



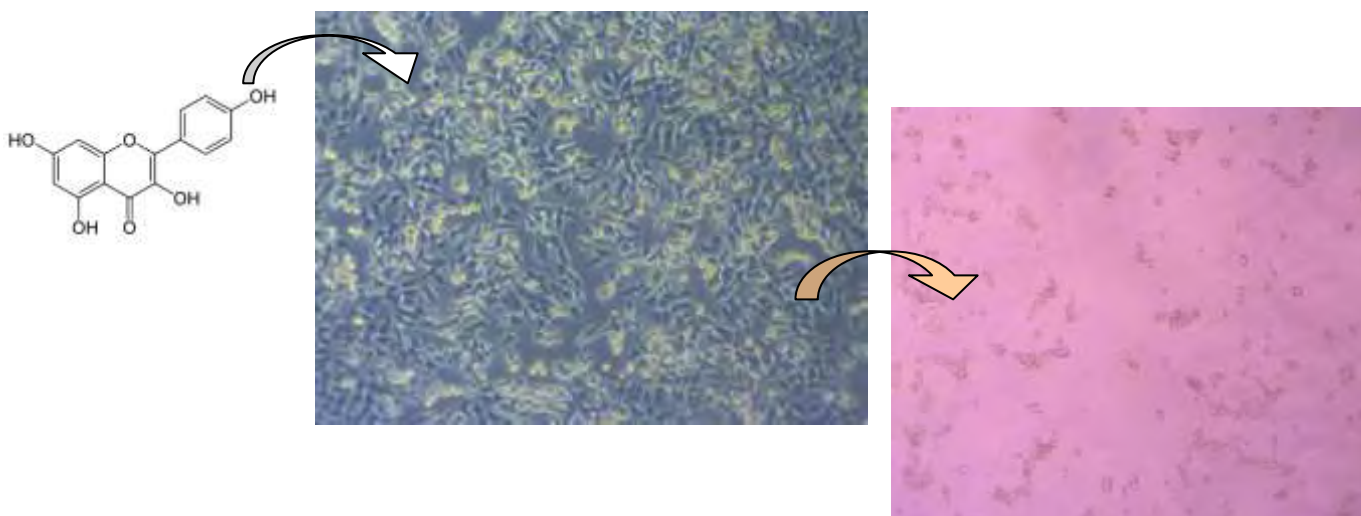
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή εργασία με θέμα:

"Μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης ημισυνθετικών γλυκοσιδών της
Καμφερόλης σε ορμονοεξαρτώμενο και μη καρκίνο του μαστού"

"Study of the cytotoxic effects of Kaempferol semisynthetic
glycosides on dependent and independent breast cancer"



Πετρισλής Απόστολος

Ημερομηνία 30/5/2017

Περίοδος εκπόνησης: Ακαδημαϊκό έτος 2016-2017

Επιβλέπων Καθηγητής: Δήμας Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής
Φαρμακολογίας, Τμήματος Ιατρικής Π.Θ

Συνεπιβλέποντες:

Ψαρρά Άννα- Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τους επιβλέποντες καθηγητές μου κ. Κωνσταντίνο Δήμα και την κα. Άννα-Μαρία Ψαρρά που μου έδωσαν την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την παρούσα μελέτη στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Π.Θ καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια. Επίσης, την υπεύθυνη διδάκτορά μου κα. Ευαγγελία Σερέτη για την συνεργασία, τις συμβουλές και όλα αυτά που μου έμαθε, αλλά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άνογη συνεργασία και βοήθεια. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη στήριξη που μου πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αντιπολλαπλασιαστικής - κυτταροτοξικής δράσης του γλυκοσιδίου της καμφερόλης, Τιλιροσίδη (Tiliroside) και του ακετυλιωμένου προϊόντος του, Tac (Tiliroside acetylated), σε κυτταρικές σειρές ορμονοεξαρτώμενου και μη ανθρώπινου καρκίνου του μαστού και η αξιολόγησή τους ως πιθανούς αντικαρκινικούς θεραπευτικούς παράγοντες.

Περίληψη

Ανάμεσα στους 5 συχνότερους τύπου καρκίνου που εμφανίστηκαν παγκοσμίως συμφωνά με τον Π.Ο.Υ ήταν και ο καρκίνος του μαστού. Η ανάγκη για καινοτόμες χημικές δομές στις οποίες θα βασιστεί η βιομηχανία φαρμάκων για την παραγωγή νέων αποτελεσματικότερων αντικαρκινικών ενώσεων οδήγησε στην μελέτη των φλαβονοειδών. Στη παρούσα μελέτη εξετάζεται η δράση του γλυκοσιδίου της καμφερόλης, Τιλιροσίδη (Tiliroside) και του ακετυλιωμένου προϊόντος του, Tac (Tiliroside acetylated), σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκίνου του μαστού MCF7/+ insulin και MDA MB231, με την δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας σουλφουροδαμίνης Β (SRB Cytotoxicity Assay). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν, πως ενώ το Tiliroside δεν εμφάνισε σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες, το Tac έδωσε καλύτερα αντικαρκινικά αποτελέσματα στις σειρές MCF7 συγκριτικά με τα MDA MB231. Όταν η δράση του Tac εξετάστηκε σε απενεργοποιημένο θρεπτικό cis-DMEM μαζί με οιστραδιόλη ($E_{2\beta}$) και έναν ανστολέα του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) τον ICI 182.780, είδαμε πως δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις μεγάλες συγκεντρώσεις του Tac, ωστόσο στις μικρές συγκεντρώσεις η E_2 και ο ICI φάνηκε να ενισχύουν την αντιπολλαπλασιαστική δράση του, σε σύγκριση με το Tac απουσία αυτών των δυο παραγόντων.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

- 1.1 Η βιολογία του καρκίνου
- 1.2 Ο καρκίνος του μαστού σε νούμερα
- 1.3 Φυσιολογία του μαστού
- 1.4 Παράγοντες αύξησης κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού
- 1.5 Κύριοι τύποι και αιτιολογία ανάπτυξης καρκίνου του μαστού
- 1.6 Ο Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος του Μαστού (TNBC)
- 1.7 Ο ρόλος των οιστρογόνων και ο καρκίνος του μαστού
- 1.8 Η αλληλεπίδραση σηματοδοτικών μονοπατιών της E₂ και insulin/IGF-I
- 1.9 Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs)
- 1.10 Εκλεκτικοί τροποποιητές του υποδοχέα οιστρογόνων (ER)
- 1.11 Αντικαρκινική δράση φυτικών προϊόντων
- 1.12 Τα Φλαβονοειδή
- 1.13 Η Καμφερόλη
 - 1.13.α Γενικά
 - 1.13.β Αντικαρκινικά αποτελέσματα
- 1.14 Η κυτταρική σειρά MCF-7
- 1.15 Η κυτταρική σειρά MDA MB231

2. Υλικά και Μέθοδοι

- 2.1. Κυτταρικές σειρές
- 2.2. Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων
- 2.3. Κατάψυξη κυττάρων
- 2.4. Απόψυξη κυττάρων
- 2.5. Καταμέτρηση των κυττάρων
- 2.7. Δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας σουλφοροδαμίνης B (SRB Cytotoxicity Assay)
- 2.8. Δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας Tac μαζί με Οιστραδιόλη και αναστολέα ICI
- 2.6 Η παρασκευή των γλυκοσυδίων της καμφερόλης
 - α. Η παρασκευή του Τιλιροσίδη από το φυτό *Platanus orientalis*
 - β. Ακετυλίωση προϊόντων
- 2.7. Δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας σουλφοροδαμίνης B (SRB Cytotoxicity Assay)
 - 1η Ημέρα: Προετοιμασία καλλιέργειας

2η Ημέρα: "Στρώσιμο" των Treated κυττάρων, των Control και των Tz σε 96-well plate

3η Ημέρα: Προσθήκη φαρμάκων, παύση επώασης-μονιμοποίησης Tz κυττάρων

4η Ημέρα: Παρατήρηση

5η Ημέρα: Παύση επώασης-μονιμοποίησης Treated και Control- εμφάνιση αποτελεσμάτων

2.8 Κατεργασία με ενεργό άνθρακα για παρασκευή cis-FBS

2.9. Δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας Tac μαζί με οιστραδιόλη και αναστολέα ICI

3. Αποτελέσματα- Συζήτηση

3.1. Αποτελέσματα ελέγχου κυτταροτοξικότητας Τιλιροσίδη και Tac με θρεπτικό υλικό 5% FBS.

Πίνακας 1

Γράφημα 1

Πίνακας 2

Γράφημα 2

Σχολιασμός αποτελεσμάτων - συζήτηση

3.2.α Αποτελέσματα δοκιμασίας ελέγχου κυτταροτοξικότητας Tac μαζί με οιστραδιόλη σε cis-DMEM

Επίδραση της E₂ απουσία Tac

Πίνακας 3

Γράφημα3

Σχολιασμός αποτελεσμάτων - συζήτηση

Επίδραση του Tac σε cis-DMEM απουσία E₂

Πίνακας 4

Γράφημα 4

Σχολιασμός αποτελεσμάτων - συζήτηση

Επίδραση του Tac + E₂ σε cis-DMEM στα MCF7 + insulin

Πίνακας 5

Γράφημα 5

Επίδραση του Tac + E₂ σε cis-DMEM στα MCF7 no insulin

Πίνακας 6

Γράφημα 6

Επίδραση του Tac + E₂ σε cis-DMEM στα MDA MB231

Πίνακας 7

Γράφημα 7

Σχολιασμός αποτελεσμάτων - συζήτηση

3.2.β Αποτελέσματα δοκιμασίας ελέγχου κυτταροτοξικότητας Tac μαζί με ICI

Επίδραση του Tac + ICI σε cis-DMEM στα MCF7 + ins

Πίνακας 8

Γράφημα 8

Επίδραση του Tac + ICI σε cis-DMEM στα MCF7 no insulin

Πίνακας 9

Γράφημα 9

Επίδραση του Tac + ICI σε cis-DMEM στα MDA MB231

Πίνακας 10

Γράφημα 10

4. Σύνοψη - Συμπεράσματα

4.1 Επίδραση του Τιλιροσίδη και Tac στις κυτταρικές σειρές MCF7/+ ins, MDA MB231

4.2 Επίδραση του Tac στις κυτταρικές σειρές MCF7/+ ins, MDA MB231 μαζί με E₂ και ICI

4.3 Σύνοψη

5. Βιβλιογραφία

1.Εισαγωγή

1.1 Η βιολογία του καρκίνου

Από βιολογική πλευρά τα καρκινικά κύτταρα θεωρούνται ως τροποποιημένα εαυτά κύτταρα του οργανισμού, τα οποία διέφυγαν από μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων και πλέον πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Στους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού συνήθως, επικρατεί μια ισορροπία μεταξύ της κυτταρικής ανανέωσης και του κυτταρικού θανάτου. Κάθε τύπος ώριμου κυττάρου έχει συγκεκριμένο χρόνο ζωής και καθώς τα κύτταρα πεθαίνουν αντικαθίστανται από νέα κύτταρα του ίδιου τύπου που προέρχονται από πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων. Έτσι σε φυσιολογικές συνθήκες ο συνολικός αριθμός κυττάρων παραμένει σταθερός. Είναι όμως δυνατό να εμφανιστούν κύτταρα που δεν υπακούν στους μηχανισμούς που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη. Από αυτό τον κυτταρικό πληθυσμό δημιουργούνται κλώνοι οι οποίοι πολλαπλασιάζονται σε μεγάλη κλίμακα, δημιουργώντας έναν όγκο ή νεόπλασμα. Όταν ένας όγκος δεν αυξάνεται απεριόριστα και δεν διηθεί σε περιβάλλοντες ιστούς τότε χαρακτηρίζεται καλοήθης. Ένας όγκος που αυξάνεται διαρκώς και γίνεται προοδευτικά διηθητικός τότε χαρακτηρίζεται κακοήθης.[8]

Οι κακοήθεις όγκοι ή καρκίνοι κατατάσσονται ανάλογα με την εμβρυική προέλευση του ιστού από τον οποίο πηγάζει ο όγκος. Οι περισσότεροι είναι καρκινώματα, δηλαδή όγκοι που προέρχονται από ενδοδερμικούς ή εξωδερμικούς όπως το δέρμα ή τον επιθήλιο οργάνων και αδένων. Η καρκίνοι του παχέος εντέρου, του μαστού, του προστάτη και του πνεύμονα είναι καρκινώματα.[8]

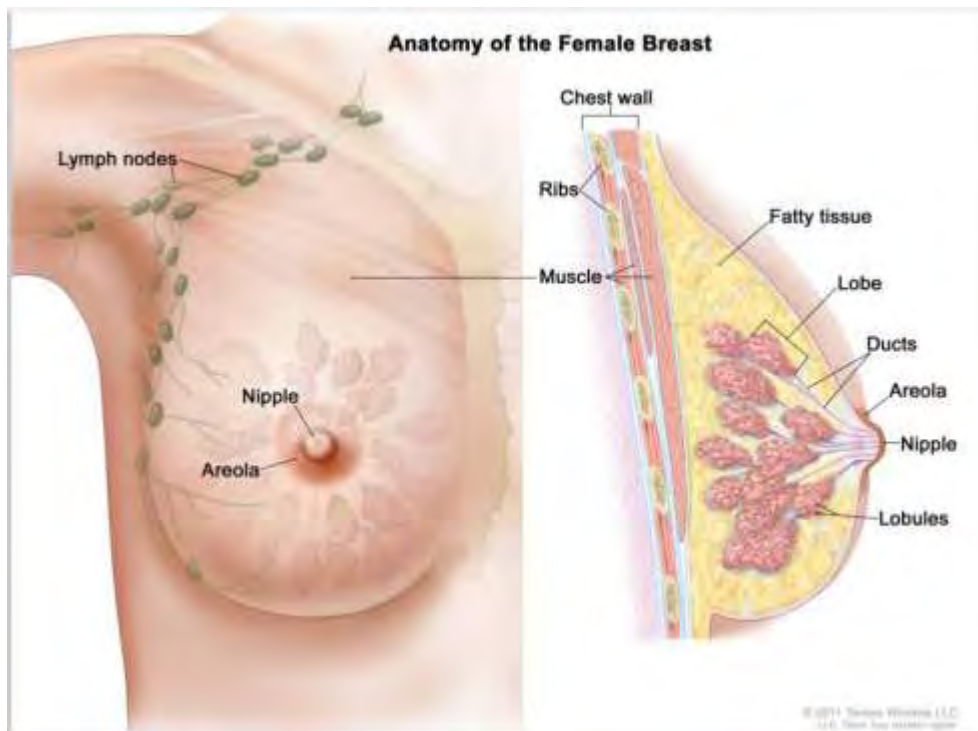
1.2 Ο καρκίνος του μαστού σε νούμερα

Στις χώρες του δυτικού κόσμου ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες εκτιμούν ότι στις ΗΠΑ ένα στα τρία άτομα θα ανάπτυξη κάποια στιγμή στη ζωή του καρκίνο και από αυτά το ένα στα πέντε θα πεθάνει.

Ανάμεσα στον παγκόσμιο γυναικείο πληθυσμό, οι 5 συχνότεροι τύποι καρκίνου που εμφανίστηκαν συμφωνά με τον Π.Ο.Υ ήταν ο καρκίνος του μαστού με ποσοστό 25.2% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου που καταγράφηκαν. Ακολουθούν ο καρκίνος του παχέος εντέρου(9.2%), του πνεύμονα(8.7%), της μήτρας (7.9%) και του στομάχου (4.8%). Ο καρκίνος του μαστού, στον γυναικείο πληθυσμό, έχει σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης (43.3 στις 100 000 γυναίκες) σε σύγκριση με οποιονδήποτε άλλο τύπο καρκίνου. Ο αμέσως επόμενος συχνότερος τύπος είναι του παχέος εντέρου (14.3 στις 100 000). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν πόσο σημαντική είναι η έρευνα για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων στρατηγικών αντιμετώπισης και θεραπείας της ασθένειας.

1.3 Φυσιολογία του μαστού

Ο κάθε μαστός του στήθους αποτελείται από συστάδες κυττάρων, που σχηματίζουν το γαλακτοπαραγωγό αδένια και ονομάζονται λοβία και ένα σύστημα γαλακτοφόρων πόρων τα οποία περιβάλλονται από λιπώδη ιστό. Κάθε φυσιολογικός μαστός διαθέτει 15 έως 20 δομές που ονομάζονται γαλακτοπαραγωγικοί λοβοί. Κάθε λοβός έχει πολλά μικρότερα τμήματα που ονομάζονται αδενοκυψελίδες. Τα επιθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν τον πόρο της κυψελίδας είναι υπεύθυνα για την παραγωγή γάλακτος. Οι λοβοί, συνδέονται με λεπτούς σωλήνες που ονομάζονται γαλακτοφόροι αγωγοί (ducts) και μεταφέρουν το γάλα από τους λοβούς στην θηλή του μαστού.[9]



Εικόνα 1.1 Ανατομία του γυναικείου μαστού. Η θηλή και η ареόλα εμφανίζονται στο εξωτερικό του μαστού, ενώ λεμφαδένες, λοβοί, αγωγοί και λιπώδης ιστός στο εσωτερικό του στήθους.

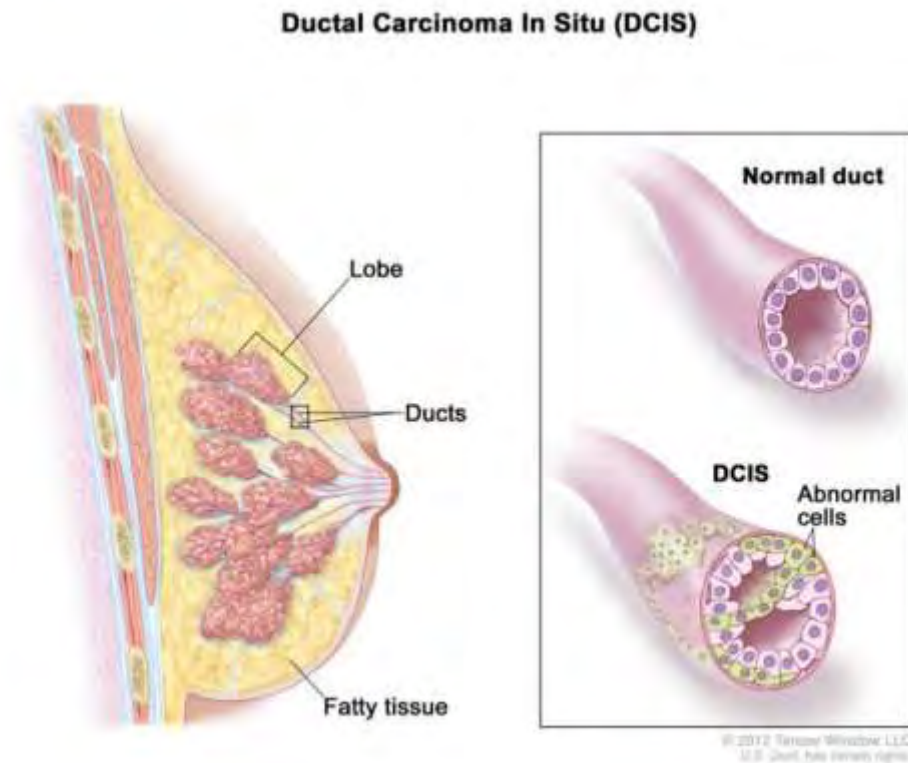
1.4 Παράγοντες αύξησης του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού

Οι παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- Ένα προσωπικό ιστορικό καρκίνου του μαστού, καρκίνου των αγωγών in situ ή (DCIS) ή λοβιακού καρκινώματος in situ (LCIS).
- Ένα προσωπικό ιστορικό καλοήθους (μη καρκινικού) όγκου του μαστού.
- Ένα οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού σε έναν συγγενή πρώτου βαθμού (μητέρα, κόρη ή αδελφή).
- Κληρονομικές μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 ή BRCA2 ή σε άλλα γονίδια που αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού.
- Όταν κάποιος ιστός του μαστού εμφανίζεται ιδιαίτερα πυκνός σε μαστογραφία.
- Έκθεση του ιστού του μαστού σε μεγάλες ποσότητες οιστρογόνων που παράγονται από το ίδιο τον οργανισμό. Αυτό μπορεί να οφείλεται στα παρακάτω:
 - Η εμμηνόρροια σε νεαρή ηλικία, μεγάλη ηλικία κατά την πρώτη γέννηση, λόγω ατεκνίας ή τέλος, λόγω έναρξης της εμμηνόπαυσης σε προχωρημένη ηλικία.
 - Επίσης, η λήψη οιστρογόνων σε συνδυασμό με την προγεστερόνη για τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης. θεραπεία με ακτινοθεραπεία στους μαστούς / στο στήθος.
- συστηματική κατανάλωση αλκοόλ, παχυσαρκία.

1.5 Κύριοι τύποι και αιτιολογία ανάπτυξης καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ασθένεια στην οποία κύτταρα που προέρχονται από τους ιστούς του μαστού γίνονται καρκινικά και σχηματίζουν κακοήθεις όγκους. Ο συνηθέστερος τύπος καρκίνου του μαστού είναι το καρκίνωμα των αγωγών (ductal carcinoma, εικόνα 1.2), το οποίο αρχίζει στα κύτταρα των γαλακτοφόρων αγωγών. Ο καρκίνος που προέρχεται από κύτταρα των λοβών ονομάζεται λοβιακό καρκίνωμα (lobular carcinoma, εικόνα 1.3) και εμφανίζεται και στους δύο μαστούς μαζί συχνότερα, σε σχέση με άλλους τύπους καρκίνου του μαστού. Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού είναι ένας ασυνήθιστος τύπος καρκίνου του μαστού με μία κλινική εικόνα στην οποία το στήθος εμφανίζεται ιδιαίτερα θερμό, ερυθρό και πρησμένο.[19]

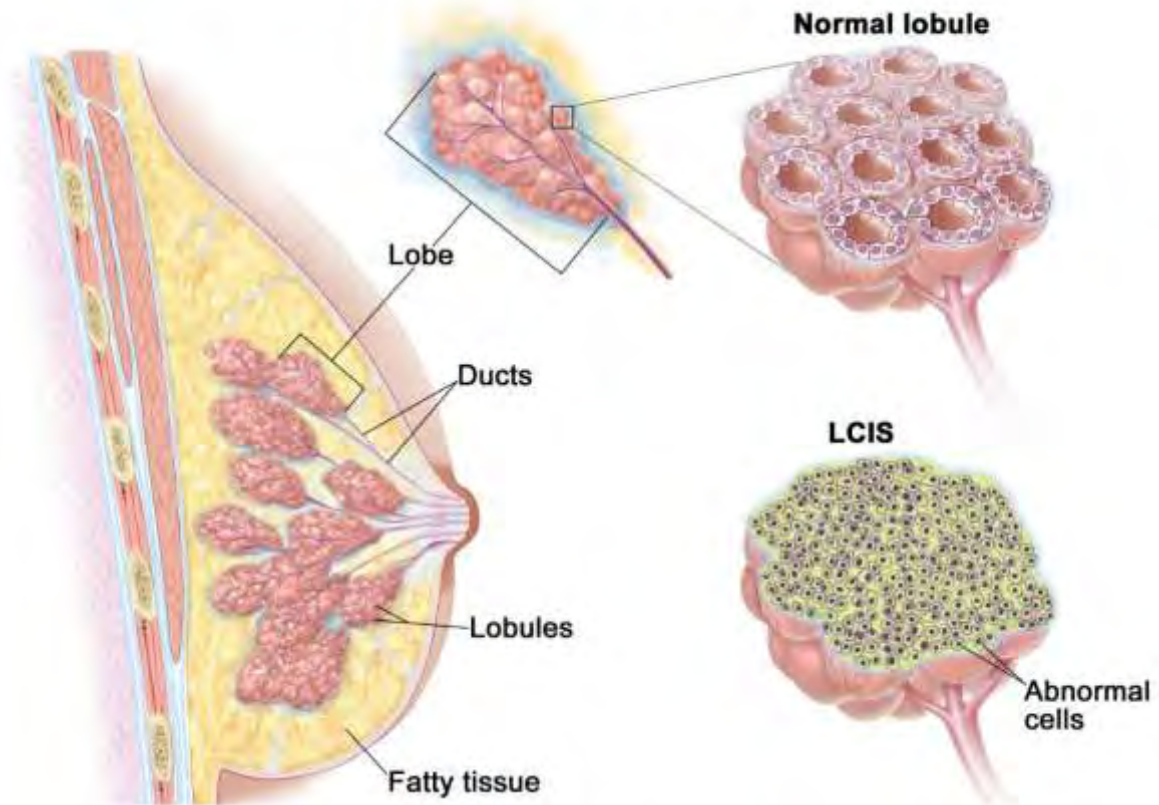


Εικόνα 1.2 Καρκίνωμα του επιθηλίου των γαλακτοφόρων αγωγών in situ (DCIS). Μη φυσιολογικά κύτταρα βρίσκονται στην επένδυση του γαλακτοφόρου αγωγού.

Οι καρκίνοι του μαστού που ταξινομούνται στους ορμονοεξαρτώμενους τύπους (ER,PR positive) και στους μη ορμονοεξαρτώμενους, οι οποίοι έχουν διαφορετικά κλινικά, παθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά [16].

Οι εγκυμοσύνες φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου, αλλά όχι με τους ER-αρνητικούς τύπους καρκίνου του μαστού. Επίσης η τεκνοποίηση σε μεγάλη ηλικία και η πρόωγη εμμηνόρροια έχουν συσχετιστεί περισσότερο με ER-θετικούς / PR-θετικούς από ER-αρνητικούς / PR-αρνητικούς όγκους. Η μετεμμηνοπαυσιακή παχυσαρκία συσχετίστηκε επίσης περισσότερο με αυξημένο κίνδυνο ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου, σε σχέση με τους ER-αρνητικούς τύπους, ενδεχομένως αντικατοπτρίζοντας αυξημένη σύνθεση οιστρογόνων στον λιπώδη ιστό και μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα αυτών.

Lobular Carcinoma In Situ (LCIS)



Εικόνα 1.3 Λοβιακό καρκίνωμα in situ (LCIS). Μη φυσιολογικά κύτταρα βρίσκονται στα στους πόρους των λοβίων του μαστού

Τα δημοσιευμένα δεδομένα δεν επαρκούν για να υποδηλώσουν ότι η χρήση εξωγενών οιστρογόνων (από του στόματος αντισυλληπτικά ή θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης) αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ορμονοεξαρτώμενων όγκων. Οι κίνδυνοι που σχετίζονται με τον θηλασμό, την κατανάλωση οινοπνεύματος, το κάπνισμα τσιγάρων, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή την προεμμηνόπαυσιακή παχυσαρκία δεν φαίνεται να σχετίζονται με κάποιον από τους δυο τύπους

1.6 Ο Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος του Μαστού (TNBC)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κλινικά, ο καρκίνος του μαστού μπορεί να χωριστεί σε ξεχωριστούς υποτύπους ανάλογα με τον ρόλο των ορμονών στην εξέλιξη του. Ο διαχωρισμός αυτός έχει προγνωστική και θεραπευτική σημασία. Στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού εξετάζεται η έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), του υποδοχέα προγεστερόνης (PR) και για την ενίσχυση της αξιολόγησης του υποδοχέα HER-2 / Neu (Human Epidermal growth factor Receptor 2) [13]. Αυτοί οι δείκτες επιτρέπουν την ταξινόμηση των όγκων καρκίνου του μαστού ως ορμονοεξαρτώμενους όγκους (hormone receptor positive), όγκους με υπερέκφραση HER-2 / Neu και όγκους που δεν εκφράζουν ER, PR και δεν έχουν ενίσχυση από HER-2 / Neu. Η τελευταία ομάδα αναφέρεται ως τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC) με βάση την έλλειψη αυτών των τριών μοριακών δεικτών.

Γενικά, οι καρκίνοι του μαστού που εκφράζουν υποδοχείς ορμονών έχουν ευνοϊκότερη για τον ασθενή εξέλιξη, από όσους υπερεκφράζουν HER-2 / Neu ή εκείνους που είναι τριπλά αρνητικοί [13]. Ενώ όλοι οι τύποι όγκων μαστού μπορούν να υποβληθούν σε αντιμετώπιση με χημειοθεραπεία, οι θεραπευτικές επιλογές τόσο στον πρώιμο όσο και στο τελευταίο στάδιο του καρκίνου του μαστού επηρεάζονται σημαντικά από την έκφραση αυτών των τριών δεικτών. Οι όγκοι που εκφράζουν ER και PR αντιμετωπίζονται με παράγοντες που παρεμποδίζουν την παραγωγή ή τη δράση των συγκεκριμένων ορμονών [13]. Οι όγκοι που υπερεκφράζουν το

HER-2 / Neu αντιμετωπίζονται με παράγοντες που αναστέλλουν την HER-2 / Neu. Αυτές οι στοχευμένες θεραπείες αποτελούν τον κύριο άξονα των επιτυχημένων αποτελεσμάτων που παρατηρούνται σε ορμονοεξαρτώμενους όγκους με υπερέκφραση HER-2 / Neu. Ωστόσο, τόσο ο πρώιμος όσο και ο προχωρημένος όγκος TNBC αντιμετωπίζονται αποκλειστικά με χημειοθεραπεία [13].

1.7 Ο ρόλος των οιστρογόνων και ο καρκίνος του μαστού

Τα οιστρογόνα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την φυσιολογία του οργανισμού. Ο πρωταρχικός τους ρόλος συνίσταται στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και λειτουργία των ιστών του αναπαραγωγικού συστήματος, περιλαμβανομένων των μαστών, της μήτρας, του κόλπου και των ωοθηκών στις γυναίκες και των όρχεων της επιδιδυμίδας και του προστάτη στους άντρες.

Στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες τα οιστρογόνα, παράγονται και εκκρίνονται σε μεγάλα ποσά από τις ωοθήκες, ενώ στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες παράγονται από την μετατροπή των ανδρογόνων, που σχηματίζονται στα επινεφρίδια και στις ωοθήκες, σε οιστρογόνα, με την επίδραση του ενζύμου αρωματάση. Η μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα λαμβάνει χώρα σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς, όπως στον λιπώδη ιστό, στους μυς, το ήπαρ, τον εγκέφαλο καθώς όμως και στα νεοπλασματικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού. Το κυριότερο οιστρογόνο του ορού είναι η **17β-οιστραδιόλη**. [1]

Η πρώτη συσχέτιση του καρκίνου του μαστού με τα οιστρογόνα χρονολογείται από το 1896, όταν ο Beaston G. διαπίστωσε ότι η αφαίρεση των ωοθηκών σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ασθενείς ακολουθείται υποχώρηση της μεταστατικής νόσου.[2] Το 1952 οι Huggins C. και Bergenstal D. ανακοίνωσαν την απόκριση του μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς στην χειρουργική αφαίρεση των επινεφριδίων.[3] Τα επόμενα χρόνια, πλήθος εργαστηριακών, επιδημιολογικών και κλινικών μελετών απόδειξαν τον καθοριστικό ρόλο των οιστρογόνων στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.[4]

Τα οιστρογόνα θεωρείται τι προάγουν την νεοπλασματική ανάπτυξη αφενός μισώ αύξησης των παραγόντων που επάγουν τον κυτταρική πολλαπλασιασμό (όπως ο TGF - α) και αφετέρου μέσω μείωσης των παραγόντων που τον αναστέλλουν (όπως ο TGF - β). Επιπρόσθετα, αναστέλλουν την απόπτωση μέσω αύξησης της έκφρασης του αντιαποπτωτικού γονιδίου bcl-2. [5]

Από το 1900, διαπιστώθηκε ότι μόλις το ένα τρίτο του συνόλου των προεμμηνοπαυσιακών ασθενών με καρκίνο του μαστού ανταποκρίνονται στη χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών. Παρόμοιο ποσοστό ανταπόκρισης πρόσφερε η χορήγηση ανδρογόνων ή υψηλών δόσεων οιστρογόνων στις μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς. Διαπιστώθηκε ότι η βιολογική δράση των οιστρογόνων ασκείται μέσω της ειδικής και με υψηλή συγγένεια σύνδεσής τους με μια συγκεκριμένη ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, τον υποδοχέα των οιστρογόνων (estrogen receptor - ER). [6]

1.8 Η αλληλεπίδραση σηματοδοτικών μονοπατιών της E₂ και insulin/IGF-I

Η οιστραδιόλη και η ινσουλίνη / ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας I (IGF-I) έχει βρεθεί πως επηρεάζουν ισχυρά την αύξηση του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού και των εξαρτωμένων από οιστρογόνα καρκινικών κυττάρων του μαστού. Υπάρχει συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ οιστρογόνων και των οδών σηματοδότησης ινσουλίνης / IGF-I και παίζει καθοριστικό ρόλο στη καρκινογένεση του μαστού, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των όγκων, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση μέσω της διαμόρφωσης πολλαπλών βιολογικών γεγονότων

Η 17β-οιστραδιόλη (E₂) έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την σηματοδότηση του IGF σε πολλαπλά επίπεδα. Η χορήγηση E₂ σε κύτταρα καρκίνου του μαστού μεταβάλλει την έκφραση

σχεδόν όλων των μελών της οικογένειας IGF περιλαμβανομένων των IGF-I, IGF-II, IGF-δεσμευτικών πρωτεϊνών, υποδοχέα IGF τύπου I (IGF-RI) και υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης I. Ο συνδεδεμένος με προσδέτη υποδοχέας οιστρογόνου έχει αναφερθεί ότι δεσμεύεται άμεσα και ενεργοποιεί το IGF-RI. Επίσης, η σηματοδότηση IGF έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την ενεργοποίηση υποδοχέα οιστρογόνου σε κύτταρα καρκίνου του μαστού ανθρώπου προκαλώντας την φωσφορυλίωση του ER. Τέλος, αρκετές ερευνητικές ομάδες ομάδες έχουν περιγράψει συνεργιστικές επιδράσεις του συνδυασμού E₂ και IGF-I στην είσοδο φάσης S σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού.

1.9 Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs)

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που βρίσκονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Είναι υποδοχείς που ενεργοποιούνται από τα οιστρογόνα (17β-οιστραδιόλη). Υπάρχουν δύο κατηγορίες ER: οι πυρηνικοί υποδοχείς οιστρογόνων (ERα και ERβ), οι οποίοι είναι μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και οι μεμβρανικοί υποδοχείς οιστρογόνων (mERs) (GPER (GPR30), ER-X και Gq-mER), οι οποίοι είναι ως επί το πλείστον συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες.

Μόλις ενεργοποιηθεί από τον προσδέτη του, ο ER διμερίζεται, μεταφέρεται στον πυρήνα, προσδένεται στο DNA και σχηματίζει σύμπλοκα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συν-ενεργοποιητές για να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων. Τα γονίδια αυτά συμμετέχουν στην επιβίωση του κυττάρου και την προόδο του κυτταρικού κύκλου.

Οι υποδοχείς οιστρογόνων είναι σημαντικοί τόσο στη διατήρηση ενός φυσιολογικού μαστικού αδένου όσο και στην ανάπτυξη πρωτοπαθούς και δευτερογενούς καρκίνου του μαστού. Η καμφερόλη έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με το σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα οιστρογόνων και μεταβάλλει την σηματοδότηση ώστε να βοηθήσει στην επιβράδυνση της ανάπτυξης. Αυτή η ένωση εμφανίζει ικανότητα να μειώνει τα επίπεδα της Αρωματάσης. Προκαλούν την αύξηση της δράσης της p53 (tumor suppressor) . [16]

1.10 Εκλεκτικοί τροποποιητές του υποδοχέα οιστρογόνων (ER)

Αρκετά φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία: εκλεκτικοί τροποποιητές (selective modulators) του υποδοχέα οιστρογόνων και αναστολείς της αρωματάσης έχουν εγκριθεί για ενδοκρινολογική θεραπεία μεταξύ γυναικών με ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, μέχρι στιγμής μόνο οι δύο εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα οιστρογόνων η Ταμοξιφαίνη και Ραλοξιφαίνη έχουν εγκριθεί για προληπτική θεραπεία κατά του καρκίνου του μαστού. Η Ταμοξιφαίνη όταν χορηγείται ως προληπτική θεραπεία, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού. Η Ταμοξιφαίνη έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τη Ραλοξιφαίνη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αλλά η Ραλοξιφαίνη έχει λιγότερες παρενέργειες και δεν έχει ταξινομηθεί ως καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο. Τα νεότερα φάρμακα στην τάξη των επιλεκτικών προσδετών υποδοχέα οιστρογόνων, για παράδειγμα το Lasoxifene, εμφανίζουν επίσης αποτελεσματικότητα και ενδεχομένως ένα καλύτερο συνολικό προφίλ οφέλους-κινδύνου, αλλά χρειάζονται περαιτέρω αξιολόγηση. Οι αναστολείς Αρωματάσης μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικοί και τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας, για παράδειγμα η Anastosole και η Exemestane, αξιολογούνται επί του παρόντος ως προληπτικοί παράγοντες για γυναίκες με ιστορικό in situ καρκινώματος του μαστού ή άλλων γυναικών που θεωρούνται ότι διατρέχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού.[10]

1.11 Αντικαρκινική δράση φυτικών προϊόντων

Τα φυσικά προϊόντα και ιδιαίτερα τα φυτικά προϊόντα χρησιμοποιούνται για την θεραπεία ασθενειών εδώ και χιλιάδες χρόνια, από πολιτισμούς σε όλο τον κόσμο. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν πάρα πολλές αναφορές για σημερινά φάρμακα τα οποία έχουν προέλθει από επεξεργασία και τροποποίηση φυτικών ενώσεων. Η μελέτες πολλών τέτοιων σκευασμάτων φυτικών ενώσεων δίνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την θεραπεία νεοπλασματικών όγκων, καθώς έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα μόρια στόχους στο εσωτερικό του κυττάρου.

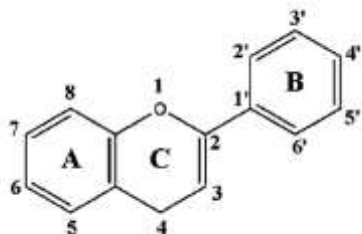
Στην εκστρατεία αντιμετώπισης του καρκίνου υπάρχει μεγάλη ανάγκη για πρωτότυπες δομές πάνω στις οποίες μπορεί να βασιστεί η τεχνολογία σύνθεσης φαρμάκων, ώστε να παρασκευαστούν αντικαρκινικές ενώσεις που θα δρουν εκλεκτικά στα ταχύτατα αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα χωρίς να προξενούν μεγάλη ζημιά σε γειτονικούς, φυσιολογικούς ιστούς. Με αυτόν τον τρόπο θα περιοριστούν και η παρενέργειες των αντικαρκινικών φαρμάκων. Μία τέτοια πηγή πρωτότυπων δομών είναι οι ουσίες φυτικής προέλευσης που μπορούν να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη καινοτόμων αντι-νεοπλασματικών φαρμάκων. (Tsuda et al, 2004, Newman and Cragg, 2007) Είναι άλλωστε γνωστό πως οι κατανάλωση φρούτων και λαχανικών βοηθά στην πρόληψη αλλά και την αποφυγή ανάπτυξης κακοηθών όγκων.

Η ανακάλυψη και μελέτη αλκαλοειδών ως αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η Βινβλαστίνη και η Βρικριστίνη, οδήγησε το Εθνικό Ίδρυμα για τον Καρκίνο των Ηνωμένων Πολιτειών (NCI-USA) να εξετάσει μια πληθώρα φυτικών ενώσεων, από την οποία οι Καμπτοθεκίνες (camptothecins) και οι Ταξάνες (taxanes) παρουσίασαν αντικαρκινική δραστηριότητα.

1.12 Τα Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις που παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των φυτών, καθώς συμβάλλουν στην διαδικασία της φωτοευαισθησίας και μεταφοράς ενέργειας, στην μορφογένεση και στον έλεγχο αναπνοής και φωτοσύνθεσης αλλά και στην άμυνα των φυτών έναντι φυτοφάγων εντόμων (Kandaswami and Middleton 1999, Middleton et al, 2002).

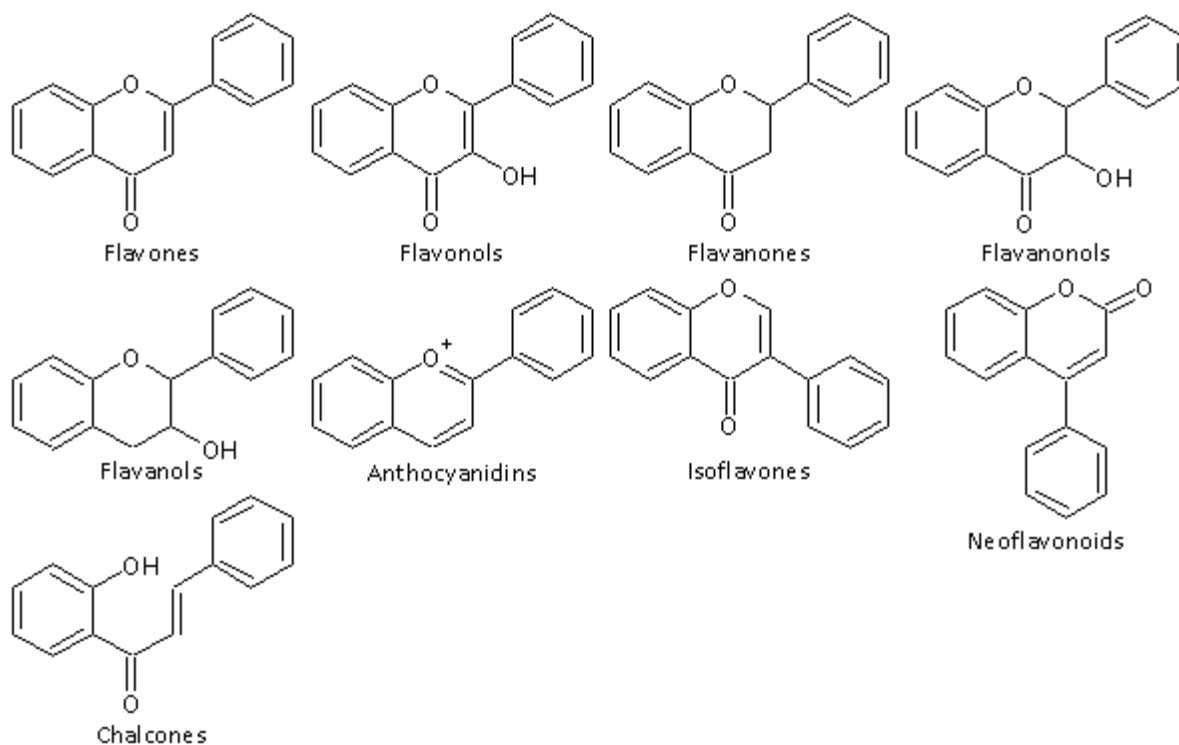
Σαν μόρια, ανήκουν σε μια χημική κατηγορία εμφανίζοντας μια βασική δομή 15 ατόμων άνθρακα που περιλαμβάνουν δύο αρωματικούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται μέσω μιας αλυσίδας 3 ανθράκων (C6-C3-C6) εικόνα 1.4 η οποία μπορεί να σχηματίζει δακτύλιο ή να είναι ανοικτή. Αυτό ο σκελετός είναι υπεύθυνος για τη χημική ποικιλομορφία αυτής της οικογένειας ενώσεων.



Εικόνα 1.4 Βασική δομή ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή γενικά ομαδοποιούνται σε διάφορες κατηγορίες, οι οποίες διαφέρουν κυρίως ως προς το βαθμό οξειδωσης του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου, εκτός από την περίπτωση των χαλκόνων. Περιλαμβάνουν διάφορους τύπους ενώσεων, όπως φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, φλαβάνες, φλαβανόλες, ανθοκυανιδίνες, ανθοκυανίνες, χαλκόνες και διυδροχαλκόνες (Baderschneider & Winterhalter, 2001).

Στη φύση, τα φλαβονοειδή υπάρχουν είτε σε ελεύθερη είτε σε στη συζευγμένη μορφή συχνά εστεροποιημένα με ένα ή δύο μόρια σακχάρου μέσω μιας τουλάχιστον υδροξυλομάδας (Ο-γλυκοσίδια, O-Glyc). Αν και η Ο-γλυκοζυλίωση μπορεί να λάβει χώρα σε οποιαδήποτε υδροξυλομάδα του σκελετού των φλαβονοειδών συνήθως λαμβάνει χώρα στην -OH της C7 θέσης των φλαβονών και φλαβονονών, στις θέσεις C3 και C7 των φλαβονολών και



Εικόνα 1.5 Υποκατηγορίες φλαβονοειδών

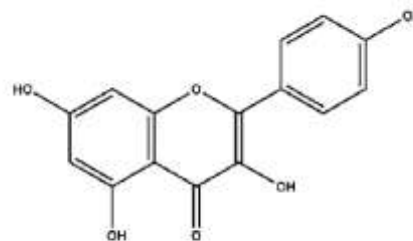
φλαβονονολών, ή στις θέσεις C3 και C5 των ανθοκυανιδινών (Jing et al, 2008; Mattivi et al, 2006). Ένας άλλος τύπος γλυκοζιτών (C-γλυκοσίδια, C-Glyc) που μπορεί να υπάρξει αφορά τη σύνδεση του μορίου του σακχάρου άμεσα στο σκελετό του φλαβονοειδούς μέσω δεσμού C-C. Αυτά τα παράγωγα είναι πιο ανθεκτικά στην υδρόλυση από τα Ο-αναλογά τους. Το σάκχαρο που απαντά σε ένα συγκεκριμένο γλυκοζίτη μπορεί να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη ή αραβινόζη. Στους C-γλυκοζίτες, η γλυκόζη είναι το σάκχαρο που απαντά περισσότερο συχνά.[11]

Τα φλαβονοειδή είναι θερμοευαίσθητες ενώσεις ενώ η απορρόφησή τους γίνεται μέσω παθητικής διάχυσης που ακολουθεί την μετατροπή των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών, σε ελεύθερα μόρια, από την μικροχλωρίδα του εντέρου (Le-Marchand 2002). Η ύπαρξη των φλαβονοειδών στα φυτά και η σημασία αυτών στην επιβίωσή τους, υποδηλώνει ότι οι ουσίες αυτές υποθάλπουν ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και την βιολογία των φυτικών οργανισμών (Buer et al, 2010). Η επιβίωσή τους στα αγγειόφυτα καθώς και η συσχέτισή τους με διάφορα ζωικά είδη και λοιπούς οργανισμούς καθ' όλη την εξελικτική πορεία, υποδηλώνει ότι είναι πιθανώς υπόλογα για διάφορες βιοχημικές και φαρμακολογικές δράσεις στα ζωικά αλλά και τα βιολογικά συστήματα (Middleton et al, 2004, Taylor and Grotewold 2005, Buer and Djordjevic, 2009).

1.13 Η Καμφερόλη

1.13.α Γενικά

Η καμφερόλη είναι μια φυσική φλαβονόλη, ένας τύπος φλαβονοειδούς, που βρίσκεται σε μια ποικιλία φυτών και τροφών που προέρχονται από φυτά. Η καμφερόλη σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) έχει μορφή κίτρινου κρυσταλλικού στερεού με σημείο τήξης 276-278 °C. Είναι ελαφρώς διαλυτό στο νερό και ιδιαίτερα διαλυτό σε θερμή αιθανόλη, αιθέρες και DMSO. Η καμφερόλη δρα ως αντιοξειδωτικό μειώνοντας το οξειδωτικό στρες. Πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι η κατανάλωση καμφερόλης μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο διάφορων τύπων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού και σήμερα θεωρείται ως πιθανή υποψηφία για την θεραπεία καρκίνου.[16]



Εικόνα 1.6 Το μόριο της Καμφερόλης

1.13.β Αντικαρκινικά αποτελέσματα

In vitro μελέτες μαζί με ορισμένες δοκιμές σε μοντέλα ζώων κατέδειξαν το ευρύ φάσμα πιθανών αντικαρκινικών ιδιοτήτων της καμφερόλης. Έχει αποδειχθεί ότι διακόπτουν την ανάπτυξη των κυττάρων σε κακοήθη όγκους, περιορίζουν την αγγειογένεση, προκαλούν απόπτωση και μειώνουν την διαθέσιμη ενέργεια για τα κύτταρα και την ικανότητά τους να μεταναστεύουν.

1.14 Η κυτταρική σειρά MCF-7

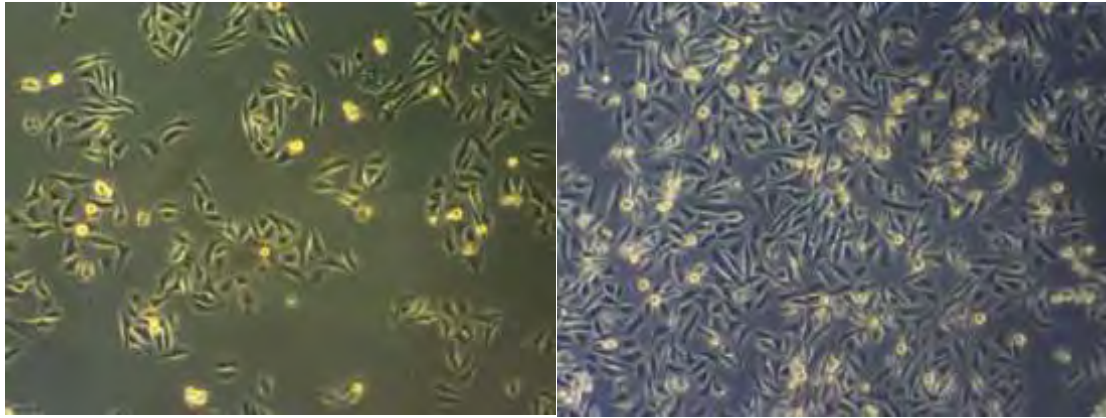
Η κυτταρική σειρά MCF-7 του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού προήλθε από μία κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή (παρακαρκινική συλλογή υγρού από τον υπεζωκότα) ασθενούς με μεταστατικό καρκίνωμα μαστού. Τα τελευταία χρόνια αυτή η κυτταρική σειρά χρησιμοποιείται κατά κόρων ως ένα μοντέλο για την μελέτη της επίδρασης διαφόρων ορμονών στον καρκίνο του μαστού. Θεωρείται κατάλληλη για τέτοιου είδους μελέτες καθώς εκφράζει υποδοχείς για αρκετές ορμόνες όπως τον υποδοχέα οιστρογόνων, ανδρογόνων, γλυκοκορτικοειδών, προγεστερόνης και ινσουλίνης.[12]

Μία από τις σημαντικότερες συνεισφορές της κυτταρικής σειράς MCF-7 στην έρευνα για τον καρκίνο του μαστού ήταν η χρησιμότητά της για τη μελέτη του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) άλφα, καθώς αυτή η κυτταρική σειρά είναι μία από τις πολύ λίγες που εκφράζουν σημαντικά επίπεδα ER και έτσι "μιμούνται" την πλειοψηφία των διεισδυτικών τύπων καρκίνου του μαστού που επίσης εκφράζουν τον ER. Είναι αξιοσημείωτο ότι η διατήρηση της έκφρασης του ER-άλφα κατά την καλλιέργεια μιας σειράς είναι ιδιαίτερα δύσκολη, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσότερων κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού, που είναι ER αρνητικές σε σύγκριση με αυτές που παραμένουν ER-θετικές.[12]

1.15 Η κυτταρική σειρά MDA MB-231

Η κυτταρική σειρά MDA MB-231 προήλθε επίσης από μία υπεζωκοτική συλλογή υγρού από ασθενή με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.[14] Ανήκει στους τριπλά αρνητικούς υποτύπους του καρκίνου του μαστού, επόμενως είναι ER ανεξάρτητα καρκινικά κύτταρα.

Συχνά συγκρίνεται η επίδραση παραγόντων στα MDA-MB-231 και στα MCF-7 για να κατανοήσουμε το πώς εμπλέκονται αυτοί οι παράγοντες στα σηματοδοτικά μονοπάτια ορμονών.[13]

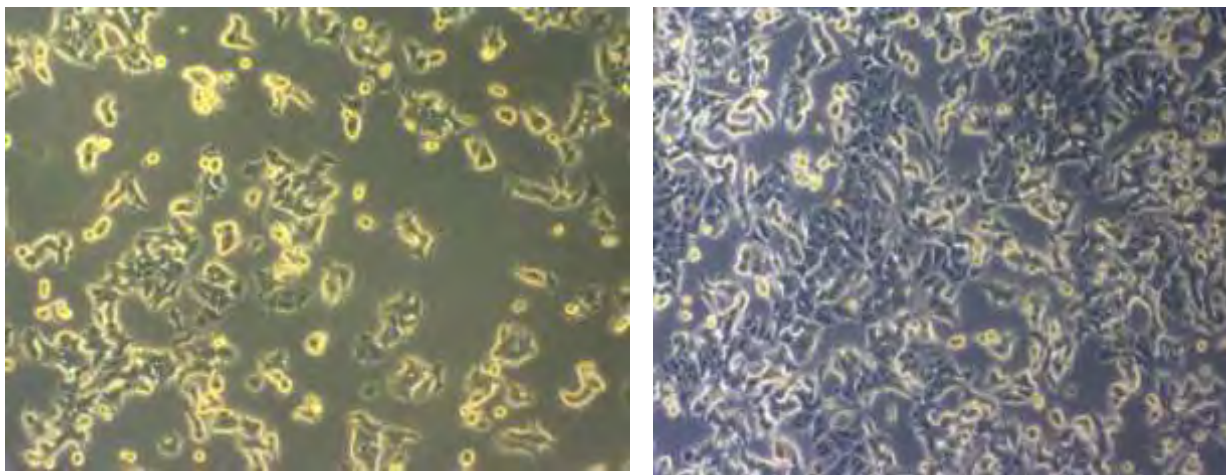


Εικόνα 2.1 Καλλιέργεια MDA MB231 μικρής επικάλυψης της φιάσκας (low density) αριστερά και υψηλής επικάλυψης (high density) δεξιά (φωτο. Εργ. Φαρμακολογίας Τμήμα Ιατρικής Π.Θ)

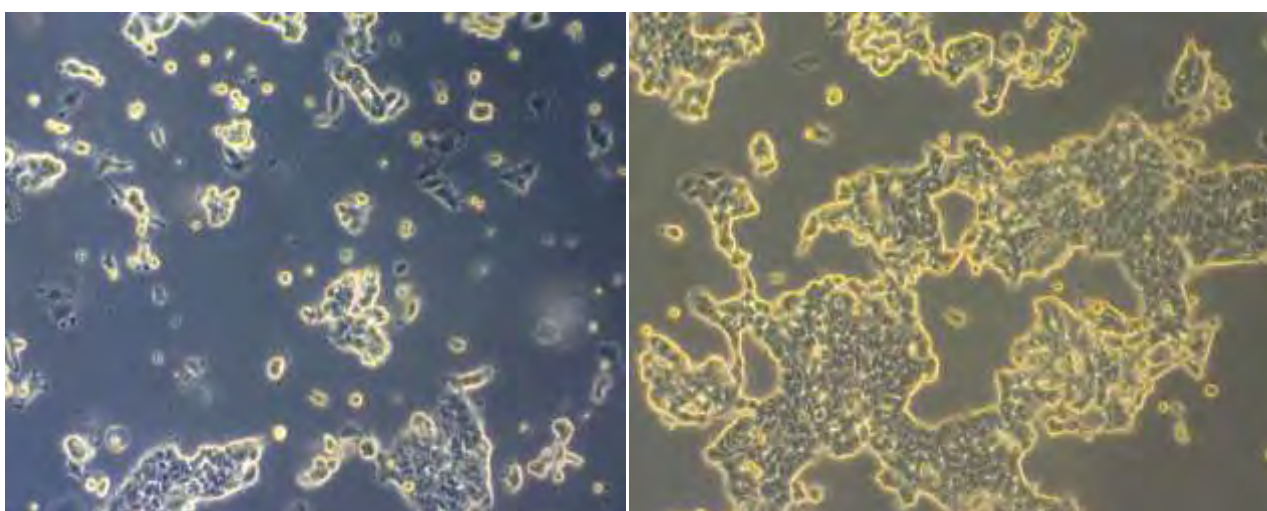
2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που καλλιεργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είναι οι MDA MB231 (εικόνα 2.1) και MCF7. Τα κυττάρα MCF7 εφόσον αποτελούν κύτταρα των οποίων η ανάπτυξη επηρεάζεται από ορμόνες, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό με ινσουλίνη 0,1 w/v (MCF7+insulin, εικόνα 2.3) και σε ξεχωριστή καλλιέργεια, με θρεπτικό χωρίς ινσουλίνη (MCF7 no insulin, εικόνα 2.2). Οι δύο καλλιέργειες MCF7 μελετήθηκαν ξεχωριστά ως προς την ανταπόκρισή τους στα προς εξέταση φάρμακα.



Εικόνα 2.2 Καλλιέργεια MCF7 no insulin μικρής επικάλυψης της φλάσκας (low density) αριστερά και υψηλής επικάλυψης (high density) δεξιά



Εικόνα 2.3 Καλλιέργεια MCF7 + insulin μικρής επικάλυψης της φλάσκας (low density) αριστερά και υψηλής επικάλυψης (high density) δεξιά

2.2 Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων

Η ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών πραγματοποιείται σε κλίβανο επώασης με σταθερή θερμοκρασία (37°C), σταθερές συνθήκες CO_2 ($5\% \text{CO}_2$) και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (hood). Οι συγκεκριμένες δύο κυτταρικές σειρές αναπτύσσονται προσκολλημένες στην επιφάνεια σχηματίζοντας μία μονή στοιβάδα (Attached Monolayer Cell Culture).

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε διαφανείς φλάσκες καλλιέργειας της Corning® (75cm^2 ή 25cm^2 U-Shaped/Product 431464U). Στις φλάσκες 25cm^2 οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε

5ml θρεπτικού μέσου, ενώ σε αυτές με επιφάνεια 75cm² αναπτύσσονται σε 10ml θρεπτικού. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των κυττάρων είναι το RPMI 1640 medium της Gibco®. Σε αυτό προστίθεται επιπλέον:

- 5% ορός εμβρύου βοοειδούς (Fetal Bovine Serum/FBS 1001G/500 της εταιρίας Biosera)
- 1% Αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (της εταιρίας Biochrom #09388)
- 1% L-Γλουταμίνη (της PAA M11-004/M00412-3274)

Όταν το ποσοστό των κυττάρων που καλύπτουν την επιφάνεια της φλάσκας (confluency) φτάσει το 80%, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων (sub culturing/ passaging). Με την ανακαλλιέργεια απομακρύνονται οι τοξικοί μεταβολίτες που παράγουν τα κύτταρα, καθώς ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό και διατηρούνται σε κατάλληλο αριθμό για την ομαλή ανάπτυξη τους.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απομακρύνεται όλο το θρεπτικό υλικό με μία αποστειρωμένη πιπέτα. Ακολουθεί ξέπλυμα της φλάσκας με ισοτονικό διάλυμα PBS 1x το οποίο παρασκευάζεται από stock διάλυμα 10x, pH 7.4 (της εταιρίας Gibco®). Έπειτα, αφού αφαιρεθεί το PBS, προστίθεται επαρκής ποσότητα τρυψίνης 1x (1ml σε φλάσκα 25cm² 2ml σε φλάσκα 75cm²). Το διάλυμα τρυψίνης που χρησιμοποιείται είναι η Trypsin (10x της Biosera cat. #XC – T1717) και αραιώνεται σε PBS 1x ώστε να παραχθεί διάλυμα τρυψίνης 1x. Η φλάσκα τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο στους 37° C για 3-4 λεπτά. Στη συνέχεια, η φλάσκα δέχεται ελαφρά χτυπήματα ώστε να ξεκολλήσουν όλα τα προσκολλημένα κύτταρα. Για να ελεγχθεί αν έχουν περάσει όλα τα κύτταρα στο υπερκείμενο, η φλάσκα παρατηρείται σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Εφόσον έχουν αποκολληθεί όλα τα κύτταρα, προστίθεται στη φλάσκα θρεπτικό υλικό ώστε να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη, πριν αρχίσει να καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες. Από το θρεπτικό υλικό που περιέχει τα κύτταρα, το 40% θα παραμείνει στην φλάσκα (ή θα περάσει σε καινούργια φλάσκα). Στην συνέχεια, δεδομένου ότι στη φλάσκα διατηρήθηκε μόνο το 40% των κυττάρων, προστίθεται επιπλέον θρεπτικό υλικό μέχρι τα 5ml. Έτσι δίνεται εκ νέου ο χώρος και η δυνατότητα στα κύτταρα να αναπτυχθούν περαιτέρω.

Εάν τα κύτταρα δεν έχουν καλύψει επαρκώς την επιφάνεια της φλάσκας αλλά το θρεπτικό υλικό έχει μεταβολιστεί, τότε αντί για ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού υλικού απομακρύνοντας το μεταβολισμένο και προσθέτοντας νέο θρεπτικό υλικό. Η ανανέωση του θρεπτικού υλικού γίνεται κάθε 2 μέρες.

2.3 Κατάψυξη κυττάρων

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, οι καλλιέργειες καταψύχονται και αποθηκεύονται για μελλοντική χρήση. Η αποθήκευση εξασφαλίζει τη διατήρηση των κυττάρων, την αποφυγή της κυτταρικής γήρανσης και μειώνει την πιθανότητα της γενετικής παρέκκλισης. Για την κατάψυξη των κυττάρων είναι απαραίτητη η χρήση ενός κρυο-προστατευτικού παράγοντα καθώς χωρίς αυτόν η απότομη πτώση της θερμοκρασίας θα ήταν θανατηφόρα για τα κύτταρα. Ο κρυο-προστατευτικός παράγοντας είναι το DMSO (Dimethylsulfoxide 99.8%, της Calbiochem cat.# 317275), το οποίο δημιουργεί ένα βραδύτερο ρυθμό ψύξης. Η σταδιακή ψύξη μειώνει την πιθανότητα δημιουργίας κρυστάλλων πάγου και καταστροφής των κυττάρων. Καθώς το DMSO 99.8% είναι τοξικό για τα κύτταρα αραιώνεται με FBS (90% FBS + 10% DMSO). Το διάλυμα που προκύπτει ονομάζεται freezing medium.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι παρόμοια με αυτή της ανακαλλιέργειας των κυττάρων. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα και στη συνέχεια η φλάσκα ξεπλένεται με PBS 1x. Έπειτα αφαιρείται το PBS, και προστίθεται η τρυψίνη. Με την αποκόλληση των κυττάρων από την τρυψίνη, προστίθεται θρεπτικό υλικό για την απενεργοποίηση της. Στη συνέχεια, το υλικό μεταφέρεται σε έναν πλαστικό σωλήνα (falcon) και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 1200 στροφές ανα λεπτό (rpm). Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί ως ίζημα στο πάτο του σωλήνα (pellet) ενώ το θρεπτικό υλικό βρίσκεται στο πάνω τμήμα του σωλήνα ως υπερκείμενο (supernatant). Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε κατάλληλη ποσότητα freezing medium (1ml για κάθε 4×10^6 cells). Μετά από καλή ανάδευση των κυττάρων στο freezing medium, τοποθετείται 1ml σε κάθε cryovial. Τα cryovials αποθηκεύονται σε υπερκαταψύκτη στους -80°C ή στην αέρια φάση ατμών υγρού αζώτου (-190°C).

2.4 Απόψυξη κυττάρων

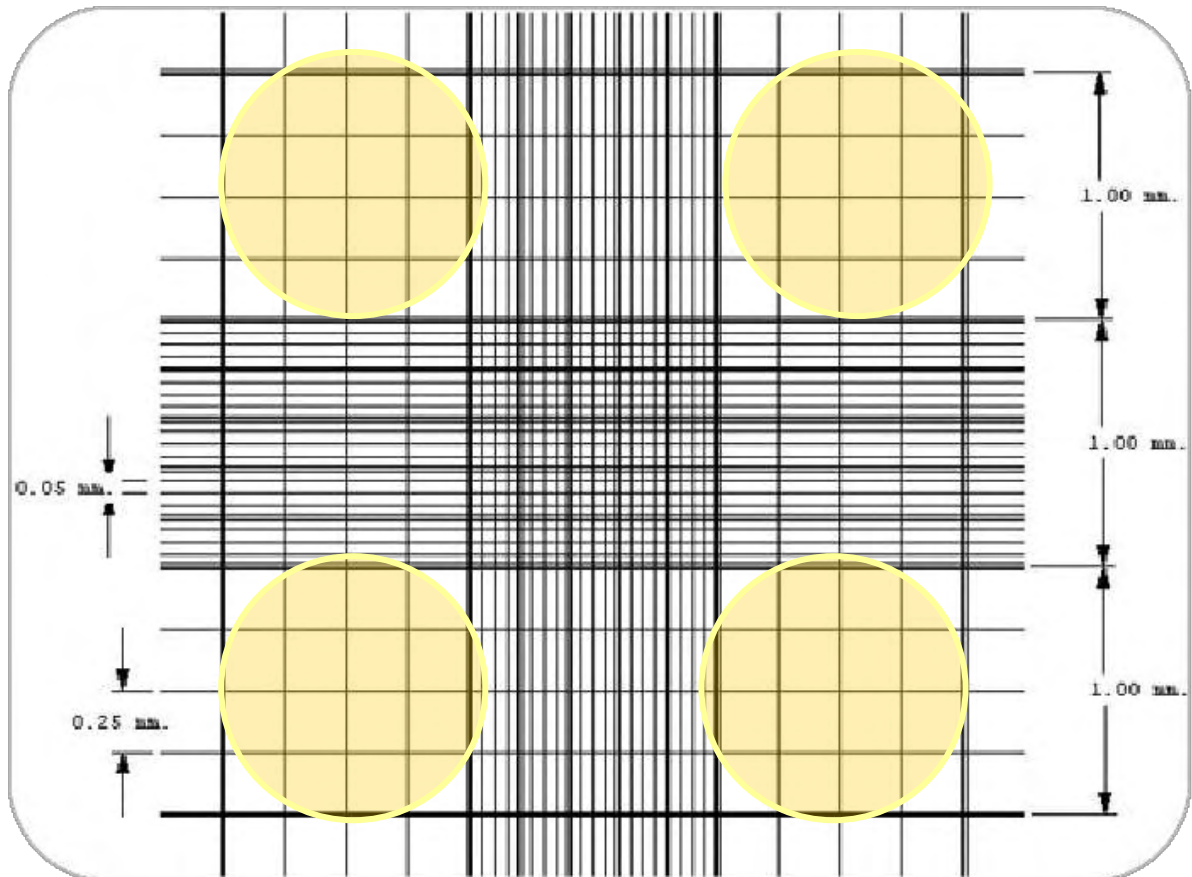
Η απόψυξη των κυττάρων πρέπει να γίνει όσο δυνατόν γρηγορότερα, ενώ το ποσοστό των κυττάρων που θα επιστρωθούν στην φλάσκα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να καλύπτει το μεγαλύτερο τμήμα της επιφάνειας της. Μετά την απομάκρυνση των cryovials από την υπερκατάψυξη, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C . Τα cryovials δέχονται ήπια και συνεχή ανάδευση στο υδατόλουτρο μέχρι να ξεπαγώσει πλήρως το περιεχόμενό τους. Στη συνέχεια το περιεχόμενο του cryovial τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα (falcon) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 900 στροφές για 10 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο το οποίο περιέχει το DMSO που είναι τοξικό

για τα κύτταρα. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό 10% σε FBS και τοποθετούνται σε φλάσκα. Ύστερα από 24 ώρες, η φλάσκα ελέγχεται ώστε να επιβεβαιωθεί η επιβίωση και η προσκόλληση των κυττάρων.

2.5 Καταμέτρηση των κυττάρων

Η καταμέτρηση των κυττάρων σε μία φλάσκα είναι πολλές φορές μια απαραίτητη διαδικασία για να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων (κατά προσέγγιση) και να αξιολογηθεί η φάση στην οποία βρίσκεται μία καλλιέργεια (εκθετική, στατική, φάση θανάτου). Το εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση των κυττάρων είναι το αιμοκυτταρόμετρο, μία παχιά γυάλινη πλάκα με μία κεντρική και τέσσερις περιφερικές περιοχές σχεδιασμένες και οριοθετημένες για την καταμέτρηση. Στη παρούσα διπλωματική εργασία για την καταμέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αιμοκυτταρόμετρο "Neubauer Improved". Η διαδικασία που ακολουθείται για την καταμέτρηση είναι ίδια με την ανακαλλιέργεια των κυττάρων ως το στάδιο της απενεργοποίησης της τρυψίνης με θρεπτικό υλικό. Μετά την απενεργοποίηση, 90 μl καλλιέργειας μεταφέρονται σε ένα μικρό σωληνάκι erpendorf. Στο erpendorf προστίθενται 10 μl χρωστικής Trypan Blue 0.4% w/v διαλυμένη σε φυσιολογικό ορό (της εταιρίας Biochrom), η οποία βάφει με σκούρο μπλέ χρώμα της μεμβράνης των νεκρών κυττάρων και τα ξεχωρίζει από τα ζωντανά που είναι πιο φωτεινά κίτρινα. Πάνω στην πλάκα Neubauer τοποθετείται μία τετράγωνη αντικειμενοφόρος και στη συνέχεια με τη βοήθεια μίας πιπέτας, μεταφέρονται 100 μl από το erpendorf στην πλάκα Neubauer εφαρμόζοντας την πιπέτα στην άκρη της αντικειμενοφόρου για να απλωθούν ομοιόμορφα τα κύτταρα στο πεδίο καταμέτρησης. Αφού τοποθετηθεί όλη η ποσότητα, αρχίζει η καταμέτρηση των κυττάρων. Η καταμέτρηση γίνεται σε μικροσκόπιο με μεγέθυνση 100x και με την βοήθεια μετρητή χειρός (counter).

Η Neubauer improved περιέχει 2 πανομοιότυπα τμήματα στο άνω και στο κάτω τμήμα της. Το μέτρημα μπορεί να γίνει σε όποιο τμήμα επιθυμούμε ανάλογα με το που έχουν



κατανεμηθεί πιο ομοιόμορφα τα κύτταρα. Το κάθε τμήμα αποτελείται από μικρότερες περιοχές, όπως φαίνεται (με κίτρινο) στην παρακάτω εικόνα.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την καταμέτρηση των κυττάρων.

Μία από αυτές είναι η καταμέτρηση των κυττάρων που εμπεριέχονται μέσα στις γραμμές που ορίζουν τα πλαίσια (με κίτρινο χρώμα στην εικόνα) 16 τετραγώνων που σχηματίζονται στις τέσσερις γωνίες του πεδίου καταμέτρησης. Έπειτα το αποτέλεσμα διαιρείται με το τέσσερα (4 πλαίσια μέτρησης) και ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με το 10.000 (10^4). Ο τελικός αριθμός αντικατοπτρίζει τον αριθμό των κυττάρων ανά 1ml καλλιέργειας.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για τις παραπάνω διαδικασίες (Ανακαλλιέργεια κυττάρων, Ανανέωση θρεπτικού υλικού, Κατάψυξη κυττάρων, Απόψυξη κυττάρων, Καταμέτρηση κυττάρων) είναι μία τροποποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture, Phelan, 2007.

2.6 Η παρασκευή των γλυκοσιδίων της καμφερόλης

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η κυτταροτοξική - αντικαρκινική δράση δύο ενώσεων που είναι γλυκοσίδια του φλαβονοειδούς **καμφερόλη (kaempferol)**, ο **Τιλιροσίδης (Tiliroside)** και το ακετυλιωμένο παράγωγό του **Tac (Tiliroside acetylated)**.

Οι παρακάτω διεργασίες έγιναν από την κυρία Τσιπούλη Χρυσή στα πλαίσια της μετα-διδακτορικής της διατριβής και θέωρησα σκόπιμο να συμπεριληφθεί η διαδικασία από την οποία προέκυψε ο Τιλιροσίδης (Tiliroside) αλλά και το ακετυλιωμένο προϊόν του Tac για να γίνει κατανοητή η προέλευση των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν.

α. Η παρασκευή του Τιλιροσίδη από το φυτό *Platanus orientalis l.*

Οι αποξηραμένοι καρποί του *Platanus orientalis* εκχυλίστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με χρήση μείγματος οργανικών διαλυτών, δίχλωρομεθανίου - μεθανόλης με αυξανόμενη πολικότητα. Το κλάσμα παρελήφθηκε με 100% MeOH και εν συνεχεία συμπηκνώθηκε με εφαρμογή περιστροφικής συσκευής υπο κενό και παρελήφθη υπόλειμμα βάρους 80g. Τα 40g αυτού τοποθετήθηκαν σε χρωματογραφική στήλη με στατική φάση γέλη πυριτίου και κινητή φάση CH₂Cl₂ και CH₂Cl₂-MeOH αυξημένης πολικότητας, ακολουθούμενο από καθαρή MeOH. Παρελήφθηκαν 45 κλασματά και τα #29 - #35, όγκου 35ml το καθένα, ελέγχθηκαν με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας με στατική φάση και πάλι γέλη πυριτίου και κινητή φάση CH₂Cl₂-MeOH 90:10. Στη συνέχεια συνενώθηκαν και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Αδιάλυτο ίζημα σε CH₂Cl₂, με καστανό χρώμα, διαχωρίστηκε από το μείγμα (29 έως 35) το οποίο στη συνέχεια παρελήφθη με CH₂Cl₂-MeOH 99:1 έγινε κρυστάλλωσή του. Το προϊόν κρυστάλλωσης ελάγχθηκε για την καθαρότητα του με TLC CH₂Cl₂-MeOH 90:10 και το βάρος του βρέθηκε 10mg.

Η ταυτοποίηση του προϊόντος έγινε με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

Το προϊόν που απομονώθηκε χαρακτηρίστηκε ως **kaempferol-3-O-b-D-(6''-E-p-coumaroy) glycopyranoside (Τιλιροσίδης)**.

Έγινε σύγκριση του προϊόντος που παρασκευάστηκε με προϊόν της αγοράς και διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε καμία διαφορά στην αντικαρκινική τους δράση. Έτσι για την συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν φλαβονόλες από την εταιρία Extrasynthese, France.

β. Ακετυλίωση προϊόντων

Η διεργασία ακετυλίωσης των φλαβονοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της κας Τσιπούλη αλλά και του Τιλιροσίδη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη έγινε με την παρακάτω διαδικασία:

- Προσθήκη πυριδίνης και οξικού ανυδρίτη σε αναλογία 1:1 για κάθε προϊόν ξεχωριστά, μέσα σε σφαιρικές φυάλες (Mitrokotsa et al,1993)
- Αφέθηκαν 4 μέρες σε χώρο μη προσπελάσιμο σε φώς
- Το τέλος της αντίδρασης σημειώνεται με αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε πορτοκαλί
- Το τέλος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC, CH₂Cl₂-MeOH 95:5
- Η περίσσεια διαλυτών απομακρύνεται με χρήση περιστρεφόμενης συσκευής υπο κενό.
- Καθαρισμός προϊόντων με χρωματογραφία στήλης. Η έκλουση έγινε με διαλύτη το CH₂Cl₂ και με την εφαρμογή πίεσης έγινε η συλλογή των κλασμάτων.
- Τα ακετυλιωμένα προϊόντα ανιχνεύθηκαν με την χρήση TLC (CH₂Cl₂-MeOH 95:5)
- Τα προϊόντα παρελήφθησαν από τον διαλύτη σε συσκευή Rotavapor.

2.7 Δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας σουλφοροδαμίνης Β (SRB Cytotoxicity Assay) με Τιλιροσίδη και Tac σε MCF7/+ins και MDA MB231

Η δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας με σουλφοροδαμίνη Β χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της αντιπολλαπλασιαστικής - κυτταροτοξικής δράσης του Τιλιροσίδη και του Tac (tiliroside acetylated) που χορηγούνται σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (dose) φαρμάκου 25μM, 12,5μM, 6,2μM, 3,1μM, 1,5μM, σε καλλιέργειες κυττάρων MCF7, MCF7 + ins και MDA MB231. Οι καλλιέργειες αυτές αναπτύσσονται σε θρεπτικό RPMI με 5% FBS, σε πηγαδάκια (wells) πλακιδίων 96 θέσεων με αρχική πυκνότητα ενοφθαλμισμού (inoculation density) 10000 κύτταρα / well.

Η αρχή του SRB Assay βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής sulforhodamine B (SRB) να συνδέεται ηλεκτροστατικά και pH-εξαρτώμενα σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα. Κάτω από ελαφρά όξινες συνθήκες, η χρωστική συνδέεται στις πρωτεΐνες των κυττάρων ενώ κάτω από ελαφρά βασικές συνθήκες, η χρωστική αυτή μπορεί να εξαχθεί από τα κύτταρα. Η

μέτρηση της αποτελεσματικότητας γίνεται με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της χρωστικής. Ολόκληρος ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιείται σε ειδικά κατασκευασμένες πλάκες με πηγαδάκια, τα επονομαζόμενα πλαίδια 96 θέσεων ή 96 well plate (Corning® Costar® cell culture 96 well plate) και διαρκεί πέντε ημέρες.

Σε ένα 96 well plate (1^ο 96 well plate) επιστρώνονται κύτταρα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων. Επίσης, σε κάποια από αυτά τα wells δεν επιστρώνονται αναστολείς. Τα wells αυτά θα ελεγχθούν στο τέλος για την ανάπτυξη των κυττάρων απουσία αναστολέων (control wells). Η ανάπτυξη των κυττάρων αυτών διακόπτεται την πέμπτη και τελευταία μέρα.

Σε ένα νέο 96 well plate (2^ο 96 well plate) επιστρώνεται επίσης ίδια ποσότητα κυττάρων. Η ανάπτυξη των κυττάρων αυτών θα σταματήσει την τρίτη ημέρα, ώστε να είναι γνωστό το αρχικό ποσό των κυττάρων πριν τη χορήγηση των αναστολέων (T_z κύτταρα). Έτσι, με την ολοκλήρωση του πειράματος, θα είναι γνωστή η συγκέντρωση των κυττάρων πριν τη χορήγηση των αναστολέων, η συγκέντρωση των κυττάρων χωρίς τη χορήγηση των αναστολέων και η συγκέντρωση των κυττάρων με τη χορήγηση των αναστολέων.

1^η Ημέρα: Προετοιμασία καλλιέργειας

Για την έναρξη του ελέγχου κυτταροτοξικότητας είναι απαραίτητο η καλλιέργεια κυττάρων που θα χρησιμοποιηθεί να καλύπτει ένα ποσοστό από 70 έως 80% της επιφάνειας της φλάσκας στην οποία αναπτύσσεται. Όταν η φλάσκα έχει επιθυμητό ποσοστό κάλυψης, τότε πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού υλικού.

2^η Ημέρα: "Στρώσιμο" των Treated κυττάρων, των Control και των T_z σε 96-well plate

Η επόμενη μέρα αρχίζει με την αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα με τη βοήθεια της τρυψίνης. Τα πρώτα στάδια είναι ίδια με την μέθοδο της ανακαλλιέργειας των κυττάρων. Την αποκόλληση των κυττάρων ακολουθεί η απενεργοποίηση της τρυψίνης με την προσθήκη θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με την βοήθεια πλάκας Neubauer. Σκοπός είναι η μεταφορά 10000 κυττάρων σε όγκο 100μl σε κάθε well του 96 well-plate (inoculation density). Η συγκεκριμένη πυκνότητα ενοφθαλμισμού αριθμός 10000 κύτταρα / well inoculation density χρησιμοποιήθηκε για την κυτταρική σειρά MCF7. Ανάλογα με το πόσα wells πρέπει να γεμίσουν, γίνεται υπολογισμός του απαραίτητου αριθμού των κυττάρων. Στη συνέχεια μεταφέρεται η κατάλληλη ποσότητα ml (που περιέχει

τη σωστή ποσότητα κυττάρων) σε σωλήνα φυγοκέντρωσης. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης απομακρύνεται το υπερκείμενο. Ακολουθεί προσθήκη θρεπτικού υλικού ανάλογα με τα wells που θα επιστρωθούν με κύτταρα. Δηλαδή προστίθεται θρεπτικό υλικό 100 μ l x τον αριθμό των wells που θα επιστρωθούν. Μετά από καλή επαναιώρηση των κυττάρων στο θρεπτικό υλικό, ακολουθεί η επίστρωση των κυττάρων στο 96 well plate με την χρήση επαναληπτικής πιπέτας (fin-tip pipette) .

Σε ένα δεύτερο 96 well plate επιστρώνονται κύτταρα υπό τις ίδιες συνθήκες. Αυτό το well-plate θα χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση των T_z κυττάρων. Τα δύο 96 well plates τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο υπό τις ίδιες συνθήκες που γίνεται η ανάπτυξη των κυττάρων.

3^η Ημέρα: Προσθήκη φαρμάκων, παύση επώασης-μονιμοποίησης T_z κυττάρων

Την τρίτη μέρα πραγματοποιείται η επίστρωση των φαρμάκων. Αρχικά κατασκευάζονται οι διαφορετικές αραιώσεις των φαρμάκων. Έστω ότι θα μελετηθεί η επίδραση 5 διαφορετικών αραιώσεων από κάθε φάρμακο (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M). Για την κατασκευή των αραιώσεων, γίνεται χρήση των αναστολέων συγκέντρωσης 20mM που κατασκευάστηκαν προηγουμένως. Η ποσότητα του φαρμάκου που επιστρώνεται την τρίτη ημέρα είναι αραιωμένη σε θρεπτικό υλικό όγκου 100 μ l. Δηλαδή, ο τελικός όγκος μετά την προσθήκη του φαρμάκου θα ανέρχεται στα 200 μ l σε κάθε well. Αυτό σημαίνει πως, για τον έλεγχο της επίδρασης ενός φαρμάκου σε συγκέντρωση 100 μ M, η συγκέντρωση του φαρμάκου που θα προστεθεί την τρίτη μέρα θα πρέπει να είναι διπλάσια από αυτή που θα ελεγχθεί. Τα 100 μ l φαρμάκου που θα προστεθούν, πρέπει να έχουν συγκέντρωση 200 μ M. Όταν τα 100 μ l φαρμάκου προστεθούν στο well με τα κύτταρα, το οποίο ήδη περιέχει 100 μ l, τότε η συγκέντρωση του φαρμάκου θα μειωθεί αυτόματα στη μέση, με αποτέλεσμα τα 200 μ M του φαρμάκου να μετατραπούν σε 100 μ M. Σκοπός λοιπόν είναι η κατασκευή διαδοχικών αραιώσεων από όλα τα φάρμακα με διπλάσια συγκέντρωση από αυτήν που θα ελεγχθεί. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων η κάθε συγκέντρωση του φαρμάκου εφαρμόζεται σε 3 διαφορετικά wells και στο τέλος υπολογίζεται η μέση τιμή. Σε έξι wells από το 96 well plate δεν γίνεται προσθήκη αναστολέων αλλά αντίθετα προστίθεται 100 μ l θρεπτικό υλικό. Τα wells αυτά θα χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της ανάπτυξης των κυττάρων απουσία αναστολέων κατά τη λήξη του πειράματος. Με την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών, το πρώτο 96 well plate επιστρέφεται στον επωαστικό κλίβανο.

Στο δεύτερο 96 well plate που επιστρώθηκαν κύτταρα τη δεύτερη ημέρα, προστίθεται σε κάθε well 100 μ l θρεπτικό υλικό. Έπειτα, ακολουθεί η προσθήκη 50 μ l 10% TCA (Trichloroacetic acid) θερμοκρασίας 4°C. Το TCA έχει την ικανότητα να μονιμοποιεί τα

κύτταρα στον πάτο των wells και φυσικά διακόπτει την ανάπτυξη τους. Το δεύτερο plate, που περιέχει τα μονιμοποιημένα κύτταρα, πρέπει να διατηρηθεί σε θερμοκρασία 4°C για μία ώρα. Με το τέλος της μίας ώρας, το plate ξεπλένεται 5 φορές με νερό βρύσης έτσι ώστε να απομακρυνθούν το TCA, το θρεπτικό υλικό και οι χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες. Έπειτα, το plate στεγνώνει στον αέρα και αποθηκεύεται για μεταγενέστερη χρήση.

4^η Ημέρα: Παρατήρηση

Την τέταρτη ημέρα δεν ακολουθείται καμία διαδικασία καθώς τα κύτταρα που αναπτύσσονται στο πρώτο plate (Treated και Control) πρέπει να επωαστούν μαζί με τον αναστολέα για 48 ώρες. Τα plates παρατηρούνται στο μικροσκόπιο για την αξιολόγηση της πορείας του πειράματος και επιστρέφονται στον κλίβανο επώασης.

5^η Ημέρα: Παύση επώασης-μονιμοποίηση Treated και Control- εμφάνιση αποτελεσμάτων

Η πέμπτη μέρα ξεκινάει με την μονιμοποίηση των κυττάρων του πρώτου 96 well plate. Όπως προηγουμένως, προστίθενται σε όλα τα wells (με ή χωρίς αναστολέα) 50μl 10% TCA θερμοκρασίας 4°C. Το plate διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C για μία ώρα. Ακολουθεί έκπλυση του 5 φορές με νερό βρύσης έτσι ώστε να απομακρυνθούν το TCA, το θρεπτικό υλικό και οι χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες. Το plate αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα. Έτσι, αυτή τη χρονική στιγμή και τα δύο plates έχουν τα κύτταρα τους μονιμοποιημένα στο πάτο των wells. Στο δεύτερο plate η ανάπτυξη των κυττάρων διακόπηκε πριν την έναρξη της δράσης των αναστολέων (Χρονική στιγμή 0 – Tzero), ενώ στο πρώτο plate, η ανάπτυξη διακόπηκε έπειτα από την εφαρμογή των αναστολέων για 2 ημέρες. Στο πρώτο plate επίσης υπάρχουν wells που δεν έχουν δεχθεί αναστολέα (control wells).

Ακολουθεί η προσθήκη χρωστικής 50 μl Sulforhodamine B (SRB) 0.4 % (w/v) σε 1% οξικό οξύ και στα δύο 96 well plates. Η χρωστική έχει την ικανότητα να διεισδύει στα κύτταρα και να προσδένεται στις πρωτεΐνες. Τα plates επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη χρώση, η μη δεσμευμένη χρωστική απομακρύνεται με πέντε εκπλήσσεις χρησιμοποιώντας 1% οξικό οξύ. Στη συνέχεια τα plates στεγνώνουν στον αέρα. Επόμενο βήμα είναι η απελευθέρωση της δεσμευμένης χρωστικής από τα κύτταρα ώστε να ποσοτικοποιηθεί. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, για την εξαγωγή της χρωστικής απαιτούνται ελαφρά βασικές συνθήκες. Για αυτόν τον λόγο προστίθεται σε κάθε well 150μl Trizma Base 10mM και τα plates επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 37° C. Έτσι, η χρωστική εξέρχεται από τα κύτταρα και αναμιγνύεται με το Trizma Base. Όσα περισσότερα κύτταρα είναι προσκολλημένα σε κάθε well, τόσο περισσότερη χρωστική έχει συνδεθεί σε

αυτά και επομένως εξάγεται στο διάλυμα με το Trizma Base. Τελευταίο είναι το στάδιο της φωτομέτρησης. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται από ένα αυτοματοποιημένο για ανάγνωση 96-well plate φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 540 nm. Όσο περισσότερη ποσότητα χρωστικής είναι διαλυμένη στο Trizma Base, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η οπτική πυκνότητα στο εκάστοτε well. Τα αποτελέσματα της οπτικής απορρόφησης (raw data) μεταφέρονται στον υπολογιστή και επεξεργάζονται σε λογισμικό Microsoft Excel. Εκεί εισάγεται η οπτική απορρόφηση των:

- Tz wells: Wells όπου η ανάπτυξη των κυττάρων διακόπηκε πριν τη χορήγηση των φαρμάκων
- Control wells: Wells όπου τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος
- Treated wells: Wells όπου επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος

Θέτουμε ως **μάρτυρα 100% ανάπτυξης** των κυττάρων απουσία φαρμάκου (**Control**) και ως **0% ανάπτυξη** των κυττάρων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου (**Tz**). Το ποσοστό της ανάπτυξης σε κάθε ένα από τα επίπεδα συγκεντρώσεων του φαρμάκου (**Ti**) υπολογίζεται με τον εξής τρόπο:

$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$ για συγκεντρώσεις στις οποίες ισχύει $Ti \geq Tz$

$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100$ για συγκεντρώσεις στις οποίες ισχύει $Ti < Tz$.

Μια τιμή 100 δηλώνει μηδενική αναστολή της ανάπτυξης. Μια τιμή 40 δηλώνει 60% αναστολή της ανάπτυξης. Η τιμή 0 δηλώνει μηδενική καθαρή αύξηση κατά τη διάρκεια του πειράματος. Μια τιμή -40 θα σήμαινε 40% θνησιμότητα. Η τιμή -100 δηλώνει ότι όλα τα κύτταρα είναι νεκρά.

Επιπλέον, με βάση τα παραπάνω στοιχεία υπολογίζονται τρεις βασικές παράμετροι απόκρισης κάθε δόσης. Οι παράμετροι αυτοί είναι οι εξής:

- **GI50** (Growth Inhibition of 50 %): Αναφέρεται στη δόση του φαρμάκου που προκαλεί 50% μείωση του πληθυσμού των κυττάρων, συγκρίνοντας τη με τα κύτταρα του control $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$
- **TGI** (Total Growth Inhibition): Αναφέρεται στη συγκέντρωση του φαρμάκου που οδηγεί σε ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων $Ti = Tz$
- **LC50** (Lethal Concentration of 50%) Αναφέρεται στη συγκέντρωση του φαρμάκου που οδηγεί σε 50% μείωση της πρωτεΐνης συγκρινόμενη με αυτή από τα κύτταρα Tz πριν τη χορήγηση του φαρμάκου $[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 = -50$

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας (SRB Assay) είναι μία ελαφρώς τροποποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου που προτείνει το NCI (National Cancer Institute) (https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm).

2.8 Κατεργασία με ενεργό άνθρακα για παρασκευή cis-FBS

Σκοπός

Το ακόλουθο πρωτόκολλο προτείνεται για την αποτελεσματική αφαίρεση της πλειοψηφίας των ορμονών και των στεροειδών ενώσεων από ορό που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή θρεπτικού μέσου για κυτταροκαλλιέργειες.

Περιγραφή

Κατεργασμένος με ενεργό άνθρακα ή φιλτραρισμένος ξυλάνθρακα ορός, είναι ο βόειος ορός που έχει επωαστεί, για μια χρονική περίοδο, σε ένα μείγμα ενεργοποιημένου ξυλάνθρακα επικαλυμμένου με δεξτράνη.

Υλικά- Αντιδραστήρια

- Fetal Bovine Serum or Bovine Serum
- Norit-A charcoal
- Dextran T-70
- Phosphate Buffered Saline
- Demonized Water – low endotoxin
- Sterile conical tubes
- 0.45 micron filter
- 0.2 micron filter

Διαδικασία

1. Παρασκευή ξυλάνθρακα επικαλυμμένου με δεξτράνη.
2. Επώαση όλη τη νύκτα σε 4 ° C 0,25% Norit A άνθρακα και 0,0025% δεξτράνης T-70 σε 10 mM Tris, pH 7,4.
3. Αφαίρεση ίσου όγκου του ενεργού άνθρακα, που έχει επικαλυφθεί με δεξτράνη, με τον επιθυμητό όγκο ορού. Φυγοκέντρωση 500 x g για 10 λεπτά για την καθίζηση του ξυλάνθρακα.
4. Απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και επαναδιαλυτοποίηση με χαμηλής περιεκτικότητας σε ενδοτοξίνες απιονισμένο νερό για να ξεπλυθεί το ίζημα.
5. Φυγοκέντρωση 500 x g για 10 λεπτά για να καθιζάνει ο ξυλάνθρακας.
6. Αφαίρεση και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και επαναδιαλυτοποίηση με ίσο όγκο βόειου ορού για ένα ισοδύναμο των 253 mg ξυλάνθρακα επικαλυμμένο με δεξτράνη ανά 100mL ορού.
7. Vortex για να αναμιχθεί και να επωαστεί για 12 ώρες στους 4 ° C ή 2 φορές για 45 λεπτά στους 56 ° C.

8. Διήθηση του απενεργοποιημένου ορού μέσω φίλτρου προ-ηθμού, 0,45 micron και 0,2 micron πριν την προσθήκη στο DMEM. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία -10 έως -30 ° C.

Το θρεπτικό που παρασκευάζεται με την προσθήκη cis-FBS καλείται cis-DMEM.

2.9 Δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας Tac μαζί με οιστραδιόλη και αναστολέα ICI

Μετά τα ικανοποιητικά αποτελέσματα αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του ακετυλιωμένου Τιλιροσίδη (Tac) ακολουθήθηκε μία δεύτερη σειρά πειραμάτων για να μελετηθεί η επίδρασή του στις ίδιες καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων σε συνδυασμό με την παρουσία οιστραδιόλης ($E_{2\beta}$) σε τέσσερις συγκεντρώσεις 1nM έως 0,001nM ($10^{-9}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$ και $10^{-12}M$) με κάθε συγκέντρωση του Tac (25 μ M, 12,5 μ M, 6,2 μ M, 3,1 μ M, 1,5 μ M) και ενός άλλου αναστολέα του υποδοχέα οιστρογόνων, τον ICI (182,780) με συγκέντρωση 0,1 μ M ή $10^{-7}M$ επίσης με όλες τις συγκεντρώσεις του Tac που μελετήθηκαν. [23] Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε απενεργοποιημένο θρεπτικό υλικό DMEM (cis-DMEM) της εταιρίας Gibco®, υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (high glucose) και απουσία του δείκτη κόκκινο της φαινόλης (phenol red). Ο σκοπός της απενεργοποίησης του ορού του θρεπτικού, ήταν να απομακρυνθούν τα ίχνη ορμονών που μπορεί να υπάρχουν στον FBS και να εξασφαλισθεί πώς η οιστραδιόλη θα είναι η μοναδική ορμόνη που θα έχει επίδραση στα κύτταρα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το ίδιο όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.6. Η διαφορά ήταν, ότι οι καλλιέργειες μετά το inoculation της δευτερης ημέρας, επώαστηκαν για 48 ώρες στο 96 well plate με το απενεργοποιημένο θρεπτικό ώστε να προσαρμοστούν στην απουσία ορμονών. Κάθε κυτταρική σειρά στρώθηκε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (template).

| $E_2 \rightarrow$ | | 0 | $(10)^{-9}$ | $(10)^{-10}$ | $(10)^{-11}$ | $(10)^{-12}$ | |
|--------------------------|------|--------|-----------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|
| Tac ↓ | 25 | 25/0 | | | | | control tac + E2 |
| | 12,5 | 12,5/0 | | | | | |
| | 6,2 | 6,2/0 | | | | | |
| | 3,1 | 3,1/0 | | | | | |
| | 1,5 | 1,5/0 | | | | | |
| | 0 | 0/0 | $(10)^{-9} / 0$ | $(10)^{-10} / 0$ | $(10)^{-11} / 0$ | $(10)^{-12} / 0$ | |
| Tac + ICI $(10)^{-7}$ | 25 | | 6,3 | 1,5 | control Tac+ ICI | | |
| | 12,5 | | 3,1 | ICI only $(10)^{-7}$ | | | |

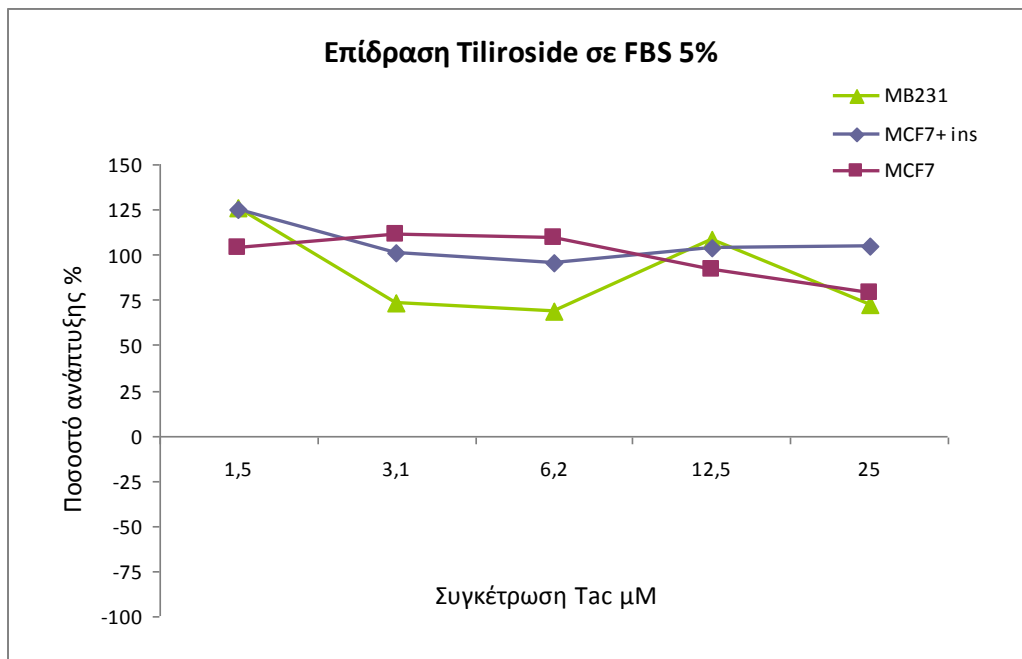
3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Αποτελέσματα ελέγχου κυτταροτοξικότητας Τιλιροσίδη και Ταc σε θρεπτικό υλικό με 5% FBS.

Πίνακας 1

| Συγκέντρωση Tiliroside | Ποσοστό ανάπτυξης % | | |
|------------------------|---------------------|-------|-----------|
| | MDA MB231 | MCF7 | MCF7+ ins |
| 25 μ M | 72,4 | 78,6 | 104,5 |
| 12,5 μ M | 108,3 | 91,5 | 103,6 |
| 6,2 μ M | 69,0 | 109,5 | 95,5 |
| 3,1 μ M | 73,8 | 111,6 | 100,9 |
| 1,5 μ M | 126,2 | 103,6 | 125,5 |

Γράφημα 1

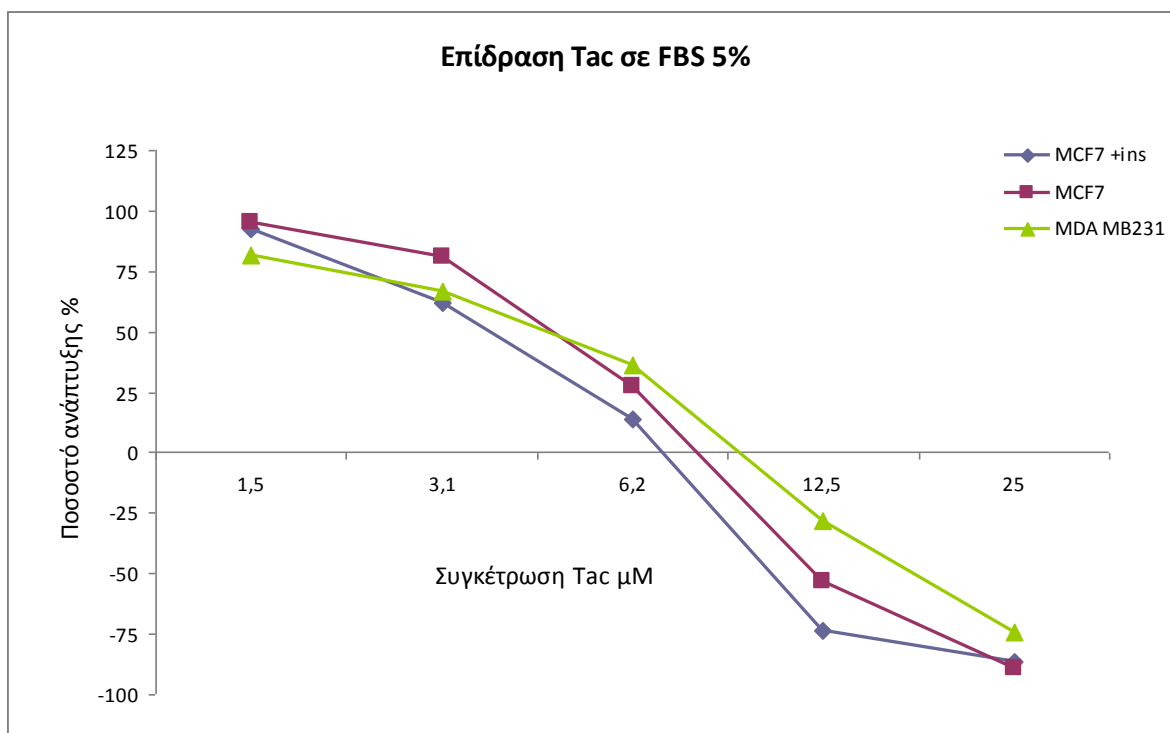


Το γράφημα 1 προέρχεται από τον πίνακα 1 και τα αποτελέσματα του προέκυψαν, από τον υπολογισμό του μέσου όρου των τιμών του ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση του φαρμάκου μετά από τρεις επαναλήψεις του πειράματος.

Πίνακας 2

| Συγκέντρωση Tiliroside | Ποσοστό ανάπτυξης % | | |
|---------------------------|---------------------|-------------|-------------|
| | MDA MB231 | MCF7 | MCF7 +ins |
| 25,0 μM | -74,1 | -89,4 | -86,7 |
| 12,5 μM | -28,2 | -53,4 | -73,9 |
| 6,2 μM | 36,1 | 27,2 | 13,6 |
| 3,1 μM | 66,5 | 80,6 | 61,7 |
| 1,5 μM | 81,4 | 95,0 | 92,1 |
| GI₅₀ | 4,9 | 4,2 | 3,9 |
| TGI | 9,7 | 7,6 | 7,2 |
| LC₅₀ | 18,4 | 11,3 | 10,8 |

Γράφημα 2



Το γράφημα 2 προέρχεται από τον πίνακα 2 και τα αποτελέσματα του προέκυψαν, από τον υπολογισμό του μέσου όρου των τιμών του ποσοστού ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση του φαρμάκου μετά από τρεις επαναλήψεις του πειράματος.

Σχολιασμός αποτελεσμάτων - συζήτηση

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 1 και το γράφημα 1 ο **Τιλιροσίδης** δεν εμφανίζει κάποια σημαντική αντικαρκινική - κυτταροτοξική δράση έναντι καμίας εκ των τριών κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού. Εμφανίζει μια ήπια αντιπολλαπλασιαστική δράση, μειώνοντας τον ρυθμό ανάπτυξης κατά 25% έναντι των MDA MB231 κυττάρων στις συγκεντρώσεις 3.1 και 6.2 μM , όμως το η τιμή GI₅₀ είναι πάνω από 10 σε κάθε περίπτωση οπότε το φάρμακο δεν μπορεί να θεωρηθεί ένας αποτελεσματικός αντικαρκινικός παράγοντας, συμφωνά με τα απαιτούμενα όρια αποτελεσματικότητας του NCI.

(http://dtp.nci.nih.gov/announcements/chg_to_screen.html)

Από την άλλη πλευρά, το ακετυλιωμένο παράγωγο του Τιλιροσίδη, **Tac**, φαίνεται να έχει μια ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική- κυτταροτοξική δράση και στις τρεις κυτταρικές καλλιέργειες. (γραφημα 2 και πίνακα; 2) Μάλιστα στις συγκεντρώσεις 25,0 μM , 12,5 μM , 6,2 μM εμφανίζεται πιο αποτελεσματικό στις καλλιέργειες MCF7 και MCF7 + insulin σε σύγκριση με την καλλιέργεια MDA MB231. Αυτό αντικατοπτρίζεται εν μέρει και στις τιμές των GI_{50} **3,9** για τα MCF7 + insulin ,που είναι η χαμηλότερη των τριών, ενώ των MDA MB231 είναι **4,9** (πίνακας 2).

Δεδομένου ότι η κυτταρική σειρά MCF7 ανήκει στον υπότυπο του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού ενώ η σειρά MDA MB231 ανήκει στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC), υποθέσαμε πως το Tac δρα μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) από τον οποίο εξαρτάται η ανάπτυξη των MCF7 καυτάρων. Έτσι στη συνέχεια εξετάστηκε η δράση του Tac παρουσία οιστραδιόλης E_2 και ενός αναστολέα του ER τον ICI σε θρεπτικό απαλαγμένο από ορμόνες του FBS.

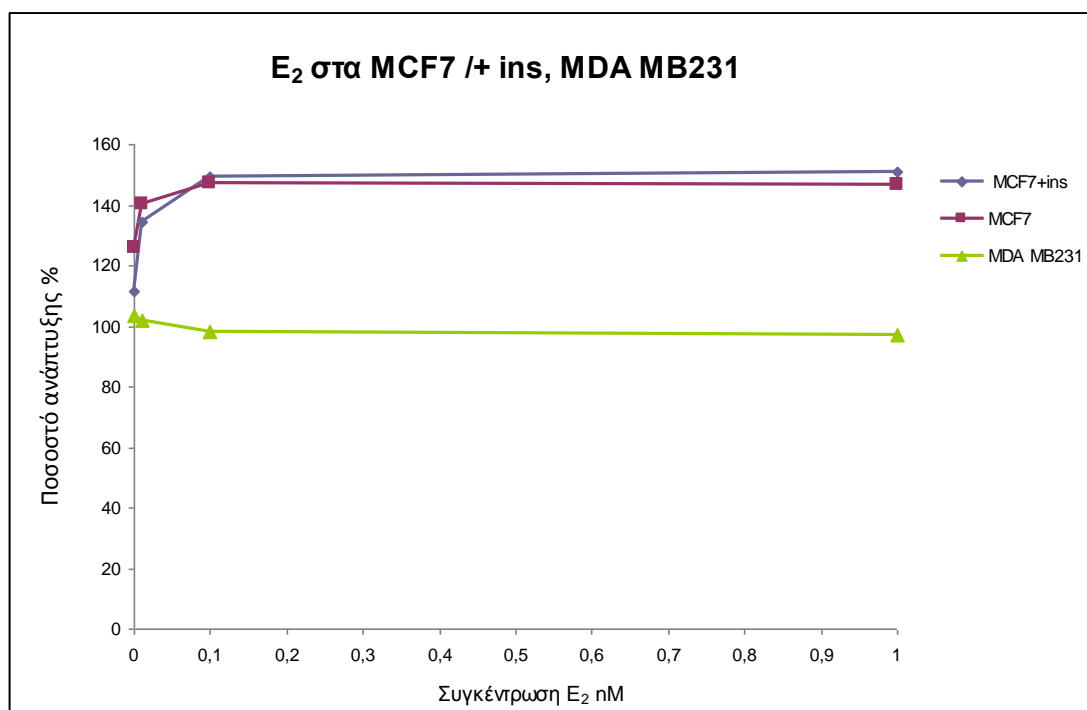
3.2.α Αποτελέσματα δοκιμασίας ελέγχου κυτταροτοξικότητας Tac μαζί με οιστραδιόλη σε cis-DMEM

Επίδραση της E_2 σε cis-DMEM απουσία Tac

Πίνακας 3

| Συγκέντρωση E_2 | Ποσοστό ανάπτυξης % | | |
|--------------------------|---------------------|-------|-----------|
| | MCF7+ins | MCF7 | MDA MB231 |
| $(10)^{-9} \text{ M}$ | 150,7 | 146,5 | 96,9 |
| $(10)^{-10} \text{ M}$ | 149,1 | 147,2 | 98,2 |
| $(10)^{-11} \text{ M}$ | 134,4 | 140,4 | 101,9 |
| $(10)^{-12} \text{ M}$ | 111,4 | 125,8 | 103,5 |

Γράφημα 3



Σχολιασμός αποτελεσμάτων - συζήτηση

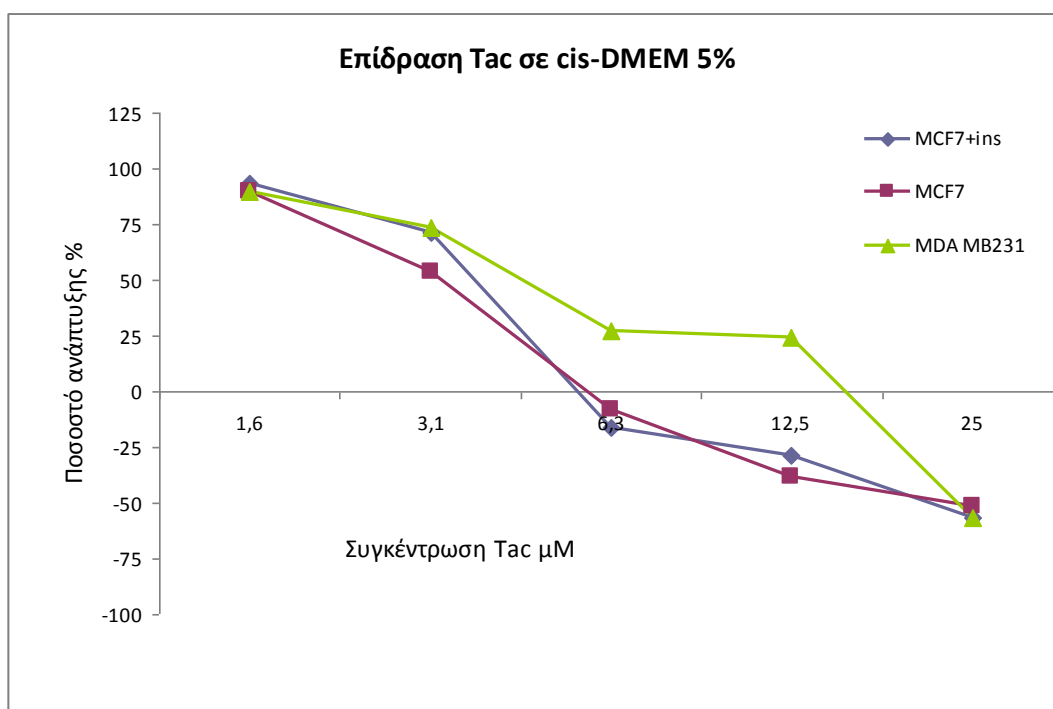
Παρατηρούμε στο γράφημα 3 πως η παρουσία της E₂ οιστραδιόλης επηρεάζει έντονα την ανάπτυξη των κυττάρων MCF7 και MCF7 + insulin αυξάνοντάς την μέχρι και 50% στην συγκέντρωση E₂ (10)⁻⁹ κάτι που ήταν αναμενόμενο καθώς παρουσία E₂ ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι του ER από το οποίο εξαρτάται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των MCF7. Από την άλλη ο ρυθμός ανάπτυξης των μη ορμονοεξαρτώμενων MDA MB231 δεν διαφέρει από αυτόν του control και δεν ξεπερνά το 100%

Επίδραση του Tac σε cis-DMEM απουσία E₂

Πίνακας 4

| Συγκέντρωση Tac | Ποσοστό ανάπτυξης% | | |
|------------------------|--------------------|-------------|-------------|
| | MCF7+ ins | MCF7 | MDA MB231 |
| 25 μM | -56,4 | -51,5 | -56,7 |
| 12,5 μM | -28,4 | -38,1 | 26,5 |
| 6,2 μM | -16,2 | -8,4 | 29,6 |
| 3,1 μM | 73,3 | 53,3 | 81,0 |
| 1,5 μM | 96,4 | 89,9 | 98,8 |
| GI₅₀ | 3,9 | 3,3 | 5,0 |
| TGI | 5,6 | 5,8 | 16,5 |
| LC₅₀ | 22,1 | 23,6 | 24,0 |

Γράφημα 4



Σχολιασμός αποτελεσμάτων - συζήτηση

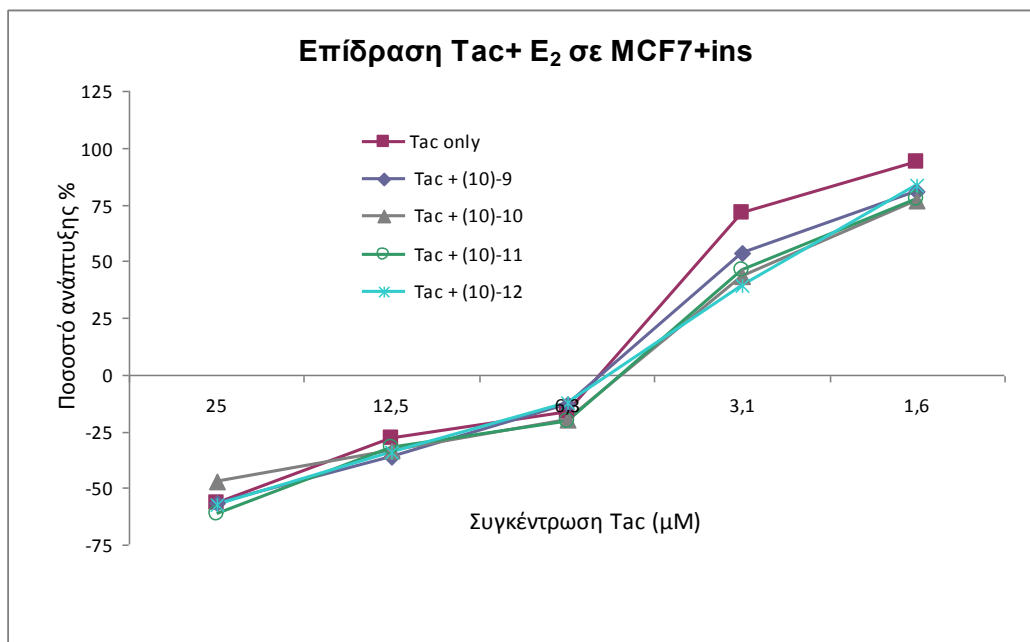
Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα (πίνακας 4, γράφημα 4), στο απενεργοποιημένο θρεπτικό cis-DMEM φαίνεται πιο ξεκάθαρα η διαφορά της αποτελεσματικότητας του Tac στα MCF7 και MCF7 + insulin σε σχέση με την δράση του στα MDA MB231. Βλέπουμε πως στα MCF7 πετυχαίνει μείωση 50% του πολλαπλασιασμού σε συγκέντρωση 3,1 μM , ενώ έχει κυτταροτοξική δράση από την συγκέντρωση 6,3 μM και πάνω. Στα MDA MB231 κυτταροτοξική δράση παρατηρείται μόνο στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 25 μM . Αυτό αντικατοπτρίζεται και στις τιμές των GI_{50} 3,9 για τα MCF7 + insulin και 3,3 για τα MCF7, MDA MB231 είναι στο 5,0. Η διαφορά των TGI είναι μεγαλύτερη, 5,6 για τα MCF7 + insulin και 16,5 για τα MDA MB231.

Επίδραση του συνδυασμού Tac + E₂ σε cis-DMEM στα MCF7 + insulin

Πίνακας 5

| MCF7+ins | Ποσοστό ανάπτυξης % | | | | |
|--------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | Συγκέντρωση E ₂ | | | |
| Συγκέντρωση Tac | (0) | (10) ⁻⁹ | (10) ⁻¹⁰ | (10) ⁻¹¹ | (10) ⁻¹² |
| 25 μM | -56,40 | -56,40 | -47,28 | -61,10 | -57,36 |
| 12,5 μM | -28,38 | -36,20 | -33,51 | -32,17 | -34,09 |
| 6,2 μM | -16,25 | -12,79 | -19,99 | -20,32 | -12,46 |
| 3,1 μM | 71,11 | 53,75 | 43,08 | 46,39 | 39,38 |
| 1,5 μM | 93,51 | 80,65 | 77,01 | 77,65 | 83,56 |
| GI_{50} | | 3,3 | | | 2,7 |
| TGI | | 5,6 | | | 5,5 |

Γράφημα 5

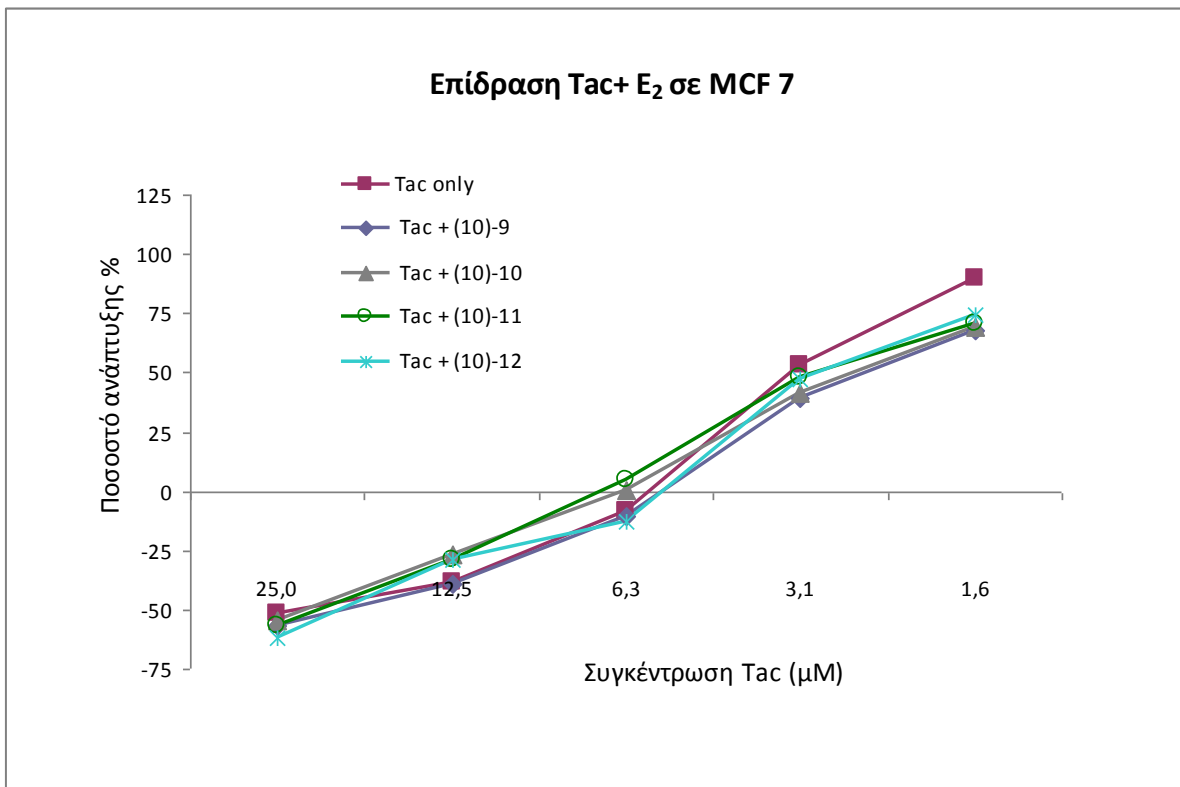


Επίδραση του Tac + E₂ σε cis-DMEM στα MCF7 no insulin

Πίνακας 6

| MCF7 | Ποσοστό ανάπτυξης % | | | | |
|------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Συγκέντρωση E ₂ | | | | |
| Συγκέντρωση Tac | (0) | (10) ⁻⁹ | (10) ⁻¹⁰ | (10) ⁻¹¹ | (10) ⁻¹² |
| 25 | -51,54 | -56,76 | -54,72 | -56,84 | -61,76 |
| 12,5 | -38,14 | -39,05 | -26,78 | -28,67 | -28,67 |
| 6,2 | -8,38 | -10,35 | 0,40 | 4,49 | -13,00 |
| 3,1 | 53,34 | 39,62 | 41,26 | 48,34 | 47,03 |
| 1,5 | 89,88 | 67,83 | 69,13 | 70,97 | 74,75 |
| GI ₅₀ | | 2,5 | | | 2,9 |
| TGI | | 5,6 | | | 5,5 |

Γράφημα 6

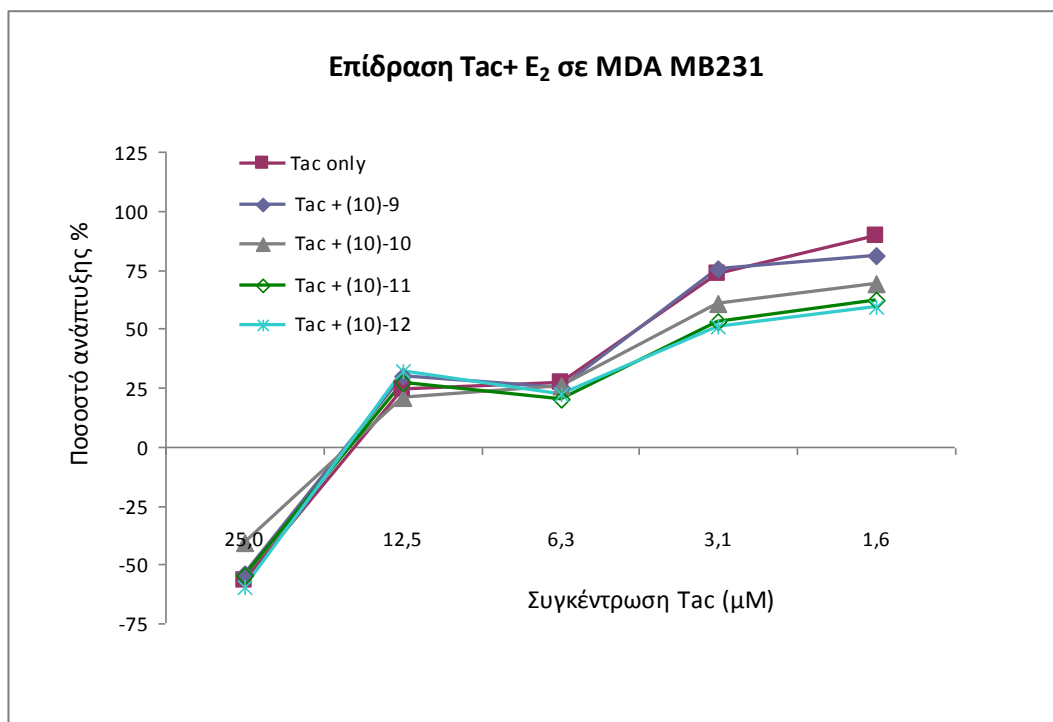


Επίδραση του Tac + E₂ σε cis-DMEM στα MDA MB231

Πίνακας 7

| MDA MB231 | Ποσοστό ανάπτυξης % | | | | |
|------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | Συγκέντρωση E ₂ | | | |
| Συγκέντρωση Tac | (0) | (10) ⁻⁹ | (10) ⁻¹⁰ | (10) ⁻¹¹ | (10) ⁻¹² |
| 25 | -56,70 | -54,22 | -41,08 | -54,52 | -59,61 |
| 12,5 | 24,09 | 29,97 | 20,75 | 27,41 | 31,82 |
| 6,2 | 26,88 | 25,21 | 26,03 | 19,98 | 22,45 |
| 3,1 | 73,52 | 75,22 | 60,75 | 52,76 | 50,63 |
| 1,5 | 89,66 | 80,96 | 69,14 | 62,21 | 59,17 |
| GI ₅₀ | | 4,7 | | | 3,2 |
| TGI | | 16,9 | | | 16,9 |

Γράφημα 7



Σχολιασμός αποτελεσμάτων - συζήτηση

Παρατηρώντας τα γραφήματα και τους πίνακες αποτελεσμάτων 5,6 και 7 για τις τρεις κυτταρικές σειρές, δεν φαίνονται ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των καμπυλών Tac απουσία E₂ και στην συνδυαστική επίδραση Tac + E₂, για τις μεγάλες συγκεντρώσεις του Tac 25 μM, 12,5 μM, 6,2 μM. Ωστόσο στις συγκεντρώσεις 3,1 και 1,5 το Tac φαίνεται να έχει καλύτερη αντι-πολλαπλασιαστική δράση παρουσία της οιστραδιόλης E₂ ακόμη και στις μικρές συγκεντρώσεις της (10)⁻¹¹ και (10)⁻¹², για τα κύτταρα MCF7 με ή χωρίς ινσουλίνη. Θα περιμέναμε η παρουσία της οιστραδιόλης ως μιτογόνο ορμόνη να άρει την αντι-πολλαπλασιαστική δράση του Tac, αντιθέτως στις μικρές συγκεντρώσεις του Tac φαίνεται να την ενισχύει και όχι να την αναστέλλει.

Στα MDA MB231 κύτταρα παρατηρείται ένα παρόμοιο μοτίβο στις δυο τελευταίες συγκεντρώσεις του Tac για τις μικρές συγκεντρώσεις της E₂, ενώ Tac only και Tac + E₂ (10)⁻⁹ σχεδόν ταυτίζονται. Βέβαια τα δεδομένα δεν αρκούν για να καταλήξουμε σε σαφή συμπέρασμα.

Αυτό που είναι πιο ξεκάθαρο, καθώς επαληθεύεται από τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος, είναι ότι το Tac με ή χωρίς την παρουσία της E₂ εμφανίζει μεγαλύτερη αντι-πολλαπλαστική και κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα MCF7 με ή χωρίς ινσουλίνη σε σύγκριση με τα MDA MB231. Στα MCF7 το Tac εμφανίζει τοξικότητα από την συγκέντρωση 6,2 μM και πάνω, ενώ στα MDA MB231 κυτταροτοξικότητα πετυχαίνεται μόνο σε συγκέντρωση 25 μM. Αυτό φέρεται αν συγκρίνουμε τις τιμές TGI (5,5 με 16,5).

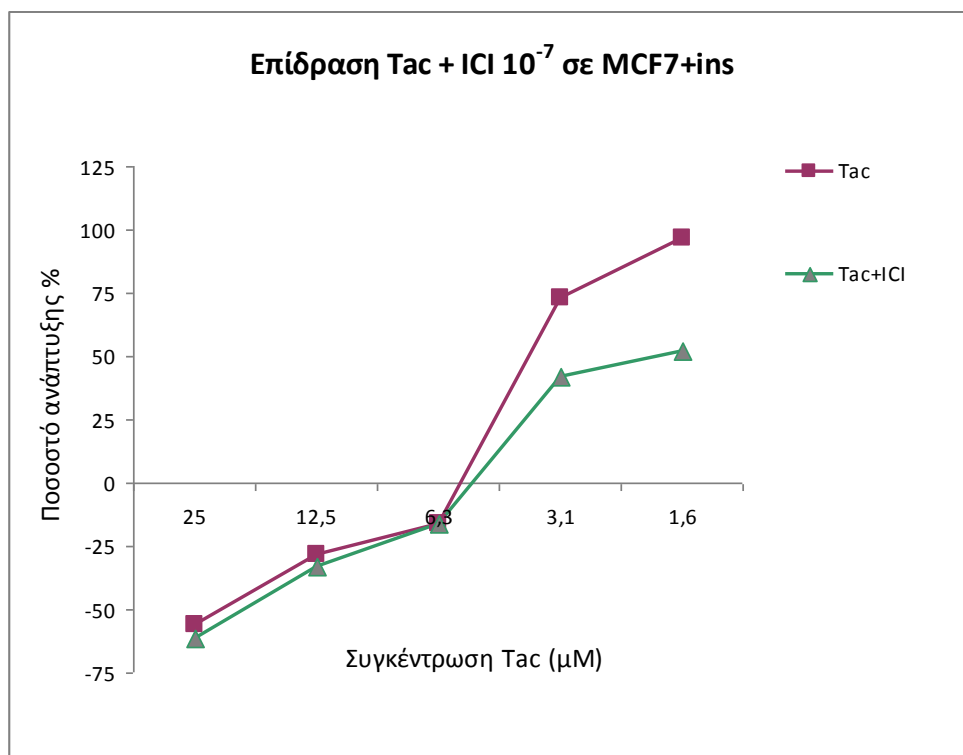
3.2.β Αποτελέσματα δοκιμασίας ελέγχου κυτταροτοξικότητας Tac μαζί με ICI

Επίδραση του Tac + ICI σε cis-DMEM στα MCF7 + ins

Πίνακας 8

| MCF7 + ins | | | | | | |
|-----------------|-------------------------|------------------|------|--|------------------|------|
| Συγκέντρωση Tac | Tac Ποσοστό ανάπτυξης % | | | Tac + ICI(10 ⁻⁷) Ποσοστό ανάπτυξης % | | |
| 25,0 μ M | -56,4 | GI ₅₀ | 3,9 | -61,3 | GI ₅₀ | 1,8 |
| 12,5 μ M | -28,4 | TGI | 5,6 | -32,8 | TGI | 5,3 |
| 6,2 μ M | -16,2 | LC ₅₀ | 22,1 | -16,4 | LC ₅₀ | 20,0 |
| 3,1 μ M | 73,3 | | | 41,8 | | |
| 1,5 μ M | 96,4 | | | 51,8 | | |

Γράφημα 8

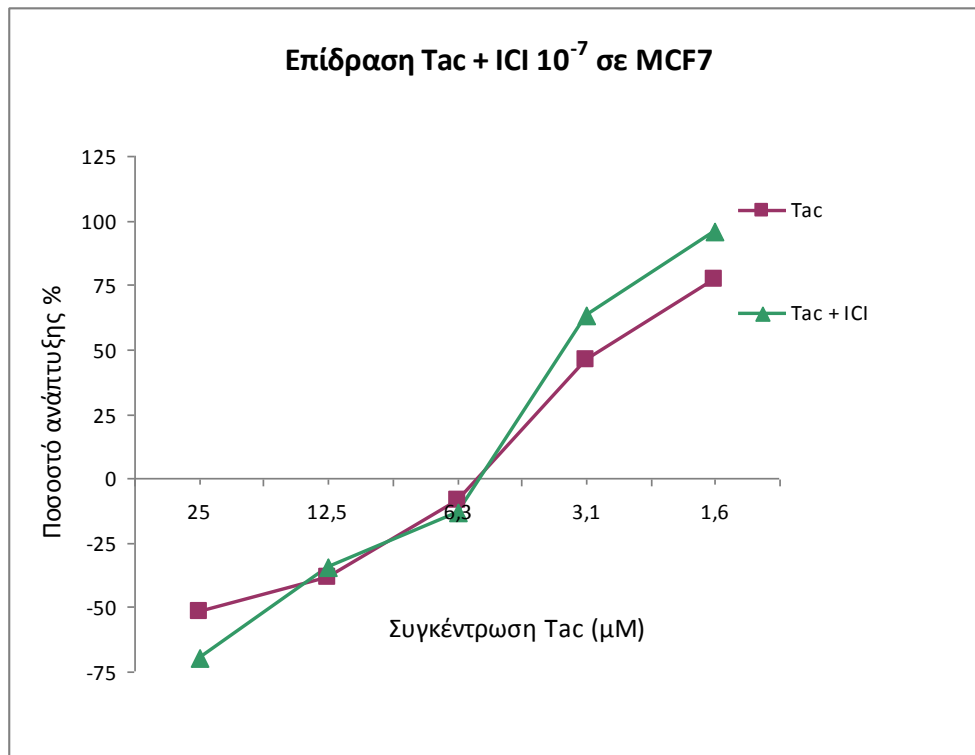


Επίδραση του Tac + ICI σε cis-DMEM στα MCF7 no insulin

Πίνακας 9

| MCF7 | | | | | | |
|-----------------|-------------------------|------------------|------|--|------------------|------|
| Συγκέντρωση Tac | Tac Ποσοστό ανάπτυξης % | | | Tac + ICI(10 ⁻⁷) Ποσοστό ανάπτυξης % | | |
| 25,0 μ M | -51,5 | GI ₅₀ | 2,9 | -69,7 | GI ₅₀ | 3,6 |
| 12,5 μ M | -38,1 | TGI | 5,7 | -34,3 | TGI | 5,7 |
| 6,2 μ M | -8,4 | LC ₅₀ | 23,6 | -13,5 | LC ₅₀ | 18,1 |
| 3,1 μ M | 45,8 | | | 63,1 | | |
| 1,5 μ M | 77,1 | | | 96,0 | | |

Γράφημα 9

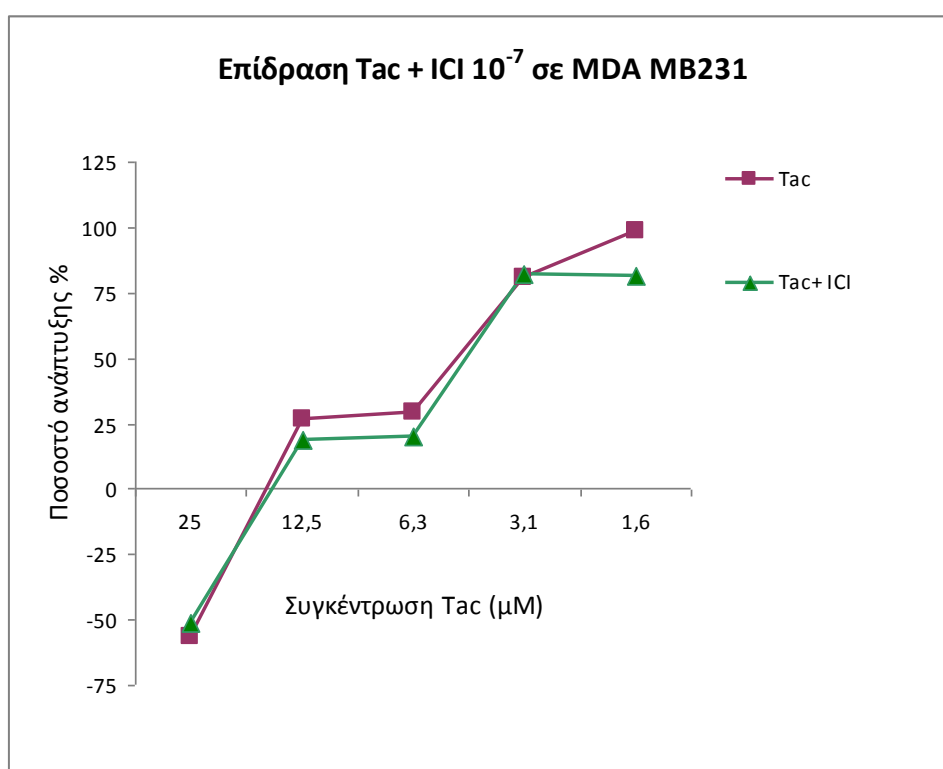


Επίδραση του Tac + ICI σε cis-DMEM στα MDA MB231

Πίνακας 10

| MDA MB231 | | | | | | |
|--------------------|-------------------------|------------------|------|--|------------------|------|
| Συγκέντρωση Tac | Tac Ποσοστό ανάπτυξης % | | | Tac + ICI(10^{-7}) Ποσοστό ανάπτυξης % | | |
| 25,0 μM | -56,7 | GI ₅₀ | 5,0 | -51,4 | GI ₅₀ | 4,7 |
| 12,5 μM | 26,5 | TGI | 16,5 | 18,8 | TGI | 15,9 |
| 6,2 μM | 29,6 | LC ₅₀ | 24,0 | 20,3 | LC ₅₀ | 24,7 |
| 3,1 μM | 81,0 | | | 82,2 | | |
| 1,5 μM | 98,8 | | | 81,1 | | |

Γράφημα 10



Σχολιασμός αποτελεσμάτων - συζήτηση

Παρατηρώντας τα γραφήματα 8,9 και 10 βλέπουμε πως οι καμπύλες του Tac απουσία του αναστολέα ICI σχεδόν ταυτίζονται με την καμπύλη του συνδυασμού Tac και ICI για τις συγκεντρώσεις 25 - 6,25 μM . Στις συγκεντρώσεις 3,1 και 1,5 μM στον συνδυασμό φαίνεται να ενισχύεται η αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε σχέση με την δράση του Tac απουσία του δευτέρου αναστολέα, στα κύτταρα MCF7 + ins εντονότερα από τα MCF7 χωρίς ινσουλίνη.

Επίσης ο συνδυασμός του Tac και του ICI, που αποτελεί αναστολέα του ER, πετυχαίνει την μέγιστη αντι-πολλαπλασιαστική δράση έναντι των MCF7 + ins σε σύγκριση με MCF7 και MDA MB231, με τιμές GI₅₀ 1,8 με 3,6 και 4,7 αντίστοιχα. Αυτό θα λέγαμε πως είναι αναμενόμενο καθώς συμφωνά με βιβλιογραφία η ύπαρξη ινσουλίνης είναι σε θέση να ενεργοποιεί τον ER μέσω τελεστών του μονοπατιού της και έτσι ο ICI ως αντι-οιστρογόνο μπλοκάρει τους ενεργοποιημένους ER.

4. Σύνοψη - Συμπεράσματα

4.1 Επίδραση του Τιλιροσίδη και Tac στις κυτταρικές σειρές MCF7/+ ins, MDA MB231

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η αντιπολλαπλασιαστική - κυτταροτοξική δράση του φλαβονοειδούς **Τιλιροσίδη** και του ακετυλιωμένου προϊόντος του, το **Tac**, σε δύο ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού MCF7 / MCF7 + ins και MDA MB231, σε θρεπτικό RPMI 5% FBS, με την δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας σουλφοροδαμίνης B (SRB Cytotoxicity Assay).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν αρχικά, πως ο **Τιλιροσίδης** δεν εμφανίζει κάποια σημαντική αντικαρκινική - κυτταροτοξική δράση έναντι καμίας εκ των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού που εξετάστηκαν . Εμφανίζει μια ήπια αντιπολλαπλασιαστική δράση, μειώνοντας τον ρυθμό ανάπτυξης κατά 25% έναντι των MDA MB231 κυττάρων στις συγκεντρώσεις 3,1 και 6,2 μM , όμως με υψηλή τιμή GI_{50} σε κάθε περίπτωση οπότε το φάρμακο θεωρήθηκε μη αποτελεσματικός αντικαρκινικός παράγοντας και δεν μελετήθηκε περαιτέρω .

Το **ακετυλιωμένο παράγωγο του Τιλιροσίδη, Tac**, εμφάνισε μια ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική - κυτταροτοξική δράση σε όλες τις κυτταρικές σειρές που δοκιμάστηκε κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από παλιότερες μελέτες του ακετυλιωμένου Τιλιροσίδη [22]. Μάλιστα στις συγκεντρώσεις 25,0 μM , 12,5 μM , 6,2 μM εμφανίζεται πιο αποτελεσματικό στις καλλιέργειες MCF7 και MCF7 + insulin σε σύγκριση με την καλλιέργεια MDA MB231. Αυτό δείχνουν τιμές των GI_{50} **3,9** για τα MCF7 + insulin ,που είναι η χαμηλότερη των τριών, ενώ των MDA MB231 είναι **4,9**.

Δεδομένου ότι η κυτταρική σειρά MCF7 ανήκει στον υπότυπο του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και αύξησης του όγκου εξαρτάται και από την σηματοδότηση του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) ενώ η σειρά MDA MB231 ανήκει στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC) και είναι μη ορμονοεξαρτώμενη . υποθέσαμε πως το Tac δρα μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης του ER [ενότητα 1.13, 1.14].

Έτσι στη συνέχεια εξετάστηκε η δράση του Tac παρουσία οιστραδιόλης E_2 και ενός αναστολέα του ER τον ICI σε θρεπτικό απαλαγμένο από ορμόνες του FBS, ώστε να διαπιστώσουμε της σχέση της δράσης του Tac αποκλειστικά με την σηματοδότηση του υποδοχέα οιστρογόνων, χωρίς την παρέμβαση άλλων ορμονών.

4.2 Επίδραση του Tac στις κυτταρικές σειρές MCF7/+ ins, MDA MB231 μαζί με E_2 και ICI

Σε μία δευτερη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε η αντιπολλαπλασιαστική - κυτταροτοξική δράση του ακετυλιωμένου Τιλιροσίδη, Tac, στις κυτταρικές σειρές MCF7 / MCF7 + ins και MDA MB231, με την δοκιμασία ελέγχου κυτταροτοξικότητας σουλφοροδαμίνης B (SRB Cytotoxicity Assay), σε θρεπτικό DMEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης 5% cis-FBS. Το συγκεκριμένο θρεπτικό χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλισθεί πως τα κύτταρα θα μεγαλώσουν σε θρεπτικό όπου απουσιάζει οποιαδήποτε ορμόνη (προγεστερόνη, IGF, GH, στεροειδείς ορμόνες του ορού FBS που θα μπορούσε να επηρεάσει την ανάπτυξή τους.

Για την επίδραση του **Tac** στις καλλιέργειες MCF7 / MCF7 + ins και MDA MB231, διαπιστώθηκε πως στο απενεργοποιημένο θρεπτικό cis-DMEM εμφάνισε καλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι των MCF7 και MCF7 + insulin σε σχέση με την δράση του στα MDA MB231. Στα MCF7 πετυχαίνει μείωση 50% του πολλαπλασιασμού σε συγκέντρωση 3,1 μM, ενώ έχει κυτταροτοξική δράση από την συγκέντρωση 6,3μM και πάνω. Στα MDA MB231 κυτταροτοξική δράση παρατηρείται μόνο στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 25μM. Η Διαφορά των **GI₅₀** για τα MCF7 + insulin και MCF7 σε σύγκριση με τα MDA MB231 είναι παρόμοια με την διαφορά τους στο θρεπτικό με FBS. Η διαφορά των τιμών TGI, της συγκέντρωσης όπου έχουμε αναστολή της ανάπτυξης, είναι μεγαλύτερη, **5,6** για τα MCF7 + insulin και 16,5 για τα MDA MB231.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της **οιστραδιόλης (E₂)** στις καλλιέργειες σε τέσσερις συγκεντρώσεις (10)⁻⁹M, (10)⁻¹⁰M, (10)⁻¹¹M, (10)⁻¹² M. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η παρουσία της E₂ οιστραδιόλης επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την ανάπτυξη των κυττάρων MCF7 και MCF7 + insulin κάτι που ήταν αναμενόμενο καθώς η E₂ ενεργοποιεί τον ER από το οποίο εξαρτάται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των MCF7. Από την άλλη ο ρυθμός ανάπτυξης των μη ορμονοεξαρτώμενων MDA MB231 παραμένει σταθερός είτε υπάρχει είτε απουσιάζει από το διάλυμα η E₂.

Αυτό που είδαμε στα αποτελέσματα της δοκιμασίας ελέγχου σουλφοροδαμίνης B πραγματοποιήθηκε για την επίδρασή του **συνδυασμού Tac και οιστραδιόλης E₂** στην ανάπτυξη των τριών κυτταρικών σειρών MDA MB231, MCF7 και MCF7 + insulin, ήταν ότι δεν υπήρχαν διαφορές στην δράση μεταξύ του **Tac απουσία E₂** και στην συνδυαστική επίδραση **Tac + E₂**, για στις υψηλές συγκεντρώσεις του Tac. Ωστόσο στις συγκεντρώσεις 3,1 και 1,5 το Tac φαίνεται να έχει καλύτερη αντι-πολλαπλασιαστική δράση παρουσία της οιστραδιόλης σε σύγκριση με όταν απουσιάζει. Θα περιμέναμε η παρουσία της οιστραδιόλης ως μιτογόνο ορμόνη να άρει την αντι-πολλαπλασιαστική δράση του Tac, αντιθέτως στις μικρές συγκεντρώσεις του Tac φαίνεται να την ενισχύει και όχι να την αναστέλλει, στα MCF7 και MCF7 + insulin.

Στα MDA MB231 βλέπουμε το Tac only και Tac + E₂ να μην παρουσιάζουν ουσιαστικές διαφορές. Βέβαια χρειάζονται περισσότερες επαναλήψεις του πειράματος για να εξάγουμε πιο ασφαλή συμπεράσματα. Στα MCF7 το Tac εμφανίζει τοξικότητα από την συγκέντρωση 6,2 μM και πάνω, ενώ στα MDA MB231 κυτταροτοξικότητα πετυχαίνεται μόνο σε συγκέντρωση 25 μM. Αυτό φέρεται αν συγκρίνουμε τις τιμές TGI (5,5 με 16,5).

Όταν μελετήθηκε η δράση του Tac σε συνδυασμό με τον αναστολέα ICI τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ του Tac και του συνδυασμού Tac + ICI στις υψηλές συγκεντρώσεις. Στις συγκεντρώσεις 3,1 και 1,5 μM του συνδυασμού Tac + ICI φαίνεται να ενισχύεται η αντι-πολλαπλασιαστική του δράση σε σχέση με την δράση του Tac απουσία του δευτέρου αναστολέα, στα κύτταρα MCF7 + ins εντονότερα από τα MCF7 χωρίς ινσουλίνη.

Επίσης ο συνδυασμός του Tac + ICI, που αποτελεί αναστολέα του ER, πετυχαίνει την μέγιστη αντι-πολλαπλασιαστική δράση έναντι των MCF7 + ins που παρατηρήθηκε κατά την διάρκεια των πειραμάτων με τιμή **GI₅₀** 1,8. Αυτό θα λέγαμε πως είναι αναμενόμενο καθώς συμφωνά με βιβλιογραφία η ύπαρξη ινσουλίνης είναι σε θέση να ενεργοποιεί τον ER μέσω τελεστών του μονοπατιού της και έτσι ο ICI ως αντι-οιστρογόνο μπλοκάρει τους ενεργοποιημένους ER.

4.3 Σύνοψη

Συνοψίζοντας, από το σύνολο των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το Tac με ή χωρίς την παρουσία της E_2 εμφανίζει αποτελεσματική αντι-πολλαπλαστική και κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα MCF7 με ή χωρίς ινσουλίνη και στα MDA MB231, κάτι που το κάνει έναν πιθανό υποψήφιο αντικαρκινικό παράγοντα, καταλληλότερο για την αντιμετώπιση και των δύο υποτύπων με προτίμηση στον ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού. Επίσης, για τον τρόπο λειτουργίας του Tac παρατηρείται πως η δράση του συνδέεται στενά με τον ίδιο το υποδοχέα οιστρογόνων ή το σηματοδοτικό μονοπάτι του, καθώς όποτε ο ER είναι ενεργοποιημένος είτε από την ύπαρξη οιστραδιόλης που τον ενεργοποιεί άμεσα είτε από την ινσουλίνη που τον ενεργοποιεί έμμεσα [20], η αντι-πολλαπλασιαστική δράση του Tac ενισχύεται στις χαμηλές συγκεντρώσεις του.

Ωστόσο περαιτέρω επαναλήψεις των παραπάνω πειραμάτων είναι ανάγκη να πραγματοποιηθούν για να εξακριβώσουμε αν οι διαφορές στην δράση του Tac σε συνδυασμό με την E_2 ή με τον αναστολέα ICI είναι στατιστικά σημαντικές και να οδηγηθούμε σε πιο ασφαλή συμπεράσματα για την λειτουργία του. Επίσης να εξεταστεί η δράση του Tac σε ζωικά μοντέλα, ώστε να δούμε αν όντως αποτελεί έναν κατάλληλο αντικαρκινικό παράγοντα για την αντιμετώπιση του ορμονοεξαρτώμενο καρκίνου του μαστού.

Βιβλιογραφία

1. Rosen M, Cedars M, "Female reproductive endocrinology and infertility." In: Greenspan F, Gardner D, eds, Basic & Clinical Endocrinology, 7th edition, New York, McGraw - Hill Companies, 2004
2. Beatson GT: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. Lancet, 2: 104 - 107, 1896
3. Huggins C, Bergenstal DM: Inhibition of human mammary and prostatic cancers by adrenalectomy. Cancer Res, 12: 134 - 141, 1952
4. Hulka BS: Epidemiology of susceptibility to breast cancer. Progress Clin Biol Res, 395: 159 - 174, 1996
5. Dickson R, Pestell R, Lippman M: Molecular biology of breast cancer. In: DeVita V, Hellman S, Rosenberg S, eds, Cancer: Principles and Practice in Oncology, 7th edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005
6. Williams DL: The estrogen receptor: a review. Life Sci, 15: 583 - 597, 1974
7. WHO, "World cancer report" 2014, 1.1
8. Kuby, Ανοσολογία, , "Καρινος και ανοσοποιητικό σύστημα", Κεφάλαιο 21 σελ.639
9. Guyton and Hall, Ιατρική Φυσιολογία, 82: 1190-1193, 11η έκδοση
10. WHO, "World cancer report", 5.2 "Breast cancer", 2014
11. Beate Baderschneider and Peter Winterhalter, "Isolation and Characterization of Novel Benzoates, Cinnamates, Flavonoids, and Lignans from Riesling Wine and Screening for Antioxidant Activity" Food Chem., 49 (6), pp 2788–2798 2001
12. W. Barkley Butler, "Effects of Serum and Insulin on the Sensitivity of the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 to Estrogen and Antiestrogens"
13. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, et al. "Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?" in Oncol. ;23:7350–7360., 2005
14. ATCC link <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRM-HTB-26.aspx#generalinformation>
15. Stefan Nilsson, Sari Mäkelä, "Mechanisms of Estrogen Action, Physiological Reviews", **Vol. 81 no. 4**, 1535-1565, Published 10 January 2001
16. Michelle D. Althuis, Jennifer H. Fergenbaum, Montserrat Garcia-Closas, Louise A. Brinton, M. Patricia Madigan, and Mark E. Sherman, "Etiology of Hormone Receptor–Defined Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature", 2004.

17. Calderón-Montaña JM¹, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M., "A review on the dietary flavonoid kaempferol", *Mini Rev Med Chem.* (4):298-344., Apr 11 2011
18. Phelan, KM May, "Basic techniques in mammalian cell tissue culture", *Current protocols in cell biology*, 2007 - Wiley Online Library
19. (PDQ®), "Breast Cancer Treatment", Patient Version, PDQ Adult Treatment Editorial Board. Published online: May 5, 2017.
20. Lanzino M¹, Morelli C, Garofalo C, Panno ML, Mauro L, Andò S, Sisci D., "Interaction between estrogen receptor alpha and insulin/IGF signaling in breast cancer", *Current Cancer Drug Targets.* 2008 Nov;8(7):597-610.
21. Hamelers IH¹, Steenbergh PH., "Interactions between estrogen and insulin-like growth factor signaling pathways in human breast tumor cells" *Endocrine Related Cancer.* 2003 Jun;10(2):331-45.
22. Chriiida Tsimplouli, Costas Demetzos, Margarita Hadzopoulou-Cladaras, Panayotis Pantazis, Konstantinos Dimas, "In vitro activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines", Springer-Verlag 2011
23. J.F.R. Robertson, "Falsodex (ICI 182,780), a novel estrogen receptor downregulator - future possibilities in breast cancer", *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, December 2001