



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ IFN α s –ΑΝΤΙΨΥΧΩΣΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ
ΚΑΙ ΘΑΝΑΤΟ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ ΣΕ
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ»**

Τσάλιος Θωμάς
Φαρμακοποιός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ IFN α s –ΑΝΤΙΨΥΧΩΣΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ
ΚΑΙ ΘΑΝΑΤΟ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ ΣΕ
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ»**

Τσάλιος Θωμάς
Φαρμακοποιός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Τσάλιου Θωμά: 5-10-2016

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 791^α/1-11-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Γαλάνη Βασιλική Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Κυρίτσης Αθανάσιος, Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βούλγαρης Σπυρίδων, Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-11-2016

«Επιδράσεις των IFNs-Αντιψυχωσικών στο κυτταρικό κύκλο και θάνατο σε κυτταρικές σειρές γλοιβλαστώματος σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 914^α/3-3-2020

Βούλγαρη Παρασκευή	Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βούλγαρης Σπυρίδων	Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καστανιουδάκης Ιωάννης	Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κυρίτσης Αθανάσιος	Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γαλάνη Βασιλική	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αλεξίου Γεώργιος	Επίκουρος Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μητσέλου Αντιγόνη	Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής με έμφαση στην Δικαστική Παθολογική Ανατομική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-5-2020

Ιωάννινα 4-6-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατισιάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Στην οικογένεια μου, στη Μαρία και στον Γιάννη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ολοκληρώνοντας την διατριβή αυτή θα ήθελα να αναφερθώ σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Βασιλική Γαλάνη, η οποία με το μόνιμο ενδιαφέρον της γύρω από την εξέλιξη της παρούσας εργασίας καθώς και με την άριστη συνεργασία, την αμέριστη βοήθεια και τη συμπαράσταση που μου έδειξε συνέβαλε ώστε η περίοδος αυτή να είναι ευχάριστη και ιδιαίτερα εποικοδομητική. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής κ. Σπυρίδωνα Βούλγαρη και τον Καθηγητή Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής κ. Αθανάσιο Κυρίτση για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή όπως και για τη συνολική βοήθειά τους, την εμπιστοσύνη και την ηθική τους συμπαράσταση στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής κ. Γεώργιο Αλεξίου για την συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή, καθώς επίσης και για την συνολική βοήθειά του, τις εύστοχες συμβουλές και παρατηρήσεις του και την παρότρυνσή του να ασχοληθώ περαιτέρω με την έρευνα. Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία του Τμήματος Ιατρικής κ. Παρασκευή Βούλγαρη, τον Καθηγητή Ωτορινολαρυγγολογίας του Τμήματος Ιατρικής κ. Καστανιουδάκη Ιωάννη και την Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής με έμφαση στην Δικαστική Παθολογική Ανατομική του Τμήματος Ιατρικής κ. Μητσέλου Αντιγόνη για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην επταμελή εξεταστική επιτροπή, για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και την ιδιαίτερα φιλική αντιμετώπισή τους. Οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους προπτυχιακούς φοιτητές, κ. Ησύχου Ραφαέλλα και κ. Παπαδόπουλο Φώτιο για την πολύτιμη βοήθειά τους στην εκτέλεση σημαντικών πειραμάτων για την εξέλιξη της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που δημιούργησαν αλλά και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν. Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στην Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών κ. Παπαδημητρίου Ευαγγελία που με εμπιστεύτηκε στα πρώτα μου βήματα ως ερευνητή και μου έδωσε την ευκαιρία να επεκταθώ περαιτέρω στην επιστήμη που επέλεξα να υπηρετήσω. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Πανταζάκα Ευαγγελία και την υποψήφια Διδάκτορα κ. Καστανά Πηνελόπη για τη συνεργασία, την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφεραν στην έναρξη της ενασχόλησής μου με τα ερευνητικά πειράματα και το φιλικό κλίμα που δημιούργησαν στην μεταξύ μας συνεργασία. Φυσικά, ευχαριστώ όλους τους δασκάλους και καθηγητές μου στους οποίους οφείλω το κυριότερο μέρος της παιδείας μου μέχρι σήμερα. Χωρίς αμφιβολία ευχαριστώ την σύντροφό μου κ. Καπατσούλια Μαρία και τον υιό μου Γιάννη για την υπομονή και την υποστήριξή τους αυτά τα χρόνια. Τέλος, δεν ξεχνώ ότι αυτά που πέτυχα μέχρι τώρα τα οφείλω στην υλική και ηθική συμπαράσταση αλλά και στα πρότυπα που είχα από τους γονείς μου, Γιάννη και Νίκη, και την αδερφή μου Κατερίνα και τους ευχαριστώ θερμά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Γενική επισκόπηση νεοπλασίας εγκεφάλου	1
1.1 Παράγοντες κινδύνου	4
1.2 Συμπτώματα	4
1.3 Διάγνωση	6
1.4 Στρατηγικές θεραπείας	7
1.5 Νέες τεχνικές αντιμετώπισης	9
2. Γλοιοβλάστωμα	10
3. Ιντερφερόνες	17
3.1 Γονίδια και πρωτεΐνες των IFNs	19
3.2 Υποδοχείς IFNs	20
3.3 Γενετικές ανωμαλίες που επηρεάζουν την απόκριση των IFNs	21
3.4 Συνεργικές και ανταγωνιστικές δράσεις μεταξύ των τύπων IFNs	22
3.5 Άλλες δράσεις των IFNs	23
3.6 Προβλήματα που προκαλούνται από IFNs	25
3.7 Μονοπάτια μεσολαβούμενα από IFNs	26
3.8 Αντικαρκινικές δράσεις των IFNs	27
4. Φάρμακα κατά των ψυχώσεων – αντιψυχωσικά	29
4.1 Αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς (νευροληπτικά ή τυπικά)	30
4.2 Αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς (άτυπα)	32
4.3 Τρόπος δράσης αντιψυχωσικών φαρμάκων	34
4.4 Δράσεις αντιψυχωσικών φαρμάκων	41
4.5 Θεραπευτικές χρήσεις αντιψυχωσικών φαρμάκων	42
4.6 Απορρόφηση και μεταβολισμός	43
4.7 Ανεπιθύμητες ενέργειες	43
4.8 Δράσεις αντιψυχωσικών στη θεραπεία του καρκίνου	46
4.9 Μηχανισμοί σηματοδότησης αντιψυχωσικών φαρμάκων στη θεραπεία του καρκίνου	52
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
1. Θρεπτικά μέσα των χρησιμοποιούμενων κυττάρων	56
2. Παρασκευή Trypsin/EDTA	56
3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων	57
4. Μέτρηση κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer	59
5. Κατάψυξη κυττάρων	60
6. Απόψυξη κυττάρων	62
7. Απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων	63
8. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	64
9. Ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western	67
10. Υπολογισμός IC50 ουσίας	69
11. Φασματοφωτομετρική ανάλυση – MTT	70
12. Προσομοίωση τραύματος διά αμυχής (In vitro scratch wound healing assay)	72
13. Κυτταρομετρία ροής- Απόπτωση	73
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
1. Η IFN-γ εμφανίζει μικρή αναστολή του πολλαπλασιασμού σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U251	75
2. Προσδιορισμός της IC50 της ζιπρασιδόνης	76
3. Η Ζιπρασιδόνη προάγει τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 και U373	77

4. Η Ζιπρασιδόνη προάγει τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 και T98 σε συνδυασμό με εφαρμογή ακτινοβολήσης και τεμοζολαμίδης	79
5. Η Ζιπρασιδόνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, λόγω στάσης του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 και G2/M	81
6. Η Ζιπρασιδόνη αναστέλλει την έκφραση του παράγοντα NF-κΒ με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο	83
7. Η Ζιπρασιδόνη επηρεάζει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87, T98 και U373	84
8. Προσδιορισμός της IC50 της Αλοπεριδόλης	86
9. Η Αλοπεριδόλη προάγει τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 και T98 σε συνδυασμό με εφαρμογή ακτινοβολήσης και τεμοζολαμίδης	87
10. Η Αλοπεριδόλη προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα U87 μέσω απόπτωσης, λόγω στάσης του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1	89
11. Η Αλοπεριδόλη επηρεάζει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87 και T98	91
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	93
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	99
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	101
SUMMARY	104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και ανώμαλη ανάπτυξη των κυττάρων, οδηγώντας στον σχηματισμό κυτταρικών μαζών που ονομάζονται όγκοι, οι οποίοι μπορεί να είναι καλοήθεις (μη επεκτάσιμοι όγκοι, περιορισμένοι σε συγκεκριμένη περιοχή) ή κακοήθεις (μεταστατικοί όγκοι, οι οποίοι διαχέονται στο σώμα μέσω του αίματος ή των λεμφαδένων), που παράγονται μέσω της διαδικασίας της αγγειογένεσης και οδηγούν σε περαιτέρω μετάσταση σε άλλους σωματικούς ιστούς/όργανα (1). Ο μη ελεγχόμενος πολλαπλασιασμός στα κύτταρα προκύπτει ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε διαφορετικά γονίδια, κυρίως πρωτο-ογκογονίδια, γονίδια καταστολής όγκων και γονίδια επιδιόρθωσης DNA, τα οποία είναι κυρίως υπεύθυνα για τη ρύθμιση της διαδικασίας κυτταρικής διαίρεσης (2, 3). Ο καρκίνος αναφέρεται ως ένας από τους 10 κυριότερους λόγους θνησιμότητας στον άνθρωπο και ως ασθένεια δεν έχει μόνο επιζήμια αποτελέσματα στην υγεία ενός ατόμου, αλλά έχει επίσης αντίκτυπο στην κοινωνικοοικονομική κατάσταση του ασθενούς. Το ποσοστό θνησιμότητας λόγω καρκίνου είναι περισσότερο στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες και μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκίνου, ο καρκίνος του μαστού έχει το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης και ο καρκίνος στην τραχεία, στους βρόγχους και στους πνεύμονες έχουν το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας. Ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό θνησιμότητας εμφανίζει και ο καρκίνος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και πιο συγκεκριμένα ο καρκίνος του εγκεφάλου, χωρίς ωστόσο να έχει μεγάλο ποσοστό εμφάνισης. Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον στοιχείο είναι η εμφάνισή του σε μεγάλο ηλικιακό εύρος, από παιδιά έως ενήλικες (4,5).

Οι νεοπλασίες εγκεφάλου είναι όγκοι που αρχίζουν και παραμένουν στον εγκέφαλο, π.χ. γλοιώματα και χαρακτηρίζονται ως καλοήθεις νεοπλασίες ή κακοήθεις νεοπλασίες. Η καλοήθης νεοπλασία του εγκεφάλου είναι αυτή που σπάνια εξαπλώνεται και εισβάλλει σε ιστούς γύρω από αυτόν, παρουσιάζει διακριτά όρια και αποτελείται από πολύ αργά αναπτυσσόμενα κύτταρα. Παράδειγμα καλοήθους νεοπλασίας εγκεφάλου είναι οι όγκοι της υπόφυσης, τα μηνιγγιώματα και τα αστροκυτώματα. Η κακοήθης νεοπλασία του εγκεφάλου είναι αυτή που εισβάλλει εύκολα σε άλλα μέρη του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, στερείται διακριτών ορίων και αποτελείται από ταχέως αναπτυσσόμενα κύτταρα. Παράδειγμα κακοήθους τύπου νεοπλασίας του εγκεφάλου είναι τα ολιγοδενδρογλοιώματα (1). Παρακάτω παρουσιάζονται οι τύποι της πρωτοπαθούς νεοπλασίας του εγκεφάλου:

1. *Γλοίωμα στελέχους του εγκεφάλου*: Γενικά εμφανίζεται στο ανώτερο στέλεχος του εγκεφάλου, στο μέσο εγκεφαλικό στέλεχος και στο χαμηλότερο εγκεφαλικό στέλεχος. Είναι διαδεδομένο σε παιδιά και ενήλικες στην ηλικιακή ομάδα που κυμαίνεται από 5-40 χρόνια.
2. *Κρανιοφαρυγγίωμα*: Είναι ένας όγκος που προέρχεται από μικρές εστίες κυττάρων που βρίσκονται κοντά στο μίσχο της υπόφυσης. Αποτελεί το 2-5% του συνόλου του πρωτογενούς καρκίνου του

εγκεφάλου σε ενήλικες μετά την ηλικία των 45 ετών και παρατηρείται επίσης στα παιδιά. Υπάρχουν δύο τύποι κρανιοφαρυγγιώματος, αδαμαντινοματώδους και θηλωματικού κρανιοφαρυγγιώματος.

3. *Καρκίνος των γεννητικών κυττάρων*: Πρόκειται για έναν τύπο όγκου που προέρχεται από την κωνοειδή περιοχή του εγκεφάλου. Αποτελεί περίπου το 1-3% των όγκων του εγκεφάλου στα παιδιά και επίσης συναντάται σε νεαρούς ενήλικες ηλικίας 11-30 ετών. Είναι ο μόνος πρωταρχικός όγκος στον εγκέφαλο που μπορεί να διαγνωστεί χρησιμοποιώντας δείκτες που βρίσκονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στην αλφα-εμβρυοπρωτεΐνη του αίματος (AFP). Χρησιμοποιούνται δείκτες πλακουντιακής αλκαλικής φωσφατάσης (PAP) και ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (HCG) για τη διάγνωση του όγκου των γεννητικών κυττάρων.
4. *Γλοιοβλάστωμα*: Εμφανίζεται κυρίως στην εγκεφαλονωτιαία περιοχή του εγκεφάλου και αποτελεί το 16% περίπου των πρωτοπαθών περιπτώσεων όγκου στον εγκέφαλο. Ταξινομείται σε πρωτογενές γλοιοβλάστωμα, που ονομάζεται επίσης de novo γλοιοβλάστωμα και δευτερογενές γλοιοβλάστωμα.
5. *Γλοιώμα*: Τα γλοιώματα προέρχονται από τα κύτταρα της γλοίας του εγκεφάλου. Τα κύτταρα της γλοίας σχηματίζουν τον ιστό, ο οποίος περιβάλλει και στηρίζει τα νευρικά κύτταρα στον εγκέφαλο. Υπάρχουν τρεις τύποι νευρογλοιακών κυττάρων που προκαλούν όγκους, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα κύτταρα του επενδύματος
6. *Αστροκύτωμα*: Προκύπτει από τα αστροκύτταρα. Το αστροκύτωμα ανήκει στην κατηγορία των γλοιωμάτων χαμηλής κακοήθειας και βραδείας ανάπτυξης. Υπό τον γενικό όρο αστροκύτωμα, συμπεριλαμβάνονται τα ινώδη αστροκυτώματα, τα πρωτοπλασματικά αστροκυτώματα, και τα γεμιστοκυτταρικά αστροκυτώματα. Εντοπίζεται κυρίως στον μετωπιαίο και στον κροταφικό λοβό του εγκεφάλου.
7. *Επενδύμμα*: Το επενδύμμα αποτελεί πρωτοπαθή όγκο του εγκεφάλου που εμφανίζεται και σε παιδιά, συνήθως στον οπίσθιο βόθρο. Δημιουργείται από υπολειπόμενα ενδοπαρεγχυματικά επενδυμικά κύτταρα.
8. *Ολιγοδενδρογλοίωμα*: Είναι ένας τύπος όγκου που προέρχεται από ολιγοδενδροκύτταρα. Κατατάσσεται περαιτέρω σε διαφορετικούς βαθμούς ανάλογα με την ταχύτητα με την οποία οι όγκοι τείνουν να αναπαράγονται. Το ολιγοδενδρογλοίωμα παρατηρείται κυρίως σε ενήλικες νέους και μεσήλικες και πολύ σπάνια σε παιδιά.
9. *Μυελοβλάστωμα*: Είναι ένας όγκος που εμφανίζεται ως επί το πλείστον στο παρεγκεφαλικό τμήμα του εγκεφάλου και είναι ένας αναπτυσσόμενος όγκος που εξαπλώνεται σε άλλα μέρη του ΚΝΣ. Αποτελεί το 13% των περιπτώσεων όγκου εγκεφάλου στα παιδιά και το 3% στους ενήλικες.

10. *Μηνιγγίωμα*: Το μηνιγγίωμα είναι ο πιο συχνός τύπος πρωτοπαθούς όγκου εγκεφάλου και αποτελεί το 30% περίπου όλων των όγκων εγκεφάλου. Τα μηνιγγιώματα προέρχονται από τις μήνιγγες που αποτελούν τα 3 εξωτερικά περιβλήματα μεταξύ του κρανίου και του εγκεφάλου που καλύπτουν και προστατεύουν τον εγκέφαλο κάτω από το κρανίο. Τα μηνιγγιώματα αναπτύσσονται από το μεσαίο περίβλημα που ονομάζεται αραχνοειδής (6,7).

- Παράγοντες κινδύνου

Οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εμφάνιση νεοπλασίας του εγκεφάλου είναι οι περιβαλλοντικοί και οι γενετικοί. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες περιλαμβάνουν: το κάπνισμα, την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, την κακή διατροφή, την έλλειψη άσκησης, την έκθεση σε υπερβολικό ηλιακό φως, τη σεξουαλική συμπεριφορά που αυξάνει την έκθεση σε ορισμένους ιούς, την έκθεση σε υψηλές ιοντίζουσες ακτινοβολίες, κατασχέσεις, έκθεση σε διάφορους τύπους ρύπανσης, χορήγηση φαρμάκων όπως υπνωτικά χάπια, φάρμακα κατά των ναρκωτικών, αντιισταμινικά φάρμακα και ευρεία έκθεση σε επιβλαβείς βιομηχανικές χημικές ουσίες. Οι γενετικοί παράγοντες περιλαμβάνουν: αλλοιώσεις των γονιδίων στα κύτταρα του σώματος, μη φυσιολογικά επίπεδα ορμονών στην κυκλοφορία του αίματος, εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα και έκθεση σε καρκινογόνους παράγοντες (6).

- Συμπτώματα

Τα συμπτώματα της νεοπλασίας του εγκεφάλου ποικίλλουν από άτομο σε άτομο ανάλογα με τον τύπο του όγκου, το μέγεθος και τη θέση που εντοπίζεται στον εγκέφαλο. Ένα άτομο που ενδέχεται να πάσχει από όγκο στον εγκέφαλο μπορεί να παρουσιάσει συμπτώματα, όπως προβλήματα μνήμης, επιληπτικές κρίσεις, αλλαγές στην ομιλία, προβλήματα ακοής ή όρασης, αλλαγή συμπεριφοράς, αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης που προκαλεί πονοκέφαλο, ναυτία, εμετό, υπνηλία, αδυναμία σε κάποια πλευρά του σώματος, παράξενο συναίσθημα στο κεφάλι και επίσης παράξενες μυρωδιές, απώλεια συνείδησης και γενική ευερεθιστότητα, κατάθλιψη ή αλλαγές στη συμπεριφορά του ατόμου. Ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου του εγκεφάλου εμφανίζονται και ανάλογα συμπτώματα, όπως παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα (3,5,8,9,10,11).

	Τύποι καρκίνου του εγκεφάλου	Συμπτώματα	
		Παιδιά	Ενήλικες
1.	Αστροκύτωμα	Πονοκέφαλοι νωρίς το πρωί, έμετος (επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου), αταξία, θηλώματα, επιληπτικές κρίσεις, εστιακό νευρολογικό έλλειμμα, υδροκεφαλία, μειωμένη όραση, δυσλειτουργία της υπόφυσης	Διαταραχές της ισορροπίας, ναυτία, έμετος, αλλαγή στο βάρος, αλλαγή προσωπικότητας και συμπεριφοράς, πονοκέφαλος, κόπωση, απώλεια της όρεξης
2.	Γλοίωμα στελέχους του εγκεφάλου	Υδροκεφαλία, παράλυση κρανιακού νεύρου VI και VII	Ανωμαλίες στην κίνηση του ματιού που οδηγούν σε διπλωπία, αδυναμία ή μεταβολές αίσθησης του προσώπου, δυσκολία στην κατάποση και βραχνάδα, κεφαλαλγία, ναυτία, εμετός και αστάθεια στο βάδισμα ή ασθενής συντονισμός στη μία πλευρά του σώματος
3.	Κρανιοφαρυγγίωμα	Πονοκέφαλοι, οπτικές διαταραχές, διαβήτης	Παχυσαρκία, καθυστερημένη ανάπτυξη, μειωμένη όραση και πρησμένο οπτικό νεύρο
4.	Επενδύωμα	Πονοκέφαλοι, έμετος, αταξία, αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, επιληπτικές κρίσεις	Αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, κεφαλαλγία, έμετος, ναυτία, επιληπτικές κρίσεις, μειωμένη μνήμη, άνοια
5.	Καρκίνος των γεννητικών κυττάρων	Ασυνήθιστη δίψα, συχνή ούρηση, πρόωρη εφηβεία ή αλλαγές στην όραση	Κεφαλαλγία, μειωμένη όραση, ορμονικά προβλήματα
6.	Γλοιοβλάστωμα	Πονοκέφαλοι, έμετος ή σύγχυση, αλλαγές στην συμπεριφορά, αυξημένος ύπνος, απώλεια μνήμης	Επίμονοι πονοκέφαλοι, διπλωπία ή θολή όραση, ναυτία, εμετός, απώλεια της όρεξης, αλλαγές στη διάθεση ή την προσωπικότητα, αλλαγές στην ικανότητα σκέψης και μάθησης, απώλεια μνήμης, επιληπτικές κρίσεις, μυϊκή αδυναμία, δυσκολία ομιλίας
7.	Γλοίωμα	Αδυναμία κίνησης σε μια πλευρά του προσώπου ή / και του σώματος, απώλεια ισορροπίας, προβλήματα στο βάδισμα, στην όραση και στην ακοή, πρωινή κεφαλαλγία, ναυτία και έμετος, ασυνήθιστη υπνηλία, προβλήματα στη μάθηση	Κεφαλαλγία, ναυτία, έμετος, προβλήματα όρασης, δυσκολία στις κινήσεις των ματιών, αδυναμία του προσώπου, αδυναμία, μούδιασμα, μειωμένη διάθεση, επιληπτικές κρίσεις, πόνος, μειωμένη όραση, δυσκολίες στη γραφή, παράλυση από τη μία πλευρά του σώματος

8.	Μυελοβλάστωμα	Ναυτία, έμετος, πονοκέφαλοι, αταξία, αυξανόμενο μέγεθος κεφαλής, λήθαργος σε παιδιά ηλικίας κάτω του 1 έτους	Αυξημένη ενδοκρανική πίεση με αποτέλεσμα πονοκέφαλο, ναυτία, εμετό νωθρότητα, έλλειψη ισορροπίας και ανεπαρκής συντονισμός των άκρων και ασυνήθιστη κίνηση των ματιών
9.	Μηνιγγίωμα	Κεφαλαλγία, έμετος, προβλήματα στη γραφή και σε άλλες κινητικές δεξιότητες, πρόβλημα στην όραση	Κεφαλαλγία, αδυναμία στη μία πλευρά, επιληπτικές κρίσεις, αλλαγές στην προσωπικότητα και συμπεριφορά, σύγχυση
10.	Ολιγοδενδρογλοίωμα	Μεταβολές στην προσωπικότητα, την αίσθηση και την κίνηση, αυξημένη ενδοκρανική πίεση, πονοκέφαλος, έμετος και επιληπτικές κρίσεις	Επιληπτικές κρίσεις, πονοκέφαλος, αδυναμία, αλλαγές στη συμπεριφορά, υπνηλία

- Διάγνωση

Η διάγνωση της νεοπλασίας του εγκεφάλου γίνεται με διάφορους τρόπους και με το συνδυασμό διάφορων τεχνικών για την καλύτερη εξαγωγή συμπερασμάτων σε σχέση με τη μορφή του όγκου και την εντόπισή του. Η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η νευρολογική εξέταση κατά την οποία γίνεται έλεγχος της όρασης, της ακοής, της εγρήγορσης, της μυϊκής δύναμης, του συντονισμού και των αντανακλαστικών. Η επιβεβαίωση του όγκου στον εγκέφαλο γίνεται με διαφορετικές τεχνικές απεικόνισης, όπως **αξονική (CT)** και **μαγνητική (MRI) τομογραφία**.

Εκτός από τις τεχνικές απεικόνισης, για την διάγνωση του όγκου στον εγκέφαλο χρησιμοποιούνται και άλλες τεχνικές, όπως αυτές που αναφέρονται παρακάτω:

SPECT scan: Αυτή η τεχνική παίρνει τρισδιάστατες εικόνες του σώματος για να εκτιμήσει τη ροή αίματος στον εγκέφαλο, αφού για παράδειγμα στην περίπτωση του καρκίνου του εγκεφάλου, προβλέπεται υψηλότερη παροχή αίματος.

PET scan: Πρόκειται για τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων, το οποίο χρησιμοποιεί κάποιους ραδιοϊχνηθέντες για τη διάγνωση και τον προσδιορισμό της σοβαρότητας των ασθενειών. Βοηθά στη διάκριση μεταξύ όγκου, νεκρωμένου ιστού λόγω ακτινοβολίας και φυσιολογικού εγκεφάλου. Ο συνδυασμός της παραπάνω τεχνικής με την αξονική τομογραφία παρέχει τις λεπτομέρειες της ανατομίας (από την CT ανίχνευση) και τις λειτουργίες (από τη σάρωση PET) του εγκεφάλου.

Εγκεφαλική αγγειογραφία και αγγειογραφία με μαγνητική τομογραφία (MRA): Αυτές οι δοκιμές χρησιμοποιούν ακτίνες X και υλικό αντίθεσης που περιέχει ιώδιο για την παραγωγή της εικόνας των αιμοφόρων αγγείων στον εγκέφαλο και επίσης παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες σχετικές με τις

ανωμαλίες που παρουσιάζονται με CT ή MRI εικόνες σάρωσης της κεφαλής . Η τεχνική αυτή είναι εξαιρετικής σημασίας στο προγραμματισμό μιας χειρουργικής αφαίρεσης ενός όγκου λόγω της μεγάλης παροχής αίματος που εμφανίζει εξαιτίας της αφθονίας αιμοφόρων αγγείων.

Βιοψία: Με τη χρήση αυτής της τεχνικής, εξετάζουμε τον ακριβή τύπο του όγκου και λαμβάνουμε σημαντικότερα αποτελέσματα όσον αφορά τη δυνατότητα αντιμετώπισής του. Η βιοψία κατατάσσεται σε:

- *Βιοψία βελόνας:* Ο νευροχειρουργός τρυπά μια μικρή τρύπα στο κρανίο και εισάγει μια στενή, κοίλη βελόνα στον όγκο για να αφαιρέσει και να εξετάσει ένα δείγμα του όγκου μέσω του πυρήνα της βελόνας.

- *Στερεοτακτική βιοψία:* Είναι ένας τύπος βιοψίας βελόνας που χρησιμοποιεί έναν υπολογιστή και μια τρισδιάστατη συσκευή σάρωσης για να βρει τον όγκο.

Φασματοσκοπία Μαγνητικού Συντονισμού (MRS): Η MRS αποκαλύπτει τη χημική σύνθεση του εγκεφάλου και είναι χρήσιμη για τη διάγνωση χαμηλού βαθμού γλοιωμάτων και όγκων με μεγάλη ποσότητα περιβάλλοντος οιδήματος. Η τεχνική βοηθά επίσης στη διαφοροποίηση μεταξύ της υποτροπής του όγκου και του νεκρωμένου λόγω ακτινοβολίας όγκου. (1,3,6,10,11,12,13,14)

- Στρατηγικές θεραπείας

Οι στρατηγικές θεραπείας που χρησιμοποιούνται για την νεοπλασία του εγκεφάλου αποσκοπούν είτε στην απομάκρυνση του όγκου είτε στην ανακούφιση από εκδηλώσεις του όγκου μέσω της συρρίκνωσής του. Η επιλογή της στρατηγικής θεραπείας εξαρτάται από παραμέτρους όπως ο τύπος, το μέγεθος και η θέση του όγκου, η ηλικία του ασθενούς, το ιατρικό ιστορικό, η γενική κατάσταση της υγείας του, οι τύποι των συμπτωμάτων και οι παρενέργειες που παρατηρούνται στον ασθενή. Οι διάφορες στρατηγικές θεραπείας που χρησιμοποιούνται για τον καρκίνο του εγκεφάλου περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο την συμβατική προσέγγιση θεραπείας, οι οποία περιλαμβάνει την **χειρουργική επέμβαση**, την **ακτινοθεραπεία** και τη **χημειοθεραπεία**.

Στα αρχικά στάδια του όγκου, η χειρουργική αφαίρεση του καλοήθους όγκου, η οποία διατηρεί τη νευρολογική λειτουργία του εγκεφάλου, προτιμάται ως πρωτογενής στρατηγική θεραπείας. Στην περίπτωση όγκου χαμηλής κλίμακας η χειρουργική επέμβαση επιτυγχάνει πλήρη ίαση. Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου επίσης ανακουφίζει από την επαγόμενη από τον όγκο αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης, μειώνοντας έτσι τα συμπτώματα του καρκίνου. Είναι μια ευκολότερη και ασφαλέστερη προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου του εγκεφάλου καθώς παράγει ελάχιστες ή καθόλου παρενέργειες. Ο

περιορισμός της χειρουργικής επέμβασης ως θεραπευτικής προσέγγισης είναι ότι η χειρουργική επέμβαση είναι δυνατή μόνο εάν ο όγκος βρίσκεται σε μια θέση που μπορεί να επιτευχθεί χωρίς να επηρεαστούν οι σημαντικές λειτουργίες του εγκεφάλου. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες μετά τη χειρουργική επέμβαση περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, αδυναμία, κόπωση, πρήξιμο του εγκεφάλου ή υδροκεφαλία και εγκεφαλική βλάβη. Η χειρουργική επέμβαση μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη επιληπτικών κρίσεων και προβλημάτων στη σκέψη, την ομιλία και την όραση.

Η ακτινοθεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση ακτίνων Χ, ακτίνων γάμμα και ακτίνων πρωτονίων για τη θανάτωση ή την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του καρκίνου του εγκεφάλου. Η ακτινοθεραπεία χορηγείται συνήθως για 5 ημέρες την εβδομάδα έως και 6 εβδομάδες. Η ακτινοθεραπεία γενικά ταξινομείται σε δύο κατηγορίες, δηλαδή εξωτερική ακτινοθεραπεία που περιλαμβάνει τη Στερεοστατική Ακτινοχειρουργική (SRS) η οποία στηρίζεται στην παροχή υψηλής ποσότητας ακτινοβολίας σε μία μόνο θεραπεία και την Κλασματική Στερεοστατική Ακτινοθεραπεία (FSR), η οποία παρέχει μια χαμηλότερη δόση ακτινοβολίας σε κάθε θεραπεία και την ακτινοθεραπεία πλήρους εγκεφάλου (WBR), η οποία παρέχει δόση ακτινοβολίας σε ολόκληρο τον εγκέφαλο. Η εσωτερική ακτινοθεραπεία περιλαμβάνει θεραπεία με ακτινοβολία με βάση εμφυτεύματα. Οι παρενέργειες μετά από ακτινοθεραπεία περιλαμβάνουν οίδημα, κόπωση, πονοκεφάλους, ναυτία, πιθανή απώλεια μαλλιών και αλλαγές στις αισθήσεις ή την κίνηση.

Η χημειοθεραπεία ως στρατηγική θεραπείας περιλαμβάνει τη χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων για τη θεραπεία του όγκου. Οι θεραπευτικοί παράγοντες δρουν κατά κύριο λόγο διαταράσσοντας την διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης ή παρεμποδίζοντας την παροχή αίματος σε κύτταρα όγκου που έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο μη φυσιολογικών κυττάρων και συνεπώς τη συρρίκνωση των όγκων. Ο περιορισμός αυτής της θεραπευτικής στρατηγικής συνίσταται στο ότι δύναται επίσης να βλάψει τους φυσιολογικούς ιστούς και κύτταρα. Οι συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που οφείλονται στη χημειοθεραπευτική αγωγή περιλαμβάνουν ναυτία, αδυναμία, κόπωση, αφυδάτωση και μείωση του ανοσοποιητικού που οδηγεί σε ευαισθησία σε λοιμώξεις. (3,11,12,13,14,15)

Οι κυριότερες κατηγορίες χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είναι:

1. *Αντιμεταβολίτες (Μεθοτρεξάτη, Γεμισιταβίνη, Καπεσιταβίνη)*

Παρακωλύουν την παροχή φυσιολογικών πρόδρομων ουσιών των πουρινικών ή πυριμιδινικών νουκλεοτιδίων, είτε εμποδίζοντας τη σύνθεσή τους είτε συναγωνιζόμενοι με αυτές στη σύνθεση DNA ή RNA.

2. Αντιβιοτικά (Δοξορουβικίνη, Μπλεομυκίνη)

Παρεμβάλλονται στην διπλή έλικα του DNA και εμποδίζει τη σύνθεσή του.

3. Αλκυλιούντες Παράγοντες (Τεμοζολαμίδη, Κυκλοφωσφαμίδη, Μεχλωραιθαμίνη)

Ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση συνδεδεμένοι ομοιοπολικά με διάφορα συστατικά του κυττάρου. Η κρίσιμότερη αντίδραση που οδηγεί στη θανάτωση του κυττάρου είναι η αλκυλίωση του DNA.

4. Αναστολείς των μικροσωληνίσκων (Βινκριστίνη, Πακλιταξέλη)

Εμποδίζουν την κατανομή των χρωμοσωμάτων στα δύο θυγατρικά κύτταρα λόγω αποδιοργάνωσης των μικροσωληνίσκων. (16)

- Νέες τεχνικές αντιμετώπισης

Παρόλο που τα φάρμακα αυτά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στις νεοπλασίες του εγκεφάλου, εμφανίστηκαν σοβαρά προβλήματα σε σχέση με την χορήγησή τους για τον τύπο αυτό του καρκίνου. Ο αιματεγκεφαλικός φραγμός είναι το πιο δύσκολο εμπόδιο που εμποδίζει την αποτελεσματική απελευθέρωση θεραπευτικών παραγόντων στον εγκέφαλο. Λειτουργεί ως φυσικό και φυσιολογικό εμπόδιο για την παροχή φαρμάκων στον εγκέφαλο. Η αδιαπερατότητα του οφείλεται στις στενές ενώσεις μεταξύ τριχοειδών ενδοθηλιακών κυττάρων. Έχει αναφερθεί ότι σχεδόν όλες οι θεραπευτικές ουσίες υψηλού μοριακού βάρους και η πλειονότητα των φαρμακευτικών ουσιών μικρού μοριακού βάρους δεν έχουν την εγγενή ικανότητα να το διασχίζουν. Οι ιδανικές ιδιότητες που είναι επιθυμητές σε μία φαρμακευτική ουσία ή σύνθεση για να διασχίσουν τον αιματεγκεφαλικό φραγμό είναι μικρά μοριακά βάρη (500 Da), διαλυτά λιπίδια, ηλεκτρικά ουδέτερα μόρια και ασθενείς βάσεις καθώς είναι ικανά να διαχέονται παθητικά σε όλη την έκτασή του (17). Άλλα εμπόδια στην παροχή ενός φαρμάκου στον εγκέφαλο είναι οι μεταφορείς εκροής που εμπλέκονται στη μεταφορά διαλυμένων ουσιών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου με κατανάλωση ATP. Οι μεταφορείς εκροής εξάγουν την φαρμακευτική ουσία που εισάγουμε εκτός του εγκεφάλου (18). Για να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια λοιπόν χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές όπως:

- **Στοχευμένη θεραπεία:** Επικεντρώνεται σε συγκεκριμένα κυτταρικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και τα χρησιμοποιεί ως στόχο, όπως π.χ. ο παράγοντας VEGF. Η στοχευμένη βιολογική θεραπεία που αναφέρεται ως «ανοσοθεραπεία», όπου το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση του καρκίνου είναι επίσης μια από τις νέες προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου.
- **Θεραπείες ηλεκτρικού πεδίου:** Αυτή η θεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση μιας συσκευής που τοποθετείται στο τριχωτό της κεφαλής. Σε αυτή την τεχνική το ηλεκτρικό ρεύμα ή τα ηλεκτρόδια είναι υπεύθυνα για τη

θανάτωση των καρκινικών κυττάρων χωρίς να βλάπτουν τα κανονικά κύτταρα.

- *Θεραπεία εμβολίων:* Σε αυτή τη θεραπεία, το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς παίζει σημαντικό ρόλο. Εδώ οι ουσίες (εμβόλια) που προέρχονται από τους εγκεφαλικούς ιστούς είναι υπεύθυνες για την αποκατάσταση του φυσικού αμυντικού συστήματος του σώματος για να θεραπεύσουν τον καρκίνο.
- *Γονιδιακή θεραπεία:* Η θεραπεία περιλαμβάνει την εισαγωγή γονιδίων που έχουν κατασκευαστεί σε καρκινικά κύτταρα για τη θανάτωσή τους. Διεγείρει επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος για την καταπολέμηση του καρκίνου. (19)

Γλοιοβλάστωμα

Το γλοιοβλάστωμα είναι ο πλέον κακοήθης πρωτοπαθής όγκος στον εγκέφαλο. Παρά την εντατική κλινική έρευνα και μερικές νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, ο μέσος χρόνος επιβίωσης είναι περίπου 15 μήνες και το ποσοστό επιβίωσης άνω των 5 ετών δεν υπερβαίνει το 2% (20). Αν και το γλοιοβλάστωμα εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον εγκέφαλο, μπορεί επίσης να εμφανιστεί στο στέλεχος του εγκεφάλου, στην παρεγκεφαλίδα και στο νωτιαίο μυελό. Εξήντα ένα τοις εκατό (61%) από όλα τα πρωτογενή γλοιώματα εμφανίζονται στους τέσσερις λοβούς του εγκεφάλου: μετωπιαίο (25%), κροταφικό (20%), βρεγματικό (13%) και ινιακό (3%). Αρχικά, το γλοιοβλάστωμα θεωρήθηκε ότι προέρχεται αποκλειστικά από κύτταρα γλοίας. ωστόσο, νεότερα στοιχεία αποδεικνύουν ότι μπορεί να προκύψει από πολλαπλούς τύπους κυττάρων με ιδιότητες παρόμοιες με τα νευρικά βλαστοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα βρίσκονται σε διάφορα στάδια της διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων σε γλοία, με τις φαινοτυπικές μεταβολές μεταξύ αυτών να οφείλονται σε μεγάλο βαθμό, σε μοριακές μεταβολές στα σηματοδοτικά μονοπάτια και όχι σε διαφορές στον τύπο κυτταρικής προέλευσης (21). Η ηλικία προσβολής από γλοιοβλάστωμα κυμαίνεται κατά μέσο όρο στα 64 έτη αλλά μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, συμπεριλαμβανομένης και της παιδικής ηλικίας και η συχνότητα εμφάνισης είναι ελαφρώς υψηλότερη στους άνδρες από τις γυναίκες. Τα γλοιοβλαστώματα μπορούν να ταξινομηθούν ως πρωτεύοντα, ή *de novo*, που προκύπτουν χωρίς γνωστό αίτιο ή δευτερεύοντα, όπου ένας όγκος χαμηλής κλίμακας μετασχηματίζεται με την πάροδο του χρόνου σε γλοιοβλάστωμα. Στην πλειοψηφία τους τα γλοιοβλαστώματα είναι πρωτογενή και άτομα που πάσχουν από αυτά είναι ηλικιωμένοι και έχουν χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με ασθενείς με δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα (22).

Κλινικά, οι ασθενείς με γλοιοβλάστωμα μπορεί να παρουσιάζουν συμπτώματα όπως, επίμονοι πονοκέφαλοι, διπλωπία ή θολή όραση, ναυτία, εμετός, απώλεια της όρεξης, αλλαγές στη διάθεση ή την προσωπικότητα, αλλαγές στην ικανότητα σκέψης και μάθησης, απώλεια μνήμης, επιληπτικές κρίσεις, μυϊκή αδυναμία, δυσκολία ομιλίας. Η διάγνωση γίνεται με μαγνητική τομογραφία (MRI) και με χρήση πρόσθετης τεχνολογίας όπως η δυναμική

MRI με αυξημένη αντίθεση, η φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (MRS) και τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET scan) (23).

Οι προσπάθειες για τον εντοπισμό συγκεκριμένων συσχετίσεων αυτής της ασθένειας με έκθεση σε περιβαλλοντικές και επαγγελματικές εστίες ήταν σε μεγάλο βαθμό μη επιβεβαιωμένη. Περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν κυρίως έκθεση σε θεραπευτική ιοντίζουσα ακτινοβολία και παράγοντες όπως χλωριούχο βινύλιο ή φυτοφάρμακα, κάπνισμα, διύλιση ή παραγωγή πετρελαίου και την εργασία ή απασχόληση στην κατασκευή συνθετικού καουτσούκ (24). Πρόσθετοι παράγοντες όπως η έκθεση σε κατοικίες με ηλεκτρομαγνητικά πεδία, η φορμαλδεΐδη, η διαγνωστική ακτινοβολία και τα κινητά τηλέφωνα δεν έχουν αποδειχθεί ότι οδηγούν σε γλοιοβλάστωμα. Ωστόσο, όσον αφορά την ακτινοβολία του κινητού τηλεφώνου, μια έρευνα που κυκλοφόρησε το 2007 έδειξε πως υπάρχει αυξημένη πιθανότητα για άτομα που χρησιμοποιούσαν τα κινητά τηλέφωνα για τουλάχιστον 10 χρόνια και ιδιαίτερα εκείνων που είχαν κυρίως καθημερινή έκθεση (25).

Επί του παρόντος, η μέγιστη χειρουργική εκτομή σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία και θεραπεία με τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα Τεμοζολαμίδη και Καρμουςτίνη είναι η θεραπεία εκλογής σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 70 ετών με νεοδιαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα. Οι τελευταίες έρευνες δίνουν μεγαλύτερο βάρος στην κατανόηση της αρχικής μοριακής παθογένειας αυτών των όγκων, συμπεριλαμβανομένων και μεταβολών στα σηματοδοτικά μονοπάτια, στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στη θεραπεία και στην αναζήτηση μεθόδων για να διαπερνούν τα φάρμακα πιο εύκολα δια του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Παρά τις προσπάθειες αυτές, παραμένει μια ανίατη νόσος και η πρόγνωση κυμαίνεται σε ένα εύρος επιβίωσης 12-15 μηνών (μέσος όρος 14,6 μηνών) και ένα μέσο ποσοστό επιβίωσης μόνο 3,3% στα 2 έτη και 1,2% στα 3 έτη (26,27).

Η τεμοζολαμίδη είναι ένας παράγοντας αλκυλίωσης ο οποίος λειτουργεί με μεταφορά αλκυλομάδων σε βάσεις γουανίνης που προκαλούν βλάβη στο DNA και κυτταρικό θάνατο. Η αποτυχία να αποκατασταθεί η αλκυλίωση έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση. Το MGMT είναι μια πρωτεΐνη αποκατάστασης του DNA που απομακρύνει τις αλκυλομάδες από τη θέση O6 της γουανίνης στο DNA, καθιστώντας τα κύτταρα ανθεκτικά στην τεμοζολαμίδη. Η μεθυλίωση του υποκινητή προκαλεί σίγαση του γονιδίου MGMT που παρεμβαίνει στην επιδιόρθωση του DNA και αυξάνει την ευαισθησία στην τεμοζολαμίδη ενώ η μη μεθυλίωση του, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργή έκφραση του γονιδίου που οδηγεί σε παραγωγή υψηλών επιπέδων της πρωτεΐνης επιδιόρθωσης και ως αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στην χημειοθεραπεία (50,51).

Ο υποκινητής του γονιδίου MGMT μεθυλιώνεται σε περίπου 50% των νεοδιαγνωσθέντων γλοιοβλαστωμάτων (52,53). Η μεθυλίωση του MGMT σχετίζεται με όγκους με μετάλλαξη στο γονίδιο IDH1, εξαιτίας των οποίων είναι πιο συνηθισμένη στο δευτερογενές σε σύγκριση με το πρωτογενές γλοιοβλάστωμα (75% έναντι 36% αντίστοιχα) (51, 54, 55). Η μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT έχει ιδιαίτερη σημασία στην πρόγνωση σε ασθενείς με

γλοιοβλάστωμα, με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης ανεξάρτητα από τις επιλογές της θεραπείας (56, 57). Επιπλέον, σχετίζεται με την καλύτερη ανταπόκριση στην τεμοζολαμίδη.

Τα κύτταρα του γλοιώματος που οι ιδιότητές τους ομοιάζουν με αυτές των βλαστοκυττάρων (glioma stem-like cells) συμβάλλουν στην αντοχή στην τυπική ακτινοθεραπεία μέσω της μη ενεργοποίησης του μηχανισμού για επιδιόρθωση του DNA μετά από βλάβη. Η αντοχή τους στη χημειοθεραπεία οφείλεται στην αναστολή του ενζύμου MGMT, την αναστολή της απόπτωσης και την αύξηση των γονιδίων που ρυθμίζουν την ανθεκτικότητα σε πολλαπλά φάρμακα (28). Έτσι, οι τελευταίες προσπάθειες κατευθύνονται προς την εξατομικευμένη θεραπεία μέσω του αποκλεισμού πρωτεϊνών σηματοδοτικών μονοπατιών στην δημιουργία του γλοιώματος.

Το γλοιοβλάστωμα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, συνήθως εμφανίζεται σε δύο διαφορετικές κλινικές μορφές, το πρωτογενές και δευτερογενές γλοιοβλάστωμα. Το πρωτογενές γλοιοβλάστωμα είναι η πιο συνηθισμένη μορφή (περίπου 95%) και τα συμπτώματά του εμφανίζονται εντός 3-6 μηνών από την εμφάνισή του, σε ηλικιωμένους ασθενείς. Το δευτερογενές γλοιοβλάστωμα προέρχεται από προηγούμενο αστροκύτωμα χαμηλής κλίμακας σε νεότερους ασθενείς και εμφανίζεται συνήθως μετά από 10-15 έτη. Παρόλο που οι πρωτογενείς και οι δευτερογενείς μορφές παρουσιάζουν μερικές μοριακές διαφορές, το τελικό αποτέλεσμα είναι λίγο πολύ το ίδιο, καθώς επηρεάζονται παρόμοιες οδοί και ανταποκρίνονται παρόμοια στην τρέχουσα χρησιμοποιούμενη θεραπεία.

Η παρατήρηση του ρόλου των μορίων που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια της παθογένεσης του γλοιοβλαστώματος, και συνήθως δρουν σαν δείκτες πρόγνωσης της ασθένειας είναι ιδιαίτερα σημαντική. Στο πρωτογενές γλοιοβλάστωμα ο παράγοντας EGFR (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας) είναι αυξημένος και παρουσιάζει μεταλλάξεις, κάτι που οδηγεί στην παραγωγή τροποποιημένου EGFR (γνωστού και ως EGFRvIII) ενώ το δευτερογενές γλοιοβλάστωμα παρουσιάζει αυξημένη σηματοδότηση μέσω του PDGF-A υποδοχέα. Και οι δύο τύποι μεταλλάξεων οδηγούν σε αυξημένη δραστηριότητα του υποδοχέα κινάσης-τυροσίνης (TKR) και κατά συνέπεια στην ενεργοποίηση των οδών RAS και PI3K.

Ο παράγοντας EGFR είναι μια διαμεμβρανική κινάση τυροσίνης που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7p12 και το ακολουθούμενο από αυτόν σηματοδοτικό μονοπάτι διαμορφώνει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών δραστηριοτήτων, όπως η ανάπτυξη, η μετανάστευση και η επιβίωση (35). Στο γλοιοβλάστωμα, η ενεργοποίηση του EGFR προάγει την κυτταρική διαίρεση, αυξάνει την επιθετικότητα του όγκου και την αντίστασή στην ακτινοβολία και τη χημειοθεραπεία (36,37,38). Η δραστηριότητα του EGFR ενισχύεται με αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης EGFR και αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού που οδηγεί στη σύνθεση αναστολέων του EGFR (39,40). Μετάλλαξη στο γονίδιο του EGFR, οδηγεί σε υπερβολική έκφραση ποικίλων μεταλλάξεων, συμπεριλαμβανομένης της πιο συνηθισμένης μετάλλαξης, EGFRvIII (παραλλαγή III), που αναφέρθηκε παραπάνω, καθώς επίσης και της άγριου τύπου EGFR (EGFRwt) (41,42,43). Η EGFRvIII

(παραλλαγή III) είναι η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη και έχει περιγραφεί σε ποσοστό περίπου 60-70% αυτών των όγκων (42,44). Η υπερέκφραση του EGFRvIII θεωρείται ισχυρός δείκτης κακής πρόγνωσης για αυξημένη ενεργοποίηση του παράγοντα EGFR (45).

Περίπου το 40% των γλοιοβλαστωμάτων εμφανίζουν αύξηση στον EGFR, και η αύξηση αυτή είναι πιο συχνή στο πρωτογενές σε σύγκριση με το δευτερογενές γλοιοβλάστωμα (46,47). Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση του EGFR μπορεί να οδηγήσει σε λιγότερο ευνοϊκή πρόγνωση. Ορισμένες μελέτες αποδεικνύουν ότι ο βαθμός ενεργοποίησης του EGFR σε μεγαλύτερα επίπεδα σχετίζεται με μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης, ενώ άλλες μελέτες συσχετίζουν την πρόγνωση με την ηλικία του ασθενούς. Η υπερέκφραση του EGFR συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση σε νεότερους ασθενείς και καλύτερη πρόγνωση σε ηλικιωμένους ασθενείς. Τέλος, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η παρατήρηση πως η μικρότερη αύξηση του παράγοντα EGFR σχετίζεται με χειρότερη απόκριση στην θεραπεία με τεμοζολαμίδη σε σύγκριση με το γλοιοβλάστωμα που εμφανίζει μεγάλη αύξηση του παράγοντα ή καθόλου (48,49).

Επιπροσθέτως το πρωτογενές γλοιοβλάστωμα παρουσιάζει αύξηση στην έκφραση του γονιδίου MDM2 (κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη-αναστολέα της p53), αύξηση των μεταλλάξεων στο μόριο PTEN και στις ομόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου CDKN2A, ενώ το δευτερογενές γλοιοβλάστωμα συνήθως παρουσιάζει μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη p53 και στο γονίδιο IDH1, ενίσχυση του παράγοντα MET και του PDGFRA. Τέλος, η μετατροπή του χαμηλού βαθμού γλοιώματος σε υψηλού βαθμού σχετίζεται με αδρανοποίηση του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (RB1) και αυξημένη δραστηριότητα του HDM2, ενός παραγωγού των ογκογονιδίων (29,30). Αυτές οι αλλαγές οδηγούν σε μη φυσιολογική ρύθμιση δύο πολύ σημαντικών κυτταρικών συστημάτων, των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν τους αυξητικούς παράγοντες και του κυτταρικού κύκλου, και παίζουν ρόλο στον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην αναστολή της απόπτωσης, στην ικανότητα επέκτασης του όγκου και στην αγγειογένεση (30). Η μετάλλαξη στο ένζυμο NADP⁺-IDH1 οδηγεί σε θετική πρόγνωση επιβίωσης και σε καλή πρόβλεψη απόκρισης στην τεμοζολαμίδη. Παρόλα αυτά, οι ασθενείς με άγριου τύπου IDH1 αναπλαστικό αστροκύτωμα παρουσιάζουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με γλοιοβλαστώματα στα οποία έχει μεταλλαχθεί ο IDH1 και η μετάλλαξη αυτή οδηγεί στην χειρότερη πρόγνωση για τα υπόλοιπα γλοιώματα (31). Οι μεταλλάξεις στον IDH1 βρέθηκαν σε ποσοστό λιγότερο από 5% στα πρωτογενή γλοιοβλάστωμα και σε περισσότερο από 80% στο δευτερογενές γλοιοβλάστωμα. Σε μεταγενέστερη μελέτη αποδεικνύεται ότι οι μεταλλάξεις του IDH1 στο γλοιοβλάστωμα οδηγούν σε αυξημένη πιθανότητα επιβίωσης (32).

Με βάση την αυξανόμενη κατανόηση της μοριακής ετερογένειας στο γλοιοβλάστωμα, το προφίλ του όγκου αυτού διαχωρίστηκε σε μοριακές υποκατηγορίες που ονομάζονται κλασσικοί, μεσεγχυματικοί, προνευρικοί και νευρικοί τύποι βασισμένοι σε γενετικές αλλοιώσεις και προφίλ έκφρασης, ειδικά των PDGFRA, EGFR, NF1 και IDH1. Το κλασικό γλοιοβλάστωμα ορίζεται από την ανώμαλη αύξηση του EGFR, προφίλ αστροκυτταρικής

έκφρασης, την απώλεια του χρωμοσώματος 10 ενώ οι μεταλλάξεις των IDH1, TP53 ή NF1 δεν είναι κοινές. Ο μεσεγχυματικός υποτύπος εμφανίζει μεταλλάξεις στα NF1 και PTEN, ένα προφίλ μεσεγχυματικής έκφρασης και μικρότερη αύξηση του EGFR σε σχέση με άλλους τύπους γλοιοβλαστώματος. Ο προνευρικός υποτύπος χαρακτηρίζεται από αύξηση του PDGFRA, μεταλλάξεις στα TP53 και IDH1, με προφίλ ολιγοδενδροκυτταρικής έκφρασης και παρουσίαση του όγκου σε μικρότερες ηλικίες. Τέλος, ο νευρικός υποτύπος, χαρακτηρίζεται από φυσιολογικό προφίλ, έκφραση των γονιδίων του εγκεφαλικού ιστού καθώς επίσης και φυσιολογικές τιμές στην αναλογία αστροκυττάρων / ολιγοδενδροκυττάρων (33).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου IDH1 είναι πολύ πιο συχνές στο αστροκύτωμα και στο ολιγοδενδρογλοίωμα σε σύγκριση με το γλοιοβλάστωμα και πάνω από το 90% των μεταλλάξεων περιλαμβάνουν και αυτή του IDH1.

Οι μεταλλάξεις IDH1 τείνουν να εμφανίζονται σε νεαρούς ενήλικες (ηλικία 20-60 ετών) και η συχνότητα των όγκων με μετάλλαξη του IDH1 αυξάνεται έντονα κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής και μειώνεται στη πέμπτη δεκαετία. Τα γλοιώματα υψηλού βαθμού με μετάλλαξη στο IDH1 προκύπτουν με μετασχηματισμό από κατώτερου βαθμού γλοίωμα, έχουν διακριτά ακτινογραφικά, ιστολογικά και μεταγραφικά χαρακτηριστικά και σχετίζονται με την λιγότερο επιθετική μορφή της ασθένειας (58). Είναι ένας επιλεκτικός μοριακός δείκτης του δευτερογενούς γλοιοβλαστώματος και τα διακρίνουν από τα πρωτεύοντα γλοιοβλαστώματα (51, 59, 60). Τα υψηλού βαθμού γλοιώματα με μετάλλαξη στο IDH1 έχουν πιο καλή πρόγνωση από αυτά που δεν έχουν μετάλλαξη στο IDH1 και η πρόγνωση από την πιο καλή στην πιο κακή έχει την παρακάτω σειρά: αστροκύτωμα με μετάλλαξη στο IDH1, γλοιοβλάστωμα με μετάλλαξη στο IDH1, αστροκύτωμα χωρίς μετάλλαξη στο IDH1 και γλοιοβλάστωμα χωρίς μετάλλαξη στο IDH1(59, 61).

Το πρωτογενές και το δευτερογενές γλοιοβλάστωμα μπορεί μην μπορούν να διακριθούν ιστολογικά, αλλά προφανώς διαφέρουν σε γενετικά προφίλ. Τα περισσότερα γλοιοβλαστώματα με μεταλλάξεις IDH1 έχουν το προνευρικό προφίλ γονιδιακής έκφρασης και έτσι η μετάλλαξη IDH1 είναι ένα πιο αξιόπιστο μοριακό διαγνωστικό κριτήριο του δευτερογενούς γλοιοβλαστώματος σε σύγκριση με τα κλινικά αποτελέσματα, καθώς τα δευτερογενή γλοιοβλαστώματα απαντώνται κατά κύριο λόγο σε αυτόν τον υποτύπο έκφρασης και είναι μια γενετικά πιο ομογενής ομάδα όσον αφορά την μετάλλαξη IDH1 σε σύγκριση με το πρωτογενές γλοιοβλάστωμα (34). Αυτή η ετερογένεια στο προφίλ του γλοιοβλαστώματος οδηγεί σε διαφορετικά αποτελέσματα στη θεραπεία των ασθενών, υποδεικνύοντας ότι η θεραπεία πρέπει να εξατομικεύεται για να στοχεύει τις μεταβολές κάθε ασθενούς σε μοριακό επίπεδο.

Η θεραπεία του νεοδιαγνωσθέντος γλοιοβλαστώματος απαιτεί μια πολυεπιστημονική προσέγγιση. Το τρέχον πρότυπο θεραπείας περιλαμβάνει την μέγιστη ασφαλή χειρουργική εκτομή, ακολουθούμενη από ταυτόχρονη ακτινοβολία και στη συνέχεια θεραπεία με τεμοζολομίδη, η οποία είναι ένας

χημειοθεραπευτικός παράγοντας αλκυλίωσης που χορηγείται από του στόματος. Η εκτεταμένη και πλήρης χειρουργική εκτομή στο γλοιοβλάστωμα είναι δύσκολη καθώς οι όγκοι αυτοί είναι ιδιαίτερα διεισδυτική και συχνά βρίσκονται σε ευαίσθητες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών που ελέγχουν την ομιλία, την κίνηση και τις αισθήσεις. Λόγω του υψηλού βαθμού διεισδυσης, η ριζική εκτομή του όγκου δεν είναι δυνατή και κύτταρα όγκου παραμένουν πάντα μέσα στον περιβάλλοντα χώρο του εγκεφάλου, οδηγώντας σε μεταγενέστερη εξέλιξη της νόσου ή υποτροπή (62). Πολλαπλές μελέτες έχουν αποδείξει τη σημασία της βαθύτερης χειρουργικής εκτομής, με τα καλύτερα αποτελέσματα να εμφανίζονται σε εκείνους τους ασθενείς στους οποίους ο όγκος είχε μεγαλύτερη έκταση, στους οποίους αυξάνεται η πιθανότητα επιβίωσης. Παράλληλα οι βελτιώσεις σε χειρουργικές και προεγχειρητικές τεχνικές χαρτογράφησης έχουν καταστήσει δυνατή την επίτευξη πλέον βαθύτερων εκτομών διατηρώντας την ομαλή λειτουργία του εγκεφάλου και την ποιότητα ζωής του ασθενούς (63).

Μετά από τη βέλτιστη χειρουργική εκτομή, ο ασθενής συνήθως περιμένει έως και τέσσερις εβδομάδες έως ότου το τραύμα της κρανιοτομής να θεραπευτεί πριν από την έναρξη της θεραπείας. Η αγωγή με ακτινοβολία ως μονοθεραπεία ήταν η πρότυπη θεραπεία μέχρι το 2005, στα πλαίσια μιας δοκιμής επιβεβαιώθηκε ότι η ακτινοθεραπεία σε συνδυασμό με τεμοζολαμίδη είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με την χορήγηση ακτινοβολίας ως μονοθεραπεία. Οι ασθενείς που έλαβαν τη συνδυασμένη θεραπεία είχαν μέσο χρόνο επιβίωσης 14,6 μήνες έναντι 12,1 μήνες στη μονοθεραπεία, ενώ και εμφανίζεται αυξημένη και η πιθανότητα μακροχρόνιας επιβίωσης με 27% έναντι 11% στα δύο χρόνια και 10% έναντι 2% στα πέντε έτη αντίστοιχα (64). Η ανάλυση αυτής της δοκιμής οδήγησε επίσης στην αναγνώριση ενός άλλου ισχυρού προγνωστικού για τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τον ασθενή: τη μεθυλίωση του γονιδίου MGMT. Το MGMT, όπως αναφέρθηκε παραπάνω κωδικοποιεί ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην επισκευή του DNA. Οι ασθενείς στους οποίους το γονίδιο MGMT έχει υποστεί μεθυλίωση, παρουσιάζουν ελλιπή επισκευή στις βλάβες του DNA, σε αντίθεση με όταν το ένζυμο MGMT είναι ενεργοποιημένο, το οποίο μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα της θεραπείας. Η συνδυασμένη θεραπεία ακτινοβολίας και χημειοθεραπείας ασκεί τη δράση προκαλώντας βλάβη στο DNA, που έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων του όγκου. Επομένως, η έκφραση του μεθυλιωμένου MGMT είναι ευεργετική για τους ασθενείς που υποβάλλονται στη συνδυασμένη θεραπεία και αποτελεί έναν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για καλύτερα αποτελέσματα στη συγκεκριμένη θεραπεία.

Η ακτινοθεραπεία με τη χρήση τρισδιάστατης συμβατικής δέσμης ή δέσμης με διαμόρφωση έντασης είναι η πρότυπη θεραπεία με χρήση ακτινοβολίας (65). Η συνολική δόση της ακτινοβολίας είναι 60 Gy, που χορηγείται σε κλάσματα 1.8-2 Gy που χορηγούνται πέντε ημέρες την εβδομάδα για έξι εβδομάδες. Αυτές οι δόσεις ακτινοβολίας επιτυγχάνουν ικανοποιητικά ποσοστά επιβίωσης, αλλά αύξηση της δόσης πέρα από αυτή οδηγεί σε αυξημένη τοξικότητα χωρίς πρόσθετα οφέλη επιβίωσης (66). Ταυτόχρονα με την ακτινοθεραπεία, η τεμοζολαμίδη χορηγείται συνήθως σε δόση 75 mg / m² καθημερινά για έξι εβδομάδες, ακολουθούμενη από περίοδο παύσης περίπου ενός μηνός μέχρι την ολοκλήρωση της ακτινοβολίας. Μετά την ολοκλήρωση

της ακτινοβολήσης, κατά την επανέναρξη της θεραπείας, οι δοθείσες τιμές κυμαίνονται στα 150 mg / m² ημερησίως για πέντε ημέρες για τον πρώτο μήνα. Αν είναι ανεκτή, η δόση αυξάνεται στα 200 mg / m² για πέντε συνεχείς ημέρες ανά μήνα για το υπόλοιπο της θεραπείας (67).

Οι διαφορές στην επίπτωση της ασθένειας ανά φύλο, ηλικία, και οι παράγοντες κινδύνου για το γλοιοβλάστωμα έχουν μελετηθεί αρκετά, όπως προκύπτει από τις παραπάνω αναφερθείσες μελέτες, πολλά ζητήματα όμως είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Ιδιαίτεροι πρόοδοι έχουν σημειωθεί στην ανάπτυξη προγνωστικών εργαλείων και στην αναγνώριση μοριακών δεικτών που βοηθούν στην πρόγνωση της ασθένειας και αντίδραση στη θεραπεία. Οι προσπάθειες για τον καθορισμό του ρόλου των IDH1 και MGMT στην πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης είναι ακόμη σε εξέλιξη, πέρα από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, όπως και ο ρόλος των κυττάρων του γλωιώματος που οι ιδιότητες τους ομοιάζουν με αυτές των βλαστοκυττάρων. Συνοπτικά, το γλοιοβλάστωμα αντιπροσωπεύει μια μοριακά ετερογενή νόσο με πολυάριθμες υποκατηγορίες και η εξατομίκευση της θεραπείας κρίνεται ιδιαίτερα κρίσιμη. Σε αυτό το πλαίσιο και στη βάση της αναζήτησης για νέους τρόπους θεραπείας κινήθηκε και η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή.

Ιντερφερόνες

Οι ιντερφερόνες (IFNs) είναι μια οικογένεια συγγενών και φυσικά απαντώμενων πρωτεϊνών σήματος που ομαδοποιούνται σε τρία κύρια είδη **άλφα (α)**, **βήτα (β)** και **γάμμα (γ)** σύμφωνα με την κυτταρική τους προέλευση και τους παράγοντες διέγερσης και είχαν αρχικά περιγραφεί ως αντι-ιικά. Κατά τη σύνδεση τους με συγκεκριμένους υποδοχείς οδηγούν στην ενεργοποίηση μιας οδού μεταγωγής σήματος που ενεργοποιεί ένα ευρύ φάσμα γονιδίων, τα οποία ρυθμίζουν όχι μόνο τις αντι-ιικές δράσεις τους αλλά και τις ανοσοκατασταλτικές και την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό. Η αναστολή της ανάπτυξης ενός ιού και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων από τις ιντερφερόνες συνδέεται με αρκετές φυσιολογικές αλλαγές, μερικές από τις οποίες εξαρτώνται από τη δραστηριότητα συγκεκριμένων πρωτεϊνών που επάγονται από τη δράση της ιντερφερόνης.

Οι ιντερφερόνες (IFNs) ανήκουν στις λεγόμενες φυσικές άμυνες του ανθρώπινου οργανισμού κατά της εισβολής εξωτερικών παραγόντων όπως οι ιοί, τα μικρόβια ή κύτταρα όγκου. Οι ιντερφερόνες σαν μόρια σχετίζονται άμεσα με την απάντηση σε κάποια ιογενή <<επίθεση>>, κάτι που σημαίνει ότι ορισμένα κύτταρα, μόλις μολυνθούν από έναν ιό, γίνονται ανθεκτικά στις επακόλουθες λοιμώξεις που προκαλούνται από τον ίδιο ή από παρόμοιους ιούς. Οι πρώτες παρατηρήσεις σχετικά με το θέμα αυτό έγιναν στα μέσα της δεκαετίας του 1930. Η εργασία του Hoskins σε κουνέλια έδειξε ότι αυτά τα ζώα, αφού μολύνθηκαν από τον ιό του απλού έρπητα, προστατεύονταν από μεταγενέστερες λοιμώξεις από τον ίδιο ιό (168).

Λίγα χρόνια αργότερα, οι Findlay και MacCallum έδειξαν το ίδιο φαινόμενο αλλά σε ευρύτερο φάσμα, καθώς αυτά τα ζώα ήταν επίσης ανθεκτικά στις λοιμώξεις που προκαλούνται από ιούς που δεν είχαν τα ίδια αντιγόνα (169). Ωστόσο, τέτοιες παρατηρήσεις δεν μπορούσαν να επιβεβαιωθούν εκείνη την εποχή, καθώς δεν είχαν ανακαλυφθεί μόρια ικανά να επάγουν αυτή τη δράση. Μόνο το 1957 οι Isaacs και Lindenmann παρατήρησαν ότι τα υπερκείμενα των κυττάρων που λαμβάνονται από κυτταρικές καλλιέργειες που έχουν μολυνθεί από έναν ιό παρήγαγαν μια πρωτεΐνη που μπορεί να κάνει άλλα κύτταρα ανθεκτικά σε άλλους ιούς (170). Συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν θραύσματα από έμβρυα κοτόπουλου, τα οποία μολύνθηκαν με αδρανοποιημένο με θερμότητα ιό της γρίπης και παρατήρησαν ότι αυτά τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να παράγουν μια πρωτεΐνη που ήταν σε θέση να προστατεύσει άλλα παρόμοια θραύσματα του ίδιου τύπου που έχουν μολυνθεί από έναν ζωντανό ιό. Ως εκ τούτου, αυτή ήταν η πρώτη παρατήρηση ότι κάτι που μεσολάβησε στο να συμβεί αυτή η προστασία από την ιογενή λοίμωξη όντως υπήρχε. Σήμερα η γνώση που έχουμε είναι πολύ βαθύτερη, καθώς γνωρίζουμε ότι οι ιντερφερόνες προστατεύουν τον οργανισμό και είναι μια φυσική ασπίδα ανάμεσα στον οργανισμό και μια λοίμωξη που μπορεί να προέρχεται από ιό, βακτήρια ή κύτταρα όγκου.

Σήμερα, οι ιντερφερόνες θεωρούνται κυτταροκίνες που ανήκουν στην ομάδα των ιντερλευκινών και είναι χωρίζονται σε τρεις τύπους: ιντερφερόνη-άλφα, βήτα και γ. Η ιντερφερόνη-άλφα και η ιντερφερόνη- βήτα ανήκουν στην ίδια υποκατηγορία τύπου I, ενώ η ιντερφερόνη-γάμμα ανήκει σε ξεχωριστή

υποκατηγορία ή την τύπου II. Οι πρωτεΐνες αυτές παράγονται από τα κύτταρα όταν αυτά διεγείρονται από εξωτερικούς παράγοντες προκαλώντας αντιικό αποτέλεσμα. Για τη διέγερσή τους απαιτείται η ενεργοποίηση και άλλων μορίων δημιουργώντας ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί σε αναστολή των ιών και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Οι IFNs ταξινομούνται σε τύπου I (IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ, IFN-ω, IFN-δ και IFNτ), τύπου II (IFN-γ) και τύπου III ιντερφερόνες (ιντερλευκίνη IL- 28 και IL-29). Η IFN-α υποδιαιρείται περαιτέρω σε διαφορετικούς υποτύπους (α1, α2, α7, α8, κ.λπ.) (68, 69, 70)124. Το 2012, ο Οργανισμός για το Ανθρώπινο Γονιδίωμα (HUGO) άλλαξε τα επίσημα σύμβολα για τα γονίδια από IL29, IL28A και IL28B σε IFN-λ1, IFN-λ2 και IFN-λ3, αντίστοιχα. Αυτές οι αλλαγές οφείλονται στο συμπέρασμα ότι αυτές οι κυτοκίνες δρουν κυρίως ως IFNs και όχι ως ιντερλευκίνες (71). Οι IFN-λ 1, 2, 3 ταξινομούνται ως IFN τύπου III, επειδή ασκούν τη δράση τους μέσω συμπλέγματος υποδοχέων που είναι διαφορετικό από τους υποδοχείς που χρησιμοποιούνται από IFN τύπου I και τύπου II (72). Επιπλέον, ένα νέο γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη έχει αναγνωριστεί, το IFN-λ1304, το οποίο σχετίζεται με IFNs (73).

Γενικά, η έκθεση των ανθρώπινων κυττάρων σε ιούς ή δίκλινα RNA διεγείρουν την παραγωγή των IFN-α, IFN-β και IFN-ο. Η αναλογία των IFN-α, IFN-β και IFN-ο που παράγεται από τα κύτταρα ποικίλλει ανάλογα με τον ιστό προέλευσης, το είδος του οργανισμού και τη φύση της ιικής μόλυνσης. Τα T λεμφοκύτταρα παράγουν την IFN-γ όταν διεγείρονται με ειδικά αντιγόνα ή όταν διεγείρονται με μιτογόνα, όπως η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη A, B ή τον συνδυασμό φυτοαιμαγλουτινίνης και εστέρες φορβόλης. Οι περισσότερες από τις IFN που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά παράγονται μέσω της γενετικής μηχανικής (76,77,78,79).

Έχουν περιγραφεί πολλές διαδικασίες για τον μερικό καθαρισμό των ανθρώπινων και ζωικών IFNs (79). Ο καθορισμός της ομοιογένειάς τους όμως έγινε το 1978 με εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης και κανονικής φάσης για τον καθαρισμό πρωτεϊνών, που οδήγησε στον πρώτο επιτυχή καθαρισμό αυτών των πρωτεϊνών ώστε να υπάρχουν επαρκείς ποσότητες για τις χημικές, βιολογικές, και ανοσολογικές μελέτες. Για τον καθαρισμό των IFNs που βρίσκονται σε ανθρώπινα λευκοκύτταρα και σε ινοβλάστες χρησιμοποιήθηκε μια άλλη τεχνική καθαρισμού, η χρωματογραφία συγγένειας αντισωμάτων. Κατά τον καθαρισμό της λευκοκυτταρικής IFN, έγινε εμφανές ότι υπήρχαν πολλαπλά είδη αυτής, τα οποία επιβεβαιώθηκαν μετά την κλωνοποίηση 12 μελών της οικογένειας IFN-α (79,80). Προσδιορίστηκαν δώδεκα είδη IFN-α (79,80, 81,82,83,84) και πολλές αλληλόμορφες παραλλαγές, οι οποίες εμφανίζονται ουσιαστικά σε 14 ανθρώπινα γονίδια που περιλαμβάνουν την οικογένεια της IFN-α. Μικρές παραλλαγές που αποτελούνται από μία ή δύο διαφορές αμινοξέων αντιπροσωπεύουν το πολλαπλά αλληλόμορφο (79,85,86). Από αυτά τα γονίδια παράγονται 13 πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο IFNA13 είναι ταυτόσημο με αυτό που παράγεται από την IFNA1 και έτσι, υπάρχουν 12 ξεχωριστές πρωτεΐνες IFN-α (και αλληλόμορφες μορφές) που παράγονται από αυτά τα 14 γονίδια. Επιπλέον, πολλές νέες IFNs έχουν ληφθεί από κύτταρα από ασθενείς με διάφορους τύπους ασθενειών όπου οι μεταλλάξεις οδήγησαν σε IFNs με διάφορες δράσεις.

Γονίδια και πρωτεΐνες των IFNs

Αν και όλες οι IFNs είναι σημαντικοί μεσολαβητές της προστασίας από ιούς, οι ρόλοι τους στην αντι-ιική άμυνα ποικίλλουν. Οι IFN τύπου I εμφανίζουν τέσσερις σημαντικές λειτουργίες. Πρώτον, διεγείρουν την παραγωγή ενδογενών κυτταρικών μορίων σε μολυσμένα και γειτονικά κύτταρα που περιορίζουν την εξάπλωση των μολυσματικών παραγόντων, ιδιαίτερα των ιικών παθογόνων. Δεύτερον, ρυθμίζουν τις εγγενείς ανοσολογικές αντιδράσεις με ισορροπημένο τρόπο και προάγουν την παρουσίαση του αντιγόνου στα φονικά κύτταρα ενώ περιορίζει τις προ-φλεγμονώδεις οδούς και την παραγωγή κυτταροκινών. Τρίτον, ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα, προάγοντας έτσι την ανάπτυξη ειδικού αντιγόνου T υψηλής συγγένειας και αποκρίσεις B κυττάρων και την ανοσολογική μνήμη (88). Τέταρτον, προκαλούν αναστολή πολλαπλασιασμού μέσω αυτοφαγίας, η οποία προκαλείται από IFNs τύπου I σε πολλαπλές καρκινικές κυτταρικές σειρές, παρουσιάζοντας έτσι την λειτουργία των IFNs τύπου I ως επαγωγέων της αυτοφαγίας. Αυτή η λειτουργία των IFN τύπου I μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση του ιού, την παρουσίαση του αντιγόνου και την αναστολή του πολλαπλασιασμού (90). Οι IFN τύπου I παρέχουν προστασία σε οξείες ιικές μολύνσεις αλλά μπορεί να έχουν προστατευτικό ή επιβλαβή ρόλο σε βακτηριακές λοιμώξεις και αυτοάνοσες ασθένειες, αντίστοιχα. Οι περισσότεροι τύποι κυττάρων παράγουν IFN-β, ενώ τα αιμοποιητικά κύτταρα, ιδιαίτερα τα πλασματοκυτοειδή δενδριτικά κύτταρα, είναι οι κύριοι παραγωγοί της IFN-α. Η παραγωγή των τύπου I IFNs προκαλείται μετά από την ανίχνευση μικροβιακών προϊόντων από τους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs) 4-6 και από κυτταροκίνες (88). Η IFN-γ εκκρίνεται κυρίως από T λεμφοκύτταρα, φονικά κύτταρα και κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνα (APCs) όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Η έκκριση της IFN-γ από φονικά κύτταρα και τα κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνα είναι πιθανό να είναι σημαντικά στην πρώιμη προστασία του ξενιστή από τη μόλυνση, ενώ τα T λεμφοκύτταρα είναι η κύριοι παραγωγείς IFN-γ στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Η παραγωγή της IFN-γ ελέγχεται από κυτταροκίνες που εκκρίνονται από κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο, ιδιαίτερα τις IL12 και IL18. Η αναγνώριση πολλών παθογόνων από τα μακροφάγα επάγει την έκκριση IL-12 και αρκετών χημειοκινών. Αυτές προσελκύουν φονικά κύτταρα στη θέση της φλεγμονής και η IL-12 επάγει τη σύνθεση της IFN-γ σε αυτά τα κύτταρα [91]. Η IFN-γ διαδραματίζει επίσης κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της ανοσολογικής απόκρισης σε κύτταρα όγκου, και μπορεί να ενισχύσει την επαγωγή της αντι-ιικής δραστηριότητας από την IFNα ή την IFNβ. Επομένως, οι τύπου I και τύπου II IFN συχνά εργάζονται μαζί για να ενεργοποιήσουν μια ποικιλία από έμφυτες και προσαρμοστικές ανοσολογικές αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη απόκρισης σε όγκους και την εξάλειψη των ιογενών λοιμώξεων [89,92].

Υποδοχείς IFNs

Οι IFNs ασκούν τη σηματοδότησή τους δεσμεύοντας συγκεκριμένους υποδοχείς που υπάρχουν στην κυτταρική επιφάνεια. Οι IFNs τύπου I συνδέονται με τον υποδοχέα IFN τύπου I, ενώ η IFN-γ δεσμεύεται στον

υποδοχέα IFN τύπου II (306). Επιπλέον, ο τύπος I του υποδοχέα των IFNs (IFNAR) εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους σωματικούς κύτταρα (307, 308) και αποτελείται από δύο υπομονάδες, την IFNAR1 και IFNAR2 (309, 310, 311). Ο τύπος II του υποδοχέα των IFNs αποτελείται επίσης από δύο υπομονάδες που ονομάζονται ως IFNGR1, που είναι και η κύρια δεσμευτική υπομονάδα και IFNGR2. Το IFNGR2 παίζει ελάχιστο ρόλο στη δέσμευση συνδέτη, αλλά ασκεί τη σηματοδότηση των IFNs (306, 312). Το IFNGR1 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στις μεμβράνες των T, των B και των μυελοειδών κυττάρων, και το IFNGR2 εκφράζεται ιδιαίτερα στις επιφάνειες του μυελοειδών κυττάρων (313). Οι IFNs είναι μέρος της μεγαλύτερης οικογένειας κυτταροκινών κατηγορίας II που επίσης περιλαμβάνουν 6 κυτταροκίνες που σχετίζονται με την IL-10: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, και IL-26 (96,97,98) καθώς επίσης και αρκετές κυτταροκίνες σχετιζόμενες με την ιική IL-10 (99). Όλες οι κυτταροκίνες κατηγορίας II δρουν μέσω υποδοχέων που μοιράζονται κοινά μοτίβα στην εξωκυττάρια περιοχή τους και υποδεικνύονται ως οικογένεια κατηγορίας II υποδοχέων κυτταροκίνης (CRF2). Κατά συνέπεια, οι IFN και οι σχετιζόμενες με την IL-10 κυτταροκίνες μερικές φορές αναφέρονται ως "κυτοκίνες CRF2" (95). Ωστόσο, αν και η τριτοταγής δομή της IFN- γ μοιάζει με αυτή της IL-10, η κύρια δομή της αποκλίνει σημαντικά από όλους τους προσδέτες των CRF2. Η πιο πρόσφατη προσθήκη στην οικογένεια CRF2, η IFN τύπου III ή IFN λ , παρουσιάζει δομικά χαρακτηριστικά με τις κυτταροκίνες που σχετίζονται με την IL-10, αλλά προκαλεί επίσης αντι-ιική δραστηριότητα σε μια ποικιλία στόχων, η οποία υποστηρίζει τη λειτουργική τους ταξινόμηση ως ένα νέο τύπο IFN (93,94). Γενετικά, τα γονίδια της IFN λ βρίσκονται ανάμεσα στις οικογένειες γονιδίων των IFN τύπου I και της IL-10. Η σύγκριση των αλληλουχιών των αμινοξέων δείχνει ότι τα μέλη IFN τύπου III παρουσιάζουν περίπου 5-18% ομοιότητα είτε με τα μέλη των IFN τύπου I είτε με τις κυτταροκίνες σχετιζόμενες με την IL-10. Οι πρωτεΐνες IFN λ δεσμεύονται και μεταδίδουν σήμα μέσω ενός συμπλέγματος υποδοχέα που αποτελείται από τη μοναδική αλυσίδα IFN1R1 (επίσης γνωστή ως IL-28RA) και την κοινή IL-10R2 αλυσίδα, η οποία είναι επίσης μέρος των συμπλόκων του υποδοχέα των IL-10, IL-22 και IL-26. Αντίθετα, όλα τα μέλη IFN τύπου I ασκούν τις βιολογικές τους δραστηριότητες μέσω ενός συμπλέγματος ετεροδιμερών ενός υποδοχέα που αποτελείται από το IFN α R1 (IFNAR1) και IFN α R2 (IFNAR2), και οι IFN τύπου II (IFN- γ) δεσμεύει τις αλυσίδες IFN γ R1 (IFNGR1) και IFN γ R2 (IFNGR2) για τη συναρμολόγηση του λειτουργικού συμπλόκου του υποδοχέα (95). Στο μονοπάτι σηματοδότησης των IFN τύπου I που περιγράφηκε πριν από 25 χρόνια, η δέσμευση τους στον υποδοχέα IFNAR αποδείχθηκε ότι ενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης JAK1 και την κινάση τυροσίνης 2 (TYK2), οι οποίες φωσφορυλιώνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT1 και STAT2. Οι φωσφορυλιωμένες STAT1 και STAT2 διμερίζονται και μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου συνδέονται με τον ρυθμιστικό παράγοντα 9 της IFN (IRF9) για να σχηματίσουν ένα τριμερές σύμπλοκο που ονομάζεται γονίδιο που διεγείρεται από τον παράγοντα 3 της IFN (ISGF3). Το ISGF3 συνδέεται με τις συγγενείς του ακολουθίες στο DNA, οι οποίες είναι γνωστές ως IFN-διεγερμένα στοιχεία απόκρισης (ISREs), ενεργοποιώντας άμεσα τη μεταγραφή των ISG, πολλές από τις οποίες οδηγούν σε αντι-ιική απόκριση. Οι κωδικοποιημένες με ISG πρωτεΐνες περιορίζουν την εξάπλωση των παθογόνων με διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της μεταγραφής, μετάφρασης και

πολλαπλασιασμού του ιού, της αποικοδόμησης των νουκλεϊκών οξέων του ιού και την αλλοίωση του μεταβολισμού των κυτταρικών λιπιδίων. Οι κυτταρικές αποκρίσεις στην πρόσδεση στον IFNAR είναι εξαρτώμενες από τον τύπο κυττάρου και από το περιβάλλον και ποικίλλουν κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής αντίδρασης (88). Ως εκ τούτου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αν και τα μέλη της IFNλ δεν το χρησιμοποιούν το σύμπλεγμα υποδοχέα IFNα για σηματοδότηση, η σηματοδότηση είτε μέσω του συμπλέγματος του υποδοχέα IFNλ είτε της IFNα οδηγούν στην ενεργοποίηση του ίδιου μονοπατιού μεταγωγής σήματος Jak-STAT (95).

Γενετικές ανωμαλίες που επηρεάζουν την απόκριση των IFNs

Η συνάφεια των γενετικών παραλλαγών στον προσδιορισμό του εύρους της ευαισθησίας και της κλινικής σοβαρότητας πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προκαλούνται από μολυσματικούς παράγοντες, στους ανθρώπους είναι γνωστή. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία του συστήματος των IFN σε μηχανισμούς άμυνας και, ευρύτερα, σε μία ανοσολογική αντίδραση, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι οι γενετικές παραλλαγές εντός των γονιδίων των IFN και σε εκείνες που αφορούν τη σηματοδότηση και την απάντηση στα σήματα, σχετίζονται με μια σειρά ασθενειών.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναφερθεί γενετικές ανωμαλίες σε ανθρώπους, που επηρεάζουν την παραγωγή μελών της οικογένειας των IFN. Πληροφορίες για το ρόλο των οδών σηματοδότησης των ανθρώπινων IFNα/β και IFN-λ στην αντιμετώπιση των ιών έχουν προκύψει από τη μελέτη του έρπητα της απλής εγκεφαλίτιδας (HSE), που είναι η πιο κοινή σποραδική ιογενής λοίμωξη εγκεφαλίτιδας στις δυτικές χώρες και προκαλείται από τον σχεδόν πανταχού παρών και σχεδόν αβλαβή ιό του απλού έρπητα-1 (HSV-1). Ο HSE έχει αποδειχθεί ότι προκύπτει από μια νέα ομάδα πρωτογενών ανοσοανεπάρκειων και οι δύο πρώτες γενετικές αιτιολογίες αυτής της ασθένειας αναγνωρίζονται ως ανεπάρκειες UNC-93B και Toll-like receptor 3 (TLR3). Αυτές οι ανακαλύψεις απέδειξαν τον κρίσιμο ρόλο του εξαρτώμενου από τον UNC-93B, τον TLR3-IFNα, την IFN-β, και την IFN-λ μονοπατιού στην ανοσία στον HSV-1 στα παιδιά. Αυξημένη ευαισθησία σε πολλαπλούς ιούς, συμπεριλαμβανομένου και του HSV-1, αναφέρθηκε επίσης και για γενετικές ανωμαλίες που επηρεάζουν τα μέλη της οικογένειας των IFN, όπως η έλλειψη του STAT1 ή του TYK2 (101).

Επιπρόσθετα, οι ανωμαλίες που αφορούν την IFN-γ προσδίδουν ευαισθησία σε μόλυνση από μυκοβακτηρίδια, που οδηγούν σε ένα σπάνιο συγγενικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση σοβαρής ασθένειας, που προκαλείται από ασθενώς μολυσματικά μυκοβακτηριακά είδη. Η παραγωγή της IFN-γ ελέγχεται από κυταροκίνες που εκκρίνονται από κύτταρα του μυελού συμπεριλαμβανομένων των IL-12 και IL23. Από το 1996 ανακαλύφθηκαν διαταραχές έξι γονιδίων του συμπλέγματος IL-12/23-IFN-γ, αποδεικνύοντας τον κρίσιμο ρόλο αυτού του κυκλώματος στην προστατευτική ανοσία στα μυκοβακτηρίδια (103,104). Επί πλέον, πάνω από 347 παραλλαγές του γονιδίου της IFN-γ και κάποιες σε μεμονωμένα νουκλεοτίδια στην περιοχή του υποκινητή της IFN-γ έχουν περιγραφεί σε πολλαπλές εθνοτικές ομάδες

πληθυσμών, που συχνά επηρεάζουν την έκφραση γονιδίου της IFN- γ . Πολλές από αυτές τις παραλλαγές φαίνεται να ρυθμίζουν την ευαισθησία όχι μόνο σε λοιμώδη νοσήματα, όπως η φυματίωση και η ιογενής ηπατίτιδα, αλλά και σε μη μολυσματικά όπως η απλαστική αναιμία και η ψωρίαση, όπως επίσης και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Εκτός από τις γενετικές παραλλαγές, περιγράφονται επίσης άλλες τροποποιήσεις, όπως αύξηση της έκφρασης IFN- γ σε Th1 λεμφοκύτταρα και μείωση της έκφρασης της IFN- γ σε Th2 λεμφοκύτταρα. Ακόμη, αυξημένη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της IFN- γ και συνεπώς μειωμένη έκφραση αυτού του γονιδίου σχετίζεται με το άσθμα. Αντίθετα, ελαττωμένη μεθυλίωση σχετίζεται με αυξημένη διαστολική αρτηριακή πίεση, και χρόνια περιοδοντίτιδα (102). Συνολικά, οι μεταλλάξεις στον άνθρωπο που επηρεάζουν το σύστημα των IFN αποδεικνύουν ότι τα μέλη της οικογένειας των IFN είναι ιδιαίτερα σημαντικά στην ανοσία και την άμυνα κατά των ιογενών και των βακτηριακών ασθενειών, όπως και των μη μολυσματικών, καθώς η IFN- γ φαίνεται να είναι απαραίτητη για την καταπολέμηση ασθενειών από μυκοβακτηρίδια, ενώ η IFN α/β και η IFN λ είναι απαραίτητες για την καταπολέμηση μολύνσεων από ιούς (100).

Συνεργικές και ανταγωνιστικές δράσεις μεταξύ των τύπων IFNs

Η ικανότητα των μελών της οικογένειας των IFN να προστατεύονται από διάφορες ιογενείς λοιμώξεις εξαρτάται από το σύνθετο μεταγραφικό πρόγραμμα που διαθέτουν. Κάθε τύπος IFN μπορεί να προκαλέσει την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων για τη μεσολάβηση διαφόρων βιολογικών απαντήσεων. Αν και οι IFNs είναι αποτελεσματικοί αναστολείς αρκετών ιών σχεδόν όλοι οι ιοί RNA και DNA έχουν εξελίξει μηχανισμούς που εμποδίζουν την ανταπόκριση του ξενιστή στις IFNs και είναι σε θέση να αντισταθούν, τουλάχιστον εν μέρει, στην αναστολή της μεσολαβούμενης από τις IFNs απάντησης. Ωστόσο, σε αρκετές μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι οι ιοί είναι συνήθως ανθεκτικοί στις επιδράσεις των IFNs τύπου I ή τύπου II ξεχωριστά, αλλά είναι ευαίσθητοι στο συνδυασμό των δύο. Η συνέργεια των δύο τύπων στην αντιμετώπιση των ιών παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1979 (105) και αφορά την αντιμετώπιση τόσο των ιών όσο και των καρκινικών κυττάρων (106). Συνέργεια όσον αφορά την αντι-ιική δραστηριότητα που προκύπτει από τη σύγχρονη παρουσία και των δύο τύπων IFNs έχει επίσης περιγραφεί σε ασθενείς με λοίμωξη από HIV και σε μερικές αυτοάνοσες ασθένειες (107). Έχει αποδειχθεί ότι οι IFN- α/β και η IFN- γ όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό αναστέλλουν την αντιγραφή του HSV-1 τόσο σε vitro και in vivo (108,109). Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές αναφορές ότι ο συνδυασμός των μελών της οικογένειας των IFNs εμφανίζουν αντι-ιική δράση έναντι και άλλων ιών, όπως ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) (110), ο ιός Lassa (LASV) (111), ο ιός Varicella-Zoster (VZV) (112), ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (hCMV) (109) και ο κορωνοϊός που οδηγεί σε οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (SARS-CoV) (113,114).

Σε μια άλλη μελέτη, ο Peng και οι συνεργάτες του προσπάθησαν να κατανοήσουν καλύτερα τους μηχανισμούς που αποτελούν τη βάση της συνέργειας μεταξύ IFNs τύπου I και τύπου II στην αναστολή της αντιγραφής του HSV-1. Έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των IFN- β και IFN- γ προέρχεται είτε μέσω μιας ανεξάρτητης οδού ενεργοποιώντας ξεχωριστές κατηγορίες γονιδίων, είτε μέσω ενός μηχανισμού συνεργασίας

ενεργοποιώντας ένα κοινό υποσύνολο γονιδίων σε ένα επίπεδο πολύ μεγαλύτερο από αυτό που ενεργοποιεί ενός τύπου IFN από μόνη της. Τα γονίδια που ενεργοποιήθηκαν από την συνεργική δράση της IFN-β με την IFN-γ περιλάμβαναν γονίδια που εμπλέκονται στην απόπτωση, αποικοδόμηση του RNA και την φλεγμονώδη αντίδραση. Ως αποτέλεσμα, ο συνδυασμός της IFN-β και της IFN-γ προκάλεσε μεγαλύτερη απόπτωση και ανέστειλε την έκφραση των γονιδίων του HSV-1 και τον αναδιπλασιασμό του DNA σημαντικά περισσότερο σε σχέση με την θεραπεία με την μία από τις δύο IFNs (115). Ενώ η συνεργία μεταξύ IFNs τύπου I και τύπου II είναι καλή, ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση των IFNs τύπου I και των IFNs τύπου III, καθώς οι διαθέσιμες μελέτες αναφέρουν την συνέργεια σε ορισμένους ιούς, όπως ο HCV (116,117) αλλά όχι για άλλους ιούς, όπως ο EMCV και ο HSV-2 (118), ενώ παρατηρήθηκε ανταγωνισμός σε σχέση με τις ενδοκυτταρικές οδούς που αφορούν την αντι-ιική ικανότητά τους (119).

Άλλες δράσεις των IFNs

Μελέτες από τα τέλη της δεκαετίας του 1960 αποκάλυψαν ότι ο αντι-ιικός παράγοντας IFN ήταν επίσης σε θέση να καταστείλει την ανάπτυξη όγκων (120). Από τότε, οι IFNs έδειξαν ότι μετά την ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων (121), προκαλούν ένα ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η διαφοροποίηση, η έκφραση σημαντικών μορίων στη μεμβράνη του πλάσματος και η απελευθέρωση μεσολαβητών, που μπορεί να είναι σχετικές με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία, την αιμοποίηση, την αγγειογένεση και με σημαντικά αποτελέσματα στην θεραπεία του καρκίνου (122,123). Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός πως μπορεί να εμφανιστούν διαφορετικά αποτελέσματα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* από την ίδια IFN, ανάλογα με το χρόνο που χρησιμοποιείται και τη δοσολογία αυτής, εξαιτίας της πολυπλοκότητας των γονιδίων που επάγονται από τις IFNs, κάτι που παρατηρήθηκε από μελέτες που έγιναν την δεκαετία του 1970 (124,125) Έτσι ανάλογα με το πλαίσιο της ασθένειας οι IFNs μπορεί να έχουν είτε θετικά είτε αρνητικά αποτελέσματα (126).

✓ **Αναστολή πολλαπλασιασμού**

Οι IFNs παρουσιάζουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των μολυσμένων από κάποιον ιό κυττάρων, να περιορίζουν την μεσολαβούμενη από τα κύτταρα ανοσία και να αναστέλλουν την αγγειογένεση, με επακόλουθη μείωση της ανάπτυξης του όγκου, κάτι το οποίο μπορεί να εμφανιστεί τόσο σε καρκινικό όγκο όσο και σε φυσιολογικά κύτταρα, *in vitro* και *in vivo*. Οι IFNs τύπου II είναι πιο αποτελεσματικές από τις IFNs τύπου I (με την IFN-β να πιο ισχυρή από την IFN-α), ενώ οι δράσεις των IFNs τύπου III περιορίζονται από την περιορισμένη παρουσία του ειδικού υποδοχέα στη μεμβράνη των κυττάρων στόχων (127,128,129). Η IFN-β έχει μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης στον υποδοχέα από ότι η IFN-α, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τις πιο ισχυρές αλλά και διαφορετικές δράσεις αναστολής του πολλαπλασιασμού και πιθανόν και τις ανοσορυθμιστικές δράσεις της IFN-β (130). Η ανασταλτική δράση των IFNs μεσολαβείται μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και της επαγωγής της δράσης κασπασών και της

απόπτωσης, η οποία εμφανίζεται σε όλα τα σωματικά κύτταρα που ελέγχθηκαν, με διαφορές ανάλογα με τον τύπο και την δοσολογία των IFNs (127,131). Οι IFNs τύπου I εμφανίζουν κάποια δράση στο μελάνωμα και γι' αυτό μελετήθηκαν εκτενώς σε κερατινοκύτταρα και σε μελανοκύτταρα (128). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αναφερθεί πως η έκφραση της IFN- β in vitro σε αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ποντικού στα οποία έχει διακοπεί η ανάπτυξη αποδεικνύει ότι η παραγωγή της από τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα συνδέεται με την αναστολή του πολλαπλασιασμού. Σε άλλες μελέτες αποδεικνύεται η επαγωγή αυτοφαγίας από IFNs τύπου I και τύπου II σε καρκινικά κύτταρα, μέσω του μονοπατιού p38 MAPK και της φωσφορυλίωσης της ATF6 (132).

✓ Κυτταρική διαφοροποίηση

Οι IFNs τύπου I και τύπου II φαίνεται να επηρεάζουν τις διεργασίες της ερυθροποίησης (124,125,133) ενώ η χρόνια παραγωγή IFN- γ μπορεί να προκαλέσει αναιμία και αναστολή του μυελού των οστών, επομένως μπορεί να εμπλέκεται με αιμοποιητικές κακοήθειες (133). Μια άλλη διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από τις IFNs είναι η διαδικασία είναι της παραγωγής λιπώδους ιστού, η οποία αναστέλλεται από τις IFNs τύπου I και II (134,135) Στα φυσιολογικά κύτταρα του θυρεοειδούς τόσο η IFN- α όσο και η IFN- γ ρυθμίζουν την έκφραση των ιντεγκρινών στη σηματοδότηση που προκαλείται από την κυτταρική προσκόλληση στη φιμπρονεκτίνη (136). Επιπρόσθετα, η IFN- γ επάγει τις χημειοκίνες δέσμησης CXCR3, οι οποίες με τη σειρά τους προσλαμβάνουν Th1 λεμφοκύτταρα, με σημαντικό ρόλο στην έναρξη της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας.

✓ Διαμόρφωση της ανοσολογικής απάντησης

Οι IFNs είναι ισχυροί διαμορφωτές της ανοσολογικής απάντησης, ιδιαίτερα η IFN- γ , ενώ μεταξύ των υποτύπων της IFN- α , η κάθε μία έχει το δικό της πρότυπο (137). Γενικά, οι IFNs διεγείρουν τα ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα βραχυπρόθεσμα, ενώ, με την αναστολή της ανάπτυξης, μακροπρόθεσμα ή με υψηλότερες συγκεντρώσεις IFNs, μπορεί να ελαττώσουν την αντικατάσταση των κυττάρων. Άλλες επιδράσεις περιλαμβάνουν την ενίσχυση μορίων όπως αντιγόνα του MHC (μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας), διαφόρων υποδοχέων, και ρύθμιση της ενεργοποίησης και διαφοροποίησης των κυττάρων, όπως τα μονοκύτταρα / μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα (DCs), τα B και T α κύτταρα και τα φονικά κύτταρα. Οι IFNs τύπου I αυξάνουν τόσο τις έμφυτες όσο και τις προσαρμοστικές ανοσολογικές αντιδράσεις, με την επαγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών, την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των CD4 + T κυττάρων και των CTLs, την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των κυττάρων B, την παραγωγή αντισωμάτων και τη αντιστάθμιση των αντισωμάτων ανοσοσφαιρίνης (Ig) (122,127,137). Οι τύπου III IFNs δεν έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την παραγωγή αντισωμάτων, ρυθμίζουν όμως την ισορροπία των κυττάρων Th1 / Th2 μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού από τις IFNs τύπου I (127). Η IFN- γ , αλλά όχι η IFN- α ή η IFN- β προκαλεί την καταστολή του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, μια δράση που τελείται από τα ουδετερόφιλα, μέσω της έκφρασης της πρωτεΐνης PD-L1, ενός σημαντικού ρυθμιστή του

ανοσοποιητικού (138). Οι IFNs τύπου II είναι απαραίτητες επίσης σε μόλυνση από ενδοκυτταρικά μη ιικά παράσιτα όπως τα *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* και άλλα και προκαλεί θάνατο των ενδοκυτταρικών παρασίτων αυτόνομα. Παρομοίως οι τύπου I IFNs, ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια αυτών των λοιμώξεων, δεν ασκούν όμως ουσιαστικό έλεγχο στα παράσιτα, αλλά η ενεργοποίησή τους του ενεργοποιεί τα φονικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια προκαλούν τη θανάτωση των παρασίτων με παραγωγή τύπου II IFNs (139).

Προβλήματα που προκαλούνται από IFNs

Ελαττωματικά στάδια στην παραγωγή ή στη σηματοδότηση όλων των τύπων των IFNs σχετίζονται με μια ποικιλία ασθενειών. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών που αφορούν την IFN-α σχετίζεται με αρκετές αυτοάνοσες ασθένειες, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η νόσος του Addison, και άλλες (140). Αποβολές στους ανθρώπους και στα ζώα έχουν συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα IFN-γ, η απουσία, από την άλλη πλευρά, συμμετέχει στη διατήρηση του στρώματος και της αγγειακής αναδιαμόρφωσης της μήτρας (141). Ανωμαλίες σε μοτίβα γονιδίων που διεγείρονται από τις IFNs προκαλώντας προβλήματα στη φυσιολογική ανοσολογική απάντηση του οργανισμού στην πρώιμη παιδική ηλικία, φαίνεται να συμβάλλουν στην ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 1, ενώ αρκετές περιπτώσεις διαβήτη τύπου 1 σχετίζονται επίσης με θεραπείες με IFNs που έχουν επεξεργαστεί με πολυαιθυλενογλυκόλη και με χρήση ριμπαβιρίνης για την χρόνια ηπατίτιδα C (142). Επιπρόσθετα, σε άτομα σε θεραπεία με κάποια IFN μπορεί να παρατηρηθούν καρδιαγγειακές επιπλοκές (αρρυθμία, μυοκαρδίτιδα, αναστρέψιμη υπέρταση, ισχαιμική καρδιακή νόσο, περικαρδίτιδα και καρδιομυοπάθεια), οι οποίες όμως είναι γενικά αναστρέψιμες (140). Η σαρκοείδωση, η οποία είναι μια συστηματική χρόνια κοκκιωματώδης ασθένεια άγνωστης αιτίας, είναι μια σπάνια ανεπιθύμητη ενέργεια μετά από χρήση των τύπου I IFN-α και IFN-β, που οδηγεί σε μια μεσολαβούμενη από τα κύτταρα ισχυρή ανοσοαπόκριση σε κάποιο άγνωστο επίμονο αντιγόνο, με υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντων IFN-γ (143). Διαταραχές του θυρεοειδούς σε ασθενείς που έλαβαν IFNs είχαν παρατηρηθεί από το 1985 (144) και εξακολουθούν να είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για τους ασθενείς που λαμβάνουν IFN-α ή IFN-β, καθώς σε *in vitro* μελέτες και σε μελέτες σε ζώα παρατηρήθηκε ότι η φλεγμονή του θυρεοειδούς και η αυτοανοσία έχουν άμεσες επιδράσεις (αυξημένη έκφραση της διαφοροποίηση του θυρεοειδούς) ενώ οδηγούν και στην ενεργοποίηση βλαβερών ανοσοποιητικών αποκρίσεων (145). Η χρήση IFN-γ για θεραπεία ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας οδηγεί σε σημαντικές παροξύνσεις, ενώ η IFN-β χορηγείται σήμερα ως θεραπεία και φαίνεται να είναι πιο ισχυρή από την IFN-α (146,147). Κατάθλιψη και άλλες γνωσιακές και ψυχιατρικές διαταραχές αναφέρονται περίπου στο 50% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με IFN-α για χρόνια ηπατίτιδα C και B, σύνδρομο Behcet, μελάνωμα και λέμφωμα. Η IFN-α δημιουργεί ανωμαλίες στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων και διαταραχές στο μεταβολισμό του εγκεφάλου και παρεμβαίνει στην

νευροτροφική σηματοδότηση, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη νευριτών, την πλαστικότητα των συνάψεων, την ενδογενή νευρογένεση και την νευρωνική επιβίωση (148). Συγκρίνοντας τους ασθενείς που έλαβαν επεξεργασμένη με πολυαιθυλενογλυκόλη IFN-α συν ριμπαβιρίνη με αυτούς που έλαβαν IFN-β με ριμπαβιρίνη, διαπιστώθηκε ότι τα συμπτώματα της κατάθλιψης ήταν πιο διαδεδομένα με τη χρήση της IFN-α σε σχέση με τη θεραπεία με την IFN-β (149). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αναφερθεί ότι σε ποντικούς, η IFN-α φαίνεται είτε να προάγει αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα τα οποία σχετίζονται με την αύξηση της σεροτονίνης στον εγκέφαλο, είτε να παρουσιάζει έναν φαινότυπο παρόμοιο με την κατάθλιψη, μέσω της καταστολής της νευρογένεσης του ιππόκαμπου (150), ενώ η έλλειψη IFN-γ οδηγεί σε συμπεριφορά άγχους και κατάθλιψη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η IFN-γ εμπλέκεται στην νευρογένεση στον ιππόκαμπο και στην πλαστικότητα του ΚΝΣ (151).

Μονοπάτια μεσολαβούμενα από IFNs

✓ Μονοπάτι Jak/STAT

Η δέσμευση των IFNs στους υποδοχείς της επάγει την ενεργοποίηση των συναφών κινάσεων τυροσίνης (Jak κινάσες). Μόνο τρεις (Jak1, Jak2 και Tyk-2 κινάσες) των τεσσάρων μελών του Jak βρέθηκαν να σχετίζονται με τη δραστηριότητα των IFNs (152). Ο υποδοχέας IFNAR1 σχετίζεται με την Tyk2 κινάση τυροσίνης, ενώ ο IFNAR2 με την κινάση Jak1, ενώ ο IFNGR1 και ο IFNGR2 συνδέονται με τις Jak1 και Jak2 κινάσες, αντίστοιχα (154). Οι τύπου I IFNs ενεργοποιούν τις Stat1, Stat2, Stat3 και Stat5, ενώ η IFN-γ κυρίως τον τον μεταγραφικό ενεργοποιητή Stat1 (153,155). Οι φωσφορυλιωμένες Stat1 και Stat2 σχηματίζουν ένα διμερές που σχετίζεται με την πρωτεΐνη p48 και σχηματίζουν το σύμπλοκο ISGF3, το οποίο μετατοπίζεται στον πυρήνα. Στη συνέχεια, αυτό το σύμπλοκο συνδέεται με τα στοιχεία απόκρισης που διεγείρονται από τις ιντερφερόνες (ISREs) και επάγει τη γονιδιακή μεταγραφή (153). Εκτός από το σύμπλοκο ISGF3, σχηματίζονται και άλλα συμπλέγματα επαγόμενα από τύπου I IFNs σύμπλοκα, που περιλαμβάνουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή των Stat1, Stat3, Stat5a και Stat5b (153,154,155). Ακόμη, η ενεργοποίηση των υποομάδων Jak1 και Jak2 κινάσης που συνδέονται με υπομονάδες των υποδοχέων των IFNs τύπου II προκαλεί τη φωσφορυλίωση του Stat1, το οποίο μετά μετακινείται στον πυρήνα και προκαλεί την μεταγραφή γονιδίων. Αυτή η δέσμευση ρυθμίζει επίσης τα αποτελέσματα που προκαλούνται από την IFN-γ, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης (156). Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση του μονοπατιού Jak-Stat από τις IFNs μπορεί να προκαλέσει την έκφραση γονιδίων που οδηγούν σε απόπτωση και προκαλούν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

✓ Μονοπάτι Src κινασών

Εκτός από τις Jak kinases, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι Src κινάσες συμμετέχουν στην επαγωγή αποκρίσεων από IFNs. Η οικογένεια Src κινασών (Hck, Lyn, Fyn, Lck, Src, κλπ) αποτελεί τη μεγαλύτερη οικογένεια κυτταροπλασματικών κινασών τυροσίνης που εκφράζεται στα κύτταρα. Η IFN-α και η IFN-γ ενεργοποιούν την πρωτεΐνη fyn (p59), η οποία σχετίζεται την με κινάση Tyk2 και την κινάση Jak2, αντίστοιχα σε κάθε τύπο, ενώ οι IFNs τύπου I προκαλούν επίσης τη σύνδεση της Lyn με την οικογένεια κινασών τυροσίνης Tyk2 (157,158). Οι Src κινάσες, όσον αφορά τη σηματοδότηση των IFNs πιθανώς συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των Stat πρωτεϊνών και άλλων σηματοδοτικών μορίων, τα οποία βρίσκονται στη συνέχεια του μονοπατιού που αφορά τις Jak κινάσες (159). Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση του μονοπατιού των κινάσεων Src από τις IFNs σχετίζεται με την επαγωγή θανάτου στα κύτταρα του όγκου και τη ρύθμιση της μετάστασης.

✓ Μονοπάτι του IRS (Insulin Receptor Substrate)

Το IRS είναι συνδέσεις πρωτεϊνών που συνδέονται με την περιοχή SH2 και σχετίζονται με πρωτεΐνες, όπως η PI3-K. Δύο μέλη της οικογένειας των IRS, τα IRS-1 και IRS-2 ενεργοποιούνται μετά από επεξεργασία των κυττάρων με IFN-άλφα, IFN-β ή IFN-ω και ενεργοποιούν πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι IFNs τύπου I ενεργοποιούν την PI3-K μέσω ενός εξαρτώμενου από το IRS μηχανισμού αλλά ανεξάρτητου από το Stat. Το ενεργοποιημένο από IFNs τύπου I IRS1 έχει μία θέση σύνδεσης για δέσμευση των περιοχών SH2 της ρυθμιστικής υπομονάδας p85 της PI3-K (160). Επιπλέον, το ενεργοποιημένο από τις τύπου I IFNs IRS2 επάγει της σηματοδότηση του μονοπατιού της PI3-K, το οποίο στη συνέχεια επάγει τη δράση μιας κινάσης σερίνης (161). Έτσι, οι πρωτεΐνες IRS έχουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση των IFNs τύπου I, καθώς και οι δύο ενεργοποιούν το μονοπάτι της PI3-K.

✓ Μονοπάτι της MARK (mitogen-activated protein kinase)

Αν και οι περισσότερες δράσεις των IFNs σχετίζονται με την ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης Jak-Stat, σημαντικό ρόλο φαίνεται επίσης να διαδραματίζουν οι MARK, που σχετίζονται με την ενεργοποίηση γονιδίων που ρυθμίζονται από τις IFNs, με την p38 να έχει τον σημαντικότερο ρόλο στην επαγωγή αποκρίσεων από IFNs. Οι τύπου I IFNs επάγουν την φωσφορυλίωση και την επακόλουθη ενεργοποίηση της p38 MAPK και αυτή με τη σειρά της επάγει τις μεσολαβούμενες από τις IFNs αποκρίσεις (162). Επιπλέον, η p38 εμπλέκεται στη μεσολαβούμενη από IFNs τύπου I μεταγραφική ρύθμιση, χωρίς καμία επίδραση στην ενεργοποίηση του Jak-Stat μονοπατιού (163)

Αντικαρκινικές δράσεις των IFNs

Οι IFNs τύπου I προκαλούν ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η διαφοροποίηση, η διακοπή της ανάπτυξης και η απόπτωση. Οι αντικαρκινικές δράσεις των IFNs τύπου I είναι είτε άμεση, προκαλώντας την αναστολή της ανάπτυξης και την απόπτωση κυττάρων όγκου είτε έμμεση, μέσω ενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης (164). Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I (MHC I) αυξάνεται από τις IFNs τύπου I με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αναγνώρισης αντιγόνου, ενώ προκαλούν την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως το ICAM-1 και L-σελεκτίνη (165). Επιπρόσθετα, οι IFNs τύπου I διεγείρουν την έκκριση της IL-15, η οποία οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των φονικών κυττάρων και των CD8 T κυττάρων (166). Οι αντικαρκινικές δράσεις των IFNs τύπου I επάγονται με τη μεταγραφική ρύθμιση προαποπτωτικών γονιδίων, όπως είναι τα γονίδια ISGs που ενεργοποιούνται από το μόριο TRAIL (167).

ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΨΥΧΩΣΕΩΝ – ΑΝΤΙΨΥΧΩΣΙΚΑ

Η σχιζοφρένεια είναι ένας ιδιαίτερος τύπος ψύχωσης, δηλαδή μια ψυχική διαταραχή που προκαλείται από κάποια εγγενή εγκεφαλική δυσλειτουργία. Χαρακτηρίζεται από παραισθήσεις, ψευδαισθήσεις (συχνά με τη μορφή φωνών) και διαταραχές της σκέψης ή της ομιλίας. Αυτή η ψυχική διαταραχή είναι ένα συνηθισμένο πρόβλημα υγείας που εμφανίζεται στον πληθυσμό σε ποσοστό περίπου 1%. Συχνά, η ασθένεια αυτή προσβάλλει για πρώτη φορά τους ανθρώπους κατά την εφηβική ηλικία και αποτελεί μια χρόνια διαταραχή που οδηγεί σε αναπηρία. Η σχιζοφρένεια έχει ισχυρή γενετική και περιβαλλοντική συνιστώσα και πιθανώς αντικατοπτρίζει κάποια βασική βιοχημική ανωμαλία, ίσως μια υπερλειτουργία των ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσομεταιχμιακού συστήματος.

Τα νευροληπτικά φάρμακα (ονομάζονται και αντισχιζοφρενικά, αντιψυχωσικά ή μείζονα ηρεμιστικά) χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας, αλλά είναι αποτελεσματικά και σε άλλες ψυχωσικές καταστάσεις, όπως οι καταστάσεις μανίας και παραληρήματος. Όλα τα έως σήμερα διαθέσιμα αντιψυχωσικά φάρμακα που μειώνουν τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας ελαττώνουν την ντοπαμινεργική ή/και τη σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση. Τα παραδοσιακά ή <<τυπικά>> νευροληπτικά φάρμακα δρουν ως συναγωνιστικοί αναστολείς σε διάφορους υποδοχείς, αλλά η αντιψυχωσική τους δράση αντιστοιχεί σε συναγωνιστικό αποκλεισμό των ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Τα φάρμακα αυτά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ισχύ, αφού για παράδειγμα η χλωροπρομαζίνη είναι φάρμακο χαμηλής ισχύος ενώ η φλουφαιναζίνη υψηλής. Ωστόσο, κανένα δε θεωρείται κλινικά πιο αποτελεσματικό από τα υπόλοιπα. Από την άλλη, τα νεότερα αντιψυχωσικά φάρμακα αποκαλούνται <<άτυπα>>, επειδή έχουν λιγότερες εξωπυραμιδικές ανεπιθύμητες ενέργειες από τα παραδοσιακά μέλη. Αυτά τα φάρμακα φαίνεται πως οφείλουν την ιδιαίτερη δράση τους στον αποκλεισμό των σεροτονινεργικών (και πιθανώς άλλων) υποδοχέων. Η σύγχρονη αντιψυχωσική θεραπεία χρησιμοποιεί τα άτυπα νευροληπτικά φάρμακα προς ελαχιστοποίηση του κινδύνου εμφάνισης των αναπηρικών κινητικών διαταραχών που σχετίζονται με τα <<τυπικά>> φάρμακα, τα οποία δρουν κυρίως μέσω των D₂ ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Όλα τα άτυπα φάρμακα έχουν αποτελεσματικότητα ισοδύναμη ή και υψηλότερη από τα τυπικά νευροληπτικά. Ωστόσο, δεν έχουν καθοριστεί θεραπευτικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα επιμέρους άτυπα νευροληπτικά φάρμακα και συχνά χρησιμοποιείται η ανταπόκριση του ασθενούς ως οδηγός της επιλογής του φαρμάκου. Τα νευροληπτικά φάρμακα δεν δρουν θεραπευτικά και δεν εξαλείφουν τις βασικές διαταραχές της σκέψης, αλλά συχνά μειώνουν την ένταση των ψευδαισθήσεων και των παραληρημάτων και επιτρέπουν στον ψυχωσικό ασθενή να λειτουργήσει με ικανοποιητικό τρόπο μέσα σε ένα περιβάλλον που τον στηρίζει (16).

Η αντιμετώπιση των ψυχικών διαταραχών συχνά απαιτεί την μακροχρόνια χορήγηση μονοθεραπείας ή συνδυασμού ψυχοτρόπων φαρμάκων, τα οποία παρουσιάζουν ποικιλία στη χημική σύσταση, στην οδό μεταβολισμού, στα μεταβολικά παράγωγα και στο μηχανισμό δράσης. Τα ψυχοτρόπα φάρμακα, πέραν των επιθυμητών τους δράσεων, ευθύνονται για πληθώρα αλληλεπιδράσεων με άλλα φάρμακα, αλλά και ανεπιθύμητων ενεργειών σε διάφορα συστήματα του οργανισμού. Το σύνολο των ψυχοτρόπων φαρμάκων περιλαμβάνει φαρμακευτικές ουσίες που επιδρούν στην ψυχική διάθεση και συμπεριφορά του ατόμου.

Τα αντιψυχωσικά ή μείζονα ηρεμιστικά φάρμακα διακρίνονται στα κλασσικά ή τυπικά αντιψυχωσικά ή νευροληπτικά και στα άτυπα ή νέα (δεύτερης γενιάς) αντιψυχωσικά (171). Η πρωταρχική ένδειξη χρήσης των αντιψυχωσικών φαρμάκων είναι η σχιζοφρενική ψύχωση και οι υποτροπές της, ενώ κάποια από αυτά έχουν εγκριθεί για την θεραπεία της μανίας, του οξέος ψυχωσικού επεισοδίου, των οργανικών ψυχώσεων, των παραληρητικών μορφών κατάθλιψης (με ταυτόχρονη χορήγηση αντικαταθλιπτικού) και την συμπτωματική θεραπεία της ναυτίας και του εμέτου (172). Τα αντιψυχωσικά φάρμακα έχουν θεραπευτική δράση στις διαταραχές σκέψης, αντίληψης, συναισθήματος, στην υπερκινητικότητα και υποβοηθούν στην επανένταξη και επανασύνδεση του σχιζοφρενούς με το περιβάλλον του. Η συνέχιση της χορήγησης μειωμένων δόσεων αντιψυχωσικών μετά την υποχώρηση της οξείας συμπτωματολογίας της σχιζοφρένειας προφυλάσσει από τις υποτροπές που εμφανίζονται εβδομάδες ή και μήνες μετά τη διακοπή των φαρμάκων. Εναλλακτικά, για την πρόληψη των υποτροπών μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι μορφές αντιψυχωσικών παρατεταμένης δράσεως (173). Οι κυριότερες κατηγορίες αντιψυχωσικών φαρμάκων είναι οι εξής:

Αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς (νευροληπτικά ή τυπικά)

Τα τυπικά αντιψυχωσικά εμφανίστηκαν κατά την δεκαετία του 1950 και περιλαμβάνουν κυρίως τα παράγωγα της φαινοθειαζίνης (χλωροπρομαζίνη), της βουτυροφαινόνης (αλοπεριδόλη) και του θειοξανθενίου (θειοθιξένη), με πιο σημαντικά τα δύο πρώτα. Ενδείκνυνται πρωτίστως για την αντιμετώπιση των θετικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας, αλλά και της οξείας μανίας και της επιθετικότητας. Η θεραπευτική τους δράση σχετίζεται με τον αποκλεισμό των μετασυναπτικών υποδοχέων D2 της ντοπαμίνης, όπου ενεργούν ως συναγωνιστικοί ανταγωνιστές της ντοπαμίνης κεντρικά και περιφερικά (172). Γνωστές ανεπιθύμητες ενέργειες των τυπικών αντιψυχωσικών είναι η εμφάνιση εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων (παρκινσονισμός, δυσκινησία, ακαθησία, δυστονία) (174), που αποδίδεται στην ανιντοπαμινεργική τους δράση, μυική ακαμψία, τρόμος, ξηροστομία, κακώθες νευροληπτικό σύνδρομο (175), καταστολή, διαταραχές σωματικού βάρους, υπερπρολακτιναιμία, φωτοευαισθησία, σύνδρομο Rabbit (4% των ασθενών) (176). Τα αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς, ανάλογα με τη δραστηκότητά τους ταξινομούνται σε χαμηλής, μέτριας και υψηλής δραστηκότητας, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Χαμηλή δραστηριότητα	Μέτρια δραστηριότητα	Υψηλή δραστηριότητα
Χλωροπρομαζίνη	Λοξαπίνη	Δροπεριδόλη
Χλωροπροθιξένη	Μολινδόνη	Φλουπενθιξόλη
Λεβοπρομαζίνη	Περφεναζίνη	Φλουφεναζίνη
Μεσοριδαζίνη	Θειοθιξένη	Αλοπεριδόλη
Περικιαζίνη		Πιμοζίδη
Θειοριθαζίνη		Προχλωροπεραζίνη
		Τριφλουοπεραζίνη
		Ζουκλοπενθιξόλη

✓ Φαινοθειαζίνες

Οι φαινοθειαζίνες αποτελούν μια κατηγορία χημικών ενώσεων που περιλαμβάνει αντιψυχωσικά και αντιϊσταμινικά φάρμακα. Δημιουργήθηκαν εργαστηριακά για πρώτη φορά από τον Bemthsen το 1883, αν και η χρώση τους με κυανού του μεθυλενίου περιγράφηκε ήδη από το 1876 (177). Ο χημικός τους τύπος είναι $S(C_6H_4)_2NH$. Οι φαινοθειαζίνες αποτελούν μία από τις 5 βασικές κατηγορίες των τυπικών αντιψυχωσικών φαρμάκων. Οι κύριες ενδείξεις χορήγησής τους συμπίπτουν με τις ενδείξεις χορήγησης των τυπικών αντιψυχωσικών. Επιπρόσθετα χρησιμοποιούνται για την συμπτωματική θεραπεία του εμέτου, της ημικρανίας, αλλά και στην συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια λόγω της δράσης τους στην φωσφοδιεστεράση τύπου I που είναι εξαρτώμενη από το ασβέστιο και την καλμοδουλίνη (178). Γνωστές ανεπιθύμητες ενέργειες των φαινοθειαζινών είναι τα σοβαρά εξωπυραμιδικά συμπτώματα (ακαθυσία και όψιμη δυσκινησία), η υπερπρολακτιναιμία και σπανιότερα η αύξηση βάρους και το εν δυνάμει θανατηφόρο κακόηθες νευροληπτικό σύνδρομο. Ανάλογα με τη χημική σύσταση που εμφανίζει η πλάγια αλυσος του χημικού τους μορίου διακρίνονται σε τρεις υποκατηγορίες: τα αλειφατικά παράγωγα (χλωροπρομαζίνη), τα πιπεριδινικά παράγωγα (θειοριδαζίνη) και τα πιπεραζινικά παράγωγα (τριφθοριοπεραζίνη).

✓ Αλοπεριδόλη

Η αλοπεριδόλη, είναι ένα τυπικό αντιψυχωσικό φάρμακο, που χρησιμοποιείται στη θεραπεία της σχιζοφρένειας, στο σύνδρομο Tourette, στη μανία και στη διπολική διαταραχή, σε ναυτία και έμετο, στο παραλήρημα, στη διέγερση, στην οξεία ψύχωση και στις ψευδαισθήσεις. Η αλοπεριδόλη μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή κίνησης γνωστή ως όψιμη δυσκινησία, η οποία μπορεί να είναι μόνιμη. Μπορεί να εμφανιστεί επίσης κακόηθες σύνδρομο νευροληπτικών και παράταση του διαστήματος QT (179).

Αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς (άτυπα)

Τα άτυπα ή νέα ή δεύτερης γενιάς αντιψυχωσικά αποτελούν τα φάρμακα πρώτης εκλογής για την αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας και των ψυχώσεων. Το πρώτο φάρμακο αυτής της κατηγορίας που ανακαλύφθηκε είναι η κλοζαπίνη. Κοινό χαρακτηριστικό τόσο των άτυπων, όσο και των τυπικών αντιψυχωσικών είναι ο αποκλεισμός των υποδοχέων της ντοπαμίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα άτυπα διαφέρουν, όμως, σε δομή και δράση από τα τυπικά αντιψυχωσικά και οι διαφορές συνοψίζονται στις ακόλουθες (180):

- αποτελεσματικότητα έναντι των αρνητικών, αλλά και των θετικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας
- αποτελεσματικότητα συχνά σε περιπτώσεις που δεν ενδείκνυνται τα τυπικά αντιψυχωσικά
- σπάνια εκδήλωση κινητικών ανεπιθύμητων ενεργειών

Συγκριτικά με τα τυπικά αντιψυχωσικά, ο διαφορετικός μηχανισμός δράσης των άτυπων αντιψυχωσικών περιλαμβάνει (181):

- ✓ μεγαλύτερη συγγένεια και ικανότητα δέσμευσης με πολλαπλούς σεροτονινεργικούς υποδοχείς (5-HT) και ιδίως του 5-HT_{2A} υποδοχέα, και
- ✓ μικρότερη συγγένεια και ικανότητα δέσμευσης με τους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς D₂,

Κύριο πλεονέκτημα της χρήσης των άτυπων αντιψυχωσικών φαρμάκων σε ασθενείς με ψύχωση είναι η απουσία ανεπιθύμητων ενεργειών, τόσο κινητικών (τρόμος χεριών, δυσκαμψία), όσο και συναισθηματικών (κατάθλιψη, έλλειψη ενδιαφέροντος). Διαπιστώνεται καλύτερη συμμόρφωση με την θεραπεία και οι ασθενείς λιγότερο συχνά χρειάζεται να επανεισαχθούν στο νοσοκομείο συγκριτικά με όσους λαμβάνουν τυπικά αντιψυχωσικά (182). Τα άτυπα αντιψυχωσικά ενδείκνυνται για την αντιμετώπιση ψυχωσικών διαταραχών (σχιζοφρένεια, οξύ ψυχωσικό επεισόδιο, παραλήρημα, παράνοια), της διπολικής διαταραχής (183), της άνοιας, της ψυχαναγκαστικής διαταραχής, της κατάθλιψης (184), των διαταραχών προσωπικότητας, των αγχωδών διαταραχών, των διαταραχών του αυτιστικού φάσματος, της επιθετικότητας, αλλά και των τάσεων αυτοκτονίας (185). Για την αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας, η αποτελεσματικότητά τους θεωρείται καλή σε ποσοστό 40-50% των περιπτώσεων, μερική σε ποσοστό 30-40% και απύσασα σε ποσοστό 20% (186).

Αν και θεωρούνται ασφαλέστερα των τυπικών αντιψυχωσικών, τα άτυπα έχουν ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως όψιμη δυσκινησία, αύξηση σωματικού βάρους, εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη, υπερλιπιδαιμία, κακώηθες

νευροληπτικό σύνδρομο, μειωμένη σεξουαλική διέγερση και επίδοση, διαταραχές εκσπερμάτισης και εμμήνου ρύσεως, υπογονιμότητα λόγω υπερπρολακτιναιμίας, αυξημένος κίνδυνος αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, καρδιαγγειακής νόσου, αιφνίδιου καρδιακού θανάτου και θρομβωτικών επεισοδίων (187).

Στα άτυπα αντιψυχωσικά περιλαμβάνονται οι ουσίες Αριπιπραζόλη, Ασenaπίνη, Κλοζαπίνη, Ολανζαπίνη, Παλιπεριδόνη, Κουετιαπίνη, Ρισπεριδόνη και Ζιπρασιδόνη.

✓ Ζιπρασιδόνη

Η ζιπρασιδόνη ανήκει στα άτυπα αντιψυχωσικά και στην χημική ομάδα των βενζοϊσοθειαζολοπιπεραζινών (188). Το εμπορικό της όνομα είναι Geodon και στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει εγκριθεί για την θεραπεία της σχιζοφρένειας από το 2001. Παρουσιάζει αρκετές χημικές διαφοροποιήσεις από όλα τα υπόλοιπα άτυπα, αλλά και τυπικά αντιψυχωσικά (189). Ο χημικός της τύπος είναι $C_{21}H_{21}ClN_4OS$. Η ζιπρασιδόνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας, των ψυχώσεων, της οξείας μανίας και των μεικτών επεισοδίων της διπολικής διαταραχής (190). Έχει χρησιμοποιηθεί και για την συμπληρωματική θεραπεία της κατάθλιψης, των συναισθηματικών διαταραχών, την θεραπεία συντήρησης της διπολικής διαταραχής (191), των αγχωδών διαταραχών, της επιθετικότητας, της άνοιας, της διαταραχής προσοχής και υπερδραστηριότητας σε νέους, της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής, του αυτισμού και της μετατραυματικής διαταραχής. Η ενδομυϊκή χορήγηση της ζιπρασιδόνης έχει εγκριθεί για την αντιμετώπιση της οξείας διέγερσης σχιζοφρενικών ασθενών για τους οποίους η μονοθεραπεία με ζιπρασιδόνη είναι κατάλληλη (192).

Οι φαρμακολογικές δράσεις της ζιπρασιδόνης είναι συνυφασμένες με την ικανότητά της να ανταγωνίζεται υποδοχείς νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο. Δρα ως ισχυρός ανταγωνιστής των νταπαμινεργικών υποδοχέων D2 και D3 και ως λιγότερο ισχυρός ανταγωνιστής των υποδοχέων D1 και D4. Η χημική της συγγένεια με τον D2 υποδοχέα είναι πέντε έως έξι φορές ασθενέστερη συγκριτικά με την υψηλής ισχύος αλοπεριδόλη, που ανήκει στα τυπικά αντιψυχωσικά (193). Η ανταγωνιστική της δράση στον D2 υποδοχέα και η ακόμα πιο ισχυρή ανταγωνιστική της δράση στον σεροτονινεργικό υποδοχέα 5-HT_{2A}, θεωρούνται υπεύθυνες για την αντιψυχωσική της δράση, ειδικά επί των θετικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας (παραληρηματικές ιδέες, ακουστικές ψευδαισθήσεις) (194). Ο συνδυασμός της ανταγωνιστικής της δράσης στους σεροτονινεργικούς υποδοχείς 5-HT_{2A} και 5-HT_{2C} με την αγωνιστική, ενεργοποιητική, δράση στον σεροτονινεργικό υποδοχέα 5-HT_{1A} μπορεί να αιτιάται την αντιψυχωσική της δράση επί των αρνητικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας (πτωχεία λόγου, επιπεδωμένο συναίσθημα) (195). Επιπρόσθετα, η ζιπρασιδόνη δρα ως μερικός αγωνιστής των σεροτονινεργικών υποδοχέων 5-HT_{1B} και ως ανταγωνιστής των 5-HT_{1D}, 5-HT₆ και 5-HT₇ υποδοχέων (196). Εμφανίζει υψηλή ικανότητα σύνδεσης με τον α1Α-αδρενεργικό υποδοχέα, όπου οφείλεται η καλή της ανοχή σε καρδιοπάθειες και παθήσεις του κυκλοφορικού συστήματος, και μέτρια

σύνδεση με τον ισταμινεργικό H1 υποδοχέα με αποτέλεσμα μια ήπιας μορφής υπνωτική δράση, χωρίς αύξηση του σωματικού βάρους (197).

Η ζιπραζιδόνη μπορεί να χορηγηθεί τόσο από το στόμα, όσο και ενδομυϊκά. Μεταβολίζεται από το ήπαρ κυρίως με την αλδεϋδική οξειδάση και σε μικρότερο ποσοστό από το κυτόχρωμα CYP3A4. Απεκκρίνεται από τα ούρα και τα κόπρανα και έχει χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 7 ώρες. Η ζιπραζιδόνη αντενδείκνυται σε ηλικιωμένους ασθενείς με ψύχωση σχετιζόμενη με άνοια, όπου αυξάνει την θνητότητα. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες (> 10%) της είναι η υπνηλία και η κεφαλαλγία (198). Αρκετά συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η σιελόρροια, ξηροστομία, αναπνευστικές διαταραχές, βήχας, ναυτία, έμετος, δυσκοιλιότητα, διάρροια, δυσπεψία, ανορεξία, ζάλη, εξωπυραμιδικά συμπτώματα, δερματικό ερύθημα, μυαλγία, ταχυκαρδία, ορθοστατική υπόταση, αύξηση σωματικού βάρους (199), διαταραχές όρασης, άγχος, ρινίτιδα. Πολύ σπάνια (< 0,1%) έχουν περιγραφεί ανεπιθύμητες ενέργειες της χρήσης ζιπραζιδόνης, όπως κακόηθες νευροληπτικό σύνδρομο (200), ραβδομύλυση (201), ηωσινοφιλία, όψιμη δυσκινησία και υπερτρανσαμινασαιμία.

Τρόπος δράσης αντιψυχωσικών φαρμάκων

Τα νευροληπτικά φάρμακα αντιπροσωπεύουν αρκετές ετερογενείς, ετεροκυκλικές δομές με εκσεσημασμένες διαφορές στην ισχύ. Το τρικυκλικό παράγωγο της φαινοθειαζίνης χλωροπρομαζίνη ήταν το πρώτο νευροληπτικό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε στην αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας. Τα αντιψυχωσικά φάρμακα που συντέθηκαν στη συνέχεια, όπως η αλοπεριδόλη, είναι περισσότερο από 100 φορές ισχυρότερα από την χλωροπρομαζίνη, αλλά έχουν αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης παρκινσονικών συμπτωμάτων. Επιπλέον, αυτά τα παραδοσιακά φάρμακα, αν και ισχυρότερα, δεν είναι πιο αποτελεσματικά από τη χλωροπρομαζίνη.

Αποκλεισμός των υποδοχέων ντοπαμίνης στον εγκέφαλο

Όλα τα νευροληπτικά φάρμακα αποκλείουν τους υποδοχείς της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο και στην περιφέρεια. Έχουν αναγνωριστεί 5 τύποι ντοπαμινεργικών υποδοχέων: οι D₁ και D₅ υποδοχείς ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση, ενώ οι D₂, D₃ και D₄ υποδοχείς αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση. Τα νευροληπτικά φάρμακα προσδένονται σε αυτούς τους υποδοχείς με ποικίλλουσα ισχύ. Ωστόσο, η κλινική αποτελεσματικότητα των παραδοσιακών νευροληπτικών φαρμάκων συσχετίζεται έντονα με την σχετική τους ικανότητα να αποκλείουν τους D₂ υποδοχείς στο μεσομεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου. Από την άλλη, το άτυπο φάρμακο κλοζαπίνη έχει υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα D₄, κάτι που ίσως ερμηνεύει τη μικρή της τάση να προκαλεί εξωπυραμιδικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Τη δράση των νευροληπτικών φαρμάκων ανταγωνίζονται ουσίες που αυξάνουν τη

συγκέντρωση της ντοπαμίνης, όπως για παράδειγμα η L-dopa και οι αμφεταμίνες.

Το ντοπαμινεργικό σύστημα παίζει βασικό ρόλο στην παθογένεση της σχιζοφρένειας και στις σχετικές με αυτήν διαταραχές. Η "ντοπαμινεργική υπόθεση" της σχιζοφρένειας υποθέτει μια υπερδραστηριότητα της ντοπαμίνης στη μεσοκλιμική περιοχή και την υπολειτουργικότητα της ντοπαμίνης σε άλλες

περιοχές του εγκεφάλου όπως ο προμετωπιαίος φλοιός (202). Άμεσες ενδείξεις δυσλειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος έχουν προσδιοριστεί είτε με τη χρήση ραδιοενώσεων είτε με την τεχνική της τομογραφίας με εκπομπή ποζιτρονίων (PET). Επιπλέον, μια αλλαγή στη σύνθεση ντοπαμίνης προσδιορίστηκε σε ανθρώπους και ζώα με μελέτη της πρόσληψης και αποθήκευσης του πρόδρομου παράγοντα ντοπαμίνης L-dopa. Με τη χρήση αυτών των τεχνικών, προσδιορίστηκε η υπερευαισθησία στην αμφεταμίνη των ασθενών με σχιζοφρένεια, καθώς η αύξηση απελευθέρωσης της ντοπαμίνης οδήγησε σε επιδείνωση της ψύχωσης (203). Τέλος, κάποια δεδομένα υπογραμμίζουν τη σημασία της αυξημένης σύνθεσης και απελευθέρωσης της ντοπαμίνης στην παθογένεση της σχιζοφρένειας, ως συνέπεια της αλλαγμένης προσυναπτικής ντοπαμινεργικής λειτουργίας (204).

✓ **D₁ υποδοχείς**

Οι υποδοχείς D₁ εμφανίζονται κυρίως στους μετασυναπτικούς νευρώνες και εκφράζονται ιδιαίτερα στο ραβδωτό σώμα, στην αμυγδαλή, στον οσφρητικό βολβό, στην παρεγκεφαλίδα, και στον προμετωπιαίο φλοιό (205). Σύμφωνα με μία μελέτη (206), οι υποδοχείς D₁ στον προμετωπιαίο φλοιό του αρουραίου εκφράζονται σε GABAμινεργικούς και γλουταμινεργικούς πυραμιδικούς νευρώνες, εμφανίζοντας μια κάποια προτίμηση στην πρώτη ομάδα. Ο προμετωπιαίος φλοιός εμπλέκεται στις γνωσιακές διαδικασίες όπως ο συλλογισμός, ο σχεδιασμός και η χωρητική ικανότητα (207), και ιδιαίτερα για το λόγο αυτό ο ρόλος των υποδοχέων D₁ στη σχιζοφρένεια έχει διερευνηθεί με διάφορες τεχνικές απεικόνισης και φαρμακολογικές μελέτες. Χρησιμοποιώντας την τεχνική PET, αποδείχτηκε ότι η δέσμευση ενός ραδιοπροσδέτη στον υποδοχέα D₁ είναι μειωμένη στον προμετωπιαίο φλοιό των ασθενών με σχιζοφρένεια, και ότι αυτή η μείωση σχετίζεται με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων (208). Πάνω σε αυτή τη μελέτη, μελετώντας το ψυχοδιεγερτικό η φαινκυκλιδίνη (PCP) αποδείχτηκε ότι η κλοζαπίνη είναι σε θέση να αντιστρέψει τα επαγόμενα από την PCP ελλείμματα συμπεριφοράς σε αρουραίους, μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδότησης του υποδοχέα της ντοπαμίνης D₁ μέσω της αύξησης της ακετυλίωσης της ιστόνης H3. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι ο υποδοχέας D₁ στον προμετωπιαίο φλοιό μπορεί να έχει κάποιο ρόλο στη δράση της κλοζαπίνης (209).

✓ **D₂ υποδοχείς**

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), οι υποδοχείς D₂ ως επί το πλείστον που εκφράζονται στο ραβδωτό σώμα, στον υποθάλαμο, στις φλοιώδεις περιοχές, στο διάφραγμα, στην αμυγδαλή και στον ιππόκαμπο (210). Λειτουργικά, ο D₂ υποδοχέας σηματοδοτεί μέσω της πρωτεΐνης Gi/o και άλλων πρωτεϊνών,

όπως η β-αρρεστίνη (211). Οι αναλύσεις νευροαπεικόνισης έχουν αποδείξει ότι η βέλτιστη απάντηση στα τυπικά αντιψυχωσικά προκύπτει όταν καλύπτεται το 65-80% των υποδοχέων στο ραβδωτό σώμα, ενώ τα εξωπυραμιδικά συμπτώματα εμφανίζονται όταν αποκλείονται περισσότερο από το 80% των υποδοχέων (212). Αντίθετα, η βέλτιστη απάντηση όσον αφορά τον υποδοχέα D₂ για άτυπα αντιψυχωσικά δεν είναι αυστηρά καθορισμένη επειδή τα άτυπα αντιψυχωσικά μπορούν να ρυθμίσουν την υπερδραστηριότητα της ντοπαμίνης μέσω εναλλακτικών μεθόδων πέρα από τον ανταγωνισμό του υποδοχέα D₂. Ωστόσο, αν κάποιος από τα άτυπα αντιψυχωσικά φθάσει σε ένα ποσοστό πληρότητας του υποδοχέα 80% ή παραπάνω, είναι πιθανό να εμφανιστούν εξωπυραμιδικά συμπτώματα. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τη ρισπεριδόνη και για την ολανζαπίνη, καθώς έχουν υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα D₂ και σε ορισμένες δοσολογίες μπορεί έχουν μια πληρότητα υποδοχέα 80% ή παραπάνω. Αντιθέτως, η κλοζαπίνη και η κουετιαπίνη δεν αποδίδουν ποτέ πάνω από 80% στην πληρότητα του υποδοχέα D₂ στις θεραπευτικές τους συγκεντρώσεις, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί ποτέ δεν προκαλούν συμπτώματα παρκινσονισμού. Μια άλλη φαρμακολογική προσέγγιση για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης των εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων είναι η χρήση μερικών αγωνιστών στον υποδοχέα D₂, όπως αποδεικνύεται από τη χρήση της αριπιπραζόλης. Αυτή η ένωση συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής όταν χορηγείται και η ντοπαμίνη είναι σε περίσσεια, αλλά εγγενώς είναι ακόμα σε θέση να ενεργοποιήσει εν μέρει τον υποδοχέα D₂ έως 20-40% (213). Έτσι, η αριπιπραζόλη έχει ένα διπλό ρόλο αγωνιστή/ανταγωνιστή που εξαρτάται από τα συναπτικά επίπεδα ντοπαμίνης. Ως εκ τούτου, έχει χαμηλότερη πιθανότητα εμφάνισης εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων, αν και σε υψηλότερες δόσεις μπορεί να εμφανιστεί κάποια ανεπιθύμητη παρενέργεια.

✓ D₃ υποδοχείς

Στο ανθρώπινο ΚΝΣ, οι υποδοχείς ντοπαμίνης D₃ εκφράζονται σε μικρότερο βαθμό από τους δύο κύριους υποδοχείς ντοπαμίνης, αλλά είναι περισσότερο συγκεντρωμένοι σε ορισμένες περιοχές. Οι υποδοχείς D₃ εκφράζονται τόσο ως αυτο-υποδοχείς στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και ως μετασυναπτικοί υποδοχείς (214). Η υψηλότερη έκφρασή τους είναι σε περιοχές, οι οποίες συνδέονται με συναισθηματικές και γνωσιακές λειτουργίες. Τα άτυπα αντιψυχωσικά δεσμεύονται στον υποδοχέα D₃ με συγγένεια παρόμοια με εκείνη του D₂, έτσι δεν είναι εύκολο να κατανοηθεί η συγκεκριμένη συμβολή του υποτύπου υποδοχέα. Ωστόσο, οι εκλεκτικοί ανταγωνιστές των D₃ υποδοχέων φαίνεται να ενισχύουν τη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση, ειδικά στον προμετωπιαίο φλοιό, όπου η απελευθέρωση της ντοπαμίνης ελέγχεται εν μέρει από τους υποδοχείς D₃ (215). Ο αποκλεισμός των υποδοχέων D₃ ενισχύει την ακετυλοχολίνη (ACh) στον προμετωπιαίο φλοιό που θα μπορούσε να συμβάλλει στις προ-γνωσιακές ενέργειες (216). Κατά συνέπεια, οι ανταγωνιστές των υποδοχέων D₃ είναι σε θέση να αντιστρέψουν την υπερδραστηριότητα και το έλλειμμα κοινωνικής αλληλεπίδρασης που προκαλούνται από τον αποκλεισμό του υποδοχέα NMDA σε ένα ζωικό μοντέλο που πάσχει από σχιζοφρένεια (217).

✓ D₄ υποδοχείς

Οι υποδοχείς ντοπαμίνης D₄ κατανέμονται κυρίως στον προμετωπιαίο φλοιό, στον ενδορρινικό φλοιό και στον ιππόκαμπο, περιοχές ιδιαίτερα σημαντικές για τη γνωστική λειτουργία, με μια λιγότερο σημαντική κατανομή στους νευρώνες του νωτιαίου μυελού, στο ραβδωτό και στον θάλαμο των τρωκτικών και των ανθρώπων (218). Ο ρόλος των υποδοχέων αυτών στη σχιζοφρένεια μελετήθηκε κυρίως λόγω της υψηλής πυκνότητας υποδοχέων D₄ στον εγκέφαλο των σχιζοφρενικών και λόγω της υψηλής συγγένειας της κλοζαπίνης για αυτόν τον υποδοχέα (219).

Αποκλεισμός των υποδοχέων σεροτονίνης στον εγκέφαλο

Οι νεότερες <<άτυπες>> ουσίες φαίνεται πως ασκούν ένα μέρος των ειδικών δράσεων τους μέσω αναστολής των υποδοχέων σεροτονίνης (5-HT). Έτσι, η κλοζαπίνη έχει υψηλή συγγένεια για τους D₁, D₂, D₄ και 5-HT₂, μουςκαρινικούς και α-αδρενεργικούς υποδοχείς, αλλά ανταγωνίζεται επίσης τους ντοπαμινεργικούς D₂ υποδοχείς. Η ρισπεριδόνη αποκλείει τους 5-HT₂ υποδοχείς σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι αποκλείει τους D₂ υποδοχείς. Το άτυπο νευροληπτικό αριπιπραζόλη είναι μερικός αγωνιστής στους D₂ και 5-HT_{1A} υποδοχείς καθώς και αποκλειστής των 5-HT_{2A} υποδοχέων.

Η σεροτονίνη, μέσω των πολλών υποδοχέων της (15 5-HTRs), είναι ικανή να έχει ισχυρή επίδραση στους ντοπαμινεργικούς, γλουταμινεργικούς και GABAμινεργικούς νευρώνες και άλλους νευροδιαβιβαστές στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Ταυτόχρονα με την υπερδραστηριότητα του γλουταμινεργικού συστήματος στο μέσο του προμετωπιαίου φλοιού ως παθοφυσιολογικού δείκτη σχιζοφρένειας, έχει παρατηρηθεί και ισχυρή σεροτονινεργική μετάδοση σήματος και η κλοζαπίνη αλλά όχι η αλοπεριδόλη ήταν σε θέση να σταθεροποιήσει την αύξηση της σεροτονίνης σε ζωικό μοντέλο με σχιζοφρένεια (220). Εκτός από τον υποτιθέμενο μηχανισμό δράσης των άτυπων αντιψυχωσικών με βάση τη σχέση 5-HT_{2A} / D₂, άλλοι υποδοχείς σεροτονίνης έχουν επίσης θεωρηθεί ως δυνητικοί στόχοι διαφορετικών άτυπων αντιψυχωσικών. Στην πραγματικότητα, σήμερα είναι σαφές ότι υποδοχείς όπως οι 5-HT_{2C} και οι 5-HT_{1A} έχουν ένα σημαντικό ρόλο παρόμοιο με εκείνο των 5-HT_{2A} στον μηχανισμό δράσης των άτυπων αντιψυχωσικών. Επιπλέον, άλλοι υποδοχείς σεροτονίνης όπως οι 5-HT₆ και 5-HT₇ έχουν αρχίσει να προσελκύουν την προσοχή ως πιθανοί νέοι στόχοι για ορισμένα άτυπα αντιψυχωσικά, όπως η αμισουλπρίδη. Η γενική ιδέα είναι ότι η βελτιωμένη εκροή ντοπαμίνης που προκαλείται από τον αποκλεισμό των υποδοχέων 5-HT₂ αντισταθμίζει την επίδραση των αντιψυχωσικών που λειτουργούν αποκλείοντας τους υποδοχείς της ντοπαμίνης, εμποδίζοντας έτσι τα επιβλαβή αποτελέσματα που σχετίζονται με τον αποκλεισμό υποδοχέων D₂ (221).

✓ **5-HT_{1A} υποδοχείς**

Οι υποδοχείς 5-HT_{1A} έχουν σύνθετες πολλαπλές λειτουργίες στο ΚΝΣ και εκφράζονται σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, κυρίως στον φλοιό, τον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή. Οι αγωνιστές του υποδοχέα 5-HT_{1A}, όπως το

8-OH-DPAT, αυξάνουν την εκροή ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο (222), αποτέλεσμα που φαίνεται να σχετίζεται με ανασταλτική δράση στους GABAμινεργικούς νευρώνες. Στην πραγματικότητα, η δράση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μη αναστολή των γλουταμινεργικών πυραμιδικών νευρώνων, που ενισχύει τη ντοπαμινεργική νευρωνική δραστηριότητα και αυξάνει την απελευθέρωση ντοπαμίνης. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί επίσης να είναι υπεύθυνος για αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο, ο οποίος θα μπορούσε να βελτιώσει τις γνωσιακές λειτουργίες. Πολλά άτυπα αντιψυχωσικά όπως η κλοζαπίνη, η κουετιαπίνη, η αριπιπραζόλη και η ζιπρασιδόνη είναι μερικοί αγωνιστές των υποδοχέων 5-HT_{1A}, οι οποίοι μπορεί να σχετίζονται με τον μηχανισμό δράσης τους. Είναι επίσης ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο επιλεκτικός ανταγωνιστής του υποδοχέα 5-HT_{1A} WAY-100635 είναι σε θέση να μειώσει την απελευθέρωση της ντοπαμίνης που προκαλείται από τα άτυπα αντιψυχωσικά που δεν έχουν συγγένεια για τον υποδοχέα 5-HT_{1A}, υποδηλώνοντας έναν έμμεσο ρόλο αυτού του υποδοχέα στον μηχανισμό των φαρμάκων αυτών. Με βάση αυτό το γεγονός, η βουσπιρόνη, η οποία είναι μερικός αγωνιστής του υποδοχέα 5-HT_{1A}, όταν χρησιμοποιείται μαζί με αλοπεριδόλη σε σχιζοφρενικούς ασθενείς, εμφανίζει ευεργετικά αποτελέσματα σε ψυχωτικά και γνωστικά συμπτώματα και στον παρκινσονισμό (223).

✓ 5-HT_{2A} υποδοχείς

Οι υποδοχείς 5-HT_{2A} εντοπίζονται κυρίως στις περιοχές του φλοιού του εγκεφάλου, όπως ο προμετωπιαίος φλοιός και διευκολύνουν τη ροή της ντοπαμίνης σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου με διεγερτική λειτουργία. Η ρύθμιση της, ωστόσο μπορεί να περίπλοκη σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, καθώς εκεί μπορεί να εμφανίζει ανασταλτικές δράσεις. Η εξαρτώμενη από τον υποδοχέα 5-HT_{2A} απελευθέρωση ντοπαμίνης στο φλοιό είναι παρόμοια με αυτή των υποδοχέων 5-HT_{1A} και περιλαμβάνει έναν μακρύ γλουταμινεργικό βρόγχο. Ο αποκλεισμός των υποδοχέων 5-HT_{2A} έχει ισχυρή επίδραση στη ντοπαμινεργική δραστηριότητα, οδηγώντας σε μείωση της απελευθέρωσης ντοπαμίνης στη μεσοκλιμική περιοχή, η οποία συμβάλλει στη δράση των αντιψυχωσικών φαρμάκων. Η χρήση της πιμαβανσερίνης, που είναι ένας επιλεκτικός ανταγωνιστής του υποδοχέα 5-HT_{2A}, έδειξε καλά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας, και επιπλέον ενίσχυσε το θεραπευτικό αποτέλεσμα της ρισπεριδόνης, όταν αυτή χορηγείται σε χαμηλή δόση (224). Από την άλλη πλευρά, όταν ο επιλεκτικός ανταγωνιστής του υποδοχέα 5-HT_{2A} SR43469B δοκιμάστηκε ως μονοθεραπεία για τη θεραπεία της οξείας φάσης της σχιζοφρένειας φάνηκε να είναι λιγότερο αποτελεσματικός από την αλοπεριδόλη, αλλά καλύτερος από το εικονικό φάρμακο (225). Έτσι είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι η πιμαβανσερίνη, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μονοθεραπεία, αποδείχθηκε αποτελεσματική στη μείωση των ψυχώσεων στη νόσο του Πάρκινσον, παρέχοντας σημαντικά στοιχεία για τη συνάφεια του υποδοχέα 5-HT_{2A} σε ψυχωτικά συμπτώματα (226)

Χολινεργικό σύστημα και μουσκαρινικοί υποδοχείς

Η οικογένεια των μουσκαρινικών υποδοχέων αποτελείται από πέντε υποτύπους, από το M1 έως το M5, οι οποίες εκφράζονται σε όλο τον εγκέφαλο και παίζουν ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργικών διεργασιών, όπως η εκμάθηση, η μνήμη, η προσοχή, η αισθητικοκινητική επεξεργασία και οι κύκλοι ύπνου-αφύπνισης. Η μείωση της σηματοδότησης του υποδοχέα M1 έχει συνδεθεί με τη γνωστική εξασθένηση στη σχιζοφρένεια και συνεπώς, έχει θεωρηθεί ως θεραπευτικός στόχος η ενίσχυση της σηματοδότησης του υποδοχέα M1. Η κλοζαπίνη ήταν το πρώτο άτυπο αντιψυχωσικό που βελτίωσε τη γνωστική αυτή εξασθένηση στη σχιζοφρένεια (227). Συγκεκριμένα, αν και η κλοζαπίνη είναι ανταγωνιστής στους υποδοχείς M1, M3 και M5 (228), ο κύριός της μεταβολίτης νορκλοζαπίνη συμπεριφέρεται ως θετικός αλλοστερικός διαμορφωτής του υποδοχέα M1 (229). Επομένως, ασθενείς που έλαβαν κλοζαπίνη και οι οποίοι εμφάνισαν υψηλή τιμή στην αναλογία νορκλοζαπίνη / κλοζαπίνη παρουσίασαν επίσης βελτιωμένη μνήμη και μειωμένες μαθησιακές δυσκολίες (230). Συνοψίζοντας, η κλοζαπίνη έχει μια μοναδική δράση στους μουσκαρινικούς υποδοχείς, και η θετική αλλοστερική διαμόρφωση των υποδοχέων M1 μέσω του μεταβολίτη της, νορκλοζαπίνη, έχει ιδιαίτερη σημασία για τη γνωστική του δράση και άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η ολανζαπίνη είναι ένας ανταγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων με αδύναμη/μεσαία συγγένεια και αυτό μπορεί να εξηγήσει το χαμηλό κίνδυνο να προκαλέσει εξωπυραμιδικά συμπτώματα.

Αδρενεργικό σύστημα και αδρενεργικοί υποδοχείς

α₁ και α₂ αδρενεργικοί υποδοχείς

Πολλά από τα άτυπα αντιψυχωσικά εμφανίζουν συγγένεια με τους αδρενεργικούς α₁ και α₂ υποδοχείς ως ανταγωνιστές και παρά τις περιορισμένες κλινικές ενδείξεις, το αδρενεργικό σύστημα φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο στη σχιζοφρένεια (231). Ο ανταγωνισμός του αδρενεργικού α₁ υποδοχέα από πολλά άτυπα αντιψυχωσικά, ιδιαίτερα την κλοζαπίνη, θεωρείται ότι συμβάλλει στον έλεγχο των θετικών συμπτωμάτων και ρυθμίζει την παραγωγή σημάτων των ντοπαμινεργικών νευρώνων (232). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η προσθήκη ενός ανταγωνιστή του α₁ υποδοχέα στον ανταγωνιστή του υποδοχέα D₂ μπορεί να συνεισφέρει συνεργιστικά στη συνολική δραστηριότητα των αντιψυχωσικών. Η κλοζαπίνη και άλλα άτυπα αντιψυχωσικά θα μπορούσαν επίσης να δράσουν έμμεσα στη ντοπαμινεργική δραστηριότητα μέσω των 5-HT_{2A/2C} και α₁ υποδοχέων, με χαμηλότερη πληρότητα στους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς D₂ (232). Σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα αντιψυχωσικά, η κλοζαπίνη και η νορκουετιαπίνη (κύριος δραστικός μεταβολίτης της κουετιαπίνης) δρουν ως ανταγωνιστές στον α₂ υποδοχέα, και αυτό το ιδιόμορφο χαρακτηριστικό έχει υποτεθεί ότι συμβάλλει στο δικό τους κλινικό προφίλ. Η ρισπεριδόνη έχει πολύ χαμηλότερη συγγένεια για το υποδοχέα α₂ από την κλοζαπίνη, αλλά ελαφρώς υψηλότερη συγγένεια από τα άλλα άτυπα αντιψυχωσικά (232). Ο

ανταγωνισμός του α_2 υποδοχέα από την κλοζαπίνη και της νορκουετιαπίνη μπορεί να είναι σημαντική για τα αντικαταθλιπτικά χαρακτηριστικά τους και αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει την ανωτερότητα της κλοζαπίνης στην πρόληψη της αυτοκτονίας (233). Μικρός αποκλεισμός ντοπαμινεργικών υποδοχέων D2 με ισχυρό ανταγωνιστή του υποδοχέα α_2 φαίνεται να είναι ένα καλό προφίλ για ένα νευροληπτικό φάρμακο, και αυτό θα μπορούσε να είναι μια άλλη ιδιαιτερότητα του μηχανισμού δράσης της κλοζαπίνης (232).

Ισταμινεργικό σύστημα και ισταμινικοί υποδοχείς

✓ **H₁ υποδοχείς**

Η κλοζαπίνη, η ολανζαπίνη και η κουετιαπίνη εμφανίζουν υψηλή πυκνότητα εμφάνισης υποδοχέων H₁ στον ανθρώπινο εγκέφαλο σε ελάχιστες κλινικές δόσεις (234). Ο υποδοχέας H₁ έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στον ανώτερο αυχενικό γάγγλιο και η δράση της κλοζαπίνης σε αυτό το επίπεδο μπορεί να είναι παράγοντας που είναι εν μέρει υπεύθυνος για τις δυσμενείς επιπτώσεις της, όπως η ορθοστατική υπόταση (235). Η αύξηση βάρους είναι μία από τις κύριες παρενέργειες των αντιψυχωσικών φαρμάκων, όπως η κλοζαπίνη, η ολανζαπίνη, η κουετιαπίνη και η ασεναπίνη, τα οποία έχουν πολύ υψηλή συγγένεια με τους υποδοχείς H₁ (236). Αντίθετα, η ρισπεριδόνη και η ζιπρασιδόνη έχουν χαμηλή έως μέση συγγένεια για αυτόν τον υποδοχέα, και αυτό μπορεί να εξηγήσει τη μειωμένη αύξηση βάρους στους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με αυτούς. Ο ανταγωνισμός των H₁ υποδοχέων είναι επίσης υπεύθυνος για την καταστολή, μια παρενέργεια που μπορεί να βοηθήσει ιδιαίτερα στις οξείες ψυχώσεις σε ασθενείς σε έξαρση.

✓ **H₃ υποδοχείς**

Ο υποδοχέας H₃ είναι κυρίως ένας προσυναπτικός αυτοϋποδοχέας και δρα ως προ-συναπτικός ετεροϋποδοχέας σε μη-ισταμινεργικά νευρικά συστήματα. Ορισμένες προκλινικές μελέτες έχουν επισημάνει τον πιθανό ρόλο της χρήσης ανταγωνιστών του υποδοχέα H₃ στην αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας, ιδιαίτερα στις γνωσιακές λειτουργίες (237), η οποία επιβεβαιώθηκε σε ασθενείς με σχιζοφρένεια με ήπια επίδραση στη βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας (238). Στους μετασυναπτικούς GABAμινεργικούς νευρώνες, οι υποδοχείς H₃ και οι D₁ και D₂ αλληλοσυνδέονται και σχηματίζουν ετεροδιμερή, και αυτή η αλληλεπίδραση συνδέεται με την πιθανή ανάπτυξη νέων νευροληπτικών φαρμάκων (239).

Δράσεις αντιψυχωσικών φαρμάκων

Οι αντιψυχωσικές δράσεις των νευροληπτικών φαρμάκων αντιστοιχούν στον αποκλεισμό των ντοπαμινεργικών ή/και των σεροτονινεργικών υποδοχέων. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πολλές από τις ουσίες αυτές αποκλείουν και χολινεργικούς, αδρενεργικούς και ισταμινεργικούς υποδοχείς. Είναι άγνωστο το ποιος είναι ο ρόλος αυτών των δράσεων στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της ψύχωσης. Ωστόσο, οι ανεπιθύμητες ενέργειες αυτών των ουσιών συχνά είναι το αποτέλεσμα της δράσης τους σε αυτούς τους άλλους υποδοχείς.

✓ *Αντιψυχωσικές δράσεις*

Όλα τα νευροληπτικά φάρμακα μειώνουν τις ψευδαισθήσεις και τη διέγερση που συνοδεύουν τη σχιζοφρένεια (τα αποκαλούμενα <<θετικά>> συμπτώματα), αποκλείοντας τους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς στο μεσομεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου. Τα <<αρνητικά>> συμπτώματα, όπως η άμβλυση του συναισθήματος, η ανηδονία, η απάθεια, η διαταραχή της προσοχής καθώς και οι γνωσιακές διαταραχές δεν ανταποκρίνονται το ίδιο καλά στη θεραπεία, ιδιαίτερα με τα τυπικά νευροληπτικά. Ορισμένα άτυπα φάρμακα, όπως η κλοζαπίνη, μετριάζουν σε κάποιο βαθμό αυτά τα αρνητικά συμπτώματα. Όλα τα φάρμακα αυτά έχουν επίσης κατευναστική δράση και ελαττώνουν την αυθόρμητη κινητικότητα. Σε αντίθεση με τα κατασταλτικά φάρμακα του ΚΝΣ, όπως είναι τα βαρβιτουρικά, τα νευροληπτικά δεν καταστέλλουν τις διανοητικές λειτουργίες του ασθενούς και η διαταραχή του συντονισμού είναι ελάχιστη. Τα αντιψυχωσικά αποτελέσματα συνήθως εμφανίζονται έπειτα από εβδομάδες χορήγησης, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα θεραπευτικά αποτελέσματα σχετίζονται με δευτερογενείς μεταβολές στη λειτουργία των φλοιοραβδωτών νευρωνικών οδών.

✓ *Εξωπυραμιδικές δράσεις*

Σε χρόνια θεραπεία εμφανίζονται δυστονίες, παρκινσονικά συμπτώματα, ακαθησία και όψιμη δυσκινησία. Ο αποκλεισμός των ντοπαμινεργικών υποδοχέων στη μελανοραβδωτή οδό πιθανόν να προκαλεί αυτά τα ανεπιθύμητα παρκινσονικά συμπτώματα. Τα άτυπα νευροληπτικά παρουσιάζουν τα συμπτώματα αυτά σε μικρή συχνότητα.

✓ *Αντιεμετικές δράσεις*

Τα περισσότερα νευροληπτικά φάρμακα, με εξαίρεση τη θειοριδαζίνη, έχουν αντιεμετική δράση η οποία οφείλεται στον αποκλεισμό των D₂

ντοπαμινεργικών υποδοχέων στη χημειοαισθητική ζώνη του εμετού στον προμήκη μυελό. Τα άτυπα αντιψυχωσικά φάρμακα δεν είναι ωστόσο αποτελεσματικά αντιεμετικά.

✓ *Αντιμουςκαρινικές δράσεις*

Ορισμένα νευροληπτικά, ιδιαίτερα η θειοριδαζίνη, η χλωροπρομαζίνη, η κλοζαπίνη και η ολανζαπίνη εμφανίζουν αντιχολινεργικές δράσεις, όπως ασαφή όραση, ξηρότητα στόματος, καταστολή, σύγχυση και αναστολή της κινητικότητας των λείων μυϊκών ινών του γαστρεντερικού σωλήνα και του ουροποιητικού, με αποτέλεσμα την εμφάνιση δυσκοιλιότητας και την κατακράτηση ούρων.

✓ *Άλλες δράσεις*

Ο αποκλεισμός των α-αδρενεργικών υποδοχέων προκαλεί ορθοστατική υπόταση και ελαφριά ζάλη. Τα νευροληπτικά φάρμακα επηρεάζουν επίσης τους μηχανισμούς θερμορύθμισης και μπορεί να προκαλέσουν ποικιλοθερμία. Στην υπόφυση, τα νευροληπτικά φάρμακα αποκλείουν τους D₂ υποδοχείς με αποτέλεσμα να αυξάνεται η απελευθερούμενη προλακτίνη. Καταστολή εμφανίζεται με τα φάρμακα που είναι ισχυροί ανταγωνιστές των H₁ ισταμινεργικών υποδοχέων, όπως η χλωροπρομαζίνη και η κλοζαπίνη.

Θεραπευτικές χρήσεις αντιψυχωσικών φαρμάκων

❖ *Θεραπεία της σχιζοφρένειας*

Η χρήση των νευροληπτικών είναι η μόνη αποτελεσματική θεραπεία της σχιζοφρένειας. Στη θεραπεία αυτή δεν ανταποκρίνονται όλοι οι ασθενείς και σπάνια επιτυγχάνεται η πλήρης επαναφορά της φυσιολογικής συμπεριφοράς. Τα παραδοσιακά νευροληπτικά (τυπικά) είναι περισσότερο αποτελεσματικά στη θεραπεία των θετικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας (παραισθήσεις, ψευδαισθήσεις, και διαταραχές της σκέψης). Οι νεότερες ουσίες που δρουν αποκλείοντας τους σεροτινινεργικούς υποδοχείς είναι αποτελεσματικές σε ασθενείς όπου δεν πετυχαίνει η θεραπεία με τις παραδοσιακές ουσίες, ιδιαίτερα για τη θεραπεία των αρνητικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας (απόσυρση, αμβλύ συναίσθημα, μειωμένη ικανότητα δημιουργίας σχέσεων με συνανθρώπους).

❖ *Πρόληψη σοβαρής ναυτίας και εμετών*

Τα νευροληπτικά (κυρίως η προχλωροπρομαζίνη) χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της ναυτίας που προκαλείται από φάρμακα (φάρμακα χημειοθεραπείας καρκίνου). Ωστόσο, η ναυτία που εμφανίζεται λόγω συγκίνησης είναι προτιμότερο να θεραπεύεται με κατασταλτικά και αντιισταμινικά και όχι με τόσο ισχυρά φάρμακα.

❖ Άλλες χρήσεις

Τα νευροληπτικά φάρμακα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ηρεμιστικά για την αντιμετώπιση διεγερτικής και καταστροφικής συμπεριφοράς. Τα νευροληπτικά, σε συνδυασμό με τα ναρκωτικά αναλγητικά, χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία χρόνιου πόνου που συνοδεύεται από έντονο άγχος. Η χλωροπρομαζίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του ανεξέλεγκτου λόξυγκα. Η προμεθαζίνη δεν είναι καλό αντιψυχωσικό φάρμακο, αλλά χρησιμοποιείται στη θεραπεία του κνησμού λόγω των αντιισταμινικών της ιδιοτήτων. Η κύρια ένδειξη της πιμοζίδης είναι η θεραπεία των κινητικών και φωνητικών τικ της διαταραχής Tourette. Τα αντιψυχωσικά φάρμακα φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο και εναντίον διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

Απορρόφηση και μεταβολισμός

Οι απορροφήσεις των νευροληπτικών, όταν αυτά χορηγούνται από το στόμα, ποικίλλουν και δεν επηρεάζονται από τη λήψη τροφής. Οι ουσίες αυτές διεισδύουν εύκολα στον εγκέφαλο, έχουν μεγάλο όγκο κατανομής, συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με πρωτεΐνες του πλάσματος και μεταβολίζονται σε πολλές διαφορετικές ουσίες από το σύστημα P-450 στο ήπαρ, ιδιαίτερα από το ισοένζυμο CYP2D6. Ορισμένοι μεταβολίτες είναι ενεργοί. Η δεκανοϊκή φθοριοφαιναζίνη και η δεκανοϊκή αλοπεριδόλη είναι φαρμακευτικές μορφές νευροληπτικών βραδείας αποδέσμευσης (μέχρι 3 εβδομάδες) και χορηγούνται με ενδομυϊκή ένεση. Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για τη θεραπεία εξωτερικών ασθενών και μη συνεργάσιμων ατόμων. Ωστόσο, περίπου το 30% των ασθενών αυτών εμφανίζουν εξωπυραμιδικά συμπτώματα. Τα νευροληπτικά φάρμακα δημιουργούν κάποια ανοχή αλλά μικρή μόνο σωματική εξάρτηση.

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες των νευροληπτικών φαρμάκων εμφανίζονται πρακτικά σε όλους τους ασθενείς και είναι σημαντικές σε ποσοστό περίπου

80%. Παρόλο που τα αντιψυχωσικά φάρμακα προκαλούν μια σειρά ανεπιθύμητων ενεργειών, ο θεραπευτικός τους δείκτης είναι υψηλός.

1) Εξωπυραμιδικές ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι ανασταλτικές δράσεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων εξισορροπούνται φυσιολογικά από τις διεγερτικές δράσεις των χολινεργικών νευρώνων. Ο αποκλεισμός των ντοπαμινεργικών υποδοχέων διαταράσσει αυτή την ισορροπία, προκαλώντας μια σχετική επικράτηση της χολινεργικής επίδρασης με αποτέλεσμα την εμφάνιση εξωπυραμιδικών κινητικών συμπτωμάτων. Ο μέγιστος κίνδυνος εμφάνισης των διαφόρων διαταραχών κινητικότητας εξαρτάται από το χρόνο. Οι δυστονίες συμβαίνουν εντός λίγων ημερών θεραπείας, ακολουθούμενες από την ακαθισία. Τα παρκινσονικά συμπτώματα της βραδυκινησίας, της ακαμψίας και του τρόμου εμφανίζονται λίγο αργότερα. Η όψιμη δυσκινησία, η οποία είναι μη αναστρέψιμη, συμβαίνει ύστερα από μήνες ή χρόνια θεραπείας.

Η χρήση φαρμάκων με αντιχολινεργική δράση οδηγεί στην αποκατάσταση μιας νέας, περισσότερο φυσιολογικής ισορροπίας, και τα εξωπυραμιδικά φαινόμενα περιορίζονται στο ελάχιστο. Ο θεραπευτικός ισολογισμός βέβαια είναι λιγότερα εξωπυραμιδικά φαινόμενα σε αντάλλαγμα για τις παρενέργειες που δημιουργούνται από τον αποκλεισμό του παρασυμπαθητικού. Τα φάρμακα εκείνα που έχουν ισχυρή αντιχολινεργική δράση, όπως η θειοριδαζίνη, παρουσιάζουν λίγες εξωπυραμιδικές διαταραχές, γιατί η χολινεργική δράση περιορίζεται έντονα σε αντίθεση με την αλοπεριδόλη και τη φθοριοφαιναζίνη, οι οποίες έχουν μικρή αντιχολινεργική δράση και προκαλούν εξωπυραμιδικά συμπτώματα εξαιτίας του εκλεκτικού αποκλεισμού της ντοπαμινεργικής μεταβίβασης, χωρίς ταυτόχρονο αποκλεισμό της χολινεργικής δράσης.

Τα άτυπα αντιψυχωσικά έχουν μικρή τάση πρόκλησης εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων και μειωμένο κίνδυνο όψιμης δυσκινησίας που έχει αποδοθεί στη δράση τους ως αποκλειστές των 5-HT_{2A} υποδοχέων. Τα φάρμακα αυτά φαίνεται να είναι ανώτερα από την αλοπεριδόλη και τη χλωροπρωμαζίνη όσον αφορά στη θεραπεία των συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας, ιδιαίτερα των αρνητικών συμπτωμάτων. Η ρισπεριδόνη συμπεριλαμβάνεται στα αντιψυχωσικά φάρμακα πρώτης επιλογής, ενώ η κλοζαπίνη θα πρέπει να φυλάσσεται για βαριά πάσχοντες σχιζοφρενείς που δεν ανταποκρίνονται στην παραδοσιακή θεραπεία, καθώς μπορεί να προκαλέσει καταστολή του μυελού των οστών και ανεπιθύμητες ενέργειες από το καρδιαγγειακό. Ο κίνδυνος σοβαρής ακοκκιοκυτταραιμίας καθιστά αναγκαίο τον συχνό έλεγχο του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων.

2) Όψιμη δυσκινησία

Η μακροχρόνια θεραπεία με νευροληπτικά φάρμακα μπορεί να προκαλέσει αυτή την κινητική διαταραχή. Οι ασθενείς εμφανίζουν ακούσιες κινήσεις, όπως πλάγιες κινήσεις της γνάθου και <<κινήσεις σύλληψης εντόμων>> της γλώσσας. Μια παρατεταμένη διακοπή της χορήγησης των νευροληπτικών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό ή ακόμα και την εξαφάνιση των συμπτωμάτων μέσα σε 3 μήνες. Ωστόσο, σε πολλά άτομα, η δυσκινησία είναι μη αναστρέψιμη και επιμένει μετά τη διακοπή της θεραπείας. Η όψιμη δυσκινησία θεωρείται ότι οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των ντοπαμινεργικών υποδοχέων λόγω αυξημένης σύνθεσής τους που αποτελεί απάντηση στον μακροχρόνιο αποκλεισμό των ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Αυτό κάνει τον νευρώνα υπερευαίσθητο στις δράσεις της ντοπαμίνης και έτσι η ντοπαμινεργική δραστηριότητα εξουδετερώνει τη χολινεργική δραστηριότητα, προκαλώντας έτσι την υπερβολική κινητικότητα του ασθενούς.

3) Κακόηθες νευροληπτικό σύνδρομο

Αυτή η δυνητικά θανατηφόρος αντίδραση στα νευροληπτικά φάρμακα χαρακτηρίζεται από μυϊκή ακαμψία, πυρετό, εμβροντησία, ασταθή αρτηριακή πίεση και μυσσφαιριναιμία. Η αντιμετώπιση περιλαμβάνει τη διακοπή του νευροληπτικού και υποστηρικτική θεραπεία με χορήγηση δαντρολένης ή βρωμοκρυπτίνης.

4) Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες

Λόγω της καταστολής του ΚΝΣ, συχνά παρατηρείται νωθρότητα, συνήθως κατά τις δύο πρώτες εβδομάδες θεραπείας. Ορισμένες φορές εμφανίζεται σύγχυση. Συχνά, τα νευροληπτικά προκαλούν ξηροστομία, κατακράτηση ούρων, δυσκοιλιότητα και απώλεια της ικανότητας προσαρμογής των οφθαλμών. Τα φάρμακα αυτά αποκλείουν τους α-αδρενεργικούς υποδοχείς, με αποτέλεσμα τη μείωση της αρτηριακής πίεσης και την εμφάνιση ορθοστατικής υπότασης. Τα νευροληπτικά καταστέλλουν τον υποθάλαμο προκαλώντας αμηνόρροια, γαλακτόρροια, στειρότητα και ανικανότητα. Η σημαντική αύξηση βάρους αποτελεί συχνά λόγο για μη συμμόρφωση.

5) Προφυλάξεις και αντενδείξεις

Η οξεία διέγερση που συνοδεύει τη διακοπή της λήψης αλκοόλ ή άλλων φαρμάκων μπορεί να επιδεινωθεί με τα νευροληπτικά. Η χλωροπρομαζίνη

αντενδείκνυται σε ασθενείς με διαταραχές που προκαλούν σπασμούς, διότι το φάρμακο αυτό μπορεί να ελαττώσει την ουδό έκλυσης των σπασμών. Τα νευροληπτικά μπορούν επίσης να προκαλέσουν επιδείνωση της επιληψίας. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης ακοκιοκυτταραιμίας από την κλοζαπίνη, που αναφέρθηκε παραπάνω, μπορεί να περιορίσει τη χορήγησή της μόνο σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με άλλα φάρμακα. (16)

Δράσεις αντιψυχωσικών στη θεραπεία του καρκίνου

- Γλοιοβλάστωμα

Σε αρκετές μελέτες που έχουν γίνει τα αντιψυχωσικά φάρμακα φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος. Η ολανζαπίνη, ένα άτυπο αντιψυχωσικό, αναστέλλει την ανάπτυξη και προάγει την απόπτωση και την αυτοφαγία σε κύτταρα ανθρώπινου γλοιώματος *in vitro* και *in vivo* (271) και καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του γλοιώματος που οι ιδιότητές τους ομοιάζουν με αυτές των βλαστοκυττάρων (GSLCs) και προάγει τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων σε ολιγοδενδροκύτταρα (259). Κατά παρόμοιο τρόπο, οι Karpel-Massler et al., (264) έδειξαν στη μελέτη τους ότι η ολανζαπίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση και προάγει την απόπτωση και τη νέκρωση σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος και όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τεμοζολαμίδη αυξάνει την ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού σε αυτά τα κύτταρα. Ένας άλλος άτυπος αντιψυχωσικός παράγοντας, η κουετιαπίνη, μειώνει την ανάπτυξη του όγκου στα βλαστοκύτταρα του γλοιώματος, μόνο του ή σε συνδυασμό με την τεμοζολαμίδη, λόγω των ενεργειών του που προάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων που μοιάζουν με ολιγοδενδροκύτταρα (258). Τέλος, η αριπιπραζόλη, παρουσιάζει κυτταροτοξικά αποτελέσματα και προάγει την απόπτωση στα κύτταρα γλοιώματος U251 μαζί με την καταστολή της μεταναστευτικής τους ικανότητας (240).

Τα τυπικά αντιψυχωσικά φαίνεται επίσης να είναι πολύ σημαντικά για τη θεραπεία του γλοιώματος. Τα πρώτα τυπικά αντιψυχωσικά που εισήχθησαν στην ιατρική χρήση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ήταν οι φαινοθειαζίνες. Η χλωροπρομαζίνη, η πρώτη που ανακαλύφθηκε, σε συνδυασμό με νιτροζουρία (BCNU) αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων του γλοιώματος (272) και αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο, προκαλεί διακοπή κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 / M και απόπτωση σε κύτταρα γλοιώματος U87MG και προάγει αυτοφαγία (256). Καταστέλλει επίσης τον πολλαπλασιασμό στα χημειοανθεκτικά GSLCs και στα κύτταρα γλοιώματος και προάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε ανθεκτικά στη τεμοζολαμίδη κύτταρα γλοιώματος (273). Στην ίδια κατηγορία, η θειοριδαζίνη ευαισθητοποιεί τα κύτταρα γλοιώματος U251MG στην απόπτωση που προκαλείται από την πρωτεΐνη TRAIL (268), μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων γλοιοβλαστώματος και ομοίων κυττάρων καρκινικών στελεχών και αυξάνει την αυτοφαγία και την απόπτωση στα κύτταρα GB48401 και U87MG (263). Μια άλλη φαινοθειαζίνη, η τριφλουοπεραζίνη, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων

γλοιοβλαστώματος και την κυτταρική βιωσιμότητα με δοσοεξαρτώμενο και εξαρτώμενο από την κυτταρική σειρά τρόπο (274). Μια άλλη εξέχουσα ομάδα αντιψυχωσικών είναι οι βουτυροφαινόλες, όπου οι μεταβολίτες των προφαρμάκων της αλοπεριδόλης μειώνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε κύτταρα γλοιώματος C6 με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση (275).

Η πενφλουριδόλη είναι ένα ισχυρό αντιψυχωσικό διφαινυλοβουτυλοπιπεριδίνης πρώτης γενιάς που μειώνει την ανάπτυξη των κυττάρων γλοιοβλαστώματος σε δέκα κυτταρικές σειρές *in vitro* και *in vivo* (252) μαζί με τη μείωση των ρυθμιστικών T κυττάρων και την αύξηση των μακροφάγων M1 (276).

Εκτός από τις κατηγορίες που παρουσιάζονται παραπάνω, υπάρχουν άλλοι παράγοντες που χρησιμοποιούνται ως αντιψυχωσικά με ικανότητες αντιμετώπισης του γλοιώματος, ένα από τα οποία είναι το βαλπροϊκό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως στην επιληψία και την σχιζοφρένεια. Οι Chang et al. (265) στη μελέτη τους έδειξαν ότι το βαλπροϊκό οξύ σε συνδυασμό με γκεφτινίμη αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων γλοιώματος U87 και T98, μια δράση που περιλαμβάνει αποπτωτικούς και αυτοφαγικούς μηχανισμούς. Σε άλλες μελέτες, καταστέλλει την αγγειογένεση *in vitro* και *in vivo* (277), ευαισθητοποιεί τα κύτταρα γλοιώματος D384 και T98 σε τεμοζολαμίδη και γ-ακτινοβολία (278) και ενισχύει τον επαγόμενο από την ακτινοβολία θάνατο των κυττάρων C6 (279). Συμπερασματικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το βαλπροϊκό οξύ επάγει την απόπτωση των κυττάρων γλοιώματος U87 μέσω μιας οδού σηματοδότησης ERK / Akt (253). Η ρεσερπίνη είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της υψηλής αρτηριακής πίεσης και έδειξε κάποιες αντιψυχωσικές ικανότητες και όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με υδροχλωρική νιτροζουρία αυξάνει την κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα γλοιώματος C6 *in vitro* και *in vivo* μέσω ενός μηχανισμού που αυξάνει την ενδοκυτταρική πρόσληψη και μειώνει την εκροή του φαρμάκου από τα κύτταρα (280).

- Νεοπλασίες μαστού

Οι αντιψυχωσικοί παράγοντες διαδραματίζουν επίσης κεντρικό ρόλο σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως οι όγκοι του μαστού. Ο παράγοντας θειοριδαζίνη, ο οποίος αναφέρθηκε παραπάνω στην κατηγορία της φαινοθειαζίνης, έδειξε κάποια σημαντικά αποτελέσματα σε πολλές μελέτες. Οι Ke et al., (281) έδειξαν ότι συνδυασμός θειοριδαζίνης και δοξορουβικίνης που χρησιμοποιεί πολυμερικά μικκύλια αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε κυτταρικές σειρές όγκου μαστού BT-474 και MCF-7 *in vitro* και ρυθμίζει προς τα κάτω την ανάπτυξη κυττάρων καρκίνου του μαστού *in vitro* και *in vivo* (282). Καταστέλλει επίσης την αύξηση του όγκου του μαστού σε ποντικούς και προάγει την απόπτωση, μειώνει την ανάπτυξη του όγκου και την αγγειογένεση όγκου σε κύτταρα καρκίνου του μαστού 4T1 ποντικού αναστέλλοντας το μονοπάτι της πρωτεΐνης NFκβ (283). Τέλος, η θειοριδαζίνη καταστέλλει την ανάπτυξη κυττάρων καρκίνου του μαστού MCF-7 *in vitro* (284) και ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB231

σε απόπτωση που επάγεται από την πρωτεΐνη TRAIL (268) (30). Άλλα αντιψυχωσικά, όπως η αριπιπραζόλη, είναι κυτταροτοξικά για τα καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231 του μαστού και αναστέλλουν την ανάπτυξη όγκων σε μοντέλα ποντικών (240), ενώ η πεφλουριδόλη μειώνει την επιβίωση μεταστατικών κυτταρικών γραμμών τριπλού αρνητικού καρκίνου του μαστού μέσω της αναστολής της ιντεγκρίνης β4 (285). Ο παράγοντας τριφλουπεραζίνη φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντοχή σε πολλαπλά φάρμακα. Ο Murren et al., (286) χρησιμοποίησε την τριφλουπεραζίνη για την ευαισθητοποίηση των ασθενών με ανθεκτικό καρκίνο του μαστού στη βινβλαστίνη, ενώ ταυτόχρονα έδειξε παρόμοια αποτελέσματα μαζί με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως η δοξορουμπικίνη (287). Το ίδιο φάρμακο αναστέλλει επίσης τον σχηματισμό αποικιών κυττάρων MDA-MB-231 του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού (288). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο παράγοντας χλωροπρομαζίνη σε συνδυασμό με την ταμοξιφένη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προάγει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την ταμοξιφένη τόσο στα ευαίσθητα στην ταμοξιφένη όσο και στα ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη κύτταρα καρκίνου του μαστού αυξάνοντας τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών (289). Οι Strobl κ.ά., (284) έδειξαν ότι η πιμοζίδη αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και καθυστερεί τη μετάβαση από την φάση G1/G0 σε S στον κυτταρικό κύκλο σε κύτταρα καρκίνου του μαστού.

- Νεοπλασίες πνεύμονα

Τρία από τα αντιψυχωσικά που αναφέρθηκαν παραπάνω δείχνουν την ικανότητα να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα. Ξεκινώντας με τον παράγοντα θειοριδαζίνη, η οποία καταστέλλει την αύξηση και τον σχηματισμό σφαιριδίων των βλαστοκυττάρων NCI-H1299 και 95-D και αυξάνει την ευαισθησία τους σε 5-FU και σισπλατίνη μειώνοντας τον πληθυσμό των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο σε φάση G0/G1 και μειώνοντας τη φωσφορυλίωση Akt της πρωτεΐνης (246). Σε μια πρόσφατη μελέτη, η θειοριδαζίνη προάγει τον κυτταρικό θάνατο, την εξαρτώμενη από κασπάσες απόπτωση (μείωση της προκασπάσης-8 και μείωση της PARP) και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου που σχετίζεται με τις πρωτεΐνες Akt/CDK2 στα καρκινικά κύτταρα που ομοιάζουν με πνευμονικά στελέχη A549 και τέλος, αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου in vivo (290). Η τριφλουπεραζίνη θα μπορούσε να λειτουργήσει ως αντικαρκινικός παράγοντας καθώς αυξάνει την απόπτωση των CSC (cancer-stem like cells) των πνευμόνων και μειώνει το ποσοστό αυτών των κυττάρων. Καταστέλλει επίσης τον πολλαπλασιασμό και αυξάνει την απόπτωση σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) που είναι ανθεκτικά στη γκεφινίμπη. Η τριφλουπεραζίνη αναστέλλει επίσης τον σχηματισμό σφαιριδίων των CSC των πνευμόνων και έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των πνευμονικών CSC in vitro σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία (291). Τα ίδια αποτελέσματα ελήφθησαν από τους Polischouk et al., (292), που έδειξαν ότι η τριφλουπεραζίνη ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της μπλεομυκίνης σε κύτταρα NSCLC U1810 και αυξάνει το ποσοστό των θραυσμάτων του κλώνου του DNA που προκαλείται από μπλεομυκίνη. Αναστέλλει επίσης την αποκατάσταση της επαγόμενης από την μπλεομυκίνη

ρήξης του δίκλωνου κλώνου και μειώνει την αποκατάσταση των ρήξεων αυτών από την πρωτεΐνη NHE1. Τέλος, η κλοζαπίνη καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις κυτταρικές σειρές καρκινώματος μη μικροκυτταρικού πνεύμονα A549 και H1299 προκαλώντας αυτοφαγικό αλλά όχι αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο μέσω της αύξησης των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών p21 και p27 (293).

- Γυναικολογικές νεοπλασίες

Ο παράγοντας θειοριδαζίνη, εκτός από το γλοίωμα, τον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα, παίζει επίσης βασικό ρόλο στους γυναικολογικούς όγκους. Αυτό το φάρμακο εμποδίζει την ανάπτυξη και εξέλιξη των 2774 καρκινικών κυττάρων ωοθήκης και αναστέλλει την αγγειογένεση του όγκου ίη νίνο αναστέλλοντας το μονοπάτι VEGFR-2/PI3K/mTOR (245), ενώ ταυτόχρονα μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και προάγει την απόπτωση σε κύτταρα καρκίνου των ωοθηκών αναστέλλοντας την ίδια οδό (251). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, η θειοριδαζίνη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και προάγει την απόπτωση, την αυτοφαγία και την παραγωγή του μορίου ROS στα κύτταρα καρκίνου των ωοθηκών SKOV3 και A2780 μέσω της οδού σηματοδότησης Akt/ERK in vitro, ενώ αναστέλλει και την ανάπτυξη όγκου σε ξενομοσχεύματα (250). Οι Meng κ.ά., (248) έδειξαν ότι ο συνδυασμός της θειοριδαζίνης και της οξικής μεδροξυπρογεστερόνης μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και αυξάνει την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα ISK και KLE μέσω της αναστολής του μονοπατιού PI3K / Akt, η οποία μεσολαβείται από τους παράγοντες PRB, DRD2 και EGFR. Σε άλλες μελέτες, η θειοριδαζίνη αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο των κυττάρων SiHa του τραχήλου της μήτρας και προάγει την απόπτωση και τη νέκρωση αυτών των κυττάρων μέσω της μείωσης του παράγοντα DRD2 (294) και μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa, Caski, C33A0) και του ενδομητρίου (HEC-1-A, KLE) μέσω της αναστολής της φωσφορυλίωσης του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR/p70S6K (247). Τα ίδια αποτελέσματα λήφθηκαν σε τρεις μελέτες που χρησιμοποιήθηκε το φάρμακο βαλπροϊκό οξύ, το οποίο ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων HeLa (295), αύξησε την επιβίωση σε ποντίκια που νοσούσαν από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (296) και ανέστειλε το δυνατότητα αγγειογένεσης του καρκίνου του τραχήλου (297).

- Γαστρεντερικές νεοπλασίες

Οι γαστρεντερικοί όγκοι, όπως οι γαστρικοί, οι στοματικοί, οι οισοφαγικοί και οι καρκίνοι του παχέος εντέρου, έδειξαν αυξημένη ευαισθησία στην αγωγή με αντιψυχωσικά φάρμακα. Σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου NCI-N87 και AGS, η θειοριδαζίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο και απόπτωση κυττάρων με τρόπο εξαρτώμενο από τις κασπάσες in vitro και αναστέλλει την ανάπτυξη όγκου σε ποντίκια (266). Στις κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου MKN-1 και καρκινώματος του κόλον CT26, η αριπιπραζόλη παρουσιάζει αυξημένη κυτταροτοξικότητα και αναστέλλει την ανάπτυξη όγκου σε μοντέλα ποντικού (240). Ο παράγοντας θειοριδαζίνη αναστέλλει επίσης τον πολλαπλασιασμό

και προάγει την απόπτωση σε κύτταρα SW480 ανθρώπινου καρκίνου του παχέος εντέρου με αυξημένη ρύθμιση της PDCD4 και αναστολή του μονοπατιού PI3K/Akt (244). Τα ίδια αποτελέσματα ελήφθησαν μετά από αγωγή με χλωροπρομαζίνη, η οποία αυξάνει την απόπτωση σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου μέσω της αναστολής της επαγόμενης από το JNK πρωτεΐνης SIRT1 και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 (270). Η αναστολή του μονοπατιού Wnt/ β -κατενίνης από την πιμοζίδη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την ανάπτυξη του όγκου *in vitro* και *in vivo* σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου (260). Τέλος, η θειοριδαζίνη αυξάνει την ευαισθητοποίηση σε ανθεκτικά στα φάρμακα στοματικά καρκινικά κύτταρα KBV20C με προώθηση της απόπτωσης και καταστολή της δραστηριότητας της P-γλυκοπρωτεΐνης (298), και όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ακτινοβολήση προάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G0/G1 και την απόπτωση των ECA-109 και TE-1 καρκινικών κυττάρων οισοφάγου *in vitro*. Το φάρμακο αυτό μειώνει επίσης την ανάπτυξη του όγκου σε ξеноμοσχέυματα ποντικού μέσω της αναστολής του μονοπατιού σηματοδότησης PI3K/Akt/m-TOR και της αύξησης της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 (249).

- Νευροβλάστωμα

Τα αντιψυχωσικά φάρμακα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία του νευροβλαστώματος, ενός τύπου καρκίνου που σχηματίζεται σε ορισμένους τύπους νευρικών ιστών. Οι Gil-Ad et al., (269) έδειξαν ότι η θειοριδαζίνη προάγει τον κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα SH-SY5Y του νευροβλαστώματος αυξάνοντας τη δραστηριότητα της κασπάσης-3. Παρόμοια αποτελέσματα που περιλαμβάνουν τον ίδιο μηχανισμό λήφθηκαν μετά από θεραπεία με αλοπεριδόλη, η οποία προκαλεί κυτταρικό θάνατο, μειώνει την κυτταρική βιωσιμότητα και αυξάνει την απόπτωση στα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH με αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-3 (299). Είναι ενδιαφέρον ότι ο αντιψυχωσικός παράγοντας σερτινδόλη, ένας παράγοντας που δεν έδειξε καμία επίδραση σε άλλους τύπους καρκίνου, φαίνεται να παίζει έναν κεντρικό ρόλο στη θεραπεία του νευροβλαστώματος, καθώς προκαλεί το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων και της μετατροπής της LC3 και αυξάνει την παραγωγή του μορίου ROS που οδηγεί σε θάνατο τα καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y με αυτοφαγία (300).

- Αιματολογικές διαταραχές

Ο ρόλος των αντιψυχωσικών στη θεραπεία της λευχαιμίας δεν έχει ακόμη αποδειχθεί, αλλά υπάρχουν μερικές μελέτες που εξετάζουν αυτή τη πιθανότητα. Το βαλπροϊκό οξύ μαζί με αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η κλοφαραβίνη (301) ή η κυτταραβίνη (302) επάγουν την κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα παιδικής οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Οι Karp et al., (303) έδειξαν ότι ο προαναφερθείς αντιψυχωσικός παράγοντας αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει απόπτωση στα πρωτογενή κύτταρα

λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Μια άλλη αντιψυχωσική ουσία, η ρεσερπίνη, αυξάνει την κυτταροτοξικότητα της επιρουβικής σε κύτταρα λευχαιμίας ποντικού P388 με ενίσχυση της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης επιρουβικής (304). Ο ίδιος μηχανισμός ήταν υπεύθυνος για την αυξημένη κυτταροτοξικότητα της μιτοξανθρόνης και της αδριαμυκίνης σε συνδυασμό με ρεσερπίνη σε ανθρώπινα κύτταρα χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (305).

- Ηπατικές και παγκρεατικές νεοπλασίες

Υπάρχουν τρεις παράγοντες που εμφανίζουν κάποια επίδραση σε αυτούς τους τύπους καρκίνου. Η θειοριδαζίνη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό, τον σχηματισμό σφαιρών και τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) σε καρκινικά κύτταρα LM3, Huh7 και SNU449, προκαλώντας αναστολή της φάσης G0/G1 του κυτταρικού κύκλου και αναστολής των γονιδίων CD133, OCT4 και EpCam (306). Ένα άλλο αντιψυχωσικό φάρμακο, η πιμοζίδη μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος προκαλώντας διακοπή κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1, αναστέλλει την αυτοανανέωση και τη μετανάστευση και μειώνει τον όγκο σε ποντικούς αναστέλλοντας την σηματοδότηση STAT3. Η χρήση του ίδιου παράγοντα στο ίδιο ακριβώς καρκίνωμα έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της απόπτωσης μέσω της αναστολής της οδού Wnt/ β -κατενίνης (242). Οι Ranjan et al., (308), έδειξαν ότι η πενφλουριδόλη μειώνει την ανάπτυξη του όγκου παγκρεατικών κυττάρων λόγω απόπτωσης που προκαλείται από αυτοφαγία. Αυτό βρέθηκε να ρυθμίζεται με την επαγωγή ενδοπλασματικού στρες στο δίκτυο αυτών των κυττάρων.

- Σάρκωμα

Η τριφλουοπεραζίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο κατά της μετάστασης, καθώς καταστέλλει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και εμποδίζει την αγγειογένεση στα κύτταρα HT1080 του ανθρώπινου ινοσαρκώματος, ακολουθώντας έναν μηχανισμό που σχετίζεται με τους παράγοντες DRD2, Akt και β -κατενίνη (261). Ο νευροληπτικός παράγοντας πιμοζίδη μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τον σχηματισμό αποικιών και σφαιρών, προάγει την απόπτωση και προκαλεί την διακοπή κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 σε ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος αναστέλλοντας την σηματοδότηση της Erk και προωθώντας την παραγωγή του μορίου ROS (255).

- Μελάνωμα

Η κλοζαπίνη μειώνει τον πολλαπλασιασμό σε πρωτεύουσες κυτταρικές σειρές μεμβρανών WM35 και μεταστατικών κυττάρων μελανώματος M1 / 15 in vitro και κλοζαπίνη μαζί με αυξημένη ισταμίνη και επιβραδύνει τον όγκο των ποντικών αυξάνοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης ERK1 / 2 (254).

- Νεοπλασίες προστάτη

Η πιμοζίδη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη, ενεργοποιεί τη διακοπή κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 και αναστέλλει τη μετανάστευση κυττάρων αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 (241).

Μηχανισμοί σηματοδότησης αντιψυχωσικών φαρμάκων στη θεραπεία του καρκίνου

- *Σηματοδότηση μέσω JAK / STAT που προκαλείται από αντιψυχωσικά.*

Η οδός σηματοδότησης JAK/STAT περιλαμβάνει μια αλυσίδα αλληλεπιδράσεων σε ένα κύτταρο, η οποία κατέχει κεντρικό ρόλο στον κυτταρικό θάνατο και στον σχηματισμό όγκων. Τα αντιψυχωσικά φάρμακα φαίνεται να ασκούν κάποιες δράσεις ενεργοποιώντας το μονοπάτι JAK/STAT, μια ενέργεια που οδηγεί ως επί το πλείστον στη μείωση του όγκου. Η αριπιπραζόλη προάγει την απόπτωση στα κύτταρα γλοιώματος U251 και καταστέλλει τη μεταναστευτική δραστηριότητα τους, αναστέλλοντας την οδό PI3K/STAT3 και την ενεργοποίηση της Src, μιας ογκογόνου κινάσης τυροσίνης (240). Η μετανάστευση κυττάρων ρυθμίζεται προς τα κάτω μέσω αναστολής της ενεργοποίησης σηματοδότησης της STAT3 μετά από θεραπεία με πιμοζίδη σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη (241), ενώ η θεραπεία με πιμοζίδη αναστέλλει τη μετανάστευση σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος με τον ίδιο μηχανισμό (242).

- *Σηματοδότηση μη μεσολαβούμενη από τον παράγοντα STAT που προκαλείται από αντιψυχωσικά*

➤ **PI3K / Akt μονοπάτι**

Η πρωτεϊνική κινάση B, επίσης γνωστή ως Akt, είναι μια ειδική πρωτεϊνική κινάση σερίνης / θρεονίνης που παίζει βασικό ρόλο σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η μεταγραφή και η κυτταρική μετανάστευση και βρίσκεται στο μονοπάτι παρακάτω από την πρωτεΐνη PI3-K. Η ενεργοποίηση του Akt οδηγεί σε ενεργοποίηση είτε του mTORC1 είτε του mTORC2, τα οποία είναι απαραίτητα για την προαγωγή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των φυσιολογικών κυττάρων και για την αναστολή της απόπτωσης. Αυτή η οδός ρυθμίζεται προς τα πάνω σε διάφορους καρκίνους και έχει μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη της νόσου (243). Οι περισσότερες από τις δράσεις που

παρέχονται από τους αντιψυχωσικούς παράγοντες φαίνεται ότι συμβαίνουν με την αναστολή της οδού PI3K / Akt. Οι Liu et al. (244) παρείχαν αποδείξεις αυτής της αναστολής σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου χρησιμοποιώντας τον αντιψυχωσικό παράγοντα θειοριδαζίνη, ο οποίος ρυθμίζει προς τα κάτω τον πολλαπλασιασμό και προάγει την απόπτωση μέσω αυτής της οδού. Περαιτέρω, η *in vivo* αγγειογένεση του όγκου σε κύτταρα καρκίνου των ωθηκών αναστέλλεται από το ίδιο φάρμακο μέσω της καταστολής της οδού VEGFR-2/PI3K/mTOR (245). Επιπλέον, η θειοριδαζίνη μειώνει τη φωσφορυλίωση του Akt σε βλαστικά κύτταρα του πνεύμονα, οδηγώντας στην καταστολή της ανάπτυξης τους (246) και ελαττώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας και του ενδομητρίου αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση της οδού PI3K / Akt / mTOR / p70S6K (247). Ο συνδυασμός της θειοριδαζίνης και της οξικής μεδροξυπρογεστερόνης αυξάνει την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του ενδομητρίου ρυθμίζοντας προς τα κάτω την οδό μεταγωγής σήματος PI3K/AKT, η οποία μεσολαβείται από τους παράγοντες PRB, DRD2 και EGFR (248). Η σημασία της αναστολής της τρέχουσας οδού για τον αντιψυχωσικό παράγοντα θειοριδαζίνη απεδείχθη επίσης με τη μείωση της ανάπτυξης του οισοφαγικού καρκινώματος (249) και την προώθηση της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα των ωθηκών μέσω της οδού σηματοδότησης Akt / ERK (250) ή το μονοπάτι PI3K / Akt (251). Η οδός PI3K / Akt θεωρείται επίσης πολύ σημαντική για άλλους αντιψυχωσικούς παράγοντες, καθώς η πενφλουριδόλη μειώνει την ανάπτυξη του όγκου του γλοιοβλαστώματος μέσω της αναστολής του GLI1 που ρυθμίζεται από Akt (252) και το βαλπροϊκό οξύ προκαλεί απόπτωση κυττάρων γλοιώματος μέσω μιας οδού σηματοδότησης ERK / Akt (253). Η οδός σηματοδότησης ERK διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου καθώς η κλοζαπίνη μειώνει τον πολλαπλασιασμό σε πρωτεύουσες κυτταρικές σειρές WM35 και μεταστατικές κυτταρικές σειρές μελανώματος M1/15 *in vitro* και η κλοζαπίνη μαζί με ισταμίνη αυξάνει τη μέση επιβίωση και μειώνει την έκταση του όγκου σε ποντίκια αυξάνοντας την φωσφορυλίωση της ERK1/2 (254). Επιπρόσθετα η πιμοζίδη μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τον σχηματισμό αποικιών και σφαιρών και προάγει την απόπτωση αναστέλλοντας την σηματοδότηση Erk και προωθώντας την παραγωγή ROS (255). Συμπερασματικά, η χλωροπρομαζίνη αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο, την απόπτωση και προάγει την αυτοφαγία σε κύτταρα γλοιώματος αναστέλλοντας την οδό σηματοδότησης Akt / mTOR (256).

➤ Wnt / β-κατενίνη

Η οδός Wnt / β-κατενίνης είναι μια οδός μεταγωγής σήματος, η οποία είναι κρίσιμη για πολλές διεργασίες, όπως η μετανάστευση κυττάρων και η εμβρυογένεση (257). Ο ρόλος αυτής της οδού στον καρκίνο είναι πολύ σημαντικός, καθώς επηρεάζει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των καρκινικών βλαστοκυττάρων. Η κουετιαπίνη μειώνει την ανάπτυξη των κυττάρων του γλοιώματος προάγοντας τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων του γλοιώματος σε κύτταρα που μοιάζουν με ολιγοδενδροκύτταρα μέσω της αναστολής αυτής της συγκεκριμένης οδού (258). Επιπλέον, η ολανζαπίνη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των

κυττάρων γλοιώματος που οι ιδιότητές τους ομοιάζουν αυτές των βλαστοκυττάρων και προάγει τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων σε κύτταρα που μοιάζουν με ολιγοδενδροκύτταρα με αναστολή της οδού σηματοδότησης Wnt / β-κατενίνης και ενεργοποίηση του CaSR (259). Η αναστολή της οδού Wnt / β-κατενίνης από την πιμοζίδη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την ανάπτυξη του όγκου *in vitro* και *in vivo* σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου (260) και μειώνει τον πολλαπλασιασμό και προάγει την απόπτωση στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Οι Pulkoski-Gross et al., (261) έδειξαν ότι ο συνδυασμός των δύο οδών θα μπορούσε να είναι πολύ κρίσιμος στην ανάπτυξη του καρκίνου, ενώ η τριφλουπεραζίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο κατά της μετάστασης λόγω της καταστολής της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων και της πρόληψης της αγγειογένεσης στο ανθρώπινο ινοσάρκωμα HT1080, ακολουθώντας έναν μηχανισμό που σχετίζεται με τους παράγοντες DRD2, Akt και β-κατενίνη.

➤ AMPK pathway

Η οδός AMPK διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση του όγκου των κυττάρων, του μεταβολισμού και πιο σημαντικού, της αυτοφαγίας (262). Οι Cheng et al. (263) έδειξαν ότι η θειοριδαζίνη μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων γλοιοβλαστώματος και των κυττάρων που μοιάζουν με καρκινικά στελέχη και αυξάνει την αυτοφαγία και την απόπτωση στα κύτταρα GB48401 και U87MG μέσω ενεργοποίησης της AMPK. Επιπλέον, η ολανζαπίνη προάγει την απόπτωση και τη νέκρωση σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος μέσω της μείωσης του φωσφορυλιωμένου AMPK (264). Τέλος, το βαλπροϊκό οξύ σε συνδυασμό με τη γκεφιτινίμη αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων γλοιώματος U87 και T98, μια δράση που περιλαμβάνει αποπτωτικούς και αυτοφαγικούς μηχανισμούς όπως σηματοδότηση LKB1/AMPK (265).

- *Γονίδια και πρωτεΐνες απόπτωσης*

Η απόπτωση είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που είναι πολύ κρίσιμη για την ομοιοστάση των κυττάρων και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε διάφορες ασθένειες, όπως ο καρκίνος. Η οδός απόπτωσης ρυθμίζεται από διάφορα γονίδια ή/και πρωτεΐνες, που είναι στόχος πολλών αντιψυχωσικών παραγόντων, οδηγώντας τελικά σε μη προγραμματισμένη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Οι Mu et al., (266) έδειξαν ότι η θειοριδαζίνη προάγει τον κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση κυττάρων στα κύτταρα του γαστρικού καρκίνου μειώνοντας τα μόρια προκασπάσης, αποτέλεσμα που παρατηρείται επίσης στην απόπτωση των κυττάρων πνεύμονα που μοιάζουν με τα βλαστοκύτταρα (267). Επιπλέον, ο ίδιος παράγοντας ευαισθητοποιεί τον καρκίνο του κυττάρου, το καρκίνωμα του μαστού και τα κύτταρα του γλοιώματος στην απόπτωση που προκαλείται από τον παράγοντα TRAIL με μείωση των Mcl-1 και C-FLIP (268) και προάγει τον κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος αυξάνοντας την κασπάση-3 (269). Η αποπτωτική οδός

ακολουθείται επίσης από άλλα αντιψυχωσικά φάρμακα, όπως η χλωροπρομαζίνη, η οποία αυξάνει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μέσω της αναστολής του παράγοντα SIRT1 με τη μεσολάβηση της JNK και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 (270) και της ολανζαπίνης που αναστέλλει την ανάπτυξη και προάγει την απόπτωση και την αυτοφαγία σε κύτταρα ανθρώπινου γλοιώματος *in vitro* και *in vivo* μέσω της μείωσης των Bcl-2 και p62 και αύξησης της κασπάσης-3 (271).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Θρεπτικά μέσα των χρησιμοποιούμενων κυττάρων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων U87MG, T98 και U251MG (ανθρώπινων κυττάρων γλοιώματος). Σε όλα τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν προστέθηκαν τα ακόλουθα: βόειος εμβρυϊκός ορός (fetal bovine serum, FBS) σε συγκέντρωση 10% και 1% αναλογία πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα αντιβιοτικά αυτά προστατεύουν το θρεπτικό υλικό από μόλυνση από βακτήρια. Στη συνέχεια του κειμένου, όταν αναφέρονται θρεπτικά υλικά για κυτταροκαλλιέργειες, θα θεωρούνται ότι περιέχουν τα παραπάνω αντιβιοτικά. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε 37 °C, 5% CO₂ και 100% υγρασία.

Το πλήρες θρεπτικό μέσο έχει ως εξής:

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 90% κ.ό.

Διατίθεται στο εμπόριο σε μπουκάλι 500ml και διατηρείται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4 °C.

FBS 10%

Διατηρείται στην κατάψυξη -20 °C. Από το δοχείο του εμπορίου διαχωρίζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 50 ml για να ξεπαγώνει όσο απαιτείται.

L- γλουταμίνη (εμπεριέχεται ως συστατικό στο μπουκάλι που διατίθεται στο εμπόριο)

1% πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη

2. Παρασκευή Trypsin/EDTA

Από το εμπόριο προμηθευόμαστε Trypsin/EDTA 10x, την οποία διαχωρίζουμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml και καταψύχουμε στους -20 °C. Αφού πρώτα καθαρίσουμε τον θάλαμο νηματικής ροής με αιθανόλη 70%,

ξεπαγώνουμε την Trypsin/EDTA και την τοποθετούμε στο θάλαμο, μαζί με PBS και ένα αποστειρωμένο δοχείο των 100 ml. Αναμειγνύουμε στο τελικό δοχείο τα 10 ml Trypsin/EDTA με 90 ml PBS και το τοποθετούμε στο ψυγείο στους 4 °C.

3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Υλικά και διαλύματα

PBS (10x)

Διατίθεται από το εμπόριο ως έτοιμο διάλυμα:

Na₂HPO₄ 0.1 M

KH₂PO₄ 0.05 M

NaCl 0.2 M

Αραιώνεται σε dH₂O 10 φορές πριν τη χρήση (PBS 1x, pH 7.4).

Πλήρες θρεπτικό μέσο της κάθε κυτταρικής σειράς (αναφέρεται αναλυτικά στην Παράγραφο 1)

Τρυψίνη/EDTA

(0,05- 0,02% σε PBS χωρίς Ca²⁺)

Αιματοκυτταρόμετρο

Πιπέτες Pasteur (αποστειρωμένες)

Αποστειρώνονται για 20 λεπτά σε 121°C (αυτόκαυστο).

Πειραματική πορεία

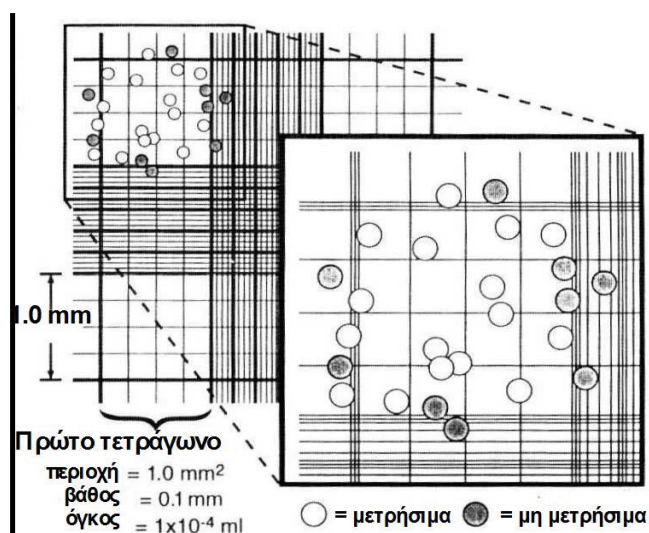
1. Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Η μορφολογία των κυττάρων είναι ενδεικτική της κατάστασής τους. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου στο οποίο καλλιεργούνται. Ο προσδιορισμός του βαθμού κάλυψης γίνεται με παρατήρηση του τρυβλίου στο μικροσκόπιο. Κύτταρα υγιή θεωρούνται αυτά που είναι προσκολλημένα στον πυθμένα του τρυβλίου χωρίς να έχει αλλάξει η μορφολογία τους.
2. Μεταφορά του τρυβλίου σε θάλαμο νηματικής ροής, όπου είναι δυνατή η εργασία υπό στείρες συνθήκες.

3. Αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας με πιπέτα Pasteur υπό κενό.
4. Έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με PBS 1x. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται τυχόν εναπομείναντα ίχνη ορού, τα οποία περιέχουν αναστολείς τρυψίνης.
5. Προσθήκη 1ml τρυψίνης ανά τρυβλίο.
6. Αναμονή για 5 λεπτά μέχρι να επέλθει η αποκόλληση των κυττάρων. Η διαδικασία δύναται να πραγματοποιηθεί και εντός του επωαστικού κλιβάνου όπου επικρατεί θερμοκρασία 37 °C για την ίδια ώρα.
7. Παρατήρηση της αποκόλλησης των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Υπό την επίδραση της τρυψίνης, τα κύτταρα αποκτούν σφαιρική μορφή και αποκολλώνται από το υπόστρωμα. Η επιβίωση των κυττάρων κινδυνεύει σε περίπτωση παραμονής πλέον των 10 λεπτών στην τρυψίνη.
8. Με την ολοκλήρωση της αποκόλλησης των κυττάρων η τρυψίνη αναστέλλεται με την προσθήκη 2 ml πλήρους θρεπτικού μέσου.
9. Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε αποστειρωμένο σωλήνα των 15 ml. Ακολουθεί ήπιο ξέπλυμα με διάλυμα PBS 1X και μεταφορά των κυττάρων που έχουν απομείνει στο τρυβλίο.
10. Φυγοκέντρηση στα 500g για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, ακολουθεί μεταφορά του σωλήνα στο θάλαμο νηματικής ροής και αναρρόφηση του υπερκειμένου με πιπέτα Pasteur υπό κενό (δύναται να εφαρμοστεί και απόχυση του υπερκειμένου σε νεροχύτη, μέθοδος που δεν προτιμάται).
12. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 3ml πλήρους θρεπτικού μέσου με τη βοήθεια πιπέτας.
13. Προσθήκη 10μl από το εναιώρημα των κυττάρων στην ειδική υποδοχή του αιματοκυτταρόμετρου και μέτρηση του αριθμού των κυττάρων.
14. Υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων.
15. Για κάθε ανακαλλιέργεια χρησιμοποιούνται 500.000 κύτταρα ανά ml πλήρους θρεπτικού μέσου, εκτός από τις περιπτώσεις που τα κύτταρα θα χρησιμοποιηθούν σε ειδικά πειράματα.

4. Μέτρηση κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer

Η μέτρηση κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο είναι η πιο άμεση, απλή και αποδοτική μέθοδος μέτρησης κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Σε κάθε μία από αυτές διακρίνεται μια διαγράμμιση σε μορφή τετραγωνισμένου πλέγματος, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (εμβαδόν τετραγώνου 1 mm²). Το κάθε τετράγωνο ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2,5 μm, και οι οποίες χρησιμεύουν για τον καθορισμό της θέσης των κυττάρων εντός ή εκτός του πλέγματος. Σε κάθε ένα από τα αρχικά τετράγωνα περιέχονται επιπλέον διαβαθμίσεις για διευκόλυνση της μέτρησης των κυττάρων. Το αιματοκυτταρόμετρο εμφανίζει δύο ίσου μεγέθους, λείες, προεξέχουσες επιφάνειες, με επίπεδο παράλληλο με τις διαγραμμισμένες, που ονομάζονται <<ράχες>> και στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Οι διαγραμμισμένες επιφάνειες βρίσκονται 0,1 mm χαμηλότερα από τις <<ράχες>>. Μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα, υπάρχει μία κοίλη επιφάνεια. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια τοποθετείται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 0,1 mm³ (1mm² x 0,1mm) ή 10⁻⁴ml. Έτσι η συγκέντρωση των κυττάρων στο κυτταρικό εναιώρημα (κύτταρα/ml) είναι:

Αριθμός κυττάρων στο ένα από τα κύρια τετράγωνα x 10.000



5. Κατάψυξη κυττάρων

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο διάστημα είναι δυνατή με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο, σε θερμοκρασίες μεταξύ -195°C και -210°C. Για μικρότερο χρονικό διάστημα (λίγους μήνες), μπορεί να διατηρηθεί ακόμη και σε θερμοκρασίες -80°C. Για την επιτυχή διατήρησή τους, είναι απαραίτητη η καλή μεταβολική τους κατάσταση πριν τη ψύξη, για το λόγο αυτό και η διαδικασία κατάψυξης των κυττάρων πραγματοποιείται όταν αυτά έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου. Για την επιτυχή κατάψυξή τους, είναι απαραίτητη και η βαθμιαία ψύξη τους, μέχρι ένα κρίσιμο σημείο θερμοκρασίας -20°C. Προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού χρησιμοποιείται διμεθυλο- σουλφοξείδιο (dimethyl-sulfoxide, DMSO).

Υλικά και διαλύματα

Διμεθυλο- σουλφοξείδιο (dimethyl-sulfoxide, DMSO)

Πρέπει να είναι ειδικό για κυτταροκαλλιέργειες

Πλήρες θρεπτικό μέσο (αναφέρεται αναλυτικά στην Παράγραφο 1)

FBS

Ειδικά φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryotubes)

Δοχείο Dewar με υγρό άζωτο και ειδικές υποδοχές για την αποθήκευση των φιαλιδίων με τα κύτταρα

Πειραματική πορεία

1. Αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη (όπως αναφέρθηκε στη διαδικασία της ανακαλλιέργειας). Τα κύτταρα από 1 τρυβλίο 100 mm αποθηκεύονται σε ένα φιαλίδιο.
2. Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές/λεπτό.
3. Σημειώνονται στο φιαλίδιο το όνομα της κυτταρικής σειράς, η ημερομηνία κατάψυξης και η γενιά των κυττάρων.
4. Αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο.
5. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 900 μl πλήρους θρεπτικού μέσου.
6. Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων στο ειδικό φιαλίδιο για την ψύξη των κυττάρων (cryotube).
7. Προσθήκη της ποσότητας DMSO που απαιτείται (100 μl). Την προσθήκη του DMSO ακολουθεί γρήγορη ανάδευση με πιπέτα. Οι κινήσεις πρέπει να είναι σύντομες, γιατί το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η τελική συγκέντρωση του DMSO δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20% στο τελικό διάλυμα για να αποφευχθούν προβλήματα τοξικότητας, ενώ η προσθήκη του μειώνει τη δημιουργία κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό των κυττάρων.
8. Τοποθέτηση του δοχείου ψύξης των κυττάρων στους -80°C για 72 ώρες. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας.
9. Τοποθέτηση του φιαλιδίου για την ψύξη των κυττάρων σε ειδική υποδοχή βυθισμένη σε υγρό άζωτο στο δοχείο Dewar.

10. Καταγραφή στο τετράδιο του δοχείου Dewar της θέσης που βρίσκεται το φιαλίδιο, του είδους των κυττάρων, της ημερομηνίας και της γενιάς που θα έχουν τα κύτταρα όταν ξεπαγώσουν.

6. Απόψυξη κυττάρων

Με τη διαδικασία αυτή, κύτταρα που βρίσκονται παγωμένα ακόμα και για μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι δυνατό να οδηγηθούν σε καλλιέργεια. Λόγω της τοξικότητας του DMSO, οι κινήσεις στη διαδικασία αυτή, όπως και στην κατάψυξη, πρέπει να είναι γρήγορες.

Υλικά και διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό μέσο της κάθε κυτταρικής σειράς (αναφέρεται αναλυτικά στην Παράγραφο 1)

Πιπέτες Pasteur (αποστειρωμένες)

Αποστειρώνονται για 20 λεπτά σε 121 °C (αυτόκαυστο).

Πειραματική πορεία

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml προστίθεται 1 ml θρεπτικού μέσου των συγκεκριμένων κυττάρων.
2. Αφαίρεση των κυττάρων από το υγρό άζωτο.

3. Σύντομο ξεπάγωμα με ανακίνηση σε υδατόλουτρο στους 37°C.
4. Μεταφορά των κυττάρων στο σωλήνα με το 1 ml και γρήγορη ανάδευση. Το στάδιο αυτό αποσκοπεί στην αραίωση του DMSO στο θρεπτικό μέσο που βρίσκονται τα κύτταρα.
5. Φυγοκέντρηση στα 500g για 4 λεπτά.
6. Απόρριψη του υπερκείμενου με πιπέτα Pasteur υπό κενό.
7. Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1 ml θρεπτικού μέσου στο δοκιμαστικό σωλήνα.
8. Προσθήκη 9 ml θρεπτικού μέσου σε τρυβλίο καλλιέργειας και τοποθέτηση των κυττάρων από το δοκιμαστικό σωλήνα με έντονη ανάδευση.
9. Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
10. Μεταφορά του τρυβλίου στον επωαστικό θάλαμο.
11. Αλλαγή θρεπτικού μέσου κάθε 3 ημέρες μέχρι τα κύτταρα να φθάσουν σε βαθμό επικάλυψης του τρυβλίου 80-90%.

7. Απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων

Η μέθοδος αυτή της απομόνωσης των πρωτεϊνών εφαρμόζεται για την απομόνωση πρωτεϊνών από κυτταροκαλλιέργειες, παγωμένες και μη.

Υλικά και διαλύματα

PBS (10x)

Na₂HPO₄ 0.1 M

KH₂PO₄ 0.05 M

NaCl 0.2 M

Αραιώνεται σε dH₂O 10 φορές πριν τη χρήση (PBS 1x, pH 7.4).

Διάλυμα RIPA (RIPA buffer) (pH 7.4)

PBS 1x

Δωδεκακυλοθειϊκό Νάτριο (sodium dodecyl sulfate SDS) 0.1%

Triton X-100 1%

PMSF 1 mM

EDTA 5 mM

Απρωτινίνη 1 μg/ml

Πεπστατίνη 0,5 μg/ml

Λευπεπτίνη 0,25 μg/ml

Na₃VO₄ 20 nM

Πειραματική πορεία

1. Απομάκρυνση υπό κενό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας.
2. Έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με PBS 1x στους 4 °C.
3. Προσθήκη 600 μl ψυχρού διαλύματος RIPA ανά τρυβλίο 100 mm ή 300 μl ψυχρού διαλύματος RIPA ανά τρυβλίο 60 mm, στους 4 °C.
4. Παραμονή των τρυβλίων στους 4 °C σε οριζόντια θέση για χρόνο 10 λεπτά, ώστε να μεγιστοποιηθεί η ποσότητα των εκχυλιζόμενων πρωτεϊνών. Το διάλυμα RIPA πρέπει να καλύπτει ιδανικά το τρυβλίο. Εάν όχι, πρέπει να πραγματοποιούνται τακτικές αναδεύσεις των τρυβλίων.
5. Λύση των κυττάρων με μηχανικό τρόπο (cell scraper) σε πάγο και με εφαρμογή υπερήχων. Η εφαρμογή των υπερήχων γίνεται με έκθεση του διαλύματος σε υπερήχους για 10 δευτερόλεπτα για 4 φορές με μεσοδιάστημα 15 δευτερολέπτων.
6. Μεταφορά του ομογενοποιημένου σε σωληνάρια φυγοκέντρου.
7. Φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 20 λεπτά στους 4 °C.
8. Μεταφορά του υπερκλειμένου σε νέο σωλήνα erpendorf και μεταφορά στην κατάψυξη -20 °C.

8. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Υλικά και διαλύματα

Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% κ.β. (ακρυλαμίδιο/μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο 30/1)

Ακρυλαμίδιο 30 g

Μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο 1 g

Απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml

Tris-HCl 1.5M, pH 8.8

Tris-base 18.165 g

Απεσταγμένο νερό

Αρχική προσθήκη 80 ml απεσταγμένου νερού, ρύθμιση του διαλύματος σε pH=8.8 και προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

Tris-HCl 0.5M, pH 6.8

Tris-base 6.055 g

Απεσταγμένο νερό

Αρχική προσθήκη 80 ml απεσταγμένου νερού, ρύθμιση του διαλύματος σε pH=6.8 και προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

Διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS) 10% κ.β.

SDS 10 g

Απεσταγμένο νερό

Αρχική προσθήκη 90 ml απεσταγμένου νερού, θέρμανση στους 68°C, ρύθμιση του διαλύματος σε pH=7.9 και προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (AMPS) 20% κ.β.

N,N,N',N'-Τετραμεθυλ-αιθυλεν-διαμίνη (N,N,N',N'-Tetramethylenethylene-diamine, TEMED)

Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (2x)

Tris-HCl pH 6.8 0.05 M

SDS 0.03 M

Γλυκερόλη 10% κ.ό.

Κυανούν της βρωμοφαινόλης 2% κ.ό.

β-μερκαπτοαιθανόλη 10% κ.ό.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (5x) (Running Buffer)

Γλυκίνη 2M

Tris-base 0.25M

SDS 0.02M

Αραίωση του διαλύματος με απεσταγμένο νερό 1:5 πριν τη χρήση του.

Πειραματική πορεία

Στην παρούσα εργασία η ανάλυση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων. Η πορεία που ακολουθείται έχει ως εξής:

1. Συναρμολόγηση της συσκευής του πηκτώματος.
2. Παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού. Ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό εξέταση πρωτεΐνης, παρασκευάζεται πήκτωμα διαχωρισμού με συγκεκριμένη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου. Η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου αυξάνει όσο μειώνεται το μοριακό βάρος

της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Τα πηκτώματα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Σύσταση των πηκτωμάτων διαχωρισμού (separating gel)

Πυκνότητα πηκτώματος	17.5%	12%	7.5%	6.2%	5%
Απεσταγμένο H ₂ O	1.345 ml	3.29 ml	4.68 ml	4.663 ml	5.08 ml
Ακρυλαμίδιο 30%	5.845 ml	5.0 ml	2.51 ml	2.09 ml	1.67 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
20% AMPS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
TEMED	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl

3. Την παρασκευή του πηκτώματος και την προσθήκη του στη συσκευή ακολουθεί η προσθήκη 1-2 ml απεσταγμένου νερού. Το υπερκείμενο νερό διευκολύνει τη συμπαγή δομή του πηκτώματος και σταθεροποιεί την επάνω επιφάνειά του. Απομακρύνεται μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος και πριν την παρασκευή του πηκτώματος συμπύκνωσης.
4. Προσθήκη εξαρτήματος (χτενάκι) που χρησιμεύει στη δημιουργία θέσεων προσθήκης του δείγματος στο πήκτωμα συμπύκνωσης.
5. Παρασκευή του πηκτώματος συμπύκνωσης. Η συγκέντρωσή του εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πηκτώματος διαχωρισμού. Η σύστασή του παρατίθεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Σύσταση των πηκτωμάτων συμπύκνωσης (stacking gel)

Πυκνότητα πηκτώματος	3.5%	5%
Απεσταγμένο H ₂ O	2.45 ml	2.25 ml
Ακρυλαμίδιο 30%	0.468 ml	0.67 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.0 ml	1.0 ml
10% SDS	40 μl	40 μl
20% AMPS	40 μl	40 μl
TEMED	4 μl	4 μl

6. Προσθήκη του πηκτώματος συμπύκνωσης στη συσκευή και αναμονή για τον πολυμερισμό του (10-20 λεπτά).
7. Σε αυτό το χρονικό διάστημα είναι εφικτή η προετοιμασία των δειγμάτων. Τα δείγματα συνήθως φυλάσσονται στους -20 °C.
8. Θέρμανση των δειγμάτων στους 100 °C για χρόνο 5 λεπτά.
9. Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Με την ολοκλήρωση του χρόνου πολυμερισμού του πηκτώματος συμπύκνωσης, απομακρύνεται το εξάρτημα (χτενάκι) και μεταφέρεται η συσκευή του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
11. Μεταφορά καθορισμένης ποσότητας ολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα στις θέσεις-υποδοχές που έχουν σχηματισθεί στο πήκτωμα πακεταρίσματος.
12. Εφαρμογή σταθερής τάσης 100 Volt (120 Volt για δύο πηκτώματα), με αποτέλεσμα τη μετακίνηση των δειγμάτων από τον αρνητικό στο θετικό πόλο του συστήματος. Η απόσταση που διανύει η κάθε πρωτεΐνη στο πήκτωμα διαχωρισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη της μοριακής μάζας της.
13. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί ανάλυση κατά Western

9. . Ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western

Υλικά και διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα για τη συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών

Γλυκίνη 0.04 M

Tris-base 0.05 M

SDS 1 mM

Μεθανόλη (απόλυτη) 20% κ.ό.

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS pH 7.6 (10x)

Tris-base 0.2 M

NaCl 1.36 M

Απεσταγμένο νερό

Ρύθμιση του διαλύματος σε pH=7.6 και αραίωση του διαλύματος με απεσταγμένο νερό 1:10 πριν τη χρήση του.

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-Tween 20, pH 7.6 (TBS-T)

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS (1x)

Tween-20 0.05% κ.ό.

Μεμβράνη PVDF (polyvinylidene fluoride)

Millipore Immobilon-P Transfer Membrane

Άπαχο γάλα σε σκόνη (Regilait)**Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA)****Σύστημα χημειοφωταύγειας****Πρώτα/Δεύτερα αντισώματα****Πειραματική πορεία**

1. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης ακολουθεί τοποθέτηση του πήκτωματος διαχωρισμού σε κατάλληλη συσκευή, για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη PVDF.
2. Η μεταφορά πραγματοποιείται με εφαρμογή ομοιογενούς ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτρομεταφορά). Το πήκτωμα και η μεμβράνη εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και εφαρμόζεται σταθερή ένταση ρεύματος 400 mA για χρόνο 3-4 ώρες, έτσι ώστε οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται στο πήκτωμα να μεταφερθούν στη μεμβράνη PVDF. Ο χρόνος της μεταφοράς είναι ανάλογος με το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών που είναι να μεταφερθούν.
3. Μετά το τέλος της μεταφοράς, ακολουθεί εμβάπτιση της μεμβράνης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T. Πραγματοποιούνται δύο ξεπλύματα των 5 λεπτών το καθένα υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ακολουθεί κορεσμός των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων (blocking) με επώαση της μεμβράνης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T με 3% BSA ή 5% άπαχο γάλα, ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα. Η μεμβράνη και στις δύο περιπτώσεις επωάζεται υπό ανακίνηση για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Εξαίρεση παρουσιάζεται στην περίπτωση βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών, όπου η επώαση (με 3% BSA) διαρκεί 16 ώρες στους 4°C.
5. Ακολουθεί απόχυση του παραπάνω διαλύματος και η μεμβράνη υφίσταται 3 ξεπλύματα των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Επώαση πρώτου αντισώματος: Η μεμβράνη επωάζεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T που περιέχει το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση. Η επώαση πραγματοποιείται υπό ανακίνηση στους 4°C για 16 ώρες.

7. Απόχυση του διαλύματος του πρώτου αντισώματος (το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί). Η μεμβράνη υφίσταται 3 ξεπλύματα των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Επώαση δευτέρου αντισώματος: Η μεμβράνη επώαζεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T που περιέχει το δεύτερο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση. Η επώαση πραγματοποιείται υπό ανακίνηση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Απόχυση του διαλύματος του δευτέρου αντισώματος. Η μεμβράνη υφίσταται 5 ξεπλύματα των 5 λεπτών με TBS-T και 2 ξεπλύματα με TBS (για να απομακρυνθεί το Tween).
10. Το ανοσοαποτύπωμα της πρωτεΐνης στη μεμβράνη εμφανίζεται στο φιλμ με τη χρήση του συστήματος χημειοφωταύγειας (ECL).

10. Υπολογισμός IC_{50} ουσίας

Η μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (half maximal inhibitory concentration- IC_{50}) είναι ένα μέτρο της ισχύος μιας ουσίας στην αναστολή μίας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Η IC_{50} είναι ένα ποσοτικό μέτρο που υποδεικνύει πόσο μια συγκεκριμένη ανασταλτική ουσία (π.χ. φάρμακο) είναι απαραίτητη για την αναστολή in vitro μιας δεδομένης βιολογικής διεργασίας ή βιολογικού συστατικού κατά 50%. Το βιολογικό συστατικό μπορεί να είναι ένα ένζυμο, κύτταρο, υποδοχέας κυττάρου ή μικροοργανισμός. Οι τιμές IC_{50} εκφράζονται τυπικά ως γραμμομοριακή συγκέντρωση.

Η IC_{50} χρησιμοποιείται συνήθως ως μέτρο δραστηριότητας φαρμάκου ανταγωνιστή στη φαρμακολογική έρευνα.

Υλικά και διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό μέσο της κάθε κυτταρικής σειράς (αναφέρεται αναλυτικά στην Παράγραφο 1)

Υπό μελέτη ουσίες

96- well plate

Πειραματική πορεία

1. Σε 96άρι well plate στρώνουμε μετά από τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας 5.000 κύτταρα ανά well. Για την ακρίβεια της μέτρησης των κυττάρων αυτών χρησιμοποιούμε το αιματοκυτταρόμετρο.
2. Χρησιμοποιούμε την ουσία που μας ενδιαφέρει σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 5, 10, 20, 50, 100 και 200μΜ.
3. Για την μεγαλύτερη ακρίβεια στο αποτέλεσμα τοποθετούμε τουλάχιστον 5 wells ανά συγκέντρωση.
4. Επωάζουμε για 48h.
5. Μετράμε τα κύτταρα και λαμβάνουμε το αποτέλεσμα του IC50.

11. Φασματοφωτομετρική ανάλυση – MTT

Η μέθοδος MTT περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 και βασίζεται στη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Η τεχνική του MTT είναι μια χρωματομετρική μέθοδος (μετράει χρωματικές αλλαγές) η οποία χρησιμοποιείται, είτε για τη μελέτη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, είτε για τη μελέτη κυτταροτοξικότητας. Βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (κίτρινη χρωστική) σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης. Συγκεκριμένα το MTT οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξειδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Οι κρύσταλλοι της φορμαζάνης που παράγονται, διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και παράγουν ένα χρωματικό διάλυμα του οποίου η ένταση είναι ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Με τη φασματοφωτομετρική ανάλυση (μέγιστη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 570nm) εξάγονται συμπεράσματα για τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων και κατ' επέκταση για τη μεταβολή της βιωσιμότητάς τους. Επίσης, η μέθοδος είναι κατάλληλη και για τη μέτρηση κυτταροτοξικότητας, αφού ένας κυτταροτοξικός παράγοντας μειώνει την αναγωγή των αλάτων τετραζολίου.

Υλικά και διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό μέσο της κάθε κυτταρικής σειράς (αναφέρεται αναλυτικά στην Παράγραφο 1)

Υπό μελέτη ουσίες

96- well plate

Διάλυμα 5mg/ml MTT (5- dimethyl tetrazolium bromide)

Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)

Πειραματική πορεία

1. Σε 96άρι well plate στρώνουμε μετά από τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας 5.000 κύτταρα ανά well. Για την ακρίβεια της μέτρησης των κυττάρων αυτών χρησιμοποιούμε το αιματοκυτταρόμετρο.
2. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούμε στο συγκεκριμένο πείραμα είναι κυτταρικές σειρές U87 και U373.
3. Σε κάθε well τοποθετούμε 100μl θρεπτικό υλικό στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα.
4. Μετά από 24 ώρες (day 1) αφαιρούμε με προσοχή το θρεπτικό υλικό και τοποθετούμε τις ουσίες και το θρεπτικό υλικό σε τελική συγκέντρωση 200μl. Τοποθετούμε το plate στον θάλαμο επώασης για 24 ώρες.
5. Μετά από 24 ώρες (day 2), είτε ακτινοβολούμε τα κύτταρα, είτε δεν επιδρούμε σε αυτά και τα αφήνουμε να επωαστούν για άλλες 24 ώρες, ανάλογα με το πρωτόκολλο του πειράματος που ακολουθούμε σε κάθε περίπτωση.
6. Μετά από 24 ώρες (day 3) τοποθετούμε 50μl MTT σε κάθε well και επωάζουμε για 3 ώρες. Έπειτα από την παρέλευση των 3 ωρών εισάγουμε 100μl DMSO σε κάθε well και φωτομετρούμε.

Το παραπάνω πείραμα, εκτός από το συνδυασμό του με επίδραση ακτινοβολίας, χρησιμοποιήθηκε και για την σύγκριση των υπό μελέτη ουσιών με τον χημειοθεραπευτικό παράγοντα Τεμοζολαμίδη, η οποία χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις της τάξης των 50 ,100 και 150μM.

12. Προσομοίωση τραύματος διά αμυχής (In vitro scratch wound healing assay)

Υλικά και διαλύματα

Πλήρες θρεπτικό μέσο της κάθε κυτταρικής σειράς (αναφέρεται αναλυτικά στην Παράγραφο 1)

Υπό μελέτη ουσίες

6- well plate

Πειραματική πορεία

1. Σε 6άρι well plate στρώνουμε μετά από τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας 150.000 κύτταρα ανά well. Για την ακρίβεια της μέτρησης των κυττάρων αυτών χρησιμοποιούμε το αιματοκυτταρόμετρο.
2. Τοποθετούμε την ουσία σε συγκεντρώσεις IC_{50} και $2 IC_{50}$.
3. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούμε στο συγκεκριμένο πείραμα είναι κυτταρικές σειρές U87, U373 και T98.
4. Σε κάθε well τοποθετούμε 2ml θρεπτικό υλικό στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα.

5. Μετά από επώαση 24 ωρών και εφόσον η πυκνότητα των κυττάρων στο plate είναι 80% και πάνω τοποθετούμε τις υπό μελέτη ουσίες και χαράσουμε το κέντρο του well, δημιουργώντας μια <<πληγή>> στα κύτταρα. Το plate, έπειτα, τοποθετείτε στο θάλαμο επώασεως.
6. Τις επόμενες ημέρες φωτογραφίζουμε το plate, αξιολογώντας την επούλωση της χαραγής, ύστερα και από την επίδραση των ουσιών και λαμβάνουμε τα αποτελέσματα.

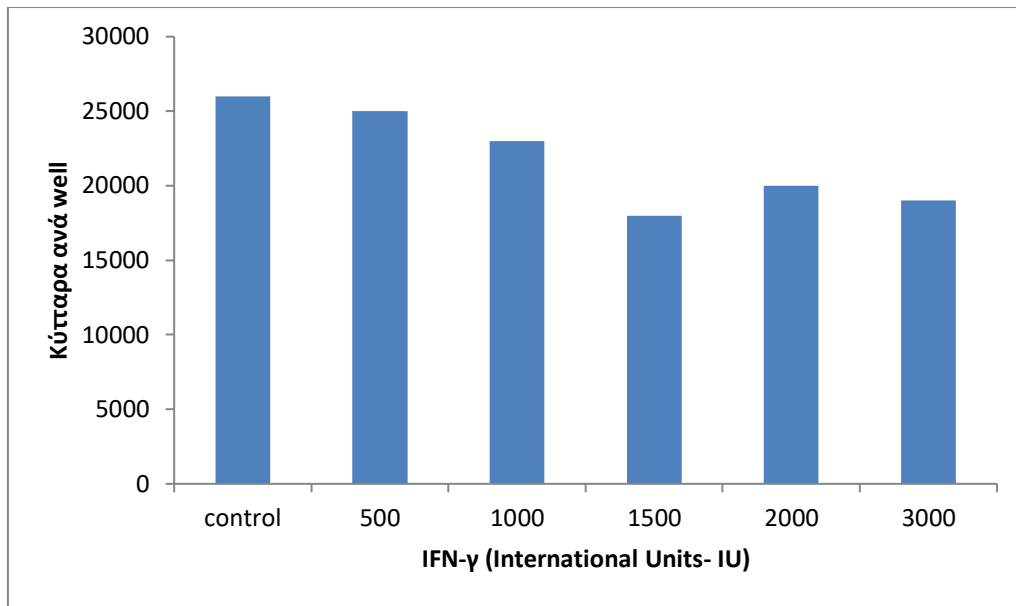
13. Κυτταρομετρία ροής- Απόπτωση

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια τεχνική μελέτης κυτταρικών πληθυσμών μέσω ανάλυσης της σκέδασης του φωτός και εκπομπής φθορισμού από τα κύτταρα. Τα κύτταρα περνούν ένα - ένα μπροστά από μια δέσμη laser των οποίων η σκέδαση και φθορισμός καταγράφονται και αναλύονται. Η τεχνική παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος, είδος και άλλων χαρακτηριστικών των κυττάρων. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ανάλυσης των δεδομένων, όπως το ιστόγραμμα, το δισδιάστατο γράφημα και η τρισδιάστατη γραφική παράσταση. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ακόμη για τον προσδιορισμό μεταβολών στα κύτταρα που σχετίζονται με στάδια της απόπτωσης. Το μείγμα των κυττάρων επωάζεται σε ιωδιούχο προπίδιο (PI), το οποίο είναι μια φθορίζουσα ουσία, η οποία δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA παρεμβαλλόμενη μεταξύ ζευγών βάσεων και διεγείρεται στα 488 nm (εντοπισμός DNA). Η τεχνική είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς έχει την ικανότητα προσδιορισμού της φάσης του κυτταρικού κύκλου των εξεταζόμενων κυττάρων. Τα αποπτωτικά κύτταρα παρουσιάζουν στάση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 και κατακερματισμένο γενετικό υλικό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Η IFN- γ εμφανίζει μικρή αναστολή του πολλαπλασιασμού σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U251

Η IFNs τύπου I, κυρίως, εμφανίζουν ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η διαφοροποίηση, η διακοπή της ανάπτυξης και η απόπτωση. Οι αντικαρκινικές δράσεις των IFNs τύπου I είναι είτε άμεση, προκαλώντας την αναστολή της ανάπτυξης και την απόπτωση κυττάρων όγκου είτε έμμεση, μέσω ενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης (164). Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I (MHC I) αυξάνεται από τις IFNs τύπου I με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αναγνώρισης αντιγόνου, ενώ προκαλούν την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως το ICAM-1 και L-σελεκτίνη (165). Επιπρόσθετα, οι IFNs τύπου I διεγείρουν την έκκριση της IL-15, η οποία οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των φονικών κυττάρων και των CD8 T κυττάρων (166). Οι αντικαρκινικές δράσεις των IFNs τύπου I επάγονται με τη μεταγραφική ρύθμιση προαποπτωτικών γονιδίων, όπως είναι τα γονίδια ISGs που ενεργοποιούνται από το μόριο TRAIL (167). Στη βιβλιογραφία παρόλα αυτά, η IFN- γ δεν έχει εμφανίσει μέχρι στιγμής κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Για αυτό το λόγο επιδράσαμε με IFN- γ σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U251 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 500 έως 3000 IU. Τα αποτελέσματά μας ταυτίζονται με αυτά της βιβλιογραφίας, καθώς δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη αναστολή στον πολλαπλασιασμό, ακόμη και σε μεγάλες δόσεις.



Εικόνα 1: Επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις IFN-γ σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U251, έπειτα από επώαση 72h.

2. Προσδιορισμός της IC_{50} της ζιπρασιδόνης

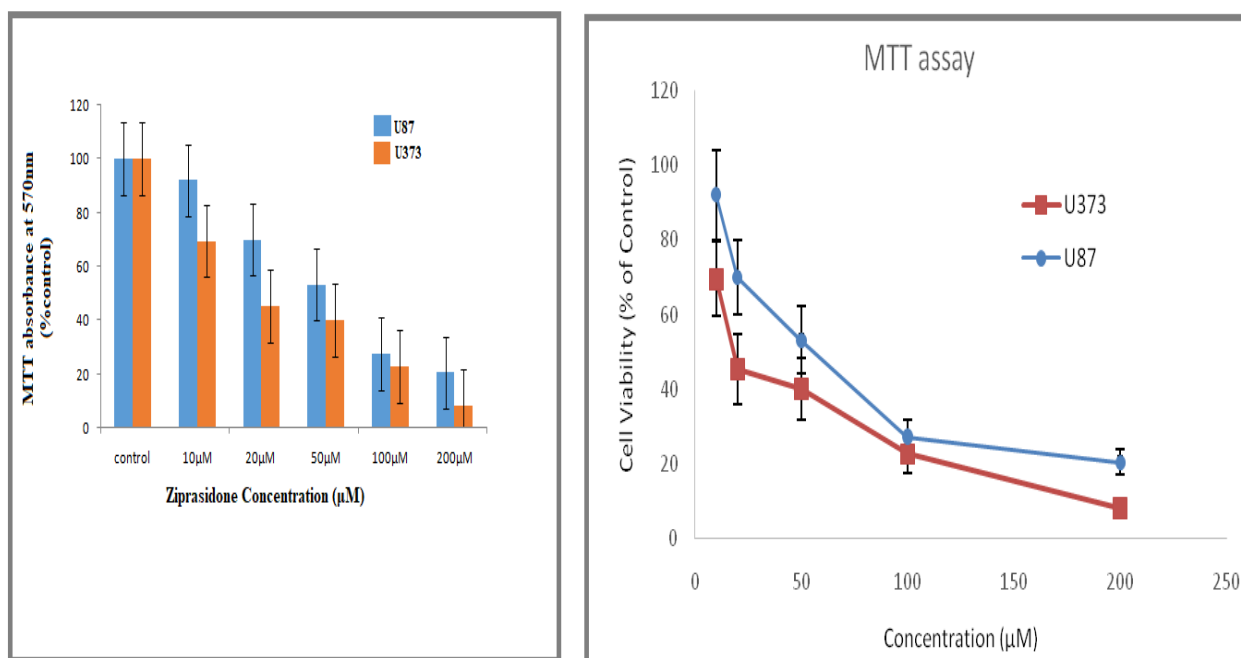
Για την χρησιμοποίηση της ζιπρασιδόνης σε πειραματικά στάδια ήταν απαραίτητος ο προσδιορισμός της μισής μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (half maximal inhibitory concentration- IC_{50}) της. Σε 96άρι well plate στρώνουμε μετά από τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας 5.000 κύτταρα ανά well. Στη συνέχεια προσθέτουμε την ζιπρασιδόνη σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 5, 10, 20, 50, 100 και 200 μ M. Για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις χρησιμοποιούμε 5 wells για να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια στο αποτέλεσμα και επωάζουμε. Μετά από 48h μετράμε τα κύτταρα και προσδιορίζουμε την IC_{50} της ζιπρασιδόνης, η οποία βρέθηκε να είναι 59 μ M για τα κύτταρα U87 και 22 μ M για τα κύτταρα U373. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί πως η IC_{50} της ζιπρασιδόνης σε έναν τρίτο κυτταρικό τύπο γλοιοβλαστώματος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας, των κυττάρων T98 προσδιορίστηκε στα 60 μ M.

U87			U373	
Concentration (μM)	Cell Viability (% of Control)		Concentration (μM)	Cell Viability (% of Control)
10	92		10	69.5
20	70		20	45.3
50	53.2		50	40.1
100	27.5		100	22.6
200	20.6		200	8.1

Εικόνα 2: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης IC_{50} στους κυτταρικούς τύπους U87 και U373. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις σε εύρος της τάξεως των 10, 20, 50, 100 και 200 μ M και μετά από επώαση 48h, τα κύτταρα μετρήθηκαν και προσδιορίστηκε η IC_{50} της ζιπρασιδόνης. Για τον τύπο U87 η IC_{50} της ζιπρασιδόνης προσδιορίστηκε στα 59 μ M και για τον τύπο U373 προσδιορίστηκε στα 22 μ M.

3. Η Ζιπρασιδόνη προάγει τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 και U373

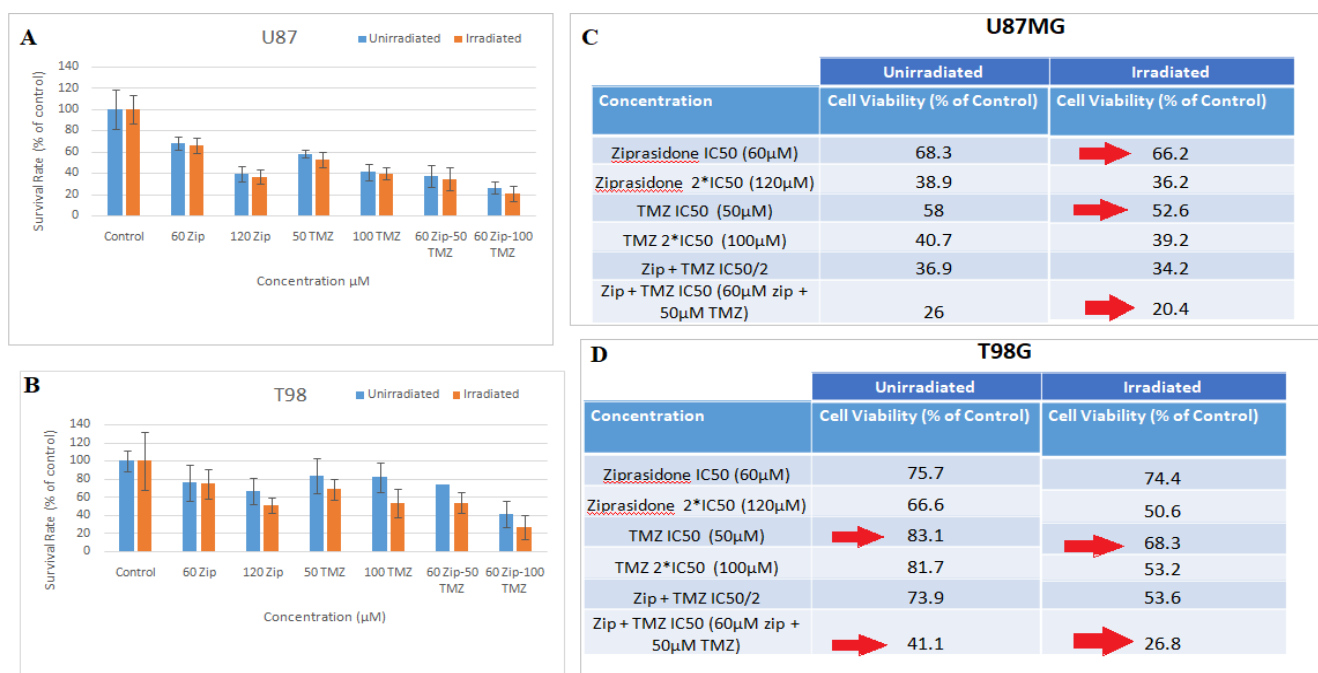
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το αντιψυχωσικό φάρμακο ζιπρασιδόνη δεν παρουσιάζει στην βιβλιογραφία κλινικά αποτελέσματα πέραν της δράσης της στην αντιμετώπιση της διπολικής διαταραχής, της σχιζοφρένειας, της μανίας και των ψυχώσεων. Παρατηρήθηκε όμως η δράση των υπόλοιπων αντιψυχικών φαρμάκων που βρίσκονται στην ίδια κατηγορία με την ζιπρασιδόνη σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου και για αυτό το λόγο διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος της ουσίας αυτής σαν αντικαρκινικό φάρμακο από την ομάδα μας. Σε πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες (240), είχε μελετηθεί ο ρόλος της αριπιπραζόλης, ενός αντιψυχωσικού της ίδιας κατηγορίας με την ζιπρασιδόνη, σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος και είχε προσδιοριστεί η ικανότητά της να λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας. Βάσει αυτής της μελέτης, μετά τον προσδιορισμό της IC_{50} της ζιπρασιδόνης, προχωρήσαμε στη μελέτη της ικανότητάς της να προκαλεί κυτταροτοξικότητα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος U87 και U373. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με την τεχνική του MTT, μια χρωματομετρικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας διαφόρων ουσιών και βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (κίτρινη χρωστική) σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης. Η τεχνική λαμβάνει χώρα σε 72h, όπου λαμβάνεται το αποτέλεσμα της κυτταροτοξικότητας της ουσίας. Στην παρούσα εργασία, η κυτταροτοξική δράση της ζιπρασιδόνης μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 5, 10, 20, 50, 100 και 200 μ M και παρατηρήθηκε η μείωση της συγκέντρωσης των κυττάρων και των δύο τύπων γλοιοβλαστώματος. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι τα τη συγκέντρωση IC_{50} η μείωση του πληθυσμού και στους δύο τύπους είναι εμφανής, αλλά όχι τόσο ώστε να θεωρήσουμε την ουσία ως ικανή να παράγει κάποιο σημαντικό ογκοκατασταλτικό αποτέλεσμα. Μετά την υπέρβαση της συγκέντρωσης αυτής η μείωση του πληθυσμού των δύο κυτταρικών σειρών είναι ιδιαίτερα εμφανής και η ζιπρασιδόνη προκαλεί θάνατο σε ποσοστό έως και 80% των κυτταρικών σειρών, ειδικά στην συγκέντρωση των 200 μ M. Ο παρατηρούμενος κυτταρικός θάνατος στις δύο κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος από την ζιπρασιδόνη οδήγησε στην ανάγκη διερεύνησης του ρόλου της ουσίας αυτής ως ογκοκατασταλτικού παράγοντα σε συνδυασμό με αντικαρκινικά φάρμακα, καθώς και σε συνδυασμό με τεχνικές αντιμετώπισης των όγκων, όπως η ακτινοβολήση.



Εικόνα 3: Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης της ζιπρασιδόνης με την μέθοδο MTT. Προσδιορίζεται η ικανότητα της ζιπρασιδόνης να λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της τάξεως των 20, 50, 100 και 200µM. Αριστερά, παρατηρείται η μειωμένη πρόσληψη της χρωστικής λόγω της μείωσης του πληθυσμού των κυττάρων, που έχει ως επακόλουθο την μειωμένη απορρόφηση μετά από μέτρηση στα 570nm και στους δύο κυτταρικούς τύπους γλοιοβλαστώματος. Δεξιά, βάσει της απορρόφησης προσδιορίζεται ο πληθυσμός των κυττάρων των δύο κυτταρικών σειρών, ύστερα από την επίδραση με ζιπρασιδόνη. Η κυτταροτοξικότητα της ουσίας είναι εμφανής, ειδικά μετά την υπέρβαση της συγκέντρωσης IC_{50} , στην οποία εμφανίζεται μείωση του πληθυσμού των κυττάρων κατά 50%. Σε συγκέντρωση της τάξεως των 200µM, η μείωση του πληθυσμού των κυττάρων φτάνει σε ποσοστό 80%.

4. *Η Ζιπρασιδόνη προάγει τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 και T98 σε συνδυασμό με εφαρμογή ακτινοβολήσης και τεμοζολαμίδης*

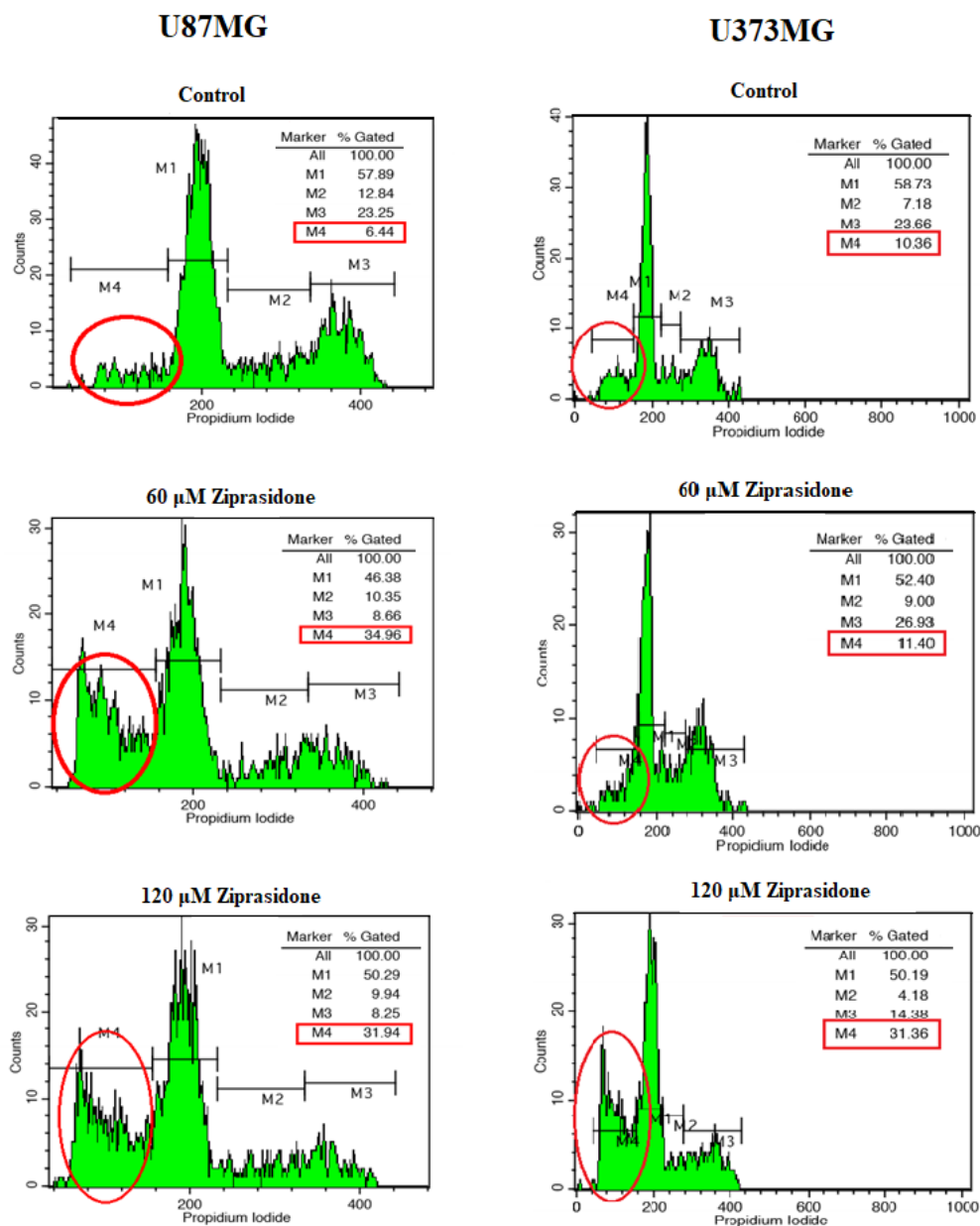
Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με την παραπάνω μέθοδο δείχνουν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά στοιχεία όσον αφορά τη χρήση της ζιπρασιδόνης ως ογκοκατασταλτικού παράγοντα. Το επόμενο βήμα ήταν να εξετάσουμε την ικανότητα της ζιπρασιδόνης να παράγει παρόμοια αποτελέσματα και να δρα συνεργικά με άλλες μεθόδους αντιμετώπισης των όγκων. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήσαμε έναν ογκοκατασταλτικό παράγοντα, την τεμοζολαμίδα, η οποία χορηγείται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με νεοδιαγνωσμένο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα συγχρηγούμενη με ακτινοθεραπεία και στη συνέχεια ως μονοθεραπεία. Αρχικά, συγχρηγήσαμε την ζιπρασιδόνη με την τεμοζολαμίδα και τα αποτελέσματα μας ανέδειξαν την συνεργική δράση των δύο ουσιών στην καταστολή του όγκου *in vitro*, καθώς περιόρισαν την ικανότητα επιβίωσης των δύο τύπων κυττάρων κατά ένα σημαντικό ποσοστό. Επιπρόσθετα, λόγω της ικανότητας της τεμοζολαμίδης να περιορίζει την ανάπτυξη του όγκου, τόσο ως μονοθεραπεία όσο και συγχρηγούμενη με ακτινοβολήση, εφαρμόσαμε ακτινοβολήση ταυτόχρονα με τη χορήγηση ζιπρασιδόνης και τεμοζολαμίδης και συγκρίναμε τα αποτελέσματα με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε εφαρμοστεί ακτινοβολήση. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις ζιπρασιδόνης ίσες με το IC_{50} και $2 IC_{50}$, ενώ όταν συγχρηγείται με τεμοζολαμίδα και ακτινοβολήση, εφαρμόζονται συγκεντρώσεις ίσες με το IC_{50} της ουσίας. Ακόμη, εφαρμόστηκαν συγκεντρώσεις τεμοζολαμίδης ίσες με 50 και 100 μ M, ως δείκτης της κυτταροτοξικότητας της ουσίας αυτής όταν χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3, ο συνδυασμός της ζιπρασιδόνης μαζί με τεμοζολαμίδα και ακτινοβολήση έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, καθώς μειώνει τον πληθυσμό των κυττάρων και των δύο τύπων σε σχέση με τη χρήση τους ως μονοθεραπεία. Η εφαρμογή 60 μ M ζιπρασιδόνης σε συνδυασμό με 50 μ M τεμοζολαμίδης και ακτινοβολήσης μειώνει τον πληθυσμό των κυττάρων σε ποσοστό περίπου 80%. Ο πληθυσμός των κυττάρων που έχουν ακτινοβοληθεί σε όλες τις περιπτώσεις είναι μειωμένος σε σχέση με αυτόν που δεν έχει ακτινοβοληθεί, που υποδηλώνει την ικανότητα της εφαρμογής της ακτινοβολήσης σε συνδυασμό με τις δύο ουσίες για την ακόμη μεγαλύτερη συνεργική δράση τους.



Εικόνα 4: Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης της ζιπρασιδόνης σε συνδυασμό με τεμοζολαμίδη και ακτινοβολήση με τη μέθοδο MTT. Προσδιορίστηκε η ικανότητα της ζιπρασιδόνης να δρα ως αναστολέας της ανάπτυξης του όγκου σε δύο τύπους κυττάρων γλοιοβλαστώματος, U87 και T98. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις ζιπρασιδόνης ίσες με το IC₅₀ και 2 IC₅₀, ενώ όταν συγχορηγείται με τεμοζολαμίδη και ακτινοβολήση, εφαρμόζονται συγκεντρώσεις ίσες με το IC₅₀ της ουσίας. Ακόμη, εφαρμόστηκαν συγκεντρώσεις τεμοζολαμίδης ίσες με 50 και 100μM, ως δείκτης της κυτταροτοξικότητας της ουσίας αυτής όταν χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία. Ο συνδυασμός των δύο ουσιών ελαττώνει την ικανότητα επιβίωσης και στους δύο τύπους κυττάρων. Ιδιαίτερα εμφανής είναι και η μείωση του πληθυσμού των κυττάρων και των δύο τύπων έπειτα από ακτινοβολήση. Ύστερα από χρήση ζιπρασιδόνης σε συγκέντρωση ίση με IC₅₀ και 50μM τεμοζολαμίδης σε συνδυασμό με ακτινοβολήση έχουμε το καλύτερο αποτέλεσμα, καθώς μειώνεται ο πληθυσμός των κυττάρων κατά 80%.

5. *Η Ζιπρασιδόνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, λόγω στάσης του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 και G2/M*

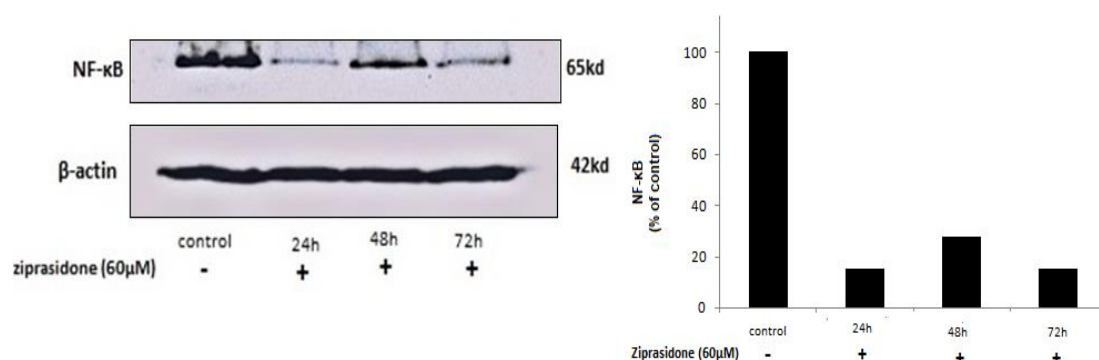
Με τα παραπάνω πειράματα ελέγχθηκε η ικανότητα της ζιπρασιδόνης να μειώνει τον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων ως μονοθεραπεία, καθώς και σε συνδυασμό με ακτινοβολία και έναν κυτταροτοξικό παράγοντα, την τεμοζολαμίδη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ζιπρασιδόνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο στις κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, χωρίς να προσδιορίζεται ο τρόπος που αυτό συμβαίνει. Το επόμενο βήμα είναι διερευνήσουμε τον λόγο που η ουσία αυτή προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε την κυτταρομετρία ροής, για να προσδιορίσουμε την φάση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων μας. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA και στη συνέχεια μέτρηση του φθορισμού, περνώντας τα κύτταρα μέσω μιας δέσμης laser. Είναι σημαντικό να τονίσουμε πως κύτταρα που έχουν υποστεί απόπτωση εμφανίζουν στάση του κυτταρικού υλικού στη φάση G1 και κατακερματισμένο γενετικό υλικό. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη απόπτωση των κυττάρων, η οποία είναι δόσοεξαρτώμενη σε συγκεντρώσεις ζιπρασιδόνης της τάξης IC_{50} και $2IC_{50}$ στους δύο τύπους κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, U87 και U373. Η απόπτωση είναι αποτέλεσμα της στάσης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (G1 arrest) και στη φάση G2/M. Το επόμενο βήμα θα είναι να προσδιοριστούν τα μόρια που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία της απόπτωσης και ο βαθμός έκφρασης των μορίων αυτών στις εκάστοτε χορηγούμενες δόσεις της ζιπρασιδόνης και σε διαφορετικούς χρόνους επώασης με την ουσία.



Εικόνα 5: Μελέτη της αποπτωτικής ικανότητας της ζιπρασιδόνης. Προσδιορίστηκε η ικανότητα της ζιπρασιδόνης να προκαλεί απόπτωση σε δύο κυτταρικούς τύπους γλοιοβλαστώματος U87 και U373. Η ανάλυση έγινε με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, η οποία στηρίζεται στην ικανότητα του ιωδιούχου προπιδίου να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να αποδίδει φθορισμό. Οι συγκεντρώσεις ζιπρασιδόνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της τάξεως IC_{50} και $2 IC_{50}$ και οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η ζιπρασιδόνη προκαλεί δόσοεξαρτώμενη απόπτωση, μέσω της στάσης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και στη φάση G2/M

6. Η Ζιπρασιδόνη αναστέλλει την έκφραση του παράγοντα NF-κB με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ζιπρασιδόνη προκαλεί απόπτωση σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος U87 και U373 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, σε συγκεντρώσεις IC_{50} (60 μ M) και $2IC_{50}$ (120 μ M). Το επόμενο βήμα είναι να εντοπίσουμε τα μόρια που είναι υπεύθυνα για τη διαδικασία της απόπτωσης. Θα εξετάσουμε πρώτα την εμπλοκή του παράγοντα NF-κB στη διαδικασία. Ο παράγοντας NF-κB είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που ελέγχει τη μεταγραφή του DNA, την παραγωγή κυτοκίνης και την επιβίωση των κυττάρων. Παρουσιάζει πολύ σημαντικό ρόλο ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας και η μειωμένη έκφρασή του σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση. Η απελευθέρωση του μορίου στη μη δεσμευμένη του μορφή οδηγεί σε έκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων και σε καταστολή της απόπτωσης των κυττάρων. Με το τελευταίο πείραμα, συμπεράναμε πως η ζιπρασιδόνη οδηγεί σε δόσοεξαρτώμενη απόπτωση, συνεπώς θα αναμένουμε πως η έκφραση του παράγοντα NF-κB θα είναι μειωμένη. Η μέτρηση της έκφρασης του παράγοντα έγινε μέσω της τεχνικής Western, όπου προσδιορίστηκε η έκφραση του μετά από επώαση 24, 48 και 72 ωρών σε κύτταρα U87. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η έκφραση του NF-κB μειώνεται, με την μεγαλύτερη μείωση να εμφανίζεται στις 24 και στις 72 ώρες.

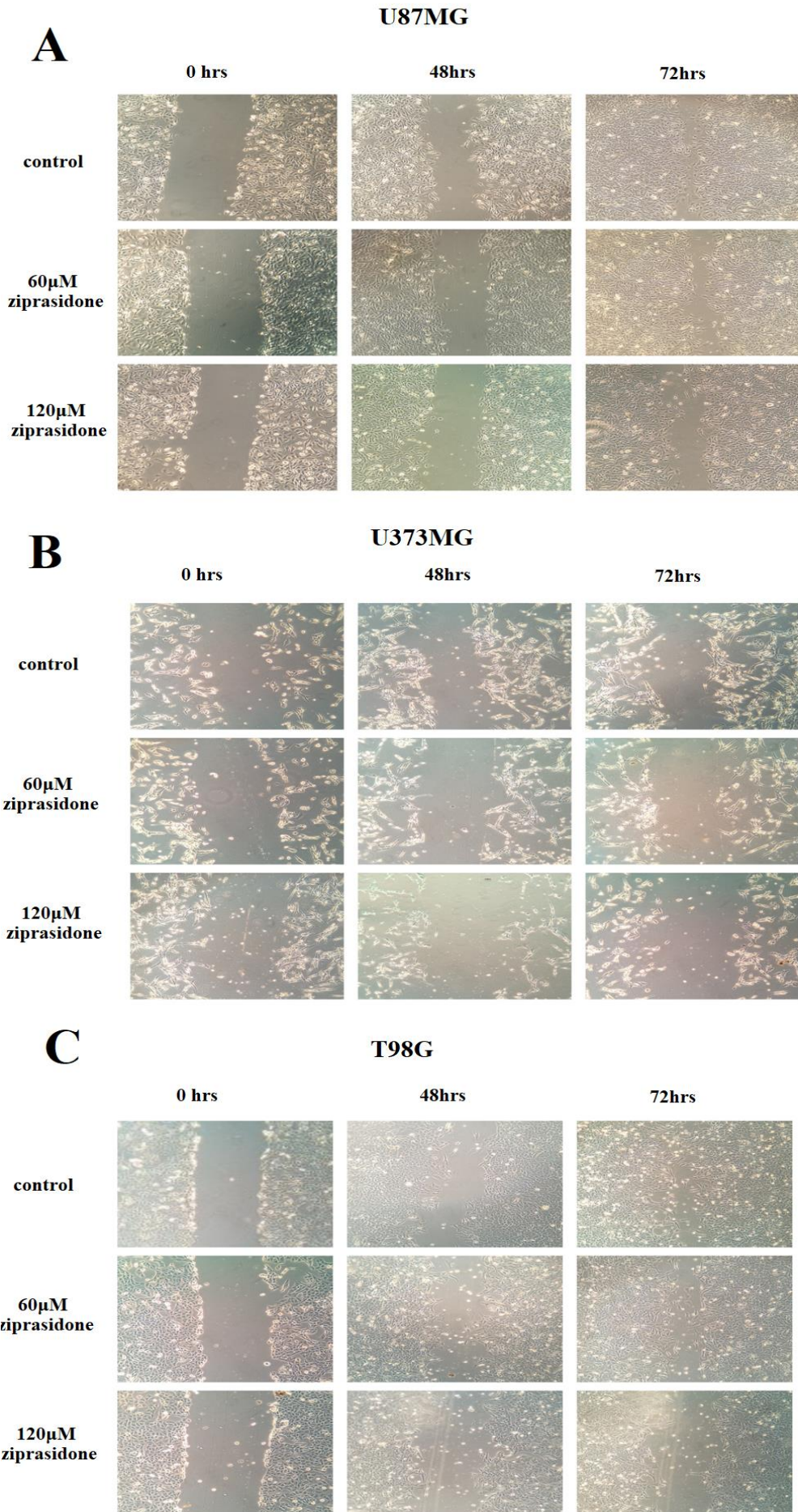


Εικόνα 6: Μελέτη της έκφρασης του παράγοντα NF-κB. Η μειωμένη έκφραση του NF-κB αποτελεί δείκτης απόπτωσης των κυττάρων. Με την τεχνική Western προσδιορίστηκε η έκφραση του παράγοντα σε 24, 48 και 72 ώρες με τη μεγαλύτερη μείωση να σημειώνεται στις 24 και στις 72 ώρες.

7. Η Ζιπρασιδόνη επηρεάζει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87, T98 και U373

Η ικανότητα της ζιπρασιδόνης να προκαλεί κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος, που όπως τονίστηκε παραπάνω, είναι αποτέλεσμα ενός μηχανισμού απόπτωσης, υπογραμμίζει την χρησιμότητα της ουσίας ως ογκοκατασταλτικού παράγοντα. Τα μέχρι τώρα περιγραφόμενα πειράματα αφορούσαν την ικανότητα της ζιπρασιδόνης να εμπλέκεται στην φυσιολογική ρύθμιση του κυττάρου και να το οδηγεί σε απόπτωση, χωρίς όμως να δίνει κάποια αποτελέσματα σε σχέση με την εμπλοκή της στην κυτταρική μετανάστευση. Στο επόμενο πείραμα διερευνήσαμε την δράση της ζιπρασιδόνης στη κυτταρική μετανάστευση σε τρεις τύπους κυττάρων γλοιοβλαστώματος, τους U87, T98 και U373. Για αυτό το σκοπό εκτελέσαμε το πείραμα της προσομοίωσης τραύματος διά αμυχής (scratch wound healing assay), στο οποίο χαράσσουμε στο κέντρο του well-plate μια <<πληγή>> και παρακολουθούμε το χρόνο που απαιτείται για να επουλωθεί. Οι συγκεντρώσεις της ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της τάξεως των IC_{50} (60 μ M) και $2IC_{50}$ (120 μ M) και η παρατήρηση έγινε κατά τη διάρκεια της δημιουργίας της αμυχής και ύστερα από 48 και 72 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ζιπρασιδόνη στους παρατηρούμενους χρόνους ελαττώνει τη μεταναστευτική/μεταστατική ικανότητα των κυττάρων, με τα καλύτερα αποτελέσματα να εντοπίζονται στα κύτταρα U373.

Εικόνα 7: Μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης των κυττάρων U87, T98 και U373 μετά από επίδραση με ζιπρασιδόνη. Με την τεχνική της προσομοίωσης τραύματος διά αμυχής (scratch wound healing assay) προσδιορίστηκε η ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν, ύστερα από <<τραυματισμό>> του plate και αναμένοντας το χρόνο επούλωσης. Η ποσότητα της ζιπρασιδόνης ήταν 60 και 120 μ M και η παρατήρηση του χρόνου επούλωσης έγινε στις 48 και στις 72 ώρες μετά την επίδραση με την ουσία.



8. Προσδιορισμός της IC_{50} της Αλοπεριδόλης

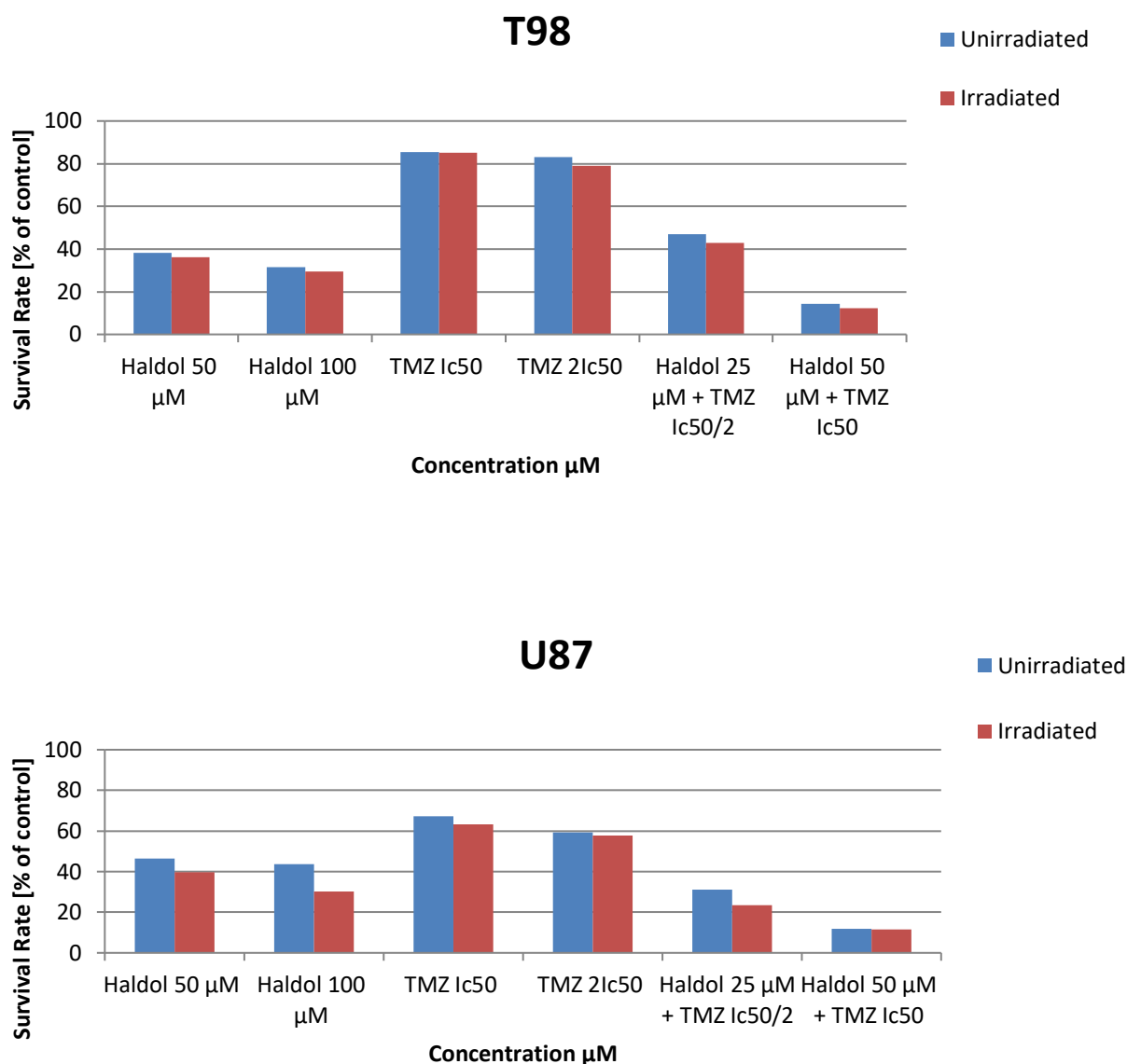
Όπως πράξαμε και στη παράγραφο 1, έτσι και για την χρησιμοποίηση της αλοπεριδόλης σε πειραματικά στάδια είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της μισής μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (half maximal inhibitory concentration- IC_{50}) της. Σε 96άρι well plate στρώνουμε μετά από τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας 5.000 κύτταρα ανά well. Στη συνέχεια προσθέτουμε την αλοπεριδόλη σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 5, 20, 50, 100 και 200 μ M για τα κύτταρα T98 και συγκεντρώσεις 10, 40, 80, 150 και 200 μ M για τα U87. Για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις χρησιμοποιούμε 5 wells για να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια στο αποτέλεσμα και επωάζουμε. Μετά από 48h μετράμε τα κύτταρα και προσδιορίζουμε την IC_{50} της αλοπεριδόλης, η οποία βρέθηκε να είναι 20 μ M για τα κύτταρα U87 και 40 μ M για τα κύτταρα T98.

U87			T98	
Concentration (μM)	Cell Viability (% of Control)		Concentration (μM)	Cell Viability (% of Control)
10	59.1		5	100
40	45.9		20	95.9
80	23.4		50	14.6
150	8.9		100	3.4
200	7.9		200	2.6

Εικόνα 8: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης IC_{50} στους κυτταρικούς τύπους U87 και T98. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις σε εύρος της τάξεως των 5, 20, 50, 100 και 200 μ M για τα κύτταρα T98 και συγκεντρώσεις 10, 40, 80, 150 και 200 μ M για τα U87 και μετά από επώαση 48h, τα κύτταρα μετρήθηκαν και προσδιορίστηκε η IC_{50} της αλοπεριδόλης. Για τον τύπο U87 η IC_{50} της αλοπεριδόλης προσδιορίστηκε στα 20 μ M και για τον τύπο T98 προσδιορίστηκε στα 40 μ M.

9. *Η Αλοπεριδόλη προάγει τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 και T98 σε συνδυασμό με εφαρμογή ακτινοβολήσης και τεμοζολαμίδης*

Όπως πράξαμε και στην παράγραφο 4, και με βάση την βιβλιογραφία, η οποία αναφέρει πως η αλοπεριδόλη δείχνει σημαντικά αποτελέσματα έναντι γλοιωμάτων (275), θα χρησιμοποιήσουμε το φάρμακο αυτό σε συνδυασμό με τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα τεμοζολαμίδα και την εφαρμογή ακτινοβολίας. Όπως και παραπάνω, συγχορηγήσαμε την αλοπεριδόλη με την τεμοζολαμίδα και τα αποτελέσματα μας ανέδειξαν την συνεργική δράση των δύο ουσιών στην καταστολή του όγκου *in vitro*, καθώς περιόρισαν την ικανότητα επιβίωσης των δύο τύπων κυττάρων κατά ένα σημαντικό ποσοστό. Ακόμη, λόγω της ικανότητας της τεμοζολαμίδης να περιορίζει την ανάπτυξη του όγκου, τόσο ως μονοθεραπεία όσο και συγχορηγούμενη με ακτινοβολήση, εφαρμόσαμε ακτινοβολήση ταυτόχρονα με τη χορήγηση αλοπεριδόλης και τεμοζολαμίδης και συγκρίναμε τα αποτελέσματα με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε εφαρμοστεί ακτινοβολήση. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις αλοπεριδόλης ίσες με το IC_{50} και $2 IC_{50}$, ενώ όταν συγχορηγείται με τεμοζολαμίδα και ακτινοβολήση, εφαρμόζονται συγκεντρώσεις ίσες με το IC_{50} της ουσίας. Ακόμη, εφαρμόστηκαν συγκεντρώσεις τεμοζολαμίδης ίσες με 50 και 100 μM , ως δείκτης της κυτταροτοξικότητας της ουσίας αυτής όταν χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 9, ο συνδυασμός της αλοπεριδόλης μαζί με τεμοζολαμίδα και ακτινοβολήση έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, καθώς μειώνει τον πληθυσμό των κυττάρων και των δύο τύπων σε σχέση με τη χρήση τους ως μονοθεραπεία. Ύστερα από χρήση αλοπεριδόλης σε συγκέντρωση ίση με IC_{50} και συγκέντρωση IC_{50} της τεμοζολαμίδης σε συνδυασμό με ακτινοβολήση έχουμε το καλύτερο αποτέλεσμα. Ο πληθυσμός των κυττάρων που έχουν ακτινοβοληθεί σε όλες τις περιπτώσεις είναι μειωμένος σε σχέση με αυτόν που δεν έχει ακτινοβοληθεί, που υποδηλώνει την ικανότητα της εφαρμογής της ακτινοβολήσης σε συνδυασμό με τις δύο ουσίες για την ακόμη μεγαλύτερη συνεργική δράση τους.

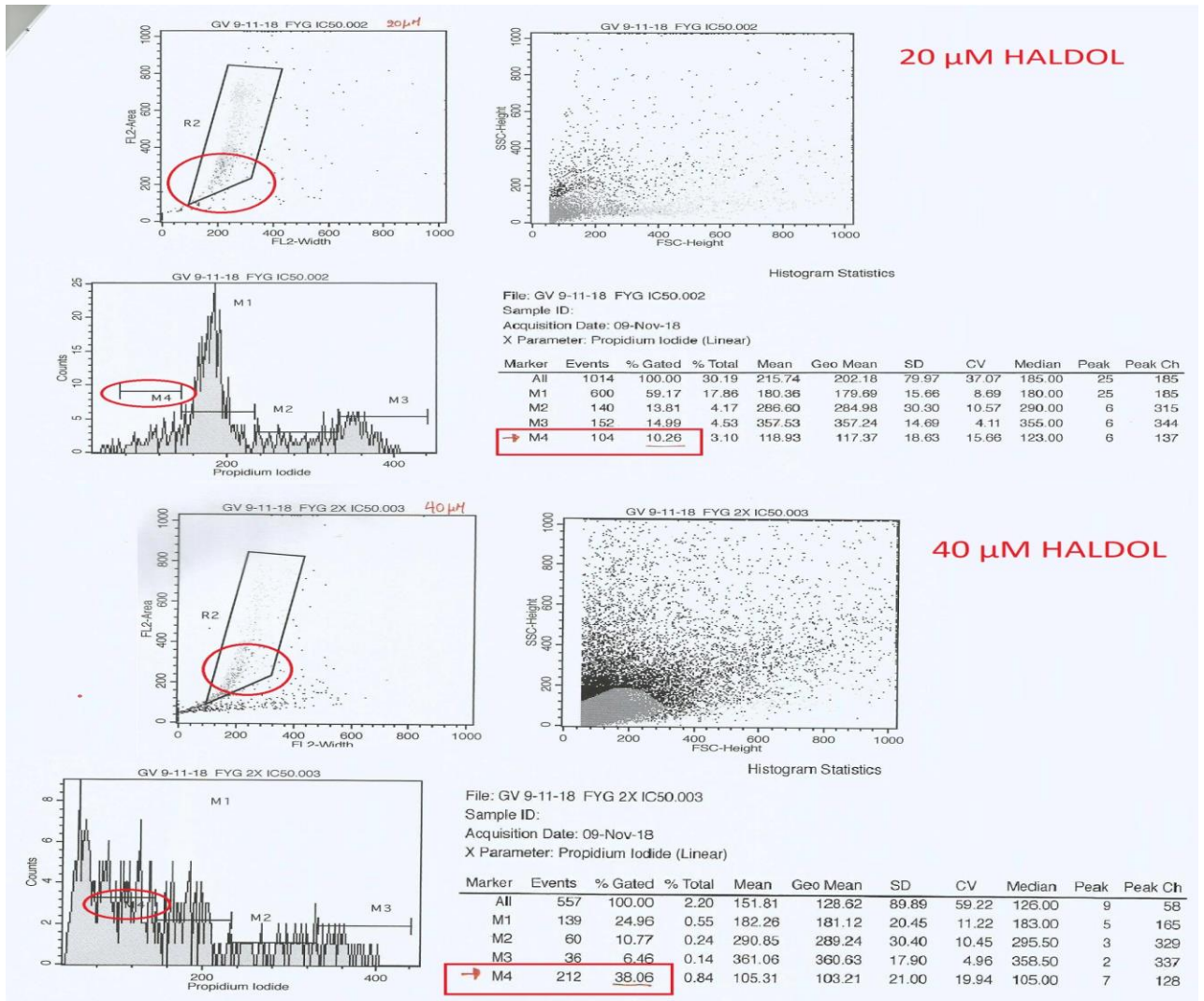
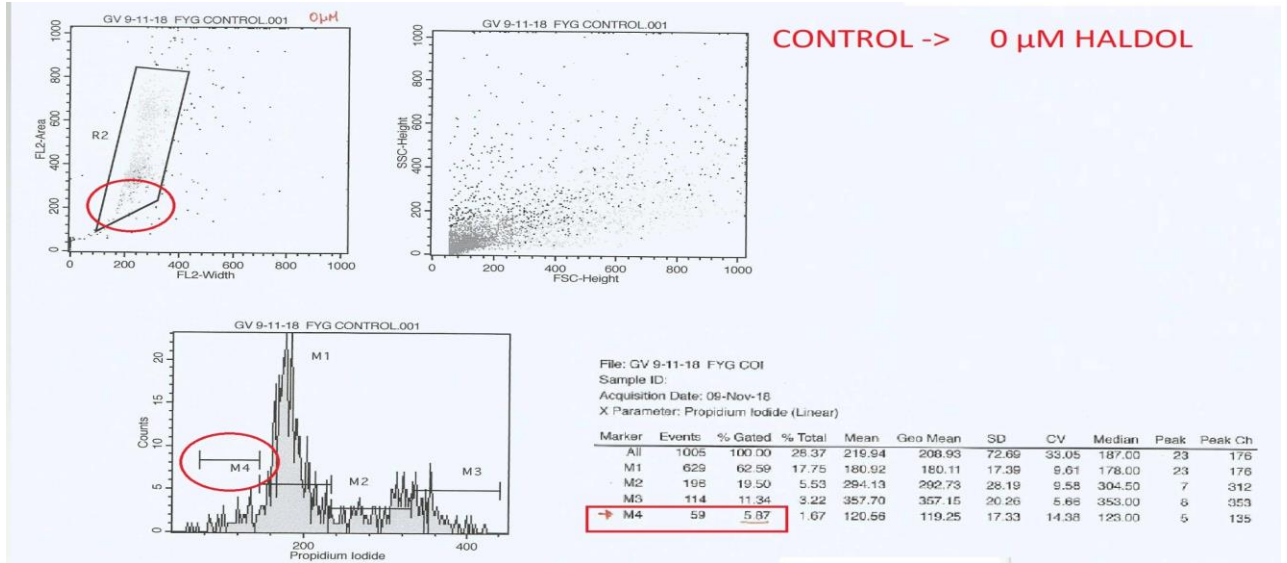


Εικόνα 9: Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης της αλοπεριδόλης σε συνδυασμό με τεμοζολαμίδη και ακτινοβολία με τη μέθοδο MTT. Προσδιορίστηκε η ικανότητα της αλοπεριδόλης να δρα ως αναστολέας της ανάπτυξης του όγκου σε δύο τύπους κυττάρων γλοιοβλαστώματος, U87 και T98. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις αλοπεριδόλης ίσες με το IC_{50} και $2 IC_{50}$, ενώ όταν συγχορηγείται με τεμοζολαμίδη και ακτινοβολία, εφαρμόζονται συγκεντρώσεις ίσες με IC_{50} και $IC_{50}/2$ της ουσίας. Ο συνδυασμός των δύο ουσιών ελαττώνει την ικανότητα επιβίωσης και στους δύο τύπους κυττάρων. Ιδιαίτερα εμφανής είναι και η μείωση του πληθυσμού των κυττάρων και των δύο τύπων έπειτα από ακτινοβολία. Ύστερα από χρήση αλοπεριδόλης σε συγκέντρωση ίση με IC_{50} και συγκέντρωση IC_{50} της τεμοζολαμίδης σε συνδυασμό με ακτινοβολία έχουμε το καλύτερο αποτέλεσμα.

10. Η Αλοπεριδόλη προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα U87 μέσω απόπτωσης, λόγω στάσης του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1

Το παραπάνω πείραμα επιβεβαιώνει την βιβλιογραφία και δείχνει πως η αλοπεριδόλη σε συνδυασμό με τεμοζολαμίδη και ακτινοβολήση έχει την ικανότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων γλοιοβλαστώματος T98 και U87. Στο επόμενο πείραμα θα εξετάσουμε τον τρόπο που προκαλείται η αναστολή αυτή και για το λόγο αυτό θα χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, όπως κάναμε και στην παράγραφο 5. Στην παρούσα μέθοδο, εφαρμόζουμε την κυτταρομετρία ροής για τα κύτταρα U87 και ύστερα από επώαση με 20 και 40μM αλοπεριδόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη απόπτωση των κυττάρων, η οποία είναι δόσοεξαρτώμενη σε συγκεντρώσεις αλοπεριδόλης της τάξης IC_{50} και $2IC_{50}$ στα κύτταρα U87. Η απόπτωση είναι αποτέλεσμα της στάσης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (G1 arrest).

Εικόνα 10: Μελέτη της αποπτωτικής ικανότητας της αλοπεριδόλης. Προσδιορίστηκε η ικανότητα της αλοπεριδόλης να προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα U87. Η ανάλυση έγινε με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής, η οποία στηρίζεται στην ικανότητα του ιωδιούχου προπιδίου να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να αποδίδει φθορισμό. Οι συγκεντρώσεις αλοπεριδόλης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της τάξεως IC_{50} και $2 IC_{50}$ και οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η αλοπεριδόλη προκαλεί δόσοεξαρτώμενη απόπτωση, μέσω της στάσης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1.



11. Η Αλοπεριδόλη επηρεάζει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87 και T98

Η ικανότητα της αλοπεριδόλης να προκαλεί κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος, που όπως τονίστηκε παραπάνω, είναι αποτέλεσμα ενός μηχανισμού απόπτωσης, υπογραμμίζει την χρησιμότητα της ουσίας ως ογκοκατασταλτικού παράγοντα. Στο επόμενο πείραμα διερευνήσαμε την δράση της αλοπεριδόλης στη κυτταρική μετανάστευση σε δύο τύπους κυττάρων γλοιοβλαστώματος, τους U87 και T98. Για αυτό το σκοπό εκτελέσαμε το πείραμα της προσομοίωσης τραύματος διά αμυχής, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 7. Οι συγκεντρώσεις της ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της τάξεως των IC_{50} και $2IC_{50}$ και η παρατήρηση έγινε κατά τη διάρκεια της δημιουργίας της αμυχής και ύστερα από 48 και 72 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αλοπεριδόλη στους παρατηρούμενους χρόνους ελαττώνει τη μεταναστευτική/μεταστατική ικανότητα των κυττάρων, με τα καλύτερα αποτελέσματα να εντοπίζονται στα κύτταρα U87.

Εικόνα 11: Μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης των κυττάρων U87 και T98 μετά από επίδραση με ζιπρασιδόνη. Με την τεχνική της προσομοίωσης τραύματος διά αμυχής (scratch wound healing assay) προσδιορίστηκε η ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν, ύστερα από <<τραυματισμό>> του plate και αναμένοντας το χρόνο επούλωσης. Η ποσότητα της αλοπεριδόλης ήταν της τάξεως IC_{50} και $2IC_{50}$ και η παρατήρηση του χρόνου επούλωσης έγινε στις 48 και στις 72 ώρες μετά την επίδραση με την ουσία.

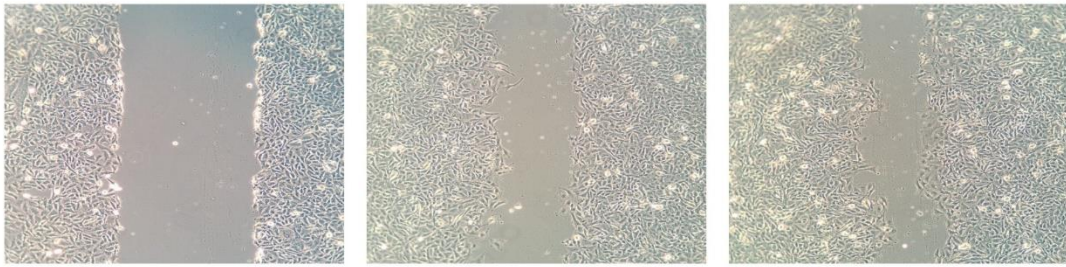
U87

0h

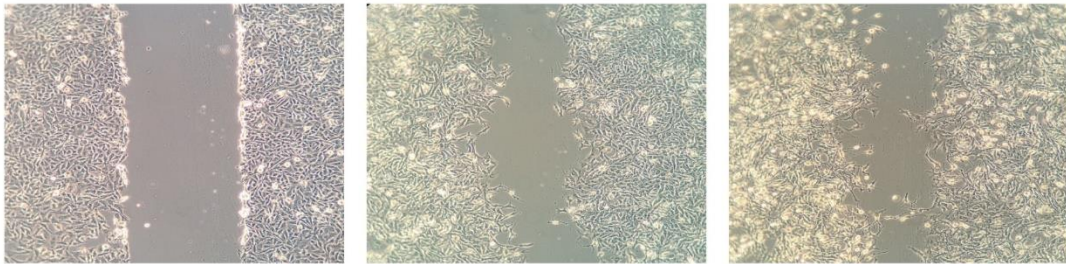
48h

72h

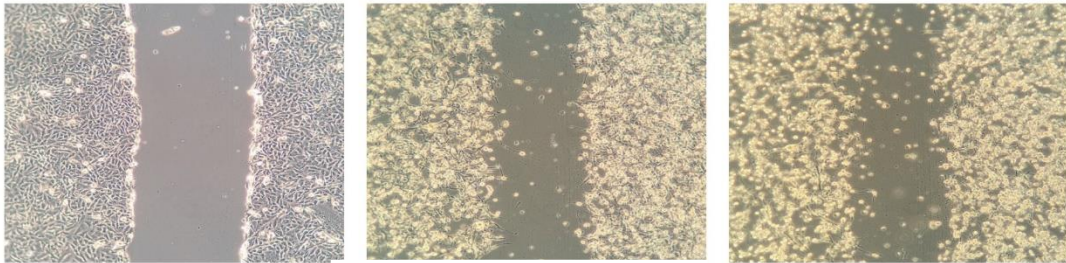
Control



IC₅₀



2IC₅₀



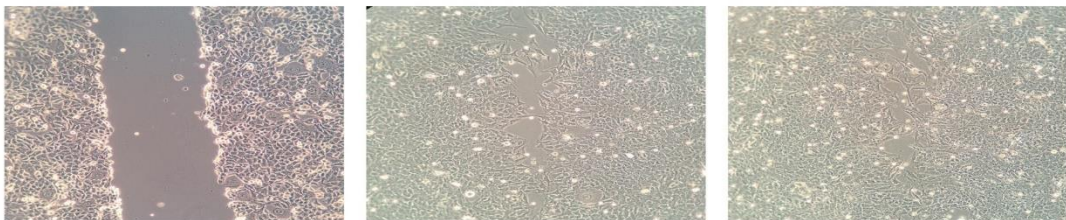
T98

0h

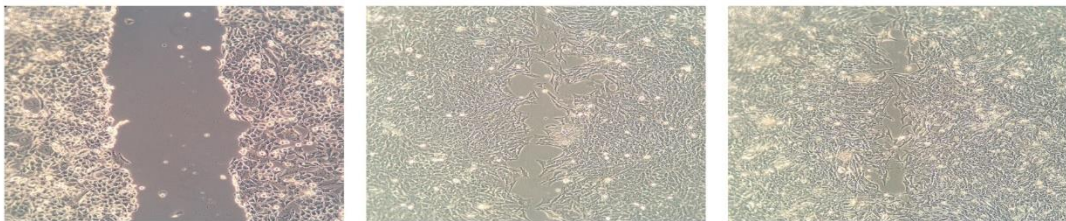
48h

72h

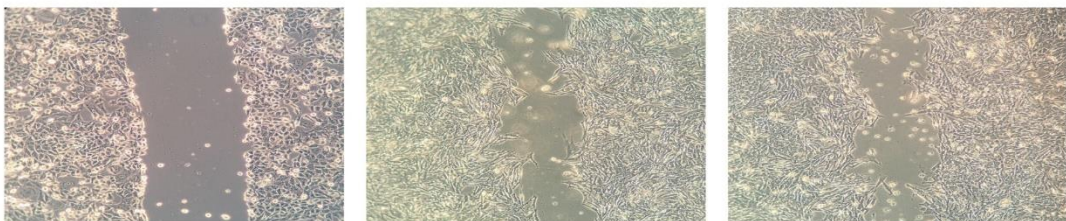
Control



IC₅₀



2IC₅₀



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γλοιοβλάστωμα είναι ο πλέον κακοήθης πρωτοπαθής όγκος στον εγκέφαλο. Παρά την εντατική κλινική έρευνα και μερικές νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, ο μέσος χρόνος επιβίωσης είναι περίπου 15 μήνες και το ποσοστό επιβίωσης άνω των 5 ετών δεν υπερβαίνει το 2% (20). Επί του παρόντος, η μέγιστη χειρουργική εκτομή σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία και θεραπεία με τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα Τεμοζολαμίδη και Καρμουςτίνη είναι η θεραπεία εκλογής σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 70 ετών με νεοδιαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα. Η τεμοζολαμίδη είναι ένας παράγοντας αλκυλίωσης ο οποίος λειτουργεί με μεταφορά αλκυλομάδων σε βάσεις γουανίνης που προκαλούν βλάβη στο DNA και κυτταρικό θάνατο. Η αποτυχία να αποκατασταθεί η αλκυλίωση έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση (50,51). Η ανάγκη για πλήρη ίαση οδήγησε στην αναζήτηση νέων μεθόδων ικανών να αναστείλουν την πορεία της κακοήθειας, μία από τις οποίες είναι ο συνδυασμός χειρουργικής εκτομής με ακτινοβολία και χημειοθεραπεία με τον παράγοντα τεμοζολαμίδη. Τα θετικά αποτελέσματα έδειξαν την πιθανότητα συνδυασμού του παράγοντα αυτού με άλλους φαρμακευτικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση της κακοήθειας.

Οι ιντερφερόνες (IFNs) είναι μια οικογένεια συγγενών και φυσικά απαντώμενων πρωτεϊνών σήματος που ομαδοποιούνται σε τρία κύρια είδη άλφα (α), βήτα (β) και γάμμα (γ) σύμφωνα με την κυτταρική τους προέλευση και τους παράγοντες διέγερσης και είχαν αρχικά περιγραφεί ως αντι-ιικά (168). Πέραν των δράσεων τους ως αντι-ιικά οι ιντερφερόνες προκαλούν ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η διαφοροποίηση, η διακοπή της ανάπτυξης και η απόπτωση. Οι αντικαρκινικές δράσεις των IFNs τύπου I είναι είτε άμεση, προκαλώντας την αναστολή της ανάπτυξης και την απόπτωση κυττάρων όγκου είτε έμμεση, μέσω ενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης (164). Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I (MHC I) αυξάνεται από τις IFNs τύπου I με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αναγνώρισης αντιγόνου, ενώ προκαλούν την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως το ICAM-1 και L-σελεκτίνη (165). Επιπρόσθετα, οι IFNs τύπου I διεγείρουν την έκκριση της IL-15, η οποία οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των φονικών κυττάρων και των CD8 T κυττάρων (166). Οι αντικαρκινικές δράσεις των IFNs τύπου I επάγονται με τη μεταγραφική ρύθμιση προαποπτωτικών γονιδίων, όπως είναι τα γονίδια ISGs που ενεργοποιούνται από το μόριο TRAIL (167). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα χρησιμοποιήσαμε την IFN-γ ως πιθανό αποπτωτικό παράγοντα σε κύτταρα U251. Η επίδραση έγινε για 72h με διαφορετικές συγκεντρώσεις IFN-γ. Τα αποτελέσματα μας φαίνεται να συμφωνούν με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία για τον συγκεκριμένο τύπο IFN-γ. Η αναστολή που προκαλεί η IFN-γ στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων U251 δεν είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτη για να την θεωρήσουμε ως σημαντικό ογκοκατασταλτικό παράγοντα παρά μόνον στην τιμή των 1500IU.

Τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η IFN- γ δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας αναστολής για τους κυτταρικούς τύπους γλοιοβλαστώματος U251. Έτσι, η ομάδα μας στράφηκε σε μια άλλη κατηγορία φαρμάκων, τα οποία είχαν ιδιαίτερα σημαντικά αποτελέσματα στον περιορισμό της ανάπτυξης διαφόρων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του γλοιοβλαστώματος που μας ενδιέφερε στη συγκεκριμένη διατριβή. Τα φάρμακα αυτά είναι οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της σχιζοφρένειας, καθώς και σε άλλες καταστάσεις, όπως η μανία και το παραλήρημα, τα οποία είναι ευρύτερα γνωστά ως αντιψυχωσικά φάρμακα. Οι παράγοντες αυτοί χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα άτυπα και τα τυπικά. Οι δύο αυτές κατηγορίες εμφανίζουν σημαντικά αποτελέσματα ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες σε διάφορους τύπους καρκίνου, και για αυτό το λόγο η ομάδα μας επικεντρώθηκε σε δύο κύρια φάρμακα, ένα από κάθε κατηγορία, τα οποία εμφανίζουν αντικαρκινική δράση γενικότερα, αλλά δεν έχουν αποτέλεσμα ως αναστολείς του γλοιοβλαστώματος στην μέχρι σήμερα βιβλιογραφία. Τα δύο αυτά φάρμακα είναι η αλοπεριδόλη, η οποία ανήκει στα τυπικά αντιψυχωσικά και η ζιπρασιδόνη, που ανήκει στα άτυπα αντιψυχωσικά.

Η αλοπεριδόλη, εμφανίζει στην βιβλιογραφία κάποια δράση σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, καθώς οι μεταβολίτες των προφαρμάκων της αλοπεριδόλης μειώνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε κύτταρα γλοιώματος C6 με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση (275). Τα επόμενα πειράματα που ήταν λοιπόν σημαντικό να γίνουν αφορούσαν την δράση της αλοπεριδόλης σε άλλους τύπους γλοιοβλαστώματος, και πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα U87 και T98, τα οποία χρησιμοποιεί η ομάδα μας. Αφού πρώτα προσδιορίσαμε την τιμή IC₅₀ της αλοπεριδόλης, προχωρήσαμε στην επώαση των δύο κυτταρικών σειρών με αλοπεριδόλη. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση, όχι όμως αρκετή ώστε να θεωρήσουμε το φάρμακο αυτό ικανό ογκοκατασταλτικό παράγοντα. Για αυτόν λοιπόν το λόγο, στο πείραμα αυτό της διατριβής χρησιμοποιήσαμε συνδυασμό της αλοπεριδόλης μαζί με εφαρμογή ακτινοβολίας και έναν ογκοκατασταλτικό παράγοντα ειδικό για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος, την τεμοζολαμίδη (Εικόνα 9). Ο συνδυασμός των δύο ουσιών σε τιμές ίσες με την τιμή του IC₅₀ τους μαζί με εφαρμογή ακτινοβολίας είναι ο καλύτερος συνδυασμός, ο οποίος θα μπορούσε δυνητικά να εφαρμοστεί και θεραπευτικά σε άτομα που νοσούν από έναν από τους δύο τύπους γλοιοβλαστώματος. Ο ισχυρισμός αυτός έγκειται και στα αποτελέσματα που πάρθηκαν και από τα υπόλοιπα πειράματα που διεξήχθησαν στην διατριβή.

Στο επόμενο στάδιο, είναι σημαντικό να προσδιορίσουμε τον τρόπο με τον οποίο επιτελείται ο κυτταρικός θάνατος από τον παραπάνω αναφερόμενο συνδυασμό. Εφαρμόζοντας το πείραμα της κυτταρομετρίας ροής σε τιμές

αλοπεριδόλης ίσες με 0, 20 και 40μM σε κύτταρα U87, συμπεραίνουμε πως ο κυτταρικός θάνατος είναι αποτέλεσμα της απόπτωσης των κυττάρων, λόγω στάσης του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 (Εικόνα 10). Αυτό πρακτικά σημαίνει πως υπάρχει κάποια σημαντική βλάβη στο DNA του κυττάρου, το οποίο εξαναγκάζεται σε απόπτωση.

Ιδιαίτερα σημαντικό, ακόμη, είναι να προσδιορίσουμε την ικανότητα των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος να μεταναστεύουν, ύστερα από επώαση τους με αλοπεριδόλη. Η ικανότητα μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων είναι από τις πιο σημαντικές ιδιότητές τους, καθώς σε αυτήν οφείλεται η ικανότητά τους να δημιουργούν μεταστάσεις. Η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε με την τεχνική της προσομοίωσης τραύματος διά αμυχής, όπου δημιουργείται ένα εικονικό <<τραύμα>> στην καλλιέργεια και προσδιορίζεται η ικανότητα των κυττάρων να το επουλώσουν. Η επίδραση με συγκεντρώσεις αλοπεριδόλης ίσες με IC_{50} και $2IC_{50}$ για χρονικό διάστημα 48 και 72h, φαίνεται να εμποδίζει την <<επούλωση του τραύματος>> που δημιουργήθηκε για να προσδιορίσουμε την κυτταρική μετανάστευση, κυρίως στα κύτταρα U87 (Εικόνα 11).

Τα δύο παραπάνω πειράματα, δείχνουν την ικανότητα της αλοπεριδόλης να εμποδίζει τις κυτταρικές διεργασίες, κυρίως των κυττάρων U87 και υπογραμμίζει τον σημαντικό ρόλο που μπορεί να επιτελέσει ο παράγοντας αυτός στην καταστολή του κυτταρικού αυτού τύπου γλοιοβλαστώματος, ενώ και το πρώτο πείραμα αποδεικνύει την ικανότητα της να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Και τα τρία πειράματα καταδεικνύουν την πιθανότητα χρήσης της συγκεκριμένης ουσίας στον περιορισμό και πιθανώς στην θεραπεία του κυτταρικού τύπου U87 του γλοιοβλαστώματος. Για αυτό το λόγο είναι σημαντική η διερεύνηση των μορίων που λαμβάνουν μέρος στις δράσεις που επιτελούνται από την αλοπεριδόλη, τόσο αυτές που αφορούν την επιτελούμενη από αυτήν απόπτωση, όσο και τις δράσεις που οδηγούν στον περιορισμό της κυτταρικής μετανάστευσης.

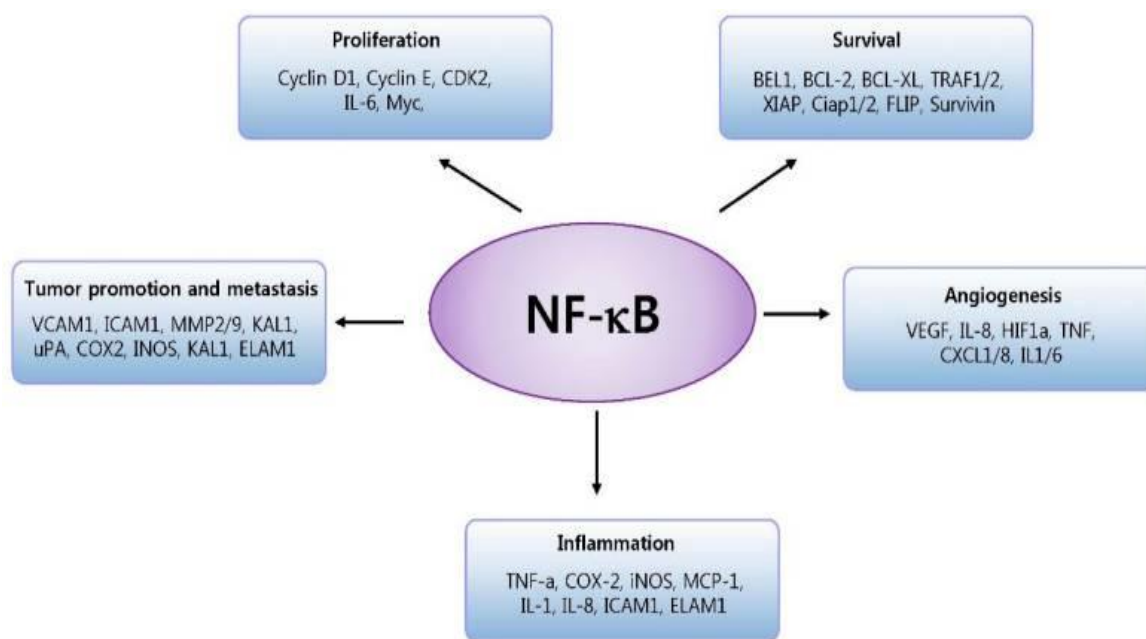
Στη συνέχεια, επικεντρώσαμε το ενδιαφέρον μας στην ζιπρασιδόνη, ουσία που ανήκει στην κατηγορία των άτυπων αντιψυχωσικών, τα οποία θεωρούνται φάρμακα πιο ασφαλή και με μεγαλύτερη ικανότητα στην θεραπεία. Η επιλογή της ζιπρασιδόνης από όλη την κατηγορία των άτυπων αντιψυχωσικών στην παρούσα διατριβή έγινε καθώς για τη συγκεκριμένη ουσία δεν υπήρχαν βιβλιογραφικές αναφορές όσον αφορά τη σχέση της με τον καρκίνο και έτσι υπήρχε άγονο και παρθένο έδαφος για έρευνα στο κομμάτι αυτό. Αρχικά, όπως και πριν την έναρξη των πειραμάτων της αλοπεριδόλης, προσδιορίσαμε την τιμή IC_{50} . Το επόμενο βήμα ήταν να εξετάσουμε την ικανότητα της ζιπρασιδόνης να προάγει τον κυτταρικό θάνατο ως μονοθεραπεία σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373 και U87. Στο πείραμα μας είναι φανερή η ικανότητα της ζιπρασιδόνης να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε όλες τις χορηγούμενες δόσεις με τα

καλύτερα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στα 200 μ M (Εικόνα 3). Στη δόση αυτή η αναστολή φτάνει σε ποσοστό έως και 80%, δίνοντας ιδιαίτερα ενθαρρυντικά στοιχεία για τον παράγοντα αυτό. Ακολουθώντας, βασιζόμενοι στα στοιχεία που λήφθηκαν από την αλοπεριδόλη, εξετάσαμε την ικανότητα της ζιπρασιδόνης να προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε συνδυασμό με εφαρμογή ακτινοβολίας και έναν κυτταροτοξικό παράγοντα, την τεμοζολαμίδη, ακολουθώντας έτσι εν μέρει το πρωτόκολλο θεραπείας για τους τύπους γλοιοβλαστώματος, που περιλαμβάνει έναν κυτταροτοξικό παράγοντα σε συνδυασμό με ακτινοβολία. Χρησιμοποιώντας και την τεμοζολαμίδη ως μονοθεραπεία σαν θετικό παράγοντα αναστολής του όγκου, τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την χρήση του τριπλού αυτού συνδυασμού ως πιθανού ογκοκατασταλτικού παράγοντα σε κύτταρα T98 και U87. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση του τριπλού αυτού συνδυασμού στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού σε ποσοστό σχεδόν 80% (Εικόνα 4) και είναι πιο αποτελεσματικός από τη χρήση των φαρμάκων ως μονοθεραπεία. Το πείραμα αυτό υποδεικνύει την ικανότητα της ζιπρασιδόνης να δρα ως πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας, όταν χρησιμοποιείται μαζί με άλλους παράγοντες αναστολής του όγκου.

Το επόμενο βήμα είναι να διερευνήσουμε τον τρόπο με τον οποίο επιτελείται αυτή η αναστολή στον όγκο και τα περαιτέρω μόρια που λαμβάνουν μέρος στην αναστολή αυτή. Όπως και στο πείραμα της αλοπεριδόλης, εφαρμόσαμε το πείραμα της κυτταρομετρίας ροής για να προσδιορίσουμε τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα μας. Το αποτέλεσμα καταδεικνύει την ικανότητα της ζιπρασιδόνης να προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα U87 και U373 λόγω στάσης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (Εικόνα 5). Η απόπτωση που προκαλείται από τον εν λόγω παράγοντα είναι δόσοεξαρτώμενη, που δείχνει και τη σημασία της αύξησης της δόσης στην καταστολή των κυττάρων του όγκου.

Για την περαιτέρω συνέχεια της έρευνας στο κομμάτι των αντιψυχωσικών φαρμάκων και ιδιαίτερα της ζιπρασιδόνης, ήταν ιδιαίτερα σημαντικός ο προσδιορισμός των μορίων ή του μονοπατιού μέσω του οποίου επιτελείται η απόπτωση. Στη συνέχεια της διατριβής, επικεντρώσαμε το ενδιαφέρον μας στον εντοπισμό αυτών των μορίων. Για αυτό το λόγο εξετάσαμε την εμπλοκή του παράγοντα NF- κ B. Ο εν λόγω παράγοντας NF- κ B, είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που ελέγχει τη μεταγραφή του DNA, την παραγωγή κυτοκίνης και την επιβίωση των κυττάρων. Παρουσιάζει πολύ σημαντικό ρόλο ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας και η μειωμένη έκφρασή του σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση. Η απελευθέρωση του μορίου στη μη δεσμευμένη του μορφή οδηγεί σε έκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων και σε καταστολή της απόπτωσης των κυττάρων. Αφού η ζιπρασιδόνη οδηγεί σε δόσοεξαρτώμενη απόπτωση, αναμένουμε πως η έκφραση του παράγοντα NF- κ B θα είναι μειωμένη. Χρησιμοποιώντας την τεχνική Western, βλέπουμε πως η τιμή του

παράγοντα μειώνεται, με την μεγαλύτερη μείωση να εμφανίζεται στις 24 και στις 72 ώρες (Εικόνα 6). Η μείωση του παράγοντα NF-κB ανοίγει ένα νέο κομμάτι στην διερεύνηση των υπόλοιπων μορίων που σχετίζονται με τον παράγοντα αυτόν και ενεργοποιούνται στη συνέχεια του μονοπατιού από την ζιπρασιδόνη, όπως εμφανίζονται στο παρακάτω σχήμα. Η παρούσα διατριβή δίνει τα βασικά σημεία της ικανότητας της ζιπρασιδόνης να δρα ως αποπτωτικός παράγοντας και έτσι τα ενεργοποιημένα μόρια στην πορεία του μονοπατιού χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης.



Αφού μελετήσαμε τον ρόλο της ζιπρασιδόνης ως αντι-αποπτωτικού παράγοντα, στο επόμενο στάδιο θα αναζητήσουμε το ρόλο της ζιπρασιδόνης στο περιορισμό της κυτταρικής μετανάστευσης, που είναι ένα βασικό κομμάτι της ικανότητας των κυττάρων να δημιουργούν μεταστάσεις. Όπως και στο πείραμα της αλοπεριδόλης, η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε με την τεχνική της προσομοίωσης τραύματος διά αμυχής, όπου δημιουργείται ένα εικονικό <<τραύμα>> στην καλλιέργεια και προσδιορίζεται η ικανότητα των κυττάρων να το επουλώσουν. Στο συγκεκριμένο πείραμα, οι συγκεντρώσεις της ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της τάξεως των IC₅₀ (60μM) και 2IC₅₀ (120μM) και η παρατήρηση έγινε κατά τη διάρκεια της δημιουργίας της αμυχής και ύστερα από 48 και 72 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ζιπρασιδόνη στους παρατηρούμενους χρόνους ελαττώνει τη μεταναστευτική/μεταστατική ικανότητα των κυττάρων, με τα καλύτερα αποτελέσματα να εντοπίζονται στα κύτταρα U373 (Εικόνα 7).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι:

1. Η IFN- γ , παρά τις δράσεις της ως αναστολέας των ιών, στην διαμόρφωση της ανοσολογικής απόκρισης και ως αναστολέας του πολλαπλασιασμού, δεν εμφανίζει ουσιαστική δράση ως καταστολέας του γλοιοβλαστώματος.
2. Η αλοπεριδόλη προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού σε κύτταρα U87 και T98 σε συνδυασμό με εφαρμογή ακτινοβολήσης και τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα τεμοζολαμίδη.
3. Η αλοπεριδόλη προκαλεί δόσοεξαρτώμενη απόπτωση σε κύτταρα U87 μέσω στάσης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1.
4. Η αλοπεριδόλη ελαττώνει τη μεταναστευτική/μεταστατική ικανότητα των κυττάρων U87 και T98.
5. Η ζιπρασιδόνη προάγει τον κυτταρικό θάνατο όταν χορηγείται ως μονοθεραπεία σε κύτταρα U87 και U373 αλλά και σε συνδυασμό με ακτινοβολία και τεμοζολαμίδη σε κύτταρα U87 και T98.
6. Η Ζιπρασιδόνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω δόσοεξαρτώμενης απόπτωσης, λόγω στάσης του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1.
7. Η επαγόμενη από την ζιπρασιδόνη απόπτωση προκαλείται λόγω αναστολής του παράγοντα NF- κ B με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο.
8. Η Ζιπρασιδόνη ελαττώνει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87, T98 και U373.

Τα αποτελέσματα αυτά αναμένεται να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος, ως εναλλακτικές ή συμπληρωματικές ογκοκατασταλτικές θεραπείες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Ιντερφερόνες (IFNs) αποτελούν πρωτεΐνες σήματος με ποικίλες δράσεις και σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση των ιών, καθώς και στην ανοσοκαταστολή και τον περιορισμό ανάπτυξης όγκων. Η βιβλιογραφία παρουσιάζει σημαντικές ικανότητες της χρήσης των IFNs ενάντια σε διάφορους τύπους όγκων και κυρίως των IFNs τύπου I (IFN- α , IFN- β). Η επώαση από την ερευνητική μας ομάδα με διαφορετικές συγκεντρώσεις IFN- γ σε κύτταρα U251 οδήγησε σε μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων, αποτέλεσμα που συμφωνεί με την παρούσα βιβλιογραφία, η οποία δεν παρουσιάζει την IFN- γ ως πιθανό ογκοκατασταλτικό παράγοντα. Στη συνέχεια της παρούσας μελέτης, εστίασαμε στη δράση των αντιψυχωσικών φαρμάκων και στην ικανότητά τους να προκαλούν αναστολή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων όγκου. Με αφετηρία την παρατήρηση ότι ο παράγοντας αλοπεριδόλη, που ανήκει στην κατηγορία των τυπικών αντιψυχωσικών, σε προγενέστερη μελέτη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων γλοιώματος C6, επώασαμε κύτταρα γλοιώματος U251 και T98 με τον παράγοντα αυτό και σε συνδυασμό με εφαρμογή ακτινοβολίας και τη χρήση ενός ογκοκατασταλτικού παράγοντα, της τεμοζολαμίδης. Η χρήση της αλοπεριδόλης σε συγκέντρωση ίση με IC₅₀ και συγκέντρωση IC₅₀ της τεμοζολαμίδης, σε συνδυασμό με ακτινοβολία, μέσω της μεθόδου MTT, παρουσιάζει το καλύτερο αποτέλεσμα. Ο επαγόμενος από την αλοπεριδόλη κυτταρικός θάνατος, προκαλείται λόγω δόσοεξαρτώμενης απόπτωσης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου σε συγκεντρώσεις της τάξεως IC₅₀ και 2IC₅₀, αποτέλεσμα που λαμβάνουμε με εφαρμογή της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής για προσδιορισμό της φάσης του κυτταρικού κύκλου. Μεσω της τεχνικής της προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής, η αλοπεριδόλη φαίνεται να αναστέλλει την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων U87 και T98, σε συνδυασμό με την ικανότητά της να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Η ενασχόληση της ερευνητικής μας ομάδας με την κατηγορία των άτυπων αντιψυχωσικών περιελάμβανε την ουσία ζιπρασιδόνη, η οποία προάγει τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα U87 και U373, χρησιμοποιούμενη ως μονοθεραπεία. Ο συνδυασμός της ζιπρασιδόνης σε συγκέντρωση IC₅₀ με εφαρμογή ακτινοβολίας και τεμοζολαμίδης σε συγκέντρωση IC₅₀ οδηγούν σε μείωση του πληθυσμού μέχρι και 80%. Τα αποτελέσματα αυτά προκύπτουν μέσω της μεθόδου MTT. Εφαρμόζοντας την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής για προσδιορισμό της φάσης του κυτταρικού κύκλου παρατηρήσαμε πως η ζιπρασιδόνη σε συγκεντρώσεις IC₅₀ και 2IC₅₀ παρουσιάζει δόσοεξαρτώμενη απόπτωση μέσω στάσης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και στη φάση G2/M, που υποδηλώνει την πιθανή συνέργεια της ουσίας με την ακτινοβολία στην αντιμετώπιση του όγκου. Το μονοπάτι που ευθύνεται για την προκαλούμενη στα κύτταρα αυτά απόπτωση είναι αυτό του παράγοντα NF- κ B, αφού μέσω της τεχνικής Western παρατηρήσαμε την χρονο-εξαρτώμενη αναστολή στην έκφραση του

παράγοντα αυτού. Η ικανότητα της ζιπρασιδόνης να δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας δεν περιορίζεται μόνο στην απόπτωση που προκαλεί, αλλά και στον περιορισμό της μεταναστευτικής ικανότητας σε κύτταρα γλοιώματος U87, T98 και U373. Συνολικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προκύπτει ότι οι παράγοντες αλοπεριδόλη και ζιπρασιδόνη προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης και αναστολή της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων γλοιοβλαστώματος και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες.

SUMMARY

The current study entitled as <<*The effects of Interferons and Antipsychotics in cell cycle and cell death in glioblastoma cell series in addition with the use of chemotherapy*>> by Thomas I. Tsalios refers to the effects of the use of Interferons and typical and atypical antipsychotics as anticancer agents and their significant role in the reduction of glioma proliferation and metastasis ability. Interferons (IFNs) are signal proteins with a variety of actions and play an important role in the treatment of viruses, as well as in immunosuppression and restriction of tumor growth. The literature demonstrates a significant use of IFNs against various types of tumors and mainly type I IFNs (IFN- α , IFN- β). Incubation with different concentrations of IFN- γ in U251 cells led to a slight inhibition in cell growth, a result that is consistent with the present literature, which does not present IFN- γ as a possible tumor suppressor. In the next step of our study, we focused on the action of antipsychotic drugs and their ability to inhibit tumor cell proliferation. Based on the observation that the typical antipsychotic haloperidol in a previous study inhibits the proliferation of C6 glioma cells, we incubated U251 and T98 glioma cells using this factor and in combination with radiation and the anticancer agent temozolamide. The use of haloperidol in a concentration equal to IC_{50} and a concentration of IC_{50} of temozolamide, in combination with radiation, through the MTT method, presents the best result. The application of the flow cytometry method to determine the phase of the cell cycle showed that haloperidol-induced cell death is caused by dose-dependent apoptosis in the G1 phase of the cell cycle at concentrations of IC_{50} and $2IC_{50}$. When using the method of in vitro scratch wound healing assay, haloperidol appears to inhibit the migration ability of U87 and T98 cells, in combination with its ability to inhibit the proliferation of these cells. The involvement of our research team with the atypical antipsychotics included the substance ziprasidone, which promotes cell death in U87 and U373 cells, when used as monotherapy. The combination of ziprasidone in a concentration equal to IC_{50} along with the use of radiation and concentration of IC_{50} of temozolamide leads to a reduction of glioma population up to 80%. These results are obtained through the MTT method. Applying the flow cytometry method to determine the phase of the cell cycle, we observed that the use of ziprasidone at concentrations equal to IC_{50} and $2IC_{50}$ showed a dose-dependent apoptosis through G1 and G2/M phase arrest, indicating the possibility that ziprasidone and radiation could act synergistically in tumor treatment. By the use of the Western blotting method, we observed that the pathway that is responsible for the apoptosis caused in these cells is the pathway of NF- κ B, as we observed the time-dependent inhibition in the expression of this factor. The ability of ziprasidone to act as a tumor suppressor is not only limited to the apoptosis it causes, but also to the reduction of the migration capacity of U87, T98 and U373 glioma cells. Overall, the results of this study show that haloperidol and ziprasidone cause cell death by apoptosis and inhibition of the migratory ability of glioblastoma cells and could be used as possible anticancer agents.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Understanding Brain Tumors. A guide for people with brain or spinal cord tumors, and their families and friends. Cancer Council NSW 2014.
2. Leland Hartwell. Biology C Rediscovering biology. Cell Biology Cancer 2017; pp. 1-17.
3. What You Need To Know About Brain Tumors. U.S. Department of health and human services. National Cancer Institute 2009; 1-46.
4. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol* 2017; 3(4): 524-48.
5. Segal D, Karajannis MA. Pediatric brain tumors: An update. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2016; 46(7): 242-50.
6. Brain Tumor Primer. A Comprehensive Introduction to Brain Tumors. 9th edition. American Brain Tumor Association 2015; pp. 7-86.
7. Cancer treatment Centers of America website. Available at www.cancercenter.com/brain-cancer
8. Brain Tumor Primer. A Comprehensive Introduction to Brain Tumors. 9th edition. American Brain Tumor Association 2015; pp. 7-86.
9. Cleveland Clinic website. Available at www.my.clevelandclinic.org/health/articles/adult-brain-tumor Mayfield Brain & Spine website. Available at www.mayfieldclinic.com/PE-BrainTumor.html
10. Cancer. Net website. Available at www.cancer.net/cancer-types/medulloblastoma-childhood/symptoms-and-sign
11. Mayfield Brain & Spine website. Available at www.mayfieldclinic.com/PE-BrainTumor.html
12. Sloan AE, Nock CJ, Einstein DB. Diagnosis and treatment of melanoma brain metastasis: A literature review *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center* 2009; 16(3) 248
13. RadiologyInfo.org for patients. Available at www.radiologyinfo.org/brain_tumors
14. Shahpar S, Mhatre PV, Huang ME. Update on brain tumors New developments in neuro-oncologic diagnosis and treatment, and impact on rehabilitation strategies *PM&R* 2017; 8(7): 678-89.
15. www.blog.braintumor.org/files/public-docs/frankly-speakingabout-cancer-brain-tumors.pdf
16. Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology, third edition By Richard D. Howland, Mary J. Mycek
17. Sonawane SV. Brain as a sancturian site in drug delivery approaches to improve bioavailability in brain. *PharmaTutor* 2014; 2(7): 63-82

18. Prog Neurobiol. 2005 May;76(1):22-76. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. Löscher W, Potschka H.
19. Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2018;13(1):70-85.
doi:10.2174/1574892812666171129142023. Brain Cancer: Implication to Disease, Therapeutic Strategies and Tumor Targeted Drug Delivery Approaches. Shah V, Kochar P.
20. Liu Y, Shete S, Etzel CJ et al. Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMGA2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. J Clin Oncol 2010;28:2467-74.
21. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell. 2006; 9:157–173. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.019 [PubMed: 16530701]
22. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. Surgical Neurology International. 2014; 5:64–62. DOI: 10.4103/2152-7806.132138 [PubMed: 24991467]
23. Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. N Engl J Med 359, 492–507.
24. Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., & Berger, M. S. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. Neuro Oncol 4, 278–299.
25. Hardell, L., Carlberg, M., Soderqvist, F., Mild, K. H., & Morgan, L. L. (2007). Long-term use of cellular phones and brain tumors: increased risk associated with use for N or >10 years. Occup Environ Med 64, 626–632.
26. Scott, C. B., Scarantino, C., Urtasun, R., Movsas, B., Jones, C. U., Simpson, J. R., et al. (1998). Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-96. Int J Radiat Oncol Biol Phys 40, 51–55.
27. Stupp, R., Hegi, M. E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P. M., et al. (2010). Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. J Clin Oncol 28(16), 2712–2718.
28. Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer 5, 275–284.
29. Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. Neuro Oncol 1, 44–51.
30. Louis, D. N. (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. Annu Rev Pathol 1, 97.
31. Hartmann, C., Hentschel, B., Wick, W., Capper, D., Felsberg, J., Simon, M., et al. (2010). Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis

- than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* 120, 707–718.
32. Cheng, H., Yue, W., Xie, C., Zhang, R., Hu, S., & Wang, Z. (2013). IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis. *Tumour Biol* 34(6), 3555-3359.
 33. Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell* 17(1), 98–1100.
 34. Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19(4), 764–772.
 35. Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, Huang HJ. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.* 1996; 56:5079–5086. [PubMed: 8895767]
 36. Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, Latham DE, Loeffler JS. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res.* 2002; 62:4307–4315. [PubMed: 12154034]
 37. Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, Cominelli M, Franzin A, Sergi L, et al. Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Res.* 2010; 70:7500–7513. [PubMed: 20858720]
 38. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia.* 2010; 12:675–684.[PubMed: 20824044]
 39. Aldape KD, Ballman K, Furth A, Buckner JC, Giannini C, Burger PC, et al. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004; 63:700–707. [PubMed:15290895]
 40. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93:1246–1256. [PubMed: 11504770]
 41. Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84:6899–6903. [PubMed: 3477813]

42. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.* 2000; 60:1383–1387. [PubMed:10728703]
43. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:4309–4313. [PubMed:1584765]
44. Schwechheimer K, Huang S, Cavenee WK. EGFR gene amplification--rearrangement in human glioblastomas. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 1995; 62:145–148.[PubMed: 7622287]
45. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2003;63:6962–6970. [PubMed: 14583498]
46. Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* 1991; 51:2164–2172. [PubMed: 2009534]
47. Benito R, Gil-Benso R, Quilis V, Perez M, Gregori-Romero M, Roldan P, et al. Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology.* 2010; 30:392–400. [PubMed: 20051017]
48. Hobbs J, Nikiforova MN, Fardo DW, Bortoluzzi S, Cieply K, Hamilton RL, et al. Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. *The American journal of surgical pathology.* 2012; 36:1186–1193. [PubMed: 22472960]
49. Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, et al. Age dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:228–233. [PubMed: 14734474]
50. Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, Zhao W, Higashimoto K, Satoh Y, et al. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene.* 2003; 22:8835–8844. [PubMed: 14647440]
51. Horbinski C. What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol.* 2013; 125:621–636. [PubMed: 23512379]
52. Mellai M, Monzeglio O, Piazzini A, Caldera V, Annovazzi L, Cassoni P, et al. MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 350 brain tumors. *J Neurooncol.* 2012; 107:617–631. [PubMed: 22287028]
53. Ohka F, Natsume A, Motomura K, Kishida Y, Kondo Y, Abe T, et al. The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter

- methylation and is a better prognostic factor for glioma. *PLoS One*. 2011; 6:e23332. [PubMed: 21829728]
54. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C -->A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*. 2001; 22:1715–1719. [PubMed: 11577014]
 55. Eoli M, Menghi F, Bruzzone MG, De Simone T, Valletta L, Pollo B, et al. Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2606–2613. [PubMed: 17473190]
 56. Olson RA, Brastianos PK, Palma DA. Prognostic and predictive value of epigenetic silencing of MGMT in patients with high grade gliomas: a systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol*. 2011; 105:325–335. [PubMed: 21523485]
 57. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:1871–1874. [PubMed: 15041700]
 58. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, et al. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol*. 2011; 29:4482–4490. [PubMed: 22025148]
 59. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009; 360:765–773. [PubMed: 19228619]
 60. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:6002–6007. [PubMed:19755387]
 61. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2010; 120:707–718. [PubMed: 21088844]
 62. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*. 2014; 5:64–62. DOI: 10.4103/2152-7806.132138 [PubMed: 24991467]
 63. Mukherjee, D.; Quiñones-Hinojosa, A. Impact of extent of resection on outcomes in patients with high-grade gliomas. In: Hayat, MA., editor. *Tumors of the central nervous system*. Vol. 2. Springer; San Francisco, CA: 2011. p. 173-179.
 64. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Mirimanoff RO. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-

- year analysis of the EORTCNCIC trial. *Lancet Oncology*. 2009; 10:459–466. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7 [PubMed: 19269895]
65. Chao, KSC.; Perez, CA.; Brady, LW.; Marinetti, T. Management of adult central nervous system tumors. In: Chao, KSC.; Perez, CA.; Brady, LW., editors. *Radiation oncology: Management decisions*. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins; Philadelphia, PA: 2011. p. 146-191.
 66. Barani IJ, Larson DA. Radiation therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment and Research*. 2015; 163:49–73. DOI: 10.1007/978-3-319-12048-5_4 [PubMed: 25468225]
 67. Johnson DR, Fogh SE, Giannini C, Kaufmann TJ, Raghunathan A, Theodosopoulos PV, Clarke JL. Case-based review: Newly diagnosed glioblastoma. *Neuro-Oncology Practice*. 2015; 2:106–121. DOI: 10.1093/nop/npv020
 68. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:727–77.
 69. Pestka S. Interferon standards and general abbreviations. *Methods Enzymol*. 1986;119:14–23.
 70. Pestka S. The human interferon alpha species and hybrid proteins. *Semin Oncol*. 1997;24:S9-4–17.
 71. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*. 2003;4(1):69–77. de Weerd NA, Nguyen T.
 72. The interferons and their receptors—distribution and regulation. *Immunol Cell Biol*. 2002;90(5):483–91. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, et al.
 73. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet*. 2013;45(2):164–
 74. Chen J, Wood WI. Interferon PRO655. Genentech. [US 6,300,475], 1–37, 2003 [Patent].
 75. Pestka S. Cloning of human interferons. In: Pestka S, ed. *Methods in Enzymology*, 79 edn. New York: Academic Press, 1981: 599–601.
 76. Pestka S. Interferon from 1981 to 1986. In: Pestka S, ed. *Methods in Enzymology*, 119 edn. New York: Academic Press, 1986: 3–14.
 77. Pestka S. The human interferons – from protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: before, between, beyond. *Arch Biochem Biophys* 1983;221:1–37.
 78. Pestka S. The human interferon a species and receptors. *Biopolymers* 2000;55:254–287.
 79. Maeda S, et al. Construction and identification of bacterial plasmids containing nucleotide sequence for human leukocyte interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7010–7013.

80. Goeddel DV, Pestka S. Microbial production of mature human leukocyte interferon K and L. Hoffmann-La Roche. [US 4,801,685], 1, 1989 [Patent].
81. Henco K, et al. Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes. *J Mol Biol* 1985;185:227–260.
82. Pestka S. The human interferon- α species and hybrid proteins. *Semin Oncol* 1997;24:S9.
83. Pestka S. The purification and manufacture of human interferons. *Sci Am* 1983;249:36–43.
84. Diaz MO, et al. Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics* 1994;22: 540–552.
85. Ortaldo JR, et al. A species of human α interferon that lacks the ability to boost human natural killer activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4926–4929.
86. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 2014;14:36–49.
87. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;202:8–32.
88. Schmeisser H, Bekisz J, Zoon KC. New function of type I IFN: induction of autophagy. *J Interferon Cytokine Res* 2014;34:71–8.
89. Lopušná K, Rezúchová I, Betačková T, Skovranová L, Tomasčková J, Lukaččíková L, et al. Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta Virol* 2013;57:171–9.
90. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 2002;14:432–6.
91. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003;4:69–77.
92. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003;4:63–8.
93. Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30:555–64.
94. Kotenko SV. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:223–40.
95. Renauld JC. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 2003;3:667–76.
96. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929–79.
97. Kotenko SV, Langer JA. Full house: 12 receptors for 27 cytokines. *Int Immunopharmacol* 2004;4:593–608.
98. Zhang SY, Boisson-Dupuis S, Chapgier A, Yang K, Bustamante J, Puel A, et al. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective

- roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. *Immunol Rev* 2008;226:29–40.
99. Jouanguy E, Zhang SY, Chappier A, Sancho-Shimizu V, Puel A, et al. Human primary immunodeficiencies of type I interferons. *Biochimie* 2007;89:878–83.
 100. Smith NL, Denning DW. Clinical implications of interferon gamma genetic and epigenetic variants. *Immunology* 2014.
 101. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996;335:1941–9.
 102. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med* 1996;335:1956–61.
 103. Fleischmann Jr WR, Georgiades JA, Osborne LC, Johnson HM. Potentiation of interferon activity by mixed preparations of fibroblast and immune interferon. *Infect Immun* 1979;26:248–53.
 104. De Clercq E, Zhang ZX, Huygen K. Synergism in the antitumor effects of type 1 and type II interferon in mice inoculated with leukemia L1210 cells. *Cancer Lett* 1982;15:223–8.
 105. Capobianchi MR, Mattana P, Mercuri F, Conciatori G, Ameglio F, Ankel H, et al. Acid lability is not an intrinsic property of interferon-alpha induced by HIV-infected cells. *J Interferon Res* 1992;12:431–8.
 106. Sainz Jr B, Halford WP. Alpha/beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 2002;76:11541–50.
 107. Sainz Jr B, LaMarca HL, Garry RF, Morris CA. Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma. *Virol J* 2005;2:14.
 108. Larkin J, Jin L, Farmen M, Venable D, Huang Y, Tan SL, et al. Synergistic antiviral activity of human interferon combinations in the hepatitis C virus replicon system. *J Interferon Cytokine Res* 2003;23:247–57.
 109. Asper M, Sternsdorf T, Hass M, Drosten C, Rhode A, Schmitz H, et al. Inhibition of different Lassa virus strains by alpha and gamma interferons and comparison with a less pathogenic arenavirus. *J Virol* 2004;78:3162–9.
 110. Desloges N, Rahaus M, Wolff MH. Role of the protein kinase PKR in the inhibition of varicella-zoster virus replication by beta interferon and gamma interferon. *J Gen Virol* 2005;86:1–6.
 111. Castilletti C, Bordi L, Lalle E, Rozera G, Poccia F, Agrati C, et al. Coordinate induction of IFN-alpha and -gamma by SARS-CoV also in the absence of virus replication. *Virology* 2005;341:163–9.

112. Scagnolari C, Trombetti S, Alberelli A, Cicetti S, Bellarosa D, Longo R, et al. The synergistic interaction of interferon types I and II leads to marked reduction in severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus replication and increase in the expression of mRNAs for interferon-induced proteins. *Inter-virology* 2007;50:156–60.
113. Peng T, Zhu J, Hwangbo Y, Corey L, Bumgarner RE. Independent and cooperative antiviral actions of beta interferon and gamma interferon against herpes simplex virus replication in primary human fibroblasts. *J Virol* 2008;82:1934–45.
114. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, MacDonald MR, et al. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 2006;131:1887–98.
115. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, et al. IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepat* 2013;20:281–9.
116. Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR. Lambda interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol* 2006;80:4501–9.
117. Francois-Newton V, Magno de Freitas Almeida G, Payelle-Brogard B, Monneron D, Pichard-Garcia L, Piehler J, et al. USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon α response. *PLoS ONE* 2011;6:e22200.
118. Gresser I. Antitumor effects of interferon. *Adv Cancer Res* 1972;16:97–140. [
119. Rusinova I, Forster S, Yu S, Kannan A, Masse M, Cumming H, et al. INTERFEROME v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res* 2013;41(database issue):D1040–46.
120. Wijesundara DK, Xi Y, Ranasinghe C. Unraveling the convoluted biological roles of type I interferons in infection and immunity: a way forward for therapeutics and vaccine design. *Front Immunol* 2014;5:412.
121. El-Baky NA, Redwan EM. Therapeutic alpha-interferons protein: structure production, and biosimilar. *Prep Biochem Biotechnol* 2015;45:109–27.
122. Swetly P, Ostertag W. Friend virus release and induction of haemoglobin synthesis in erythroleukaemic cells respond differently to interferon. *Nature* 1974;251:642–4.
123. Rossi GB, Dolei A, Cioe' L, Benedetto A, Matarese GP, Belardelli F. Inhibition of transcription and translation of globin messenger RNA in dimethyl sulfoxide-stimulated Friend erythroleukemic cells treated with interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:2036–40.

124. Axtell RC, Raman C. Janus-like effects of type I interferon in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 2012;248:23–35.
125. Li Q, Kawamura K, Tada Y, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Novel type III interferons produce anti-tumor effects through multiple functions. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013;18:909–18.
126. Ismail A, Yusuf N. Type I interferons: key players in normal skin and select cutaneous malignancies. *Dermatol Res Pract* 2014;2014:847545.
127. Balachandran S, Adams GP. Interferon-g-induced necrosis: an antitumor biotherapeutic perspective. *J Interferon Cytokine Res* 2013;33:171–80.
128. Jaitin DA, Roisman LC, Jaks E, Gavutis M, Piehler J, Van der Heyden J, et al. Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta. *Mol Cell Biol* 2006;26:1888–97.
129. Levin D, Schneider WM, Hoffmann HH, Yarden G, Busetto AG, Manor O, et al. Multifaceted activities of type I interferon are revealed by a receptor antagonist. *Sci Signal* 2014;7:ra50.
130. Gade P, Manjegowda SB, Nallar SC, Maachani UB, Cross AS, Kalvakolanu DV. Regulation of the death-associated protein kinase 1 expression and autophagy via ATF6 requires apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2014;34:4033–48.
131. de Bruin AM, Voermans C, Nolte MA. Impact of interferon-g on hematopoiesis. *Blood* 2014. pii:blood-2014-04-568451.
132. Cioe' L, O'Brien TG, Diamond L. Inhibition of adipose conversion of BALB/c 3T3 cells by interferon and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cell Biol Int Rep* 1980;4:255–64.
133. Vidal C, Bermeo S, Li W, Huang D, Kremer R, Duque G. Interferon gamma inhibits adipogenesis in vitro and prevents marrow fat infiltration in oophorectomized mice. *Stem Cells* 2012;30:1042–8.
134. Russo E, Salzano M, Postiglione L, Guerra A, Marotta V, Vitale M. Interferon-g inhibits integrin-mediated extracellular signal-regulated kinase activation stimulated by fibronectin binding in thyroid cells. *J Endocrinol Invest* 2013;36:375–8.
135. Bekisz J, Sato Y, Johnson C, Husain SR, Puri RK, Zoon KC. Immunomodulatory effects of interferons in malignancies. *J Interferon Cytokine Res* 2013;33: 154–61.
136. de Kleijn S, Langereis JD, Leentjens J, Kox M, Netea MG, Koenderman L, et al. IFN-g-stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PLOS ONE* 2013;8:e72249.
137. Beiting DP. Protozoan parasites and type I interferons: a cold case reopened. *Trends Parasitol* 2014;30:491–8.
138. Hellesen A, Edvardsen K, Breivik L, Husebye ES, Bratland E. The effect of types I and III interferons on adrenocortical cells and its possible implications for autoimmune Addison's disease. *Clin Exp Immunol* 2014;176:351–62.

139. Micallef A, Grech N, Farrugia F, Schembri-Wismayer P, Calleja-Agius J. The role of interferons in early pregnancy. *Gynecol Endocrinol* 2014;30:1–6.
140. Panarina M, Kisand K, Alnek K, Heilman K, Peet A, Uibo R. Interferon and interferon-inducible gene activation in patients with type 1 diabetes. *Scand J Immunol* 2014;80:283–92.
141. Buss G, Cattin V, Spring P, Malinverni R, Gilliet M. Two cases of interferon-alpha-induced sarcoidosis Koebnerized along venous drainage lines: new pathogenic insights and review of the literature of interferon-induced sar-coidosis. *Dermatology* 2013;226:289–97.
142. Burman P, Karlsson FA, Oberg K, Alm G, Orava M, Vihko R. Autoimmune thyroid disease in interferon-treated patients. *Lancet* 1985;2:100–1.
143. Akeno N, Smith EP, Stefan M, Huber AK, Zhang W, Keddache M, et al. IFN- α mediates the development of autoimmunity both by direct tissue toxicity and through immune cell recruitment mechanisms. *J Immunol* 2011;186: 4693–706.
144. Reder AT, Feng X. How type I interferons work in multiple sclerosis and other diseases: some unexpected mechanisms. *J Interferon Cytokine Res* 2014;34: 589–99.
145. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987;1:893–5.
146. Hoyo-Becerra C, Schlaak JF, Hermann DM. Insights from interferon- α -related depression for the pathogenesis of depression associated with inflammation. *Brain Behav Immun* 2014. pii:S0889-1591(14)00365-1.
147. Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Yamashita N, Oohashi S, Nishiura S. Occurrence of clinical depression during combination therapy with pegylated interferon alpha or natural human interferon beta plus ribavirin. *Hepatol Res* 2012;42:241–7.
148. Zheng LS, Hitoshi S, Kaneko N, Takao K, Miyakawa T, Tanaka Y, et al. Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dys-function. *Stem Cell Rep* 2014;3:73–84.
149. Campos AC, Vaz GN, Saito VM, Teixeira AL. Further evidence for the role of interferon-gamma on anxiety- and depressive-like behaviors: involvement of hippocampal neurogenesis and NGF production. *Neurosci Lett* 2014;578: 100–5.
150. Domanski P, Fish E, Nadeau OW, et al. A region of the beta subunit of the interferon alpha receptor different from box 1 interacts with Jak1 and is sufficient to activate the Jak-stat pathway and induce an antiviral state. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26388–93.
151. Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science*. 1997;277(5332):1630–5.
152. Plataniias LC, Fish EN. Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol*. 1999;27:1583–92.

153. Darnell JE. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res.* 1998;18:549–54.
154. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749–95.
155. Uddin S, Sher DA, Alsayed Y, et al. Interaction of p59fyn with interferon-activated Jak kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235:83–8.
156. Uddin S, Grumbach IM, Yi T, Colamonici OR, Plataniias LC. Interferon alpha activates the tyrosine kinase Lyn in haemopoietic cells. *Br J Haematol.* 1998;101:446–9.
157. Uddin S, Plataniias LC. Mechanisms of type-I interferon signal transduction. *J Biochem Mol Biol.* 2004;37(6):635–41.
158. Uddin S, Yenush L, Sun XJ, et al. Interferon-alpha engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 30-kinase. *J Biol Chem.* 1995;270(27):15938–41.
159. Plataniias LC, Uddin S, Yetter A, Sun XJ, White MF. The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 2. *J Biol Chem.* 1996;271(1):278–82.
160. Uddin S, Lekmine F, Sharma N, et al. The Rac1/p38 mitogenactivated protein kinase pathway is required for interferon alpha dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J Biol Chem.* 2000;275:27634–40.
161. Uddin S, Majchrzak B, Woodson J, et al. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *J Biol Chem.* 1999;274(42):30127–31.
162. Galani V, Kastamoulas M, Varouktsi A, Lampri E, Mitselou A, Arvanitis DL. 2016. IFNs-signaling effects on lung cancer: an up-to-date pathways-specific review. *Clin Exp Med* 1–9. 2016 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1007/s10238-016-0432-3.
163. Martí n-Henao GA, Quiroga R, Sureda A, González JR, Moreno V, García J. 2000. L-selectin expression is low on CD34+ cells from patients with chronic myeloid leukemia and interferon-a up-regulates this expression. *Haematologica* 85(2):139–146
164. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA. 2002. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL- 12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 169(8):4279–4287.
165. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC. (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8(3):237–249.
166. Hoskins M. A protective action of neurotropic against viscerotropic yellow fever virus in *Macacus rhesus*. *Am J Trop Med Hyg* 1935; 15: 675-680
167. Findlay GM, Mac alum FO. An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses. *J Path Bact* 1937; 44: 405-424

168. Isaac A., Lindenmann J. Virus Interference. I. The interferon. Proc Roy Soc 1957; B147: 258-267
169. Εθνικό Συνταγολόγιο. Εκδόσεις ΕΟΦ, Αθήνα (2003): 195.
170. Remington, The science and practice of pharmacy. Lippincott Williams and Wilkins, 21st edition, USA (2005) : 1510.
171. Remington, The science and practice of pharmacy. Lippincott Williams and Wilkins, 21st edition, USA (2005) : 1515.
172. A roadmap to key pharmacologic principles in using antipsychotics. In. Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry 9 (6) (2007): 444-54.
173. Tyrer P., Kendall T., The spurious advance of antipsychotic drug therapy. The Lancet 373 (9657) (2009): 4-5.
174. Yassa R, Lal S., Prevalence of the rabbit syndrome. Am J Psychiatry 143 (5) (May 1986): 656-7.
175. Taurand G., Phenothiazine and Derivatives. In. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim (2005).
176. Rang, Dale et al., Pharmacology. 6th edition.
177. "Haloperidol". The American Society of Health-System Pharmacists. Archived from the original on 2 January 2015
178. Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM., Second generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. Lancet 373 (9657) (2009 Jan): 31-41.
179. Horacek J., Bubenikova-Valesova V., Kopecek M., Palenicek T., Dockery C., Mohr P., Höschl C., Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs and the Neurobiology of Schizophrenia. CNS Drugs 20 (5) (2006): 389-409.
180. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, et al., Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple treatments meta-analysis. Lancet 382 (9896) (2013 Sep): 951-62.
181. Tyrer P., Kendall T., The spurious advance of antipsychotic drug therapy. The Lancet 373 (9657) (2009): 4-5.
182. McKim W., Antipsychotics in Drugs and Behavior: An Introduction to Behavioral Pharmacology. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ. (2007): 241-60.
183. Maher AR., Maglione M., Bagley S., Suttorp M., Hu JH., Ewing B., WangZ., Timmer M., Sultzer D., Shekelle PG., Efficacy and Comparative Effectiveness of Atypical Antipsychotic Medications for Off-Label Uses in Adults. A Systematic Review and Metaanalysis. JAMA 306 (12) (2011): 1359-69.
184. Schultz SH., North SW., Shields CG., Schizophrenia: A review. American Family Physician 75 (12) (2007): 1821-9.\
185. Taylor D., Paton C., Kapur S., The Maudsley Prescribing Guidelines. Informa Healthcare. 12th ed. (2012): 12-152, 173-196, 222-235.

186. Brunton L., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, 12th Edition, China, (2011): 406-410.
187. Alan F, Schatzberg CB., Nemeroff, Essentials of Clinical Psychopharmacology. American Psychiatric Pub. (2006 Feb): 297.
188. Greenberg WM., Citrome L., Ziprasidone for Schizophrenia and Bipolar Disorder: A Review of the Clinical Trials. CNS Drug Reviews 13 (2) (2007): 137-77.
189. Hagop S.A., Tohen M., Bipolar Psychopharmacotherapy: Caring for the Patient. John Wiley & Sons. (2011 Jun): 209.
190. Daniel DG, Zimbardo DL, Potkin SG, Reeves KR, Harrigan EP, Lakshminarayanan M., Ziprasidone 80 mg/day and 160 mg/day in the acute exacerbation of schizophrenia and schizoaffective disorder: a 6- week placebo-controlled trial. Ziprasidone Study Group. Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology 20 (5) (1999 May): 491-505.
191. Seeger TF, Seymour PA, Schmidt AW, et al., Ziprasidone (CP-88,059): a new antipsychotic with combined dopamine and serotonin receptor antagonist activity. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 275 (1) (1995 Oct): 101-13.
192. Wood MD, Scott C, Clarke K, et al., Pharmacological profile of antipsychotics at monoamine receptors: atypicality beyond 5-HT_{2A} receptor blockade. CNS & Neurological Disorders Drug Targets 5 (4) (2006 Aug): 445-52.
193. Newman-Tancredi A, Gavaudan S, Conte C, et al., Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [^{35S}] GTP gamma S binding study. European Journal of Pharmacology 355 (2-3) (1998 Aug): 245-56.
194. Schotte A, Janssen PF, Gommeren W, et al., Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. Psychopharmacology 124 (1-2) (1996 Mar): 57-73.
195. Tatsumi M, Jansen K, Blakely RD, Richelson E., Pharmacological profile of neuroleptics at human monoamine transporters. European Journal of Pharmacology 368 (2-3) (1999 Mar): 277-83.
196. Tschoner A, Engl J, Rettenbacher M, et al., Effects of six second generation antipsychotics on body weight and metabolism – risk assessment and results from a prospective study. Pharmacopsychiatry 42 (1) (2009 Jan): 29-34.
197. Guo JJ, Keck PE, Corey-Lisle PK, et al., Risk of diabetes mellitus associated with atypical antipsychotic use among Medicaid patients with bipolar disorder: a nested case-control study. Pharmacotherapy 27 (1) (2007 Jan): 27-35.
198. Murty RG, Mistry SG, Chacko RC., Neuroleptic Malignant Syndrome with ziprasidone. J Clin Psychopharmacol. 22(6) (2002 Dec): 624-6.

199. Akkaya C, Sarandol A, Sivrioglu EY, Kotan Z, Kirli S., A patient using ziprasidone with polydipsia, seizure, hyponatremia and rhabdomyolysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30(8) (2006 Dec 30): 1535-8.
200. Carlsson, A., & Lindqvist, M. (1963). Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacologica et Toxicologica (Copenh)* 20, 140–144.
201. Breier, A., Su, T. P., Saunders, R., Carson, R. E., Kolachana, B. S., de Bartolomeis, A., ... Pickar, D. (1997). Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: Evidence from a novel positron emission tomography method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2569–2574.
202. Howes, O., McCutcheon, R., & Stone, J. (2015). Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21st century. *Journal of Psychopharmacology* 29, 97–115.
203. Ariano, M. A., & Sibley, D. R. (1994). Dopamine receptor distribution in the rat CNS: elucidation using anti-peptide antisera directed against D1A and D3 subtypes. *Brain Research* 649, 95–110.
204. Santana, N., & Artigas, F. (2017). Laminar and cellular distribution of monoamine receptors in rat medial prefrontal cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11–87.
205. Wood, J. N., & Grafman, J. (2003). Human prefrontal cortex: Processing and representational perspectives. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 139–147.
206. Okubo, Y., Suhara, T., Suzuki, K., Kobayashi, K., Inoue, O., Terasaki, O., ... Toru, M. (1997). Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* 385, 634–636.
207. Aoyama, Y., Mouri, A., Toriumi, K., Koseki, T., Narusawa, S., Ikawa, N., ... Nabeshima, T. (2014). Clozapine ameliorates epigenetic and behavioral abnormalities induced by phencyclidine through activation of dopamine D1 receptor. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 17, 723–737.
208. Vallone, D., Picetti, R., & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24, 125–132.
209. Quan, W., Kim, J. H., Albert, P. R., Choi, H., & Kim, K.M. (2008). Roles of G protein and betaarrestin in dopamine D2 receptor-mediated ERK activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377, 705–709.
210. Uchida, H., Takeuchi, H., Graff-Guerrero, A., Suzuki, T., Watanabe, K., & Mamo, D. C. (2011). Predicting dopamine D₂ receptor occupancy from plasma levels of antipsychotic drugs: A systematic review and pooled analysis. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 31, 318–325.
211. Yokoi, F., Gründer, G., Biziere, K., Stephane, M., Dogan, A. S., Dannals, R. F., ... Wong, D. F. (2002). Dopamine D2 and D3 receptor occupancy in normal humans

- treated with the antipsychotic drug aripiprazole (OPC 14597): A study using positron emission tomography and [¹¹C]raclopride. *Neuropsychopharmacology* 27, 248–259.
212. Diaz, J., Lévesque, D., Lammers, C. H., Griffon, N., Martres, M. P., Schwartz, J. C., & Sokoloff, P. (1995). Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 65, 731–745.
213. Lahti, A. C., Weiler, M., Carlsson, A., & Tamminga, C. A. (1998). Effects of the D3 and autoreceptor-preferring dopamine antagonist (+)-UH232 in schizophrenia. *Journal of Neural Transmission* 105, 719–734.
214. Lacroix, L. P., Ceolin, L., Zocchi, A., Varnier, G., Garzotti, M., Curcuruto, O., & Heidbreder, C. A. (2006). Selective dopamine D3 receptor antagonists enhance cortical acetylcholine levels measured with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry without anti-cholinesterases. *Journal of Neuroscience Methods* 157, 25–31.
215. Sokoloff, P., & Le Foll, B. (2017). The dopamine D3 receptor, a quarter century later. *European Journal of Neuroscience* 45, 2–19.
216. Lauzon, N. M., & Laviolette, S. R. (2010). Dopamine D4-receptor modulation of cortical neuronal network activity and emotional processing: Implications for neuropsychiatric disorders. *Behavioural Brain Research* 208, 12–22.
217. Seeman, P., Guan, H. C., & Van Tol, H. H. (1993). Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. *Nature* 365, 441–445.
218. López-Gil, X., Babot, Z., Amargós-Bosch, M., Suñol, C., Artigas, F., & Adell, A. (2007). Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 32, 2087–2097.
219. Kapur, S., & Remington, G. (1996). Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry* 153, 466–476.
220. Sakaue, M., Somboonthum, P., Nishihara, B., Koyama, Y., Hashimoto, H., Baba, A., & Matsuda, T. (2000). Postsynaptic 5-hydroxytryptamine(1A) receptor activation increases in vivo dopamine release in rat prefrontal cortex. *British Journal of Pharmacology* 129, 1028–1034.
221. Meltzer, H. Y., & Sumiyoshi, T. (2008). Does stimulation of 5-HT(1A) receptors improve cognition in schizophrenia? *Behavioural Brain Research* 195, 98–102.
222. Abbas, A., & Roth, B. L. (2008). Pimavanserin tartrate: A 5-HT_{2A} inverse agonist with potential for treating various neuropsychiatric disorders. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 9, 3251–3259.
223. Meltzer, H. Y., Arvanitis, L., Bauer, D., & Rein, W. (2004). Placebo-controlled evaluation of four novel compounds for the treatment of schizophrenia and schizoaffective disorder. *The American Journal of Psychiatry* 161, 975–984.

224. Meltzer, H. Y., Mills, R., Revell, S., Williams, H., Johnson, A., Bahr, D., & Friedman, J. H. (2010). Pimavanserin, a serotonin(2A) receptor inverse agonist, for the treatment of parkinson's disease psychosis. *Neuropsychopharmacology* 35, 881–892.
225. Hagger, C., Buckley, P., Kenny, J. T., Friedman, L., Ubogy, D., & Meltzer, H. Y. (1993). Improvement in cognitive functions and psychiatric symptoms in treatmentrefractory schizophrenic patients receiving clozapine. *Biological Psychiatry* 34, 702–712.
226. Chew, M. L., Mulsant, B. H., Pollock, B. G., Lehman, M. E., Greenspan, A., Mahmoud, R. A., ... Gharabawi, G. (2008). Anticholinergic activity of 107 medications commonly used by older adults. *Journal of the American Geriatrics Society* 56, 1333–1341.
227. Yohn, S. E., & Conn, P. J. (2017). Positive allosteric modulation of M1 and M4 muscarinic receptors as potential therapeutic treatments for schizophrenia. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.012>.
228. Rajji, T. K., Mulsant, B. H., Davies, S., Kalache, S. M., Tsoutsoulas, C., Pollock, B. G., & Remington, G. (2015). Prediction of working memory performance in schizophrenia by plasma ratio of clozapine to N-desmethylclozapine. *The American Journal of Psychiatry* 172, 579–585.
229. Uys, M. M., Shahid, M., & Harvey, B. H. (2017). Therapeutic potential of selectively targeting the α 2C-adrenoceptor in cognition, depression, and schizophrenia-new developments and future perspective. *Frontiers in Psychiatry* 8, 144.
230. Svensson, T. H. (2003). Alpha-adrenoceptor modulation hypothesis of antipsychotic atypicality. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27, 1145–1158.
231. Meltzer, H. Y., Alphas, L., Green, A. I., Altamura, A. C., Anand, R., Bertoldi, A., ... Potkin, S. (2003). Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia: International Suicide Prevention Trial (InterSePT). *Archives of General Psychiatry* 60, 82–91.
232. Sato, H., Ito, C., Hiraoka, K., Tashiro, M., Shibuya, K., Funaki, Y., ... Yanai, K. (2015). Histamine H1 receptor occupancy by the new-generation antipsychotics olanzapine and quetiapine: A positron emission tomography study in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 232, 3497–3505.
233. Cardozo, T., Shmelkov, E., Felsovalyi, K., Swetnam, J., Butler, T., Malaspina, D., & Shmelkov, S. V. (2017). Chemistry-based molecular signature underlying the atypia of clozapine. *Translational Psychiatry* 7, e1036.
234. Kim, S. F., Huang, A. S., Snowman, A.M., Teuscher, C., & Snyder, S. H. (2007). Antipsychotic drug-induced weight gain mediated by histamine H1 receptor-linked

- activation of hypothalamic AMP-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3456–3459.
235. Ito, C. (2009). Histamine H₃-receptor inverse agonists as novel antipsychotics. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 9, 132–136.
236. Jarskog, L. F., Lowy, M. T., Grove, R. A., Keefe, R. S., Horrigan, J. P., Ball, M. P., ... Peykamian, M. A. (2015). A Phase II study of a histamine H₃ receptor antagonist GSK239512 for cognitive impairment in stable schizophrenia subjects on antipsychotic therapy. *Schizophrenia Research* 164, 136–142.
237. Ferrada, C., Moreno, E., Casadó, V., Bongers, G., Cortés, A., Mallol, J., ... Franco, R. (2009). Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H₃ receptors. *British Journal of Pharmacology* 157, 64–75.
238. Kim MS, Yoo BC, Yang WS, Han SY, Jeong D, Song JM, Kim KH, Aravinthan A, Kim JH, Kim JH, Kim SC, Cho JY. Src is the primary target of aripiprazole, an atypical antipsychotic drug, in its anti-tumor action. *Oncotarget*. 2017
239. Zhou W, Chen MK, Yu HT1, Zhong ZH, Cai N, Chen GZ, Zhang P1, Chen JJ. The antipsychotic drug pimozide inhibits cell growth in prostate cancer through suppression of STAT3 activation. *Int J Oncol*. 2016
240. Fako V, Yu Z, Henrich CJ, Ransom T, Budhu AS, Wang XW. Inhibition of wnt/ β -catenin Signaling in Hepatocellular Carcinoma by an Antipsychotic Drug Pimozide. *Int J Biol Sci*. 2016 Apr 28;12(7):768-75. doi: 10.7150/ijbs.14718. eCollection 2016.
241. Spirina LV, Kondakova IV, Tarasenko NV, Slonimskaya EM, Usynin EA, Gorbunov AK, Yurmazov ZA, Chigevskaya SY. Targeting of the AKT/m-TOR Pathway: Biomarkers of Resistance to Cancer Therapy--^[P]AKT/m-TOR Pathway and Resistance to Cancer Therapy. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2018 Jan 20;21(1):63-66. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2018.01.09.
242. Liu JK1, Hao YJ, Huang JW, Li X, Cai HB, Peng K. Mechanism of thioridazine-induced apoptosis of human colorectal cancer SW480 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2015 Apr;35(4):511-5.
243. Park MS, Dong SM, Kim BR, Seo SH, Kang S, Lee EJ, Lee SH, Rho SB. Thioridazine inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting the VEGFR-2/PI3K/mTOR pathway in ovarian cancer xenografts. *Oncotarget*. 2014 Jul 15;5(13):4929-34.
244. Yue H, Huang D, Qin L, Zheng Z, Hua L, Wang G, Huang J, Huang H. Targeting Lung Cancer Stem Cells with Antipsychological Drug Thioridazine. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6709828. doi: 10.1155/2016/6709828. Epub 2016 Jul 31.
245. Apoptosis. 2012 Sep;17(9):989-97. doi: 10.1007/s10495-012-0717-2. Thioridazine induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in cervical and endometrial cancer cells. Kang S1, Dong SM, Kim BR, Park MS, Trink B, Byun HJ, Rho SB.

246. Am J Transl Res. 2016 Jun 15;8(6):2767-75. eCollection 2016. The important application of thioridazine in the endometrial cancer.
Meng Q1, Sun X2, Wang J3, Wang Y3, Wang L3.

247. Med Sci Monit. 2016 Jul 25;22:2624-34.

Thioridazine Sensitizes Esophageal Carcinoma Cell Lines to Radiotherapy-Induced Apoptosis In Vitro and In Vivo.

Li H1, Juan L2, Xia L2, Wang Y2, Bao Y2, Sun G1.

248. Oncol Lett. 2017 Dec;14(6):8171-8177. doi: 10.3892/ol.2017.7184.

Epub 2017 Oct 16.

DR2 blocker thioridazine: A promising drug for ovarian cancer therapy.

Yong M1, Yu T2, Tian S3, Liu S2, Xu J2, Hu J2, Hu L2.

249. Gynecol Oncol. 2011 Jan;120(1):121-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.10.003.

Epub 2010 Oct 29.

A gene signature-based approach identifies thioridazine as an inhibitor of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT pathway in ovarian cancer cells.

Rho SB1, Kim BR, Kang S.

250. Oncotarget. 2017 May 16;8(20):32960-32976. doi:

10.18632/oncotarget.16515.

Penfluridol suppresses glioblastoma tumor growth by Akt-mediated inhibition of GLI1.

Ranjan A1, Srivastava SK1,2.

251. Cell Physiol Biochem. 2016;39(6):2173-2185. Epub 2016 Nov 2.

Valproic Acid Promotes Human Glioma U87 Cells Apoptosis and Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 β Through ERK/Akt Signaling.

Zhang C1, Liu S, Yuan X, Hu Z, Li H, Wu M, Yuan J, Zhao Z, Su J, Wang X, Liao Y, Liu Q.

252. J Dermatol Sci. 2013 Dec;72(3):252-62. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.07.012.

Epub 2013 Aug 8.

Antitumor activity of histamine and clozapine in a mouse experimental model of human melanoma.

Massari NA1, Medina VA, Cricco GP, Martinel Lamas DJ, Sambuco L, Pagotto R, Ventura C, Ciraolo PJ, Pignataro O, Bergoc RM, Rivera ES.

253. Am J Transl Res. 2017 Aug 15;9(8):3853-3866. eCollection 2017.

The STAT3 inhibitor pimozide impedes cell proliferation and induces ROS generation in human osteosarcoma by suppressing catalase expression.

Cai N1,2, Zhou W3, Ye LL1, Chen J2, Liang QN1, Chang G1, Chen JJ1.

254. The antipsychotic agent chlorpromazine induces autophagic cell death by inhibiting the Akt/mTOR pathway in human U-87MG glioma cells.

Shin SY, Lee KS, Choi YK, Lim HJ, Lee HG, Lim Y, Lee YH.

Carcinogenesis. 2013 Sep;34(9):2080-9. doi: 10.1093/carcin/bgt169. Epub 2013 May 20.

255. Organogenesis. 2008 Apr;4(2):68-75. Wnt signal transduction pathways.

Komiya Y1, Habas R.

256. Promoting oligodendroglial-oriented differentiation of glioma stem cell: a repurposing of quetiapine for the treatment of malignant glioma.

Wang Y, Huang N, Li H, Liu S, Chen X, Yu S, Wu N, Bian XW, Shen HY, Li C, Xiao L. *Oncotarget*. 2017 Jun 6;8(23):37511-37524. doi: 10.18632/oncotarget.16400.

257. Olanzapine inhibits the proliferation and induces the differentiation of glioma stem-like cells through modulating the Wnt signaling pathway in vitro.

Guo QH, Yang HJ, Wang SD.

Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015 Dec;19(23):4455.

258. Pimozide suppresses colorectal cancer via inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Ren Y, Tao J, Jiang Z, Guo D, Tang J.

Life Sci. 2018 Sep 15;209:267-273. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.027. Epub 2018 Aug 11.

259. *Mol Pharmacol*. 2015;87(3):501-12. doi: 10.1124/mol.114.096941. Epub 2014 Dec 31.

Repurposing the antipsychotic trifluoperazine as an antimetastasis agent.

Pulkoski-Gross A1, Li J1, Zheng C1, Li Y1, Ouyang N1, Rigas B1, Zucker S1, Cao J2.

260. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism.

Mihaylova MM, Shaw RJ.

Nat Cell Biol. 2011 Sep 2;13(9):1016-23. doi: 10.1038/ncb2329. Review.

261. *Cell Death Dis*. 2015 May 7;6:e1753. doi: 10.1038/cddis.2015.77.

Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data.

Cheng HW1, Liang YH2, Kuo YL3, Chuu CP4, Lin CY5, Lee MH1, Wu AT6, Yeh CT7, Chen EI2, Whang-Peng J8, Su CL9, Huang CY10.

262. Olanzapine inhibits proliferation, migration and anchorage-independent growth in human glioblastoma cell lines and enhances temozolomide's antiproliferative effect.

Karpel-Massler G, Kast RE, Westhoff MA, Dwucet A, Welscher N, Nonnenmacher L, Hlavac M, Siegelin MD, Wirtz CR, Debatin KM, Halatsch ME.

J Neurooncol. 2015 Mar;122(1):21-33. doi: 10.1007/s11060-014-1688-7. Epub 2014 Dec 19.

263. Valproic acid sensitizes human glioma cells to gefitinib-induced autophagy.

Chang CY, Li JR, Wu CC, Ou YC, Chen WY, Kuan YH, Wang WY, Chen CJ.

IUBMB Life. 2015 Nov;67(11):869-79. doi: 10.1002/iub.1445. Epub 2015 Oct 21.

264. *Oncol Rep*. 2014 May;31(5):2107-14. doi: 10.3892/or.2014.3068.

Epub 2014 Mar 6.

Thioridazine, an antipsychotic drug, elicits potent antitumor effects in gastric cancer.

Mu J1, Xu H2, Yang Y2, Huang W2, Xiao J3, Li M1, Tan Z1, Ding Q1, Zhang L1, Lu J1, Wu X1, Liu Y1.

265. Thioridazine has potent antitumor effects on lung cancer stem-like cells.

Shen J, Ma B, Zhang X, Sun X, Han J, Wang Y, Chu L, Xu H, Yang Y.

Oncol Lett. 2017 Mar;13(3):1563-1568. doi: 10.3892/ol.2017.5651. Epub 2017 Jan 25.

266. Antipsychotic agent thioridazine sensitizes renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated inhibition of Akt signaling and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP(L).

Min KJ, Seo BR, Bae YC, Yoo YH, Kwon TK.

Cell Death Dis. 2014 Feb 20;5:e1063. doi: 10.1038/cddis.2014.35.

267. J Mol Neurosci. 2004;22(3):189-98.

Characterization of phenothiazine-induced apoptosis in neuroblastoma and glioma cell lines: clinical relevance and possible application for brain-derived tumors.

Gil-Ad I1, Shtaif B, Levkovitz Y, Dayag M, Zeldich E, Weizman A.

268. Repositioning antipsychotic chlorpromazine for treating colorectal cancer by inhibiting sirtuin 1.

Lee WY, Lee WT, Cheng CH, Chen KC, Chou CM, Chung CH, Sun MS, Cheng HW, Ho MN, Lin CW.

Oncotarget. 2015 Sep 29;6(29):27580-95. doi: 10.18632/oncotarget.4768.

269. Autophagy involvement in olanzapine-mediated cytotoxic effects in human glioma cells.

Wang YX, Xu SQ, Chen XH, Liu RS, Liang ZQ.

Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(19):8107-13.

270. Chlorpromazine in combination with nitrosourea inhibits experimental glioma growth.

Aas AT, Brun A, Pero RW, Salford LG.

Br J Neurosurg. 1994;8(2):187-92.

271. Oncotarget. 2017 Jun 6;8(23):37568-37583. doi: 10.18632/oncotarget.17247.

Repositioning chlorpromazine for treating chemoresistant glioma through the inhibition of cytochrome c oxidase bearing the COX4-1 regulatory subunit.

Oliva CR1, Zhang W2, Langford C1, Suto MJ2, Griguer CE1,3.

272. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Dec 16;494(3-4):477-483. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.106. Epub 2017 Oct 21.

A chemical screen identifies trifluoperazine as an inhibitor of glioblastoma growth.

Pinheiro T1, Otrocka M2, Seashore-Ludlow B2, Rraklli V3, Holmberg J3, Forsberg-Nilsson K4, Simon A1, Kirkham M5.

273. Eur J Med Chem. 2015 Jan 27;90:1-9. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.012. Epub 2014 Nov 6.

Haloperidol metabolite II prodrug: asymmetric synthesis and biological evaluation on rat C6 glioma cells.

Sozio P1, Fiorito J2, Di Giacomo V1, Di Stefano A1, Marinelli L1, Cacciatore I1, Cataldi A1, Pacella S1, Turkez H3, Parenti C4, Rescifina A4, Marrazzo A5.

274. Immune consequences of penfluridol treatment associated with inhibition of glioblastoma tumor growth.

Ranjan A, Wright S, Srivastava SK.

Oncotarget. 2017 Jul 18;8(29):47632-47641. doi: 10.18632/oncotarget.17425.

275. Neurol Med Chir (Tokyo). 2012;52(4):186-93.

Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain.

Osuka S1, Takano S, Watanabe S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A.

276. J Neurooncol. 2012 Mar;107(1):61-7. doi: 10.1007/s11060-011-0725-z. Epub 2011 Oct 26.

Valproic acid sensitizes human glioma cells for temozolomide and γ -radiation.

- Van Niftherik KA1, Van den Berg J, Slotman BJ, Lafleur MV, Sminia P, Stalpers LJ.
277. Histone deacetylase inhibitor, valproic acid, radiosensitizes the C6 glioma cell line in vitro.
- Zhou Y, Xu Y, Wang H, Niu J, Hou H, Jiang Y.
Oncol Lett. 2014 Jan;7(1):203-208. Epub 2013 Nov 7.
278. Modulation in vitro and in vivo of ACNU resistance in a subline of C6 glioma with reserpine.
- Yoshida T, Shimizu K, Ushio Y, Mogami H, Sakamoto Y.
J Neurosurg. 1987 Feb;66(2):251-5.
279. Biomaterials. 2014 Jan;35(3):1096-108. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.049. Epub 2013 Nov 1.
- Co-delivery of thioridazine and doxorubicin using polymeric micelles for targeting both cancer cells and cancer stem cells.
- Ke XY1, Lin Ng VW, Gao SJ, Tong YW, Hedrick JL, Yang YY.
280. Int J Nanomedicine. 2016 Sep 8;11:4545-4552. eCollection 2016.
- Codelivery of thioridazine and doxorubicin using nanoparticles for effective breast cancer therapy.
- Jin X1, Zou B2, Luo L1, Zhong C3, Zhang P1, Cheng H1, Guo Y1, Gou M1.
281. Mol Med Rep. 2015 Sep;12(3):4103-4108. doi: 10.3892/mmr.2015.3967. Epub 2015 Jun 22.
- Dopamine receptor antagonist thioridazine inhibits tumor growth in a murine breast cancer model.
- Yin T1, He S1, Shen G1, Ye T1, Guo F1, Wang Y1.
282. Cancer Res. 1990 Sep 1;50(17):5399-405.
- Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine.
- Strobl JS1, Kirkwood KL, Lantz TK, Lewine MA, Peterson VA, Worley JF 3rd.
283. Penfluridol: An Antipsychotic Agent Suppresses Metastatic Tumor Growth in Triple-Negative Breast Cancer by Inhibiting Integrin Signaling Axis.
- Ranjan A, Gupta P, Srivastava SK.
Cancer Res. 2016 Feb 15;76(4):877-90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1233. Epub 2015 Dec 1.
284. Cancer Chemother Pharmacol. 1996;38(1):65-70.
- Trifluoperazine as a modulator of multidrug resistance in refractory breast cancer.
- Murren JR1, Durivage HJ, Buzaid AC, Reiss M, Flynn SD, Carter D, Hait WN.
285. J Natl Cancer Inst. 1986 May;76(5):839-44.
- Circumvention of multiple-drug resistance in human cancer cells by thioridazine, trifluoperazine, and chlorpromazine.
- Akiyama S, Shiraishi N, Kuratomi Y, Nakagawa M, Kuwano M.
286. Inhibition of human breast cancer colony formation by anticalmodulin agents: trifluoperazine, W-7, and W-13.
- Wei JW, Hickie RA, Klaassen DJ.

Cancer Chemother Pharmacol. 1983;11(2):86-90.

287. Anticancer Drugs. 2009 Sep;20(8):723-35. doi:
10.1097/CAD.0b013e32832ec041.

The antipsychotic drug chlorpromazine enhances the cytotoxic effect of tamoxifen in tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant human breast cancer cells.

Yde CW1, Clausen MP, Bennetzen MV, Lykkesfeldt AE, Mouritsen OG, Guerra B.

288. Thioridazine has potent antitumor effects on lung cancer stem-like cells.
Shen J, Ma B, Zhang X, Sun X, Han J, Wang Y, Chu L, Xu H, Yang Y.
Oncol Lett. 2017 Mar;13(3):1563-1568. doi: 10.3892/ol.2017.5651. Epub 2017 Jan 25.

289. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Dec 1;186(11):1180-8. doi:
10.1164/rccm.201207-1180OC. Epub 2012 Sep 28.

Trifluoperazine, an antipsychotic agent, inhibits cancer stem cell growth and overcomes drug resistance of lung cancer.

Yeh CT1, Wu AT, Chang PM, Chen KY, Yang CN, Yang SC, Ho CC, Chen CC, Kuo YL, Lee PY, Liu YW, Yen CC, Hsiao M, Lu PJ, Lai JM, Wang LS, Wu CH, Chiou JF, Yang PC, Huang CY.

290. Mol Cancer Ther. 2007 Aug;6(8):2303-9.

The antipsychotic drug trifluoperazine inhibits DNA repair and sensitizes non small cell lung carcinoma cells to DNA double-strand break induced cell death.

Polischouk AG1, Holgersson A, Zong D, Stenerlöw B, Karlsson HL, Möller L, Viktorsson K, Lewensohn R.

291. Clozapine induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells.
Yin YC, Lin CC, Chen TT, Chen JY, Tsai HJ, Wang CY, Chen SY.
Cell Physiol Biochem. 2015;35(3):945-56. doi: 10.1159/000369751. Epub 2015 Feb 2.

292. J Obstet Gynaecol Res. 2015 Aug;41(8):1240-5. doi: 10.1111/jog.12691.
Epub 2015 Apr 1.

Dopamine D2 receptor blocker thioridazine induces cell death in human uterine cervical carcinoma cell line SiHa.

Mao M1, Yu T1, Hu J1, Hu L1.

293. Valproic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via caspase-dependent apoptosis.
Han BR, You BR, Park WH.
Oncol Rep. 2013 Dec;30(6):2999-3005. doi: 10.3892/or.2013.2747. Epub 2013 Sep 20.

294. J Biochem. 2008 Sep;144(3):357-62. doi: 10.1093/jb/mvn074.
Epub 2008 May 31.

Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both in vitro and in vivo.

Sami S1, Höti N, Xu HM, Shen Z, Huang X.

295. Valproic acid inhibits the angiogenic potential of cervical cancer cells via HIF-1 α /VEGF signals.
Zhao Y, You W, Zheng J, Chi Y, Tang W, Du R.
Clin Transl Oncol. 2016 Nov;18(11):1123-1130. Epub 2016 Mar 4.

296. Tumour Biol. 2014 Oct;35(10):9831-8. doi: 10.1007/s13277-014-2278-1.
Epub 2014 Jul 3.

Thioridazine specifically sensitizes drug-resistant cancer cells through highly increase in apoptosis and P-gp inhibition.

Choi AR1, Kim JH, Yoon S.

297. Neurotoxic/neuroprotective activity of haloperidol, risperidone and paliperidone in neuroblastoma cells.

Gassó P, Mas S, Molina O, Bernardo M, Lafuente A, Parellada E.

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2012 Jan 10;36(1):71-7. doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.08.010. Epub 2011 Aug 22

298. Sertindole, a potent antagonist at dopamine D₂ receptors, induces autophagy by increasing reactive oxygen species in SH-SY5Y neuroblastoma cells.

Shin JH, Park SJ, Kim ES, Jo YK, Hong J, Cho DH.

Biol Pharm Bull. 2012;35(7):1069-75.

299. Valproic acid synergistically enhances the cytotoxicity of clofarabine in pediatric acute myeloid leukemia cells.

Xie C, Edwards H, Lograsso SB, Buck SA, Matherly LH, Taub JW, Ge Y.

Pediatr Blood Cancer. 2012 Dec 15;59(7):1245-51. doi: 10.1002/pbc.24152. Epub 2012 Apr 5.

300. Mechanisms of synergistic antileukemic interactions between valproic acid and cytarabine in pediatric acute myeloid leukemia.

Xie C, Edwards H, Xu X, Zhou H, Buck SA, Stout ML, Yu Q, Rubnitz JE, Matherly LH, Taub JW, Ge Y.

Clin Cancer Res. 2010 Nov 15;16(22):5499-510. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1707. Epub 2010 Oct 1.

301. Adv Clin Exp Med. 2015 Jan-Feb;24(1):55-62. doi: 10.17219/acem/29264.

Cytotoxic activity of valproic acid on primary chronic lymphocytic leukemia cells.

Karp M1, Kosior K2, Karczmarczyk A1, Zając M1, Zaleska J1, Tomczak W2, Chocholska S2, Hus M2, Dmoszyńska A2, Giannopoulos K3.

302. Cancer Biother. 1993 Spring;8(1):77-85.

Sensitization of P388 murine leukemia cells to epirubicin cytotoxicity by reserpine.

Viladkar A1, Chitnis M.

303. Mitoxantrone & adriamycin cytotoxicity enhanced by reserpine in human chronic myeloid leukaemia cells.

Chitnis MP, Kamath NS, Advani SH.

Indian J Med Res. 1989 Jun;90:197-202.

304. Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis.

Lu M, Li J, Luo Z, Zhang S, Xue S, Wang K, Shi Y, Zhang C, Chen H, Li Z.

Oncotargets Ther. 2015 Jun 22;8:1543-52. doi: 10.2147/OTT.S77373. eCollection 2015.

305. Penfluridol suppresses pancreatic tumor growth by autophagy-mediated apoptosis.

Ranjan A, Srivastava SK.

Sci Rep. 2016 May 18;6:26165. doi: 10.1038/srep26165.

306. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem. 1998;67:227-64.

307. Borden EC, Sen GC, Uze G, et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. Nat Rev Drug Discov. 2007;6:975-90.

308. De Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. J Biol Chem. 2007;282:20053-7.

309. Colamonici OR, Domanski P, Krolewski JJ, et al. Interferon alpha (IFN alpha) signaling in cells expressing the variant form of the type I IFN receptor. *J Biol Chem.* 1994;2269(8):5660–5.
310. Novick D, Cohen B, Rubinstein M. The human interferon cplx receptor: characterization and molecular cloning. *Cell.* 1994;77:391–400.
311. Domanski P, Witte M, Kellum M, et al. Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J Biol Chem.* 1995;270(37):21606–11.
312. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:563–91.
313. Bernabei P, Coccia EM, Rigamonti L, et al. Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):950–60.