



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Σχεδιασμός και ανάπτυξη μορίων που στοχεύουν τους υποδοχείς VEGFR και αναστέλλουν την ενεργότητα της PI3K στο γλοίωμα»

ΣΑΡΚΙΣΙΑΝ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ-ΑΣΟΤ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα, Φεβρουάριος του 2022 έως Ιούνιος του 2023 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Τζάκου Ανδρέα με θέμα «Σχεδιασμός και ανάπτυξη μορίων που στοχεύουν τον VEGFR και την PI3K στο γλοίωμα».

Πρωταρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, Καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκο. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την πολύ ενδιαφέρουσα ανάθεση του παρόντος θέματος και την υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας, καθώς και την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου προσέφερε για την επίτευξη των στόχων που μου ανέθεσε. Η παρουσία του σε οποιαδήποτε ανησυχία ή προβληματισμό μου καθώς και επίλυση όλου του πλήθους των αποριών μου, με βοήθησε στην ομαλή εργαστηριακή μου πορεία. Τέλος, τον ευχαριστώ πολύ για την υπομονή του, την παρότρυνση να ασχοληθώ με ένα πλήθος θεμάτων το οποίο συνέβαλε στην μόνιμη βελτίωσή μου, τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου προσέφερε απλόχερα.

Ένα ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στον κ. Βασίλειο Τσίκαρη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τον ευχαριστώ που αποδέχθηκε αν αποτελέσει μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του, που μου επέλυσαν απορίες που τυχόν δημιουργήθηκαν.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Νικόλαο Κουρκουμέλη, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που δέχτηκε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου όπως και για την αξιολόγηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω θερμά, για την πολύ ευχάριστη και δημιουργική συνεργασία μας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να αποδώσω στον κ. Γεώργιο Αλεξίου, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στην ερευνητική του ομάδα για την πραγματοποίηση των πειραμάτων βιολογικής αξιολόγησης των μορίων 3 και 4.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στους συνεργάτες και φίλους μου που με υποστήριξαν με τις ιδέες, τις γνώσεις και τον χρόνο τους και κυρίως τους: Ανδρονίκη Κωσταγιάννη, Ab Majeed Ganai, Βασίλη Γκάλπινο, Χρήστο Χατζηγιάννη, Δημήτρη Διαμαντή, Σταυρούλα Κύρκου, Λέανδρο Πολυχρόνη, Χριστόδουλο Φασούλη, Ιωάννη Νικούλη, Θωμά Αντωνίου και Βασίλη Μπίστα. Ένα επιπλέον ευχαριστώ θέλω να αποδώσω στους επίσης συνεργάτες και φίλους μου του Αναλυτικού Κέντρου του εργαστηρίου, Νικόλαο Παρίση και Βασιλική-Χαρά Αναγνώστου οι οποίοι με βοήθησαν τόσο στην πραγμάτωση πειραμάτων αλλά και προσωπικά όποτε αυτό ήταν αναγκαίο.

Το πιο ιδιαίτερο ευχαριστώ και την απόλυτη εκτίμησή μου θα ήθελα να δώσω στην οικογένεια μου και στους συγγενείς μου. Οι γονείς μου, Άρμεν και Μαρία και τα αδέρφια μου, Χόρεν και Λεωνίδα, αποτέλεσαν το απόλυτο στήριγμα μου από τότε που μπήκα στην σχολή ως φοιτητής και με υποστήριξαν όλα αυτά τα χρόνια τόσο οικονομικά όσο και ψυχολογικά. Χωρίς αυτήν την συμπαράσταση δεν θα ολοκληρωνόταν αυτή η μεταπτυχιακή διατριβή. Για αυτό αφιερώνω την μεταπτυχιακή μου διατριβή στην οικογένεια μου και στην γιαγιά μου Nelly.

Σαρκισιάν Αλέξανδρος-Άσοτ

Ιωάννινα 2023

**Στην γιαγιά μου,
Nelly**

Πίνακας Περιεχομένων

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	10
Περίληψη.....	13
Abstract.....	14
<i>Μέρος I</i>	16
1. Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο	17
2. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου	20
2.1. Γενικά στοιχεία.....	20
2.2. Διατήρηση της σηματοδότησης πολλαπλασιασμού	23
2.3. Αποφυγή των παραγόντων καταστολής των παραγόντων ανάπτυξης του κυττάρου	26
2.4. Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο	29
2.5. Δυνατότητα απεριόριστων πολλαπλασιασμών	31
2.6. Διαρκής αγγειογένεση.....	33
2.7. Εισβολή στους ιστούς και μετάσταση	34
2.8. Γονιδωματική αστάθεια και μεταλλάξεις.....	37
2.9. Φλεγμονή που προάγει τον όγκο	38
2.10. Επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού	39
2.11. Αποφυγή της καταστροφής από το ανοσοποιητικό σύστημα.....	41
2.12. Ξεκλειδώνοντας την φαινοτυπική πλαστικότητα.....	42
2.13. Μη μεταλακτικός επιγενετικός επαναπρογραμματισμός	43
2.13.1. Μηχανισμοί του μικροπεριβάλλοντος του επιγενετικού επαναπρογραμματισμού	44
2.13.2. Ετερογένεια της επιγενετικής ρύθμισης.....	45
2.14. Πολυμορφικό μικροβίωμα	46
2.14.1. Ποικίλες ρυθμιστικές επιδράσεις του μικροβιώματος του εντέρου	46
2.15. Κυτταρική γήρανση	48
3. Μικροπεριβάλλον του καρκίνου	49
3.1. Συστατικά του TME.....	49
3.1.1. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.....	49
3.1.1.1. Κύτταρα του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος.....	50
3.1.1.2. Κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος	52
3.1.2. Άλλα κύτταρα.....	54
3.2. Υποξία.....	57
3.3. Φαινόμενο αυξημένης διείσδυσης και κατακράτησης (EPR effect).....	60
3.4. Φαινόμενο Warburg	62

4. Θεραπεία του καρκίνου.....	63
5. Γλοίωμα και γλοιοβλάστωμα.....	66
6. Αγγειογένεση.....	69
7. Σύστημα VEGF/VEGFR.....	70
7.1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	70
7.2. Οι υποδοχείς της οικογένειας VEGF (VEGFRs).....	70
7.2.1. Ο υποδοχέας VEGFR1.....	72
7.2.2. Ο υποδοχέας VEGFR2.....	72
7.2.3. Καταρράκτης σηματοδότησης του υποδοχέα VEGFR1.....	73
7.2.4. Καταρράκτης σηματοδότησης του υποδοχέα VEGFR-2.....	74
7.2.5. Σηματοδοτική πορεία PI3K/mTOR και αναστολείς της PI3K.....	75
8. Στοχευμένη θεραπεία.....	78
8.1. Τα πεπτίδια στην στοχευμένη θεραπεία.....	79
8.2. Πεπτίδια που στοχεύουν τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2.....	83
9. Μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος.....	85
9.1. Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση (SPPS).....	85
9.2. Φωταύγεια (Luminescence).....	93
9.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	93
9.2.2. Διάγραμμα Jablonski.....	93
9.2.3. Μηχανισμοί αποδιέγερσης χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας.....	94
9.2.3.1. Δονητική αποδιέγερση (1).....	94
9.2.3.2. Εσωτερική μετατροπή (2).....	95
9.2.3.3. Διασυστηματική διασταύρωση (3).....	95
9.2.3.4. Αποδιέγερση στην βασική κατάσταση χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας (4)	95
9.2.4. Μηχανισμοί αποδιέγερσης με εκπομπή ακτινοβολίας (φθορισμός-φωσφορισμός).....	96
9.2.5. Αρχή Franck-Condon.....	96
9.2.6. Μόρια δότη-αποδέκτη (Donor-Acceptor Molecules, D-A Molecules).....	97
9.2.7. Ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Intramolecular Charge Transfer, ICT) και ICT στρέψης (Twisted ICT).....	98
<i>Μέρος II</i>	100
1. Σύνθεση των φθορίζοντων αναλόγων πεπτιδίων που στοχεύουν τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2.....	102
1.1. Υλικά-Συσκευές-Όργανα.....	102
1.2. Μέθοδοι.....	103

1.2.1.	Γενική μέθοδος σύζευξης των Na-Fmoc αμινοξέων στην Wang-Cys ρητίνη	103
1.2.2.	Γενική μέθοδος σύζευξης των Na-Fmoc αμινοξέων στην CLTR-Cl ρητίνη	103
1.2.3.	Γενική μέθοδος σύζευξης με την μέθοδο των καρβοδιϊμιδίων.....	103
1.2.4.	Μέθοδος ελέγχου σύνδεσης του αμινοξέος με τεστ Kaiser.....	104
1.2.5.	Παραλαβή του ακάθαρτου μίγματος του επιθυμητού πεπτιδίου	104
1.3.	Σύνθεση αναλόγου πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-1 με την συμβατική μέθοδο.....	105
1.4.	Σύνθεση αναλόγου πεπτιδίου που στοχεύει τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2 με την συμβατική μέθοδο	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.5.	Σύνθεση αναλόγου πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-2 με την συμβατική μέθοδο.....	106
1.6.	Αποτελέσματα	107
1.6.1.	Ανάλογο πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-1.....	107
1.6.1.1.	Συνθετική πορεία	107
1.6.1.2.	Καθαρισμός πεπτιδίου.....	108
1.6.1.3.	Ταυτοποίηση με φάσμα μάζας.....	108
1.6.2.	Ανάλογο πεπτιδίου που στοχεύει τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.6.2.1.	Συνθετική πορεία	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.6.2.2.	Καθαρισμός πεπτιδίου.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.6.2.3.	Ταυτοποίηση με φάσμα μάζας	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.6.3.	Ανάλογο πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-2.....	110
1.6.3.1.	Συνθετική πορεία	110
1.6.3.2.	Καθαρισμός πεπτιδίου.....	111
1.6.3.3.	Ταυτοποίηση με φάσμα μάζας.....	112
2.	Σύνθεση μορίων που αναστέλλουν την δράση της PI3K στο γλοίωμα.....	113
2.1.	Υλικά-Συσκευές-Όργανα	113
2.2.	Συνθετική πορεία των ενώσεων 1 και 2	114
2.2.1.	Σύνθεση της ένωσης 1.....	115
2.2.1.1.	Ταυτοποίηση της ένωσης 1 (¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, MS).....	116
2.2.2.	Σύνθεση της ένωσης 2.....	117
2.2.2.1.	Ταυτοποίηση της ένωσης 2.....	118
2.2.3.	Σύνθεση της ένωσης 3.....	119
2.2.3.1.	Ταυτοποίηση της ένωσης 3.....	120
2.2.3.2.	Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 3	122
2.2.4.	Σύνθεση της ένωσης 4.....	129

2.2.4.1. Ταυτοποίηση της ένωσης 4.....	130
2.2.4.2. Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 4	132

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ADCC	Antibody-dependent cellular toxicity
ARG	Arginase
ATP	Adenosine triphosphate
BAL	Backbone Amide Linker
BBB	Blood-brain barrier
Breg cell	B regulatory cells
CAF	Cancer associated fibroblast
CAM	Cell-to-cell molecules
CD	Cluster of differentiation
CDCl ₃	Chloroform
CDK	Cyclin-dependent kinase
CLTR-Cl	Chlorotryl Chloride
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CPP	Cell penetrating peptides
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	CXC chemokine receptors
DCC	N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DIC	N, N'-Diisopropylcarbodiimide
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular matrix
EDT	1, 2-Ethanedithiol
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EPR effect	Enhanced Permeability and retention effect
FAK	Focal adhesion kinase
FASL	Fas ligand
FASR	Fas ligand receptor
FDG	¹⁸ F-fluorodeoxyglucose
FGF	Fibroblast growth factor
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GF	Growth factor
GFR	Growth factor receptor
GLUT1	Glucose transporter 1
GPCR	G-protein coupled receptor
HATU	Hexafluorophosphate azabenzotriazole tetramethyl uonium
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxia-inducible factor
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	Hydroxybenzotriazole

HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICT	Intracellular charge transfer
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-R	Insulin-like growth factor receptor
IL	Interleukin
iNKT cells	Invariant natural killer T cells
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LDH	Lactate dehydrogenase
mAbs	monoclonal Antibodies
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MeCN	Acetonitrile
MET	Mesenchymal-epithelial transition
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrix metalloproteinase
MS	Mass spectrometry
NE	Neutrophil elastase
NET	Neutrophil extracellular trap
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural killer
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOTCH	Neurogenic locus notch homolog protein
OV	Overall survival
OXPPOS	Oxidative phosphorylation
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEG	Polyethylene glycol
PET	Positron emission tomography
PGE	Prostaglandin E synthase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIGF	Placental growth factor
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PKS	Polyketide synthase
PLC	Phospholipase C
pRb	Retinoblastoma protein
PTB	Polypyrimidine tract-binding protein
ROS	Reactive oxygen species
RTK	Receptor tyrosine kinase
SASP	Senescence-associated secretory phenotype
SIRP-a	Signal regulatory protein alpha
SPPS	Solid phase peptide synthesis
TAA	Tumour associated antigen
TAM	Tumour associated macrophages
TATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-Oxide Tetrafluoroborate

TBTU	2-(1H-Benzotrazole-1-yl)
tBu	tert-Butyl
TCA	Tricarboxylic acid
TFA	Trifluoroacetic acid
TGF	Tumour growth factor
Th	T helper cell
TICT	Twisted intracellular charge transfer
TLC	Thin layer chromatography
TLR	Toll-like receptor
TME	Tumour microenvironment
TMZ	Temozolomide
TNF	Tumour necrosis factor
TNF-R	Tumour necrosis factor receptor
Treg cell	T regulatory cell
uPA	Urokinase-type-plasminogen-activator
uPAR	Urokinase-type-plasminogen-activator receptor
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πιο θανατηφόρες ασθένειες της σύγχρονης εποχής που προκαλεί πολλούς θανάτους κάθε χρόνο. Ειδικότερα, ο καρκίνος προκαλείται από παθοφυσιολογικές αλλαγές στις εγγενείς διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης. Έχει αναδειχθεί ως μία σημαντική διαταραχή η οποία είναι υπεύθυνη για έναν μεγάλο αριθμό θανάτων ανά τον χρόνο παγκοσμίως και πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 2022, ο καρκίνος αποτελεί το μεγαλύτερο πρόβλημα υγείας παγκοσμίως και την δεύτερη αιτία θανάτου στις Η.Π.Α. μετά τους θανάτους από καρδιαγγειακές ασθένειες.

Οι όγκοι στον άνθρωπο μπορούν να διαχωριστούν με ποικίλους τρόπους και ειδικότερα ανάλογα με την επιθετικότητά του ή τον ιστό στον οποίο σχηματίζεται. Περισσότεροι από 120 διαφορετικούς τύπους όγκων έχουν βρεθεί στον ανθρώπινο εγκέφαλο με το γλοιοβλάστωμα να είναι ο πιο κοινός από αυτούς, προκαλώντας την πλειονότητα των θανάτων (περίπου 200.000) που σχετίζονται με όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος κάθε χρόνο παγκοσμίως. Ένα από τα χαρακτηριστικά του γλοιοβλαστώματος και γενικά τον όγκων είναι η αγγειογένεση, ο σχηματισμός δηλαδή νέων αιμοφόρων αγγείων μέσω των οποίων μεταφέρονται θρεπτικά συστατικά στα κύτταρα και απομακρύνονται τοξικά παράγωγα από αυτά. Στον όγκο παρατηρείται έντονη αγγειογένεση η οποία προκαλείται από την υπερέκφραση των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Μερικές από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του καρκίνου είναι το χειρουργείο, η χημειοθεραπεία και η στοχευμένη θεραπεία, όμως καθ' όλη τη διάρκεια της ιστορίας οι μέθοδοι αυτές χαρακτηρίζονται από αρνητικά στοιχεία, όπως η αναποτελεσματικότητα των φαρμάκων, η υποτροπή, η μετάσταση καθώς και οι δυσχερείς παρενέργειες. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη νέων μεθόδων για την διάγνωση αλλά και την καλύτερη και σωστότερη αντιμετώπισή του.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση νέων μικρών μορίων και ειδικότερα φθορίζοντων αναλόγων πεπτιδίων, που θα στοχεύουν και θα ανιχνεύουν τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2, οι οποίοι υπερεκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του γλοιοβλαστώματος, και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό του ποσοστού έκφρασης των υποδοχέων αυτών. Επιπλέον σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν δύο νέα μόρια που αποτελούν αναστολείς της PI3K καθώς έδειξαν έντονη κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον, ανταποκρίνονται στις μεταβολές του ιζώδους, καθιστώντας τα ικανά να χρησιμοποιηθούν και ως διαγνωστικά μόρια. Ειδικότερα, στην ένωση 3 παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης φθορισμού κατά 125 φορές ενώ στην ένωση 4 αύξηση της έντασης φθορισμού κατά 34,5 φορές. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα

κυτταροτοξικότητας των παραπάνω ενώσεων στις καρκινικές κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος U87 και T98, από τα οποία καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως οι ενώσεις 3 και 4 παρουσιάζουν καλή κυτταροτοξικότητα.

Οι ενδιάμεσες όσο και οι τελικές ενώσεις καθαρίστηκαν με κατάλληλες τεχνικές όπως για παράδειγμα η χρωματογραφία στήλης και η HPLC και ταυτοποιήθηκαν με 1D φασματοσκοπία NMR και φασματομετρία μάζης. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis και φθορισμού όπου ελέγχθηκε η απόκριση των ενώσεων σε μεταβολές του διαλύτη, του ιζώδους και της θερμοκρασίας.

Abstract

Cancer is one of the most fatal diseases of modern times, causing many deaths every year. In particular, cancer is caused by pathophysiological changes in the intrinsic processes of cell division. It has emerged as a major disorder that is responsible for a large number of deaths per year worldwide and more specifically, according to studies conducted in 2022, cancer is the biggest health problem worldwide and the second cause of death in the U.S. after deaths from cardiovascular diseases.

Tumours in humans can be classified in a variety of ways and in particular, according to its aggressiveness or the tissue in which it forms. More than 120 different types of tumours have been found in the human brain with glioblastoma being the most common of these, causing the majority of deaths (around 200,000) associated with central nervous system tumours each year worldwide. One of the characteristics of glioblastoma and tumours in general is angiogenesis, the formation of new blood vessels through which nutrients are transported to the cells and toxic products are removed from them. In the tumour, there is marked angiogenesis which is caused by the overexpression of VEGFR-1 and VEGFR-2 receptors in endothelial cells.

Some of the methods used to treat cancer are surgery, chemotherapy, and targeted therapy, but throughout history these methods have been characterised by negative aspects such as drug ineffectiveness, relapse, metastasis, and side effects. It is therefore necessary to develop new methods for diagnosis and better appropriate treatment.

The aim of the present work is to find a new formulation that will use small molecules, and in particular fluorescent peptide analogues, that will target and detect the VEGFR-1 and VEGFR-2 receptors, which are overexpressed in glioblastoma endothelial cells, and can be used to determine the expression levels of these receptors. In addition, two new molecules that are PI3K inhibitors were designed, synthesized, and evaluated as they showed strong cytotoxicity. Moreover, they are responsive to changes in viscosity, therefore they can also be

used as diagnostic molecules. In particular, compound 3 showed a 125-fold increase in fluorescence intensity while compound 4 showed a 34.5-fold increase in fluorescence intensity. In addition, cytotoxicity experiments of the above compounds on glioblastoma cancer cell lines U87 and T98 were performed, from which we concluded that compounds 3 and 4 exhibit good cytotoxicity.

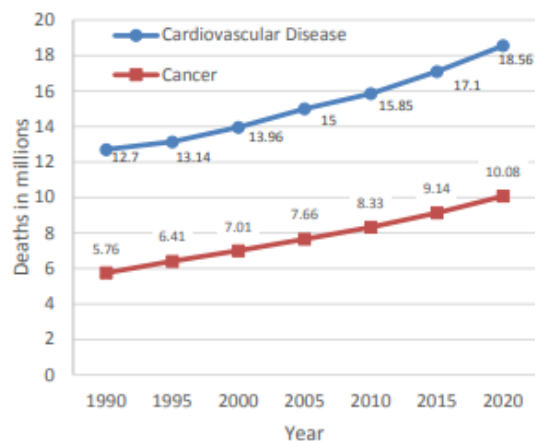
Both intermediate and final compounds were purified by appropriate techniques such as column chromatography and HPLC, and identified by 1D NMR spectroscopy and mass spectrometry. Subsequently, UV-Vis and fluorescence spectroscopy experiments were carried out where the response of the compounds to changes in solvent, viscosity and temperature were tested.

Μέρος Ι
Θεωρητικό μέρος

1. Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο

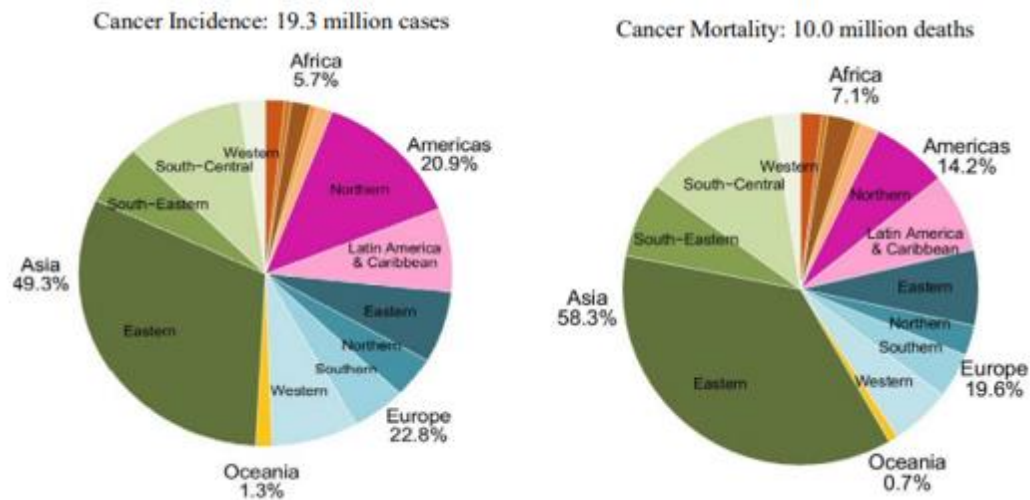
Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις περισσότερο θανατηφόρες ασθένειες της σύγχρονης εποχής που προκαλεί πολλούς θανάτους κάθε χρόνο. Οι διακυμάνσεις της συγκεκριμένης νόσου στις διάφορες περιοχές του κόσμου, οι διαθέσιμες ιατρικές εγκαταστάσεις καθώς και άλλοι κοινωνικο-οικονομικοί παράγοντες έχουν επηρεάσει τη σωστή διαχείριση του καρκίνου[1].

Ειδικότερα, ο καρκίνος προκαλείται από παθοφυσιολογικές αλλαγές στις εγγενείς διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης. Έχει αναδειχθεί ως μία σημαντική διαταραχή η οποία είναι υπεύθυνη για έναν μεγάλο αριθμό θανάτων ανά τον χρόνο παγκοσμίως[1] και πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 2022, ο καρκίνος αποτελεί το μεγαλύτερο πρόβλημα υγείας παγκοσμίως και την δεύτερη αιτία θανάτου στις Η.Π.Α. μετά τους θανάτους από καρδιαγγειακές ασθένειες (**Εικόνα 1**)[2]. Περισσότερες από 19,3 εκατομμύρια περιπτώσεις καρκίνου διαγνώστηκαν και αναφέρθηκαν πρόσφατα, οδηγώντας σε περίπου 10 εκατομμύρια θανάτους το 2020[1].



Εικόνα 1. Σχετικός αριθμός θανάτων, ανά πέντε χρόνια, που οφείλονται σε καρδιαγγειακές παθήσεις και σε καρκίνο[1].

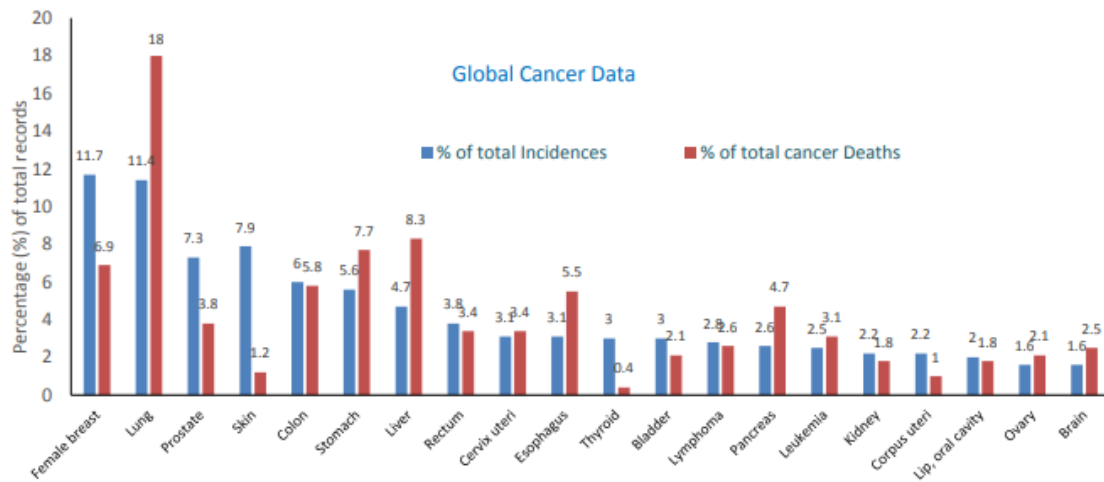
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η κοινωνικοοικονομική κατάσταση μιας συγκεκριμένης περιοχής αποτελεί μέρος των περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς επηρεάζουν την διαθεσιμότητα των ιατρικών εγκαταστάσεων και την διάθεση πιο αποτελεσματικών ακριβών φαρμάκων. Επιπλέον, η μη κατάλληλη χρήση φυτοφαρμάκων, πρακτικών διάθεσης βιομηχανικών απορριμμάτων και των πολιτικών ελέγχου της ρύπανσης συμβάλλουν έμμεσα στην ποιότητα της υγείας. Οι παραπάνω παράγοντες ευθύνονται άμεσα για τον επιπολασμό της νόσου και για τους θανάτους μιας συγκεκριμένης περιοχής (**Εικόνα 2**)[1].



Εικόνα 2. Πίτες ποσοστιαίας αναλογίας των περιστατικών και των θανάτων από τον καρκίνο σε διάφορες περιοχές[1].

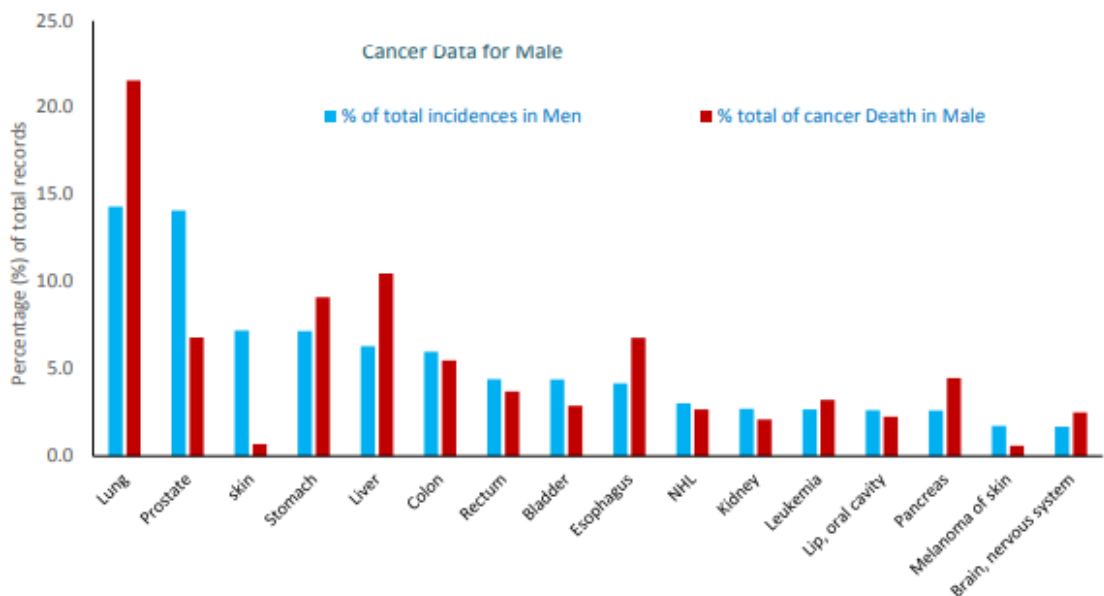
Ένα επιπλέον αίτιο που επηρέασε δυσμενώς την διάγνωση και την θεραπεία του καρκίνου το 2020, ήταν η εμφάνιση της πανδημίας της νόσου Coronavirus 2019 (Coronavirus Disease 2019, COVID-19). Η μειωμένη πρόσβαση στα κέντρα υγείας λόγω της διακοπής λειτουργίας των εγκαταστάσεων υγειονομικής περίθαλψης καθώς και ο φόβος για την έκθεση του ανθρώπου στον ιό COVID-19 οδήγησε σε καθυστερήσεις στην διάγνωση και την θεραπεία του καρκίνου με αποτέλεσμα την πιθανή βραχυπρόθεσμη πτώση της συχνότητας εμφάνισής του ακολουθούμενη από την αύξηση της νόσου σε προχωρημένο στάδιο και τελικά σε αύξηση της θνησιμότητάς του[2].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, 19,3 εκατομμύρια περιστατικά και 10 εκατομμύρια θάνατοι λόγω του καρκίνου παγκοσμίως υπολογίστηκαν σύμφωνα με την GLOBOCAN το 2020. Από τα συνολικά αυτά περιστατικά, η συχνότητα εμφάνισης των πιο κοινά διαγνωσμένων καρκίνων παγκοσμίως ήταν ο καρκίνος του μαστού (2,26 εκατομμύρια περιστατικά, 11,7%), ο καρκίνος στους πνεύμονες (2,21 εκατομμύρια, 11,4%) και ο καρκίνος του προστάτη (1,41 εκατομμύρια, 7,3%). Η συνδυαστική θνησιμότητα λόγω του καρκίνου υπέδειξε πως η κύρια αιτία θανάτων από καρκίνο ήταν αυτή του πνεύμονα (1,79 εκατομμύρια θάνατοι, 18% του συνόλου των θανάτων λόγω του καρκίνου), του ήπατος (830.000, 8,3%), του στομάχου (769.000, περίπου 7,7%) και του καρκίνου του μαστού (680.000, 6,9%) (**Εικόνα 3**)[2].

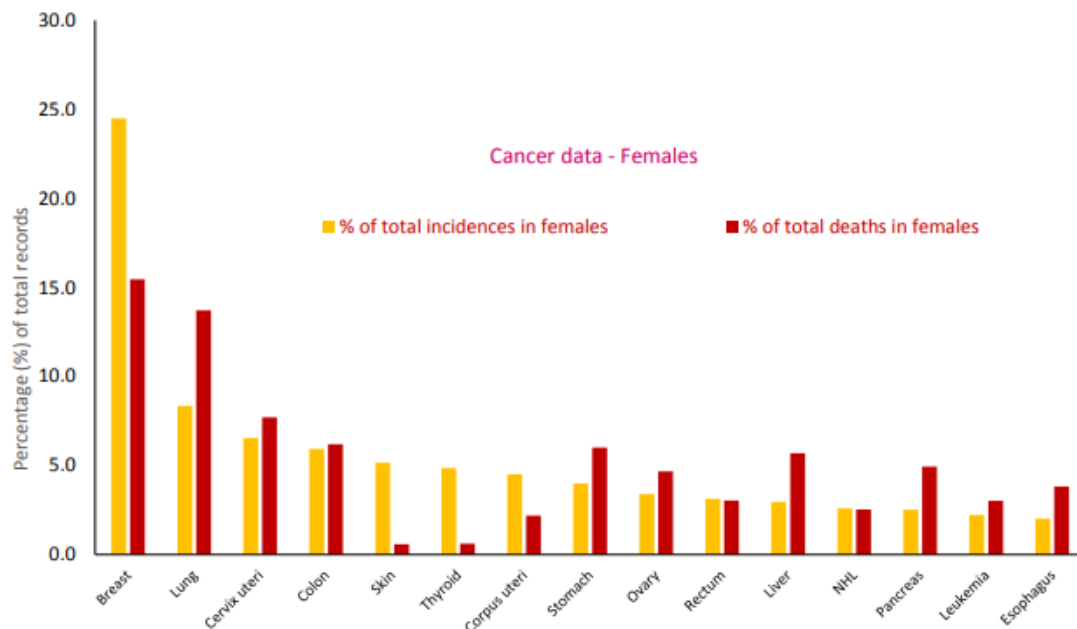


Εικόνα 3. Σχετική αναπαράσταση σε ποσοστά των συνολικών περιστατικών (19,3 εκατομμύρια) και των συνολικών θανάτων (10 εκατομμύρια) από τον καρκίνο[1].

Ός προς την θνησιμότητα, οι περισσότεροι θάνατοι στους άντρες προκαλούνται από καρκίνο του πνεύμονα (21,5%), του ήπατος (10,4%) και του στομάχου (9,1%) ενώ στις γυναίκες από καρκίνο του μαστού (15,5%), του πνεύμονα (13,7%) και του τραχήλου της μήτρας (7,7%) (Εικόνα 4, **Εικόνα 5**)[1].



Εικόνα 4. Σχετική αναπαράσταση του ποσοστού του συνολικού αριθμού των περιστατικών (10,1 εκατομμύρια) και των θανάτων (5,5 εκατομμύρια) από καρκίνο στους άνδρες για τους πιο κύριους τύπους καρκίνου που συναντώνται στους άντρες[1].



Εικόνα 5. Σχετική αναπαράσταση του ποσοστού του συνολικού αριθμού των περιστατικών (9,2 εκατομμύρια) και των θανάτων (4,4 εκατομμύρια) από καρκίνο για τους πιο κύριους τύπους καρκίνου που συναντώνται στις γυναίκες[1].

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής για το έτος 2019, εκτιμήθηκε, πως ο αριθμός των ασθενών που θα διαγνωστούν με καρκίνο είναι περίπου 1,7 εκατομμύρια το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 4.800 διαγνώσεις κάθε μέρα ενώ 606.880 άνθρωποι έχασαν την ζωή τους κάτι το οποίο αντιστοιχεί σε σχεδόν 1.700 κάθε ημέρα.

Για το έτος 2022, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, εκτιμώνται 1.918.030 περιστατικά καρκίνου[1], [2] που αντιστοιχούν σε περίπου 5.250 διαγνώσεις κάθε μέρα[2] και 609.360 θάνατοι, υποδηλώνοντας μια αύξηση 8,8% στα περιστατικά και 0,41% στους θανάτους λόγω του καρκίνου σε σχέση με το 2019[1]. Η πιθανότητα διάγνωσης με επιθετικό τύπο καρκίνου καθ' όλη την διάρκεια ζωής είναι ελαφρώς μεγαλύτερη στους άντρες (40,2%) απ' ότι στις γυναίκες (38,5%) κάτι το οποίο αποδίδεται ίσως στην μεγαλύτερη έκθεση σε καρκινογόνους παράγοντες του περιβάλλοντος, σε βιολογικούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα και το ύψος καθώς και στις διαφοροποιήσεις στις ενδογενείς ορμόνες μεταξύ των δύο φύλων[2].

2. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου

2.1. Γενικά στοιχεία

Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από τρισεκατομμύρια κύτταρα τα οποία όταν λειτουργούν φυσιολογικά, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με μια διαδικασία που

ονομάζεται κυτταρική διαίρεση οδηγώντας τελικά στον σχηματισμό νέων κυττάρων. Όταν ένα κύτταρο φτάνει στο στάδιο της γήρανσης ή όταν υποστεί κάποια βλάβη θανατώνεται και νέα κύτταρα παίρνουν την θέση του. Ο καρκίνος μπορεί να δημιουργηθεί σε οποιαδήποτε περιοχή του ανθρώπινου σώματος και είναι μία ασθένεια κατά την οποία ορισμένα κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και εξαπλώνονται σε άλλες περιοχές του σώματος. Ειδικότερα, είναι μία γενετική ασθένεια κατά την οποία παρατηρούνται μεταβολές σε γονίδια τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική λειτουργία και ειδικότερα την ανάπτυξη και την διαίρεση του κυττάρου [3].

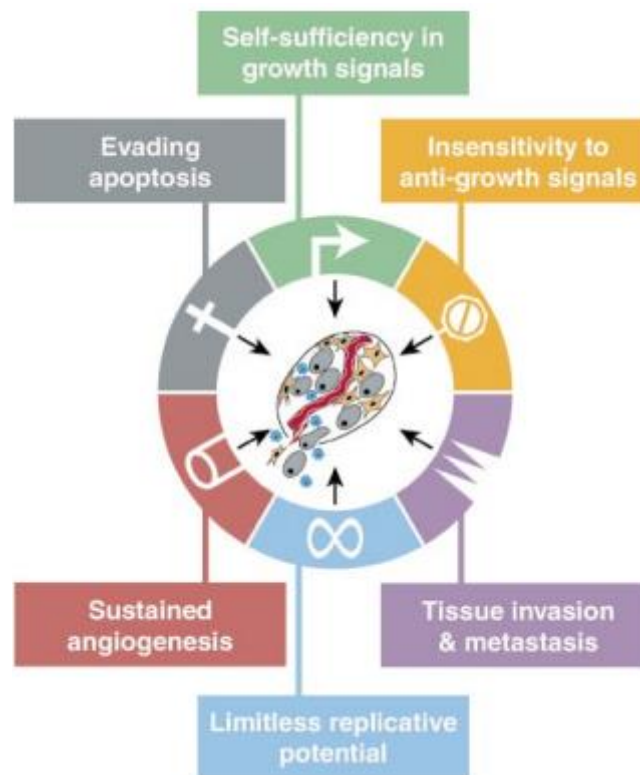
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί βλάβη ή βρίσκονται στο στάδιο της γήρανσης καταστρέφονται και νέα κύτταρα, τα οποία προέκυψαν με την διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης, παίρνουν την θέση τους. Μερικές φορές η διαδικασία αυτή δεν γίνεται σωστά και ορισμένα μη φυσιολογικά κύτταρα ή κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί βλάβες συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να σχηματίσουν όγκους, οι οποίοι μπορεί να είναι καρκινικοί ή μη καρκινικοί [3].

Οι καρκινικοί όγκοι μπορούν να εξαπλωθούν και να εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς όπως και να ταξιδέψουν σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος και να σχηματίσουν νέους όγκους (μια διαδικασία που λέγεται μετάσταση). Οι καρκινικοί όγκοι καλούνται συχνά και κακοήθεις όγκοι. Στον καρκίνο μπορούν να σχηματιστούν στερεοί όγκοι ή και όχι όπως ο καρκίνος του αίματος (π.χ. λευχαιμία). Οι μη καρκινικοί όγκοι δεν εξαπλώνονται και δεν εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς. Όταν απομακρυνθούν χειρουργικά, οι μη καρκινικοί όγκοι συχνά δεν επανεμφανίζονται κάτι το οποίο συμβαίνει στους καρκινικούς όγκους [3].

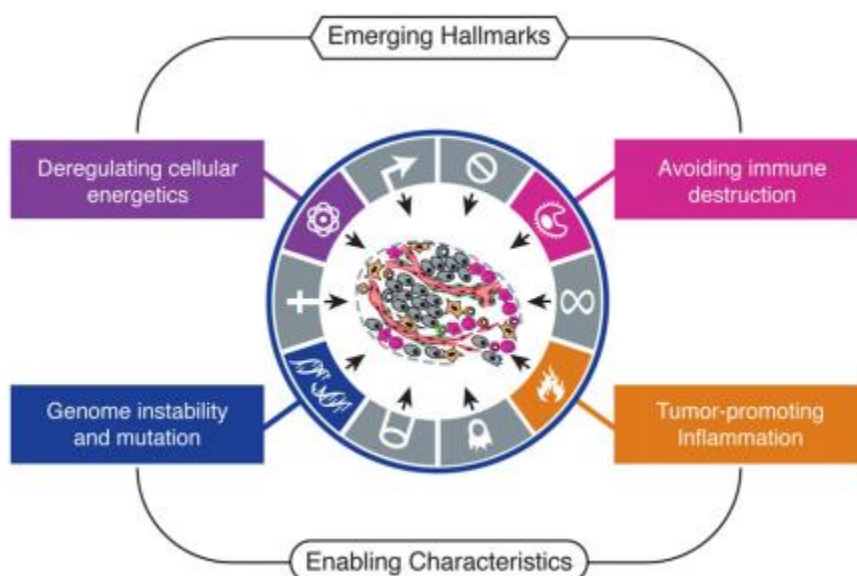
Παρά την μεγάλη ετερογένεια που εμφανίζουν οι διάφοροι καρκίνοι, ο καρκίνος αλλά και η διαδικασία κατά την οποία τα φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά κύτταρα μοιράζονται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα σε επίπεδο κυτταρικού φαινοτύπου. Το 2000, αυτά τα χαρακτηριστικά κοινά γνωρίσματα ανέρχονταν στα έξι, και ήταν τα εξής: η διατήρηση της σηματοδότησης του πολλαπλασιασμού, η αποφυγή των παραγόντων καταστολής των παραγόντων ανάπτυξης του κυττάρου, η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, η απεριόριστη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, η διαρκής αγγειογένεση και η εισβολή στους ιστούς και η μετάσταση (**Εικόνα 6**) [3].

Η απόκτηση των παραπάνω χαρακτηριστικών βρέθηκε, το 2011, ότι γίνεται από δύο νέα χαρακτηριστικά του καρκίνου τα οποία προτάθηκαν ως 'χαρακτηριστικά ενεργοποίησης'. Αυτά είναι η γονιδιωματική αστάθεια, η οποία οδηγεί στην παραγωγή μεταλλάξεων που περιλαμβάνουν ανακατατάξεις χρωμοσωμάτων, και η φλεγμονή που προάγει τον όγκο, η

οποία καθοδηγείται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μερικά από τα οποία χρησιμεύουν στην εξέλιξη του όγκου. Επιπλέον στα παραπάνω στοιχεία, προστέθηκαν ακόμη δύο χαρακτηριστικά τα οποία αποτελούν τα 'αναδυόμενα χαρακτηριστικά' του καρκίνου. Αυτά είναι ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού του κυττάρου με σκοπό την υποστήριξη της συνεχούς ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η αποφυγή της καταστροφής από το ανοσοποιητικό σύστημα (Εικόνα 7)[4].



Εικόνα 6. Τα έξι βασικά χαρακτηριστικά του καρκίνου που προτάθηκαν το 2000[3].



Εικόνα 7. Αναδυόμενα χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά ενεργοποίησης που συμπληρώνουν τα έξι βασικά χαρακτηριστικά του καρκίνου [4].

Πλέον, στα δέκα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά συμπληρώθηκαν και προστέθηκαν τέσσερα ακόμη, δύο από τα οποία είναι ‘αναδυόμενα χαρακτηριστικά’: η φαινοτυπική πλαστικότητα και η γήρανση των κυττάρων και δύο που αποτελούν ‘χαρακτηριστικά ενεργοποίησης’: ο μη-μεταλλακτικός επιγενετικός επαναπρογραμματισμός και το πολυμορφικό μικροβίωμα (**Εικόνα 8**)[5].



Εικόνα 8. Τα επιπλέον δύο αναδυόμενα και δύο χαρακτηριστικά ενεργοποίησης που προτάθηκαν ως χαρακτηριστικά του καρκίνου το 2022[5].

2.2. Διατήρηση της σηματοδότησης πολλαπλασιασμού

Τα φυσιολογικά κύτταρα πριν μεταβούν από την κατάσταση ηρεμίας στην ενεργή κατάσταση του πολλαπλασιασμού χρειάζονται μιτογόνα αυξητικά σήματα (Growth Signals, GS). Τα σήματα αυτά μεταφέρονται στο κύτταρο μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων οι οποίοι δεσμεύουν διακριτές κατηγορίες σηματοδοτικών μορίων όπως είναι οι διάχυτοι αυξητικοί παράγοντες, τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας καθώς και τα μόρια προσκόλλησης/αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων[3].

Η παραπάνω παρατήρηση είναι εμφανής κατά τον πολλαπλασιασμό κυττάρων σε μια καλλιέργεια, καθώς τυπικά πολλαπλασιάζονται μόνο μετά την παροχή κατάλληλων διάχυτων μιτογονικών παραγόντων και των κατάλληλων υποστρωμάτων για τις ιντεγκρίνες τους. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα καθώς παρουσιάζουν αρκετά μειωμένη εξάρτηση από την εξωγενή ενεργοποίηση από ειδικούς παράγοντες ανάπτυξης. Συμπερασματικά, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν και παράγουν πολλά από τα δικά τους σήματα ανάπτυξης, μειώνοντας έτσι την εξάρτησή τους από το μικροπεριβάλλον του φυσιολογικού τους ιστού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαταράσσεται ένας ομοιοστατικός μηχανισμός ο οποίος εξασφαλίζει την σωστή συμπεριφορά των διαφόρων τύπων κυττάρων σε έναν ιστό[3].

Αυτή η αυτονομία των καρκινικών κυττάρων ως προς την ανάγκη των παραγόντων ανάπτυξης για τον πολλαπλασιασμό τους βρέθηκε, λόγω της επικράτησης σε μεγάλο βαθμό των κυρίαρχων ογκογονιδίων που τους ρυθμίζουν. Για την επίτευξη αυτής της αυτονομίας τα καρκινικά κύτταρα ακολουθούν τρεις κοινές μοριακές στρατηγικές οι οποίες περιλαμβάνουν την αλλαγή, των εξωκυττάρων σημάτων ανάπτυξης, των διακυτταρικών μεταφορέων των σημάτων αυτών ή τέλος των ενδοκυτταρικών πορειών που μετατρέπουν αυτά τα σήματα σε ενδοκυτταρική δράση. Έτσι, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα, οι διαλυτοί μιτογόνοι αυξητικοί παράγοντες (GFs) παράγονται από ένα είδος κυττάρου με σκοπό την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού ενός άλλου κυττάρου (μια διαδικασία που ονομάζεται ετεροτυπική σηματοδότηση), τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να παράγουν τους αυξητικούς παράγοντες τους στους οποίους αποκρίνονται και δημιουργούν έναν βρόγχο θετικής σηματοδοτικής ανατροφοδότησης (μια διαδικασία που ονομάζεται αυτοκρινής διέγερση). Τέτοια παραδείγματα είναι η παραγωγή των παραγόντων PDGF (Platelet derived growth factor) και του TGF α (Tumor growth factor α) στο γλοιοβλάστωμα και στο σάρκωμα[3].

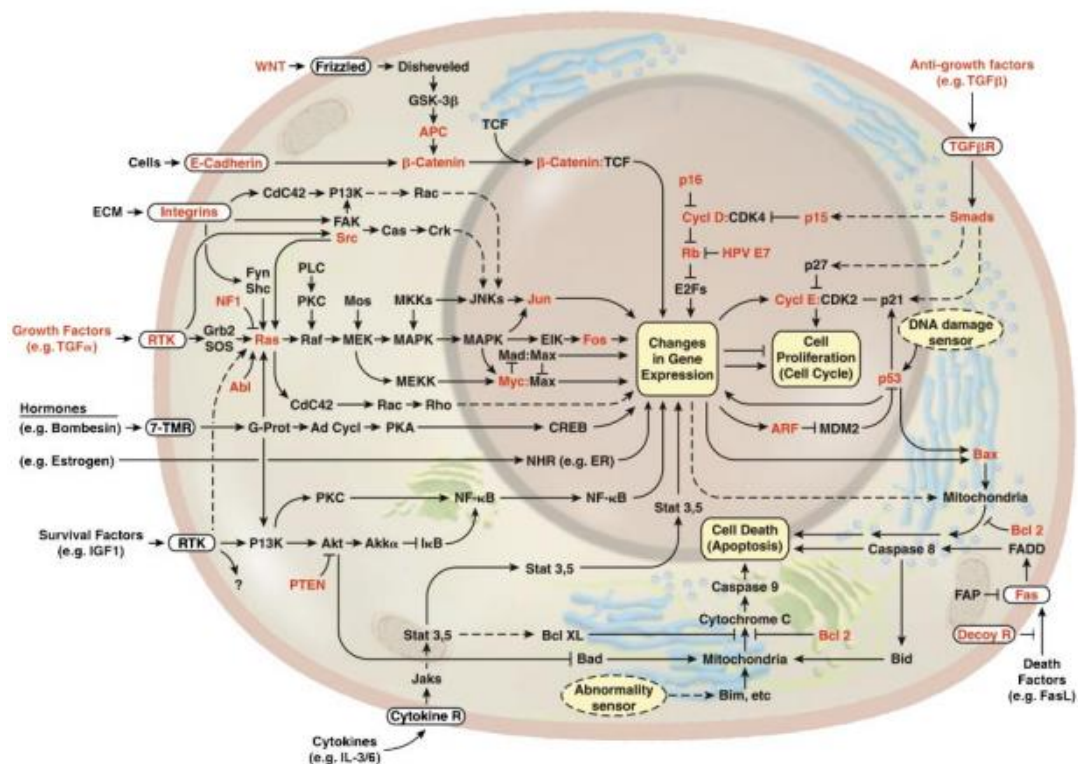
Οι υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίοι μεταφέρουν στο εσωτερικό του κυττάρου τα αυξητικά σήματα που ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό, είναι οι ίδιοι στόχοι απορρύθμισης κατά την καρκινική παθογένεση. Οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (Growth factor receptors, GFRs) έχουν ενεργότητα τυροσινικής κινάσης στην ενδοκυττάρια περιοχή τους και υπερεκφράζονται σε πολλά είδη καρκίνων. Η υπερέκφραση αυτών των υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα το κύτταρο να γίνει υπερευαίσθητο σε φυσιολογικά επίπεδα αυξητικών παραγόντων που φυσιολογικά δεν θα ενεργοποιούσαν τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Επιπλέον, η υπερέκφραση αυτών των υποδοχέων όπως και αλλαγές στην δομή τους μπορεί να οδηγήσουν σε μη εξαρτώμενη από το υπόστρωμα σηματοδότηση[3].

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αλλάξουν επίσης τους υποδοχείς της εξωκυττάριας μήτρας που εκφράζουν ευνοώντας αυτούς που μεταφέρουν σήματα προανάπτυξης δηλαδή τις ιντεγκρίνες. Αυτοί οι διλειτουργικοί, ετεροδιμερικοί υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης συνδέουν φυσιολογικά, τα κύτταρα με εξωκυττάρια υπερδομές οι οποίες είναι γνωστές ως εξωκυττάρια μήτρα (ECM, Extracellular matrix). Επιτυχής δέσμευση σε ειδικές δομές της εξωκυττάριας μήτρας οδηγεί σε ενεργοποίηση των υποδοχέων ιντεγκρίνης, οι οποίοι μεταφέρουν στο κυτταρόπλασμα σήματα που επηρεάζουν την συμπεριφορά των κυττάρων (από την κατάσταση ηρεμίας στον φυσιολογικό ιστό έως την κινητικότητα), την αντίσταση στην απόπτωση και την είσοδο στον ενεργό κυτταρικό κύκλο. Αντιθέτως, αδυναμία σχηματισμού τέτοιων αλληλεπιδράσεων των ιντεγκρινών με την εξωκυττάρια μήτρα μπορεί

να οδηγήσει στην απόπτωση και στην παύση του κυτταρικού κύκλου. Τόσο οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων που ενεργοποιούνται από ειδικά υποστρώματα όσο και οι προαυξητικές ιντεγκρίνες που συνδέονται με την εξωκυττάρια μήτρα οδηγούν στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής πορείας SOS-Ras-Raf-MAPK[3].

Ο πιο περίπλοκος όμως μηχανισμός κατά την απόκτηση της αυτονομίας προς τους αυξητικούς παράγοντες, περιλαμβάνει τις αλλαγές στα συστατικά του κυτταροπλάσματος που παίρνουν μέρος στις ενδοκυττάρειες σηματοδοτικές πορείες, δηλαδή αυτά τα συστατικά που παραλαμβάνουν και επεξεργάζονται τα σήματα που δημιουργήθηκαν κατά την σύνδεση των υποστρωμάτων στους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων και στις ιντεγκρίνες. Σε αυτήν την περίπτωση, η σηματοδοτική πορεία SOS-Ras-Raf-MAPK παίζει κεντρικό ρόλο καθώς βρέθηκε πως στο 25% των ανθρώπινων όγκων, οι πρωτεΐνες Ras εμφανίζονται με δομικά αλλαγμένες δομές οι οποίες τους δίνουν την δυνατότητα να απελευθερώνουν μιτογόνα σήματα στο κύτταρο χωρίς να χρειάζονται ενεργοποίηση από τα μόρια που τις ρυθμίζουν[3].

Μετά από πολυάριθμες μελέτες, βρέθηκε το σηματοδοτικό κύκλωμα της ανάπτυξης στα κύτταρα των θηλαστικών (**Εικόνα 9**). Ειδικότερα, ανακαλύφθηκαν νέες καθοδικές οδοί, οι οποίες προκύπτουν από τον καταρράκτη σηματοδότησης SOS-Ras-Raf-MAPK, που είναι συνδεδεμένος με ένα πλήθος διασταυρούμενων συνδέσεων με άλλα μονοπάτια. Αυτά τα διασταυρούμενα μονοπάτια είναι που επιτρέπουν στα εξωκυττάρια σήματα να προκαλούν πολλαπλές κυτταρικές βιολογικές δράσεις. Για παράδειγμα, η άμεση αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Ras με την PI3K κινάση (που προάγει την επιβίωση), επιτρέπει στους αυξητικούς παράγοντες να προκαλέσουν ταυτόχρονα σήματα επιβίωσης μέσα στο κύτταρο[3].



Εικόνα 9. Η πρόοδος στην ανάπτυξη των σηματοδοτικών μονοπατιών. Εκτός από το πρωτότυπο κύκλωμα σηματοδότησης της ανάπτυξης που επικεντρώνεται γύρω από τις Ras πρωτεΐνες και συνδέεται με ένα φάσμα εξωκυττάρων ενδείξεων, συστήματα που περιλαμβάνουν άλλα συστατικά μπορούν να μεταδίδουν σήματα κατά της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης ή να δίνουν εντολές για τον θάνατο με απόπτωση ή όχι του κυττάρου. Τα γονίδια που είναι γνωστό ότι μεταβάλλονται λειτουργικά επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα[3].

Παρόλο που οι έως τώρα μελέτες των όγκων επικεντρώθηκαν στις γενετικές αλλαγές των καρκινικών κυττάρων, για την εξήγηση της απορρύθμισης της ανάπτυξης σε έναν όγκο θα πρέπει να κατανοηθεί η συμβολή των βοηθητικών κυττάρων που υπάρχουν σε έναν όγκο και θεωρούνται φυσιολογικά παρευρισκόμενα, όπως οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην προώθηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Μέσα σε έναν φυσιολογικό ιστό, η ανάπτυξη των κυττάρων ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τα γειτονικά του κύτταρα (παρακρινή σήματα) ή μέσω συστηματικών (ενδοκρινών) σημάτων. Τέτοιου είδους σηματοδοτήσεις φαίνεται πως παίζουν ρόλο και στην συντριπτική πλειονότητα των ανθρώπινων όγκων, οι οποίοι αποτελούνται από διάφορους τύπους κυττάρων που επικοινωνούν μέσω ετεροτυπικής σηματοδότησης[3].

2.3. Αποφυγή των παραγόντων καταστολής των παραγόντων ανάπτυξης του κυττάρου

Σε έναν φυσιολογικό ιστό, πολλαπλά αντι-πολλαπλασιαστικά σήματα λειτουργούν ώστε να εξασφαλίσουν την ηρεμία του κυττάρου και την ομοιόσταση του ιστού. Αυτά τα

σήματα περιλαμβάνουν τους διαλυτούς αναστολείς της ανάπτυξης, τους ακινητοποιημένους υποδοχείς της εξωκυττάριας μήτρας καθώς και τους υποδοχείς της επιφάνειας των γειτονικών κυττάρων. Αυτά τα σήματα των αναστολέων την ανάπτυξης αναγνωρίζονται και συνδέονται στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίοι ενδοκυττάρια εμπλέκονται σε πολλούς καταρράκτες σηματοδοτικών μονοπατιών[3].

Τα σήματα κατά της ανάπτυξης μπορούν να μπλοκάρουν τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου με δύο διακριτούς μηχανισμούς. Κατά τον πρώτο μηχανισμό, τα κύτταρα εξαναγκάζονται να βγουν από τον ενεργό κύκλο πολλαπλασιασμού και να μπουν σε μια κατάσταση ηρεμίας (G_0) από την οποία μπορούν να ξαναμπουν στον κυτταρικό κύκλο όταν εμφανιστούν τα κατάλληλα εξωκυττάρια σήματα. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την μόνιμη αποφυγή των κυττάρων από την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται και οδηγούνται σε μεταμιτωτικές καταστάσεις, οι οποίες συνδέονται με την απόκτηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την διαφοροποίηση [3].

Κατά τον σχηματισμό τους, τα καρκινικά κύτταρα θα πρέπει να αποφύγουν αυτά τα σήματα κατά του πολλαπλασιασμού ώστε να καταφέρουν κυριαρχήσουν και να αναπτυχθούν. Τα μόρια τα οποία επιτρέπουν τα φυσιολογικά κύτταρα να αποκρίνονται στα σήματα κατά της ανάπτυξης παίρνουν μέρος στο κύκλωμα το οποίο σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο και ειδικότερα με τα συστατικά που ελέγχουν την διέλευση του κυττάρου από την φάση G_1 . Σε αυτήν την περίοδο, τα κύτταρα ελέγχουν το εξωκυττάριο περιβάλλον τους και αποφασίζουν με βάση τα σήματα που λαμβάνουν, αν θα πολλαπλασιαστούν, αν θα παραμείνουν σε κατάσταση ηρεμίας ή αν θα μπουν σε μεταμιτωτική φάση. Σε μοριακό επίπεδο, τα περισσότερα σήματα κατά του πολλαπλασιασμού συνδέονται με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb) και των δύο συγγενών μορφών της, p107 και p130. Όταν η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος είναι υποφωσφορυλιωμένη, μπλοκάρει τον πολλαπλασιασμό, δεσμεύοντας και μεταβάλλοντας την λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων E2F που ελέγχουν την έκφραση μιας σειράς γονιδίων που είναι απαραίτητα για την διέλευση του κυττάρου από την φάση G_1 στην φάση S[3].

Η διατάραξη του μονοπατιού του pRb, όπως με το διαλυτό σηματοδοτικό μόριο TGFβ, απελευθερώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F, που καθιστούν το κύτταρο μη ευαίσθητο στους παράγοντες κατά της ανάπτυξης οι οποίοι λειτουργούν κατά μήκος αυτού του μονοπατιού ώστε να εμποδίσουν την διέλευση του κυττάρου μέσω της φάσης G_1 του κυτταρικού κύκλου, επιτρέποντάς το κύτταρο να πολλαπλασιαστεί. Ο TGFβ ασκεί με ποικίλους τρόπους την λειτουργία του ώστε να αποτρέψει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, που την απενεργοποιεί. Συνεπώς, ο TGFβ αποτρέπει την είσοδο του

κυττάρου στην φάση G1. Σε κάποιους κυτταρικούς τύπους, καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου *c-myc*, το οποίο ρυθμίζει τον μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου G1. Μία πιο άμεση μέθοδος είναι η πρόκληση της σύνθεσης των πρωτεϊνών p15^{INK4B} και p21 από τον TGFβ, οι οποίες μπλοκάρουν τα σύμπλοκα κυκλίνης: CDK που είναι υπεύθυνα για την φωσφορυλίωση του pRb[3].

Το κύκλωμα σηματοδότησης της pRb, όπως ελέγχεται από τον TGFβ καθώς και από άλλους εξωγενείς παράγοντες, μπορεί να διαταραχθεί με ποικίλους τρόπους στους διάφορους τύπους ανθρώπινων όγκων. Σε ορισμένους όγκους χάνεται η απόκριση του TGFβ λόγω της απορρύθμισης των υποδοχέων τους (TGFβ receptors) ή άλλοι όγκοι εμφανίζουν μεταλλαγμένους ή δυσλειτουργικούς υποδοχείς. Επιπλέον, η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Smad4, η οποία μεταδίδει σήματα από τους υποδοχείς TGFβ που ενεργοποιούνται με την πρόσδεση του υποστρώματος σε ενδοκυττάρους στόχους, μπορεί να εξαλειφθεί μέσω μετάλλαξης του γονιδίου που την κωδικοποιεί. Επίσης η περιοχή που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p15^{INK4B} μπορεί να διαγραφεί ή διαφορετικά ο άμεσος επόμενος στόχος του, ο CDK4, μπορεί να μην αποκρίνεται στις ανασταλτικές δράσεις της p15^{INK4B} λόγω μεταλλάξεων όπου παράγουν υποκατεστημένα αμινοξέα στην αλληλεπιδρούσα INK4A/B περιοχή. Τα παραγόμενα σύμπλοκα της κυκλίνης D με την CDK4 μπορούν και απενεργοποιούν στη συνέχεια την υπερφωσφορυλίωση της pRb. Τέλος, το κύκλωμα σηματοδότησης της pRb μπορεί να διαταραχθεί από μεταλλάξεις του γονιδίου που την κωδικοποιεί[3].

Ένας διαφορετικός τρόπος αποφυγής των καρκινικών κυττάρων από τους παράγοντες της καταστολής της ανάπτυξης, είναι η καταστολή της έκφρασης των ιντεγκρινών καθώς και άλλων μορίων προσκόλλησης οι οποίοι στέλνουν σήματα καταστολής της ανάπτυξης και έκφραση άλλων μορίων που μεταφέρουν πρόδρομα σήματα ανάπτυξης. Συμπερασματικά, με τους ποικίλους τρόπους που προαναφέρθηκαν, το κύκλωμα καταστολής της ανάπτυξης που ελέγχεται από την pRb στη διαίρεση του κυττάρου κατά τον κυτταρικό κύκλο, διαταράσσεται στο μεγαλύτερο μέρος των ανθρώπινων καρκίνων[3].

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, εκτός από τα κυτταροπλασματικά σήματα καταστολής της ανάπτυξης εξαρτάται και από τα γειτονικά του κύτταρα. Ειδικότερα, οι ιστοί περιορίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δίνοντας εντολή στα κύτταρα να εισέλθουν μη αντιστρεπτά σε μεταμιτωτικές, διαφοροποιημένες καταστάσεις. Τα καρκινικά κύτταρα προσπαθούν να αποφύγουν αυτή την τελική διαφοροποίηση. Μια στρατηγική για την επίτευξη αυτού του στόχου, περιλαμβάνει το ογκογονίδιο *c-myc* το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα. Κατά την φυσιολογική ανάπτυξη του κυττάρου, η δράση της *Myc* (διέγερση της αύξησης και ανάπτυξης του κυττάρου), σε συνδυασμό με έναν άλλον παράγοντα, τον *Max*,

μπορεί να αντικατασταθεί από άλλα σύμπλοκα του Max, όπως η ομάδα των μεταγραφικών παραγόντων Mad. Τα σύμπλοκα Mad-Max δημιουργούν σήματα που επάγουν την διαφοροποίηση. Ωστόσο, η υπερέκφραση του ογκογονιδίου c-Myc, που παρατηρείται σε πολλούς όγκους, μπορεί να αντιστρέψει την παραπάνω διεργασία, μεταφέροντας την ισορροπία προς την εύνοια του Myc-Max συμπλόκου, διαταράσσοντας την διαφοροποίηση και επάγοντας την ανάπτυξη του κυττάρου [3].

2.4. Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο

Η ικανότητα των πληθυσμών των καρκινικών κυττάρων να αυξάνονται σε αριθμό εξαρτάται όχι μόνο από τον ρυθμό του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού αλλά και από τον ρυθμό με τον οποίο αυτά φθείρονται. Η κύρια πηγή αυτής της φθοράς των κυττάρων είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή αλλιώς απόπτωση. Όταν διεγερθεί από ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών σημάτων, οι κυτταρικές μεμβράνες διαταράσσονται, ο κυτταροπλασματικός και ο πυρηνικός σκελετός καταρρέουν, το κυτοσόλιο εξωθείται από το κύτταρο, τα χρωμοσώματα αποικοδομούνται και ο πυρήνας κατακερματίζεται. Η διεργασία αυτές γίνονται σε ένα διάστημα 30 έως 120 λεπτών και στο τέλος το συρρικνωμένο κυτταρικό σώμα απορροφάται από γειτονικά κύτταρα του ιστού και τελικά εξαφανίζεται (τυπικά μετά από 24 ώρες)[3].

Ο αποπτωτικός μηχανισμός αποτελείται γενικά από δύο διαδοχικά στάδια σε κάθε ένα από τα οποία κυριαρχεί μια συγκεκριμένη ομάδα μορίων, τα αισθητήρια και τα μόρια ενεργοποίησης. Κατά το πρώτο στάδιο, τα αισθητήρια μόρια είναι υπεύθυνα για την παρακολούθηση του εξωκυττάρου και του ενδοκυττάρου περιβάλλοντος έτσι ώστε να ελέγξουν, αν οι συνθήκες είναι φυσιολογικές ή μη φυσιολογικές και τελικά αν είναι κατάλληλες για την επιβίωση του κυττάρου ή όχι. Αν όχι, το οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Αυτά τα σήματα, ρυθμίζουν την δεύτερη κατηγορία μορίων τα οποία παίρνουν μέρος στο δεύτερο στάδιο του αποπτωτικού μηχανισμού και λειτουργούν σαν ενεργοποιητές του θανάτου με απόπτωση [3].

Για την διασφάλιση της απόπτωσης του κυττάρου, όταν σε αυτό προκληθεί κάποια βλάβη, εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη υποδοχείς οι οποίοι δεσμεύουν παράγοντες επιβίωσης ή θανάτου. Παραδείγματα ζευγών υποστρωμάτων/υποδοχών μέσω των οποίων μεταδίδονται σήματα επιβίωσης, είναι οι IGF-1 ή IGF-2 μέσω του υποδοχέα τους IGF-1R και της IL-3 μέσω του υποδοχέα της IL-3R και παραδείγματα ζευγών υποστρωμάτων/υποδοχών μέσω των οποίων μεταδίδονται σήματα θανάτου είναι οι FAS μέσω του υποδοχέα τους FASR και του TNFα μέσω του TNF-R1 [3].

Πολλά από τα σήματα που προκαλούν απόπτωση επεξεργάζονται από τα μιτοχόνδρια, τα οποία ανταποκρίνονται στα προ-αποπτωτικά σήματα απελευθερώνοντας το κυτόχρωμα C, ο οποίος είναι ένα ισχυρός καταλύτης της απόπτωσης. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2, της οποίας τα μέλη έχουν είτε προ-αποπτωτική (Bax, Bak, Bid και Bim) είτε αντι-αποπτωτική δράση (Bcl-2, Bcl-XL και Bcl-W), δρουν ρυθμίζοντας την σηματοδότηση του μιτοχονδριακού θανάτου μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ρυθμίζοντας την έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax, ως συνέπεια της ανίχνευσης βλαβών στο DNA. Η Bax με την σειρά της διεγείρει τα μιτοχόνδρια τα οποία απελευθερώνουν το κυτόχρωμα C και το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση[3].

Οι τελικοί ενεργοποιητές της απόπτωσης, περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που ονομάζονται κασπάσες. Η πυροδότηση της ενεργοποίησης πολλών διαφορετικών κασπασών, οι οποίες τελικά οδηγούν το κύτταρο στον κυτταρικό θάνατο, εξαρτάται από δύο κασπάσες τις, -8 και -9. Αυτές ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς που αναγνωρίζουν παράγοντες θανάτου ή από το κυτόχρωμα C που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, αντίστοιχα[3].

Η απόπτωση ως χαρακτηριστικό γνώρισμα των ανθρώπινων όγκων επιδρά σημαντικά στην εξέλιξη και την ανάπτυξη του καρκίνου. Για παράδειγμα, πειράματα που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου ο αναστολέας του καρκίνου pRb ήταν λειτουργικά απενεργοποιημένος στο χοριοειδές πλέγμα, μικροσκοπικά τμήματα όγκου άρχισαν να αναπτύσσονται με σχετικά αργό ρυθμό ενώ παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός κυττάρων να θανατώνεται με την διαδικασία της απόπτωσης. Όταν επιπλέον έγινε ταυτόχρονη απενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 (ένα σημαντικό μόριο στη σηματοδοτική πορεία της απόπτωσης), ο σχηματισμός των όγκων γινόταν με ταχείς ρυθμούς και μικρός αριθμός κυττάρων έμπαιναν στην διαδικασία της απόπτωσης[3].

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν αντίσταση στην απόπτωση με την χρήση διαφόρων στρατηγικών. Η πιο συχνά εμφανιζόμενη, είναι η απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 λόγω μετάλλαξης του γονιδίου. Η επακόλουθη λειτουργική αδρανοποίηση του προϊόντος του, της πρωτεΐνης p53, παρατηρείται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ανθρώπινων όγκων και έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση ενός σημαντικού ανιχνευτή των βλαβών που συμβαίνουν στο DNA και που οδηγούν τελικά το κύτταρο σε απόπτωση[3].

2.5. Δυνατότητα απεριόριστων πολλαπλασιασμών

Το απορυθμισμένο πρόγραμμα πολλαπλασιασμού του κυττάρου που προκύπτει σύμφωνα με την ανάλυση των προηγούμενων χαρακτηριστικών του καρκίνου, θα έπρεπε να ήταν αρκετό για την δημιουργία πολλών κυτταρικών πληθυσμών που συνολικά αποτελούν τους όγκους. Όμως, αποδείχτηκε πως η διαταραχή της σηματοδότησης μεταξύ των κυττάρων δεν είναι αρκετή από μόνη της, για την ανάπτυξη μεγάλων όγκων[3].

Οι περισσότεροι τύποι κυττάρων των θηλαστικών φέρουν ένα εγγενές αυτόνομο σύστημα ελέγχου του πολλαπλασιασμού τους, το οποίο λειτουργεί ανεξάρτητα από τα μονοπάτια σηματοδότησης μεταξύ κυττάρων που περιεγράφηκαν παραπάνω. Για να αυξηθεί ο όγκος μακροσκοπικά και να γίνει απειλητικός για την ζωή του ανθρώπου θα πρέπει και αυτός να διαταραχθεί. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τον Hayflick απέδειξαν πως τα κύτταρα σε μία καλλιέργεια έχουν πεπερασμένο αριθμό πολλαπλασιασμών. Έτσι, μόλις οι κυτταρικοί πληθυσμοί περάσουν αυτόν τον αριθμό διπλασιασμών, σταματούν να αναπτύσσονται, μια διαδικασία που ονομάζεται γήρανση [3].

Η γήρανση των καλλιιεργειών ανθρώπινων ινοβλαστών μπορεί να παρακαμφθεί με την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών pRb και p53, τα οποία εν συνεχεία, μπορούν να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται για επιπλέον γενιές έως ότου εισέλθουν σε μία δεύτερη κατάσταση που ονομάζεται κατάσταση κρίσης. Αυτή η κατάσταση χαρακτηρίζεται από τον μαζικό θάνατο των κυττάρων, την καρυοτυπική αταξία που σχετίζεται με την σύντηξη των χρωμοσωμάτων και την περιστασιακή εμφάνιση μιας παραλλαγής (1 στα 10^7 κύτταρα) κυττάρων που έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται χωρίς όρια, ένα χαρακτηριστικό που ονομάζεται αθανασία. Οι περισσότεροι τύποι καρκινικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργειες εμφανίζουν το χαρακτηριστικό της αθανασίας, υποδηλώνοντας έτσι πως το απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού είναι ένας φαινότυπος που αποκτάται *in vivo* κατά την διάρκεια εξέλιξης του όγκου και είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη της κακοηθούς κατάστασής τους[3].

Παρατηρήσεις σε διάφορες καλλιέργειες κυττάρων, υποδεικνύουν πως στους διάφορους φυσιολογικούς κυτταρικούς τύπους ο αριθμός των διπλασιασμών του κυττάρου ανέρχεται στους 60-70. Στις άκρες κάθε χρωμοσώματος υπάρχουν περιοχές, τα λεγόμενα τελομερή, τα οποία αποτελούνται από αρκετές χιλιάδες επαναλαμβανόμενες επαναλήψεις μιας μικρής αλληλουχίας 6 ζευγών βάσεων. Κάθε γενιά κυττάρων που προκύπτει μετά τον πολλαπλασιασμό ενός κυττάρου, χάνει ένα μικρό τμήμα τελομερικού DNA περίπου 50-100 ζευγών βάσεων στις άκρες κάθε χρωμοσώματος μετά από κάθε κυτταρικό κύκλο. Αυτή η σταδιακή απώλεια του DNA των τελομερών μετά από κάθε κυτταρικό κύκλο οφείλεται στην

αδυναμία των DNA πολυμερασών να αντιγράψουν το 3' άκρο του χρωμοσωμικού DNA κατά την διάρκεια της κάθε φάσης S του κάθε κυτταρικού κύκλου. Η προοδευτική απομάκρυνση των τελομερών του DNA μετά από κάθε επιτυχές διπλασιασμό του κυττάρου, προκαλεί σταδιακά την αδυναμία του κυττάρου να προστατεύσει το χρωμοσωμικό DNA. Τα μη προστατευμένα χρωμοσωμικά άκρα των χρωμοσωμάτων, συμμετέχουν σε συγχωνεύσεις μεταξύ των άκρων τους οι οποίες δημιουργούν μία καρυστυπική αταξία που σχετίζεται με την κατάσταση της κρίσης. Αυτό οδηγεί τελικά στον θάνατο του κυττάρου που έχασε τις περιοχές των τελομερών το[3].

Η διατήρηση των τελομερών των χρωμοσωμάτων είναι εμφανής σε όλους σχεδόν τους τύπους κακοηθών καρκίνων. Το 85-90% αυτών, το καταφέρνουν με την ρύθμιση της έκφρασης ενός ενζύμου, την τελομεράση, η οποία προσθέτει αλληλουχίες 6 νουκλεοτιδίων στα άκρα των τελομερών του DNA, ενώ τα υπόλοιπα έχουν εφεύρει έναν τρόπο ενεργοποίησης ενός μηχανισμού, που ονομάζεται ALT, ο οποίος φαίνεται να διατηρεί τα τελομερή μέσω διαχρωμοσωμικών ανταλλαγών αλληλουχιών, που βασίζεται στον ανασυνδυασμό του DNA. Συνολικά, και με τους δύο μηχανισμούς, τα τελομερή διατηρούνται σε μήκος πάνω από το κρίσιμο όριο, το οποίο με την σειρά του επιτρέπει τον απεριόριστο πολλαπλασιασμό των απογόνων του αρχικού κυττάρου. Και οι δύο μηχανισμοί που προαναφέρθηκαν, φαίνεται να καταστέλλονται στα περισσότερα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα ώστε να μην τους δίνεται η δυνατότητα απεριόριστου πολλαπλασιασμού [3].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι κυτταρικοί πληθυσμοί όταν περάσουν τον πεπερασμένο φυσιολογικό αριθμό διπλασιασμών, σταματούν να αναπτύσσονται και μπαίνουν σε μια διαδικασία που ονομάζεται κυτταρική γήρανση. Το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης παρατηρήθηκε αρχικά ως μία καθυστερημένη απόκριση των πρωτογενών κυττάρων στον παρατεταμένο πολλαπλασιασμό *in vitro* και έχει συνδεθεί έτσι με μηχανισμούς καταμέτρησης των διαιρέσεων. Παρατηρήθηκε επιπλέον, πως η κατάσταση της γήρανσης μπορεί να επαχθεί σε μερικές καλλιέργειες κυττάρων ως απάντηση στα υψηλά ποσοστά έκφρασης ορισμένων γονιδίων όπως το ενεργοποιημένο ογκογονίδιο *ras*[3].

Σύμφωνα με τα προηγούμενα, μπορεί να ισχυριστεί πως η γήρανση, όπως και η απόπτωση, αποτελούν προστατευτικούς μηχανισμούς που μπορούν να ενεργοποιηθούν από την απουσία τελομερών ή από αντικρουόμενα αυξητικά σήματα αντίστοιχα, και που τελικά μπορούν να αναγκάσουν τα κύτταρα αυτά να εισέλθουν μη αντιστρεπτά σε μία κατάσταση τύπου G₀, καθιστώντας τα μη ικανά να πολλαπλασιαστούν περαιτέρω [3].

2.6. Διαρκής αγγειογένεση

Το αγγειακό σύστημα παρέχει θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων, για αυτό σχεδόν όλα τα κύτταρα ενός ιστού βρίσκονται σε απόσταση 100 μm από ένα τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο. Κατά την διαδικασία του σχηματισμού των οργάνων, η απόσταση αυτή μεταξύ των τριχοειδών αγγείων και των κυττάρων εξασφαλίζεται με την συντονισμένη ανάπτυξη των αγγείων και του παρεγχύματος. Μετά τον σχηματισμό του ιστού, η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων, μια διαδικασία που ονομάζεται αγγειογένεση, δεν είναι συνεχής και ρυθμίζεται προσεκτικά. Παρόλο που αυτή η εξάρτηση από τα τριχοειδή αγγεία θα αποδιδόταν στην εγγενή ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν αιμοφόρα αγγεία, στην πραγματικότητα, τα κύτταρα στις περιοχές που πολλαπλασιάζονται μη φυσιολογικά στερούνται αρχικά την ικανότητα αγγειογένεσης περιορίζοντας έτσι την ικανότητά τους για επέκταση. Προκειμένου λοιπόν να εξελιχθούν σε μέγεθος, οι νεοπλασίες πρέπει να αναπτύξουν την ικανότητα της αγγειογένεσης[3].

Στον οργανισμό κυκλοφορούν θετικά ή αρνητικά σήματα τα οποία επάγουν ή καταστέλλουν την αγγειογένεση αντίστοιχα. Μία κατηγορία τέτοιων σημάτων μεταφέρεται από διαλυτούς παράγοντες και τους αντίστοιχους υποδοχείς τους, οι οποίοι εδράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παραδείγματα σημάτων που ενεργοποιούν την αγγειογένεση, είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular endothelial growth factor, VEGF) και οι όξινοι και βασικοί αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (Fibroblast growth factor 1/2, FGF1/2). Κάθε ένας από αυτούς συνδέεται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίοι έχουν ενδοκυττάρια ενεργότητα τυροσινικής κινάσης. Ένας αναστολέας της αγγειογένεσης είναι η θρομβοσπονδίνη-1, η οποία συνδέεται με τον CD36, έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα στα ενδοθηλιακά κύτταρα που συνδέεται με ενδοκυττάρια κινάσες τυροσίνης τύπου Src[3].

Οι ιντεγκρινες καθώς και τα μόρια προσκόλλησης που μεσολαβούν στην σύνδεση των κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα και των κυττάρων μεταξύ τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Ειδικότερα, η σηματοδότηση μέσω των ιντεγκρινών συμβάλλει στην ρυθμιστική ισορροπία της αγγειογένεσης καθώς τα αγγεία που δεν αναπτύσσονται περαιτέρω εκφράζουν μία συγκεκριμένη κατηγορία ιντεγκρινών ενώ τα αναπτυσσόμενα τριχοειδή αγγεία εκφράζουν μια άλλη κατηγορία ιντεγκρινών. Έτσι, η παρεμβολή στην σηματοδότηση από την τελευταία κατηγορία των ιντεγκρινών μπορεί να αναστείλει την αγγειογένεση τονίζοντας έτσι, την σημαντική συμβολή των ιντεγκρινών και των μορίων προσκόλλησης των κυττάρων στην αγγειογένεση[3].

Η ικανότητα των κυττάρων να επάγουν και να διατηρούν την αγγειογένεση αποκτάται σε ένα διακριτό βήμα (ή βήματα) κατά την ανάπτυξη του όγκου, μέσω ενός «αγγειογενετικού διακόπτη». Σε σχετικά πειράματα, τρία διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών αναλύθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της πολυσταδιακής καρκινογένεσης. Σε κάθε περίπτωση διαπιστώθηκε ότι η αγγειογένεση ενεργοποιείται κατά τα ενδιάμεσα στάδια της καρκινογένεσης, πριν από την εμφάνιση πλήρως ανεπτυγμένων όγκων. Σε συνδυασμό με τις επιδράσεις των αναστολέων της αγγειογένεσης, υποδεικνύουν ότι η νεοαγγείωση αποτελεί προϋπόθεση για την ταχεία κλωνική επέκταση που σχετίζεται με τον σχηματισμό μακροσκοπικών όγκων. Συνολικά, σε συνδυασμό με τις επιδράσεις των αναστολέων της αγγειογένεσης, φαίνεται ότι η νεοαγγείωση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ταχεία ανάπτυξη ενός κλώνου κυττάρων και για τον σχηματισμό μακροσκοπικών όγκων[3].

Οι όγκοι φαίνεται πως ενεργοποιούν τον αγγειογενετικό διακόπτη μεταβάλλοντας την ισορροπία των παραγόντων επαγωγής και αναστολής της αγγειογένεσης. Μια κοινή στρατηγική για τη μετατόπιση της ισορροπίας περιλαμβάνει την μεταβολή στην μεταγραφή των γονιδίων. Για παράδειγμα, πολλοί όγκοι παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του VEGF ή/και των FGF παραγόντων σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Σε άλλες περιπτώσεις όγκων, ρυθμίζεται η έκφραση των ενδογενών αναστολέων όπως η θρομβοσπονδίνη-1 ή η β-ιντερφερόνη. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η αγγειογένεση που παρατηρείται στις περιοχές των όγκων προσφέρει έναν θεραπευτικό στόχο ο οποίος είναι κοινός στους περισσότερους τύπους των ανθρώπινων όγκων[3].

2.7. Εισβολή στους ιστούς και μετάσταση

Κατά την ανάπτυξη των περισσότερων τύπων των ανθρώπινων καρκίνων, οι πρωτογενείς καρκινικές μάζες, δηλαδή οι περιοχές στις οποίες σχηματίστηκε αρχικά ο όγκος, παράγουν ειδικά κύτταρα τα οποία μπορούν και απομακρύνονται από τις πρωτογενείς καρκινικές μάζες, εισβάλλουν σε παρακείμενους ιστούς και στη συνέχεια ταξιδεύουν σε απομακρυσμένες περιοχές του ανθρώπινου σώματος όπου δημιουργούν νέες καρκινικές μάζες. Αυτές οι απομακρυσμένες καρκινικές μάζες (μεταστάσεις) οφείλονται για το μεγαλύτερο ποσοστό, περίπου 90%, των θανάτων από καρκίνο στον άνθρωπο[3].

Η ικανότητα της εισβολής και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων σε κάποιον άλλο ιστό, τα επιτρέπει να φεύγουν από την πρωτογενή καρκινική μάζα του όγκου και να μετακομίζουν σε κάποιον άλλο ιστό, όπου τουλάχιστον για τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του τα θρεπτικά συστατικά και ο χώρος ανάπτυξης δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα. Οι νέες μεταστάσεις που δημιουργούνται αποτελούνται από καρκινικά κύτταρα και από φυσιολογικά υποστηρικτικά κύτταρα του ιστού ξενιστή. Όπως και η κύρια πρωτογενής

καρκινική μάζα, έτσι και η μετάσταση εξαρτάται από τις προαναφερθέντα πέντε χαρακτηριστικά γνωρίσματα/ικανότητες των καρκινικών κυττάρων[3].

Η εισβολή και η μετάσταση είναι πολύπλοκες διαδικασίες οι οποίες είναι στενά συνδεδεμένες σε μηχανιστικό επίπεδο, γεγονός που δικαιολογεί την συσχέτισή τους ως ένα γενικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Και οι δύο χρησιμοποιούν στρατηγικές που περιλαμβάνουν αλλαγές στην φυσική σύνδεση των κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους και την ενεργοποίηση εξωκυττάρων πρωτεασών[3].

Αρκετές κατηγορίες πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στην σύνδεση μεταξύ των κυττάρων και του περιβάλλοντός τους σε έναν ιστό μεταβάλλονται στα κύτταρα που έχουν τις ικανότητες της διείσδυσης και της μετάστασης. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες που επηρεάζονται περιλαμβάνουν τα μόρια προσκόλλησης μεταξύ κυττάρου-κυττάρου (Cell-to-cell adhesion molecules, CAMs) και κυρίως τα μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών και των εξαρτώμενων από το ασβέστιο καδερινών, και τις ιντεγκρίνες, οι οποίες συνδέουν τα κύτταρα με υποστρώματα της εξωκυττάριας μήτρας. Όλες αυτές οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων είναι σημαντικές καθώς μεταφέρουν σήματα στο κύτταρο[3].

Η μεταβολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρου-εξωκυττάρου περιβάλλοντος που παρατηρείται περισσότερο στους καρκίνους αφορά την E-καδερίνη, έναν ομοτυπικό μόριο που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρου-κυττάρου που εκφράζεται σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα. Η σύζευξη μεταξύ παρακείμενων κυττάρων μέσω γεφυρών της E-καδερίνης έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά σημάτων κατά της καταστολής καθώς και άλλων σημάτων μέσω κυτταροπλασματικών επαφών με την β-κατενίνη σε ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει ο Lef/Tcf μεταγραφικός παράγοντας. Η λειτουργία της E-καδερίνης στην πλειονότητα των επιθηλιακών καρκίνων χάνεται, με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την αδρανοποίηση των γονιδίων της E-καδερίνης ή της β-κατενίνης μέσω μετάλλαξης, καταστολή της μεταγραφής ή πρωτεόλυση της εξωκυττάριας περιοχής της καδερίνης. Η πρόκληση της έκφρασης της E-καδερίνης σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων καθώς και σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο καρκινογένεσης σε ποντίκια έδειξε πως εξασθενεί τους διεισδυτικούς και μεταστατικούς φαινοτύπους, ενώ η καταστολή της λειτουργίας της E-καδερίνης ενισχύει και τις δύο αυτές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων[3].

Οι αλλαγές στην έκφραση των CAMs που αφορούν την υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της εισβολής και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Η πιο εμφανής περίπτωση περιλαμβάνει την N-CAM, στην οποία μεταβάλλεται η έκφραση από μία ισομορφή με έντονα

προσκολλητική ικανότητα σε μία άλλη ισομορφή η οποία δεν έχει έντονα προσκολλητική ικανότητα (έως και αποθητική ικανότητα) όπως στον όγκο του Wilms, στο νευροβλάστωμα και στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Πειράματα που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια, απέδειξαν τον ρόλο της N-CAM ως μόριο συγκόλλησης που συμμετέχει στην καταστολή της μετάστασης[3].

Εκτός από τις αλλαγές στην έκφραση των CAMs, παρατηρούνται αλλαγές και στην έκφραση των ιντεγκρινών στα μεταστατικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα που εισβάλλουν και προκαλούν μεταστάσεις σε άλλους απομακρυσμένους ιστούς, μεταβάλλουν το μικροπεριβάλλον τους, το οποίο περιλαμβάνει διαφορετικά συστατικά στην εξωκυττάρια μήτρα του. Έτσι, η επιτυχής εισβολή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στον νέο ιστό, απαιτεί προσαρμογή, η οποία επιτυγχάνεται με την μεταβολή των υπομονάδων των ιντεγκρινών α και β που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά. Αυτές οι μετατροπές έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό νέων υποτύπων ιντεγκρινών (πάνω από 22), ο κάθε ένας από τους οποίους αναγνωρίζει διαφορετικά υποστρώματα. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα διευκολύνουν την εισβολή τους και κατ' επέκταση την μετάσταση σε νέους ιστούς μεταβάλλοντας την έκφραση των ιντεγκρινών από αυτές που ευνοούν το ECM που υπάρχει στο φυσιολογικό επιθήλιο, σε άλλες ιντεγκρίνες (π.χ. $\alpha_3\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$) οι οποίες δεσμεύουν τα αποικοδομημένα συστατικά που παράγονται από τις εξωκυττάρειες πρωτεάσες [3].

Η δεύτερη γενική παράμετρος της εισβολής και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει τις εξωκυττάρειες πρωτεάσες. Ειδικότερα, αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων πρωτεασών ενώ μειώνεται η έκφραση των γονιδίων των αναστολέων των πρωτεασών και οι ανενεργές μορφές των ζυμογόνων μετατρέπονται σε ενεργά ένζυμα. Πρωτεάσες που αποικοδομούν τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, συνδέονται με την κυτταρική επιφάνεια με την προσθήκη μιας διαμεμβρανικής περιοχής κατά την σύνθεσή τους η οποία, συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς πρωτεασών ή με ιντεγκρίνες[3].

Πολλαπλοί κυτταρικοί τύποι εμπλέκονται στην έκφραση και την εμφάνιση των πρωτεασών. Σε πολλούς τύπους καρκινωμάτων, οι πρωτεάσες που αποικοδομούν την εξωκυττάρια μήτρα δεν παράγονται από τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα αλλά από τα στρωματικά και τα φλεγμονώδη κύτταρα. Μόλις απελευθερωθούν από τα κύτταρα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, ορισμένα καρκινικά κύτταρα επάγουν την έκφραση της ουροκινάσης (uPA), σε συγκαλλιεργούμενα στρωματικά κύτταρα, η οποία στη συνέχεια συνδέεται με τον υποδοχέα ουροκινάσης (uPAR) που εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα. Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση των εξωκυττάριας πρωτεασών καθώς και οι τροποποιημένες λειτουργίες των καδερινών, των

CAMs και των ιντεγκρινών παίζουν σημαντικό ρόλο στην εισβολή και την μετάσταση του καρκίνου[3].

2.8. Γονιδιωματική αστάθεια και μεταλλάξεις

Η απόκτηση των πολλαπλών χαρακτηριστικών που περιεγράφηκαν παραπάνω, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από μια σειρά μεταβολών στα γονιδιώματα των νεοπλασματικών κυττάρων. Ειδικότερα, μερικοί μεταλλαγμένοι γενότυποι δίνουν ένα πλεονέκτημα έναντι ορισμένων υποκλώνων κυττάρων, επιτρέποντάς τα να αναπτυχθούν και να κυριαρχήσουν στο περιβάλλον ενός ιστού. Επειδή οι κληρονομικοί φαινότυποι, όπως για παράδειγμα η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μπορούν επίσης να αποκτηθούν μέσω επιγενετικών μηχανισμών όπως η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών, ορισμένες επεκτάσεις κλώνων κυττάρων μπορούν να πυροδοτηθούν από μη μεταλλακτικές αλλαγές που επηρεάζουν την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης[4].

Η ικανότητα των συστημάτων συντήρησης του γονιδιώματος να ανιχνεύουν και να επιλύουν ελαττώματα στο DNA, διασφαλίζει ότι οι μεταλλάξεις θα διατηρούνται σε χαμηλά ποσοστά κατά την διάρκεια κάθε κυτταρικής γενιάς. Κατά την διαδικασία της απόκτησης των πολυάριθμων μεταλλαγμένων γονιδίων που απαιτούνται για την ογκογένεση, τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν συχνά τα ποσοστά των μεταλλάξεων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αυξημένης ευαισθησίας στους μεταλλαξιόγόνους παράγοντες ή της κατάρρευσης ενός ή περισσότερων συστατικών του μηχανισμού συντήρησης του γονιδιώματος ή τέλος μέσω και των δύο μηχανισμών. Τέλος, η συσσώρευση των μεταλλάξεων μπορεί να επιταχυνθεί με την καταστροφή των συστημάτων επιτήρησης οι οποίοι ελέγχουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος και αναγκάζουν τα γενετικά κατεστραμμένα κύτταρα να μπουκ στην κυτταρική γήρανση ή να καταστραφούν με την διαδικασία της απόπτωσης[4].

Τα γονίδια τα οποία εκφράζουν τα βασικά συστατικά της συντήρησης του DNA καλούνται ως 'φύλακες' του γονιδιώματος. Πολλά ελαττώματα μπορούν να προκληθούν σε αυτά τα είδη γονιδίων (γονίδια 'φύλακες') και ειδικότερα στα γονίδια των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται: στην ανίχνευση βλαβών του DNA και στην ενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσής του, στην άμεση επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA και στην αδρανοποίηση των μεταλλαξιόγόνων μορίων πριν αυτά καταστρέψουν το DNA. Από γενετικής άποψης, τα γονίδια 'φύλακες' δρουν όπως τα γονίδια καταστολής όγκων, καθώς οι λειτουργίες τους μπορούν να χαθούν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου. Τέτοιες

απώλειες επιτυγχάνονται είτε μέσω μεταλλάξεων αδρανοποίησης είτε μέσω επιγενετικής καταστολής[4].

Κατά την πρώτη δεκαετία στην οποία ανακαλύφθηκαν τα έξι βασικά χαρακτηριστικά του καρκίνου είχε βρεθεί και μια άλλη σημαντική πηγή γονιδιωματικής αστάθειας που σχετίζεται με τον όγκο. Αυτή είναι η απώλεια του τελομερικού DNA η οποία εμφανίζεται στα περισσότερα είδη όγκων. Αυτή δημιουργεί καρυστυπική αστάθεια και σχετίζεται με την διαγραφή χρωμοσωμικών τμημάτων. Έτσι λοιπόν, η τελομεράση αποτελεί κυρίαρχο συστατικό το οποίο προσδίδει την δυνατότητα απεριόριστου πολλαπλασιαστικού δυναμικού και το γονίδιο του συγκαταλέγεται στα γονίδια 'φύλακες' του γονιδιώματος το οποίο είναι υπεύθυνο για την διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος[4].

Ο μεγάλος αριθμός των ελαττωμάτων στην συντήρηση και την επιδιόρθωση του γονιδιώματος που έχουν βρεθεί στους ανθρώπινους όγκους καθώς και η εκτεταμένη αποσταθεροποίηση του αριθμού των αντιγράφων των γονιδίων και της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων αποδεικνύει πως η αστάθεια του γονιδιώματος είναι μία εγγενής ιδιότητα των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων και ως εκ τούτου είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου το οποίο σχετίζεται με την απόκτηση των υπόλοιπων χαρακτηριστικών του καρκίνου[4].

2.9. Φλεγμονή που προάγει τον όγκο

Οι παθολόγοι έχουν αναγνωρίσει πως τα κύτταρα τόσο του έμφυτου όσο και του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, διεισδύουν σε ορισμένους όγκους και προκαλούν φλεγμονώδεις καταστάσεις που εμφανίζονται σε μη νεοπλασματικούς ιστούς. Μετά την ανακάλυψη των καλύτερων δεικτών για τον ακριβή προσδιορισμό των διαφόρων διακριτών κυτταρικών τύπων του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι πλέον γνωστό ότι σχεδόν κάθε νεοπλασματική βλάβη περιλαμβάνει ανοσοποιητικά κύτταρα σε πυκνότητες που κυμαίνονται από μικρές διεισδύσεις που ανιχνεύονται μόνο με την χρήση αντισωμάτων ειδικά για τον εκάστοτε κυτταρικό τύπο του ανοσοποιητικού συστήματος, έως μεγάλες φλεγμονώδεις καταστάσεις που είναι εμφανείς ακόμη και με τις συνήθεις τεχνικές ιστοχημικής χρώσης[4].

Έως το 2000, υπήρχαν ήδη ενδείξεις ότι η σχετιζόμενη με τον όγκο φλεγμονώδης αντίδραση είχε το παράδοξο αποτέλεσμα πως ενισχύει την καρκινογένεση και την εξέλιξη του όγκου, βοηθώντας στην πραγματικότητα νεοπλασίες να αποκτήσουν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που προαναφέρθηκαν. Στη δεκαετία που ακολούθησε, βρέθηκε πως η φλεγμονή μπορεί να συμβάλλει στην απόκτηση των παραπάνω χαρακτηριστικών, παρέχοντας

βιοδραστικά μόρια στο μικροπεριβάλλον του όγκου, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων που υποβοηθούν την πολλαπλασιαστική σηματοδότηση, παράγοντες επιβίωσης που αποτρέπουν τον κυτταρικό θάνατο, προ-αγγειογενετικούς παράγοντες, ένζυμα που τροποποιούν την εξωκυττάρια μήτρα διευκολύνοντας την αγγειογένεση, την εισβολή και την μετάσταση και επαγωγικά σήματα που οδηγούν στην ενεργοποίηση της EMT καθώς και άλλων προγραμμάτων που διευκολύνουν την εμφάνιση των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων του καρκίνου [4].

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η φλεγμονή είναι, σε ορισμένες περιπτώσεις, εμφανής στα πρώιμα στάδια της εξέλιξης της νεοπλασίας και είναι ικανή να προάγει την ανάπτυξη των αρχόμενων νεοπλασιών προς ολοκληρωμένους καρκίνους. Επιπλέον, τα φλεγμονώδη κύτταρα απελευθερώνουν χημικές ουσίες, κυρίως δραστικές μορφές οξυγόνου, οι οποίες είναι ιδιαίτερα μεταλλαξιογόνες για τα γειτονικά καρκινικά κύτταρα, και επιταχύνουν την γενετική τους εξέλιξη προς καταστάσεις αυξημένης κακοήθειας. Συμπερασματικά, η φλεγμονή μπορεί να θεωρηθεί ένα χαρακτηριστικό που συμβάλει στην απόκτηση των υπόλοιπων βασικών χαρακτηριστικών του καρκίνου [4].

2.10. Επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού

Ο χρόνιος και συχνά ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της νεοπλαστικής νόσου περιλαμβάνει όχι μόνο την απορρύθμιση του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και την προσαρμογή του ενεργειακού μεταβολισμού προκειμένου να τροφοδοτηθεί η κυτταρική ανάπτυξη και η διαίρεση [4].

Υπό αερόβιες συνθήκες, τα φυσιολογικά κύτταρα χρησιμοποιούν την γλυκόζη για τον σχηματισμό αρχικά του πυρουβικού (πυροσταφυλικού) οξέος στο κυτοσόλιο, μια διαδικασία που ονομάζεται γλυκόλυση, και εν συνεχεία την μετατροπή του σε διοξείδιο του άνθρακα στα μιτοχόνδρια. Υπό αναερόβιες συνθήκες, στο φυσιολογικό κύτταρο ευνοείται η γλυκόλυση και σχετικά μικρή ποσότητα πυροσταφυλικού οξέος μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα στα μιτοχόνδρια. Ο Otto Warburg πρώτος παρατήρησε ένα ανώμαλο χαρακτηριστικό στον ενεργειακό μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων. Ειδικότερα, παρατήρησε πως ακόμη και με την παρουσία οξυγόνου, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματίσουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης, και συνεπώς την παραγωγή της ενέργειάς τους, περιορίζοντας τον ενεργειακό μεταβολισμό στην γλυκόλυση, μια διαδικασία που ονομάζεται 'αερόβια γλυκόλυση' [4].

Ο παραπάνω ενεργειακός επαναπρογραμματισμός των καρκινικών κυττάρων έρχεται σε αντίθεση με την ενέργεια που χρειάζονται τα καρκινικά κύτταρα για την ανάπτυξη

και τον πολλαπλασιασμό τους καθώς η παραγωγή ενέργειας (ATP) μέσω της γλυκόλυσης αποκλειστικά, είναι 18 φορές χαμηλότερη απ' ότι όταν πραγματοποιείται και οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα ρυθμίζουν τους μεταφορείς της γλυκόζης, κυρίως τον GLUT1, ο οποίος ουσιαστικά αυξάνει την πρόσληψη της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα. Πράγματι, η αυξημένη πρόσληψη και αξιοποίηση της γλυκόζης έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους ανθρώπινων όγκων με την χρήση μιας μη επεμβατικής απεικόνισης πρόσληψης της γλυκόζης, της τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET) η οποία χρησιμοποιεί ένα ραδιοεπισημασμένο ανάλογο της γλυκόζης την 18F-fluorodeoxyglucose ή FDG[4].

Η παροχή ενέργειας μέσω της γλυκολυτικής πορείας έχει αποδειχθεί πως σχετίζεται με ενεργοποιημένα ογκογονίδια (όπως τις Ras και Myc) και με μεταλλαγμένους ογκοκατασταλτικούς παράγοντες (π.χ. TP53), των οποίων οι μεταβολές στα καρκινικά κύτταρα επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να εμφανιστούν τα χαρακτηριστικά του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της αποφυγής των κυτταροστατικών ελέγχων και της αποφυγής της απόπτωσης. Οι συνθήκες υποξίας που επικρατούν στις περιοχές των όγκων μπορούν επάγουν την εξάρτηση από την γλυκόλυση καθώς το σύστημα απόκρισης στην υποξία δρα πλειοτροπικά στην ρύθμιση των μεταφορέων της γλυκόζης καθώς και πολλαπλά ένζυμα της γλυκολυτικής οδού. Έτσι, τόσο η ογκοπρωτεΐνη Ras όσο και οι συνθήκες υποξίας μπορούν να αυξήσουν ανεξάρτητα τα επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων HIF1α και HIF2α, οι οποίοι με την σειρά τους ρυθμίζουν την πορεία της γλυκόλυσης[4].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η ενεργειακή εξάρτηση των καρκινικών κυττάρων από την γλυκόλυση, η οποία παράγει τελικά 18 φορές λιγότερη ενέργεια απ' ότι η ολοκληρωμένη πορεία η οποία περιλαμβάνει και την οξειδωτική φωσφορυλίωση που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, έρχεται σε αντίθεση με τις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις των καρκινικών κυττάρων. Αυτό εξηγείται από το γεγονός πως τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν τα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκολυτικής πορείας σε διάφορες βιοσυνθετικές οδούς, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που παράγουν νουκλεοζίτες και αμινοξέα. Αυτό με την σειρά του διευκολύνει την βιοσύνθεση μακρομορίων και οργανιδίων που απαιτούνται για την συγκρότηση των νέων κυττάρων. Τέλος, ο μεταβολισμός που ανακάλυψε ο Warburg δηλαδή η 'αερόβια γλυκόλυση' παρατηρείται και στους ταχέως διαιρούμενους εμβρυϊκούς ιστούς, κάτι το οποίο επισημαίνει τον ρόλο του συγκεκριμένου μεταβολισμού και κυρίως των ενδιαμέσων προϊόντων της γλυκολυτικής πορείας στα συνθετικά μονοπάτια που απαιτούνται για τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό[4].

Ένα ενδιαφέρον στοιχείο των καρκινικών κυττάρων είναι ότι ορισμένοι αποτελούνται από δύο υποπληθυσμούς, οι οποίοι διαφέρουν ως προς τα μονοπάτια παραγωγής ενέργειας. Ο ένας υποπληθυσμός αποτελείται από κύτταρα τα οποία εξαρτώνται από την γλυκόζη για την παραγωγή ενέργειας ('φαινόμενο Warburg') και εκκρίνουν γαλακτικό οξύ, ενώ τα καρκινικά κύτταρα του δεύτερου υποπληθυσμού προλαμβάνουν και χρησιμοποιούν το γαλακτικό οξύ που παράχθηκε από τα γειτονικά του κύτταρα ως κύρια πηγή ενέργειας χρησιμοποιώντας τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Αυτοί οι δύο πληθυσμοί κυττάρων λειτουργούν συμβιωτικά καθώς τα καρκινικά κύτταρα στα οποία επικρατεί υποξία χρησιμοποιείται η γλυκόζη ως πηγή ενέργειας και παράγεται γαλακτικό οξύ ως παραπροϊόν, το οποίο μεταφέρεται και χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από τα κύτταρα που έχουν καλύτερη οξυγόνωση. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η οξυγόνωση, από την φυσιολογική κατάσταση έως την υποξία δεν είναι σταθερή στους όγκους αλλά μεταβάλλεται σχέση με τον χρόνο και την περιοχή κάτι το οποίο αποδίδεται στην αστάθεια και το ανοργάνωτο νεοαγγειοβλαστικό σύστημα του όγκου [4].

2.11. Αποφυγή της καταστροφής από το ανοσοποιητικό σύστημα

Η θεωρία της ανοσολογικής επιτήρησης προτείνει ότι τα κύτταρα και ιστοί παρακολουθούνται πάντα από το ανοσοποιητικό σύστημα και ότι αυτή είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την εξάλειψη του μεγαλύτερου μέρους των αρχόμενων καρκινικών κυττάρων και συνεπώς των υπό ανάπτυξη όγκων [4].

Τα ελαττώματα στην ανοσολογική παρακολούθηση των όγκων παίζει σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξή τους κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται από την αύξηση των καρκίνων σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Η μεγάλη πλειονότητα αυτών είναι καρκίνοι που προκαλούνται από ιούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μεγαλύτερο μέρος του ελέγχου αυτής της κατηγορίας του καρκίνου εξαρτάται από την μείωση του ιικού φορτίου στα μολυσμένα άτομα και εν μέρει μέσω της εξάλειψης των μολυσμένων από τον ιό κυττάρων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, βρέθηκε πως ο σχηματισμός του μεγαλύτερου ποσοστού των καρκίνων (>80%) μη ιογενούς αιτιολογίας περιορίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ωστόσο, στοιχεία από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια και από την κλινική επιδημιολογία, υποδηλώνουν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα λειτουργεί ως σημαντικό εμπόδιο έναντι του σχηματισμού και την εξέλιξη του όγκου σε ορισμένους μη ιογενούς τύπους καρκίνων [4].

Για την απόδειξη των παραπάνω, αξιολογήθηκαν γενετικά τροποποιημένα ποντίκια τα οποία σχεδιάστηκαν ώστε να είναι ανεπαρκή ως προς τα διάφορα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος ως προς την ανάπτυξη των όγκων από καρκινογόνα και παρατηρήθηκε ότι οι όγκοι εμφανίζονταν συχνότερα ή/και αναπτύσσονταν ταχύτερα σε αυτά

απ' ότι σε ποντίκια μάρτυρες, δηλαδή ποντίκια στα οποία υπήρχε επάρκεια στα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος. Ειδικότερα, τα ελαττώματα στην ανάπτυξη ή την λειτουργία των CD8+ κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (CTLs), των CD4+ T_H1 βοηθητικών Τ κυττάρων ή των NK (Natural Killer) κυττάρων οδήγησαν σε αυξημένη πιθανότητα σχηματισμού καρκίνου. Επιπρόσθετα, ποντίκια με συνδυασμένες ανοσοανεπάρκειες τόσο στα Τ όσο και στα NK κύτταρα έδειχναν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη του όγκου. Συνολικά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα, τόσο το έμφυτο όσο και το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην ανοσολογική επιτήρηση και συνεπώς στην καταστροφή των όγκων[4].

2.12. Ξεκλειδώνοντας την φαινοτυπική πλαστικότητα

Κατά την διάρκεια του σχηματισμού των οργάνων, η ανάπτυξη, ο προσδιορισμός και η οργάνωση των κυττάρων στους ιστούς, έτσι ώστε να λάβουν τις ομοιοστατικές τους λειτουργίες, συνδέεται με την τελική διαφοροποίηση των κυττάρων κατά την οποία τα προγονικά κύτταρα σταματούν να αναπτύσσονται, σχεδόν μη αντιστρεπτά. Συνεπώς, το τελικό αποτέλεσμα αυτής της κυτταρικής διαφοροποίησης αναστέλλει τις περισσότερες φορές των πολλαπλασιασμό ο οποίος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη νεοπλασιών. Αυτή η τελική διαφοροποίηση των κυττάρων φαίνεται πως αποφεύγεται με την ικανότητα της φαινοτυπικής πλαστικότητας στις παθολογίες του καρκίνου. Η αποφυγή της τελικής διαφοροποίησης από τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να επιτευχθεί με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς, την αποδιαφοροποίηση, την αναστολή της τελικής διαφοροποίησης και την μεταδιαφοροποίηση[5].

Τα σχηματιζόμενα καρκινικά κύτταρα, που προέρχονται από ένα φυσιολογικό κύτταρο το οποίο είχε προχωρήσει σε μία οδό προς μία πλήρως διαφοροποιημένη κατάσταση, μπορούν να αντιστρέψουν την πορεία αυτή με τον μηχανισμό της αποδιαφοροποίησης κατά την οποία επιστρέφουν σε κύτταρα που μοιάζουν με τα προγονικά. Αντίθετα, τα νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από ένα προγονικό κύτταρο το οποίο προοριζόταν να ακολουθήσει μια συγκεκριμένη πορεία η οποία θα οδηγούσε σε ένα διαφοροποιημένο τελικό στάδιο, μπορούν να βραχυκυκλώσουν αυτήν την διαδικασία, διατηρώντας τα αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα σε μία μερικώς διαφοροποιημένη κατάσταση αντίστοιχη των προγονικών του κυττάρων. Στον τελευταίο μηχανισμό της μεταδιαφοροποίησης, τα κύτταρα τα οποία προχώρησαν προς μία συγκεκριμένη οδό διαφοροποίησης μεταβάλλουν αυτήν την οδό και ακολουθούν μία διαφορετική. Με αυτήν την μεταβολή αποκτούν χαρακτηριστικά ειδικά για τους ιστούς τους

οποίους μεταδιαφοροποιήθηκαν και τα οποία δεν είχαν προκαθοριστεί από τα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία προέρχονταν[5].

Οι τρεις κατηγορίες της φαινοτυπικής πλαστικότητας, δηλαδή η αποδιαφοροποίηση των ώριμων κυττάρων προς τις προγονικές τους καταστάσεις, η αναστολή της διαφοροποίησης για την παραμονή των αναπτυσσόμενων κυττάρων στην κατάσταση προγονικών/βλαστικών κυττάρων και η μεταδιαφοροποίηση των κυττάρων σε κυτταρικούς τύπους άλλων ιστών, παρατηρείται σε πολλούς τύπους καρκίνου κατά τη διάρκεια του σχηματισμού πρωτοπαθών όγκων, στην εξέλιξη των κακοηθών όγκων ή/και στην ανταπόκριση στην θεραπεία. Συνεπώς, οι μηχανισμοί που ακολουθούν τα καρκινικά κύτταρα για την αποφυγή της τελικής διαφοροποίησης καθιστούν την φαινοτυπική πλαστικότητα ένα διακριτό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων[5].

2.13. Μη μεταλλακτικός επιγενετικός επαναπρογραμματισμός

Το χαρακτηριστικό της γονιδιωματικής αστάθειας και των μεταλλάξεων αποτελούν, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, βασικό συστατικό του καρκίνου και της παθογένειάς του. Έως τώρα, έχουν καταγραφεί μεταλλάξεις σε όλο το γονιδίωμα των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, σε κάθε τύπο ανθρώπινου καρκίνου, σε διάφορα στάδια της κακοήθους εξέλιξης, συμπεριλαμβανομένων των μεταστατικών αλλοιώσεων, και κατά την ανάπτυξη προσαρμοστικής αντίστασης στην θεραπεία. Με τα αποτελέσματα των καταγραφών των μεταλλάξεων που προαναφέρθηκαν, εκτιμάται πως οι μεταλλάξεις στα γονίδια τα οποία οργανώνουν, τροποποιούν και διατηρούν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης, και συνεπώς ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση, ανιχνεύονται ολοένα και περισσότερο και συνδέονται λειτουργικά με τα χαρακτηριστικά του καρκίνου [5].

Μία επιπλέον προσθήκη στον επαναπρογραμματισμό του γονιδιώματος είναι ο μη μεταλλακτικός γονιδιωματικός επαναπρογραμματισμός ο οποίος περιλαμβάνει αλλαγές στα γονίδια που ρυθμίζονται επιγενετικά. Ειδικότερα, είναι ο κεντρικός μηχανισμός που μεσολαβεί κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την οργανογένεση. Στον ενήλικα, η μακροπρόθεσμη μνήμη περιλαμβάνει αλλαγές στην τροποποίηση των γονιδίων και των ιστονών, στην δομή της χρωματίνης και στην ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων, που διατηρούνται σταθερά με την πάροδο του χρόνου από θετικούς και αρνητικούς βρόγχους ανατροφοδότησης. Κατά την ανάπτυξη του ανθρώπου, ανάλογες επιγενετικές μεταβολές μπορούν να συμβάλλουν στην απόκτηση των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων του καρκίνου [5].

2.13.1. Μηχανισμοί του μικροπεριβάλλοντος του επιγενετικού επαναπρογραμματισμού

Οι ανώμαλες φυσικές ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου μπορούν να προκαλέσουν ευρείες αλλαγές στο επιγονιδίωμα οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη κλώνων καρκινικών κυττάρων με αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Ένα κοινό χαρακτηριστικό του μικροπεριβάλλοντος των όγκων (ή περιοχών εντός των όγκων) είναι η υποξία, που οφείλεται στην ανεπαρκή αγγείωση. Η υποξία, μειώνει την δραστηριότητα των απομεθυλασών TET η οποία οδηγεί τελικά στην υπερμεθυλίωση. Η ανεπαρκής αγγείωση περιορίζει επίσης την βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών που μεταφέρονται με το αίμα. Ένα παράδειγμα αυτής της στέρησης των θρεπτικών συστατικών έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλει τον έλεγχο της μετάφρασης και ενισχύει τελικά τον κακοήγη φαινότυπο του καρκίνου του μαστού [5].

Ένα άλλο παράδειγμα επιγονιδιωματικής ρύθμισης που προκαλείται από το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει την ικανότητα της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων μετά την εισβολή στους ιστούς. Ένα παράδειγμα αποτελεί η αντιστρέψιμη επαγωγή της διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων στα όρια πολλών συμπαγών όγκων το οποίο ρυθμίζεται από έναν μηχανισμό που ονομάζεται μετάβαση από το επιθήλιο στην μεσεγχυματική κατάσταση (EMT, epithelial-to-mesenchymal transition). Ένας κύριος ρυθμιστής του μηχανισμού EMT είναι ο ZEB1 ο οποίος έχει αποδειχθεί πως επάγει την έκφραση μιας μεθυλοτρανσφεράσης ιστονών, την SETD1B, η οποία με την σειρά της διατηρεί την έκφραση της ZEB1 με έναν βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης ο οποίος διατηρεί την ρυθμιστική δράση του μηχανισμού EMT (εισβολή στους ιστούς). Τέλος, υπάρχει μια σειρά συνθηκών και παραγόντων, όπως η υποξία και οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα στρωματικά κύτταρα, στα οποία εκτίθενται τα καρκινικά κύτταρα στα όρια του όγκου και μπορούν να επάγουν τον μηχανισμό EMT και αυτός στη συνέχεια την διείσδυση των καρκινικών κυττάρων[5].

Οι εκτεταμένες μεταβολές της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) που περιβάλλει τα κύτταρα και ευθύνεται για την δυσκαμψία πολλών συμπαγών όγκων, έχει μεγάλη επίδραση στην εισβολή των καρκινικών κυττάρων και στη διαμόρφωση των φαινοτυπικών του χαρακτηριστικών. Σε σύγκριση με το ECM των φυσιολογικών ιστών, από τους οποίους προέρχονται οι καρκινικοί ιστοί, το καρκινικό ECM χαρακτηρίζεται συνήθως από αυξημένες διασταυρούμενες συνδέσεις όπως και μεγάλη πυκνότητα, τροποποιήσεις ενζύμων και τροποποιημένη μοριακή σύνθεση, οι οποίες συνολικά ελέγχουν εν μέρει μέσω των υποδοχέων ιντεγκρίνης, τη σηματοδότηση που προκαλείται από την ακαμψία και τα δίκτυα

της γονιδιακής έκφρασης που με την σειρά τους προκαλούν την διείσδυση των καρκινικών κυττάρων και τελικά την απόκτηση των χαρακτηριστικών τους γνωρισμάτων[5].

Εκτός από τους παραπάνω μηχανισμούς ρύθμισης του όγκου από το μικροπεριβάλλον τους, η παρακρινής σηματοδότηση που περιλαμβάνει διαλυτούς παράγοντες που απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον από τους διάφορους κυτταρικούς τύπους που υπάρχουν στους συμπαγείς όγκους μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην διείσδυση των καρκινικών κυττάρων[5].

2.13.2. Ετερογένεια της επιγενετικής ρύθμισης

Η ετερογένεια εντός του όγκου μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία φαινοτυπικής ποικιλομορφίας κατά την οποία κύτταρα που είναι ικανά για τον αυξημένο πολλαπλασιασμό και την εισβολή ξεπερνούν τα γειτονικά τους κύτταρα και προκαλούν την κακοήγη εξέλιξη του όγκου. Ένα τμήμα της φαινοτυπικής αυτής ετερογένειας βασίζεται στην χρόνια ή επεισοδιακή γονιδιωματική αστάθεια και την συνακόλουθη γενετική ετερογένεια των καρκινικών κυττάρων του όγκου. Επιπλέον, είναι πλέον αποδεκτό ότι μπορεί να υπάρξει και μη μεταλλακτική επιγενετική ετερογένεια. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συνδετική ιστόνη H1.0, η οποία εκφράζεται δυναμικά ή αναστέλλεται σε υποπληθυσμούς καρκινικών κυττάρων σε διάφορους τύπους όγκων. Ειδικότερα, ο πληθυσμός των καρκινικών κυττάρων στους οποίους έχει ανασταλεί η έκφραση της συνδετικής ιστόνης H1.0 βρέθηκε πως έχουν χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων, αυξημένη ικανότητα έναρξης όγκου και σχετίζεται με την αδυναμία στην πρόγνωση των ασθενών[5].

Με τις τεχνολογίες ανάλυσης του προφίλ των ποικίλων χαρακτηριστικών ολόκληρου του γονιδιώματος, εκτός της αλληλουχίας του DNA και των μεταλλάξεών του, διαλευκάνουν στοιχεία που επηρεάζουν το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων και την οργάνωσή του το οποία τελικά συσχετίζεται με την πρόγνωση των ασθενών. Με τις τεχνολογίες αυτές ανιχνεύεται το προφίλ της μεθυλίωσης του DNA σε όλο το γονιδίωμα, της τροποποίησης των ιστονών, της προσβασιμότητας της χρωματίνης καθώς και της μεταμεταγραφικής τροποποίησης και μετάφρασης του RNA[5].

2.13.3. Επιγενετική ρύθμιση των τύπων στρωματικών κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του όγκου

Γενικά, τα βοηθητικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου τα οποία συμβάλλουν στην απόκτηση των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων των καρκινικών κυττάρων, δεν υπόκεινται σε γενετικές αστάθειες και στον μεταλλακτικό επαναπρογραμματισμό για την ενίσχυση των δράσεων του που προάγουν τον όγκο. Αντιθέτως τα παραπάνω κύτταρα, δηλαδή οι ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο, τα

κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού συστήματος του όγκου, επαναπρογραμματίζονται επιγενετικά κατά την στρατολόγησή τους από τους διαλυτούς και φυσικούς παράγοντες που υπάρχουν στο καρκινικό μικροπεριβάλλον του όγκου [5].

2.14. Πολυμορφικό μικροβίωμα

Στον ανθρώπινο οργανισμό παρατηρείται ποικιλομορφία μικροοργανισμών, που ονομάζεται μικροβιόκοσμος, οι οποίοι συνδέονται συμβιωτικά με τους ιστούς φραγμούς του σώματος που εκτίθενται στο εξωτερικό περιβάλλον και ειδικότερα την επιδερμίδα, τον γαστρεντερικό σωλήνα, τους πνεύμονες, το στήθος και το ουροποιητικό σύστημα. Στον καρκίνο, αυτή η πολυμορφική μεταβλητότητα του μικροβιώματος μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στον φαινότυπο του καρκίνου. Μελέτες συσχέτισης στον άνθρωπο αποκάλυψαν πως συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί, κυρίως βακτήρια, μπορούν να έχουν είτε προστατευτική είτε επιβλαβή δράση στην ανάπτυξη του καρκίνου, στην κακοήθη εξέλιξη του και στην απόκριση στην θεραπεία. Παρόλο που το μικροβίωμα του εντέρου μελετήθηκε πρώτο, πολλοί ιστοί και όργανα του ανθρώπινου σώματος έχουν συσχετιστεί με μικροβιώματα, τα οποία έχουν διακριτά χαρακτηριστικά όσον αφορά την δυναμική και την ποικιλομορφία του είδους ή του υποείδους του μικροβιώματος. Σε μία έρευνα 1.526 καρκίνων εφτά διαφορετικών τύπων (οστού, εγκεφάλου, μαστού, πνεύμονα, μελανώματος, ωοθηκών και παγκρέατος) βρέθηκε πως ο κάθε ένας χαρακτηρίζεται από ένα ξεχωριστό μικροβίωμα το οποίο εντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό στο εσωτερικό των καρκινικών και ανοσοποιητικών κυττάρων [5].

2.14.1. Ποικίλες ρυθμιστικές επιδράσεις του μικροβιώματος του εντέρου

Έχει αποδειχθεί, πως το μικροβίωμα του εντέρου είναι πολύ σημαντικό για την λειτουργία του παχέος εντέρου, δηλαδή την αποικοδόμηση και την μεταφορά σημαντικών θρεπτικών συστατικών στον οργανισμό κατά την ομοιόσταση του μεταβολισμού. Μεταβολές του μικροβιακού πληθυσμού (δυσβίωση) στο παχύ έντερο μπορεί να προκαλέσουν ένα μεγάλο φάσμα φυσιολογικών παθήσεων. Βάση των παραπάνω, η ευαισθησία, η ανάπτυξη και η παθογένεια του καρκίνου του παχέος εντέρου θεωρείται πως επηρεάζεται από το μικροβίωμα του εντέρου [5].

Έως τώρα έχουν αναλυθεί δύο μηχανισμοί με τους οποίους το μικροβίωμα προσδίδει αυτούς τους ρυθμιστικούς ρόλους. Η πρώτη επίδραση είναι η μεταλαξίγνεση του επιθηλίου του παχέος εντέρου, ως αποτέλεσμα της παραγωγής βακτηριακών τοξινών και

άλλων μορίων που βλάπτουν άμεσα το DNA, διαταράσσουν τα συστήματα που διατηρούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος, προκαλούν στρες στα κύτταρα με τρόπους που βλάπτουν έμμεσα την πιστότητα της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το E. Coli που φέρει τον PKS, ο οποίος έχει αποδειχθεί πως μεταλλάσσει το ανθρώπινο γονιδίωμα και εμπλέκεται στη μετάδοση μεταλλάξεων[5].

Έχει αναφερθεί πως τα βακτήρια συνδέονται με την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου και παράγουν μιμήσεις υποστρωμάτων που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό, αποδίδοντας στα νεοπλασματικά κύτταρα να αποκτήσουν το χαρακτηριστικό γνώρισμα της σηματοδότησης του πολλαπλασιασμού. Ένας άλλος μηχανισμός με το οποίο συγκεκριμένα βακτηριακά είδη προάγουν την καρκινογένεση, περιλαμβάνει την παραγωγή του βουτυρικού οξέος. Η ύπαρξη σε μεγάλο βαθμό τέτοιων βακτηρίων παρατηρείται σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Η παραγωγή του μεταβολίτη, βουτυρικό οξύ, έχει σύνθετες φυσιολογικές επιδράσεις, όπως η επαγωγή της γήρανσης των επιθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών. Σε ένα μοντέλο ποντικού με καρκίνο του παχέος εντέρου στο οποίο υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ αναπτύσσονται περισσότεροι όγκοι απ' ό τι σε ποντίκια που δεν έχουν τέτοια βακτήρια. Επιπρόσθετα, στις συνθήκες όπου ο εντερικός φραγμός διαταράσσεται (δυσβίωση) και τα βακτήρια είναι διεισδυτικά, επηρεάζοντας για παράδειγμα την κυτταρική ενεργετική και τον μεταβολισμό, τις τροποποιήσεις των ιστονών, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την έμφυτη ανοσολογική φλεγμονή η οποία είναι ιανοσοκατασταλτική, το βουτυρικό οξύ που παράγεται από τα βακτήρια έχει διαφορετική επίδραση στα διαφοροποιημένα απ' ό τι στα αδιαφοροποίητα (βλαστικά) κύτταρα του επιθηλίου του παχέος εντέρου[5].

Πράγματι, μια ευρεία δράση του πολυμορφικού μικροβιώματος περιλαμβάνει τη διαμόρφωση του έμφυτου και του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος και της παραγωγής από τα βακτήρια 'ανοσοτροποποιητικών' παραγόντων που ενεργοποιούν του μηχανισμούς αναγνώρισης βλαβών στα επιθηλιακά ή στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό οδηγεί στην έκφραση χημειοκινών και κυτταροκινών που μπορούν να διαμορφώσουν τα χαρακτηριστικά των ανοσοποιητικών κυττάρων του επιθηλίου του παχέος εντέρου. Πέρα από την αιτιολογική συσχέτιση με τον καρκίνο του παχέος εντέρου και το μελάνωμα, η ικανότητα του εντερικού μικροβιώματος να προκαλεί την έκφραση ανοσοτροποποιητικών χημειοκινών και κυτταροκινών που εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία είναι επίσης ικανή να επηρεάσει την παθογένεια του καρκίνου και την ανταπόκριση στην θεραπεία σε άλλα όργανα του σώματος[5].

2.15. Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση είναι τυπικά μία μη αντιστρέψιμη μορφή αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, η οποία πιθανώς εξελίχθηκε σαν προστατευτικός μηχανισμός για την διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και φαινομενικά ως ένα συμπληρωματικός μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ο οποίος είναι χρήσιμος για την απενεργοποίηση και εν συνεχεία απομάκρυνση δυσλειτουργικών κυττάρων ή κυττάρων που έχουν υποστεί κάποια βλάβη. Το πρόγραμμα της κυτταρικής γήρανσης, εκτός από την αναστολή της συνέχια του κυτταρικού κύκλου, προκαλεί αλλαγές στην μορφολογία και τον μεταβολισμό των κυττάρων και κυρίως την ενεργοποίηση ενός φαινοτύπου έκκρισης που σχετίζεται με την γήρανση (Senescence-associated secretory phenotype, SASP). Αυτός ο φαινότυπος περιλαμβάνει την απελευθέρωση μιας πληθώρας βιοδραστικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των χημειοκινών, των κυτοκινών και πρωτεασών, ο τύπος των οποίων εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου και του ιστού από τον οποίο προέρχεται το κύτταρο γήρανσης. Η κυτταρική γήρανση μπορεί να προκληθεί από πλήθος διαφορετικών συνθηκών, για παράδειγμα από το στρες του μικροπεριβάλλοντος όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και των βλαβών του DNA. Επιπλέον, μπορεί να προκληθεί και από βλάβες στα οργανίδια, στην κυτταρική δομή και στα δίκτυα σηματοδότησης[5].

Η κυτταρική γήρανση θεωρείται ως ένας αμυντικός μηχανισμός ο οποίος επάγεται στα καρκινικά κύτταρα κατά τον σχηματισμό νεοπλασιών. Οι περισσότεροι από τους παραπάνω εκκινητές της κυτταρικής γήρανσης σχετίζονται με την κακοήθεια και ειδικότερα με τις βλάβες στο DNA ως συνέπεια του μη φυσιολογικού υπερπολλαπλασιασμού (επαγόμενη από ογκογονίδια γήρανση λόγω της υψηλής δραστηριοποίησης της σηματοδότησης) και την επαγόμενη από την θεραπεία γήρανση ως αποτέλεσμα των κυτταρικών και γονιδιωματικών βλαβών, η οποία προκαλείται από την χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Υπάρχουν όμως και στοιχεία που μαρτυρούν την διέγερση της ανάπτυξης του όγκου και της κακοήθειάς του από τα γηρασμένα κύτταρα[5].

Ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο τα γηρασμένα κύτταρα προωθούν τον καρκινικό φαινότυπο θεωρείται ότι είναι ο SASP, ο οποίος μπορεί να μεταφέρει με παρακρινή τρόπο, σηματοδοτικά μόρια τόσο στα βιώσιμα καρκινικά κύτταρα όσο και σε άλλα κύτταρα του TME, προάγοντας τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου. Έχει αποδειχθεί πως σε διαφορετικά πειραματικά συστήματα, τα γηρασμένα καρκινικά κύτταρα συμβάλλουν με ποικίλους τρόπους στην σηματοδότηση του πολλαπλασιασμού, στην αποφυγή της

απόπτωσης, στην επαγωγή της αγγειογένεσης διεγείροντας την εισβολή, την μετάσταση και την ανοσία που καταστέλλει τον όγκο[5].

Μία ακόμη επίπτωση των γηρασμένων καρκινικών κυττάρων στους καρκινικούς φαινότυπους, περιλαμβάνει μεταβατικές και αναστρέψιμες καταστάσεις γηρασμένων κυττάρων στις οποίες τα γηρασμένα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποφύγουν την μη πολλαπλασιαστική κατάσταση που προκαλείται από την SASP και να συνεχίσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και των υπόλοιπων δυνατοτήτων των καρκινικών κυττάρων[5].

Πρέπει να αναφερθεί πως η απόκτηση των χαρακτηριστικών του καρκίνου από τα γηρασμένα κύτταρα δεν προκαλείται μόνο από τα καρκινικά κύτταρα. Οι ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (Cancer associated fibroblasts, CAFs) έχει αποδειχθεί πως μπορούν να δημιουργήσουν γηρασμένα CAFs τα οποία μπορούν να προάγουν τον όγκο. Οι γηρασμένοι ινοβλάστες στους φυσιολογικούς ιστούς, παράγονται εν μέρει από την φυσική γήρανση ή από τις συνθήκες του περιβάλλοντός τους, και εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος των ιστών μέσω του φαινοτύπου SASP τους. Έτσι, παρέχουν παρακρινή υποβοήθηση ενάντια στην εισβολή τοπικών καρκινικών κυττάρων καθώς και στην μετάσταση των νεοπλασιών που αναπτύσσονται σε κοντινή απόσταση από αυτά[5].

3. Μικροπεριβάλλον του καρκίνου

Η διαδικασία του σχηματισμού και της εξέλιξης του όγκου επηρεάζεται, εκτός από τις γενετικές και τις επιγενετικές αλλαγές των καρκινικών κυττάρων και από τις μεταβολές των συστατικών και των συνθηκών του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (tumor microenvironment, TME)[6]. Ειδικότερα, το καρκινικό μικροπεριβάλλον αποτελείται εκτός από τα καρκινικά κύτταρα, από καρκινικά στρωματικά κύτταρα (περιλαμβάνουν τους στρωματικούς ινοβλάστες), από ενδοθηλιακά κύτταρα, από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (όπως τα μικρόγλοια, μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα), από νευρώνες καθώς και από μη-κυτταρικής φύσεως συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας όπως το κολλαγόνο, η φιβρονεκτίνη, η λαμινίνη[7]–[10]. Οι μεταβολές των συνθηκών στο TME αφορούν το φαινόμενο Warburg, τον σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), το φαινόμενο EPR, τον σχηματισμό υποξικού περιβάλλοντος και της υπερέκφραση της γλουταθειόνης των υποδοχέων καθώς και άλλων συστατικών του[5].

3.1. Συστατικά του TME

3.1.1. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν σημαντικά στοιχεία του TME. Ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο όγκος καθώς και της πολυπλοκότητας του

TME, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να δρουν είτε κατά του όγκου είτε να προάγουν την ανάπτυξή του. Η συσσώρευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην περιοχή του όγκου, προκαλείται από την ύπαρξη χρόνιων φλεγμονών είτε με την συμβολή των συστατικών του TME και κυρίως από τα στρωματικά κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν κυτοκίνες και χημειοκίνες που προσελκύουν την εισροή των κυττάρων τόσο του έμφυτου όσο και του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος[11].

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος χωρίζονται σε δύο είδη, σε αυτά του έμφυτου και σε αυτά του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος περιλαμβάνουν τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα κατασταλτικά κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό και τα κύτταρα φυσικοί-δολοφόνοι (natural killer cells, NT cells) ενώ τα κύτταρα του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος τα T και B κύτταρα[12].

3.1.1.1. Κύτταρα του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος

Σε έναν όγκο παρατηρείται, όπως προαναφέρθηκε, η ύπαρξη των B κυττάρων και των T κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των βοηθητικών κυττάρων T1 και T2 (T helper 1 και T helper 2, T_H1 και T_H2 αντίστοιχα), των ρυθμιστικών Tα κυττάρων (regulatory T cells, T_{reg}) και των κυτταροτοξικών T κυττάρων[13].

Τα αντιγόνα που σχετίζονται με τον όγκο (tumor-associated antigens, TAAs) είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που προκαλούν την ανοσολογική απόκριση. Τα TAAs ενεργοποιούν, μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), την απόκριση των T κυττάρων, τα οποία αποτελούν μία σημαντική γραμμή άμυνας κατά της καρκινογένεσης. Αν και τα TAAs μπορούν να προκύψουν με διαφορετικούς μηχανισμούς, στα T κύτταρα προκύπτουν μέσω του MHC τύπου I ή II και πυροδοτούν την ενεργοποίηση των T κυττάρων με την ταυτόχρονη έκφραση διεγερτικών μορίων και την έκκριση χημειοκινών και κυτοκινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την επέκταση των κλώνων των T κυττάρων καθώς και την στρατολόγηση άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (συμπεριλαμβανομένων και των συστατικών του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος που θα συζητηθούν παρακάτω) [13].

Τα CD4 T κύτταρα, τα οποία είναι γνωστά και ως βοηθητικά T κύτταρα, εκκρίνουν κυτοκίνες και χημειοκίνες οι οποίες με την σειρά τους ρυθμίζουν διάφορες πτυχές της ανοσολογικής απόκρισης. Τα T_H1 CD4 T κύτταρα ενεργοποιούν τα CD8 T κύτταρα, ευνοώντας έτσι την κυτταρική ανοσία. Τα T_H2 CD4 T κύτταρα δρουν στα B κύτταρα, ευνοώντας την χυμική ανοσία. Τα CD8 T κύτταρα, τα οποία είναι κυτταροτοξικά, ενεργοποιούνται τόσο με την άμεση παρουσία αντιγόνου, μέσω του MHC της τάξης I, όσο

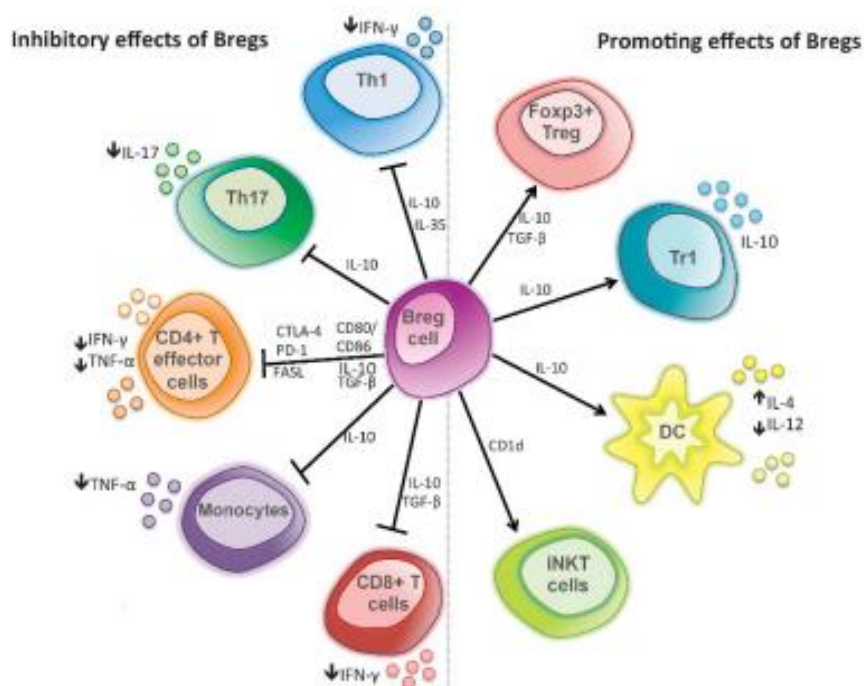
και μέσω την ενεργοποίησης από τα CD4 T κύτταρα. Μετά την ενεργοποίησή τους, το καρκινικό κύτταρο καταστρέφεται άμεσα από την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από τα κύτταρα αυτά ή έμμεσα με την συμπληρωματική μεσολάβηση αντισωμάτων [13].

Οι όγκοι μπορούν επιπλέον να αποφύγουν την ανοσολογική απόκριση ρυθμίζοντας ειδικά μόρια αναστολής και επάγοντας μία μορφή αυτοανοχής, η οποία επιτυγχάνεται από ρυθμιστικά κύτταρα και ανασταλτικούς υποδοχείς. Τέτοια ρυθμιστικά ανασταλτικά κύτταρα είναι τα ρυθμιστικά T κύτταρα T_{reg} τα οποία είναι ανοσοκατασταλτικά. Τα T_{reg} εκκρίνουν ανασταλτικές κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-10 (interleukin-10, IL-10) και ο αυξητικός παράγοντας του όγκου-β (tumor growth factor-β, TGFβ), που ρυθμίζουν τελικά τα B και T κύτταρα [13].

Τα περιφερειακά B κύτταρα χωρίζονται σε διάφορα είδη ένα από τα οποία είναι τα μεταβατικά 'μη ώριμα' B κύτταρα, τα οποία ωριμάζουν στο μικροπεριβάλλον της σπλήνας σε κύτταρα της χυμικής ανοσίας του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα θυλακίωδη B κύτταρα και τα κύτταρα μνήμης B. Ο κύριος ρόλος των B κυττάρων είναι η διαμόρφωση των ανοσολογικών αντιδράσεων, η φλεγμονή μέσω της παραγωγής αντισωμάτων και η προώθηση της ενεργοποίησης και του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων με την παρουσία αντιγόνου. Τα κατασταλτικά B κύτταρα έχουν την ικανότητα να διατηρούν την ανοσοποιητική ανοχή, να καταστέλλουν τα παθολογικά αυτοάνοσα και τις φλεγμονώδεις ανοσολογικές αποκρίσεις καθώς και να καταστέλλουν αποκρίσεις κατά την ανοσολογική επιτήρηση του καρκίνου με την απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών μορίων όπως της IL-10 καθώς και μορίων αναστολής όπως η PD-L1. Αυτά τα κατασταλτικά B κύτταρα της ανοσολογικής ανοχής χαρακτηρίζονται ως 'ρυθμιστικά B κύτταρα' ή αλλιώς Bregs[14].

Η IL-10 διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στις κατασταλτικές επιδράσεις των Bregs. Αρχικά, οι κατασταλτικές επιδράσεις των Bregs στην παραγωγή της IL-17 και του IFN-γ από τα κύτταρα Th17 και Th1 αντίστοιχα και η διαφοροποίηση των T κυττάρων προς Th17 κύτταρα εξαρτώνται από την IL-10. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί με σχετικές μελέτες ότι τα Bregs μπορούν να καταστείλουν τις αποκρίσεις των T κυττάρων αλλά και με την παραγωγή της IL-10 να δημιουργήσουν συμβατικά κύτταρα T_{regs} καθώς και T κύτταρα, που παράγουν IL-10, από T κύτταρα ενεργοποιητές. Πέρα από την διαμόρφωση των λειτουργιών των T κυττάρων, τα Bregs αναφέρεται πως καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων και την παραγωγή των κυτοκινών, μέσω της παραγωγής της IL-10. Τέλος, μια λειτουργία των Bregs είναι η προώθηση των δενδριτικών κυττάρων να παράγουν IL-4 και να ρυθμίζουν την μείωση της έκφρασης της IL-12, με αποτέλεσμα την μεταβολή της ισορροπίας των Th1/Th2[14].

Επιπλέον, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10** τα Bregs μπορούν να επηρεάσουν ποικίλα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι ανασταλτικές επιδράσεις των Bregs περιλαμβάνουν την καταστολή των ακόλουθων μορίων: την διαφοροποίηση των T κυττάρων σε κύτταρα Th1 και Th17, την παραγωγή προφλεγμονοδών κυτοκινών από τα CD4+ T κύτταρα, την παραγωγή TNF-α από τα μονοκύτταρα και τις κυτταροτοξικές αποκρίσεις των CD8+ T κυττάρων. Μέσω της έκφρασης της FASL, τα Bregs μπορούν να εκκινήσουν την απόπτωση των T-κυττάρων ενεργοποιητών. Τα Bregs μπορούν επίσης να προάγουν τη διαφοροποίηση των Foxp3+ T κυττάρων και των κυττάρων Tr1, να μεταβάλλει την παραγωγή κυτοκινών από τα δενδριτικά κύτταρα και να υποστηρίξουν τη διατήρηση των iNKT κυττάρων, τα οποία μπορούν να έχουν ρυθμιστική λειτουργία. Οι μηχανισμοί λειτουργίας των Bregs διαμεσολαβούνται μέσω της απελευθέρωσης διαλυτών παραγόντων, όπως η IL-10, ο TGF-β και η IL-35, και μέσω της άμεσης επαφής κυττάρου-κυττάρου μέσω συνδεδειγμένων μορίων[14].



Εικόνα 10. Μηχανισμοί λειτουργίας των B ρυθμιστικών κυττάρων[14].

3.1.1.2. Κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος

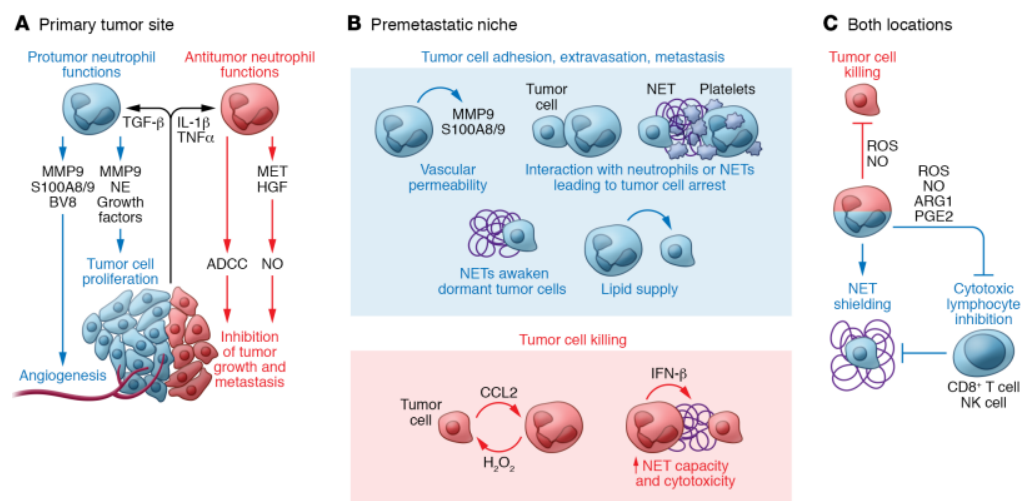
Τα ουδετερόφιλα αποτελούν το 70% των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων και παρέχουν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι ενός μεγάλου αριθμού παθογόνων. Στον καρκίνο, τα ουδετερόφιλα μπορούν είτε να καταστείλουν είτε να προωθήσουν την ανάπτυξη του καρκίνου, το οποίο εξαρτάται και από τον τύπο και το στάδιο της ανάπτυξής του. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου, τα ουδετερόφιλα μεταφέρονται στο TME και δημιουργούν φλεγμονή μέσω της απελευθέρωσης κυτοκινών και δραστικών ειδών

οξυγόνου, που επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Στα μετέπειτα στάδια του καρκίνου, τα ουδετερόφιλα προάγουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω τροποποιήσεων της εξωκυττάριας μήτρας, της απελευθέρωσης των παραγόντων VEGF και της παραγωγής μίας μεταλλοπρωτεάσης της μήτρας, της MMP9, οι οποίες οδηγούν στην διέγερση της αγγειογένεσης και τελικά την εξέλιξη του όγκου[9].

Ειδικότερα, τα ουδετερόφιλα προέρχονται από τα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και οι όγκοι συχνά εκκρίνουν συστημικούς παράγοντες όπως ο G-CSF, με σκοπό την διέγερση της κοκκιοποίησης στον μυελό των οστών. Μόλις απελευθερωθούν από τον μυελό των οστών, τα ουδετερόφιλα στρατολογούνται στους όγκους μέσω των υποστρωμάτων του υποδοχέα CXCR2, των CXCL1, CXCL2, CXCL5 και του CXCL8, τα οποία ρυθμίζονται από τις KRAS και NOTCH σηματοδοτήσεις και από τον μεταγραφικό παράγοντα SNAIL. Για την αναγνώριση και τη φαγοκυττάρωση των καρκινικών κυττάρων, τα ουδετερόφιλα χρησιμοποιούν τους υποδοχείς Fc και τις ανοσοσφαιρίνες, IgG ή IgA, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρική τοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα (antibody-dependent cellular toxicity, ADCC). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει πως ο αποκλεισμός της αλληλεπίδρασης του CD47, ενός υποστρώματος που υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και εμποδίζει την φαγοκυττάρωση, με τον υποδοχέα του δηλαδή της ρυθμιστική πρωτεΐνης του σήματος-α (signal regulatory protein-α, SIRPα) στα ουδετερόφιλα, ενισχύει την ADCC. Τα ουδετερόφιλα μπορούν επίσης να αποτρέψουν τον σχηματισμό του καρκίνου με την εμφάνιση αντιγόνων του όγκου στα CD8+ T κύτταρα και την έκκριση της IL-12[15], [16].

Τα ουδετερόφιλα συμμετέχουν στην εξέλιξη του όγκου δρώντας τόσο στους πρωτογενείς όγκους όσο και σε προ-μεταστατικές θέσεις όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 11**. Στους πρωτοπαθείς όγκους (**Εικόνα 11A**), τα ουδετερόφιλα στην αγγειογένεση με την απελευθέρωση των MMP9, S100A8/9 και BV8 για την ενεργοποίηση του παράγοντα VEGF. Η παραγωγή αυξητικών παραγόντων και η αποικοδόμηση της λαμινίνης από τις πρωτεάσες που προέρχονται από τα ουδετερόφιλα, όπως η ελαστάση των ουδετερόφιλων (neutrophil elastase, NE) και η MMP9, μπορούν να υποβοηθήσουν στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Εναλλακτικά, φλεγμονώδη ερεθίσματα (όπως τα IL-1β και TNF-α) μπορούν να επάγουν την έκφραση των MET των ουδετερόφιλων και την δέσμευση του HGF, οδηγούν στην παραγωγή NO και στην θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο θανατώνονται τα καρκινικά κύτταρα με αυτόν τον εναλλακτικό τρόπο περιλαμβάνει την κυτταροτοξικότητα μέσω της ADCC. Τα ουδετερόφιλα μπορούν να υποστηρίξουν την μετάσταση μέσω ενός αριθμού διαφορετικών παραγόντων που

λειτουργούν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (**Εικόνα 11B**). Η φλεγμονή που προκαλείται από μόρια όπως το S100A8 αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα και συνεπώς την εξωαγγείωση. Οι άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των ουδετερόφιλων ή των NET μπορούν να οδηγήσουν στην είσοδό τους στο αγγειακό σύστημα. Τα παραπάνω στοιχεία μαζί ευνοούν την εξωαγγείωση και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα, τα ουδετερόφιλα μπορούν να βοηθήσουν στην θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Ειδικότερα, η CCL2 που παράγεται στον πρωτογενή όγκο μπορεί να ενεργοποιήσει τα ουδετερόφιλα στις προ-μεταστατικές θέσεις, με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, ο οποίος αποτελεί έναν αποτελεσματικό μηχανισμό θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, ο IFN-β έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει το αντικαρκινικό δυναμικό των ουδετερόφιλων, αυξάνοντας την ικανότητα των NETs και την κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, η απελευθέρωση των ROS και του NO μπορεί να επάγει τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων, αλλά και αντίθετα, μέσω των ROS, του NO, της αργινάσης (ARG), της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) ή μέσω μιας προστατευτική δράσης των NETs, τα ουδετερόφιλα μπορούν να καταστείλουν την κυτταροτοξική δραστηριότητα των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (**Εικόνα 11C**)[15]



Εικόνα 11. Λειτουργίες των ουδετερόφιλων κατά την εξέλιξη του όγκου [15].

3.1.2. Άλλα κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς αναγνωρίζουν, συλλαμβάνουν και μεταφέρουν τα διάφορα αντιγόνα, στα Τ κύτταρα των δευτερογενών λεμφοειδών οργάνων (π.χ. λεμφαδένες). Η μοίρα των δενδριτικών κυττάρων στο TME διαμορφώνεται από παράγοντες που προάγουν είτε μία ανοσολογική απόκριση κατά του καρκίνου είτε την ανοχή. Τα δενδριτικά κύτταρα είναι εγγενώς προγραμματισμένα να έχουν αντικαρκινική λειτουργία, αλλά το μικροπεριβάλλον

του όγκου μπορεί να τα μετατρέψει ώστε να ευνοούν την εξέλιξη του όγκου. Πιο αναλυτικά, οι κυτοκίνες που εκκρίνονται από το μικροπεριβάλλον του όγκου ενεργοποιούν τα δενδριτικά κύτταρα να αποκτήσουν ανοχή στην παρουσία των κυττάρων του όγκου και να εμποδίσουν την επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης[9], [16]. Συνολικά, τα δενδριτικά κύτταρα ενώνουν τα χάσμα μεταξύ του προσαρμοστικού και του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος με την έναρξη ειδικών T κυτταρικών παθογόνων αποκρίσεων που είναι σημαντικές για την προστασία από το ανοσοποιητικό σύστημα[12].

Τα NK κύτταρα (natural killer cells) μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος σε ιογενώς μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή και σε καρκινικά κύτταρα. Ως προς την λειτουργία τους, τα NK κύτταρα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, εκείνα που συμμετέχουν άμεσα στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων μεσολαβούμενη από κύτταρα και εκείνα που εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Τα NK κύτταρα, λόγω του γεγονότος ότι παρατηρούνται στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ είναι αποτελεσματικά στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων εντός της κυκλοφορίας του αίματος και μπορούν να συμμετέχουν στην παρεμπόδιση της μετάστασης, είναι λιγότερο αποτελεσματικά στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου[A4,A11,A13]. Γενικά, τα NK κύτταρα χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες με βάση τα επίπεδα έκφρασης των CD16 και CD56, την CD56hi CD16+/- και την CD56lo CD16hi. Η πρώτη εκκρίνει φλεγμονώδεις κυτοκίνες ενώ η δεύτερη έχει κυτταροτοξικές λειτουργίες και προκαλεί την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων [12].

Οι σχετιζόμενοι με τον όγκο ινοβλάστες (cancer-associated fibroblasts, CAFs) αποτελούν κύριο συστατικό των κυττάρων του στρώματος του όγκου και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του TME. Τα κύτταρα αυτά, παρόλο που προέρχονται από ινοβλάστες φυσιολογικών ιστών, προέρχονται από ποικίλα κύτταρα, όπως για παράδειγμα τα λιποκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα περικύτταρα, τα αστεροειδή κύτταρα και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών. Μετά από έναν τραυματισμό, οι ινοβλάστες που βρίσκονται φυσιολογικά μέσα στους ιστούς, μπορούν να μετατραπούν αντιστρεπτά σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι συμμετέχουν ενεργά στην επούλωση των τραυμάτων. Οι μυοϊνοβλάστες ενεργοποιούνται μέσω της σηματοδότησης του TGF-β και αναπτύσσουν χαρακτηριστικά όπως ο πολλαπλασιασμός, οι συστατικές ιδιότητες, οι εκκριτικοί φαινότυποι και ο σχηματισμός εξωκυττάριας μήτρας τα οποία είναι σημαντικά στην επούλωση των τραυμάτων[9], [10], [17].

Στο TME, ο καρκίνος και τα στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες όπως ο TGF-β, ο PDGF και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) με σκοπό την μετατροπή των ινοβλαστών σε καρκινικούς ινοβλάστες. Αυτοί οι σχετιζόμενοι με τον καρκίνο ινοβλάστες έχει αποδειχθεί πως μπορούν να προάγουν ή να περιορίσουν την καρκινογένεση. Ειδικότερα, εντός του TME, οι CAFs παράγουν την πλειονότητα των εξωκυττάρων συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, των κυτοκινών καθώς και των εξωκυττάρων συστατικών της μήτρας. Τα κύτταρα αυτά διαμορφώνουν το TME με τέσσερις κύριους τρόπους: των πολλαπλασιασμό και την μετάσταση του όγκου, την νεοαγγειογένεση, την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας και την ανοσοκαταστολή[9].

Στους όγκους που προέρχονται από το επιθήλιο, η μετάβαση από επιθήλιο στο μεσέγχυμα αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα για την μετάσταση, κατά την οποία αυξάνεται η πολικότητα των κυττάρων και η συγκόλληση μεταξύ τους ενώ ταυτόχρονα αποκτούν μεταναστευτικούς και διεισδυτικούς φαινότυπους. Ένας τρόπος με τον οποίο οι CAFs ελέγχουν την μετάσταση είναι μέσω της έκκρισης του TGF-β παράγοντα, ο οποίος απαιτείται για την μετάβαση του επιθηλίου προς μεσέγχυμα και την αγγειογένεση. Για την διευκόλυνση της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων μέσω του TME, οι CAFs εκκρίνουν την MMP-3, η οποία αποικοδομεί την E-καδερίνη, για την προώθηση της εισβολής των καρκινικών κυττάρων. Η εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί επίσης μια σημαντική πηγή του παράγοντα VEGF, ο οποίος μπορεί να απελευθερωθεί από την MMP-13 για την προώθηση της αγγειογένεσης. Γενικά, οι CAFs προάγουν έναν ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο μέσω της παραγωγής χημειοκινών και κυτοκινών που τροποποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα[9].

Τα μακροφάγα αποτελούν σημαντικά συστατικά του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος και ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω της φαγοκυττάρωσης των παθογόνων και την παρουσία αντιγόνων. Επιπλέον, τα μακροφάγα, όπως και οι CAFs, παίζουν σημαντικό ρόλο στην επούλωση των πληγών και την αποκατάσταση των ιστών. Τα μακροφάγα που προέρχονται από τα μονοκύτταρα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε ως φλεγμονώδη μακροφάγα M1, τα οποία φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν τα κύτταρα, είτε ως ανοσοκατασταλτικά M2 μακροφάγα, τα οποία συμμετέχουν στην επούλωση των τραυμάτων. Παρόλο που και οι δύο κατηγορίες μακροφάγων μπορούν να βρεθούν στον όγκο, το μικροπεριβάλλον του όγκου προωθεί τον φαινότυπο M2 των μακροφάγων με την ύπαρξη της υποξίας και την έκκριση κυτοκινών (όπως η IL-4) με σκοπό την υποστήριξη της ανάπτυξης του όγκου. Σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνων τα μακροφάγα αποτελούν έως και το 50% της μάζας ενός όγκου. Συνήθως, τα μακροφάγα εδράζονται σε σημεία του

μικροπεριβάλλοντος του όγκου που περιβάλλονται από αιμοφόρα αγγεία, τα οποία εκκρίνουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF) ο οποίος επάγει τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων[9], [17]–[20].

3.2. Υποξία

Η υποξία αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό των συμπαγών κακοηθειών. Γενικά, ένας ιστός χαρακτηρίζεται ως υποξικός όταν η πίεση του οξυγόνου πέσει κάτω από 10 mmHg σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς όπου η πίεση του οξυγόνου κυμαίνεται στα 40 με 60 mmHg. Σε έναν όγκο, η υποξία προκύπτει ως αποτέλεσμα της διαταραχής της ισορροπίας της παροχής και της κατανάλωσης του οξυγόνου και συνδέεται στενά με την εξέλιξη του όγκου, την αυξημένη επιθετικότητά του, την ενισχυμένη δυνατότητα μετάστασης και την αντίσταση στην ράδιο- και χημειοθεραπεία[21], [22].

Η υποξία μπορεί να χαρακτηριστεί είτε ως οξεία είτε ως χρόνια. Η οξεία υποξία σχετίζεται με την αιμάτωση και εμφανίζεται μέσω του παροδικού ανοίγματος και κλεισίματος των αγγείων του όγκου. Η χρόνια υποξία σχετίζεται με την διάχυση, καθώς η ζήτηση του οξυγόνου που χρειάζεται για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων βρίσκεται σε μεγάλη απόσταση στην οποία το οξυγόνο δεν μπορεί να διαχυθεί. Η χρόνια υποξία είναι μακροχρόνια και συνήθως μη αναστρέψιμη όταν τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από λειτουργικά αγγεία. Τα υποξικά καρκινικά κύτταρα μπορούν να υποστούν νέκρωση ή επαναοξυγόνωση κατά την διάρκεια των οποίων μπορούν να αποκτήσουν περισσότερο επιθετικούς φαινότυπους[21], [23].

Το οξυγόνο χρειάζεται για την αποτελεσματική παραγωγή της ATP, συνεπώς είναι λογικό πως η υποξία σχετίζεται με τον μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ειδικότερα, στους όγκους, τα καλά οξυγονωμένα κύτταρα, τα οποία γειτνιάζουν με λειτουργικά αιμοφόρα αγγεία, έχουν υψηλότερο βαθμό πολλαπλασιασμού, ενώ τα υποξικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε απόσταση 100-200 mm μακριά από τα λειτουργικά αιμοφόρα αγγεία ή/και κοντά σε νεκρωτικές περιοχές έχουν σχετικά χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 12**)[21].

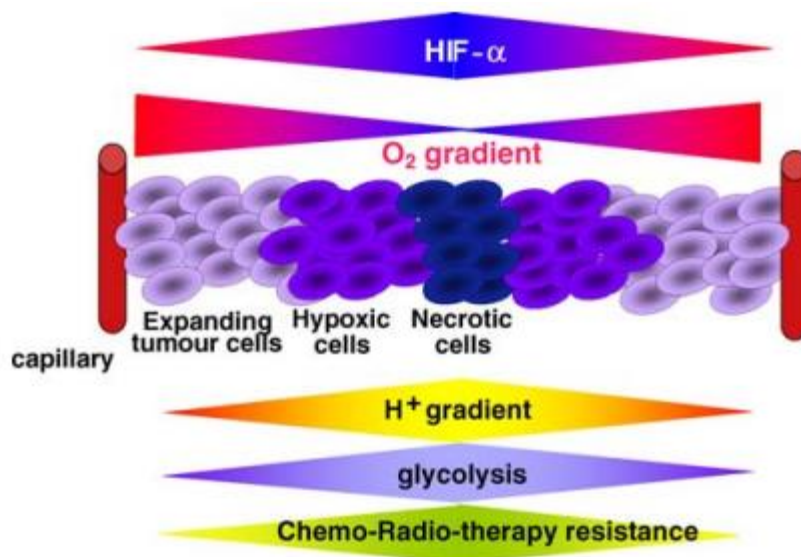
Μια ακόμη διαδικασία η οποία επηρεάζεται από την υποξία είναι η αγγειογένεση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που επενδύουν το εσωτερικό των αιμοφόρων αγγείων, βρίσκονται φυσιολογικά σε ηρεμία, αλλά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, της επούλωσης τραυμάτων ή την εμφάνιση μιας νόσου, μπορούν να ενεργοποιηθούν και να εισέλθουν στην αγγειογενετική διαδικασία. Οι όγκοι σχηματίζονται αρχικά σε μία προ-αγγειακή φάση, δηλαδή όταν η διάμετρος του όγκου είναι μικρότερη από 1 mm, δεν παρατηρείται ο σχηματισμός αγγείων και τα κύτταρα εξαρτώνται κυρίως από την διαπερατότητα για την

απόκτηση των θρεπτικών τους ουσιών. Καθώς ο όγκος μεγαλώνει, αναπτύσσονται νέα αγγεία και τα κύτταρα αποκτούν τα θρεπτικά τους συστατικά μέσω της αγγειογένεσης. Εάν αποτύχει η αγγειογένεση, η απουσία του οξυγόνου ή άλλων θρεπτικών συστατικών περιορίζει το μέγεθος του όγκου στα 2-3 mm[21].

Η υποξία μπορεί να οδηγήσει επιπλέον σε οξέωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία χαμηλού εξωκυττάρου pH το οποίο είναι ένα άλλο χαρακτηριστικό των συμπαγών όγκων. Οι περισσότεροι καρκίνοι χαρακτηρίζονται από έναν υψηλό ρυθμό γλυκόλυσης, καθώς τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου αναγκάζουν τα καρκινικά κύτταρα να στραφούν από την οξειδωτική φωσφορλίωση στη διαδικασία της γλυκόλυσης, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολικών οξέων. Όπως και η αυξημένη αγγειογένεση, αυτές οι αλλαγές διαμεσολαβούνται από τον επαγόμενο από την υποξία παράγοντα 1α (HIF-1α) ο οποίος οδηγεί σε ρύθμιση τόσο των μεταφορέων γλυκόζης όσο και των γονιδίων που εμπλέκονται στη γλυκόλυση [21].

Η υποξία μπορεί επιπλέον να ενισχύσει την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων προς το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες (HIFs), οι βασικοί μεσολαβητές της σηματοδότησης της υποξίας, ρυθμίζουν μια σειρά γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ανοσία του όγκου στις συνθήκες υποξίας. Ειδικότερα, μελέτες έχουν αποδείξει πως στις υποξικές περιοχές του καρκίνου μεταφέρονται υψηλά επίπεδα κατασταλτικών κυττάρων προερχόμενα από τον μυελοειδή (MDSCs, myeloid-derived suppressor cells), μακροφάγων (TAMs) και τα-ρυθμιστικών κυττάρων (Treg)[21].

Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στην **Εικόνα 12** στην οποία απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά του υποξικού περιβάλλοντος του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, τα αιμοφόρα τριχοειδή αγγεία μεταφέρουν οξυγόνο στους ιστούς, όμως η διάχυση του οξυγόνου έχει ένα συγκεκριμένο όριο, επομένως η συγκέντρωσή του μειώνεται καθώς η απόσταση από τα τριχοειδή αυξάνεται. Με την μακροσκοπική εξέταση συμπαγών όγκων παρατηρήθηκε πως τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται στις περιοχές κοντά στα τριχοειδή αγγεία ενώ στις απομακρυσμένες από τα αγγεία περιοχές επικρατούν νεκρωτικές συνθήκες. Αυτή η διαβάθμιση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων, είναι παράλληλη με την φθίνουσα διαβάθμιση του οξυγόνου, η οποία συνοδεύεται από μία αύξηση των επιπέδων του HIF-1α, την μείωση του εξωκυττάρου pH[23] και την αύξηση της αντίστασης στην ακτινοθεραπεία και την χημειοθεραπεία[23], [24].

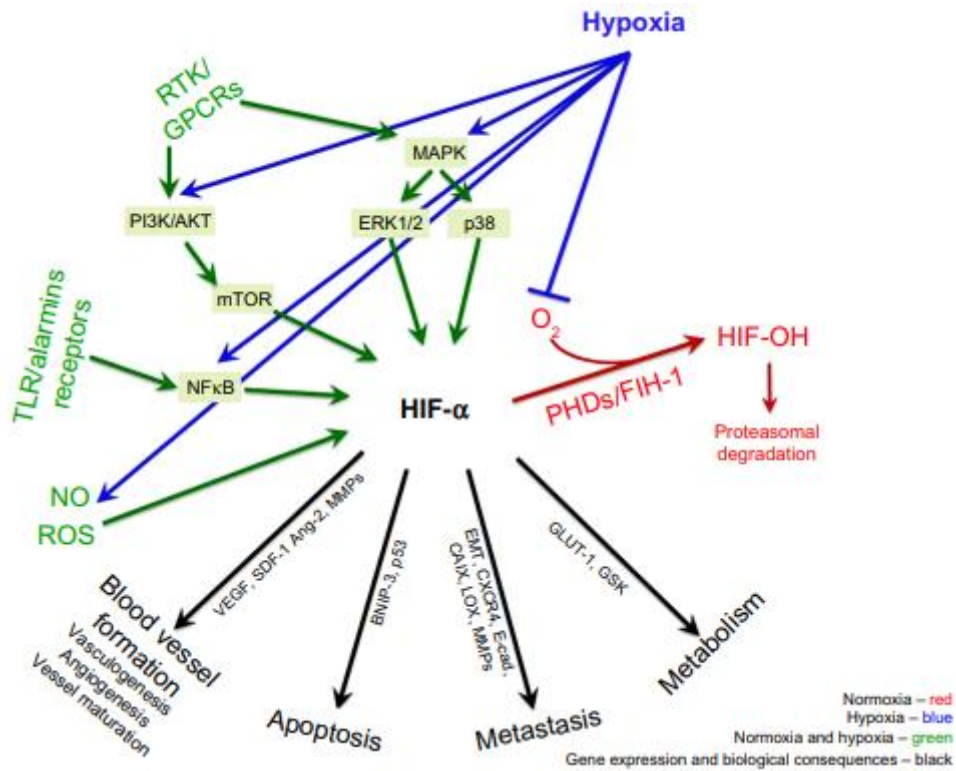


Εικόνα 12. Τα χαρακτηριστικά της υποξίας σε μία μάζα όγκου [23].

Η υποξία μπορεί και επάγει έναν μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών πορειών, όπως για παράδειγμα οι PI3K/AKT/mTOR, MAPK, NF-κB και του HIF η οποία αποτελεί την κύρια σηματοδοτική πορεία. Η επαγωγή της παραγωγής και η πρωτεϊνική σταθεροποίηση των υπομονάδων HIF-α (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α)[25], [26] ρυθμίζεται από ειδικά ένζυμα που ανιχνεύουν τα επίπεδα οξυγόνου, όπως είναι τα PHD και FIH-1 ένζυμα. Στα οξυγονωμένα κύτταρα, οι υπομονάδες του HIF-α υδροξυλιώνονται από τα PHDs και FIH-1, τα οποία διευκολύνουν την επισήμανση του HIF-α-OH από την pVHL, την πολυουβικουιτινίωση και την πρωτεϊνική αποικοδόμηση του HIF-α από το πρωτεάσωμα. Όταν μειωθούν τα επίπεδα του οξυγόνου, τα ένζυμα PHD χάνουν την δραστηριότητά τους, αναστέλλεται η υδροξυλίωση της υπομονάδας HIF-α και σταματά η αποικοδόμηση. Οι μη-υδροξυλιωμένες, σταθεροποιημένες υπομονάδες HIF-α μεταφέρονται στον πυρήνα όπου διμερίζεται με την υπομονάδα HIF-β η οποία εκφράζεται συνεχώς, προσδένεται στο DNA και ξεκινά η έκφραση την μεταγραφής των γονιδίων των προσαρμοστικών μονοπατιών[27].

Ο HIF είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ρυθμίζεται τόσο από υποξικούς όσο και από μη-υποξικούς παράγοντες[27]–[29]. Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 13** στην νορμοξία οι υπομονάδες του HIF υδροξυλιώνονται προκαλώντας πολυουβικουιτινίωση και πρωτεασωμική αποικοδόμηση των υδροξυλιωμένων υπομονάδων (κόκκινο βέλος). Στην κατάσταση υποξίας (μπλε βέλος) τα ένζυμα που οδηγούν στην υδροξυλίωση των υπομονάδων χάνουν την δραστηριότητά τους και ο HIF μεταφέρεται στον πυρήνα προς την μεταγραφή γονιδίων[A22,A27] (μαύρα βέλη). Ο HIF ρυθμίζεται και από παράγοντες ανεξάρτητους από την υποξία και ειδικότερα ως απόκριση στο μονοξείδιο του αζώτου (NO), στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), τις κυτοκίνες τους λιποπολυσακχαρίτες και από τους

αυξητικούς παράγοντες που αναγνωρίζονται από υποδοχείς τυροσινικών κινασών (RTKs), υποδοχείς συνδεδεμένους με G πρωτεΐνες (GPCRs), τους toll-like υποδοχείς (TLRs) και τους υποδοχείς αλαρμινών. Η ρύθμιση του HIF από αυτούς τους μη-υποξικούς παράγοντες μεσολαβείται από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των NF-κB, PI3K/AKT/mTOR και MAPK/ERK (πράσινα βέλη)[27].



Εικόνα 13. Ρύθμιση του HIF σε νορμοξικές και υποξικές συνθήκες[27].

3.3. Φαινόμενο αυξημένης διείσδυσης και κατακράτησης (EPR effect)

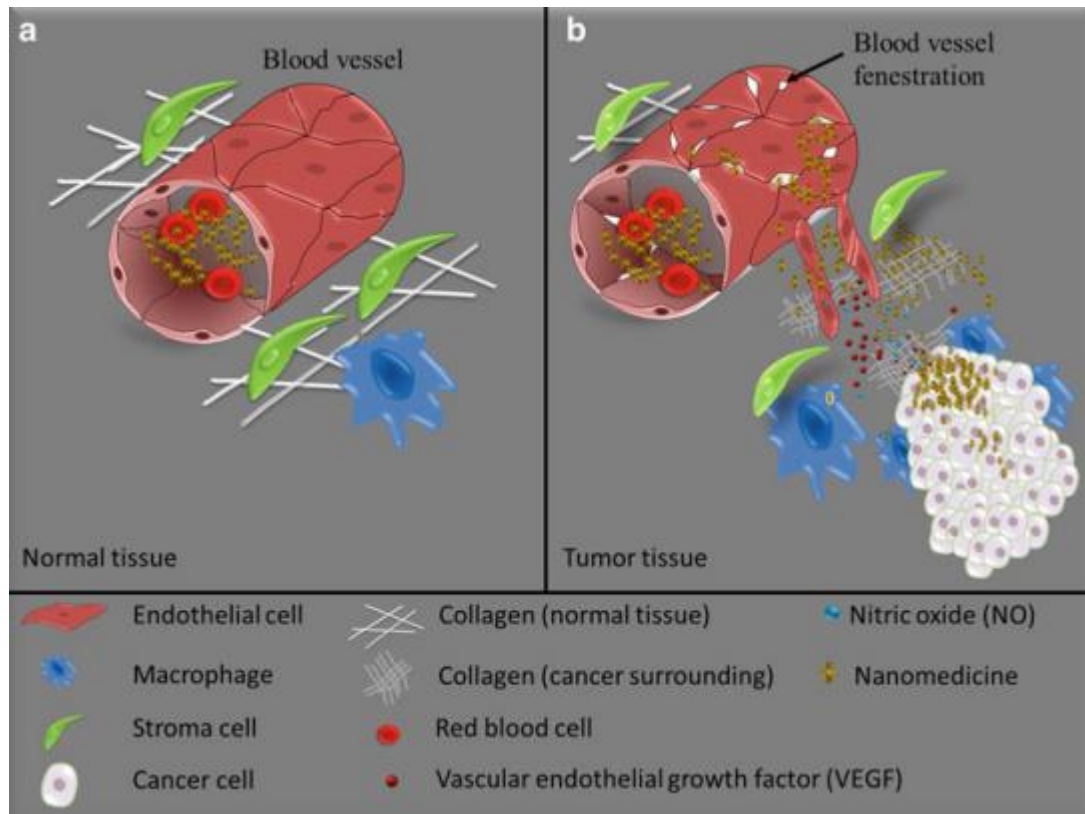
Το φαινόμενο της αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης (enhanced permeability and retention time) περιγράφει ένα καθολικό παθοφυσιολογικό φαινόμενο και μηχανισμό κατά τον οποίο μακρομοριακές ενώσεις όπως η αλβουμίνη καθώς και άλλα συζευγμένα με πολυμερή φάρμακα πέραν ορισμένων μεγεθών (πάνω από 40 kDa) μπορούν προοδευτικά να συσσωρεύονται στην περιοχή του όγκου όπου έχουν σχηματιστεί αγγεία και με αυτόν τον τρόπο να επιτευχθεί στοχευμένη χορήγηση και κατακράτηση αντικαρκινικών ενώσεων στον ιστό του συμπαγούς όγκου[30].

Το φαινόμενο EPR έχει παρατηρηθεί σε συμπαγείς όγκους τρωκτικών, κουνελιών, σκύλων και ασθενών ανθρώπων και βασίζεται, όπως προαναφέρθηκε, σε διάφορα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά. Ένα χαρακτηριστικό, αποτελεί η μαζικός και ακανόνιστος σχηματισμός νέων αγγείων στους όγκους το οποίο δημιουργεί δομικές και λειτουργικές ανωμαλίες στα αιμοφόρα αγγεία. Ειδικότερα, για την κάλυψη των υψηλών απαιτήσεων στα θρεπτικά συστατικά και στο οξυγόνο, το αγγειακό σύστημα του όγκου είναι πολύ πυκνό και

ελικοειδές, με μη πλήρως ανεπτυγμένη βασική μεμβράνη. Τα περικύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα που περιβάλλουν τα αιμοφόρα αγγεία είναι είτε ανεπαρκή ή δυσλειτουργικά. Βέβαια, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα κενά μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία των όγκων παρατηρείται σε χαμηλή συχνότητα και οι διαενδοθηλιακές οδοί είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός εξώθησης νανοσωματιδίων στους όγκους. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό, αποτελεί η αυξημένη έκφραση φλεγμονοδών παραγόντων, όπως οι προσταγλανδίνες, η βραδυκινίνη, το μονοξειδίο του αζώτου, ο υπεροξυνιτρίτης, οι IL1, 2 και 6, οι πρωτεάσες, η ιντερφερόνη γάμμα, ο VEGF και ο HIF-1. Τέλος, η ανεπάρκεια της απομάκρυνσης μορίων μέσω των λεμφικών συστημάτων στους ιστούς των συμπαγών όγκων έχει ως αποτέλεσμα, την συγκράτηση εξωκυττάρων μορίων στους ιστούς του όγκου [30], [31].

Το φαινόμενο EPR (**Εικόνα 14**) εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια η οποία οφείλεται, μεταξύ άλλων, στην διαφορετική διάμετρο μεταξύ διαφορετικών όγκων οι οποίοι μπορεί να είναι μικρότεροι του 1 cm έως και μεγαλύτεροι των 10 cm, μπορεί να είναι εξαιρετικά υποξικοί έως και νορμοξικοί, μπορεί να έχουν διαφορετικές παθολογικές κατηγορίες, γενετική ποικιλία και να υπάρχει μερική ή εκτεταμένη νέκρωση [32], [33].

Το EPR φαινόμενο χρησιμοποιείται στην νανοτεχνολογία για την κατασκευή νανοσωματιδίων φαρμάκων για την εκλεκτική στόχευση στην περιοχή του όγκου. Τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, στο γεγονός ότι έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα φόρτωσης του φαρμάκου, μειωμένη αποικοδόμηση στον οργανισμό, στόχευση και ελεγχόμενη απελευθέρωση στα κύτταρα-στόχους [34].



Εικόνα 14. Διαφορές μεταξύ του φυσιολογικού και καρκινικού ιστού ως προς την στόχευση στην περιοχή του όγκου με την χρήση νανοφαρμάκων μέσω του EPR φαινομένου. (α) Ο φυσιολογικός ιστός περιέχει ενδοθηλιακά κύτταρα στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους, τα οποία εμποδίζουν την διάχυση του νανοφαρμάκου έξω από τα αιμοφόρα αγγεία. (β) Ο καρκινικός ιστός περιέχει μεγάλα κενά μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία επιτρέπουν στα νανοφάρμακα να φτάσουν στη εξωκυττάρια μήτρα και στα καρκινικά κύτταρα[35].

3.4. Φαινόμενο Warburg

Ο Otto Warburg την δεκαετία του 1920 διαπίστωσε πως ακόμη και υπό την παρουσία οξυγόνου, τα καρκινικά κύτταρα προτιμούν να μεταβολίζουν την γλυκόζη με την διεργασία της γλυκόλυσης κάτι το οποίο είναι παράδοξο καθώς στα φυσιολογικά κύτταρα με την παρουσία οξυγόνου, η γλυκόζη μεταβολίζεται αρχικά στο πυρουβικό οξύ και στη συνέχεια μέσω του κύκλου του KREBS και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μεταβολίζεται περαιτέρω ώστε να αποδώσει περισσότερα μόρια ATP[36], [37].

Ο κυτταρικός μεταβολισμός μετατρέπει τα θρεπτικά συστατικά σε ενέργεια και βιομάζα, το οποίο είναι απαραίτητο για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα των θηλαστικών είναι η γλυκόζη η οποία προσλαμβάνεται στο κύτταρο και μεταβολίζεται σε πυροσταφυλικό οξύ στο κυτταρόπλασμα με την μέση της γλυκόλυσης. Κατά την διαδικασία αυτή παράγονται 2 μόρια ATP από ένα μόριο γλυκόζης. Στα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε ηρεμία, το πυροσταφυλικό οξύ που παράγεται από την γλυκόλυση εισάγεται στα μιτοχόνδρια όπου

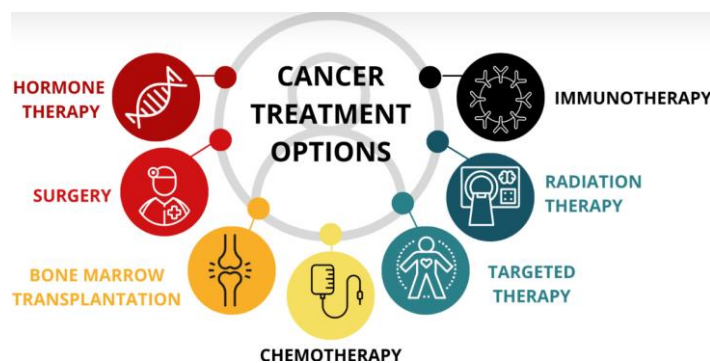
οξειδώνεται σε ακετυλο-συνένζυμο Α (CoA) από το σύμπλεγμα της πυρουβικής αφυδρογονάσης (PDC). Το ακετυλο-CoA εισέρχεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA), το οποίο είναι γνωστό και ως κύκλος του KREBS ή κύκλος του κιτρικού οξέος, και στη συνέχεια στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS). Μετά την πλήρη οξείδωση ένα μόριο γλυκόζης παράγει 36 μόρια ATP[38]–[41].

Τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν σημαντικά την πρόσληψη της γλυκόζης καθώς και του γλυκολυτικούς ρυθμούς. Ωστόσο, ακόμη και υπό την παρουσία επαρκούς οξυγόνου, η αυξημένη παραγωγή του πυροσταφυλικού οξέος δεν αυξάνει ταυτόχρονα και τις διαδικασίες της οξείδωσής του στα μιτοχόνδρια. Αντιθέτως, το μεγαλύτερο μέρος του πυροσταφυλικού οξέος μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ στο κυτταρόπλασμα από την γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) και στη συνέχεια οι μεγάλες ποσότητες του γαλακτικού οξέος απελευθερώνονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται ως αερόβια γλυκόλυση ή ως φαινόμενο Warburg [38]–[41].

Ο μεταβολισμός Warburg ικανοποιεί τις απαιτήσεις για τις αναβολικές διαδικασίες των ταχέως διαιρούμενων καρκινικών κυττάρων. Η αυξημένη κατανάλωση της γλυκόζης παράγει μεγάλες ποσότητες διαφόρων ενδιάμεσων μεταβολιτών της γλυκόλυσης, μέρος των οποίων χρησιμοποιείται σε άλλες βιοσυνθετικές οδούς για την σύνθεση της βιομάζας, όπως για παράδειγμα την σύνθεση των αμινοξέων, των νουκλεϊκών οξέων και των λιπιδίων, που απαιτείται για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων[38].

4. Θεραπεία του καρκίνου

Η θεραπεία του καρκίνου καθ' όλη τη διάρκεια της ιστορίας χαρακτηρίζεται τόσο από θετικά γεγονότα όσο και από αρνητικά, όχι μόνο λόγω της αναποτελεσματικότητας των θεραπειών που χρησιμοποιούνται και των παρενεργειών, αλλά και από την ελπίδα της πλήρους ύφεσης και της θεραπείας του σε πολλές περιπτώσεις. Μεταξύ των θεραπειών που χρησιμοποιούνται είναι το χειρουργείο, η χημειοθεραπεία, η στοχευμένη θεραπεία, η ραδιοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία, η ορμονική θεραπεία και η μεταμόσχευση του μυελού των οστών(Εικόνα 15)[42].



Εικόνα 15. Μέθοδοι θεραπείας κατά του καρκίνου.

Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί έναν από τους κύριους πυλώνες στην θεραπεία του καρκίνου και μπορεί να είναι προληπτική, διαγνωστική και θεραπευτική. Η προληπτική χειρουργική πραγματοποιείται για την αφαίρεση ιστού που είναι πιθανό να εξελιχθεί σε καρκίνο. Η θεραπεία των καρκίνων που βρίσκονται στα πρώιμα στάδια, όπως του μαστού και του παχέος εντέρου καθώς και μερικών που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο πραγματοποιείται με χειρουργική επέμβαση. Σε πολλές χώρες υψηλού εισοδήματος η χειρουργική επέμβαση συνδυάζεται με την χρήση της χημειοθεραπείας καθώς και με την εκτέλεση ενδοσκοπήσεων και ακτινολογικών εξετάσεων[43]–[47].

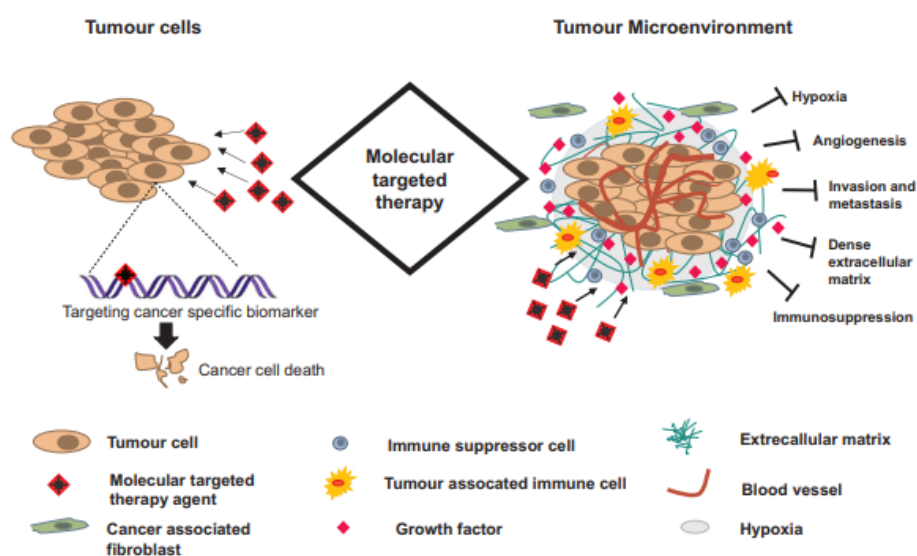
Μια επιπλέον μέθοδος θεραπείας του καρκίνου αποτελεί η χημειοθεραπεία στην οποία γίνεται η χρήση φαρμάκων για την αντιμετώπιση μίας ασθένειας μία από τις οποίες αποτελεί και ο καρκίνος[48]–[50]. Εκτός από την άμεση κυτταροτοξικότητα, τα εν λόγω φάρμακα προκαλούν ανοσοενισχυτικά αποτελέσματα μέσω της απελευθέρωσης αντιγόνων του όγκου, διαταράσσουν την ανοσοκατασταλτική δράση η οποία προκαλείται από τον όγκο και ευαισθητοποιούν τα κύτταρα του όγκου σε ανοσολογικές επιθέσεις[51].

Όπως προαναφέρθηκε, η χαρακτηριστική θεραπεία κατά του καρκίνου αποτελεί η χημειοθεραπεία. Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα έχουν σχεδιαστεί για να στοχεύουν όχι μόνο τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα (καρκινικά κύτταρα), αλλά και ορισμένα φυσιολογικά κύτταρα, όπως τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Τα τελευταία χρόνια, μία νέα γενιά θεραπειών έχει αναπτυχθεί, οι οποίες αναφέρονται ως στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου. Όπως και η συμβατική χημειοθεραπεία, έτσι και η στοχευμένες θεραπείες του καρκίνου χρησιμοποιούν φαρμακολογικούς παράγοντες που αναστέλλουν την ανάπτυξη, αυξάνουν τον κυτταρικό θάνατο και περιορίζουν την εξάπλωση του καρκίνου αλλά, όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, οι στοχευμένες θεραπείες παρεμβαίνουν σε συγκεκριμένα μόρια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση [52]–[54].

Σύμφωνα με τα προηγούμενα, η στοχευμένη θεραπεία, και ειδικότερα η μοριακή στοχευμένη θεραπεία, αναφέρεται στη χρήση φαρμάκων ή άλλων ουσιών τα οποία στοχεύουν συγκεκριμένα μόρια (μοριακοί στόχοι) ώστε να μπλοκάρουν την ανάπτυξη και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Για να αναπτυχθούν οι κατάλληλες μοριακές στοχευμένες θεραπείες θα έπρεπε να βρεθούν οι ιδανικοί στόχοι του καρκίνου. Μερικοί από τους μοριακούς στόχους της στοχευμένης θεραπείας αποτελούν μεταξύ άλλων οι παράγοντες ανάπτυξης, τα σηματοδοτικά μόρια, οι πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου και οι ρυθμιστές της απόπτωσης που προωθούν την αγγειογένεση [55].

Οι θεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του καρκίνου μπορούν να παρουσιάσουν διαφορετικές λειτουργίες και χαρακτηριστικά. Ειδικότερα,

μπορούν να ταξινομηθούν σε μικρά μόρια, μονοκλωνικά αντισώματα[56], ανοσοθεραπευτικά αντικαρκινικά εμβόλια και σε παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην γονιδιακή θεραπεία και ανάλογα με τους στόχους τους, μπορούν να δράσουν σε αντιγόνα της κυτταρικής επιφάνειας, σε αυξητικούς παράγοντες, σε υποδοχείς ή σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τον κυτταρικό θάνατο, την μετάσταση και την αγγειογένεση. Τα παραπάνω αντικαρκινικά φάρμακα μπορούν και στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα καθώς και συστατικά του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος ώστε να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα και επιπλέον μπορούν να παρεμποδίσουν την εξέλιξη και την εισβολή του όγκου και με τον συνδυασμό του με άλλες θεραπείες, όπως η χημειοθεραπεία, να αντιμετωπίσουν τον ανθεκτικό σε άλλες θεραπείες όγκο (Εικόνα 16)[55].



Εικόνα 16. Επισκόπηση του μηχανισμού μοριακής στοχευμένης θεραπείας. Η μοριακή στοχευμένη θεραπεία επικεντρώνεται στη στόχευση συγκεκριμένων μορίων τα οποία εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα καρκινικά κύτταρα ή στην διαμόρφωση του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος που σχετίζεται με την αγγείωση του όγκου, την μετάσταση ή την υποξία[55].

Τα μικρά μόρια που χρησιμοποιούνται στην μοριακή στοχευμένη θεραπεία είναι μόρια με σχετικά χαμηλό μοριακό βάρος (<900 Da) που είναι ικανά να διεισδύσουν στα κύτταρα και να στοχεύσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες εντός των κυττάρων. Πολλά μικρά μόρια που χρησιμοποιούνται ως αναστολείς χρησιμοποιούνται στην αδρανοποίηση κινασών[57] και στην διακοπή των σηματοδοτικών μονοπατιών που απορρυθμίζονται κατά την καρκινογένεση. Επιπλέον, τα μικρά αυτά μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη στόχευση των πρωτεασωμάτων, των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs), να ενεργοποιήσουν την απόπτωση και να συντονίσουν την επιδιόρθωση του DNA[55].

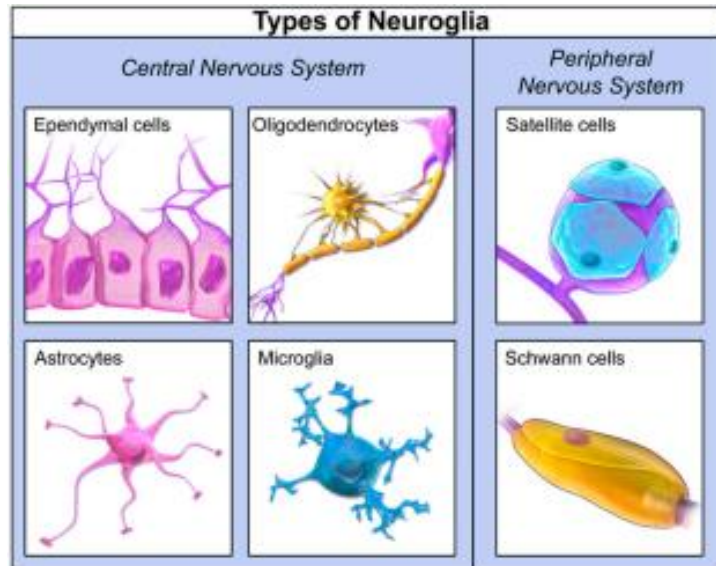
Μια επιπλέον μέθοδος θεραπείας του καρκίνου αποτελεί η ραδιοθεραπεία, η οποία χρησιμοποιείται σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με καρκίνο είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους θεραπείας όπως η χημειοθεραπεία ή το χειρουργείο. Στην ραδιοθεραπεία χρησιμοποιούνται φωτόνια υψηλής ενέργειας (6-25 MV) που μεταφέρουν ενέργεια μέσα στους ιστούς ενώ το δέρμα εκτίθεται σε ακτινοβολία[58]–[61].

Οι παραπάνω μέθοδοι που περιγράφηκαν αποτελούν τις πιο συνήθεις μεθόδους αντιμετώπισης του καρκίνου. Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται και αξίζει να σημειωθούν είναι η ανοσοθεραπεία, στην οποία αξιοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα για την πρόκληση μιας ισχυρής αντικαρκινικής απόκρισης[62]–[65], η ορμονική θεραπεία η οποία είναι μια αποτελεσματική και μη τοξική θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού και του προστάτη που είναι θετικοί στον υποδοχέα οιστρογόνων και προγεστερόνης[66]–[69] και η μεταμόσχευση μυελού των οστών η οποία όμως επιφυλάσσει αρκετές παρενέργειες[70]–[73].

5. Γλοϊώμα και γλοιοβλάστωμα

Περισσότεροι από 120 διαφορετικούς τύπους όγκων έχουν βρεθεί στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Τα γλοϊώματα προέρχονται από γλοιακά κύτταρα (**Εικόνα 17**) ή από τις πρόδρομες μορφές τους και αντιπροσωπεύουν το 30-40% όλων των ενδοκρανιακών νεοπλασιών[74]. Το γλοιοβλάστωμα, είναι ο πιο κοινός κακοήθης πρωτοπαθής όγκος του εγκεφάλου με συχνότητα εμφάνισης 3,19 περιπτώσεις ανά 100.000 ανθρώπους. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 64 έτη, είναι συχνότερος στους άνδρες απ' ότι στις γυναίκες (κατά 1,5 φορές) και αποτελεί το 45,2% όλων των κακοήθων όγκων του κεντρικού νευρικού συστήματος και το 80% όλων των πρωτοπαθών κακοήθων όγκων του κεντρικού νευρικού συστήματος[75]–[77].

Τα γλοϊώματα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αποτελούν την πλειονότητα των κακοήθων όγκων του εγκεφάλου στους ενήλικες. Τα γλοϊώματα είναι οι όγκοι των νεοπλασματικών γλοιακών κυττάρων (ή νευρογλοίων) και ταξινομούνται περαιτέρω από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ, World Health Organization WHO) ως αστροκύττωμα, ολιγοδενδρογλοϊώμα, μικτό ολιγοαστροκύττωμα και επενδύμομα. Μία επιπλέον διαστρωμάτωση του βαθμού του όγκου καθορίζεται από την ιστοπαθολογία του και πιο συγκεκριμένα από την παρουσία πυρηνικού πλειομορφισμού, αυξημένης μιτωτικής δραστηριότητας και κυτταρικότητας, πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και της νέκρωσης (με την νέκρωση να αποτελεί το χαρακτηριστικό που υποδηλώνει ένα όγκο βαθμού IV)[78], [79].



Εικόνα 17. Μορφολογία νευρογλοιακών κυττάρων[80].

Το χαμηλού βαθμού αστροκύτωμα (βαθμός II κατά WHO) αντιπροσωπεύει το 1,6% των γλοιωμάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και σε αντίθεση με τα πιλοκυτταρικά αστροκυτώματα (βαθμός I κατά WHO), τα αστροκυτώματα βαθμού II συχνά μπορούν να εξελιχθούν σε όγκους υψηλότερου βαθμού. Οι ασθενείς με βαθμού II αστροκυτώματα έχουν ένα ποσοστό 50% για πενταετή επιβίωση. Τα αναπλαστικά αστροκυτώματα (βαθμός III κατά WHO) είναι επιθετικοί όγκοι και αντιπροσωπεύουν το 6,7% των γλοιωμάτων και παρουσιάζουν τρία από τα ιστολογικά χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν προηγουμένως, συνήθως τον πυρηνικό πλειομορφισμό, την μιτωτική δραστηριότητα και τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι περισσότεροι ασθενείς με αυτού του είδους τα γλοιώματα εξελίσσονται σε αστροκυτώματα βαθμού IV κατά WHO (γλιοβλάστωμα) και έχουν ένα ποσοστό 30% για πενταετή επιβίωση [78], [81], [82].

Τα ολιγοδενδρογλοιώματα αντιπροσωπεύουν το 6,5% των συνολικών περιπτώσεων γλοιώματος στον άνθρωπο. Είναι παρόμοια με τα αστροκυτώματα, καθώς είναι συνήθως αργά αναπτυσσόμενοι όγκοι και ταξινομούνται ως βαθμού II ή III κατά WHO (ο βαθμός III μπορεί επίσης να αναφέρεται ως αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα). Ασθενείς με αυτού του τύπου όγκο (γλοίωμα), έχουν ένα ποσοστό 80% για πενταετή επιβίωση. Τα μικτά ολιγοαστροκυτώματα έχουν τα χαρακτηριστικά και των δύο δηλαδή και των ολιγοδενδρογλοιωμάτων και των αστροκυττωμάτων (απ' όπου παίρνει και την ονομασία) αν και αυτή η κατηγορία γλοιωμάτων είναι αμφιλεγόμενη. Τα επενδυμάτια είναι συνήθως καλοήθη και αργά αναπτυσσόμενοι όγκοι που αντιπροσωπεύουν το 6% όλων των γλοιωμάτων όμως όταν είναι κακοήθεις οι όγκοι αυτοί έχουν κακή πρόγνωση [78], [81], [82].

Το πιο συχνό είδος γλοιώματος στους ενήλικες είναι το γλοιοβλάστωμα (αστροκύττωμα βαθμού IV κατά WHO). Το γλοιοβλάστωμα (ή πολύμορφο γλοιοβλάστωμα) αντιπροσωπεύει περίπου το 15% όλων των πρωτοπαθών όγκων του εγκεφάλου και του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς και το 55% όλων των γλοιωμάτων. Οι ασθενείς που πάσχουν με γλοιοβλάστωμα έχουν ένα ποσοστό 5% για πενταετή επιβίωση. Το γλοιοβλάστωμα μπορεί να ταξινομηθεί ως πρωτογενές ή δευτερογενές, ανάλογα με την κλινική του εικόνα, με την πλειοψηφία τους (περίπου 80-85%) να αποτελούν τα πρωτογενή γλοιοβλαστώματα. Αυτοί οι όγκοι φαίνεται πως αναπτύσσονται γρήγορα, καθώς οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν σημεία ή συμπτώματα σε λιγότερο από έξι μήνες πριν την διάγνωση. Επιπλέον, κατά την διάγνωση υπάρχουν ελάχιστες κλινικές ή ιστολογικές ενδείξεις ότι ο όγκος προήλθε από έναν χαμηλού βαθμού όγκο. Ασθενείς με δευτερογενές γλοιοβλάστωμα έχουν συνήθως συμπτώματα για μεγαλύτερο από έξι μήνες χρονικό διάστημα και συχνά υπάρχει κλινική ή παθολογική ένδειξη ότι αποτελεί ότι έχει εξελιχθεί από ένα γλοίωμα χαμηλότερου βαθμού [78], [81], [82].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το γλοιοβλάστωμα είναι ο πιο κοινός και επιθετικός τύπος πρωτογενούς όγκου του εγκεφάλου, προκαλώντας περίπου 2.500 θανάτους κάθε χρόνο στο Ηνωμένο Βασίλειο καθώς και την πλειονότητα των θανάτων (περίπου 200.000) που σχετίζονται με όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος κάθε χρόνο παγκοσμίως [83]. Μορφολογικά, το γλοιοβλάστωμα ορίζεται ως ένας όγκος των γλοιακών κυττάρων του εγκεφάλου με χαρακτηριστικά κακοήθειας που περιλαμβάνουν αγγειογένεση και νέκρωση. Η νέα ταξινόμηση κατά WHO αναγνωρίζει εκτός από το κλασικό γλοιοβλάστωμα, το γλοιοβλάστωμα του μεγάλου κυττάρου, το γλοιοσάρκωμα και το επιθηλοειδές γλοιοβλάστωμα, ως ιστολογικά καθορισμένες παραλλαγές [84]. Σήμερα, η θεραπεία των ασθενών με γλοιοβλάστωμα περιλαμβάνει χειρουργική εκτομή ακολουθούμενη από ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη (Temozolomide, TMZ). Ωστόσο, ακόμη και με αυτόν τον συνδυασμό θεραπειών, η διάμεση συνολική επιβίωση (overall survival, OV) είναι περίπου 10-16 μήνες, με λιγότερο από το 10% των ασθενών να επιβιώνουν για 5 ή περισσότερα έτη από την στιγμή της διάγνωσης, ένα σενάριο το οποίο έχει βελτιωθεί ελάχιστα τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες [83], [85].

Η θεραπεία των όγκων του εγκεφάλου παρουσιάζει σημαντικές προκλήσεις, κυρίως λόγω της παρουσίας του αιματεγκεφαλικού φραγμού (Blood-Brain Barrier, BBB), ο οποίος αποτελεί έναν εξαιρετικά επιλεκτικό ημιπερατό φραγμό που διαχωρίζει το αίμα από τον εγκέφαλο. Ο αιματεγκεφαλικός φραγμός αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων, τα αστροκύτταρα που περιβάλλουν το τριχοειδές και τα περικύτταρα τα

οποία είναι ενσωματωμένα στο βασικό έλασμα του τριχοειδούς. Για να καταφέρει ένα μόριο να διασχίσει τον αιματεγγεφαλικό φραγμό, θα πρέπει να έχουν κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένου του μοριακού βάρους, της λιποφιλικότητας και του φορτίου τους. Ο αιματεγγεφαλικός φραγμός εμποδίζει σχεδόν όλα τα μεγάλα μόρια (>400 Da) και περίπου το 98% των μικρών μορίων να εισέλθουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα [86].

Η κακή πρόγνωση που παρατηρείται στην περίπτωση του γλοιοβλαστώματος οφείλεται στην νεοαγγειογένεση καθώς και στην μεγάλη ενδο-ογκολογική ετερογένειά του και ειδικότερα σε ποικίλες γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις. Παρά την ετερογένεια αυτή, μια μεγάλη ανάλυση αυτών των αλλοιώσεων προσδιόρισε τρία κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμφανίζονται συχνά απορρυθμισμένα. Η πρώτη είναι η ενεργοποίηση των υποδοχέων τυροσινικών κινάσων (Receptor Tyrosine Kinase, RTKs)/Ras/Κινάση 3 των φωσφοινοσιτιδίων (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) (88%), η δεύτερη η αναστολή της p53 (87%) και τέλος τα μονοπάτια της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) (78%). Τα φάρμακα τα οποία μελετώνται για την χρήση τους ως πιθανές στοχευμένες θεραπείες του γλοιοβλαστώματος στοχεύουν τα παραπάνω μονοπάτια. Δύο τέτοιοι αναστολείς είναι οι αναστολείς των υποδοχέων EGFR και VEGFR οι οποίοι ενδοκυττάρια έχουν δάση τυροσινικής κινάσης και υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα [79], [86].

6. Αγγειογένεση

Η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί τη συντονισμένη αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων με το περιβάλλον τους. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα χρειάζονται την κατάλληλη εξωκυττάρια μήτρα, αποτελούμενη από λαμινίνη και φιμπρονεκτίνη, για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσκολλώνται στην εξωκυττάρια μήτρα μέσω συγκολλητικών μορίων, των ιντεγκρινών και επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω άλλων συγκολλητικών μορίων, όπως η VR-καδερίνη. Η αγγειακή ανάπτυξη από ήδη υπάρχοντα αγγεία απαιτεί αρχικά την τοπική αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης από ειδικές πρωτεάσες, όπως ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (u-PA) και τις μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας μήτρας. Οι διαλυτοί αυξητικοί παράγοντες και οι κυτταροκίνες λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια και συντονίζουν τις κυτταρικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων που οδηγούν στην νεοαγγείωση, την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων ή την διαπερατότητά τους. Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν συγκεκριμένους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, προκαλώντας έτσι έναν καταρράκτη ενδοκυτταρικών σηματοδοτήσεων [87].

Ο αυξητικός παράγοντας VEGF παίζει κεντρικό ρόλο κατά την εμβρυϊκή αγγειογένεση. Ποντίκια τα οποία έχουν ανεπάρκεια σε έναν μόνο από τους παράγοντες VEGF αποτυγχάνουν να αναπτύξουν μεγάλα αγγεία και κατά συνέπεια πεθαίνουν στην μήτρα κατά την 10η εμβρυϊκή ημέρα. Ο VEGF φαίνεται πως δρα με αυστηρά δόσοεξαρτώμενο τρόπο στα ενδοθηλιακά κύτταρα ή στα πρόδρομά τους κατά τα πρώτα στάδια της αγγειακής ανάπτυξης. Αυτή η δόσοεξαρτώμενη δράση του επιβεβαιώνεται επίσης από την παρατήρηση ότι η υπερέκφραση ή η εξωγενής προσθήκη του παράγοντα VEGF αυξάνει την πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων. Οι κυτταρικές αποκρίσεις του αυξητικού παράγοντα VEGF διαμεσολαβούνται κυρίως με τον υψηλής συγγένειας ενδοθηλιακό υποδοχέα με ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης, τον VEGFR-1 (Flt-1) και τον VEGFR-2 (Flk-1/KDR) από τους οποίους ο VEGFR-2 να αποτελεί τον κύριο υποδοχέα σηματοδότησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα [87].

7. Σύστημα VEGF/VEGFR

7.1. Εισαγωγικά στοιχεία

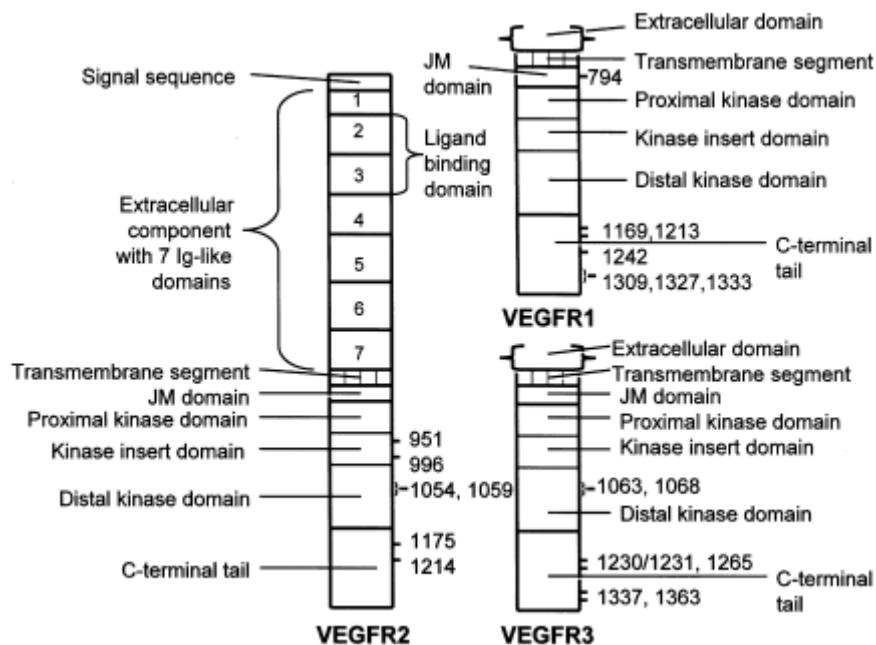
Η οικογένεια των ανθρώπινων παραγόντων VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) αποτελείται από τους VEGF (VEGFA), VEGFB, VEGFC, VEGFD και τον πλακουντιανό αυξητικό παράγοντα (Placental Growth Factor, PlGF). Η οικογένεια των VEGF υποδοχέων (Vascular Endothelial Growth Factor Receptors, VEGFRs) αποτελείται από τρεις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3) και δύο συνυποδοχείς μη πρωτεϊνικών κινασών (neuropilin-1 και neuropilin-2). Αυτά τα συστατικά συμμετέχουν στον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από αγγειοβλάστες και στον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία (αγγειογένεση). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 ή μεταξύ των υποδοχέων VEGFR-2 και VEGFR-3 οδηγεί στην φωσφορυλίωση των τυροσινών του υποδοχέα [88]–[91].

7.2. Οι υποδοχείς της οικογένειας VEGF (VEGFRs)

Ο υποδοχέας πρωτεϊνικών κινασών VEGF αποτελείται από μία εξωκυττάρια περιοχή η οποία περιέχει επτά δομές τύπου ανοσοσφαιρίνης, ένα ενιαίο διαμεμβρανικό τμήμα, ένα παραμεμβρανικό τμήμα, μια ενδοκυτταρική περιοχή με ενεργότητα πρωτεϊνικής τυροσινικής κινάσης η οποία περιέχει 70 κατάλοιπα αμινοξέων και τέλος μία καρβοξυτελική ουρά (**Εικόνα 18**). Τα ένζυμα αυτά (τυροσινικές κινάσες) καταλύουν την ακόλουθη αντίδραση:



όπου το -OH είναι μία υδροξυλομάδα τυροσίνης [88].



Εικόνα 18. Οργάνωση των υποδοχών με ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης των αυξητικών παραγόντων VEGF. Οι αριθμοί που βρίσκονται στα δεξιά αντιστοιχούν σε θέσεις καταλοίπων τυροσινών που φωσφορυλιώνονται στον άνθρωπο[88].

Η πρόσδεση των αυξητικών παραγόντων στην εξωκυττάρια περιοχή των διαμεμβρανικών υποδοχών οδηγεί σε διμερισμό του υποδοχέα, στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης, την trans-αυτοφωσφορυλίωση και τελικά την έναρξη της σηματοδοτικής πορείας. Ο παράγοντας VEGF προσδέεται στην δεύτερη περιοχή ανοσοσφαιρίνης του υποδοχέα VEGFR-1 και στην δεύτερη και τρίτη περιοχή ανοσοσφαιρίνης του υποδοχέα VEGFR-2. Αν και είναι πιθανό ότι οι παράγοντες VEGFC και VEGFD προσδέονται στην δεύτερη ή στην δεύτερη και την τρίτη περιοχή ανοσοσφαιρίνης του υποδοχέα VEGFR-3, αυτό δεν έχει αποδειχτεί[88].

Υπάρχουν τουλάχιστον δύο πιθανοί μηχανισμοί αυτοφωσφορυλίωσης: η cis και η trans. Κατά τον μηχανισμό cis, ένα μονομερές υποδοχέα καταλύει τη φωσφορυλίωσή του. Σε έναν trans μηχανισμό, ένας υποδοχέας ενός διμερούς χρησιμεύει ως ένζυμο, ενώ ο άλλος υποδοχέας του διμερούς χρησιμεύει ως υπόστρωμα και αντίστροφα. Ο μηχανισμός cis προβλέπει ότι η αυτοφωσφορυλίωση θα είναι ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του ενζύμου, ενώ σε έναν trans μηχανισμό θα εξαρτάται από την συγκέντρωση του ενζύμου. Η αυτοφωσφορυλίωση των καταλοίπων της τυροσίνης στο τμήμα ενεργοποίησης της ενδοκυττάριας περιοχής της κινάσης διεγείρει την καταλυτική δραστηριότητα, ενώ η αυτοφωσφορυλίωση των καταλοίπων της τυροσίνης σε άλλες θέσεις δημιουργεί περιοχές πρόσδεσης της Src με ομολογία 2 (Src homology 2, SH2) και περιοχές πρόσδεσης της φωσφοτυροσίνης (phosphotyrosine binding, PTB) η οποία αναγνωρίζει την φωσφοτυροσίνη σε συγκεκριμένες περιοχές[88].

7.2.1. Ο υποδοχέας VEGFR-1

Ο VEGFR-1 είναι ένας υποδοχέας μοριακού βάρους 180 kDa, υψηλής συγγένειας προς τους αυξητικούς παράγοντες VEGFA, VEGFB και PlGF. Εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, καθώς και στα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα και τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Το δεύτερο τμήμα ανοσοσφαιρίνης του VEGFR-1 υποδοχέα αποτελεί την κύρια θέση πρόσδεσης των παραγόντων VEGFA και PlGF. Ο VEGFR-1 δεσμεύει τον VEGFA με τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια απ' ό,τι ο VEGFR-2 (Kd=10-30 pM), ωστόσο η δέσμευση του υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα μία μέγιστη αύξηση της ενεργότητας την πρωτεϊνικής κινάσης κατά 2 φορές. Σε πολλές περιπτώσεις, η επίδραση του υποδοχέα VEGFR-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως για παράδειγμα η επιβίωση και ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, μπορεί να επαχθεί ασθενώς με την θεραπεία με ειδικά για τον υποδοχέα VEGFR-1 υποστρώματα[92], [93].

Ο VEGFR-1 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης κατά την πρώιμη ανάπτυξη, αλλά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση κατά τις παθολογικές συνθήκες. Τα αντισώματα που μπλοκάρουν τον VEGFR-1 εμποδίζουν την μετανάστευση αλλά όχι τον πολλαπλασιασμό των HUVEC κυττάρων (human umbilical vein endothelial cells) μετά από απόκριση στον VEGFA, κάτι το οποίο υποδεικνύει την συμμετοχή του VEGFR-1 στην μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η σηματοδοτική πορεία που διαμεσολαβείται από τον VEGFR-1 φαίνεται πως οδηγεί στην αναδιοργάνωση της ακτίνης μέσω της p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από το μιτογόνο), ενώ ο VEGFR-2 συμβάλλει στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω της φωσφορυλίωσης της FAK (focal adhesion kinase) και την παξιλίνη (paxillin), γεγονός που υποδηλώνει την διαφορετική συμβολή των δύο υποδοχέων στην χημειοτακτική απόκριση. Η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα VEGFR-1 εμπλέκεται επίσης στην μετανάστευση των μονοκυττάρων/μακροφάγων και στην ανασύσταση της αιμοποίησης μέσω της στρατολόγησης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων[92], [93].

7.2.2. Ο υποδοχέας VEGFR-2

Ο VEGFR-2 είναι ένας υποδοχέας με μοριακό βάρος 200-230 kDa, υψηλής συγγένειας προς τους αυξητικούς παράγοντες VEGFA (Kd=75-760 pM) και την επεξεργασμένη μορφή των VEGFC και VEGFD. Η θέση πρόσδεσης του παράγοντα VEGFA στον υποδοχέα VEGFR-2 έχει βρεθεί πως είναι στα τμήματα τύπου ανοσοσφαιρίνης 2 και 3 της εξωκυττάριας περιοχής. Ο VEGFR-2 υποδοχέας βρέθηκε πως εκφράζεται στα αγγειακά και στα λεμφατικά ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και στα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Οι θέσεις των τυροσινών που υπόκεινται μετά από φωσφορυλίωση του υποδοχέα

VEGFR-2 του ανθρώπου από τον αυξητικό παράγοντα VEGFA είναι οι Tyr951 και Tyr996 στην περιοχή εισαγωγής της κινάσης, οι Tyr1054 και Tyr1059 στην περιοχή της κινάσης και οι Tyr1175 και Tyr1214 της καρβόξυ-τελικής ουράς από τις οποίες οι τελευταίες δύο περιοχές, δηλαδή οι Tyr1175 και η Tyr1214 είναι οι πιο σημαντικές[92], [93].

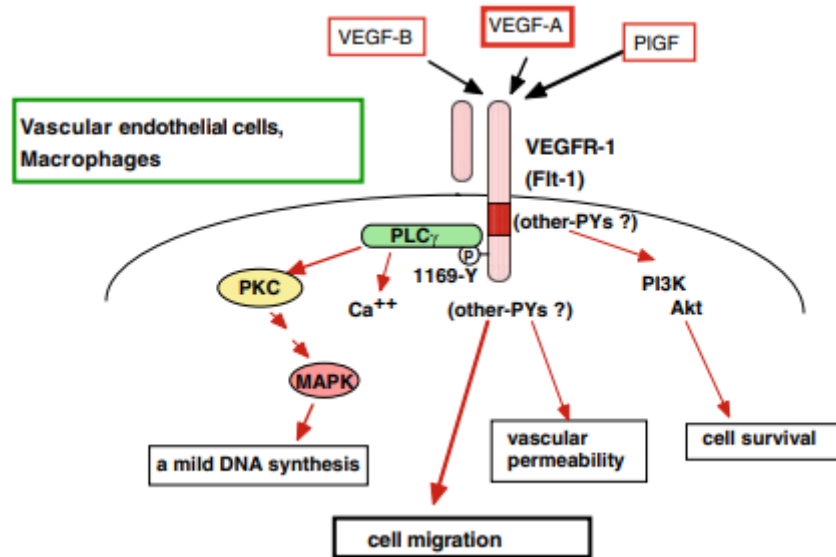
Ο VEGFR-2 είναι ο κύριος μεσολαβητής της μιτογένεσης, των αγγειογενετικών επιδράσεων και των επιδράσεων ενίσχυσης της διαπερατότητας του VEGFA. Επιπλέον, νέες μελέτες απέδειξαν πως η ενεργοποίηση του VEGFR-2 προάγουν την λεμφαγγειογένεση. Η σηματοδότηση επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGFR-2 περιλαμβάνει την PI3K (κινάση 3 των φωσφοινοσιτιδίων)/Akt. Ωστόσο εκτός της παραπάνω οδού, μπορεί να εμπλέκεται και άλλη οδός, δεδομένου ότι το σήμα που παράγεται από την ενεργοποίηση της PI3K από τον υποδοχέα VEGFR-2 δεν είναι ισχυρό. Οι Byzova et al. αναφέρουν ότι η ενεργοποίηση του VEGFR2 από τον αυξητικό παράγοντα VEGFA έχει ως αποτέλεσμα την εξαρτώμενη από την PI3K/Akt ενεργοποίηση διαφόρων ιντεγκρινών, η οποία οδηγεί σε ενισχυμένη κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση. Η συνεργιστική αλληλεπίδραση που προαναφέρθηκε (με τις ιντεγκρίνες) απαιτείται για την παραγωγική σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα VEGFR-2[92], [93].

7.2.3. Καταρράκτης σηματοδότησης του υποδοχέα VEGFR-1

Ο VEGFR-1 μεταδίδει ασθενή σήματα τόσο για την ανάπτυξη και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των περικυττάρων καθώς και για την κυτταρική μετανάστευση των μακροφάγων πιθανώς δια μέσου της επαγόμενης από το υπόστρωμα αυτοφωσφορυλίωσης και της σύζευξης με τα ενδοκυττάρια μόρια μεταγωγής σήματος. Με την χρήση διαφόρων πειραματικών προσεγγίσεων βρέθηκαν οι θέσεις στις οποίες πραγματοποιείται η αυτοφωσφορυλίωση των τυροσινών της ενδοκυττάριας περιοχής του υποδοχέα VEGFR-1 (Y1169, Y1213, Y1242, Y1327, Y1333). Η φωσφορυλίωση του καταλοίπου τυροσίνης επιτρέπει την δέσμευση και την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) η οποία ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω του ενεργοποιημένου από το μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (MAPK)[94], [95].

Ο ενδοκυτταρικός καταρράκτης σηματοδότησης του VEGFR-1 δεν είναι πλήρως κατανοητός κυρίως λόγω της ήπιας βιολογικής δραστηριότητας αυτού του υποδοχέα σε καλλιέργειες. Όπως προαναφέρθηκε, οι θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης του υποδοχέα VEGFR-1 είναι οι Y1169, Y1213, Y1242, Y1327, Y1333. Μεταξύ αυτών των φωσφορυλιωμένων καταλοίπων τυροσινών, η Y1169 φαίνεται πως αντιστοιχεί στην Y1175 του υποδοχέα VEGFR-2, η οποία αποτελεί την κύρια θέση για την δέσμευση της PLCc και την περαιτέρω σηματοδότηση μέσω της PCK-Raf-MEK-MAP κινάσης πορείας προς την αγγειογένεση.

Ωστόσο, η φωσφορυλίωση του Y1169 του υποδοχέα VEGFR-1 είναι σχετικά ασθενής και ενεργοποιεί την PLC-PKC για την ενεργοποίηση της MAP κινάσης. Η Y1213 είναι η θέση με τον μεγαλύτερο βαθμό αυτοφωσφορυλίωσης στον VEGFR-1 αλλά η ενδοκυτταρική πορεία σηματοδότησης δεν είναι ακόμα σαφής αν και η PI3K αποτελεί ένα από τα μόρια της ενεργοποίησης και την επακόλουθη σηματοδότησης (**Εικόνα 19**)[95], [96].



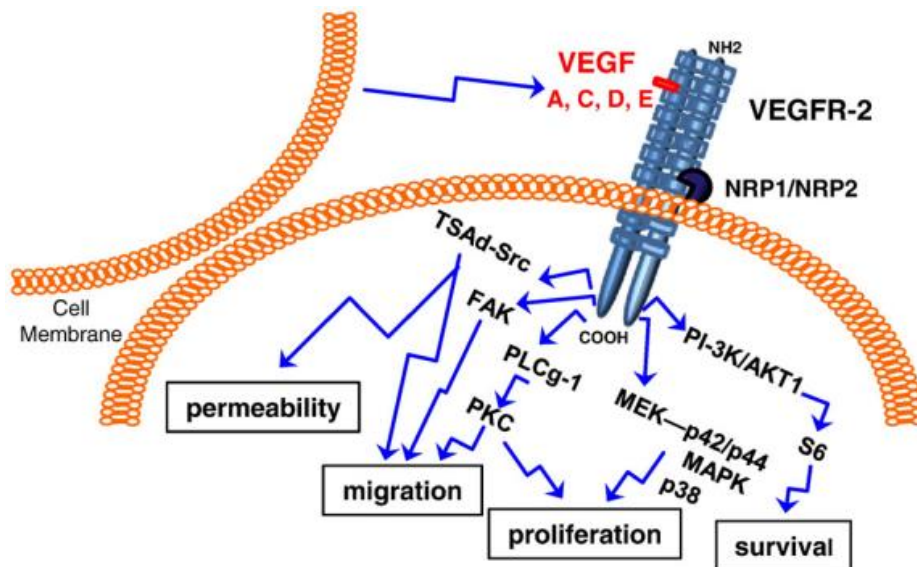
Εικόνα 19. Πιθανές οδοί μεταγωγή σήματος από τον υποδοχέα VEGFR-1. Η τυροσινική κινάση του VEGFR-1 μεταδίδει διάφορα καθοδικά σήματα συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής μετανάστευσης και της σύνθεσης του DNA στην ενήλικη ζωή. Η Y1169 φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιεί το PKC-PC monophosphate το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της MAP κινάσης και την σύνθεση του DNA. Η PI3K και η Akt ενεργοποιούνται επίσης, ως έναν βαθμό, κατά την διέγερση του VEGFR-1. Ωστόσο τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος προς την αγγειακή διαπερατότητα και την μετανάστευση των μακροφάγων και των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως[96].

7.2.4. Καταρράκτης σηματοδότησης του υποδοχέα VEGFR-2

Η δράση του υποδοχέα VEGFR-2 εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ειδική ενεργοποίηση των καταλοίπων τυροσίνης της ενδοκυττάριας κυτταροπλασματικής ουράς του υποδοχέα. Η πλειονότητα των ενδοκυτταρικών περιοχών του VEGFR-2 περιέχουν κατάλοιπα τυροσίνης που εμπλέκονται στις περισσότερες δράσεις κατά την αγγειογένεση. Τα σήματα που παράγονται από τον υποδοχέα VEGFR-2 επηρεάζουν την αγγειακή διαπερατότητα, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η εξωκυττάρια φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου τυροσίνης (Y801) μεταξύ της συγκλίνουσας περιοχής της μεμβράνης του VEGFR-2 είναι απαραίτητη για την επακόλουθη ενεργοποίησης της καταλυτικής περιοχής. Συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης του υποδοχέα VEGFR-2 της ενδοκυτταροπλασματικής περιοχής αποτελούν στόχο της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και εμπλέκονται σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς που ελέγχουν τα επίπεδα του υποδοχέα (ουβικουιτινίωση και αποικοδόμηση)[97], [98].

Η πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα VEGF στον VEGFR-2 υποδοχέα πυροδοτεί την ειδική ενεργοποίηση των καταλοίπων τυροσίνης της ενδοκυτταροπλασματικής ουράς του υποδοχέα επάγοντας πολλαπλά δίκτυα σηματοδότησης που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση, την προσκόλληση, την αναδιαμόρφωση της ακτίνης και την αγγειακή διαπερατότητα. Η σηματοδότηση μέσω της ενεργοποιημένης από το μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK, συμπεριλαμβανομένης της MEK-p42/p44 MAPK και της p38 MAPK, συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό) και της κινάσης 3 της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (PI3K)/Akt1 αποτελεί ένα κοινό μοντέλο ενεργοποίησης της κινάσης της τυροσίνης [97], [98].

Άλλες πρόσθετες οδοί σηματοδότησης που ενεργοποιούνται μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα VEGFR-2 αποτελούν αυτές της φωσφολιπάσης Cγ (PKCγ) η οποία συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό, της κινάσης προσκόλλησης FAK η οποία σχετίζεται με την μετανάστευση και της κινάσης TsAd-Src (T-cell Adapter-Src) η οποία σχετίζεται με την μετανάστευση και την αγγειακή διαπερατότητα. Από την άλλη, Η Y1175 μεσολαβεί τόσο στην PLCγ-1 όσο και στα εξαρτώμενα από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) σηματοδοτικά μονοπάτια που απαιτούνται για την επαγόμενη από τον VEGF απελευθέρωση του παράγοντα von Willebrand από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 20) [97], [98].



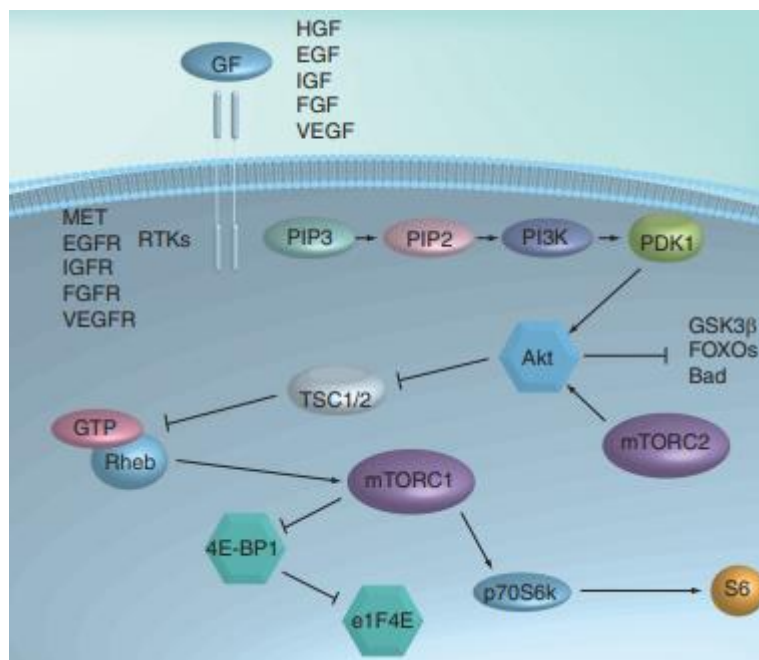
Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο τα σηματοδοτικά μονοπάτια του VEGFR-2 συνδέονται με τις κύριες βιολογικές λειτουργίες του [97].

7.2.5. Σηματοδοτική πορεία PI3K/mTOR και αναστολείς της PI3K

Οι PI3Ks, οι οποίες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες (τύπος IA, IB, II και III), είναι σημαντικές κινάσες που ρυθμίζουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων. Ο τύπος IA είναι η πιο ευρέως μελετημένη κινάση και έχει τρεις καταλυτικές υπομονάδες (p110a, b και d) και μία ρυθμιστική υπομονάδα την p85. Η

απόκριση μετά την διέγερση από αυξητικούς παράγοντες και την επακόλουθη ενεργοποίηση των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (RTKs) και των υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G, η PI3K στρατολογείται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης με άμεσες ή έμμεσες αλληλεπιδράσεις με τους ενεργοποιημένους υποδοχείς[99].

Η ενεργοποιημένη PI3K παράγει τον δεύτερο αγγελιοφόρο, την (3,5)-τριφωσφορική-φωσφατιδύλοινσιτόλη (PIP3), από την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδύλοινσιτόλη μετά από την φωσφορυλίωση λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Στη συνέχεια, η κινάση σερίνης-θρεονίνης Akt στρατολογείται στην μεμβράνη μέσω της πρόσδεσης στην PIP3, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωσή της από κινάσες εξαρτώμενες από το φωσφοϊνοσιτίδιο. Μόλις ενεργοποιηθεί, η Akt ενεργοποιεί τους σηματοδοτικούς τελεστές για την ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού, της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, της μετανάστευσης και της αγγειογένεσης. Στη συνέχεια, η Akt επάγει την ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) του mTORC1, η οποία αποτελεί επίσης μία κινάση σερίνης/θρεονίνης. Η πρωτεΐνη mTOR, με την σειρά της, ρυθμίζει τους επόμενους δρώντες, την κινάση p70S6k και την κατασταλτική πρωτεΐνη της μετάφρασης 4E-BP1 μέσω φωσφορυλίωσης. Είναι γνωστό ότι και οι δύο πρωτεΐνες ρυθμίζουν την μετάφραση πολλών σημαντικών πολλαπλασιαστικών και αγγειογενετικών παραγόντων, όπως οι c-myc, cyclinD1, HIF1a και VEGF(Εικόνα 21)[99].

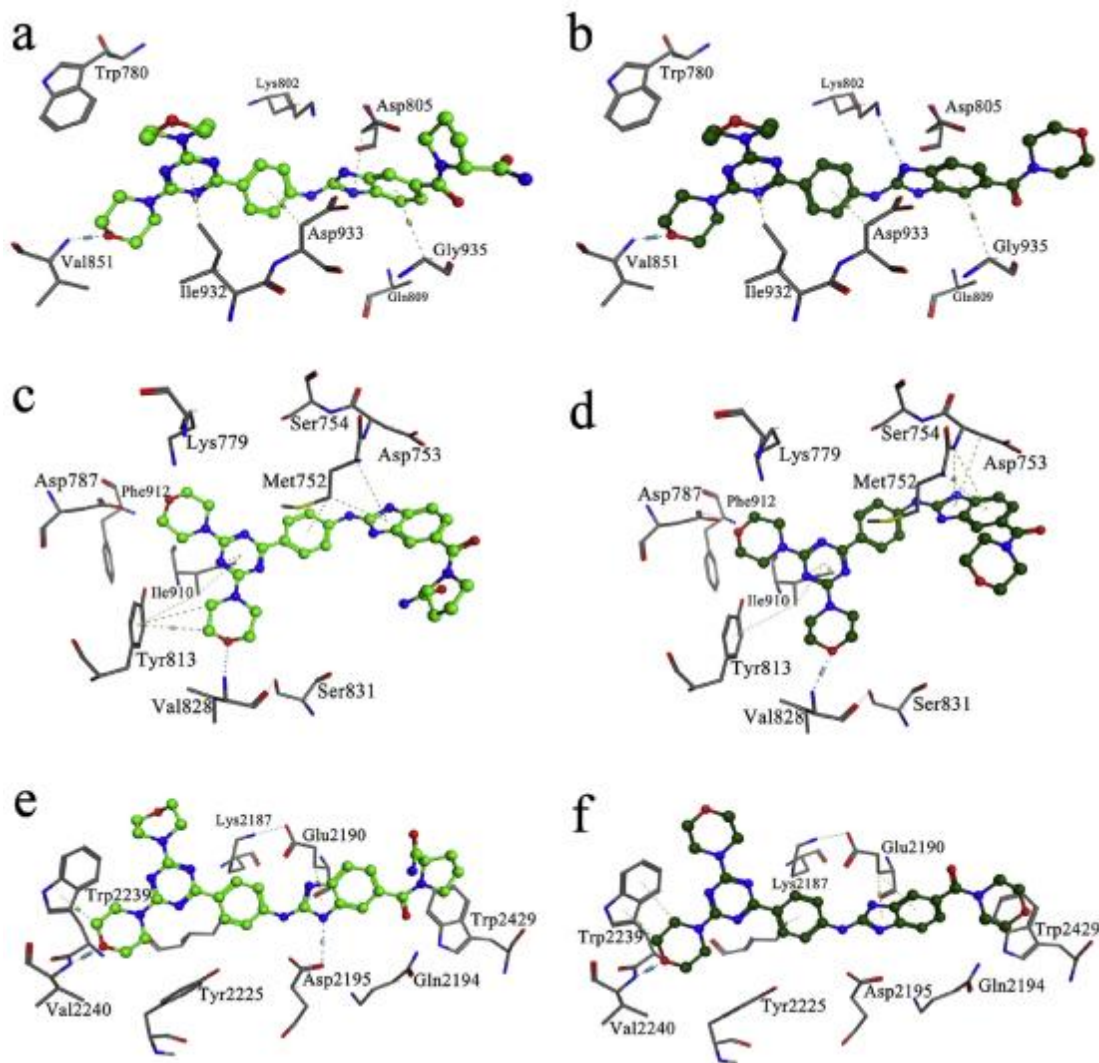


Εικόνα 21. Σηματοδοτική πορεία PI3K/Akt/mTOR[99].

Γενικά, τα παράγωγα πυριμιδίνης και τριαζίνης τα οποία έχουν υποκατασταθεί με δύο μορφολίνες έχουν δείξει μεγάλες δυνατότητες στην θεραπεία του καρκίνου. Ειδικότερα, ο αναστολέας κατηγορίας I της PI3K, buparlisib, είναι ο πρώτος ο οποίος έχει πυριμιδίνη και

είναι υποκατεστημένος με δύο μορφολίνες και έχει προχωρήσει στις κλινικές αξιολογήσεις φάσης III. Ένας επιπλέον αναστολέας της PI3K είναι παράγωγο διμορφόλινο υποκατεστημένης τριαζίνης που αναπτύχθηκε από την Pfizer και βρίσκεται στην φάση II των κλινικών δοκιμών ως ένας δυνητικός παράγοντας για την θεραπεία του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού [100], [101].

Το άτομο O στο δακτύλιο της μορφολίνης των μορίων 19c και 19i σχηματίζουν έναν καθοριστικό δεσμό υδρογόνου με την Val851 της PI3Ka (**Εικόνα 22α** και β), την Val 828 της PI3Kd (**Εικόνα 22γ** και δ) και την Val2240 του mTOR (**Εικόνα 22ε** και στ), αντίστοιχα. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως αυτός ο σχηματιζόμενος δεσμός υδρογόνου είναι κρίσιμος για την ανασταλτική δράση έναντι των mTOR και της PI3Ka. Ο σκελετός της τριαζίνης και το δομικό μοτίβο βενζυλιμιδαζολίου των μορίων 19c και 19i θα μπορούσαν να σχηματίσουν αλληλεπιδράσεις αρενίου-υδρογόνου και/ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με διάφορα κατάλοιπα των PI3Ka, PI3Kd και mTOR. Για παράδειγμα, η τριαζίνη και το βενζιμιδαζόλιο του 19i σχηματίζουν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις αρενίου-H με τα κατάλοιπα αμινοξέων Ile932 και Gly935 της PI3Ka και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα αμινοξέων Trp7780, Gly953 και Lys802 της PI3Ka [100].



Εικόνα 22. Οι τρόποι πρόσδεσης των 19c και 19i στις κρυσταλλικές δομές των πρωτεϊνών PI3Kα, PI3Kδ και mTOR, αντίστοιχα. (α) Η 19c συνδεδεμένη με την PI3Kα. (β) 19i συνδεδεμένη με την PI3Kα. (γ) 19c συνδεδεμένη με την PI3Kδ. (δ) 19i συνδεδεμένο με την PI3Kδ. (ε) 19c συνδεδεμένη με mTOR. (στ) 19i συνδεδεμένο με mTOR[100].

8. Στοχευμένη Θεραπεία

Όπως προαναφέρθηκε (Κεφάλαιο 4) , στην μοριακή στοχευμένη θεραπεία γίνεται η χρήση φαρμάκων ή άλλων ουσιών οι οποίες στοχεύουν συγκεκριμένους μοριακούς στόχους με σκοπό να αποτρέψουν την ανάπτυξη και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων[55], [102], [103].

Η μοριακή στοχευμένη θεραπεία ορίζεται ως ένας τύπος θεραπείας που εμποδίζει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων παρεμβαίνοντας σε συγκεκριμένα κυτταρικά μόρια που απαιτούνται για την καρκινογένεση και την ανάπτυξη του όγκου. Δύο από τις κατηγορίες της στοχευμένης θεραπείας του καρκίνου περιλαμβάνουν τα μικρά μόρια και τα μονοκλωνικά αντισώματα. Τα μικρά μόρια αναφέρονται σε οργανικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (κάτω των 800 Da). Αυτά τα μικρά μόρια μπορούν να διεισδύσουν στην κυτταρική μεμβράνη

και έχουν σχεδιαστεί με τέτοιον τρόπο για να μπορούν να παρεμβαίνουν σε μονοπάτια της σηματοδότησης και να δρουν σε στόχους που βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου [104]–[106].

Τα μονοκλωνικά αντισώματα, σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα μικρά μόρια δεν μπορούν να διεισδύσουν την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και είναι σχεδιασμένα με τέτοιον τρόπο ώστε να δρουν σε συγκεκριμένους στόχους που βρίσκονται στο εξωτερικό του κυττάρου ή στην επιφάνειά του. Η ονομασία της εκάστοτε στοχευμένης θεραπείας παρέχει τον τύπο του μορίου καθώς και των κυτταρικών στόχων του. Μικρά μόρια τα οποία έχουν την κατάληξη ‘-ib’ υποδηλώνουν ένα μόριο που έχει ανασταλτικές ιδιότητες. Τα περισσότερα από αυτά τα μόρια αναπτύσσονται ως αναστολείς τυροσινικών κινασών, όπως για παράδειγμα η ιματινίμπη (Imatinib) και τζεφτινίμπη (Gefitinib)[104].

8.1. Τα πεπτίδια στην στοχευμένη θεραπεία

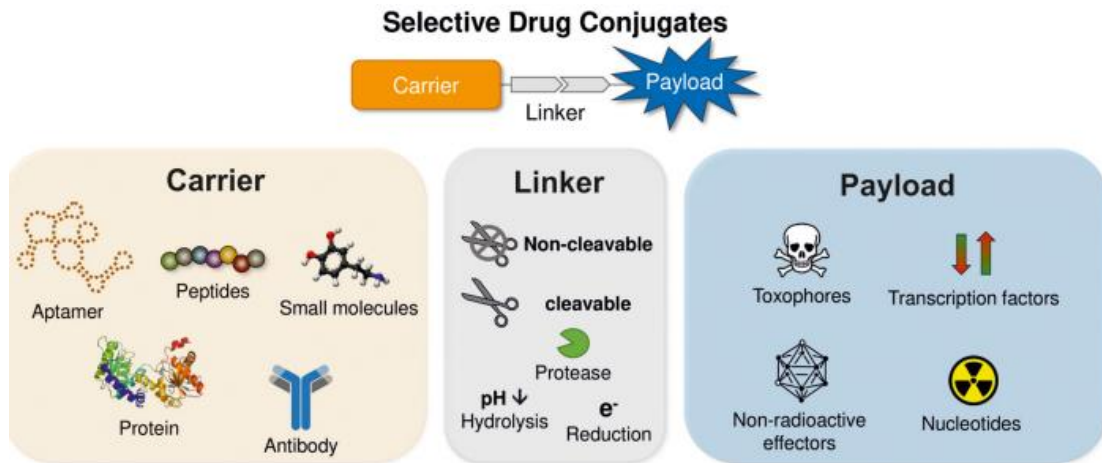
Στόχος της θεραπείας του όγκου είναι η παράταση της επιβίωσης των ασθενών το οποίο γίνεται με την εξάλειψη και την πρόληψη των πολλαπλών μεταστάσεων του. Η συμβατική χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και οι χειρουργικές επεμβάσεις του καρκίνου επικεντρώνονται στην μαζική θανάτωση των κυττάρων χωρίς ιδιαίτερη εξειδίκευση και συχνά συνοδεύονται με την εμφάνιση σοβαρών παρενεργειών και τοξικότητας. Συνεπώς κρίνεται επείγουσα ανάγκη για την ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών οι οποίες θα μπορούσαν να στοχεύσουν αποτελεσματικά τα καρκινικά κύτταρα και θα έχουν χαμηλότερη τοξικότητα προς τους φυσιολογικούς ιστούς[107].

Επειδή υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ειδικών μεμβρανικών πρωτεϊνών στα καρκινικά κύτταρα, θα ήταν δυνατός ο σχεδιασμός και η επιλογή νέων μορίων τα οποία θα μπορούσαν να συνδεθούν ειδικά με αυτές τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies, mAbs) μπορούν να βελτιώσουν την εκλεκτική στόχευση του όγκου καθώς και τα αντικαρκινικά αποτελέσματα. Ωστόσο, οι περαιτέρω εφαρμογές τους στην θεραπεία του όγκου είναι περιορισμένες λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους, της χαμηλής διείσδυσης στους ιστούς και της χαμηλής κυτταρικής πρόσληψης. Τα πεπτίδια που αναγνωρίζουν ειδικά και προσδένονται στις μεμβρανικές αυτές πρωτεΐνες των καρκινικών κυττάρων θα μπορούσαν να ξεπεράσουν ορισμένα από τα προαναφερθέντα προβλήματα των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Γενικά, τα πεπτίδια διαθέτουν πολλά πλεονεκτήματα όπως το μικρό μέγεθός τους, η ευκολία στη σύνθεση και την τροποποίησή τους, καλή βιοσυμβατότητα, καλή διείσδυση στους ιστούς και χαμηλή τοξικότητα τα οποία συνολικά θα μπορούσαν να εξασφαλίσουν υψηλή πρόσληψη στους ιστούς-στόχους. Το μεγαλύτερο

μειονέκτημα που παρουσιάζουν τα πεπτίδια στην χρήση τους ως αντικαρκινικά φάρμακα είναι η εύκολη αποικοδόμησή τους από πρωτεολυτικά ένζυμα η οποία μπορεί να αποφευχθεί με την χημική τροποποίηση των L-αμινοξέων προς D-αμινοξέα καθώς και την κυκλοποίηση των πεπτιδίων [107]–[110].

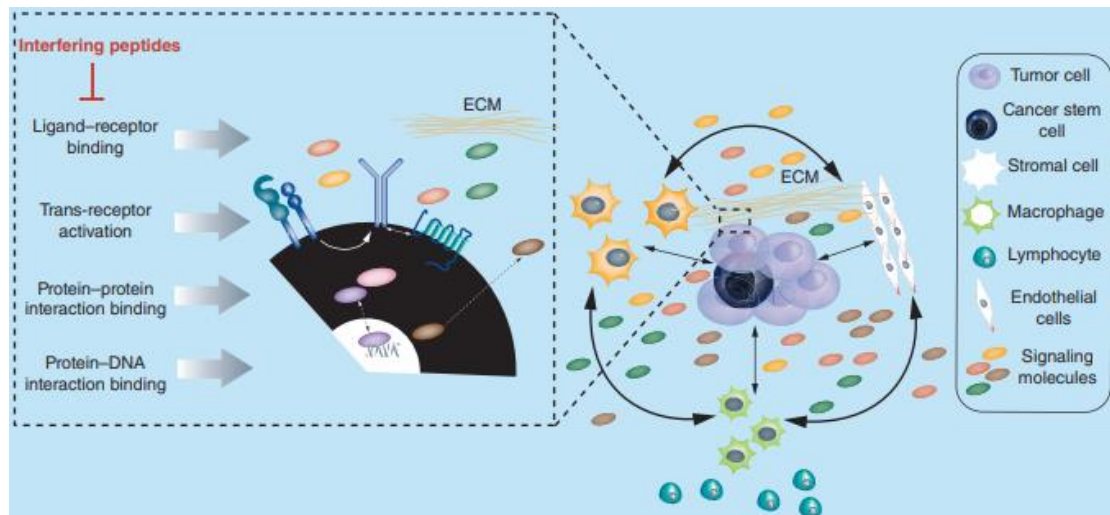
Ένας άλλος τρόπος για να βελτιωθούν οι ιδιότητες των αντικαρκινικών φαρμάκων είναι με την χρήση πεπτιδίων κυτταρικής διείσδυσης (Cell Penetrating Peptides, CPPs) με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας από την μεμβράνη. Τα CPP είναι μια κατηγορία πεπτιδίων τα οποία είναι ικανά να μεταφέρουν μεγάλα μόρια δια μέσου της πλασματικής μεμβράνης. Τα CPP μπορούν να είναι υδρόφοβα από την φύση τους ή πιο συχνά περιέχουν σε μεγάλο βαθμό βασικά κατάλοιπα, καθιστώντας τα διαπερατά από την μεμβράνη. Αυτά τα θετικά φορτισμένα πεπτίδια έχουν μεγάλη συγγένεια προς την εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και όταν συνδέονται με το φορτίο τους (μεγάλο μόριο) μεσολαμβάνουν στην αλληλεπίδραση με την μεμβράνη και τελικά βοηθούν στην μεταφορά του μεγάλου μορίου-φορτίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Γενικά υπάρχουν ενδείξεις ότι τα ελεύθερα πεπτίδια (CPP) ή τα πεπτίδια συνδεδεμένα με μικρά μόρια, όπως για παράδειγμα φθορίζοντα μόρια, μπορούν να εισέλθουν στα κύτταρα μέσω μιας ενεργειακά ανεξάρτητης διαδικασίας ενώ όταν το φορτίο είναι ένα μεγάλο μόριο, όπως μία πρωτεΐνη, τότε τα CPP τα οποία είναι συνδεδεμένα με το φορτίο τους εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων με ενδοκύτωση[111], [112].

Μία επιπλέον προσέγγιση η οποία έχει σκοπό την επίτευξη της εκλεκτικής μεταφοράς διαφορετικών μορίων-ενεργών παραγόντων στα καρκινικά κύτταρα είναι η σύζευξη των τελευταίων με πεπτίδια μέσω ενός συνδέτη. Αρχικά όλα αυτά τα μόρια αποτελούνται από τα συγκεκριμένα τρία στοιχεία (πεπτίδιο-συνδέτης-ενεργός παράγοντας) (**Εικόνα 23**). Ο πρώτος παράγοντας διευκολύνει την στόχευση στον όγκο και μπορεί να είναι εκτός από τα απταμερή και μικρά μόρια και βιολογικά προϊόντα όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες και αντισώματα. Ο δεύτερος παράγοντας είναι το ίδιο το φάρμακο το οποίο μπορεί να προκαλέσει μια ποικιλία βιολογικών λειτουργιών, που στην περίπτωση του καρκίνου είναι η κυτταροτοξικότητα. Τέλος, ο τρίτος παράγοντας είναι ο συνδέτης ο οποίος συνδέει τους δύο προηγούμενους παράγοντες[113], [114].



Εικόνα 23. Σχηματική δομή συζευγμάτων φαρμάκων που στοχεύουν εκλεκτικά υποδοχείς. Τα συζεύγματα αποτελούνται από τρεις παράγοντες: το φορτίο, τον συνδέτη και τον φορέα[113].

Τα αντικαρκινικά πεπτίδια δρουν με διάφορους τρόπους, όπως είναι η αναστολή της αγγειογένεσης στους όγκους, η επαγωγή της απόπτωσης, της νέκρωσης, η τροποποίηση της ανοσολογικής λειτουργίας, η αναστολή της ενεργότητας των κινασών και των πρωτεασών. Ειδικότερα, η αγγειογένεση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την εισβολή και την μετάσταση των συμπαγών όγκων, καθώς τα νέα αγγεία που σχηματίζονται μπορούν να παρέχουν τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες και το οξυγόνο και να απομακρύνουν τα μεταβολικά απόβλητα των κυττάρων. Έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι αυξητικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην αγγειογένεση στους όγκους, όπως ο αυξητικός των ινοβλαστών (FGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Έτσι, πολλά πεπτίδια θα μπορούσαν να προκαλέσουν αντι-αγγειογενετική και αντικαρκινική δράση κυρίως μέσω της διακοπής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραπάνω αυξητικών παραγόντων με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους (interfering peptides) (Εικόνα 24)[107].



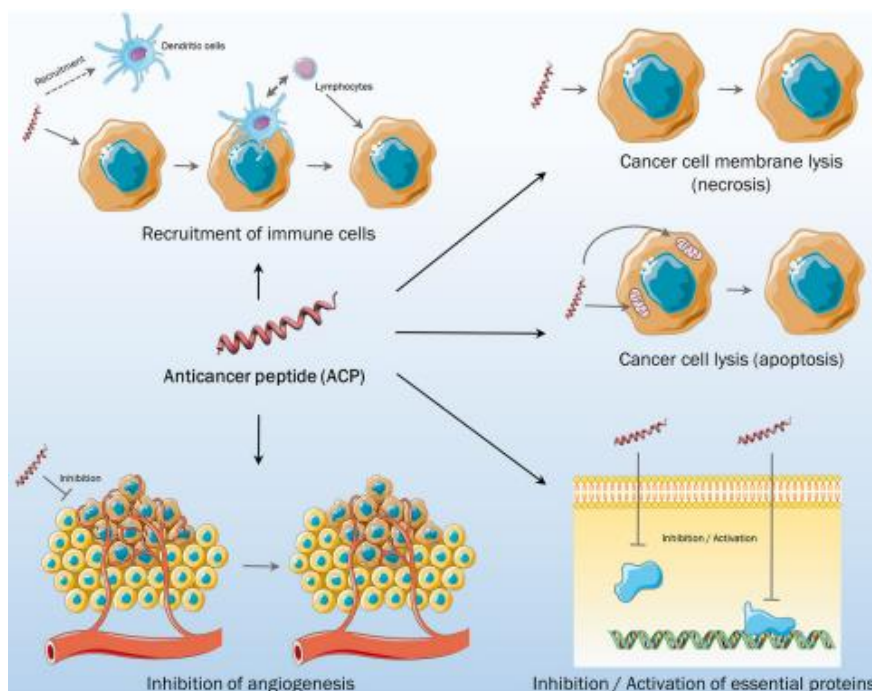
Εικόνα 24. Συνθετικά πεπτίδια που δρουν με την παρεμβολή τους μεταξύ αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-υποδοχών[115].

Η απόπτωση είναι ένα εγγενές πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου που έχουν αναπτύξει οι πολυκύτταροι οργανισμοί ώστε να ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ως απάντηση στις βλάβες του κατά την διάρκεια της ανάπτυξης ή μετά από το κυτταρικό στρες. Κατά την απόπτωση, ο πυρήνας και το κυτταρόπλασμα συρρικνώνονται, συμπυκνώνονται και στην συνέχεια κατακερματίζονται και τελικά απελευθερώνουν μικρά αποπτωτικά σωμάτια που συνδέονται στην μεμβράνη των μακροφάγων και φαγοκυτταρώνονται. Η νέκρωση είναι ένας άλλος τρόπος κυτταρικού θανάτου ο οποίος δεν έχει τόσο περίπλοκους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που χαρακτηρίζουν την απόπτωση. Τα κύρια χαρακτηριστικά της νέκρωσης είναι η κροκίδωση της χρωματίνης, η διόγκωση και ο εκφυλισμός του κυτταροπλάσματος και της μιτοχονδριακής μήτρας, η καταστροφή και εκροή του κυτταροπλασματικού περιεχομένου στον εξωκυττάριο χώρο. Η επαγωγή της νέκρωσης συμβαίνει συνήθως σε πολλές τυχαίες (φυσικός ή χημικός τραυματισμός) ή οξείες παθολογικές καταστάσεις κυτταρικής βλάβης. Τα πεπτίδια που προκαλούν νέκρωση είναι μια ομάδα λυτικών πεπτιδίων που διασπούν την κυτταρική μεμβράνη και έχουν υψηλότερο βαθμό εκλεκτικότητας προς τα καρκινικά κύτταρα απ' ότι τα κλασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα[107].

Τα κακοήγη καρκινικά κύτταρα στρατολογούν μία ευρεία ποικιλία κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των φλεγμονοδών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και των ινοβλαστών και παράγουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες παράγοντες σχηματίζοντας το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου υπάρχει μία λεπτή ισορροπία μεταξύ της αντικαρκινικής ανοσίας και της προφλεγμονώδους δραστηριότητας που προέρχεται από τον όγκο, η οποία περιορίζει την αντικαρκινική

την αντικαρκινική ανοσία. Ένας μεγάλος αριθμός πεπτιδίων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την για την ανοσοθεραπεία το καρκίνου (

Εικόνα 25)[107].



Εικόνα 25. Διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων[116].

8.2. Πεπτίδια που στοχεύουν τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενα κεφάλαια η αγγειογένεση, δηλαδή ο σχηματισμός και η διατήρηση των δομών των αγγείων, είναι κρίσιμη για την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών στους όγκους και την εξέλιξη του καρκίνου και την μετάσταση. Διάφοροι τύποι σηματοδοτικών μορίων έχουν αναγνωρισθεί ως επαγωγείς της αγγειογένεσης των όγκων, μεταξύ των οποίων είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας A (VEGFA), ο οποίος αναφέρεται και ως VEGF, και ο υποδοχέας VEGFR-2 να είναι οι πιο σημαντικοί. Η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από το σύστημα VEGF/VEGFR-2 διαμεσολαβείται κυρίως από το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK/ERK, και λιγότερο αποτελεσματικά από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR. Επιπρόσθετα, η σύνδεση του αυξητικού παράγοντα VEGFB με τον υποδοχέα VEGFR-1 παίζει και αυτή σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση και τον μετάσταση των όγκων κυρίως μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR[117].

Πειραματικά ευρήματα αποκάλυψαν ότι η αναστολή των παραπάνω υποδοχέων μπορεί να αναστείλει την αγγειογένεση του όγκου και ότι ενισχύεται με τον ταυτόχρονο

αποκλεισμό των δύο αλληλεπιδράσεων, VEGFA/VEGFR-2 και VEGFB/VEGFR-1. Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων των αντισωμάτων (όπως το bevacizumab), των πρωτεϊνών (όπως το afibercept και το endostar) και των αναστολέων τυροσινικών κινασών (όπως το sunitinib και το sofarenib). Ωστόσο, η κλινική χρήση των παραπάνω φαρμάκων εξακολουθεί να περιορίζεται από διάφορους παράγοντες όπως οι ανεπιθύμητες ενέργειες, η τοξικότητα, η επίκτητη αντίσταση στα φάρμακα και η μη διαθεσιμότητα σε έγκυρους βιοδείκτες[117].

Ο υποδοχέας VEGFR-1 δεσμεύει τον αυξητικό παράγοντα VEGFA με μεγαλύτερη συγγένεια απ' ότι ο VEGFR-2 (δέκα φορές μεγαλύτερη). Συνεπώς, ο ορθολογικός σχεδιασμός ενός αναστολέα ο οποίος θα μπλοκάρει την αλληλεπίδραση των VEGFB/VEGFR-1 και VEGFA/VEGFR-1 συστημάτων θα αποτελούσε μία καλή στρατηγική για την αναστολή της αγγειογένεσης στους όγκους. Μεταξύ των πέντε κύριων μεγάλων επιφανειών αλληλεπίδρασης του VEGFR-1, ένα μικρό πεπτιδίο ανταγωνιστής θα μπορούσε να σχεδιαστεί και να δράσει σε μία από αυτές τις περιοχές καλύπτοντας ένα μικρό μέρος της και με την οποία θα αλληλεπιδρούσε με υψηλή συγγένεια. Ένα τέτοιο μικρό πεπτιδίο σχεδιάστηκε το οποίο ονομάστηκε ως VGB3 και το οποίο έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τον VEGFR-1D2 (VEGFR-1 domain 2)[118].

Μία σημαντική θέση πρόσδεσης για την αλληλεπίδραση με τον VEGFR-1D2 περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 60-67 (η περιοχή βρόγχου που συνδέει το β3 με το β4 πτυχωτό φύλλο), τα 62-PDDGL-66 και το σκέλος β7 102-ECRP-105 του VEGF-B. Επιπλέον, για να αυξηθεί ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου στην κυκλοφορία του αίματος, προστέθηκε ένα κατάλοιπο Cys στο C-τελικό άκρο για την δημιουργία ενός δισουλφιδικού δεσμού. Η περιοχή του βρόγχου περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό όξινων καταλοίπων αμινοξέων τα οποία μπορούν να συμμετέχουν στις πολικές αλληλεπιδράσεις με τον VEGFR-1D2 κάτι το οποίο έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει και στα τρία σύμπλοκα του υποδοχέα VEGFB/VEGFR-1D2, VEGFA/VEGFR-1D2 και PIGF/VEGFR-1D2. Συνεπώς αυτές οι πολικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να θεωρηθούν σημαντικές για την δημιουργία του συμπλόκου VEGFB/VEGFR-1D2. Με την γνώση των παραπάνω κατασκευάστηκε το δεκαπεπτιδίο $_2\text{NH-Glu-Cys-Arg-Pro-Pro-Asp-Asp-Gly-Leu-Cys-COOH}$ [118].

Ο υπολογισμός της ενεργότητας σύνδεσης του VGB3 πεπτιδίου στον υποδοχέα VEGFR-1D2 υπολογίστηκε και βρέθηκε ίση με $-30,819 \text{ kcal/mol}$. Επιπλέον, βρέθηκε πως στο σύμπλοκο VGB3/VEGFR-1D2 τα κατάλοιπα αμινοξέων της περιοχής του βρόγχου σχηματίζουν συνολικά 14 αλληλεπιδράσεις Van der Waals με τα κατάλοιπα Pro143, Leu204, Phe172, Lys170, Pro173, Leu174, Lys171, Thr206, Glu208, Leu215 και Lys217. Οι περισσότερες Van der

Waals αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται με τα υδρόφοβα κατάλοιπα Phe172 και Leu204 του VEGFR-1D2 και τα Cys2, Arg3, Cys10 και Leu9 του πεπτιδίου VGB3. Τέλος, με πειράματα βρέθηκε πως η σταθερά διάστασης του συμπλόκου VGB3/VEGFR-1D2 είναι ίση με $K_d=1,96 \pm 0,69 \mu\text{M}$ [118].

Στο πεπτίδιο που προαναφέρθηκε πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 4 επιπλέον αμινοξέων στο N-τελικό άκρο και βρέθηκε πως μπορεί να αναγνωρίσει και να ουδετεροποιήσει ταυτόχρονα τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2. Το δεκατετραπεπτίδιο έχει την δομή $\text{NH}_2\text{-Lys-Ala-Trp-Ala-Glu-Cys-Arg-Pro-Pro-Asp-Asp-Gly-Leu-Cys-COOH}$ και βρέθηκε ότι μπορεί να επάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, την παραγωγή σε μεγάλες ποσότητες των ROS, την απόπτωση και ότι μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων[117], [119].

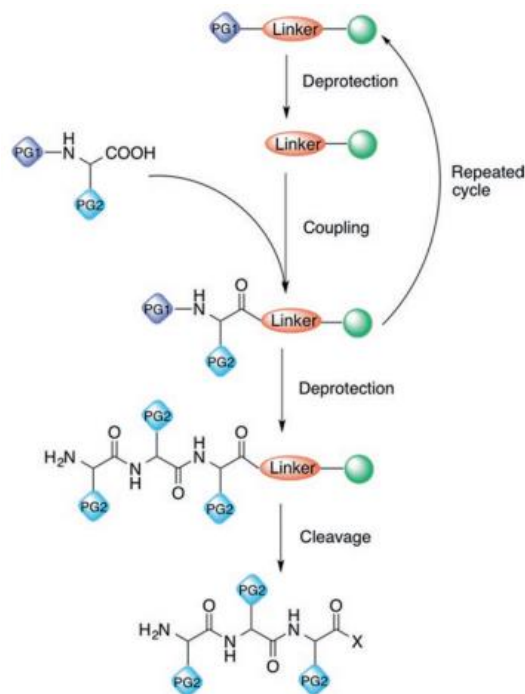
Τέλος, ένα πεπτίδιο το οποίο στοχεύει και ουδετεροποιεί τον υποδοχέα VEGFR-2 βρέθηκε με την μέθοδο high-throughput bacterial display, ονομάστηκε ως VRBP1 και αποτελεί ένα αποτελεσματικό μόριο για την διάγνωση και την θεραπεία του καρκίνου. Η αλληλουχία του πεπτιδίου VRBP1 είναι η εξής: Tyr-Asp-Gly-Asn-Ser-Phe-Tyr-Glu-Met-Trp-Gly-Val-Lys-Pro-Ala-Ser-Glu-Ser[120].

9. Μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές και μέθοδοι της πεπτιδικής σύνθεσης, της HPLC, του MS, του NMR και της φθορισμομετρίας.

9.1. Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση (SPPS)

Η σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεά φάση (SPPS), που εισήχθη από τον Bruce Merrifield το 1963[121], είναι μια στρατηγική για την σύνθεση πεπτιδίων η οποία συνεπάγεται την επαναλαμβανόμενη σύζευξη του C-τελικού άκρου προστατευμένων αμινοξέων σε έναν αδιάλυτο φορέα ρητίνης. Αυτή η πρόσδεση σε έναν στερεό φορέα μέσω ενός διασπώμενου συνδέσμου επιτρέπει την χρήση μεγάλης περίσσειας αντιδραστηρίων και διευκολύνει την αποτελεσματική απομάκρυνση των παραπροϊόντων και την λήψη πεπτιδίων υψηλής καθαρότητας. Επιπλέον αυτή η μέθοδος επιτρέπει την αυτοματοποίηση όλης της διαδικασίας και σήμερα είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική για την σύνθεση πεπτιδίων (**Εικόνα 26**)[122]–[124].



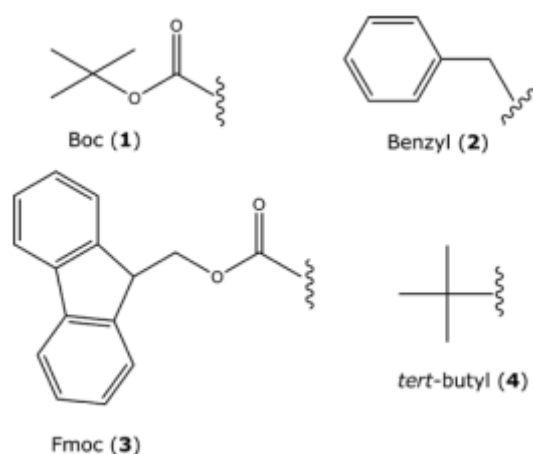
Εικόνα 26. Επισκόπηση της σύνθεσης πεπτιδίου σε στερεά φάση. PG: προστατευτική ομάδα, X= OH ή NH₂. Όταν ως PG1 χρησιμοποιείται η ομάδα Fmoc τότε ακολουθείτε η στρατηγική Fmoc SPPS[122].

Στο αρχικό στάδιο της σύνθεσης, το πρώτο αμινοξύ συνδέεται (συνήθως μέσω της καρβοξυλικής του ομάδας) με την ρητίνη μέσω ενός συνδέσμου. Για να αποφευχθεί ο πολυμερισμός, τα αμινοξέα προστατεύονται στην α-αμινομάδα τους καθώς και στις δραστικές λειτουργικές πλευρικές αλυσίδες. Η χρήση προστατευτικών ομάδων, όπως αυτών που είναι ανθεκτικές σε οξέα και βάσεις, επιτρέπει την επιλεκτική απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας της α-αμινομάδας χωρίς να επηρεάζονται οι προστατευτικές ομάδες της πλευρικής αλυσίδας. Έτσι το πεπτίδιο συντίθεται σταδιακά έως ότου επιτευχθεί το κατάλληλο μήκος. Ωστόσο, οι ερευνητές υποστηρίζουν πως μόνο η σύνθεση πεπτιδίων μήκους έως 50 αμινοξέων είναι δυνατόν να συντεθούν[122].

Ανάλογα με τον σύνδεσμο που χρησιμοποιείται μεταξύ της ρητίνης και του πρώτου αμινοξέος καθώς και την στρατηγική της προστασίας που υιοθετείται, είναι στη συνέχεια δυνατόν να πραγματοποιηθεί επιλεκτική αφαίρεση των προστατευτικών πλευρικών αλυσίδων ή να απελευθερωθεί το πεπτίδιο από την ρητίνη, χωρίς να απομακρυνθούν οι προστατευτικές ομάδες από τις πλευρικές αλυσίδες ή τέλος να συμβούν και τα δύο ταυτόχρονα ώστε τελικά να ληφθεί το ελεύθερο πεπτίδιο[122].

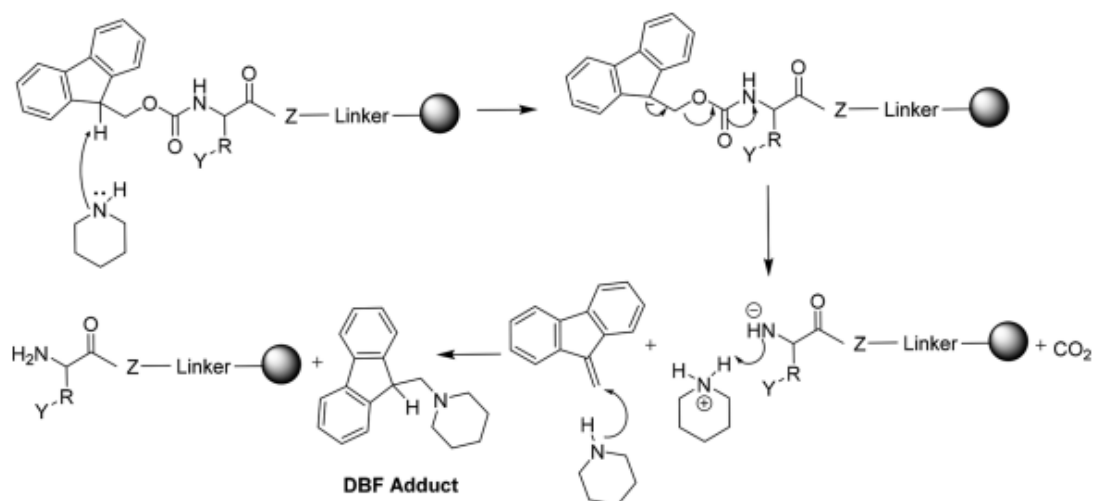
Αρχικά η σύνθεση του Merrifield περιλάμβανε ομάδες Boc (1) στο Na και βενζυλικής φύσης ομάδες (2) στις πλευρικές αλυσίδες. Παρόλο που και οι δύο ομάδες είναι ευαίσθητες στα οξέα, αυτό το σύστημα προστασίας μπορεί να εφαρμοστεί στην σύνθεση SPPS λόγω της διαφορετικής ευαισθησίας στα οξέα. Ειδικότερα, οι Boc ομάδες μπορούν να αφαιρεθούν με

50% τριφθοροοξικό οξύ (TFA), ενώ η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων με βάση το βενζόλιο και η διάσπαση από την ρητίνη απαιτούν την χρήση περισσότερο ισχυρών οξέων, όπως το υδρίδιο του φθορίου (HF) και το τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ (TFMSA). Ωστόσο, η χρήση αυτών των τοξικών και εξαιρετικά πτητικών αντιδραστηρίων είναι επικίνδυνη και απαιτεί την χρήση ειδικού εξοπλισμού. Συγκριτικά, η στρατηγική Fmoc είναι περισσότερο ορθογωνική με την χρήση της ευπαθούς στις βάσεις Fmoc (3) ομάδας για την προστασία του Na και όξινης ομάδες (π.χ. *tert*-butyl) (4) για την προστασία των πλευρικών αλυσίδων (**Εικόνα 27**)[122].



Εικόνα 27. Οι πιο σημαντικές προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται στην Boc και Fmoc σύνθεση πεπτιδίων στερεάς φάσης[122].

Η απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας Fmoc με την χρήση βάσης μέσω β-εξάλειψης, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα και διβενζοφουλβενίου, ενός ηλεκτρονιόφιλου αντιδραστηρίου. Οι δευτεροταγής αμίνες, όπως η πιπεριδίνη (**Εικόνα 28**), λειτουργούν τόσο ως βάσεις αλλά και ως μόρια που αιχμαλωτίζουν το απελευθερούμενο διβενζοφουλβένιο και αποτρέπουν την μη αναστρέψιμη επανασύνδεσή του με την αμινο-ομάδα[122].

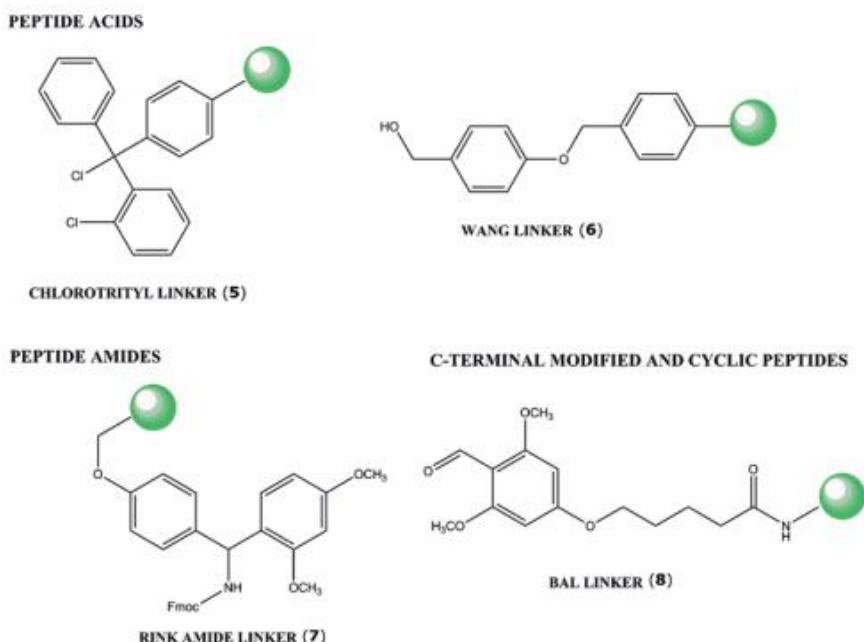


Εικόνα 28. Αποπροστασία από την Fmoc ομάδα με πιπεριδίνη[125].

Οι ρητίνες που χρησιμοποιούνται στην SPPS πρέπει να είναι χημικά, μηχανικά και φυσικά σταθερά. Εκτός αυτού, παράμετροι όπως η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων και η ικανότητα διόγκωσης πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν, ανάλογα με την προβλεπόμενη εφαρμογή. Οι περισσότερες ρητίνες κατατάσσονται σε μία από τις τρεις κατηγορίες: τις κλασικές ρητίνες πολυστυρενίου (PS), PS επενδυμένο με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και τις διασυνδεδεμένες PEG ρητίνες[122].

Ο σύνδεσμος είναι ένα διλειτουργικό τμήμα, που μπορεί να διασπαστεί, και επιτρέπει την σύνδεση μεταξύ της πεπτιδικής αλυσίδας (στις περισσότερες περιπτώσεις μέσω της C-τελικής α-καρβοξυλομάδας) και του κορμού της ρητίνης. Εναλλακτικά η πεπτιδική αλυσίδα αγκυροβολείται στον κορμό της ρητίνης μέσω μια πλευρικής αλυσίδας ή μέσω ενός αμιδικού συνδέσμου (backbone amide linker, BAL). Στην τελευταία περίπτωση, τα πρώτα αμινοξύ φέρει μια καρβόξυ-προστατευτική ομάδα η οποία μπορεί να αφαιρεθεί για να ληφθεί το ελεύθερο α-καρβοξυλικό οξύ, επιτρέποντας έτσι τις τροποποιήσεις στο C-τελικό άκρο[122].

Ο σύνδεσμος ο οποίος χρησιμοποιείται κρίνει τις συνθήκες που θα χρησιμοποιηθούν για την απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη και συνολικά την στρατηγική της σύνθεσής του. Για την σύνθεση πεπτιδίων τα οποία θα φέρουν καρβοξυλομάδα στο C-τελικό άκρο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ποικίλοι συνδέτες οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι από τους οποίους είναι ο 2-χλωροτρίτυλο (5) συνδέτης και ο Wang (6). Ο 2-χλωροτρίτυλο συνδέτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για την σύνθεση προστατευμένων συνδετών. Ο Rink amide συνδέτης (7) είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος για την δημιουργία αμιδίων στο C-τελικό άκρο και ο συνδέτης BAL χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό C-τροποποιημένων ή κυκλικών πεπτιδίων (**Εικόνα 29**)[122].

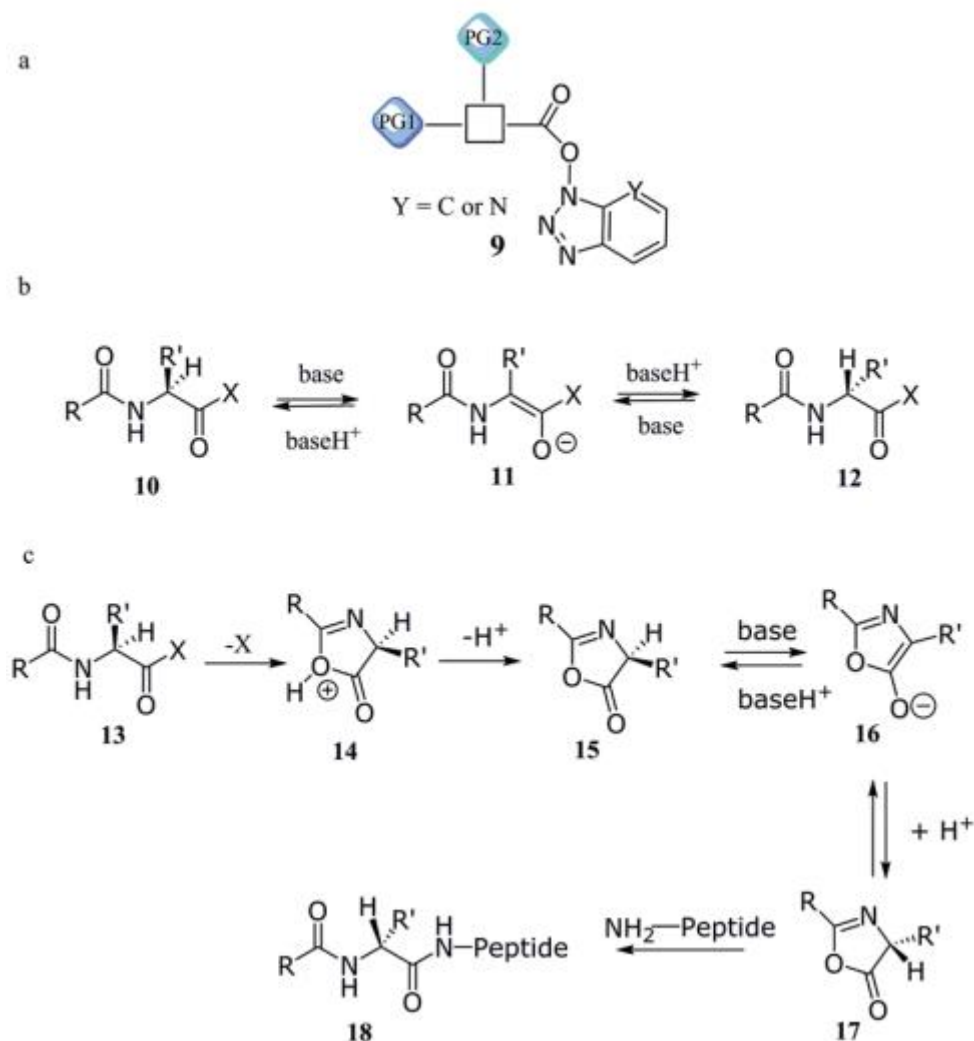


Εικόνα 29. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι συνδέτες στην Fmoc SPPS[122].

Τα αντιδραστήρια σύζευξης είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού μεταξύ της μίας αμινομάδας του N-τελικού άκρου του ενός καταλοίπου με την καρβοξυλομάδα του C-τελικού άκρου του επόμενου αμινοξέος. Το αντιδραστήριο σύζευξης οδηγεί στην ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να συνδεθεί, προσφέροντάς του μία καλή αποχωρούσα ομάδα, η οποία μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί από την αμινομάδα του καταλοίπου αμινοξέος που είναι συνδεδεμένο με την ρητίνη. Συνήθως, μετά την ενεργοποίηση με το αντιδραστήριο σύζευξης σχηματίζεται ένας εστέρας (Εικόνα 30a). Ωστόσο, η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας μπορεί να οδηγήσει στην ρακεμοποίηση ενός α-χειρόμορφου άνθρακα μέσω δύο κύριων οδών οι οποίες καταλύονται από την ύπαρξη μιας βάσης, η άμεση ενολοποίηση (Εικόνα 30b) και ο σχηματισμός της 5(4H)-οξαζολόνης (Εικόνα 30c)[122].

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια σύζευξης μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες: τα καρβοδιμίδια, τα άλατα φωσφονίου και τα άλατα των αμινίων. Τα καρβοδιμίδια, που περιγράφηκαν πρώτη φορά από τους Sheehan και Hess το 1955, περιλαμβάνουν τα DCC (19) και DIC (20). Γενικά, το DIC προτιμάται έναντι του DCC, καθώς το παραπροϊόν της ουρίας που σχηματίζεται είναι διαλυτό στο DMF και λιγότερο τοξικό. Τα καρβοδιμίδια οδηγούν στον σχηματισμό O-ακυλοισουρίας, το οποίο είναι ένα δραστικό στοιχείο το οποίο αλληλεπιδρά με την ελεύθερη αμινομάδα του καταλοίπου αμινοξέος που βρίσκεται συνδεδεμένο στην ρητίνη με αποτέλεσμα να προκύψει ένας αμιδικός δεσμός. Εναλλακτικά, μπορεί είτε να σχηματιστεί οξαζολόνη η οποία θα οδηγήσει στη συνέχεια σε ρακεμοποίηση είτε το ενδιάμεσο προϊόν O-ακυλοισουρίας μπορεί να αναδιαταχτεί στην μη

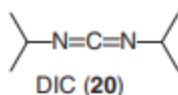
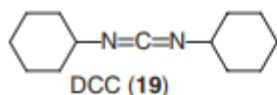
δραστική N-ακυλουρία, η οποία τερματίζει την επιμήκυνση της αλυσίδας. Για αυτό, τα καρβοδιμίδια χρησιμοποιούνται συνήθως με N-υδρόξυ παράγωγα, όπως το HOBT (21), το HOAt (22) και το Οχγμα (23) με σκοπό την αναστολή των παραπάνω ανεπιθύμητων πλευρικών αντιδράσεων[122].



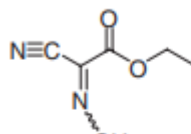
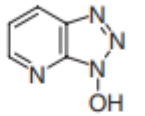
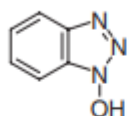
Εικόνα 30. (a) Ενεργοποιημένος εστέρας. (b) Ρακεμοποίηση μέσω της άμεσης ενολοποίησης. (c) Ρακεμοποίηση μέσω του σχηματισμού της 5(4H)-οξαζολόνης[122].

Στα άλατα αμινίου, όπως τα GBTU (28), TBTU (29), HATU (30) και TATU (31), ένα θετικό άτομο αζώτου αντικαθιστά ένα θετικό άτομο φωσφονίου, στην περίπτωση των αλάτων φωσφονίου. Το αντιδραστήριο COMU παρουσιάζει αυξημένη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με το HATU/HBTU, έχει συμβατότητα με την SPPS με την χρήση μικροκυμάτων, είναι μη τοξικό και έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα στο DMF όμως δεν είναι σταθερό στο DMF και συνεπώς δεν είναι κατάλληλο για αυτοματοποιημένη σύνθεση (Εικόνα 31)[122].

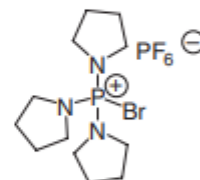
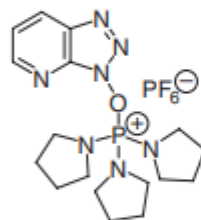
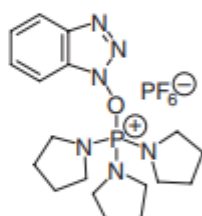
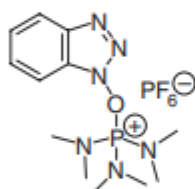
Carbodiimides



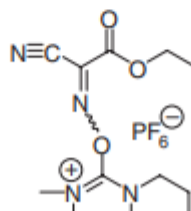
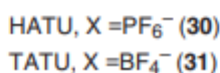
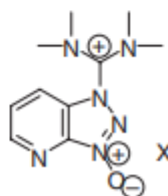
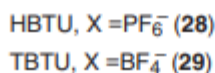
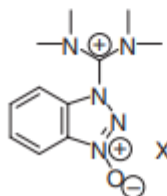
Additives



Phosphonium



Aminium



Εικόνα 31. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια σύζευξης.

Οι προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων είναι απαραίτητες για την προστασία των πυρηνόφιλων ομάδων τους. Οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων Ser, Thr, Tyr, Glu και Asp προστατεύονται συνήθως από την σταθερή στα οξέα ομάδα tert-butyl (tBu). Στις πλευρικές αλυσίδες Lys και Trp προτιμάται η προστατευτική ομάδα Boc, στην Arg η 2,2,4,6,7-πενταμεθυλ-διυδροβενζοφουραν-5-σουλφονυλ- ομάδα (ή Pbf) ενώ η προστατευτική τρίτυλ- ομάδα χρησιμοποιείται ευρέως για τα αμινοξέα Cys, Asn, Gln και His. Ωστόσο, υπάρχουν και ειδικές προστατευτικές ομάδες οι οποίες χρησιμοποιούνται όταν συντίθεται το πεπτίδιο για άλλους σκοπούς.

Στην Fmoc SPPS (**Εικόνα 32**), το πεπτίδιο συνήθως απελευθερώνεται από την ρητίνη χρησιμοποιώντας ένα σύνολο από οξέα καθώς και από μόρια που παγιδεύουν ενεργά είδη που παράγονται κατά τις όξινες αντιδράσεις. Το οξύ που χρησιμοποιείται είναι συνήθως το TFA η συγκέντρωση του οποίου κυμαίνεται από 1% έως 95%. Παραδείγματα τέτοιων

μιγμάτων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται συχνά για την απελευθέρωση του πεπτιδίου από την ρητίνη είναι τα εξής:

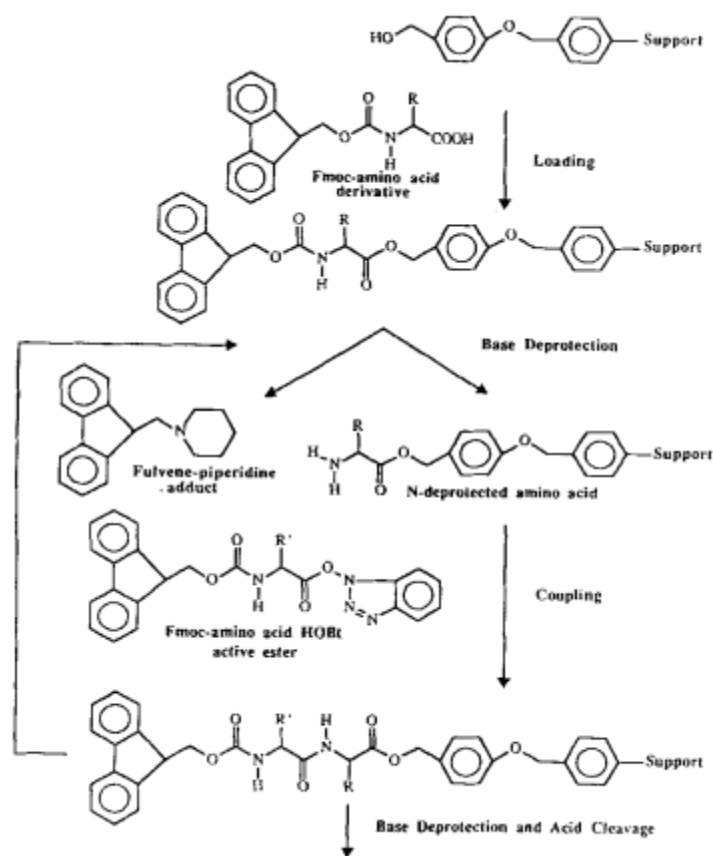
Μίγμα K: TFA/θειοανισόλη/H₂O/φαινόλη/EDT (85,5:5:5:2,5)

Μίγμα L: TFA/TIS/διθειοθρεϊτόλη/H₂O (88:2:5:5:5)

Μίγμα R: TFA/διθειοανισόλη/εθανοδιόλη/ανισόλη (90:5:3:2)

Μίγμα B: TFA/φαινόλη/H₂O/τρισοπροπυλοσιλάνιο (88:5:5:2)

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ως μίγμα για την απελευθέρωση του πεπτιδίου από την ρητίνη χρησιμοποιείται ο συνδυασμός TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) (v/v). Ωστόσο, θα πρέπει να προστίθονται θειόλες ώστε να εξασφαλιστεί ότι τα πεπτίδια που περιέχουν Cys παραμένουν στην ανηγμένη τους κατάσταση. Από τις θειόλες που αναφέρθηκαν παραπάνω στην ανάλυση των μιγμάτων αποκοπής από την ρητίνη συνίσταται η χρήση της διθειοθρεϊτόλης (DTT, στο μίγμα L) έναντι της αιθανοδιθειόλης (EDT) και της 2-μερκαπτοαιθανόλης.



Εικόνα 32. Στρατηγική Fmoc SPPS. Το πρώτο αμινοξύ, το οποίο είναι προστατευμένο στην α-αμινομάδα με την Fmoc (στρατηγική Fmoc) και στην πλευρική αλυσίδα με την εκάστοτε προστατευτική ομάδα, συνδέεται με την ρητίνη μέσω του συνδέτη. Μετά την αφαίρεση της Fmoc ομάδας συνδέεται το επόμενο αμινοξύ το οποίο είναι επίσης προστατευμένο στην α-αμινομάδα του. Μετά την αποπροστασία της α-αμινομάδας προστίθεται το επόμενο Fmoc προστατευμένο αμινοξύ. Τα δυο παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται έως ότου κατασκευαστεί το επιθυμητό πεπτίδιο. Στο τέλος, απομακρύνονται οι προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων και το πεπτίδιο αποκόπεται από την ρητίνη[126].

9.2. Φωταύγεια (Luminescence)

9.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία

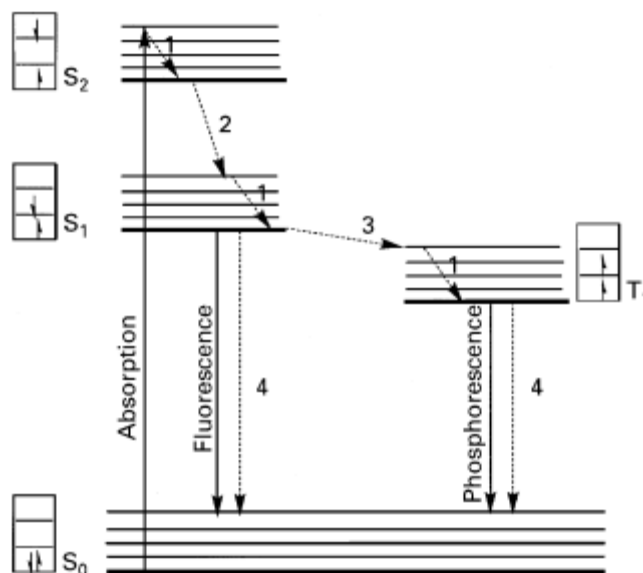
Η φωταύγεια αναφέρεται στην εκπομπή φωτός από μία διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση ενός μοριακού είδους. Στην περίπτωση της φωτοφωταύγειας, ένα μόριο απορροφά φως ενός μήκους κύματος λ_1 , μεταπίπτει σε μίας χαμηλότερης ενέργειας ηλεκτρονιακή κατάσταση και στη συνέχεια εκπέμπει ακτινοβολία μήκους κύματος λ_2 , καθώς μεταπίπτει στην βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση. Γενικά, το μήκος κύματος εκπομπής, λ_2 , είναι μεγαλύτερο από το μήκος κύματος διέγερσης αλλά στην εκπομπή φθορισμού $\lambda_1 = \lambda_2$. Η φωταύγεια μπορεί να είναι είτε φθορισμός είτε φωσφορισμός, ανάλογα με τον μέσο χρόνο ζωής της διεγερμένης κατάστασης, η οποία είναι μεγαλύτερη στον φωσφορισμό απ' ό τι στον φθορισμό[127]–[129].

Η φωτοφωταύγεια σε ένα μοριακό είδος είναι διαφορετική από την εκπομπή ενός ατομικού είδους. Στην περίπτωση της εκπομπής των ατόμων, τόσο η απορρόφηση όσο και η εκπομπή συμβαίνουν στο ίδιο μήκος κύματος ενώ στην περίπτωση των μοριακών ειδών η διέγερση έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ακτινοβολίας μεγαλύτερου μήκους κύματος από την ακτινοβολία της απορρόφησης[127]–[129].

Αν μία χημική αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μοριακού είδους που βρίσκεται σε μία διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση και εκπέμπει ακτινοβολία, το φαινόμενο ονομάζεται χημειοφωταύγεια. Ενώ η φωτοφωταύγεια μπορεί να εμφανιστεί στην αέρια, στην υγρή και στην στερεή φάση η χημειοφωταύγεια εμφανίζεται μόνο στην αέρια και στην υγρή[127]–[129].

9.2.2. Διάγραμμα Jablonski

Οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις που προκαλούνται με ακτινοβολία ή χωρίς ακτινοβολία και οδηγούν στην παρατήρηση της μοριακής φωτοφωταύγειας απεικονίζονται με ένα διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων το οποίο ονομάζεται διάγραμμα Jablonski (**Εικόνα 33**). Το διάγραμμα Jablonski εξηγεί τον μηχανισμό της εκπομπής του φωτός στα περισσότερα οργανικά και ανόργανα φωτοφόρα. Η πολλαπλότητα σπιν μίας δεδομένης ηλεκτρονιακής κατάστασης μπορεί να είναι είτε απλή, όταν τα ηλεκτρόνια είναι σε ζεύγη (με αντίθετα σπιν) είτε τριπλή τα οποία δεν βρίσκονται σε ζεύγη. Η βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση είναι κανονικά απλή και συμβολίζεται ως S_0 . Οι διεγερμένες καταστάσεις μπορεί να είναι απλές (S_1 , S_2) ή τριπλές (T_1)[127], [130]–[132].



Εικόνα 33. Το διάγραμμα Jablonski[127].

Όταν ένα μόριο απορροφήσει φως, τότε ηλεκτρόνιο μεταφέρεται μέσα σε 10^{-14} - 10^{-15} sec από την βασική ηλεκτρονική κατάσταση σε μία διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση η οποία θα πρέπει να έχει την ίδια πολλαπλότητα σπιν με την απλή ηλεκτρονική κατάσταση. Αυτό αποκλείει την μετάβαση σε μία τριπλή διεγερμένη κατάσταση ως τελική κατάσταση ηλεκτρονικής απορρόφησης γιατί οι κανόνες επιλογής για τις ηλεκτρονικές μεταβάσεις προτείνουν ότι η κατάσταση σπιν πρέπει να διατηρείται κατά την διέγερση. Μετά την απορρόφηση φωτός ένας μεγάλος αριθμός διεργασιών, ακτινοβολιών και μη, συμβαίνουν μέχρι να παρατηρηθεί η μοριακή φωταύγεια (φθορισμός-φωσφορισμός)[127], [130]–[132].

9.2.3. Μηχανισμοί αποδιέγερσης χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας

9.2.3.1. Δονητική αποδιέγερση (1)

Η διέγερση γίνεται συνήθως σε ένα υψηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης κατάστασης στην οποία θα μεταβεί το ηλεκτρόνιο. Τα διεγερμένα μόρια συνήθως αποδιηγείρονται ταχύτατα στο χαμηλότερο επίπεδο της δονητικής κατάστασης της εκάστοτε διεγερμένης ηλεκτρονικής κατάστασης χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας. Αυτή η μη ακτινοβόλουμένη διαδικασία ονομάζεται ‘δονητική αποδιέγερση’ και λαμβάνει χώρα μέσα σε 10^{-14} - 10^{-12} sec, ο οποίος είναι πολύ μικρότερος από τον τυπικό χρόνο ζωής της φωταύγειας. Συνεπώς αυτές η διεργασίες συμβαίνουν πριν την παρατήρηση της φωταύγειας[127], [130].

9.2.3.2. Εσωτερική μετατροπή (2)

Εάν το μόριο διεγερθεί σε μία απλή διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση υψηλότερης ενέργειας από την S1 (για παράδειγμα την S2) τότε αρχικά το μόριο αποδιεγείρεται με μία ταχεία μη ακτινοβολούμενη διεργασία στην χαμηλότερης ενέργειας απλή διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση (S1). Η διαδικασία της αποδιέγερσης σε από υψηλότερη ενεργειακά ηλεκτρονική κατάσταση σε μία χαμηλότερης ενέργειας ηλεκτρονική κατάσταση ίδιας πολλαπλότητας και χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας, ορίζεται ως 'εσωτερική μετατροπή' και λαμβάνουν χώρα σε 10^{-12} sec [127], [130].

9.2.3.3. Διασυστηματική διασταύρωση (3)

Οι διεργασίες αποδιέγερσης χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας μεταξύ διαφορετικών διεγερμένων καταστάσεων δεν περιορίζονται σε ηλεκτρονικές καταστάσεις που έχουν την ίδια πολλαπλότητα σπιν. Μία τέτοια διεργασία κατά την οποία η αποδιέγερση λαμβάνει χώρα μεταξύ διεγερμένων καταστάσεων διαφορετική πολλαπλότητας σπιν ονομάζεται διασυστηματική διασταύρωση [127], [130].

Η διασυστηματική διασταύρωση είναι γενικά μία λιγότερο πιθανή διαδικασία από την εσωτερική μετατροπή, επειδή δεν διατηρείται η πολλαπλότητα του σπιν. Λόγω αυτής της μικρότερης πιθανότητας να λάβει χώρα διασυστηματική διασταύρωση η διεργασία αυτή γίνεται πιο αργά (περίπου 10^{-8}) σε σχέση με την εσωτερική μετατροπή. Η διασυστηματική διασταύρωση αποτελεί περισσότερο συχνό φαινόμενο όταν υπάρχει ένα βαρύ άτομο στο μόριό τους όπως το ιώδιο και το βρώμιο στα οργανικά φωτοφόρα ή μεταλλικά ιόντα στα ανόργανα φωτοφόρα (σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης). Αυτό συμβαίνει καθώς η αλληλεπίδραση μεταξύ της γωνιακής στροφορμής και της τροχιακής στροφορμής (σύζευξη τροχιάς-σπιν) γίνεται πιο σημαντική παρουσίας βαρέων ατόμων και κατά συνέπεια η μεταβολή του σπιν πιο ευνοϊκή [127], [130].

9.2.3.4. Αποδιέγερση στην βασική κατάσταση χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας (4)

Η ενέργεια διέγερσης που αποθηκεύεται στα μόρια μετά από την απορρόφηση της ακτινοβολίας, πρέπει να μεταφερθεί λόγω του νόμου διατήρησης της ενέργειας. Οι προαναφερθείσες διεργασίες που δεν εκπέμπουν ακτινοβολία απελευθερώνουν πολύ μικρά ποσά ενέργειας. Η υπόλοιπη αποθηκευμένη ενέργεια απομακρύνεται είτε με την εκπομπή ακτινοβολίας-φωτονίων (φωταύγεια) είτε χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας με την απελευθέρωση θερμικής ενέργειας. Αυτή απομάκρυνση της ενέργειας χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας και συνεπώς η μετάπτωση του μορίου από την διεγερμένη κατάσταση στην βασική ηλεκτρονική κατάσταση καλείται 'αποδιέγερση χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας'. Αυτές οι αποδιεγέρσεις έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση απειροελάχιστων ποσοτήτων

θερμότητας που δεν μπορούν να μετρηθούν πειραματικά. Οι πειραματικές ενδείξεις για την αποδιέγερση χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας είναι η μείωση της έντασης της φωταύγειας. Η κύρια οδός απομάκρυνσης της ενέργειας είναι η μεταφορά της στον διαλύτη ή σε μη φθορίζουσες ενώσεις του διαλύματος[127].

9.2.4. Μηχανισμοί αποδιέγερσης με εκπομπή ακτινοβολίας (φθορισμός-φωσφορισμός)

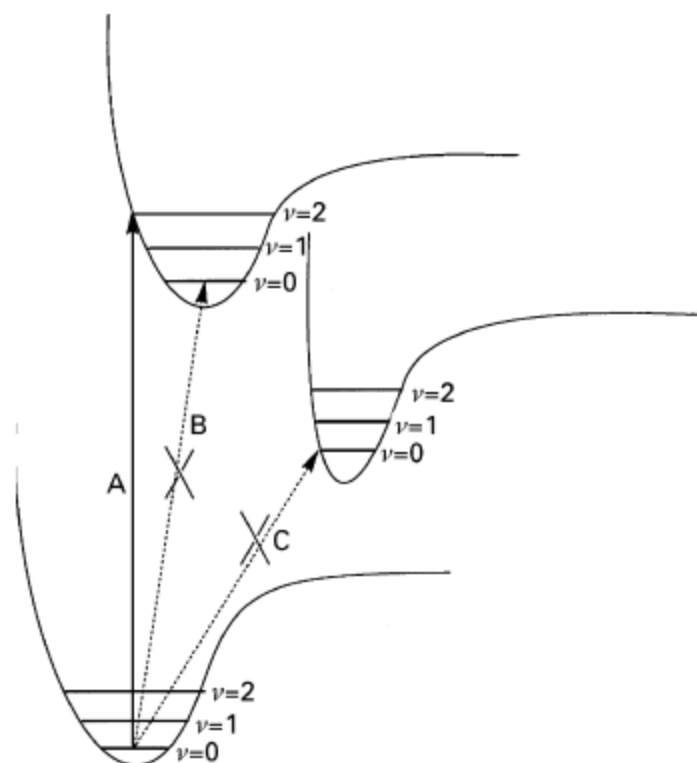
Ο κανόνας επιλογής σπιν για τις ηλεκτρονιακές μεταβάσεις (τόσο για την απορρόφηση όσο και την εκπομπή) ορίζει ότι οι επιτρεπόμενες μεταβάσεις είναι εκείνες στις οποίες τόσο η αρχική κατάσταση όσο και η τελική έχουν την ίδια πολλαπλότητα σπιν. Ο φθορισμός (Fluorescence) αναφέρεται στην εκπομπή φωτός υπό την μορφή ακτινοβολίας από μία διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση που έχει την ίδια πολλαπλότητα σπιν με την βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση ($S1 \rightarrow S0$, Εικόνα 33). Δεδομένου ότι οι ηλεκτρονιακές μεταβάσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τον φθορισμό είναι επιτρεπτές ως προς το ηλεκτρονιακό σπιν, εμφανίζονται πιο συχνά και οι μέσοι χρόνοι ζωής των διεγερμένων καταστάσεών τους είναι συνήθως μικρότεροι των 10^{-6} sec[127], [130], [133].

Οι ηλεκτρονιακές μεταβάσεις μεταξύ καταστάσεων διαφορετικής πολλαπλότητας σπιν είναι απαγορευμένες, κάτι το οποίο σημαίνει ότι είναι λιγότερο πιθανό να παρατηρηθεί μία τέτοια μετάβαση. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι απαγορευμένες αυτές μεταβάσεις γίνονται πιο πιθανές να συμβούν όσο αυξάνεται η σύζευξη τροχιάς-σπιν. Οι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα φωσφορισμού (Phosphorescence) και συνεπώς αυξάνουν την πιθανότητα διασυστηματικής διασταύρωσης συζητήθηκαν παραπάνω. Ο φωσφορισμός συνεπώς αναφέρεται στην εκπομπή φωτός υπό την μορφή ακτινοβολίας που σχετίζεται με την μετάβαση από μία διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση που έχει διαφορετική πολλαπλότητα σπιν από την βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση, πιο συχνά από μία τριπλή κατάσταση σε μία απλή ($T1 \rightarrow S0$, Εικόνα 33). Δεδομένου ότι οι μεταβάσεις κατά τον φωσφορισμό είναι απαγορευμένες συμβαίνουν αργά και ο χρόνος ζωής μίας διεγερμένης κατάστασης κυμαίνεται συνήθως από 10^{-6} sec έως και μερικά δευτερόλεπτα[127], [130], [133].

9.2.5. Αρχή Franck-Condon

Η ηλεκτρονιακή απορρόφηση του φωτός πραγματοποιείται μέσα σε 10^{-15} sec. Δεδομένου ότι ο χρόνος αυτός είναι εξαιρετικά μικρός, οι πυρήνες θεωρούνται ότι είναι 'παγωμένοι' κατά την διάρκεια της απορρόφησης. Για αυτόν τον λόγο οι ηλεκτρονιακές μεταβάσεις μεταξύ των διαφόρων ηλεκτρονιακών καταστάσεων απεικονίζονται ως 'κάθετες' γραμμές στα ενεργειακά διαγράμματα. Το παραπάνω φαινόμενο είναι γνωστό ως αρχή Franck-Condon. Οι διεγερμένες ηλεκτρονιακές μεταβάσεις έχουν συνήθως διαφορετική

γεωμετρία από την βασικά κατάσταση. Δεδομένου ότι οι ηλεκτρονιακές μεταβάσεις είναι 'κάθετες', μόνο η μετάβαση A στην **Εικόνα 34** είναι εφικτή. Η μετάβαση Γ περιλαμβάνει μια διεγερμένη κατάσταση η οποία είναι σε μεγάλο βαθμό μετατοπισμένη από την βασική κατάσταση. Η μετάβαση B, από την άλλη, καταλήγει στην χαμηλότερη δονητική στάθμη της διεγερμένης ηλεκτρονιακής κατάστασης κάτι το οποίο δεν μπορεί επιπλέον να πραγματοποιηθεί. Οι τρεις μεταβάσεις που αναλύθηκαν εξηγούν γιατί στο διάγραμμα Jablonski η απορρόφηση οδηγεί σε μετάβαση σε υψηλότερη δονητική στάθμη της διεγερμένης ηλεκτρονιακής κατάστασης και όχι στην $v=0$ και τον λόγο που δεν πραγματοποιείται άμεση διέγερση στην τριπλή διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση (T_1)[127].



Εικόνα 34. Η αρχή Franck-Condon. Μόνο 'κάθετες ηλεκτρονιακές μεταβάσεις είναι επιτρεπτές[127], [130].

9.2.6. Μόρια δότη-αποδέκτη (Donor-Acceptor Molecules, D-A Molecules)

Όλα τα οργανικά μόρια δότη-αποδέκτη (D-A) έχουν ένα κοινό μοτίβο το οποίο περιλαμβάνει μία ομάδα που προσφέρει ηλεκτρόνια και μία ομάδα που δέχεται αυτά τα ηλεκτρόνια. Οι δύο αυτές ομάδες διαχωρίζονται μεταξύ τους από ένα συζυγιακό π-σύστημα (**Εικόνα 35**). Τέτοια μόρια (D-A) χρησιμοποιούνται ευρέως σε ένα μεγάλο εύρος χημικών και βιολογικών επιστημών, παρέχοντας έναν μοναδικό χωροχρονικό έλεγχο της αντιδραστικότητάς και της συμπεριφοράς τους, χωρίς την χρήση μετάλλων, με την χρήση

χαμηλής ενέργειας ορατού φωτός. Στην οργανική σύνθεση, τα μόρια D-A χρησιμοποιούνται ως φωτοευαίσθητες προστατευτικές ομάδες σε όξινες λειτουργικές ομάδες καθώς και ως φωτοοξειδοαναγωγικοί καταλύτες. Στην βιολογική έρευνα, τα φθοροφόρα D-A χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια σήμανσης για την απεικόνιση της συμπεριφοράς, της έκφρασης και για τον εντοπισμό βιολογικών μακρομορίων, κυρίως με την χρήση μικροσκοπίας φθορισμού[134]–[136].



Εικόνα 35. Κλασικός σκελετός μορίων D-A[134].

9.2.7. Ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Intramolecular Charge Transfer, ICT) και ICT συστροφής (Twisted ICT)

Η διαδικασία της ενδομοριακής μεταφοράς φορτίου (ICT) είναι πανταχού παρούσα στην φύση, καθώς αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα σε πολλές βιολογικές διεργασίες (π.χ. ICT στις οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες και στην μυοσφαιρίνη, φωτοσύνθεση και μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων) που συμβαίνουν στην φύση. Τα οργανικά μόρια που έχουν μια ομάδα δότη ηλεκτρονίων (D) και μία ομάδα αποδέκτη ηλεκτρονίων (A) που συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός π-συζυγιακού συστήματος (γέφυρας) αποτελούν ένα σύστημα για της μελέτες του ICT[137]–[139].

Ένας μεγάλος αριθμός μορίων που εμφανίζουν το φαινόμενο της ICT χαρακτηρίζονται από διπλή εκπομπή φωτός σε διαλύτες με υψηλότερες πολικότητες. Η συμπεριφορά της εκπομπής του φωτός εξαρτάται επίσης από το ιξώδες και την θερμοκρασία του μέσου. Ένα εύκαμπτο μόριο D-A το οποίο έχει διεγερμένη κατάσταση στην οποία εμφανίζει το φαινόμενο της ICT συστροφής (TICT) σε πρωτικό διαλύτη, θα ήταν επίσης επιρρεπές σε αποδιέγερση χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας η οποία περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση με τον περιβάλλοντα διαλύτη. Τέτοιες διαδρομές αποδιέγερσης που δεν εκπέμπουν ακτινοβολία, ανταγωνίζονται την εκπομπή φθορισμού του μορίου και μπορούν να το καταστήσουν τελείως μη φθορίζον. Η ενίσχυση της έντασης του φθορισμού των μορίων που εμφανίζουν ICT, παρατηρείται καθώς ανταγωνίζονται οι διεργασίες της εκπομπής με φθορισμό καθώς και της εκπομπής χωρίς ακτινοβολία σε ένα σύστημα στο οποίο περιορίζεται η εσωτερική μετατροπή λόγω ιξώδους. Συνολικά, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται όταν περιορίζεται η συστροφή του μορίου (TICT) σε διαλύματα μεγάλου ιξώδους[137]–[140].

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση νέων μικρών μορίων και ειδικότερα φθορίζοντων αναλόγων πεπτιδίων, που θα στοχεύουν και θα ανιχνεύουν τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2, οι οποίοι υπερεκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του γλοιοβλαστώματος, και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό του ποσοστού έκφρασης των υποδοχέων αυτών.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η αξιολόγηση δύο νέων μορίων που αποτελούν αναστολείς της PI3K. Επιπλέον, ανταποκρίνονται στις μεταβολές του ιξώδους, καθιστώντας τα ικανά να χρησιμοποιηθούν και ως διαγνωστικά μόρια. Ειδικότερα, στην ένωση 3 παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης φθορισμού κατά 125 φορές ενώ στην ένωση 4 αύξηση της έντασης φθορισμού κατά 34,5 φορές. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταροτοξικότητας των παραπάνω ενώσεων στις καρκινικές κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος U87 και T98, από τα οποία καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως οι ενώσεις 3 και 4 παρουσιάζουν καλή κυτταροτοξικότητα.

Μέρος II
Πειραματικό μέρος

1. Σύνθεση των φθορίζοντων αναλόγων πεπτιδίων που στοχεύουν τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2

1.1. Υλικά-Συσκευές-Όργανα

Για την σύνθεση των πεπτιδίων με την συμβατική μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν υάλινοι αντιδραστήρες με πορώδη ηθμό G2 στο κάτω μέρος, άνοιγμα και βιδωτό πώμα στο πάνω μέρος. Ακόμη, διέθεταν στρόφιγγα με την οποία μπορούν να συνδεθούν με αντλία κενού (Millipore). Η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιήθηκε με την χρήση Wang-Cys(Trt)-Fmoc ρητίνης από την εταιρεία Shanghai Ltd και της 2-χλωροτρίτυλο χλωριδίου ρητίνης (CLTR-Cl) από την εταιρεία Activotec (United Kingdom). Τα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Met-OH και Fmoc-Val-OH τα οποία προέρχονται από την εταιρεία Shanghai Ltd, Fmoc-aminohexanoic acid από την εταιρεία Thermoscientific και το αντιδραστήριο HOBt από την εταιρεία Fluka. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: διχλωρομεθάνιο (Sigma-Aldrich), διμέθυλοφορμαμίδιο (Fisher Chemicals), μεθανόλη (Sigma Aldrich), πιπεριδίνη (Alfa-Aesar), DIPEA (Alfa-Aesar), διαιθυλεθαίρας (Sigma-Aldrich), εξάνιο (Macron Fine Chemicals), ακετονιτρίλιο (J. T. Bakers), οξικό οξύ (Riedel-de Haën) και τριφθοροοξικό οξύ (Thermoscientific).

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων Kaiser και οι εταιρείες από τις οποίες προμηθευτήκαμε είναι: KCN (Sigma-Aldrich), πυριδίνη (Alfa-Aesar), νινυδρίνη (Alfa-Aesar), φαινόλη (Sigma-Aldrich) και αιθανόλη (Sigma-Aldrich). Το αντιδραστήριο σύζευξης που χρησιμοποιήθηκε είναι το DIC από την εταιρεία Fluorochem. Για την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη χρησιμοποιήθηκαν EDT και TIS από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

Για τον καθαρισμό των ενώσεων πραγματοποιήθηκαν παρασκευαστικοί καθαρισμοί RP-HPLC σε χρωματογράφο ThermoScientific Ultimate 3000 εξοπλισμένο με αντλία Dionex Ultimate 3000 και ανιχνευτή μήκους κύματος. Οι παρασκευαστικοί καθαρισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μια στήλη Phenomenex Jupiter 10 μm Proteo 90Å C18 (250 × 21.2 mm). Η απομάκρυνση του νερού πραγματοποιήθηκε με τον λυοφιλοποιητή από την εταιρεία Biobase Bioindustry (Shandong) Co., Ltd.. Τέλος, για την ταυτοποίηση του αναλόγου χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζης (Waters Acquity I-Class Plus UPLC και Waters Xevo G2-XS QToF).

1.2. Μέθοδοι

1.2.1. Γενική μέθοδος σύζευξης των Nα-Fmoc αμινοξέων στην Wang-Cys ρητίνη

Η συγκεκριμένη ρητίνη έχει συζευγμένο το πρώτο αμινοξύ (Cys) το οποίο είναι Fmoc προστατευμένο στην Nα-αμινομάδα του. Συνεπώς, δεν χρειάζεται συγκεκριμένη μεθοδολογία για την σύνδεση του πρώτου αμινοξέος. Ωστόσο απαιτείται η διόγκωση των πόρων της ρητίνης η οποία πραγματοποιείται αρχικά με την προσθήκη ποσότητας διαλύτη DMF και ανάδευση για 30 λεπτά. Εν συνεχεία απομακρύνεται ο διαλύτης DMF με την χρήση αντλίας κενού και προστίθεται διαλύτης DCM για 30 λεπτά και απομακρύνεται ξανά με την χρήση κενού. Ακολουθεί απομάκρυνση την Fmoc προστατευτικής ομάδας του N-τελικού άκρου με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF (1 x 5 λεπτά και 1 x 15 λεπτά) η οποία ακολουθείται από εκπλύσεις της ρητίνης με DMF και DCM (2 x 2 λεπτά εναλλάξ – 2 επαναλήψεις). Πραγματοποιείται τεστ Kaiser (αναλύεται παρακάτω, παράγραφος 1.2.3.) το οποίο πρέπει να βγει θετικό λόγω της παρουσίας ελεύθερων πλέον αμινομάδων. Η πορεία συνεχίζεται κανονικά με την μέθοδο σύζευξης των αμινοξέων με την μέθοδο των καρβοδιιμιδίων η οποία αναλύεται παρακάτω.

1.2.2. Γενική μέθοδος σύζευξης των Nα-Fmoc αμινοξέων στην CLTR-Cl ρητίνη

Αρχικά, η ρητίνη διογκώνεται με την προσθήκη DCM και ακολουθεί ανάδευση για 30 λεπτά. Προστίθεται, στη συνέχεια, στάγδην DIPEA (3 equiv.) και αφήνεται υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Έπειτα, η ποσότητα του πρώτου αμινοξέος (1,2 equiv.) το οποίο είναι Fmoc προστατευμένο στην Nα-αμινομάδα του, διαλύεται στην ελάχιστη ποσότητα DCM και προστίθεται στον αντιδραστήρα που περιέχει την ρητίνη, και αφήνεται προς ανάδευση για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το πέρας των δύο ωρών παρασκευάζεται ένα διάλυμα 1 mL MeOH στο οποίο προστίθεται 1,5 equiv. DIPEA, προστίθεται στον αντιδραστήρα και η ανάδευση συνεχίζεται για μία ώρα. Μετά το πέρας της μίας ώρας το διάλυμα του μίγματος του αντιδραστήρα απομακρύνεται. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα DCM/MeOH/DIPEA (85/10/5 v/v/v) το οποίο χρησιμοποιείται για την έκπλυση της ρητίνης (3 x 15 λεπτά) και στη συνέχεια πραγματοποιούνται εκπλύσεις με DMF και DCM (όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2.2.). Μετά τις παραπάνω εκπλύσεις πραγματοποιείται αποκοπή της Fmoc προστασίας του πρώτου αμινοξέος με την χρήση διαλύματος 20% πιπεριδίνης/DMF (1 x 5 λεπτά και 1 x 15 λεπτά).

1.2.3. Γενική μέθοδος σύζευξης με την μέθοδο των καρβοδιιμιδίων

Η σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεά φάση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Fmoc/tBu. Ειδικότερα, το αμινοξύ διαλύεται σε ένα φιαλίδιο σε DMF/DCM (σε ίσους όγκους), προστίθεται το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο (HOBt) και το διάλυμα αφήνεται σε παγόλουτρο και

υπό ανάδευση έως ότου κρυώσει. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου προστίθεται το αντιδραστήριο σύζευξης, στην περίπτωση μας το N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) με σκοπό της ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 20 λεπτά στο παγόλουτρο. Η συνολική αναλογία των αντιδραστηρίων είναι Fmoc-αμινοξύ/DIC/HOBt 1:1:1 v/v/v ενώ το κάθε ένα από τα παραπάνω αντιδραστήρια προστίθεται σε 3 ισοδύναμα (3 equiv.). Μετά τα 20 λεπτά, το διάλυμα του αμινοξέος προστίθεται στον αντιδραστήρα που περιέχει την ρητίνη και αφήνεται προς ανάδευση για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 4 ωρών, η ρητίνη εκπλένεται με DMF και DCM όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 1.2.1. και ελέγχεται η σύζευξη του αμινοξέος με την εφαρμογή του τεστ Kaiser.

1.2.4. Μέθοδος ελέγχου σύνδεσης του αμινοξέος με τεστ Kaiser.

Σε έναν μικρό δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρονται περίπου 10 – 15 κόκκοι ρητίνης-πεπτιδίου και προστίθενται κατά σειρά 4 σταγόνες από τα παρακάτω αντιδραστήρια (Kaiser 1, 2, 3):

Kaiser 1: 1 mL 0,0001 M KCN σε 49 mL πυριδίνης

Kaiser 2: 1 g νινυδρίνης σε 20 mL EtOH

Kaiser 3: 40 g PhOH σε 20 mL EtOH

Ο δοκιμαστικός σωλήνας, μετά την προσθήκη των παραπάνω διαλυμάτων, τοποθετείται σε υδατόλουτρο το οποίο βρίσκεται στους 100°C και αφήνεται για 1 λεπτό. Για τον έλεγχο της σύνδεσης οι κόκκοι θα πρέπει να είναι διαυγής ή να έχουν ελαφρώς κίτρινο χρώμα καθώς σε αυτήν την περίπτωση το τεστ θεωρείται αρνητικό ως προς την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων. Συνεπώς, αντίδραση θα έχει ολοκληρωθεί με επιτυχία. Αν χρωματιστούν μπλε τότε το τεστ θεωρείται θετικό, υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες και η σύζευξη δεν έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία. Σε αυτήν την περίπτωση απαιτείται επανάληψη της αντίδρασης σύζευξης (Σημείωση: στο στάδιο απομάκρυνσης της Fmoc προστατευτικής ομάδας από την Na αμινομάδα το τεστ Kaiser θα πρέπει να είναι θετικό καθώς σε αυτό το στάδιο πρέπει να παρατηρηθούν ελεύθερες αμινομάδες).

1.2.5. Παραλαβή του ακάθαρτου μίγματος του επιθυμητού πεπτιδίου

Μετά την διαδικασία αποκοπής του πεπτιδίου από την εκάστοτε ρητίνη (διαφορετική για τα δύο πεπτιδία, αναλύεται παρακάτω), το μίγμα διηθείται στη συνέχεια από χωνί πορώδους Por. 4 σε μία κωνική φιάλη κενού και πραγματοποιείται έκπλυση του χωνιού με μικρή ποσότητα TFA και ποσότητας DCM/Εξανίου (1:1 v/v). Εν συνεχεία, το διήθημα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη το οποίο συνδέεται με συνδέτη κενού και τελικά με κενό βρύσης. Πραγματοποιείται εξάτμιση του TFA με την προσθήκη τρεις φορές

DCM/Εξανίου (1:1 v/v) και τρεις φορές με DCM υπό κενό με σκοπό την παράσυρση του TFA, που είναι δύσκολο να εκδιωχθεί. Αφού αφεθεί να εξατμιστεί όλη η δυνατή ποσότητα των διαλυτών, προστίθεται παγωμένος διαιθυλαιθέρας (στον οποίον διαλύονται οι προστατευτικές ομάδες που αποκόπηκαν και όχι το πεπτίδιο) και αφήνεται στην κατάψυξη για τουλάχιστον 30 λεπτά. Αμέσως μετά την πάροδο του παραπάνω χρόνου, το διάλυμα διηθείται γρήγορα από χωνί υπό κενό προς μία κωνική φιάλη ώστε να περάσει ο αιθέρας και μαζί με αυτόν ποσοτικά οι προστατευτικές ομάδες. Γίνεται έκπλυση της σφαιρικής φιάλης και του χωνιού με μικρές ποσότητες κρύου αιθέρα, ώστε να παρασυρθούν οι εναπομείνουσες ποσότητες προστατευτικών ομάδων από το χωνί. Στη συνέχεια, αλλάζουμε κωνική φιάλη και προσθέτουμε στο χωνί διάλυμα οξικού οξέος 2N/H₂O (1:3 v/v) (το οξικό οξύ προστίθεται ώστε να πρωτονιωθούν όλες οι όξινες και βασικές ομάδες οι οποίες με αυτόν τον τρόπο αποκτούν φορτία και διαλυτοποιούνται στο νερό) και πιθανώς μικρές ποσότητες ACN στην περίπτωση που το πεπτίδιο δεν διαλύεται τόσο καλά στο νερό. Αυτό που συλλέγουμε τελικά στην κωνική φιάλη, το μεταφέρουμε σε προζυγισμένο φιαλίδιο και το τοποθετούμε για λυοφιλοποίηση (προς απομάκρυνση του νερού). Με αυτόν τον τρόπο παίρνουμε τελικά το ακάθαρτο μίγμα του πεπτιδίου το οποίο θα καθαριστεί στη συνέχεια με την χρήση της HPLC.

1.3. Σύνθεση αναλόγου πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-1 με την συμβατική μέθοδο

Για την παρασκευή του τροποποιημένου με φλουορεσκεΐνη εντεκαπεπτιδίου φλουορεσκεΐνη-αμινοεξανοϊκό-Glu-Cys-Arg-Pro-Pro-Asp-Asp-Gly-Leu-Cys-COOH πάρθηκε ποσότητα Wang-Cys ρητίνης η οποία είναι Fmoc προστατευμένη στην Na-αμινομάδα. Αρχικά απομακρύνθηκε η Fmoc προστασία της Cys με την χρήση διαλύματος 20% πιπεριδίνης/DMF, τεστ Kaiser (πaráγραφος 1.2.4.). Στη συνέχεια ακολούθησε η πορεία της πεπτιδικής σύνθεσης όπως περιγράφηκε στις παραγράφους 1.2.4. και 1.2.5.. Μετά την πεπτιδική σύνθεση ελήφθησαν 181, 6 mg ρητίνης-πεπτιδίου.

Από την παραπάνω ποσότητα πάρθηκαν 58 mg ρητίνης-πεπτιδίου (αντιστοιχούν σε 20 mg πεπτιδίου) τα οποία επεξεργάστηκαν για την παραλαβή του ελεύθερου πεπτιδίου αποκομμένου από την ρητίνη και χωρίς τις προστατευτικές ομάδες. Η παραπάνω επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με την χρήση του διαλύματος TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2,5:2,5:1 v/v/v/v) για 3,5 ώρες (2,5 ώρες και μία επιπλέον ώρα για την αργινίνη) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως. Αμέσως μετά, πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία που περιγράφηκε λεπτομερώς στην παράγραφο 1.2.5. για την παραλαβή του μίγματος του ακάθαρτου πεπτιδίου. Το στερεό μίγμα που παραλήφθηκε είχε μάζα 14,6 mg.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με την χρήση παρασκευαστικής HPLC με διαλύτες έκλουσης MeCN (0,1% TFA) και H₂O (0,1% TFA) και με το ακόλουθο σύστημα μεταβαλλόμενης σύστασης: 3% MeCN → 100% MeCN σε χρόνο 30 λεπτά. Μετά τον καθαρισμό ελήφθησαν δύο φιαλίδια με τις αντίστοιχες μάζες:

Φιαλίδιο 1: 2,3 mg

Φιαλίδιο 2: 1,5 mg

Η απόδοση βρέθηκε ίση με 15,7%.

1.4. Σύνθεση αναλόγου πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-2 με την συμβατική μέθοδο

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου αυτού, που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-2, χρησιμοποιήθηκε η CLTR-Cl ρητίνη η οποία διογκώθηκε και στην οποία πραγματοποιήθηκε η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος, Fmoc-Ser(tBu)-OH (1,2 equiv.), με την μεθοδολογία που περιγράφηκε στην παράγραφο 1.2.2.. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε η Fmoc προστατευτική ομάδα με την χρήση του διαλύματος 20% πιπεριδίνης σε DMF και πραγματοποιήθηκε τεστ Kaiser (παράγραφος 1.2.4.). Στη συνέχεια ακολούθησε η πορεία της πεπτιδικής σύνθεσης όπως περιγράφηκε στις παραγράφους 1.2.4. και 1.2.5.. Μετά την πεπτιδική σύνθεση ελήφθησαν 287 mg ρητίνης-πεπτιδίου.

Από την παραπάνω ποσότητα άρθηκαν 56 mg ρητίνης-πεπτιδίου (αντιστοιχούν σε 20 mg πεπτιδίου) τα οποία επεξεργάστηκαν για την παραλαβή του ελεύθερου πεπτιδίου αποκομμένου από την ρητίνη και χωρίς τις προστατευτικές ομάδες. Η παραπάνω επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με την χρήση του διαλύματος TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5 v/v/v) για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως. Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία που περιγράφηκε λεπτομερώς στην παράγραφο 1.2.5. για την παραλαβή του μίγματος του ακάθαρτου πεπτιδίου. Το στερεό μίγμα που παραλήφθηκε είχε μάζα 34,3 mg.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με την χρήση παρασκευαστικής HPLC με διαλύτες έκλουσης MeCN (0,1% TFA) και H₂O (0,1% TFA) και με το ακόλουθο σύστημα μεταβαλλόμενης σύστασης: 3% MeCN → 100% MeCN σε χρόνο 30 λεπτά. Μετά τον καθαρισμό ελήφθησε ένα φιαλίδιο με μάζα:

Φιαλίδιο 1: 12,1 mg (επιθυμητό πεπτίδιο)

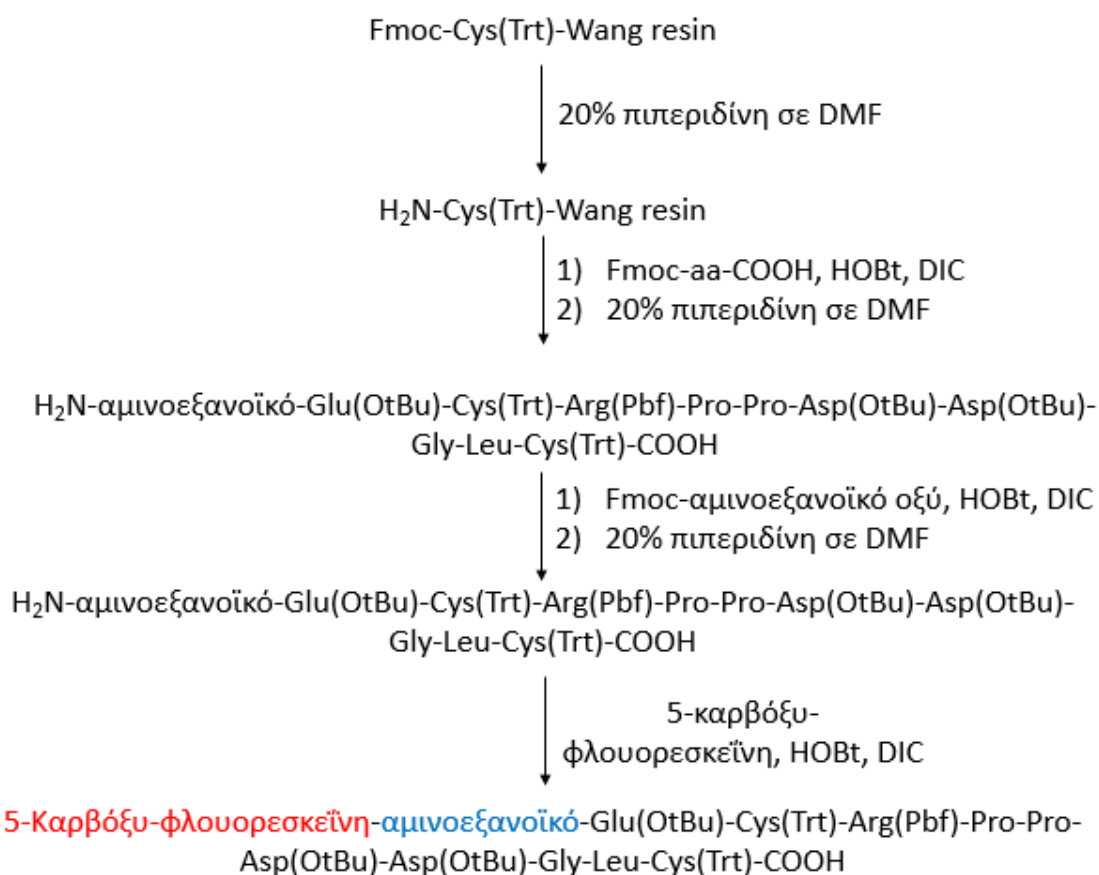
Η απόδοση βρέθηκε ίση με 22,8%

1.5. Αποτελέσματα

1.5.1. Ανάλογο πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-1

1.5.1.1. Συνθετική πορεία

Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση του πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-1 φαίνεται σχηματικά στην **Εικόνα 36**. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε ρητίνη Wang-Cys(Trt)-Fmoc. Ο χρόνος των συζεύξεων για το κάθε αμινοξύ ήταν 4 ώρες. Πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις σύζευξης των αμινοξέων Cys2, Arg3, Pro5, Asp6, Gly8 και Leu9 καθώς το τεστ Kaiser ήταν θετικό ως προς την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων.



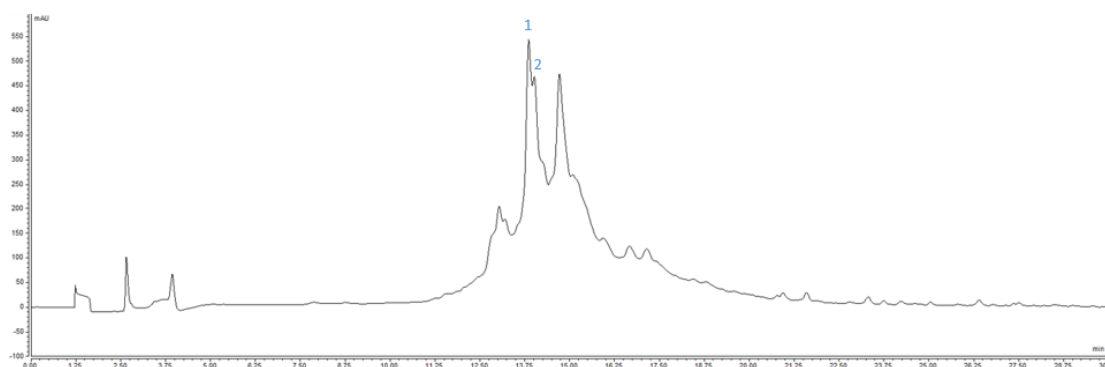
Εικόνα 36. Συνθετική πορεία σύνθεσης πεπτιδίου που στοχεύει τον VEGFR-1 με την συμβατική μέθοδο.

Το τεστ Kaiser κατά την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας Fmoc παρείχε αξιόπιστα αποτελέσματα λόγω του έντονου χρώματος των κόκκων που σχηματίζονται λόγω των ελεύθερων αμινομάδων. Αντίθετα, τα αποτελέσματα του τεστ Kaiser κατά την σύζευξη δεν είναι τόσο αξιόπιστα καθώς μετά την σύζευξη ενός αριθμού αμινοξέων η παρατήρηση των κόκκων γίνεται κατά την διάρκεια που βρίσκεται το διάλυμα στο νερό γιατί μετά την απομάκρυνσή του οι κόκκοι αποχρωματίζονται αμέσως.

Η αποκοπή του προστατευμένου πεπτιδίου από την ρητίνη πραγματοποιήθηκε με την χρήση του διαλύματος TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2,5:2,5:1 v/v) για 3,5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

1.5.1.2. Καθαρισμός πεπτιδίου

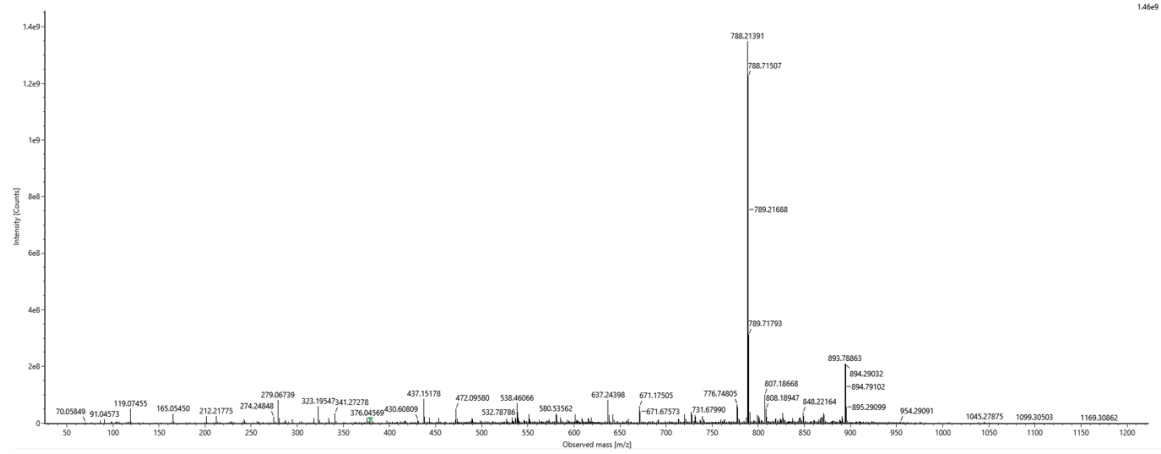
Το στερεό που λήφθηκε μετά την λυοφιλοποίηση (14,6 mg) διαλύθηκε σε 2,3 mL διαλύματος MeCN (0,1% TFA) και H₂O (0,1% TFA). Στην **Εικόνα 37** απεικονίζεται το χρωματογράφημα που λήφθηκε κατά τον καθαρισμό του πεπτιδίου με την χρήση της HPLC με διαλύτες έκλουσης MeCN (0,1% TFA) και H₂O (0,1% TFA) (3% MeCN → 100% MeCN, 30 λεπτά, 20 mL/min, 214 nm). Στο χρωματογράφημα παρατηρούμε την ύπαρξη μίας επιπλέον έντονης κορυφής ($t_R=14,8$ λεπτά) η οποία αποτελεί παραπροϊόν της σύνθεσης.



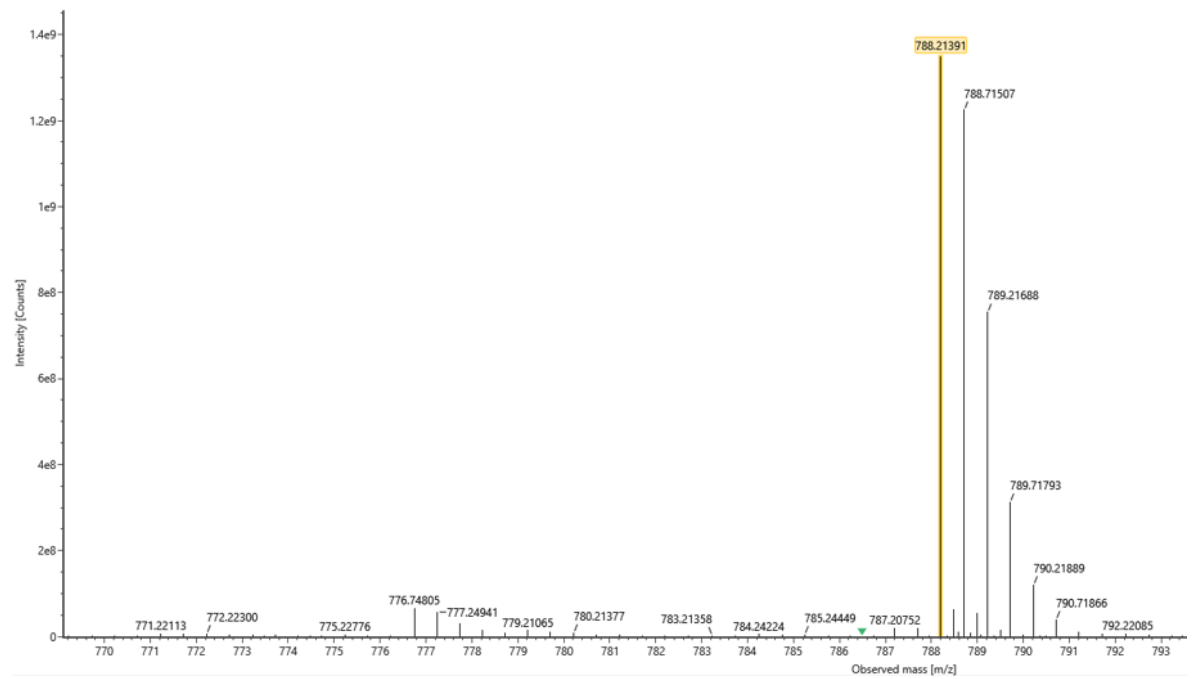
Εικόνα 37. Χρωματογράφημα του πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-1. Ο χρόνος κατακράτησης του πεπτιδίου είναι $t_R=14$ λεπτά. Οι κορυφές που συλλέχθηκαν αναγράφονται ως 1 και 2. Οι υπόλοιπες κορυφές αποτελούν παραπροϊόντα.

1.5.1.3. Ταυτοποίηση με φάσμα μάζας

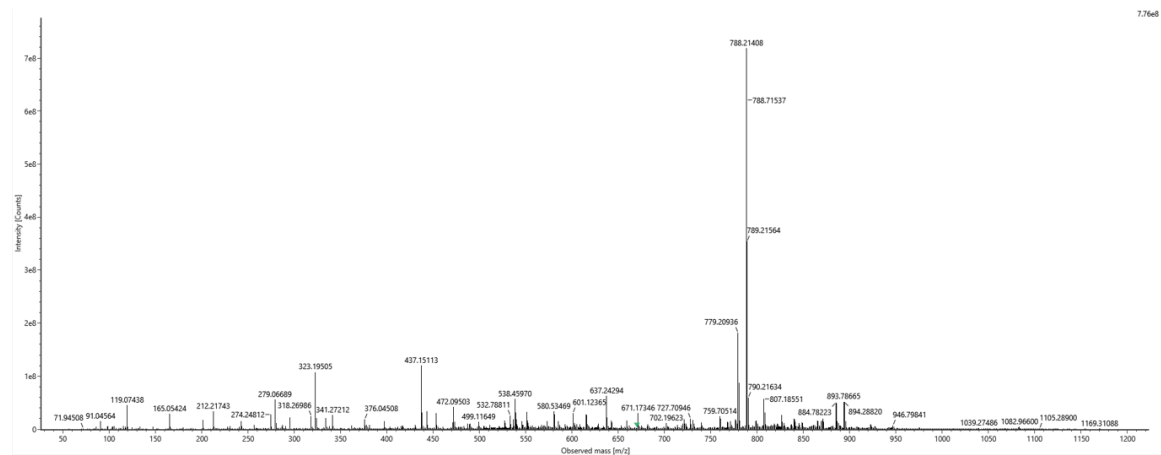
Στις **Εικόνα 38** και **Εικόνα 39** παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας του καθαρού πεπτιδίου που συντέθηκε με την συμβατική μέθοδο. Η θεωρητική μάζα του πεπτιδίου είναι 1574,57 g/mol, στα φάσματα μάζας του φιαλιδίου 1 βλέπουμε την κορυφή ταυτοποίησης $m/z = 788,2$ ($[M/2]^{2+}$) ενώ τις ίδιες κορυφές παρατηρούμε και στα φάσματα μάζας του φιαλιδίου 2 (**Εικόνα 40** και **Εικόνα 41**).



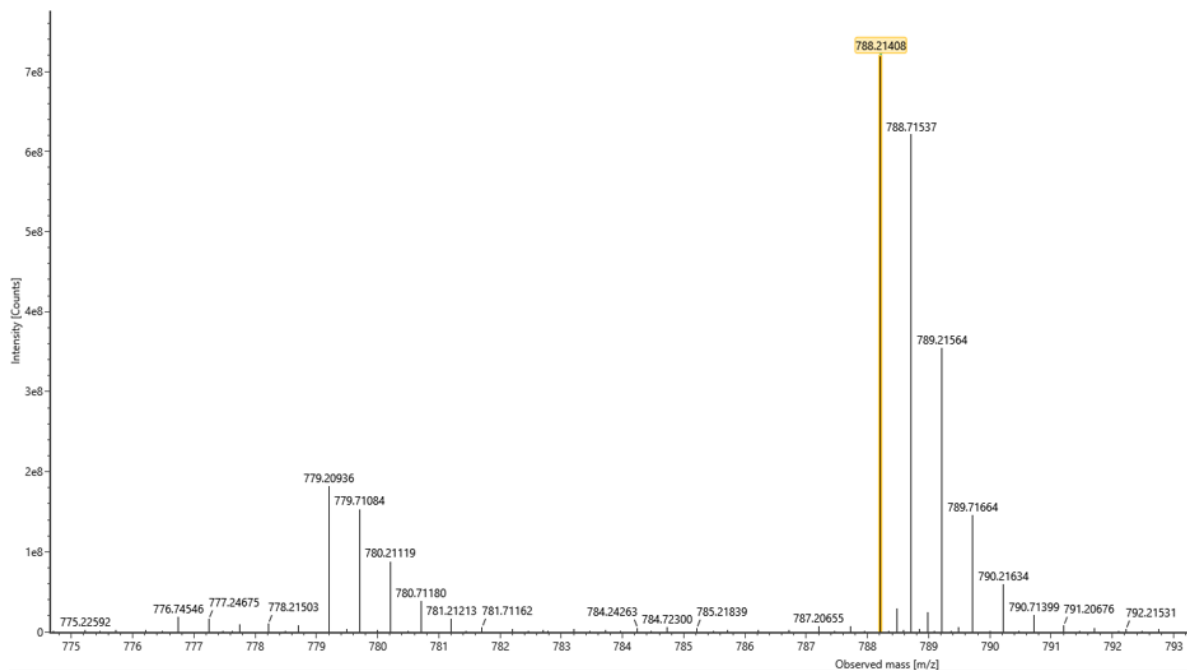
Εικόνα 38. Συνολικό φάσμα μάζας (φιαλίδιο 1).



Εικόνα 39. Η κορυφή ταυτοποίησης $m/z = 788,2$ ($[M/2]^{2+}$) (φιαλίδιο 1).



Εικόνα 40. Συνολικό φάσμα μάζας (φιαλίδιο 2).

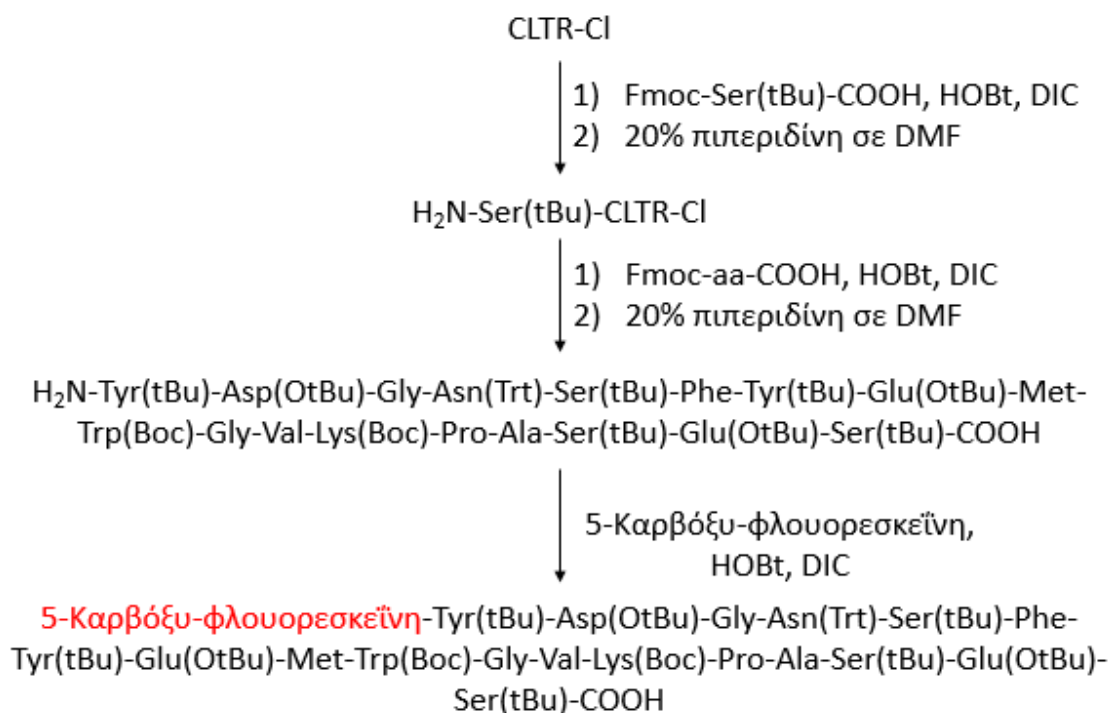


Εικόνα 41. Η κορυφή ταυτοποίησης $m/z = 788,2$ ($[M/2]^{2+}$) (φιαλίδιο 2).

1.5.2. Ανάλογο πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-2

1.5.2.1. Συνθετική πορεία

Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση του πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-2 φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 42. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε ρητίνη CLTR-Cl. Ο χρόνος των συζεύξεων για το κάθε αμινοξύ ήταν 4 ώρες. Πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις σύζευξης των αμινοξέων Tyr1, Gly3, Asn4, Ser5, Phe6, Tyr7, Glu8, Met9, Trp10, Lys13 και Ser16 καθώς το τεστ Kaiser ήταν θετικό ως προς την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων.



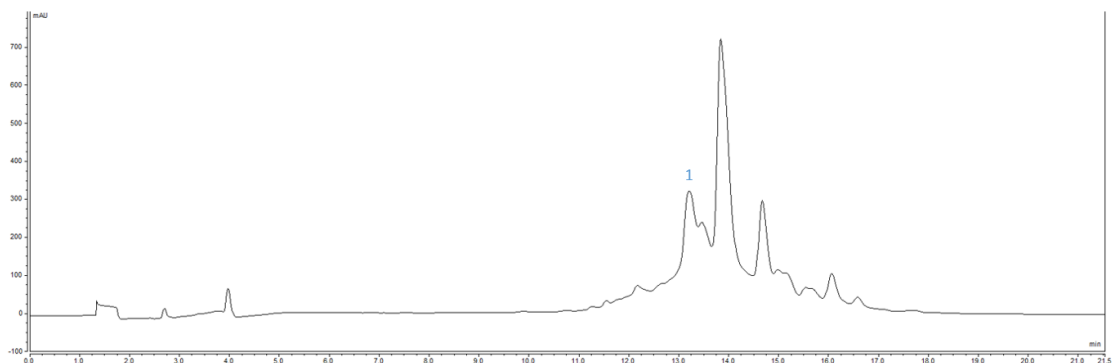
Εικόνα 42. Συνθετική πορεία σύνθεσης του πεπτιδίου που στοχεύει τον VEGFR-2 με την συμβατική μέθοδο.

Το τεστ Kaiser κατά την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας Fmoc παρείχε αξιόπιστα αποτελέσματα λόγω του έντονου χρώματος των κόκκων που σχηματίζονται λόγω των ελεύθερων αμινομάδων. Αντίθετα, τα αποτελέσματα του τεστ Kaiser κατά την σύζευξη δεν είναι τόσο αξιόπιστα καθώς μετά την σύζευξη ενός αριθμού αμινοξέων η παρατήρηση των κόκκων γίνεται κατά την διάρκεια που βρίσκεται το διάλυμα στο νερό γιατί μετά την απομάκρυνσή του οι κόκκοι αποχρωματίζονται αμέσως.

Η αποκοπή του προστατευμένου πεπτιδίου από την ρητίνη πραγματοποιήθηκε με την χρήση του διαλύματος TFA/H₂O/TIS (94:2,5:2,5 v/v/v) για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

1.5.2.2. Καθαρισμός πεπτιδίου

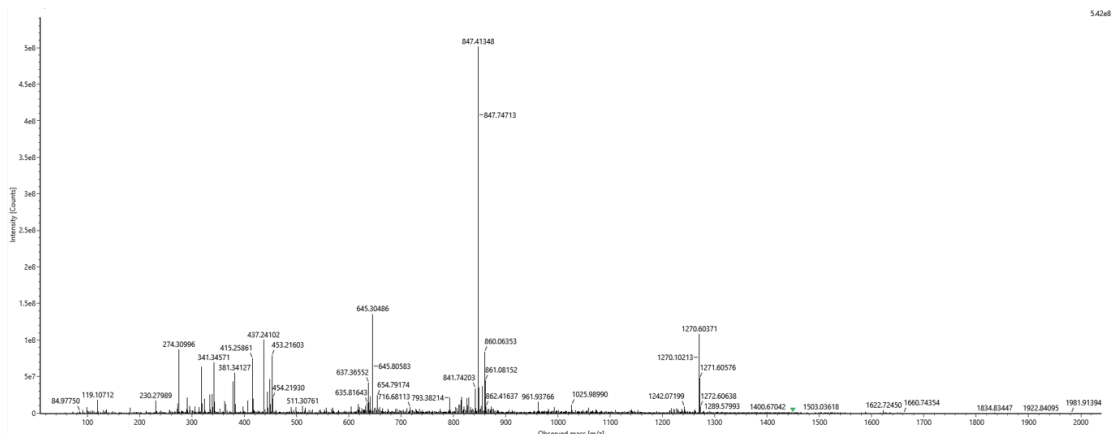
Το στερεό που λήφθηκε μετά την λυοφιλοποίηση (34,3 mg) διαλύθηκε σε 2,3 mL διαλύματος MeCN (0,1% TFA) και H₂O (0,1% TFA). Στην **Εικόνα 43** απεικονίζεται το χρωματογράφημα που λήφθηκε κατά τον καθαρισμό του πεπτιδίου με την χρήση της HPLC με διαλύτες έκλυσης MeCN (0,1% TFA) και H₂O (0,1% TFA) (3% MeCN → 100% MeCN, 30 λεπτά, 20 mL/min, 214 nm). Στο χρωματογράφημα παρατηρούμε την ύπαρξη δύο επιπλέον έντονων κορυφών ($t_R = 13,75$ και $14,75$ λεπτά) οι οποίες αποτελούν παραπροϊόντα της σύνθεσης.



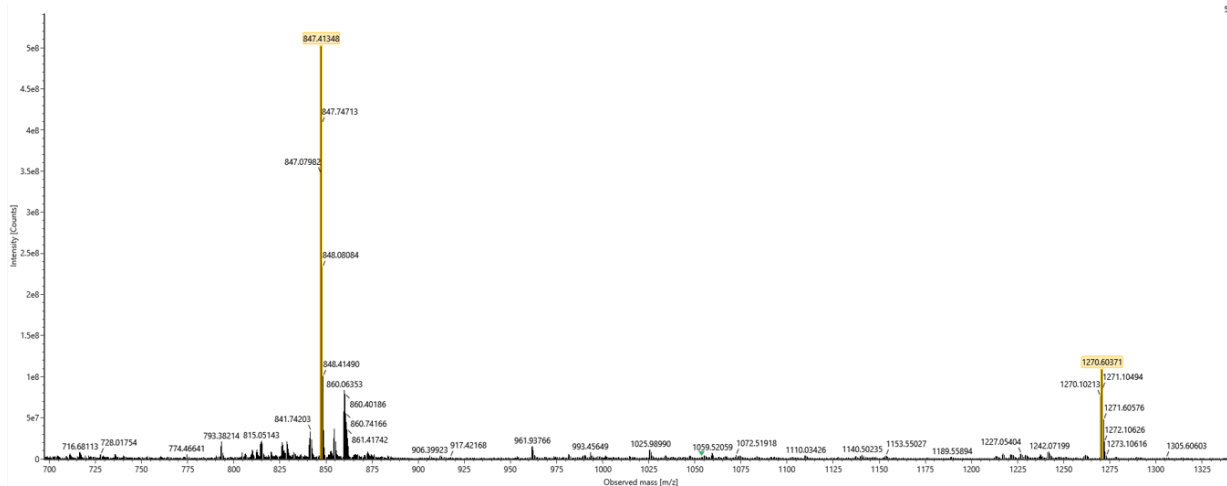
Εικόνα 43. Χρωματογράφημα του πεπτιδίου που στοχεύει τον υποδοχέα VEGFR-2. Ο χρόνος κατακράτησης του πεπτιδίου είναι $t_R = 13,25$ λεπτά. Η κορυφή που συλλέχθηκε αναγράφεται ως 1. Οι υπόλοιπες κορυφές αποτελούν παραπροϊόντα.

1.5.2.3. Ταυτοποίηση με φάσμα μάζας

Στην **Εικόνα 44** και **Εικόνα 45** παρουσιάζεται το φάσμα μάζας του καθαρού πεπτιδίου που συντέθηκε με την συμβατική μέθοδο. Η θεωρητική μάζα του πεπτιδίου είναι 2423,92 και στο φάσμα μάζας βλέπουμε τις κορυφές ταυτοποίησης $m/z = 847,4$ ($[M/3]^{3+}$) και $m/z = 1270,6$ ($[M/2]^{2+}$) του φιαλιδίου 1, τα οποία αναφέρονται στο μόριο μετά από προσθήκη TFA.



Εικόνα 44. Συνολικό φάσμα μάζας (φιαλίδιο 1).



Εικόνα 45. Οι κορυφές ταυτοποίησης $m/z = 847,4$ ($[M/3]^{3+}$) και $m/z = 1270,6$ ($[M/2]^{2+}$) μετά από προσθήκη TFA (φιαλίδιο 1).

2. Σύνθεση μορίων που αναστέλλουν την δράση της PI3K στο γλοίωμα

2.1. Υλικά-Συσκευές-Όργανα

Για την σύνθεση των τελικών μορίων αυτού του κεφαλαίου χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια: κυανουρικό χλωρίδιο (Thermoscientific), μορφολίνη (Sigma-Aldrich), 4-διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδη (Alfa-Aesar), πικολίνη (Thermoscientific), ινδόλιο-3-καρβαλδεΐδη (Fluorochem), πυριδίνη (Alfa-Aesar) και όξινο ανθρακικό νάτριο (Lachner). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: διχλωρομεθάνιο (Sigma-Aldrich), μεθανόλη (Sigma Aldrich), ακετόνη (Sigma-Aldrich), οξικός αιθυλεστέρας (Sigma-Aldrich), εξάνιο (Macron Fine Chemicals), τολουόλιο (Macron Fine Chemicals), ακετονιτρίλιο (J. T. Bakers) και τριφθοροοξικό οξύ (Thermoscientific). Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το DMSO- d_6 από την εταιρεία Sigma-Aldrich και το $CDCl_3-d_1$ από την εταιρεία Eurisotop. Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) με προεπικαλυμμένες πλάκες Merck silica gel 60 F254. Οι πλάκες οπτικοποιήθηκαν με έκθεση σε υπεριώδες φως (UV).

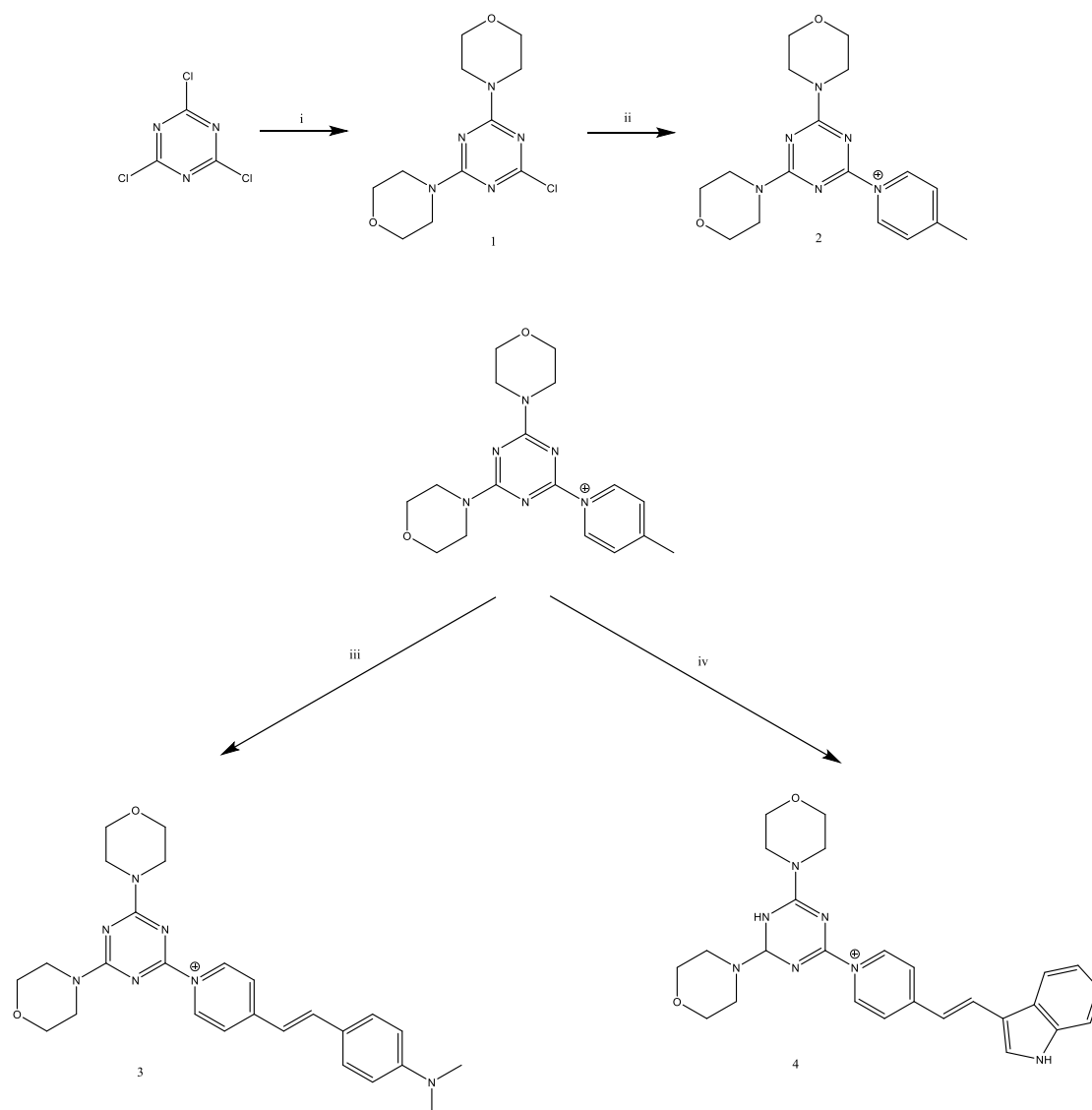
Για τον καθαρισμό των παρακάτω ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, χρωματογραφία στήλης και HPLC. Στην χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε silica από πυρηνική γέλη Acros Organics 60 (239-400 mesh) και οι παρασκευαστικοί καθαρισμοί (RP-HPLC) πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο ThermoScientific Ultimate 3000 εξοπλισμένο με αντλία Dionex Ultimate 3000 και ανιχνευτή μήκους κύματος. Οι παρασκευαστικοί καθαρισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μια στήλη Phenomenex Jupiter 10 μm Proteo 90Å C18 (250 \times 21.2 mm).

Τα πειράματα ταυτοποίησης πραγματοποιήθηκαν με φασματοσκοπία NMR (1H και ^{13}C) και MS, με την χρήση του φασματογράφου NMR Bruker Avance MHz 250MHz και ανιχνευτή

BBI. Το πρόγραμμα Topspin 4.1.4 χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του συστήματος NMR. Για την ταυτοποίηση των ενώσεων με φασματομετρία μάζας χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζας Waters Xevo G2-XS QToF.

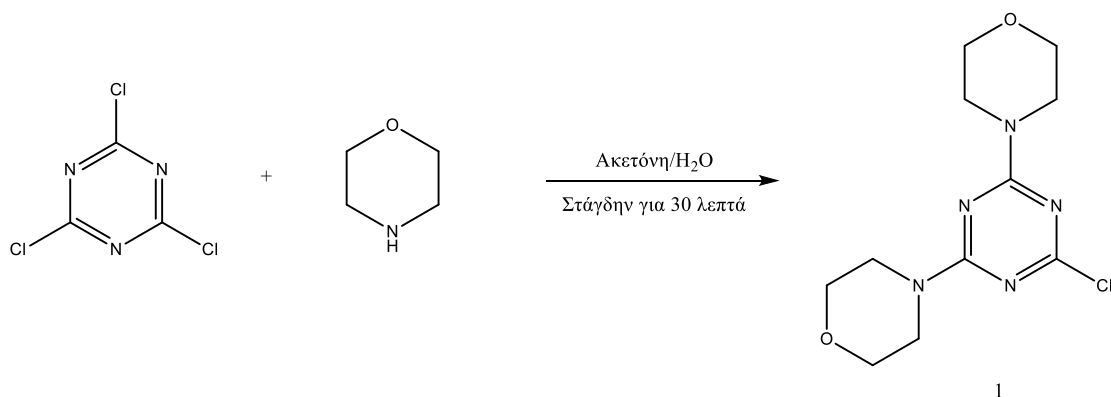
Τα φάσματα ορατού-υπεριώδους καταγράφηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο Edinburg DS5 σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm στους 25°C. Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν στο φθορισμόμετρο Edinburg FS5 σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm στους 25°C.

2.2. Συνθετική πορεία των ενώσεων 3 και 4



Εικόνα 46. Πειραματική πορεία σύνθεσης των ενώσεων 3 και 4: i) Μορφολίνη, Ακετόνη/Νερό, 0°C, 30 λεπτά, ii) Πικολίνη, Τολουόλιο, θέρμανση υπό επαναρροή, 17 ώρες, iii) 4-διμεθυλάμινοβενζαλδεΰδη, Ακετονιτρίλιο, Πυριδίνη, θέρμανση υπό επαναρροή, 16 ώρες και iv) Ινδόλιο-3-καρβαλδεΰδη, Ακετονιτρίλιο, Πυριδίνη, θέρμανση υπό επαναρροή, 16 ώρες.

2.2.1. Σύνθεση της ένωσης 1



Εικόνα 47. Σύνθεση της ένωσης 1.

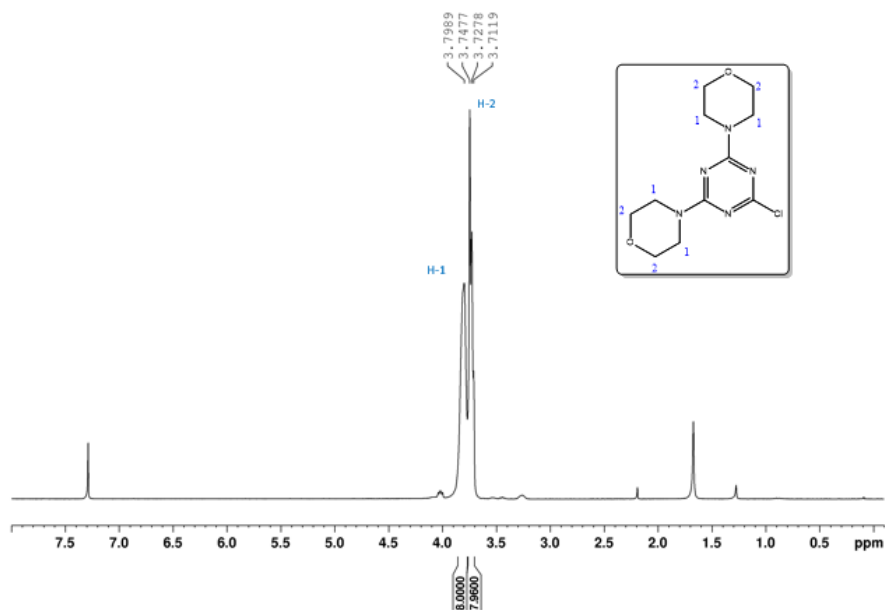
Μία σφαιρική φιάλη των 50 mL εφοδιασμένη με μαγνητάκι, τοποθετήθηκε σε παγόνερο και τέθηκε υπό ανάδευση. Προστέθηκε κυανουρικό χλωρίδιο (1 g, 0,005 mol, 1 ισοδύναμο) και όξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO₃, ως βάση (1,37 mg, 0,01 mol, 3 ισοδύναμα) και διαλύθηκαν σε 5:1 ακετόνη/απεσταγμένο νερό (10 mL ακετόνη και 2,5 mL H₂O). Στη συνέχεια, σε ένα ποτήρι ζέσεως των 50 mL αραιώθηκε ο όγκος της μορφολίνης σε 6 mL ακετόνη (1,9 mL, 0,02 mol, 4 ισοδύναμα). Εν συνεχεία, το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε σε παγόνερο και προστέθηκε το διάλυμα της αραιωμένης μορφολίνης στάγδην στη σφαιρική φιάλη σε διάστημα 30 λεπτών. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 70% οξικό αιθυλεστέρα σε εξάνιο.

Αμέσως μετά την προσθήκη, το διάλυμα της αντίδρασης μεταφέρθηκε σε ένα ποτήρι ζέσεως των 250 mL το οποίο περιείχε παγόνερο (0°C) στο οποίο το προϊόν είναι αδιάλυτο ενώ η περίσσεια βάσης και αντιδρώντων, καθώς και η ύπαρξη πιθανού προϊόντος υπό την μορφή άλατος είναι διαλυτά. Το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως διηθήθηκε από έναν ηθμό με Por. 4 και το λευκό ίζημα εκπλύθηκε με την χρήση κρύου απεσταγμένου νερού.

Το προϊόν καθαρίστηκε με την χρήση χρωματογραφίας στήλης με σύστημα διαλυτών οξικό αιθυλεστέρα σε εξάνιο (το σύστημα ανέβηκε έως το 50% στο οποίο εκλούστηκε το επιθυμητό προϊόν). Το λευκό στερεό που συλλέχθηκε είχε βάρος 1,17 g και η απόδοση της αντίδρασης βρέθηκε ίση με α=75,39%.

2.2.1.1. Ταυτοποίηση της ένωσης 1 ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)

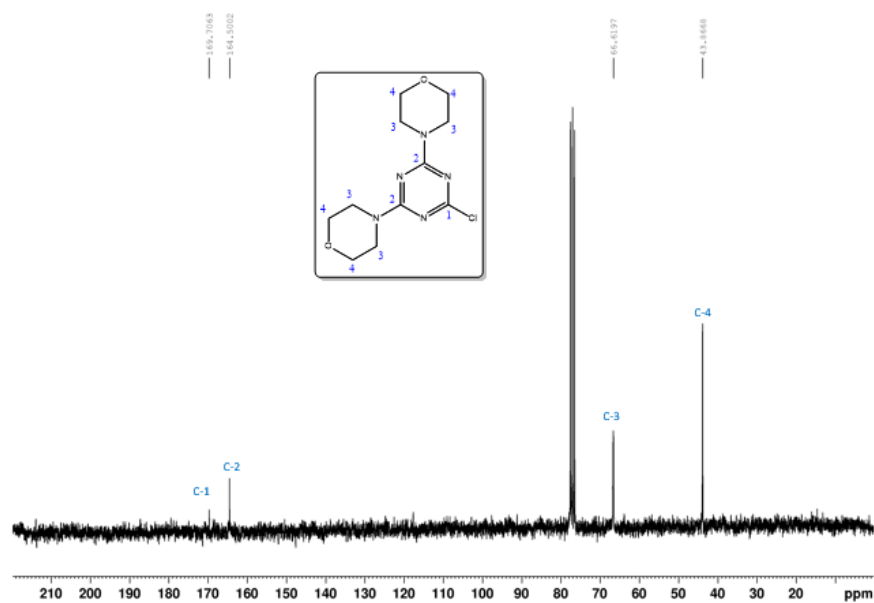
Η ταυτοποίηση της ένωσης 1 πραγματοποιήθηκε με την λήψη φάσματος NMR ($^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$, 25°C).



Εικόνα 48. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, 25°C) σε $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ της ένωσης 1.

Ανάλυση φάσματος $^1\text{H-NMR}$

Λευκό στερεό, Απόδοση: 75,39%, $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ ppm): 3,80 (s, 8H), 3,73 (m, 8H).

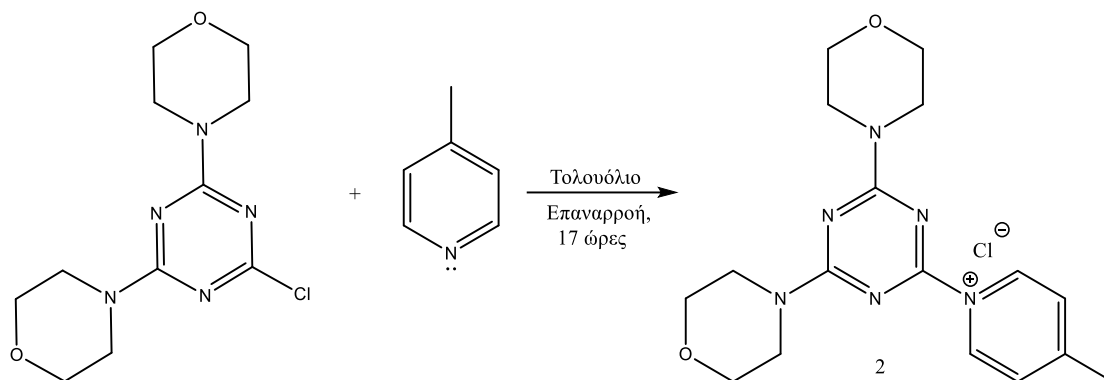


Εικόνα 49. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, 25°C) σε $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ της ένωσης 1.

Ανάλυση φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ ppm): 169,7, 164,5, 66,6, 43,9.

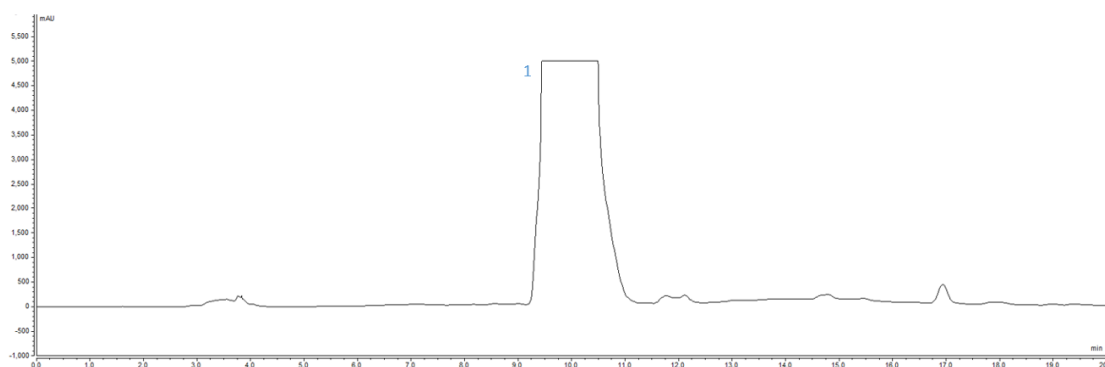
2.2.2. Σύνθεση της ένωσης 2



Εικόνα 50. Σύνθεση της ένωσης 2.

Σε μία σφαιρική φιάλη των 5 mL εφοδιασμένη με μαγνητάκι, προστέθηκε η ένωση 1 (150 mg, 0,525 mmol, 1 ισοδύναμο) και διαλύθηκε σε τολουόλιο (750 μ L). Εν συνεχεία, προστέθηκε η πικολίνη (56,2 μ L, 0,577 mmol, 1 ισοδύναμο) και αφέθηκε υπό ανάδευση και επαναρροή (111°C) για 17 ώρες. Πραγματοποιήθηκε διήθηση του μίγματος της αντίδρασης με την χρήση ηθμού Por. 4 και το σκουρόχρωμο στερεό που παρέμεινε στον ηθμό εκπλύθηκε με 4 x 2 mL τολουόλιο ώστε να παρασυρθεί η περίσσεια της πικολίνης στο διήθημα. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 8% μεθανόλης σε διχλωρομεθάνιο.

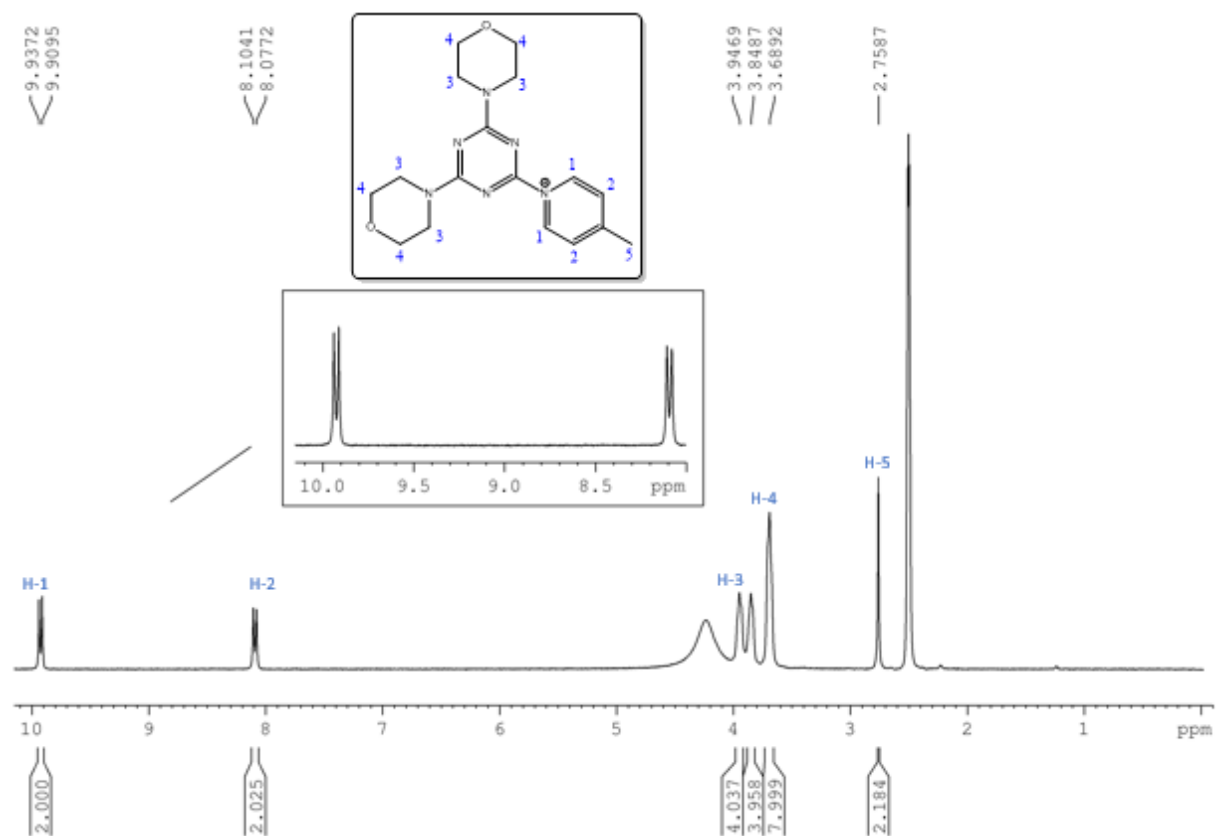
Για τον καθαρισμό του στερεού που συλλέχθηκε πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική HPLC (3% MeCN \rightarrow 80% MeCN, 20 mL/min, 20 λεπτά, 254 nm). Στην Εικόνα 51 φαίνεται το χρωματογράφημα της ένωσης 2 η οποία έχει χρόνο κατακράτησης $t_R = 10$ λεπτά. Το ανοιχτόχρωμο στερεό που συλλέχθηκε είχε βάρος 1,01 g και η απόδοση της αντίδρασης βρέθηκε ίση με $\alpha = 67,9\%$



Εικόνα 51. Χρωματογράφημα της ένωσης 2.

2.2.2.1. Ταυτοποίηση της ένωσης 2 ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)

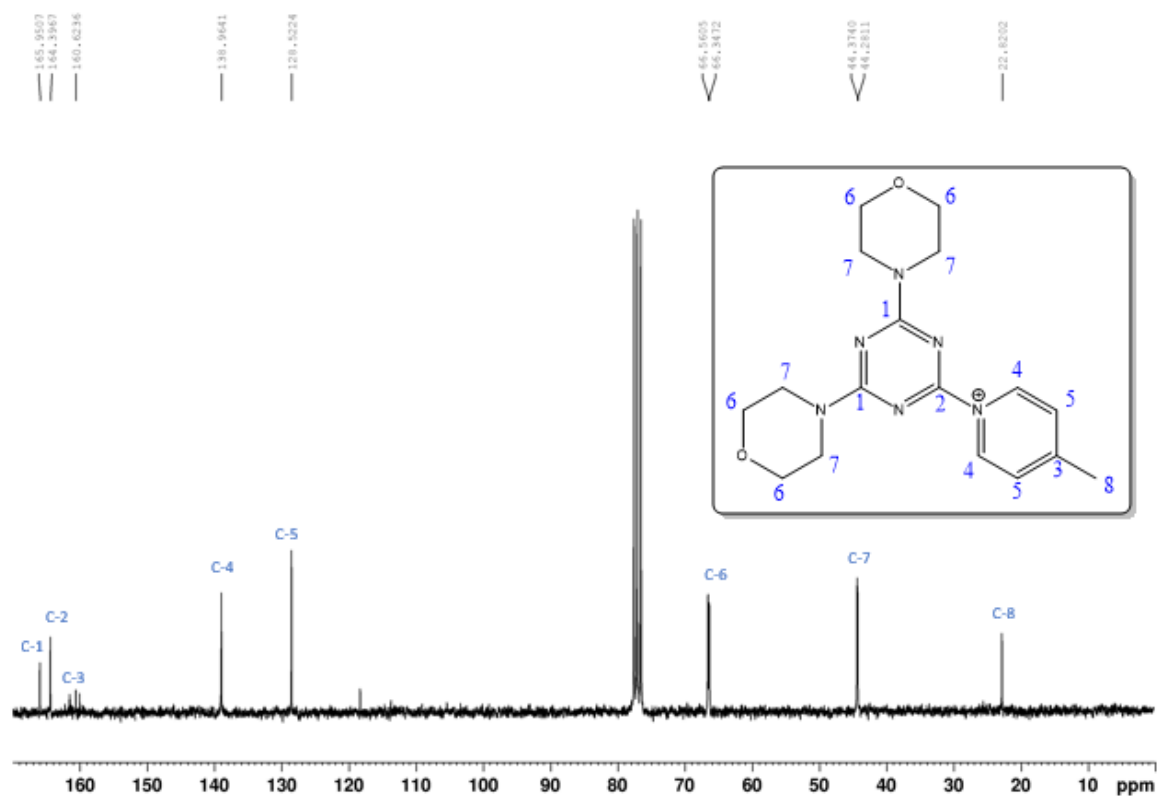
Η ταυτοποίηση της ένωσης 2 πραγματοποιήθηκε με την λήψη φάσματος NMR ($^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$, 25°C).



Εικόνα 52. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, 25°C) σε DMSO-d_6 της ένωσης 2.

Ανάλυση φάσματος $^1\text{H-NMR}$

Ροζ-ελαφρώς γκρι στερεό, Απόδοση: 67,9%, $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 9,94 (d, 2H, $J = 6,88$), 8,11 (d, 2H, $J = 6,88$), 3,91 (dt, 8H), 3,70 (t, 8H), 2,77 (s, 3H).

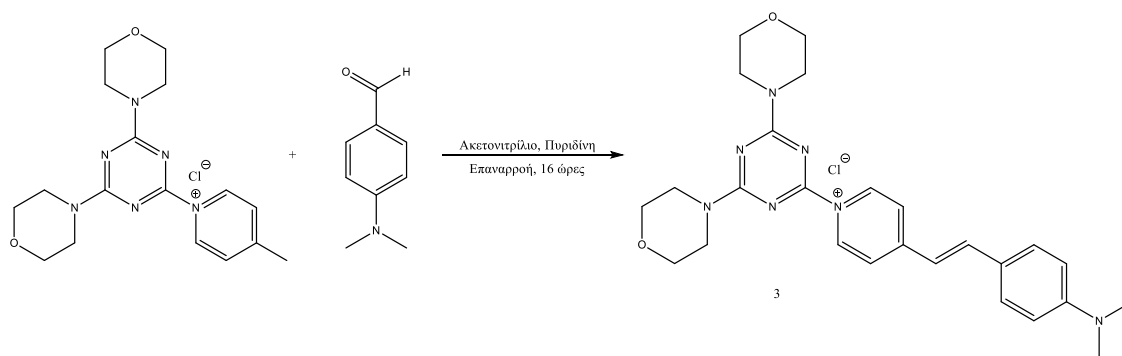


Εικόνα 53. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, 25°C) σε $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ της ένωσης 2.

Ανάλυση φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ ppm): 165,95, 164,40, 160,62, 138,96, 128,52, 66,46, 44,33, 22,82.

2.2.3. Σύνθεση της ένωσης 3



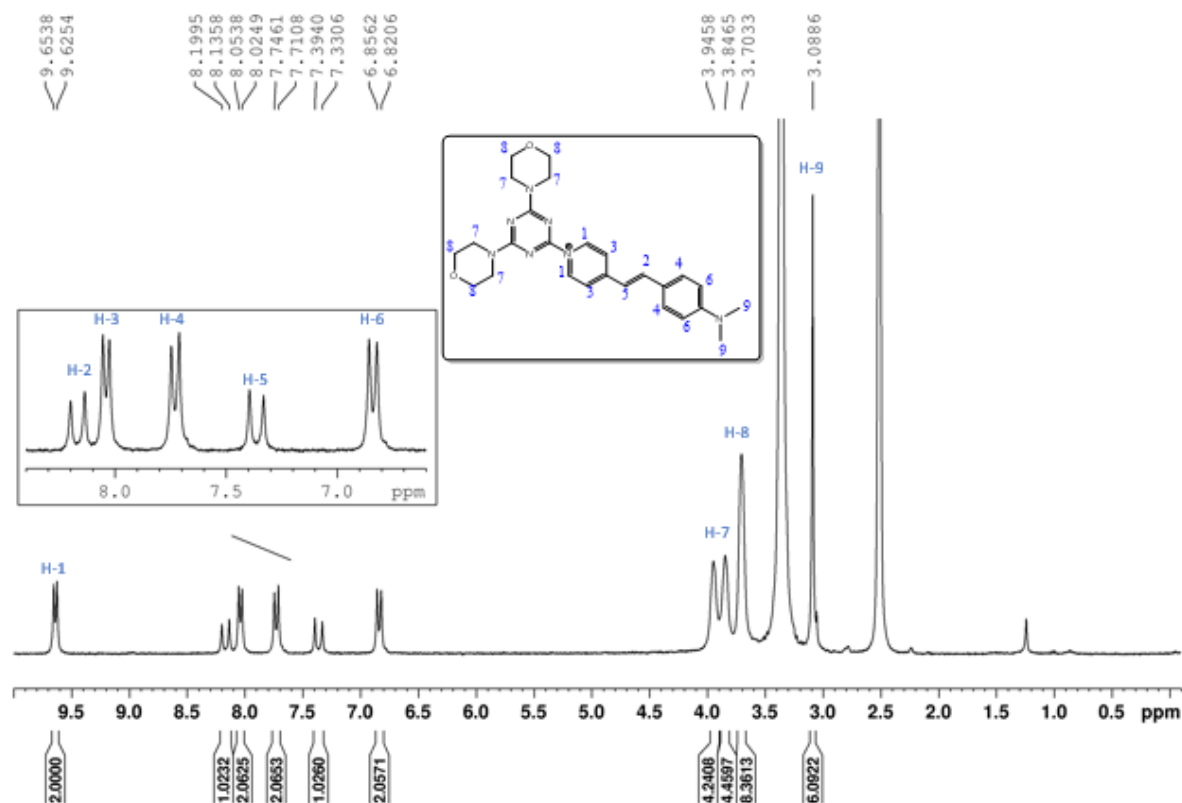
Εικόνα 54. Σύνθεση της ένωσης 3.

Σε μία σφαιρική φιάλη των 25 mL εφοδιασμένη με μαγνητάκι, διαλύθηκε η ένωση 2 (200 mg, 0,53 mmol, 1 ισοδύναμο) σε ακετονιτρίλιο (4 mL) και προστέθηκε καταλυτική ποσότητα πυριδίνης (500 μL). Εν συνεχεία προστέθηκε η ποσότητα της 4-διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδης (78,8 mg, 0,53 mmol, 1 ισοδύναμο) και αφέθηκε υπό επαναρροή για 16 ώρες. Η πρόδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 8% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο.

Το προϊόν καθαρίστηκε με την χρήση χρωματογραφίας στήλης με σύστημα διαλυτών μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο (το σύστημα ανέβηκε έως το 10% στο οποίο εκλούστηκε το επιθυμητό προϊόν). Το σκουρόχρωμο στερεό που συλλέχθηκε είχε βάρος 106,2 mg και η απόδοση της αντίδρασης βρέθηκε ίση με $\alpha=39,44\%$.

2.2.3.1. Ταυτοποίηση της ένωσης 3 ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS)

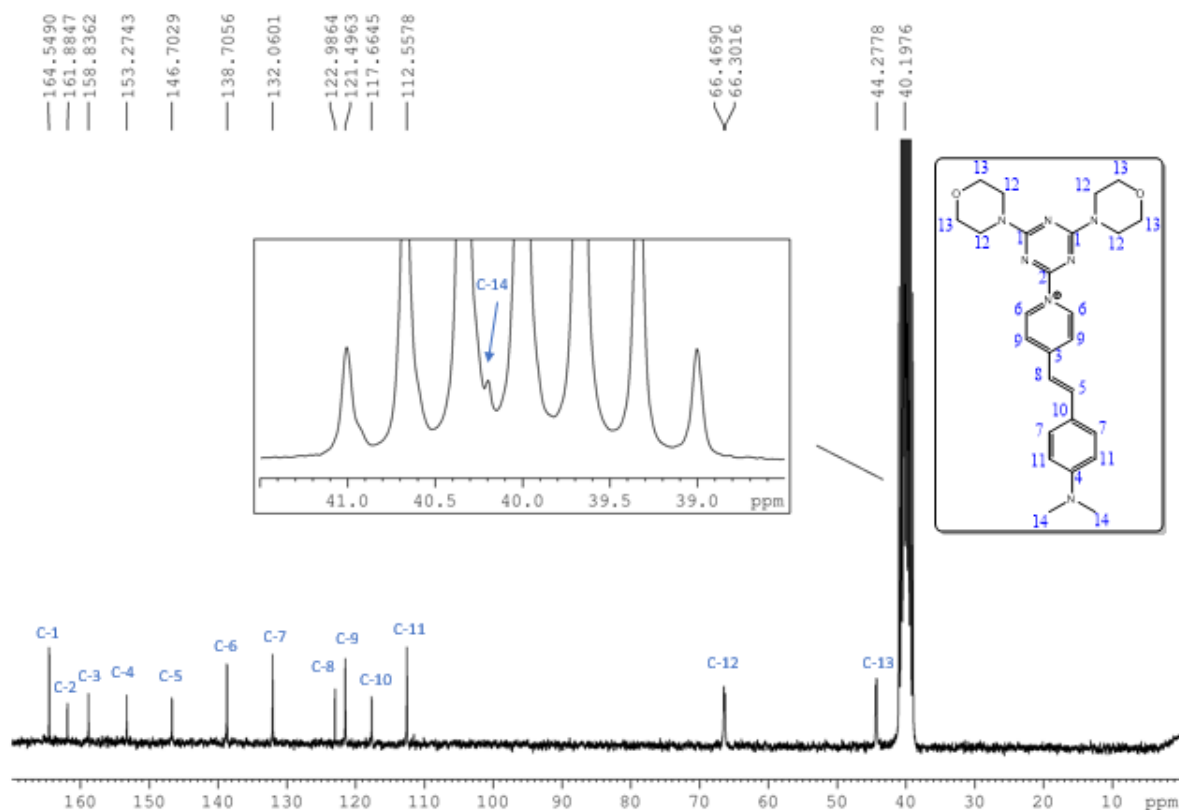
Η ταυτοποίηση της ένωσης 3 πραγματοποιήθηκε με την λήψη φάσματος NMR ($^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$, 25°C) όπως και MS.



Εικόνα 55. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, 25°C) σε DMSO-d_6 της ένωσης 3.

Ανάλυση φάσματος $^1\text{H-NMR}$

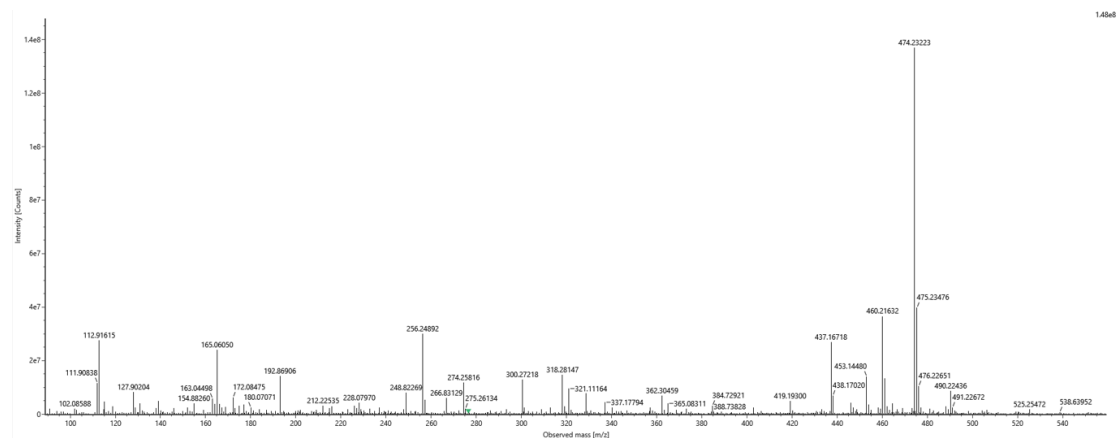
Σκουρόχρωμο στερεό, $\alpha=39,44\%$, $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 9,64 (d, 2H, $J = 7,14$), 8,17 (d, 1H, $J = 15,92$, trans-H), 8,04 (d, 2H, $J = 7,18$), 7,73 (d, 2H, $J = 8,85$), 7,36 (d, 1H, $J = 15,92$, trans-H), 6,84 (d, 2H, $J = 8,97$), 3,90 (dt, 8H), 3,70 (s, 8H), 3,09 (s, 6H).



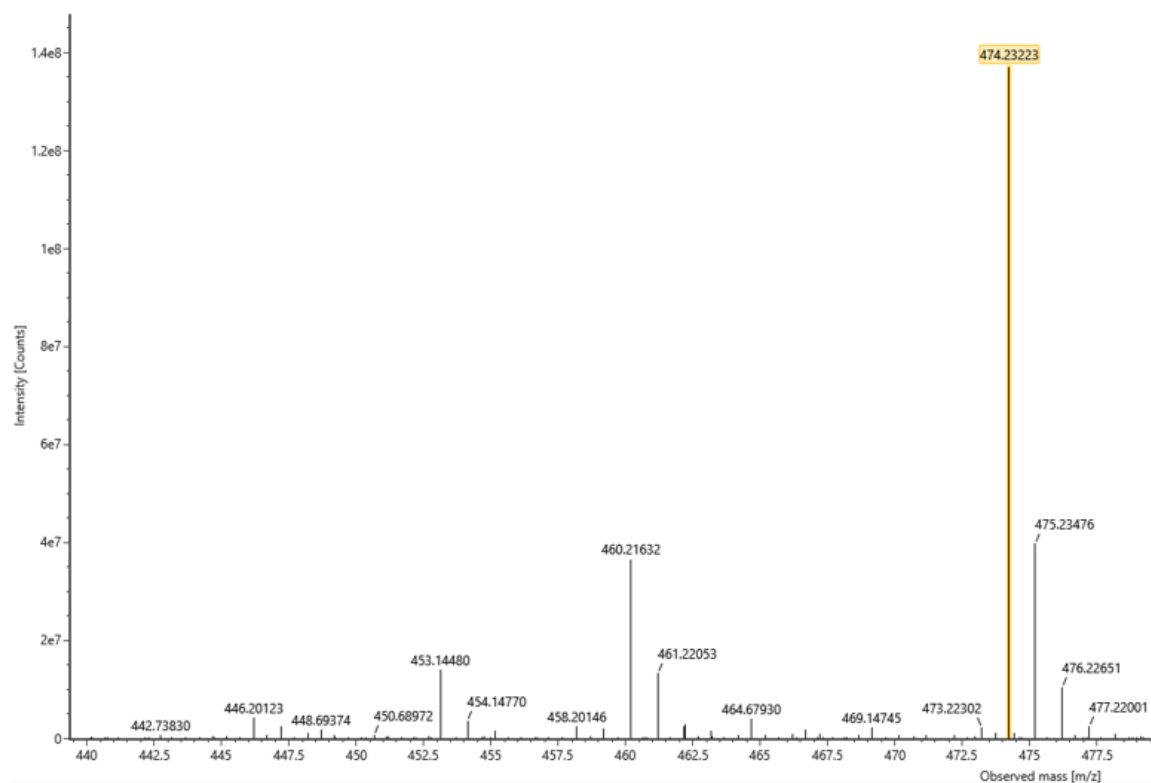
Εικόνα 56. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, 25°C) σε DMSO-d_6 της ένωσης 3.

Ανάλυση φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 164,55, 161,88, 158,84, 153,27, 146,70, 138,71, 132,06, 122,99, 121,50, 117,66, 112,56, 66,38, 44,34, 40,20.



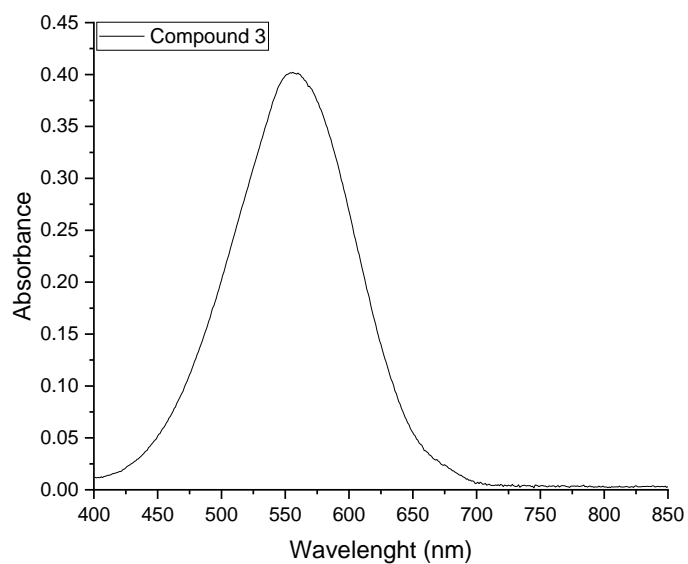
Εικόνα 57. Συνολικό φάσμα μάζας της ένωσης 3.



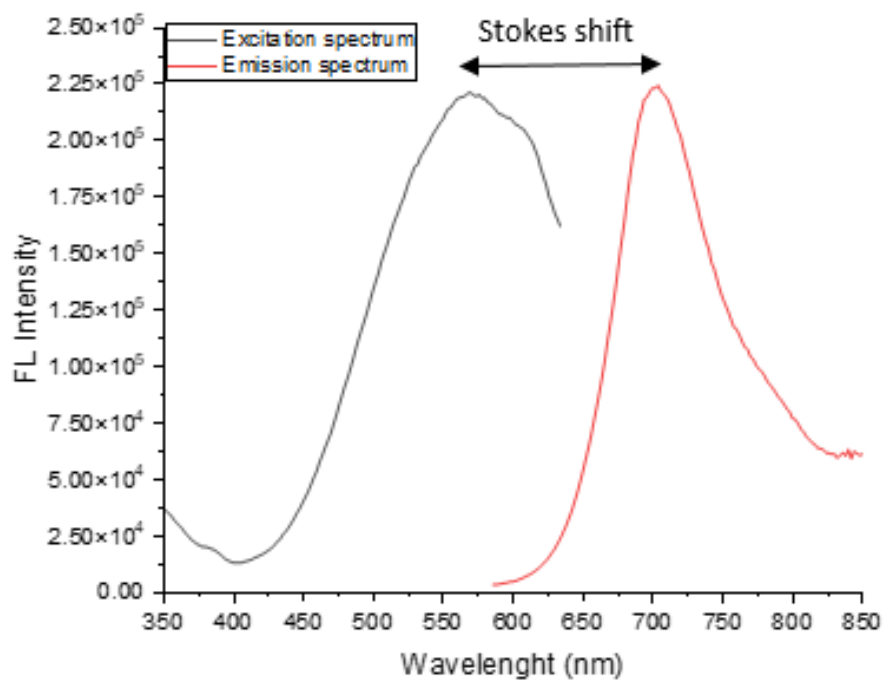
Εικόνα 58. Φάσμα μάζας της ένωσης 3 όπου φαίνεται η κορυφή ταυτοποίησης $m/z = 474,2$ (M^+).

2.2.3.2. Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 3

Για να αξιολογήσουμε τις φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 3 χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού και η φασματοσκοπία φθορισμού. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αφορούν την επίδραση του διαλύτη, του ιξώδους και της θερμοκρασίας. Για τα παραπάνω πειράματα παρασκευάστηκε ένα διάλυμα 10 μM της ένωσης 3 σε DMSO από το οποίο πάρθηκε ποσότητα για το εκάστοτε πείραμα.



Εικόνα 59. Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 3 (10 μ M) σε DMSO, σε θερμοκρασία 25°C και lamp width: 4.

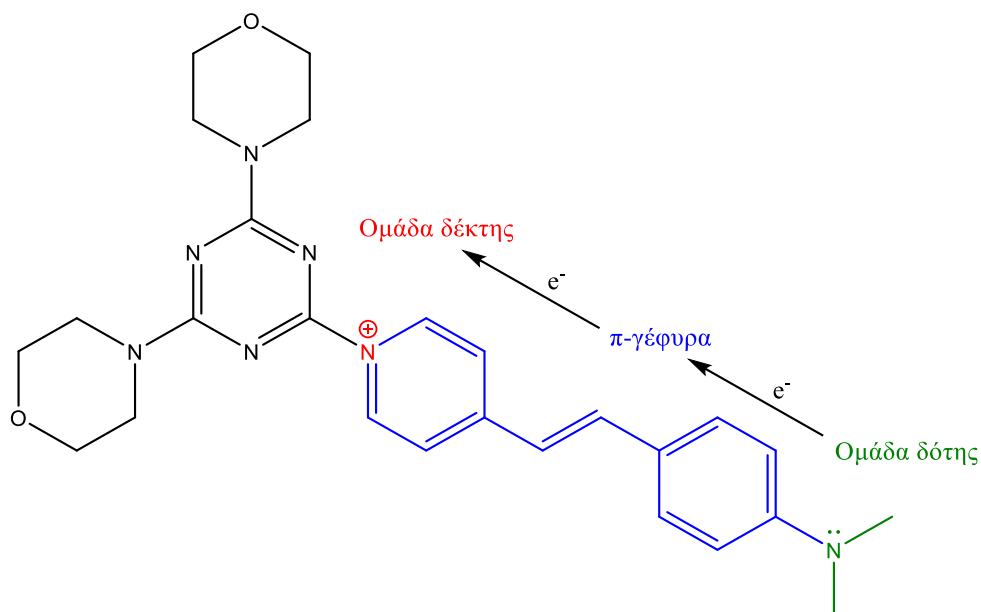


Εικόνα 60. Φάσμα φθορισμού της ένωσης 3 (10 μ M) σε DMSO, σε θερμοκρασία 25°C και step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

Πίνακας 1. Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπισης Stokes της ένωσης 3.

λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
556	570	704	134

Η ένωση 3 περιλαμβάνει μία ομάδα δότη (ώθηση) και μία ομάδα δέκτη (έλξη) ηλεκτρονίων οι οποίες συνδέονται με μία π -γέφυρα ηλεκτρονίων (Εικόνα 61). Επιπλέον, λόγω του γεγονότος ότι η μετατόπιση Stokes υπερβαίνει τα 100 nm (είναι ίση με 134 nm), σημαίνει ότι η παραπάνω ένωση φθορίζει μέσω του ICT φαινομένου.

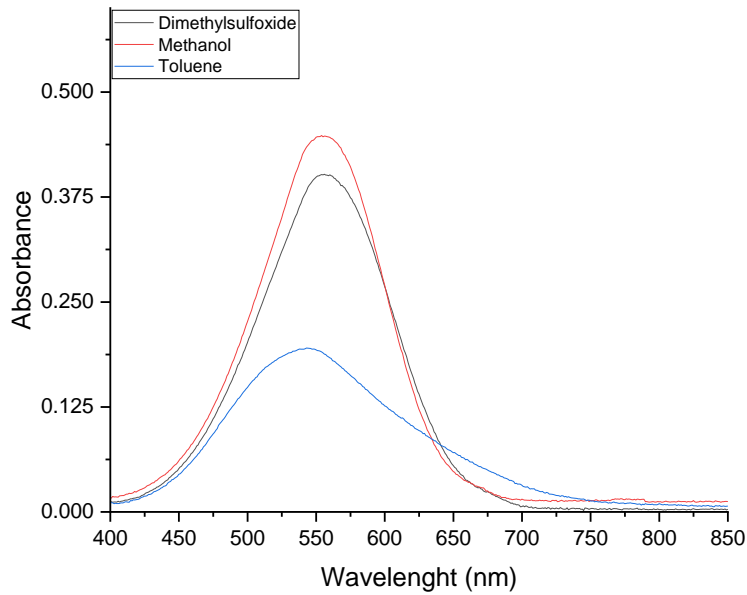


Εικόνα 61. ICT φαινόμενο της ένωσης 3.

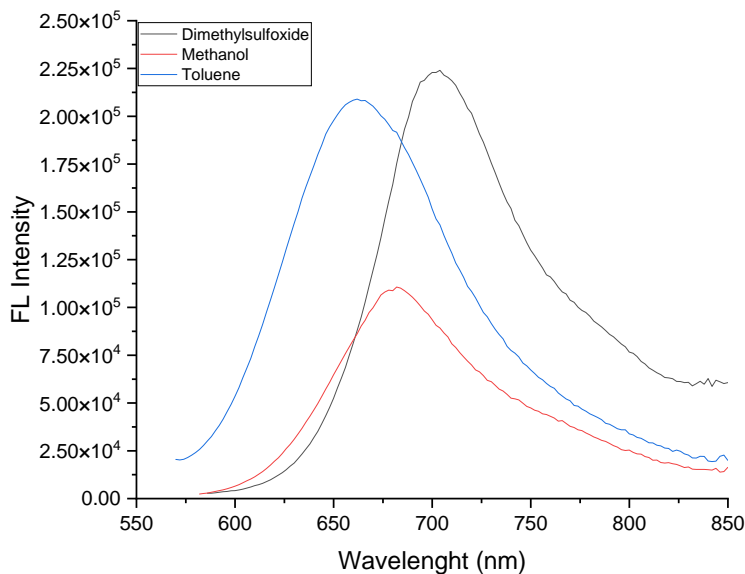
Η ένωση 3, απορροφά φως συγκεκριμένου μήκους κύματος και πραγματοποιείται το ICT φαινόμενο, δηλαδή μεταφέρεται ηλεκτρικό φορτίο από την ομάδα δότη στην ομάδα δέκτη μέσω της π -γέφυρας ηλεκτρονίων. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μία διπολική κατάσταση διέγερσης. Κατά την αποδιέγερση από αυτήν την διπολική κατάσταση διέγερσης η ένωση 3 αλληλεπιδρά με τα δίπολα μόρια του διαλύτη με αποτέλεσμα η εκπομπή να μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (μετά την αλληλεπίδραση με τα μόρια του διαλύτη, η ένωση αποδιεγείρεται σε χαμηλότερες δονητικές καταστάσεις χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας και όταν αποδιεγερθεί με την εκπομπή ακτινοβολίας αυτή είναι τελικά χαμηλότερης ενέργειας και συνεπώς μεγαλύτερου μήκους κύματος).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης 3 (συγκέντρωσης 10 μM) σε διαλύτες που διαφέρουν ως προς την πολικότητά τους καθώς και την δυνατότητά τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαλύτες:

διμέθυλοσουλφοξείδιο (πολικός απρωτικός διαλύτης), μεθανόλη (πολικός πρωτικός διαλύτης) και τολουόλιο (μη πολικός διαλύτης).



Εικόνα 62. Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 3 (10 μ M) σε πολικό απρωτικό διαλύτη (DMSO), πολικό πρωτικό διαλύτη (μεθανόλη) και μη πολικό διαλύτη (τολουόλιο), σε θερμοκρασία 25°C και lamp width: 4.



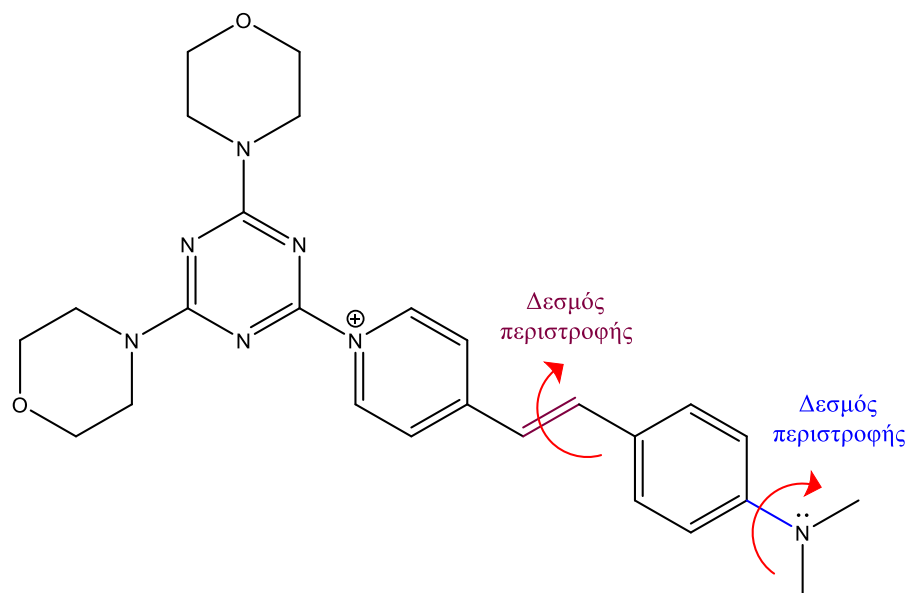
Εικόνα 63. Φάσμα φθορισμού της ένωσης 3 (10 μ M) σε πολικό απρωτικό διαλύτη (DMSO), πολικό πρωτικό διαλύτη (μεθανόλη) και μη πολικό διαλύτη (τολουόλιο). Τα φάσματα περιγράφουν την επίδραση των φαινομένων διαλυτοποίησης στον φθορισμό της ένωσης 3 σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

Πίνακας 2. Μήκη κύματος απορρόφησης και φθορισμού της ένωσης 3 στους τρεις διαλύτες.

Διαλύτης	λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)
Διμεθυλοσουλφοξείδιο Πολικός απρωτικός διαλύτης	557	704
Μεθανόλη Πολικός πρωτικός διαλύτης	557	682
Τολουόλιο Μη πολικός διαλύτης	544	662

Παρατηρούμε ότι στο φάσμα απορρόφησης στην μεθανόλη έχουμε την μεγαλύτερη απορρόφηση ενώ στο τολουόλιο την μικρότερη απορρόφηση και ότι στο φάσμα φθορισμού στο διμεθύλοσουλφοξείδιο έχουμε πιο έντονο φθορισμό καθώς και μετατόπιση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Συνεπώς, παρατηρούμε πως η ένωση 3 παρουσιάζει μεταβολή στην ένταση απορρόφησης καθώς και φθορισμού σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δηλαδή σε διαφορετικούς διαλύτες.

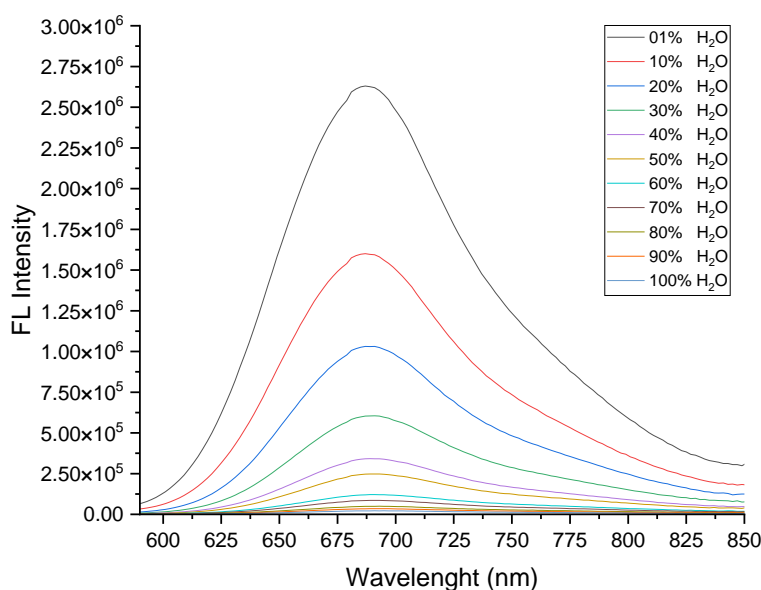
Επιπρόσθετα, η ένωση 3 διαθέτει μία ομάδα που έχει την ικανότητα να περιστρέφεται (Εικόνα 64).



Εικόνα 64. Σχηματική αναπαράσταση των δεσμών περιστροφής της ένωσης 3 σε χαμηλό ιξώδες.

Σε περιβάλλον με υψηλό ιξώδες η περιστροφή αυτή μπορεί να περιοριστεί και συνεπώς να διευκολυνθεί η μεταφορά του φορτίου μέσω δεσμών. Για την αξιολόγηση της ένωσης 3 ως προς την μεταβολή του ιξώδους, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με

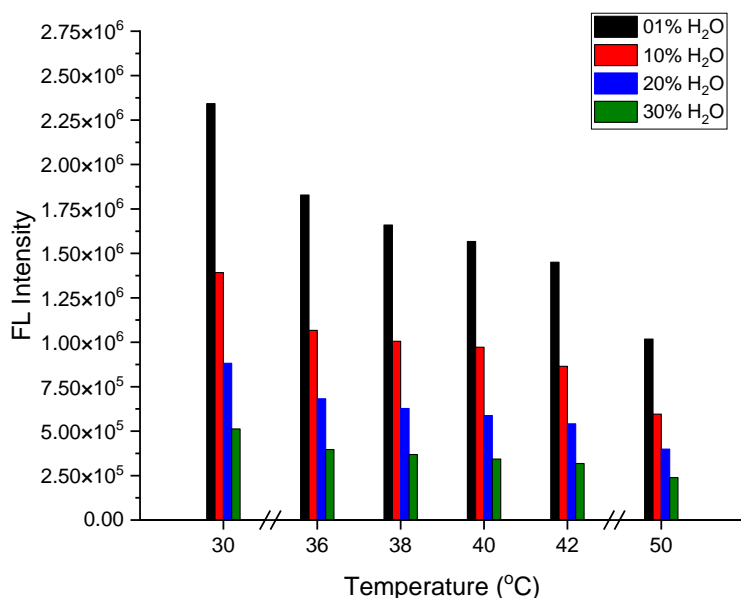
φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 01% έως 100% νερό) σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).



Εικόνα 65. Φάσμα φθορισμού της ένωσης 3 (10 μΜ) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 01% έως 100% νερό) μετά από διέγερση στα 570 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 5, Embw: 5.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 65, η ένωση 3 σε συστήματα όπου το νερό αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό, η ένταση φθορισμού είναι μικρή (λόγω της περιστροφής γύρω από τους δεσμούς που φαίνονται παραπάνω). Με την σταδιακή αύξηση του ποσοστού της γλυκερόλης, η ένταση φθορισμού αυξήθηκε σημαντικά (περίπου 125 φορές) το οποίο αποδίδεται στην μείωση της περιστροφής σε ιώδη περιβάλλοντα καθώς σε μέσα με μεγάλο ιώδες περιορίζεται η ενδομοριακή περιστροφή.

Τέλος, λόγω του γεγονότος ότι το ιώδες επηρεάζεται σημαντικά από την μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικά πειράματα σε διαφορετικές θερμοκρασίες (από 30°C έως 50°C). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 66, η διαφορά στην ένταση του φθορισμού της ένωσης 3 στα διαφορετικά συστήματα γλυκερόλης/νερού παραμένει σταθερή παρά την αύξηση της σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30°C στους 50°C. Επιπλέον, παρατηρούμε την μείωση της έντασης του φθορισμού σε ένα συγκεκριμένο ιώδες με την αύξηση της θερμοκρασίας, κάτι το οποίο σημαίνει ότι η διαλυτότητα της ένωσης δεν επηρεάζει την μεταβολή της έντασης του φθορισμού με την μεταβολή του ιώδους.

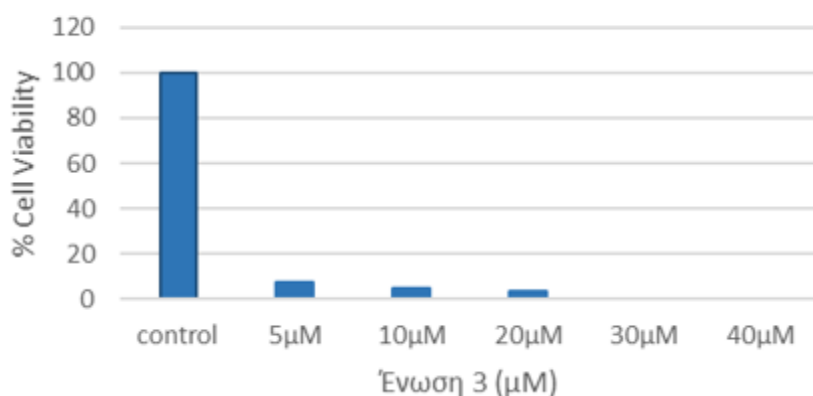


Εικόνα 66. Συσχέτιση της μεταβολής της έντασης φθορισμού της ένωσης 3 (10 μM) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού ως προς την θερμοκρασία μετά από διέγερση στα 570 nm με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

2.2.3.3. Πειράματα κυτταρικής βιωσιμότητας της ένωσης 3

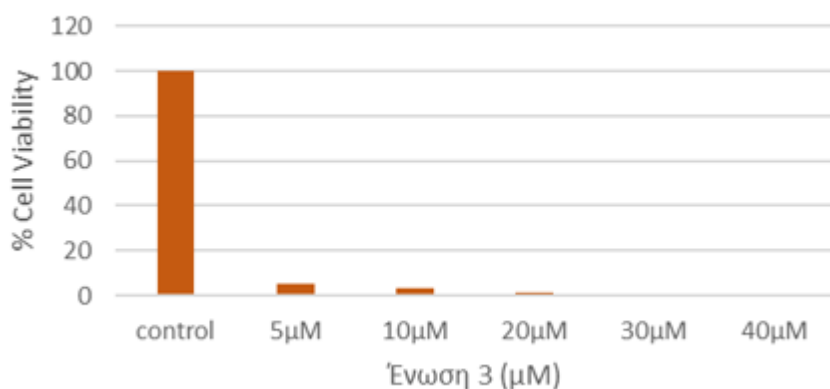
Τα πειράματα κυτταρικής βιωσιμότητας της ένωσης 3 ελέγχθηκαν σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 και T98 (Εικόνα 67 και Εικόνα 68) και επιπλέον βρέθηκε η μέση συγκέντρωση αναστολής των παραπάνω κυττάρων (IC_{50}) ίση με 2,87 μM και 2,85 μM , για τα κύτταρα U87 και T98, αντίστοιχα.

Ένωση 3, U87



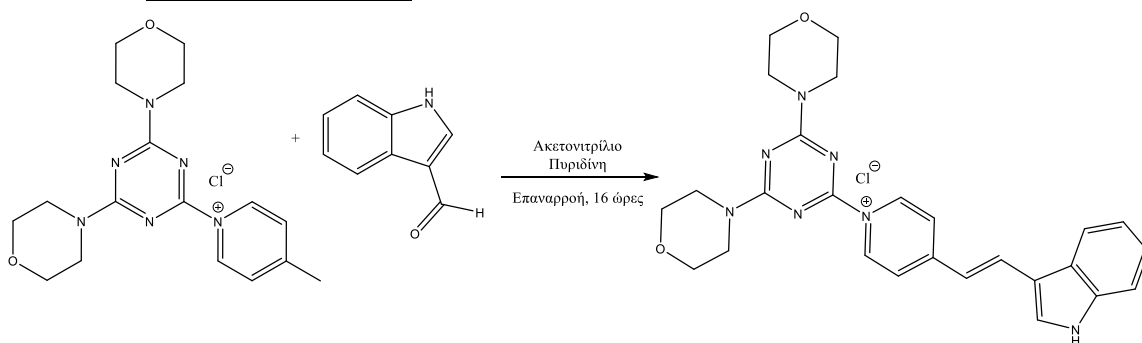
Εικόνα 67. Διάγραμμα κυτταρικής βιωσιμότητας της ένωσης 3 σε καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87. Το IC_{50} είναι ίσο με 2,87 μM .

Ένωση 3, T98



Εικόνα 68. Διάγραμμα κυτταρικής βιωσιμότητας της ένωσης 3 σε καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος T98. Το IC₅₀ είναι ίσο με 2,85 μM.

2.2.4. Σύνθεση της ένωσης 4



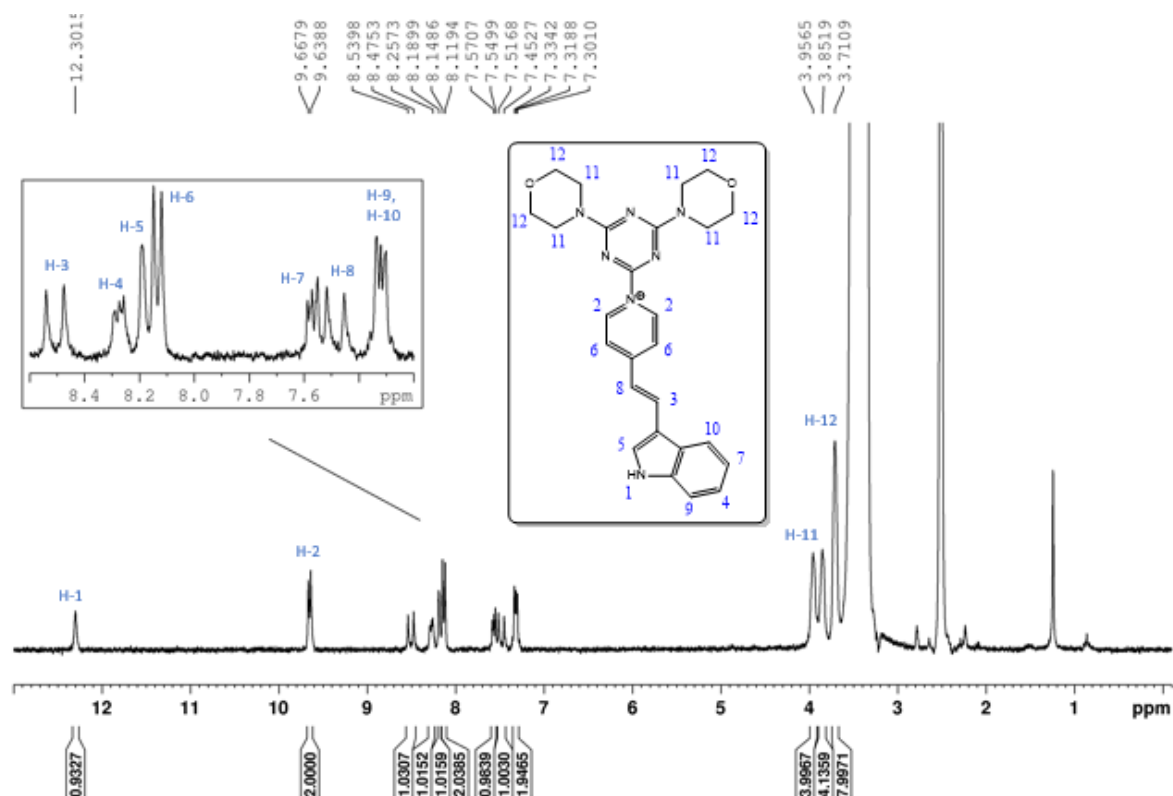
Εικόνα 69. Δομή της ένωσης 4.

Σε μία σφαιρική φιάλη των 25 mL εφοδιασμένη με μαγνητάκι, διαλύθηκε η ένωση 2 (200 mg, 0,53 mmol, 1 ισοδύναμο) σε ακετονιτρίλιο (4 mL) και προστέθηκε καταλυτική ποσότητα πυριδίνης (500 μL). Εν συνεχεία, προστέθηκε η ποσότητα του ινδολίου-4-καρβαλδεΐδης (84 mg, 0,58 mmol, 1,1 ισοδύναμο) και αφέθηκε υπό επαναρροή για 16 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 8% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο.

Το προϊόν καθαρίστηκε με την χρήση χρωματογραφίας στήλης με σύστημα διαλυτών μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο (το σύστημα ανέβηκε έως το 10% στο οποίο εκλούστηκε το επιθυμητό προϊόν). Το έντονο πορτοκαλί στερεό που συλλέχθηκε είχε βάρος 140 mg και η απόδοση της αντίδρασης βρέθηκε ίση με $\alpha=52,41\%$.

2.2.4.1. Ταυτοποίηση της ένωσης 4 ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS)

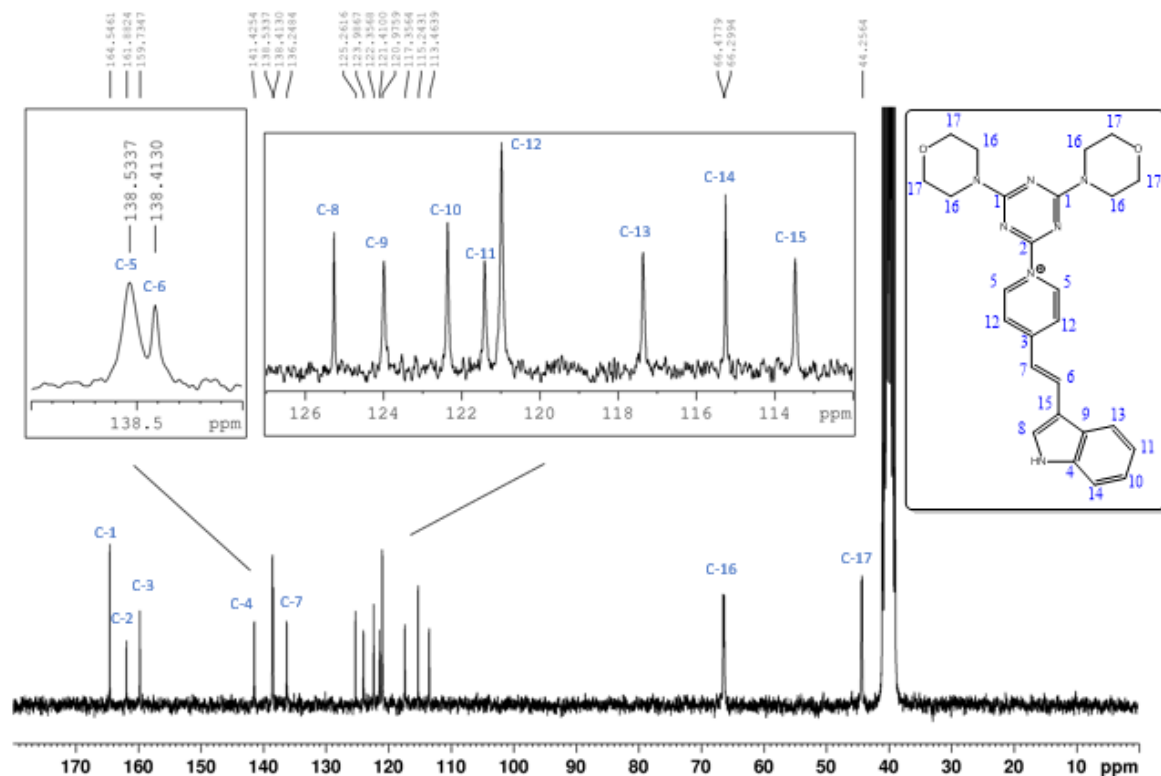
Η ταυτοποίηση της ένωσης 4 πραγματοποιήθηκε με την λήψη φάσματος NMR ($^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$, 25°C) όπως και MS.



Εικόνα 70. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, 25°C) σε DMSO-d_6 της ένωσης 4.

Ανάλυση φάσματος $^1\text{H-NMR}$

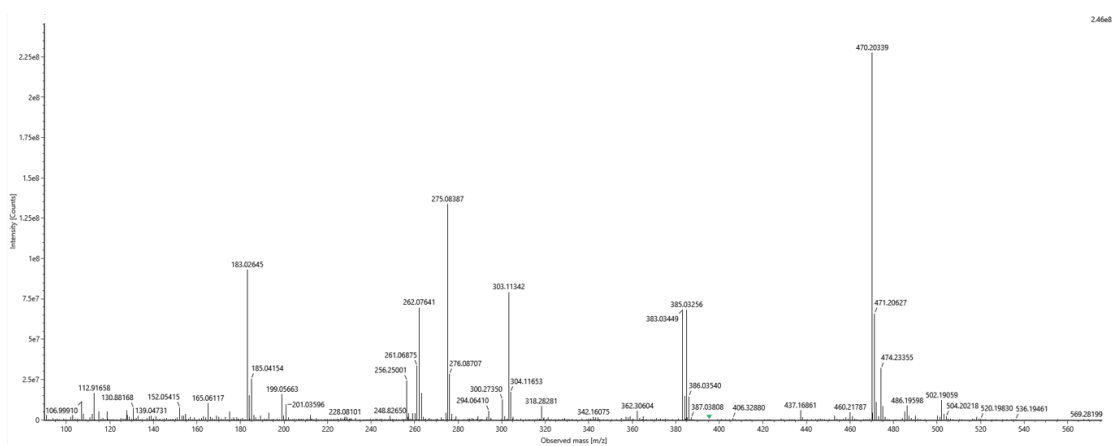
Έντονο πορτοκαλί στερεό, $\alpha=52,41\%$, $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 12,30 (s, 1H, N-H), 9,65 (d, 2H, $J = 7,32$), 8,50 (d, 1H, $J = 16,13$, trans -H), 8,27 (t, 1H, $J = 4,02$), 8,19 (s, 1H), 8,13 (d, 2H, $J = 7,30$), 7,57 (t, 1H, $J = 4,50$), 7,48 (d, 1H, $J = 16,13$, trans -H), 7,32 (m, 2H), 3,90 (dt, 8H), 3,71 (s, 8H).



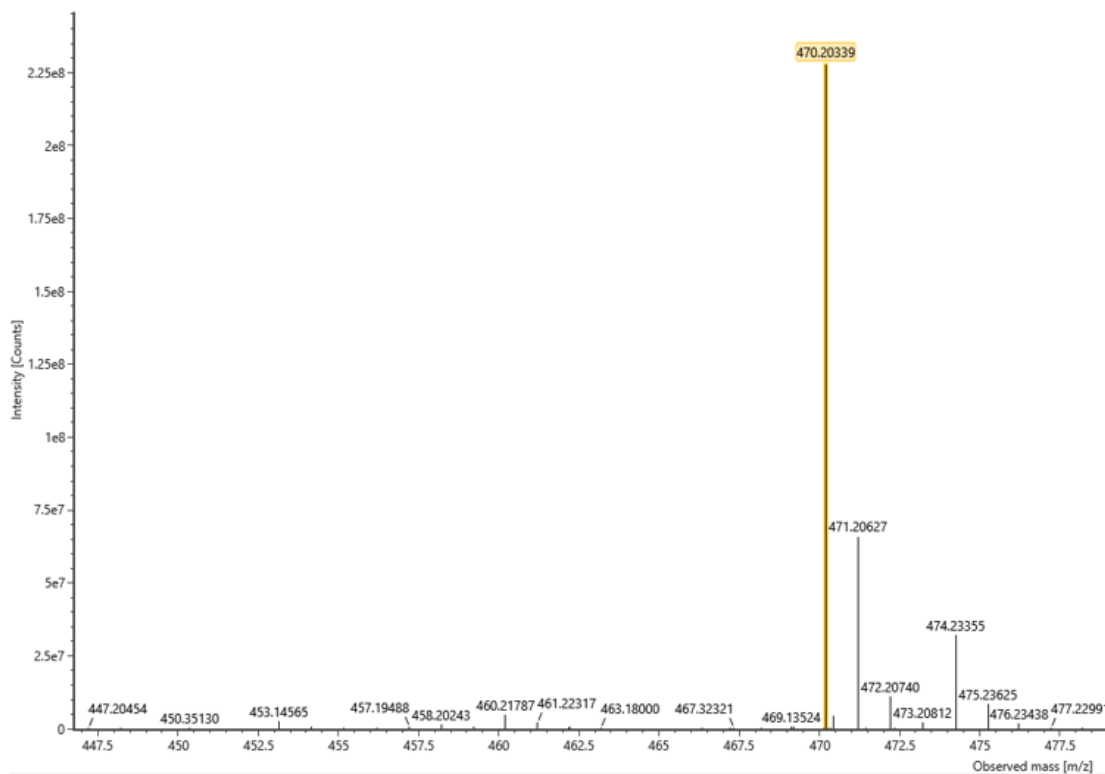
Εικόνα 71. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, 25°C) σε DMSO-d_6 της ένωσης 4.

Ανάλυση φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 164,55, 161,88, 159,73, 141,43, 138,53, 138,41, 136,25, 125,26, 123,99, 122,36, 121,41, 120,97, 117,36, 115,24, 113,46, 66,40, 44,31.



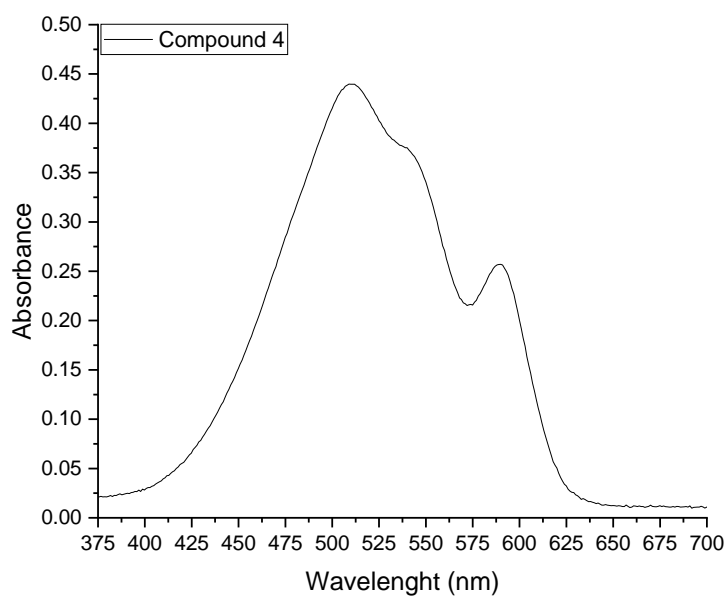
Εικόνα 72. Συνολικό φάσμα μάζας της ένωσης 4.



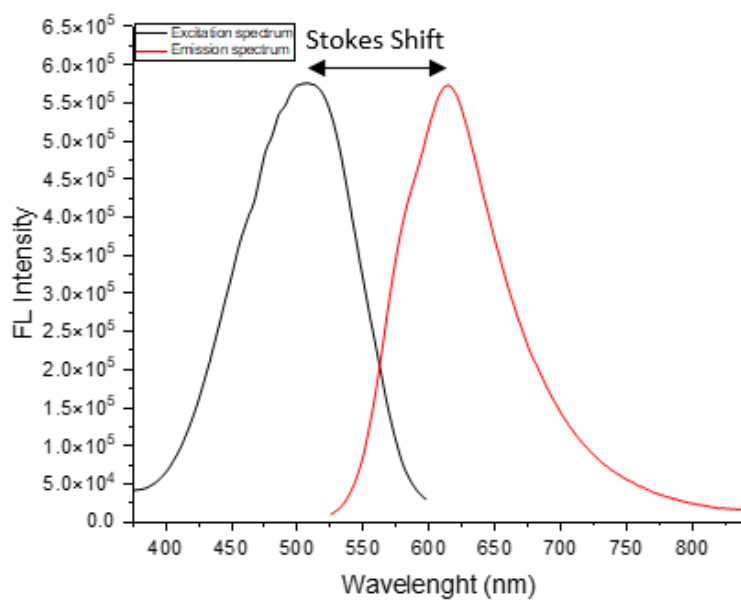
Εικόνα 73. Φάσμα μάζας της ένωσης 4 όπου φαίνεται η κορυφή ταυτοποίησης $m/z = 470,2$ (M^+).

2.2.4.2. Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 4

Για να αξιολογήσουμε τις φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 4 χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού και η φασματοσκοπία φθορισμού. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αφορούν την επίδραση του διαλύτη, του ιξώδους και της θερμοκρασίας. Για τα παραπάνω πειράματα παρασκευάστηκε ένα διάλυμα 10 μM της ένωσης 4 το οποίο χρησιμοποιήθηκε για το εκάστοτε πείραμα.



Εικόνα 74. Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 4 (10 μ M) σε DMSO, σε θερμοκρασία 25°C και lamp width: 4.

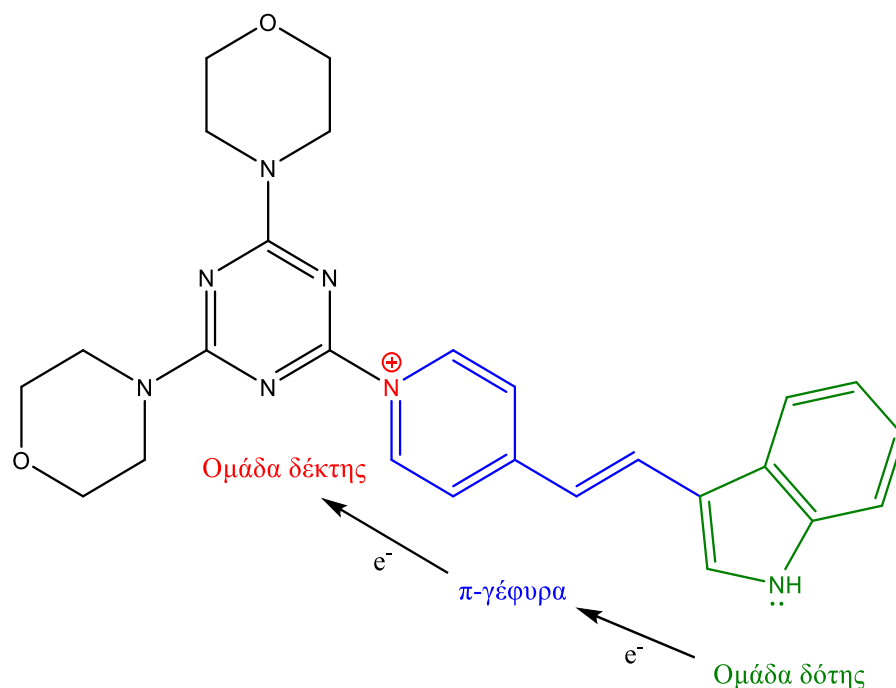


Εικόνα 75. Φάσμα διέγερσης-φθορισμού της ένωσης 4 (10 μ M) σε DMSO, σε θερμοκρασία 25°C και step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

Πίνακας 3. Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπισης Stokes της ένωσης 4.

λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
511 και 589	508	616	108

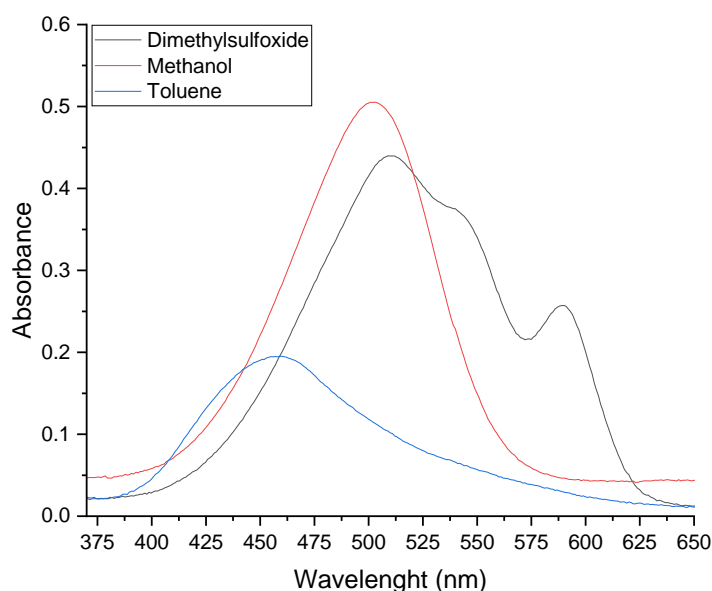
Η ένωση 4 περιλαμβάνει μία ομάδα δότη (ώθηση) και μία ομάδα δέκτη (έλξη) ηλεκτρονίων οι οποίες συνδέονται με μία π-γέφυρα ηλεκτρονίων (Εικόνα 76). Επιπλέον, λόγω του γεγονότος ότι η μετατόπιση Stokes υπερβαίνει τα 100 nm (είναι ίση με 108 nm), σημαίνει ότι η παραπάνω ένωση φθορίζει μέσω του ICT φαινομένου.



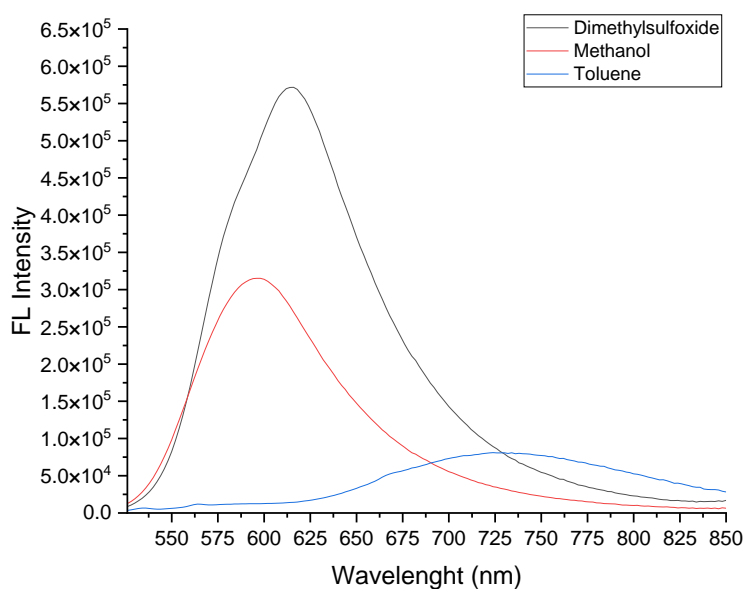
Εικόνα 76. ICT φαινόμενο της ένωσης 4.

Η ένωση 4, απορροφά φως συγκεκριμένου μήκους κύματος και πραγματοποιείται το ICT φαινόμενο, δηλαδή μεταφέρεται ηλεκτρικό φορτίο από την ομάδα δότη στην ομάδα δέκτη μέσω της π-γέφυρας ηλεκτρονίων. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μία διπολική κατάσταση διέγερσης. Κατά την αποδιέγερση από αυτήν την διπολική κατάσταση διέγερσης, η ένωση 4 αλληλεπιδρά με τα δίπολα μόρια του διαλύτη με αποτέλεσμα η εκπομπή να μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (μετά την αλληλεπίδραση με τα μόρια του διαλύτη, η ένωση αποδιεγείρεται σε χαμηλότερες δονητικές καταστάσεις χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας και όταν αποδιεγερθεί με την εκπομπή ακτινοβολίας αυτή είναι τελικά χαμηλότερης ενέργειας και συνεπώς μεγαλύτερου μήκους κύματος).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης 4 (συγκέντρωσης 10 μM) σε διαφορετικούς διαλύτες που διαφέρουν ως προς την πολικότητά τους καθώς και δυνατότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαλύτες: διμέθυλοσουλφοξείδιο (πολικός απρωτικός διαλύτης), μεθανόλη (πολικός πρωτικός διαλύτης) και τολουόλιο (μη πολικός διαλύτης).



Εικόνα 77. Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 4 (10 μM) σε πολικό απρωτικό διαλύτη (DMSO), πολικό πρωτικό διαλύτη (μεθανόλη) και μη πολικό διαλύτη (τολουόλιο), σε θερμοκρασία 25°C και με lamp width: 4.



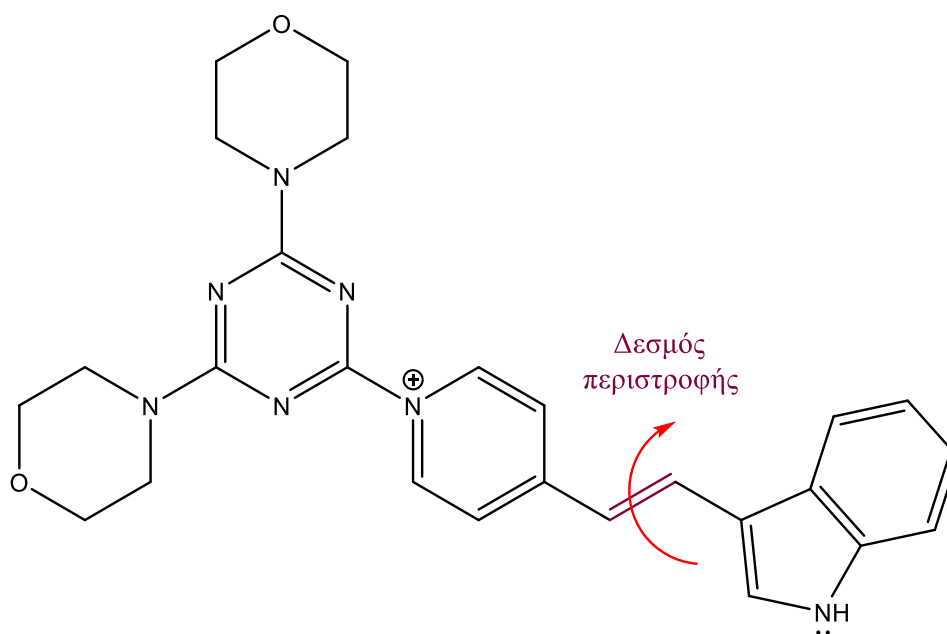
Εικόνα 78. Φάσμα φθορισμού της ένωσης 4 (10 μM) του δείγματος σε πολικό απρωτικό διαλύτη (DMSO), πολικό πρωτικό διαλύτη (μεθανόλη) και μη πολικό διαλύτη (τολουόλιο). Τα φάσματα περιγράφουν την επίδραση των φαινομένων διαλυτοποίησης στον φθορισμό της ένωσης 4 μετά από διέγερση στα 508 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

Πίνακας 4. Μήκη κύματος απορρόφησης και φθορισμού της ένωσης 4 στους τρεις διαλύτες.

Διαλύτης	λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)
Διμεθυλοσουλφοξείδιο Πολικός απρωτικός διαλύτης	511 και 589	616
Μεθανόλη Πολικός πρωτικός διαλύτης	503	598
Τολουόλιο Μη πολικός διαλύτης	457	734

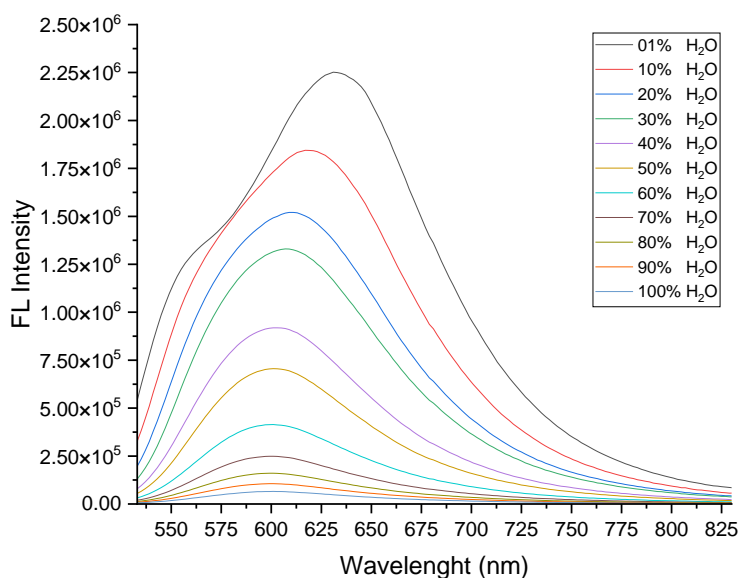
Παρατηρούμε ότι στο φάσμα απορρόφησης στην μεθανόλη έχουμε την μεγαλύτερη απορρόφηση ενώ στο τολουόλιο την μικρότερη απορρόφηση και ότι στο φάσμα φθορισμού στο διμέθυλοσουλφοξείδιο έχουμε πιο έντονο φθορισμό. Συνεπώς, παρατηρούμε πως η ένωση 4 παρουσιάζει μεταβολή στην ένταση απορρόφησης καθώς και φθορισμού σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δηλαδή σε διαφορετικούς διαλύτες.

Επιπρόσθετα, η ένωση 4 διαθέτει μία ομάδα που έχει την ικανότητα να περιστρέφεται (Εικόνα 79).



Εικόνα 79. Σχηματική αναπαράσταση των δεσμών περιστροφής της ένωσης 4 σε χαμηλό ιξώδες.

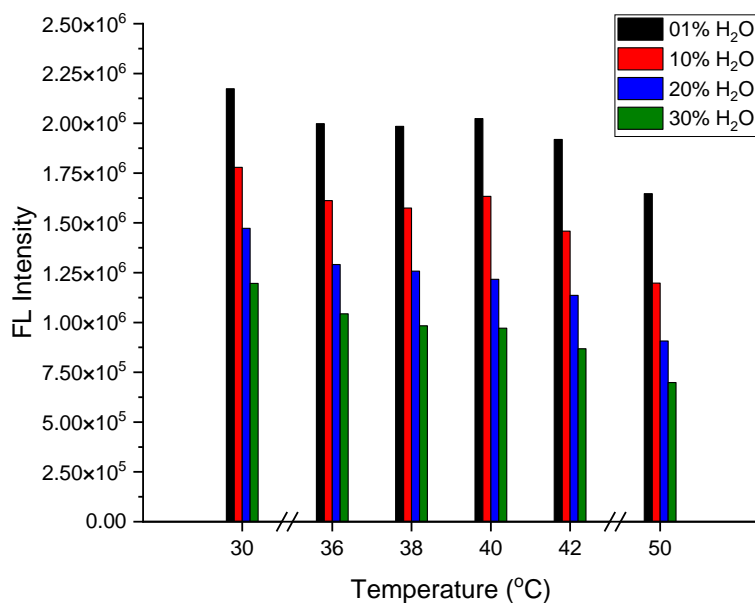
Σε περιβάλλον με υψηλό ιξώδες η περιστροφή αυτή μπορεί να περιοριστεί και συνεπώς να πραγματοποιηθεί η μεταφορά του φορτίου μέσω δεσμών. Για την αξιολόγηση της ένωσης 4 ως προς την μεταβολή του ιξώδους, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 01% έως 100% νερό) σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).



Εικόνα 80. Φάσμα φθορισμού της ένωσης 4 (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 01% έως 100% νερό) μετά από διέγερση στα 508 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 5, Embw: 5.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 80, η ένωση 4 σε συστήματα όπου το νερό αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό η ένταση φθορισμού είναι μικρή (λόγω της περιστροφής της ομάδας). Με την σταδιακή αύξηση του ποσοστού της γλυκερόλης, η ένταση φθορισμού αυξήθηκε σημαντικά (περίπου 34,5 φορές) το οποίο αποδίδεται στην μείωση της περιστροφής σε ιώδη περιβάλλοντα καθώς σε μέσα με μεγάλο ιώδες περιορίζεται η ενδομοριακή περιστροφή.

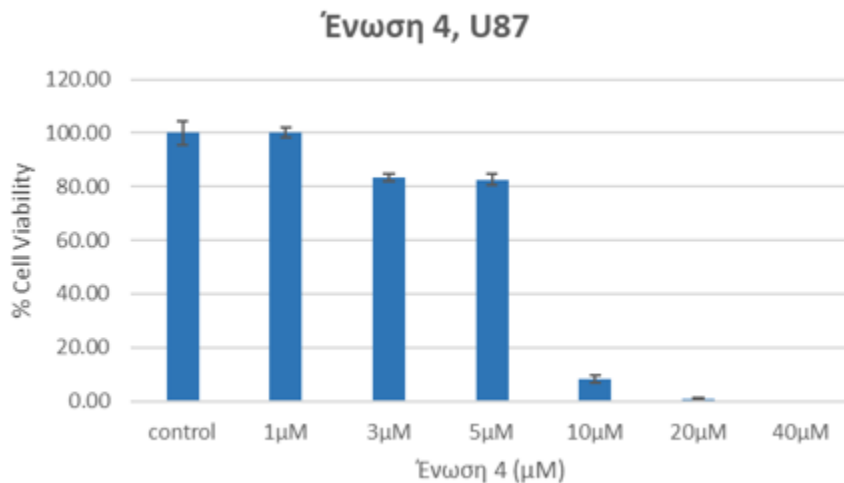
Τέλος, λόγω του γεγονότος ότι το ιώδες επηρεάζεται σημαντικά από την μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικά πειράματα σε διαφορετικές θερμοκρασίες (από 30°C έως 50°C). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 81, η διαφορά στην ένταση του φθορισμού της ένωσης 4 στα διαφορετικά συστήματα γλυκερόλης/νερού παραμένει σταθερή παρά την αύξηση της σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30°C στους 50°C. Επιπλέον, παρατηρούμε την μείωση της έντασης του φθορισμού σε ένα συγκεκριμένο ιώδες με την αύξηση της θερμοκρασίας, κάτι το οποίο σημαίνει ότι η διαλυτότητα της ένωσης δεν επηρεάζει την μεταβολή της έντασης του φθορισμού με την μεταβολή του ιώδους.



Εικόνα 81. Συσχέτιση της μεταβολής της έντασης φθορισμού της ένωσης 4 (10 μM) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού ως προς την θερμοκρασία με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

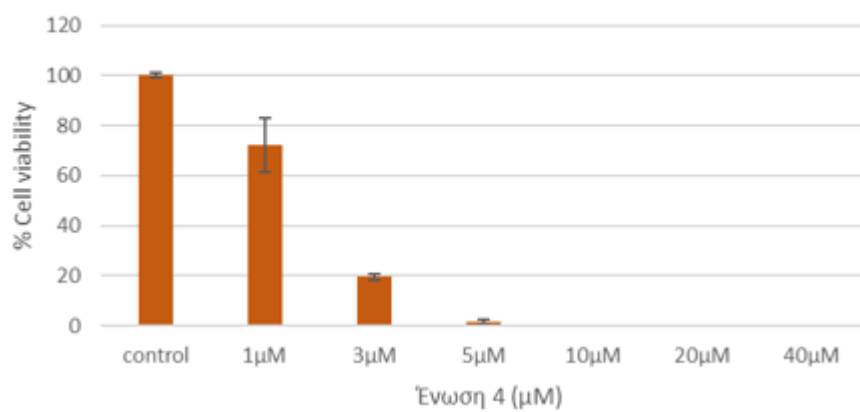
2.2.4.3. Πειράματα κυτταρικής βιωσιμότητας της ένωσης 4

Τα πειράματα κυτταρικής βιωσιμότητας της ένωσης 4 ελέγχθηκαν σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 και T98 (Εικόνα 9 και Εικόνα 9) και επιπλέον βρέθηκε η μέση συγκέντρωση αναστολής των παραπάνω κυττάρων (IC₅₀) ίση με 6,5 μM και 1,84 μM, για τα κύτταρα U87 και T98, αντίστοιχα.



Εικόνα 82. Διάγραμμα κυτταρικής βιωσιμότητας της ένωσης 4 σε καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87. Το IC₅₀ είναι ίσο με 6,5 μM.

Ένωση 4, T98



Εικόνα 83. Διάγραμμα κυτταρικής βιωσιμότητας της ένωσης 4 σε καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος T98. Το IC_{50} είναι ίσο με 1,84 μM .

Βιβλιογραφία

- [1] B. S. Chhikara and K. Parang, "Chemical Biology LETTERS Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis." [Online]. Available: <https://pubs.thesciencein.org/cbl>
- [2] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2022," *CA Cancer J Clin*, vol. 72, no. 1, pp. 7–33, Jan. 2022, doi: 10.3322/caac.21708.
- [3] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre," 2000.
- [4] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5. pp. 646–674, Mar. 04, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [5] D. Hanahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions," *Cancer Discovery*, vol. 12, no. 1. American Association for Cancer Research Inc., pp. 31–46, Jan. 01, 2022. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [6] R. Baghban *et al.*, "Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance," *Cell Communication and Signaling*, vol. 18, no. 1. BioMed Central Ltd., Apr. 07, 2020. doi: 10.1186/s12964-020-0530-4.
- [7] B. Arneht, "Tumor microenvironment," *Medicina (Lithuania)*, vol. 56, no. 1. MDPI AG, Jan. 01, 2020. doi: 10.3390/medicina56010015.
- [8] Y. Xiao and D. Yu, "Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 221. Elsevier Inc., May 01, 2021. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753.
- [9] N. M. Anderson and M. C. Simon, "The tumor microenvironment," *Current Biology*, vol. 30, no. 16. Cell Press, pp. R921–R925, Aug. 17, 2020. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.
- [10] T. Wu and Y. Dai, "Tumor microenvironment and therapeutic response," *Cancer Letters*, vol. 387. Elsevier Ireland Ltd, pp. 61–68, Feb. 28, 2017. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.043.
- [11] A. Tiwari, R. Trivedi, and S. Y. Lin, "Tumor microenvironment: barrier or opportunity towards effective cancer therapy," *Journal of Biomedical Science*, vol. 29, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2022. doi: 10.1186/s12929-022-00866-3.
- [12] D. C. Hinshaw and L. A. Shevde, "The tumor microenvironment innately modulates cancer progression," *Cancer Research*, vol. 79, no. 18. American Association for Cancer Research Inc., pp. 4557–4567, Sep. 15, 2019. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
- [13] E. L. Spurrell and M. Lockley, "Adaptive immunity in cancer immunology and therapeutics," *ecancermedicalscience*, vol. 8, no. 1. Cancer Intelligence, Jul. 02, 2014. doi: 10.3332/ecancer.2014.441.
- [14] A. Sarvaria, J. A. Madrigal, and A. Saudemont, "B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity," *Cellular and Molecular Immunology*, vol. 14, no. 8. Chinese Soc Immunology, pp. 662–674, Aug. 01, 2017. doi: 10.1038/cmi.2017.35.
- [15] A. J. McFarlane, F. Fercoq, S. B. Coffelt, and L. M. Carlin, "Neutrophil dynamics in the tumor microenvironment," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 131, no. 6. American Society for Clinical Investigation, Mar. 15, 2021. doi: 10.1172/JCI143759.
- [16] W. E. Crusio and H. H. Radeke, "Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 1273 Series Editors." [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/5584>
- [17] A. Labani-Motlagh, M. Ashja-Mahdavi, and A. Loskog, "The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses," *Frontiers in Immunology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., May 15, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.00940.

- [18] I. Vitale, G. Manic, L. M. Coussens, G. Kroemer, and L. Galluzzi, "Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment," *Cell Metabolism*, vol. 30, no. 1. Cell Press, pp. 36–50, Jul. 02, 2019. doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.001.
- [19] Y. Pan, Y. Yu, X. Wang, and T. Zhang, "Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity," *Frontiers in Immunology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Dec. 03, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.583084.
- [20] J. Kim and J. S. Bae, "Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment," *Mediators of Inflammation*, vol. 2016. Hindawi Limited, 2016. doi: 10.1155/2016/6058147.
- [21] Y. Li, L. Zhao, and X. F. Li, "Hypoxia and the Tumor Microenvironment," *Technology in Cancer Research and Treatment*, vol. 20. SAGE Publications Inc., 2021. doi: 10.1177/15330338211036304.
- [22] P. Vaupel and A. Mayer, "Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 26, no. 2. pp. 225–239, Jun. 2007. doi: 10.1007/s10555-007-9055-1.
- [23] A. Challapalli, L. Carroll, and E. O. Aboagye, "Molecular mechanisms of hypoxia in cancer," *Clinical and Translational Imaging*, vol. 5, no. 3. Springer-Verlag Italia s.r.l., pp. 225–253, Jun. 01, 2017. doi: 10.1007/s40336-017-0231-1.
- [24] M. C. Brahimi-Horn, J. Chiche, and J. Pouyssegur, "Hypoxia and cancer," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 85, no. 12. pp. 1301–1307, Dec. 2007. doi: 10.1007/s00109-007-0281-3.
- [25] D. Mennerich, K. Kubaichuk, and T. Kietzmann, "DUBs, Hypoxia, and Cancer," *Trends in Cancer*, vol. 5, no. 10. Cell Press, pp. 632–653, Oct. 01, 2019. doi: 10.1016/j.trecan.2019.08.005.
- [26] J. Zhou, T. Schmid, S. Schnitzer, and B. Brüne, "Tumor hypoxia and cancer progression," *Cancer Letters*, vol. 237, no. 1. Elsevier Ireland Ltd, pp. 10–21, Jun. 08, 2006. doi: 10.1016/j.canlet.2005.05.028.
- [27] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, and A. K. Azab, "The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy," *Hypoxia*, p. 83, Dec. 2015, doi: 10.2147/hp.s93413.
- [28] A. Sebestyén, L. Kopper, T. Dankó, and J. Tímár, "Hypoxia Signaling in Cancer: From Basics to Clinical Practice," *Pathology and Oncology Research*, vol. 27. Frontiers Media S.A., May 03, 2021. doi: 10.3389/pore.2021.1609802.
- [29] V. Bhandari *et al.*, "Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types," *Nat Genet*, vol. 51, no. 2, pp. 308–318, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41588-018-0318-2.
- [30] J. Wu, "The enhanced permeability and retention (Epr) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application," *Journal of Personalized Medicine*, vol. 11, no. 8. MDPI, Aug. 01, 2021. doi: 10.3390/jpm11080771.
- [31] H. Maeda, "Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond," *Journal of Controlled Release*, vol. 164, no. 2. pp. 138–144, Dec. 10, 2012. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.038.
- [32] H. Maeda, "Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 91. Elsevier B.V., pp. 3–6, Aug. 30, 2015. doi: 10.1016/j.addr.2015.01.002.
- [33] M. A. Subhan, S. S. K. Yalamarty, N. Filipczak, F. Parveen, and V. P. Torchilin, "Recent advances in tumor targeting via epr effect for cancer treatment," *Journal of Personalized Medicine*, vol. 11, no. 6. MDPI AG, Jun. 01, 2021. doi: 10.3390/jpm11060571.

- [34] Y. Nakamura, A. Mochida, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, "Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer?," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 27, no. 10. American Chemical Society, pp. 2225–2238, Oct. 19, 2016. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00437.
- [35] Y. H. Bae, R. J. Mersny, and K. Park, "Cancer Targeted Drug Delivery."
- [36] P. P. Hsu and D. M. Sabatini, "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond," *Cell*, vol. 134, no. 5. Elsevier B.V., pp. 703–707, Sep. 05, 2008. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.021.
- [37] P. S. Ward and C. B. Thompson, "Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate," *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3. Cell Press, pp. 297–308, Mar. 20, 2012. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.014.
- [38] J. Lu, "The Warburg metabolism fuels tumor metastasis," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 38, no. 1–2. Springer New York LLC, pp. 157–164, Jun. 15, 2019. doi: 10.1007/s10555-019-09794-5.
- [39] M. V. Liberti and J. W. Locasale, "The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 41, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 211–218, Mar. 01, 2016. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- [40] Z. Chen, W. Lu, C. Garcia-Prieto, and P. Huang, "The Warburg effect and its cancer therapeutic implications," *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 39, no. 3. pp. 267–274, Jun. 2007. doi: 10.1007/s10863-007-9086-x.
- [41] P. Vaupel and G. Multhoff, "Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding," *Journal of Physiology*, vol. 599, no. 6. John Wiley and Sons Inc, pp. 1745–1757, Mar. 01, 2021. doi: 10.1113/JP278810.
- [42] M. Arruebo *et al.*, "Assessment of the evolution of cancer treatment therapies," *Cancers*, vol. 3, no. 3. pp. 3279–3330, Sep. 2011. doi: 10.3390/cancers3033279.
- [43] S. Tohme, R. L. Simmons, and A. Tsung, "Surgery for cancer: A trigger for metastases," *Cancer Research*, vol. 77, no. 7. American Association for Cancer Research Inc., pp. 1548–1552, 2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1536.
- [44] J. D. Birkmeyer, Y. Sun, S. L. Wong, and T. A. Stukel, "Hospital volume and late survival after cancer surgery," *Ann Surg*, vol. 245, no. 5, pp. 777–783, May 2007, doi: 10.1097/01.sla.0000252402.33814.dd.
- [45] L. Wyld, R. A. Audisio, and G. J. Poston, "The evolution of cancer surgery and future perspectives," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 12, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 115–124, Feb. 17, 2015. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.191.
- [46] R. Sullivan *et al.*, "Global cancer surgery: Delivering safe, affordable, and timely cancer surgery," *The Lancet Oncology*, vol. 16, no. 11. Lancet Publishing Group, pp. 1193–1224, Sep. 01, 2015. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00223-5.
- [47] "Personal view Excisional surgery." [Online]. Available: <http://oncology.thelancet.com>
- [48] V. T. DeVita and E. Chu, "A history of cancer chemotherapy," *Cancer Research*, vol. 68, no. 21. pp. 8643–8653, Nov. 01, 2008. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.
- [49] B. G. Katzung, *Basic & clinical pharmacology*.
- [50] "chabner2005".
- [51] Q. Luo, L. Zhang, C. Luo, and M. Jiang, "Emerging strategies in cancer therapy combining chemotherapy with immunotherapy," *Cancer Letters*, vol. 454. Elsevier Ireland Ltd, pp. 191–203, Jul. 10, 2019. doi: 10.1016/j.canlet.2019.04.017.
- [52] T. A. Baudino, "Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment," 2015.
- [53] D. E. Gerber, "Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments," 2008. [Online]. Available: www.aafp.org/afp.

- [54] M. Vanneman and G. Dranoff, "Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment," *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, no. 4. pp. 237–251, Apr. 2012. doi: 10.1038/nrc3237.
- [55] Y. T. Lee, Y. J. Tan, and C. E. Oon, "Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity," *European Journal of Pharmacology*, vol. 834. Elsevier B.V., pp. 188–196, Sep. 05, 2018. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.07.034.
- [56] "Targetedtherapyforcancer-JCancerMol2006 μικρά μόρια και αντίσωμα".
- [57] C. Sawyers, "Targeted cancer therapy," *Nature*, vol. 432, no. 7015. pp. 294–297, Nov. 18, 2004. doi: 10.1038/nature03095.
- [58] C. Allen, S. Her, and D. A. Jaffray, "Radiotherapy for Cancer: Present and Future," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 109. Elsevier B.V., pp. 1–2, Jan. 15, 2017. doi: 10.1016/j.addr.2017.01.004.
- [59] Y. Anacak and S. Laskar, "PAEDIATRIC RADIATION ONCOLOGY," 2017. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/318207041>
- [60] H. H. W. Chen and M. T. Kuo, "Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges," 2017. [Online]. Available: www.impactjournals.com/oncotarget
- [61] G. Delaney, S. Jacob, C. Featherstone, and M. Barton, "The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines," *Cancer*, vol. 104, no. 6. pp. 1129–1137, Sep. 15, 2005. doi: 10.1002/cncr.21324.
- [62] H. Borghaei, M. R. Smith, and K. S. Campbell, "Immunotherapy of cancer," *European Journal of Pharmacology*, vol. 625, no. 1–3. pp. 41–54, Dec. 25, 2009. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.067.
- [63] J. M. Kirkwood, L. H. Butterfield, A. A. Tarhini, H. Zarour, P. Kalinski, and S. Ferrone, "Immunotherapy of cancer in 2012," *CA Cancer J Clin*, vol. 62, no. 5, pp. 309–335, Sep. 2012, doi: 10.3322/caac.20132.
- [64] C. J. M. Melief, R. E. M. Toes, J. P. Medema, S. H. Van Der Burg, and R. Offringa, "Strategies for Immunotherapy of Cancer," 2000.
- [65] L. Gattinoni, D. J. Powell, S. A. Rosenberg, and N. P. Restifo, "Adoptive immunotherapy for cancer: Building on success," *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 5. pp. 383–393, May 2006. doi: 10.1038/nri1842.
- [66] J. Abraham and J. Staffurth, "Hormonal therapy for cancer," *Medicine (United Kingdom)*, vol. 44, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 30–33, Jan. 01, 2016. doi: 10.1016/j.mpmed.2015.10.014.
- [67] M. Drăgănescu and C. Carmocan, "Hormone therapy in breast cancer," *Chirurgia (Romania)*, vol. 112, no. 4. Editura Celsius, pp. 413–417, Jul. 01, 2017. doi: 10.21614/chirurgia.112.4.413.
- [68] J. E. Axelrad *et al.*, "Hormone Therapy for Cancer Is a Risk Factor for Relapse of Inflammatory Bowel Diseases," *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 18, no. 4, pp. 872–880.e1, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.cgh.2019.06.042.
- [69] V. Shilling, V. Jenkins, L. Fallowfield, and T. Howell, "The effects of hormone therapy on cognition in breast cancer," in *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Ltd, 2003, pp. 405–412. doi: 10.1016/j.jsbmb.2003.07.001.
- [70] L. A. Bellm, J. B. Epstein, A. Rose-Ped, P. Martin, and H. J. Fuchs, "Patient reports of complications of bone marrow transplantation," *Supportive Care in Cancer*, vol. 8, no. 1, pp. 33–39, 2000, doi: 10.1007/s005209900095.

- [71] M. R. Widows, P. B. Jacobsen, M. Booth-Jones, and K. K. Fields, "Predictors of posttraumatic growth following bone marrow transplantation for cancer," *Health Psychology*, vol. 24, no. 3, pp. 266–273, May 2005, doi: 10.1037/0278-6133.24.3.266.
- [72] R. E. Ochelle C Urtis *et al.*, "SOLID CANCERS AFTER BONE MARROW TRANSPLANTATION A BSTRACT Background The late effects of bone marrow trans," 1997.
- [73] "thomas1975".
- [74] H. Hatzikirou, A. Deutsch, C. Schaller, M. Simon, and K. Swanson, "MATHEMATICAL MODELLING OF GLIOBLASTOMA TUMOUR DEVELOPMENT: A REVIEW," 2005. [Online]. Available: www.worldscientific.com
- [75] N. A. O. Bush, S. M. Chang, and M. S. Berger, "Current and future strategies for treatment of glioma," *Neurosurgical Review*, vol. 40, no. 1. Springer Verlag, Jan. 01, 2017. doi: 10.1007/s10143-016-0709-8.
- [76] Y. Jiang and L. Uhrbom, "On the origin of glioma," *Ups J Med Sci*, vol. 117, no. 2, pp. 113–121, May 2012, doi: 10.3109/03009734.2012.658976.
- [77] A. N. Mamelak and D. B. Jacoby, "Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601)," *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 4, no. 2, pp. 175–186, Mar. 2007, doi: 10.1517/17425247.4.2.175.
- [78] M. L. Goodenberger and R. B. Jenkins, "Genetics of adult glioma," *Cancer Genetics*, vol. 205, no. 12. pp. 613–621, Dec. 2012. doi: 10.1016/j.cancergen.2012.10.009.
- [79] J. M. Günel, J. M. Piepmeier, and J. M. Baehring Editors, "Malignant Brain Tumors State-of-the-Art Treatment."
- [80] D. Persaud-Sharma, J. Burns, J. Trangle, and S. Moulik, "Disparities in Brain Cancer in the United States: A Literature Review of Gliomas," *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, vol. 5, no. 3. NLM (Medline), Jul. 25, 2017. doi: 10.3390/medsci5030016.
- [81] E. A. Maher *et al.*, "Malignant glioma: Genetics and biology of a grave matter," *Genes and Development*, vol. 15, no. 11. pp. 1311–1333, 2001. doi: 10.1101/gad.891601.
- [82] D. N. Louis *et al.*, "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary," *Acta Neuropathologica*, vol. 131, no. 6. Springer Verlag, pp. 803–820, Jun. 01, 2016. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- [83] O. Rominiyi, A. Vanderlinden, S. J. Clenton, C. Bridgewater, Y. Al-Tamimi, and S. J. Collis, "Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions," *British Journal of Cancer*, vol. 124, no. 4. Springer Nature, pp. 697–709, Feb. 16, 2021. doi: 10.1038/s41416-020-01136-5.
- [84] M. Weller, E. Le Rhun, M. Preusser, J. C. Tonn, and P. Roth, "How we treat glioblastoma," *ESMO Open*, vol. 4. BMJ Publishing Group, Jun. 01, 2019. doi: 10.1136/esmoopen-2019-000520.
- [85] H. Ohgaki and P. Kleihues, "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma," *American Journal of Pathology*, vol. 170, no. 5. American Society for Investigative Pathology Inc., pp. 1445–1453, 2007. doi: 10.2353/ajpath.2007.070011.
- [86] O. G. Taylor, J. S. Brzozowski, and K. A. Skelding, "Glioblastoma multiforme: An overview of emerging therapeutic targets," *Frontiers in Oncology*, vol. 9, no. SEP. Frontiers Media S.A., Sep. 01, 2019. doi: 10.3389/fonc.2019.00963.
- [87] G. Breier, "Functions of the VEGF/VEGF Receptor System in the Vascular System," 2000.
- [88] R. Roskoski, "VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 375, no. 3. pp. 287–291, Oct. 24, 2008. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.121.

- [89] N. Vaismanz, D. Gospodarowicz, and G. Neufeldsll, "Characterization of the Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor*," 1990.
- [90] M. Clauss, "Molecular Biology of the VEGF and the VEGF Receptor Family," 2000.
- [91] E. Stutfeld and K. Ballmer-Hofer, "Structure and function of VEGF receptors," *IUBMB Life*, vol. 61, no. 9. pp. 915–922, 2009. doi: 10.1002/iub.234.
- [92] H. Takahashi and M. Shibuya, "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions," *Clinical Science*, vol. 109, no. 3. pp. 227–241, Sep. 2005. doi: 10.1042/CS20040370.
- [93] F. S. Grünwald, A. E. Prota, A. Giese, and K. Ballmer-Hofer, "Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling," *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, vol. 1804, no. 3. pp. 567–580, Mar. 2010. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.09.002.
- [94] M. Shibuya and L. Claesson-Welsh, "Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis," *Experimental Cell Research*, vol. 312, no. 5. Academic Press Inc., pp. 549–560, Mar. 10, 2006. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012.
- [95] S. Koch, S. Tugues, X. Li, L. Gualandi, and L. Claesson-Welsh, "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors," *Biochemical Journal*, vol. 437, no. 2. pp. 169–183, Jul. 15, 2011. doi: 10.1042/BJ20110301.
- [96] M. Shibuya, "Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis.," *Angiogenesis*, vol. 9, no. 4. pp. 225–230, 2006. doi: 10.1007/s10456-006-9055-8.
- [97] S. Guo, L. S. Colbert, M. Fuller, Y. Zhang, and R. R. Gonzalez-Perez, "Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1806, no. 1. pp. 108–121, Aug. 2010. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.04.004.
- [98] "Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis".
- [99] Q. Zhou, V. W. Y. Lui, and W. Yeo, "Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma," *Future Oncology*, vol. 7, no. 10. pp. 1149–1167, Oct. 2011. doi: 10.2217/fon.11.95.
- [100] T. T. Wu *et al.*, "Design, synthesis and bioevaluation of novel substituted triazines as potential dual PI3K/mTOR inhibitors," *Eur J Med Chem*, vol. 204, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112637.
- [101] D. Rageot *et al.*, "(S)-4-(Difluoromethyl)-5-(4-(3-methylmorpholino)-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)pyridin-2-amine (PQR530), a Potent, Orally Bioavailable, and Brain-Penetrable Dual Inhibitor of Class i PI3K and mTOR Kinase," *J Med Chem*, vol. 62, no. 13, pp. 6241–6261, Jul. 2019, doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00525.
- [102] L. Zhong *et al.*, "Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6, no. 1. Springer Nature, Dec. 01, 2021. doi: 10.1038/s41392-021-00572-w.
- [103] P. L. Bedard, D. M. Hyman, M. S. Davids, and L. L. Siu, "Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology," *The Lancet*, vol. 395, no. 10229. Lancet Publishing Group, pp. 1078–1088, Mar. 28, 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30164-1.
- [104] W. D. Joo, I. Visintin, and G. Mor, "Targeted cancer therapy - Are the days of systemic chemotherapy numbered?," *Maturitas*, vol. 76, no. 4. pp. 308–314, Dec. 2013. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.09.008.

- [105] Y. T. Lee, Y. J. Tan, and C. E. Oon, "Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity," *European Journal of Pharmacology*, vol. 834. Elsevier B.V., pp. 188–196, Sep. 05, 2018. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.07.034.
- [106] H. Y. Min and H. Y. Lee, "Molecular targeted therapy for anticancer treatment," *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 54, no. 10. Springer Nature, pp. 1670–1694, Oct. 01, 2022. doi: 10.1038/s12276-022-00864-3.
- [107] D. Wu, Y. Gao, Y. Qi, L. Chen, Y. Ma, and Y. Li, "Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge," *Cancer Letters*, vol. 351, no. 1. Elsevier Ireland Ltd, pp. 13–22, Aug. 28, 2014. doi: 10.1016/j.canlet.2014.05.002.
- [108] J. Thundimadathil, "Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects," *J Amino Acids*, vol. 2012, pp. 1–13, Dec. 2012, doi: 10.1155/2012/967347.
- [109] M. Xie, D. Liu, and Y. Yang, "Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification," *Open Biology*, vol. 10, no. 7. Royal Society Publishing, Jul. 01, 2020. doi: 10.1098/rsob.200004.
- [110] K. Kurrikoff, D. Aphkhazava, and Ü. Langel, "The future of peptides in cancer treatment," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 47. Elsevier Ltd, pp. 27–32, Aug. 01, 2019. doi: 10.1016/j.coph.2019.01.008.
- [111] G. L. Bidwell and D. Raucher, "Therapeutic peptides for cancer therapy. Part I - Peptide inhibitors of signal transduction cascades," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 6, no. 10. pp. 1033–1047, Oct. 2009. doi: 10.1517/17425240903143745.
- [112] D. Raucher, S. Moktan, I. Massodi, and G. L. Bidwell, "Therapeutic peptides for cancer therapy. Part II - Cell cycle inhibitory peptides and apoptosis-inducing peptides," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 6, no. 10. pp. 1049–1064, Oct. 2009. doi: 10.1517/17425240903158909.
- [113] P. Hoppenz, S. Els-Heindl, and A. G. Beck-Sickinger, "Peptide-Drug Conjugates and Their Targets in Advanced Cancer Therapies," *Frontiers in Chemistry*, vol. 8. Frontiers Media S.A., Jul. 07, 2020. doi: 10.3389/fchem.2020.00571.
- [114] A. Sunna, "Peptides and Peptide-based Biomaterials and their Biomedical Applications," 1030. [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/5584>
- [115] A. Ellert-Miklaszewska, K. Poleszak, and B. Kaminska, "Short peptides interfering with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 9, no. 2. Future Medicine Ltd., pp. 199–221, Feb. 01, 2017. doi: 10.4155/fmc-2016-0189.
- [116] M. R. Felício, O. N. Silva, S. Gonçalves, N. C. Santos, and O. L. Franco, "Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities," *Frontiers in Chemistry*, vol. 5, no. Feb. Frontiers Media S. A, 2017. doi: 10.3389/fchem.2017.00005.
- [117] P. Zanjanchi, S. M. Asghari, H. Mohabatkar, M. Shourian, and M. Shafiee Ardestani, "Conjugation of VEGFR1/R2-targeting peptide with gold nanoparticles to enhance antiangiogenic and antitumoral activity," *J Nanobiotechnology*, vol. 20, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12951-021-01198-4.
- [118] A. Sadremomtaz *et al.*, "Molecular docking, synthesis and biological evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) B based peptide as antiangiogenic agent targeting the second domain of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR1D2) for anticancer application," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 5, no. 1. Springer Nature, Dec. 01, 2020. doi: 10.1038/s41392-020-0177-z.
- [119] M. Namjoo, H. Ghafoori, and S. M. Asghari, "VGB3 Induces Apoptosis by Inhibiting Phosphorylation of NF-κB p65 at Serine 536 in the Human Umbilical Vein Endothelial Cells", doi: 10.29252/mlj.17.1.7.

- [120] Y. Fang *et al.*, “Dual-modality Imaging of Angiogenesis in Unstable Atherosclerotic Plaques with VEGFR2-Targeted Upconversion Nanoprobes *in vivo*,” *Mol Imaging Biol*, vol. 24, no. 5, pp. 721–731, Oct. 2022, doi: 10.1007/s11307-022-01721-5.
- [121] B. Merrifield, “Solid Phase Synthesis on a Solid Matrix.” [Online]. Available: www.sciencemag.org
- [122] L. Münzker, A. Oddo, and P. R. Hansen, “Chemical synthesis of antimicrobial peptides,” in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2017, pp. 35–49. doi: 10.1007/978-1-4939-6737-7_3.
- [123] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, and G. Subra, “Modern Solid Phase Peptide Synthesis 239 MOLECULAR BIOTECHNOLOGY Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis,” 2006.
- [124] G. B. Fields, “Introduction to Peptide Synthesis,” *Curr Protoc Protein Sci*, vol. 26, no. 1, Dec. 2001, doi: 10.1002/0471140864.ps1801s26.
- [125] O. Al Musaimi, A. Basso, B. G. De La Torre, and F. Albericio, “Calculating Resin Functionalization in Solid-Phase Peptide Synthesis Using a Standardized Method based on Fmoc Determination,” *ACS Comb Sci*, vol. 21, no. 11, pp. 717–721, Nov. 2019, doi: 10.1021/acscombsci.9b00154.
- [126] G. B. Fields and R. L. Noble, “Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids,” 1990.
- [127] M. A. Omary and H. H. Patterson, “Luminescence, Theory.”
- [128] W. G. Jerome, “The Theory of Fluorescence,” in *Basic Confocal Microscopy: Second Edition*, Springer International Publishing, 2018, pp. 21–36. doi: 10.1007/978-3-319-97454-5_2.
- [129] M. W. Davidson, “Alexander Jablonski, PhD,” *Lab Med*, vol. 40, no. 11, pp. 694–695, Nov. 2009, doi: 10.1309/lmyh007zkfvffrc.
- [130] N. S. White and R. J. Errington, “Fluorescence techniques for drug delivery research: Theory and practice,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 1 SPEC. ISS. Elsevier B.V., pp. 17–42, Jan. 02, 2005. doi: 10.1016/j.addr.2004.08.003.
- [131] J. R. Lakowicz, “Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition.”
- [132] W. L. Gray Jerome Robert Price, “Basic Confocal Microscopy.”
- [133] P. T. So and C. Y. Dong, “Fluorescence Spectrophotometry.” [Online]. Available: www.els.net
- [134] C. A. Hoelzel *et al.*, “A General Strategy to Enhance Donor-Acceptor Molecules Using Solvent-Excluding Substituents,” *Angewandte Chemie*, vol. 132, no. 12, pp. 4815–4822, Mar. 2020, doi: 10.1002/ange.201915744.
- [135] I. S. Park, H. Komiyama, and T. Yasuda, “Pyrimidine-based twisted donor-acceptor delayed fluorescence molecules: a new universal platform for highly efficient blue electroluminescence,” *Chem Sci*, vol. 8, no. 2, pp. 953–960, 2017, doi: 10.1039/c6sc03793c.
- [136] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, and A. Siemiarz, “DUAL FLUORESCENCE OF DONOR-ACCEPTOR MOLECULES AND THE TWISTED INTRAMOLECULAR CHARGE TRANSFER (TICT) STATES,” 1979.
- [137] P. K. Samanta and R. Misra, “Intramolecular charge transfer for optical applications,” *J Appl Phys*, vol. 133, no. 2, Jan. 2023, doi: 10.1063/5.0131426.
- [138] “2 Brief History of ICT Molecules 2.1 Introduction,” 2018.
- [139] M. Hao, W. Chi, C. Wang, Z. Xu, Z. Li, and X. Liu, “Molecular Origins of Photoinduced Backward Intramolecular Charge Transfer,” *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 124, no. 31, pp. 16820–16826, Aug. 2020, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c04218.

- [140] S. Lee, M. Jen, T. Jang, G. Lee, and Y. Pang, "Twisted intramolecular charge transfer of nitroaromatic push-pull chromophores," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-10565-6.