



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ



ΔΠΜΣ: «Ιατρική Χημεία»



**«IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΨΥΧΩΣΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΟΦΙΑ ΓΑΛΑΝΙΔΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

A.M. 292

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΜΑΡΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΗ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
1.	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Καρκίνος: Ιστορική αναδρομή.....	6
1.2 Καρκίνος.....	8
1.3 Αντινεοπλασματικά φάρμακα.....	10
1.4 Νεότερες Αντινεοπλασματικές Θεραπείες	26
1.5 Κυτταρικός θάνατος	39
1.5.1 Απόπτωση.....	39
1.5.2 Αυτοφαγία.....	45
1.5.3 Νέκρωση.....	53
1.6 Καρκινογένεση.....	59
1.6.1 Μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης σχετιζόμενα με την καρκινογένεση.....	59
1.6.2 Στάδια καρκινογένεσης.....	70
1.6.3 Χημική καρκινογένεση.....	73
1.7 Καρκίνος του μαστού.....	75
2. Σχιζοφρένεια	91
2.1 Σχιζοφρένεια και καρκίνος.....	91
2.2 Παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας.....	95
2.3 Ντοπαμινεργικοί υποδοχείς	105
2.4 Φαρμακευτική αγωγή κατά της σχιζοφρένειας - αντιψυχωσικά	110

3. Drug Repurposing.....	113
4. ΣΚΟΠΟΣ.....	116
5. Μεθοδολογικές Προσεγγίσεις στην Προκλινική και Κλινική Έρευνα Επαναστόχευσης Αντιψυχωσικών Φαρμάκων στον Καρκίνο του Μαστού.....	117
5.1.1 Ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών.....	117
5.1.2 Αποθήκευση των κυττάρων στο υγρό άζωτο (Κρυοσυντήρηση)-Ανασύσταση των κυττάρων από το υγρό άζωτο.....	118
5.1.3 Επανακαλλιέργεια κυττάρων-Ανανέωση του μέσου.....	120
5.1.4 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.....	121
5.1.5 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση Σουλφοροδαμίνης Β (SRB assay).....	122
5.1.6 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry).....	124
5.1.7 Ανάλυση της απόπτωσης μέσω της δοκιμασίας annexin V- PI (Propidium Iodine).....	125
5.1.8 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών του κυττάρου (TCP).....	126
5.1.9. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο BCA.....	127
5.1.10 Ανοσοαποτύπωση Western Blot.....	129
5.1.11 Φαρμακολογικοί Χειρισμοί.....	132
5.1.12 Στατιστική Ανάλυση.....	132
5.1.13 Κυτταρικές Σειρές.....	132

6. Παρουσίαση Ενδεικτικών Ευρημάτων της Χρήσης Αντιψυχωσικών στο πλαίσιο της Επαναστόχευσης Φαρμάκων.....	133
6.1 Αξιολόγηση της επίδρασης της αριπιπραζόλης στα καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού.....	135
6.2 Αξιολόγηση της επίδρασης της χλωροπρομαζίνης στα καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού.....	141
6.3 Αξιολόγηση της επίδρασης της πιμοζίδης στα καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού.....	147
7. Διερεύνηση στάσεων του κοινού στην επαναστόχευση αντιψυχωσικών φαρμάκων στον καρκίνο του μαστού.....	169
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	187
9. ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ ABSTRACT.....	188
10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	189

Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και Διευθύντρια του εργαστηρίου, Δρ. **Μαρία Κωνσταντή** για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας που εκπόνησα, καθώς και την αδιάλειπτη καθοδήγησή της. Ως επιβλέπουσα, μου παρείχε πολύτιμη γνώση και αξιόλογες συμβουλές.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους Δρ. **Περικλή Παππά**, Καθηγητή Φαρμακολογίας και Δρ. **Γεώργιο Λεονταρίτη**, Επίκουρο Καθηγητή, οι οποίοι είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής, καθώς και την Καθηγήτρια Δρ. **Αικατερίνη Αντωνίου**. Η διάδραση μαζί τους, σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου πορείας, υπήρξε άκρως διαφωτιστική, με «μύησή» μου στη Φαρμακοκινητική και Φαρμακοδυναμική, αντίστοιχα, μείζονος σημασίας πυλώνες του αντικειμένου της Φαρμακολογίας, στο οποίο και εντρυφά η παρούσα διπλωματική εργασία.

Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την έκφραση της ευγνωμοσύνης στην διδάκτορα **Ειρήνη – Χριστίνα Ανδριοπούλου**, τον υποψήφιο διδάκτορα **Αριστείδη Κοφινά**, καθώς και την απόφοιτη του Τμήματος Βιολογικών Επιστημών και Τεχνολογιών, **Εμμανουέλα Επεσλίδου** για την συνύπαρξή μας στο εργαστήριο και την αρωγή τους στην αποπεράτωση της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστίες απονέμονται, εξίσου, και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας για την προθυμία τους για βοήθεια και το αρμονικό κλίμα συνεργασίας, που διαμόρφωσαν.

Κλείνοντας, το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένειά μου, με ξεχωριστή έμφαση στην μητέρα και την αδερφή μου, τον φίλο μου, Ηλία, τους φίλους και τους μαθητές μου, για την αμέριστη υποστήριξή τους και την πίστη τους σε εμένα, που αποτέλεσε «ασπίδα προστασίας». Η εν λόγω εργασία «ακροβατεί» μεταξύ των δύο εκφάνσεων του καρκίνου, της αρνητικής και θετικής του έκβασης, γι' αυτό και αφιερώνεται, ιδιαίτερα, στην κυρία Καλλιόπη, οικογενειακή φίλη, που δεν στάθηκε νικήτρια στην άνιση μάχη, αλλά και στην κυρία Βασιλική, που αποτελεί οικογενειακό μέλος, πλέον, που αποτελεί επιζήσασα καρκίνου του μαστού κι ένα «φωτεινό» παράδειγμα ζωής.

1. Εισαγωγή

1.1. Καρκίνος: Ιστορική Αναδρομή

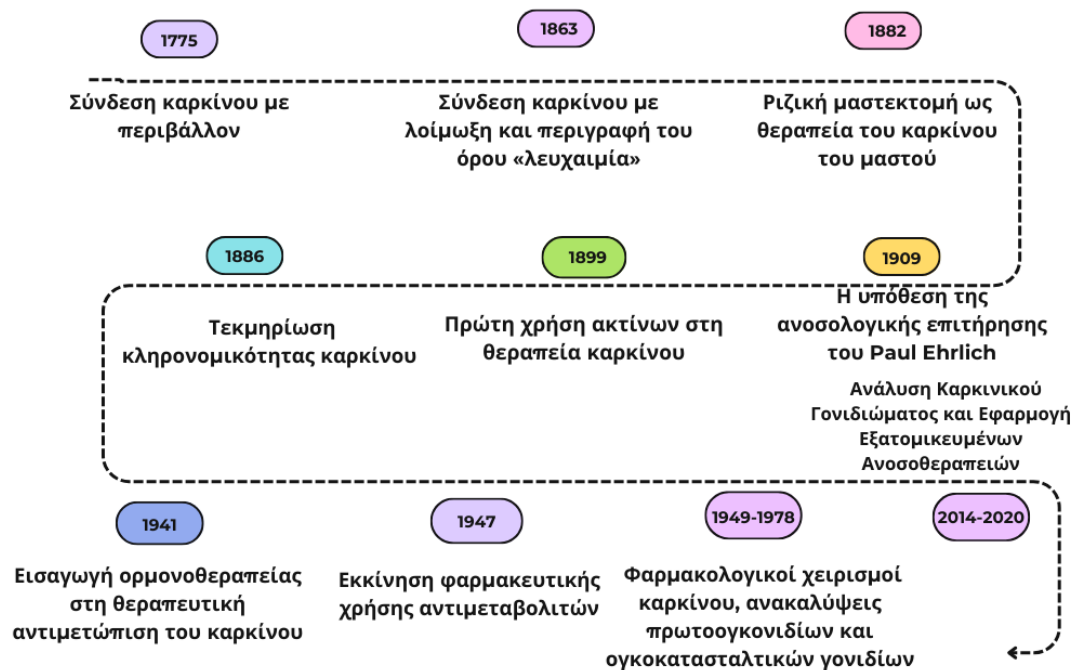
Ο καρκίνος έχει πλήξει την ανθρωπότητα από τους προϊστορικούς χρόνους, αν και η εξάπλωσή του παγιώθηκε ραγδαία τις τελευταίες δεκαετίες, σε συνδυασμό με την ταχεία γήρανση του πληθυσμού και, τον τελευταίο μισό αιώνα, την αυξανόμενη παρουσία καρκινογόνων ουσιών στο περιβάλλον και στα καταναλωτικά προϊόντα.

Η παλαιότερη αξιόπιστη απόδειξη καρκίνου στα θηλαστικά αποτελούνταν από μάζες όγκων που βρίσκονταν σε απολιθωμένους δεινόσαυρους και ανθρώπινα οστά από την προϊστορική εποχή. Ακόμη και στην αρχαιότητα, ο Ιπποκράτης αναγνώριζε την ύπαρξή του. Ο πατέρας της ιατρικής, (460-370 π.Χ.), ήταν ο πρώτος που επινόησε τον όρο «όγκοι», αν και δεν ήταν αυτός που αποκάλυψε την ύπαρξη αυτής της ασθένειας. Το παλαιότερο γραπτό αρχείο που θεωρείται ότι περιγράφει τον ανθρώπινο καρκίνο εμφανίστηκε σε αρχαία αιγυπτιακά χειρόγραφα, που ανακαλύφθηκαν τον 19ο αιώνα, με έμφαση στους παπύρους των Edwin Smith και George Ebers, που περιγράφουν χειρουργικές και φαρμακολογικές θεραπείες, που γράφτηκαν μεταξύ 1500 και 1600 π.Χ.

Εμβαθύνοντας στον χρόνο, περίπου 2000 χρόνια μετά, το 1775, ο Percivall Pott εντοπίζει μια σχέση μεταξύ της έκθεσης στην αιθάλη της καμινάδας και της συχνότητας του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του οσχέου μεταξύ των καπνοδοχοκαθαριστών. Η έκθεσή του είναι η πρώτη που συνδέει ξεκάθαρα μια περιβαλλοντική έκθεση με την ανάπτυξη καρκίνου. Λίγο αργότερα, το 1863, ο Rudolph Virchow εντοπίζει λευκά αιμοσφαίρια στον καρκινικό ιστό, επιχειρώντας την πρώτη σύνδεση μεταξύ φλεγμονής και καρκίνου. Ο ίδιος επινόησε και τον όρο «λευχαιμία», γεγονός που τον κατέστησε τον πρώτο άνθρωπο που περιέγραψε τον υπερβολικό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα ασθενών με αυτή την ασθένεια. Περίπου μια εικοσαετία μετά, το 1882, πραγματοποιήθηκε η πρώτη ριζική μαστεκτομή για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού από τον William Halsted. Το αξιοσημείωτο είναι πως η συγκεκριμένη χειρουργική επέμβαση παραμένει η τυπική επέμβαση για τον καρκίνο του μαστού μέχρι το δεύτερο μισό του 20ου αιώνα. Εν συνεχεία, το 1886, ο Βραζιλιάνος οφθαλμίατρος Hilário de Gounêa παρείχε τα πρώτα τεκμηριωμένα στοιχεία ότι ο καρκίνος μπορεί να κληρονομηθεί από έναν γονέα σε κάποιο απόγονό του. Έπειτα, το 1898, η Marie και ο Pierre Curie ανακάλυψαν τα ραδιενεργά στοιχεία ράδιο και πολώνιο. Μέσα σε λίγα χρόνια, μάλιστα, επιστρατεύτηκε η χρήση του ραδίου στη θεραπεία του καρκίνου. Έναν χρόνο μετά, έλαβε χώρα η χρήση της ακτινοθεραπείας για την ίαση του καρκίνου, σε περιπτώσεις βασικοκυτταρικού καρκινώματος του δέρματος και ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του δέρματος. Το 1909 αποτέλεσε έτος «ορόσημο» της ιστορικής αναδρομής του καρκίνου, καθώς ο Paul Ehrlich πρότεινε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα καταστέλλει τον σχηματισμό όγκων, μια πρόταση που έγινε ευρύτερα γνωστή ως υπόθεση της «ανοσολογικής επιτήρησης».

Αυτή η πρόταση έδωσε μεγάλη ώθηση στην έρευνα γύρω από τον καρκίνο, η οποία συνεχίζεται σήμερα, να αξιοποιήσει τη δύναμη του ανοσοποιητικού συστήματος για την καταπολέμηση του καρκίνου. Επιπλέον, εστιάζοντας συγκεκριμένα στον καρκίνο του μαστού, το 1932, ο David H. Patey ανέπτυξε την τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή, μια λιγότερο παραμορφωτική παρέμβαση από τη ριζική μαστεκτομή, που, τελικά, την αντικατέστησε ως τυπική χειρουργική θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού. Μια άλλη χειρουργική προσέγγιση του ίδιου τύπου καρκίνου ήταν, το 1937, η θεραπεία του καρκίνου του μαστού με χειρουργική επέμβαση διατήρησης του μαστού, που ακολουθείται από ακτινοθεραπεία, με εισαγωγή βελόνων, που περιέχουν ράδιο, σε όλο τον προσβεβλημένο μαστό και κοντά στους παρακείμενους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Πίσω από αυτήν, βρισκόταν ο Sir Geoffrey Keynes. Μια διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση αποτέλεσε η ορμονοθεραπεία, η οποία έκανε την εμφάνισή της το 1941, ως κεντρικός άξονας της θεραπείας του καρκίνου του προστάτη. Εξίσου σημαντικός παράγοντας στην ίαση του καρκίνου ήταν οι αντιμεταβολίτες, φάρμακα, δομικά παρόμοια με χημικές ουσίες, που απαιτούνται για σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η σύνθεση DNA, επιφέροντας κυτταρικό θάνατο εμποδίζοντας αυτές τις διαδικασίες. Η δομή των αντιμεταβολιτών έχει μια εντυπωσιακή ομοιότητα με τους ζωτικούς μεταβολίτες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία των κυττάρων, είτε με το να ενσωματώνονται σε νεοσυντιθέμενο πυρηνικό υλικό είτε να εμπλέκονται σε ανταγωνισμό με βασικά ένζυμα, με αποτέλεσμα τη διακοπή της λειτουργίας και της διαίρεσης των κυττάρων. Κάποια έτη αργότερα, το 1984, ανακαλύφθηκε το γονίδιο HER2, ένα νέο ογκογονίδιο, που εντοπίστηκε σε κύτταρα αρουραίου, αποκαλούμενο ως «neu». Η ανθρώπινη «εκδοχή» αυτού του γονιδίου, που ονομάζεται HER2 (και ErbB2), υπερεκφράζεται σε περίπου 20% έως 25% των καρκίνων του μαστού (γνωστοί ως HER2-θετικοί καρκίνοι του μαστού) και σχετίζεται με πιο επιθετική νόσο και κακή πρόγνωση. Όμοια συμπεράσματα εξήχθησαν και από την μελέτη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου BRCA1. Βρέθηκε ότι η κληρονομικότητα συγκεκριμένων μεταλλάξεων του γονιδίου BRCA1 αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών στις γυναίκες και τους κινδύνους που ενέχουν αρκετοί άλλοι καρκίνοι, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Ακριβώς το ίδιο τεκμηριώθηκε ότι συμβαίνει και σε μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA2. Κατόπιν πολυάριθμων φαρμάκων που κυκλοφόρησαν έως το 2000, όπως η αναστροζόλη, που εγκρίθηκε, για τη θεραπεία του καρκίνου, ως ο πρώτος αναστολέας αρωματάσης, εμποδίζοντας την παραγωγή οιστρογόνων στο σώμα, αλλά και η τραστουζουμάμπη, μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τα καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο HER2, για τη θεραπεία γυναικών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού θετικό στο HER2, συνιστώντας επικουρική, μετεγχειρητική θεραπεία γυναικών με HER2⁺ καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου, ο δρόμος «άνοιξε» για την ανάληψη πρωτοβουλιών εφαρμογής ρηξικέλευθων ερευνητικών προσεγγίσεων του καρκίνου. Χαρακτηριστικά, το 2014, μέσα από το έργο «Άτλας του Καρκινικού Γονιδιώματος», The Cancer Genome Atlas (TCGA), ερευνητές επιχείρησαν την ανάλυση του DNA και άλλων μοριακών αλλαγών σε περισσότερους από 30 τύπους ανθρώπινου καρκίνου, διαπιστώνοντας ότι ο καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική νόσος, με μεγάλη πολυπλοκότητα και ετερογένεια, ακόμα και ως προς τα

χαρακτηριστικά των όγκων. Αυτό το εύρημα, σε συνδυασμό με άλλα σχετικά έργα, έθεσαν τις βάσεις για την εδραίωση ενός νέου συστήματος ταξινόμησης για τον καρκίνο, στο οποίο οι καρκίνοι ταξινομούνται με βάση τις μοριακές τους ανωμαλίες και το όργανο ή τον ιστό προέλευσης. Η καινοτομία συνέχισε να πρωταγωνιστεί στο πεδίο της έρευνας με την εφαρμογή των πρώτων ανοσοθεραπειών, με χρήση T-κυττάρων, με χημειικούς υποδοχείς αντιγόνου (CAR), που είναι εξατομικευμένες για κάθε ασθενή. Για να δημιουργηθούν αυτές οι θεραπείες, τα T-κύτταρα αφαιρούνται από τον ασθενή, τροποποιούνται γενετικά για να αναγνωρίζουν ειδικά για τον καρκίνο αντιγόνα, αναπτύσσονται σε μεγάλους αριθμούς στο εργαστήριο και στη συνέχεια εγχέονται πίσω στον ασθενή για να πυροδοτήσουν την επίθεση στα καρκινικά κύτταρα από το ανοσοποιητικό του σύστημα. Το ίδιο έτος σηματοδοτήθηκε από την υλοποίηση Δοκιμασιών Ανάλυσης του Γονιδιωματικού Προφίλ (Genomic Profiling Tests), ως διαγνωστικό εργαλείο, για εκατοντάδες, συσχετιζόμενα με την καρκινογένεση, γονίδια, δεκάδων καρκινικών τύπων, ερευνητική προσπάθεια που εμπλουτίστηκε, κατά τα έτη 2018 και 2020, με τις μελέτες Pan-Cancer Atlas και Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes, αντίστοιχα, λεπτομερείς γονιδιωματικές αναλύσεις μοριακών και κλινικών δεδομένων, από περισσότερους από 10.000 όγκους, με τις οποίες, επιτεύχθηκε η πλήρης κατανόηση του πώς, πού και γιατί εμφανίζονται οι όγκοι στους ανθρώπους. Πέραν αυτής, αποκαλύφθηκε ο καταλυτικός ρόλος που διαδραματίζουν οι αλλαγές σε όλο το γονιδίωμα στην ανάπτυξη και εξάπλωση του καρκίνου, ενώ η έρευνα επεκτάθηκε στην ανάλυση του γενετικού υλικού και σε μη κωδικοποιούσες περιοχές, προς εξαγωγή περαιτέρω συμπερασμάτων γύρω από τον καρκίνο.



Εικόνα 1: Χρονογραμμή ανακαλύψεων στην ιστορία του καρκίνου

1.2 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική ασθένεια που παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία στην παθογένεια, την ανάπτυξη και την έκβασή της μεταξύ των ασθενών. Αυτή η ετερογένεια είναι εμφανής και σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Κατά την πορεία του καρκίνου, τα κύτταρα υποβάλλονται σε αλλαγές που οδηγούν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους, καθιστώντας τα ικανά να αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα και την απόπτωση, ενώ ταυτόχρονα αποκτούν την ικανότητα να εισβάλλουν σε άλλους ιστούς και να δημιουργούν μεταστάσεις.

Οι καρκινικοί όγκοι μπορεί να παραμείνουν ασυμπτωματικοί για μεγάλο χρονικό διάστημα, αλλά τελικά προκαλούν συμπτώματα που εξαρτώνται από τη θέση και την εξάπλωσή τους. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες όγκων: οι καλοήθεις, που παραμένουν στον ιστό προέλευσής τους, και οι κακοήθεις, που μπορούν να εξαπλωθούν σε άλλους ιστούς.

Η διαδικασία της ογκογένεσης, δηλαδή η ανάπτυξη καρκίνου, περιλαμβάνει διάφορα στάδια, όπως η έναρξη (initiation), η προαγωγή (promotion) και η εξέλιξη του όγκου (progression). Στα στάδια αυτά εμπλέκονται γενετικές μεταλλάξεις σε δύο κατηγορίες γονιδίων: τα ογκογονίδια, που προάγουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που περιορίζουν αυτή τη διαδικασία.

Τα ογκογονίδια παράγουν πρωτεΐνες που μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο μεταβάλλοντας τον φαινότυπο των κυττάρων, ενώ τα ογκοκατασταλτικά γονίδια δρουν ως προστατευτικοί μηχανισμοί που εμποδίζουν την ανάπτυξη του καρκίνου. Η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι απαραίτητη για την πρόοδο της νόσου.

Η κατανόηση αυτών των διεργασιών είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη νέων θεραπειών και τη βελτίωση της διαχείρισης του καρκίνου.

1.3 Αντινεοπλασματικά φάρμακα

Τα τελευταία έτη έχει σημειωθεί σημαντική αύξηση στη χρήση των αντινεοπλασματικών (γνωστών και ως αντικαρκινικών ή κυτταροστατικών) και ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία κακοήθων νεοπλασμάτων. Αυτά τα φάρμακα μπορούν να χορηγηθούν μέσω διαφόρων οδών, συμπεριλαμβανομένης της στοματικής, ενδομυϊκής, ενδοφλέβιας και σπανιότερα, ενδορραχιαίας, ενδοαρτηριακής ή μέσω ένεσης σε ορώδεις κοιλότητες. Επιπλέον, ορισμένα φάρμακα εφαρμόζονται απευθείας στην πάσχουσα περιοχή, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις κακοήθων δερματικών παθήσεων.

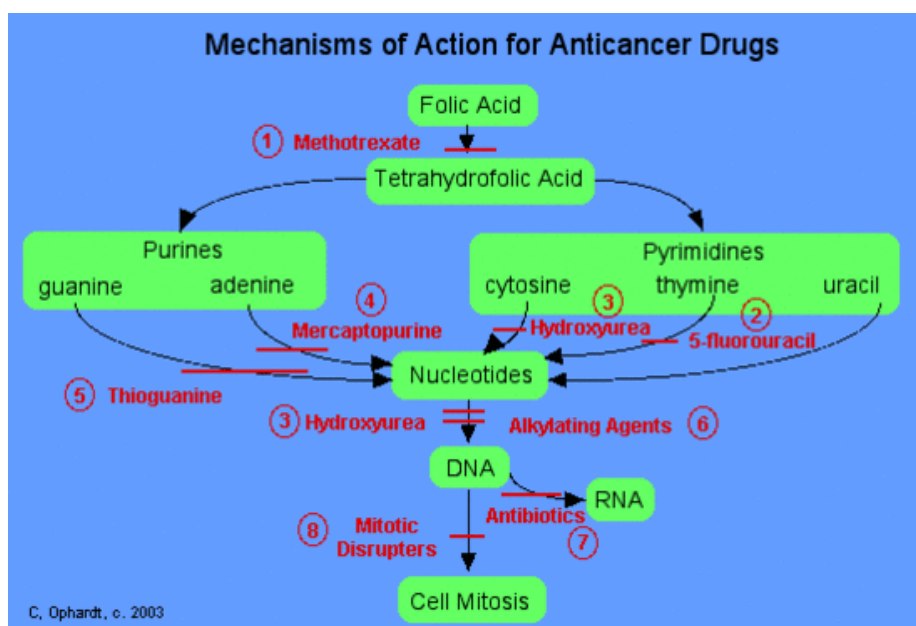
Όσον αφορά τον τρόπο δράσης τους, τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά αντινεοπλασματικά φάρμακα δεν εξαλείφουν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα. Αντίθετα, διαταράσσουν την κυτταρική διαίρεση ή πυροδοτούν την απόπτωση, η οποία είναι ο

προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Αυτά τα φάρμακα επηρεάζουν όχι μόνο τα καρκινικά κύτταρα αλλά και όλα τα κύτταρα του σώματος, εκτός από την ασπαραγινάση. Ως αποτέλεσμα, τα κυτταροστατικά φάρμακα μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα τοξικότητας.

Υπάρχουν πολλές μεγάλες κατηγορίες αντικαρκινικών φαρμάκων. Αυτά περιλαμβάνουν αλκυλιωτικούς παράγοντες, αντιμεταβολίτες, φυσικά προϊόντα και ορμόνες. Επιπλέον, υπάρχει ένας αριθμός φαρμάκων, που δεν εμπίπτουν σε αυτές τις κατηγορίες, αλλά επιδεικνύουν αντικαρκινική δράση και επομένως, χρησιμοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία.

Ένα από τα πρώτα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν κλινικά στη σύγχρονη ιατρική για τη θεραπεία του καρκίνου ήταν ο αλκυλιωτικός παράγοντας, μεχλωρεθαμίνη, μια μουστάρδα αζώτου που στη δεκαετία του 1940 βρέθηκε να είναι αποτελεσματική στη θεραπεία των λεμφωμάτων. Το 1956 ο αντιμεταβολίτης μεθοτρεξάτη έγινε το πρώτο φάρμακο, που θεραπεύει έναν συμπαγή όγκο και τον επόμενο χρόνο η φθοριοουρακίλη (5-FU) εισήχθη ως ανάλογο πυριμιδίνης, εκπροσωπώντας μια νέα κατηγορία χημειοθεραπευτικών ενώσεων. Έκτοτε, πληθώρα αντικαρκινικών φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται με μεγάλη επιτυχία.

Σε κάθε περίπτωση, η απόφαση χρήσης ενός συγκεκριμένου αντικαρκινικού φαρμάκου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του τύπου και της περιοχής του καρκίνου, της σοβαρότητάς του, εάν μπορεί ή πρέπει να λάβουν χώρα χειρουργική επέμβαση ή ακτινοθεραπεία και τις παρενέργειες που σχετίζονται με το φάρμακο.



Εικόνα 2: Μηχανισμοί Δράσης Αντικαρκινικών Φαρμάκων
(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16026315/>)

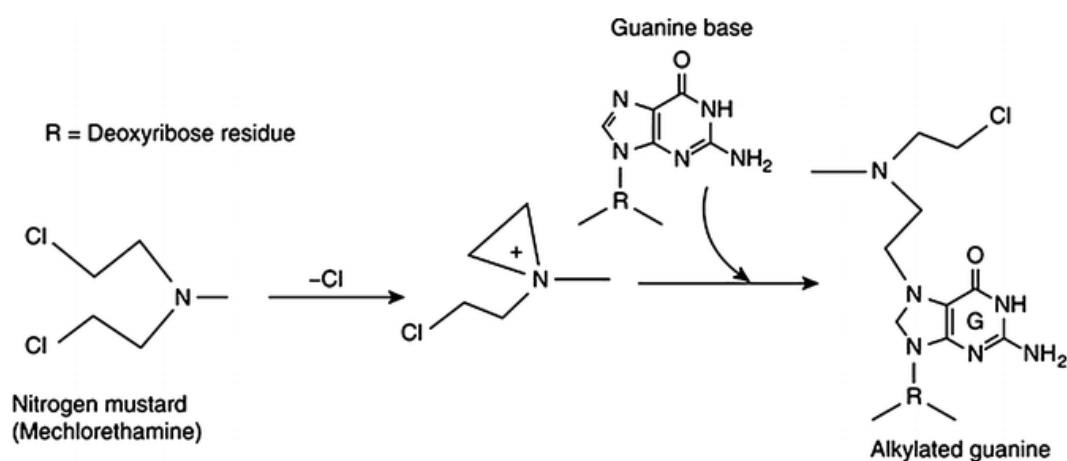
Ο γενικός μηχανισμός δράσης της πλειοψηφίας των αντινεοπλασματικών φαρμάκων συνοψίζεται στους στόχους-πυλώνες που παρατίθενται ακολούθως:

- Βλάβη στο DNA των καρκινικών κυττάρων.
- Αναστολή της σύνθεσης νέων κλώνων DNA, με σκοπό την αναχαίτιση του πολλαπλασιασμού του κυττάρου, που ευθύνεται για την περαιτέρω ανάπτυξη της κακοήθειας.
- Διακοπή της μίτωσης, η οποία σταματά την κυτταρική διαίρεση (αντιγραφή) του καρκίνου και μπορεί τελικά να σταματήσει την εξέλιξή του, ολοκληρωτικά.

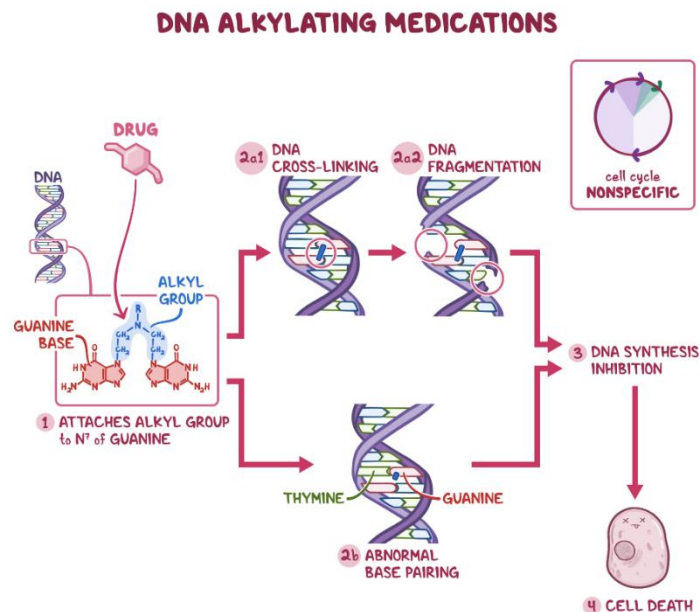
Ο μηχανισμός αυτός καθίσταται ακόμα πιο ειδικός και συγκεκριμένος ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη ομάδα των αντινεοπλασματικών παραγόντων.

Αλκυλιούντες παράγοντες

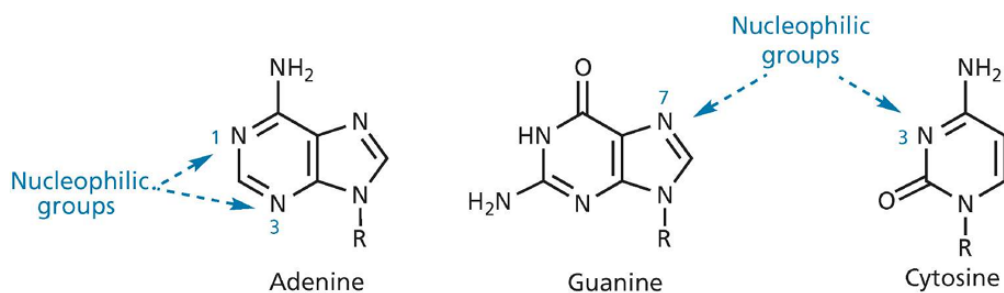
Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι μια οικογένεια αντικαρκινικών φαρμάκων που παρεμβαίνουν στον κυτταρικό κύκλο του γενετικού υλικού και αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Ονομάζονται έτσι λόγω της ικανότητάς τους να προσθέτουν ομάδες αλκυλίου σε αρνητικά φορτισμένες ομάδες που εδράζονται σε βιολογικά μόρια, όπως το DNA και οι πρωτεΐνες. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες συγκαταλέγονται στην πρώτη ομάδα χημικών ουσιών που έχουν προσδιοριστεί ότι είναι χρήσιμες στη χημειοθεραπεία του καρκίνου. Παραμένουν να είναι τα πιο σημαντικά συστατικά των σύγχρονων χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα), λόγω της αποδεδειγμένης και σημαντικής κλινικής αντικαρκινικής τους δράσης [56], [83].



Εικόνα 3: Χημικός μηχανισμός δράσης μουστάρδας αζώτου
(https://www.researchgate.net/figure/Reaction-between-nitrogen-mustard-and-guanylate-residue-on-DNA-at-N7-position-of-guanine_fig1_302538044)

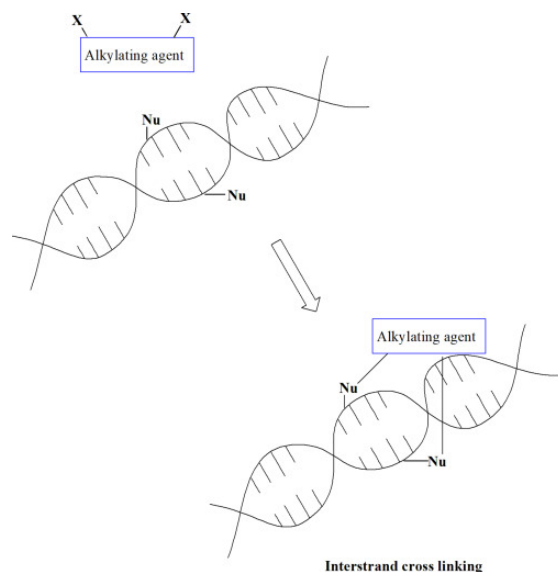


Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης αλκυλιούντων παραγόντων
(https://www.osmosis.org/learn/DNA_alkylating_medications)



Εικόνα 5: Πυρηνόφιλες ομάδες σε αζωτούχες βάσεις του DNA
(<https://www.slideshare.net/slideshow/nucleic-acids-structure-and-function/238333482>)

Περιέχουν ηλεκτρονιόφιλες ομάδες, με τις οποίες σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις πυρηνόφιλες ομάδες του DNA (π.χ. ⁷N γουανίνης). Ο τρόπος σύνδεσης των φαρμάκων που φέρουν δύο αλκυλιωτικές ομάδες με το DNA είναι είτε διακλωνική είτε ενδοκλωνική διασύνδεση.



Εικόνα 6: Σύνδεση αλκυλιωτικών ομάδων φαρμάκων με το DNA

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780080552323610347>)

Με αυτή τους την προσκόλληση στο DNA των κυττάρων, σταματούν τον πολλαπλασιασμό τους. Τα φάρμακα στοχεύουν στα καρκινικά κύτταρα που διαιρούνται γρήγορα, επιβραδύνουν την κυτταρική ανάπτυξη και τα σκοτώνουν, επιφέροντας απόπτωση. Οι αλκυλιούντες παράγοντες είναι μη ειδικοί στη φάση του κυτταρικού κύκλου. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να σκοτώσουν το κύτταρο σε διάφορες και πολλαπλές φάσεις του κύκλου ζωής του. Ως εκ τούτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τους περισσότερους τύπους καρκίνου, αλλά φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικοί έναντι των βραδέως αναπτυσσόμενων καρκίνων.

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες χωρίζονται γενικά σε έξι υποομάδες:

- Αζωτούχες μουστάρδες (βενταμουστίνη, χλωραμβουκίλη, κυκλοφωσφαμίδη, ιφωσφαμίδη, μεχλωρεθαμίνη και μελφαλάνη)
- Αιθυλεναμίνη και παράγωγα μεθυλεναμίνης (αλτρεταμίνη και θειοτέπα)
- Αλκυλοσουλφονικά (βουσουλφάνη)
- Τριαζένια (δακαρβαζίνη, προκαρβαζίνη, τεμοζολομίδη)
- Αντινεοπλασματικοί παράγοντες που περιέχουν πλατίνα (καρβοπλατίνη, σισπλατίνη, οξαλιπλατίνη)
- Νιτροζουρίες (καρμουστίνη, λομουστίνη, στρεπτοζοκίνη) είναι ένα ειδικό είδος αλκυλιωτικού παράγοντα. Σε αντίθεση με τα περισσότερα φάρμακα, είναι σε θέση να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

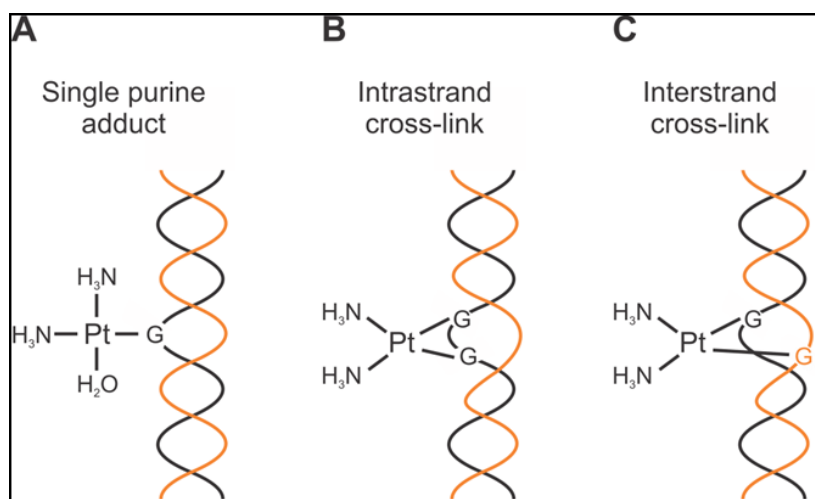
Οι μουστάρδες αζώτου, μαζί με την αιθυλεναμίνη και τα παράγωγα της μεθυλεναμίνης, χρησιμοποιούνται συνήθως με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τη θεραπεία διαφόρων σταδίων καρκίνου του μαστού.

Ενδεικτικά, η ένωση μουστάρδας αζώτου, γνωστή ως κυκλοφωσφαμίδη, αναφερόμενη συνήθως ως Cytosin, χορηγείται παράλληλα με άλλα φάρμακα χημειοθεραπείας, είτε σε μορφή χαπιού είτε μέσω ενδοφλέβιας έγχυσης. Η κυκλοφωσφαμίδη εμφανίζει κυτταροστατικές ιδιότητες σε μια ποικιλία πειραματικών όγκων, με τη συμφωνία μεταξύ των ερευνητών ότι ο μηχανισμός δράσης της στοχεύει κυρίως τις φάσεις G2 ή S του κυτταρικού κύκλου. Το Cytosin χρησιμοποιείται συχνά για διάφορους σκοπούς: από την αποτροπή της επανεμφάνισης του καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο μετά από χειρουργική επέμβαση ή άλλες θεραπείες για τον καρκίνο, ελάττωση των όγκων καρκίνου του μαστού προχωρημένου σταδίου πριν από τη χειρουργική επέμβαση ή και αντιμετώπισή του καρκίνου προχωρημένου σταδίου, μετά από χειρουργική επέμβαση και άλλες θεραπείες.

Η θειοτέπα, υπό την εμπορική ονομασία «Tepadina» είναι ένα παράγωγο αιθυλενοαμίνης και μεθυλενοαμίνης, χορηγούμενο συνήθως ενδοφλεβίως για την επίτευξη αρκετών στόχων στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. κυτταροτοξικός παράγοντας, έχει χημικές και φαρμακολογικές ομοιότητες με το υποξείδιο του αζώτου. Ο μηχανισμός δράσης της θειοτέπας πιστεύεται ότι μιμείται τα αποτελέσματα της ακτινοβολίας δημιουργώντας ρίζες αιθυλενοϊμίνης. Αυτές οι ρίζες, παρόμοιες με αυτές που παράγονται κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας, διαταράσσουν τους δεσμούς του DNA αλκυλιώνοντας τη γουανίνη στη θέση N-7. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στον διαχωρισμό των βάσεων πουρίνης από το μόριο του σακχάρου και στην επακόλουθη απελευθέρωση αλκυλιωμένης γουανίνης. Παίζει κρίσιμο ρόλο στην πρόληψη της επανεμφάνισης του καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο μετά από χειρουργική επέμβαση ή άλλες θεραπείες για τον καρκίνο. Επιπλέον, βοηθά στη μείωση του μεγέθους των προχωρημένων όγκων καρκίνου του μαστού πριν από τη χειρουργική επέμβαση. Ακόμη, χρησιμοποιείται στη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού μετά από χειρουργικές επεμβάσεις και άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις, ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα υποτροπής του καρκίνου του μαστού στα αρχικά του στάδια, καθώς και στη θεραπευτική αντιμετώπιση του προχωρημένου καρκίνου του μαστού.

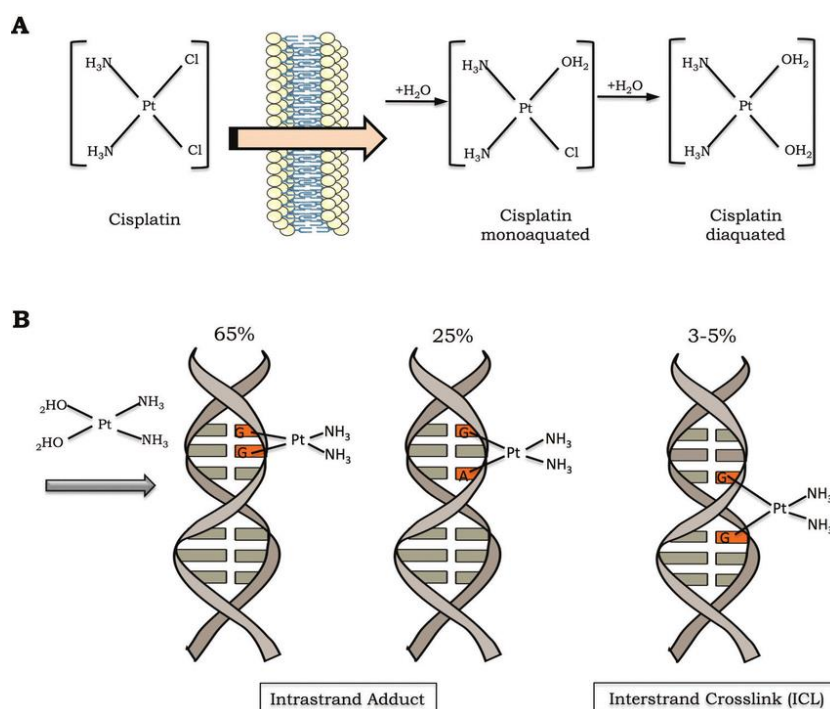
Ενώσεις πλατίνας

Πρόκειται για μεταλλικές σύμπλοκες ενώσεις λευκοχρύσου, με τετραγωνική επίπεδη γεωμετρία. Μετά την είσοδο στα καρκινικά κύτταρα με ενεργή μεταφορά ή παθητική διάχυση, η σισπλατίνη σχηματίζει προσδέματα με το DNA στον πυρήνα, οδηγώντας σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και κυτταρική απόπτωση. Τα προσδέματα σισπλατίνης είναι διασταυρούμενες συνδέσεις γουανίνης-γουανίνης (GG) εντός του DNA που προκαλούνται από τη χημική ένωση σισπλατίνη. Η διασταύρωση με το DNA προκαλεί απόπτωση στο επηρεαζόμενο κύτταρο [13], [86].



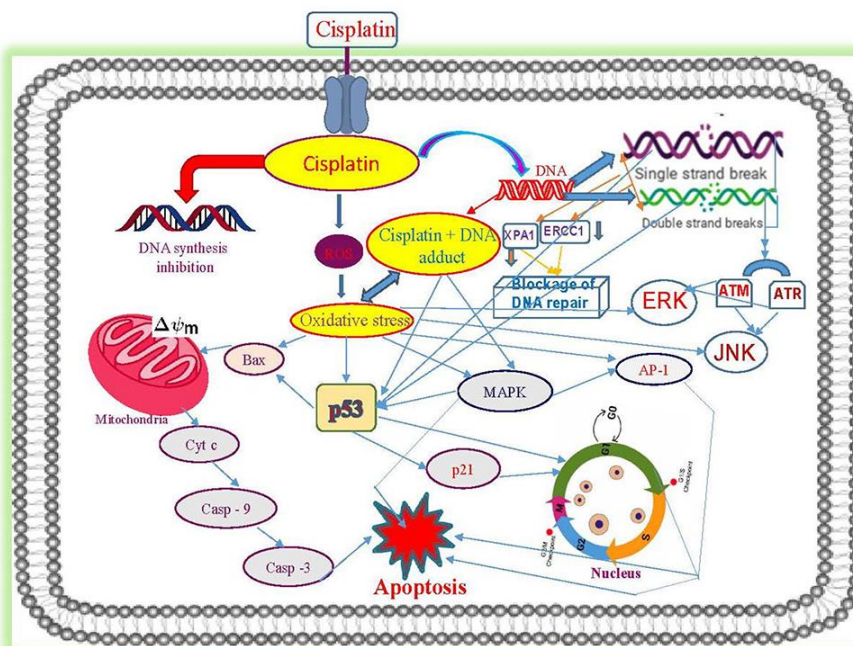
Εικόνα 7: Προσδέματα σισπλατίνης

(https://www.researchgate.net/figure/Cisplatin-induced-DNA-adducts-The-predominant-DNA-adducts-caused-by-cisplatin-include_fig1_298103457)



Εικόνα 8: Α. Ενεργοποίηση σισπλατίνης, Β. Μηχανισμός δράσης σισπλατίνης

(https://www.researchgate.net/figure/Cisplatin-activation-and-DNA-damage-induction-A-The-cisplatin-activation-process_fig1_327352081)



Εικόνα 11: Κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, στα οποία, εμπλέκεται η σισπλατίνη
(<https://www.dovepress.com/advances-in-our-understanding-of-the-molecular-mechanisms-of-action-of-peer-reviewed-fulltext-article-JEP>)

Η σισπλατίνη αποκτά δραστηριότητα ενδοκυτταρικά μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης, όπου ένα άτομο χλωρίου αντικαθίσταται με ένα μόριο νερού. Το νεοσχηματιζόμενο δραστικό σύμπλοκο προσδένεται σε άτομα με περίσσεια ηλεκτρονίων, όπως το ^7N της γουανίνης στο DNA. Αρχικά, αλληλεπιδρά με το DNA, μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού, δημιουργώντας το λεγόμενο ‘Pt-DNA adduct’. Στη συνέχεια αλληλεπιδρά με μια δεύτερη πουρίνη (γουανίνη ή αδερίνη), σχηματίζοντας εγκάρσιες διασυνδέσεις μεταξύ του ίδιου (intrastrand crosslink) ή διαφορετικών κλώνων (interstrand crosslink). Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών στο DNA, την επαγωγή μηχανισμών κυτταρικού θανάτου και συνακόλουθα την εμφάνιση αντικαρκινικής δράσης. Όπως αναμένεται, εμφανίζεται και πληθώρα παρενεργειών, ενώ συχνό είναι και το φαινόμενο της αντίστασης στη θεραπεία. Η αντίσταση στη σισπλατίνη έχει συνδεθεί με αποτελεσματική σύζευξη με την γλουταθειόνη ή με ενίσχυση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA.

Η ενδοκυτταρική δραστηριότητα της σισπλατίνης επιτυγχάνεται μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης, οι οποίες περιλαμβάνουν την αντικατάσταση ενός ατόμου χλωρίου με ένα μόριο νερού. Αυτό το νεοσύστατο ενεργό σύμπλεγμα στη συνέχεια συνδέεται με άτομα με περίσσεια ηλεκτρονίων, όπως το ^7N γουανίνης στο DNA. Αρχικά, σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με το DNA, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της «προσδεμάτων λευκοχρύσου Pt-DNA». Στη συνέχεια, αλληλεπιδρά με μια δεύτερη πουρίνη (γουανίνη ή αδερίνη), οδηγώντας στο σχηματισμό σταυροδεσμών εντός του ίδιου κλώνου DNA

(intrastand crosslink) ή μεταξύ διαφορετικών κλώνων (interstand crosslink). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις προκαλούν βλάβη στο DNA, πυροδοτούν μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου και τελικά εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι διάφορες παρενέργειες συνοδεύουν αυτή τη διαδικασία και η ανάπτυξη αντοχής στη θεραπεία με σισπλατίνη είναι σύνηθες φαινόμενο. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντίσταση στη σισπλατίνη, η οποία έχει συσχετιστεί με αποτελεσματική σύζευξη γλουταθειόνης και την ενίσχυση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA.

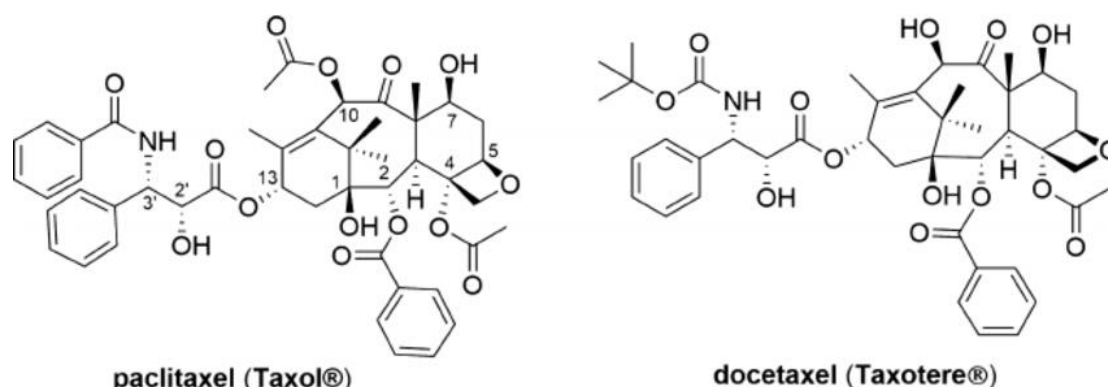
Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της κυτταρικής αντίστασης στη σισπλατίνη είναι η μειωμένη συσσώρευση της ένωσης. Ως συνέπεια της μειωμένης πρόσληψης ή κατακράτησης, ο σχηματισμός προσαγωγών πλατίνας-DNA μειώνεται αντίστοιχα, μειώνοντας την κυτταροτοξικότητα, με αποτέλεσμα μεγαλύτερη αντίσταση στην ένωση της πλατίνας.

Η σισπλατίνη ασκεί αντικαρκινικές επιδράσεις μέσω πολλαπλών μηχανισμών, ωστόσο ο σημαντικότερος (και καλύτερα κατανοητός) τρόπος δράσης της περιλαμβάνει τη δημιουργία βλαβών στο DNA που ακολουθείται από την ενεργοποίηση της απόκρισης στη βλάβη του DNA και την επαγωγή της μιτοχονδριακής απόπτωσης. Παρά το σταθερό ποσοστό αρχικής ανταπόκρισης, η θεραπεία με σισπλατίνη οδηγεί συχνά στην ανάπτυξη χημειοανθεκτικότητας, οδηγώντας σε θεραπευτική αποτυχία. Τα τελευταία 30 χρόνια έχει διεξαχθεί εντατική έρευνα και έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί που ευθύνονται για τον φαινότυπο ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων στη σισπλατίνη. Εδώ, παρέχουμε μια συστηματική συζήτηση αυτών των μηχανισμών, ταξινομώντας τους σε μεταβολές (1) που αφορούν βήματα που προηγούνται της σύνδεσης της σισπλατίνης με το DNA (προ-στόχου αντίσταση), (2) που σχετίζονται άμεσα με προσμίξεις DNA-σισπλατίνης (on-target αντίσταση), (3) που αφορούν το(α) θανατηφόρο(α) μονοπάτι(α) σηματοδότησης που προκαλείται(-ούνται) από βλάβη του DNA με τη μεσολάβηση της σισπλατίνης (post-target αντίσταση) και (4) που επηρεάζουν μοριακά κυκλώματα που δεν παρουσιάζουν προφανείς συνδέσεις με σήματα που προκαλούνται από τη σισπλατίνη (off-target αντίσταση). Δεδομένου ότι σε ορισμένες κλινικές καταστάσεις η σισπλατίνη αποτελεί τη βασική θεραπευτική επιλογή, η ανάπτυξη στρατηγικών χημειοευαισθητοποίησης αποτελεί στόχο με σημαντικές κλινικές επιπτώσεις.

Αναστολείς μικροσωληνίσκων

Η σφαίρα της θεραπείας του καρκίνου έχει ιδιαίτερη γοητεία για τους επιστήμονες, όταν πρόκειται για φάρμακα που προέρχονται από φυτά. Σε αυτή την κατηγορία, οι ταξάνες κυριαρχούν ως οι πιο διάσημοι εκπρόσωποι. Οι ταξάνες, που είναι διτερπένια που συντίθενται από τέσσερις μονάδες ισοπρενίου, διαθέτουν αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα κατά του καρκίνου. Η πακλιταξέλη, επίσης γνωστή ως ταξόλη, και το παράγωγό της ντοσεταξέλη ήταν μεταξύ των αρχικών ταξανών που χρησιμοποιήθηκαν. Το 1962, ο βοτανολόγος Arthur S. Barclay απομόνωσε με επιτυχία την πακλιταξέλη από το φλοιό του δέντρου πουρνάρι του Ειρηνικού, επιστημονικά γνωστό ως *Taxus brevifolia* Nutt. Ωστόσο, λόγω του τεράστιου αριθμού δέντρων που

απαιτούνται για την παραγωγή πακλιταξέλης ως φυτικό εκχύλισμα, τώρα συντίθεται και ημισυντίθεται με εναλλακτικές μεθόδους.



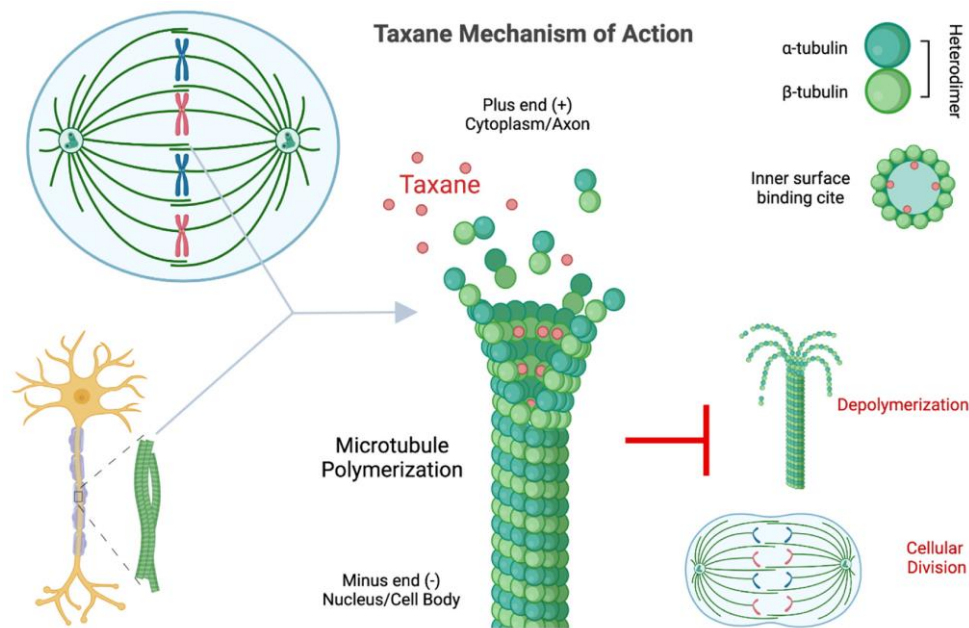
Εικόνα 12: Παραδείγματα, ευρέως χρησιμοποιούμενων, ταξανών

(https://www.researchgate.net/figure/First-generation-taxanes_fig1_286529479)

Η πακλιταξέλη, ένας αντινεοπλασματικός παράγοντας, λειτουργεί στοχεύοντας ειδικά την τουμπουλίνη, ένα ζωτικό συστατικό εντός του κυττάρου. Με την υπερβολική σταθεροποίηση των κυτταρικών μικροσωληνίσκων, που είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική οργάνωση και λειτουργία, η πακλιταξέλη διαταράσσει τη διαδικασία της μίτωσης. Αυτό αποτρέπει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών α- και β-τουμπουλίνης, οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, η πακλιταξέλη προκαλεί απόπτωση, ή προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, επηρεάζοντας την έκφραση βασικών γονιδίων, που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, όπως τα Raf-1, p53 και p21. Ακόμη και σε ελάχιστες συγκεντρώσεις, η πακλιταξέλη αποδεικνύει την ικανότητά της να ρυθμίζει αυτά τα γονίδια, που σχετίζονται με την απόπτωση. Οι επιθετικές μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα και των ωοθηκών, αντιμετωπίζονται αποτελεσματικά με την πακλιταξέλη λόγω του ισχυρού μηχανισμού δράσης της.

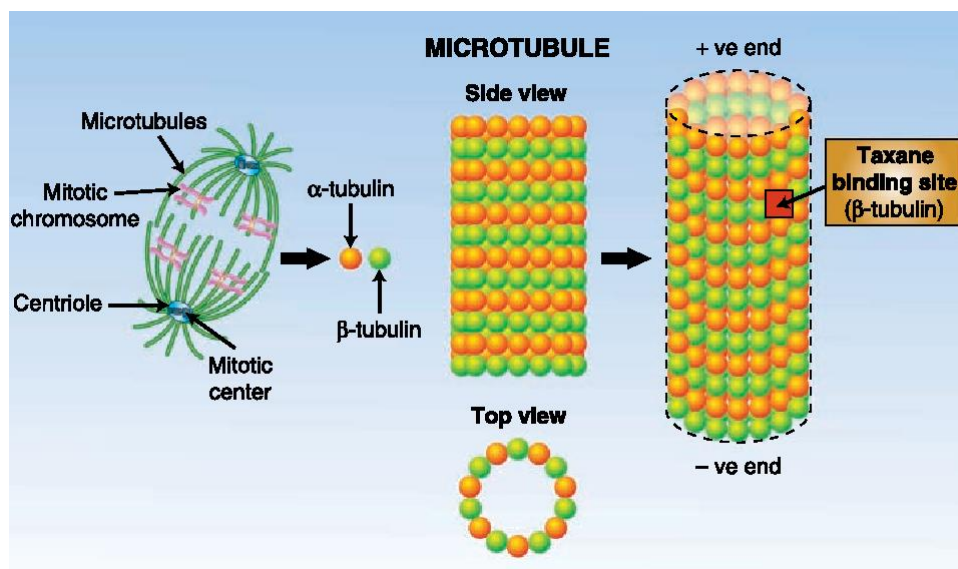
Οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου (δομή του κυτταρικού σκελετού όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων) συναποτελούν το δομικό πλαίσιο για πολλές από τις διαδικασίες που διενεργούνται κατά τη μίτωση. Μέσω των ταξανών, η δράση τους αναστέλλεται, με συνέπεια να μπλοκάρεται η διαδικασία της μίτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Εξετάζοντας την αναστολή αυτή, από περισσότερο μικροσκοπική άποψη, με άλλα λόγια, σε μοριακό επίπεδο, σημειώνεται πως οι ταξάνες δρουν, αποπολυμερίζοντας τους μικροσωληνίσκους ή τροποποιώντας τη δυναμική τους. Η αποσταθεροποίηση της δυναμικής τους (αλλαγή στην ισορροπία πολυμερισμού-αποπολυμερισμού) οδηγεί σε δυσλειτουργία της μίτωσης. Επακόλουθη είναι η αναστολή της μίτωσης και η επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα που υποβάλλονται στη διαδικασία διαίρεσης. Τα φάρμακα, που λειτουργούν,

αναστέλλοντας τους μικροσωληνίσκους, είναι ειδικά για τον κυτταρικό κύκλο στη φάση M [1].



Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης ταξανών και δομή τους

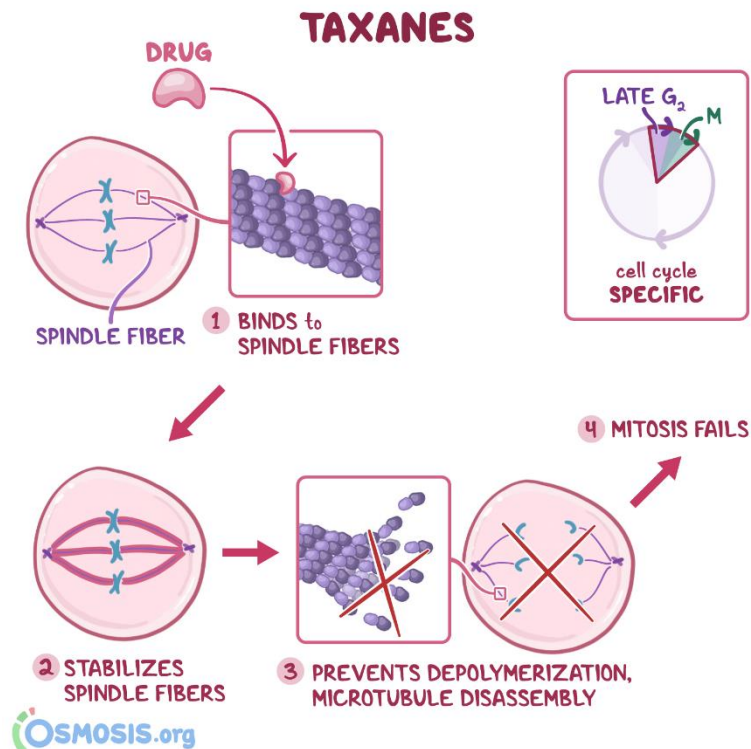
(<https://www.mdpi.com/2072-6694/14/14/3325>)



Εικόνα 14: Αρχιτεκτονική αναστολέων μικροσωληνίσκων

(<https://www.semanticscholar.org/paper/Microtubule-Active-Agents%3A-Beyond-the-Taxane-Morris-Fornier/445a3660f65d7ff73c3820f581d649bdd19194fc/figure/0>)

Στην ακόλουθη σχηματική αναπαράσταση, διαφαίνεται ο τρόπος λειτουργίας των ταξανών.



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού δράσης ταξανών
(https://www.osmosis.org/learn/Plant_extracts_for_chemotherapy:_Nursing_Pharmacology)

Πέραν των αναστολέων των μικροσωληνίσκων, υφίστανται και άλλα φυσικά προϊόντα με αντικαρκινική δράση, όπως οι ανθρακυκλίνες, που είναι κυτταροστατικά αντιβιοτικά, τα οποία επιφέρουν ρήξη της διπλής έλικας του DNA, εμποδίζοντας μάλιστα, την επιδιόρθωσή της, μέσω αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης-II και οι ποδοφυλλοτοξίνες, που δρουν αναστέλλοντας, επίσης, την τοποϊσομεράση-II, και ως εκ τούτου, την κυτταρική διαίρεση, κατά τη φάση της μετάφρασης. Ομοίως, «ξετυλίγεται» και ο μηχανισμός δράσης της D-ακτινομυκίνης. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και τα αλκαλοειδή της Vinca, τα οποία ασκούν τη δράση τους, ενωμένα με την τουμπουλίνη των μικροσωληναρίων της μιτωτικής ατράκτου του κυττάρου κατά την μίτωση, στο στάδιο της μετάφρασης, με αποτέλεσμα τη διακοπή της μιτωτικής διαίρεσης του κυττάρου. Επιπρόσθετα, η μπλεομυκίνη αναστέλλει τη σύνθεση του DNA, αλλά και του RNA, σε μικρότερο βαθμό. Ξεχωριστή θέση στην υποομάδα αυτή, κατέχει η μιτομυκίνη C, που εμποδίζει την κυτταρική διαίρεση, σχηματίζοντας σύμπλοκο με το DNA, αλλά και η καμπτοθεκίνη, κυτταροτοξικό αλκαλοειδές κινολίνη, το οποίο αναστέλλει το ένζυμο τοποϊσομεράση-I.

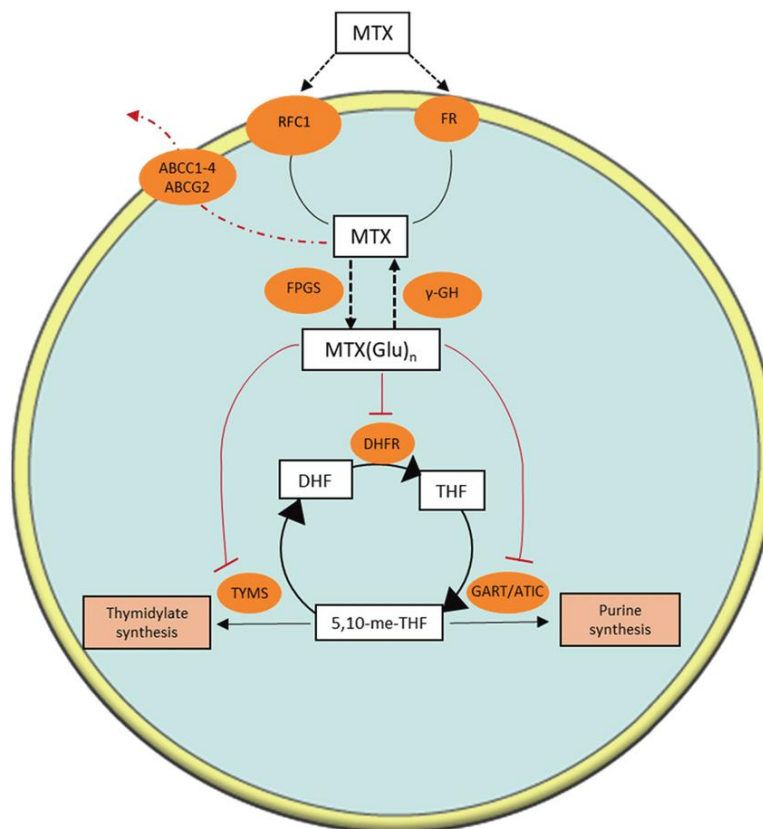
Αντιμεταβολίτες

Πρόκειται για ουσίες ανάλογες με φυσικά συστατικά.

- Ανάλογο φυλλικού οξέος: μεθοτρεξάτη.
- Ανάλογο πουρίνης: 6-μερκαπτοπουρίνη.

- Ανάλογα πυριμιδίνης: 5-φθοριοουρακίλη.

Δίνοντας έμφαση στα φάρμακα που χρησιμοποιούνται από παλιότερα, στη θεραπεία καρκίνου του μαστού, η μεθοτρεξάτη έχει παρόμοια δομή με το φυλλικό οξύ και δρα ως ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος, δηλαδή ως αντιμεταβολίτης. Ειδικότερα, αναστέλλει τη διυδροφολική αναγωγή, το ένζυμο που μετατρέπει το φολικό οξύ στον ενεργό μεταβολίτη του, το συνένζυμο τετραϋδροφολικό οξύ. Έτσι, μειώνεται η σύνθεση των: θυμιδυλικού, της σερίνης, της μεθειονίνης, της αδενίνης και της γουανίνης, οδηγώντας τελικά σε μειωμένη σύνθεση DNA και RNA και μακροπρόθεσμα σε κυτταρικό θάνατο [48].

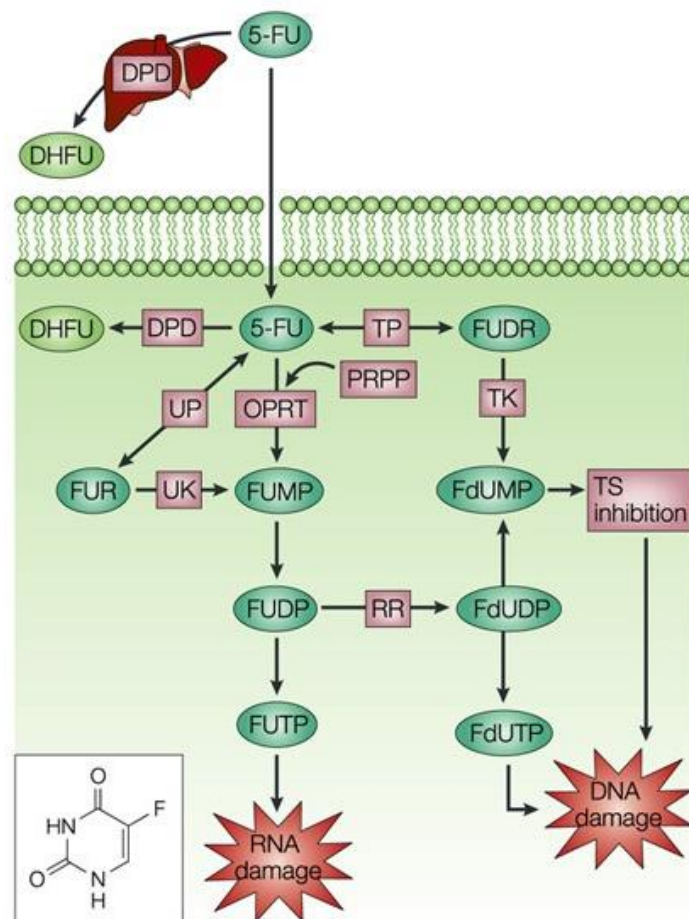


Εικόνα 16: Προτεινόμενος μηχανισμός συνέργειας μεθοτρεξάτης (MTX) με αναστολείς υδροξυμεθυλοτρανσφεράσης της σερίνης (SHMT). Η αναστολή της διυδροφολική αναγωγής (DHFR) από το MTX μειώνει το ενδοκυτταρικό τετραϋδροφουράνιο (THF), επομένως, ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε αναστολείς SHMT.

(<https://www.nature.com/articles/s41375-021-01189-2/figures/5>)

Η 5- φθοριοουρακίλη (5-FU) είναι ανάλογο της ουρακίλης, με ένα άτομο φθορίου στη θέση ^5C , αντί του υδρογόνου. Εισέρχεται ταχέως στο κύτταρο χρησιμοποιώντας τον ίδιο μηχανισμό διευκολυνόμενης μεταφοράς, όπως η ουρακίλη και μετατρέπεται ενδοκυτταρικά σε διάφορους ενεργούς μεταβολίτες: την μονοφωσφορική φθοριοδεοξουριδίνη (FdUMP), την τριφωσφορική φθοριοδεοξουριδίνη (FdUTP) και την τριφωσφορική φθοριοουριδίνη (FUTP). Αυτοί οι ενεργοί μεταβολίτες

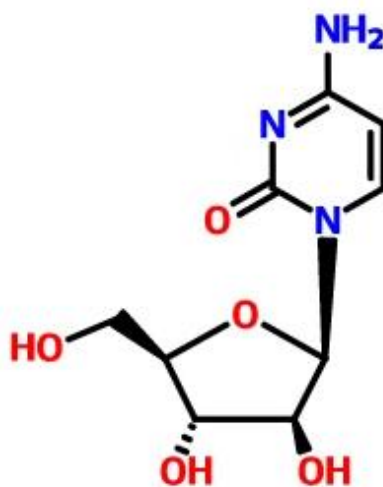
διαταράσσουν το RNA και τη σύνθεση και δράση του ενζύμου θυμιδυλική συνθετάση (TS).



Εικόνα 17: Δομή και τρόπος δράσης 5- φθοριοουρακίλης (5-FU)
(<https://www.nature.com/articles/nrc1074>)

Στην ίδια κατηγορία ανήκει και το χημειοθεραπευτικό φάρμακο, γνωστό ως cytarabine, ή cytosine arabinoside, το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως στη θεραπεία καρκίνων λευκών αιμοσφαιρίων, όπως η οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) και το λέμφωμα μη Hodgkin. Αναφέρεται, επίσης, ως ara-C (αραβινοφουρανοσυλκυτιδίνη). Επιτυγχάνει τη διαταραχή της σύνθεσης του DNA, οδηγώντας τελικά στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Η ένωση αραβινοσίδη κυτοσίνης, όπως φανερώνεται και από το όνομά της, συντίθεται από μια βάση κυτοσίνης και ένα σάκχαρο αραβινόζης. Τυπικά, η κυτοσίνη συνδυάζεται με τη δεοξυριβόζη για να δημιουργήσει δεοξυκυτιδίνη, ένα ζωτικό συστατικό του DNA. Ωστόσο, ορισμένοι σπόγγοι, όπου ανακαλύφθηκε αρχικά η κυτοσίνη αραβινοσίδη, χρησιμοποιούν σάκχαρο αραβινοσίδης για να δημιουργήσουν μια ξεχωριστή ένωση που δεν σχετίζεται με το

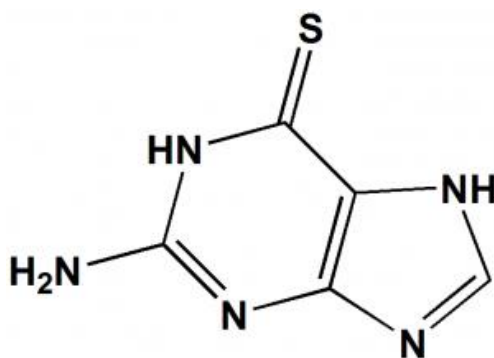
DNA. Ενώ η αραβινοσίδη της κυτοσίνης έχει αρκετή ομοιότητα με την ανθρώπινη δεοξυριβόζη κυτοσίνης (δεοξυκυτιδίνη) για να ενσωματωθεί στο ανθρώπινο DNA, έχει επίσης αρκετές διαφορές, ικανές για να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 18: Χημική δομή cytarabine

(<https://gr.hsp-pharma.com/apis-and-intermediates/cytarabine-cas-147-94-4.html>)

Η 6-θειογουανίνη, ανάλογο πουρίνης, αξιοποιείται, επίσης, ως χημειοθεραπευτικό φάρμακο για καρκίνους των λευκών αιμοσφαιρίων. Λειτουργεί επιβραδύνοντας ή σταματώντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στο σώμα, χρησιμοποιώντας το ένζυμο υποξανθινο-γουανινο φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση (HGPRTase) για να μετατραπεί σε μονοφωσφορική 6-θειογουανοσίνη (TGMP), ενεργό μεταβολίτη ενσωματώνεται στο κυτταρικό DNA, αναστέλλοντας τη σύνθεση νουκλεοτιδίων πουρίνης και καθυστερώντας τον πολλαπλασιασμό των ταχέως διαιρούμενων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των T- και B- κυττάρων.



6-Thioguanine

Εικόνα 19: Δομή 6-θειογουανίνης

Η 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) χρησιμοποιείται ως φάρμακο έναντι του καρκίνου, αλλά και αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn. Χρησιμοποιείται στη διαχείριση και θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Η μερκαπτοπουρίνη και η αζαθειοπρίνη είναι προφάρμακα ενός αναλόγου πουρίνης υποξανθίνης που δρα ως ανταγωνιστής στις ενδογενείς πουρίνες που απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή της σύνθεσης RNA και πρωτεΐνης. Η αζαθειοπρίνη διασπάται σε 88% μερκαπτοπουρίνη και 12% σε άλλους μεταβολίτες θειοπουρίνης. Το 6-MP απαιτεί μετατροπή σε νουκλεοτίδια 6-θειογουανίνης (6TGN) για να γίνει ενεργό και να ασκήσει αντιλευχαιμική δράση. Το προφάρμακο μεταβολίζεται στο ήπαρ, στο γαστρεντερικό σωλήνα και προσλαμβάνεται από τα λεμφοκύτταρα, όπου η μερκαπτοπουρίνη μεταβολίζεται μέσω του ενζύμου διάσωσης πουρίνης μέσω της φωσφοριβοσυλοτρανσφεράσης υποξανθίνης-γουανίνης (HGPRT) σε νουκλεοτίδια θειογουανίνης 6TGN και θειοϊσοφανοσίνη (μονοφωϊνοσίνη). Η τριφωσφορική ινόςίνη (ITPA) καταλύει την υδρόλυση της τριφωσφορικής θειοϊνόςίνης (TITP) σε μονοφωσφορική θειοϊνόςίνη (TIMP), η οποία αυξάνει τα επίπεδα 6-TGN. Υπάρχει, επίσης, μια δευτερεύουσα οδός μέσω της μεθυλτρανσφεράσης της θειοπουρίνης (TPMT), η οποία παράγει ανενεργή βάση μεθυλιωμένη με μεθυλοπουρίνη. Ο μεθυλιωμένος μεταβολίτης, η μονοφωσφορική μεθυλθειοϊνόςίνη (Me-TIMP), είναι ένας ισχυρός αναστολέας της de novo σύνθεσης πουρίνης. Το Me-TIMP μειώνει περαιτέρω τις πουρίνες που είναι διαθέσιμες για ενσωμάτωση στη σύνθεση DNA. Η τριφωσφορική δεοξυ-6-θειογουανίνη (6-dTGTP) ενσωματώνεται στο DNA και η τριφωσφορική 6-θειογουανίνη (6-TGTP) ενσωματώνεται στο RNA. Το 6-TGTP συνδέεται επίσης με το Rac1, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση της οδού σηματοδότησης Vav-Rac1 στα T-λεμφοκύτταρα. Αυτή η διαδικασία αποτρέπει περαιτέρω την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων Rac1, όπως ο πυρηνικός παράγοντας κάπα βήτα (NF-kB), ο οποίος επάγει την απόπτωση των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων. που σταματά τη σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών, οδηγώντας σε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κυτταροτοξικότητα [19], [77].



Εικόνα 20: Δομή 6-MP

(https://www.chemsrc.com/en/cas/157930-14-8_1463655.html)

Εν συντομία, όσον αφορά στα υπάρχοντα θεραπευτικά σχήματα, υπάρχουν αρκετά θεραπευτικά σχήματα συνδυασμού φαρμάκων για τον καρκίνο του μαστού, που έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά, παρόλο που υφίστανται εξαιρέσεις και δεν υπάρχουν επίσης τυπικά σχήματα, καθώς η θεραπεία του καρκίνου του μαστού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Υπάρχουν έξι πολύ καλά χαρακτηρισμένοι συνδυασμοί φαρμάκων. Το AC (δοξορουβικίνη σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη) χρησιμοποιείται ως επικουρική θεραπεία για την πρωτογενή θεραπεία του καρκίνου του μαστού και για τη θεραπεία του μεταστατικού και υποτροπιάζοντος καρκίνου του μαστού. Αυτό το σχήμα μπορεί να ακολουθηθεί από πακλιταξέλη (AC-T), που χρησιμοποιείται, επίσης, ως επικουρική θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, στην επικουρική θεραπεία, χρησιμοποιείται TAC (ντοσεταξέλη, κυκλοφωσφαμίδη και δοξορουβικίνη). Από την άλλη πλευρά, τα σχήματα CAF (κυκλοφωσφαμίδη, 5-φθοροουρακίλη και δοξορουβικίνη) και CMF (κυκλοφωσφαμίδη, 5-φθοροουρακίλη και μεθοτρεξάτη) χρησιμοποιούνται για μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού, με επικουρικό τρόπο ή ως μονοθεραπεία για μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Χρησιμοποιείται, ακόμα, με επικουρικό τρόπο το FEC (επιρουβικίνη, κυκλοφωσφαμίδη και 5-φθοροουρακίλη), για τη θεραπεία του μεταστατικού και υποτροπιάζοντος καρκίνου του μαστού.

1.4 Νεότερες αντινεοπλασματικές θεραπείες

Παρά την ύπαρξη εμποδίων που «γεννά» ο καρκίνος, με ενδεικτικά την ανθεκτικότητα στα φάρμακα και τα συστήματα απελευθέρωσής τους και τη μείωση των συμπτωμάτων, που ευνοούν την έγκαιρη ανίχνευση και αντιμετώπισή του, επί του παρόντος, υπάρχουν πολλές εγκεκριμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις και φάρμακα. Εντούτοις, τα προαναφερθέντα εμπόδια, σε συνδυασμό με τη μειωμένη αποτελεσματικότητα των συμβατικών αντικαρκινικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, λόγω της πολυπλοκότητας της παθολογίας των όγκων και της αρχιτεκτονικής ανωμαλίας των αιμοφόρων αγγείων των ιστών των όγκων, «παραδίδουν τη σκυτάλη» σε ρηξικέλευθες μεθόδους και θεραπευτικές αντικαρκινικές στρατηγικές, οι οποίες παρουσιάζονται ακροθιγώς ακολούθως.

Εκκινώντας, τα βλαστοκύτταρα που βρίσκονται εντός του μυελού των οστών (MM), διαθέτουν την αξιοσημείωτη ικανότητα να μετασχηματίζονται σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρου μέσα στο σώμα. Αυτό τα καθιστά μια πολλά υποσχόμενη και αξιόπιστη επιλογή για τη θεραπεία του καρκίνου. Αν και βρίσκονται ακόμη σε πειραματικό στάδιο και κάποιες περιπτώσεις σε κλινικές δοκιμές, τα βλαστοκύτταρα διερευνώνται για τις δυνατότητές τους στην αναγέννηση κατεστραμμένων ιστών. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs), που εξάγονται από διάφορες πηγές όπως ο μυελός των οστών, ο λιπώδης ιστός και ο συνδετικός ιστός, χρησιμοποιούνται σε αυτές τις δοκιμές.

Η πρωταρχική λειτουργία των μεταμοσχεύσεων βλαστοκυττάρων δεν είναι η άμεση καταπολέμηση του καρκίνου. Αντίθετα, χρησιμεύουν για την αναζωογόνηση της ικανότητας του σώματος να παράγει φρέσκα αιμοσφαίρια μετά από έντονη χημειοθεραπεία και ενδεχομένως, άλλες θεραπείες, όπως η θεραπεία με ακτινοβολία, που χρησιμοποιούνται για την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων.

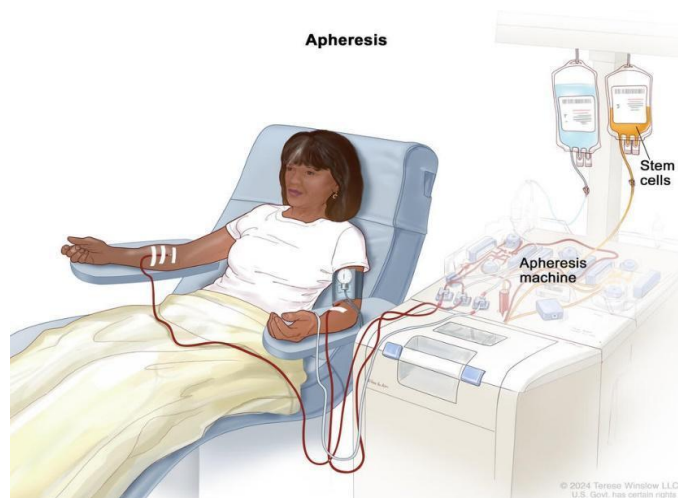
Εντούτοις, καθίστανται άμεσες θεραπευτικές μέθοδοι, όταν πρόκειται για λευχαιμία, στην οποία η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων μπορεί πραγματικά να καταπολεμήσει τον ίδιο τον καρκίνο. Αυτό οφείλεται σε ένα φαινόμενο γνωστό ως αποτέλεσμα μοσχεύματος έναντι όγκου ή αποτέλεσμα μοσχεύματος έναντι λευχαιμίας, το οποίο μπορεί να συμβεί μετά από μεταμόσχευση με βλαστικά κύτταρα από δότη. Σε αυτή την περίπτωση, τα λευκά αιμοσφαίρια από τον δότη (το μόσχευμα) στοχεύουν και επιτίθενται σε τυχόν εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα στο σώμα του λήπτη (τα κύτταρα όγκου ή λευχαιμίας). Αυτό το αποτέλεσμα ενισχύει σημαντικά την πιθανότητα επιτυχούς μεταμόσχευσης.

Σε μια μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων, ο ασθενής λαμβάνει υγιή αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, τα περισσότερα εκ των οποίων, χρησιμοποιούνται σε μεταμοσχεύσεις που προέρχονται από την κυκλοφορία του αίματος. Όταν τα βλαστοκύτταρα προέρχονται από το αίμα, η μεταμόσχευση μπορεί να ονομάζεται μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων περιφερικού αίματος. Ωστόσο, τα βλαστοκύτταρα του αίματος μπορεί, επίσης, να προέρχονται από τον μυελό των οστών ή τον ομφάλιο λώρο, που είναι αίμα που συλλέγεται όταν γεννιέται ένα μωρό. Όταν τα βλαστοκύτταρα προέρχονται από τον μυελό των οστών, η διαδικασία ονομάζεται μεταμόσχευση μυελού των οστών. Όταν προέρχονται από αίμα ομφάλιου λώρου, η διαδικασία ονομάζεται μεταμόσχευση αίματος ομφάλιου λώρου. Μόλις εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίμας, τα βλαστοκύτταρα ταξιδεύουν στον μυελό των οστών, όπου παίρνουν τη θέση των κυττάρων που καταστράφηκαν από τη θεραπεία. Οι μεταμοσχεύσεις μπορεί να είναι:

- αυτόλογες, που σημαίνει ότι τα βλαστοκύτταρα προέρχονται από τα ίδια τα άτομα με καρκίνο
- αλλογενείς, που σημαίνει ότι τα βλαστοκύτταρα προέρχονται από κάποιον δότη, ο οποίος μπορεί να είναι συγγενής εξ αίματος ή κάποιος που δεν έχει συγγένεια, εάν τα κύτταρα ταιριάζουν αρκετά με αυτά του ασθενούς

Υπάρχουν οφέλη και κίνδυνοι τόσο σε αυτόλογες όσο και σε αλλογενείς μεταμοσχεύσεις βλαστοκυττάρων. Με αυτόλογες μεταμοσχεύσεις, τα μεταμοσχευμένα κύτταρα θα είναι απολύτως συμβατά, αλλά ελλοχεύει ένας μικρός κίνδυνος να μεταμοσχευθούν και καρκινικά κύτταρα. Με τις αλλογενείς μεταμοσχεύσεις, είναι σημαντικό τα κύτταρα να είναι συμβατά, ώστε το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς να μην αντιμετωπίσει τα μεταμοσχευμένα βλαστοκύτταρα αίματος ως ξένα και τα καταστρέψει. Σημειώνεται πως για τη συλλογή βλαστοκυττάρων για μεταμόσχευση, ο δότης συνδέεται με ένα μηχάνημα αφαίρεσης. Αφού το μηχάνημα

συλλέξει βλαστοκύτταρα αίματος από τον δότη, επιστρέφει το υπόλοιπο αίμα στο σώμα του.



Εικόνα 21: Σύνδεση δότη με μηχανήμα αφαίρεσης για μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων
(<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/stem-cell-transplant>)

Μια διαφορετική πτυχή της αντικαρκινικής δραστηριότητας των βλαστοκυττάρων, αναδεικνύουν τα αιμοποιητικά εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (hESCs) και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, iPSCs, σταδιακοί αντικαταστάτες των πρώτων, τα οποία επάγουν τα κύτταρα-τελεστές, T-φονικά κύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK), γι' αυτό και δοκιμάζονται ως αντικαρκινικά εμβόλια.

Επιπλέον, οι ομάδες ενηλίκων βλαστοκυττάρων (ASC), που χρησιμοποιούνται συχνά στη θεραπεία όγκων, περιλαμβάνουν αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSCs), μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) και νευρικά βλαστοκύτταρα (NSCs). Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, που βρίσκονται στον μυελό των οστών, μπορούν να σχηματίσουν όλα τα ώριμα αιμοσφαίρια στο σώμα. Εγκεκριμένη από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) είναι η έγχυση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, που προέρχονται από αίμα ομφάλιου λώρου για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και της λευχαιμίας. όπως οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα. Τα MSCs διαθέτουν ειδικά βιολογικά χαρακτηριστικά και χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά με άλλες προσεγγίσεις στη θεραπεία όγκων. Τα NSCs μπορούν να αυτοανανεωθούν και να δημιουργήσουν νέους νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα, και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία τόσο του πρωτογενούς όσο και του μεταστατικού μαστού και άλλων όγκων.

Συνεχίζοντας με την παράθεση και ανάδειξη καινοτόμων αντineοπλασματικών θεραπειών, είναι γεγονός πως η επιλεκτική θεραπεία των καρκινικών κυττάρων με τη συμβατική χημειοθεραπεία είναι δύσκολη, καθώς δεν είναι δυνατή η διάκρισή τους από τα φυσιολογικά κύτταρα. Τα φάρμακα στοχευμένης θεραπείας λειτουργούν με

διαφορετικούς τρόπους από τη συνήθη θεραπεία με φάρμακα χημειοθεραπείας, όπως η επίθεση στα καρκινικά κύτταρα, ενώ προκαλούν λιγότερη βλάβη στα φυσιολογικά κύτταρα, με την ικανότητα να τα ξεχωρίζουν από τα φυσιολογικά, υγιή κύτταρα. Η χρήση στοχευμένης θεραπείας, μάλιστα, αυξάνει σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενειών, όπως ο προχωρημένος καρκίνος του παγκρέατος, το νεφρικό καρκίνωμα και ο καρκίνος του μαστού.

Οι εξειδικευμένοι, στοχευμένοι θεραπευτικοί παράγοντες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τον μηχανισμό δράσης τους ή/και τη «θέση-στόχο» τους. Ορισμένες στοχευμένες θεραπείες αναστέλλουν ένζυμα, που είναι σήματα για την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Ο αποκλεισμός αυτών των κυτταρικών σημάτων μπορεί να εμποδίσει τον καρκίνο να γίνει μεγαλύτερος και να εξαπλωθεί. Άλλες στοχευμένες θεραπείες προκαλούν απόπτωση, στοχεύοντας ακριβώς στα μέρη του κυττάρου που ελέγχουν εάν τα κύτταρα ζουν ή πεθαίνουν. Χαρακτηριστικός εκπρόσωπος αυτών είναι η κινάση σερίνης/θρεονίνης ή κινάση πρωτεΐνης B (PKB/Akt), η οποία προάγει την κυτταρική επιβίωση και οι αναστολείς αυτής της πρωτεΐνης βρίσκονται στην προκλινική φάση. Τέτοιου είδους στοχευμένοι θεραπευτικοί παράγοντες δεν επιτρέπουν στους όγκους να δημιουργήσουν νέα αιμοφόρα αγγεία, γεγονός που βοηθά στη διακοπή της παροχής αίματος των όγκων, καταστέλλοντας την ανάπτυξή τους ραγδαία. Επιπλέον, σταματούν την ανάπτυξη του όγκου που περιλαμβάνει τον περιορισμό της παροχής αίματος στον όγκο, αναστέλλοντας αγγειογενείς παράγοντες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) ή υποδοχείς του.

Ενδεικτικά παραδείγματα στοχευμένων θεραπειών είναι:

- Μονοκλωνικά αντισώματα

Τα φάρμακα αντισωμάτων είναι ανθρωπογενείς εκδόσεις πρωτεϊνών του ανοσοποιητικού συστήματος που χορηγούνται ενδοφλεβίως για να επιτεθούν συγκεκριμένους στόχους στα καρκινικά κύτταρα. Οι μηχανισμοί δράσης τους είναι η στρατολόγηση των ανοσολογικών λειτουργιών του ξενιστή για να επιτεθεί στο «κύτταρο-στόχο» και η δέσμευση σε υποδοχείς, προς αναχαίτιση των διαδικασιών, που λαμβάνουν χώρα σε καρκινικά κύτταρα και μεταφορά ενός φορτίου, όπως κάποιο ραδιοϊσότοπο ή τοξίνη, στο «κύτταρο-στόχο». Η παροχή ενεργών θεραπευτικών ενζύμων ενεργοποίησης προφαρμάκων και τοξινών χημειοθεραπείας είναι, επίσης, μια άλλη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

- Μικρομοριακοί αναστολείς

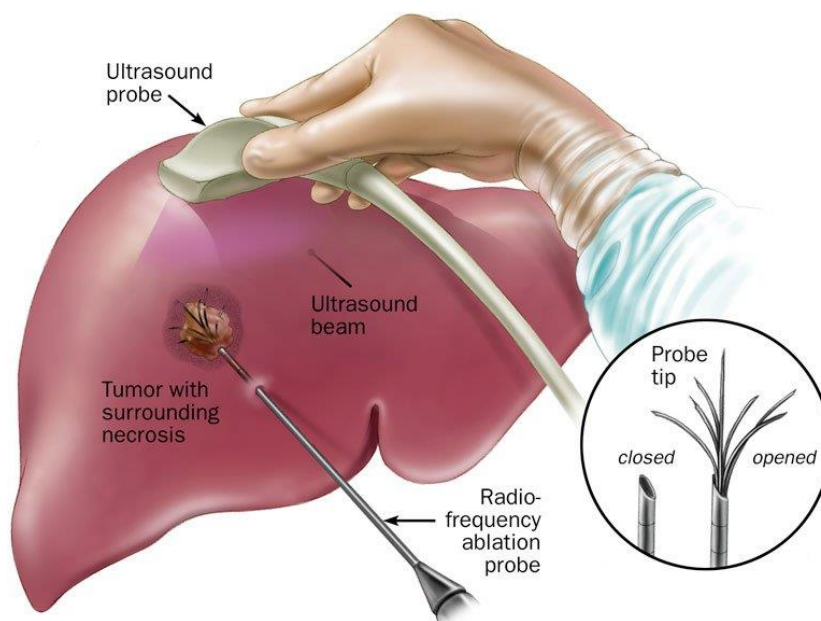
Πρόκειται για πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους από τα μονοκλωνικά αντισώματα, που υπερτερούν σε σχέση με αυτά, στο ότι μπορούν να μετατοπίζονται μέσω των πλασματικών μεμβρανών και να λαμβάνονται από το στόμα. Η κύρια λειτουργία τους είναι να διακόπτουν τις κυτταρικές διεργασίες, παρεμβαίνοντας στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση των κινάσων τυροσίνης. Έτσι, δίνεται σήμα για την αρχή ενός «καταρράκτη» μοριακών διεργασιών, που δύναται να οδηγήσει στην παρεμπόδιση της κυτταρικής ανάπτυξης, κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά και

μετανάστευσης και αγγειογένεσης κακοήθων ιστών. μικρομοριακών αναστολέων είναι το gefitinib και το erlotinib που αναστέλλουν την κινάση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και τον EGFR σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), αντίστοιχα. Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, που αποτελεί αντικείμενο εντρύφησης στην παρούσα εργασία, υφίστανται οι αναστολείς lapatinib και sorafenib που δρουν στην αναστολή του υποδοχέα EGFR/Erb-B2 Tyrosine Kinase 2 (ERBB2) για τον θετικό σε ERBB2 καρκίνο του μαστού.

- Θεραπεία κατάλυσης με καθετήρα

Η κατάλυση με καθετήρα είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιεί ενέργεια ραδιοσυχνότητας ή άλλες πηγές για να τερματίσει ή να τροποποιήσει μια ελαττωματική διεργασία, όπως ο καρκίνος ή η κολπική μαρμαρυγή. Η διαδικασία κατάλυσης μπορεί να ταξινομηθεί ανά πηγή ενέργειας: κατάλυση με ραδιοσυχνότητες, θερμοκατάλυση και κρυοκατάλυση. Η θεραπεία κατάλυσης είναι μια θεραπεία που χρησιμοποιεί θερμότητα ή κρύο για να καταστρέψει ή να αφαιρέσει καρκινικούς όγκους, χωρίς να απαιτείται πιο επεμβατική χειρουργική επέμβαση. Ωστόσο, αυτή η τεχνική δεν ενδείκνυται για τη θεραπεία όγκων κοντά σε μεγάλα αιμοφόρα αγγεία, στο διάφραγμα ή στους κύριους χοληφόρους πόρους λόγω της καταστροφής μέρους του φυσιολογικού ιστού γύρω από τον όγκο.

Όσον αφορά στη θεραπεία κατάλυσης με τη χρήση ραδιοσυχνότητας είναι μια ελάχιστα επεμβατική διαδικασία, καθοδηγούμενη από εικόνα που χρησιμοποιεί υπερθερμικές συνθήκες (ηλεκτρικά ρεύματα υψηλής συχνότητας) για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Οι τεχνικές απεικόνισης, όπως ο υπέρηχος, η αξονική τομογραφία (CT) ή η μαγνητική τομογραφία (MRI), οδηγούν τα ηλεκτρόδια της βελόνας σε ένα κύτταρο όγκου. Πρόκειται για την πιο αποτελεσματική προσέγγιση για τη θεραπεία όγκων μικρού μεγέθους, με διάμετρο μικρότερη από 3 εκατοστά.



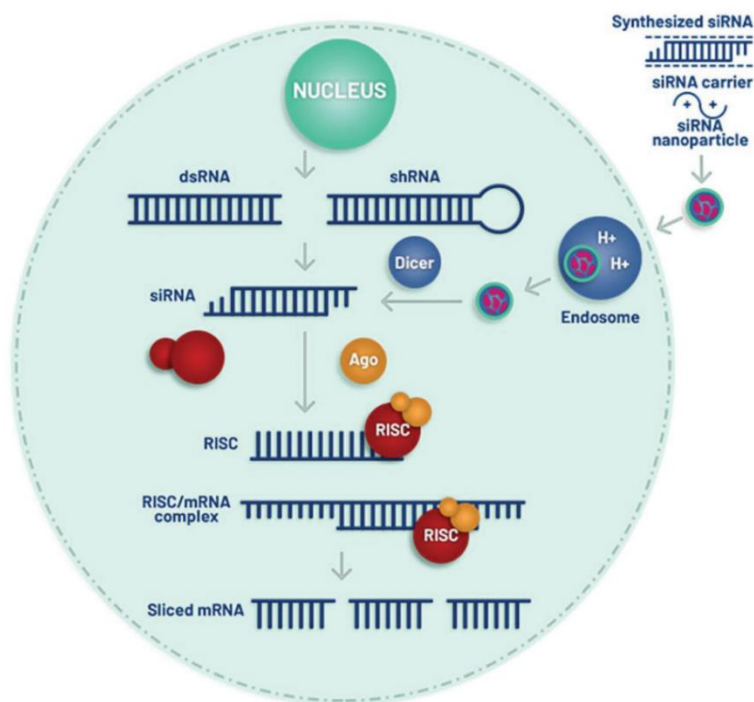
Εικόνα 22: Θεραπεία κατάλυσης με ραδιοσυχνότητες

(<https://southfloridasurgicaloncology.com/liver-tumor-ablation/>)

- Γονιδιακή θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία συνίσταται στην εισαγωγή ενός φυσιολογικού αντιγράφου ενός ελαττωματικού γονιδίου στο γονιδίωμα για τη θεραπεία μιας συγκεκριμένης διαταραχής. Η πρώτη εφαρμογή χρονολογείται από το 1990. Έπειτα, μέχρι και σήμερα, χιλιάδες κλινικές δοκιμές βρίσκονται σε εξέλιξη, αφορώντας τη σχετιζόμενη με τον καρκίνο γονιδιακή θεραπεία. Στρατηγικές, όπως έκφραση προαποπτωτικών και χημειοευαισθητοποιητικών γονιδίων, η έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η έκφραση γονιδίων ικανών να προκαλέσουν ειδικές αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις και η στοχευμένη σίγαση ογκογονιδίων (gene silencing) βρίσκονται υπό αξιολόγηση για γονιδιακή θεραπεία καρκίνου.

Μια από τις πιο πρόσφατες αντικαρκινικές θεραπευτικές στρατηγικές, στο πλαίσιο της γονιδιακής θεραπείας, είναι η σίγαση γονιδίων, μέσω της αξιοποίησης της τεχνολογίας των MicroRNAs (miRNAs), καθώς και της παρεμβολής RNA (RNAi). Τα κύτταρα χρησιμοποιούν το ένζυμο Dicer για την επεξεργασία διπλής αλυσίδας RNA (dsRNA) ή προκαταρκτικών μικροRNA (pre-miRNA), για τη δημιουργία μικρών παρεμβαλλόμενων RNA (siRNA) ή μικροRNA (miRNA), αντίστοιχα. Μέσω αυτού του ενζύμου, πραγματοποιείται η επεξεργασία αυτών των μορίων διπλής αλυσίδας RNA, των οποίων η αλληλουχία κόβεται σε μικρότερου πλήθους νουκλεοτιδίων αλυσίδες, συνήθως της τάξης των 20-23 νουκλεοτιδίων. Τα μικρά αυτά RNA, στη συνέχεια, ενσωματώνονται στο σύμπλοκο επαγόμενης καταστολής από RNA (RISC). Αυτό, με τη σειρά του, αφαιρεί μία από τις δύο αλυσίδες του RNA, αφήνοντας μόνο την αλυσίδα «οδηγό», που θα χρησιμοποιηθεί σαν αλληλουχία αναγνώρισης των στόχων. Η καθοδηγητική αλυσίδα οδηγεί το RISC να δεσμευτεί σε συγκεκριμένες περιοχές στο αγγελιοφόρο RNA (mRNA), που περιέχουν συμπληρωματικές, προς αυτή, αλληλουχίες. Ανάλογα με τον βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ της καθοδηγητικής αλυσίδας του siRNA ή miRNA και του mRNA, το RISC μπορεί είτε να προκαλέσει την αποικοδόμηση του mRNA είτε να καταστείλει την μετάφρασή του. Με αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτή η ακριβής ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ως εκ τούτου, μπορεί να εμποδιστούν επιθυμητοί στόχοι, που περιλαμβάνουν αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, μεταγραφικοί παραγόντες, όπως το πρωτοογκογονίδιο c-MYC ή μεταλλαγμένα γονίδια καρκίνου, όπως το K-RAS, μείζονος σημασίας ρυθμιστής της κυτταρικής διαφοροποίησης, διαίρεσης και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 23: Σηματοδοτική πορεία σίγασης RNA

(<https://www.genengnews.com/insights/rna-silencing-finds-its-therapeutic-voice/>)

- Φυσικά αντιοξειδωτικά

Το οξειδωτικό στρες και τα είδη ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) μπορούν να αλλάξουν σημαντικά τη ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων, καταστρέφοντας το DNA και άλλα βιομακρομόρια. Οι βιταμίνες, οι πολυφαινόλες και οι βιοδραστικές ενώσεις φυτικής προέλευσης είναι φυσικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται ως προληπτικά και θεραπευτικά φάρμακα ενάντια σε μόρια που βλάπτουν τον οργανισμό, λόγω των αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Ενώσεις, όπως βιταμίνες, αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, καροτενοειδή, κουρκουμίνη, βερβερίνη, κερκετίνη και άλλα, είναι παραδείγματα φυσικών αντιοξειδωτικών που εξετάζονται *in vitro* και *in vivo*, σε σύγχρονες κλινικές μελέτες, λόγω των αξιοπρόσεκτων αντιπολλαπλασιαστικών και προαποπτωτικών τους ιδιοτήτων.

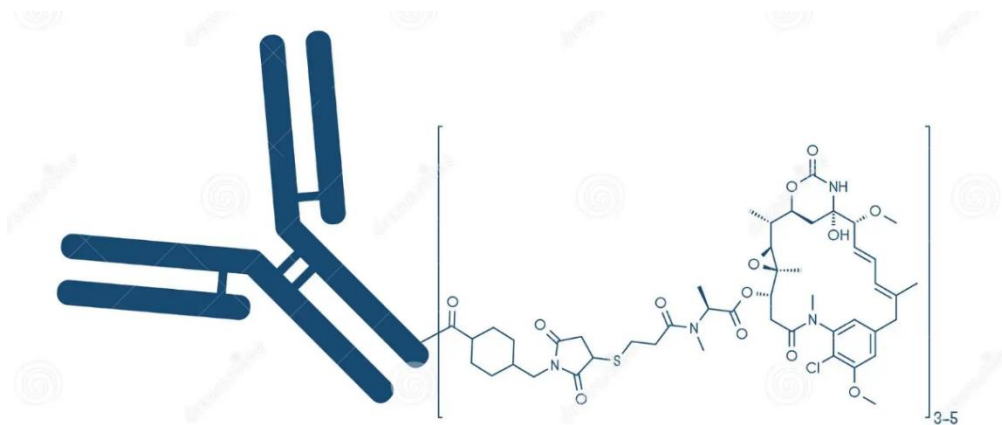
Όμως, η περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα και η τοξικότητα είναι μία από τις προκλήσεις των φυσικών φαρμάκων που καθιστά την ενσωμάτωσή τους στην κλινική πράξη δύσκολο εγχείρημα.

Η ανοσοθεραπεία έχει πυροδοτήσει μια επανάσταση στον τομέα της κλινικής ογκολογίας, με την αξιοσημείωτη εφαρμογή της σε διάφορους συμπαγείς όγκους. Θεαματικά αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί στο μελάνωμα, τον καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο των νεφρών και πολλά άλλα. Μια άλλη πρωτοποριακή πρόοδος στη θεραπεία του καρκίνου περιλαμβάνει τη χρήση συζευγμάτων φαρμάκων αντισωμάτων (ADCs), τα οποία έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στον καρκίνο του μαστού, τον καρκίνο του πνεύμονα και άλλες κακοήθειες. Επιπρόσθετα, η εισαγωγή αναστολέων κυκλίνης (αναστολείς CDK4/6) για τον καρκίνο του μαστού και η εμφάνιση νέων θεραπειών πυρηνικής ιατρικής όπως η θεραπεία με ραδιονουκλεϊδικούς υποδοχείς πεπτιδίων (PRRT) για νευροενδοκρινικούς όγκους σηματοδοτούν σημαντική πρόοδο και καινοτόμες προσεγγίσεις στον τομέα της ογκολογίας.

Μολαταύτα, χωρίς αμφιβολία, η προτιμώμενη προσέγγιση για τη θεραπεία των περισσότερων όγκων είναι η χειρουργική αφαίρεση είτε ο στόχος είναι η πλήρης εκρίζωση του όγκου για θεραπευτικούς σκοπούς είτε η μερική αφαίρεση (κυτταρομείωση), η οποία είναι κατάλληλη για ορισμένες περιπτώσεις μεταστατικής νόσου. Οι σύγχρονες τεχνικές, όπως η ρομποτική χειρουργική έχουν αποφέρει εξαιρετικά θετικά κλινικά αποτελέσματα, ελαχιστοποιώντας τις παρενέργειες και διατηρώντας την ποιότητα ζωής των ασθενών. Επιπλέον, υπάρχουν πολλά υποσχόμενα στοιχεία που υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των πρόσφατων εξελίξεων στις τοπικές θεραπείες για ογκολογικούς ασθενείς, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων ακτινοθεραπείας και των τοπικών θεραπειών όπως η ακτινοχειρουργική, η θεραπεία με λέιζερ και η κατάλυση.

- Μονοκλωνικά αντισώματα

- I. Τραστουζουμάμπη (Herceptin, άλλες εμπορικές ονομασίες): Αξιοποιείται στη θεραπεία τόσο του πρώιμου όσο και του προχωρημένου καρκίνου του μαστού. Χορηγείται συχνά με χημειοθεραπεία, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί μόνο του (ειδικά εάν η χημειοθεραπεία μόνο έχει ήδη δοκιμαστεί). Για τον προχωρημένο καρκίνο του μαστού, η θεραπεία χορηγείται συχνά για όσο διάστημα το φάρμακο είναι χρήσιμο. Αυτό το φάρμακο χορηγείται ενδοφλεβίως. Μια άλλη μορφή τραστουζουμάμπης, που ονομάζεται ένεση υαλουρονιδάσης (Herceptin Hylecta), χορηγείται με τη μορφή εμβολίου, υποδόρια.



Εικόνα 24: Δομή τραστοζουμάμπης

(<https://shorturl.at/f1LEZ>)

- II. Pertuzumab (Perjeta): Αυτό το μονοκλωνικό αντίσωμα HER2 μπορεί να χορηγηθεί ενδοφλέβια, συνδυαστικά με τραστοζουμάμπη και χημειοθεραπεία, είτε πριν είτε μετά τη χειρουργική επέμβαση για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο ή για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού.
- III. Έγχυση τραστοζουμάμπης, περτουζουμάμπης και υαλουρονιδάσης (Phesgo): Αυτός είναι ένας συνδυασμός αυτών των φαρμάκων που χορηγούνται ως υποδόρια (κάτω από το δέρμα) εμβόλιο για αρκετά λεπτά.
- IV. Μαργετουξιμάμπη (Margetenza): Αυτό το μονοκλωνικό αντίσωμα HER2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενδοφλεβίως μαζί με τη χημειοθεραπεία για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού.

- Αναστολείς κινάσης

Το HER2 είναι ένας τύπος πρωτεΐνης γνωστός ως κινάση. Οι κινάσες είναι πρωτεΐνες σε κύτταρα που κανονικά αναμεταδίδουν σήματα. Τα φάρμακα που μπλοκάρουν τις κινάσες ονομάζονται αναστολείς κινασών.

- I. Λαπατινίμπη (Tykerb): Αυτό το φάρμακο είναι ένα χάπι που λαμβάνεται καθημερινά. Η λαπατινίμπη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού. Συνήθως χορηγείται μαζί με την τραστοζουμάμπη και το χημειοθεραπευτικό φάρμακο καπεσιταβίνη.
- II. Neratinib (Nerlynx): Αυτός ο αναστολέας κινάσης λαμβάνεται ως χάπι, σε καθημερινή βάση. Το Neratinib χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου

του μαστού σε πρώιμο στάδιο, αφού μια γυναίκα έχει λάβει θεραπεία με τραστοζουμάμπη για ένα χρόνο και συνήθως χορηγείται για ένα χρόνο. Μπορεί, επίσης, να χορηγηθεί μαζί με το αντineοπλασματικό φάρμακο καπεσιταβίνη για τη θεραπεία ατόμων με μεταστατική νόσο, συνήθως αφού έχουν δοκιμαστεί τουλάχιστον 2 άλλα στοχευμένα φάρμακα κατά του HER2.

- III. Tucatinib (Tukysa): Αυτός ο αναστολέας κινάσης λαμβάνεται ως χάπι, συνήθως δύο φορές την ημέρα. Το tucatinib χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού, αφού έχει δοκιμαστεί τουλάχιστον ένα άλλο φάρμακο στοχευμένο κατά του HER2. Συνήθως χορηγείται μαζί με την τραστοζουμάμπη και το χημειο φάρμακο καπεσιταβίνη.

Περίπου 3 στους 4 καρκίνους του μαστού είναι θετικοί σε υποδοχείς ορμονών (οιστρογόνων ή προγεστερόνης). Για τις γυναίκες με αυτούς τους καρκίνους, η θεραπεία με ορμονοθεραπεία είναι συχνά χρήσιμη. Ορισμένα φάρμακα στοχευμένης θεραπείας μπορούν να κάνουν την ορμονοθεραπεία ακόμη πιο αποτελεσματική, αν και αυτά τα στοχευμένα φάρμακα μπορεί, επίσης, να εντείνουν τις παρενέργειες.

Όσον αφορά στη στοχευμένη θεραπεία για τον θετικό σε ορμονικούς υποδοχείς καρκίνο του μαστού, αξιοποιούνται:

- Αναστολείς κυκλικών κινασών:

I. Αναστολείς CDK4/6

Το Palbociclib (Ibrance), το Ribociclib (Kisqali) και το Abemaciclib (Verzenio) είναι φάρμακα που «μπλοκάρουν» τη δράση πρωτεϊνών στο κύτταρο, που ονομάζονται κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs), ιδιαίτερα τις CDK4 και CDK6. Ο αποκλεισμός αυτών των πρωτεϊνών στα θετικά για ορμονικούς υποδοχείς καρκινικά κύτταρα του μαστού βοηθά να σταματήσει η διαίρεση των κυττάρων. Αυτό μπορεί να επιβραδύνει την ανάπτυξη του καρκίνου. Πρόκειται για φάρμακα που έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία ορισμένων καρκίνων του μαστού που είναι θετικοί στους ορμονικούς υποδοχείς, αρνητικούς στο HER2. Οποιοδήποτε από αυτά τα φάρμακα μπορεί να χορηγηθεί μαζί με έναν αναστολέα αρωματάσης (AI) ή με το αντιοιστρογονικό φάρμακο φουλβεστράντη (fulvestrant) σε γυναίκες με προχωρημένο καρκίνο του μαστού, που έχουν βιώσει εμμηνόπαυση.

Οποιοδήποτε από αυτά τα φάρμακα μπορεί να χορηγηθεί με fulvestrant ή έναν αναστολέα αρωματάσης σε γυναίκες με προχωρημένο καρκίνο του μαστού που εξακολουθούν να βρίσκονται σε προεμμηνοπαυσιακή ή σχεδόν σε περιεμμηνοπαυσιακή φάση. Αυτές οι γυναίκες, ωστόσο, πρέπει επίσης να λαμβάνουν ανάλογα της ορμόνης απελευθέρωσης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRH), που εμποδίζουν τις ωοθήκες να παράγουν οιστρογόνα ή προβαίνουν σε χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών.

Το Abemaciclib μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί από μόνο του σε γυναίκες με προχωρημένο καρκίνο του μαστού που έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε ορμονοθεραπεία και χημειοθεραπεία. Για γυναίκες με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου που έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες και έχει μεγάλες πιθανότητες να επανέλθει μετά από χειρουργική επέμβαση, το abemaciclib μπορεί να χορηγηθεί ως επικουρική θεραπεία μαζί με ταμοξιφαίνη ή ΑΙ.

II. Αναστολέας mTOR

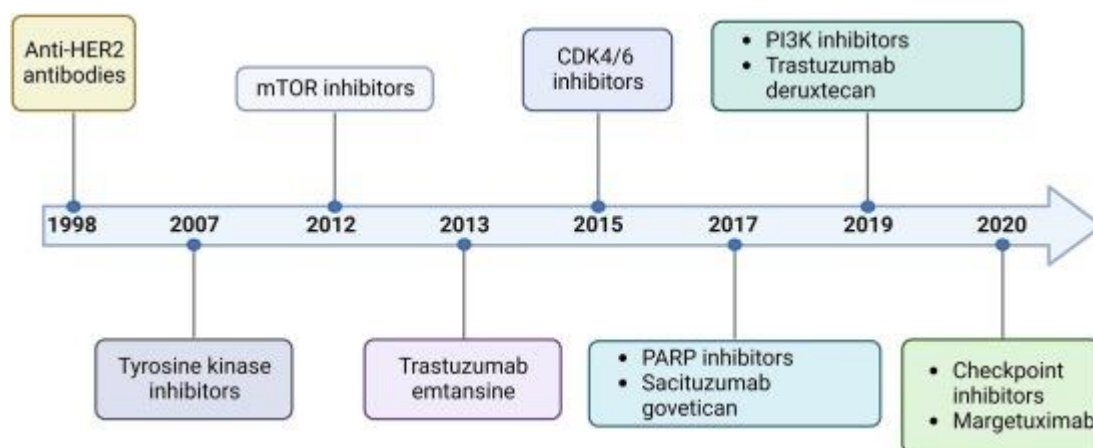
Το Everolimus (Afinitor) μπλοκάρει το mTOR, θηλαστικό στόχο της ραπαμυκίνης (mTOR), πρωτεΐνη που συνδράμει στην κυτταρική διαίρεση και, ως εκ τούτου, ανάπτυξη του καρκίνου. Ακόμα, εμποδίζει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων στους όγκους, περιστέλλοντας την εξάπλωσή τους. Όταν χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, μάλιστα, ενισχύει τη δράση των φαρμάκων ορμονοθεραπείας. Αυτό το φάρμακο χρησιμοποιείται σε γυναίκες που έχουν περάσει την εμμηνόπαυση και έχουν προχωρημένο καρκίνο του μαστού, θετικό στους ορμονικούς υποδοχείς, αρνητικό στον HER2. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον αναστολέα αρωματάσης Exemestane, υπό την εμπορική ονομασία Aromasin, σε γυναίκες των οποίων ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί περαιτέρω, παρόλο που λάμβαναν θεραπεία είτε λετροζόλης είτε αναστροζόλης ή σε περιπτώσεις συνέχισης ανάπτυξης του καρκίνου, λίγο μετά τη διακοπή της θεραπείας με τα προαναφερθέντα φάρμακα. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά με fulvestrant, ορμονοθεραπευτικό φάρμακο. Το Everolimus λαμβάνεται ως χάπι, συνήθως μία φορά την ημέρα.

III. Αναστολέας PI3K

Το Alpelisib (Piqray) μπλοκάρει μια μορφή της πρωτεΐνης PI3K στα καρκινικά κύτταρα, συνεισφέροντας στην παρεμπόδιση της ανάπτυξής τους. Αυτό το φάρμακο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με το ορμονικό φάρμακο fulvestrant για τη θεραπεία γυναικών με προχωρημένο θετικό σε ορμονικούς υποδοχείς, αρνητικό σε HER2 καρκίνο του μαστού, με μετάλλαξη γονιδίου PIK3CA, που έχει αναπτυχθεί κατά τη διάρκεια ή μετά τη θεραπεία με αναστολέα αρωματάσης. Το γονίδιο PIK3CA είναι το γονίδιο που σηματοδοτεί την παραγωγή της πρωτεΐνης PI3K από το κύτταρο.

IV. Αναστολέας AKT

Το Capivasertib (Truqap) μπλοκάρει τις μορφές της πρωτεΐνης AKT, η οποία αποτελεί μέρος μιας οδού σηματοδότησης μέσα στα κύτταρα (συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων) που μπορεί να τα βοηθήσει να αναπτυχθούν. Στο ίδιο μονοπάτι, περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες PI3K και PTEN. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με το ορμονικό φάρμακο fulvestrant για τη θεραπεία προχωρημένου καρκίνου του μαστού θετικού ορμονικού υποδοχέα, αρνητικού HER2, εάν τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα γονίδια PIK3CA, AKT1 ή PTEN και εάν ο καρκίνος έχει αναπτυχθεί κατά τη διάρκεια ή έπειτα από θεραπεία με ορμονοθεραπεία.



Εικόνα 25: Μονοκλωνικά αντισώματα ως αντινεοπλασματικοί παράγοντες
(<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0006295222003033-ga1.jpg>)

Όπως αναπτύχθηκε και ανωτέρω, θίγοντας τις καινοτόμες αντινεοπλασματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις, υφίστανται και συζεύγματα αντισώματος-φαρμάκου. Σε αυτά, το μονοκλωνικό αντίσωμα δρα σαν σήμα, προσκολλώμενο σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη στα καρκινικά κύτταρα, φέρνοντας τη χημειοθεραπεία απευθείας σε αυτά.

- Συζεύγματα αντισώματος-φαρμάκου

Sacituzumab govitecan (Trodelyv): Το τμήμα μονοκλωνικού αντισώματος προσκολλάται στην πρωτεΐνη Trop-2 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και φέρνει τη χημειοθεραπεία απευθείας σε αυτά. Μερικά καρκινικά κύτταρα του μαστού χαρακτηρίζονται από υπερβολική ποσότητα Trop-2, η οποία τα βοηθά να αναπτυχθούν και να εξαπλωθούν γρήγορα. Αυτό το σύζευγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία προχωρημένου καρκίνου του μαστού, θετικού για ορμονικούς υποδοχείς, αρνητικού σε HER2, σε άτομα που έχουν ήδη λάβει ορμονοθεραπεία και τουλάχιστον 2 χημειοθεραπείες.

Συνεχίζοντας με στοχεύσουσα θεραπεία για γυναίκες με μεταλλάξεις γονιδίων BRCA, αξιοποιούνται τα φάρμακα ολαπαρίμπη (Lynparza) και ταλαζοπαρίμπη (Talzenna), ως αναστολείς PARP. Οι πρωτεΐνες PARP συνήθως βοηθούν στην επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA μέσα στα κύτταρα. Τα γονίδια BRCA (BRCA1 και BRCA2) βοηθούν, επίσης, στην επιδιόρθωση του DNA, αλλά οι μεταλλάξεις σε ένα από αυτά τα γονίδια δρουν καταστέλλοντάς την. Οι αναστολείς PARP δρουν αναστέλλοντας τις πρωτεΐνες PARP. Επειδή τα καρκινικά κύτταρα με ένα μεταλλαγμένο γονίδιο BRCA αντιμετωπίζουν ήδη προβλήματα με την επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA, ο αποκλεισμός των πρωτεϊνών PARP συχνά οδηγεί στο θάνατο αυτών των κυττάρων. Αυτά τα φάρμακα είναι χάπια και λαμβάνονται μία ή δύο φορές την ημέρα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

Όσον αφορά στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC), είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν υποδοχείς οιστρογόνων ή προγεστερόνης και παράγουν πολύ λίγη ή καθόλου πρωτεΐνη HER2.

Σε αυτόν, αξιοποιείται και πάλι, όπως και στον θετικό σε ορμονικούς υποδοχείς καρκίνο, ένα σύζευγμα αντισώματος-φαρμάκου, το Sacituzumab-gonithec (Trodelvy). Επίσης, το Olaparib μπορεί να χορηγηθεί σε γυναίκες με μετάλλαξη BRCA, με πρώιμο στάδιο HER2-αρνητικό καρκίνο του μαστού, μετά από χειρουργική επέμβαση, που έχουν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία (πριν ή μετά την επέμβαση) και διατρέχουν υψηλό κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου. Χορηγείται συνήθως για ένα χρόνο. Όταν χορηγείται με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να αυξήσει το προσδόκιμο ζωής σε ορισμένες γυναίκες.

Συμπληρωματικά, το Olaparib και το Talazoparib μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία προχωρημένου ή μεταστατικού, αρνητικού σε HER2 καρκίνου του μαστού σε γυναίκες με μετάλλαξη BRCA, που έχουν ήδη υποβληθεί σε χημειοθεραπεία. Εάν ο καρκίνος είναι θετικός στους ορμονικούς υποδοχείς, το Olaparib μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί σε γυναίκες, που έχουν ήδη λάβει ορμονική θεραπεία.

Συχνές παρενέργειες της χημειοθεραπείας αποτελούν η αδιαθεσία, απώλεια όρεξης, απώλεια σωματικού βάρους, η αίσθηση εξάντλησης, ο αυξημένος κίνδυνος μόλυνσης, η αιμορραγία, η διάρροια ή δυσκοιλιότητα, η απώλεια μαλλιών και πλήθος άλλων δυσάρεστων για την ασθενή συνεπειών.

Πέραν της χημειοθεραπείας, η ακτινοθεραπεία αποτελεί θεραπευτική στρατηγική έναντι του καρκίνου του μαστού. Η ακτινοθεραπεία χορηγείται παράλληλα με «συντηρητικές» χειρουργικές επεμβάσεις, όπως ογκεκτομή ή μερική μαστεκτομή, και περιστασιακά μετά από ριζική μαστεκτομή σε ορισμένες περιπτώσεις. Μπορεί ακόμη να χορηγηθεί πριν από τη χειρουργική επέμβαση για τη συρρίκνωση ενός μεγάλου όγκου. Πραγματοποιείται με χρήση ραδιενεργών πηγών (από τη μεταστοιχείωση ραδιενεργών ατόμων) ή γραμμικών επιταχυντών. Παρενέργειές της είναι η ερυθρότητα που προσομοιάζει σε έγκαυμα, κνησμός, ξηροδερμία, φωτοευαισθησία και άλλες.

Στην περίπτωση που οι υποδοχείς των ορμονών είναι θετικοί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ορμονοθεραπεία, είτε μόνη της ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία και /ή Ακτινοθεραπεία. Συνήθως, χορηγείται Tamoxifen (αντιοιστρογόνο μεταξύ άλλων), αλλά και αναστολείς της αρωματάσης, είτε στη θέση του Tamoxifen ή διαδοχικά. Η Ορμονοθεραπεία χορηγείται συνήθως από το στόμα και έχει λιγότερες παρενέργειες από τη Χημειοθεραπεία. Μπορεί, όμως, να επιφέρει και αυτή, μεμονωμένα, σημαντικές παρενέργειες και γι' αυτό χρήζει στενής ιατρικής παρακολούθησης, κατά τη χορήγησή της. Παραδείγματα ορμονοθεραπείας αναλύθηκαν και νωρίτερα στην παρούσα εργασία [18], [43], [80], [81].

1.5 Κυτταρικός θάνατος

Ο κυτταρικός θάνατος συμβαίνει όταν τα κύτταρα στο σώμα σας σταματούν να λειτουργούν και πεθαίνουν. Τα υγιή ανθρώπινα κύτταρα μπορούν να αναπαραχθούν ή να διαιρεθούν έως και 60 φορές πριν συμβεί ο κυτταρικός θάνατος. Οι αιτίες κυτταρικού θανάτου είναι πολλές. Μερικά κύτταρα πεθαίνουν καθώς αναπτύσσονται, πριν καν σχηματιστούν πλήρως, στην τελική τους μορφή. Ορισμένα παλιά κύτταρα φτάνουν στην ηλικία που δεν μπορούν πλέον να διαιρεθούν και πεθαίνουν. Τα ανεπανόρθωτα κατεστραμμένα κύτταρα πεθαίνουν φυσικά. Τέλος, ασθένειες, τραυματισμοί, τοξίνες και ορισμένες θεραπείες βλάπτουν τα κύτταρα, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο.

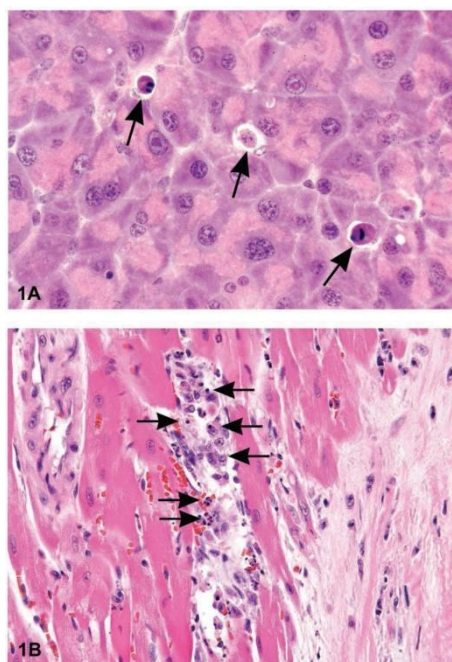
Υπάρχουν τέσσερα είδη κυτταρικού θανάτου: I. η απόπτωση, II. η αυτοφαγία, III. η νέκρωση και IV. η νεκρόπτωση. Τα δύο πρώτα είδη αποτελούν μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ενώ η νέκρωση χαρακτηρίζεται από πρόωμο κυτταρικό θάνατο μετά από τραυματισμό ή βλάβη, όπως υποξεία ή φλεγμονή. Η νεκρόπτωση είναι γενετικά ελεγχόμενη, ιδιότητα που τη διαφοροποιεί από τη νέκρωση, με την οποία έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Η απόπτωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία, που ακολουθεί τη φαγοκυττάρωση του κυτταρικού περιεχομένου, δίχως να επιφέρει βλάβη σε γειτονικά υγιή κύτταρα. Η αυτοφαγία περιλαμβάνει τη διάσπαση κυτταρικών συστατικών εντός του κυττάρου. Αντίθετα, η νέκρωση και η νεκρόπτωση κινητοποιούν μηχανισμούς φλεγμονώδους απόκρισης. Η βαθιά και πλήρης εμπέδωση των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, ιδίως της απόπτωσης, οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω, είναι πολύτιμης σημασίας, καθώς μπορεί να συμβάλει αποτελεσματικά στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών στρατηγικών για τη θεραπεία του καρκίνου και άλλων ασθενειών.

1.5.1 Απόπτωση

Ο όρος απόπτωση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1972 από τους Kerr, Wyllie και Currie για να περιγράψει μια μορφολογικά ξεχωριστή μορφή κυτταρικού θανάτου. Η κατανόηση για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης σε κύτταρα θηλαστικών προέκυψε από τη διερεύνηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη του νηματώδους *Caenorhabditis Elegans*. Η απόπτωση, έκτοτε, έχει αναγνωριστεί και γίνει αποδεκτή ως ένας ξεχωριστός και σημαντικός τρόπος «προγραμματισμένου» κυτταρικού θανάτου, ο οποίος περιλαμβάνει τη γενετικά καθορισμένη εξάλειψη των κυττάρων.

Η οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία έχουν περιγράψει διάφορες μορφολογικές αλλαγές, που συμβαίνουν κατά την απόπτωση. Στα αρχικά της στάδια της, η συρρίκνωση και η πύκνωση των κυττάρων μπορεί να παρατηρηθεί με οπτικό μικροσκόπιο. Η πύκνωση είναι το αποτέλεσμα της συμπύκνωσης της χρωματίνης, το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα της απόπτωσης. Η ιστολογική εξέταση με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης δείχνει ότι η απόπτωση αφορά μεμονωμένα κύτταρα ή μικρές ομάδες κυττάρων. Τα αποπτωτικά κύτταρα εμφανίζονται ως στρογγυλές ή ωοειδείς

μάζες με σκούρο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και σκούρα μωβ θραύσματα πυρηνικής χρωματίνης. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία παρέχει μια ακόμα πιο σαφέστερη εικόνα των ενδοκυτταρικών μεταβολών. Στην αρχή της φάσης συμπίκνωσης της χρωματίνης, πυκνό πυρηνικό υλικό με ηλεκτρονική πυκνότητα βρίσκεται σε ομάδες στην περιφέρεια κάτω από την πυρηνική μεμβράνη, δίχως αυτό να αναιρεί και την παρουσία ομοιόμορφα πυκνών πυρήνων.



Εικόνα 26: Σχήμα 1A: Τα βέλη δείχνουν αποπτωτικά κύτταρα που συρρικνώνονται με συμπυκνωμένο κυτταρόπλασμα. Οι πυρήνες είναι πυκνωτικοί και κατακερματισμένοι.

Σχήμα 1B: Μέσα στον διάμεσο χώρο υπάρχουν αποπτωτικά κύτταρα με συμπυκνωμένο κυτταρόπλασμα, συμπυκνωμένη και υπερχρωματική χρωματίνη και κατακερματισμένοι πυρήνες (μακριά βέλη). Αναμεμιγμένα με τα αποπτωτικά σώματα είναι μακροφάγα, μερικά με εμποτισμένα αποπτωτικά σώματα (κεφαλές βέλους)

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/>)

Πραγματοποιείται διάρρηξη πυρήνων και διαχωρισμός των κυτταρικών θραυσμάτων, ώστε να μετατραπούν σε αποπτωτικά σώματα, κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας που ονομάζεται «εκβλάστηση». Τα αποπτωτικά σώματα αποτελούνται από κυτταρόπλασμα με πυκνά συσκευασμένα οργανίδια με ή χωρίς πυρηνικό θραύσμα. Η ακεραιότητα των οργανιδίων εξακολουθεί να διατηρείται, ενώ περικλείονται στην άθικτη πλασματική μεμβράνη. Εν συνεχεία, τα αποπτωτικά σώματα φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα, παρεγχυματικά κύτταρα ή νεοπλασματικά κύτταρα και αποικοδομούνται εντός των λυσοσωμάτων. Δεν υπάρχει ουσιαστικά καμία φλεγμονώδης αντίδραση που να σχετίζεται με τη διαδικασία της απόπτωσης ούτε με την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων, λόγω του ότι, κατά πρώτον, τα

αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν τα κυτταρικά τους συστατικά στον περιβάλλοντα διάμεσο ιστό και, δευτερευόντως, φαγοκυτταρώνονται γρήγορα από τα περιβάλλοντα κύτταρα, αποτρέποντας έτσι πιθανώς τη δευτερογενή νέκρωση. Τέλος, αλλά όχι ελάσσονος σημασίας, τα μακροφάγα δεν παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες.

Οι μηχανισμοί της απόπτωσης είναι εξαιρετικά περίπλοκοι και πολυποίκιλοι, περιλαμβάνοντας έναν «καταρράκτη μοριακών γεγονότων». Η, μέχρι σήμερα, έρευνα δείχνει ότι υπάρχουν δύο κύρια αποπτωτικά μονοπάτια: η εξωτερική οδός ή η οδός του υποδοχέα του θανάτου και η ενδογενής ή μιτοχονδριακή οδός. Ωστόσο, αναδύονται στην επιφάνεια στοιχεία που υποδηλώνουν σύνδεση των δύο μονοπατιών και αλληλεπίδραση-αλληλεξάρτηση μεταξύ τους.

Υφίσταται και μια πρόσθετη οδός που περιλαμβάνει κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από T-κύτταρα και εξαρτώμενη, από τη συνεργασία μεταξύ της περφορίνης και των γκρανζύμων, θανάτωση του κυττάρου. Η οδός περφορίνης/γκρανζύμου μπορεί να προκαλέσει απόπτωση είτε μέσω του γρανζύμου B είτε του γρανζύμου A. Αυτή η οδός ξεκινά με τη διάσπαση της κασπάσης-3 και οδηγεί σε κατακερματισμό του DNA, αποικοδόμηση κυτταροσκελετικών και πυρηνικών πρωτεϊνών, διασύνδεση πρωτεϊνών, σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων, έκφραση συνδετών για υποδοχείς φαγοκυτταρικών κυττάρων και τελικά πρόσληψη από φαγοκυτταρικά κύτταρα. Η οδός του γρανζύμου A ενεργοποιεί μια παράλληλη, ανεξάρτητη από κασπάση, οδό κυτταρικού θανάτου, μέσω μονόκλωνης βλάβης του DNA.

Όσον αφορά στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης, γίνεται ενεργοποίηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (οι Bak και Bax), οι οποίες σχηματίζουν ολιγομερή στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, προκαλώντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τον διαμεμβρανικό χώρο. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c οδηγεί στον σχηματισμό αποπτωσωμάτων στα οποία συμμετέχουν ο παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικής πρωτεάσης-1 (Araf-1) και η κασπάση-9. Η κασπάση-9 ενεργοποιείται μέσα στα αποπτωσώματα και στη συνέχεια, ενεργοποιεί, με τη σειρά της, μέσω πρωτεολυτικής πέψης, καθοδικές κασπάσες, όπως είναι η κασπάση 3.

Οι εξωτερικές οδοί σηματοδότησης της απόπτωσης περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις, που εκκινούν από διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Πρόκειται για υποδοχείς θανάτου, που είναι μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF). Τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων TNF μοιράζονται παρόμοιες εξωκυτταρικές περιοχές και έχουν μια κυτταροπλασματική περιοχή περίπου 80 αμινοξέων που ονομάζεται «περιοχή θανάτου». Αυτή η περιοχή θανάτου παίζει κρίσιμο ρόλο στη μετάδοση του σήματος κυτταρικού θανάτου από την επιφάνεια του κυττάρου στις ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης.

Η αλληλουχία των γεγονότων που ορίζουν την εξωγενή φάση της απόπτωσης χαρακτηρίζεται καλύτερα με τα μοντέλα FasL/FasR και TNF- α /TNFR1. Σε αυτά τα μοντέλα, υπάρχει ομαδοποίηση υποδοχέων και δέσμευση με τον ομόλογο τριμερή συνδέτη. Κατά τη δέσμευση συνδέτη, στρατολογούνται πρωτεΐνες κυτταροπλασματικού προσαρμογέα που εμφανίζουν αντίστοιχες περιοχές θανάτου που συνδέονται με τους υποδοχείς. Η δέσμευση του συνδέτη Fas στον υποδοχέα Fas έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση της πρωτεΐνης προσαρμογής FADD και η δέσμευση του συνδέτη TNF στον υποδοχέα TNF έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση της πρωτεΐνης προσαρμογής TRADD. Στη συνέχεια, το FADD συνδέεται με την προκασπάση-8, μέσω διμερισμού της περιοχής τελεστή θανάτου. Σε αυτό το σημείο, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο σηματοδότησης που προκαλεί θάνατο (DISC), με αποτέλεσμα την αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση της προκασπάσης-8. Μόλις ενεργοποιηθεί η κασπάση-8, ενεργοποιείται η φάση εκτέλεσης της απόπτωσης.

Σε αυτό το μονοπάτι, που καλείται «φάση εκτέλεσης» καταλήγουν τόσο η εξωτερική όσο και η εγγενής οδός απόπτωσης. Σημείο εκκίνησης αποτελεί η ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών. Οι κασπάσες εκτέλεσης ενεργοποιούν την κυτταροπλασματική ενδονουκλεάση, η οποία αποικοδομεί το πυρηνικό υλικό και τις πρωτεάσες, που αποικοδομούν τις πυρηνικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Η κασπάση-3, η κασπάση-6 και η κασπάση-7 λειτουργούν ως «εκτελεστές», διασπώντας διάφορα υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένων των κυτοκερατινών, της πολυμεράσης πολύ (ADP-ριβόζης) (PARP), της κυτταροσκελετικής πρωτεΐνης, της πυρηνικής πρωτεΐνης NuMA και άλλων, που, εν τέλει, πυροδοτούν το σύνολο των μορφολογικών και βιοχημικών μεταβολών, που παρατηρούνται στα αποπτωτικά κύτταρα.

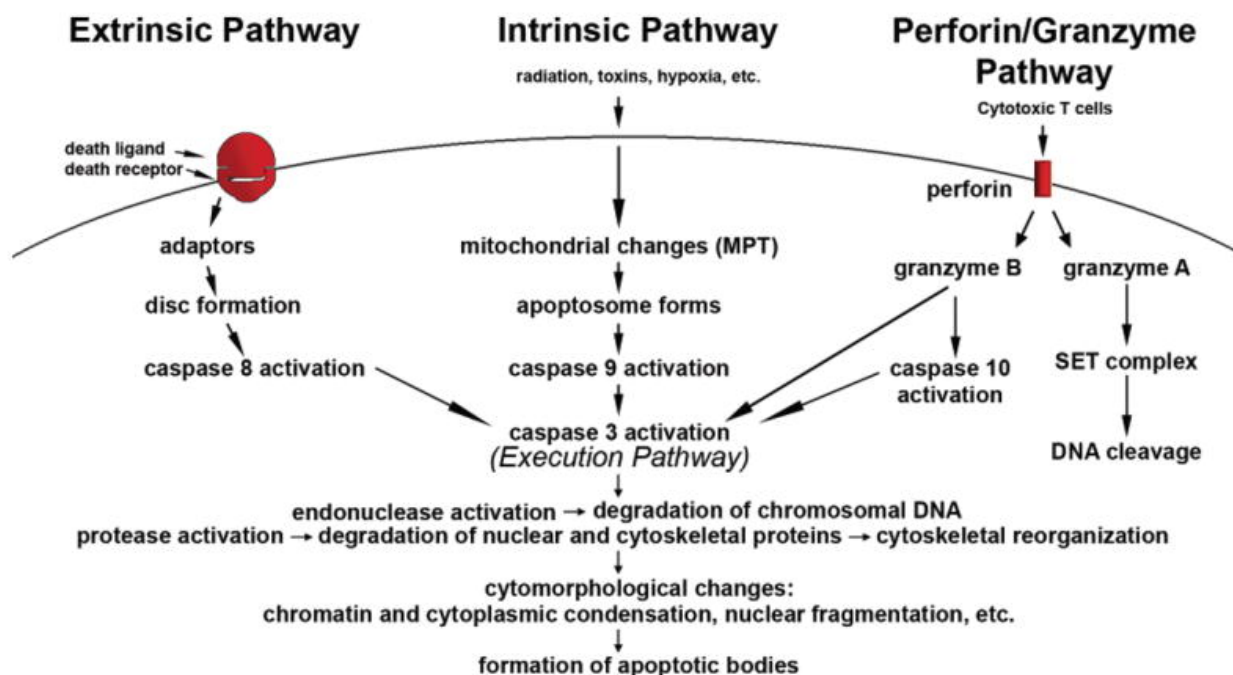
Η κασπάση-3 θεωρείται ότι είναι η πιο σημαντική από τις κασπάσες εκτελεστές και ενεργοποιείται από οποιαδήποτε από τις «κασπάσες-εκκινήτες» (κασπάση-8, κασπάση-9 ή κασπάση-10). Η κασπάση-3 ενεργοποιεί ειδικά την ενεργοποιημένη από κασπάση DNase (CAD) ή υπομονάδα βήτα παράγοντα κατακερματισμού DNA (ενδονουκλεάση CAD). Σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα η CAD συμπλέκεται με τον αναστολέα της, την ICAD. Σε αποπτωτικά κύτταρα, η ενεργοποιημένη κασπάση-3 διασπά το ICAD για να απελευθερώσει CAD. Το CAD στη συνέχεια αποικοδομεί το χρωμοσωμικό DNA εντός των πυρήνων και προκαλεί συμπύκνωση χρωματίνης. Η κασπάση-3 προκαλεί, επίσης, κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση και αποσύνθεση του κυττάρου σε αποπτωτικά σώματα. Μάλιστα, η τζελσολίνη πλάσματος, μια πρωτεΐνη

που δεσμεύει την ακτίνη, έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα βασικά υποστρώματα της ενεργοποιημένης κασπάσης-3.

Η τζελσολίνη τυπικά ενεργεί ως «πυρήνας» για τον πολυμερισμό της ακτίνης και δεσμεύει τη διφωσφορική φωσφατιδυλινουσιτόλη, συντελώντας στην οργάνωση της ακτίνης και τη μεταγωγή σήματος. Η κασπάση-3 διασπά τη τζελσολίνη, τα διασπασμένα θραύσματα της οποίας, με τη σειρά τους, διασπούν νημάτια ακτίνης με τρόπο ανεξάρτητο από το ασβέστιο. Αυτό οδηγεί σε διαταραχή του κυτταροσκελετού, ενδοκυτταρική μεταφορά, κυτταρική διαίρεση και μεταγωγή σήματος.

Η φαγοκυτταρική πρόσληψη αποπτωτικών κυττάρων είναι το τελευταίο συστατικό της απόπτωσης. Η ασυμμετρία φωσφολιπιδίων και η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων και των θραυσμάτων τους είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της φάσης. Αν και ο μηχανισμός της μετατόπισης της φωσφατιδυλοσερίνης στο εξωτερικό του κυττάρου κατά τη διάρκεια της απόπτωσης δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, έχει συσχετιστεί με απώλεια δραστηριότητας της αμινοφωσφολιπιδικής τρανσλοκάσης. Η εμφάνιση της φωσφοτιδυλοσερίνης στο εξωτερικό των αποπτωτικών κυττάρων, μεταγενέστερα, διευκολύνει τη μη φλεγμονώδη φαγοκυτταρική αναγνώριση, επιτρέποντας την πρόωμη πρόσληψη και απόρριψή τους. Αυτή η διαδικασία πρόωμης και αποτελεσματικής πρόσληψης, χωρίς απελευθέρωση κυτταρικών συστατικών, ευθύνεται για την απουσία φλεγμονώδους απόκρισης

Τα κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης της απόπτωσης διακρίνονται και στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 27: Κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης: Εξωγενές, ενδογενές και μονοπάτι περφορίνης/γρανζύμου (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/>)

Εξετάζοντας την απόπτωση από βιοχημική σκοπιά, οι κασπάσες, που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε αυτήν, διακρίνονται για την πρωτεολυτική δράση τους και είναι σε θέση να διασπών πρωτεΐνες σε υπολείμματα ασπαρτικού οξέος, αν και διαφορετικές κασπάσες έχουν διαφορετικές ειδικότητες που περιλαμβάνουν την αναγνώριση γειτονικών αμινοξέων. Μόλις ενεργοποιηθούν, αρχικά, οι κασπάσες, φαίνεται να υπάρχει μια μη αναστρέψιμη δέσμευση για τον κυτταρικό θάνατο. Μέχρι σήμερα, δέκα κύριες κασπάσες έχουν εντοπιστεί και κατηγοριοποιηθεί ευρέως σε εκκινητές (κασπάση-2,-8,-9,-10), τελεστές ή εκτελεστές (κασπάση-3,-6,-7) και φλεγμονώδεις κασπάσες (κασπάση-1,-4,-5). Οι άλλες κασπάσες που έχουν ταυτοποιηθεί περιλαμβάνουν την κασπάση-11, η οποία αναφέρεται ότι ρυθμίζει την απόπτωση και την ωρίμανση της κυτοκίνης κατά τη διάρκεια του σηπτικού σοκ, την κασπάση-12, η οποία μεσολαβεί στην ενδοπλασματική ειδική απόπτωση και την κυτταροτοξικότητα από το αμυλοειδές-β, την κασπάση-13, η οποία προτείνεται να είναι ένα γονίδιο βοοειδών και την κασπάση-14, η οποία εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε εμβρυϊκούς ιστούς, αλλά όχι σε ιστούς ενηλίκων.

Η εκτεταμένη διασύνδεση πρωτεϊνών είναι ένα άλλο χαρακτηριστικό των αποπτωτικών κυττάρων και επιτυγχάνεται μέσω της έκφρασης και ενεργοποίησης της τρανσγλουταμίνωσης των ιστών. Συμβαίνει, επίσης, διάσπαση του DNA από ενδονουκλεάσες, η δράση των οποίων εξαρτάται από Ca^{2+} και Mg^{2+} , με αποτέλεσμα τη δημιουργία θραυσμάτων DNA, μήκους από 180 έως 200 ζεύγη βάσεων. Τα θραύσματα αυτά μπορούν να απεικονιστούν με ηλεκτροφόρηση γέλης αгарόζης, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου, σε υπεριώδη φωτισμό.

Ένα άλλο βιοχημικό χαρακτηριστικό είναι η έκφραση δεικτών στην επιφάνεια των κυττάρων, που έχουν ως αποτέλεσμα την πρόιμη φαγοκυτταρική αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων από γειτονικά κύτταρα, επιτρέποντας γρήγορη φαγοκυττάρωση, με ελάχιστο κίνδυνο στον περιβάλλοντα ιστό. Αυτό επιτυγχάνεται με την κίνηση της φυσιολογικής φωσφατιδυλοσερίνης που στρέφεται προς το εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστιβάδας του κυττάρου προς έκφραση στα εξωτερικά στρώματα της πλασματικής μεμβράνης. Αν και η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης είναι ένας πολύ γνωστός δείκτης αναγνώρισης για φαγοκύτταρα στην επιφάνεια του αποπτωτικού κυττάρου, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι και άλλες πρωτεΐνες εκτίθενται στην επιφάνεια του κυττάρου κατά την εξάλειψη των αποπτωτικών κυττάρων. Αυτά περιλαμβάνουν την αννεξίνη I και την καλρετικουλίνη.

Η αννεξίνη V είναι πρωτεΐνη που δεσμεύει τη φωσφατιδυλοσερίνη που αλληλεπιδρά με τα υπολείμματα φωσφατιδυλοσερίνης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της απόπτωσης. Οι ποσότητες καλρετικουλίνης αυξάνονται σημαντικά στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων, ρυθμίζοντας έτσι τη διαδικασία εξάλειψής τους, μιας και, η εν λόγω, πρωτεΐνη συνιστά δείκτη για την προσέλκυση της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης. Υπογραμμίζεται, μάλιστα, πως η καλρετικουλίνη

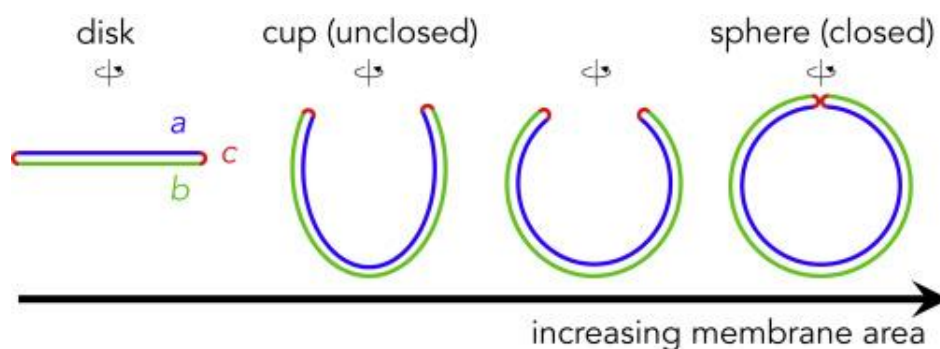
(CRT) εκφράζεται σε πολλά καρκινικά κύτταρα και παίζει ρόλο στο να αναγνωριστούν από τα μακροφάγα, τα οποία τα «εγκολπώνουν».

1.5.2 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ενεργή σε βασικά επίπεδα στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, όπου θεωρείται ότι διαδραματίζει καίριο ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας των ενδοκυτταρικών οργανιδίων και πρωτεϊνών. Εντούτοις, η αυτοφαγία συνιστά βασικό συστατικό της προσαρμοστικής απόκρισης των κυττάρων και των οργανισμών στη στέρηση θρεπτικών ουσιών, επιτυγχάνοντας την κυτταρική επιβίωση, έως ότου τα θρεπτικά συστατικά γίνουν ξανά διαθέσιμα.

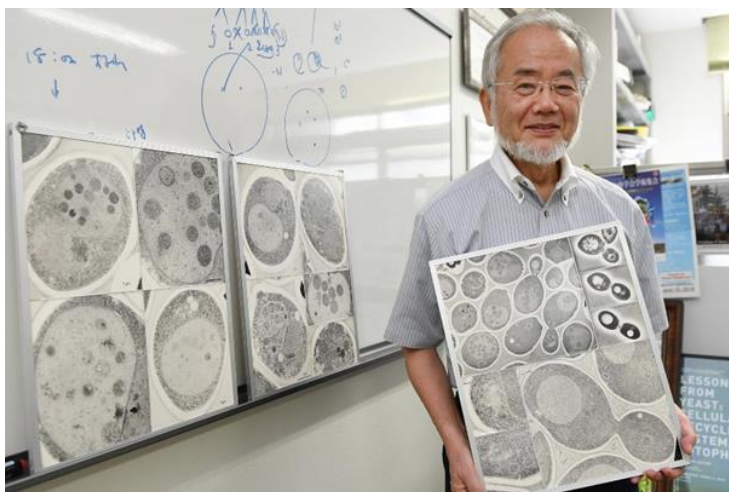
Κατά την εξέταση των νεφρών σε νεογνά μυών, ο C. De Duve εισήγαγε τον όρο «κυτταρική αυτοφαγία», το 1963. Αυτή η διαδικασία εμφανίζεται μέσα στα κύτταρα και περιλαμβάνει την απομόνωση και την αποικοδόμηση κατεστραμμένων ή μακρόβιων οργανιδίων και πρωτεϊνών από τα λυσοσώματα. Αν και είναι μια φυσιολογική διαδικασία, μπορεί, επίσης, να ενεργοποιηθεί ως απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες για τα κύτταρα, όπως η στέρηση θρεπτικών ουσιών, η έλλειψη αυξητικών παραγόντων και το οξειδωτικό στρες. Η ενεργοποίηση της κυτταρικής αυτοφαγίας εξυπηρετεί έναν διπλό σκοπό για το κύτταρο: προστατεύει την επιβίωσή του επανατοποθετώντας τα προϊόντα διάσπασης, αλλά μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική πέψη της κυτταρικής μάζας.

Σε μορφολογικό επίπεδο, υφίστανται αλλαγές στο κύτταρο που διαφαίνονται στην εικόνα. Κάθε σχήμα αντιπροσωπεύει ένα αξονικά συμμετρικό κυστίδιο μεμβράνης. Καθώς αυξάνεται η επιφάνεια, ένας φαγοφόρος προχωρά μετασχηματίζεται από μορφή δίσκου, αρχικά, σε ένα ενδιάμεσο σε σχήμα κυπέλλου και, καταλήγει, σε ένα σφαιρικό στοματοκύτταρο. Οι περιοχές a, b και c δείχνουν την εσωτερική μεμβράνη, την εξωτερική μεμβράνη και το χείλος, αντίστοιχα.



Εικόνα 28: Μορφολογικές αλλαγές κυττάρου στην αυτοφαγία

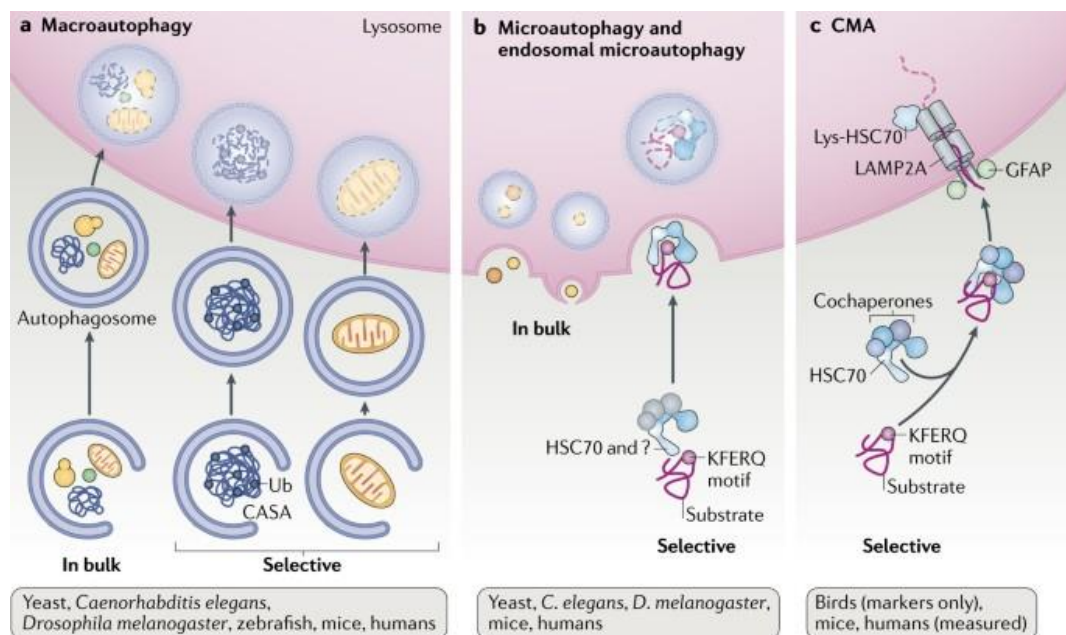
Ο καθηγητής Ohsumi κατέκτησε βραβείο Nobel Φυσιολογίας το 2016, με αφορμή την εκτεταμένη γενετική του μελέτη για την αυτοφαγία σε ζύμες, μελετώντας τις κυτταρικές διαδικασίες που διενεργούνται, προκειμένου να προσαρμοστούν στο διατροφικό περιβάλλον τους, αλλά και σε άλλους παράγοντες. Η συνεισφορά του πρωτοποριακές στην αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών της αυτοφαγίας και της βιοχημικής σημασίας της υπήρξε λυσιτελής.



Εικόνα 29: Η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών της αυτοφαγίας και των κυτταρικών μεταβολών της, ως εφαλτήριο για την κατάκτηση του βραβείου Nobel, το 2016

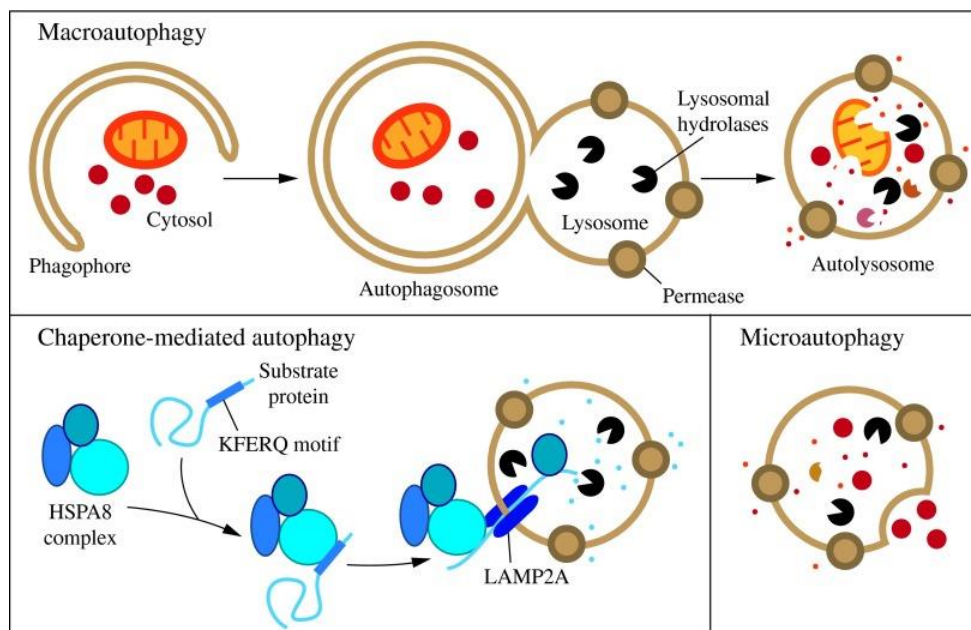
(<https://www.science.org/content/article/nobel-honors-discoveries-how-cells-eat-themselves>)

Διακρίνεται σε διάφορες μορφές, συμπεριλαμβανομένης της μακροαυτοφαγίας, της μικροαυτοφαγίας και της αυτοφαγίας μέσω πρωτεϊνών- συνοδών (Chaperone-Mediated Autophagy, CMA), οι οποίες είναι οι πιο ευρέως αναγνωρισμένες. Πρόσφατα, εισήχθη ένας νέος τύπος αυτοφαγίας, στον οποίο το RNA λαμβάνεται και αποικοδομείται απευθείας από τα λυσοσώματα. Αυτή η οδός, που ονομάζεται «αυτοφαγία RNA», εξαρτάται από το ATP και, σε αντίθεση με την αυτοφαγία που διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες-συνοδούς, είναι ανεξάρτητη από τις πρωτεΐνες HSPA8/Hsc70.



Εικόνα 30: *a.* Μακροαυτοφαγία, *b.* ενδοσωμική μικροαυτοφαγία και *c.* αυτοφαγία μέσω πρωτεϊνών-συνοδών

(<https://www.nature.com/articles/s41580-018-0001-6>)

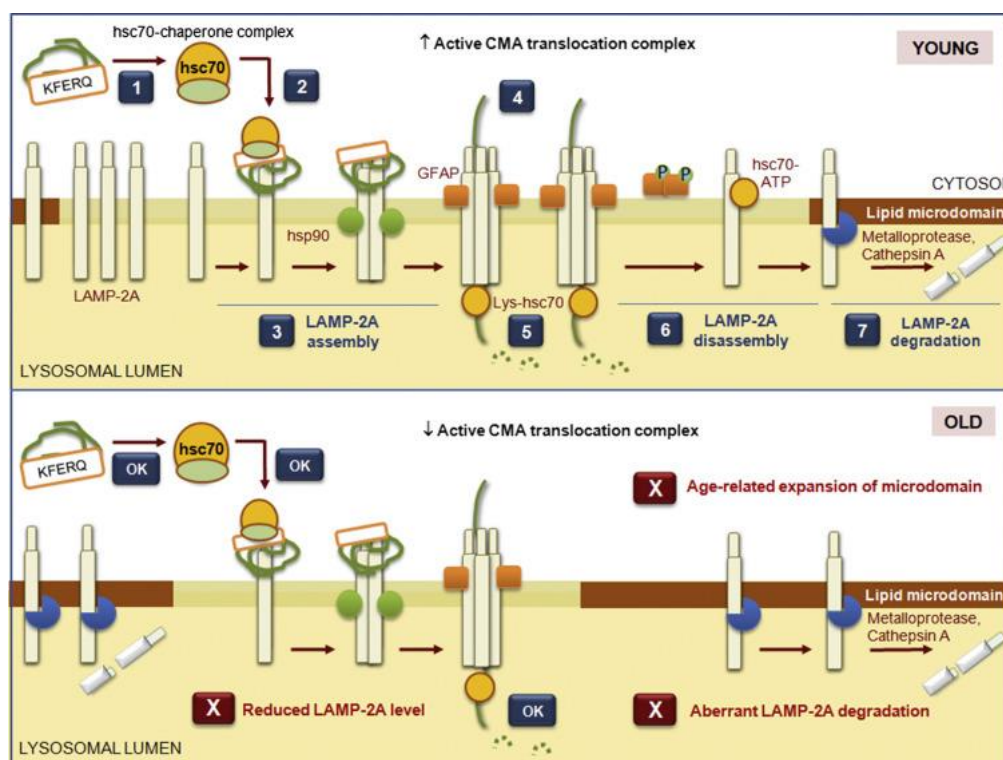


Εικόνα 31: Σχηματική αναπαράσταση πορείας τύπων αυτοφαγίας

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894687/>)

Επιχειρώντας μια συνοπτική παρουσίαση κάθε μορφή αυτοφαγίας, εναρκτήριο σημείο αποτελεί η αυτοφαγία με μεσολάβηση πρωτεϊνών-συνοδών ή, με άλλα λόγια, η αυτοφαγία μεσολαβούμενη από μοριακούς συνοδούς (Chaperone Mediated Autophagy, CMA). Κατά τη διάρκεια αυτού του μηχανισμού, οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν το μοτίβο πενταπεπτιδίου KFERQ ((Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) διασπώνται

από το σύμπλοκο Hsc70 και κατευθύνονται ειδικά προς τα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Η αποικοδόμηση πραγματοποιείται, στη συνέχεια, μέσω αλληλεπίδρασης και εσωτερίκευσης μέσω του λυσοσωματικού υποδοχέα LAMP-2A (Lysosome-Associated Membrane Protein 2).

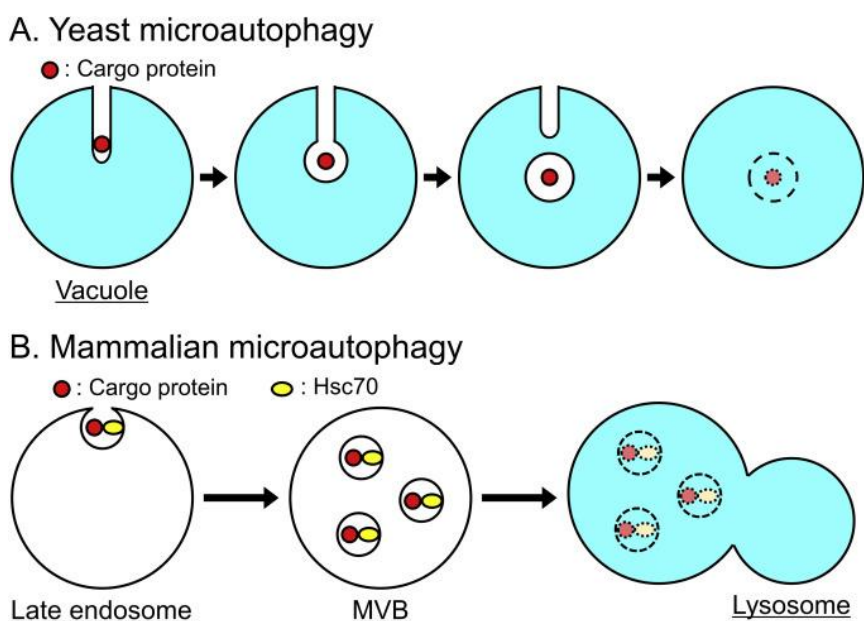


Εικόνα 32: Αυτοφαγία μέσω πρωτεϊνών-συνοδών (Chaperone-mediated Autophagy) (<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/chaperone-mediated-autophagy>)

Εμβαθύνοντας στον μηχανισμό της μικροαυτοφαγίας, πρόκειται για μια μορφή αυτοφαγίας, όπου το κυτταρόπλασμα περιβάλλει τη μεμβράνη των λυσοσωμάτων και των συστατικών της, που πρόκειται να αποικοδομηθούν, δίχως το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων ή παρόμοιων δομών. Η μικροαυτοφαγία, που εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1966, έχει διερευνηθεί κυρίως σε ζυμομύκητες. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την αποικοδόμηση των κυτταροπλασματικών υποστρωμάτων. Ωστόσο, ο μηχανισμός της μικροαυτοφαγίας στα κύτταρα των θηλαστικών είναι ένα επίκαιρο ερώτημα εδώ και πολλά χρόνια, με την έρευνα να μην έχει κατορθώσει να οδηγήσει σε οριστικές απαντήσεις. Όμως, κοινό τόσο σε κύτταρα ζυμών όσο και θηλαστικών είναι το γεγονός ότι η μικροαυτοφαγία επάγεται από τη ραπαμυκίνη, τόσο στα κύτταρα των ζυμών όσο και σε αυτά των θηλαστικών. Η εφαρμογή μηχανισμών που προέρχονται από ζυμομύκητες στη μικροαυτοφαγία θηλαστικών δεν είναι εφικτή λόγω των παραλλαγών στους τύπους των οργανιδίων που εμπλέκονται στην «εγκόλπωση» πρωτεϊνών υποστρώματος. Τα όψιμα ενδοσώματα σε κύτταρα θηλαστικών έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, μέσω μιας διαδικασίας

που βασίζεται στην παρουσία της πρωτεΐνης θερμικού σοκ, Hsc70. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70, Hsc70, αναγνωρίζει τις στοχεύουσες πρωτεΐνες, οι οποίες, εν συνεχεία, μεταφέρονται σε όψιμα ενδοσώματα, με απότοκο το σχηματισμό πολυκυστιδιακών σωμάτων, MVBs. Τα MVBs, στη συνέχεια, συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα, ξεκινώντας τη διάσπαση των πρωτεϊνών που συνδέονται με την πρωτεΐνη Hsc70. Αυτή η διαδικασία αναγνωρίζεται, επί του παρόντος, ως μικροαυτοφαγία θηλαστικών και αναφέρεται συνήθως ως ενδοσωματική μικροαυτοφαγία [32], [94].

Έπεται η διάκριση της μικροαυτοφαγίας σε δύο διαφορετικά είδη οργανισμών, όπου και μελετήθηκε: ζύμες και θηλαστικά.

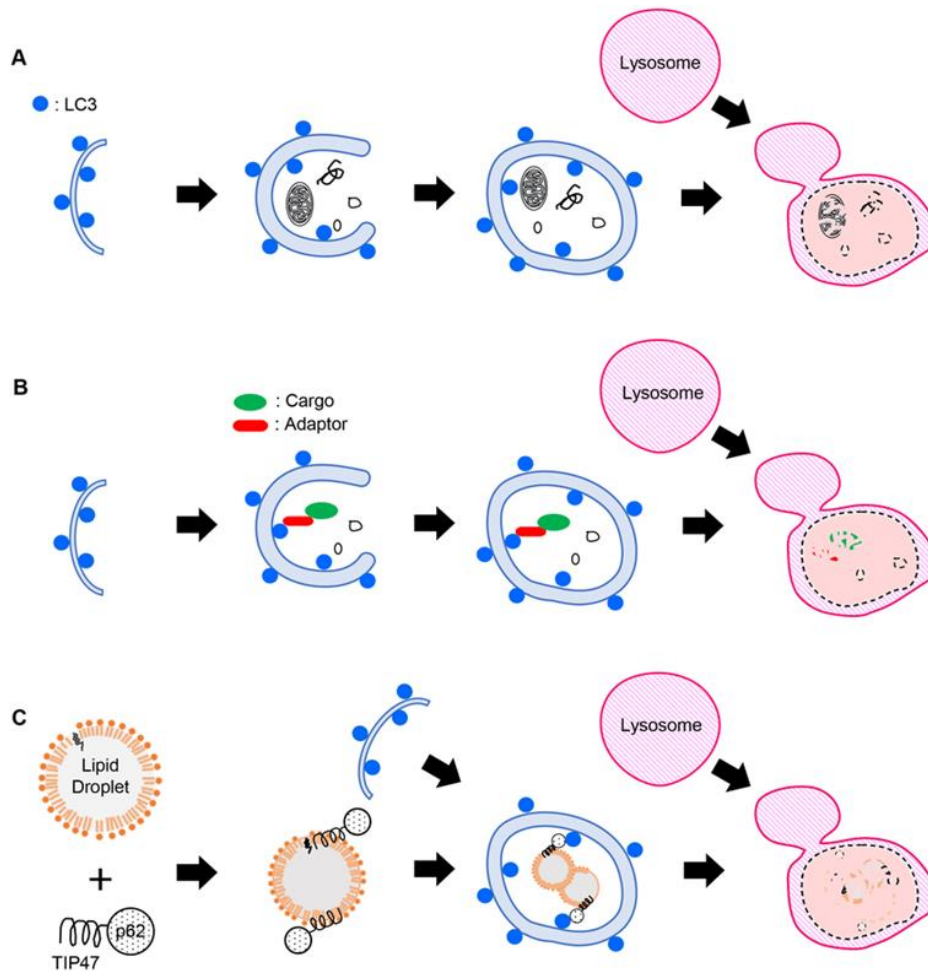


Εικόνα 33: Μικροαυτοφαγία σε ζύμες και θηλαστικά
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990190/>)

Όσον αφορά στην μακροαυτοφαγία, πυροδοτείται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καταπόνησης για το κύτταρο, όπως για παράδειγμα οι συνθήκες ασιτίας. Μέσω της διάσπασης των ποικίλων κυτταροπλασματικών συστατικών στους δομικούς τους λίθους, είναι δυνατή η αξιοποίηση των τελευταίων είτε σε αναβολικές ενδοκυτταρικές διεργασίες είτε στην παραγωγή ενέργειας, αποβλέποντας στην επιβίωση του κυττάρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, η μακροαυτοφαγία συμβάλλει στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας καθώς καταβολίζονται τα κατεστραμμένα ή άχρηστα οργάνδια. Εάν όμως αυτή η διαδικασία τελεστεί σε υπερβολικό βαθμό, τότε μπορεί να καταστήσει το «έδαφος» γόνιμο για την ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης, η γήρανση ή νευροεκφυλιστικές νόσοι και καρδιοπάθειες.

Η διαδικασία ξεκινά με το de novo σχηματισμό φαγοφόρου μεμβρανικής δομής ή, απλώς, φαγοφόρου. Έπεται η επέκταση των φαγοφόρων, προς σχηματισμό κυστιδίων διπλής μεμβράνης, τα αυτοφαγосώματα, τα οποία, με τη σειρά τους, οδηγούνται στα

λυσοσώματα και συντήκονται με αυτά, μετατρέπονται σε αυτολυσοσώματα. Το περιεχόμενό τους μπορεί να είναι κατεστραμμένα οργάνδια, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που έχουν απολέσει τη χρησιμότητά τους ή ακόμη και εισβάλλοντες μικροοργανισμοί. Μετά την αποικοδόμηση, τα προϊόντα διάσπασης απελευθερώνονται πίσω στο κυτταρόπλασμα, προκειμένου να ανακυκλωθούν τα μακρομοριακά συστατικά και να παραχθεί ενέργεια, πολύτιμης σημασίας για το κύτταρο, ακόμη και υπό αντίξοες συνθήκες. Προκειμένου να ωριμάσουν τα αυτοφαγοσώματα απαιτείται η ιεραρχική προσάρτηση/συμμετοχή των διαφόρων πρωτεϊνών της οικογένειας ATG (Autophagy Related Gene), οι οποίες συνδράμουν στην μεμβρανική σύντηξη. Οι διαδικασίες αυτές αναπαρίστανται και στην εικόνα 34.



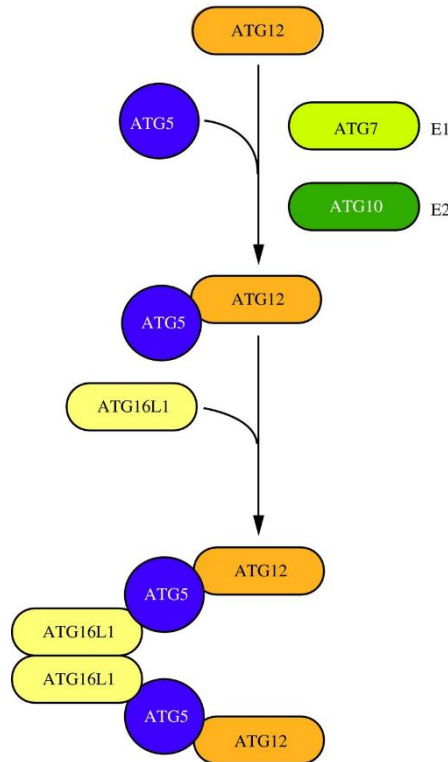
Εικόνα 34: Αυτοφαγία και δημιουργία λυσοσωμάτων

(https://www.researchgate.net/figure/A-Overview-of-autophagy-process-A-double-membrane-structure-isolation-membrane_fig1_324763142)

Τα βασικά βήματα του μηχανισμού αυτοφαγίας είναι:

(I) σχηματισμός φαγοφόρων (II) σύζευξη των αυτοφαγικών πρωτεϊνών Atg5-Atg12, αλληλεπίδραση με την Atg16L (Autophagy Related 16 Like 1) και πολυμερισμός εντός

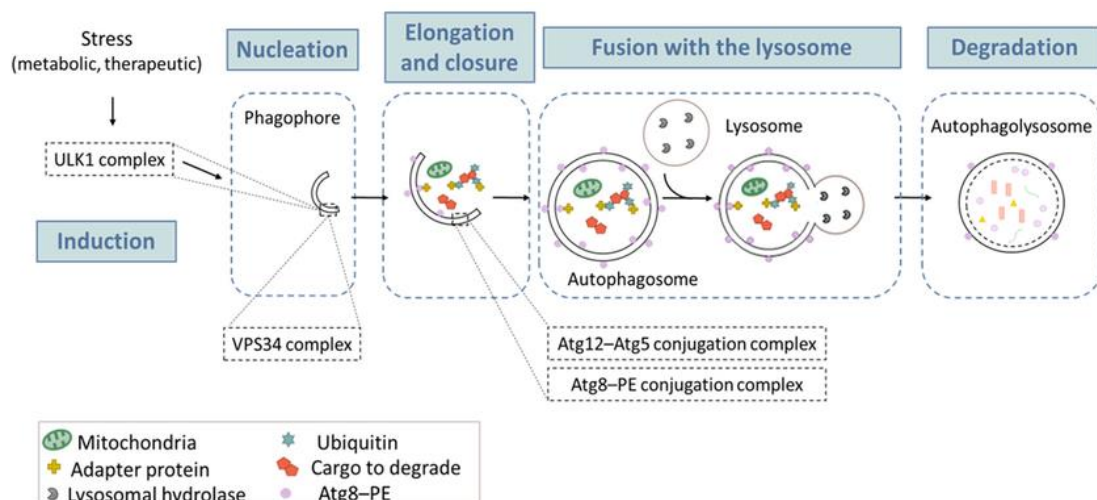
του φαγοφόρου, (III) επεξεργασία της LC3 (Microtubule-Associated Protein 1A/1B-light chain 3) και ενσωμάτωση των φαγοφόρων στην επιμήκη μεμβράνη, (IV) σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα και (V) αποικοδόμηση του φορτίου από λυσοσωμικές πρωτεάσες.



Εικόνα 35: Σύμπλεγμα σύζευξης *ATG12-ATG5-ATG16L1*

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894687/>)

Τα 5 βήματα της μακροαυτοφαγίας διακρίνονται και στην εικόνα 36.

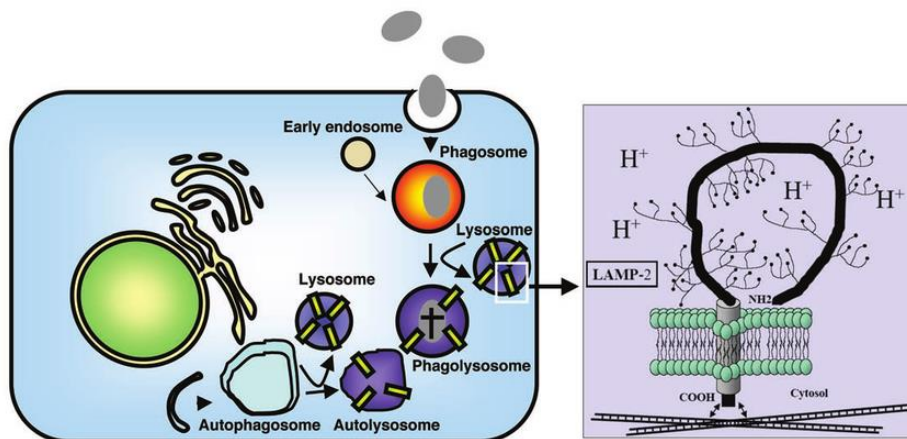


Εικόνα 36: Τα 5 βήματα της μακροαυτοφαγίας: (I) σχηματισμός φαγοφόρων (II) σύζευξη των αυτοφαγικών πρωτεϊνών *Atg5-Atg12* (III) επεξεργασία της LC3 και ενσωμάτωση των φαγοφόρων στην

επιμήκη μεμβράνη, (IV) σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα και (V) αποικοδόμηση του φορτίου από λυσοσωμικές πρωτεΐνες.

(https://www.researchgate.net/figure/The-macroautophagy-process-Macroautophagy-takes-place-in-five-main-steps-1-Induction_fig1_321326322)

Κλείνοντας, άλλο ένα μοντέλο αυτοφαγίας είναι η RNA αυτοφαγία. Αρχικά, το υπόστρωμα RNA προσκολλάται στην κυτοσολική «ουρά» του LAMP2C που βρίσκεται στη λυσοσωμική μεμβράνη, χρησιμεύοντας ως υποδοχέας για αυτήν την οδό. Το κυτταροπλασματικό τμήμα του LAMP2C είναι γνωστό ότι δεσμεύει σχεδόν όλο το κυτταρικό RNA. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με RNA στο κυτταρόπλασμα ρυθμίζουν αυτόν τον μηχανισμό, καθώς η κυτταροπλασματική αλληλουχία του LAMP-2C δεν φαίνεται να παρουσιάζει ειδικές ικανότητες δέσμησης RNA. Στη συνέχεια, το RNA μεταφέρεται στον λυσοσωμικό αυλό. Η μεταφορά διευκολύνεται από το LAMP-2C και πρόσθετες πρωτεΐνες, βασιζόμενες στο ATP. Οι εξαρτώμενες από το RNA ATPάσες, συμπεριλαμβανομένων των ελικάσες RNA, εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία με το ξετύλιγμα του RNA, παρόμοιο με το ρόλο του HSPA8 στην αυτοφαγία που προκαλείται από συνοδό. Τελικά, τα λυσοσωμικά ένζυμα όπως οι RNases και οι εξωνουκλεάσες αποικοδομούν το RNA μέσα στο λυσοσώμα.



Εικόνα 37: Το LAMP-2 χρειάζεται για την ωρίμανση των (αυτο)φαγοσωμάτων (Lysosome-associated membrane protein 2)

(https://www.researchgate.net/figure/LAMP-2-is-needed-for-maturation-of-autophagosomes-A-schematic-drawing-demonstrating_fig1_254917531)

1.5.3 Νέκρωση

Η νέκρωση είναι το πρότυπο του κυτταρικού θανάτου, που συμβαίνει ως απόκριση σε τραυματισμούς, όπως η υποξία, οι ακραίες θερμοκρασίες, οι τοξίνες, το σωματικό τραύμα και η μόλυνση με ιούς. Ο τραυματισμός σε ένα κύτταρο λέγεται ότι είναι μη αναστρέψιμος εάν σκοτώσει το κύτταρο. Εάν η ζημιά είναι λίγο μικρότερη, ο τραυματισμός λέγεται ότι είναι αναστρέψιμος. Στον κυτταρικό τραυματισμό, υπάρχει

μια συνέχεια υποθανατηφόρων αλλαγών, οι οποίες μπορεί να εξελιχθούν σε θανατηφόρες κυτταρικές αλλαγές, ανάλογα με τη σοβαρότητα και τη διάρκεια του ζημιογόνου ερεθίσματος. Τα ερεθίσματα που πυροδοτούν τη νέκρωση είναι:

I) Υποξία: Αυτό μπορεί να συμβεί λόγω ισχαιμίας, σοκ ή αναπνευστικής ανεπάρκειας.

II) Φυσικοί παράγοντες: Αυτοί περιλαμβάνουν εξωτερικούς τραυματισμούς, όπως τραύμα, ακραίες θερμοκρασίες, έκθεση σε ακτινοβολία ή ηλεκτροπληξία.

III) Χημικοί παράγοντες: Αυτοί περιλαμβάνουν δηλητήρια, τοξικότητες φαρμάκων κ.ά.

IV) Βιολογικοί παράγοντες: βακτήρια, ιοί ή μύκητες.

V) Ανοσολογικές αντιδράσεις: αυτοάνοσες αποκρίσεις.

Ο κυτταρικός μηχανισμός που οδηγεί σε νέκρωση είναι η απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε ένα επιβλαβές ερέθισμα. Αυτό επιτρέπει στα εξωκυτταρικά ιόντα να κινηθούν μέσα στο κύτταρο, ακολουθούμενο από υγρό που οδηγεί σε ενδεχόμενη διόγκωση του κυττάρου και των οργανιδίων του. Ένας άλλος κυτταρικός μηχανισμός είναι η διάσπαση της λυσοσωμικής μεμβράνης, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων στο κύτταρο, όπως πρωτεάσες, RNAάσες, DNAάσες και φωσφατάσες. Αυτά, όταν ενεργοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, οδηγούν σε βλάβη στο DNA, το RNA και τις πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Επίσης, συντελούν στην πέψη των κυτταρικών συστατικών, προκαλώντας την καταστροφή των κυττάρων. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί επιφέρουν διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης και διαρροή του ενδοκυτταρικού περιεχομένου στον περιβάλλοντα ιστό, που έχει χαρακτήρα φλεγμονής.

Υπάρχουν διαφορετικά μοτίβα νέκρωσης με βάση τη φύση της προσβολής και του ιστού: μεμονωμένων, μη συνεχόμενων κυττάρων ιστού, που χαρακτηρίζονται από διόγκωση του κυττάρου και του πυρήνα και ωχρο κύτταρόπλασμα και συνεχόμενων κυττάρων.

Στα κύρια μορφολογικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νέκρωσης ανήκουν: το οίδημα του κυττάρου, του πυρήνα, η καρυόλυση (διάλυση του πυρήνα), η καρυόρροια (πυρηνικός κατακερματισμός) και η πυρηνική πύκνωση. Σε περιοχές νέκρωσης μπορεί να υπάρχουν κυτταροπλασματικά κενοτόπια, καθώς και γειτονικά κυτταρικά υπολείμματα και φλεγμονώδη κύτταρα, εάν υπάρχει διαρροή στην κυτταρική μεμβράνη.

Έτσι, έχει καταστεί κατανοητό πως όταν τα κύτταρα υφίστανται νέκρωση, παρουσιάζουν διαφορετική μικροσκοπική και μακροσκοπική εμφάνιση. Αυτά τα διαφορετικά μοτίβα νέκρωσης εμφανίζονται παρακάτω:

I) Πηκτική νέκρωση: Η ισχαιμία στα περισσότερα όργανα εκτός από τον εγκέφαλο μπορεί να οδηγήσει σε πηκτική νέκρωση. Σε αυτόν τον τύπο νέκρωσης, η αρχιτεκτονική των κυττάρων παραμένει διατηρημένη. Στο μικροσκόπιο τα κύτταρα φαίνονται πυρηνοειδή, ηωσινόφιλα, με διατηρημένη δομή. Τελικά, τα νεκρά κύτταρα εξαλείφονται, με φαγοκυττάρωση και λευκοκύτταρα.

II) Υγροποιητική νέκρωση: Αυτή η μορφολογία παρατηρείται συχνότερα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα κύτταρα που πεθαίνουν, πέπτονται από υδρολυτικά ένζυμα και, ως εκ τούτου, χάνουν τη δομική τους ακεραιότητα, μετατρέπονται σε παχύρρευστη μάζα. Αυτή η μορφολογία εμφανίζεται, επίσης, στις περισσότερες βακτηριακές λοιμώξεις και η συσσώρευση τέτοιου νεκρωτικού υλικού ονομάζεται «πύον».

III) Κασώδης εκφύλιση ή νέκρωση (Caseous necrosis): Ο όρος «caseous» σημαίνει «τυροειδής», χαρακτηρισμός που αναφέρεται στην υπόλευκη εμφάνιση της νεκρωτικής περιοχής. Αυτή η νέκρωση λαμβάνει χώρα σε φυματιώδη μόλυνση και η νεκρωτική περιοχή αναφέρεται ως «κοκκίωμα».

IV) Γαγγραινώδης νέκρωση: Αυτό δεν είναι μορφολογικό πρότυπο, αλλά μάλλον κλινικός όρος για την ισχαιμική νέκρωση των άκρων. Έχει δύο τύπους i) ξηρή (ισχαιμία που οδηγεί σε πηκτική νέκρωση) και ii) υγρή (ισχαιμία, με επάλληλη βακτηριακή λοίμωξη που οδηγεί σε υγροποιητική νέκρωση).

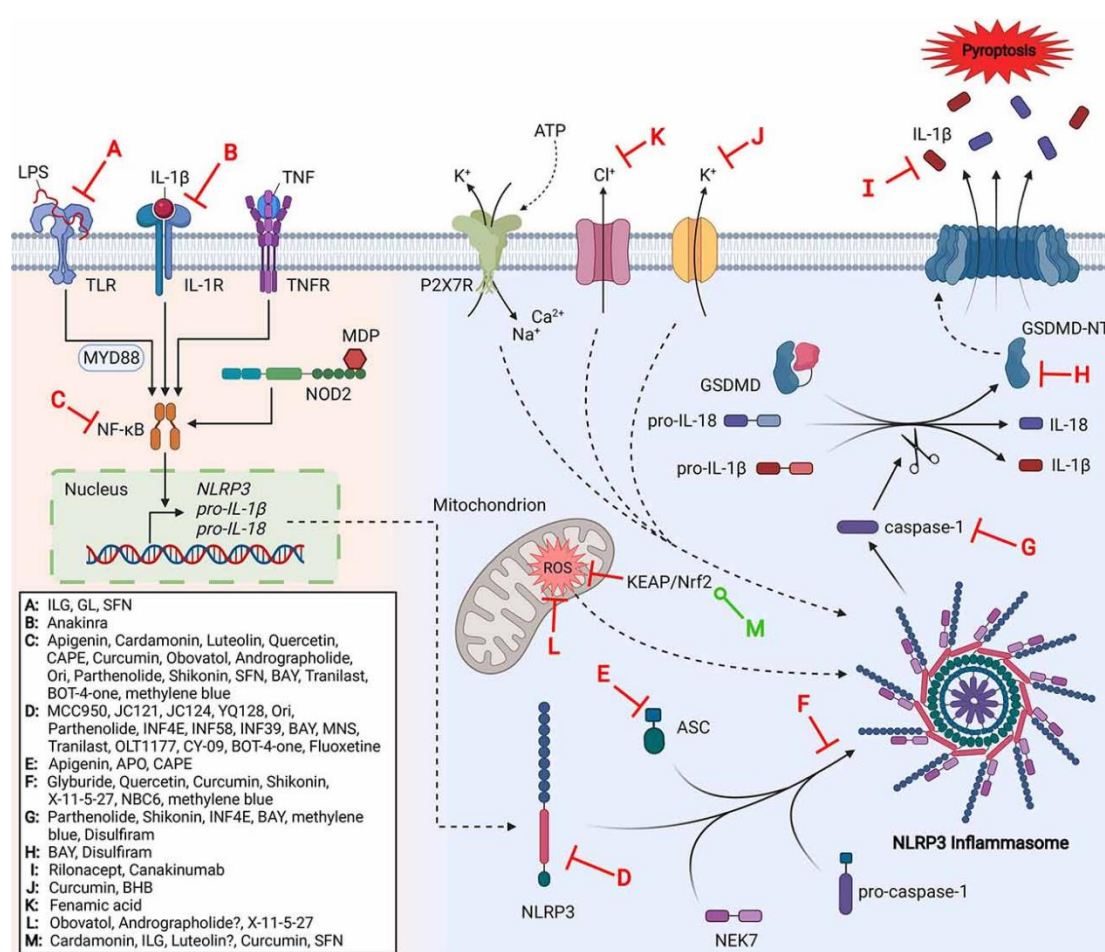
V) Νέκρωση λίπους: Αυτός ο τύπος νέκρωσης εμφανίζεται στην οξεία παγκρεατίτιδα. Η απελευθέρωση παγκρεατικών ενζύμων οδηγεί σε ρευστοποίηση των λιποκυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Αυτά τα υγροποιημένα λιποκύτταρα, στη συνέχεια, συνδυάζονται με ασβέστιο και αναγνωρίζονται ως λευκές περιοχές. Κάτω από μικροσκόπιο, αυτό είναι ορατό ως βασεόφιλες εναποθέσεις ασβεστίου στα περιγράμματα των νεκρωτικών λιποκυττάρων. Νέκρωση λίπους εμφανίζεται, επίσης, στον ιστό του μαστού, λόγω της σαπωνοποίησης του λίπους.

VI) Ινώμοειδης νέκρωση: Αυτός ο τύπος νέκρωσης εμφανίζεται στα αιμοφόρα αγγεία, λόγω της εναπόθεσης ανοσοσυμπλεγμάτων στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων που οδηγεί σε διαρροή ινώδους. Αυτή η παρατηρούμενη χρώση εμφανίζεται ως ένα λαμπερό ροζ άμορφο υλικό.

Μορφολογικά, τα νεκρωτικά κύτταρα εκδηλώνονται χαρακτηριστικά, με διόγκωση οργανιδίων, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, τη ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και τη λύση του κυττάρου. Αυτές οι μεταβολές επιφέρουν απώλεια ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, ηωσινόφιλη, υαλώδη μορφή και με παρουσία κενотоπίων. Η εξάντληση του ATP ή η μειωμένη του σύνθεση είναι η πρώτη βιοχημική αλλαγή που παρατηρείται σε τραυματισμό. Το ATP παράγεται με οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια παρουσία οξυγόνου. Οπότε, σε νέκρωση, που σχετίζεται με υποξία ή χημικό τραυματισμό, η έλλειψη παροχής οξυγόνου στα κύτταρα, οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ATP, η οποία, με τη σειρά της, συνδράμει στην ενεργειακή εξάντληση της αντλίας νατρίου στη μεμβράνη του πλάσματος, προκαλώντας εισροή ασβεστίου και νερού, που οδηγεί σε διόγκωση των κυττάρων και

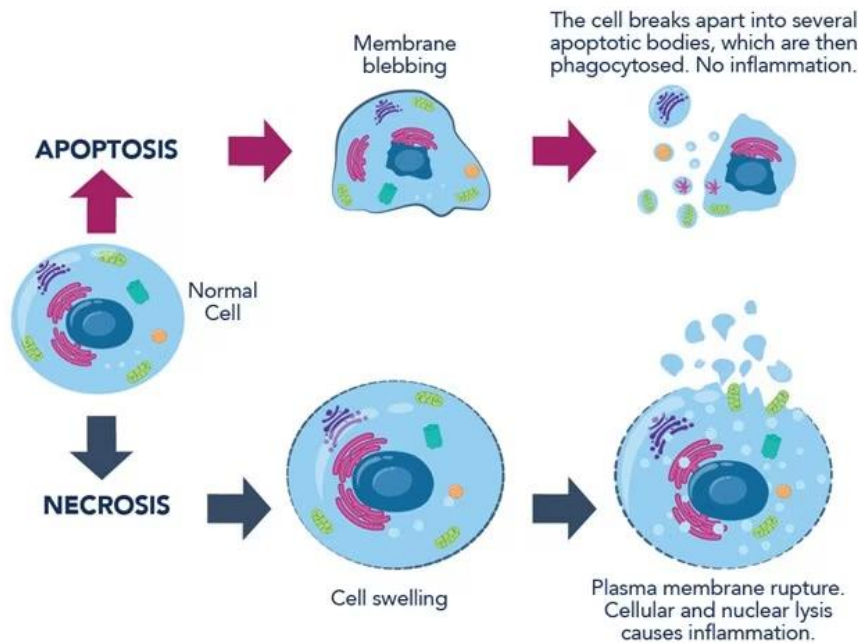
αποκόλληση των ριβοσωμάτων από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Το αυξημένο κυτοσολικό ασβέστιο και το οξειδωτικό στρες οδηγούν σε μιτοχονδριακή βλάβη. Το κυτοσολικό ασβέστιο μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ενεργοποίηση πολλών κυτοσολικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των φωσφολιπασών και των πρωτεασών, που διασπούν και τις δύο μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένων των λυσοσωμικών μεμβρανών και των πρωτεϊνών.

Σε επίπεδο μηχανισμού, ο νεκρωτικός θάνατος σχετίζεται, σχεδόν, πάντα με μια φλεγμονώδη απόκριση. Τα νεκρωτικά κύτταρα απελευθερώνουν παράγοντες, όπως η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1 (High Mobility Group Box 1, HMGB1) και ο αυξητικός παράγοντας, που προέρχεται από το ήπαρ (Hepatoma-Derived Growth Factor, HDGF). Αυτοί οι παράγοντες ανιχνεύονται από μια πρωτεΐνη-υποδοχέα (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3, NLRP3), η οποία είναι η βασική πρωτεΐνη του φλεγμονοσώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος και προκαλεί την απελευθέρωση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL1 β . Η ενεργοποίηση του φλεγμονώδους NLRP3 πυροδοτείται, κυρίως, μέσω του ATP, που παράγεται από μιτοχόνδρια που απελευθερώνονται από κατεστραμμένα κύτταρα [10], [19], [39], [40], [74].



Εικόνα 38: Σηματοδοτική πορεία νέκρωσης

Βάσει αυτής της σηματοδοτικής πορείας, καθίσταται σαφές ότι απόπτωση και νέκρωση αποκκλίνουν σημαντικά, η μια από την άλλη, με την τελευταία να χαρακτηρίζεται από φλεγμονή. Η εικόνα, παρακάτω, αποδίδει ακριβώς αυτή την ειδοποιό διαφορά μεταξύ τους.



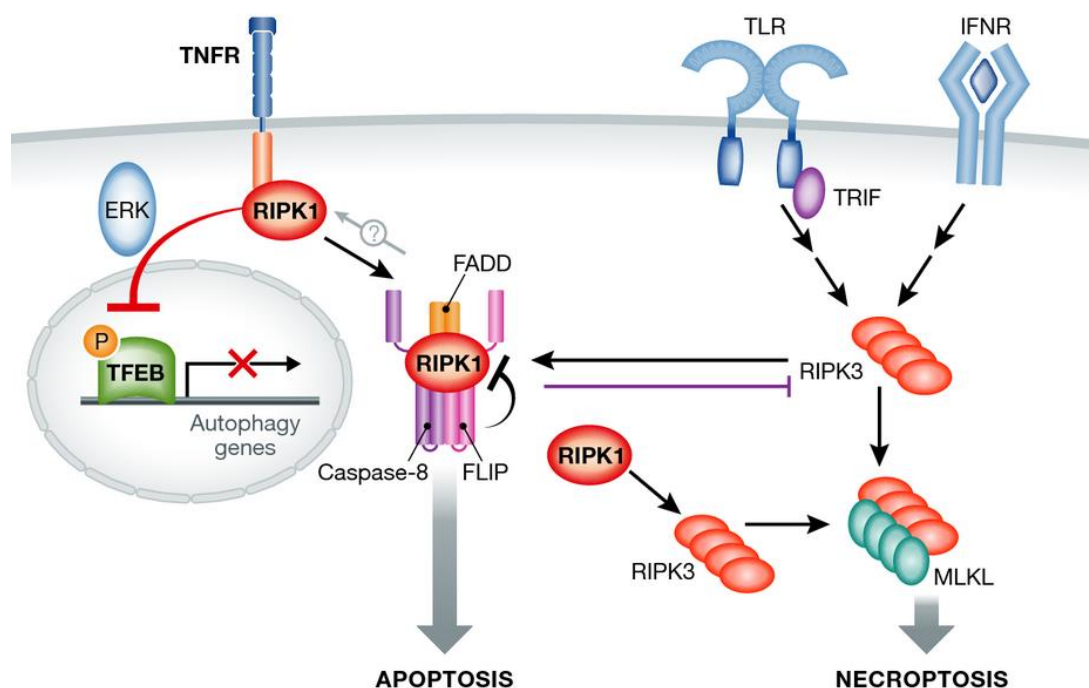
Εικόνα 39: Σχηματικές διαφορές απόπτωσης- νέκρωσης

(<https://www.ptglab.com/news/blog/what-is-the-difference-between-necrosis-and-apoptosis/>)

Νεκρόπτωση

Η νέκρωση δεν συσχετίζεται τυπικά με την ενεργοποίηση των κασπασών και φαίνεται ότι προκαλεί θάνατο των κυττάρων ως απόκριση σε βλάβη ή παθολογία, αλλά όχι κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης. Παρόλα αυτά, αποδεικνύεται ότι μια προγραμματισμένη μορφή νεκρωτικού θανάτου (που ονομάζεται νεκρόπτωση) είναι πολύ συχνή *in vivo*, κυρίως σε διάφορες μορφές νευροεκφυλισμού και θανάτου που προκαλούνται από ισχαιμία ή μόλυνση. Σε αντίθεση με την μη διατεταγμένη νέκρωση, η νεκρόπτωση είναι ένας πιο φυσιολογικός και προγραμματισμένος τύπος νεκρωτικού θανάτου και μοιράζεται πολλές βασικές διαδικασίες με την απόπτωση. Εμφανίζεται λόγω της ενεργοποίησης της περιοχής κινάσης της πρωτεΐνης 1, που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα (RIP1) και της συναρμολόγησης του συμπλέγματος σηματοδότησης που περιέχει RIP1/RIP3. Πυροδοτείται από μέλη της οικογένειας του

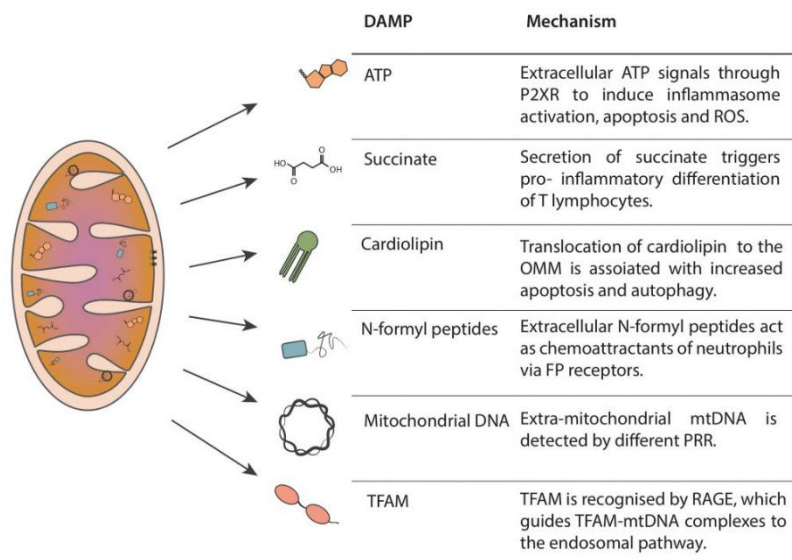
παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) και συναρμολόγηση νεκροσώματος (RIPK1-RIPK3, σύμπλεγμα IIb).



Εικόνα 40: Η διαφοροποίηση απόπτωσης-νέκρωσης ως προς τα ακολουθούμενα κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης (<https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embr.201540470>)

Η νεκρόπτωση είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης όγκου, οι αισθητήρες νουκλεϊκών οξέων ή η σηματοδότηση TLR. Ενεργοποιούν τις κινάσες των υποδοχέων και σχηματίζουν μοριακά σύμπλοκα που ονομάζονται νεκροσώματα. Μαζί με τις πρωτεάσες και τις κινάσες, παράγουν πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους στα κυτταρικά τοιχώματα, επιτρέποντας τη διαφυγή του κυτταρικού περιεχομένου. Τα μιτοχόνδρια δεν εμπλέκονται στη διεργασία. Όπως η πυρόπτωση, η νεκρόπτωση προκαλεί φλεγμονή λόγω της διαφυγής των ενδοκυτταρικών DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), όπως το HMGB-1 και η ιντερλευκίνη 33 (IL-33).

Τα μονοπάτια της νεκρόπτωσης περιλαμβάνουν δύο κύρια συστατικά: μια πρωτεϊνική κινάση που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα (RIPK3) που φωσφορυλιώνει μια πρωτεΐνη, που μοιάζει με κινάση μικτής γραμμής (MLKL), προκαλώντας έτσι ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης και θάνατο. Ωστόσο, μεταξύ ορισμένων σειρών θηλαστικών, τα γονίδια που κωδικοποιούν RIPK3 και MLKL έχουν διαγραφεί ή είναι ψευδογονίδια. Το γεγονός ότι η οδός της νεκρόπτωσης έχει χαθεί αρκετές φορές κατά την εξέλιξη των θηλαστικών υποδηλώνει ότι η παρουσία της δεν είναι υποχρεωτική. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει σε ανθρώπους και ποντίκια [25].



Εικόνα 41: Ενδοκυτταρικά DAMPs

(<https://www.cell-stress.com/researcharticles/2019a-rodriquez-nuevo-cell-stress/>)

1.6 Καρκινογένεση

1.6.1 Μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης σχετιζόμενα με την καρκινογένεση

Η υποκείμενη αιτία του καρκίνου παραμένει ασαφής, αλλά είναι ευρέως αποδεκτό ότι είναι πρωτίστως μια γενετική ασθένεια με περίπλοκους μηχανισμούς. Στις περισσότερες περιπτώσεις, εντοπίζονται μόνο παράγοντες κινδύνου ή προδιαθεσικοί παράγοντες, αφήνοντας αβέβαιες τις ακριβείς αιτίες της ανάπτυξής του. Επιπλέον, υπάρχουν ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις σχετικά με τη συμμετοχή οργάνων που δεν επηρεάζονται συνήθως από κακοήθεις όγκους, όπως το λεπτό έντερο, η καρδιά, ο σπλήνας και οι νευρώνες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος.

Η διαδικασία ανάπτυξης του όγκου απαιτεί μια σειρά γενετικών και μη αλλοιώσεων, που διακρίνουν τα κύτταρα εντός του όγκου. Ενδεικτικά, παρατίθενται η σηματοδότηση πολλαπλασιαστικών επιδράσεων, η απόπτωση, η προώθηση της αγγειογένεσης και η ικανότητα διείσδυσης στους περιβάλλοντες ιστούς, που αποτελεί γενεσιουργό παράγοντα μεταστάσεων.

Μονοπάτι TGF-beta

Η οδός σηματοδότησης TGF-beta διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την ομοιοστάση και την επιδιόρθωση των περισσότερων ιστών στους οργανισμούς. Όλες οι κυτταρικές σειρές του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των B-κυττάρων, T-κυττάρων και δενδριτικών κυττάρων, καθώς και μακροφάγων, εκκρίνουν την πρωτεΐνη TGF-beta, η οποία ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίησή τους από άλλες κυτοκίνες. Έτσι, ο παράγοντας TGF-βήτα είναι ένας ισχυρός ανοσοκατασταλτικός παράγοντας και η διαταραχή της σηματοδότησής του συνδέεται με την αυτοανοσία, τη φλεγμονή και τον καρκίνο.

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε σωματικούς ιστούς, η προδιαγραφή της μοίρας των κυττάρων κατά την εμβρυογένεση, η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός θάνατος ελέγχονται από ένα πλήθος κυτταρικών σημάτων. Η απώλεια ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έχει καταστροφικές συνέπειες. Η υπερικογένεια TGF (Transforming Growth Factor), η οποία κατέχει εξέχουσα θέση μεταξύ αυτών των ρυθμιστικών σημάτων, περιλαμβάνει μια μεγάλη και ποικιλόμορφη ομάδα πολυπεπτιδικών μορφογόνων, συμπεριλαμβανομένων του ίδιου του TGF-beta, καθώς και των BMPs (Μορφογενετικές Πρωτεΐνες των Οστών) και GDF (Growth and Differentiation Factors), αλλά και της ακτιβίνης. Τα μέλη της οικογένειας TGF εκφράζονται σε διακριτά χρονικά και ειδικά για κάθε ιστό, πρότυπα.

Εμβαθύνοντας σε αυτόν, αξίζει να υπογραμμιστεί ότι εκτός από τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς που διαθέτουν ενδογενή δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης, τα κύτταρα διαθέτουν επίσης διαμεμβρανικούς υποδοχείς με ενδογενή δράση κινάσης Ser/Thr. Ο υποδοχέας του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα β (TGF-β) χρησιμεύει ως παράδειγμα αυτού του τύπου υποδοχέα. Ο TGFβ, ένα μέλος της οικογένειας κυτοκινών των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών σηματοδότησης, παίζει ρόλο στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και μορφογένεσης σε διάφορους τύπους κυττάρων. Όταν ο TGFβ συνδέεται με τον υποδοχέα του, ενεργοποιεί έναν καταρράκτη σηματοδότησης που τελικά ρυθμίζει τη μεταγραφή, επηρεάζοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα TGFβ δημιουργεί αντι-μιτογονικά σήματα, όπως η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης. Αυτό το αποτέλεσμα προκαλείται από την αύξηση της παραγωγής ειδικών πρωτεϊνικών κινασών που χρησιμεύουν ως αναστολείς του κυτταρικού κύκλου.

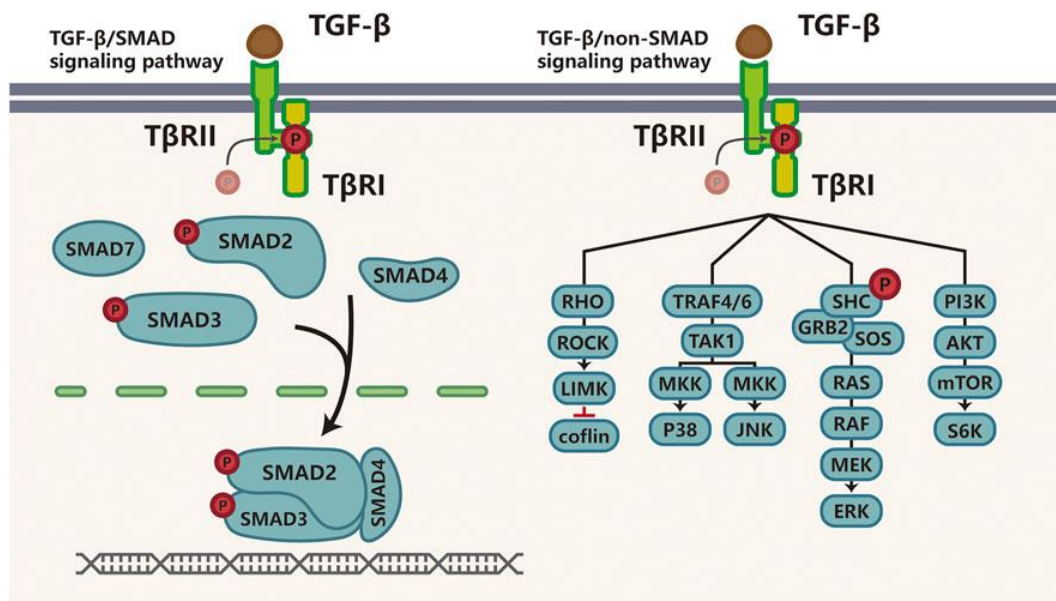
Αφού πραγματοποιηθεί η ωρίμανση του TGF-beta, γίνεται η εμφάνιση ενός διμερούς μορίου TGF-β στο χώρο έξω από το κύτταρο, το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα του. Ο υποδοχέας TGFβ, όταν ενεργοποιείται, παίρνει τη μορφή ενός ετερο-τετραμερούς που περιλαμβάνει δύο διακριτές

υπομονάδες, συγκεκριμένα TβRI και TβRII. Και οι δύο υπομονάδες διαθέτουν μια Ser/Thr κινάση εντός των ενδοκυτταρικών περιοχών τους και ο συνδέτης ρυθμίζει τη δραστηριότητα του TβRI. Η διαδικασία ενεργοποίησης εκτυλίσσεται με τον ακόλουθο τρόπο: Ο διμερής συνδέτης TGFβ δεσμεύεται αρχικά στον υποδοχέα TβRII, ο οποίος στη συνέχεια επιτρέπει την αναγνώριση από τον TβRI.

Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ του TβRI και του TGFβ-TβRII σχηματίζει ένα ετεροολιγομερές, όπου ο TβRII, που έχει δράση Ser/Thr κινάσης, φωσφορυλιώνει τον TβRI. Το συμβάν φωσφορυλίωσης συμβαίνει σε μια συγκεκριμένη περιοχή του υποδοχέα TβRI, που βρίσκεται ακριβώς κάτω από την πλασματική μεμβράνη, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση υπολειμμάτων γλυκίνης και σερίνης (Gly/Ser), που συνήθως αναφέρεται ως GSbox.

Τα μόρια σηματοδότησης τελεστών είναι σε θέση να συνδέονται με τον υποδοχέα TβRI μέσω φωσφορυλίωσης, δημιουργώντας θέσεις δέσμησης. Αυτός ο συγκεκριμένος τύπος υποδοχέα χρησιμοποιεί δύο υπομονάδες για τη διευκόλυνση της μεταγωγής σήματος: την υπομονάδα TβRII, υπεύθυνη για τη δέσμευση στο πρόσδεμα, και την υπομονάδα TβRI, η οποία καθορίζει την ειδικότητα της επακόλουθης μεταγωγής σήματος. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα TGFβ περιλαμβάνει πολλαπλά γεγονότα φωσφορυλίωσης. Οι μεταγραφικοί παράγοντες γνωστοί ως Smads μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: R-Smads, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς TGF-β (όπως Smad2 και Smad3) και R-Smads που ενεργοποιούνται από υποδοχείς BMP (όπως Smad1, Smad5 και Smad8). Αυτά τα συμβάντα φωσφορυλίωσης συμβαίνουν εντός των κυτταροπλασματικών περιοχών του υποδοχέα και μπορούν να στοχεύουν τόσο τα υπολείμματα Ser/Thr όσο και τα υπολείμματα Tyr. Αυτές οι φωσφορυλίώσεις περιλαμβάνουν, επίσης, αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων του υποδοχέα. Ακολούθως, τον ενεργοποιημένο υποδοχέα διαδέχεται η σηματοδότηση, μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Smads (Smad2, Smad3), πρωτεΐνες που αντιπροσωπεύουν τα υποστρώματα των υποδοχέων TβRI.

Κάνοντας λόγο για τους Smads, ο TGFβ αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, εμποδίζοντας τη μετάβαση από τη G1 στην S φάση, μέσω δύο μονοπατιών, του Smad και του Non-Smad. Μέσω της ενεργοποίησης του Smad, δρα άμεσα ή μέσω της PKA ή, αλλιώς, cAMP πρωτεϊνικής κινάσης, σε γονίδια που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο. Η σημαντικότερη επίδραση είναι η αναστολή του πρωτο-ογκογονιδίου myc. Μέσω του Non-Smad μονοπατιού, αναστέλλεται η δράση της p70S6K (Ribosomal Protein S6 Kinase beta-1), κινάσης που εισέρχεται στον πυρήνα, μέσω της ενεργοποίησης της PP2A (Protein Phosphatase 2) και προωθεί τον κυτταρικό κύκλο από τη φάση G1 στη φάση S [96].



Εικόνα 42: Οδός σηματοδότησης TGF-beta

(<https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.786728/full>)

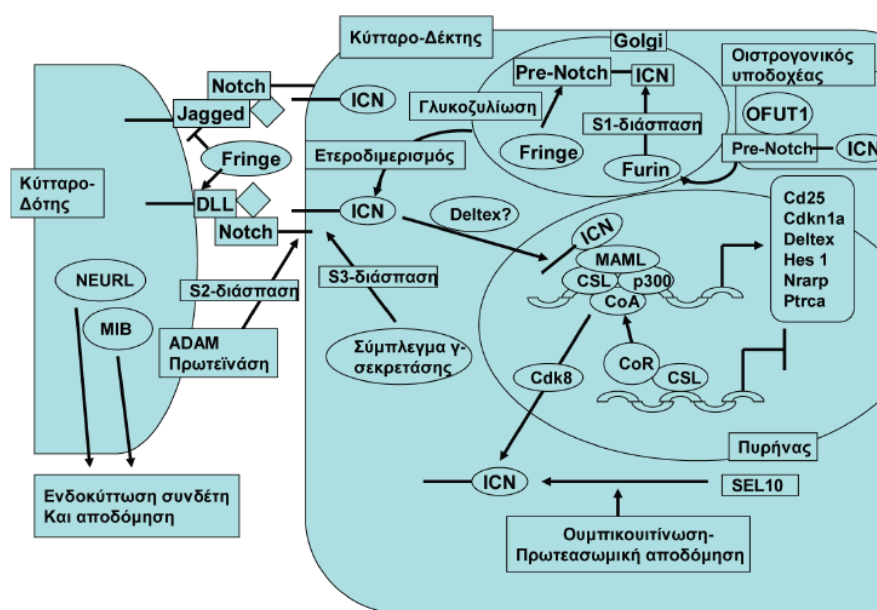
Μονοπάτι Notch

Το μονοπάτι σηματοδότησης Notch είναι ένα πολύ διατηρημένο αναπτυξιακό μονοπάτι που παίζει ρόλο στη μορφογένεση, τον σχηματισμό των ιστών και την κυτταρική διαφοροποίηση. Μπορεί να δράσει ως ογκογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Είναι κρίσιμο για τη λειτουργία διαφόρων ιστών, όπως το δέρμα, το πάγκρεας, το κεντρικό νευρικό σύστημα, οι μύες και το αιμοποιητικό σύστημα.

Το μονοπάτι Notch αναστέλλει συνήθως την αρχική κυτταρική διαφοροποίηση, διατηρώντας τα κύτταρα σε μια μη διαφοροποιημένη κατάσταση ή προκαλώντας εναλλακτική διαφοροποίηση. Οι πρωτεΐνες Notch είναι διαμεμβρανικές και λειτουργούν ως υποδοχείς και μεταγραφικοί παράγοντες. Στα θηλαστικά, υπάρχουν τέσσερις υποδοχείς Notch (1, 2, 3, και 4), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με προσδέτες όπως οι Delta και Jagged, ενεργοποιώντας το μονοπάτι μέσω μιας σειράς πρωτεολυτικών διασπάσεων.

Το μονοπάτι Notch μπορεί να εμπλέκεται σε διάφορες μορφές καρκίνου, όπως του μαστού, πνεύμονα, ωοθηκών και λευχαιμίες. Η ενεργοποίησή του μπορεί να επηρεάσει γονίδια στόχους όπως οι κυκλίνες D1, p21, NFκB, και c-Myc. Αλληλεπιδρά επίσης με άλλα μονοπάτια σηματοδότησης, όπως τα NFκB, Akt, Sonic hedgehog, mTOR, Wnt, και τα μονοπάτια των ορμονικών υποδοχέων.

Η σημασία του Notch στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και τον καρκίνο είναι μεγάλη, καθώς οι ίδιες μοριακές οδοί εμπλέκονται και στις δύο διαδικασίες. Η δυσλειτουργία του Notch μπορεί να οδηγήσει σε αδυναμία διαφοροποίησης των κυττάρων, προκαλώντας κακοήθειες. Το μονοπάτι Notch μπορεί να λειτουργήσει ως προγνωστικός ή διαγνωστικός δείκτης στον καρκίνο, επηρεάζοντας την επιβίωση των ασθενών. Για παράδειγμα, υψηλά επίπεδα έκφρασης του Jagged1 ή του Notch1 συνδέονται με μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης στον καρκίνο του προστάτη και του μαστού.



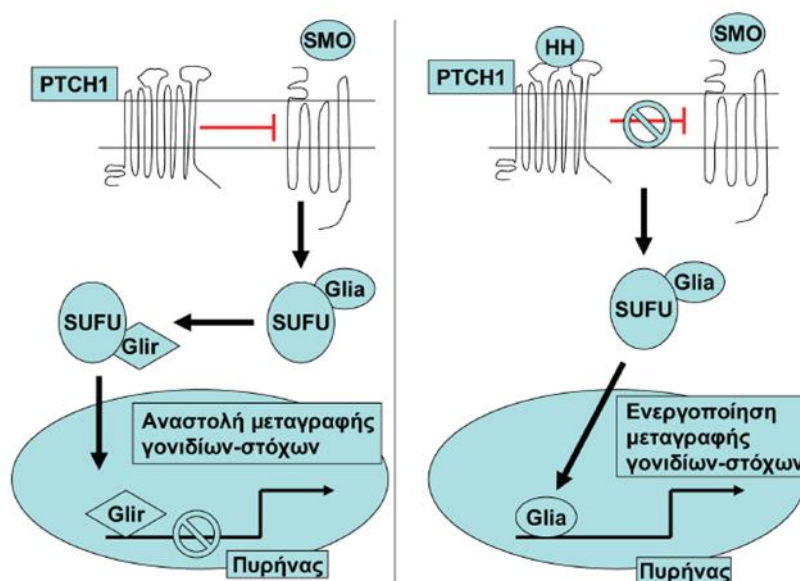
Εικόνα 43: Οδός σηματοδότησης Notch. Τα μαύρα βέλη αναφέρονται σε ενεργοποίηση ή επαγωγή

(<https://www.cusabio.com/pathway/Notch-signaling-pathway.html>)

Μονοπάτι Hedgehog

Πρόκειται για βασικό ρυθμιστή στην εμβρυϊκή ανάπτυξη των σπονδυλωτών, επηρεάζοντας τη συντήρηση βλαστικών κυττάρων, την κυτταρική διαφοροποίηση, την πολικότητα των ιστών και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η ανώμαλη ενεργοποίηση του μονοπατιού Hh μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση, όπως στα βασικοκυτταρικά καρκινώματα και το μυελοβλάστωμα, καθώς και σε άλλους καρκίνους (εγκέφαλος, πνεύμονες, μαστός, προστάτης). Η σηματοδότηση του Hh μονοπατιού παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, οδηγώντας σε ογκογένεση ή επιτάχυνση της ανάπτυξης όγκων. Οι προσδέτες Hh, όπως οι Shh, Dhh και Ihh, δρουν μέσω των υποδοχέων Ptc1 και Ptc2 και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Smo, ρυθμίζοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες Gli και επηρεάζοντας την έκφραση γονιδίων στόχων. Η δυσλειτουργία αυτού του μονοπατιού μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες μορφές καρκίνου. Η απουσία του συνδέτη Hh οδηγεί σε αποπτωτικές διαδικασίες μέσω θραύσης του υποδοχέα Ptc και ενεργοποίησης

κασπασών, ενώ επίσης παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της κυκλίνης B1. Επίσης, η πρωτεΐνη Kif7 συμβάλλει στη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης του Gli και στην αποδόμησή του. Τρία μοντέλα δραστηριότητας του Hh μονοπατιού στον καρκίνο περιλαμβάνουν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις, αυτοκρινείς και παρακρινείς σηματοδοτήσεις. Η Hh σηματοδότηση είναι σημαντική για τη δραστηριότητα των βλαστικών κυττάρων και η ανώμαλη ρύθμισή της μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο. Ο ρόλος της σηματοδότησης Hh στη μετάσταση όγκου συνδέεται με την ενίσχυση της διαδικασίας EMT και τη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο SNAIL. Η αναστολή του Hh μονοπατιού αποτελεί υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση τύπων καρκίνου.



Εικόνα 44: Οδός σηματοδότησης Hedgehog. Τα μαύρα βέλη αναφέρονται σε ενεργοποίηση ή επαγωγή.

(<https://www.cusabio.com/pathway/Notch-signaling-pathway.html>)

Μονοπάτι JAK/STAT

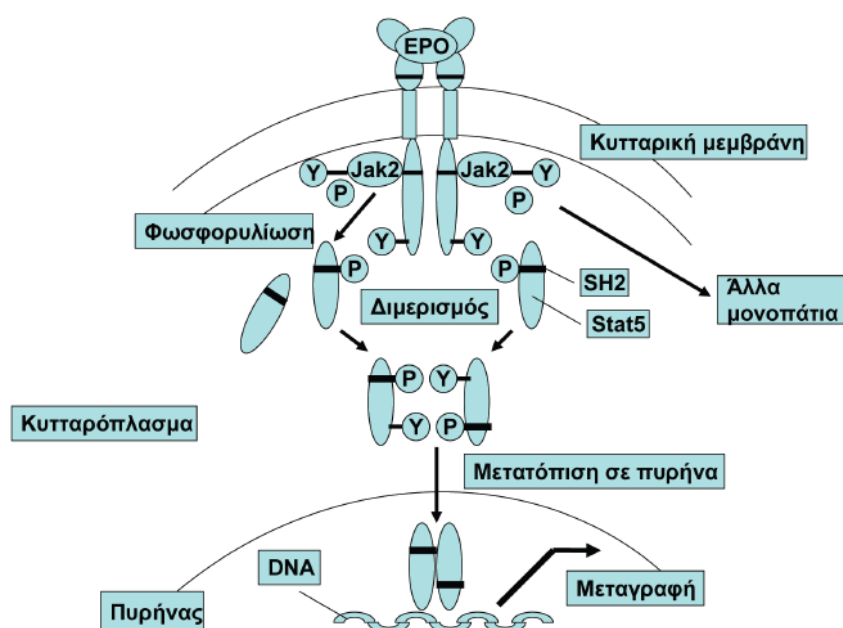
Το μονοπάτι JAK/STAT είναι σημαντικό για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και παίζει ρόλο στη συντήρηση βλαστικών κυττάρων, αιμοποίηση και φλεγμονώδη απόκριση. Ρυθμίζει σήματα από κυτοκίνες, ιντερλευκίνες και παράγοντες ανάπτυξης μέσω υποδοχέων τύπου I και II. Οι υποδοχείς συνδέονται με Janus κινάσες (JAKs), που ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης και ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες STATs. Οι ενεργοποιημένες STATs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση που επηρεάζει κυτταρικές διεργασίες όπως πολλαπλασιασμός και απόπτωση.

Υπάρχουν τέσσερις JAKs στον άνθρωπο (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) και επτά STATs (STAT1-4, STAT5A, STAT5B, STAT6). Η αλληλεπίδραση μεταξύ JAKs και STATs δεν είναι απλή, με κάποιες STATs να προάγουν την ογκογένεση (STAT3, STAT5A/B) και άλλες να έχουν αντίθετες επιδράσεις (STAT1). Το μονοπάτι ελέγχεται από αρνητικούς ρυθμιστές όπως φωσφατάσες, PIAS και SOCS, που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των JAKs και STATs.

Οι JAK/STAT ενεργοποιήσεις παίζουν ρόλο σε αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους. Η μετάλλαξη JAK2V617F συνδέεται με μυελοϊπερπλαστικά νεοπλάσματα, ενώ μεταλλάξεις σε άλλες JAKs και STATs έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες κακοήθειες. Θεραπείες που στοχεύουν JAKs, όπως το ruxolitinib, έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές.

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού JAK/STAT μπορεί να προκληθεί από διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων και των επιγενετικών αλλαγών που επηρεάζουν τους αρνητικούς ρυθμιστές. Στους συμπαγείς όγκους, τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν πολλαπλές στρατηγικές για την ενεργοποίηση του μονοπατιού, ενώ τα γονίδια που ελέγχονται από τις STATs συμβάλλουν τόσο στην κυτταρική αύξηση όσο και στη μεταβολή του μικροπεριβάλλοντος του όγκου.

Τέλος, η έρευνα συνεχίζεται για να κατανοηθεί πλήρως ο ρόλος της ενεργοποίησης JAK/STAT στην ογκογένεση και η συμβολή της στην ανάπτυξη καρκίνων, με τις θεραπείες να στοχεύουν τη μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και την αύξηση της απόπτωσης.



Εικόνα 45: Οδός σηματοδότησης JAK/STAT. Τα μαύρα βέλη αναφέρονται σε ενεργοποίηση ή επαγωγή.

(<https://www.cusabio.com/pathway/Notch-signaling-pathway.html>)

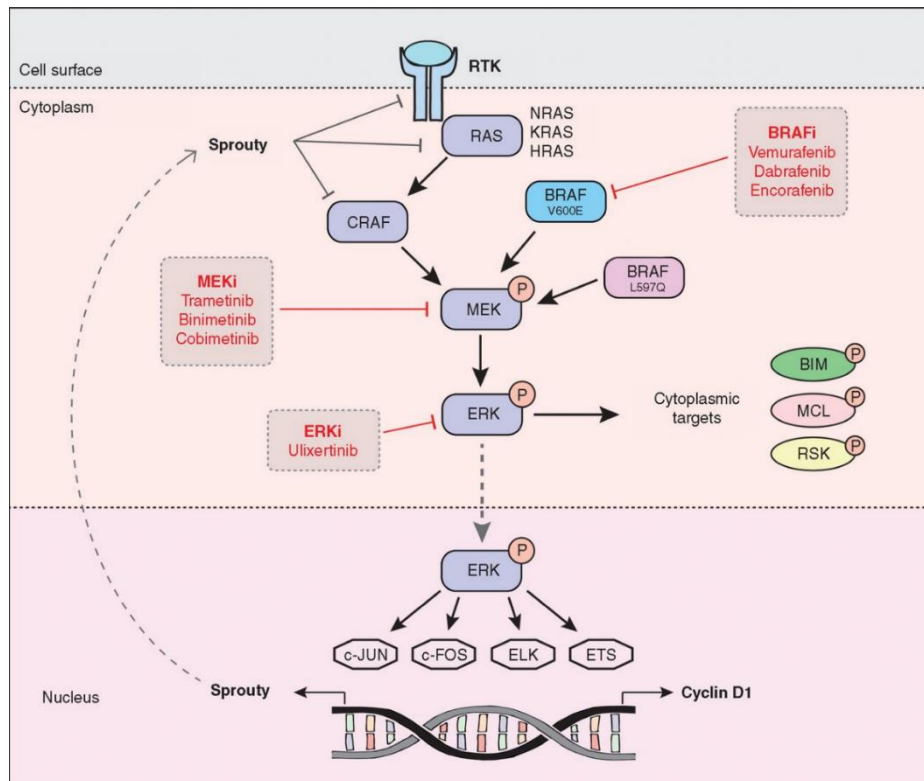
Μονοπάτι MAPK κινασών

Παρούσα σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η οδός MAPK (Μιτογόνο Ενεργοποιημένη Πρωτεϊνική Κινάση) αποτελεί ένα κρίσιμο και εξαιρετικά διατηρημένο σύστημα σηματοδότησης κυττάρων. Η επιρροή του επεκτείνεται σε θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της ανάπτυξης και της απόπτωσης. Επιπλέον, λόγω του σημαντικού του ρόλου στην ανάπτυξη καρκίνου, η οδός MAPK έχει ερευνηθεί εκτενώς, με τη δυσρρύθμισή της να ανιχνεύεται σε σημαντικό μέρος των διαγνωσμένων κακοηθειών.

Παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες χρησιμεύουν ως έναυσμα για την ενεργοποίηση της οδού. Στα θηλαστικά, οι κινάσες MAP χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: ERKs (εξωκυτταρικές κινάσες ρυθμιζόμενες με σήμα), JNKs (Jun αμινοτελικές κινάσες) και p38/SAPK (πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από το στρες).

Τυπικά, η ενεργοποίηση όλων των κατηγοριών κινασών MAP προσκολλάται σε μια ξεχωριστή αλληλουχία. Ξεκινά με την αλληλεπίδραση μεταξύ ενός μορίου αγωνιστή και του διαμεμβρανικού του υποδοχέα, μια διαδικασία που παραδειγματίζεται από τον υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και τους GPCRs. Αυτή η αλληλεπίδραση πυροδοτεί την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί κινάσες MAP3K όπως οι Raf και MEKKs. Ως κινάσες σερίνης/θρεονίνης, τα MAP3Ks φωσφορυλιώνουν τις MAP2K κινάσες σε δύο υπολείμματα σερίνης, ενεργοποιώντας έτσι την τελευταία.

Οι κινάσες MAP2K (όπως οι MKK4/7, MKK5 κ.ά.) μπορούν να φωσφορυλιώνουν καταλοίπα θρεονίνης και τυροσίνης στις MAPK και των τριών κατηγοριών, που αναφέρθηκαν. Στο τελικό στάδιο του μονοπατιού, οι φωσφορυλιωμένες MAPK, όπως η ERK1/2, είτε παραμένουν στο κυτταρόπλασμα για να αλληλεπιδράσουν με άλλα υποστρώματα είτε μεταφέρονται στον πυρήνα. Εκεί ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο CREB, που παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση.



Εικόνα 46: Οδός σηματοδότησης MAPK κινασών

(<https://cancercommons.org/latest-insights/mapk-pathway-in-cancer-new-treatments/>)

Μονοπάτι PI3K/Akt

Η PI3K είναι μέλος της οικογένειας των λιπιδικών κινάσεων, οι οποίες ενεργοποιούνται με την φωσφορυλίωση της 3-υδροξυλικής ομάδας του δακτυλίου του ινositόλης των λιπιδίων φωσφατιδυλινositόλης (PtdIns) στην πλασματική μεμβράνη. Η PI3K μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την προτίμησή της για λιπιδικά υποστρώματα και τις διαφορετικές δομές της. Από αυτές, η τύπου I PI3K παίζει σημαντικό ρόλο στους όγκους και είναι ο υποτύπος που έχει μελετηθεί περισσότερο. Η τύπου I PI3K αποτελείται από το p110. Ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μια καταλυτική υπομονάδα p110 και μια ρυθμιστική υπομονάδα p85, όπου υπάρχουν επτά ρυθμιστικές υπομονάδες που παράγονται από διαφορετικά γονίδια και συνδυασμούς γονιδίων: p85α, p85β, p55α, p55γ, p50α, p101 και p87. Η καταλυτική υπομονάδα (p110) έχει τέσσερις υποτύπους, p110α, p110β, p110γ και p110δ. Συνήθως, η καταλυτική υπομονάδα (p110) συνδέεται με τη ρυθμιστική υπομονάδα για να σταθεροποιήσει το πρωτεϊνικό ετεροδιμερές και να αναστείλει την ενεργοποίηση της PI3K. Η PI3K ενεργοποιείται κανονικά από εξωκυτταρικά σήματα υπό φυσιολογικές συνθήκες, και υπάρχουν δύο κύριοι δρόμοι ενεργοποίησης, οι οποίοι περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση με έναν υποδοχέα παράγοντα μιας φωσφορυλιωμένης τυροσίνης για την πρόκληση αλλαγών στη διαμόρφωση του ετεροδιμερούς και την ενεργοποίηση. Διάφορα ερεθίσματα, όπως αυξητικοί

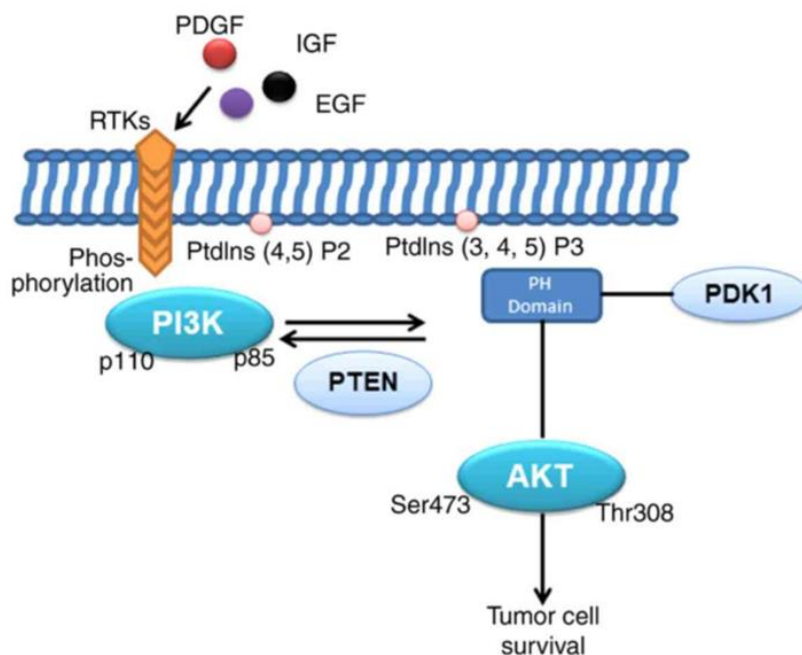
παράγοντες, κυτοκίνες και ορμόνες, έχουν αναφερθεί ότι ενεργοποιούν την PI3K. Συγκεκριμένα, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια και ο αυξητικός παράγοντας που μοιάζει με την ινσουλίνη συνδέονται με την αντίστοιχη διαμεμβρανική περιοχή της τυροσίνης κινάσης του υποδοχέα (RTK) της εξωκυτταρικής περιοχής του N-τερματικού, προκαλώντας την αυτόφωσφορυλίωση των υπολειμμάτων τυροσίνης στην κυτταροπλασματική περιοχή του RTK και του συνδετικού μορίου, ακολουθούμενη από p85SH2. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του τομέα και του υπολείμματος φωσφο-τυροσίνης στο σύμπλεγμα RTK προσελκύει την PI3K στους RTKs, προκαλώντας την αλλοστερική ενεργοποίηση της PI3K. Εκτός από τους RTKs, οι υποδοχείς που συζευγνύονται με G-πρωτεΐνες είναι μια άλλη σημαντική κατηγορία κλασικών ανάντι ρυθμιστών που ενεργοποιούν την PI3K, με τον πιο συνηθισμένο να είναι το p110β. Επιπλέον, η PI3K μπορεί να ενεργοποιηθεί άμεσα ή έμμεσα από την καταλυτική υπομονάδα (p110) σε συνδυασμό με μικρές GTPάσες, όπως η Ras και η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την Ras Rab-5A.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, από τις τέσσερις καταλυτικές υπομονάδες τύπου I, μόνο η φωσφατιδυλινοσιτόλη-4,5-διφωσφορική 3-κινάση καταλυτική υπομονάδα άλφα (PIK3CA) μεταλλάσσεται συχνά στον ανθρώπινο καρκίνο. Παρά το ότι υπάρχουν πολλές μεταλλάξεις στην PIK3CA, μόνο δύο θέσεις έχουν βρεθεί να προκαλούν αύξηση της δραστηριότητας της PI3K μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Η πανταχού παρούσα PIK3CB είναι λιγότερο συχνά μεταλλαγμένη, πιθανώς λόγω του μοναδικού ρυθμιστικού μοτίβου που υπάρχει μεταξύ της καταλυτικής υπομονάδας και της ρυθμιστικής υπομονάδας. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της ρυθμιστικής υπομονάδας τύπου I (PIK3R1 ή PIK3R2) έχουν ταυτοποιηθεί σε καρκινικά κύτταρα και προκαλούν αύξηση της δραστηριότητας της PI3K, και έχει αποδειχθεί μέσω πειραμάτων κυτταρικού μετασχηματισμού ότι η PIK3CA παίζει σημαντικό ρόλο στην πιθανή καρκινογένεση των μεταλλάξεων PIK3R1. Επιπλέον, η p110α παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της αγγειογένεσης των όγκων. Μελέτες έχουν δείξει ότι μετά την εξάλειψη του γονιδίου p110α, η ανάπτυξη του εμβρύου είναι αργή και ο σχηματισμός αγγείων του εμβρύου είναι ελαττωματικός στο δεύτερο τρίμηνο. Σε καρκινικά κύτταρα με το άγριο γονίδιο PI3K, το οποίο προκαλεί συνταγματική μεταγωγή σημάτων από την PI3K, συνήθως υπάρχει καρκινογόνος βλάβη που προκαλείται από την ανάντι τυροσίνη κινάση ή τη Ras. Η φωσφατάση και ο ομόλογος της τενσίνης (PTEN) λιπιδική φωσφατάση ή η ινοσιτόλη πολυφωσφορική-4-φωσφατάση τύπου II B διαγραφή είναι ένας άλλος δρόμος για την αύξηση των λιπιδικών προϊόντων της PI3K, αλλά η απενεργοποίηση αυτών των καταστολέων όγκων δεν αποκλείεται αμοιβαία με τις μεταλλάξεις στα γονίδια PI3K ή Ras. Τα μοντέλα ποντικών έχουν επίσης δείξει ότι η απώλεια της PTEN και η μετάλλαξη της PIK3CA μαζί μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών.

Υπάρχουν αρκετοί στόχοι πολυμερισμού που λαμβάνουν σήματα που δημιουργούνται από την κατωφέρεια αλυσίδα της PI3K, αλλά ο πιο σημαντικός διαμεσολαβητής είναι

η σερίνη/θρεονίνη κινάση AKT. Η AKT παίζει κυρίαρχο ρόλο στη μεταγωγή σημάτων ολόκληρης της οδού PI3K.

Υπάρχουν τρεις υποτύποι της σερίνη/θρεονίνη (Ser/Thr) κινάσης AKT στα θηλαστικά, οι AKT1, AKT2 και AKT3, που είναι βασικά μόρια στην οδό μεταγωγής σημάτων της PI3K. Η αμινοξική δομή της AKT, από το N-τελικό άκρο μέχρι το C-τελικό, περιλαμβάνει έναν τομέα plekstrin homology (PH), τον κεντρικό καταλυτικό τομέα και τον ρυθμιστικό τομέα του καρβοξυ-τερματικού. Ο τομέας PH κυρίως διαμεσολαβεί τη μεμβρανική μετατόπιση μετά την ενεργοποίηση της AKT. Ο καταλυτικός τομέας περιέχει θέσεις δέσμησης ATP. Η ενεργοποίηση της AKT εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της εσωτερικής θέσης Thr308. Ο ρυθμιστικός τομέας στο καρβοξυ-τερματικό περιέχει μια μεγάλη ποσότητα προλίνης, που περιέχει μια άλλη φωσφορυλιωμένη θέση Ser473 που απαιτείται για την ενεργοποίηση της AKT. Στον κλασικό τρόπο ενεργοποίησης της PI3K/AKT, η AKT και η ανάντι 3-φωσφοϊνοσιτόλη-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση-1 (PDK1) προσελκύονται στη κυτταρική μεμβράνη μέσω της αλληλεπίδρασης του τομέα PH [79].



Εικόνα 47: Οδός σηματοδότησης PI3K/Akt

(<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2019.10121>)

1.6.2 Καρκινογένεση

Η καρκινογένεση μπορεί να προκύψει από τη δράση οποιουδήποτε ή συνδυασμού χημικών, φυσικών, βιολογικών ή/και γενετικών προσβολών στα κύτταρα. Η διαδικασία της καρκινογένεσης μπορεί να χωριστεί σε τουλάχιστον τρία στάδια: έναρξη, προαγωγή και πρόοδος. Το πρώτο στάδιο της καρκινογένεσης, η έναρξη, προκύπτει από μια μη αναστρέψιμη γενετική αλλοίωση, πιθανότατα μία ή περισσότερες απλές μεταλλάξεις, μετατροπές, μεταβάσεις ή/και μικρές διαγραφές στο DNA. Το αναστρέψιμο στάδιο της προαγωγής δεν περιλαμβάνει αλλαγές στη δομή του DNA, αλλά στην έκφραση του γονιδιώματος, που προκαλείται μέσω αλληλεπιδράσεων προαγωγέα-υποδοχέα. Το τελικό μη αναστρέψιμο στάδιο προόδου χαρακτηρίζεται από καρυοτυπική αστάθεια και κακοήγη ανάπτυξη. Οι κρίσιμοι μοριακοί στόχοι, κατά τα στάδια της καρκινογένεσης, περιλαμβάνουν τα πρωτο-ογκογονίδια, τα κυτταρικά ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, αλλοιώσεις και στα δύο αλληλόμορφα των τελευταίων εντοπίζονται μόνο στο στάδιο της εξέλιξης. Αν και πολλά από αυτά τα κρίσιμα γονίδια-στόχοι έχουν ταυτοποιηθεί, ο τελικός αριθμός και τα χαρακτηριστικά των μοριακών αλλοιώσεων που ορίζουν τη νεοπλασία δεν έχουν διευκρινιστεί.

Έναρξη

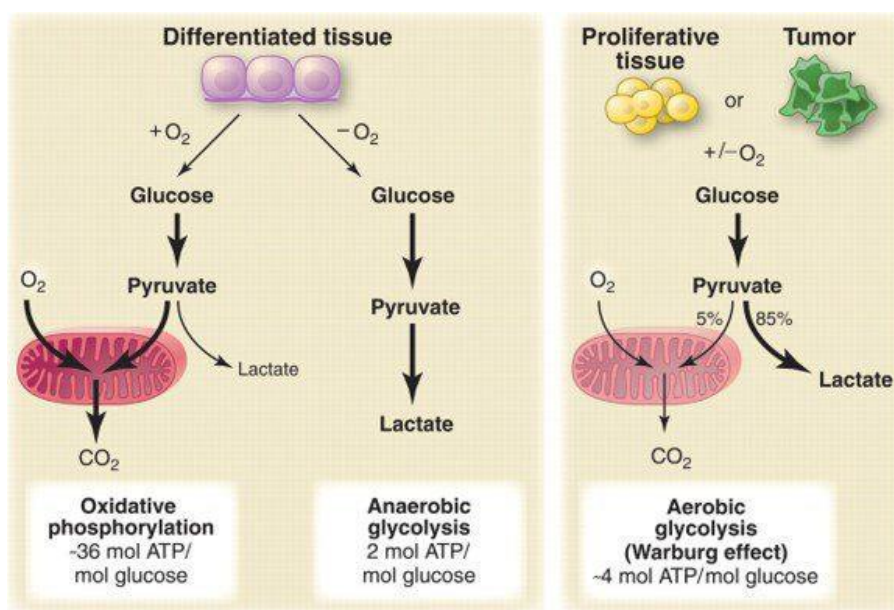
Η έναρξη αυτού του σταδίου συμβαίνει όταν μεταλλαξιογόνα δρουν στο γενετικό υλικό ενός μεμονωμένου κυττάρου. Οι μεταλλάξεις που αναφέρονται σε γονίδια "κλειδιά" προκαλούν ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αντίσταση στους κυτταροτοξικούς μηχανισμούς και βλάβη στους μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός πρώιμου όγκου. Αυτός ο όγκος έχει πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι του φυσιολογικού ιστού, αλλά δεν ταξινομείται ως καρκίνος, εκτός εάν συμβούν μη αναστρέψιμες γενετικές αλλαγές στο επόμενο προχωρημένο στάδιο. Μέχρι αυτή τη στιγμή ο όγκος είναι ασυμπτωματικός και τα μεταλλαγμένα κύτταρα αναπτύσσονται αργά έως ότου φτάσουν σε ένα μέγιστο, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός.

Προαγωγή

Η προαγωγή περιλαμβάνει τα στάδια από τον αρχικό σχηματισμό του όγκου έως τη μετατροπή σε μεταστατικούς όγκους. Πειραματικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός όγκων ξεκινά και στη συνέχεια πυροδοτείται από εξωτερικά γεγονότα, όπως τραύμα ή φλεγμονή. Έτσι, δημιουργούνται συνθήκες υποξίας και οξέωσης. Οι συνθήκες αυτές, σε συνδυασμό με την αυξημένη τοπική ροή αίματος, ευνοούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων αυξάνονται ραγδαία και διαγιγνώσκονται ως καρκινικοί όγκοι.

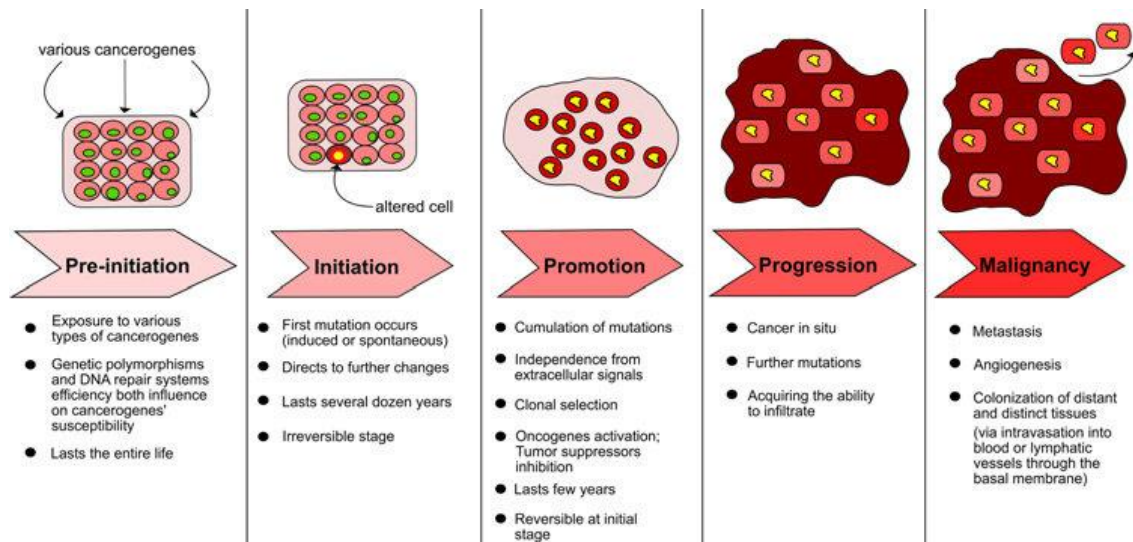
Πρόοδος

Οι καρκινικοί όγκοι συνεχίζουν να αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Προκειμένου να προωθηθεί η υποοξίνιση και να καταστεί το pH του περιβάλλοντος όξινο (συνεχής παραγωγή γαλακτικού οξέος, λόγω αυξημένης γλυκόλυσης- φαινόμενο Warburg), οι όγκοι σχηματίζονται αρκετά μεγάλοι, ώστε να βλάπτουν τα γειτονικά υγιή κύτταρα. Ταυτόχρονα, τα μεταστατικά κύτταρα εισβάλλουν σε νέους ιστούς και σχηματίζουν δευτερογενείς όγκους. Έτσι, είναι γεγονός πως το ίδιο στάδιο περιέχονται οι διεργασίες της αγγειογένεσης και της μετάστασης [23], [67].

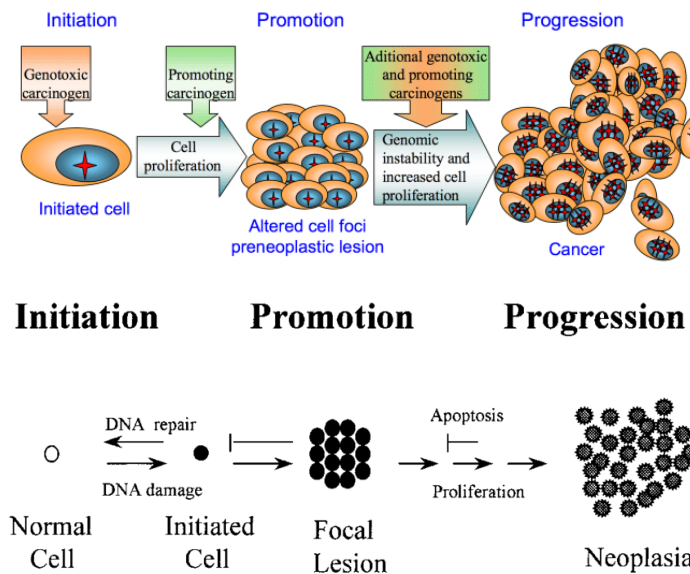


Εικόνα 48: Φαινόμενο Warburg

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849637/>)



Εικόνα 49: Στάδια καρκινογένεσης, με έμφαση στη διαφορετική μορφολογία των ιστών
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6418405/>)



Εικόνα 50: Έναρξη- Προαγωγή- πρόοδος- Νεοπλασία

Εικόνα πάνω: (https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-chemical-carcinogenesis-The-three-stages-of-carcinogenesis-initiation_fig2_286340165)

Εικόνα κάτω: https://www.researchgate.net/figure/The-multistage-process-of-chemical-carcinogenesis-The-induction-of-hepatic-cancer-is-a_fig1_12682947

1.6.3 Χημική Καρκινογένεση

Οι πρώτες ενδείξεις ότι χημικές ουσίες μπορεί να συνδέονται με την εμφάνιση καρκίνου εντοπίζονται ήδη από τον 16ο αιώνα, όταν ο Theophrastus Bombastus von Hohenheim, γνωστός και ως Παράκελσος, περιέγραψε την ασθένεια των ανθρακωρύχων. Αργότερα, το 1775, ο Άγγλος χειρουργός Percival Pott παρατήρησε αυξημένα ποσοστά καρκίνου του όσχεου στους καπνοδοκαθαριστές. Ακολούθησαν παρατηρήσεις από διάφορους ερευνητές που επιβεβαίωσαν τη σχέση του καρκίνου με ορισμένα επαγγέλματα. Η πρώτη επιτυχής αναπαραγωγή καρκινικής νόσου στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε το 1915 από τους Yamagiwa και Ichikawa, οι οποίοι προκάλεσαν καρκίνο του δέρματος σε κουνέλια χρησιμοποιώντας λιθανθρακόπισσα. Σήμερα, είναι αποδεδειγμένο ότι πολλές χημικές ουσίες είναι καρκινογόνες για τον άνθρωπο.

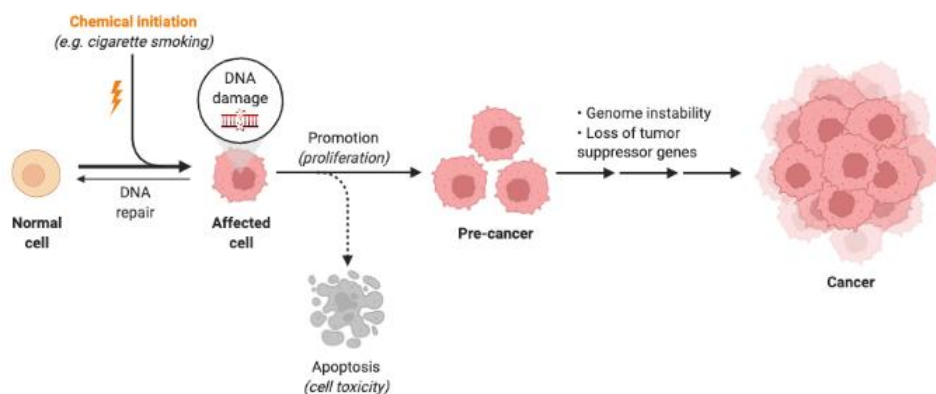
Τα χημικά καρκινογόνα ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα γενοτοξικά καρκινογόνα και τα μη γενοτοξικά ή επιγενετικά καρκινογόνα. Τα γενοτοξικά καρκινογόνα δρουν σε κύτταρα-στόχους διαφόρων ιστών δημιουργώντας σύμπλοκα με το DNA, προκαλώντας έτσι γενετικές βλάβες. Συνήθως είναι οργανικές ουσίες, είτε συνθετικές είτε φυσικές. Αυτά τα καρκινογόνα περιέχουν ηλεκτρονιόφιλα μόρια ή μπορούν να μετατραπούν σε ηλεκτρονιόφιλα ενεργά μόρια από τον ξενιστή. Η χημική αλλοίωση του DNA είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ των πυρηνόφιλων κέντρων του DNA και των ηλεκτρονιόφιλων μορφών των καρκινογόνων. Τα πυρηνόφιλα κέντρα του DNA είναι τα άτομα οξυγόνου και αζώτου των νουκλεοτιδίων, καθώς και τα άτομα οξυγόνου των φωσφορικών του σκελετού του DNA.

Τα επιγενετικά καρκινογόνα δεν έχουν τη μοριακή δομή που απαιτείται για τον σχηματισμό ηλεκτρονιόφιλων μορίων και επομένως δεν αντιδρούν με το DNA. Η δράση τους είναι είτε έμμεση, οδηγώντας σε νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων, είτε προάγοντας την ανάπτυξη όγκων από ήδη μετασχηματισμένα κύτταρα. Συνήθως πρόκειται για συνθετικά εντομοκτόνα, πρόσθετες ουσίες των τροφίμων και φάρμακα. Για να προκαλέσουν καρκίνο, απαιτείται μακροχρόνια έκθεση και υψηλές συγκεντρώσεις της χημικής ουσίας.

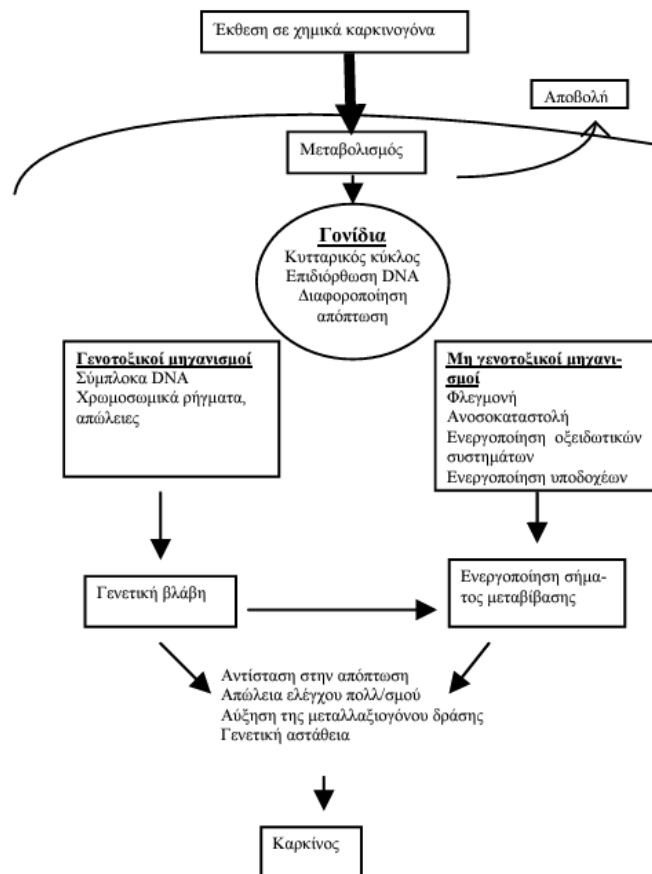
Ουσίες	Κύριες πηγές	Όργανο στόχος
Aminoazo dyes a-Aminoazotoluene N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene	Βαφές, χρώματα, ανοσοκατασταλτικά Γυαλιστικές ουσίες	Ήπαρ, πνεύμονας, ουροδόχος κύστη Πνεύμονας, ήπαρ
Αντινεοπλασματικά φάρμακα Μεθοτρεπάτη Θεωτέπα	Χημειοθεραπεία Χημειοθεραπεία	Λευχαιμία Λευχαιμία
Αρωματικές αμίνες 2-Naphthylamine 4-Aminobiphenyl 2-Acetylaminofluorene	Χρώματα, αντιοξειδωτικά Ερευνητική ουσία Εντομοκτόνα	Ουροδόχος κύστη Ουροδόχος κύστη Ήπαρ, ουροδόχος κύστη
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες Βενζο[α]πυρένιο 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzop-dioxin Polychlorinated biphenyls	Ανθρακόπισσα, κάπνισμα Λέν χρησιμοποιείται στο εμπόριο Οικοδομικά υλικά, εντομοκτόνα	Δέρμα, πνεύμονας, στομάχος Πνεύμονας, λέμφωμα, ήπαρ Δέρμα, ήπαρ
Μέταλλα Αρσενικό Κάδμιο Νικέλιο	Φαρμακευτικές ουσίες, φυσικά μεταλλεύματα, κράματα μετάλλων Φυσικά μεταλλεύματα, χρώματα, μπαταρίες, κεραμικά είδη Φυσικά μεταλλεύματα, ηλεκτροδία, κράματα μετάλλων, καταλύτες	Δέρμα, πνεύμονας, ήπαρ Πνεύμονας, προστάτης, νεφροί Πνεύμονας, ρινική κοιλότητα
Φυσικά καρκινογόνα Αφλατοξίνη B1 Αμύαντος	Συντηρητικά τροφίμων Θερμομόνωση, φλάντζες	Ήπαρ Πνεύμονας, μεσοθηλίωμα
N-nitroso compounds N-Nitrosodimethylamine 4-(Methylnitrosamino)-d-(3-peridyl)-1-birane	Πολυμερή, μπαταρίες Τσιγάρα, ερευνητικές ουσίες	Πνεύμονας, ήπαρ, νεφροί Πνεύμονας, ήπαρ
Αλκένια Οξείδιο του αιθυλενίου Βινυλοχλωρίδιο Τριχλωραιθυλένιο	Πολυεστερικά προϊόντα, παράγωγα γλυκόλης, αποστείρωση Πλαστικά (PVC), πολυμερή Επεμβάσεις, λιποαφαρέσεις, συγκολλητικά, γυαλιστικά	Λευχαιμία, λέμφωμα Ήπαρ, (αγγειοσάρκωμα) Ήπαρ, νεφροί
Παραφίνες 1,2 Dichloroethane Bis(chloroethyl)ether Αέριο μουστάρδας Nitrogen mustard	Παραγωγή VC, διαλυτικά για αφαίρεση λίπους Τεχνικές εφαρμογές Χημικό όπλο Αντινεοπλασματική ουσία	Ήπαρ, πνεύμονας, μαστός Πνεύμονας Πνεύμονας Πνεύμονας, δέρμα, λέμφωμα

Εικόνα 51: Χημικά καρκινόνες ουσίες, οι κύριες πηγές τους και το συσχετιζόμενο «όργανο-στόχος»

(eclass.hua.gr)



Εικόνα 52: Σχηματική αναπαράσταση χημικής καρκινογένεσης: απόπτωση και κυτταροτοξικότητα
(<https://www.biorender.com/template/chemical-carcinogenesis>)



Εικόνα 53: Μηχανισμοί χημικής καρκινογένεσης

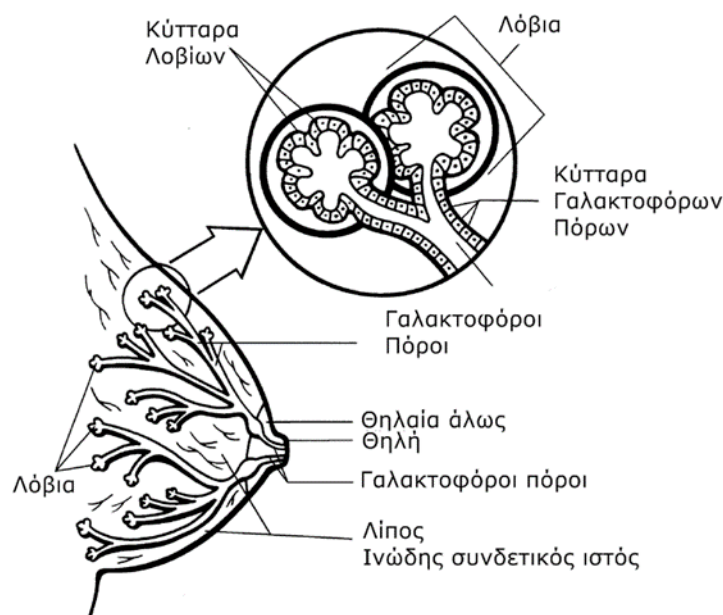
(eclass.hua.gr)

1.7 Καρκίνος του Μαστού

Πριν την εισαγωγή στον καρκίνο του μαστού, είναι ουσιώδους σημασίας, μια συνοπτική παρουσίαση της ανατομίας των μαστών και της φυσιολογίας τους.

Όσον αφορά στην ανατομία των μαστών, βρίσκονται στην πρόσθια θωρακική επιφάνεια, εκτεινόμενοι μεταξύ 2^{ης} ή 3^{ης} και 6^{ης} ή 7^{ης} πλευράς και μεταξύ της στερνικής και πρόσθιας μασχαλιαίας γραμμής. Στο κέντρο τους, υπάρχει ένα έπαρμα του δέρματος, που ονομάζεται θηλή, η οποία εμφανίζει ορισμένες ρωγμές, που αποτελούν τα στόμια των γαλακτοφόρων πόρων. Η περιοχή που περιβάλλει τη θηλή ονομάζεται θηλαία άλω και είναι πιο σκουρόχρωμη. Σε αυτήν, υπάρχουν αλωαία οζίδια, που «στεγάζουν» σηματογόνους αδένες. Τόσο η θηλή όσο κι η θηλαία άλω διαθέτουν και μυικές ίνες. Πέραν της εξωτερικής εμφάνισης των μαστών, σε επίπεδο τόσο ανατομίας όσο και φυσιολογίας, ο μαστός εσωτερικά αποτελείται από δύο κύρια στοιχεία: τους λοβούς, οι οποίοι είναι επενδεδυμένοι με κύτταρα που παράγουν γάλα και τους αγωγούς, οι οποίοι μεταφέρουν το γάλα από τους λοβούς στη θηλή. Η βασική λειτουργική μονάδα του μαστού είναι η πορολοβική μονάδα. Υπάρχουν 15-20 τέτοιες μονάδες (πορολοβία) ανά στήθος. Ο καρκίνος του μαστού ξεκινά συνήθως εκεί που

τελειώνουν οι λοβοί και αρχίζουν οι πόροι (η Τελική Λοβιακή Μονάδα Πόρων - Terminal Duct Lobular Unit, TDLU).

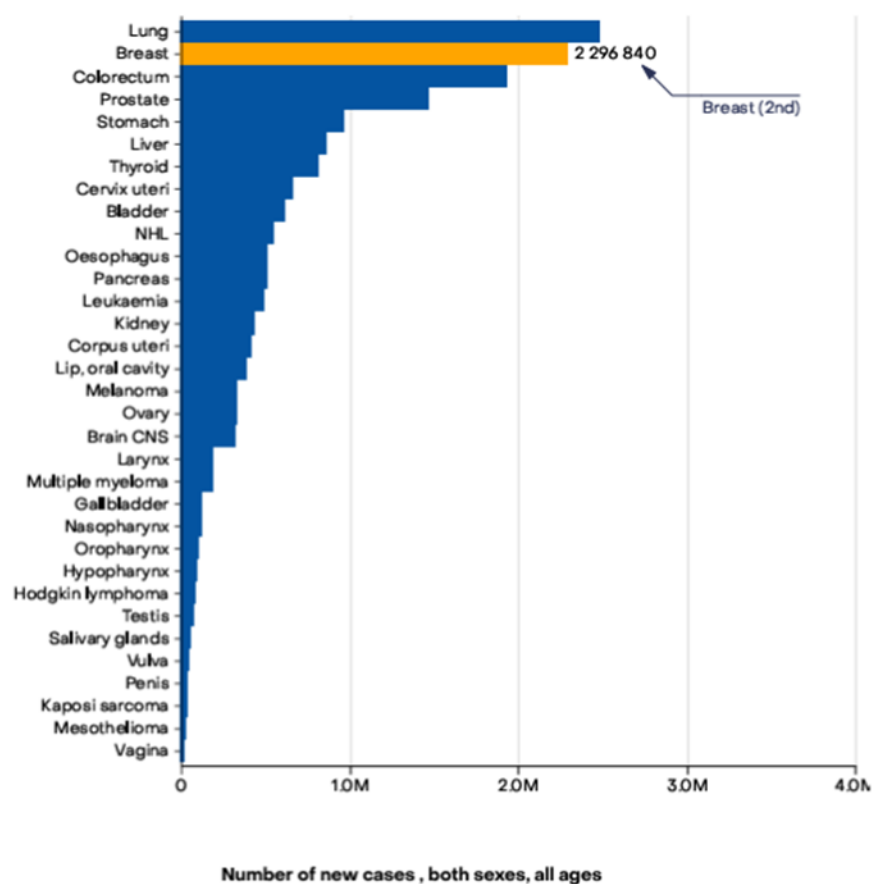


Εικόνα 53: Οπτική αναπαράσταση ανατομίας μαστού

(<https://shorturl.at/fdQtx>)

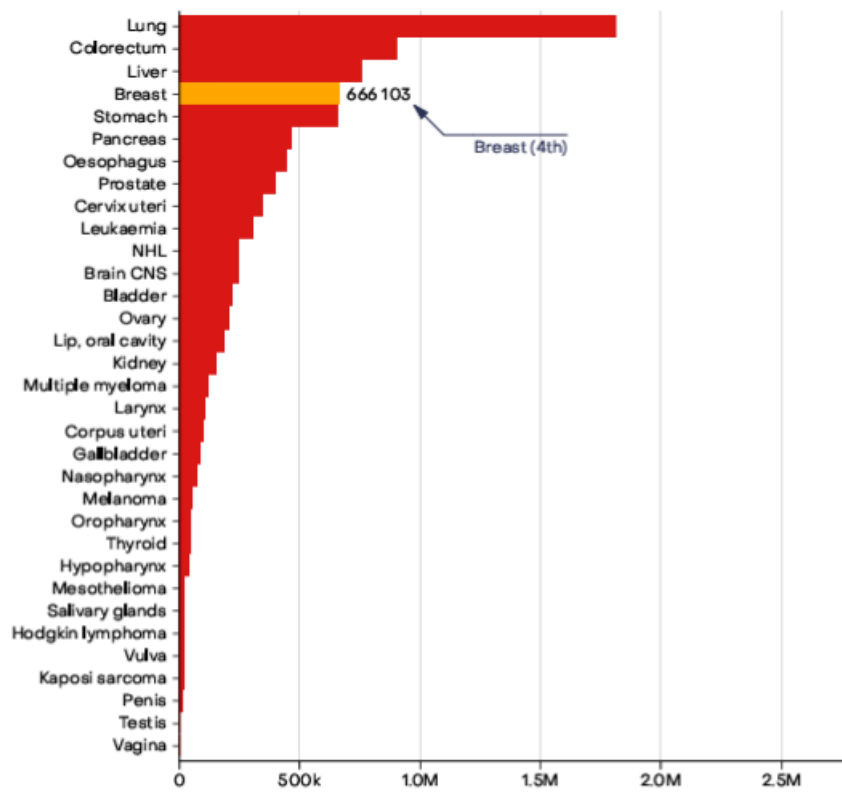
Κατά κανόνα, ο καρκίνος λαμβάνει το όνομά του από το μέρος του σώματος, από το οποίο προήλθε. Έτσι, ο καρκίνος του μαστού αναφέρεται στην ακανόνιστη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων, που προέρχονται από τον ιστό του μαστού. Αποτελεί την πιο κοινή αιτία θανάτου, που σχετίζεται με καρκίνο στις γυναίκες και εμφανίζεται πιο συχνά σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών. Ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται, επίσης, στους άνδρες, αλλά είναι πολύ σπάνιος, «αγγίζοντας» περίπου το 1% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού [21], [22].

Incidence



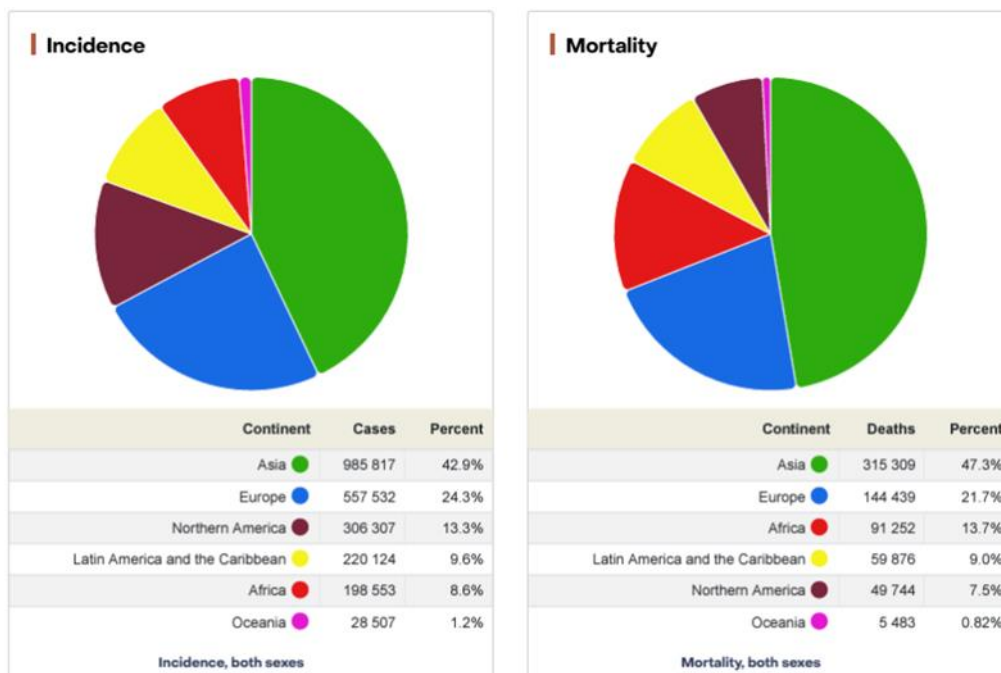
Εικόνα 54: Γραφική αναπαράσταση συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε παγκόσμια κλίμακα (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38230766/>)

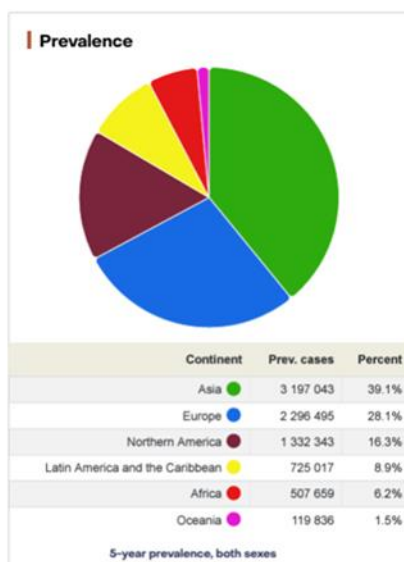
Mortality



Number of deaths , both sexes, all ages

Εικόνα 55: Γραφική αναπαράσταση θνησιμότητας καρκίνου του μαστού σε παγκόσμια κλίμακα
(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38230766/>)



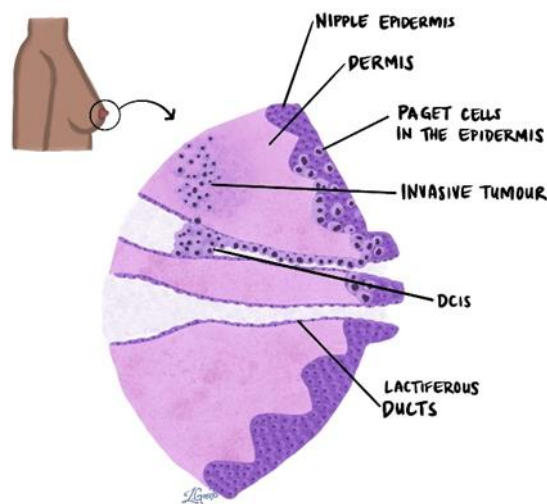


Εικόνα 56, με τη σειρά: Διαγράμματα σε μορφή πίτας συχνότητας εμφάνισης, θνησιμότητας και επιπολασμού καρκίνου του μαστού διεθνώς

(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38230766/>)

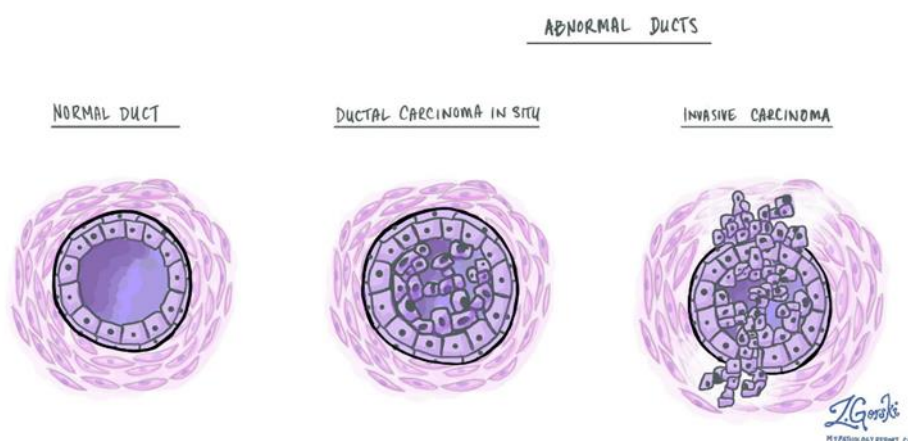
Οι υψηλές θέσεις που καταλαμβάνει ο καρκίνος του μαστού τόσο σε επίπεδο εμφάνισης περιστατικών όσο και σε επίπεδο θνησιμότητας καθιστούν επιτακτική την ανάγκη περαιτέρω μελέτης του και διεξαγωγής έρευνας σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις του.

Υφίστανται ποικίλοι τύποι όγκων, που μπορεί να αναπτυχθούν σε διαφορετικές περιοχές του μαστού. Οι περισσότεροι όγκοι είναι αποτέλεσμα καλοήθων (μη καρκινικών) μεταβολών εντός του μαστού. Για παράδειγμα, η ινοκυστική νόσος του μαστού είναι μια μη καρκινική κατάσταση, κατά την οποία οι γυναίκες αναπτύσσουν κύστες (συσσωρευμένα πακέτα υγρού), ίνωση (σχηματισμός συνδετικού ιστού που μοιάζει με ουλή), εξογκώματα και περιοχές ευαισθησίας ή πόνου στο στήθος. Οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού ξεκινούν από τα κύτταρα των γαλακτοφόρων πόρων (πορογενή καρκινώματα). Μερικοί ξεκινούν από τα κύτταρα που επενδύουν τους λοβούς (λοβιακά καρκινώματα), ενώ ένας μικρός αριθμός ξεκινά από τους άλλους ιστούς.



Εικόνα 57: Επιδερμίδα της θηλής – επιδερμίδα – κύτταρα καρκινώματος Paget που έχουν εξαπλωθεί από την επιδερμίδα στο χόριο - διηθητικό καρκίνωμα – μη διηθητικό καρκίνωμα μαστού – γαλακτοφόροι πόροι

(<https://link.springer.com/article/10.1007/s12070-023-03806-1>)



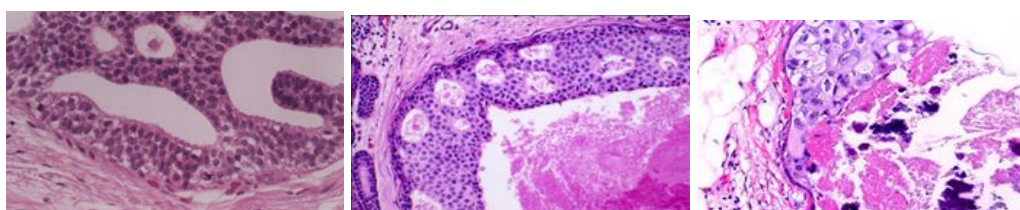
Εικόνα 58: Απεικόνιση κυττάρων φυσιολογικών γαλακτοφόρων πόρων – κυττάρων in situ πορογενούς καρκινώματος – κυττάρων διηθητικού πορογενούς καρκινώματος

(<https://link.springer.com/article/10.1007/s12070-023-03806-1>)

Αρχικά, είναι σημαντική η κατανόηση των τύπων καρκίνου του μαστού. Υπάρχουν διάφοροι τύποι καρκίνου του μαστού και η κατηγοριοποίησή τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Ανάλογα με το πόσο έχει επεκταθεί ο καρκίνος μέσα στο μαστό, διακρίνεται σε In situ και Διηθητικό. Ανάλογα με τα κύτταρα από τα οποία προέρχεται, διακρίνεται σε Πορογενή και Λοβιακό. Ανάλογα με την κακοήθεια των κυττάρων του, διακρίνεται σε βαθμό κακοήθειας 1 (Χαμηλός), 2 (Μέτριος) ή 3 (Υψηλός). Ανάλογα με το επίπεδο διαφοροποίησης των κυττάρων του, διακρίνεται σε Χαμηλής, Μέσης και Υψηλής Διαφοροποίησης. Επιπλέον, διακρίνεται σε δύο ομάδες ανάλογα με την παρουσία ορμονικών υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης στα κύτταρα: καρκίνοι θετικοί ή αρνητικοί σε ορμονικούς υποδοχείς. Επίσης, διακρίνεται

σε δύο ομάδες ανάλογα με την παρουσία υποδοχέων HER2 στα κύτταρα: HER2-θετικοί και HER2-αρνητικοί.

Εμβαθύνοντας στους ανωτέρω τύπους, με έμφαση στους ιστολογικούς, ο in-situ, όπως υποδηλώνει και το όνομά του, εκδηλώνεται τοπικά, σε συγκεκριμένο σημείο, δίχως να επεκτείνεται. Αποτελεί το στάδιο 0 και αναφέρεται, συχνά, ως τοπικό καρκίνωμα του μαστού. Η καταλληλότερη αντιμετώπισή του είναι η χειρουργική, ωστόσο δεν αποκλείεται η υποβολή της ασθενούς σε συμπληρωματική θεραπεία, φαρμακευτική αγωγή ή ορμονοθεραπεία, προς αποφυγήν επανεμφάνισης του καρκινώματος. Διακρίνεται, περαιτέρω, σε Μη Διηθητικό Πορογενές Καρκίνωμα του Μαστού (Ductal Carcinoma In situ, DCIS), που μπορεί να είναι και πλήρως ιάσιμο, αν εντοπιστεί εγκαίρως πριν επεκταθεί σε άλλους ιστούς. Πρόκειται για καρκίνο στατικό, που εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά του γαλακτοφόρου αδένα.



Εικόνα 59: Απεικονίσεις του DCIS: Εμφανίζεται κλινικά ως μικροαποτιτανώσεις, ορατές στη μαστογραφία, εστιασμένες στην περιοχή της βλάβης

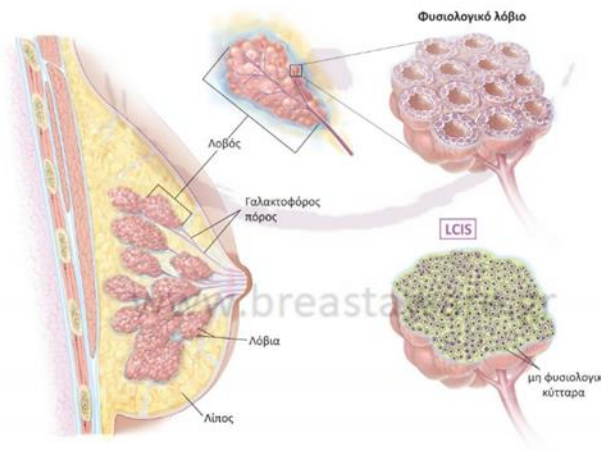
<https://shorturl.at/QGeSE>

Άλλη μια διάκριση του in-situ καρκίνου του μαστού είναι το Μη Διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα του Μαστού (Lobular Carcinoma In Situ, LCIS). Τα κύτταρα που καλύπτουν το εσωτερικό τοίχωμα των λοβών του μαστικού αδένα αναπτύσσονται ακανόνιστα, αλλά δεν διεισδύουν στο τοίχωμα του μαστικού αδένα. Δεν εκδηλώνεται ως ψηλαφητή μάζα. Δεν πρόκειται για καρκίνο, παρά το όνομά του, ωστόσο οι γυναίκες που εμφανίζουν τέτοιου είδους καρκίνωμα παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου.



Εικόνα 60: Απεικόνιση του Μη Διηθητικού Λοβιακού Καρκινώματος του Μαστού

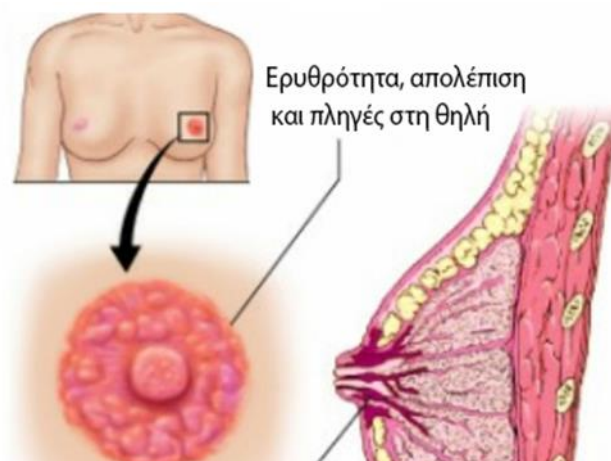
<https://shorturl.at/QGeSE>



Εικόνα 61: Απεικόνιση της μορφής φυσιολογικών κυττάρων, αλλά και καρκινικών λοβιακών κυττάρων (LCIS)

(<https://www.breast-glyfada.gr/pa8hseis/in-situ-lcis/>)

Εξαιρετικά σπάνια μορφή in-situ καρκίνου του μαστού αποτελεί η Νόσος Paget στο δέρμα της θηλής του στήθους. Εμφανίζεται στο 5% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και συχνά προσομοιάζει σε μαστίτιδα. Συνοδεύεται συχνά από συμπτώματα απλής δερματίτιδας, με αίσθημα καύσου και αλλοιώσεις του δέρματος στην περιοχή της θηλαίας άλω και της θηλής.



Εικόνα 62: Νόσος Paget

(<https://www.mypathologyreport.ca/el/diagnosis-library/pagets-disease-of-the-breast/>)

Πολύ μεγαλύτερης συχνότητας και επιθετικότητας είναι ο Διηθητικός καρκίνος του μαστού. Χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη στους πόρους, τη διάσπαση των τοιχωμάτων των πόρων και τη διείσδυση στους περιβάλλοντες ιστούς, τον λιπώδη, τον συνδετικό ιστό και τα αιμοφόρα αγγεία. Απόρροια αυτού είναι, μέσω του αίματος και των λεμφικών οδών, να μπορεί να εξαπλώνεται σε άλλα μέρη του σώματος, όπως οστά, συκώτι, πνεύμονες, εγκέφαλος. Οδηγώντας σε μεταστάσεις σε αυτά. Διακρίνεται σε Διηθητικό Καρκίνωμα του Πόρου και Διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα.

Όσον αφορά το πρώτο, μέσω εξέτασης του όγκου στο μικροσκόπιο, σταδιοποιείται με γνώμονα τον βαθμό Nottingham, ο οποίος προσδιορίζεται με αξιολόγηση τριών χαρακτηριστικών: το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που σχηματίζουν σωληνάρια ή, αλλιώς ομάδες κυττάρων που συνδέονται μεταξύ τους προς διαμόρφωση στρογγυλών δομών, που μοιάζουν με δακτυλίους, τον πυρηνικό πλειομορφισμό και τον μιτωτικό ρυθμό των κυττάρων του όγκου. Η βαθμολογία που προκύπτει είναι κρίσιμη για την εξέλιξη του καρκινώματος, τον βαθμό εξάπλωσής του, την ανάπτυξη μεταστάσεων κ.λπ.

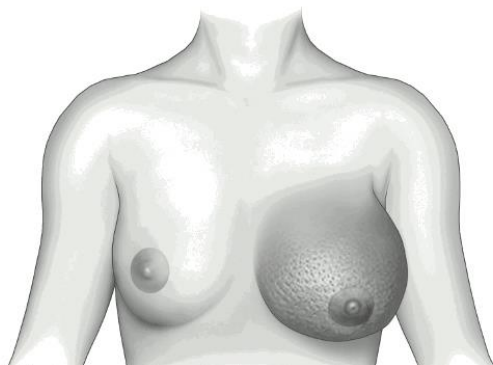
Όσον αφορά το δεύτερο, συνήθως ξεκινά ως μια μη καρκινική ανάπτυξη μη φυσιολογικών κυττάρων του μαστού, που ονομάζεται λοβιακό καρκίνωμα *in situ* (LCIS). Το LCIS μπορεί να υπάρχει για μήνες ή χρόνια πριν μετατραπεί σε διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα. Επιπλέον, οι ασθενείς με προηγούμενη διάγνωση LCIS διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης διηθητικού λοβιακού καρκινώματος. Το, εν λόγω, καρκίνωμα αξιολογείται μέσω του βαθμού Nottingham, που αναλύθηκε παραπάνω. Σημαντική, ωστόσο, είναι και η κατηγοριοποίηση του Διηθητικού Λοβιακού Καρκινώματος σε Κλασικό και Πλειομορφικό Τύπο, με τον πρώτο να είναι συνηθέστερος και να χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μικρότερων καρκινικών κυττάρων που επεκτείνονται ανεξάρτητα, δίχως να συνδέονται με άλλα και τον δεύτερο να παρουσιάζει μεγαλύτερα κύτταρα, περισσότερο αποκλίνοντα από τη φυσιολογική μορφή, με πυρήνα, πιο σκουρόχρωμο από τον πυρήνα των κυττάρων του κλασικού τύπου.

Ο Διηθητικός Καρκίνος του Μαστού εμφανίζεται και ως Κολλοειδές ή Βλεννώδες Καρκίνωμα, αποτελώντας το 2% των εμφανιζόμενων περιστατικών. Διακρίνεται σε δύο υποτύπους: τον Γνήσιο Βλεννώδη Καρκίνο του Μαστού και τον Μικτού Τύπου Βλεννώδη Καρκίνο του Μαστού, όπου το βλεννώδες καρκίνωμα συνυπάρχει με *in situ* ή διηθητικό μη βλεννογόνο καρκίνωμα του μαστού, μπορεί να είναι ένας τύπος λοβιακού ή πορογενούς καρκινώματος. Έχει πολύ καλή πρόγνωση. Σπάνια δίνει μεταστάσεις σε μασχαλιαίους λεμφαδένες και ακόμη πιο σπάνια απομακρυσμένες μεταστάσεις. Συνήθως εκφράζει ορμονικούς υποδοχείς και σπάνια υποδοχείς HER.

Άλλος ένας υπότυπος του Διηθητικού Καρκίνου του Μαστού είναι το Θηλώδες Καρκίνωμα του Μαστού. Είναι άριστης πρόγνωσης και δεν εκδηλώνει επιθετική συμπεριφορά με τάση εξάπλωσης και μεταστάσεων. Εμφανίζεται σε ποσοστό μόλις 1% των περιπτώσεων.

Τελευταία μορφή του Διηθητικού Καρκινώματος του Μαστού είναι το Μυελοειδές Καρκίνωμα, το οποίο εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες νεαρής ηλικίας. Διαθέτει μικρή τάση ανάπτυξης και μεταστάσεων και εμφανίζεται σε γυναίκες με μετάλλαξη του γονιδίου BReast CAncer 1, BRCA-1.

Εξίσου σπάνιος τύπος καρκίνου του μαστού είναι ο Φλεγμονώδης. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να «μπλοκάρουν» τα λεμφικά αγγεία στο δέρμα και να προκαλέσουν φλεγμονή στο στήθος. Διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο, λόγω της εξάπλωσης στο δέρμα και της συνολικής επιθετικότητας.



Εικόνα 63: Φλεγμονώδης Καρκίνος του Μαστού

(<https://www.frontidamastou.gr/iatrika-themata/typi-karkinou-mastou/>)

Η κατηγοριοποίηση, ωστόσο, του καρκίνου του μαστού δεν είναι μόνο ιστολογική, καθώς υπάρχει και μοριακή του ταξινόμηση. Η μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού αποτελεί μια συμπληρωματική μέθοδο στην ιστολογική ταξινόμηση, λαμβάνοντας υπόψη τα μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου. Βασίζεται στην ανάλυση της έκφρασης γονιδίων και πρωτεϊνών, με σκοπό τον προσδιορισμό του υποτύπου του καρκίνου και την πρόγνωση της πορείας του. Ακολουθώντας, παρατίθενται κάποιοι από τους σημαντικούς μοριακούς δείκτες που εξετάζονται.

- Υποδοχείς οιστρογόνων (OR) και προγεστερόνης (PR): Η παρουσία OR και PR καθιστά τον όγκο ορμονοεξαρτώμενο, ευαίσθητο σε ορμονοθεραπεία.
- Υποδοχέας HER2/neu: Η υπερέκφραση του υποδοχέα HER2/neu σχετίζεται με επιθετικότερη μορφή καρκίνου και ανταποκρίνεται σε στοχευμένες θεραπείες.
- Oncogene RAS: Η ενεργοποίηση των RAS οδηγεί σε ανάπτυξη και εξάπλωση του καρκίνου.
- Γονίδιο BRCA1 και BRCA2: Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών.

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να προκληθεί από τη μετάλλαξη πολλαπλών γονιδίων, των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, που συνήθως αποσιωπούνται ή των ογκογονιδίων που ενεργοποιούνται. Πολλές από αυτές τις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού κατηγοριοποιούνται από τους ορμονικούς υποδοχείς: τους υποδοχείς οιστρογόνων

(ER), τον υποδοχέα προγεστερόνης (PR) και υποδοχείς ανδρογόνων (AR), που προέρχονται από τον ασθενή με καρκίνο του μαστού. Η απουσία ή η παρουσία των ορμονικών υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και ανδρογόνων μπορεί να καθορίσει τι είδους κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού θα πρέπει να αξιοποιηθούν οι ερευνητές για τα πειράματά τους, στην έρευνα καρκίνου του μαστού.

Μάλιστα, στον παρακάτω πίνακα, παρατίθενται τα χαρακτηριστικά των μοριακών υποτύπων καρκίνου του μαστού, με βιοδείκτες και κυτταρικές σειρές, με τις οποίες συσχετίζονται άμεσα.

Μοριακοί Υποτύποι Καρκίνου του Μαστού	Χαρακτηριστικά υποτύπου καρκίνου του μαστού
Luminal A	Ο πιο κυρίαρχος τύπος. Αντιμετωπίζεται στοχευμένα, με ταμοξιφαίνη. MicroRNAs, όπως το miR-10, miR-29a, miR-181a είναι πιθανοί βιοδείκτες, που μπορεί να βοηθήσουν στη ρύθμισή του. Συσχετιζόμενες κυτταρικές σειρές: ZR-75-1, T-47D, MCF-7, MDA-MB-415
Luminal B	Παρουσιάζει υψηλά επίπεδα Ki-67, με ταχύτερη κυτταρική ανάπτυξη. MicroRNAs, όπως το miR-155, miR-135b, miR-4516 είναι πιθανοί βιοδείκτες, που μπορεί να βοηθήσουν στη θεραπευτική του αντιμετώπιση. Συσχετιζόμενες κυτταρικές σειρές: MDA-MB-330, ZR-75-30
Luminal Her2	Παρουσιάζει υψηλά επίπεδα Ki-67, με ταχύτερη κυτταρική ανάπτυξη. MicroRNAs, όπως το miR-21, miR-200, miR-375 είναι πιθανοί βιοδείκτες, που μπορεί να βοηθήσουν στην έρευνα γύρω από τη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Συσχετιζόμενες κυτταρικές σειρές: MDA-MB-361, BT-474, UACC-B12
Her2-enriched	Χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 (πρώτο-ογκογονίδιο HER-2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)). Αντιμετωπίζεται με στοχευμένη θεραπεία τραστουζουμάμπης (herceptin), που αναστέλλει τον υποδοχέα. MicroRNAs, όπως το miR-142-3p, θεωρείται πως διαθέτει ογκοκατασταλτικό ρόλο, που μπορεί να αποβεί ρυθμιστικός παράγοντας, όσον αφορά στην εξέλιξη και λειτουργικότητα του όγκου. Συσχετιζόμενες κυτταρικές σειρές: AU565, MDA-MB-453, HCC1569, SUM190PT, SK-BR-3
Triple Negative	Χαρακτηρίζεται από την υψηλότερη σύνδεση με την μετάλλαξη του γονιδίου BRCA-1, συνιστώντας τον πιο επιθετικό υποτύπο. Χημειοθεραπεία και πειραματικές

	θεραπείες αποτελούν τις κυριότερες μεθόδους αντιμετώπισης του συγκεκριμένου καρκινικού τύπου.
Basal-like	Εντάσσεται στον υποτύπο Triple-Negative. Πρόκειται για βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη βιοδεικτών, όπως η κυτοκερατίνη και οι ιντεγκρίνες. Συσχετιζόμενες κυτταρικές σειρές: BT-20, HCC70, SUM229PE, CAL 148
Normal-like	Εντάσσεται στον υποτύπο Triple-Negative. Εναλλακτικά, καλείται και ως Claudin-Low. Χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση γονιδίων, που συνδέονται με διηθητικούς όγκους, που είναι αρκετά επιθετικοί. Συσχετιζόμενες κυτταρικές σειρές: BT-549, MDA-MB-157, MDA-MB-231, His 578T

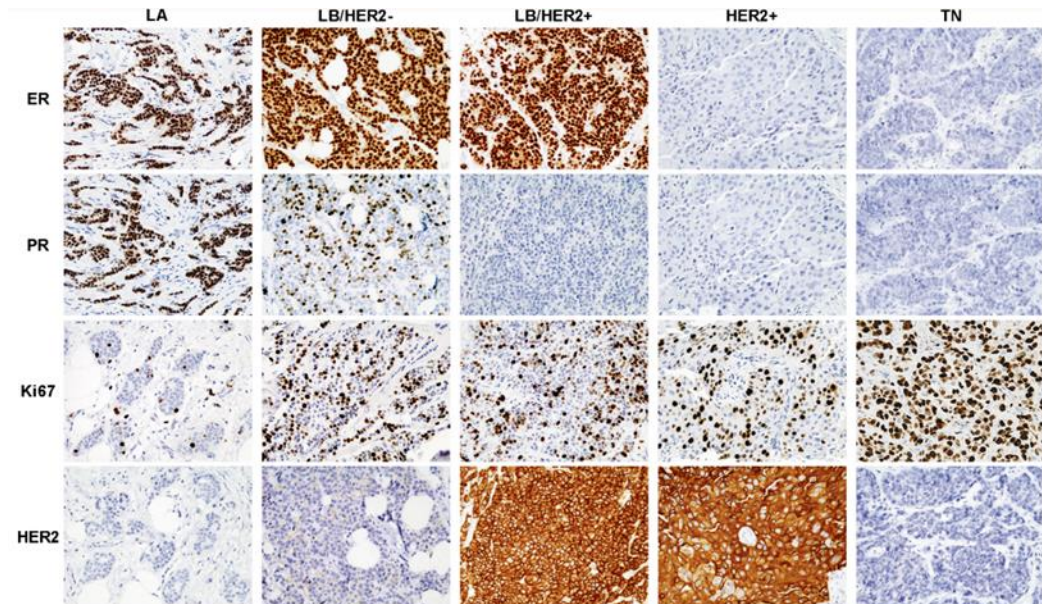
Πίνακας 1: Μοριακοί Υποτύποι Καρκίνου του Μαστού και τα χαρακτηριστικά τους

Η αξιολόγηση καρκινικών κυτταρικών σειρών, με βάση τους βιοδείκτες: ER, PR και HER2 είναι ένα πολύτιμο εργαλείο, που οδηγεί σε αυξημένη κατανόηση της κυτταρικής συμπεριφοράς. Η Ανοσοϊστοχημεία έχει εφαρμοστεί ως διαγνωστική μέθοδος για τον εντοπισμό των πέντε κλασικών υποτύπων καρκίνου του μαστού, με βάση το ανοσοϊστοχημικό τους προφίλ: luminal A-like, luminal B-like (HER2-), luminal B-like (HER2+), HER2+(nonluminal) και τριπλά αρνητικό (Triple Negative) (πορογενές καρκίνωμα). Οι υποτύποι Luminal A και Luminal B είναι θετικοί ως προς τους ορμονικούς υποδοχείς και αρνητικοί ως προς τον υποδοχέα HER2.

Οι ορμονικοί υποδοχείς είναι πρωτεΐνες, που βρίσκονται σε μερικά καρκινικά κύτταρα. Όταν τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη συνδέονται με αυτούς τους υποδοχείς, επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να αναπτυχθούν. Όγκοι θετικοί στους υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης (ER⁺ και PR⁺) διαθέτουν μεγάλο πλήθος ορμονικών υποδοχέων. Όγκοι αρνητικοί στους υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης (ER⁻ και PR⁻) διαθέτουν λίγους ή καθόλου ορμονικούς υποδοχείς. Ο προσδιορισμός της κατάστασης του ορμονικού υποδοχέα του όγκου είναι ζωτικής σημασίας για τη στρατηγική της θεραπείας. Εάν ο όγκος είναι θετικός για υποδοχείς οιστρογόνων (ER⁺) και/ή υποδοχείς προγεστερόνης (PR⁺), θεραπευτικές προσεγγίσεις που αναχαιτίζουν την ορμονική δραστηριότητα, όπως η ταμοξιφαίνη ή οι αναστολείς της αρωματάσης, μπορεί να εμποδίσουν την ανάπτυξη του όγκου. Αντίθετα, όγκοι που δεν διαθέτουν υποδοχείς οιστρογόνων (ER⁻) και υποδοχείς προγεστερόνης (PR⁻) δεν υφίστανται ορμονική καταστολή, ως μέρος της θεραπείας τους.

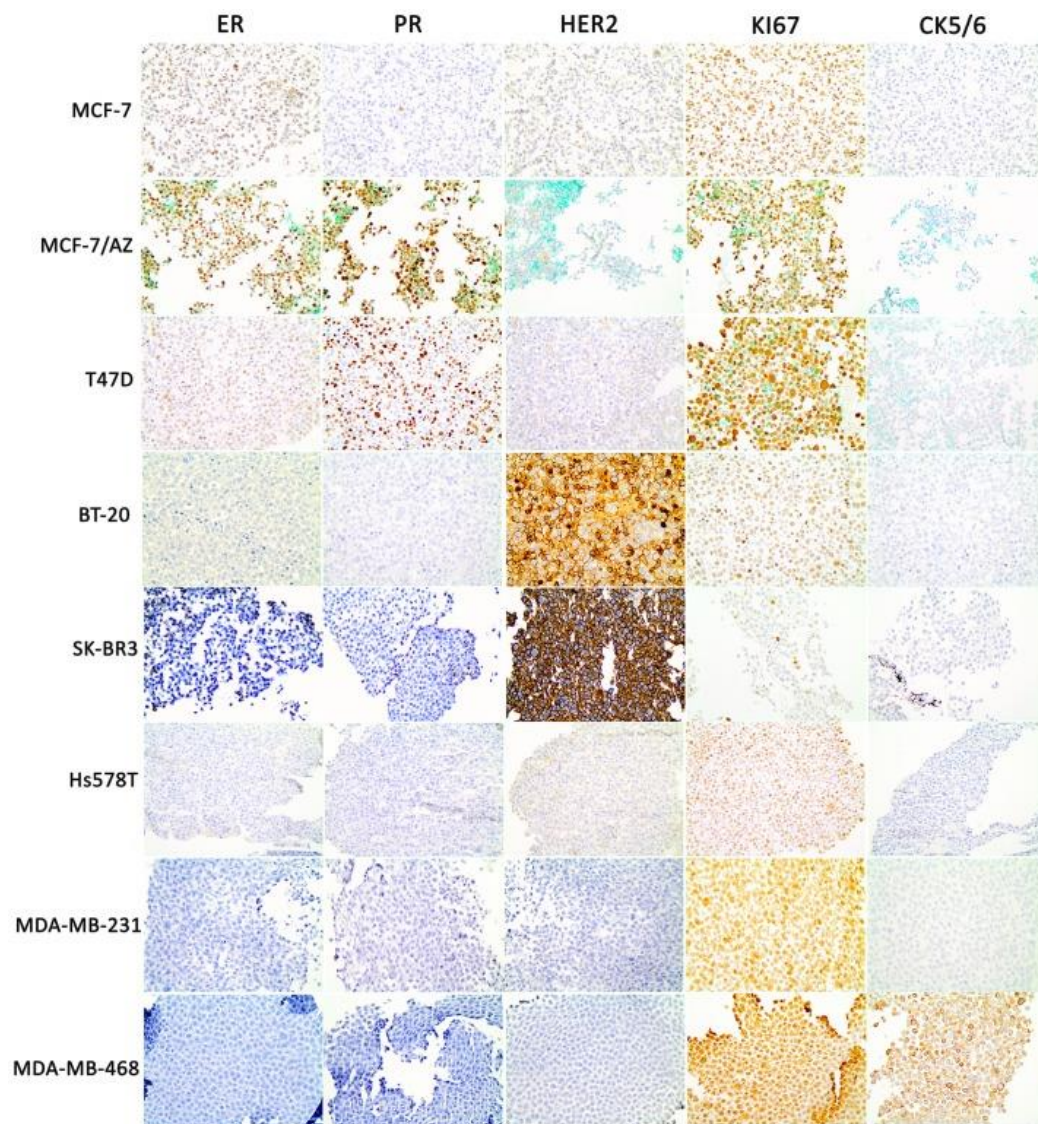
Ο υποδοχέας Erb-B2 (Τυροσινοκινάση 2), επίσης, γνωστός ως HER2/neu, είναι μια πρωτεΐνη που υπάρχει στο εξωτερικό ορισμένων καρκινικών κυττάρων του μαστού. Αυτή η πρωτεΐνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην οδό, που διευκολύνει την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Οι όγκοι που ταξινομούνται ως θετικοί HER2/neu (HER2⁺) περιέχουν πλήθος γονιδίων HER2/neu εντός της κυτταρικής τους σύνθεσης, με αποτέλεσμα μια αφθονία πρωτεϊνών HER2/neu να παράγεται και να

εμφανίζεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα, οι αρνητικοί HER2/neu όγκοι (HER2⁻) διαθέτουν μόνο μικρό αριθμό γονιδίων HER2/neu εντός των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας σε ελάχιστη ή ανύπαρκτη παρουσία της πρωτεΐνης HER2/neu στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Περίπου το 15 έως 20% των καρκίνων του μαστού εμπίπτουν στην κατηγορία των HER2⁻ θετικών. Αυτοί οι συγκεκριμένοι τύποι καρκίνου του μαστού είναι γνωστό ότι είναι πιο επιθετικοί σε σύγκριση με άλλους όγκους [55], [77].



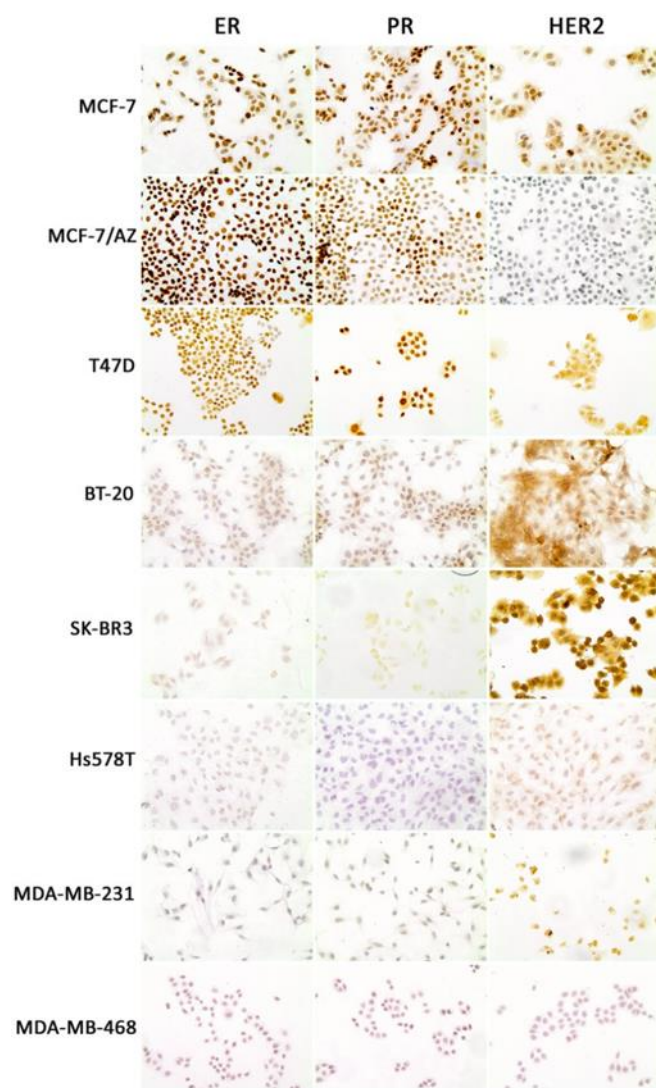
Εικόνα 64: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των διαφορετικών υποτύπων καρκίνου του μαστού, σε επίπεδο Ανοσοϊστοχημείας

(<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6093>)



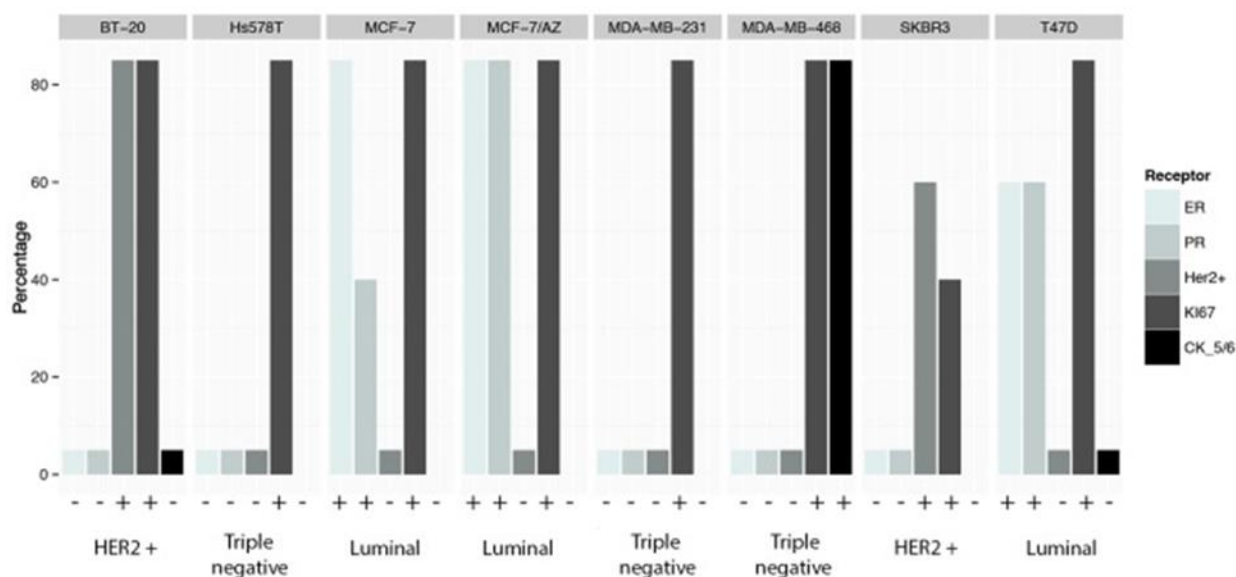
Εικόνα 65: Αντιπροσωπευτική ανοσοκυτταροχημεία για ER, PR, HER2, KI67 και CK5/6 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, MCF-7, MCF-7/AZ, T47D, BT-20, SKBR3, Hs578T, MDA-MB-231 και MDA-MB- 468

(<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6093>)



Εικόνα 66: Αντιπροσωπευτική ανοσοϊστοχημεία για ER, PR και HER2 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού MCF-7, MCF-7/AZ, T47D, BT-20, SKBR3, Hs578T, MDA-MB-231 και MDA-MB-468

(<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6093>)



Εικόνα 67: Βαθμολογίες έντασης χρώσης των δεικτών υποδοχέα έκφρασης ER, PR, HER2, Ki67 και CK5/6, που ελήφθησαν με ανοσοϊστοχημεία και ανοσοκυτταροχημεία, σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού BT-20, Hs578T, MCF-7, MCF-7/AZ, MDA-MB-2, MDA-MB-468, SKBR3 και T47D.

(https://www.researchgate.net/figure/Staining-intensity-scores-of-receptor-markers-ER-PR-HER2-Ki67-and-CK5-6-expression_fig1_316461864)

2. Σχιζοφρένεια

2.1 Σχιζοφρένεια και καρκίνος

Οι διαγεγνωσμένοι με σχιζοφρένεια ασθενείς παρουσιάζουν, κατά προσέγγιση, 50% αυξημένο κίνδυνο θανάτου από καρκίνο, σε σύγκριση με αντίστοιχης ηλικίας και φύλου, άτομα γενικού πληθυσμού. Συγκεκριμένα, ένα ικανοποιητικό πλήθος μελετών έχουν επιβεβαιώσει αυξημένη θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, παρατήρηση που δεν επαληθεύεται σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, όπου παρουσιάζονται αντικρουόμενα αποτελέσματα [58].

Μάλιστα, μεμονωμένες μελέτες ανέδειξαν ότι, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, οι ασθενείς με σχιζοφρένεια διέτρεχαν αυξημένο κίνδυνο να μην διαγνωστούν ή να μην υποβληθούν σε θεραπεία για καρκίνο, πριν από τη ραγδαία εξέλιξη του και πρόκληση θανάτου από αυτόν. Επιπλέον, οι ασθενείς με σχιζοφρένεια χαρακτηρίζονται από μικρότερες πιθανότητες να λάβουν τη βέλτιστη θεραπεία για τον καρκίνο, πχ. του παχέος εντέρου, μετά τη διάγνωση.

Κατά γενική ομολογία, τα άτομα με σχιζοφρένεια είναι πιο πιθανό να πεθάνουν πρόωρα, συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό, τόσο από αυτοκτονία όσο και από κακή σωματική υγεία. Δημοσιευμένες μελέτες που εξετάζουν τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου σε ασθενείς με σχιζοφρένεια αναφέρουν αυξημένη, μειωμένη ή παρόμοια επίπτωση, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Παλαιότερες μελέτες έτειναν να αναφέρουν χαμηλότερα ποσοστά επίπτωσης, που τροφοδότησαν εικασίες σχετικά με τους βιολογικούς και άλλους μηχανισμούς γι' αυτήν την «προστατευτική», έναντι του καρκίνου, επίδραση. Επιπρόσθετα, τα ποσοστά θνησιμότητας σε ασθενείς με σχιζοφρένεια εμφανίζονται υψηλότερα από τα αναμενόμενα.

Επιχειρώντας μια ιστορική αναδρομή στη σύνδεση μεταξύ σχιζοφρένειας και καρκίνου, το 1909, το Συμβούλιο Ελέγχου των Επιτρόπων στο Lunacy, για την Αγγλία και την Ουαλία, εντόπισε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου σε ψυχιατρικούς ασθενείς. Μεταγενέστερες μελέτες, που διαδέχτηκαν την απόφαση του συγκεκριμένου συμβουλίου, διάρκειας τριών δεκαετιών, φάνηκε να επιβεβαιώνουν αυτά τα ευρήματα, αν τα εξαγόμενα αποτελέσματά τους, βασίστηκαν σε αναλογίες θνησιμότητας, που μπορεί να είναι παραπλανητικές, επειδή δεν ελέγχονται σημαντικοί συγχυτικοί παράγοντες. Αυτές οι πρώιμες μελέτες ακολουθήθηκαν από πιο εξελιγμένες μελέτες, που συνέκριναν επιλεγμένες ομάδες ψυχιατρικών ασθενών με τον γενικό πληθυσμό στις αντίστοιχες χώρες τους, οι οποίες, όμως, απέτυχαν να επιβεβαιώσουν τα προηγούμενα ευρήματα για μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου.

Μεταξύ μελετών, ξεχώρισε αυτή του Mortensen, εν έτει 1989, ο οποίος παρακολούθησε μια ομάδα 6168 Δανών ασθενών, με σχιζοφρένεια για σχεδόν 30 χρόνια και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η συνολική επίπτωση του καρκίνου ήταν χαμηλότερη τόσο για τους άνδρες όσο και για τις γυναίκες με σχιζοφρένεια, από τον γενικό πληθυσμό. Μάλιστα, στην ίδια έρευνα, ελέγχθηκε και το κάπνισμα και, ως εκ τούτου, προτάθηκε ότι τα χαμηλότερα ποσοστά καρκίνου σε ασθενείς με σχιζοφρένεια σχετίζονταν με τις απαγορεύσεις του καπνίσματος σε ορισμένα ψυχιατρικά νοσοκομεία, ανά συγκεκριμένες χρονικές περιόδους. Μεγάλης σημασίας εύρημα, επίσης, αποτέλεσε ότι τα ψυχοτρόπα φάρμακα είχαν προστατευτική δράση έναντι του καρκίνου. Σε άλλες μελέτες, αρχές δεκαετίας του 1990, οι Gulbinat et al. επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα στη Δανία, αλλά όχι σε δύο άλλα κέντρα μελέτης, τη Χονολουλού και το Ναγκασάκι, δίχως την ενσωμάτωση στην έρευνά τους, παραγόντων και κριτηρίων ελέγχου, όπως η ηλικία, το κάπνισμα ή άλλοι παράγοντες κινδύνου.

Τα έτη που ακολούθησαν, υπήρξε μεγάλο εύρος δεδομένων, που συσχετίζει τη σχιζοφρένεια με τον καρκίνο. Άλλες μελέτες κατέδειξαν παρόμοια ποσοστά εμφάνισης καρκίνου στο γενικό πληθυσμό και στον πληθυσμό ασθενών με σχιζοφρένεια. Άλλες παρουσίασαν χαμηλότερα ποσοστά καρκίνου σε σχιζοφρενείς, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, γεγονός που τους οδήγησε να προτείνουν ότι οι παράγοντες του τρόπου ζωής ευθύνονται για το αυξημένο ποσοστό καρκίνου σε άτομα με σχιζοφρένεια, αλλά και ότι σημειώνεται προστατευτική επίδραση των γονιδίων αυξημένου κινδύνου εκδήλωσης σχιζοφρένειας σε όσους δεν εμφανίζουν τη νόσο.

Σε επίπεδο θνησιμότητας, βρέθηκε ότι υπάρχει χάσμα θνησιμότητας και συχνότητας εμφάνισης, γεγονός για το οποίο υπάρχουν πολλές πιθανές εξηγήσεις, που κυμαίνονται από εγγενείς παράγοντες της σχιζοφρένειας ή της θεραπείας της, που επιταχύνουν τον θάνατο από νεόπλασμα, έως ψυχοκοινωνικές επιδράσεις, όπως η δυσχέρεια συμμόρφωσης με τη θεραπεία σε ασθενείς με συννοσηρότητα σχιζοφρένειας και καρκίνου, που οφείλεται σε στίγμα ή άλλες κοινωνικές διακρίσεις.

Εξετάζοντας τη σχιζοφρένεια από μια διαφορετική σκοπιά, ως παράγοντα που «θωρακίζει» έναντι του καρκίνου, δεδομένων των αυξημένων παραγόντων κινδύνου καρκίνου για τους ασθενείς με σχιζοφρένεια, όπως το κάπνισμα, η σωματική αδράνεια και η κακή διατροφή, το εύρημα αυτό φαντάζει ανορθόδοξο και προκαλεί έκπληξη. Το ίδιο το γεγονός ότι δεν υπάρχει δραματική αύξηση στα ποσοστά καρκίνου υποδηλώνει ότι η σχιζοφρένεια μπορεί να προσφέρει κάποια προστασία. Οι γενετικοί παράγοντες, που έχει προταθεί, ότι είναι η αιτία πίσω από τον μειωμένο κίνδυνο, ενδεικτικά, είναι το γονίδιο p53 που παράγει, μέσω της απόπτωσης, τα διπλά ευεργετικά αποτελέσματα της διακοπής της νευροανάπτυξης και της μείωσης του κινδύνου καρκίνου.

Εντούτοις, μεταγενέστερη έρευνα που συσχέτισε τη σχιζοφρένεια με επιταχυνόμενη γήρανση, έρχεται σε αντίθεση με την υπόθεση ότι μπορεί να είναι προστατευτική απέναντι στον καρκίνο. Η συσχέτιση αυτή, ωστόσο, αντικρούεται από το γεγονός ότι σύμφωνα με την Μοριακή Βιολογία και Γενετική Καρκίνου, ο καρκίνος δεν είναι μια ενιαία ασθένεια και έχει πολλές διαφορετικές αιτιολογικές οδούς, που συγκλίνουν στην μετάλλαξη του DNA. Τα κύτταρα που έχουν εισέλθει σε φάση φυσιολογικής γήρανσης, δεν είναι επιρρεπή να αναπτύξουν καρκίνο, λόγω του ότι έχουν φτάσει σε μια μη αναστρέψιμη «στάση» στον κυτταρικό κύκλο.

Το γεγονός ότι αυτή η ασθένεια εξακολουθεί να υφίσταται έχει οδηγήσει σε εικασίες ότι τα γονίδια που προδιαθέτουν την εκδήλωση της νόσου μπορεί, επίσης, να προσφέρουν πλεονέκτημα, και ως εκ τούτου να απορρέει η επιμονή ύπαρξης μιας ασθένειας που, προφανώς, προσδίδει αναπαραγωγικό μειονέκτημα. Όπως η σχιζοφρένεια δεν είναι μια ενιαία ασθένεια, ο καρκίνος είναι ένα σύνθετο βιολογικό φαινόμενο, που αποτελείται από περισσότερους από 100 ανατομικούς υποτύπους, πολλοί από τους οποίους διακρίνονται περαιτέρω σε παραλλαγές με διαφορετική ιστολογία, πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία. Μερικοί εξ αυτών μπορεί να είναι τροποποιήσιμοι από παράγοντες, που σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια. Κάποιοι παρατίθενται ακολούθως.

I) Κάπνισμα και κατάχρηση ουσιών

Γενικά, οι ασθενείς με σχιζοφρένεια τείνουν να καπνίζουν με διπλάσιο ρυθμό από τον υπόλοιπο πληθυσμό. Η συσχέτιση μεταξύ του καπνίσματος και του καρκίνου είναι γνωστή, αλλά η χρήση άλλων επιβλαβών ουσιών με πιθανή καρκινογένεση είναι, επίσης, υψηλότερη στον πληθυσμό της σχιζοφρένειας. Για παράδειγμα, το αλκοόλ

σχετίζεται με καρκίνους του οισοφάγου και το κάπνισμα κάνναβης εκθέτει τους χρήστες σε μια ποικιλία καρκινογόνων παραγόντων.

II) Φυσική άσκηση και διατροφή

Η άσκηση και η διατροφή είναι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου για πολλούς καρκίνους. Οι ασθενείς με σχιζοφρένεια ακολουθούν κακή διατροφή και είναι σωματικά ανενεργοί. Ενδεικτικά, χαρακτηρίζονται από κακές διατροφικές συνήθειες, όπως η κατανάλωση σημαντικά λιγότερης ενέργειας, φυτικών ινών και βιταμινών, με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο επιρρεπείς σε εμφάνιση καρκίνου ή να παρουσιάζουν μειωμένα ποσοστά επιβίωσης και ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Στο ίδιο πλαίσιο, και η παχυσαρκία περιγράφεται ως τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης πληθώρας τύπων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων του μεταεμμηνοπαυσιακού καρκίνου του μαστού, των νεφρών και του οισοφάγου. Η παχυσαρκία μπορεί να είναι συνέπεια ή αιτία σωματικής αδράνειας και ανθυγιεινής διατροφής. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί, με τους οποίους, η παχυσαρκία μπορεί να προδιαθέσει σε κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, περιλαμβάνουν μέσω του μεταβολισμού της γλυκόζης και, ειδικά στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού και του ενδομητρίου, μέσω ορμονικών μηχανισμών. Άλλοι μηχανισμοί είναι, επίσης, σχετικοί, όπως η παχυσαρκία που αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του οισοφάγου, προκαλώντας παλινδρόμηση γαστρικού οξέος) και αυξάνοντας τον κίνδυνο χολόλιθων, που με τη σειρά τους αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου της χοληδόχου κύστης. Η παχυσαρκία είναι μόνο ένα χαρακτηριστικό του μεταβολικού συνδρόμου. Ορισμένα άλλα συστατικά, συμπεριλαμβανομένης της υπέρτασης και του διαβήτη, μπορεί, συμπληρωματικά, να προκαλέσουν αυξημένο κίνδυνο καρκίνου.

III) Μαιευτικοί παράγοντες

Το μειωμένο βάρος γέννησης αποτελεί, επίσης, παράγοντα κινδύνου για σχιζοφρένεια, καθώς και για καρδιαγγειακές παθήσεις. Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι το χαμηλό βάρος γέννησης μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για κακοήθεια. Συγκεκριμένα, το πολύ χαμηλό βάρος γέννησης συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο ορισμένων τύπων παιδικού καρκίνου του εγκεφάλου, όπως ορισμένα γλοιώματα. Ωστόσο, εάν ληφθεί υπόψη ο καρκίνος του μαστού, που αποτελεί κεντρικό πυλώνα της, εν λόγω, εργασίας, προκύπτει ένα διαφορετικό συμπέρασμα. Σε μια μετα-ανάλυση 18 μελετών, οι γυναίκες με βάρος γέννησης μικρότερο από 4000 g είχαν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού από εκείνες με μικρότερο βάρος γέννησης από 2500 g ή 3000 g. Αυτά τα ευρήματα συμβαδίζουν με το αποτέλεσμα του προτύπου δόσης-απόκρισης. Ο καρκίνος του μαστού περιγράφεται ως ορμονοευαίσθητος, αλλά σε έναν άλλο ορμονοευαίσθητο καρκίνο, τον καρκίνο του ενδομητρίου, δεν υπήρξε καμία ένδειξη σύνδεσης μεταξύ του βάρους γέννησης και καρκίνου.

Κλείνοντας με τους παραπάνω παράγοντες και όσον αφορά στη συνεισφορά των αντιψυχωσικών στην αντινεοπλασματική θεραπεία, ήδη, από τη δεκαετία του 1950,

έχουν αναπτυχθεί αποτελεσματικές βιολογικές θεραπείες για τη σχιζοφρένεια, οι οποίες μπορεί να έχουν τόσο άμεσες όσο και έμμεσες επιπτώσεις στη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου και τη θνησιμότητα. Πολλά αντιψυχωσικά φαίνεται να έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες *in vitro*. Η πιμοζίδη και η θειοριδαζίνη σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα, εμποδίζοντας τη σύνθεση ή την κίνηση της χοληστερόλης και των λιπιδίων σε αυτά. Η προσθήκη μεβαστατίνης, ενός φαρμάκου που αναστέλλει την παραγωγή χοληστερόλης στα κύτταρα, αύξησε αυτό το αποτέλεσμα. Οι φαινοθειαζίνες έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Ωστόσο, η προέκταση των ελεγχόμενων εργαστηριακών ευρημάτων στον πραγματικό κόσμο είναι δύσκολη, δεδομένων των πολλών πιθανών παραγόντων σύγχυσης.

Εντούτοις, παρόλο που τα αντιψυχωσικά μπορεί να έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες, προκαλούν, επίσης, παρενέργειες που μπορεί να έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα. Η υπερπρολακτιναιμία είναι μια κοινή παρενέργεια για την πρώτη γενιά και ορισμένα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς, όπως η ρισπεριδόνη και η αμισουλπρίδη. Αρχικά, η υπερπρολακτιναιμία ήταν μια απόκρυφη παρενέργεια, αλλά τώρα αναγνωρίζεται ως αιτία αμηνόρροιας, γαλακτόρροιας, σεξουαλικής δυσλειτουργίας, οστεοπόρωσης και καταγμάτων οστών. Ενώ τα αυξημένα επίπεδα προλακτίνης είναι γνωστό ότι προάγουν την καρκινογένεση του μαστού των τρωκτικών και την μετάβαση σε διηθητικό καρκίνωμα, η σχέση μεταξύ του καρκίνου του ανθρώπινου μαστού και της υπερπρολακτιναιμίας, αρχικά αποκλείστηκε. Εν μέρει αυτό οφειλόταν στην υποτιθέμενη προστατευτική δράση των νευροληπτικών, στις διαφορές μεταξύ της ενδοκρινολογίας τρωκτικών και ανθρώπου και στην αποτυχία των ανθρώπινων όγκων να ανταποκριθούν σε φάρμακα, που μειώνουν την προλακτίνη, όπως η βρωμοκρυπτίνη

Ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία που συνδέουν τα αυξημένα επίπεδα προλακτίνης με τον καρκίνο του ανθρώπινου μαστού στο γενικό πληθυσμό. Μεταξύ αυτών, ξεχωρίζει η μελέτη των Peveler et al., που δήλωσε ότι η υπερπρολακτιναιμία θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, κατά την έναρξη ενός αντιψυχωσικού φαρμάκου, σε μια γυναίκα με προσωπικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού [27].

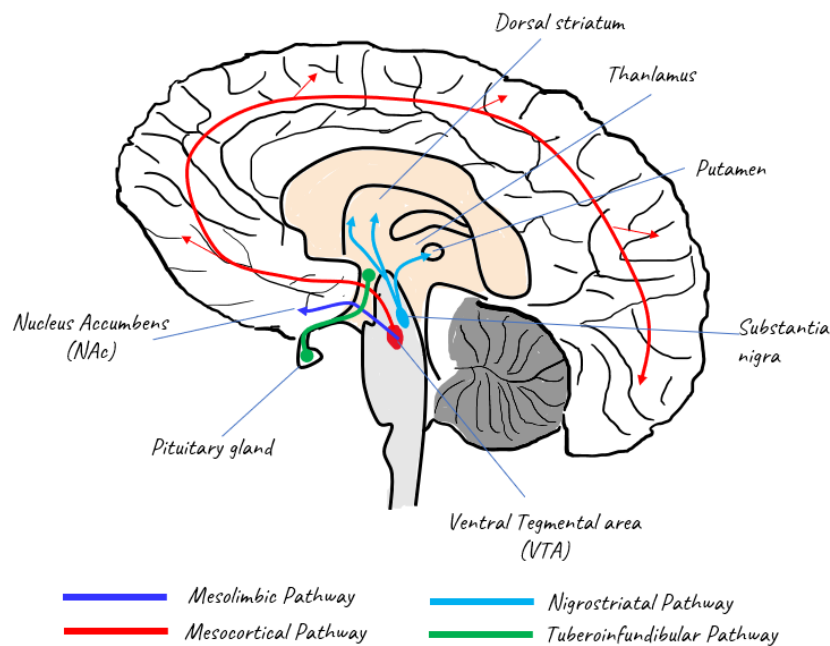
2.2 Παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας

Η σχιζοφρένεια είναι μια σοβαρή και διαδεδομένη πολυπαραγοντική ψυχωσική κατάσταση, που επηρεάζει το 1% του παγκόσμιου πληθυσμού. Κατατάσσεται μεταξύ των 10 κορυφαίων αιτιών αναπηρίας. Σε αυτή, οι ασθενείς παρερμηνεύουν τις πραγματικές συνθήκες και μπορεί να βρεθούν αντιμέτωποι με έναν συνδυασμό συμπτωμάτων, όπως ψευδαισθήσεις, παραληρητικές ιδέες, αποδιοργανωμένη ομιλία, καθώς και εξαιρετικά διαταραγμένη σκέψη και συμπεριφορά, κατά τη διάρκεια της καθημερινότητάς τους. Η επίδραση της σχιζοφρένειας στην καθημερινή ζωή ποικίλλει πολύ, με πολλά άτομα να αντιμετωπίζουν σημαντική αναπηρία και ελλιπή ανάρρωση. Ακόμη και εκείνοι με πιο ευνοϊκά αποτελέσματα καλούνται να διαχειριστούν προκλήσεις, όπως η κοινωνική απομόνωση, το στίγμα και οι μειωμένες ευκαιρίες για τη δημιουργία στενών σχέσεων, την ανεργία. Σημειωτέον είναι, επίσης, πως παράγοντες, όπως η ανθυγιεινή διατροφή, η αύξηση σωματικού βάρους, το κάπνισμα

και η ταυτόχρονη χρήση ουσιών, που επικρατούν, μειώνουν συλλογικά το προσδόκιμο ζωής σχιζοφρενών ασθενών, κατά περίπου 13 έως 15 χρόνια. Επιπλέον, ελλοχεύει ο μείζων κίνδυνος θανάτου από αυτοκτονία, σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, κατά τη διάρκεια της ζωής τους, ο οποίος κυμαίνεται από 5% έως 10%. Τα συμπτώματα εμφανίζονται, γενικά, στα τέλη της εφηβείας ή στις αρχές της ενηλικίωσης και η διαταραχή μπορεί να είναι πιο συχνή στους άνδρες. Τα αίτια περιλαμβάνουν γενετικούς, περιβαλλοντικούς και νευροβιολογικούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων, λαμβάνει χώρα ισχυρή αλληλεπίδραση. Όσον αφορά στις περιβαλλοντικές επιρροές, περιλαμβάνουν προγεννητικούς και μαιευτικούς κινδύνους, ψυχοκοινωνικούς στρεσογόνους παράγοντες, αλλά και χρήση ουσιών. Λεπτομερέστερα, λοιμώξεις της μητέρας κατά την εγκυμοσύνη, όπως αυτή που οφείλεται στο *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) και τον ιό του απλού έρπητα τύπου 2 (HSV-2) αλλά και η αυξημένη ηλικία του πατέρα (άνω των 55 ετών) μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου. Άλλες μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν, επίσης, ότι η πρόωπη στέρηση της μητέρας προκαλεί έντονο στρες, που μπορεί να οδηγήσει σε συμπτώματα παρόμοια με αυτά της σχιζοφρένειας, στην ενηλικίωση, ενώ πολλές μελέτες φανερώνουν ότι άτομα που εκδηλώνουν σχιζοφρένεια στην ενήλικη ζωή τους, έχουν προβεί σε χρήση κάνναβης, στην εφηβεία τους. Η μόλυνση της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ειδικά στο δεύτερο τρίμηνο, ή οι περιγεννητικές ή μεταγεννητικές επιπλοκές έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη σχιζοφρένειας στους απογόνους. Επιπλέον, ο κίνδυνος ανάπτυξης ψύχωσης είναι πενταπλάσιος μετά από λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος στην παιδική ηλικία ή υποξία κατά τη γέννηση. Πάνω από το 50% των γονιδίων που συνδέονται με τη σχιζοφρένεια ρυθμίζονται από την υποξία. Κλείνοντας, τα άτομα που πάσχουν από σχιζοφρένεια χρήζουν δια βίου θεραπείας.

Πολλαπλές αλλαγές μοριακών και νευρικών κυκλωμάτων συνδέονται με την παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας, αλλά είναι ασαφές εάν αυτές οι αλλαγές είναι άμεσες αιτίες ή προσαρμοστικές αποκρίσεις σε πλήθος δυσλειτουργιών, που συμβαίνουν. Κανένα παρόν μοντέλο της παθοφυσιολογίας της σχιζοφρένειας δεν μπορεί να εξηγήσει πλήρως όλες τις, παρατηρούμενες σε αυτή, αλλαγές.

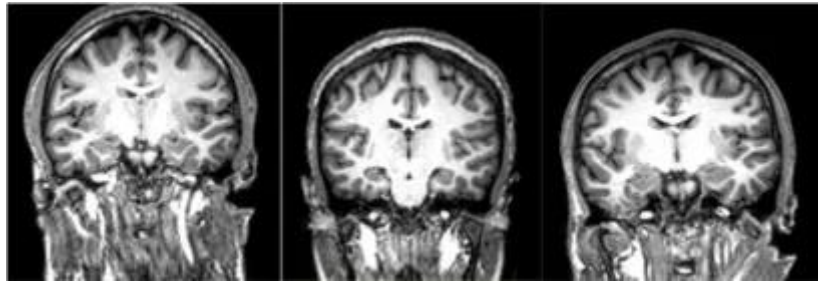
Οι ανωμαλίες των νευροδιαβιβαστών είναι κεντρικές στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας, με τη ντοπαμίνη, τη σεροτονίνη, το γλουταμικό οξύ και το γάμμα-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) να παίζουν κεντρικό ρόλο. Η σχέση μεταξύ ντοπαμίνης και σχιζοφρένειας προέκυψε από την τυχαία ανακάλυψη της αποτελεσματικότητας των αναστολέων των υποδοχέων ντοπαμίνης D2 στην ανακούφιση των ψυχωτικών συμπτωμάτων. Τέσσερις βασικές οδοί ντοπαμίνης έχουν εντοπιστεί στον εγκέφαλο: μεσομεταιχμιακή, μεσοφλοιώδης, φυματοχοανική και μελαινοραβδωτή. Καθεμιά από αυτές, διαδραματίζει ξεχωριστό ρόλο στην εκδήλωση της, εν λόγω, ασθένειας.



Εικόνα 68: Βασικές οδοί ντοπαμίνης στον εγκέφαλο: Μπλε γραμμή: Μεσομεταιχμιακή, Κόκκινη γραμμή: Μεσοφλοιώδης Γαλάζια γραμμή: Μελαινοραβδωτή, Πράσινη γραμμή: Φυματοχοανική (https://sharetechnote.com/html/Neuroscience/Neuroscience_DopaminePathway.html)

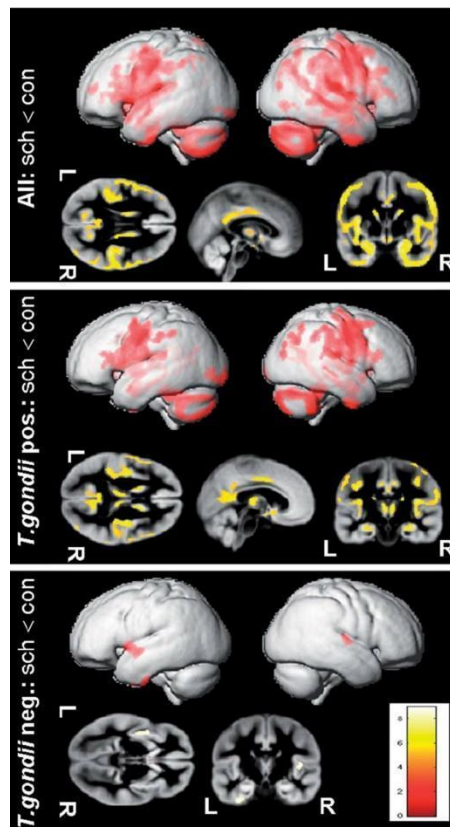
Η θεωρία της νευροαναπτυξιακής βάσης της σχιζοφρένειας υποστηρίζει ότι διαταραχές, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στη νευρική συνδεσιμότητα και τη βιοχημική λειτουργία του εγκεφάλου, οδηγώντας σε δυσλειτουργίες στη γνωστική και συναισθηματική συμπεριφορά αργότερα στη ζωή. Οι αλλαγές στον εγκέφαλο, που έχουν παρατηρηθεί, σε μελέτες μεταθανάτιων εξετάσεων εγκεφάλων σχιζοφρενών, οι οποίες μπορεί να προέρχονται από νευροαναπτυξιακές διαταραχές, εντοπίζονται, κυρίως, στον ιππόκαμπο, τους προμετωπιαίους και ανώτερους κροταφικούς λοβούς. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και από μελέτες απεικόνισης. Ειδικότερα, μεταβολές, όπως η εγκεφαλική ασυμμετρία, η διεύρυνση των κοιλιών, η μείωση του όγκου του εγκεφάλου, αλλά και αλλαγές στο πάχος του φλοιού, τη μορφολογία και το σχήμα του ιππόκαμπου, που παρατηρούνται σε ασθενείς με πρώτο επεισόδιο σχιζοφρένειας, χωρίς φαρμακευτική αγωγή, υποδεικνύουν πρώιμες νευροαναπτυξιακές διαταραχές.

Τα σημάδια διαταραγμένης νευρωνικής συνδεσιμότητας είναι εμφανή στους ασθενείς με σχιζοφρένεια στον ενδορρινικό φλοιό (Lateral Entorhinal Cortex) και το νεοφλοιό (Neocortex). Η απώλεια νευρωνικών στοιχείων στο νευροπίλημα συνδέεται με την ατροφία του εγκεφάλου [33].



Εικόνα 69: Μαγνητική Τομογραφία σε σχιζοφρενή

(<https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2022.1042814/full>)



Εικόνα 70: Η περιφερειακή μείωση της φαιάς ουσίας στη σχιζοφρένεια και η σύνδεση με το *T. gondii*

(https://www.researchgate.net/figure/The-regional-gray-matter-volume-reduction-in-schizophrenia-for-the-whole-sample-upper_fig1_51153242)

Οι παραπάνω τύποι εικόνων υψηλής ανάλυσης επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό της φαιάς ουσίας και την απεικόνιση των δομών που περιέχουν εγκεφαλονωτιαίο υγρό, γεγονός που έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι ασθενείς με σχιζοφρένεια έχουν συνολικά μειωμένους όγκους φαιάς ουσίας και διευρυσμένους χώρους εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

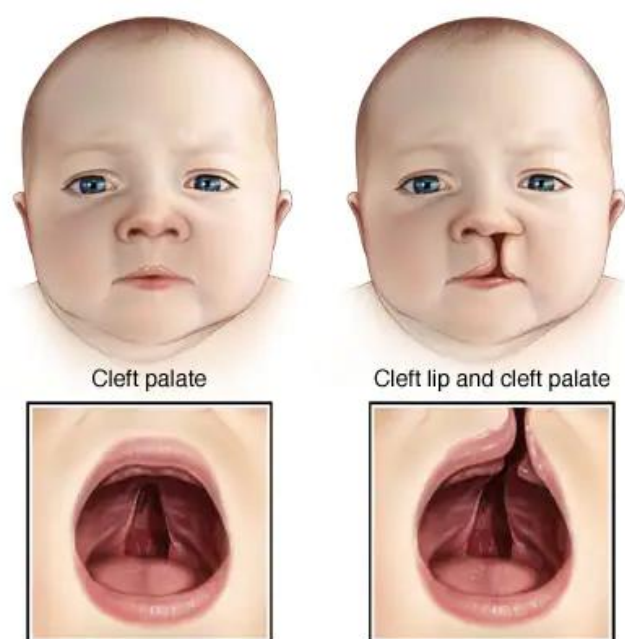
Η πιο ευρέως αποδεκτή νευροχημική θεωρία για τη σχιζοφρένεια είναι η θεωρία της ντοπαμίνης, η οποία προτείνει ότι τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας μπορεί να προκύπτουν από υπερβολική ντοπαμινεργική δραστηριότητα, ιδιαίτερα στις μεσολιμβικές και ραβδωτές περιοχές του εγκεφάλου, οδηγώντας σε θετικά

συμπτώματα, ενώ η ελλιπή της δραστηριότητα, στις προμετωπιαίες περιοχές, ευθύνεται για τα αρνητικά συμπτώματα.

Όλα τα κοινά αντιψυχωτικά φάρμακα είναι ανταγωνιστές ή μερικοί αγωνιστές του υποδοχέα ντοπαμίνης D2, ο οποίος είναι το κύριο σημείο δράσης τους. Αυτός ο κεντρικός ρόλος των υποδοχέων D2 στην αποτελεσματική ψυχοφαρμακολογική θεραπεία παρέχει, επίσης, ισχυρά στοιχεία ότι οι υποδοχείς D2 επηρεάζουν την ευαισθησία στη σχιζοφρένεια. Στοιχεία από τη νευροαπεικόνιση δείχνουν ότι οι σχιζοφρενείς ασθενείς έχουν αυξημένη πυκνότητα υποδοχέων D2 στον εγκέφαλο.

Εμβαθύνοντας στην παθοφυσιολογία της νόσου, σε αντίθεση με άλλες διαταραχές, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson και η επιληψία, η σχιζοφρένεια είναι μια πολύπλοκη διαταραχή, με πολλούς και διάφορους παράγοντες να συμβάλλουν στην εμφάνισή της. Παρόλα αυτά, επιδημιολογικές μελέτες σε διδύμους και οικογένειες δείχνουν ότι είναι σε μεγάλο βαθμό κληρονομική διαταραχή, αν και δεν ακολουθεί το κλασικό Μενδελικό πρότυπο κληρονομικότητας.

Ως απόρροια του πολυσύνθετου υποβάθρου της σχιζοφρένειας, παρακάτω, παρουσιάζεται ένα ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών μηχανισμών, πίσω από την εκδήλωση της νόσου. Ενδεικτικά, παρατίθενται σύνθετα μονοπάτια σηματοδότησης, αλλά και γενετικοί μηχανισμοί, όπως το γονίδιο DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1, DISC1), που προδιαθέτει την εμφάνιση ψυχικών διαταραχών, εν γένει, αλλά και γενετικές ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως η διαγραφή μιας περιοχής στο χρωμόσωμα 22 (22q11.2 Deletion Syndrome), που μπορεί να προκαλέσει το σύνδρομο DiGeorge. Πολλοί από αυτούς, που παρουσιάζουν αυτή τη χρωμοσωμική ανωμαλία, θα εμφανίσουν, επίσης, σχιζοφρένεια, σε κάποια φάση της ζωής τους.



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

(<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/digeorge-syndrome/symptoms-causes/syc-20353543>)

Παραμένοντας στο πεδίο της Γενετικής, υπάρχει μια σταθερή συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών, όπως ο πολυμορφισμός Taq1A του γονιδίου του υποδοχέα D2 (DRD2), ο πολυμορφισμός T102C του γονιδίου του υποδοχέα σερατονίνης 5-HT2A (5-HT2A receptor), ο πολυμορφισμός -141 C Ins/del του γονιδίου του DRD2, ο πολυμορφισμός του γονιδίου C957T, συνώνυμη μετάλλαξη που εντοπίζεται στο 957ο ζεύγος βάσεων του γονιδίου DRD2, καθώς και ο πολυμορφισμός Ser311Cys του DRD2, με τη σχιζοφρένεια. Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί αποτελούν προδιαθεσιακούς παράγοντες για την εκδήλωση της ψυχικής αυτής ασθένειας, καθώς και επιδρούν, σύμφωνα με κλινικές μελέτες, στην απόκριση στη θεραπεία, με χρήση αντιψυχωσικών φαρμάκων. Χαρακτηριστικά, η απόκριση στην κλοζαπίνη έχει συνδεθεί με τον πολυμορφισμό Taq1A στο γονίδιο του υποδοχέα D2 ντοπαμίνης, με τους ασθενείς, μάλιστα, με το δευτερεύον αλληλόμορφο, το αλληλόμορφο A1, να εμφανίζουν πιο ευνοϊκή θεραπευτική απόκριση σε άλλες αντιψυχωσικές αγωγές, όπως η αλοπεριδόλη και η νεμοναπρίδη.

Πέραν, όμως, της μεγάλης σημασίας των υποδοχέων ντοπαμίνης D2 και των πολυμορφισμών των γονιδίων τους, και οι υποδοχείς ντοπαμίνης D3 σχετίζονται με τα συμπτώματα της νόσου και τις συναισθηματικές λειτουργίες του εγκεφάλου. Ο ρόλος των υποδοχέων D3 στη σχιζοφρένεια έχει εμπλακεί στην παθοφυσιολογία και αποτελεσματική θεραπεία της. Επίσης, ο γονότυπος Ser9Gly του υποδοχέα D3 έχει συνδεθεί ισχυρά με τη σχιζοφρένεια, τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της και την ανταπόκριση σε θεραπευτικές προσεγγίσεις. Ωστόσο, βάσει μετα-αναλύσεων, το γονίδιο του υποδοχέα D3 μπορεί να έχει πολύ μικρή επίδραση στον κίνδυνο ανάπτυξης σχιζοφρένειας. Η ρυθμιστική υπομονάδα 1B της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PPP1R1B), γνωστή ως νευρωνική φωσφοπρωτεΐνη ρυθμιζόμενη από ντοπαμίνη και cAMP (DARPP-32), είναι μια πρωτεΐνη που στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο PPP1R1B. Μια μεταθανάτια μελέτη ανέφερε μειωμένη έκφραση του DARPP-32 στον ραχιαίο προμετωπιαίο φλοιό των σχιζοφρενών ασθενών. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες δεν εντόπισαν συσχέτιση της σχιζοφρένειας με παραλλαγές του γονιδίου, που ρυθμίζει την έκφραση της πρωτεΐνης DARPP-32. Τέλος, ο εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF), που προάγει την ανάπτυξη

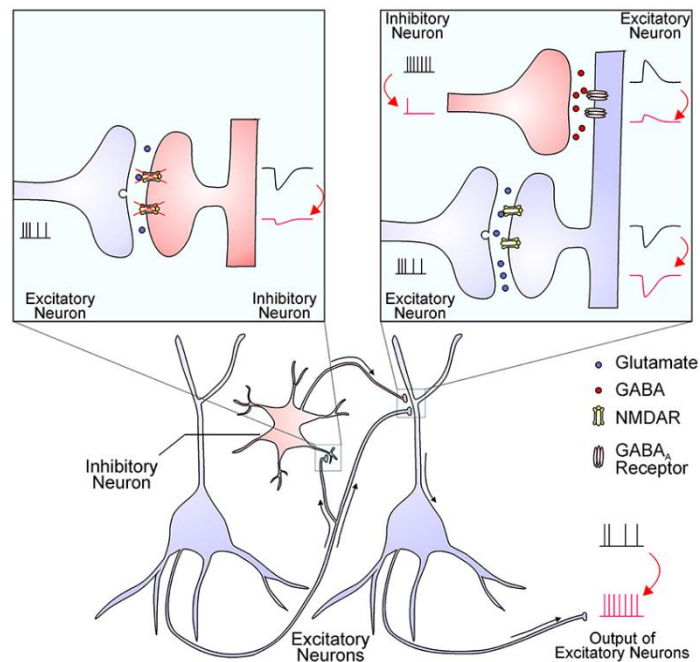
και επιβίωση των νευρώνων, έχει συνδεθεί με την νευροπαθολογία της σχιζοφρένειας. Ο BDNF παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη των μεσολιμβικών ντοπαμινεργικών συστημάτων και ρυθμίζει την έκφραση των υποδοχέων D3. Έτσι, είναι εύλογη η σύνδεση μεταξύ των νευροτροφικών ιδιοτήτων του BDNF και της ντοπαμινεργικής οδού στη σχιζοφρένεια. Μια μετα-ανάλυση δείχνει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού C270T του γονιδίου BDNF και της σχιζοφρένειας, αλλά δεν ισχύει το ίδιο για τον πολυμορφισμό G196A. Επίσης, ο πολυμορφισμός Val66Met του BDNF δεν φαίνεται να συνδέεται με τη σχιζοφρένεια.

Αναφορικά με τις υποθέσεις γύρω από βιοχημικά κυτταροσηματοδοτικά μονοπάτια στη σχιζοφρένεια, παρακάτω, παρουσιάζονται οι κυριότερες:

I) Η υπόθεση του γλουταμινικού οξέος

Κατά την εξέταση της ανάπτυξης της σχιζοφρένειας, είναι σημαντικό να αναγνωρίσουμε τη συμμετοχή νευροδιαβιβαστών πέρα από την ντοπαμίνη. Το γλουταμινικό οξύ, ένας εξέχων διεγερτικός νευροδιαβιβαστής, παίζει σημαντικό ρόλο καθώς οι νευρώνες του είναι ευρέως κατανομημένοι σε όλο τον εγκέφαλο. Η έρευνα έχει αποκαλύψει ότι τα άτομα με σχιζοφρένεια εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα γλουταμινικού οξέος στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό τους, υποδηλώνοντας δυσλειτουργία στο γλουταμινεργικό σύστημα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι υποδοχείς NMDA, καθώς οι ανταγωνιστές αυτών των υποδοχέων έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν συμπεριφορές παρόμοιες με τη σχιζοφρένεια σε πειράματα με ζώα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα στην περιοχή του ιππόκαμπου.

Ο υποδοχέας NMDA, γνωστός για τη δεσμευτική του συγγένεια με μια σειρά ουσιών, ιδίως τη φαινκυκλιδίνη (PCP), παίζει καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση θετικών και αρνητικών συμπτωμάτων όταν παρεμποδίζεται η λειτουργία του. Ως αποτέλεσμα, ο ανταγωνισμός NMDA χρησιμεύει στη φαρμακολογική διαχείριση της σχιζοφρένειας. Εκτεταμένες έρευνες που χρησιμοποιούν νευροαπεικόνιση και μεταθανάτιες αναλύσεις έχουν αποκαλύψει δυσλειτουργία των υποδοχέων και αυξημένες συνάψεις γλουταμινικού, ως σημαντικά ευρήματα σε αυτόν τον τομέα [52].

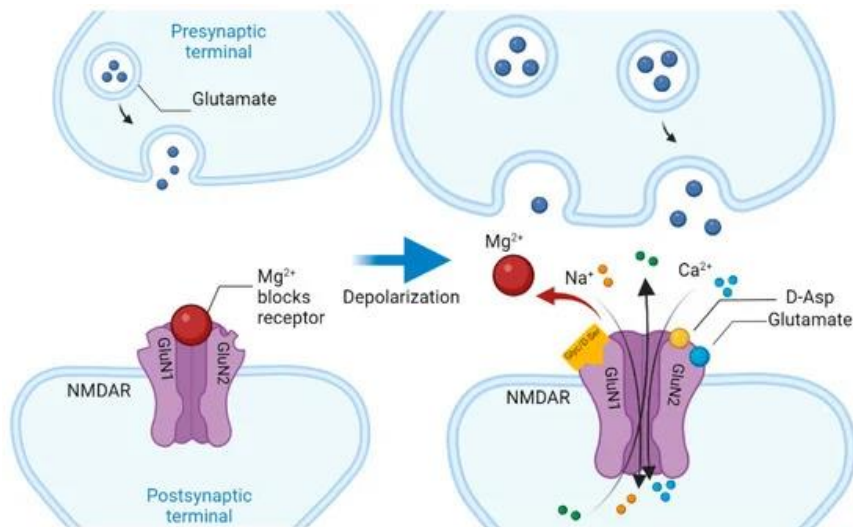


Εικόνα 72: Η υπόθεση του γλουταμικού

(https://www.frontiersin.org/files/Articles/413537/fpsy-09-00544-HTML/image_m/fpsy-09-00544-g001.jpg)

II) Η υπόθεση της σεροτονίνης

Άλλος ένας νευροδιαβιβαστής που προκάλεσε ενδιαφέρον είναι η σεροτονίνη, η οποία σχετίζεται με τη διάθεση και τη συμπεριφορά. Ουσίες όπως το LSD έχουν παρόμοια δομή με τη 5-υδροξυτρυπταμίνη (5HT) και προκαλούν ψευδαισθήσεις. Θεωρείται πιθανό ότι κάποια αλλαγή στις λειτουργίες της σεροτονίνης συνδέεται με αυτές τις εμπειρίες. Τα πιο σύγχρονα αντιψυχωτικά φάρμακα, εκτός από το ότι αποκλείουν τους υποδοχείς D2, μπλοκάρουν και τον σεροτονινεργικό υποδοχέα 5HT₂. Συνολικά, έχει παρατηρηθεί μειωμένη δραστηριότητα του σεροτονινεργικού συστήματος στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα σε άτομα με σχιζοφρένεια.



III) Η υπόθεση της ντοπαμίνης

Σε βιοχημικό επίπεδο, έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεωρίες για την αιτία της σχιζοφρένειας, οι οποίες περιλαμβάνουν νευροδιαβιβαστές όπως η ντοπαμίνη, η σεροτονίνη και το γλουταμινικό οξύ. Η πιο διαδεδομένη θεωρία είναι αυτή της ντοπαμίνης. Σύμφωνα με αυτή, η αυξημένη δραστηριότητα της ντοπαμίνης παίζει σημαντικό ρόλο, ενώ τα αντιψυχωσικά φάρμακα λειτουργούν αποκλείοντας τους υποδοχείς D2 της ντοπαμίνης, μειώνοντας έτσι την παραγωγή της.

Το πρώτο αντιψυχωτικό φάρμακο, η χλωροπρομαζίνη, ήταν αποτελεσματικό ως αναστολέας υποδοχέων ντοπαμίνης, δεσμεύοντας τους υποδοχείς D1 και D2 και εμποδίζοντας την ενεργοποίησή τους. Αυτός ο αποκλεισμός αύξησε την απελευθέρωση ντοπαμίνης από τον προσυναπτικό νευρώνα, η οποία στη συνέχεια μεταβολιζόταν. Η θεωρία ενισχύθηκε από το γεγονός ότι η χρήση αμφεταμινών προκαλούσε ψυχωτικά συμπτώματα σε υγιή άτομα και επιδείνωνε τα συμπτώματα σε σχιζοφρενείς, μέσω της απελευθέρωσης ντοπαμίνης.

Οι μελέτες που ακολούθησαν διαπίστωσαν ότι η ποσότητα της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο των σχιζοφρενών δεν ήταν αυξημένη, αλλά ο αριθμός των υποδοχέων της ή η υπερευαισθησία τους ήταν μεγαλύτερη. Αυτό σημαίνει ότι οι περισσότεροι υποδοχείς στον μετασυναπτικό νευρώνα αυξάνουν την πιθανότητα διέγερσης από τη ντοπαμίνη. Η κύρια περιοχή δράσης της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας εντοπίστηκε στη μεσομεταιχμιακή οδό, στόχο των αντιψυχωσικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση των θετικών συμπτωμάτων. Επιπλέον, υπάρχει η μεσοφλοιώδης οδός, η οποία φτάνει στον προμετωπιαίο φλοιό, περιοχή, στην οποία, σύμφωνα με έρευνες, η ντοπαμίνη επηρεάζει τη γνωστική λειτουργία.

Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες στον προμετωπιαίο φλοιό παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα, πιθανόν συνδεδεμένη με τα αρνητικά συμπτώματα. Αυτή η θεωρία επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα αντιψυχωσικά φάρμακα είναι αποτελεσματικά μόνο στα θετικά και όχι στα αρνητικά συμπτώματα. Η θεωρία της ντοπαμίνης αναθεωρήθηκε με βάση αυτά τα ευρήματα, αλλά δέχθηκε κριτική και αμφισβητήθηκε ως προς την εγκυρότητά της. Αφενός, τα αρνητικά συμπτώματα δεν μπορούσαν να εξηγηθούν από τη χρήση αμφεταμινών και, αφετέρου, η αποτελεσματικότητα των αντιψυχωσικών στα θετικά συμπτώματα δεν ήταν ομοιόμορφη σε όλους τους ασθενείς ούτε άμεση. Επίσης, η αιτιολογία της σχιζοφρένειας δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στη ντοπαμίνη.

Η κατανόηση του ρόλου της ντοπαμίνης στη σχιζοφρένεια εκτείνεται πέρα από την παραδοσιακή υπόθεση της ντοπαμίνης. Υπάρχει μια καθυστέρηση 2 έως 4 εβδομάδων μεταξύ του μέγιστου αποκλεισμού των υποδοχέων D2 από τα αντιψυχωσικά φάρμακα

και της κλινικής ανταπόκρισης. Αυτό υποδηλώνει ότι τα αντιψυχωτικά αποτελέσματα αυτών των φαρμάκων μπορεί να εξαρτώνται από δευτερογενείς νευροχημικούς μηχανισμούς, που ενεργοποιούνται από τον παρατεταμένο αποκλεισμό των υποδοχέων D2, και όχι αποκλειστικά από τη μειωμένη μετάδοση ντοπαμίνης.

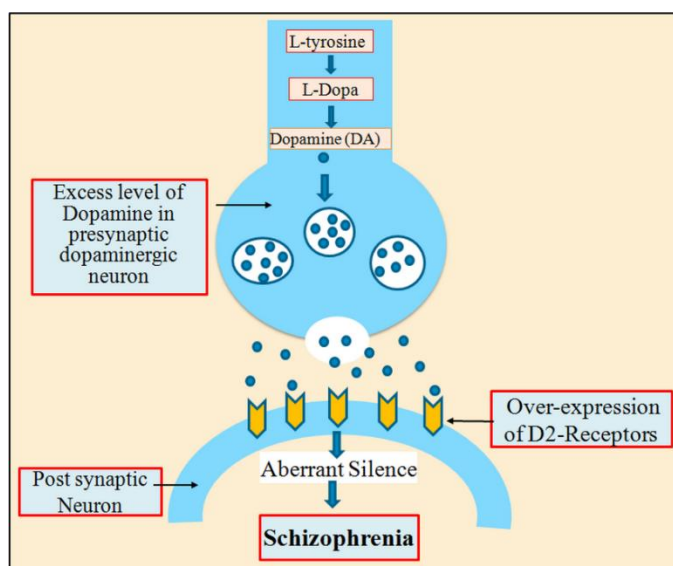
Κλείνοντας με τα βιοχημικά μονοπάτια, μεγάλο ενδιαφέρον προξενεί και η σύνδεση της οδού της PI3K με τη σχιζοφρένεια.

Η PI3K εμπλέκεται σε κυτταρικές διαδικασίες που είναι κεντρικές για την ανάπτυξη της σχιζοφρένειας, όπως η ανάπτυξη των κυττάρων, η διαφοροποίησή τους, η μετανάστευσή τους, η ανάπτυξη των νευραξόνων και η επιβίωση των κυττάρων. Οι στόχοι κατάντη της PI3K περιλαμβάνουν το Ομόλογο του Ιικού Ογκογονιδίου του Θυμώματος των Τρωκτικών (v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homologue) (Akt), την κινάση της συνθάσης γλυκογόνου-3 (Glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 beta), την β-κατενίνη και την πρωτεΐνη δέσμευσης στοιχείων κυκλικής απόκρισης AMP (Cyclic AMP Response Element Binding Protein, CREB), οι οποίοι εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ασθένειας, με βάση τις μεταβολές στις πρωτεΐνες, τα mRNA και τη δραστηριότητα των ενζύμων. Η αυξημένη απόπτωση, λόγω ανωμαλίων στη σηματοδότηση Akt μπορεί να συνεισφέρει στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας. Ωστόσο, παρόλο που τα στοιχεία για το Akt ως γονίδιο ευαισθησίας για τη σχιζοφρένεια είναι ενθαρρυντικά, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Ολοκληρώνοντας με την παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας, θίγεται η ανοσολογική υπόθεση της σχιζοφρένειας. Επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν μια σύνδεση μεταξύ σχιζοφρένειας και γρίπης, και επιπλέον έχουν βρεθεί σημάδια φλεγμονής σε εγκεφάλους σχιζοφρενών που συνδέουν την ασθένεια με μια «ήπια τοπική χρόνια εγκεφαλίτιδα». Η μόλυνση των μητέρων, που προαναφέρθηκε και ως προδιαθεσιακός παράγοντας, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, σχετίζεται με την ανάπτυξη σχιζοφρένειας στα παιδιά τους, με μια πρόσφατη μετα-ανάλυση, μάλιστα, να επιβεβαιώνει αυτό το εύρημα, καθώς σε δεκάδες μελέτες ασθενών, σε όλες τις κλινικές φάσεις, ανιχνεύτηκε αυξημένη επικράτηση αντισωμάτων κατά του *Toxoplasma gondii*, σε άτομα με σχιζοφρένεια.

Σε μια γενετική μελέτη συσχέτισης αρκετών υποψηφίων γονιδίων κυτοκίνης, όπως IL-1B, ο ανταγωνιστής υποδοχέα IL-1 (IL-1RN) και IL-10, καθώς και μια επιπλέον μετα-ανάλυση που συνδύασε προηγούμενες μελέτες συσχέτισης, προτάθηκε ότι το IL-1B παίζει ρόλο στην προδιάθεση για σχιζοφρένεια. Ο πολυμορφισμός IL-1RN έχει συνδεθεί με βελτίωση των αρνητικών συμπτωμάτων και κλινική βελτίωση, κατά τη διάρκεια θεραπείας με αντιψυχωτικά φάρμακα σε ασθενείς με πρώιμα, μη-συναισθηματικής φύσης, ψυχωσικά επεισόδια. Ακόμα, οι πολυμορφισμοί έχουν φανερώσει συσχέτιση με σημαντική διεύρυνση των κοιλιών σε ασθενείς με σχιζοφρένεια. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί των IL-1B, IL-1RN, IL-2 και IL-4 έχει βρεθεί ότι σχετίζονται σημαντικά με τη σχιζοφρένεια.

Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ της ντοπαμίνης, του γλουταμικού και του GABA είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση της λειτουργίας διεγερτικών και ανασταλτικών ενδονευρώνων, μέσα στα κυκλώματα του φλοιού. Μελέτες μετά το θάνατο ασθενών δείχνουν αλλοιώσεις στη μικροδομή και τη λειτουργία αυτών των μικροκυκλωμάτων στη σχιζοφρένεια. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν τους ερευνητές στη διερεύνηση της δυνατότητας στόχευσης οδών σηματοδότησης, όπως αυτή του γλουταμικού, εκτός από την ντοπαμίνη, για διαμόρφωση πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων στη σχιζοφρένεια [89].



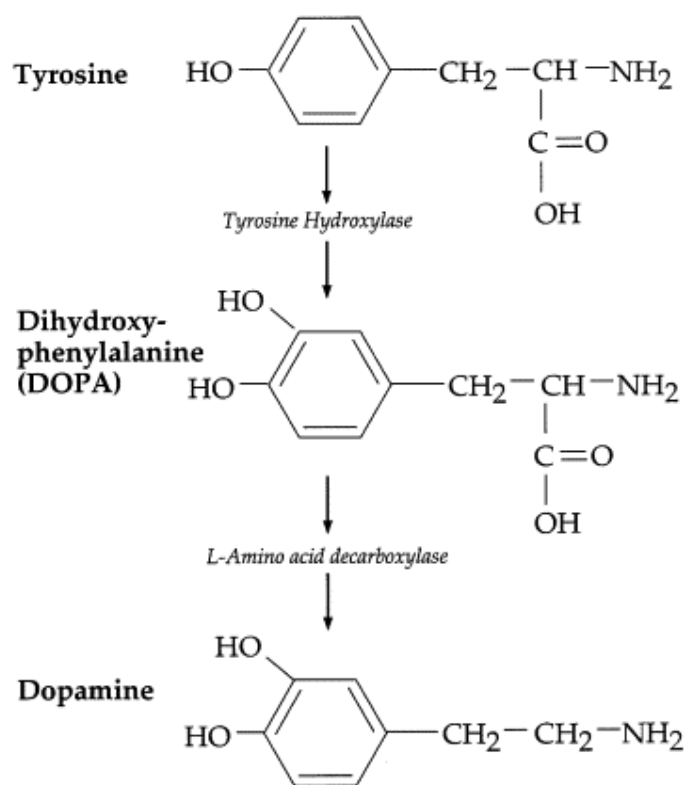
Εικόνα 74: Η υπόθεση της ντοπαμίνης

(https://www.researchgate.net/figure/Pathophysiology-of-schizophrenia-dopamine-pathway_fig3_376552782)

2.3 Ντοπαμινεργικοί Υποδοχείς

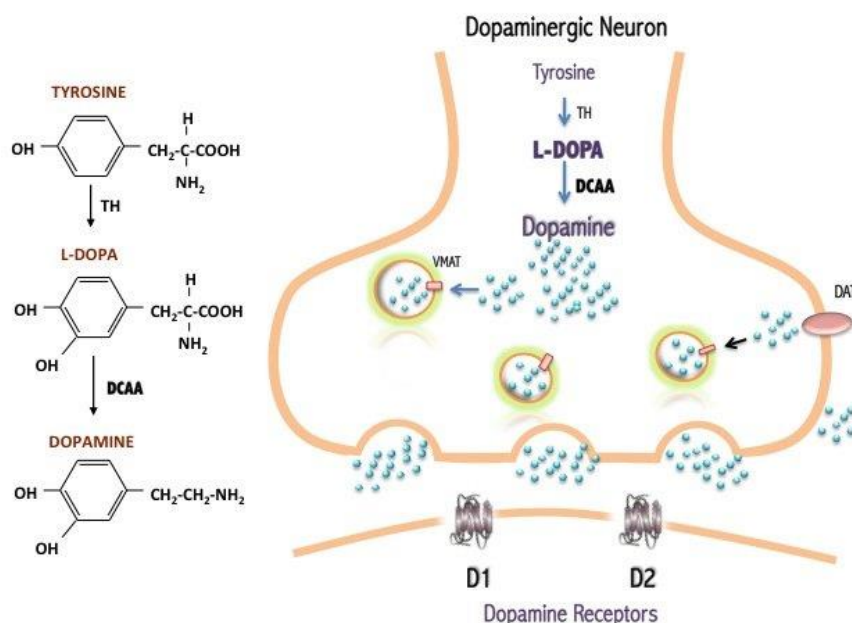
Η ντοπαμίνη, ένας νευροδιαβιβαστής και κατεχολαμίνη, βρίσκεται, κυρίως, στα βασικά γάγγλια του εγκεφάλου. Παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων λειτουργιών που είναι απαραίτητες για την επιβίωση, συμπεριλαμβανομένων της ακούσιας κίνησης, της μνήμης, της μάθησης, της πείνας και της εμπειρίας της ανταμοιβής. Εκτός του κεντρικού νευρικού συστήματος, η ντοπαμίνη συμβάλλει στη σύνθεση άλλων νευροδιαβιβαστών, όπως η νορεπινεφρίνη και η επινεφρίνη στα επινεφρίδια. Επιπλέον, βοηθά στη ρύθμιση του κυκλοφορικού και του συστήματος και στην επαναρρόφηση του νατρίου στο νεφρά. Η ντοπαμίνη ασκεί τα αποτελέσματά της, δεσμεύοντας υποδοχείς, συζευγμένους με πρωτεΐνη G (G Protein-Coupled Receptors, GPCRs), που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη.

Η παραγωγή της ντοπαμίνης γίνεται στα κύτταρα που εκκρίνουν ντοπαμίνη, τους νευρώνες. Πρωταρχικό βήμα στη σύνθεσή της είναι η μετατροπή της τυροσίνης σε L-3,4-Δυδροξυφαινυλαλανίνη ή λεβοντόπα (L-DOPA). Αυτή η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο τυροσινική υδροξυλάση (Tyrosine Hydroxylase, TH). Το L-DOPA, εν συνεχεία, μετατρέπεται σε ντοπαμίνη, μέσω του ενζύμου αρωματική αποκαρβοξυλάση L- αμινοξέος. Η διαδικασία της σύνθεσης απεικονίζεται ακολούθως.



Εικόνα 75: Βιοσύνθεση ντοπαμίνης

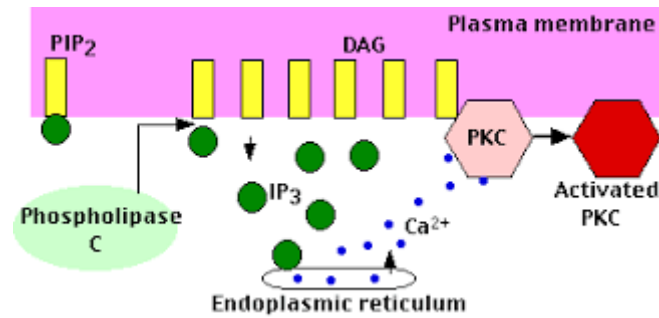
(<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/dopamine-uptake>)



Εικόνα 76: Ντοπαμινεργικός νευρώνας

(https://www.researchgate.net/figure/Synthesis-of-dopamine-from-L-DOPA-in-the-dopaminergic-nerve-terminals-DCAA-aromatic_fig2_272999388)

Αναφορικά με τους υποδοχείς ντοπαμίνης, έχουν ταυτοποιηθεί πέντε υποτύποι: D1, D2, D3, D4, D5. Οι D1, D5 ανήκουν στην D1-τάξη υποδοχέων, ενώ οι D2, D3, D4 στην οικογένεια της D2-τάξης υποδοχέων. Στη D1 τάξη, γίνεται σύζευξη των υποδοχέων με Gas πρωτεΐνες. Μέσω της διέγερσής τους και με τη βοήθεια του ATP, ενεργοποιείται η αδενυλική κυκλάση (Adenyl Cyclase, AC) και παράγεται κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (Cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP), σημαντικός κυτταρικός σηματοδότης για βιολογικές διεργασίες. Στη D2 τάξη, οι υποδοχείς συζεύγνυνται με Gai πρωτεΐνες (G Protein Alpha i Subunit) και η διέγερσή τους αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση. Αξίζει να αναφερθεί ότι στη μεταγωγή σήματος δεν συναντώνται μόνο ομοδιμερή των ντοπαμινεργικών υποδοχέων, αλλά κι ετεροδιμερή, μέσω σύνδεσης με πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη Gaq. Οι υπομονάδες G άλφα μπορούν να αναφέρονται ως Gq άλφα, Gaq ή Gqa. Οι πρωτεΐνες Gq συνδέονται με υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G για να ενεργοποιήσουν τα ένζυμα βήτα τύπου φωσφολιπάσης C (PLC-β). Το PLC-β με τη σειρά του υδrolύει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP2) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3). Το IP3 δρα ως δεύτερος αγγελιοφόρος για την απελευθέρωση του αποθηκευμένου ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα, ενώ ο DAG δρα ως δεύτερος αγγελιοφόρος που ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC).



Εικόνα 77: Δράση δεύτερων αγγελιαφόρων

(https://www.biology-pages.info/S/Second_messengers.html)

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς υφίστανται σε ποικίλες ποσότητες, με τον υποτύπο D1 να είναι ο πιο άφθονος, ακολουθούμενος από τους D2, D3, D5 και D4. Η αναθεωρημένη «υπόθεση ντοπαμίνης» προτείνει ότι τα άτομα με σχιζοφρένεια διαθέτουν μεγαλύτερο αριθμό υποδοχέων D2, σε σύγκριση με εκείνα, χωρίς την πάθηση. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από το γεγονός ότι τα αντιψυχωσικά φάρμακα, τα οποία αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τη σχιζοφρένεια, δρουν ως ανταγωνιστές ή μερικοί αγωνιστές των υποδοχέων D2, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω τη συσχέτιση αυτού του συγκεκριμένου υποτύπου και της παθολογίας της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ της μειωμένης δραστηριότητας των υποδοχέων D1 στον προμετωπιαίο φλοιό και της αυξημένης δραστηριότητας των υποδοχέων D2 στο ραβδωτό σώμα, γεγονός, με κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της σχιζοφρένειας. Επιπλέον, οι υποδοχείς D2, ιδιαίτερα αυτοί που βρίσκονται στο ραβδωτό σώμα, μπορούν να ενεργοποιήσουν τη φωσφορυλίωση της GSK3β (Glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 beta), χωρίς τη συμμετοχή των πρωτεϊνών G [63].

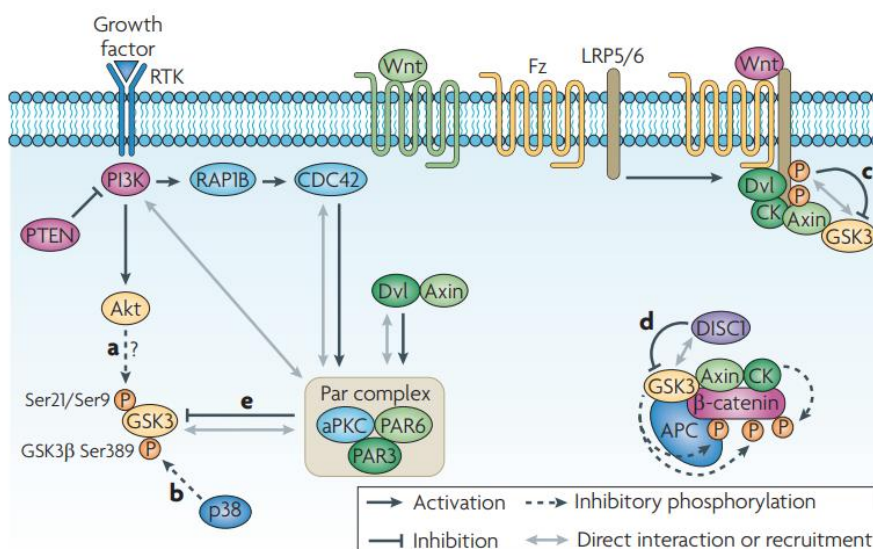
Μάλιστα, παρατίθεται και αναλυτικός πίνακας, που παρουσιάζει τους υποδοχείς ντοπαμίνης, τον μηχανισμό λειτουργίας τους.

Υποδοχέας Ντοπαμίνης	Τοποθεσία	Μηχανισμός λειτουργίας	Ρόλος
D1	Οσφρητικός βολβός, Επικλινής πυρήνας, Ραβδωτό σώμα, Αμυγδαλή, Ιππόκαμπος, Μετωπιαίος Φλοιός, Μέλαινα ουσία, Υποθάλαμος	Ενισχυμένη ενδοκυτταρική cAMP, μέσω ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης	Προσοχή, μάθηση, μετακίνηση, έλεγχος παρόρμησης, ύπνος, ρύθμιση νεφρικής λειτουργίας, μνήμη
D2	Κοιλιακή Τμηματική Περιοχή (Ventral Tegmental Area, VTA), Οσφρητικός βολβός, Ραβδωτό σώμα, Εγκεφαλικός Φλοιός	Ενισχυμένη ενδοκυτταρική cAMP, μέσω ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης	Αναπαραγωγική συμπεριφορά, μετακίνηση, ύπνος, προσοχή
D3	Εγκεφαλικός Φλοιός, Ραβδωτό σώμα, Islands of Calleja	Αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, μέσω ανασταλτικών G-πρωτεϊνών	Μετακίνηση, Ρύθμιση πρόσληψης τροφής, Γνωστική λειτουργία, έλεγχος παρόρμησης
D4	Υποθάλαμος, Αμυγδαλή, Μετωπιαίος Φλοιός, Επικλινής πυρήνας	Αναστολή της γλουταμινεργικής δραστηριότητας στον προμετωπιαίο φλοιό, μείωση σηματοδοτικών επιδράσεων του N-μεθυλο- D-ασπαρτικού (NMDA) και του α-αμινο-3- υδροξυ-5-μεθυλ-4 - ισοξαζολοπροπιονικό οξύ (AMPA)	Προσοχή, αναπαραγωγική συμπεριφορά, έλεγχος παρόρμησης
D5	Υποθάλαμος, Μέλαινα ουσία, Εγκεφαλικός φλοιός	Προαγωγή της σύνθεσης του cAMP από την αδενυλική κυκλάση, μέσω της ενεργοποίησης της οικογένειας Gas/olf πρωτεϊνών G	Κίνηση, Μάθηση, Γνωστική λειτουργία, Λήψη αποφάσεων, Έκκριση ρενίνης

Πίνακας 2: Υποδοχείς ντοπαμίνης, τοποθεσία, μηχανισμός λειτουργίας και ρόλος

Εστιάζοντας στην τελευταία, η κινάση-3 της συνθάσης γλυκογόνου (GSK3) έχει πρόσφατα συνδεθεί με διαταραχές της διάθεσης και σχιζοφρένεια, καθώς και με τα συστήματα νευροδιαβιβαστών και τις θεραπευτικές θεραπείες που σχετίζονται με αυτές τις ασθένειες. Το GSK3 είναι ένα ένζυμο με ευρεία επιρροή, ικανό να φωσφορυλιώνει και, ως εκ τούτου, να ρυθμίζει πάνω από σαράντα γνωστά υποστρώματα. Τέσσερις μηχανισμοί που ρυθμίζουν το GSK3 (φωσφορυλίωση, σύμπλοκα πρωτεϊνών, εντοπισμός και φωσφορυλίωση υποστρώματος) συνδυάζονται για να παρέχουν, ειδική για το υπόστρωμα, ρύθμιση των δράσεων του GSK3. Αρκετοί ενδοκυτταρικοί καταρράκτες σηματοδότησης συγκλίνουν στο GSK3, για να ρυθμίσουν τη δραστηριότητά του και πολλά συστήματα νευροδιαβιβαστών ρυθμίζουν, επίσης, το GSK3, συμπεριλαμβανομένων των σεροτονινεργικών, ντοπαμινεργικών, χολινεργικών και γλουταμινεργικών συστημάτων. Λόγω των αλλαγών σε αυτά τα συστήματα νευροδιαβιβαστών και της δράσης των αντιψυχωσικών φαρμάκων, το GSK3 έχει συνδεθεί με τις διαταραχές της διάθεσης, τη διπολική διαταραχή, την κατάθλιψη και τη σχιζοφρένεια. Η αναστολή του GSK3 μπορεί να είναι ένας σημαντικός θεραπευτικός στόχος των σταθεροποιητών της διάθεσης και η ρύθμιση της GSK3 μπορεί να εμπλέκεται στα θεραπευτικά αποτελέσματα άλλων φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται στην ψυχιατρική.

Η απορρυθμισμένη GSK3 στη διπολική διαταραχή, την κατάθλιψη και τη σχιζοφρένεια θα μπορούσε να έχει πολλαπλές επιδράσεις στη νευρική πλαστικότητα, όπως τη διαμόρφωση της νευρωνικής αρχιτεκτονικής, τη νευρογένεση, την έκφραση γονιδίων και την ικανότητα των νευρώνων να ανταποκρίνονται σε στρεσογόνες, δυνητικά θανατηφόρες καταστάσεις. Εν μέρει λόγω αυτών των βασικών δράσεων του GSK3 και των συσχετισμών του με τις διαταραχές της διάθεσης και τη σχιζοφρένεια, πολλές έρευνες αφιερώνονται επί του παρόντος στον εντοπισμό νέων εκλεκτικών αναστολέων του GSK3 [36].



Εικόνα 78: Οδός σηματοδότησης GSK3, αναστολή και επαγωγή
(<https://www.nature.com/articles/nrn2870#citeas>)

2.4 Φαρμακευτική Αγωγή κατά της Σχιζοφρένειας - Αντιψυχωσικά

Νεότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε τρία βασικά γονίδια: το γονίδιο του υποδοχέα D2 της ντοπαμίνης, που αναφέρθηκε προηγουμένως, τα γονίδια των γλουταμινεργικών νευροδιαβιβαστών και τα γονίδια των τασοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου (Ca^{2+}). Ο υποδοχέας D2 της ντοπαμίνης είναι ο κύριος στόχος της φαρμακευτικής θεραπείας κατά της σχιζοφρένειας και θα αναλυθεί, με ξεχωριστή έμφαση, ακολούθως.

Οι πρώιμες προσπάθειες για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας θα θεωρούνταν ανήθικες με τα σημερινά πρότυπα. Οι συνήθεις θεραπείες περιελάμβαναν παρατεταμένη συγκράτηση, απομόνωση, παγόλουτρα, πυρετούς που προκαλούνται και θεραπεία σοκ. Ίσως οι πιο διαβόητες μέθοδοι ήταν οι λοβοτομές ή οι χειρουργικές επεμβάσεις όπου αφαιρούνταν τμήματα του εγκεφάλου, συχνά στον μετωπιαίο λοβό. Αν και παρείχαν μακροχρόνια θεραπεία της σχιζοφρένειας, οι μετωπιαίες λοβοτομές ήταν αναποτελεσματικές στη βελτίωση των συμπτωμάτων και δεν επέζησαν όλοι οι ασθενείς από τη διαδικασία.

Τα πρώτα αντιψυχωσικά φάρμακα αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1950. Η ανακάλυψη της χλωροπρομαζίνης, του πρώτου νευροληπτικού φαρμάκου, ήταν «ατύχημα», μια και αναπτύχθηκε, αρχικά, ως ήπιο αναισθητικό και χορηγήθηκε σε ψυχωσικούς ασθενείς για καταστολή. Τα αντιψυχωσικά της αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από πολλαπλές μελέτες, με αποτέλεσμα να εμπορευματοποιηθεί ως ψυχιατρικό φάρμακο με την επωνυμία Thorazine.

Τα αντιψυχωσικά φάρμακα μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, παρόμοια με τα αντικαταθλιπτικά. Η πρώτη ομάδα είναι τα τυπικά αντιψυχωσικά, που αναφέρονται επίσης ως κλασικά ή πρώτης γενιάς αντιψυχωσικά. Όπως υποδηλώνει το όνομα, αυτά ήταν τα πρώτα αντιψυχωσικά φάρμακα που ανακαλύφθηκαν. Αυτά τα φάρμακα τείνουν να είναι πιο αποτελεσματικά στη θεραπεία των θετικών συμπτωμάτων από τα αρνητικά. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει χλωροπρομαζίνη, φλουφαιναζίνη (Prolixin), θειοριδαζίνη (Mellaril) και αλοπεριδόλη (Haldol).

Μια άλλη κατηγορία νευροληπτικών φαρμάκων αναφέρεται ως νέα ή άτυπα αντιψυχωσικά, που αναφέρονται επίσης ως αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς. Αυτά τα φάρμακα διακρίνονται από τα ελαφρώς διαφορετικά φαρμακολογικά τους προφίλ, τα οποία επιτρέπουν την καλύτερη αντιμετώπιση των αρνητικών συμπτωμάτων. Τα φάρμακα αυτής της ομάδας περιλαμβάνουν την κλοζαπίνη (Clozaril), την αριπιπραζόλη (Abilify), τη ρισπεριδόνη (Risperdal) και την κουετιαπίνη (Seroquel).

Σε σύγκριση με τα αντικαταθλιπτικά, οι διαφορές μεταξύ των δύο γενεών αντιψυχωσικών είναι πολύ μικρότερες. Τα άτυπα αντιψυχωσικά μειώνουν ορισμένες ανεπιθύμητες ενέργειες, ενώ εισάγουν νέες. Εξαιτίας αυτού, τα τυπικά αντιψυχωσικά εξακολουθούν να είναι μια βιώσιμη θεραπευτική επιλογή πρώτης γραμμής για πολλούς ασθενείς. Μια μελέτη, ωστόσο, έδειξε ότι η ποιότητα ζωής ήταν παρόμοια και μεταξύ των δύο ομάδων αντιψυχωσικών.

Η σχιζοφρένεια συνήθως αντιμετωπίζεται με αντιψυχωσικά φάρμακα, τα οποία επιλέγονται ειδικά για αυτήν την πάθηση. Ενώ αυτά τα φάρμακα δεν θεραπεύουν άμεσα την ασθένεια, ανακουφίζουν αποτελεσματικά τα συμπτώματά της και μειώνουν την εμφάνιση ψυχωσικών επεισοδίων στους ασθενείς. Ως αποτέλεσμα, χορηγούνται σε μακροχρόνια περίοδο. Το 1967, ο Van Rossum διατύπωσε την αρχική υπόθεση που συνδέει τον μηχανισμό δράσης των αντιψυχωσικών με τους υποδοχείς ντοπαμίνης. Στη συνέχεια, την επόμενη δεκαετία, επιβεβαιώθηκε ότι αυτά τα φάρμακα λειτουργούν ως ανταγωνιστές των υποδοχέων D2. Το πρώτο αντιψυχωτικό που εισήχθη στην κλινική πράξη ήταν η χλωροπρομαζίνη πριν από περίπου πενήντα χρόνια. Επί του παρόντος, υπάρχουν πολλά διαθέσιμα αντιψυχωσικά, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ευρέως σε δύο ομάδες: τυπικά (1ης γενιάς) και άτυπα (2η γενιά + 3η γενιά).

Τα νευροληπτικά, κοινώς γνωστά ως τυπικά αντιψυχωσικά, προέρχονται από το όνομά τους από την ικανότητά τους να προκαλούν νευροληψία. Αυτά τα φάρμακα λειτουργούν δρώντας ως ανταγωνιστές στους υποδοχείς D2 στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Με βάση τη χημική τους συγγένεια με τους υποδοχείς D2, ταξινομούνται περαιτέρω σε χαμηλή και υψηλή ισχύ. Ωστόσο, τα τυπικά αντιψυχωσικά παρουσιάζουν επίσης ανταγωνιστικές επιδράσεις στους νοραδρενεργικούς, χολινεργικούς και ισταμινεργικούς υποδοχείς στο περιφερικό νευρικό σύστημα (PNS). Αυτή η ευρύτερη δράση είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών, συμπεριλαμβανομένων εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων όπως ακούσιες μυϊκές συσπάσεις, καθώς και άλλες νευρολογικές επιπλοκές. Η κύρια εφαρμογή των τυπικών αντιψυχωσικών έγκειται στη διαχείριση των θετικών συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια.

Τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς λειτουργούν αναστέλλοντας τόσο τους υποδοχείς ντοπαμίνης D2 όσο και τους υποδοχείς σεροτονίνης 5-HT_{2A}. Είναι ενδιαφέρον ότι παρουσιάζουν μεγαλύτερη προτίμηση για τους υποδοχείς 5-HT_{2A} σε σύγκριση με τους υποδοχείς D2.

Ειδικότερα, τα νευροληπτικά, κοινώς γνωστά ως τυπικά αντιψυχωσικά, κέρδισαν το όνομά τους λόγω της ικανότητάς τους να προκαλούν νευροληψία. Αυτά τα φάρμακα λειτουργούν αναστέλλοντας τους υποδοχείς D2 στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Με βάση τη χημική τους συγγένεια με τους υποδοχείς D2, ταξινομούνται ως χαμηλής ή υψηλής δραστηριότητας. Ωστόσο, τα τυπικά αντιψυχωσικά ανταγωνίζονται επίσης τους νοραδρενεργικούς, χολινεργικούς και ισταμινεργικούς υποδοχείς στο περιφερικό νευρικό σύστημα (PNS). Αυτός ο μηχανισμός δράσης μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένων των εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων όπως ακούσιες μυϊκές συσπάσεις, καθώς και σε άλλες νευρολογικές επιπλοκές. Κατά κύριο λόγο, αυτά τα φάρμακα συνταγογραφούνται για την αντιμετώπιση των θετικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας.

Από την άλλη πλευρά, τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς, όχι μόνο μπλοκάρουν τους υποδοχείς ντοπαμίνης D2, αλλά δρουν και ως ανταγωνιστές των υποδοχέων σεροτονίνης 5-HT2A. Στην πραγματικότητα, παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια για τους υποδοχείς 5-HT2A από τους υποδοχείς D2. Τα άτυπα αντιψυχωσικά τρίτης γενιάς περιλαμβάνουν φάρμακα που λειτουργούν ως μερικοί αγωνιστές ντοπαμίνης. Η αριπιπραζόλη είναι το μοναδικό φάρμακο εγκεκριμένο από τον FDA σε αυτήν την κατηγορία. Αν και τα άτυπα αντιψυχωσικά έχουν συσχετιστεί με μεταβολικές παρενέργειες όπως η παχυσαρκία και ο διαβήτης τύπου II, παρουσιάζουν λιγότερες νευρολογικές παρενέργειες σε σύγκριση με τα τυπικά αντιψυχωσικά, καθιστώντας τα μια προτιμώμενη επιλογή.

3. Drug Repurposing

Η επαναστόχευση φαρμάκων, ευρέως γνωστή ως repurposing ή reprofiling ή repositioning είναι μια σχετικά νέα στρατηγική για τον εντοπισμό εναλλακτικών χρήσεων γνωστών θεραπευτικών σκευασμάτων, που βρίσκονται εκτός του πεδίου εφαρμογής των αρχικών ιατρικών ενδείξεων. Μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να συνεπάγεται ορισμένα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την τυπική de novo ανάπτυξη φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένου του λιγότερου χρόνου που απαιτείται για την εισαγωγή του φαρμάκου στην αγορά και του χαμηλότερου κόστους. Μια πολλά υποσχόμενη κατηγορία φαρμάκων, που θα μπορούσε να θεωρηθεί ως υποψήφια για επαναχρησιμοποίηση στην ογκολογία, περιλαμβάνει τα φάρμακα του κεντρικού νευρικού συστήματος, με χαρακτηριστικούς εκπροσώπους της, τους αντιψυχωσικούς παράγοντες. Η δυνατότητα αντιψυχωσικών φαρμάκων να επαναχρησιμοποιηθούν ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες στη θεραπεία του καρκίνου ή σε επίπεδο πρόληψης, βρίσκεται υπό διερεύνηση. Ωστόσο, αν και η επαναχρησιμοποίηση φαρμάκων φαίνεται να είναι μια ελκυστική στρατηγική για την αναζήτηση ογκολογικών φαρμάκων, διασαφηνίζεται ότι δεν πρέπει να αντικαταστήσει, εξ ολοκλήρου, την αναζήτηση νέων αντineοπλασματικών, αλλά μόνο να συμπληρώσει την de novo ανάπτυξη φαρμάκων.

Επαναστόχευση φαρμάκων και καρκίνος του μαστού

Εκτός από όλα τα εγκεκριμένα φάρμακα, ορισμένα φάρμακα έχουν τη δυνατότητα να επαναχρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Αυτά τα φάρμακα μπορεί να είναι πολύ ενδιαφέροντα για την αναγνώριση βιοδεικτών, τη βελτίωση των μακροπρόθεσμων χειρουργικών αποτελεσμάτων και τη χορήγηση σε συνδυασμό με τις τρέχουσες θεραπείες για την αύξηση της συνολικής αποτελεσματικότητας. Υπάρχει μια ποικιλία φαρμάκων, τα οποία μελετώνται, με δυνατότητα επαναπροορισμού για τον καρκίνο του μαστού. Ένα παράδειγμα είναι ο μη εκλεκτικός β-αναστολέας προπρανολόλη. Πολλές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης μιας τυχαιοποιημένης ελεγχόμενης με εικονικό φάρμακο δοκιμής φάσης II της προπρανολόλης σε συνδυασμό με μια άλλη υποψήφια επαναχρησιμοποίηση, την ετοντολάκη, σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου, έδειξαν μειωμένη δραστηριότητα μεταγραφικών

παραγόντων που προάγουν τόσο τη μετάσταση όσο και τη φλεγμονή, μειωμένη επιθηλιακή -μεσεγγυματική μετάβαση και, επίσης, μειωμένα και αυξημένα μονοκύτταρα και Β κύτταρα, που διεισδύουν στον όγκο, αντίστοιχα. Μια άλλη μελέτη σε πρώιμο στάδιο καρκίνου του μαστού, με την πρόσβαση στον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67, έδειξε ότι ο μη εκλεκτικός βήτα αποκλεισμός μείωσε τον πολλαπλασιασμό του όγκου κατά 66%. Στην πραγματικότητα, ένας τεράστιος αριθμός μελετών έχει αποδείξει την αντι-πολλαπλασιαστική, αντι-αγγειογενετική, αντι-μεταναστευτική και κυτταροτοξική δράση μιας ποικιλίας β-αναστολέων. Τα αποτελέσματα *in vivo* έδειξαν ότι η ισοπροτερενόλη, η μεταπροτερενόλη και η φορμοτερόλη (όλοι οι β-αγωνιστές) διεγείρουν με σημαντικό τρόπο την ανάπτυξη μετάστασης των καρκινικών κυττάρων του μαστού, υπογραμμίζοντας τον ρόλο των β υποδοχέων στον καρκίνο του μαστού [57].

Ένα άλλο παράδειγμα είναι η χλωροκίνη, με πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα σε αρκετές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και κλινικές δοκιμές φάσης I, είτε ως μεμονωμένος παράγοντας είτε σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες. Τα αποτελέσματα σε ποντίκια έδειξαν ότι αυτό το φάρμακο αύξησε τον χρόνο επιβίωσης και μείωσε το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου, μετριάζοντας τον βαθμό μετάστασης στους πνεύμονες. Άλλα πιθανά φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι ο αναστολέας των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II, λοσαρτάνη καθώς και η δισουλφιδάμη, τα οποία αντίστοιχα ανέστειλαν πλήρως τον σχηματισμό του όγκου στο 20% των ποντικών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία και παρουσίασαν σημαντική μείωση του φορτίου όγκου σε ένα μοντέλο όγκου του μαστού και, σε βλαστοκύτταρα καρκίνου του μαστού. ανθεκτικό στην ακτινοβολία, επαγόμενο ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, πολλές αναδρομικές μελέτες αναφέρουν ότι τα ΜΣΑΦ θα μπορούσαν να μειώσουν τις υποτροπές του καρκίνου του μαστού. Με ιδιαίτερη σημασία, διεξάγεται μια μελέτη φάσης III με κετορολάκη σε χειρουργικές επεμβάσεις καρκίνου του μαστού, υποδηλώνοντας ότι αυτό το ΜΣΑΦ μπορεί να είναι ένα άλλο πιθανό φάρμακο για επαναστόχευση.

Η σαλινομυκίνη (αντιβιοτικό) είναι ένα άλλο φάρμακο που έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για τον καρκίνο του μαστού. Μελέτες δείχνουν ότι αυτό το φάρμακο μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου και την έκφραση των γονιδίων των καρκινικών βλαστικών κυττάρων *in vivo*, καθώς και να προκαλέσει διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε συνδυασμό με πανοβινοστάτη, έναν αναστολέα αποακετυλάσης της ιστόνης. Όσον αφορά την ιτρακοναζόλη, ένα αντιμυκητιασικό φάρμακο, μια πιλοτική δοκιμή απέκτησε πρόσβαση στις φαρμακοκινητικές της παραμέτρους σε 13 ασθενείς με καρκίνο του μαστού μεταστατικού τύπου. Αυτή η μελέτη οδήγησε στις παρατηρήσεις ότι υψηλά επίπεδα αυτού του φαρμάκου στο πλάσμα οδήγησαν σε υψηλότερα επίπεδα αναστολέων αγγειογένεσης και μειωμένα επίπεδα αγγειογενετικών παραγόντων. Επιπλέον, σε συνδυασμό με 5-φθοροουρακίλη, η ιτρακοναζόλη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7 (κύτταρα καρκίνου του μαστού). Στην ίδια μελέτη, το Tacrine ή Verapamil, σε συνδυασμό με 5-Fluorouracil, παρουσίασαν επίσης μείωση στον πολλαπλασιασμό και

τη βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7. Ένα ανθελμινθικό που ονομάζεται νικλοσαμίδα έχει επίσης δείξει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον καρκίνο του μαστού. Σε μια μελέτη, αυτό το φάρμακο ανέστρεψε την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση και ανέστειλε τον φαινότυπο των κυττάρων που μοιάζει με στέλεχος. Οι στατίνες έχουν επίσης δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Αύξηση της απόπτωσης και της ραδιοευαισθησίας, καθώς και αναστολή της εισβολής και του πολλαπλασιασμού, παρατηρήθηκε σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MDA-IBC3, Sum149 και Sum190). Οι κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού υποστηρίζουν αυτά τα ευρήματα με την επίδειξη βελτίωσης στον τοπικό έλεγχο και μείωση της θνησιμότητας για τους ασθενείς που χρησιμοποιούν στατίνες. Υπολογιστικές μελέτες με αντιικά φάρμακα, όπως το ombitasvir (ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται στην ηπατίτιδα C) έδειξαν επίσης ότι αυτό το φάρμακο θα μπορούσε να επαναχρησιμοποιηθεί για την πρόληψη και τον έλεγχο του καρκίνου του μαστού. Σε αυτή τη σειρά αντιικών, μελέτες με κυτταρικές σειρές και ποντίκια έδειξαν ότι η νελφίναβιρ έχει πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική δράση σε δοκιμές θεραπείας για τον καρκίνο του μαστού, θετικού HER2, σε δόση ίδια με αυτή, που χρησιμοποιείται σε ασθενείς με HIV. Άλλα πιθανά φάρμακα, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στον καρκίνο του μαστού είναι η κατηγορία των αντιψυχωσικών, φαινοθειαζίνες (Θειοριδαζίνη, Φλουφαιναζίνη και Τριφλουπεραζίνη). In vitro, αυτά τα φάρμακα μείωσαν την κυτταρική εισβολή, τον πολλαπλασιασμό και αύξησαν τον κυτταρικό θάνατο σε τριπλά αρνητικά καρκινικά κύτταρα του μαστού. Επίσης, in vivo, υπήρξε μείωση της ανάπτυξης όγκου με τη χορήγηση αυτών των αντιψυχωσικών σε ποντικούς που είχαν ξενομοσχεύματα του MDA-MB-231 τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. Άλλο ένα φάρμακο με δυνατότητα χρησιμοποίησης στον καρκίνο του μαστού είναι η ασπιρίνη. Με την τακτική χρήση ασπιρίνης, πολλαπλές μελέτες παρατήρησης ανέφεραν βελτίωση στην επιβίωση από καρκίνο του μαστού. Εκτός από την αναστολή της κυκλοοξυγενάσης-2, αυτό το φάρμακο ρυθμίζει επίσης μονοπάτια που εμπλέκονται στον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένων των NFκB και mTORC1. Επιπλέον, η συνδυαστική θεραπεία με μετοφορμίνη για τη διαχείριση του καρκίνου του μαστού είναι επίσης μια υπόσχεση. Συγκεκριμένα, η μετοφορμίνη έχει συνδυαστεί με δοξορουβικίνη, 5-φθοροουρακίλη, προπρανολόλη και βιταμίνη D3, με εξαιρετικά αποτελέσματα στη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας αναστέλλοντας την έκφραση του NF-kB, την επαγωγή βλάβης του DNA από μεταβολική κρίση, την αναστολή του μεταβολισμού της γλυκόζης και την αύξηση της απόπτωσης, αντίστοιχα. Ο καρκίνος του μαστού, παρά τη μεγάλη ποικιλία εγκεκριμένων θεραπευτικών παραγόντων και φαρμάκων με δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, παραμένει ένα ανησυχητικό πρόβλημα υγειονομικής περίθαλψης. Το κόστος και οι δυσκολίες στην οργάνωση των προγραμμάτων προσυμπτωματικού ελέγχου καθιστούν τα προγράμματα αυτά δύσκολο να εκτελεστούν. Οι υψηλά καταρτισμένοι πάροχοι υγειονομικής περίθαλψης και οι κατάλληλες συνθήκες στα χειρουργεία είναι σημαντικά για την κατάλληλη χειρουργική θεραπεία. Επιπλέον, οι προηγμένες μέθοδοι θεραπείας που περιλαμβάνουν ακτινοβολία είναι δύσκολο να επιτευχθούν, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Έτσι, στο πλαίσιο της επαναστόχευσης, καθίσταται σαφές πως οι προκλήσεις είναι πολλές, όπως η διαχείριση των ενδεχόμενων δευτερογενών επιπτώσεων και η ανάγκη

για βελτίωση της ακρίβειας προηγμένων στοχευμένων θεραπειών, με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας και της μοριακής παθολογικής ανάλυσης. Επιπρόσθετα, το ζήτημα των διαφορετικών μηχανισμών αντοχής στα αντικαρκινικά φάρμακα, που εμφανίζεται στην πλειονότητα των τύπων καρκίνου, παραμένει ένα πρόβλημα που είναι δύσκολο να καταπολεμηθεί και απαιτεί εκτεταμένη και πολυεπίπεδη έρευνα [15], [88].

4. Σκοπός

Η παρούσα εργασία, συνυφασμένη με τις σύγχρονες τάσεις της έρευνας, εστιάζει το ενδιαφέρον της στο drug repurposing και την εφαρμογή του στο πεδίο των αντινεοπλασματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ως εκ τούτου, υπό αυτό το πρίσμα, επιχειρείται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση της αξιοποίησης αντιψυχωσικών φαρμάκων είτε ως μονοθεραπεία είτε ως συνδυαστική θεραπεία με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, αποβλέποντας στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην αριπιπραζόλη, με παράλληλη ανάδειξη της δράσης και άλλων φαρμάκων, όπως η χλωροπρομαζίνη. Γίνεται εκτενής αναφορά στην ακολουθούμενη πειραματική πορεία της *in vitro* αξιολόγησης της δράσης αντιψυχωσικών στη θεραπεία καρκίνου του μαστού, προσδίδοντας ξεχωριστή βαρύτητα στην κυτταρική σειρά MCF-7 και δοκιμασιών, όπως η αξιολόγηση της επίδρασης αντιψυχωσικών στην κυτταρική επιβίωση των κυττάρων, με δοκιμασία SRB, η αξιοποίηση κυτταρομετρίας ροής - πρωτοκόλλου annexin V- PI, για την μελέτη της ρύθμισης της απόπτωσης, αλλά και εξέταση του αντίκτυπου στην έκφραση πρωτεϊνών, μέσω Western Blot, τόσο σε αυτή, όσο και σε άλλες κυτταρικές σειρές.

5. Μεθοδολογικές Προσεγγίσεις στην Προκλινική και Κλινική Έρευνα Επαναστόχευσης Αντιψυχωσικών Φαρμάκων στον Καρκίνο του Μαστού

Οι ακολουθούμενες εργαστηριακές πρακτικές για τον έλεγχο της επίδρασης των αντιψυχωσικών σε κύτταρα καρκίνου του μαστού περιγράφονται ακολούθως:

5.1.1 Ανάπτυξη κυτταροκαλλιέργειών

Εναρκτήριο σημείο αποτελούν οι κυτταροκαλλιέργειες. Μέσα από την καλλιέργεια κυττάρων σε ειδικό επωαστικό θάλαμο, υπό ελεγχόμενες συνθήκες, μπορεί να λάβει χώρα *in vitro* η αξιολόγηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης αντιψυχωσικών φαρμάκων, όπως η αριπιπραζόλη, η χλωροπρομαζίνη, η πιμοζίδη κ.ά., υπό το πρίσμα της επαναστόχευσης φαρμάκων (drug repurposing). Ο τύπος της κυτταρικής σειράς καθορίζει τα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας και τον χειρισμό των κυττάρων, όπως και το είδος του θρεπτικού μέσου και της σύστασης, που πρέπει να διαθέτει. Τα κύτταρα που ανακαλλιεργούνται είναι καρκινικά και έχουν απομονωθεί από ζωντανό ιστό. Σε παρακάτω υποενότητα, πρόκειται να γίνει εκτενής αναφορά στις

χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές και τα χαρακτηριστικά τους. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), εμπλουτισμένο με την προσθήκη 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 1% αντιβιοτικών παραγόντων, όπως η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη (P/S, penicillin/streptomycin, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Το FBS είναι εμβρυϊκός ορός μόσχου, που λειτουργεί ως συμπλήρωμα, περιέχοντας απαραίτητες πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες και χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων, που προάγουν την κυτταρική επιβίωση. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται σε εστία κάθετης νηματικής ροής (Laminar Flow Hood), με σκοπό την αποφυγή μολύνσεων, ενώ η καλλιέργεια αναπτύχθηκε σε ειδικά κατεργασμένα τρυβλία για την προσκόλληση των κυττάρων. Τέλος, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, ο οποίος τηρεί θερμοκρασία 37°C σε συνθήκες νορμοξίας, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% v/v CO₂, προς διατήρηση σταθερού pH.



Εικόνα 79: Αριστερά: Κυτταρική καλλιέργεια σε τρυβλίο (Petri Dish), Δεξιά: Εστία κάθετης νηματικής ροής

(<https://facellitate.com/introduction-to-cell-culture-and-its-applications/>)

(<https://www.dksh.com/ph-en/products/ins/biobase-laminar-flow-cabinet>)



Μάλιστα, για μεγιστοποίηση της πρόληψης επιμολύνσεων, τα χρησιμοποιούμενα τρυβλία, ήταν αποστειρωμένα, όπως και τα αναλώσιμα, στο σύνολό τους, σε αυτόκλειστο, στους 121 °C, για 20 min. Ακόμα, το δωμάτιο των κυτταροκαλλιεργειών υφίσταντο αποστείρωση, μετά το πέρας των διεργασιών σε αυτό, με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), όπως και η εστία κάθετης νηματικής ροής, όπου πραγματοποιούνταν ο χειρισμός των κυττάρων.

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

Η κρυοσυντήρηση περιλαμβάνει την αποθήκευση κυττάρων, ιστών ή οργάνων σε υγρό άζωτο στους -196°C για μελλοντική χρήση. Σε αυτή την ακραία θερμοκρασία, η μεταβολική δραστηριότητα σχεδόν σταματά. Όταν καλύπτεται το 80%-90% της επιφάνειας του πιάτου, υποδεικνύοντας ότι η κυτταρική ανάπτυξη παραμένει ανεπηρέαστη από χωρικούς περιορισμούς, τα κύτταρα στη συνέχεια ανακαλλιεργούνται, μετρώνται και επαναιωρούνται σε ένα μέσο κατάψυξης που περιλαμβάνει ορό εμβρύου μόσχου (FBS) και 10% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Το DMSO, ένας πολικός και απρωτικός διαλύτης, συλλαμβάνει προσωρινά τα κύτταρα στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και σε καθορισμένη συγκέντρωση χρησιμεύει ως κρυοπροστατευτικό για την αναστολή του σχηματισμού κρυστάλλων πάγου, που θα μπορούσαν να βλάψουν τα κύτταρα. Το μέσο κατάψυξης τοποθετείται σε πάγο για διάρκεια 10 λεπτών προτού χρησιμοποιηθεί για την εκ νέου εναιώρηση των κυττάρων. Κάθε φιαλίδιο κατάψυξης (Cryovial) περιέχει περίπου $2-3 \times 10^6$ κύτταρα. Έπειτα, γίνεται αποθήκευση στους -80 °C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight), ενώ τα δείγματα μεταφέρονται σε υγρό άζωτο, την επόμενη ημέρα. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει μια σταδιακή διαδικασία κατάψυξης και αποθήκευσης.

Για την απόψυξη και την καλλιέργεια των επιθυμητών δειγμάτων, το Cryovial μετακινείται από το υγρό άζωτο σε ένα υδατόλουτρο στους 37 °C, όπου παραμένει για 3-5 λεπτά για να διευκολυνθεί η απόψυξη του κυτταρικού εναιωρήματος. Εν συνεχεία, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται άμεσα σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο, με ήπιες κινήσεις χειρισμού. Αφού περάσει μια ημέρα, πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού μέσου, ώστε να απομακρυνθεί το DMSO, το οποίο επιφυλάσσει τοξικές επιδράσεις στα κύτταρα, με περαιτέρω παραμονή.



Εικόνα 81: Κρυοσυντήρηση κυττάρων σε υγρό άζωτο

(<https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cryopreservation-applications-and-advances-349021>)

Η ακολουθούμενη πειραματική πορεία συνοψίζεται στα ακόλουθα βήματα:

- Σε υδατόλουτρο, στη θερμοκρασία των 37 °C, γίνεται προσθήκη του κατάλληλου θρεπτικού μέσου, ενδεικτικά για κύτταρα MCF-7, DMEM (+ 10% FBS, +1% P/S), του PBS (Phosphate Buffered Saline 1x, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) και της τρυψίνης (διάλυμα 1x, 0,5% Trypsin EDTA, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), για 15 min.
- Πραγματοποιείται, με τη βοήθεια σιφωνίου, αφαίρεση του μέσου από τα τρυβλία, που προορίζονται για κρυοσυντήρηση και πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις των 3 mL με PBS.
- Με τη βοήθεια σιφωνίου, γίνεται προσεκτική προσθήκη 1mL τρυψίνης και ακολουθεί επώαση του τρυβλίου στον επωαστικό θάλαμο, για 2-3 min.
- Προαιρετικά, αλλά προς πλήρη τήρηση του πρωτοκόλλου, σε αυτό το σημείο, μπορεί να γίνει παρατήρηση του τρυβλίου στο μικροσκόπιο, με σκοπό να παρατηρηθεί δράση της τρυψίνης. Μάλιστα, για να υποβοηθηθεί η δράση της, μπορεί να συνοδευτεί η παρατήρηση με ομαλά «χτυπήματα» στο τρυβλίο κυκλικά, ώστε να ανασηκωθούν τα κύτταρα και να διακρίνεται έντονη κινητικότητα στο μικροσκόπιο. Ο ρόλος της τρυψίνης, ως πρωτεολυτικό ένζυμο, είναι να συντελεί στην αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο και στο να ανασηκωθούν, μέσα από τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών, που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες των κυττάρων, στις οποίες οφείλεται η προσκόλληση στο τρυβλίο.
- Αφού δράσει η τρυψίνη, προστίθεται ποσότητα μέσου, γίνεται αναρρόφηση του περιεχομένου του τρυβλίου με πιπέτα και μεταφορά του σε ειδικό φιαλίδιο (falcon), με προορισμό την φυγόκεντρο, όπου τοποθετούνται για 5min, στις 2200 στροφές (rpm).

- Το σχηματιζόμενο ίζημα (pellet) επαναιωρείται σε διάλυμα ορού: 10% DMSO σε FBS.
- Γίνεται διανομή του προκύπτοντος αιωρήματος κυττάρων σε φιαλίδια ψύξης (Cryovials).
- Τα φιαλίδια ψύξης αποθηκεύονται για 1 ημέρα στους -80° C και, ακολούθως, σε υγρό άζωτο, αφού παρέλθει ένα 24ωρο.

5.1.3 Επανακαλλιέργεια κυττάρων- Ανανέωση του μέσου

Πρόκειται για διαδικασία που πρέπει να πραγματοποιείται σε τακτικά χρονικά διαστήματα, με σκοπό την διατήρηση της ανάπτυξής τους και του πλήθους τους, για τη χρήση στη διεξαγωγή πειραμάτων. Ο καθορισμός του, απαιτούμενου για επανακαλλιέργεια, χρονικού διαστήματος εξαρτάται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά. Ο γενικός κανόνας ορίζει ότι όταν τα κύτταρα καλύψουν το 80%-90% της επιφάνειας του τρυβλίου, τότε απαιτείται επανακαλλιέργεια μέχρι κάποια γενιά (passage). Για τις πλύσεις χρησιμοποιείται διάλυμα φωσφορικών αλάτων, PBS Για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας χρησιμοποιείται διάλυμα τρυψίνης (1x) (0,5% Trypsin EDTA (10x), Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

- Πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα, με την χρήση πιπέτας Pasteur
- Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με PBS (Phosphate Buffered Saline (1x), Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), ποσότητας 4 mL / φορά, προς απομάκρυνση τυχόν εναπομείνουσας ποσότητας ορού, ο οποίος περιέχει θρεπτικό υλικό και αδρανοποιεί την τρυψίνη.
- Προστίθεται 1 mL τρυψίνης (1x) σε τρυβλίο και έπεται επώαση στον κλίβανο στους 37 °C για 2-3 min.
- Προστίθενται 9mL θρεπτικού μέσου, με στόχο την απενεργοποίηση της τρυψίνης και λαμβάνουν χώρα επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις κι επαναρροφήσεις του κυτταρικού εναιωρήματος, με την πιπέτα, ώστε να αποκολληθούν τυχόν, συγκολλημένα μεταξύ τους, κύτταρα.
- Γίνεται τοποθέτηση σε νέα τρυβλία με ποσότητα θρεπτικού μέσου, κατάλληλης ποσότητας του κυτταρικού εναιωρήματος. Τα παλιά τρυβλία απορρίπτονται.

5.1.4 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

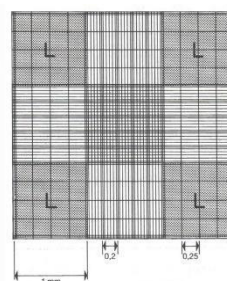
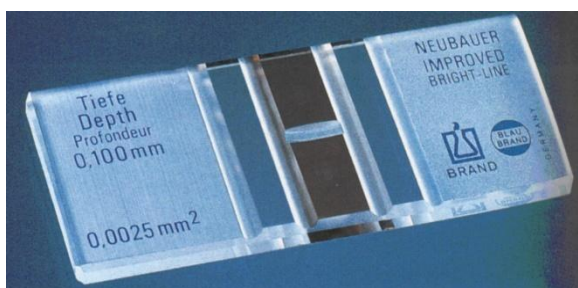
Ο πιο απλός και αποτελεσματικός τρόπος μέτρησης των κυττάρων σε εναιώρημα είναι η χρήση ενός αιμοκυτταρόμετρου Neubauer. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την παρακολούθηση της κυτταρικής ανάπτυξης και προωθεί την κατάλληλη επιλογή του αριθμού των κυττάρων που πρόκειται να επιστρωθούν, εξασφαλίζοντας βέλτιστες συνθήκες για τη διεξαγωγή πειραμάτων. Ένα αιμοκυτταρόμετρο Neubauer διαθέτει μια

βαθμονομημένη αντικειμενοφόρο πλάκα με δύο λείες, ειδικά επεξεργασμένες επιφάνειες. Κάθε επιφάνεια εμφανίζει ένα τετράγωνο πλέγμα που αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα, το καθένα με μέγεθος 1 mm, σε κάθε πλευρά του. Η θέση των κελιών, είτε βρίσκονται μέσα είτε έξω από το τετράγωνο πλέγμα, ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές, που περιγράφουν κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα. Επιπλέον, τα κύρια τετράγωνα υποδιαιρούνται σε μικρότερα, προκειμένου να καταστεί πιο εύκολη η καταμέτρηση των κελιών.

Η ακολουθούμενη πειραματική πορεία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα, με την χρήση πιπέτας Pasteur
- Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με PBS (Phosphate Buffered Saline (1x), Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), ποσότητας 4 mL / φορά, προς απομάκρυνση τυχόν εναπομείνουσας ποσότητας ορού, ο οποίος περιέχει θρεπτικό υλικό και αδρανοποιεί την τρυψίνη.
- Προστίθεται 1 mL τρυψίνης (1x) σε τρυβλίο και έπεται επώαση στον κλίβανο στους 37 °C για 2-3 min.
- Προστίθενται 5mL θρεπτικού μέσου DMEM (+ 10% FBS, +1% P/S)
- Το εναιώρημα φυγοκεντρείται για 5 min, στις 2200 στροφές.
- Το ίζημα που προκύπτει επαναιωρείται, αξιοποιώντας 3-5 mL θρεπτικού μέσου.
- Γίνεται μεταφορά 10 μ L του εναιωρήματος, που λαμβάνονται με αυτόματη πιπέτα, σε έκαστη από τις δύο επιφάνειες αντικειμενοφόρου πλάκα Neubauer.

Ο υπολογισμός του πλήθους κυττάρων αποτελεί τον μέσο όρο του αριθμού των παρατηρούμενων κυττάρων στους δύο σταυρούς, πολλαπλασιασμένο επί 10^4 .



Εικόνα 82: Πλάκα Neubauer & σχηματική αναπαράσταση του αιματοκυτταρόμετρου Neubauer

(<https://itemscatalogue.redcross.int/detail.aspx?productcode=XLABCHAM03>)

5.1.5 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση Σουλφοροδαμίνης B (SRB assay)

Η δοκιμασία χρώσης σουλφοροδαμίνης B (sulforhodamine B, SRB, Sigma-Aldrich®, Missouri, USA) αξιοποιείται για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας και της κυτταρικής επιβίωσης. Ειδικότερα, η χρωστική σουλφοροδαμίνη B διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύει πρωτεΐνες στα κύτταρα, σχηματίζοντας έγχρωμα σύμπλοκα. Έπειτα, πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου, μέσω φασματοφωτομετρίας ELISA, στα 492 nm. Η ακολουθούμενη πειραματική πορεία αποδίδεται παρακάτω, μέσα από τα ακόλουθα βήματα:

- Εφόσον έχει πραγματοποιηθεί η επώαση κατάλληλου πλήθους κυττάρων σε 100 μL εναιωρήματος με φαρμακευτικές ή οποιεσδήποτε άλλες ενώσεις βρίσκονται υπό εξέταση, σε θάλαμο επώασης, στους 37 °C, 5% v/v CO₂, γίνεται μεταφορά σε ειδικά πιάτα-τρυβλία 96 θέσεων-πηγαδιών (96-well), με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας.
- Αφού παρέλθει ο απαιτούμενος χρόνος, ο οποίος μπορεί να κυμαίνεται από 24, 48, 72 ή 96 ώρες, ανάλογα με την, υπό εξέταση χημική ένωση, το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και, στη θέση του, τοποθετούνται, με χρήση πιπέτας, 50 μL κρύου 50% w/v TCA (Trichloroacetic Acid, TCA, Fisher Scientific®, Thermo Fisher Scientific, UK).
- Έπεται επώαση 1 ώρας, στους 4 ° C (ψυγείο εργαστηρίου), ώστε να λάβει χώρα η μονιμοποίησή τους στο τρυβλίο.
- Πραγματοποιείται απόρριψη του υπερκείμενου και 5 εκπλύσεις με νερό βρύσης, με τίναγμα, με έντονες κινήσεις.
- Τα τρυβλία χωρητικότητας 96 θέσεων τοποθετούνται μέσα σε απαγωγό, όπου και παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου, overnight, έως ότου στεγνώσουν πλήρως, μετά τις πλύσεις.
- Αφού έχει παρασκευαστεί κατάλληλα το χρησιμοποιούμενο διάλυμα: 0,4% w/v διαλύματος SRB, διαλυμένου σε 1% w/v οξικό οξύ, γίνεται προσθήκη ποσότητας του διαλύματος.
- Στη συνέχεια τα τρυβλία επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, δίχως να εκτίθενται σε φως.
- Πραγματοποιείται έκπλυση με 1% οξικό οξύ, για να απομακρυνθεί όση χρωστική δεν έχει προσδεθεί σε πρωτεΐνες.
- Τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν για περίπου 3 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, εντός απαγωγού.
- Προστίθενται 200 μL 10mM Tris-base (pH 10,5).
- Λαμβάνει χώρα επώαση υπό ανακίνηση σε αναδευτήρα κλίσης για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τέλος, γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο ELISA, στα 492nm.

Ο υπολογισμός του επί τοις εκατό ποσοστού αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων πραγματοποιείται με χρήση των τύπων, ακολούθως. Για τον πρωτογενή έλεγχο, χρησιμοποιούμε ένα κατώφλι αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης 50 %, ως όριο για την τοξικότητα της ένωσης έναντι των κυτταρικών σειρών. Ωστόσο, το κατώτατο όριο μπορεί να μεταβληθεί σύμφωνα με τα κριτήρια τοξικότητας που ορίζονται, κατά την εκάστοτε μελέτη. Για τον προσδιορισμό του IC50, σχεδιάζεται μια καμπύλη δόσης-απόκρισης μεταξύ της συγκέντρωσης της ένωσης και της ποσοστιαίας αναστολής της ανάπτυξης. Οι τιμές IC50 μπορούν να προκύψουν με τη χρήση μεθόδων καμπυλοποίησης με λογισμικό στατιστικής ανάλυσης ή λογισμικό υπολογισμού IC50.

$$\text{Το \% της ανάπτυξης των κυττάρων ελέγχου} = \frac{\text{μέση οπτική πυκνότητα (OD) δείγματος} - \text{μέση οπτική πυκνότητα ημέρας 0 (ODT0)}}{\text{μέση οπτική πυκνότητα αρνητικού μάρτυρα (OD) δείγματος} - \text{μέση οπτική πυκνότητα ημέρας 0 (ODT0)}}$$

Το % της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης = 100% - % της ανάπτυξης των κυττάρων ελέγχου

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία SRB για τον προσδιορισμό των τιμών LD50 των ενώσεων από τη σχέση δόσης-απόκρισης μεταξύ της συγκέντρωσης της ένωσης και του ποσοστού των κυττάρων που θανατώνονται, η οποία υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Το \% των κυττάρων που θανατώνονται} = 100 - \frac{\text{μέση οπτική πυκνότητα (OD) δείγματος}}{\text{μέση οπτική πυκνότητα ημέρας 0 (ODT0)}} * 100$$

Ως αρνητικός μάρτυρας (control) αξιοποιείται δείγμα καλλιέργειας, στην οποία έχει προστεθεί DMSO (stock 1% σε μέσο), σε ποσότητα αντίστοιχη με αυτή των φαρμακευτικών ενώσεων που βρίσκονται υπό μελέτη, ενώ ως θετικός μάρτυρας (control) δείγμα καλλιέργειας, στην οποία έχει προστεθεί αντίστοιχη ποσότητα θρεπτικού μέσου [87].



Εικόνα 83: Τα βασικά βήματα της δοκιμασίας SRB

(<http://infobil.bilkent.edu.tr/DrugScreening.html>)



Εικόνα 84: Η εικόνα που αποδίδουν τα πηγάδια κυττάρων, μετά τη δοκιμασία SRB

(<https://www.creative-bioarray.com/Services/sulforhodamine-b-SRB-assay.htm>)

5.1.6 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμεύει ως μέθοδος για την εξέταση και την απομόνωση των κυττάρων σύμφωνα με τα φυσικά και βιολογικά τους χαρακτηριστικά. Σε αυτή τη διαδικασία, τα κύτταρα από ένα εναιώρημα κινούνται μεμονωμένα μέσα από ένα εξειδικευμένο κανάλι, όπου εκτίθενται σε μια δέσμη λέιζερ. Στη συνέχεια, οι αισθητήρες συλλαμβάνουν το φως που είτε διασκορπίζεται είτε εκπέμπεται από αυτά τα κύτταρα. Η διασπορά προς τα εμπρός, η οποία αφορά την ανίχνευση φωτός παράλληλου προς τη δέσμη λέιζερ, λειτουργεί ως δείκτης του μεγέθους της κυνέλης. Εν τω μεταξύ, η πλευρική σκέδαση, που αναγνωρίζεται από την ανίχνευση του φωτός κάθετα στη δέσμη λέιζερ, παρέχει πληροφορίες για την κοκκοποίηση. Επιπλέον, τα κύτταρα μπορούν να επισημανθούν με μια φθορίζουσα ουσία, επιτρέποντάς τους να εκπέμπουν ακτινοβολία κατά τη διέγερση με λέιζερ. Αυτό το σήμα ψηφιοποιείται και τα δεδομένα που προκύπτουν αναλύονται χρησιμοποιώντας υπολογιστή. Η ανίχνευση κάθε κυττάρου ταξινομείται ως συμβάν. Το λογισμικό για το κυτταρόμετρο εξετάζει την ένταση του σήματος κάθε συμβάντος ξεχωριστά και δημιουργεί διαγράμματα είτε ως ιστογράμματα είτε ως σημειογραφία διπαραμέτρων κατά τη διεξαγωγή ανάλυσης δύο παραμέτρων. Επιπλέον, επιτρέπει την οριοθέτηση πληθυσμών κυττάρων (gating) με βάση συγκεκριμένα χαρακτηριστικά για να διευκολυνθεί η ανάλυση περαιτέρω παραμέτρων.

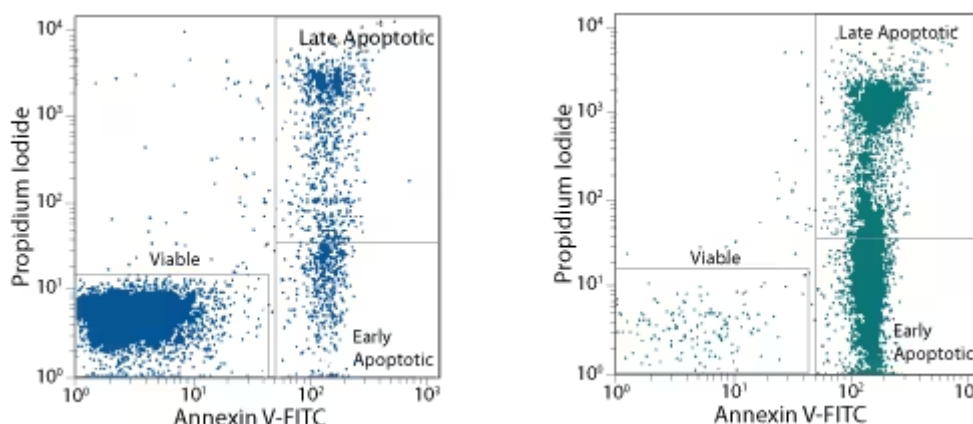
Η κυτταρομετρία ροής εξυπηρετεί διάφορους σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της διερεύνησης της θεμελιώδους κυτταρικής βιολογίας, της ανάλυσης κυτταρικών λειτουργιών, των μελετών καρυότυπου, της αναγνώρισης και απομόνωσης βλαστοκυττάρων, της διάγνωσης ασθενειών και της ανίχνευσης καρκινικών κυττάρων. Ενδεικτικά, σε αυτή τη μελέτη, η κυτταρομετρία ροής συνδυάστηκε με δοκιμασία αννεξίνης, για την αξιολόγηση της απόπτωσης.

5.1.7 Ανάλυση της απόπτωσης μέσω της δοκιμασίας Annexin V- PI (Propidium Iodine)

Η αννεξίνη V (Annexin V ή AnnV ή Annexin A5) αποτελεί κυτταρική πρωτεΐνη, με την ιδιότητα πρόσδεσης στη φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφολιπίδιο, που εδράζεται εσωτερικά, στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Όταν υφίστανται απόπτωση, στα κύτταρα, η φωσφατιδυλοσερίνη προεκβάλλεται εξωτερικά και είναι δυνατόν να ανιχνευθεί από την αννεξίνη, εφόσον αυτή σημανθεί και συζευχθεί με φθοριόχρωμα. Όσον αφορά στο PI (Propidium Iodide, ιωδιούχο προπίδιο), πρόκειται για φθορίζουσα ουσία, που διέρχεται μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης νεκρών κυττάρων και ενσωματώνεται στο DNA τους, λειτουργώντας σαν δείκτης νέκρωσης. Η διαφοροποίηση της δράσης τους συντελεί στη διάκριση τεσσάρων ομάδων κυττάρων. Στην πρώτη, τα ζωντανά κύτταρα είναι αρνητικά και ως προς τις δύο δοκιμασίες: PI (-) και Annexin V-FITC (-). Στη δεύτερη, τα νεκρά κύτταρα είναι θετικά ως προς τη σήμανση με PI, αλλά αρνητικά ως προς την αννεξίνη. Στην τρίτη, εντάσσονται κύτταρα σε πρόιμη φάση απόπτωσης, οπότε και είναι PI (-) και Annexin V-FITC (+), ενώ η τέταρτη περιλαμβάνει κύτταρα, σε όψιμη φάση απόπτωσης θετικά ως προς τις δύο δοκιμασίες, δηλαδή: PI (+) και Annexin V-FITC (+). Ο συνολικός κυτταρικός θάνατος προσδιορίζεται ποσοτικά με συμψηφισμό των τριών τελευταίων ομάδων επί τοις εκατό, ενώ η συνολική απόπτωση ως άθροισμα των δύο τελευταίων ομάδων επί τοις εκατό.

Η ακολουθούμενη πειραματική πορεία είναι η εξής:

- Μετά την προσθήκη φαρμακευτικών ή άλλων ενώσεων και επώαση της καλλιέργειας, γίνεται προσθήκη τρυψίνης και έκπλυση με διάλυμα φωσφορικών αλάτων, PBS.
- Το υπερκείμενο εισάγεται σε φυγόκεντρο, για διάστημα 5 min, στις 2.500 στροφές, στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Επαναλαμβάνεται πλύση του pellet με PBS.
- Πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση σε ίδιες συνθήκες με τις ανωτέρω.
- Επαναιωρείται το ιζήματος σε Annexin V Binding Buffer.
- 100μL του κυτταρικού εναιωρήματος εισάγονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 5mL.
- Γίνεται προσθήκη 5μL διαλύματος φθοριοχρώματος, Fluorochrome Conjugated Annexin V.
- Ακολουθεί προσθήκη διπλάσιας ποσότητας PI και ήπια ανάδευση.
- Λαμβάνει χώρα επώαση για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό μέρος.
- Προστίθενται 400 μL Annexin V Binding Buffer.
- Πραγματοποιείται κυτταρομετρία ροής [4].



Εικόνα 85: Αναπαράσταση εικόνας αποτελέσματος ανάλυσης: Νεκρά κύτταρα, κύτταρα σε φάση όψιμης απόπτωσης, ζωντανά κύτταρα, κύτταρα σε πρώιμη φάση απόπτωσης

(https://www.rndsystems.com/products/tacs-annexin-v-fitc-apoptosis-detection-kit_4830-250-k)

5.1.8 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών του κυττάρου (TCPs)

Σε επίπεδο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση των φαρμάκων, πραγματοποιείται εκχύλιση των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών (Total Cell Proteins). Αφού γίνει επώαση των κυττάρων με φαρμακευτικές ενώσεις σε 6 φρεατίων/ wells, ακολουθείται η εξής πειραματική πορεία:

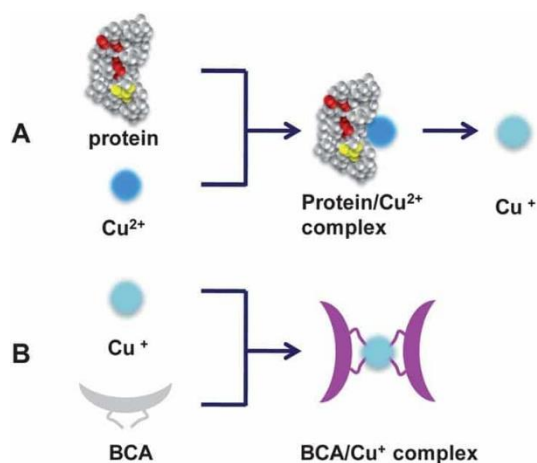
- Αρχικά, παρασκευάζεται ένα μείγμα γνωστό ως MixA, αποτελούμενο από πρωτεάσες και αναστολείς φωσφατάσης, το οποίο περιέχει τα ακόλουθα για κάθε 6 δείγματα: 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος RIPA (Ρυθμιστικό Διάλυμα Προσδιορισμού Ραδιοανοσοκαθίζησης), 20 μ L PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride), 20 μ L NaF, 20 μ L BGP (Bone Gla protein) , 20 μ L NaOrthovanadate και 40 μ L Na_2MoO_4 .
- Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα Pasteur, απορρίπτεται προσεκτικά το μέσο επώασης από τα κύτταρα.
- Πραγματοποιούνται δύο πλύσεις των 2 mL, η καθεμία, χρησιμοποιώντας 1x PBS (Phosphate Buffered Saline 1x, Gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).
- Σε κάθε θέση, προστίθενται 150 μ L κατεψυγμένου μείγματος A.
- Χρησιμοποιείται ειδική ξύστρα για την αποκόλληση των κυψελών από την επιφάνεια της πλάκας.
- Συλλέγονται με πιπέτα και μεταφέρονται σε eppendorfs.
- Αναδεύονται έντονα για 30 δευτερόλεπτα.
- Αφήνονται για 30 λεπτά σε πάγο.
- Φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά στις 14000 στροφές (rpm), στους 4 °C.
- Συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο αποτελείται από τις ολικές πρωτεΐνες και αποθηκεύονται στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

5.1.9 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA

Περιγράφεται η πειραματική πορεία ακολούθως:

- Αφού πραγματοποιηθεί η απομόνωση ολικών πρωτεϊνών, αξιοποιώντας πιπέτα, γίνεται μεταφορά από το πιάτο 6 φρεατίων σε eppendorfs.
- Γίνεται ζωηρή ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα.
- Πρέπει να τοποθετηθούν σε πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε στους 4 °C για 30 min στις 14.000 rpm.
- Οι συνολικές πρωτεΐνες συλλέγονται στο υπερκείμενο και διατηρούνται στους -80°C, για μετέπειτα χρήση.
- Τα απομονωμένα δείγματα πρωτεΐνης θα πρέπει σταδιακά να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ παραμένουν στον πάγο.
- Πραγματοποιείται προετοιμασία των διαλυμάτων, τόσο για την τυπική καμπύλη όσο και για το αντιδραστήριο εργασίας BCA.
- Για κάθε 10 δείγματα, συνδυάζονται 1 mL αντιδραστηρίου A με 20 μ L αντιδραστηρίου B. Η αραιώση των δειγμάτων διεξάγεται σε eppendorfs, χρησιμοποιώντας ddH₂O και κάθε δείγμα αναδεύεται έντονα, τόσο πριν, όσο και μετά την αραιώση.
- Για κάθε φρεάτιο σε πλάκα 96 φρεατίων/πηγαδιών, προστίθενται 100 μ L αντιδραστηρίου εργασίας BCA μαζί με 5 μ L δείγματος. Η ίδια διαδικασία ισχύει και για τα τυπικά διαλύματα καμπύλης.
- Στη συνέχεια, επωάζεται το τρυβλίο στους 37 °C, με ανάδευση για 30 min, χρησιμοποιώντας ένα Thermoshaker for Microplates, σειράς PHMP.
- Για να τερματιστεί η αντίδραση, το τρυβλίο μεταφέρεται σε πάγο για 5 min, έως ότου επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου για μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με συσκευή Nanodrop 2000. Η φωτομετρική ανίχνευση πραγματοποιείται στα 562 nm.

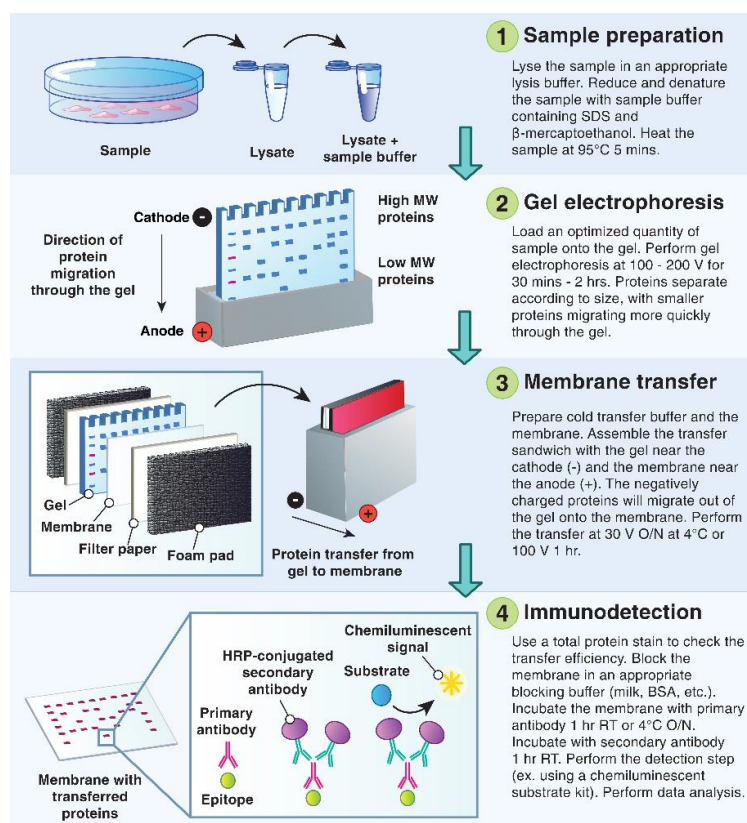
Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση αναγωγής του Cu²⁺ σε Cu⁺, όπου οι πρωτεΐνες χρησιμεύουν ως αναγωγικοί παράγοντες σε ένα αλκαλικό περιβάλλον. Η ανίχνευση του Cu⁺ πραγματοποιείται χρωματομετρικά, χρησιμοποιώντας δικινχονικό οξύ, το οποίο περιλαμβάνει την κατασκευή μιας τυπικής καμπύλης, βασισμένης σε γνωστές συγκεντρώσεις λευκωματίνης ορού βοοειδών. Η, εν λόγω, αντίδραση διαφαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 86: Αντίδραση αναγωγής του Cu^{2+} σε Cu^+

(<https://onelab.andrewalliance.com/library/bca-colorimetric-protein-assay-X5nPg0gP>)

5.1.10 Ανοσοαποτύπωση Western Blot



Εικόνα 87: Απεικόνιση πειραματικής πορείας Western Blot σε 4 βήματα

(<https://www.antibodies.com/applications/western-blotting>)

Στην ανοσοαποτύπωση, είναι δυνατόν να αξιοποιηθούν δείγματα, με πρωτεϊνικό περιεχόμενο, από εκχυλίσματα κυττάρων έως εκχυλίσματα ιστών κ.ά. Το πρώτο στάδιο για τη Western Blot είναι η λύση και διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, με την χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων. Μόλις αρχίσει η λύση, απελευθερώνονται ένζυμα που μπορούν να προκαλέσουν πρωτεόλυση και αποφωσφορυλίωση, ως εκ τούτου, η λύση, κατά κανόνα, πραγματοποιείται σε πάγο και παρουσία αναστολέων πρωτεασών, για την πρόληψη της αποδόμησης των πρωτεϊνών και αναστολέων φωσφατάσης, για την πρόληψη της αποφωσφορυλίωσης.

Η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης εξαρτάται από την υποκυτταρική θέση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Το ρυθμιστικό διάλυμα RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay), το οποίο περιέχει SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), είναι κατάλληλο για την παρασκευή εκχυλισμάτων ολόκληρων κυττάρων, μεμβρανικών εκχυλισμάτων και πυρηνικών εκχυλισμάτων, αλλά διαταράσσει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Μετά τη λύση, τα δείγματα πρέπει να διηθούνται ή να φυγοκεντρίζονται για την απομάκρυνση των αδιάλυτων κυτταρικών υπολειμμάτων. Στη συνέχεια προσδιορίζονται οι ολικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών των δειγμάτων για να διευκολυνθεί η ισόποση φόρτωση στο πήκτωμα για ηλεκτροφόρηση. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίζεται με τη χρήση βιοχημικών χρωματομετρικών ή φθορισμομετρικών δοκιμασιών σε συνδυασμό με φασματοφωτόμετρο. Η δοκιμασία BCA, που περιγράφηκε παραπάνω, είναι συμβατή με απορρυπαντικά και μεταλλικά αντιδραστήρια, αλλά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με αναγωγικούς παράγοντες.

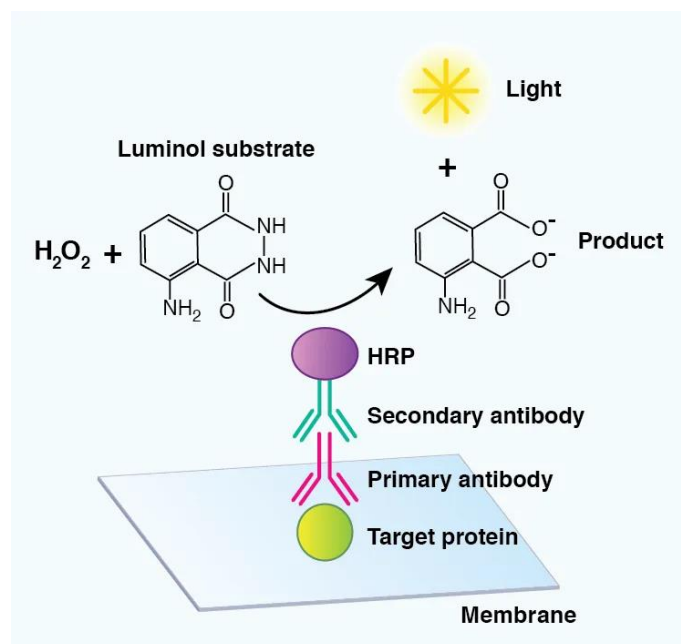
Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά δείγματα αραιώνονται κατάλληλα σε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος που περιέχει γλυκερόλη, για να αυξηθεί η πυκνότητα του δείγματος, και μπλε της βρωμοφαινόλης, για να παρατηρηθεί η μετανάστευση του δείγματος μέσω της πηκτής. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται συνήθως αναγωγικοί παράγοντες θειόλης (DTT ή β-μερκαπτοαιθανόλη) για τη μείωση των δισουλφιδικών δεσμών και την εξάλειψη της δομής υψηλότερης τάξης στα πρωτεϊνικά δείγματα. Το πρωτεϊνικό δείγμα μπορεί να συμπυκνωθεί μέσω πρωτεϊνικής κατακρήμνισης με TCA/ακετόνη, εάν είναι απαραίτητο.

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή μεταφέρονται στη συνέχεια σε μεμβράνη στερεάς φάσης. Η διαδικασία αυτή απαιτείται επειδή οι πρωτεΐνες είναι πιο προσιτές στα αντισώματα στην επιφάνεια αυτών των μεμβρανών. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος blotting είναι μέσω της ηλεκτροφορητικής μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, η οποία γίνεται συνήθως με υγρή ή ημίξηρη μεταφορά.

Σε επίπεδο ανοσοανίχνευσης, καθώς οι μεμβράνες στερεάς φάσης που χρησιμοποιούνται στην ανοσοαποτύπωση, διαθέτουν υψηλή συγγένεια για τις πρωτεΐνες, τα αντισώματα που εφαρμόζονται στη μεμβράνη μπορούν να

προσκολληθούν σε αυτήν, με μη ειδικό τρόπο. Για να αποφευχθεί αυτή η δέσμευση υποβάθρου και να βελτιωθεί ο λόγος σήματος προς θόρυβο του σταδίου ανίχνευσης, η μεμβράνη πρέπει να «μπλοκαριστεί» πριν από την επώαση αντισωμάτων. Τα ειδικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για το μπλοκάρισμα και ο χρόνος επώασης πρέπει να καθορίζονται εμπειρικά. Τα συνήθη αντιδραστήρια αποκλεισμού περιλαμβάνουν το μη λιπαρό γάλα και τη λευκωματίνη ορού βοοειδών (BSA). Αυτά μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα Tris (TBS) ή σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (PBS) και μπορεί να προστεθεί 0,1% Tween-20 για την αποφυγή μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Το TBS θα πρέπει να χρησιμοποιείται ιδιαίτερα εάν η μέθοδος ανίχνευσης χρησιμοποιεί αλκαλική φωσφατάση (AP), καθώς το PBS μπορεί να παρεμβαίνει στην ενζυμική δραστηριότητά της.

Μεταξύ των βημάτων επώασης αντισωμάτων, η μεμβράνη πρέπει να πλένεται με TBS + 0,1% Tween 20 (TBST) ή PBS + 0,1% Tween 20 (PBST) για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντισωμάτων και τη μείωση του σήματος υποβάθρου. Ενώ κατά την επώαση με τα αντισώματα, οι μεμβράνες τοποθετούνται σε rocking platform, υπό κλίση. Μάλιστα, το πρωτογενές αντίσωμα αραιώνεται και αυτό στο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης ή στο ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού, με ελαφρώς μειωμένο ποσοστό παράγοντα αποκλεισμού για να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Η πιο κοινή μέθοδος ανίχνευσης κατά την εμφάνιση των μεμβρανών, χρησιμοποιεί δευτερογενή αντισώματα συνδεδεμένα με ένζυμο σε συνδυασμό με χημειοφωταύγεια, χρωμογόνο ή φθορίζον υπόστρωμα. Τα υποστρώματα χημειοφωταύγειας είναι συμβατά με την ψηφιακή απεικόνιση. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται συνήθως ένα σύστημα απεικόνισης με κάμερα CCD, κλεισμένο σε σκοτεινό θάλαμο. Τα δευτερογενή αντισώματα με φθορίζουσα σήμανση μπορούν να παρέχουν φωτεινότερο σήμα και να επιτρέψουν την ανίχνευση περισσότερων από μία πρωτεϊνών ταυτόχρονα, αλλά απαιτούν ακριβό εξειδικευμένο εξοπλισμό απεικόνισης. Ένα δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με υπεροξειδάση χρένου (HRP) μετατρέπει τη λουμινόλη παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε χημειοφωταύγεια και 3-αμινοφθαλικό άλας, μεσολαβώντας στην οπτικοποίηση μιας πρωτεΐνης-στόχου, όπως διαφαίνεται και στην παρακάτω εικόνα [92].



Εικόνα 88: Απεικόνιση της πρωτεΐνης-στόχου με τη βοήθεια της αντίδρασης με HRP

(<https://www.antibodies.com/applications/western-blotting>)

5.1.11 Φαρμακολογικοί Χειρισμοί

Οι όποιοι φαρμακολογικοί χειρισμοί εφαρμόζονται εξαρτώνται από το είδος του αντικειμένου της μελέτης, το είδος της κυτταρικής σειράς, το εύρος των συγκεντρώσεων, που αξιοποιούνται και το αν πρόκειται για μονοθεραπεία ή συγχορήγηση. Λαμβάνει χώρα η επώασή των καρκινικών κυττάρων σε πιάτα 96 φρεατίων, στους 37 °C, για 24 ώρες. Έπειτα, πραγματοποιείται η χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων είτε αντιψυχωσικών είτε αντικαρκινικών φαρμάκων ή συνδυασμού τους (ή οποιωνδήποτε άλλων ενώσεων), για διαφορετικούς χρόνους επώασης: 24, 48, 72, 96 ώρες. Η χορήγηση των φαρμάκων λαμβάνει χώρα σε καθημερινή βάση, μέχρι το πέρας του πειράματος. Τέλος, συχνά, αξιοποιείται ως θετικός μάρτυρας, επαγωγέας της απόπτωσης, υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2 , Sigma-Aldrich®, Missouri, USA), για 7 ώρες.

5.1.12 Στατιστική Ανάλυση

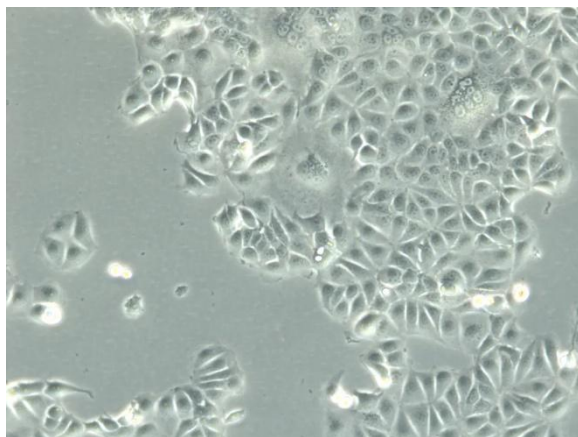
Τα δεδομένα στα γραφήματα αποτυπώνονται ως Μέσος Όρος $\pm$ Τυπικό Σφάλμα (Mean $\pm$ SE) και αξιολογούνται με τη δοκιμασία Student's test. Ως επίπεδο σημαντικότητας όλων των αναλύσεων καθορίζεται, συνήθως, όριο μικρότερο ή ίσο του 0.05 ($P < 0.05$).

5.1.13 Κυτταρικές σειρές

Στην εργασία, γίνεται λόγος, για τις κυτταρικές σειρές: MCF-7, MCF-10A, TAMR-1, MDA-MB-231, οι οποίες αξιοποιούνται σε *in vitro* αξιολογήσεις των αντινεοπλασματικών ιδιοτήτων αντιψυχωσικών.

MCF-7

Το MCF-7 είναι μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού με υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης και γλυκοκορτικοειδών. Προέρχεται από την υπεζωκοτική συλλογή μιας 69χρονης Καυκάσιας με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (αδενοκαρκίνωμα) το 1970 από τον Dr Soule του Michigan Cancer Foundation, Detroit, MI. Τα κύτταρα MCF-7 είναι χρήσιμα για *in vitro* μελέτες του μαστού επειδή διατηρούν αρκετά ιδανικά χαρακτηριστικά που χαρακτηρίζουν το μαστικό επιθήλιο, όπως η επεξεργασία των οιστρογόνων, υπό μορφή οιστραδιόλης, μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Πρόκειται για την πρώτη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού που ανταποκρίνεται στις ορμόνες. Οι μοναδικές ιδιότητές της είναι χρήσιμες για την πειραματική θεραπευτική. Είναι επίσης ευαίσθητα στην κυτταροκερατίνη. Όταν αναπτύσσονται *in vitro*, τα κύτταρα είναι ικανά να σχηματίζουν θόλους και τα κύτταρα που μοιάζουν με επιθήλια αναπτύσσονται σε μονοστρώματα [51].

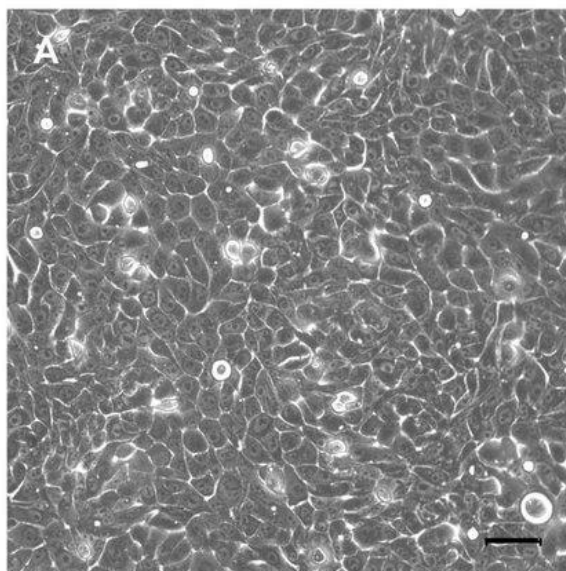


Εικόνα 89: Μορφολογία κυτταρικής σειράς MCF-7

(<https://www.cytion.com/MCF-7-Cells/300273>)

MCF-10A

Η κυτταρική σειρά MCF 10A είναι μια μη καρκινική επιθηλιακή κυτταρική σειρά. Τα κύτταρα είναι θετικά για τις επιθηλιακές σιαλομυκίνες, τις κυτταροκερατίνες και το αντιγόνο των λιποσφαιρίων του γάλακτος. Παρουσιάζουν τρισδιάστατη ανάπτυξη σε κολλαγόνο και σχηματίζουν θόλους, σε συγκολλημένες καλλιέργειες. Μέχρι στιγμής, τα κύτταρα δεν έχουν δείξει σημάδια τελικής διαφοροποίησης ή γήρανσης. Η κυτταρική σειρά επιδεικνύει ανταπόκριση στην ινσουλίνη, τα γλυκοκορτικοειδή, την εντεροτοξίνη της χολέρας και τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF). Τα κύτταρα MCF-10A εκφράζουν, επίσης, ειδικά αντιγόνα του μαστού, όπως ανιχνεύεται με θετική αντίδραση με τα μονοκλωνικά αντισώματα MFA-Breast και MC-5. Η περιεκτικότητα του μέσου σε ασβέστιο ασκεί ισχυρή επίδραση στη μορφολογία των κυττάρων. Έχουν απομονωθεί από 36χρονη Καυκάσια [8].



Εικόνα 90: Μορφολογία κυτταρικής σειράς MCF-10A

(https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-MCF-10A-in-2D-and-3D-cultures-A-Phase-contrast-microscopy-of-MCF-10A_fig3_265261050)

TAMR-1

Η MCF-7/TAMR-1 είναι μια ανθεκτική στην ταμοξιφαίνη κυτταρική σειρά, που προέρχεται από την ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF-7/S0.5, ύστερα από μακροχρόνια θεραπεία με το φάρμακο ταμοξιφαίνη [51].

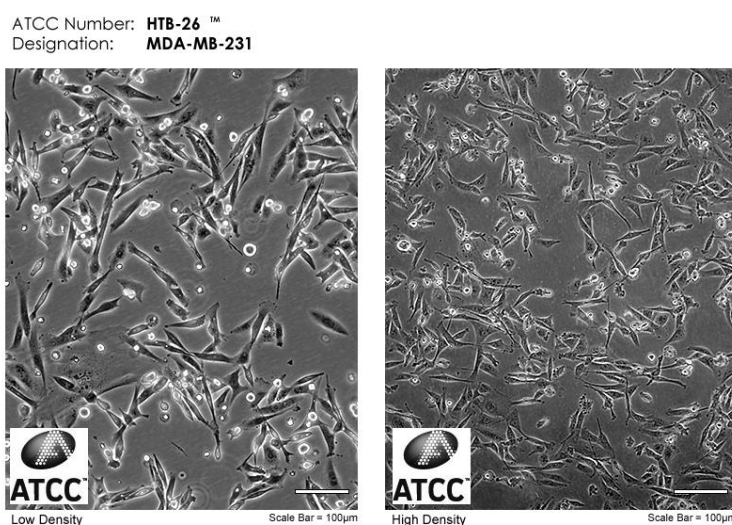


Εικόνα 91: Μορφολογία κυτταρικής σειράς (MCF-7/TAMR-1)

(https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/MCF-7-TAMR-1-Human-Breast-Cancer-Cell-Line,MM_NF-SCC101)

MDA-MB-231

Η κυτταρική σειρά MDA-MB-231 (που απομονώθηκε στο MD Anderson από υπεζωκοτική συλλογή ασθενούς, με διηθητικό καρκίνωμα του πόρου) χρησιμοποιείται, κατά κανόνα, για τη μοντελοποίηση καρκίνου του μαστού, σε προχωρημένο στάδιο. Αυτή η κυτταρική σειρά είναι αρνητική ως προς ER, PR και E-cadherin και εκφράζει μεταλλαγμένο p53. Κατά τη δημιουργία προφίλ μικροσυστοιχιών, το γονιδίωμα των κυττάρων MDA-MB-231 συσσωρεύεται με τον βασικό υπότυπο του καρκίνου του μαστού. Δεδομένου ότι τα κύτταρα στερούνται του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα HER2, αποτελούν ένα καλό μοντέλο τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. Κλείνοντας, τα κύτταρα MDA-MB-231 είναι διεισδυτικά in vitro και όταν εμφυτεύονται ορθοτοπικά, παράγουν ξενομοσχεύματα, που προβαίνουν σε αυθόρμητη μετάσταση σε λεμφαδένες [51].



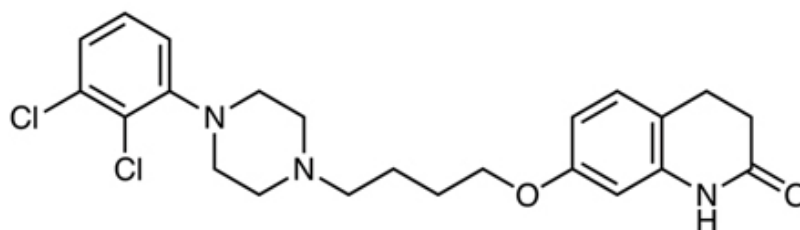
Εικόνα 92: Μορφολογία κυτταρικής σειράς MDA-MB-231

(<https://www.atcc.org/products/htb-26>)

6. Παρουσίαση Ενδεικτικών Ευρημάτων της Χρήσης Αντιψυχωσικών στο πλαίσιο της Επαναστόχευσης Φαρμάκων

6.1 Αξιολόγηση της επίδρασης της αριπιπραζόλης σε καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού

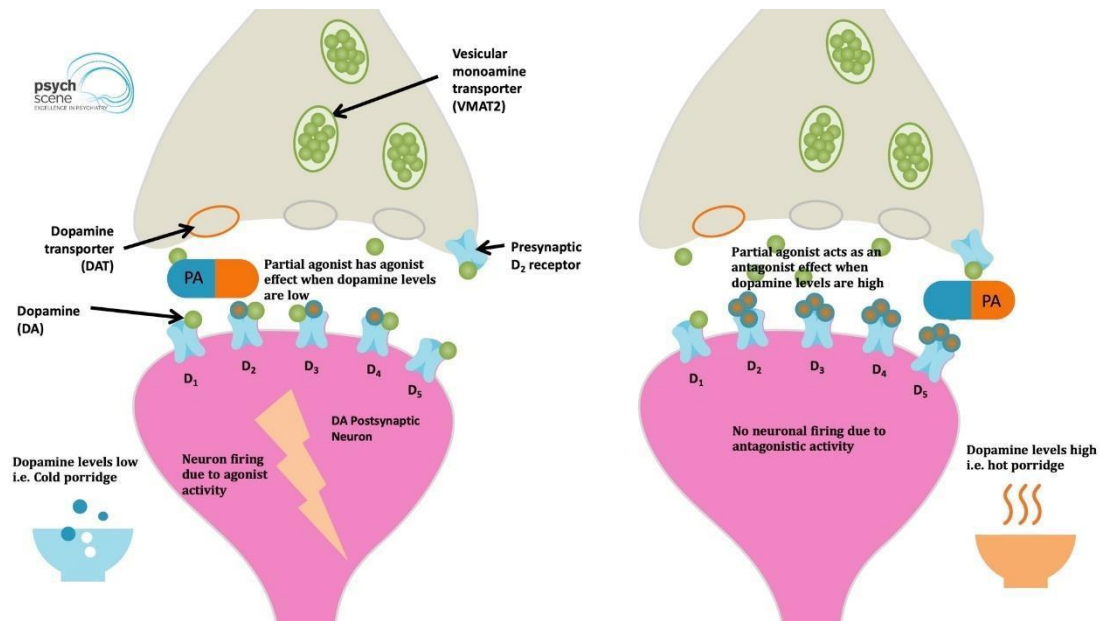
Η αριπιπραζόλη είναι ένα άτυπο αντιψυχωσικό φάρμακο. Δρα ως μερικός αγωνιστής των υποδοχέων ντοπαμίνης D2 (DRD2). Η αριπιπραζόλη είναι επίσης ανταγωνιστής των υποδοχέων σεροτονίνης 2A (HTR2A) και αγωνιστής των υποδοχέων σεροτονίνης 1A (HTR1A). Επιπλέον, η αριπιπραζόλη είναι ανταγωνιστής στους άλφα1 αδρενεργικούς υποδοχείς. Επιδεικνύει, επίσης, υψηλή συγγένεια για τους υποδοχείς ντοπαμίνης D3 (DRD3), μέτρια συγγένεια για τους υποδοχείς ντοπαμίνης D4 (DRD4), HTR2C, HTR7 και υποδοχείς H1 ισταμίνης (HRH1).



Εικόνα 93: Ο συντακτικός τύπος της αριπιπραζόλης

(<https://www.tcichemicals.com/IN/en/p/A2496>)

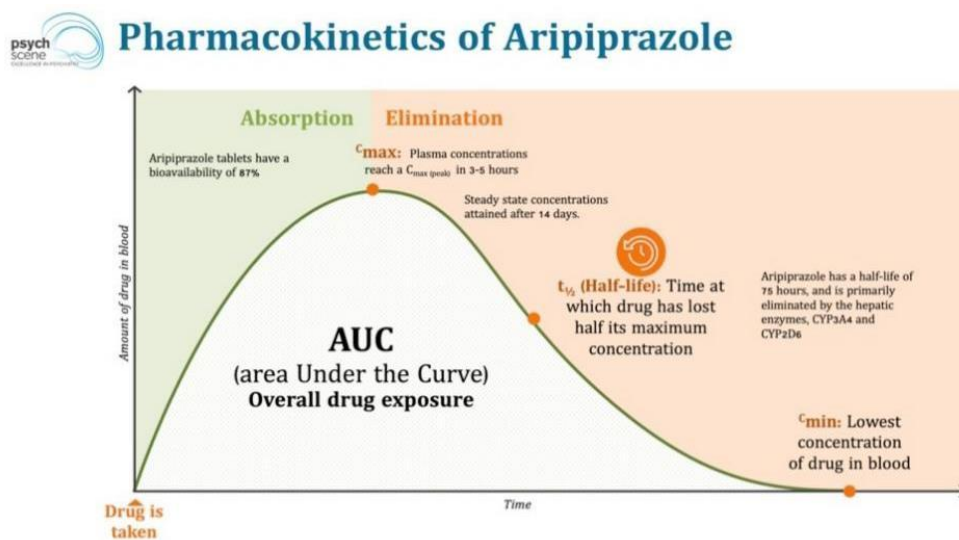
Σε μελέτες *in vitro*, η αριπιπραζόλη συσχετίστηκε με αυξημένη δραστηριότητα προαγωγέα νευροτροφικού παράγοντα (BDNF) και αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της συνθάσης γλυκογόνου κινάσης 3-B (GSK3B) και πρωτεΐνης λεμφώματος B κυττάρων (BCL2) σε κύτταρα που έχουν υποστεί αγωγή με αριπιπραζόλη.



Εικόνα 94: Μηχανισμός δράσης αριπιπραζόλης

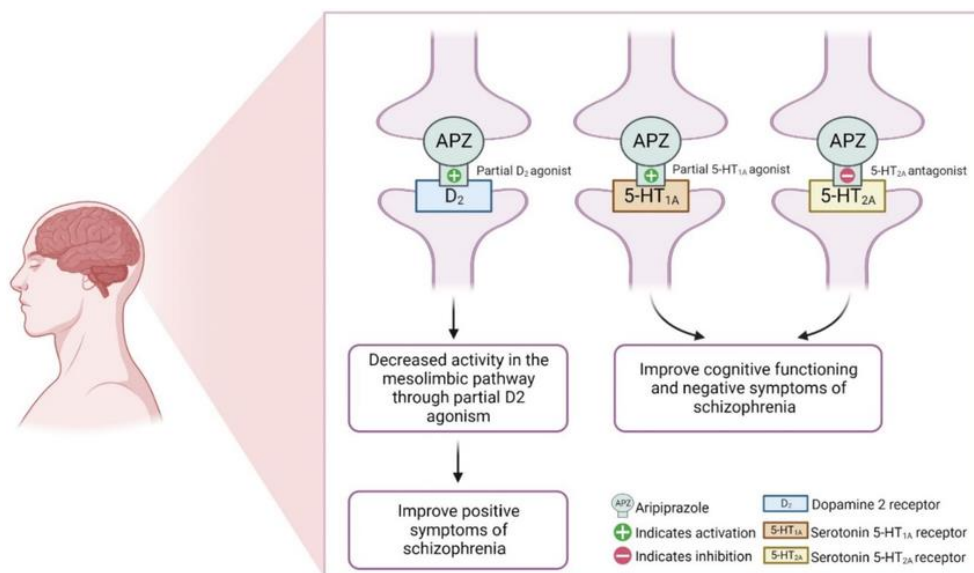
(<https://psychscenehub.com/psychinsights/aripiprazole-mechanism-of-action-psychopharmacology-and-clinical-application/>)

Τα δισκία αριπιπραζόλης έχουν βιοδιαθεσιμότητα 87% και οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα σημειώνονται εντός 3 έως 5 ωρών με τις συγκεντρώσεις σε σταθερή κατάσταση να επιτυγχάνονται μετά από 14 ημέρες. Η αριπιπραζόλη έχει χρόνο ημιζωής 75 ωρών και μεταβολίζεται κυρίως από τα ηπατικά ένζυμα, CYP3A4 και CYP2D6. Τα επίπεδα ηπατικής έκφρασης αυτών των ενζύμων είναι γνωστό ότι ποικίλουν μεταξύ των ατόμων [6].



Εικόνα 95: Η φαρμακοκινητική της αριπιπραζόλης

(<https://psychscenehub.com/psychinsights/psychopharmacology-of-aripiprazole-long-acting-injection/>)



Εικόνα 96: Η Φαρμακοδυναμική της αριπιπραζόλης

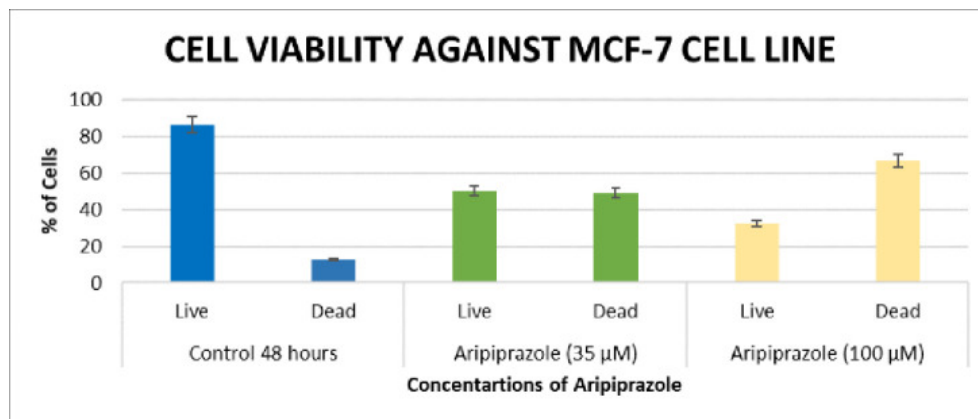
(<https://psychscenehub.com/psychinsights/psychopharmacology-of-aripiprazole-long-acting-injection/>)

Η αριπιπραζόλη είναι σε θέση να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7, με τρόπο, μάλιστα, δόσοεξαρτώμενο. Η δράση της αυτή βρέθηκε ότι οφείλεται στην επαγόμενη απόπτωση, όπως παρατηρήθηκε στην ανάλυση της αννεξίνης V-FITC/PI κυττάρων, που υποβλήθηκαν σε αγωγή με αριπιπραζόλη.

Παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά κυτταρικού πληθυσμού στα πρώιμα και όψιμα στάδια της απόπτωσης, αλλά και σημαντική πυρηνική συμπύκνωση σε, χρωσμένους με DAPI, πυρήνες κυττάρων MCF-7, γεγονός που επιβεβαίωσε ότι η αριπιπραζόλη εμφανίζει προ-αποπτωτική δράση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, MCF-7.

Επιπρόσθετα, μέσω Western Blot, εξακριβώθηκε ότι η ικανότητα της αριπιπραζόλης να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση ορισμένων παραγόντων, με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και, ως απόρροια αυτού, στην εξέλιξη του καρκίνου.

Ενδεικτικά, η αξιολόγηση της έκφρασης προ-αποπτωτικών γονιδίων, όπως αυτά των κασπασών 3 και BCL-10 (B-cell lymphoma/leukemia 10) έδειξαν την επαγωγή απόπτωσης, ενώ η έκφραση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων BCL2 (B-cell lymphoma/leukemia 2) και c-myc, μειώθηκε παρουσία αριπιπραζόλης, εύρημα που συνηγορεί υπέρ της αποπτωτικής δράσης του φαρμάκου. Ακολούθως, παρατίθενται εικόνες που αναδεικνύουν τα προαναφερθέντα πειραματικά αποτελέσματα.



Εικόνα 97: Γραφική αναπαράσταση της ποσοστιαίας αναστολής της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων. Με μπλε αναπαρίστανται τα ποσοστά ζωντανών και νεκρών κυττάρων στην ομάδα ελέγχου, παρουσία αριπιπραζόλης 35 μΜ, με πράσινο και 100 μΜ, με κίτρινο. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7398703/>)

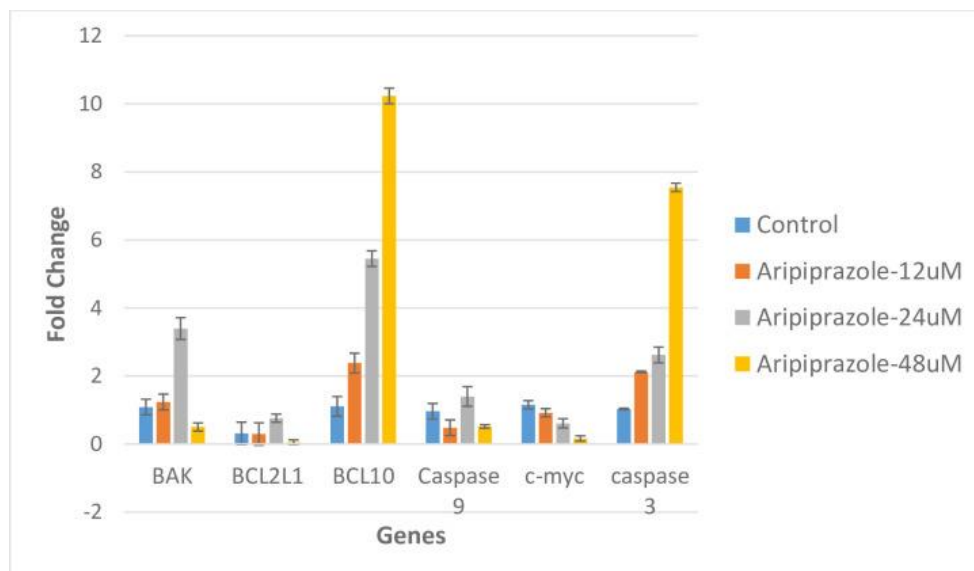
Στη γραφική παράσταση, διαφαίνεται η δόσοεξαρτώμενη ικανότητα της αριπιπραζόλης να επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, καθώς ο πληθυσμός των νεκρών κυττάρων αυξάνεται με επώαση των MCF-7 με αριπιπραζόλη, σε μεγαλύτερη, μάλιστα, συγκέντρωση.

Στην ακόλουθη γραφική παράσταση, απεικονίζονται οι μεταβολές στο λόγο της σχετικής έκφρασης (fold change) του mRNA παραγόντων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, με αντιαποπτωτικό ή αποπτωτικό ρόλο. Ξεχωριστή έμφαση δίνεται στους παράγοντες που επάγουν την απόπτωση, όπως η κασπάση 3 και το γονίδιο BCL-10 (B-cell lymphoma/leukemia 10), ο λόγος σχετικής έκφρασης του mRNA, των οποίων, υπερβαίνει, κατά προσέγγιση, τις αριθμητικές τιμές 10 και 8, αντίστοιχα, γεγονός, που καταμαρτυρά την υπερέκφρασή τους, όταν γίνεται χορήγηση αριπιπραζόλης, ιδίως σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (48 μΜ). Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με συγκριτική μέθοδο CT, μετά την επώαση με αριπιπραζόλη και καμπτοθεκίνη. Ως γονίδια ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν β-ακτίνη και GAPDH.

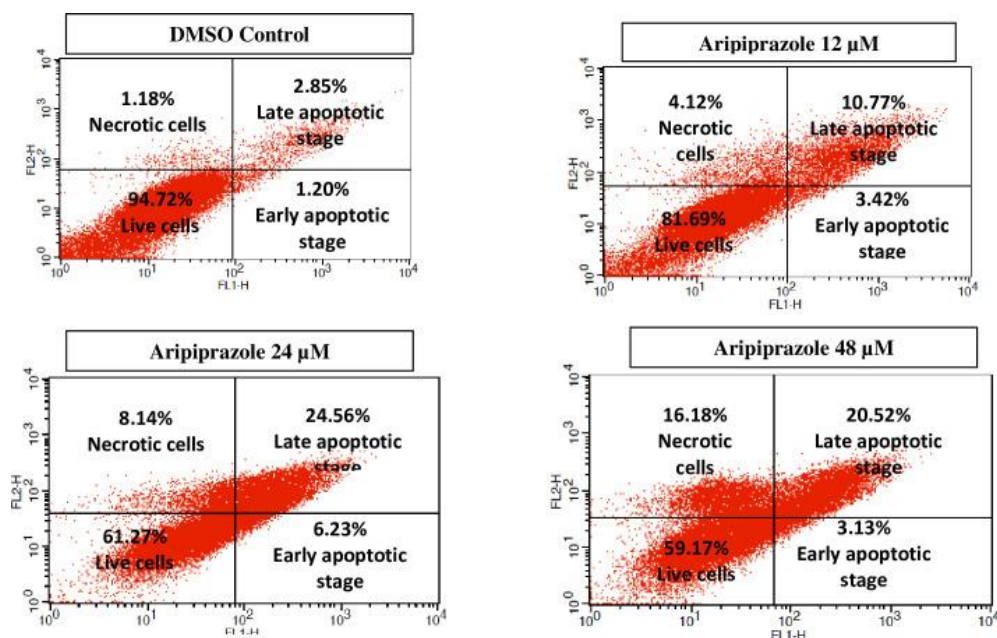
Ελήφθησαν τιμές CT, τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν έναντι της ακτίνης και υπολογίστηκε ο λόγος σχετικής έκφρασης με τη μέθοδο $\Delta\Delta CT$. Ο λόγος αυτός υπολογίζεται μέσω της σχέσης: $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta CT}$, όπου $\Delta\Delta CT = \Delta Ct$ (δείγματος υπό εξέταση) – ΔCt (ομάδας ελέγχου) για το κάθε γονίδιο, με τιμή κανονικοποιημένων πρωτογενών δεδομένων, $\Delta CT = Ct$ (γονιδίου στόχου) – Ct (γονιδίου αναφοράς). Υπογραμμίζεται ότι τιμή λόγου σχετικής έκφρασης άνω του 1 υποδηλώνει υπερέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στους ασθενείς συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ από 0-1 δηλώνει υποέκφραση (αν ο λόγος ισούται με 1, υποδηλώνεται απουσία διαφοράς στην έκφραση).

Η έκφραση και των δύο αντι-αποπτωτικών γονιδίων (BCL2L1, και c-myc) μειώθηκε παρουσία αριπιπραζόλης. Η καθοδική ρύθμιση του c-myc ήταν με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Μεταξύ των προ-αποπτωτικών γονιδίων (BCL-10, BAK-1 και κασπάσες 3 και

9), το BCL-10 και η κασπάση 3 ρυθμίστηκαν προς τα πάνω με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ το BAK-1 (BCL2 Antagonist/Killer 1) και η κασπάση 9 ρυθμίστηκαν προς τα πάνω στα 24 μM . Τα δεδομένα αυτά εξήχθησαν μέσω qRT-PCR.

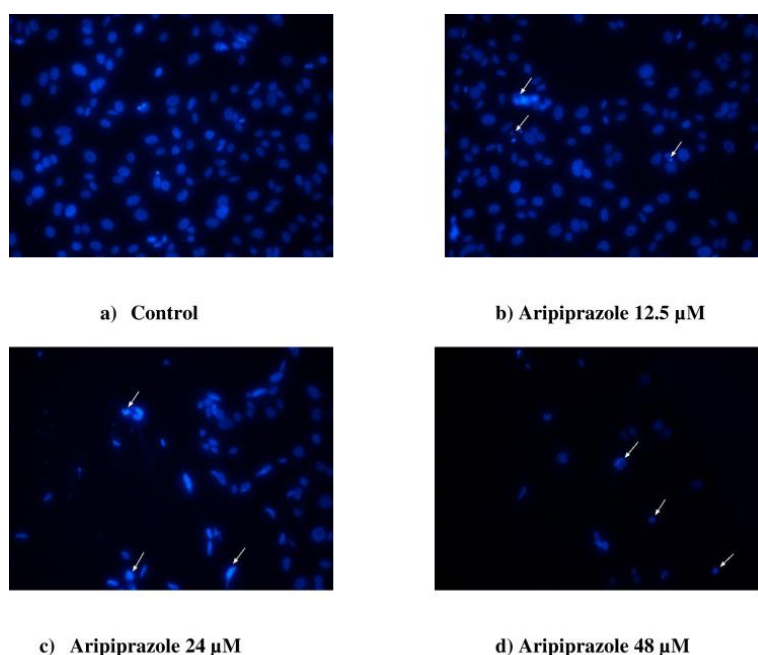


Εικόνα 98: Γραφική αναπαράσταση μεταβολών στο λόγο της σχετικής έκφρασης (fold change) mRNA των: κασπάσης 3, κασπάσης 9, c-myc, BAK-1, BCL-1 και BCL-10 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7398703/>)



Εικόνα 99: Dot plot: Κατανομή των ζωντανών κυττάρων (κάτω αριστερά), των νεκρών κυττάρων (ή νεκρωτικών) (πάνω αριστερά), των πρώιμων αποπτωτικών (κάτω δεξιά) και των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων (πάνω δεξιά), στα τέσσερα τεταρτημόρια των διαγραμμάτων κουκκίδων κυτταρικών σειρών, με ή χωρίς επώαση με αριπιπραζόλη (12, 24 και 48 μM) κυτταρικών σειρών MCF-7. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7398703/>)

Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με αριπιπραζόλη, σε συγκεντρώσεις 12, 24 και 48 μM και αναλύθηκαν, με την πάροδο 48 ωρών, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Το DMSO χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control και έδειξε μεγάλο ποσοστό ζωντανών κυττάρων, αλλά και ελάχιστα κύτταρα σε όψιμο και πρώιμο αποπτωτικό στάδιο, αντίστοιχα. Αντίθετα, η αριπιπραζόλη στα 12 μM προκάλεσε σημαντική αύξηση της απόπτωσης στα πρώιμα και όψιμα στάδια της απόπτωσης, καθώς και των νεκρωτικών κυττάρων. Η αύξηση της συγκέντρωσης της αριπιπραζόλης (24 μM) οδήγησε σε σημαντικά ενισχυμένη απόπτωση στα πρώιμα και όψιμα αποπτωτικά στάδια, αλλά και στα νεκρωτικά. Ακόμα, ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων μειώθηκε σημαντικά σε κύτταρα, που υποβλήθηκαν σε αγωγή με αριπιπραζόλη 24 μM . Είναι αξιοσημείωτο ότι αποτελέσματα ήταν δοσοεξαρτώμενα, καθώς η υψηλότερη συγκέντρωση αριπιπραζόλης, δηλαδή 48 μM , έδειξε περαιτέρω μείωση στα ζωντανά κύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αριπιπραζόλη έχει αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην κυτταρική σειρά MCF-7, μεσολαβώντας στην απόπτωση, όπως είναι εμφανές με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων στο νεκρωτικό στάδιο.



*Εικόνα 100: Ανάλυση απόπτωσης που προκαλείται από αριπιπραζόλη σε κύτταρα καρκίνου του μαστού MCF-7, με χρωστική DAPI. α) έλεγχος (χωρίς θεραπεία MCF-7), β) αριπιπραζόλη 12,5 μM , γ) αριπιπραζόλη 24 μM , δ) αριπιπραζόλη 48 μM . Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με DAPI (μπλε).
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7398703/>)*

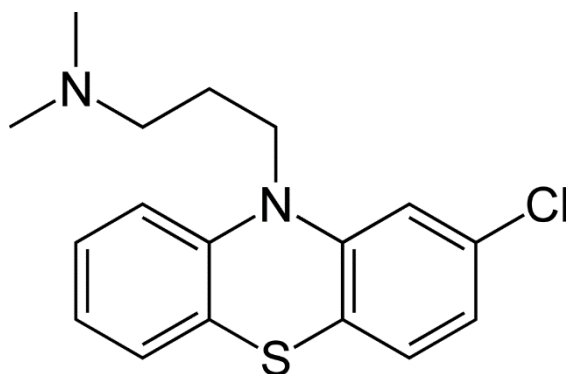
Η πυρηνική συμύκνωση είναι ένας από τους δείκτες της απόπτωσης. Περιλαμβάνει κατακερματισμό του DNA και αύξηση στη φάση G1. Ως εκ τούτου, η επίδραση της αριπιπραζόλης στα κύτταρα μελετήθηκε περαιτέρω με ανάλυση της συμύκνωσης των πυρήνων. Οι κηλίδες DAPI συνδέονται με την πλούσια σε A-T (Αδενίνη-Θυμίνη) περιοχή του DNA περνώντας από την άθικτη κυτταρική μεμβράνη.

Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε DAPI για τον προσδιορισμό της πυρηνικής συμύκνωσης των κυττάρων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με αριπιπραζόλη (12,5, 24 και 48 μM). Τα κύτταρα που επώαστηκαν με αριπιπραζόλη έδειξαν σημαντική πυρηνική συμύκνωση και κατακερματισμό του DNA, με ταυτόχρονη ελάττωση του κυτταρικού πληθυσμού.

Ενθαρρυντικά φαίνεται να είναι τα ευρήματα της *in vitro* χορήγησης αριπιπραζόλης και σε άλλες κυτταρικές σειρές, όπως η MDA-MB-231, κυτταρική σειρά τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, η AU565, κυτταρική σειρά Her2 θετικού καρκίνου του μαστού και η BT-474, κυτταρική σειρά τριπλά θετικού καρκίνου του μαστού, με τα ποσοστά $\text{IC}_{50} \pm \text{SEM}$ (μM), να είναι, αντίστοιχα: 19.83 ± 0.27 , 18.02 ± 0.44 και 36.42 ± 0.12 [93].

6.2 Αξιολόγηση της επίδρασης της χλωροπρομαζίνης σε καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού

Η χλωροπρομαζίνη είναι ένας ψυχοτρόπος παράγοντας που ενδείκνυται για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας. Ασκει επίσης ηρεμιστική και αντιεμετική δράση. Η χλωροπρομαζίνη έχει δράσεις σε όλα τα επίπεδα του κεντρικού νευρικού συστήματος-κυρίως σε επίπεδα υποφλοιωδών περιοχών-καθώς και σε πολλαπλά συστήματα οργάνων. Έχει ισχυρή αντιαδρενεργική και ασθενέστερη περιφερική αντιχολινεργική δράση. Η δράση του γαγγλιακού αποκλεισμού είναι σχετικά μικρή. Διαθέτει, επίσης, ελαφρά αντισταμινική και αντισεροτονική δράση.



Εικόνα 101: Συντακτικός τύπος χλωροπρομαζίνης

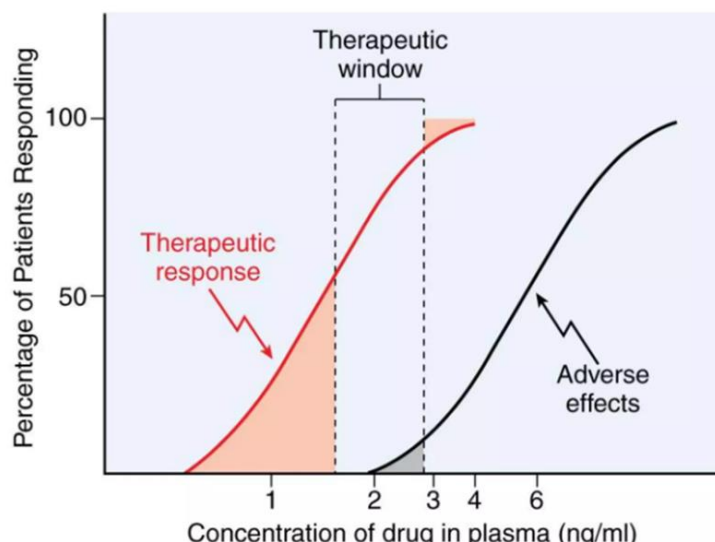
(<https://psychology.fandom.com/wiki/Chlorpromazine>)

Η χλωροπρομαζίνη δρα ως ανταγωνιστής (ανασταλτικός παράγοντας) σε διαφορετικούς μετασυναπτικούς υποδοχείς - σε ντοπαμινεργικούς υποδοχείς (υποτύποι D1, D2, D3 και D4 - διαφορετικές αντιψυχωσικές ιδιότητες σε παραγωγικά και μη παραγωγικά συμπτώματα), σε σεροτονινεργικούς υποδοχείς (5-HT1 και 5-HT , με

αγγολυτικές, αντικαταθλιπτικές και αντιεπιθετικές ιδιότητες καθώς και μετριασμό των εξωπυραμιδικών παρενεργειών, αλλά και που οδηγεί σε αύξηση βάρους, πτώση της αρτηριακής πίεσης, καταστολή και δυσκολίες εκσπερμάτωσης), στους ισταμινεργικούς υποδοχείς (υποδοχείς H1, καταστολή, αντίεμεση, ίλιγγος, πτώση της αρτηριακής πίεσης και αύξηση βάρους), άλφα1/άλφα2-υποδοχείς (αντισυμπαθομιμητικές ιδιότητες, μείωση της αρτηριακής πίεσης, αντανακλαστική ταχυκαρδία, ίλιγγος, καταστολή, υπερσιελόρροια και ακράτεια καθώς και σεξουαλική δυσλειτουργία, αλλά μπορεί επίσης να μετριάσουν τον ψευδοπαρκινσονισμό - αμφιλεγόμενο) και τέλος στους μουςκαρινικούς (χολινεργικούς) υποδοχείς M1/M2 (προκαλώντας αντιχολινεργικά συμπτώματα όπως ξηροστομία, θολή όραση, δυσκοιλιότητα, δυσκολία/αδυναμία ούρησης, φλεβοκομβική ταχυκαρδία, αλλαγές στο ΗΚΓ και απώλεια μνήμης, αλλά η αντιχολινεργική δράση μπορεί να μετριάσει την εξωπυραμιδική πλευρά- υπάρχοντα). Επιπλέον, η χλωροπρομαζίνη είναι ένας ασθενής προσυναπτικός αναστολέας της επαναπρόσληψης ντοπαμίνης, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε (ήπια) αντικαταθλιπτικά και αντιπαρκινσονικά αποτελέσματα. Αυτή η δράση θα μπορούσε επίσης να ευθύνεται για την ψυχοκινητική διέγερση και την ενίσχυση της ψύχωσης (πολύ σπάνια σημειώνεται σε κλινική χρήση).

Μεταβολίζεται εκτενώς στο ήπαρ και τα νεφρά. Μεταβολίζεται εκτενώς από τα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450 CYP2D6 (κύρια οδός), CYP1A2 και CYP3A4. Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 10 έως 12 κύριοι μεταβολίτες. Η υδροξυλίωση στις θέσεις 3 και 7 του πυρήνα της φαινοθειαζίνης και της πλευρικής αλυσίδας N-διμεθυλαμινοπροπυλίου υφίσταται απομεθυλίωση και επίσης μεταβολίζεται σε ένα N-οξείδιο. Στα ούρα, το 20% της χλωροπρομαζίνης και των μεταβολιτών της απεκκρίνονται μη συζευγμένα στα ούρα ως αμετάβλητο φάρμακο, δεμονομεθυλοχλωροπρομαζίνη, δεδιμεθυλοχλωροπρομαζίνη, οι μεταβολίτες σουλφοξειδίου τους και χλωροπρομαζίνη-N-οξείδιο. Το υπόλοιπο 80% αποτελείται από συζευγμένους μεταβολίτες, κυρίως O-γλυκουρονίδια και μικρές ποσότητες αιθερικών θεικών των μονο- και διυδροξυ-παραγώγων της χλωροπρομαζίνης και των μεταβολιτών σουλφοξειδίου τους. Οι κύριοι μεταβολίτες είναι το μονογλυκουρονίδιο της N-δεδιμεθυλοχλωροπρομαζίνης και η 7-υδροξυχλωροπρομαζίνη. Περίπου το 37% της χορηγούμενης δόσης χλωροπρομαζίνης απεκκρίνεται στα ούρα.

Απεκκρίνεται με τα ούρα, τη χολή και τα κόπρανα. Έχει χρόνο ημιζωής μεταξύ 23 και 37 ωρών για το μητρικό φάρμακο και ο ενεργός μεταβολίτης του έχει χρόνο ημιζωής από 10 έως 40 ώρες [93].



Εικόνα 102: Η φαρμακοκινητική της χλωροπρομαζίνης

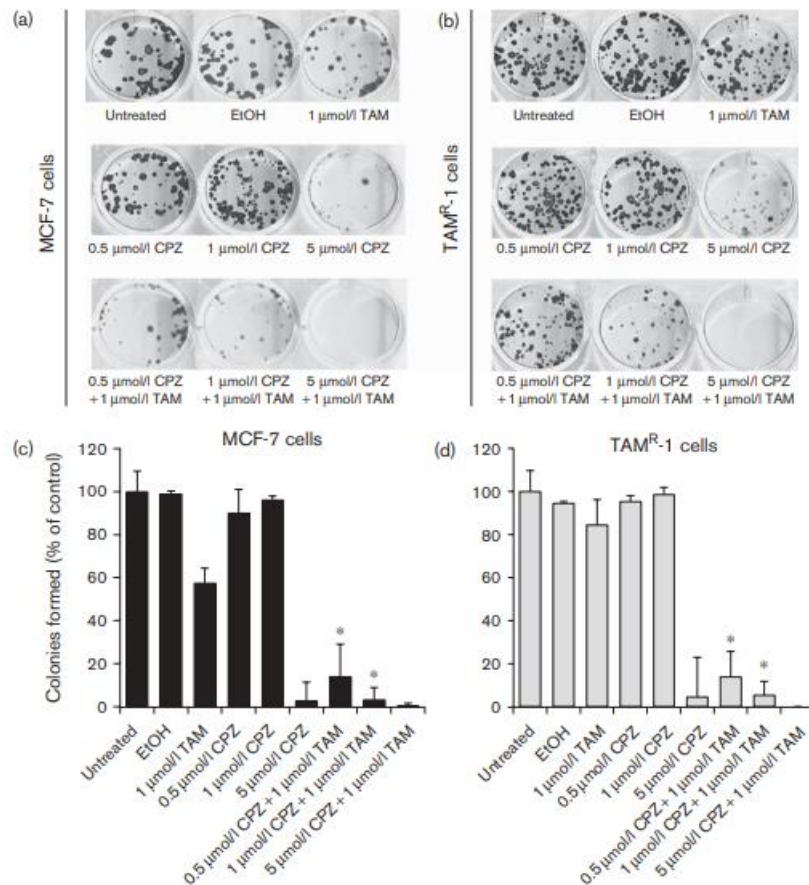
(<https://www.slideshare.net/slideshow/chlorpromazineantipsychotic-drug/9734175>)

Η αντίσταση στην ταμοξιφαίνη είναι ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα στη θεραπεία όγκων του μαστού θετικού υποδοχέα οιστρογόνων, δίχως, μάλιστα, προς το παρόν, να είναι σαφές τι ακριβώς προκαλεί την αντίσταση σε αυτή. Για δεκαετίες, η χλωροπρομαζίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ψυχωσικών ασθενειών, όπως η σχιζοφρένεια. Ωστόσο, η ένωση αναγνωρίζεται, πλέον, και ως φάρμακο πολλαπλής στόχευσης, με ποικίλες πιθανές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα, την αντιστροφή της αντίστασης των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Επιπλέον, η χλωροπρομαζίνη μπορεί να αναστρέψει την αντίσταση σε φάρμακα, που προκαλείται από την υπερέκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης σε καρκινικά κύτταρα. Υπό αυτό το πρίσμα, έχει διερευνηθεί η επίδραση της χλωροπρομαζίνης στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων του μαστού στην ταμοξιφαίνη. Βρέθηκε ότι η χλωροπρομαζίνη λειτούργησε συνεργικά μαζί με την ταμοξιφαίνη, όσον αφορά στην μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης και της μεταβολικής δραστηριότητας, τόσο στην ευαίσθητη σε αντιοιστρογόνα κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού, MCF-7, όσο και σε μια ανθεκτική στην ταμοξιφαίνη κυτταρική σειρά, που δημιουργήθηκε από κύτταρα MCF-7. Σε κύτταρα ευαίσθητα, αλλά και ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη επήλθε απόπτωση, ως απότοκο της συνδυασμένης θεραπείας με χλωροπρομαζίνη και ταμοξιφαίνη. Αυτό το συνεργιστικό αποτέλεσμα βρέθηκε ότι ερείζεται στο ότι η χλωροπρομαζίνη ενισχύει την επίδραση της ταμοξιφαίνης, μέσω ενός μηχανισμού που διαμεσολαβείται από υποδοχείς οιστρογόνων. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η χλωροπρομαζίνη μπορεί να αλλάξει τις ιδιότητες εισροής των μεμβρανών, υποδηλώνοντας, επομένως, ότι η χλωροπρομαζίνη μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη χημειοευαισθητοποιητική ένωση, που ισχυροποιεί την κυτταροτοξική δράση της ταμοξιφαίνης.

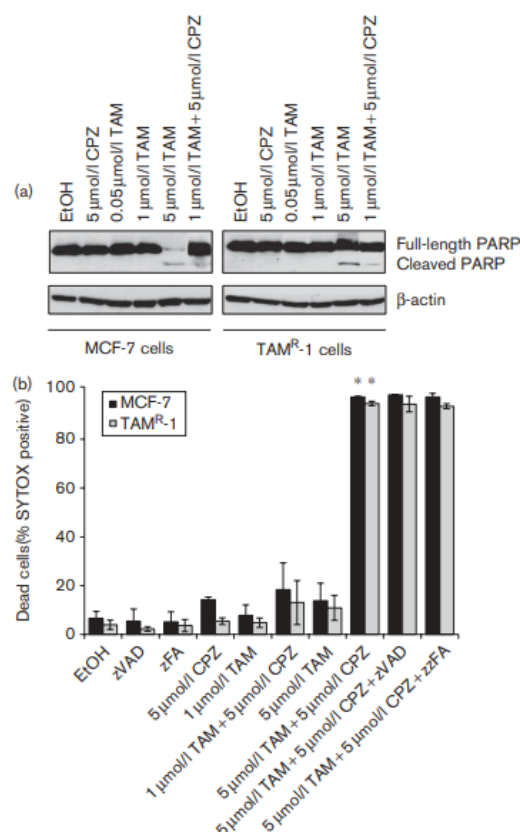
Για τη μελέτη της επίδρασης της χλωροπρομαζίνης στην ευαισθησία στην ταμοξιφαίνη, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές: η αντιοιστρογονοευαίσθητη κυτταρική σειρά, MCF-7, και η ανθεκτική στην ταμοξιφαίνη

κυτταρική σειρά, TAMR-1. Η επίδραση της θεραπείας με χλωροπρομαζίνη εξετάστηκε για 48 ώρες, με τη δοκιμή βιωσιμότητας WST-1, σε κύτταρα MCF-7 και TAMR-1, παρέχοντας ένα μέτρο της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου που δοκιμάστηκαν δεν οδήγησαν σε καμία μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων, ενώ αποδείχτηκε ότι η χλωροπρομαζίνη μπορεί να επηρεάσει άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να προκαλέσει απόπτωση σε ορισμένους τύπους κυττάρων, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Μάλιστα, τα κύτταρα MCF-7 και τα κύτταρα TAMR-1 ανταποκρίθηκαν παρόμοια στη θεραπεία, παρόλο που τα πρώτα ήταν πιο ευαίσθητα στην ταμοξιφαίνη.

Τα κύτταρα βάφτηκαν με crystal violet (κρυσταλλικό ιώδες), όπως διακρίνεται στις εικόνες a (κύτταρα MCF-7) και b (κύτταρα TAMR-1). Ο αριθμός των κυτταρικών αποικιών, που σχηματίστηκαν, διακρίνεται στις εικόνες c και d για τα κύτταρα MCF-7 και TAMR-1, αντίστοιχα. Η κλωνογονική δοκιμασία έδειξε ποσοστό μείωσης της τάξεως του 40%, κατά την επεξεργασία με ταμοξιφαίνη, ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις χλωροπρομαζίνης δεν επηρέασαν την επιβίωση των κυττάρων MCF-7. Όταν έγινε ταυτόχρονη επεξεργασία με χλωροπρομαζίνη και ταμοξιφαίνη, προέκυψε στατιστικά σημαντική μείωση στον αριθμό των αποικιών, που σχηματίζονται από κύτταρα MCF-7, σε σύγκριση με θεραπεία, σε παρόμοιες συγκεντρώσεις, μόνο με χρήση ταμοξιφαίνης, όπως διαφαίνεται στην εικόνα c. Στο ίδιο μήκος κύματος ήταν και τα ευρήματα κλωνογονικής δοκιμασίας, σε κύτταρα, ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη, όπως η κυτταρική σειρά, TAMR-1. Σε αυτά, η ταυτόχρονη επώαση χλωροπρομαζίνης σε συνδυασμό με ταμοξιφαίνη μείωσε σημαντικά τον σχηματισμό αποικιών, όπως καταδεικνύεται στην εικόνα d. **Κατά συνέπεια, όχι μόνο υποδηλώνεται ότι η χλωροπρομαζίνη ενισχύει την επίδραση της ταμοξιφαίνης, αλλά στην περίπτωση κυττάρων ανθεκτικών στην ταμοξιφαίνη, μπορεί να υπερνικήσει την αντίσταση που προβάλλουν σε αυτή.**



Εικόνα 103: α) Κλώνοι MCF-7, με χρώση crystal violet, σε 3 φάσεις: δίχως φαρμακευτική θεραπεία, επωασμένοι σε αιθανόλη και σε ταμοξιφαίνη (1 $\mu\text{mol/L}$). Στην παρακάτω σειρά, γίνεται απεικόνιση τριών φάσεων, με επώαση σε χλωροπρομαζίνη 1 και 5 $\mu\text{mol/L}$. Στην τελευταία σειρά, απεικονίζονται οι εναπομείναντες κλώνοι, κατά την επώαση σε συνδυασμό χλωροπρομαζίνης και ταμοξιφαίνης. β) Κλώνοι TAMR-1, με χρώση crystal violet, σε 3 φάσεις: δίχως φαρμακευτική θεραπεία, επωασμένοι σε αιθανόλη και σε ταμοξιφαίνη (1 $\mu\text{mol/L}$). Στην παρακάτω σειρά, γίνεται απεικόνιση τριών φάσεων, με επώαση σε χλωροπρομαζίνη 1 και 5 $\mu\text{mol/L}$. Στην τελευταία σειρά, απεικονίζονται οι εναπομείναντες κλώνοι, κατά την επώαση σε συνδυασμό χλωροπρομαζίνης και ταμοξιφαίνης. γ) Ποσοστό επί τοις εκατό (%) σχηματισμού κλώνων συναρτήσει των συνθηκών επώασης των κυττάρων MCF-7: δίχως φαρμακευτική θεραπεία, σε αιθανόλη, σε ταμοξιφαίνη (1 $\mu\text{mol/L}$), σε χλωροπρομαζίνη 1 και 5 $\mu\text{mol/L}$ και σε συνδυασμό χλωροπρομαζίνης και ταμοξιφαίνης (5 και 1 $\mu\text{mol/L}$, αντίστοιχα) δ) Ποσοστό επί τοις εκατό (%) σχηματισμού κλώνων συναρτήσει των συνθηκών επώασης των κυττάρων TAMR-1: δίχως φαρμακευτική θεραπεία, σε αιθανόλη, σε ταμοξιφαίνη (1 $\mu\text{mol/L}$), σε χλωροπρομαζίνη 1 και 5 $\mu\text{mol/L}$ και σε συνδυασμό χλωροπρομαζίνης και ταμοξιφαίνης (5 και 1 $\mu\text{mol/L}$, αντίστοιχα) (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19584708/>)



Εικόνα 104: Η χλωροπρομαζίνη (CPZ) και η ταμοξιφαίνη (TAM) ενεργοποιούν αποπτωτικό ή νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, σε προχωρημένο στάδιο. (α) Western Blot Analysis σε MCF-7 και TAMR-1 κύτταρα, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με CPZ και TAM για την ανίχνευση του πλήρους μήκους (116 kDa) και των διασπασμένων (85 kDa) πολυ(ADPριβόζη)πολυμερασών (PARP) (β) Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 1 ή 5 mmol/L TAM μόνο ή σε συνδυασμό με 5 mmol/L CPZ. Αναστολέας κασπάσης ευρείας εμβέλειας (85 mmol/l zVAD-fmk) ή αναστολέας της κατεψίνης (5 mmol/l zFA-fmk) προστέθηκε. Μετά από 3 ημέρες, τα κύτταρα επώαστηκαν με SYTOX green nucleic stain και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Το ποσοστό των όψιμων αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων (θετικά στην χρωστική SYTOX green κύτταρα) διαφαίνεται στην εικόνα. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19584708/>)

Προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσον η χλωροπρομαζίνη επιδρά στην, προκαλούμενη από ταμοξιφαίνη, κυτταροτοξικότητα, διερευνήθηκε αρχικά η διάσπαση της πολυμεράσης πολυ (ADP-ριβόζης), PARP ως μέτρο της απόπτωσης σε πρώιμο στάδιο. Έτσι, τα κύτταρα MCF-7 και TAMR-1 επώαστηκαν με 0,05, 1 και 5 mmol/l ταμοξιφαίνης για 3 ημέρες, όπου διαπιστώθηκε πως μόνο η υψηλότερη συγκέντρωση ταμοξιφαίνης (5 mmol/l) οδήγησε σε διάσπαση της PARP και στις δύο κυτταρικές σειρές. Οπότε, ο κυτταρικός θάνατος, που μεσολαβεί από την αγωγή ταμοξιφαίνης 5 mmol/l, φαίνεται να λαμβάνει χώρα μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης (πιθανώς της κασπάσης-7), η οποία αποτελεί δείκτη της κλασικής απόπτωσης, σε πρώιμο στάδιο. Όταν συνδυάστηκε 1 mmol/l ταμοξιφαίνης με 5 mmol/l χλωροπρομαζίνης, παρατηρήθηκε μια μικρή, αλλά όχι έντονη επαγωγή της διάσπασης της PARP. Στην περίπτωση της χρήσης 5 mmol/l ταμοξιφαίνης σε συνδυασμό με 5 mmol/l

χλωροπρομαζίνης, τα κύτταρα είχαν δεχθεί σοβαρή επίδραση από την αγωγή, καθιστώντας αδύνατη τη διενέργεια ανάλυσης Western Blot για την ανίχνευση της PARP. Συνακόλουθα, τέθηκε υπό εξέταση το ενδεχόμενο η προσθήκη χλωροπρομαζίνης να επιφέρει μεταβολή του τύπου του κυτταρικού θανάτου, που προκαλείται από την ταμοξιφαίνη, σε αποπτωτικό ή νεκρωτικό τύπο σε προχωρημένο στάδιο. Για να στοιχειοθετηθεί η υπόθεση αυτή, αξιοποιήθηκε η τεχνική της χρώσης κυττάρων με SYTOX green, φθορίζουσα χρωστική, που διεισδύει μόνο σε κύτταρα με εξασθενημένη κυτταροπλασματική μεμβράνη, χαρακτηριστικό της απόπτωσης/νέκρωσης σε προχωρημένο στάδιο, με το ποσοστό των SYTOX-θετικών κυττάρων να προσδιορίζεται με κυτταρομετρία ροής. Θεραπεία με ταμοξιφαίνη για 3 ημέρες (1 ή 5 mmol/l) δεν οδήγησε σε όψιμο στάδιο απόπτωσης ή νέκρωσης, ενώ μόνο μια μικρή, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, αύξηση του ποσοστού των θετικών για SYTOX κυττάρων μετρήθηκε στην περίπτωση συνδυασμού 1 mmol/l ταμοξιφαίνης με 5 mmol/l χλωροπρομαζίνης. Ωστόσο, ο συνδυασμός 5 mmol/l χλωροπρομαζίνης και 5 mmol/l ταμοξιφαίνης είχε ως αποτέλεσμα σχεδόν την πλήρη θανάτωση των κυττάρων, αποτέλεσμα που ήταν στατιστικά σημαντικό τόσο στα κύτταρα MCF-7 όσο και στα κύτταρα TAMR-1.

Σε μια προσπάθεια ερμηνείας των παραπάνω παρατηρούμενων αποτελεσμάτων, υποδηλώνεται ότι η χλωροπρομαζίνη σε συνδυασμό με ταμοξιφαίνη σκοτώνει τα MCF-7 και TAMR-1 κύτταρα, προκαλώντας έναν πιο πρώιμο αποπτωτικό ή νεκρωτικό τύπο κυτταρικού θανάτου. Μάλιστα, ο μαζικός κυτταρικός θάνατος, μετά από συνδυαστική θεραπεία χλωροπρομαζίνης και ταμοξιφαίνης δεν μετριάστηκε από την προσθήκη του αναστολέα κασπάσης, ευρείας εμβέλειας, zVAD-fmk, ούτε του αναστολέα της κατεψίνης zFA-fmk, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι ο κυτταρικός θάνατος ήταν περισσότερο νεκρωτικής παρά αποπτωτικής φύσης.

6.3 Αξιολόγηση της επίδρασης της πιμοζίδης σε καρκινικά κύτταρα καρκίνου του μαστού

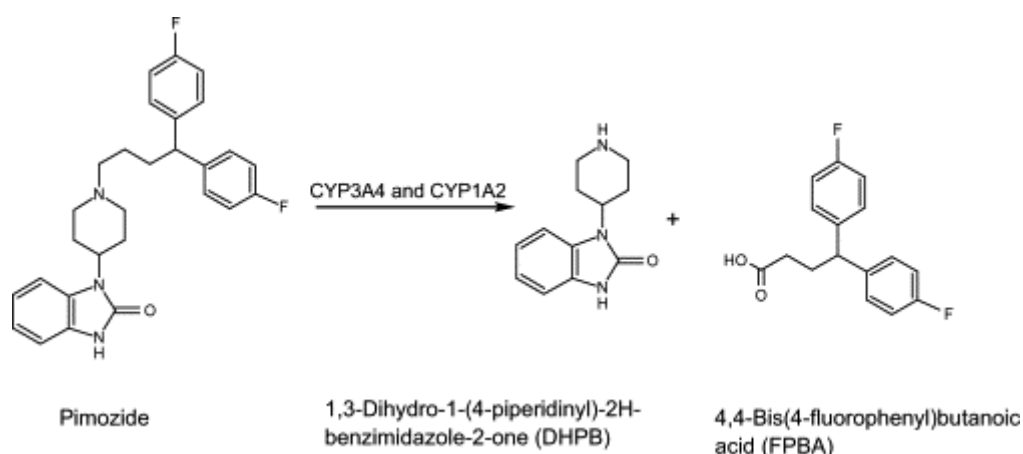
Σε επίπεδο Φαρμακοδυναμικής, η πιμοζίδη, φαινυλοβουτυλοπιπεραδίνη, είναι ένα, από του στόματος, δραστικό αντιψυχωσικό φαρμακευτικό προϊόν, με την ικανότητα αποκλεισμού των ντοπαμινεργικών υποδοχέων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ωστόσο, ο αποκλεισμός των υποδοχέων συνοδεύεται, συχνά, από μια σειρά δευτερογενών μεταβολών στον κεντρικό μεταβολισμό και τη λειτουργία της ντοπαμίνης, οι οποίες μπορεί να συμβάλλουν τόσο στις θεραπευτικές, όσο και στις ανεπιθύμητες ενέργειες της πιμοζίδης. Επιπλέον, η πιμοζίδη, όπως και άλλα αντιψυχωσικά φάρμακα, έχει διάφορες επιδράσεις σε άλλα συστήματα υποδοχέων του κεντρικού νευρικού συστήματος, οι οποίες δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως. Διαθέτει, μάλιστα, μικρότερη πιθανότητα πρόκλησης καταστολής και υπότασης, καθώς έχει πιο ειδική δράση αποκλεισμού των υποδοχέων της ντοπαμίνης, σε σχέση με άλλους νευροληπτικούς παράγοντες και, ως εκ τούτου, αποτελεί κατάλληλη εναλλακτική λύση της αλοπεριδόλης. Η ικανότητα της πιμοζίδης να καταστέλλει τα κινητικά και

φωνητικά τικ στη διαταραχή Tourette θεωρείται ότι είναι, κυρίως, συνάρτηση της ντοπαμινεργικής ανασταλτικής της δράσης. Η πιμοζίδη δεσμεύει και αναστέλλει τον υποδοχέα της ντοπαμίνης D2 στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Σε επίπεδο Φαρμακοκινητικής, αξιοσημείωτος είναι ο μεταβολισμός πρώτης διέλευσης στο ήπαρ, κυρίως με N-αποαλκυλίωση, μέσω των ισοενζύμων CYP3A και CYP1A2 του κυτοχρώματος P450 (και ενδεχομένως του CYP2D6). Η δραστηριότητα των δύο κύριων μεταβολιτών δεν έχει προσδιοριστεί. Ο χρόνος ημιζωής είναι 29 ± 10 ώρες, σύμφωνα με μελέτη μιας δόσης σε υγιείς εθελοντές.

Η πιμοζίδη μεταβολίζεται κυρίως σε τρία προϊόντα: 6-hydroxypimozide, 5-hydroxypimozide και 1,3-dihydro-1-(4-piperidiny)-2H-benzimidazol-2-one (DHPBI), που αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% του βιομετασχηματισμού. Οι σχετικές ποσότητες των διαφόρων μεταβολιτών που παράγονται από τα μικροσώματα του ανθρώπινου ήπατος συσχετίστηκαν με τη σχετική αφθονία των CYP2D6 και CYP3A4. Το CYP2D6 παράγει, πρωτίστως, τον μεταβολίτη 5-υδροξυ-υπιμοζίδη, με κάποιο σχηματισμό 6-υδροξυ-υπιμοζίδης, ενώ το CYP3A4 παράγει κυρίως DHPBI. Μελέτες μεταφοράς in vitro σε κύτταρα Caco-2 έδειξαν ότι η πιμοζίδη μεταφέρεται μέσω του ABCB1. Επιπλέον, η σερτραλίνη ή η αριπιπραζόλη μείωσαν σημαντικά την αναλογία εκροής της πιμοζίδης in vitro, παρέχοντας έναν πιθανό μηχανισμό αλληλεπιδράσεων φαρμάκων, που ήταν θανατηφόρες σε μια αναφερθείσα μελέτη περίπτωσης.

Η κύρια οδός αποβολής της πιμοζίδης και των μεταβολιτών της είναι μέσω των νεφρών. Ο μέσος χρόνος αποβολής της πιμοζίδης στον ορό σε σχιζοφρενικούς ασθενείς ήταν περίπου 55 ώρες [59].



Εικόνα 105: Προϊόντα μεταβολισμού πιμοζίδης

(<https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/pimozide>)

Με τα πλεονεκτήματα της μείωσης του κόστους και του χρόνου ανάπτυξης φαρμάκων και των προκλινικών μελετών, η στρατηγική της ανακάλυψης νέων χρήσεων για παλιά

φάρμακα έχει λάβει μεγάλη προσοχή την τελευταία δεκαετία και έχει εφαρμοστεί στη συστηματική φαρμακολογία και την κλινική πρακτική, όπως αναλύθηκε και παραπάνω. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αντιψυχωσικό πιμοζίδη, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει αντικαρκινική δράση σε διάφορα καρκινικά κύτταρα. Η πιμοζίδη θα μπορούσε να αναστείλει τον καρκίνο του παχέος εντέρου, αναστέλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης, να αναστείλει την εισβολή και τη μετανάστευση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού στοχεύοντας το STAT3 (Tyr705), να αναστείλει την ανάπτυξη του καρκίνου του εγκεφάλου, μέσω της αυτοφαγικής απόπτωσης και τον καρκίνο του προστάτη, δημιουργώντας δραστικά είδη οξυγόνου. Τα τελευταία χρόνια, ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού έχει λάβει αυξανόμενη προσοχή. Πρόκειται για μια κατάσταση γνωστή ως φαινόμενο Warburg, η οποία εμφανίζει έναν ανώμαλο μεταβολισμό, που χαρακτηρίζεται από υψηλή γλυκόλυση, ανεξάρτητα από την αφθονία οξυγόνου. Η γλυκολυτική διαδικασία συνοδεύεται, συνήθως, από την πρόσληψη γλυκόζης, την παραγωγή γαλακτικού οξέος και την παραγωγή ATP, προωθώντας την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Οι αναδυόμενες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη θεραπεία του καρκίνου, μέσω της αναστολής των μεταβολικών ενζύμων και, συνεπώς, του αποκλεισμού της γλυκόλυσης. Η κινάση του πυροσταφυλικού (PK), ένας βασικός ρυθμο-περιοριστικός μεσολαβητής του φαινομένου Warburg, καταλύει τη μη αναστρέψιμη μεταφορά του φωσφοενωμένου πυροσταφυλικού σε διφωσφορική αδενοσίνη για την παραγωγή πυροσταφυλικού και ATP. Μεταξύ των τεσσάρων ισομορφών της PK, η PKM2 εκφράζεται ανώμαλα στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα και θεωρείται δυνητικός διαγνωστικός βιοδείκτης και θεραπευτικός στόχος για τους ανθρώπινους καρκίνους.

Ενδεικτικά, σε έναν από αυτούς, τον καρκίνο του μαστού, η πιμοζίδη είχε δράση, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, κατορθώνοντας να επιβραδύνει και αναστείλει την εξέλιξη του όγκου, μειώνοντας την έκφραση της PKM2 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Πρόσφατες μελέτες είχαν δείξει ότι πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ρυθμίζουν την PKM2. Αν και είχαν εντοπιστεί η ακετυλίωση, η υδροξυλίωση, η οξειδωση, η φωσφορυλίωση και η ουβικουιτινίωση, η διαμόρφωση της αποικοδόμησης της PKM2 από την πιμοζίδη απαιτεί περαιτέρω μελέτες για να βελτιωθεί η κατανόηση γύρω από αυτή. Συνοπτικά, η πιμοζίδη που στοχεύει στο φαινόμενο Warburg φαίνεται να είναι μια αποτελεσματική στρατηγική για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Αρκετοί ενδοκυτταρικοί σηματοδοτικοί μεσολαβητές, όπως οι PI3K/Akt, Myc, HIF και p53, εμπλέκονται στη μεταβολική ρύθμιση του φαινομένου Warburg. Πολυάριθμες μελέτες είχαν επιβεβαιώσει ότι η p53 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόλυσης, ρυθμίζοντας την έκφραση διαφόρων γλυκολυτικών γονιδίων. Ως εκ τούτου, η ανασύσταση της λειτουργίας της p53 αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η θεραπεία με πιμοζίδη ενίσχυσε σημαντικά τα επίπεδα πρωτεΐνης p53 στα κύτταρα MCF-7 και MDA-MB-231. Η προεπεξεργασία με τον αναστολέα της p53 PFT-α ανέστρεψε την επίδραση της πιμοζίδης στην πρόσληψη γλυκόζης, την παραγωγή ATP, την παραγωγή γαλακτικού και την ECAR και ανέστρεψε την αναστολή της PKM2 από την πιμοζίδη,

αποτελέσματα που υπέδειξαν ότι η επίδραση της πιμοζίδης στο μεταβολισμό της γλυκόζης μεσολαβείται, κυρίως, από την p53. Αυτή αναφέρθηκε ότι είναι η πρώτη μελέτη που περιγράφει έναν νέο ρόλο της πιμοζίδης στη ρύθμιση της p53 σε καρκινικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη καταστολέας του κυτταρικού κύκλου p21, ένα από τα πιο κρίσιμα μεταγενέστερα «γονίδια-στόχους» της p53, έχει την ευρύτερη ανασταλτική δράση κίνησης, συνδέεται και αναστέλλει την ενεργοποίηση του συμπλόκου Cyclin-CDK. Ενώ η p21 μπορεί να επηρεάσει την κατανομή του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των CyclinD1-CDK4/6 και CyclinE1-CDK2, μπορεί να εμποδίσει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Rb και την απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F, οδηγώντας σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου.

Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MCF-7, MDA-MB-231) και απαθανατισμένες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές επιθηλίου του μαστού (MCF-10A) καλλιεργήθηκαν σε DMEM υψηλής γλυκόζης, συμπληρωμένο με πενικιλίνη (100 U/ml), στρεπτομυκίνη (100 µg/ml) και 10% FBS σε ατμόσφαιρα, που περιέχει 5% CO₂, στους 37 °C. Κύτταρα MCF-7, MDA-MB-231 και MCF-10A επιστρώθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών, κυτταρικής πυκνότητας 8 x 10³ κύτταρα/πηγάδι, με μέσο ανάπτυξης, ολονυχτίως. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διάφορες συγκεντρώσεις πιμοζίδης (2, 4, 6, 8, 10 µM) για 24 ώρες, με 0,1% DMSO, ως control. Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα επώαστηκαν με 90 µL φρέσκου μέσου και 10 µL CCK-8 για 3 ώρες στους 37 °C. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm, χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας. Τα κύτταρα MCF-7 και MDA-MB-231 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 πηγαδιών, με πυκνότητα 500 κυττάρων ανά πηγάδι και υποβλήθηκαν σε αγωγή με DMSO ή τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις πιμοζίδης για 15 ημέρες. Οι αποικίες σταθεροποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεΐδη και χρωματίστηκαν με χρώση κρυσταλλικού ιώδους 0,2%, ενώ έπειτα καταμετρήθηκαν.

Το kit χρωματομετρικής ανάλυσης πρόσληψης γλυκόζης, το kit χρωματομετρικής ανάλυσης ATP και το kit ανάλυσης γαλακτικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της πρόσληψης γλυκόζης, του ATP και της παραγωγής γαλακτικού οξέος, αντίστοιχα, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του κατασκευαστή. Για τη δοκιμασία πρόσληψης γλυκόζης, τα κύτταρα σπάρθηκαν σε πλάκες των 6 cm και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τις υποδεικνυόμενες συγκεντρώσεις πιμοζίδης για 24 ώρες και, στη συνέχεια, 1 x 10⁶ κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96 πηγαδιών και καλλιεργήθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τα κύτταρα υπέστησαν στέρηση γλυκόζης, με επώαση σε 100 µL ρυθμιστικού διαλύματος Krebs-Ringer-Phosphate-HEPES (KRPH), που περιείχε 2% BSA, για 40 λεπτά. Κατόπιν, 10 µL 10 mM 2-DG προστέθηκαν και τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλα 20 λεπτά. Τα κύτταρα λύθηκαν με 80 µL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης και, εν συνεχεία, καταψύχθηκαν/αποψύχθηκαν μία φορά και θερμάνθηκαν στους 85 °C για 40 λεπτά.

Το κυτταρολυτικό διάλυμα εξουδετερώθηκε με την προσθήκη 10 µL ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης και μετρήθηκε στα 412 nm σε συσκευή ανάγνωσης

μικροπλακών. Για τις αναλύσεις ATP, 1×10^6 κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης ATP που παρέχεται από τα kit. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε $13.000 \times g$ (στροφές) για 5 λεπτά και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ATP. Το μείγμα αντίδρασης επώαστηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένο από το φως, και μετρήθηκε στα 570 nm σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών. Για την ανάλυση της δραστηριότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης, 1×10^6 κύτταρα λύθηκαν σε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης του kit. Η οπτική πυκνότητα στα 530 nm διαβάστηκε με τη χρήση συσκευής ανάγνωσης μικροπλακών.

Όσον αφορά στον προσδιορισμό του κυτταρικού μεταβολισμού, με Seahorse XFe Extracellular Flux Analyzer 8-well format, πραγματοποιήθηκε η σύγχρονη ανίχνευση του ρυθμού εξωκυτταρικής οξίνισης (ECAR) και του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου (OCR) σε κύτταρα MCF-7 και MDA-MB-231, σε πραγματικό χρόνο. Εν συντομία, τα κύτταρα σπέρνονταν σε πλάκες 6 πηγαδιών, με μέσο ανάπτυξης, κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τα κύτταρα MCF-7 και MDA-MB-231 υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τις υποδεικνυόμενες συγκεντρώσεις πιμοζίδης για 24 ώρες και στη συνέχεια 8×10^3 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκα 8-πηγών XFe και καλλιεργήθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ο ρυθμός εξωκυτταρικής οξίνισης (ECAR) και ο ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου (OCR) εξετάστηκαν με τη χρήση του Seahorse XFe Glycolysis Stress Test Kit και του Seahorse XFe Cell Mito Stress Test Kit, αντίστοιχα. Για την ανάλυση ECAR, σε κάθε πηγαδάκι εγχύθηκαν διαδοχικά γλυκόζη (10 mM), ολιγομυκίνη (2 μM) και 2-δεοξυ-D- γλυκόζη, 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) (50 μM). Για την ανάλυση OCR, η ολιγομυκίνη (2 μM), η κυανιούχο- καρβόνυλο-p-τριφθορομεθοξυφαινυλοϋδραζόνη, Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) (1 μM) και η ροτενόνη/αντιμυκίνη A (0,5 μM) εγχύθηκαν διαδοχικά σε κάθε πηγάδι. Οι μετρήσεις ECAR ή OCR πραγματοποιήθηκαν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το ολικό RNA εξήχθη με τη χρήση αντιδραστηρίου Trizol από τις καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών. Μετά την ποσοτικοποίηση, πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή με χρήση kit σύνθεσης cDNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε qRT-PCR σε τριπλάσια αντίγραφα, χρησιμοποιώντας TB Green® Premix Ex Taq™ II, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Οι αλληλουχίες εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση qRT-PCR των εξής γονιδίων: p53, PKM2 και αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Η τελευταία, μάλιστα, χρησιμοποιήθηκε ως control. Τα επίπεδα mRNA των p53 και PKM2 αναλύθηκαν με τη μέθοδο της 2- $\Delta\Delta\text{CT}$, όπου $\Delta\text{CT} = \text{CT γονιδίου-«στόχος»} - \text{CT εσωτερικού γονιδίου αναφοράς}$.

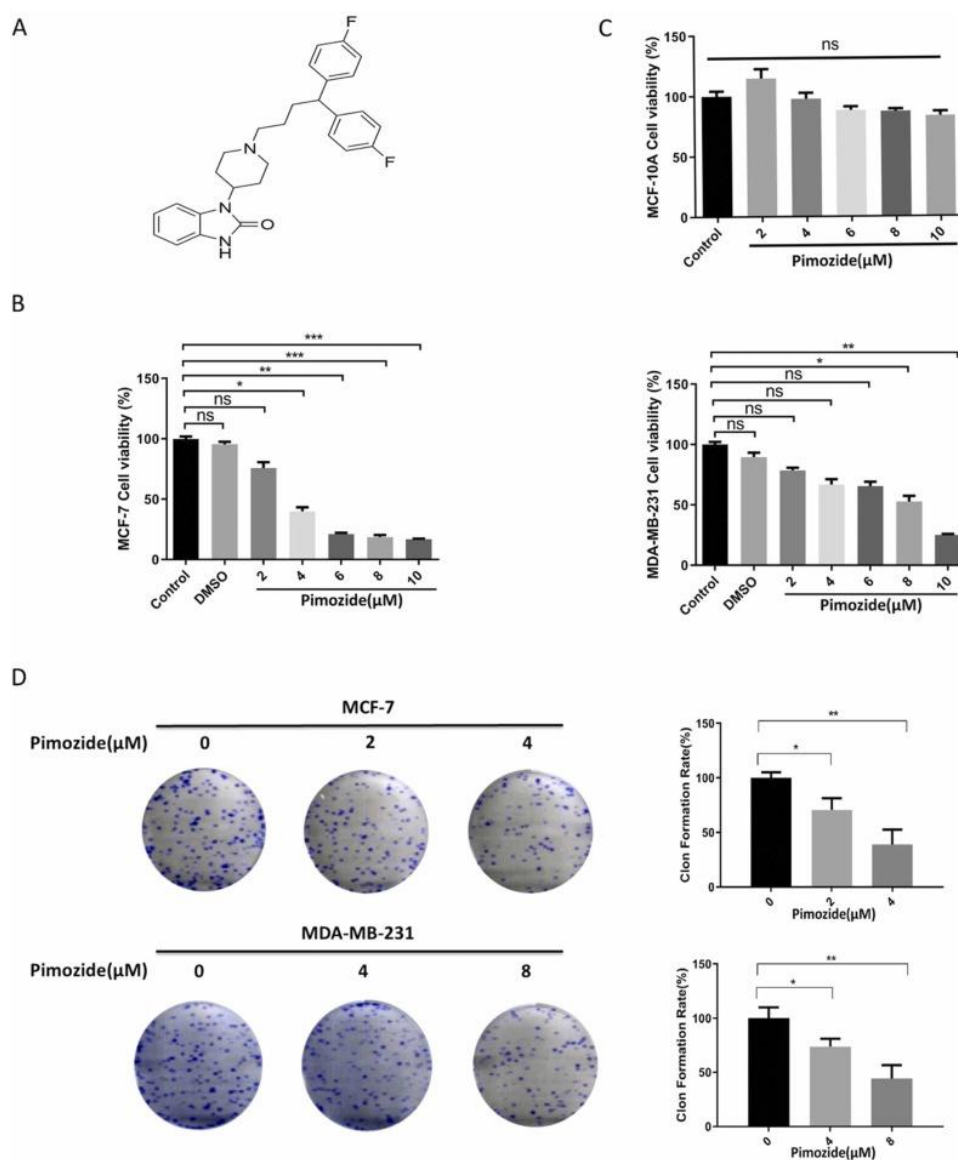
Συνολικός όγκος 100 μL κυττάρων MCF-7 (5×10^6 κύτταρα) εμβολιάστηκε κάτω από το δέρμα του λαιμού ή της πλάτης γυμνών ποντικών (ηλικίας 5 εβδομάδων, 10 ποντίκια χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες). Τα ποντίκια έλαβαν ενδοπεριτοναϊκή έγχυση πιμοζίδης (10 mg/kg) κάθε μέρα μέχρι ο όγκος του όγκου να φτάσει περίπου τα 100 mm³, ενώ η ομάδα ελέγχου έλαβε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση DMSO. Στη συνέχεια, η

διάμετρος του όγκου μετρήθηκε με διαβήτη κάθε μέρα. Μετά από 20 ημέρες από την έναρξη της θεραπείας ή όταν το μέγεθος του όγκου έφθανε τα 2 cm σε διάμετρο, τα ποντίκια θανατώθηκαν.

Οι καρκινικοί ιστοί διαχωρίστηκαν από γυμνά ποντίκια και ζυγίστηκαν. Ένα μέρος του ιστού αποθηκεύτηκε στους - 80 °C για ανάλυση Western Blot και το υπόλοιπο αποθηκεύτηκε σε παραφορμαλδεΰδη 4%. Οι καρκινικοί ιστοί ενσωματώθηκαν σε παραφίνη, κόπηκαν σε λεπτές τομές 5-8 μm .

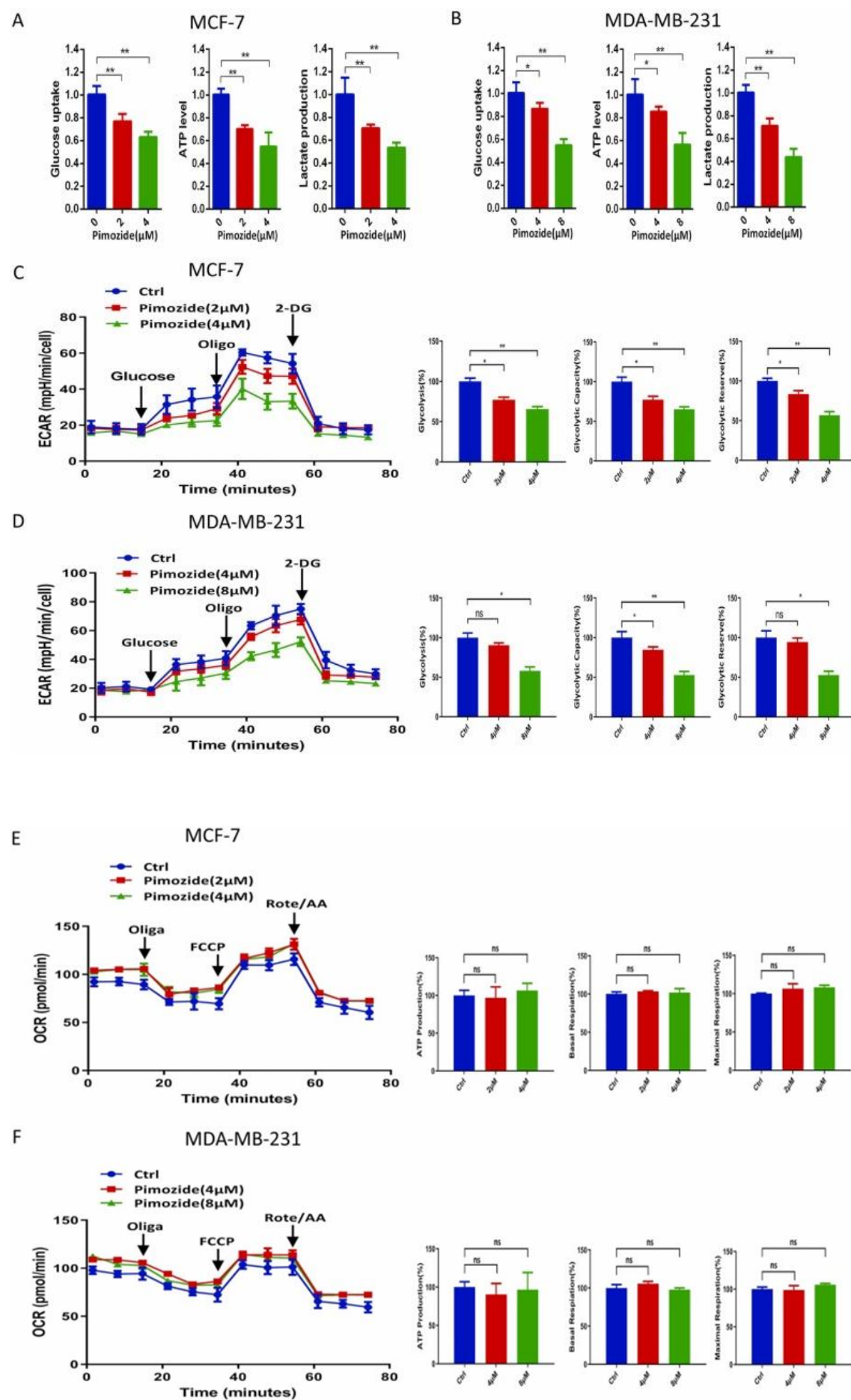
Για τη δοκιμασία ιστοπαθολογίας, οι καρκινικοί ιστοί χρωματίστηκαν με 10% αιματοξυλίνη για την απεικόνιση του κυτταρικού πυρήνα και 1% ηωσίνη για την απεικόνιση του κυτταροπλάσματος. Για τη δοκιμασία ανοσοϊστοχημείας, οι καρκινικοί ιστοί χρωματίστηκαν με Ki67, PKM2, p53. Οι εικόνες παρατηρήθηκαν με χρώση σε ελαφρά μεγέθυνση.

Καταλήγοντας, ο καρκίνος του μαστού είναι μια ετερογενής κακοήθεια. Αναμένεται ότι μέχρι το 2050 θα διαγιγνώσκονται ετησίως 3,2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις παγκοσμίως. Το φαινόμενο Warburg διακρίνει τα καρκινικά κύτταρα, για τον υψηλό ρυθμό αερόβιας γλυκόλυσης και την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης, που τα χαρακτηρίζει, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου. Ως εκ τούτου, η αναζήτηση νέων φαρμάκων που εμποδίζουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης είναι απαραίτητη για τη θεραπεία του καρκίνου. Στο πλαίσιο αυτό, η πιμοζίδη μείωσε σημαντικά την αερόβια γλυκόλυση, όπως υποδεικνύεται από την πτώση της πρόσληψης γλυκόζης, του επιπέδου ATP, της παραγωγής γαλακτικού και της ECAR, και ανέστειλε την έκφραση του PKM2, αναστέλλοντας έτσι, επακόλουθα, τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Εν τω μεταξύ, η εν λόγω μείωση διασώθηκε σε μεγάλο βαθμό από τον αναστολέα της p53, PFT- α , γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα η πιμοζίδη να δρα ανασταλτικά ως προς τη γλυκόλυση, μέσω της σηματοδοτικής οδού της p53. Επίσης, η πιμοζίδη ανέστειλε την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/MDM2, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της πρωτεΐνης p53 και μείωση της PKM2.



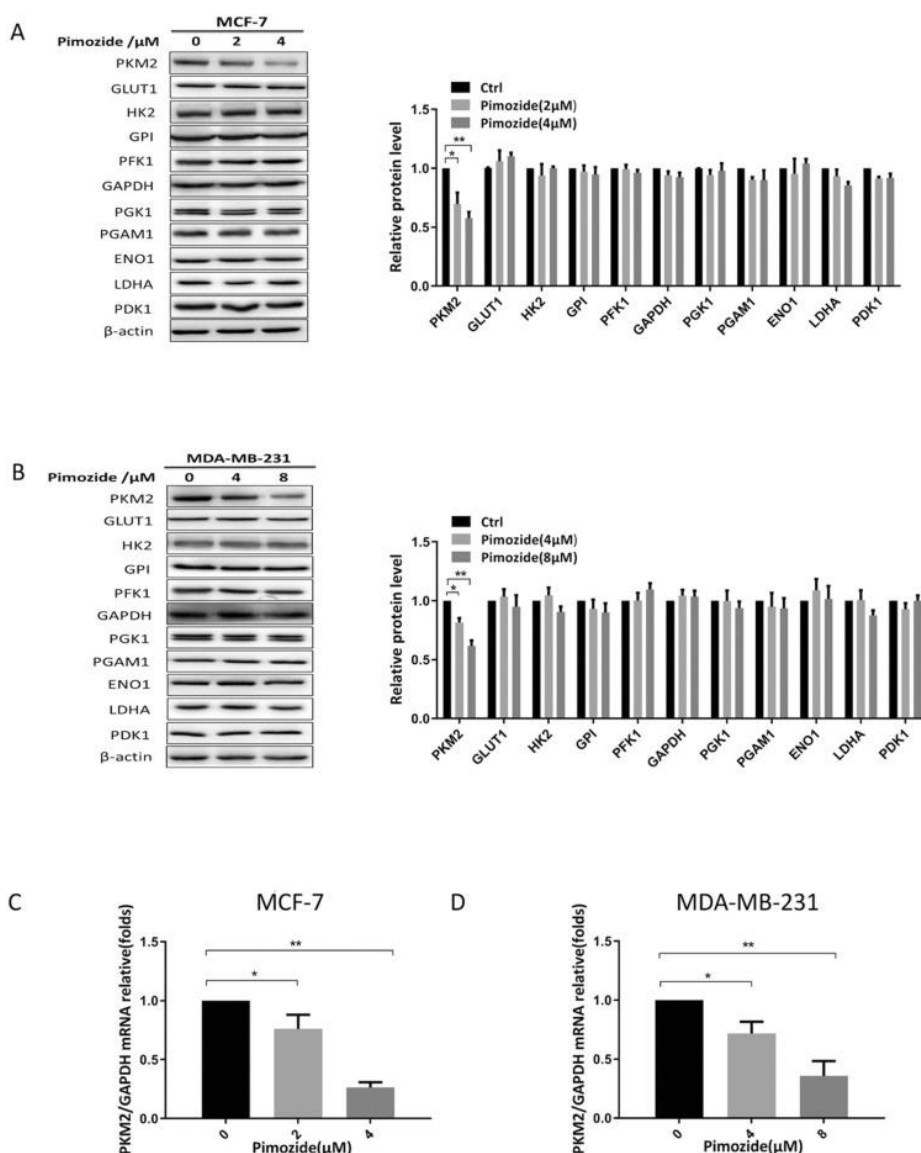
Εικόνα 106: Η πιμοζίδη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού. (Α) Δομή της πιμοζίδης. (Β) Δοκιμασία CCK-8 για την αξιολόγηση των επιδράσεων διαφορετικών συγκεντρώσεων της πιμοζίδης στα κύτταρα MCF-7 και MDA-MB-231. (C) Δοκιμασία CCK-8 για την αξιολόγηση των επιδράσεων διαφορετικών συγκεντρώσεων πιμοζίδης σε κύτταρα MCF-10A. (D) Εικόνες δοκιμασίας σχηματισμού αποικιών (αριστερά) και ποσοτικοποίηση των ποσοστών αριθμού αποικιών (δεξιά)

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222004528>)



Εικόνα 107: Η πιμοζίδη μετριάζει το φαινόμενο Warburg στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. (Α-Β) Η πιμοζίδη μπλόκαρε την πρόσληψη γλυκόζης, το επίπεδο ATP και την παραγωγή γαλακτικού σε κύτταρα MCF-7 (Α) και MDA-MB-231 (Β) με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. (C-D) Ο ρυθμός της γλυκόλυσης μειώθηκε στα κύτταρα MCF-7 (C) και MDA-MB-231 (D) με τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις Pimozide μέσω της ανάλυσης ECAR (υποκατάστατο του ρυθμού της γλυκόλυσης) (αριστερό πλαίσιο). Οι παράμετροι της γλυκόλυσης, της γλυκολυτικής ικανότητας και του γλυκολυτικού αποθέματος εξετάστηκαν σε κύτταρα MCF-7 (C) και MDA-MB-231 (D) (δεξιός πίνακας). (Ε-Ε) Η ανάλυση OCR δεν άλλαξε σε κύτταρα MCF-7 (Ε) και MDA-MB-231 (Ε) χωρίς θεραπεία ή σε θεραπεία με Pimozide (αριστερό πάνελ). Οι παράμετροι της παραγωγής ATP, της βασικής αναπνοής και της μέγιστης αναπνοής εξετάστηκαν σε κύτταρα MCF-7 (Ε) και MDA-MB-231 (Ε) (δεξιό πάνελ).

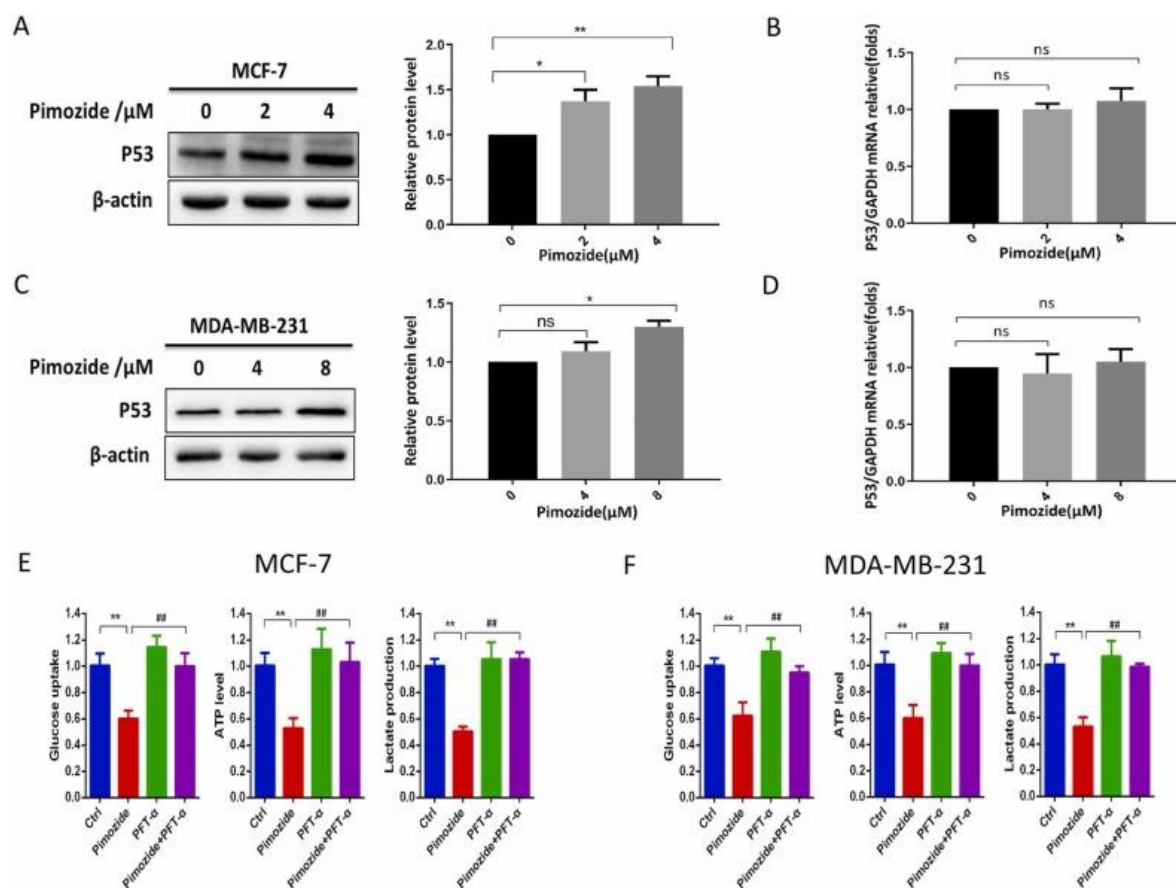
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222004528>)

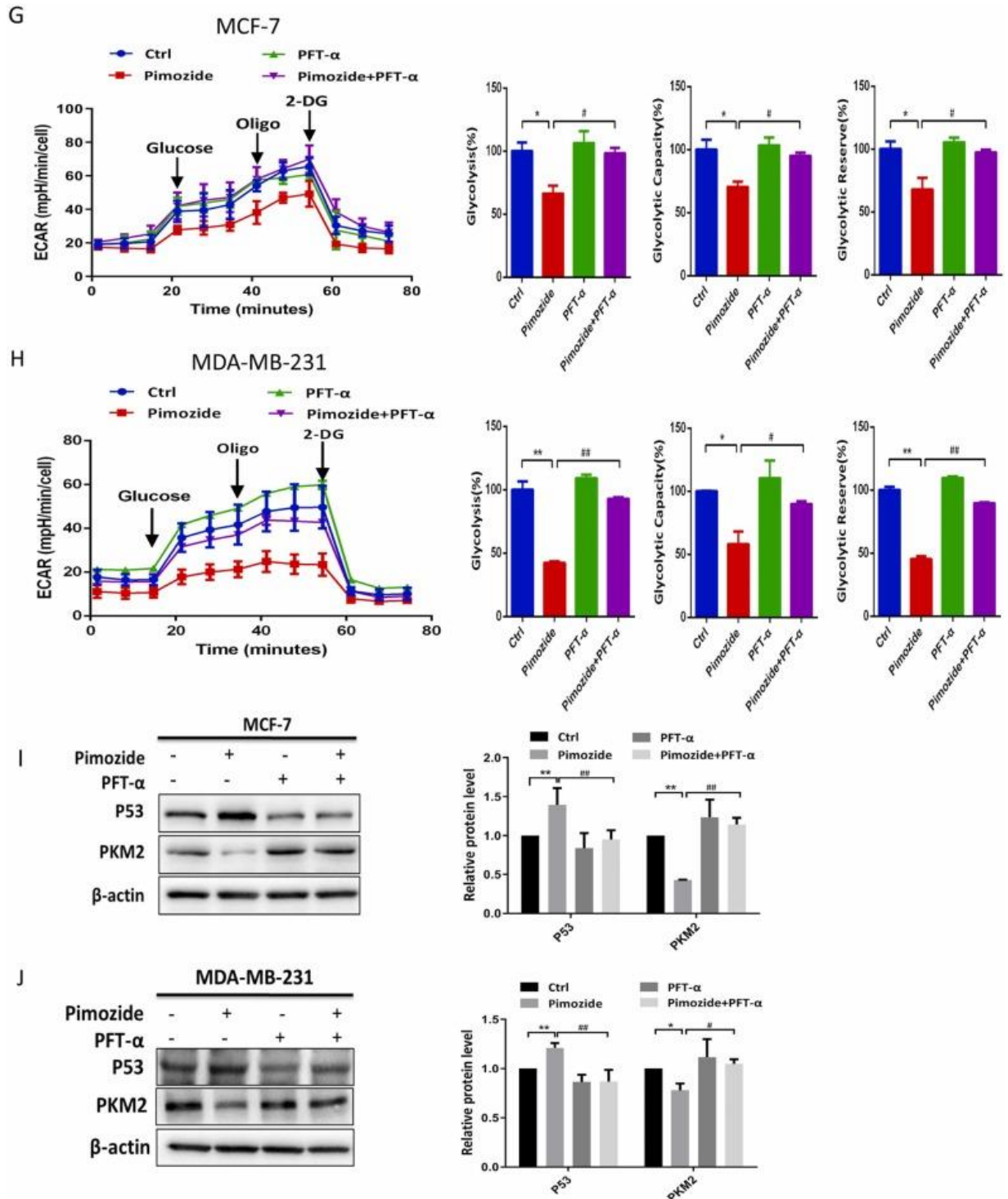


Εικόνα 108: Η πιμοζίδη αναστέλλει την πρωτεΐνη PKM2 και το mRNA τόσο στα κύτταρα MCF-7 όσο και στα κύτταρα MDA-MB-231 in vitro. (Α-Β) Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις πιμοζίδης για 24 ώρες και η πρωτεϊνική έκφραση των γλυκολυτικών ενζύμων στα κύτταρα MCF-7 (Α) και MDA-MB-231 (Β) προσδιορίστηκε με ανάλυση Western blot (αριστερό τμήμα). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση πυκνομετρίας για την αξιολόγηση της πρωτεϊνικής

έκφρασης των γλυκολυτικών ενζύμων (κανονικοποιημένη ως προς την έκφραση β-ακτίνης), η PKM2 μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα κύτταρα (δεξί πάνελ). (C-D) Η έκφραση mRNA της PKM2 σε κύτταρα MCF-7(C) και MDA-MB-231(D) που δεν είχαν υποβληθεί σε θεραπεία ή σε θεραπεία με Pimozide προσδιορίστηκε με qRT-PCR. Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος.

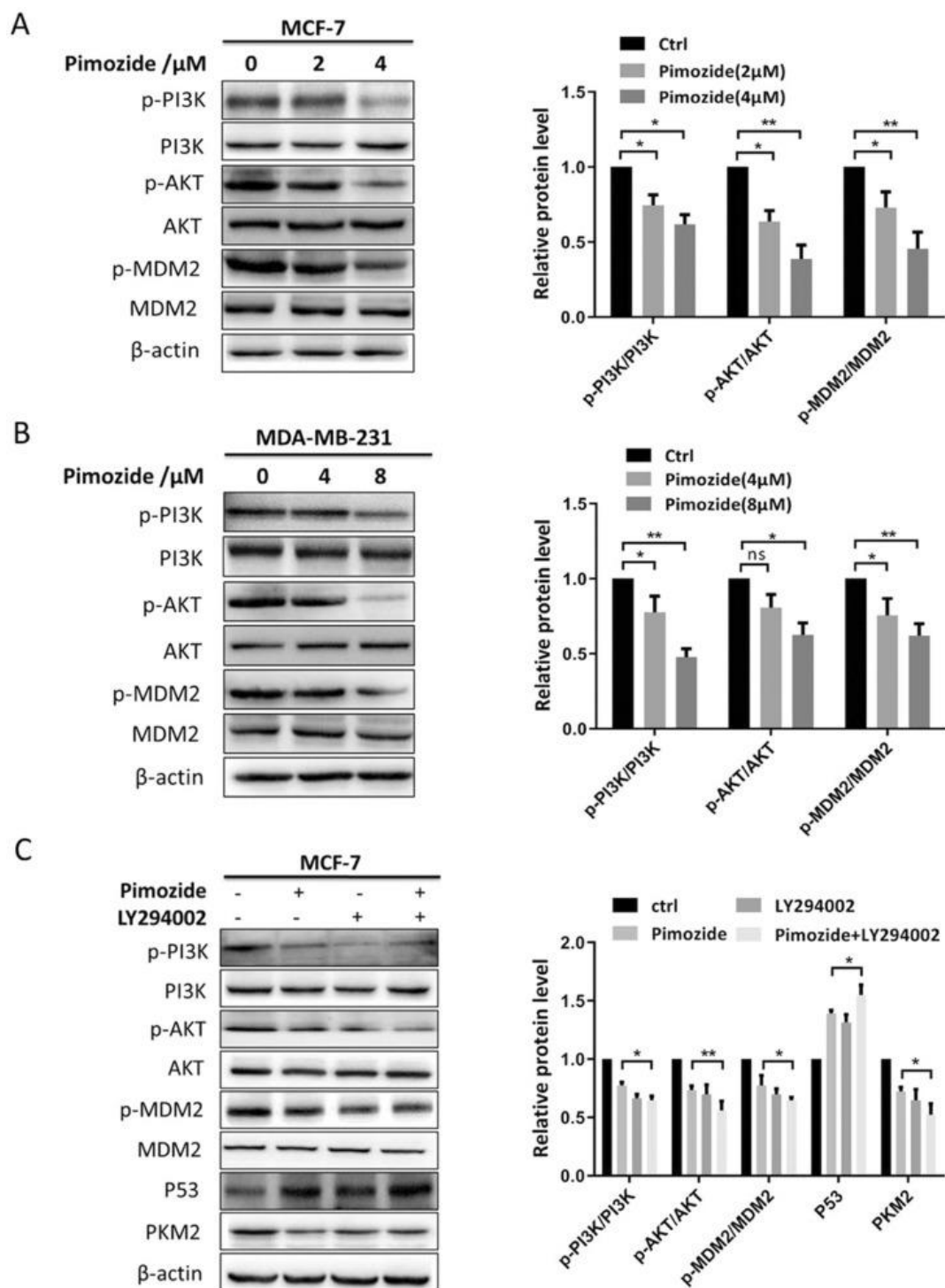
(<https://jphcs.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40780-021-00199-7>)



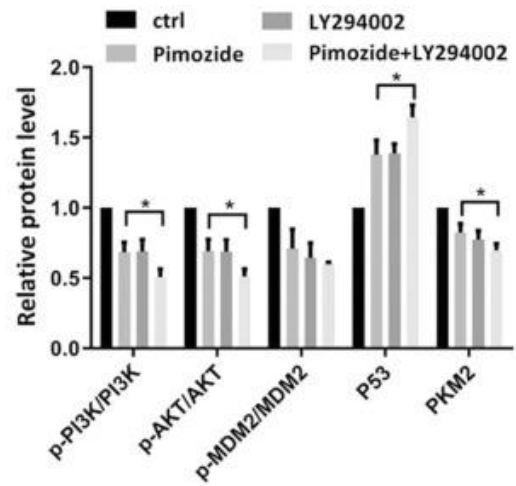
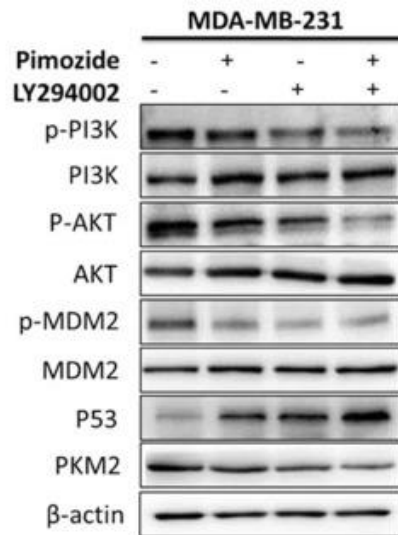


Εικόνα 109: Η πιμοζίδη μετριάζει το φαινόμενο Warburg με τρόπο εξαρτώμενο από την p53. (Α-Δ) Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις Pimozide για 24 ώρες και η πρωτεϊνική έκφραση της p53 σε MCF-7 (Α) και MDA-MB-231 (C) προσδιορίστηκε με ανάλυση Western blot (αριστερό τμήμα). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση πυκνομετρίας για την αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της p53 (κανονικοποιημένη ως προς την έκφραση β-ακτίνης) (δεξιός πίνακας). Η έκφραση mRNA του p53 σε κύτταρα MCF-7 (Β) και MDA-MB-231 (Δ) που δεν είχαν υποβληθεί σε θεραπεία ή σε θεραπεία με Pimozide προσδιορίστηκε με qRT-PCR. Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος. (Ε-Η) Η χορήγηση του αναστολέα P53 PFT-α ανέστρεψε την επαγόμενη από Pimozide καταστολή της πρόσληψης

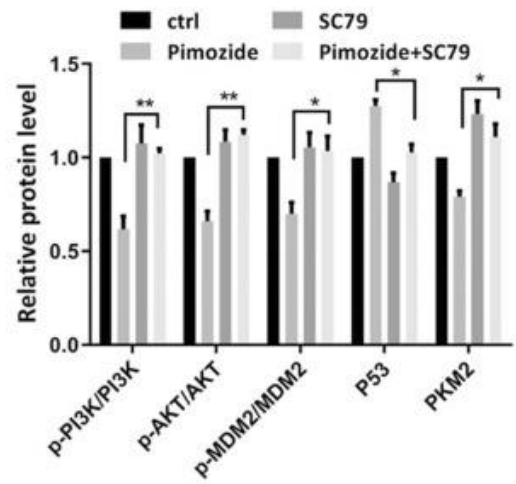
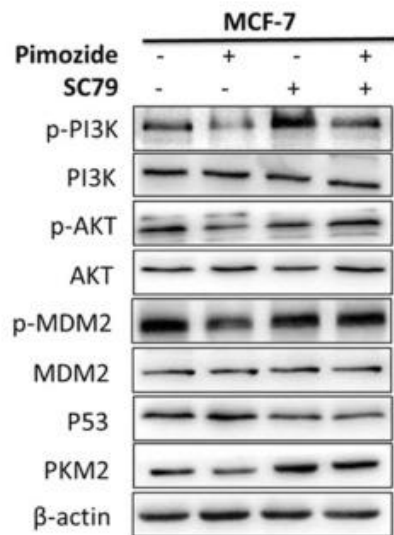
γλυκόζης, του επιπέδου ATP, της παραγωγής γαλακτικού και της ECAR σε κύτταρα MCF-7 (E, G) και MDA-MB-231 (F, H). (I-J) Η χορήγηση PFT-α ενίσχυσε την επαγόμενη από την πιμοζίδη καταστολή της πρωτεϊνικής έκφρασης της PKM2 σε κύτταρα MCF-7 (I) και MDA-MB-231 (J).



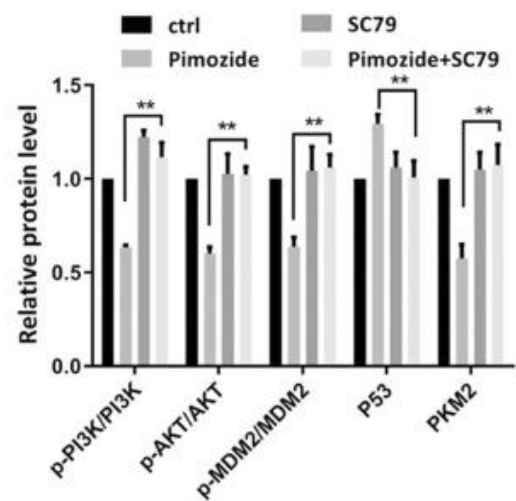
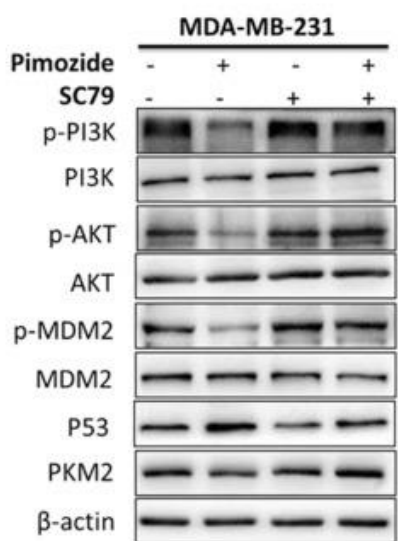
D

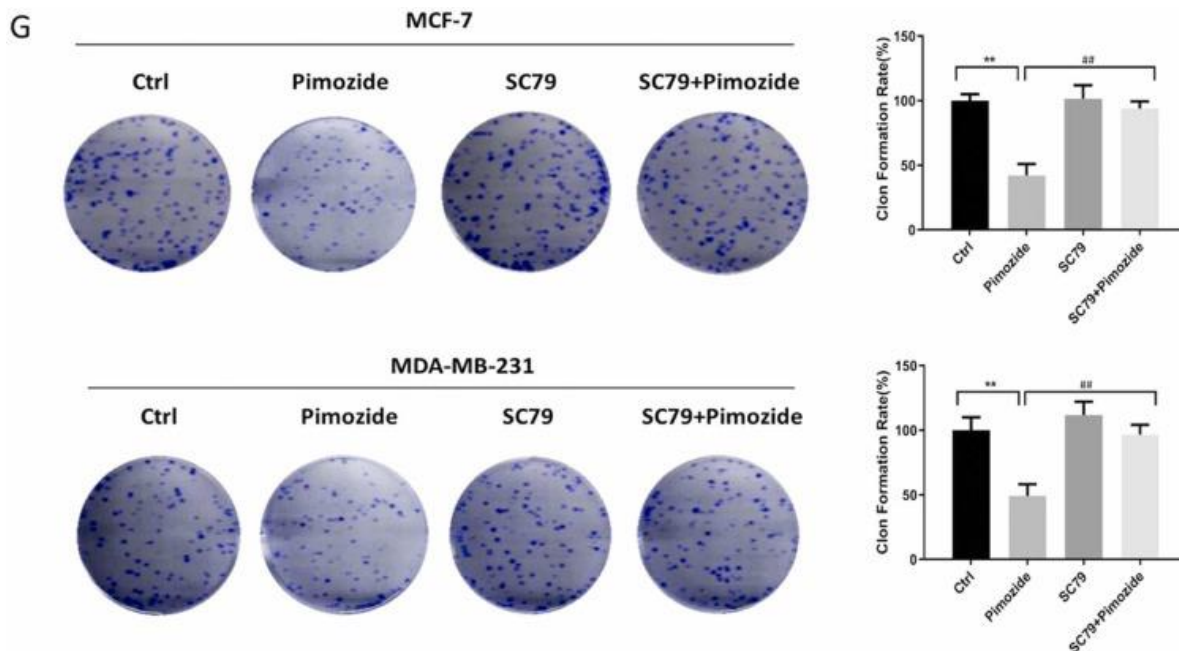


E



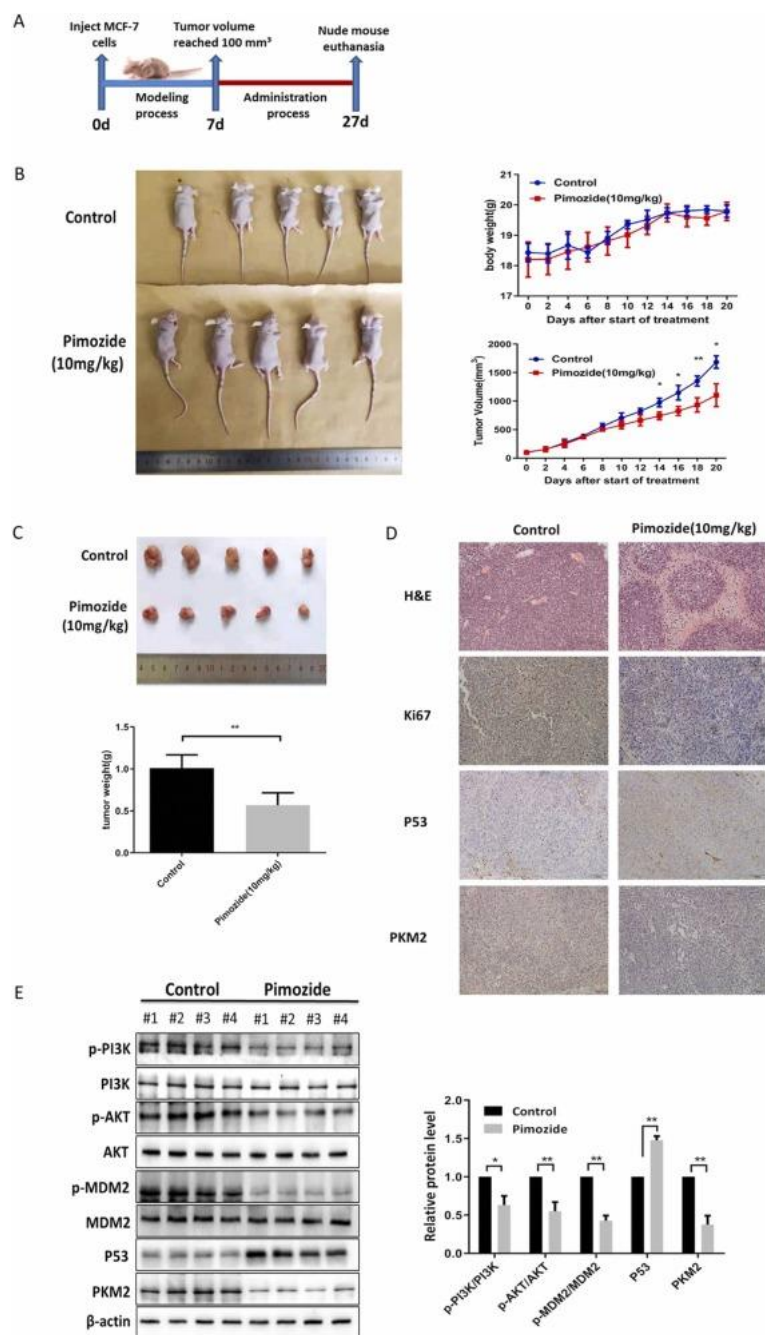
F





Εικόνα 110: Η πιμοζίδη προάγει την έκφραση του p53 μέσω της οδού PI3K/Akt/MDM2. (Α-Β) Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις Pimozide για 24 ώρες, η πρωτεϊνική έκφραση των p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-MDM2, MDM2 σε κύτταρα MCF-7 (Α) και MDA-MB-231 (Β) προσδιορίστηκε με ανάλυση Western blot (αριστερό τμήμα). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση πυκνομετρίας για την αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-MDM2/MDM2 (κανονικοποιημένη ως προς την έκφραση β-ακτίνης) (δεξιός πίνακας). (C-F) Ανάλυση Western blot για τα επίπεδα πρωτεϊνών p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-MDM2, MDM2, P53 και PKM2 σε κύτταρα MCF-7 (C, E) και MDA-MB-231 (D, F) που επωάστηκαν με τον αναστολέα PI3K LY294002 ή τον αγωνιστή PI3K SC79, όπως υποδεικνύεται. (G) Μετά τη θεραπεία με SC79, εικόνες δοκιμασίας σχηματισμού αποικιών (αριστερός πίνακας) και ποσοτικοποίηση των ποσοστών αριθμού αποικιών (δεξιός πίνακας).

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222004528>)



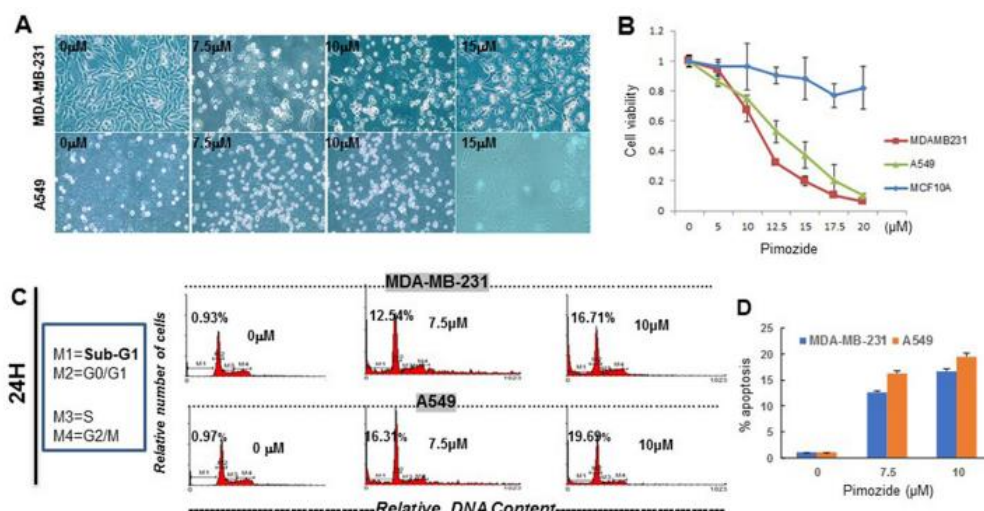
Εικόνα 111: Η πιμοζίδη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού *in vivo*. (Α) Πειραματική διαδικασία του μοντέλου ξеноμοσχέυματος όγκου MCF-7. Στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα πιμοζίδης, (Β) ο όγκος του όγκου και το σωματικό βάρος μετρήθηκαν κάθε δύο ημέρες, (Γ) το βάρος του όγκου μετρήθηκε μετά τη θανάτωση. (Δ) Χρώση H&E και εικόνες IHC (Ki67, P53, PKM2) του ιστού του όγκου στις δύο ομάδες. Ράβδοι κλίμακας = 100 μm. (Ε) Η πρωτεϊνική έκφραση των p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-MDM2, MDM2, p53, PKM2 σε ιστούς όγκων (κανονικοποιημένη ως προς την έκφραση β-ακτίνης). Οι συμβολισμοί: #1, #2, #3 και #4 αντιπροσωπεύουν τέσσερα διαφορετικά ποντίκια σε κάθε ομάδα.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222004528>)

Σύμφωνα με την μελέτη, βρέθηκε ότι η πιμοζίδη αύξησε την p21 και μείωσε την έκφραση της πρωτεΐνης CyclinD1, γεγονός που καταμαρτυρά ότι η πιμοζίδη μπορεί να αναστείλει τον καρκίνο του μαστού, μέσω της αναστολής του κυτταρικού κύκλου. Πολλά στοιχεία ανέφεραν ότι το μονοπάτι PI3K/Akt ήταν ένας σημαντικός «καταρράκτης» σηματοδότησης, που ρυθμίζει τον μεταβολισμό της γλυκόζης και ότι η φωσφορυλίωση του MDM2 με τη μεσολάβηση της Akt αναστέλλει τη δραστηριότητα του p53. Λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση της πιμοζίδης στην ενεργοποίηση του p53, διερευνήθηκε περαιτέρω η επιρροή της στο κυτταρικό μονοπάτι PI3K/Akt/MDM2. Επιβεβαιώθηκε με Western blot ότι η πιμοζίδη είχε παρόμοια αποτελεσματικότητα με τον αναστολέα PI3K, LY294002, ενεργοποιώντας το μονοπάτι PI3K/Akt/MDM2, αλλά και ότι ο αγωνιστής PI3K, SC79, ανέτρεψε την αποτελεσματικότητα της πιμοζίδης. Ωστόσο, η διαδικασία επαναπρογραμματισμού της πιμοζίδης, που εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης μέσω PI3K/Akt, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης [47].

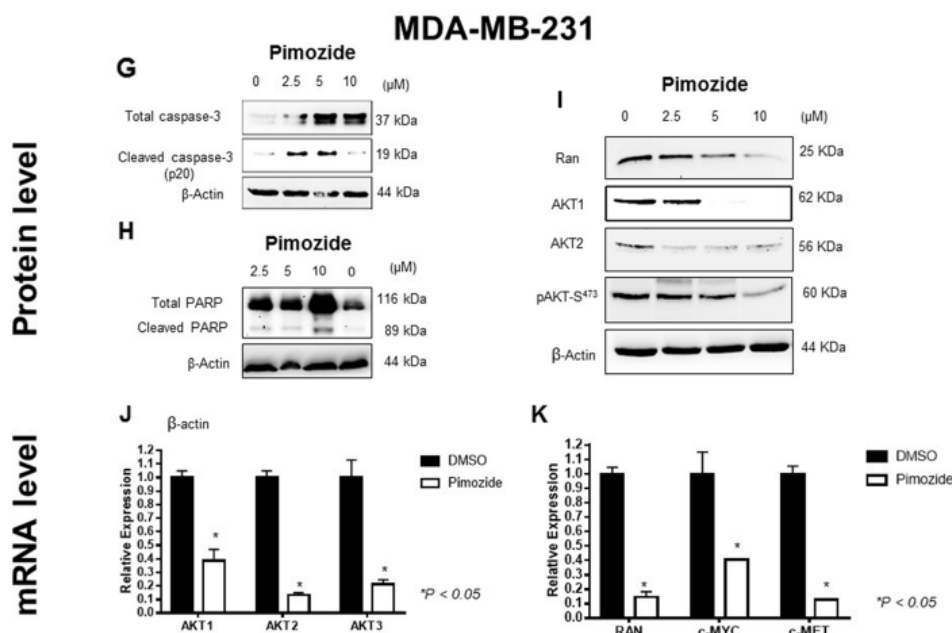
Σε άλλη μελέτη, που έθεσε υπό εξέταση την επίδραση της πιμοζίδης στις παραπάνω κυτταρικές σειρές, επιβεβαιώθηκαν οι αντι-πολλαπλασιαστικές και προ-αποπτωτικές επιδράσεις, καθώς και η βλάβη του DNA καρκινικών κυττάρων, που επιφέρει το, εν λόγω, αντιψυχωσικό φάρμακο. Έμφαση δόθηκε σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου διηθητικού καρκίνου του μαστού, MDA-MB-231 και φυσιολογικά κύτταρα μαστού, MCF10A, τα οποία επώαστηκαν με αυτό το φάρμακο, σε διαφορετικές δόσεις, για 24 ή 48 ώρες, οπότε και παρατηρήθηκε η μορφολογία τους κατόπιν 24 ωρών και αξιολογήθηκε η βιωσιμότητά τους κατόπιν 48 ωρών. Έτσι, βρέθηκε ότι η κυτταρική σειρά MDA-MB-231 επηρεάστηκε σημαντικά από την πιμοζίδη, σε αντίθεση με φυσιολογικά μαστικά κύτταρα, MCF-10A, τα οποία και επέδειξαν μικρό κυτταρικό θάνατο (~5% κυτταρικό θάνατο) ακόμη και με 20 μ M Pimozide (η οποία προκάλεσε > 90% κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα MDA-MB-231).

Επιπλέον, μέσω κυτταρομετρίας ροής και χρήση δεικτών απόπτωσης, αναλύθηκε περαιτέρω ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος, που επάγεται από την πιμοζίδη στα κύτταρα MDA-MB-231. Έτσι, αναλύσεις του κυτταρικού κύκλου έδειξαν ότι η επώαση με πιμοζίδη για 24 ώρες επέφερε αύξηση του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων σε φάση υπό της G1.



Εικόνα 112: (Α) Μικρογραφία αντίθεσης φάσης που δείχνει τη μορφολογία των κυττάρων του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού MDA-MB-231, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Pimozide, σε διαφορετικές δόσεις (μM) για 24 ώρες. Κλίμακα 100 μm. (Β) Η βιωσιμότητα των MDA-MB-231 καρκινικών κυττάρων, MCF-10A φυσιολογικών κυττάρων του μαστού, μετά από 48ωρη θεραπεία με Pimozide. (C) Προφίλ κυτταρικού κύκλου. Η περιεκτικότητα σε DNA των σταθεροποιημένων, χρωματισμένων με ιωδιούχο προπίδιο κυττάρων αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα MDA-MB-231 επωάστηκαν απουσία (έλεγχος 0 μM Pimozide με DMSO) ή παρουσία Pimozide, σε διαφορετικές δόσεις για 24 ώρες και το ποσοστό των κυττάρων σε φάσεις sub-G1 (M1) (υποδιπλοειδία), G0/G1 (M2), S (M3) και G2/M (M4) υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Για κάθε ιστόγραμμα DNA για τα M1, M2, M3 και M4 υποδεικνύονται οι συλλογές δεδομένων. Το ποσοστό των κυττάρων με περιεκτικότητα σε DNA μικρότερη από G1 (sub-G1) υποδεικνύεται σε κάθε ιστόγραμμα. Τα προφίλ του κυτταρικού κύκλου που παρουσιάζονται, με την ένδειξη του πληθυσμού sub-G1, είναι αντιπροσωπευτικά των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. (D) Προφίλ κυτταρικού κύκλου (Sub-G1) που συνοψίζεται με τη χρήση ιστογράμματος. Τα κύτταρα MDA-MB-231 υποβλήθηκαν σε θεραπεία με διαφορετικές δόσεις πιμοζίδης για 24 ώρες και το ποσοστό των κυττάρων στη φάση sub-G1 του κυτταρικού κύκλου (νεκρά και ετοιμοθάνατα κύτταρα) ποσοτικοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής.

(<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26175>)



Εικόνα 113: Αναλύσεις Western Blot (G) Ανάλυση του Caspas-3 σε MDA-MB-231, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με πιμοζίδη σε διαφορετικές δόσεις για 24 ώρες. (H) Ανάλυση της PARP σε MDA-MB-231, που υποβλήθηκε σε θεραπεία με Pimozide σε διαφορετικές δόσεις για 24 ώρες. (I) Ανάλυση των Ran, AKT1, AKT2 και pAKT σε MDA-MB-231, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Pimozide σε διαφορετικές δόσεις για 24 ώρες. (J) Σχετική έκφραση mRNA όλων των ισομορφών AKT σε κύτταρα MDA-MB-231 είτε χωρίς θεραπεία είτε σε θεραπεία με Pimozide 7,5 μM για 24 ώρες. (K) Σχετική έκφραση mRNA των Ran, c-MYC και c-MET σε κύτταρα MDA-MB-231, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Pimozide 7,5 μM για 24 ώρες.

(<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26175>)

Ανακεφαλαιώνοντας, η πιμοζίδη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με δόσοεξαρτώμενο και χρόνοεξαρτώμενο τρόπο, προκαλώντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, οδηγεί σε ελάττωση της έκφρασης των Ran και AKT, σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνικής έκφρασης, αλλά και την έκφραση των cMET και cMYC, σύμφωνα με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η Ran είναι πρωτεΐνη G, που ρυθμίζει κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της προόδου του κυτταρικού κύκλου, της αντιγραφής του DNA, της επεξεργασίας RNA και της συναρμολόγησης της μιτωτικής ατράκτου. Η πρωτεϊνική κινάση B (PKB), επίσης γνωστή ως AKT, είναι η συλλογική ονομασία ενός συνόλου τριών πρωτεϊνικών κινασών, ειδικών για τη σερίνη/θρεονίνη, που παίζουν βασικούς ρόλους σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η μεταγραφή και η κυτταρική μετανάστευση. Το c-MET είναι μια κινάση τυροσίνης υποδοχέα που, αφού δεσμευτεί με τον συνδέτη της, τον αυξητικό παράγοντα ηπατοκυττάρων, ενεργοποιεί ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών κυτταρικών οδών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα, τη μετανάστευση και την εισβολή. Το ογκογονίδιο c-Myc είναι κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού των καρκινικών

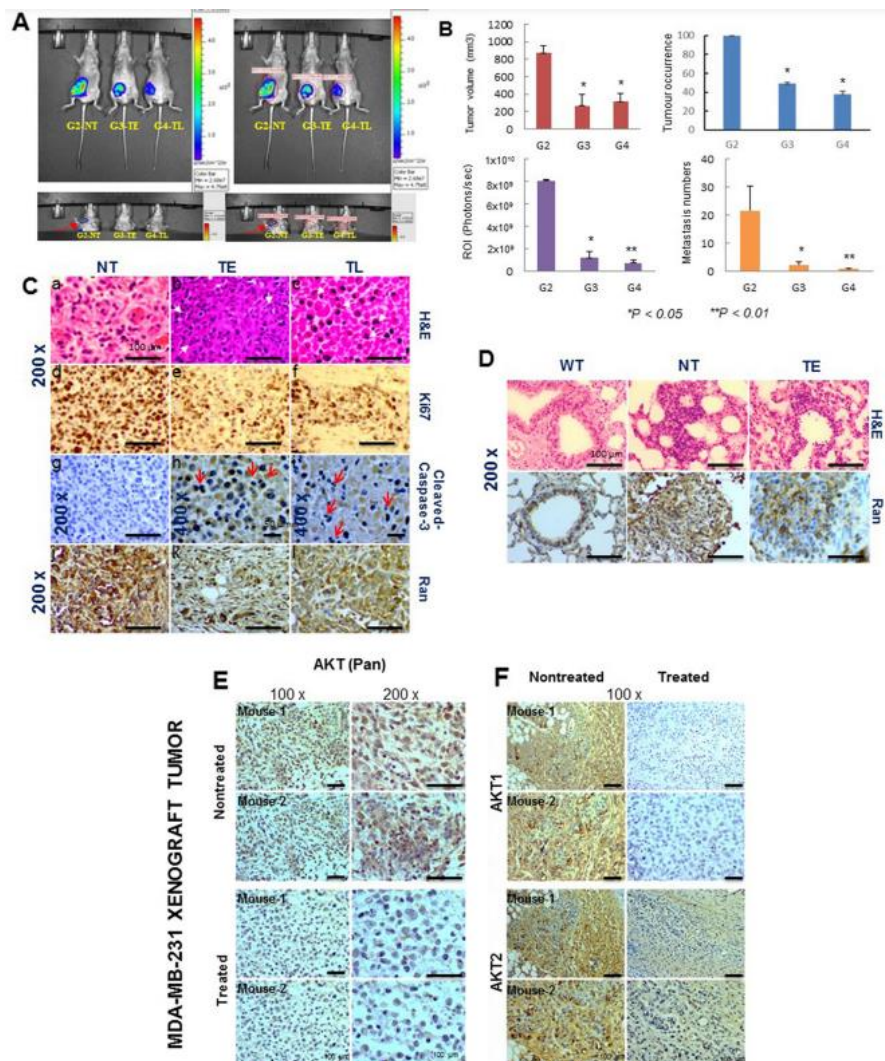
κυττάρων, ο οποίος ελέγχει μια ποικιλία οδών, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και της επιγενετικής

Σε *in vivo* επίπεδο, επιβεβαιώθηκε ότι η πιμοζίδη αναστέλλει την ανάπτυξη των διεισδυτικών ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου του μαστού MDA-MB-231, που είχαν μεταμοσχευθεί σε ξενομοσχεύματα όγκων μαστού, σε SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease) ποντίκια. Τα ποντίκια SCID είναι ανεπαρκή σε T- και B-λεμφοκύτταρα, αλλά διατηρούν κύτταρα φυσικών φονέων (NK), πάσχοντας από σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια. Ειδικότερα, τα ποντίκια χωρίστηκαν σε 4 ομάδες: Ομάδα-1 ως control, χωρίς όγκους, Ομάδα-2 με μη επεξεργασμένους όγκους (NT), Ομάδα-3 με όγκους, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία την ημέρα, μετά την εμφύτευση, με Pimozide 20 mg/kg (TE) και Ομάδα-4 με όγκους που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με ίδια δόση, όταν ο όγκος ήταν ψηλαφητός, δηλαδή σε όψιμη φάση (TL). Καταγράφηκε μείωση στην εμφάνιση όγκων, στις ομάδες που έλαβαν θεραπεία, κατά 55%. Μεταστάσεις του όγκου βρέθηκαν μόνο στον πνεύμονα, μετά από πλήρη νεκροψία, και υπήρχαν λιγότεροι μεταστάσεις σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα ποντίκια. Τα μη επεξεργασμένα ποντίκια που έφεραν όγκο και τα επεξεργασμένα ποντίκια (NT, TE και TL) υποβλήθηκαν σε αυτοψία και οι τομές του όγκου χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Αυτό έδειξε την παρουσία πυρηνικών κατακερματισμών (κόκκινο βέλος) στους όγκους από ποντίκια TE και ακανόνιστους πυκνωτικούς πυρήνες (λευκό βέλος), σε όγκους από TL ποντίκια, χαρακτηριστικά του κυτταρικού θανάτου από απόπτωση. Ακόμα, έντονη δραστηριότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως εκτιμάται με την Ki67 χρώση, προσδιορίστηκε στους όγκους από μη υποβεβλημένα σε θεραπεία ποντίκια, ενώ ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ήταν χαμηλός στους όγκους σε ποντίκια TE και TL, όπως φαίνεται από τη μειωμένη χρώση των κυττάρων για το Ki67. Υπήρχε, επίσης, αυξημένη χρώση για τη διασπασμένη κασπάση-3 στους όγκους από ποντίκια που έλαβαν πρόιμη και όψιμη θεραπεία σε σύγκριση με τους όγκους από μη θεραπευόμενα ποντίκια, μαζί με αύξηση του δείκτη απόπτωσης *in vivo*, όπως υποδεικνύεται από τα κόκκινα βέλη. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η πιμοζίδη επάγει την απόπτωση σε MDA-MB-231 όγκους, *in vivo*. Η χρώση για την πρωτεΐνη Rap μειώθηκε στους όγκους των ομάδων, που έλαβαν πρόιμη ή όψιμη θεραπεία (ομάδες TE και TL). Οι πνευμονικές μεταστάσεις αξιολογήθηκαν στο τέλος του πειράματος και ο μεγαλύτερος αριθμός αλλοιώσεων βρέθηκε στα μη επεξεργασμένα ποντίκια, με λιγότερες βλάβες στα ποντίκια, που έλαβαν πρόιμη και όψιμη θεραπεία και πολύ λίγες εστιακές μεταστάσεις στο επιθήλιο των αεραγωγών των ποντικών, που έλαβαν πρόιμη θεραπεία. Τα καρκινικά κύτταρα που βάφτηκαν για Rap ελέγχθηκαν με ανοσοϊστοχημεία στις μεταστατικές εστίες του πνεύμονα, αποκαλύπτοντας υψηλότερη χρώση στις πνευμονικές μεταστάσεις από μη επεξεργασμένα ποντίκια (NT) σε σύγκριση με εκείνες από ποντίκια που έλαβαν θεραπεία (TE).

Η μελέτη των βιολογικών μηχανισμών που διέπουν την ανασταλτικές επιδράσεις της πιμοζίδης και, πιο συγκεκριμένα, το σηματοδοτικό μονοπάτι AKT, το οποίο παίζει ρόλο κατά την ανάπτυξη του όγκου και της αγγειογένεσης, αξιολογήθηκε εξετάζοντας την έκφραση των δύο ισομορφών AKT (AKT1, AKT2), με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας. Η AKT (Pan) απουσίαζε από τους όγκους που υποβλήθηκαν σε θεραπεία, αλλά ήταν παρούσα στους μη επεξεργασμένους όγκους. Η έκφραση του AKT1 καταστέλλεται πλήρως στους θεραπευμένους όγκους (TE και TL), σε σύγκριση με τους μη επεξεργασμένους όγκους, ενώ μικρή ανίχνευση του AKT2 παρατηρήθηκε σε θεραπευμένους όγκους, πιθανότατα λόγω σφαλμάτων στη χρήση των τεχνικών χρώσης. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι η πιμοζίδα καταστέλλει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του μαστού και μειώνει την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) *in vitro* και *in vivo*. Η πιμοζίδα εμποδίζει την μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) σε MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα.

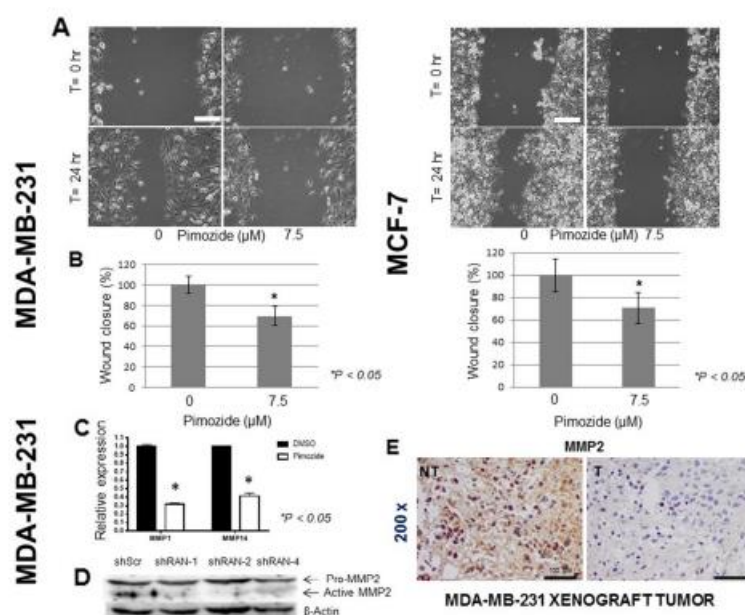
Η πιμοζίδα αναστέλλει την έκφραση δεικτών που σχετίζονται με την αγγειογένεση *in vivo* και επάγει την απόπτωση σε HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ενδοθηλιακά κύτταρα (Ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας). Η πιμοζίδα καταστέλλει την, επαγόμενη από τον VEGF, κυτταρική μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό μειώνοντας το CD31 έκφραση και την υπορύθμιση της σηματοδότησης AKT σε HUVEC κύτταρα. Για να επιβεβαιωθεί η επίδραση της πιμοζίδης κατά της αγγειογένεσης, *in vivo*, η έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αγγειογένεση αξιολογήθηκε σε επεξεργασμένους και μη όγκους και *in vitro*, χρησιμοποιώντας MDA-MB-231 και HUVEC κύτταρα.

Συμπληρωματικά, με ανοσοϊστοχημική χρώση και ανοσοφθορισμό σε τμήματα όγκων από ποντίκια, που έχουν υποστεί θεραπεία με πιμοζίδα, αποκαλύφθηκε δραματικά μειωμένη χρώση για το CD31 και χρωματισμένα αιμοφόρα αγγεία κατά 78%, σε σύγκριση με τα μη υποβεβλημένα σε θεραπεία ποντίκια. Η σχετική έκφραση RNA των VEGFR1 και VEGFR2 μειώθηκε σημαντικά, κατά 4,33 φορές και 1,66 φορές αντίστοιχα, σε ινοβλαστικά κύτταρα, μετά από θεραπεία με πιμοζίδα σε 7,5 μ M. Ομοίως, η δραστηριότητα του υποκινητή του γονιδίου VEGFR2 σε MDA-MB-23 κύτταρα βρέθηκε σημαντικά μειωμένη, ως απότοκο της θεραπείας με πιμοζίδα, μεταξύ 5 και 20 μ M, μετά από 24 ώρες και καταργήθηκε πλήρως με 20 μ M πιμοζίδης. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με πρωτεΐνες των κυττάρων HUVEC, που επώαστηκαν με πιμοζίδα (5 μ M) για 24 ώρες, αποκάλυψε ότι η έκφραση των πρωτεϊνών Ran, AKT1 και AKT2 μειώθηκε κατά 73%, 97% και 95% αντίστοιχα. Η φωσφορυλίωση των AKT και VEGFR2 ήταν, επίσης, δραματικά μειωμένη, αν και η έκφραση της πρωτεΐνης VEGFR2 αυξήθηκε. Επιπλέον, η πιμοζίδα άσκησε αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις σε κύτταρα HUVEC, με αυξημένο δείκτη απόπτωσης που μετρήθηκε ως το κλάσμα των κυττάρων στο τμήμα sub-G1 του κυτταρικού κύκλου με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, μετά από επώαση για 24 ώρες, ενώ, τέλος, σημειώθηκε σημαντική (20%) αύξηση του κυτταρικού θανάτου με μόλις 2,5 μ M πιμοζίδης [17], [47], [66], [79].



Εικόνα 114: (Α) Σύστημα απεικόνισης βιοφωταύγειας *in vivo* (IVIS) των ξενομοσχευμάτων MDA-MB-231-Luc (D3H2LN) σε ποντίκια SCID. (Β) Χαρακτηρισμός των όγκων σε μη επεξεργασμένους/ υποβεβλημένους σε θεραπεία (PBS) και επεξεργασμένους/ υποβεβλημένους σε θεραπεία (Pimozide) και παράλληλη απεικόνιση του όγκου, ανάδειξη του ποσοστού εμφάνισης όγκου (%) και των μεταστατικών εστιών στον πνεύμονα με (C) Χρώση αιματοξιλίνης και ηωσίνης (H&E) των όγκων των ξενομοσχευμάτων σε ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία (NT) (α), ποντίκια που έλαβαν πρόωμη θεραπεία (TE) (β) και ποντίκια που έλαβαν όψιμη θεραπεία (TL) (γ). Ανοσοϊστοχημική χρώση για Ki67, διασπασμένη κασπάση-3 και Ran, σε ποντίκια NT, TE και TL. (D) Χρώση H&E αντιπροσωπευτικών πνευμονικών μεταστάσεων από ποντίκια WT, NT και TE. Η ανοσοχρώση Ran αξιολογήθηκε στον πνεύμονα άγριου τύπου και στις πνευμονικές μεταστάσεις (NT και TE), (E & F) Ανοσοϊστοχημική χρώση για την AKT σε όγκους ξενομοσχεύματος MDA-MB-231. (E) Ανοσοϊστοχημική χρώση για την AKT (Pan). Ισομορφές AKT (AKT1, AKT2) σε όγκους ξενομοσχευμάτων μαστού μη θεραπευόμενων και θεραπευόμενων ποντικών.

(<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26175>)

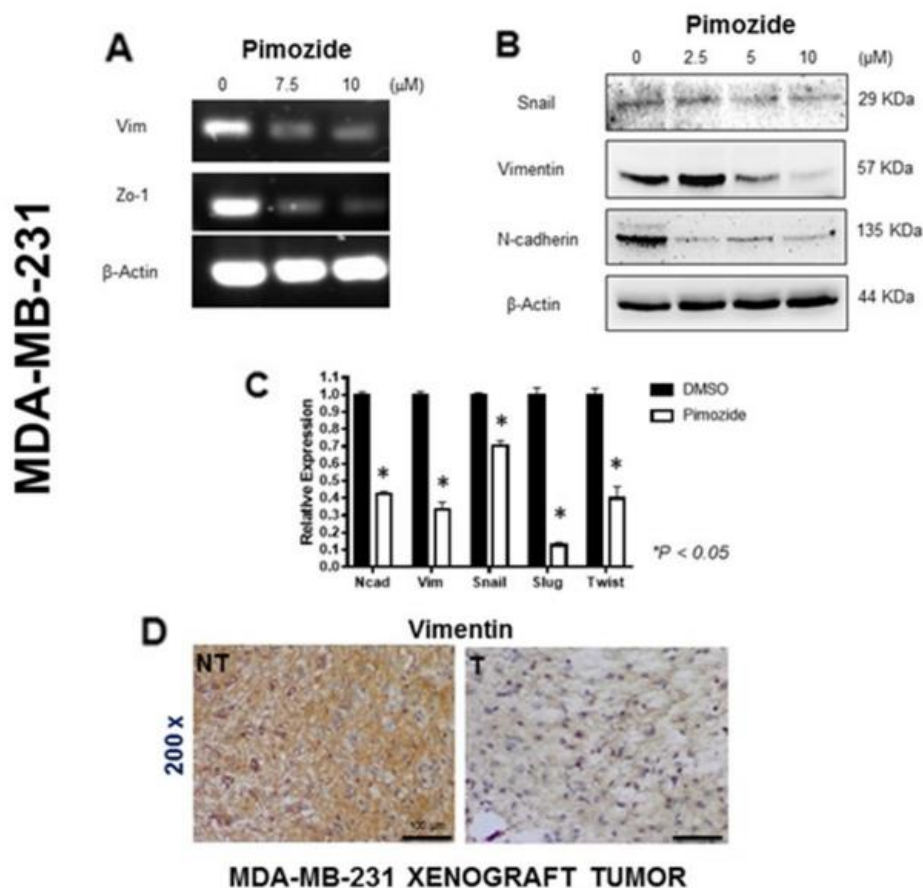


Εικόνα 115: Η πιμοζΐδη καταστέλλει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του μαστού και μειώνει την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. (A) Τα κύτταρα MDA-MB-231 και MCF7 αναπτύχθηκαν για 48 ώρες. Έπειτα, υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 7,5 μM Pimozide ή λειτούργησαν ως έλεγχος ή μάρτυρας (control) (DMSO) και προσδιορίστηκε η μετανάστευσή τους.

Χρονικές εικόνες των κυττάρων MDA-MB-231 και MCF7 αρχικά και μετά από 24 ώρες. (B)

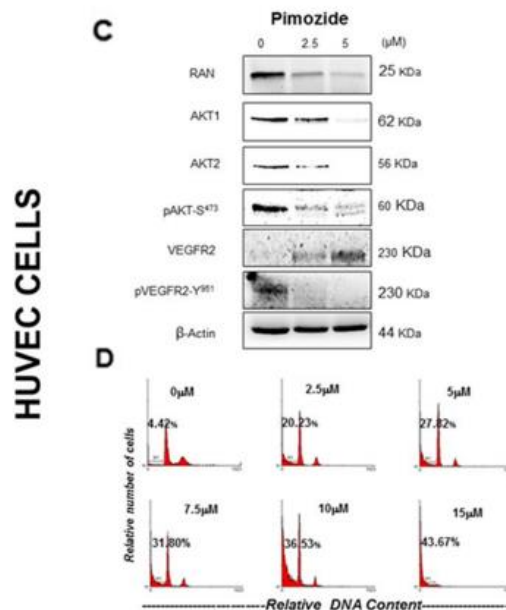
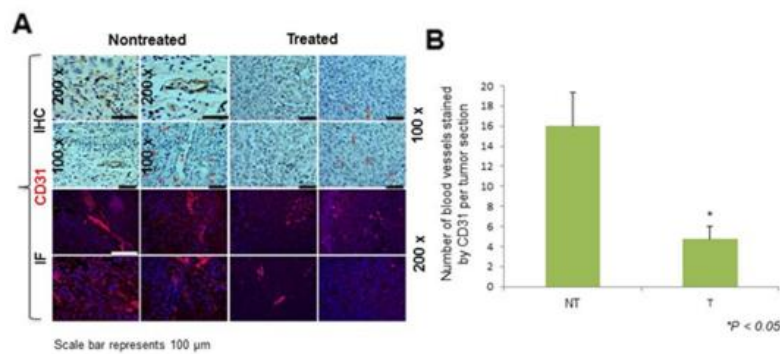
Ποσοτικοποίηση του ελέγχου (DMSO), που ορίζεται στο 100%, και των επεξεργασμένων (υποβεβλημένων σε θεραπεία) κυττάρων των καλλιιεργειών MDA-MB-231 και MCF7., 24 ώρες μετά (C) Σχετική έκφραση mRNA των μεταλλοπρωτεϊνών MMP1 και MMP14 σε κύτταρα MDA-MB-231 είτε χωρίς θεραπεία είτε σε θεραπεία με 7,5 μM Pimozide για 24 ώρες. (D) Western blot που δείχνει τα επίπεδα πρωτεΐνης της ενεργοποιημένης μεταλλοπρωτεΐνωσης MMP2 σε κύτταρα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με shScr, RAN-1, RAN-2 και RAN-4 shRNA για 24 ώρες. (E) Ανοσοϊστοχημική χρώση για τη MMP2 σε ξενομοσχεύματα όγκων ποντικών (NT & T). Η πιμοζΐδη αναστέλλει τη μετανάστευση των κυττάρων.

(<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26175>)



Εικόνα 116: Η πιμοζίδη επάγει τα μονοπάτια σηματοδότησης της επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) στα κύτταρα MDA-MB-231. (A) RT-PCR των mRNA δεικτών EMT Vimentin (Vim) και Zo-1 μετά από 24 ώρες θεραπείας με Pimozide σε 7,5 μM και 10 μM, που δείχνει μείωση σε σχέση με το mRNA για τη β-ακτίνη. (B) Western blot των πρωτεϊνών Snail, Vimentin και N-cadherin μετά από 24 ώρες θεραπείας με Pimozide. (Γ) Σχετικό επίπεδο mRNA για δείκτες EMT σε κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 7,5 μM Pimozide για 24 ώρες, όπου παρατηρείται μείωση της N-cadherin (Ncad), της Vimentin (Vim), του Snail, του Slug και του Twist σε σύγκριση με τα δείγματα που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία (control, DMSO). (D) Ανοσοϊστοχημική χρώση για τη Vimentin σε όγκους από ποντίκια που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία (NT) και ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία (T) με Pimozide (αντιπροσωπευτικό δείγμα 10 τομών ανά ομάδα).

(<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26175>)



Εικόνα 117: Η πιμοζΐδη αναστέλλει την έκφραση των δεικτών που σχετίζονται με την αγγειογένεση *in vivo* και επάγει την απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC. (A) Ανοσοϊστοχημική και ανοσοφθοριστική ανίχνευση του δείκτη CD31 των ενδοθηλιακών κυττάρων σε όγκους MDA-MB-231 από ποντίκια, που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία και ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με Pimozide. (B) Ιστόγραμμα που δείχνει τον αριθμό των αιμοφόρων αγγείων σε τομές όγκων ποντικών, που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με Pimozide, όπου οι όγκοι που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με Pimozide παρουσίασαν ~τριπλάσια μείωση της χρώσης του CD31. (C) Western blot των πρωτεϊνών AKT1, AKT2, pAKT, VEGFR2 και pVEGFR2 σε κύτταρα HUVEC, που υποβλήθηκαν σε 24ωρη θεραπεία με Pimozide. (D) Ανάλυση του DNA με κυτταρομετρία ροής των κυττάρων HUVEC, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για 24 ώρες με Pimozide. Η απόπτωση προσδιορίστηκε στην κυτταρομετρία ροής με το ποσοστό των υποδιπλοειδών (sub-G1) κυττάρων μετά από ανάλυση του κυτταρικού κύκλου. Το ποσοστό των κυττάρων με περιεκτικότητα σε DNA μικρότερη του G1 (sub-G1) υποδεικνύεται σε κάθε ιστόγραμμα.

(<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26175>)

7. Διερεύνηση στάσεων του κοινού στην επαναστόχευση αντιψυχωσικών φαρμάκων στον καρκίνο του μαστού

Στο πλαίσιο διερεύνησης των στάσεων του κοινού, σε σχέση με την επαναστόχευση αντιψυχωσικών φαρμάκων (drug repurposing) στον καρκίνο του μαστού, διενεργήθηκαν ερωτηματολόγια, στο πλαίσιο ποιοτικής έρευνας, τα οποία διανεμήθηκαν σε δείγμα 50 ατόμων. Οι ερωτήσεις κλειστού τύπου, που τέθηκαν, παρατίθεται ακολούθως, όπως και διαγράμματα, σε μορφή πίτας, όπου διαφαίνονται οι απαντήσεις, εκφρασμένες, ως ποσοστά επί τοις εκατό:

Ερωτηματολόγιο: Αντιλήψεις για τη Χρήση Αντιψυχωσικών ως Αντικαρκινικά Φάρμακα

1. Ποιο είναι το φύλο σας;

- Άνδρας
- Γυναίκα
- Άλλο

2. Ποια είναι η ηλικία σας;

- 18-24
- 25-34
- 35-44
- 45-54
- 55-64
- 65+

3. Ποιο είναι το υψηλότερο επίπεδο εκπαίδευσής σας;

- Δημοτικό
- Γυμνάσιο
- Λύκειο
- Πτυχίο

- Μεταπτυχιακό
- Διδακτορικό
- Άλλο

4. Έχετε ακούσει ποτέ για τη χρήση αντιψυχωσικών φαρμάκων ως αντικαρκινικά;

- Ναι
- Όχι

5. Αν ναι, από ποια πηγή πληροφορήθηκατε για αυτό;

- Ιατρικό προσωπικό
- Διαδίκτυο
- Φίλοι/Οικογένεια
- Μέσα μαζικής ενημέρωσης
- Άλλο

6. Πιστεύετε ότι οι πληροφορίες που λάβατε ήταν αξιόπιστες;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

7. Πόσο αποτελεσματικά πιστεύετε ότι είναι τα αντιψυχωσικά φάρμακα ως αντικαρκινικά;

- Πολύ αποτελεσματικά
- Κάπως αποτελεσματικά
- Λίγο αποτελεσματικά
- Καθόλου αποτελεσματικά
- Δεν έχω γνώμη

8. Πόσο ασφαλή πιστεύετε ότι είναι τα αντιψυχωσικά φάρμακα ως αντικαρκινικά;

- Πολύ ασφαλή
- Κάπως ασφαλή
- Λίγο ασφαλή
- Καθόλου ασφαλή
- Δεν έχω γνώμη

9. Θα δοκιμάζατε ποτέ ένα αντιψυχωσικό φάρμακο ως αντικαρκινικό αν σας το πρότεινε ο γιατρός σας;

- Ναι
- Όχι
- Ίσως

10. Πιστεύετε ότι οι γιατροί είναι επαρκώς ενημερωμένοι για αυτή τη χρήση των αντιψυχωσικών;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

11. Έχετε ποτέ εσείς ή κάποιο κοντινό σας πρόσωπο λάβει αντιψυχωσικά φάρμακα;

- Ναι, εγώ
- Ναι, κάποιο κοντινό μου πρόσωπο
- Όχι

12. Πιστεύετε ότι οι ασθενείς πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να επιλέγουν εναλλακτικές θεραπείες, που περιλαμβάνουν αντιψυχωσικά φάρμακα:

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

13. Πιστεύετε ότι οι ασθενείς πρέπει να ενημερώνονται για όλες τις πιθανές χρήσεις των φαρμάκων που τους συνταγογραφούνται;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

14. Πιστεύετε ότι τα ΜΜΕ καλύπτουν επαρκώς τις καινοτόμες θεραπείες για τον καρκίνο;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

15. Πιστεύετε ότι οι φαρμακευτικές εταιρείες είναι ειλικρινείς σχετικά με τις πολλαπλές χρήσεις των φαρμάκων τους;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

16. Πόσο εμπιστεύεστε τον γιατρό σας σχετικά με τη συνταγογράφηση φαρμάκων;

- Πολύ
- Αρκετά

- Μέτρια
- Λίγο
- Καθόλου

17. Πόσο εμπιστεύεστε τις φαρμακευτικές εταιρείες;

- Πολύ
- Αρκετά
- Μέτρια
- Λίγο
- Καθόλου

18. Πόσο εμπιστεύεστε την επιστημονική έρευνα σχετικά με την ιατρική και τις θεραπείες;

- Πολύ
- Αρκετά
- Μέτρια
- Λίγο
- Καθόλου

19. Πιστεύετε ότι η χρήση αντιψυχωσικών φαρμάκων ως αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να στιγματίσει τους ασθενείς;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

20. Πιστεύετε ότι τα αντιψυχωσικά φάρμακα πρέπει να εξετάζονται περαιτέρω για αντικαρκινικές ιδιότητες;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

21. Πιστεύετε ότι οι ασθενείς έχουν το δικαίωμα να επιλέγουν τη θεραπεία τους ακόμη και αν δεν είναι ευρέως αποδεκτή;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

22. Ποιες είναι οι κύριες ανησυχίες σας σχετικά με τη χρήση αντιψυχωσικών ως αντικαρκινικά φάρμακα;

- Αποτελεσματικότητα
- Ασφάλεια
- Παρενέργειες
- Κόστος
- Άλλο

23. Πιστεύετε ότι οι ασθενείς πρέπει να έχουν πρόσβαση σε πειραματικές θεραπείες;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

24. Ποιους παράγοντες θεωρείτε πιο σημαντικούς κατά την επιλογή μιας αντικαρκινικής θεραπείας;

- Αποτελεσματικότητα

- Ασφάλεια
- Κόστος
- Διαθεσιμότητα
- Άλλο

25. Πώς αξιολογείτε τη συνολική σας εμπειρία με το σύστημα υγείας;

- Πολύ καλή
- Καλή
- Ουδέτερη
- Κακή
- Πολύ κακή

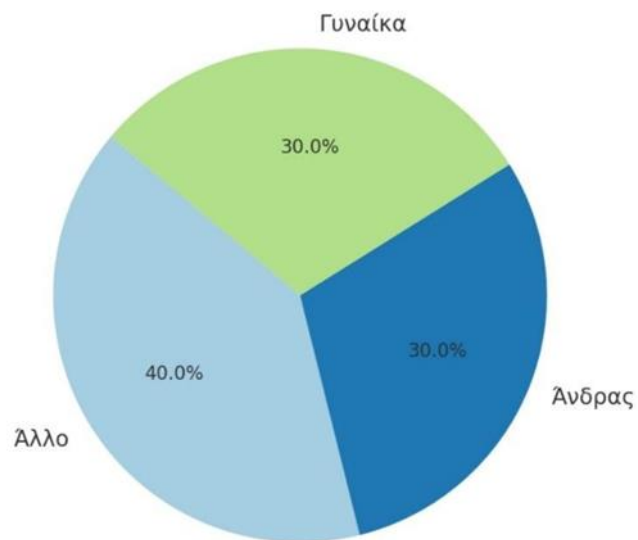
26. Πιστεύετε ότι το σύστημα υγείας παρέχει επαρκή ενημέρωση για τις νέες θεραπείες;

- Ναι
- Όχι
- Δεν είμαι σίγουρος/η

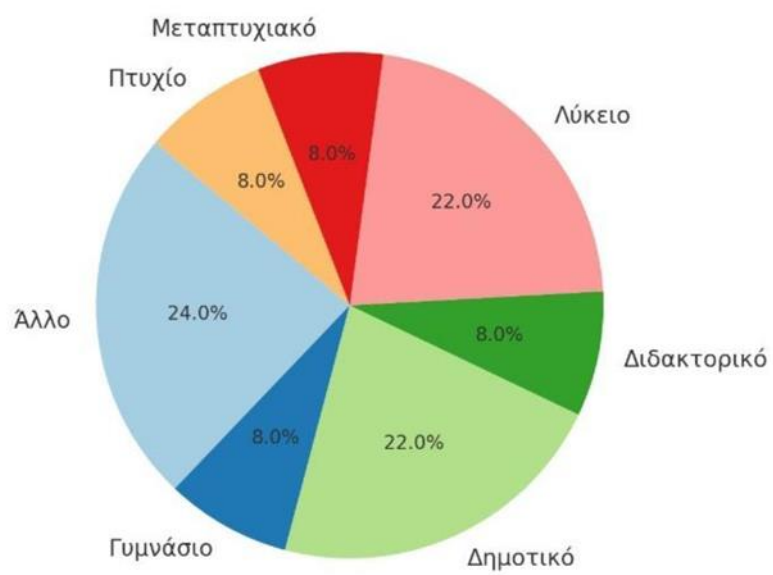
Σας ευχαριστούμε για το χρόνο και τις απαντήσεις σας!

Ακολούθως και η ποσοτικοποίηση των αποκρίσεων του δείγματος, σε εικόνες διαγραμμάτων, σε μορφή πίτας, που καθιστούν εμφανές πως πρέπει να προτεραιοποιηθεί η ενημέρωση του κοινού για τα αντιψυχωσικά φάρμακα:

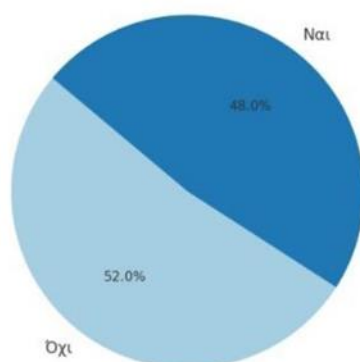
1: Ποιο είναι το φύλο σας;



3: Ποιο είναι το υψηλότερο επίπεδο εκπαίδευσής σας;



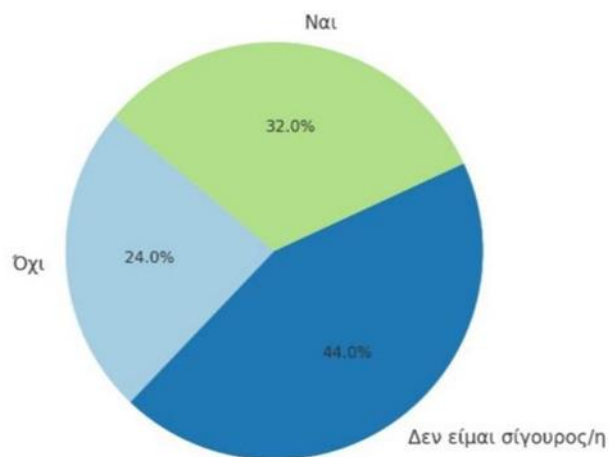
4: Έχετε ακούσει ποτέ για τη χρήση αντιψυχωσικών φαρμάκων ως αντικαρκινικά;



5: Αν ναι, από ποια πηγή πληροφορήθηκατε για αυτό;



6: Πιστεύετε ότι οι πληροφορίες που λάβατε ήταν αξιόπιστες;



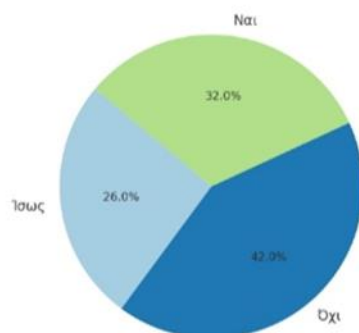
7: Πόσο αποτελεσματικά πιστεύετε ότι είναι τα αντιψυχωσικά φάρμακα ως αντικαρκινικά;



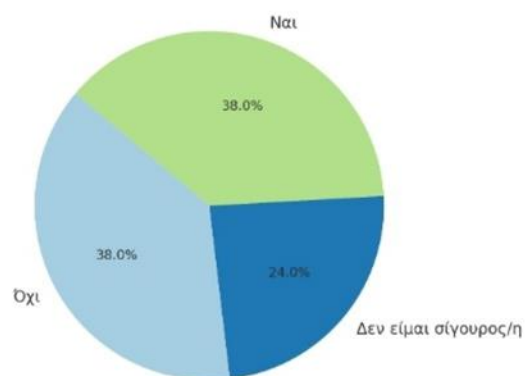
8: Πόσο ασφαλή πιστεύετε ότι είναι τα αντιψυχωσικά φάρμακα ως αντικαρκινικά;



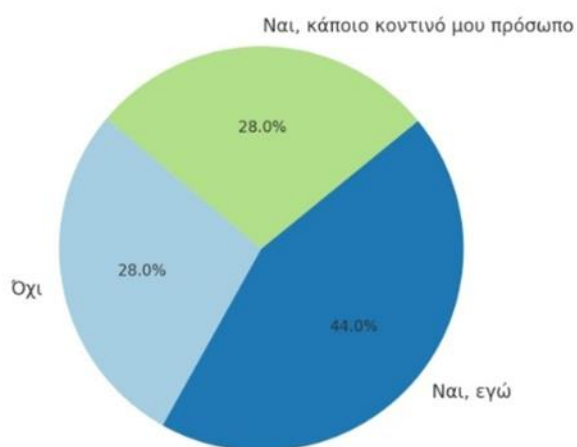
9: Θα δοκιμάζατε ποτέ ένα αντιψυχωσικό φάρμακο ως αντικαρκινικό αν σας το πρότεινε ο γιατρός σας;



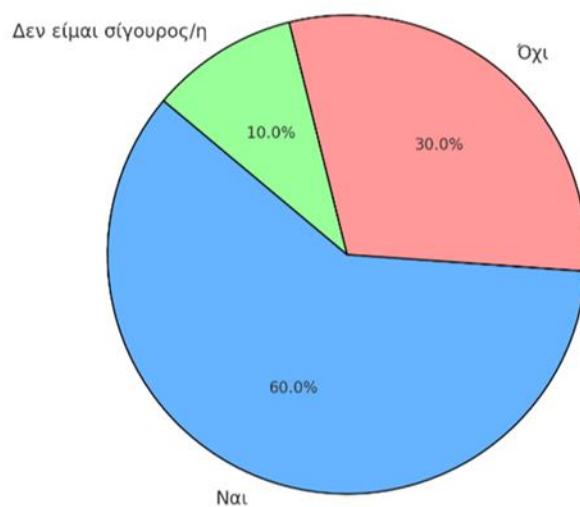
10: Πιστεύετε ότι οι γιατροί είναι επαρκώς ενημερωμένοι για αυτή τη χρήση των αντιψυχωσικών;



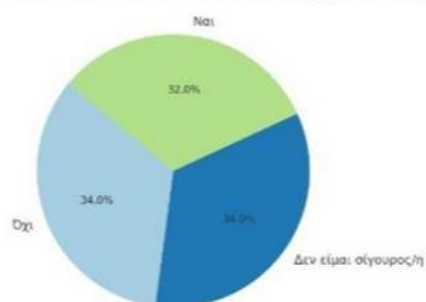
11: Έχετε ποτέ εσείς ή κάποιο κοντινό σας πρόσωπο λάβει αντιψυχωσικά φάρμακα;



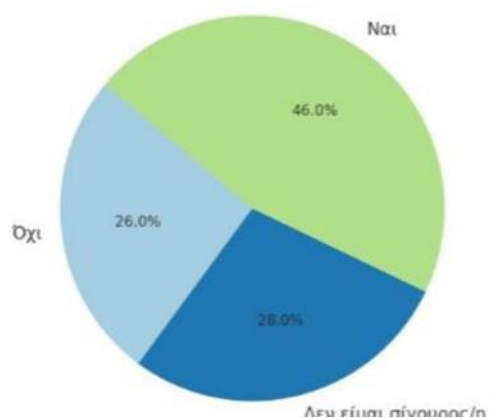
Πιστεύετε ότι οι ασθενείς πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να επιλέγουν εναλλακτικές θεραπείες που περιλαμβάνουν αντιψυχωσικά φάρμακα;



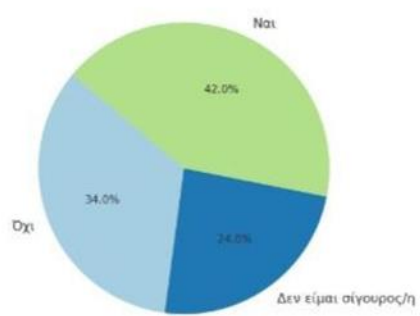
13: Πιστεύετε ότι οι ασθενείς πρέπει να ενημερώνονται για όλες τις πιθανές χρήσεις των φαρμάκων που τους συνταγογραφούνται;



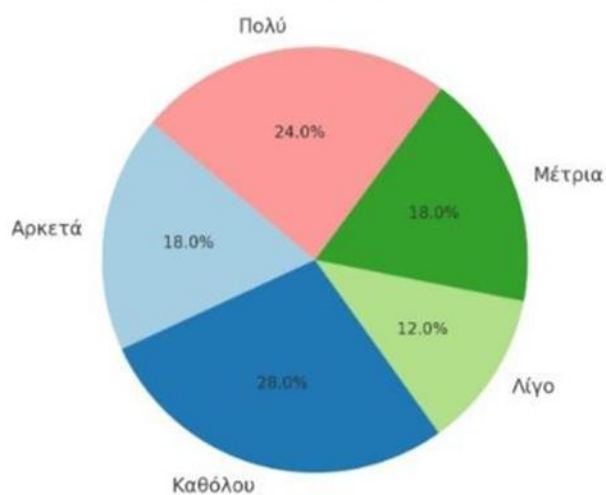
14: Πιστεύετε ότι τα ΜΜΕ καλύπτουν επαρκώς τις καινοτόμες θεραπείες για τον καρκίνο;



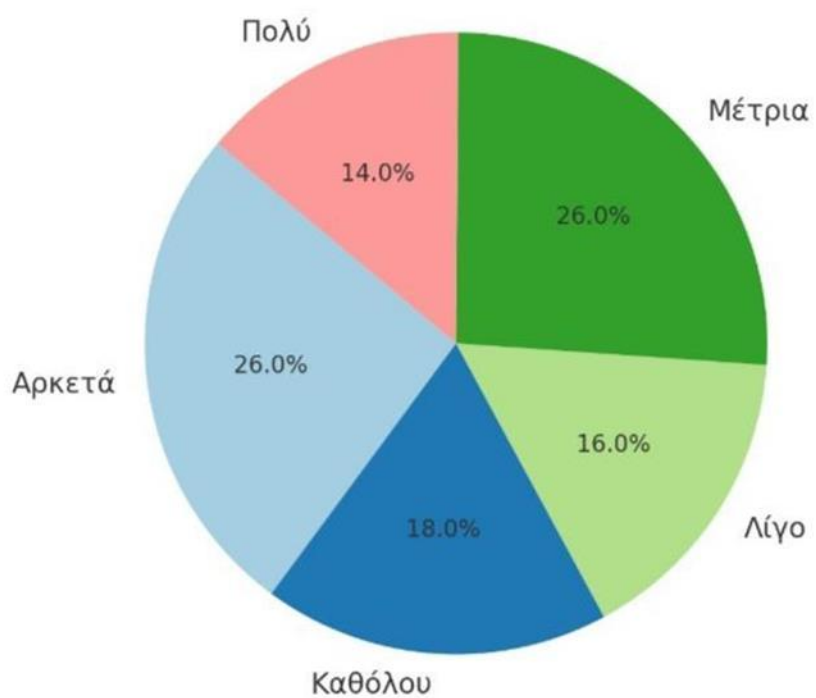
15: Πιστεύετε ότι οι φαρμακευτικές εταιρείες είναι ειλικρινείς σχετικά με τις πολλαπλές χρήσεις των φαρμάκων τους;



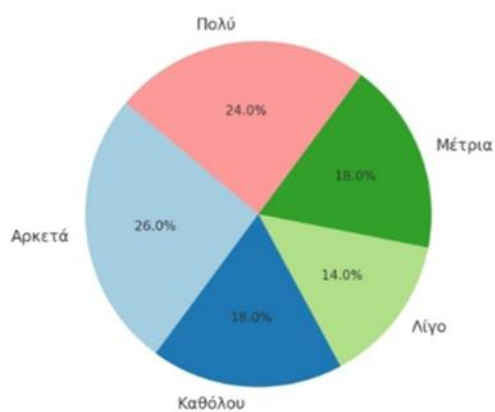
16: Πόσο εμπιστεύεστε τον γιατρό σας σχετικά με τη συνταγογράφηση φαρμάκων;



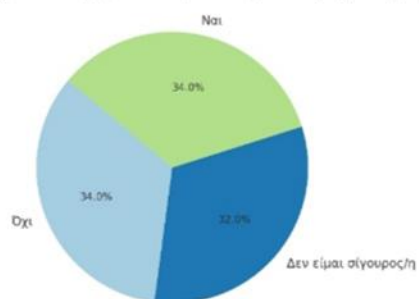
17: Πόσο εμπιστεύεστε τις φαρμακευτικές εταιρείες;



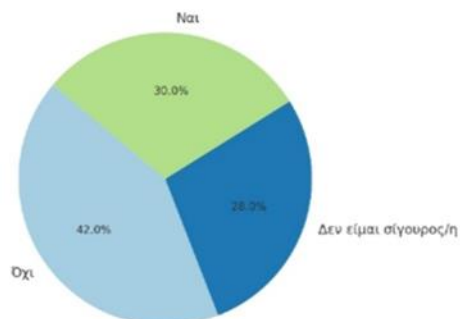
18: Πόσο εμπιστεύεστε την επιστημονική έρευνα σχετικά με την ιατρική και τις θεραπείες;



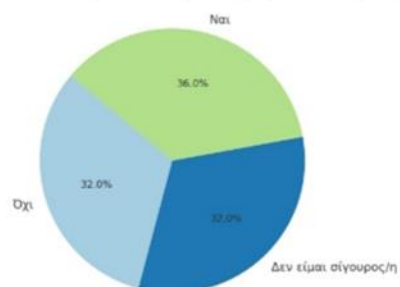
19: Πιστεύετε ότι η χρήση αντιψυχωσικών φαρμάκων ως αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να στιγματίσει τους ασθενείς;



20: Πιστεύετε ότι τα αντιψυχωσικά φάρμακα πρέπει να εξετάζονται περαιτέρω για αντικαρκινικές ιδιότητες;



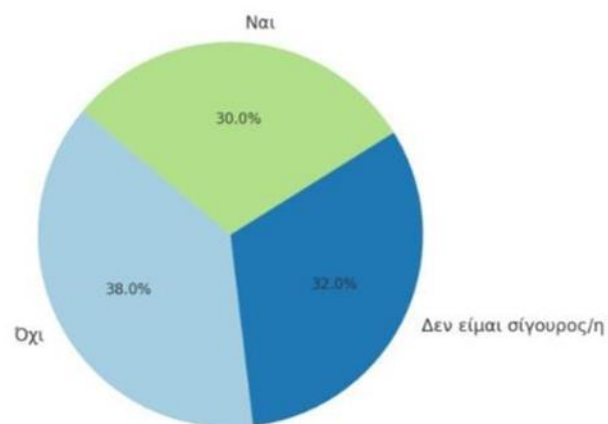
21: Πιστεύετε ότι οι ασθενείς έχουν το δικαίωμα να επιλέγουν τη θεραπεία τους ακόμη και αν δεν είναι ευρέως αποδεκτή;



22: Ποιες είναι οι κύριες ανησυχίες σας σχετικά με τη χρήση αντιψυχωσικών ως αντικαρκινικά φάρμακα;



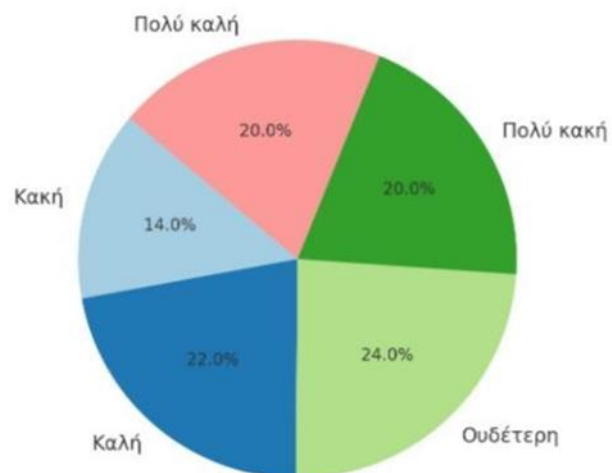
23: Πιστεύετε ότι οι ασθενείς πρέπει να έχουν πρόσβαση σε πειραματικές θεραπείες;



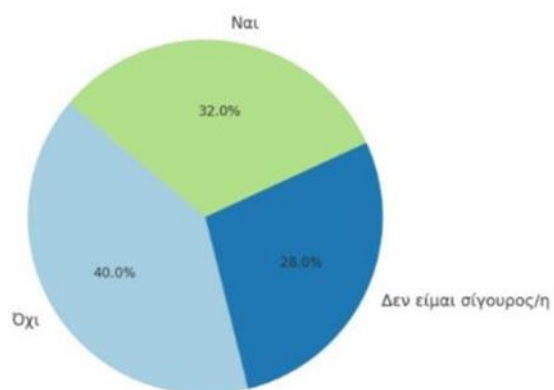
24: Ποιοι παράγοντες θεωρείτε πιο σημαντικούς κατά την επιλογή μιας αντικαρκινικής θεραπείας;



25: Πώς αξιολογείτε τη συνολική σας εμπειρία με το σύστημα υγείας;



26: Πιστεύετε ότι το σύστημα υγείας παρέχει επαρκή ενημέρωση για τις νέες θεραπείες;



8. Συμπεράσματα- Συζήτηση

Ο καρκίνος αποτελεί πολυπαραγοντική νόσο, με μεγάλη πολυπλοκότητα στη φαρμακευτική και όχι μόνο, αντιμετώπισή του, λόγω της υψηλής του ετερογένειας. Πέραν των ευρέως χρησιμοποιούμενων αντινεοπλασματικών φαρμάκων, υπό το πρίσμα του drug repurposing, αναδεικνύονται αντιψυχωσικά φάρμακα, όπως η αριπιπραζόλη, η χλωροπρομαζίνη και η πιμοζίδη για την αντικαρκινική τους δράση, συγκεκριμένα στον καρκίνο του μαστού.

Η αριπιπραζόλη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Προκαλεί απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) και ρυθμίζει γονίδια που εμπλέκονται στην απόπτωση. Τα αποτελέσματα δείχνουν αυξημένη έκφραση των προ-αποπτωτικών γονιδίων και μείωση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων, ενισχύοντας την αποπτωτική δράση του φαρμάκου. Παράλληλα, σε συνδυασμό με την ταμοξιφαίνη, δηλαδή, ως σχήμα συγχωρήγησης, η χλωροπρομαζίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα MCF-7 και TAMR-1. Ο θάνατος των κυττάρων αυτών είναι, κυρίως, νεκρωτικός παρά αποπτωτικός. Ταυτόχρονα, συνδράμει στην αντιμετώπιση της αντίστασης των κυττάρων στην ταμοξιφαίνη. Τέλος, η πιμοζίδη παρουσιάζει αντικαρκινική δράση, στοχεύοντας τον μεταβολισμό της γλυκόζης στα καρκινικά κύτταρα, μέσω της αναστολής του φαινομένου Warburg. Αναστέλλει το μονοπάτι PI3K/Akt/MDM2, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της πρωτεΐνης p53 και μείωση της PKM2, καταστέλλοντας την αερόβια γλυκόλυση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, η πιμοζίδη αναστέλλει την επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάβαση και την κυτταρική μετανάστευση, παρουσιάζοντας, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* αντικαρκινική δράση. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τις τρεις ουσίες ως υποψήφιες για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα, για την εξακρίβωση των αντινεοπλασματικών τους δράσεων και αντιστάθμιση των αρνητικών συνεπειών της αξιοποίησής τους, όπως η υπερλακτιναιμία ή άλλες παρενέργειες.

9. Περίληψη

Η παρούσα εργασία εμβαθύνει στον καρκίνο και ειδικότερα, στον καρκίνο του μαστού. Αρχικά, εξετάζει τις αντineοπλασματικές θεραπείες, συμβατικές και πιο καινοτόμες, εστιάζοντας στη θεμελιώδη αξία της επαναστόχευσης, ήδη, ευρέως χρησιμοποιούμενων φαρμάκων, σε νέα πεδία εφαρμογής, όπως η αξιοποίηση των αντιψυχωσικών φαρμάκων στην αντineοπλασματική θεραπεία. Για τον σκοπό αυτό, αναδεικνύονται εκτενώς οι ακολουθούμενες πειραματικές πορείες *in vitro* αξιολόγησης των αντικαρκινικών ιδιοτήτων αντιψυχωσικών, είτε ως μονοθεραπεία είτε σε σχήμα συγχορήγησης, με συμβατικά αντineοπλασματικά φάρμακα. Έτσι, με εφαρμογή Κυτταρομετρίας Ροής, Ανοσοαποτύπωσης κατά Western και άλλων μεθόδων, εξετάζεται η επίδραση των αντιψυχωσικών σε κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, σχετιζόμενα με την καρκινογένεση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες αντιψυχωσικών, όπως η αριπιπραζόλη, η χλωροπρομαζίνη και η πιμοζίδη και τον μείζονα ρόλο τους στη ρύθμιση της έκφρασης αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Ως απότοκο, τα αντιψυχωσικά παρουσιάζονται ως υποψήφιοι αντineοπλασματικοί παράγοντες, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα, τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* επίπεδο, για την εδραίωσή τους στην κλινική πράξη.

Abstract

This paper delves into cancer and, in particular, breast cancer. First, it examines antitumor therapies, both conventional and more innovative, focusing on the fundamental value of retargeting already widely used drugs to new fields of application, such as the use of antipsychotic drugs in antineoplastic therapy. For this purpose, the following experimental courses of *in vitro* evaluation of the antitumor properties of antipsychotics, either as monotherapy or in co-administration with conventional antineoplastic drugs, are highlighted extensively. Thus, by applying Flow Cytometry, Western Blot and other methods, the effect of antipsychotics on cellular signaling pathways related to carcinogenesis is examined. The results indicated the antitumor properties of antipsychotics, including aripiprazole, chlorpromazine and pimozide and their major role in regulating the expression of antiapoptotic proteins. It is of interest to note that antipsychotics could be considered as candidate antineoplastic agents, however thorough research studies, both preclinical and clinical, are needed to establish them in clinical practice.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abal, M., Andreu, J., & Barasoain, I. (2003). Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Current Cancer Drug Targets*, 3(3), 193–203. <https://doi.org/10.2174/1568009033481967>
2. Abel, E. A. (2000). Immunosuppressant and cytotoxic drugs: unapproved uses or indications. *Clinics in Dermatology*, 18(1), 95–101. [https://doi.org/10.1016/s0738-081x\(99\)00098-x](https://doi.org/10.1016/s0738-081x(99)00098-x)
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Programmed cell death (Apoptosis). *Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26873>
4. Annexin V and PI Staining Apoptosis Assay by Flow Cytometry rotocol. (n.d.). Bio-Techne. <https://www.bio-techne.com/resources/protocols-troubleshooting/apoptosis-flow-annexin-v-protocol>
5. Antoszczak, M., Markowska, A., Markowska, J., & Huczyński, A. (2021). Antidepressants and antipsychotic agents as repurposable oncological drug candidates. *Current Medicinal Chemistry*, 28(11), 2137–2174. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200907141452>
6. Aripiprazole – mechanism of action, psychopharmacology and clinical application. (2020, October 23). <https://psychscenehub.com/psychinsights/aripiprazole-mechanism-of-action-psychopharmacology-and-clinical-application/>
7. Badran, A., Tul-Wahab, A., Zafar, H., Mohammad, N., Imad, R., Khan, M. A., Baydoun, E., & Choudhary, M. I. (2020). Antipsychotics drug aripiprazole as a lead against breast cancer cell line (MCF-7) in vitro. *PLoS ONE*, 15(8), e0235676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235676>
8. BCRJ. (2022, November 23). Celula2 - BCRJ. <https://bcrj.org.br/celula/mcf-10a/>
9. Birgisdottir, Å. B., & Johansen, T. (2020). Autophagy and endocytosis – interconnections and interdependencies. *Journal of Cell Science*, 133(10). <https://doi.org/10.1242/jcs.228114>
10. Blevins, H. M., Xu, Y., Biby, S., & Zhang, S. (2022). The NLRP3 Inflammasome Pathway: A review of mechanisms and inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.879021>
11. Brinkley, B. R., Beall, P. T., Wible, L. J., Mace, M. L., Turner, D. S., & Cailleau, R. M. (1980). Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer research*, 40(9), 3118–3129

12. Bonios, M., Repassos, E., Poulos, M., Melexopoulou, X., & Papadakou, M. (2007). Chemical carcinogenesis. *Clinical Oncology*. eclass.hua.gr
13. Cheng, Y., Li, S., Gao, L., Zhi, K., & Ren, W. (2021). The molecular basis and therapeutic aspects of cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.761379>
14. Chlorpromazine: Uses, interactions, mechanism of action | DrugBank Online. (n.d.). DrugBank. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00477>
15. Correia, A. S., Gärtner, F., & Vale, N. (2021). Drug combination and repurposing for cancer therapy: the example of breast cancer. *Heliyon*, 7(1), e05948. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05948>
16. Dabiri, M., Firouzabadi, F. D., Yang, K., Barker, P. B., Lee, R. R., & Yousem, D. M. (2022). Neuroimaging in schizophrenia: A review article. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1042814>
17. Dakir, E., Pickard, A., Srivastava, K., McCrudden, C. M., Gross, S. R., Lloyd, S., Zhang, S., Margariti, A., Morgan, R., Rudland, P. S., & El-Tanani, M. (2018). The anti-psychotic drug pimozide is a novel chemotherapeutic for breast cancer. *Oncotarget*, 9(79), 34889–34910. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26175>
18. Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9, 205031212110343. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
19. Dhuriya, Y. K., & Sharma, D. (2018). Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1235-0>
20. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
21. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.who.int/today>
22. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
23. Ferreira, L. M. R., Hebrant, A., & Dumont, J. E. (2012). Metabolic reprogramming of the tumor. *Oncogene*, 31(36), 3999–4011. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.576>

24. Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., & Kroemer, G. (2011). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869–1883. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>
25. Gándara-Cortes, M., Vázquez-Boquete, Á., Fernández-Rodríguez, B., Viaño, P., Ínsua, D., Seoane-Seoane, A., Gude, F., Gallego, R., Fraga, M., Antúnez, J. R., Curiel, T., Pérez-López, E., & García-Caballero, T. (2017). Breast cancer subtype discrimination using standardized 4-IHC and digital image analysis. *Virchows Archiv*, 472(2), 195–203. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2194-z>
26. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
27. Hodgson, R., Wildgust, H. J., & Bushe, C. J. (2010). Review: Cancer and schizophrenia: is there a paradox? *Journal of Psychopharmacology*, 24(4_suppl), 51–60. <https://doi.org/10.1177/1359786810385489>
28. Horacek, J., Flegr, J., Tintera, J., Verebova, K., Spaniel, F., Novak, T., Brunovsky, M., Bubenikova-Valesova, V., Holub, D., Palenicek, T., & Höschl, C. (2011). Latent toxoplasmosis reduces gray matter density in schizophrenia but not in controls: Voxel-based-morphometry (VBM) study. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 13(7), 501–509. <https://doi.org/10.3109/15622975.2011.573809>
29. Hormone therapy for breast cancer fact sheet. (2022, July 12). Cancer.gov. <https://www.cancer.gov/types/breast/breast-hormone-therapy-fact-sheet>
30. Huang, Y., Chan, P., & Halliday, G. (2007). Genetics of Parkinson's Disease. In Elsevier eBooks (pp. 663–697). <https://doi.org/10.1016/b978-044452809-4/50169-1>
31. Hur, E., & Zhou, F. (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(8), 539–551. <https://doi.org/10.1038/nrn2870>
32. Hurley, J. H., & Emr, S. D. (2006). THE ESCRT COMPLEXES: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35(1), 277–298. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.102126>
33. Iliuta, F., Manea, M., Budisteanu, M., Ciobanu, A., & Manea, M. (2021). Magnetic resonance imaging in schizophrenia: Luxury or necessity? (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(1). <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10197>
34. Isoldi, M. C., Visconti, M. A., & Castrucci, A. M. (2005). Anti-cancer drugs: molecular mechanisms of action. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 5(7), 685–695. <https://doi.org/10.2174/1389557054368781>

35. Jacobs, A. T., Castaneda-Cruz, D. M., Rose, M. M., & Connelly, L. (2022). Targeted therapy for breast cancer: An overview of drug classes and outcomes. *Biochemical Pharmacology*, 204, 115209. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115209>
36. Jope, R., & Roh, M. (2006). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Current Drug Targets*, 7(11), 1421–1434. <https://doi.org/10.2174/1389450110607011421>
37. Juvet, L. K., Elvsaa, I. K. Ø., Leivseth, G., Anker, G., Bertheussen, G. F., Falkmer, U., Fors, E. A., Lundgren, S., Oldervoll, L. M., Thune, I., & Norderhaug, I. N. (2009). Rehabilitation of Breast Cancer Patients. Knowledge Centre for the Health Services at The Norwegian Institute of Public Health (NIPH).
38. Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 7(8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>
39. Kendall, T. (n.d.). Necrosis – pathologia. <https://pathologia.ed.ac.uk/topic/necrosis/>
40. Khalid, N., & Azimpouran, M. (2023, March 6). Necrosis. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/>
41. Khan, H. J., Rohondia, S. O., Ahmed, Z. S. O., Zalavadiya, N., & Dou, Q. P. (2020). Increasing opportunities of drug repurposing for treating breast cancer by the integration of molecular, histological, and systemic approaches. In Elsevier eBooks (pp. 121–172). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819668-7.00005-1>
42. Kołat, D., Kałuzińska, Ż., Bednarek, A. K., & Płuciennik, E. (2019). The biological characteristics of transcription factors AP-2 α and AP-2 γ and their importance in various types of cancers. *Bioscience Reports*, 39(3). <https://doi.org/10.1042/bsr20181928>
43. Kovac, M. B., & Seruga, B. (2024). Potentially fatal complications of new systemic anticancer therapies: pearls and pitfalls in their initial management. *Radiology and Oncology*, 58(2), 170–178. <https://doi.org/10.2478/raon-2024-0027>
44. Kwon, J. S., Kim, E., Kang, D., Choi, J. S., Yu, K., Jang, I., Shin, S., & Group, N. a. S. (2008). Taq1A polymorphism in the dopamine D2 receptor gene as a predictor of clinical response to aripiprazole. *European Neuropsychopharmacology*, 18(12), 897–907. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.07.010>
45. Lang, U. E., Puls, I., Müller, D. J., Strutz-Seebohm, N., & Gallinat, J. (2007). Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20(6), 687–702. <https://doi.org/10.1159/000110430>
46. Lee, C. (2017). A simple outline of methods for protein isolation and purification. *Endocrinology and Metabolism*, 32(1), 18. <https://doi.org/10.3803/enm.2017.32.1.18>

47. Li, J., Qu, P., Zhou, X., Ji, Y., Yuan, S., Liu, S., & Zhang, Q. (2022). Pimozide inhibits the growth of breast cancer cells by alleviating the Warburg effect through the P53 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113063. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113063>
48. Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews. Cancer*, 3(5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
49. Mateo, J., Steuten, L., Aftimos, P., André, F., Davies, M., Garralda, E., Geissler, J., Husereau, D., Martinez-Lopez, I., Normanno, N., Reis-Filho, J. S., Stefani, S., Thomas, D. M., Westphalen, C. B., & Voest, E. (2022). Delivering precision oncology to patients with cancer. *Nature medicine*, 28(4), 658–665. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01717-2>
50. McCutcheon, R. A., Krystal, J. H., & Howes, O. D. (2020). Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. *World Psychiatry*, 19(1), 15–33. <https://doi.org/10.1002/wps.20693>
51. MCF-7/TAMR-1 Human Breast Cancer Cell Line | SCC101. (n.d.). https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/MCF-7-TAMR-1-Human-Breast-Cancer-Cell-Line,MM_NF-SCC101
52. Mei, Y., Wu, D. C., & Zhou, N. (2018b). Astrocytic regulation of glutamate transmission in schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00544>
53. Michalczyk, A., Pełka-Wysiecka, J., Kucharska-Mazur, J., Wroński, M., Misiak, B., & Samochowiec, J. (2020). Association between DRD2 and ANKK1 polymorphisms with the deficit syndrome in schizophrenia. *Annals of General Psychiatry*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12991-020-00289-0>
54. Milestones in cancer research and discovery. (2020, August 31). Cancer.gov. <https://www.cancer.gov/research/progress/250-years-milestones>
55. Mota, A., Evangelista, A., Macedo, T., Oliveira, R., Scapulatempo-Neto, C., Vieira, R., & Marques, M. (2017). Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6093>
56. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2024, August 5). Antineoplastic agents. LiverTox- NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548022/>
57. NCI Dictionary of Cancer Terms. (n.d.). Cancer.gov. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/ki-67-proliferation-index>

58. Nordentoft, M., Plana-Ripoll, O., & Laursen, T. M. (2021). Cancer and schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry*, 34(3), 260–265. <https://doi.org/10.1097/ycp.0000000000000697>
59. Orap (pimozide) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more. (n.d.). <https://reference.medscape.com/drug/orap-pimozide-342982#10>
60. Osman, R., Tacnet-Delorme, P., Kleman, J., Millet, A., & Frachet, P. (2017). Calreticulin release at an early stage of death modulates the clearance by macrophages of apoptotic cells. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01034>
61. Othman, B. K. (2023). Re: Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland mimicking Pleomorphic adenoma on Cytology: a case report. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 75(3), 2737–2738. <https://doi.org/10.1007/s12070-023-03806-1>
62. Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
63. Penedo, M. A., Rivera-Baltanás, T., Pérez-Rodríguez, D., Allen, J., Borrajo, A., Alonso-Crespo, D., Fernandez-Pereira, C., Nieto-Araujo, M., Ramos-García, S., Barreiro-Villar, C., Caruncho, H. J., Olivares, J. M., & Agís-Balboa, R. C. (2021). The role of dopamine receptors in lymphocytes and their changes in schizophrenia. *Brain Behavior & Immunity - Health*, 12, 100199. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100199>
64. PharmGKB. (n.d.). PharmGKB. <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA166228061>
65. PharmGKB. (n.d.-b). PharmGKB. <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA10026>
66. Pimozide: Uses, interactions, mechanism of action | DrugBank Online. (n.d.). DrugBank. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01100>
67. Pitot H. C. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, 72(3 Suppl), 962–970. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930801\)72:3+<962::aid-cnrcr2820721303>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930801)72:3+<962::aid-cnrcr2820721303>3.0.co;2-h)
68. Psychopharmacology and clinical application of aripiprazole long acting injections – Review of Abilify Maintena & Aristada. (2021, September 21). <https://psychscenehub.com/psychinsights/psychopharmacology-of-aripiprazole-long-acting-injection/>
69. Qaddumi, W. N., & Jose, P. A. (2021). The role of the renal dopaminergic system and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Biomedicines*, 9(2), 139. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020139>

70. Quock, R. (n.d.). Chapter 18: Antipsychotics – Drugs and Behavior. <https://opentext.wsu.edu/biopsychological-effects-alcohol-drugs/chapter/chapter-17-antipsychotics/>
71. Radiation therapy side effects. (2022, January 11). Cancer.gov. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy/side-effects>
72. Raza, M., & Su, S. (2020). Differential roles for dopamine d1-like and d2-like receptors in learning and behavior of honeybee and other insects. *Applied Ecology and Environmental Research*. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(1), 1317–1327. https://doi.org/10.15666/aeer/1801_13171327
73. Rodríguez-Nuevo, A., & Zorzano, A. (2019). The sensing of mitochondrial DAMPs by non-immune cells. *Cell Stress*, 3(6), 195–207. <https://doi.org/10.15698/cst2019.06.190>
74. Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-Associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Network*, 18(4). <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
75. Rosen, E., Drilon, A., & Chakravarty, D. (2022). Precision Oncology: 2022 in Review. *Cancer discovery*, 12(12), 2747–2753. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-1154>
76. Seki, T., & Katsuki, H. (2022). Mammalian microautophagy: mechanism and roles in disease. In Elsevier eBooks (pp. 385–397). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822003-0.00027-9>
77. Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1(2), 109–126.
78. Sharma, H., & Wadhwa, R. (2023, May 22). *Mercaptopurine*. StatPearls – NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557620/>
79. Shi, X., Wang, J., Lei, Y., Cong, C., Tan, D., & Zhou, X. (2019). Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, 19, 4529-4535. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10121>
80. Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA a Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
81. Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>

82. Staging & Grade - Breast Pathology | Johns Hopkins Pathology. (n.d.). <https://pathology.jhu.edu/breast/staging-grade/>
83. Stringer, J. L., & Snyder, I. S. (2013, April 4). Anticancer drug | Pharmacology, Mechanisms & Side Effects. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/anticancer-drug>
84. Targeted Drug therapy | Breast cancer treatment. (n.d.). American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/targeted-therapy-for-breast-cancer.html>
85. Targeted therapy drug list by cancer type. (2024, August 12). Cancer.gov. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/approved-drug-list#targeted-therapy-approved-for-breast-cancer>
86. Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., & Kumar, S. (2021). Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*, Volume 13, 303–328. <https://doi.org/10.2147/jep.s267383>
87. Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
88. Vlachos N, Lampros M, Voulgaris S, Alexiou GA. Repurposing Antipsychotics for Cancer Treatment. *Biomedicines*. 2021; 9(12):1785. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121785>
89. Wani, S. N., Singh, S., Sharma, N., Zahoor, I., Grewal, S., & Gupta, S. (2023b). Transferosome-Based Intranasal Drug Delivery Systems for the Management of Schizophrenia: a Futuristic Approach. *BioNanoScience*. <https://doi.org/10.1007/s12668-023-01249-0>
90. Welsh, J. (2013). Animal models for studying prevention and treatment of breast cancer. In Elsevier eBooks (pp. 997–1018). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415894-8.00040-3>
91. Westergard, L., Christensen, H. M., & Harris, D. A. (2007). The cellular prion protein (PrPC): Its physiological function and role in disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(6), 629–644. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.02.011>
92. Western Blot | Antibodies.com. (n.d.). Antibodies.com. <https://www.antibodies.com/applications/western-blotting>

93. Yde, C. W., Clausen, M. P., Bennetzen, M. V., Lykkesfeldt, A. E., Mouritsen, O. G., & Guerra, B. (2009). The antipsychotic drug chlorpromazine enhances the cytotoxic effect of tamoxifen in tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant human breast cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 20(8), 723–735. <https://doi.org/10.1097/cad.0b013e32832ec041>
94. Yuji Sakai, Ikuko Koyama-Honda, Masashi Tachikawa, Roland L. Knorr, Noboru Mizushima, Modeling Membrane Morphological Change during Autophagosome Formation, *iScience*, Volume 23, Issue 9, 2020, 101466, ISSN 2589-0042, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101466>.
95. Zarou, M. M., Vazquez, A., & Helgason, G. V. (2021). Folate metabolism: a re-emerging therapeutic target in haematological cancers. *Leukemia*, 35(6), 1539–1551. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01189-2>
96. Zhang, M., Zhang, Y. Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, Q., & Lu, H. (2021). TGF- β signaling and resistance to cancer therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.786728>

