



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ GSK2334470 ΣΤΟΝ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ»**

ΚΩΤΣΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022



UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY  
BACHELOR PROGRAM



LABORATORY OF PHARMACOLOGY  
DEPARTMENT OF MEDICINE

BACHELOR THESIS

«EVALUATION OF THE ROLE OF GSK2334470 IN PANCREATIC CANCER»

KOTSOPOULOS GEORGIOS

LARISA 2022

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΑΣ (Επιβλέπων):

Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΨΑΡΡΑ ANNA-MΑΡΙΑ:

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ:

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα προπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Μάρτιο του 2022 έως τον Ιούνιο του 2022, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Κωνσταντίνο Δήμα, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την καθοδήγηση που μου προσέφερε και το χρόνο που διέθεσε δίνοντάς μου χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Άννα-Μαρία Ψαρρά και κ. Νικόλαο Μπαλατσό, οι οποίοι δέχτηκαν να γίνουν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, όμως, είναι αποτέλεσμα μιας σειράς αλληλεπιδράσεων και συνεργασίας με άτομα του συγκεκριμένου εργαστηρίου καθένα από τα οποία έπαιξε ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξή της. Αξίζει λοιπόν, να αφιερώσω την παρούσα σελίδα για να ευχαριστήσω αυτούς τους ανθρώπους για τη βοήθεια που μου προσέφεραν. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Φανή Κουτσουγιάννη για την πολύτιμη βοήθεια της, τις συμβουλές της, την υπομονή της και την άψογη συνεργασία μας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Νικολέτα Γιοβάνοβιτς, Δήμητρα Αλεξοπούλου, Κωνσταντίνο Λαφαζάνη και Ανδρομάχη Λαμπριανίδου για την βοήθεια και το αρμονικό κλίμα που αναπτύχθηκε μεταξύ μας.

Τέλος, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που μου έμαθαν να προσπαθώ και με βοήθησαν να γίνουν «ανεκτοί» οι συμβιβασμοί και οι κόποι αυτών των τεσσάρων ετών: την οικογένεια μου, τους φίλους μου καθώς και ορισμένους πολύ αγαπητούς και αξιόλογους ανθρώπους που συνάντησα κατά την διάρκεια των σπουδών μου. Σε αυτούς που με την καθημερινή τους συμπαράσταση, την υπομονή τους και την θετική τους σκέψη, συνέβαλλαν στην εκπλήρωση των στόχων που είχα θέσει μέχρι σήμερα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της *in vitro* αντικαρκινικής δράσης της ινδαζόλης GSK2334470, ενός αναστολέα PDK-1, στον παγκρεατικό καρκίνο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε κυτταροτοξικός έλεγχος της GSK2334470, της ικανότητας της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της τόσο σε μεμονωμένα κύτταρα για να δημιουργήσουν αποικίες όσο και στην μεταναστευτική δράση. Στα πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκε η καρκινική παγκρεατική κυτταρική σειρά PANC-1. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρίας ροής με σκοπό την ταυτοποίηση της φάσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία δρα η GSK2334470.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα φάνηκε ότι η GSK2334470 παρουσιάζει αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση στην παγκρεατική καρκινική κυτταρική σειρά PANC-1, διότι επιδρά στην ιδιότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν και να δημιουργούν αποικίες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η GSK2334470 δρα στην S και στην G2/M φάσεις του κυτταρικού κύκλου, καθώς τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας έδειξαν αυξημένη επιβίωση των κυττάρων τα οποία βρίσκονται στην G1 φάση. Ωστόσο, η αντικαρκινική δράση καθώς και ο μηχανισμός δράσης της GSK2334470, ιδιαίτερα όσον αφορά τις ιδιότητες της που μελετήθηκαν εδώ, χρήζει πιο εμπειρισταωμένων μελετών ώστε να συλλεχθούν απαραίτητες πληροφορίες με σκοπό αναστολέας PDK-1 να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινική θεραπεία για τον παγκρεατικό καρκίνο.

**Λέξεις-κλειδιά:** GSK2334470, αναστολέας PDK-1, παγκρεατικός καρκίνος, αναστολή κυτταρικού κύκλου, PANC-1 παγκρεατική καρκινική κυτταρική σειρά

## **ABSTRACT**

The aim of this current bachelor thesis is to study of the in vitro anti-cancer activity of indole GSK2334470, a PDK-1 inhibitor, in pancreatic cancer. Specifically, cytotoxic testing of GSK2334470, its antiproliferative ability in both single cells to form colonies and migratory activity was performed. Pancreatic cancer cell line PANC-1 was used in the experiments. In addition, flow cytometry was performed to identify the cell cycle phase in which GSK2334470 acts.

According to the results obtained from the above experiments, it appeared that GSK2334470 exhibits anti-proliferative and cytotoxic effects on the pancreatic cancer cell line PACN-1, because it affects the ability of the cells to migrate and create colonies. In addition, GSK2334470 was observed to act in the S and G2/M phases of the cell cycle, as cytometry results showed increased survival of cells in the G1 phase. However, the antitumor activity, as well as the mechanism of action of GSK2334470, especially regarding its properties studied here, needs more thorough studies to collect necessary information for a PDK-1 inhibitor to be used as an antitumor therapy for pancreatic cancer.

**Key Words:** GSK2334470, PDK-1 inhibitor, pancreatic cancer, PANC-1 pancreatic cancer cell line, cell cycle arrest

## Περιεχόμενα

<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ .....	9
1.2 ΟΡΟΣΗΜΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ .....	10
1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ .....	10
1.4 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ .....	11
1.4.1 ΠΑΓΚΡΕΑΣ.....	11
1.4.2 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ .....	13
1.4.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ .....	14
1.4.4 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ .....	15
1.4.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ.....	16
1.4.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....	17
1.5 GSK2334470 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ .....	19
1.5.1 PDK-1 .....	19
1.5.2 ΜΟΝΟΠΑΤΙ PDK1/ΑΚΤ/mTOR ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	20
1.5.3 ΜΟΝΟΠΑΤΙ RAS/MARK ΚΙΑ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ .....	21
1.5.4 GSK2334470.....	22
1.6 ΣΚΟΠΟΣ .....	24
<b>2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	25
2.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	25
2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	25
2.3 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ PANC-1 .....	26
2.4 ΚΑΝΟΝΕΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ.....	27
2.5 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	27
2.6 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ-ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	27
2.7 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ ΝΕΥΒΑΥΕΡ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	28
2.8 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	29
2.9 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	30
2.10 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB.....	30
2.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (CLONOGENIC ASSAY).....	34
2.12 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (WOUND HEALING ASSAY/SCRATCH ASSAY) .....	35
2.13 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	37
2.13.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	37
2.13.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	38

2.13.3 ΜΕΘΟΔΟΣ.....	39
2.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	42
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB.....	43
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΛΩΝΟΥ (CLONOGENIC ASSAY) .....	45
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (WOUND HEALING ASSAY) .....	46
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ .....	48
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	50



## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο όρος «καρκίνος» δεν αποδίδεται για να περιγράψει μία μοναδική ασθένεια, αλλά πρόκειται για μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Benz, 2017). Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα στο σώμα μας τα οποία αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα και είναι ικανά να μεταναστεύσουν και να εξαπλωθούν σε ιστούς οι οποίοι βρίσκονται σε άλλα σημεία του σώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σταδιακά την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων, που ονομάζεται όγκος. Οι όγκοι μπορεί να είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι αναπτύσσονται αργά, δεν εξαπλώνονται σε άλλα μέρη του σώματος και δεν απειλούν την ζωή. Οι κακοήθεις όγκοι είναι επιβλαβείς, αναπτύσσονται πιο γρήγορα και τα κύτταρα μπορεί να εξαπλωθούν σε άλλα μέρη του σώματος, όπου σχηματίζουν δευτερεύοντες ή μεταστατικούς όγκους (Benz, 2017). Ένα κρίσιμο σημείο στην καρκινογένεση φαίνεται να είναι η αδυναμία του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίσει και να καταστρέψει ένα κύτταρο με αποκλίσεις από τη φυσιολογική ανάπτυξη ακόμη και στα πρώιμα στάδια (Coventry & Henneberg, 2021).

Αν και το 90% των καρκίνων είναι σποραδικοί, που σημαίνει ότι δεν εμφανίζονται σε οικογένειες, σχεδόν το 10% των καρκίνων αναγνωρίζονται ως οικογενείς και ορισμένοι κληρονομούνται με φαινομενικά αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Ως εκ τούτου, ο καρκίνος μπορεί να θεωρηθεί μία πολυπαραγοντική νόσος, που προκαλείται από αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης και λειτουργίας γονιδίων που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό (Jackson et al., 2018). Οι γενετικές αλλαγές μπορεί να αφορούν λάθη που γίνονται κατά τη διαίρεση των κυττάρων, καταστροφή του DNA που μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (90%) ή να έχουν κληροδοτηθεί από τους γονείς (10%) (Bashyam et al., 2019).

Τα εν λόγω γονίδια μπορεί να είναι: ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια και γονίδια miRNA. Οι όγκοι συχνά διαθέτουν κυτταρογενετικά διαφορετικούς κλώνους, που προέρχονται από αρχικά μεταλλαγμένο κύτταρο μέσω δευτερογενών ή τριτογενών γενετικών αλλαγών. Τα ογκογονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες όταν ενεργοποιηθούν επάγουν την εμφάνιση κακοήθους εξαλλαγής. Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι γονίδια που φυσιολογικά βοηθούν στην ανάπτυξη του κυττάρου. Όταν ένα πρωτο-ογκογονίδιο υποστεί μετάλλαξη, τότε μετατρέπεται σε ογκογονίδιο, το οποίο έχει ως ιδιότητα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, δηλαδή την καρκινογένεση. Τα ογκοκατασταλτικά είναι γονίδια τα οποία φυσιολογικά επιβραδύνουν την κυτταρική διαίρεση, επιδιορθώνουν λάθη του DNA και επάγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Όταν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια υποστούν μεταλλάξεις, τότε τα κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα, άρα προωθείται η καρκινογένεση (Bashyam et al., 2019).

## 1.2 ΟΡΟΣΗΜΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Τα ορόσημα του καρκίνου αποτελούν ένα σύνολο λειτουργιών και δυνατοτήτων των ανθρώπινων κυττάρων, τα οποία αναφέρονται στην κατάσταση ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού κατά την οποία μεταβαίνουν τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούν τις ικανότητες που είναι κρίσιμες για την ικανότητά τους να σχηματίζουν κακοήθεις όγκους. Τα χαρακτηριστικά αρχικά ήταν 6, τα οποία διατυπώθηκαν το 2000 από τους Douglas Hanahan και Robert Weinberg, και το 2011, οι ίδιοι ερευνητές πρόσθεσαν 2 ακόμα. Τέλος, την ίδια χρονιά προστέθηκαν 2 ακόμη χαρακτηριστικά. Τα οποία βοηθούν στην ενεργοποίηση των προηγούμενων 8, από τους ερευνητές (Hanahan, 2022). Τα χαρακτηριστικά, που φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 1.1], είναι τα εξής:



Εικόνα 1.1 Τα ορόσημα του καρκίνου. (Hanahan, 2022).

- Διατήρηση πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης
- Αποφυγή καταστολέων ανάπτυξης
- Αντίσταση κυτταρικού θανάτου
- Αποφυγή ανοσολογικής απόκρισης
- Ενεργοποίηση αναπαραγόμενης αθανασίας
- Αγγειογένεση
- Ενεργοποίηση μετάστασης
- Αστάθεια και μεταλλάξεις γονιδιώματος
- Απορρύθμιση κυτταρικού μεταβολισμού
- Φλεγμονή προκαλούμενη από όγκο

## 1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Τα καρκινικά κύτταρα προέρχονται από διάφορους ιστούς και όργανα του ανθρώπινου σώματος (Cancer Research UK, 2020). Έτσι, σύμφωνα με την προέλευση των κυττάρων από τα οποία αποτελείται, ο καρκίνος ταξινομείται στις παρακάτω κατηγορίες:

- Καρκίνωμα: προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά επικαλύπτουν την επιφάνεια του δέρματος, των εσωτερικών οργάνων και των αδένων.

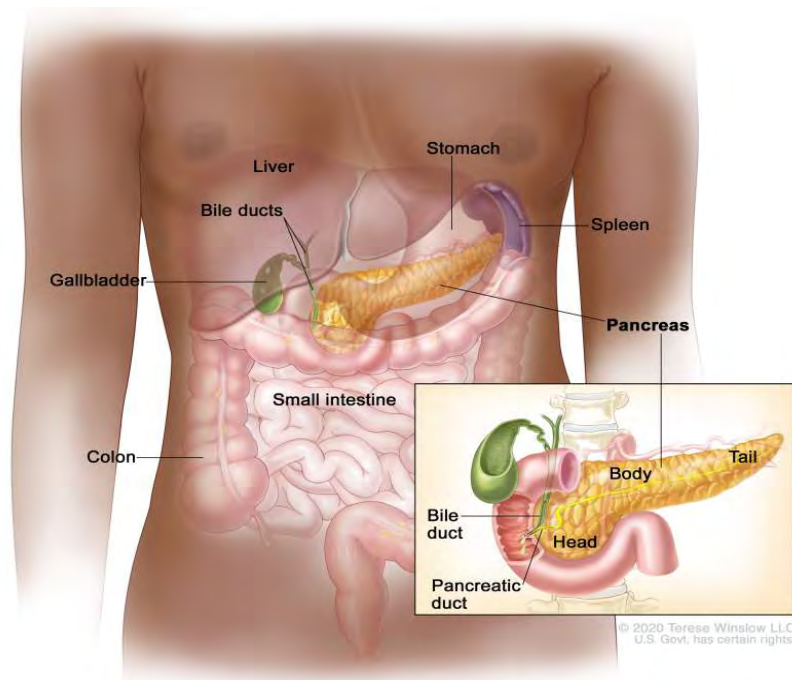
- **Μελάνωμα:** προέρχεται από μελανοκύτταρα. Συνήθως αναπτύσσεται στο δέρμα αλλά μερικές φορές και σε άλλα όργανα.
- **Σάρκωμα:** προέρχεται από διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, όπως τα οστά (οστεοσάρκωμα) ή τα «μαλακά μόρια», δηλαδή μύες, νεύρα, αγγεία, χόνδροι και συνδετικός ή λιπώδης ιστός (σαρκώματα μαλακών μορίων).
- **Λέμφωμα:** προέρχεται από λευκοκύτταρα μέσα στο λεμφικό σύστημα (π.χ. λεμφαδένες).
- **Λευχαιμία:** προέρχεται από ιστούς που παράγουν τα κύτταρα του αίματος, όπως είναι ο μυελός των οστών και προκαλεί παραγωγή ανώμαλων μορφών κυττάρων. Αυτός ο τύπος καρκίνου συνήθως δεν προκαλεί όγκο.
- **Όγκοι εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού:** αναπτύσσονται στο εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό, περιοχές που ονομάζονται κεντρικό νευρικό σύστημα, και συνήθως περιορίζονται εκεί.

## 1.4 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

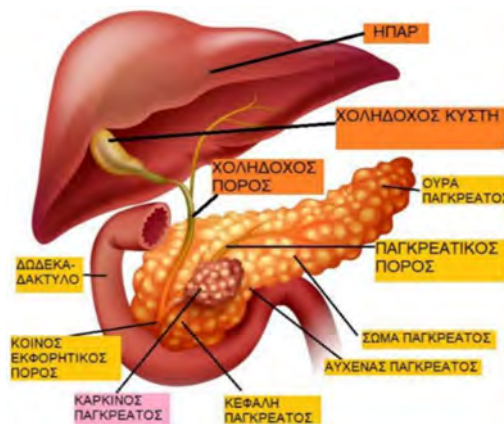
### 1.4.1 ΠΑΓΚΡΕΑΣ

#### 1.4.1.1 Δομή

Το πάγκρεας είναι ένας μικτός αδένας, ενδοκρινής και εξωκρινής, μήκους 12–15 εκατοστά και ζυγίζει λιγότερο από 110gr. Η τοποθεσία του είναι στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, μεταξύ στόμαχος και σπονδυλικής στήλης, στο ύψος των Ο1 και Ο2 σπονδύλων [Εικόνα 1.2]. Κύριος ρόλος του είναι η αξιοποίηση και η αποθήκευση της ενέργειας της τροφής, παράγοντας ορμόνες που ελέγχουν τα επίπεδα σακχάρου και ένζυμα για την διάσπαση της τροφής και την πέψη (Beger et al., 2009). Η τροφή καθώς περνάει από το στομάχι στο λεπτό έντερο, αναμιγνύεται με τις εκκρίσεις από το πάγκρεας. Το πάγκρεας χωρίζεται σε τέσσερα (4) μέρη: στην κεφαλή, τον αυχένα, το σώμα και την ουρά. Η κεφαλή αποτελεί μεγάλο μέρος του παγκρέατος. Εντοπίζεται πίσω από την δεξιά πλευρά της κοιλιάς, εφαπτόμενη σχεδόν στο δωδεκαδάχτυλο και περιέχει τμήμα του χοληδόχου πόρου. Στο επάνω μέρος της βρίσκεται η σπληνική αρτηρία ενώ στο κάτω η μεσεντέριος φλέβα, οι οποίες σχηματίζουν την πυλαία φλέβα, η οποία τροφοδοτεί με αίμα το ήπαρ. Επιπλέον, ένα μικρό τμήμα της εκτείνεται προς τα κάτω και αριστερά και σχηματίζει την αγκιστροειδή απόφυση. Ο αυχένας είναι το λεπτό τμήμα του αδένου, ανάμεσα στην κεφαλή και το σώμα του παγκρέατος. Το σώμα βρίσκεται μπροστά από σημαντικά αγγεία, τα οποία εκφύονται από την αορτή και τα οποία τροφοδοτούν με αίμα το στομάχι, το ήπαρ, το πάγκρεας και το ανώτερο τμήμα του εντέρου. Έχει τρεις επιφάνειες, την πρόσθια άνω, την πρόσθια κάτω και οπίσθια. Τέλος, η ουρά είναι το λεπτό άκρο του παγκρέατος και βρίσκεται στην αριστερή πλευρά της κοιλιάς, ακουμπώντας σχεδόν πάνω στο σπλήνα (Longnecker, 2014). Τα τμήμα του παγκρέατος τα οποία προαναφέρθηκαν παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 1.3].



Εικόνα 1.2 Αναπαράσταση τοποθεσία παγκρέατος στον ανθρώπινο οργανισμό (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002)



Εικόνα 1.3 Αναπαράσταση του παγκρέατος με τα επιμέρους τμήματά του (Ελληνική Αντικαρκινική Εταιρεία, 2020)

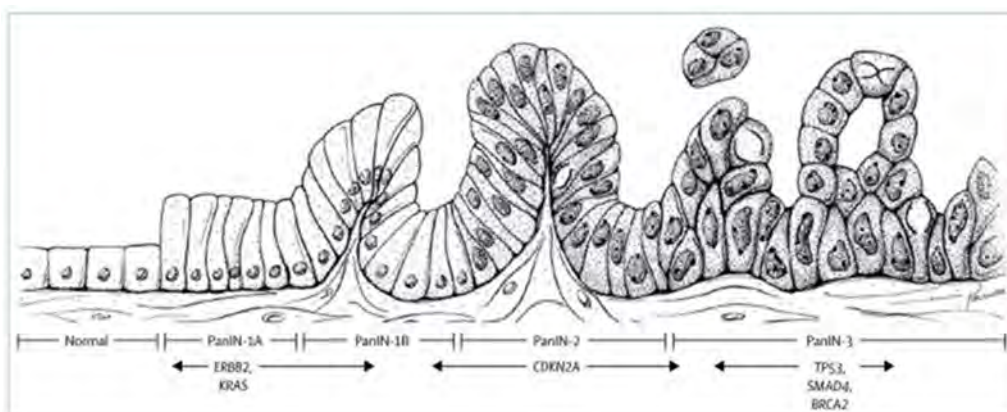
#### 1.4.1.2 Λειτουργία

Η λειτουργία του παγκρέατος είναι διπλή, καθώς αποτελείται και από δύο ξεχωριστά τμήματα. Τα τμήματα αυτά είναι η εξωκρινής και η ενδοκρινής μοίρα. Η εξωκρινής μοίρα, η οποία αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της μάζας του (85%), είναι υπεύθυνη για την παραγωγή παγκρεατικού υγρού, το οποίο περιέχει προένζυμα υπεύθυνα για την αποδόμηση πρωτεϊνών, λιπών και υδατανθράκων τα οποία μέσα στο λεπτό έντερο ενεργοποιούνται σε ενεργά ένζυμα (Columbia University, 2016). Τα ένζυμα αυτά είναι η θρυψίνη και χυμοθρυψίνη (υπεύθυνες για την πέψη πρωτεϊνών), η αμυλάση (υπεύθυνη για την διάσπαση υδατανθράκων) και η λιπάση (υπεύθυνη για την διάσπαση των λιπαρών οξέων). Το δεύτερο τμήμα του παγκρέατος είναι η ενδοκρινή μοίρα, η οποία αποτελείται από ενδοκρινικά νησίδια (νησίδια Langerhans), τα οποία παράγουν ορμόνες που ρυθμίζουν την σταθερότητα των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και την είσοδό της στα κύτταρα. Καθένας από τους πέντε κύριους τύπους κυττάρων νησίδας

συνθέτει και εκκρίνει μια βασική ορμόνη: ινσουλίνη (β-κύτταρα), γλυκαγόνη (α-κύτταρα), σωματοστατίνη (δ-κύτταρα), παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (κύτταρα PP) και γκρελίνη (ε-κύτταρα) (Atkinson et al., 2020). Μερικές από τις ιδιότητες αυτών των ορμονών είναι οι εξής: η ινσουλίνη μειώνει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα και ενισχύει την είσοδό της στα κύτταρα. Επίσης η γλυκαγόνη αυξάνει το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα διεγείροντας την απελευθέρωση της αποθηκευμένης γλυκόζης. Στο πάγκρεας καταλήγουν κλάδοι νευρών με προσαγωγούς αισθητικούς κλάδους του νευρικού συστήματος οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στον πόνο. Αυτό εξηγεί τον έντονο πόνο που συνοδεύει παθήσεις του οργάνου, όπως η χρόνια παγκρεατίτιδα και ο καρκίνος του παγκρέατος (Beger et al., 2009).

#### 1.4.2 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

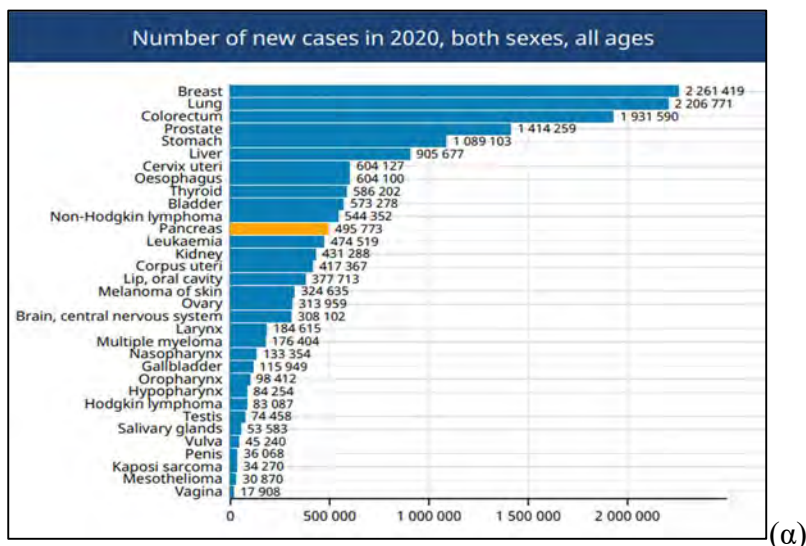
Ο παγκρεατικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στους ιστούς του παγκρέατος. Πάνω από το 95% των καρκίνων του παγκρέατος αφορούν την εξωκρινή μοίρα, και μάλιστα το 85% όλων των περιπτώσεων αφορά το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος και συνήθως ο όρος «καρκίνος του παγκρέατος» αναφέρεται σε αυτό (Rawla et al., 2019). Σε περίπου 15% των ασθενών βρίσκονται άλλοι όγκοι στο πάγκρεας που είναι λιγότερο επιθετικοί τύποι και που είναι συχνά ιάσιμοι. Οι όγκοι του ενδοκρινικού παγκρέατος είναι πιο σπάνιοι και είναι γνωστοί ως όγκοι κυττάρων νησιδίων Langerhans (όπως ινσουλίνωμα, γλυκαγόνωμα και σωματοστατίνωμα) και νευροενδοκρινικοί όγκοι (όπως γαστρίνωμα). Περίπου το 75% όλων των καρκινωμάτων εμφανίζονται στην κεφαλή ή στον αυχένα του παγκρέατος, 15% -20% στο σώμα και 5% -10% στην ουρά του παγκρέατος. Αν ο καρκίνος εντοπίζεται στην κεφαλή του παγκρέατος, με την αύξηση του μεγέθους του μπορεί να μπλοκάρει τη ροή του παγκρεατικού υγρού και της χολής (Distler et al., 2014). Πιο ειδικά, το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα αναπτύσσεται μετά από μια σειρά σταδιακών μεταλλάξεων από τον φυσιολογικό βλεννογόνο σε συγκεκριμένες πρόδρομες βλάβες με τελικό αποτέλεσμα την κακοήθεια. Οι τρεις καλύτερα χαρακτηριζόμενοι πρόδρομοι αυτής της κακοήθειας είναι η παγκρεατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (PanIN), τα ενδοπορικά θηλώδη βλενώδη νεοπλάσματα (IPMN) και τα βλενώδη κυστικά νεοπλάσματα (MCN). Καθένα από αυτά έχει μοναδικά κλινικά, παθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά (Distler et al., 2014).



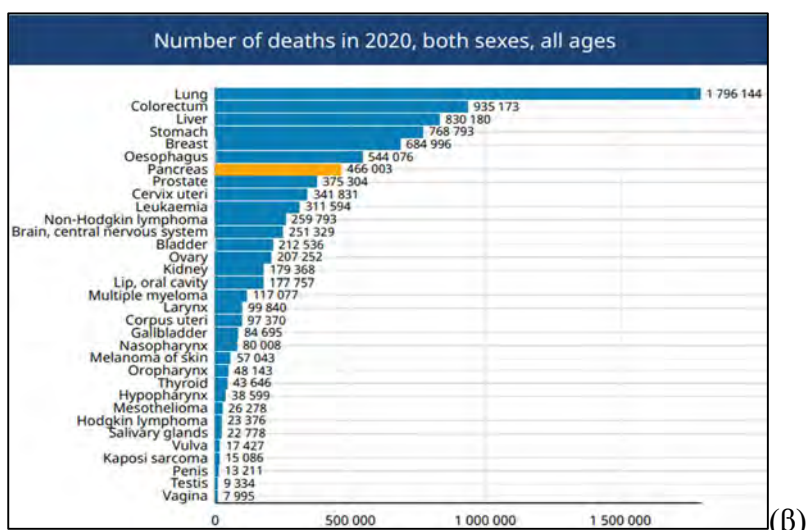
Εικόνα 1.4 Αναπαράσταση μοντέλου προόδου παγκρεατικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (Vincent et al., 2011).

### 1.4.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι ένας κοινός κακοήθης όγκος του πεπτικού συστήματος με χαμηλό ποσοστό εκτομής, εξαιρετικά υψηλό ποσοστό θνησιμότητας και κακή πρόγνωση, καθώς τα χαρακτηριστικά αυτού του όγκου συγκαλύπτονται. Πρόκειται για μια από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας από καρκίνο στις ανεπτυγμένες χώρες και ένα από τα πιο θανατηφόρα κακοήθη νεοπλασμάτα σε όλο τον κόσμο [Εικόνα 1.5α & 1.5β].



(α)



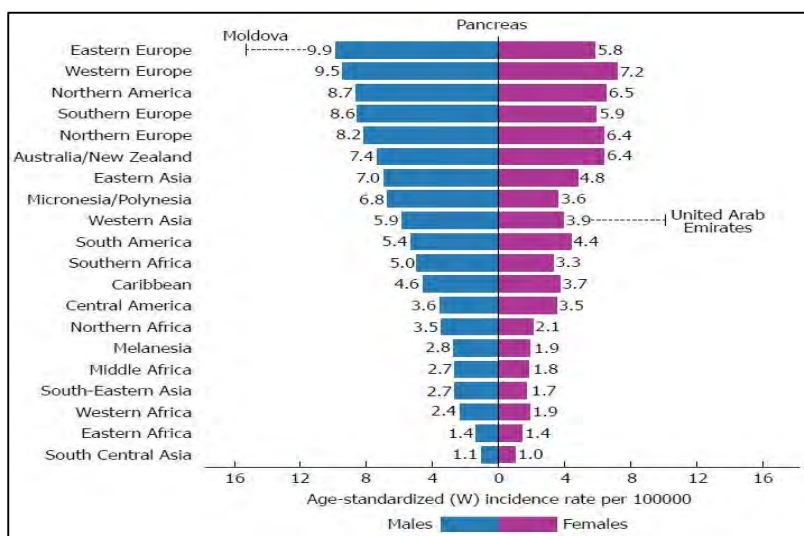
(β)

Εικόνα 1.5 Γραφήματα αναπαράσταση αριθμού α) κρουσμάτων και β) θανάτων των διάφορων τύπων καρκίνου (Globocan, 2020)

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες σημειώθηκε διπλασιασμός του παγκόσμιου ετήσιου αριθμού των διαγνωσθέντων καρκίνων του παγκρέατος. Το 2017 καταγράφηκαν 441.000 περιπτώσεις καρκίνου του παγκρέατος παγκοσμίως σε σύγκριση με 196.000 το 1990. Ο καρκίνος του παγκρέατος παραμένει η έβδομη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως και οι παγκόσμιες στατιστικές για τον καρκίνο του 2020 έδειξαν ότι, παγκοσμίως, συνολικά 495773 νέες περιπτώσεις και 466.003 σχετικοί θάνατοι, σύμφωνα με την GLOBOCAN, αναφέρθηκαν για τον καρκίνο του παγκρέατος το 2020, με σχεδόν τόση θνησιμότητα όση η επίπτωση (Torres & Grippo, 2018).

Συχνά εμφανίζεται σε προχωρημένο στάδιο, γεγονός που συμβάλλει σε χαμηλά ποσοστά πενταετούς επιβίωσης της τάξης του 5% (κυμαίνεται 2%-9%), κατατάσσοντας σταθερά στην τελευταία θέση μεταξύ όλων των σημείων καρκίνου όσον αφορά τα προγνωστικά αποτελέσματα για τους ασθενείς. Η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνεται κατά 0,5% έως 1,0% ετησίως και προβλέπεται να γίνει η δεύτερη κύρια αιτία θνησιμότητας που σχετίζεται με τον καρκίνο έως το 2030 (Park et al., 2021). Επιπλέον, η κατά μέσο όρο επιβίωση για ασθενείς με μη θεραπευμένο, τοπικά προχωρημένο και ανεγχείρητο καρκίνο του παγκρέατος είναι 8 έως 12 μήνες και μόνο 3 έως 6 μήνες για εκείνους με μεταστατική νόσο κατά την παρουσίαση (Portal et al., 2015).

Ωστόσο, υπάρχουν τόσο σημαντικές γεωγραφικές διακυμάνσεις στη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του παγκρέατος όσο και σημαντικές διαφορές βασιζόμενες στο φύλο. Τα ποσοστά επίπτωσης ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των χωρών, όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα [Εικόνα 1.6]. Η υψηλότερη τυποποιημένη για την ηλικία επίπτωση παρατηρείται στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική και η χαμηλότερη στην Αφρική και τη Νότια Κεντρική Ασία. Υπάρχει μια γενική τάση υψηλότερων ποσοστών εμφάνισης στις ανεπτυγμένες χώρες σε σύγκριση με τις αναπτυσσόμενες χώρες (Wong et al., 2017). Αποδείχθηκε, λοιπόν, ότι σε χώρες με υψηλότερο δείκτη ανθρώπινης ανάπτυξης υπάρχουν υψηλότερες περιπτώσεις καρκίνου του παγκρέατος τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες (Rawla et al., 2019, ).



Εικόνα 1.6 Διάγραμμα αναπαράστασης επίπτωσης καρκίνου του παγκρέατος και στα δύο φύλα σε όλο τον κόσμο (Globocan, 2018).

#### 1.4.4 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Οι πιο συχνές γενετικές ανωμαλίες στα αδενοκαρκινώματα του παγκρέατος είναι η μεταλλακτική ενεργοποίηση του ογκογονιδίου KRAS, η αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των CDKN2A, TP53, SMAD4 και BRCA2, όπως και εκτεταμένες χρωμοσωμικές απώλειες (Grant et al., 2016). Οι μεταλλάξεις KRAS και η βράχυνση των τελομερών είναι οι πιο γνωστές γενετικές ανωμαλίες σε πρώιμο στάδιο που έχουν καταγραφεί, ακόμη και σε χαμηλού βαθμού παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες. Η βράχυνση των τελομερών πιστεύεται ότι συμβάλλει στη χρωμοσωμική αστάθεια, ενώ η αδρανοποίηση των TP53, SMAD4 και BRCA2 συμβαίνει στις πολύ

προχωρημένες παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες και διηθητικά καρκινώματα (Hu et al., 2021).

#### 1.4.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ

Η εμφάνιση του παγκρεατικού καρκίνου έγκειται στην επίδραση μιας πληθώρας παραγόντων οι οποίοι σχετίζονται με τον τρόπο ζωής αλλά και με γενετικές παραμέτρους, καθώς επίσης και με την ηλικία και το φύλο. Έχουν εντοπιστεί αρκετοί παράγοντες υψηλού κινδύνου. Αυτοί χωρίζονται σε τροποποιήσιμους και μη τροποποιήσιμους (McGuigan et al., 2018). Πιο αναλυτικά:

##### Τροποποιήσιμοι παράγοντες:

**Κάπνισμα:** Θεωρείται ο πιο σημαντικός τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του παγκρέατος, με πολλές μεμονωμένες και συνδυασμένες μελέτες να δείχνουν μια ισχυρή θετική συσχέτιση.

**Αλκοόλ:** Η υπερκατανάλωση είναι η κύρια αιτία της χρόνιας παγκρεατίτιδας, η οποία είναι γνωστός παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του παγκρέατος και ως εκ τούτου το αλκοόλ σε αυτό το πλαίσιο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για καρκίνο του παγκρέατος.

**Χρόνια παγκρεατίτιδα:** Είναι μια προοδευτική φλεγμονώδης κατάσταση του παγκρέατος που οδηγεί σε ίνωση και απώλεια κυψελίδων και κυττάρων νησιδίων. Περίπου το 5% αυτών των ασθενών θα αναπτύξουν καρκίνο του παγκρέατος κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

**Διατροφή:** Υπάρχουν περιορισμένες ενδείξεις ότι η κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου του παγκρέατος. Αυτό είναι βιολογικά εύλογο δεδομένου ότι η υπερβολική κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA και το σχηματισμό καρκινογόνων ουσιών όπως οι ενώσεις N-nitroso.

**Παχυσαρκία:** Ο παγκόσμιος επιπολασμός της παχυσαρκίας αυξάνεται καθώς εκτιμάται ότι 1,97 δισεκατομμύρια ενήλικες και 338 εκατομμύρια παιδιά και έφηβοι ταξινομήθηκαν παγκοσμίως ως υπέρβαροι ή παχύσαρκοι το 2016. Παρατηρείται, επίσης, αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος σε παχύσαρκους ασθενείς.

Για την συσχέτιση του παγκρεατικού καρκίνου με την παχυσαρκία, αξίζει να αναφερθεί, πως μελέτες έδειξαν πως άτομα με κοιλιακοί παχυσαρκία έχουν 50% μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Κατά την παχυσαρκία απελευθερώνονται από τον λιπώδη ιστό λιπαρά οξέα, τα οποία μέσω της κυκλοφορίας εισέρχονται και συσσωρεύονται στο συκώτι και στο πάγκρεας (Ben et al., 2011). Επιπλέον, από τον σπλαχνικό λιπώδη ιστό, παράγονται αδιποκίνες, όπως η λεπτίνη και η αδιπονεκτίνη, πρωτεΐνες που έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο. Οι δύο ουσίες είναι υπεύθυνες στην παραγωγή κυτοκινών όπως η IL-6 και ο TNF-α, ως απόκριση στην χρόνια φλεγμονώδη χαμηλού βαθμού, που υπάρχει στα παχύσαρκα άτομα. Οι δύο κυτοκίνες αυτές, έχουν συσχετιστεί με αρκετούς καρκίνους μέσω των επιπτώσεών τους στην αγγειογένεση, την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Bracci, 2012).

##### Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες:



Ηλικία: Είναι κυρίως νόσος των ηλικιωμένων και σχεδόν το 90% όλων των περιπτώσεων διαγιγνώσκονται μετά την ηλικία των 55 ετών με την πλειοψηφία να εμφανίζεται μεταξύ της 7<sup>ης</sup> και 8<sup>ης</sup> δεκαετίας της ζωής.

Εθνικότητα: Εντός των Ηνωμένων Πολιτειών, έχει αναφερθεί 50%-90% αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του παγκρέατος στους Αφροαμερικανούς σε σύγκριση με τους Καυκάσιους, ενώ τα ποσοστά επίπτωσης είναι χαμηλότερα στους κατοίκους των νησιών του Ειρηνικού και στους Ασιάτες-Αμερικανούς.

Ομάδα αίματος: Ευρήματα των μελετών συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα έδειξαν μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου σε άτομα με ομάδα αίματος 0, σε σχέση με άτομα με ομάδα αίματος A ή B ή AB.

Διαβήτης: Είναι ένας καλά εδραιωμένος παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του παγκρέατος.

Οικογενειακό ιστορικό: Οι ασθενείς με οικογενειακούς παράγοντες κινδύνου έχουν εννέα φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος από εκείνους χωρίς οικογενειακό ιστορικό, και αυτός αυξάνεται σε τριάντα δύο φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εάν έχουν προηγουμένως διαγνωσθεί τρεις ή περισσότεροι συγγενείς πρώτου βαθμού.

#### 1.4.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

##### ΔΙΑΓΝΩΣΗ & ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί γιατί πολλές περιπτώσεις διαγιγνώσκονται σε μεταγενέστερο στάδιο, μετά την εξάπλωση του όγκου. Ο καρκίνος του παγκρέατος σε πρώιμο στάδιο είναι συνήθως κλινικά σιωπηλός και η ασθένεια γίνεται εμφανής μόνο αφού ο όγκος εισβάλει στους περιβάλλοντες ιστούς ή κάνει μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα. Οι περισσότεροι άνθρωποι που παρουσιάζουν συμπτώματα που αποδίδονται στον καρκίνο του παγκρέατος έχουν προχωρημένη νόσο (Vincent et al., 2011). Μέχρι σήμερα, ο προ-συμπτωματικός έλεγχος για καρκίνο του παγκρέατος δεν συνιστάται για τον γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, άτομα που έχουν ιστορικό στενών συγγενών με καρκίνο του παγκρέατος, άτομα με παθολογικό παραλλαγή σε ένα από τα γονίδια ευαισθησίας στον καρκίνο του παγκρέατος υψηλού κινδύνου ή άτομα υψηλού κινδύνου λόγω προσωπικού ιστορικού παγκρεατικών κύστεων μπορεί να υποβληθούν σε προ-συμπτωματικό έλεγχο (Klein, 2021). Η τριφασική αξονική τομογραφία παγκρέατος με πρωτόκολλο είναι η καλύτερη αρχική διαγνωστική εξέταση για τον καρκίνο του παγκρέατος. Είναι επίσης το καλύτερο για τη σταδιοποίηση της νόσου και οι βέλτιστες αξονικές τομογραφίες παρέχουν περίπου 80% ακρίβεια για την πρόβλεψη της εξαιρεσιμής ικανότητας (Vincent et al., 2011).

Τα τυπικά συμπτώματα του καρκίνου του παγκρέατος περιλαμβάνουν πόνο στην κοιλιά ή στη μέση, τον αποφρακτικό ίκτερο και την απώλεια βάρους. Η απώλεια βάρους μπορεί να προκύψει από ανορεξία, δυσπεψία από απόφραξη του παγκρεατικού πόρου και καχεξία (Vincent et al., 2011). Περιστασιακά, η απόφραξη του παγκρεατικού πόρου μπορεί να οδηγήσει σε προσβολές παγκρεατίτιδας. Η βαθιά και επιφανειακή φλεβική θρόμβωση δεν είναι

ασυνήθιστη και μπορεί να αποτελεί ένδειξη κακοήθους νόσου. Η απόφραξη της γαστρικής εξόδου με ναυτία και έμετο συμβαίνει μερικές φορές με πιο προχωρημένη νόσο. Λιγότερο συχνές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν παννικουλίτιδα και κατάθλιψη (Vincent et al., 2011).

## ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Οι ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος διαχειρίζονται από μια διεπιστημονική ομάδα που περιλαμβάνει ογκολόγους, χειρουργούς, ακτινολόγους, γαστρεντερολόγους, ακτινοθεραπευτές ογκολόγους, παθολόγους, ειδικούς διαχείρισης πόνου, κοινωνικούς λειτουργούς, διαιτολόγους (Vincent et al., 2011).

Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί σημαντική διαγνωστική πρόκληση και η πλειονότητα των περιπτώσεων εμφανίζεται καθυστερημένα, είτε με τοπικά προχωρημένα είτε με μεταστατική νόσο. Η καθυστερημένη διάγνωση οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως την μη ειδική συσχέτιση συμπτωμάτων που είναι αποτέλεσμα της νόσου και της στενής με τα κύρια αιμοφόρα αγγεία τα οποία μπορούν να εισβάλουν εύκολα στον όγκο και να βοηθήσουν στην ανάπτυξή του. Για καρκίνους που διαγιγνώσκονται σε πρώιμο στάδιο, η χειρουργική επέμβαση είναι η καλύτερη επιλογή για θεραπεία. Σε περιπτώσεις εισαγωγής ασθενών που επρόκειτο να χειρουργηθούν αλλά και εκείνων με προχωρημένου σταδίου καρκίνου, όταν δεν αποτελεί επιλογή η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία, με σκοπό την θανάτωση των καρκινικών κυττάρων, αποτελεί μία καλή επιλογή. Στην πρώτη περίπτωση, δηλαδή του υπό εγχείρηση ασθενή, αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχίας του χειρουργείου και την μη επανεμφάνιση του όγκου. (Vincent et al., 2011).

Η χειρουργική θεραπεία θεωρείται ο μόνος τρόπος θεραπείας του αδενοκαρκινώματος συγκεκριμένα, και η μόνη που μπορεί να παρατείνει σημαντικά την επιβίωση. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει γίνει αρκετά ασφαλής και ο κίνδυνος μετεγχειρητικής θνησιμότητας έχει πέσει στο 3%. Η χειρουργική επέμβαση για τον καρκίνο του παγκρέατος αποτελείται κυρίως από 2 διακριτές επεμβάσεις, βασισμένες σε μεγάλο βαθμό στην ανατομική θέση του όγκου δεξιά ή αριστερά του άξονα SMV/PV: παγκρεατοδωδεκαδακτεκτομή για όγκους της κεφαλής του παγκρέατος και αριστερή ή περιφερική παγκρεατεκτομή για όγκους το παγκρεατικό σώμα ή την ουρά (Clancy, 2015). Η εκτομή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σταδια I, II της νόσου καθώς και σε προχωρημένο σταδιο III, όμως για ασθενής σταδίου IV με απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν συνίσταται χειρουργική επέμβαση.

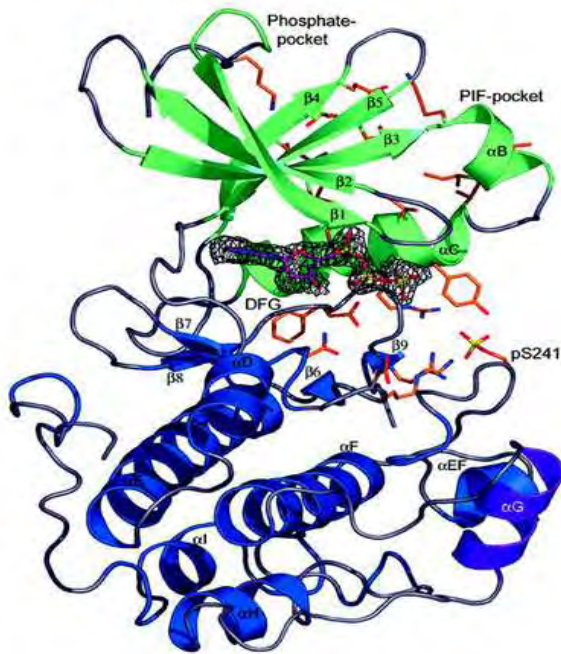
Για να επιτευχθεί καλύτερος τοπικός έλεγχος του όγκου και τελικά να βελτιωθεί η επιβίωση και η ποιότητα ζωής των ασθενών, έχει αποδειχθεί σε πολλές κλινικές δοκιμές στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Ευρώπη και την Ιαπωνία ότι η χειρουργική εκτομή, εάν χορηγηθεί χημειοθεραπεία πλήρους δόσης πριν από τη χειρουργική επέμβαση, έχει μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας και μικρότερα ποσοστά επανεμφάνισης της νόσου (Zhao & Liu, 2020). Υπάρχουν λίγες αποτελεσματικές χημειοθεραπευτικές επιλογές για τον μεταστατικό καρκίνο του παγκρέατος. Από τη δεκαετία του 1990, η γεμισιταβίνη σε συνδυασμό με αμπραξάνη θεωρείται η τυπική χημειοθεραπευτική επιλογή, πλέον όμως υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης έχουν παρατηρηθεί με το σχήμα FOLFIRINOX (FOL: φυλλινικό οξύ, F: φθοριοουρακίλη, IRIN:

ιρινοτεκάνη, OX: οξαλιπλατίνη) τα οποία χρησιμοποιούνται για επικουρική θεραπεία (Mohammed et al., 2014).

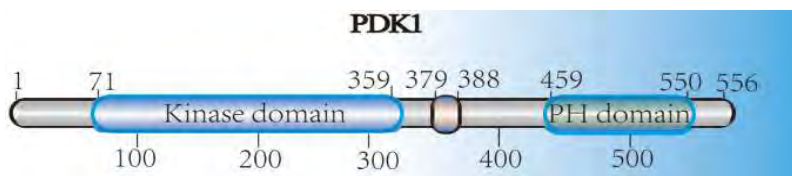
## 1.5 GSK2334470 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### 1.5.1 PDK-1

Η PDK-1, μια πρωτεΐνη 556 αμινοξέων, είναι μία βασική πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης και ανακαλύφθηκε το 1997 σε σκελετικούς μυς κουνελιών (Alessi et al., 1997). Είναι ένα ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο PDK1 στους ανθρώπους. Είναι ζωτικής σημασίας για την ενεργοποίηση της AKT/PKB και πολλών άλλων κινασών της υποοικογένειας AGC, στην οποία ανήκει, συμπεριλαμβανομένης της κινάσης της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 p70 (p70RSK), της ρυθμιζόμενης κινάσης ορού/γλυκοκορτικοειδούς (SGK), της ριβοσωμικής κινάσης S6 της πρωτεΐνης p90 (p90RSK) και τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) (Gagliardi et al., 2018). Επιπλέον, είναι γνωστή για την ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS/MAPK. Η οικογένεια κινασών AGC περιέχει τουλάχιστον 60 μέλη μεταξύ 21 υποοικογενειών, τα οποία έχουν όλες ανάλογες δομές και παρόμοιους τρόπους ενεργοποίησης σε σχέση με δύο άκρως συντηρημένα μοτίβα (Wang et al., 2022). Πιο συγκεκριμένα, ο καταλυτικός πυρήνας του διαθέτει έναν N-τελικό λοβό που αποτελείται κυρίως από β-φύλλο και έναν κυρίως α-ελικοειδές O-τελικό λοβό. Διαθέτει, λοιπόν, μια N-τελική καταλυτική περιοχή κινάσης και μια C-τελική περιοχή ομολογίας πλεκστρίνης (PH) (Biondi et al., 2002) (Εικόνα 1.09). Επίσης, η θέση δέσμευσης ATP βρίσκεται ανάμεσα στους δύο λοβούς. Η περιοχή PH χρησιμοποιείται κυρίως για την αλληλεπίδραση με τη διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (3,4) (PIP2) και τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (3,4,5) (PIP3) που είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό και την ενεργοποίηση ορισμένων υποστρώματων PDK-1 που σχετίζονται με τη μεμβράνη, όπως το AKT. Η περιοχή με ενεργότητα κινάσης έχει τρεις θέσεις δέσμευσης συνδέτη, δηλαδή τη θέση δέσμευσης υποστρώματος, τη θέση δέσμευσης ATP και τη θέση πρόσδεσης που είναι επίσης γνωστή ως θύλακος PIF. Η PIF αλληλεπιδρά και δεσμεύει ορισμένα υποστρώματα PDK-1 όπως το S6K και η πρωτεϊνική κινάση C (Εικόνα 1.7) (Mora et al., 2004).



Εικόνα 1.7 Απεικόνιση της δομής της PDK-1 (Biondi et al., 2002)



Εικόνα 1.7 Αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης PDK-1 στην οποία βρίσκεται: ο τομέας κινάσης (71-359αα) και η περιοχή PH (459-550αα) (The Landscape of PDK1 in Breast Cancer, 2022)

### 1.5.2 ΜΟΝΟΠΑΤΙ PDK1/AKT/mTOR ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

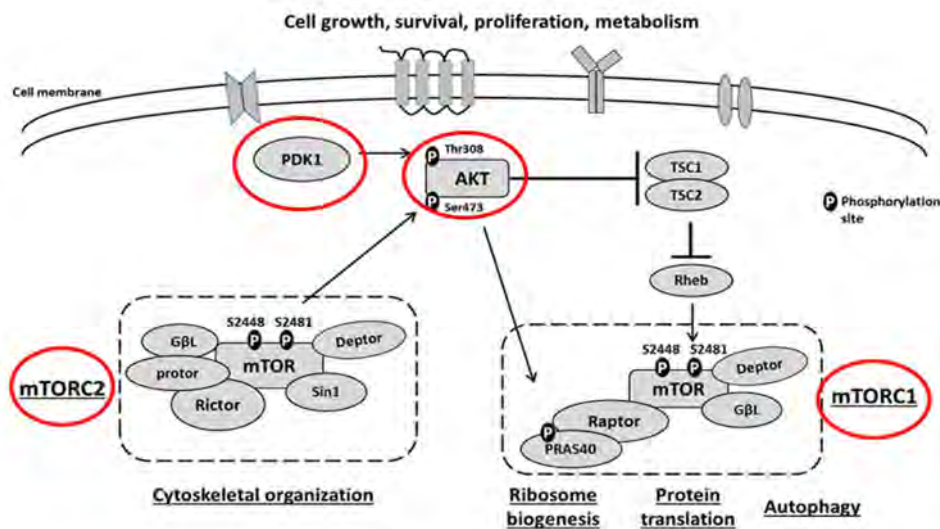
Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η διακοπή των φυσιολογικών αυτοανασταλτικών περιορισμών στη δραστηριότητα της PDK-1 που εμπλέκεται στην παρακολούθηση της ανάπτυξης και της επιβίωσης θα μπορούσε να προκαλέσει τον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων. Πολλές μεταλλάξεις που προκαλούν καρκίνο επάγουν την ενεργοποίηση των στόχων PDK1, συμπεριλαμβανομένων των Akt, S6K και SGK. Η υπερενεργοποίηση της οδού PI3K/PDK-1/AKT έχει στενή σχέση με πολλούς ανθρώπινους καρκίνους (Faes & Dormond, 2015).

Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή PH επιτρέπει στο PDK1 να συνεντοπίζεται με το AKT στην πλασματική μεμβράνη και να φωσφορυλιώνει την θρεονίνη 308 στον βρόχο ενεργοποίηση T του, οδηγώντας σε ενεργοποίηση PKB/Akt. Για να επιτραπεί όμως στην PDK-1 να ενεργοποιήσει την Akt είναι απαραίτητη η δράση ενός λιπιδικού δευτέρου αγγελιοφόρου, της φωσφατιδυλινοσιτόλη-3,4,5-τριφωσφορικής (PIP3). Αυτή επίσης με την σειρά της είναι προϊόν της 3 κινάσης της φωσφοϊνοσιτιδής (PI3K), η οδός σηματοδότησης η οποία είναι από τα πιο συχνά μεταβαλλόμενα μονοπάτια στον ανθρώπινο καρκίνο και έχει κρίσιμο ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη του όγκου (Lien et al., 2017).

Το ενεργοποιημένο Akt, στην συνέχεια, ενεργοποιεί το mTORC1 μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης του PRAS40 (πλούσιο σε προλίνη υπόστρωμα 40kDa) και της TSC2 (πρωτεΐνη 2 της κονδυλώδους σκλήρυνσης). Τα υποστρώματα mTORC1

περιλαμβάνουν τον 4EBP1 (ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης μετάφρασης 4E πρωτεΐνης δέσμευσης 1) και ριβοσωματική πρωτεΐνη S6 κινάση πολυπεπίδιο 1 (S6K1), το οποίο, με τη σειρά του, φωσφορυλιώνει τη ριβοσωματική πρωτεΐνη S6 (S6/RPS6), προάγοντας τη σύνθεση της πρωτεΐνης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Hemmings & Restuccia, 2012b).

Η πλήρως ενεργή, λοιπόν, PKB/Akt διαμεσολαβεί πολυάριθμες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της αγγειογένεσης, του μεταβολισμού, της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης, της πρωτεϊνικής σύνθεσης, της μεταγραφής και της απόπτωσης (Hemmings & Restuccia, 2012a).



Εικόνα 1.8 Αναπαράσταση μονοπατιού ενεργοποίησης της Akt μέσω του PDK-1 και την επακόλουθη ενεργοποίησης του mTORC (Chadha & Meador-Woodruff, 2020).

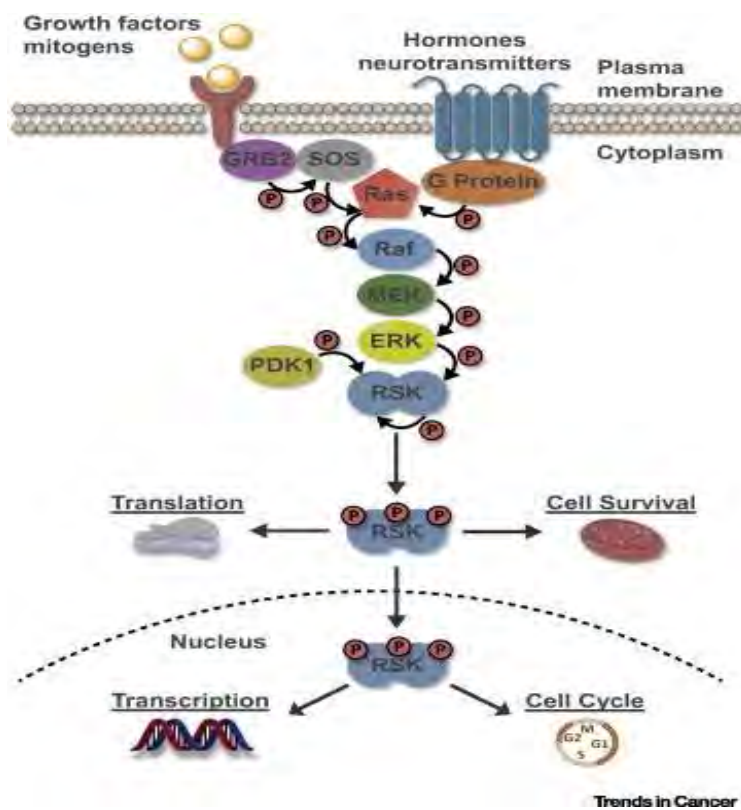
### 1.5.3 ΜΟΝΟΠΑΤΙ RAS/MARK ΚΙΑ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Το μονοπάτι RAS/MARK, γνωστό και ως Ras/Raf/MEK/ERK μονοπάτι, είναι μια κρίσιμη οδός για την επιβίωση και την αντίσταση στη φαρμακευτική θεραπεία των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων του παγκρέατος περιλαμβάνει μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο KRAS, με αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του (Almoguer et al., 1988). Το προϊόν του γονιδίου KRAS είναι μια

Το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK μπορεί να ενεργοποιηθεί από υποδοχείς που έχουν δράση κινάσης τυροσίνης (RTKs), με την μεσολάβηση αυξητικών παραγόντων. Η συνδεδεμένη με τους υποδοχείς αυξητικού παράγοντα (GRB2), μετά την ενεργοποίησή τους κάποιο αυξητικό σήμα, δημιουργεί σύμπλοκο με τη SOS, έναν παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης. Το SOS καταλύει την δέσμευση GTP στην οικογένεια των κινάσων Ras, με αποτέλεσμα η Ras GTPάση μεταβαίνει από μια ανενεργή κατάσταση δεσμευμένη στο GDP σε μια ενεργή κατάσταση δεσμευμένη στο GTP (Casalvieri et al., 2017). Το ενεργό Ras-GTP στη συνέχεια δεσμεύεται στη N-τερματική ρυθμιστική περιοχή της κινάσης RAF, προκαλώντας μια διαμορφωτική αλλαγή που προάγει τον σχηματισμό διμερών RAF, μία κινάση σερίνης/θρεονίνης (Simanshu et al., 2017). Αυτός ο διμερισμός οδηγεί στην ενεργοποίηση της περιοχής κινάσης RAF (Terrell & Morrison, 2019). Με τη σειρά της η Raf, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση MAP2K1/MEK, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση MAPK1/ERK2 (ERK1/2).

ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεΐνη κινάση (MAPK) και την εξωκυτταρική κινάση που ρυθμίζεται από το σήμα (MEK), η οποία με την σειρά της φωσφορυλώνει και ενεργοποιεί την ERK (Casalvieri et al., 2017).

Τα RSK φωσφορυλιώνονται απευθείας και ενεργοποιούνται διαδοχικά από τα ERK1/2 και PDK1. Το ενεργοποιημένο RSK μπορεί να παραμείνει συνδεδεμένο με τη μεμβράνη, να διασπαστεί στο κυτταρόπλασμα ή να μετατοπιστεί στον πυρήνα, φωσφορυλιώνοντας έτσι τα υποστρώματα σε όλο το κύτταρο και εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταγραφή γονιδίων, η πρωτεϊνική σύνθεση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Συμπεραίνουμε ότι η υπερενεργοποίηση της οδού Ras/Raf/MEK/ERK με αυξημένη διέγερση ή μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας προάγει την ανάπτυξη και την επιβίωση πολλών ανθρώπινων καρκίνων (Casalvieri et al., 2017).



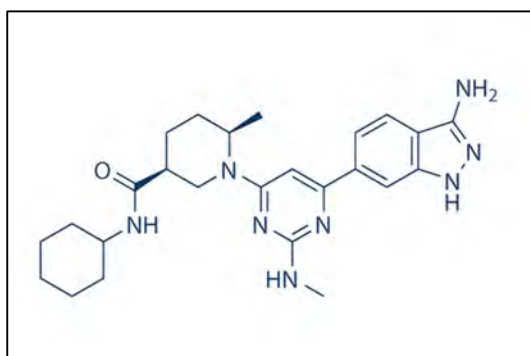
Εικόνα 1.9 Απεικόνιση μονοπατιού RAS/MARK (Casalvieri et al., 2017).

#### 1.5.4 GSK2334470

Το GSK2334470 δημιουργήθηκε από την GlaxoSmithKline και έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία σαν ένας αναστολέας της PDK-1 κινάσης, ο οποίος μπορεί να την καταστείλει αποτελεσματικά ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, χωρίς να καταστέλλει τη δραστηριότητα 93 άλλων πρωτεϊνικών κινάσεων, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας 13 πρωτεϊνικών κινάσεων AGC (Najafon et al., 2011). Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι πρόκειται για έναν εξαιρετικά ειδικό και ισχυρό αναστολέα της PDK1 (Yang et al., 2017). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλει την φωσφορυλίωση του T βρόγχου T και την ενεργοποίηση του Akt.

Η ουσία αυτή σαν χημική ένωση ανήκει στις ινδαζόλες, οι οποίες είναι μία ετεροκυκλικές αρωματικές οργανικές ενώσεις. Η πλήρης ονομασία της κατά UIPAC είναι (3S,6R)-1-(6-(3-αμινο-1H-ινδαζολ-6-υλ)-2-(μεθυλαμινο)πυριμιδιν-4-υλ)-N-κυκλοεξυλ-6-μεθυλπiperιδινο-3-καρβοξαμίδιο, ο μοριακός της τύπος (C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O) και η στεreoχημική της δομή απεικονίζεται παρακάτω [Εικόνα 1.10].

Η αποθήκευση του φαρμάκου αυτού γίνεται σε ξηρό και σκοτεινό μέρος, στους -20°C για 3 χρόνια και στους 4°C για 2 χρόνια, εάν βρίσκεται σε μορφή σκόνης, και στους -80°C για 6 μήνες και -20°C για 1 μήνα εάν βρίσκεται σε διαλύτη. Οι διαλύτες μπορεί να είναι είτε DMSO είτε αιθανόλη (MedChemExpress). Τέλος, πωλείται για ερευνητικούς σκοπούς μόνο κατόπιν συμφωνίας από την GlaxoSmithKline.



Εικόνα 1.10 Στεreoχημική απεικόνιση της GSK2334470 (Catalog No.S7087, selleckchem)

## 1.6 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής διατριβής είναι η *in vitro* διερεύνηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της ινδαζόλης GSK2334470, ενός αναστολέα της PDK-1, στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, και συγκεκριμένα έναντι της εγκαθιδρυμένης παγκρεατικής καρκινικής σειράς PANC-1. Επίσης, στόχος της είναι η εύρεση της φάσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία αυτή δρα ο εν λόγω αναστολέας, αλλά και η διερεύνηση της ικανότητάς του να αναστείλει την δημιουργία αποκίων και τη μεταναστευτική ικανότητα των υπό μελέτη καρκινικών κυττάρων.



## 2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των PANC-1 είναι τα εξής:

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640 (Gibco,code-2194780)
- Αδρανοποιημένος ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS: Fetal bovine serum,) PanBiotech
- L-γλουταμίνη (Gibco, code-2165253)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (Gibco, code-2145465)
- Θρυψίνη (Gibco, code- 15090-046)

Τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Φλάσκες T25 (25 cm<sup>2</sup> επιφάνεια) (Thermo Scientific, code: 169389)
- Πιπέτες των 5 ml (Corning Costrar® Incorporated, code 4051)
- Πιάτο 96 θέσεων (Corning Costrar® Incorporated, code 4051)
- Πιάτο 6 θέσεων (Thermo Scientific, code: 169389)
- Φιαλίδια (Falcon) (Corning, code: 430921)
- Φιαλίδια του 1,5 ml (Eppendorfs) (Thermo Scientific, code: 3456)
- Φιαλίδια κατάψυξης (cryovials) (Corning, 430487)

Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι τα εξής:

- SRB (Sulforhodamine B) (SIGMA, Code: S9012)
- Οξικό οξύ (Fluka: Code: 45731)
- Trizma Base (PanReac AppliChem, code:0M013429)
- TCA (Trichloroacetic acid) (PanReac AppliChem, Code: A1431)
- Διάλυμα NaCl (Demo ABEE, code: 2107757)
- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O (Demo ABEE, code:2006777)
- Trypan Blue (Gibco®, ThermoFisher Scientific, code:15250-061)

### 2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες (φλάσκες) εμβαδού 25 cm<sup>2</sup> και 75cm<sup>2</sup>, έως ότου να δημιουργηθεί μονόστοιβο ταπήτιο και να καλυφθεί το 80% της επιφάνειάς τους. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε περιείχε τα εξής:

- Θρεπτικό υλικό RPMI.
- 5% αδρανοποιημένος ορός εμβρύου βοοειδούς.
- 1% αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (Pen-Strep)
- 1% L-γλουταμίνη.

Η Πενικιλίνη και Στρεπτομυκίνη προστίθενται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ώστε να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις των κυτταροκαλλιεργειών από μύκητες ή βακτήρια, ενώ η L-γλουταμίνη είναι ένα αμινοξύ που είναι απαραίτητο ως εναλλακτική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα, εξασφαλίζοντας ένα φυσιολογικό περιβάλλον στα κύτταρα, ώστε να διατηρήσουν τις βασικές μεταβολικές τους λειτουργίες. Το FBS, περιέχει αυξητικούς παράγοντες και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα ανάπτυξης στις in vitro κυτταροκαλλιεργείες, προάγοντας την υγιή τους ανάπτυξη, όπως επίσης ενισχύοντας και την προσκόλληση των κυττάρων. Η

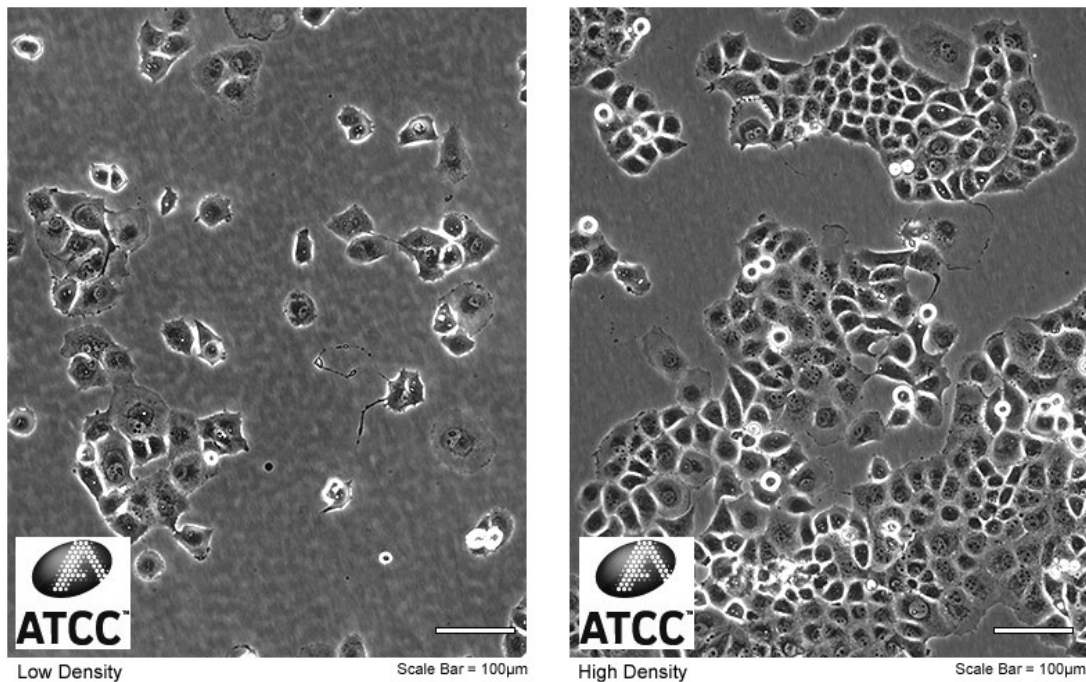
θρυψίνη χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης που θα περιγραφεί παρακάτω και είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, που οδηγεί στη διάσπαση των πρωτεϊνών σε κύτταρα που είναι προσκολλημένα στη φλάσκαδοχείο καλλιέργειας, ώστε να αποκολληθούν από αυτή. Συγκεκριμένα καταλύει την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών σε κατάλοιπα Lys και Arg.

Το πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας φυλάσσεται στους 4°C.

Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, με σταθερή παροχή CO<sub>2</sub> 5% και υγρασία 95%, καθώς αυτές είναι οι βέλτιστες συνθήκες για την επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων και επίσης παρομοιάζουν τις συνθήκες του ανθρώπινου σώματος.

## 2.3 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ PANC-1

ATCC Number: **CRL-1469**™  
Designation: **PANC-1**



Εικόνα 2.1 Φωτογραφία μικροσκοπίου κυττάρων της καρκινικής παγκρεατικής σειράς PANC-1 (ATCC)

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν η κυτταρική σειρά PANC-1. Η κυτταρική σειρά αυτή είναι πρωτογενείς όγκοι που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος ως μοντέλα *in vitro* για την μελέτη της καρκινογένεσης του αδενοκαρκινώματος του παγκρεατικού πόρου. Καλλιεργήθηκε από έναν Καυκάσιο 56 ετών άνδρα με αδενοκαρκίνωμα στην κεφαλή του παγκρέατος που εισέβαλε στο τοίχωμα του δωδεκαδάχτυλου και προμηθεύτηκε από την ATCC (American Type Culture Collections). Ο χρόνος διπλασιασμού της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς είναι 52 ώρες και δραστηριότητα G6PD αργής κινητικότητας ή τύπου B. Τα κύτταρα μπορούν να κάνουν

μεταστάσεις αλλά έχουν φτωχές ικανότητες διαφοροποίησης. Χρησιμοποιήθηκε λόγω της σταθερότητας που εμφανίζει στην ανάπτυξή της σε σχετικά γρήγορο χρόνο υπό σταθερές συνθήκες.

#### 2.4 ΚΑΝΟΝΕΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Εκτός από την καθαριότητα του επωαστικού κλίβανου, του θαλάμου νηματικής ροής και υπόλοιπων συσκευών που ενδέχεται να χρησιμοποιούνταν, είναι απαραίτητα η φροντίδα για την γενικότερη καθαριότητα του χώρου. Όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν, όπως πλάκες Neubauer, συσκευές θρεπτικών μέσων, ηλεκτρική πιπέτα, θα πρέπει να απολυμαίνονται με διάλυμα αιθανόλης 70% πριν χρησιμοποιηθούν και να διατηρούνται σε εξίσου καθαρούς χώρους, ενώ οι φλάσκες, πιπέτες και multi-well plates χρησιμοποιούνταν αποστειρωμένα και για μία χρήση. Τέλος, άλλες επιφάνειες που μπορεί να χρησιμοποιήθηκαν (π.χ. εργαστηριακοί πάγκοι) πρέπει να καθαρίζονται τόσο πριν όσο και μετά το πέρας των πειραμάτων. Οι παραπάνω διεργασίες θα εξασφαλίσουν τόσο την καλύτερη διεξαγωγή των πειραμάτων, λόγω του ότι θα αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις, όσο και για την προσωπική υγιεινή του προσωπικού.

#### 2.5 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η ανανέωση του θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται έτσι ώστε να εξαλειφθεί η πιθανότητα εξάντλησης των θρεπτικών στοιχείων και να απομακρυνθούν τα ανεπιθύμητα προϊόντα μεταβολισμού των κυττάρων, που έχει ως αποτέλεσμα την θανάτωση τους από ασιτία. Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνουμε ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται σε βέλτιστες συνθήκες. Τα βήματα που ακολουθούνται για την μέθοδο αυτή είναι τα εξής:

- Απόγλυση θρεπτικού από την φλάσκα
- Προσθήκη 14ml θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS, 1% L-glut, 1% pen/strep)

#### 2.6 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ-ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η μέθοδος ανακαλλιέργειας πραγματοποιείται έτσι ώστε να μειωθεί ο αριθμός κυττάρων στην φλάσκα, με σκοπό να αποφευχθεί η παύση της ανάπτυξης των κυττάρων και η θανάτωση τους λόγω έλλειψης χώρου και συναγωνισμού μεταξύ των κυττάρων για θρεπτικά συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, όταν η πυκνότητα (confluency) φτάσει περίπου πάνω από το 80% πραγματοποιείται η μέθοδος της ανακαλλιέργειας (passing) των κυττάρων. Η συχνότητα πραγματοποίησης της διαδικασίας εξαρτάται από τον χρόνο διπλασιασμού της εκάστοτε κυτταρικής σειράς. Τα βήματα που ακολουθούνται για την μέθοδο αυτή είναι τα εξής:

- Απόγλυση θρεπτικού μέσου από την φλάσκα
- Πλύση με NaCl (2-4ml) για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ορού FBS, ο οποίος απενεργοποιεί την θρυψίνη
- Προσθήκη 2ml θρυψίνης και ήπια ανακίνηση με σκοπό την κάλυψη της επιφάνειας των προσκολλημένων κυττάρων

- Επώαση στον κλίβανο στους 37°C μέχρι να ξεκολλήσουν τα κύτταρα. Ο χρόνος εξαρτάται από την κυτταρική σειρά. Στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (Panc-1) ο χρόνος επώασης διαρκούσε 5-6 λεπτά. Σε περίπτωση που τα κύτταρα επωάζονταν λιγότερο από το κατάλληλο χρονικό διάστημα, τότε παρατηρούνταν ότι δεν ξεκολλούσαν από την φλάσκα, ενώ σε περίπτωση που επωάζονταν παραπάνω υπήρχε κίνδυνος θανάτωσης των κυττάρων
- Απόσυρση της φλάσκας από τον κλίβανο, ακολουθούν ήπια χτυπήματα στα πλάγια τοιχώματα της φλάσκας με σκοπό να αποκολληθούν τυχόν προσκολλημένα κύτταρα. Ακολουθεί παρατήρηση της φλάσκας στο μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί ότι έχουν ξεκολλήσει όλα τα κύτταρα. Σε περίπτωση που υπάρχουν εναπομείναντα προσκολλημένα κύτταρα, ακολουθεί επαναεπωασμός για 1 λεπτό στον κλίβανο.
- Στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, προστίθεται στην φλάσκα 4ml RPMI το οποίο περιέχει όρο, με σκοπό την απενεργοποίηση της δράσης της θρυψίνης. Πρέπει το θρεπτικό μέσο να πάει σε όλη την επιφάνεια της φλάσκας έτσι ώστε να απενεργοποιηθεί όλη η θρυψίνη και να μην μείνουν τυχόν υπολείμματα της. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω πολύ καλής ανάδευσης με αποστειρωμένη πιπέτα.
- Ανάλογα με τον ρυθμό ανάπτυξης που έχει η κάθε κυτταρική σειρά, επιλέγουμε και προσθέτουμε στην φλάσκα η επιθυμητή ποσότητα που συλλέχθηκε από το εναιώρημα με την ανάδευση. Στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά από τα 6ml που συλλέγονται κατά την ανάδευση, προστίθεται το 1ml.
- Τέλος, προστίθεται RPMI 5% για να φτάσουμε τον τελικό όγκο (14ml) και τοποθετείται στον κλίβανο, ώστε να αναπτυχθούν εκ νέου τα εναπομείναντα κύτταρα.

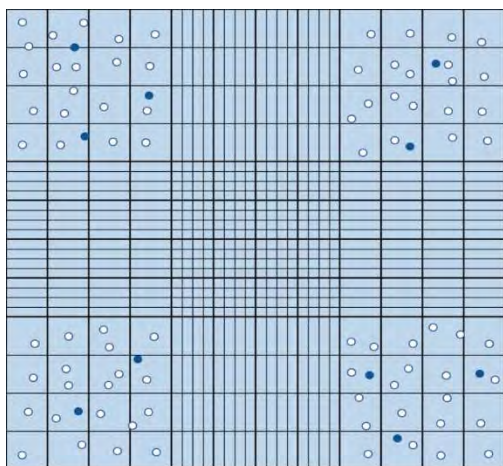
## 2.7 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEYBAUER ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η διαδικασία καταμέτρησης των κυττάρων είναι μία απαραίτητη διαδικασία για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Βασικό εργαλείο για την πραγματοποίηση της μεθόδου αυτής είναι το αιμοκυτταρόμετρο, το οποίο είναι μία παχιά γυάλινη αντικειμενοφόρος πλάκα που περιλαμβάνει μία κεντρική περιοχή σχεδιασμένη ως θάλαμος μέτρησης. Αυτή η περιοχή χωρίζεται σε 9 θαλάμους μέτρησης μήκους 1mm. Από αυτούς τους θαλάμους χρησιμοποιούνται μόνο οι 4 για την μέτρηση των κυττάρων, και πιο συγκεκριμένα αυτοί που βρίσκονται στις γωνίες του τετραγώνου. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Συλλογή κυττάρων μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης [2.6]
- Πολύ καλή ανάδευση των κυττάρων και μεταφορά είτε 10μl, περίπτωση δείγματος με πολλά κύτταρα, είτε 90μl, σε περίπτωση πιο αραιού από κύτταρα δείγματος, από το δείγμα με πιπέτα 200μl σε ένα φιαλίδιο 1,5ml.
- Σε αυτό το φιαλίδιο γίνεται προσθήκη 90μl ή 10μl αντίστοιχα, της χρωστικής Trypan Blue, η οποία βάφει με μπλε χρώμα τις μεμβράνες των νεκρών κυττάρων και βοηθά στην διάκριση των ζωντανών, τα οποία, σε αντίθεση με τα νεκρά που είναι βαμμένα μπλε, φαίνονται με έντονο φωτεινό άσπρο προς το κίτρινο χρώμα.
- Προετοιμασία της πλάκας Neubauer βάζοντας την καλυπτρίδα πάνω από τον θάλαμο μέτρησης
- Ακολουθεί καλή ανάδευση του φιαλιδίου ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή κυττάρων σε αυτό και συλλογή 20μl από αυτό με πιπέτα 20μl. Στη συνέχεια,

τοποθετούμε προσεκτικά σε μία εσοχή στην πλάκα με σκοπό το εναιώρημα να μπει μεταξύ πλάκας-καλυπτρίδας.

- Καταμέτρηση των κυττάρων όπως προαναφέρθηκε. Η μέτρηση γίνεται για κάθε τεταρτημόριο ξεχωριστά και μετράμε μόνο τα ζωντανά κύτταρα που βρίσκονται μέσα σε αυτό.



Εικόνα 2.2. Αναπαράσταση εικόνας αιμοκυτταρόμετρου ύστερα από την χορήγηση δείγματος καρκινικών κυττάρων με σκοπό την καταμέτρηση τους. (Funk & Musa, 2021).

Έτσι, εφόσον μετρήσαμε τα κύτταρα και από τα 4 τεταρτημόρια, υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = x/4 * (10^4 \text{ ή } 10^5) * y$$

[Σημείωση: για τα  $10^4$  ή  $10^5$  χρησιμοποιούνται ανάλογα την αραίωση, δηλαδή για 90μl δείγματος και 10μl χρωστικής χρησιμοποιούμε το  $10^4$ , ενώ για 10μl δείγματος και 90μl χρωστικής χρησιμοποιούμε το  $10^5$ ]

Οπου:

x: το άθροισμα από τα 4 τεταρτημόρια

y: τα συνολικά ml του δείγματος

## 2.8 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα κύτταρα τα οποία είναι αποθηκευμένα στην βαθιά κατάψυξη ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) πρέπει να ξεπαγώσουν ομαλά και με συγκεκριμένη μέθοδο, έτσι ώστε να είναι ομαλή η μετάβαση στην θερμοκρασία δωματίου ( $25^{\circ}\text{C}$ ) και να παραμείνουν υγιής και λειτουργικά. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Ανάδευση των δειγμάτων στους 37°C για 1-2 λεπτά, έως ότου δηλαδή αποκρυσταλλωθεί το περιεχόμενο του φιαλιδίου παγώματος.
- Γίνεται μεταφορά του δείγματος σε σωληνάριο των 10ml (falcon) στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.
- Στην συνέχεια, προστίθενται σε αυτό 5ml σε σταγόνες ακουμπώντας πρώτα στα τοιχώματα του σωληναρίου με σκοπό να μην είναι απότομη η μετάβαση θερμοκρασίας και σοκαριστούν τα κύτταρα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 900 rpm και μετά αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται.
- Τέλος, προσθέτουμε 5ml RPMI και μεταφέρεται σε φλάσκα T75. Συμπληρώνεται RPMI μέχρι τα 14ml και τοποθετείται στον κλίβανο.

## 2.9 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Υπάρχει η δυνατότητα αποθήκευσης των κυττάρων εκτός κλίβανου και εκτός καλλιέργειας για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ψυγείο βαθειάς κατάψυξης (-80°C). Η διαδικασία αυτή απαιτεί τα εξής βήματα:

- Από μία φλάσκα με πληρότητα κυττάρων 70-80% αποκολλώ τα κύτταρα με την διαδικασία την θρυψινοποίησης που περιγράφηκε στο [2.6]
- Τα αποκολλημένα κύτταρα, ύστερα από της μεταφορά τους σε 9ml θρεπτικό μέσο RPMI 5% και φυγοκεντρούνται για 7 λεπτά στις 1400 στροφές ανά λεπτό.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1-2 ml διαλύματος συντήρησης (90% RPMI 10% DMSO)
- Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε ειδικά eppendorfs (cryovials) του 1ml και αποθηκεύεται αμέσως στους -80°C, μέσα σε χαρτοπετσέτες έτσι ώστε η αλλαγή θερμοκρασίας να είναι πιο ομαλή.

## 2.10 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB

Η ανάλυση SRB είναι μία φθηνή μέθοδος για την διερεύνηση της κυτταροτοξικότητας σε κυτταρικές σειρές. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα του SRB, το οποίο συνδέεται στοιχειομετρικά με πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες και στην συνέχεια μπορεί να εκχυλιστεί υπό βασικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, η SRB είναι μία χρωστική με δύο σουλφονικές ομάδες που προσδένεται σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα. Έτσι, η ποσότητα της δεσμευμένης χρωστικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής μάζας, ως υποκατάστατό της, η οποία στην συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Στο συγκεκριμένο πείραμα θα μελετήσουμε την κυτταροτοξικότητας της ουσίας GSK2334470 στην καρκινική παγκρεατική κυτταρική σειρά PANC-1 σε συγκεντρώσεις 100, 10, 1, 0.1μM. Τα βήματα που απαιτούνται για την διεκπεραίωση της μεθόδου αυτή είναι τα εξής:

### 1<sup>η</sup> Μέρα:

#### Ανανέωση θρεπτικού μέσου και έλεγχος κυττάρων.

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η διαδικασία που περιγράφεται στην παραπάνω ενότητα [2.5], με σκοπό την διασφάλιση ιδανικών συνθηκών για τα κύτταρα και την υγιή συντήρηση για την πραγματοποίηση του πειράματος.

## 2<sup>η</sup> Μέρα:

### Ανακαλλιέργεια κυττάρων και στρώσιμο των σε πιάτο 96 θέσεων.

Τα βήματα αυτής της διαδικασίας είναι τα εξής:

- Κατά την δημιουργία ανακαλλιέργειας, στο στάδιο το οποίο έχει συλλεχθεί το εναιώρημα με το θρεπτικό μέσο, το εναιώρημα το οποία δεν θα τοποθετηθεί στην φλάσκα, συλλέγεται σε σωληνάριο των 10ml (falcon).
- Στην συνέχεια ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων με την διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα [2.6].
- Ακολουθεί υπολογισμός του συνολικού αριθμού κυττάρων, καθώς και τον συνολικό αριθμό κυττάρων που θα χρειαστούμε ώστε κάθε πηγαδάκι να περιέχει τη επιθυμητή ποσότητα σύμφωνα με την εκάστοτε κυτταρική σειρά (στο συγκεκριμένο πείραμα ο αριθμός είναι 5000 κύτταρα ανά πηγαδάκι πιάτου). Ο συνολικός αριθμός από τα πηγαδάκια εξαρτάται από :
  1. σε πόσες διαφορετικές συγκεντρώσεις φαρμάκου θα επωαστούν τα κύτταρα.
    2. κύτταρα ελέγχου (control) χωρίς προσθήκη ουσιών, ώστε να υπάρχει σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης τους με σχέση τα κύτταρα που επώαστηκαν με μία ουσία.
    3. κύτταρα ελέγχου που αντιστοιχούν στην χρονική στιγμή 0, δηλαδή στην στιγμή που προστίθενται οι υπό μελέτη ουσίες στα υπόλοιπα πηγαδάκια, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση της ουσίας στα κύτταρα από την πρώτη μέρα έως την τελευταία.
- Αφού συλλεχθεί ο συνολικός αριθμός κυττάρων σε ένα σωληνάριο των 10ml (falcon), ακολουθεί προσθήκη θρεπτικού RPMI ώστε να γίνει προσθήκη επακριβής ποσότητας 100μl σε κάθε πηγαδάκι.
- Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση και vortex έτσι ώστε να επιτευχθεί η ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στα πηγαδάκια.
- Τέλος, μεταφέρονται σε κάθε πηγαδάκι 100μl εναιωρήματος με την πιπέτα 200μl.

Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν για 24 ώρες από την ώρα που στρώθηκαν στο πιάτο 96 θέσεων.

## 3<sup>η</sup> Μέρα:

### Προσθήκη υπό μελέτη ουσιών.

Μετά το πέρας των 24 ωρών, ακολουθεί προσθήκη του υπό μελέτη φαρμάκου και η μονιμοποίηση των κυττάρων ελέγχου που αντιστοιχούν στην χρονική στιγμή 0. Η ουσία που θα μελετηθεί σε αυτό το πείραμα είναι η GSK2334470 στην παγκρεατική καρκινική κυτταρική σειρά PANC-1. Οι συγκεντρώσεις που θα μελετηθούν είναι 100, 10, 1, 0.1μM της ουσίας.

Για την παραγωγή αυτών των συγκεντρώσεων έγινε αραιώση από αρχικό stock των 20.000μM σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου RPMI. Για την δημιουργία των μικρότερων από το 100μM συγκεντρώσεων, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις από το φάρμακο με δείγμα 100μM.

Στην συνέχεια ακολουθούν:

- Καλή ανάδευση στο vortex με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή του φαρμάκου στο θρεπτικό.
- Προσθήκη 100μl προσεκτικά από κάθε συγκέντρωση του φαρμάκου, εγχύνοντας πρώτα στο τοίχωμα από το κάθε πηγαδάκι, με σκοπό να μην κουνηθούν τα κύτταρα.
- Στα δείγματα ελέγχου προσθέτουμε 100μl θρεπτικό μέσο RPMI 5% χωρίς φάρμακο.
- Τέλος, ακολουθεί επώαση στον κλίβανο για 48 ώρες.

Στην συνέχεια πραγματοποιείται μονιμοποίηση κυττάρων ελέγχου που αντιστοιχούν στην χρονική στιγμή 0 (Tzero), μια διαδικασία τα βήματα της οποίας είναι τα εξής:

- Το πιάτο τοποθετείται εκτός κλίβανου, σε θερμοκρασία δωματίου (22-25°C).
- Στην συνέχεια, προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 50 μl από TCA για μονιμοποίηση. Το TCA που χρησιμοποιήθηκε είναι 50% και φυλάσσεται στους 4°C.
- Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 4°C.
- Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, απομακρύνεται το περιεχόμενο των πιάτων με απότομη κάθετη κίνηση.
- Ακολουθεί ξέπλυμα του πιάτου 3 φορές με απιονισμένο νερό, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων TCA, θρεπτικού μέσου RPMI και διάφορων μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους.
- Τέλος, το πιάτο αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου ανοιχτό, με στόχο να χρωματομετρηθεί όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία και για τα υπόλοιπα πιάτα.

#### 4<sup>η</sup> Μέρα:

##### Παρακολούθηση κυττάρων.

Μετά από 24 ώρες ακολουθεί παρατήρηση των δειγμάτων που περιέχουν κύτταρα ελέγχου και κύτταρα που περιέχουν την υπό μελέτη ουσία, για να επιβεβαιωθεί η σωστή πορεία της ανάπτυξής τους και κατ' επέκταση του πειράματος. Η επώαση συνεχίζεται για άλλες 24 ώρες.

#### 5<sup>η</sup> Μέρα:

##### Λήξη του πειράματος και μονιμοποίηση των κυττάρων.

Τελευταία μέρα, ακολουθεί η λήξη του πειράματος. Η διαδικασία η οποία ακολουθείται είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε για τα κύτταρα ελέγχου που αντιστοιχούν στην χρονική στιγμή 0 (Tzero).

Η μονιμοποίηση είναι μια χημική διαδικασία που έχει ως κύριο σκοπό την προστασία των ιστών από αυτόλυση και βακτηριακή μόλυνση καθώς και τη σταθεροποίησή τους ώστε να διατηρείται η κυτταρική δομή στα επόμενα στάδια. Ο ιστός που θα μονιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει μικρό μέγεθος (όχι >5 mm) και μάλιστα ο λόγος επιφάνεια/πάχος >>1 και να τοποθετηθεί σε τουλάχιστον 10πλάσιο όγκο μονιμοποιητικού. Η μονιμοποίηση, επίσης, καθιστά τα κύτταρα διαπερατά στις χρωστικές. Στο συγκεκριμένο πείραμα η ουσία που χρησιμοποιείται για την μονιμοποίηση των κυττάρων είναι η αιθανόλη.



Τελευταίο στάδιο αποτελεί η χρώση με σουλφοροδαμίνη Β (Sulforhodamine Β, SRB), το οποίο σηματοδοτεί την λήξη του πειράματος.

Τα στάδια αυτής της διαδικασίας είναι τα εξής:

- Προσθήκη 50μl 0,4% SRB σε 1% οξικό οξύ.
- Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στην συνέχεια, πραγματοποιείται ξέπλυμα 3 φορές με 1% οξικό οξύ, με σκοπό την απομάκρυνση της υπολειπόμενης χρωστικής που δεν δεσμεύτηκε σε κυτταρικές πρωτεΐνες.
- Αφήνονται να στεγνώσουν.
- Ακολουθεί πρόσθεση 150μl Trizma base 10μM συγκέντρωσης, το οποίο είναι ρυθμιστικό διάλυμα ελαφρώς βασικό και βοηθά στην απελευθέρωση της δεσμευμένης χρωστικής από τα κύτταρα, με σκοπό την ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας.
- Στην συνέχεια, επωάζονται στον κλιβανο (37°C) για 10 λεπτά.
- Ύστερα από την επώαση πραγματοποιείται ήπια ανάδευση στην μπαλαρίνα για 10 λεπτά στις 30 στροφές ανά λεπτό.
- Τέλος, φωτομετράται η οπτική απορρόφηση στα 540nm σε φωτόμετρο microplate reader Biotek microelisa (Biotek, El-311), το οποίο είναι αυτοποιημένο για πιάτο 96 θέσεων.

Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης επεξεργάζονται στο EXCEL και υπολογίζονται οι εξής παράμετροι:

1. **GI50 (Growth Inhibition of 50%)**: είναι η συγκέντρωση της ουσίας στην οποία μειώνεται κατά 50 % η αύξηση της καθαρής πρωτεΐνης, άρα και η ανάπτυξη των κυττάρων, σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control). Υπολογίζεται με τον μαθηματικό τύπο:

$$100 * (T - T_0)/(T_c - T_0) = 50$$

2. **TGI (Total Growth Inhibition)**: είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που προκαλεί πλήρη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων. Υπολογίζεται με τον μαθηματικό τύπο:

$$100 * (T - T_0)/T_0 = -50$$

3. **LC50 (Lethal Concentration of 50%)**: είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που μειώνει την πρωτεΐνη, και κατ' επέκταση την κυτταρική ανάπτυξη, κατά 50% σε σχέση με την ποσότητα της πρωτεΐνης πριν από την χορήγηση του φαρμάκου. Υπολογίζεται από το μαθηματικό τύπο:

$$100 * (T - T_0)/(T_c - T_0) = 0.$$

Σημειώσεις: T → η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού μετά από την χορήγηση του φαρμάκου (δηλαδή τα δείγματα τα οποία φωτομετρήθηκαν 48 ώρες μετά την χορήγηση φαρμάκου σε αυτά)

T<sub>0</sub> → η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού τη στιγμή την οποία χορηγείται το φάρμακο (δηλαδή τα δείγματα τα οποία περιέχουν τα κύτταρα ελέγχου που αντιστοιχούν στην χρονική στιγμή 0, T<sub>zero</sub>)

$T_c \rightarrow$  η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού μετά από την χορήγηση θρεπτικού μέσου RPMI 5% (δηλαδή τα δείγματα τα οποία φωτομετρήθηκαν 48 ώρες μετά την χορήγηση RPMI, δείγματα control).

## 2.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)

Η κλωνογονική δοκιμασία ή δοκιμασία σχηματισμού αποικιών είναι in vitro διαδικασία κατά την οποία αξιολογείται η ικανότητα μεμονωμένων κυττάρων να επιβιώνουν και να αναπαράγονται για να σχηματίσουν αποικίες. Η αποικία ορίζεται από τουλάχιστον 50 κύτταρα. Αυτή η ανάλυση περιγράφηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1950, όπου χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των επιπτώσεων της ακτινοβολίας στην επιβίωση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και στη συνέχεια έπαιξε ουσιαστικό ρόλο στη ραδιοβιολογία. Οι κλωνογονικές δοκιμασίες χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα της έρευνας για τον καρκίνο, καθώς ο σχηματισμός κλώνων ερμηνεύεται ως χαρακτηριστικό καρκινικών κυττάρων με ικανότητες έναρξης όγκου. Αυτή η ανάλυση χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό του αναπαραγωγικού θανάτου ενός καρκινικού κυττάρου και επίσης για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας κυτταροτοξικών φαρμάκων ή ενώσεων.

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η ικανότητα της ουσίας GSK2334470 στην αναστολή της δημιουργίας αποικιών των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων PANC-1. Η ουσία χρησιμοποιήθηκε στις συγκεντρώσεις 10, 5, 1, 0.5, 0.1 μM και συγκρίθηκε με τα κύτταρα ελέγχου. Η διαδικασία του ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

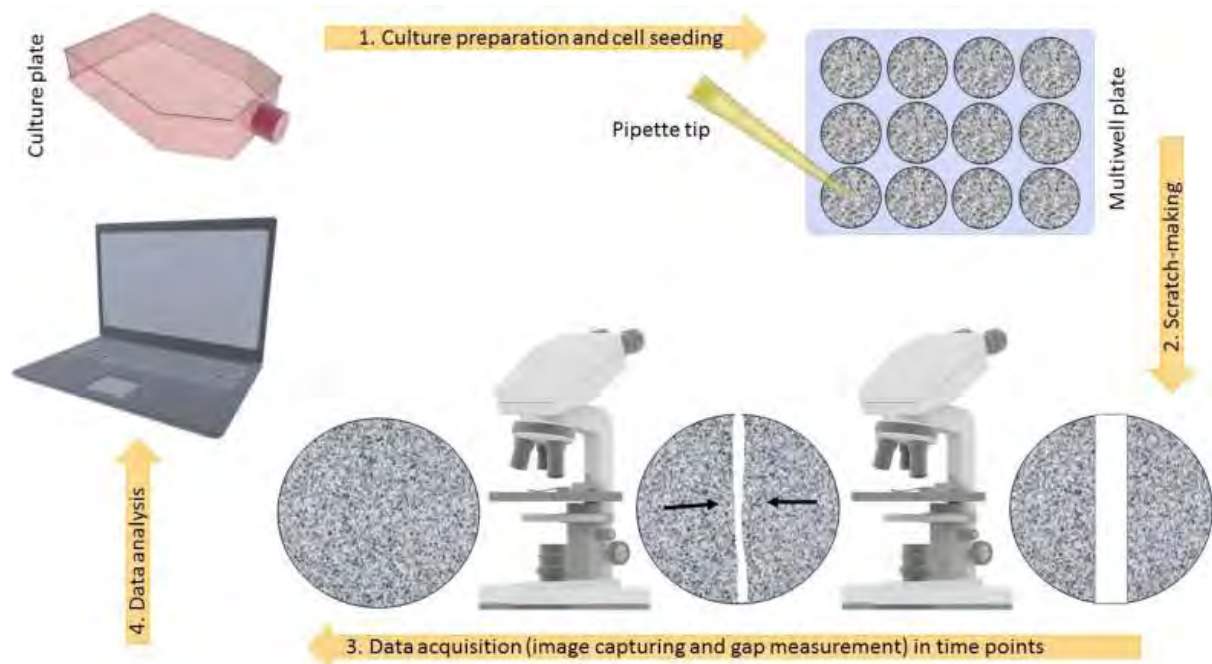
- Αρχικά, συλλέγονται κύτταρα ύστερα από την διαδικασία της θρυψινοποίησης που περιγράφηκε στο [2.6] και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που χρειάζεται το συγκεκριμένο πείραμα, σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται [2.7]. Ο αριθμός των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν σε κάθε πηγάδι εξαρτάται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά. Στο συγκεκριμένο πείραμα, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε παγκρεατική καρκινική σειρά κυττάρων PANC-1, χρειάζεται ως αρχικός πληθυσμός κυττάρων ανά πηγάδι τα 400 κύτταρα. Τα πηγάδια που στρώνονται χωρίζονται ως εξής:
  1. Κύτταρα στα οποία θα προστεθεί η υπό μελέτη ουσία στις διάφορες συγκεντρώσεις.
  2. Κύτταρα ελέγχου (control) στα οποία δεν προστίθεται κάποια ουσία, με σκοπό την σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης των φυσιολογικών έναντι των κυττάρων που επώαστηκαν με την ουσία.
- Τα κύτταρα στρώνονται σε πιάτων 6 θέσεων και προστίθεται 1ml ανά πηγάδι, στο οποίο περιέχεται ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων.
- Αφήνονται για επώαση 24 ώρες.
- Μετά το πέρας των 24 ωρών, προστίθενται το υπό μελέτη φάρμακο (GSK2334470) και θρεπτικό μέσο RPMI 5% χωρίς παρουσία φαρμάκου στα κύτταρα ελέγχου (control). Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν είναι 10, 5, 1, 0.5, 0,1 μM. Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν με παρόμοιο τρόπο με το πείραμα [2.10]
- Ακολουθεί, επώαση των κυττάρων στον κλίβανο για 2 εβδομάδες, καθώς παρεμβάλλεται από μία ενδιάμεση ανανέωση 1 εβδομάδα μετά από την προσθήκη των φαρμάκων. Συγκεκριμένα προστίθενται οι συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο βήμα.

Μετά το πέρας της επώασης (14 μέρες), για να αναλυθεί το αποτέλεσμα που είχαν οι διάφορες συγκεντρώσεις στην ανάπτυξη αποικιών, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Μονιμοποίηση πιάτων με 500μl TCA 25%.
- Χρώση με SRB, όπως στο πείραμα [2.10].
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 540nm.
- Τέλος, ακολουθεί σκανάρισμα των πιάτων και φωτογράφιση χρησιμοποιώντας το μικροσκόπιο, καθώς οι αποικίες είναι πιο ορατές έπειτα από την χρώση με SRB.

## 2.12 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (WOUND HEALING ASSAY/SCRATCH ASSAY)

Η δοκιμασία επούλωσης πληγών είναι μία απλή, φθηνή, δισδιάστατη (2D) τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη κυτταρικής μετανάστευσης και μετρά τον ρυθμό με τον οποίο τα κύτταρα, σε μία μονοστιβάδα κυττάρων, μεταναστεύουν για να καλύψουν ένα κενό χωρίς κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των κυττάρων ενός πληθυσμού, κατά την δημιουργία ενός τεχνητού κενού (πληγή), να μετακινούνται ώστε να επουλώσουν την πληγή και να δημιουργήσουν ξανά διακυτταρικούς δεσμούς.



Εικόνα 2.3. Αναπαράσταση βημάτων της πειραματικής διαδικασίας του πειράματος wound healing assay (Grada et al., 2017).

Τα βήματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν για την επίτευξη της συγκεκριμένης μεθόδου είναι τα εξής:

### 1<sup>η</sup> Μέρα:

Ανανέωση θρεπτικού μέσου και έλεγχος κυττάρων.

Η διαδικασία ξεκινάει, όπως και στα προηγούμενα πειράματα με την ανανέωση της καλλιέργειας των κυττάρων μία μέρα πριν το πείραμα, όπως περιγράφεται στη ενότητα [2.5].

### 2<sup>η</sup> Μέρα:

#### Ανακαλλιέργεια κυττάρων και στρώσιμο των σε πιάτο 6 θέσεων.

Τα βήματα αυτής της διαδικασίας είναι τα εξής:

- Θρυψινοποίηση και συλλογή κυττάρων, όπως έγινε και στο πείραμα [2.6]. Η ποσότητα των κυττάρων που παρατηρήθηκε πως είναι βέλτιστη για την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (PANC-1), είναι τα 30.000 κύτταρα ανά πηγάδι, οπότε συλλέχθηκε ανάλογος αριθμός κυττάρων ώστε να ικανοποιεί τις ανάγκες του πειράματος. Ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε με την μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα [2.7] και πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις έτσι ώστε σε συγκεκριμένη ποσότητα να περιέχεται ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων.
- Ακολούθησε, στρώσιμο των κυττάρων σε πιάτο 96 θέσεων. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 100μl δείγματος ανά πηγαδάκι τα οποία περιείχαν την επιθυμητή ποσότητα κυττάρων.
- Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων στον κλίβανο για 24 ώρες, με σκοπό την προσκόλληση στον πάτο από τα πηγάδια και την προσαρμογή των κυττάρων στις συνθήκες.

### 3<sup>η</sup> Μέρα:

#### Προσθήκη υπό μελέτη ουσιών.

Αρχικά, προετοιμάστηκαν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις του φαρμάκου, με παρόμοιο τρόπο με τα προηγούμενα πειράματα. Μελετήθηκε το φάρμακο GSK2334470, στις συγκεντρώσεις 10, 5, 1, 0.5 μM. Η διαδικασία που ακολούθησε έχει τα εξής βήματα:

- Αρχικά, αφαίρεση του εναιωρήματος του πηγαδιού με σύριγγα 10ml και βελόνα 21 χ 1 ½'' g, με ήπια ταχύτητα προσρόφησης, χωρίς να ακουμπάει στον πάτο από το πηγαδάκι, με σκοπό να μην ξεκολλήσουν κύτταρα.
- Με το ρύγχος των 200μl tip έγινε πληγή σε κάθε θέση, δημιουργώντας μια διαμετρική γραμμή, όπως στην εικόνα [ ].
- Ακολούθησαν πλύσεις με NaCl, με παρόμοια σύριγγα με το πρώτο βήμα, επίσης πολύ προσεκτικά χωρίς απότομη και δυνατή έγχυση, για την προστασία των κυττάρων.
- Επαναλήφθηκε το 1<sup>ο</sup> βήμα για το υπερκείμενο NaCl.
- Μετά το βήμα αυτό, ακολούθησε προσθήκη 200μl από τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου και 200μl θρεπτικό μέσο RPMI 5% μόνο στα κύτταρα control. Το βήμα αυτό γίνεται χωρίς να υπάρχει καθυστέρηση από τα προηγούμενα βήματα, διότι τα κύτταρα ύστερα από την δημιουργία πληγής είναι αρκετά ευαίσθητα και δεν πρέπει να παραμείνουν χωρίς θρεπτικό μέσο για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, τα δείγματα παρατηρούνται και φωτογραφίζονται στο ανάστροφο μικροσκόπιο (χρησιμοποιώντας την κάμερα AxionCam ERc5s της εταιρίας Zeiss), με τέτοιο τρόπο ώστε να φαίνονται αναλυτικά οι πληγή και τα κύτταρα γύρω από αυτή. Αυτές οι φωτογραφίες αντιπροσωπεύουν την ώρα 0, δηλαδή την ώρα που προστέθηκε το φάρμακο και δεν έχει προλάβει να εκδηλωθεί η δράση του. Η φωτογράφιση την στιγμή 0 γίνεται έτσι ώστε να

εξασφαλιστούν συγκρίσιμα αποτελέσματα, με τις υπόλοιπες 2 χρονικές στιγμές, και να διαπιστωθεί εάν, κατά πόσο και σε ποια συγκέντρωση το φάρμακο ανέστειλε την επούλωση της πληγής. Στην συνέχεια, τα κύτταρα επωάζουν στον κλίβανο και φωτογραφίζονται ξανά στις μετά από 24 και 48 ώρες.

Τα αποτελέσματα προκύπτουν από τις μετρήσεις εμβαδών των πληγών που μετριοούνται στις φωτογραφίες σε κάθε ώρα ελέγχου και με την μετατροπή αυτών σε ποσοστό ανοιχτής περιοχής ή ποσοστό μετανάστευσης των κυττάρων.

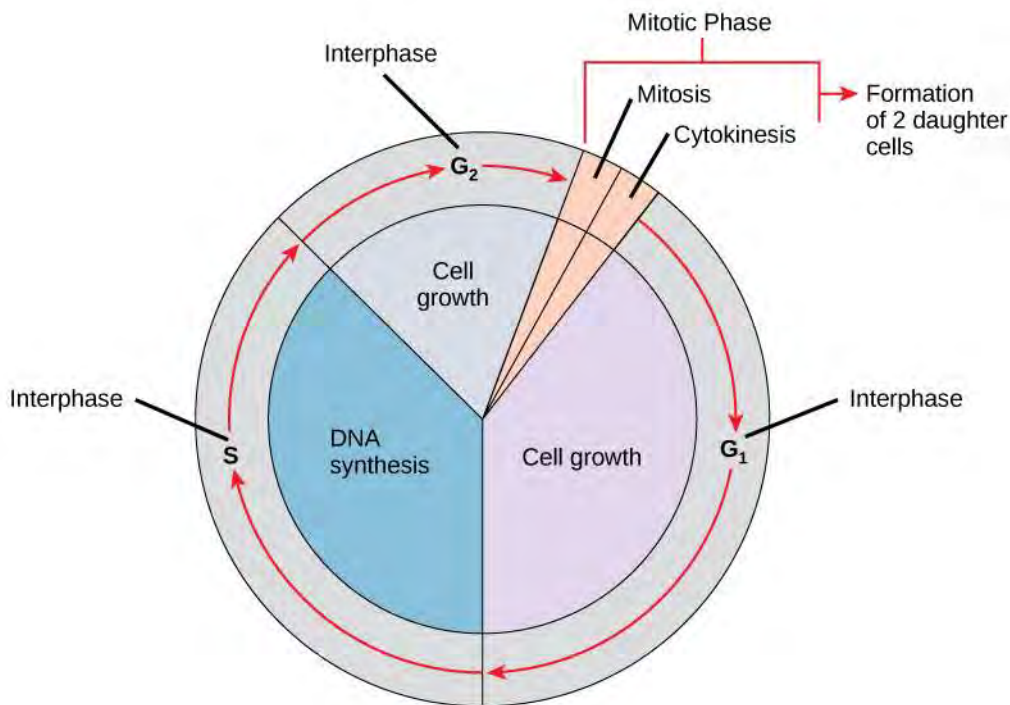
## 2.13 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

### 2.13.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο κυτταρικός κύκλος είναι μια σειρά γεγονότων που λαμβάνουν χώρα σε ένα κύτταρο καθώς αναπτύσσεται και διαιρείται. Συγκεκριμένα, από ένα κύτταρο προκύπτουν 2 θυγατρικά, στην συνέχεια από κάθε θυγατρικό κύτταρο προκύπτουν δύο νέα κύτταρα και αυτή η διαδικασία οδηγεί στην δημιουργία ενός πληθυσμού κυττάρων. Ο κύκλος διαίρεσης των περισσότερων κυττάρων αποτελείται από τέσσερις συντονισμένες διαδικασίες: ανάπτυξη κυττάρων, αντιγραφή DNA , κατανομή των διπλών χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα και κυτταρική διαίρεση.

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από 2 διακριτές φάσεις: την μεσόφαση και την μίτωση. Η μεσόφαση παρεμβάλλεται από δύο διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις και καταλαμβάνει το 90%-95% της ζωής του κυττάρου. Κατά τη διάρκεια αυτής, τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και κατανέμονται σε όλο τον πυρήνα, οπότε ο πυρήνας φαίνεται μορφολογικά ομοιόμορφος. Σε μοριακό επίπεδο, ωστόσο, η μεσόφαση είναι ο χρόνος κατά τον οποίο τόσο η κυτταρική ανάπτυξη όσο και η αντιγραφή του DNA συμβαίνουν με εύρυθμο τρόπο κατά την προετοιμασία για κυτταρική διαίρεση. Η μίτωση (πυρηνική διαίρεση) είναι το πιο δραματικό στάδιο του κυτταρικού κύκλου, που αντιστοιχεί στον διαχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων και συνήθως τελειώνει με την κυτταρική διαίρεση (κυτταροκίνηση).

Ο χρονισμός της σύνθεσης του DNA διαιρεί έτσι τον κύκλο των ευκαρυωτικών κυττάρων σε τέσσερις διακριτές φάσεις [Εικόνα 2.4]. Η φάση M του κύκλου αντιστοιχεί στη μίτωση, η οποία συνήθως ακολουθείται από κυτταροκίνηση . Αυτή η φάση ακολουθείται από τη φάση G 1, που αντιστοιχεί στο διάστημα μεταξύ της μίτωσης και της έναρξης της αντιγραφής του DNA. Κατά τη διάρκεια του G1, το κύτταρο είναι μεταβολικά ενεργό, γίνεται η βιοσύνθεση mRNA, tRNA, ριβοσωμάτων και πρωτεϊνών (δομικών και λειτουργικών) και αναπτύσσεται συνεχώς αλλά δεν αντιγράφει το DNA του. Το G1 ακολουθείται από τη φάση S, που είναι η μικρότερη σε διάρκεια, κατά την οποία λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA. Επίσης, αντιγράφει μια δομή οργάνωσης μικροσωληνίσκων που ονομάζεται κεντρόσωμα. Τα κεντροσώματα βοηθούν στο διαχωρισμό του DNA κατά τη φάση M. Την ολοκλήρωση της σύνθεσης του DNA ακολουθεί η φάση G2, κατά την οποία η κυτταρική ανάπτυξη συνεχίζεται και οι πρωτεΐνες συντίθενται ως προετοιμασία για μίτωση. Επίσης, διαιρούνται οι χλωροπλάστες , τα μιτοχόνδρια και το κεντροσωματίδιο. Επιπλέον τα κύτταρα μπορούν να εισέλθουν σε μία φάση γνωστή ως G0, κατά την οποία το κύτταρο παραμένει αδρανές, παύει δηλαδή να διαιρείται, ή προορίζεται για απόπτωση. Η διάρκεια αυτών των φάσεων του κυτταρικού κύκλου ποικίλλει σημαντικά σε διαφορετικά είδη κυττάρων.



Εικόνα 2.4 Αναπαράσταση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου (OpenStax, 2013).

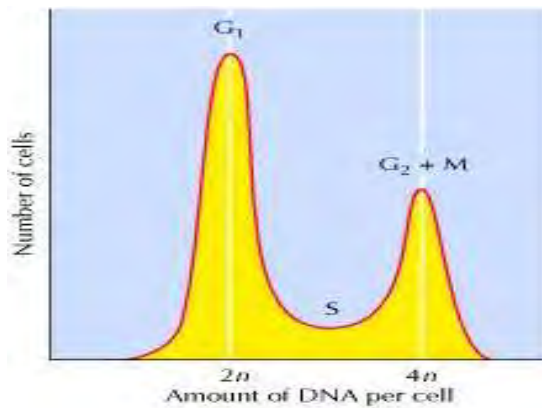
### 2.13.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry - FC) είναι μια αυτοματοποιημένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση και μετέπειτα ανάλυση πολλαπλών φυσικών χαρακτηριστικών μικροσωματιδίων (κυρίως κυττάρων) καθώς αυτά διέρχονται μέσα από μία δέσμη φωτός (laser). Μία από τις βασικές ιδιότητες της FC είναι η ικανότητά της να μετράει τις ιδιότητες των μεμονωμένων σωματιδίων.

Πιο συγκεκριμένα, κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 ρέει συνεχώς σε ένα ισότονο υγρό και το δείγμα βρίσκεται σε πολύ χαμηλό ρεύμα ροής, έτσι ώστε τα κύτταρα να περνούν ένα-ένα διαμέσου της δέσμης λέιζερ. Το σωματίδιο σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμπουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Το φως συλλέγεται από συγκεκριμένους ανιχνευτές πρόσθιου σκεδασμού (FS), όπου σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου, ή πλάγιου σκεδασμού (SS), όπου σχετίζεται με την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου. Όταν το φως χτυπά έναν φωτοανιχνευτή δημιουργείται ρεύμα μερικών mA (microampere), τα οποία ύστερα από μία σειρά ενισχύσεων, αναπαραστούν γραφικά τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας.

Η προσέγγιση για την ανάλυση της κατάστασης του κυτταρικού κύκλου είναι η μέτρηση της περιεκτικότητας σε κυτταρικό DNA σε ένα μόνο χρονικό σημείο. Αυτό αποκαλύπτει ένα στιγμιότυπο της κατάστασης του κυτταρικού κύκλου μεταξύ 3 διακριτών ομάδων (δηλαδή, φάση G0/G1 (2n), S (2n~4n) και G2/M (4n), αντίστοιχα).

Στην εικόνα [] απεικονίζονται οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου στις οποίες βρίσκεται ένας ασύγχρονος πληθυσμός. Η πρώτη κορυφή αφορά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, στην οποία δεν έχει γίνει διπλασιασμός του DNA, στη συνέχεια ακολουθεί η φάση S και η επόμενη μικρότερη κορυφή αφορά κύτταρα που βρίσκονται στη G2 φάση όπου έχει διπλασιαστεί το DNA.



Εικόνα 2.5. Αναπαράσταση γραφήματος που προκύπτει από την ένταση φθορισμού (ποσότητα DNA) και την ποσότητα κυττάρων. (Cooper & Hausman, 2007).

Η ανάλυση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου σε έναν λογαριθμικά αυξανόμενος κυτταρικό πληθυσμό βασίζεται στην ιδιότητα ορισμένων χρωστικών, όπως το ιωδιούχο προπίδιο (PI), το οποίο είναι μια πυρηνική και χρωμοσωμική αντιχρώση με κόκκινο φθορισμό και χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα. Η συγκεκριμένη ουσία διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και προσδένεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA χωρίς να παρουσιάζει κάποια εκλεκτικότητα. Δεδομένου ότι το ιωδιούχο προπίδιο δεν είναι διαπερατό στα ζωντανά κύτταρα, χρησιμοποιείται επίσης συνήθως για την ανίχνευση νεκρών κυττάρων σε έναν πληθυσμό. Μόλις δεσμευτεί η βαφή, ο φθορισμός της ενισχύεται 20 έως 30 φορές, το μέγιστο διέγερσης φθορισμού μετατοπίζεται ~30-40 nm στο κόκκινο και η μέγιστη εκπομπή φθορισμού μετατοπίζεται ~15 nm στο μπλε, με αποτέλεσμα ένα μέγιστο διέγερσης στα 535 nm και μέγιστη εκπομπή φθορισμού στα 617 nm. Η ένταση φθορισμού των χρωματισμένων κυττάρων συσχετίζεται με την ποσότητα του DNA που περιέχουν.

### 2.13.3 ΜΕΘΟΔΟΣ

Στο παρόν πείραμα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου της καρκινικής κυτταρικής σειράς PANC-1, αναλύοντας την ποσότητα DNA που περιείχαν τα κύτταρα για τις διάφορες χρονικές στιγμές του κυτταρικού κύκλου, ύστερα από την χορήγηση φαρμάκου σε αυτά. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

#### 1<sup>η</sup> Μέρα:

[Ανανέωση θρεπτικού μέσου και έλεγχος κυττάρων.](#)

Επίσης το συγκεκριμένο πείραμα ξεκινάει με τον έλεγχο και την ανανέωση των κυττάρων, όπως πραγματοποιήθηκε και στο πείραμα [2.6].

#### 2<sup>η</sup> Μέρα:

## Ανακαλλιέργεια κυττάρων και στρώσιμο των διαφορετικές φλάσκες.

Τα κύτταρα, ύστερα από την ανάπτυξή τους στην φλάσκα είναι απαραίτητο να χωριστούν σε 8 φλάσκες, έτσι ώστε να διεξαχθούν κατάλληλες μέθοδοι για την στόχευση και διαφορετικών χρονικών στιγμών του κυτταρικού κύκλου και σύγκρισή με τα κύτταρα ελέγχου. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Έλεγχος των κυττάρων και αποκόλληση τους από την φλάσκα καλλιέργειας, όπως στο πείραμα [2.6]
  - Συλλογή εναιωρήματος κυττάρων με το θρεπτικό μέσο. Έπειτα αφήνεται κατάλληλη ποσότητα στην φλάσκα με σκοπό την συνέχιση της ανάπτυξης των κυττάρων.
  - Το υπόλοιπο εναιώρημα συλλέγεται σε σωληνάριο των 10ml και ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση στο vortex, ώστε να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα και για την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στο δείγμα.
  - Ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων με την διαδικασία που περιγράφηκε στο [2.7].
  - Γίνεται υπολογισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων και υπολογίζεται η ποσότητα των κυττάρων που χρειάζονται, ώστε κάθε φλάσκα να έχει τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων, σύμφωνα με την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, έτσι ώστε να πετύχουμε την βέλτιστη ανάπτυξή τους (ανά φλάσκα 500.000 κύτταρα). Συνολικά χρειάζονται τόσα κύτταρα έτσι ώστε να έχουμε:
1. Κύτταρα που θα επωάσουν σε συγκεκριμένη συγκέντρωση φαρμάκου για τις χρονικές στιγμές που έχουμε ορίσει ώστε να αντιστοιχούν στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.
  2. Κύτταρα ελέγχου που θα επωάσουν σε θρεπτικό μέσο RPMI 5% για τις χρονικές στιγμές που έχουμε ορίσει ώστε να αντιστοιχούν στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, ώστε να υπάρχει σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης τους με σχέση τα κύτταρα που επωάστηκαν με μία ουσία.
  3. Κύτταρα ελέγχου που αντιστοιχούν στην χρονική στιγμή 0, χωρίς την προσθήκη φαρμάκων, τα οποία μονιμοποιούνται την μέρα που γίνεται η χορήγηση του φαρμάκου, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση της ουσίας στα κύτταρα από την πρώτη μέρα έως την τελευταία.
- Αφού συλλεχθεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων σε ένα falcon 10ml, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1400 για 7 λεπτά.
  - Απορρίπτεται το εναιώρημα και το ίζημα επαναδιαλύεται σε επακριβή ποσότητα RPMI, ώστε σε κάθε 1ml να υπάρχει ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων.
  - Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση vortex, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στο δείγμα.
  - Τέλος, προστίθεται σε κάθε φλάσκα 1ml από το δείγμα και αφήνονται 48 ώρες για να αναπτυχθούν.

### 3<sup>η</sup> Μέρα:

#### Συγχρονισμός των κυττάρων στην G1 φάση.

Ύστερα από 24 ώρες απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από κάθε φλάσκα, ξεπλένοντας 2 φορές με NaCl με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του θρεπτικού. Στην συνέχεια, προστίθεται plain



RPMI, δηλαδή θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, έτσι ώστε να συγχρονιστούν τα κύτταρα στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Τέλος τα κύτταρα αφήνονται για 24ωρη επώαση.

#### 5<sup>η</sup> Μέρα:

##### Προσθήκη υπό μελέτη ουσιών.

Τα κύτταρα ύστερα από την 48ωρη επώαση με θρεπτικό μέσο απουσία ορού, πρέπει να επωαστούν με το φάρμακο. Το φάρμακο που χρησιμοποιείται βρίσκεται σε 10μΜ και προστίθενται σε RPMI 5%, με σκοπό την συνέχιση του κυτταρικού κύκλου. Τα βήματα που ακολουθούμε για αυτή την διαδικασία είναι τα εξής:

- Παρακολούθηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί η σωστή ανάπτυξη τους.
- Αποβολή θρεπτικού υλικού από κάθε φλάσκα αποχύνοντας το.
- Προσθήκη 2ml φαρμάκου στις φλάσκες, και 2ml θρεπτικό μέσο RPMI χωρίς την παρουσία φαρμάκου στις φλάσκες με τα κύτταρα ελέγχου.
- Αφήνουμε στο κλίβανο για 24, 28, 32 ώρες για τα διάφορα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

Τέλος, τα κύτταρα ελέγχου που αντιστοιχούν στην χρονική στιγμή 0 με την εξής διαδικασία:

- Συλλογή του εναιωρήματος σε falcon 10ml.
- Ακολουθεί η διαδικασία της θρυψινοποίησης του δείγματος, με σκοπό την συλλογή των κυττάρων από την φλάσκα, όπως περιγράφηκε στο [2.7]
- Κατά το πέρας την θρυψινοποίησης ξεπλένω με πιπέτα πολύ καλά τα τοιχώματα της φλάσκας, έτσι ώστε να μειώσω τις απώλειες κυττάρων.
- Συλλέγω το εναιώρημα στο falcon.
- Για την περαιτέρω επίτευξη της συλλογής όσο το δυνατόν περισσότερων κυττάρων, ξεπλένω την φλάσκα με 2ml διάλυμα NaCl, περιχύνοντας το καλά στα τοιχώματα και συλλογή του στο falcon. Επαναλαμβάνω αυτό το βήμα 1 φορά ακόμα.
- Ύστερα από την συλλογή των κυττάρων στο falcon, ελέγχω στο μικροσκόπιο την φλάσκα για τυχόν απώλειες.
- Στην συνέχεια, με μία σύριγγα 10ml και βελόνα 21g x 1<sup>1/2</sup> προσροφώ και εγχέω το εναιώρημα μέσα στον falcon αρκετές φορές, έτσι ώστε να διασπαστούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων, διότι τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται σε μονήρη κατάσταση για να περάσουν μέσω της (βελόνα)?
- Στην συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 1400 στροφές ανά λεπτό για 7 λεπτά, με σκοπό να συλλέξω όλα τα κύτταρα και να απομακρύνω τυχόν υπολείμματα ορού και πρωτεϊνών.
- Αποβάλω το υπερκείμενο και διαλύω το ίζημα σε 5ml NaCl.
- Επαναλαμβάνω την φυγοκέντρηση.
- Αποβάλω ξανά το υπερκείμενο και αναδεύω με vortex καλά με σκοπό να διαλυθεί το ίζημα και να μην υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων.
- Στην συνέχεια, προσθέτω 1,5ml αιθανόλης 70% στάγδην υπό στροβιλισμό (vortexing). Τα κύτταρα, ύστερα από την μονιμοποίηση μπορούν να παραμείνουν στο διάλειμμα έως και 2 εβδομάδες.

#### 6<sup>η</sup> Μέρα:

### Μονιμοποίηση των κυττάρων.

Ακολουθεί μονιμοποίηση των υπόλοιπων δειγμάτων στα κατάλληλα time points (24, 28, 32 ώρες), με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

Μέσα στο διάστημα των 2 εβδομάδων, που διαρκεί η διαδικασία της μονιμοποίησης, για να περάσει το δείγμα από τον αναλυτή είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσουμε ένα διάλυμα υποτονικής λύσης. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Πλύση των κυττάρων 2x με διάλειμμα NaCl και φυγοκέντρηση στις 1400 στροφές ανά λεπτό για 7 λεπτά, με σκοπό την απομάκρυνση της αιθανόλης.
- Στην συνέχεια, ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων σε κάθε δείγμα με την μέθοδο [2.7].
- Προσθέτουμε pi + rnase (dnase free) + sodium citrate buffer. Η ποσότητα που προσθέτουμε υπολογίζεται σύμφωνα με την αναλογία στα  $1 \times 10^6$  κύτταρα 300μl από το μείγμα.

Τέλος, επωάζουμε το δείγμα για 20 λεπτά τουλάχιστον έως 2 ώρες πριν ξεκινήσει η ανάλυση των δειγμάτων.

### 2.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

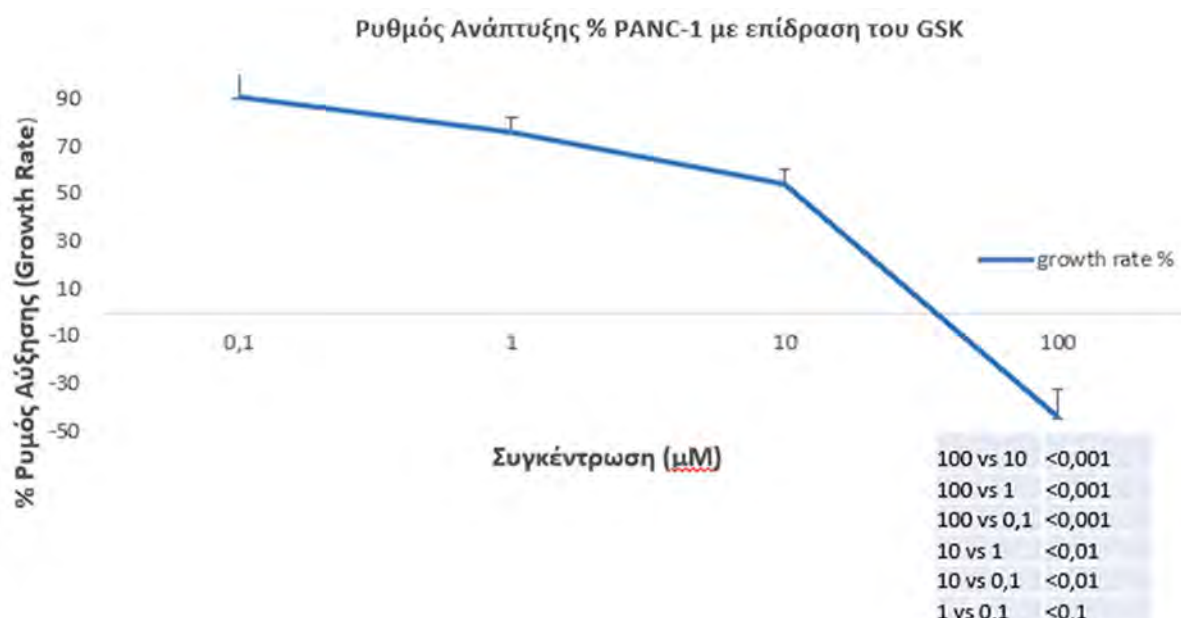
Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν μέσω του excel Microsoft 2010 και συγκεκριμένα με τη δοκιμασία t-test. Για κάθε συγκέντρωση φαρμάκου στα διάφορα χρονικά διαστήματα έλαβε χώρα στατιστική σύγκριση τους με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου. Για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντικό το αποτέλεσμα έπρεπε το p-value να είναι μικρότερο της τάξης του 0,05 ( $p < 0,05$ ).

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB

Με την μέθοδο κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB μελετήθηκε η αντιπολλαπλασιαστική δράση του υπό μελέτη φαρμάκου GSK2334470 ((3S,6R)-1-[6-(3-αμινο-1H-ινδαζολ-6-υλ)-2-(μεθυλαμινο)-4-πυριμιδινυλ]-N-κυκλοεξυλ-6-μεθυλ-3-πιπεριдиноκαρβοξαμίδιο) στην παγκρεατική καρκινική κυτταρική σειρά PANC-1. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δράση της ουσίας στις συγκεντρώσεις 100, 10, 1 και 0.1  $\mu\text{M}$ . Από τα αποτελέσματα αυτής την μεθόδου υπολογίστηκε το GI50, TGI και LC50 [Πίνακας 3.1].

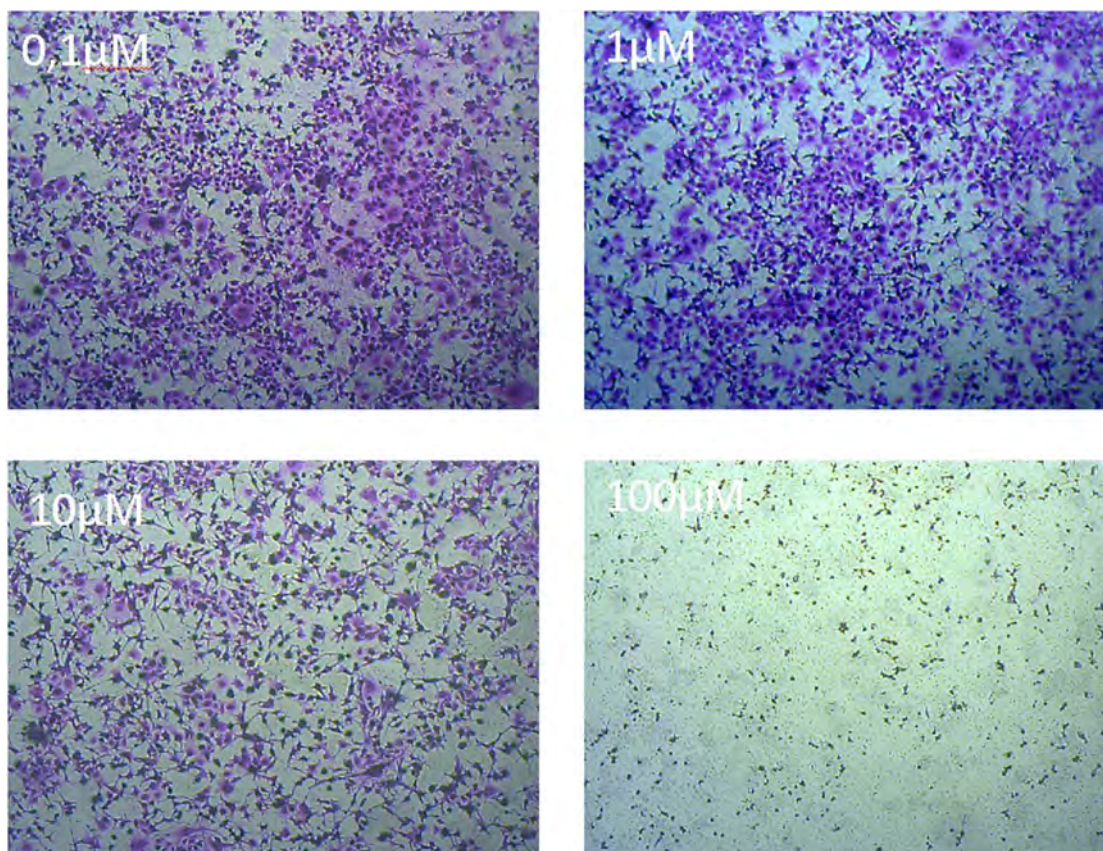
Στο παρακάτω γράφημα [Γράφημα 3.1] φαίνεται η επίδραση του φαρμάκου για κάθε διαφορετική συγκέντρωση που εξετάστηκε, ως προς το ρυθμό αύξησης των υπό μελέτη κυττάρων. Το γράφημα αντιπροσωπεύει τις μέσες τιμές των αποτελεσμάτων από το in vitro πείραμα κυτταροτοξικότητας.



Γράφημα 3.1. Ρυθμός αύξησης των PANC-1 παρουσία GSK2334470 σε σχέση με το control.

Πιο αναλυτικά, για την υπό μελέτη ουσία, όπως φαίνεται και στο γράφημα 3.1, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων φαίνεται να παρουσιάζει διαβαθμίσεις, για τις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, στην συγκέντρωση των 100 $\mu\text{M}$  παρατηρείται να έχει αρνητική τιμή (-43,97%), στην συγκέντρωση 10 $\mu\text{M}$  παρατηρείται μια σημαντική διαφορά σε σχέση με τη συγκέντρωση 100 $\mu\text{M}$  (54,54%). Στην συγκέντρωση 1 $\mu\text{M}$  ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων για το GSK2334470 παρατηρείται μια μικρή αύξηση σε σχέση με την προηγούμενη συγκέντρωση (76,09%). Τέλος, στην χαμηλότερη συγκέντρωση, 0.1 $\mu\text{M}$ , παρατηρείται πολύ μικρή αύξηση (90,7%). Στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 3.1] παρατίθενται ενδεικτικές φωτογραφίες τραβηγμένες από το ανάστροφο μικροσκόπιο, έπειτα από χρώση SRB, τόσο του πληθυσμού ελέγχου όσο και των PANC-1 υπό την επίδραση των

διάφορων συγκεντρώσεων του GSK2334470 (100, 10, 1, 0.1  $\mu\text{M}$ ). Οι συγκεντρώσεις παρουσιάζουν μεταξύ τους στατιστική σημαντικότητα ( $p < 0.05$ ).



Εικόνα 3.1 Φωτογραφίες από μικροσκόπιο κυττάρων PANC-1 ύστερα από επώαση 48ωρών με GSK2334470 αυξανόμενης συγκέντρωσης.

Από τις παραπάνω τιμές αύξησης υπολογίσθηκαν οι παρακάτω παράμετροι (GI50, TGI, LC50) και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 3.1].

Πίνακας 3.1 Κυτταροτοξικής δράσης GSK2334470 στην παγκρεατική καρκινική σειρά PANC-1.

PANC-1	GSK2334470( $\mu\text{M}$ )
GI50	14,15
TGI	59,83
LC50	>100

Σύμφωνα με τον πίνακα [Πίνακας 3.1], όσο αφορά την τιμή GI50, η οποία αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας στην οποία μειώνεται κατά 50% ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου βρέθηκε να είναι ίση με 14,15 $\mu\text{M}$ . Επιπλέον, αναφορικά με την τιμή TGI, η οποία αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας στην οποία προκαλείται πλήρης αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή ο ρυθμός ανάπτυξης να

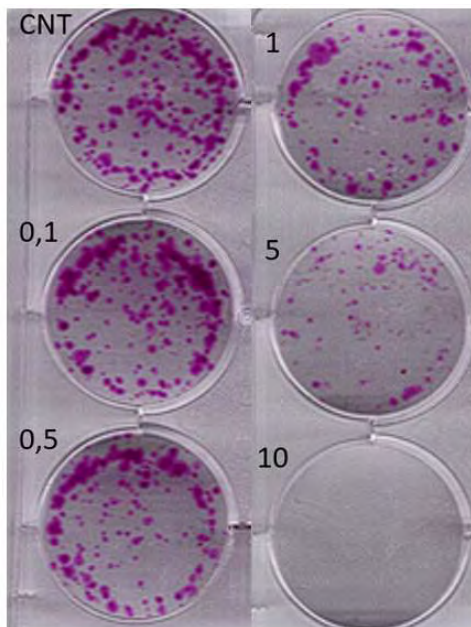
είναι ίσο με το 0, βρέθηκε να είναι ίση με 59,83 $\mu$ M. Τέλος, όσο αφορά την τιμή LC50, η οποία αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της ουσίας στην οποία μειώνεται κατά 50% ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων σε σχέση με την ποσότητα των κυττάρων πριν την χορήγηση του φαρμάκου, βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη από 100 $\mu$ M. Οι τιμές παρουσιάζουν μεταξύ τους στατιστική σημαντικότητα ( $p < 0.05$ ).

### 3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΛΩΝΟΥ (CLONOGENIC ASSAY)

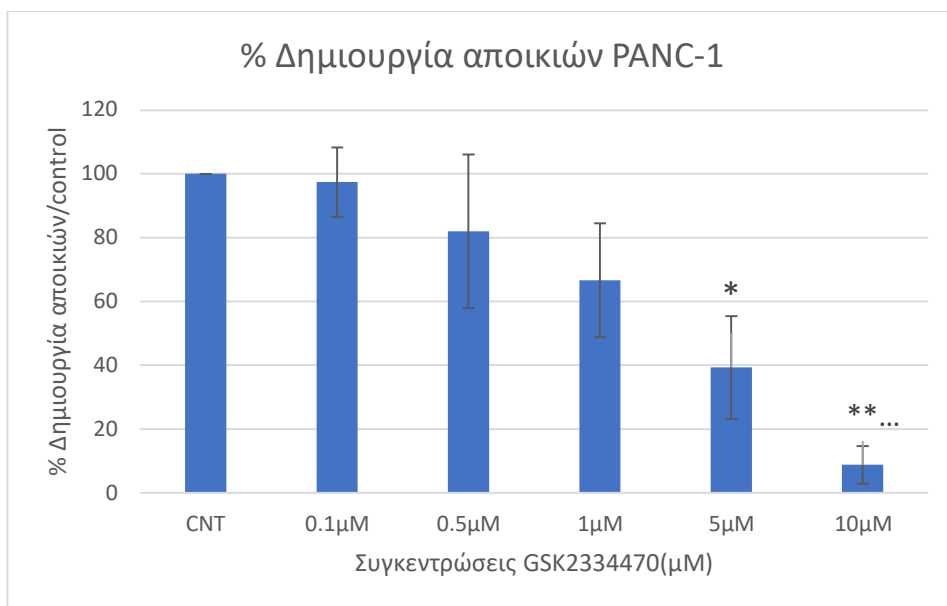
Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η ουσία GSK2334470, όσο αφορά την ικανότητά της να αναστέλλει την δημιουργία κλώνων των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων PANC-1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Όπως περιγράφηκε στην ενότητα [2.11], μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 10, 5, 1, 0.5, 0.1 $\mu$ M και συγκρίθηκαν με τα κύτταρα ελέγχου (Control) στα οποία δεν χορηγήθηκε ουσία.

Παρατηρήθηκε, λοιπόν, ότι στην συγκέντρωση 0.1 $\mu$ M δημιουργήθηκαν αποικίες σε ποσότητα 97.4% σε σύγκριση με το control. Στην συγκέντρωση 0.5 $\mu$ M δημιουργήθηκαν αποικίες σε ποσότητα 82% σε σύγκριση με το control, ενώ στην συγκέντρωση 1 $\mu$ M αντιστοιχεί το 66.7%. Τέλος, στις συγκεντρώσεις 5 $\mu$ M και 10 $\mu$ M το ποσοστό δημιουργίας αποικιών ισούται με 39,3% και 8.8%, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο αυτή παρουσιάζονται στην εικόνα [Εικόνα 3.2] και στο γράφημα [Γράφημα 3.2]. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αποτελούν τον μέσο όρο αυτών.

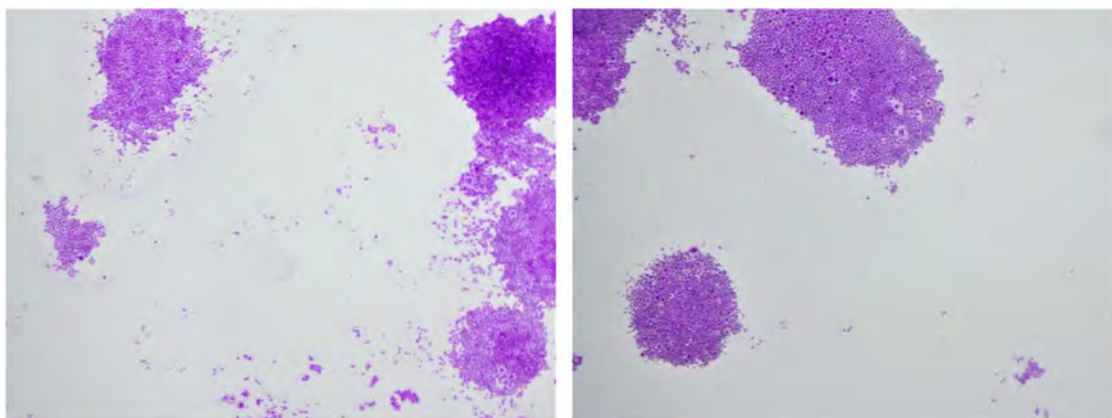


Εικόνα 3.2 Φωτογραφίες κλώνων PANC-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων GSK2334470, από στερεοσκόπιο.



Γράφημα 3.2 Σχηματισμός κλώνων των PANC-1 υπό επίδραση με GSK2334470 σε σχέση με το control.

Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο παραπάνω γράφημα [Γράφημα 3.2] φαίνεται να συνάδουν με τις φωτογραφίες των αποικιών των κυττάρων στις διάφορες συγκεντρώσεις της GSK2334470. Παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου, τόσο μειώνεται ο αριθμός των αποικιών. Ενώ στο δείγμα ελέγχου έχουμε τον μέγιστο αριθμό αποικιών. Τέλος, στην εικόνα [3.3] παρατηρούνται μεμονωμένες αποικίες, 14 μέρες ύστερα από την έναρξη του πειράματος.



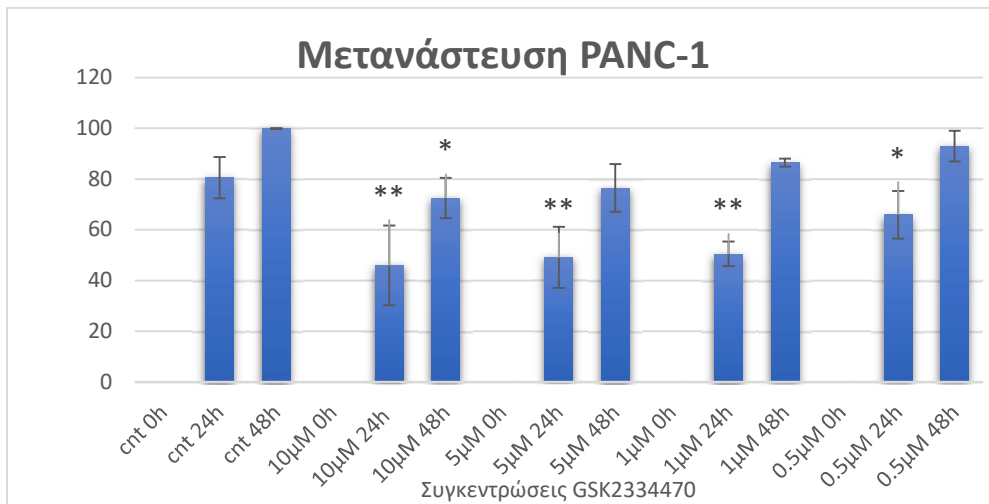
Εικόνα 3.3 Φωτογραφία αποικιών κυττάρων. Κάθε αποικία πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 50 κύτταρα

### 3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (WOUND HEALING ASSAY)

Η μέθοδος ελέγχου επούλωσης πληγών πραγματοποιήθηκε για την μελέτη του ρυθμού μετανάστευσης των κυττάρων μιας τεχνητής πληγής, με στόχο να καλύψουν το κενό. Στο παρακάτω γράφημα [Γράφημα 3.2] παρουσιάζεται το % ποσοστό μετανάστευσης των κυττάρων στα χρονικά διαστήματα των 24 και 48 ωρών ύστερα από την δημιουργία πληγών. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν τα δείγμα απουσία ή παρουσία GSK2334470 στις συγκεντρώσεις 10, 5, 1, 0.1μΜ. Η μετανάστευση των κυττάρων σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με την λήψη

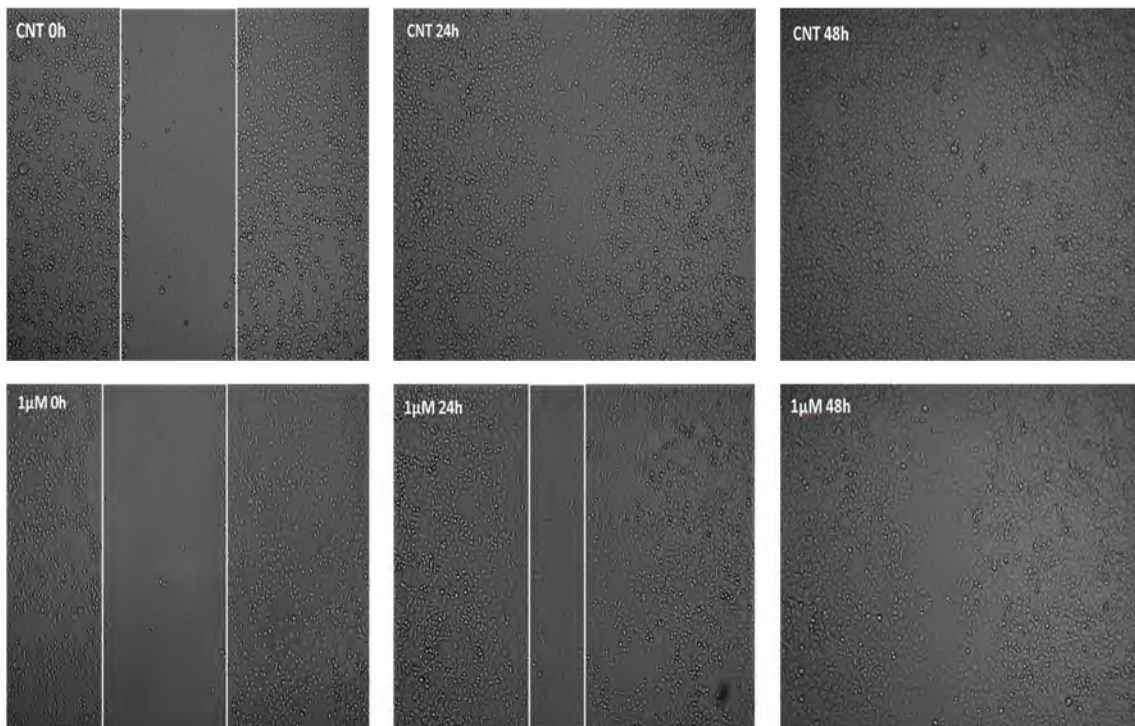
φωτογραφιών κάθε δείγματος και μέτρηση του εμβαδού της πληγής την χρονική στιγμή 0, 24, 48 ωρών και συγκρίθηκαν με αυτά της χρονικής στιγμής 0 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

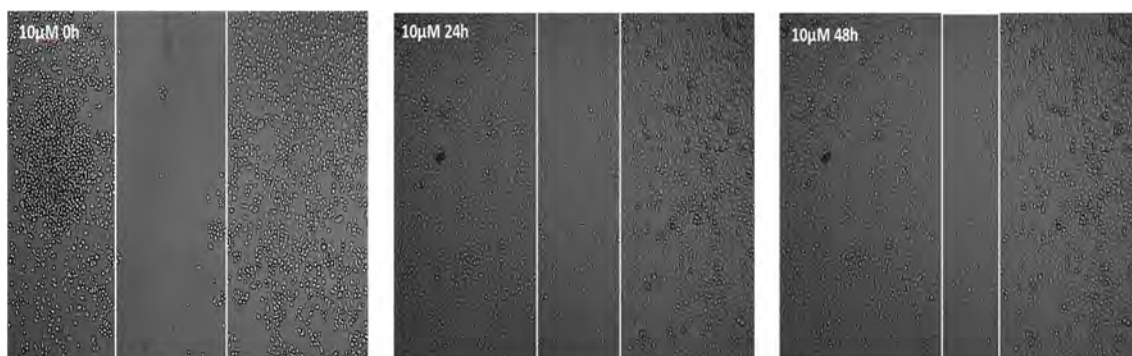
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν και απεικονίζονται στο παρακάτω γράφημα είναι τα εξής: για το δείγμα ελέγχου παρατηρήθηκε ότι στις 24h η πληγή είχε επουλωθεί κατά 80.5% ενώ στις 48h είχε επουλωθεί πλήρως. Για την συγκέντρωση 10μM παρατηρήθηκε ότι στις 24h η πληγή είχε επουλωθεί κατά 46% ενώ στις 48h κατά 72.6%. Για τις συγκεντρώσεις 5μM, 1μM και 0.5μM παρατηρήθηκε πως η πληγή είχε επουλωθεί κατά 49.2%, 50.6% και 66% αντίστοιχα, ενώ στις 48h κατά 76.5%, 86.5% και 93% αντίστοιχα.



Γράφημα 2. % μετανάστευση κυττάρων σε σχέση με τη συγκέντρωση της GSK2334470 και το πέρας του χρόνου στην κυτταρική σειρά PANC-1 (30.000cells/well).

Στην συνέχεια, παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες η οποίες λήφθηκαν με την χρήση του ανάστροφου μικροσκοπίου [Εικόνα 3.].

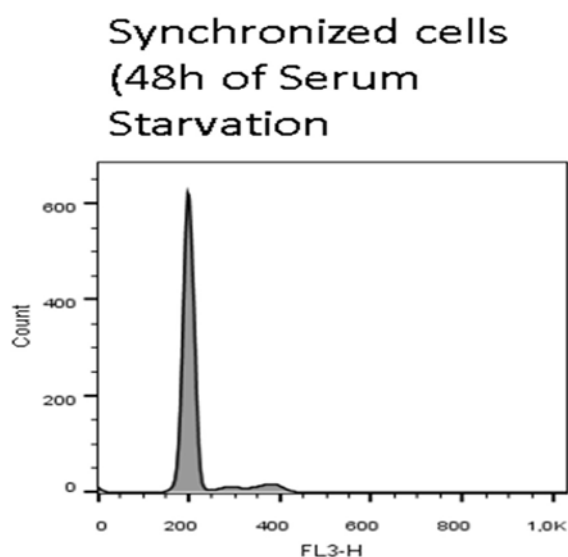




Εικόνα 3.4 Απεικόνιση της μετανάστευσης των κυττάρων PANC-1 έπειτα από χορήγηση GSK2334470 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έπειτα από 24 και 48 ώρες έκθεσης.

### 3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Η μέθοδος η οποία προαναφέρθηκε στην ενότητα [2.13] πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον προσδιορισμό την φάσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία συγχρονίζονται τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα PANC-1, ύστερα από την χορήγηση GSK2334470 συγκέντρωσης 10µΜ. Στην εικόνα παρατηρείται τα κύτταρα ελέγχου την στιγμή 0 ύστερα από 48ωρη νηστεία από ορό συγχρονίζονται στην G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου.

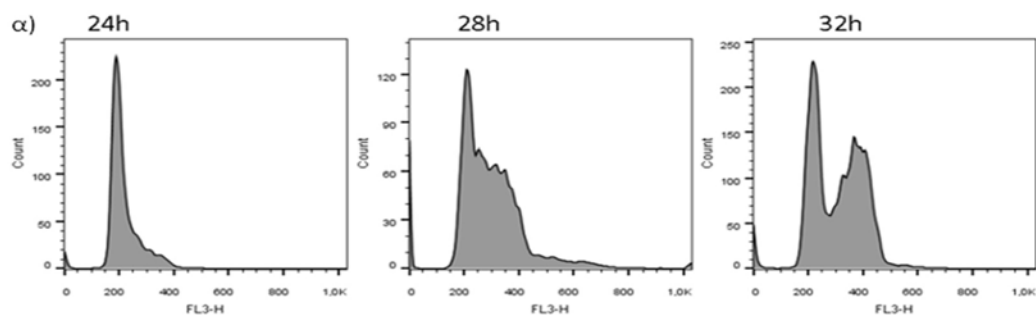


Εικόνα 3.5 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας κυττάρων ελέγχου την στιγμή 0, ύστερα από 48ωρη ασιτία από ορό.

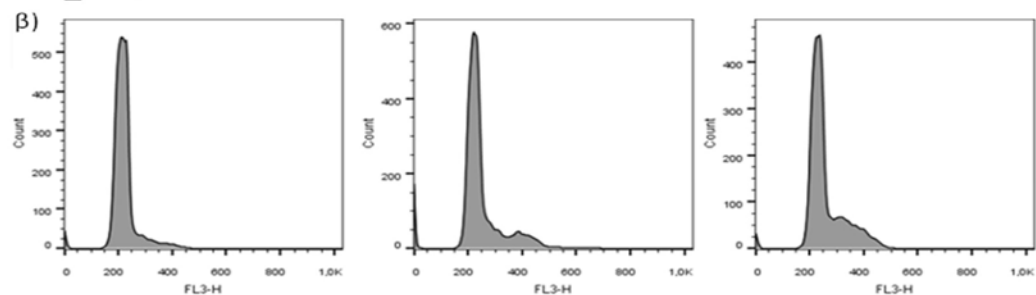
Στην εικόνα [2] αναπαρίστανται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής στα κύτταρα ελέγχου (control) και των κυττάρων παρουσία φαρμάκου, τις χρονικές στιγμές 24, 28, 32 ώρες, ύστερα από 48 επώαση απουσία ορού. Παρατηρείται, ότι τα κύτταρα ελέγχου [2.α)] την στιγμή 24ώρων βρίσκονται στην G0/G1 φάση, ενώ μέχρι της 32 ώρες έχουν κατανεμηθεί και στις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (S, G2/M). Σε αντίθεση, τα κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό παρουσία φαρμάκου [2.β)] παρατηρείται ότι βρίσκονται και τις 3 χρονικές στιγμές στην G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή έχουν υποστεί G1 arrest. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι το φάρμακο είτε δεν επιτρέπει στα κύτταρα την μετάβασή τους από την G0/G1 στις επόμενες φάσεις του κυτταρικού κύκλου είτε θανατώνει τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στις S και G1/M φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Και οι δύο εκδοχές έχουν ως αποτέλεσμα την παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού άρα και κατ' επέκταση της καρκινογένεσης.



### Untreated



### GSK\_10uM



Εικόνα 3.6 Αποτελέσματα κυτταρομετρία ροής των κυττάρων PANC-1 ελέγχου (control) και των κυττάρων παρουσία GSK2334470, στις χρονικές στιγμές 24, 28, 32 ώρες.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί καίριο ζήτημα της επιστημονικής κοινότητας, καθώς η εμφάνισή του όλο αυξάνεται και των υψηλών ποσοστών θνησιμότητας του, λόγω την μη έγκαιρης διάγνωσής του και την έντονης μεταστατική του ικανότητα. Επιπλέον, αρκετά χαμηλά θεωρούνται τα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης, τα οποία είναι της τάξεως του 5% ενώ η διάμεση επιβίωση για ασθενείς με μη θεραπευμένο, τοπικά προχωρημένο, ανεγχείρητο καρκίνο του παγκρέατος είναι 8 έως 12 μήνες και μόνο 3 έως 6 μήνες για εκείνους με μεταστατική νόσο κατά την παρουσίαση (Portal et al., 2015).

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η *in vitro* δράση της ινδαζόλης GSK2334470 η οποία αποτελεί έναν αναστολέα της PDK-1, στην παγκρεατική καρκινική σειρά PANC-1. Τα μονοπάτια που ενεργοποιεί η PDK-1 είναι από τα πιο συχνά μεταβαλλόμενα μονοπάτια στον ανθρώπινο καρκίνο και έχουν κρίσιμο ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη του όγκου (Lien et al., 2017). (Lien et al., 2017). (Lien et al., 2017). (Lien et al., 2017). (Lien et al., 2017). Για την επιλογή της εν λόγω ουσίας, μελετήθηκε η κυτταροτοξική της δράση στην καρκινική κυτταρική σειρά PANC-1. Παρατηρήθηκε ότι η κυτταροτοξική δράση της GSK2334470 είναι δόσοεξαρτώμενη. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η GSK2334470 σε συγκέντρωση 14,15μM προκαλεί 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά συνέλαβαν στην επιλογή της GSK2334470 για της πραγματοποίηση της πτυχιακής εργασίας.

Εκτός από την κυτταροτοξική δράση, μελετήθηκε η ικανότητα μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων να επιβιώνουν και να αναπαράγονται για να σχηματίσουν αποικίες. Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται κλωνογονική δοκιμασία (Clonogenic assay), με την οποία προσομοιάζεται ένα *in vitro* πείραμα και φανερώνει τα ανθεκτικότερα καρκινικά κύτταρα, δηλαδή αυτά που μπορούν να εμφανίσουν ανοχή σε θεραπείες, να οδηγήσουν σε δημιουργία δευτερογενών όγκων καθώς και την επανεμφάνιση του καρκίνου ύστερα από φαρμακευτική αγωγή ή χειρουργική αφαίρεση. Αποτέλεσμα αυτής της έρευνας έδειξε ότι η GSK2334470, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της ουσίας τόσο μεγαλύτερη ήταν η ανασταλτική της ικανότητα. Στην συνέχεια, για την μελέτη της μεταναστευτικής ικανότητας της κυτταρικής σειράς που ελέγξαμε, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ελέγχου επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay/Scratch Assay). Παρόμοια με την προηγούμενη μέθοδο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντιμεταναστευτική δράση της GSK2334470 αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση της ουσίας.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη GSK2334470 σε συγκέντρωση 10μM σε κύτταρα της καρκινικής παγκρεατικής σειράς PANC-1, στα οποία πραγματοποιήθηκε συγχρονισμός στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου για 48 ώρες, προκάλεσε παραμονή των κυττάρων στην φάση G1 (G1 arrest). Παρατηρήθηκε, λοιπόν πως η δράση της ουσίας είναι χρονοεξαρτώμενη καθώς όσο μεγαλύτερο το χρονικό διάστημα το οποίο επωαζόντουσαν τα κύτταρα σε αυτή τόσο μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων παρέμενε στην G1 φάση και κατ' επέκταση ο κυτταρικός θάνατος. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς υποδηλώνουν ότι η GSK2334470 δρα στην φάση S ή/και στην φάση G2, καθώς τα κύτταρα που βρίσκονται στην G1 παραμένουν ζωντανά μη μπορώντας να εισέλθουν στις επόμενες φάσεις. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό εάν τα κύτταρα τα οποία που βρίσκονται στην G2 πεθαίνουν ή μπαίνουν εκ νέου στην G1.

Συμπερασματικά, η GSK2334470 αξιολογήθηκε ως μία ουσία με αξιοσημείωτη αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι των καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων της σειράς PANC-1. Συνεπώς, αποτελούν ελκυστικοί στόχοι για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων που θα μπορούσαν να δοκιμασθούν ακόμα και για το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Ωστόσο, ο τρόπος με το οποίο η GSK2334470 χρήζει περισσότερης διερεύνησης.

Συνοψίζοντας, η παρούσα πτυχιακή εργασία μπορεί να αποτελέσει βάση για μελλοντικές πιο λεπτομερείς μελέτες, οι οποίες είναι πιθανό να οδηγήσουν στην κατανόηση των μηχανισμών της αντιπολλαπλασιαστικής και αντιμεταναστευτικής δράσης της. Έτσι, η GSK2334470 θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ικανό αντικαρκινικό παράγοντα με στόχο επιθετικούς τύπους καρκίνου με υψηλή θνησιμότητα, όπως είναι και ο παγκρεατικός καρκίνος, ανοίγοντας το δρόμο για καινοτόμες και με λιγότερες παρενέργειες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

## 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A., & Bownes, M. (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): Structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Current Biology*, 7(10). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00336-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00336-8)
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53(4). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90571-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90571-5)
- Atkinson, M. A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I., & Kaestner, K. H. (2020). Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. In *Diabetologia* (Vol. 63, Issue 10). <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05203-7>
- Bashyam, M. D., Animireddy, S., Bala, P., Naz, A., & George, S. A. (2019). The Yin and Yang of cancer genes. In *Gene* (Vol. 704). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.025>
- Beger, H. G., Warshaw, A. L., Büchler, M. W., Kozarek, R. A., Lerch, M. M., Neoptolemos, J. P., Shiratori, K., Whitcomb, D. C., & Rau, B. M. (2009). The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery: Second Edition. In *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781444300123>
- Ben, Q., Xu, M., Ning, X., Liu, J., Hong, S., Huang, W., Zhang, H., & Li, Z. (2011). Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Cancer*, 47(13). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.03.003>
- Ben, E. J. (2017). The Jeremiah Metzger Lecture Cancer in the Twenty-First Century: An Inside View from an Outsider. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 128.
- Biondi, R. M., Komander, D., Thomas, C. C., Lizcano, J. M., Deak, M., Alessi, D. R., & van Aalten, D. M. F. (2002). High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site. *EMBO Journal*, 21(16). <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf437>
- Bracci, P. M. (2012). Obesity and pancreatic cancer: Overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular Carcinogenesis*, 51(1). <https://doi.org/10.1002/mc.20778>
- Casalvieri, K. A., Matheson, C. J., Backos, D. S., & Reigan, P. (2017). Selective Targeting of RSK Isoforms in Cancer. In *Trends in Cancer* (Vol. 3, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.03.004>
- Chadha, R., & Meador-Woodruff, J. H. (2020). Downregulated AKT-mTOR signaling pathway proteins in dorsolateral prefrontal cortex in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 45(6). <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0614-2>
- Clancy, T. E. (2015). Surgery for Pancreatic Cancer. In *Hematology/Oncology Clinics of North America* (Vol. 29, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2015.04.001>
- Columbia University. (2016). The Pancreas and Its Functions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9).

- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition*. In *Sinauer Associates*.
- Coventry, B. J., & Henneberg, M. (2021). The Immune System and Responses to Cancer: Coordinated Evolution. *F1000Research*, 4. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6718.3>
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., & Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. In *BioMed Research International* (Vol. 2014). <https://doi.org/10.1155/2014/474905>
- Faes, S., & Dormond, O. (2015). PI3K and AKT: Unfaithful partners in cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/ijms160921138>
- Funk, C. M., & Musa, J. (2021). Proliferation Assessment by Trypan Blue Exclusion in Ewing Sarcoma. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2226). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1020-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1020-6_11)
- Gagliardi, P. A., Puliafito, A., & Primo, L. (2018). PDK1: At the crossroad of cancer signaling pathways. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 48). <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.014>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 137, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
- Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 144). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.008>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. In *Cancer Discovery* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012a). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012b). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
- Hu, H. feng, Ye, Z., Qin, Y., Xu, X. wu, Yu, X. jun, Zhuo, Q. feng, & Ji, S. rong. (2021). Mutations in key driver genes of pancreatic cancer: molecularly targeted therapies and other clinical implications. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 42, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00584-2>
- Jackson, M., Marks, L., May, G. H. W., & Wilson, J. B. (2018). The genetic basis of disease. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 62, Issue 5). <https://doi.org/10.1042/EBC20170053>
- Klein, A. P. (2021). Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 18, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00457-x>
- Lien, E. C., Dibble, C. C., & Toker, A. (2017). PI3K signaling in cancer: beyond AKT. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 45). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.007>
- Longnecker, D. (2014). Anatomy and Histology of the Pancreas (Version 1.0). *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*.

- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 24, Issue 43). <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
- Mohammed, S., van Buren, G., & Fisher, W. E. (2014). Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 20(28). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9354>
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M. F., & Alessi, D. R. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15(2). <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.022>
- Najafov, A., Sommer, E. M., Axten, J. M., DeYoung, M. P., & Alessi, D. R. (2011). Characterization of GSK2334470, a novel and highly specific inhibitor of PDK1. *Biochemical Journal*, 433(2). <https://doi.org/10.1042/BJ20101732>
- OpenStax. (2013). The Cell Cycle - Biology - OpenStax CNX. In *OpenStax, Cnx Biology*.
- Park, W., Chawla, A., & O'Reilly, E. M. (2021). Pancreatic Cancer: A Review. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 326, Issue 9). <https://doi.org/10.1001/jama.2021.13027>
- PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. (2002). Childhood Pancreatic Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*.
- Portal, A., Pernot, S., Tougeron, D., Arbaud, C., Bidault, A. T., de La Fouchardière, C., Hammel, P., Lecomte, T., Dréanic, J., Coriat, R., Bachet, J. B., Dubreuil, O., Marthey, L., Dahan, L., Tchoundjeu, B., Locher, C., Lepère, C., Bonnetain, F., & Taieb, J. (2015). Nab-paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic adenocarcinoma after Folfirinox failure: An AGEO prospective multicentre cohort. *British Journal of Cancer*, 113(7). <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.328>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1). <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Simanshu, D. K., Nissley, D. v., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. In *Cell* (Vol. 170, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>
- Terrell, E. M., & Morrison, D. K. (2019). Ras-mediated activation of the Raf family kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033746>
- Torres, C., & Grippo, P. J. (2018). Pancreatic cancer subtypes: a roadmap for precision medicine. In *Annals of Medicine* (Vol. 50, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1453168>
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 378(9791). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
- Wang, N., Fu, J., Li, Z., Jiang, N., Chen, Y., & Peng, J. (2022). The Landscape of PDK1 in Breast Cancer. *Cancers*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/cancers14030811>
- Wong, M. C. S., Jiang, J. Y., Liang, M., Fang, Y., Yeung, M. S., & Sung, J. J. Y. (2017). Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02997-2>

Yang, C., Huang, X., Liu, H., Xiao, F., Wei, J., You, L., & Qian, W. (2017). PDK1 inhibitor GSK2334470 exerts antitumor activity in multiple myeloma and forms a novel multitargeted combination with dual mTORC1/C2 inhibitor PP242. *Oncotarget*, 8(24).  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16642>

Zhao, Z. Y., & Liu, W. (2020). Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19. <https://doi.org/10.1177/1533033820962117>