδιο (6-AN)



(MMPR)

Εικόνα 12 N-(φωσφονακετυλο)-ασπαρτικό (PALA)



Εικόνα 13 Ριβοσίδιο της 6-μεθυλομερκαπτοπουρίνης

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο αναστολείς γλυκόλυσης, η 2-δεόξυγλυκόζη και το διχλωροακετικό οξύ. Η επίδραση των δύο αυτών ενώσεων δοκιμάστηκε σε καρκινικά κύτταρα K562, μόνες τους καθώς και σε συνδυασμό με δοξορουβικίνη και μια τροπολόνη με πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες, την *rhein-amide tropolone*.

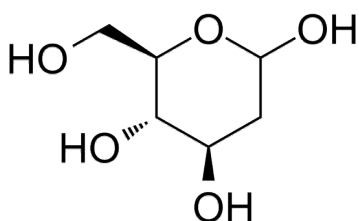
2. Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν

2.1 2- Δεόξυ-γλυκόζη (2-DG)

(4R,5S,6R)-6-(hydroxymethyl)oxane-2,4,5-triol

C₆H₁₂O₅

M.B 164,16



Η 2-DG είναι μια τροποποιημένη μορφή της D-γλυκόζης, που παρουσιάζει αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντι-ικές ιδιότητες. Στον καρκίνο, η 2-DG λειτουργεί ως αντιπολλαπλασιαστικό, αντιαγγειογενετικό και αντιμεταστατικό φάρμακο και μειώνει επίσης την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εμφανίζουν αντίσταση στα φάρμακα (Dey S. et al 2022).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η 2-δεοξυ-D-γλυκόζη (2-DG) μπορεί να προσληφθεί επιλεκτικά από τα καρκινικά κύτταρα και να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός χημειο- και ραδιοευαισθητοποιητής. Σε υποξικές συνθήκες όπου η γλυκόλυση είναι η μόνη πηγή ενέργειας, η 2-DG εξαντλεί σοβαρά τα αποθέματα ATP οδηγώντας τελικά σε μαζικό κυτταρικό θάνατο στις περισσότερες καρκινικές σειρές. Υπό νορμοξικές συνθήκες η 2DG είναι τοξική μόνο σε επιλεγμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές, συνήθως όταν χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις (~20 mM) (Gu L. et al 2020).

Η 2-DG έχει δοκιμαστεί σε συνδυασμό με άλλες ουσίες τόσο σε προκλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο. Δοκιμή σε κύτταρα οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας έδειξε ότι χαμηλές συγκεντρώσεις 2-DG μπορούν να επαγουν κυτταρικό θάνατο και να ανατρέψουν την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα γλυκοκορτικοειδή υπό νορμοξικές συνθήκες (Gu L. et al 2020). Μια πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε ότι ο συνδυασμός της μπουφορίνης 2β (αντιμικροβιακό πεπτίδιο που παρουσιάζει αποτελεσματική αντικαρκινική δράση) με 2-DG αναστέλλει γρήγορα τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω μείωσης της παραγωγής ATP και γαλακτικού οξέος (Dey S. et al 2022). Μελέτη σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος εξέτασε την επίδραση της 2-DG σε συνδυασμό με την 1,3- bis (2-χλωροαιθύλο)-1-νιτροζουρία (BCNU), μια χλωροαιθυλονιτροζουρία που συχνά χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση του γλοιώματος. Η 2-DG αύξησε σημαντικά τις ανασταλτικές επιδράσεις της BCNU στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με την BCNU μόνη της, ενώ η 2-DG δεν εμφάνισε εμφανή ενισχυτική επίδραση στην επαγόμενη από την BCNU κυτταροτοξικότητα για τα φυσιολογικά κύτταρα (Sun X. et al 2022) Σε επίπεδο κλινικών μελετών, η 2-DG δοκιμάστηκε σε συνδυασμό με δοσεταξέλη σε μελέτη φάσης 1 σε ασθενείς με στερεούς όγκους (Raez, L.E., Papadopoulos, K., Ricart, A.D. et al. 2013). Η 2-DG έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την επιδιόρθωση του DNA σε έντονα γλυκολυτικά κύτταρα. Αυτό ώθησε ερευνητές να αξιολογήσουν τη δυνατότητα της 2-DG να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας. Η ραδιοευαισθητοποιητική δράση της 2-DG στην ακτινοθεραπεία έχει αποδειχθεί σε κύτταρα καρκίνου του μαστού, του προστάτη, του τραχήλου της μήτρας, και του πνεύμονα (Pajak, B et al 2020).

Μηχανισμός δράσης

Η 2-DG είναι ένας συναγωνιστικός αναστολέας της εξοκίνησης. Η εξοκίνηση (HK) καταλύει την πρώτη αντίδραση της γλυκολυτικής οδού, την φωσφορυλίωση της γλυκόζης. Η 2-DG ως ανάλογο της γλυκόζης ανταγωνίζεται για σύνδεση με το ένζυμο. Το προϊόν φωσφορυλίωσής της, η φωσφορική 2-DG, δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την ισομεράση της φωσφορικής γλυκόζης, το ένζυμο που καταλύει το επόμενο στάδιο της γλυκόλυσης, με αποτέλεσμα το σταμάτημα της γλυκολυτικής οδού. Η οδός των φωσφορικών πεντοζών αναστέλλεται επίσης. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση της παραγωγής ATP, ενδοκυττάρων αναγωγικών μορίων, όπως το NADPH, και του γαλακτικού οξέος (Pelicano H et al 2006, Jang M et al 2013, Sun X et al 2022)

Η αναστολή της HK οδηγεί επίσης σε ταχεία αποφωσφορυλίωση του σχετιζόμενου με Bcl-2 επαγωγέα θανάτου (BAD), ενός μορίου που είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σημαντικά τόσο στη γλυκόλυση όσο και στην απόπτωση. (Pelicano H et al 2006). Η αποφωσφορυλίωση του BAD στη Ser-112 σχετίζεται με την ενεργοποίηση και συσσώρευση του ρυθμιστή της απόπτωσης BAX στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης, απελευθέρωση κυτοχρώματος c και απόπτωση. (Peña-Blanco A, García-Sáez AJ 2018) Επιπλέον, η HK συνεισφέρει στην εξέλιξη και ανάπτυξη του καρκίνου μέσω ενίσχυσης του MAPK/ERK μονοπατιού που επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την εισβολή και τη μετάσταση στον πνεύμονα, στο μαστό, στο παχύ έντερο και στο πάγκρεας.(Dey S et al 2022)

Η 2-DG επηρεάζει επίσης μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, όπως η γλυκοζυλίωση και η σύνδεση με N-ακετυλογλουκοζαμίνη, οδηγώντας σε συσσώρευση λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών και πρόκληση στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) , η οποία μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε θάνατο (Pelicano H. et al 2006). Αυτό πιθανόν οφείλεται στην δομική ομοιότητα της 2-DG με τη μαννόζη (Matsuo T et al 2020, Pajak, B et al 2020).

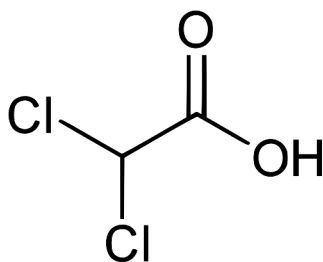
Τοξικότητα

Κλινικές μελέτες σχετικά με την εφαρμογή 2-DG σε καρκίνους έχουν αναφέρει ότι η χορήγηση 2-DG προκαλεί παρενέργειες παρόμοιες με συμπτώματα υπογλυκαιμίας, όπως κόπωση, εφίδρωση ναυτία και ζάλη (Matsuo T et al 2020).

2.2 Διχλωροοξικό οξύ (DCA)

$C_2H_2Cl_2O_2$

M.B 128,94

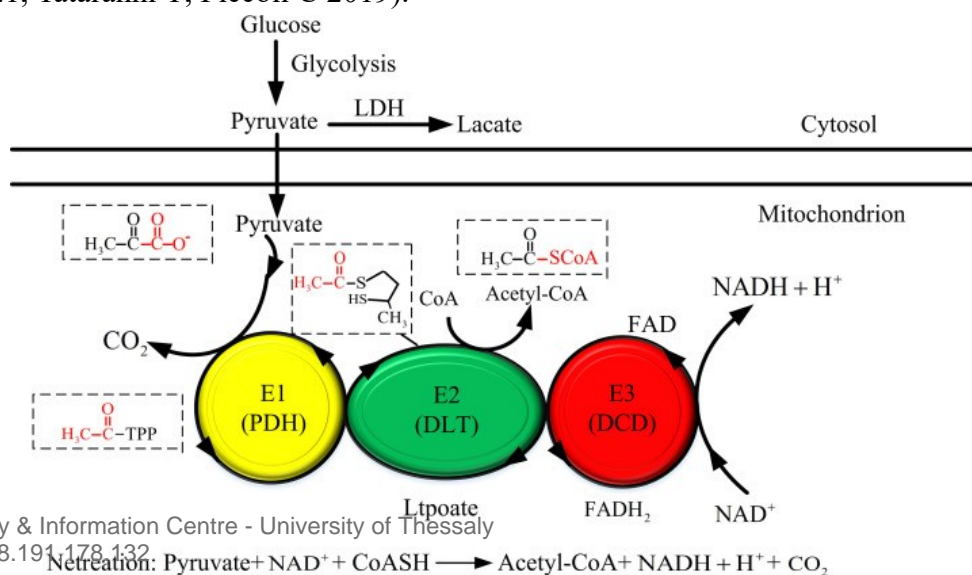


Το διχλωροξικό οξύ (DCA) χρησιμοποιείται κλινικά από τη δεκαετία του 1980 για τη θεραπεία της γαλακτικής οξέωσης, της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και της ανεπάρκειας της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (PDH). Μέχρι σήμερα, τέσσερις μικρές (N = 5-23) κλινικές δοκιμές πρώιμης φάσης έχουν δοκιμάσει το DCA σε ασθενείς με διάφορους τύπους προχωρημένων συμπαγών όγκων και έχει καθοριστεί η συνιστώμενη δόση φάσης II (Dunbar, E.M et al 2014, Michelakis, E.D et al 2010, Garon, E.B et al 2014, Chu, Q.S.-C et al 2015). Μία πολύ μικρή μελέτη φάσης II κατέδειξε σταθεροποίηση ή υποχώρηση του όγκου σε 4 από τους 5 ασθενείς με γλοιοβλάστωμα. Η κλινική χρήση του DCA είναι διαθέσιμη τόσο σε από του στόματος όσο και σε παρεντερικά σκευάσματα και οι δόσεις κυμαίνονται από 10 έως 50 mg/Kg/ημέρα. (Lu X et al 2018)

Η δράση του DCA έχει επίσης διερευνηθεί σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα. Μελέτη που έγινε σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα έδειξε ότι η συγχρόνηση DCA-πακλιταξέλης (PTX) εμφανίζει συνεργιστική δράση στην καταστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα *in vitro* και *in vivo*. Το DCA ανέστειλε την προστατευτική διαδικασία της αυτοφαγίας που χρησιμοποιείται από τα καρκινικά κύτταρα ως απόκριση στη θεραπεία με πακλιταξέλη, ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική κινάση AKT και προάγοντας τον κυτταρικό θάνατο (Lu X et al 2018). Συνδυασμός DCA και δοξορουβικίνης (DOX) που δοκιμάστηκε σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα (HepG2), απέδειξε την ικανότητα του DCA να ευνοεί την προκαλούμενη από τη δοξορουβικίνη οξειδωτική βλάβη, διαταράσσοντας την κυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα (Korga A et al 2019). Συγχρόνηση με το αντιβιοτικό σαλινομυκίνη, που θεωρείται πιθανό αντικαρκινικό λόγω των κυτοτοξικών ιδιοτήτων του, έδειξε συνεργιστικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου, λόγω αναστολής έκφρασης πρωτεϊνών υπεύθυνων για την ανάπτυξη πολυφαρμακευτικής ανθεκτικότητας (Skeberdytė A et al 2018). Μελέτες έχουν δείξει ότι το DCA μπορεί επίσης να αυξήσει την ακτινοευαισθησία μέσω της επαγωγής αυξημένης παραγωγής ROS και μεταβολών της μιτοχονδριακής λειτουργίας και της καταστολής της ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA (Gupta S., Dwarakanath B 2018, Shen H et al 2015).

Μηχανισμός δράσης

Το διχλωροξικό οξύ δρα ως αναστολέας της κινάσης της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης, (PDK) η οποία αναστέλλει την δράση της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (PDH). Η κινάση της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης έχει τέσσερις ισομορφές (PDK 1-4) και αποτελεί τμήμα του συμπλόκου της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης που είναι υπεύθυνο για την μετατροπή του πυροσταφυλλικού σε ακετυλο-CoA. Αύξηση της δραστηριότητας της PDH ενισχύει την οξείδωση του πυροσταφυλλικού από τα μιτοχόνδρια και την είσοδό του στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Wang X et al 2021, Tataranni T, Piccoli C 2019).



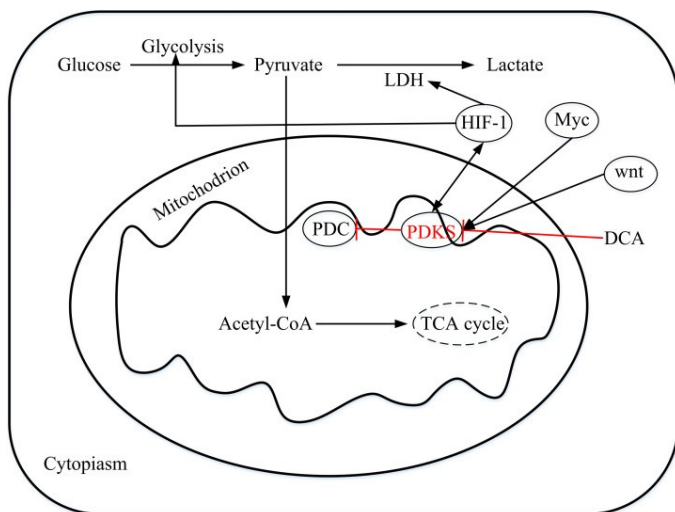
Πιο λεπτομερώς, το DCA είναι ανάλογο του πυροσταφυλικού και δρα στη θέση πρόσδεσής του, προάγοντας αλλαγές στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου της PDK, που εμποδίζουν τη διάσπαση του ADP από το ενεργό κέντρο.

Οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA, που συχνά συμβαίνουν κατά την καρκινογένεση και οδηγούν σε δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, καθιστούν τα κακοήθη κύτταρα ανίκανα να διατηρήσουν την κυτταρική ενεργειακή ζήτηση όταν η γλυκόλυση αναστέλλεται. Επιπλέον, μειώνοντας την παραγωγή γαλακτικού οξέος, το DCA εξουδετερώνει το όξινο μικροπεριβάλλον του όγκου, συμβάλλοντας στην αναστολή της ανάπτυξης και της εξάπλωσης του όγκου. Η παροχή πυροσταφυλικού στα μιτοχόνδρια προκαλεί αναδιαμόρφωση των οργανιδίων με αποτέλεσμα αυξημένη εκροή κυτοχρώματος c και άλλων παραγόντων που προκαλούν απόπτωση και ρύθμιση των επιπέδων ROS με επακόλουθη μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων (Skeberdytè A et al 2018).

Ένας λόγος για τον οποίο η PDK αποτελεί στόχο για την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι ότι, όπως φαίνεται από διάφορα στοιχεία, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την διείσδυση σε άλλους ιστούς, τη μετανάστευση, την αντίσταση στην απόπτωση και τη μεταβολική αλλαγή των καρκινικών κυττάρων. Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας (HIF), η αυξημένη δραστηριότητα του οποίου έχει παρατηρηθεί σε πολλά καρκινικά κύτταρα, προκαλεί αύξηση της έκφρασης της PDK. Όσον αφορά συγκεκριμένα την PDK1, αποτελέσματα από διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η PDK1 προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη διείσδυση και τη μετανάστευση διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Η έκφραση της PDK1 έχει συσχετιστεί σημαντικά με τη μετάσταση, τη μειωμένη χημειοευαισθησία και την κακή συνολική επιβίωση. Η έκφραση της επάγεται από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), και φαίνεται να σχετίζεται με την επαγωγή του μετασχηματισμού των καρκινικών κυττάρων, της μετανάστευσης και της εισβολής τους σε άλλους ιστούς από τον EGF, καθώς η μείωση ή η αναστολή της δραστηριότητάς της προκάλεσε μείωση αυτών των διαδικασιών. Η αποσιώπηση της PDK1 επιβράδυνε την παραγωγή γαλακτικού οξέος, την κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση, την εισβολή και την αγγειογένεση και, κατά συνέπεια, τη μετάσταση, ενώ η υπερέκφραση της PDK1 έδειξε αντίστροφα αποτελέσματα. Επιπλέον, η αναστολή της προκαλεί αποσταθεροποίηση του HIF-1 το οποίο οδηγεί σε αντιστροφή του υπερπλωμένου δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων. (Li B et al 2018)

Η PDK2 φαίνεται επίσης να σχετίζεται με τον καρκίνο καθώς και με την φαρμακευτική αντοχή. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της PDK2 είναι αυξημένα σε ανθεκτικά στην πακλιταξέλη κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα και ότι μείωση ή αναστολή της έκφρασής της οδηγεί σε σημαντική αύξηση της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων.

Η PDK3 επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταβολική αλλαγή και την αντίσταση στα φάρμακα. Σε κύτταρα μεταστατικού μελανώματος, ο άξονας HIF-1/PDK3 λειτουργεί ως αισθητήρας μεταβολικού στρες, ρυθμίζοντας το επίπεδο των μιτοχονδριακών ROS υπό νορμοξία. Οι φαρμακολογικοί ή γενετικοί αποκλεισμοί του μονοπατιού HIF-1α μείωσαν τη γλυκόλυση και προώθησαν την οξειδωτική φωσφορυλίωση μέσω ειδικής μείωσης της έκφρασης της PDK3 (Wang X et al 2021).



Εικόνα 15 Πιθανοί μηχανισμοί των PDKs και της αναστολής τους στον καρκίνο (Wang X. et al 2021)

Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί δράσης

Είναι πιθανό το διχλωροξικό οξύ να επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα άλλους κυτταρικούς και μοριακούς στόχους, εμφανίζοντας άλλους μηχανισμούς δράσης, ώστε να εξηγηθεί η αποτελεσματικότητά του και σε κυτταρικά μοντέλα όπου δεν προκαλεί την αναμενόμενη μεταβολική μετατόπιση. Μερικοί από αυτούς είναι:

1. Αύξηση της de novo σύνθεσης του συνενζύμου A. Δεδομένου ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις CoA φαίνεται να είναι τοξικές για τα κύτταρα, αυτή η μεταβολική επίδραση θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την τοξικότητα των καρκινικών κυττάρων με τη μεσολάβηση του DCA
2. Ανταγωνισμός του οξικού οξέος λόγω δομικής ομοιότητας με το οξικό άλας. Το οξικό οξύ είναι γνωστό ως ενεργειακό υπόστρωμα για το γλοιοβλάστωμα και τις εγκεφαλικές μεταστάσεις, ικανό να ενισχύει τη σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ευνοώντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την εξέλιξη του καρκίνου. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα οξικού οξέος έχουν συνδεθεί με την ανθεκτικότητα στα αντικαρκινικά φάρμακα. Έχει αποδειχθεί ότι το DCA είναι σε θέση να αναστρέψει τις μεταβολικές μεταβολές που προκαλούνται από το οξικό οξύ, αποκαθιστώντας τα φυσιολογικά επίπεδα γαλακτικού και ελεύθερου λιπαρού οξέος στον ορό και τη συγκέντρωση καλίου και φωσφόρου (El Sayed S et al 2019).
3. Αλλαγή του pH, η οποία επηρεάζει τις διαδικασίες πολλαπλασιασμού και απόπτωσης(91), καθώς και την ευαισθησία στη χημειοθεραπεία (Neri D., Supuran C. T. 2011). Η θεραπεία με DCA μπορεί είτε να αυξήσει είτε να μειώσει το ενδοκυτταρικό pH. Η αύξηση του pH οφείλεται στη μείωση παραγωγής γαλακτικού οξέος ενώ η μείωση σε μείωση της έκφρασης των μεταφορέων μονοκαρβοξυλικών και της V-ATPάσης, το οποίο συμβαίνει κυρίως σε καρκινικά κύτταρα, που εκφράζουν μεγαλύτερη ποσότητα αυτών των μεταφορέων, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά αντίστοιχα κύτταρα.
4. Μείωση της έκφρασης γονιδίων και πρωτεϊνών των μεταφορέων ABC, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την εξαγωγή φαρμάκων από τα κύτταρα και τη συνακόλουθη πολυφαρμακευτική αντοχή (Tataranni T, Piccoli C 2019).

Τοξικότητα

Η σημαντικότερη και πιο γνωστή παρενέργεια που έχει παρατηρηθεί σε κλινικές και μη κλινικές μελέτες είναι η περιφερειακή νευροπάθεια. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην αυξημένη εξάρτηση των νευρικών κυττάρων από την γλυκόλυση σε σύγκριση με τα κύτταρα άλλων ιστών, με αποτέλεσμα μειωμένη ικανότητά προσαρμογής σε πιο παρατεταμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η προκύπτουσα υπερφόρτωση των μιτοχονδρίων θέτει σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων, τα οποία αδυνατούν να αντιμετωπίσουν την υπερβολική ποσότητα ROS. Η παρενέργεια αυτή φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με από του στόματος χρόνια χορήγηση και είναι αντιστρεπτή και περιορισμένη στο χρόνο χορήγησης. Μελέτες που διεξάχθηκαν σε μοντέλα ποντικών έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην έκθεση σε DCA στα πρώτα στάδια της ζωής και στην αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ηπατοκυτταρικών όγκων.

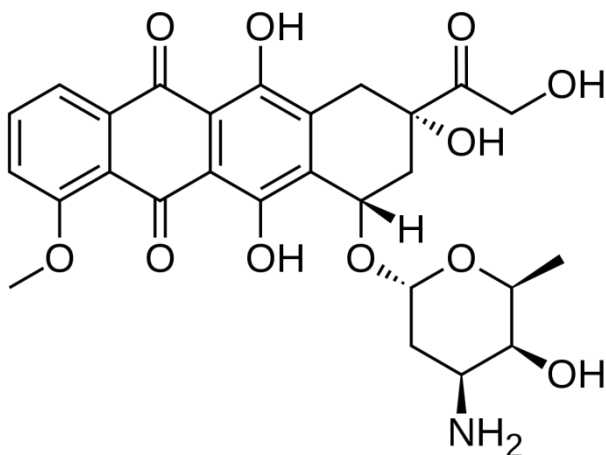
Υπάρχει επίσης πιθανότητα πρόκλησης καρκινογένεσης, η οποία επί του παρόντος βρίσκεται υπό αξιολόγηση. Οι παρατεταμένες αλλαγές στον κυτταρικό μεταβολισμό που προκαλούνται από το DCA μπορεί να παράγουν επιγενετικές επιδράσεις. Η μακροχρόνια επαγωγή της *PDH* και άλλων οξειδωτικών μονοπατιών που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλυκόζης θα μπορούσε να συμβάλει στην αύξηση των ROS και του μιτοχονδριακού στρες. Ωστόσο, καμία ένδειξη καρκινογόνου δράσης δεν έχει αναφερθεί σε κλινικές μελέτες, όταν το DCA χορηγείται στη θεραπεία του καρκίνου (Tataranni T, Piccoli C 2019).

2.3 Δοξορουβικίνη

(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dione

C₂₇H₂₉NO₁₁

M.B 543.5



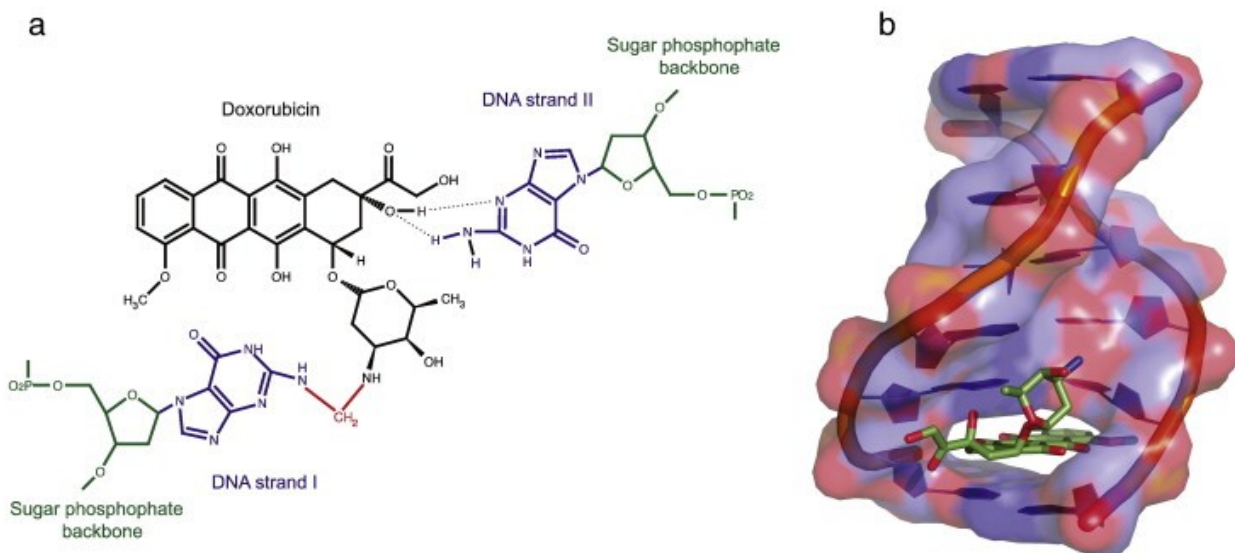
Η δοξορουβικίνη είναι ένα αντινεοπλασματικό φάρμακο που ανήκει στην ομάδα των ανθρακυκλινών. Χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα συμπαγών όγκων και αιματολογικών κακοηθειών, μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες.

Μηχανισμός δράσης

1) Θραύση του DNA. Η δοξορουβικίνη εισέρχεται στο κύτταρο με απλή διάχυση και σχηματίζει σύμπλοκο με το πρωτεόσωμα το οποίο στη συνέχεια λόγω κατευθυντήριων πυρηνικών σημάτων μεταφέρεται ενεργητικά στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων όπου συνδέεται με το DNA, καθώς και με πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αντιγραφή και τη μεταγραφή του. Η δράση της οφείλεται κυρίως στην επίδραση της στην τοποϊσομεραση II, μια DNA γυράση που κατά την διάρκεια της αντιγραφής κόβει και τις δύο αλυσίδες του DNA, επιτρέποντας σε ένα δεύτερο αντίγραφο DNA να περάσει και στη συνέχεια επανενώνει τα κομμένα άκρα (Carvalho C. et al. 2009). Έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα έκφρασής της είναι κάποιες φορές αυξημένα σε καρκινικά κύτταρα.

Η δοξορουβικίνη συνδέεται αρχικά με το DNA μέσω πρόσδεσης στην μικρή αύλακα και στη συνέχεια παρεμβάλλεται ανάμεσα στα τμήματα του DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή βασίζεται κυρίως σε ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δυνάμεις δίπολου – επαγόμενου δίπολου. Το μόριο του φαρμάκου εισέρχεται ανάμεσα σε δύο γειτονικά ζεύγη βάσεων (Denny W.A 2007, H. Lei et al 2012).

Η δοξορουβικίνη σταθεροποιεί το σύμπλοκο διάσπασης DNA-Top2, το ενδιάμεσο στο οποίο η αλυσίδα DNA είναι κομμένη και ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το ένζυμο. Αυτό εμποδίζει την επανένωση των άκρων, μονιμοποιώντας τη θραύση του DNA (Nateewattana J et al 2014). Η βλάβη του DNA επάγει την έκφραση του p53, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση του παραγοντα *Bax*. Ο *Bax* ενεργοποιεί στη συνέχεια την κασπάση 3, πυροδοτώντας έτσι την απόπτωση του κυττάρου (Nateewattana J et al 2014).



Εικόνα 16 Αλληλεπίδραση της δοξορουβικίνης με το DNA (Cutts SM et al 2005)

2) Παραγωγή ελεύθερων ριζών.

Μέσα στο κύτταρο η δοξορουβικίνη μπορεί να αναχθεί με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από κυτταρικές οξειδοαναγωγασες, όπως η ξανθινοοξειδάση, η συνθάση του νιτρικού οξέος, η NADPH δεϋδρογονάση και η εξαρτώμενη από NADPH αναγωγή του κυτοχρώματος P450, σε ημικινόνη. Η επακόλουθη μη ενζυμική επανοξείδωση της από μοριακό οξυγόνο οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξεικού ανιόντος και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Carvalho C. et al. 2009). Η μετατροπή της δοξορουβικίνης ανάμεσα στις δύο μορφές παράγει μεγάλες ποσότητες ρίζας, οι οποίες μπορούν να εξουδετερωθούν σε σχετικά σταθερό και χαμηλότερης τοξικότητας υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) από την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) ή να μετατραπούν σε ακόμη δραστικότερες μορφές οξυγόνου ή αζώτου, όπως $\cdot ONOO$ ή $OH\cdot$. Το H_2O_2 μπορεί επίσης να παράξει ρίζες υδροξυλίου ($OH\cdot$).

Επιπλέον, η δοξορουβικίνη, όπως επίσης η ημικινόνη και η δοξορουβικινόλη, ο μεταβολίτης της δοξορουβικίνης που προκύπτει μετά από υδροξυλίωση στον άνθρακα 13, σχηματίζουν σύμπλοκα με το σίδηρο τα οποία καταλύουν την αντίδραση *Fenton*, οδηγώντας σε μετατροπή του H_2O_2 σε ρίζες υδροξυλίου ($\cdot OH$, $\cdot OH$). Η ημικινόνη και η δοξορουβικινόλη μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με πρωτεΐνες που περιέχουν ή μεταφέρουν σίδηρο, όπως η φερριτίνη και η κυτταροπλασματική ακονιτάση, προκαλώντας απελευθέρωση του σιδήρου από την πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση των επιπέδων σιδήρου, που μέσω κατάλυσης της αντίδρασης *Fenton* συμβάλει στην παραγωγή ROS.

Ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό μεγάλων ποσοτήτων ελεύθερων ριζών οι οποίες αντιδρούν στη συνέχεια με διάφορα μόρια του κυττάρου οδηγώντας στο σχηματισμό τοξικών ενώσεων όπως η μηλόνυλοδιαλδεύδη, τα οποία αντιδρούν περαιτέρω με βιομόρια όπως πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια και λιπίδια προκαλώντας αλλαγές στη δομή και την λειτουργία τους (Volkova M, Russell R 2011, Mobaraki M, et al 2017). Η οξείδωση του πυρηνικού καθώς και μιτοχονδριακού DNA οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση

διαφόρων σημαντικών για τη λειτουργία του κυττάρου πρωτεϊνών. Η οξείδωση του mtDNA συγκεκριμένα μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών του μεταβολισμού που οδηγούν στην μείωση παραγωγής ενέργειας. Η παραγωγή ενέργειας επηρεάζεται επιπλέον από την οξείδωση ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας. Η αύξηση των επιπέδων ROS διαταράσσει την λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου οδηγώντας σε συσσώρευση ιόντων ασβεστίου και μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. (Τα δραστικά είδη οξυγόνου που παράγονται από τον μεταβολισμό της δοξορουβικίνης στα καρδιομυοκύτταρα προκαλούν ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και της κασπάσης 3, άνοιγμα του πόρου μεταβολής της διαπερατότητας στα μιτοχόνδρια και επακόλουθη απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση) (Volkova M, Russell R 2011).

3) Επίδραση στα μιτοχόνδρια

Μεγάλο ποσοστό δοξορουβικίνης συγκεντρώνεται στα μιτοχόνδρια λόγω της σύνδεσής της με την **καρδιολιπίνη**, ένα φωσφολιπίδιο που βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη του οργανιδίου λόγω της παραγωγής ROS, που οδηγεί σε οξείδωση και δυσλειτουργία των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, οξείδωση λιπιδίων της μιτοχονδριακής μεμβράνης και οξείδωση του mtDNA. Η σύνδεση αυτή επιπλέον διαταράσσει την ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και αυξάνει την διαπερατότητα της. Στην αύξηση της διαπερατότητας συμβάλει και η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου που οδηγεί σε αύξηση του μιτοχονδριακού ασβεστίου και απώλεια του ηλεκτρικού δυναμικού της μεμβράνης. Η αύξηση της διαπερατότητας έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα c, το οποίο στο κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρά με την κασπάση 9 και τον APAF και σχηματίζει το αποπτώσωμα.

Η δοξορουβικίνη σχηματίζει επίσης προϊόντα προσθήκης με το mtDNA, προκαλώντας αλλαγές στην έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων, με αποτέλεσμα την διατάραξη των λειτουργιών του μιτοχονδρίου, όπως η παραγωγή ενέργειας και η οξείδωση των λιπιδίων (Tacar O. et al 2013)

Ένας άλλος στόχος της δοξορουβικίνης στα μιτοχόνδρια είναι η **οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX)**, η οποία, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελεί ένα από τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Έχει αποδειχθεί ότι η δοξορουβικίνη μπορεί να αναστείλει την δράση της COX μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης με το ένζυμο (Papadopoulou L.C, Tsiftoglou A.S 1993). καθώς και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, μέσω καταστολής της έκφρασης των γονιδίων δύο υπομονάδων του ενζύμου, των **COXII** και **COXIV** (Papadopoulou L.C, Tsiftoglou A.S 1996). Η αλληλεπίδραση με το ένζυμο φαίνεται να οφείλεται σε διάφορες περιοχές του ενζύμου, μια εκ των οποίων είναι η ομάδα αίμης (Papadopoulou L.C, Tsiftoglou A.S 1993). Η αναστολή αυτή οδηγεί σε διαταραχή της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς η COX αποτελεί βασικό ένζυμο της.

Συνολικά, η βλάβη των μιτοχονδρίων από την δοξορουβικίνη οδηγεί σε μείωση της παραγωγής ενέργειας, αύξηση της παραγωγής ROS και απόπτωση (Tacar O et al 2013).

Τοξικότητα

Οι κυτταροτοξικές επιδράσεις της δοξορουβικίνης δεν στοχεύουν ειδικά στον όγκο και, ως εκ τούτου, μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη πολλών άλλων τύπων κυττάρων στο σώμα. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος της προκαλούμενης από τη δοξορουβικίνη τοξικότητας είναι η οξεία ή χρόνια καρδιοτοξικότητα. Η καρδιά έχει χαμηλά επίπεδα ενδογενών αντιοξειδωτικών σε σύγκριση

με άλλους ιστούς, με αποτέλεσμα να είναι πιο ευάλωτη στις οξειδωτικές βλάβες που προκαλεί η δοξορουβικίνη. Επιπλέον, τα κύτταρα του μυοκαρδίου αποτελούνται κατά μεγάλο ποσοστό από μιτοχόνδρια (περίπου 30-40%) λόγω των υψηλών ενεργειακών απαιτήσεών τους. Το υψηλό αυτό ποσοστό έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση μεγάλης συγκέντρωσης δοξορουβικίνης λόγω της δέσμευσης της στην καρδιολιπίνη της μιτοχονδριακής μεμβράνης και επιπλέον καθιστά τα κύτταρα του μυοκαρδίου πιο ευαίσθητα στις μιτοχονδριακές βλάβες. Η μείωση παραγωγής ενέργειας επίσης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό αυτά τα κύτταρα λόγω των αυξημένων ενεργειακών τους απαιτήσεων τους. Άλλοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην καρδιοτοξικότητα είναι η αύξηση των επιπέδων σιδήρου μέσα στα κύτταρα, η διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου και η αλλαγή έκφρασης σημαντικών πρωτεϊνών όπως αυτές που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας, την κυτταρική ανάπτυξη, τον κυτταρικό θάνατο, την κυτταροσκελετική λειτουργία, την κυτταρική προσκόλληση και την μεταγωγή σήματος (Tasar O et al 2013).

Μια άλλη σημαντική επίδραση της δοξορουβικίνης είναι η μυελοκαταστολή. Εμφανίζεται συνήθως με την μορφή αναιμίας, θρομβοκυτοπενίας, λευκοπενίας ή συνδυασμού των προηγούμενων, και σχετίζεται κυρίως με την παραγωγή ROS (.Fernando A et al. 2021).

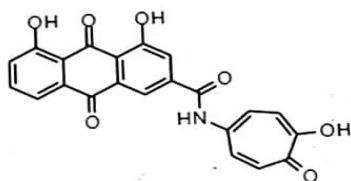
Ένα άλλο κοινό σημείο για τον κυτταρικό θάνατο και την ιστική βλάβη που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη είναι το ήπαρ, με το 40% των ασθενών που υποβάλλονται σε αυτή τη θεραπεία να υποφέρουν από κάποια μορφή ηπατικής βλάβης. Άλλες σημαντικές πιθανές ανεπιθύμητες δράσεις της δοξορουβικίνης είναι νεφροπάθεια, πρωτεϊνουρία, εξασθένηση της γνωστικής ανάκλησης όπως των οπτικοχωρικών δεξιοτήτων, λόγω έμμεσης τοξικότητας στον εγκέφαλο, εμετός, υπερμελάγχρωση του δέρματος, αλωπεκία, κνησμός, φωτοευαισθησία και εξανθήματα (Tasar O et al 2013).

2.4 Rhein-amide-tropolone

4,5-dihydroxy-N-(4-hydroxy-5-oxocyclohepta-1,3,6-trien-1yl)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxamide

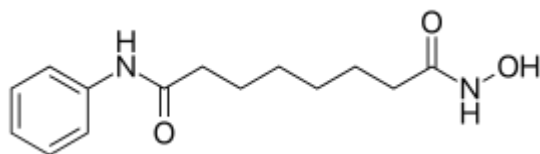
C₂₂H₁₃NO₇

M.B : 403,41

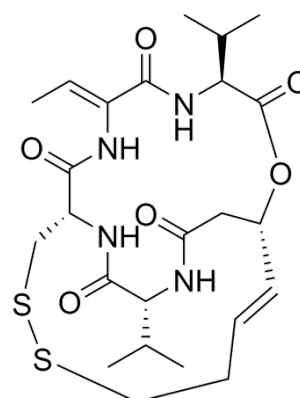


Πολλά παράγωγα τροπολόνης έχουν εμφανίσει ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε δοκιμές σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η δράση αυτή φαίνεται να οφείλεται κυρίως στην επίδρασή τους στα ένζυμα αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) (Staci L. et al. 2017). Οι αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) είναι ένζυμα που καταλύουν την απομάκρυνση των λειτουργικών ομάδων ακετυλίου από τα κατάλοιπα λυσίνης τόσο των ιστονικών όσο και των μη ιστονικών πρωτεϊνών (Seto E, Yoshida M 2014). Στον άνθρωπο υπάρχουν 18 ένζυμα HDAC, από

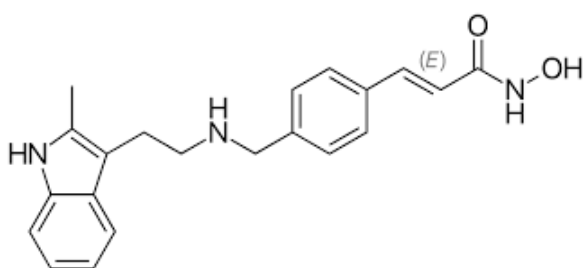
τα οποία τα 11 που χρησιμοποιούν μηχανισμούς που εξαρτώνται από ψευδάργυρο για την αποακετυλίωση υποστρωμάτων ακετυλολυσίνης. Η δράση των τροπολονών ενδεχομένως οφείλεται σε δέσμευση του ψευδαργύρου λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλα (Onopye S. N. et al. 2013). Η ακετυλίωση των ιστονών, καθώς και η αντιστροφή της, έχει σημαντική επίδραση στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η στόχευση της μπορεί να οδηγήσει σε επιγενετικό επαναπρογραμματισμό και μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης των καρκινικών κυττάρων που τα καθιστούν πιο ευάλωτα στη θανάτωση. Αναστολείς των HDAC χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία επιλεγμένων αιματολογικών κακοηθειών. Για παράδειγμα, η **βορινοστάτη** και η **ρομιδεψίνη** χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του δερματικού T-κυτταρικού λεμφώματος, ενώ η **πανοβινοστάτη**, έχει εγκριθεί για χρήση σε συνδυασμό με τον αναστολέα του πρωτεασώματος **βορτεζομίμη** σε υποτροπιάζον/ανθεκτικό πολλαπλό μυέλωμα (Staci L et al. 2017).



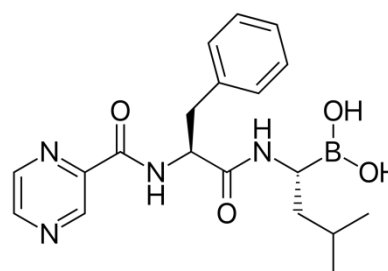
Εικόνα 17 βορινοστάτη



Εικόνα 18 ρομιδεψίνη



Εικόνα 19 πανοβινοστάτη



Εικόνα 20 βορτεζομίμη

Σκοπός της εργασίας

- Αξιολόγηση της επίδρασης της δοξορουβικίνης στην κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα K562
- Αξιολόγηση της επίδρασης των συνδυασμών δοξορουβικίνης - διχλωροξικού οξέος και δοξορουβικίνης - 2-δεόξυ-γλυκόζης στην κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα K562
- Αξιολόγηση της επίδρασης της υπό εξέταση νέας χημικής ουσίας «*rhein-amide-tropolone*» στην κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα K562
- Αξιολόγηση της επίδρασης των συνδυασμών *rhein-amide-tropolone* και διχλωροξικού οξέος και *rhein-amide-tropolone* και 2-δεόξυ-γλυκόζης στην κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα K562
- Συγκριτική αξιολόγηση

3.Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

Κυτταρική σειρά: Η κυτταρική σειρά K-562 (ATCC CCL-243TM) αποτελείται από ανθρώπινους βλάστες που απομονώθηκαν από τον μυελό των οστών 53χρονου ασθενούς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία. (<https://www.atcc.org/products/ccl-243>) Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό RPMI που περιέχει 10% Fetal Bovine Serum (FBS) και 1% αντιβιοτικά. Αραιώνονται κάθε τρεις μέρες σε αρχική συγκέντρωση $1 \cdot 10^5$ κύτταρα/ ml.

Θρεπτικό υλικό: Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το RPMI 1640 Medium (GibcoTM, REF 31800-089). Το διάλυμα παρασκευάζεται με ανάμιξη 31,22 gr RPMI, σε μορφή σκόνης και 6 gr NaHCO₃ σε 3lt miliQ αποστειρωμένο H₂O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται σε τιμή 6,9-7, προσθέτοντας HCl, και ακολουθεί διήθηση του διαλύματος μέσω φίλτρων με πόρους διαμέτρου 0,22 μm. Διατηρείται αποθηκευμένο σε αεροστεγώς κλεισμένα μπουκάλια στους 4°C. Για να χρησιμοποιηθεί, προηγείται προσθήκη *Fetal Bovine Serum* (GibcoTM, A31650) σε τελική συγκέντρωση 10%, και μείγματος αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης- αντιμυκητησιακού (GibcoTM, REF 15240-062) σε τελική συγκέντρωση 1%.

Φαρμακευτικές ουσίες:

Δοξορουβικίνη: Σε μορφή σκόνης από την εταιρία *Pfizer* φαρμακευτικό σκεύασμα *ADRIBLASTINA* (10mg *Doxorubicin Hydrochloride*). Το σκεύασμα αυτό περιέχει επίσης 50 mg μονοϋδρική λακτόζη και 1 mg παραϋδροξυβενζοϊκό μεθυλεστέρα.

Με βάση αυτό, παρασκευάστηκε αρχικό πυκνό διάλυμα Δοξορουβικίνης, HCl, συγκέντρωσης 10⁻³ M (διάλυση 0,003538g σκόνης σε 1 ml απιονισμένο αποστειρωμένο *miliQ* νερό). Από το διάλυμα αυτό, προέκυψαν, με αραιώση, όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

Διγλωροξικό οξύ: Σε μορφή διαλύματος συγκέντρωσης 12,12 M από την εταιρία *Sigma Aldrich* (Cat.D5, 470-02, Lot: S65139-029) Ως πυκνό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1,212 M (που προκύπτει από αραιώση αρχικού διαλύματος 12,12 M με απιονισμένο νερό *miliQ*) από όπου προέκυψαν, με αραιώση, όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

2-Δεόξυ-γλυκόζη: Σε μορφή σκόνης από την εταιρία *Sigma Aldrich* (D8375-1G Lot WXBD7821V).

Ως αρχικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0,5M, από όπου προέκυψαν, με αραιώση, όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Το αρχικό διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, με διάλυση της σκόνης σε αποστειρωμένο *miliQ* H₂O. Ο όγκος ποικίλει, ανάλογα με το πείραμα.

Rhein-amide tropolone: Μας παραχωρήθηκε από τον κ. Νικολάου Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας, του Τμήματος Φαρμακευτικής, ΑΠΘ, σε μορφή σκόνης, την οποία παρασκεύασε η ερευνητική του ομάδα, ως έχουσα πιθανή αντικαρκινική δράση.

Ως αρχικό πυκνό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 20 mM που παρασκευάστηκε με την προσθήκη 8 mg σκόνης σε 1 ml DMSO 10 % .

Trypan Blue Stain: Σε μορφή διαλύματος 0.4 % (GibcoTM, REF15250-061)

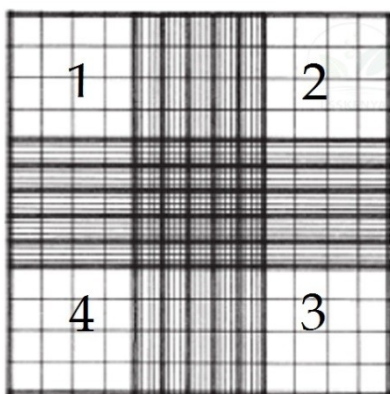
3.2 Μεθόδοι.

Μέτρηση ρυθμού ανάπτυξης και κυτταρικού θανάτου

Μέτρηση ρυθμού ανάπτυξης

Για τον υπολογισμό του χρόνου διπλασιασμού τους, χρειάζονται μετρήσεις της συγκέντρωσης των κυττάρων σε διάφορες χρονικές (0, 24, 48, 72 και 96 ώρες) Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με τη χρήση της πλάκας *Neubauer*. (Εικόνα 21)

Η καλλιέργεια αναδεύεται και στη συνέχεια μεταφέρεται δείγμα όγκου ~9 μL σε κάθε πλευρά της πλάκας. Μετρούνται τα κύτταρα που βρίσκονται εντός των τεσσάρων αριθμημένων τετραγώνων σε κάθε πλευρά της πλάκας. Η διαδικασία αυτή γίνεται δύο φορές. Υπολογίζεται ο αριθμητικός μέσος όρος από τα 16 τετράγωνα που έχουν μετρηθεί, εκφράζει την συγκέντρωση του δείγματος σε $\times 10^4$ κύτταρα/ml.



Εικόνα 21 Πλάκα *Neubauer*

Υπολογισμός κυτταρικού θανάτου

Ο υπολογισμός του κυτταρικού θανάτου γίνεται με τη χρήση της χρωστικής ουσίας *trypan blue* Η χρώση πραγματοποιείται με την ανάμειξη διαλύματος *trypan blue* με εναιώρημα των κυττάρων σε αναλογία 1:1 για 5 λεπτά. Τα άθικτα κύτταρα δεν προσλαμβάνουν τη χρωστική και δεν χρωματίζονται, ενώ τα νεκρά ή κατεστραμμένα κύτταρα προσλαμβάνουν τη χρωστική και εμφανίζονται μπλε έως λιλά στο μικροσκόπιο. ~ 9 μL από το μείγμα μεταφέρονται σε κάθε περιοχή της πλάκας και μετρούνται συνολικά ~600 κύτταρα, ~300 σε κάθε περιοχή. Ο αριθμός νεκρών κυττάρων μετατρέπεται σε ποσοστό %.

Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Γίνεται χρήση του **GraphPad Prism 8** για **α)** τον υπολογισμό των **IC50** των ουσιών αλλά και **β)** τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, με την εφαρμογή του **t-test** ($P < 0,005$)

Η IC50 (Inhibitory Concentration) μιας ουσίας είναι η συγκέντρωση που προκαλεί μείωση μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας, στην συγκεκριμένη περίπτωση της ανάπτυξης των κυττάρων, κατά 50%. Αποτελεί ένα μέτρο της ισχύος της δράσης μιας ουσίας. Η τιμή αυτή είναι διαφορετική για κάθε κυτταρική σειρά που επωάζεται με την ουσία.

4. Αποτελέσματα

4.1 Κινητική των κυττάρων

Για την μελέτη της κινητικής των κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της συγκέντρωσης των κυττάρων καθώς και των νεκρών κυττάρων στις 0, 24, 48, 72 και 96 ώρες. Για κάθε μια χρονική στιγμή πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις της συγκέντρωσης των κυττάρων απεικονίζονται στο διάγραμμα της εικόνας 22. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, η ανάπτυξη των κυττάρων αυξάνεται εκθετικά τις πρώτες 72 ώρες και στη συνέχεια ο ρυθμός ανάπτυξης δείχνει να μειώνεται. Ο χρόνος διπλασιασμού, ο οποίος υπολογίστηκε βάση των δεδομένων των πρώτων 72 ωρών με τη βοήθεια του προγράμματος **doubling time cell calculator** (https://www.doubling-time.com/compute_more.php), είναι ~22 ώρες (21.86 ώρες).

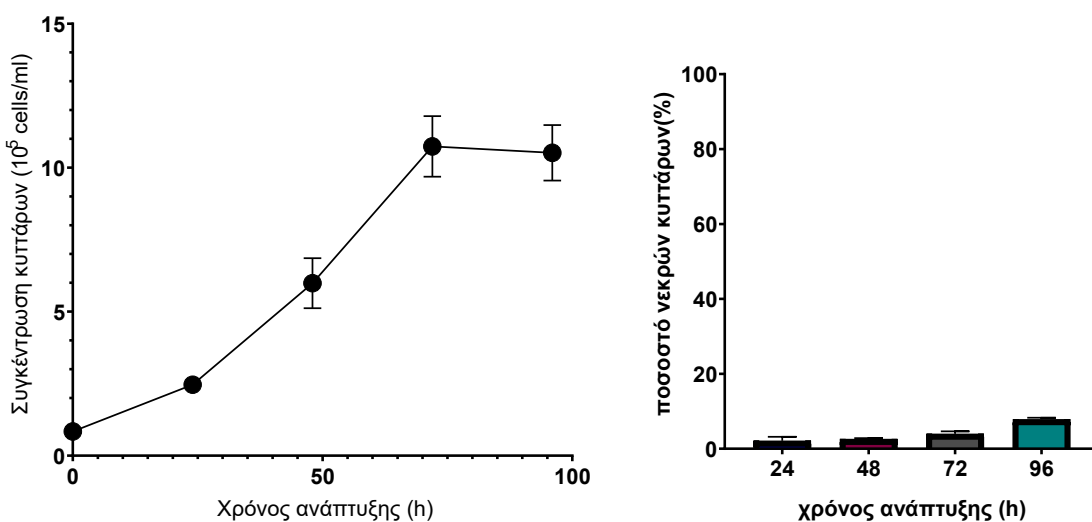
Η **ανάπτυξη των κυττάρων στην εκθετική φάση**, φαίνεται, σύμφωνα με τις μετρήσεις και με τη βοήθεια του ίδιου προγράμματος, να ακολουθεί την εξής εξίσωση:

$$c_t = c_0 * e^{0.0317 * \text{time}}$$

c_t : συγκέντρωση κυττάρων την χρονική στιγμή t ,

c_0 : αρχική συγκέντρωση κυττάρων

Όσον αφορά το ποσοστό κυτταρικού θανάτου, φαίνεται να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. (Εικόνα 23)



Εικόνα 22 Διάγραμμα απεικόνισης της κυτταρικής ανάπτυξης σε συνάρτηση με το χρόνο

Εικόνα 23 Διάγραμμα απεικόνισης του ποσοστού νεκρών κυττάρων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές

4.2 Υπολογισμός IC50

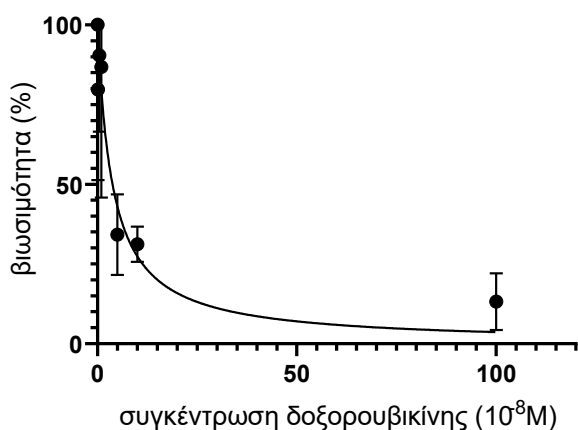
Η διαδικασία προσδιορισμού της IC50 των ουσιών, της συγκέντρωσης δηλαδή που προκαλεί 50% μείωση του πληθυσμού των κυττάρων, για τα K562, περιλαμβάνει μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων και του ποσοστού κυτταρικού θανάτου κυτταρικών καλλιέργειών που έχουν επωαστεί παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της ουσίας καθώς και απουσία κάποιας ουσίας (καλλιέργειες ελέγχου). Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές καλλιέργειες όγκου 2 ml και αρχικής συγκέντρωσης $1 * 10^5$ κύτταρα/ml. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις για την

κάθε ουσία. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της κυτταρικής ανάπτυξης, εκφρασμένα ως ποσοστό βιωσιμότητας, δηλαδή ως ποσοστό της συγκέντρωσης των κυττάρων στις καλλιέργειες ελέγχου, απεικονίστηκαν σε διαγράμματα με την βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 8, από όπου υπολογίστηκαν οι τιμές IC50.

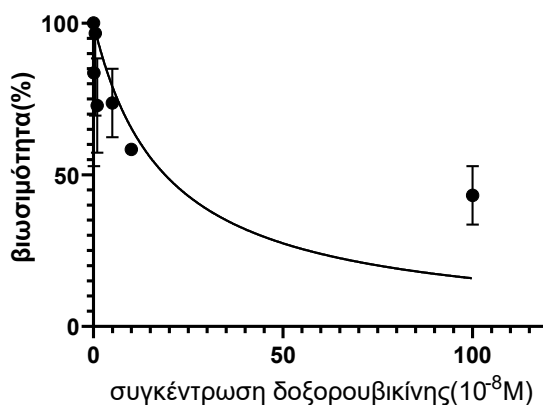
Δοξορουβικίνη

Η τιμή IC50 προσδιορίστηκε στις 24,48 και 72 ώρες και υπολογίστηκε σε $19,37 \cdot 10^{-8} \text{M}$, $3,776 \cdot 10^{-8} \text{M}$ και $0,8968 \cdot 10^{-8} \text{M}$ αντίστοιχα (Πίνακας 1). Τα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζουν την μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των K562 όσο αυξάνεται η συγκέντρωση δοξορουβικίνης (Εικόνα 24) καθώς και το ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε διάφορες δόσεις δοξορουβικίνης. (Εικόνα 25) Στις 48 και 72 ώρες παρατηρείται αύξηση του ποσοστού κυτταρικού θανάτου σε συγκεντρώσεις $>5 \cdot 10^{-8} \text{M}$.

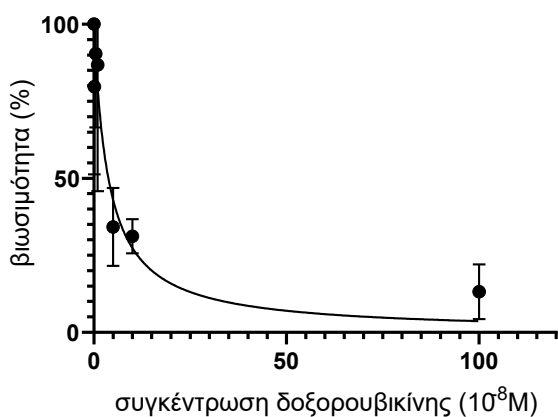
A



B



Γ

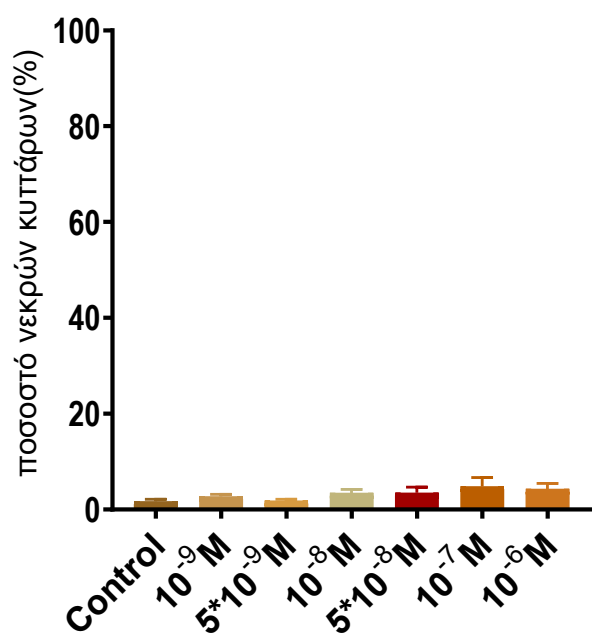


Εικόνα 24 Διαγράμματα απεικόνισης της βιωσιμότητας των κυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση δοξορουβικίνης μετά από 24, (A) 48 (B) και 72 (Γ) ώρες επώασης

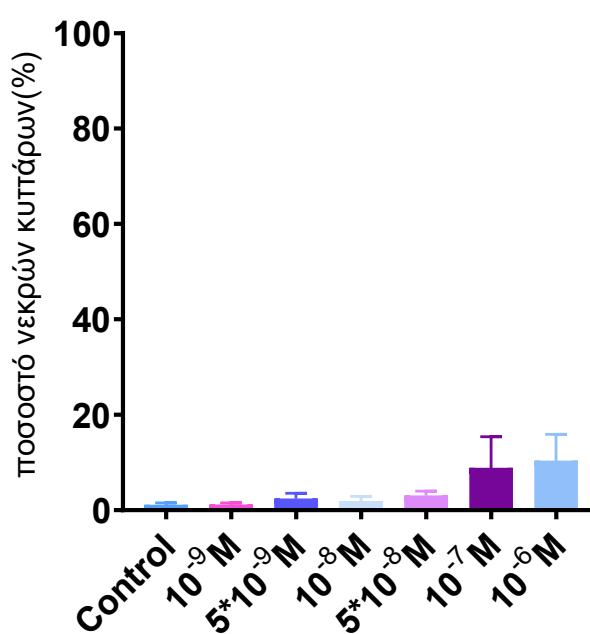
IC50 (10 ⁻⁸ M)	IC50 (μM)	Χρόνος (ώρες)
19.37	0.1937	24
3.776	0.03776	48
0.8968	0.008968	72

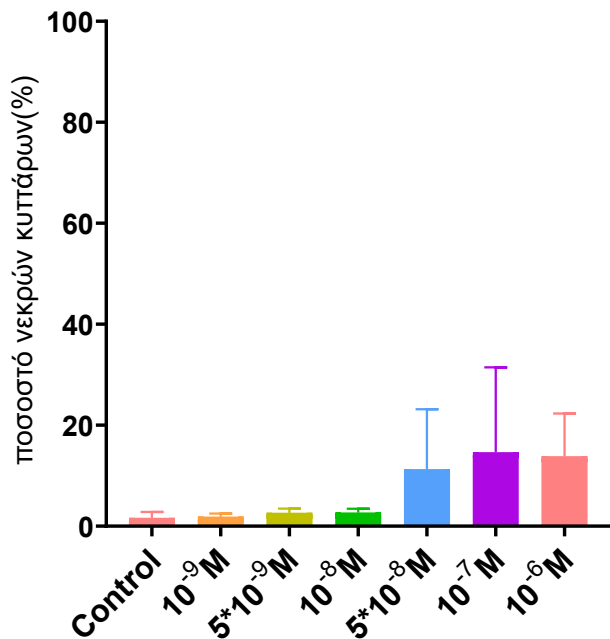
Πίνακας 1 Τιμές IC50 της δοξορουβκίνης στα K562 στις 24, 48 και 72 ώρες

A



B



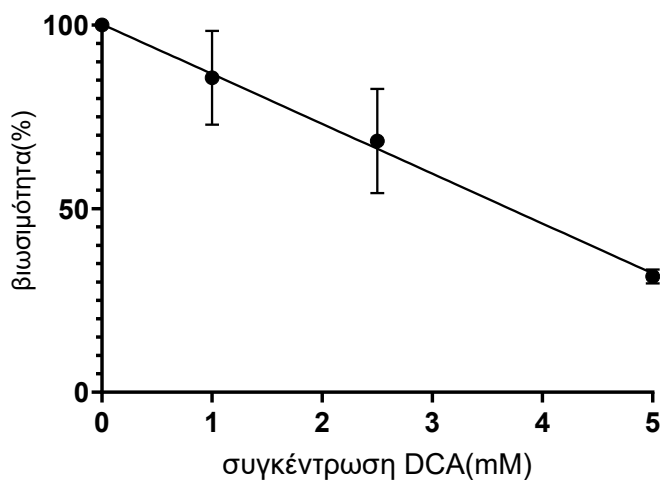


Γ

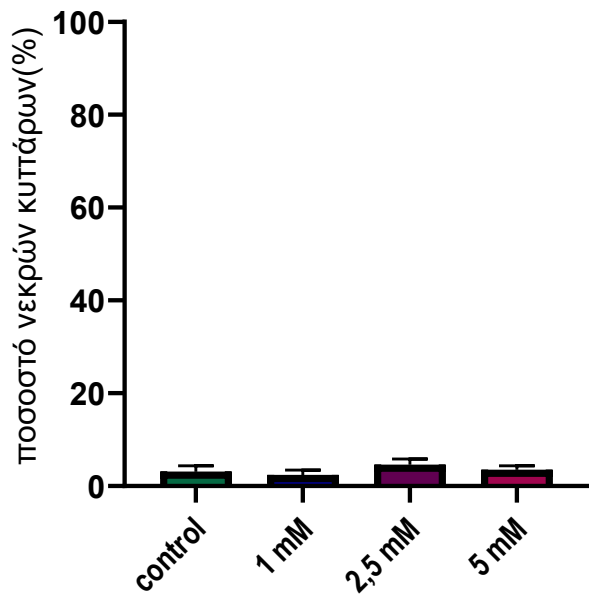
Εικόνα 25 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης καθώς και απουσία δοξορουβικίνης για 24(A), 48(B) και 72(Γ) ώρες

DCA

Η τιμή IC₅₀ του DCA για τα K562 στις 72 ώρες σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων είναι **3,682 mM**. Τα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζουν την μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των K562 όσο αυξάνεται η συγκέντρωση DCA (Εικόνα 26) καθώς και το ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε διάφορες δόσεις της ουσίας. (Εικόνα 27)



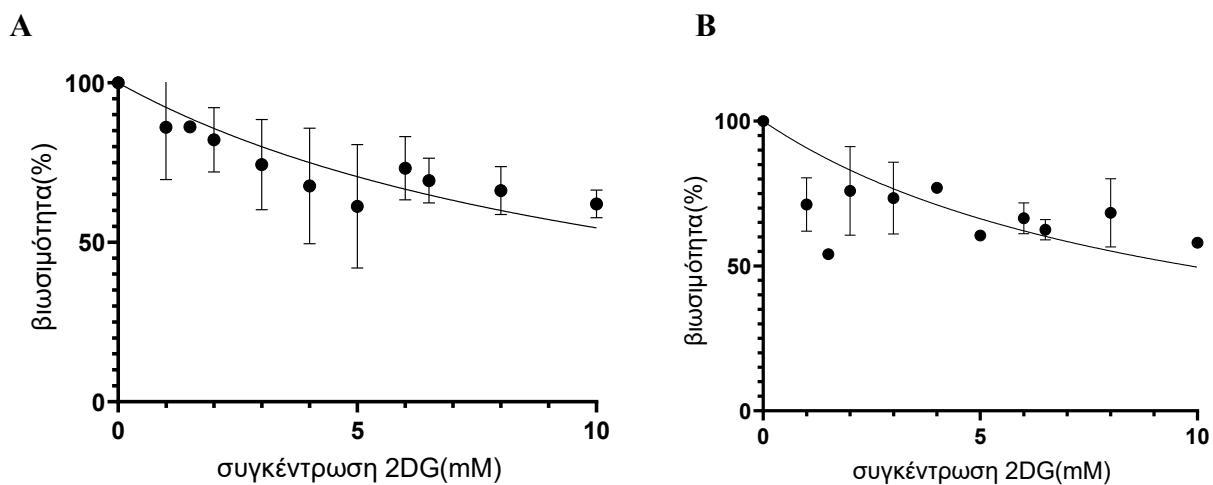
Εικόνα 26 Διάγραμμα απεικόνισης της βιωσιμότητας των κυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση DCA μετά από 72 ώρες επώασης



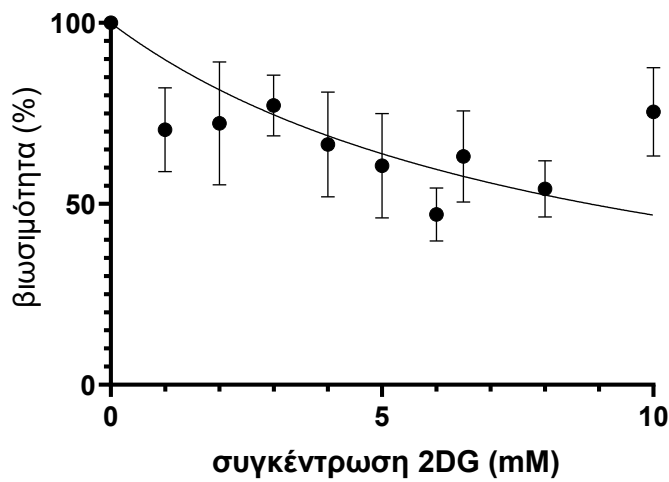
Εικόνα 27 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου μετά από επόαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις DCA καθώς και απουσία DCA για 72ώρες

2-DG

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στις 24, 48 και 72 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις έως 10 mM, οι οποίες ωστόσο δεν φαίνεται να φτάνουν την IC50. Τα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζουν την μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των K562 όσο αυξάνεται η συγκέντρωση 2- DG (Εικόνα 28) καθώς και το ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε διάφορες δόσεις της ουσίας.

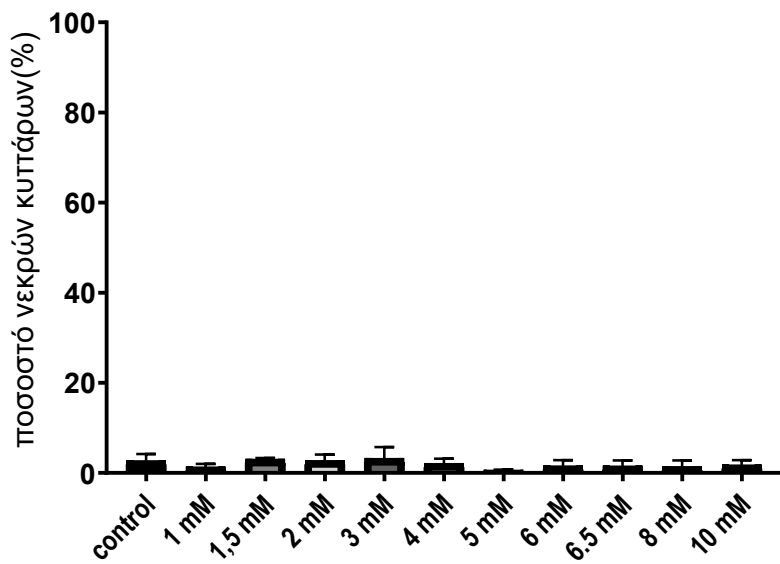


Γ

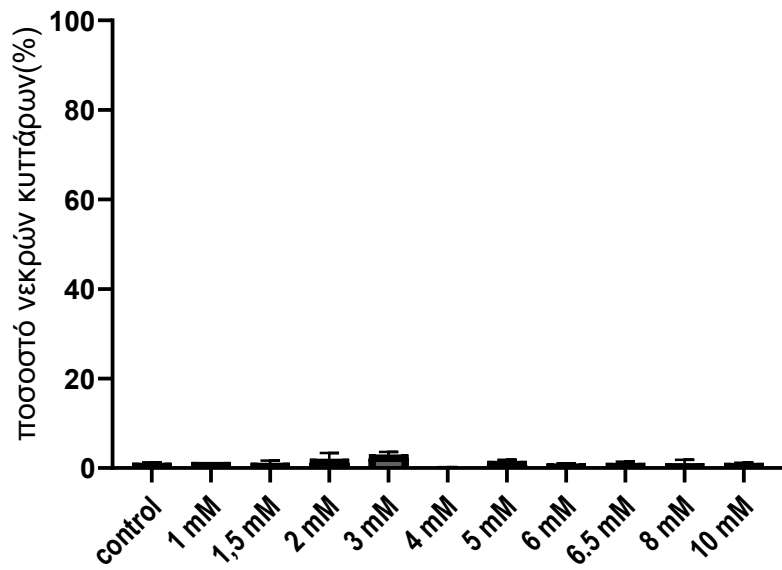


Εικόνα 28 Διαγράμματα απεικόνισης της βιωσιμότητας των κυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση 2DG μετά από 24, (Α) 48 (Β) και 72 (Γ) ώρες επώασης

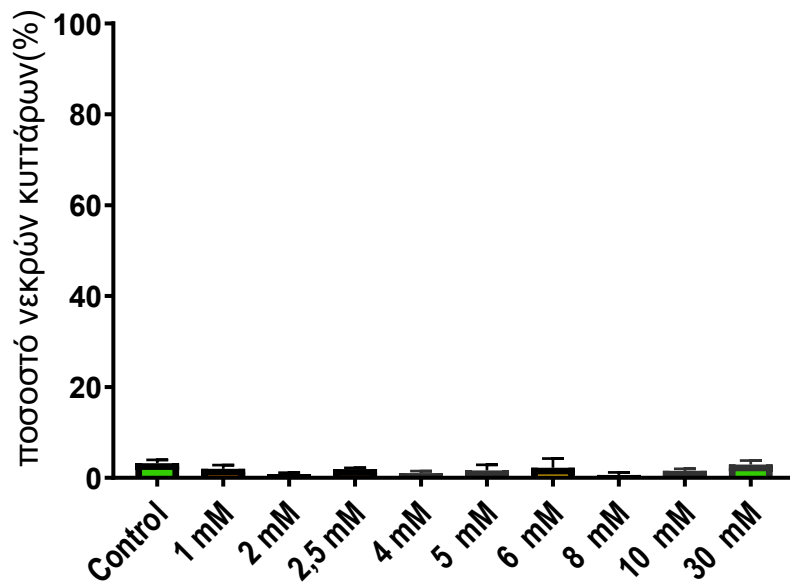
A



B



Γ

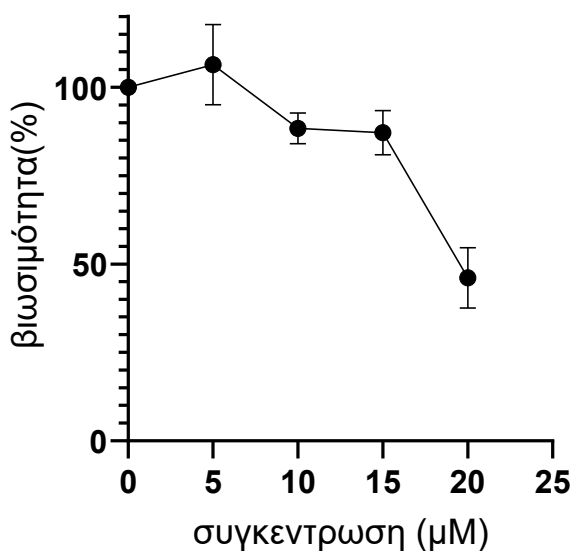


Εικόνα 29 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις 2-DG καθώς και απουσία 2-DG για 24(A), 48(B) και 72(Γ) ώρες

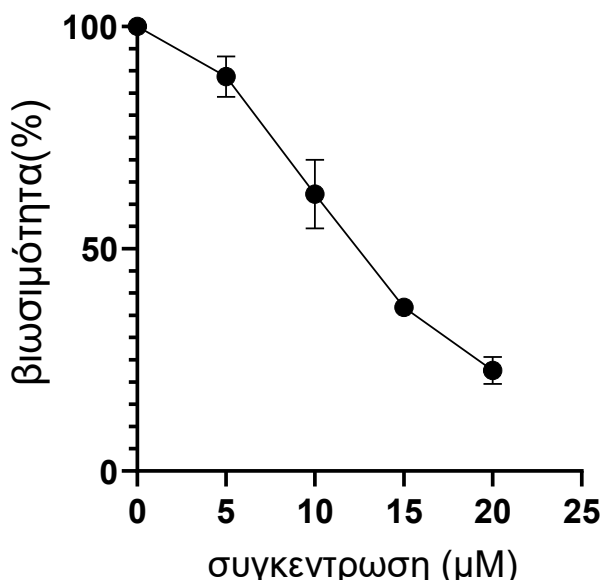
Rhein-amide tropolone

Η τιμή IC₅₀ προσδιορίστηκε στις 24,48 και 72 ώρες και υπολογίστηκε σε 19,968 μM, 12,341 μM και 8,433 μM αντίστοιχα (Πίνακας 2). Τα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζουν την μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των K562 όσο αυξάνεται η συγκέντρωση *rhein-amide tropolone* (Εικόνα 30) καθώς και το ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε διάφορες δόσεις της ουσίας. Στις 48 και 72 ώρες παρατηρείται αύξηση του ποσοστού κυτταρικού θανάτου σε συγκεντρώσεις >15 μM. (Εικόνα 31)

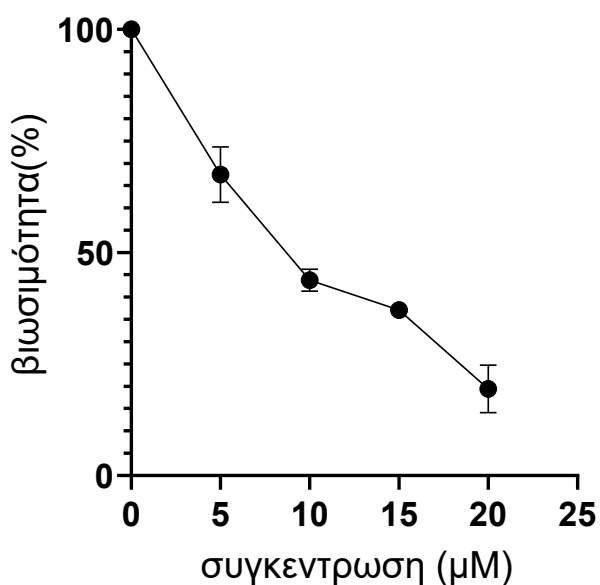
A



B



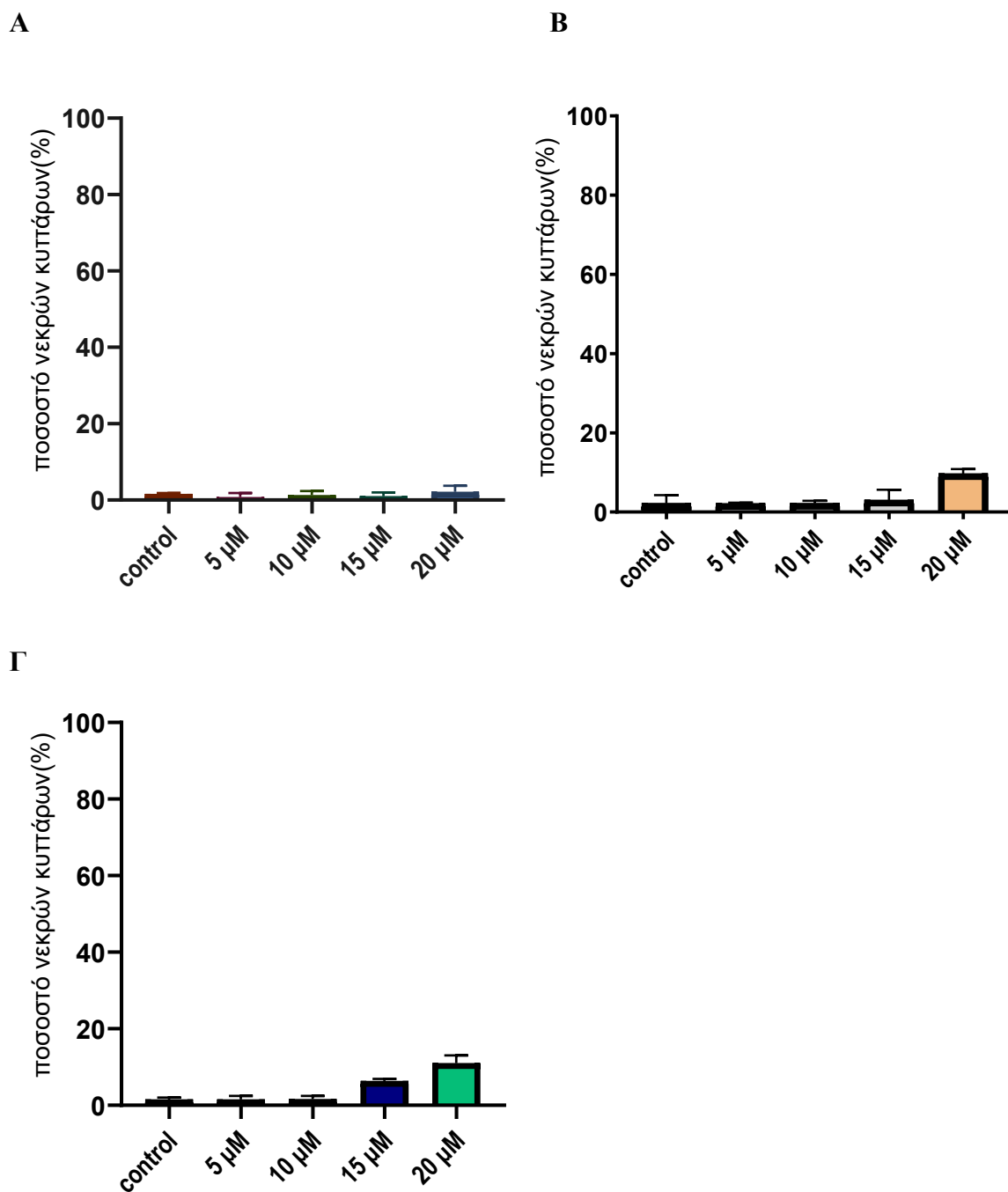
Γ



Εικόνα 30 Διαγράμματα απεικόνισης της βιωσιμότητας των κυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση *rhein-amide tropolone* μετά από 24, (A) 48 (B) και 72 (Γ) ώρες επώασης

Χρόνος (h)	Ic50 (μM)
24	19,968
48	12,341
72	8,334

Πίνακας 2 Τιμές IC50 της rheinamide tropolone στα K562 στις 24, 48 και 72 ώρες



Εικόνα 31 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις rhein-amide tropolone καθώς και απουσία της ουσίας για 24(A), 48(B) και 72(Γ) ώρες

4.3 Επώαση των K562 με δοξορουβικίνη, 2-DG και DCA.

Για την μελέτη της επίδρασης των συνδυασμών της δοξορουβικίνης με τους δύο αναστολείς γλυκόλυσης στην κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο και την σύγκριση της με την δράση της κάθε ουσίας ξεχωριστά, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες όγκου 2 ml και αρχικής συγκέντρωσης $1 \cdot 10^5$ κύτταρα/ml, οι οποίες επώαστηκαν παρουσία των ουσιών για 72 ώρες. Η δοξορουβικίνη χορηγήθηκε σε τελική συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-7}$ M ενώ η 2-DG και το DCA σε τελική συγκέντρωση 4 mM. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις και περιλαμβάνει μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων και του ποσοστού κυτταρικού θανάτου κυτταρικών καλλιιεργειών που έχουν επωαστεί παρουσία των ουσιών, καθώς και απουσία κάποιας ουσίας (καλλιιεργειες ελέγχου). Τα αποτελέσματα της κυτταρικής ανάπτυξης εκφράζονται ως ποσοστό βιωσιμότητας.

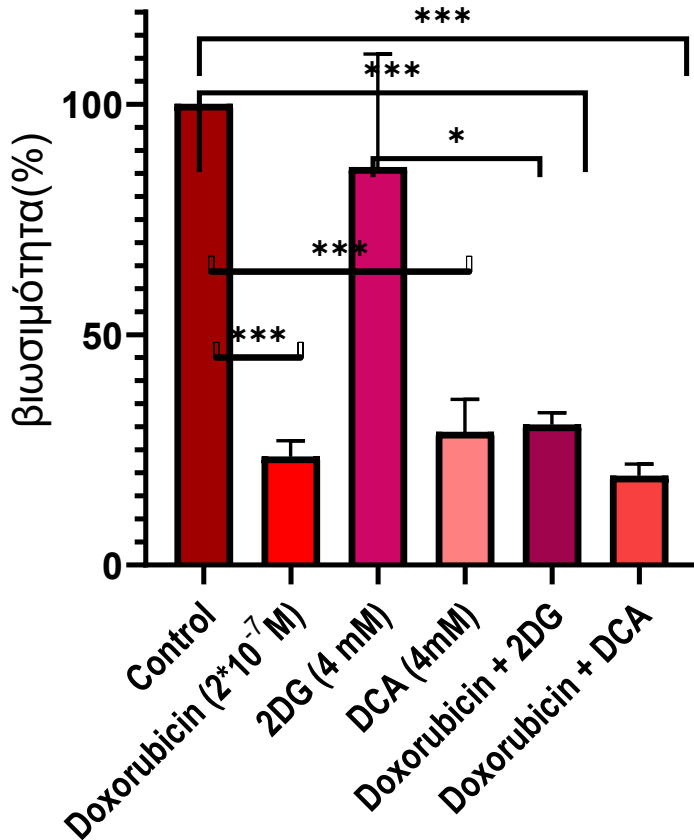
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας 10, η δοξορουβικίνη και το DCA προκαλούν σημαντική μείωση της ανάπτυξης των K562, σε αντίθεση με την 2-DG που δεν φαίνεται να έχει κάποια ιδιαίτερη επίδραση.

Η προκαλούμενη από την DCA αναστολή είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη, δεδομένου ότι η δόση που χρησιμοποιείται είναι σχεδόν ίση με την IC50 (3,682 mM), για αυτό τον λόγο, η δοκιμασία αυτή θα ήταν χρήσιμο να επαναληφθεί στο μέλλον για να επιβεβαιωθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων.

Ο συνδυασμός της δοξορουβικίνης με την 2-DG προκαλεί μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων η οποία δεν διαφέρει σημαντικά από την μείωση που προκαλεί η δοξορουβικίνη μόνη της, το οποίο δείχνει ότι η 2-DG δεν επηρεάζει την δράση της δοξορουβικίνης ως προς την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης.

Η ταυτόχρονη χορήγηση δοξορουβικίνης και DCA δεν προκαλεί σημαντικά μεγαλύτερη μείωση από ότι οι δύο ουσίες μόνες τους, επομένως δεν φαίνεται να υπάρχει συνέργεια στη δράση τους αλλά μάλλον πρόκειται για αθροιστική δράση.

Δείγμα	Βιωσιμότητα %
Control	100
Doxorubicin	23,52 +/- 3,485
2DG	86,293 +/- 24,5
DCA	28,86 +/- 7,11
Doxorubicin+2DG	30,477 +/- 2.604
Doxarubicin+DCA	19,343 +/- 2,606



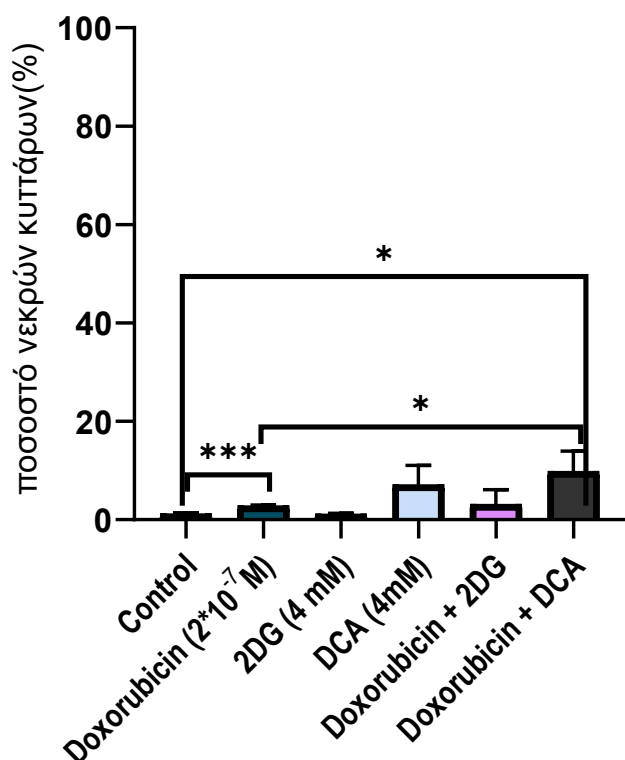
Εικόνα 32 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων K562 μετά από 72 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη, 2DG και DCA.

Δείγματα που συγκρίνονται	Διαφορά	Στατιστική (P<0,005)	σημαντικότητα
Control / Doxorubicin	-76,48	***	
Control / 2DG	-13,707	Ns	
Control / DCA	-71,14	***	
Control / Doxorubicin+2DG	-69,523	***	
Control / Doxarubicin+DCA	-80,657	***	
Doxorubicin / Doxorubicin+2DG	+6,957	Ns	
Doxorubicin / Doxorubicin+DCA	-4,177	Ns	
2DG / Doxorubicin+2DG	-55,816	*	
DCA / Doxarubicin+DCA	-9,517	Ns	

Πίνακας 3 Στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων της εικόνας 32

Όσον αφορά τον κυτταρικό θάνατο, η δοξορουβικίνη φαίνεται να προκαλεί στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τις καλλιέργειες *control*, ενώ η ταυτόχρονη χορήγηση της δοξορουβικίνης με DCA φαίνεται να προκαλεί αύξηση του κυτταρικού θανάτου που είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τον αντίστοιχο από επώαση των κυττάρων μόνο με δοξορουβικίνη.

Το DCA και η 2DG δεν φαίνεται να συμβάλουν στον κυτταρικό θάνατο.



Δείγμα	Βιωσιμότητα %
Control	1,2 +/- 0,2
Doxorubicin	2,8 +/- 0.2
2DG	1,15 +/- 0,132
DCA	7,1 +/- 3,929
Doxorubicin+2DG	3,117 +/- 2.973
Doxarubicin+DC A	9,83 +/- 5,759

Εικόνα 33 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου K562 μετά από 72 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη, 2-DG και DCA

Δείγματα που συγκρίνονται	Διαφορά	Στατιστική (P<0,005)	σημαντικότητα
---------------------------	---------	-------------------------	---------------

Control / Doxorubicin	+2,6	***
Control / 2DG	-0,05	Ns
Control / DCA	+5,9	Ns
Control / Doxorubicin+2DG	+1,917	Ns
Control / Doxorubicin+DCA	+8,83	*
Doxorubicin / Doxorubicin+2DG	+0,317	Ns
Doxorubicin / Doxorubicin+DCA	+7,03	*
2DG / Doxorubicin+2DG	+1,967	Ns
DCA / Doxorubicin+DCA	+2,83	Ns

4.4 Επώαση των K562 με *rhein-amide tropolone*, 2-DG και DCA.

Για την μελέτη της επίδρασης των συνδυασμών της *rhein-amide tropolone* με τους δύο αναστολείς γλυκόλυσης στην κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο και την σύγκριση της με την δράση της κάθε ουσίας ξεχωριστά, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες όγκου 2 ml και αρχικής συγκέντρωσης $1 \cdot 10^5$ κύτταρα/ml, οι οποίες επώαστηκαν παρουσία των ουσιών για 72 ώρες. Η *rhein-amide tropolone* χορηγήθηκε σε τελική συγκέντρωση 8,5 μ M ενώ η 2-DG και το DCA σε τελική συγκέντρωση 4 mM. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις και περιλαμβάνει μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων και του ποσοστού κυτταρικού θανάτου κυτταρικών καλλιεργειών που έχουν επωαστεί παρουσία των ουσιών, καθώς και απουσία κάποιας ουσίας (καλλιέργειες ελέγχου). Τα αποτελέσματα της κυτταρικής ανάπτυξης εκφράζονται ως ποσοστό βιωσιμότητας.

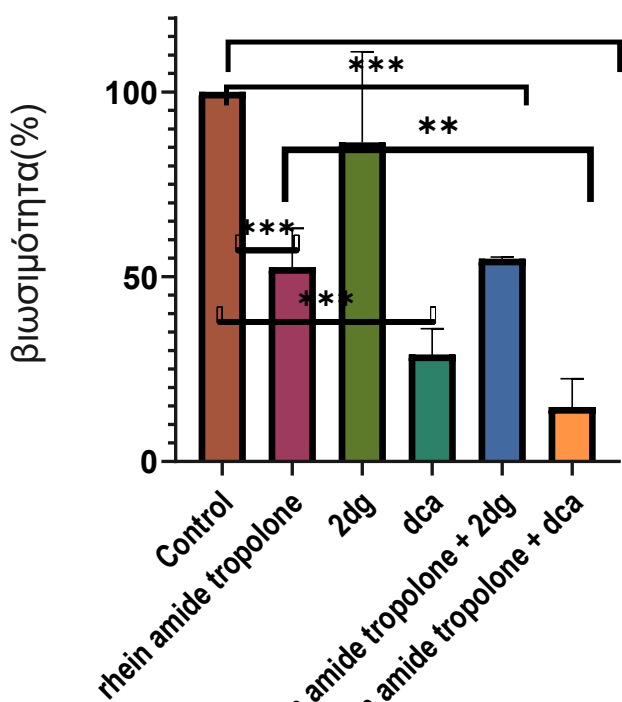
Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της εικόνας 34, η *Rhein-amide tropolone* και το DCA προκαλούν σημαντική μείωση της ανάπτυξης των K562, σε αντίθεση με την 2DG που δεν φαίνεται να έχει

Πίνακας 4 Στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων της εικόνας 33

κάποια ιδιαίτερη επίδραση. Η προκαλούμενη από την DCA αναστολή είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη, δεδομένου ότι η δόση που χρησιμοποιείται είναι σχεδόν ίση με την IC50 (3,682 mM), για αυτό τον λόγο, η δοκιμασία αυτή θα ήταν χρήσιμο να επαναληφθεί στο μέλλον για να επιβεβαιωθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων.

Ο συνδυασμός της *Rhein-amide tropolone* με την 2DG προκαλεί μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων η οποία δεν διαφέρει σημαντικά από την μείωση που προκαλεί η *rhein-amide tropolone* μόνη της, το οποίο δείχνει ότι η 2DG δεν επηρεάζει την δράση της *rhein-amide tropolone* ως προς την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης.

Η ταυτόχρονη χορήγηση *rhein-amide tropolone* και DCA φαίνεται να παρουσιάζει συνεργιστική δράση, καθώς προκαλεί μείωση η οποία είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την *rhein-amide tropolone* και την DCA όταν χορηγούνται ξεχωριστά.



Δείγμα	Βιωσιμότητα %
Control	100
Rhein-amide tropolone	52.586 +/- 10.4
2DG	86,293 +/- 24,5
DCA	28,86 +/- 7,11
Rhein-amide tropolone + 2DG	54.805 +/- 0.53
Rhein-amide tropolone + DCA	14.7067 +/- 2,631

Εικόνα 34 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων K562 μετά από 72 ώρες επώασης με *rhein amide tropolone*, 2DG και DCA.

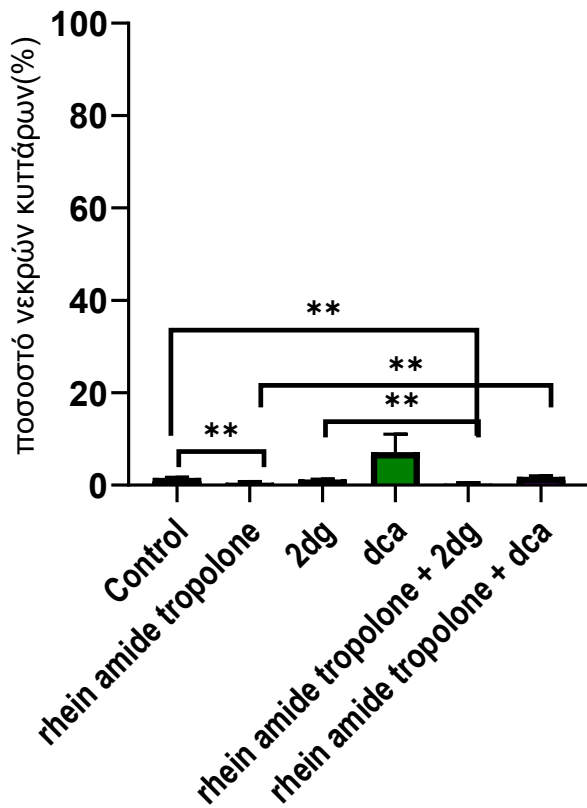
Δείγματα που συγκρίνονται	Διαφορά	Στατιστική σημαντικότητα (P<0,005)
Control / Rhein-amide tropolone	-47,414	***
Control/ 2DG	-13,707	Ns
Control / DCA	-71,14	***
Control / Rhein-amide tropolone +2DG	-45,195	***
Control / Rhein-amide tropolone +DCA	-85,293	***
Rhein-amide tropolone / Rhein-amide tropolone +2DG	+2,219	Ns
Rhein-amide tropolone / Rhein-amide tropolone +DCA	-37,8793	**
2DG/ Rhein-amide tropolone +2DG	-31,488	Ns
DCA / Rhein-amide tropolone +DCA	-14,153	**

Πίνακας 5 Στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων της εικόνας 34

Η *rhein-amide tropolone* φαίνεται να προκαλεί μείωση του ποσοστού κυτταρικού θανάτου σε σύγκριση με τις καλλιέργειες *control* όταν χορηγείται μόνη της ή σε συνδυασμό με 2DG, ενώ δεν δείχνει να έχει κάποια επίδραση όταν χορηγείται μαζί με DCA.

Η συγχορήγησή της με 2DG έχει ως αποτέλεσμα ποσοστό κυτταρικού θανάτου μικρότερο από τον αντίστοιχο με μόνη τη 2DG, ενώ δεν διαφέρει σημαντικά από τον αντίστοιχο της *rhein-amide tropolone*.

Η χορήγηση της *rhein-amide tropolone* μαζί με DCA φαίνεται να προκαλεί αύξηση στο ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε σχέση με τη χορήγηση μόνον της *rhein amide tropolone* (Εικόνα 35). Από τα αποτελέσματα αυτά, φαίνεται ότι η *rhein-amide tropolone* ενδεχομένως προκαλεί μείωση του ρυθμού κυτταρικού θανάτου των K562, και πως η επίδραση αυτή μειώνεται με τη συγχορήγηση DCA.



Δείγμα	Βιωσιμότητα %
Control	1,2 +/- 0,2
Rhein-amide tropolone	0,5 +/- 0,25
2DG	1,15 +/- 0,132
DCA	7,1 +/- 3,929
Rhein-amide tropolone + 2DG	0,267 +/- 0,231
Rhein-amide tropolone + DCA	1,75 +/- 0,25

Εικόνα 35 Ποσοστό κυτταρικού θανάτου K562 μετά από 72 ώρες επώασης με rhein-amide tropolone, 2DG και DCA

Δείγματα που συγκρίνονται	Διαφορά	Στατιστική σημαντικότητα (P<0,005)
Control / Rhein-amide tropolone	-0,7	**
Control / 2DG	-0,05	Ns
Control / DCA	+5,9	Ns
Control / Rhein-amide tropolone +2DG	-0,933	**
Control / Rhein-amide tropolone +DCA	+0,55	Ns
Rhein-amide tropolone / Rhein-amide tropolone +2DG	-0,233	Ns
Rhein-amide tropolone / Rhein-amide tropolone +DCA	+1,25	**
2DG / Rhein-amide tropolone +2DG	-0,883	**
DCA / Rhein-amide tropolone +DCA	-5,35	Ns

Πίνακας 6 Στατιστική σημαντικότητα αποτελεσμάτων εικόνας 35

5. Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Οι αλλαγές του μεταβολισμού είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό πολλών καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό έχει εξεταστεί η χρήση ουσιών που επιδρούν στο μεταβολισμό στη θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου. Η συγκεκριμένη εργασία ασχολείται με δύο τέτοιες ουσίες, το διχλωροξικό οξύ (DCA) και την 2-δεόξυγλυκόζη (2DG), οι οποίες αναστέλλουν την λειτουργία της γλυκολυτικής οδού μέσω αναστολής ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτή. Πιο συγκεκριμένα, το DCA αναστέλλει την κινάση της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (PDK) και η 2DG αναστέλλει την εξοκινάση (HK1). Και οι δύο ουσίες έχουν δοκιμαστεί σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο σε συνδυασμό με άλλες αντικαρκινικές θεραπείες και έχουν δείξει ότι αυξάνουν την αποτελεσματικότητά τους.

Η δράση τους δοκιμάστηκε σε καρκινικά κύτταρα K562 και σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη. Καμία από τις δύο ουσίες δεν φάνηκε να επηρεάζει την δράση της δοξορουβικίνης, αν και ο συνδυασμός δοξορουβικίνης –DCA προκάλεσε μεγαλύτερα επίπεδα κυτταρικού θανάτου από την σκέτη δοξορουβικίνη, αυτό φαίνεται να οφείλεται απλώς σε αρθροιστική δράση παρά σε συνέργεια των δύο ουσιών.

Σε αυτή την εργασία επίσης εξετάστηκε η δράση μιας νέας ένωσης, της *rhein-amide tropolone*. Πολλά παράγωγα τροπολόνης έχουν δείξει ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε *in vitro* δοκιμές, λόγω αναστολής των ενζύμων «αποακετυλάσες» των ιστονών (HDACs), πιθανόν μέσω σχηματισμού χηλικών συμπλόκων με τον ψευδάργυρο που είναι απαραίτητος για την δράση αυτών των ενζύμων. Θεωρείται επομένως πιθανό η ουσία αυτή να διαθέτει αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδρασή της στην κυτταρική ανάπτυξη και στον κυτταρικό θάνατο των K562. Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση και του DCA και της 2DG στην δράση της. Τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία υποστηρίζουν ότι η *rhein-amide tropolone* έχει όντως την ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των K562 κατά δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο, καθώς η αναστολή αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης καθώς και με το πέρασμα του χρόνου. Παρατηρήθηκε επίσης μικρή αύξηση του ποσοστού κυτταρικού θανάτου, αλλά μόνο στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι οποίες ξεπερνούσαν την IC50 που υπολογίσαμε, το οποίο δείχνει ότι η δράση του οφείλεται περισσότερο σε αναστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων από ότι σε πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα, οι καλλιέργειες που επώαστηκαν για 72 ώρες παρουσία της *rhein-amide tropolone* σε συγκέντρωση σχεδόν ίση με την IC50 που υπολογίστηκε στις 72 ώρες, εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου σε σχέση με τις καλλιέργειες *control*, αν και αυτό πιθανόν να οφείλεται στην χαμηλότερη συγκέντρωση κυττάρων που ίσως έχει ως επακόλουθο χαμηλότερο ανταγωνισμό των κυττάρων για τα θρεπτικά συστατικά. Όσον αφορά τον συνδυασμό της με τους δύο αναστολείς γλυκόλυσης, η 2DG δεν δείχνει να επηρεάζει την δράση της, ενώ το DCA είναι πιθανόν να έχει συνεργιστική δράση. Χορήγηση *rhein-amide tropolone* και DCA ταυτόχρονα, προκαλεί σημαντικά μεγαλύτερη αναστολή από ότι οι δύο ουσίες χώρα. Εν κατακλείδι, βάση των προαναφερθέντων αποτελεσμάτων, η ένωση αυτή φαίνεται να παρουσιάζει προοπτικές για πιθανή αντικαρκινική δράση, οι οποίες αξίζει να διερευνηθούν περαιτέρω, όπως επίσης και η πιθανότητα συνεργιστικής δράσης με την DCA.

Τέλος, να αναφερθεί ότι, λόγω της μεγαλύτερης από την αναμενόμενη αναστολή της ανάπτυξης των K562 που παρατηρείται από την DCA μετά τις 72 ώρες επώασης με τελική συγκέντρωση 4 mM, ενδεχομένως θα ήταν χρήσιμο να επαναληφθούν στο μέλλον τα πειράματα, ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων.

Βιβλιογραφία

1. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2011) Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας 2^η έκδοση 2011 σελ. 903-909
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J. (2002) How Cells Obtain Energy from Food Molecular Biology of the Cell. 4th edition. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26882/?fbclid=IwAR18KMTqGjA5k5CjOoB2k_FZkx8I2Uuc4vwWknFTQND4GcVXK9FZczjgrb4
3. Amin R.M, Karpowicz P.A, Carey T.E, Arbiser J, Nahta R, Chen Z.G, Dong J.T, Kucuk O, Khan G.N (2015) Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds, Seminars in cancer biology 2015 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25749195/>
4. Bartoszewska, S., Collawn, J.F.(2020) Unfolded protein response (UPR) integrated signaling networks determine cell fate during hypoxia. *Cellular Molecular Biology Letters* 25, 18 (2020). <https://cml.biomedcentral.com/articles/10.1186/s11658-020-00212-1>
5. Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, Marchi D.M, Suski J.M, Bononi A, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Wieckowski M.R, Pinton P. (2012) ATP synthesis and storage Purinergic Signal. 2012 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3360099/?fbclid=IwAR18KMTqGjA5k5CjOoB2k_FZkx8I2Uuc4vwWknFTQND4GcVXK9FZczjgrb4
6. Carvalho C, Coelho Dos Santos R, Cardoso S, Correia S, Oliveira P, Santos M, Moreira P (2009). Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current medicinal chemistry*. 16. 3267-85. <https://abdn.pure.elsevier.com/en/publications/doxorubicin-the-good-the-bad-and-the-ugly-effect>
7. Chen X.S, Li L.Y, Guan Y.D, Yang J.M, Cheng Y. (2016) Anticancer strategies based on the metabolic profile of tumor cells: therapeutic targeting of the Warburg effect. *Acta Pharmacol Sin*. 2016 Aug; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27374491/>

8. Chu Q.S.-C, Sangha R, Spratlin J, Vos L.J, Mackey J.R, McEwan A.J.B, Venner P, Michelakis E.D, (2015) A Phase I Open-Labeled, Single-Arm, Dose-Escalation, Study of Dichloroacetate (DCA) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Investig. New Drugs* **2015**, 33, 603–610. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10637-015-0221-y>

9. Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR. (2005) The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life*. 2005 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16036566/>

10. Denny W.A., (2007) Therapeutic Areas II: Cancer, Infectious Diseases, Inflammation & Immunology and Dermatology in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 2007 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B008045044X002066>

11. Deshpande OA, Mohiuddin SS. (2022) Biochemistry, Oxidative Phosphorylation. 2022 Aug 1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553192/>

12. Dey S, Murmu N, Mondal T, Saha I, Chatterjee S, Manna R, Haldar S, Dash S.K, Sarkar T.R, Giri B (2022) Multifaceted entrancing role of glucose and its analogue, 2-deoxy-D-glucose in cancer cell proliferation, inflammation, and virus infection, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 156, 2022 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222011908?via%3Dihub>

13. Du W, Amarachintha S, Wilson AF, Pang Q. (2016) SCO2 Mediates Oxidative Stress-Induced Glycolysis to Oxidative Phosphorylation Switch in Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells*. 2016 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26676373/>

14. Dunbar, E.M.; Coats, B.S.; Shroads, A.L.; Langae, T.; Lew, A.; Forder, J.R.; Shuster, J.J.; Wagner, D.A.; Stacpoole, P.W. (2014) Phase 1 Trial of Dichloroacetate (DCA) in Adults with Recurrent Malignant Brain Tumors. *Investig. New Drugs* **2014**, 32, 452–464. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8026821/>

15. El Sayed S. M., Baghdadi H., Ahmed N. S., et al. (2019) Dichloroacetate is an antimetabolite that antagonizes acetate and deprives cancer cells from its benefits: a novel evidence-based medical hypothesis. *Medical Hypotheses*. 2019 pp 206–209. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30593413/>

16. Fernando A , Dairion Gatot D , Fajar Sitepu Y. I (2021) The Differences of Myelosuppression before and after Doxorubicin Chemotherapy in Breast Cancer Patients in Rsup. H. Adam Malik Medan https://www.ijrrjournal.com/IJRR_Vol.8_Issue.7_July2021/IJRR04.pdf

17. Garon E.B, Christofk H.R, Hosmer W, Britten C.D, Bahng A, Crabtree M.J, Hong, C.S, Kamranpour N, Pitts S, Kabbinavar F et al. Dichloroacetate Should Be Considered with Platinum-Based Chemotherapy in Hypoxic Tumors Rather than as a Single Agent in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2014**, *140*, 443–452. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3939783/>
18. Gu L, Yi Z, Zhang Y, Ma Z, Zhu, Gao J (2020) Low dose of 2-deoxy-D-glucose kills acute lymphoblastic leukemia cells and reverses glucocorticoid resistance via N-linked glycosylation inhibition under normoxia *ONCOLOGY LETTERS* 20: 962-966, 2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5458182/>
19. Gupta S., Dwarakanath B.(2018) Modulation of Immuno-biome during radio-sensitization of tumors by glycolytic inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*. 2018 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29852858/>
20. Guyton and Hall (2013) *Ιατρική Φυσιολογία* 12^η έκδοση John E. Hall 2013 σελ.35-39
21. Hanahan D, Weinberg R.A (2011), Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, Volume 144, Issue 5, 2011, Pages 646-674 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279>
22. Haney S.L, Allen C, Varney M.L, Dykstra K.M, Falcone E.R, Colligan S.H, Hu Q, Aldridge A.M, D.L, Wiemer A.J and Holstein S.A Novel tropolones induce the unfolded protein response pathway and apoptosis in multiple myeloma cells *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 44), pp: 76085-76098 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29100294/>
23. Jang M, Kim S.S, Lee J. (2013) Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp Mol Med*. 2013 Oct <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3809361/>
24. Jögi A, Vaapil M, Johansson M, Pählman S. (2012) Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. *Ups J Med Sci*. 2012 May;117(2):217-24 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3339553/>
25. Kierans S. J, . Taylor C. T (2021) Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology *The Journal of Physiology* Volume599, Issue1 1 January 2021 Pages 23-37 <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/JP280572>
26. Kim, S-H & Baek, K-H (2021). Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/12/6173>

27. Korga A, Ostrowska M, Iwan M, Herbet M, Dudka J. (2019) Inhibition of glycolysis disrupts cellular antioxidant defense and sensitizes HepG2 cells to doxorubicin treatment. *FEBS Open Bio*. 2019 <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/2211-5463.12628>
28. Lei H, Wang X, Wu C, (2012) Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, Volume 38, 2012, Pages 279-289 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1093326312000678>
29. Li B, Zhu Y, Sun Q, Yu C, Chen L, Tian Y and Yan J (2018) Reversal of the Warburg effect with DCA in PDGF-treated human PASMOC is potentiated by pyruvate dehydrogenase kinase-1 inhibition mediated through blocking Akt/GSK-3 β signalling. *Int J Mol Med* 42: 1391-1400, 2018 <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2018>
30. Liberti V.M, Locasale J.W. (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 41, Issue 3, March 2016, Pages 211-218 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26778478/>
31. Lu X, Zhou D, Hou B, Liu Q.X, Chen Q, Deng X.F, Yu ZB, Dai J.G, Zheng H.(2018) Dichloroacetate enhances the antitumor efficacy of chemotherapeutic agents via inhibiting autophagy in non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res*. 2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5962308/>
32. Matsuo T, Konya Y, Hirayama E and Sadzuka Y (2020) 2-Deoxy-D-glucose enhances the anti-cancer effects of idarubicin on idarubicin-resistant P388 leukemia cells 2020 *Oncol Lett* 2020 Jul;20(1):962-966. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7285881/>
33. Michelakis E.D, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, Maguire C, Gammer T.L, Mackey J.R, Fulton D et al.(2010) Metabolic Modulation of Glioblastoma with Dichloroacetate. *Sci. Transl. Med.* **2010** <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/scitranslmed.3000677>
34. Mobaraki M, Faraji A, Zare M, Dolati P, Ataei M, Deghan Manshadi H. R. (2017) Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity: A Review on the Major Side-effect of Doxorubicin *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* May 2017 <https://www.ijpsonline.com/articles/molecular-mechanisms-of-cardiotoxicity-a-review-on-major-sideeffect-of-doxorubicin-3333.html>
35. Nateewattana J, Dutta S, Reabroi S, Saeeng R, Kasemsook S, Chairoungdua A, Weerachayaphorn J, Wongkham S, Piyachaturawat P, (2014) Induction of apoptosis in

cholangiocarcinoma by an andrographolide analogue is mediated through topoisomerase II alpha inhibition, *European Journal of Pharmacology*, Volume 723, 2014, Pages 148-155
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344256/>

36. National Cancer Institute 2022 <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging>
37. Neri D., Supuran C. T. (2011) Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011;10(10):767–777.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21921921/>
38. Nicholson J.M and Cimini D (2013) Cancer karyotypes: survival of the fittest, *Front. Oncol.*, 07 June 2013 Sec. Molecular and Cellular Oncology
(<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2013.00148/full>)
39. Nicholson J.M Duesberg P (2009) On the karyotypic origin and evolution of cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009 Oct 15 96-110 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19781442/>
40. Ok C.Y, Kurian E, Woda B (2018) The Pathology of Cancer Cancer Concepts: A Guidebook for the Non-Oncologist 01/2018
<https://publishing.escholarship.umassmed.edu/plugins/books/1/>
41. Ononye S.N, VanHeyst M.D, Oblak E.Z, Zhou W, Ammar M, Anderson A.C,* and Wright D.L (2013) Tropolones As Lead-Like Natural Products: The Development of Potent and Selective Histone Deacetylase Inhibitors *ACS Medicinal Chemistry Letters* June 9, 2013
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24900743/>
42. Pajak B., Siwiak E., Sołtyka M., Priebe A., Zieliński R., Fokt I., Ziemniak M., Jaśkiewicz A., Borowski R., Domoradzki T., Priebe W (2020)., 2-Deoxy-D-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21, 234. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31905745/>
43. Papadopoulou LC, Tsiftoglou AS.(1993) Mitochondrial cytochrome c oxidase as a target site for daunomycin in K-562 cells and heart tissue. *Cancer Res*. 1993 Mar 1;53(5):1072-8.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8382552/>
44. Papadopoulou LC, Tsiftoglou AS (1996). Effects of hemin on apoptosis, suppression of cytochrome c oxidase gene expression, and bone-marrow toxicity induced by doxorubicin (adriamycin). *Biochemical Pharmacology* September 1996 pp 713-722
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8765469/>

45. Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 2006 Aug 7;25(34):4633-46. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16892078/>
46. Peña-Blanco A, García-Sáez A.J. (2018) Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*. 2018 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28755482/>
47. Potter M, Newport E, Morten K.J ; (2016) The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans* 15 October 2016 p1499–1505. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5095922/>
48. Protasoni M, Zeviani M. (2021) Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33435522/>
49. Raez L.E., Papadopoulos K., Ricart A.D. *et al.* (2013) A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 71, 523–530 (2013). <https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-012-2045-1>
50. Rang H.P, Dale M.M, Flower J.M, Henderson G. (2013) Φαρμακολογία 7_η έκδοση 2013 σελ. 744-746
51. Seto E, Yoshida M. (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Apr 1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970420/>
52. Sever R, Brugge JS. (2015) Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Apr <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25833940/>
53. Seyfried T.N, Flores R.E, Poff A.M, D'Agostino D.P. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*. 2014 p 515-27 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25833940/>
54. Shen H., Hau E., Joshi S., Dilda P. J., McDonald K. L. (2015) Sensitization of glioblastoma cells to irradiation by modulating the glucose metabolism. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015;14(8):1794–1804. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26063767/>

55. Skeberdytė A, Sarapinienė I, Aleksander-Krasko J, Stankevičius V, Sužiedėlis K, Jarmalaitė S. (2018) Dichloroacetate and Salinomycin Exert a Synergistic Cytotoxic Effect in Colorectal Cancer Cell Lines. *Sci Rep*. 2018 Dec <https://www.nature.com/articles/s41598-018-35815-4>
56. Spinelli J.B, & Haigis M.C (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology*, 20(7), 745–754 <https://www.nature.com/articles/s41556-018-0124-1>
57. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink M.M.C, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Grüning N.M, Krüger A, Tauqeer Alam M, Keller M.A, Breitenbach M, Brindle K.M, Joshua D Rabinowitz, Markus Ralser (2015) The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway 2015 *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2015 Aug;90(3):927-63. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25243985/>
58. Sun X, Fan T, Sun G, Zhou Y, Huang Y, Zhang N, Zhao L, Zhong R, Peng Y (2013) 2-Deoxy-D-glucose increases the sensitivity of glioblastoma cells to BCNU through the regulation of glycolysis, ROS and ERS pathways: In vitro and in vivo validation, *Biochemical Pharmacology*, Volume 199, 2022 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35381210/>
59. Tacar O, Sriamornsak P, Dass C.R (2013) Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 65, Issue 2, February 2013, pp 157–170 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23278683/>
60. Tataranni T, Piccoli C. (2019) Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Nov <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6885244/>
61. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida A.T, Norberg E The role of mitochondria in metabolism and cell death, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 482, Issue 3, 2017,
62. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International Journal of Radiation Biology* Volume 95, 2019 July, pp 912-919 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09553002.2019.1589653?journalCode=irab20>
63. Vaupel P, Multhoff G (2020) Revisiting the Warburg effect: historical dogma *versus* current understanding *The Journal of Physiology* **March** 2021, pp 1745-1757 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33347611/>

64. Volkova M, Russell R (2011) . Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev.* 2011 Nov;7(4):214-2
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322439/>
65. Wang X, Shen X, Yan Y, Li H. (2021) Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs): an overview toward clinical applications. *Biosci Rep.* 2021 Apr
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8026821/>
66. Wanka, C., Brucker, D., Bähr, O. *et al.*(2012) Synthesis of cytochrome *c* oxidase 2: a p53-dependent metabolic regulator that promotes respiratory function and protects glioma and colon cancer cells from hypoxia-induced cell death. *Oncogene* 31, 3764–3776 (2012)
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22120717/>
67. Xu R.H, Pelicano H, Zhou Y, Carew J.S, Feng L, Bhalla K.N, Keating M.J, Huang P. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 2005 Jan 15;65(2):613-21 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15695406/>
68. Ι.Γ. Γεωργιάτσου (2013) Εισαγωγή στη βιοχημεία 7^η έκδοση σελ. 182-194