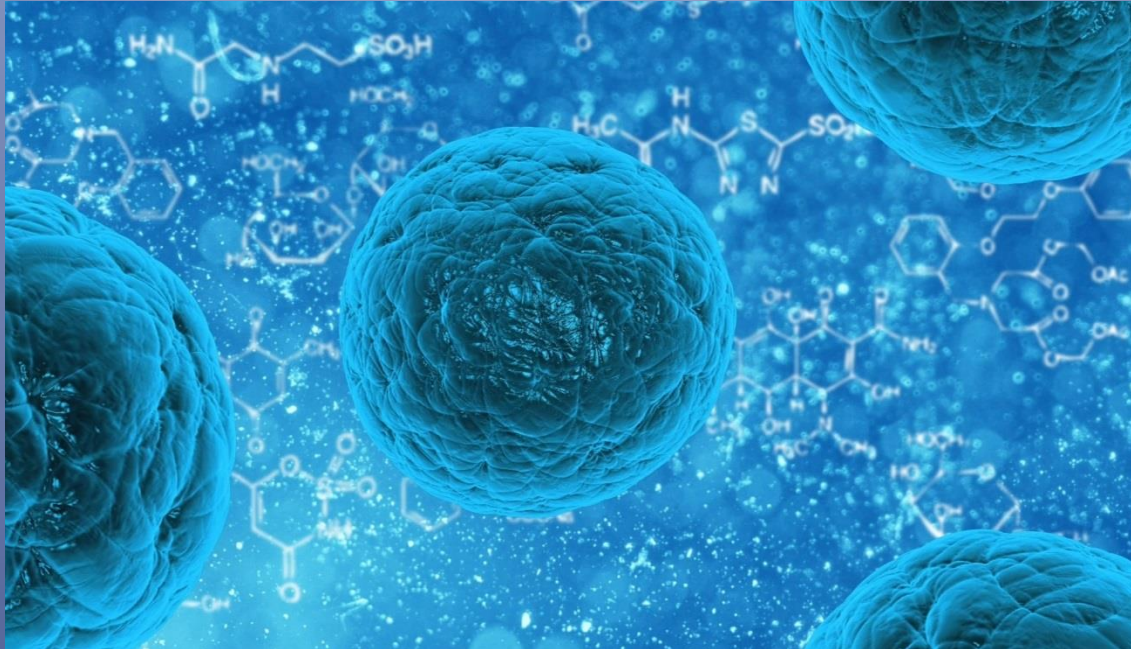




Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
ΔΠΜΣ “Ιατρική Χημεία”



Μεταβολικό και Λιπιδιακό Προφίλ στον Καρκίνο του Μαστού: Σύγκριση βλαστικών και μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων

Χρυσάνθη Καζέλογλου, Χημικός



**«Μεταβολικό και Λιπιδιακό Προφίλ στον Καρκίνο του
Μαστού: Σύγκριση βλαστικών και μη βλαστικών
καρκινικών κυττάρων»**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία στα πλαίσια του
ΔΠΜΣ «Ιατρική Χημεία»**

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια:

Χρυσάνθη Καζέλογλου, Χημικός AM: 157

Τριμελής Επιτροπή:

Αγγελική Μαγκλάρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Γεώργιος Λεονταρίτης, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Μέλος)

Ελένη Μπαϊρακτάρη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Μέλος)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία έχει σαν αντικείμενο τη σύγκριση του μεταβολικού και λιπιδιακού προφίλ των βλαστικών και μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι κύτταρα, τα οποία έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης και της διαφοροποίησης. Είναι ογκογόνα και εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε ακτινοβολίες και χημειοθεραπείες, προκαλώντας τη δημιουργία ή την επανεμφάνιση του όγκου, αντίστοιχα, κάτι που κρίνει απαραίτητη τη βαθύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς τους. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στα θετικά για τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER⁺) MCF-7 καρκινικά κύτταρα του μαστού. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν in vitro τόσο υπό καθιερωμένες συνθήκες, όσο και υπό συνθήκες που ευνοούν την επιβίωση πληθυσμού, που είναι εμπλουτισμένος σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Τα βλαστικά και μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε η διακοπή της μεταβολικής τους δραστηριότητας. Στη συνέχεια έλαβε χώρα η εκχύλιση των συστατικών των κυττάρων με τη χρήση των διαλυτών μεθανόλη/νερό/χλωροφόρμιο, ώστε να διαχωριστούν η υδατική και οργανική φάση και να προετοιμαστούν για τη λήψη φάσματος με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR).

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να γίνει η καταγραφή και η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών στα βλαστικά και μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα του μαστού, έτσι ώστε να εντοπιστούν χαρακτηριστικοί μεταβολίτες ή χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις αυτών για τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, κάτι που θα συμβάλλει στη καλύτερη κατανόηση της βιολογίας τους.

Έτσι, λοιπόν, μετά από την ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο προφίλ των βλαστικών και μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων MCF-7, κυρίως σε αυτό των λιπιδίων. Ωστόσο, δεν μπόρεσε να γίνει σύγκριση του μεταβολικού προφίλ των δύο κυτταρικών τύπων λόγω πειραματικού σφάλματος.

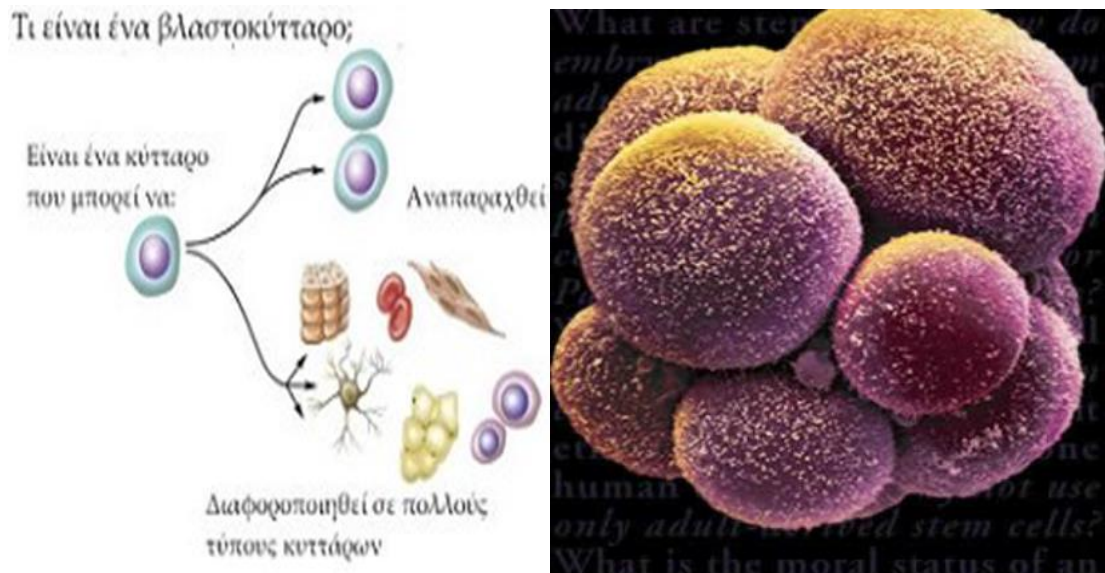
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1. Τα Φυσιολογικά Βλαστικά Κύτταρα (Stem Cells) και οι Ιδιότητές τους.....	4
2. Ο Καρκίνος και τα Μοντέλα Ετερογένειας	7
2.1. Το Μοντέλο της Κλωνικής Εξέλιξης (The Clonal Evolution Model)	7
2.2. Η Θεωρία των Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων (Cancer Stem Cell Model).....	10
2.3. Το Μοντέλο Πλαστικότητας των Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων (Plastic Cancer Stem Cell Model).....	10
3. Τα Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα (Cancer Stem Cells).....	11
3.1. Ο Ορισμός των Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων και οι Πιθανές Προελεύσεις τους.....	12
3.2. Ο Καρκίνος του Μαστού.....	14
3.2.1. Βλαστικά Κύτταρα του Μαστού.....	15
3.2.2. Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα του Μαστού.....	16
4. Μεταβολομική (Metabolomics) στον Καρκίνο του Μαστού.....	19
4.1. Ο Ορισμός της Μεταβολομικής (Metabolomics) και οι Εφαρμογές της.....	19
4.2. Αναλυτικές Μέθοδοι Μεταβολομικής Ανάλυσης.....	19
4.3. Το Μεταβολικό Προφίλ στον Καρκίνο του Μαστού.....	22
Σκοπός της Παρούσας Εργασίας	27
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
1. Η Καρκινική Κυτταρική Σειρά MCF-7.....	28
2. Κυτταροκαλλιέργειες.....	29
3. Διακοπή της Μεταβολικής Δραστηριότητας.....	30
4. Εκχύλιση Μεταβολιτών.....	30
5. Εξάτμιση Διαλυτών.....	33
6. Λυοφιλοποίηση της Υδατοδιαλυτής Φάσης.....	33
7. Φασματοσκοπία NMR.....	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	48
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Τα Φυσιολογικά Βλαστικά Κύτταρα (Stem Cells) και οι Ιδιότητές τους

Όπως είναι γνωστό, ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από κύτταρα. Η εξέλιξή του αρχίζει από το γονιμοποιημένο ωάριο, το οποίο μετατρέπεται σε έναν πολυσύνθετο και πολυκύτταρο οργανισμό. Το γονιμοποιημένο ωάριο αναπτύσσεται σταδιακά σε μία πολυδύναμη σφαίρα κυττάρων, τη βλαστοκύστη, η οποία αποτελείται εν μέρει από βλαστοκύτταρα. (**Εικόνα 1**) Αυτά είναι αρχέγονα κύτταρα που ορίζονται από την ικανότητά τους να αυτο-ανανεώνονται και στη συνέχεια να διαφοροποιούνται σε τουλάχιστον έναν ώριμο κυτταρικό τύπο. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται οι ιστοί του ενήλικου ανθρώπινου σώματος. Η ανακάλυψή τους έγινε τη δεκαετία του 1950 από τους Καναδούς ερευνητές Ernest McCulloch και James Till [1], με τη βοήθεια πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στον μυελό των οστών ενώ μόλις το 1988 μπόρεσαν να απομονωθούν ως καθαροί πληθυσμοί.



Εικόνα 1: Τι είναι το βλαστοκύτταρο.

Τα *εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα* είναι αρχέγονα, αδιαφοροποίητα κύτταρα που δημιουργούνται με τη γονιμοποίηση του ωαρίου και προέρχονται από τη βλαστική μάζα των κυττάρων που υπαλείφουν την εσωτερική επιφάνεια της βλαστοκύστης. Από τα κύτταρα αυτά θα σχηματιστεί το έμβρυο, ενώ από τα κύτταρα που βρίσκονται εκτός του εμβρύου και εντός της βλαστοκύστης θα σχηματιστεί ο πλακούντας. Τα *εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα* αποτελούν τους θεμέλιους λίθους του σώματος μας. Μπορούν να ληφθούν από ένα πολύ αρχικό στάδιο της ανθρώπινης ανάπτυξης και έχουν τη δυνατότητα να παράγουν όλους τους κυτταρικούς τύπους του ανθρώπινου οργανισμού.

Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από πάνω από 200 διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως είναι τα νευρικά κύτταρα, τα κύτταρα του αίματος, του δέρματος και των μυών, τα οποία προέρχονται από διάφορους τύπους βλαστικών κυττάρων, που ονομάζονται *ενήλικα ή σωματικά βλαστικά κύτταρα*. Αυτά είναι κύτταρα που έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τους ιστούς καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Βρίσκονται σε διάφορους ιστούς του πλήρως ανεπτυγμένου ανθρώπινου οργανισμού, όπως στον μυελό των οστών, στο δέρμα, στη καρδιά, στον εγκέφαλο και αλλού, και μπορεί να περιορίζονται μόνο στη παραγωγή συγκεκριμένων, εξειδικευμένων κυττάρων που συμβάλλουν στην αναγέννηση των ιστών.

Ένα φυσιολογικό βλαστικό κύτταρο πρέπει να διαθέτει δύο ιδιότητες για να εκτελέσει τη φυσική λειτουργία του: *A)* Αυτο-ανανέωση (self-renewal) (δηλαδή την ικανότητα να παράγει περισσότερα βλαστικά κύτταρα), και *B)* Διαφοροποίηση (differentiation) [8].

A) Η αυτο-ανανέωση επιτυγχάνεται μέσω μίας «ειδικής» μιτωτικής κυτταρικής διαίρεσης που επιτρέπει στο βλαστικό κύτταρο να παράγει ένα (ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση) ή δύο (συμμετρική κυτταρική διαίρεση) θυγατρικά βλαστικά κύτταρα, με ουσιαστικά την ίδια δυνατότητα ανάπτυξης και αναπαραγωγής με το αρχέγονο [2]. Αποτελεί ίσως τη πιο σημαντική ικανότητα του βλαστικού κυττάρου, δεδομένου ότι επιτρέπει την αύξηση του πληθυσμού τους σε απόκριση σε ερεθίσματα, τα οποία πυροδοτούν τον μαζικό πολλαπλασιασμό και τη διατήρηση μίας ιστοειδικής ομάδας αδιαφοροποίητων κυττάρων στο όργανο ή τον ιστό [1].

B) Η διαφοροποίηση ενός βλαστικού κυττάρου περιλαμβάνει τη παραγωγή προγονικών και κατ'επέκταση θυγατρικών κυττάρων, που μετατρέπονται σε εξειδικευμένα κύτταρα ιστού, με τη χρήση γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών. Ένα παράδειγμα αποτελούν τα βλαστικά κύτταρα του αίματος, τα οποία παράγουν προγονικά κύτταρα (progenitors cells) που πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς για ένα μικρό χρονικό διάστημα και τελικά διαφοροποιούνται σε πιο ειδικά κύτταρα, όπως τα βασεόφιλα, τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα [1]. **(Εικόνα 2)**

Αξίζει να αναφερθεί ότι σημαντικό ρόλο στην ιεραρχία των βλαστικών κυττάρων παίζουν οι επιγενετικοί μηχανισμοί. Πρόκειται για μηχανισμούς γονιδιακής ρύθμισης, οι οποίοι δεν προκαλούν μετάλλαξη στην αλληλουχία του DNA και είναι εξ' ορισμού αναστρέψιμοι. Οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση των ιστονών και τα μη κωδικοποιούντα RNAs.



Εικόνα2: Σχηματική απεικόνιση της διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στα εξειδικευμένα κύτταρα του αίματος.

Λόγω της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται, τα βλαστοκύτταρα δίνουν ελπίδες για την ανάπτυξη θεραπειών σε ποικίλες ιατρικές περιπτώσεις, όπως είναι οι φυσικοί τραυματισμοί, οι εκφυλιστικές νόσοι αλλά και οι γενετικές ασθένειες.

2. Ο Καρκίνος και τα Μοντέλα Ετερογένειας

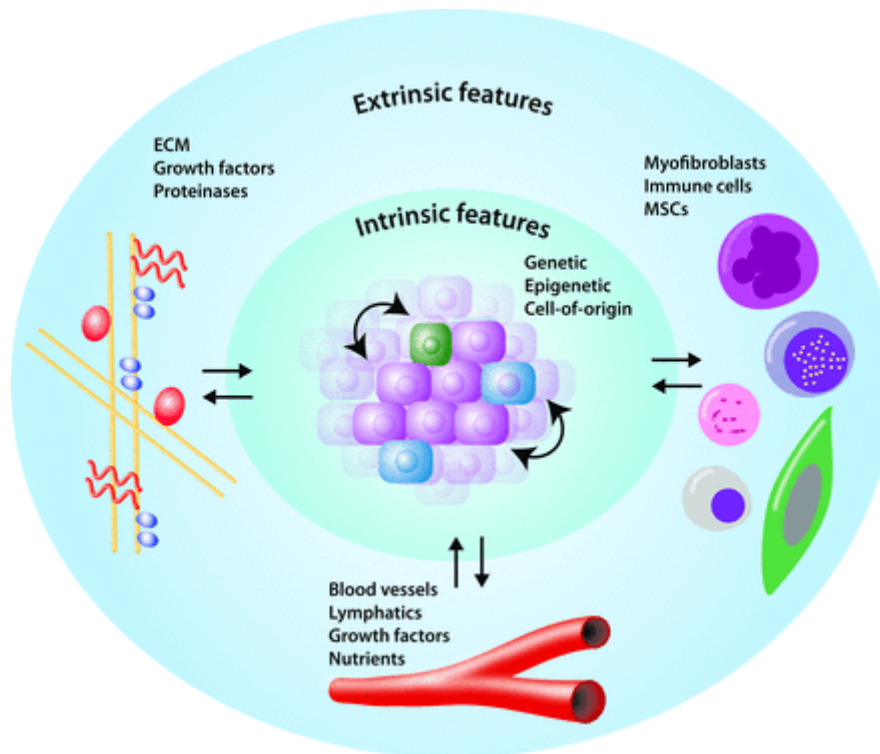
Με τον όρο «καρκίνο», ο οποίος αποδίδεται στον «πατέρα της Ιατρικής» Ιπποκράτη, περιγράφεται μία ομάδα νοσημάτων που σαν κύριο γνώρισμα έχουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και κατ'επέκταση τη δημιουργία όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται είτε άμεσα στον παρακείμενο ιστό με «διήθηση», ή μεταφέρονται σε άλλα όργανα του οργανισμού μέσω των αιμοφόρων αγγείων και των λεμφαγγείων (μετάσταση). Αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, μετά από τις καρδιαγγειακές παθήσεις.

Ο καρκίνος αποτελεί μία ετερογενή ασθένεια και υπάρχει αυξανόμενη ανησυχία ότι η ετερογένεια εντός του όγκου συμβάλλει στην αποτυχία της θεραπείας και τη εξέλιξη της νόσου. Η ετερογένεια του καρκίνου προκύπτει από διάφορους τύπους κυττάρων που βρίσκονται στον όγκο και από γενετικές ή / και επιγενετικές διαφορές μεταξύ των ίδιων των καρκινικών κυττάρων. Όλα αυτά, καθώς επίσης και εγγενείς (ιδιότητες του κυττάρου που συμβάλλουν σε ογκογόνο φαινότυπο) ή εξωγενείς (τα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του κυττάρου που επιδρούν σε αυτό, επηρεάζοντας τον φαινότυπό του και διαταράσσοντας τη πορεία της νόσου) κυτταρικοί παράγοντες (**Εικόνα 3**), δρουν συνεργιστικά για να δημιουργήσουν μία ασθένεια με ποικίλους φαινοτύπους. Δύο είναι τα κυρίαρχα μοντέλα που προσπαθούν να εξηγήσουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου: το μοντέλο της κλωνικής εξέλιξης (The Clonal Evolution Model) και το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Cancer Stem Cell Model). Μία πρόσφατη διαφοροποίηση του τελευταίου είναι το μοντέλο της πλαστικότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Plastic Cancer Stem Cell Model) (**Εικόνα 4**) [3].

2.1. Το Μοντέλο της Κλωνικής Εξέλιξης (The Clonal Evolution Model)

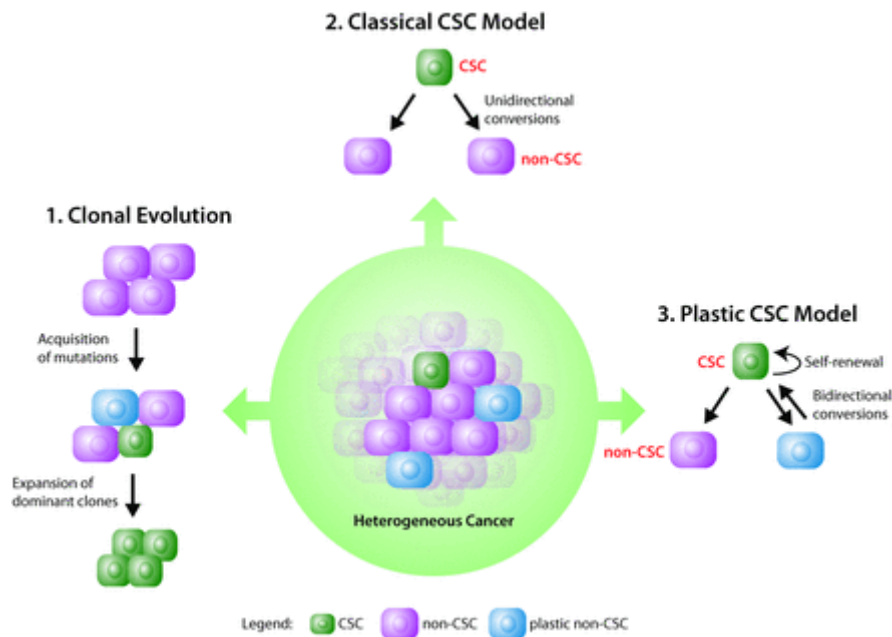
Το συγκεκριμένο μοντέλο υποστηρίζει ότι τα καρκινικά κύτταρα εξελίσσονται προοδευτικά κατά τη διάρκεια πολλαπλών σταδίων της ογκογένεσης και ότι η ετερογένεια των καρκινικών κυττάρων, η οποία δημιουργείται από κληρονομικές γενετικές και επιγενετικές μεταβολές, δημιουργεί τη πρώτη ύλη για την επιλογή και τη κλωνική ανάπτυξη νέων κυτταρικών πληθυσμών. Σε αυτό συμβάλλουν και οι πιέσεις που δέχεται το κύτταρο από το μικροπεριβάλλον του [4].

Σε αυτή τη θεωρία φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο οι διαδοχικές μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε μία γενιά κυττάρων και οι οποίες προκαλούν σταδιακό μετασχηματισμό του φαινοτύπου τους σε κακοήθη.



Εικόνα 3: Εγγενή και Εξωγενή Χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην Ετερογένεια των Καρκινικών Κυττάρων. Τα καρκινώματα περιλαμβάνουν ετερογενείς πληθυσμούς κυττάρων. Ποικίλοι παράγοντες συμβάλλουν σε διάφορους βιολογικούς φαινοτύπους των καρκινικών κυττάρων, και υπάρχουν τόσο στο εσωτερικό του όγκου όσο και μεταξύ των υποτύπων του όγκου. Αυτή η ποικιλομορφία προκύπτει από (α) Εγγενείς κυτταρικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της μεταβλητότητας στη γενετική, την επιγενετική, και τη βιολογία της προέλευσης του κυττάρου στον όγκο, και (β) Εξωγενείς κυτταρικές ιδιότητες που προκύπτουν από παράγοντες στο μικροπεριβάλλον, οι οποίοι περιλαμβάνουν τη σύνθεση του εξωκυττάρου πλέγματος και παράγοντες που απομονώθηκαν στα συστατικά του, την ικανότητα του όγκου να έχει επαρκή παροχή αίματος, και να προσλαμβάνει στρωματικούς κυτταρικούς τύπους, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη [3].

Δεδομένου ότι η δημιουργία νέων κλώνων, ιδιαίτερα στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του όγκου, μπορεί να συμβεί πιο γρήγορα σε σχέση με την εξάλειψη των λιγότερο προσαρμοσμένων κλώνων, δείχνει ότι αυτό μπορεί να είναι υπεύθυνο για τη σημαντική ετερογένεια που παρατηρείται μέσα στον όγκο.



Εικόνα 4: Τα Μοντέλα της Ετερογένειας του Όγκου. Η θεωρία της κλωνικής εξέλιξης ήταν το πρώτο μοντέλο που περιέγραψε έναν τρόπο με τον οποίο καρκινικά κύτταρα με ποικίλους φαινοτύπους μπορούν να προκύψουν εντός του όγκου. Σε αυτό το μοντέλο, διακριτοί καρκινικοί κυτταρικοί πληθυσμοί εξελίσσονται προοδευτικά κατά τη διάρκεια πολλαπλών σταδίων ογκογένεσης, που οφείλεται σε κληρονομικές γενετικές και επιγενετικές μεταβολές. Αυτά τα γεγονότα δημιουργούν την πρώτη ύλη για την επιλογή και την κλωνική ανάπτυξη των νέων κυτταρικών πληθυσμών που προκύπτουν από τη συσσώρευση μεταλλάξεων. Ένα δεύτερο μοντέλο περιγράφεται από τη κλασική θεωρία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, η οποία προτείνει ότι η ετερογένεια του όγκου προκύπτει όταν τα καρκινικά κύτταρα μέσα σε ένα δεδομένο όγκο διαμένουν σε διαφορετικές καταστάσεις βλαστικής ικανότητας ή διαφοροποίησης. Σημαντικό στοιχείο γι' αυτό το μοντέλο είναι η μετατροπή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε μη βλαστικά είναι μία μονόδρομη διαδικασία. Η θεωρία της πλαστικότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων περιγράφει ένα τρίτο και εξελισσόμενο μοντέλο, στο οποίο υπάρχει αμφίδρομη μετατροπή μεταξύ των καρκινικών μη βλαστικών και των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Το μοντέλο αυτό συνεπάγεται ότι τα καρκινικά μη βλαστικά κύτταρα μπορούν να δημιουργούν συνεχώς πληθυσμούς καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε όλη την ογκογένεση [3].

2.2. Η Θεωρία των Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων (Cancer Stem Cell Model)

Η θεωρία αυτή προτείνει ότι καρκινικά κύτταρα με παρόμοιο γενετικό υπόβαθρο μπορούν να οργανωθούν ιεραρχικά σύμφωνα με την ογκογόνο δράση τους. Η παραμονή σε διαφορετικές καταστάσεις βλαστικής ικανότητας και διαφοροποίησης προκαλεί την ετερογένεια στα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στη κορυφή της ιεραρχίας και πιστεύεται ότι η έναρξη του καρκίνου, όπως και η μεταστατική του ικανότητα, οφείλεται σε αυτά.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό αυτού του μοντέλου είναι η μονής κατεύθυνσης φύση του, σύμφωνα με τη οποία τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα υποβάλλονται σε συμμετρική διαίρεση για τον πολλαπλασιασμό τους και τη δημιουργία νέων καρκινικών βλαστικών κυττάρων με τον ίδιο φαινότυπο, και σε μη αναστρέψιμη ασύμμετρη διαίρεση, παράγοντας θυγατρικά κύτταρα (καρκινικά μη βλαστικά κύτταρα) με χαμηλή ογκογόνο δράση και μεταστατική ικανότητα. Στη περίπτωση αυτή, οι αποκλίνοντες φαινότυποι των κυττάρων ρυθμίζονται από τα διάφορα ερεθίσματα που προκύπτουν στο μικροπεριβάλλον. Αυτά τα ερεθίσματα μπορούν να ενεργοποιήσουν ειδικές οδούς αυξητικών παραγόντων που, με τη σειρά τους, προκαλούν επιγενετικές μεταβολές στα καρκινικά βλαστικά και στα μη βλαστικά κύτταρα που προκύπτουν σαν απόγονοί τους.

Η κεντρική ιδέα του μοντέλου των καρκινικών βλαστικών κυττάρων είναι ότι ένας μικρός υποπληθυσμός κυττάρων εντός ενός όγκου καθοδηγεί την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου ως σύνολο. Τα καρκινικά μη βλαστικά κύτταρα ενός όγκου φαίνεται να παίζουν έναν μικρό ρόλο στην ογκογένεση. Σημαντικό γεγονός αποτελεί και το ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα φαίνεται να είναι ανθεκτικά σε πολλές από τις σημερινές θεραπείες [5-8].

Είναι πιθανό τόσο το μοντέλο της κλωνικής εξέλιξης όσο και η θεωρία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων να εφαρμόζονται στους ανθρώπινους καρκίνους, και μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις οι όγκοι εμφανίζουν χαρακτηριστικά και των δύο μοντέλων [2].

2.3. Το Μοντέλο Πλαστικότητας των Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων (Plastic Cancer Stem Cell Model)

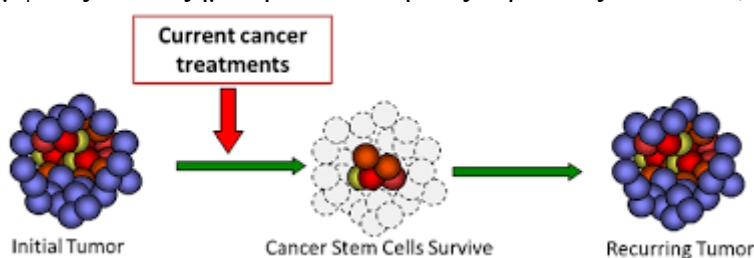
Πρόσφατα στοιχεία υποστηρίζουν ένα διαφοροποιημένο μοντέλο που εξηγεί την ετερογένεια του όγκου, στο οποίο υπάρχει σημαντική πλαστικότητα μεταξύ των καρκινικών μη βλαστικών και βλαστικών κυττάρων, έτσι ώστε τα καρκινικά μη βλαστικά κύτταρα να έχουν τη δυνατότητα επανάκτησης του φαινοτύπου των καρκινικών βλαστικών κυττάρων [3]. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ορισμένοι όγκοι είναι δυνατόν να υιοθετήσουν το μοντέλο πλαστικότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, στο οποίο οι αμφίδρομες μετατροπές είναι κοινά και βασικά συστατικά της δημιουργίας όγκου.

Τα καρκινικά μη βλαστικά κύτταρα είναι δυνατόν να υποβληθούν σε μία διαδικασία αποδιαφοροποίησης και να επανενταχθούν στη κατάσταση καρκινικών βλαστοκυττάρων [3].

3. Τα Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα (Cancer Stem Cells)

Η πρώτη σύνδεση μεταξύ του καρκίνου και των βλαστικών κυττάρων έγινε κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα, με βάση τις ιστολογικές ομοιότητες που παρατηρήθηκαν μεταξύ των όγκων και των εμβρυϊκών ιστών από τον Γερμανό παθολόγο Rudolf Virchow [10]. Το γεγονός ότι το καρκίνωμα αποτελείται από ανώριμα και περισσότερο διαφοροποιημένα κύτταρα οδήγησε σε δύο βασικές παραδοχές για την υπόθεση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων: A). Δεν είναι όλα τα καρκινικά κύτταρα πανομοιότυπα όσον αφορά τη φαινοτυπική και βιολογική συμπεριφορά τους. B). Οι όγκοι περιέχουν έναν υποπληθυσμό κυττάρων, τα οποία φέρουν βασικές ιδιότητες των φυσιολογικών αρχέγονων κυττάρων, όπως η αυτο-ανανέωση και η ικανότητα να παράγουν περισσότερο διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα.

Επιπλέον, το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων υποστηρίζει ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα κατευθύνουν την επανεμφάνιση και την ανάπτυξη του όγκου, διότι εμφανίζουν αυξημένη αντίσταση στις θεραπείες [11, 12]. (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της ανθεκτικότητας στη θεραπεία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και η επανεμφάνιση του όγκου.

Τα πρώτα στοιχεία ότι ένα προγονικό κύτταρο (progenitor cell) προκαλεί την αναπαραγωγή κλώνων, οι οποίοι αποκτούν διαδοχικές μεταλλάξεις και τελικά δημιουργούν έναν όγκο, δόθηκαν από τον Phillip Fialkow με μελέτες σχετικά με τη χρόνια (chronic myelogenous leukemia, CML) και την οξεία μυελογενή λευχαιμία (acute myeloid leukemia, AML) [13]. Εκτεταμένες έρευνες απέδειξαν ότι τα λευχαιμικά βλαστικά κύτταρα ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία όχι μόνο έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, αλλά και αυτή της ανασύστασης του πλήρους φάσματος των φαινοτύπων των καρκινικών κυττάρων, ευρήματα που είναι σύμφωνα με το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων [11].

Το 1994 μία ερευνητική ομάδα από το Πανεπιστήμιο του Τορόντο πραγματοποίησε μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων ασθενών που έπασχαν από λευχαιμία, σε ποντικούς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Παρατήρησαν ότι τελικά εμφανίστηκε λευχαιμία και στα πειραματόζωα [14]. Μεταγενέστερες αναλύσεις πληθυσμών καρκινικών βλαστικών κυττάρων της λευχαιμίας από διάφορους υποτύπους της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, έδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά ήταν σχετικά ανώριμα από την άποψη της διαφοροποίησης. Κύτταρα που εμφανίζουν ομοιότητες με τα βλαστικά απομονώθηκαν από όγκους του μαστού, του παχέος εντέρου, του εγκεφάλου, του παγκρέατος και του προστάτη, με τη χρήση ειδικών πρωτεϊνικών δεικτών που εντοπίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου [15-21].

3.1. Ορισμός των Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων και οι Πιθανές Προελεύσεις τους

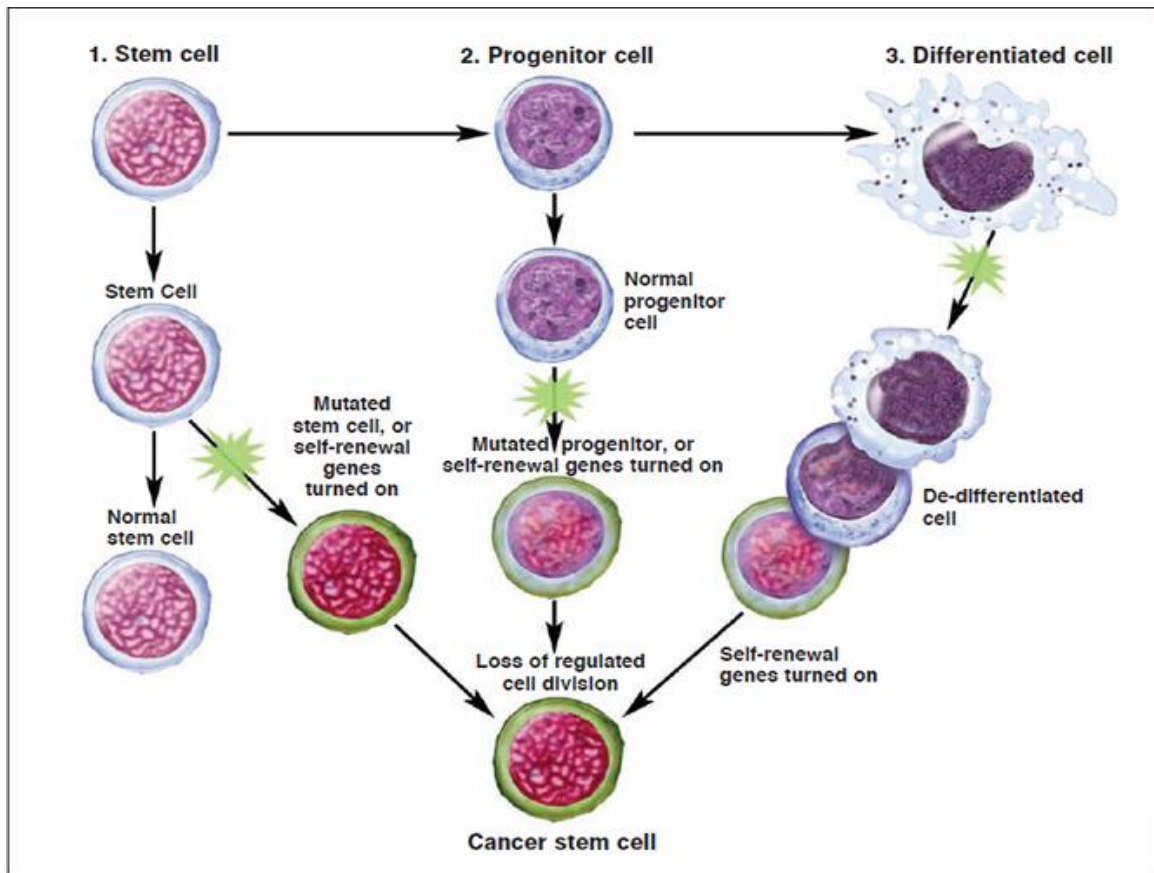
Σύμφωνα με την Αμερικανική Ένωση Έρευνας για τον Καρκίνο (American Association of Cancer Research) ως καρκινικό βλαστικό κύτταρο ορίζεται «ένα κύτταρο εντός του όγκου, το οποίο διαθέτει την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και να προκαλεί ετερογενείς γενιές καρκινικών κυττάρων που αποτελούν τον όγκο» [22]. Φαίνεται να μοιράζονται αρκετές ιδιότητες με τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα, όπως είναι η έκφραση δεικτών της επιφάνειάς τους, η υπερέκφραση του ενζύμου αλδεϋδική αφυδρογονάση (ALDH) και η ενεργοποίηση συγκεκριμένων οδών σηματοδότησης του κυττάρου (Wnt, Notch ή Hedgehog) [23]. Ο παραπάνω ορισμός δεν περιέχει τη προέλευση αυτών των κυττάρων. Υποθετικά είναι δυνατόν να προέρχονται από αρχέγονα (stem), προγονικά (progenitor) ή διαφοροποιημένα (differentiated) κύτταρα [24]. **(Εικόνα 6)**

➤ Τα Καρκινικά Κύτταρα προέρχονται από Βλαστικά Κύτταρα.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα βλαστικά κύτταρα έχουν δύο χαρακτηριστικά: την ικανότητα να παράγουν αντίγραφα του εαυτού τους κάτω από κατάλληλες συνθήκες (αυτο-ανανέωση), και να διαφοροποιούνται στους περισσότερους, αν όχι όλους, ώριμους κυτταρικούς τύπους. Αν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα προκύψουν από αρχέγονα κύτταρα που υπάρχουν στον ενήλικο ιστό, δεν θα είναι απαραίτητη η αποδιαφοροποίηση για τον σχηματισμό του όγκου. Σε αυτή τη περίπτωση, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αξιοποιήσουν τα ισχύοντα ρυθμιστικά μονοπάτια των βλαστοκυττάρων, ώστε να προωθήσουν την αυτο-ανανέωσή τους. Η ικανότητα της αυτο-ανανέωσης δίνει βλαστικά κύτταρα με μεγάλη διάρκεια ζωής, σε σχέση με αυτή των ώριμων, διαφοροποιημένων κυττάρων [25]. Επομένως, η περιορισμένη διάρκεια ζωής ενός ώριμου κυττάρου το καθιστά λιγότερο πιθανό να ζήσει αρκετά, ώστε να υποβληθεί στις πολλαπλές μεταλλάξεις που είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του όγκου αλλά και τη μετάσταση. **(Εικόνα 6, 1)**

➤ Τα Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα προέρχονται από Προγονικά Κύτταρα (Progenitor Cells).

Η οδός που ακολουθεί ένα κύτταρο ώστε από βλαστικό να μετατραπεί σε διαφοροποιημένο, συνήθως περιλαμβάνει έναν ή περισσότερους ενδιάμεσους τύπους κυττάρων. Αυτά είναι πιο άφθονα στους ενήλικους ιστούς απ'ότι στα βλαστικά κύτταρα, και ονομάζονται προγονικά ή πρόδρομα κύτταρα (progenitor ή precursor cells). Είναι εν μέρει διαφοροποιημένα κύτταρα που υπάρχουν σε εμβρυϊκούς και ενήλικους ιστούς, τα οποία συνήθως διαιρούνται για να παράγουν ώριμα κύτταρα. Ωστόσο, διατηρούν μία μερική ικανότητα για αυτο-ανανέωση. Η συγκεκριμένη ιδιότητά τους οδήγησε πολλούς ερευνητές να προτείνουν ότι τα προγονικά κύτταρα ίσως να αποτελούν πηγή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων [26, 27]. **(Εικόνα 6, 2)**



Εικόνα 6: Από πού προέρχονται τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Cancer Stem Cells). Τα μοριακά μονοπάτια, που διατηρούν τη «βλαστική ικανότητα (stem-ness)» στα βλαστοκύτταρα, είναι ενεργά σε πολλές μορφές καρκίνου. Αυτή η ομοιότητα οδήγησε τους επιστήμονες να προτείνουν ότι οι καρκίνοι είναι δυνατόν να προκύπτουν όταν κάποιο γεγονός προκαλεί μία μετάλλαξη σε ένα βλαστικό κύτταρο, στερώντας του την ικανότητα να ρυθμίζει τη κυτταρική διαίρεση. Στην εικόνα φαίνονται τρεις τρόποι, με τους οποίους μπορεί να προκύψει ένα καρκινικό βλαστικό κύτταρο: (1). Ένα βλαστοκύτταρο (stem cell) υφίσταται μετάλλαξη, (2). Ένα προγονικό κύτταρο (progenitor cell) υφίσταται δύο ή περισσότερες μεταλλάξεις, ή (3). Ένα πλήρως διαφοροποιημένο κύτταρο (differentiated cell) υφίσταται αρκετές μεταλλάξεις, που οδηγούν πίσω σε μια κατάσταση παρόμοια με του βλαστικού κυττάρου (stem-like state). Και στις τρεις περιπτώσεις, το καρκινικό βλαστικό κύτταρο έχει χάσει την ικανότητα να ρυθμίζει τη κυτταρική του διαίρεση. (© 2009 Terese Winslow)

➤ **Τα Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα προέρχονται από Διαφοροποιημένα Κύτταρα (Differentiated Cells).**

Μερικοί ερευνητές έχουν προτείνει ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα προέρχονται από ώριμα, διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία με κάποιο τρόπο διαφοροποιούνται εκ νέου ώστε να μετατραπούν σε κύτταρα παρόμοια με τα βλαστικά. Σε αυτή τη περίπτωση, οι απαιτούμενες ογκογόνες γενετικές μεταλλάξεις θα χρειαστούν ώστε να καθοδηγήσουν την αποδιαφοροποίηση, καθώς επίσης και την αυτο-ανανέωση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Το μοντέλο αυτό αφήνει ανοιχτό το ενδεχόμενο ότι ένας σχετικά μεγάλος πληθυσμός κυττάρων έχει ογκογόνο δράση, και πως τελικά ένα μικρό υποσύνολό τους θα δημιουργήσει τον όγκο [28]. (Εικόνα 6, 3)

3.2. Ο Καρκίνος του Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί έναν από τους πιο συχνούς και σοβαρούς τύπους καρκίνου για τις γυναίκες παγκοσμίως και είναι η δεύτερη πιο κοινή αιτία θανάτου τους. Σύμφωνα με τη Διεθνή Έκθεση για τις καρκινικές νόσους που παρουσιάστηκε στη Γενεύη της Ελβετίας τον Απρίλιο του 2003 από την IARC (International Agency for Research on Cancer), τα νέα κρούσματα υπολογίζονται σε περίπου 1.000.000 ενώ στην Ελλάδα αναφέρονται 4.500 περίπου νέες περιπτώσεις το χρόνο. Στην Ευρώπη, το 60% των κρουσμάτων καρκίνου του μαστού διαγιγνώσκεται σε πρώιμο στάδιο. Το αντίστοιχο ποσοστό στην Ελλάδα είναι μόλις 5%, κάτι που αποδεικνύει πόσο ελλιπής είναι η σχετική ενημέρωση μεταξύ των Ελληνίδων. (Πηγή: Wikipedia)

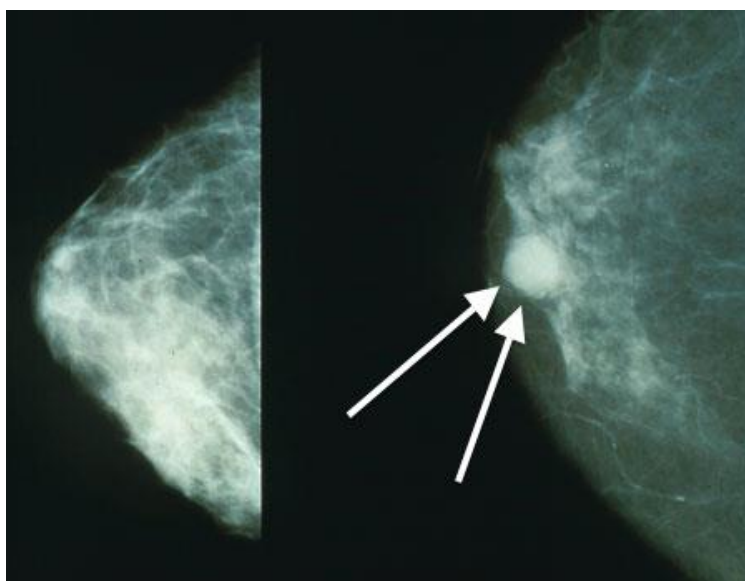
Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου αναφέρεται στον καρκίνο που αναπτύσσεται στους γαλακτοπαραγωγούς αδένες του μαστού ή στους γαλακτοφόρους πόρους που μεταφέρουν το γάλα. Προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό παθολογικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού. Τα παθολογικά αυτά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα εξάπλωσης σε γειτονικούς ιστούς με δυσάρεστες συνέπειες για ολόκληρο τον οργανισμό. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε άρρενες είναι υπαρκτή αλλά πολύ μικρή. Όσον αφορά στις γυναίκες όλες αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου – όχι όμως στον ίδιο βαθμό.

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να διακριθεί σε δύο βασικούς τύπους:

- Ο *πορογενής καρκίνος*, που προέρχεται από τους γαλακτοφόρους πόρους.
- Ο *λοβιακός καρκίνος*, που προέρχεται από τα λόβια, τα σημεία από τα οποία παράγεται το μητρικό γάλα.

Επιπλέον, διαχωρίζεται σε *διηθητικό*, που μπορεί να προκαλέσει μεταστάσεις, και *μη διηθητικό* ή *in situ*, ο οποίος θεωρείται αρχόμενος και δυνητικά μη μεταστατικός.

Για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού χρησιμοποιείται η μαστογραφία (**Εικόνα 7**), ενώ στις θεραπείες του περιλαμβάνονται η χειρουργική επέμβαση, η ορμονοθεραπεία, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία.



Εικόνα 7: Μαστογραφία, στην οποία απεικονίζεται ο φυσιολογικός (αριστερά) και ο προσβεβλημένος (δεξιά) από καρκίνο μαστός.

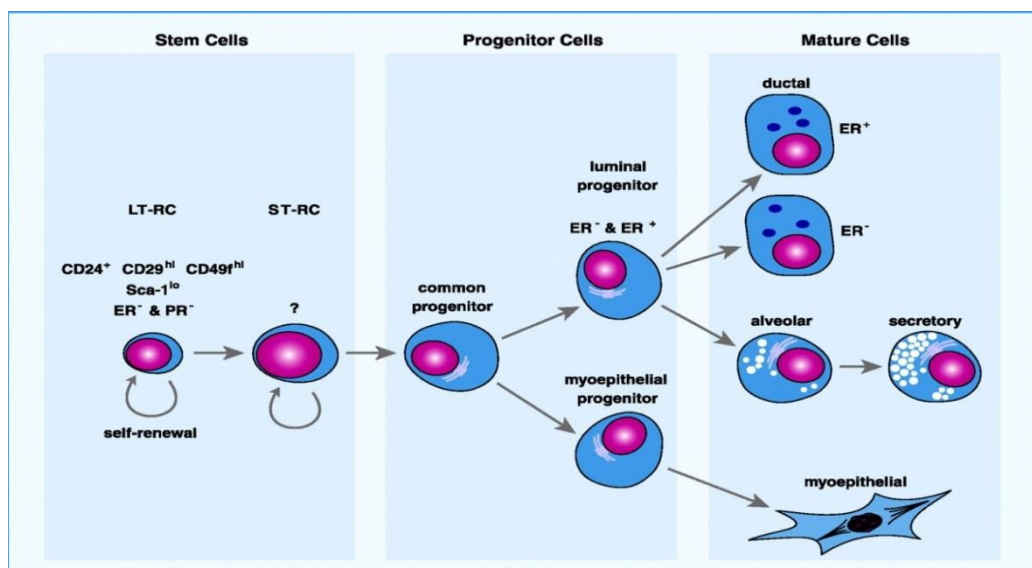
3.2.1 Βλαστικά Κύτταρα του Μαστού

Οι τερματικές μονάδες των λοβιακών καναλιών αποτελούν τα βασικά λειτουργικά/δομικά στοιχεία του διακλαδωτού πορογενούς-κυψελιδικού συστήματος στον ανθρώπινο αδένου του μαστού των προεμμηνόπαυσιακών γυναικών, όταν αυτός βρίσκεται σε ηρεμία. Τα λοβιακά/πορογενή επιθηλιακά κύτταρα ευθυγραμμίζονται στην εσωτερική επιφάνεια και τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν την εξωτερική βασική στιβάδα [29].

Υπάρχει ισχυρή ένδειξη ότι τόσο οι λοβιακοί όσο και οι μυοεπιθηλιακοί κυτταρικοί τύποι προέρχονται από ένα κοινό πολυδύναμο προγονικό κύτταρο. Πιο πρόσφατα, η κλωνική ανάλυση αποκαλύπτει ότι τα μονήρη επιθηλιακά κύτταρα του μαστού διατηρούν την ικανότητά τους να δημιουργήσουν μία ολοκληρωμένη δομή του μαστού [30]. Τέλος, η ανάλυση του μοτίβου της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος-X έδειξε ότι το επιθήλιο του μαστού είναι οργανωμένο σε ομάδες ώριμων κυττάρων, τα οποία προέρχονται από ένα κοινό βλαστικό/προγονικό κύτταρο [31].

Τα βλαστικά κύτταρα του μαστού έχουν περιγραφεί ως αδιαφοροποίητα ωχρά ή ελαφριά-χρώσης κύτταρα [32], παρουσιάζοντας δύο διακριτές μορφές: τα Small Light Cells (SLC) με βασική θέση, και τα Undifferentiated Large Light Cells (ULLC), τα οποία εντοπίζονται μεταξύ της βασικής και λοβιακής σειράς, είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα SLC και έχουν μεγαλύτερο πυρήνα από άλλα επιθηλιακά κύτταρα [33, 34]. (Εικόνα 8)

Μελέτες προτείνουν ότι υπάρχει μία κυτταρική ιεραρχία στο επιθήλιο του αδένου του μαστού, με την προέλευσή της να οφείλεται στα αρνητικά στον υποδοχέα οιστρογόνου (ER⁻) μακρόβια βλαστικά κύτταρα, τα οποία σπάνια διαιρούνται προκειμένου να δημιουργήσουν έναν πληθυσμό των θετικών στον υποδοχέα οιστρογόνου (ER⁺) βραχύβιων βλαστικών κυττάρων. Τα τελευταία φαίνεται να διαιρούνται πιο συχνά απ'ότι τα προγονικά κύτταρα, τα οποία έχουν δεσμευτεί να υποβληθούν σε τελική διαφοροποίηση μετά από έναν περιορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων [35-37].



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας ώριμων κυττάρων από βλαστικά στον αδένου του μαστού.

3.2.2. Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα του Μαστού

Η έκφραση συγκεκριμένων δεικτών της επιφάνειας των κυττάρων, όπως είναι τα αντιγόνα CD44 και CD24, έχουν χρησιμοποιηθεί για να απομονώσουν και να εμπλουτίσουν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού από τους όγκους [15, 38]. Οι Al-Hajj et.al [38], χρησιμοποιώντας μη παχύσαρκα/με σοβαρή ανοσοεπάρκεια και ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (NOD/SCID) παρατήρησαν ότι μόνο ένας πολύ μικρός πληθυσμός καρκινικών κυττάρων του μαστού είχε την ικανότητα να σχηματίζει νέους όγκους. Οι ερευνητές κατάφεραν να διαχωρίσουν τα καρκινικά κύτταρα με ογκογόνο δράση από τη μη ογκογόνα, με βάση την έκφραση συγκεκριμένων δεικτών στην επιφάνεια των κυττάρων. Ταυτοποίησαν και απομόνωσαν για πρώτη φορά σε στερεό όγκο (solid tumor) τα ογκογόνα κύτταρα με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{-/low} σε οκτώ από τους εννέα ασθενείς. Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι περίπου 100 κύτταρα με τον συγκεκριμένο φαινότυπο είχαν την ικανότητα σχηματισμού όγκου σε ποντίκια, κάτι που δεν ισχύει για δεκάδες χιλιάδες κύτταρα με διαφορετικό φαινότυπο. Ο φαινότυπος των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού είναι CD44⁺/CD24^{-/low}. Αυτά τα κύτταρα έχουν ιδιότητες για τη δημιουργία όγκου με πλειοδύναμα χαρακτηριστικά.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, υπάρχει ένας μικρός πληθυσμός ετερογενών κυττάρων που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία του όγκου καθώς και για τη πρόοδό του, τα λεγόμενα καρκινικά βλαστικά κύτταρα [15]. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε ακτινοβολίες και στη χημειοθεραπεία [39, 40]. (Πίνακας 1)

Πιο πρόσφατα, ερευνητές ανέπτυξαν ένα σύστημα καλλιέργειας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό in vitro ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστικών/προγονικών κυττάρων του μαστού σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, ως μη-προσκολλημένους σφαιρικούς σχηματισμούς, που ονομάζονται “mammospheres” [35]. Τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφανίζουν επίσης αυξημένη ανθεκτικότητα, κάτι που καθιστά τη μελέτη τους απαραίτητη για την εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

	CSC isolation technique	Source	Type of treatment	Enrichment or preferential survival
Chemo-resistance	ESA ⁺ CD44 ⁺ /CD24 ^{low} CD44 ⁺ /CD24 ⁻	Cell lines Cell lines	5-Fluorouracil or Paclitaxel Doxorubicin-selected MCF7s	<i>In vitro</i> – FACS 5-30-fold ↑ <i>In vitro</i> – FACS 30% ↑ and ↑ tumours <i>in vivo</i>
	CD44 ⁺ /CD24 ⁻ mammosphere assay CD44 ⁺ /CD24 ⁻ mammosphere assay CD44 ⁺ /CD24 ⁻ /mammosphere gene expression signature Mammosphere assay	Clinical samples Clinical samples Clinical samples	Neoadjuvant 5-fluorouracil, epirubicin & cyclophosphamide Neoadjuvant docetaxel or doxorubicin & cyclophosphamide Neoadjuvant docetaxel	<i>In vivo</i> – FACS 9.5-fold ↑ <i>In vivo</i> MS ↑ 0.5% to 5.9% <i>In vivo</i> – FACS ↑ 5% to 14% <i>In vitro</i> MS ↑ 5-fold <i>In vivo</i> – ↑ gene signature following chemotherapy
Radio-resistance	Mammosphere assay	Cell lines	Radiation – single & fractionated	<i>In vitro</i> – clonogenic assay 2-fold ↑ in survival
	CD44 ⁺ /CD24 ^{-low}	Cell lines	Radiation – fractionated	<i>In vitro</i> – FACS, up to 3-fold ↑
	Sca1 ⁺ BALB/c mice CD24 ⁺ Thy1 ⁺ Lin ⁻ MMTV-Wnt1	Mouse Mouse	Radiation – single dose Radiation – fractionated	<i>In vivo</i> – FACS 3-fold ↑ <i>In vivo</i> – FACS, 2-fold ↑
Endocrine resistance	Lin ⁻ CD29 ⁺ CD24 ⁺ P53-nullmouse CK5 ⁺	Mouse	Radiation – single dose	<i>In vitro</i> – clonogenic assay up to 10-fold ↑
		Cell lines	Tamoxifen or Fulvestrant	<i>In vitro</i> - up to 3.4-fold ↑ in CK5 protein expression
		Clinical samples	Neoadjuvant tamoxifen +/- exemestane	<i>In vivo</i> – 2-fold ↑ in CK5 expression <i>In vivo</i> – number of CK5 + cells/field ↑ 2.6 to 30.4
	CD44 ⁺ /CD24 ⁻ /Mammosphere gene expression signature	Clinical samples	Neoadjuvant letrozol	<i>In vivo</i> – ↑ gene expression signature

Πίνακας 1: Περίληψη των προκλινικών και κλινικών ενδείξεων σε ζωικά μοντέλα της αντίστασης στη χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και ορμονική θεραπεία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού [41-51].

➤ CD44:

Ο δείκτης CD44 είναι μία πολυλειτουργική διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, τάξης I [52], η οποία γενικά δρα ως ειδικός υποδοχέας για το υαλουρονικό οξύ, τη προώθηση της μετανάστευσης στα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε σχεδόν κάθε καρκινικό κύτταρο [53]. Συνδέεται κυρίως με πρωτεΐνες που ελέγχουν τις εξωκυτταρικές αλλαγές, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, την επιβίωση, τη κινητικότητα, τη μετανάστευση, την αγγειογένεση, και τη διαφοροποίηση [53, 54]. Επίσης, αλληλεπιδρά με την οστεοποντίνη και ρυθμίζει τις κυτταρικές λειτουργίες με σκοπό την εξέλιξη του όγκου [55], με το κολλαγόνο, τη λαμνίνη, και την φιμπρονεκτίνη όπου η φυσιολογική λειτουργία του δεν είναι σαφής [53]. Οι λειτουργίες του περιλαμβάνουν τη δέσμευση του υποκαταστάτη με τον υποδοχέα και τον συν-υποδοχέα. Εκφράζεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και συμβάλλει στην αιματογόνο εξάπλωση ενώ αλληλεπιδρά με τη P- ή L-σελεκτίνη [56]. Επιπλέον, ο CD44 εμπλέκεται σε πολύπλοκα μονοπάτια σηματοδότησης που ενισχύουν τη δημιουργία του όγκου, αλληλεπιδρώντας με τους γειτονικούς υποδοχείς, όπως είναι αυτός της τυροσινικής κινάσης [57].

Χρησιμοποιείται εκτενώς σαν δείκτης επιφάνειας για την απομόνωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού, του προστάτη, του παγκρέατος, των ωοθηκών και του παχέος εντέρου [53, 58].

➤ **CD24:**

Ο δείκτης CD24 είναι ένα μικρό πρωτεϊνικό μόριο της κυτταρικής επιφάνειας, που προσδένεται από τη γλυκοσυλ-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη σε μία ευρεία ποικιλία καρκινικών κυττάρων. Είναι σε μεγάλο βαθμό γλυκοζυλιωμένο και παίζει ρόλο στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-υποστρώματος (cell-matrix) [59-61]. Ανακαλύφθηκε σε ποντικούς σαν ένα σταθερό στη θερμότητα αντιγόνο (heat-stable antigen) και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων από τα νευρωνικά [62, 63]. Η μεταβλητή γλυκοζυλίωση στον CD24 συνεισφέρει σε αρκετές λειτουργίες σε διαφορετικά κύτταρα, οι οποίες είναι ακόμη ασαφείς. Εξαιτίας της διακριτής γλυκοζυλίωσής του, ενεργεί ως ένας ευέλικτος υποκαταστάτης σε διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των καρκινικών, με διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες, καθιστώντας τους μηχανισμούς του δύσκολους στη κατανόηση [63].

Ο CD24 υπερεκφράζεται σε καρκινώματα, όπως είναι των ωοθηκών, του μαστού, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, του νεφρικού και άλλων ανθρώπινων καρκίνων [60, 64]. Εμπλέκεται στη προσκόλληση των κυττάρων και στη μετάσταση [59]. Λειτουργικά, έχει αναγνωρισθεί ως ένας εναλλακτικός υποκαταστάτης για τη Ρ-σελεκτίνη, ένας υποδοχέα προσκόλλησης στα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [65], μέσω του οποίου η αλληλεπίδρασή τους διευκολύνει το πέρασμα των καρκινικών κυττάρων στο αίμα κατά τη διάρκεια της μετάστασης. Αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και τη προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στη φμπρονεκτίνη, το κολλαγόνο και τη λαμίνη [64].

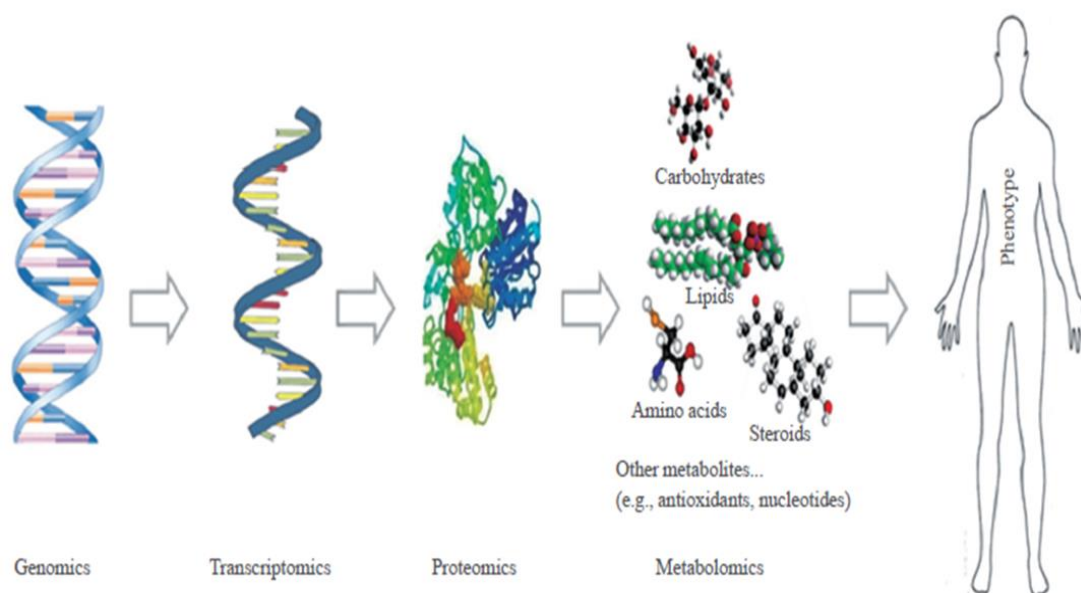
Επίσης, άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού χαρακτηρίζονται από υψηλή δραστηριότητα της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης (ALDH) [66-68] και το ένζυμο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης για την απομόνωσή τους. Έχει αναφερθεί ότι η έκφραση αυτών των δεικτών συσχετίζεται κλινικά με κακή έκβαση.

Στο εργαστήριο, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού είναι ικανά να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν ως μη-προσκολλημένοι σφαιρικοί σχηματισμοί, που ονομάζονται “mammospheres”, επιτρέποντας τον εμπλουτισμό της καλλιέργειας σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα και τη μελέτη των ιδιοτήτων τους [69, 70].

4. Η Μεταβολομική (Metabolomics) στον Καρκίνο του Μαστού

4.1. Ο Ορισμός της Μεταβολομικής (Metabolomics) και οι Εφαρμογές της

Ο όρος “omic” αναφέρεται σε οποιονδήποτε τύπο συγκεκριμένης μελέτης, που παρέχει πληροφορίες συνολικά για ένα βιολογικό σύστημα [71]. **(Εικόνα 9)** Η Μεταβολομική (Metabolomics) αποτελεί έναν κλάδο των “omics” τεχνικών. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση του συνόλου των μεταβολιτών που έχουν μικρό μοριακό βάρος (<1500 Da), η σύσταση των οποίων μεταβάλλεται ανάλογα με τη φυσιολογία, την εξελικτική ή παθολογική κατάσταση του κυττάρου, του ιστού ή του οργανισμού [72]. Πρόκειται για το σύστημα της στατιστικής επεξεργασίας του συνολικού προφίλ των μορίων ενός δείγματος σε μία μόνο ανάλυση. Έτσι, είναι δυνατόν να ληφθεί ένα «αποτύπωμα», μοναδικό για κάθε άτομο, το οποίο μπορεί να απεικονίζει φυσιολογικές καταστάσεις καθώς και την απόκριση του οργανισμού σε διάφορα παθολογικά ερεθίσματα. Εφαρμόζεται σε τομείς της βιοτεχνολογίας, της φαρμακολογίας, της ιατρικής, με σκοπό την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, τον εντοπισμό διαταραχών σε μονοπάτια σηματοδότησης, τη διάγνωση ασθενειών και την ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπευτική αγωγή [73].



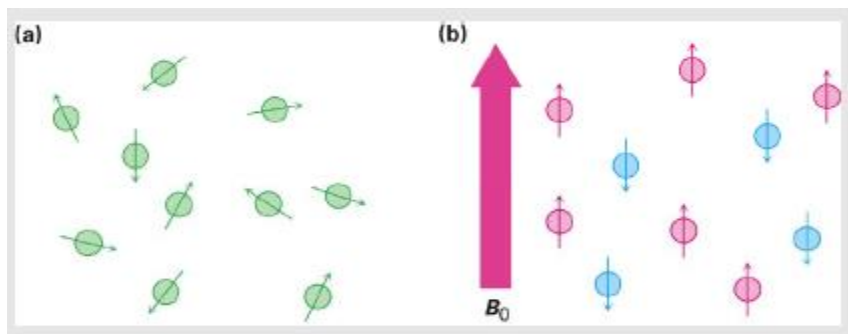
Εικόνα 9: Μέθοδοι “omic” τεχνικών στη Βιολογία, από τη Γονιδιωματική έως τη Μεταβολομική. Νέες “omic” τεχνικές προστίθενται συνεχώς, όπως είναι οι lipidomics και glycomics [72].

4.2. Αναλυτικές Μέθοδοι Μεταβολομικής Ανάλυσης

Δύο κύριες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) και η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS).

➤ **Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)**

Η φασματοσκοπία NMR βασίζεται στο γεγονός της διέγερσης των μαγνητικών πυρήνων που βρίσκονται σε ένα ισχυρό και ομογενές μαγνητικό πεδίο (B_0). Επειδή ο πυρήνας είναι φορτισμένος, η περιστροφή γύρω από τον άξονά του (ιδιοπεριστροφή, spin) δημιουργεί ένα μαγνητικό δίπολο, του οποίου το μέγεθος εκφράζεται από την πυρηνική μαγνητική ροπή μ . Τα πυρηνικά σπιν των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου με τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ένας περιστρεφόμενος πυρήνας, όπως είναι για παράδειγμα ο ^{13}C , το ^1H , ο ^{31}P , το ^{15}N , μπορεί να αποκτήσει τέτοιο προσανατολισμό, ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να διαταχθεί είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα προς το εξωτερικό πεδίο. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ο παράλληλος προσανατολισμός έχει χαμηλότερη ενέργεια, ευνοώντας σχετικά τη συγκεκριμένη κατάσταση του σπιν σε σχέση με τον προσανατολισμό των αντιπαράλληλων σπιν. (Εικόνα 10)



Εικόνα 10: Απουσία μαγνητικού πεδίου, τα πυρηνικά σπιν προσανατολίζονται τυχαία (a), ενώ με την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (B_0) αποκτούν συγκεκριμένο προσανατολισμό (b). Τα σπιν που συμβολίζονται με κόκκινο είναι διατεταγμένα παράλληλα προς το B_0 , ενώ τα κυανά είναι αντιπαράλληλα. Η παράλληλη διάταξη του σπιν έχει μικρότερη ενέργεια [74].

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας ν , λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας (παράλληλο spin ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0) αλλάζει φορά προς τη κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, λέγεται ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία ν , εξ ου και ο όρος *πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός* [74].

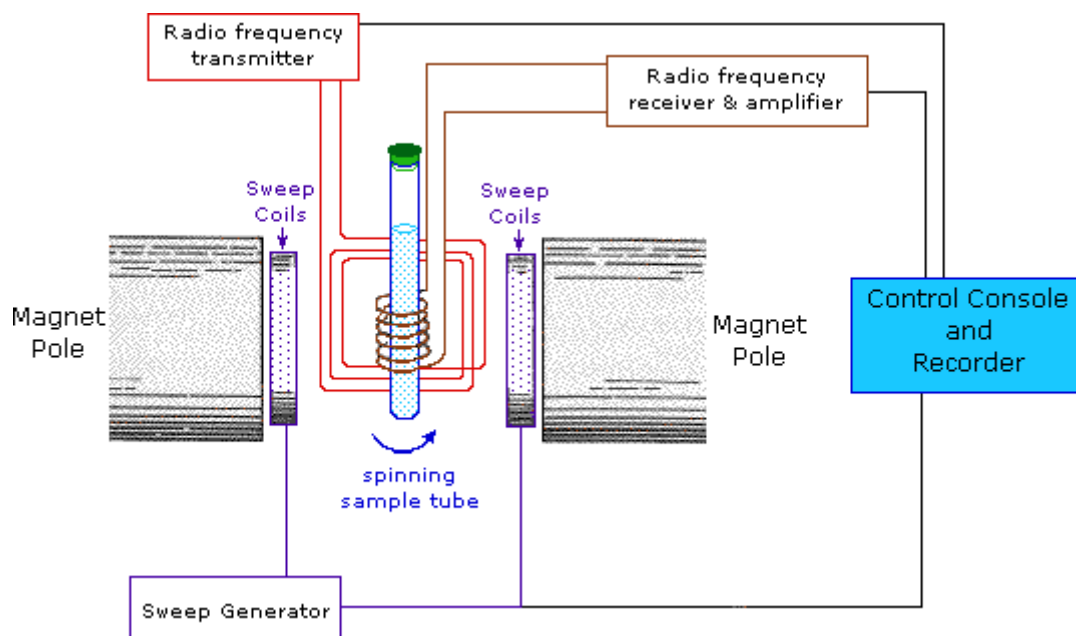
Εάν πυρήνες υδρογόνου, $I = \frac{1}{2}$ (όπου I ο κβαντικός αριθμός πυρηνικού spin), τεθούν σε μαγνητικό πεδίο, το άνυσμα του spin της στροφορμής τους έχει δύο προσανατολισμούς σε σχέση με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 . Ο παράλληλος προσανατολισμός αποτελεί τη βασική στάθμη ενέργειας, ενώ ο αντιπαράλληλος προσανατολισμός τη διεγερμένη. Η διαφορά ενέργειας ΔE των ενεργειακών σταθμών δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta E = h\nu = (h/2\pi) \gamma B_0$$

όπου γ : ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα και B_0 η ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Τα φάσματα NMR προκύπτουν λόγω διεγέρσεων από τη βασική στη διεγερμένη κατάσταση κατά την επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, ικανής να προκαλέσει συντονισμό. Για να είναι δυνατή η εμφάνιση απορρόφησης στο φάσμα NMR, πρέπει να εξασφαλίζεται μία μικρή περίσσεια πυρήνων στη στάθμη της χαμηλότερης ενέργειας, διότι αν οι πληθυσμοί των δύο στάθμων είναι ίδιοι, η απορρόφηση ακτινοβολίας από τους πυρήνες της χαμηλότερης ενεργειακής στάθμης εξισορροπείται από την επαγόμενη εκπομπή με αυτούς της υψηλότερης στάθμης. Η περίσσεια αυτή εξασφαλίζεται με διάφορους μηχανισμούς επαναφοράς ή αποδιέγερσης των διεγερμένων πυρήνων, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τον *χρόνο επαναφοράς* T (relaxation time). Κατά της επαναφορά spin-πλέγματος, οι διεγερμένοι πυρήνες αποδιεγείρονται με μεταφορά ενέργειας σε άλλους πυρήνες του μοριακού πλέγματος που τους περιβάλλει. Ο μηχανισμός αυτός χαρακτηρίζεται από έναν *χρόνο επαναφοράς* T_1 . Κατά την επαναφορά spin-spin, η ενέργεια από τον διεγερμένο πυρήνα μεταφέρεται σε έναν γειτονικό με ανταλλαγή spin. Ο μηχανισμός αυτός χαρακτηρίζεται από έναν *χρόνο επαναφοράς* T_2 , και επηρεάζει το εύρος των κορυφών απορρόφησης.

Το ύψος και η θέση των κορυφών επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό ενός μορίου. Η συχνότητα του σήματος συντονισμού δείχνει τη παρουσία του μεταβολίτη, ενώ η ένταση του σήματος σχετίζεται με τη συγκέντρωσή του. Το ^1H NMR είναι επαναλήψιμο, οικονομικό από άποψη κόστους, πολύ γρήγορο, ποσοτικό, χαρακτηρίζεται όμως από χαμηλή ευαισθησία σε σύγκριση με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές όπως η φασματομετρία μάζας [75]. Στην **Εικόνα 11** φαίνεται ενδεικτικά η οργάνωση ενός φασματομέτρου NMR.



Εικόνα 11: Σχηματική οργάνωση ενός φασματομέτρου NMR. Ένας λεπτός γυάλινος σωλήνας που περιέχει διάλυμα δείγματος τοποθετείται ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη και ακτινοβολείται με ενέργεια.

➤ **Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)**

Η MS είναι μία φασματοσκοπική μέθοδος μέτρησης της μάζας, και συνεπώς του μοριακού βάρους (MB) ενός μορίου. Βασική της αρχή είναι η δημιουργία ιόντων (κυρίως κατιόντων), και κάνει διακρίσεις μεταξύ των ενώσεων με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) σε φορτισμένα σωματίδια. Μετά τον βομβαρδισμό της ένωσης με μία δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας, προκύπτει μία κατιονική ρίζα, το μοριακό ιόν, με την εκπομπή ενός ηλεκτρονίου. Αυτό, λόγω της μεγάλης του ενέργειας, μπορεί να διασπαστεί σε επιμέρους ιόντα, ανάλογα με τη σταθερότητά τους. Τα συγκεκριμένα ιόντα είναι δυνατόν να δώσουν νέα ιόντα με την επίδραση μαγνητικού πεδίου, οπότε και καταγράφεται το φάσμα. Παρέχει πληροφορίες για τον μοριακό τύπο ενός μορίου, έχει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με το NMR, και η προετοιμασία του δείγματος είναι κρίσιμη εξαιτίας της εξάρτησης από τη pK του μεταβολίτη και την υδροφοβικότητα [76].

4.3. Το Μεταβολικό Προφίλ στον Καρκίνο του Μαστού

➤ **Καρκίνος του Μαστού:**

Οι κυρίαρχες αλλαγές στον μεταβολικό φαινότυπο του καρκίνου του μαστού, όπως αναφέρθηκε σε πολλές μελέτες, είναι ο αυξανόμενος ρυθμός τόσο του μεταβολισμού της γλυκόλυσης όσο και των φωσφολιπιδίων της χολίνης [77].

Οι περισσότεροι όγκοι χαρακτηρίζονται από αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης, ανάλογα με την επιθετικότητα του όγκου. Για παράδειγμα, τα μη μεταστατικά MCF-7 κύτταρα του καρκίνου του μαστού έχουν πολύ χαμηλότερα ποσοστά κατανάλωσης γλυκόζης από τα ιδιαίτερα μεταστατικά MDA-MB-231 κύτταρα [78]. Η αύξηση της γλυκόζης και ο έλεγχος τη ροής της συμβαίνει κυρίως στα επίπεδα μεταφοράς και φωσφορυλίωσης, με την αύξηση των μεταφορέων γλυκόζης και εξοκινασών, που μεσολαβείται από την αύξηση της πρωτεΐνης c-myc και του επαγωγίμου παράγοντα-1 της υποξίας (HIF-1) [79].

Στον Πίνακα 2 αναφέρονται ενδεικτικά διαταραχές των μεταβολιτών που βρέθηκαν από μελέτες με τη χρήση καρκινικών δειγμάτων ιστού και κυττάρων του μαστού.

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Yang et al [80] χρησιμοποιώντας φυσιολογικά κύτταρα του μαστού (MCF-10A) έδειξαν ότι αυτά παράγουν πυροσταφυλικό από τη γλυκόλυση, ενώ δεν παρατηρήθηκε αυξημένη de novo σύνθεση λιπαρών οξέων.

Η ίδια ομάδα ερευνητών, χρησιμοποιώντας σταδιακά κακοήθεις κυτταρικές σειρές, τις MCF-10, MCF-7, έδειξαν και πάλι αύξηση της PPP (στα MCF-10), σταδιακή αύξηση της βιοσύνθεσης γλυκίνης αλλά και προοδευτική ογκογόνο δράση. Αύξηση της βιοσύνθεσης προλίνης από γλουταμινικό παρατηρήθηκε μόνο στις μεταστατικές κυτταρικές σειρές. Στα κύτταρα MCF-7 παρατηρήθηκε μείωση του κιτρικού οξέος (TCA, κύκλος Krebs) [81].

Οι Forbes et al. ανέλυσαν την απόκριση των MCF-7 κυττάρων του καρκίνου του μαστού στην οιστραδιόλη, χρησιμοποιώντας NMR. Η οιστραδιόλη, η οποία αυξάνει σημαντικά τον ρυθμό πολλαπλασιασμού αυτών των κυττάρων, φάνηκε να αυξάνει τη γλυκόλυση και τον κύκλο του κιτρικού οξέος, αυξάνοντας τη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων [82, 92].

Η αύξηση του μεταβολικού μονοπατιού της χολίνης αποτελεί χαρακτηριστικό για τον καρκίνο του μαστού. Έρευνες σε καρκινικές σειρές κυττάρων έδειξαν υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων της χολίνης, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού, όπου ήταν χαμηλότερες [93].

Οι Glunde et al. [85] σύγκριναν καρκινικά και μη κύτταρα και παρατήρησαν στα πρώτα αύξηση της φωσφοχολίνης (Phosphocholine, PCho) και των μεταβολιτών που περιέχουν χολίνη, και μείωση της γλυκεροφωσφοχολίνης (Glycerophosphocholine, GPC) σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικές με τη μεταβολική οδό της χολίνης και των παράγωγων της, σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού, με διαφορετικά χαρακτηριστικά η καθεμιά. Όλες κατέληξαν στο ίδιο αποτέλεσμα, με μικρές διαφορές στις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που μετρήθηκαν, πράγμα που οφείλεται στις διαφορετικές καρκινικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και συνεπώς, στην ετερογένεια του καρκίνου [94-98]. Οι έρευνες αυτές έγιναν με τη συνδυαστική χρήση των τεχνικών NMR και MS.

Μελέτη	Δείγμα	Αλλαγές στο Μεταβολικό Προφίλ
1). Yang et al, 2007b	Καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού MCF-10, MCF-7	↑ PPP(MCF-10), ↑ Gly, ↑ Pro (μόνο σε μεταστατικές σειρές), ↓ citric acid(MCF-7)
2). Forbes et al, 2006	Καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MCF-7	↑ glycolysis, ↑ citric acid
3). Glunde et al, 2004	Καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-231	↑ PCho, ↓ GPC
4). Richardson et al, 2008	Καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MCF-10	↑ PPP, ↓NADPH
5). Tinget et al, 1996	Καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού MCF-7, T47D	↑ Cho phospholipids
6). Brockmöller SF et al, 2012	Καρκινικός ιστός	↑ GPAM
7). Li M et al, 2011	Σύγκριση καρκινικών και μη δειγμάτων ιστού του μαστού (31 δείγματα από τα οποία τα 13 ήταν καρκινικά)	↑ Tau, ↑Cho
8). Giskeødegård GF et al, 2012	Καρκινικός ιστός του μαστού (98 ασθενείς)	↑ Gly, ↑ Lac

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας διαταραχών που παρατηρήθηκαν σε μελέτες με χρήση καρκινικών δειγμάτων ιστού του μαστού [82-91], όπου: GSH: γλουταθειόνη, Cr: κρεατίνη, PCho: φωσφοχολίνη, Ile: ισολευκίνη, Leu: λευκίνη, Val: βαλίνη, GPC: γλυκεροφωσφοχολίνη, PPP: τριφωσφορική πεντόζη, Gly: γλυκίνη, Pro: προλίνη, Citric Acid: κιτρικό οξύ, Glycolysis: γλυκόλυση, NADPH: νικοτιναμίδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο, GPAM: γλυκερολ-3-φωσφορική ακυλοτρανσφεράση, Tau: ταυρίνη, Lac: γαλακτικό

➤ **Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα:**

Σχετικά με τα μεταβολικά χαρακτηριστικά των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, μελέτες έχουν δείξει ότι ως πηγή ενέργειας χρησιμοποιούν τη γλυκόλυση ή τον μιτοχονδριακό μεταβολισμό. Φαίνεται να προσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους σύμφωνα με τις αλλαγές του μικροπεριβάλλοντός τους, μετατοπίζοντας τη παραγωγή ενέργειας από το ένα μονοπάτι στο άλλο, ή αποκτώντας ενδιάμεσους μεταβολικούς φαινότυπους. Γενικά, η μεταβολική προσαρμογή τους είναι βασικό χαρακτηριστικό τους [99]. Αξίζει μάλιστα να τονιστεί ότι διαφορετικοί φαινότυποι, όπως είναι αυτός της υποξίας έναντι της φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου, ή της αδράνειας έναντι του πολλαπλασιασμού τους, θα έχουν διαφορετικές μεταβολικές απαιτήσεις, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές αποκρίσεις σε θεραπευτικές προσεγγίσεις. Για παράδειγμα, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι δυνατόν να εισέλθουν εκ νέου στον κυτταρικό κύκλο μετά από έκθεση στην ακτινοθεραπεία, ενώ τα περισσότερα διαφοροποιημένα κύτταρα πεθαίνουν ή υπόκεινται σε διακοπή του κυτταρικού τους κύκλου [100].

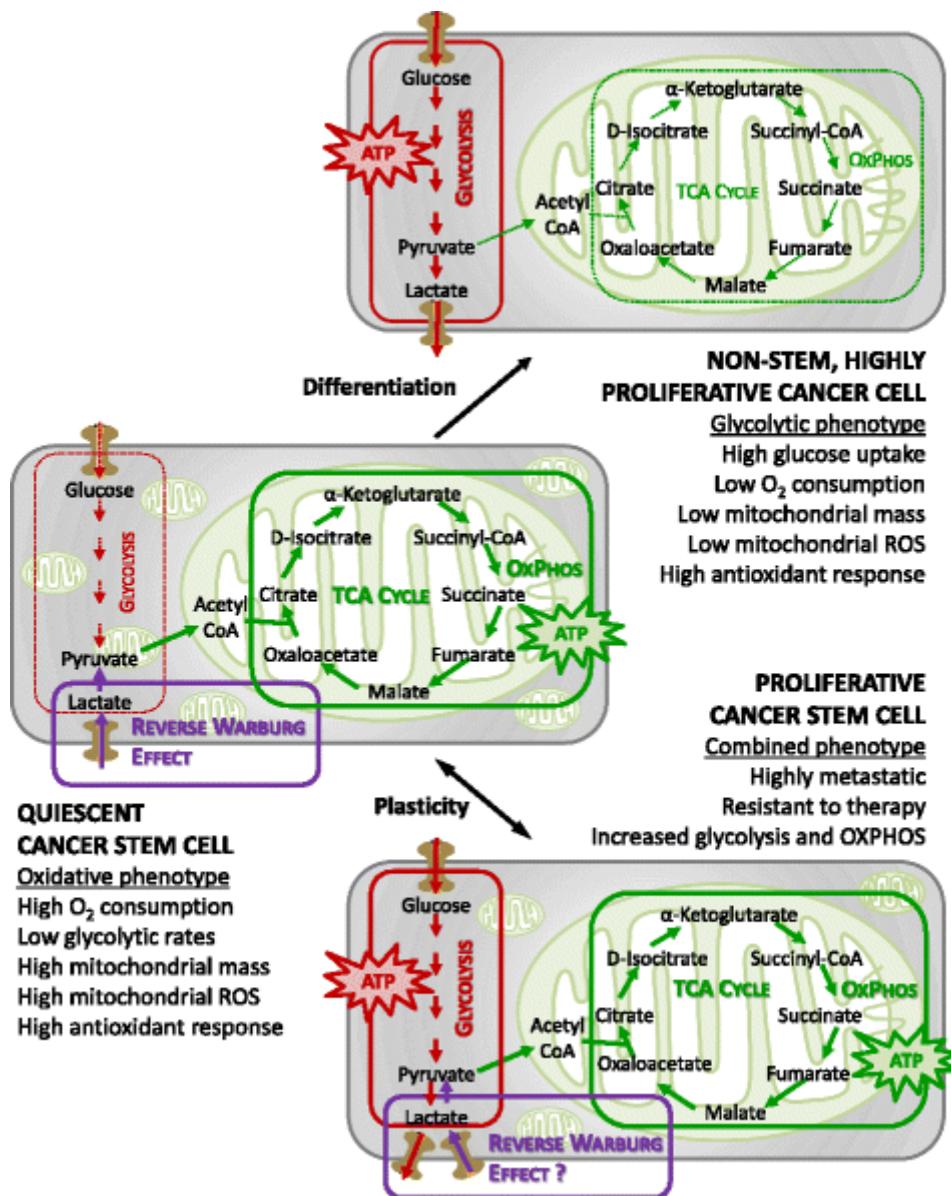
Η γλυκόλυση (αναερόβια) είναι η ακολουθία αντιδράσεων που μεταβολίζουν ένα μόριο γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού, κατά την οποία παράγονται 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης. Το πυροσταφυλικό μπορεί να μετατραπεί αναεροβίως σε γαλακτικό. Παρουσία του οξυγόνου, τα κύτταρα γενικά υιοθετούν την οξειδωτική φωσφορυλίωση (*OXPHOS*) ως το κύριο μονοπάτι για την παραγωγή ενέργειας, το οποίο είναι πιο αποτελεσματικό από αυτό της γλυκόλυσης επειδή δημιουργεί θεωρητικά 36 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης. Τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να παράγουν ATP μέσω της γλυκόλυσης ακόμη και κάτω από κανονικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (normoxic concentrations), κάτι που είναι γνωστό ως το Φαινόμενο Warburg (Warburg Effect). Στη πραγματικότητα, η γλυκόλυση μπορεί να παράγει ταχύτερα ATP σε σύγκριση με την *OXPHOS* παρουσία υψηλών επιπέδων γλυκόζης [101]. Γενικά, η γλυκόζη φαίνεται ότι αποτελεί βασικό θρεπτικό συστατικό για τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, δεδομένου ότι η παρουσία της στο μικροπεριβάλλον αυξάνει σημαντικά το ποσοστό τους στον συνολικό πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η στέρηση γλυκόζης επάγει την εξάντληση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων *in vitro* [102].

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πολλούς τύπους όγκων, όπως το οστεοσάρκωμα (κύτταρα 3AB-OS σε σύγκριση με τα MG63), το γλοιοβλάστωμα (κύτταρα U87), ο καρκίνος του μαστού [καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού σαν σφαίρες σε σύγκριση με προερχόμενα από σφαίρες προσκολλημένα κύτταρα (spheroid-derived adherent cells, SDACs)], ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος των ωοθηκών και του παχέος εντέρου [103-107], δείχνουν ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούν περισσότερο τη γλυκόλυση σε σχέση με άλλα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα *in vitro* και *in vivo*. Η πρόσληψη γλυκόζης, η έκφραση των ενζύμων της γλυκόλυσης, η παραγωγή γαλακτικού οξέος και ATP είναι σημαντικά αυξημένα στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα σε σύγκριση με τα διαφοροποιημένα ομόλογά τους. Τα παραπάνω φαίνεται να συνδέονται με μία μείωση στον μιτοχονδριακό οξειδωτικό μεταβολισμό.

Σε πλήρη αντίθεση με τα παραπάνω, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που δείχνει ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα έχουν μία προτίμηση στον μιτοχονδριακό οξειδωτικό μεταβολισμό. (Εικόνα 12) Έτσι, παρουσιάζονται ως λιγότερο γλυκολυτικά, με μικρότερη κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού, και με υψηλότερα επίπεδα ATP σε σχέση με τους διαφοροποιημένους απογόνους τους. Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια των καρκινικών βλαστικών κυττάρων έχουν αυξημένο

δυναμικό μάζας και μεμβράνης, που είναι μία αντανάκλαση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, των υψηλότερων στα μιτοχόνδρια επίπεδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και του αυξημένου ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου, σε σύγκριση με το μεγαλύτερο μέρος των διαφοροποιημένων κυττάρων του καρκίνου, τα οποία παράγουν την ενέργειά τους κυρίως μέσω της γλυκόλυσης [108-114].

Μία πιθανή εξήγηση για τις διαφορές που παρατηρούνται στον μεταβολισμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων μπορεί να δοθεί από την ικανότητα προσαρμογής τους στις μεταβολές του μικροπεριβάλλοντός τους. Για παράδειγμα, καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού από ανθρώπους και ποντίκια έχουν έναν πιο γλυκολυτικό φαινότυπο σε σύγκριση με τους διαφοροποιημένους απογόνους τους [115], ενώ τα βλαστοκύτταρα της λευχαιμίας βασίζονται περισσότερο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (*OXPPOS*) [110]. Αυτή η παρατηρούμενη πλαστικότητα θα μπορούσε να επιτρέψει τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα να επιβιώσουν σε ένα ευμετάβλητο, μερικές φορές εχθρικό περιβάλλον, ή κάτω από δυσμενείς γι'αυτά συνθήκες κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, όπως είναι τα σημεία της μετάστασης. Μελέτες που αφορούν το συγκεκριμένο θέμα έχουν δείξει ότι όταν είναι αποκλεισμένη η οξειδωτική φωσφορυλίωση (*OXPPOS*), τότε τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα στρέφονται προς έναν πιο γλυκολυτικό μεταβολισμό, κάτι που μπορεί να οφείλεται στη μεταστατική ικανότητα αλλά και στους διαφορετικούς πληθυσμούς τους [115, 80]. **(Εικόνα 12)**



Εικόνα 12: Βιοενεργειακά μονοπάτια που διέπουν τον μεταβολισμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Στα περισσότερα διαφοροποιημένα κύτταρα, ο γλυκολυτικός φαινότυπος θα μπορούσε να υπερτερεί της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (*OXPHOS*). Αντίθετα, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα ενδέχεται να βασίζονται περισσότερο στον οξειδωτικό μεταβολισμό για τη παραγωγή της ενέργειάς τους. Επίσης, εμφανίζουν μεταβολικά μία πλαστικότητα: όταν η οξειδωτική φωσφορυλίωση (*OXPHOS*) είναι αποκλεισμένη, μπορούν τελικά να αναπτύξουν ανθεκτικότητα, αποκτώντας έναν ενδιάμεσο γλυκολυτικό/οξειδωτικό φαινότυπο. ROS: δραστικά είδη οξυγόνου, TCA: κιτρικό οξύ [116]

Σκοπός της Παρούσας Εργασίας

Οι μεταβολικές ιδιαιτερότητες των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και οι επιδράσεις διαφόρων μεταβολιτών στη φυσιολογία τους παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητες. Ο αριθμός των δημοσιεύσεων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων είναι πολύ μικρός [95]. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να συμβάλλει στη καλύτερη κατανόηση της βιολογίας των συγκεκριμένων καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού, τα οποία φαίνεται να εμφανίζουν ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στις σύγχρονες θεραπείες. Μέσα από τη μελέτη του μεταβολικού τους προφίλ και συγκρίνοντάς το με αυτό των καρκινικών μη βλαστικών κυττάρων, γίνεται προσπάθεια εντοπισμού χαρακτηριστικών μεταβολικών μονοπατιών των κυττάρων αυτών, τα οποία ενδεχομένως να αποτελέσουν στόχο για την εύρεση μελλοντικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, που θα συμβάλλουν στην αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

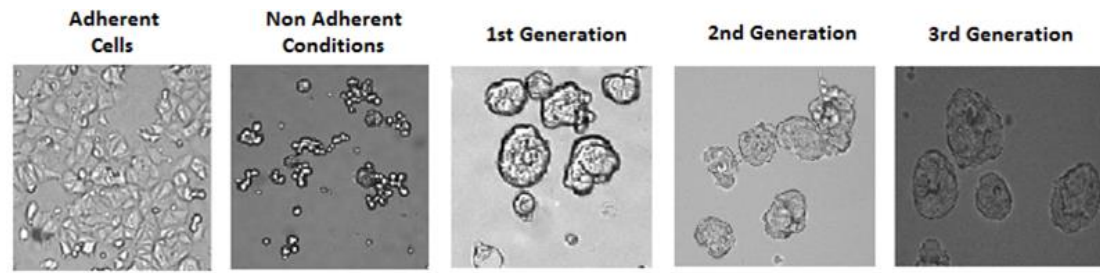
1. Η Καρκινική Κυτταρική Σειρά MCF-7

Για τα πειράματα στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7.

Τα MCF-7 (**Εικόνα 13**) είναι μια κυτταρική γραμμή που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1970 από τον ιστό του μαστού μίας 69-ετών καυκάσιας γυναίκας. Από τις δύο μαστεκτομές που υπέστη, η πρώτη αποκάλυψε ότι ο ιστός που αφαιρέθηκε ήταν καλοήθης. Πέντε χρόνια αργότερα, μία δεύτερη επέμβαση αποκάλυψε κακόηθες αδenoκαρκίνωμα σε μία υπεζωκοτική συλλογή, από την οποία ελήφθησαν κύτταρα MCF-7. Η γυναίκα ήταν σε θεραπεία για καρκίνο του μαστού με ακτινοθεραπεία και ορμονοθεραπεία.

Τα κύτταρα αυτά είναι χρήσιμα για *in vitro* μελέτες στον καρκίνο του μαστού διότι η κυτταρική σειρά έχει διατηρήσει αρκετά χαρακτηριστικά του επιθηλίου του μαστού. Αυτά περιλαμβάνουν τη δυνατότητα για τα κύτταρα MCF-7 να ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα, με τη μορφή της οιστραδιόλης, μέσω υποδοχέων οιστρογόνων στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (ER⁺). Επίσης, εκφράζουν σε μικρό βαθμό και τους υποδοχείς προγεστερόνης (PR⁺).

Όταν καλλιεργούνται *in vitro*, η κυτταρική σειρά είναι ικανή να αναπτύσσεται σε μονοστιβάδες, ενώ υπό ειδικές συνθήκες καλλιέργειας (περιγράφονται παρακάτω) εμπλουτίζεται σημαντικά σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα. (Πηγή: Wikipedia)



Εικόνα 13: Κύτταρα MCF-7 προσκολλημένα, σε μη προσκολλημένες συνθήκες και κατά τον σχηματισμό σφαιρών 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς. (Ι. Βερίγος)

2. Κυτταροκαλλιέργειες

➤ *Καλλιέργεια της Καρκινικής Κυτταρικής Σειράς Μαστού MCF-7*

Κύτταρα της καρκινικής σειράς μαστού MCF-7 καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό DMEM (Gibco, 4.5 g/L D-Glucose, + D-Glutamine, Pyruvate), εμπλουτισμένο με ορό μόσχου σε περιεκτικότητα 10% (Fetal Bovine Serum, Gibco) σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Παρακολουθώντας τη πυκνότητα των κυττάρων στα πιάτα καλλιέργειας, πραγματοποιούνταν είτε αλλαγή θρεπτικού υλικού είτε διαίρεση των κυττάρων σε νέα πιάτα. Για την εκτέλεση των πειραμάτων εκχύλισης μεταβολιτών τα κύτταρα συλλέγονταν μετά τη πέμπτη τους διαίρεση.

➤ *Καλλιέργεια Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων Μαστού (KBK)*

Για τον εμπλουτισμό των κυττάρων σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα εφαρμόζονται συνθήκες που δεν επιτρέπουν τη προσκόλληση των κυττάρων στην εσωτερική επιφάνεια των πιάτων καλλιέργειάς τους. Για να επιτευχθεί αυτό, πραγματοποιείται επίστρωση των πιάτων με πολυ (2-υδροξυαιθυλ-μεθακρυλικό) (pHEMA) σε συγκέντρωση 20 mg/ml. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν σφαιροειδείς αποικίες (που έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 50 μm) όταν καλλιεργούνται υπό αυτές τις συνθήκες.

Κύτταρα της καρκινικής σειράς μαστού MCF-7 συλλέγονται με φυγοκέντρηση (1500 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου) και επαναιωρούνται σε θρεπτικό καλλιέργειας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων [DMEM F-12 (biosera), εμπλουτισμένο με γλουταμίνη, B27, 20 ng/ml EGF και FGF (Immunotools)] . Σε πιάτα καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων, επιστρωμένα με pHEMA, προστίθενται 15000 κύτταρα/θέση σε 2.5 ml θρεπτικού. Σημαντικό στη συγκεκριμένη στιγμή είναι τα κύτταρα να είναι μονήρη. Τα κύτταρα καλλιεργούνται στους 37°C και 5% CO₂. Σφαίρες ξεκινούν να σχηματίζονται σε 3-4 ημέρες και συνολικά καλλιεργούνται για 7-10 μέρες πριν χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση (έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 50 μm). Ανάλογα με τον αριθμό των σφαιρών ανά θέση, σε κάθε πιάτο προστίθεται θρεπτικό υλικό μετά από 5-7 ημέρες καλλιέργειας.

Για την απομόνωση των μεταβολιτών από τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα συλλέγονται οι σφαίρες με το θρεπτικό από κάθε πιάτο και εν συνεχεία φυγοκεντρούνται (800 στροφές/λεπτό, 3 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου). Κατά τη διαδικασία της συλλογής η ανάδευση είναι έντονη με αποτέλεσμα να καταστρέφονται τα συσσωματώματα των κυττάρων και να παραμένουν ανέπαφες μόνο οι σφαίρες. Το ίζημα αποτελείται από σφαίρες, ενώ τα μονήρη κύτταρα έχουν παραμείνει στο υπερκείμενο. Από τις σφαίρες ακολουθεί η διαδικασία της απομόνωσης των μεταβολιτών.

3. Διακοπή της Μεταβολικής Δραστηριότητας

➤ Πειραματική Πορεία:

Τα κύτταρα που είναι προσκολλημένα στο τρυβλίο (10^6 - 10^7 κύτταρα) πλένονται 2 φορές με κρύο PBS1X (Phosphate-Buffered Saline) και στη συνέχεια προστίθενται 2.5 ml μεθανόλη και συλλέγονται με cell lifter σε ένα γυάλινο σωληνάκι. Οι mammospheres διασπώνται σε μονήρη κύτταρα, εν συνεχεία προστίθενται σε αυτά 2.5 ml μεθανόλης και συλλέγονται επίσης σε ένα γυάλινο σωληνάκι.

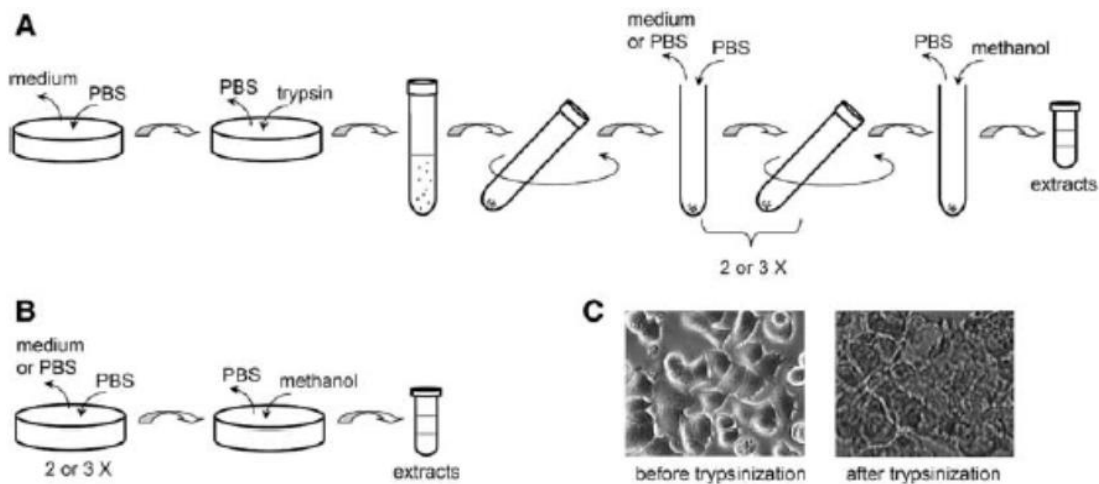
4. Εκχύλιση Μεταβολιτών

➤ Θεωρητικό Μέρος:

Εισαγωγή: Ιδανική θα ήταν η περίπτωση μίας μεθόδου καταστολής, η οποία θα σταματούσε αμέσως όλη τη κυτταρική ενζυματική δραστηριότητα ή τις αλλαγές στις συγκεντρώσεις των κυτταρικών μεταβολιτών, χωρίς να αλλάξει το κυτταρικό μικροπεριβάλλον, δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών είναι πολύ ευαίσθητες σε οποιαδήποτε αλλαγή στο περιβάλλον του κυττάρου [117, 118]. Επιπλέον, μία μέθοδος κυτταρικής καταστολής θα πρέπει να είναι ταχεία, υψηλής απόδοσης και επαναλήψιμη έτσι ώστε να επιτρέπει την μέτρηση των κυτταρικών συγκεντρώσεων του μεταβολίτη και την άμεση σύγκριση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ανάλυσης.

Η συμβατική μέθοδος για τη καταστολή και την εκχύλιση προσκολλημένων κυτταρικών καλλιιεργειών απέχει πολύ από το ιδανικό. Για τη συμβατική μέθοδο, χρησιμοποιείται πρώτα η τρυψίνη για την απόσπαση των κυττάρων από την επιφάνεια ανάπτυξής τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του προφίλ των κυτταρικών μεταβολιτών, δεδομένου ότι το ένζυμο μεταβάλλει σημαντικά τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, επειδή διασπά τις πρωτεΐνες της μεμβράνης πρώτα σε πεπτίδια και τελικά σε αμινοξέα. Επιπλέον, δεν υπάρχουν διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά και συμπληρώματα στο διάλυμα της τρυψίνης, τα οποία βρίσκονται στο μέσο καλλιιεργείας. Αφού προστεθεί η τρυψίνη υπάρχουν μετά πολυάριθμα χρονοβόρα βήματα, όπως είναι η φυγοκέντρωση, που απαιτούνται στη συμβατική μέθοδο πριν η κυτταρική δραστηριότητα κατασταλεί και σταθεροποιηθεί. Σε αυτό το διάστημα, ένα σημαντικό μέρος ενδοκυττάρων μεταβολιτών χάνεται από τα κύτταρα, λόγω του μικρού μοριακού τους βάρους και της διαφορετικής ωσμωτικής δύναμης των εφαρμοζόμενων διαλυμάτων [119, 120]. Κατά συνέπεια, η συμβατική μέθοδος απαιτεί 10^7 με 2×10^8 κύτταρα, ώστε να παρέχουν τις κατάλληλες συγκεντρώσεις των ενδοκυττάρων μεταβολιτών για τις μετρήσεις με το NMR [121, 122].

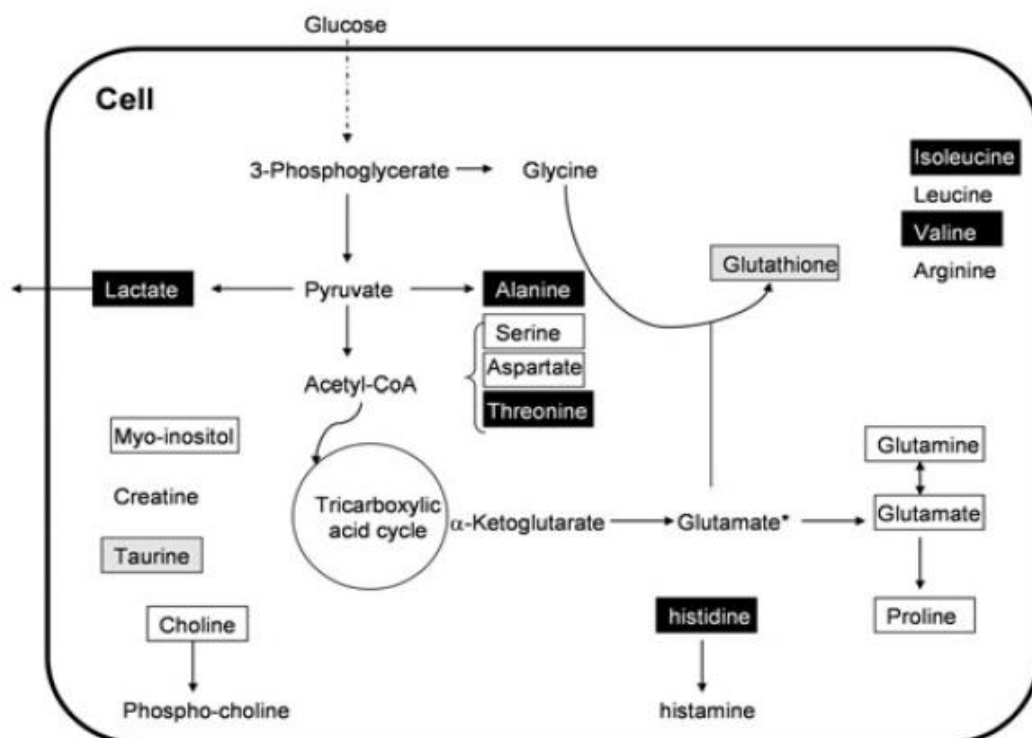
Στη παρούσα μέλετη χρησιμοποιήθηκε η νέα μέθοδος για τη καταστολή και εκχύλιση προσκολλημένων κυτταρικών καλλιιεργειών, που ξεπερνά τα μειονεκτήματα της συμβατικής μεθόδου. Με τη μέθοδο αυτή αποφεύγεται η προσθήκη τρυψίνης ή οποιουδήποτε άλλου ξένου υλικού, το οποίο μπορεί να μεταβάλλει το κυτταρικό περιβάλλον. Τα προσκολλημένα κύτταρα καταστέρονται άμεσα με μεθανόλη, αποφεύγοντας έτσι τη χρονοβόρα φυγοκέντρωση. Η μέθοδος αυτή είναι πιο γρήγορη, λιγότερο μεταβλητή, δεν αλλάζει το κυτταρικό περιβάλλον και παρουσιάζει επίπεδα ανάκτησης τουλάχιστον 50 φορές υψηλότερα από αυτά της συμβατικής [122]. (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Η προετοιμασία των δειγμάτων. Α). Στη συμβατική μέθοδο καταστολής για τις προσκολλημένες κυτταρικές καλλιέργειες, τα κύτταρα αποσπώνται πρώτα από τις επιφάνειες ανάπτυξής τους με τη προσθήκη τρυψίνης για να ληφθούν κυτταρικά εναιωρήματα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται και πλένονται με PBS. Τα στάδια πλύσης / φυγοκέντρωσης συνήθως επαναλαμβάνονται δύο ή τρεις φορές. Στη συνέχεια τα κύτταρα καταστέλλονται με μεθανόλη (ή άλλο διάλυμα καταστολής) και υφίστανται εκχύλιση. Β). Η νέα μέθοδος άμεσης κυτταρικής καταστολής. Σε αυτή τη μέθοδο δεν χρησιμοποιείται τρυψίνη στα κύτταρα. Αφού αναρροφηθεί το μέσο καλλιέργειας, τα κύτταρα ξεπλένονται γρήγορα δύο φορές με PBS. Υπολείμματα διαλύματος PBS απομακρύνονται με κενό. Στη συνέχεια τα κύτταρα καταστέλλονται αμέσως με μεθανόλη. Τόσο τα κύτταρα όσο και η μεθανόλη συλλέγονται για τη κυτταρική εκχύλιση. Γ). Εικόνες των κυττάρων MCF-7 πριν και μετά τη προσθήκη τρυψίνης. Η εμφάνιση των κυττάρων άλλαξε σημαντικά μετά τη προσθήκη της τρυψίνης, υποδεικνύοντας ότι η τρυψίνη μεταβάλλει σημαντικά τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων λόγω της αλληλεπίδρασής της με τις πρωτεΐνες της μεμβράνης [122].

Οι Martineau E. et.al [123] χρησιμοποίησαν τη νέα μέθοδο άμεσης καταστολής και εκχύλισης σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού, τις MDA-MB-468, SKBR3 και MCF-7 και οι αλλαγές που παρατήρησαν στους μεταβολίτες φαίνονται στην **Εικόνα 15**.

Αξίζει να τονιστεί ότι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σχετικά με την εκχύλιση μεταβολιτών από ιστούς με τη χρήση των διαλυτών μεθανόλη/νερό/χλωροφόρμιο, απέδειξαν ότι η μέθοδος είναι αξιόπιστη, εύκολη και γρήγορη. Επίσης, πλεονεκτεί στο ότι έχει την ικανότητα να διαχωρίζει τους μεταβολίτες της υδρόφοβης φάσης από αυτούς της υδρόφιλης. Τα παραπάνω πειράματα έγιναν σε κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού (MDA-MB-468, SKBR3, ZR75-1, MCF-7) και του καρκίνου του παχέος εντέρου, σε μυς νεαρών σολομών (*Onchorhyncus tshawytscha*) και στον ηπατικό ιστό ενήλικων κυπρίνων (*Leuciscus cephalus*) και ενήλικων πλατύσαρων (*Platichthys flesus*, *Limanda limanda*) [124-127].



Εικόνα 15: Οι αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ σε κύτταρα του καρκίνου του μαστού. Οι μεταβολίτες στα κουτάκια ποσοτικοποιήθηκαν με 2D 1H INADEQUATE ανάλυση. Οι μεταβολίτες που είναι χρωματισμένοι βρέθηκαν αυξημένοι στα καρκινικά κύτταρα MCF-7 (μαύρο) ή στα SKBR3 (γκρι) σε σχέση με τα MDA-MB-468 κύτταρα [123].

➤ Πειραματική Πορεία:

Τα βήματα που ακολουθήσαμε για την εκτέλεση της πειραματικής πορείας ήταν τα παρακάτω:

1. Αρχικά σε κάθε δείγμα προστίθενται 4 ml μεθανόλη και 0.85 ml ddH₂O. Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με vortex για 60 δευτερόλεπτα.
2. Ακολουθεί προσθήκη 2 ml χλωροφορμίου και ανάδευση με vortex για 60 δευτερόλεπτα. Τα λιπίδια μεταφέρονται στην χλωροφορμική ενώ οι μεταβολίτες στην υδατική φάση.
3. Τα δείγματα αφήνονται για 10 λεπτά στον πάγο.
4. Στη συνέχεια προστίθενται 2 ml χλωροφορμίου και 2 ml ddH₂O και τα δείγματα αναδεύονται με vortex για 60 δευτερόλεπτα. Σε αυτό το στάδιο γίνεται ορατός ο διαχωρισμός των δύο φάσεων.
5. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά, στις 2.500-3.000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου, και διαχωρίζονται η υδατική από τη χλωροφορμική φάση σε δύο διαφορετικά σωληνάκια.
6. Τέλος, ακολουθεί και μία δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες ώστε να διαχωριστούν πλήρως οι δύο φάσεις. Οι δύο φάσεις φυλάσσονται για τα επόμενα πειραματικά βήματα.

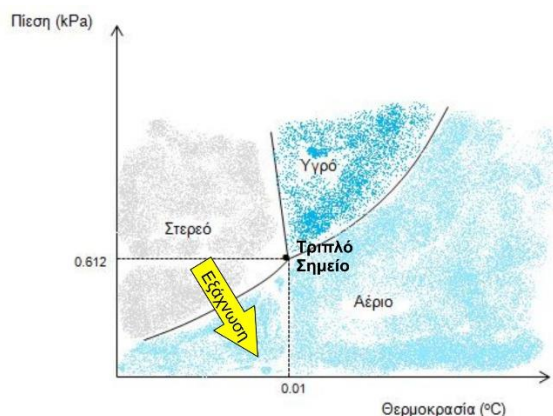
5. Εξάτμιση Διαλυτών

➤ Πειραματική Πορεία:

Αφού έχει συλλεχθεί η χλωροφορμική φάση σε γυάλινο σωληνάκι, ακολουθεί εξάτμιση των διαλυτών χρησιμοποιώντας ρεύμα αζώτου. Το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C μέχρι τη λήψη των NMR φασμάτων.

6. Λυοφιλοποίηση της Υδατοδιαλυτής Φάσης

Η λυοφιλοποίηση/λυοφιλίωση ή κρυοξηρανση είναι μία μέθοδος ξήρανσης, η οποία βασίζεται στην *εξάχνωση* του νερού, όταν αυτό βρίσκεται σε θερμοκρασία πολύ χαμηλή, ώστε είναι σε στερεή φάση και εφαρμόζεται μείωση της πίεσης. Κατά την λυοφιλίωση η πίεση και η θερμοκρασία είναι αρκετά χαμηλές ώστε στο διάγραμμά τους (T, P) το σημείο που ορίζει την κατάσταση που βρίσκεται το δείγμα να είναι κάτω από το τριπλό σημείο, οπότε τότε μια ουσία μεταβαίνει από τη στερεή στην αέρια φάση απευθείας, με εξάχνωση, χωρίς να περάσει από το στάδιο της υγρής φάσης.



Εικόνα 16: Διάγραμμα θερμοκρασίας ως προς πίεση, όπου φαίνονται οι φάσεις και το τριπλό σημείο του νερού

Προκειμένου να ξηρανθεί μια ουσία, ακολουθείται συνήθως η εξής διαδικασία:

- ψύξη της ουσίας. Συνήθως γίνεται με υγρό άζωτο, οπότε το περιεχόμενο σ' αυτή νερό παγώνει.
- τοποθέτηση σε αεροστεγή χώρο, όπου μειώνεται η πίεση σε σημείο κάτω από το τριπλό σημείο του νερού (ή γενικότερα του διαλύτη, σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί άλλο υγρό).

Στη χαμηλή αυτή πίεση, το νερό απομακρύνεται με εξάχνωση και απομακρύνεται με κατάλληλο συμπυκνωτή – παγίδα υδρατμών, ενώ ταυτόχρονα το υλικό συνεχίζει να ψύχεται, δεδομένου ότι για την εξάχνωση του νερού απαιτείται η αντίστοιχη λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης.

Στην **Εικόνα 16** φαίνεται ότι το τριπλό σημείο του νερού είναι σε θερμοκρασία ΤΤΣ ≈ 0 °C και πίεση ΡΤΣ $\approx 0,612$ kPa . Σε μια ποσότητα νερού που ψύχεται σε θερμοκρασία κάτω των 0 °C και εφαρμόζεται πίεση κάτω από την πίεση ΡΤΣ, τότε το νερό βρίσκεται στον χώρο αριστερά από την καμπύλη που χωρίζει το στερεό από το υγρό. Μειώνοντας κι άλλο την πίεση, προσεγγίζεται η καμπύλη που χωρίζει το στερεό από το υγρό, οπότε το νερό περνάει από την στερεή στην αέρια φάση (εξάχνωση) χωρίς να παρεμβληθεί η υγρή φάση [128, 129].

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στην επεξεργασία ουσιών που διασπώνται ή αλλοιώνονται εύκολα με τη θέρμανση και βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους, όπως για παράδειγμα στη συντήρηση τροφίμων και την παρασκευή φαρμάκων και φαρμακευτικών ειδών (πρωτεΐνες, εμβόλια, κ.ά.).

Επειδή η τάση ατμών του νερού κάτω του σημείου της πήξης του (0°C) είναι ελάχιστη, η εξάτμιση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μόνο με τη βοήθεια ενός πολύ υψηλού κενού, με πιέσεις που φτάνουν την τάξη των 10 mm στήλης υδραργύρου. Με ένα κενό σχεδόν απόλυτο των 1-2 mm στήλης υδραργύρου, είναι δυνατή η επίτευξη ξήρανσης μέχρι τους -75°C. Οι παράγοντες που ενεργούν ώστε να διατηρούνται σχεδόν αναλλοίωτα τα χημικά και τα οργανοληπτικά των ξηραίνόμενων ουσιών με τη λυοφιλίωση είναι ουσιαστικά η χαμηλή θερμοκρασία, οι συνθήκες του υψηλού κενού και η απευθείας εξάχνωση του νερού. Οι δύο πρώτες συνθήκες αποτρέπουν τις αλλοιώσεις που οφείλονται στη θέρμανση και στην οξείδωση από το οξυγόνο του αέρα, ενώ η εξάχνωση αποτρέπει την απώλεια συστατικών, όπως τα αιθέρια έλαια και τα αρώματα, τα οποία κατά τη συνήθη ξήρανση παρασύρονται από το ρεύμα του ατμού και απομακρύνονται. Επειδή όμως η εξάχνωση του νερού απορροφά αρκετή ποσότητα θερμότητας, η αναγκαία θερμότητα προσφέρεται με ακτινοβολία, έτσι ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία της ουσίας κατά την πορεία της μεθόδου.

Οι συσκευές λυοφιλίωσης αποτελούνται από έναν θάλαμο με σταθερή πίεση, ο οποίος συνδέεται με αντλία κενού και είναι εφοδιασμένος με ένα σύστημα ψύξης. (**Εικόνα 17**) Στο εσωτερικό του θαλάμου είναι τοποθετημένοι οι επίπεδοι δίσκοι με το προς επεξεργασία υλικό και οι μικρές ακτινοβολούσες επιφάνειες για τη θέρμανση· οι επιφάνειες αυτές είναι τοποθετημένες έτσι ώστε να απέχουν μόνο λίγα εκατοστά από την επιφάνεια των υλικών. Το φαινόμενο είναι ασυνεχές και γι' αυτό απαιτείται αυτόματος έλεγχος της θερμοκρασίας [130].



Εικόνα 17: Συσκευή λυοφιλίωσης

➤ **Πειραματική Πορεία:**

Για τη λυοφιλίωση της υδατοδιαλυτής φάσης των βλαστικών και μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων MCF-7 χρησιμοποιήθηκε ο λυοφιλιωτής CHRIST ALPHA 1-2 LD PLUS, με αντλία υπερκενού τύπου RZ 2. Τα δείγματα παρέμειναν για περίπου 24 ώρες στους -51°C . Η ποσότητα των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν περίπου 2 ml.

7. Φασματοσκοπία NMR

Προετοιμασία των δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων ^1H NMR

Τα εκχυλίσματα των λιπιδίων κυτταρικών σειρών παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά περίπου και επαναδιαλύθηκαν σε μίγμα δευτεριωμένων διαλυτών που περιελάμβανε δευτεριωμένη μεθανόλη (Methyl- d_3 alcohol- d , με βαθμό δευτερίωσης 99.8%): δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (Chloroform- d_1 , με βαθμό δευτερίωσης 99.8%), σε αναλογία 2:1 (v/v) αντίστοιχα. Η επαναδιάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε ποσότητα 500μl του παραπάνω μίγματος δευτεριωμένων διαλυτών. Τα διαλύματα μεταφέρθηκαν με πιπέτα σε ειδικά σωληνάκια NMR (NMR tubes, εσωτερικής διαμέτρου 5mm). Η παρασκευή του μίγματος των δευτεριωμένων διαλυτών πραγματοποιήθηκε λίγο πριν την έναρξη του πειράματος ώστε να ελαχιστοποιηθεί η εξάτμιση των πτητικών διαλυτών.

Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα που περιέχουν τους μεταβολίτες των κυτταρικών σειρών επαναδιαλύθηκαν σε 500 μl D_2O που περιέχει TSP (Trimethylsilylpropanoic Acid) ως εσωτερικό πρότυπο και μεταφέρθηκαν με πιπέτα στα ειδικά σωληνάκια NMR.

Η λήψη των φασμάτων ^1H NMR πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker Avance DRX 500MHz εντάσεως μαγνητικού πεδίου 11.74 Tesla σε θερμοκρασία 298°K .

Λήψη των φασμάτων ^1H NMR

1) Καταγραφή του λιπιδιακού προφίλ των κυτταρικών σειρών

Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η παλμική ακολουθία “zgpr” της εταιρείας Bruker. Σε κάθε φάσμα έγινε συλλογή 64 παλμών (scans) 32K δεδομένων (data points) με φασματικό εύρος 5000Hz, παλμό 90° και χρόνο αποδιέγερσης 3s. Για την αύξηση της ευαισθησίας, οι FID πολλαπλασιάστηκαν πριν το μετασχηματισμό Fourier με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) 0.3Hz. Ο μέσος χρόνος λήψης ενός φάσματος ήταν περίπου 10 λεπτά.

2) Καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των κυτταρικών σειρών

Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η παλμική ακολουθία NOESYPRESAT (RD- 90° - t_1 - 90° - t_m -FID λήψη). Σε κάθε φάσμα έγινε συλλογή 128

παλμών (scans) 64K δεδομένων (data points) με φασματικό εύρος 5000Hz και παλμό 90°. Για την αύξηση της ευαισθησίας, οι FID πολλαπλασιάστηκαν πριν το μετασχηματισμό Fourier με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) 0.3Hz. Ο μέσος χρόνος λήψης ενός φάσματος ήταν περίπου 10 λεπτά.

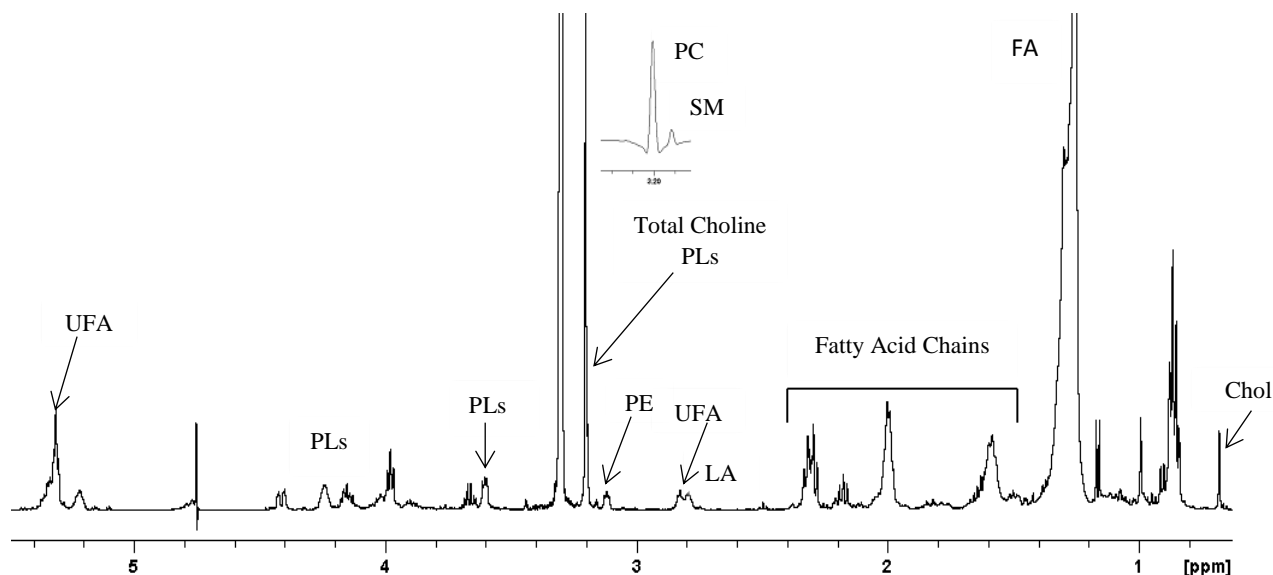
Ανάλυση των δεδομένων ¹H NMR

Η ανάλυση των δεδομένων NMR πραγματοποιήθηκε με τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition-PR). Τα φάσματα NMR διαιρέθηκαν αυτόματα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα AMIX (Analysis of MIXtures) (version 3.9, Bruker Biospin Corporation) σε συνεχή ακέραια τμήματα (bins) ίσου πλάτους 0.03 ppm. Όλα τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν διαιρώντας κάθε τμήμα με τη συνολική επιφάνεια του φάσματος προκειμένου να αντισταθμιστούν οι διαφορές στη συνολική συγκέντρωση μεταξύ των δειγμάτων. Ο τελικός πίνακας των δεδομένων εισήχθη στο λογισμικό SIMCA-P (version 14.0, UMETRICS AB, Umea, Sweden) για την ανάλυση αναγνώρισης προτύπων. Πριν την εφαρμογή της ανάλυσης των κυρίων συνιστωσών (PCA) στα δεδομένα NMR, έγινε κεντράρισμα του μηδενός (mean centering) κάθε στήλης και όλα τα δεδομένα διαιρέθηκαν με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης της εκάστοτε στήλης στην οποία ανήκαν (Pareto scaling).

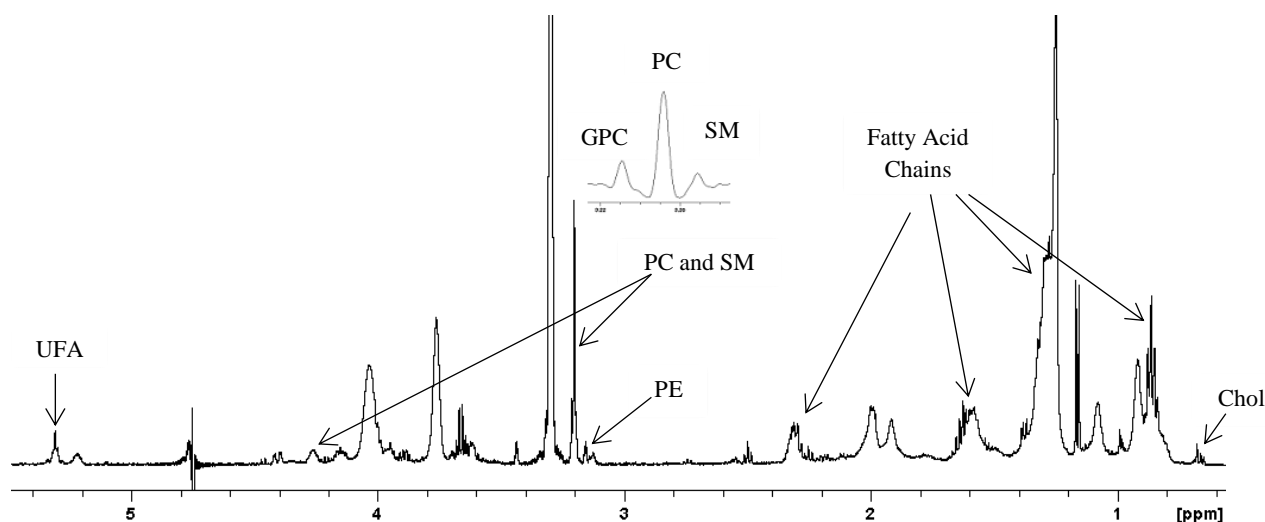
Η PCA χρησιμοποιήθηκε αρχικά για μια γενική επισκόπηση του συνόλου των πολυμεταβλητών δεδομένων, την επισημάνση δειγμάτων με ακραία συμπεριφορά (outliers) μεταξύ των παρατηρήσεων (observations, φάσματα), καθώς και την ανίχνευση οποιασδήποτε τάσης ομαδοποίησης ή διαχωρισμού των δεδομένων. Με τις supervised τεχνικές, σε όλα τα δείγματα δίνεται μια κατάλληλη αριθμητική τιμή κατηγοριοποίησης (εξαρτημένη ψευδομεταβλητή) ανάλογα με την υποομάδα στην οποία ανήκουν για την κατασκευή ενός πίνακα απόκρισης Y (response Y matrix). Με την PLS-DA αναζητήθηκε η εκάστοτε σχέση που συνδέει τον πίνακα X (περιοχές ολοκλήρωσης NMR, bins) με τον πίνακα Y που περιείχε κωδικοποιημένη την πληροφορία π.χ. της νόσου. Συγκεκριμένα, με την μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η βέλτιστη διαχωριστική συνάρτηση (discriminant function), δηλαδή το στατιστικό μοντέλο PLS-DA που παρείχε τον σαφέστερο διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων της μελέτης βάσει των μεταβλητών X. Για την ερμηνεία των γραφημάτων συντεταγμένων χρησιμοποιήθηκαν τα διαγράμματα συντελεστών παλινδρόμησης (regression coefficients plots) αποσκοπώντας στην ανάδειξη των φασματικών περιοχών NMR που συνεισφέρουν σημαντικά στο διαχωρισμό των υπό μελέτη ομάδων. Η τεχνική Orthogonal Projections to PLS-DA (OPLS-DA) εφαρμόστηκε για την αφαίρεση εκείνων των γραμμικών συνδυασμών των μεταβλητών X που ήταν ορθογώνιοι προς το διάνυσμα Y (πίνακας στήλη) των εξαρτημένων μεταβλητών κατηγοριοποίησης, με σκοπό την ελαχιστοποίηση της συστημικής διακύμανσης και την επίτευξη του μεγαλύτερου βαθμού διάκρισης των υπό μελέτη ομάδων. Σε κάθε στατιστικό μοντέλο εφαρμόστηκε η μέθοδος cross validation (διασταυρούμενη αξιολόγηση) εφαρμόζοντας την προεπιλεγμένη διαδικασία των 7 διαδοχικών επαναλήψεων του λογισμικού προγράμματος SIMCA-P. Η παράμετρος Q^2 που υπολογίστηκε με την μέθοδο αυτή παρείχε μια εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης των στατιστικών μοντέλων, η οποία θεωρείται «καλή» για $Q^2 > 0.5$ και «άριστη» για $Q^2 > 0.9$, ενώ αντίστοιχα η παράμετρος R^2 , παρείχε μια εκτίμηση της explained variation και του βαθμού προσαρμογής του εκάστοτε στατιστικού μοντέλου στα δεδομένα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α ΜΕΡΟΣ: Σύγκριση Φασμάτων Λιπιδιακής Σύστασης



Εικόνα 18: Φάσμα ¹H NMR λιπιδιακής φάσης μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων MCF-7, όπου: Chol (Cholesterol): Χοληστερόλη, Fatty Acid Chains: Αλυσίδες Λιπαρών Οξέων, FA (Fatty Acids): Λιπαρά Οξέα, UFA (Unsaturated Fatty Acids): Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα, LA (Linoleic Acid): Λινελαϊκό Οξύ, Total Choline PLs (Total Choline Phospholipids): Ολικά Φωσφολιπίδια Χολίνης, PC (Phosphatidylcholine): Φωσφατιδυλοχολίνη, SM (Sphingomyelin): Σφιγγομυελίνη



Εικόνα 19: Φάσμα ¹H NMR λιπιδιακής φάσης καρκινικών βλαστικών κυττάρων (mammospheres) MCF-7, όπου: Chol (Cholesterol): Χοληστερόλη, Fatty Acid Chains: Αλυσίδες Λιπαρών Οξέων, FA (Fatty Acids): Λιπαρά Οξέα, UFA (Unsaturated Fatty Acids): Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα, LA (Linoleic Acid): Λινελαϊκό Οξύ, Total Choline PLs (Total Choline Phospholipids): Ολικά Φωσφολιπίδια Χολίνης, PC (Phosphatidylcholine): Φωσφατιδυλοχολίνη, SM (Sphingomyelin): Σφιγγομυελίνη, PE (Phosphoethanolamine) Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, GPC (Glycerophosphocholine): Γλυκεροφωσφοχολίνη

Στην **Εικόνα 18** παρατηρείται ένα αντιπροσωπευτικό ^1H NMR φάσμα εκχυλίσματος λιπιδίων των μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων MCF-7, ενώ στην **Εικόνα 19** ένα αντιπροσωπευτικό ^1H NMR φάσμα εκχυλίσματος των λιπιδίων των καρκινικών βλαστικών κυττάρων MCF-7 (mammospheres). Στα φάσματα αυτά διακρίνονται σήματα που αντιστοιχούν στην ολική χοληστερόλη (εστεροποιημένη ή μη), στα φωσφολιπίδια και τα λιπαρά οξέα. Κάθε μόριο λιπιδίου εμφανίζεται στο φάσμα με περισσότερα από ένα σήματα, τα οποία μπορεί να αλληλεπικαλύπτονται. Η κορυφή στα 3.20 ppm που αντιστοιχεί στο σήμα της $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ σχάζεται στα δύο, από όπου μπορούμε να διακρίνουμε τα δύο φωσφολιπίδια, τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και τη σφιγγομυελίνη (SM). (**Εικόνα 18**)

Με μία πρώτη ποιοτική σύγκριση των δυο φασμάτων του εκχυλίσματος λιπιδίων των καρκινικών βλαστικών και μη κυττάρων MCF-7 παρατηρούμε κάποιες διαφορές όπως:

1) Τα επίπεδα της χοληστερόλης (Chol) όπως αυτά καθορίζονται από την ένταση του χαρακτηριστικού σήματος στα 0.68 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του C-18, είναι σημαντικά μειωμένα στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα σε σχέση με τα μη βλαστικά. (**Εικόνα 19**)

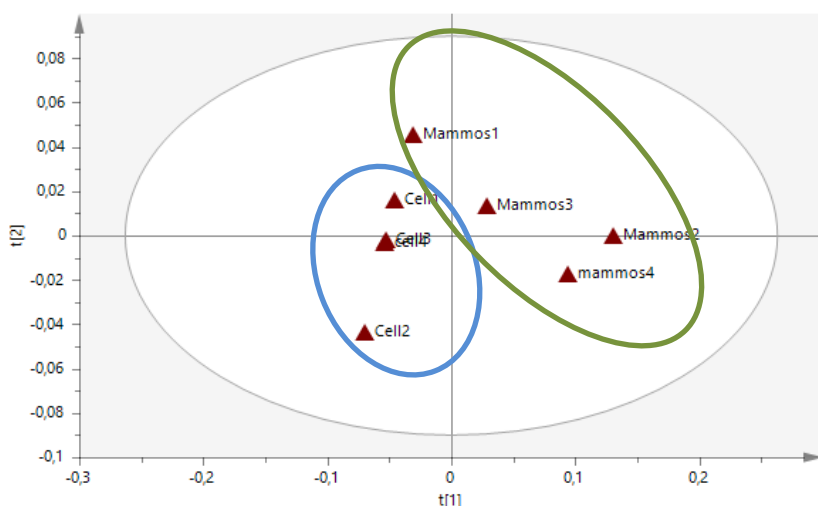
2) Τα επίπεδα των φωσφολιπιδίων είναι μειωμένα στα mammospheres σε σχέση με τα μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, στην **Εικόνα 19** όπου διακρίνεται το φάσμα των βλαστικών καρκινικών κυττάρων, μετά από ανάλυση του σήματος στα 3.20 ppm παρατηρείται η εμφάνιση μίας τρίτης κορυφής, που σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα αντιστοιχεί στη γλυκεροφωσφοχολίνη (GPC) [77].

3) Τα επίπεδα των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Unsaturated Fatty Acids, UFA) είναι μειωμένα στα mammospheres σε σύγκριση με τα μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα. Μάλιστα, το σήμα των διαλλυλικών πρωτονίων από όπου μπορούμε να προσδιορίσουμε τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα δεν υπάρχει στο φάσμα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. (**Εικόνα 19**)

Omics Ανάλυση

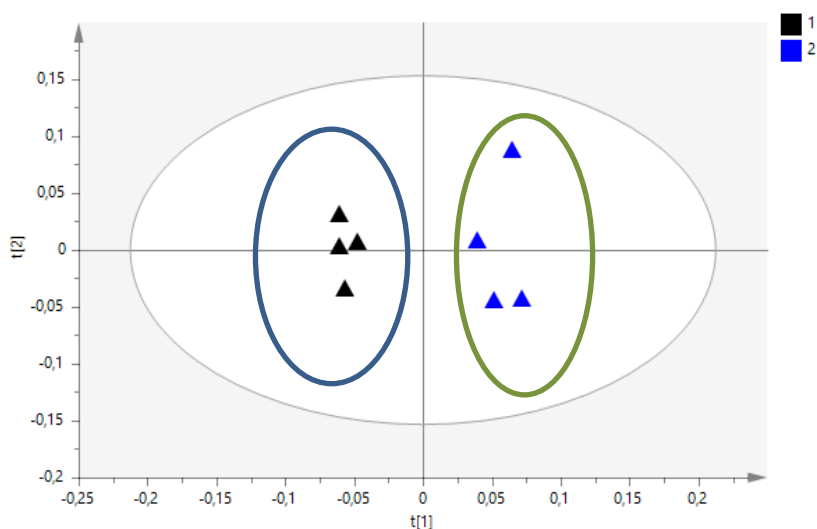
➤ PCA Ανάλυση:

Με την εφαρμογή της τεχνικής PCA διαπιστώθηκε ότι το λιπιδιακό προφίλ των μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων MCF-7 διαφοροποιείται σημαντικά από αυτό των βλαστικών (mammospheres). (**Εικόνα 20**) Οι τιμές R^2X και Q^2 είναι 0.99 και 0.914, αντίστοιχα.



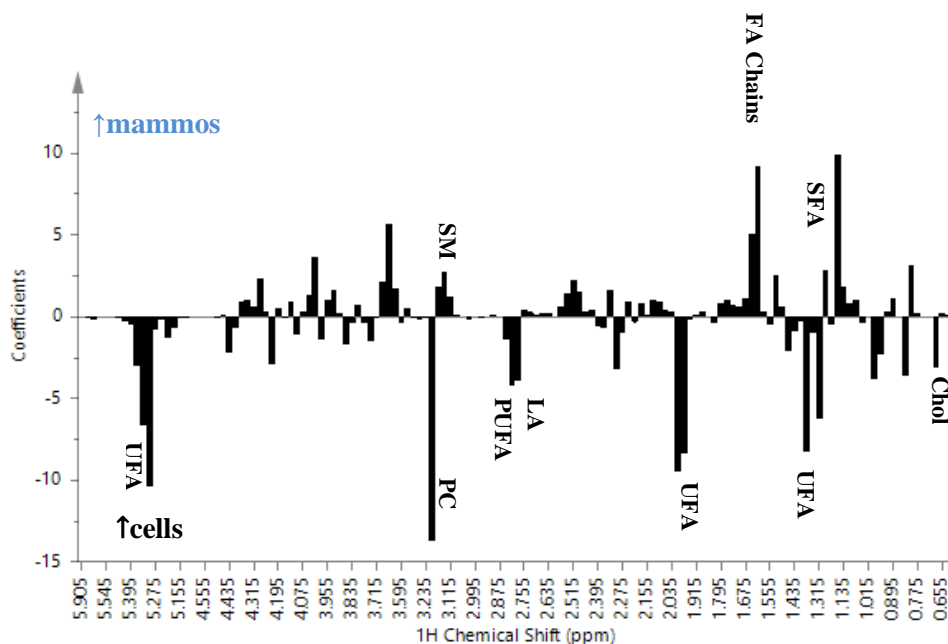
Εικόνα 20: PCA γράφημα συντεταγμένων ¹H NMR μη βλαστικών και βλαστικών (mammospheres) καρκινικών κυττάρων MCF-7. $R^2X=0.99$ $Q^2=0.914$

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος Orthogonal Projections to PLS-DA (OPLS-DA) ώστε να ελαχιστοποιηθεί η συστηματική διακύμανση και να επιτευχθεί μεγαλύτερος βαθμός διάκρισης μεταξύ των μη βλαστικών και βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού. Πράγματι, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 21**, ο διαχωρισμός μεταξύ των δυο υπό μελέτη ομάδων κυττάρων βελτιώθηκε. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις τιμές των παραμέτρων R^2X , R^2Y και Q^2 (0.966, 0.972 και 0.615, αντίστοιχα).



Εικόνα 21: Το OPLS-DA γράφημα συντεταγμένων για τα μη βλαστικά (▲) και βλαστικά (▲) καρκινικά κύτταρα MCF-7. $R^2X=0.966$, $R^2Y=0.972$, $Q^2=0.615$

Παρατηρώντας το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης για το μοντέλο των μη βλαστικών (cells) και βλαστικών καρκινικών κυττάρων (mammos) του μαστού, φαίνεται ότι οι κύριες φασματικές περιοχές που συνέβαλαν στον διαχωρισμό των δύο κυτταρικών τύπων είναι αυτές της χοληστερόλης, των ακόρεστων λιπαρών οξέων και της φωσφατιδυλοχολίνης που βρέθηκαν σε μειωμένα επίπεδα στα βλαστικά καρκινικά κύτταρα (mammospheres), και οι περιοχές που αντιστοιχούν στα κορεσμένα λιπαρά οξέα και τη σφιγγομυελίνη, τα επίπεδα των οποίων είναι αυξημένα στα βλαστικά καρκινικά κύτταρα MCF-7.



Εικόνα 22: Το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης για το μοντέλο μη βλαστικών (cells) και βλαστικών (mammos) καρκινικών κυττάρων MCF-7

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 8 δείγματα: 4 για την ανάλυση του μεταβολικού προφίλ και 4 για τη μελέτη του λιπιδικού προφίλ των βλαστικών και μη καρκινικών κυττάρων. Από τα 4 δείγματα που αφορούσαν το λιπιδικό προφίλ των δύο καρκινικών τύπων, τα 2 προέρχονταν από προηγούμενο πείραμα της Ι.Μητρέντση (Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

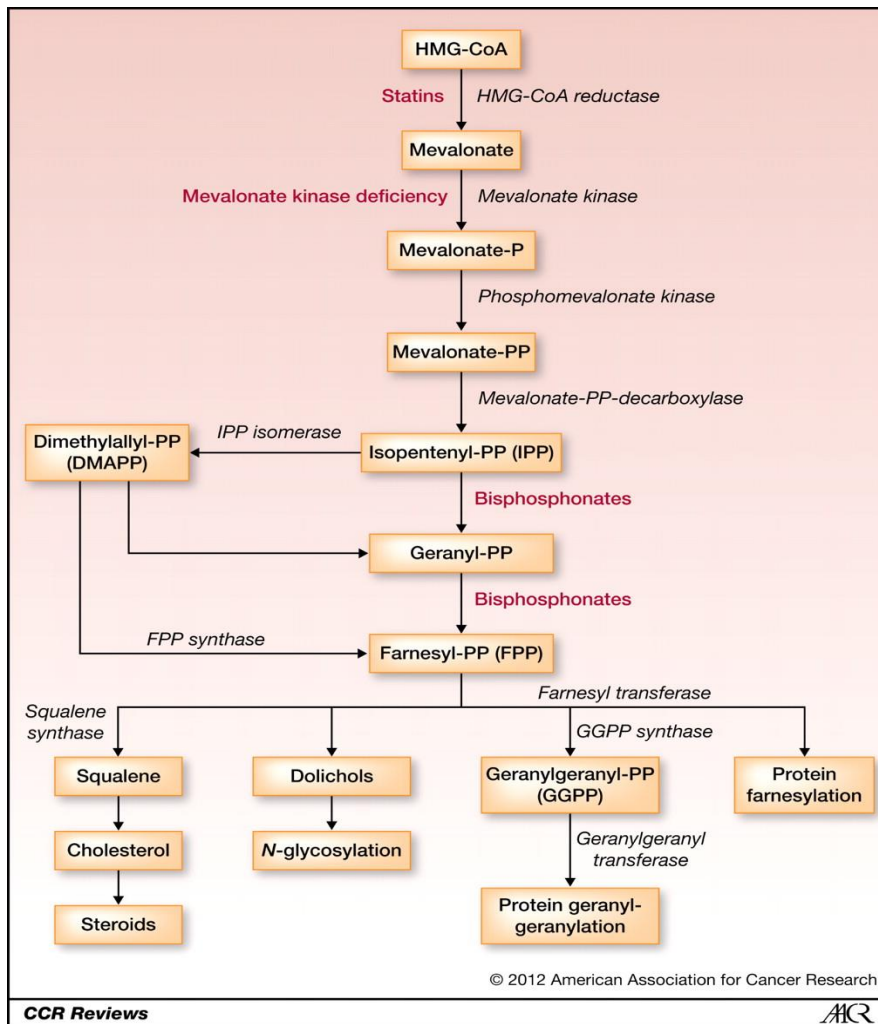
Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη του λιπιδιακού και μεταβολικού προφίλ των βλαστικών και μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού, MCF-7, με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας NMR. Μετά από τη ποιοτική σύγκριση των φασματών και την επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR με τις τεχνικές PCA και OPLS-DA παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο προφίλ των δύο κυτταρικών τύπων, κυρίως σε αυτόν των λιπιδίων.

➤ Λιπίδια:

Συγκρίνοντας το λιπιδιακό προφίλ των βλαστικών καρκινικών κυττάρων (mammospheres) με αυτό των μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων MCF-7, παρατηρήθηκαν στα πρώτα μειωμένα επίπεδα της χοληστερόλης, των ακόρεστων λιπαρών οξέων και της φωσφατιδυλοχολίνης, και αυξημένα τα επίπεδα της σφιγγομυελίνης και των κορεσμένων λιπαρών οξέων.

Η χοληστερόλη είναι βασικό λιπίδιο για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης [131]. Πέραν του ότι αποτελεί πρόδρομο μόριο για τις στεροειδείς ορμόνες και συστατικό των μεμβρανών του πλάσματος, παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυτταρική μεταγωγή του σήματος [131]. Η χοληστερόλη συντίθεται πρωτίστως στο ήπαρ και μεταφέρεται στα κύτταρα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος με τη μορφή της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (low density lipoprotein, LDL). Η LDL εισέρχεται στα κύτταρα με ενδοκυττάρωση, μεταφέρεται στα λυσοσώματα και στη συνέχεια υδρολύεται σε ελεύθερη χοληστερόλη, η οποία μεταφέρεται στη κυτταρική μεμβράνη και σε άλλα οργανίδια [131, 132].

Γενικά, η χοληστερόλη είναι παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού, μολονότι οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό δεν είναι πλήρως κατανοητοί [133]. Τα επίπεδα της χοληστερόλης τείνουν να είναι υψηλά στα μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα, κάτι με το οποίο συμφωνούν και τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, αλλά μέχρι στιγμής δεν είναι ξεκάθαρο το τι σημαίνει αυτό [134, 135], δεδομένου μάλιστα ότι η βιβλιογραφία σχετικά με το συγκεκριμένο θέμα είναι αρκετά περιορισμένη. Αρκετές μέletes [137, 138] συνδέουν τη χοληστερόλη με τον καρκίνο του μαστού μέσω της μεβαλονικής μεταβολικής οδού (mevalonate pathway), κατά την οποία παράγονται δύο ενώσεις, το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (isopentenyl pyrophosphate, IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP). Οι ενώσεις αυτές είναι χρήσιμες για τη σύνθεση ισοπρενοειδών, μία κατηγορία ενώσεων στην οποία ανήκει και η χοληστερόλη [136]. **(Εικόνα 23)** Σύμφωνα με τις συγκεκριμένες μελέτες, η αναστολή της σύνθεσης του μεβαλονικού οξέος μέσω του υδροξυ-μεθυλ-γλουταρυλ-συνένζυμο Α (hydroxyl-methylglutaryl-coenzymeA, HMG-CoA) με τη χρήση στατίνης [140,141], όπως είναι για παράδειγμα η συμβαστατίνη (simvastatin) [138-139], είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού των βλαστικών καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον μελέτες [142-144] έδειξαν ότι ασθενείς με καρκίνο του μαστού που λαμβάνουν στατίνες, εμφανίζουν λιγότερες πιθανότητες επανεμφάνισης της νόσου.



Εικόνα 23: Η Μεβαλονική Μεταβολική Οδός (Mevalonate Pathway).

Ένας μικρός αριθμός μελετών έχει συνδέσει τη λιπογένεση με τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, η αναστολή της συνθάσης των λιπαρών οξέων (fatty acid synthase) φαίνεται ότι καταστέλλει την ανάπτυξη των βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού *in vivo* [145]. Επιπροσθέτως, αρκετές μελέτες φαίνεται να υποδεικνύουν τη λιπογένεση ενδεχομένως ως μία τροποποιημένη μεταβολική διαδικασία στα καρκινικά βλαστοκύτταρα, αλλά ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα λιπίδια ρυθμίζουν τη βλαστικότητα παραμένει άγνωστος [146, 147].

Καθώς τα περισσότερα κύτταρα σε μορφή σφαιρών παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ακορεστότητας, είναι πιθανό τα βλαστικά καρκινικά κύτταρα να είναι πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα [148]. Οι J.Li et al [149] παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα ακόρεστων λιπιδίων σε βλαστοκύτταρα του καρκίνου ωοθηκών σε σύγκριση με τα μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα. Μέσα από μία σειρά πειραμάτων έδειξαν ότι η αναστολή των λιποειδών δεσατουρασών (lipid desaturases) εξαλείφει τα βλαστικά καρκινικά κύτταρα, καταστέλλει τον σχηματισμό σφαιρών *in vitro* και μπλοκάρει των σχηματισμό του όγκου *in vivo*. Επιπλέον, απέδειξαν ότι ο παράγοντας κΒ (NF-κΒ) ρυθμίζει άμεσα τα επίπεδα έκφρασης των λιποειδών δεσατουρασών, ενώ η αναστολή των συγκεκριμένων ενζύμων αποκλείει τη σηματοδότηση του NF-κΒ. Σύμφωνα λοιπόν με τα ευρήματά τους, η αυξημένη ακορεστότητα των λιπιδίων αποτελεί

μεταβολικό δείκτη για καρκινικά βλαστοκύτταρα των ωοθηκών και στόχος για μελλοντική θεραπεία.

Στη παρούσα μελέτη, τα επίπεδα των λιπαρών οξέων, και ειδικά των ακόρεστων λιπαρών οξέων, είναι μειωμένα στα mammospheres σε σχέση με τα μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα MCF-7. Παρατηρούμε ότι αυτό δε συμφωνεί με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα άλλων ερευνών πιθανότατα λόγω και των διαφορετικών ειδών καρκινικών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν. Περαιτέρω μελέτη σχετικά με τον μεταβολισμό λιπιδίων στα καρκινικά βλαστοκύτταρα του μαστού κρίνεται απαραίτητη.

Η χολίνη (Choline) είναι μια χημική ουσία, που αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της διατροφής. Σχεδόν σε όλους τους ιστούς συσσωρεύεται χολίνη και μπορεί να μεταβολιστεί με τουλάχιστον τρεις τρόπους:

A). Μέσω της βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης (Phosphatidylcholine, PC) και διαμέσου της μεταβολικής οδού Kennedy (Kennedy Pathway). Η φωσφατιδυλοχολίνη είναι το πιο άφθονο φωσφολιπίδιοφωσφολιπίδιο που βρίσκεται στη διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών.

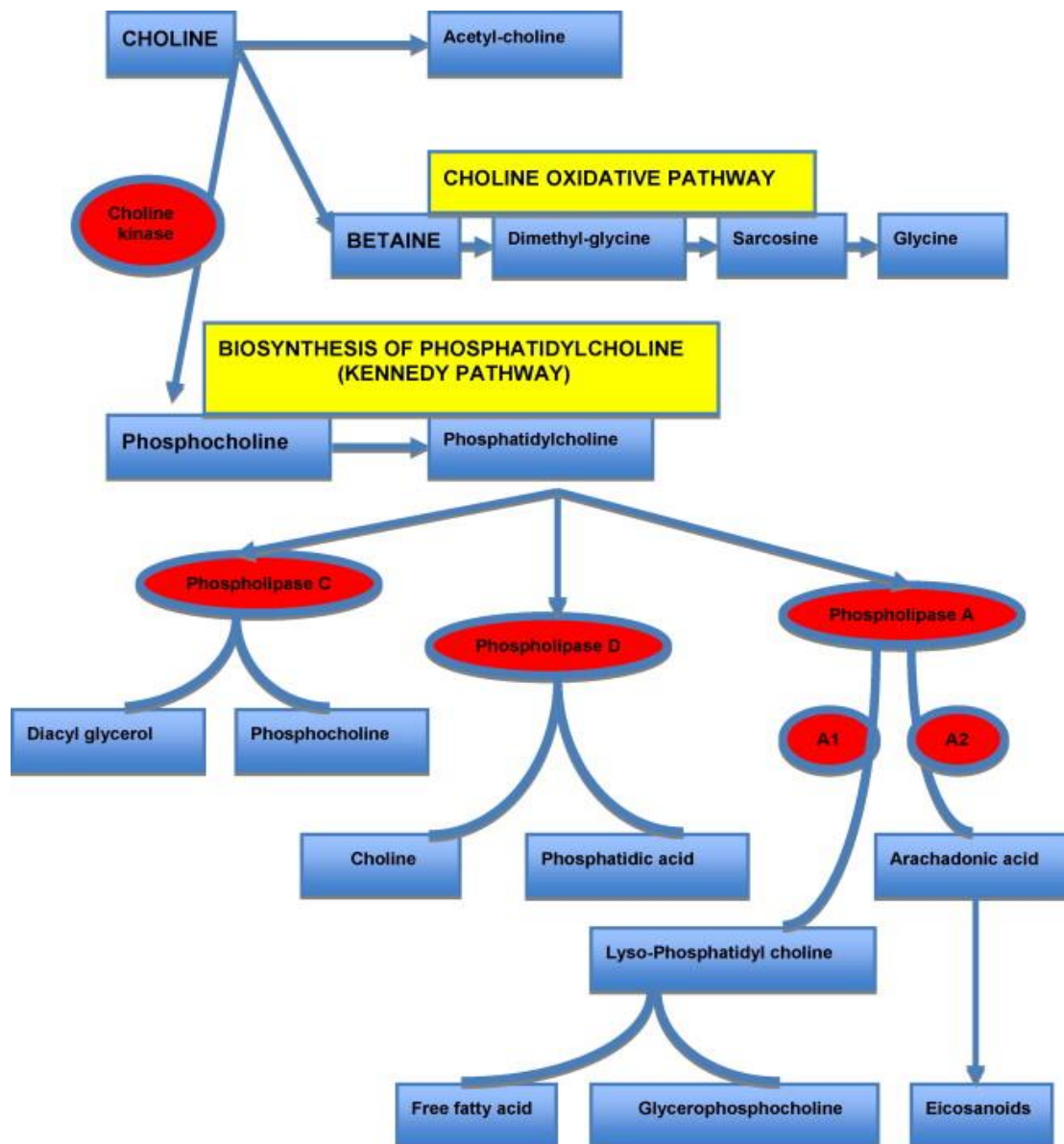
B). Μέσω μη αναστρέψιμης οξειδωσης προς βεταϊνη.

Γ). Με τη βοήθεια της δευτερεύουσας οδού παραγωγής ακετυλοχολίνης, σε νευρώνες και πλακούντα (μέσω τρανσφεράσης της ακετυλοχολίνης). (**Εικόνα 24**)

Τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν και να εκκρίνουν υψηλά επίπεδα χολίνης και των μεταβολιτών της. Η πρόσληψη γίνεται μέσω της ενεργής μεμβρανικής μεταφοράς και της παθητικής διαμεμβρανικής διάχυσης. Η διάχυση επηρεάζεται από τη σύνθεση και τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης [77].

Η αύξηση του μεταβολισμού της χολίνης είναι χαρακτηριστικό στον καρκίνο του μαστού [93]. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού (MCF-7, MDA-MB-231, T47D), έδειξαν υψηλά επίπεδα συγκεντρώσεων των φωσφολιπιδίων της χολίνης και μείωση της γλυκεροφωσφοχολίνης (GPC) [85, 93-98]. Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), αυξημένα επίπεδα της σφιγγομυελίνης (SM) και η παρουσία της γλυκεροφωσφοχολίνης (GPC) στα βλαστικά καρκινικά κύτταρα μετά από σύγκριση με τα μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα MCF-7.

Οι Ting et al [93], οι οποίοι σύγκριναν καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 με φυσιολογικά, παρατήρησαν στα πρώτα αυξημένα επίπεδα της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), κάτι με το οποίο φαίνεται να συμφωνεί και η παρούσα έρευνα. Οι Katz-Brull et al [150], έδειξαν αυξημένη μεταφορά της χολίνης, αυξημένη σύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και της βεταϊνης, και μείωση της σύνθεσης των αιθερικών λιπιδίων που προέρχονται από χολίνη (choline-derived ether lipids) σε κύτταρα του καρκίνου του μαστού (MCF-7, T47D). Μάλιστα, προτείνουν ότι το σήμα της χολίνης που ανιχνεύεται μέσω μαγνητικού συντονισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον καρκίνο του μαστού.



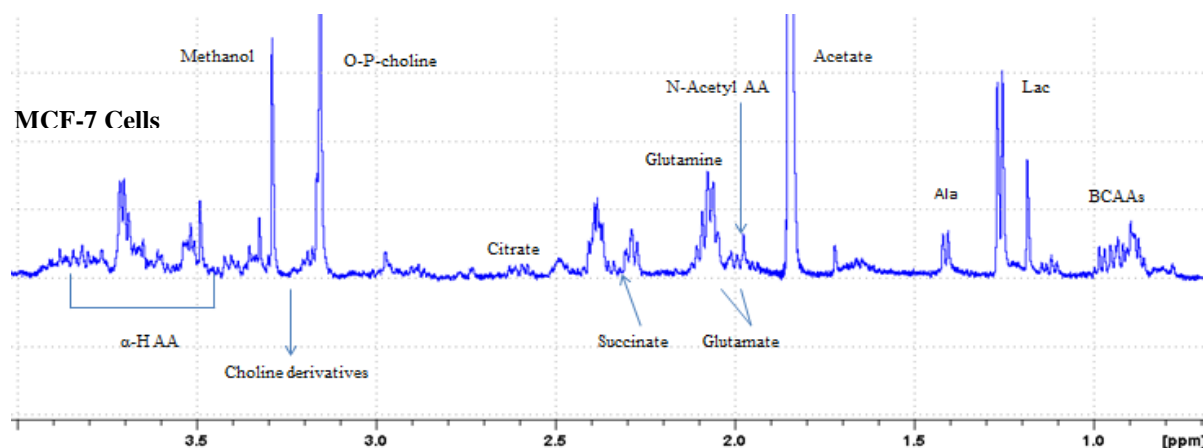
Εικόνα 24: Μεταβολικές Οδοί Χολίνης: Παραγωγή Ακετυλοχολίνης (Acetyl-choline), Μη Αναστρέψιμη Οξείδωση προς Βεταΐνη, Βιοσύνθεση της Φωσφατιδυλοχολίνης [77].

Στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, τα αυξημένα επίπεδα της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) συνοδεύονται από μειωμένα επίπεδα της γλυκεροφωσφοχολίνης (GPC), κάτι το οποίο μέχρι στιγμής δεν έχει ερμηνευτεί πλήρως [151, 152]. Προς το παρόν, ο μόνος μηχανισμός που περιλαμβάνει τη γλυκεροφωσφοχολίνη (GPC) είναι αυτός που αναφέρεται στην αυξημένη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης A2 (PLA2) [153]. Η φωσφολιπάση A2 (PLA2) μετατρέπει τη φωσφατιδυλοχολίνη σε 1-ακυλγλυκεροφωσφοχολίνη (1-acylglycerophosphocholine), που αποτελεί πρόδρομο της γλυκεροφωσφοχολίνης (GPC). Τα επίπεδα του ενζύμου φωσφολιπάση A2 βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στον καρκίνο του μαστού σε ασθενείς με μεταστάσεις σε σύγκριση με αυτούς χωρίς μετάσταση [154].

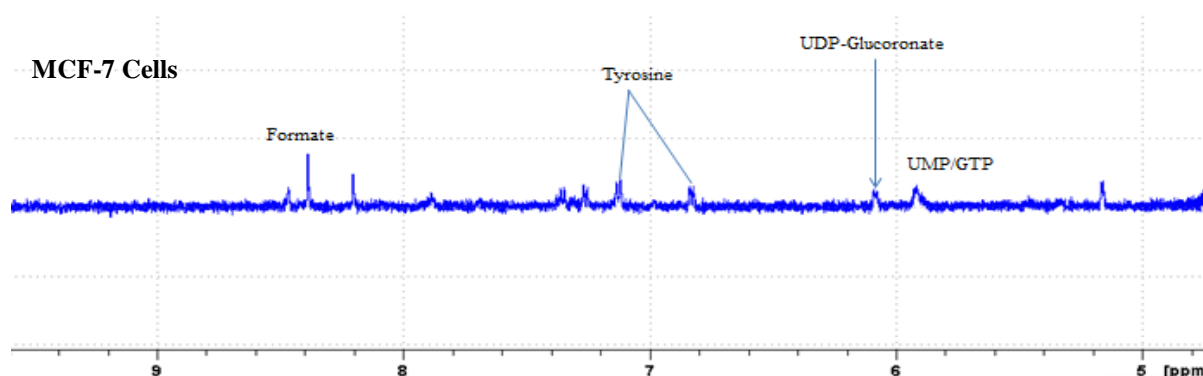
Οι Stewart et al [155], χρησιμοποιώντας τις καρκινικές σειρές κυττάρων MCF-7, MDA-MB-231 και AN3-CA, ανέφεραν ότι το ένζυμο EDI3 (endometrial differential 3) είναι η γλυκεροφωσφοδιεστεράση, η οποία είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση της

γλυκεροφωσφοχολίνης (GPC) σε χολίνη και 3-φωσφορική γλυκερόλη (glycerol-3-phosphate, G3P) σε κύτταρα θηλαστικών. Αυτό φαίνεται να είναι σημαντικό για τον καρκίνο του μαστού, καθώς αυτή η ασθένεια, σύμφωνα με τους συγγραφείς, σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα GPC και χαμηλή αναλογία GPC / PC. Κλείνοντας, οι ερευνητές πιστεύουν πως η αναστολή του EDI3 θα μπορούσε να αυξήσει τη συγκέντρωση της GPC, να επαναφέρει μία κανονική αναλογία GPC / PC. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω μελέτη σχετικά με τον ρόλο των φωσφολιπιδίων στον μεταβολισμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, καθώς τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν είναι περιορισμένα.

➤ **Μεταβολίτες:**

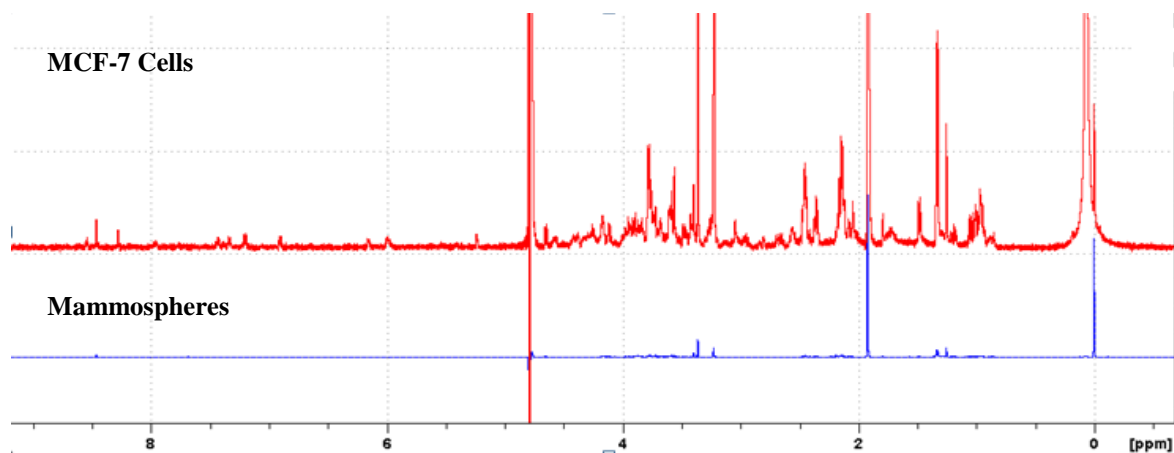


Εικόνα 25: Αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR υδατοδιαλυτής φάσης μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού, MCF-7, όπου: BCAAs: Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, Βαλίνη, Λευκίνη, Ισολευκίνη (Val, Leu, Ileu), Lac: γαλακτικό οξύ, Acetate: οξικό οξύ, N-Acetyl AA [N-Acetyl-aspartate, N-Acetyl-glutamine]: N-Ακετυλ-ασπαραγινικό, N-ακετυλ- γλουταμίνη, Glutamine: γλουταμινικό οξύ, Succinate: Σουκινικό οξύ, Citrate: κιτρικό οξύ, O-P-choline: Ο-φωσφοχολίνη, Choline derivatives: παράγωγα χολίνης, Methanol: μεθανόλη, α -H AA(Amino Acids): α πρωτόνια αμινοξέων

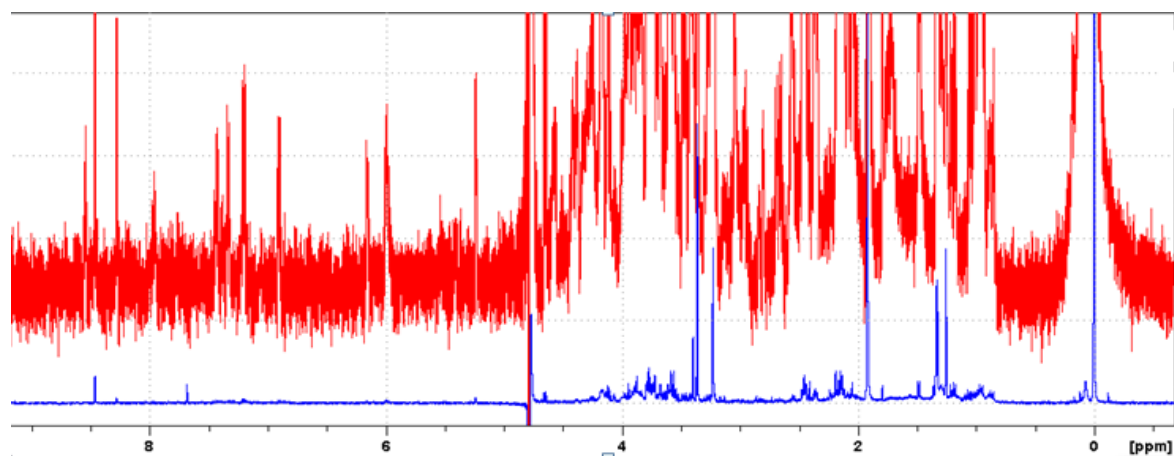


Εικόνα 26: Αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR υδατοδιαλυτής φάσης μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού, MCF-7, όπου: UMP/GTP (Uridine Monophosphate/ Guanosine Triphosphate): Μονοφωσφορική ουριδίνη/ Τριφωσφορική γουανοσίνη, UDP(Uridine Diphosphate)-Glucuronate: UDP-γλυκουρονικό, Tyrosine: τυροσίνη, Formate: φορμικό οξύ

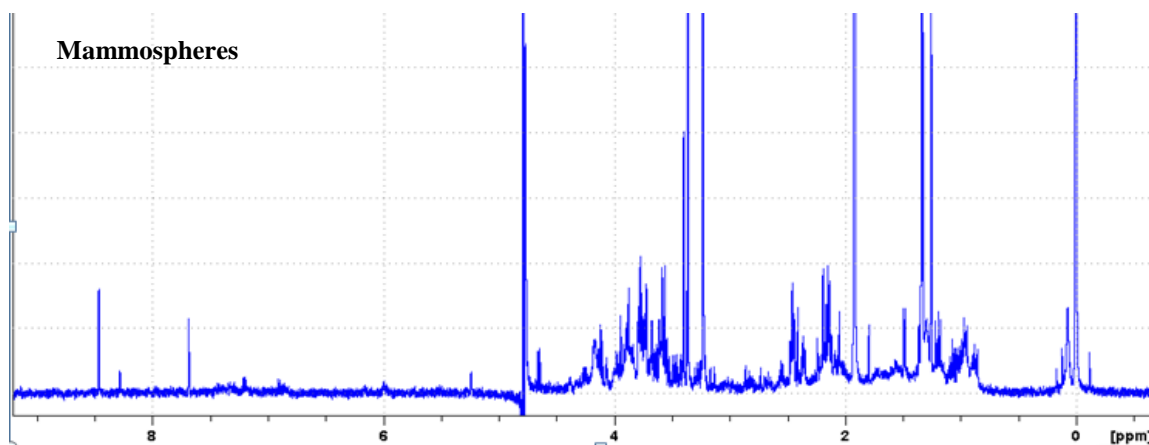
Στις **Εικόνες 25** και **26** διακρίνεται το αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR της υδατοδιαλυτής φάσης των μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού, MCF-7. Παρατηρούνται χαρακτηριστικοί μεταβολίτες, όπως τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs), το γαλακτικό οξύ, παράγωγα της χολίνης καθώς και άλλα αρωματικά και μη αμινοξέα. Από το παραπάνω φάσμα (**Εικόνα 25**), διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση του οξικού οξέος (Acetate) είναι ασυνήθιστα αυξημένη, γεγονός που δε συμφωνεί με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα [122].



Εικόνα 27: Σύγκριση φασμάτων ^1H NMR υδατοδιαλυτής φάσης μη βλαστικών (κόκκινο) και βλαστικών (μπλε) καρκινικών κυττάρων του μαστού, MCF-7.



Εικόνα 28: Αναλογική σύγκριση φασμάτων ^1H NMR υδατοδιαλυτής φάσης μη βλαστικών (κόκκινο) και βλαστικών (μπλε) καρκινικών κυττάρων του μαστού, MCF-7, ως προς TSP.



Εικόνα 29: Αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR υδατοδιαλυτής φάσης βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού (Mammospheres), MCF-7.

Δεν μπορεί να γίνει η σύγκριση του μεταβολικού προφίλ των βλαστικών και μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων, MCF-7, διότι δεν συμφωνούν αναλογικά τα δύο φάσματα. (Εικόνες 27, 28) Ενώ στα φάσματα ^1H NMR και των δύο κυτταρικών τύπων διακρίνονται μεταβολίτες (Εικόνες 25, 26 και 29), η σύγκριση δε μπορεί να είναι αξιόπιστη. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται σε κάποιο πειραματικό σφάλμα, το οποίο προέκυψε κατά τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύγκριση του μεταβολικού και λιπιδιακού προφίλ των βλαστικών και μη βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού, MCF-7, με τη βοήθεια της Μεταβολομικής (Metabolomics) και της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο προφίλ των δύο κυτταρικών τύπων, ιδιαίτερα σε αυτό των λιπιδίων. Τα επίπεδα της χοληστερόλης, των φωσφολιπιδίων και των ακόρεστων λιπαρών οξέων βρέθηκαν μειωμένα στα καρκινικά βλαστοκύτταρα σε σύγκριση με τα μη βλαστικά. Σχετικά με το μεταβολικό προφίλ, δεν πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των δύο κυτταρικών φαινοτύπων, λόγω πειραματικού σφάλματος.

Ωστόσο, η ερμηνεία και η σύνδεση των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας με τον καρκίνο του μαστού δεν είναι πλήρως ξεκάθαρη. Επιπλέον μελέτες κρίνονται απαραίτητες για τη κατανόηση της βιολογίας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού και την εύρεση χαρακτηριστικών μεταβολικών οδών, με στόχο την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στους:

- Ιωάννης Βερίγος, Υποψήφιος Διδάκτορας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Χριστίνα Κωσταρά, Πανεπιστημιακή Υπότροφος, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Δημήτριος Αλίβεργης, Λέκτορας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Αικατερίνη Δήμου, Υποψήφια Διδάκτωρ, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Στην οικογένειά μου

Και στη τριμελή επιτροπή:

Αγγελική Μαγκλάρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Γεώργιος Λεονταρίτης, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ελένη Μπαϊρακτάρη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σας ευχαριστώ θερμά για τη πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές και τον χρόνο που διαθέσατε ώστε να ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη εργασία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1). *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:675-99, The biology of cancer stem cells, Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF.
- 2). *Cell Stem Cell.* 2014 Mar 6;14(3):275-91, Evolution of the cancer stem cell model, Kreso A, Dick JE.
- 3). *Clin Chem.* 2013 Jan;59(1):168-79, Cell plasticity and heterogeneity in cancer, Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL.
- 4). *Science.* 1976 Oct 1;194(4260):23-8, The clonal evolution of tumor cell populations, Nowell PC.
- 5). *Nature.* 2006 Dec 7;444(7120):756-60, Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN.
- 6). *J Natl Cancer Inst.* 2008 May 7;100(9):672-9, Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy, Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC.
- 7). *Nature.* 2009 Apr 9;458(7239):780-3, Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells, Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF.
- 8). *Nat Biotechnol.* 2007 Nov;25(11):1315-21, Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region, Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, Nakamura R, Tanaka T, Tomiyama H, Saito N, Fukata M, Miyamoto T, Lyons B, Ohshima K, Uchida N, Taniguchi S, Ohara O, Akashi K, Harada M, Shultz LD.
- 9). *Cell.* 2009 Sep 4;138(5):822-9, Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution, Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ.
- 10). *Nat Rev Cancer.* 2005 Apr;5(4):311-21, Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research, Huntly BJ, Gilliland DG.
- 11). *Nat Rev Cancer.* 2012 Jan 12;12(2):133-43, Cancer stem cells: an evolving concept, Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ.
- 12). *Nat Rev Cancer.* 2013 Oct;13(10):727-38, Unravelling cancer stem cell potential. Beck B, Blanpain C.

- 13).** *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1990;74:43-7, Stem cell origin of human myeloid blood cell neoplasms, Fialkow PJ.
- 14).** *Nature.* 1994 Feb 17;367(6464):645-8, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice, Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE.
- 15).** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF.
- 16).** *Nature.* 2007 Jan 4;445(7123):106-10, A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice, O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE.
- 17).** *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):396-401, Identification of human brain tumour initiating cells, Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB.
- 18).** *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):1030-7, Identification of pancreatic cancer stem cells, Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM.
- 19).** *Cell Stem Cell.* 2007 Sep 13;1(3):313-23, Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer, Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C.
- 20).** *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10946-51, Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ.
- 21).** *Oncogene.* 2006 Mar 16;25(12):1696-708, Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells, Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L, Tang DG.
- 22).** *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19):9339-44, Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells, Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM.
- 23).** *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jul;13(7):497-512, Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose?, Pattabiraman DR1, Weinberg RA2.
- 24).** *Cell Cycle.* 2008 Jan 1;7(1):45-51, Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells, Rapp UR, Ceteci F, Schreck R.

- 25).** Breast Dis. 2006-2007;26:87-98, Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis, Allan AL, Vantighem SA, Tuck AB, Chambers AF.
- 26).** Cell Res. 2007 Jan;17(1):3-14, Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis, Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y.
- 27).** J Physiol Pharmacol. 2006 Nov;57 Suppl 7:5-16, Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation, Kucia M, Ratajczak MZ.
- 28).** http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/pages/2006chapter9.aspx
- 29).** Eur J Cancer. 2006 Jun;42(9):1219-24, Breast cancer stem cells: an overview, Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG.
- 30).** Development. 1998 May;125(10):1921-30, An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell, Kordon EC, Smith GH.
- 31).** Cancer Res. 1996 Jan 15;56(2):402-4, Contiguous patches of normal human mammary epithelium derived from a single stem cell: implications for breast carcinogenesis, Tsai YC, Lu Y, Nichols PW, Zlotnikov G, Jones PA, Smith HS.
- 32).** J Cell Sci. 1988 May;90 (Pt 1):173-83, A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland, Smith GH, Medina D.
- 33).** Tissue Cell. 1997 Apr;29(2):239-53, Three division-competent, structurally-distinct cell populations contribute to murine mammary epithelial renewal, Chepko G, Smith GH.
- 34).** Microsc Res Tech. 2001 Jan 15;52(2):190-203, Mammary epithelial stem cells, Smith GH, Chepko G.
- 35).** Genes Dev. 2003 May 15;17(10):1253-70, In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells, Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS.
- 36).** Genes Dev. 2002 Mar 15;16(6):693-706, Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties, Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Rønnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW.
- 37).** Trends Endocrinol Metab. 2004 Jul;15(5):193-7, Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor, Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS.
- 38).** Oncogene. 2004 Sep 20;23(43):7274-82, Self-renewal and solid tumor stem cells, Al-Hajj M, Clarke MF.
- 39).** Nature. 2009 Apr 9;458(7239):780-3, Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells, Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ,

Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF.

40). J Natl Cancer Inst. 2008 May 7;100(9):672-9, Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy, Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC.

41). Breast Cancer Res. 2008; 10(2): R25, Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy, Christine M Fillmore and Charlotte Kuperwasser

42). J Natl Cancer Inst. 2010 Nov 3; 102(21): 1637–1652, Prolonged Drug Selection of Breast Cancer Cells and Enrichment of Cancer Stem Cell Characteristics, Anna Maria Calcagno, Crystal D. Salcido, Jean-Pierre Gillet, Chung-Pu Wu, Jennifer M. Fostel, Melanie D. Mumau, Michael M. Gottesman, Lyuba Varticovski, and Suresh V. Ambudkar

43). Cell. 2007 Dec 14;131(6):1109-23, let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells, Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E.

44). J Natl Cancer Inst. 2008 May 7;100(9):672-9, Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy, Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC.

45). Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 18;106(33):13820-5, Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features, Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC,

Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC.

46). J Natl Cancer Inst. 2006 Dec 20;98(24):1777-85, The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation, Phillips TM, McBride WH, Pajonk F.

47). Breast Cancer Res. 2010;12(1):R13, Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment, Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Meng Y, Dekmezian C, Kim K, Pajonk F.

48). Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 9;104(2):618-23, WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells, Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM.

- 49).** Nature. 2009 Apr 9;458(7239):780-3, Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells, Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF.
- 50).** Cancer Res. 2008 Jun 15;68(12):4674-82, Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer, Zhang M, Behbod F, Atkinson RL, Landis MD, Kittrell F, Edwards D, Medina D, Tsimelzon A, Hilsenbeck S, Green JE, Michalowska AM, Rosen JM.
- 51).** Breast Cancer Res Treat. 2011 Jul;128(1):45-55, Cytokeratin 5 positive cells represent a steroid receptor negative and therapy resistant subpopulation in luminal breast cancers, Kabos P, Haughian JM, Wang X, Dye WW, Finlayson C, Elias A, Horwitz KB, Sartorius CA.
- 52).** Semin Cancer Biol. 2008 Aug;18(4):260-7, Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination, Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV.
- 53).** Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Jan;4(1):33-45, CD44: from adhesion molecules to signalling regulators, Ponta H, Sherman L, Herrlich PA.
- 54).** Clin Cancer Res. 2008 Nov 1;14(21):6751-60, CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells, Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q.
- 55).** Trends Cell Biol. 2006 Feb;16(2):79-87, Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression, Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC.
- 56).** J Biol Chem. 2007 Feb 9;282(6):3433-41, Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands, Napier SL, Healy ZR, Schnaar RL, Konstantopoulos K.
- 57).** J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2001 Jul;6(3):287-97, CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression, Bourguignon LY.
- 58).** Reproduction. 2010 Jul;140(1):33-41, Human ovarian cancer stem cells, Bapat SA.
- 59).** J Thorac Oncol. 2010 May;5(5):649-57, CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease-free survival of non-small cell lung carcinomas: a retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forthcoming (seventh) new TNM classification, Lee HJ, Choe G, Jheon S, Sung SW, Lee CT, Chung JH.

- 60).** Clin Cancer Res. 2003 Oct 15;9(13):4906-13, CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer, Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M.
- 61).** Eur J Immunol. 1987 Dec;17(12):1781-5, Evidence that murine hematopoietic cell subset marker J11d is attached to a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor, Pierres M, Naquet P, Barbet J, Marchetto S, Marics I, Devaux C, Barad M, Hyman R, Rougon G.
- 62).** Eur J Immunol. 1978 Aug;8(8):539-51, Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens, Springer T, Galfrè G, Secher DS, Milstein C.
- 63).** Cell Mol Immunol. 2010 Mar;7(2):100-3, CD24: from A to Z, Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y.
- 64).** BMC Cancer. 2011 Jun 16;11:251:1-9, NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression, Zheng J, Li Y, Yang J, Liu Q, Shi M, Zhang R, Shi H, Ren Q, Ma J, Guo H, Tao Y, Xue Y, Jiang N, Yao L, Liu W.
- 65).** FASEB J. 1998 Sep;12(12):1241-51, CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin, Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, Ley K.
- 66).** Cell Stem Cell. 2007 Nov;1(5):555-67, ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome, Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G.
- 67).** Breast Cancer Res Treat. 2012 Nov;136(2):407-17, Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer, Tsang JY, Huang YH, Luo MH, Ni YB, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM
- 68).** Histopathology. 2011 Mar;58(4):608-16, Aldehyde dehydrogenase 1 expression is a predictor of poor prognosis in node-positive breast cancers: a long-term follow-up study, Yoshioka T, Umekita Y, Ohi Y, Souda M, Sagara Y, Sagara Y, Sagara Y, Rai Y, Tanimoto A.
- 69).** Genes Dev. 2003 May 15;17(10):1253-70, In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells, Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS.
- 70).** J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2012 Jun;17(2):111-7, A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity, Shaw FL, Harrison H, Spence K, Ablett MP, Simões BM, Farnie G, Clarke RB.

- 71).** *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2016 Mar;31(1):7-16. Understanding Metabolomics in Biomedical Research, Kim SJ, Kim SH, Kim JH, Hwang S, Yoo HJ.
- 72).** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002 Jan 29; 357(1417): 17–23. Functional genomics: lessons from yeast, Stephen G Oliver
- 73).** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 4;102(40):14458-62, Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops, Catchpole GS, Beckmann M, Enot DP, Mondhe M, Zywicki B, Taylor J, Hardy N, Smith A, King RD, Kell DB, Fiehn O, Draper J.
- 74).** John McMurry (2008), *Οργανική Χημεία Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*.
- 75).** *Anal Biochem*. 2006 Aug 1;355(1):62-70, Metabolomic analysis using optimized NMR and statistical methods, Aranibar N, Ott KH, Roongta V, Mueller L.
- 76).** *J Proteome Res*. 2007 Feb;6(2):459-68, From exogenous to endogenous: the inevitable imprint of mass spectrometry in metabolomics, Want EJ, Nordström A, Morita H, Siuzdak G.
- 77).** *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Jul;43(7):1010-20, Uncovering the metabolomic fingerprint of breast cancer, Oakman C, Tenori L, Biganzoli L, Santarpia L, Cappadona S, Luchinat C, Di Leo A.
- 78).** *Nat Rev Cancer*. 2004 Nov;4(11):891-9, Why do cancers have high aerobic glycolysis?, Gatenby RA, Gillies RJ.
- 79).** *J Bioenerg Biomembr*. 1997 Aug;29(4):345-54, Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis, Dang CV, Lewis BC, Dolde C, Dang G, Shim H.
- 80).** *Cancer Cell*. 2013 Mar 18;23(3):316-31, Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer, Dong C, Yuan T, Wu Y, Wang Y, Fan TW, Miriyala S, Lin Y, Yao J, Shi J, Kang T, Lorkiewicz P, St Clair D, Hung MC, Evers BM, Zhou BP.
- 81).** *Metabolomics* March 2008, Volume 4, Issue 1, pp 13-29, Profiling of central metabolism in human cancer cells by two-dimensional NMR, GC-MS analysis, and isotopomer modeling, Chen Yang, Adam D. Richardson, Andrei Osterman, Jeffrey W. Smith.
- 82).** *Pac Symp Biocomput*. 2007:181-92, Comparative metabolomics of breast cancer, Yang C, Richardson AD, Smith JW, Osterman A.
- 83).** *Metabolomics* 2007b;4:13–29, Profiling of central metabolism in human cancer cells by two dimensional NMR, GC-MS analysis, and isotopomer modelling, Chen Yang, Adam D. Richardson, Andrei Osterman, Jeffrey W. Smith.

- 84).** *Metab Eng.* 2006 Nov;8(6):639-52, Estradiol stimulates the biosynthetic pathways of breast cancer cells: detection by metabolic flux analysis. Forbes NS, Meadows AL, Clark DS, Blanch HW.
- 85).** *Cancer Res.* 2004 Jun 15;64(12):4270-6, Molecular causes of the aberrant choline phospholipid metabolism in breast cancer, Glunde K, Jie C, Bhujwalla ZM.
- 86).** *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Jul; 110(2): 297–307, Central carbon metabolism in the progression of mammary carcinoma, Adam D. Richardson, Chen Yang, Andrei Osterman, Jeffrey W. Smith.
- 87).** *Anticancer Res* 1996;16:1381–8, Variations in energy and phospholipid metabolism in normal and cancer human mammary epithelial cells, Ting YL, Sherr D, Degani H.
- 88).** *J Proteome Res.* 2012 Feb 3;11(2):850-60, Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer-link to patient survival, hormone receptor status, and metabolic profiling, Brockmüller SF, Bucher E, Müller BM, Budczies J, Hilvo M, Griffin JL, Orešič M, Kallioniemi O, Iljin K, Loibl S, Darb-Esfahani S, Sinn BV, Klauschen F, Prinzler J, Bangemann N, Ismaeel F, Fiehn O, Dietel M, Denkert C.
- 89).** *PLoS One* 2011;6(10):e25563, An HR-MAS MR Metabolomics Study on Breast Tissues Obtained with Core Needle Biopsy, MuLan Li , Yonghyun Song , Nariya Cho, Jung Min Chang, Hye Ryoung Koo, Ann Yi, Hyeonjin Kim, Sunghyouk Park , Woo Kyung Moon.
- 90).** *NMR Biomed.* 2012 Nov;25(11):1271-9, Lactate and glycine-potential MR biomarkers of prognosis in estrogen receptor-positive breast cancers, Giskeødegård GF, Lundgren S, Sitter B, Fjøsne HE, Postma G, Buydens LM, Gribbestad IS, Bathen TF.
- 91).** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Sep;86(3-5):477-86, Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis, Yue W, Santen RJ, Wang JP, Li Y, Verderame MF, Bocchinfuso WP, Korach KS, Devanesan P, Todorovic R, Rogan EG, Cavalieri EL.
- 92).** *Metab Eng.* 2006 Nov;8(6):639-52, Estradiol stimulates the biosynthetic pathways of breast cancer cells: detection by metabolic flux analysis, Forbes NS, Meadows AL, Clark DS, Blanch HW.
- 93).** *Anticancer Res.* 1996 May-Jun;16(3B):1381-8, Variations in energy and phospholipid metabolism in normal and cancer human mammary epithelial cells, Ting YL, Sherr D, Degani H.

- 94).** *Cancer Res.* 2002 Apr 1;62(7):1966-70, Metabolic markers of breast cancer: enhanced choline metabolism and reduced choline-ether-phospholipid synthesis, Katz-Brull R, Seger D, Rivenson-Segal D, Rushkin E, Degani H.
- 95).** *Cancer Res.* 1999 Jan 1;59(1):80-4, Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells, Aboagye EO, Bhujwala ZM.
- 96).** *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Sep;104(3):249-55, In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of breast lesions: an update, Tse GM, Yeung DK, King AD, Cheung HS, Yang WT.
- 97).** *Cancer Res.* 2001 Oct 15;61(20):7536-43, Levels of phospholipid metabolites in breast cancer cells treated with antimetabolic drugs: a ³¹P-magnetic resonance spectroscopy study, Sterin M, Cohen JS, Mardor Y, Berman E, Ringel I.
- 98).** *Int J Oncol.* 2005 Jul;27(1):257-63, ¹H-NMR metabolic markers of malignancy correlate with spontaneous metastases in a murine mammary tumor model, Whitehead TL, Monzavi-Karbassi B, Jousheghany F, Artaud C, Elbein A, Kieber-Emmons T.
- 99).** *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74, Hallmarks of cancer: the next generation, Hanahan D, Weinberg RA.
- 100).** *Oncogene.* 2009 May 7;28(18):1960-70, TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells, Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, Toillon RA, Oxombre B, Hondermarck H, Le Bourhis X.
- 101).** *Eur J Biochem.* 1993 Feb 15;212(1):95-9, The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes, Guppy M, Greiner E, Brand K.
- 102).** *Cell Death Differ.* 2014 Jan;21(1):124-35, Metabolic regulation of cancer cell side population by glucose through activation of the Akt pathway, Liu PP, Liao J, Tang ZJ, Wu WJ, Yang J, Zeng ZL, Hu Y, Wang P, Ju HQ, Xu RH, Huang P.
- 103).** *Cell Death Dis.* 2014 Jul 17;5:e1336, Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment, Ciavardelli D, Rossi C, Barcaroli D, Volpe S, Consalvo A, Zucchelli M, De Cola A, Scavo E, Carollo R, D'Agostino D, Forlì F, D'Aguzzo S, Todaro M, Stassi G, Di Ilio C, De Laurenzi V, Urbani A.
- 104).** *J Proteomics.* 2013 Oct 8;91:84-96, The secretome of colon cancer stem cells contains drug-metabolizing enzymes, Emmink BL, Verheem A, Van Houdt WJ, Steller EJ, Govaert KM, Pham TV, Piersma SR, Borel Rinkes IH, Jimenez CR, Kranenburg
- 105).** *PLoS One.* 2014 Jan 7;9(1):e84941, Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy

resistance through hypoxia-resistant metabolism, Liao J, Qian F, Tchabo N, Mhaweche-Fauceglia P, Beck A, Qian Z, Wang X, Huss WJ, Lele SB, Morrison CD, Odunsi K.

106). *J Cell Biochem.* 2014 Feb;115(2):368-79, Energy metabolism characterization of a novel cancer stem cell-like line 3AB-OS, Palorini R, Votta G, Balestrieri C, Monestiroli A, Olivieri S, Vento R, Chiaradonna F

107). *J Biol Chem.* 2011 Sep 16;286(37):32843-53, Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells: preference for hypoxia and high dependency on glycolysis, Zhou Y, Zhou Y, Shingu T, Feng L, Chen Z, Ogasawara M, Keating MJ, Kondo S, Huang P.

108). *Oncotarget.* 2015 Jun 20;6(17):14777-95, Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells, De Luca A, Fiorillo M, Peiris-Pagès M, Ozsvári B, Smith DL, Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Cappello AR, Pezzi V, Lisanti MP1, Sotgia F.

109). *Genes Dev.* 2012 Sep 1;26(17):1926-44, Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells, Janiszewska M, Suvà ML, Riggi N, Houtkooper RH, Auwerx J, Clément-Schatlo V, Radovanovic I, Rheinbay E, Provero P, Stamenkovic I.

110). *Cell Stem Cell.* 2013 Mar 7;12(3):329-41, BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells, Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, Ashton JM, Pei S, Grose V, O'Dwyer KM, Liesveld JL, Brookes PS, Becker MW, Jordan CT.

111). *Oncotarget.* 2015 Oct 13;6(31):30453-71, Mitochondrial mass, a new metabolic biomarker for stem-like cancer cells: Understanding WNT/FGF-driven anabolic signaling, Lamb R, Bonuccelli G1, Ozsvári B1, Peiris-Pagès M, Fiorillo M, Smith DL, Bevilacqua G, Mazzanti CM, McDonnell LA, Naccarato AG, Chiu M, Wynne L, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP.

112). *Oncotarget.* 2014 Jun 30;5(12):4305-19, Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation, Pastò A, Bellio C, Pilotto G, Ciminale V, Silic-Benussi M, Guzzo G, Rasola A, Frasson C, Nardo G, Zulato E, Nicoletto MO, Manicone M, Indraccolo S, Amadori A.

113). *Cell Metab.* 2015 Oct 6;22(4):590-605, MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells, Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, Barneda D, Sellers K, Campos-Olivas R, Graña O, Viera CR, Yuneva M, Sainz B Jr, Heeschen C.

- 114).** Breast Cancer Res Treat. 2014 Aug;146(3):525-34, Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny, Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Reue K, Frohnen P, Chan M, Alhiyari Y, Dratver MB, Pajonk F.
- 115).** Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38):16062-7, Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells, Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M, Popescu R, Della Donna L, Evers P, Dekmezian C, Reue K, Christofk H, Mischel PS, Pajonk F.
- 116).** Breast Cancer Res. 2016; 18: 55, Cancer stem cell metabolism, Maria Peiris-Pagès, Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Richard G. Pestell, Federica Sotgia,corresponding author and Michael P. Lisant.
- 117).** Anal Biochem. 1992 Jul;204(1):118-23, A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH, de Koning W, van Dam K.
- 118).** Villas-Boas, S. G., Nielsen, J., Smedsgaard, J., et al. (2007), Metabolome Analysis: An introduction. Wiley
- 119).** Bacteriol Rev. 1962 Sep; 26(3): 292–335, The amino acid pool in Escherichia Coli, Roy J. Britten and F. T. McClure.
- 120).** Biochem Biophys Res Commun. 1967 Jan 10;26(1):75-81, Selective release of ribonuclease-inhibitor from Bacillus subtilis cells by cold shock treatment, Smeaton JR, Elliott WH.
- 121).** Mol Cancer Ther. 2006 Jan;5(1):187-96, Identification of magnetic resonance detectable metabolic changes associated with inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in human breast cancer cells, Belouèche-Babari M, Jackson LE, Al-Saffar NM, Eccles SA, Raynaud FI, Workman P, Leach MO, Ronen SM.
- 122).** Metabolomics June 2009, 5:199, A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics, Quincy Teng, Wenlin Huang, Timothy W. Collette, Drew R. Ekman, Chalet Tan.
- 123).** NMR Biomed. 2012 Aug;25(8):985-92, Absolute quantification of metabolites in breast cancer cell extracts by quantitative 2D (1) H INADEQUATE NMR, Martineau E, Tea I, Akoka S, Giraudeau P.
- 124).** Anal Bioanal Chem. 2011 Oct;401(7):2133-42, Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells, Martineau E, Tea I, Loaëc G, Giraudeau P, Akoka S.
- 125).** Metabolites. 2016 Jan 15;6(1). pii: E4, Development of an Optimized Protocol for NMR Metabolomics Studies of Human Colon Cancer Cell Lines and First Insight from Testing of the Protocol Using DNA G-Quadruplex Ligands as Novel Anti-

Cancer Drugs, Lauri I, Savorani F, Iaccarino N, Zizza P, Pavone LM, Novellino E, Engelsen SB, Randazzo A.

126). *Metabolomics* March 2007, Volume 3, Issue 1, pp 55-67, Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics, Ching Yu Lin, Huifeng Wu, Ronald S. Tjeerdema, Mark R. Viant.

127). *Anal Biochem.* 2008 Jan 15;372(2):204-12, High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics, Wu H, Southam AD, Hines A, Viant MR.

128). Φυσικοχημεία, Βασική Θεώρηση" Ν. Κατσάνος, Εκδόσεις Παπαζήση, 1999

129). Στοιχεία χημικών διεργασιών, Μάτης Κ. Α.; Μαύρος Π.; Τριανταφυλλίδης Κ. Σ., Εκδόσεις Τζιόλα, 2009

130). <http://www.ygeiaonline.gr/component/k2/item/32589-lyofilivsh>

131). *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):125-38, Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization, Ikonen E.

132). *Science.* 1986 Apr 4;232(4746):34-47, A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, Brown MS, Goldstein JL.

133). *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Dec;25(12):649-55, Cholesterol and breast cancer pathophysiology, Nelson ER, Chang CY, McDonnell DP.

134). *Cell Rep.* 2012 Sep 27;2(3):580-90, Anticancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene, Smith B, Land H.

135). *Biochim Biophys Acta.* 2013 Apr;1835(2):219-29, Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective, Krycer JR, Brown AJ.

136). Holstein, S. A., and Hohl, R. J. (2004) Isoprenoids: Remarkable Diversity of Form and Function. *Lipids* 39, 293–309

137). *Cell.* 2012 Jan 20;148(1-2):244-58, Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway, Freed-Pastor WA, Mizuno H, Zhao X, Langerød A, Moon SH, Rodriguez-Barrueco R, Barsotti A, Chicas A, Li W, Polotskaia A, Bissell MJ, Osborne TF, Tian B, Lowe SW, Silva JM, Børresen-Dale AL, Levine AJ, Bargonetti J, Prives C.

138). *Stem Cells.* 2012 Jul;30(7):1327-37, Mevalonate metabolism regulates Basal breast cancer stem cells and is a potential therapeutic target, Ginestier C, Monville F, Wicinski J, Cabaud O, Cervera N, Josselin E, Finetti P, Guille A, Larderet G, Viens P, Sebti S, Bertucci F, Birnbaum D, Charafe-Jauffret E.

- 139).** *J Cancer Res Ther.* 2016 Apr-Jun;12(2):725-30, Investigation of simvastatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in cancer stem cells of MCF-7, Afzali M, Vatankhah M, Ostad SN.
- 140).** *Oncogene.* 2012 Nov 29;31(48):4967-78, Targeting tumor cell metabolism with statins, Clendening JW, Penn LZ.
- 141).** *Clin Cancer Res.* 2012 Jul 1;18(13):3524-31, Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents, Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G.
- 142).** *J Natl Cancer Inst.* 2011 Oct 5;103(19):1461-8, Statin prescriptions and breast cancer recurrence risk: a Danish nationwide prospective cohort study, Ahern TP, Pedersen L, Tarp M, Cronin-Fenton DP, Garne JP, Silliman RA, Sørensen HT, Lash TL.
- 143).** *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Jun;109(3):573-9, Post-diagnosis statin use and breast cancer recurrence in a prospective cohort study of early stage breast cancer survivors, Kwan ML, Habel LA, Flick ED, Quesenberry CP, Caan B.
- 144).** *N Engl J Med.* 2012 Nov 8;367(19):1792-802, Statin use and reduced cancer-related mortality, Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE.
- 145).** *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Nov;130(2):387-98. Resveratrol suppresses growth of cancer stem-like cells by inhibiting fatty acid synthase, Pandey PR, Okuda H, Watabe M, Pai SK, Liu W, Kobayashi A, Xing F, Fukuda K, Hirota S, Sugai T, Wakabayashi G, Koeda K, Kashiwaba M, Suzuki K, Chiba T, Endo M, Fujioka T, Tanji S, Mo YY, Cao D, Wilber AC, Watabe K.
- 146).** *Oncogene.* 2013 Dec 5;32(49):5512-21, PPAR γ maintains ERBB2-positive breast cancer stem cells, Wang X, Sun Y, Wong J, Conklin DS.
- 147).** *Stem Cells.* 2015 Jan;33(1):35-44, Lipid droplets: a new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging, Tirinato L, Liberale C, Di Franco S, Candeloro P, Benfante A, La Rocca R, Potze L, Marotta R, Ruffilli R, Rajamanickam VP, Malerba M, De Angelis F, Falqui A, Carbone E, Todaro M, Medema JP, Stassi G, Di Fabrizio E.
- 148).** *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5506-11, Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties, Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG.
- 149).** *Cell Stem Cell.* 2017 Mar 2;20(3):303-314.e5, Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells, Li J, Condello S, Thomes-Pepin J, Ma X, Xia Y, Hurley TD, Matei D, Cheng JX.

150). Cancer Res. 2002 Apr 1;62(7):1966-70, Metabolic markers of breast cancer: enhanced choline metabolism and reduced choline-ether-phospholipid synthesis. Katz-Brull R, Seger D, Rivenson-Segal D, Rushkin E, Degani H.

151). Cancer Res. 1999 Jan 1;59(1):80-4, Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells. Aboagye EO, Bhujwala ZM.

152). Cancer Res. 2005 Oct 15;65(20):9369-76, Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. Iorio E, Mezzanzanica D, Alberti P, Spadaro F, Ramoni C, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Pavan A, Dolo V, Canevari S, Podo F.

153). Cancer Lett. 1994 Oct 28;86(1):11-21, Phospholipases A2 in ras-transformed and immortalized human mammary epithelial cells. Guthridge CJ, Stampfer MR, Clark MA, Steiner MR.

154). Br J Cancer. 1994 Jun;69(6):1166-70, Overexpression of group II phospholipase A2 in human breast cancer tissues is closely associated with their malignant potency. Yamashita S, Yamashita J, Ogawa M.

155). Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 May 22;109(21):8155-60, Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 drives tumor cell migration and metastasis. Stewart JD, Marchan R, Lesjak MS, Lambert J, Hergenroeder R, Ellis JK, Lau CH, Keun HC, Schmitz G, Schiller J, Eibisch M, Hedberg C, Waldmann H, Lausch E, Tanner B, Sehouli J, Sagemueller J, Staude H, Steiner E, Hengstler JG.

- *Άλλες πηγές:*

https://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page