



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΩΝ RSKs ΣΤΟΝ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ»**

**ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΛΙΟΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, *Επιβλέπων***

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, *Μέλος***

**ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, *Μέλος***

**ΛΑΡΙΣΑ, 2021**



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM  
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS  
« TARGETING RSKs IN PANCREATIC CANCER »**

**APOSTOLOS KOLIOS**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για την διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος Φαρμακολογίας, τόσο για την πολύτιμη βοήθεια του, όσο και για την καθοδήγηση και γνώση που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το ΠΜΣ και όλους τους καθηγητές που είχα την χαρά να παρακολουθήσω την διδασκαλία τους, ιδιαίτερα την υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος, κυρία Ασπασία Τσέζου, καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και την κυρία Βαρβάρα Τραχανά, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, που είχα την τιμή να ολοκληρώνουν την Τριμελή επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ξεχωριστή αναφορά χρήζει και η πολύτιμη βοήθεια των συναδέλφων μου στο εργαστήριο, της Ανδρομάχης Λαμπριανίδου, του Κωνσταντίνου Λαφαζάνη, της Ίριδας Παπαποστόλου, της Φανής Κουτσογιάννη και της Ελισάβετ Κορμέντζα. Επιπλέον, σημαντική υπήρξε και η συμβολή του κυρίου Ηλία Μπέγα, επιστημονικού συνεργάτη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επίσης, θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη αναφορά στους φίλους μου και στους συμφοιτητές μου στο ΠΜΣ για την συμπαράσταση και βοήθεια τους, κυρίως όμως στον συμφοιτητή μου Μουρελάτο Κωνσταντίνο, ο οποίος καθ' όλη την διάρκεια της ακαδημαϊκής χρονιάς ήταν στο πλάι μου, ιδιαίτερα στην ψυχολογική υποστήριξη.

Τέλος, όπως γίνεται αντιληπτό δεν θα μπορούσα να ξεχάσω τους πιο σημαντικούς ομολογουμένως ανθρώπους της ζωής μου, την οικογένεια μου, αφού χάρη σε αυτούς και την βοήθεια τους σε εύκολες αλλά κυρίως σε δύσκολες στιγμές, μπορώ και προσπαθώ καθημερινά να πραγματοποιήσω τα όνειρα μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν κύριους ρυθμιστές της κυτταρικής λειτουργίας. Οι RSKs ή S6 ριβοσωμικές κινάσες είναι μια οικογένεια ενδοκυττάρων κινασών σερίνης – θρεονίνης οι οποίες διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στις λειτουργίες του κυττάρου και εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα σε πλήθος καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η υποοικογένεια των p90RSKs αποτελούν καθοδικούς τελεστές του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK) και η υποοικογένεια p70 αποτελούν καθοδικούς τελεστές του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-Akt-mTOR. Κοινό στοιχείο των δυο αυτών σηματοδοτικών μονοπατιών είναι η ανώμαλη έκφραση τους στον παγκρεατικό καρκίνο. Στόχος ήταν η μελέτη του ρόλου των RSKs στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω της στοχευμένης αναστολής της δράσης τους με τη βοήθεια φαρμακολογικών αναστολέων τόσο σε εγκαθιδρυμένες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και σε πρωτογενή ξενομοσχεύματα από όγκους ασθενών (Patient Derived Xenografts, PDX). Για τον σκοπό αυτό έγινε *in vitro* έλεγχος κυτταροτοξικότητας έξι διαφορετικών αναστολέων, με τη μέθοδο SRB, σε καλλιέργειες καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, τα AsPC-1, και τα Attached, τα οποία αποτελούν πρωτογενή καρκινική κυτταρική σειρά. Η δράση του αναστολέα T-ac, φαίνεται να έχει την ίδια ανασταλτική δράση στις δύο κυτταρικές σειρές. Επίσης ο αναστολέας GSK 2334470 αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικός τόσο στην μια όσο και στην άλλη κυτταρική σειρά. Τέλος, ο αναστολέας BX-912 φάνηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη των Attached σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα AsPC-1. Έτσι έγινε μια δεύτερη σειρά πειραμάτων στα κύτταρα Attached χρησιμοποιώντας τους αναστολείς T-ac και GSK 2334470. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η μέθοδος αναστολής δημιουργίας κλώνων ή clonogenic assay, μια δοκιμασία επιβίωσης κυττάρων *in vitro* βασισμένη στην ικανότητα ενός μεμονωμένου κυττάρου να αναπτυχθεί σε αποικία και η δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών ή κοινώς wound healing assay η οποία πρόκειται για μια μέθοδο μελέτης της κατευθυνόμενης μετανάστευσης κυττάρων *in vitro*. Συμπερασματικά προέκυψε ότι είναι πολύ πιθανό οι RSKs κινάσες να παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του παγκρεατικού καρκίνου με αποτέλεσμα να αποτελέσουν στόχους για την ανάπτυξη νέων βελτιωμένων θεραπειών στον παγκρεατικό καρκίνο.

**Λέξεις- Κλειδιά:** Παγκρεατικός καρκίνος, RSK κινάσες

## **ABSTRACT**

Protein kinases are major regulators of cellular function. RSKs or S6 ribosomal kinases (S6K) are a family of intracellular serine-threonine kinases that play a key role in cell function and are highly active in a number of cancer cells. Specifically, the p90RSKs subfamily are downstream operators of the MAPK signaling pathway (Ras / Raf / MEK / ERK) and the p70 subfamily are downstream operators of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. Common element of these two signaling pathways is their abnormal expression in pancreatic cancer. The aim was to study the role of RSKs in the growth of cancer cells. This was accomplished by targeted inhibition of their action via pharmacological inhibitors both in established human cancer cell lines and in primary xenografts from patient tumors (Patient Derived Xenografts, PDX). For this purpose, in vitro testing of cytotoxicity of six different inhibitors was performed with the SRB method in cultures of pancreatic cancer cells. Two different cancer cell lines, AsPC-1, and «Attached», which are primary cancer cell lines, were used. The activity of the T-ac inhibitor appears to have the same inhibitory effect on both cell lines. Inhibitor GSK 2334470 has also been shown to be very effective in both cell lines. Finally, the BX-912 inhibitor appeared to inhibit the development of Attached cells to a much greater extent than the AsPC-1 cells. A second series of experiments was performed on Attached cells using the T-ac and GSK 2334470 inhibitors. Specifically, the clonogenic assay was performed, which is an in vitro cell survival test based on the ability of an individual cell to grow into a colony and also wound healing (or scratch) assay, which is a method to study cell migration in vitro. It was concluded that RSKs kinases are very likely to play a role in the development and progression of pancreatic cancer and thus become targets for the development of new improved therapies in this kind of cancer.

**Key words:** Pancreatic cancer, RSKs

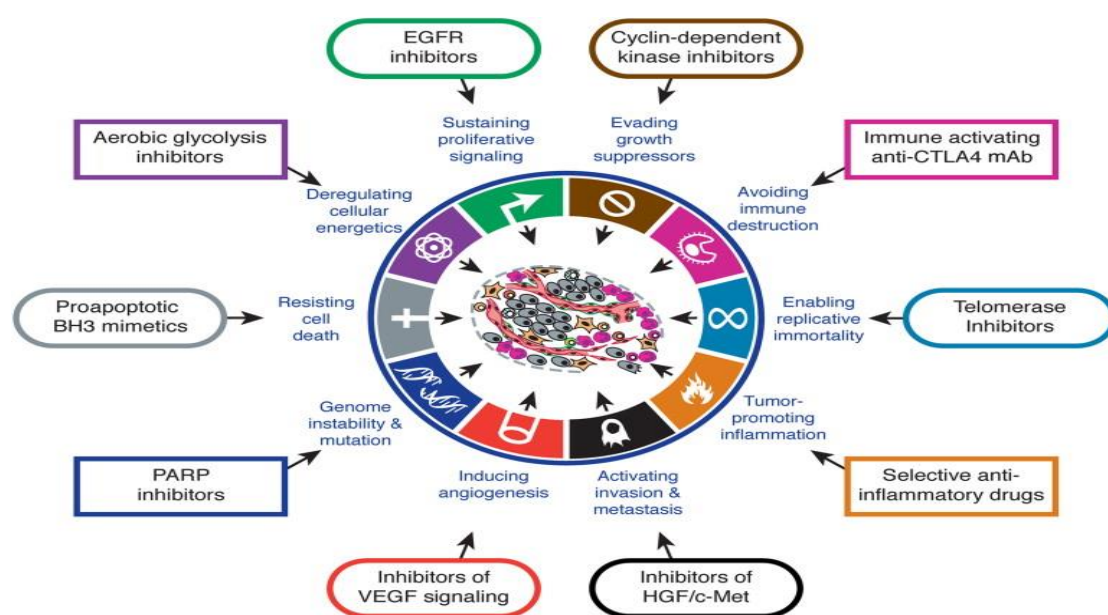
## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ	1
1.2 ΠΑΓΚΡΕΑΣ	4
1.3 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	6
1.3.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	6
1.3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	8
1.3.3 ΤΥΠΟΙ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	9
1.3.4 ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ TNM	12
1.3.5 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ	14
1.3.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ	19
1.3.7 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ RSKs ΚΙΝΑΣΩΝ	23
1.3.8 ΟΙ RSKs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	27
1.3.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	29
1.3.10 ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ	30
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>33</b>
2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	33
2.1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ – ASPC1 ΚΑΙ ATTACHED	33
2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ	35
2.2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	35
2.3 ΘΡΥΨΙΝΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	36
2.4 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΑΙ ΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	37
2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΜΕ TRYPAN BLUE	39
2.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB	41
2.7 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΛΩΝΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)	46
2.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΗΣ (WOUND HEALING ASSAY – SCRATCH ASSAY)	48
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>49</b>
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ	49
3.2 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΑ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ	52
3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΛΩΝΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)	55
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΗΣ (WOUND HEALING ASSAY – SCRATCH ASSAY)	58
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>63</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>65</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια στην οποία ορισμένα σωματικά κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και συχνά μεταναστεύουν σε άλλα μέρη του σώματος. Φυσιολογικά, τα ανθρώπινα κύτταρα πολλαπλασιάζονται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρική διαίρεση, η οποία υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο. Όταν τα κύτταρα γερνούν, πεθαίνουν και νέα κύτταρα παίρνουν τη θέση τους. Μερικές φορές αυτή η τακτική διαδικασία εκτρέπεται από το φυσιολογικό και τα ανώμαλα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα επιβιώνουν. Αυτά τα κύτταρα μπορεί να σχηματίσουν όγκους. Οι όγκοι μπορεί να είναι καρκινικοί (κακοήθεις) ή καλοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι δεν εξαπλώνονται ή εισβάλλουν σε κοντινούς ιστούς. Οι κακοήθεις όγκοι εξαπλώνονται και έχουν την ικανότητα να διεισδύουν σε κοντινούς ιστούς και να ταξιδεύουν σε μακρινά μέρη του σώματος για να σχηματίσουν νέους όγκους (μια διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση) ([www.cancer.gov-NCI](http://www.cancer.gov-NCI)). Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων ή Ορόσημα του καρκίνου (εικόνα 1) σύμφωνα με τους D.Hanahan & R.A.Weinberg (2000) είναι: η αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα, η αναισθησία σε αντί-αυξητικά σήματα, η αποφυγή απόπτωσης, ο απεριόριστος πολλαπλασιασμός, η συνεχόμενη αγγειογένεση για την αιμάτωσή τους, η διήθηση και μετάσταση, η γενετική αστάθεια και μεταλλάξεις, η φλεγμονή που προωθεί τον καρκίνο, η απορρύθμιση της κυτταρικής ενέργειας-μεταβολισμού και τέλος η αποφυγή ανοσοκαταστροφής.



Εικόνα 1: Τα ορόσημα του καρκίνου καθώς και οι θεραπευτικοί στόχοι τους.

## Διαφορές μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των φυσιολογικών κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα κανονικά κύτταρα σε διάφορα χαρακτηριστικά τους. Για παράδειγμα, τα καρκινικά κύτταρα: αναπτύσσονται απουσία σημάτων υπεύθυνων για την ανάπτυξή τους. Τα φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται μόνο όταν λαμβάνουν τέτοια σήματα. Επίσης αγνοούν τα σήματα που υπό κανονικές συνθήκες ειδοποιούν τα κύτταρα να σταματήσουν να διαιρούνται ή να πεθαίνουν (διαδικασία γνωστή ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση). Επιπλέον τα καρκινικά κύτταρα εισβάλλουν σε κοντινές περιοχές και εξαπλώνονται σε άλλες περιοχές του σώματος. Τα φυσιολογικά κύτταρα σταματούν να αναπτύσσονται όταν συναντούν άλλα κύτταρα και τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα δεν περιφέρονται στο ανθρώπινο σώμα. Τα καρκινικά κύτταρα ειδοποιούν τα αιμοφόρα αγγεία να αναπτυχθούν σε όγκους. Αυτά τα αιμοφόρα αγγεία τροφοδοτούν τους όγκους με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και απομακρύνουν τα απόβλητα από τους όγκους. Ενώ ένα άλλο χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητα τους να διαφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα. Το ανοσοποιητικό σύστημα κανονικά εξαλείφει τα κατεστραμμένα ή μη φυσιολογικά κύτταρα. Ουσιαστικά στρέφουν το ανοσοποιητικό σύστημα μαζί τους ώστε να τα βοηθήσει να παραμείνουν ζωντανά και να αναπτυχθούν. Για παράδειγμα, ορισμένα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να κάνουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού να προστατεύσουν τον όγκο αντί να του επιτεθούν. Επίσης συσσωρεύουν πολλαπλές αλλαγές στα χρωμοσώματα τους, όπως διπλασιασμούς και ελλείματα χρωμοσωμικών τμημάτων. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα έχουν διπλάσιο από τον κανονικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Τέλος τα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά βασίζονται σε διαφορετικά είδη θρεπτικών ουσιών, δηλαδή ορισμένα καρκινικά κύτταρα παράγουν ενέργεια από θρεπτικά συστατικά με διαφορετικό τρόπο από τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτό τους επιτρέπει να αναπτυχθούν πιο γρήγορα. (<https://www.cancer.gov>, [National Cancer Institute](#)).



## **Ο τρόπος που ανάπτυξης του καρκίνου**

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια - δηλαδή προκαλείται από αλλαγές στα γονίδια που ελέγχουν τον τρόπο λειτουργίας των κυττάρων μας, ειδικότερα τον τρόπο με τον οποίο αναπτύσσονται και διαιρούνται. Γενετικές αλλαγές που προκαλούν καρκίνο μπορεί να συμβούν λόγω διαφόρων γεγονότων, όπως μέσω των λαθών που συμβαίνουν κατά την διαίρεση των κυττάρων, μέσω βλαβών στο DNA που προκαλούνται από επιβλαβείς ουσίες του περιβάλλοντος, όπως οι χημικές ουσίες στον καπνό του τσιγάρου και η υπερϊώδης ακτινοβολία του ηλίου. Ενώ τέλος οι γενετικές αλλαγές δύναται να κληρονομηθούν από τους γονείς μας. Το ανθρώπινο σώμα φυσιολογικά αποβάλλει τα κύτταρα με κατεστραμμένο DNA πριν αυτά μετατραπούν σε καρκινικά. Ωστόσο η συγκεκριμένη ικανότητα μειώνεται δραματικά καθώς μεγαλώνουμε σε ηλικία. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος υψηλότερου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου αργότερα στη ζωή μας. Ο καρκίνος κάθε ατόμου έχει έναν μοναδικό συνδυασμό γενετικών αλλαγών. Καθώς ο καρκίνος συνεχίζει να αυξάνεται, προκύπτουν νέες αλλαγές. Ακόμα και μέσα στον ίδιο όγκο, διαφορετικά κύτταρα μπορεί να έχουν διαφορετικές γενετικές αλλαγές (<https://www.cancer.gov>, National Cancer Institute).

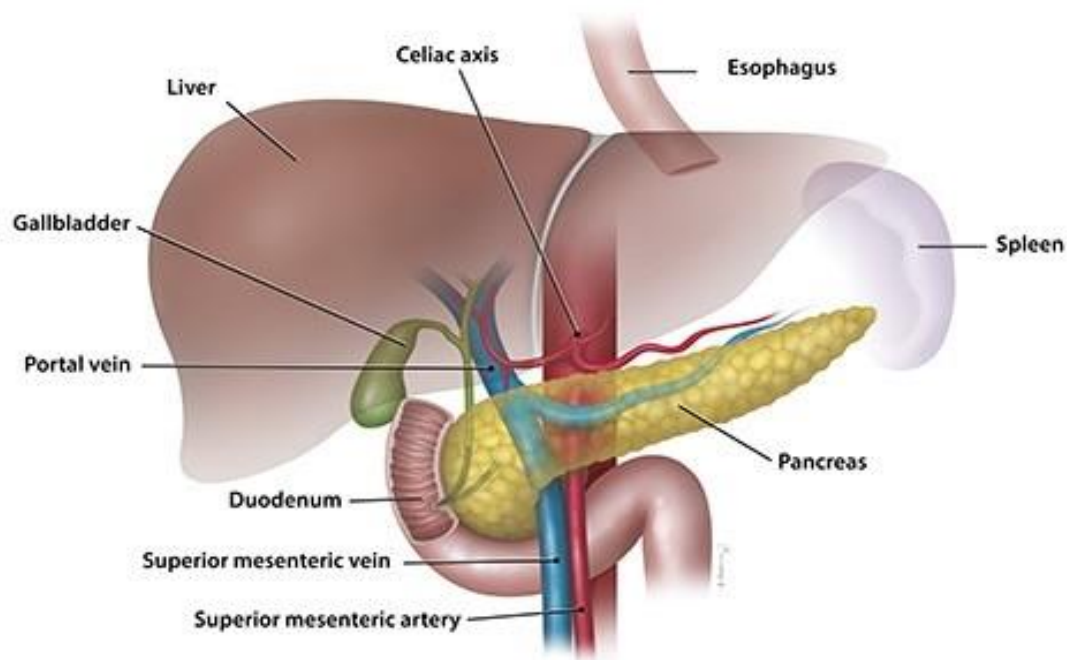
## 1.2 ΠΑΓΚΡΕΑΣ

Το ανθρώπινο πάγκρεας αποτελείται από δύο όργανα: έναν εξωκρινή αδένα και έναν ενδοκρινή αδένα. Ο εξωκρινής αδένας αποτελείται από κυψελιδωτά κύτταρα και κύτταρα πόρων που παράγουν πεπτικά ένζυμα και όξινο ανθρακικό νάτριο, αντίστοιχα. Η πρωταρχική λειτουργία του εξωκρινούς παγκρέατος είναι να εκκρίνει τα πεπτικά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την πέψη και απορρόφηση των καθημερινών τροφίμων και τέλος την αφομοίωση των θρεπτικών συστατικών στο σώμα μας. Ο ενδοκρινής αδένας, , αποτελείται από πέντε τύπους εκκριτικών κυττάρων και εκκρίνει πεπτιδικές ορμόνες για τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Οι παγκρεατικές εκκριτικές λειτουργίες ρυθμίζονται λεπτομερώς από νευροκρινείς, ενδοκρινείς και παρακρινείς μηχανισμούς. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το γεγονός, η ακατάλληλη ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των οδών που μεσολαβούν στους λεπτούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς του παγκρέατος έχει σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία και τις ασθένειες. Ωστόσο, οι υποκείμενοι τοπικοί μηχανισμοί με τους οποίους ρυθμίζεται η λειτουργία και η δυσλειτουργία του παγκρέατος παραμένουν ελάχιστα κατανοητοί (Leung, 2010).

### Δομή του παγκρέατος

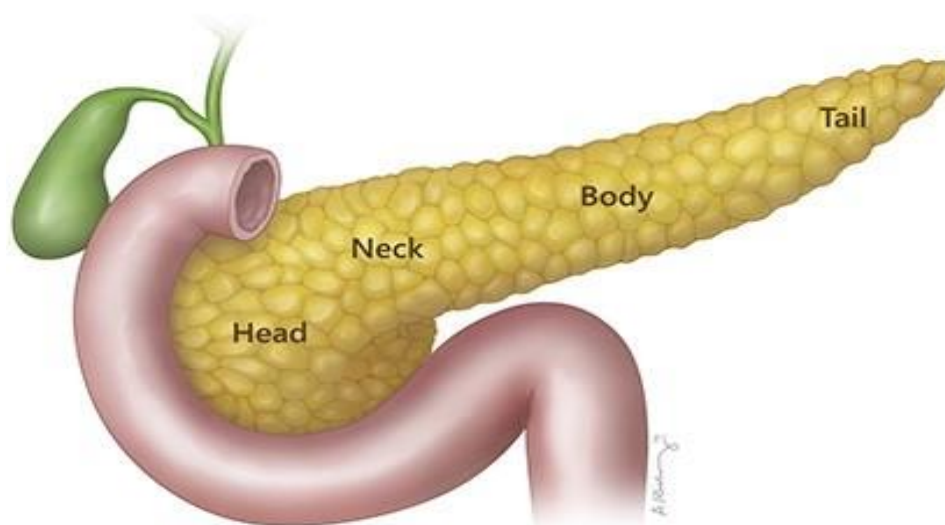
Το ανθρώπινο πάγκρεας είναι ένα οπισθοπεριτοναϊκό όργανο της άνω κοιλίας που, κατά μέσο όρο, ζυγίζει στην περιοχή 100-150 g και έχει μήκος 15-25 cm. Εκκρίνει περίπου ένα κιλό παγκρεατικού χυμού καθημερινά στο δωδεκαδάκτυλο. Ανατομικά, το πάγκρεας συνδέεται με άλλα κοιλιακά όργανα συμπεριλαμβανομένης της σπλήνας, του στομάχου, του δωδεκαδακτύλου και του παχέος εντέρου (εικόνα 2). Το πάγκρεας χωρίζεται δομικά σε τρία μέρη (εικόνα 3), που ονομάζονται κεφάλι, σώμα και ουρά. Η περιοχή της κεφαλής του παγκρέατος είναι σχετικά επίπεδη και βρίσκεται στον πρώτο βρόχο του δωδεκαδακτύλου. Η περιοχή της ουράς βρίσκεται πολύ κοντά στο ύψωμα της σπλήνας. είναι το μόνο μέρος του παγκρέατος που περιέχει κύτταρα παγκρεατικού πολυπεπτιδίου (PP) που παράγουν την πεπτιδική ορμόνη PP. Η περιοχή του σώματος του παγκρέατος έχει σχήμα που μοιάζει με πρίσμα. Η παροχή αίματος στο πάγκρεας εξαρτάται από διάφορες κύριες αρτηρίες, συγκεκριμένα την κατώτερη παγκρεατική δωδεκαδακτυλική αρτηρία, την ανώτερη παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία και τη σπληνική αρτηρία. Η παγκρεατική αφαίρεση των μεταβολιτών και η απελευθέρωση ορμονών διαμεσολαβούνται μέσω της παγκρεατοδωδεκαδακτυλικής φλέβας και της παγκρεατικής φλέβας, αντίστοιχα. Το πάγκρεας νευρώνεται σε μεγάλο βαθμό από το

παγκρεατικό πλέγμα και τα νεύρα του κόλπου. Οι ενδοκρινείς και εξωκρινείς ρόλοι του παγκρέατος, αν και διακριτοί, έχουν στενά αλληλένδετες φυσιολογικές λειτουργίες. Το πάγκρεας μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα δομικά διακριτά συστατικά: το εξωκρινές πάγκρεας, που αποτελείται κυρίως από κυψελωδά κύτταρα και κύτταρα πόρων, το ενδοκρινές πάγκρεας, τη θέση των κυττάρων των νησίδων, τα αιμοφόρα αγγεία και τον εξωκυττάριο χώρο (Leung, 2010).



© 2016 Columbia University. All Rights Reserved.

Εικόνα 2: Το πάγκρεας με τα αγγεία και τα όργανα που το περιβάλλουν (<https://columbiasurgery.org>, Columbia University Department of Surgery).



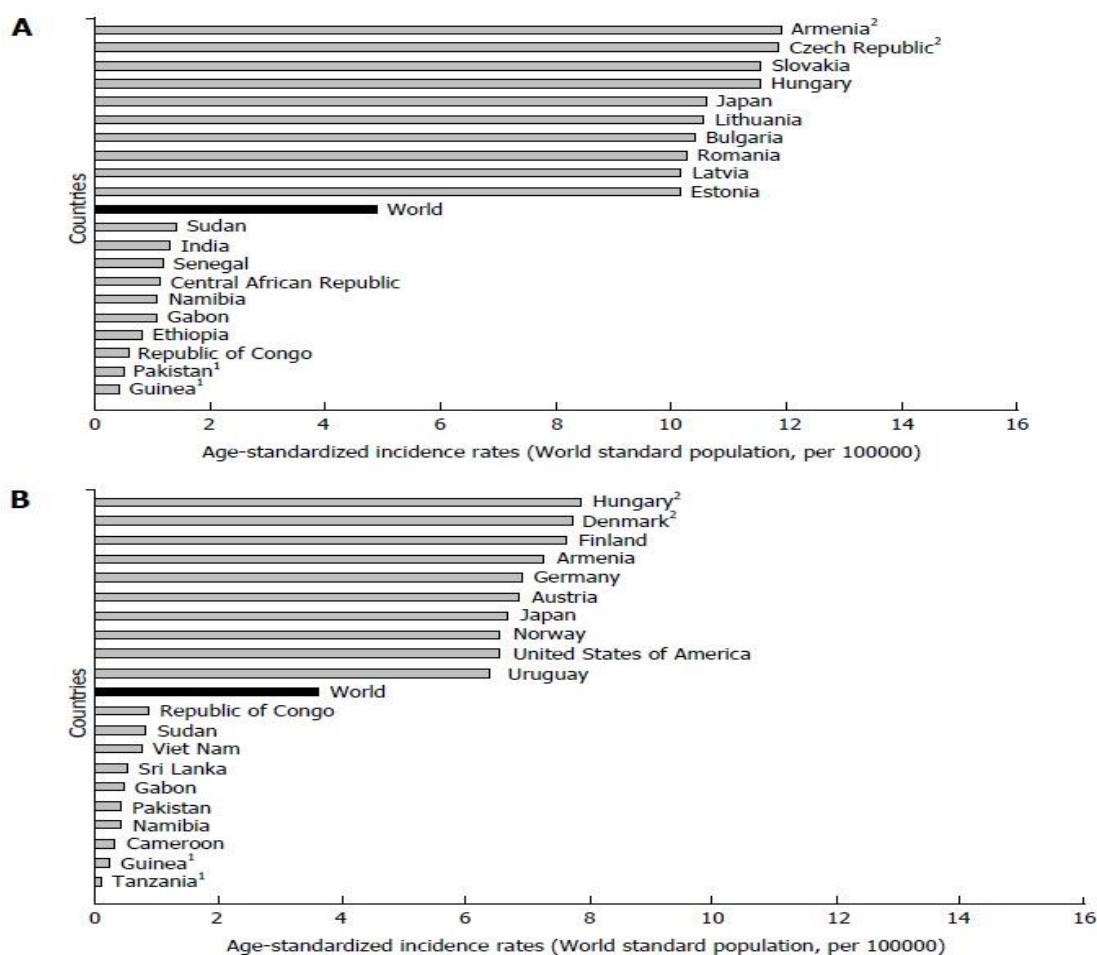
© 2016 Columbia University. All Rights Reserved.

Εικόνα 3: Τμήματα του παγκρέατος (<https://columbiasurgery.org>, Columbia University Department of Surgery).

### 1.3 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

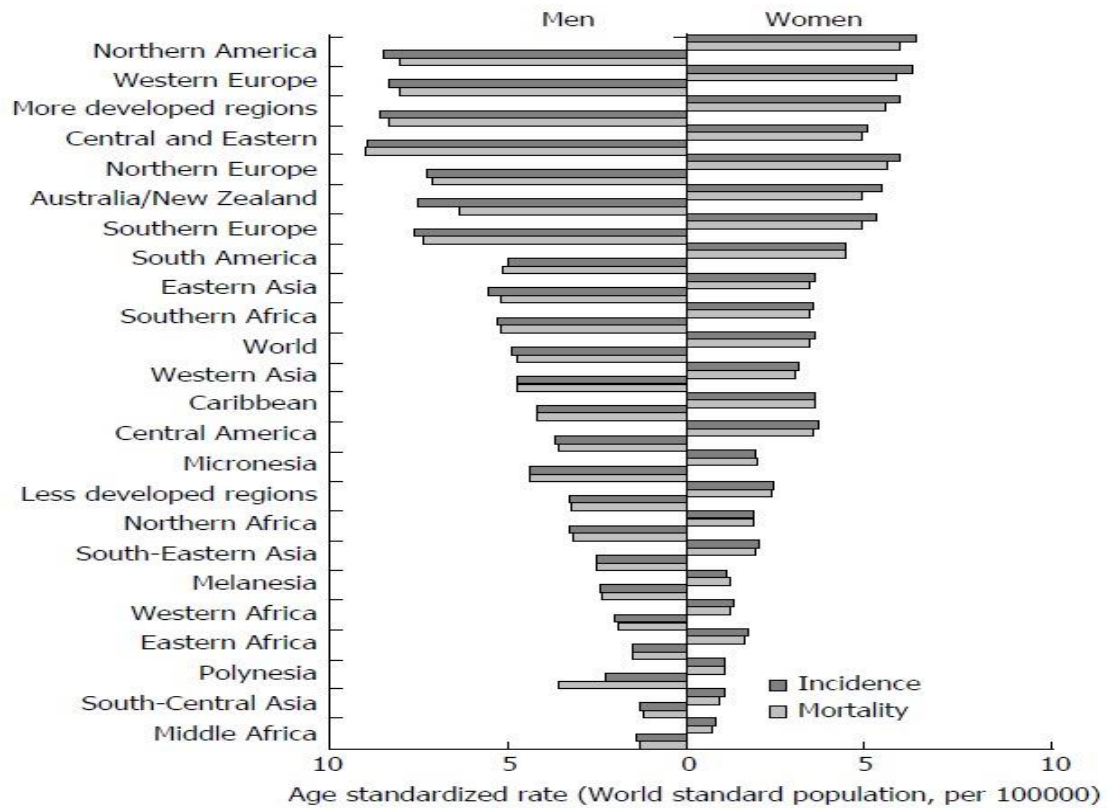
#### 1.3.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Οι δύο κύριοι τύποι όγκων του καρκίνου του παγκρέατος είναι το αδενοκαρκίνωμα (που αντιπροσωπεύει περίπου το 85% των περιπτώσεων) και οι παγκρεατικοί ενδοκρινείς όγκοι, οι οποίοι αποτελούν λιγότερο από το 5% όλων των περιπτώσεων (Vincent et al, 2011; Hidalgo et al, 2015). Με βάση τις εκτιμήσεις του GLOBOCAN 2012, ο καρκίνος του παγκρέατος προκαλεί περισσότερους από 331.000 θανάτους ετησίως που αντιπροσωπεύει το 4,0% όλων των θανάτων, κατατάσσοντας τον ως την έβδομη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο και στα δύο φύλα. Περίπου 338.000 άνθρωποι είχαν καρκίνο του παγκρέατος το 2012, καθιστώντας τον, τον 11ο συχνότερο καρκίνο (Ferlay et al, 2015). Το εκτιμώμενο ποσοστό επιβίωσης 5 ετών για τον καρκίνο του παγκρέατος είναι μικρότερο από 5% (Ferlay et al, 2015; Hidalgo et al, 2015).



**Γράφημα 1:** Συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος σε άνδρες (A) και γυναίκες (B), σύμφωνα με το GLOBOCAN 2012. <sup>1</sup>Χώρα με τα χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας. <sup>2</sup>Χώρα με τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας. Εκτιμήσεις της GLOBOCAN 2012 (Ilic et al, 2016).

Υπάρχουν σημαντικές γεωγραφικές διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος ανά φύλο (Wang et al, 2003; Qiu et al, 2009; Malvezzi et al, 2016). Το ποσοστό εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος μεταξύ ανδρών το 2012 ήταν 4,9 ανά 100.000 και μεταξύ των γυναικών 3,6 ανά 100.000.



Γράφημα 2: Συχνότητα και θνησιμότητα καρκίνου του παγκρέατος σε άνδρες και γυναίκες, ανά περιοχή, σύμφωνα με εκτιμήσεις του GLOBOCAN 2012 (Ilic et al, 2016).

### **1.3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

Οι παράγοντες κινδύνου είναι ποικίλοι. Χαρακτηριστικά παραγόντων κινδύνου εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου αποτελούν η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα, καθώς και η ομάδα αίματος. Επίσης αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος από μια σειρά οικογενών συνδρόμων καρκίνου όπως το σύνδρομο FAMMM, το σύνδρομο Peutz-Jeghers, η κυστική ίνωση, ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών, η αναιμία Fanconi, ο οικογενής αδενωματώδης πολύποδας, το σύνδρομο Li-Fraumeni και το σύνδρομο Lynch. Επίσης παράγοντες κινδύνου αποτελούν η χρόνια παγκρεατίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπεργλυκαιμία, η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης αλλά και οι ηπατίτιδες Β και C. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου παίζουν τα αντιδιαβητικά φάρμακα, το αλκοόλ, η παχυσαρκία, η διατροφή καθώς και το κάπνισμα (Midha et al, 2016).

### 1.3.3 ΤΥΠΟΙ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ενώ υπάρχουν διάφοροι τύποι καρκίνου του παγκρέατος, η συντριπτική πλειοψηφία (πάνω από το 90%) όλων των διαγνώσεων είναι αδenoκαρκίνωμα του παγκρέατος. Οι τύποι καρκίνου του παγκρέατος μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγαλύτερες κατηγορίες: τον εξωκρινή καρκίνο του παγκρέατος, ο οποίος περιλαμβάνει το αδenoκαρκίνωμα και τον νευροενδοκρινή καρκίνο του παγκρέατος. Κάθε κατηγορία έχει διάφορους τύπους καρκίνου που μπορεί να διαφέρουν ως προς τα συμπτώματα και την πρόγνωση.

#### **Εξωκρινής παγκρεατικός καρκίνος**

Ο εξωκρινής παγκρεατικός καρκίνος αναπτύσσεται από εξωκρινή κύτταρα, τα οποία αποτελούν τον εξωκρινή αδένα και τους αγωγούς του παγκρέατος. Ο εξωκρινής αδένας εκκρίνει ένζυμα που βοηθούν στη διάσπαση υδατανθράκων, λιπών, πρωτεϊνών και οξέων στο δωδεκαδάκτυλο. Οι διάφοροι τύποι εξωκρινών παγκρεατικών καρκίνων αποτελούν περισσότερο από το 95 τοις εκατό όλων των καρκίνων του παγκρέατος. Πιο συγκεκριμένα αποτελούνται από τα ακόλουθα:

##### **❖ Αδenoκαρκίνωμα**

Ονομάζεται επίσης καρκίνωμα του πόρου, ο πιο συνηθισμένος τύπος καρκίνου του παγκρέατος, αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το 90% των διαγνώσεων του καρκίνου του παγκρέατος. Αυτός ο καρκίνος εμφανίζεται στην επένδυση των αγωγών στο πάγκρεας. Είναι επίσης πιθανό το αδenoκαρκίνωμα (εικόνα 4) να αναπτυχθεί από τα κύτταρα που δημιουργούν παγκρεατικά ένζυμα. Όταν συμβεί αυτό, ονομάζεται καρκίνωμα των κυψελιδωτών κυττάρων το οποίο αντιπροσωπεύει το 1-2 % των εξωκρινών καρκίνων. Τα συμπτώματα καρκινώματος των κυψελιδωτών κυττάρων είναι παρόμοια με τα συμπτώματα του αδenoκαρκινώματος, τα οποία περιλαμβάνουν κοιλιακό άλγος, ναυτία και απώλεια βάρους. Ωστόσο, ο ίκτερος δεν είναι τόσο συνηθισμένος. Λόγω της αύξησης των ενζύμων, ορισμένοι ασθενείς μπορεί να έχουν δερματικά εξανθήματα και πόνο στις αρθρώσεις.

##### **❖ Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα**

Αυτός ο εξαιρετικά σπάνιος μη ενδοκρινής καρκίνος του παγκρέατος σχηματίζεται στους παγκρεατικούς πόρους και αποτελείται καθαρά από πλακώδη κύτταρα, τα οποία συνήθως δεν παρατηρούνται στο πάγκρεας. Δεν έχουν αναφερθεί αρκετά περιστατικά αυτής της νόσου για να γίνει πλήρως κατανοητή η προέλευσή της. Μελέτες έχουν

αναφέρει ότι έχει πολύ κακή πρόγνωση λόγω των περισσότερων περιπτώσεων που ανακαλύπτονται μετά από μετάσταση.

#### ❖ **Αδενοσκυώδες καρκίνωμα**

Αυτός ο σπάνιος τύπος καρκίνου του παγκρέατος αντιπροσωπεύει το 1-4 % των εξωκρινών καρκίνων του παγκρέατος. Σε σύγκριση με το αδenoκαρκίνωμα, το αδενοσκυώδες καρκίνωμα είναι ένας πιο επιθετικός όγκος με φτωχότερη πρόγνωση. Αυτοί οι όγκοι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά τόσο του αδenoκαρκινώματος του πόρου όσο και του πλακώδους καρκινώματος.

#### ❖ **Κολλοειδές καρκίνωμα**

Ένας άλλος σπάνιος τύπος, τα κολλοειδή καρκινώματα (εικόνα 5) αποτελούν το 1-3 % των εξωκρινών καρκίνων του παγκρέατος. Αυτοί οι όγκοι τείνουν να αναπτύσσονται από έναν τύπο καλοήθους κύστης που ονομάζεται ενδοαγγειακό θηλοειδές βλενωδές νεόπλασμα (IPMN). Επειδή ο παγκρεατικός κολλοειδής όγκος αποτελείται από κακοήθη κύτταρα που επιπλέουν σε μια ζελατινώδη ουσία που ονομάζεται βλενίνη, δεν είναι τόσο πιθανό να εξαπλωθεί και είναι ευκολότερο να αντιμετωπιστεί από άλλους καρκίνους του παγκρέατος. Έχει επίσης πολύ καλύτερη πρόγνωση.

#### **Νευροενδοκρινής καρκίνος του παγκρέατος**

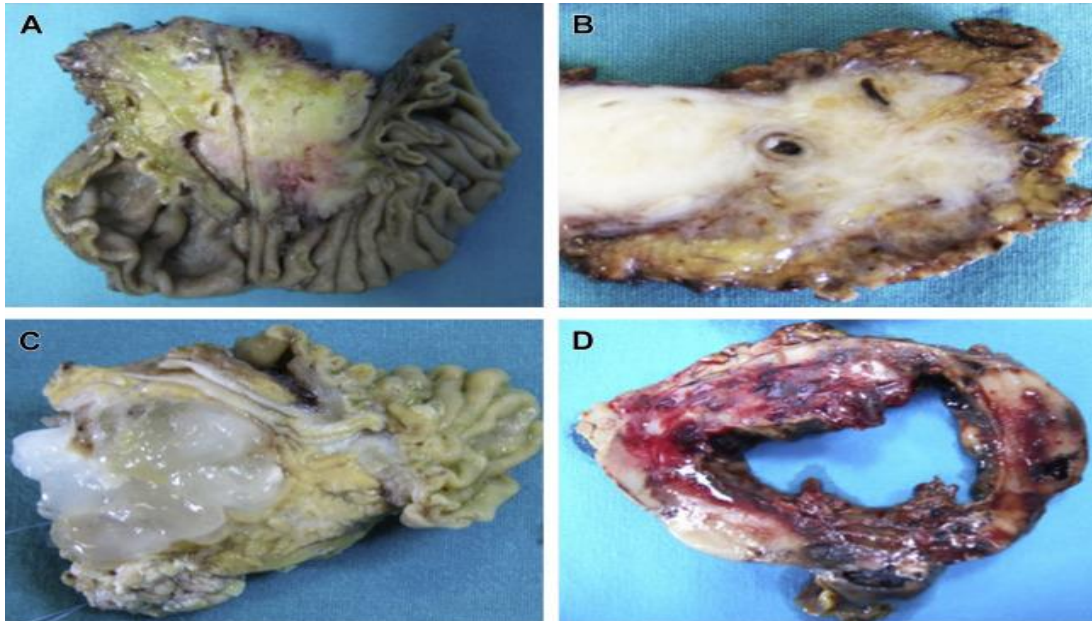
Οι παγκρεατικοί νευροενδοκρινείς όγκοι (NET) αναπτύσσονται από κύτταρα του ενδοκρινικού αδένου του παγκρέατος, ο οποίος εκκρίνει τις ορμόνες ινσουλίνη και γλυκαγόνη στην κυκλοφορία του αίματος που έχουν ως στόχο τη ρύθμιση του σακχάρου στο αίμα. Επίσης γνωστοί ως όγκοι ενδοκρινών ή κυττάρων των νησιδίων, οι νευροενδοκρινείς καρκίνοι είναι σπάνιοι, αποτελώντας λιγότερο από το 5 % όλων των περιπτώσεων καρκίνου του παγκρέατος.

#### **Καλοήθεις προκαρκινικές αλλοιώσεις**

Κύστες και άλλοι καλοήθεις όγκοι μπορούν να σχηματιστούν στο πάγκρεας και ορισμένοι μπορεί να είναι πρόδρομοι του καρκίνου του παγκρέατος, συμπεριλαμβανομένων των ενδοαγγειακών θηλοειδών βλενωδών νεοπλασμάτων (IPMNs). Συχνά, IPMN και άλλες καλοήθεις βλάβες εντοπίζονται όταν ο ασθενής εξετάζεται για μη σχετικό ιατρικό λόγο. Ανάλογα με τη θέση και τον τύπο της ανάπτυξης, ο γιατρός μπορεί είτε να αφαιρέσει χειρουργικά τη βλάβη είτε να συνεχίσει



να την παρακολουθεί για να διασφαλίσει ότι δεν θα γίνει κακοήθεια (<https://www.hopkinsmedicine.org>, Johns Hopkins Medicine).



Εικόνα 4: Αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος και οι παραλλαγές του (Luchini et al, 2016).

	Normal	Low-grade	High-grade	PDAC
Macroscopic				
Microscopic				

Εικόνα 5: Η παθολογία των IPMNs. Τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των IPMNs τυπικά χαρακτηρίζονται από τη συμμετοχή του κύριου παγκρεατικού πόρου, του πόρου διακλάδωσης (φαίνεται εδώ) ή και των δύο. Τα IPMN αποτελούνται από βλενώδες επιθήλιο που μπορεί να είναι είτε επίπεδα είτε θηλώδη στην όψη. Με βάση το βαθμό κυτταροαρχιτεκτονικής ατυπίας, τα IPMNs μπορούν να ταξινομηθούν σε χαμηλής ή υψηλής ποιότητας δυσπλασία. Ο πιο σημαντικός προγνωστικός δείκτης, ωστόσο, είναι η απουσία ή η παρουσία ενός σχετικού επεμβατικού PDAC ([www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org), Journal of Gastroenterology).

### 1.3.4 ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ TNM

#### Σταδιοποίηση TNM

Η σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα TNM (πίνακας 1) περιγράφεται ως εξής :

**T:** Περιγράφει το μέγεθος του πρωτογενούς όγκου και αν υπάρχει ανάπτυξη του στους γύρω ιστούς. Συνήθως αναφέρεται ως ένας αριθμός από το 1-4. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός σημαίνει ότι ο όγκος είναι μεγαλύτερος ή έχει αρχίσει να αναπτύσσεται σε κοντινούς ιστούς.

**N:** Περιγράφει την κατάσταση των λεμφαδένων. Συμβολίζεται με NO που σημαίνει ότι δεν υπάρχει εξάπλωση του καρκίνου στους λεμφαδένες και με N1 που σημαίνει ότι ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες ενώ μπορεί να περιγράψει και τη θέση των λεμφαδένων.

**M:** Περιγράφει την ύπαρξη εξάπλωσης ή μετάστασης του καρκίνου σε άλλα μέρη του σώματος. Συμβολίζεται με MO που σημαίνει ότι ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε άλλα μέρη ή ιστούς του σώματος και με M1 που σημαίνει ότι υπάρχει μετάσταση σε άλλα μέρη του σώματος.

Για τον καρκίνο του παγκρέατος υπάρχουν 5 στάδια σύμφωνα με το σύστημα TNM. Στάδιο 0 ακολουθούμενο από τα στάδια 1 έως 4. Συχνά τα στάδια 1 έως 4 περιγράφονται ως ρωμαϊκοί αριθμοί I, II, III και IV. Γενικά, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός σταδίων, τόσο περισσότερο έχει εξαπλωθεί ο καρκίνος

#### **Στάδιο 0** (ή καρκίνωμα in situ)

Τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται μόνο στην επένδυση του παγκρέατος.

#### **Στάδιο 1**

Ο όγκος είναι 4 cm ή μικρότερος. Στο στάδιο 1A, ο όγκος είναι 2 cm ή μικρότερος. Στο στάδιο 1B, ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 2 cm αλλά όχι μεγαλύτερος από 4 cm.

#### **Στάδιο 2**

Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 4 cm (στάδιο 2A). Ή ο όγκος έχει οποιοδήποτε μέγεθος και ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί από 1 έως 3 κοντινούς λεμφαδένες (στάδιο 2B).

### Στάδιο 3

Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε 4 ή περισσότερους κοντινούς λεμφαδένες. Ή ο όγκος έχει εξελιχθεί σε μεγάλα αιμοφόρα αγγεία έξω από το πάγκρεας και ο καρκίνος μπορεί να έχει εξαπλωθεί στους κοντινούς λεμφαδένες.

### Στάδιο 4

Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του σώματος, όπως το συκώτι, οι πνεύμονες ή η κοιλιακή κοιλότητα. Αυτό ονομάζεται επίσης μεταστατικός καρκίνος του παγκρέατος.

#### Υποτροπιάζων καρκίνος του παγκρέατος

Ο υποτροπιάζων καρκίνος του παγκρέατος σημαίνει ότι ο καρκίνος επανήλθε μετά τη θεραπεία του. Εάν επανέλθει στο ίδιο σημείο που ξεκίνησε για πρώτη φορά ο καρκίνος, ονομάζεται τοπική υποτροπή. Εάν επανέλθει σε ιστούς ή λεμφαδένες κοντά στο σημείο που ξεκίνησε για πρώτη φορά, ονομάζεται περιοδική υποτροπή. Μπορεί επίσης να επαναληφθεί σε άλλο σημείο του σώματος. Αυτό ονομάζεται μακρινή μετάσταση ή μακρινή υποτροπή ([cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/pancreatic/staging](https://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/pancreatic/staging)).

Πίνακας 1: Στάδια του καρκίνου του παγκρέατος σύμφωνα με το σύστημα TNM (Hidalgo, 2010).

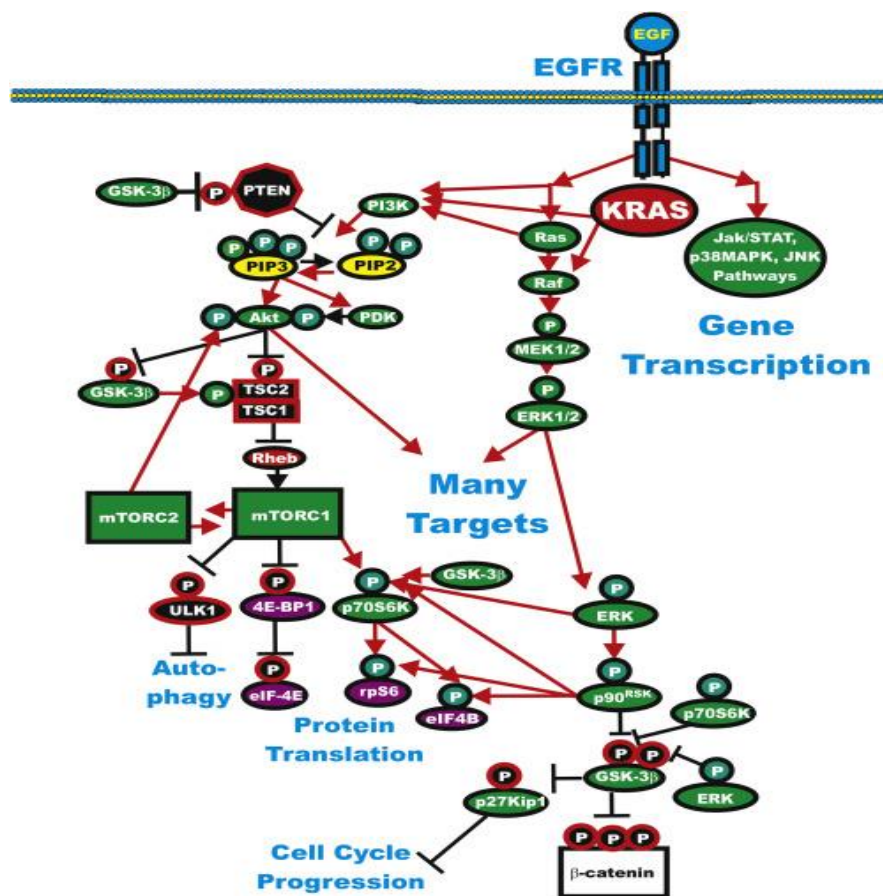
Stage	Tumor Grade	Nodal Status	Distant Metastases	Median Survival† mo	Characteristics
IA	T1	N0	M0	24.1	Tumor limited to the pancreas, ≤2 cm in longest dimension
IB	T2	N0	M0	20.6	Tumor limited to the pancreas, >2 cm in longest dimension
IIA	T3	N0	M0	15.4	Tumor extends beyond the pancreas but does not involve the celiac axis or superior mesenteric artery
IIB	T1, T2, or T3	N1	M0	12.7	Regional lymph-node metastasis
III	T4	N0 or N1	M0	10.6	Tumor involves the celiac axis or the superior mesenteric artery (unresectable disease)
IV	T1, T2, T3, or T4	N0 or N1	M1	4.5	Distant metastasis

\* N denotes regional lymph nodes, M distant metastases, and T primary tumor.

† Data are from Bilimoria et al.<sup>45</sup>

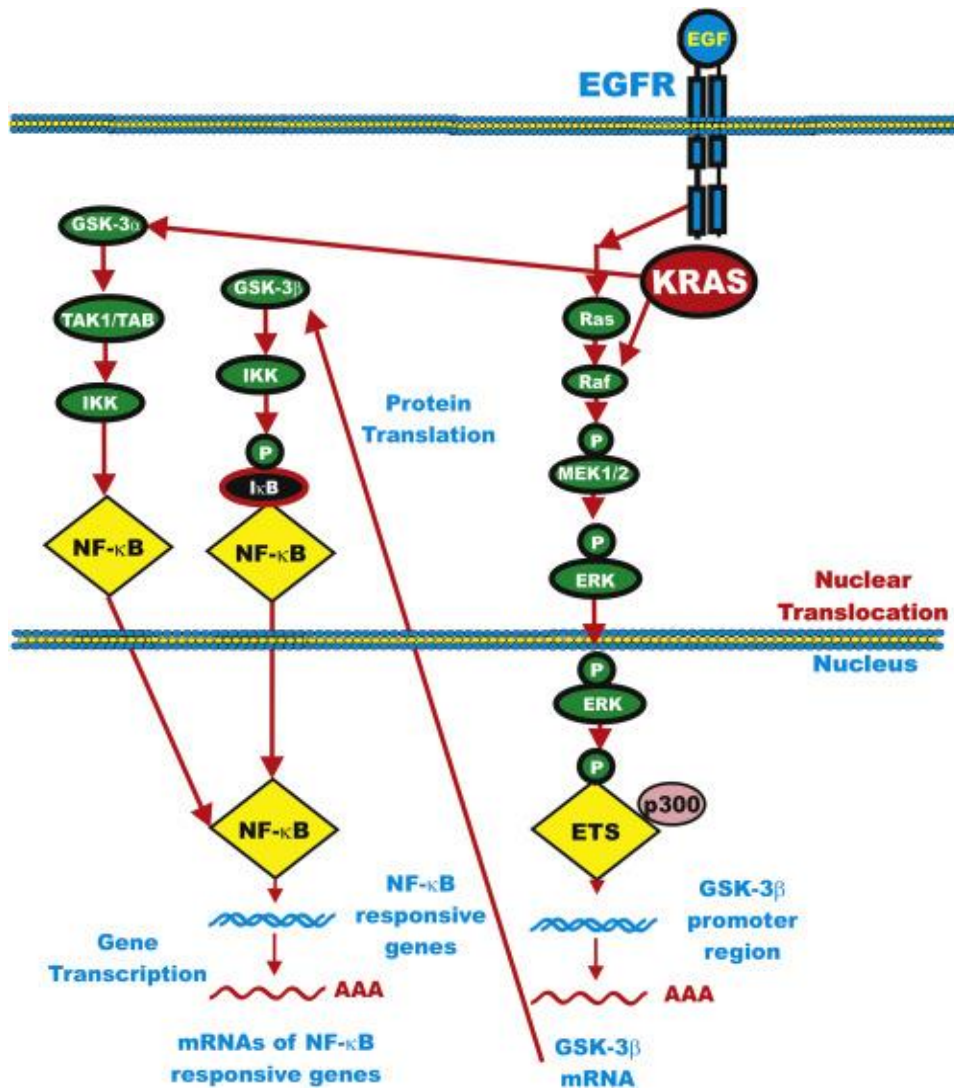
### 1.3.5 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Μεταλλάξεις σε πολλά ογκογονίδια έχουν βρεθεί στο PDAC. Μία από τις πρώτες μεταλλάξεις που βρέθηκε είναι στο **KRAS**. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια συνεχόμενα ενεργή GTPase που κλειδώνει την πρωτεΐνη στο GTP της και έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχόμενη αλληλεπίδραση με καθοδικά μονοπάτια σηματοδότησης όπως: το **Raf/MEK/ERK** και το **PI3K/PTEN/Akt/mTORC1/GSK-3**. Η απορρύθμιση αυτών των μονοπατιών μπορεί να οδηγήσει σε συνεχή κυτταρική ανάπτυξη, αποφυγή της απόπτωσης, της γήρανσης και χημειοθεραπευτική αντοχή στα φάρμακα (Maertens and Cichowski, 2014). Το KRAS (εικόνα 6) είναι μεταλλαγμένο στο 90% περίπου των περιπτώσεων των PDAC. Μια συνέπεια του μεταλλαγμένου KRAS είναι η αποφυγή της γήρανσης των κυττάρων που οδηγεί στην επαγωγή του παράγοντα μεταγραφής TWIST ο οποίος εμποδίζει την επαγωγή του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p16<sup>INK4</sup> (Fitzgerald et al, 2015).



Εικόνα 6: Επισκόπηση του μονοπατιού **EGFR** και του μεταλλαγμένου **KRAS** στον καρκίνο του παγκρέατος (Fitzgerald et al, 2015).

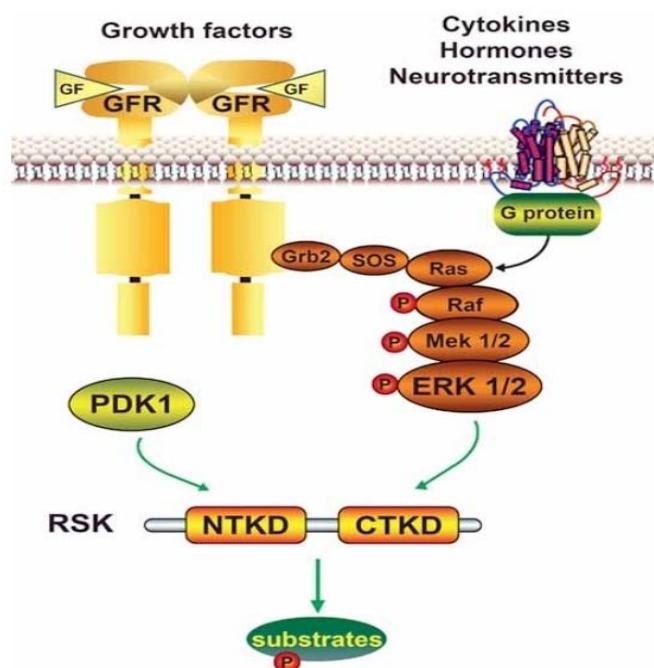
Η λανθασμένη ρύθμιση της έκφρασης των μεταλλάξεων EGFR (εικόνα 7) και KRAS μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των Ras/Raf/MEK/ERK, Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών που συμβάλλουν στον καρκίνο του παγκρέατος. Μερικές φορές η λανθασμένη ρύθμιση της έκφρασης των EGFR ή KRAS μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση των Ras/Raf/MEK/ERK, Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR και άλλων οδών σηματοδότησης. Ο EGF και ο EGFR υποδεικνύονται με μπλε σχήματα. Οι μεταλλάξεις του KRAS υποδεικνύονται με κόκκινα οβάλ. Η πρωτεΐνη PTEN, η οποία αδρανοποιείται σε ορισμένους καρκίνους, υποδεικνύεται με μαύρο οκτάγωνο. Η PIP2 και η PIP3 υποδεικνύονται με κίτρινα οβάλ. Οι βασικές πρωτεϊνικές κινάσες υποδεικνύονται με πράσινα οβάλ. Η β-κατενίνη υποδεικνύεται σε ένα διαυγές κουτί καθώς αφού φωσφορυλιωθεί από το GSK-3β, στην συνέχεια αποικοδομείται. Η κινάση Unc-51 (ULK1) υποδεικνύεται από ένα μαύρο οβάλ. Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μετάφραση των πρωτεϊνών υποδεικνύονται σε μωβ οβάλ. Τα γεγονότα φωσφορυλίωσης που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας πρωτεΐνης υποδεικνύονται με ένα P σε έναν πράσινο κύκλο. Τα γεγονότα φωσφορυλίωσης που έχουν ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση μιας πρωτεΐνης υποδεικνύονται με ένα P σε μαύρο κύκλο. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τα γεγονότα της ενεργοποίησης στα μονοπάτια. Αποκλεισμένα μαύρα βέλη δείχνουν αδρανοποιημένα γεγονότα στα μονοπάτια (Fitzgerald et al, 2015).



Εικόνα 7: Επιδράσεις των μεταλλάξεων του **KRAS** και του **Raf/MEK/ERK** στην ενεργοποίηση της **GSK-3** και την ενεργοποίηση του **NF-κB**. Ο ενεργοποιημένος **EGFR** (μπλε σχήμα) μπορεί να επάγει το μονοπάτι **Ras/Raf/MEK/ERK** (πράσινα οβάλ) που με τη σειρά του μπορεί να ενεργοποιήσει τον συντελεστή μεταγραφής **ETS** ο οποίος μπορεί να δεσμεύσει την περιοχή **GSK-3β** και να προκαλέσει την έκφραση των **GSK-3** (πράσινο οβάλ) και **IKK** (πράσινο οβάλ). Αυτό μπορεί με τη σειρά του να ρυθμίσει τη δραστηριότητα του **NF-κB** (κίτρινο διαμάντι) και να προκαλέσει την έκφραση των **NF-κB** πρωτεϊνών. Εναλλακτικά, το μεταλλαγμένο **KRAS** (κόκκινο οβάλ) μπορεί να επάγει το **Raf/MEK/ERK** μονοπάτι. Το μεταλλαγμένο **KRAS** μπορεί επίσης να επάγει το **GSK-3α** το οποίο μπορεί επίσης με την σειρά του να επάγει το μονοπάτι **NF-κB** (Fitzgerald et al, 2015).

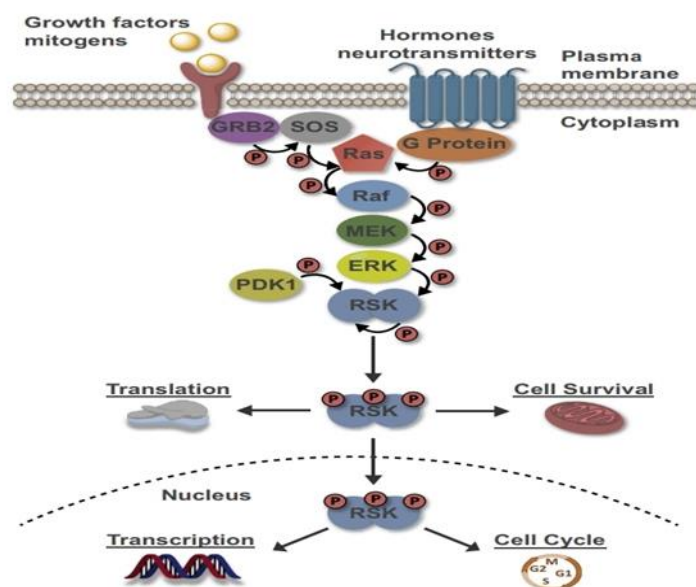
## Το μονοπάτι Ras/Raf/Mek/Erk

Το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω διέγερσης των RTKs (υποδοχείς τυροσίνης) όπως οι υποδοχείς επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας οδηγεί σε αυξημένη αυτοφωσφορυλίωση κινάσης τυροσίνης και δημιουργεί θέσεις σύνδεσης για τον παράγοντα ανάπτυξης που συνδέεται με τον υποδοχέα πρωτεΐνη-2 (GRB2), η οποία συνδέει τον υποδοχέα με τον παράγοντα SOS. Ο SOS καταλύει τη σύνδεση του GTP με την οικογένεια Ras των GTPασων (KRAS, NRAS και HRAS) και η GTP δεσμευμένη μορφή του Ras συνδέει και ενεργοποιεί τις δραστικές κινάσες Raf, μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών (BRAF, CRAF και ARAF), που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη. Το Raf φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το MAPK και τις MAPK κινάσες 1 και 2 (MAP2K1/2, επίσης γνωστές ως MEK1/2), τα κυρία υποστρώματα της Raf. Η ενεργοποιημένη MEK1/2 στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί επιπλέον τις κινάσες ERK1 και 2. Οι RSKs φωσφορυλιώνονται άμεσα και από τις ERK1/2 και την PDK1 (εικόνα 8), μια κινάση σερίνης/θρεονίνης μόνιμως ενεργή (Casalvieri et al, 2017).



**Εικόνα 8:** Το σηματοδοτικό μονοπάτι RSK. Η RSK σχετίζεται με το Ras-ERK μονοπάτι και ενεργοποιείται από το ERK1/2 ως απάντηση στους αυξητικούς παράγοντες, τις κυτοκίνες, τις ορμόνες και τους νευροδιαβιβαστές. Η PDK1 είναι επίσης απαραίτητη για την ενεργοποίηση των RSKs. Οι RSKs φωσφορυλιώνουν ένα ευρύ φάσμα κυτοσολικών και πυρηνικών πρωτεϊνών, και χαρακτηρίζεται από δύο περιοχές, ένα αμινο-τελικό άκρο κινάσης (NTKD) και ένα καρβοξυτελικό άκρο κινάσης (CTKD) (Nguyen et al, 2008).

Σε αντίθεση με το μονοπάτι PI3K/PTEN/Akt, το οποίο απαιτεί για την ενεργοποίηση της Akt εξαρτώμενη από την PDK-1, η ενεργοποίηση της PI3K εδώ δεν απαιτείται για την ενεργοποίηση της RSK και δεν χρειάζεται μεσολάβηση της PDK-1. Η ενεργοποιημένη RSK μπορεί να παραμείνει συνδεδεμένη με τη μεμβράνη, να διαχωριστεί στο κυττόςολιο ή να μεταφερθεί στον πυρήνα, φωσφορυλιώνοντας έτσι υποστρώματα σε όλο το κύτταρο. Αυτή η σηματοδότηση-καταρράκτης, από Ras έως RSK, συνδέει σήματα από υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας με μεταγραφικούς παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της προόδου του κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τον μεταβολισμό, την μετανάστευση και την εισβολή. Η υπερδραστηριοποίηση του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK (εικόνα 9) από αυξημένες διεγέρσεις ή μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας προάγει την ανάπτυξη και την επιβίωση πολλών ανθρώπινων καρκίνων. Ως εκ τούτου, η στόχευση των καθοδικών τελεστών αυτού του μονοπατιού θεωρείται ελκυστική αντικαρκινική στρατηγική (Casalvieri et al, 2017).



**Εικόνα 9:** Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK ενεργοποιείται κατά τη διέγερση από παράγοντες ανάπτυξης, μιτογόνα, ορμόνες και νευροδιαβιβαστές. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας οδηγεί σε ενισχυμένη αυτοφωσφορυλίωση κινάσης τυροσίνης και δημιουργεί θέσεις σύνδεσης για τον παράγοντα ανάπτυξης που συνδέεται με τον υποδοχέα πρωτεΐνης-2 (GRB2), η οποία συνδέει τον υποδοχέα με τον παράγοντα SOS. Ο SOS καταλύει τη δέσμευση της GTP με την Ras. Η GTP μορφή του Ras δεσμεύει και ενεργοποιεί τον τελεστή της, την κινάση Raf, που εντοπίζεται στη πλασματική μεμβράνη. Η Raf φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την MAPK και την εξωκυττάρια κινάση MEK1/2. Οι ενεργοποιημένες MEK φωσφορυλιώνουν την ERK1/2 τόσο στο κατάλοιπο τυροσίνης όσο και σε αυτό της θρεονίνης. Οι ριβοσωμικές κινάσες S6 (RSKs) φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται από τις ERK1/2 και PDK1, μια μονίμως ενεργή κινάση σερίνης/θρεονίνης. Οι ενεργοποιημένες RSKs παραμένουν προσκολλημένες στην μεμβράνη, ελεύθερες στο κυττόςολιο, ή μεταφέρονται στον πυρήνα, φωσφορυλιώνοντας υποστρώματα σε όλο το κύτταρο που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής γονιδίων, της πρωτεϊνσύνθεσης και του πολλαπλασιασμού (Casalvieri et al, 2017).



### **1.3.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ**

#### **ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Η χειρουργική εκτομή είναι η μόνη θεραπεία που προσφέρει πιθανή θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος και σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει τα ποσοστά επιβίωσης (McGuigan et al, 2018).

#### **ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ**

Η παγκρεατό-δωδεκαδακτυλεκτομή (διαδικασία Whipple), η περιφερική ή ολική παγκρεατεκτομή είναι οι χειρουργικές επιλογές για την εκτομή του καρκίνου του παγκρέατος, ανάλογα με την ανατομική θέση του όγκου ή των όγκων. Ο στόχος της χειρουργικής εκτομής είναι να επιτευχθεί μια εκτομή R0 καθώς αυτό σχετίζεται με μια σημαντικά βελτιωμένη επιβίωση σε σύγκριση με τις εκτομές R1 (Demir et al, 2018). Η συνεπικουρική θεραπεία και οι αγγειακές εκτομές έχουν χρησιμοποιηθεί σε μια προσπάθεια να αυξηθεί ο ρυθμός του μικροσκοπικού καθαρισμού. Υπάρχει συνεχής συζήτηση σχετικά με το τι συνιστά εκτομή R1 με την Ένωση Διεθνούς Ελέγχου του Καρκίνου και το Κολέγιο Αμερικανών Παθολόγων να το ορίζουν ως μικροσκοπική απόδειξη καρκινικών κυττάρων στο καθορισμένο περιθώριο εκτομής, ενώ το Βασιλικό Κολέγιο Παθολόγων τον ορίζει ως όγκο σε απόσταση 1 mm από το περιθώριο εκτομής (Kim et al, 2017).

#### **ΠΡΟΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΧΟΛΗΦΟΡΟΣ ΑΠΟΡΡΟΗ**

Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος παρουσιάζει ίκτερο. Αυτό μπορεί να έχει επιπτώσεις σε σχέση με την πήξη και τις αυξημένες περιεγχειρητικές μολυσματικές επιπλοκές (Blamey et al, 1983). Παραδοσιακά, οι ασθενείς με αποφρακτικό ίκτερο θα ανακουφίζονταν από αυτό πριν από την εκτομή. Μια ανασκόπηση του Cochrane που συνέκρινε τα αποτελέσματα πέντε μελετών που διερεύνησαν την προεγχειρητική χοληφόρο απορροή [(τέσσερις μέσω διαδερμικής διαηπατικής χολαγγειογραφίας και μια χρησιμοποιώντας ενδοσκοπική ανάδρομη χολαγγειοπαγκρεατογραφία (ERCP)] δεν βρήκε στοιχεία υπέρ ή κατά της απορροής (Wang et al, 2008). Ωστόσο, μια πρόσφατη τυχαίοποιημένη δοκιμασία ERCP και απορροής σε σχέση με την άμεση χειρουργική επέμβαση διαπίστωσε υψηλότερο ποσοστό περιεγχειρητικών επιπλοκών στην ομάδα ασθενών που τους έγινε απορροή (Van der Gaag et al, 2010). Αυτό υποδηλώνει ότι μια επιλεγμένη ομάδα ασθενών

μπορεί να έχει καλύτερα αποτελέσματα με επιταχυνόμενο χειρουργείο παρά με χολήφόρο απορροή, ακολουθούμενη από εκτομή.

#### ΑΝΑΣΤΟΜΩΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ

Μια σημαντική πηγή νοσηρότητας μετά τη διαδικασία Whipple είναι η διαρροή από την παγκρεατική αναστόμωση και ο σχηματισμός ενός παγκρεατικού συριγγίου. Είναι δυνατή η ανοικοδόμηση της πεπτικής οδού μετά το Whipple με αναστόμωση του παγκρεατικού υπολείμματος στο στομάχι ή τη νήστιδα. Μια πρόσφατη ανασκόπηση του Cochrane δεν βρήκε καμία διαφορά στο αποτέλεσμα όταν αυτές οι δύο τεχνικές συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Έχουν επίσης περιγραφεί παραλλαγές στην αναστομωτική τεχνική, αλλά μια πρόσφατη μετά-ανάλυση απέτυχε να καταδείξει μειωμένα ποσοστά παγκρεατικού συριγγίου με την αναστόμωση «από αγωγό σε βλεννογόνο» έναντι της τεχνικής «επιμόλυνσης» (Cheng et al, 2017).

#### ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΕΠΕΜΒΑΣΗ

Σύμφωνα με άλλους τομείς, το ενδιαφέρον έχει αυξηθεί για τις λαπαροσκοπικές χειρουργικές επεμβάσεις του παγκρέατος. Η λαπαροσκοπική περιφερική παγκρεατεκτομή ήταν η πρώτη λαπαροσκοπική χειρουργική επέμβαση παγκρεατικής εκτομής που περιεγράφηκε. Μία μετά-ανάλυση διαπίστωσε συγκρίσιμη νοσηρότητα και θνησιμότητα μεταξύ λαπαροσκοπικής και ανοικτής περιφερικής παγκρεατεκτομής, με μειωμένη απώλεια αίματος και διάρκεια παραμονής στην ομάδα ασθενών που τους έγινε λαπαροσκοπική χειρουργική επέμβαση. Δεν υπήρχε διαφορά στο ποσοστό θετικών περιθωρίων εκτομής. Έχουν γίνει επίσης προσπάθειες για τη χρήση ρομποτικών τεχνικών για τη βελτίωση της διαδικασίας του Whipple. Σε σύγκριση με την ανοιχτή παγκρεατεκτομή, μια μετά-ανάλυση αναδρομικών μελετών κοόρτης διαπίστωσε χαμηλότερο ποσοστό επιπλοκών και μικρότερη εμπλοκή περιθωρίου στην ομάδα ασθενών που έγινε χρήση ρομποτικής (Zhang et al, 2013).

#### ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΑΓΓΕΙΩΝ

Η σχέση μεταξύ οποιουδήποτε παγκρεατικού όγκου και του περιβάλλοντος αγγείου είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας εκτομής. Ενώ είναι συχνά τεχνικά εφικτό, το όφελος της εκτομής των μεσεντερικών και των πυλαίων αγγείων που εισβάλλονται από όγκο παραμένει ένα αμφιλεγόμενο θέμα (Mollberg et al, 2011). Η μετά-ανάλυση μελετών που περιλάμβαναν ασθενείς που υποβάλλονταν σε επέμβαση

Whipple με ή χωρίς μείζονα αρτηριακή εκτομή διαπίστωσαν υψηλότερα ποσοστά περιεγχειρητικής θνησιμότητας και κακή έκβαση το πρώτο και το τρίτο έτος στην ομάδα που υποβλήθηκε σε αρτηριακή επανόρθωση. Για το λόγο αυτό, η εισβολή στην ανώτερη μεσεντέρια αρτηρία παραμένει μια σε μεγάλο βαθμό αποδεκτή αντένδειξη για εκτομή. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της φλεβικής εκτομής μπορεί να είναι πιο ελπιδοφόρα. Μια μετά-ανάλυση 22 αναδρομικών μελετών κοόρτης δεν βρήκε διαφορά στην περιεγχειρητική νοσηρότητα, στους επιβιώσαντες ενός ή τριών ετών που υποβάλλονται σε εκτομή της πυλαίας ή ανώτερης μεσεντερικής φλέβας σε σύγκριση με εκείνους στους οποίους δεν πραγματοποιήθηκε αγγειακή παρέμβαση. Δεν αποτελεί έκπληξη ότι καταγράφηκε αυξημένος χρόνος χειρουργικής επέμβασης και απώλεια αίματος στην ομάδα φλεβικής εκτομής. Η συνδυασμένη παγκρεατεκτομή και φλεβική εκτομή μπορεί να έχουν ρόλο σε μια επιλεγμένη ομάδα ασθενών (Oettle et al, 2013).

### **ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ**

#### **ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Πρόκειται για την θεραπεία μετά την εγχείρηση. Η χρήση επικουρικής χημειοθεραπείας υποστηρίχθηκε από την τυχαιοποιημένη μελέτη ορόσημο CONKO-001 που συνέκρινε την επικουρική gemcitabine μετά από πλήρη χειρουργική εκτομή με την απλή χειρουργική επέμβαση. Αυτή η μελέτη κατέδειξε μια σημαντικά βελτιωμένη διάμεση επιβίωση χωρίς ασθένειες καθώς και μια συνολική βελτίωση πενταετούς αλλά και δεκαετούς επιβίωσης (Neoptolemos et al, 2010). Η δοκιμασία ESPAC-3 απέδειξε ότι η gemcitabine ήταν ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας επιλογής σε σύγκριση με την 5-φθοροουρακίλη (5-Fu). Άλλα χημειοθεραπευτικά σχήματα έχουν μελετηθεί, για παράδειγμα, στην τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή PRODIGE24/CCTG που συνέκρινε τα αποτελέσματα της gemcitabine ή του FOLFIRONOX [συνδυασμός οξαλιπλατίνης, ιρινοτεκάνης, λευκοβορίνης και 5-φθοροουρακίλης (5-Fu) ] σε ασθενείς με R1 ή R0 εκτομή παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Conroy et al, 2018).

#### **ΝΕΟ-ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Πρόκειται για την θεραπεία πριν την εγχείρηση. Αν και έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει όφελος επιβίωσης με επικουρική θεραπεία, μεταξύ 71% και 76% των ασθενών εξακολουθούν να υποτροπιάζουν εντός δύο ετών. Επιπλέον, λόγω επιπλοκών που σχετίζονται με χειρουργική επέμβαση, έως και το 40% των ασθενών δεν είναι κατάλληλοι για να προχωρήσουν σε επικουρική θεραπεία (Ghosh et al, 2016). Τέτοια

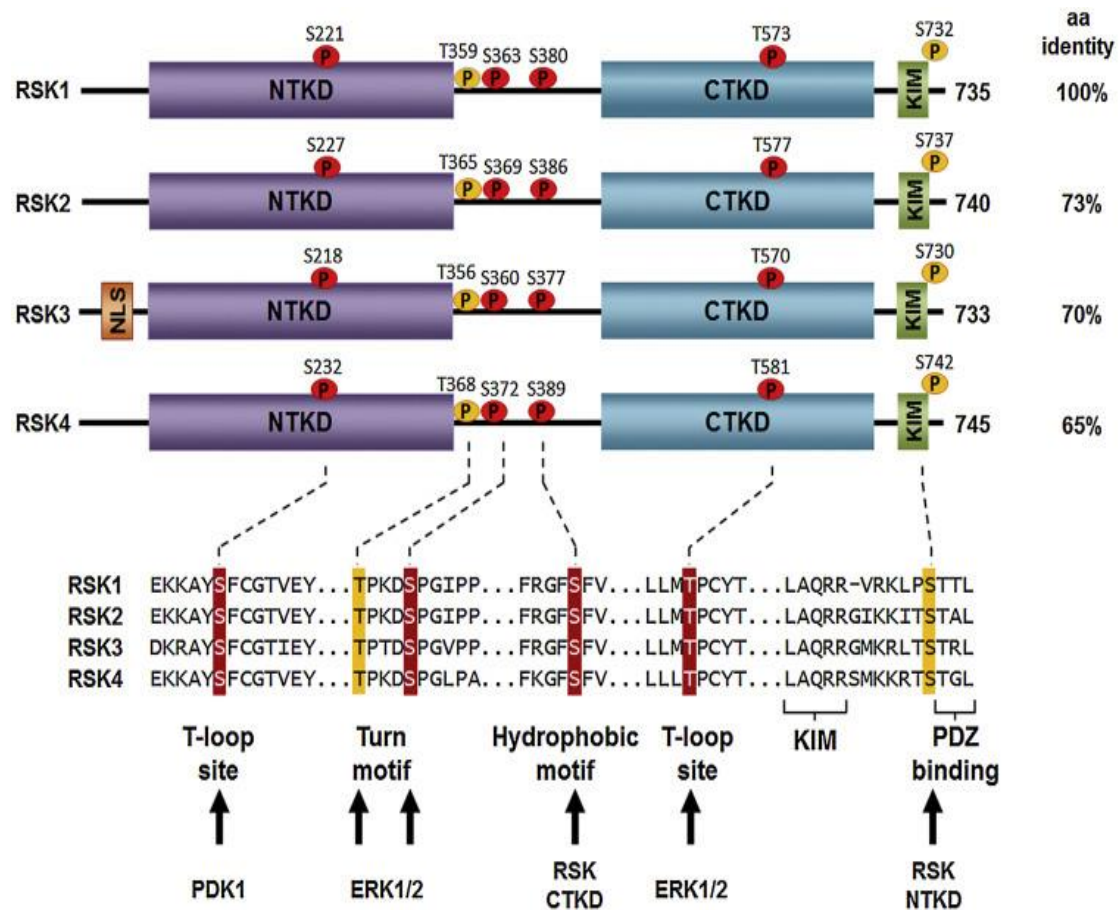
στοιχεία σε συνδυασμό με την επιτυχία που παρατηρήθηκε με την νέο-επικουρική θεραπεία σε διάφορους άλλους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του ορθού, του οισοφάγου και του γαστρικού καρκίνου, οδήγησαν στη διερεύνηση του αντικτύπου της συνεπικουρικής θεραπείας στον καρκίνο του παγκρέατος (Labori et al, 2017). Το θεωρητικό πλεονέκτημα της νέο-επικουρικής θεραπείας περιλαμβάνει την εξάλειψη μικρό-μεταστάσεων και τη συρρίκνωση του πρωτοπαθούς όγκου και αμφότεροι αυτοί οι παράγοντες σχετίζονται με μειωμένη συχνότητα υποτροπής του όγκου. Ωστόσο, οι ασθενείς που λαμβάνουν νέο-επικουρική θεραπεία μπορεί να αναπτύξουν επιπλοκές που μπορεί να καθυστερήσουν ή να αποτρέψουν το να προχωρήσουν σε χειρουργική επέμβαση. Οι όγκοι μπορεί να μην ανταποκρίνονται στη χημειό-ακτινοθεραπεία που οδηγεί σε εξέλιξη της νόσου, με αποτέλεσμα ένας όγκος που μπορεί να αφαιρεθεί να γίνει μη αναστρέψιμος. Επιπλέον, η χορήγηση χημειοθεραπείας προκαλεί ίνωση στο πάγκρεας, η οποία μπορεί να αυξήσει το ποσοστό επιπλοκών που σχετίζεται με την παγκρεατεκτομή (Lopez et al, 2014).

#### ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Η διαχείριση του μεταστατικού καρκίνου του παγκρέατος περιλαμβάνει έλεγχο συμπτωμάτων, διαχείριση ίκτερου και χημειοθεραπεία με το προτιμώμενο σχήμα χημειοθεραπείας FOLFIRONOX. Πραγματοποιήθηκε μια τυχαιοποιημένη δοκιμασία σε 48 γαλλικά κέντρα με ασθενείς που έλαβαν είτε gemcitabine είτε FOLFIRINOX μέσα σε μια εβδομάδα από την εγγραφή τους (Conroy et al, 2011). Υπήρχαν 171 ασθενείς σε κάθε ομάδα και πραγματοποιήθηκε ανάλυση intention-to-treat (ITT). Η μέση συνολική επιβίωση στην ομάδα FOLFIRONOX ήταν 11,1 μήνες σε σύγκριση με 6,8 μήνες στην ομάδα που δόθηκε gemcitabine. Υπήρξε αυξημένη συχνότητα ανεπιθύμητων ενεργειών εντός της ομάδας που έλαβε FOLFIRONOX, ωστόσο, υπήρξε το συμπέρασμα ότι αυτή θα πρέπει να είναι η επιλεγόμενη θεραπεία σε ασθενείς με μεταστατική νόσο (Chu et al, 2012).

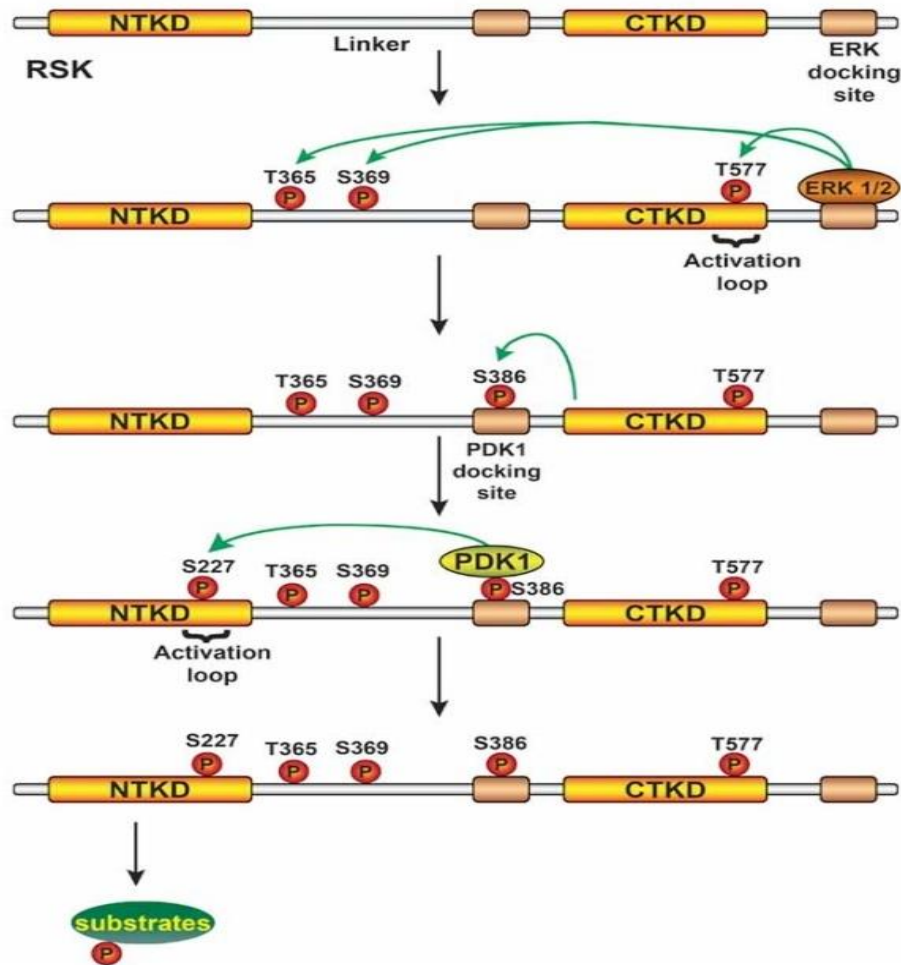
### 1.3.7 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ RSKs ΚΙΝΑΣΩΝ

Το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK ή MAPK είναι συχνά τροποποιημένο σε πολλούς καρκίνους και συμβάλλει στην κακή πρόγνωση και στην αντοχή στην χημειοθεραπεία. Οι ριβοσωμικές S κινάσες 90 kDa (RSK1–4) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινάσων σερίνης/θρεονίνης που περιλαμβάνει τους καθοδικούς παράγοντες αυτού του μονοπατιού και φωσφορυλιώνει υποστρώματα που εμπλέκονται στη μεταγραφή, τη μετάφραση, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς και την κυτταρική επιβίωση. Στους ανθρώπους, τέσσερις ισομορφες των RSKs (RSK1–4) (εικόνα 10) και δύο δομικά συσχετιζόμενες, γνωστές ως κινάσες MSK1 και MSK2 έχουν ταυτοποιηθεί (Casalvieri et al, 2017).



Εικόνα 10: Δομικά χαρακτηριστικά των RSKs και θέσεις φωσφορυλίωσης. Στην κορυφή φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση της RSK. Οι RSK1-4 χαρακτηρίζονται από την παρουσία δύο λειτουργικών περιοχών, του N-άκρου NTKD και του C-άκρου CTKD, τα οποία συνδέονται με μια περιοχή σύνδεσης. Το τερματικό άκρο C περιέχει μια εξοκκτώα κινάση 1/2 (ERK1/2) - που μοιάζει με μοτίβο KIM. Επιπλέον, η RSK3 περιέχει ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού (NLS) στη N-τερματική περιοχή της. Η ενεργοποίηση της RSK σχετίζεται με αύξηση της φωσφορυλίωσης σε έξι θέσεις (το καθένα εμφανίζεται ως χρωματισμένοι κύκλοι). Στην μέση φαίνονται οι θέσεις φωσφορυλίωσης είναι υψηλά συντηρημένες στις RSK1-4 και αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητες είτε άμεσα (κόκκινες) είτε έμμεσα (πορτοκαλί) για ενεργοποίηση των RSKs. Στο κάτω μέρος βλέπουμε συντηρημένες θέσεις φωσφορυλίωσης που απαιτούνται για την ενεργοποίηση της RSK και τις φωσφορυλιωμένες κινάσες τους. Το άκρο C περιλαμβάνει μια PDZ-σύνδεση. Δεξιά, το ποσοστό της αμινοξικής ταύτισης που αναφέρεται στην ανθρώπινη RSK1 (Houles et al, 2018).

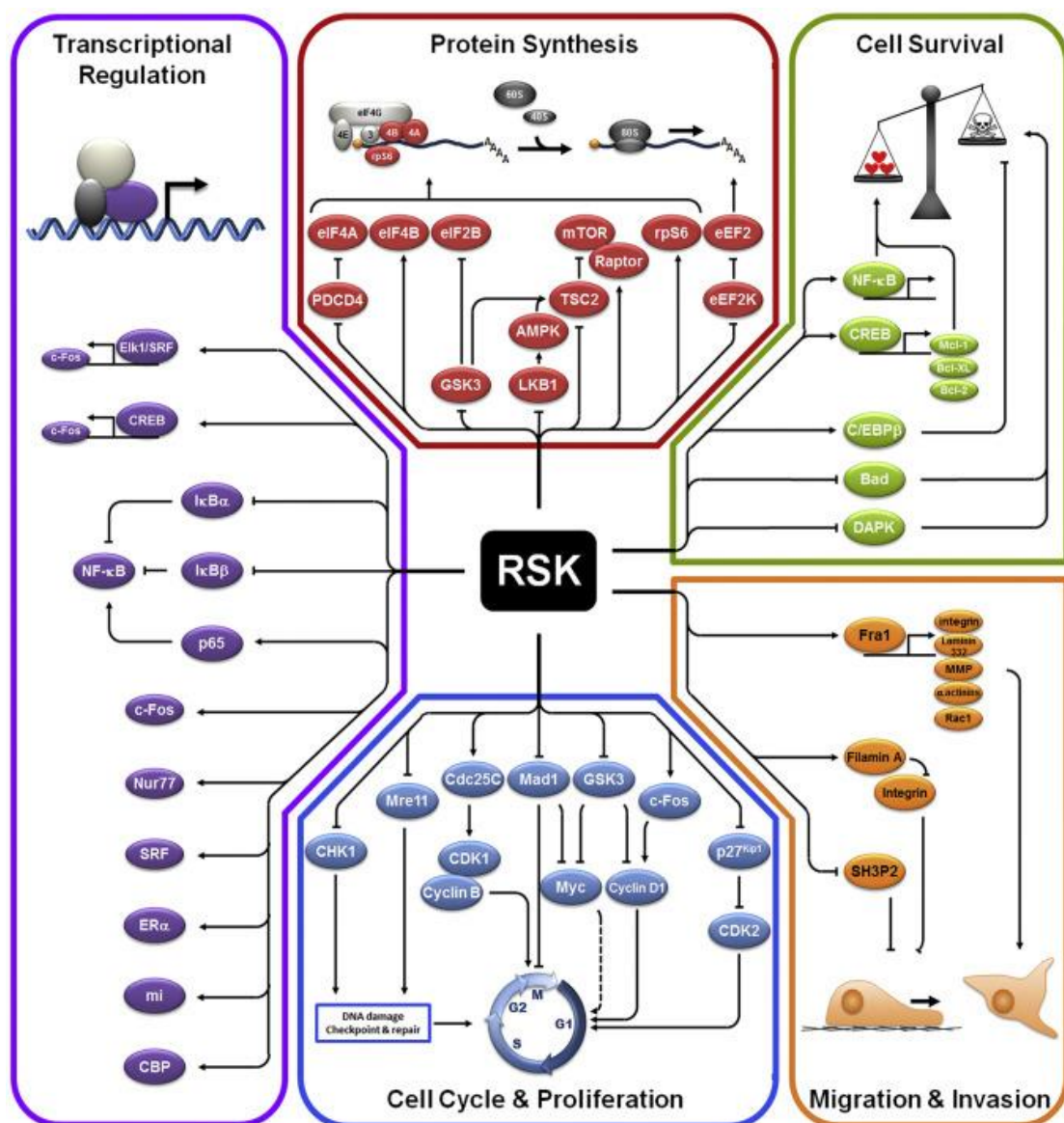
Οι RSKs έχουν δύο διακριτές περιοχές κινάσης, ένα NTKD και ένα CTKD, συνδεδεμένα από μια συντηρημένη περιοχή σύνδεσης. Το CTKD εμπλέκεται στην αυτοφωσφορυλίωση των RSKs και είναι ομόλογο με τις πρωτεϊνικές κινάσες CaMKs, ενώ το NTKD μοιράζεται ομολογία με την οικογένεια κινάσης AGC και είναι υπεύθυνο για την φωσφορυλίωση του υποστρώματος των RSKs. Αν και οι RSKs παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομόλογης αλληλουχίας (73-80%), ιδιαίτερα στις περιοχές κινάσης (78-90%), υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία ισόμορφης εξειδίκευσης μεταξύ των RSKs στη διαμεσολάβηση κυτταρικών διαδικασιών. Σε κύτταρα σε ηρεμία, οι ανενεργές ισόμορφες RSK1-3 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλοκο με τον ανοδικό ενεργοποιητή τους ERK1/2. Μετά τη διέγερση του αυξητικού παράγοντα, οι RSKs συσσωρεύονται στην πλασματική μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται, επάγοντας τη μεταφορά στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Η ικανότητα των RSKs να εισέρχονται στον πυρήνα δείχνει να σχετίζεται με ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού στο άκρο C. Η RSK4 διακρίνεται από τις άλλες ισόμορφες RSKs στο ότι είναι κυρίως κυτοσολική, συνεχώς ενεργή, και εμφανίζει δράση κινάσης ανεξάρτητη από παράγοντες ανάπτυξης. Ο καθορισμός του συγκεκριμένου μηχανισμού ενεργοποίησης της RSK ήταν δύσκολος λόγω των πολλαπλών θέσεων φωσφορυλίωσης στις RSKs, της έκφρασης και ρύθμισης των τεσσάρων ισόμορφων RSKs, καθώς και της μετατόπιση τους εντός του κυττάρου. Συνολικά έξι θέσεις φωσφορυλίωσης έχουν χαρτογραφηθεί στις RSK1 και 2 (όπως και στις RSK3 και RSK4) και, από αυτές τις θέσεις, το Ser211 στον βρόχο ενεργοποίησης του NTKD, τα Ser363 και Ser380 στην περιοχή σύνδεσης καθώς και το Thr573 στον βρόχο ενεργοποίησης του CTKD είναι σημαντικές για τη δραστηριότητα. Ο γενικός μηχανισμός ενεργοποίησης των RSKs (εικόνα 11) περιλαμβάνει τη σύνδεση του ανενεργού ERK1/2 σε ένα εξειδικευμένο μοτίβο σύνδεσης της ERK (Leu-Arg-Gln-Arg-Arg) της περιοχής (domain) D στο άκρο C των RSKs. Μετά την ενεργοποίηση, η ERK1/2 φωσφορυλιώνει το Thr573 στον βρόχο ενεργοποίησης στο CTKD της RSK και μπορεί επίσης φωσφορυλιώσει τα Ser363 και Thr359 στην περιοχή σύνδεσης, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλέγματος ERK1/2-RSK (Casalvieri et al, 2017).



Εικόνα 11: Μοριακός μηχανισμός ενεργοποίησης των RSKs. Μια διαδοχική αλληλουχία γεγονότων εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των RSKs. Η ERK1/2 συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο της RSK και ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη ERK1/2 φωσφορυλιώνει την RSK στα Thr365 και Ser369 στην περιοχή σύνδεσης και Thr577 στον βρόχο ενεργοποίησης του CTKD. Το CTKD αυτοφωσφορυλιώνει το Ser386 στην περιοχή σύνδεσης. Η PDK1 συνδέεται με την RSK στη νέα περιοχή σύνδεσης της PDK1 κοντά στο Ser386, και φωσφορυλιώνει την RSK στο Ser227 στον βρόχο ενεργοποίησης του NTKD. Η ενεργοποιημένη RSK στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τον καθοδικό στόχο (Nguyen et al, 2008).

Η φωσφορυλίωση του Thr573 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του CTKD και την αυτοφωσφορυλίωση του Ser380, επάγοντας την συμμετοχή της PDK1 στην περιοχή σύνδεσης. Η PDK1 τότε φωσφορυλιώνει το Ser211 στο NTKD, οδηγώντας στην πλήρη ενεργοποίηση της RSK και στην φωσφορυλίωση των κυτταροπλασματικών ή πυρηνικών υποστρωμάτων στο NTKD. Εναλλακτικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης των RSKs έχουν αναφερθεί και περιλαμβάνουν τις p38 MAPK και ERK5 του CTKD της RSK, τη φωσφορυλίωση της RSK2 στο Tyr529 από τον παράγοντα FGFR3, καθώς και μέσω της Src που επάγει την πρόσδεση της ERK1/2 με την RSK2. Η αποφωσφορυλίωση των RSKs από πρωτεϊνικές φωσφατάσες πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην απενεργοποίησή τους. Η αναγνώριση των υποστρωμάτων των RSKs αποτελεί έναν τομέα έρευνας για την κατανόηση των

μηχανισμών με τους οποίους οι ισόμορφες των RSKs ασκούν τις επιδράσεις τους σε διάφορες βιολογικές διεργασίες (εικόνα 12). Η εξειδίκευση του υποστρώματος της RSK1 έχει εξεταστεί χρησιμοποιώντας βιβλιοθήκες συνθετικών πεπτιδίων που εντόπισε ένα μοτίβο φωσφορυλίωσης των Arg/Lys-X-Arg-X-X-pSer/Thr ή Arg-Arg-X-pSer/Thr. Οι RSKs έχουν τη δυνατότητα να φωσφορυλιώνουν υποστρώματα σε διάφορα σημεία του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένης της πλασματικής μεμβράνης, του κυτταροπλάσματος αλλά και του πυρήνα, υποδεικνύοντας ότι διάφορα μέλη της οικογένειας μπορεί να ρυθμίζουν την πρωτεϊνική δραστηριότητα σε όλο το κύτταρο (Casalvieri et al, 2017).



**Εικόνα 12:** Οι βιολογικές λειτουργίες και οι μοριακοί στόχοι των ισόμορφων RSKs. Η RSK ελέγχει διάφορες βιολογικές διεργασίες ρυθμίζοντας αρκετά ενδοκυτταρικά δίκτυα σηματοδότησης. Οι πρωτεΐνες στόχοι των RSKs απεικονίζονται σε αυτό το σχήμα και περιλαμβάνουν την μεταγραφική ρύθμιση (μωβ), την πρωτεϊνοσύνθεση (κόκκινο), τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (μπλε), την κυτταρική επιβίωση (πράσινο), τη μετανάστευση και την εισβολή (πορτοκαλί) (Houles et al, 2018).



### 1.3.8 ΟΙ RSKs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Οι ισόμορφες RSK1-4 εκφράζονται παντού σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές και ιστούς, αλλά ελάχιστα είναι γνωστά για συγκεκριμένες λειτουργίες των επιμέρους ισόμορφων των RSKs. Οι συνολικές λειτουργικές διαφορές των ισόμορφων RSKs είναι εμφανείς στον καρκίνο, όπου η έκφραση και η δραστηριότητα των RSK1 και RSK2 προάγει την ανάπτυξη και την επιβίωση του όγκου, ενώ η RSK3 και η RSK4 έχει αναφερθεί ότι ενεργούν αντίστροφα ως καταστολείς των όγκων. Η ανώμαλη έκφραση ή δραστηριότητα των RSKs έχει συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του παχέος εντέρου, του πλακώδους καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου (HNSCC), της λευχαιμίας, του καρκίνου του πνεύμονα, του κακοήθους μελανώματος, του πολλαπλού μυελώματος, του καρκίνου των ωοθηκών, του καρκίνου του προστάτη αλλά και του καρκίνου του παγκρέατος. Η αυξημένη ρύθμιση της έκφρασης των RSK1 και RSK2 σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου υποδηλώνει ότι εμπλέκονται στην ογκογένεση και θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχους σε αντικαρκινικές θεραπείες. Η έκφραση των RSK1 και RSK2 έχει αναφερθεί ότι είναι αυξημένη σε δείγματα όγκου του μαστού και του προστάτη και η αναστολή της δραστηριότητας των RSKs έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον πολλαπλασιασμό σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού και του προστάτη. Η έκφραση και η ενεργοποίηση των RSKs στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο μέσω αδρανοποίησης των προαππτωτικών πρωτεϊνών, όπως ο BAD. Η έκφραση της RSK2, αλλά όχι της RSK1, βρέθηκε ότι συσχετίζεται με αυξημένη μετάσταση σε ασθενείς με HNSCC. Η απώλεια της λειτουργίας της RSK2 οδηγεί σε μειωμένη φωσφορυλίωση του cAMP σαν απάντηση στις CREB και Hsp27, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διαμεσολαβούμενη από την RSK2 διηθητικότητα των κυττάρων HNSCC. Σε αιματολογικές κακοήθειες, το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK συχνά ενεργοποιείται κατά λάθος και συμβάλλει σε κακή πρόγνωση και αντοχή στη χημειοθεραπεία. Αυτό το μονοπάτι αναφέρεται ότι είναι συνεχώς ενεργοποιημένο σε πάνω από 50% των περιπτώσεων της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML) αλλά και σε περιπτώσεις λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (ALL). Οι RSK1 και RSK2 είναι οι κύριες ισόμορφες που εκφράζονται σε κύτταρα AML. Ενεργοποιημένες μεταλλάξεις στον υποδοχέα FLT3, λόγω εσωτερικής διπλής επικάλυψης (ITD), είναι οι πιο συχνές ανωμαλίες σε AML και προσδίδουν κακή πρόγνωση. Οι μεταλλάξεις στις FLT3/ITD μπορούν να οδηγήσουν σε συνεχή

ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK και μπορεί να αποτρέψει την απόπτωση μέσω της φωσφορυλίωσης του BAD με τη μεσολάβηση της RSK1. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το RSK2 είναι επίσης απαραίτητο για την έναρξη και εξέλιξη της AML που προκαλείται από τις FLT3/ITD, και έχει ρόλο στην αιματοποιητικό μετασχηματισμό στην OMA και στο πολλαπλό μυέλωμα. Ο υποδοχέας κινάσης τυροσίνης FGFR3 έχει εμπλακεί στην εξέλιξη των αιματολογικών κακοηθειών μέσω της άμεσης ενεργοποίησης της RSK2 μέσω ενός μηχανισμού δύο σταδίων που διευκολύνει την αλληλεπίδραση των ERK-RSK2 και φωσφορυλίωση της RSK2. Αυτές οι μελέτες παρέχουν στοιχεία για έναν εναλλακτικό μηχανισμό ενεργοποίησης της RSK2 όπου ο FGFR3 θα συμβάλλει άμεσα στην ένταση και τη διάρκεια της ενεργοποίησης του RSK2. Αντίθετα, η RSK3 έχει αποδειχθεί ότι δρα ως καταστολέας όγκων στον καρκίνο των ωοθηκών και ότι η έκφραση της στις καρκινικές κυτταρικές σειρές των ωοθηκών μείωσε τα ποσοστά πολλαπλασιασμού τους. Η RSK4 υποδεικνύει δραστηριότητα που δεν εξαρτάται από το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK, υποδεικνύοντας έτσι διαφορετικό τρόπο ενεργοποίησης αυτής της ισόμορφης. Η RSK4 έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει σε p53-εξαρτώμενη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και σε κυτταρική γήρανση που προκαλείται από ογκογονίδια. Η αυξημένη έκφραση της RSK4 μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του μαστού και αυξάνει τη συσσώρευση κυττάρων στην φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου. Η μειωμένη έκφραση της RSK4 προβλέπει κακή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, και ασθενείς με OMA. Ωστόσο, η RSK4 έχει επίσης αναφερθεί ότι έχει αυξημένη έκφραση σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των πρωτογενών κακοήθων καρκίνων του πνεύμονα και φαίνεται να δρα υπέρ της ανάπτυξης του όγκου. Επιπλέον, υπάρχουν μερικά στοιχεία ότι η έκφραση των RSK3 και RSK4 επάγει αντίσταση στους αναστολείς της κινάσης PI3 στον καρκίνο του στήθους. Ως εκ τούτου, οι λειτουργίες των RSK3 και RSK4 στον καρκίνο δεν έχουν ακόμη ξεκαθαριστεί. Συνολικά, οι RSK1 και RSK2 θεωρούνται γενικά οι κύριες ισόμορφες που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό του όγκου. Σύμφωνα με αυτό, η έκφραση των RSK1 και RSK2 είναι συχνά υψηλότερη σε όγκους παρά σε υγιείς ιστούς, ενώ η έκφραση των RSK3 και RSK4 είναι συνήθως χαμηλότερη σε όγκους σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς (Casalvieri et al, 2017).

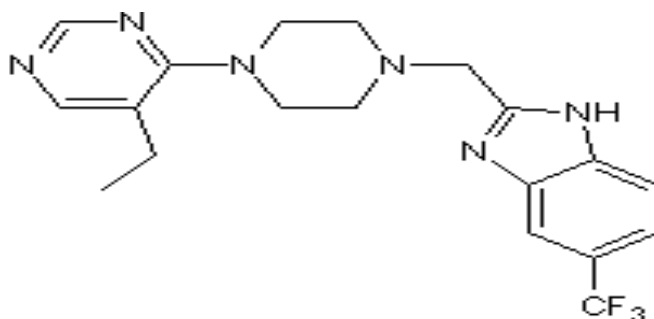
### 1.3.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι μία από τις πιο θανατηφόρες κακοήθειες. Έχει σε σχέση με όλες τις άλλες μορφές καρκίνου, τα υψηλότερα ποσοστά θνητότητας. Ενδεικτικά βάση των διεθνών στατιστικών, μόνο το 7% των ασθενών εμφανίζουν επιβίωση για διάστημα πέντε ετών. Σύμφωνα με τις καταγραφές περίπου το 30% των ασθενών χάνουν τη ζωή τους μέσα σε διάστημα 2 έως 6 μηνών από τη στιγμή της διάγνωσης. Όπως οι περισσότερες μορφές καρκίνου έτσι και ο καρκίνος του παγκρέατος δεν παρουσιάζει στα πρώτα στάδια συμπτώματα. Και το χειρότερο είναι πως εξαιτίας της έλλειψης συμπτωμάτων, συχνά η νόσος προχωρά τόσο πολύ που δεν είναι εφικτή ούτε καν μια χειρουργική επέμβαση. Παρότι η χειρουργική επέμβαση θεωρείται ο βασικός τρόπος αντιμετώπισης του καρκίνου του παγκρέατος, στο 80% των περιπτώσεων μπορεί να είναι τόσο αργά που οι γιατροί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν νυστέρι. Δυστυχώς δεν υπάρχει κάποια εξέταση στο αίμα που να μπορεί να θέσει την διάγνωση του καρκίνου παγκρέατος. Ο καρκινικός δείκτης Ca 19-9 συνήθως αυξάνει στον καρκίνο του παγκρέατος, αλλά δεν θέτει διάγνωση. Ο δείκτης Ca 19-9 χρησιμεύει κυρίως για την παρακολούθηση της εξέλιξης ήδη διαγνωσμένης νόσου. Έτσι προκύπτει η ανάγκη για την ανακάλυψη νέων αποτελεσματικών θεραπειών εναντίον του παγκρεατικού καρκίνου. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου των RSKs ως στόχοι για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών θεραπειών οι οποίοι θα είναι πιο αποτελεσματικοί και λιγότερο τοξικοί για τον καρκίνο του παγκρέατος. Στόχος είναι η μελέτη του ρόλου των RSKs στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων μέσω της στοχευμένης αναστολής της δράσης των κινασών RSKs με τη βοήθεια φαρμακολογικών αναστολέων και τη χρήση εγκαθιδρυμένων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών και πρωτογενών ξενομοσχευμάτων από όγκους ασθενών (Patient Derived Xenografts, PDX).

### 1.3.10 ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

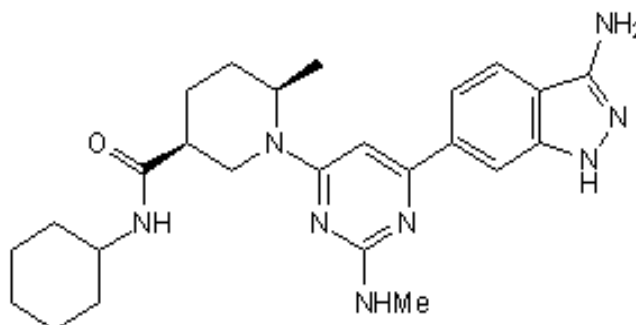
Η διαφορετική έκφραση και οι αποκλίσεις στις λειτουργίες των ισόμορφων RSKs στον καρκίνο υποστηρίζουν την ανάγκη για ανάπτυξη εξειδικευμένων αναστολέων των RSKs. Τέτοιοι αναστολείς θα ήταν χρήσιμοι ως χημικά εργαλεία για να εξετάσουμε την επίδραση των αναστολέων των ισόμορφων RSKs και θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη αποτελεσματικών αντικαρκινικών παραγόντων. Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

1. Ο **PF-4708671** είναι ένας εξειδικευμένος αναστολέας της RSK1 και εμποδίζει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης που παράγεται από την RSK1. Η θεραπεία με PF-4708671 οδηγεί συχνά σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Park et al, 2015).



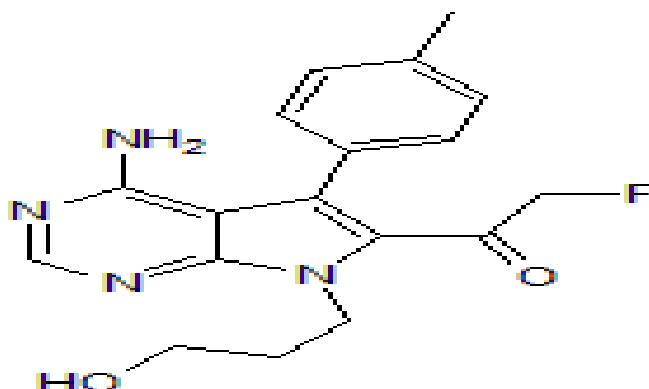
Εικόνα 13: Χημική δομή του **PF-4708671** (<https://www.tocris.com>).

2. Ο **GSK 2334470** είναι ένας ισχυρός αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης (PDK1) που εξαρτάται από 3-φωσφοϊνοσιτίδη (IC<sub>50</sub> ~ 10 nM). Καταστέλλει τη φωσφορυλίωση του βρόχου T και την μεταγενέστερη ενεργοποίηση των υποστρωμάτων της PDK1: S6K1, SGK και RSK in vitro (Heberle et al, 2019).



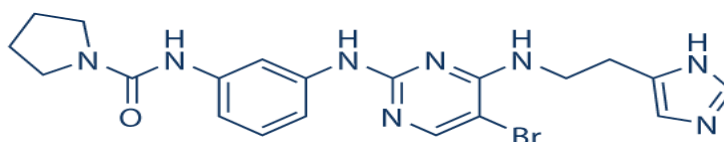
Εικόνα 14: Χημική δομή του **GSK 2334470** (<https://www.tocris.com>).

3. Ο **FMK** είναι ένας ισχυρός μη αναστρέψιμος αναστολέας των RSK1/2 (IC<sub>50</sub> = 15nM). Απενεργοποιεί τη δραστηριότητα στο C-τερματικό άκρο. Καταστέλλει τη δραστηριότητα κινάσης RSK2 (Kang et al, 2010).



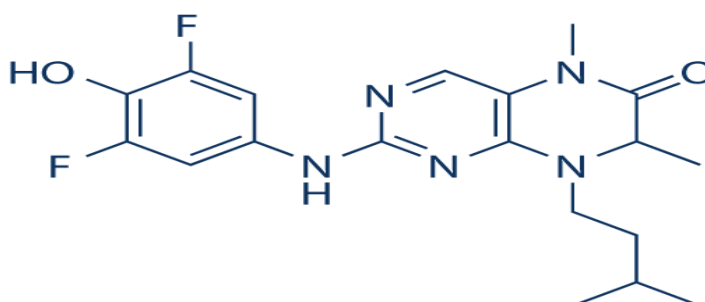
Εικόνα 15: Χημική δομή του **FMK** (<https://www.tocris.com>).

4. Ο **BX-912** είναι ένας ισχυρός και ειδικός αναστολέας PDK1 με IC<sub>50</sub> 12 nM, 9 και 105 φορές μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για την PDK1 από την PKA και την PKC (Feldman et al, 2005).



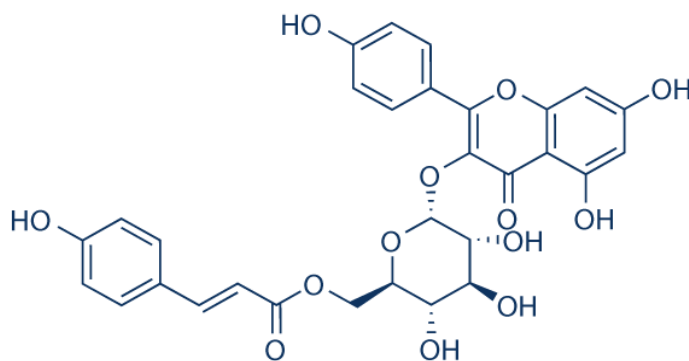
Εικόνα 16: Χημική δομή **BX-912** (<https://www.selleckchem.com>).

5. Ο **BI-D1870** αναστέλλει τις RSK1, RSK2, RSK3 και RSK4 με IC<sub>50</sub> 10-30 nM (Sapkota et al, 2007).



Εικόνα 17: Χημική δομή **BI-D1870** (<https://www.selleckchem.com>).

6. Τα φλαβονοειδή είναι μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων, παρουσιάζοντας ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δραστηριοτήτων. Κάποιοι μεταβολίτες τους μπορεί να είναι πιο ενεργοί από τις χημικές ενώσεις από τις οποίες προέρχονται. Η ένωση T-ac αποτελεί παρακετυλιωμένο παράγωγο του 7-methylether tiliroside, που προέρχεται από την επάση πλατανοσίδη με τιλιροσίδη, δύο κουμαρου γλυκοσίδες καμφερόλης που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα των βλαστών του *Platanus orientalis* L (Demetzos et al, 1997). Η κυτταροτοξική δράση των αρχικών χημικών ουσιών δεν ήταν ενεργή ενώ ο γλυκοζυλιωμένος τιλιροσίδης έχει βρεθεί να έχει κυτταροτοξική δράση σε ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών (Dimas et al, 1999).



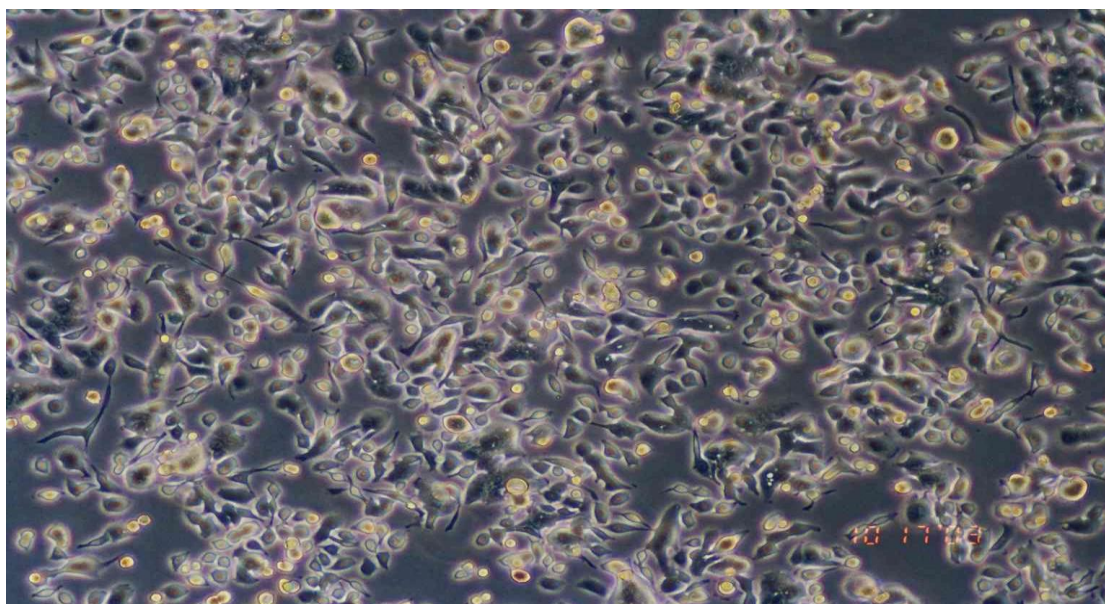
Εικόνα 18: Χημική δομή **Tiliroside** (<https://www.selleckchem.com>).

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

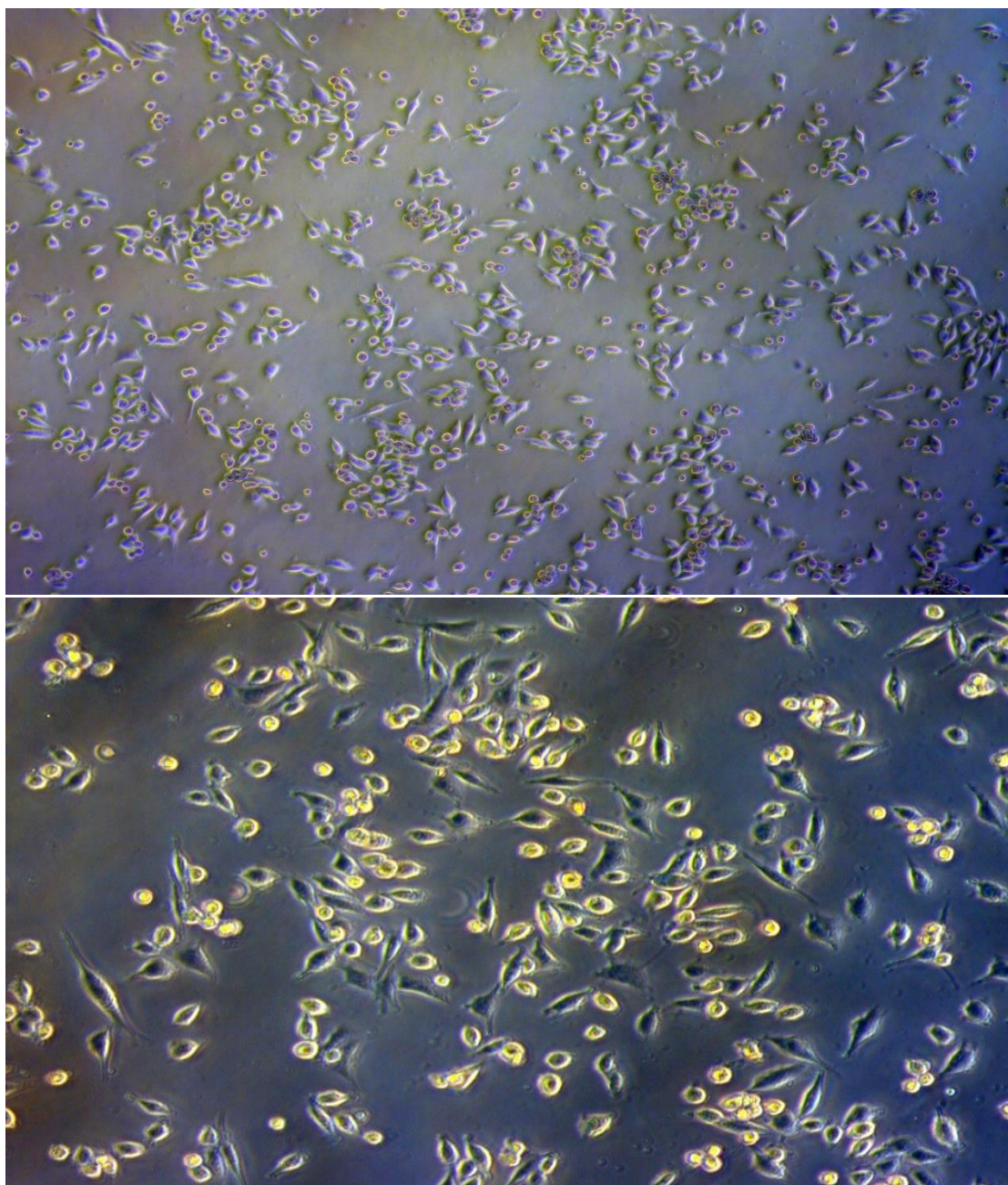
### 2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

#### 2.1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ – ASPC1 ΚΑΙ ATTACHED

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παγκρέατος. Επιλέχθηκαν 2 διαφορετικές κυτταρικές σειρές, AsPC-1 (εικόνα 19) και Attached (εικόνα 20). Ο καρκινικός κυτταρικός πληθυσμός AsPC-1 αποτελεί μια πρωτογενή καρκινική σειρά η οποία απομονώθηκε από μια 62χρονη γυναίκα με αδenoκαρκίνωμα της κεφαλής του παγκρέατος και μεταστάσεις σε πολλά κοιλιακά όργανα. Η ασθενής έλαβε ακτινοβολία και χημειοθεραπεία αλλά τελικά εμφάνισε ασκίτη (εξίδρωση και άθροιση υγρού εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας) και πέθανε δύο εβδομάδες αργότερα. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε σε έρευνα των Chen et al. το 1982 με τίτλο: Ανθρώπινο παγκρεατικό αδenoκαρκίνωμα: in vitro και in vivo μορφολογία μιας νέας σειράς όγκων που δημιουργήθηκε από ασκίτη (Deer et al, 2010; Chen et al, 1982). Η καρκινική κυτταρική σειρά attached πρόκειται για πρωτογενή καρκινική κυτταρική σειρά και προέρχεται από την διδακτορική διατριβή της κ. Ευαγγελίας Σερέτη (2019) και πιο συγκεκριμένα μέσω απομόνωσης κυττάρων από ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος έπειτα από χειρουργική εξαίρεση. Τα συγκεκριμένα κύτταρα αναπτύσσονταν προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας κυτταροκαλλιέργειας και ονομάστηκε Attached\_021013 (AT\_021013).



Εικόνα 19: Καρκινική κυτταρική σειρά AsPC-1 ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).



Εικόνα 20: Καρκινική κυτταρική σειρά **Attached\_021013** (personal communication).



## 2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

### 2.2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων έγινε σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco, code: 2194780) εμπλουτισμένο με εμβρυικό ορό μοσχαριού 5% [(FBS: Fetal Bovine Serum) PanBiotech], L-γλουταμίνη 1% (Gibco, code: 2165253) και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη 1% (Gibco, code: 2145465). Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη χρησιμοποιούνται με στόχο την πρόληψη της βακτηριακής μόλυνσης των κυτταρικών καλλιιεργειών λόγω της αποτελεσματικής συνδυασμένης δράσης τους κατά των gram-θετικών και των gram-αρνητικών βακτηριδίων. Η πενικιλίνη απομονώθηκε αρχικά από τον μύκητα *Penicillium* και η δράση της είναι η παρέμβαση στον κύκλο εργασιών του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και η απελευθέρωση των ενζύμων που μεταβάλλουν περαιτέρω το κυτταρικό τοίχωμα. Η στρεπτομυκίνη απομονώθηκε αρχικά από τον *Streptomyces griseus*. Η λειτουργία της είναι να δεσμεύει την υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος, που οδηγεί στην αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης και του θανάτου σε ευαίσθητα βακτήρια. Η L-γλουταμίνη πρόκειται για ένα ασταθές βασικό αμινοξύ που απαιτείται σε σκευάσματα μέσω κυτταροκαλλιέργειας. Τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα μέσα σχηματίζονται με ελεύθερη L-γλουταμίνη η οποία είτε περιλαμβάνεται στον βασικό τύπο είτε προστίθεται σε υγρές συνθέσεις κατά τον χρόνο χρήσης. Η L-γλουταμίνη είναι ασταθής σε φυσιολογικό pH σε υγρά μέσα. Διασπάται σε αμμώνιο και πυρογλουταμικό με ρυθμούς που το καθιστούν πρόβλημα σε πολλές εφαρμογές βιομηχανίας. Σήμερα, πολλά ιδιόκτητα μέσα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία συμπληρώνονται με L-γλουταμίνη με την μορφή διπεπτιδίων, όπως η αλανυλ-1-γλουταμίνη και η γλυκυλ-1-γλουταμίνη. Μία λιγότερο καθορισμένη πηγή L-γλουταμίνης προέρχεται χρησιμοποιώντας υδρολύματα πρωτεϊνών, ιδιαίτερα υδρολύματα γλουτένης. Οι κύριες λειτουργίες της γλουταμίνης σε συστήματα κυτταροκαλλιέργειας είναι η υποστήριξη της ανάπτυξης κυττάρων που έχουν υψηλές απαιτήσεις ενέργειας και συνθέτουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Επίσης, αποτελούν μια εναλλακτική πηγή ενέργειας για ταχέως διαιρούμενα κύτταρα και κύτταρα που χρησιμοποιούν γλυκόζη αναποτελεσματικά. Επιπλέον, τα κύτταρα απαιτούν άτομα αζώτου για την κατασκευή μορίων όπως τα νουκλεοτίδια, τα αμινοξέα, τα αμινοσάκχαρα και οι βιταμίνες. Το αμμώνιο είναι μια ανόργανη πηγή αζώτου που υπάρχει

κυρίως ως θετικά φορτισμένο κατιόν,  $\text{NH}^{4+}$ , σε φυσιολογικό pH. Το άζωτο αμμωνίου που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα αρχικά ενσωματώνεται στο οργανικό άζωτο ως αμίνη γλουταμικού ή αμίδιο γλουταμίνης. Αυτά τα δύο αμινοξέα παρέχουν τις πρωταρχικές δεξαμενές αζώτου για τη σύνθεση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων αζωτούχων ενώσεων.

### 2.3 ΘΡΥΨΙΝΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Οι καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων αναπτύχθηκαν μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση (confluency) σε 75-cm<sup>2</sup> φλάσκα ιστοκαλλιέργειας με 15ml θρεπτικού μέσου ιστοκαλλιέργειας. Τα κύτταρα υπόκεινται σε κατεργασία με θρυψίνη (Gibco, code: 15090-046) και στη συνέχεια επανατοποθετούνται σε δευτερογενείς καλλιέργειες. Η θρυψίνη βρίσκεται αποθηκευμένη στους -20°C σε συγκέντρωση 10X αλλά χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X η οποία μετά την παρασκευή της αποθηκεύεται στους 4°C. Η αραίωση από 10X σε 1X γίνεται με Sodium Chloride 0,9%. Η διαδικασία απομάκρυνσης των κυττάρων από την πρωτογενή καλλιέργεια και η μεταφορά τους σε δευτερογενείς καλλιέργειες αποτελεί ένα πέρασμα ή υποκαλλιέργεια. Όλες οι επώσεις καλλιεργιών πραγματοποιήθηκαν σε υγροποιημένο επωαστήρα με 37°C και 5% CO<sup>2</sup> προκειμένου το pH να παραμένει σταθερό στο 7.4. Όλοι οι χειρισμοί των καλλιεργιών των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής. Κατά σειρά τα βήματα είναι : η αφαίρεση του θρεπτικού υλικού με πιπέτα ή απευθείας απομάκρυνση του στη φιάλη αποβλήτων, η διπλή πλύση με 7ml 0,9% Sodium Chloride για την απομάκρυνση υπολείμματος ορού FBS που μπορεί να αναστείλει τη δράση της θρυψίνης, η προσθήκη στη φλάσκα 2ml θρυψίνης (σε θερμοκρασία δωματίου) έτσι ώστε να καλύψει το προσκολλημένο στρώμα κυττάρων, η τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο (37°C) για 1-2 λεπτά. Ελαφρύ χτύπημα του πάτου της φλάσκας έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα, ο έλεγχος σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο για επιβεβαίωση ότι τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια. Σε περίπτωση που τα κύτταρα δεν έχουν αποκολληθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, η φλάσκα επιστρέφεται για 1-2 επιπλέον λεπτά στον κλίβανο. Στη συνέχεια, στο θάλαμο νηματικής ροής, γίνεται προσθήκη 4ml θρεπτικού μέσου με ορό (RPMI). Το εναιώρημα των κυττάρων συλλέγεται σε μια πιπέτα και ξεπλένεται το στρώμα των κυττάρων δύο ή τρεις φορές για να διαχωριστούν τα κύτταρα και να απομακρυνθούν τυχόν υπόλοιπα προσκολλημένα κύτταρα. Μόλις απομακρυνθούν τα κύτταρα, προστίθεται μέσο που

περιέχει ορό (RPMI) για να αναστείλει περαιτέρω δραστικότητα θρυψίνης που μπορεί να βλάψει κύτταρα. Έπειτα συλλέγεται το περιεχόμενο της φλάσκας (4ml RPMI και 2ml θρυψίνη εντός των οποίων βρίσκονται και τα κύτταρα) και τοποθετείται σε falcon των 15ml το οποίο φυγοκεντρείται σε 1200 στροφές/min για 5 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απομακρύνεται το υπερκείμενο και πραγματοποιείται επαναιώρηση του ιζήματος που περιέχει τα κύτταρα σε θρεπτικό μέσο (RPMI) και τέλος ο εμβολιασμός των κυττάρων στην φλάσκα ιστοκαλλιέργειας 75-cm<sup>2</sup> στην οποία έχει τοποθετηθεί εκ νέου θρεπτικό μέσο με ορό (RPMI) περίπου 15ml. Έπειτα γίνεται επανατοποθέτηση της καλλιέργειας στον κλίβανο (37°C, 5% CO<sup>2</sup>) και ανανέωση θρεπτικού υλικού, με απομάκρυνση του παλιού και προσθήκη νέου, ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε κυτταρικής σειράς. Αυτό συνέβαινε συνήθως στις 3-4 μέρες. Τέλος το πέρασμα (passage) με θρυψίνη γινόταν ανάλογα με τη συγκέντρωση (confluency) των κυττάρων.

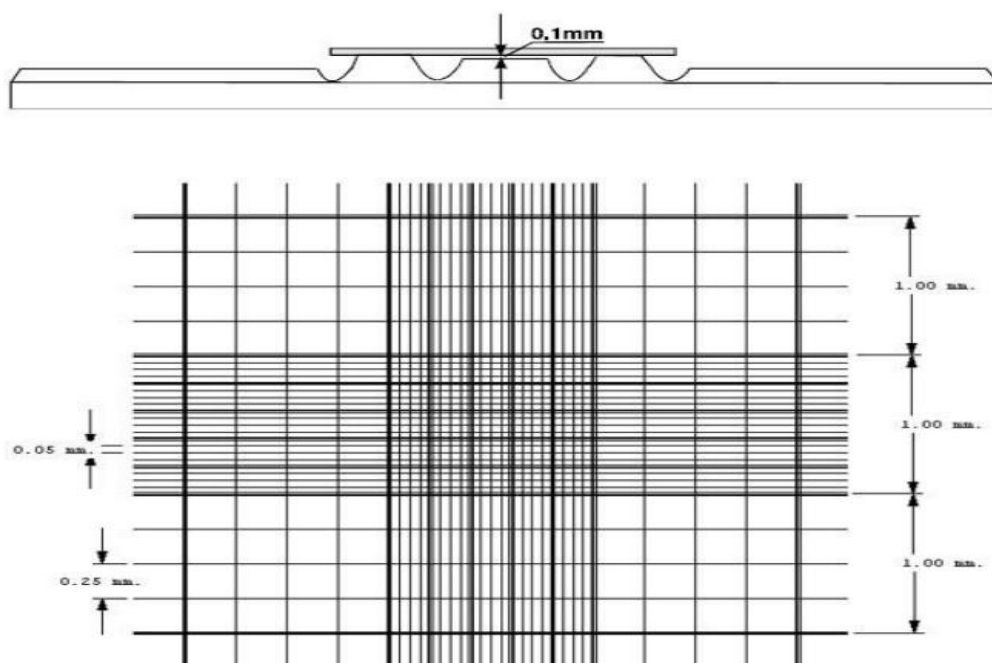
## 2.4 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΑΙ ΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

**Απόψυξη :** Η διαδικασία αφορά ξεπάγωμα κυττάρων που έχουν αποθηκευτεί τους -80°C ή σε υγρό άζωτο, σε φιαλίδια (cryovials) σε ειδικό μέσο για πάγωμα (freezing medium). Η διαδικασία πραγματοποιείται με γρήγορες κινήσεις προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα των κυττάρων όσο το δυνατό καλύτερα. Αφαιρείται το επιθυμητό cryovial από την κατάψυξη των -80°C ή υγρό άζωτο και τοποθετείται στο υδατόλουτρο, που έχει ρυθμιστεί στους 37°C. Ανακινείται το cryovial περίπου 1min στο υδατόλουτρο. Το cryovial πιάνεται με προσοχή από το καπάκι έτσι ώστε να μην ακουμπήσει στο νερό του υδατόλουτρο. Αφού φανεί πως τα κύτταρα έχουν ξεπαγώσει, γίνεται καθαρισμός του cryovial με αιθανόλη πριν το μεταφέρουμε στο θάλαμο νηματικής ροής όπου θα ανοιχτεί. Αφαιρείται το περιεχόμενο σε falcon φυγοκέντρωσης με μια κίνηση. Προστίθενται 5ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου και γίνεται φυγοκέντρωση στις 900rpm για 5min. Αφαιρείται το υπερκείμενο, και επαναιώρεται το ίζημα. Προστίθενται 5ml στο falcon και στη συνέχεια μεταφέρονται με πιπέτα σε μια φλάσκα (75-cm<sup>2</sup>). Τοποθετείται στον κλίβανο επώασης.

**Ψύξη :** Για τη διατήρηση κυττάρων, αποφυγή της γήρανσης, μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης και ελαχιστοποίηση γενετικής παρέκκλισης, οι κυτταρικές σειρές θα πρέπει να είναι παγωμένες για μακροχρόνια αποθήκευση. Χωρίς τη χρήση κρυοπροστατευτικού παράγοντα το πάγωμα θα ήταν θανατηφόρο για τα κύτταρα σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Γενικά, μια κρυοπροστατευτική ουσία όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide-DMSO) χρησιμοποιείται μαζί με πλήρες θρεπτικό μέσο για διατήρηση κυττάρων στους  $-70^{\circ}\text{C}$  ή χαμηλότερα. Το DMSO επίσης δρά για να μειώσει το σημείο παγώματος και επιτρέπει ένα βραδύτερο ρυθμό παγώματος. Το σταδιακό πάγωμα μειώνει τον κίνδυνο του σχηματισμού κρυστάλλων και τον τραυματισμό κυττάρων. Το μέσο για πάγωμα (freezing medium) αποτελείται από 90% FBS και 10% DMSO. Για κάθε διαδικασία παρασκευάζεται φρέσκο μέσο και φυλάσσεται συνεχώς στον πάγο (το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου). Θρυψινοποιούνται τα κύτταρα από το plate καλλιέργειάς τους όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Καλό είναι να χρησιμοποιούνται κύτταρα που βρίσκονται στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης τους για κρυοσυντήρηση. Στη συνέχεια μετρούνται τα κύτταρα στην Neubauer πλάκα. Για αποθήκευση χρειάζονται τουλάχιστον  $3 \times 10^6$  κύτταρα για κάθε cryovial, στο οποίο αντιστοιχεί 1ml freezing medium. Γίνεται αναρρόφηση υπερκείμενου της φλάσκας με πιπέτα και τοποθέτηση σε falcon το οποίο στη συνέχεια θα φυγοκεντρηθεί στις 1.200rpm για 10min. Αφαιρείται το υπερκείμενο από το falcon και πραγματοποιείται επαναιώρηση του ιζήματος. Προστίθεται 1ml freezing medium σταγόνα-σταγόνα στο falcon με μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να μην προκληθεί βλάβη στα κύτταρα. Τοποθετείται το 1ml freezing medium μαζί με τα κύτταρα στο cryovial και γίνεται μεταφορά και αποθήκευση του cryovial στον καταψύκτη των  $-80^{\circ}\text{C}$ . Το cryovial σημειώνεται στο εξωτερικό του το όνομα της κυτταρικής σειράς, την ημερομηνία αποθήκευσης και τον αριθμό των κυττάρων που αποθηκεύτηκαν.

## 2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΜΕ TRYPAN BLUE

Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων στην καλλιέργεια είναι σημαντικός για την τυποποίηση των συνθηκών της καλλιέργειας και την πραγματοποίηση πειραμάτων ποσοτικοποίησης με ακρίβεια. Ένα αιματοκυτταρόμετρο (εικόνα 21) είναι ένα χοντρό γυαλί με μία κεντρική περιοχή σχεδιασμένη ως ένας θάλαμος μέτρησης. Το κεντρικό τμήμα χωρίζεται σε δύο θαλάμους μέτρησης από ένα εγκάρσιο αυλάκι. Κάθε θάλαμος μέτρησης αποτελείται από ένα πλέγμα επί του οποίου χαρά ένα πλέγμα  $3 \times 3$  mm. Αυτό το πλέγμα διαιρείται σε εννέα δευτερεύοντα τετράγωνα, κάθε  $1 \times 1$  mm. Τα τέσσερα τετράγωνα γωνιών και το κεντρικό τετράγωνο χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυψελών. Τα τετράγωνα γωνιών διαιρούνται περαιτέρω σε 16 τετράγωνα και το κεντρικό τετράγωνο σε 25 τριτογενή τετράγωνα για να βοηθήσει στην καταμέτρηση των κυττάρων. Η πλάκα του αιματοκυτταρόμετρου συνοδεύεται από μια παχιά καλυπτρίδα. Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται πάνω στην πλάκα αιματοκυτταρόμετρου στην καθορισμένη περιοχή, καλύπτεται με την καλυπτρίδα ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας.



Εικόνα 21: Διαφάνεια και κάλυμμα αιμοκυτταρόμετρου. Το κάλυμμα εφαρμόζεται στην κεντρική περιοχή της πλάκας και το κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται στο θάλαμο μέτρησης χρησιμοποιώντας μια πιπέτα. Κάθε θάλαμος μέτρησης έχει ένα πλέγμα  $3 \times 3$  mm. Τα τέσσερα τετράγωνα γωνιών και η κεντρική πλατεία υπολογίζονται σε κάθε πλευρά του αιμοκυτταρομέτρου.

## **Διαδικασία**

Μετά από επεξεργασία της καλλιέργειας των κυττάρων με τρυψίνη, σε erppendorf προστίθενται 50μl εναιωρήματος κυττάρων και 50μl χρωστικής Trypan Blue 0.4% (w/v) (Gibco®, ThermoFisher Scientific). Προσθήκη του μείγματος αυτού στην πλάκα του αιματοκυτταρόμετρου. Μεταφορά της πλάκας στο μικροσκόπιο για παρατήρηση και μέτρηση.

## Υπολογισμός αριθμού κυττάρων

Προσδιορισμός κυττάρων ανά ml σύμφωνα με τους παρακάτω υπολογισμούς:  
Κύτταρα/ml = μέσος όρος μετρήσεων ανά τετραγωνικό × συντελεστής αραιώσης (2 στην συγκεκριμένη περίπτωση καθώς είναι 1:1 η αναλογία εναιωρήματος και χρωστικής) ×  $10^4$ . Ολικά κύτταρα = κύτταρα / ml × ολικό αρχικό όγκο κυτταρικού εναιωρήματος από την οποία ελήφθη το δείγμα. *Ο αριθμός  $10^4$  είναι ο συντελεστής διόρθωσης όγκου για το αιμοκυτταρόμετρο: κάθε τετράγωνο είναι  $1 \times 1 \text{ mm}$  και το βάθος είναι  $0,1 \text{ mm}$ .*

## 2.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB

Η δοκιμασία σουλφοροδαμίνης Β (SRB) όπως περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Skehan και τους συνεργάτες του, αναπτύχθηκε για χρήση στο πρόγραμμα διάγνωσης αντικαρκινικών φαρμάκων μεγάλης κλίμακας του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου της Αμερικής (National Cancer Institute - NCI) που ξεκίνησε το 1985. Ο προσδιορισμός SRB βασίζεται στην ικανότητα της βαφής SRB να συνδέεται ηλεκτροστατικά και pH να εξαρτάται από πρωτεϊνικές βασικές περιοχές αμινοξέων. Υπό ήπιες όξινες συνθήκες, το SRB δεσμεύεται με πρωτεϊνικές βασικές αμινοξικές περιοχές των σταθεροποιημένων με τριχλωροοξικό οξύ (TCA) κυττάρων. Μπορεί να εκχυλισθεί ποσοτικά από τα κύτταρα και να διαλυτοποιηθεί για μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) από ασθενείς βάσεις όπως η βάση Tris. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης SRB είναι γραμμικά με τον αριθμό των κυττάρων. Το τελικό σημείο της ανάλυσης SRB είναι χρωματομετρική, μη καταστρεπτική και σταθερή. Η δοκιμασία SRB αντιπροσωπεύει μια κατάλληλη και ευαίσθητη δοκιμασία για τη μέτρηση της επαγόμενης από φάρμακο κυτταροτοξικότητας και είναι χρήσιμη για την ποσοτικοποίηση της κλωνογονικότητας. Το SRB είναι μια ανιονική λαμπερή ροζ χρωστική αμινοξανθίνης με δύο σουλφονικές ομάδες. Ο μοριακός του τύπος και το μοριακό βάρος είναι  $C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$  και 558,66, αντίστοιχα. Το βέλτιστο μήκος κύματος για τη μέτρηση της OD του SRB είναι 564 nm. Οι καμπύλες συγκέντρωσης OD έναντι βαφής είναι γραμμικές μέχρι 1.5-2 μονάδες OD. Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης από τις οπές που αντικατοπτρίζουν τα κύτταρα την ώρα της προσθήκης των ουσιών ( $T_z$ ), τα κύτταρα μάρτυρες (C) καθώς και τα κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί αντίστοιχη ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας σε κάθε επιθυμητή συγκέντρωση ( $T_i$ ), δύναται ο υπολογισμός της ποσοστιαίας ανάπτυξης των κυττάρων (**Growth Rate %**) για κάθε συγκέντρωση που έχει χρησιμοποιηθεί με την χρήση του παρακάτω τύπου:

$$[(T_i - T_z) / (C - T_z)] \times 100 \text{ για συγκεντρώσεις όπου } T_i \geq T_z$$

$$[(T_i - T_z) / T_z] \times 100 \text{ για συγκεντρώσεις όπου } T_i < T_z$$

Εκτός της ποσοστιαίας ανάπτυξης, για κάθε εξεταζόμενη ουσία, υπολογίζονται και τρεις διαφορετικοί παράμετροι :

**Growth Inhibition 50% (GI<sub>50</sub>):** υπολογίζεται από τον τύπο  $[(T_i - T_z)/(C - T_z)] \times 100 = 50$  και είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων στο 50%.

**Total Growth Inhibition (TGI):** υπολογίζεται από τον τύπο  $T_i = T_z$  και είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων.

**Lethal Concentration 50% (LC<sub>50</sub>):** η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιφέρεται θάνατος στο 50% του αρχικού πληθυσμού των κυττάρων.

**Therapeutic Index (TI):** είναι ο λόγος της LC<sub>50</sub> προς τη GI<sub>50</sub>. Όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης τόσο ασφαλέστερο είναι το φάρμακο. Υπολογίζεται από τον τύπο Therapeutic Index = LC<sub>50</sub>/ GI<sub>50</sub>.

## Υλικά

Μικροπλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα

Αντιδραστήρια κλασσικής καλλιέργειας κυττάρων (θρεπτικό υλικό, ορός, θρυψίνη, Sodium Chloride 0,9%, κλίβανος επώασης, falcons, φλάσκες, πιπέττες, finntips)

Αναστολείς BI-D 1870, FMK, Tiliroside (T-ac), GSK 2334470, BX-912, PF 4708671

50% (w/v) TCA (Applichem, Code: A1431)

1% Acetic acid (Fluka: Code: 45731)

0.4% (w/v) SRB διαλυμένη σε 1% acetic acid (SIGMA, Code: S9012)

10mM Tris base (pH 10.0)

Φωτόμετρο (Biotek, El-311)



## **Διαδικασία**

Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής.

### **Ημέρα 1η: Έλεγχος κυττάρων για το στάδιο της ανάπτυξής τους και ανανέωση του θρεπτικού υλικού**

- Αφαίρεση υπερκειμένου φλάσκας.
- Προσθήκη 7 ml Sodium Chloride 0,9% (για 75mm<sup>2</sup> φλάσκα) και διπλή πλύση.
- Προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού (RPMI με FBS, pen/strep, L-Glu).

### **Ημέρα 2η: Συλλογή κυττάρων με θρυψινισμό και στρώσιμο σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων**

- Αφαίρεση υπερκειμένου φλάσκας.
- Προσθήκη 7 ml Sodium Chloride 0,9% (για 75mm<sup>2</sup> φλάσκα) και διπλή πλύση.
- Προσθήκη 2ml θρυψίνης (για 75mm<sup>2</sup> φλάσκα) και τοποθέτηση στον κλίβανο (37°C) για 2-3min.
- Αφαίρεση από τον κλίβανο και έλεγχος στο μικροσκόπιο.
- Στη συνέχεια, αφού ελεγχθεί ότι τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί πλήρως από την επιφάνεια της φλάσκας, προστίθενται 4ml RPMI 5% προκειμένου να γίνει η απενεργοποίηση της θρυψίνης. Γίνεται καλή ανάδευση με την πιπέτα προς όλα τα σημεία της φλάσκας.
- Το υπερκείμενο που περιέχει θρυψίνη και RPMI μεταφέρεται σε falcon για να γίνει η φυγοκέντρηση όπως αναφέρθηκε παραπάνω.
- Επιστρέφεται στη φλάσκα το μέρος των κυττάρων το οποίο έχει υπολογιστεί ως κατάλληλο να φτάσει την επιθυμητή συγκέντρωση (confluency) μέχρι το επόμενο πέρασμα (passage).
- Από το υπόλοιπο που βρίσκεται στο falcon, μετά από καλή ανάδευση προκειμένου να ληφθεί αντιπροσωπευτικός αριθμός κυττάρων, μεταφέρονται 50μl κυττάρων σε ένα erpendorf και εκεί προστίθενται 50μl χρωστικής Trypan Blue.

-Στη συνέχεια, το μείγμα του εναιωρήματος των κυττάρων και της χρωστικής μεταφέρονται με πιπέτα σε πλάκα Neubauer για να γίνει η μέτρηση των κυττάρων.

-Μετά τη μέτρηση των κυττάρων/ml, γίνονται οι κατάλληλοι υπολογισμοί με σκοπό να τοποθετηθούν σε κάθε πηγαδάκι 5.000 cells για τα Attached και 10.000 cells για τα AsPC1. Τα πηγαδάκια που υπολογίζονται για να τοποθετηθούν κύτταρα είναι: 1) αυτά που εκτίθενται στα φάρμακα που μελετώνται, 2) τα controls τα οποία αναπτύσσονται χωρίς κάποια προσθήκη μέχρι τη λήξη της επίδρασης των φαρμάκων προκειμένου να συγκρίνεται ο φυσιολογικός ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών σειρών και 3) τα T<sub>0</sub> στα οποία προστίθεται 50% TCA την ημέρα προσθήκης των φαρμάκων. Έτσι υπολογίζεται η επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων από την στιγμή της έκθεσης στο φάρμακο.

- Με την πιπέτα finntips, προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 100μl από το εναιώρημα που αραιώνεται με RPMI με βάση τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων που πρέπει να τοποθετηθεί σε κάθε well αναλόγως όπως αναφέρθηκε την κυτταρική σειρά.

### Ημέρα 3η: Προσθήκη φαρμάκων

-Μετά από 24 ώρες ανάπτυξης των κυττάρων που έχουν προστεθεί στα πηγαδάκια, γίνεται προσθήκη των φαρμάκων που τα οποία μελετώνται για την επίδρασή τους στις παγκρεατικές καρκινικές σειρές AsPC1 και ATTACHED.

-Οι αναστολείς **BI-D 1870**, **FMK**, **Tiliroside (T-ac)**, **GSK 2334470**, **BX-912**, **PF 4708671** προστέθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις το καθένα: 100, 10, 1, 0.1 μM.

-Πριν την προσθήκη στα πηγαδάκια, προετοιμάζονται οι παραπάνω αραιώσεις. Τα διαθέσιμα stock είχαν συγκέντρωση 20mM. Μετά τους κατάλληλους υπολογισμούς, τα φάρμακα αραιώνονται σε RPMI 5%. Ο όγκος του κάθε φαρμάκου που προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι είναι 100μl. Πριν την προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι γίνεται καλή ανάδευση έτσι ώστε η συγκέντρωση των φαρμάκων να είναι ίδια.

-Στα control πηγαδάκια προστίθενται 100μl RPMI 5%.

-Τέλος, στα T<sub>0</sub> πηγαδάκια, σε μη στειρές συνθήκες προστίθενται 100μl RPMI 5% και στη συνέχεια 50μl 50% TCA και αφήνεται για επώαση στους 4°C για 1hr. Μετά τη 1hr το TCA αφαιρείται από τα T<sub>0</sub> και ξεπλένεται καλά με απεσταγμένο νερό.

Ημέρα 4η: Ημέρα παρακολούθησης ανάπτυξης των κυττάρων με προσθήκη φαρμάκων και των controls

Ημέρα 5η: Μονιμοποίηση κυττάρων και χρώση – Μέτρηση απορρόφησης

-Τελευταίο στάδιο της διαδικασίας αποτελεί η μονιμοποίηση των κυττάρων. Σε μη στειρές συνθήκες, γίνεται προσθήκη 50μl κρύου TCA σε όλα τα πηγαδάκια και στη συνέχεια γίνεται επώαση στους 4°C για 1hr. Σημαντικό είναι η προσθήκη του TCA να γίνεται ήπια και ακουμπώντας τα τοιχώματα του well ώστε να μην γίνει αποκόλληση των κυττάρων.

-Αφού τελειώσει ο χρόνος της επώασης με TCA γίνονται καλές πλύσεις με απεσταγμένο νερό.

-Τα plates αφήνονται να στεγνώσουν εντελώς πριν το επόμενο βήμα.

-Στη συνέχεια, προστίθεται η χρωστική SRB. Προστίθενται 50μl αυτής σε κάθε πηγαδάκι και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.

-Μόλις η επώαση με την SRB ολοκληρωθεί, γίνονται πλύσεις με 1% οξικό οξύ (CH<sub>3</sub>COOH) για την απομάκρυνσή της.

-Διαλυτοποίηση τη συνδεδεμένης με πρωτεΐνη χρωστικής με προσθήκη 150 μL 10 mM Tris base ανά πηγαδάκι. Επώαση για 10min σε κλίβανο στους 37°C. Ανακίνηση των plate για τουλάχιστον 5 λεπτά σε αναδευτήρα για να ομογενοποιηθεί του διαλύματος χρωστικής.

-Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας με τη χρήση ημί-αυτόματης συσκευής ανάλυσης μικροπλακιδίων 96 θέσεων σε μήκος κύματος 540 nm.

## **2.7 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΛΩΝΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)**

### **Διαδικασία**

Η μέθοδος αναστολής δημιουργίας κλώνων ή clonogenic assay είναι μια δοκιμασία επιβίωσης κυττάρων in vitro βασισμένη στην ικανότητα ενός μεμονωμένου κυττάρου να αναπτυχθεί σε αποικία. Σαν αποικία ορίζεται ότι κυτταρικός πληθυσμός αποτελείται από τουλάχιστον 50 κύτταρα. Η μέθοδος αυτή ουσιαστικά δοκιμάζει κάθε κύτταρο στον πληθυσμό για την ικανότητά του να υποστεί «απεριόριστη» διαίρεση. Το clonogenic είναι η μέθοδος που έχει ως στόχο τον προσδιορισμό της ικανότητας αναπαραγωγής των κυττάρων μετά από έκθεση με καρκινικούς αναστολείς, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας άλλων κυτταροτοξικών παραγόντων. Μόνο ένα κλάσμα των σπαρμένων κυττάρων διατηρεί την ικανότητα να παράγει αποικίες. Πριν ή μετά την έκθεση στους καρκινικούς αναστολείς, τα κύτταρα σπέρνονται σε κατάλληλες αραιώσεις για να σχηματίσουν αποικίες σε 1-3 εβδομάδες. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε και σε αυτό το assay η καρκινική κυτταρική σειρά Attached καθώς και οι αναστολείς που αναφέρονται στα υλικά.

**Ημέρα 1η: Έλεγχος κυττάρων για το στάδιο της ανάπτυξής τους και ανανέωση του θρεπτικού υλικού**

**Ημέρα 2η: Συλλογή κυττάρων με θρυψινισμό και στρώσιμο σε μικροπλακίδιο 6 θέσεων**

Συγκεκριμένα χρειάστηκαν 400 κύτταρα για κάθε well του μικροπλακιδίου κυτταροκαλλιέργειας 6 θέσεων σε σύνολο 2ml RPMI (10%) σε κάθε well.

**Ημέρα 3η: Προσθήκη φαρμάκων**

Χρησιμοποιήθηκαν 2 μικροπλακίδια 6 θέσεων, στο καθένα υπήρξαν 2 wells με κύτταρα control με 2ml θρεπτικό μέσο RPMI 5%. Τόσο για τον αναστολέα T-ac όσο και για τον GSK χρησιμοποιήθηκαν 4 wells με συγκεντρώσεις 5μM, 2 με συγκεντρώσεις 10μM, 2 με συγκεντρώσεις 1μM. Την 7<sup>η</sup> ημέρα από την προσθήκη των φαρμάκων έγινε η μονιμοποίηση των κυττάρων με το 50% (w/v) TCA, τοποθετώντας 500 μl σε κάθε well το οποίο είχε ήδη μέσα 2ml υλικού (είτε RPMI είτε φάρμακο αραιωμένο σε RPMI). Η διαδικασία μονιμοποίησης έχει αναλυθεί εκτενώς παραπάνω. Τέλος, μετά και την μονιμοποίηση έγινε αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και της

δράσης των φαρμάκων καθώς και μέτρηση της απορρόφησής τους στο φωτόμετρο στα 540nm όπως και στις προηγούμενες μεθόδους, με βάψιμο από SRB (περίπου 500ml σε κάθε well) και προσθήκη 1,5ml Tris Base σε κάθε well πριν την μέτρηση.

## **2.8 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΗΣ (WOUND HEALING ASSAY – SCRATCH ASSAY)**

### **Διαδικασία**

Η δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών ή κοινώς wound healing assay πρόκειται για μια απλή, φθηνή καθώς και μία από τις πρώτες αναπτυγμένες μεθόδους για τη μελέτη της κατευθυνόμενης μετανάστευσης κυττάρων in vitro. Αυτή η μέθοδος μιμείται τη μετανάστευση κυττάρων κατά τη διάρκεια της επούλωσης πληγών in vivo. Τα βασικά βήματα περιλαμβάνουν τη δημιουργία μιας «πληγής» σε μια στιβάδα κυττάρων, τη λήψη εικόνων στην αρχή καθώς και ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη μετανάστευση των κυττάρων μέχρι να κλείσει το τραύμα. Τέλος γίνεται σύγκριση των εικόνων για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ρυθμού μετανάστευσης των κυττάρων παρουσία φαρμάκου.

**Ημέρα 1η: Έλεγχος κυττάρων για το στάδιο της ανάπτυξής τους και ανανέωση του θρεπτικού υλικού**

**Ημέρα 2η: Συλλογή κυττάρων με θρυψινισμό και στρώσιμο σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων**

Για την καρκινική κυτταρική σειρά Attached χρειάστηκαν 10.000 κύτταρα σε κάθε well.

**Ημέρα 3η: Προσθήκη φαρμάκων**

Πιο συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις από τους αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για τον T-ac 5μM, 2,5μM, 1μM και 0,5μM ενώ για τον αναστολέα GSK ήταν 10μM, 5μM, 2,5μM και 1μM. Αρχικά χαράχτηκε μια πληγή σε κάθε στιβάδα κυττάρων με την χρήση ενός finntip. Έπειτα, έγινε διπλή πλύση με RPMI ώστε να απομακρυνθούν τα πιθανά υπολείμματα που μπορεί να έχουν προκύψει μετά την δημιουργία της πληγής. Τέλος, τα κύτταρα controls συμπληρώθηκαν με θρεπτικό μέσο RPMI 10% ενώ τα υπόλοιπα wells με κύτταρα συμπληρώθηκαν με τα φάρμακα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η σύγκριση μεταξύ των κυττάρων στα οποία προστέθηκε συγκεκριμένη συγκέντρωση φαρμάκου έγινε με τα αντίστοιχα controls. Ο χρόνος επούλωσης ποικίλλει από κυτταρική σε κυτταρική σειρά και σημαντικό είναι να αναφερθεί το γεγονός ότι δεν χρειάζεται να κλείσει πλήρως η πληγή, καθώς εφικτή είναι η σύγκριση και μεταξύ των κυττάρων με βάση το ποσοστό που έκλεισε η πληγή, συγκρίνοντας πάντα τα κύτταρα στα οποία προστέθηκε φάρμακο με τα controls.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το σημείο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του ποσοστού για κάθε συγκέντρωση, στη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας των καρκινικών κυττάρων, ήταν τα κύτταρα μάρτυρες δηλαδή τα controls, στα οποία προστέθηκε μόνον η αντίστοιχη ποσότητα θρεπτικού υλικού. Από τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που λήφθηκαν από την φασματοφωτομετρική μέτρηση, για κάθε μικροκυψελίδα, σχεδιάστηκε μια καμπύλη βαθμονόμησης στην οποία υπολογίστηκε η ποσοστιαία ανάπτυξη των κυττάρων (Growth Rate %) για κάθε συγκέντρωση του κάθε αναστολέα που χρησιμοποιήθηκε. Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν κάθε φορά με τον ίδιο τρόπο και αποτελούν τη μέση τιμή από ανεξάρτητα πειράματα. Έτσι, για κάθε συγκέντρωση του κάθε αναστολέα παρασκευάστηκαν τρεις μικροκυψελίδες, καταχωρήθηκαν οι τιμές της απορρόφησης και για τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά ο μέσος όρος αυτών.

#### 3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές AsPC-1 και Attached έδειξαν ευαισθησία απέναντι στους αναστολείς T-ac και GSK 2334470 ενώ η κυτταρική σειρά των Attached έδειξε ευαισθησία και στον αναστολέα BX-912. Τη σημαντικότερη δράση από όλους τους αναστολείς εμφάνισε ο αναστολέας GSK2334470. Όπως φαίνεται και στα Γραφήματα 3 και 4, την μεγαλύτερη μείωση στο ρυθμό αύξησης των κυττάρων είχε ο GSK 2334470 καθώς ακόμα και στο 1μM είχε σημαντική αναστολή της αύξησης των κυττάρων, 43,2% αναστολή στην κυτταρική σειρά AsPC-1 και 35% στα Attached. Ακολουθεί ο Tac με αναστολή της ανάπτυξης 81% στα AsPC-1 και πλήρη αναστολή στα Attached σε συγκέντρωση 10μM. Επίσης ο BX-912 ήταν ο πιο δραστικός στα κύτταρα Attached καθώς ανέστειλε την ανάπτυξή τους κατά 93% σε συγκέντρωση 10μM και 34% σε συγκέντρωση μόλις 1μM. Από τις καμπύλες αύξησης προέκυψε ότι την χαμηλότερη τιμή στην παράμετρο GI50 και για τις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές την είχε ο GSK 2334470. Ανάμεσα στις δυο κυτταρικές σειρές ωστόσο μεγαλύτερη ευαισθησία στον αναστολέα GSK 2334470 εμφανίζεται να έχει η κυτταρική σειρά AsPC-1 όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, καθώς εμφανίζει GI50 2,2μM

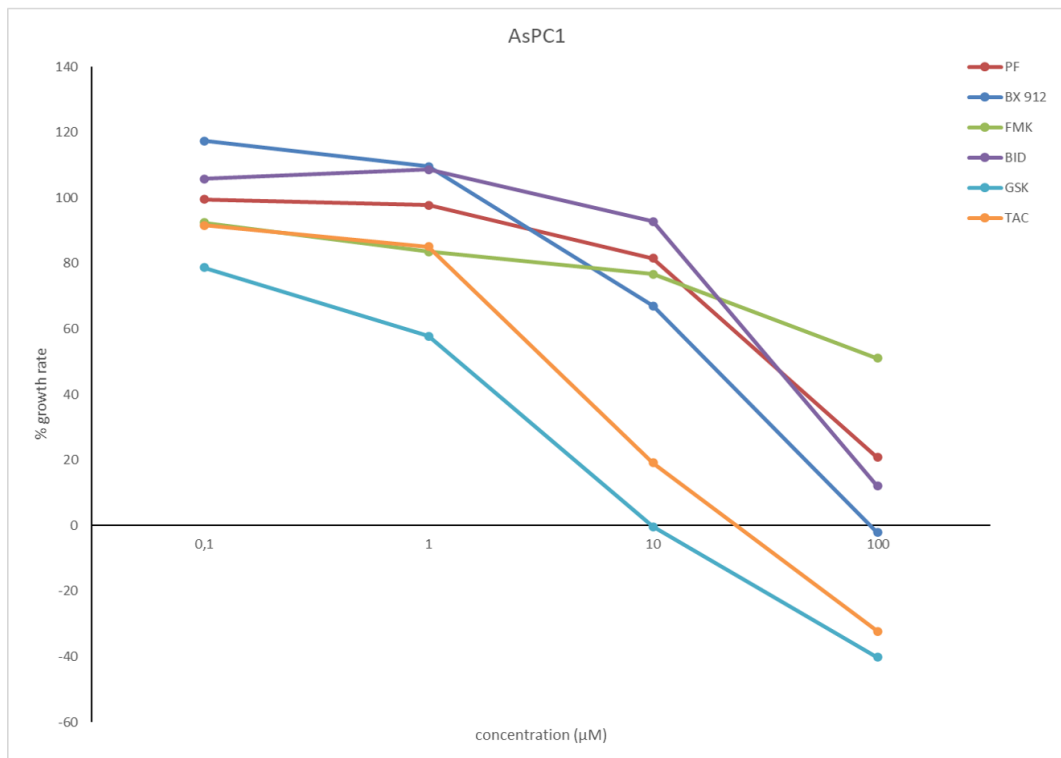
ενώ στα Attached έχει το διπλάσιο GI50. Ο T-ac έχει ίδιο GI50 ανάμεσα στις δυο κυτταρικές σειρές, 5,7 και 5,8 καθιστώντας τον εξαιρετικά δραστικό. Ενώ ο BX-912 όπως αναφέρθηκε παραπάνω παρουσιάζει εξαιρετικό GI50 στα Attached, 3,5 συγκεκριμένα αλλά 32,2 στα AsPC-1. Καμία δραστικότητα δεν εμφανίζεται να έχουν οι αναστολείς FMK, PF και BID. Τα αποτελέσματα των παραμέτρων, αναστολή ανάπτυξης κατά 50% (GI50), ολική αναστολή ανάπτυξης (TGI) και η θανατηφόρα συγκέντρωση κατά 50% (LC50) από την μελέτη της κυτταροτοξικότητας και της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των αναστολέων έναντι των δύο παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 2.

Πίνακας 2: Κυτταροτοξική δράση των αναστολέων για τις παγκρεατικές καρκινικές σειρές AsPC-1 και Attached.

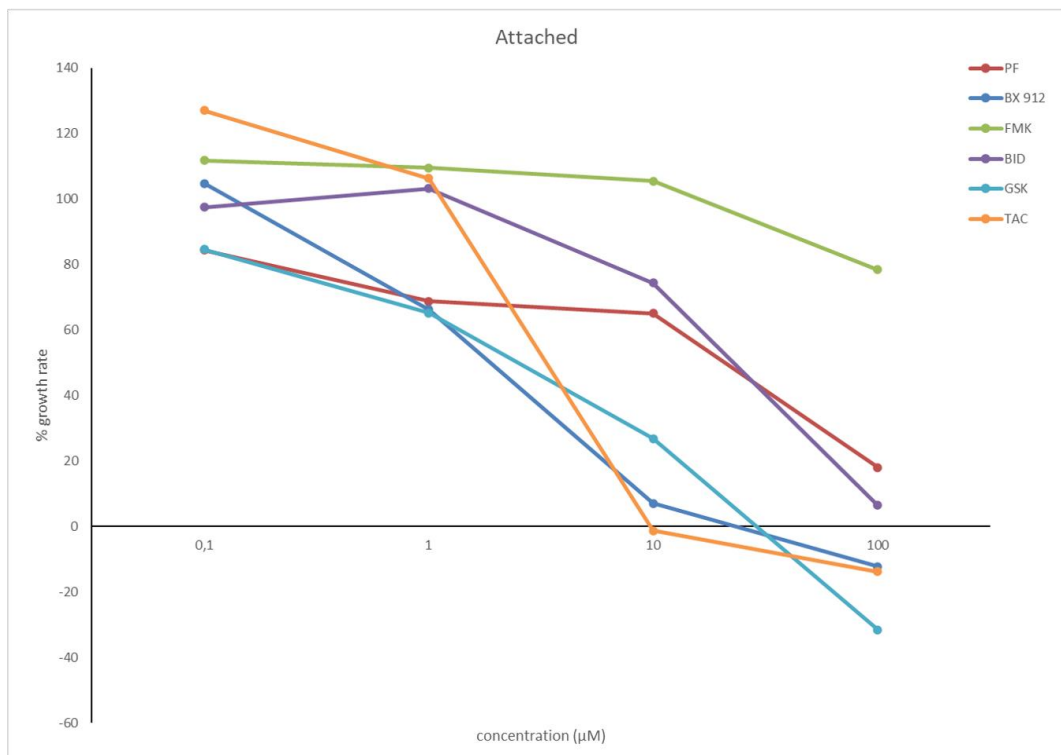
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	
		AsPC-1	Attached
<b>BI-D 1870</b>	GI50	57,7	42,2
	TGI	11,3	>100
	LC50	>100	>100
<b>BX-912</b>	GI50	32,2	<b>3,5</b>
	TGI	97,3	42,8
	LC50	>100	>100
<b>FMK</b>	GI50	>100	>100
	TGI	>100	>100
	LC50	>100	>100
<b>GSK 2334470</b>	GI50	<b>2,2</b>	<b>4,5</b>
	TGI	9,9	51,4
	LC50	>100	>100
<b>PF 4708671</b>	GI50	56,7	38,8
	TGI	>100	>100
	LC50	>100	>100
<b>T-ac</b>	GI50	<b>5,8</b>	<b>5,7</b>
	TGI	43,4	9,8
	LC50	>100	>100

Ο ποσοστιαίος ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων για κάθε συγκέντρωση του κάθε αναστολέα, εκφραζόμενη σε  $\mu\text{M}$ , εμφανίζεται συγκεντρωτικά για τα καρκινικά κύτταρα AsPC-1 στο Γράφημα 3 και για τα καρκινικά κύτταρα Attached στο Γράφημα 4.





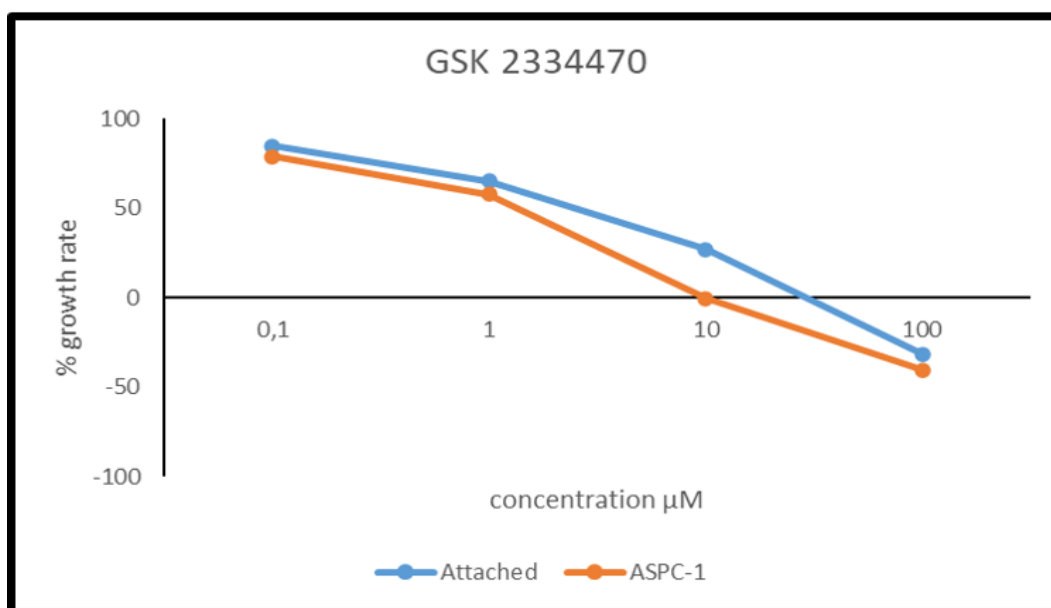
**Γράφημα 3:** Καμπύλες ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων **AsPC-1** ανά αναστολέα μετά από επώαση τους για 48 ώρες με 4 αραιώσεις (100, 10, 1 και 0,1μM) του κάθε αναστολέα.



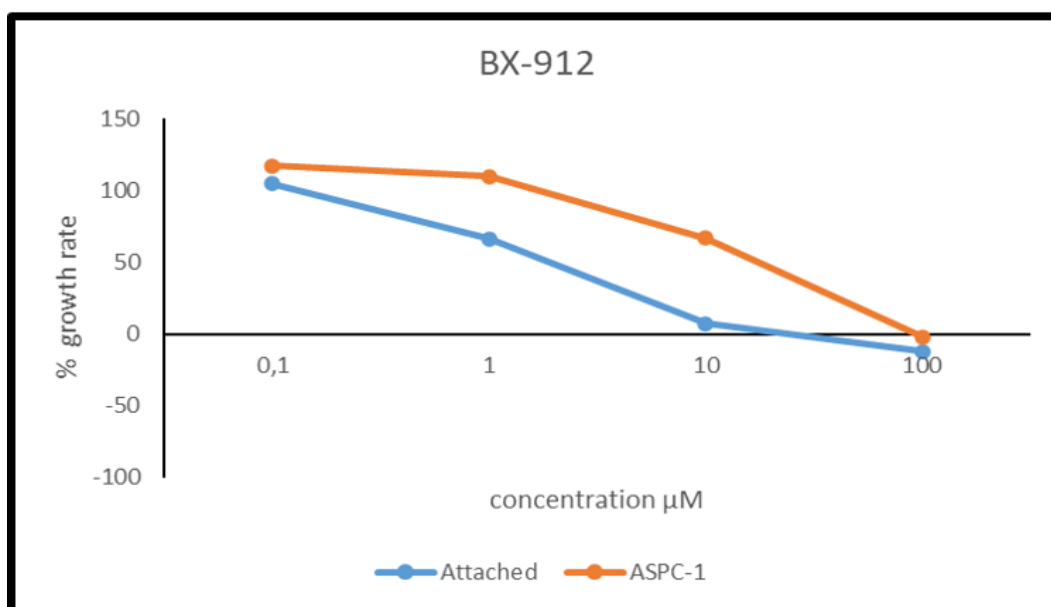
**Γράφημα 4:** Καμπύλες ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων **Attached** ανά αναστολέα μετά από επώαση τους για 48 ώρες με 4 αραιώσεις (100, 10, 1 και 0,1μM) του κάθε αναστολέα.

### 3.2 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΑ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ

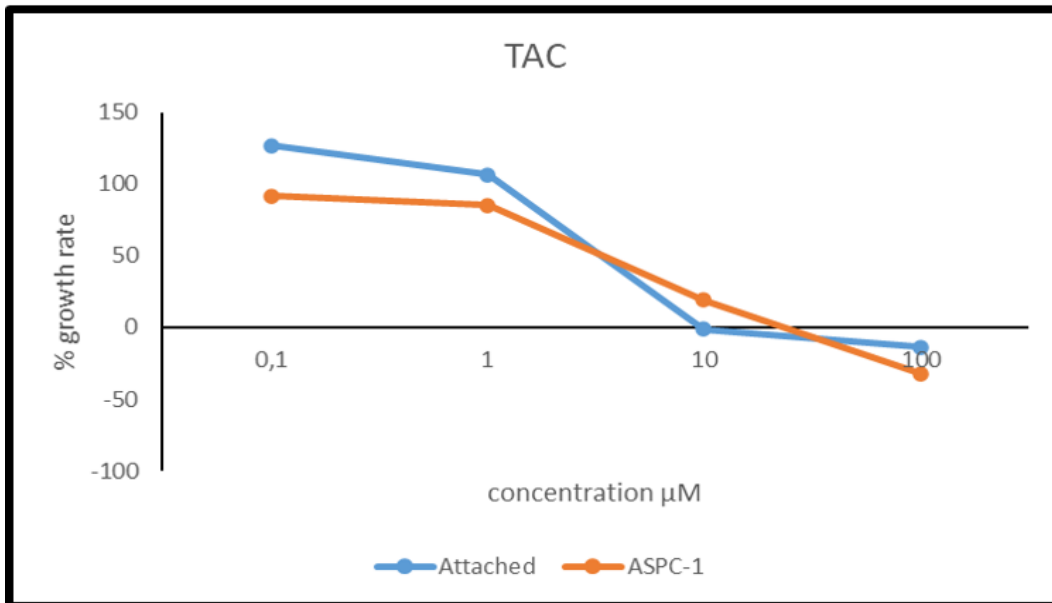
Στα Γραφήματα 5, 6, 7, 8, 9 και 10 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών, ύστερα από επώαση με τον κάθε αναστολέα για 48 ώρες στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις εκφρασμένες σε  $\mu\text{M}$ , στις οποίες φαίνεται η δραστηριότητα του κάθε αναστολέα και στις δύο παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.



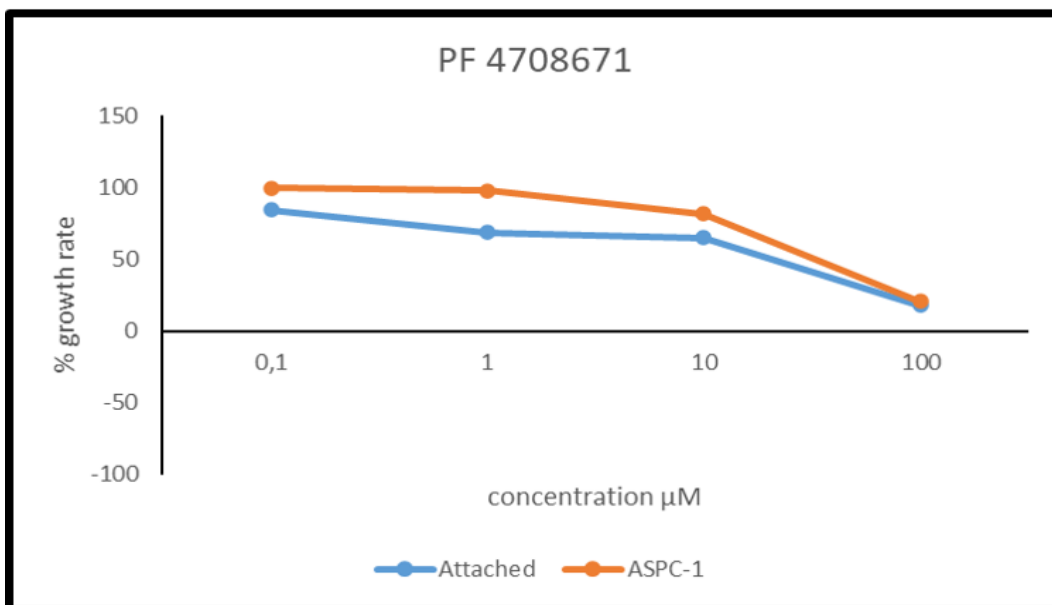
Γράφημα 5: Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα GSK 2334470.



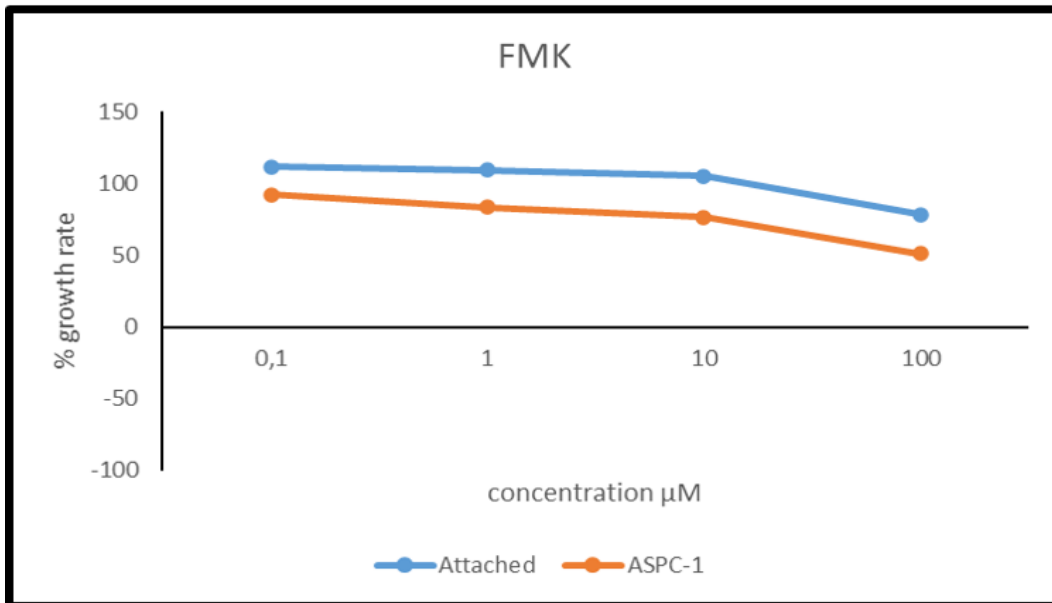
Γράφημα 6: Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα BX-912.



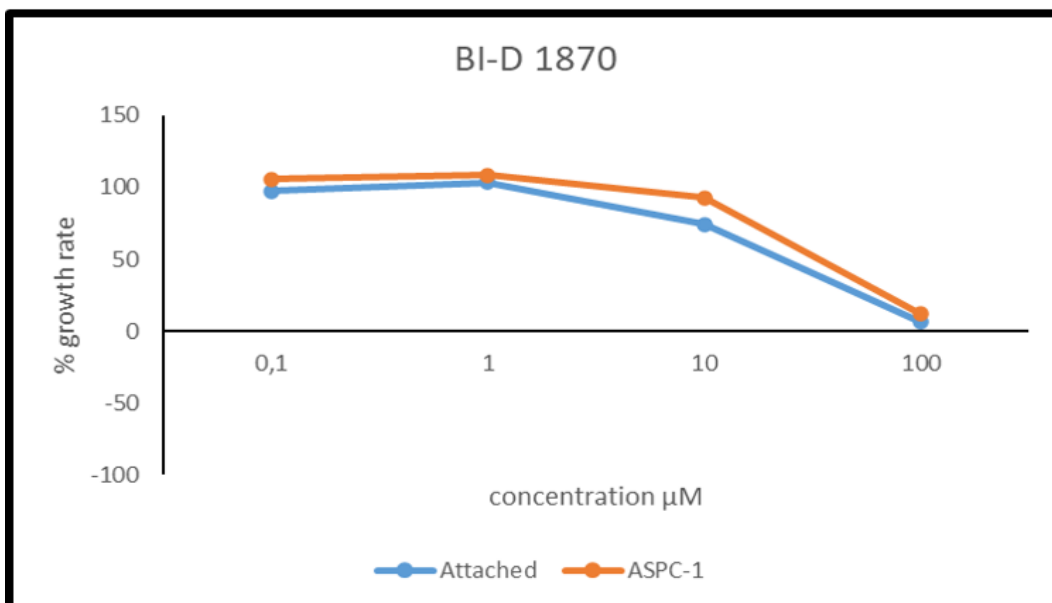
Γράφημα 7 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα **T-ac**.



Γράφημα 8 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα **PF 4708671**.



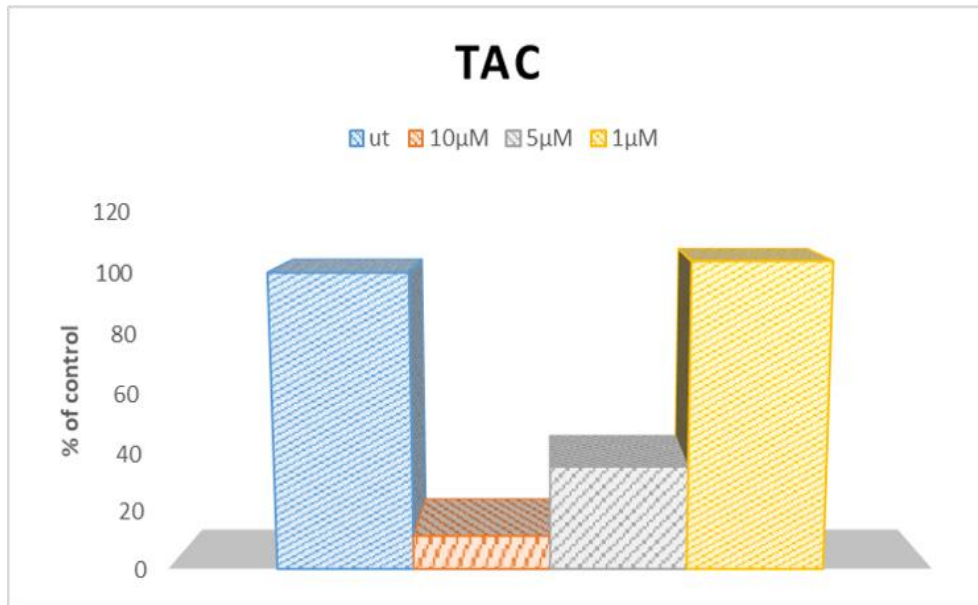
**Γράφημα 9 :** Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα **FMK**.



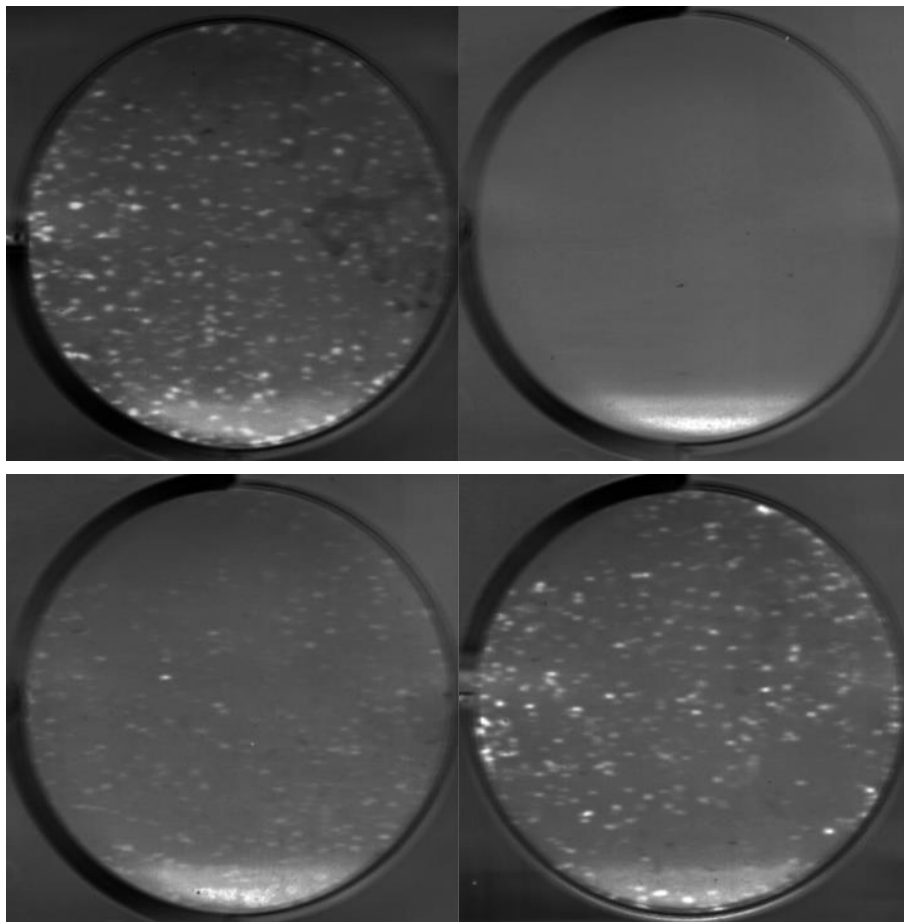
**Γράφημα 10 :** Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα **BI-D 1870**.

### 3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΛΩΝΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στην κυτταρική σειρά Attached με τους αναστολείς T-ac και GSK 2334470 που αποδείχθηκαν ως οι πιο αποτελεσματικοί στην μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας των καρκινικών κυττάρων με την μέθοδο της SRB. Πιο συγκεκριμένα στα πειράματα αναστολής δημιουργίας κλώνων ή clonogenic assay επιβεβαιώθηκε η σημαντική δράση των αναστολέων T-ac και GSK 2334470 μέσα από την ικανότητα τους να προκαλέσουν κυτταροτοξικότητα στα πιο επιθετικά κύτταρα του πληθυσμού, τα κύτταρα δηλαδή τα οποία σε χαμηλή πυκνότητα και πιο μακροχρόνια καλλιέργεια είχαν τη δυνατότητα να δημιουργήσουν κλώνους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω φωτογραφίες (εικόνες 22 και 23) όπου και παρουσιάζεται η δράση τους έπειτα από χρώση με SRB, γεγονός το οποίο γίνεται αντικατοπτρίζεται στις αποικίες που σχηματίστηκαν. Στα γραφήματα 11 και 12 που ακολουθούν, φαίνεται και η ποσοτικοποίηση της δράσης των ουσιών υπό δοκιμή μέσω των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας σε κάθε συγκέντρωση, δηλαδή στα 10, 5 και 1μM. Ειδικότερα, ο αναστολέας T-ac φαίνεται να λειτουργεί καλύτερα σε συγκέντρωση 10 έως 5μM ενώ δεν παρατηρείται δραστηριότητα στην συγκέντρωση 1μM. Για τον αναστολέα GSK 2334470, παρατηρείται καλύτερη δράση και στην μικρότερη συγκέντρωση, της 1μM. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο GSK είναι πιο δραστικός και πιθανά πιο ενδιαφέρων καθώς αναστέλλει σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις την ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν κλώνους, δηλαδή τη δράση των πιο επιθετικών καρκινικών κυττάρων του αρχικού πληθυσμού. Αξίζει να αναφερθεί ότι όπως προκύπτει από το πείραμα αυτό η συγκέντρωση του αναστολέα που οδηγεί στην αναστολή δημιουργίας κλώνων είναι πολύ πιο χαμηλή από το GI50 που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο SRB. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δράση της ουσίας είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό χρονοεξαρτώμενη δηλαδή εξαρτάται από το χρόνο έκθεσης των κυττάρων στην ουσία.



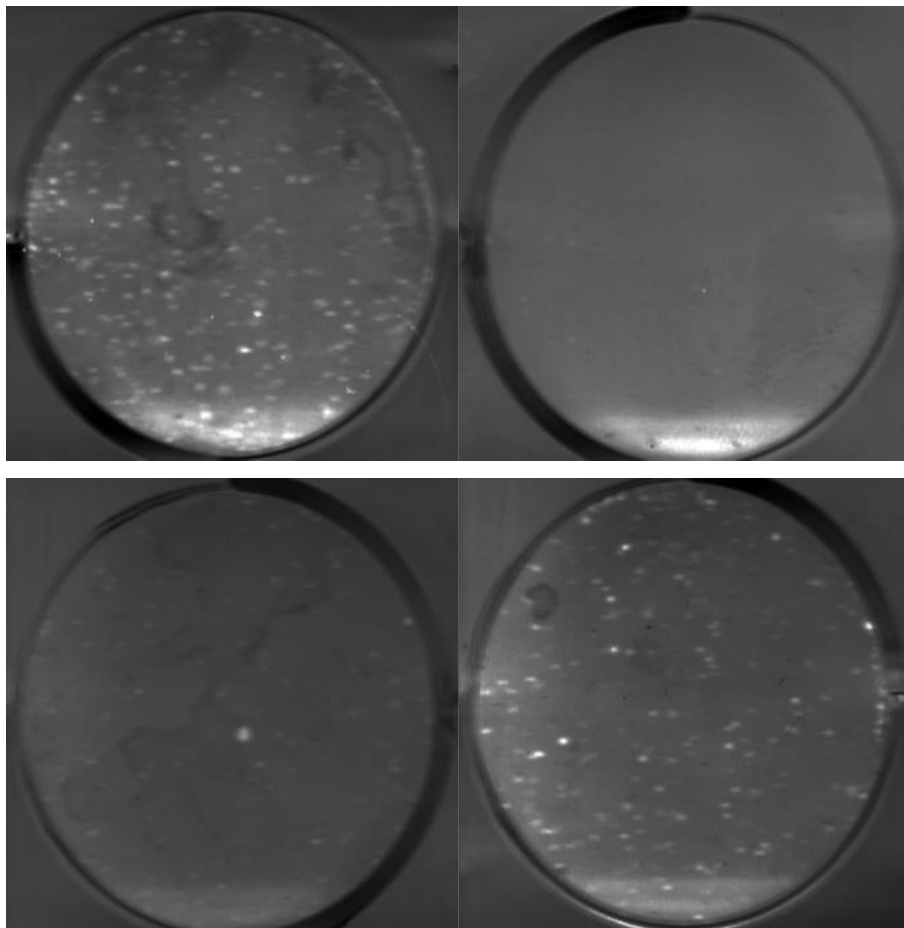
Γράφημα 11: Ποσοστό % των control δημιουργίας κλώνων σε κάθε συγκέντρωση για τον αναστολέα **T-ac**.



Εικόνα 22: Φωτογραφίες των κυτταρικών κλώνων στα **control** (πάνω αριστερά), στα **10μM T-ac** (πάνω δεξιά), στα **5μM T-ac** (κάτω αριστερά) και στο **1μM T-ac** (κάτω δεξιά).



**Γράφημα 12:** Ποσοστό % των control δημιουργίας κλώνων σε κάθε συγκέντρωση για τον αναστολέα **GSK 2334470**.

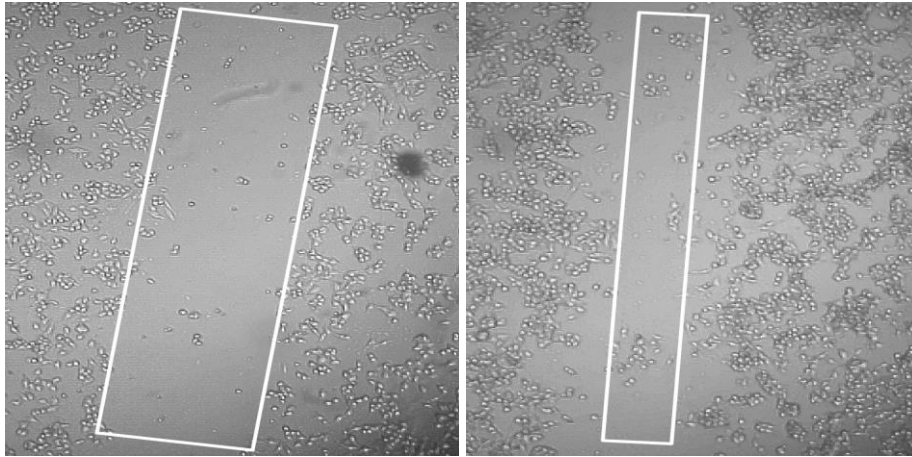


**Εικόνα 23:** Φωτογραφίες των κυτταρικών κλώνων στα **control** (πάνω αριστερά), στα **10μM GSK 2334470** (πάνω δεξιά), στα **5μM GSK 2334470** (κάτω αριστερά) και στο **1μM GSK 2334470** (κάτω δεξιά).

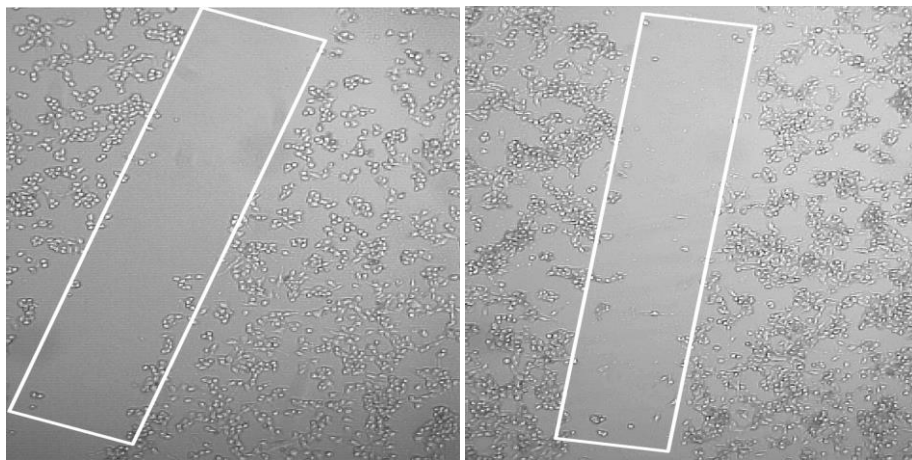
### 3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΗΣ (WOUND HEALING ASSAY – SCRATCH ASSAY)

Πιο συγκεκριμένα στην δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών ή κοινώς wound healing assay έγινε έλεγχος του μεταναστευτικού δυναμικού τους παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων των αναστολέων που έχουν επιλεχθεί. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν τα 10, 5, 2,5 και 1μM για τον αναστολέα GSK 2334470 και 5, 2,5, 1 και 0,5μM για τον αναστολέα T-ac. Και σε αυτήν την περίπτωση φάνηκε δράση των αναστολέων ιδιαίτερα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Χαρακτηριστικό είναι ότι στην συγκέντρωση των 5μM και 2,5μM T-ac η πληγή έμεινε ανοικτή έπειτα από 48 ώρες σε ποσοστά 86,5% (εικόνα 25) και 73,5% (εικόνα 26) αντίστοιχα, έναντι του μόλις 43,6% στα κύτταρα μάρτυρες (εικόνα 24). Επίσης για τον T-ac παρατηρείται δράση και στις μικρότερες συγκεντρώσεις 1μM (εικόνα 27) και 0,5μM (εικόνα 28) αλλά όχι υψηλή συγκριτικά με τα 5 και 2,5μM. Για τον αναστολέα GSK 2334470 το ποσοστό της πληγής που έμεινε ανοικτό έπειτα από 48 ώρες στην συγκέντρωση 10μM (εικόνα 29) ήταν υψηλό (74,8 %) όπως φαίνεται στην εικόνα 29. Το παράδοξο έγκειται ότι στις τρεις αμέσως επόμενες συγκεντρώσεις 5, 2,5 και 1μM (εικόνες 30,31,32) το ποσοστό ήταν σχεδόν το ίδιο, καθώς κυμαίνεται από 68-69%. Το πιθανότερο είναι αυτό να σημαίνει ότι ο GSK στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι δραστικός και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις οι οποίες ωστόσο δεν ελέγχθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Σαν συμπέρασμα προκύπτει ότι ανάμεσα στους δύο αναστολείς ο GSK δείχνει μεγαλύτερη ικανότητα να αναστέλλει την αυθόρμητη μετανάστευση των Attached και άρα την κινητικότητα τους σε in vitro συνθήκες. Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω φωτογραφίες και γραφήματα.

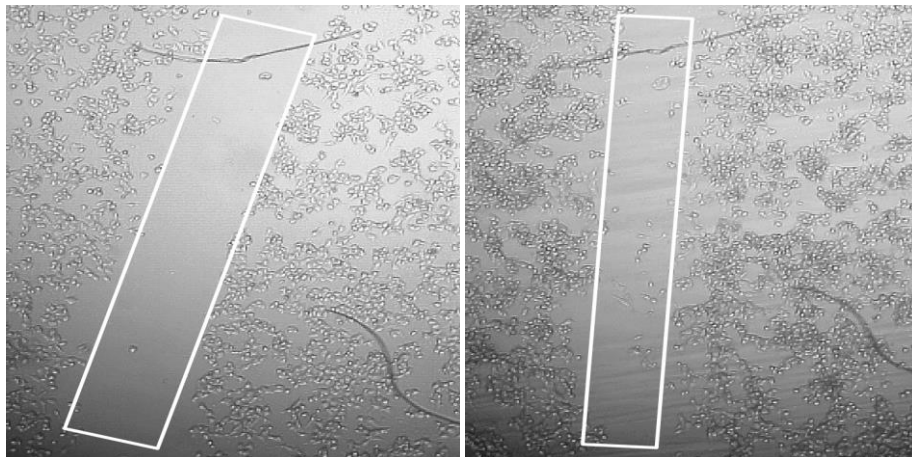




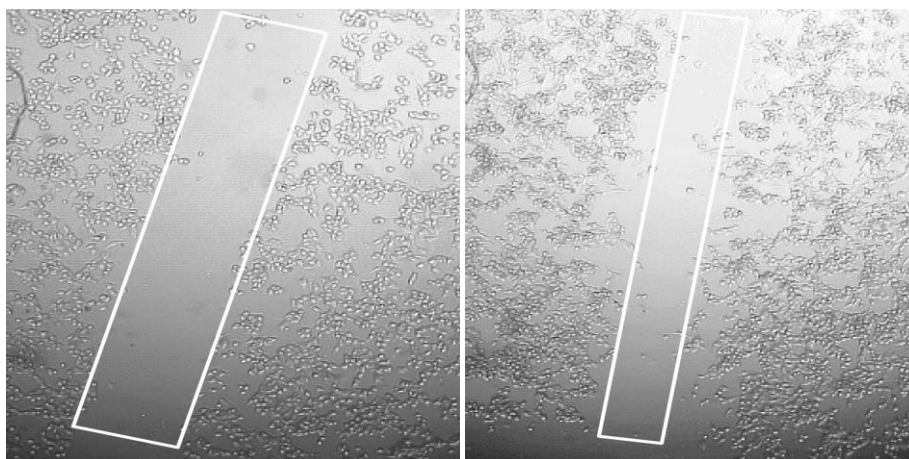
Εικόνα 24: Κύτταρα **control** την στιγμή της δημιουργίας της πληγής (αριστερά) και έπειτα από 48 ώρες (δεξιά).



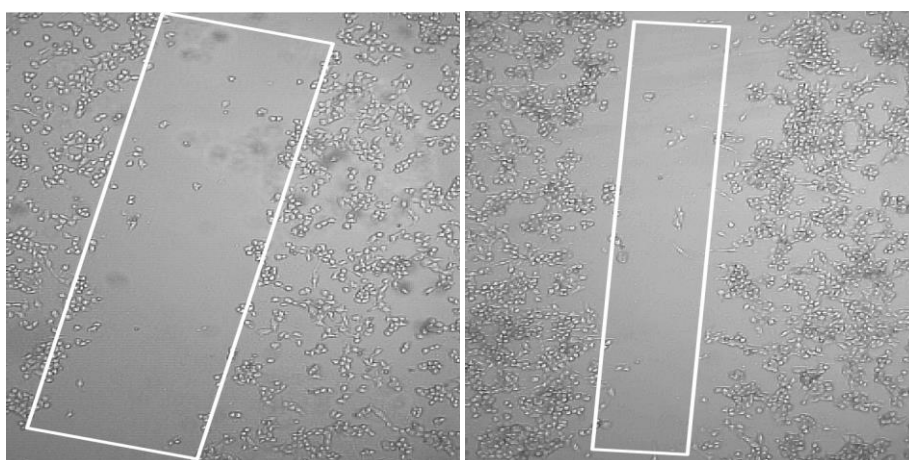
Εικόνα 25: Κύτταρα που προστέθηκε **5μM T-ac** την στιγμή της δημιουργίας της πληγής (αριστερά) και έπειτα από 48 ώρες (δεξιά).



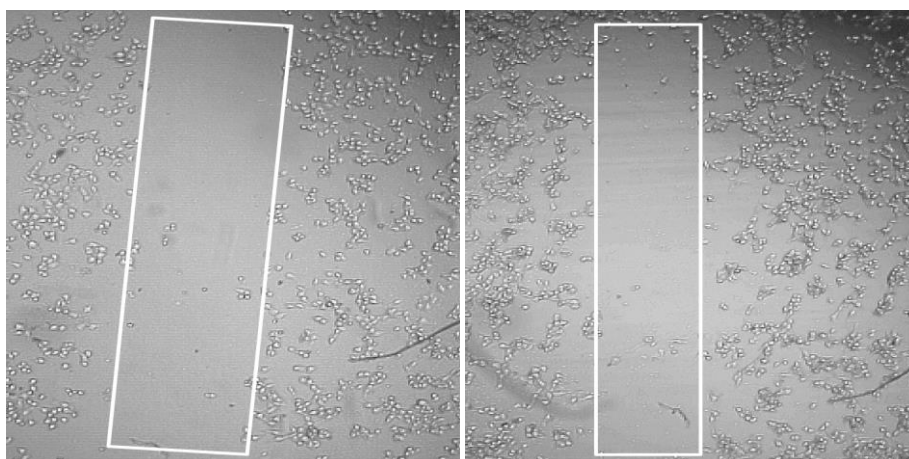
Εικόνα 26: Κύτταρα που προστέθηκε **2,5μM T-ac** την στιγμή της δημιουργίας της πληγής (αριστερά) και έπειτα από 48 ώρες (δεξιά).



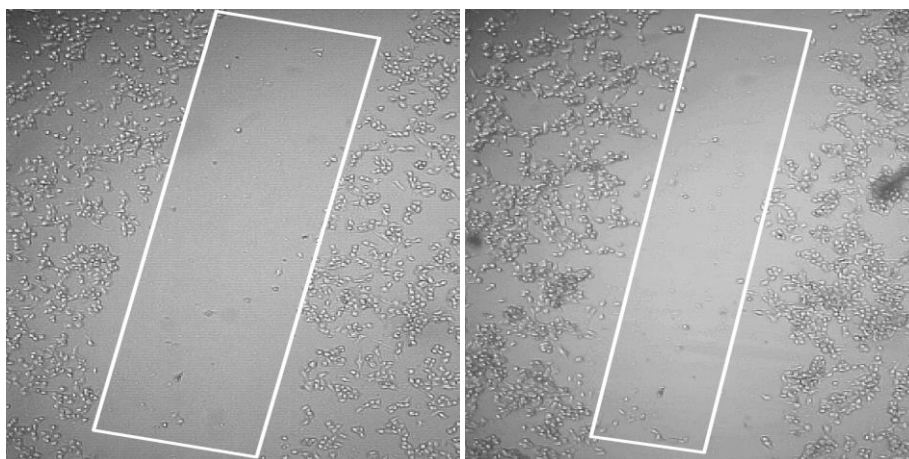
Εικόνα 27: Κύτταρα που προστέθηκε **1 $\mu$ M T-ac** την στιγμή της δημιουργίας της πληγής (αριστερά) και έπειτα από 48 ώρες (δεξιά).



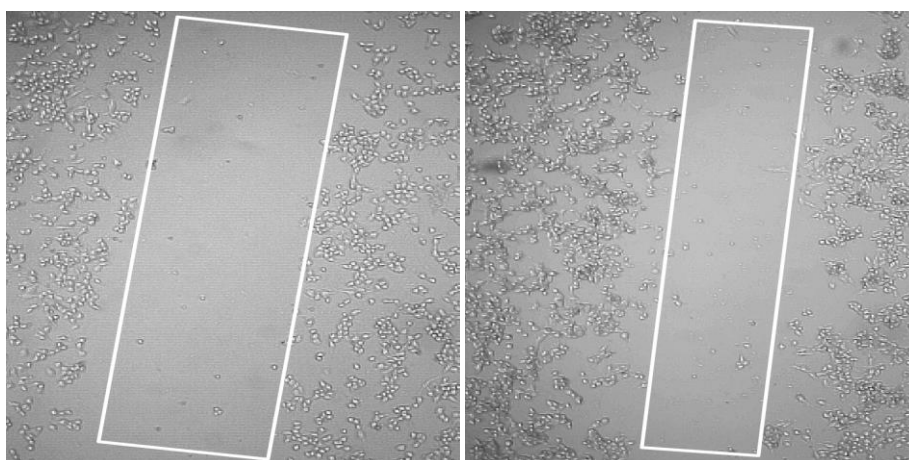
Εικόνα 28: Κύτταρα που προστέθηκε **0,5 $\mu$ M T-ac** την στιγμή της δημιουργίας της πληγής (αριστερά) και έπειτα από 48 ώρες (δεξιά).



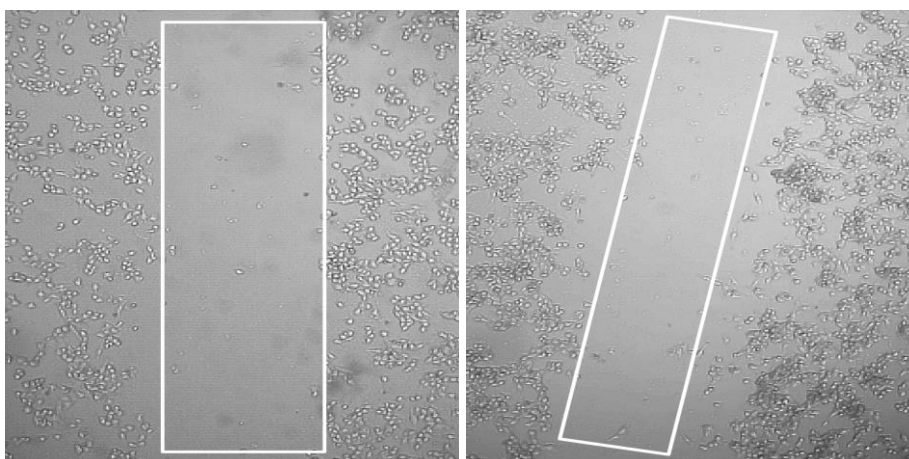
Εικόνα 29: Κύτταρα που προστέθηκε **10 $\mu$ M GSK 2334470** την στιγμή της δημιουργίας της πληγής (αριστερά) και έπειτα από 48 ώρες (δεξιά).



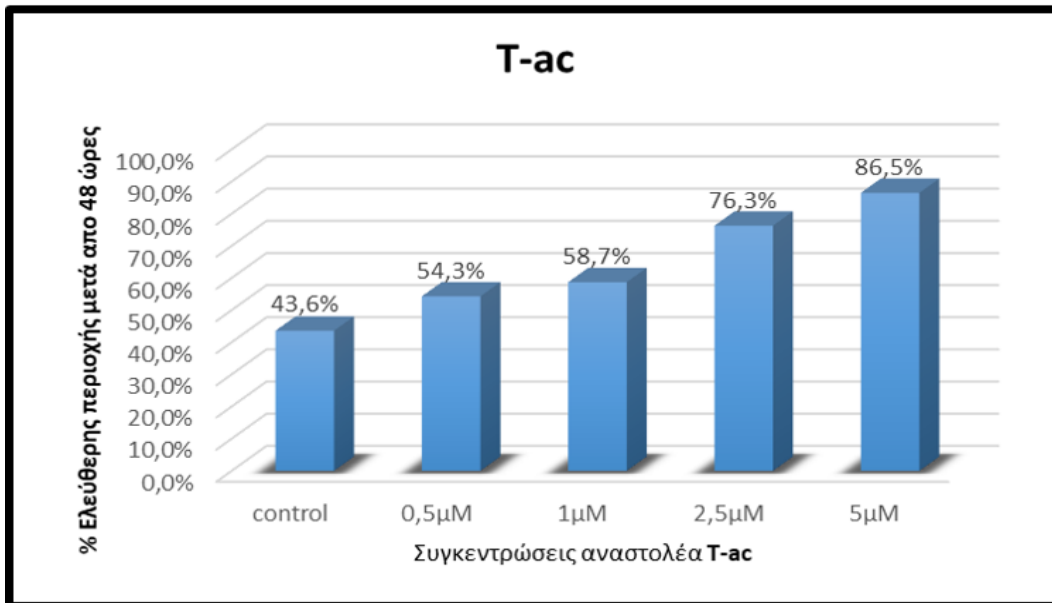
Εικόνα 30: Κύτταρα που προστέθηκε **5μM GSK 2334470** την στιγμή της δημιουργίας της πληγής (αριστερά) και έπειτα από 48 ώρες (δεξιά).



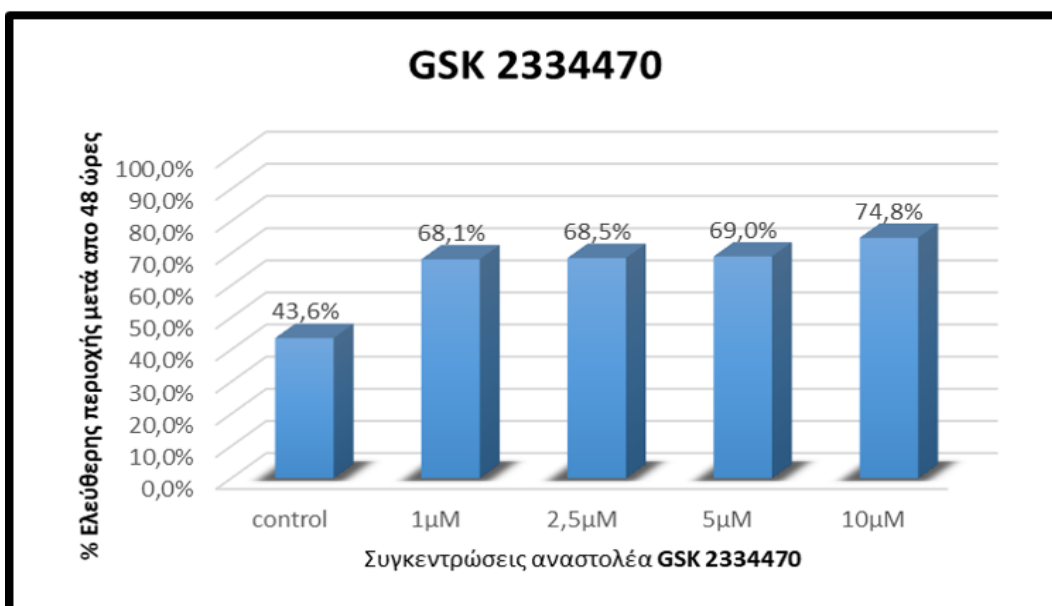
Εικόνα 31: Κύτταρα που προστέθηκε **2,5μM GSK 2334470** την στιγμή της δημιουργίας της πληγής (αριστερά) και έπειτα από 48 ώρες (δεξιά).



Εικόνα 32: Κύτταρα που προστέθηκε **1μM GSK 2334470** την στιγμή της δημιουργίας της πληγής (αριστερά) και έπειτα από 48 ώρες (δεξιά).



**Γράφημα 13:** Ποσοστό ελεύθερης περιοχής μετά από 48 ώρες συγκριτικά με την αρχική ελεύθερη περιοχή ανά συγκέντρωση του αναστολέα **T-ac**.



**Γράφημα 14:** Ποσοστό ελεύθερης περιοχής μετά από 48 ώρες συγκριτικά με την αρχική ελεύθερη περιοχή ανά συγκέντρωση του αναστολέα **GSK 2334470**.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος των RSKs κινασών στις παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές AsPC-1 και Attached μέσα από την *in vitro* αντικαρκινική δράση έξι αναστολέων της λειτουργίας αυτών των RSK κινασών, όσον αφορά στην κυτταροτοξική στην αντιπολλαπλασιαστική και στην αντιμεταναστευτική τους ικανότητα. Πιο συγκεκριμένα, τιμές του GI50 κάτω από 10 $\mu$ M θεωρούνται σημαντικές για την δράση τους. Οι αναστολείς GSK2334470 και T-ac, εμφάνισαν τιμές κάτω από 10 $\mu$ M και στις δυο κυτταρικές σειρές, γεγονός που δείχνει την υψηλή δράση τους, ενώ ο αναστολέας BX-912 εμφάνισε τιμή GI50 κάτω 10 $\mu$ M μόνο για την κυτταρική σειρά των Attached, πράγμα το οποίο είναι αξιοσημείωτο και δύναται για περεταίρω μελέτη και έρευνα για το που έγκειται η διαφορά που παρουσιάζουν οι δυο αυτές παγκρεατικές καρκινικές σειρές. Ήπια έως χαμηλή κυτταροτοξική δράση εμφάνισε ο αναστολέας PF 4708671 και στις δύο παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ο αναστολέας PF 4708671 μπορεί να αναστέλλει σημαντικά την ενεργοποίηση της p70RSK στα καρκινικά κύτταρα και έχει την ικανότητα να εισχωρεί στα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα να επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο τους, αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Qiu et al, 2016). Ο αναστολέας BI-D1870 εμφάνισε και αυτός ήπια ως χαμηλή δράση. Πρόκειται για έναν εξαιρετικά εξειδικευμένο αναστολέα των RSKs, η δράση του οποίου είναι ως ανταγωνιστικός αναστολέας του ATP του N-τερματικού άκρου της AGC κινάσης της RSK (Sapkota et al, 2007). Ο αναστολέας FMK φαίνεται να είναι αδρανής τόσο στα AsPC-1 όσο και στα Attached παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα. Ο FMK αποτρέπει το N-τερματικό άκρο της RSK κινάσης να ενεργοποιηθεί από το C-τερματικό άκρο της κινάσης, ωστόσο δεν επηρεάζει την δραστικότητα του N-τερματικού άκρου. Πιθανώς, αυτό να αποτελεί την αιτία για την οποία οι RSKs δεν αναστέλλονται από τον FMK (Cohen et al, 2005). Ο FMK δεν έχει την ικανότητα να αναστείλει την RSK αν το N-τερματικό άκρο της κινάσης ενεργοποιηθεί με έναν μηχανισμό ανεξάρτητο του C-τερματικού άκρου (Cohen et al, 2007). Όπως ήδη γνωρίζουμε ο αναστολέας T-ac, που εμφάνισε υψηλή δράση και στις δυο καρκινικές σειρές, επηρεάζει μόνο την N-τερματική περιοχή (NTKD) της κινάσης RSK2 και επιφέρει αποπτωτικό θάνατο στα καρκινικά κύτταρα καθώς εμπλέκεται στο μονοπάτι MAPK (Tsimplouli et al, 2012).

Ο αναστολέας GSK 2334470 ο οποίος φαίνεται να έχει εξαιρετικά υψηλή δράση και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, καθώς και ο BX-912 ο οποίος έχει οριακά την υψηλότερη δράση στα κύτταρα Attached, και οι δύο αναστέλουν την PDK1. Φαίνεται επομένως ότι, η αναστολή της PDK1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Πρόσφατη έρευνα του 2019, η οποία εξέτασε τον ρόλο της PDK1 σε είδος παγκρεατικού καρκίνου (παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα-PDAC) συμφωνεί με τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Πιο συγκεκριμένα, η PDK1 συνδέεται συχνότερα με τη σηματοδότηση Akt, ωστόσο ο ρόλος της PDK1 στον καρκίνο δεν περιορίζεται στην ενεργοποίηση του Akt. Η PDK1 μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει τουλάχιστον 23 κινάσες AGC συμπεριλαμβανομένης της κινάσης RSK, την οποία μελετήσαμε. Η ποικιλία των υποστρωμάτων που μπορούν να ενεργοποιηθούν από την PDK1 έχουν μεγάλη σημασία στη σηματοδότηση του καρκίνου. Η PDK1 αποτελεί τελεστή-κλειδί του ογκογόνου KRAS στον παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, το πιο συχνό είδος καρκίνου του παγκρέατος. Η συγκεκριμένη έρευνα κατέδειξε ότι η θεραπεία με ειδικούς αναστολείς της PDK1 εξασθένησε την ανάπτυξη των καρκινικών κυτταρικών σειρών του παγκρέατος, καθώς και την ανάπτυξη όγκου του παγκρέατος σε μοντέλο ξενομοσχεύματος. Συμπερασματικά, αποδείχθηκε ότι η PDK1 είναι ένας κατάλληλος στόχος για θεραπευτική παρέμβαση στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος (PDAC) και πρέπει να υποστηριχθεί η κλινική ανάπτυξη αναστολέων της PDK1 για το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (PDAC) (Emmanouilidi et al, 2019).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι είναι πολύ πιθανό να υπάρχει κάποιος ιδιαίτερος ρόλος των RSKs κινασών στον καρκίνο του παγκρέατος και ότι η αναστολή τους είναι εξαιρετικής σημασίας για το πως θα εξελιχθεί η νόσος. Η μελέτη του ρόλου των RSKs σε ακόμη περισσότερες παγκρεατικές καρκινικές σειρές, η επίδραση των αναστολέων κάτω από διάφορες συνθήκες καθώς και επιπλέον τεχνικές μελέτης όπως η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά western blot analysis αλλά και κυρίως η μελέτη της δράσης τους σε ζωικά πρότυπα καρκίνου θα ήταν εφικτό να προσφέρει ακόμη περισσότερες πληροφορίες για το ρόλο τους καθώς και την πιθανή στόχευση τους σαν μια νέα στρατηγική θεραπεία με στόχο την αντιμετώπιση της νόσου.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <https://www.cancer.gov>, National Cancer Institute
2. <https://columbiasurgery.org>, Columbia University Department of Surgery
3. [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org), Journal of Gastroenterology
4. <https://www.hopkinsmedicine.org>, Johns Hopkins Medicine
5. [cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/pancreatic/staging](http://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/pancreatic/staging)
6. <https://www.tocris.com>
7. <https://www.selleckchem.com>
8. [www.atcc.org](http://www.atcc.org)
9. Blamey SL, Fearon KC, Gilmour WH, Osborne DH, Carter DC. Prediction of risk in biliary surgery. *Br J Surg*. 1983 Sep;70(9):535-8. doi: 10.1002/bjs.1800700910. PMID: 6616158.
10. Casalvieri KA, Matheson CJ, Backos DS, Reigan P. Selective Targeting of RSK Isoforms in Cancer. *Trends Cancer*. 2017 Apr;3(4):302-312. doi: 10.1016/j.trecan.2017.03.004. Epub 2017 Apr 3. PMID: 28718440.
11. Chen WH, Horoszewicz JS, Leong SS, Shimano T, Penetrante R, Sanders WH, Berjian R, Douglass HO, Martin EW, Chu TM. Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro*. 1982 Jan;18(1):24-34. doi: 10.1007/BF02796382. PMID: 7182348.
12. Cheng Y, Briarava M, Lai M, Wang X, Tu B, Cheng N, Gong J, Yuan Y, Pilati P, Mocellin S. Pancreaticojejunostomy versus pancreaticogastrostomy reconstruction for the prevention of postoperative pancreatic fistula following pancreaticoduodenectomy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Sep 12;9(9):CD012257. doi: 10.1002/14651858.CD012257.pub2. PMID: 28898386; PMCID: PMC6483797.
13. Chu QD, Sun G, Pope M, Luraguiz N, Curiel DT, Kim R, Li BD, Mathis JM. Virotherapy using a novel chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival in a human pancreatic cancer xenograft model. *Surgery*. 2012 Sep;152(3):441-8. doi: 10.1016/j.surg.2012.05.040. Epub 2012 Jul 31. PMID: 22853858; PMCID: PMC3432747.
14. Cohen MS, Hadjivassiliou H, Taunton J. A clickable inhibitor reveals context-dependent autoactivation of p90 RSK. *Nat Chem Biol*. 2007 Mar;3(3):156-60. doi: 10.1038/nchembio859. Epub 2007 Jan 28. PMID: 17259979; PMCID: PMC3634365.
15. Cohen MS, Zhang C, Shokat KM, Taunton J. Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1318-21. doi: 10.1126/science1108367. PMID: 15919995; PMCID: PMC3641834.
16. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011 May 12;364(19):1817-25. doi: 10.1056/NEJMoa1011923. PMID: 21561347.

17. Conroy, Thierry & Hammel, Pascal & Hebbar, Mohamed & Abdelghani, Meher & Wei, Alice & Raoul, Jean-Luc & Chone, Laurence & Francois, Eric & Artru, Pascal & Biagi, James & Lecomte, Thierry & Assenat, Eric & Faroux, Roger & Ychou, Marc & Volet, Julien & Sauvanet, Alain & Jouffroy-Zeller, Claire & RAT, Patrick & Castan, Florence & Bachet, Jean-Baptiste. (2018). Unicancer GI PRODIGE 24/CCTG PA.6 trial: A multicenter international randomized phase III trial of adjuvant mFOLFIRINOX versus gemcitabine (gem) in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinomas.. *Journal of Clinical Oncology*. 36. LBA4001-LBA4001. 10.1200/JCO.2018.36.18\_suppl.LBA4001.
18. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*. 2010 May;39(4):425-35. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181c15963. Erratum in: *Pancreas*. 2018 Jul;47(6):e37. PMID: 20418756; PMCID: PMC2860631.
19. Demetzos, Costas & Magiatis, Prokopios & Typas, Milton & Dimas, Konstantinos & Sotiriadou, R & Perez, Sonia & Kokkinopoulos, Dimitris. (1997). Biotransformation of the flavonoid tiliroside to 7-methylether tiliroside: Bioactivity of this metabolite and of its acetylated derivative. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 53. 587-92. 10.1007/s000180050076.
20. Demir IE, Jäger C, Schlitter AM, Konukiewitz B, Stecher L, Schorn S, Tieftrunk E, Scheufele F, Calavrezos L, Schirren R, Esposito I, Weichert W, Friess H, Ceyhan GO. R0 Versus R1 Resection Matters after Pancreaticoduodenectomy, and Less after Distal or Total Pancreatectomy for Pancreatic Cancer. *Ann Surg*. 2018 Dec;268(6):1058-1068. doi: 10.1097/SLA.0000000000002345. PMID: 28692477.
21. Dimas K, Demetzos C, Mitaku S, Vaos B, Marselos M, Tzavaras T, Kokkinopoulos D. Cytotoxic activity and antiproliferative effects of a new semi-synthetic derivative of Ent-3 beta-hydroxy-13-epi-manoyl oxide on human leukemic cell lines. *Anticancer Res*. 1999 Sep-Oct;19(5B):4065-72. PMID: 10628355.
22. Emmanouilidi A, Fyffe CA, Ferro R, Edling CE, Capone E, Sestito S, Rapposelli S, Lattanzio R, Iacobelli S, Sala G, Maffucci T, Falasca M. Preclinical validation of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 inhibition in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 May 14;38(1):191. doi: 10.1186/s13046-019-1191-2. PMID: 31088502; PMCID: PMC6518649.
23. Feldman RI, Wu JM, Polokoff MA, Kochanny MJ, Dinter H, Zhu D, Biroc SL, Aliche B, Bryant J, Yuan S, Buckman BO, Lentz D, Ferrer M, Whitlow M, Adler M, Finster S, Chang Z, Arnaiz DO. Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J Biol Chem*. 2005 May 20;280(20):19867-74. doi: 10.1074/jbc.M501367200. Epub 2005 Mar 16. PMID: 15772071.
24. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25220842.
25. Fitzgerald TL, Lertpiriyapong K, Cocco L, Martelli AM, Libra M, Candido S, Montalto G, Cervello M, Steelman L, Abrams SL, McCubrey JA. Roles of EGFR and KRAS and their downstream signaling pathways in pancreatic cancer and pancreatic cancer stem cells. *Adv Biol Regul*. 2015 Sep;59:65-81. doi: 10.1016/j.jbior.2015.06.003. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26257206.
26. Ghosn M, Kourie HR, El Rassy E, Haddad FG, Hanna C, El Karak F, Nasr D. Where does chemotherapy stands in the treatment of ampullary carcinoma? A review of literature. *World J Gastrointest Oncol*. 2016 Oct 15;8(10):745-750. doi: 10.4251/wjgo.v8.i10.745. PMID: 27795814; PMCID: PMC5064052.



27. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.
28. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.
29. Heberle AM, Razquin Navas P, Langelaar-Makkinje M, Kasack K, Sadik A, Faessler E, Hahn U, Marx-Stoelting P, Opitz CA, Sers C, Heiland I, Schäuble S, Thedieck K. The PI3K and MAPK/p38 pathways control stress granule assembly in a hierarchical manner. *Life Sci Alliance*. 2019 Mar 28;2(2):e201800257. doi: 10.26508/lsa.201800257. PMID: 30923191; PMCID: PMC6441495.
30. Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, Labianca R, Löhner JM, Neoptolemos J, Real FX, Van Laethem JL, Heinemann V. Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatology*. 2015 Jan-Feb;15(1):8-18. doi: 10.1016/j.pan.2014.10.001. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25547205.
31. Houles T, Roux PP. Defining the role of the RSK isoforms in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2018 Feb;48:53-61. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.04.016. Epub 2017 May 2. PMID: 28476656.
32. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 Nov 28;22(44):9694-9705. doi: 10.3748/wjg.v22.i44.9694. PMID: 27956793; PMCID: PMC5124974.
33. Kang S, Elf S, Lythgoe K, Hitosugi T, Taunton J, Zhou W, Xiong L, Wang D, Muller S, Fan S, Sun SY, Marcus AI, Gu TL, Polakiewicz RD, Chen ZG, Khuri FR, Shin DM, Chen J. p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Clin Invest*. 2010 Apr;120(4):1165-77. doi: 10.1172/JCI40582. Epub 2010 Mar 15. PMID: 20234090; PMCID: PMC2846050.
34. Kim KS, Kwon J, Kim K, Chie EK. Impact of Resection Margin Distance on Survival of Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Res Treat*. 2017 Jul;49(3):824-833. doi: 10.4143/crt.2016.336. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27561314; PMCID: PMC5512376.
35. Labori KJ, Lassen K, Hoem D, Grønbech JE, Søreide JA, Mortensen K, Smaaland R, Sorbye H, Verbeke C, Dueland S. Neoadjuvant chemotherapy versus surgery first for resectable pancreatic cancer (Norwegian Pancreatic Cancer Trial - 1 (NorPACT-1)) - study protocol for a national multicentre randomized controlled trial. *BMC Surg*. 2017 Aug 25;17(1):94. doi: 10.1186/s12893-017-0291-1. PMID: 28841916; PMCID: PMC6389186.
36. Lara R, Seckl MJ, Pardo OE. The p90 RSK family members: common functions and isoform specificity. *Cancer Res*. 2013 Sep 1;73(17):5301-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4448. Epub 2013 Aug 22. PMID: 23970478.
37. Leung PS. Overview of the pancreas. *Adv Exp Med Biol*. 2010;690:3-12. doi: 10.1007/978-90-481-9060-7\_1. PMID: 20700834.
38. Lopez NE, Prendergast C, Lowy AM. Borderline resectable pancreatic cancer: definitions and management. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 21;20(31):10740-51. doi: 10.3748/wjg.v20.i31.10740. PMID: 25152577; PMCID: PMC4138454.
39. Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. *Surg Pathol Clin*. 2016 Dec;9(4):547-560. doi: 10.1016/j.path.2016.05.003. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27926359.
40. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Rosso T, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Ann Oncol*. 2016 Apr;27(4):725-31. doi: 10.1093/annonc/mdw022. Epub 2016 Jan 26. PMID: 26812903.

41. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol.* 2018 Nov 21;24(43):4846-4861. doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846. PMID: 30487695; PMCID: PMC6250924.
42. Midha S, Chawla S, Garg PK. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett.* 2016 Oct 10;381(1):269-77. doi: 10.1016/j.canlet.2016.07.022. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27461582.
43. Mollberg N, Rahbari NN, Koch M, Hartwig W, Hoeger Y, Büchler MW, Weitz J. Arterial resection during pancreatectomy for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg.* 2011 Dec;254(6):882-93. doi: 10.1097/SLA.0b013e31823ac299. PMID: 22064622.
44. Najafov A, Sommer EM, Axten JM, Deyoung MP, Alessi DR. Characterization of GSK2334470, a novel and highly specific inhibitor of PDK1. *Biochem J.* 2011 Jan 15;433(2):357-69. doi: 10.1042/BJ20101732. PMID: 21087210.
45. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Wente MN, Izbicki JR, Friess H, Lerch MM, Dervenis C, Oláh A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Valle JW, Palmer DH, Buckels JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Büchler MW; European Study Group for Pancreatic Cancer. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2010 Sep 8;304(10):1073-81. doi: 10.1001/jama.2010.1275. PMID: 20823433.
46. Nguyen TL. Targeting RSK: an overview of small molecule inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008 Oct;8(7):710-6. doi: 10.2174/187152008785914770. PMID: 18855572.
47. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zülke C, Fahlke J, Arning MB, Sinn M, Hinke A, Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA.* 2013 Oct 9;310(14):1473-81. doi: 10.1001/jama.2013.279201. PMID: 24104372.
48. Park JS, Kang DH, Lee DH, Bae SH. PF-4708671, a specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase 1, activates Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Oct 23;466(3):499-504. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.059. Epub 2015 Sep 14. PMID: 26381178.
49. Qiu D, Katanoda K, Marugame T, Sobue T. A Joinpoint regression analysis of long-term trends in cancer mortality in Japan (1958-2004). *Int J Cancer.* 2009 Jan 15;124(2):443-8. doi: 10.1002/ijc.23911. PMID: 18844218.
50. Qiu ZX, Sun RF, Mo XM, Li WM. The p70S6K Specific Inhibitor PF-4708671 Impedes Non-Small Cell Lung Cancer Growth. *PLoS One.* 2016 Jan 15;11(1):e0147185. doi: 10.1371/journal.pone.0147185. PMID: 26771549; PMCID: PMC4714881.
51. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012 Jan;16(1):103-19. doi: 10.1517/14728222.2011.645805. Epub 2012 Jan 12. PMID: 22239440; PMCID: PMC3457779.
52. Sapkota GP, Cummings L, Newell FS, Armstrong C, Bain J, Frodin M, Grauert M, Hoffmann M, Schnapp G, Steegmaier M, Cohen P, Alessi DR. BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem J.* 2007 Jan 1;401(1):29-38. doi: 10.1042/BJ20061088. PMID: 17040210; PMCID: PMC1698666.

53. Sereti E, Tsimplouli C, Kalaitidou E, Sakellaridis N, Dimas K. Study of the Relationship between Sigma Receptor Expression Levels and Some Common Sigma Ligand Activity in Cancer Using Human Cancer Cell Lines of the NCI-60 Cell Line Panel. *Biomedicines*. 2021 Jan 5;9(1):38. doi: 10.3390/biomedicines9010038. PMID: 33466391; PMCID: PMC7824900.
54. Tsimplouli C, Demetzos C, Hadzopoulou-Cladaras M, Pantazis P, Dimas K. In vitro activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines. *Eur J Nutr*. 2012 Mar;51(2):181-90. doi: 10.1007/s00394-011-0204-5. Epub 2011 May 20. PMID: 21598030.
55. Van der Gaag NA, Rauws EA, van Eijck CH, Bruno MJ, van der Harst E, Kubben FJ, Gerritsen JJ, Greve JW, Gerhards MF, de Hingh IH, Klinkenbijn JH, Nio CY, de Castro SM, Busch OR, van Gulik TM, Bossuyt PM, Gouma DJ. Preoperative biliary drainage for cancer of the head of the pancreas. *N Engl J Med*. 2010 Jan 14;362(2):129-37. doi: 10.1056/NEJMoa0903230. PMID: 20071702.
56. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2011 Aug 13;378(9791):607-20. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0. Epub 2011 May 26. PMID: 21620466; PMCID: PMC3062508.
57. Wang L, Yang GH, Lu XH, Huang ZJ, Li H. Pancreatic cancer mortality in China (1991-2000). *World J Gastroenterol*. 2003 Aug;9(8):1819-23. doi: 10.3748/wjg.v9.i8.1819. PMID: 12918128; PMCID: PMC4611551.
58. Wang Q, Gurusamy KS, Lin H, Xie X, Wang C. Preoperative biliary drainage for obstructive jaundice. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Jul 16;(3):CD005444. doi: 10.1002/14651858.CD005444.pub2. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;9:CD005444. PMID: 18677779.
59. Zhang J, Wu WM, You L, Zhao YP. Robotic versus open pancreatectomy: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2013 Jun;20(6):1774-80. doi: 10.1245/s10434-012-2823-3. Epub 2013 Mar 17. PMID: 23504140.