



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

Π.Μ.Σ. «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες»
Κατεύθυνση: Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φαρμακολογία

**«*IN VITRO* ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΑΝΤΙΨΥΧΩΣΙΚΩΝ ΑΛΟΠΕΡΙΔΟΛΗ, ΣΟΥΛΠΙΡΙΔΗ ΚΑΙ ΚΛΟΖΑΠΙΝΗ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ
ΣΕΙΡΕΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ»**

**ΚΥΡΓΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2017-2018, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες», υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κας Κωνσταντή Μαρίας, Διευθύντριας του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα Κωνσταντή Μαρία, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Ιδιαίτερα θέλω να την ευχαριστήσω για τον χρόνο, τις γνώσεις, την καθοδήγηση της και πάνω απ'όλα για την συμπαράσταση, την υπομονή και την έμπρακτη βοήθεια της προκειμένου να ολοκληρωθεί αυτή η μελέτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Παππά Περικλή, για την βοήθεια που μου προσέφερε. Ήταν πάντα πρόθυμος να απαντήσει σε κάθε απορία μου και συνέβαλλε σημαντικά στην εξεύρεση λύσεων στις όποιες δυσκολίες παρουσιαζόταν. Τον ευχαριστώ επίσης για τις χρήσιμες υποδείξεις του στις κυτταροκαλλιέργειες.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Λεονταρίτη Γεώργιο, για τον χρόνο που αφιέρωσε σε απορίες μου, για την καθοδήγηση του σε πειραματικές τεχνικές καθώς και για τις επιστημονικές συζητήσεις που με βοήθησαν να κατανοήσω και να δω με μία άλλη οπτική την έρευνα. Το συνεχές ενδιαφέρον του συνέβαλε σημαντικά στην περάτωση της μελέτης αυτής.

Οφείλω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα και φίλη μου Ειρήνη-Χριστίνα Ανδριοπούλου για την απεριόριστη βοήθεια, επιμονή και υπομονή που έδειξε όλο το διάστημα της συνεργασίας μας. Με εκπαίδευσε σε όλες τις τεχνικές με τον καλύτερο τρόπο και με βοήθησε να γίνω καλύτερη και υπεύθυνη. Πάνω απ'όλα την ευχαριστώ διότι ήταν πάντα δίπλα μου να μου λύσει απορίες, να συζητήσουμε τυχόν προβλήματα που παρουσιαζόταν και σίγουρα η συμβολή της στην ολοκλήρωση της μελέτης μου είναι ιδιαίτερα σημαντική.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτωρ Ναυσικά Πούλια και την φοιτήτρια Αλεξάνδρα Πολύζου για την στήριξη και βοήθεια τους καθ' όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου έρευνας. Μαζί με την υποψήφια διδάκτορα Ειρήνη- Χριστίνα

Ανδριοπούλου μου προσέφεραν ένα ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον εργασίας και πάρα πολλές όμορφες στιγμές σε προσωπικό επίπεδο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας της κας Κωνσταντής καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας για την άριστη συνεργασία μας και την βοήθεια τους. Όλοι συνέβαλλαν με τον δικό τους τρόπο στην ολοκλήρωση της μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Καρκίνος: Ιστορική αναδρομή.....	7
1.2 Καρκίνος.....	8
1.3 Καρκίνος του πνεύμονα	13
1.3.1 Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (<i>non-small cell lung cancer, NSCLC</i>)... 17	
1.3.1.1 Φαρμακευτικές προσεγγίσεις του NSCLC.....	18
1.4 Σχιζοφρένεια και καρκίνος.....	23
1.4.1 Εισαγωγή στη Σχιζοφρένεια.....	23
1.4.2 Συσχέτιση των νευροδιαβιβαστών.....	24
1.4.2.1 Η υπόθεση της ντοπαμίνης.....	25
1.4.2.2 Η υπόθεση του γλουταμικού	27
1.4.3 Φαρμακευτική αγωγή κατά της σχιζοφρένειας.....	27
1.4.4 Ποσοστό εμφάνισης καρκίνου σε ασθενείς με σχιζοφρένεια.....	34
ΣΚΟΠΟΣ.....	36
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	38
2.1.1 Ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών	39
2.1.2 Αποθήκευση των κυττάρων στο υγρό άζωτο (Κρυοσυντήρηση)-Ανασύσταση των κυττάρων από το υγρό άζωτο.....	39
2.1.3 Επανακαλλιέργεια κυττάρων	40
2.1.4 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	41
2.2 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση Σουλφοροδαμίνης Β (<i>SRB assay</i>) ..	43
2.3 Κυτταρομετρία ροής (<i>Flow Cytometry</i>)	45
2.3.1 Ανάλυση της απόπτωσης μέσω της δοκιμασίας annexin V- PI (<i>Propidium Iodine</i>)	45
2.4. Φαρμακολογικοί Χειρισμοί.....	47
2.5. Στατιστική Ανάλυση.....	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49

3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των αντιψυχωσικών φαρμάκων στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα	50
3.1.1. Επίδραση του τυπικού αντιψυχωσικού αλοπεριδόλη στην κυτταρική επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, A549 και H1299.....	51
3.1.2. Επίδραση του τυπικού αντιψυχωσικού σουλπριδίου στην κυτταρική επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, A549 και H1299	55
3.1.3 Επίδραση του άτυπου αντιψυχωσικού κλοζαπίνης στην κυτταρική επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, A549 και H1299.....	59
3.2. Διερεύνηση του μηχανισμού αρνητικής επίδρασης στην κυτταρική ανάπτυξη των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλπριδίου και κλοζαπίνης σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα.....	63
3.2.1 Επίδραση των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλπριδίου και κλοζαπίνης στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549	64
3.2.2 Επίδραση των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλπριδίου και κλοζαπίνης στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα H1299	65
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	67
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	78
ABSTRACT.....	79
Βιβλιογραφία.....	80

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος: Ιστορική αναδρομή

Ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου στον κόσμο μετά από τις καρδιαγγειακές παθήσεις και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) 1 στους 6 θανάτους οφείλεται στον καρκίνο. Ο καρκίνος όμως δεν είναι μια σύγχρονη ασθένεια. Ο Ιπποκράτης (460- 370 π.Χ.), ο πατέρας της Ιατρικής, ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε αυτόν τον όρο για να περιγράψει όγκους, αλλά δεν είναι αυτός που ανακάλυψε αυτή την ασθένεια. Τα απολιθωμένα οστά και οι μούμιες της αρχαίας Αιγύπτου δείχνουν ενδείξεις όγκων και μια γραπτή περιγραφή του καρκίνου βρέθηκε σε έναν αιγυπτιακό πάπυρο, που χρονολογείται από το 1600 π.Χ. (Sudhakar 2009)

Σε όλη τη διάρκεια της ιστορίας έχουν εκφραστεί διάφορες θεωρίες για την πρόκληση της νόσου όπως παραδείγματος χάριν ο θυμός των θεών ή κάποιος ερεθισμός. Αυτές οι θεωρίες δεν είχαν αμφισβητηθεί μέχρι την Αναγέννηση, όταν ο Γαλιλαίος και ο Νεύτωνας άρχισαν να χρησιμοποιούν επιστημονικές μεθόδους θέτοντας τα θεμέλια για τη σύγχρονη επιστημονική μελέτη της νόσου. Κατά τη διάρκεια του 18^{ου} αιώνα έγιναν τρεις διορατικές παρατηρήσεις που συνέβαλλαν στη γέννηση της επιδημιολογίας του καρκίνου. Πρώτον, το 1713 ο Bernardino Ramazzini, Ιταλός γιατρός, παρατήρησε την υψηλή συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού και την απουσία καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις καλόγριες. Αυτή ήταν η πρώτη ένδειξη ότι οι ορμόνες και τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον καρκίνο. Στη συνέχεια, το 1775 ο Percival Pott, Άγγλος χειρουργός, ανέφερε την εμφάνιση καρκίνου των όρχεων σε καθαριστές καπνοδόχων λόγω της συλλογής αιθάλης στην περιοχή του οσχέου. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη δημιουργία και εγκαθίδρυση μέτρων δημόσιας υγείας για τη μείωση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου κατά την εργασία και είναι η πρώτη αναφορά ότι ο καρκίνος μπορεί να προκληθεί από περιβαλλοντικό καρκινογόνο παράγοντα. Η τελευταία παρατήρηση αποτελεί και την πρώτη συσχέτιση της χρήσης του καπνού με τον καρκίνο. Συγκεκριμένα, το 1761 δημοσιεύεται το βιβλίο του βοτανολόγου John Hill με τίτλο «*Προειδοποιήσεις κατά της υπερβολικής χρήσης του καπνού*», θέτοντας τα θεμέλια για την έκθεση που εκδόθηκε το 1964 από τη συμβουλευτική επιτροπή του Γενικού Χειρουργού των Ηνωμένων Πολιτειών με τίτλο «*Κάπνισμα και Υγεία*», όπου σε αυτήν την έκθεση αναφέρεται ότι το κάπνισμα προκαλεί καρκίνο του πνεύμονα (Hajdu 2011), (David and R. 2006).

Κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα τα κύτταρα θεωρούνταν τα σημαντικότερα στοιχεία των καλοηθών και κακοηθών όγκων, λάμβαναν χώρα προ-εγχειρηματικές μικροσκοπικές διαγνώσεις και οι καρκίνοι ταξινομούσαν σε ,διάφορους τύπους (Hajdu 2012). Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι ο καρκίνος μπορεί να προκληθεί από την επίδραση εξωγενών παραγόντων (καρκινογόνες ουσίες) όπως το κάπνισμα, η ακτινοβολία, η διατροφή και τα χημικά. Επίσης, κατανόησαν καλύτερα τις λειτουργίες των γονιδίων και πως μπορούν να υποστούν μεταλλάξεις λόγω της έκθεσης στις καρκινογόνες ουσίες. Η συσχέτιση ανωμαλιών με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου επέτρεψε στους επιστήμονες να εντοπίζουν άτομα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κάποιου ειδικού τύπου καρκίνου (Sudhakar 2009).

1.2 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μία πολυπαραγοντική νόσος εμφανίζοντας μεταβλητότητα στην παθογένεια , ανάπτυξη και έκβαση από τον έναν ασθενή στον άλλο. Ανάλογη ετερογένεια και μεταβλητότητα υπάρχει σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Ο καρκίνος είναι μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων κατά τη διάρκεια των οποίων τα κύτταρα υφίστανται αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και τους προσδίδουν ιδιότητες ώστε να αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα και τους μηχανισμούς της απόπτωσης, διηθώντας τελικά απομακρυσμένους ιστούς (μεταστάσεις) (Merlo LM 2006).

Ο καρκινικός όγκος, που δημιουργείται μπορεί να είναι ασυμπτωματικός για μεγάλο χρονικό διάστημα, εντούτοις, τελικά θα προκαλέσει την εμφάνιση πολλαπλών συμπτωμάτων ανάλογα με τη θέση, το μέγεθος και την εξάπλωση στον οργανισμό. Οι καρκινικοί όγκοι κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες με κοινά μορφολογικά γνωρίσματα, με σημαντική διαφορά ότι οι καλοήθεις όγκοι παραμένουν περιορισμένοι στον ιστό όπου δημιουργήθηκαν ενώ οι κακοήθεις όγκοι έχουν την δυνατότητα να διηθούνται σε άλλους φυσιολογικούς ιστούς με συνέπεια την εξάπλωση τους (Μετάσταση) (Steeg 2006). Παρόλα αυτά η διήθηση και η εξάπλωση αποτελούν, σε ορισμένες περιπτώσεις, ιδιότητες και μη κακοηθών καταστάσεων όπως η ενδομητρίωση, μια ασθένεια στην οποία κύτταρα του ενδομητρίου μεταναστεύουν σε άλλες ανατομικές περιοχές, εισβάλλουν σε νέους ιστούς, διατηρώντας μία ιστολογικά καλοήγη εμφάνιση (Wilbur, Shih et al. 2017). Επίσης, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι υπάρχουν κύτταρα που φέρουν ένα ποσοστό μη σιωπηλών

σωματικών μεταλλάξεων χωρίς να αποκτούν κακοήθη χαρακτηριστικά (Martincorena, Roshan et al. 2015).

Ως ογκογένεση ορίζεται η διαδικασία, που οδηγεί σε γενετικές μεταλλάξεις, προκαλούμενες από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες. Από εννοιολογικής άποψης χωρίζεται σε διάφορα, ξεχωριστά στάδια. Πρώτο στάδιο αποτελεί η έναρξη της νεοπλασίας (initiation), όπου παρατηρείται μία μη αναστρέψιμη γενετική αλλαγή. Για την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου ακολουθεί το στάδιο της προαγωγής (promotion). Σε αυτό το στάδιο το αρχικό κύτταρο, που έχει υποστεί κάποια μεταλλαγή επεκτείνεται κλωνικά με αποτέλεσμα το σχηματισμό κυτταρικής μάζας. Η προαγωγή είναι μία διαδικασία κατά την οποία χημικοί παράγοντες διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό του αρχικού νεοπλάσματος. Επόμενο στάδιο αποτελεί η αύξηση των κυττάρων του όγκου (progression). Το στάδιο αυτό αναφέρεται στη διαδικασία απόκτησης πρόσθετων μεταλλάξεων, που οδηγούν σε κακοήθεια και προσδίδουν έναν μεταστατικό φαινότυπο. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου ενεργοποιείται ένας «αγγειογόνος διακόπτης» προκαλώντας την εκβλάστηση νέων αγγείων που βοηθούν στην ανάπτυξη του όγκου μέσω της μεταφοράς των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Το νεόπλασμα αποκτά σταδιακά την ικανότητα της διείσδυσης σε άλλους ιστούς με αποτέλεσμα την δημιουργία μεταστάσεων. (MARTINEZ, PARKER et al. 2003), (Hanahan and Weinberg 2011), (Wallig 2013).

Έχουν αναφερθεί πάνω από 100 διαφορετικά είδη καρκίνου στον άνθρωπο (Luch 2005). Πολλοί τύποι προκύπτουν από ένα μόνο κύτταρο ή από μικρό αριθμό κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν κάποιου είδους μετάλλαξη (Nowell 1976). Στη βιολογία του καρκίνου χρησιμοποιείται ο όρος «μεταλλάξεις οδηγού» για να χαρακτηριστούν οι γενετικές μεταλλάξεις, που εκκινούν την καρκινογένεση (Vogelstein, Papadopoulos et al. 2013). Υπάρχουν δύο μεγάλες τάξεις γονιδίων, που φέρουν αυτού του τύπου τις μεταλλάξεις, αυτή των ογκογονιδίων και των γονιδίων καταστολής όγκων. Αυτές οι αλλαγές προκύπτουν συνήθως σε σωματικά κύτταρα και μία μόνο γενετική αλλαγή δεν είναι επαρκής για την ανάπτυξη ενός κακοήθη όγκου. Οι όγκοι διαθέτουν κυτταρογενετικά διαφορετικούς κλώνους, που προκύπτουν από το αρχικό μετασηματισμένο κύτταρο λόγω δευτερογενών ή τριτογενών γενετικών μεταλλάξεων. Εκτός από τον αρχικό κλώνο και τους υποκλώνους, οι ογκοί μπορεί να περιέχουν και προγονικά καρκινικά κύτταρα με διαφορετικές γενετικές αλλοιώσεις (Croce 2008).

Τα ογκογονίδια κωδικοποιούν πρωτεϊνικά προϊόντα ικανά να αλλάζουν τον φαινότυπο ενός κυττάρου. Αρχικά, τα ογκογονίδια αναγνωρίστηκαν ως μετασηματισμένα γονίδια

ρετροιών, αλλά στη συνέχεια ανακαλύφθηκε πως ήταν γονίδια φυσιολογικών κυττάρων προερχόμενα από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, που είχαν μολυνθεί στο παρελθόν από κάποιον ρετροϊό (Wallig 2013). Τα προϊόντα των ογκογονιδίων ταξινομούνται στις εξής έξι κατηγορίες: μεταγραφικοί παράγοντες, παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, αυξητικοί παράγοντες και οι υποδοχείς αυτών, παράγοντες μεταγωγής σημάτων και ρυθμιστές της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων λόγω μεταλλαγών σε επίπεδο χρωμοσώματος ή λόγω της αύξησης αντιγράφων ογκογονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση των κυττάρων, που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις, τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τελικά, την εμφάνιση καρκίνου (Croce 2008).

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι ρυθμιστικά γονίδια, τα οποία αναστέλλουν ή περιορίζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Ανακαλύφθηκαν το 1969, όταν ο Henry Harris και οι συνεργάτες του παρατήρησαν πως η σύντηξη φυσιολογικών κυττάρων με κακοήθη κύτταρα (λόγω μεταλλαγμένων ογκογονιδίων) είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια ογκογονικότητας στα σχηματιζόμενα υβρίδια,, αποτελέσματα που έδειξαν την ύπαρξη γονιδίων που καταστέλλουν την ογκογονικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. Τα προϊόντα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ταξινομούνται στις εξής πέντε κατηγορίες:

- α) κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες
- β) υποδοχείς εκκρινόμενων ορμονών
- γ) πρωτεΐνες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου
- δ) πρωτεΐνες προαγωγής της απόπτωσης
- ε) ένζυμα για την επιδιόρθωση του DNA (Harvey Lodish 2000)

Όταν τα γονίδια αυτά λειτουργούν φυσιολογικά, η δράση τους αντιτίθεται στη δράση των ογκογονιδίων. Ενώ, τα ογκογονίδια πρέπει να ενεργοποιηθούν για να επάγουν την καρκινογένεση, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια πρέπει να είναι αδρανοποιημένα. Η απενεργοποίηση αυτών μπορεί να επιτευχθεί με απώλεια τμήματος των χρωμοσωμάτων, με τη διαγραφή ενός γονιδίου, λόγω ανασυνδυασμού ή σημειακής μετάλλαξης. Η ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης σε σωματικά κύτταρα, αντίθετα, μεταλλαγμένες μορφές ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να υπάρχουν σε γαμετικά κύτταρα με αποτέλεσμα την κληρονομία αυτών των μεταλλάξεων. Για την εμφάνιση ενός καρκινικού όγκου λόγω μετάλλαξης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, είναι αναγκαία η αδρανοποίηση τους και στα δύο αλληλόμορφα (Wallig 2013).

Πίνακας 1: Παραδείγματα ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ

Αυξητικοί Παράγοντες (Sis)

Υποδοχείς Αυξητικών Παραγόντων (EGFR, PDGFR, HER2/neu)

Παράγοντες Μεταγωγής Σήματος (ras, abl)

Μεταγραφικοί Παράγοντες (myc)

ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Κυτταροπλασματικές Πρωτεΐνες (APC/b-catenin, PTEN, Smad 2)

Προαγωγοί της Απόπτωσης (p53, bcl-2, bcl-x, bax)

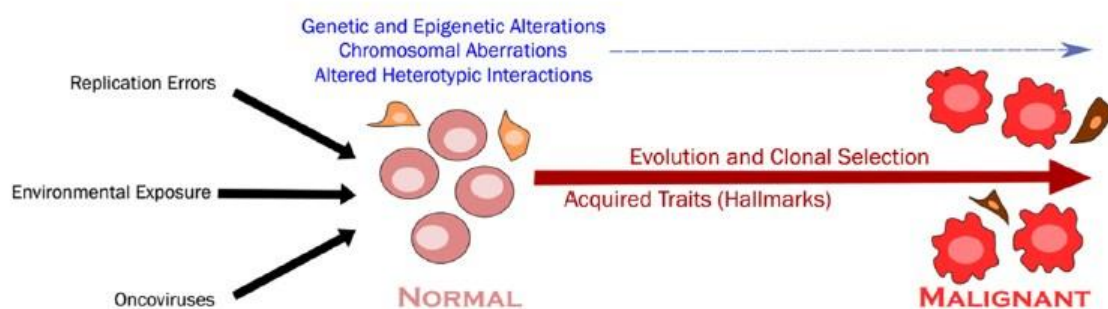
Μεταγραφικοί Παράγοντες (Rb1, p53, Brac1)

Ένζυμα επιδιόρθωσης DNA (XP, ATM, Brca1, Brca2, MLH1)

Για πάρα πολλά χρόνια, ο καρκίνος θεωρήθηκε ως μια ασθένεια οφειλόμενη κυρίως σε μεταλλάξεις σε σημαντικά γονίδια. Παρόλα αυτά, τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έρευνες στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου έδειξαν ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις συνδέονται με σχεδόν κάθε στάδιο ανάπτυξης του όγκου (Feinberg 2013). Η γενετική οδός προς τον καρκίνο είναι σχετικά απλή σε σύγκριση με την επιγενετική πορεία, η οποία καθορίζεται από τη δομή της χρωματίνης και αλλαγές σε αυτή όπως η μεθυλίωση του DNA, αλλαγές και τροποποιήσεις σε επίπεδο ιστονών, αναδιαμορφώσεις νουκλεοσωμάτων και μικρών ρυθμιστικών μη κωδικοποιήσιμων RNA (tRNAs, rRNAs, snRNAs) (Sharma, Kelly et al. 2010). Οι επιγενετικές τροποποιήσεις παρέχουν ένα τρόπο στα κύτταρα να ελέγχουν και να ρυθμίζουν τη γονιδιακή δραστηριότητα χωρίς να αλλάζουν μόνιμα την αλληλουχία του DNA. Επίσης, μπορεί οι τροποποιήσεις αυτές να είναι απαραίτητες για την κανονική ανάπτυξη και διατήρηση των ιστο-ειδικών προτύπων γονιδιακής έκφρασης, όμως διαταραχή αυτών οδηγεί σε αλλαγή της φυσιολογικής λειτουργίας των γονιδίων και την εμφάνιση κακοήθειας. Τέτοιες μεταβολές πιστεύεται πως συμβαίνουν σε πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης του καρκίνου και γι' αυτό το λόγο αναφέρονται ως βασικοί συντελεστές στην πρόοδο της καρκινογένεσης (Kanwal and Gurta 2012).

Οι γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί δεν αποτελούν ξεχωριστά γεγονότα στον καρκίνο, αντιθέτως συνυπάρχουν και εκμεταλλεύονται ο ένας τον άλλον κατά την ογκογένεση. Μεταβολές στους επιγενετικούς μηχανισμούς μπορεί να οδηγήσουν σε γενετικές μεταλλάξεις και οι οποίες όταν συμβαίνουν σε επιγενετικούς ρυθμιστές έχουν ως αποτέλεσμα τροποποιήσεις στην επιγενετική ρύθμιση (You and Jones 2012).

Η εμφάνιση κακοήθειας δεν είναι αποτέλεσμα μόνο γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων στα κύτταρα αλλά και αλληλεπίδρασης με εξωτερικούς παράγοντες. Στο περιβάλλον υπάρχουν φυσικά καρκινογόνα, όπως η υπεριώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία καθώς και χημικά καρκινογόνα, όπως τα συστατικά του τσιγάρου, οι αφλατοξίνες στα τρόφιμα και το αρσενικό σε μολυσμένο πόσιμο νερό. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου αποτελούν και οι λοιμώξεις από ορισμένους ιούς (ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV)) και βακτήρια (ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*)). Επιπλέον, η παχυσαρκία, η κακή διατροφή, η έλλειψη σωματικής άσκησης και η κατανάλωση αλκοόλ αποτελούν παράγοντες, που επηρεάζουν την εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου αυξάνεται δραματικά και με την ηλικία. Στις μεγαλύτερες ηλικίες οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA δεν λειτουργούν αποτελεσματικά με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων.



Εικόνα 1: Διαδικασία μετασχηματισμού φαινοτυπικά φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα. (Fouad and Aanei 2017)

Σύμφωνα με την έκθεση του Εθνικού Προγράμματος Τοξικολογίας των Ηνωμένων Πολιτειών για τα καρκινογόνα, υπάρχουν περισσότερες από 200 γνωστές καρκινογόνες ουσίες που προκαλούν καρκίνο στους ανθρώπους. Παγκοσμίως, 1 στους 6 θανάτους προκαλείται από καρκίνο, ένα ποσοστό που είναι πολύ πιθανό να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια λόγω της μεγαλύτερης έκθεσης των ανθρώπων σε καρκινογόνες ουσίες. Επιπλέον, ο σημερινός τρόπος ζωής καθώς και η σύγχρονη διατροφή επηρεάζουν θετικά αυτό το ποσοστό. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου είναι το κάπνισμα και εκτιμάται πως είναι υπεύθυνο για το 22% των θανάτων προκαλούμενων από καρκίνο. Το κάπνισμα είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας πρόκλησης καρκίνου του πνεύμονα. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την

κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο και μόλις το 2012 παρατηρήθηκαν 1,69 εκατομμύρια θάνατοι λόγω αυτού του τύπου.

1.3 Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει μεγάλη ιστολογική ετερογένεια λόγω των διαφορετικών τύπων κυττάρων από τους οποίους μπορεί να προέλθει, όπως το βρογχικό επιθήλιο, τα βρογχοειδή, τις κυψελίδες ή τους βρογχικούς βλεννογόνους αδένες (Zamay, Zamay et al. 2017). Παρόλο που χαρακτηρίζεται από άφθονη γενετική ποικιλομορφία, οι γενετικές αλλοιώσεις επηρεάζουν μια κοινή ομάδα ογκογόνων οδών σηματοδότησης. Κατά την ογκογένεση παρατηρείται η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και η αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Cooper, Lam et al. 2013). Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα οι γενετικές αλλοιώσεις αποκτώνται κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου και σπάνια κληρονομούνται.

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53*, *KRAS* και *EGFR* είναι κοινές στον καρκίνο του πνεύμονα. Το γονίδιο *TP53* (ογκοκατασταλτικό γονίδιο) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53, η οποία συνδέεται απευθείας με το DNA ρυθμίζοντας την κυτταρική ανάπτυξη και ελέγχοντας την καταστροφή του DNA. Η δράση της πρωτεΐνης p53 οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή σε απόπτωση. Η απώλεια της λειτουργικότητας της p53 λόγω κάποιας μεταλλαγής, έχει ως αποτέλεσμα την συνεχιζόμενη ανεξέλεγκτη διαίρεση των κυττάρων οδηγώντας στην ανάπτυξη όγκου.

Τα γονίδια *KRAS* και *EGFR* ανήκουν στην κατηγορία των ογκογονιδίων. Το *KRAS* είναι μια μικρή GTPάση, η οποία συμμετέχει στον έλεγχο της μεταγωγής σημάτων ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων (Cooper, Lam et al. 2013). Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη Ras ενεργοποιεί στη συνέχεια δύο σημαντικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος αυτό των MAP κινάσεων και το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR (Karnoub and Weinberg 2008). Τα πρώτο σήμα για την ενεργοποίηση των μονοπατιών μέσω της πρωτεΐνης Ras προκαλείται από την σύνδεση αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς τους.

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος. Ο EGFR είναι μία διαμεμβρανική κινάση τυροσίνης, που ενεργοποιείται με την σύνδεση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και ρυθμίζει πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο

πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η επιβίωση και διαφοροποίηση αυτών, η αγγειογένεση, η εισβολή και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Scagliotti, Selvaggi et al. 2004) (Yarden and Sliwkowski 2001; Sordella, Bell et al. 2004). Το γονίδιο *EGFR* αποτελεί το δεύτερο πιο συχνά μεταλλαγμένο ογκογονίδιο στον καρκίνο του πνεύμονα μετά το *KRAS* στις Ηνωμένες Πολιτείες, περίπου 15% στους Καυκάσιους και τους Αφροαμερικανούς και είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στους Ασιατικούς πληθυσμούς (60%) (Campbell, Alexandron et al. 2016), (Li, Choi et al. 2016).

Μεταλλάξεις στα γονίδια *KRAS* και *EGFR* οδηγούν στη μόνιμη ενεργοποιημένη μορφή των αντίστοιχων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα τα κύτταρα να λαμβάνουν συνεχώς σήματα για πολλαπλασιασμό, οδηγώντας στον σχηματισμό όγκου. Επίσης, σε περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα, έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις σε πολλά άλλα γονίδια (π.χ. *BRAF*, *ALK*, *PTEN*), που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης (Cooper, Lam et al. 2013).

Ο καρκίνος του πνεύμονα προέρχεται από φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία έχουν υποστεί μεταλλαγές με αποτέλεσμα την ανάπτυξη όγκου. Τα πιο κοινά συμπτώματα είναι βήχας (με ή χωρίς αίμα), πόνος στο στήθος, απώλεια βάρους, δύσπνοια και βραχνάδα. Στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα μπορεί ο ασθενής να μην εμφανίσει έντονα συμπτώματα, αλλά εάν διαγνωστεί νωρίς μπορεί να αντιμετωπιστεί χειρουργικά έχοντας ένα καλό ποσοστό επιβίωσης. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις η διάγνωση γίνεται στα τελευταία στάδια της νόσου, όπου η χειρουργική επέμβαση δεν είναι δυνατή και έχουν προκληθεί μεταστάσεις (Kanwal, Ding et al. 2017).

Οι περισσότεροι άνθρωποι, που αναπτύσσουν καρκίνο του πνεύμονα έχουν στο ιστορικό τους ένα κοινό χαρακτηριστικό, την μακροχρόνια χρήση προϊόντων καπνού. Από πολύ παλιά τα προϊόντα του φυτού είτε καπνίζονταν είτε μασιόνταν. Παρόλα αυτά, ο καπνός έγινε ευρέως διαθέσιμος με τη μορφή των τσιγάρων στα μέσα του 18^{ου} αιώνα. Η πρώτη αναφορά ότι ο καπνός των τσιγάρων αποτελεί άμεση αιτία για την πρόκληση καρκίνου του πνεύμονα έγινε στα μέσα της δεκαετίας του 1960 από την Υπηρεσία Δημόσιας Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών (Stanhope Bayne-Jones, Walter J. Burdette et al. 1964).

Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει περισσότερες από 7000 χημικές ενώσεις, πολλές από τις οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως καρκινογόνες (>50 σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Ερευνών για τον Καρκίνο). Τέτοιες ενώσεις είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (χαρακτηριστικός εκπρόσωπος το Βενζο[α]πυρένιο), οι αρωματικές

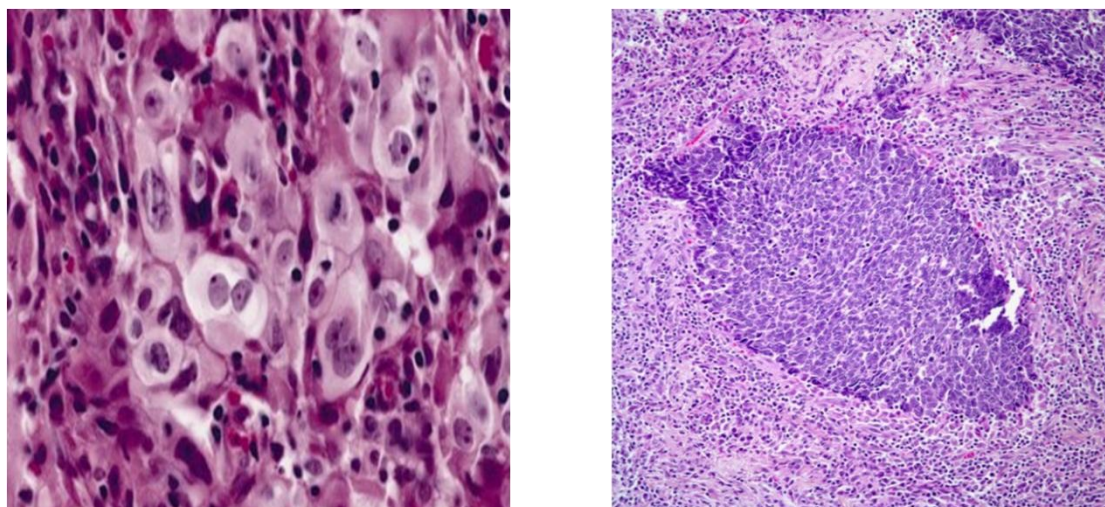
αμίνες, οι N- νιτροζαμίνες και άλλες οργανικές και ανόργανες ενώσεις όπως το βενζόλιο, το αρσενικό και το χρώμιο. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι N- νιτροζαμίνες μετατρέπονται μέσω του μεταβολισμού σε ενεργά καρκινογόνες ουσίες. Επίσης, ραδιενεργά υλικά όπως το ραδόνιο είναι παρόντα στον καπνό του τσιγάρου. Το σύνολο των συστατικών του καπνού προκαλούν μεταλλάξεις και επιγενετικές τροποποιήσεις στο DNA και επηρεάζουν σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν ογκογονίδια και γονίδια καταστολής όγκων, οδηγώντας στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τελικά, στην ογκογένεση (STEWART and WILD 2014), (Dela Cruz, Tanoue et al. 2011).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, πιστεύεται ότι το 85% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα οφείλεται στο κάπνισμα. Παγκοσμίως, σχεδόν το 20% των ενηλίκων καπνίζουν και μόλις το 2012 υπολογίστηκαν συνολικά 1,8 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα αντιπροσωπεύοντας το 12,9% όλων των περιπτώσεων καρκίνου. Συγκριτικά στα 2 φύλα, είναι ο συχνότερος τύπος καρκίνου στους άνδρες (16,7%), με τα υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται στη Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη (53,5 ανά 100.000) και στην Ανατολική Ασία (50,4). Η συχνότητα εμφάνισης είναι κατά πολύ μειωμένη στη Μέση και Δυτική Αφρική και στη Κεντρική Αμερική. Για τις γυναίκες αποτελεί τον τρίτο πιο συχνό τύπο καρκίνου και παρουσιάζει μία διαφορετική γεωγραφική κατανομή των ποσοστών. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφανίζονται στη Βόρεια Αμερική (33,8% ανά 100.000) και τη Βόρεια Ευρώπη (23,7%), με τα χαμηλότερα να εκτιμώνται στη Δυτική και Μέση Αφρική. Αναφορικά με τη θνησιμότητα, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως (19,4% του συνόλου) και εκτιμάται ως ένας από τους επιθετικότερους τύπους με προσδόκιμο όριο επιβίωσης τα 5 έτη (15% για τους άντρες, 21% για τις γυναίκες) (STEWART and WILD 2014), (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015), (Wong, Lao et al. 2017), (Society 2017).

Περίπου το 25 % των περιπτώσεων συμβαίνουν σε άτομα που δεν έχουν καπνίσει ποτέ και μάλιστα εάν θεωρούταν ως ξεχωριστή κατηγορία θα κατατάσσονταν ως η έβδομη πιο κοινή αιτία θανάτου από καρκίνο. Επομένως, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες, όπως η ακτινοβολία, η μόλυνση του περιβάλλοντος (τόσο στο εσωτερικό του σπιτιού όσο και στο εξωτερικό περιβάλλον), οι διατροφικές συνήθειες και το παθητικό κάπνισμα που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα (Dela Cruz, Tanoue et al. 2011). Σημαντική επίδραση φέρεται να έχουν και οι γενετικοί παράγοντες, αλλά μέχρι σήμερα

έχουν αναγνωρισθεί μόνο μερικά υποψήφια γονίδια με υψηλή συχνότητα εμφάνισης στον καρκίνο του πνεύμονα (Kanwal, Ding et al. 2017).

Ο καρκίνος του πνεύμονα διαιρείται σε δύο τύπους με βάση το μέγεθος των προσβεβλημένων κυττάρων όταν παρατηρούνται στο μικροσκόπιο. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, που δημοσιεύθηκε το 2015, οι δύο τύποι είναι ο *Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα (SCLC)* και ο *Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα (NSCLC)*.

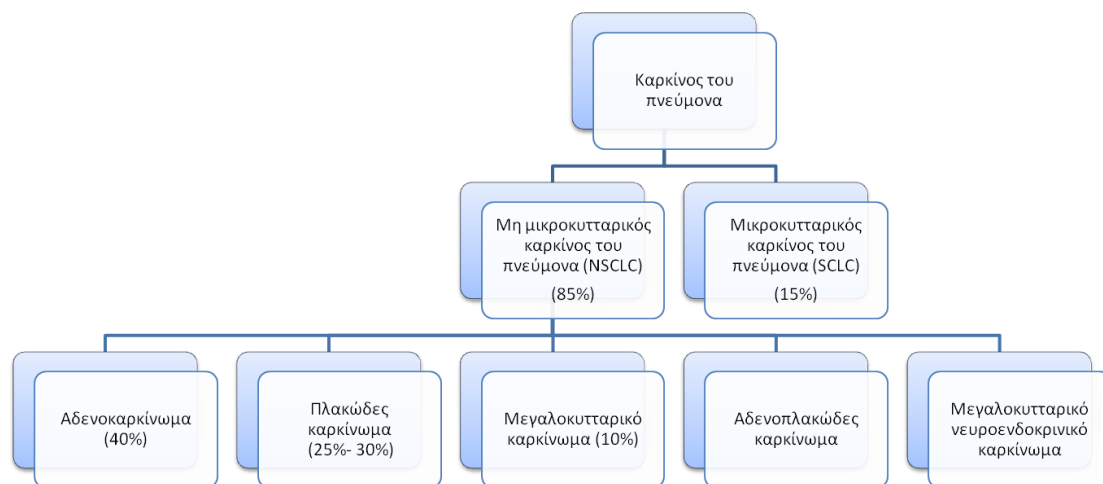


Εικόνα 2: Καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων (υποτύπος NSCLC) (αριστερά), μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC) (δεξιά), (www.cancernetwork.com)

Ο SCLC αποτελεί την πιο επιθετική μορφή καρκίνου του πνεύμονα, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 15% των περιπτώσεων. Σε περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις η διάγνωση γίνεται αφού έχουν προκληθεί μεταστάσεις στο ήπαρ, τον εγκέφαλο, τα οστά και τα επινεφρίδια (Kalemkerian, Akerley et al. 2011). Μετά τη διάγνωση, οι περισσότεροι ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα επιβιώνουν για περίπου 1 χρόνο και το ποσοστό επιβίωσης 5 ετών είναι μικρότερο από 7%. Σε αντίθεση με τον NSCLC, η έρευνα του οποίου παρουσιάζει σημαντική πρόοδο, η έρευνα για τον SCLC εμφανίζει πολλά εμπόδια συμπεριλαμβανομένων την έλλειψη μεθόδων έγκαιρης διάγνωσης, την ελλιπή κατανόηση της βιολογίας της ασθένειας και την ταχεία εξέλιξη αυτής (Byers and Rudin 2015).

1.3.1 Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (non-small cell lung cancer, NSCLC)

Το 85% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα είναι NSCLC και λόγω των ποικίλων μοριακών και βιολογικών χαρακτηριστικών αυτού του τύπου υποδιαιρείται στις εξής κατηγορίες: το αδenoκαρκίνωμα, το αδenoπλακώδες καρκίνωμα, το πλακώδες καρκίνωμα, το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα και το νευροενδοκρινικό καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων (Zamag, Zamag et al. 2017). Το αδenoκαρκίνωμα αποτελεί τον κύριο υπότυπο NSCLC με ποσοστό εμφάνισης 40% συγκριτικά με όλους τους καρκίνους του πνεύμονα και προέρχεται από το αδενικό επιθήλιο του βλεννογόνου των βρόγχων. Οι περισσότερες περιπτώσεις αδenoκαρκινώματος, σε άνδρες και γυναίκες ανεξάρτητα με την ηλικία τους, σχετίζονται με το κάπνισμα και αποτελεί τον πιο κοινό τύπο στους μη καπνιστές. Σε σύγκριση με τους άλλους τύπους, το αδenoκαρκίνωμα παρουσιάζει πιο αργή ανάπτυξη και η διάγνωση του είναι εφικτή πριν την εξάπλωση και την δημιουργία μεταστάσεων. Το πλακώδες καρκίνωμα αποτελεί περίπου το 25% με 30% των καρκίνων του πνεύμονα και προέρχεται από βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών στο κέντρο των πνευμόνων. Και αυτός ο υποτύπος NSCLC σχετίζεται έντομα με το κάπνισμα. Το 10% περίπου των καρκίνων του πνεύμονα είναι μεγαλοκυτταρικού τύπου. Αυτός ο υποτύπος NSCLC εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια μη διαφοροποιημένων νεοπλασμάτων, που στερούνται τα κυτταρολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά αδenoκαρκινώματος ή πλακώδους καρκινώματος. Το αδenoπλακώδες καρκίνωμα και το μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα εμφανίζονται με μικρότερη συχνότητα σε σχέση με τους άλλους υποτύπους NSCLC (Zamag, Zamag et al. 2017), (Zappa and Mousa 2016).



Εικόνα 3: Ταξινόμηση των διαφόρων τύπων καρκίνου του πνεύμονα.

Οι πιο κοινές θεραπείες για τον καρκίνο του πνεύμονα περιλαμβάνουν την χειρουργική επέμβαση, την ακτινοβολία και τη χημειοθεραπεία. Επίσης, τα τελευταία χρόνια, με την πρόοδο των ερευνητικών μελετών, η στοχευμένη θεραπεία και η ανοσοθεραπεία έχουν συμβάλει σημαντικά στην καλύτερη διαχείριση του καρκίνου του πνεύμονα (Zarra and Mousa 2016).

1.3.1.1 Φαρμακευτικές προσεγγίσεις του NSCLC

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου του πνεύμονα εκτός της χειρουργικής επέμβασης, αφορά τη χημειοθεραπεία αλλά και πλέον τη στοχευμένη θεραπεία. Στόχος της χημειοθεραπείας είναι η συρρίκνωση του όγκου χρησιμοποιώντας φάρμακα που έχουν σκοπό να θανατώσουν τα καρκινικά κύτταρα και να αναστείλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Τα φάρμακα αυτά ανήκουν στην κατηγορία των κυτταροστατικών ή κυτταροτοξικών φαρμάκων και χορηγούνται συνήθως ενδοφλεβίως, εκτός από κάποια που μπορούν να ληφθούν και από το στόμα, όπως η βινορελμπίνη (φυτικό προϊόν, αλκαλοειδές του φυτού *Vinca rosea*), η κυκλοφωσφαμίδη (αλκυλιωτικός παράγοντας, νιτρομουστάρδα) και η ετοποσίδη (φυτικό προϊόν, συστατικό του φυτού *Podophyllum peltatum*). Η χημειοθεραπεία αποτελεί θεραπεία πρώτης γραμμής σε προχωρημένα μεταστατικά στάδια καρκίνου του πνεύμονα (Pfister, Johnson et al. 2004).

Τα οφέλη της χημειοθεραπείας με ενώσεις πλατίνας (σισπλατίνη, καρβοπλατίνη) ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με προχωρημένο NSCLC αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1988 (Rapp, Pater et al. 1988). Μια μετα-ανάλυση, που σύγκρινε θεραπευτικά σχήματα με σισπλατίνη και θεραπευτικά σχήματα με καρβοπλατίνη έδειξε ότι τα θεραπευτικά σχήματα με σισπλατίνη σε συνδυασμό με άλλο κυτταροτοξικό φάρμακο έχουν ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα στο χρόνο επιβίωσης του ασθενούς (Hotta, Matsuo et al. 2004). Κυτταροτοξικά φάρμακα, όπως η γεμισταβίνη (αντιμεταβολίτης), η πακλιταξέλη(φυτικό προϊόν, συστατικό θάμνων του γένους *Taxus*, ταξάνες), η δοκεταξέλη (φυτικό προϊόν, συστατικό θάμνων του γένους *Taxus*, ταξάνες), η βινορελμπίνη (φυτικό προϊόν, αλκαλοειδές του φυτού *Vinca rosea*) και η ιρινοτεκάνη (φυτικό προϊόν, αλκαλοειδές του φυτού *Camptotheca acuminata*) μελετήθηκαν σε συνδυασμό με σισπλατίνη και παρατηρήθηκαν πλεονεκτήματα όσον αφορά τη δραστικότητα, την τοξικότητα και την ποιότητα ζωής (Rinaldi, Cauchi et al. 2006). Το θεραπευτικό σχήμα γεμισταβίνης- πλατίνας εμφανίζει την καλύτερη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με άλλους θεραπευτικούς συνδυασμούς βασισμένους στην πλατίνα (Le Chevalier, Scagliotti et al. 2005).

Οι παρενέργειες των συνδυασμών διαφέρουν αρκετά. Παρόλα αυτά, τα σχήματα βασισμένα στις ενώσεις πλατίνας έχουν συσχετιστεί με αυξημένη νεφροτοξικότητα, ναυτία, εμετό και αιματολογική τοξικότητα. Αναφορικά με τη νευροτοξικότητα, τη συχνότητα εμφάνισης ουδετεροπενίας και τοξικής θνησιμότητας, δεν παρατηρείται κάποια αύξηση λόγω της εφαρμογής σχημάτων πλατίνας (Pujol, Barlesi et al. 2006).

Η αυξανόμενη γνώση της βιολογίας του καρκίνου του πνεύμονα και των διαφόρων «μονοπατιών», που συμμετέχουν στην καρκινογένεση, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων θεραπειών, που στοχεύουν συγκεκριμένα βιολογικά μόρια. Οι ειδικές στοχευόμενες θεραπείες έχουν αντικαταστήσει τη χημειοθεραπεία λόγω της καλύτερης αποτελεσματικότητας και χαμηλότερης τοξικότητας που εμφανίζουν.

Όλοι οι ασθενείς με προχωρημένο NSCLC θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμασία πρόβλεψης βιοδεικτών με σκοπό την ανίχνευση των μεταλλάξεων και τη χορήγηση σωστού θεραπευτικού σχήματος. Ο FDA έχει εγκρίνει φάρμακα, που στοχεύουν σε μεταλλαγμένα μόρια- οδηγούς της καρκινογένεσης, όπως ο EGFR (epidermal growth factor receptor), η ALK (anaplastic lymphoma kinase), η ROS1 (ROS proto-oncogene 1 receptor tyrosine kinase) και το πρωτογονίδιο BRAF (Yoda, Dagogo-Jack et al. 2018). Τα φάρμακα αυτά είναι είτε μικρά μόρια με δράση αναστολής κινασών τυροσίνης είτε μονοκλωνικά αντισώματα, τα

οποία έχουν στόχο να διακόψουν τη μεταγωγή σήματος μονοπατιών, που οδηγούν σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Chan and Hughes 2015).

1. EGFR

Το 2004, το Erlotinib εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο στάδιο NSCLC με μετάλλαξη του EGFR (15% των ασθενών με NSCLC), οι οποίοι είχαν ήδη υποβληθεί στα κλασικά χημειοθεραπευτικά σχήματα 1^{ης} γραμμής, χωρίς επιτυχή αποτελέσματα (David S. Ettinger 2017). Τα Erlotinib (εγκρίθηκε το 2013), Gefitinib (εγκρίθηκε το 2014) και Afatinib (εγκρίθηκε το 2018) είναι φάρμακα που χρησιμοποιούνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής. Οι περισσότεροι ασθενείς αναπτύσσουν αντοχή σχεδόν μετά από 1 χρόνο εφαρμογής της θεραπείας λόγω δευτερογενών μεταλλάξεων. Γι' αυτούς, έχει εγκριθεί ως θεραπεία δεύτερης γραμμής το osimertinib το οποίο μειώνει, επιπλέον, τη συχνότητα μεταστάσεων προς το κεντρικό νευρικό σύστημα (Doroshov and Herbst 2018). Σε σύγκριση με τους άλλους αναστολείς το osimertinib εμφανίζει καλύτερο προφίλ τοξικότητας και μεγαλύτερα ποσοστά ασθενών που επιβιώνουν χωρίς να υποτροπιάζουν (Soria, Ohe et al. 2018). Λόγω αυτών των παρατηρήσεων, το 2018 εγκρίθηκε ως θεραπεία πρώτης γραμμής του μεταστατικού NSCLC με μεταλλαγή στον EGFR (Yoda, Dagogo-Jack et al. 2018).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα αντιπροσωπεύουν έναν εναλλακτικό τρόπο αναστολής της ενεργοποίησης και σηματοδότησης μέσω του EGFR. Εκτός από τον ανταγωνισμό με τους ενδοκυττάριους συνδέτες του υποδοχέα, μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα αντισώματος- υποδοχέα τα οποία ενδοκυτταρώνονται και αποικοδομούνται. Τα διαθέσιμα αντισώματα κατά του EGFR είναι το cetuximab (εγκρίθηκε το 2014), Necitumumab (εγκρίθηκε το 2015), Panitumumab (εγκρίθηκε το 2006) και το Matuzumab (εγκρίθηκε το 2007) (Chan and Hughes 2015).

2. ALK

Το 2011 ο FDA ενέκρινε το Crizotinib για τη θεραπεία ασθενών με NSCLC με μεταλλαγμένη ALK (5% των ασθενών με NSCLC) μετά από αποτυχία αντιμετώπισης της νόσου με χημειοθεραπευτικό σχήμα 1^{ης} γραμμής. Παρά τα θετικά αποτελέσματα, η πλειονότητα των ασθενών υποτροπιάζει εντός ενός έτους λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Yoda, Dagogo-Jack et al. 2018). Πιο ισχυροί και εκλεκτικοί αναστολείς δεύτερης γενιάς αναπτύχθηκαν για τη θεραπεία. Το Ceritinib (εγκρίθηκε το 2014), Alectinib (εγκρίθηκε το 2017), Brigatinib (εγκρίθηκε το 2017) είναι αναστολείς δεύτερης γενιάς με δράση εναντίον

των δευτερευόντων μεταλλάξεων. Σε σύγκριση με το Ceritinib, το Alectinib και το Brigatinib διαπερνούν αποτελεσματικότερα το κεντρικό νευρικό σύστημα (Doroshov and Herbst 2018). Ο τρίτης γενιάς αναστολέας της ALK είναι το Lorlatinib (βρίσκεται σε κλινική δοκιμή φάσης 1/2) και έχει δράση έναντι της αντίστασης που αναπτύσσεται ύστερα από τη χορήγηση αναστολέων πρώτης και δεύτερης γενιάς. Ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με NSCLC με μεταλλαγή της ALK χρησιμοποιείται το Alectinib (Yoda, Dagogo-Jack et al. 2018).

Το μόνο φάρμακο που έχει πάρει έγκριση για τη θεραπεία ασθενών με NSCLC με μεταλλαγμένη ROS-1 (1%- 2% των ασθενών με NSCLC) είναι το crizotinib, το 2016. Για τους ασθενείς με NSCLC με μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF (2%-4% των ασθενών με NSCLC) χρησιμοποιείται συνδυαστική θεραπεία με έναν αναστολέα του BRAF, το dabrafenib, και έναν αναστολέα της MEK, το trametinib (η θεραπεία εγκρίθηκε το 2017) (Yoda, Dagogo-Jack et al. 2018).

Η ανάπτυξη στοχευόμενων θεραπειών φέρνει θετικά αποτελέσματα, αλλά δεν είναι δυνατό να ανιχνευθεί ακόμα το πιο συχνά μεταλλαγμένο βιολογικό μόριο, KRAS (Doroshov and Herbst 2018). Σπάνιες μεταλλάξεις όπως αυτές των γονιδίων MET, RET και ERBB2 / HER2, καθώς και NTRK πρέπει να ελέγχονται καθώς αποτελεσματικά φάρμακα είναι διαθέσιμα.

Μπορεί η στοχευόμενη θεραπεία να είναι πιο εκλεκτική προς τα καρκινικά κύτταρα απ' ότι η χημειοθεραπεία, αλλά αυτό δε σημαίνει πως είναι λιγότερο τοξική. Η στοχευόμενη θεραπεία μπορεί να προκαλέσει σημαντικές παρενέργειες όπως υψηλή αρτηριακή πίεση, κόπωση, δερματική τοξικότητα (εξανθήματα, ξηρότητα), γαστρεντερική τοξικότητα (διάρροια, στομαχικές διαταραχές) και μεταβολικές διαταραχές (National Cancer Institute).

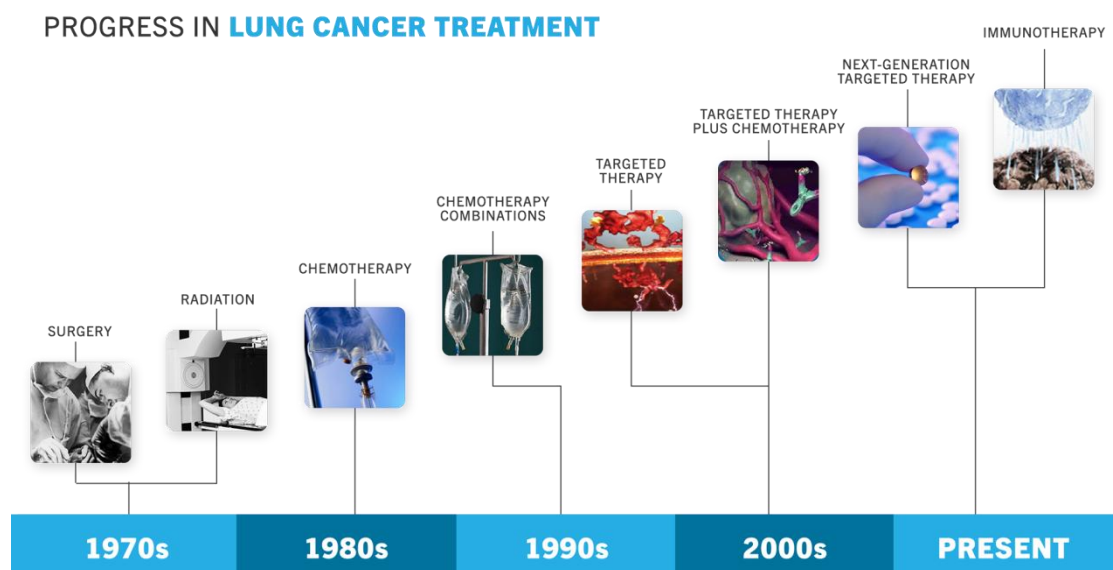
3. Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία είναι η νεότερη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του καρκίνου, εκμεταλλευόμενη το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα μοιράζονται κάποια χαρακτηριστικά με τα υγιή, με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό σύστημα να μη μπορεί να στοχεύσει μόνο στα καρκινικά (Schreiber, Old et al. 2011). Η ανοσοθεραπεία λειτουργεί ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να στοχεύσει τα καρκινικά κύτταρα και να σταματήσει ή να επιβραδύνει την ανάπτυξή τους.

Τα ανοσοθεραπευτικά φάρμακα στοχεύουν σε μόρια μονοπατιών που βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να αμυνθούν έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος. Για παράδειγμα στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης PD-L1

(programmed-death ligand-1) η οποία αδρανοποιεί τα T κύτταρα του ανοσοποιητικού μόλις συνδεθεί με τον υποδοχέα της (PD-1) σε αυτά. Οι εγκεκριμένες ανοσοθεραπείες για τον NSCLC περιλαμβάνουν αντισώματα που στοχεύουν σε αυτά τα δύο μόρια (Postow, Callahan et al. 2015).

Τα τελευταία τρία χρόνια έχουν εγκριθεί δύο αντισώματα που στοχεύουν τον PD-1, το Nivolumab (εγκρίθηκε το 2014) και το Pembrolizumab, και ένα αντίσωμα κατά της PD-L1, το Atezolizumab (εγκρίθηκε το 2016). Αυτά χρησιμοποιούνται ως θεραπεία δεύτερης γραμμής κατά του μεταστατικού NSCLC. Πρόσφατες μελέτες του 2018 που μελέτησαν τη χρήση του Pembrolizumab ως θεραπεία πρώτης γραμμής, με εξαίρεση ασθενείς με μεταλλάξεις στον EGFR ή στην ALK, έδειξαν ότι τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών αυξήθηκαν. Το Pembrolizumab μελετήθηκε ως μονοθεραπεία και με τη συγχρόνηση ενός χημειοθεραπευτικού σχήματος (Yoda, Dagogo-Jack et al. 2018).



Εικόνα 4: Πρόοδος στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

1.4 Σχιζοφρένεια και καρκίνος

1.4.1 Εισαγωγή στη Σχιζοφρένεια

Η σχιζοφρένεια είναι η πιο γνωστή διαταραχή στην οποία τα άτομα εμφανίζουν ψυχωτικά συμπτώματα, χωρίς να είναι η μόνη. Παγκοσμίως, η σχιζοφρένεια επηρεάζει το 1% του πληθυσμού, με τα αρσενικά άτομα να βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο απ' ό,τι τα θηλυκά (1,4 προς 1) και τείνουν να εμφανίζουν τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας πολύ πιο γρήγορα (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009). Είναι μία ασθένεια η οποία δεν επηρεάζει μόνο την ψυχική υγεία αλλά φαίνεται πως άτομα με σχιζοφρένεια πεθαίνουν 12 με 15 χρόνια νωρίτερα από τον υπόλοιπο πληθυσμό. Αυτό είναι κυρίως αποτέλεσμα προβλημάτων υγείας σε συνδυασμό με μειωμένη πρόσβαση σε ιατρική περίθαλψη και υιοθέτηση ενός κακού τρόπου ζωής (κακή διατροφή, κάπνισμα). Επίσης, έχει εκτιμηθεί ότι ο κίνδυνος αυτοκτονίας κατά τη διάρκεια της ζωής είναι 5% για άτομα με σχιζοφρένεια (van Os and Kapur 2009), (Hor and Taylor 2010)

Όπως και κάθε άλλη χρόνια ασθένεια, η σχιζοφρένεια παρουσιάζει σύνθετους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου. Έχει παρατηρηθεί σε οικογένειες πως όσο περισσότερες ακολουθίες DNA μοιράζονται με ένα άτομο που έχει σχιζοφρένεια τόσο υψηλότερος είναι ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου, χωρίς όμως να ακολουθούνται τα τυπικά πρότυπα του Mendel. Παρόλο που έχουν εντοπιστεί κάποια υποψήφια γονίδια πρόκλησης σχιζοφρένειας, δεν μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα ότι αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης (Edwards, Bacanu et al. 2016). Ούτε οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να προσδιοριστούν με βεβαιότητα. Πιθανότατα, η γέννηση σε κάποιο αστικό κέντρο, η μετανάστευση, η χρήση κάνναβης, το στρες, η αύξηση της πατρικής ηλικίας, η ενδομήτρια έκθεση σε ιογενή λοίμωξη και η μειωμένη πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων κατά την εγκυμοσύνη να επηρεάζουν το ποσοστό εμφάνισης αυτής της ψυχικής διαταραχής. Αναφορικά με την παθοφυσιολογία της νόσου, η σχιζοφρένεια είναι μια ψυχική διαταραχή οφειλόμενη σε μη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου. Κατά τη περίοδο εμφάνισης της νόσου (εφηβεία/ πρώιμη ενήλικη ζωή) ο εγκέφαλος υφίσταται την τελευταία περίοδο ωρίμανσης ορμονικά και κοινωνικά. Επιπλέον, κατά την εφηβική ηλικία, παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές στη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση στον προμετωπιαίο φλοιό και σε σχιζοφρενείς έχει παρατηρηθεί 14% αύξηση της ικανότητας σύνθεσης ντοπαμίνης (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009), (Howes, McCutcheon et al. 2017), (Howes and Murray 2014), (Fusar-Poli and Meyer-Lindenberg 2013).

Η κλινική εικόνα της νόσου χαρακτηρίζεται από θετικά ψυχωτικά συμπτώματα, αρνητικά συμπτώματα και διαταραχές γνωστικού τύπου. Ο όρος θετικά συμπτώματα αναφέρεται σε ψυχωτικά φαινόμενα που απουσιάζουν από υγιή άτομα όπως οι ψευδαισθήσεις και οι αυταπάτες/παραισθήσεις. Ο όρος αρνητικά συμπτώματα χρησιμοποιείται για να περιγράψει την απώλεια ή εξασθένηση φυσιολογικών λειτουργιών όπως η απώλεια κινήτρων και κοινωνικής αλληλεπίδρασης. Οι διαταραχές γνωστικού τύπου περιλαμβάνουν αποδιοργάνωση του λόγου και βλάβες στη μνήμη εργασίας (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009). Άνθρωποι που αναπτύσσουν σχιζοφρένεια τείνουν να παρουσιάζουν γνωστικές και κοινωνικές δυσλειτουργίες κατά την παιδική ηλικία. Αυτά τα συμπτώματα ακολουθούνται, κατά την εφηβεία/ πρώιμη ενήλικη ζωή, από την κοινωνική απόσυρση και τη μειωμένη διάθεση και στη συνέχεια από την εμφάνιση προδρομικών συμπτωμάτων της ψύχωσης που οδηγούν στην εμφάνιση του πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου (Howes and Murray 2014).

1.4.2 Συσχέτιση των νευροδιαβιβαστών

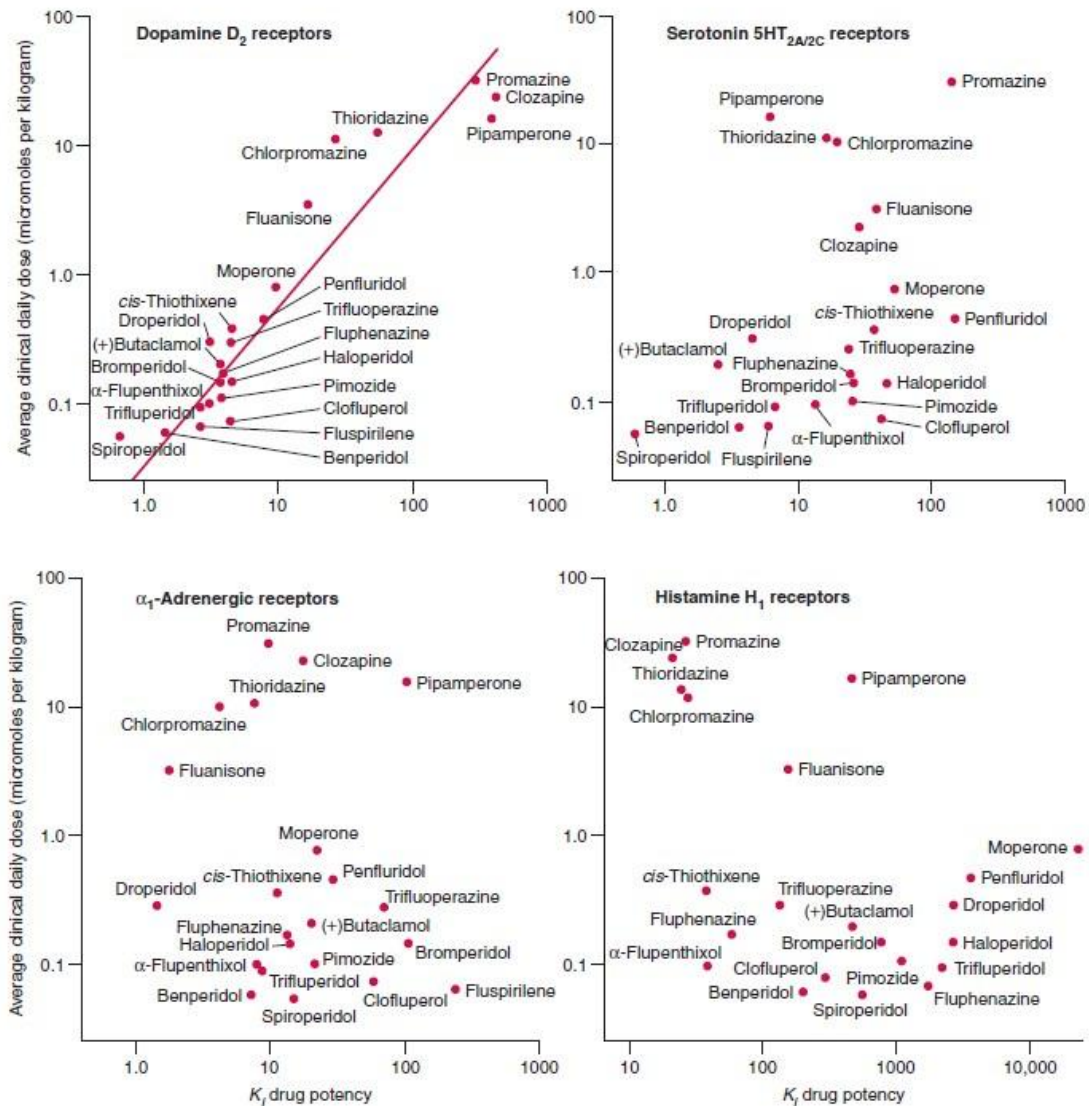
Η εμφάνιση της νόσου σχετίζεται με δυσλειτουργίες που παρατηρούνται στη δράση της ντοπαμίνης στις υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου. Η πλειοψηφία των ντοπαμινεργικών νευρώνων υπάρχει στο μεσεγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρικών σωμάτων της μέλαινας ουσίας που προβάλλουν στο ραβδωτό σώμα και τον φλοιό (Haber 2014). Η ντοπαμίνη που απελευθερώνεται δρα στους υποδοχείς της για να ρυθμίσει την ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση. Τα θετικά συμπτώματα της ψύχωσης συνδέονται με την υψηλή ντοπαμινεργική διαβίβαση που παρατηρείται στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου. Ο όρος αυτός αναφέρεται στην εμφάνιση ψευδαισθήσεων, παραισθήσεων και αϋπνίας. Τα αρνητικά συμπτώματα και οι διαταραχές γνωστικού τύπου πιστεύεται πως οφείλονται σε αλλαγές της διαβίβασης σε άλλη περιοχή του εγκεφάλου, συγκεκριμένα υπεύθυνη είναι η μειωμένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα που παρατηρείται στον προμετωπιαίο φλοιό (Meyer-Lindenberg, Miletich et al. 2002). Ως αρνητικά συμπτώματα αναγνωρίζονται η απάθεια, η έλλειψη κινήτρου για κοινωνική αλληλεπίδραση, η μείωση του περιεχομένου της σκέψης και της ομιλίας. Στις διαταραχές γνωστικού τύπου περιλαμβάνονται η αποδιοργάνωση του λόγου και βλάβες στη μνήμη εργασίας (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009).

1.4.2.1 Η υπόθεση της ντοπαμίνης

Ο Matthyse το 1973, ήταν ο πρώτος ο οποίος πρότεινε ότι η σχιζοφρένεια μπορεί να οφείλεται σε «υπερβολική δραστηριότητα της ντοπαμινεργικής μετάδοσης». Η προέλευση της υπόθεσης της ντοπαμίνης βασίζεται επίσης σε δύο πολύ σημαντικές παρατηρήσεις. Πρώτον, κλινικές μελέτες έδειξαν ότι οι ντοπαμινεργικοί αγωνιστές και οι ψυχοδιεγερτικές ουσίες (π.χ αμφεταμίνη, κοκαΐνη), οι οποίες αυξάνουν τα συναπτικά επίπεδα της ντοπαμίνης, μπορούν να προκαλέσουν ψύχωση σε υγιή άτομα και να επιδεινώσουν την ήδη υπάρχουσα ψύχωση στους ασθενείς με σχιζοφρένεια. Δεύτερον, ήταν η ανακάλυψη ότι όλα τα αποτελεσματικά αντιψυχωσικά φάρμακα είναι ανταγωνιστές των υποδοχέων ντοπαμίνης. Η υποτιθέμενη εμπλοκή της ντοπαμίνης στη σχιζοφρένεια είναι συμβατή και με την υψηλή ντοπαμινεργική νεύρωση που παρατηρείται στον προμετωπιαίο φλοιό (περιοχή που εμπλέκεται στην παθολογία της διαταραχής) (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009), (Howes, McCutcheon et al. 2017).

Συγκεκριμένα η αποτελεσματικότητα των αντιψυχωσικών φαρμάκων συνδέθηκε με την υψηλή συγγενείά τους έναντι των υποδοχέων ντοπαμίνης D₂, συνδέοντας έτσι τη μοριακή δράση με τις κλινικές παρατηρήσεις (Seeman and Lee 1975). Ο D₂- ντοπαμινεργικός υποδοχέας είναι ένας υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνη G (GPCR) και μπορεί να υπάρχει σε μορφή υψηλής συγγένειας με τη ντοπαμίνη (D2 high), ή σε χαμηλής συγγένειας (D2 low). Αυτές οι δύο μορφές μπορούν να μετατρέπονται η μία στην άλλη και υπάρχουν ενδείξεις πως η D2 high αποτελεί την λειτουργική μορφή και αυτή που σχετίζεται με τις φυσιολογικές δράσεις της ντοπαμίνης (Seeman 2013). Η πρωτεΐνη G που είναι προσδεδεμένη με τους D₂- υποδοχείς ανήκει στην οικογένεια των G_{i/o} πρωτεϊνών, οι οποίες δρουν ανασταλτικά στην αδενυλική κυκλάση, ενεργοποιούν τα κανάλια ιόντων K⁺, αναστέλλουν τους διαύλους Ca²⁺, ρυθμίζουν το μονοπάτι των MAP κινασών και την δραστικότητα της Akt (Beaulieu and Gainetdinov 2011). Δεδομένου του κεντρικού ρόλου του υποδοχέα στον τρόπο δράσης των αντιψυχωσικών, πραγματοποιούνται πληθώρα ερευνών για την καλύτερη κατανόηση της φύσης και της μοριακής δράσης του.

Παρόλο που η θεραπευτική δράση όλων των διαθέσιμων αντιψυχωσικών φαρμάκων εξαρτάται από την ικανότητά τους να ανταγωνίζονται τους D₂- υποδοχείς, αυτά δρουν και σε άλλους GPCRs του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων άλλων ντοπαμινεργικών υποδοχέων, των υποδοχέων σεροτονίνης, ισταμίνης και τους αδρενεργικούς υποδοχείς.



Εικόνα 5: Σύγκριση συγγένειας αντιψυχωσικών φαρμάκων με τους διάφορους υποδοχείς δράσεις τους (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009).

Η υπόθεση της ντοπαμίνης θεωρείται ως η κύρια παθολογική θεωρία για τη σχιζοφρένεια για πάνω από τέσσερις δεκαετίες. Παρόλα αυτά μελέτες σε ασθενείς με σχιζοφρένεια έχουν δείξει και δυσλειτουργίες στη γλουταμινεργική διαβίβαση (Lutkenhoff, van Erp et al. 2010), (Natsubori, Inoue et al. 2014).

1.4.2.2 Η υπόθεση του γλουταμικού

Το γλουταμικό είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του εγκεφάλου και ο ρόλος του στη διαδικασία ανάπτυξης της νόσου παρατηρείται από το 1949 (Kitzinger, Arnold et al. 1949). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στη γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση λόγω των δράσεων των φαρμάκων που μπλοκάρουν τους υποδοχείς γλουταμικού NMDA. Έχει αποδειχθεί ότι οι ανταγωνιστές των υποδοχέων NMDA, συμπεριλαμβανομένων της φαινοκυκλιδίνης (PCP), του MK-801 και της κεταμίνης, οδηγούν σε αυξημένη απελευθέρωση γλουταμικού στον προμετωπιαίο φλοιό. Αυτό το γεγονός αυξάνει την πιθανότητα της γλουταμινεργικής νευροδιαβίβασης σε υποδοχείς που δεν είναι NMDA (π.χ σε υποδοχείς AMPA), οδηγώντας στην εμφάνιση ψυχωτικών συμπτωμάτων συμπεριλαμβανομένων τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών συμπτωμάτων σχιζοφρένειας. Μια μελέτη μετα-ανάλυσης του 2009, ανέφερε ότι φάρμακα αγωνιστές των υποδοχέων NMDA οδήγησαν σε βελτίωση των ψυχωτικών συμπτωμάτων σε ασθενείς με σχιζοφρένεια όταν χορηγήθηκαν σε συνδυασμό με την αντιψυχωτική θεραπεία. Εντούτοις, οι μελέτες, για να καθιερωθούν ως αποτελεσματικά φάρμακα κατά της σχιζοφρένειας, είναι ελλιπή, σε αντίθεση με τις ενδείξεις για την αποτελεσματικότητα των αναστολέων των υποδοχέων ντοπαμίνης (Howes, McCutcheon et al. 2015), (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009).

1.4.3 Φαρμακευτική αγωγή κατά της σχιζοφρένειας

Η σχιζοφρένεια είναι μια σοβαρή, χρόνια ψυχική διαταραχή για τη θεραπεία της οποίας χορηγούνται αντιψυχωσικά φάρμακα τα οποία λειτουργούν, κυρίως, ως ανταγωνιστές των D₂- ντοπαμινεργικών υποδοχέων με στόχο τον έλεγχο των συμπτωμάτων. Όλα επί του παρόντος εγκεκριμένα αντιψυχωσικά φάρμακα μειώνουν τα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας, εμφανίζουν μικρότερη αποτελεσματικότητα έναντι των αρνητικών και έχουν μηδενικό όφελος για τα γνωστικού τύπου συμπτώματα (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009).

Αυτά τα φάρμακα ταξινομούνται ως τυπικά (πρώτης γενιάς) και άτυπα (δεύτερης γενιάς), σύμφωνα με τους υποδοχείς στους οποίους δεσμεύονται (Li, Snyder et al. 2016). Τα τυπικά και άτυπα αντιψυχωσικά διαφέρουν ως προς τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες, την επίδραση τους στα συμπτώματα και εμφανίζουν ένα διαφορετικό προφίλ παρενεργειών. Τα τυπικά αντιψυχωσικά είναι αποτελεσματικά στη μείωση των θετικών συμπτωμάτων που

σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια και εκτός της λειτουργίας τους ως ανταγωνιστές των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων μπορεί να εμφανίζουν επιπρόσθετη ανταγωνιστική δράση έναντι άλλων υποδοχέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χλωροπρομαζίνη που εμφανίζει επιπρόσθετη δράση ως ανταγωνιστής των H₁ ισταμινικών, α₁ αδρενεργικών και M₁ μουσκαρινικών/ χολινεργικών υποδοχέων. Σαν αποτέλεσμα ορισμένα τυπικά αντιψυχωσικά ενδέχεται να επιδεινώσουν τα αρνητικά συμπτώματα. Η χορήγηση των τυπικών αντιψυχωσικών περιορίζεται λόγω της πρόκλησης ανεπιθύμητων εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων, όπως ακαθισία, οξεία δυστονία, παρκισσονισμό και όψιμη δυσκινησία, υπερπρολακτιναιμίας και νοητικής θόλωσης. Ωστόσο, ο κίνδυνος εμφάνισης των παρενεργειών εξαρτάται από τη συγγένεια ενός φαρμάκου ως προς τον υποδοχέα ντοπαμίνης D₂ και τη δόση που χρησιμοποιήθηκε. Η χλωροπρομαζίνη, η αλοπεριδόλη και η πιμοζίδη είναι γνωστά τυπικά αντιψυχωσικά και από μελέτες γι' αυτή τη κατηγορία αντιψυχωσικών συγκριτικά με τη ντοπαμίνη, συμπεραίνεται ότι δεσμεύονται πιο ισχυρά με τον υποδοχέα ντοπαμίνης D₂ και αποδεσμεύονται πιο αργά. (Li, Snyder et al. 2016), (Miyamoto, Miyake et al. 2012), (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009).

Χαρακτηριστικό της φαρμακολογίας των άτυπων αντιψυχωσικών φαρμάκων είναι η συνδυαστική δράση τους ως ανταγωνιστές του υποδοχέα σεροτονίνης 5HT₂ και του D₂-υποδοχέα. Τα άτυπα αντιψυχωσικά ανακαλύφθηκαν μεταγενέστερα, λόγω του περιορισμού που εμφάνιζαν τα τυπικά αντιψυχωσικά σε ό,τι αφορά τα εξωπυραμιδικά συμπτώματα και την επίδραση τους κυρίως στα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας. Έχει αποδειχθεί ότι σε κλινικά αποτελεσματικές δόσεις προκαλούν λιγότερα εξωπυραμιδικά συμπτώματα σε αντίθεση με τα τυπικά αντιψυχωσικά. Βέβαια πολλά φάρμακα αυτής της κατηγορίας έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση ακαθισίας (εξωπυραμιδικό σύμπτωμα). Παρόλα αυτά, τα άτυπα αντιψυχωσικά προκαλούν ποικίλες άλλες παρενέργειες συμπεριλαμβανομένων την αύξηση του βάρους και των επιπέδων γλυκόζης και χοληστερόλης με αποτέλεσμα την πιθανή πρόκληση διαβήτη και καρδιαγγειακών παθήσεων (Li, Snyder et al. 2016), (Meltzer 2013), (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009).

Η ολανζαπίνη, η ρισπεριδόνη και η κουετιαπίνη είναι χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι άτυπων αντιψυχωσικών φαρμάκων. Τα άτυπα αντιψυχωσικά εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια έναντι των D₂ ντοπαμινεργικών υποδοχέων σε σχέση με τα τυπικά αντιψυχωσικά και δεσμεύονται ασθενέστερα σε αυτούς, συγκριτικά με τη ντοπαμίνη, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύονται πιο γρήγορα (Miyamoto, Miyake et al. 2012).

Παρά την υψηλή αποτελεσματικότητα των μέχρι τώρα αντιψυχωσικών φαρμάκων, η πρόκληση παρενεργειών υποδεικνύει την ανάγκη ανάπτυξης νέων παραγόντων εξίσου αποτελεσματικών αλλά με λιγότερες παρενέργειες. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η αριπιπραζόλη, ένα άτυπο αντιψυχωσικό με ιδιαίτερο φαρμακολογικό προφίλ. Έχει χαρακτηριστεί ως τρίτης γενιάς αντιψυχωσικό καθώς ήταν ο πρώτος μερικός αγωνιστής των D₂- ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Εμφανίζει επιπρόσθετη δράση ως μερικός αγωνιστής των υποδοχέων σεροτονίνης 5- HT_{1A} και ως ανταγωνιστής των υποδοχέων σεροτονίνης 5-HT_{2A}. Η αριπιπραζόλη παρουσιάζει παρόμοια αποτελεσματικότητα με αυτή των τυπικών και άτυπων αντιψυχωσικών, είναι καλύτερα ανεκτό από την αλοπεριδόλη, την ολανζαπίνη και τη ρισπεριδόνη και είναι πιο ασφαλές. Η αριπιπραζόλη σχετίζεται με χαμηλότερη τάση για αύξηση του βάρους, μικρότερη εμφάνιση μεταβολικών διαταραχών, δεν έχει αποδειχθεί καμία συσχέτιση με την υπερπρολακτιναιμία και προκαλεί εξωπυραμιδικά συμπτώματα σε μικρότερο βαθμό. Η χρήση της έχει συσχετιστεί με παρενέργειες όπως η δυστονία και αίσθηση πανικού (Hirose and Kikuchi 2005), (Citrome 2006), (Ribeiro, de Mendonca Lima et al. 2018) .

Τα περισσότερα αντιψυχωσικά φάρμακα έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν πρωτεΐνες του πλάσματος και ιστών και εμφανίζουν υψηλή λιπιδική διαλυτότητα, με αποτέλεσμα να έχουν μεγάλους χρόνους ημιζωής. Ο μεταβολισμός των αντιψυχωσικών φαρμάκων είναι μια περίπλοκη διαδικασία. Τα περισσότερα αντιψυχωσικά μεταβολίζονται από τις ισομορφές των κυτοχρωμάτων P-450, CYP2D6 ή CYP3A4. Επίσης, άλλες ισομορφές μπορεί να συμμετάσχουν (1A2, 2B6, 2C9) και οι μονοαμινικές οξειδάσες συμμετέχουν στο μεταβολισμό στο ήπαρ και στον εγκέφαλο. Λόγω των πολυμορφισμών που παρατηρούνται στα κυτοχρώματα CYP2D6 και CYP1A2, υπάρχουν ασθενείς με μικρή λειτουργικότητα αυτών των ισομορφών που εμφανίζουν πιο εύκολα τοξικότητα έναντι των ασθενών με τις φυσιολογικές ισομορφές. Αν και οι μεταβολίτες πολλών αντιψυχωσικών φαρμάκων είναι δραστικοί, το αποτέλεσμα τους δεν είναι τόσο ισχυρό όσο της αρχικής φαρμακευτικής ένωσης. Επιπλέον, οι p- γλυκοπρωτεΐνες συμμετέχουν στην απομάκρυνση των αντιψυχωσικών από τον οργανισμό. Ο μεταβολισμός των αντιψυχωσικών μπορεί να επηρεαστεί από γενετικές μεταβολές, αλλάζοντας την αποτελεσματικότητα αυτών αλλά και τη δοσολογία. Γενικά, η θεραπεία με αντιψυχωσικά φάρμακα είναι αδιάκοπη και μεγάλης διάρκειας (Lewis 2017) .

Αλοπεριδόλη

Η αλοπεριδόλη είναι ένα τυπικό αντιψυχωσικό, το οποίο ανακαλύφθηκε το 1958, και ανήκει χημικά στις βουτυροφαινόνες (Lewis 2017). Μεταξύ των τυπικών αντιψυχωσικών η αλοπεριδόλη είναι το πιο συχνά χορηγούμενο φάρμακο σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, σχιζοσυναισθηματική ή σχιζοφρενοειδής διαταραχή.

Μολονότι η θεραπευτική αποτελεσματικότητα των αντιψυχωσικών φαρμάκων καθώς και της αλοπεριδόλης, αποδίδεται στην ισχυρή συγγένεια τους με τον D₂- ντοπαμινεργικό υποδοχέα, αυτή δεσμεύεται και σε άλλους υποδοχείς του κεντρικού νευρικού συστήματος. Με υψηλή συγγένεια δεσμεύεται στους α₁ αδρενεργικούς υποδοχείς και εμφανίζει πολύ χαμηλότερη συγγένεια έναντι των υποδοχέων σεροτονίνης 5- HT_{2C}, των ισταμινικών υποδοχέων H₁ και των M₁ μουσκαρινικών υποδοχέων (Li, Snyder et al. 2016), (Peprah, Zhu et al. 2011).

Η αλοπεριδόλη μπορεί να προκαλέσει παρενέργειες, μερικές από τις οποίες είναι ιδιαίτερα σοβαρές. Η χρήση της σχετίζεται με την εμφάνιση εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων, παρκισσονισμού και συμπτωμάτων όψιμης δυσκινησίας (Peprah, Zhu et al. 2011). Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να οφείλονται είτε στην ισχυρή δέσμευση της αλοπεριδόλης στον D₂- ντοπαμινεργικό υποδοχέα είτε στην επίδραση των παραγόντων του μεταβολισμού της ή ακόμη και σε συνδυασμό των δύο καταστάσεων (Sampson, Bricker et al. 2014).

Ο μεταβολισμός της αλοπεριδόλης πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ και απεκκρίνεται από τα νεφρά και τη χολή. Ανάλογα με την οδό χορήγησης, εμφανίζει και διαφορετικό χρόνο ημίσειας ζωής (t_{1/2}). Όταν χορηγείται ενδοφλεβίως (IV) ο t_{1/2} είναι 14-26 ώρες, σε ενδομυϊκή (IM) χορήγηση είναι 20,7 ώρες και η από του στόματος (p.o.) χορήγηση εμφανίζει 14- 37 ώρες t_{1/2}. Η βιοδιαθεσιμότητα της αλοπεριδόλης (p.o) είναι πολύ υψηλή και κυμαίνεται από 60% έως 70%. Σε μεγαλύτερο ποσοστό η ένωση υφίσταται γλυκουρονιδοποίηση ενώ σε μικρότερο ποσοστό αναγωγή και οξείδωση. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη βιομετατροπή της αλοπεριδόλης είναι τα κυτοχρώματα P-450, συγκεκριμένα το CYP3A4, η αναγωγή του καρβονυλίου και η UDP- γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση. Μπορεί η αλοπεριδόλη να είναι ένα υπόστρωμα για το CYP3A4 αλλά λειτουργεί και ως αναστολέας, καθώς και ως διεγέρτης του CYP2D6. Οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις της αλοπεριδόλης με άλλα φάρμακα οδηγούν σε μικρές αλλαγές της συγκέντρωσης αλοπεριδόλης στον ορό. Από την άλλη πλευρά όμως, η κλινική εικόνα αλλάζει αισθητά με τη συγχορήγηση βαρβιτουρικών, αντιεπιληπτικών και ορισμένων αντιβιοτικών φαρμάκων (Kudo and Ishizaki 1999).

Σουλπιρίδη

Η σουλπιρίδη ανήκει στα τυπικά αντιψυχωσικά φάρμακα και λόγω της χημικής δομής της κατατάσσεται στην ομάδα των βενζαμιδίων. Συγκριτικά με τα υπόλοιπα αντιψυχωσικά αυτής της κατηγορίας η σουλπιρίδη εμφανίζει ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα. Παρόλο που έχει παρόμοια αποτελεσματικότητα, η εμφάνιση παρενεργειών είναι κατά πολύ μειωμένη (Lai, Chang et al. 2013).

Χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας με τις κλινικές μελέτες να δείχνουν υψηλή βελτίωση των αρνητικών συμπτωμάτων της νόσου και μερική δραστικότητα έναντι των θετικών (Lai, Chang et al. 2013). Η σουλπιρίδη χορηγείται συμπληρωματικά της κλοζαπίνης και σε περιπτώσεις ασθενών με σχιζοφρένεια ανθεκτική σε άλλες θεραπείες, φέροντας καλύτερα αποτελέσματα (Wang, Omori et al. 2010). Επίσης, χρησιμοποιείται ως αντικαταθλιπτικό για τη θεραπεία της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής. Βέβαια η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης σουλπιρίδης στον ορό του αίματος και της κλινικής αποτελεσματικότητας είναι ασαφής. Πιστεύεται ότι με μικρές δόσεις (<100mg) έχει αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις δρα ως αντιψυχωσικό (Wagstaff, Benfield et al. 1994), (Pani and Gessa 2002).

Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αντιψυχωσικά φάρμακα, η σουλπιρίδη εμφανίζει εκλεκτική συγγένεια έναντι των D₂- ντοπαμινεργικών υποδοχέων στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ανταγωνίζεται, επίσης, περιφερικούς υποδοχείς ντοπαμίνης στα αιμοφόρα αγγεία και στο λείο μυ του γαστρεντερικού σωλήνα (Wagstaff, Benfield et al. 1994).

Η σουλπιρίδη είναι ένα καλά ανεκτό και χαμηλού κόστους αντιψυχωσικό φάρμακο χωρίς να εμφανίζει έντονες παρενέργειες. Έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων (οξεία δυστονία, παρκισσονισμό) και την αύξηση του βάρους των ασθενών. Εκτός αυτών, μπορεί να παρατηρηθεί ζάλη, αϋπνία, ναυτία, εμετός και αντιχολινεργικά συμπτώματα όπως δυσκοιλιότητα, ξηρό στόμα, θολή όραση. Επίσης σε in vivo μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση σουλπιρίδης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχει αρνητικές επιπτώσεις στους απογόνους (Lai, Chang et al. 2013), (Helmy 2013), (Pani and Gessa 2002), (Bai, Ma et al. 2017).

Υφίσταται χαμηλό μεταβολισμό, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της να απομακρύνεται αμετάβλητη μέσω της νεφρικής απέκκρισης (70%-90% IV, 15%-25% p.o.). Η σουλπιρίδη εμφανίζει χρόνο ημίσειας ζωής (t_{1/2}) 6- 8 ώρες. Επίσης, εμφανίζει χαμηλή λιποφιλικότητα

και χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα (25%- 40%), η οποία αποδίδεται στη διαδικασία εκροής από τις p- γλυκοπρωτεΐνες (Helmy 2013).

Κλοζαπίνη

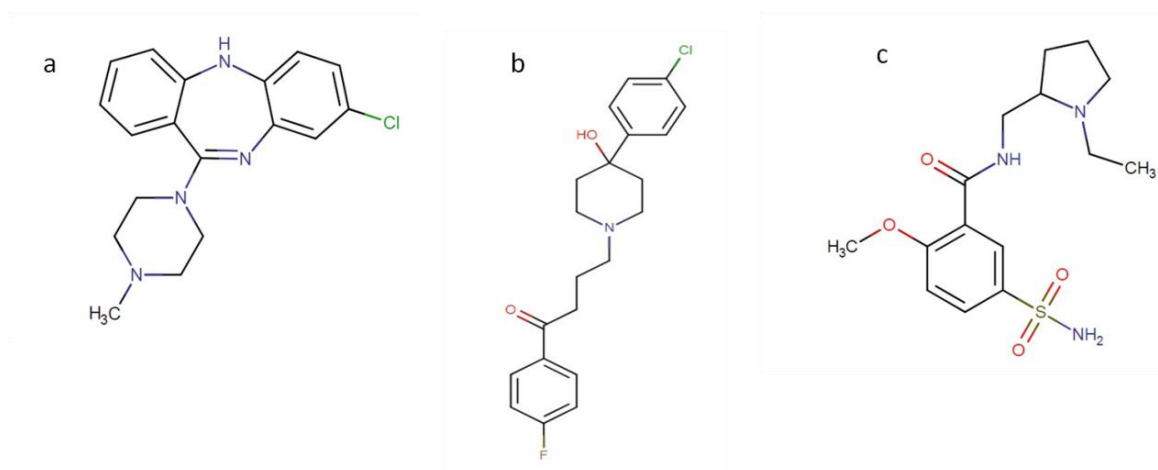
Η κλοζαπίνη ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1960 ανοίγοντας ένα σημαντικό κεφάλαιο της φαρμακολογίας στη θεραπεία της σχιζοφρένειας (Seeman 2014). Είναι ένα άτυπο αντιψυχωσικό φάρμακο και λόγω της χημικής της δομής ανήκει στην κατηγορία των διβενζοδιαζεπινών (Lewis 2017). Σε αντίθεση με τα τυπικά αντιψυχωσικά δεν παράγει σημαντικά εξωπυραμιδικά συμπτώματα, δεν αυξάνει τα επίπεδα της προλακτίνης και δεν προκαλεί την εμφάνιση Παρκινσονικών συμπτωμάτων μετά από μακροχρόνια χρήση (Nucifora, Mihaljevic et al. 2017), (Seeman 2014).

Ως αντιψυχωσικό φάρμακο είναι το μοναδικό που έχει πάρει έγκριση από τον FDA για τη μείωση του ποσοστού αυτοκτονικής συμπεριφοράς σε άτομα με σχιζοφρένεια ή σχιζοσυναισθηματική διαταραχή. Κλινικές δοκιμές έδειξαν ότι η κλοζαπίνη μπορεί να φέρει θετικά αποτελέσματα σε σχιζοφρενείς ασθενείς που δεν κατάφεραν να ανταποκριθούν στη θεραπεία με άλλα αντιψυχωσικά. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση κλοζαπίνης στη θεραπεία της σχιζοφρένειας έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των αρνητικών συμπτωμάτων (Nucifora, Mihaljevic et al. 2017), (Seeman 2014).

Παρά τη σπουδαία αποτελεσματικότητα της, είναι ένα φάρμακο που μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Είναι γνωστό ότι η χορήγηση κλοζαπίνης προκαλεί αύξηση του σωματικού βάρους, διαβήτη, σοβαρή δυσκοιλιότητα και απόφραξη του εντέρου. Η πιο χαρακτηριστική και δυνητικά θανατηφόρα παρενέργεια είναι η εμφάνιση ακοκκιοκυτταραιμίας. Η ακοκκιοκυτταραιμία είναι μία παθολογική κατάσταση κατά την οποία ο αριθμός των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων είναι πολύ χαμηλός. Γι' αυτό το λόγο κρίνεται αναγκαία η παρακολούθηση της συγκέντρωσης των λευκοκυττάρων στο αίμα, σε σχιζοφρενείς υπό θεραπεία με κλοζαπίνη (Seeman 2014).

Η θεραπευτική ιδιότητα της κλοζαπίνης καθώς και οι ανεπιθύμητες ενέργειες οφείλονται στην ικανότητα της να δεσμεύεται σε διάφορους υποδοχείς. Η αποτελεσματικότητα στη θεραπεία της σχιζοφρένειας οφείλεται στην ανταγωνιστική δράση της κλοζαπίνης έναντι των D₂- ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Παρουσιάζει, όμως, πρόσθετο ανταγωνισμό ως προς τους σεροτονινεργικούς (5-HT_{2,6,7}), ισταμινικούς, μουσκαρινικούς, α₁- α₂ αδρενεργικούς και τους ντοπαμινεργικούς D₁, D₄ υποδοχείς (Lewis 2017).

Η κλοζαπίνη μεταβολίζεται εκτενώς στο ήπαρ, μέσω της διαδικασίας της οξείδωσης και της απομεθυλίωσης, σε δραστικούς μεταβολίτες. Η απέκκριση της από τον οργανισμό γίνεται κατά 30% από τη χολή και κατά 80% από τα νεφρά. Χορηγείται από το στόμα και εμφανίζει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (60%- 70%) και χρόνο ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) 14,2 ώρες. Ερευνητικές μελέτες δείχνουν ότι το κύριο ένζυμο μεταβολισμού της είναι το CYP1A2, ενώ σε μικρότερο ποσοστό συμμετέχει το CYP3A4 και CYP2D6 (Pirmohamed, Williams et al. 1995). Επίσης έχουν παρατηρηθεί φαρμακολογικές αλληλεπιδράσεις, ιδιαίτερα με ισχυρούς αναστολείς ή επαγωγείς του κυτοχρώματος CYP1A2. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η σιπροφλοξασίνη, ένας ισχυρός αναστολέας του CYP1A2, και το κάπνισμα, ένας ισχυρός επαγωγέας, οι οποίοι μεταβάλλουν την συγκέντρωση κλοζαπίνης στον ορό του αίματος (Meyer, Proctor et al. 2016), (Rostami-Hodjegan, Amin et al. 2004).



Εικόνα 6: Χημική δομή των φαρμάκων a: κλοζαπίνη, b: αλοπεριδόλη, c: σουλπριδίδη. (πηγή: drugbank.ca)

1.4.4 Ποσοστό εμφάνισης καρκίνου σε ασθενείς με σχιζοφρένεια

Εικασίες ότι ασθενείς με σχιζοφρένεια εμφάνιζαν χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου αναφέρονταν στην βιβλιογραφία από τις αρχές του 1900. Πληθώρα μελετών πραγματοποιήθηκε τα επόμενα χρόνια αλλά καμία δεν κατάφερε να επιβεβαιώσει αυτή τη μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου. Η επιβεβαίωση ήρθε τη δεκαετία του 1970, όταν ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ξεκίνησε μια προοπτική μελέτη παρακολούθησης σχιζοφρενών σε 5 χώρες και παρατήρησε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στους ασθενείς (Cohen, Dembling et al. 2002).

Πλέον υπάρχουν δεκάδες επιστημονικές μελέτες που αναφέρουν είτε μειωμένη συννοσηρότητα μεταξύ σχιζοφρένειας και καρκίνου (Grinshroon, Barchana et al. 2005), (Ji, Sundquist et al. 2013), (Li, Li et al. 2018) είτε αυξημένη (Lichtermann, Ekelund et al. 2001), (Lin, Chen et al. 2013), (Lin, Lane et al. 2013) για διάφορους τύπους καρκίνου. Για παράδειγμα, μια μετα- ανάλυση με 500.000 συμμετέχοντες έδειξε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και μειωμένο κίνδυνο για μελάνωμα και καρκίνο του πνεύμονα (Catala-Lopez, Suarez-Pinilla et al. 2014). Τα αποτελέσματα άλλης μελέτης έδειξαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου και του μαστού και λιγότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, σε αντίθεση με τα αναμενόμενα αποτελέσματα (Ajdacic-Gross, Tschopp et al. 2014). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι ασθενείς με σχιζοφρένεια εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας έναντι του γενικού πληθυσμού (Chou, Tsai et al. 2011) .

Η σχέση μεταξύ καρκίνου και σχιζοφρένειας δεν είναι απλή και μπορεί να φαίνεται παράδοξη. Υπάρχουν παράγοντες που καθορίζουν την αλληλεπίδραση τους συμπεριλαμβανομένων της κατάχρησης ουσιών, την άσκηση, τη διατροφή, τις επιδράσεις της θεραπείας, την υπερπρολακτιναιμία, την παχυσαρκία και το κάπνισμα (Hodgson, Wildgust et al. 2010).

Είναι γνωστό ότι άτομα διαγνωσμένα με σχιζοφρένεια εμφανίζουν διπλάσια ποσοστά καπνίσματος σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, γεγονός που θα έπρεπε να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (McClave, McKnight-Eily et al. 2010). Αντιθέτως, υπάρχουν αρκετές μελέτες που διαπιστώνουν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε σχιζοφρενείς ασθενείς (Hippisley-Cox, Vinogradova et al. 2007), (Chou, Tsai et al. 2011), (Dalton, Mellekjaer et al. 2005), (Gulbinat, Dupont et al. 1992), (Mortensen 1994), (Mortensen 1989). Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στη διατύπωση θεωριών ότι οι ασθενείς με σχιζοφρένεια μπορεί να έχουν δραστικά ογκοκατασταλτικά γονίδια ή

ενισχυμένη δραστικότητα των κυττάρων φυσικών φόνων (Natural Killer Cells) (Rybakowski, Skibinska et al. 2009), (Tabarés-Seisdedos and Rubenstein 2009).

Άλλες υποθέσεις υποστηρίζουν ότι τα αντιψυχωσικά φάρμακα που λαμβάνουν οι ασθενείς ως θεραπεία, μπορεί να έχουν αντι-νεοπλασματικές δράσεις χωρίς να έχουν διευκρινιστεί ακριβώς οι μοριακοί μηχανισμοί που συμμετέχουν (Dalton , Johansen et al. 2006), (Wiklund, Catts et al. 2010). Επίσης μπορεί να ενισχύουν την επίδραση κάποιων αντικαρκινικών φαρμάκων και είναι πιθανό να αναστέλλουν τον μεταβολισμό προκαρκινογόνων ουσιών σε δραστικές καρκινογόνες ουσίες. (Yde, Clausen et al. 2009), (Li, Yao et al. 2017), (Daskalopoulos, Lang et al. 2012), (Harkitis, Daskalopoulos et al. 2015).

ΣΚΟΠΟΣ

Επιδημιολογικές μελέτες των τελευταίων ετών αναφέρουν μειωμένα επίπεδα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε σχιζοφρενείς ασθενείς, παρόλο που εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά καπνίσματος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Το κοινό αυτών των μελετών είναι ότι οι ασθενείς, που συμπεριλήφθηκαν βρίσκονταν υπό θεραπεία με αντιψυχωσικά φάρμακα. Επίσης, πειραματικές μελέτες, που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, έδειξαν ότι εκλεκτικοί ανταγωνιστές των D₂-υποδοχέων αναστέλλουν τον μεταβολισμό προκαρκινογόνων ουσιών σε δραστικές καρκινογόνες ουσίες. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών μπορεί να υποδεικνύουν φαρμακολογική βάση στην μειωμένη εμφάνιση καρκίνου. Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή αντικαρκινική δράση των αντιψυχωσικών φαρμάκων έναντι του καρκίνου του πνεύμονα. Γι αυτό το σκοπό, δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα NSCLC, η A549 και H1299, εκτέθηκαν στα τυπικά αντιψυχωσικά, αλοπεριδόλη και σουλπιρίδη, και στο άτυπο αντιψυχωσικό κλοζαπίνη και αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιούνται ευρέως στη κυτταρική και μοριακή βιολογία. Αποτελούν ιδανικά μοντέλα για τη μελέτη της φυσιολογίας και βιοχημείας των κυττάρων, της επίδρασης φαρμάκων και τοξικών ουσιών, και της καρκινογένεσης. Επίσης, χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη φαρμάκων και μεγάλης κλίμακας βιολογικών ενώσεων (π.χ. εμβολίων). Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης κυτταροκαλλιεργειών είναι η επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων.

Οι συνθήκες καλλιέργειας ποικίλλουν για κάθε τύπο κυττάρου, αλλά το τεχνητό περιβάλλον ανάπτυξης προσομοιάζει της φυσιολογικές συνθήκες που συναντώνται σε έναν οργανισμό. Έτσι χρησιμοποιούνται ειδικά κατεργασμένα τρυβλία ή φλάσκες, τα οποία περιέχουν ένα υπόστρωμα ή ένα θρεπτικό υλικό παρέχοντας τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (αμινοξέα, υδατάνθρακες, βιταμίνες), αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και επωαστικοί κλίβανοι οι οποίοι διατηρούν σταθερές τις φυσικοχημικές παραμέτρους όπως τα αέρια (O_2 , CO_2), τη θερμοκρασία και το pH.

Τα περισσότερα κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε ένα στερεό ή ημιστερεό υπόστρωμα, σχηματίζοντας ένα κυτταρικό ταπήτιο ή αλλιώς κυτταρική στιβάδα, ενώ άλλα μπορούν να αναπτυχθούν σε υγρές καλλιέργειες ή αλλιώς καλλιέργειες εναιωρήματος (Cell culture basics, Invitrogen/ Gibco).

Για τη μελέτη του καρκίνου χρησιμοποιούνται διάφορες κυτταρικές σειρές, ανάλογα τον τύπο που αναπτύσσεται. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται κυρίως για τη μελέτη του καρκίνου του πνεύμονα είναι η A549 και η H1299, οι οποίες χρησιμοποιηθήκαν και στη παρούσα μελέτη.

A549: Ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος με μεταλλαγή του γονιδίου *KRAS*. Απομονώθηκαν από έναν 58χρονο Καυκάσιο άντρα το 1972.

H1299: Ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα, απομονωμένα από λεμφαδένα ασθενή (Καυκάσιος άντρας 43 ετών) με Μη Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα στο στάδιο της μετάστασης. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν μερική ομόζυγη αποσιώπηση του γονιδίου *TP53*, με αποτέλεσμα να μην εκφράζουν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Επίσης, εκκρίνουν το ορμονικό πεπτίδιο νευρομεδίνη Β.

2.1.1 Ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών

Ο χειρισμός των κυττάρων έγινε σε εστία κάθετης νηματικής ροής (laminar flow hood) για αποτροπή ανεπιθύμητων μολύνσεων και η καλλιέργεια αναπτύχθηκε σε ειδικά κατασκευασμένα τρυβλία για την προσκόλληση των κυττάρων. Ως θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το DMEM(1x)+GlutaMAX™ (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό ορό μόσχου, FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (P/S, penicillin/streptomycin, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Ο εμβρυικός ορός μόσχου, FBS, περιέχει απαραίτητες πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες και χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων για την επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για την διατήρηση σταθερού pH.

2.1.2 Αποθήκευση των κυττάρων στο υγρό άζωτο (Κρυοσυντήρηση)-Ανασύσταση των κυττάρων από το υγρό άζωτο

Η κρυοσυντήρηση είναι η διαδικασία κατά την οποία κύτταρα, ιστοί ή όργανα αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο (-196 °C), με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε μεταγενέστερη χρονική στιγμή. Σε αυτή τη θερμοκρασία ο μεταβολισμός διακόπτεται σχεδόν απολύτως.

Μόλις η επιφάνεια του τρυβλίου καλυφθεί σε ποσοστό 80%- 90%, κατάσταση κατά την οποία η ανάπτυξη τους δεν επηρεάζεται από την έλλειψη χώρου, τα κύτταρα επανακαλλιεργούνται, μετρώνται και επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό κατάψυξης που περιέχει εμβρυικό ορό μόσχου, FBS, και 10% (v/v) Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Το Dimethyl sulfoxide (DMSO) είναι ένας πολικός, απρωτικός διαλύτης ο οποίος παγιδεύει αντιστρεπτά τα κύτταρα στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται, λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικό αποτρέποντας τη δημιουργία κρυστάλλων νερού που θα οδηγούσε στην καταστροφή των κυττάρων.

Το θρεπτικό υλικό κατάψυξης αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά και στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την επαναιώρηση των κυττάρων. Σε κάθε φιαλίδιο κατάψυξης

(Cryovial) αποθηκεύονται περίπου, $2-3 \times 10^6$ κύτταρα. Στη συνέχεια, το Cryovial τοποθετείται άμεσα στους $-80\text{ }^\circ\text{C}$ για ολονύκτια επώαση και την επόμενη μέρα μεταφέρεται στο υγρό άζωτο. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται σταδιακά η κατάψυξη των κυττάρων και η αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για κύτταρα που επιθυμείται να ξεπαγώσουν και να καλλιεργηθούν, γίνεται μεταφορά του Cryovial από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας $37\text{ }^\circ\text{C}$, όπου και αφήνεται για 3-5 λεπτά μέχρι να τήξει το κυτταρικό εναιώρημα. Στη συνέχεια, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται άμεσα σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό. Μετά το πέρας ενός 24ώρου πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού ώστε να απομακρυνθεί το DMSO το οποίο πιθανώς να δράσει τοξικά.

2.1.3 Επανακαλλιέργεια κυττάρων

Η επανακαλλιέργεια πρέπει να γίνεται σε συχνά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με το είδος της κυτταρικής σειράς που δουλεύεται, ώστε να διασφαλίζεται η ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων και ο κατάλληλος αριθμός τους για τα πειράματα. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 80%-90% της επιφάνειας του τρυβλίου, τότε πραγματοποιείται η διαδικασία της επανακαλλιέργειας.

Η επανακαλλιέργεια των A549 και H1299 κυττάρων γινόταν μέχρι τη γενιά (passage) 5. Για τις πλύσεις χρησιμοποιείται διάλυμα φωσφορικών αλάτων, PBS (Phosphate Buffered Saline (1x), Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας χρησιμοποιείται διάλυμα τρυψίνης (1x) (0,5% Trypsin EDTA (10x), Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Η τρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια πρωτεασών σερίνης. Χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιέργειες για να αποκόπτει τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του τρυβλίου, επιτρέποντας την αποκόλλησή τους.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

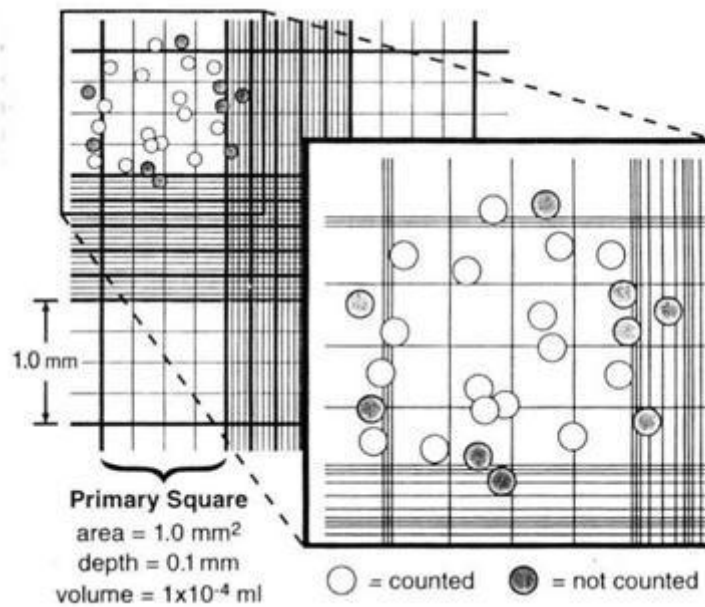
1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα με πιπέτα Pasteur και έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με (1x) PBS, ποσότητας 4 ml/φορά, για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ορού ο οποίος περιέχει θρεπτικό υλικό και αδρανοποιεί την τρυψίνη.

2. Προσθήκη 1 ml τρυψίνης (1X) σε 10 cm τρυβλίο και επώαση στον κλίβανο στους 37 °C για 2-3 λεπτά.
3. Προσθήκη 9ml θρεπτικού μέσου, με στόχο την απενεργοποίηση της τρυψίνης και έντονο πιπετάρισμα του κυτταρικού εναιώρηματος ώστε τα κύτταρα να γίνουν μονήρη.
4. Μεταφορά της επιθυμητής ποσότητας κυτταρικού εναιωρήματος σε νέα τρυβλία αφού προηγουμένως έχει προστεθεί θρεπτικό μέσο.

2.1.4 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Η μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer είναι η πιο άμεση, απλή και αποδοτική μέθοδος μέτρησης κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Μέσω αυτής παρακολουθείται η ανάπτυξη των κυττάρων και γίνεται κατάλληλα η επιλογή του αριθμού των κυττάρων που πρέπει να επιστρωθεί ώστε να επιτευχθεί ιδανική πληρότητα για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer είναι μια τροποποιημένη και διαβαθμισμένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες, λείες επιφάνειες. Σε κάθε μια από αυτές διακρίνεται ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Το καθένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που χρησιμεύουν για τον καθορισμό της θέσης των κυττάρων (το αν αυτά βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα). Επίσης, κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα χωρίζεται σε μικρότερα τετράγωνα που εξυπηρετούν στην ευκολότερη μέτρηση των κυττάρων. Το αιμοκυτταρόμετρο εμφανίζει δυο ίσου μεγέθους, λείες, προεξέχουσες επιφάνειες, με επίπεδο παράλληλο με τις διαγραμμισμένες, που ονομάζονται «ράχες», και στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από τις «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια η οποία ονομάζεται αυλάκωση. Στην αυλάκωση τοποθετείται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο απλώνεται με τριχοειδικά φαινόμενα στη τετραγωνισμένη επιφάνεια.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer.

Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται τοποθετώντας 10 μl τρυψινοποιημένου κυτταρικού εναιωρήματος σε κάθε μία από τις δύο λείες επιφάνειες. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύψει το ένα από τα εννιά τετράγωνα είναι 1×10^{-4} ml. Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα/ml) υπολογίζεται ως, ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων στους δύο σταυρούς επί 10^4 .

2.2 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση Σουλφοροδαμίνης Β (SRB assay)

Η δοκιμασία σουλφοροδαμίνης Β (sulforhodamine B, SRB, Sigma-Aldrich®, Missouri, USA) αναπτύχθηκε το 1990 και αποτελεί μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους ελέγχου της κυτταροτοξικότητας και της κυτταρικής επιβίωσης (Vichai and Kirtikara 2006). Βασίζεται στην ιδιότητα του SRB να δεσμεύει τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα κυττάρων, αφού πρώτα αυτά έχουν μονιμοποιηθεί με τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA, Fisher Scientific®, Thermo Fisher Scientific, UK). Μετά από μια περίοδο επώασης με τις προς μελέτη ενώσεις, οι μονοστιβάδες κυττάρων σταθεροποιούνται με 10% TCA και χρωματίζονται για 10 λεπτά, η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνεται με πλύσεις με οξικό οξύ 1%. Πιο συγκεκριμένα, το TCA έχει την ιδιότητα να μετουσιώνει και να κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες των κυττάρων, αφήνοντας έτσι ελεύθερα κατάλοιπα για να δεσμευθεί το SRB. Το SRB είναι μία χρωστική, η οποία συνδέεται με αμινοξικά κατάλοιπα πρωτεϊνών υπό ήπια όξινες συνθήκες και διαλυτοποιείται κάτω από βασικές συνθήκες. Η συνδεδεμένη με πρωτεΐνες χρωστική διαλυτοποιείται σε διάλυμα 10 mM Tris-base, pH=10,5 και η μέτρηση γίνεται σε φασματοφωτόμετρο ELISA στα 492 nm. Η διαδικασία γίνεται σε αποστειρωμένα 96-well πιάτα.

Ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης της εξεταζόμενης κυτταρικής σειράς θα επιστρωθεί διαφορετικός αριθμός κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι του 96-well πιάτου. Μετά το πέρας 24 ωρών ένα πιάτο από κάθε ομάδα πειραμάτων μονιμοποιείται με 10% TCA, αντικατοπτρίζοντας τον αρχικό πληθυσμό καλλιέργειας πριν την προσθήκη των προς μελέτη ενώσεων (T_0).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Προσθήκη 100μl κυτταρικού εναιωρήματος σε κάθε πηγαδάκι.
2. Επώαση του πιάτου για 24 ώρες σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂.
3. Προσθήκη των προς μελέτη ενώσεων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και για διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης, και σε ανάλογο όγκο για να καταλήξουμε στην επιθυμητή τελική συγκέντρωση.
4. Τερματισμός του πειράματος με προσθήκη 50μl κρύου 50% TCA (τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 10%).
5. Επώαση για 1 ώρα στους 4 °C.
6. Αφαίρεση του υπερκειμένου και πλύσεις με νερό βρύσης.

7. Τα πιάτα αφήνονται να στεγνώσουν overnight σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Προσθήκη 100μl 0,4% w/v διαλύματος SRB (διαλυμένη σε 1% οξικό οξύ).
9. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
10. Πλύσεις με 1% οξικό οξύ για να απομακρυνθεί όση χρωστική δεν έχει προσδεθεί.
11. Τα πιάτα αφήνονται να στεγνώσουν για περίπου 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Προσθήκη 200μl 10mM Tris-base(pH 10,5).
13. Επώαση υπό ανακίνηση σε αναδευτήρα κλίσης για 30 λεπτά.
14. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο ELISA στα 492nm.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται καλλιέργεια στην οποία έχει προστεθεί αντίστοιχη ποσότητα, με αυτή των ενώσεων, DMSO σε τελική συγκέντρωση 1/1000 (stock 1% σε μέσο), ενώ ως θετικός μάρτυρας καλλιέργεια στην οποία έχει προστεθεί αντίστοιχη ποσότητα μέσου.

Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις απορρόφησης από τα πηγαδάκια που αντικατοπτρίζουν των αρχικό πληθυσμό των κυττάρων πριν την προσθήκη των ενώσεων, τα κύτταρα μάρτυρες και τα κύτταρα στα οποία έχει γίνει το κάθε treatment υπολογίζεται η ποσοστιαία ανάπτυξη για κάθε treatment.

Η επί της % κυτταρική αναστολή υπολογίζεται από τις παρακάτω σχέσεις:

$$\frac{(OD_{\text{δείγματος}} - ODT_0)}{ODT_0} * 100, \text{ για απορροφήσεις δείγματος } < ODT_0$$

$$\frac{(OD_{\text{δείγματος}} - ODT_0)}{OD_{\text{αρνητικού μάρτυρα}} - ODT_0} * 100, \text{ για απορροφήσεις δείγματος } > ODT_0$$

2.3 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η παρατήρηση και ο διαχωρισμός κυττάρων βάσει φυσικών και βιολογικών χαρακτηριστικών. Τα κύτταρα ενός εναιωρήματος περνάνε ένα προς ένα από ειδικό κανάλι και ακτινοβολούνται από δέσμη laser. Στη συνέχεια αισθητήρες συλλέγουν το φως που σκεδάζεται ή εκπέμπεται από αυτά. Η ανίχνευση σκέδασης παράλληλα με τη δέσμη laser αφορά στην πρόσθια σκέδαση (forward scatter) και αποτελεί παράμετρο ενδεικτική του μεγέθους των κυττάρων. Η ανίχνευση σκέδασης κάθετα στη δέσμη laser αφορά στην πλάγια σκέδαση (side scatter) και αποτελεί παράμετρο ενδεικτική της κοκκίωσης. Επίσης τα κύτταρα μπορούν να σημανθούν με φθορίζουσα ουσία και να εκπέμπουν ακτινοβολία μετά από διέγερση με τη δέσμη laser.

Στη συνέχεια το σήμα ψηφιοποιείται και τα δεδομένα αναλύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η ανίχνευση κάθε κυττάρου αποτελεί ένα γεγονός (event). Το λογισμικό του κυτταρομέτρου αναλύει την ένταση σήματος από κάθε event χωριστά και δημιουργεί διαγράμματα με τη μορφή ιστογράμματος ή διπαραμετρικού σημειογραφήματος σε περίπτωση ανάλυσης δύο παραμέτρων. Επίσης, δίνεται η δυνατότητα οριοθέτησης του πληθυσμού κυττάρων (gating) με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά προκειμένου να αναλυθούν επιπλέον παράμετροι. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη βασικής βιολογίας κυττάρων, την ανάλυση κυτταρικών λειτουργιών, τη μελέτη του καρυότυπου, την ταυτοποίηση και απομόνωση βλαστικών κυττάρων, τη διάγνωση ασθενειών και την ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της απόπτωσης η δοκιμασία της ανεξίνης.

2.3.1 Ανάλυση της απόπτωσης μέσω της δοκιμασίας annexin V- PI (Propidium Iodine)

Η annexin V (annexin A5) είναι μια κυτταρική πρωτεΐνη, η οποία έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στη φωσφατιδυλοσερίνη, με τρόπο εξαρτώμενο από το ασβέστιο. Η φωσφατιδυλοσερίνη είναι ένα φωσφολιπίδιο που εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Κατά την απόπτωση μετατοπίζεται στην εξωτερική πλευρά και μπορεί να ανιχνευθεί από τη συζευγμένη με φθορίζουσα ουσία annexin V. Από την άλλη το PI είναι μια φθορίζουσα ουσία που διαπερνά τη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων και προσδένεται στο DNA χρησιμεύοντας ως δείκτης νέκρωσης. Με αυτή τη δοκιμασία τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να διαχωριστούν από τα αποπτωτικά και νεκρά

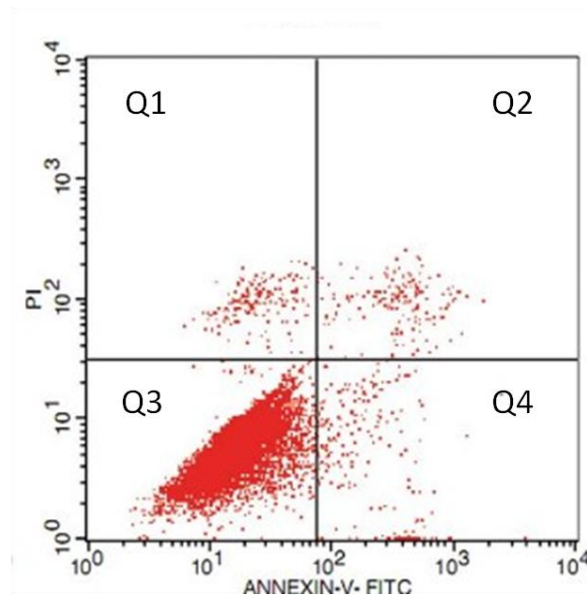
κύτταρα τα οποία ανιχνεύονται από την annexin V και το PI, αντίστοιχα. Τα κύτταρα που προσλαμβάνουν annexin V κατηγοριοποιούνται ως κύτταρα που βρίσκονται στην αρχική φάση της απόπτωσης, ενώ τα κύτταρα που προσλαμβάνουν annexin V και PI είναι κύτταρα της καθυστερημένης φάσης της απόπτωσης.

Μετά από περίοδο επώασης με τις προς μελέτη ενώσεις, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και πλύθηκαν με διάλυμα φωσφορικών αλάτων, PBS (1x). Έπειτα, επαναιωρήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης annexin V (Annexin V Binding Buffer, Biolegend®, San Diego, USA), σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml. Το Annexin V Binding Buffer διευκολύνει τη δέσμευση της annexin V στη φωσφατιδυλοσερίνη. Στη συνέχεια εναιώρημα κυττάρων, συγκέντρωσης 10^5 κύτταρα/ 100μl Annexin V Binding Buffer, επωάζεται παρουσία ενός διαλύματος annexin V συζευγμένης με φθοριόχρωμα (fluorochrome conjugated Annexin V) και ενός διαλύματος PI (Biolegend®, San Diego, USA). Τέλος, τα δείγματα αναλύονται στο κυτταρόμετρο CyFlow® ML (Partec, Germany).

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται καλλιέργεια στην οποία έχει προστεθεί DMSO ενώ ως θετικός μάρτυρας καλλιέργεια στην οποία έχει προστεθεί υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 , που έχει την ιδιότητα να επάγει την απόπτωση.

Η διαδικασία, που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Μετά το treatment τα κύτταρα, θρυψινοποιούνται και πλένονται με PBS (1x).
2. Φυγοκέντρηση υπερκειμένου για 5 λεπτά σε 2.500 rpm στους 4 °C.
3. Απόρριψη υπερκειμένου, πλύση του ιζήματος με PBS (1x) και επανάληψη του βήματος 2.
4. Επαναιώρηση του ιζήματος σε Annexin V Binding Buffer, σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml.
5. Μεταφορά 100μl κυτταρικού εναιωρήματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 5ml.
6. Προσθήκη 5μl διαλύματος fluorochrome conjugated Annexin V.
7. Προσθήκη 10μl διαλύματος PI και ήπια ανάδευση.
8. Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
9. Προσθήκη 400μl Annexin V Binding Buffer.
10. Ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής.



Εικόνα 8: Πρότυπο αποτέλεσμα μελέτης της απόπτωσης.

Q1: νεκρά κύτταρα (necrotic cells), Q2: κύτταρα της καθυστερημένης φάσης της απόπτωσης (late apoptotic), Q3: ζωντανά κύτταρα (live cells), Q4: κύτταρα της αρχικής φάσης της απόπτωσης (early apoptotic) (Ravi Hingorani, Jun Deng et al. 2011)

2.4. Φαρμακολογικοί Χειρισμοί

Αφού επανακαλλιεργήθηκαν τα κύτταρα, έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός τους και τοποθετήθηκαν σε 96-well πιάτα, όπου οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε επωαστήρα στους 37 °C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα άρχισαν τα πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ποικίλες συγκεντρώσεις φαρμάκων για διάφορους χρόνους επώασης. Η χορήγηση των φαρμάκων πραγματοποιούνταν κάθε μέρα μέχρι την ολοκλήρωση του treatment.

Για τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης οι καλλιέργειες εκτέθηκαν σε:

- Αλοπεριδόλη (τυπικό αντιψυχωσικό) (Alfa Aesar[®], Thermo Fisher (Kandel) GmbH, Germany) σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 0,3- 100 μM
- Σουλπιρίδη (τυπικό αντιψυχωσικό) (Sigma-Aldrich[®], Missouri, USA) σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 1- 100μM
- Κλοζαπίνη (άτυπο αντιψυχωσικό) (Sigma-Aldrich[®], Missouri, USA) σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 5- 100μM

Και οι δυο κυτταρικές σειρές επωάστηκαν με τα ανωτέρω φάρμακα για διάφορες χρονικές περιόδους, από 24 μέχρι 96 ώρες.

Για τον έλεγχο της απόπτωσης οι καλλιέργειες εκτέθηκαν σε:

- Αλοπεριδόλη, σουλιριδίδη, κλοζαπίνη σε συγκέντρωση 50μM για χρονικό διάστημα 48 ωρών
- Υπεροξειδίου του υδρογόνου H₂O₂ (επαγωγέας της απόπτωσης) (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA) σε συγκέντρωση 500μM για την A549 κυτταρική σειρά και σε συγκέντρωση 750μM για την H1299 κυτταρική σειρά. Η επώαση πραγματοποιείται για 7 ώρες.

2.5. Στατιστική Ανάλυση

Τα δεδομένα στα γραφήματα εκφράστηκαν ως Μέσος Όρος ± Τυπικό Σφάλμα (mean ± SE) και αξιολογήθηκαν με Student's t-test. Ως επίπεδο σημαντικότητας όλων των αναλύσεων καθορίστηκε όριο μικρότερο ή ίσο του 0.05 (P<0.05).

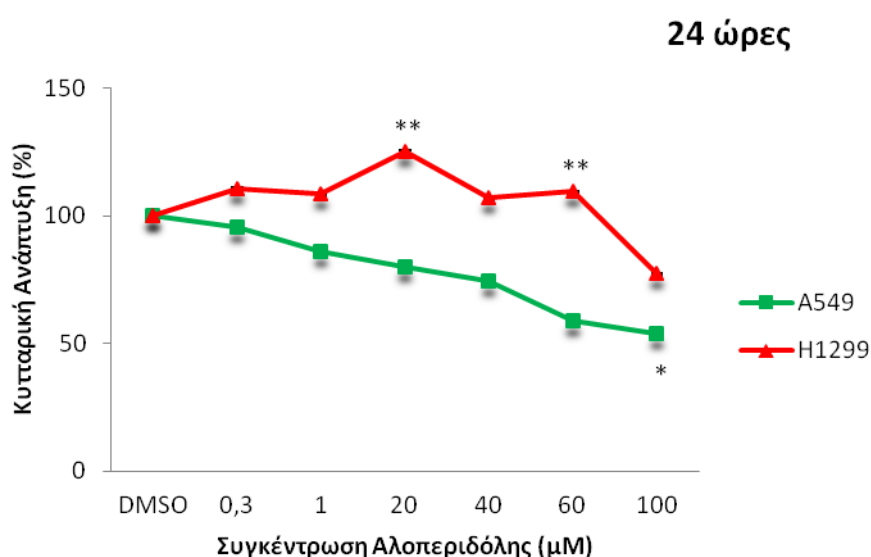
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των αντιψυχωσικών φαρμάκων στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα

Η καρκινική κυτταρική σειρά πνεύμονα A549 και η καρκινική κυτταρική μεταστατική σειρά πνεύμονα H1299 εκτέθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων για το κάθε φάρμακο, σε τέσσερα διαφορετικά χρονικά διαστήματα, 24, 48, 72, 96 ωρών. Για την κυτταρική σειρά A549 και τα χρονικά διαστήματα επώασης 24 και 48 ωρών επιστρώθηκαν 5000 κύτταρα ανά πηγαδάκι ενώ για τα χρονικά διαστήματα 72 και 96 ωρών επιστρώθηκαν 3000 κύτταρα. Για την κυτταρική σειρά H1299 και τα χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών επιστρώθηκαν 4000 κύτταρα ενώ για τα χρονικά διαστήματα 72 και 96 ωρών επιστρώθηκαν 2500 κύτταρα. Η διαφορά στον αριθμό των κυττάρων μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών έγκειται στην υψηλότερη πολλαπλασιαστική ικανότητα των H1299. Ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε ύστερα από πιλοτικές μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν πριν την έναρξη των κυρίων πειραμάτων. Για τα χρονικά διαστήματα των 72 και 96 ωρών χρησιμοποιήθηκε μικρότερος αριθμός κυττάρων ώστε να εξασφαλιστεί η ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων και η πιθανή μείωση του κυτταρικού πληθυσμού να οφείλεται στη δράση του εκάστοτε φαρμάκου. Η αξιολόγηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλπριρίδη, κλοζαπίνη και η άμεση επίδραση τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των δύο κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία SRB.

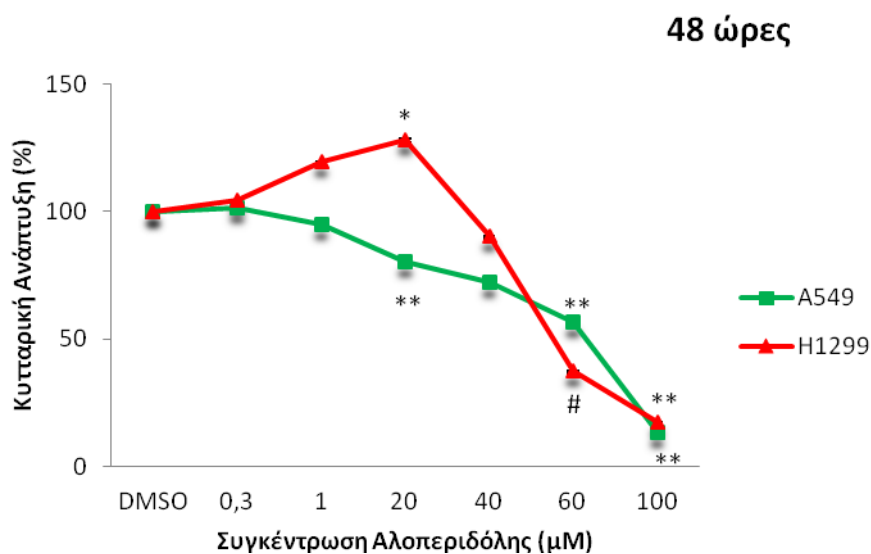
3.1.1. Επίδραση του τυπικού αντιψυχωσικού αλοπεριδόλης στην κυτταρική επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, A549 και H1299

Η αλοπεριδόλη είναι ένα τυπικό αντιψυχωσικό φάρμακο με υψηλή συγγένεια προς του D₂-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς και αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο φάρμακο σε ασθενείς με σχιζοφρένεια και σχιζοφρενοειδείς διαταραχές. Και οι δύο καρκινικές σειρές πνεύμονα εκτέθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων αλοπεριδόλης από 0,3μM έως 100μM, με τη συγκέντρωση των 0,3μM κατά προσέγγιση να αντιστοιχεί στη μέση θεραπευτική δόση που χορηγείται (5mg), για τέσσερα χρονικά διαστήματα, 24, 48, 72 και 96 ωρών.



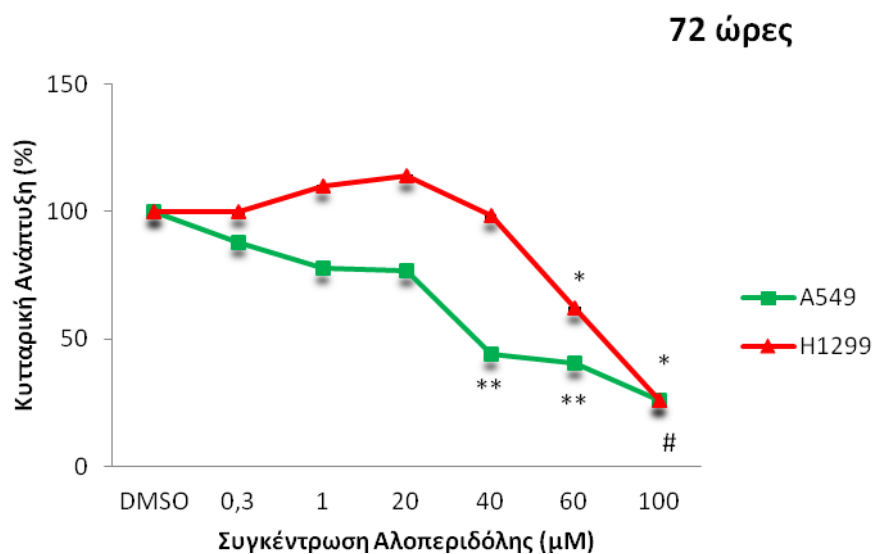
Γράφημα 1: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 24ωρη έκθεση σε Αλοπεριδόλη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0.05, **P < 0.01). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Μελετήθηκε η επίδραση της αλοπεριδόλης στην κυτταρική ανάπτυξη για περίοδο έκθεσης 24 ωρών. Η έκθεση σε αλοπεριδόλη επιδρά αρνητικά στην κυτταρική ανάπτυξη μειώνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των **A549** καρκινικών κυττάρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο καθώς παρατηρείται αυξανόμενη μείωση με την αύξηση της συγκέντρωσης. Για την κυτταρική σειρά **H1299**, σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μόνο για την υψηλότερη συγκέντρωση των 100μM.



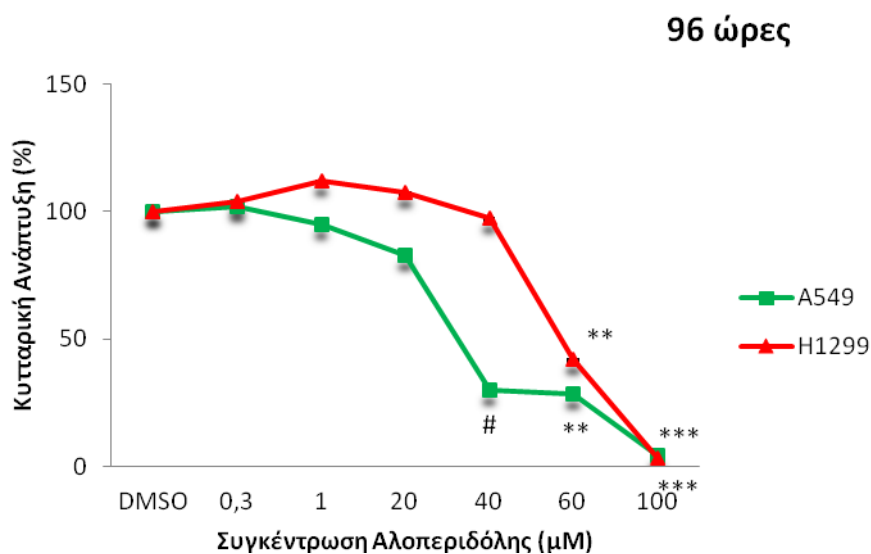
Γράφημα 2: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 48ωρη έκθεση σε αλοπεριδόλη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0.05, **P < 0.01, #P < 0.005). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Για την χρονική περίοδο έκθεσης 48 ωρών παρατηρείται η δόσοεξαρτώμενη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των **A549** καρκινικών κυττάρων, σε πιο έντονο βαθμό από αυτή που παρατηρήθηκε στην περίοδο των 24 ωρών. Σε αυτό το χρονικό διάστημα η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των **H1299** καρκινικών κυττάρων λόγω της επίδρασης της αλοπεριδόλης παρατηρείται από τη συγκέντρωση των 40μΜ, ακολουθώντας επίσης δόσοεξαρτώμενη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέχρι τη συγκέντρωση των 100μΜ. Η μεγαλύτερη μείωση εμφανίζεται στις συγκεντρώσεις των 60μΜ και 100μΜ.



Γράφημα 3: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 72ωρη έκθεση σε αλοπεριδόλη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0.05, **P < 0.01, #P < 0.005). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Για την χρονική περίοδο έκθεσης 72 ωρών παρατηρείται πιο έντονη δόσοεξαρτώμενη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των **A549** καρκινικών κυττάρων, σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε στα χρονικά διαστήματα των 24 και 48 ωρών. Και στις 72 ώρες επώασης με αλοπεριδόλη, η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των **H1299** καρκινικών κυττάρων φαίνεται ότι είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε για το χρονικό διάστημα των 48 ωρών. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση της εμφανίζεται από τη συγκέντρωση των 40μΜ, ακολουθώντας δόσοεξαρτώμενη αποτελεσματικότητα μέχρι τη συγκέντρωση των 100μΜ. Η μεγαλύτερη μείωση εμφανίζεται στις συγκεντρώσεις των 60μΜ και 100μΜ.

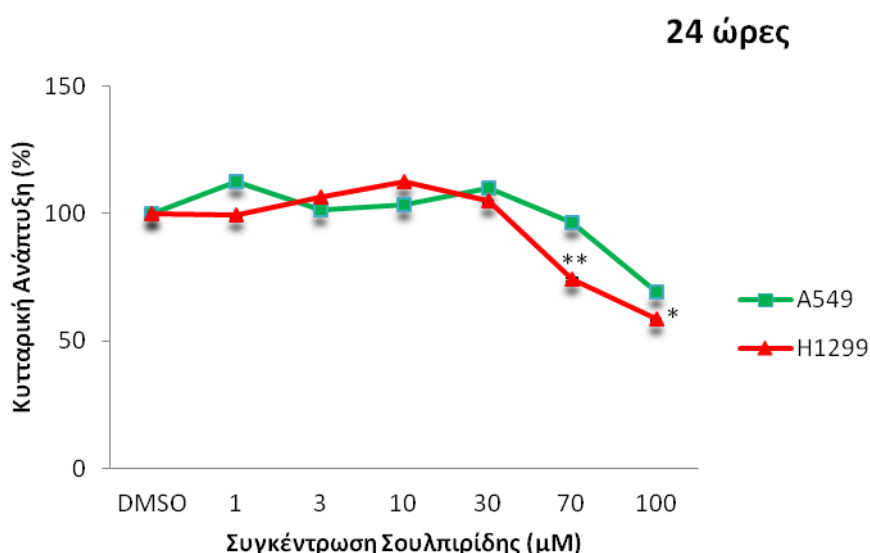


Γράφημα 4: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 96ωρη έκθεση σε αλοπεριδόλη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, **P < 0.01, ***P < 0,001, #P < 0.005). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Για την χρονική περίοδο έκθεσης 96 ωρών παρατηρείται δόσοεξαρτώμενη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των **A549** καρκινικών κυττάρων, σε πιο έντονο βαθμό από αυτή που παρατηρήθηκε στις προηγούμενες περιόδους. Για την υψηλότερη συγκέντρωση των 100μΜ παρατηρείται πλήρης αναστολή του πολλαπλασιασμού. Σε αυτό το χρονικό διάστημα η επίδραση της αλοπεριδόλης στην κυτταρική ανάπτυξη των κυττάρων της καρκινικής σειράς **H1299** ακολουθεί τον ίδιο δόσοεξαρτώμενο τρόπο όπως στα χρονικά διαστήματα των 48 και 72 ωρών. Συγκεκριμένα, η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των H1299 καρκινικών κυττάρων εμφανίζεται από τη συγκέντρωση των 40μΜ, ακολουθώντας δόσοεξαρτώμενη αποτελεσματικότητα μέχρι τη συγκέντρωση των 100μΜ. Η μεγαλύτερη μείωση εμφανίζεται στις συγκεντρώσεις των 60μΜ και 100μΜ. Η δράση της αλοπεριδόλης είναι πιο έντονη συγκριτικά με τις προηγούμενες χρονικές περιόδους και παρατηρείται ότι για τη μέγιστη συγκέντρωση των 100μΜ το αποτέλεσμα είναι σχεδόν ίδιο με αυτό που παρατηρείται στα κύτταρα της A549 καρκινικής σειράς.

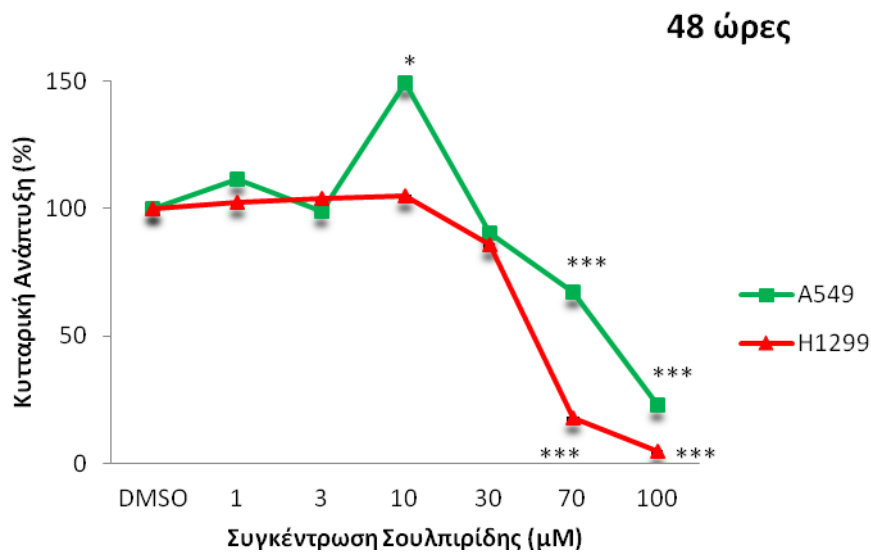
3.1.2. Επίδραση του τυπικού αντιψυχωσικού σουλπιρίδη στην κυτταρική επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, A549 και H1299

Η σουλπιρίδη είναι ένα τυπικό αντιψυχωσικό φάρμακο έχοντας εκλεκτική συγγένεια προς του D₂- ντοπαμινεργικούς υποδοχείς. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας και εμφανίζει τις λιγότερες παρενέργειες. Και οι δύο καρκινικές σειρές πνεύμονα εκτέθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων σουλπιρίδης από 1μM έως 100μM, με την συγκέντρωση των 18 μM κατά προσέγγιση να αντιστοιχεί στη μέση θεραπευτική δόση που χορηγείται (300mg), για τέσσερα χρονικά διαστήματα, 24, 48, 72 και 96 ωρών.



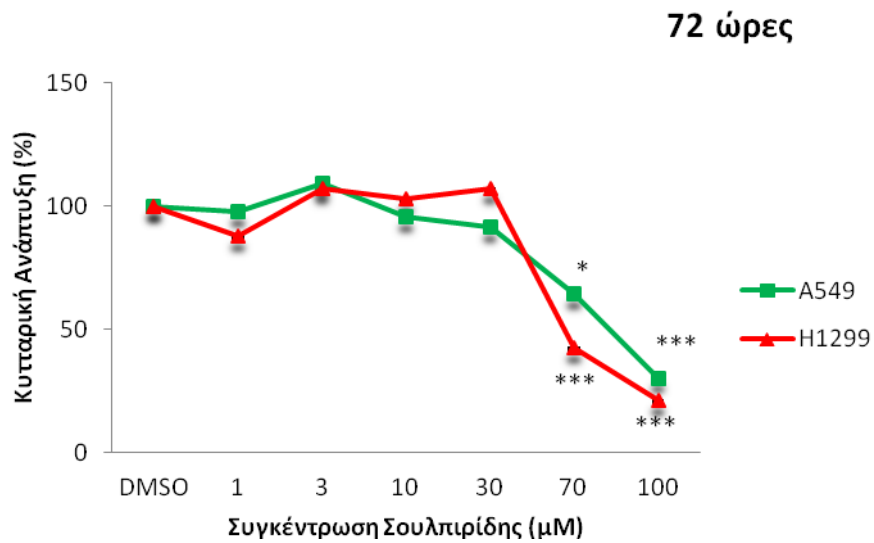
Γράφημα 5: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 24ωρη έκθεση σε σουλπιρίδη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0,05, **P < 0.01). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Μελετήθηκε η επίδραση της σουλπιρίδης στην κυτταρική ανάπτυξη για περίοδο έκθεσης 24 ωρών. Και στις δύο κυτταρικές σειρές, **A549** και **H1299**, η έκθεση σε σουλπιρίδη επιδρά αρνητικά στην κυτταρική ανάπτυξη μόνο στις μέγιστες συγκεντρώσεις επώασης. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εμφανίζεται από τη συγκέντρωση των 70μM, με τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα να εμφανίζεται στην υψηλότερη συγκέντρωση των 100μM.



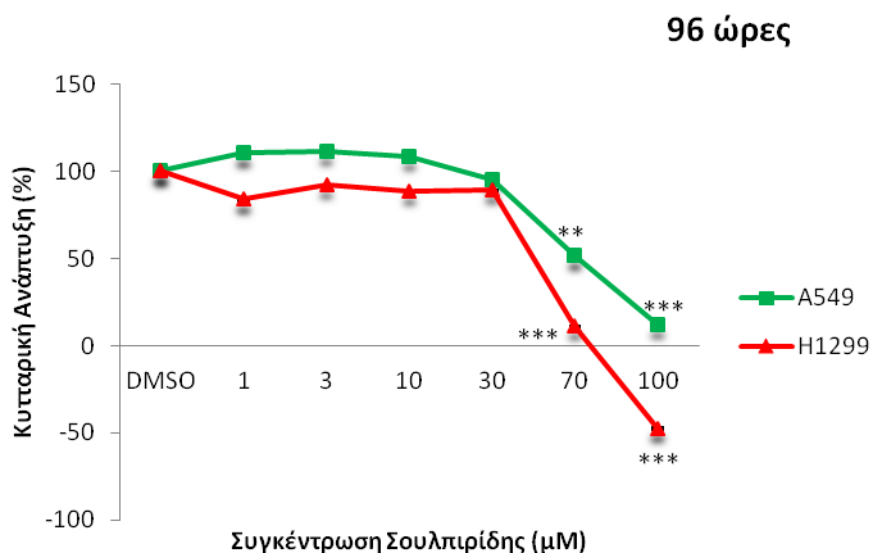
Γράφημα 6: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 48ωρη έκθεση σε σουλπιρίδη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0,05, *** P < 0.001). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Για τη χρονική περίοδο έκθεσης 48 ωρών παρατηρείται μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού της **A549** και **H1299** κυτταρικής σειράς, η οποία εμφανίζεται επίσης από τη συγκέντρωση των 70μΜ και κορυφώνεται στη συγκέντρωση των 100μΜ. Συγκριτικά με το χρονικό διάστημα των 24 ωρών, η επίδραση της σουλπιρίδης φαίνεται να είναι πιο έντονη ύστερα από 48 ώρες.



Γράφημα 7: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 72ωρη έκθεση σε σουλπιρίδη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, * $P < 0,05$, *** $P < 0.001$). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Ίδια εικόνα με τα προηγούμενα χρονικά διαστήματα παρατηρείται και ύστερα από 72 ώρες επώασης των κυττάρων με σουλπιρίδη. Και στις δυο κυτταρικές σειρές, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναστέλλεται μόνο στις μέγιστες συγκεντρώσεις των 70μM και 100μM.

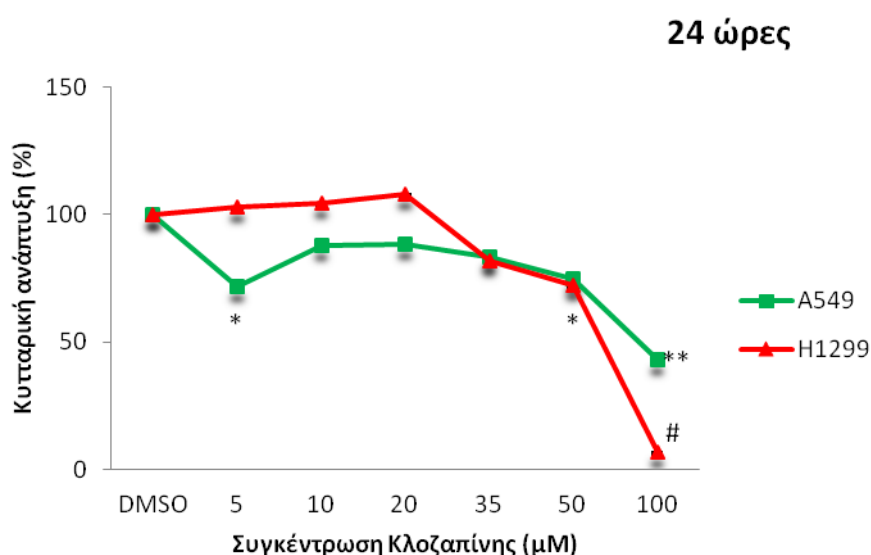


Γράφημα 8: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 96ωρη έκθεση σε σουλπιρίδη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0,05, **P < 0.01, ***P < 0.001). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Παρόμοια εικόνα με τα προηγούμενα χρονικά διαστήματα παρατηρείται και ύστερα από 96 ώρες επώασης των κυττάρων με σουλπιρίδη. Και στις δυο κυτταρικές σειρές, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναστέλλεται μόνο στις μέγιστες συγκεντρώσεις των 70μM και 100μM. Μάλιστα για τα H1299 παρατηρούμε ότι η σουλπιρίδη 100μM προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό περίπου 50%.

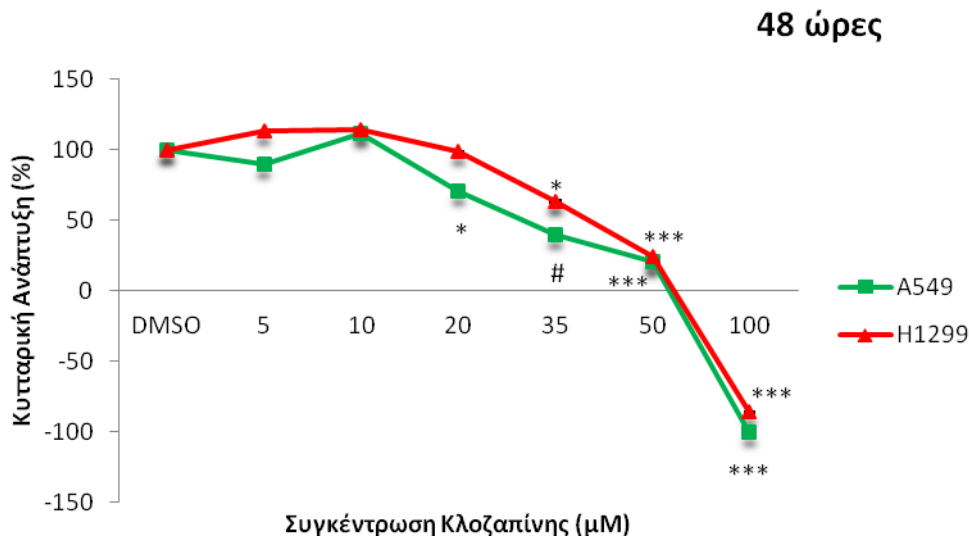
3.1.3 Επίδραση του άτυπου αντιψυχωσικού κλοζαπίνη στην κυτταρική επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, A549 και H1299

Η κλοζαπίνη είναι ένα άτυπο αντιψυχωσικό φάρμακο με ανταγωνιστική δράση προς τους D₂- ντοπαμινεργικούς υποδοχείς και τους σεροτονινεργικούς 5- HT_{2,6,7}. Χορηγείται σε ανθεκτικές μορφές σχιζοφρένειας και μειώνει τα ποσοστά αυτοκτονικής συμπεριφοράς σε σχιζοφρενείς ασθενείς. Και οι δύο καρκινικές σειρές πνεύμονα εκτέθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων κλοζαπίνης από 5μM έως 100μM, με την συγκέντρωση των 21μM κατά προσέγγιση να αντιστοιχεί στη μέση θεραπευτική δόση που χορηγείται (300mg), για τέσσερα χρονικά διαστήματα, 24, 48, 72 και 96 ωρών.



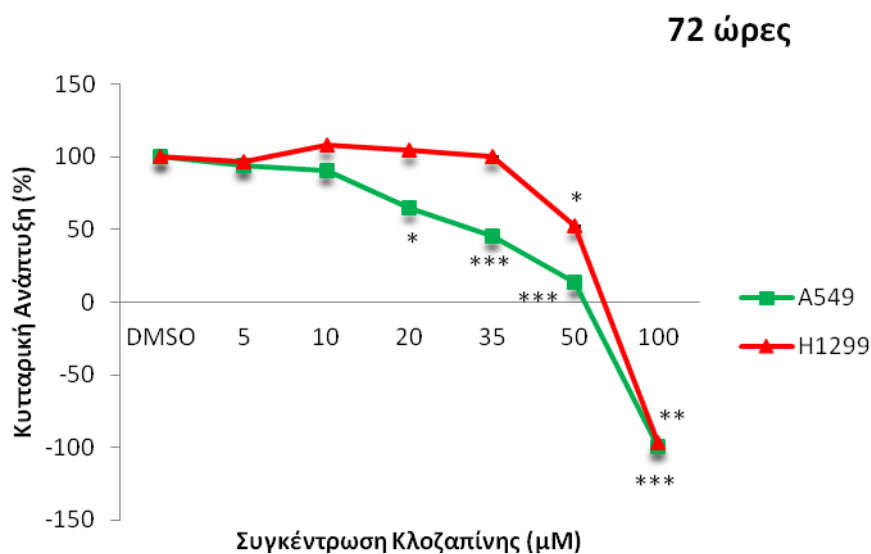
Γράφημα 9: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 24ωρη έκθεση σε κλοζαπίνη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0,05, **P < 0.01, #P < 0.005). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Μελετήθηκε η επίδραση της κλοζαπίνης στην κυτταρική ανάπτυξη για περίοδο έκθεσης 24 ωρών. Και στις δύο κυτταρικές σειρές, η έκθεση σε κλοζαπίνη επιδρά αρνητικά στην κυτταρική ανάπτυξη. Η κλοζαπίνη μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των **A549** καρκινικών κυττάρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο καθώς παρατηρείται αυξανόμενη μείωση με την αύξηση της συγκέντρωσης. Για την κυτταρική σειρά **H1299**, η κλοζαπίνη ήταν αποτελεσματική στις συγκεντρώσεις των 35μM, 50μM, 100μM, όπου και παρατηρήθηκε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



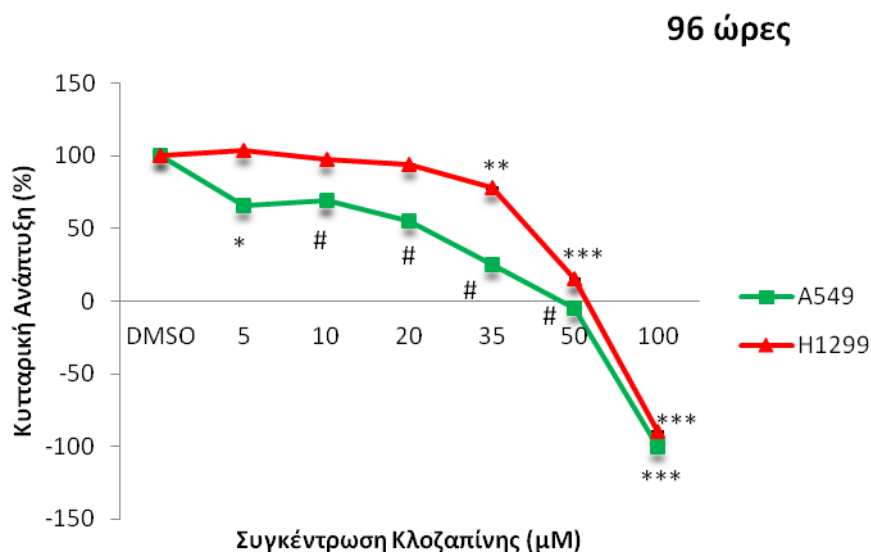
Γράφημα 10: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 48ωρη έκθεση σε κλοζαπίνη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0,05, *** P < 0.001, #P < 0.005). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Για την χρονική περίοδο έκθεσης 48 ωρών παρατηρείται δόσοεξαρτώμενη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των **A549** καρκινικών κυττάρων, η οποία ξεκινά από τη συγκέντρωση των 20 μΜ κλοζαπίνης, σε πιο έντονο βαθμό από αυτή που παρατηρήθηκε στην περίοδο των 24 ωρών. Παρόμοια δόσοεξαρτώμενη μείωση παρατηρείται και για τα **H1299** καρκινικά κύτταρα. Ενδιαφέρον προκαλεί ότι η κλοζαπίνη στη συγκέντρωση των 100μΜ προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε όλο τον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων, και των δύο κυτταρικών σειρών.



Γράφημα 11: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 72ωρη έκθεση σε κλοζαπίνη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0,05, ***P < 0.001). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Για την χρονική περίοδο έκθεσης 72 ωρών παρατηρείται δόσοεξαρτώμενη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των **A549** καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται ότι στη συγκέντρωση των 20 μΜ ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός για την κυτταρική σειρά των A549 κυττάρων έχει ανασταλεί σε ποσοστό περίπου 50%. Ενώ στη συγκέντρωση των 50μΜ έχουμε πλήρη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των **H1299** καρκινικών κυττάρων, για 72 ώρες επώασης παρατηρήθηκε λόγω της επίδρασης της κλοζαπίνης στις συγκεντρώσεις των 50μΜ και 100μΜ. Συγκεκριμένα, η κλοζαπίνη των 100μΜ προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε όλο τον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων, και των δύο κυτταρικών σειρών.



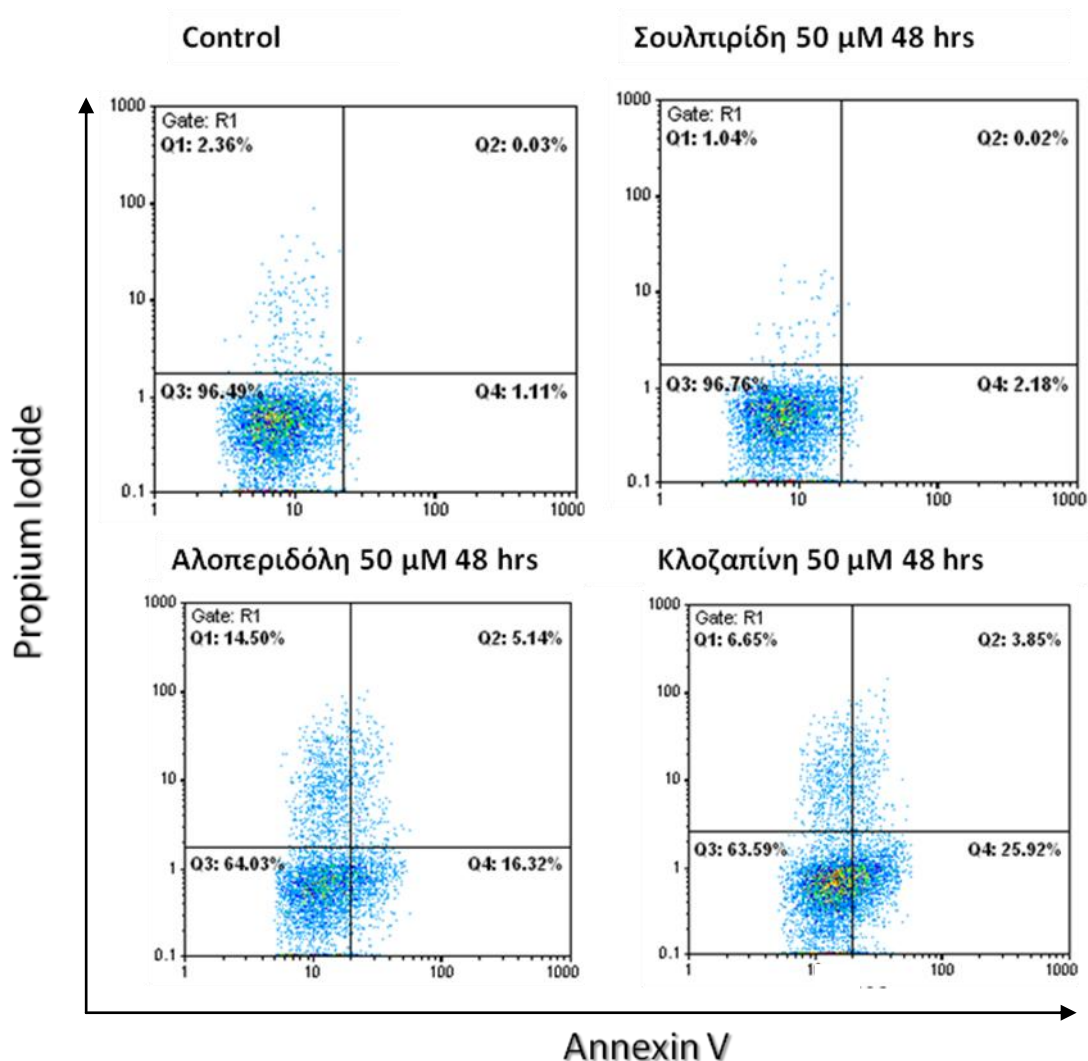
Γράφημα 12: Επιβίωση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 και H1299 μετά από 96ωρη έκθεση σε κλοζαπίνη. Αξιολόγηση με SRB test (οι τιμές εκφράζονται ως: Μέσος όρος ± Τυπικό Σφάλμα, *P < 0,05, **P < 0.01, ***P < 0.001, #P < 0.005). Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control).

Για την χρονική περίοδο έκθεσης 96 ωρών παρατηρείται δοσοεξαρτώμενη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των **A549** καρκινικών κυττάρων, σε πιο έντονο βαθμό από αυτή που παρατηρήθηκε στις προηγούμενες περιόδους. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των A549 κυττάρων ξεκινά από τη μικρότερη συγκέντρωση που μελετήθηκε (5 μM) και παρατηρούμε ότι στη συγκέντρωση των 50μM παρατηρείται επίσης πλήρης αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η κλοζαπίνη μειώνει, επίσης, την κυτταρική ανάπτυξη των **H1299** καρκινικών κυττάρων πνεύμονα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Και για τις δύο κυτταρικές σειρές, προκαλείται κυτταρικός θάνατος σε όλο τον κυτταρικό πληθυσμό ύστερα από την έκθεση στη συγκέντρωση κλοζαπίνης 100μM.

3.2. Διερεύνηση του μηχανισμού αρνητικής επίδρασης στην κυτταρική ανάπτυξη των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλπριρίδη και κλοζαπίνη σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα

Στη συνέχεια μελετήσαμε εάν η παρατηρούμενη μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των δύο καρκινικών σειρών πνεύμονα, A549 και H1299, οφείλεται στην πιθανή αποπτωτική δράση της αλοπεριδόλης, σουλπριρίδης και κλοζαπίνης. Γι' αυτό το σκοπό διερευνήσαμε την πρόσληψη Annexin V και PI (Propidium Iodide) με κυτταρομετρία ροής σε A549 και H1299 καρκινικά κύτταρα πνεύμονα που επωάσθηκαν σε 50μΜ συγκέντρωση, για κάθε φαρμακευτική ουσία, για 48 ώρες. Η Annexin V έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στη φωσφατιδυλοσερινη, ένα φωσφολιπίδιο της εσωτερικής πλευράς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης το οποίο μετατοπίζεται στην εξωτερική πλευρά κατά την απόπτωση. Το PI είναι μια φθορίζουσα ουσία που διαπερνά τη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων και προσδένεται στο DNA. Η συγκέντρωση των 50μΜ επιλέχθηκε από το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν ανωτέρω και για τις τρεις φαρμακευτικές ουσίες, δείχνοντας μείωση στον κυτταρικό πληθυσμό και στις δύο καρκινικές σειρές ύστερα από την έκθεσή τους σε αυτές. Οι 48 ώρες είναι ένα χρονικό διάστημα στο οποίο παρατηρήθηκε μείωση του κυτταρικού πληθυσμού και για τις δύο καρκινικές σειρές για τις τρεις φαρμακευτικές ουσίες.

3.2.1 Επίδραση των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλπιρίδη και κλοζαπίνη στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549

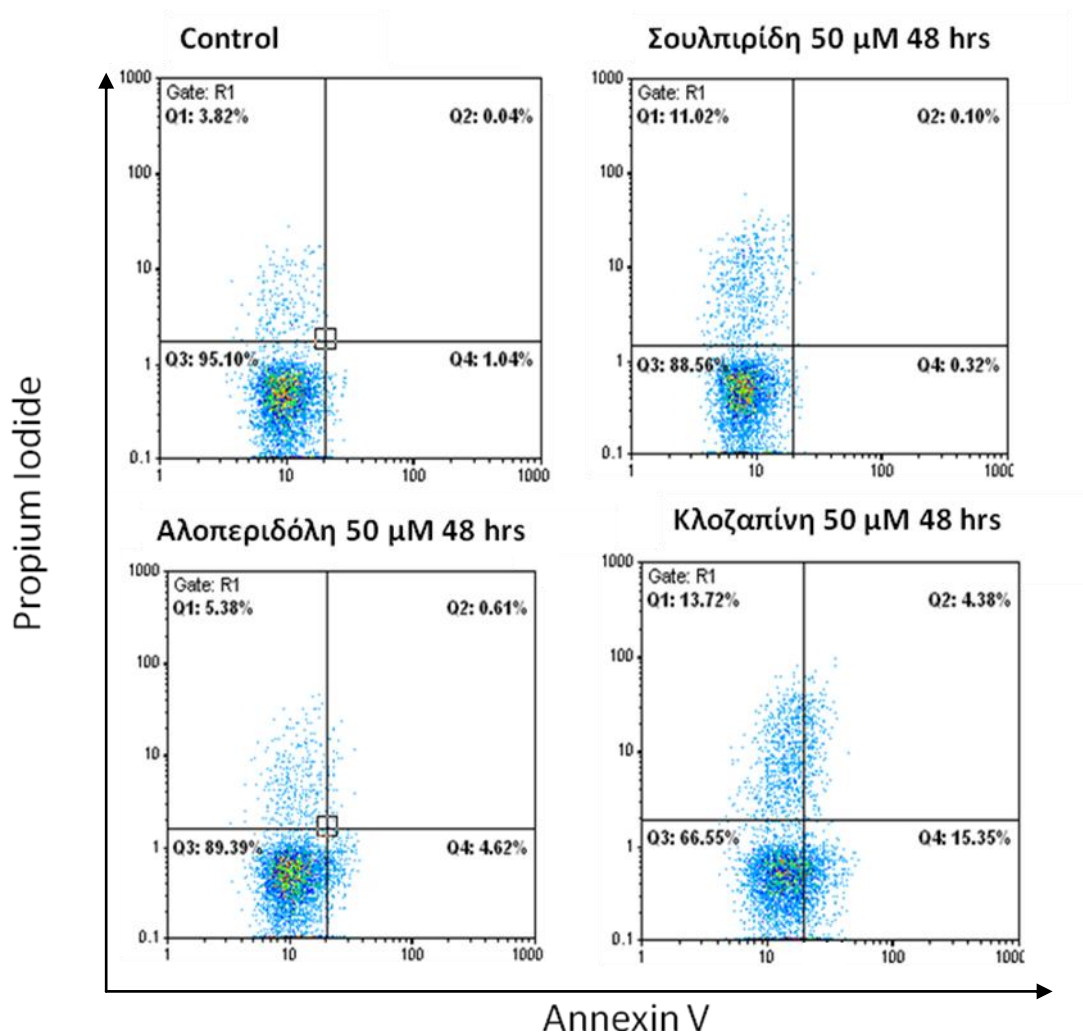


Γράφημα 13: Διπαραμετρικό σημειογράφημα (dot plot) που καταδεικνύει την πρόσληψη Annexin V και/ή PI από τα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα A549 μετά από 48ωρη έκθεση σε αλοπεριδόλη, σουλπιρίδη και κλοζαπίνη. Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control). Οι τιμές αφορούν σε ποσοστά του ολικού αριθμού κυττάρων. Q1: PI θετικά (νεκρωτικά κύτταρα), Q2: Annexin V + PI θετικά (προχωρημένα αποπτωτικά κύτταρα), Q3: Annexin V + PI αρνητικά (ζωντανά κύτταρα), Q4: Annexin V θετικά (αρχικού σταδίου αποπτωτικά κύτταρα), Q2 + Q4: Συνολικός αριθμός αποπτωτικών κυττάρων.

Μελετήθηκε η πιθανή αντι-αποπτωτική δράση των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλπιρίδη και κλοζαπίνη για περίοδο έκθεσης 48 ωρών. Η έκθεση των κυττάρων σε **αλοπεριδόλη** 50μM επάγει την απόπτωση, καθώς παρατηρείται ότι ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων αυξήθηκε μετά την επώαση κατά 18,8 φορές. Αναφορικά με την επώαση των κυττάρων με **σουλπιρίδη** 50μM παρατηρείται ότι δεν επάγεται η

απόπτωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549, καθώς δεν αυξήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που ήταν θετικά για Annexin V. Η έκθεση των κυττάρων σε **κλοζαπίνη** επάγει την απόπτωση, καθώς αυξήθηκε ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων κατά 26,11 φορές. Τη μεγαλύτερη επίδραση φαίνεται να έχει η κλοζαπίνη σε σύγκριση με τα άλλα φάρμακα.

3.2.2 Επίδραση των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλπριδίδη και κλοζαπίνη στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα H1299



Γράφημα 14: Διπαραμετρικό σημειογράφημα (dot plot) που καταδεικνύει την πρόσληψη Annexin V και/ή PI από τα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299 μετά από 48ωρη έκθεση σε αλοπεριδόλη, σουλπριδίδη και κλοζαπίνη. Η σύγκριση έγινε σε σχέση με κύτταρα που εκτέθηκαν σε DMSO (control). Οι τιμές αφορούν σε ποσοστά του ολικού αριθμού κυττάρων. Q1: PI θετικά (νεκρωτικά κύτταρα), Q2: Annexin V + PI θετικά (προχωρημένα αποπτωτικά κύτταρα), Q3: Annexin V + PI αρνητικά (ζωντανά κύτταρα), Q4: Annexin V θετικά (αρχικού σταδίου αποπτωτικά κύτταρα), Q2 + Q4: Συνολικός αριθμός αποπτωτικών κυττάρων.

Μελετήθηκε η πιθανή αντι-αποπτωτική δράση των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλιπρίδη και κλοζαπίνη για περίοδο έκθεσης 48 ωρών. Η **αλοπεριδόλη** 50μΜ δεν επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα H1299, καθώς δεν αυξάνεται ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων. Και η έκθεση των κυττάρων σε **σουλιπρίδη** 50μΜ δεν αλλάζει τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων, συνεπώς δεν επάγει τη διαδικασία της απόπτωσης. Αναφορικά με την επώαση των κυττάρων με **κλοζαπίνη** 50μΜ, παρατηρείται αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων κατά 18,26 φορές. Σε σύγκριση με τα άλλα φάρμακα η κλοζαπίνη εμφανίζει τη μεγαλύτερη επίδραση. Παρατηρείται ότι στην κυτταρική σειρά H1299 η απόπτωση δεν επάγεται το ίδιο ισχυρά με την κυτταρική σειρά A549. Ένα αποτέλεσμα το οποίο επιβεβαιώνει και τη μεγαλύτερη αντίσταση των κυττάρων αυτών στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τους από τα αντιψυχωσικά.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η *in vitro* μελέτη σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα, την A549 και τη μεταστατική H1299, οδήγησε σε σημαντικά συμπεράσματα όσον αφορά την επίδραση των αντιψυχωσικών φαρμάκων αλοπεριδόλη, σουλπιρίδη και κλοζαπίνη στην επιβίωση των κυττάρων.

Για τη δράση της **αλοπεριδόλης** στην κυτταρική ανάπτυξη διαπιστώθηκε ότι:

1. Μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των **A549** καρκινικών κυττάρων πνεύμονα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο για όλες τις χρονικές περιόδους.
2. Για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των **H1299** καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, μείωση παρατηρείται μόνο στα 100μΜ για όλες τις χρονικές περιόδους. Για την περίοδο έκθεσης των 48, 72 και 96 ωρών παρατηρείται μείωση και στα 60μΜ.

Για την επίδραση της **αλοπεριδόλης** στην απόπτωση διαπιστώθηκε ότι:

1. Επάγει την απόπτωση των **A549** καρκινικών κυττάρων πνεύμονα.
2. Δεν επάγει την απόπτωση των **H1299** καρκινικών μεταστατικών κυττάρων πνεύμονα.

Τα κύτταρα της H1299 καρκινικής σειράς εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στην επίδραση της **Αλοπεριδόλης** σε σύγκριση με τα κύτταρα της A549 κυτταρικής σειράς.

Για τη δράση της **σουλπιρίδης** στην κυτταρική ανάπτυξη διαπιστώθηκε ότι:

1. Μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των **A549** καρκινικών κυττάρων πνεύμονα στις συγκεντρώσεις των 70μΜ και 100μΜ σε όλες τις χρονικές περιόδους.
2. Μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των **H1299** καρκινικών κυττάρων πνεύμονα στις συγκεντρώσεις των 70μΜ και 100μΜ σε όλες τις χρονικές περιόδους.

Για την επίδραση της **σουλπιρίδης** στην απόπτωση διαπιστώθηκε ότι:

1. Δεν επάγει την απόπτωση σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές.

Για τη δράση της **κλοζαπίνης** στην κυτταρική ανάπτυξη διαπιστώθηκε ότι:

1. Μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των **A549** καρκινικών κυττάρων πνεύμονα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο για όλες τις χρονικές περιόδους.
2. Για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των **H1299** καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, μείωση παρατηρείται σε όλες τις χρονικές περιόδους. Η αποτελεσματικότητα της Κλοζαπίνης είναι δοσοεξαρτώμενη για τις χρονικές περιόδους των 48 και 96 ωρών.

Για την επίδραση της **κλοζαπίνης** στην απόπτωση διαπιστώθηκε ότι:

1. Επάγει την απόπτωση των **A549** και **H1299** καρκινικών κυττάρων.

Η **κλοζαπίνη** επιδρά με μεγαλύτερη ευαισθησία στα A549 κύτταρα έναντι των H1299 κυττάρων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας στον κόσμο, με κύρια γνωστή αιτία πρόκλησης το κάπνισμα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (non small cell lung cancer, NSCLC) αντιπροσωπεύει το 85% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Οι μέχρι τώρα θεραπείες περιλαμβάνουν τη χειρουργική επέμβαση, την ακτινοβολία, τη χημειοθεραπεία και τη στοχευμένη θεραπεία (Zappa and Mousa 2016). Παρά τις πρόσφατες εξελίξεις στη στοχευμένη θεραπεία, η συνολική θνησιμότητα ασθενών με προχωρημένο στάδιο NSCLC παραμένει υψηλή. Ως εκ τούτου, η θεραπευτική αγωγή του NSCLC απαιτεί την ανάπτυξη κυτταροτοξικών παραγόντων με την καλύτερη δυνατή αποτελεσματικότητα και τη μικρότερη δυνατή εμφάνιση τοξικότητας.

Στα πλαίσια της αναθεώρησης της θεραπευτικής στρατηγικής για τον καρκίνο, οι επιστήμονες παρατήρησαν ότι η συννοσηρότητα σε ασθενείς που πάσχουν από σχιζοφρένεια βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα, αλλά η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου είναι μειωμένη στους άνδρες σχιζοφρενείς σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (Carney, Jones et al. 2006). Το παράδοξο αυτής της παρατήρησης είναι πως οι σχιζοφρενείς εκτίθενται σε πολλούς παράγοντες κινδύνου (π.χ. κατάχρηση αλκοόλ, κακή διατροφή), που σχετίζονται με τον καρκίνο, με πιο σημαντικό το κάπνισμα (Hodgson, Wildgust, & Bushe, 2010). Σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό οι σχιζοφρενείς ασθενείς καπνίζουν με διπλάσια συχνότητα και λόγω αυτού θα περιμέναμε υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (McClave, McKnight-Eily, Davis, & Dube, 2010). Αντιθέτως, υπάρχουν πολλές επιδημιολογικές μελέτες, που αναφέρουν μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό (Catala-Lopez, Suarez-Pinilla et al. 2014), (Ajdacic-Gross, Tschopp et al. 2014). Η αιτία αυτής της μείωσης είναι ασαφής. Όλοι όμως οι ασθενείς ακολουθούν αγωγή με αντιψυχωσικά φάρμακα, με κοινό χαρακτηριστικό τον ανταγωνισμό των ντοπαμινεργικών D₂-υποδοχέων. Τα τυπικά αντιψυχωσικά ή αλλιώς πρώτης γενιάς εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα και συγγένεια προς τους D₂ ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, ενώ τα άτυπα αντιψυχωσικά ή αλλιώς δεύτερης γενιάς εμφανίζουν συγγένεια και ως προς τους σεροτονινεργικούς υποδοχείς (5-HT₂) (Nestler Eric J., Hyman Steven E. et al. 2009).

Εδώ να σημειωθεί ότι οι υποδοχείς στους οποίους δρουν τα αντιψυχωσικά φάρμακα συμπεριλαμβανομένων των D₂ υποδοχέων, ανήκουν στην οικογένεια των GPCRs και παρά τη μεγάλη βιολογική σημασία των GPCRs στην ανάπτυξη του καρκίνου, υπάρχουν ελάχιστα αντικαρκινικά φάρμακα, που στοχεύουν σε αυτούς.

Παλαιότερες μελέτες, που διεξήχθησαν στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα τους D₂-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι τα αντιψυχωσικά φάρμακα επιδρούν στα κυριότερα κυτοχρώματα, που συμμετέχουν στον μεταβολισμό προκαρκινογόνων ουσιών σε δραστικές καρκινογόνες ουσίες, μέσω μειορρύθμισης με αποτέλεσμα να αναστέλλεται ο μεταβολισμός τους.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται να ενισχύσουν τις προηγούμενες μελέτες, που προαναφέρθηκαν, και να αξιολογήσουν την πιθανή αντικαρκινική δράση των αντιψυχωσικών σε κύτταρα NSCLC.

Αρχικά, αξιολογήθηκε η επίδραση δύο τυπικών αντιψυχωσικών, της αλοπεριδόλης και σουλπριδής, στην κυτταρική επιβίωση και των δύο κυτταρικών σειρών καρκίνου του πνεύμονα με δοκιμασία SRB. Διαπιστώθηκε ότι η αλοπεριδόλη επιδρά στην κυτταρική επιβίωση των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο, καθώς παρατηρούμε αυξανόμενη μείωση του κυτταρικού πληθυσμού με την αύξηση της συγκέντρωσης και την αύξηση του χρόνου επώασης. Το καλύτερο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε μετά από 96 ώρες επώασης με το φάρμακο και μάλιστα στην υψηλότερη συγκέντρωση (100μM), παρατηρείται πλήρης αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299 παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στη δράση της αλοπεριδόλης. Η μείωση του κυτταρικού πληθυσμού γίνεται εμφανής στη συγκέντρωση των 40 μM και μέχρι τη μέγιστη συγκέντρωση των 100μM (είναι δόσοεξαρτώμενη). Με την επώαση των κυττάρων σε Αλοπεριδόλη 100μM για 96 ώρες παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός τους έχει φτάσει τα επίπεδα των A549 κυττάρων.

Η ανασταλτική δράση της αλοπεριδόλης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, που παρατήθηκε για τις δυο κυτταρικές σειρές NSCLC, συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η οποία αναφέρει κυτταροτοξική δράση της αλοπεριδόλης έναντι κυττάρων νευροβλαστώματος. Και στα κύτταρα νευροβλαστώματος η αποτελεσματικότητά της ακολουθεί δόσοεξαρτώμενο τρόπο κάτι που παρατηρήθηκε και στα NSCLC (Gasso, Mas et al. 2012).

Όσον αφορά την κυτταροτοξική επίδραση της σουλπριδής, διαπιστώθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και στις δύο καρκινικές σειρές πνεύμονα μόνο στις μέγιστες συγκεντρώσεις. Η μεγαλύτερη αναστολή του πολλαπλασιασμού παρατηρείται στις

συγκεντρώσεις των 70 μ M και 100 μ M, με το αποτέλεσμα να είναι στατιστικά σημαντικό σε όλες τις χρονικές περιόδους. Συγκεκριμένα για την κυτταρική σειρά H1299, βρέθηκε ότι ύστερα από 96 ώρες επώασης, η σουλιπρίδη (100 μ M) προκαλεί κυτταρικό θάνατο στο μεγαλύτερο ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού. Όσον αφορά τη μειωμένη δράση της σουλιπρίδης, πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες και ειδικά ύστερα από συγχορήγηση με άλλα φάρμακα με εξακριβωμένη αντικαρκινική δράση, αφού σύμφωνα τον Jian Li και τους συνεργάτες του η συνδυαστική θεραπεία σουλιπρίδης με δεξαμεθαζόνη (συνθετικό γλυκοκορτικοειδές) ενισχύει την αποτελεσματικότητα της δεξαμεθαζόνης στη θεραπεία του ανθεκτικού σε φάρμακα και μεταστατικού καρκίνου του μαστού μέσω ανταγωνισμού των D₂ υποδοχέων (Li, Yao et al. 2017). Σε συνδυασμό αυτής της μελέτης και της σημαντικής αναστολής που προκαλεί η σουλιπρίδη στα κυτοχρώματα CYP1A1/2 και CYP1B1 (Harkitis et al., 2015), πιστεύεται ότι είναι πιθανό, η σουλιπρίδη είτε να ενισχύει την αποτελεσματικότητα κλασικών χημειοθεραπευτικών ουσιών, που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του Καρκίνου του Πνεύμονα, είτε να ασκεί ευεργετική δράση μέσω της αναστολής της βιοενεργοποίησης των προκαρκινογόνων (Harkitis et al 2015, Daskalopoulos et al 2012).

Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η επίδραση του άτυπου αντιψυχωσικού κλοζαπίνη στην κυτταρική επιβίωση και των δύο κυτταρικών σειρών καρκίνου του πνεύμονα. Στην κυτταρική σειρά A549, η μείωση είναι δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη, με τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα να εμφανίζεται μετά από 96 ώρες επώασης. Μάλιστα σε αυτό το χρονικό διάστημα η συγκέντρωση του δείκτη αναστολής GI₅₀ (50% growth inhibition) είναι 22,5 μ M, η συγκέντρωση TGI (total growth inhibition) 47,5 μ M και η συγκέντρωση LC₅₀ (50% lethal concentration) 73,7 μ M. Οι τιμές των δεικτών δίνουν ένα καλό θεραπευτικό εύρος. Συγκριτικά με τα προηγούμενα χρονικά διαστήματα παρατηρείται ότι στη συγκέντρωση των 50 μ M και μετά από επώαση των κυττάρων για αυτό το χρονικό διάστημα, η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ήταν πλήρης. Επίσης, η επώαση των κυττάρων με κλοζαπίνη 100 μ M για 48, 72 και 96 ώρες είχε ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο των κυττάρων σε ποσοστό 100%. Μειωμένη ευαισθησία στη δράση της κλοζαπίνης εμφανίζουν τα H1299 μεταστατικά καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα A549. Η κλοζαπίνη επιδρά αρνητικά στην κυτταρική ανάπτυξη των H1299 καρκινικών κυττάρων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 20 μ M. Επίσης, η μέγιστη συγκέντρωση των 100 μ M προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό περίπου 100% στα χρονικά διαστήματα 48, 72 και 96 ωρών. Όπως έχει αναφερθεί και ανωτέρω, κυτταρικές σειρές με δυσλειτουργική p53 φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικές στις φαρμακευτικές ενώσεις, κάτι που παρατηρήσαμε και

στην παρούσα μελέτη. Οι έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με την αντικαρκινική δράση της κλοζαπίνης είναι λίγες, αλλά τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με την παρατήρηση των Yu-Chun Yin το 2015, ότι η κλοζαπίνη μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Yin, Lin et al. 2015).

Ενδιαφέρον προκαλεί ότι η κλοζαπίνη μειώνει αισθητά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ακόμη και στη συγκέντρωση, που αντιστοιχεί στη μέση θεραπευτική δόση (21μM). Κάτι που δεν παρατηρήθηκε για την αλοπεριδόλη και την σουλπριρίδη όταν χορηγήθηκαν σε συγκεντρώσεις, που αντιστοιχούν στις θεραπευτικές δόσεις φαρμάκων, 0,3μM και 18μM αντίστοιχα.

Για να διερευνήσουμε τον μηχανισμό στον οποίο οφείλεται η κυτταροτοξικότητα των αντιψυχωσικών φαρμάκων και συγκεκριμένα, η πιθανή αποπτωτική ισχύς τους πραγματοποιήσαμε κυτταρομετρία ροής ελέγχοντας την πρόσληψη Annexin V και PI. Η μείωση του κυτταρικού πληθυσμού των A549 κυττάρων, που προκαλεί η αλοπεριδόλη φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αποπτωτικών μηχανισμών. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί και με την έρευνα της Gasso, που έδειξε ότι η αλοπεριδόλη αυξάνει τη δραστικότητα της κασπάσης 3 (αποπτωτική πρωτεΐνη) και επάγει την απόπτωση σε κύτταρα νευροβλαστώματος (Gasso, Mas et al. 2012). Και το άτυπο αντιψυχωσικό κλοζαπίνη αναστέλλει τον πληθυσμό των A549 κυττάρων. Η ενεργοποίηση που προκαλεί στους αποπτωτικούς μηχανισμούς όμως είναι πιο έντονη καθώς μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων είναι αποπτωτικά. Η σουλπριρίδη δεν επάγει την απόπτωση των A549 κυττάρων, συνεπώς η κυτταροτοξικότητα της οφείλεται σε κάποιον άλλον μηχανισμό που χρήζειενδελεχούς μελέτης για την ταυτοποίηση του. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και από τη μελέτη στη μεταστατική κυτταρική σειρά H1299, όπου η σουλπριρίδη και η αλοπεριδόλη δεν άλλαξαν το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων. Αντιθέτως, η κλοζαπίνη φάνηκε να επάγει την απόπτωση των H1299 κυττάρων, ωστόσο σε μικρότερο βαθμό από ότι στα κύτταρα A549.

Η μειωμένη ευαισθησία, που εμφανίζουν τα H1299 κύτταρα ίσως να οφείλεται στο διαφορετικό γενετικό προφίλ τους. Σε αυτή την κυτταρική σειρά απουσιάζει ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας p53. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο p53 ρυθμίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και η ενεργοποίηση του επάγει τη διαδικασία της απόπτωσης. Κύτταρα, που δε διαθέτουν λειτουργικό παράγοντα p53 αντιστέκονται στους μηχανισμούς της απόπτωσης και εμφανίζουν αντοχή έναντι χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (Ozaki and Nakagawara 2011). Επίσης, όπως αναφέρεται ανωτέρω η κυτταρική σειρά H1299 είναι

μεταστατική. Τα μεταστατικά κύτταρα διαθέτουν πλεονεκτήματα, όπως η κυτταρική πλαστικότητα, ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού, η αποφυγή του ανοσοποιητικού και της απόπτωσης. Οι μεταστατικοί όγκοι εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι των χημειοθεραπειών, ιδιότητα, η οποία οφείλεται στην ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης έναντι των φαρμάκων (Multidrug resistance (MDR)). Αυτή η μείωση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας οφείλεται στην υπερέκφραση μεταφορέων ATP-binding cassette (ABC), όπως η p- γλυκοπρωτεΐνη και η MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1). Αυτοί οι μεταφορείς είναι αντλίες εκροής φαρμάκου εξαρτώμενες από ATP. Τα H1299 καρκινικά μεταστατικά κύτταρα εκφράζουν και τις 2 αντλίες στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη, γεγονός, που ίσως να δικαιολογεί τη μειωμένη ευαισθησία τους προς την εκάστοτε θεραπεία (Kono, Utsunomiya et al. 2014), (Celia-Terrassa and Kang 2016). Επίσης, παλαιότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακολογίας έδειξαν ότι η έκφραση των ντοπαμινεργικών D₂- υποδοχέων είναι στα ίδια επίπεδα και για τις δύο καρκινικές σειρές. Κατ'επέκταση οι διαφορές, που παρατηρούνται στη δράση των αντιψυχωσικών φαρμάκων στα A549 και H1299 καρκινικά κύτταρα δεν έγκειται στη διαφορετική συγκέντρωση υποδοχέων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Παρόλο που τα αποτελέσματα μας ενισχύουν τα ήδη υπάρχοντα για την κυτταροτοξική δράση των αντιψυχωσικών φαρμάκων και επικεντρώνονται στη δράση αυτών έναντι του Καρκίνου του Πνεύμονα, υπήρξαν διαφορές όσον αφορά το βαθμό της επίδρασης τους, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στη συγγένεια τους έναντι των D₂ ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Η αλοπεριδόλη (K_i 0,7 nM/L) και η σουλπιρίδη (K_i 0,015 nM/L) εμφανίζουν μεν μεγάλη συγγένεια προς τους D₂ ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, ειδικά η σουλπιρίδη είναι ένας εκλεκτικός ανταγωνιστής αυτών των υποδοχέων, αλλά η αλοπεριδόλη ήταν πιο δραστική. Η αυξημένη δραστικότητα της αλοπεριδόλης μπορεί να οφείλεται σε αποκλεισμό και άλλων υποδοχέων από το φάρμακο. Επίσης, η κλοζαπίνη (K_i 82 nM/L ως προς τους D₂R), ανταγωνιστής D₂/5-HT₂ υποδοχέων, εμφανίζει την υψηλότερη κυτταροτοξικότητα από τα άλλα δύο φάρμακα. Είναι πολύ πιθανό η κυτταροτοξικότητα της να οφείλεται στον επιπλέον ανταγωνισμό των σεροτονινεργικών υποδοχέων 5-HT_{2A}. Ο υποδοχέας αυτός είναι συζευγμένος με G_q πρωτεΐνη και ρυθμίζει την ενεργοποίηση της PLCβ, την υδρόλυση του PIP₂ και τη σύνθεση των IP₃ και DAG (Zhang and Stackman 2015). Κατ'επέκταση, μέσω των δεύτερων αγγελιοφόρων μορίων ρυθμίζεται η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση και η συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Το Ca²⁺ μέσω των κλασσικών cPKC και της εξαρτώμενης από Ca²⁺/CaM πρωτεϊνικής κινάσης ρυθμίζει ποικίλα σηματοδοτικά

μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένου εκείνου που ελέγχει τον κυτταρικό θάνατο, οπότε η αναστολή του υποδοχέα είναι πιθανόν να επηρεάζει την ενδοκυττάρια δραστικότητα του Ca^{2+} . Οι εξαρτώμενες από Ca^{2+}/CaM πρωτεϊνικές κινάσες II και IV είναι ρυθμιστικά μόρια της αδενυλικής κυκλάσης και το Ca^{2+} ενεργοποιεί την φωσφοδιεστεράση PDE1, μειώνοντας τα επίπεδα του cAMP (Halls and Cooper 2011). Επίσης, η PKC συμμετέχει στο μονοπάτι των MAP κινασών. Ο συνδυασμός του αποκλεισμού των D_2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων με αλλαγές της ενδοκυττάριας σηματοδότησης, λόγω της δράσης των αντιψυχωσικών και σε άλλους υποδοχείς, μπορεί να είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση της κυτταροτοξικότητας των αντιψυχωσικών. Επίσης, υπάρχουν έρευνες, που αποδεικνύουν ότι η κυτταροτοξικότητα των αντιψυχωσικών πιθανόν να οφείλεται σε αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, αλλαγές στο μεταβολισμό της χοληστερόλης παίζουν κύριο ρόλο στην αντιψυχωσική κυτταροτοξικότητα. Μία μελέτη των πιθανών μηχανισμών δράσης των αντιψυχωσικών σε κύτταρα λεμφώματος, νευροβλαστώματος, μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και καρκίνου του μαστού έδειξε αυξημένη μείωση του κυτταρικού πληθυσμού όταν τα αντιψυχωσικά φάρμακα συγχορηγήθηκαν με έναν αναστολέα της σύνθεσης της χοληστερόλης, την μεβαστατίνη (Wiklund et al., 2010).

Η ρύθμιση της απόπτωσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν πληθώρα παραγόντων. Στην παρούσα πειραματική διάταξη, διαφαίνεται ότι τα δύο εκ των τριών αντιψυχωσικών φαρμάκων που μελετήθηκαν επάγουν την απόπτωση. Κρίνεται όμως απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση των αποπτωτικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται λόγω του αποκλεισμού των D_2 υποδοχέων. Επίσης, πρέπει να μελετηθεί εάν εμπλέκονται άλλοι μηχανισμοί στον προκαλούμενο κυτταρικό θάνατο, όπως η ρυθμιζόμενη νέκρωση ή η αυτοφαγία.

Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης των αντιψυχωσικών ως κυτταροτοξικών φαρμάκων έρχεται από την παρατήρηση των Erik D. Wiklund και των συνεργατών του το 2010. Παρατήρησαν ότι τα αντιψυχωσικά εμφανίζουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα προς τα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ είναι επιλεκτικά έναντι των καρκινικών κυττάρων (Wiklund, Catts et al. 2010). Μειονέκτημα της χρήσης των αντιψυχωσικών φαρμάκων στη θεραπεία του Καρκίνου του Πνεύμονα είναι η εμφάνιση παρενεργειών, όπως τα εξωπυραμιδικά συμπτώματα (τυπικά αντιψυχωσικά) και μεταβολικές διαταραχές (άτυπα αντιψυχωσικά). Παρόλα αυτά, εάν αποδειχθεί ότι δρουν ως κυτταροτοξικά με υψηλή αποτελεσματικότητα μπορούν να βελτιστοποιηθούν οι χημικές δομές τους για την αποφυγή των παρενεργειών (Wong, Tarazi et al. 2010).

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν την αντικαρκινική αποτελεσματικότητα των αντιψυχωσικών φαρμάκων και μπορούν να εξηγήσουν εν μέρει τα κλινικά ευρήματα ότι ασθενείς με σχιζοφρένεια εμφανίζουν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης Καρκίνου του Πνεύμονα. Θα ήταν πολύ θετικό να αποδειχθεί και σε in vivo αλλά και κλινικές μελέτες αυτή τους η δράση καθώς τα αντιψυχωσικά είναι καλά ανεκτά από τους ασθενείς και χαμηλού κόστους φάρμακα. Επίσης, είναι γενικά καλά χαρακτηρισμένα φάρμακα και θα μπορούσαν να αναπτυχθούν ενώσεις που να εμφανίζουν μεγαλύτερη ασφάλεια χρήσης για το βέλτιστο αποτέλεσμα, όπως η αριπιπραζόλη, ένα πολύ ασφαλές αντιψυχωσικό φάρμακο με καλό φαρμακολογικό προφίλ και αντικαρκινική δράση (Suzuki, Okada et al. 2016).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες ανέφεραν σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου σε άντρες σχιζοφρενείς, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, παρόλο που αυτοί οι ασθενείς είναι συνήθως βαρείς καπνιστές και υιοθετούν διατροφικές συνήθειες, που σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την καρκινογένεση. Η παρούσα μελέτη διερευνά τις πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες των αντιψυχωσικών φαρμάκων, που μοιράζονται ένα κοινό χαρακτηριστικό, δρουν ως D₂-ντοπαμινεργικοί ανταγωνιστές. Ο κύριος στόχος αυτής της μελέτης είναι η *in vitro* διερεύνηση των μηχανισμών, που εμπλέκονται στην πιθανή αντικαρκινική δράση των αντιψυχωσικών. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), A549 και H1299 και αξιολογήθηκε η επίδραση της αλοπεριδόλης, της σουλπιρίδης και της κλοζαπίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αυτών των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία SRB. Τα κύτταρα NSCLC επώαστηκαν με τα αντιψυχωσικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και το αποτέλεσμα της δράσης του φαρμάκου αξιολογήθηκε σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Ενδιαφέρον προκαλεί, ότι η δοκιμασία SRB και η κυτταρομετρία ροής έδειξαν ότι η κλοζαπίνη μείωσε αισθητά τον πληθυσμό των A549 και H1299 κυττάρων επάγοντας απόπτωση, ενώ η αλοπεριδόλη και η σουλπιρίδη στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, που αντιστοιχούν σε εκείνες που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά, δεν είχαν παρόμοια αποτελέσματα. Συμπερασματικά, τα παρόντα ευρήματα υποδεικνύουν ότι αντιψυχωσικά φάρμακα θα μπορούσαν να εμφανίσουν αντικαρκινική δράση μειώνοντας τον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα μέσω επαγωγής αποπτωτικών μηχανισμών. Με βάση τα δεδομένα αυτά, θα πρέπει επίσης, να αξιολογηθεί η πιθανή αντικαρκινική επίδραση άλλων αντιψυχωσικών φαρμάκων και των σχετικών μηχανισμών, χρησιμοποιώντας διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και *in vivo* ζωικά μοντέλα.

ABSTRACT

Several epidemiological studies reported markedly lower cancer incidence in male schizophrenic patients compared to general population, although these patients are usually heavy smokers and adopt dietary habits that are largely related to carcinogenicity. The present study investigates the potential anticancer properties of antipsychotic drugs that share a common characteristic- they act as D₂-dopaminergic antagonists. The main focus is the *in vitro* investigation of the mechanisms involved in their potential anticancer activity. For this purpose, A549 and H1299 non-small cell lung cancer cell lines (NSCLC) were used and the impact of haloperidol, sulpiride and clozapine on cellular proliferation of these cancer cells was evaluated using the SRB test. The NSCLC cells were incubated with the drugs at different concentrations and the drug effect was assessed at different time points. Interestingly, the SRB test and flow cytometry indicated that clozapine markedly reduced the A549 and H1299 cell population by inducing apoptosis, whereas haloperidol and sulpiride, in the concentrations tested that correspond to those used as antipsychotics, had no similar effects. In conclusion, the present findings suggest that antipsychotic drugs could display anticancer activity reducing the lung cancer cell population by inducing apoptotic mechanisms, among others. Based on these data, the potential anticancer impact of other antipsychotic drugs and the mechanisms involved should be also assessed, using various cancer cell lines and *in vivo* animal models.

Βιβλιογραφία

- Ajdacic-Gross, V., A. Tschopp, et al. (2014). "Cancer comortality patterns in schizophrenia and psychotic disorders: a new methodological approach for unique databases." Int J Methods Psychiatr Res **23**(1): 19-24.
- Bai, M., Z. Ma, et al. (2017). "Multiple drug transporters mediate the placental transport of sulphiride." Arch Toxicol **91**(12): 3873-3884.
- Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." Pharmacol Rev **63**(1): 182-217.
- Byers, L. and C. Rudin (2015). "Small cell lung cancer: where do we go from here?" Cancer **121**(5): 664-672.
- Campbell, J. D., A. Alexandrov, et al. (2016). "Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas." Nat Genet **48**(6): 607-616.
- Carney, C. P., L. Jones, et al. (2006). "Medical comorbidity in women and men with schizophrenia: a population-based controlled study." J Gen Intern Med **21**(11): 1133-1137.
- Catala-Lopez, F., M. Suarez-Pinilla, et al. (2014). "Inverse and direct cancer comorbidity in people with central nervous system disorders: a meta-analysis of cancer incidence in 577,013 participants of 50 observational studies." Psychother Psychosom **83**(2): 89-105.
- Celia-Terrassa, T. and Y. Kang (2016). "Distinctive properties of metastasis-initiating cells." Genes Dev **30**(8): 892-908.
- Chan, B. A. and B. G. Hughes (2015). "Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future." Transl Lung Cancer Res **4**(1): 36-54.
- Chou, F., K. Tsai, et al. (2011). "The incidence and relative risk factors for developing cancer among patients with schizophrenia: a nine-year follow-up study." Schizophrenia Research **129**(2-3): 97-103.
- Citrome, L. (2006). "A review of aripiprazole in the treatment of patients with schizophrenia or bipolar I disorder." Neuropsychiatr Dis Treat **2**(4): 427-443.
- Cohen, M., B. Dembling, et al. (2002). "The association between schizophrenia and cancer: a population-based mortality study." Schizophrenia Research **1**(57): 139-146.
- Cooper, W. A., D. C. Lam, et al. (2013). "Molecular biology of lung cancer." J Thorac Dis **5 Suppl 5**: S479-490.
- Croce, C. M. (2008). "Oncogenes and cancer." N Engl J Med **358**(5): 502-511.
- Dalton, S., C. Johansen, et al. (2006). "Cancer risk among users of neuroleptic medication: a population-based cohort study." British Journal of cancer **95**(7): 934-939.
- Dalton, S. O., L. Mellekjaer, et al. (2005). "Risk for cancer in a cohort of patients hospitalized for schizophrenia in Denmark, 1969-1993." Schizophr Res **75**(2-3): 315-324.
- Daskalopoulos, E. P., M. A. Lang, et al. (2012). "D(2)-dopaminergic receptor-linked pathways: critical regulators of CYP3A, CYP2C, and CYP2D." Mol Pharmacol **82**(4): 668-678.
- David S. Ettinger, M., Douglas E. Wood, MD, FRCSEd, Dara L. Aisner, MD, PhD, Wallace Akerley, MD, Jessica Bauman, MD, Lucian R. Chirieac, MD, Thomas A. D'Amico, MD, Malcolm M. DeCamp, MD, Thomas J. Dilling, MD, MS, Michael Dobelbower, MD, PhD, Robert C. (2017). "Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." Journal of the National Comprehensive Cancer Network **15**: 504-535.
- David, W. and L. J. R. (2006). Molecular carcinogenesis and the molecular biology of human cancer, Taylor & Francis Group.

- Dela Cruz, C. S., L. T. Tanoue, et al. (2011). "Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention." *Clin Chest Med* **32**(4): 605-644.
- Doroshov, D. and R. Herbst (2018). "Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in 2018." *JAMA Oncology* **4**(4): 569-570.
- Edwards, A. C., S. A. Bacanu, et al. (2016). "Evaluating the dopamine hypothesis of schizophrenia in a large-scale genome-wide association study." *Schizophr Res* **176**(2-3): 136-140.
- Feinberg, W. T. A. P. (2013). "Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host." *Nature Reviews Cancer* **13**(7): 497-510
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int J Cancer* **136**(5): E359-386.
- Fouad, Y. A. and C. Aanei (2017). "Revisiting the hallmarks of cancer." *Am J Cancer Res* **7**(5): 1016-1036.
- Fusar-Poli, P. and A. Meyer-Lindenberg (2013). "Striatal presynaptic dopamine in schizophrenia, Part I: meta-analysis of dopamine active transporter (DAT) density." *Schizophr Bull* **39**(1): 22-32.
- Gasso, P., S. Mas, et al. (2012). "Neurotoxic/neuroprotective activity of haloperidol, risperidone and paliperidone in neuroblastoma cells." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **36**(1): 71-77.
- Grinshpoon, A., M. Barchana, et al. (2005). "Cancer in schizophrenia: is the risk higher or lower?" *Schizophrenia Research* **1**(73): 333-341.
- Gulbinat, W., A. Dupont, et al. (1992). "Cancer incidence of schizophrenic patients. Results of record linkage studies in three countries." *Br J Psychiatry Suppl*(18): 75-83.
- Haber, S. N. (2014). "The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit." *Neuroscience* **282**: 248-257.
- Hajdu, S. I. (2011). "A note from history: landmarks in history of cancer, part 2." *Cancer* **117**(12): 2811-2820.
- Hajdu, S. I. (2012). "A note from history: landmarks in history of cancer, part 3." *Cancer* **118**(4): 1155-1168.
- Halls, M. L. and D. M. Cooper (2011). "Regulation by Ca²⁺-signaling pathways of adenylyl cyclases." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(1): a004143.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Harkitis, P., E. P. Daskalopoulos, et al. (2015). "Dopamine D2-Receptor Antagonists Down-Regulate CYP1A1/2 and CYP1B1 in the Rat Liver." *PLoS One* **10**(10): e0128708.
- Harvey Lodish, A. B., S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell (2000). *Molecular Cell Biology*. New York, W. H. Freeman.
- Helmy, S. A. (2013). "Therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic compartmental analysis of sulpiride double-peak absorption profile after oral administration to human volunteers." *Biopharm Drug Dispos* **34**(5): 288-301.
- Hippisley-Cox, J., Y. Vinogradova, et al. (2007). "Risk of malignancy in patients with schizophrenia or bipolar disorder: nested case-control study." *Arch Gen Psychiatry* **64**(12): 1368-1376.
- Hirose, T. and T. Kikuchi (2005). "Aripiprazole, a novel antipsychotic agent: dopamine D2 receptor partial agonist." *J Med Invest* **52** Suppl: 284-290.
- Hodgson, R., H. J. Wildgust, et al. (2010). "Cancer and schizophrenia: is there a paradox?" *Journal of Psychopharmacology* **24**(4): 51-60.
- Hor, K. and M. Taylor (2010). "Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors." *J Psychopharmacol* **24**(4 Suppl): 81-90.

- Hotta, K., K. Matsuo, et al. (2004). "Meta-analysis of randomized clinical trials comparing Cisplatin to Carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **22**(19): 3852-3859.
- Howes, O., R. McCutcheon, et al. (2015). "Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century." J Psychopharmacol **29**(2): 97-115.
- Howes, O. D., R. McCutcheon, et al. (2017). "The Role of Genes, Stress, and Dopamine in the Development of Schizophrenia." Biol Psychiatry **81**(1): 9-20.
- Howes, O. D. and R. M. Murray (2014). "Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model." Lancet **383**(9929): 1677-1687.
- Ji, J., K. Sundquist, et al. (2013). "Incidence of cancer in patients with schizophrenia and their first-degree relatives: a population-based study in Sweden." Schizophr Bull **39**(3): 527-536.
- Kalemkerian, G. P., W. Akerley, et al. (2011). "Small cell lung cancer." J Natl Compr Canc Netw **9**(10): 1086-1113.
- Kanwal, M., X. J. Ding, et al. (2017). "Familial risk for lung cancer." Oncol Lett **13**(2): 535-542.
- Kanwal, R. and S. Gupta (2012). "Epigenetic modifications in cancer." Clin Genet **81**(4): 303-311.
- Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg (2008). "Ras oncogenes: split personalities." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(7): 517-531.
- Kitzinger, H., D. G. Arnold, et al. (1949). "A preliminary study of the effects of glutamic acid on catatonic schizophrenics." Rorschach Res Exch J Proj Tech **13**(2): 210-218.
- Kono, Y., K. Utsunomiya, et al. (2014). "Longitudinal time-dependent effects of irradiation on multidrug resistance in a non-small lung cancer cell line." Mol Cancer Ther **13**(11): 2706-2712.
- Kudo, S. and T. Ishizaki (1999). "Pharmacokinetics of haloperidol: an update." Clin Pharmacokinet **37**(6): 435-456.
- Lai, E. C., C. H. Chang, et al. (2013). "Effectiveness of sulpiride in adult patients with schizophrenia." Schizophr Bull **39**(3): 673-683.
- Le Chevalier, T., G. Scagliotti, et al. (2005). "Efficacy of gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of survival outcomes." Lung Cancer **47**(1): 69-80.
- Lewis, V. A. (2017). Psychopharmacology, Pharmacology and Therapeutics for Dentistry
- Li, H., J. Li, et al. (2018). "The incidence rate of cancer in patients with schizophrenia: A meta-analysis of cohort studies." Schizophr Res **195**: 519-528.
- Li, J., Q. Y. Yao, et al. (2017). "Dopamine D2 receptor antagonist sulpiride enhances dexamethasone responses in the treatment of drug-resistant and metastatic breast cancer." Acta Pharmacol Sin **38**(9): 1282-1296.
- Li, P., G. L. Snyder, et al. (2016). "Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future." Curr Top Med Chem **16**(29): 3385-3403.
- Li, S., Y. L. Choi, et al. (2016). "Comprehensive Characterization of Oncogenic Drivers in Asian Lung Adenocarcinoma." J Thorac Oncol **11**(12): 2129-2140.
- Lichtermann, D., J. Ekelund, et al. (2001). "Incidence of cancer among persons with schizophrenia and their relatives." Archives of General Psychiatry **58**(6): 573-578.
- Lin, C., H. Lane, et al. (2013). "Inverse association between cancer risks and age in schizophrenic patients: a 12-year nationwide cohort study." Cancer Science **104**(3): 383-390
- Lin, G. M., Y. J. Chen, et al. (2013). "Cancer incidence in patients with schizophrenia or bipolar disorder: a nationwide population-based study in Taiwan, 1997-2009." Schizophr Bull **39**(2): 407-416.

- Luch, A. (2005). "Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis." Nat Rev Cancer **5**(2): 113-125.
- Lutkenhoff, E. S., T. G. van Erp, et al. (2010). "Proton MRS in twin pairs discordant for schizophrenia." Mol Psychiatry **15**(3): 308-318.
- Martincorena, I., A. Roshan, et al. (2015). "Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin." Science **348**(6237): 880-886.
- MARTINEZ, J. D., M. T. PARKER, et al. (2003). Molecular Biology of Cancer, John Wiley&Sons.
- McClave, A. K., L. R. McKnight-Eily, et al. (2010). "Smoking characteristics of adults with selected lifetime mental illnesses: results from the 2007 National Health Interview Survey." Am J Public Health **100**(12): 2464-2472.
- Meltzer, H. Y. (2013). "Update on typical and atypical antipsychotic drugs." Annu Rev Med **64**: 393-406.
- Merlo LM, P. J., Reid BJ, et al (2006). "Cancer as an evolutionary and ecological process." Nature Reviews Cancer **6**(12): 924-935
- Meyer-Lindenberg, A., R. S. Miletich, et al. (2002). "Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia." Nat Neurosci **5**(3): 267-271.
- Meyer, J. M., G. Proctor, et al. (2016). "Ciprofloxacin and Clozapine: A Potentially Fatal but Underappreciated Interaction." Case Rep Psychiatry **2016**: 5606098.
- Miyamoto, S., N. Miyake, et al. (2012). "Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents." Mol Psychiatry **17**(12): 1206-1227.
- Mortensen, P. B. (1989). "The incidence of cancer in schizophrenic patients." J Epidemiol Community Health **43**(1): 43-47.
- Mortensen, P. B. (1994). "The occurrence of cancer in first admitted schizophrenic patients." Schizophr Res **12**(3): 185-194.
- Natsubori, T., H. Inoue, et al. (2014). "Reduced frontal glutamate + glutamine and N-acetylaspartate levels in patients with chronic schizophrenia but not in those at clinical high risk for psychosis or with first-episode schizophrenia." Schizophr Bull **40**(5): 1128-1139.
- Nestler Eric J., Hyman Steven E., et al. (2009). Molecular Neuropharmacology, A foundation of Clinical Neuroscience
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-28.
- Nucifora, F. J., M. Mihaljevic, et al. (2017). "Clozapine as a Model for Antipsychotic Development." Neurotherapeutics **14**(3): 750-761.
- Ozaki, T. and A. Nakagawara (2011). "Role of p53 in Cell Death and Human Cancers." Cancers (Basel) **3**(1): 994-1013.
- Pani, L. and G. Gessa (2002). "The substituted benzamides and their clinical potential on dysthymia and on the negative symptoms of schizophrenia." Molecular Psychiatry **7**(3): 247-253.
- Peprah, K., X. Y. Zhu, et al. (2011). "Multi-receptor drug design: Haloperidol as a scaffold for the design and synthesis of atypical antipsychotic agents." Bioorg Med Chem. **20**(3): 1291-1297.
- Pfister, D. G., D. H. Johnson, et al. (2004). "American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003." J Clin Oncol **22**(2): 330-353.
- Pirmohamed, M., D. Williams, et al. (1995). "Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro." J Pharmacol Exp Ther **272**(3): 984-990.

- Postow, M. A., M. K. Callahan, et al. (2015). "Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy." *J Clin Oncol* **33**(17): 1974-1982.
- Pujol, J., F. Barlesi, et al. (2006). "Should chemotherapy combinations for advanced non-small cell lung cancer be platinum-based? A meta-analysis of phase III randomized trials." *Lung Cancer* **51**(3): 335-345.
- Rapp, E., J. Pater, et al. (1988). "Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer--report of a Canadian multicenter randomized trial." *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* **6**(4): 633-641.
- Ravi Hingorani, Jun Deng, et al. (2011). "Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ System." *BD Biosciences*.
- Ribeiro, E. L. A., T. de Mendonca Lima, et al. (2018). "Efficacy and safety of aripiprazole for the treatment of schizophrenia: an overview of systematic reviews." *Eur J Clin Pharmacol* **74**(10): 1215-1233.
- Rinaldi, M., C. Cauchi, et al. (2006). "First line chemotherapy in advanced or metastatic NSCLC." *Ann Oncol* **17 Suppl 5**: v64-67.
- Rostami-Hodjegan, A., A. M. Amin, et al. (2004). "Influence of dose, cigarette smoking, age, sex, and metabolic activity on plasma clozapine concentrations: a predictive model and nomograms to aid clozapine dose adjustment and to assess compliance in individual patients." *J Clin Psychopharmacol* **24**(1): 70-78.
- Rybakowski, J. K., M. Skibinska, et al. (2009). "Functional polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene in schizophrenia." *Schizophr Res* **109**(1-3): 90-93.
- Sampson, D., B. Bricker, et al. (2014). "Further evaluation of the tropane analogs of haloperidol." *Bioorg Med Chem Lett* **24**(17): 4294-4297.
- Scagliotti, G. V., G. Selvaggi, et al. (2004). "The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer." *Clin Cancer Res* **10**(12 Pt 2): 4227s-4232s.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et al. (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* **331**(6024): 1565-1570.
- Seeman, P. (2013). "Schizophrenia and dopamine receptors." *Eur Neuropsychopharmacol* **23**(9): 999-1009.
- Seeman, P. (2014). "Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic." *ACS Chem Neurosci* **5**(1): 24-29.
- Seeman, P. and T. Lee (1975). "Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons." *Science* **188**(4194): 1217-1219.
- Sharma, S., T. K. Kelly, et al. (2010). "Epigenetics in cancer." *Carcinogenesis* **31**(1): 27-36.
- Society, A. C. (2017). "Cancer Facts and Figures 2017."
- Sordella, R., D. W. Bell, et al. (2004). "Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways." *Science* **305**(5687): 1163-1167.
- Soria, J. C., Y. Ohe, et al. (2018). "Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *N Engl J Med* **378**(2): 113-125.
- Stanhope Bayne-Jones, M. D., LL.D., M. D. Walter J. Burdette, Ph. D., et al. (1964). *Smoking and Health: Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service*, U.S DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE Public Health Service
- Steeg, P. S. (2006). "Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges." *Nat Med* **12**(8): 895-904.
- STEWART, B. W. and C. P. WILD (2014). World Cancer Report 2014. LYON, FRANCE: 88-95, 350-361.
- Sudhakar, A. (2009). "History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods." *J Cancer Sci Ther* **1**(2): 1-4.

- Suzuki, S., M. Okada, et al. (2016). "Aripiprazole, an Antipsychotic and Partial Dopamine Agonist, Inhibits Cancer Stem Cells and Reverses Chemoresistance." Anticancer Res **36**(10): 5153-5161.
- Tabarés-Seisdedos, R. and J. Rubenstein (2009). "Chromosome 8p as a potential hub for developmental neuropsychiatric disorders: implications for schizophrenia, autism and cancer." Molecular Psychiatry **14**(6): 563-589.
- van Os, J. and S. Kapur (2009). "Schizophrenia." Lancet **374**(9690): 635-645.
- Vichai, V. and K. Kirtikara (2006). "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening." Nat Protoc **1**(3): 1112-1116.
- Vogelstein, B., N. Papadopoulos, et al. (2013). "Cancer genome landscapes." Science **339**(6127): 1546-1558.
- Wagstaff, A. J., P. Benfield, et al. (1994). "Sulpiride: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy in Schizophrenia." CNS Drugs **2**(4): 313-333
- Wallig, W. H. C. R. M. (2013). Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, Academic Press
- Wang, J., I. M. Otori, et al. (2010). "Sulpiride augmentation for schizophrenia." Schizophr Bull **36**(2): 229-230.
- Wiklund, E., V. Catts, et al. (2010). "Cytotoxic effects of antipsychotic drugs implicate cholesterol homeostasis as a novel chemotherapeutic target." International Journal of Cancer **126**(1): 28-40.
- Wilbur, M. A., I. M. Shih, et al. (2017). "Cancer Implications for Patients with Endometriosis." Semin Reprod Med **35**(1): 110-116.
- Wong, E. H., F. I. Tarazi, et al. (2010). "The effectiveness of multi-target agents in schizophrenia and mood disorders: Relevance of receptor signature to clinical action." Pharmacol Ther **126**(2): 173-185.
- Wong, M. C. S., X. Q. Lao, et al. (2017). "Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status." Sci Rep **7**(1): 14300.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.
- Yde, C. W., M. P. Clausen, et al. (2009). "The antipsychotic drug chlorpromazine enhances the cytotoxic effect of tamoxifen in tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant human breast cancer cells." Anticancer Drugs **20**(8): 723-735.
- Yin, Y. C., C. C. Lin, et al. (2015). "Clozapine induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells." Cell Physiol Biochem **35**(3): 945-956.
- Yoda, S., I. Dagogo-Jack, et al. (2018). "Targeting oncogenic drivers in lung cancer: Recent progress, current challenges and future opportunities." Pharmacol Ther.
- You, J. S. and P. A. Jones (2012). "Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?" Cancer Cell **22**(1): 9-20.
- Zamay, T. N., G. S. Zamay, et al. (2017). "Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer." Cancers (Basel) **9**(11).
- Zappa, C. and S. A. Mousa (2016). "Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances." Transl Lung Cancer Res **5**(3): 288-300.
- Zhang, G. and R. W. Stackman, Jr. (2015). "The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition." Front Pharmacol **6**: 225.