



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

ΔΠΜΣ : Ιατρική Χημεία

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΚΛΟΖΑΠΙΝΗΣ : IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ**

ΑΓΓΕΛΙΚΗ-ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΣΙΑΦΟΛΩΛΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ- ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΣΙΑΦΟΛΩΛΗ

A.M. 235

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΜΑΡΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΗ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΠΕΡΙΚΛΗΣ ΠΑΠΠΑΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΛΕΟΝΤΑΡΙΤΗΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Περιεχόμενα

1. Ευχαριστίες	5
2. Περίληψη	6
3. Abstract	7
4. Ιστορική αναδρομή	8
5. Εισαγωγή	9
5.1. Καρκίνος	9
5.1.1. Γενικά	9
5.1.2. Στάδια καρκινογένεσης.....	11
5.1.3. Κυτταρικός θάνατος.....	13
5.1.4. Μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης σχετιζόμενα με την καρκινογένεση	18
5.1.5. Χημική καρκινογένεση.....	22
5.1.6. Καρκίνος του πνεύμονα	25
5.1.7. Αντινεοπλασματικά φάρμακα.....	28
5.1.8. Θεραπευτική προσέγγιση καρκίνου του πνεύμονα	32
5.2. Σχιζοφρένεια.....	33
5.2.1. Παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας.....	33
5.2.2. Ντοπαμινεργικοί υποδοχείς.....	35
5.2.3. Φαρμακευτική αγωγή - Αντιψυχωσικά	37
5.2.4. Κλοζαπίνη	38
5.3. Σχιζοφρένεια και καρκίνος.....	40
5.4. Επαναστόχευση φαρμάκων	41
6. Σκοπός	42
7. Υλικά και μέθοδοι	43
8. Αποτελέσματα	59
8.1. Αξιολόγηση της επίδρασης της κλοζαπίνης στην κυτταρική επιβίωση των κυττάρων A549 (δοκιμασία SRB)	59
8.2. Αξιολόγηση της επίδρασης της κλοζαπίνης στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων A549 (με κυτταρομετρία ροής - πρωτόκολλο AnnexinV- PI).....	66
8.3. Αλληλεπιδράσεις φαρμάκων	70
8.4. Αξιολόγηση της επίδρασης της κλοζαπίνης σε κύτταρα A549 στα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση.....	72
8.4.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT.....	73
8.4.2. Σηματοδοτικό μονοπάτι MAP κινασών	77
9. Συζήτηση	80

10. Βιβλιογραφία.....87

1. Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Φαρμακολογίας και Διευθύντρια του εργαστηρίου, κυρία **Μαρία Κωνσταντή** για την ένταξη μου στην ερευνητική της ομάδα, την ανάθεση της ερευνητικής εργασίας που εκπονώ, καθώς και τη συνεχή καθοδήγηση σε ερευνητικό και σε προσωπικό επίπεδο. Ως επιβλέπουσα μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθεια της και τις γνώσεις της, μου έδειξε εμπιστοσύνη στη διεξαγωγή των πειραμάτων και τον χειρισμό οργάνων, κατανόηση και στήριξη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο **Περικλή Παππά**, καθηγητή Φαρμακολογίας, για τις γνώσεις που μου προσέφερε στη Φαρμακοκινητική, για την εκπαίδευση στις κυτταροκαλλιέργειες και την καθοδήγηση σχετικά με την παρούσα εργασία.

Εξίσου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο **Γεώργιο Λεονταρίτη**, αναπληρωτή καθηγητή Φαρμακολογίας για την εκπαίδευση που μου προσέφερε σε βασικές τεχνικές που χρησιμοποίησα στην παρούσα εργασία αλλά και για την προθυμία του να με βοηθήσει στην επίλυση αποριών.

Τις πιο θερμές ευχαριστίες μου οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα **Ειρήνη -Χριστίνα Ανδριοπούλου** για την αμέριστη βοήθεια, την αδιάκοπη υπομονή, την επαρκή εκπαίδευση και την διεύρυνση των ερευνητικών δυνατοτήτων μου. Ήταν πάντα πρόθυμη να επιλύσει τις απορίες μου, να με καθοδηγήσει, να αφιερώσει προσωπικό της χρόνο, να με στηρίξει ακόμα και σε προσωπικό επίπεδο. Ακόμα με έμαθε να εργάζομαι με πειθαρχία, οργάνωση και σεβασμό στον χώρο του εργαστηρίου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα **Αριστείδη Κοφινάγια** για τη συνεργασία που είχαμε, τη στήριξη, την πολύτιμη βοήθεια του όταν τη χρειάστηκα καθώς και για την ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας για την αποδοχή τους, την άριστη συνεργασία, το ευχάριστο κλίμα και την προθυμία τους για βοήθεια.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στην οικογένεια μου και στους φίλους μου που είναι δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια να με στηρίζουν πρακτικά, ψυχολογικά και ηθικά.

2. Περίληψη

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου παγκοσμίως, μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Το επιστημονικό ενδιαφέρον είναι στραμμένο στη μελέτη των μοριακών μηχανισμών, που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, καθώς και στην ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών θεραπειών, με τη μέγιστη δυνατή μείωση των παρενεργειών τους. Μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του πνεύμονα είναι η έκθεση σε καρκινογόνες ενώσεις, που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου. Ωστόσο, έχει δημοσιευτεί πλήθος επιδημιολογικών μελετών, που αναφέρουν πως οι άνδρες σχιζοφρενείς αν και συνήθως υιοθετούν ανθυγιεινές καπνιστικές συνήθειες, παρουσιάζουν μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Επιπλέον, μελέτες έχουν συνδέσει αυτό το παράδοξο με την αντιψυχωσική αγωγή που λαμβάνουν οι συγκεκριμένοι ασθενείς. Αξιολογώντας τα παραπάνω δεδομένα, στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η πιθανή αντικαρκινική δράση του αντιψυχωσικού κλοζαπίνη, στην κυτταρική σειρά A549. Η κλοζαπίνη είναι ένα άτυπο αντιψυχωσικό που ανταγωνίζεται τους υποδοχείς D₂ της ντοπαμίνης. Η κυτταρική σειρά A549 αποτελείται από κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και συγκεκριμένα αδενοκαρκινώματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με κλοζαπίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις, ως μονοθεραπεία, για διαστήματα 48 και 72 ωρών, συνδυαστικά με ένα αλλά και με δύο αντινεοπλασματικά. Τα αντινεοπλασματικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα κλασικά αντινεοπλασματικά φάρμακα, που χορηγούνται σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, δηλαδή ήταν η σισπλατίνη και η πακλιταξέλη. Μετά την επώαση με τα φάρμακα μελετήθηκε η κυτταρική επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, με τη δοκιμασία SRB. Επιπλέον, ερευνήθηκε η συμμετοχή των φαρμάκων στη ρύθμιση των μηχανισμών της απόπτωσης, με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής (πρωτόκολλο AnnexinV-PI). Ακόμα, αξιολογήθηκε η επίδραση των φαρμάκων στη ρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών, που περιλαμβάνονται σε μονοπάτια σχετιζόμενα με την καρκινογένεση, με τη τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η κλοζαπίνη επιδρά αρνητικά στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και συνδυαστικά με τα αντινεοπλασματικά φαίνεται να αυξάνει την ισχύ τους. Επίσης, η κλοζαπίνη ακόμα και σε μικρή συγκέντρωση επάγει την απόπτωση, ενώ συνδυαστικά με την σισπλατίνη αποδεικνύεται ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση μονοπατιών σχετιζόμενων με την καρκινογένεση, όπως τα μονοπάτια PI3K/AKT και MAP κινασών. Τέλος, για τη διεξαγωγή ολοκληρωμένων συμπερασμάτων για την αντικαρκινική δράση της κλοζαπίνης, θα πρέπει να διεξαχθούν προκλινικές μελέτες και με *in vivo* πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης, ώστε με βάση τα αποτελέσματα που θα προκύψουν, να σχεδιαστούν οι κατάλληλες κλινικές μελέτες.

3. Abstract

Lung cancer is the second most common cause of death worldwide, after cardiovascular disease. The scientific interest is focused on the study of molecular mechanisms involved in carcinogenesis, as well as the development of new effective therapies, with the maximum possible reduction of their side effects. The biggest risk factor for lung cancer is exposure to carcinogens contained in cigarette smoke. However, a number of epidemiological studies have been published, which report that men with schizophrenia, although usually adopting unhealthy smoking habits, have a reduced incidence of lung cancer. In addition, studies have linked this paradox to the antipsychotic treatment that these patients receive. Evaluating the above data, in the present study the possible anti-cancer effect of the antipsychotic clozapine in the A549 cell line was investigated. Clozapine is an atypical antipsychotic that competes with dopamine D₂ receptors. The A549 cell line consists of non-small cell lung cancer cells, specifically adenocarcinoma. The cells were incubated with clozapine in various concentrations, as monotherapy, for intervals of 48 and 72 hours, in combination with one and two anticancer drugs. The anticancer drugs used were the classic anticancer drugs used to treat patients with non-small cell lung cancer, namely cisplatin and paclitaxel. After incubation with the drugs, cell survival and proliferation of cancer cells were studied by the SRB assay. In addition, the involvement of drugs in the regulation of apoptotic mechanisms was investigated using the flow cytometry technique (Annexin V-PI protocol). Furthermore, the effect of drugs on the regulation of protein expression, involved in carcinogenesis-related pathways, was evaluated by Western blotting. From the results we conclude that clozapine has a negative effect on the survival of cancer cells and in combination with anticancer drugs seems to increase their potency. Also, clozapine even in small concentrations induces apoptosis, while in combination with cisplatin it is shown to play a key role in regulating carcinogenesis-related pathways, such as the PI3K/AKT and MAP kinase pathways. Finally, in order to draw comprehensive conclusions about the anti-cancer effect of clozapine, preclinical studies with *in vivo* experimental carcinogenicity models should be performed, so that based on the results obtained, appropriate clinical studies may be designed.

4. Ιστορική αναδρομή

Υπάρχει ένα παλιό ρητό που αναφέρει πως ο καρκίνος είναι μια τόσο αρχαία ασθένεια, όσο και η ύπαρξη της ανθρωπότητας. Ωστόσο, στους προϊστορικούς χρόνους, πολύ πριν εμφανιστούν οι άνθρωποι στη Γη, ευρήματα δείχνουν ότι οι όγκοι εμφανίζονται και σε ζώα. Στην ιατρική, η πρώτη γραπτή αναφορά του καρκίνου και μάλιστα του μαστού, βρέθηκε στον πάπυρο Edwin Smith, περίπου το 1500 π.Χ. Σε αυτή την αναφορά ο καρκίνος περιγράφεται ως μια σοβαρή διόγκωση, ένας λιπώδης όγκος για τον οποίο δεν υπάρχει θεραπεία. Τον όρο «καρκίνος» όμως, τον χρησιμοποίησε για πρώτη φορά ο Ιπποκράτης το 460-375 π.Χ. για να περιγράψει σχηματισμένους όγκους (1).

Οι Αιγύπτιοι προσπάθησαν να θεραπεύσουν καρκινικούς όγκους με καυτηριασμό, μαχαίρια και άλατα, και δημιούργησαν μια πάστα αρσενικού, γνωστή ως «αιγυπτιακή αλοιφή» τον 19ο αιώνα. Οι Σουμέριοι, οι Κινέζοι, οι Ινδοί, οι Πέρσες και οι Εβραίοι της ίδιας εποχής χρησιμοποιούσαν φαρμακευτικά φυτά όπως το τσάι, χυμούς φρούτων, σύκα και βραστό λάχανο, αλλά σε προχωρημένες περιπτώσεις δεν δίστασαν να καταφύγουν σε διαλύματα σιδήρου, χαλκού, θείου και υδραργύρου. Πολλά από αυτά τα παρασκευάσματα παρέμειναν σε χρήση, σε διάφορες συγκεντρώσεις, για περισσότερα από 3000 χρόνια (1).

Στις αρχές του 1900, ο διάσημος Γερμανός χημικός Paul Ehrlich ξεκίνησε να αναπτύσσει φάρμακα για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών. Ήταν αυτός που επινόησε τον όρο «χημειοθεραπεία» και τον χαρακτήρισε ως τη χρήση χημικών για τη θεραπεία ασθενειών. Ο Ehrlich μελέτησε φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των αλκυλιούντων παραγόντων, αλλά δεν ήταν αισιόδοξος για την επιτυχία των πειραμάτων του. Στη συνέχεια, τη δεκαετία του 1960 κυριάρχησαν η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Ωστόσο, η χρήση αυτών των τεχνικών είχε μικρά ποσοστά θεραπείας που δεν ξεπερνούσαν το 33%. Τότε μετά από μελέτες περιπτώσεων ασθενών με προχωρημένους καρκίνους, κατέστη σαφές πως η θεραπεία του καρκίνου απαιτούσε τον συνδυασμό χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας και φαρμακευτικής αγωγής(2).

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τον καρκίνο ολοένα και αυξάνεται καθώς σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, στις ημέρες μας αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου στον κόσμο μετά από τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Ο καρκίνος του πνεύμονα μάλιστα κατέχει την υψηλότερη θνησιμότητα. Επιπλέον, οι επιστήμονες έχουν κατανοήσει ότι ο καρκίνος μπορεί να προκληθεί από την επίδραση εξωγενών παραγόντων όπως είναι οι καρκινογόνες ουσίες που προέρχονται από το κάπνισμα, η ακτινοβολία, η διατροφή, τα χημικά και οι μεταλλάξεις σε γονίδια «κλειδιά» μεταξύ άλλων. Ο συσχετισμός αυτός «ανοίγει» δρόμους για αποτελεσματικότερες θεραπείες και έγκαιρο εντοπισμό ατόμων με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κάποιου τύπου καρκίνου (3).

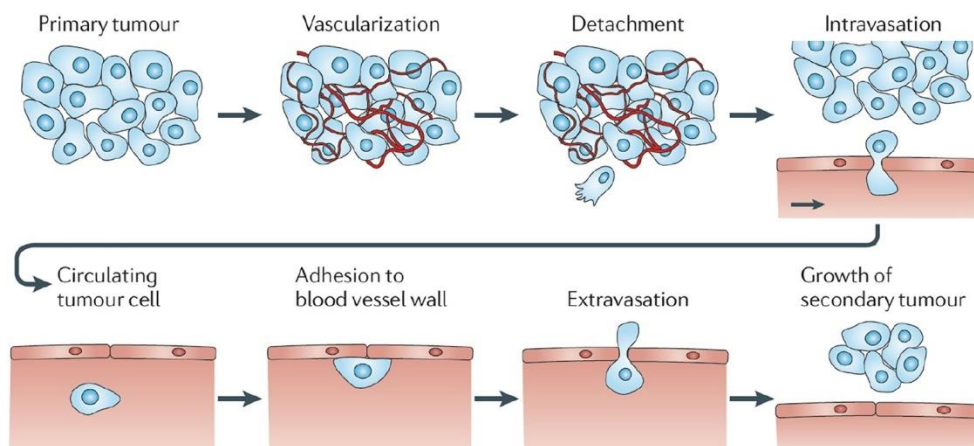
5. Εισαγωγή

5.1. Καρκίνος

5.1.1. Γενικά

Με τον όρο «καρκίνος» περιγράφεται ο έκρυθμος, μη φυσιολογικός πολλαπλασιασμός κυττάρων που οφείλεται στην απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Συνήθως προκύπτει ύστερα από συσσώρευση γενετικών βλαβών (π.χ. μεταλλάξεις γονιδίων) ή/και επιγενετικών αλλαγών (π.χ. μεθυλίωση του DNA). Αποτέλεσμα των βλαβών αυτών, είναι η δημιουργία όγκων που λειτουργούν εκτός των κανόνων της ιστικής ομοιοστασίας και έτσι αποκτούν πλεονέκτημα ανάπτυξης έναντι των φυσιολογικών κυττάρων(4),(5).

Ένας όγκος μπορεί να είναι καλοήθης ή κακοήθης. Ο κακοήθης όγκος παρουσιάζει μεταστατικές ιδιότητες, οι οποίες και τον διακρίνουν από τον καλοήθη. Η μετάσταση είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα διηθούνται από τον πρωτογενή όγκο, διεισδύουν σε περιβάλλοντες υγιείς ιστούς, ενδοαγγειώνονται και μεταφέρονται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος όπου τελικά εισβάλλουν σε μια νέα περιοχή και σχηματίζουν το δευτερογενή όγκο (Εικόνα 1.) (6),(7),(8).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της μεταστατικής διαδικασίας [5].

Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου εμπίπτουν σε μία από τις τρεις κύριες ομάδες: καρκινώματα, σαρκώματα και λευχαιμίες ή λεμφώματα. Τα καρκινώματα, τα οποία περιλαμβάνουν περίπου το 90% των ανθρώπινων καρκίνων, αφορούν κακοήθειες των επιθηλιακών κυττάρων. Τα σαρκώματα, τα οποία είναι σπάνια στους ανθρώπους, είναι συμπαγείς όγκοι συνδετικών ιστών, όπως μυών, οστών, χόνδρων και ινώδους ιστού. Οι λευχαιμίες και τα λεμφώματα, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 8% των ανθρώπινων κακοηθειών, προκύπτουν από αιμοποιητικά κύτταρα και από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αντίστοιχα. Οι όγκοι ταξινομούνται περαιτέρω σύμφωνα με τον ιστό προέλευσης τους (π.χ. καρκινώματα πνευμόνων ή μαστών) και τον τύπο των κυττάρων. Για παράδειγμα, τα ινোসαρκώματα προκύπτουν από τους ινοβλάστες και οι ερυθροειδείς λευχαιμίες από προδρόμους ερυθροκυττάρων (ερυθρά αιμοσφαίρια) (9).

Παράγοντες κινδύνου

Παρά την υψηλή ετερογένεια που εμφανίζουν οι διάφοροι τύποι καρκίνου η έναρξη της καρκινογένεσης, σε όλες τις περιπτώσεις, συνδέεται με γενετικούς, περιβαλλοντικούς και βιολογικούς παράγοντες. Ο καρκίνος είναι μια γενετική νόσος, αυτό σημαίνει ότι προκύπτει από μεταλλάξεις στο γονιδίωμα, οι οποίες μπορεί να είναι κληρονομούμενες (συνήθως οι παιδικές νεοπλασίες), τυχαίες ή να σχετίζονται με περιβαλλοντικούς παράγοντες(10). Το 2008 ο Anand και οι συνεργάτες του αναφέρθηκαν στους βασικούς παράγοντες κινδύνου που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του 70-95% των περιπτώσεων καρκίνου. Αυτοί είναι: η διατροφή (30-35%), ο καπνός του τσιγάρου (25-30%), οι λοιμώξεις (15-20%), η παχυσαρκία (10-20%), το αλκοόλ (4-6%), οι ρύποι και η ακτινοβολία (10-15%)(11),(12).

Οι μεταλλάξεις στο γονιδίωμα μπορεί να είναι σημειακές, δηλαδή να προκύπτουν από απλή αντικατάσταση ενός ζεύγους βάσεων, να σχετίζονται με αλλαγή του αριθμού των αντιγράφων ενός γονιδίου ή/και να προκύπτουν από χρωμοσωμικές μεταθέσεις. Μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα είδη γονιδίων έχουν συνδεθεί με την καρκινογένεση. Τα γονίδια αυτά διακρίνονται σε ογκογονίδια (κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους), ογκοκατασταλτικά γονίδια (κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ανταγωνίζονται τη δράση των ογκογονιδίων) και γονίδια που κωδικοποιούν τα επιδιορθωτικά ένζυμα (φροντίζουν για την ομαλή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου). Τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια, που εντοπίζονται πιο συχνά σε πολλούς τύπους καρκίνου, είναι τα *BRAF*, *H-RAS*, *PI3KCA*, τα απενεργοποιημένα ογκοκατασταλτικά είναι τα *APC*, *PTEN*, *TP53*, ενώ τα επίσης απενεργοποιημένα επιδιορθωτικά είναι τα *BRCA2*, *MSH2*(13).

Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου για τη δημιουργία νεοπλασιών, φαίνεται πως στην υψηλότερη θέση βρίσκεται ο καπνός του τσιγάρου, ενώ οι ρύποι και η ακτινοβολία ακολουθούν. Το κάπνισμα φαίνεται να σκοτώνει μισό εκατομμύριο ενηλίκους Αμερικανούς το χρόνο. Οι καπνιστές πόσο μάλλον, αλλά και τα άτομα που εκτίθενται στον καπνό του τσιγάρου (παθητικοί καπνιστές, never smokers) έχουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν καρκίνο του πνεύμονα, άλλους τύπους καρκίνου, καθώς επίσης καρδιαγγειακές παθήσεις και άλλες ασθένειες(14).

Το 2008, περίπου 2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου (16% των ετήσιων περιπτώσεων) παγκοσμίως οφείλονταν σε κάποια λοίμωξη. Μάλιστα οι παθογόνοι μικροοργανισμοί ειδικεύονται σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου και οδηγούν σε καρκινογένεση είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω της ενεργοποίησης μονοπατιών χρόνιας φλεγμονής. Πιο γνωστά παραδείγματα τέτοιων μικροοργανισμών αποτελούν ο Ιός Ανθρωπίνων Θηλωμάτων τύπου 16 (Human Papilloma Virustype 16, HPV-16), καθώς και ο Ιός Ανοσοανεπάρκειας του Ανθρώπου τύπου 1 (Human Immunodeficiency Virustype1, HIV-1), που έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας(15).

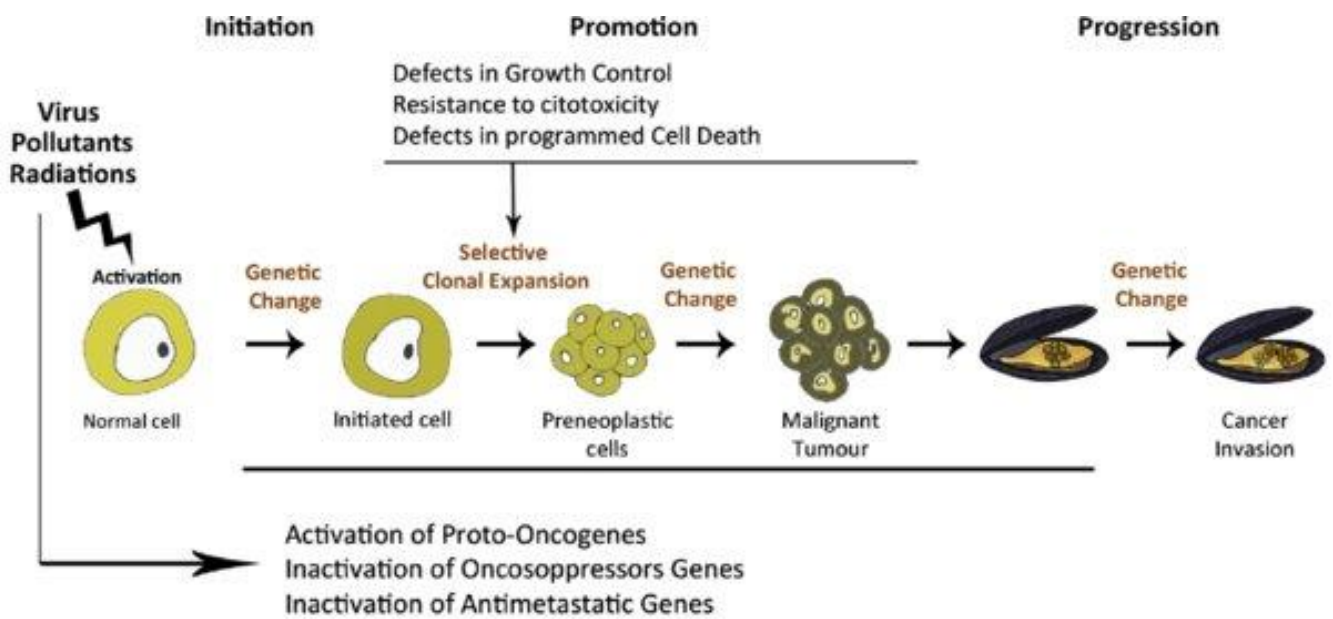
Κατά αντιστρεπτό τρόπο, όσοι νοσούν από καρκίνο είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα παρουσιάσουν κάποια λοίμωξη, η οποία πολλές φορές είναι και η αιτία θανάτου των ασθενών. Για τους ανωτέρω

λόγους η υιοθέτηση υγιεινού τρόπου ζωής, καθώς και η αποτελεσματική και έγκαιρη αντιμετώπιση των λοιμώξεων θα μπορούσαν να συνεισφέρουν αποτελεσματικά στη μείωση των ασθενών, που νοσούν από καρκίνο(15).

Ωστόσο, η εύρεση της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής για την αντιμετώπιση του καρκίνου φαίνεται ολοένα και δυσκολότερη εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που παρουσιάζει το καρκινικό κύτταρο. Τα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνουν: συνεχή ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αντίσταση στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, γενετική αστάθεια και μεταλλάξεις, επαγωγή αγγειογένεσης, ενεργοποίηση της διήθησης και επομένως της μετάστασης, επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού (με συνηθέστερη τη συνεχή ενεργοποίηση των καταβολικών μονοπατιών με σκοπό τη συνεχή παραγωγή ενέργειας), προώθηση της φλεγμονής, μείωση των τελομερών επιτρέποντας την αθανασία, αποφυγή της φαγοκυττάρωσης από κύτταρα του ανοσοποιητικού αλλά και συνεχή κυτταρική ανάπτυξη. Έτσι, μια πετυχημένη θεραπεία θα πρέπει να περιλαμβάνει φάρμακα, που θα στοχεύουν πλήθος από τα παραπάνω χαρακτηριστικά(16).

5.1.2. Στάδια καρκινογένεσης

Για τη βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού της καρκινογένεσης έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεωρίες. Από τις πιο γνωστές είναι αυτή της μονοκλωνικής προέλευσης του καρκίνου. Συγκεκριμένα πιστεύεται πως οι περισσότεροι καρκίνοι είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης γενετικών μεταλλάξεων σε ένα μεμονωμένο κύτταρο. Επιπρόσθετες μελλοντικές μεταλλάξεις παρέχουν στο κύτταρο πλεονεκτήματα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης, προσδίδοντας του την ικανότητα να δημιουργήσει όγκους. Οι μεταλλάξεις οφείλονται στην επίδραση γενετικών, περιβαλλοντικών και βιολογικών παραγόντων και αφορούν την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών και επιδιορθωτικών γονιδίων. Όλα τα παραπάνω καθιστούν την καρκινογένεση μια διαδικασία πολλών σταδίων με χαρακτηριστικά αυτά της Έναρξης (*Initiation*), της Προαγωγής (*Promotion*) και της Προόδου (*Progression*)(17), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2**.



Εικόνα 2. Η καρκινογένεση είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων (18).

Έναρξη (Initiation)

Η εκκίνηση του σταδίου λαμβάνει χώρα κατά την επίδραση ενός μεταλλαξιογόνου παράγοντα στο γενετικό υλικό ενός μεμονωμένου κυττάρου. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια “κλειδιά” που αναφέρθηκαν προκαλούν ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου, αντίσταση σε μηχανισμούς κυτταροτοξικότητας και βλάβες σε μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου οδηγώντας στη δημιουργία ενός πρώιμου όγκου. Ο όγκος αυτός αποκτά πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι του φυσιολογικού ιστού, όμως δεν μπορεί να χαρακτηριστεί καρκινικός αν στο επόμενο στάδιο της προαγωγής, δεν πραγματοποιηθεί μια επιπλέον μη αναστρέψιμη γενετική μεταβολή. Μέχρι τη στιγμή αυτή ο όγκος είναι ασυμπτωματικός και τα μεταλλαγμένα κύτταρα αυξάνονται με βραδύ ρυθμό, έως ότου φτάσει σε ένα μέγιστο ρυθμό αύξησης που σηματοδοτεί την έναρξη της προαγωγής (19).

Προαγωγή (Promotion)

Η προαγωγή περιλαμβάνει τα στάδια δημιουργίας του πρώιμου όγκου μέχρι τη στιγμή της μετατροπής του σε μεταστατικό. Πειραματικά στοιχεία αποδεικνύουν ότι μετά την έναρξη ο σχηματισμός του όγκου επάγεται από ένα εξωτερικό συμβάν όπως ένα τραύμα ή μια φλεγμονή. Έτσι, δημιουργούνται συνθήκες υποξείας και οξέωσης. Οι συνθήκες αυτές σε συνδυασμό με την τοπική αύξηση της αιματικής ροής ευνοούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων έναντι των υγιών. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων αυξάνεται ραγδαία και ο καρκινικός όγκος μπορεί να διαγνωσθεί (19).

Πρόοδος (Progression)

Η ανάπτυξη του καρκινικού όγκου συνεχίζεται και σε αυτό το στάδιο. Ο όγκος έχει σχηματιστεί σε ικανοποιητικό μέγεθος για να προκαλέσει βλάβες σε γειτονικά υγιή κύτταρα, αφού προάγει την υποξεία και μεταβάλλει το pH του περιβάλλοντος σε όξινο (μέσω της αυξημένης γλυκόλυσης που οδηγεί στη συνεχή παραγωγή γαλακτικού- φαινόμενο Warburg). Ταυτόχρονα, μεταστατικά κύτταρα εισβάλλουν σε νέους ιστούς δημιουργώντας δευτερογενείς όγκους (19).

5.1.3. Κυτταρικός θάνατος

Ένα κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί σε θάνατο μέσω πληθώρας σηματοδοτικών μονοπατιών, με χαρακτηριστικά αυτά που επάγουν: I. την απόπτωση, II. την αυτοφαγία, III. τη νέκρωση και IV. τη νεκρόπτωση. Η απόπτωση και η αυτοφαγία αποτελούν μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ενώ η νέκρωση χαρακτηρίζεται από πρόωρο θάνατο του κυττάρου, ύστερα από κάποια βλάβη ή τραυματισμό, όπως η υποξεία ή η φλεγμονή. Η νεκρόπτωση, που παρουσιάζει ομοιότητες με την νέκρωση, χαρακτηρίζεται ως γενετικά ελεγχόμενος κυτταρικός θάνατος. Η απόπτωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία που ακολουθείται από φαγοκύτωση των περιεχόμενων συστατικών του κυττάρου και ως εκ τούτου δεν προκαλεί βλάβες σε γειτονικά, υγιή κύτταρα. Η αυτοφαγία περιλαμβάνει ενδοκυττάρια αποικοδόμηση των ίδιων των συστατικών του κυττάρου. Σε αντίθεση η νέκρωση και η νεκρόπτωση, ενεργοποιούν μηχανισμούς φλεγμονώδους αντίδρασης. Η κατανόηση των παραπάνω μηχανισμών κυτταρικού θανάτου και ιδιαίτερα της απόπτωσης, μπορεί να συνεισφέρει αποτελεσματικά στην ανάπτυξη καινοτόμων, θεραπευτικών στρατηγικών αντιμετώπισης του καρκίνου και άλλων ασθενειών, γι' αυτό και οι μηχανισμοί θα αναλυθούν περαιτέρω (20).

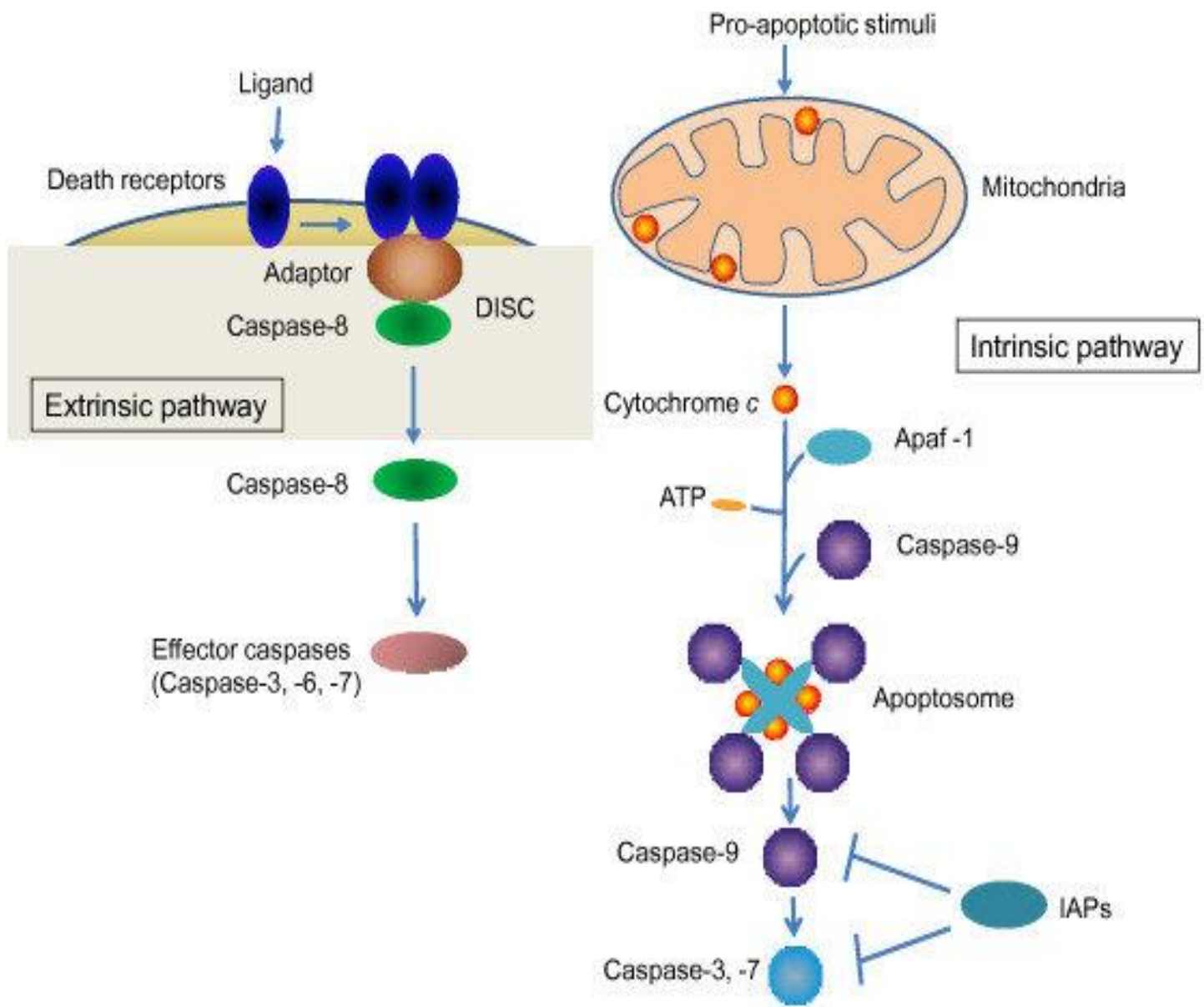
I. Απόπτωση

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 έγινε προσπάθεια για την ταξινόμηση και τον χαρακτηρισμό των τύπων του κυτταρικού θανάτου. Η περιγραφή του μονοπατιού της απόπτωσης ήρθε το 1973 από τους Schweichel και Merker, οι οποίοι χρησιμοποίησαν αρχικά τον όρο κυτταρικός θάνατος τύπου I που σχετίζεται με ετεροφαγία. Η ονομασία απόπτωση δόθηκε αργότερα από την Επιτροπή Ονοματολογίας Κυτταρικού θανάτου (NCCD). Τα μονοπάτια της απόπτωσης διαχωρίστηκαν περαιτέρω σε εξωγενή και ενδογενή (συνοπτικά φαίνονται στην **εικόνα 3**). Η εξωγενής απόπτωση περιλαμβάνει μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου που επάγονται από εξωκυττάρια σήματα στρες, τα οποία ανιχνεύονται και πολλαπλασιάζονται από ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς (υποδοχείς θανάτου, οικογένεια TNF). Η ενδογενής απόπτωση είναι εξαρτώμενη από τα μιτοχόνδρια αλλά μπορεί να είναι ανεξάρτητη ή και όχι από

τις κασπάσες (21). Η διάκριση των οδών που επάγουν την απόπτωση έγκειται στη συμμετοχή ή όχι των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2, καθώς και στο είδος της αρχικής κασπάσης.

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από μια σειρά καθορισμένων μορφολογικών μεταβολών στο κύτταρο. Οι μεταβολές αυτές περιλαμβάνουν : τη μείωση ή συρρίκνωση του κυτταρικού όγκου, τη συμπύκνωση του πυρήνα με συμπύκνωση της χρωματίνης, τον κατακερματισμό της πυρηνικής χρωματίνης και τον επακόλουθο σχηματισμό των αποπτωσωμάτων, τη φωσφορυλίωση των ιστονών και σε τελευταίο στάδιο τη φαγοκυττάρωση των αποπτωσωμάτων. Η φαγοκυττάρωση λαμβάνει χώρα από μακροφάγα ή γειτονικά κύτταρα, αποτρέποντας την απελευθέρωση των κυτταρικών περιεχομένων στις γύρω περιοχές (22).

Η ενεργοποίηση των μονοπατιών της απόπτωσης μπορεί να αναστείλει τη δημιουργία όγκου. Για παράδειγμα μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *P53*, όπως ήδη αναφέρθηκε, εντοπίζονται στους περισσότερους τύπους καρκίνου. Η δράση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *P53* μπορεί να αναστείλει τη δημιουργία όγκων μέσω επαγωγής της απόπτωσης. Η επαγωγή της απόπτωσης γίνεται είτε μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης αποπτωτικών γονιδίων όπως τα *PUMA*, *NOXA*, *P53AIP1*, *BAX*, *APAF-1*, είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με τις πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 και BCL-XL(αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες) και επάγοντας τον ολιγομερισμό της BAX(προαποπτωτική πρωτεΐνη)(23).



Εικόνα 3. Εξωγενές και ενδογενές σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης (24).

II. Αυτοφαγία

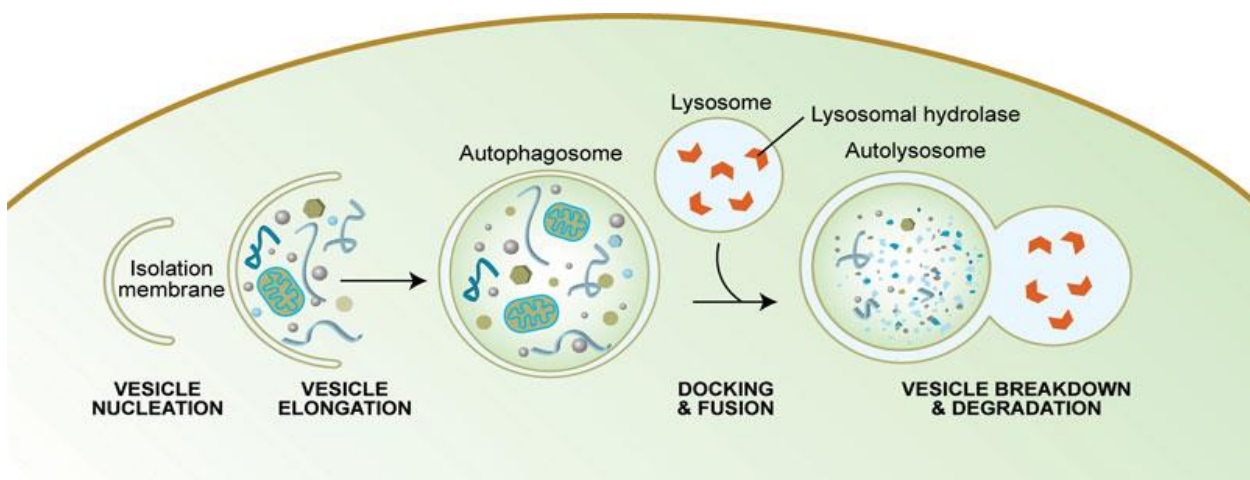
Ο όρος «κυτταρική αυτοφαγία» επινοήθηκε πρώτη φορά από τον C. De Duve το 1963 κατά τη διάρκεια μορφολογικής ανάλυσης των νεφρών νεογέννητων μυών (25). Είναι μια φυσιολογική, ενδοκυττάρια διαδικασία για την απομόνωση και την αποικοδόμηση από τα λυσοσώματα οργανιδίων και πρωτεϊνών του κυττάρου, που έχουν υποστεί βλάβη ή είναι μακρόβιες. Ωστόσο, η αυτοφαγία δύναται να ενεργοποιηθεί κάτω από στρεσογόνες για το κύτταρο συνθήκες, όπως είναι η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων καθώς και η ύπαρξη οξειδωτικού στρες. Η ενεργοποίηση αυτή παρουσιάζει διττό ρόλο για το κύτταρο, αφενός το προστατεύει επαναχρησιμοποιώντας τα προϊόντα διάσπασης με σκοπό την επιβίωση του στις δύσκολες συνθήκες και αφετέρου μπορεί να οδηγήσει σε υπερβάλλουσα μαζική πέψη (26), (27).

Υπάρχουν πολλά είδη αυτοφαγίας, τα οποία διαφέρουν κυρίως ως προς τον τόπο της απομόνωσης του φορτίου και τον τύπο του φορτίου. Τα πιο γνωστά είναι η *μακροαυτοφαγία*, η *μικροαυτοφαγία* και η *αυτοφαγία μέσω πρωτεϊνών συναρμογής (Chaperone-mediated autophagy)*(28).

Η *μακροαυτοφαγία* είναι ο πιο συνηθισμένος και καλά περιγραφόμενος τύπος αυτοφαγίας. Περιλαμβάνει την εγκόλπωση οργανιδίων και μη χρησιμοποιούμενων πρωτεϊνών, με σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Τα αυτοφαγοσώματα είναι κενοτόπια που περιβάλλονται από διπλή κυτταροπλασματική μεμβράνη, τα οποία τελικά συντήκονται με τα λυσοσώματα όπου θα πραγματοποιηθεί η αποικοδόμηση.

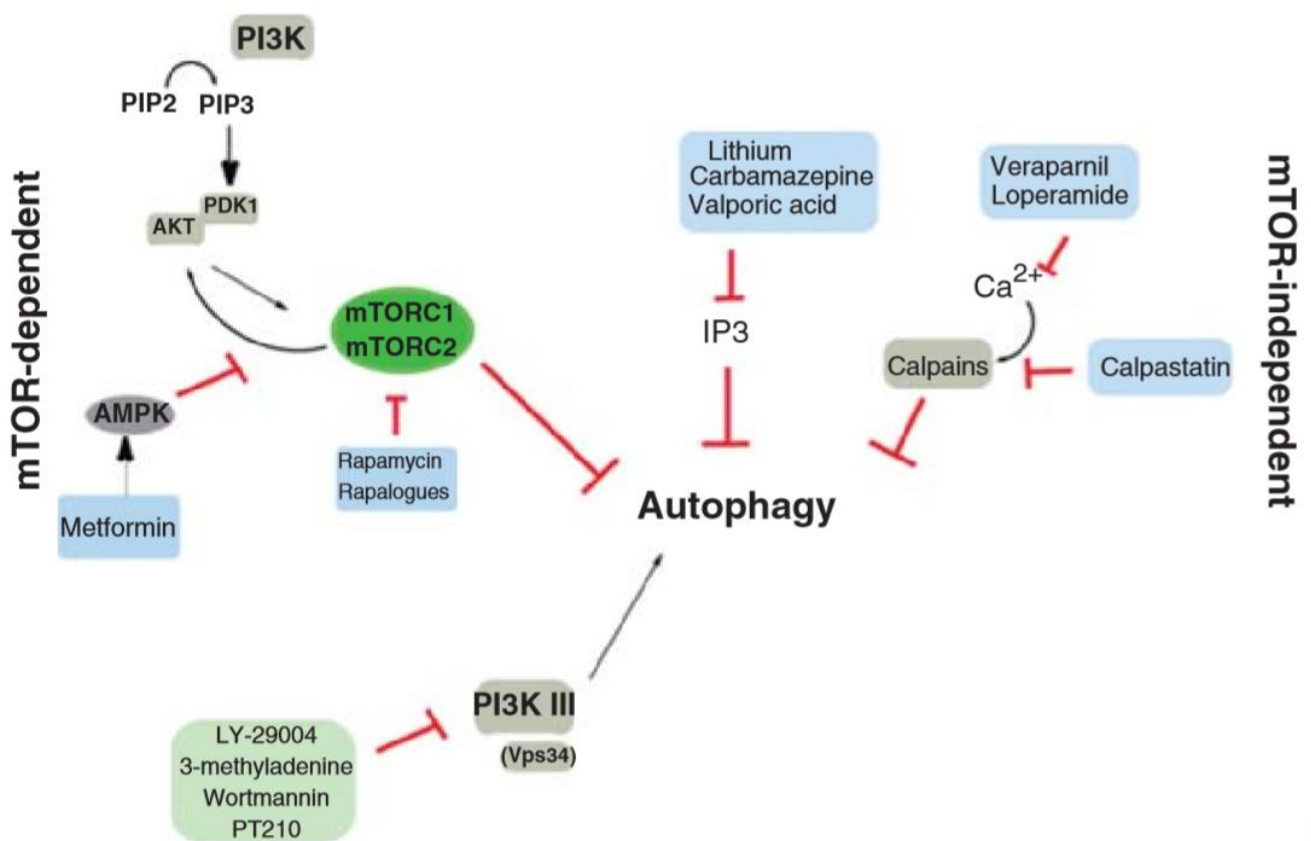
Η *μικροαυτοφαγία* παρουσιάζει ομοιότητες με την μακροαυτοφαγία, αφού περιλαμβάνει διαδικασίες εγκόλπωσης κυτταροπλασματικών συστατικών και αποικοδόμηση τους από τα λυσοσώματα. Η διαφορά είναι ότι δεν υφίσταται ο σχηματισμός αυτοφαγοσώματος.

Η *αυτοφαγία μέσω πρωτεϊνών συναρμογής (Chaperone-mediated autophagy)* είναι μια ιδιαίτερα επιλεκτική διαδικασία, με απευθείας μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης των λυσοσωμάτων (συμμετοχή της HSP-70).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού της αυτοφαγίας. Διακρίνονται τα εξής στάδια: 1. Έναρξη 2. Εμπυρήνωση 3. Επιμήκυνση 4. Έγκλιση-Ωρίμανση 5. Αποδόμηση (29).

Η αυτοφαγία είναι μία σύνθετη και δυναμική διαδικασία. Ρυθμίζεται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το PI3K/AKT/-mTORC1/p70S6K (mammalian Target Of Rapamycin). Σε συνθήκες πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά, το mTORC1 ενεργοποιείται με αποτέλεσμα την αναστολή της αυτοφαγίας, ενώ αντίθετα η στέρηση θρεπτικών ουσιών αναστέλλει το mTORC1 που οδηγεί στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού του mTORC1 ρυθμίζεται από κινάσες που ανήκουν στην οικογένεια PI3K (Phosphoinositide 3-kinase). Υπάρχουν κυρίως δύο διαφορετικές κατηγορίες PI3K που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι της αυτοφαγίας. Το τάξης I PI3K οδηγεί σε ενεργοποίηση του mTOR και συνεπώς στην αναστολή της αυτοφαγίας και το τάξης III PI3K που επάγει την αυτοφαγία. Η ρύθμιση της αυτοφαγίας μπορεί να είναι και ανεξάρτητη του mTOR και να περιλαμβάνει αναστολείς των λυσοσωμικών υδρολασών, την πρωτεΐνη IP3 (Inositol trisphosphate), αποκλειστές διαύλων ασβεστίου κ.α. Συνοπτικά τα βασικά σηματοδοτικά μόρια που αναφέρθηκαν φαίνονται στην **Εικόνα 5**.(30).



Εικόνα 5. Σηματοδοτικό μονοπάτι της αυτοφαγίας. Με κόκκινα βέλη εμφανίζονται οι αναστολείς, ενώ με γκρι οι επαγωγείς.

III. Νέκρωση

Η νέκρωση των κυττάρων ενός ιστού είναι συχνά αποτέλεσμα κάποιου τραυματισμού, μακροχρόνιας λοίμωξης, υποξείας, στρες, εμφράγματος του μυοκαρδίου κ.α. Ο νεκρωτικός κυτταρικός μηχανισμός ενεργοποιεί φλεγμονώδεις αποκρίσεις και έτσι προκαλεί γενικευμένη βλάβη και σε υγιή κύτταρα του οργανισμού. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι κύτταρα του λεπτού εντέρου χρησιμοποιούν ένα συνδυασμό αποπτωτικών και νεκρωτικών διεργασιών για να αυτοανανεωθούν έπειτα από κάποια λοίμωξη, όπως είναι μια ίωση για παράδειγμα (28).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί θεραπείες που στοχεύουν στην ενεργοποίηση νεκρωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών σε καρκινικά κύτταρα με σκοπό την επαγωγή μιας γενικευμένης ανοσολογικής απόκρισης. Με τον τρόπο αυτόν είναι πιθανό να καταστραφούν μελλοντικά και νέα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, με νέκρωση μπορούν να οδηγηθούν σε θάνατο κύτταρα όγκων που μάλιστα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντίστασης στην απόπτωση (28).

IV. Νεκρόπτωση

Για περισσότερες από 4 δεκαετίες, θεωρούνταν ότι υπάρχουν δύο μορφές κυτταρικού θανάτου: η απόπτωση και η νέκρωση. Πρόσφατες ανακαλύψεις έχουν ανατρέψει αυτό το απλοϊκό μοντέλο για να αποκαλύψουν μηχανισμούς που επάγουν γενετικά προγραμματισμένη νέκρωση, δηλαδή τη νεκρόπτωση. Χαρακτηρίζεται ως μηχανισμός κυτταρικού θανάτου στον οποίο πρωταρχικό ρόλο διαδραματίζουν ο ολιγομερισμός της RIPK3 (Receptor-interacting protein kinase-3), η φωσφορυλίωση της MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain-Like), καθώς και μια κυτταροκίνη ο TNF (Tumor Necrosis Factor). Ο TNF παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και συνδέεται στους υποδοχείς TNF-R1 και TNFR2 (28).

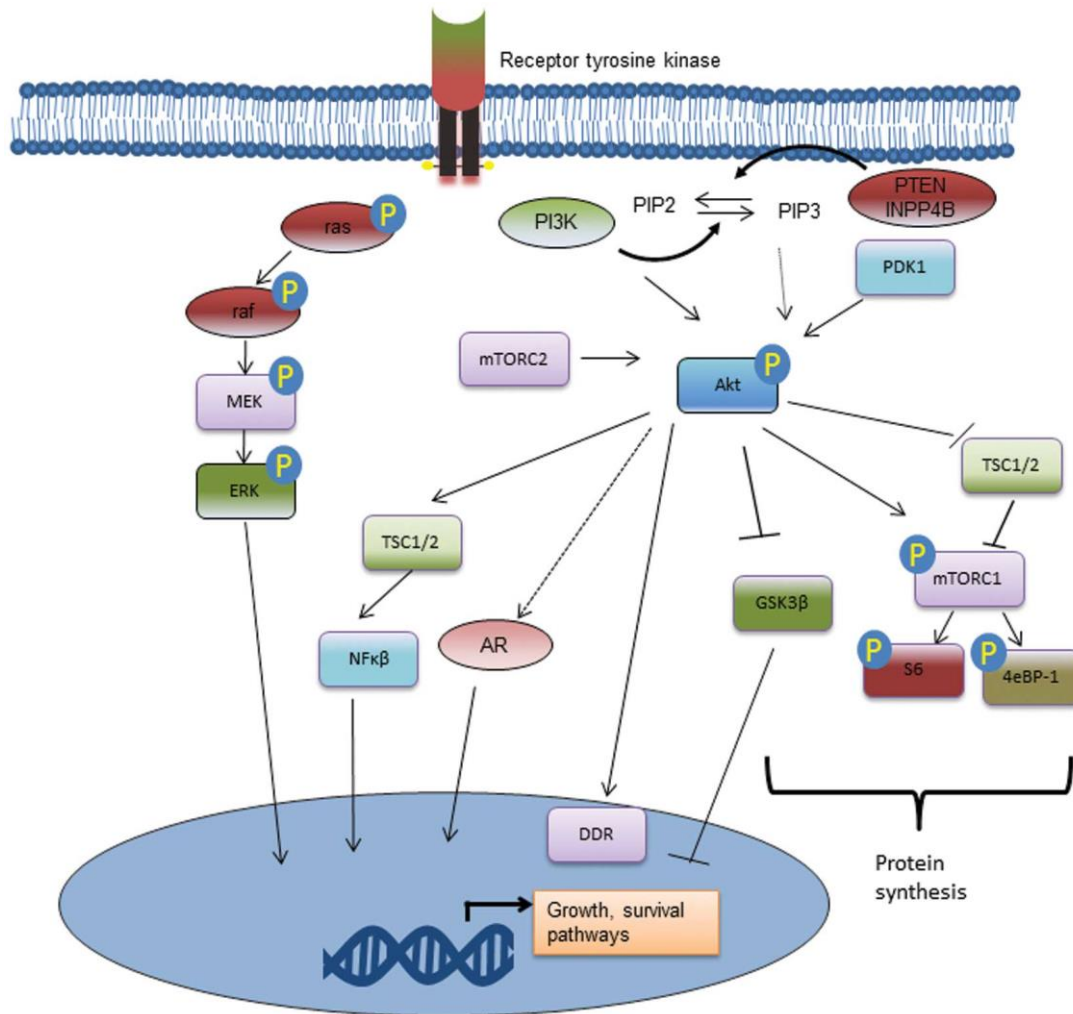
5.1.4. Μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης σχετιζόμενα με την καρκινογένεση

Τα υγιή κύτταρα αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον και μεταξύ τους χρησιμοποιώντας πολύπλοκα δίκτυα κυτταρικής σηματοδότησης. Η μεταγωγή του σήματος σε αυτά τα μονοπάτια πραγματοποιείται από την πρόσδεση πρωτεϊνικών μορίων στους αντίστοιχους υποδοχείς τους, γεγονός που πυροδοτεί τη ρύθμιση της έκφρασης νέων μορίων κατά μήκος του μονοπατιού. Η ανταπόκριση στα εξωκυττάρια σήματα σχετίζεται με τη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου αλλά και ζωτικής φύσεως ιδιοτήτων όπως είναι η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η κινητικότητα, η μεταβολή της θέσης στο χώρο, η σύνθεση πρωτεϊνών καθώς και η απόπτωση. Τα καρκινικά κύτταρα λειτουργούν εκτός των κανόνων ιστικής ομοιοστασίας και διαφοροποιούνται από τα υγιή ως προς τις παραπάνω ιδιότητες, αποκτώντας πλεονέκτημα επιβίωσης. Επομένως, η μελέτη των παραπάνω μονοπατιών είναι εξέχουσας σημασίας στην ογκολογία (31).

Τα πρωτεϊνικά μόρια που έχουν μελετηθεί και σχετίζονται με την κυτταρική σηματοδότηση είναι πολυάριθμα. Ως εκ τούτου πολλά είναι και τα διαφορετικά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Το καθένα από αυτά έχει συσχετιστεί με διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Για παράδειγμα στον καρκίνο του πνεύμονα κρίσιμο ρόλο έχει αποδειχτεί ότι έχει η απορρύθμιση των μονοπατιών PI3K/AKT, των MAP κινασών κ.α. (32).

Μονοπάτι της PI3K/AKT

Το μονοπάτι της PI3K (phosphoinositide-3-kinase) συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, διαίρεσης και επιβίωσης. Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν συσχέτισμό της καρκινογένεσης με μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν την οικογένεια των PI3K καθώς και μορίων στόχων που ενεργοποιούνται από αυτές καθοδικά. Οι κινάσες της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-3 είναι λιπίδια που ενεργοποιούνται με την σύνδεση αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς τους (RTKs) ή/και μέσω μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN*(32). Οι PI3K κινάσες καταλύουν εν συνεχεία τη φωσφορυλίωση της PIP2 σε PIP3. Η PIP3 (3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ϊνοσιτόλη) δεσμεύεται στην AKT (ή πρωτεϊνική κινάση Β) και την μετατοπίζει στο κυτταρόπλασμα. Εκεί η AKT φωσφορυλιώνεται από την PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) στα κατάλοιπα της θρεονίνης (Thr308) και της σερίνης (S473). Για να ενεργοποιηθεί ωστόσο απαιτείται η φωσφορυλίωση της σε μια δεύτερη θέση από την πρωτεϊνική κινάση mTOR (στόχος ραπαμυκίνης των θηλαστικών), μέλος του συμπλόκου mTORC2. Με την ενεργοποίηση της AKT πυροδοτείται η φωσφορυλίωση μορίων που κατέχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας FOXO. Με την φωσφορυλίωση του ο FOXO παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα και αδυνατεί να επάγει κυτταρικό θάνατο. Επίσης, η AKT αναστέλλει την GSK3 που ρυθμίζει το μεταβολισμό και την επιβίωση του κυττάρου. Τέλος, η AKT φωσφορυλιώνει και αναστέλλει το σύμπλοκο TSC1/2, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιεί το mTOR1, που με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την κινάση S6, η οποία ελέγχει σημαντικά την πρωτεϊνοσύνθεση (33).



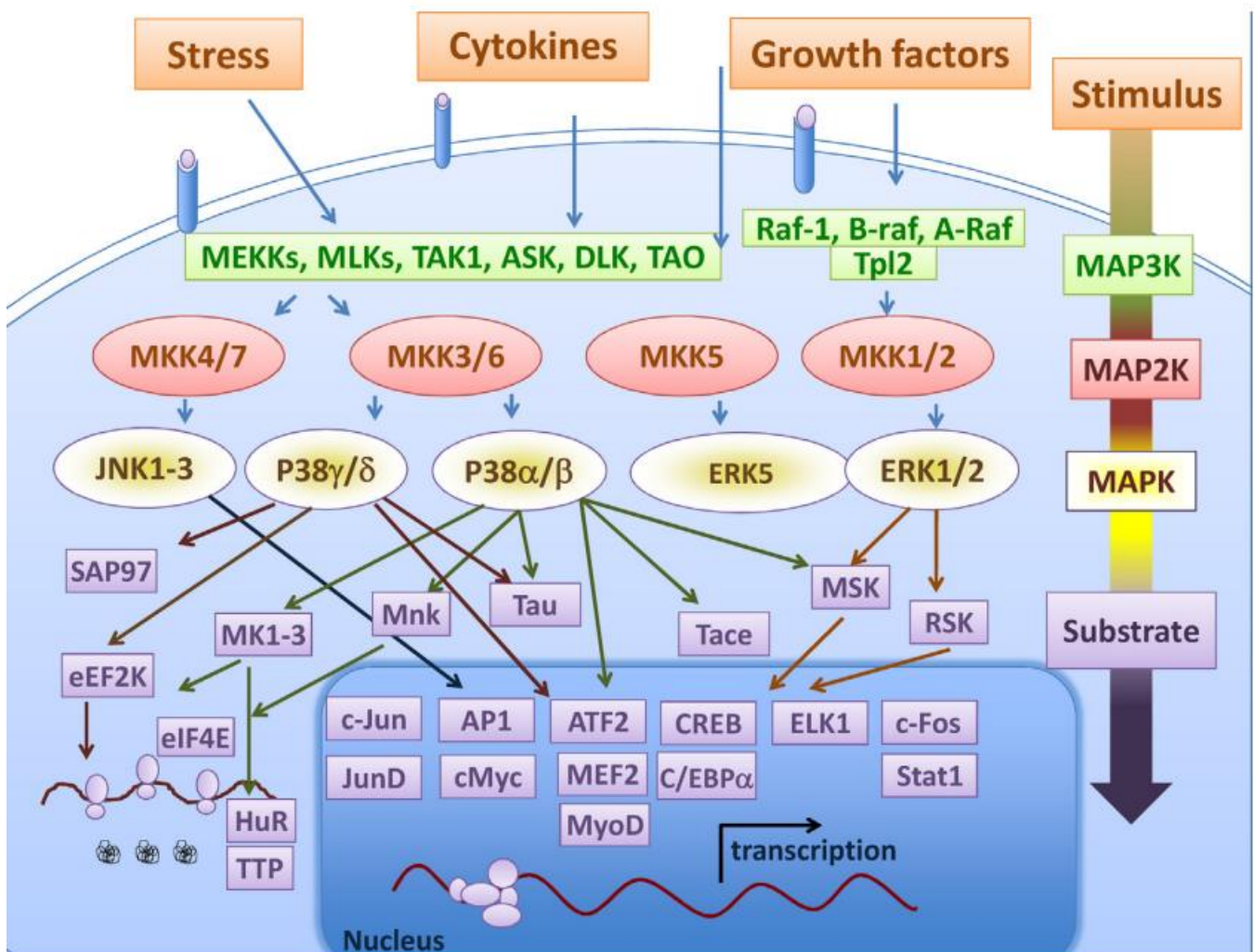
Εικόνα 6. Ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT(33).

Σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK κινασών

Το μονοπάτι πρωτεϊνικών κινασών ενεργοποιούμενων από μιτογόνα MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) είναι από τα σημαντικότερα συστήματα κυτταρικής σηματοδότησης και συναντάται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι συντηρημένο εξελικτικά και ελέγχει θεμελιώδεις λειτουργίες του κυττάρου, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη και η απόπτωση. Επίσης, είναι από τα πιο μελετημένα μονοπάτια καθώς η απορρύθμιση αυτού συναντάται τουλάχιστον στο ένα τρίτο των διαγνωσμένων καρκίνων (34).

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού πυροδοτείται από παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες καθώς και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες. Στα θηλαστικά οι MAP κινάσες ταξινομούνται σε 3 μεγάλες κατηγορίες, στις ERK (extracellular signal regulated kinases), στις JNK (Jun aminoterminal kinases) και στις P38/SAPKs (stress activated protein kinases) (35). Γενικά η ενεργοποίηση των MAP κινασών όλων των κατηγοριών ακολουθεί ένα συγκεκριμένο μοτίβο. Η ενεργοποίησή τους προϋποθέτει αρχικά την πρόσδεση ενός μορίου-αγωνιστή στον αντίστοιχο διαμεμβρανικό υποδοχέα του. Από τα πιο γνωστά παραδείγματα είναι ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (epidermal growth factor receptor)

και οι υποδοχείς GPCRs. Αυτή η πρόσδεση επάγει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κινάσες MAP3K, όπως η RAF, MEKKS κ.α. Οι MAP3K είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης και φωσφορυλιώνουν σε δύο κατάλοιπα σερίνης τις κινάσες MAP2K, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των τελευταίων. Οι MAP2K κινάσες (όπως οι MKK4/7, MKK5 κ.α.) έχουν τη δυνατότητα να φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα θρεονίνης αλλά και τυροσίνης, στις MAPK και των τριών κατηγοριών που αναφέρθηκαν. Στο τελευταίο τμήμα του μονοπατιού οι φωσφορυλιωμένες MAPK όπως για παράδειγμα η ERK1/2 παραμένουν στο κυτταρόπλασμα για να αλληλεπιδράσουν με άλλα υποστρώματα ή μεταφέρονται στον πυρήνα. Εκεί, ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο CREB, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση (36).



Εικόνα 7. Ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAP κινασών (36).

5.1.5. Χημική καρκινογένεση

Είναι γνωστό πως η έκθεση των οργανισμών σε ορισμένες χημικές ενώσεις μπορεί να επάγει την καρκινογένεση. Από το 1775 ο Άγγλος χειρουργός Sir Percival Pott παρατήρησε πως οι καθαριστές καπνοδόχων εμφάνιζαν σε μεγάλο ποσοστό καρκίνο των όρχεων. Συμπέρανε ότι αυτός ο τύπος καρκίνου οφειλόταν σε έκθεση των εργατών στην αιθάλη (37). Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 ο Bruce N. Ames με μελέτες του αποδεικνύει την αιτιολογική σχέση ανάμεσα στον καπνό του τσιγάρου και τον καρκίνο του πνεύμονα. Επίσης, κάνει λόγο για μεταβολές στο DNA κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου, περιγράφοντας έτσι τις σωματικές μεταλλάξεις (38).

Ο κατάλογος των χημικών ενώσεων, που μπορούν να προκαλέσουν καρκινογένεση είναι εκτενής. Αυτές μπορεί να είναι οργανικές, ανόργανες, αδρανή υποστρώματα, ακόμα και ορμόνες. Οι μηχανισμοί δράσης τους διαφέρουν αρκετά. Οι οργανικές και ανόργανες ενώσεις εισερχόμενες στον οργανισμό απορροφώνται, κατανέμονται στους ιστούς και μεταβολίζονται (στο ήπαρ), δίνοντας είτε ενεργούς μεταβολίτες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, είτε ανενεργούς που απεκκρίνονται. Στον **Πίνακα 1**, φαίνονται μερικά παραδείγματα οργανικών και ανόργανων μεταλλαξιογόνων ενώσεων. Όσον αφορά στις ορμόνες, παράδειγμα αποτελεί η αυξημένη παραγωγή οιστρογόνων, που έχει συνδεθεί με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών. Τα αδρανή υποστρώματα είναι καρκινογόνα απλά και μόνο με τη παρουσία τους σε κάποιο ιστό. Για παράδειγμα η εμφύτευση πλαστικών σε ζώα μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία σαρκώματος (39),(40).

Πίνακας 1. Χημικά καρκινογόνα.

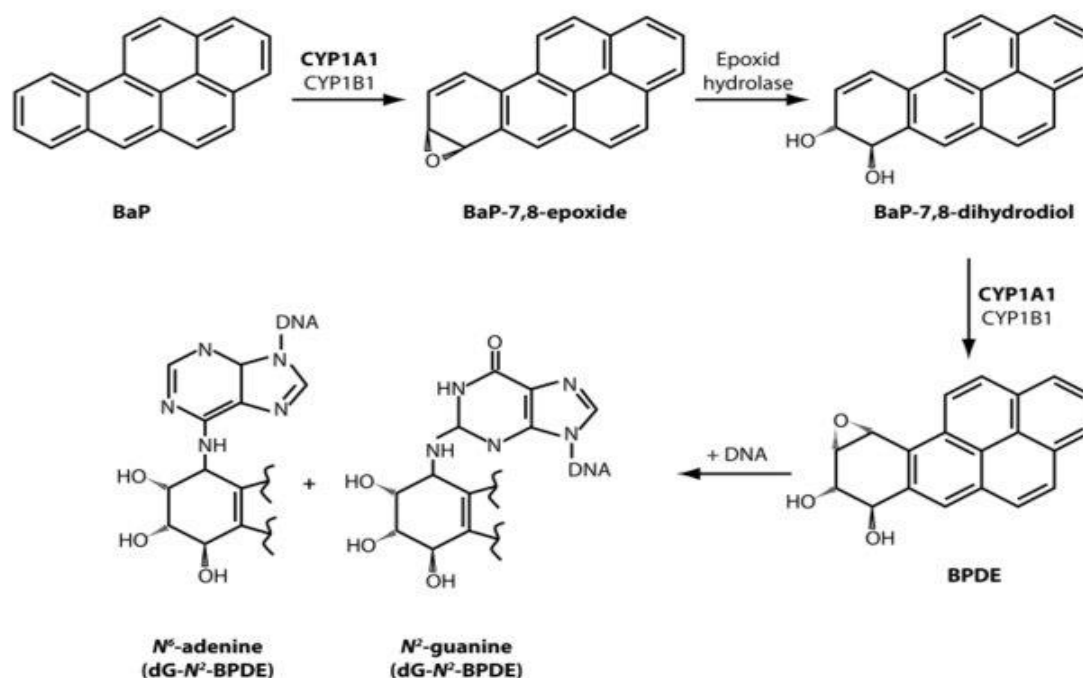
Κατηγορία	Χημική ένωση	Ιστούς που επηρεάζει/ καρκινικός τύπος
Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες	Benzo[α]pyrene	Πνεύμονες, δέρμα, στόμαχος, ήπαρ
Αρωματικές αμίνες/ αμίδια	2-Napthhtylamine	Αίμα
Αμινοαζίδια	Aminoazobenzene	Πνεύμονες, ήπαρ
N-Νιτροζαμίνες	N-Nitrosodimethylamine	Πνεύμονες, ήπαρ, νεφροί
Αλογονωμένες ενώσεις	Trichloroethylene	Πνεύμονες, ήπαρ, νεφροί
Τοξίνες	Aflatoxin B1	Πνεύμονες, ήπαρ
Μέταλλα	Αρσενικό (As)	Δέρμα, πνεύμονες, ήπαρ
Μέταλλα	Κάδμιο (Cd)	Προστάτης, νεφροί, ήπαρ
Μέταλλα	Νικέλιο (Ni)	Πνεύμονες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο καπνός του τσιγάρου είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης νεοπλασιών. Εκτιμάται πως αν δεν υπάρξει κάποια μεταβολή στις τρέχουσες τάσεις, 10 εκατομμύρια καπνιστές το χρόνο θα έχουν αποβιώσει μέχρι το 2025. Οι επιβλαβείς χημικές ενώσεις που εμπεριέχονται στον καπνό των τσιγάρων, τον καθιστούν νούμερο ένα αιτία εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, αλλά και άλλων τύπων καρκίνου. Ακόμα και απλή έκθεση των οργανισμών (άνθρωποι και ζώα) σε αυτές τις ενώσεις επάγει την καρκινογένεση. Έχουν βρεθεί περίπου 5,000 τέτοιες ενώσεις στον καπνό των τσιγάρων. Από τις πιο γνωστές και δραστικές είναι το *Βενζο(α)πυρένιο* και οι *N-Νιτροζαμίνες*, που θα αναλυθούν περαιτέρω (41).

Βενζο[α]πυρένιο

Το Βενζο[α]πυρένιο (B(α)P) είναι ένας πολυκυκλικός - αρωματικός υδρογονάνθρακας, ο οποίος σχηματίζεται κατά την ατελή καύση ή πυρόλυση οργανικών υλικών. Είναι στερεό σε θερμοκρασία δωματίου, με μοριακό βάρος 252.31g/mol. Οι οργανισμοί μπορούν να εκτεθούν στην οργανική αυτή ένωση κυρίως μέσω του καπνού των τσιγάρων, του ατμοσφαιρικού αέρα, του νερού, των εδαφών, των τροφίμων και ορισμένων φαρμακευτικών προϊόντων. Αξιοσημείωτο είναι πως οι παθητικοί καπνιστές εκτίθενται σε 52 έως 95 ng B(α)P ανά τσιγάρο, ποσότητα τρεις φορές μικρότερη από αυτή που εκτίθενται οι ίδιοι οι καπνιστές (42).

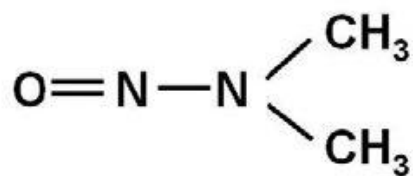
Το B(α)P έχει χαρακτηριστεί καρκινογόνο, αφού μελέτες έχουν δείξει ότι προκαλεί μεταλλάξεις αλληλεπιδρώντας ακόμα και απευθείας με τις αζωτούχες βάσεις του DNA. Οι μεταλλάξεις είναι τύπου μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης (frame shift mutation). Αρχικά, εισέρχεται στον οργανισμό ως προκαρκινογόνο (ανενεργή μορφή B(α)P). Αφού, απορροφηθεί και κατανεμηθεί στους ιστούς, μεταβολίζεται στο ήπαρ δίνοντας ενεργούς μεταβολίτες (BPDE κ.α.). Η βιομετατροπή του πραγματοποιείται από ένα συνδυασμό ενζύμων, τα κυτοχρώματα P450 (CYPs) και την εποξειδική υδρολάση. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 8.**, το κυτόχρωμα CYP1A1 (το CY1B1 σπανιότερα στις *in vivo* δοκιμές) οξειδώνει το βενζο[α]πυρένιο προς σχηματισμό του βενζο[α]πυρενο-7,8-εποξειδίου. Αυτό υδρολύεται από την εποξειδική υδρολάση προς βενζο[α]πυρενο-7,8-διυδροδιόλη, που οξειδώνεται επίσης από το CYP1A1 δίνοντας τον ενεργό μεταβολίτη βενζο[α]πυρενο-7,8-διυδροδιολο-9,10-εποξειδίου (BPDE). Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης μπορεί να διεισδύσει στα κύτταρα και να σχηματίσει συζεύγματα με το DNA ή ακόμα και να αλληλεπιδράσει ομοιοπολικά με τις αζωτούχες βάσεις (δημιουργία DNA adducts), για παράδειγμα στη θέση N2 της γουανίνης (43).



Εικόνα 8. Μεταβολισμός του Βενζο[α]πυρενίου.

N-Νιτροζαμίνες

Οι νιτροζαμίνες είναι μια κατηγορία χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά τροφίμων και εμπεριέχονται στον καπνό των τσιγάρων. Έχουν ενταχθεί στη λίστα των καρκινογόνων, παρουσιάζοντας μάλιστα εξειδίκευση ως προς το τύπο του όγκου, που δημιουργούν. Για παράδειγμα, οι μεθυλιωμένες και αιθυλιωμένες νιτροζαμίνες προκαλούν καρκίνο του ήπατος, οι νιτροζαμίνες των τσιγάρων προκαλούν καρκίνο των πνευμόνων, ενώ κάποιες βουτυλιωμένες νιτροζαμίνες έχουν συνδεθεί με λευχαιμίες. Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει αρχικά τη μεταβολική ενεργοποίησή τους στο ήπαρ από τα κυτοχρώματα. Στη συνέχεια, οι ενεργοί μεταβολίτες που παράγονται έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν σημειακές μεταλλάξεις στο DNA και να ενεργοποιήσουν πρωτοογκογονίδια, επάγοντας την καρκινογένεση. Από τις πιο γνωστές είναι η N-Nitrosodimethylamine, της οποίας η δομή φαίνεται στην **Εικόνα 9**. (44),(45).



Εικόνα 9. Συντακτικός τύπος της χημικής ένωσης N-Nitrosodimethylamine(46).

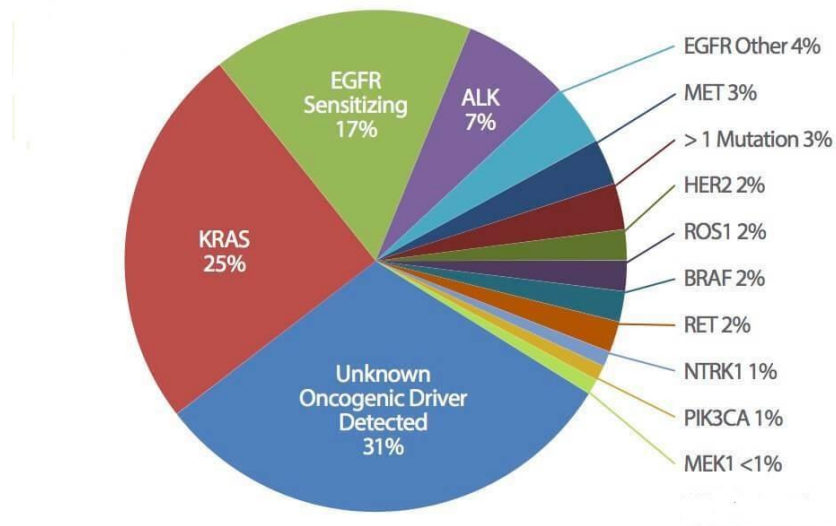
5.1.6. Καρκίνος του πνεύμονα

Τα τελευταία χρόνια ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τύπο καρκίνου και αυτόν με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα. Μόνο το 2012 εκτιμάται πως διαγνώσθηκαν 1,8 εκατομμύρια νέων περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως καθώς και 1,6 εκατομμύρια θάνατοι από την ίδια αιτία, την ίδια χρονιά. Ο καπνός των τσιγάρων είναι ο μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου, με το 90% των περιπτώσεων καρκίνου των πνευμόνων να οφείλεται στο κάπνισμα. Η εκρηκτική αύξηση των ποσοστών νοσηρότητας τις τελευταίες δεκαετίες, οφείλεται στη δραματική αύξηση του καπνίσματος, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες, κατά τη διάρκεια και μετά τη λήξη των παγκοσμίων πολέμων. Επίσης, είναι και ένας λόγος που οι άνδρες εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά νοσηρότητας από τις γυναίκες. Αξιοσημείωτο είναι όμως πως και στους μη καπνιστές ο καρκίνος του πνεύμονα καταλαμβάνει την έβδομη θέση στους θανατηφόρους τύπους καρκίνων (47).

Η αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα γίνεται με συνδυασμό χειρουργικής αφαίρεσης του όγκου, ακτινοθεραπειών και συστηματικής φαρμακευτικής αγωγής. Η εύρεση του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος καθώς και η πρόγνωση εξαρτώνται από το στάδιο της ασθένειας. Το μέγεθος του σταδίου καθορίζεται από παράγοντες όπως: οι διαστάσεις του όγκου, η ύπαρξη ή όχι μετάστασης, η θέση και ο αριθμός των μεταστάσεων (48).

Τα συχνότερα μεταλλαγμένα γονίδια σε όλους τους τύπους καρκίνου του πνεύμονα φαίνονται στην **Εικόνα 10**. Πρόσφατες αναλύσεις αποδεικνύουν πως οι γενετικές μεταλλάξεις, που θα παρουσιαστούν στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα σχετίζονται με τις καπνιστικές τους συνήθειες. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το γενετικό προφίλ τριών πληθυσμών ασθενών (που νοσούν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα NSCLC): α. οι μη καπνιστές, β. οι πρώην καπνιστές, γ. οι καπνιστές. α. Στην περίπτωση των μη καπνιστών πιο συχνή εμφανίζεται η μετάλλαξη του υποδοχέα EGFR σε ποσοστό 67.9%, η δεύτερη πιο συχνή αφορά άγνωστα γονίδια 16,4%, ενώ μεταλλάξεις άλλων γνωστών γονιδίων (*KRAS, PIK3CA, BRAF* κ.α.) καταλαμβάνουν μικρό ποσοστό. β. Στους πρώην καπνιστές οι περιπτώσεις μετάλλαξης του EGFR είναι 33,2%, ποσοστό υποδιπλασιασμένο από τη πρώτη περίπτωση, ενώ οι πιο συχνές μεταλλάξεις παρατηρούνται σε άγνωστα μέχρι στιγμής γονίδια σε ποσοστό 54,5%. Σημαντικό ποσοστό 6,7% καταλαμβάνει και η *KRAS*. Το αξιοσημείωτο είναι η περίπτωση γ. των εν ενεργεία καπνιστών. Η

μετάλλαξη του EGFR εδώ αφορά μόνο το 20,7% των περιπτώσεων, με το 60,1% των περιπτώσεων να σχετίζονται με μεταλλάξεις σε άγνωστα γονίδια, ενώ σημαντικό είναι και εδώ το ποσοστό 11,9% της μεταλλαγμένης KRAS. Τα παραπάνω στοιχεία εξηγούν και την εμφάνιση συνήθως, διαφορετικών υποτύπων καρκίνου του πνεύμονα σε καπνιστές και μη καπνιστές (49).



Εικόνα 10. Γενετικές μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα. Πιο συχνές είναι αυτή του γονιδίου του υποδοχέα EGFR και του γονιδίου KRAS (πηγή: lcfamerica.org)

Ο καρκίνος του πνεύμονα ιστολογικά χωρίζεται σε δύο υποτύπους, τον *μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)* και τον *μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Small-Cell Lung Cancer SCLC)*(50).

Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Small-Cell Lung Cancer SCLC)

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα διαγιγνώσκεται στο 15% των ασθενών. Διαφέρει από το μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ως προς το μέγεθος των καρκινικών κυττάρων από τα οποία αποτελείται, όταν αυτά παρατηρούνται στο μικροσκόπιο, συνεπώς και ως προς την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ιστολογικού μετασχηματισμού μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε μικροκυτταρικό, αποδεικνύοντας ότι και οι δύο μορφές προκύπτουν από ένα κοινό τύπο κυττάρων (51).

Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)

Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αντιπροσωπεύει το 85% των περιπτώσεων. Διαιρείται περαιτέρω σε υποτύπους όπως το: I. αδenoκαρκίνωμα, II. καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων και III. καρκίνωμα αποτελούμενο από μεγάλα κύτταρα. Η διάκριση των υποτύπων βασίζεται σε μορφολογικά-ιστολογικά χαρακτηριστικά, αλλά και σε μελέτες ανοσοϊστοχημείας (52).

I. Αδενοκαρκίνωμα

Στις ΗΠΑ, το αδenoκαρκίνωμα αντιπροσωπεύει σχεδόν το 50% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Επίσης, παρουσιάζει τάση για απομακρυσμένες μεταστάσεις, ενώ τείνει να αναπτύσσεται πιο αργά συγκριτικά με τους άλλους υποτύπους. Μη-καπνιστές, που εμφανίζουν καρκίνο του πνεύμονα συνήθως έχουν τον συγκεκριμένο υπότυπο, ωστόσο αυξημένα είναι και τα ποσοστά των καπνιστών που τον εμφανίζουν. Δημιουργείται από μικρά επιθηλιακά, κυψελιδικά κύτταρα των αεραγωγών, τα οποία εκκρίνουν βλέννα και άλλες ουσίες. Επίσης, έχει την τάση να εμφανίζεται στην περιφέρεια του πνεύμονα, η οποία μπορεί να οφείλεται στην προσθήκη φίλτρων στα τσιγάρα που εμποδίζουν την είσοδο μεγάλων σωματιδίων στους πνεύμονες. Αυτό οδηγεί σε βαθύτερη εισπνοή καπνού τσιγάρων, οδηγώντας σε περιφερειακές αλλοιώσεις (53).

II. Καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων

Το καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα αφορά το 25-30% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Εμφανίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, στους βρογχικούς σωλήνες στο κέντρο των πνευμόνων. Αυτός ο υπότυπος του NSCLC έχει συσχετιστεί με το κάπνισμα τσιγάρων (54).

III. Καρκίνωμα αποτελούμενο από μεγάλα κύτταρα

Το καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων του πνεύμονα είναι η λιγότερο μελετημένη μορφή NSCLC, αφού αντιπροσωπεύει το 5-10% των καρκίνων του πνεύμονα και διαγιγνώσκεται με αποκλεισμό των άλλων υποτύπων. Δημιουργείται στο κεντρικό τμήμα των πνευμόνων, μερικές φορές και στους κοντινούς λεμφαδένες. Επίσης, και αυτός ο υπότυπος συσχετίζεται με το κάπνισμα (54).

5.1.7. Αντινεοπλασματικά φάρμακα

Από τη δεκαετία του 1940, που για πρώτη φορά αναφέρθηκαν μελέτες για αντικαρκινικά - αντινεοπλασματικά φάρμακα έως και σήμερα, έχει χρησιμοποιηθεί πληθώρα φαρμακευτικών ενώσεων για την αντιμετώπιση των νεοπλασιών. Ως εκ τούτου η κατηγοριοποίηση των αντικαρκινικών φαρμάκων φαντάζει πολύπλοκη διαδικασία. Ενδεικτικά τα αντικαρκινικά φάρμακα δύνανται να ταξινομηθούν βάση του μηχανισμού δράσης τους (π.χ. αλκυλιούντες παράγοντες, αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών κ.α.), του τύπου της νεοπλασίας που στοχεύουν (π.χ. λέμφωμα, μελάνωμα, σάρκωμα κ.α.), της χημικής δομής τους (π.χ. μεταλλικό σύμπλοκο, ανάλογο πουρίνης ή πυριμιδίνης) αλλά και της ύπαρξης στοχευμένης ή γενικευμένης κυτταροτοξικής δράσης. Ωστόσο, ιστορικά ταξινομούνται όπως φαίνεται στο παρακάτω **σχήμα 1**(55).

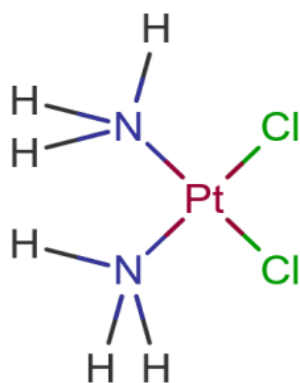


Σχήμα 1. Ιστορική κατηγοριοποίηση των αντικαρκινικών φαρμάκων.

Ενώσεις πλατίνας

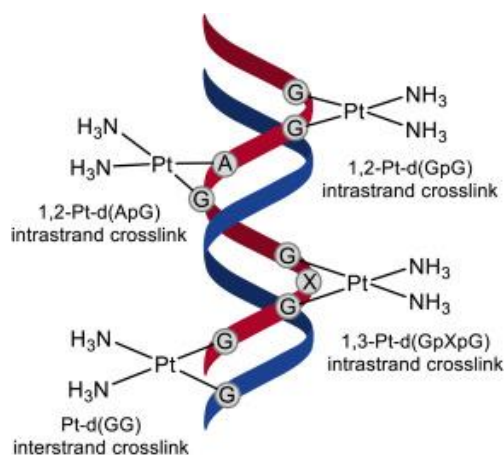
Από τα πρώτα αντικαρκινικά φάρμακα, που χρησιμοποιήθηκαν ευρέως και χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα, είναι η κατηγορία των αλκυλιούντων παραγόντων. Προέρχονται από το αέριο μουστάρδας που αποτέλεσε χημικό όπλο κατά τη διάρκεια του πρώτου Παγκοσμίου πολέμου. Τα αλκυλιωτικά ταξινομούνται βάση της δομής τους και του μηχανισμού δράσης τους σε μουστάρδες αζώτου, νιτροζουρίες και σύμπλοκα πλατίνας. Από τα πιο διαδεδομένα σύμπλοκα πλατίνας είναι η σισπλατίνη και τα παράγωγα του (carboplatin, oxaliplatin κ.α.).

Οι ενώσεις πλατίνας ανακαλύφθηκαν τυχαία το 1969 και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση πληθώρας καρκίνων όπως αυτοί των ωοθηκών, του πνεύμονα, των σαρκωμάτων, λεμφωμάτων κ.α. Η δομή του συμπλόκου της σισπλατίνης φαίνεται στην **εικόνα 11**. (56),(57),(58).



Εικόνα 11. Συντακτικός τύπος της χημικής ένωσης της σισπλατίνης. (Πηγή: drugbank.ca)

Η σισπλατίνη αποκτά δραστικότητα ενδοκυτταρικά μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης, όπου το ένα χλώριο αντικαθίσταται με ένα μόριο νερού. Το νεοσχηματιζόμενο δραστικό σύμπλοκο προσδένεται σε άτομα με περίσσεια ηλεκτρονίων όπως το N7 της γουανίνης στο DNA. Αρχικά, αλληλεπιδρά με το DNA μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού, δημιουργώντας το λεγόμενο "Pt-DNA adduct". Στη συνέχεια αλληλεπιδρά με μια δεύτερη πουρίνη (γουανίνη ή αδερίνη) σχηματίζοντας εγκάρσιες διασυνδέσεις μεταξύ του ίδιου (intrastrand crosslink) ή διαφορετικών κλώνων (interstrand crosslink), όπως φαίνεται στην **εικόνα 12**. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών στο DNA, την επαγωγή μηχανισμών κυτταρικού θανάτου και άρα την εμφάνιση αντικαρκινικής δράσης. Όπως αναμένεται, εμφανίζεται και πληθώρα παρενεργειών, ενώ συχνό είναι και το φαινόμενο της αντίστασης στη θεραπεία(56),(57),(59).



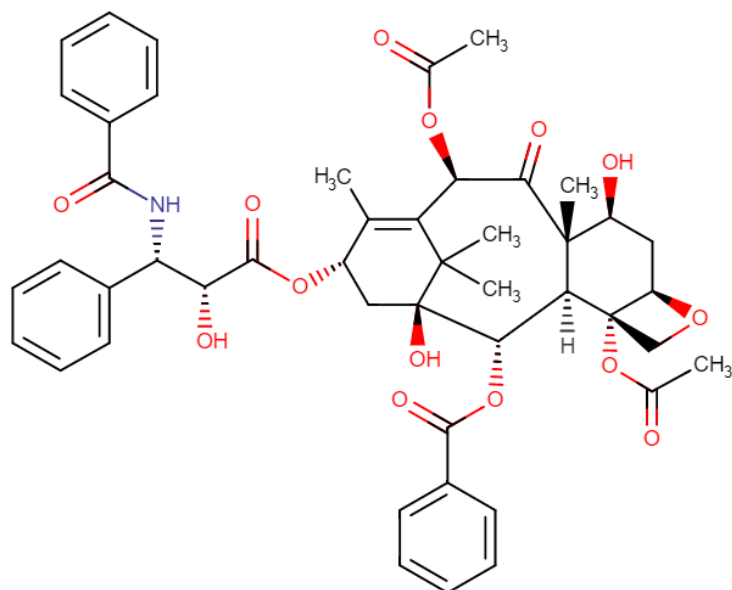
Εικόνα 12. Πιθανές αλληλεπιδράσεις της σισπλατίνης με τις πουρίνες του DNA(59).

Αντίσταση σε ένα φάρμακο ονομάζεται η δραστική μείωση της αποτελεσματικότητας του. Αυτό το φαινόμενο είναι συχνό στα αντινεοπλασματικά φάρμακα, ενώ φαίνεται να σχετίζεται με πληθώρα διαφορετικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν: την αντίσταση σε πολλαπλά φάρμακα (multidrug resistance, MDR), την αναστολή μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, την ενίσχυση μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA καθώς και τη ρύθμιση του μεταβολισμού των φαρμάκων. Ο μηχανισμός MDR περιλαμβάνει το μόριο-«κλειδί» Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, που είναι μια κυτταρική πρωτεΐνη με ιδιότητα ATP-εξαρτώμενης αντλίας εκροής. Από την άλλη πλευρά, ο μηχανισμός που σχετίζεται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού των αντινεοπλασματικών αφορά σε μεταλλάξεις σε γονίδια, που κωδικοποιούν ένζυμα απαραίτητα για το μεταβολισμό όπως τα κυτοχρώματα, οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) κ.α. Η αντίσταση στην σισπλατίνη έχει συνδεθεί με αποτελεσματική σύζευξη με τη γλουταθειόνη ή με ενίσχυση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA(60).

Αναστολείς μικροσωληνίσκων

Ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον όσον αφορά τη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου, παρουσιάζει και η κατηγορία των φαρμάκων, που προέρχονται από φυτά. Πιο γνωστός εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι οι ταξάνες. Οι ταξάνες είναι διτερπένια (συντίθενται από τέσσερις μονάδες ισοπρενίου) με αποτελεσματική αντικαρκινική δράση. Από τις πρώτες ταξάνες, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η πακλιταξέλη (ή ταξόλη) καθώς και το παράγωγο αυτής, δοσιταξέλη. Το 1962 ο βοτανολόγος Arthur S. Barclay απομόνωσε για πρώτη φορά την πακλιταξέλη από το φλοιό του κορμού του Ελάτου του Ειρηνικού (Pacific yew tree), με τη συστηματική ονομασία *Taxus brevifolia* Nutt. Εξαιτίας του τεράστιου όγκου δέντρων, που απαιτείται για την παραγωγή της πακλιταξέλης, ως εκχύλισμα φυτικών προϊόντων, πλέον παρασκευάζεται με συνθετικές και ημισυνθετικές μεθόδους (61),(62).

Η πακλιταξέλη είναι αντινεοπλασματικός παράγοντας που δρα στοχεύοντας στην τουμπουλίνη. Πιο συγκεκριμένα προκαλεί υπερβολική σταθεροποίηση των κυτταρικών μικροσωληνίσκων. Οι μικροσωληνίσκοι είναι σωληνοειδείς διατάξεις από ετεροδιμερή των πρωτεϊνών α- και β-τουμπουλίνης και αποτελούν δομές μείζονος σημασίας για την οργάνωση και τη λειτουργία του κυττάρου. Η πρόσδεση της πακλιταξέλης στην β-τουμπουλίνη, με συνέπεια τον πολυμερισμό των πρωτεϊνών αυτών, καθιστά αδύνατο το διαχωρισμό τους κατά τη μίτωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το κύτταρο να αδυνατεί να διαιρεθεί και να οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο. Εκτός από την υπερσταθεροποίηση των τουμπουλινών είναι γνωστό ότι η πακλιταξέλη δρα επίσης επάγοντας την απόπτωση. Μελέτες αναφέρουν πως ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις η πακλιταξέλη επηρεάζει τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων - «κλειδιών» της απόπτωσης όπως για παράδειγμα του *RAF-1*, *P53*, *P21*(63),(64). Εξαιτίας του ισχυρού μηχανισμού δράσης της χρησιμοποιείται ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε επιθετικούς καρκίνους όπως αυτοί του μαστού, των πνευμόνων, των ωοθηκών κ.α.(65). Τέλος, ο συντακτικός τύπος της πακλιταξέλης παρουσιάζεται παρακάτω στην **Εικόνα 13**.Είναι ένωση σχετικά μικρού μοριακού βάρους. Μεταβολίζεται στο ήπαρ κυρίως από τα κυτοχρώματα CYP2C8 και CYP3A4, ενώ ο χρόνος ημιζωής της είναι 52 ώρες (drugbank.ca).



Εικόνα 13. Συντακτικός τύπος της χημικής ένωσης της πακλιταξέλης (ταξόλη). (Πηγή: drugbank.ca)

Νεότερες αντινεοπλασματικές θεραπείες

Τα σύμπλοκα της πλατίνας, η πακλιταξέλη αλλά και διάφοροι άλλοι αντινεοπλασματικοί παράγοντες, εμφανίζουν επαρκή αποτελεσματικότητα ως φαρμακολογικές ενώσεις. Ωστόσο, στην καθημερινή κλινική πράξη τα προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν είναι η πληθώρα των ανεπιθύμητων παρενεργειών καθώς και φαινόμενα αντίστασης. Ως εκ τούτου οι νεότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις αναφέρουν ως πιο αποτελεσματική θεραπεία, θεραπευτικά σχήματα τα οποία αποτελούνται από περισσότερα του ενός αντινεοπλασματικά φάρμακα. Αυτό γιατί τα φάρμακα που επιλέγονται δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών και εμφανίζουν συνέργεια ως προς την κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον, επιλέγονται οι ελάχιστες δυνατές δόσεις αυτών, ενώ συνδυάζονται φάρμακα, που εμφανίζουν αντίσταση μέσω διαφορετικών μηχανισμών (57),(58).

Παρά ταύτα οι ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες συμπεριλαμβάνουν στη θεραπεία πρώτης γραμμής, για τον καρκίνο, μια νέα κατηγορία αντινεοπλασματικών, τους Αναστολείς της Τυροσινικής Κινάσης (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs). Οι κινάσες τυροσίνης είναι οικογένεια ενζύμων που καταλύουν τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης, σε πρωτεΐνες στόχους. Τα TKIs αναστέλλουν την ενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών, που εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, ο κυτταρικός θάνατος κ.α. Ακόμα είναι ενώσεις, που εμφανίζουν αυξημένη φαρμακολογική αποτελεσματικότητα και εκλεκτικότητα. Ο πρώτος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας ήταν το imatinib, ενώ ακολούθησαν το gefitinib, erlotinib, sorafenib, sunitinib, και dasatinib. Το imatinib χορηγήθηκε για πρώτη φορά σε ασθενή με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (Chronic myelogenous leukemia, CML). ΗCML χαρακτηρίζεται από τη παρουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια(Ph). Το χρωμόσωμα αυτό προκύπτει από τη μετάθεση t(9;22) (q34;q11), μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22. Το

σχηματιζόμενο χμαιοικό γονίδιο *BCR-ABL1* κωδικοποιεί μια υβριδική πρωτεΐνη, που εμφανίζει δραστικότητα τυροσινικής κινάσης πολύ εντονότερη από εκείνη της πρωτεΐνης *ABL1*(66).

Ωστόσο, το παγκόσμιο ερευνητικό ενδιαφέρον φαίνεται να στρέφεται στην ανοσοθεραπεία για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του καρκίνου, που χρησιμοποιεί το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς για την καταστροφή των καρκινικών όγκων. Η ανοσοθεραπεία περιλαμβάνει: τη χορήγηση κυτταροκινών (IL-2), εμβολίων, μονοκλωνικών αντισωμάτων (anti-CD20, rituximab), αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (immune check point inhibitors) και στρατηγικές μεταφοράς κυττάρων (adoptive cell transfer, ACT). Ιδιαίτερα ελπιδοφόρα εμφανίζεται η τελευταία τεχνική. Ένα παράδειγμα αυτής αποτελεί η «πολλά υποσχόμενη» θεραπεία CAR T-cells. Κατά αυτήν, T-λεμφοκύτταρα του ασθενή συλλέγονται και του επαναχορηγούνται, αφού έχουν προηγουμένως υποστεί επεξεργασία ώστε να εκφράζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη έναν χμαιοικό υποδοχέα αντιγόνου (Chimeric Antigen Receptor, CART-cells). Ο υποδοχέας αυτός αποτελείται από μια εξωτερική περιοχή, που συνδέεται με συγκεκριμένο αντιγόνο του καρκινικού κυττάρου (target-binding domain) και μια εσωτερική, που ενεργοποιεί το T-λεμφοκύτταρο το οποίο στη συνέχεια καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα(67).

5.1.8. Θεραπευτική προσέγγιση καρκίνου του πνεύμονα

Για τη θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου του πνεύμονα αρχικά είναι απαραίτητη η διενέργεια βιοψίας με σκοπό τη ταυτοποίηση του καρκινικού τύπου. Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο καρκίνος του πνεύμονα διακρίνεται σε *μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα* (SCLC) και σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Για τον SCLC η θεραπεία πρώτης γραμμής περιλαμβάνει ακτινοθεραπεία συνδυαστικά με χημειοθεραπεία. Τα αντινεοπλασματικά που ενδείκνυνται είναι η σισπλατίνη ή/και η ετοποσίδη(68).

Για τον NSCLC η θεραπευτική προσέγγιση περιλαμβάνει χειρουργική αφαίρεση, στις περιπτώσεις που καθίσταται εφικτή, σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που ακολουθούνται αποτελούνται από ενώσεις πλατίνας, όπως η σισπλατίνη ή το carboplatin, σε συνδυασμό με πακλιταξέλη, gemcitabine, δοσεταξέλη και βινορελμπίνη. Η σισπλατίνη εμφανίζει ικανοποιητική αποτελεσματικότητα, ωστόσο είναι συνδεδεμένη με τη πρόκληση πληθώρας παρενεργειών και γι' αυτό επιλέγεται η συγχορήγηση της με ένα δεύτερο αντινεοπλασματικό. Η ακτινοθεραπεία συνίσταται στα αρχικά στάδια του NSCLC, ενώ η ανοσοθεραπεία έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται συνδυαστικά με όλα τα παραπάνω σχήματα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα, όπως το Ipilimumab, χορηγούνται ευρέως, συνδυαστικά με ενώσεις πλατίνας και πακλιταξέλη και εμφανίζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το Ipilimumab στοχεύει την πρωτεΐνη CTLA-4, που ρυθμίζει καθοδικά την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T Λεμφοκυττάρων (Cytotoxic T lymphocytes, CTLs)(52).

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην εξατομικευμένη θεραπεία για τον καρκίνο. Η τάση αυτή ολοένα και κερδίζει έδαφος αφού έχει επεκτείνει το προσδόκιμο ζωής από μερικούς μήνες σε τρία χρόνια, για ασθενείς με NSCLC, τελικού σταδίου. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς υποβάλλονται σε μοριακές (RT-PCR) ή ανοσοϊστοχημικές εξετάσεις, όπου ανιχνεύονται μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια όπως του *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* και στη συνέχεια επιλέγεται η κατάλληλη στοχευμένη θεραπεία. Το 2003 το gefitinib ήταν από τα πρώτα αντινεοπλασματικά που χορηγήθηκαν για τη θεραπεία του NSCLC σε ασθενή με μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον EGFR. Το γονίδιο αυτό ανήκει στα ογκογονίδια και η μετάλλαξη σε αυτό οδηγεί στη μόνιμη ενεργοποίηση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, η οποία με τη σειρά της πυροδοτεί συνεχώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το gefitinib είναι αναστολέας τυροσινικών κινασών, ο οποίος ανταγωνίζεται την πρόσδεση του ATP στο καταλυτικό κέντρο του EGFR(69).

5.2. Σχιζοφρένεια

5.2.1. Παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας

Η σχιζοφρένεια είναι από τις πιο κοινές και σοβαρές ψυχιατρικές διαταραχές παγκοσμίως. Η μέγιστη ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι τα πρώτα χρόνια της ενήλικης ζωής. Ωστόσο, κάποιες ενδείξεις δύνανται να εμφανιστούν κατά τη βρεφική ή/και παιδική ηλικία (70). Η ψυχική αυτή διαταραχή περιγράφηκε, όπως τη γνωρίζουμε σήμερα, τη δεκαετία του 1890 από το Γερμανό ψυχίατρο Emil Kraepelin. Συμπεριλαμβάνεται στη λίστα των πιο σοβαρών ασθενειών εξαιτίας της υψηλής θνησιμότητας των ασθενών της, με αποτέλεσμα το προσδόκιμο ζωής των ασθενών αυτών να είναι περίπου 20 χρόνια χαμηλότερο από αυτό του γενικού πληθυσμού. Επιπλέον, τα άτομα που νοσούν από σχιζοφρένεια συνήθως χαρακτηρίζονται από χαμηλή λειτουργικότητα στην καθημερινή τους ζωή (71). Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι οι άντρες αναπτύσσουν σχιζοφρένεια σε μικρότερη ηλικία από τις γυναίκες, ενώ οι πιθανότητες μονοζυγωτικά δίδυμα να εμφανίσουν και τα δύο σχιζοφρένεια, είναι πάνω από 50%. Τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν ότι η μελέτη της αιτιοπαθογένεσης της σχιζοφρένειας, όπως αναφέρεται και παρακάτω, δεν είναι απλό ζήτημα (72).

Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγείας (NIMH), τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας εμπίπτουν σε τρεις κατηγορίες: *θετικά*, *αρνητικά* και *γνωστικά*. Τα *θετικά* συμπτώματα είναι ψυχωτικές συμπεριφορές που δεν παρατηρούνται γενικά σε υγιείς ανθρώπους, όπως δηλαδή οι ψευδαισθήσεις, οι παραληρηματικές συμπεριφορές, οι διαταραχές της σκέψης (ασυνήθιστοι ή δυσλειτουργικοί τρόποι σκέψης) και οι διαταραχές της κίνησης. Τα *αρνητικά* συμπτώματα

σχετίζονται με διαταραχές των φυσιολογικών συναισθημάτων και συμπεριφορών. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν: το "Flat affect" (μειωμένη έκφραση συναισθημάτων μέσω εκφράσεων του προσώπου ή του τόνου της φωνής), μειωμένα αισθήματα ευχαρίστησης στην καθημερινή ζωή, δυσκολία στο ξεκίνημα και τη διατήρηση δραστηριοτήτων και μειωμένη ομιλία. Τα γνωστικά συμπτώματα ποικίλλουν ανά ασθενή ως προς την έκταση της εμφάνισης τους και αφορούν διαταραχές προσοχής, μνήμης και προβλήματα στην κατανόηση και εκτέλεση πληροφοριών (73).

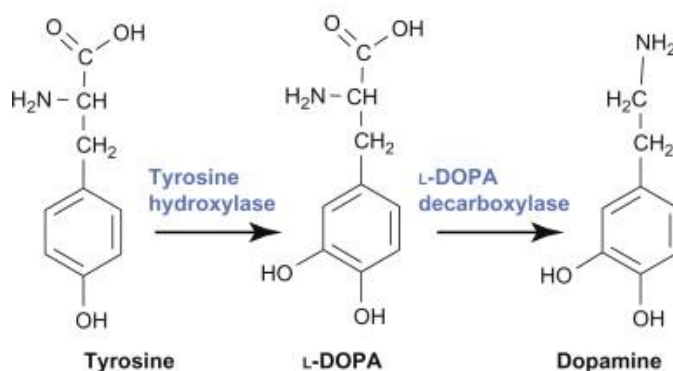
Ιστολογικά η σχιζοφρένεια φαίνεται να σχετίζεται με μεταβολές σε βασικές δομές του εγκεφάλου. Οι μεταβολές αυτές αφορούν τόσο τη φαιά όσο και τη λευκή ουσία. Είναι πιθανό μάλιστα οι μεταβολές να δημιουργούνται πριν από την εμφάνιση των πρώτων κλινικών συμπτωμάτων της νόσου (πριν το πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο) στις φλοιώδεις περιοχές και ιδιαίτερα σε εκείνες που σχετίζονται με την ομιλία (συνειρμικές περιοχές). Εργαλείο για την ανίχνευση αυτών είναι η τεχνική Απεικόνισης Μαγνητικού Συντονισμού (MRI) (74).

Σε αντίθεση με άλλες διαταραχές όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson και η επιληψία, η σχιζοφρένεια αντιπροσωπεύει ένα φάσμα διαταραχών με πολυπαραγοντική αιτιολογία. Επιδημιολογικές μελέτες όμως, σε διδύμους καθώς και σε οικογένειες με σχιζοφρενείς φανερώνουν πως είναι σε μεγάλο βαθμό κληρονομική διαταραχή, παρόλο που δεν ακολουθεί το Μενδελικό πρότυπο κληρονομικότητας. Γνωστή μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, που έχει συνδυαστεί με τη σχιζοφρένεια και με διπολικές διαταραχές είναι η DISC1 (Disrupted in Schizophrenia1), η οποία εντοπίζεται και στη ρύθμιση μονοπατιών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παλαιότερες μελέτες για τη μοριακή βάση της νόσου, έχουν συσχετίσει τη σχιζοφρένεια με χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Για παράδειγμα η διαγραφή μιας περιοχής στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 22 (22q11.2) οδηγεί στη διακοπή της έκφρασης των γονιδίων που εδράζουν στη περιοχή αυτή, όπως το γονίδιο της πρωτεΐνης DGCR8 με αποτέλεσμα την εμφάνιση του συνδρόμου DiGeorge. Πολλοί από αυτούς που παρουσιάζουν τη συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία θα εμφανίσουν και σχιζοφρένεια. Νεότερες μελέτες έχουν εστιάσει την αιτιολογία της νόσου σε τρεις τύπους γονιδίων, το γονίδιο του υποδοχέα D2 της ντοπαμίνης, τα γονίδια των γλουταμινεργικών νευροδιαβιβαστών και τα γονίδια των τασοελεγχόμενων διαύλων Ca^{2+} . Μάλιστα ο υποδοχέας D2 της ντοπαμίνης αποτελεί τον κύριο στόχο της φαρμακευτικής θεραπείας κατά της σχιζοφρένειας και γι' αυτό θα αναλυθεί περαιτέρω (κεφάλαιο 5.2.2.) (75), (70).

Η σχιζοφρένεια είναι μια πολυπαραγοντική νόσος. Εκτός από τους κληρονομικούς παράγοντες, άλλος παράγοντας κινδύνου σε άτομα που εμφανίζουν σχιζοφρένεια μπορεί να είναι η λοίμωξη της μητέρας τους κατά την κύηση. Μάλιστα έχουν συσχετιστεί συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί όπως το *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) και ο Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) με την εμφάνιση σχιζοφρένειας (76). Επιπλέον, παράγοντας κινδύνου της νόσου μπορεί να είναι και η αυξημένη ηλικία του πατέρα (>55 έτη). Ακόμα, μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν πως η πρόωμη στέρηση της μητέρας (early Maternal Deprivation, MD) προκαλεί έντονο στρες στα ζώα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων κατά την ενηλικίωση, που ομοιάζουν με αυτά της σχιζοφρένειας (77). Τέλος, υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που αποδεικνύουν πως άτομα που εκδηλώνουν σχιζοφρένεια στην ενήλικη ζωή τους έχουν κάνει χρήση κάνναβης στην εφηβεία τους (78).

5.2.2. Ντοπαμινεργικοί υποδοχείς

Η ντοπαμίνη (Dopamine, DA) είναι μια κατεχολαμίνη, που δρα ως νευροδιαβιβαστής. Ντοπαμινεργικοί νευρώνες εντοπίζονται κυρίως στα βασικά γάγγλια του εγκεφάλου. Δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) ρυθμίζοντας λειτουργίες μείζονος σημασίας για τη ζωή, όπως αυτές της ακούσιας κίνησης, της μνήμης, της μάθησης, της πείνας και αισθημάτων, όπως αυτό της ανταμοιβής. Στο περιφερικό νευρικό σύστημα, η ντοπαμίνη συμμετέχει στη βιοσύνθεση άλλων νευροδιαβιβαστών όπως η νορεπινεφρίνη και η επινεφρίνη στα επινεφρίδια, καθώς και στη ρύθμιση του κυκλοφορικού συστήματος, στην επαναπρόσληψη Na^+ στους νεφρούς κ.α.. Ο μηχανισμός δράσης της ντοπαμίνης περιλαμβάνει την πρόσδεση της σε μεταβοτροπικούς, μεμβρανικούς υποδοχείς που συζευγνούνται με G πρωτεΐνες (GPCRs). Παράγεται στους νευρώνες από τη μετατροπή αρχικά της L-τυροσίνης σε λεβοντόπα (L-DOPA), από το ένζυμο τυροσινική υδροξυλάση και στη συνέχεια με αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa, από το ένζυμο αρωματική αποκαρβοξυλάση L-αμινοξέος, προκύπτει η ντοπαμίνη (Συνοπτικά οι αντιδράσεις φαίνονται στην **Εικόνα 14**. Σύμφωνα με την “υπόθεση της ντοπαμίνης” η αυξημένη παραγωγή της έχει συνδεθεί με τη σχιζοφρένεια(79), (80).

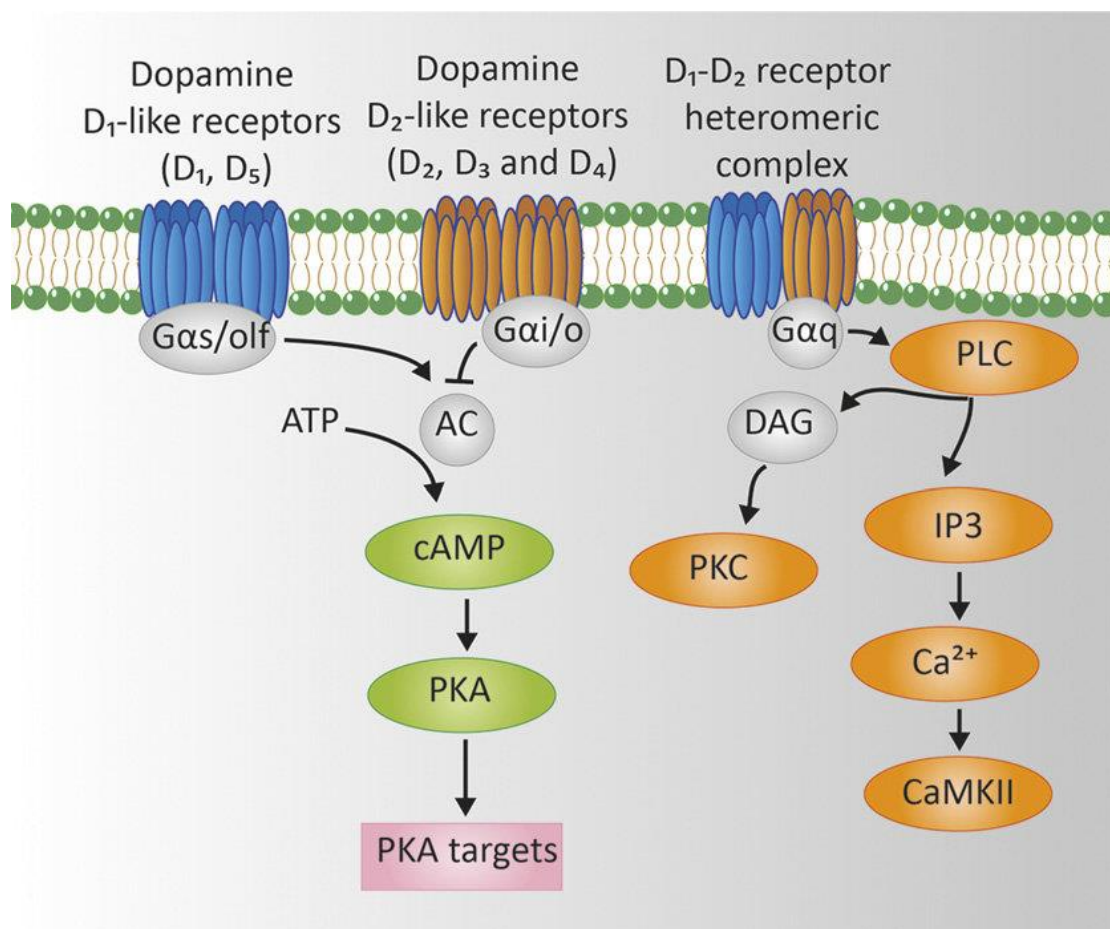


Εικόνα 14. Σύνθεση της ντοπαμίνης.

Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε υπότυποι υποδοχέων ντοπαμίνης (D_1, D_2, D_3, D_4, D_5). Οι υπότυποι ταξινομούνται σε δύο μεγαλύτερες οικογένειες υποδοχέων, αυτή της D_1 -τάξης και της D_2 -τάξης υποδοχέων. Η ταξινόμηση παρουσιάζεται και στο Πίνακα 2. Η D_1 -τάξη περιλαμβάνει τους υποτύπους των υποδοχέων D_1 και D_5 , οι οποίοι συζευγνούνται με $G_{\alpha s}$ πρωτεΐνες. Η διέγερσή τους έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (AC) και την παραγωγή cAMP από ATP. Η D_2 -τάξη περιλαμβάνει τους υποτύπους D_2, D_3 και D_4 , που συζευγνούνται με $G_{\alpha i/o}$ πρωτεΐνες και η διέγερση τους αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση. Στη μεταγωγή σήματος δεν συναντώνται μόνο ομοδιμερή των ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Για παράδειγμα οι υπότυποι D_1 και D_2 μπορούν να σχηματίζουν ετεροδιμερή, που συζευγνούνται με τη πρωτεΐνη $G_{\alpha q}$, η οποία ενεργοποιεί τη φωσφολιπάσηC (PLC) προς παραγωγή της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και της διακυλογλυκερόλης (DAG). Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος παρουσιάζονται και στην **Εικόνα 15**.(81).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση ντοπαμινεργικών υποδοχέων (82),(83).

Υπότυπος	Οικογένεια	Ιστός	Σηματοδότηση	Λειτουργίες
D ₁	D ₁ -τάξης	Υποθάλαμος, θάλαμος, μετωπιαίος φλοιός	↑AC, cAMP	Μετακίνηση, μάθηση, γνώση
D ₂	D ₂ -τάξης	Επικλινής πυρήνας, φλοιός, κέλυφος φακοειδούς πυρήνα, ραβδωτό σώμα	↓AC, cAMP	Μετακίνηση, μάθηση, γνώση ανταμοιβή,
D ₃	D ₂ -τάξης	Επικλινής πυρήνας, φλοιός, κέλυφος φακοειδούς πυρήνα	↓AC, cAMP	Μετακίνηση, νόηση
D ₄	D ₂ -τάξης	Μεσεγκέφαλος, αμυγδαλή, ιππόκαμπος, υποθάλαμος, μέλαινα ουσία	↓AC, cAMP	Νόηση, Συγκέντρωση, ύπνος
D ₅	D ₁ -τάξης	Ιππόκαμπος, θάλαμος, πυρήνας, ραβδωτό, φλοιός,	↑AC, cAMP	Νόηση, Συγκέντρωση, ύπνος



Εικόνα 15. Μονοπάτια μεταγωγής σήματος, που ρυθμίζονται από την πρόσδεση της ντοπαμίνης στους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς.

Στο ΚΝΣ σε μεγαλύτερη αφθονία συναντάται ο υπότυπος D₁ από τους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, ακολουθούν ο D₂, ο D₃, ο D₅ και τελευταίος ο D₄. Η αναθεωρημένη “υπόθεση της ντοπαμίνης” αναφέρει πως στους σχιζοφρενείς συναντάται μεγαλύτερος αριθμός D₂ υποδοχέων από ότι στους υγιείς. Μάλιστα τα αντιψυχωσικά που χορηγούνται στους σχιζοφρενείς και δρουν αποτελεσματικά, είναι ανταγωνιστές ή μερικοί αγωνιστές των D₂ υποδοχέων, επιβεβαιώνοντας τη σύνδεση του συγκεκριμένου υποτύπου με την παθοφυσιολογία της νόσου(84). Αξίζει επίσης να αναφερθούν μελέτες που αποδεικνύουν ότι η μειωμένη δραστηριότητα των υποδοχέων D₁ στον προ-μετωπιαίο φλοιό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη δραστηριότητα των υποδοχέων της D₂ στο ραβδωτό σώμα. Αυτή η ανισορροπία φαίνεται να είναι κρίσιμη στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας (85).

Επιπλέον, οι D₂ υποδοχείς (κυρίως οι ευρισκόμενοι στο ραβδωτό σώμα), χωρίς τη μεσολάβηση G πρωτεϊνών, ενεργοποιούν τη φωσφορυλίωση της GSK3β. Μεταλλαγές στο γονίδιο της GSK3 (3-κινάση συνθάσης γλυκογόνου), που οδηγούν στη συνεχή ενεργοποίηση της πρωτεΐνης, έχουν συνδεθεί με τη σχιζοφρένεια και άλλες ψυχιατρικές διαταραχές. Οι D₁ υποδοχείς (κυρίως του προ-μετωπιαίου φλοιού) αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της GSK3, οπότε η απορύθμιση των ντοπαμινεργικών υποδοχέων, που αναφέρθηκε μπορεί να επιφέρει επιπλέον ενεργοποίηση της GSK3(85).

5.2.3. Φαρμακευτική αγωγή – Αντιψυχωσικά

Τα αντιψυχωσικά είναι τα φάρμακα εκλογής για τη σχιζοφρένεια. Δεν εμφανίζουν θεραπευτική δράση, άλλα χρησιμοποιούνται για να κατευνάσουν τα συμπτώματα της νόσου και κυρίως να μειώσουν τα ψυχωσικά επεισόδια των ασθενών. Γι’ αυτό και η χορήγηση τους είναι μακροχρόνια. Το 1967, ο Van Rossum ήταν ο πρώτος που υποθέτει ότι ο μηχανισμός δράσης τους συσχετίζεται με τους υποδοχείς της ντοπαμίνης. Την επόμενη δεκαετία επιβεβαιώνεται πως δρουν ως ανταγωνιστές των D₂ υποδοχέων. Το πρώτο αντιψυχωσικό που χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη ήταν η χλωροπρομαζίνη (chlorpromazine) περίπου πριν από πέντε δεκαετίες. Σήμερα χρησιμοποιείται πληθώρα αντιψυχωσικών, τα οποία ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα τυπικά (1^{ης} γενιάς) και τα άτυπα (2^{ης} γενιάς + 3^{ης} γενιάς) (86),(87).

Τυπικά (1^{ης} γενιάς)

Τα τυπικά αντιψυχωσικά ονομάζονται και νευροληπτικά εξαιτίας της ικανότητας τους να προκαλούν νευροληψία. Δρουν ως ανταγωνιστές των D₂ υποδοχέων στο ΚΝΣ. Διαχωρίζονται περαιτέρω σε χαμηλής και υψηλής ισχύος, ως προς τη χημική τους συγγένεια με τους D₂ υποδοχείς. Ωστόσο τα τυπικά αντιψυχωσικά στο ΠΝΣ ανταγωνίζονται και νοραδρενεργικούς, χολινεργικούς και ισταμινεργικούς υποδοχείς. Αυτή η δράση τους σχετίζεται με την εμφάνιση των ανεπιθύμητων παρενεργειών όπως τα εξωπυραμδικά συμπτώματα (π.χ. ακούσιες συσπάσεις των μυών) και άλλων νευρολογικών. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την αντιμετώπιση των θετικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας(88), (89).

Πίνακας 3. Τυπικά (1^{ης} γενιάς) αντιψυχωσικά.

Τυπικά αντιψυχωσικά (χαμηλής ισχύος)	Τυπικά αντιψυχωσικά (υψηλής ισχύος)
Θειοριδαζίνη	Αλοπεριδόλη
Χλωροπρομαζίνη	Λοξαπίνη
Σουλπιρίδη	Πιμοζίδη
	Φλουφαιναζίνη

Άτυπα (2^{ης} γενιάς+ 3^{ης} γενιάς)

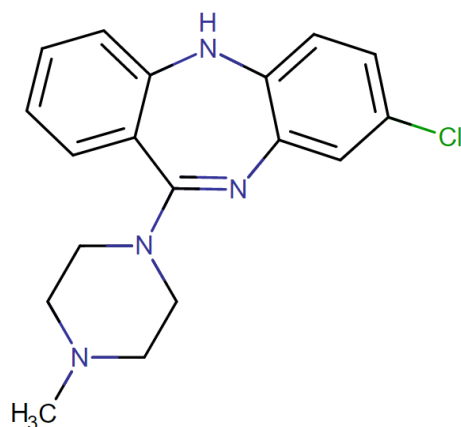
Τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς δρουν ως ανταγωνιστές των υποδοχέων της ντοπαμίνης D₂ καθώς και του υποδοχέα 5-HT_{2A} της σεροτονίνης. Στην πραγματικότητα, εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια για τους υποδοχείς 5-HT_{2A} από τους υποδοχείς D₂. Τα φάρμακα που δρουν ως μερικοί αγωνιστές ντοπαμίνης εμπίπτουν στην κατηγορία των άτυπων αντιψυχωσικών τρίτης γενιάς. Επί του παρόντος, το μόνο φάρμακο που έχει εγκριθεί από τον FDA είναι η αριπιπραζόλη. Τα άτυπα αντιψυχωσικά έχουν συνδεθεί με παρενέργειες του μεταβολισμού όπως η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, ενώ εμφανίζουν μειωμένες νευρολογικές παρενέργειες σε σχέση με τα τυπικά και γι' αυτό χρησιμοποιούνται περισσότερο (88),(89).

Πίνακας 4. Άτυπα (2^{ης} και 3^{ης} γενιάς αντιψυχωσικά).

Άτυπα αντιψυχωσικά (2 ^{ης} γενιάς)	Άτυπα αντιψυχωσικά (3 ^{ης} γενιάς)
Κλοζαπίνη	Αριπιπραζόλη
Κουετιαπίνη	
Ολανζαπίνη	
Ρισπεριδόνη	

5.2.4. Κλοζαπίνη

Η ιστορία της κλοζαπίνης θα μπορούσε να χαρακτηριστεί εξαιρετικά ενδιαφέρουσα καθώς συνδυάζει περισσότερα του ενός παράδοξα. Καταρχάς η ανακάλυψη της στην βιβλιογραφία αναφέρεται δύο φορές, μια στα μέσα της δεκαετίας του 1960 από Ευρωπαίους κλινικούς ερευνητές και για δεύτερη φορά την δεκαετία του 1980 από Αμερικανούς ερευνητές. Ταυτόχρονα ενώ η ανακάλυψη της μετράει ήδη σχεδόν 6 δεκαετίες, από πολλούς θεωρείται νέα θεραπευτική ένωση, ενώ δεν έχουν διστάσει να την χαρακτηρίσουν φάρμακο του μέλλοντος. Ακόμα οι συνθετικοί χημικοί ανέμεναν βάση της δομής της (όπως φαίνεται παρακάτω στην **Εικόνα 16.**) πως θα δρούσε ως αντικαταθλιπτικό, ωστόσο η κλοζαπίνη εμφανίζει αντιψυχωσική δράση με ικανοποιητική φαρμακολογική αποτελεσματικότητα, απουσίας δε εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων (90).



Εικόνα 16. Συντακτικός τύπος της χημικής ένωσης της κλοζαπίνης (Πηγή: Drugbank.com)

Είναι μια τρικυκλική διβενζοδιαζεπίνη που συγκαταλέγεται στα άτυπα αντιψυχωσικά. Ανταγωνίζεται εκλεκτικά κυρίως τους υποδοχείς 5-HT_{2A} της σεροτονίνης, αλλά παρουσιάζει υψηλή συγγένεια και με τους υποδοχείς D2 της ντοπαμίνης. Χορηγείται κυρίως από του στόματος, με σχετικά μικρή βιοδιαθεσιμότητα (<60%) αλλά και ενδοφλεβίως. Μεταβολίζεται στο ήπαρ, από τα κυτοχρώματα CYP1A2, CYP3A4 και CYP2D6. Ο χρόνος ημιζωής της είναι περίπου 8 ώρες. Φαίνεται ότι κατευνάζει ικανοποιητικά τα ψυχωσικά συμπτώματα, ιδίως αυτά που συνδέονται με αυτοκτονικές τάσεις. (91),(92). Μάλιστα σε μια μετα-ανάλυση του 2013 η κλοζαπίνη εμφανίζει τα μεγαλύτερα ποσοστά αποτελεσματικότητας έναντι άλλων αντιψυχωσικών όπως η σουλπιρίδη, η ολανζαπίνη, η αλοπεριδόλη, η αριπιπραζόλη κ.α. αντιψυχωσικά (93).

Η κλοζαπίνη δεν χρησιμοποιείται ως θεραπεία πρώτης γραμμής στην σχιζοφρένεια, αλλά χορηγείται σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί ήδη σε τουλάχιστον δύο αποτυχημένα θεραπευτικά σχήματα με άλλα αντιψυχωσικά (94). Η μειωμένη χρήση της σχετίζεται με τις σοβαρές παρενέργειες που εμφανίζει. Μερικές από τις πιο κρίσιμες για την γενική υγεία του ασθενούς είναι η ουδετεροπενία (διαταραχή του αριθμού και της κατανομής των λευκών αιμοσφαιρίων) , μια κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, η μυοκαρδίτιδα, η παχυσαρκία, οι επιληπτικές κρίσεις, αλλά και η φλεβική θρομβοεμβολή (95).

5.3. Σχιζοφρένεια και καρκίνος

Εδώ και πολλές δεκαετίες εικάζεται πως οι σχιζοφρενείς ασθενείς έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε σχέση με υγιή άτομα. Έχουν δημοσιευτεί όμως και μελέτες που υποστηρίζουν το αντίθετο, δηλαδή αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε σχιζοφρενείς (96),(97). Το 2011 η ομάδα του Chou έπειτα από επιδημιολογικές μελέτες εννέα χρόνων επιβεβαίωσε ότι οι ασθενείς με σχιζοφρένεια ήταν λιγότερο πιθανό να αναπτύξουν καρκίνο σε σχέση με υγιή άτομα, κυρίως οι άνδρες. Η διαπίστωση αυτή εξαιρεί καρκινικούς τύπους όπως αυτός του μαστού και του τραχήλου της μήτρας, που εμφανίζονται σε γυναίκες. Παρόλα αυτά η συννοσηρότητα καρκίνου και σχιζοφρένειας αυξάνει το ποσοστό θνησιμότητας των ασθενών έναντι του γενικού πληθυσμού(98),(99),(100).

Το παράδοξο είναι ότι αν και οι σχιζοφρενείς ασθενείς υιοθετούν συνήθως ανθυγιεινό τρόπο ζωής, αφού καπνίζουν, είναι παχύσαρκοι, δεν ασκούνται, είναι εξαρτώμενοι από το αλκοόλ(101), στατιστικές μελέτες σε σχιζοφρενείς από την Σουηδία έδειξαν ότι εμφανίζουν σε χαμηλότερο ποσοστό καρκίνο του πνεύμονα από το γενικό πληθυσμό. Μάλιστα οι άντρες σχιζοφρενείς παρουσιάζουν χαμηλότερο ποσοστό καρκίνου και από τις γυναίκες (102).

Έχουν αναπτυχθεί δύο θεωρίες για την αιτιολόγηση αυτού του παραδόξου. Η πρώτη σχετίζει την παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας, με την υπερέκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή με ενισχυμένη δραστικότητα κυττάρων φυσικών φονέων (NKcells). Από την άλλη πλευρά, έρευνες έχουν αποδείξει ότι ορισμένα αντιψυχωσικά (π.χ. κλοζαπίνη) παρουσιάζουν και αντικαρκινικές ιδιότητες, αφού σε *in vitro* δοκιμασίες αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων ή και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα αντιψυχωσικά τύπου σουλπιρίδης αναστέλλουν τον μεταβολισμό προκαρκινογόνων ουσιών και επομένως την ενεργοποίησή τους *in vivo*(101),(103).

5.4. Επαναστόχευση φαρμάκων

Η επαναστόχευση φαρμάκων (drug repurposing, drug repositioning) είναι μια αναπτυσσόμενη στρατηγική για την εύρεση νέων εφαρμογών, εκτός του αρχικού πεδίου εφαρμογής τους, των εγκεκριμένων φαρμάκων. Το 1949 ο Henri Laborit, ένας Γάλλος χειρουργός χρησιμοποίησε το αντιϊσταμινικό προμεθαζίνη ως αναισθητικό. Η πεποίθηση της αναστολής του κεντρικού νευρικού συστήματος από την προμεθαζίνη, τον οδήγησε να το χορηγήσει και σε ασθενή με συμπτώματα μανίας, τα οποία και κατευνάστηκαν τελικά. Έτσι ο Laborit έθεσε ήδη από τη δεκαετία του 1940 τα θεμέλια της «επαναστόχευσης» (104).

Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης στρατηγικής, έναντι της εξ ολοκλήρου έρευνας και ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου, είναι πολυάριθμα. Αρχικά από τη στιγμή που αφορά εγκεκριμένο φάρμακο, είναι δεδομένο ότι το συγκεκριμένο φάρμακο δεν εμφανίζει τοξικότητα, ενώ ταυτόχρονα είναι ασφαλές και αποτελεσματικό. Αυτό ισχύει, αφού για να εγκριθεί ένα φάρμακο θα πρέπει να έχει «περάσει» επιτυχώς τόσο από πολυεπίπεδες προκλινικές, όσο και κλινικές μελέτες. Επιπλέον, είναι αναμενόμενο ότι η έλλειψη της αναγκαιότητας της διενέργειας τέτοιων μελετών μειώνει και το κόστος, αλλά και το χρόνο κυκλοφορίας ενός νέου φαρμάκου. Το γεγονός αυτό μειώνει σημαντικά το κόστος παραγωγής και κατά συνέπεια, την τελική τιμή πώλησης του φαρμάκου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα επαναστόχευσης αποτελεί το Viagra της Pfizer, με τη δραστική σιλденаφίλη. Η σιλденаφίλη χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως αντιυπερτασικό. Όταν η όμως Pfizer τη χρησιμοποίησε για τη θεραπεία της στυτικής δυσλειτουργίας, με την επωνυμία Viagra, αύξησε τις πωλήσεις της κατά \$2.05 δισεκατομμύρια, μόνο για το 2012 (105).

6. Σκοπός

Με βάση τα ευρήματα επιδημιολογικών μελετών, που δείχνουν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε άνδρες σχιζοφρενείς, παρόλο που οι ίδιοι φαίνεται να υιοθετούν ανθυγιεινό τρόπο ζωής, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης διερευνήσαμε αυτό το παράδοξο. Με μια πρώτη ματιά θα αναρωτηθεί κανείς αν η μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα στους άνδρες σχιζοφρενείς είναι αποτέλεσμα της αντιψυχωσικής αγωγής, που λαμβάνουν, ή συσχετίζεται με την παθοφυσιολογία της νόσου. Στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων έχουν διεξαχθεί *in vitro* μελέτες που αποδεικνύουν την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά και την επαγωγή κυτταρικού θανάτου σε κυτταρική σειρά μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) μετά από χορήγηση διάφορων αντιψυχωσικών. Η παρούσα *in vitro* μελέτη στοχεύει στη διερεύνηση της δράσης του αντιψυχωσικού, κλοζαπίνη, σε καρκινική κυτταρική σειρά (NSCLC), ως μονοθεραπεία αλλά και συνδυαστικά με κλασσικά αντινεοπλασματικά, όπως η σισπλατίνη και η πακλιταξέλη. Αυτή η διερεύνηση συνάδει με τη στρατηγική της «επαναστόχευσης» φαρμάκων, όπως προαναφέρθηκε. Ταυτόχρονα το συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα στοχεύει στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας με ταυτόχρονη μείωση των παρενεργειών, που είναι μια σημαντική παράμετρος της κλασσικής χημειοθεραπείας. Η τοξικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων είναι μεγάλη και συνιστά αποτρεπτικό παράγοντα της συναίνεσης αρκετών ασθενών να υποβληθούν σε αντικαρκινική αγωγή, συνθήκη που συχνά έχει κόστος για τη ζωή τους.

7. Υλικά και μέθοδοι

I. Κυτταροκαλλιέργειες

Η καλλιέργεια μιας κυτταρικής σειράς σε ειδικό επωαστικό θάλαμο, υπό ελεγχόμενες συνθήκες χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* διερεύνηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης της κλοζαπίνης. Τα κύτταρα που ανακαλλιεργήθηκαν είναι καρκινικά και έχουν απομονωθεί από ζωντανό ιστό. Ο τύπος της κυτταρικής σειράς καθορίζει και τις συνθήκες της καλλιέργειας όπως είναι η θερμοκρασία, το CO₂, η σύσταση του θρεπτικού μέσου κ.α. Στις παρούσες δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αποστειρωμένα με γ-ακτινοβολία τρυβλία ανάπτυξης των κυττάρων και όλα τα αναλώσιμα είχαν αποστειρωθεί σε αυτόκλειστο στους 121°C, για 20min. Το δωμάτιο των κυτταροκαλλιεργειών αποστειρώνονταν μετά το πέρας των εργασιών με ακτινοβολία UV, όπως και η εστία κάθετης νηματικής ροής (laminar flow hood), όπου πραγματοποιούνταν ο χειρισμός των κυττάρων. Η επώαση τους έγινε σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5% (v/v) διοξείδιο του άνθρακα, για την διατήρηση σταθερού pH. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) με προσθήκη 10% ορού (FBS-Fetal Bovine Serum) και 1% αντιβιοτικών παραγόντων, όπως η πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Το FBS είναι ορός-συμπλήρωμα που περιέχει τις απαραίτητες πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες και χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων, για την επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων.

II. Κυτταρική σειρά

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά **A549**(ATCC®). Είναι ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και συγκεκριμένα αδενοκαρκινώματος. Απομονώθηκαν από Καυκάσιο άνδρα 58 ετών, το 1972 και φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο KRAS.

III. Κρυοσυντήρηση

Για τη διακοπή της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων και την επίτευξη της διατήρησης κυτταρικών σειρών, για μεγάλα χρονικά διαστήματα, χωρίς αυτά να υφίστανται αλλοιώσεις χρησιμοποιείται η τεχνική της κρυοσυντήρησης. Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε ειδικά φιαλίδια (cryovials) και διατηρούνται σε δοχεία υγρού αζώτου, σε θερμοκρασίες που φτάνουν τους -196 °C. Πιο συγκεκριμένα, όταν η καλλιέργεια των κυττάρων καλύψει το 80-90% του τρυβλίου που επωάζονται, αυτά δύναται να καταψυχθούν για μελλοντική επανακαλλιέργεια. Για την κατάψυξη αυτών ακολουθείται η εξής πορεία:

- Το θρεπτικό μέσο DMEM (+ 10% FBS, +1% P/S), το PBS (Phosphate Buffered Saline 1x, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) και η τρυψίνη (διάλυμα 1x, 0,5% Trypsin EDTA, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) θερμαίνονται για 15λεπτά στους 37 °C σε υδατόλουτρο.
- Αφαιρείται το μέσο από τα τρυβλία και πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις των 3ml PBS.
- Προστίθενται 1ml τρυψίνης και το τρυβλίο επωάζεται για 2min στον επωαστικό θάλαμο.
- Το τρυβλίο παρατηρείται στο μικροσκόπιο για να ελεγχθεί η δράση της τρυψίνης. Η τρυψίνη είναι πρωτεολυτικό ένζυμο και αποκόπτει πεπτιδικούς δεσμούς που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες των κυττάρων και οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την προσκόλληση τους στο τρυβλίο.
- Προστίθεται ποσότητα μέσου, τα κύτταρα ανασηκώνονται, μεταφέρονται σε ειδικό φιαλίδιο (falcon) και φυγοκεντρώνονται για 5min στα 2200rpm.
- Το ίζημα που σχηματίζεται (pellet) επαναιωρείται σε διάλυμα ορού (10% DMSO σε FBS).
- Διανέμεται σε φιαλίδια και αποθηκεύεται για 1 ημέρα στους -80 °C και από εκεί σε υγρό άζωτο.

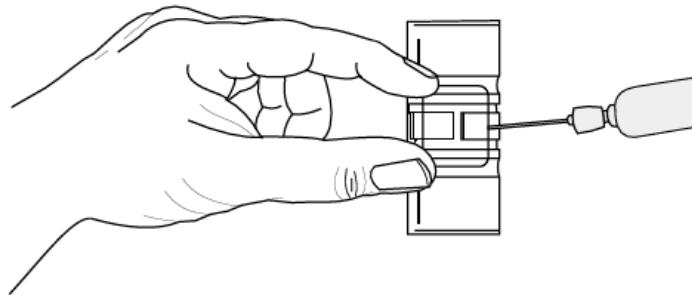
IV. Επανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα κατά την επώαση τους στα τρυβλία μπορούν να πολλαπλασιαστούν μέχρι έναν ορισμένο πληθυσμό, ο οποίος αν ξεπεραστεί ενεργοποιεί μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Για την αποφυγή του θανάτου των κυττάρων ή για λόγους επιθυμητών αραιώσεων χρησιμοποιείται η τεχνική της επανακαλλιέργειας, όταν ο πληθυσμός τους καλύψει το 80-90% του τρυβλίου. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

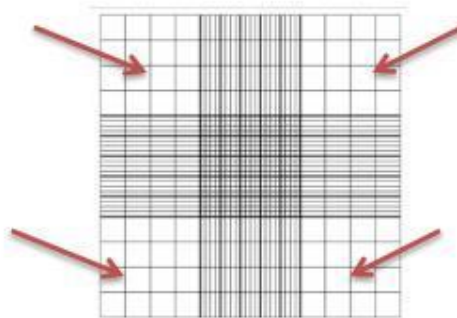
- Αρχικά όλα τα αντιδραστήρια που θα χρησιμοποιηθούν θερμαίνονται στους 37 °C στο υδατόλουτρο για 15min.
- Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα με πιπέτα Pasteur και πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις των 2ml PBS (PhosphateBufferedSaline 1x, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ορού ο οποίος περιέχει θρεπτικό υλικό και αδρανοποιεί την τρυψίνη.
- Προστίθεται 1 ml τρυψίνης (διάλυμα 1x, 0,5% Trypsin EDTA, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) στην επιφάνεια του πιάτου και επωάζεται 37 °C για 2-3 λεπτά.
- Αφού περάσει ο χρόνος επώασης τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και αν δεν κινούνται, αφήνονται να επωαστούν για 1min ακόμα.
- Υπό κλίση προστίθενται 9ml μέσου DMEM (+ 10% FBS, +1% P/S) και με έντονο πιπετάρισμα, ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα, το εναιώρημα μεταφέρεται σε νέα τρυβλία, όπου προηγουμένως έχει προστεθεί επιθυμητή ποσότητα μέσου.

V. Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Για τον προσδιορισμό του κυτταρικού πληθυσμού χρησιμοποιείται η μέθοδος μέτρησης κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Ο χειρισμός των κυττάρων είναι ίδιος με την τεχνική της επανακαλλιέργειας μέχρι το τελευταίο βήμα. Εκεί προτίθενται 5ml μέσου DMEM (+ 10% FBS, +1% P/S) και ακολουθεί φυγοκέντρηση του εναιωρήματος για 5min, στα 2200rpm. Στην συνέχεια το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 3-5ml μέσου. Από αυτό 10μl μεταφέρονται και στις δύο πλευρές της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 17**.



Εικόνα 17. Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer.



Εικόνα18. Μέτρηση κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer.

Η εικόνα που λαμβάνεται στο μικροσκόπιο είναι αυτή που φαίνεται στην **Εικόνα 18**. Μετρούνται τα κύτταρα και των τεσσάρων πλευρών και η συγκέντρωση των κυττάρων - κυτταρικός πληθυσμός υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση (αριθμός κυττάρων ανά ml)} = (\text{αριθμός κυττάρων/αριθμός τετραγώνων}) \times 10^4$$

VI. Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση σουλφοροδαμίνης B (SRB assay)

Η δοκιμασία SRB (σουλφοροδαμίνης B) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της κυτταρικής πυκνότητας, βάση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων. Γι αυτό αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη της κυτταροτοξικότητας ενώσεων και στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πιο συγκεκριμένα το SRB είναι μια χρωστική η οποία δεσμεύει τις κυτταρικές πρωτεΐνες προς σχηματισμό συμπλόκων. Τα σχηματιζόμενα έγχρωμα σύμπλοκα προσδιορίζονται ποσοτικά με φασματοφωτόμετρο ELISA, στα 492nm. Η ακριβής πειραματική διαδικασία είναι η εξής(106):

- Αρχικά επωάζονται 100μl εναιωρήματος με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων ύστερα από προσθήκη των προς μελέτη ενώσεων, για το ζητούμενο χρονικό διάστημα και σε ειδικό επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες (37 °C και 5% CO₂). Χρησιμοποιούνται ειδικά τρυβλία 96 θέσεων (96-well).
- Μετά το πέρας του επιθυμητού χρόνου απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό από το τρυβλίο και προστίθενται 50μl κρύου 50% TCA (trichloroacetic acid, TCA, Fisher Scientific®, Thermo Fisher Scientific, UK) - τελικής συγκέντρωσης στο διάλυμα 10%.
- Επωάζονται για 1 ώρα στους 4 °C, ώστε να μονιμοποιηθούν στο τρυβλίο.
- Απορρίπτεται εκ νέου το υπερκείμενο και πραγματοποιούνται 5 εκπλύσεις με νερό βρύσης.
- Τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν μέσα στον απαγωγό, σε θερμοκρασία δωματίου, overnight (δηλαδή 16 ώρες).
- Ακολουθεί προσθήκη 100μl 0,4% w/v διαλύματος SRB (διαλυμένη σε 1% οξικό οξύ).
- Στη συνέχεια τα τρυβλία επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Εκπλένονται με 1% οξικό οξύ για να απομακρυνθεί όση χρωστική δεν έχει προσδεθεί.
- Τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν για περίπου 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, μέσα στον απαγωγό.
- Προστίθενται 200μl 10mM Tris-base(pH 10,5).
- Επωάζονται υπό ανακίνηση σε αναδευτήρα κλίσης για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τελικά μετρείται η οπτική απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο ELISA στα 492nm.

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

VII. Κυτταρομετρία ροής – δοκιμασία AnnexinV- PI (Propidium Iodine)

Οι δύο βασικές κατηγορίες κυτταρικού θανάτου είναι η νέκρωση και η απόπτωση, όπως ήδη έχει αναφερθεί. Η νέκρωση αφορά τον «απρογραμματιστό» κυτταρικό θάνατο, λόγω τοπικής βλάβης ή ασθενειών, με αποτέλεσμα την καταστροφή των κυττάρων. Στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο εντάσσονται διάφορες μορφές απόπτωσης, που είναι αποτέλεσμα φυσιολογικής γήρανσης των κυττάρων. Το μεγάλο ενδιαφέρον για την απόπτωση προκύπτει εξαιτίας της αναγνώρισης ότι εκτός από το σημαντικό φυσιολογικό της ρόλο, αυξημένα ποσοστά απόπτωσης παρατηρούνται σε ασθένειες όπως η νόσος Parkinson, Alzheimer, το AIDS, ενώ μειωμένα ποσοστά σε διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος. Ως εκ τούτου, κατά τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας των φαρμάκων καθίσταται αναγκαίο να αποσαφηνιστεί το είδος του κυτταρικού θανάτου, που πιθανότατα αυτά επάγουν.

Ο προσδιορισμός του είδους του θανάτου μέσα σε έναν κυτταρικό πληθυσμό πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής και με σήμανση των κυττάρων με Αννεξίνη. Η κυτταρομετρία ροής είναι μία αναλυτική τεχνική που επιτρέπει την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών και νεκρών κυττάρων βάσει των φυσικών και βιολογικών χαρακτηριστικών τους. Τα κύτταρα «υποχρεώνονται» να περάσουν μέσω ροής υγρού (sheath fluid) σε μια λεπτή στήλη διαμέτρου περίπου αντίστοιχης με αυτήν των κυττάρων, οπότε μετρώνται και αναλύεται ο φθορισμός κάθε κυττάρου χωριστά, μετά από πρόσπτωση δέσμης φωτός λέιζερ. Με κατάλληλους ανιχνευτές καταγράφονται σήματα πρόσθιας (FSC), πλάγιας (SSC) σκέδασης και σήματα φθορισμού.

Η Αννεξίνη είναι μια πρωτεΐνη, που δεσμεύεται στη φωσφατιδυλοσερίνη, με τρόπο εξαρτώμενο από Ca^{2+} . Η φωσφατιδυλοσερίνη είναι ένα φωσφολιπίδιο, που εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Κατά την απόπτωση μετατοπίζεται στην εξωτερική πλευρά και μπορεί να ανιχνευθεί από τη συζευγμένη με φθοριόχρωμα AnnexinV. Από την άλλη πλευρά, το PI είναι μια φθορίζουσα ουσία που διαπερνά τη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων και προσδένεται στο DNA χρησιμεύοντας ως δείκτης νέκρωσης. Η διάκριση των κυτταρικών πληθυσμών υπολογίζεται ως εξής:

Ζωντανά κύτταρα: PI (-) και AnnexinV-FITC (-)

1. Νέκρωση: PI (+) και AnnexinV-FITC (-)

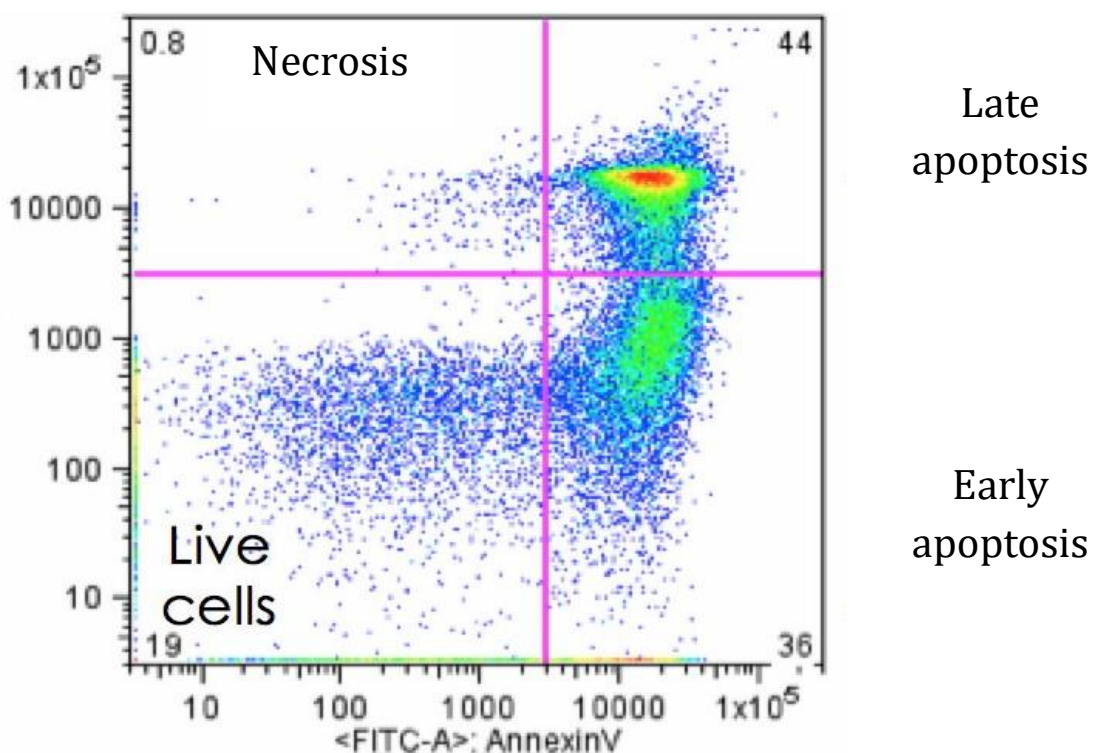
2. Πρώιμη απόπτωση: PI (-) και AnnexinV-FITC (+)

3. Όψιμη απόπτωση: PI (+) και AnnexinV-FITC (+)

Όπου: (+): θετικά κεχρωσμένη (-): αρνητικά κεχρωσμένη

Συνολικός κυτταρικός θάνατος (%) = (1+2+3)%

Συνολική απόπτωση (%) = (2+3)%



Εικόνα 19. Σχηματιστική αναπαράσταση πρότυπου διαγράμματος μελέτης της απόπτωσης με το πρωτόκολλο της Αννεξίνης (AnnexinV) PI.

Πειραματική πορεία:

- Το PBS(Phosphate Buffered Saline 1x, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) και η τρυψίνη (διάλυμα 1x, 0,5% Trypsin EDTA, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) θερμαίνονται για 15λεπτά στους 37°C σε υδατόλουτρο.
- Μετά την επιθυμητή επώαση σε τρυβλίο 6 θέσεων (6-wells) τα κύτταρα εκπλένονται με PBS (1x) και προστίθενται σε αυτά 350μl τρυψίνης (1x).
- Λαμβάνεται το υπερκείμενο και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 2.500 rpm στους 4 °C.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα εκπλένεται με προσοχή με PBS (1x).
- Το ίζημα επαναιωρείται σε AnnexinV Binding Buffer, σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml.
- Μεταφορονται 100μl κυτταρικού εναιωρήματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 5ml.
- Προστίθενται 5μl διαλύματος fluorochrome conjugated AnnexinV.
- Προστίθενται 10μl διαλύματος PI και ακολουθεί ήπια ανάδευση.
- Επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Προστίθενται 400μl AnnexinV Binding Buffer.
- Μέτρηση με κυτταρομετρία ροής.

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

VIII. Φαρμακολογικοί χειρισμοί

Για τα πειράματα μελέτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ενώσεις:

1. Clozapine (Sigma-Aldrich) σε συγκεντρώσεις 1- 100 μ M.
2. Cisplatin(Pfizer) σε συγκεντρώσεις 16, 32, 64 μ M και 1,056, 2mM.
3. Taxol (Bristol-Myers Squibb A.E.) σε συγκεντρώσεις 0,01 –100 μ M.
4. DMSO ((Sigma-Aldrich) σε τελική συγκέντρωση 1%.

Οι χρόνοι επώασης με τα φάρμακα κυμαίνονταν από 24-96 ώρες.

Για τα πειράματα της μελέτης της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων αλλά και της ανοσοαποτύπωσης κατά Westernχρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ενώσεις:

- Clozapine (Sigma-Aldrich) σε συγκέντρωση 5 μ M.
- Sulpiride (Sigma-Aldrich) σε συγκέντρωση 5 μ M
- Cisplatin (Pfizer) σε συγκέντρωση 16 μ M.
- Taxol (Bristol-Myers Squibb A.E.) σε συγκέντρωση 0,1 μ M.
- Insulin (Sigma-Aldrich)σε συγκέντρωση 10nM.
- Dopamine (Sigma-Aldrich)σε συγκέντρωση 10nM.
- Bromocriptine (Sigma-Aldrich) σε συγκέντρωση 10nM.
- DMSO ((Sigma-Aldrich) σε τελική συγκέντρωση 1%.

Ο χρόνος επώασης για τα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western ήταν τα 30 λεπτά, ενώ για τη μελέτη της απόπτωσης οι 48 ώρες.

IX. Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές που ελήφθησαν από τη διεξαγωγή των δοκιμών αξιολογήθηκαν με το Student's t-test. Το όριο σημαντικότητας όλων των τιμών τέθηκε ως μικρότερο ή ίσο του 0,05 ($P < 0,05 \rightarrow *$, $P < 0,01 \rightarrow **$, $P < 0,001 \rightarrow ***$).

X. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών του κυττάρου (TCPs)

Για τη μελέτη της επίδρασης των φαρμάκων που χορηγήθηκαν, σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, αρχικά εκχυλίστηκαν οι ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων (Total cellular proteins, TCPs). Μετά την επώαση των κυττάρων με τις επιθυμητές ενώσεις, σε τρυβλία 6 θέσεων (6-well) η πορεία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Αρχικά παρασκευάστηκε το mixA (μίγμα πρωτεασών και αναστολέων φωσφατασών) όπου περιλαμβάνει (για κάθε 6 δείγματα)
2ml RIPA Buffer (Radio Immuno Precipitation Assay Buffer)
20μl PMSF
20μl NaF
20μl BGP
20μl NaOrthovanadate
40μl Na₂MoO₄
- Αφαιρείται προσεκτικά το μέσο επώασης από τα κύτταρα με πιπέτα Pasteur.
- Πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις των 2ml με 1x PBS (Phosphate Buffered Saline 1x, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).
- Προστίθενται 150μl από το παγωμένο mixA σε κάθε θέση.
- Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του τρυβλίου με χρήση ειδικής ξύστρας.
- Συλλέγονται με πιπέτα και μεταφέρονται σε eppendorfs.
- Αναδεύονται έντονα για 30 δευτερόλεπτα.
- Αφήνονται για 30 λεπτά σε πάγο.
- Φυγοκεντρώνονται για 30 λεπτά στα 14000rpm, στους 4 °C.
- Συλλέγεται το υπερκείμενο όπου αποτελείται από τις ολικές πρωτεΐνες και αποθηκεύονται στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

XI. Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA

Αντιδραστήρια

- BSA (Pierce, USA) συγκέντρωσης 2mg/ml.
Διαδοχικές αραιώσεις για την παρασκευή πρότυπης καμπύλης με συγκεντρώσεις διαλυμάτων (σε mg/ml):
A. 2,000
B. 1,500
C. 1,000
D. 0,750

Όργανα



IKA Orbital shaker Vortex 2

E. 0,500
F. 0,250
G. 0,125
H. 0,025
I. 0,000 (blank)

- *BCA Working Reagent*
Διάλυμα 50/1 BCA Reagent A/
BCA Reagent B
- *φυσιολογικός ορός*



PHMP Series Thermoshakers for



Nanodrop 2000 thermo scientific

Πειραματική πορεία

Το πρωτόκολλο BCA Protein Assay Kit, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε άγνωστο δείγμα, στην περίπτωση μας σε δείγματα απομονωμένων μικροσωματικών πρωτεϊνών από ιστούς ήπατος και πνευμόνων. Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση αναγωγής του $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$ όπου η πρωτεΐνη δρα ως αναγωγικό (σε αλκαλικό περιβάλλον). Ο Cu^{1+} ανιχνεύεται χρωματομετρικά από το δικιγχονικό οξύ (bicinchoninic acid) με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης από βόειο ορό. Αναλυτικότερα, τα δείγματα των απομονωμένων πρωτεϊνών έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου, σταδιακά σε πάγο. Προετοιμάζονται τα διαλύματα της πρότυπης καμπύλης καθώς και το BCA Working Reagent, για 10 δείγματα αναμιγνύονται 1ml Reagent A με 20μl Reagent B. Σε εppendorfs πραγματοποιείται αραίωση των δειγμάτων με ddH₂O. Πριν και μετά την αραίωση τα δείγματα αναδεύονται σε συσκευή Vortex. Σε πιάτο 96 θέσεων προστίθενται 100μl BCA Working Reagent και 5μl δείγματος ανά πηγαδάκι. Ομοίως και με διαλύματα της πρότυπης καμπύλης. Ακολουθεί επώαση του πιάτου στους 37°C, υπό ανάδευση, για 30 λεπτά σε συσκευή Thermoshaker for Microplates, PHMP Series. Το πιάτο μεταφέρεται για 5 λεπτά στον πάγο για να σταματήσει η αντίδραση και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για να μετρηθεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε συσκευή Nanodrop 2000 thermo scientific. Η φωτομετρική ανίχνευση πραγματοποιείται στα 595nm. Μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα, είναι έτοιμα για ανάλυση με Ανοσοαποτύπωση κατά Western.

XII. Western Blot

Παρασκευή διαλυμάτων

1. **1,5 M Tris-HCl pH=8,8**

Ζυγίζονται 181,7g Tris-base (Trizma® base) και διαλυτοποιούνται σε 800ml ddH₂O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8,8 με HCl 1N. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1L.

2. **0,5 M Tris-HCl pH=6,8**

Ζυγίζονται 60,6g Tris-base (Trizma® base) και διαλυτοποιούνται σε 800ml ddH₂O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6,8 με HCl 1N. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1L.

3. **SDS (Sodium Dodecylsulfate) 10% w/v**

Ζυγίζονται 10g SDS και διαλυτοποιούνται σε 100ml ddH₂O. ⚠️ Απαιτείται προσοχή στον χειρισμό του αντιδραστηρίου, αφού είναι ιδιαίτερα τοξικό.

4. **APS (Ammonium Persulfate) 10% w/v**

Ζυγίζονται 0,05g και διαλυτοποιούνται σε 500μl ddH₂O.

5. **Running buffer 5x**

Ζυγίζονται 15g Tris-base (Trizma® base), 72g Glycine, 5g SDS και διαλυτοποιούνται σε 1L ddH₂O.

6. **Transfer Buffer 1x**

Ζυγίζονται 3,03g Tris-base (Trizma® base), 14,4g Glycine, και διαλυτοποιούνται σε 800ml ddH₂O. Λίγο πριν τη χρήση του προστίθενται και 200ml μεθανόλης.

7. **TBS (Tris Buffer Saline) 1x**

Ζυγίζονται 4,84g Tris-base (Trizma® base) και 58,48g NaCl. Διαλυτοποιούνται σε 1,8L ddH₂O και το pH ρυθμίζεται στο 7,5 με HCl. Συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 2L.

8. **TTBS 0,1%**

Το TBS βρίσκεται υπό ανάδευση και στην σχηματιζόμενη δίνη προστίθεται 1ml Tween 20%, για κάθε λίτρο TBS.

9. **Sample buffer**

Ζυγίζονται 0,01 bromophenolblue και διαλυτοποιούνται σε 10ml ddH₂O για την παρασκευή διαλύματος 0,1% w/v.

Για το buffer προστίθενται 4ml ddH₂O, 1ml 0,5 M Tris-HCl pH=6,8, 0,8ml glycerol, 1,6ml 10% SDS και 0,4ml 0,1% bromophenolblue. Στο τέλος και στον απαγωγό προστίθενται και 0,4ml β-mercaptoethanol.

10. **Blocking buffer 3%**

Ζυγίζονται 3gr άπαχου γάλακτος σε σκόνη και διαλυτοποιούνται σε 100ml TTBS.

Σημασία των αντιδραστηρίων

Η μέθοδος αφορά στο διαχωρισμό πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Βασίζεται στο γεγονός ότι οι αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες, βρισκόμενες στην πρωτοταγή δομή τους, φορτίζονται αρνητικά από το SDS και μετακινούνται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο ως φορτισμένα μόρια. Η κινητικότητα τους στο πεδίο αυτό σχετίζεται μόνο με το μοριακό τους βάρος.

- **APS (AmmoniumPersulfate):** Εκκινητής πολυμερισμού, δημιουργία ελεύθερων ριζών.
- **TEMED (τετραμεθυλεναιθυλαμινδιαμίνη):** Καταλύτης αντίδρασης πολυμερισμού
- **Ακρυλαμίδιο:** Πολυμερίζεται και δίνει πηκτή πολυακρυλαμιδίου που λειτουργεί ως μοριακός ηθμός.
- **SDS (SodiumPersulfate):** Ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και καταργεί τις ενδομοριακές. Προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται και έτσι το αρχικό τους φορτίο καθίσταται αμελητέο μετά τη σύνδεση με το SDS. Το φορτίο που αποκτούν είναι περίπου ανάλογο με τη μάζα τους.
- **β -mercaptoethanol:** Αποδιατακτικός παράγοντας. Ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και αποδιατάσσει την τριτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης, μετατρέποντάς την σε ευθύγραμμο τμήμα.
- **Γλυκερόλη:** Αποτρέπει τη διάχυση πρωτεϊνών στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, διατηρώντας τις διαλυμένες σε ένα πυκνότερο διάλυμα, με αποτέλεσμα ομοιόμορφο φόρτωμα και τρέξιμο πρωτεϊνών.
- **Ρυθμιστικά διαλύματα Tris-HCl:** Αναστέλλουν ένζυμα και διατηρούν την επιθυμητή τιμή pH.
- **Μεθανόλη:** Βοηθά την πρόσδεση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη.
- **Γλυκίνη:** Ρυθμίζει την κινητικότητα των ιόντων Χλωρίου, για να υπάρχει ίδια κινητικότητα σε όλες τις πρωτεΐνες.

Συσκευές και όργανα



Mini-PROTEAN Tetra Cell and Mini Trans-Blot Module from Bio-Rad (California, USA)



WT15 Rocking Platform, Core life science



Stuart™ Block Heater



Συσκευή απεικόνισης ChemiDoc™ XRS+ system (BioRad, USA)

Πειραματική πορεία

Πριν την έναρξη της διαδικασίας υπολογίζεται η ποσότητα κάθε πρωτεΐνης που πρέπει να φορτωθεί και γίνονται οι αραιώσεις των δειγμάτων που έχουν μετρηθεί, με loading buffer. Οι συγκεντρώσεις που είναι αποδοτικές κατά την ηλεκτροφόρηση διαφέρουν ανά ιστό όπως φαίνεται στον πίνακα 3. Επίσης, υπολογίζονται και οι αραιώσεις των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν όπως φαίνεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 3. Συγκέντρωση πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από τα κύτταρα A549.

Συγκέντρωση πρωτεϊνών (A549)
8 µg

Πίνακας 4. Αραιώσεις και επώσεις των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

Αντίσωμα	Αραίωση	Επόαση	Ζογενές αντίσωμα	Επόαση
A-TUBULIN	1:2000	Overnight στους 4 °C, υπό ανάδευση	a-mouse 1:3000	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση
pAKT	1:1500	Overnight στους 4 °C, υπό ανάδευση	a-rabbit 1:2500	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση
pS6	1:1500	Overnight στους 4 °C, υπό ανάδευση	a-rabbit 1:2500	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση
pGSK3	1:2000	Overnight στους 4 °C, υπό ανάδευση	a-rabbit 1:2500	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση
pERK	1:750	Overnight στους 4 °C, υπό ανάδευση	a-rabbit 1:2500	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση
pCREB	1:500	Overnight στους 4 °C, υπό ανάδευση	a-goat 1:1500	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση
pFOXO-1	1:500	Overnight στους 4 °C, υπό ανάδευση	a-rabbit 1:2500	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση
pP38	1:500	Overnight στους	a-rabbit	1 ώρα σε

		4 °C, υπό ανάδευση	1:2500	θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση
--	--	--------------------	--------	------------------------------------

I. Ηλεκτροφόρηση

Για την έναρξη της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου αρχικά παρασκευάζονται οι 2 πηκτές, διαχωρισμού και επιστοίβαξης όπως φαίνονται στους πίνακες 5 και 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 5. Πηκτή διαχωρισμού (separating gel) 10%

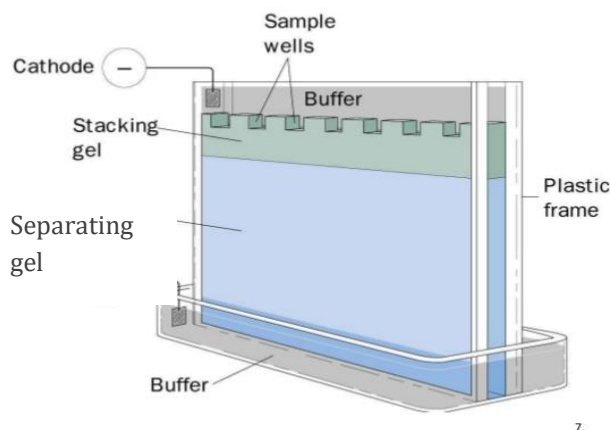
ddH ₂ O	9,9ml
1,5M Tris-HCl pH=8,8	6,3ml
30% Acrylamide	8,3ml
10% SDS	250μl
10 % APS	250μl
TEMED	10μl

- ✓ Οι ποσότητες επαρκούν για την παρασκευή 4 πηκτών, πάχους 1cm η καθεμία.
- ✓ Τα APS και TEMED προστίθενται στο τέλος, ώστε να μην ξεκινήσει πρώιμα ο πολυμερισμός.

Πίνακας 6. Πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) 5%

ddH ₂ O	6,8ml
1M Tris-HCl pH=6,8	1,25ml
30% Acrylamide	1,7ml
10% SDS	100μl
10 % APS	100μl
TEMED	10μl

Αφού συναρμολογηθεί η συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN Tetra Cell and Mini Trans-Blot Module from Bio-Rad(California, USA), παρασκευάζονται οι πηκτές. Τα δείγματα (που έχουν αραιωθεί κατάλληλα με loading buffer) τοποθετούνται σε συσκευή Block Heater (Stuart™) στους 95°C, για 5min και στην συνέχεια αφήνονται για 1 λεπτό στον πάγο. Η επώαση στους 95°C καθώς η ύπαρξη β-μερκαπτοαιθανόλης στο loading buffer οδηγεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την καταστροφή της τριτοταγούς δομής, ώστε ο διαχωρισμός τους να οφείλεται αποκλειστικά στο μοριακό τους βάρος και όχι σε τυχόν αλληλεπιδράσεις. Ακολουθεί φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής επιστοίβαξης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 20**.



Εικόνα 20. Πηκτή διαχωρισμού και επιστοιβάξης για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

Τα πηγαδάκια (wells) και η συσκευή πληρώνονται με 1x Running Buffer και ξεκινάει η ηλεκτροφόρηση. Το τροφοδοτικό ρυθμίζεται στα 100 Volt για περίπου 90 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά πραγματοποιείται στην ίδια συσκευή στα 30 Volt, overnight (16 ώρες), στον ψυκτικό θάλαμο 4°C και υπό ανάδευση.

II. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Οι μεμβράνες επώζονται για 1 ώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα (blocking solution) milk 3%, υπό ανακίνηση σε συσκευή WT15 Rocking Platform, Core life science. Το blocking solution χρησιμοποιείται για να δεσμεύσει τις μη ειδικές θέσεις στη μεμβράνη. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 3 πλύσεις, των 5 λεπτών με διάλυμα TTBS, υπό ανακίνηση. Ακολουθεί επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα (το οποίο έχει αραιωθεί κατάλληλα σε milk 3%) υπό ανακίνηση. Οι συνθήκες επώασης ποικίλλουν ανάλογα με το επιλεγόμενο αντίσωμα και φαίνονται λεπτομερώς στον πίνακα 4. Μετά το πέρας της επώασης συλλέγεται το αντίσωμα προσεκτικά και ακολουθούν άλλες 5 πλύσεις με TTBS, των 5 λεπτών η καθεμία, υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια οι μεμβράνες επώζονται με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα (αραιωμένο σε 3% milk), υπό ανακίνηση. Επίσης, οι συνθήκες επώασης διαφέρουν ανά αντίσωμα και φαίνονται στον πίνακα 4. Πραγματοποιούνται άλλες 5 πλύσεις με TTBS, από 5 λεπτά η καθεμία, υπό ανακίνηση.

III. Εμφάνιση των πρωτεϊνών

Σε σκοτεινό θάλαμο οι μεμβράνες επώζονται για 5 λεπτά με μίγμα 1:1 των αντιδραστηρίων A και B του συστήματος χημειοφωταύγειας ECL (Amersham, GE Healthcare, UK). Χρησιμοποιείται 1 ml μίγματος για κάθε μεμβράνη. Οι μεμβράνες τοποθετούνται σε ειδική επιφάνεια στη συσκευή απεικόνισης ChemiDoc TMXRS+ system (BioRad, USA και έπειτα από ρύθμιση των παραμέτρων λαμβάνονται ψηφιακές φωτογραφίες. Αυτές όπως φαίνεται στη συνέχεια επεξεργάζονται με ειδικό πρόγραμμα (ImageJ), όπου και ποσοτικοποιεί τις πρωτεΐνες των μεμβρανών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8. Αποτελέσματα

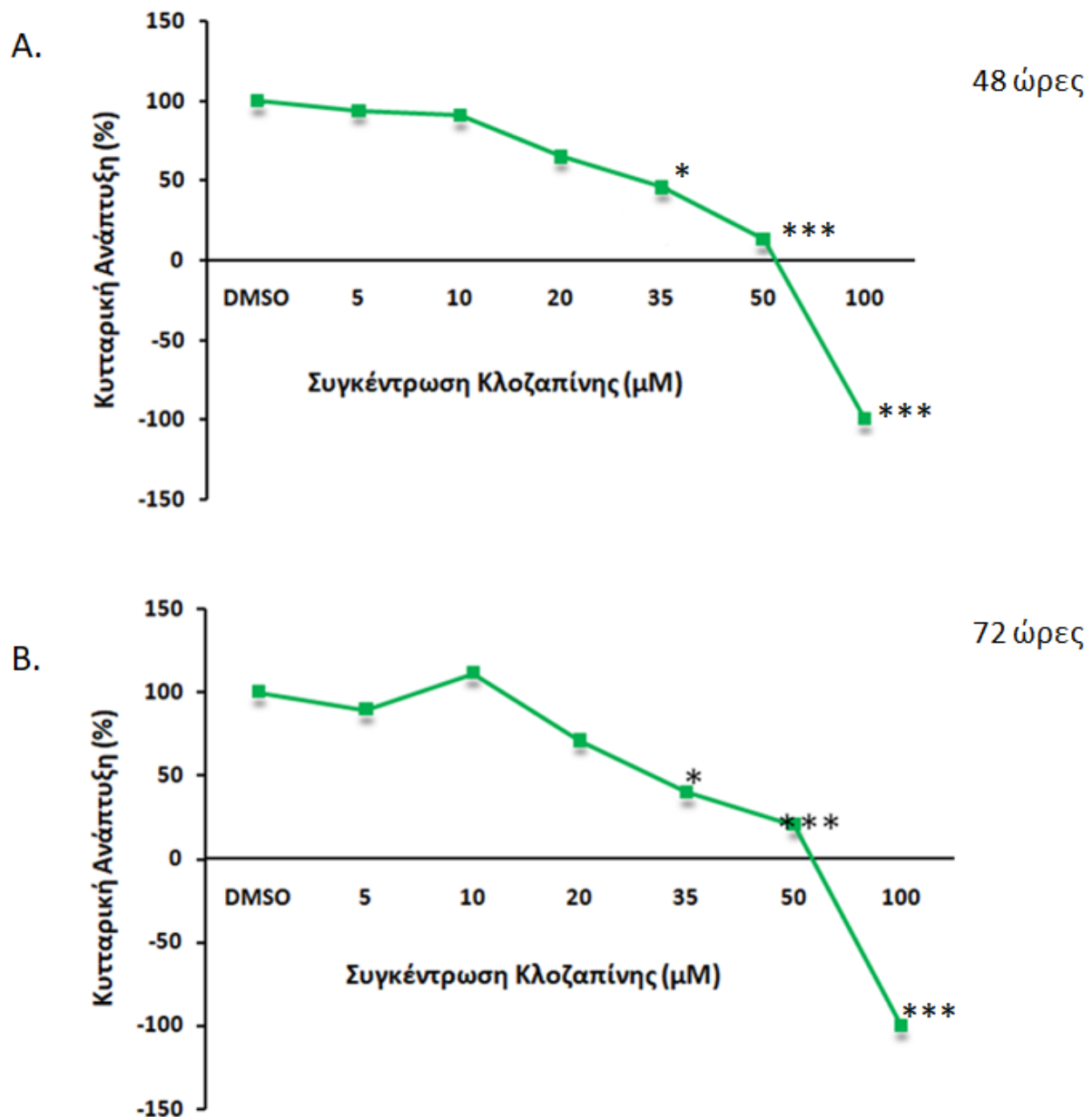
Διερεύνηση της δράσης της κλοζαπίνης στα κύτταρα A549

Στη παρούσα μελέτη διενεργήθηκαν πειράματα για τη διερεύνηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης της κλοζαπίνης ως μονοθεραπεία, συνδυαστικά με ένα, ή και δύο κλασσικά αντινεοπλασματικά φάρμακα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά A549 και τα αντινεοπλασματικά ήταν η σισπλατίνη και η ταξόλη, που χρησιμοποιούνται ευρέως ως θεραπεία στον καρκίνο του πνεύμονα. Επιπλέον, η κλοζαπίνη συγκαταλέγεται στα άτυπα αντιψυχωσικά και ως εκ του τούτου κρίθηκε αναγκαία η σύγκριση της δράσης της με αυτή ενός τυπικού αντιψυχωσικού όπως η σουλπριδίνη. Μελετήθηκε επίσης, συγκριτικά η δράση της ινσουλίνης, της ντοπαμίνης, αλλά και του αγωνιστή της ντοπαμίνης, βρωμοκρυπτίνη. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν οι παραπάνω ενώσεις ως προς την επίδραση τους: **7.1.** στην κυτταρική επιβίωση, με την δοκιμασία SRB, **7.2.** στη ρύθμιση της απόπτωσης, με κυτταρομετρία ροής (πρωτόκολλο AnnexinV- PI), **7.3.** στην έκφραση πρωτεϊνών που περιλαμβάνονται σε μονοπάτια σχετιζόμενα με την καρκινογένεση (Western Blot).

8.1. Αξιολόγηση της επίδρασης της κλοζαπίνης στην κυτταρική επιβίωση των κυττάρων A549 (δοκιμασία SRB)

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της κλοζαπίνης στην επιβίωση και ανάπτυξη των καρκινικών A549 χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία SRB. Αρχικά τα κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου για διαστήματα 24,48,72 και 96 ωρών. Από αυτά επιλέχθηκαν οι 48 και 72 ώρες για τη διενέργεια των πειραμάτων. Κάθε φορά επιστρώνονταν 4.500 κύτταρα ανά θέση. Κύτταρα επώαστηκαν με την κλοζαπίνη ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με τα κλασσικά αντινεοπλασματικά σισπλατίνη και πακλιταξέλη.

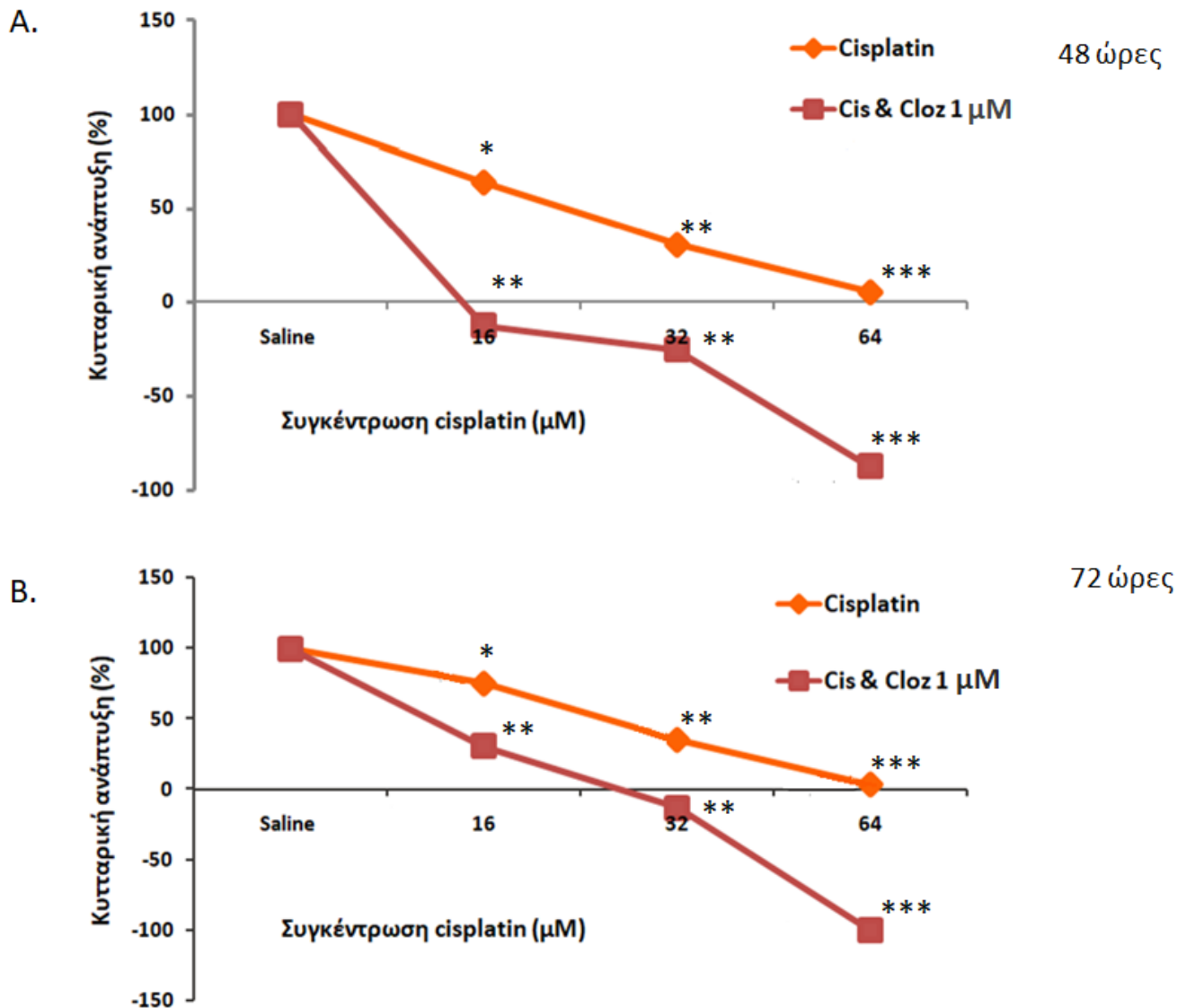
Όπως παρατηρούμε στο **Γράφημα 1.** η επώαση των κυττάρων A549 με κλοζαπίνη επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη τους με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Ειδικά σε συγκεντρώσεις 50μM και άνω επιφέρει πλήρη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Για το χρονικό διάστημα των 72 ωρών η επίδραση είναι ελαφρώς πιο έντονη αφού η καμπύλη εμφανίζει μεγαλύτερη κλίση. Το IC₅₀ της κλοζαπίνης για τις 48 ώρες είναι στα 30μM, ενώ για τις 72 ώρες 32μM.



Γράφημα 1. Επιβίωση της κυτταρικής σειράς A549 μετά από επώαση με κλοζαπίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις, για χρονικό διάστημα **A:** 48ώρες, **B:** 72 ώρες. Η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου που εκτέθηκε για ίδια χρονικά διαστήματα και συνθήκες σε DMSO. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα. Η στατική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με student's test.

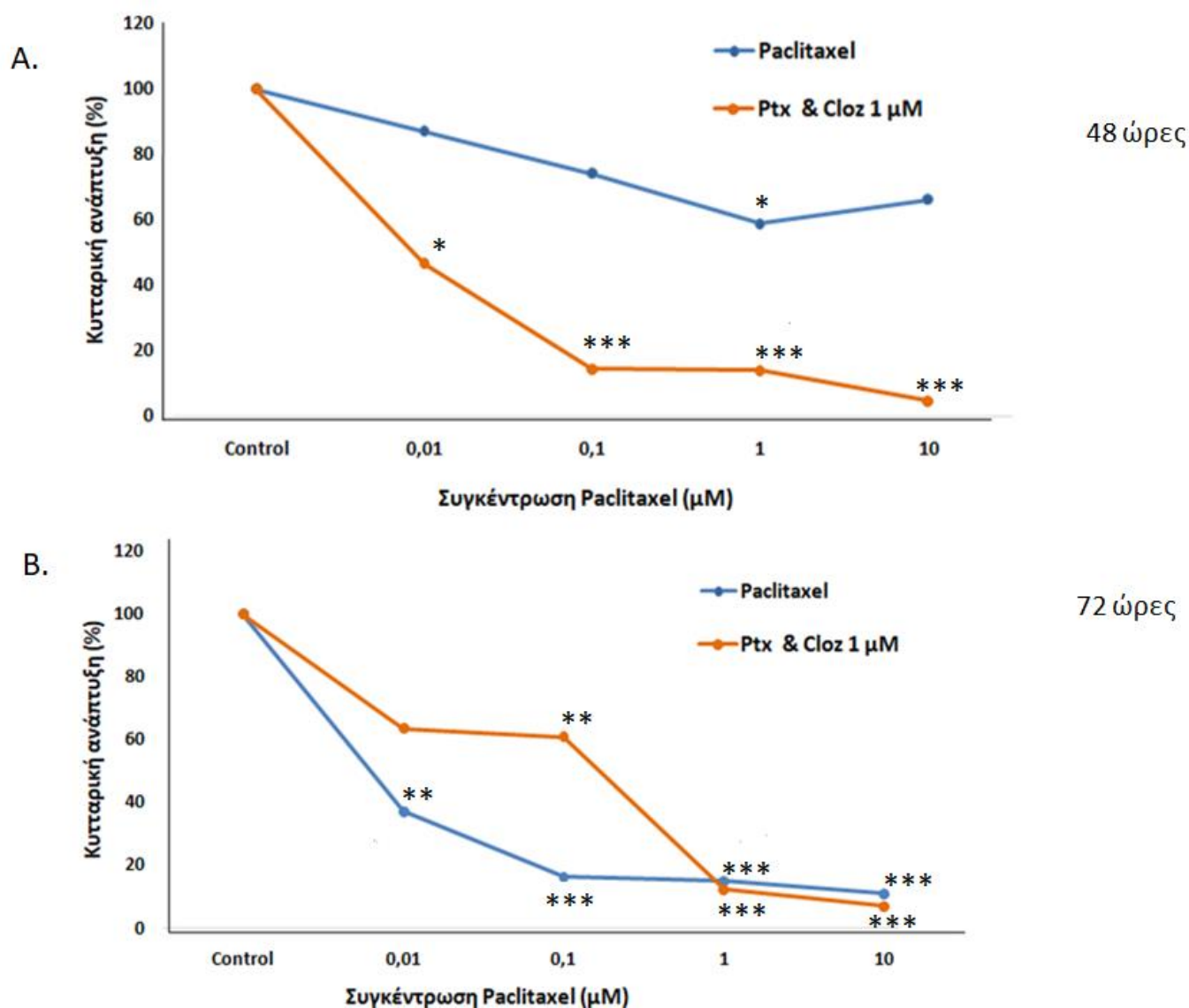
Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της κλοζαπίνης όταν αυτή χορηγείται συνδυαστικά την σισπλατίνη. Στην περίπτωση αυτή το αντινεοπλασματικό ελέγχθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις, ενώ για την κλοζαπίνη επιλέχθηκε η χαμηλή συγκέντρωση του 1μM. Παρατηρούμε από το **Γράφημα 2.** πως τόσο η σισπλατίνη όσο και ο συνδυασμός αυτής με την κλοζαπίνη επιδρούν επίσης αρνητικά και με δοσοεξαρτώμενο τρόπο στην κυτταρική επιβίωση. Μάλιστα η χορήγηση του αντιψυχωσικού φαίνεται να ενισχύει την αντικαρκινική δράση της σισπλατίνης παρόλη τη

χαμηλή συγκέντρωση. Ίδια εικόνα παρουσιάζεται και για τα δύο διαστήματα επώασης. Αξιοσημείωτο είναι πως ήδη με 16μM σισπλατίνης σε συνδυασμό με 1μM κλοζαπίνη στις 48 ώρες επώασης, επέρχεται κυτταρικός θάνατος. Επιπλέον, οι τιμές του IC₅₀ για τη χορήγηση μόνο της πλατίνας στις 48 ώρες είναι 23μM, ενώ στις 72 ώρες 27μM. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μεταβολές των τιμών του IC₅₀ της πλατίνας, που όταν αυτή χορηγείται συνδυαστικά με την κλοζαπίνη οι τιμές μειώνονται σημαντικά σε 7μM και 9μM αντίστοιχα.



Γράφημα 2. Επιβίωση της κυτταρικής σειράς A549 μετά από επώαση με σισπλατίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις (πορτοκαλί καμπύλη) και με σισπλατίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις συνδυαστικά με κλοζαπίνη 1μM (καφέ καμπύλη), για χρονικό διάστημα **A:** 48ώρες, **B:** 72 ώρες. Η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου που εκτέθηκε για ίδια χρονικά διαστήματα και συνθήκες σε φυσιολογικό ορό. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. Η στατική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με student's test.

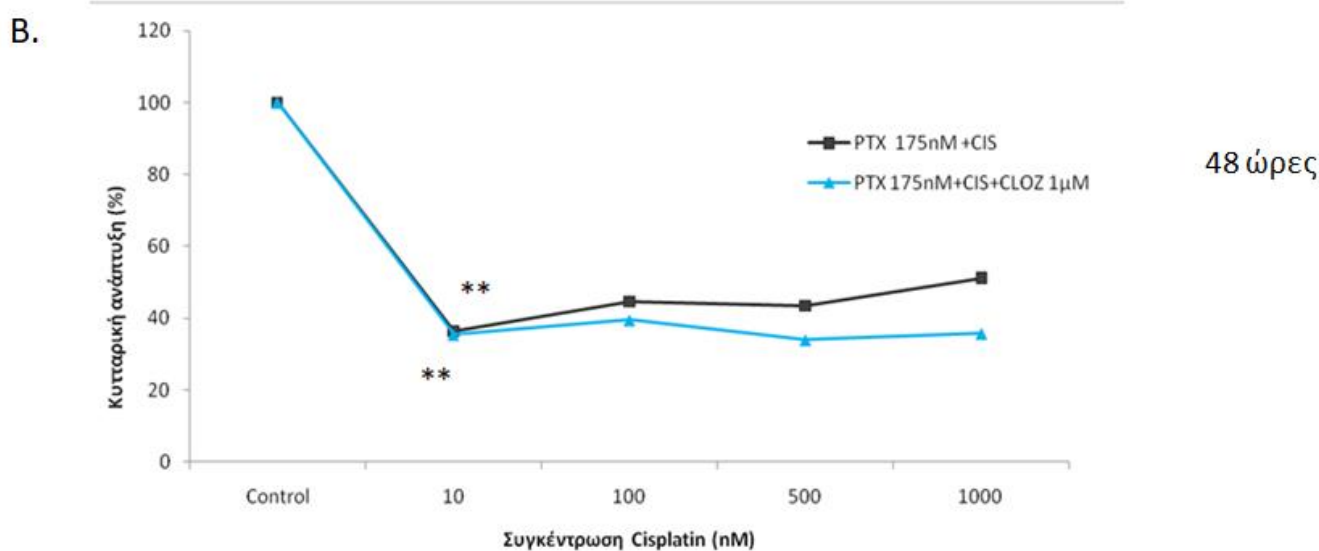
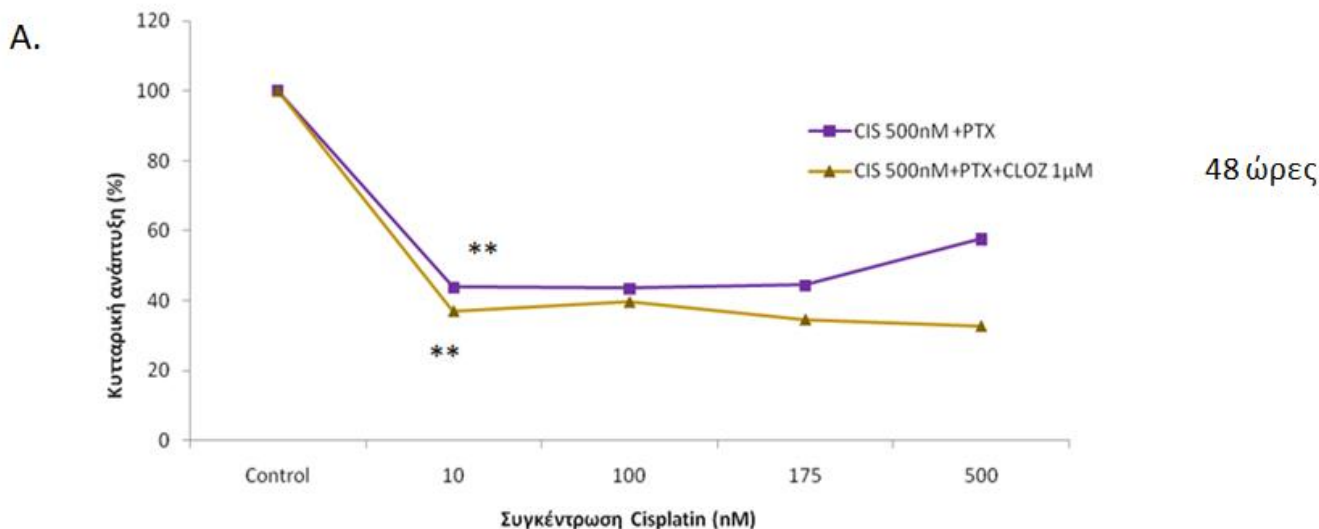
Η ίδια διερεύνηση πραγματοποιήθηκε και με το αντινεοπλασματικό πακλιταξέλη. Από το **Γράφημα 3**, αποδεικνύεται η αρνητική επίδραση και αυτού του αντικαρκινικού φαρμάκου στην κυτταρική επιβίωση των A549 αλλά αυτή τη φορά είναι ηπιότερη. Για το διάστημα των 48 ωρών ωστόσο, όταν τα κύτταρα επωάζονται με πακλιταξέλη και κλοζαπίνη 1μM, η αρνητική επίδραση αυξάνεται σημαντικά. Στις 72 ώρες η προσθήκη κλοζαπίνης δεν επιφέρει πιο έντονη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με την πακλιταξέλη ως μονοθεραπεία, ιδιαίτερα για μικρές συγκεντρώσεις του αντινεοπλασματικού. Ακόμα, η τιμή IC₅₀ για την πακλιταξέλη ως μονοθεραπεία υπολογίζεται στα 100μM για τις 48 ώρες και στα 0,01μM για τις 72 ώρες. Μετά την προσθήκη της κλοζαπίνης στο σχήμα, η IC₅₀ της πακλιταξέλης μεταβάλλεται σε 14μM και 4μM αντίστοιχα.



Γράφημα 3. Επιβίωση της κυτταρικής σειράς A549 μετά από επώαση με πακλιταξέλη σε διάφορες συγκεντρώσεις (μπλε καμπύλη) και με πακλιταξέλη σε διάφορες συγκεντρώσεις συνδυαστικά με

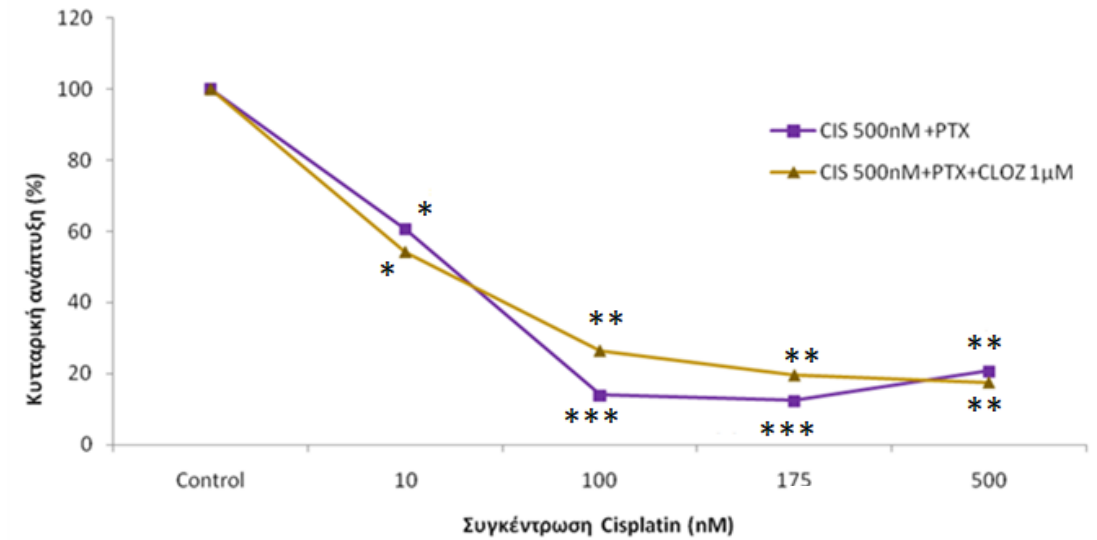
κλοζαπίνη 1 μ M (πορτοκαλί καμπύλη), για χρονικό διάστημα **A**: 48 ώρες, **B**: 72 ώρες. Η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου που εκτέθηκε για ίδια χρονικά διαστήματα και συνθήκες στον διαλύτη της πακλιταξέλης (0,7% CremoEL + 0,7% EtOH) μαζί με DMSO. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα. Η στατική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με student's test.

Τέλος, συγκρίθηκε η επίδραση του συνδυασμού και των τριών φαρμάκων με τη περίπτωση της επώασης με τα δύο αντινεοπλασματικά. Για το διάστημα των 48 ωρών, είτε κρατώντας σταθερή την συγκέντρωση του ενός αντινεοπλασματικού, είτε του άλλου όπως βλέπουμε στο **Γράφημα 4**. παρατηρείται έντονη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης ήδη από μικρές συγκεντρώσεις (10nM). Ωστόσο, το παράδοξο εδώ είναι πως η επίδραση αυτή δεν μοιάζει να είναι δόσοεξαρτώμενη. Επιπλέον, η προσθήκη κλοζαπίνης δεν φαίνεται να επιδρά σημαντικά στην κυτταρική αναστολή. Το ίδιο μοτίβο ακολουθείται και στο διάστημα των 72 ωρών. Η διαφορά σε σχέση με τις 48 ώρες είναι πως στην περίπτωση όπου είναι σταθερή η συγκέντρωση της σισπλατίνης (500nM), με την προσθήκη κλοζαπίνης δεν αυξάνεται η αρνητική επίδραση στην κυτταρική επιβίωση. Αντίθετα, στην περίπτωση που κρατάμε σταθερή την πακλιταξέλη και μεταβάλλουμε την σισπλατίνη, με την προσθήκη του αντιψυχωσικού ενισχύεται η αναστολή του πολλαπλασιασμού, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 5**.



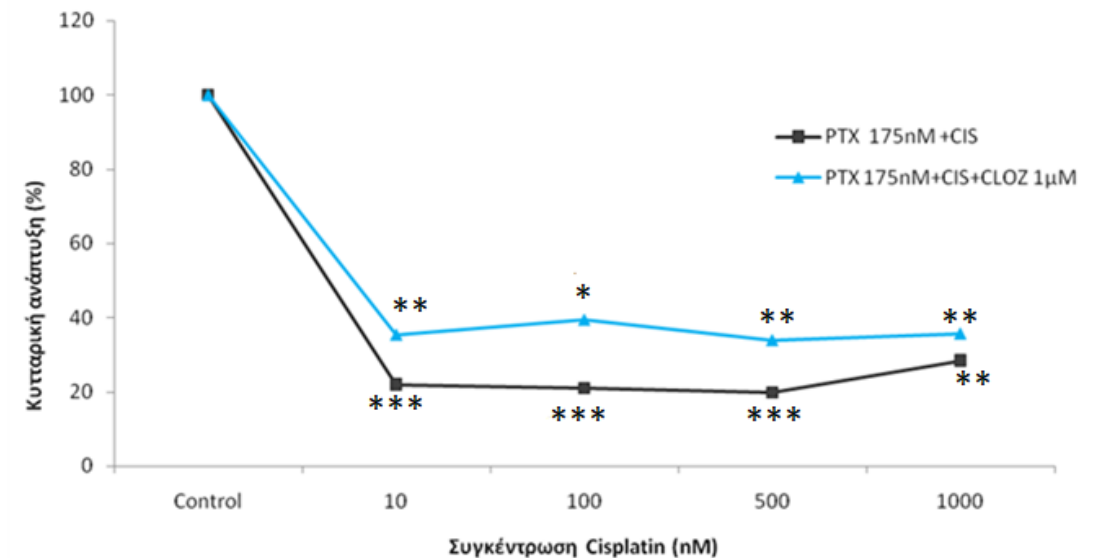
Γράφημα 4. Επιβίωση της κυτταρικής σειράς A549 μετά από επώαση για 48 ώρες **A:** με πακλιταξέλη σε διάφορες συγκεντρώσεις (μωβ καμπύλη) και σισπλατίνη 500nM καθώς και με πακλιταξέλη σε διάφορες συγκεντρώσεις συνδυαστικά με κλοζαπίνη 1μM και με σισπλατίνη 500nM (κίτρινη καμπύλη), **B:** με σισπλατίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις (γκρι καμπύλη) και πακλιταξέλη 175nM καθώς και με σισπλατίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις συνδυαστικά με κλοζαπίνη 1μM και με πακλιταξέλη 175nM (γαλάζια καμπύλη). Η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου που εκτέθηκε για ίδια χρονικά διαστήματα και συνθήκες στον διαλύτη της πακλιταξέλης (0,7% CremoE1 + 0,7% EtOH) μαζί με DMSO και φυσιολογικό ορό. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. Η στατική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με student's test.

A.



72 ώρες

B.



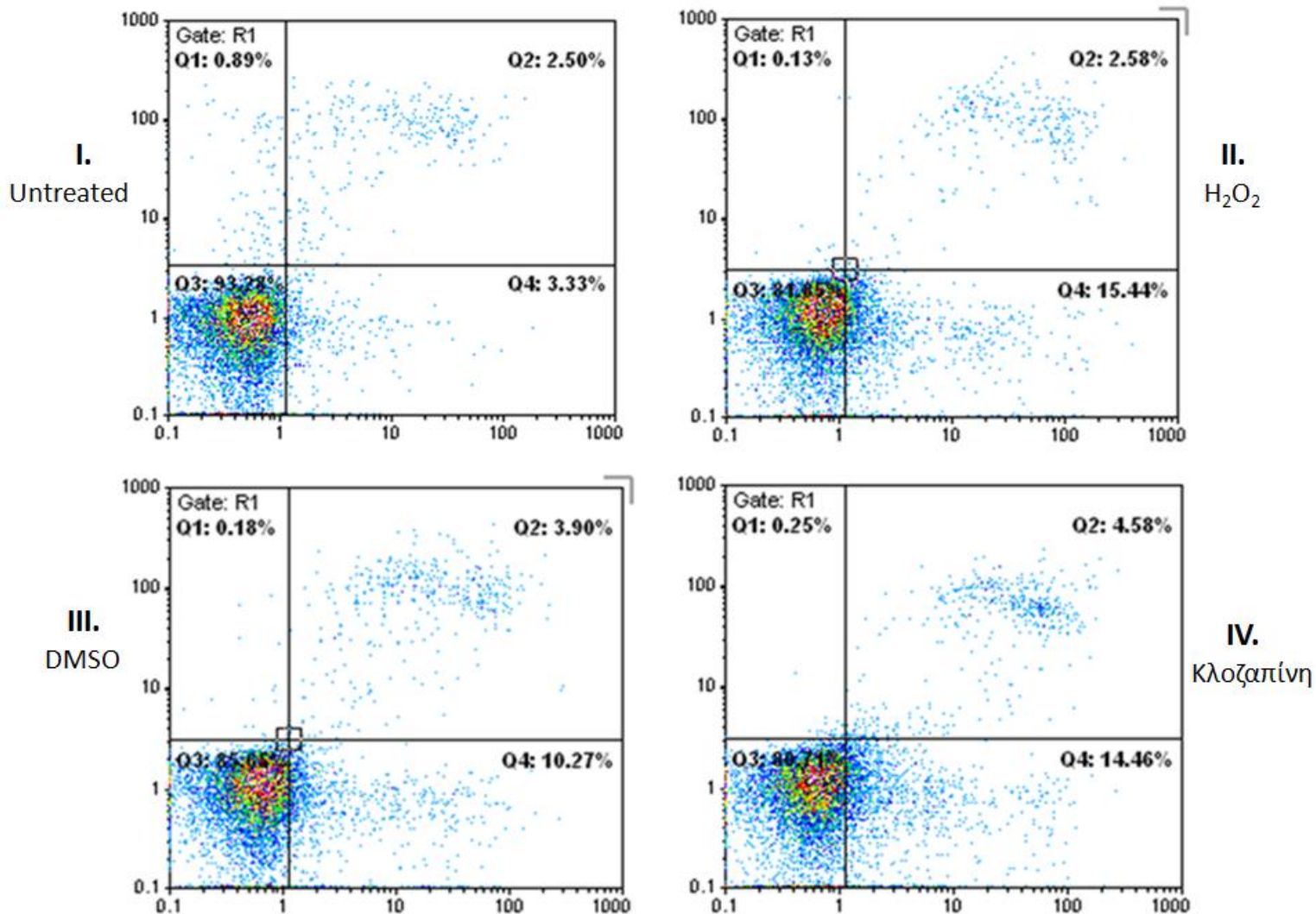
72 ώρες

Γράφημα 5. Επιβίωση της κυτταρικής σειράς A549 μετά από επώαση για 72 ώρες **A:** με πακλιταξέλη σε διάφορες συγκεντρώσεις (μωβ καμπύλη) και σισπλατίνη 500nM καθώς και με πακλιταξέλη σε διάφορες συγκεντρώσεις συνδυαστικά με κλοζαπίνη 1µM και με σισπλατίνη 500nM (κίτρινη καμπύλη), για 72 ώρες **B:** με σισπλατίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις (γκρι καμπύλη) και πακλιταξέλη 175nM καθώς και με σισπλατίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις συνδυαστικά με κλοζαπίνη 1µM και με πακλιταξέλη 175nM (γαλάζια καμπύλη). Η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου που εκτέθηκε για ίδια χρονικά διαστήματα και συνθήκες στον διαλύτη της πακλιταξέλης (0,7% CremoEl + 0,7% EtOH) μαζί με DMSO και φυσιολογικό ορό. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. Η στατική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με student's test

8.2. Αξιολόγηση της επίδρασης της κλοζαπίνης στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων A549 (με κυτταρομετρία ροής - πρωτόκολλο AnnexinV- PI)

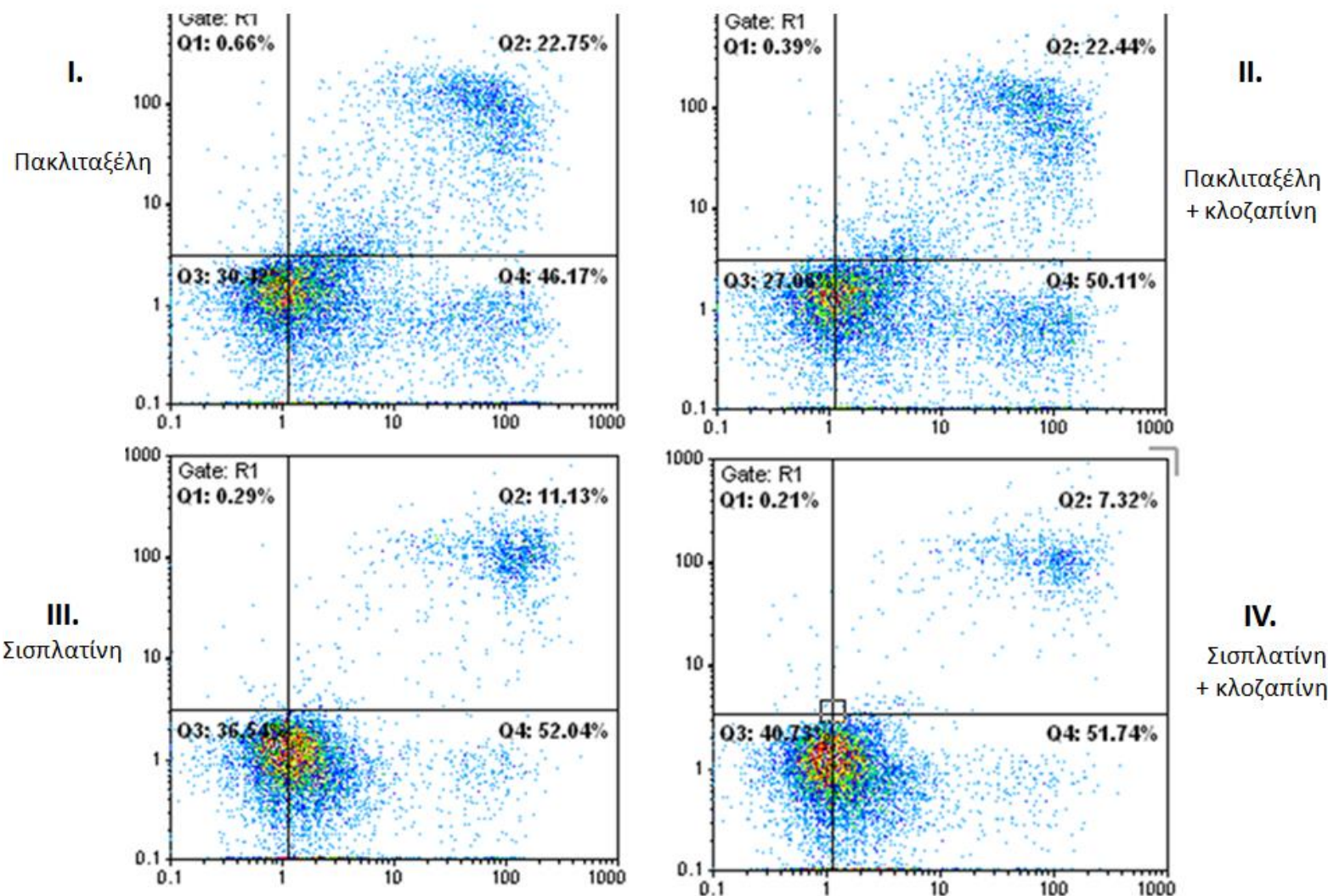
Από τη δοκιμασία SRB είναι φανερή η μείωση του κυτταρικού πληθυσμού (A549) μετά από την έκθεση τους σε κλοζαπίνη. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η επαγωγή της απόπτωσης από το άτυπο αντιψυχωσικό. Για τη μελέτη αυτής της υπόθεσης, κύτταρα A549 που επώαστηκαν με 5μM κλοζαπίνη, για 48 ώρες αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (πρωτόκολλο AnnexinV- PI). Όπως ήδη έχει αναφερθεί τα κύτταρα που αποπίπτουν διακρίνονται από τα ζωντανά και τα νεκρά ως προς την ιδιότητα τους να δεσμεύουν την Αννεξίνη. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας παραθέτονται στα παρακάτω γραφήματα.

Για τη μελέτη της πιθανής δράσης της κλοζαπίνης στη ρύθμιση των μηχανισμών του κυτταρικού θανάτου, έγινε καταρχάς σύγκριση με τρεις ομάδες ελέγχου. Όπως φαίνεται στο παρακάτω **Γράφημα 6**, τα κύτταρα που δεν υφίστανται έκθεση σε καμία ουσία παρουσιάζουν συνολικό ποσοστό απόπτωσης 5,83%. Ως δεύτερη ομάδα ελέγχου επιλέχθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν για 8 ώρες με H₂O₂. Το H₂O₂ είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι επάγει την απόπτωση. Το συνολικό ποσοστό της απόπτωσης σε αυτή την περίπτωση ήταν 18,02%. Η τελευταία ομάδα ελέγχου ήταν αυτή των κυττάρων που εκτέθηκαν για 48 ώρες σε DMSO. Η ένωση αυτή είναι ένας κοινός οργανικός διαλύτης και χρησιμοποιήθηκε για τη διαλυτοποίηση της κλοζαπίνης. Σε αυτή την ομάδα το συνολικό ποσοστό απόπτωσης ήταν 14,17%. Η τελευταία ομάδα είναι τα κύτταρα που επώαστηκαν 48 ώρες με 5μM κλοζαπίνη. Το ποσοστό σε αυτή την περίπτωση φτάνει το 19,04%. Το γεγονός πως το συνολικό ποσοστό απόπτωσης κλοζαπίνη ξεπερνάει εκείνο με H₂O₂ επιβεβαιώνει την υπόθεση της πιθανής αποπτωτικής δράσης του συγκεκριμένου αντιψυχωσικού.



Γράφημα 6. Διαγραμματική μελέτη της απόπτωσης με το πρωτόκολλο της Αννεξίνης (AnnexinV) PI σε μορφή dotplot. **I.** κύτταρα A549 χωρίς να έχουν υποστεί έκθεση σε κάποια ουσία (untreated), **II.** κύτταρα A549 μετά από 8 ώρες επώαση με H₂O₂, **III.** κύτταρα A549 μετά από 48 ώρες επώαση με DMSO, **IV.** κύτταρα A549 μετά από 48 ώρες επώαση με 5μM κλοζαπίνη. Τα ποσοστά υπολογίστηκαν επί του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Όπου **Q1:** Νέκρωση, PI (+) και AnnexinV-FITC (-) **Q2:** Όψιμη απόπτωση, PI (+) και AnnexinV-FITC (+) **Q3:** Ζωντανά κύτταρα, PI (-) και AnnexinV-FITC (-), **Q4:** Πρώιμη απόπτωση, PI (-) και AnnexinV-FITC (+).

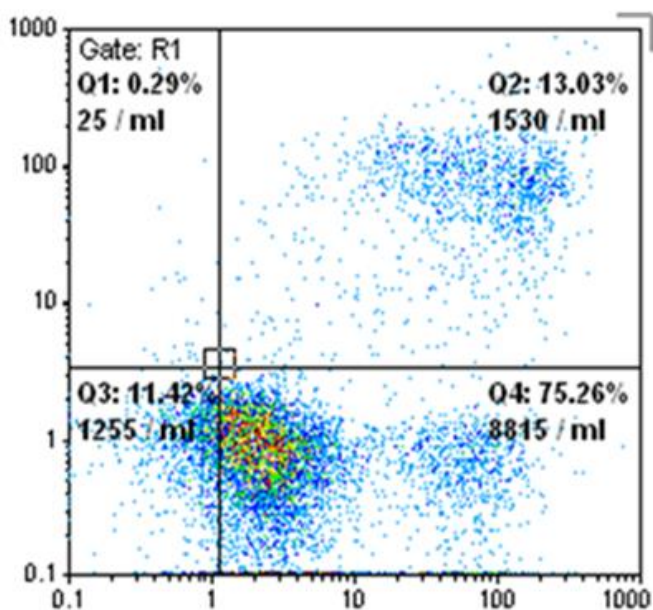
Στη συνέχεια μελετήθηκε η αποπτωτική δράση των αντινεοπλασματικών: πακλιταξέλη και σισπλατίνη ως μονοθεραπείες αλλά και σε συνδυασμό με την κλοζαπίνη. Όπως είναι αναμενόμενο τα δύο αντινεοπλασματικά επάγουν σημαντικά την απόπτωση στα κύτταρα A549. Πιο συγκεκριμένα από το **Γράφημα 7.** φαίνεται πως μετά από 48 ώρες επώαση με πακλιταξέλη το συνολικό ποσοστό απόπτωσης φτάνει το 68,92%. Συνδυαστικά μάλιστα με την κλοζαπίνη αυξάνεται φτάνοντας το 72,55%. Στην περίπτωση της σισπλατίνης το ποσοστό της απόπτωσης υπολογίζεται σε 63,17%, ενώ συνδυαστικά με την κλοζαπίνη μεταβάλλεται οριακά φτάνοντας το 59,06%. Μαζί με την πακλιταξέλη η κλοζαπίνη επιδρά θετικά στην επαγωγή της απόπτωσης, ωστόσο η αύξηση του ποσοστού δεν θεωρείται σημαντική.



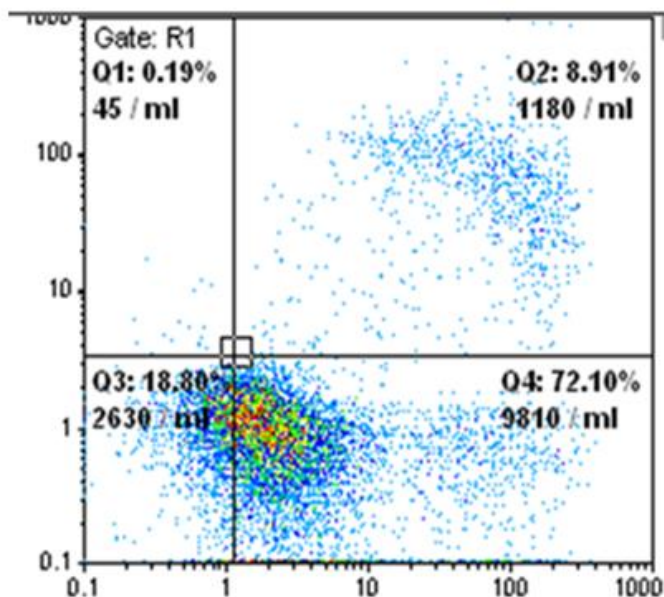
Γράφημα 7. Διαγραμματική μελέτη της απόπτωσης με το πρωτόκολλο της Αννεξίνης (AnnexinV) PI σε μορφή dotplot. **I.** κύτταρα A549 μετά από 48 ώρες επώαση με 0,1μM πακλιταξέλη, **II.** κύτταρα A549 μετά από 48 ώρες επώαση με 0,1μM πακλιταξέλη και με 5μM κλοζαπίνη, **III.** κύτταρα A549 μετά από 48 ώρες επώαση με 16μM σισπλατίνη, **IV.** κύτταρα A549 μετά από 48 ώρες επώαση με 16μM σισπλατίνη και με 5μM κλοζαπίνη. Τα ποσοστά υπολογίστηκαν επί του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Όπου **Q1:** Νέκρωση, PI (+) και AnnexinV-FITC (-) **Q2:** Όψιμη απόπτωση, PI (+) και AnnexinV-FITC (+) **Q3:** Ζωντανά κύτταρα, PI (-) και AnnexinV-FITC (-), **Q4:** Πρώιμη απόπτωση, PI (-) και AnnexinV-FITC (+).

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση που έχει η χορήγηση των δύο αντινεοπλασματικών μαζί, αφού αποτελεί σύνηθες θεραπευτικό σχήμα στον καρκίνο του πνεύμονα (όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 5.1.8.), αλλά και ο συνδυασμός των δύο αντινεοπλασματικών και με την κλοζαπίνη. Για την πρώτη περίπτωση όπως παρουσιάζεται στο **Γράφημα 8.** το συνολικό ποσοστό της απόπτωσης είναι 88,29%. Ωστόσο, όταν προστίθεται και κλοζαπίνη το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 81,01% καταδεικνύοντας πιθανότατα ότι η επίδραση του αντιψυχωσικού είναι αμελητέα συγκριτικά με εκείνη των δύο αντινεοπλασματικών.

I. Πακλιταξέλη + σισπλατίνη



II. Πακλιταξέλη + σισπλατίνη + κλοζαπίνη



Γράφημα 8. Διαγραμματική μελέτη της απόπτωσης με το πρωτόκολλο της Αννεξίνης (AnnexinV) PI σε μορφή dotplot. **I.** κύτταρα A549 μετά από 48 ώρες επώαση με 0,1μM πακλιταξέλη και με 16μM σισπλατίνη, **II.** κύτταρα A549 μετά από 48 ώρες επώαση με 16μM σισπλατίνη, με 0,1μM πακλιταξέλη και με 5μM κλοζαπίνη. Τα ποσοστά υπολογίστηκαν επί του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Όπου **Q1:** Νέκρωση, PI (+) και AnnexinV-FITC (-) **Q2:** Όψιμη απόπτωση, PI (+) και AnnexinV-FITC (+) **Q3:** Ζωντανά κύτταρα, PI (-) και AnnexinV-FITC (-), **Q4:** Πρώιμη απόπτωση, PI (-) και AnnexinV-FITC (+).

8.3. Αλληλεπιδράσεις φαρμάκων

Σισπλατίνη(μM)		
	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
GI50	22,7	26,06
TGI	97,3	114
LC50	403,8	869,1

Πακλιταξέλη(μM)		
	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
GI50	100	0,01
TGI	0,02	0,01
LC50	0,02	0,02

Κλοζαπίνη(μM)		
	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
GI50	30,1	31,7
TGI	58,4	55,8
LC50	79,2	78,1

Σισπλατίνη + Κλοζαπίνη(μM)		
	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
GI50	7,11	8,99
TGI	14,2	27,3
LC50	44,6	45,6

Πακλιταξέλη + Κλοζαπίνη(μM)		
	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
GI50	14,48	3,84
TGI	21,99	12,26
LC50	29,50	20,68

Σισπλατίνη + Πακλιταξέλη(μM)		
	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
GI50	0,547	0,001
TGI	1,079	0,003
LC50	1,612	0,004

Πακλιταξέλη+ Σισπλατίνη(μM)		
	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
GI50	0,008	0,006
TGI	0,016	0,013
LC50	0,024	0,019

Σισπλατίνη + Πακλιταξέλη + Κλοζαπίνη(μM)		
	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
GI50	0,008	0,011
TGI	0,016	0,022
LC50	0,024	0,033

Πακλιταξέλη + Σισπλατίνη + Κλοζαπίνη(μM)		
	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
GI50	0,008	0,007
TGI	0,015	0,013
LC50	0,023	0,020

Για τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης των φαρμάκων χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$CI = C_{A,x}/IC_{x,A} + C_{B,x}/IC_{x,B}$$

- Για $CI < 1$ συνέργεια
- Για $CI > 1$ ανταγωνισμός

Οι τιμές CI αντιστοιχούν σε 50%μείωση του κυτταρικού πληθυσμού για τα A549

Όπου $C_{A,x}$, $C_{B,x}$: οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων, που επωάστηκαν τα κύτταρα συγχρόνως, για να επιτευχθεί το αποτέλεσμα x%.

Όπου $IC_{x,A}$, $IC_{x,B}$: οι συγκεντρώσεις των ίδιων φαρμάκων, που επωάστηκαν τα κύτταρα ως μονοθεραπείες, για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα x%.

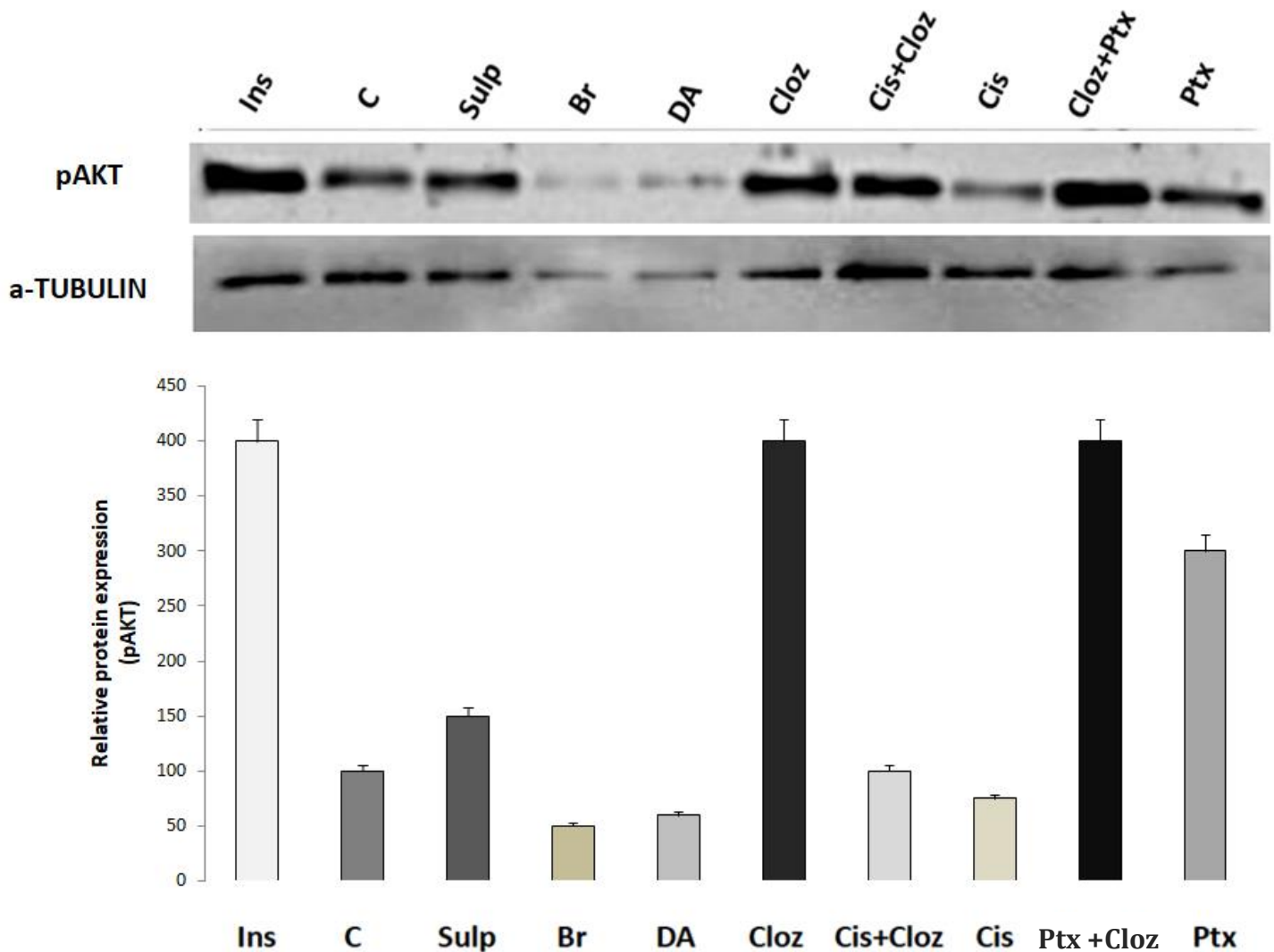
48 hrs			
	Σισπλατίνη + Κλοζαπίνη	Πακλιταξέλη + Κλοζαπίνη	Σισπλατίνη + Πακλιταξέλη
Τιμή CI	0,35	0,17	0,03
Αποτέλεσμα	Συνέργεια	Συνέργεια	Συνέργεια
	Πακλιταξέλη + Σισπλατίνη	Σισπλατίνη + Πακλιταξέλη + Κλοζαπίνη	Πακλιταξέλη + Σισπλατίνη + Κλοζαπίνη
Τιμή CI	0,002	0,06	0,03
Αποτέλεσμα	Συνέργεια	Συνέργεια	Συνέργεια

72 hrs			
	Σισπλατίνη + Κλοζαπίνη	Πακλιταξέλη + Κλοζαπίνη	Σισπλατίνη + Πακλιταξέλη
Τιμή CI	0,38	3,88	0,02
Αποτέλεσμα	Συνέργεια	Ανταγωνισμός	Συνέργεια
	Πακλιταξέλη + Σισπλατίνη	Σισπλατίνη + Πακλιταξέλη + Κλοζαπίνη	Πακλιταξέλη + Σισπλατίνη + Κλοζαπίνη
Τιμή CI	17,5	1,13	17,53
Αποτέλεσμα	Ανταγωνισμός	Ανταγωνισμός	Ανταγωνισμός

8.4. Αξιολόγηση της επίδρασης της κλοζαπίνης σε κύτταρα A549 στα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση

Για τη μελέτη της επίδρασης της κλοζαπίνης στην έκφραση των πρωτεϊνών στα κύτταρα A549 χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Western Blot. Αρχικά, A549 καρκινικά κύτταρα επιστρώθηκαν και επώαστηκαν με τους υπό εξέταση φαρμακολογικούς παράγοντες για 30λεπτά. Ο συγκεκριμένος χρόνος επώασης επιλέχθηκε, αφού από τη βιβλιογραφία αποδεικνύεται ότι σε αυτόν πραγματοποιούνται οι περισσότερες φωσφορυλιώσεις (107),(108). Αφού έγιναν πιλοτικές μελέτες, τα φάρμακα που μελετήθηκαν ήταν η σουλπιδίδη και η κλοζαπίνη σε συγκεντρώσεις 5μM, η πακλιταξέλη 0,1μM, η σισπλατίνη 16μM, η ντοπαμίνη, η βρωμοκρυπτίνη και η ινσουλίνη σε συγκεντρώσεις 10nM. Εν συνεχεία, σύμφωνα με πρωτόκολλο που επιλέχθηκε από τη βιβλιογραφία (109), απομονώθηκαν οι ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες και τα δείγματα φορτώθηκαν σε ειδικές πηκτές, διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση, επώαστηκαν με τα κατάλληλα αντισώματα και εμφανίστηκαν σε ειδικές μεμβράνες με τεχνικές ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Image J. Η ποσότητα των πρωτεϊνών που φορτώθηκαν ανά δείγμα ήταν 8μg, ενώ για την αποφυγή σφαλμάτων ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η α-TUBULIN, που εκφράζεται ισομερώς, φυσιολογικά στα κύτταρα.

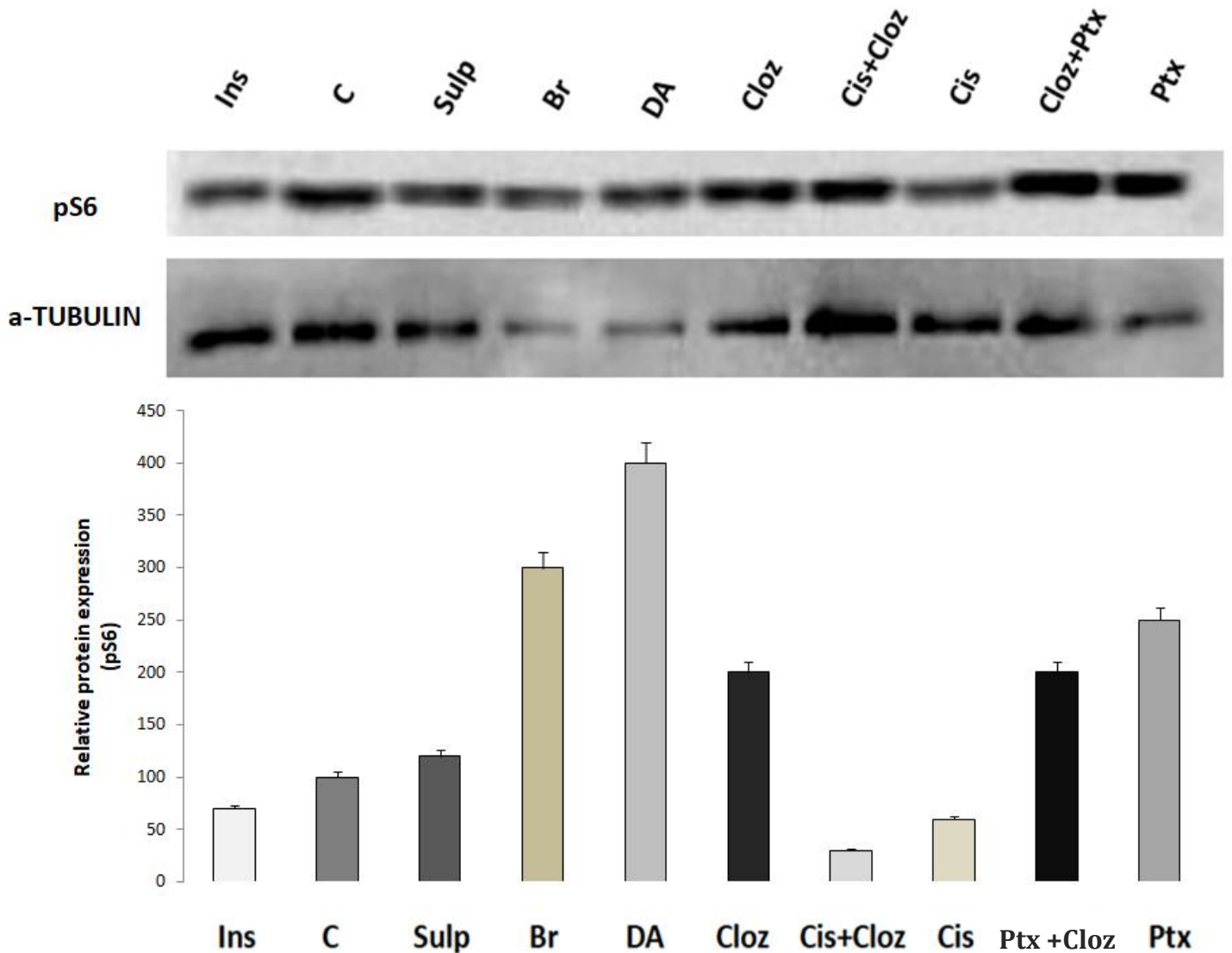
8.4.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT



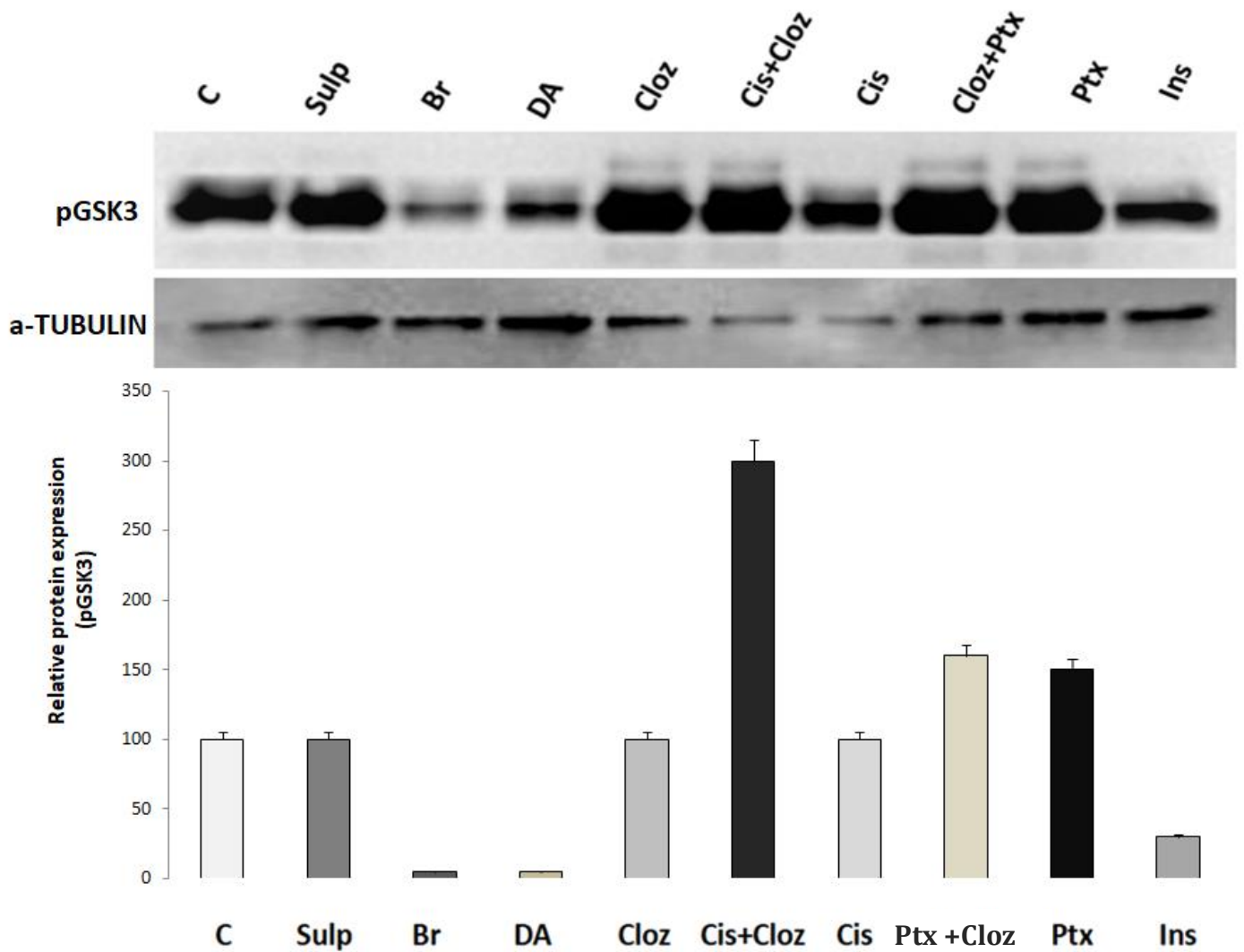
Γράφημα 9. Σχετικά επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης AKT σε ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων A549 μετά από 30λεπτά έκθεσης τους στους παραπάνω φαρμακολογικούς παράγοντες: ομάδα ελέγχου (C), σουλπιρίδη (Sulp), βρωμοκρυπτίνη (Br), ντοπαμίνη (DA), κλοζαπίνη (Cloz), σισπλατίνη (Cis), πακλιταξέλη (Ptx), ινσουλίνη (Ins). Στατιστική διόρθωση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αναφοράς α -TUBULIN.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 9**, η έκθεση των A549 σε ινσουλίνη αυξάνει σημαντικά τη φωσφορυλίωση της AKT σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επαγωγή της φωσφορυλίωσης της AKT προκαλεί και η σουλπιρίδη, ενώ αντίθετα η βρωμοκρυπτίνη και η ντοπαμίνη αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της. Η κλοζαπίνη επίσης προκαλεί σημαντική αύξηση της φωσφορυλιωμένης AKT ως μονοθεραπεία, καθώς και συνδυαστικά με την πακλιταξέλη. Την ίδια εικόνα ακολουθεί και η πακλιταξέλη ως μονοθεραπεία. Αντίθετα, η κλοζαπίνη σε συνδυασμό με τη σισπλατίνη οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης AKT, όπως και η σισπλατίνη.

Καθοδικά της pAKT βρίσκουμε τηpS6. Από το **Γράφημα 10**, φαίνεται ότι η ινσουλίνη αναστέλλει την έκφραση της φωσφορυλιωμένης S6, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Σε αντίθεση η σουλπιρίδη, η βρωμοκρυπτίνη, η ντοπαμίνη και η κλοζαπίνη επάγουν τη φωσφορυλίωση της S6 στα κύτταρα A549. Επίσης επαγωγή της φωσφορυλιωμένης S6 προκαλούν η κλοζαπίνη συνδυαστικά με την πακλιταξέλη και η πακλιταξέλη. Από την άλλη πλευρά η κλοζαπίνη συνδυαστικά με τη σισπλατίνη και η σισπλατίνη ως μονοθεραπεία αναστέλλουν τη PS6.

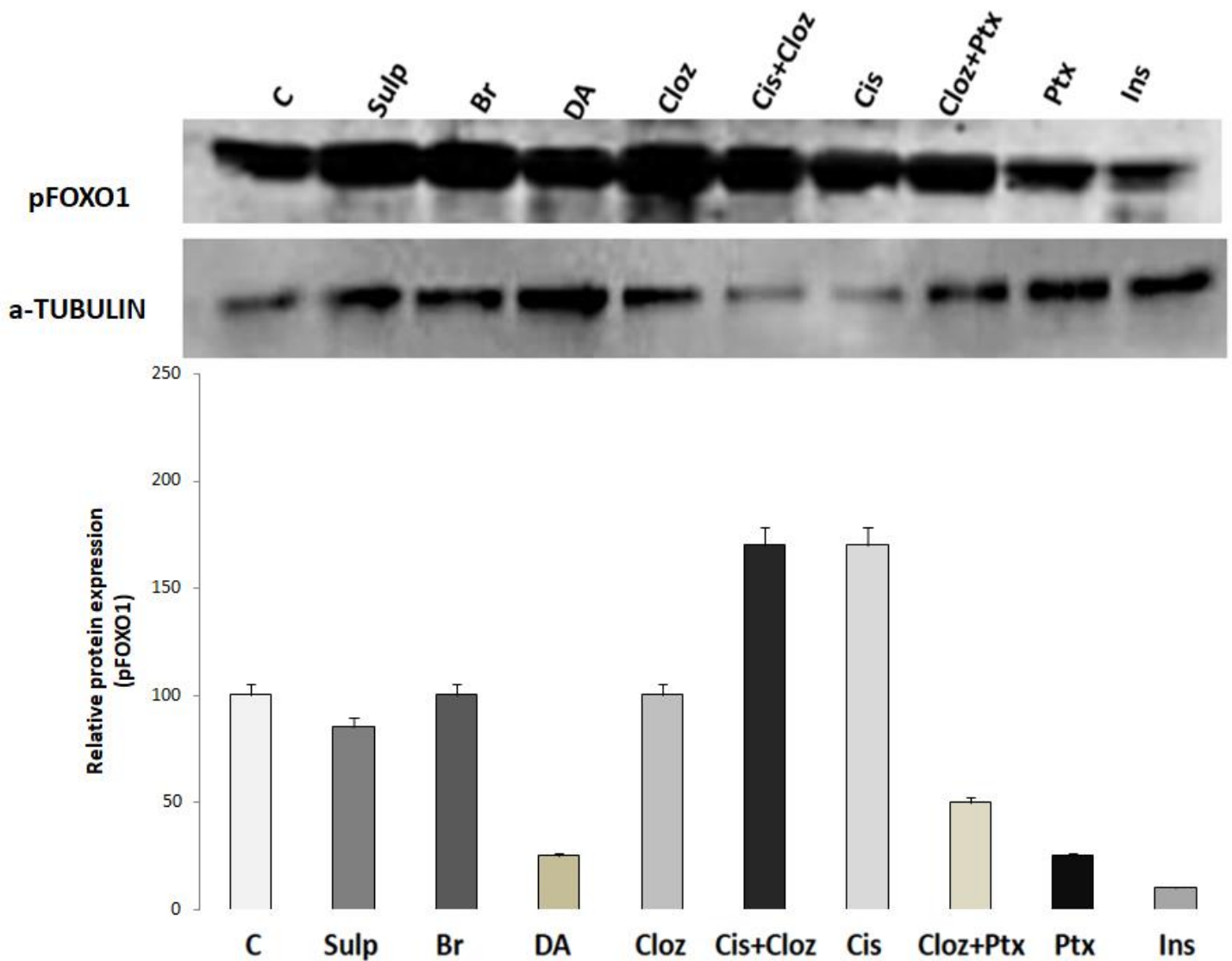


Γράφημα 10. Σχετικά επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης S6 σε ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων A549 μετά από 30λεπτά έκθεσης τους στους παραπάνω φαρμακολογικούς παράγοντες: ομάδα ελέγχου (C), σουλπιρίδη (Sulp), βρωμοκρυπτίνη (Br), ντοπαμίνη (DA), κλοζαπίνη (Cloz), σισπλατίνη (Cis), πακλιταξέλη (PtX), ινσουλίνη (Ins). Στατιστική διόρθωση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αναφοράς a-TUBULIN.



Γράφημα 11. Σχετικά επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης GSK3 σε ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων A549 μετά από 30λεπτά έκθεσης τους στους παραπάνω φαρμακολογικούς παράγοντες: ομάδα ελέγχου (C), σουλπιρίδη (Sulp), βρωμοκρυπτίνη (Br), ντοπαμίνη (DA), κλοζαπίνη (Cloz), σισπλατίνη (Cis), πακλιταξέλη (Ptx), ινσουλίνη (Ins). Στατιστική διόρθωση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αναφοράς a-TUBULIN.

Η φωσφορυλίωση της GSK3(Γράφημα 11.) φαίνεται να αναστέλλεται από την επώαση των κυττάρων με ινσουλίνη. Η σουλπιρίδη, όπως και η κλοζαπίνη δεν φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση της pGSK3, ενώ αντίθετα η βρωμοκρυπτίνη και η ντοπαμίνη την αναστέλλουν σημαντικά. Η κλοζαπίνη συνδυαστικά με τη σισπλατίνη, αλλά και με την πακλιταξέλη επάγουν την έκφραση της pGSK3. Η πακλιταξέλη ακολουθεί το ίδιο μοτίβο, της επαγωγής της φωσφορυλίωσης της pGSK3. Η σισπλατίνη ως μονοθεραπεία δεν φαίνεται να επηρεάζει τη ρύθμιση της pGSK3.

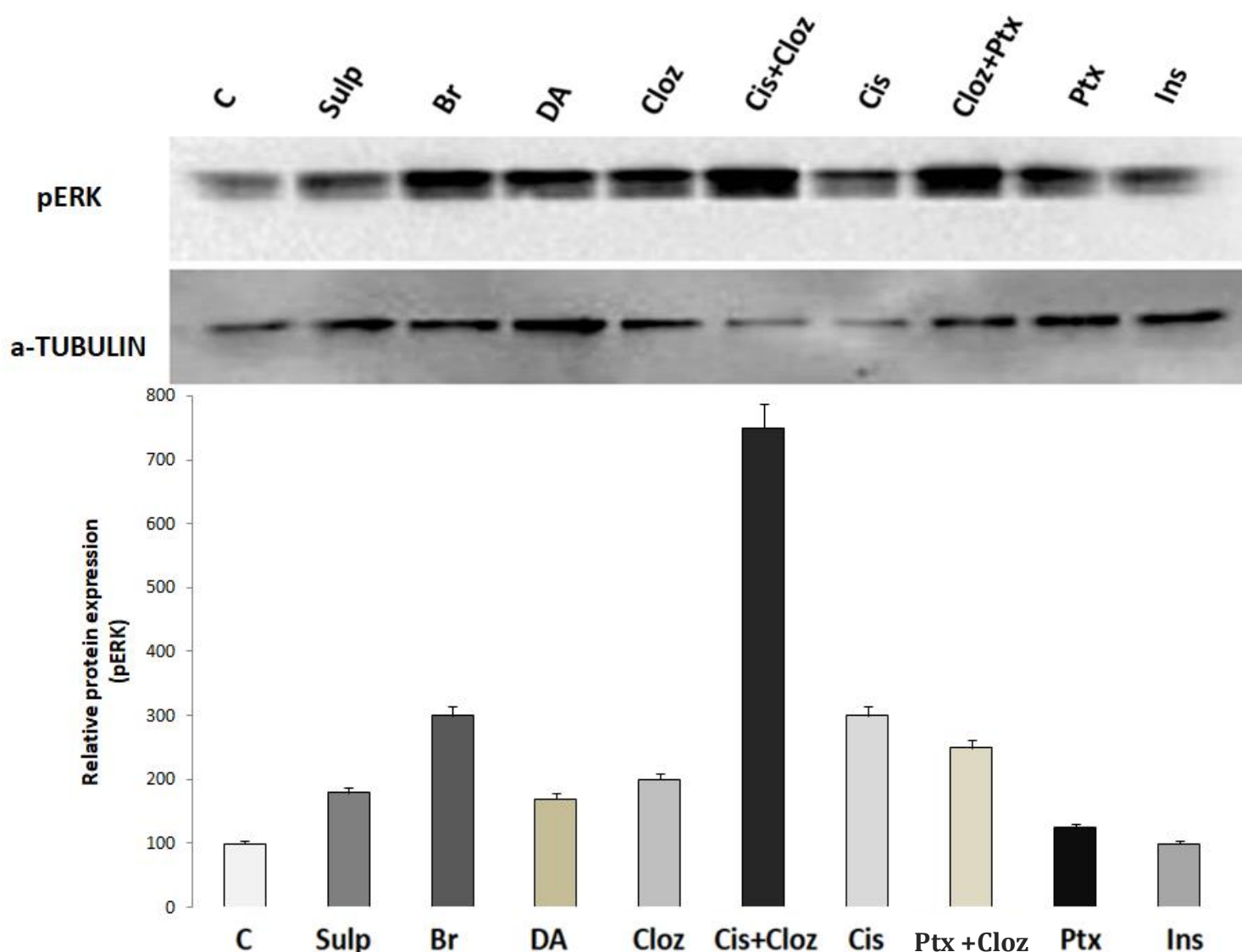


Γράφημα 12. Σχετικά επίπεδα έκφρασης του φωσφορυλιωμένου FOXO1 σε ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων A549 μετά από 30λεπτά έκθεσης τους στους παραπάνω φαρμακολογικούς παράγοντες: ομάδα ελέγχου (C), σουλπιρίδη (Sulp), βρωμοκρυπτίνη (Br), ντοπαμίνη (DA), κλοζαπίνη (Cloz), σισπλατίνη (Cis), πακλιταξέλη (Ptx), ινσουλίνη (Ins). Στατιστική διόρθωση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αναφοράς a-TUBULIN.

Όσον αφορά τον παράγοντα FOXO1 από το **Γράφημα 12**, φαίνεται πως η ινσουλίνη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του, στα κύτταρα A549. Επίσης αναστολή προκαλούν η σουλπιρίδη και η ντοπαμίνη, ενώ η βρωμοκρυπτίνη και η κλοζαπίνη δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη φωσφορυλίωση του FOXO1. Η κλοζαπίνη συνδυαστικά με την πακλιταξέλη αναστέλλει την έκφραση του pFOXO1, όπως και η πακλιταξέλη. Ακόμα, η κλοζαπίνη σε συνδυασμό με τη σισπλατίνη επάγει τη φωσφορυλίωση του FOXO1, όπως ακριβώς και η σισπλατίνη.

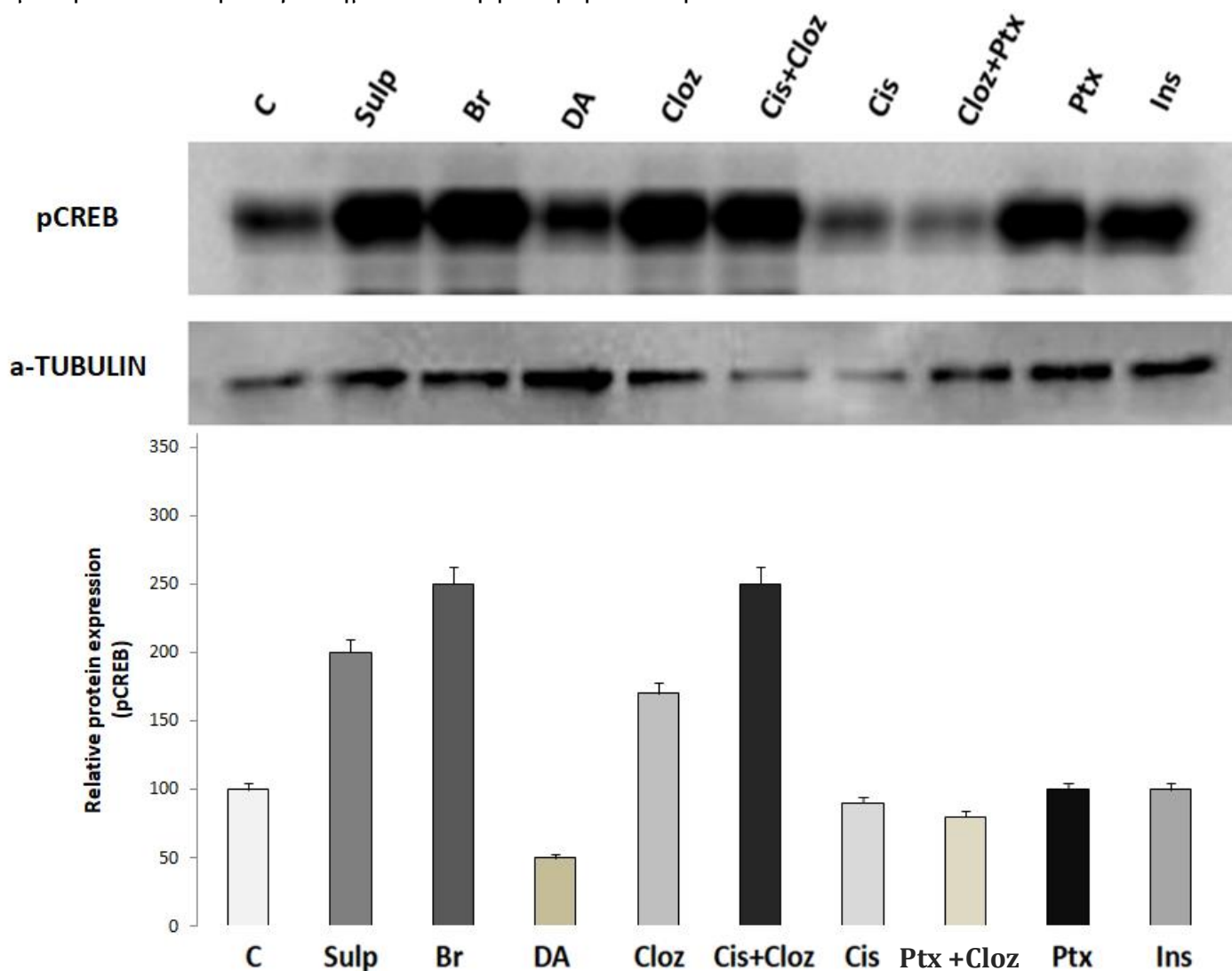
8.4.2. Σηματοδοτικό μονοπάτι MAP κινασών

Όσον αφορά το μονοπάτι των MAP κινασών αρχικά εξετάστηκε η ρύθμιση της έκφρασης της pERK. Η επώαση των κυττάρων A549 με ινσουλίνη δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα της pERK. Από την άλλη πλευρά, όλοι οι υπόλοιποι φαρμακολογικοί παράγοντες όπως η σουλπιρίδη, η βρωμοκρυπτίνη, η ντοπαμίνη, η κλοζαπίνη, η κλοζαπίνη με πακλιταξέλη, η πακλιταξέλη, η κλοζαπίνη και η κλοζαπίνη με σισπλατίνη φαίνεται να ενεργοποιούν την ERK. Μάλιστα η κλοζαπίνη συνδυαστικά με τη σισπλατίνη δίνει το πιο αυξημένο αποτέλεσμα, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 13**.



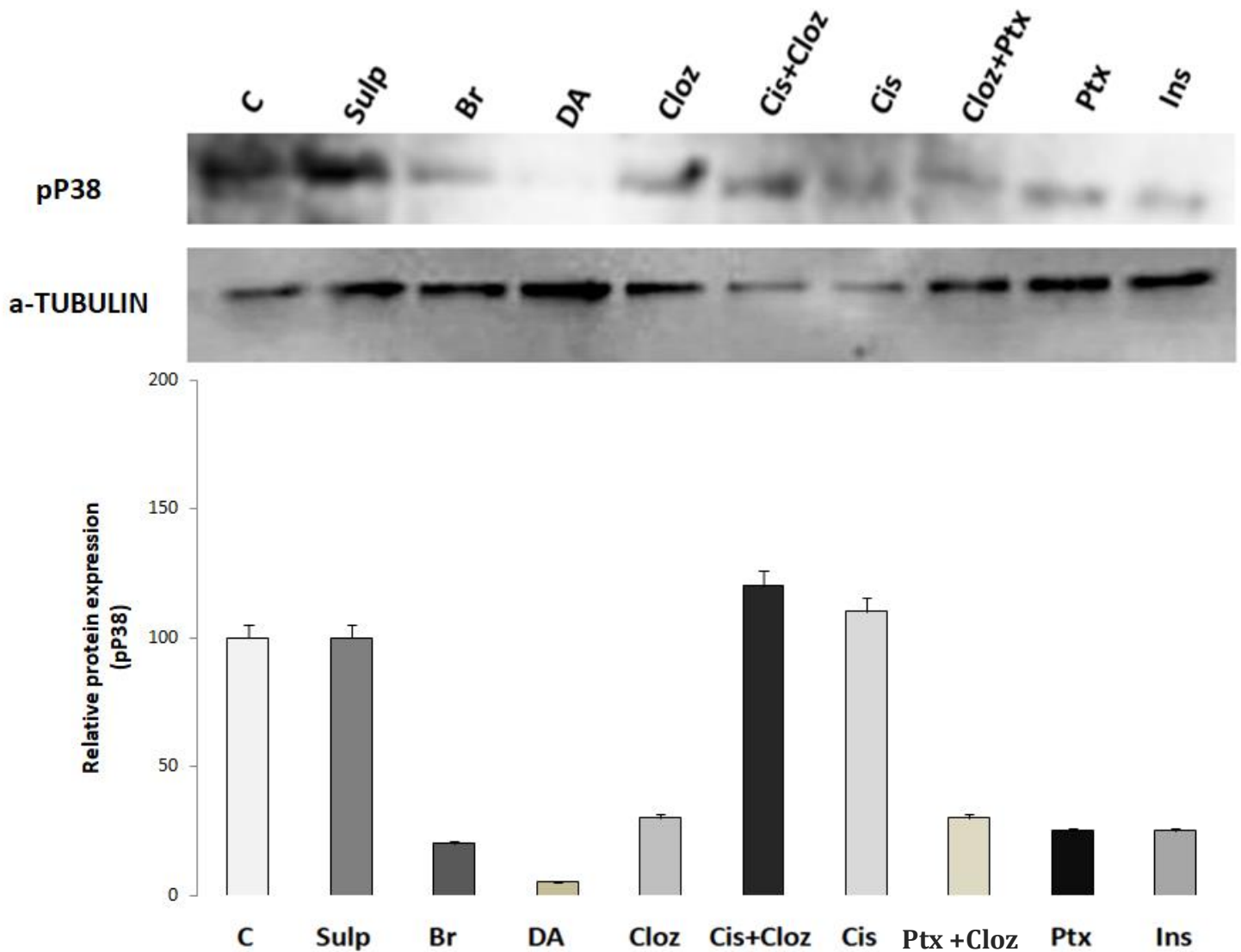
Γράφημα 13. Σχετικά επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης ERK σε ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων A549 μετά από 30λεπτά έκθεσης τους στους παραπάνω φαρμακολογικούς παράγοντες: ομάδα ελέγχου (C), σουλπιρίδη (Sulp), βρωμοκρυπτίνη (Br), ντοπαμίνη (DA), κλοζαπίνη (Cloz), σισπλατίνη (Cis), πακλιταξέλη (Ptx), ινσουλίνη (Ins). Στατιστική διόρθωση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αναφοράς a-TUBULIN.

Από το **Γράφημα 14**, η φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB μοιάζει να μην επηρεάζεται από την επώαση των κυττάρων A549 με ινσουλίνη. Η σουλπιρίδη όπως και η βρωμοκρυπτίνη επάγουν τη φωσφορυλίωση του CREB. Από την άλλη πλευρά η ντοπαμίνη φαίνεται να αναστέλλει τον pCREB. Η κλοζαπίνη επάγει την έκφραση του pCREB, ενώ η πακλιταξέλη δεν φαίνεται να την επηρεάζει σημαντικά. Η κλοζαπίνη συνδυαστικά με πακλιταξέλη και η σισπλατίνη ως μονοθεραπεία αναστέλλουν τον pCREB. Ακόμα, η κλοζαπίνη σε συνδυασμό με τη σισπλατίνη επάγει σημαντικά τη φωσφορυλίωση του CREB.



Γράφημα 14. Σχετικά επίπεδα έκφρασης του φωσφορυλιωμένου CREB σε ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων A549 μετά από 30λεπτά έκθεσης τους στους παραπάνω φαρμακολογικούς παράγοντες: ομάδα ελέγχου (C), σουλπιρίδη (Sulp), βρωμοκρυπτίνη (Br), ντοπαμίνη (DA), κλοζαπίνη (Cloz), σισπλατίνη (Cis), πακλιταξέλη (PtX), ινσουλίνη (Ins). Στατιστική διόρθωση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αναφοράς a-TUBULIN.

Η φωσφορυλίωση της P38 (Γράφημα 15.) αναστέλλεται από την ινσουλίνη. Η έκθεση των κυττάρων σε σουλπιρίδη δεν μεταβάλλει τα επίπεδα της pP38 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, η βρωμοκρυπτίνη, η ντοπαμίνη, η κλοζαπίνη, η κλοζαπίνη με πακλιταξέλη και η πακλιταξέλη αναστέλλουν την pP38. Αντιθέτως, η κλοζαπίνη με σισπλατίνη και η σισπλατίνη ενεργοποιούν την P38.



Γράφημα 15. Σχετικά επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης P38 σε ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων A549 μετά από 30λεπτά έκθεσης τους στους παραπάνω φαρμακολογικούς παράγοντες: ομάδα ελέγχου (C), σουλπιρίδη (Sulp), βρωμοκρυπτίνη (Br), ντοπαμίνη (DA), κλοζαπίνη (Cloz), σισπλατίνη (Cis), πακλιταξέλη (Ptx), ινσουλίνη (Ins). Στατιστική διόρθωση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αναφοράς a-TUBULIN.

9. Συζήτηση

Ο καρκίνος έχει χαρακτηριστεί ως η μάστιγα του αιώνα, καθώς τα ποσοστά των καρκινοπαθών αυξάνονται δραματικά παγκοσμίως, ανεξαρτήτως φύλλου και ηλικίας. Ο πιο συχνός τύπος καρκίνου, στον γενικό πληθυσμό, είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, που συνδέεται με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα. Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου είναι η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, όπως αυτές που εμπεριέχονται στον καπνό των τσιγάρων, η γενετική προδιάθεση, οι χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις, οι λοιμώξεις από ιούς, η παχυσαρκία και η έλλειψη άσκησης. Αξιοσημείωτο είναι πως επιδημιολογικές μελέτες αποδεικνύουν ότι οι καπνιστές παρουσιάζουν 10-30 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό, ενώ 1 στους 6 καπνιστές είναι βέβαιο πως θα νοσήσει μακροπρόθεσμα. Μάλιστα όσον αφορά το ενεργητικό κάπνισμα ο κίνδυνος αυξάνεται αναλογικά με την ποσότητα των ημερησίων τσιγάρων, την ηλικία έναρξης του καπνίσματος κ.α. (110).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization) ο καρκίνος του πνεύμονα έχει διακριθεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες, βάση παθολογοανατομικών κριτηρίων. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τον Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) και η δεύτερη τον Μη Μικροκυτταρικό (NSCLC). Ο Μη Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αφορά τη πλειονότητα των περιπτώσεων και ως βασικός παράγοντας κινδύνου εμφανίζεται το κάπνισμα. Η στρατηγική που ακολουθείται για την αντιμετώπιση της νόσου περιλαμβάνει την κλασσική αντινεοπλασματική αγωγή, χειρουργική αφαίρεση, ακτινοβολία και ανοσοθεραπεία. Παρόλο που τα ποσοστά επιβίωσης έχουν αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες δεν θεωρούνται ικανοποιητικά αφού η συγκεκριμένη μορφή είναι επιθετική και στις περισσότερες περιπτώσεις μεταστατική. Η εκτενέστερη έρευνα γύρω από νέα φάρμακα καθίσταται επιτακτική ανάγκη, με απώτερο σκοπό την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας, τη μείωση των παρενεργειών, αλλά και των φαινομένων αντίστασης(111).

Και ενώ τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως ολοένα και αυξάνουν, οι ερευνητές εδώ και δεκαετίες έχουν παρατηρήσει κάτι παράδοξο. Ο Mortensen το 1989 ήταν ο πρώτος που δημοσίευσε μελέτη, η οποία ανέφερε ότι οι άνδρες σχιζοφρενείς εμφανίζουν μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Το παράδοξο έγκειται στον ανθυγιεινό τρόπο ζωής που υιοθετούν οι συγκεκριμένοι ασθενείς, αφού τείνουν να καπνίζουν υπερβολικά στη πλειονότητα τους και μάλιστα διπλάσιο αριθμών τσιγάρων την ημέρα, συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό(112).

Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες έρχονται να ενισχύσουν τη παραπάνω θεωρία, υποστηρίζοντας πως τα αντιψυχωσικά που λαμβάνουν οι σχιζοφρενείς εμφανίζουν αντικαρκινική δράση. Πιο συγκεκριμένα, τα αντιψυχωσικά διακρίνονται ως προς τον μηχανισμό δράσης τους σε τυπικά και άτυπα. Τα τυπικά αντιψυχωσικά παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα και συγγένεια προς τους D₂ ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, ενώ τα άτυπα αντιψυχωσικά εμφανίζουν συγγένεια ως προς

τους σεροτονινεργικούς υποδοχείς 5-HT₂, αλλά ανταγωνίζονται ικανοποιητικά και τους D₂ υποδοχείς. (113).

Μελέτες που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων καθώς και δημοσιευμένες έρευνες αναφέρουν ότι ορισμένες κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα εκφράζουν τους D₂ ντοπαμινεργικούς υποδοχείς. Μάλιστα, η υπερέκφραση τους θεωρείται θετικός, προγνωστικός, βιολογικός δείκτης. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί πως οι ανταγωνιστές των D₂ υποδοχέων της ντοπαμίνης δρουν ως αναστολείς των κυτοχρωμάτων CYP1A1/2 και CYP1B1, ενζύμων που συμμετέχουν στη μεταβολική ενεργοποίηση σημαντικών ομάδων προκαρκινογόνων ενώσεων (114), (115).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω δεδομένα, αλλά και στα πλαίσια της επαναστόχευσης φαρμάκων, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η πιθανή αντικαρκινική δράση της κλοζαπίνης στην καρκινική κυτταρική σειρά A549. Η σειρά που επιλέχθηκε είναι κύτταρα Μη Μικροκυτταρικού Καρκίνου του Πνεύμονα (NSCLC). Η κλοζαπίνη συγκαταλέγεται στα άτυπα αντιψυχωσικά και διαθέτει ανταγωνιστική δράση ως προς τους D₂ υποδοχείς της ντοπαμίνης.

Αρχικά, ερευνήθηκε η επίδραση της κλοζαπίνης στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των A549. Τα κύτταρα επώαστηκαν για διαστήματα 48 και 72 ωρών και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν η δοκιμασία SRB. Από τα γραφήματα φαίνεται πως η κλοζαπίνη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε δόσεις από 5μM έως 100μM ενώ για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται και κυτταρικός θάνατος. Η δράση της κλοζαπίνης γίνεται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, με τη συγκέντρωση των 50μM να εμφανίζει τη μέγιστη κυτταροτοξικότητα. Από τη τιμή IC₅₀ που υπολογίστηκε στα 30μM και 32μM για τις 48 και 72 ώρες αντίστοιχα, συμπεραίνουμε ότι τα βέλτιστα αποτελέσματα λαμβάνονται στις 48ώρες επώασης.

Τα κύτταρα επώαστηκαν, υπό τις ίδιες συνθήκες, με τα αντνεοπλασματικά σισπλατίνη και πακλιταξέλη. Η δράση τους ήταν η αναμενομένη και για τα δύο διαστήματα επώασης. Φαίνεται και σε αυτή τη περίπτωση ότι η κυτταροτοξικότητα τους είναι δοσοεξαρτώμενη. Κατά την επώαση των κυττάρων με την σισπλατίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις και την κλοζαπίνη παράλληλα, στη χαμηλή συγκέντρωση του 1μM, προκύπτει σημαντική αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, συγκριτικά με την επώαση μόνο με σισπλατίνη. Έτσι έχουμε μείωση του IC₅₀ της σισπλατίνης από 23μM σε 7μM για τις 48 ώρες και από 26μM σε 9μM για τις 72ώρες. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει πως η προσθήκη της κλοζαπίνης αυξάνει την ισχύ της σισπλατίνης, γεγονός που υποδηλώνει συνέργεια, ενώ ταυτόχρονα επιβεβαιώνει την υπόθεση της κυτταροτοξικής δράσης της κλοζαπίνης στα καρκινικά κύτταρα.

Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και κατά την επώαση των κυττάρων με πακλιταξέλη σε συνδυασμό με κλοζαπίνη. Εδώ η κλίση των καμπυλών είναι μικρότερη, οπότε το αντίστοιχο φαρμακολογικό αποτέλεσμα επέρχεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της πακλιταξέλης. Επίσης, και σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση της κλοζαπίνης που δοκιμάστηκε ήταν 1μM. Επιπλέον, στις 72 ώρες η προσθήκη κλοζαπίνης στο φαρμακολογικό σχήμα δεν επιφέρει

σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικότητας συγκριτικά με τη πακλιταξέλη ως μονοθεραπεία. Εδώ η μεταβολή του IC₅₀ της πακλιταξέλης είναι από 100μM σε 14,48μM για τις 48 ώρες και από 0,01μM σε 4μM για τις 72ώρες. Στην πρώτη περίπτωση διαπιστώνουμε ότι υπάρχει συνέργεια, ενώ στη δεύτερη ανταγωνισμός μεταξύ των δύο φαρμάκων.

Στο πλαίσιο του συνδυασμού αντινεοπλασματικών φαρμάκων για τη θεραπεία διάφορων τύπων καρκίνου δημοσιεύονται μελέτες όπου συγκρίνουν θεραπευτικά σχήματα. Βασιζόμενοι σε μια τέτοια μελέτη για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα, εξετάστηκε η επώαση των κυττάρων με πακλιταξέλη, σισπλατίνη και κλοζαπίνη ταυτόχρονα, υπό τις ίδιες συνθήκες(116). Η συγκέντρωση της κλοζαπίνης ήταν σταθερά 1μM, ενώ των αντινεοπλασματικών μεταβάλλονταν εναλλάξ. Από τα γραφήματα παρατηρούμε ραγδαία μείωση του κυτταρικού πληθυσμού, αλλά αυτή τη φορά όχι με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η προσθήκη της κλοζαπίνης δεν επηρέασε σημαντικά το φαρμακολογικό αποτέλεσμα του συνδυασμού σισπλατίνης και πακλιταξέλης. Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις των φαρμάκων, για τις 48 ώρες τα τρία φάρμακα εμφανίζουν συνέργεια, ενώ στις 72 ώρες εμφανίζουν ανταγωνισμό. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στη σημαντική μεταβολή του IC₅₀ της πακλιταξέλης από 100μM σε 0,01μM για τις 48 και 72 ώρες αντίστοιχα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνάδουν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Αρκετές εργασίες αναφέρουν κυτταροτοξικότητα των αντιψυχωσικών στα καρκινικά κύτταρα(117). Η κλοζαπίνη επιδρά αρνητικά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καρκίνου του πνεύμονα, ενώ αξιοσημείωτη είναι η ενίσχυση της δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων (σισπλατίνη και πακλιταξέλη) που αυτή προκαλεί, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της είναι υπό διερεύνηση, ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι επάγει την αυτοφαγία σε κύτταρα NSCLC(118).

Στην προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού της κυτταροτοξικότητας που εμφανίζει η κλοζαπίνη στα A549, εξετάστηκε η πιθανή αποπτωτική της δράση. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες με κλοζαπίνη σε συγκέντρωση 5μM. Στη συνέχεια αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (πρωτόκολλο AnnexinV-PI). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου, είναι φανερό πως η κλοζαπίνη επάγει την απόπτωση στα A549.

Επιπλέον, τα κύτταρα επώαστηκαν με κλοζαπίνη συνδυαστικά με πακλιταξέλη καθώς και με σισπλατίνη. Όπως αναμέναμε, η επαγωγή της απόπτωσης και από τα δύο αντινεοπλασματικά ήταν σε αυξημένα επίπεδα (σε όλες τις περιπτώσεις έφτανε το 50% του αρχικού πληθυσμού). Η κλοζαπίνη δεν φαίνεται να επιδρά καθοριστικά, συγκριτικά με τα αποτελέσματα που παρουσίασαν τα αντινεοπλασματικά ως μονοθεραπείες, καθώς η προσθήκη της δεν αύξησε σημαντικά τα ποσοστά της απόπτωσης. Παρόλα αυτά σε συνδυασμό με την σισπλατίνη παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης, από αυτά με την πακλιταξέλη.

Η επώαση των κυττάρων με τον συνδυασμό των δύο αντινεοπλασματικών δίνει το μέγιστο αποτέλεσμα κυτταροτοξικότητας, επάγοντας την απόπτωση στο 88% του πληθυσμού. Σε αυτή τη περίπτωση η προσθήκη της κλοζαπίνης δεν προκαλεί κάποια αξιοσημείωτη διαφορά.

Εδώ και δύο δεκαετίες είναι γνωστό πως τα κλασικά αντιψυχωσικά επάγουν την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα. Χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της Αννεξίνης διαπιστώθηκε ότι και η κλοζαπίνη σε συγκέντρωση 5μM δρα αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγοντας την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα. Ωστόσο, συνιστάται η διενέργεια πειραμάτων κυτταρομετρίας σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα και σε διάφορες συγκεντρώσεις του αντιψυχωσικού για την εξαγωγή πιο ολοκληρωμένων συμπερασμάτων(119).

Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η πιθανή αντικαρκινική δράση της κλοζαπίνης σε επίπεδο κυτταρικής σηματοδότησης. Κύτταρα A549 επώαστηκαν για 30 λεπτά α) είτε με κλοζαπίνη μόνο, είτε με κλοζαπίνη και πακλιταξέλη, β) με πακλιταξέλη ή σισπλατίνη ή κλοζαπίνη και σισπλατίνη, ή ντοπαμίνη ή ινσουλίνη ή βρωμοκρυπτίνη. Η ντοπαμίνη επιλέχθηκε ως αγωνιστής των ντοπαμινεργικών υποδοχέων, η βρωμοκρυπτίνη ως ειδικός D₂-αγωνιστής, ενώ η ινσουλίνη ως ενεργοποιητής του μονοπατιού PI3K/AKT. Στη συνέχεια απομονώθηκαν οι ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων και ηλεκτροφορήθηκαν ακολουθώντας την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Εξετάστηκε η έκφραση πρωτεϊνών, που συμμετέχουν ή/και ρυθμίζουν μονοπάτια σχετιζόμενα με την καρκινογένεση, όπως το μονοπάτι της PI3K/AKT και των MAP κινασών.

Η ινσουλίνη ενεργοποίησε το μονοπάτι PI3K/AKT στα A549, και η δράση αυτή χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας. Είναι γνωστό πως η ινσουλίνη επάγει τη φωσφορυλίωση της AKT και επομένως, την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT. Αυτή η ενεργοποίηση έχει συσχετιστεί με την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την εμφάνιση μεταστατικών ιδιοτήτων αλλά και φαινομένων αντίστασης στα καρκινικά κύτταρα (120). Επίσης, ενεργοποίηση της AKT προκαλείται στα A549 με τα αντιψυχωσικά σουλπιρίδη και κλοζαπίνη. Αντιθέτως, οι αγωνιστές των ντοπαμινεργικών υποδοχέων, βρωμοκρυπτίνη και ντοπαμίνη, αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της AKT. Πολυάριθμες μελέτες επιβεβαιώνουν αυτά τα αποτελέσματα που αποδεικνύουν πως η έκθεση των κυττάρων σε κλοζαπίνη ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/AKT(121), (122). Η πακλιταξέλη επάγει την ενεργοποίηση της AKT και η προσθήκη κλοζαπίνης στην καλλιέργεια A549 αυξάνει ελαφρά αυτή την ενεργοποίηση.

Το φαινόμενο της ενεργοποίησης της AKT, μετά τη προσθήκη του αντινεοπλασματικού, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της προσπάθειας των κυττάρων να διατηρήσουν την ομοίωσή τους, ή/και ενδέχεται να σχετίζεται με μηχανισμούς αντίστασης. Η επαγωγή της φωσφορυλίωσης της AKT από αντινεοπλασματικά, όπως οι ενώσεις πλατίνας, αλλά και άλλων (όπως η πακλιταξέλη), έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης των κυττάρων. Οι μηχανισμοί της αντίστασης περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του EGFR και επιγενετικές αλλαγές, όπως η υπερμεθυλίωση του DNA(123).

Όπως ήδη αναφέρθηκε το μονοπάτι PI3K/AKT σχετίζεται με τη ρύθμιση λειτουργιών του κυττάρου όπως η επιβίωση, η ανάπτυξη και η διαίρεση. Η φωσφορυλίωση της AKT, καθοδικά πυροδοτεί την ενεργοποίηση μορίων στόχων όπως η πρωτεΐνη S6, μεταξύ άλλων. Η φωσφορυλιωμένη S6 με τη σειρά της, ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και την

πρωτεϊνοσύνθεση. Η ενεργοποίηση της S6 εμφανίζει παρόμοια εικόνα με την AKT με εξαίρεση την ινσουλίνη, τη βρωμοκρυπτίνη και τη ντοπαμίνη. Σε αυτή την περίπτωση, η επώαση των κυττάρων με ινσουλίνη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της S6. Το γεγονός της διαφοροποίησης στην ενεργοποίηση της AKT και της S6, για τα παραπάνω φάρμακα, αποδίδεται στη συμμετοχή επιπρόσθετων σηματοδοτικών μονοπατιών στη ρύθμιση της έκφρασης των παραπάνω στόχων που δεν εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία. Επιπλέον, η αναστολή της φωσφορυλίωσης της S6 είναι αναμενόμενη και επιθυμητή από το αντινεοπλασματικό σισπλατίνη (124), ενώ με την προσθήκη της κλοζαπίνης λαμβάνεται ακόμα πιο ισχυρή αναστολή, ενισχύοντας το φαρμακολογικό αποτέλεσμα της σισπλατίνης.

Αντίθετα με τη περίπτωση της S6, η AKT ρυθμίζει τον GSK3 αλλά και τον FOXO-1 αντιστρεπτά. Δηλαδή, οι μη φωσφορυλιωμένες μορφές των δύο αυτών μορίων είναι οι ενεργοποιημένες. Η GSK3 είναι γνωστό ότι ρυθμίζει το μεταβολισμό των κυττάρων και την επιβίωση τους. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, επομένως, μεταβολίζουν διαρκώς γλυκόζη για να επιβιώσουν, μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης. Η επώαση των καρκινικών κυττάρων A549 με ινσουλίνη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της GSK3, αφήνοντας την ενεργοποιημένη. Τα αντιψυχωσικά σουλπιρίδη και κλοζαπίνη δεν φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση της pGSK3, ενώ η βρωμοκρυπτίνη και η ντοπαμίνη την αναστέλλουν. Η κλοζαπίνη συνδυαστικά με τη σισπλατίνη επάγει τη φωσφορυλίωση της GSK3, όπως επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία για κυτταρικές σειρές NSCLC(125). Η κλοζαπίνη όμως δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση της GSK3 όταν συνδυάζεται με πακλιταξέλη. Η ενεργοποίηση της GSK3 από κλοζαπίνη και σισπλατίνη μπορεί να σηματοδοτεί την αναστολή του μεταβολισμού του γλυκογόνου και έτσι την αδυναμία τροφοδότησης των καρκινικών κυττάρων και επομένως, την αναστροφή του ραγδαίου πολλαπλασιασμού, ή/και ακόμα την επαγωγή θανάτου στα A549.

Από την άλλη πλευρά, ο μη φωσφορυλιωμένος FOXO1 επάγει την απόπτωση και επίσης, ρυθμίζει το μεταβολισμό στα καρκινικά κύτταρα. Η ινσουλίνη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του, όπως και η σουλπιρίδη αλλά και η ντοπαμίνη. Η κλοζαπίνη και η βρωμοκρυπτίνη δεν φαίνεται να συμμετέχουν σημαντικά στην φωσφορυλίωση του FOXO1. Όσον αφορά τα αντινεοπλασματικά, η πακλιταξέλη ως μονοθεραπεία αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του FOXO1. Η κλοζαπίνη δεν αναστρέφει αυτή την αναστολή. Αντίθετα, η σισπλατίνη αυξάνει τη φωσφορυλίωση του FOXO1, ενώ και πάλι η κλοζαπίνη δεν μεταβάλλει αυτή την επαγωγή. Η απενεργοποιημένη μορφή του FOXO1 σε κατάσταση φωσφορυλίωσης στο κυτταρόπλασμα, μετά από επώαση με σισπλατίνη, είναι πιθανό να σχετίζεται και εδώ με τη προσπάθεια διατήρησης της ομοιόστασης στα κύτταρα ή/και με φαινόμενα αντίστασης.

Στο μονοπάτι των MAP κινασών αρχικά εξετάσαμε τη ρύθμιση της έκφρασης της pERK. Εκτός από την ινσουλίνη, που δεν φαίνεται να την επηρεάζει σημαντικά, όλοι οι υπόλοιποι φαρμακολογικοί παράγοντες όπως η σουλπιρίδη, η βρωμοκρυπτίνη, η ντοπαμίνη, η κλοζαπίνη, η κλοζαπίνη με πακλιταξέλη, η πακλιταξέλη, η σισπλατίνη και η σισπλατίνη με κλοζαπίνη, επάγουν τη φωσφορυλίωση της ERK στα καρκινικά κύτταρα A549. Η κλοζαπίνη ειδικά ενισχύει σημαντικά την ενεργοποίηση της ERK, που προκαλεί η σισπλατίνη. Η ενεργοποίηση της ERK από ενώσεις πλατίνης είναι εδώ και δεκαετίες γνωστή. Ωστόσο, είναι ακόμα αμφιλεγόμενο κατά πόσο αυτή η

ενεργοποίηση συμβάλλει ή αποτρέπει την απόπτωση (126). Γνωστή είναι και η επαγωγή της φωσφορυλίωσης της ERK ύστερα από έκθεση των κυττάρων σε κλοζαπίνη. Μάλιστα, η κλοζαπίνη συγκρινόμενη με άλλα αντιψυχωσικά παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (127).

OCREB, που βρίσκεται καθοδικά της ERK, ρυθμίζει σημαντικά την κυτταρική επιβίωση, διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η ινσουλίνη δεν μεταβάλλει τα επίπεδα του pCREB συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στα καρκινικά κύτταρα A549. Η σουλπριδίδη και η βρωμοκρυπτίνη επάγουν τη φωσφορυλίωση του CREB, ενώ η ντοπαμίνη την αναστέλλει. Επίσης, η κλοζαπίνη επάγει την έκφραση του pCREB, ενώ η πακλιταξέλη δεν την επηρεάζει ακόμη και όταν συνδυάζεται με κλοζαπίνη. Ωστόσο, ο CREB ενεργοποιείται σημαντικά στα καρκινικά κύτταρα με σισπλατίνη και κλοζαπίνη, όπως στην περίπτωση της ERK, που βρίσκεται ανοδικά του CREB.

Από την άλλη πλευρά, η φωσφορυλίωση της P38 αναστέλλεται από την ινσουλίνη, τη βρωμοκρυπτίνη, τη ντοπαμίνη, την κλοζαπίνη, την κλοζαπίνη με πακλιταξέλη, ενώ η σουλπριδίδη δεν φαίνεται να την επηρεάζει. Ωστόσο, ομοίως με τις υπόλοιπες MAP κινάσες η P38 ενεργοποιείται ελαφρά, ύστερα από έκθεση των καρκινικών κυττάρων σε σισπλατίνη. Η ενεργοποίηση της P38 από ενώσεις πλατίνας και ειδικά από τη σισπλατίνη, έχει αποδειχθεί σε πλήθος διαφορετικών καρκινικών σειρών. Επίσης, έχει συνδεθεί με φαινόμενα αντίστασης, λόγω της τοξικότητας του λευκόχρυσου (128).

Η κλοζαπίνη συνδυαστικά με την σισπλατίνη, αλλά και με την πακλιταξέλη, φαίνεται να ρυθμίζει καθοριστικά την έκφραση πρωτεϊνών, που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια σχετιζόμενα με την καρκινογένεση. Ακόμα και ως μονοθεραπεία, η κλοζαπίνη επάγει τη φωσφορυλίωση της AKT και ERK, ενεργοποιώντας τα αντίστοιχα μονοπάτια. Παρατηρούμε ωστόσο πως δεν συμφωνεί σε όλες τις περιπτώσεις με τη βρωμοκρυπτίνη, έναν κλασσικό αγωνιστή των D₂ υποδοχέων της ντοπαμίνης. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στον επιπλέον ανταγωνισμό της για τους σεροτονινεργικούς υποδοχείς 5-HT_{2A}. Αυτοί οι υποδοχείς ανήκουν στην κατηγορία GPCRs. Μέσω των δεύτερων αγγελιαφόρων μορίων ρυθμίζουν τη συγκέντρωση του ενδοκυττάρου Ca²⁺, μεταβολές του οποίου ρυθμίζουν μηχανισμούς σχετιζόμενους με τον κυτταρικό θάνατο, την επιβίωση και το μεταβολισμό (129).

Συνοψίζοντας, η κλοζαπίνη εμφανίζει κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα, επάγοντας το μηχανισμό της απόπτωσης. Ταυτόχρονα συνδυαστικά με την πακλιταξέλη, επάγει τη φωσφορυλίωση της AKT, ενώ σε συνδυασμό με τη σισπλατίνη επάγει τη φωσφορυλίωση της ERK, ενεργοποιώντας τη μετάδοση σήματος στα μονοπάτια PI3K/AKT και των MAP κινάσων, αντίστοιχα. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν την αρχική υπόθεση για την πιθανή αντικαρκινική δράση των αντιψυχωσικών. Επίσης, εξηγούν μερικώς το παράδοξο των επιδημιολογικών μελετών, που εμφανίζουν τους σχιζοφρενείς να διατρέχουν μειωμένο κίνδυνο να νοσήσουν από καρκίνο του πνεύμονα.

Τέλος, τα αντιψυχωσικά είναι μη τοξικά, ασφαλή φάρμακα χαμηλού κόστους. Στο πλαίσιο της επαναστόχευσης φαρμάκων, η εισαγωγή αντιψυχωσικών σε φαρμακολογικά σχήματα για τον καρκίνο του πνεύμονα, συνδυαστικά με αντινεοπλασματικά, μοιάζει πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση, καθώς όλο και περισσότερες μελέτες αποδεικνύουν την κυτταροτοξικότητα των αντιψυχωσικών στα καρκινικά κύτταρα (130). Επιπλέον, η λογική της συγχορήγησης προϋποθέτει τη μείωση της δόσης κάθε φαρμάκου στον συνδυασμό, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών. Το γεγονός αυτό είναι σημείο «κλειδί» στη θεραπεία του καρκίνου. Ωστόσο, μέχρι την εφαρμογή της ανωτέρω προσέγγισης στην κλινική πράξη θα πρέπει να διεξαχθούν προκλινικές μελέτες με *in vivo* μοντέλα καρκινογένεσης και ακολούθως κλινικές μελέτες σε σχέση με την αποτελεσματικότητα αλλά και με φαινόμενα αντίστασης που εμφανίζονται από τη συγχορήγηση της κλοζαπίνης με την σισπλατίνη. Θα πρέπει επίσης να διερευνηθούν περισσότερα άτυπα αντιψυχωσικά με παρόμοιο φαρμακολογικό προφίλ, όπως η ρισπεριδόνη και η ολανζαπίνη. Η κλοζαπίνη αν και εμφανίζει μεγάλη αποτελεσματικότητα έχει συνδεθεί με παρενέργειες όπως τα εξωπυραμιδικά συμπτώματα, η λευκοπενία, η παχυσαρκία κ.α.(131). Παρόλα αυτά, στην πολύ χαμηλή συγκέντρωση που φαίνεται ότι δρα αποτελεσματικά, οι ανεπιθύμητες αυτές ενέργειες είναι πιθανό να μην εμφανίζονται.

10. Βιβλιογραφία

1. Hajdu SI. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 2011.
2. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*. 2008.
3. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*. 2009;
4. Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. In: *Redox Biology*. 2017.
5. Perri F, Longo F, Giuliano M, Sabbatino F, Favia G, Ionna F, et al. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017.
6. Stafford LJ, Vaidya KS, Welch DR. Metastasis suppressors genes in cancer. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008.
7. Coleman WB, Tsongalis GJ. The molecular basis of human cancer. *The Molecular Basis of Human Cancer*. 2016.
8. Zhang D, Feng F, Liu R, Zhu W, Yao L. Mechanochemistry in cancer cell metastasis. *Chinese Chem Lett*. 2019;
9. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. *The Development and Causes of Cancer. The Cell: A Molecular Approach*. 2000.
10. Johnson AV. An Update: Genetic Mutations and Childhood Cancers. *J Nurse Pract*. 2018;
11. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes (Pharmaceutical Research DOI: 10.1007/s11095-008-9661-9). *Pharmaceutical Research*. 2008.
12. Madia F, Worth A, Whelan M, Corvi R. Carcinogenicity assessment: Addressing the challenges of cancer and chemicals in the environment. *Environment International*. 2019.
13. Baudot A, De La Torre V, Valencia A. Mutated genes, pathways and processes in tumours. *EMBO Rep*. 2010;
14. Lariscy JT. Smoking-attributable mortality by cause of death in the United States: An indirect approach. *SSM - Popul Heal*. 2019;
15. Oh JK, Weiderpass E. Infection and cancer: Global distribution and burden of diseases. *Annals of Global Health*. 2014.
16. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011.
17. Smart RC, Hodgson E. *Molecular and Biochemical Toxicology. Molecular and Biochemical Toxicology*. 2007.
18. Carella F, Feist SW, Bignell JP, De Vico G. Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *J Invertebr Pathol*. 2015;

19. Vincent TL, Gatenby RA. An evolutionary model for initiation, promotion and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol*. 2008;
20. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. 2019.
21. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V., et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*. 2012.
22. Sidhartha DR, George BC. Cell Death and Apoptosis. In: *General and Applied Toxicology*. 2009.
23. Vousden KH, Lu X. Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*. 2002.
24. Li Z, Sheng M. Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain*. 2012.
25. Chan EYW, Köchl R, Tooze SA. Cell Biology and Biochemistry of Autophagy. In: *Autophagy in Immunity and Infection: A Novel Immune Effector*. 2006.
26. Jones SA, Mills KHG, Harris J. Autophagy and inflammatory diseases. *Immunology and Cell Biology*. 2013.
27. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2009.
28. Radosevich J. Apoptosis and beyond: The many ways cells die. *Apoptosis and Beyond: The Many Ways Cells Die*. 2018.
29. Meléndez A, Levine B. Autophagy in *C. elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology*. 2009.
30. Triola G. Autophagy: Assays and Small-Molecule Modulators. In: *Concepts and Case Studies in Chemical Biology*. 2014.
31. Li J, Mansmann UR. A molecular signaling map and its application. *Cell Signal*. 2014;
32. Sarris EG, Saif MW, Syrigos KN. The biological role of PI3K pathway in lung cancer. *Pharmaceuticals*. 2012.
33. Toren P, Zoubeydi A. Targeting the PI3K/Akt pathway in prostate cancer: Challenges and opportunities (Review). *International Journal of Oncology*. 2014.
34. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007.
35. Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;
36. Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in Immunology*. 2014.
37. BROWN JR, THORNTON JL. Percivall Pott (1714-1788) and chimney sweepers' cancer of the scrotum. *Br J Ind Med*. 1957;
38. Ames BN. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*. 1979.

39. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz LFP, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc.* 2007;
40. The Cancer Handbook. *The Cancer Handbook.* 2005.
41. Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;
42. IARC. Chemical agents and related occupations - Volume 100 F: A review of human carcinogens. *Int Agency Res Cancer.* 2012;
43. Moserová M, Kotrbová V, Aimová D, Šulc M, Frei E, Stiborová M. Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: Optimization of the method. *Interdiscip Toxicol.* 2009;
44. Mehta R, Schrader TJ. CARCINOGENS | Carcinogenic Substances in Food: Mechanisms. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition.* 2003.
45. Quah S, Heggenhougen K. International encyclopedia of public health. *International Encyclopedia of Public Health.* 2008.
46. Park SH, Wei S, Mizaikoff B, Taylor AE, Favero C, Huang CH. Degradation of amine-based water treatment polymers during chloramination as N-nitrosodimethylamine (NDMA) precursors. *Environ Sci Technol.* 2009;
47. de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. *Translational Lung Cancer Research.* 2018.
48. Ramalingam SS, Khuri FR. Section 1 Thoracic Cancers Lung Cancer - Risk Factors. In: *The American Cancer Society's Oncology in Practice: Clinical Management.* 2018.
49. Zheng S, Wang R, Zhang Y, Pan Y, Cheng C, Zheng D, et al. Former smokers with non-small-cell lung cancers: a comprehensive investigation of clinicopathologic characteristics, oncogenic drivers, and prognosis. *Cancer Med.* 2016;
50. Oser MG, Niederst MJ, Sequist L V., Engelman JA. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: Molecular drivers and cells of origin. *The Lancet Oncology.* 2015.
51. Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P, Borghaei H, Chow LQ, Downey RJ, et al. Small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw [Internet].* 2013 Jan 1 [cited 2021 May 26];11(1):78–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307984>
52. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res [Internet].* 2016 Jun 1 [cited 2021 May 24];5(3):288–300. Available from: </pmc/articles/PMC4931124/>
53. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;
54. Large Cell Carcinoma - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cited 2021 May 26]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/large-cell-carcinoma>

55. Wellstein A. General Principles in the Pharmacotherapy of Cancer. In: Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e. 2017.
56. Lind MJ. Principles of cytotoxic chemotherapy. Medicine. 2011.
57. Takimoto BCH, Calvo E. Principles of oncologic pharmacotherapy. Cancer. 2008;
58. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. Bioorganic Chemistry. 2019.
59. Wang Z, Zhu G. DNA Damage Repair Pathways and Repair of Cisplatin-Induced DNA Damage. In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. 2018.
60. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2017.
61. Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. Microbial Biotechnology. 2011.
62. Vaishampayan U, Parchment RE, Jasti BR, Hussain M. Taxanes: An overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. Urology. 1999;
63. Abu Samaan TM, Samec M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. Biomolecules. 2019.
64. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M. Paclitaxel and its evolving role in the management of ovarian cancer. BioMed Research International. 2015.
65. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Molecular Biology of the Cell. 2014.
66. Hartmann J, Haap M, Kopp H-G, Lipp H-P. Tyrosine Kinase Inhibitors – A Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects. Curr Drug Metab. 2009;
67. Filley AC, Henriquez M, Dey M. CART immunotherapy: Development, success, and translation to malignant gliomas and other solid tumors. Frontiers in Oncology. 2018.
68. Waqar SN, Morgensztern D. Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). Vol. 180, Pharmacology and Therapeutics. Elsevier Inc.; 2017. p. 16–23.
69. Pakkala S, Ramalingam SS. Personalized therapy for lung cancer: striking a moving target [Internet]. Vol. 3, JCI insight. NLM (Medline); 2018 [cited 2021 May 24]. Available from: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120858>
70. Bassett AS, Chow EWC, Weksberg R. Chromosomal abnormalities and schizophrenia. American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics. 2000.
71. Laursen TM, Nordentoft M, Mortensen PB. Excess Early Mortality in Schizophrenia. Annu Rev Clin Psychol. 2014;
72. Bromet EJ, Dew MA, Eaton WW. Epidemiology of Psychosis with Special Reference to Schizophrenia. In: Textbook in Psychiatric Epidemiology. 2003.
73. The National Institute of Mental Health. NIMH · Depression. 2018. 2018.

74. DeLisi LE, Szulc KU, Bertisch HC, Majcher M, Brown K. Understanding structural brain changes in schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;
75. Brown WA, Solomon DA, Khan A. *Handbook of Contemporary Neuropharmacology*. JAMA. 2007;
76. Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: A review of epidemiologic and translational studies. *American Journal of Psychiatry*. 2010.
77. Maria K. The effects of maternal deprivation on behavioural, neurochemical and neurobiological indices related to dopaminergic activity. *Front Behav Neurosci*. 2009;
78. Messias EL, Chen CY, Eaton WW. Epidemiology of Schizophrenia: Review of Findings and Myths. *Psychiatric Clinics of North America*. 2007.
79. Gunzler SA. Dopamine. In: *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. 2014.
80. Marsden CA. Dopamine: The rewarding years. *British Journal of Pharmacology*. 2006.
81. Osinga TE, Links TP, Dullaart RPF, Pacak K, Van Der Horst-Schrivers ANA, Kerstens MN, et al. Emerging role of dopamine in neovascularization of pheochromocytoma and paraganglioma. *FASEB Journal*. 2017.
82. Ares-Santos S, Granado N, Moratalla R. The role of dopamine receptors in the neurotoxicity of methamphetamine. *J Intern Med*. 2013;
83. Missale C, Russel Nash S, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*. 1998.
84. Anmol Bhatia AS. *Biochemistry: Dopamine receptors*. 2019. p. NCBI.
85. Jope R, Roh M-S. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Psychiatric Diseases and Therapeutic Interventions. *Curr Drug Targets*. 2012;
86. ZAFAR SHARIF SMAJAL. PHARMACOTHERAPY OF SCHIZOPHRENIA. In: *Handbook of Contemporary Neuropharmacology*. 2007.
87. Krutika Chokhawala LS. *Antipsychotic Medications*. 2019. p. NCBI.
88. M.D. FG. First-vs-second generation antipsychotics. *Psychopharmacology Institute*. 2019.
89. Pazdernik T. *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology, 4th Edition*. Med Sci Sport Exerc. 2009;
90. Hippus H. The history of clozapine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1989;
91. Manjunath K, Venkateswarlu V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J Control Release*. 2005;
92. Thorn CF, Müller DJ, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: Clozapine pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics*. 2018;
93. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Örey D, Richter F, et al. Comparative efficacy and

- tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: A multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*. 2013;
94. Siskind D, McCartney L, Goldschlager R, Kisely S. Clozapine v. first- and second-generation antipsychotics in treatment-refractory schizophrenia: Systematic review and meta-analysis. *British Journal of Psychiatry*. 2016.
 95. Nucifora FC, Mihaljevic M, Lee BJ, Sawa A. Clozapine as a Model for Antipsychotic Development. *Neurotherapeutics*. 2017.
 96. Hippisley-Cox J, Vinogradova Y, Coupland C, Parker C. Risk of malignancy in patients with schizophrenia or bipolar disorder: Nested case-control study. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;
 97. McGinty EE, Zhang Y, Guallar E, Ford DE, Steinwachs D, Dixon LB, et al. Cancer incidence in a sample of Maryland residents with serious mental illness. *Psychiatr Serv*. 2012;
 98. Chou FHC, Tsai KY, Su CY, Lee CC. The incidence and relative risk factors for developing cancer among patients with schizophrenia: A nine-year follow-up study. *Schizophr Res*. 2011;
 99. Barak Y, Achiron A, Mandel M, Mirecki I, Aizenberg D. Reduced cancer incidence among patients with schizophrenia. *Cancer*. 2005;
 100. Gal G, Goral A, Murad H, Gross R, Pugachova I, Barchana M, et al. Cancer in parents of persons with schizophrenia: Is there a genetic protection? *Schizophr Res*. 2012;
 101. Chou FHC, Tsai KY, Wu HC, Shen SP. Cancer in patients with schizophrenia: What is the next step? *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2016.
 102. Ji J, Sundquist K, Ning Y, Kendler KS, Sundquist J, Chen X. Incidence of cancer in patients with schizophrenia and their first-degree relatives: A population-based study in Sweden. *Schizophr Bull*. 2013;
 103. P. Harkitis, E. P. Daskalopoulos, F. Malliou, M. A. Lang, M. Marselos, A. Fotopoulos, G. Albucharali and MK. Dopamine D2-Receptor Antagonists Down-Regulate CYP1A1/2 and CYP1B1 in the Rat Liver. *PLoS One*. 2015;
 104. J. K. Aronson Editor. Old drugs – new uses. *Br J Clin Pharmacol*. 2007;
 105. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations [Internet]. Vol. 18, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 May 24]. p. 41–58. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd.2018.168>
 106. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;
 107. Xu X, Kwon OK, Shin IS, Mali JR, Harmalkar DS, Lim Y, et al. Novel benzofuran derivative DK-1014 attenuates lung inflammation via blocking of MAPK/AP-1 and AKT/mTOR signaling in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
 108. Tanel A, Palapati P, Bettaieb A, Morin P, Averill-Bates DA. Acrolein activates cell survival and apoptotic death responses involving the endoplasmic reticulum in A549 lung cells. *Biochim*

Biophys Acta - Mol Cell Res. 2014 May 1;1843(5):827–35.

109. Daskalopoulos EP, Malliou F, Rentesi G, Marselos M, Lang MA, Konstandi M. Stress is a critical player in CYP3A, CYP2C, and CYP2D regulation: Role of adrenergic receptor signaling pathways. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2012 Jul 1;303(1).
110. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*. 2020.
111. Yang P. Epidemiology of lung cancer prognosis: Quantity and quality of life. *Methods in Molecular Biology*. 2009.
112. Mortensen PB. The incidence of cancer in schizophrenic patients. *J Epidemiol Community Health*. 1989;
113. Fond G, Macgregor A, Attal J, Larue A, Brittner M, Ducasse D, et al. Antipsychotic drugs: Pro-cancer or anti-cancer? A systematic review. *Med Hypotheses [Internet]*. 2012 Jul [cited 2021 May 26];79(1):38–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22543071/>
114. Wu XY, Zhang CX, Deng LC, Xiao J, Yuan X, Zhang B, et al. Overexpressed D2 Dopamine Receptor Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Progression through Inhibiting NF-κB Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem [Internet]*. 2018 Aug 1 [cited 2021 May 26];48(6):2258–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30114693/>
115. Harkitis P, Daskalopoulos EP, Malliou F, Lang MA, Marselos M, Fotopoulos A, et al. Dopamine D2-receptor antagonists down-regulate CYP1A1/2 and CYP1B1 in the rat liver. *PLoS One [Internet]*. 2015 Oct 14 [cited 2021 May 26];10(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26466350/>
116. Qin S, Yu H, Wu X, Luo Z, Wang H, Sun S, et al. Weekly albumin-bound paclitaxel/cisplatin versus gemcitabine/cisplatin as first-line therapy for patients with advanced non-small-cell lung cancer: A phase II open-label clinical study. *Chinese J Cancer Res [Internet]*. 2019 [cited 2021 Jun 2];31(2):339–48. Available from: </pmc/articles/PMC6513743/>
117. Zhang W, Zhang C, Liu F, Mao Y, Xu W, Fan T, et al. Antiproliferative activities of the second-generation antipsychotic drug sertindole against breast cancers with a potential application for treatment of breast-to-brain metastases. *Sci Rep [Internet]*. 2018 Dec 1 [cited 2021 May 26];8(1):1–13. Available from: www.nature.com/scientificreports
118. Yin YC, Lin CC, Chen TT, Chen JY, Tsai HJ, Wang CY, et al. Clozapine induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells. *Cell Physiol Biochem [Internet]*. 2015 Mar 16 [cited 2021 May 26];35(3):945–56. Available from: www.karger.com/cpb945Yinetal.:ClozapineCausesAutophagicCellDeath
119. Weissenrieder JS, Neighbors JD, Mailman RB, Hohl RJ. Cancer and the dopamine D2 receptor: A pharmacological perspective [Internet]. Vol. 370, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy; 2019 [cited 2021 May 26]. p. 111–26. Available from: </pmc/articles/PMC6558950/>
120. Jiang J, Ren HY, Geng GJ, Mi YJ, Liu Y, Li N, et al. Oncogenic activity of insulin in the development of non-small cell lung carcinoma. *Oncol Lett [Internet]*. 2018 Jan 1 [cited 2021 Jun

29];15(1):447–52. Available from: </pmc/articles/PMC5768075/>

121. Dwyer DS, Aamodt E, Cohen B, Buttner EA. Drug elucidation: Invertebrate genetics sheds new light on the molecular targets of cns drugs [Internet]. Vol. 5 JUL, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Research Foundation; 2014 [cited 2021 May 27]. Available from: </pmc/articles/PMC4112795/>
122. Panariello F, Perruolo G, Cassese A, Giacco F, Botta G, Barbagallo APM, et al. Clozapine impairs insulin action by up-regulating Akt phosphorylation and Ped/Pea-15 protein abundance. *J Cell Physiol*. 2012 Apr;227(4):1485–92.
123. Granados ML, Hudson LG, Samudio-Ruiz SL. Contributions of the epidermal growth factor receptor to acquisition of platinum resistance in ovarian cancer cells. *PLoS One*. 2015 Sep 9;10(9).
124. Wu C, Wangpaichitr M, Feun L, Kuo MT, Robles C, Lampidis T, et al. Overcoming cisplatin resistance by mTOR inhibitor in lung cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2005 Jul 20 [cited 2021 Jun 29];4(1):1–10. Available from: <http://www.molecular-cancer.com/content/4/1/25>
125. Yamaguchi H, Hsu JL, Chen C-T, Wang Y-N, Hsu M-C, Chang S-S, et al. Caspase-Independent Cell Death Is Involved in the Negative Effect of EGF Receptor Inhibitors on Cisplatin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. 2013 [cited 2021 Jun 30]; Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
126. Achkar IW, Abdulrahman N, Al-Sulaiti H, Joseph JM, Uddin S, Mraiche F. Cisplatin based therapy: The role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway [Internet]. Vol. 16, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2021 Jun 30]. p. 96. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1471-1>
127. Aringhieri S, Kolachalam S, Gerace C, Carli M, Verdesca V, Brunacci MG, et al. Clozapine as the most efficacious antipsychotic for activating ERK 1/2 kinases: Role of 5-HT_{2A} receptor agonism. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2021 May 27];27(4):383–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28283227/>
128. Losa JH, Cobo CP, Viniestra JG, Sánchez-Arevalo Lobo VJ, Ramón y Cajal S, Sánchez-Prieto R. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene* [Internet]. 2003 [cited 2021 Jun 30];22(26):3998–4006. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12821934/>
129. Kurrasch-Orbaugh DM, Watts VJ, Barker EL, Nichols DE. Serotonin 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A₂ signaling pathways have different receptor reserves. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2021 May 27];304(1):229–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12490596/>
130. Huang J, Zhao D, Liu Z, Liu F. Repurposing psychiatric drugs as anti-cancer agents. Vol. 419, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 257–65.
131. Dumas R, Bardin P, Védie C. Long-term treatment of clozapine-induced leukopenia with lithium: Fast-onset agranulocytosis following lithium discontinuation [Internet]. Vol. 18, *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*. Physicians Postgraduate Press Inc.; 2016 [cited 2021 May 27]. Available from: </pmc/articles/PMC4874758/>

