

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πτυχιακή εργασία

IN VIVO ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΕ
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ
ΠΡΩΤΕΙΝΗ TR4

Μαρία Κουλέντη

Λεμεσός 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΥΛΙΚΩΝ

Πτυχιακή εργασία

IN VIVO ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΕ
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ
ΠΡΩΤΕΙΝΗ TR4

Μαρία Κουλέντη

Σύμβουλος καθηγητής
Καθ. Αντρέας Αναγιωτός
Δρ. Κωνσταντίνος Καπνίσης

Λεμεσός 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Μαρία Κουλέντη, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών και επιστήμης και Μηχανικής Υλικών του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής, η οποία υλοποιήθηκε στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Βιοσυστημάτων (Biomechanics and Living System Analysis - BIOLISYS), θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν ο καθένας με το δικό του τρόπο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Ανδρέα Αναγιωτό για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου την ευκαιρία να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο συγκεκριμένο τομέα της μηχανολογίας καθώς και για τη βοήθεια και την υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο μεταδιδακτορικό συνεργάτη Δρ. Κωνσταντίνο Καπνίση, για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για τη διεκπεραίωση της εργασίας, για την αμέριστη και πολύτιμη βοήθεια του καθώς και για την καθοδήγηση και τη συμπαράσταση του σ' όλη τη διάρκεια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. Μαριάννα Προκόπη, βιολόγο και μέλος της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου, για την πολύτιμη βοήθεια της και τις γνώσεις που μου παρείχε για να είναι εφικτή η ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και στον μεταδιδακτορικό συνεργάτη Δρ. Κώστα Πιτσιλλίδη για τη εξίσου σημαντική βοήθεια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τη βιολόγο Μαρία Ελευθερίου και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρίνα Ευστρατίου για τη πολύτιμη βοήθεια και συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη συνεχή και ανιδιοτελή υποστήριξη, βοήθεια και εμπιστοσύνη που μου παρείχαν σ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, αλλά ιδιαίτερα κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού έχει αποδειχθεί ότι είναι ο συχνότερη μορφή καρκίνου παγκοσμίως και η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Προκύπτει από την ακανόνιστη ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που προέρχονται από τον ιστό του μαστού. Οι τρέχουσες θεραπείες δεν είναι αρκετά αποτελεσματικές, προκαλώντας αρκετές επιπτώσεις και παρενέργειες. Η συνθετική πρωτεΐνη TR4 στοχεύει κυτταρικά μονοπάτια τα οποία υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα. Η αυξημένη έκφραση των γονιδίων Notch και των συνδετών τους έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζεται σε πολλά ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα και ιστούς. Έτσι, το κυτταρικό μονοπάτι Notch θεωρείται ελκυστικός στόχος για τη θεραπεία. Το TR4 είναι μια υβριδική πρωτεΐνη η οποία αναστέλλει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch, και το κύτταρο-διδυμικό πεπτίδιο Antennapedia.

Σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής είναι η εξέταση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου και η αξιολόγηση της ανταπόκρισης των όγκων στη θεραπευτική ουσία.

Η μεθοδολογία περιλαμβάνει πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα κύτταρα (*in vitro*) έτσι ώστε να εξεταστεί η επιλεκτική συγκέντρωση του TR4 στα καρκινικά κύτταρα και η τοξικότητα (κυτταρικός θάνατος λόγω απόπτωσης) του TR4. Επίσης, περιλαμβάνει πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα ποντίκια (*in vivo*) έτσι ώστε να μελετηθεί η βιοκατανομή του TR4 σε υγιή ποντίκια και η επίδραση του TR4 σε ορθοτοπικά μοντέλα καρκινικών όγκων, με τη χρήση *in vivo* απεικονιστικών συστημάτων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θεραπευτική ουσία είναι αποτελεσματική αφού εισχωρεί στα καρκινικά κύτταρα προκαλώντας τον κυτταρικό τους θάνατο. Τα *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι η ουσία στοχεύει τον όγκο προκαλώντας τη μείωση του.

Η στοχευμένη θεραπεία μέσω του TR4 προσφέρει μια εξειδικευμένη και καινοτόμο προοπτική στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού έστω και αν βρίσκεται ακόμα στο προκλινικό, πειραματικό στάδιο. Με βάση τα μέχρι στιγμής επιτυχή αποτελέσματα της θεραπείας, αναμένονται ανάλογα θετικά αποτελέσματα και στο κλινικό στάδιο.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος του μαστού, κυτταρικό μονοπάτι Notch, στοχευμένη θεραπεία, TR4, *in vivo* συστήματα απεικόνισης

ABSTRACT

Breast cancer has been shown to be the most common cancer worldwide and the second leading cause of death due to cancer. It results from the irregular growth and proliferation of cells derived from breast tissue. Current therapies are not effective enough, causing a number of side effects. The protein TR4 targets signaling pathways that are overexpressed in cancer cells. The increased expression of Notch genes and their ligands have been shown to appear in many human cancer cells and tissues. Thus, Notch signaling pathway is considered an attractive target for therapy. The TR4 is a hybrid protein which inhibits the activation of Notch signaling pathway and the cell-penetrating peptide Antennapedia.

The purpose of this thesis is to examine the effectiveness of the drug and to evaluate the response of tumors to therapeutic drug.

Methods include experiments performed in cells (*in vitro*) in order to examine the selective concentration of TR4 and the toxicity of TR4 (cell death due to apoptosis). Also include experiments performed in mice (*in vivo*) in order to study the biodistribution of TR4 in healthy mice and the effect of TR4 in orthotopically tumor models using *in vivo* imaging systems.

Results showed that the therapeutic agent is effective since it penetrates the cancer cells and causes cell death. The *in vivo* experiments demonstrated that the agent targets the tumor, causing its reduction.

Targeted therapy through TR4 protein provides a specialized and innovative prospect in the treatment of breast cancer, even if it is still in experimental pre-clinical phase. Based on hitherto successful results of TR4 targeted treatment; are expected comparable positive results in clinical phase.

Keywords: breast cancer, Notch signaling pathway, targeted therapy, TR4, *in vivo* imaging systems

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT	v
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	x
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xi
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xii
ΕΝΤΟΛΗ ΘΕΜΑΤΟΣ	xiii
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	xv
1 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	1
1.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ.....	1
1.1.1 Η κυτταρική μεμβράνη.....	1
1.1.2 Το κυτταρόπλασμα.....	2
1.1.3 Ο πυρήνας.....	4
1.2 ΟΙ ΒΑΣΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ.....	5
1.2.1 Πρωτεϊνοσύνθεση.....	5
1.2.2 Κυτταρική διαίρεση.....	5
1.2.3 Απόπτωση.....	6
1.2.4 Γήρανση.....	6
1.3 ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	6
1.4 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	7
1.4.1 Τύποι καρκίνου.....	9
1.4.2 Στάδια ανάπτυξης του όγκου.....	9
1.4.3 Στάδια ανάπτυξης της μετάστασης	10

1.4.4	Αγγειογένεση.....	11
1.4.5	Αιτίες ανάπτυξης καρκίνου	12
1.5	ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	12
1.5.1	Ορισμός	12
1.5.2	Τα χαρακτηριστικά τους.....	13
1.5.3	Κυτταρικά μονοπάτια.....	14
1.6	ΤΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ	14
1.6.1	Γενικά	14
1.6.2	Τα μη κακοήθη κύτταρα.....	15
1.6.3	Μετάσταση	16
1.7	Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	18
1.7.1	Γενικά	18
1.7.2	Αιτίες πρόκλησης	21
1.7.3	Τα στάδια.....	23
1.7.4	Η ομαδοποίηση.....	26
1.7.5	Εξέταση και ανίχνευση του καρκίνου του μαστού	28
1.7.6	Η θεραπεία.....	29
2	ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ TR4.....	33
2.1	ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	33
2.1.1	Επιδράσεις των συμβατικών θεραπειών.....	33
2.1.2	Παραδείγματα προηγμένων στοχευμένων θεραπειών.....	33
2.2	Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ TR4.....	37
2.2.1	Η σημασία του κυτταρικού μονοπατιού Notch.....	37
2.2.2	Ο ορισμός της φαρμακευτικής ουσίας TR4	38
2.3	Η ΣΥΖΕΥΞΗ ΤΟΥ TR4	39
2.4	IN VIVO ΜΟΝΤΕΛΑ ΖΩΩΝ.....	40

2.4.1	<i>In vivo</i> μοντέλα ζώων για τον καρκίνο του μαστού	43
3	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	45
3.1	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	45
3.2	<i>IN VITRO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	45
3.2.1	Μελέτη της επιλεκτικής συγκέντρωσης του TR4 στα καρκινικά κύτταρα	45
3.2.2	Μελέτη της τοξικότητας (κυτταρικός θάνατος λόγω απόπτωσης) του TR4.....	46
3.3	<i>IN VIVO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	47
3.3.1	Μελέτη της βιοκατανομής του TR4 σε υγιή ποντίκια (bio-distribution assay)	48
3.3.2	Ενέσιμη χορήγηση καρκινικών κυττάρων στα ποντίκια (Injections)	48
3.3.3	Μελέτη της επίδρασης του TR4 σε ορθοτοπικά μοντέλα καρκινικών όγκων ..	49
3.4	ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ	49
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
4.1	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ TR4 ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	53
4.2	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ (ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ΛΟΓΩ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ) ΤΟΥ TR4	54
4.3	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΟΥ TR4 ΣΕ ΥΓΙΗ ΠΟΝΤΙΚΙΑ (BIO-DISTRIBUTION ASSAY).....	56
4.4	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ TR4 ΣΕ ΟΡΘΟΤΟΠΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ	57
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
5.1	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	59
5.2	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	61
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Το TNM σύστημα.....	25
Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις ουσιών για το πείραμα ελέγχου του κυτταρικού θανάτου.....	47
Πίνακας 3: Κυτταρικός θάνατος των MDA-MB-231 GFP καρκινικών κυττάρων ανάλογα με τη συγκέντρωση της φαρμακευτικής ουσίας.....	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Οι τυπικές δομές που βρέθηκαν στα κύτταρα του σώματος.....	2
Σχήμα 2: Το καρκινικό κύτταρο.....	7
Σχήμα 3: Τα στάδια της μετάστασης.....	11
Σχήμα 4: Η δομή του μαστού.....	19
Σχήμα 5: Υποθετικό μοντέλο της εξέλιξης του όγκου του μαστού	21
Σχήμα 6: Η ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης Notch.....	36
Σχήμα 7: Το μοντέλο της πρωτεΐνης TR4.....	40
Σχήμα 8: Η ανατομία του μαστικού αδένου του ποντικιού.	48
Σχήμα 9: Η διάταξη του <i>in vivo</i> συστήματος κυτταρομετρίας ροής.	51
Σχήμα 10: Η ανίχνευση κυκλοφορούντων κυττάρων φθορισμού χρησιμοποιώντας το <i>in vivo</i> σύστημα κυτταρομετρίας ροής.....	51
Σχήμα 11: Η διάταξη του <i>in vivo</i> συστήματος απεικόνισης φθορισμού.....	52
Σχήμα 12: Εισχώρηση της φαρμακευτικής ουσίας TR4 στον πυρήνα των MDA-MB-231 (non GFP) καρκινικών κυττάρων.....	53
Σχήμα 13: Κυτταρικός θάνατος των MDA-MB-231 (non GFP) καρκινικών κυττάρων λόγω του TR4	54
Σχήμα 14: Γραφική απεικόνιση του κυτταρικού θανάτου μέσω του TR4 και GSI.....	56
Σχήμα 15: Το σήμα του υποβάθρου (θόρυβος) που συλλέχθηκε από τα αιμοφόρα αγγεία των υγιών ποντικών.....	57
Σχήμα 16: Η βιοκατανομή του TR4 σε (A) 2 ώρες και (B) 24 ώρες μετά την ενέσιμη χορήγηση.....	57
Σχήμα 17: Η ανταπόκριση του όγκου σε ποντίκια χωρίς θεραπεία και σε ποντίκια με τη θεραπεία TR4-Cy5, 7 και 14 ημέρες μετά την ενέσιμη χορήγηση του TR4.....	58

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CCD	Charge-Coupled Device
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFP	Green Fluorescent Protein
LED	Light-Emitting Diode
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidium Iodide
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonucleic acid

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

Adenosine triphosphate (ATP):	Τριφωσφορική αδενοσίνη
Deoxyribonucleic acid (DNA):	Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ
Fetal Bovine Serum (FBS):	Εμβρυϊκό διάλυμα συνήθως από βοειδή
Green Fluorescent Protein (GFP):	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
In Vitro:	Το περιβάλλον στο οποίο εξετάζονται τα κύτταρα, το οποίο είναι διαφορετικό από το φυσιολογικό τους βιολογικό περιβάλλον
In Vivo:	Το περιβάλλον στο οποίο τα αποτελέσματα των διάφορων βιολογικών οντοτήτων, δοκιμάζονται σε ζωντανούς οργανισμούς, συνήθως ζώα
Light-Emitting Diode (LED):	Πηγή διόδου φωτοεκπομπής
Natural Killer cells:	Κύτταρα φυσικοί δολοφόνοι
Phosphate Buffered Saline (PBS):	Ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συνήθως στη βιολογική έρευνα
Red Fluorescent Protein (RFP):	Κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
Ribonucleic acid (RNA):	Ριβονουκλεϊνικό οξύ
B κύτταρα:	B λεμφοκύτταρα
T κυττάρα:	T λεμφοκύτταρα/θυμοκύτταρα

ΕΝΤΟΛΗ ΘΕΜΑΤΟΣ

Πολλοί τύποι καρκίνου παραμένουν αδύνατον να θεραπευτούν με συμβατικές φαρμακευτικές ή γονιδιακές θεραπείες. Αυτό σχετίζεται εν μέρει με την ανεπαρκή παράδοση φαρμάκων ή γονιδίων στα συγκεκριμένα σημεία νεοπλασίας. Επομένως, υπάρχει επιτακτική ανάγκη ανάπτυξης νέων στρατηγικών που αφορούν τη στόχευση όγκων και καρκινικών κυττάρων.

Η σηματοδότηση Notch αποτελεί ένα εξελικτικά συντηρημένο μοριακό μονοπάτι που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη βιολογία των βλαστικών κυττάρων, στην καρκινογένεση, στην αγγειογένεση, στην κυτταρική διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό και απόπτωση. Διάφορες μελέτες καταδεικνύουν ότι τα ίδια μοριακά μονοπάτια που ρυθμίζουν την αυτο-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων, χρησιμοποιούνται επίσης και στην εξέλιξη του καρκίνου. Η σηματοδοτική οδός Notch έχει συσχετιστεί με πολλές μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, του προστάτη, του μαστού κ.α. Επομένως η οδός Notch αποτελεί τα τελευταία χρόνια αντικείμενο μελέτης για πολλές φαρμακευτικές εταιρείες που δραστηριοποιούνται στην ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών κατά του καρκίνου, όπως για παράδειγμα η συνθετική πρωτεΐνη TR4, προϊόν της εταιρείας Trojantec Ltd.

Ο στόχος της εργασίας είναι η δυναμική παρακολούθηση της εξέλιξης των καρκινικών όγκων, μετά τη θεραπευτική χορήγηση της συνθετικής πρωτεΐνης TR4, σε ορθοτοπικά μοντέλα ξενο-μεταμοσχευμένων ζωντανών οργανισμών. Η αξιολόγηση των καρκινικών όγκων θα πραγματοποιείται μέσω συστημάτων *in vivo* απεικόνισης τα οποία έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο BIOLISYS. Με τη χρήση του συστήματος *in vivo* flow cytometry θα παρακολουθείται η εισχώρηση και η κυκλοφορία του TR4 στα αγγεία του αίματος ενώ με τη χρήση του συστήματος whole body reflectance imaging θα αξιολογείται η συγκέντρωση του TR4 στις νεοπλασίες και η αναστολή της ανάπτυξης και επέκτασης των καρκινικών όγκων. Η μελέτη θα περιλαμβάνει μετρήσεις σχετικά με την επιλεκτικότητα της μεθόδου και δοκιμή διαφόρων θεραπευτικών δόσεων ώστε να προκαλείται ικανοποιητική εξάλειψη/απόπτωση των καρκινικών όγκων με ελάχιστες δυνατές βλάβες στους παρακείμενους υγιείς ιστούς.

Η εργασία θα αποτελεί μέρος ερευνητικού προγράμματος που πραγματοποιείται στα πλαίσια συνεργασίας του εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Βιοσυτημάτων (BIOLISYS) με την εταιρεία Trojantec Ltd, και χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση μέσω του προγράμματος Eureka Eurostars (E!8520 – TROJANDRUG).

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Ο καρκίνος είναι η πιο κοινή και θανατηφόρα ασθένεια στις μέρες μας. Εκατομμύρια άνθρωποι σε ολόκληρο τον κόσμο έχουν διαγνωστεί με καρκίνο και πολλοί άλλοι έχουν πεθάνει εξαιτίας αυτού. Έτσι, πολλοί επιστήμονες επικεντρώθηκαν σε μελέτες που αφορούν τη θεραπεία και την πρόληψη της ασθένειας αυτής.

Η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη μεταλλαγμένων κυττάρων στο σώμα, καλείται καρκίνος. Τα κύτταρα αυτά, ονομάζονται καρκινικά και παρουσιάζουν συγκεκριμένες βιολογικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων της ικανότητας να διατηρούν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους, να αποφεύγουν τους καταστολείς ανάπτυξης και τον κυτταρικό θάνατο, και να επάγουν την αγγειογένεση ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς της μετάστασης (Hanahan & Weinberg 2011).

Εκτός από τις μεταλλάξεις, κάποιοι ιοί έχουν την ικανότητα να προάγουν τον καρκίνο στον άνθρωπο καθώς επίσης αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στη δημιουργία καρκίνου, όπως οι ακτίνες X, το υπεριώδες φως, τα προϊόντα καπνού, οι ρύποι, και πολλές άλλες χημικές ουσίες (Hejmadi 2010).

Υπάρχουν περισσότερα από 100 είδη καρκίνου και ονομάζονται ανάλογα με τα όργανα ή τους ιστούς όπου σχηματίζεται ο καρκίνος (Hejmadi 2010). Οι καρκίνοι μπορούν επίσης να περιγράφουν από τον τύπο του κυττάρου που τους σχηματίζει (Tortora J. Gerard 2009).

Τα καρκινικά κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα σχηματίζουν όγκους και η ανάπτυξη τους πραγματοποιείται μέσω μιας σειράς σταδίων. Αρχικά υφίσταται το στάδιο της υπερπλασίας, στο οποίο προκύπτουν πολλά κύτταρα λόγω της ανεξέλεγκτης κυτταρικής διαίρεσης. Το δεύτερο στάδιο αφορά την περαιτέρω ανάπτυξη και τις ανώμαλες αλλαγές των κυττάρων. Το τελευταίο στάδιο αφορά τα κύτταρα του όγκου τα οποία κάνουν μετάσταση (Cascades 1980). Η διαδικασία της μετάστασης περιλαμβάνει τα εξής στάδια: την τοπική εισβολή των καρκινικών κυττάρων, την ενδαγγείωση όπου τα καρκινικά κύτταρα εισβάλλουν και κινούνται μέσα από τα τοιχώματα των κοντινών λεμφαδένων και αιμοφόρων αγγείων σε άλλα μέρη του σώματος, τη σύλληψη και την εξαγγείωση όπου τα καρκινικά κύτταρα σταματούν να κινούνται όταν βρίσκονται σε τριχοειδή αγγεία σε μακρινές τοποθεσίες και εισβάλλουν στα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων και μεταναστεύουν στους γύρω ιστούς,

τον πολλαπλασιασμό όπου τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε μακρινές τοποθεσίες για να σχηματίσουν μικρούς όγκους και τέλος την αγγειογένεση όπου οι μικροί όγκοι διεγείρουν την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων για να λαμβάνεται η παροχή αίματος (Hejmadi 2010; OmKarova & Wodarz 2010). Κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης, τα καρκινικά κύτταρα φτιάχνουν αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι επάγουν το σχηματισμό νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων. Η παροχή αίματος βοηθά τους όγκους να αναπτύσσονται περισσότερο από μισό του χιλιοστού και επίσης να εξαπλώνονται και να κάνουν μεταστάσεις σε νέους ιστούς (Cascades 1980).

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται μέσα σε όγκο και έχουν τη δυνατότητα αυτο-ανανέωσης και παραγωγής ετερογενών γενεών καρκινικών κυττάρων που αποτελούν τον όγκο (Yoon 2012). Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα έχουν μια κύρια διαφορά με τα βλαστικά κύτταρα. Τα βλαστικά κύτταρα δημιουργούν φυσιολογικούς ιστούς με μια ρυθμιζόμενη διεργασία ενώ τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα δημιουργούν όγκους. Έρευνες απέδειξαν ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα ή τα προγονικά τους κύτταρα είναι οι περιοχές για τις αρχικές μεταλλάξεις (Spillane & Henderson 2007). Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών βλαστικών κυττάρων είναι : η μετανάστευση και η επιρροή τους στη μετάσταση, η απόπτωση, αφού έχουν φυσική αντοχή εναντίον της, όπως και τα βλαστικά κύτταρα και η αντοχή στη χημειοθεραπεία, αφού μπορούν να αποφεύγουν τα χημικά τα οποία είναι σχεδιασμένα για την καταστροφή τους και να παράγουν ένζυμα για την προστασία τους (Atena et al. 2014). Επίσης τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι ογκογενή, αφού έχουν τη δυνατότητα έναρξης του όγκου και συμβάλλουν στην ανάπτυξη του (Τζωρτζιάτου-Σταθοπούλου 2010).

Τα βλαστικά κύτταρα των ιστών χρησιμοποιούν πολλαπλά κυτταρικά μονοπάτια για να ελέγχεται η φυσιολογική αυτο-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων. Η απορρύθμιση αυτών των μονοπατιών μπορεί να οδηγήσει σε νεοπλαστικό πολλαπλασιασμό με την ανάπτυξη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Πολλά κυτταρικά μονοπάτια εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή, συμπεριλαμβανομένων του Notch, του Wnt και του Hedgehog (Spillane & Henderson 2007).

Στην παρούσα διατριβή, μελετήσαμε τον καρκίνο του μαστού, ο οποίος είναι ένας από τους πιο συχνούς καρκίνους που διαγιγνώσκονται στις γυναίκες παγκοσμίως και περιλαμβάνει το 16% όλων των περιπτώσεων καρκίνου σε γυναίκες (Sarkar & Mandal 1990). Προκύπτει από την ακανόνιστη ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που προέρχονται από τον

ιστό του μαστού. Ο μαστός αποτελείται από δύο βασικούς τύπους ιστών, τους αδενικούς και στρωματικούς ιστούς (Cancer 2015). Εντός του μαστού μπορούν να αναπτυχθούν διάφοροι τύποι όγκων. Οι περισσότεροι ξεκινούν από τα κύτταρα που παρατάσσονται στους αγωγούς και στα λόβια, ενώ υπάρχει ένας μικρός αριθμός που αρχίζει από άλλους ιστούς (Sharma et al. 2010). Ο καρκίνος του μαστού εξελίσσεται μέσω καθορισμένων παθολογικά και κλινικά σταδίων, ξεκινώντας με υπερπολλαπλασιασμό του πόρου, με επακόλουθη εξέλιξη επί τόπου αλλά και διεισδυτικών καρκινωμάτων, και τελικά καταλήγει σε μεταστατική νόσο. Η έναρξη του καρκίνου του μαστού οφείλεται σε γεγονότα μετασχηματισμού τα οποία συμβαίνουν σ' ένα κύτταρο μετατρέποντας το σε μεταλλαγμένο, ενώ η μεταγενέστερη εξέλιξη του όγκου οδηγείται από τη συσσώρευση επιπλέον γενετικών αλλαγών οι οποίες οδηγούν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των μεταλλαγμένων κυττάρων (Polyak 2007).

Κλινικά, η επιλογή των θεραπειών του καρκίνου του μαστού εξαρτώνται από την ηλικία του ασθενούς, την υγεία, το στάδιο, τη νόσο και την προηγούμενη αγωγή (Kalra & Edwards 2012). Οι τρέχουσες επιλογές για τη θεραπεία του καρκίνου περιλαμβάνουν ένα συνδυασμό της χειρουργικής επέμβασης, της ακτινοθεραπείας και της χημειοθεραπείας (Thakor & Gambhir 2013). Παρότι δεν έχει βελτιωθεί η θνησιμότητα ή η παράταση του χρόνου επιβίωσης όσο θα αναμενόταν, έχουν εντοπιστεί τα χαρακτηριστικά και τα μονοπάτια των διαφόρων οντοτήτων του όγκου (Wu et al. 2006). Αυτές οι γνώσεις χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη πιο αποδοτικής τοπικής χορήγησης φαρμάκων ή στοχευμένων θεραπειών για να ξεπεραστούν τα εμπόδια που παρουσιάζονται με τη χρήση των συμβατικών θεραπειών.

Οι νέες θεραπείες σχεδιάζονται έτσι ώστε να παραδίδουν τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα στον όγκο σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλλά και με ελάχιστη βλάβη στους κανονικούς ιστούς (Thakor & Gambhir 2013). Αυτές οι νέες μορφές θεραπείας έχουν ως στόχο να αναστέλλουν συγκεκριμένους μοριακούς στόχους και συγκεκριμένα αλλοιωμένες ή απορυθμισμένες πρωτεΐνες, οι οποίες προσφέρουν τη δυνατότητα εξατομικευμένων θεραπειών (Malinowsky et al. 2011). Αποδίδουν φαρμακολογικούς παράγοντες οι οποίοι είναι όσο το δυνατόν πιο μονο-ειδικοί έτσι ώστε να αποφεύγονται οι ολέθριες παρενέργειες που συμβαίνουν με τις παραδοσιακές θεραπείες καθώς και η επίκτητη αντίσταση στο φάρμακο (Wu et al. 2006). Επίσης, έρχονται σε αντίθεση με την παραδοσιακή χημειοθεραπεία η οποία στηρίζεται στην εξάλειψη των ταχέως διαιρούμενων κυττάρων, ανεξάρτητα από το αν είναι ή όχι κακοήθεις (Xue et al. 1999).

Σκοπός εργασίας

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι ο εντοπισμός της συντηγμένης πρωτεΐνης TR4, δηλαδή η επαλήθευση της εισχώρησης της ουσίας στα καρκινικά κύτταρα (cell penetration assay) και η εξακρίβωση της ελάχιστης ικανοποιητικής συγκέντρωσης της φαρμακευτικής ουσίας με την οποία επιτυγχάνεται κυτταρικός θάνατος, τουλάχιστον στο 50% του αριθμού των καρκινικών κυττάρων (cell kill assay). Ο κύριος σκοπός της εργασίας, είναι η συνεχής *in vivo* παρακολούθηση της εξέλιξης των καρκινικών όγκων μετά τη θεραπευτική χορήγηση της συνθετικής πρωτεΐνης TR4, σε ορθοτοπικά μοντέλα ξено-μεταμοσχευμένων ζωντανών οργανισμών. Η αξιολόγηση των καρκινικών όγκων πραγματοποιείται μέσω συστημάτων *in vivo* απεικόνισης τα οποία έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο BIOLISYS. Με τη χρήση του συστήματος *in vivo* flow cytometry παρακολουθείται η εισχώρηση και η κυκλοφορία του TR4 στα αγγεία του αίματος ενώ με τη χρήση του συστήματος whole body reflectance imaging αξιολογείται η συγκέντρωση του TR4 στις νεοπλασίες και η αναστολή της ανάπτυξης και επέκτασης των καρκινικών όγκων. Περιλαμβάνει μετρήσεις σχετικά με την επιλεκτικότητα της μεθόδου και δοκιμή διαφόρων θεραπευτικών δόσεων ώστε να προκαλείται ικανοποιητική εξάλειψη/απόπτωση των καρκινικών όγκων με ελάχιστες δυνατές βλάβες στους παρακείμενους υγιείς ιστούς.

Οργάνωση κειμένου

Η δομή του κειμένου χωρίζεται στα εξής κεφάλαια: το πρώτο εισαγωγικό κεφάλαιο αναφέρεται στα κύτταρα και τις λειτουργίες του, στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα και τα χαρακτηριστικά τους, στον καρκίνο και αναλυτικά στον καρκίνο του μαστού. Το δεύτερο εισαγωγικό κεφάλαιο, επικεντρώνεται στις στοχευμένες θεραπείες καθώς και στην εξεταζόμενη πειραματική θεραπεία του TR4, περιγράφοντας τη ανάπτυξη της επιπρόσθετα γίνεται αναφορά στα *in vivo* μοντέλα ζώων και συγκεκριμένα στα *in vivo* μοντέλα ζώων για τον καρκίνο του μαστού. Το επόμενο κεφάλαιο, αναφέρεται στη μεθοδολογία και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Περιγράφεται η διαδικασία καλλιέργειας των καρκινικών κυττάρων, τα *in vitro* πειράματα: εισχώρησης του TR4 στα καρκινικά κύτταρα και ελέγχου του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από το TR4 καθώς και τα *in vivo* πειράματα: βιοκατανομής του TR4, ενέσιμης χορήγησης καρκινικών κυττάρων στα ποντίκια και ενέσιμης χορήγησης της φαρμακευτικής ουσίας στα ποντίκια με όγκο. Επίσης, γίνεται περιγραφή των καινοτόμων συστημάτων απεικόνισης που χρησιμοποιήθηκαν. Στο τέταρτο κεφάλαιο, γίνεται αναφορά στα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τα *in vitro* και *in vivo*

πειράματα παρουσιάζοντας και σχετικά σχήματα και πίνακες. Τέλος, στο τελευταίο κεφάλαιο γίνεται συζήτηση αναφέροντας τα συμπεράσματα τα οποία εξήχθησαν από τα πειράματα καθώς και τη μελλοντική ανάπτυξη γύρω από τον τομέα των στοχευμένων θεραπειών κατά του καρκίνου του μαστού.

1 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Οι έμβιοι οργανισμοί απαρτίζονται από τα κύτταρα, τις δομικές μονάδες της ζωής. Ο άνθρωπος αποτελείται από περίπου 100 τρισεκατομμύρια κύτταρα τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε περίπου 200 διαφορετικούς τύπους και εκτελούν ένα πλήθος λειτουργιών και διαδικασιών για την ανάπτυξη του και για τη διατήρηση της ομοιόστασης του σώματος. Ξεκινώντας από τα ανατομικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, περιβάλλονται από τη μεμβράνη και αποτελούνται από το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Αυτά αποτελούν τα τρία κύρια μέρη ενός κυττάρου (Tortora J. Gerard 2009).

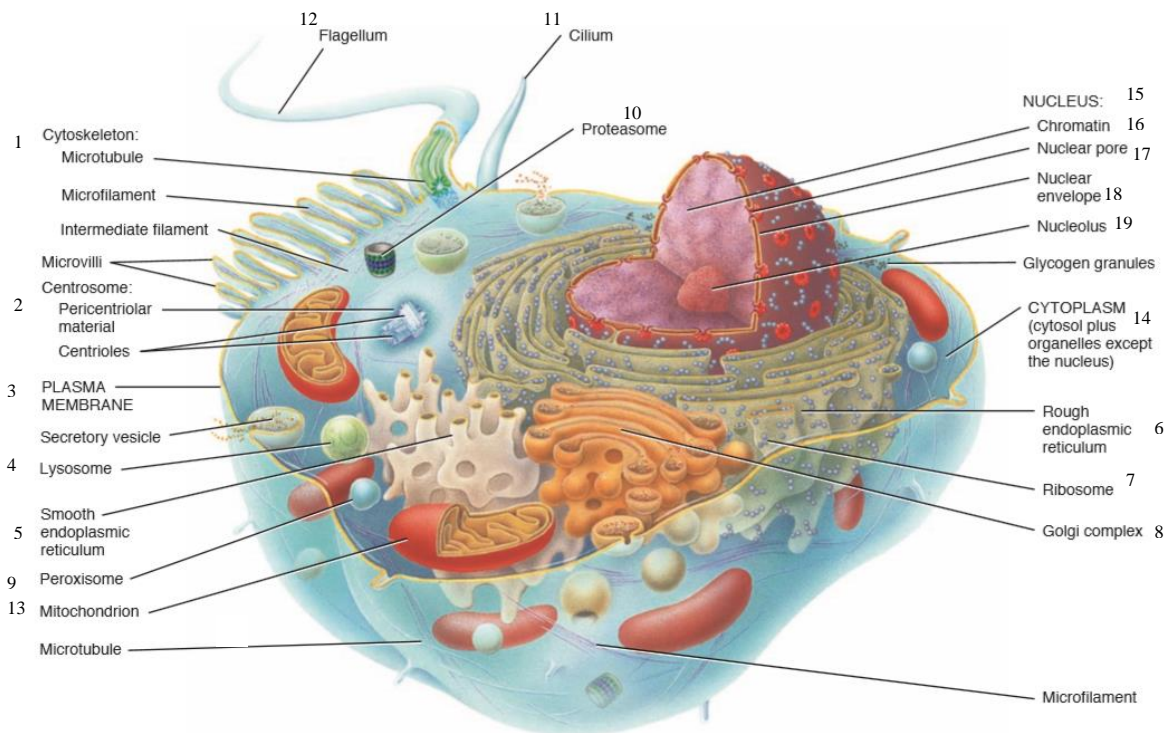
1.1.1 Η κυτταρική μεμβράνη

Η κυτταρική μεμβράνη διαχωρίζει το εσωτερικό περιβάλλον από το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου (Σχήμα 1). Μπορεί να περιγραφεί ως μοντέλο ρευστού μωσαϊκού, λόγω της μοριακής της διάταξης αφού αποτελείται από ρευστά λιπίδια και πρωτεΐνες. Η βασική δομή της χαρακτηρίζεται από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα, δύο στρώματα με φωσφορολιπίδια, χοληστερόλη και γλυκολιπίδια, λόγω της υδρόφιλης κεφαλής των φωσφορολιπιδίων και των δύο υδρόφοβων μακρυνών ουρών λιπαρών οξέων. Τα διάφορα είδη των πρωτεϊνών είναι είτε ενσωματωμένες είτε περιφερειακές. Η κυτταρική μεμβράνη είναι ευέλικτη και έχει ρυθμιστικό ρόλο αφού ελέγχει την ροή υλικών από και προς το κύτταρο, επιλεκτικά. Η μεταφορά κατά μήκος της, γίνεται με τις παθητικές και τις ενεργές διαδικασίες. Η διαφορά τους βασίζεται στο γεγονός αν για την ολοκλήρωση της διαδικασίας απαιτείται κυτταρική ενέργεια. Στις παθητικές διαδικασίες συμπεριλαμβάνονται η απλή διάχυση, όπου ελεύθερες ουσίες κινούνται μέσω της διπλοστοιβάδας, η διευκολυνόμενη διάχυση, όπου οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη γίνονται το μέσο για να περάσουν συγκεκριμένες ουσίες και η όσμωση, όπου δεν κινούνται οι διαλυμένες ουσίες μέσω της μεμβράνης αλλά μόρια νερού. Στις ενεργές διαδικασίες συμπεριλαμβάνονται η αρχική ενεργή μεταφορά όπου η πρωτεΐνη - αντλία αλλάζει σχήμα με την υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine triphosphate, ATP) και αντλεί μια ουσία μια ουσία κατά μήκος της μεμβράνης, η δεύτερη ενεργή μεταφορά όπου η πρωτεΐνη -αντλία δεσμεύει ιόντα νατρίου και μια άλλη ουσία αλλάζοντας ανάλογα το σχήμα της για να περάσουν ταυτόχρονα, η ενδοκυττάρωση η οποία επιτυγχάνεται με μεσολάβηση υποδοχέα, με φαγοκυττάρωση και σε φάση διαλύτη, όπου με

την ενέργεια από την ATP ουσίες μπαίνουν ή βγαίνουν από το κύτταρο σε κυστίδια της μεμβράνης, η εξωκυττάρωση όπου οι ουσίες ελευθερώνονται από το κύτταρο σε εκκριτικά κυστίδια και η διακυττάρωση όπου ουσίες κινούνται κατά μήκος του κυττάρου λόγω της ενδοκυττάρωσης στη μια πλευρά και της εξωκυττάρωσης στην άλλη πλευρά του κυττάρου (Tortora J. Gerard 2009).

1.1.2 Το κυτταρόπλασμα

Μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος υπάρχει το κυτταρόπλασμα το οποίο αποτελείται από δυο συστατικά: το κυτοσόλιο και τα οργανίδια. Το κυτοσόλιο είναι το ρευστό μέρος του κυτταροπλάσματος και εκεί λαμβάνουν χώρα χημικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ύπαρξη του κυττάρου. Τα οργανίδια (Σχήμα 1) είναι ειδικές δομές, οι οποίες έχουν συγκεκριμένα σχήματα και ζωτικές λειτουργίες για το κύτταρο και ποικίλλουν σε αριθμό και τύπο ανάλογα με την λειτουργία του κυττάρου (Tortora J. Gerard 2009).



Σχήμα 1: Οι τυπικές δομές που βρέθηκαν στα κύτταρα του σώματος, (Tortora J. Gerard 2009), 1. ο κυτταροσκελετός και τα τρία είδη νημάτων πρωτεΐνης, 2. το κεντρόσωμα, 3. η πλασματική μεμβράνη, 4. το λυσόσωμα, 5. το ομαλό ενδοπλασματικό δίκτυο, 6. το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, 7. το ριβόσωμα, 8. το σύμπλεγμα Golgi, 9. το υπεροξειδίσωμα, 10. το πρωτεόσωμα, 11. η βλεφαρίδα, 12. το μαστίγιο, 13. το μιτοχόνδριο, 14. το κυτταρόπλασμα, 15. ο πυρήνας, 16. η χρωματίνη, 17. ο πυρηνικός πόρος, 18. ο πυρηνικός φάκελος, 19. ο πυρηνίσκος.

Ο κυτταροσκελετός είναι ένα δίκτυο που αποτελείται από τρία είδη νημάτων πρωτεΐνης, εκτείνεται σε όλο το κυτταρόπλασμα και συμβάλλει στη δομή άλλων οργανιδίων (Tortora J. Gerard 2009). Το κεντρόσωμα αποτελείται από ένα ζευγάρι κεντριόλια και περικεντριολικό υλικό. Το περικεντριολικό υλικό περιέχει τουμπουλίνες, οι οποίες χτίζουν μικροσωληνίσκους σε μη διαιρούμενα κύτταρα, χτίζοντας την μιτωτική άτρακτο κατά την κυτταρική διαίρεση. Οι βλεφαρίδες και τα μαστίγια αποτελούνται από μικροσωληνίσκους. Έχουν την ίδια λειτουργία με την διαφορά ότι οι βλεφαρίδες κινούν υγρά κατα μήκος της επιφάνειας του κυττάρου ενώ τα μαστίγια μπορούν να κινήσουν ένα ολόκληρο κύτταρο (Scanlon C. Valerie 2007). Τα ριβοσώματα είναι η περιοχή όπου εκτελείται η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα ριβοσώματα που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του πυρήνα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο συνθέτουν πρωτεΐνες για να μούν στην πλασματική μεμβράνη ή για να εκκριθούν από το κύτταρο. Τα ελεύθερα ριβοσώματα συνθέτουν πρωτεΐνες για να χρησιμοποιούνται στο κυτοσόλιο. Το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελείται από διπλωμένα σακίδια ή σωληνίσκους. Είναι συνδεδεμένο με τον πυρηνικό φάκελο και εκτείνεται σ' όλο το κυτταρόπλασμα. Αποτελείται από δυο είδη τα οποία διαφέρουν στη δομή και στη λειτουργία. Το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο συνθέτει γλυκοπρωτεΐνες και φωσφορολιπίδια ενώ το ομαλό ενδοπλασματικό δίκτυο συνθέτει λιπαρά οξέα και στεροειδή, απενεργοποιεί ή αποτοξινώνει φάρμακα και άλλες επικίνδυνες ουσίες και αποθηκεύει και ελευθερώνει ιόντα ασβεστίου που προκαλούν συστολή των μυϊκών κυττάρων. Το σύμπλεγμα Golgi τροποποιεί, ταξινομεί, αποθηκεύει και μεταφέρει πρωτεΐνες που τις παίρνει από το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο. Επίσης σχηματίζει εκκριτικά τα οποία αποβάλλουν μεταποιημένες πρωτεΐνες μέσω εξοκυττάρωσης, μεμβρανικά κυστίδια τα οποία φέρνουν νέα μόρια στην πλασματική μεμβράνη και κυστίδια μεταφοράς τα οποία κουβαλούν μόρια σ' άλλα οργανίδια. Τα λυσοσώματα είναι κυστίδια μεμβράνης τα οποία σχηματίζονται από το σύμπλεγμα Golgi και έχουν σημαντικές λειτουργίες. Χωνεύουν ουσίες που μπαίνουν στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης και μεταφέρουν τα τελικά προϊόντα της χώνευσης στο κυτοσόλιο, εκτελούν αυτοφαγία την πέψη των φθαρμένων οργανιδίων, αυτόλυση την πέψη ολόκληρων των κυττάρων και εξοκυττάρια πέψη (Reece B. Jane, Urry A. Lisa, Cain L. Michael, Wasserman A. Steven, Minorsky V. Peter 2011). Τα υπεροξεισώματα έχουν παρόμοια δομή με τα λυσοσώματα αλλά είναι πιο μικρά. Περιέχουν πολλές οξειδάσες και ένζυμα που οξειδώνουν διάφορες οργανικές ουσίες. Τα πρωτεασώματα είναι μικρές δομές σε σχήμα βαρελιών και έχουν εκατομμύρια πρωτεάσες που διασπούν τις πρωτεΐνες σε μικρότερα πεπτίδια. Καταστρέφουν συνεχώς αχρείαστες, τραυματισμένες ή λανθασμένες

πρωτεΐνες. Τα μιτοχόνδρια είναι τα ‘εργοστάσια παραγωγής ενέργειας’ του κυττάρου, αφού παράγουν το περισσότερο ATP μέσω της αερόβιας αναπνοής (Tortora J. Gerard 2009).

1.1.3 Ο πυρήνας

Ο πυρήνας είναι ένα μεγάλο οργανίδιο, με σφαιρική ή σε σχήμα οβάλ δομή και λόγω της ειδικής σημασίας του για την κατεύθυνση της ζωής του κυττάρου, συζητείται ξεχωριστά (Σχήμα 1). Το κυτταρόπλασμα και ο πυρήνας χωρίζονται από τον πυρηνικό φάκελο, μια διπλή μεμβράνη. Πολλά ανοίγματα ονομάζονται πυρηνικοί πόροι και εκτείνονται μέσα στον πυρηνικό φάκελο, ελέγχοντας την κίνηση ουσιών μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Μέσα στον πυρήνα βρίσκονται οι πυρηνίσκοι, μικρά σφαιρικά σώματα τα οποία λειτουργούν στην παραγωγή ριβοσωμάτων, και τα γονίδια, οι κληρονομικές μονάδες του κύτταρου, τα οποία ελέγχουν την κυτταρική δομή και τις άμεσες κυτταρικές δραστηριότητες. Τα γονίδια είναι τοποθετημένα κατά μήκος των χρωματοσωμάτων. Κάθε χρωματόσωμα είναι ένα μακρύ μόριο δεσοξυριβοζονουκλεϊνικού οξέος (Deoxyribonucleic acid, DNA) το οποίο περιελίσσεται μαζί με αρκετές πρωτεΐνες. Το σύμπλεγμα DNA, πρωτεϊνών και κάποιων ριβονουκλεϊκών οξέων (Ribonucleic acid, RNA) ονομάζεται χρωματίνη. Η χρωματίνη έχει δομή που μοιάζει με χάντρες σ’ ένα σχοινί. Κάθε χάντρα έχει ένα νουκλεόσωμα και περιέχει δίκλωνο DNA τυλιγμένο διπλά γύρω από ένα πυρήνα οκτώ πρωτεϊνών που ονομάζονται ιστόνες. Το σχοινί μεταξύ των χαντρών είναι συνδέτης DNA ο οποίος κρατά τα γειτονικά νουκλεοσώματα μαζί. Στα κύτταρα που δεν διαιρούνται, μια άλλη ιστόνη προάγει τον περιελυγμό των νουκλεοσωμάτων σ’ ένα μεγαλύτερης διαμέτρου νήμα χρωματίνης το οποίο μετά αναδιπλώνεται σε μεγαλύτερους βρόγχους. Μόλις πριν την κυτταρική διαίρεση όμως, το DNA διπλασιάζεται και οι βρόγχοι συμπυκνώνονται περισσότερο σχηματίζοντας ένα ζευγάρι χρωματίδων. Η συνολική γενετική πληροφορία που υπάρχει σε ένα κύτταρο ή οργανισμό ονομάζεται το γονιδίωμα του (Tortora J. Gerard 2009; Scanlon C. Valerie 2007).

1.2 ΟΙ ΒΑΣΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

1.2.1 Πρωτεϊνοσύνθεση

Η πρωτεϊνοσύνθεση αποτελεί ένα κυτταρικό μηχανισμό αφιερωμένο στη σύνθεση μεγάλων αριθμών ποικίλων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες καθορίζουν τα φυσικά και τα χημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων και βοηθούν στη συναρμολόγηση των κυτταρικών δομών. Άλλες εξυπηρετούν ως ορμόνες, αντισώματα και στοιχεία συστολής στο μυϊκό ιστό. Ακόμα άλλες δρουν ως ένζυμα τα οποία ρυθμίζουν τα ποσοστά των πολυάριθμων χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στα κύτταρα ή ως μεταφορείς κουβαλώντας διάφορα υλικά στο αίμα. Η έκφραση γονιδίου είναι η διαδικασία κατά την οποία το DNA ενός γονιδίου χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη σύνθεση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Στην πρώτη διαδικασία η οποία ονομάζεται μεταγραφή, η πληροφορία που είναι κωδικοποιημένη σ' ένα συγκεκριμένο μέρος του DNA μεταγράφεται για να παράξει ένα συγκεκριμένο μόριο RNA. Στη δεύτερη διαδικασία η οποία ονομάζεται μετάφραση, το RNA συνδέεται στο ριβόσωμα όπου η πληροφορία που περιέχεται στο RNA μεταφράστηκε σε μια αντίστοιχη αλληλουχία αμινοξέων για να σχηματιστεί το νέο μόριο πρωτεΐνης (Tortora J. Gerard 2009).

1.2.2 Κυτταρική διαίρεση

Η κυτταρική διαίρεση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα αναπαράγονται και υπάρχουν δύο τύποι, η σωματική και η αναπαραγωγική κυτταρική διαίρεση. Στη σωματική κυτταρική διαίρεση, το κύτταρο υποβάλλεται σε πυρηνική διαίρεση που ονομάζεται μίτωση, για να αντικατασταθούν τα νεκρά ή τραυματισμένα κύτταρα και να προστεθούν νέα κατά την ανάπτυξη των ιστών και σε κυτταροπλασματική διαίρεση που ονομάζεται κυτταροκίνηση, έτσι ώστε να παραχθούν δυο πανομοιότυπα κύτταρα το καθένα με τον ίδιο αριθμό και είδος χρωματοσωμάτων με το αρχικό. Στην αναπαραγωγική κυτταρική διαίρεση παράγονται οι γαμέτες, τα κύτταρα που χρειάζονται για να σχηματίσουν την επόμενη γενιά σεξουαλικά αναπαραγωγικών οργανισμών. Είναι μια διαδικασία διαίρεσης δύο σταδίων που ονομάζεται μείωση και ο αριθμός των χρωματοσωμάτων στον πυρήνα χωρίζεται στα δυο (Reece B. Jane, Urry A. Lisa, Cain L. Michael, Wasserman A. Steven, Minorsky V. Peter 2011).

1.2.3 Απόπτωση

Το κύτταρο έχει τρεις πιθανούς προορισμούς: να παραμείνει ζωντανό και να λειτουργεί χωρίς διαίρεση, να μεγαλώνει και να διαιρείται ή να πεθάνει. Τα κύτταρα υφίστανται απόπτωση η οποία είναι ένας ομαλός γενετικά προγραμματισμένος θάνατος. Η απόπτωση απομακρύνει αχρείαστα κύτταρα κατά την εμβρυική ανάπτυξη και μετά τη γέννηση συνεχίζει και για να ρυθμίζει τον αριθμό των κυττάρων στον ιστό και να εξαλείφει τα πιθανά επικίνδυνα κύτταρα όπως τα καρκινικά. Είναι ένας φυσιολογικός τύπος κυτταρικού θανάτου σε αντίθεση με την νέκρωση, ο οποίος είναι ένας παθολογικός τύπος κυτταρικού θανάτου και προκαλείται από τραυματισμό ιστού (Tortora J. Gerard 2009).

1.2.4 Γήρανση

Η γήρανση είναι μια φυσιολογική διαδικασία όπου παρατηρούνται αλλαγές των ομοιοστατικών προσαρμοστικών ανταποκρίσεων του σώματος. Παράγει αλλαγές στη δομή και στη λειτουργία και αυξάνει την ευπάθεια για περιβαλλοντικό στρες και ασθένεια. (Tortora J. Gerard 2009).

1.3 ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν αρκετά από τα φυσιολογικά κύτταρα (Σχήμα 2). Είναι κύτταρα με ανωμαλίες, τα οποία πλέον δεν συμπεριφέρονται ως φυσιολογικά, αλλά εκτελούν τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης και μεγαλώνουν χωρίς έλεγχο. Ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα ωριμάζουν σε διακριτούς τύπους με συγκεκριμένες λειτουργίες, τα καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν ασταμάτητα να διαιρούνται και να εξελίσσονται σε ιστούς (Anon 2014). Τα φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται μόνο και όταν χρειάζονται, ενώ τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ξεκινήσουν να διαιρούνται από μόνα τους, παράγοντας αντίγραφα του εαυτού τους. Τα υγιή κύτταρα όταν λάβουν σήματα από τα γειτονικά τους κύτταρα ότι είναι πλήρης η περιοχή ή όταν χαλάσει ο κυτταρικός τους μηχανισμός, σταματούν να διαιρούνται. Σε αντίθεση, με τα καρκινικά τα οποία σ' αυτές τις συνθήκες συνεχίζουν να διαιρούνται παράγοντας αντίγραφα τους με καταστραμμένο DNA. Τα κύτταρα είναι προγραμματισμένα να σταματούν να λειτουργούν ή να 'αυτοκτονούν' είτε όταν ο μηχανισμός τους έχει επισκευαστεί αλλά εξακολουθεί να παρουσιάζει βλάβες, είτε όταν έχει μολυνθεί από έναν ιό, ή όταν υπάρχουν πάρα πολλά κύτταρα. Αυτός ο προγραμματισμένος θάνατος ονομάζεται απόπτωση. Τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να αγνοήσουν την απόπτωση και να αυξάνουν τον αριθμό τους. Επίσης τα καρκινικά κύτταρα

έχουν τη δυνατότητα να διαιρούνται απείρως παρά τα σήματα για το ότι η ανάπτυξη τους έχει φτάσει στο τέλος της, παράγοντας κύτταρα με μεταλλαγμένους κλώνους DNA. Έχουν την ικανότητα να προκαλούν την ανάπτυξη νέων αγγείων μέσα στον όγκο για να τους παρέχεται οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και να φεύγουν από την αρχική τους τοποθεσία μεταναστεύοντας σ' άλλα μέρη του σώματος, σε μια διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση και είναι υπεύθυνη για την πλειονότητα των θανάτων από καρκίνο (Moustafa 2014).



Σχήμα 2: Το καρκινικό κύτταρο, (http://www.medicinenet.com/cancer_101_pictures_slideshow/article.htm).

1.4 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος μπορεί να οριστεί ως μια ασθένεια στην οποία ομάδες ανώμαλων κυττάρων, καρκινικών κυττάρων αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Ο συνεχής πολλαπλασιασμός τους οδηγεί στην ανάπτυξη μαζών με κύτταρα και στην εξάπλωση τους, επηρεάζοντας τους γύρω ιστούς. Οι μεταλλάξεις προκύπτουν ένα σε κάθε είκοσι εκατομμύρια ανά γονίδιο ανά κυτταρική διαίρεση (Hejmadi 2010).

Η ανάπτυξη του καρκίνου είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων. Οι τρεις κύριες φάσεις είναι: η έναρξη, η προαγωγή και η εξέλιξη. Η έναρξη, είναι το πρώτο βήμα στην καρκινογένεση και πρόκειται για μία ή περισσότερες σταθερές κυτταρικές αλλαγές που υφίστανται αυθόρμητα ή που προκαλούνται από έκθεση σε καρκινογόνες συνθήκες. Το κυτταρικό γονιδίωμα υφίσταται μεταλλάξεις, δημιουργώντας τη δυνατότητα για την νεοπλασματική ανάπτυξη, η οποία προδιαθέτει το προσβεβλημένο κύτταρο και τους απογόνους στον επόμενο νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Οι ανθρώπινες αλληλουχίες DNA οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον μετασχηματισμό αυτό, ονομάζονται ογκογονίδια. Τέτοιες

μεταλλάξεις ογκογονιδίου μπορεί να έχουν έντονη επίδραση στην κυτταρική συμπεριφορά και απόκριση, και μπορεί να οδηγήσει στην απορρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται σε βιοχημικές οδούς σηματοδότησης που σχετίζονται με τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, την επικοινωνία, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση. Το μετασχηματισμένο κύτταρο υφίσταται συνεχή διαίρεση με μετασχηματισμένο καρυότυπο και με περαιτέρω μεταλλάξεις, εκδηλώνεται μια κακοήθης βλάβη. Η προαγωγή, είναι η διαδικασία κατά την οποία οι επόμενες αλλαγές του μετασχηματισμένου κυττάρου απαιτούν επαναλαμβανόμενες και παρατεταμένες εκθέσεις για την προώθηση διεγέρσεων. Η νεοπλασματική ανάπτυξη επηρεάζεται από το ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο περιβάλλον. Η έκφραση της αρχικής μετάλλαξης δεν εξαρτάται μόνο σε αλληλεπιδράσεις με άλλες ογκογόνες μεταλλάξεις, αλλά και στους παράγοντες που μπορούν να αλλάξουν προσωρινά τα πρότυπα ειδικής γονιδιακής έκφρασης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση του δυναμικού κυτταρικής ανάπτυξης ή / και σε αποσύνδεση των διαδικασιών διακυτταρικής επικοινωνίας που περιορίζουν την κυτταρική αυτονομία και έτσι να συντονίζουν τη συντήρηση των ιστών και την ανάπτυξη. Η εξέλιξη, είναι η διαδικασία μέσω της οποίας οι διαδοχικές αλλαγές στο νεόπλασμα δημιουργούν όλο και πιο κακοήθεις υπο-πληθυσμούς. Οι μεταλλάξεις και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες φαίνεται ότι συμμετέχουν. Η διαδικασία επιταχύνεται με την επαναλαμβανόμενη έκθεση σε καρκινογόνες συνθήκες. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα πολλαπλασιάζονται προκαλώντας ταχεία αύξηση του μεγέθους του όγκου. Τα κύτταρα μπορούν να υποστούν περαιτέρω μεταλλάξεις καθώς ο όγκος μεγαλώνει σε μέγεθος, οδηγώντας σε αύξηση της ετερογένειας του κυτταρικού πληθυσμού (Devi 2004).

Οι σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων είναι το βασικό γεγονός στην μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Η θεωρία μετάλλαξη του γονιδίου της ογκογένεσης υποστηρίζει ότι καρκινογόνες ουσίες αλληλεπιδρούν με το DNA οδηγώντας σε μη αναστρέψιμες αλλαγές στο γονίδιο, που προδιαθέτουν το κύτταρο σε κακοήθη μετασχηματισμό. Πολλά διαφορετικά γονίδια έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στην καρκινογένεση. Οι δύο κατηγορίες ρυθμιστικών γονιδίων οι οποίες εμπλέκονται άμεσα στην καρκινογένεση είναι τα ογκογονίδια και τα αντι-ογκογονίδια. Τα ογκογονίδια είναι θετικοί ρυθμιστές της καρκινογένεσης και σε μη-μετασχηματισμένα κύτταρα είναι ανενεργά (πρωτο-ογκογονίδια). Τα αντι-ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι αρνητικοί ρυθμιστές ανάπτυξης. Αυτά τα γονίδια λειτουργούν ως αντι-ογκογονίδια ή γονίδια καταστολής όγκου και σε φυσιολογικά κύτταρα ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τον έλεγχο της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Όταν σ' αυτά τα γονίδια συμβούν μεταλλάξεις,

προκαλείται απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου, προωθώντας την καρκινογένεση (Devi 2004).

1.4.1 Τύποι καρκίνου

Υπάρχουν περισσότερα από 100 είδη καρκίνου και ονομάζονται ανάλογα με τα όργανα ή τους ιστούς όπου σχηματίζεται ο καρκίνος (Hejmadi 2010). Για παράδειγμα, ο καρκίνος του πνεύμονα αρχίζει στα κύτταρα του πνεύμονα και καρκίνου του εγκεφάλου ξεκινά στα κύτταρα του εγκεφάλου. Οι καρκίνοι μπορούν επίσης να περιγραφούν από τον τύπο του κυττάρου που τους σχηματίζει όπως επιθηλιακά κύτταρα ή πλακώδη κύτταρα. Κάποια παραδείγματα είναι το καρκίνωμα, το οποίο είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου. Σχηματίζεται από επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία καλύπτουν τις εσωτερικές και τις εξωτερικές επιφάνειες του σώματος. Υπάρχουν πολλοί τύποι επιθηλιακών κυττάρων. Το σάρκωμα, το οποίο είναι ο καρκίνος που σχηματίζεται στα οστά και τους μαλακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των μυών, του λίπους, των αιμοφόρων αγγείων, των λεμφικών αγγείων, και του ινώδους ιστού. Η λευχαιμία, η οποία είναι ο καρκίνος που σχηματίζεται στις λευχαιμίες, τους ιστούς που σχηματίζουν το αίμα στο μυελό των οστών. Το λέμφωμα, το οποίο είναι ο καρκίνος που ξεκινά στα λεμφοκύτταρα. Το πολλαπλό μυέλωμα το οποίο είναι καρκίνος που ξεκινά στα κύτταρα πλάσματος, έναν άλλο τύπο του ανοσοποιητικού κυττάρου. Το μελάνωμα το οποίο είναι καρκίνος που ξεκινά στα κύτταρα που γίνονται μελανοκύτταρα (Tortora J. Gerard 2009).

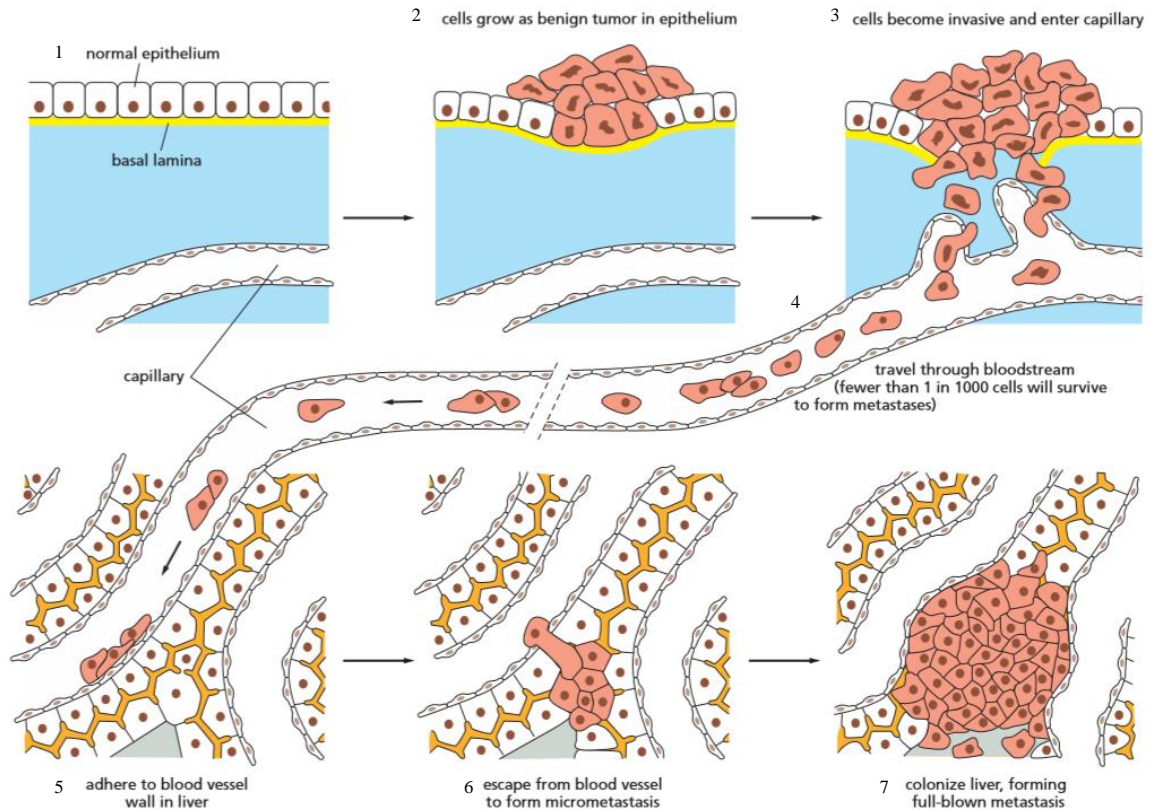
1.4.2 Στάδια ανάπτυξης του όγκου

Τα καρκινικά κύτταρα τα οποία είναι ανεξέλεγκτα σχηματίζουν τους όγκους. Η ανάπτυξη του όγκου μπορεί να παρουσιαστεί με μια σειρά από στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η υπερπλασία, όπου υπάρχουν πάρα πολλά κύτταρα που προκύπτουν από την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση. Μπορεί να φαίνονται φυσιολογικά, αλλά έχουν υποστεί μεταβολές με αποτέλεσμα την απώλεια του ελέγχου της ανάπτυξης. Το δεύτερο στάδιο είναι η δυσπλασία, προκύπτουν περισσότερα κύτταρα από την περαιτέρω ανάπτυξη, που συνοδεύεται από ανώμαλες αλλαγές στα κύτταρα. Στο τρίτο στάδιο παρατηρούνται πρόσθετες αλλαγές, οι οποίες οδηγούν τα κύτταρα να είναι ακόμα πιο ανώμαλα και να μπορούν να εξαπλωθεί σε μια ευρύτερη περιοχή του ιστού. Τα κύτταρα αυτά που αρχίζουν να χάνουν την αρχική τους λειτουργία ονομάζονται αναπλαστικά. Σε αυτό το στάδιο, επειδή ο όγκος είναι ακόμα στην αρχική του θέση και δεν είναι επεμβατικός, δεν θεωρείται κακοήθης. Το τελευταίο στάδιο λαμβάνει χώρα όταν τα κύτταρα του όγκου κάνουν μετάσταση, εισβάλλοντας στο

περιβάλλοντα ιστό, συμπεριλαμβανομένου στην κυκλοφορία του αίματος, και έτσι εξαπλώνονται σε άλλες τοποθεσίες. Οι μη επεμβατικοί όγκους λέγονται καλοήθεις (Cascades 1980).

1.4.3 Στάδια ανάπτυξης της μετάστασης

Η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων συνήθως περιλαμβάνει τα εξής στάδια: η τοπική εισβολή όπου τα καρκινικά κύτταρα εισβάλλουν σε κοντινούς φυσιολογικούς ιστούς, η ενδαγγείωση όπου τα καρκινικά κύτταρα εισβάλλουν και κινούνται μέσα από τα τοιχώματα των κοντινών λεμφαδένων και αιμοφόρων αγγείων, όπου καρκινικά κύτταρα κινούνται μέσω του λεμφικού συστήματος και της κυκλοφορίας του αίματος σε άλλα μέρη του σώματος, σύλληψη και εξαγγείωση όπου τα καρκινικά κύτταρα σταματούν να κινούνται όταν βρίσκονται σε τριχοειδή αγγεία σε μακρινές τοποθεσίες και εισβάλλουν στα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων και μεταναστεύουν στους γύρω ιστούς, ο πολλαπλασιασμός όπου τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε μακρινές τοποθεσίες για να σχηματίσουν μικρούς όγκους και τέλος η αγγειογένεση όπου οι μικροί όγκοι διεγείρουν την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων για να λαμβάνεται η παροχή αίματος, η οποία είναι απαραίτητη έτσι ώστε να λαμβάνονται οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά για να συνεχιστεί η ανάπτυξη του όγκου (Σχήμα 3) (Hejmadi 2010; OmKarova & Wodarz 2010).



Σχήμα 3: Τα στάδια της μετάστασης, (OmKarona & Wodarz 2010), 1. ο φυσιολογικός ιστός, 2. η ανάπτυξη των κυττάρων δημιουργώντας καλοήγη όγκο στον ιστό, 3. η εισβολή και η είσοδος των κυττάρων στο αγγείο, 4. το ταξίδι των κυττάρων μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, 5. η προσκόλληση των κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία, 6. η έξοδος των κυττάρων από τα αιμοφόρα αγγεία, 7. ο σχηματισμός μετάστασης.

1.4.4 Αγγειογένεση

Λόγω του ότι καθώς οι όγκοι μεγαλώνουν, τα κύτταρα στο κέντρο δεν λαμβάνουν πλέον θρεπτικές ουσίες από τα κανονικά αιμοφόρα αγγεία, σχηματίζονται νέα αιμοφόρα αγγεία για την παροχή των κυττάρων στο κέντρο με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο. Κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης, τα καρκινικά κύτταρα φτιάχνουν αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι επάγουν το σχηματισμό νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων. Τα κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων που χωρίζονται για να κάνουν νέα τριχοειδή αγγεία είναι ανενεργά στους φυσιολογικούς ιστούς, ωστόσο οι όγκοι κάνουν αγγειογόνους παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούν αυτά τα κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων και αρχίζουν να διαιρούνται. Η παροχή αίματος βοηθά τους όγκους να αναπτύσσονται περισσότερο από μισό του χιλιοστού και επίσης να εξαπλώνονται και να κάνουν μεταστάσεις σε νέους ιστούς. Τα κύτταρα του όγκου μπορούν να είναι αγγειογόνα ή μη αγγειογόνα. Και τα δύο είδη περνούν από μέσα από αιμοφόρα αγγεία και εξαπλώνονται, και τα μη-αγγειογόνα κύτταρα δημιουργούν αδρανής

όγκους όταν αναπτύσσονται σε άλλες τοποθεσίες. Τα αγγειογόνα κύτταρα γρήγορα εγκαθίστανται στις νέες θέσεις με την ανάπτυξη και την παραγωγή νέων αιμοφόρων αγγείων (Cascades 1980).

1.4.5 Αιτίες ανάπτυξης καρκίνου

Εκτός από τις μεταλλάξεις, κάποιοι ιοί έχουν την ικανότητα να προάγουν τον καρκίνο στον άνθρωπο, όπως οι DNA ιοί και οι ρετροϊοί, οι οποίοι είναι ένα είδος RNA ιού. Η παρουσία των ογκογονιδίων σ' αυτούς τους ιούς, τους δίνει την ικανότητα να προωθήσουν τον καρκίνο. Οι ιοί που σχετίζονται με τον καρκίνο είναι τα ανθρώπινα θηλώματα, η ηπατίτιδα Β, ο ιός Epstein-Barr, ο ιός ανθρώπινης Τ κυττάρων λευχαιμίας και ο ιός έρπη KSHV. Επίσης αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στη δημιουργία καρκίνου, όπως οι ακτίνες Χ, το υπεριώδες φως, τα προϊόντα καπνού, οι ρύποι, και πολλές άλλες χημικές ουσίες. Οι ακτίνες Χ και άλλες πηγές ακτινοβολίας, όπως το ραδόνιο, θεωρούνται καρκινογόνες επειδή έχουν την ικανότητα να είναι ισχυρά μεταλλαξιογόνα. Το υπεριώδες φως συνδέεται με τις περισσότερες μορφές καρκίνου του δέρματος και ο καπνός του τσιγάρου συνδέεται με τον καρκίνο του πνεύμονα, του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστης, και του παγκρέατος. Βιομηχανικές χημικές ουσίες όπως το βενζόλιο, το αρσενικό και άλλοι οργανικοί διαλύτες θεωρούνται καρκινογόνες (9). Αν και ο καρκίνος δεν βλέπει ηλικία, η εμφάνιση του αυξάνεται με την ηλικία, κατέχοντας τα δυο τρίτα των θανάτων σε άτομα μεγαλύτερα των 65 χρόνων. Κάποιες πιθανές εξηγήσεις του φαινομένου αυτού είναι οι αλλοιώσεις που σχετίζονται με την ηλικία στο ανοσοποιητικό σύστημα, ορμονικές μεταβολές ή έκθεση σε ορμόνες και άλλα (Hejmadi 2010).

1.5 ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

1.5.1 Ορισμός

Στο μυελό των οστών λαμβάνει χώρα η αιμοποίηση, η διαδικασία παραγωγής των κυττάρων του αίματος. Ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων του ερυθρού μυελού των οστών ονομάζονται πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και έχουν την ικανότητα να αναπτύξουν πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Αρχικά παράγονται δυο είδη βλαστικών κυττάρων, τα μυελοειδή και τα λεμφοειδή βλαστικά κύτταρα. Κάποια μυελοειδή βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε προγονικά κύτταρα. Άλλα μυελοειδή και λεμφοειδή βλαστικά κύτταρα αναπτύσσουν αμέσως πρόδρομα κύτταρα (Tortora J. Gerard 2009).

Τα βλαστικά κύτταρα έχουν δυο κύρια χαρακτηριστικά: υφίστανται διαίρεση για να αυτο-ανανεωθούν, παράγοντας ακριβές αντίγραφο με αναπτυξιακή δυνατότητα ίδια με αυτή που έχουν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα και παράγουν τα προγονικά κύτταρα, τα οποία χάνουν διαδοχικά την ικανότητα αυτο-ανανέωσης τους με κάθε επόμενη κυτταρική διαίρεση, καθώς διαφοροποιούνται για να δημιουργήσουν ώριμα κύτταρα πολλών τύπων κυττάρων. Στους περισσότερους ιστούς, τα βλαστικά κύτταρα είναι σπάνια (Spillane & Henderson 2007; Reya et al. 2001). Τα βλαστικά κύτταρα έχουν μια κύρια διαφορά με τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Τα βλαστικά κύτταρα δημιουργούν φυσιολογικούς ιστούς με μια ρυθμιζόμενη διεργασία ενώ τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα δημιουργούν όγκους. Έρευνες απέδειξαν ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα ή τα προγονικά τους κύτταρα είναι οι περιοχές για τις αρχικές μεταλλάξεις (Spillane & Henderson 2007).

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα σύμφωνα με την Αμερικάνικη ένωση του εργαστηρίου έρευνας του καρκίνου, είναι τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται μέσα σε όγκο και έχουν τη δυνατότητα αυτο-ανανέωσης και παραγωγής ετερογενών γενεών καρκινικών κυττάρων που αποτελούν τον όγκο. Αυτός ο ορισμός εξηγήθηκε με δυο μοντέλα: το 'στοχαστικό μοντέλο' 'το οποίο ισχυρίζεται ότι κάθε καρκινικό κύτταρο του όγκου τελικά έχει την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και πολλαπλής δραστηριότητας και το μοντέλο ιεράρχησης το οποίο ισχυρίζεται ότι κάθε καρκινικό κύτταρο σε όγκο είναι ετερογενής και κάποια μειοψηφία των κυττάρων αυτών είναι καρκινικά βλαστικά κύτταρα τα οποία προκαλούν όγκο (Yoon 2012).

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι πιο διαφοροποιημένα από τα βλαστικά κύτταρα. Η πρώτη φορά που οι επιστήμονες τα απομόνωσαν ήταν το 1994 και η ανακάλυψη τους έγινε με τη μελέτη των αιματολογικών κακοηθειών (Atena et al. 2014). Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα αρχικά εμπλέκονταν στην παθογένεση των αιματολογικών ανωμαλιών και στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν σε στερεούς όγκους, συγκεκριμένα σε καρκίνωμα του στήθους (Hanahan & Weinberg 2011).

1.5.2 Τα χαρακτηριστικά τους

Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών βλαστικών κυττάρων είναι τα εξής: η μετανάστευση και η επιρροή τους στη μετάσταση, αφού εκτός από την ανάπτυξη των όγκων ευθύνονται για την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των όγκων σε νέες περιοχές. Η απόπτωση, αφού έχουν φυσική αντοχή εναντίον της, όπως και τα βλαστικά κύτταρα. Η αντοχή στη χημειοθεραπεία, αφού μπορούν να αποφεύγουν τα χημικά τα οποία είναι σχεδιασμένα για την καταστροφή τους και να παράγουν ένζυμα για την προστασία τους (Atena et al. 2014).

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι ογκογενή, αφού έχουν τη δυνατότητα έναρξης του όγκου και συμβάλλουν στην ανάπτυξη του (Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου 2010).

1.5.3 Κυτταρικά μονοπάτια

Τα βλαστικά κύτταρα των ιστών χρησιμοποιούν πολλαπλά κυτταρικά μονοπάτια για να ελέγχεται η φυσιολογική αυτο-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων. Η απορρυθμίση αυτών των μονοπατιών μπορεί να οδηγήσει σε νεοπλαστικό πολλαπλασιασμό με την ανάπτυξη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Πολλά κυτταρικά μονοπάτια εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή, συμπεριλαμβανομένων το Notch, το Wnt, το Hedgehog. Το μονοπάτι Notch είναι σημαντικό στα αιμοποιητικά και μαστικά επιθηλιακά βλαστικά κύτταρα και εμπλέκεται στη λεμφοβλαστική λευχαιμία και στον καρκίνο του μαστού. Το κυτταρικό μονοπάτι Wnt εμπλέκεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στη λεμφοβλαστική λευχαιμία, στο μυελοβλάστωμα, στον καρκίνο του προστάτη και των ωθηκών και σε όγκους του μαστού, καθώς και στη διατήρηση της ακεραιότητας της εξειδίκευσης των βλαστικών κυττάρων. Τα μόρια στο μονοπάτι Wnt έχουν τόσο υπέρ-ογκογονιδιακό όσο και ογκοκατασταλτικό ρόλο (Spillane & Henderson 2007).

1.6 ΤΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ

1.6.1 Γενικά

Ο όγκος δεν είναι απλώς ένας σάκος ομοιογενών κακοηθών κυττάρων. Είναι ένα πολύπλοκο οικοσύστημα που περιέχει κύτταρα όγκου, καθώς και διάφορα είδη κυττάρων όπως ενδοθηλιακά, αιμοποιητικά, στρωματικά και άλλα που μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία του όγκου, δημιουργώντας μεταβολικές αλλαγές, όπως υποξικό περιβάλλον και θρεπτικές διακυμάνσεις, οι οποίες συμβάλλουν στην ετερογένεια της λειτουργίας των κακοηθών κυττάρων. Μη κακοήθη κύτταρα που συσχετίζονται με τον όγκο, αποκαλούνται το μικροπεριβάλλον του όγκου. Η πολυπλοκότητα που επιβάλλεται από το μικροπεριβάλλον του όγκου, ενισχύεται λόγω των αλληλοπαρεμβολών μεταξύ των κυττάρων του όγκου και του μικροπεριβάλλοντος (Kreso & Dick 2014). Τα μη κακοήθη κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος έχουν δυναμική λειτουργία και προάγουν όγκους σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης. Η ενδοκυτταρική επικοινωνία καθοδηγείται από ένα πολύπλοκο και δυναμικό δίκτυο κυτοκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων, φλεγμονωδών και ένζυμα αναδιαμόρφωσης μήτρας σε ένα περιβάλλον μεγάλων διαταραχών με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του ιστού. Η εξέλιξη, η δομή και οι δραστηριότητες των κυττάρων στο

μικροπεριβάλλον του όγκου έχουν πολλά κοινά με τις διεργασίες επούλωσης τραυμάτων και της φλεγμονής. Τα μη κακοήθη κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος είναι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, του αγγειακού συστήματος του όγκου και τα λεμφαγγεία, καθώς και ινοβλάστες και λιποκύτταρα. (Balkwill et al. 2012).

1.6.2 Τα μη κακοήθη κύτταρα

Το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει και προστατεύει τους ιστούς από μολύνσεις και ζημιές. Τόσο το έμφυτο όσο και το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα εμπλέκονται στην προώθηση και πρόληψη της ανάπτυξης του όγκου. Το ανοσοποιητικό σύστημα εξαπολύει αποκρίσεις έναντι των όγκων, αλλά οι μηχανισμοί ανοσοκαταστολής έχουν τη δυνατότητα να εμποδίσουν αυτή τη διαδικασία. Η πρόσληψη και ο εντοπισμός ανοσοποιητικών κυττάρων στους κύκλους των όγκων διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό και μεταξύ των βλαβών. Η ετερογένεια του ανοσοποιητικού 'μίγματος' του όγκου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως εκείνων που εκκρίνονται από τους ινοβλάστες, από την έκταση και τη διαπερατότητα του αγγειακού συστήματος, και από τα ίδια τα κύτταρα όγκου. Η ενεργοποίηση των T κυττάρων (T λεμφοκύτταρα, θυμοκύτταρα) εμπλέκει τόσο διεγερτικά όσο και ανασταλτικά σήματα ελέγχου για να ποφεύγεται η υπερβολική φθορά και αυτοανοσία. Τα B κύτταρα (B λεμφοκύτταρα) έχει δείχθει ότι καταστέλλουν αλλά και υποστηρίζουν τη λειτουργία των T κυττάρων, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν διαφορά στις επιδράσεις στην ογκογένεση. Επίσης προάγουν την εξέλιξη του όγκου, ενισχύοντας την προκαρκινική φλεγμονή. Τα ιστιοκύτταρα εμπλέκονται στην ογκογένεση και την αγγειογένεση. Τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (Tumor-associated macrophages, TAM) επηρεάζουν δραστικά την εξέλιξη του όγκου ανάλογα με την πόλωση τους (Junttila & de Sauvage 2013).

Οι ινοβλάστες είναι άφθονος κυτταρικός τύπος που προέρχεται από το μεσέγχυμα, οι οποίοι διατηρούν το δομικό πλαίσιο των ιστών. Αν και οι φυσιολογικοί ινοβλάστες συνήθως καταστέλλουν το σχηματισμό όγκου, οι ινοβλάστες οι οποίοι σχετίζονται με τον καρκίνο (Cancer associated fibroblasts, CAFs) μπορούν να προωθήσουν σημαντικά την ογκογένεση. Έχουν αυξημένο πολλαπλασιασμό, ενισχυμένη παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας και μοναδική έκκριση κυτοκινών. Τα λιποκύτταρα τα οποία είναι ένας άλλος κυτταρικός τύπος που προέρχεται από το μεσέγχυμα συμβάλει επίσης στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Διαφορές στη συμπεριφορά και απόκριση των ινοβλαστών οδηγούν σε εκτεταμένη ανακατασκευή του ιστού που προκαλείται από την επαυξημένη έκφραση πρωτεολυτικών

ενζύμων, από την απόθεση εξωκυτταρικής μήτρας και την παθογονική αγγειογένεση απελευθερώνοντας προ-αγγειογόνους παράγοντες εντός της μήτρας. Η ετερογένεια μπορεί να αποδοθεί σε μοναδικά σήματα βλάβης στα οποία εκτίθενται ινοβλάστες ή, ενδεχομένως στην προέλευσή τους, καθώς και η κυτταρική πλαστικότητα ενισχύει την ετερογένεια, αφού και οι μεσεγγυματικές προς επιθηλιακές μεταβάσεις, και οι επιθηλιακές προς μεσεγγυματικές μεταβάσεις συμβαίνουν (Junttila & de Sauvage 2013).

Το αγγειακό δίκτυο του όγκου είναι δυναμικό, με την ικανότητα να περιορίσει την ανάπτυξη του όγκου. Το αγγειακό δίκτυο προέρχεται μέσω του σχηματισμού νέων αιμοφόρων (αγγειογένεση), της τροποποίησης των υφιστάμενων αγγείων εντός του ιστού, ή της πρόσληψης και της διαφοροποίησης των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από το μυελό των οστών (αγγειογένεση), τα οποία συμβάλλουν στην αγγειακή ετερογένεια εντός και μεταξύ των όγκων. Ο σχηματισμός αγγείων περιλαμβάνει την αποικοδόμηση και την επανενσωμάτωση των υφιστάμενων βασικών αγγειακών μεμβρανών που διαφέρουν μ' ένα ιστό-ειδικό τρόπο. Η άνιση αγγείωση και οι διαφορές στην ωριμότητα των αγγείων σε συνδυασμό με την έλλειψη αποστράγγισης λόγω της ανεπαρκούς κάλυψης των λεμφικών αγγείων, συμβάλλει στην περίπλοκη τοπογραφία και μεταβλητή διάμεση πίεση εντός όγκων. Η ανεπαρκής λειτουργία των φτωχά οργανωμένων αγγειώσεων του όγκου, οδηγεί σε περιβάλλον υποξικό και περιορισμένης προσφοράς θρεπτικών συστατικών. Αυτές οι διακυμάνσεις των αγγειακών δικτύων έχουν τη δυνατότητα να δημιουργήσουν ξεχωριστό μικροπεριβάλλον εντός του όγκου και συμβάλλουν στη δια- και ενδο-ετερογένεια των όγκων (Junttila & de Sauvage 2013).

Εκτός από τους διάφορους τύπους κυττάρων που εμπλέκονται στην ογκογένεση, η εξωκυττάρια μήτρα συνεισφέρει και αυτή, περιορίζοντας την έναρξη του καρκίνου στα αρχικά στάδια, και οδηγώντας την εξέλιξη της νόσου προς την κακοήθεια (Quail & Joyce 2013).

1.6.3 Μετάσταση

Η μεταστατική διάδοση εξελίσσεται όταν ο κύριος όγκος αποφύγει τις ανοσοποιητικές άμυνες του ξενιστή και τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία. Διάφοροι τύποι κυττάρων που κάποτε προοριζόταν για να καταστρέψουν τον πρωτογενή όγκο προσλαμβάνονται για να διευκολύνουν το ταξίδι του μέσα από το σώμα. Ένα από τα αρχικά στάδια της πρωτογενούς εισβολής όγκου είναι η επιθηλιακή προς μεσεγγυματική μετάβαση, κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα χάνουν τους επιθηλιακούς δείκτες και αποκτούν

μεσεγγυματικά χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν παρόμοιες ιδιότητες των βλαστικών και το μεταναστευτικό φαινότυπο. Το επόμενο σημαντικό στάδιο στη μεταστατική αλληλουχία είναι ενδαγγείωση σε κυκλοφορία. Έχει δειχθεί ότι τα μακροφάγα εντοπίζονται κυρίως στο περιφερειακό στρώμα του όγκου και ο αριθμός τους μειώνεται προς το κέντρο. Σε βαθιές περιοχές του όγκου, τα μακροφάγα εντοπίζονται σε αιμοφόρα αγγεία, όπου βοηθούν τα κύτταρα του όγκου να ενδαγγειωθούν στην κυκλοφορία (Quail & Joyce 2013).

Η μετάσταση θεωρείται μια αναποτελεσματική διαδικασία, αφού μόνο 0,01% των κυττάρων που ενδαγγειώνονται στην κυκλοφορία είναι ικανά να σχηματίσουν μεταστάσεις. Τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο, κατά τη διάρκεια της διάδοσης, στο εχθρικό μικροπεριβάλλον της κυκλοφορίας του αίματος, αφού αλληλεπιδρούν άμεσα με καρκινικά κύτταρα και ενισχύουν την επιβίωση. Τα αιμοπετάλια σχηματίζουν προστατευτικά συσσωματώματα με κύτταρα όγκου στην κυκλοφορία, τα οποία έρχονται σε επαφή με την διαμεσολαβούμενη από κύτταρα φυσικούς δολοφόνους (Natural killer cells, NK cells) κυτταροτοξικότητα, ενισχύοντας την εναπόθεση του ινώδους και εμποδίζοντας την ανοσολογική αναγνώριση των κυττάρων. Οι συστάδες αυτές των κυττάρων του όγκου και των αιμοπεταλίων παρέχουν έτσι ένα επιπλέον στρώμα της ανοσοποιητικής διαφυγής, συμβάλλοντας στην εξέλιξη της νόσου. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από τη θρομβίνη, λόγω της φυσιολογικής απόκρισης στην αγγειακή βλάβη, προσκολλώνται στο ενδοθήλιο, και συσσωρεύονται για να σχηματίσουν ένα θρόμβο ινώδους. Η εξαγγείωση των κυττάρων του όγκου και η δευτερογενής ‘σπορά’ είναι προαπαιτούμενο για τη μεταστατική έκφυση (Quail & Joyce 2013).

Έχει αποδειχθεί ότι η κατανομή των μεταστάσεων δεν είναι τυχαία, αλλά εμφανίζονται όργανα προτίμησης. Πριν από την μεταστατική διάδοση, οι πρωτογενείς όγκοι εκκρίνουν παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της προ-μεταστατικής θέσης, η οποία χαρακτηρίζεται από τύπους κυττάρων οι οποίοι προέρχονται από το μυελό των οστών, από ινοβλάστες, και εκκριμένες ογκοπρωτεΐνες και κυτοκίνες, καθιστώντας το δευτερεύον περιβάλλον δεκτικό στην ανάπτυξη του όγκου. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα πρωτογενή μικροπεριβάλλοντα έχουν πολλές ομοιότητες με τα δευτερεύοντα μικροπεριβάλλοντα (Quail & Joyce 2013).

Ακόμη και αν τα καρκινικά κύτταρα ‘φυτευτούν’ με επιτυχία στα δευτεροβάθμια όργανα, η επιβίωση και η επέκτασή τους δεν εξασφαλίζεται, αφού το μικροπεριβάλλον στη δευτερογενή θέση μπορεί να καταστείλει την ενεργά μεταστατική κυτταρική επιβίωση και

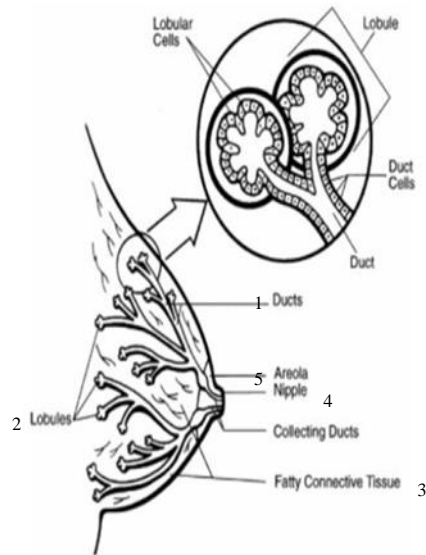
έκφυση. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν από τους αρχικούς αμυντικούς μηχανισμούς στα δευτερογενή όργανα και στη συνέχεια να υπάρχουν ως ασυμπτωματικές αδρανείς μικρομεταστάσεις που μπορούν να παραμείνουν στο σώμα για χρόνια χωρίς να γίνουν αντιληπτές. Η αδράνεια του όγκου προκαλείται από διάφορες διαδικασίες που οφείλεται εν μέρει στο μικροπεριβάλλον του όγκου, συμπεριλαμβανομένων της αδράνειας της μάζας του όγκου, στην κυτταρική αδράνεια και στην ανοσοποιητική αδράνεια (Quail & Joyce 2013).

1.7 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.7.1 Γενικά

Ο καρκίνος του μαστού έχει αποδειχθεί ότι είναι ο συχνότερος καρκίνος παγκοσμίως και η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Πιστεύεται ότι μία στις εννέα γυναίκες στο Ηνωμένο Βασίλειο και τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής θα αναπτύξουν καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Η εμφάνιση της νόσου αυτής θεωρείται πιο συχνή στις Δυτικές χώρες παρότι στην Αφρική, τη Νότια Αμερική ή την Ασία (Ih 2013). Αποτελεί το 10,4% του συνόλου εμφάνισης καρκίνου παγκοσμίως μεταξύ των γυναικών και είναι περίπου 100 φορές πιο συχνός στις γυναίκες παρά στους άνδρες, λόγω της καθυστέρησης στη διάγνωση. Το 2004, προκάλεσε 519.000 θανάτους παγκοσμίως (Cancer 2015).

Ο καρκίνος του μαστού προκύπτει από την ακανόνιστη ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που προέρχονται από τον ιστό του μαστού. Ο μαστός αποτελείται από δύο βασικούς τύπους ιστών, τους αδενικούς και στρωματικούς ιστούς. Οι αδενικοί ιστοί περιλαμβάνουν τους αδένες που παράγουν το γάλα (λόβια) και τους αγωγούς (τα περάσματα του γάλακτος), ενώ στρωματικοί ιστοί περιλαμβάνουν τους λιπαρούς και ινώδεις συνδετικούς ιστούς του μαστού (Σχήμα 4). Το στήθος αποτελείται επίσης από το λεμφατικό ιστό-ανοσοποιητικού συστήματος ιστό, ο οποίος απομακρύνει τα απόβλητα και τα κυτταρικά υγρά (Cancer 2015).



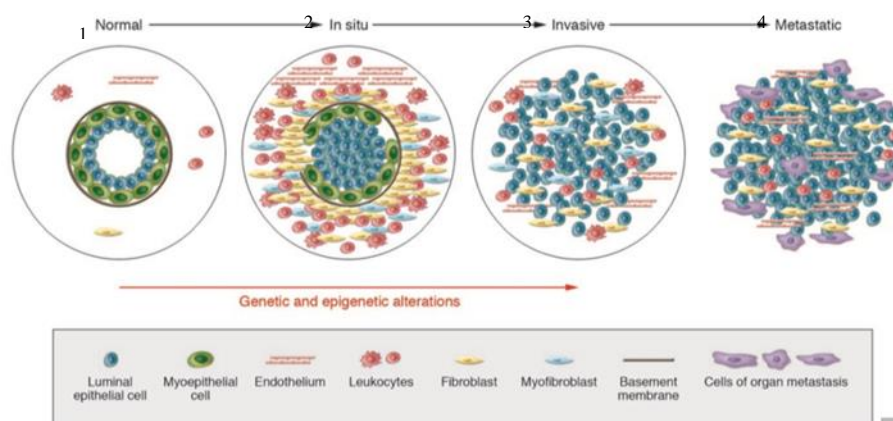
Σχήμα 4: Η δομή του μαστού, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3255438/>), 1. οι αγωγοί, 2. τα λόβια, 3. ο λιπαρός συνδετικός ιστός, 4. η θηλή, 5. η θηλαία άλω.

Το λεμφικό σύστημα είναι σημαντικό γιατί είναι ένας τρόπος εξάπλωσης του καρκίνου του μαστού. Αυτό το σύστημα έχει διάφορα μέρη. Οι λεμφαδένες είναι μικρές, σε σχήμα φασολιού συλλογές κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που συνδέονται με τα λεμφαγγεία. Τα λεμφαγγεία είναι σαν μικρές φλέβες, αλλά φέρουν ένα διαυγές υγρό που ονομάζεται λέμφος μακριά από το στήθος. Η λέμφος περιέχει το υγρό των ιστών και τα προϊόντα των αποβλήτων, καθώς και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού μπορούν να εισέλθουν στα λεμφαγγεία και να αρχίζουν να αναπτύσσονται στους λεμφαδένες. Τα περισσότερα λεμφαγγεία στο στήθος συνδέονται με τους λεμφαδένες κάτω από το βραχίονα. Μερικά λεμφαγγεία συνδέονται με λεμφαδένες μέσα στο στήθος και είτε πάνω είτε κάτω από την κλείδα. Εάν τα καρκινικά κύτταρα εξαπλωθούν στους λεμφαδένες, υπάρχει μια μεγαλύτερη πιθανότητα τα κύτταρα να περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος και να εξαπλωθούν σε άλλα σημεία του σώματος (Cancer 2015).

Εντός του μαστού μπορούν να αναπτυχθούν διάφοροι τύποι όγκων. Οι περισσότεροι όγκοι είναι αποτέλεσμα των καλοήθων (μη-καρκινικών) αλλαγών μέσα στο μαστό. Οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού ξεκινούν από τα κύτταρα που παρατάσσονται στους αγωγούς (πορογενές καρκίνου) και στα λόβια (καρκίνοι λοβών), ενώ υπάρχει ένας μικρός αριθμός που αρχίζει σε άλλους ιστούς. Υπάρχουν διάφοροι τύποι καρκίνου του μαστού και

είναι οι ακόλουθοι: το πορογενές επί τόπου καρκίνωμα (Ductal Carcinoma In Situ, DCIS) και το λοβιακό επί τόπου καρκίνωμα (Lobular Carcinoma In Situ, LCIS), όπου μη επεμβατικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού περιορίζονται στους αγωγούς και δεν εισβάλλουν στους γύρω λιπαρούς και συνδετικούς ιστούς του μαστού. Τα επεμβατικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού τα οποία σπάζουν το λοβιακό τοίχωμα και το τοίχωμα του αγωγού και εισβάλλουν στους γύρω λιπαρούς και συνδετικούς ιστούς του μαστού. Το διεισδυτικό λοβιακό καρκίνωμα, το οποίο αρχίζει στους αδένες του γάλακτος (λόβια) του μαστού αλλά συχνά εξαπλώνεται σε άλλες περιοχές του σώματος και το διεισδυτικό πορογενές καρκίνωμα, το οποίο αρχίζει στους αγωγούς γάλακτος του στήθους και διαπερνά το τοίχωμα του αγωγού, εισβάλλοντας στο λιπώδη ιστό του μαστού και σε άλλες περιοχές του σώματος. Το μυελώδες καρκίνωμα, το οποίο είναι διεισδυτικός καρκίνος του μαστού που σχηματίζει ένα διακριτό όριο μεταξύ του ιστού του όγκου και του φυσιολογικού ιστού, το βλεννώδες καρκίνωμα το οποίο σχηματίζεται από τη βλέννα που παράγουν τα καρκινικά κύτταρα και το σωληνοειδή καρκίνωμα, το οποίο είναι διεισδυτικό. Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού όπου το στήθος εμφανίζει φλεγμονή με κωνικές προεξοχές που προκαλούνται από τα καρκινικά κύτταρα που μπλοκάρουν τα λεμφαγγεία ή τα κανάλια στο δέρμα πάνω από το στήθος. Η νόσος Paget της θηλής, η οποία είναι μια σπάνια μορφή καρκίνου του μαστού, που αρχίζει στους γαλακτοφόρους πόρους και απλώνεται στο δέρμα της θηλής και της θηλαίας άλω. Οι φυλλοειδείς όγκοι οι οποίοι αναπτύσσονται στους συνδετικούς ιστούς του μαστού, μπορούν να είναι είτε καλοήθεις ή κακοήθεις και είναι πολύ σπάνιοι (Sharma et al. 2010).

Ο καρκίνος του μαστού εξελίσσεται μέσω καθορισμένων παθολογικά και κλινικά σταδίων, ξεκινώντας με υπερπολλαπλασιασμό του πόρου, με επακόλουθη εξέλιξη επί τόπου αλλά και διεισδυτικών καρκινωμάτων, και τελικά καταλήγει σε μεταστατική νόσο. Το πορογενές επί τόπου καρκίνωμα πιστεύεται ότι είναι ένας πρόδρομος του διεισδυτικού καρκινώματος πόρου με βάση τις μοριακές, επιδημιολογικές και παθολογικές μελέτες. Η έναρξη του καρκίνου του μαστού οφείλεται σε γεγονότα μετασχηματισμού σ' ένα κύτταρο, ενώ η μεταγενέστερη εξέλιξη του όγκου οδηγείται από τη συσσώρευση επιπλέον γενετικών αλλαγών (Σχήμα 5) (Polyak 2007).



Σχήμα 5: Υποθετικό μοντέλο της εξέλιξης του όγκου του μαστού, (Polyak 2007), 1. ο φυσιολογικός πόρος, 2. η επί τόπου εξέλιξη του καρκίνου στον πόρο, 3. Ο διεισδυτικός καρκίνος, 4. ο μεταστατικός καρκίνος.

1.7.2 Αιτίες πρόκλησης

Αρκετοί αιτιολογικοί παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου αυτής.

Ηλικία

Παρατηρήθηκε ότι ο καρκίνος του μαστού είναι πολύ ασυνήθιστος πριν τα είκοσι χρόνια ηλικίας, αλλά η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται σταδιακά με την ηλικία, και από την ηλικία των ενενήντα χρόνων, το ένα πέμπτο των γυναικών επηρεάζονται. Επίσης αναφέρθηκε ότι λιγότερο από δέκα νέες περιπτώσεις καταγράφηκαν ανά 100.000 γυναίκες κάτω των εικοσιπέντε χρόνων, και αυξήθηκε μέχρι εκατό φορές από την ηλικία των σαράντα πέντε χρόνων. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι αναπαραγωγικές ορμόνες που παράγονται από τις ωοθήκες και τα επινεφρίδια εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, πιστεύεται ότι η ηλικία εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης συμβάλλουν στην διάρκεια της έκθεσης στις καρκινογόνες επιδράσεις των γονάδων ορμονών, αφού παρατηρήθηκε ότι ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού μειώνεται κατά 15-20% για κάθε έτος που η εμμηναρχή καθυστερεί, και ότι η καθυστερημένη εμμηνόπαυση σε πενήντα πέντε ετών και άνω είναι ένας παράγοντας κινδύνου (Ih 2013).

Φύλο

Οι άντρες κατέχουν λιγότερο από το 1% των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Αυτό συμβαίνει λόγω των ορμονικών διαφορών των δύο φύλων. Ο αρσενικός καρκίνος του μαστού έχει δείχθει ότι εκφράζει υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης και ανδρογόνων (Ih 2013).

Γενετικοί παράγοντες

Σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό ο καρκίνος του μαστού είναι πιο κοινός σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό. Παρατηρήθηκε ότι μόνο το 5% των καρκίνων του μαστού σχετίζονται με μια συγκεκριμένη μετάλλαξη. Μελέτες έδειξαν ότι το 12% των γυναικών με την ασθένεια αυτή έχουν ένα προσβεβλημένο μέλος της οικογένειας και ότι μόνο το 1% των ασθενών έχουν ένα ή περισσότερους συγγενείς. Επίσης έχειδειχθεί ότι, γυναίκες οι οποίες έχουν έναν ή περισσότερους συγγενείς πρώτου βαθμού που έχουν προσβληθεί από καρκίνο του μαστού έχουν υψηλότερο κίνδυνο καρκίνου του μαστού με σε σχέση με όσους δεν έχουν (Ih 2013).

Μεταβολικοί και εκκριντικοί παράγοντες

Μελέτες υποθέτουν ότι τόσο η προστασία όσο και ο κίνδυνος για τον καρκίνο του μαστού οφείλονται στις διαφορές στα επίπεδα της μεταβολικής και εκκριντικής δραστηριότητας του μαστού. Οι γυναίκες με ξηρό γονότυπο κυψελίδας έχουν χαμηλότερα επίπεδα εκκριντικής δραστηριότητας στα επιθηλιακά κύτταρα που παρατάσσονται τους αγωγούς του μαστού από τις γυναίκες με υγρό γονότυπο κυψελίδας. Η διαφορά αυτή μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, προστατεύοντας τα κύτταρα του αγωγού του μαστού των γυναικών με ξηρή κυψελίδα από την έκθεση σε περιβαλλοντικές και διατροφικές καρκινογόνες ουσίες και από ουσίες που προωθούν τον καρκίνο εκκρινόμενες στους αγωγούς του μαστού από το πλάσμα (Mansfield 1993).

Παχυσαρκία

Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του μαστού σε γυναίκες που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Οι παχύσαρκες γυναίκες έχουν αυξημένη έκθεση των ιστών του μαστού σε οιστρογόνα, λόγω της μειωμένης παραγωγής των ενώσεων 2-OH οιστρογόνων (2-hydroxyestrone), η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπεροιστρογονική κατάσταση. Τα δεδομένα θνησιμότητας από τον καρκίνο του μαστού σε διαφορετικές χώρες σχετίζονται στενά με την κατανάλωση λίπους. Μπορεί να είναι απαραίτητο να μειωθεί το διατροφικό λίπος κατά 80%, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης του καρκίνου του μαστού (Mansfield 1993).

Διατροφικοί παράγοντες και αλκοόλ

Η διατροφή είναι ένα σημαντικό στοιχείο για τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η Εθνική Ακαδημία Επιστημών κατέληξε στο συμπέρασμα υπάρχει συσχετισμός μεταξύ διατροφικών συστατικών και της συχνότητας εμφάνισης ορισμένων μορφών καρκίνου και αυτός είναι το λίπος, ιδίως για τον καρκίνο του μαστού (Mansfield 1993). Οι δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά είναι πλούσιες σε χοληστερόλη, η οποία είναι ένας πρόδρομος στην σύνθεση των οιστρογόνων και άλλων στεροειδών ορμονών. Έτσι εκθέτοντας το στήθος σε υψηλότερες ποσότητες οιστρογόνων, μπορεί να διεγείρουν την ανάπτυξη του καρκίνου (Ih 2013). Έτσι η πιο αποτελεσματική μέθοδος της πρωτογενούς πρόληψης του καρκίνου του μαστού είναι η μείωση του διαιτητικού λίπους. Ορισμένες ενδείξεις έδειξαν ότι τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα σε μερικά ψάρια έχουν μια προστατευτική επίδραση (Mansfield 1993). Παρατηρήθηκε επίσης ότι η κατάποση φυτικών ινών αναστέλλει την εντερική απορρόφηση των οιστρογόνων. Άλλοι διατροφικοί παράγοντες, όπως τα φασόλια σόγιας και οιβιταμίνες πιστεύεται ότι μειώνουν τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, αλλά οι ακριβείς μηχανισμοί δεν έχουν εξηγηθεί (Ih 2013).

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις του αλκοόλ δείχνουν μια σαφή συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου κινδύνου για την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού, πίνοντας κρασί ή σκληρό ποτό (Mansfield 1993).

Μαστογραφική πυκνότητα

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι γυναίκες με μεγαλύτερη από 75% αυξημένη πυκνότητα του μαστού στη μαστογραφία έχουν έως και πενταπλάσια αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου σε σχέση με αυτές με μικρότερη από 5% αυξημένη πυκνότητα του μαστού. Επίσης αποδείχθηκε ότι οι γυναίκες με μέγεθος όγκου μεγαλύτερο από ένα εκατοστό ήταν πιο πιθανό να έχουν πυκνούς μαστούς σε σύγκριση με εκείνες με μέγεθος όγκου μικρότερο από ένα εκατοστό (Ih 2013).

1.7.3 Τα στάδια

Ένα σύστημα σταδιοποίησης είναι ένας τυποποιημένος τρόπος για να συνοψισθούν οι πληροφορίες για το πόσο μακριά έχει εξαπλωθεί ο καρκίνος. Το πιο κοινό σύστημα που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα στάδια του καρκίνου του μαστού είναι το TNM (tumor node metastasis) σύστημα της αμερικανικής μεικτής επιτροπής για τον καρκίνο (Cancer 2010). Το στάδιο ενός καρκίνου μαστού βασίζεται είτε στα αποτελέσματα της φυσικής

εξέτασης της βιοψίας και των δοκιμών απεικόνισης, που ονομάζεται το κλινικό στάδιο, είτε από τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών συν τα αποτελέσματα από τη χειρουργική επέμβαση, η οποία ονομάζεται παθολογικό στάδιο. Η σταδιοποίηση που περιγράφεται εδώ είναι το παθολογικό στάδιο, το οποίο περιλαμβάνει τα ευρήματα μετά την επέμβαση, όταν ο παθολόγος εξέτασε τη μάζα του μαστού και τους κοντινούς λεμφαδένες. Τα παθολογικά στάδια είναι πιο ακριβή από την κλινική σταδιοποίηση, καθώς επιτρέπει στο γιατρό να πάρει μια πρώτη εντύπωση για την έκταση του καρκίνου (Cancer 2015).

Το σύστημα σταδιοποίησης TNM κατηγοριοποιεί τον καρκίνο βασιζόμενο στα T, N και M στάδια του (Πίνακας 1). Το γράμμα T ακολουθούμενο από έναν αριθμό από 0 έως 4 περιγράφει το μέγεθος του όγκου και την εξάπλωση στο δέρμα ή στο θωρακικό τοίχωμα κάτω από το στήθος. Οι υψηλότεροι αριθμοί T σημαίνει ένα μεγαλύτερο όγκο ή / και ευρύτερη διάδοση σε ιστούς κοντά στο στήθος. Το γράμμα N ακολουθούμενο από έναν αριθμό από 0 έως 3 δείχνει εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες κοντά στο στήθος και, αν ναι, πόσοι λεμφαδένες επηρεάζονται. Το γράμμα M που ακολουθείται από ένα 0 ή 1 δείχνει εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα όργανα, όπως οι πνεύμονες ή τα οστά (Kalogerakos et al. 2008; Cancer 2015).

Πίνακας 1: Το TNM σύστημα

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ		
T	N	M
TX: Πρωτοβάθμιος όγκος ο οποίος δεν μπορεί να αξιολογηθεί	NX: οι κοντινοί λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθεί	MX: η μακρινή εξάπλωση (μετάσταση) δεν μπορεί να αξιολογηθεί
T0: Κανένα στοιχείο του πρωτοπαθούς όγκου	N0: Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί στους γειτονικούς λεμφαδένες	M0: Καμία μακρινή εξάπλωση βρίσκεται με τις ακτίνες X ή με άλλες διαδικασίες απεικόνισης ή με φυσικές εξέταση
Tis: επί τόπου καρκίνωμα	N0(i+): Οι ελάχιστες ποσότητες του καρκίνου που βρέθηκαν στους λεμφαδένες της μασχάλης. Η περιοχή της εξάπλωσης του καρκίνου περιέχει λιγότερο από 200 κύτταρα και είναι μικρότερη από 0,2 χιλιοστά	cM0(i+): Μικροί αριθμοί των καρκινικών κυττάρων βρίσκονται στο αίμα ή στο μυελό των οστών, ή μικρές περιοχές της εξάπλωσης του καρκίνου (όχι μεγαλύτερες από 0,2 χιλιοστά) βρίσκονται σε λεμφαδένες μακριά από το στήθος
T1 (περιλαμβάνει T1a, T1b και T1c): ο όγκος είναι δυο εκατοστά ή λιγότερο κατά μήκος	N0(mol+): Τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να φανούν στους λεμφαδένες της μασχάλης, αλλά τα ίχνη τους ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική RT-PCR	M1: Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα όργανα
T2: ο όγκος είναι περισσότερο από δυο εκατοστά, αλλά όχι περισσότερο από 5 εκατοστά κατά μήκος	N1: ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε έναν έως τρεις μασχαλιαίους λεμφαδένες, ή / και μικρές ποσότητες του καρκίνου βρέθηκαν σε εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες	
T3: ο όγκος είναι περισσότερο από 5 εκατοστά κατά μήκος	N1mi: μικρομεταστάσεις σε έναν έως τρεις λεμφαδένες κάτω από το βραχίονα. Τουλάχιστον 200 καρκινικά κύτταρα ή 0,2 χιλιοστά πλάτος	
T4 (περιλαμβάνει T4a, T4b, T4c, και T4d): ο όγκος οποιουδήποτε μεγέθους αναπτύσσεται στο θωρακικό τοίχωμα ή στο δέρμα	N2: a. Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε τέσσερις έως εννέα λεμφαδένες κάτω από το βραχίονα, ή b. ο καρκίνος έχει διευρυνθεί στους εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες	
	N3a: i. ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε δέκα ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες, ή ii. ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες κάτω από την κλείδα	
	N3b: i. ο καρκίνος βρίσκεται σε τουλάχιστον έναν κόμβο μασχαλιαίων λεμφαδένων και έχει διευρυνθεί στους εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες, ή ii. ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε τέσσερις ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες	
	N3c: ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες πάνω από την κλείδα	

1.7.4 Η ομαδοποίηση

Αφού έχουν προσδιοριστεί οι κατηγορίες T, N και M, υπάρχει μια διαδικασία η οποία ονομάζεται το στάδιο ομαδοποίησης όπου αυτές οι πληροφορίες συνδυάζονται. Οι καρκίνοι με παρόμοια στάδια τείνουν να έχουν μια παρόμοια προοπτική και συχνά αντιμετωπίζονται με παρόμοιο τρόπο. Τα στάδια εκφράζονται με λατινικούς αριθμούς και ξεκινά από το στάδιο I (το λιγότερο προχωρημένο στάδιο) μέχρι το στάδιο IV (το πιο προχωρημένο στάδιο). Ο μη διεισδυτικός καρκίνος αναφέρεται ως στάδιο μηδέν (Hayes 2010).

Στάδιο 0: Tis, N0, M0: Αυτό είναι πορογενές επί τόπου καρκίνωμα (DCIS), ένας προ-καρκίνος του μαστού. Πολλοί θεωρούν το DCIS ως η πρώτη μορφή του καρκίνου του μαστού. Το λοβιακό επί τόπου καρκίνωμα (LCIS) μερικές φορές επίσης ταξινομείται ως στάδιο μηδέν του καρκίνου του μαστού, αλλά οι περισσότεροι ογκολόγοι πιστεύουν ότι δεν είναι ένας αληθινός καρκίνος ή προ-καρκίνος. Η νόσος του Paget της θηλής είναι επίσης στο στάδιο μηδέν. Σε όλες τις περιπτώσεις ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες ή απομακρυσμένες περιοχές (Hayes 2010).

Στάδιο IA: T1, N0, M0: Ο όγκος είναι δυο εκατοστά ή και λιγότερο κατά μήκος (T1) και δεν έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες (N0) ή απομακρυσμένες περιοχές (M0) (Hayes 2010).

Στάδιο IB: T0 ή T1, N1mi, M0: Ο όγκος είναι δυο εκατοστά ή λιγότερο κατά μήκος (ή δεν βρέθηκε) (T0 ή T1) με μικρομεταστάσεις σε έναν έως τρεις μασχαλιαίους λεμφαδένες (ο καρκίνος στους λεμφαδένες είναι μεγαλύτερος από 0,2 χιλιοστά κατά μήκος ή / και πάνω από 200 κύτταρα αλλά δεν είναι μεγαλύτερος από δυο χιλιοστά) (N1mi). Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα σημεία (M0) (Hayes 2010).

Στάδιο IIA: Ισχύει ένα από τα παρακάτω:

T0 ή T1, N1 (αλλά όχι N1mi), M0: Ο όγκος είναι δυο εκατοστά ή λιγότερο κατά μήκος (ή δεν βρέθηκε) (T1 ή T0) και είτε έχει εξαπλωθεί σε έναν έως τρεις μασχαλιαίους λεμφαδένες, με τον καρκίνο στους λεμφαδένων μεγαλύτερο από δυο χιλιοστά κατά μήκος (N1a), είτε οι ελάχιστες ποσότητες του καρκίνου βρέθηκαν σε εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες με βιοψία λεμφαδένα (N1B), είτε έχει εξαπλωθεί σε έναν έως τρεις λεμφαδένες κάτω από το βραχίονα και στους εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες (N1c).

Η T2, N0, M0: Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από δυο εκατοστά αλλά μικρότερος από πέντε εκατοστά κατά μήκος (T2), αλλά δεν έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες (N0). Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα σημεία (M0) (Hayes 2010).

Στάδιο IIB: Ισχύει ένα από τα παρακάτω:

T2, N1, M0: Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από δυο εκατοστά αλλά μικρότερος από πέντε εκατοστά σε όλη την (T2). Έχει εξαπλωθεί σε έναν έως τρεις μασχαλιαίους λεμφαδένες και / ή μικρές ποσότητες από τον καρκίνο βρίσκονται στους εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες με βιοψία λεμφαδένα (N1). Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένες περιοχές (M0).

Η T3, N0, M0: Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από πέντε εκατοστά κατά μήκος, αλλά δεν αναπτύσσεται στο θωρακικό τοίχωμα ή στο δέρμα και δεν έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες (T3, N0). Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένες τοποθεσίες (M0) (Hayes 2010).

Στάδιο IIIA: Ισχύει ένα από τα παρακάτω:

T0 να T2, N2, M0: Ο όγκος δεν είναι μεγαλύτερος από πέντε εκατοστά κατά μήκος (ή δεν μπορεί να βρεθεί) (T0 έως T2). Έχει εξαπλωθεί σε τέσσερις έως εννέα μασχαλιαίους λεμφαδένες, ή έχει διευρυνθεί στους εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες (N2). Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα σημεία (M0).

Η T3, N1 ή N2, M0: Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από πέντε εκατοστά κατά μήκος, αλλά δεν αναπτύσσεται μέσα στο θωρακικό τοίχωμα ή στο δέρμα (T3). Έχει εξαπλωθεί σε έναν έως εννέα μασχαλιαίους αδένες, ή στους εσωτερικούς μαστικούς αδένες (N1 ή N2). Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα σημεία (M0) (Hayes 2010).

Στάδιο IIIB: T4, N0 σε N2, M0: Ο όγκος έχει μεγαλώσει μέσα στο θωρακικό τοίχωμα ή στο δέρμα (T4), και ισχύει ένα από τα παρακάτω: δεν έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες (N0), έχει εξαπλωθεί σε έναν έως τρεις μασχαλιαίους λεμφαδένες και / ή μικροσκοπικά ποσά του καρκίνου βρίσκονται σε εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες με βιοψία λεμφαδένα (N1), έχει εξαπλωθεί σε τέσσερις έως εννέα μασχαλιαίους λεμφαδένες, ή έχει διευρυνθεί στους εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες (N2). Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα σημεία (M0). Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού ταξινομείται ως T4d και είναι τουλάχιστον στάδιο IIIB. Αν έχει εξαπλωθεί σε πολλούς κοντινούς λεμφαδένες (N3) θα μπορούσε να είναι στο στάδιο IIIC, και αν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένους λεμφαδένες ή όργανα (M1) θα είναι στο στάδιο IV (Hayes 2010).

Στάδιο IIIC: κάθε T, N3, M0: Ο όγκος είναι σε οποιοδήποτε μέγεθος (ή δεν μπορεί να βρεθεί), και ισχύουν ένα από τα ακόλουθα: ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε δέκα ή

περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες (N3), ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες κάτω από την κλείδα (N3), ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες πάνω από την κλείδα (N3), ο καρκίνος περιλαμβάνει μασχαλιαίους λεμφαδένες και διευρύνεται στους εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες (N3), ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε τέσσερις ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες, και μικροσκοπικά ποσά του καρκίνου βρέθηκαν σε εσωτερικούς μαστικούς λεμφαδένες με βιοψία λεμφαδένα (N3), ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα σημεία (M0) (Hayes 2010).

Στάδιο IV: Κάθε T, κάθε N, M1: Ο καρκίνος μπορεί να είναι σε οποιοδήποτε μέγεθος (οποιαδήποτε T) και μπορεί ή δεν μπορεί να έχει εξαπλωθεί σε γειτονικούς λεμφαδένες (οποιαδήποτε N). Έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα όργανα ή λεμφαδένες μακριά από το μαστό (M1). Οι πιο κοινές θέσεις εξάπλωσης είναι τα οστά, το ήπαρ, ο εγκέφαλος, ή οι πνεύμονες (Cancer 2010; Hayes 2010).

1.7.5 Εξέταση και ανίχνευση του καρκίνου του μαστού

Η αξιολόγηση πραγματοποιείται με τεχνικές οι οποίες ελέγχουν τους ασθενείς επιτρέποντας την αντιμετώπιση της νόσου σε πρώιμο στάδιο, όπου η θεραπεία είναι πιο πιθανή. Η αξιολόγηση του καρκίνου του μαστού γίνεται με τη μαστογραφία, η οποία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιεί ακτίνες X χαμηλής δόσης για να απεικονίσει την εσωτερική δομή του μαστού. Κατά μέσο όρο, η μαστογραφία θα εντοπίσει περίπου το 80-90% των καρκίνων του μαστού σε γυναίκες χωρίς συμπτώματα. Η τεχνική αυτή είναι πιο ακριβής σε μετεμμηνοπαυσιακές από ό, τι σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η μαγνητική τομογραφία (Magnetic resonance imaging, MRI) είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιεί μαγνήτες και ραδιοκύματα για να παράξουν λεπτομερείς εικόνες διατομής του εσωτερικού του σώματος. Η μαγνητική τομογραφία δεν χρησιμοποιεί ακτίνες X, έτσι δεν συνεπάγεται έκθεση σε ακτινοβολία. Η σάρωση με τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (positron emission tomography, PET) δημιουργεί μηχανογραφικές εικόνες των χημικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στον ιστό. Οι σαρώσεις PET μπορεί να παίζουν ρόλο στο να καθοριστεί εάν μια μάζα του μαστού είναι καρκινική. Ωστόσο, οι σαρώσεις PET είναι πιο ακριβείς στην ανίχνευση μεγαλύτερων και πιο επιθετικών όγκων από ό, τι για τον εντοπισμό όγκων που είναι μικρότεροι από οκτώ χιλιοστά ή / και λιγότερο επιθετικοί. Μπορούν επίσης να ανιχνεύσουν τον καρκίνο όταν άλλες τεχνικές απεικόνισης δείχνουν φυσιολογικά αποτελέσματα. Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων μπορεί να είναι χρήσιμη για την αξιολόγηση και σταδιοποίηση της υποτροπής της νόσου. Η κλινική εξέταση μαστού (

Clinical Breast Exam, CBE) συνιστάται για το μέσο ασυμπτωματικό κίνδυνο στην ηλικιακή ομάδα των είκοσι με τριάντα χρονών, ώστε να παρατηρηθούν οποιεσδήποτε αλλαγές στο σχήμα, την υφή, και τη θέση των εξογκωμάτων. Οι μαστοί θα πρέπει επίσης να επιθεωρούνται για τυχόν αλλαγές του δέρματος και ασυμμετρία. Ο μαμματόμος (Mammotome) είναι μια υποβοηθητική βιοψία του μαστού που χρησιμοποιεί την καθοδήγηση εικόνας, όπως στερεοτακτική ακτινογραφία, υπέρηχο, MRI ή / και μοριακή απεικόνιση για να εκτελέσει βιοψίες μαστού. Η mammotome προσφέρει μια πλήρη σειρά από δείκτες ιστού για να σηματοδοτήσει την τοποθεσία βιοψίας για την συνεχείς παρατηρήσεις (Sarkar & Mandal 1990).

1.7.6 Η θεραπεία

Κλινικά, η επιλογή των θεραπειών του καρκίνου του μαστού εξαρτώνται από την ηλικία του ασθενούς, την υγεία, το στάδιο, τη νόσο και την προηγούμενη αγωγή (Kalra & Edwards 2012). Οι περισσότερες γυναίκες με καρκίνο του μαστού θα υποστούν κάποιο είδος εγχείρησης, συχνά σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες, όπως θεραπεία ακτινοβολίας, χημειοθεραπεία (Sarkar & Mandal 1990).

Χειρουργική επέμβαση

Οι περισσότεροι ασθενείς με καρκίνο του μαστού δέχονται τη χειρουργική επέμβαση για να αφαιρέσουν τη μάζα του όγκου από το στήθος. Οι τύποι της χειρουργικής επέμβασης διαφέρουν στην ποσότητα του ιστού που αφαιρείται με τον όγκο, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του όγκου, αν έχει εξαπλωθεί (μετάσταση) και στα προσωπικά συναισθήματα του ασθενούς. Συνήθως, μερικοί από τους λεμφαδένες οι οποίοι βρίσκονται κάτω από το βραχίονα βγαίνουν έξω με σκοπό να εξετασθούν στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί εάν περιέχουν καρκινικά κύτταρα. Η χειρουργική επέμβαση διατήρησης του μαστού ή η χειρουργική αφαίρεση του όγκου απομακρύνουν τα καρκινικά κύτταρα και όχι το ίδιο το στήθος. Η απλή ή η ολική μαστεκτομή περιλαμβάνει αφαίρεση ολόκληρου του μαστού. Η τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή περιλαμβάνει αφαίρεση ολόκληρου του μαστού και των λεμφαδένων κάτω από το βραχίονα, αλλά δεν περιλαμβάνει την αφαίρεση του υποκείμενου μυός στο θωρακικό τοίχωμα, όπως συμβαίνει στη ριζική μαστεκτομή (Sarkar & Mandal 1990).

Ακτινοθεραπεία

Είναι μια θεραπεία του καρκίνου η οποία χρησιμοποιεί υψηλής ενέργειας ακτίνες X ή άλλες μορφές ακτινοβολίας με σκοπό να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα που παραμένουν στο στήθος, στο θωρακικό τοίχωμα, ή στην περιοχή της μασχάλης μετά από την χειρουργική επέμβαση, ή να μειώσει το μέγεθος του όγκου πριν από την χειρουργική επέμβαση. Υπάρχουν δύο τύποι θεραπείας με ακτινοβολία. Η εξωτερική ακτινοθεραπεία, η οποία χρησιμοποιεί ένα μηχάνημα έξω από το σώμα για να στείλει ακτινοβολία προς τον καρκίνο και η εσωτερική ακτινοθεραπεία, η οποία χρησιμοποιεί μια ραδιενεργή ουσία η οποία βρίσκεται μέσα στις βελόνες, σπόρους, σύρματα ή καθετήρες που τοποθετούνται απευθείας εντός ή πλησίον του καρκίνου. Η ακτινοθεραπεία που δίνεται στους ασθενείς εξαρτάται από τον τύπο και το στάδιο του καρκίνου. Χρησιμοποιώντας παραδοσιακούς κλινικούς και παθολογικούς παράγοντες, οι ασθενείς μπορούν να ταξινομηθούν σε υποομάδες ανάλογα με τον κίνδυνο της τοπικής υποτροπής. Στις ομάδες υψηλού κινδύνου έχουν μεγαλύτερο απόλυτο όφελος της ακτινοβολίας (Sarkar & Mandal 1990).

Σημαντικό ποσοστό των ασθενών παραμένει ελεύθερο από την τοπική υποτροπή ακόμη και χωρίς να λάβουν ακτινοθεραπεία, και κάποιοι ασθενείς αναπτύσσουν τοπική υποτροπή ενώ έλαβαν μετεγχειρητική ακτινοβολία (Sarkar & Mandal 1990). Στις γυναίκες ηλικίας 70 και άνω, με όγκους μεγαλύτερους από πέντε εκατοστά, μικρές παρατηρήθηκε τοπική περιφερειακή υποτροπή κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας μετά από μαστεκτομή, σε σχέση με τις γυναίκες που δεν έλαβαν ακτινοθεραπεία. Η ακτινοθεραπεία μετά τη μαστεκτομή (Post mastectomy radiotherapy, PMRT) θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για τη διαχείριση του καρκίνου του μαστού με χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου. Η ανοσοενισχυτική ακτινοθεραπεία είναι μια θεραπεία διατήρησης του μαστού (Breast conserving therapy, BCT) στις νεότερες γυναίκες και συχνά δεν συνιστάται σε ασθενείς προχωρημένης ηλικίας (Sheikh et al. 2011).

Χημειοθεραπεία

Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα εφαρμόζονται συρρικνωθεί το μέγεθος του όγκου που έχει κάνει μετάσταση και για να καθυστερήσει την περαιτέρω ανάπτυξη και την εξάπλωση του όγκου (Sarkar & Mandal 1990). Εάν χρησιμοποιείται αμέσως μετά την επέμβαση αποκαλείται ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία και αν χορηγείται πριν από την χειρουργική επέμβαση ονομάζεται εισαγωγική χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία συνιστάται για όλες τις γυναίκες με διεισδυτικό καρκίνο μεγαλύτερο από ένα εκατοστό. Η ανοσοενισχυτική

χημειοθεραπεία σχετίζεται με πιο σοβαρά σωματικά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένων του μυοσκελετικού πόνου, των κοιλικών προβλημάτων και προβλημάτων βάρους και της ναυτίας. Η εισαγωγική χημειοθεραπεία είναι μια συνήθης προσέγγιση για τη διαχείριση και την επεξεργασία του τοπικά προχωρημένου καρκίνου του μαστού. Εφαρμόζεται πολύ αποτελεσματικά για τη θεραπεία ασθενών με τοπικά προχωρημένο καρκίνο του μαστού πριν γίνει εκτομή του μαστού και των λεμφαδένων της μασχάλης. Έχει στόχο τη μείωση του μεγέθους του όγκου, βοηθώντας τη μαστεκτομή και την ακτινοθεραπεία. Είναι η καλύτερη θεραπευτική επιλογή, διότι αποτρέπει τις ανεπιθύμητες φυσιολογικές αντιδράσεις (Sheikh et al. 2011).

Οι ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο του μαστού, έδειξαν πλήρη κλινική και παθολογική απόκριση στην εισαγωγική χημειοθεραπεία, ενώ οι ασθενείς με καθαρό μικροθηλωματώδη καρκίνωμα έδειξαν ελλιπή απόκριση. Η δράση της θεραπείας του ασθενή μπορεί να προβλεφθεί από τις κλινικές και παθολογικές αποκρίσεις καθώς και από τα επίπεδα βιοδεικτών των ασθενών, οι οποίοι έχουν καλύτερη προγνωστική επιρροή σε αντίθεση με την παθολογική και κλινική απόκριση. Τα επίπεδα πολυ-βιοδεικτών έδειξαν καλύτερη εκφραστική δύναμη για την έκβαση της θεραπείας, σε σύγκριση με το ενιαίο επίπεδο βιοδεικτών (Sheikh et al. 2011).

Στοχευμένη θεραπεία με μικρά μόρια

Κατανοώντας τα μοριακά γεγονότα που διέπουν την αιτιολογία των διαφορετικών καρκίνων, καθώς και τα γεγονότα σηματοδότησης, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη συνεχή ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, δόθηκε η ευκαιρία ενίσχυσης της ανάπτυξης νέων παραγόντων. Είναι ο νέος τύπος χημειοθεραπείας και ονομάζεται στοχευμένη θεραπεία, με στόχο να παρέχει παράγοντες βασισμένους σε μοριακό επίπεδο και πιο ειδικούς για τα καρκινικά κύτταρα. Αποδίδει σε φαρμακολογικούς παράγοντες για να αποφευχθούν οι ολέθριες παρενέργειες που συμβαίνουν μερικές φορές με τις παραδοσιακές θεραπείες (Wu et al. 2006).

Αντι-αγγειογενετική θεραπεία

Η αγγειογένεση είναι αναπόσπαστο βήμα στην ανάπτυξη του όγκου, έτσι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες μπορούν να αναπτυχθούν για την καλύτερη διαχείριση και πρόληψη του καρκίνου του μαστού. Το μονοκλωνικό αντίσωμα στο μόριο προσκόλλησης κυττάρου αιμοπεταλίων / ενδοθηλιακών κυττάρων, έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας ευαίσθητος

και ειδικός δείκτης για τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτά τα αντισώματα μπορούν να μειώσουν το μέγεθος του όγκου ή να εμποδίσουν την ανάπτυξη των μεταστατικών όγκων (Sheikh et al. 2011).

Ανακουφιστική φροντίδα

Η ανακουφιστική φροντίδα είναι η ενεργός και η ολοκληρωμένη φροντίδα που παρέχεται σε ασθενείς των οποίων η νόσος δεν είναι ή δεν ανταποκρίνεται πλέον στις θεραπευτικές θεραπείες. Στην παρηγορητική ιατρική περιλαμβάνονται η κλινική παρηγορητική φροντίδα, η εκπαίδευση και η έρευνα που εστιάζουν στην ποιότητα της ζωής των ασθενών με προχωρημένη νόσο και των οικογενειών τους. Ο έλεγχος των συμπτωμάτων και η μη περαιτέρω παράταση της επιβίωσης, γίνεται ο μοναδικός στόχος προς επίτευξη. Δεν περιορίζεται σε ασθενείς τελικού σταδίου και γι' αυτό πρέπει να προβλεφθεί και να διοργανωθεί το συντομότερο όταν γίνει γνωστό ότι η ασθένεια είναι ανίατη. Έτσι, συχνά είναι συμπληρωματική επί μήνες ή χρόνια για να βελτιωθεί η ποιότητα ζωής του ασθενούς. Τα βασικά στοιχεία της παρηγορητικής φροντίδας των ασθενών με καρκίνο είναι: η συμπονετική επικοινωνία, η εξερεύνηση των αξιών και των στόχων της φροντίδας του ασθενούς και της οικογένειάς του, η ειδική προσοχή στην ανακούφιση του πόνου, η διαχείριση του πόνου, της κατάθλιψης και άλλων συμπτωμάτων, η συνειδητοποίηση των εκδηλώσεων της θλίψης και η ευαισθησία στις ανησυχίες των επιζώντων θυμάτων. Για έναν ασθενή με ανίατη ασθένεια, η φροντίδα στο σπίτι είναι η προτιμότερη επιλογή και ιδίως για τους ανθρώπους με μια τερματική ασθένεια, αφού τα οφέλη της είναι πολλά, όπως: η αίσθηση ομαλότητας, επιλογής και άνεσης και είναι πιο αποδοτική από ό, τι νοσοκομειακή περίθαλψη (V. & Suhag 2005).

2 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ TR4

2.1 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

2.1.1 Επιδράσεις των συμβατικών θεραπειών

Οι συνήθεις θεραπείες οι οποίες χορηγούνται σε ασθενείς με καρκίνο, ανεξαιρέτως του είδους του σταδίου και της ηλικίας, αναπόφευκτα οδηγούν σε αισθητές παρενέργειες στον ασθενή. Ακόμα και μήνες ή χρόνια μετά το τέλος της θεραπείας (Aron 2003). Η κόπωση είναι η πιο κοινή και επίμονη παρενέργεια της θεραπείας του καρκίνου (Denlinger et al. 2015; Pachman et al. 2012). Ο πόνος υφίσταται κατά τη στιγμή της διάγνωσης, κατά τη διάρκεια της ενεργού θεραπείας, αφότου η θεραπεία έχει λήξει, ακόμη και εάν ο καρκίνος δεν ξανά εμφανιστεί (van den Beuken-van Everdingen et al. 2007). Μια ακόμη σημαντική επίδραση είναι το λεμφοίδημα, πρήξιμο που προσβάλλει συνήθως τα χέρια ή τα πόδια και προκαλεί προβλήματα στην λειτουργία, πόνο, και επηρεάζει την εικόνα του σώματος. Προκύπτει από βλάβη σε τμήματα του λεμφικού συστήματος και εμποδίζει τη ροή του λεμφικού υγρού. Εμφανίζεται πιο συχνά στις γυναίκες υποβάλλονται σε θεραπεία για καρκίνο του μαστού. Οι ενδείξεις και τα συμπτώματα περιλαμβάνουν αίσθημα βάρους και δυσφορία, περιορισμένο εύρος της κίνησης και πρήξιμο (Lawenda et al. 2009).

Η έρευνα στον τομέα των στοχευμένων θεραπειών ενισχύθηκε και εξελίχθηκε κυρίως λόγω των πιο πάνω μειονεκτημάτων και επιδράσεων των συνήθη θεραπειών. Η στοχευμένη θεραπεία μικρών μορίων αποδίδει σε φαρμακολογικούς παράγοντες για να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες παρενέργειες (Wu et al. 2006).

2.1.2 Παραδείγματα προηγμένων στοχευμένων θεραπειών

Κάποιες βασικές τρέχον προηγμένες στοχευμένες θεραπείες οι οποίες έχουν αναπτυχθεί παρουσιάζονται πιο κάτω.

Η miRNA στοχευμένη θεραπεία

Τα miRNAs (micro RNAs) είναι μη-κωδικοποιημένα, μονόκλωνα RNA με περίπου 22 νουκλεοτίδια και αποτελούν μια νέα κατηγορία ρυθμιστών των γονιδίων. Έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν αρνητικά τους στόχους τους με δύο τρόπους, ανάλογα με το βαθμό της συμπληρωματικότητας μεταξύ του miRNA και του στόχου. Έχει δειχθεί ότι οι συνιστώσες των miRNA μηχανισμών εμπλέκονται στην ογκογένεση. Η έκφραση miRNA

έχει συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου, και πιστεύεται ότι αυτά τα γονίδια λειτουργούν τόσο ως καταστολείς όγκων όσο και ως ογκογονίδια. Η διαπύστωση του ρόλου των miRNAs ως σημαντικά γονίδια για την πρόληψη του καρκίνου έχουν μεγάλη επίδραση στις γονιδιακές θεραπείες που έχουν σχεδιαστεί για να μπλοκάρουν την εξέλιξη του όγκου. Μελλοντικά, η χορήγηση των συνθετικών anti-sense ολιγονουκλεοτιδίων, που κωδικοποιούν αλληλουχίες συμπληρωματικές σε ώριμα ογκογόνα miRNAs - ονομαζόμενα αντι-miRNA ολιγονουκλεοτίδια, μπορεί να αδρανοποιήσει αποτελεσματικά τα miRNAs στους όγκους και να επιβραδύνουν την ανάπτυξή τους (Esquela-Kerscher & Slack 2006).

Ενδοκρινική θεραπεία

Παράδειγμα ενδοκρινικής θεραπείας είναι το Tamoxifen για όγκους με υποδοχείς οιστρογόνου (estrogen receptors, ER). Η κατάσταση των κλινικοπαθολογικών παραγόντων, υποδοχέα οιστρογόνου (ER), υποδοχέα προγεστερόνης (progesterone receptor, PR) και human epidermal growth factor receptor 2 (Her2) παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τους ασθενείς και τους θεράποντες κλινικούς γιατρούς. Για παράδειγμα οι όγκοι οι οποίοι είναι ER αρνητικοί και οι Her2 καρκίνοι έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση. Έτσι ο εντοπισμός νέων θεραπευτικών στόχων στις ομάδες καρκίνου με κακή πρόγνωση είναι κρίσιμος, στην προσπάθεια για περαιτέρω βελτιώσεις στη θεραπεία (Zardawi et al. 2009).

Κυτταρικά μονοπάτια

Κάποια κυτταρικά μονοπάτια, τα οποία χρησιμοποιούνται από τα βλαστικά κύτταρα των ιστών έτσι ώστε να ελέγχεται η φυσιολογική αυτό-ανανέωση τους, μπορεί αυθόρμητα να απορρυθμιστούν με αποτέλεσμα το νεοπλαστικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Spillane & Henderson 2007). Έτσι, στοχεύοντας τα συγκεκριμένα κυτταρικά μονοπάτια τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή, η θεραπεία θα είναι πιο αποτελεσματική. Τα κυριότερα απ' αυτά παρουσιάζονται πιο κάτω.

(α) Το κυτταρικό μονοπάτι Hedgehog

Τα τρία ομόλογα του γονιδίου αυτού στα θηλαστικά τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί είναι τα: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) και Desert hedgehog (Dhh). Κάποιες άλλες μελέτες που έγιναν, εντόπισαν και άλλα μέλη του κυτταρικού μονοπατιού, τα οποία είναι επίσης ομόλογα του γονιδίου αυτού στα θηλαστικά όπως το patched (Ptch) και το smoothened (Smo). Οι ανωμαλίες στο κυτταρικό μονοπάτι Hedgehog σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη ανθρώπινων κακοηθειών. Από υπάρχοντα στοιχεία παρατηρείται

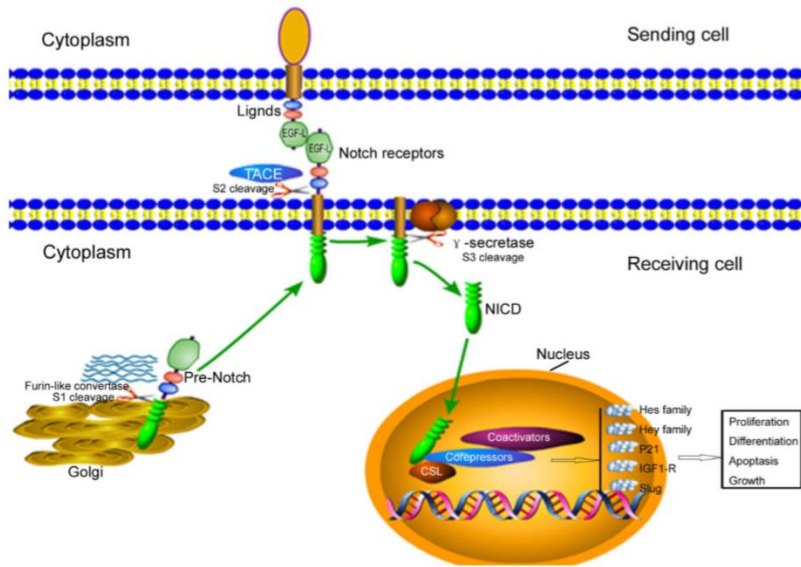
ότι οι ανωμαλίες αυτές παίζουν καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση του μαστού (Zardawi et al. 2009). Αυτό αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά με την ανακάλυψη ότι μια μετάλλαξη στο Ptc1 ήταν η αιτία του συνδρόμου Gorlin, ένα σπάνιο σύνδρομο που σχετίζεται με ανωμαλίες στο σκελετό στο δέρμα και στο νευρικό σύστημα (Hahn et al. 1996). Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι οι αυθόρμητες μεταλλάξεις Ptc1 αποτελούν τη βάση για την ανάπτυξη της πλειονότητας των σποραδικών καρκινωμάτων των μυοεπιθηλιακών κυττάρων (Undén et al. 1997).

(β) Το κυτταρικό μονοπάτι Wnt

Θεωρείται ένα πολύπλοκο κυτταρικό μονοπάτι, έχοντας κεντρικό ρόλο στην εμβρυϊκή σχηματοποίηση του ιστού (Daniel et al. 2006). Εμπλέκεται στην κυτταρική μετανάστευση, τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων και προγονικών κυττάρων σε πολλούς ιστούς, τις επιθηλιακές - μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις, την κυτταρική προσκόλληση (Nelson & Nusse 2004), και την καρκινογένεση (Polakis 2000). Οι ανωμαλίες στη σηματοδότηση Wnt εμπλέκονται σε πολλούς όγκους, ιδιαίτερα στο καρκίνωμα του μαστού και του παχέος εντέρου. Η απορρύθμιση του μονοπατιού Wnt στον καρκίνο του παχέος εντέρου συχνά οφείλεται σε μια απλή μετάλλαξη. Το μονοπάτι Wnt ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία τα οποία δείχνουν το ρόλο της ανώμαλης σηματοδότησης Wnt στην καρκινογένεση του μαστού (Zardawi et al. 2009).

(γ) Το κυτταρικό μονοπάτι Notch

Είναι ένα από τα σημαντικότερα κυτταρικά μονοπάτια και είναι το μόνο μονοπάτι που βασίζεται στην επαφή κυττάρου-κυττάρου. Τα γεγονότα ενεργοποίησης του κυτταρικού μονοπατιού Notch (Σχήμα 6), έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων (Guo et al. 2014).



Σχήμα 6: Η ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης Notch.

Η Notch σηματοδότηση διαδραματίζει βασικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη πολλών ιστών και τύπων κυττάρων, μέσω διαφόρων επιδράσεων στη διαφοροποίηση, την επιβίωση και / ή τον πολλαπλασιασμό που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό στην ισχύ του σήματος και το κυτταρικό πλαίσιο. Το κυτταρικό μονοπάτι Notch έχει τέσσερις μεγάλους υποδοχείς στα θηλαστικά (Notch 1-4), οι οποίοι είναι τύπου I διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αποτελούνται από πολλαπλά δομικά μοτίβα (Allenspach J. Eric, Maillard Ivan, Aster C. Jon 2002).

Οι διαταραχές των πιο πάνω λειτουργιών προωθούν τον κακοήγη μετασχηματισμό και τα παθοφυσιολογικά σήματα του Notch συμβάλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου με πολλούς διαφορετικούς τρόπους (Allenspach J. Eric, Maillard Ivan, Aster C. Jon 2002). Η εύρεση μιας χρωμοσωμικής μετατόπισης σ' έναν ασθενή με T-cell (thymocytes) οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, όπου η ανάπτυξη του όγκου ελεγχόταν ή επηρεαζόταν από τη σηματοδότηση Notch, ήταν ο αρχικός προτεινόμενος ρόλος της σηματοδότησης Notch στον καρκίνο (Ellisen et al. 1991).

Μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση των Notch πρωτεϊνών υποδοχέα και συνδέτη είναι υψηλότερη στους ιστούς του καρκίνου του μαστού σε σχέση με το φυσιολογικό επιθήλιο του μαστού. Ένας άλλος προτεινόμενος μηχανισμός για την ανώμαλη ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch στον καρκίνο του μαστού είναι η απώλεια του Notch-αρνητικού ρυθμιστή, Numb. Ο Numb ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση Notch προωθώντας την πολυουβικουϊτίνωση (προσθήκη ουβικιτίνης σε μια πρωτεΐνη υπόστρωμα) και τη λυσοσωμική

υποβάθμιση του ή ρυθμίζοντας την ενδοκυττάρωση του (ή και τα δύο), μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητά του στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου ανταποκρίνεται στην ενεργοποίηση του συνδέτη με επαγόμενη δέσμευση (McGill et al. 2009). Ο Numb απουσιάζει ή βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, περίπου 50% των δειγμάτων του καρκίνου του μαστού και αυτό οφείλεται στην αυξημένη πρωτεασωμική αποικοδόμηση (Pecce et al. 2004). Η υψηλή έκφραση Jagged1, συνδέτη του Notch-1 βρέθηκε να συσχετίζεται με την κακή κλινική έκβαση μέσω μηχανισμών διαφορετικών από την ενεργοποίηση της σηματοδότησης Notch και την προώθηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Sethi et al. 2011).

Ένα κίνητρο για έρευνα της αναστολής του κυτταρικού μονοπατιού Notch για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι ότι το μονοπάτι αυτό έχει προταθεί να διατηρεί τη βλαστική ικανότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού (Han et al. 2011), τα οποία είναι υπεύθυνα για την υποτροπή και τη μετάσταση των όγκων (Guo et al. 2014). Έχει αναφερθεί ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να ταυτοποιηθούν με φαινοτυπικούς δείκτες και η μοίρα τους ελέγχεται από το μονοπάτι Notch στον καρκίνο του μαστού (Phillips et al. 2007). Ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος για τη διαχείριση του καρκίνου παρέχεται μέσω του ρόλου που έχει η σηματοδότηση Notch στην παθοφυσιολογία του καρκίνου και των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Για παράδειγμα, η θεραπεία αναστολής είναι μια πολλά υποσχόμενη επιλογή για τη θεραπεία του καρκίνου, χάρις την υπερδραστήρια σηματοδότηση Notch σε διάφορους στερεούς όγκους, όπως η χρήση των αναστολών γ-σεκρετάσης ή αντισωμάτων έναντι του κυτταρικού μονοπατιού Notch (Guo et al. 2014).

2.2 Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ TR4

2.2.1 Η σημασία του κυτταρικού μονοπατιού Notch

Έχει αποδειχθεί ότι η αυξημένη έκφραση των γονιδίων Notch και των συνδετών τους εμφανίζεται σε πολλά ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα και ιστούς, όπως αυτά του παγκρέατος, του μαστού, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, των ωοθηκών και της λευχαιμίας και άλλα. Συμπερασματικά, η απενεργοποίηση της σηματοδότησης Notch θα έχει σημαντικό αντίκτυπο στη θεραπεία του καρκίνου. Οι τρέχουσες θεραπείες του καρκίνου, οι οποίες βασίζονται στην υποχώρηση του όγκου, μπορούν να στοχεύουν και να σκοτώνουν τα διαφοροποιημένα κύτταρα του όγκου ενώ παράλληλα προστατεύουν το σπάνιο πληθυσμό καρκινικών βλαστικών κυττάρων, ο οποίος πρέπει να θανατωθεί για να είναι επιτυχής η

θεραπεία. Το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων υποδεικνύει το σχεδιασμό νέων θεραπειών του καρκίνου οι οποίες να στοχεύουν και να εξαλείφουν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Έτσι το μονοπάτι Notch θεωρείται ελκυστικός στόχος για τη θεραπεία. Η μείωση της δραστηριότητας του Notch στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα προωθεί τη διαφοροποίησή τους, μειώνοντας έτσι την ικανότητά τους να ανασυστήσουν τα κύτταρα που σχηματίζουν τη μάζα του όγκου (Wang et al. 2008).

2.2.2 Ο ορισμός της φαρμακευτικής ουσίας TR4

Το TR4 είναι μια υβριδική πρωτεΐνη, η οποία παράχθηκε γενετικά και συνθετικά και αποτελείται από την συμπιγμένη εκδοχή της Mastermind-like (MAML) πρωτεΐνης, που συμπεριφέρεται με ένα κυρίαρχο αρνητικό τρόπο (DN), αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch, και το κύτταρο-διεισδυτικό πεπτίδιο Antennapedia (Antp). Αποτελέσματα έδειξαν ότι η στόχευση της σηματοδότησης Notch με το Antp-DNMAML μετατοπίζεται στον πυρήνα και καταστέλλει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η εξασθένηση της σηματοδότησης Notch με το ανασυνδυασμένο Antp-DNMAML επαναφέρει το μετασχηματισμένο φαινότυπο, αναστέλλει την ανάπτυξη που εξαρτάται από την προσκόλληση και επάγει την αναστολή επαφής του μορίου με τον εαυτό του και την απόπτωση σε ιδιαίτερα ογκογονικά επιθηλιακά ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού. Οι πιο σημαντικές αποδείξεις είναι ότι αυτή η αναστολή της σηματοδότησης Notch στο μεταγραφικό επίπεδο με την πρωτεΐνη Antp-DNMAML, καταστέλλει την έκφραση των μεταγενέστερων στόχων Notch καθώς επίσης επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει ή εξαλείφει την ανάπτυξη ανθρώπινου όγκου σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (nude) χωρίς να δημιουργείται τοξικότητα στο όργανο ή στο σύστημα. Η προσέγγιση της ενδοκυτταρικής διανομής των κυρίαρχων-αρνητικών πρωτεϊνών μεταγραφικού συμπλόκου χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Antp, είναι μια νέα και ειδική θεραπεία του καρκίνου.

Το TR4 έχει συντεθεί χημικά. Η σύνθεση έγινε σε 0,05 mmol κλίμακα με Rink Amide ChemMatrix resin (214 mg, 0,23 mmol / g loading) χρησιμοποιώντας 20 ισοδύναμα αμινοξέος και ενιαίου ζευγαριού στρατηγικής. oxyma pure και DIC (Disseminated intravascular coagulation) συνήθως χρησιμοποιούνται για την ενεργοποίηση των αμινοξέων πριν από την σύζευξη.

Η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης είναι :

MHHHHHHGSRKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIW
FQNRRMKWKKENGEFMALPRHSAVMERLRRRIELCRRHHSTCEARYEAVSPERLEL
ERQHTFALHQRCIQAKAKRAGKH

Μοριακό βάρος = 16983.57 κατάλοιπο αμινοξέων = 137

Μέσο βάρος καταλοίπων αμινοξέων (Average Residue Weight) = 123.968 φορτίο = 26.0

Ισοηλεκτρικό σημείο = 11.5599

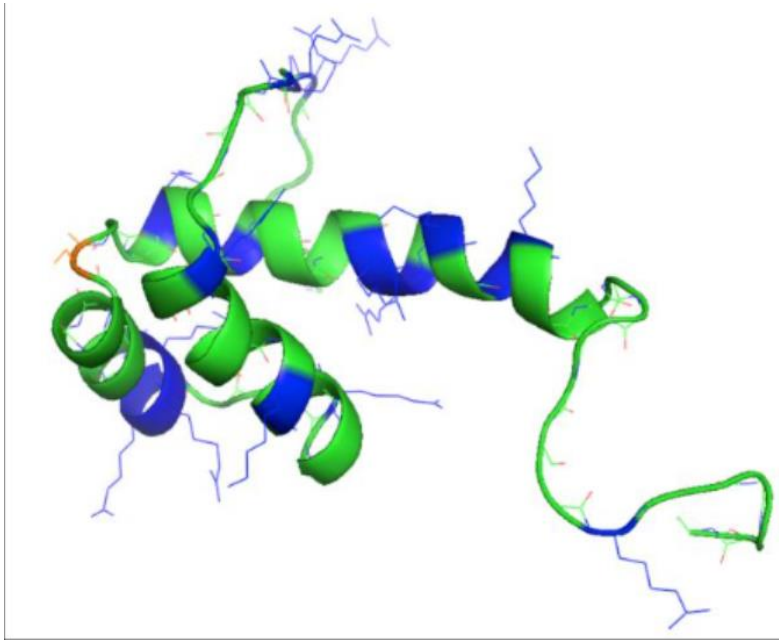
2.3 Η ΣΥΖΕΥΞΗ ΤΟΥ TR4

Οι μελέτες μοριακής μοντελοποίησης πραγματοποιήθηκαν για να προσδιοριστούν οι κατάλληλες θέσεις σύζευξης στο μόριο TR4 και για να εξασφαλιστεί η διατήρηση των δυνατοτήτων μεταφοράς της πρωτεΐνης σύντηξης στη μεμβράνη.

Το TR4 (πρωτεΐνη σύντηξης Antennapedia-MAML) είναι ένα πεπτίδιο 137 καταλοίπων, πλούσιο σε βασικά αμινοξέα. Τα θετικά φορτία επιτρέπουν την ένωση της μεμβράνη και διευκολύνουν τη λειτουργία της μετατόπισης.

MHHHHHHGSRKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIW
FQNRRMKWKKENGEFMALPRHSAVMERLRRRIELCRRHHSTCEARYEAVSPERLEL
ERQHTFALHQRCIQAKAKRAGKH

Η σύζευξη χρησιμοποιώντας το πρότυπο αμινοχημείας και αντίδρασης N-υδροξυηλεκτριμιδικού εστέρα (N-hydroxy succinimide) δεν ήταν εφικτή, καθώς αυτό αναμένεται να βλάψει τη λειτουργία μετατόπισης της μεμβράνης. Το TR4 περιέχει 24 κατάλοιπα αργινίνης και 9 υπολείμματα λυσίνης (μπλε) (Σχήμα 7). Η αλληλουχία TR4 χρησιμοποιήθηκε για να δημιουργήσει ένα ομόλογο μοντέλο για τη διερεύνηση της προσβασιμότητας της επιφάνειας των 4 καταλοίπων κυστεΐνης θειόλης (πορτοκαλί). Αυτό το μοντέλο πρότεινε ότι τουλάχιστον μία θειόλη ήταν ελεύθερη και αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν τη στρατηγική σύζευξης. Το μήκος κύματος διέγερσης των χρωμάτων που χρησιμοποιούνται στην απεικόνιση πρέπει να είναι γύρω στα 650nm με προφίλ απορρόφησης γύρω στα 650-700 nm.



Σχήμα 7: Το μοντέλο της πρωτεΐνης TR4.

Ένα εύρος από φθορίζουσες χρωστικές παρασκευάστηκαν, με μηλεϊμίδιο (maleimide) ομάδες κατάλληλες για βιοσύζευξη στις θειόλες του μορίου TR4. Μια φθορίζουσα χρωστική (Cy5.5) επιλέχθηκε τελικά με κορυφή απορρόφησης στην περιοχή του ερυθρού (600 - 650 nm) και κορυφή εκπομπής στην περιοχή του μακρινού ερυθρού (> 650 nm) του φάσματος. Το TR4 ήταν βιοσυζευγμένο και καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας ιδιόκτητες μεθόδους, οι οποίες εξασφαλίζουν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης και αποφεύγεται η υπερβολική συνάθροιση. Στη συνέχεια, αυτά τα καθαρισμένα προϊόντα σύζευξης διερευνήθηκαν προκειμένου να καθοριστεί εάν έχουν διατηρήσει τη λειτουργία τους και έτσι είναι κατάλληλα για τις *in vivo* μελέτες απεικόνισης.

2.4 IN VIVO ΜΟΝΤΕΛΑ ΖΩΩΝ

Την δεκαετία του 1950 ξεκίνησε η επιστήμη των προκλινικών μοντέλων για τις θεραπείες του καρκίνου. Η ερευνητική ομάδα με επικεφαλής τον Howard Skipper θέσπισε τις κατευθυντήριες γραμμές για την πειραματική ποιότητα και την αυστηρότητα του τελικού σημείου. Στα μέσα της δεκαετίας του 1960, αυτή η ομάδα δημοσίευσε τα κριτήρια της "θεραπευσιμότητας", την κινητική συμπεριφορά των λευχαιμικών κυττάρων σε ποντίκια και τις επιπτώσεις της αντικαρκινικής χημειοθεραπείας. Οι αρχές που προτείνονται στις δημοσιεύσεις προήλθαν από τη συμπεριφορά των βακτηριακών κυτταρικών πληθυσμών, οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και βασίστηκαν στα πειραματικά

αποτελέσματα σε μοντέλα λευχαιμίας ποντικών (Pittillo et al. 1965; Wilcox et al. 1966; Skipper 1979; Skipper 1971b; Skipper 1971a; Skipper 1974). Στη συνέχεια, οι ερευνητές μετά από προσπάθεια να μοντελοποιήσουν στερεούς όγκους σε μοντέλα, κατάφεραν να αναπτύξουν μια ποικιλία από αυτούς (Teicher 2006).

Τα μοντέλα συγγενικών όγκων, όπου ο όγκος του ποντικού μεγαλώνει σε ποντίκια του γένους από τα οποία προέρχεται ο όγκος. Είναι οξίδια που μεγαλώνουν σε μη φυσικές περιοχές (υποδόρια) και παρουσιάζουν τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Έρχονται σε μια ευρεία ποικιλία τύπων όγκου, είναι σχετικά χαμηλού κόστους και αναπαραγώγιμα, αναπτύσσονται σε ξενιστές με φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα και είναι γενικά μη ανοσογόνα. Το κύριο μειονεκτήματα των μοντέλων συγγενικών όγκων είναι ότι τα κύτταρα του όγκου είναι από τρωκτικά και εκφράζουν τα ομόλογα ποντικού / αρουραίου των επιθυμητών στόχων, και οι όγκοι τείνουν να αυξάνονται γρήγορα (Teicher 2006).

Τα ξενομοσχεύματα ανθρώπινου όγκου, τα οποία ήταν ένα μεγάλο βήμα για τη μετάβαση προς τα πιο κλινικά σχετικά μοντέλα όγκων και είναι οξίδια που μεγαλώνουν σε μη φυσικές περιοχές(υποδόρια) και παρουσιάζοντας κάποια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Αρχικά, τα κακοήθη κύτταρα είναι ανθρώπινα, πολλά απ' αυτά τα μοντέλα είναι αρκετά αναπαραγώγια και υπάρχει μια ευρεία ποικιλία των διαθέσιμων γραμμών όγκου, και έτσι υπάρχει μια ισχυρή γραμμή βάσης των δεδομένων απόκρισης του φαρμάκου. Τα μειονεκτήματα είναι ότι αυτά τα μοντέλα είναι πιο δαπανηρά στην λειτουργία από τα μοντέλα συγγενικών όγκων, το στρωματικό συστατικό των όγκων είναι από τρωκτικό και οι οικοδεσπότες είναι ανοσοανεπαρκείς (Teicher 2006).

Οι ερευνητές έχουν εξελίξει τα υποδόρια εμφυτεύματα σε εμφύτευση συγγενικών όγκων και ξενομοσχευμάτων ανθρώπινου όγκου στην ορθοτοπική θέση των πρωτογενών όγκων από τα οποία προέρχονται οι γραμμές όγκων. Τα πλεονεκτήματα αυτών μοντέλων είναι ότι η ανάπτυξη του όγκου γίνεται στον ιστό προέλευσης του πρωτογενούς τύπου όγκου, υπάρχει κάποια ποικιλία στις γραμμές όγκου και οι ξενιστές είναι άμεσα διαθέσιμα. Τα μειονεκτήματα του ορθοτοπικού μοντέλου ξενομοσχεύματος ανθρώπινου όγκου είναι ότι οι χειρουργικές επεμβάσεις είναι συχνά πολύπλοκες, τα μοντέλα είναι πιο δαπανηρά, το στρώμα είναι ακόμα από τρωκτικό και οι ξενιστές είναι συχνά ανοσοανεπαρκείς. Επίσης, η ανάπτυξη του όγκου και η απόκριση είναι δύσκολο να ακολουθηθούν και έτσι τα στατιστικά στοιχεία είναι δύσκολα (Bibby 2004).

Επιπλέον, οι συγγενικοί όγκοι καθώς και οι ανθρώπινοι όγκοι ξενομοσχεύματος μπορούν να καλλιεργηθούν ως διαδιδόμενη νόσος είτε από μία πρωτογενή εμφύτευση του όγκου ή με μια ενδοκαρδιακή ένεση των κυττάρων του όγκου. Τα πλεονεκτήματα του μοντέλου διαδιδόμενης νόσου είναι ότι η πρότυπο νόσος μοιάζει περισσότερο με το κλινικό πρόβλημα επειδή τα κύτταρα όγκου κατευθύνονται στις μεταστατικές θέσεις, οι ξενιστές είναι άμεσα διαθέσιμοι και υπάρχει μια καλή ποικιλία τύπων όγκων που μπορούν να εφαρμοστούν σε αυτό το μοντέλο. Τα μειονεκτήματα είναι ότι το εμφύτευμα του όγκου απαιτεί είτε μια εκτομή του πρωτογενούς όγκου ή ενδοκαρδιακή ένεση των κυττάρων του όγκου γεγονός το οποίο είναι δύσκολο, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται χαμηλοί αριθμοί ποντικών ανά μελέτη. Επίσης, το στρώμα είναι από τρωκτικό και η ανάπτυξη και η απόκριση της νόσου είναι δύσκολο να ακολουθηθεί και έτσι τα στατιστικά στοιχεία είναι δύσκολα (Bibby 2004).

Τα 'επισημασμένα' μοντέλα όγκων αναπτύχθηκαν από τους ερευνητές για να είναι εφικτή η παρακολούθηση της ορθοτοπικής και μεταστατικής / διαδιδόμενης κακοήθους νόσου (Hoffman 2001). Τα μοντέλα αυτά τα περιλαμβάνουν την ανάπτυξη των γραμμών όγκου, οι οποίες φέρουν μια ξένη πρωτεΐνη, όπως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescence Protein, GFP), κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Red Fluorescence Protein RFP), ή λουσιφεράση. Τα κύρια πλεονεκτήματα αυτών των μοντέλων είναι ότι η πρόοδος / απόκριση του όγκου μπορεί να παρακολουθείται με κάποια μορφή απεικόνισης, η μετάσταση μπορεί να απεικονιστεί και τα εσωτερικά οζίδια του όγκου μπορούν (Hoffman 2002). Τα κύρια μειονεκτήματα είναι ότι οι περισσότερες γραμμές όγκου είναι κλωνικές, οι οποίες είναι τροποποιημένα κύτταρα από την αρχική γραμμή όγκου, οι κλωνικές υπο-γραμμές πιθανόν να αναπαραστούν λανθασμένα την αρχική νόσου και η απεικόνιση της νόσου απαιτεί δαπανηρό εξοπλισμό (Teicher 2006).

Ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές γραμμές καθώς και καρκινικές κυτταρικές γραμμές από τρωκτικά αναπτύχθηκαν οι οποίες εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη GFP και παράγουν μεταστατικό καρκίνο όταν καλλιεργούνται σε τρωκτικά. Ο φθορισμός από τα κύτταρα του όγκου οπτικοποιήθηκε εξωτερικά με τη χρήση ποσοτικής απεικόνισης φθορισμού ολόκληρου σώματος (Hoffman 2002; Hoffman 2001). Ακολούθως αναπτύχθηκαν τα διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν την GFP και περιλαμβάνουν όγκους που προκύπτουν από γενετικά τροποποιημένους ξενιστές. Το κύριο πλεονέκτημα αυτών των μοντέλων είναι ότι ο όγκος προκύπτει " φυσικά " στον ξενιστή και μπορεί να ακολουθείται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα κύρια μειονεκτήματα η αναπαραγωγή και διατήρηση μιας αρκετά μεγάλης

αποικίας έτσι ώστε να δημιουργήσει επαρκή αριθμό των ποντικών στην ίδια ηλικία / φύλο μπορεί να είναι πολύ δαπανηρή, οι όγκοι προκύπτουν σε μεταβλητά στάδια ζώων σε ζώα και οζίδιο σε οζίδιο και οι όγκοι είναι δύσκολο να ακολουθηθούν. Αυτά τα μοντέλα είναι πιο χρήσιμα για τη μελέτη της βιολογίας των υπερπολλαπλασιαστικών / κακοήθων κυττάρων απ'ότι για την ανακάλυψη φαρμάκων (Teicher 2006).

2.4.1 *In vivo* μοντέλα ζώων για τον καρκίνο του μαστού

Το BOM μοντέλο

Οι μελέτες για τον καρκίνο του μαστού εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα των πειραματικών μοντέλων ζώων. Λόγω του ότι η μετάσταση είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο του μαστού, δίνεται περισσότερη προσοχή στους μηχανισμούς της εξέλιξης και της μετάστασης του καρκίνου του μαστού (Chambers et al. 2002). Ένα ιδανικό μοντέλο του καρκίνου του μαστού δεν απαιτείται μόνο να μιμηθεί την όλη διαδικασία της εξέλιξης του όγκου και της μετάστασης, αλλά να παράσχει ένα φυσιολογικό ανθρώπινο μαστικό μικροπεριβάλλον για τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού για να πολλαπλασιαστούν και να κάνουν μετάσταση (Wang et al. 2010). Αρκετά μοντέλα ποντικών του καρκίνου του μαστού έχουν δημιουργηθεί για τη μελέτη των μηχανισμών του καρκίνου του μαστού, όπως τα ενδοκαρδιακά / ενδοφλέβια μοντέλα, τα υποδόρια μοντέλα, τα μοντέλα μαστικού στρώματος λίπους ποντικού και το μοντέλο χειρουργικής ορθοτοπικής εμφύτευσης, αλλά δεν κατάφεραν να επιτύχουν ταυτόχρονα τις δύο απαιτήσεις (Ottewell et al. 2006).

Ένα νέο ιστό-προερχόμενο από ανθρώπινο μαστό, ορθοτοπικό και μεταστατικό μοντέλο ποντικού του καρκίνου του μαστού (bone-only metastasis, BOM) αναπτύχθηκε, στο οποίο οι φυσιολογικοί ανθρώπινοι ιστοί μαστού εμφυτεύθηκαν υποδορίως για να δημιουργήσουν ένα φυσιολογικό ανθρώπινο μαστικό μικροπεριβάλλον. Ακολούθως, τα ανθρώπινα κύτταρα του καρκίνου του μαστού εμβολιάστηκαν μέσα στα εμφυτεύματα. Το μοντέλο αυτό, μιμείται όλες τις διαδικασίες της εξέλιξης και της μετάστασης του όγκου καθώς επίσης επιτρέπει στα ορθοτοπικά ανθρώπινα κύτταρα του καρκίνου του μαστού να πολλαπλασιάζονται στο φυσιολογικό ανθρώπινο μαστικό μικροπεριβάλλον, και τελικά να κάνει μεταστάσεις κατά προτίμηση σε απόμακρους ανθρώπινους ιστούς (Wang et al. 2010).

Το NSG μοντέλο

Ένα νέο *in vivo* μοντέλο χρησιμοποιεί ανθρώπινα ξενομοσχεύματα καρκίνου του μαστού σε γένος NOD scid gamma ποντικών (NSG). Τα ανθρώπινα κύτταρα του καρκίνου του μαστού κάνουν μεταστάσεις με αξιοπιστία σε απομακρυσμένα όργανα από πρωτογενείς όγκους που καλλιεργούνται εντός του μαστικού στρώματος λίπους. Έτσι, επιτρέπεται η μελέτη της όλης μεταστατικής διαδικασίας από την κατάλληλη ανατομική θέση, παρέχοντας μια σημαντική νέα προσέγγιση για την εξέταση των μηχανισμών στους οποίους βασίζεται η μετάσταση του καρκίνου του μαστού. Επίσης, προσδιορίζονται οι αλλαγές της έκφρασης γονιδίου, οι οποίες συμβαίνουν σε μεταστατικές θέσεις σε σχέση με το πρωτογενή όγκο μαστικού στρώματος λίπους. Συγκρίνοντας τις πολλαπλές μεταστατικές τοποθεσίες και τις ανεξάρτητες κυτταρικές γραμμές, έχουν εντοπιστεί αρκετές αλλαγές έκφρασης του γονιδίου που μπορεί να είναι σημαντικές για την ανάπτυξη του όγκου σε απομακρυσμένες θέσεις. Αυτό το μοντέλο διευκολύνει την καλύτερη κατανόηση των θεμελιωδών μηχανισμών που διέπουν τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού, η οποία μπορεί τελικά να οδηγήσει σε σημαντική θεραπευτική πρόοδο (Iorns et al. 2012).

3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα MDA-MB-231 (ATCC-HTB-26 - non GFP, Middlesex, United Kingdom) είναι μια καρκινική κυτταρική γραμμή, ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του μαστού. Τα καρκινικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο (complete medium) το οποίο περιείχε DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, Gibco, Paisley, UK), 10% FBS (Fetal bovine serum, Gibco, Paisley, UK), 1% pen/strep (penicillin Streptomycin, Gibco, Paisley, UK), 0.02% normocin (InvivoGen, San Diego, California).

Οι φλάσκες επωάζονταν σε συνθήκες 37°C, 5% CO₂ και 95% υγρασία (CO₂ incubator CB-150, BINDER), και όλες οι διαδικασίες χειρισμού των κυττάρων λάμβαναν χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής (Biological Safety Hood, Class II, NuAire, Plymouth, USA) σε ασηπτικές συνθήκες. Για την ανακαλλιέργεια κυττάρων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πλύση των κυττάρων με PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco, Paisley, UK). Για το διαχωρισμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θρυψίνη (0.25% Trypsin EDTA, Gibco, Paisley, UK) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 λεπτά για να επιτευχθεί ο πλήρης διαχωρισμός τους. Ακολούθως, προστέθηκε θρεπτικό μέσο (complete medium) ίσου όγκου με της θρυψίνης και έγινε φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 1200rpm (στροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το τέλος της φυγοκέντρησης, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα κυττάρων προστέθηκε θρεπτικό μέσο (complete medium). Τα κύτταρα διαχωρίστηκαν στις αντίστοιχες φλάσκες οι οποίες περιείχαν θρεπτικό μέσο (complete medium) και τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα.

3.2 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

3.2.1 Μελέτη της επιλεκτικής συγκέντρωσης του TR4 στα καρκινικά κύτταρα

Για να προσδιοριστεί ο εντοπισμός της συντηγμένης πρωτεΐνης TR4, διεξήχθηκε ανοσοβαφή σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 (ATCC-HTB-26 - non GFP, Middlesex, United Kingdom). Αρχικά, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε υπο-πληρότητα σε 37 °C & 5% CO₂ σε 8-φρεατίων γυάλινων πλακιδίων θάλαμο LabTek II (NUNC, St. Louis, USA). Στη συνέχεια, τα προσκολλημένα κύτταρα πλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν με την πρωτεΐνη σύντηξης TR4 σε θρεπτικό μέσο χωρίς

ορό σε συγκέντρωση 50 μ M (MicroMolar) για 3 διαφορετικά χρονικά σημεία 1 ώρα, 2 ωρών και 3 ωρών, (λόγω της εξαιρετικά υψηλής δόσης που προτείνεται από προηγούμενα πειράματα, συμπεριλήφθηκε επίσης ένα δείγμα συγκέντρωσης 10 μ M για 20 λεπτά χρόνος επώασης). Ακολούθως τα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με PBS και σταθεροποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεΐδη για 15 λεπτά. Μετά από σύντομες πλύσεις, τα δείγματα έγιναν διαπερατά με τη χρήση PBS / 3% tween 20 (Fisher Scientific, Paisley, UK) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πλύθηκαν με PBS / 0.1% tween 20 και επώαστηκαν με διάλυμα μπλοκαρίσματος 3% BSA (Bovine Serum Albumin, BioLabs, Ipswich, USA) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα πλύθηκαν και επώαστηκαν με το αρχικό αντίσωμα Penta-His (Anti-Pentahistidine, Qiagen) με αραιώση 1:100 σε 0.1 mg/ml για 1 ώρα στο σκοτάδι και πλύθηκαν 3 φορές με PBS / 0.1% tween 20. Στη συνέχεια, προστέθηκε το FITC (Fluorescein isothiocyanate, Sigma, St. Louis, USA) - συζευγμένο δευτερογενές αντίσωμα στα δείγματα σε αραιώση 1 500 για 1 ώρα στο σκοτάδι. Παρατηρήθηκε φθορισμός με μικροσκόπιο φθορισμού (Leica Microscopy DMLM, Leica DMLM LAS core software LASV4 20x/0.50, New York Microscope Co, Hicksville, USA) και χρησιμοποιήθηκε vectashield (Mounting Medium For Fluorescence, Vector, Burlingame, USA) περιέχοντας PI (Propidium Iodide, Vector, Burlingame, USA) σαν μέσο στήριξης. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με τη χρήση του μικροσκοπίου Leica DMLM και επεξεργάστηκαν με το LAS core software LASV4. Ο φακός που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20x/0.50 (PL FLUOTAR). Οι εικόνες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τη χρήση του λογισμικού ImageJ 1.47V.

3.2.2 Μελέτη της τοξικότητας (κυτταρικός θάνατος λόγω απόπτωσης) του TR4

Εφαρμόστηκαν σειριακές αραιώσεις TR4 σε PBS στα κύτταρα και συγκρίθηκαν με τον GSI-1 αναστολέα (γ -secretase inhibitors). Μετά από 72 ώρες, μια δοκιμασία MTT διεξήχθη σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού, MDA-MB-231 (ATCC-HTB-26 non GFP, Middlesex, United Kingdom) προστέθηκαν για καλλιέργεια σε πυκνότητα 5,000 κύτταρα/φρεάτιο σε 100 μ L σ' ένα 96-φρεατίων πιάτο μέχρι την απαραίτητη πληρότητα. Κάθε δείγμα και δείγμα ελέγχου (control samples) που προστέθηκε στα κύτταρα, εφαρμόστηκε και σε 2 επιπλέον φρεατία για καλύτερα στατιστικά αποτελέσματα και επώαστηκαν για 72 ώρες σε συνθήκες χωρίς ορό. Όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν για τη βιωσιμότητα χρησιμοποιώντας το kit δοκιμασίας MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Sigma, St. Louis, USA). Λεπτομερώς, οι καλλιέργειες απομακρύνθηκαν από τον επωαστήρα σε στρωτή ροή και

προστέθηκε ασηπτικό διάλυμα MTT σε ποσότητα ίση με το 10% του όγκου της καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες επεστράφησαν στον επωαστήρα και επώαστηκαν για 3 ώρες. Μετά την περίοδο επώασης, οι καλλιέργειες αφαιρέθηκαν από τον επωαστήρα και οι προκύπτοντες κρύσταλλοι MTT φορμαζάνης διαλύθηκαν ως εξής: ο MTT διαλύτης προστίθεται σε ποσότητα ίση προς τον αρχικό όγκο καλλιέργειας. Η απορρόφηση μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 570 nm και απ' αυτή αφαιρέθηκε η απορρόφηση υποβάθρου στα 690nm. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Ακολούθως τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό GraphPad Prism, version 6.07. Επίσης χρησιμοποιήθηκε 0.1% DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) για δείγμα ελέγχου (control samples). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με τη χρήση του μικροσκοπίου Olympus CKX41SF. Ο φακός που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10x/20.

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις ουσιών για το πείραμα ελέγχου του κυτταρικού θανάτου

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν						
TR4	0.1 μ M	0.5 μ M	1 μ M	2 μ M	5 μ M	10 μ M
GSI-αναστολέας	0.1 μ M	0.5 μ M	1 μ M	2 μ M	5 μ M	10 μ M

3.3 *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Βιοσυστημάτων (BioLISYS) το οποίο είναι πλήρως αδειοδοτημένο και πιστοποιημένο από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες Κύπρου (αρ. άδειας υποστατικού: CY.EXP.108) για τη διεξαγωγή ελεγχόμενων πειραμάτων σε ποντίκια. Όλες οι διαδικασίες που αφορούν τα πειραματόζωα πραγματοποιήθηκαν από το ειδικά εκπαιδευμένο και αδειοδοτημένο ερευνητικό προσωπικό του εργαστηρίου. Τα πειραματικά πρωτόκολλα έχουν εγκριθεί από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες (αρ. άδειας σχεδίου: CY/EXP/PR.L1/2015) και υλοποιήθηκαν σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές και διεθνείς οδηγίες (οδηγία 2010/63 / ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου, Οδηγός Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας (NIH) για τη Φροντίδα και Χρήση των ζώων Εργαστηρίου).

Για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν, θηλυκά CD1 nude (γενετικά τροποποιημένα - κατεσταλμένου ανοσοποιητικού συστήματος) ποντίκια, βάρους 25 \pm 5 g (12-16 weeks old),

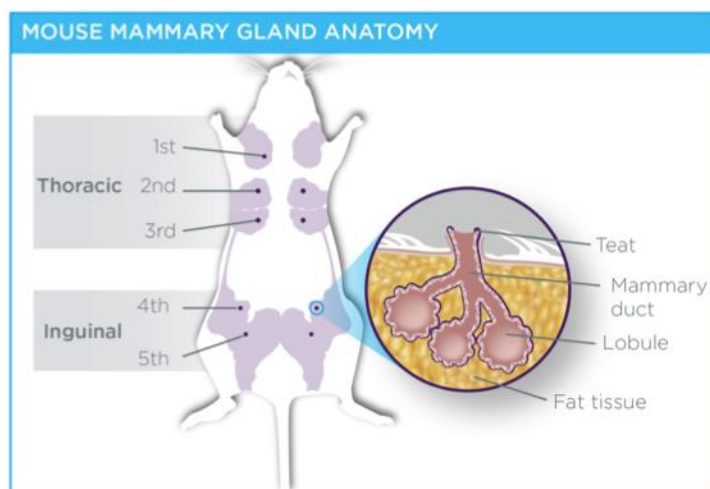
τα οποία εκτρέφονται από το Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου. Τα ποντίκια φυλάσσονταν σε ειδικό σύστημα κλωβών σε ελεγχόμενο περιβάλλον με σταθερή θερμοκρασία ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), σχετική υγρασία ($60\pm 10\%$) και 12ωρο κύκλο ημέρας-νύκτας.

3.3.1 Μελέτη της βιοκατανομής του TR4 σε υγιή ποντίκια (bio-distribution assay)

Η *in vivo* μελέτη βιοκατανομής πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της φαρμακευτικής ουσίας TR4-Cy-5.5 στην κυκλοφορία των υγιών ποντικών. Η ενέσιμη χορήγηση έγινε ενδοφλέβια σε φλέβα της ουράς. Χρησιμοποιήθηκε το *in vivo* σύστημα κυτταρομετρίας ροής και τα ποντίκια παρακολούθηθηκαν σε χρονικές περιόδους 2 ώρες και 24 ώρες μετά την ενέσιμη χορήγηση του φαρμάκου. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με τη χρήση του *in vivo* συστήματος απεικόνισης φθορισμού.

3.3.2 Ενέσιμη χορήγηση καρκινικών κυττάρων στα ποντίκια (Injections)

Για την δημιουργία ορθοτοπικού μοντέλου καρκίνου του μαστού στα ποντίκια, πραγματοποιήθηκαν υποδόριες ενέσιμες χορηγήσεις SCL-C018-GFP MDA-MB-231 κυττάρων στην 4η θηλή στην αριστερή πλευρά των ποντικών (Σχήμα 8). Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν σε συνθήκες 3% isoflurane (αναισθητικό εισπνοής) και 1,5% οξυγόνο για 1 λεπτό και 2% isoflurane και 1,5% οξυγόνο για 3 λεπτά. Στη συνέχεια και μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία των ενέσιμων χορηγήσεων η παροχή της αναισθησίας γινόταν μέσω ειδικής κατασκευής, η οποία εφαρμοζόταν στο κεφάλι και οι συνθήκες ήταν 1,5% isoflurane και 1% οξυγόνο.



Σχήμα 8: Η ανατομία του μαστικού αδένου του ποντικιού, (<http://aegiscreative.com/wp-content/uploads/2013/11/Figure-1B.png>).

3.3.3 Μελέτη της επίδρασης του TR4 σε ορθοτοπικά μοντέλα καρκινικών όγκων

Αφού χορηγήθηκαν ορθοτοπικά τα καρκινικά κύτταρα στο μαστό, τα ζώα διατηρήθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες για κάποιο χρονικό διάστημα (περίπου 10 με 14 ημέρες) μέχρι να αναπτυχθούν πλήρως οι όγκοι. Καθόλη τη διάρκεια λαμβάνονταν μετρήσεις για το βάρος των ζώων και τις εξωτερικές διαστάσεις των καρκινικών όγκων με χρήση βερνιέρου. Για τον υπολογισμό του όγκου χρησιμοποιήθηκε η σχέση: Συνολικός όγκος = $[\text{μήκος} \times (\text{πλάτος})^2]/2$ (Euhus et al. 1986; Tomayko & Reynolds 1989). Όταν η ανάπτυξη των όγκων ήταν ικανοποιητική ($>50\text{mm}^3$), χορηγήθηκε ενδοφλέβια η θεραπευτική ουσία TR4 σε συγκέντρωση 4 mg/kg ανά 200μl PBS. Η χορήγηση του φαρμάκου δεν ήταν επαναληπτική.

3.4 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί αύξηση στον αριθμό και στις εφαρμογές των διάφορων τεχνολογιών απεικόνισης, αφού η απεικόνιση είναι πλέον απαραίτητο εργαλείο στην έρευνα για τον καρκίνο, τις κλινικές δοκιμές και την ιατρική πρακτική. Τα συστήματα απεικόνισης συνήθως ομαδοποιούνται ανάλογα με την ενέργεια που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή οπτικής πληροφορίας, τη χωρική ανάλυση που λαμβάνεται και το είδος των πληροφοριών που λαμβάνονται (Condeelis & Weissleder 2010).

Τα μακροσκοπικά συστήματα απεικόνισης, τα οποία παρέχουν ανατομικές και φυσιολογικές πληροφορίες βρίσκονται τώρα σε ευρεία κλινική και προκλινική χρήση, όπως η αξονική τομογραφία, η μαγνητική τομογραφία και το υπερηχογράφημα. Αντιθέτως, τα συστήματα μοριακής απεικόνισης είναι είτε σε κλινικές χρήσεις, όπως η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων, η μονοφωτονιακή τομογραφία εκπομπής ή σε πειραματική χρήση, όπως η απεικόνιση και η τομογραφία φθορισμού, η απεικόνιση βιοφωταύγειας, το ομοεστιακό οπτικό μικροσκόπιο και η πολυφωτονική μικροσκοπία. Τα συστήματα μοριακής απεικόνισης επιτρέπουν την οπτικοποίηση του όγκου ο οποίος βρίσκεται στο σώμα, αλλά επίσης και την απεικόνιση της έκφρασης και τη δραστηριότητα συγκεκριμένων μορίων, κυττάρων και βιολογικών διεργασιών, οι οποίες επιρεάζουν τη συμπεριφορά του όγκου ή / και την ανταπόκριση σε θεραπευτικά φάρμακα (Condeelis & Weissleder 2010).

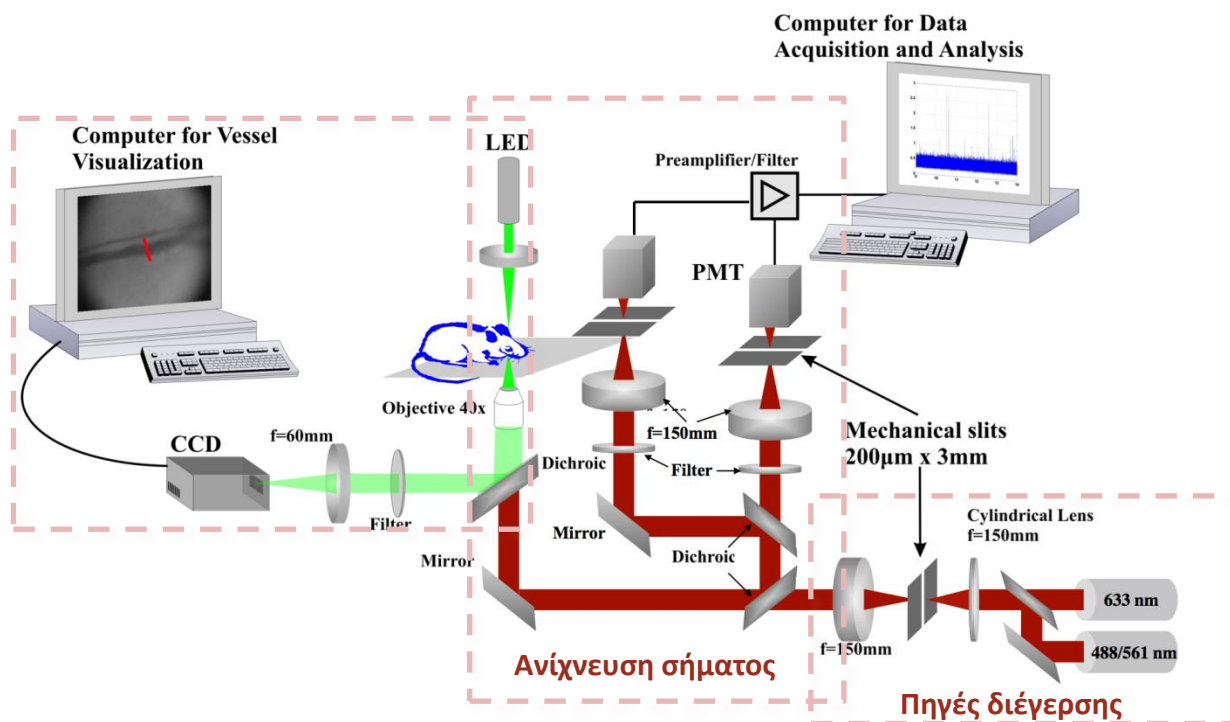
In vivo σύστημα κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής αναδείχθηκε ένα θεμελιώδες εργαλείο των βιολογικών ανακαλύψεων. Λόγω του ότι η επεμβατική εξαγωγή των κυττάρων από ένα ζωντανό οργανισμό, πιθανόν να οδηγήσει σε αλλαγές των ιδιοτήτων των κυττάρων και εμποδίζει τη

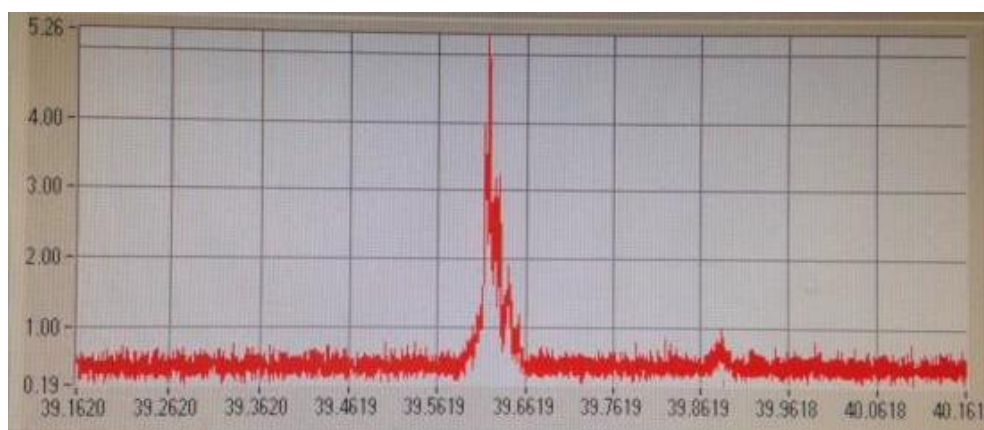
μελέτη των κυττάρων στο φυσιολογικό τους περιβάλλον, χρησιμοποιείται η *in vivo* κυτταρομετρία ροής, η οποία ανιχνεύει και απεικονίζει άμεσα τα κυκλοφορούντα φυσιολογικά και μη φυσιολογικά κύτταρα στη ροή αίματος ή λέμφου (Tuchin et al. 2011). Η *in vivo* ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των σπάνιων κυκλοφορούντων κυττάρων είναι σημαντική για την έγκαιρη διάγνωση πολλών ασθενειών, ή ακόμα και για τη μελέτη της επίδρασης των διαφόρων παρεμβάσεων σε μεμονωμένα κύτταρα. Για παράδειγμα, για να κατανοηθεί ο μηχανισμός της ανάπτυξης της μετάστασης, είναι σημαντικό να παρακολουθείται η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και η αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα (Rabindra Tirouvanziam, Daisy Diaz, Yael Gernez, Julie Laval, Monique Crubezy 2011; Tuchin et al. 2009).

Στην παρούσα εργασία, έγινε χρήση του *in vivo* συστήματος κυτταρομετρίας ροής, το οποίο αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Βιοσυστημάτων (Biomechanics and Living Systems Analysis - Biolisys (Σχήμα 9). Το σύστημα επέτρεψε τη μη επεμβατική παρακολούθηση της φθορίζουσας φαρμακευτικής ουσίας TR4 Cy5 στην κυκλοφορία, για μια παρατεταμένη χρονική περίοδο, και την εξαγωγή ποσοτικών πληροφοριών στην κινητική κυκλοφορίας της ουσίας σε ποντίκια. Η βασική αρχή της λειτουργίας του *in vivo* συστήματος κυτταρομετρίας ροής είναι η συνεστιακή διέγερση και ανίχνευση των φθορίζον σημασμένων κυττάρων στην κυκλοφορία (Novak J., Georgakoudi I., Wei X., Prossin A. 2013; Pitsillides et al. 2011; Fan et al. 2010).

Το φως από ένα λέιζερ ηλίου-νέου (He-Ne 632,8 nm) χρησιμοποιείται για να διεγείρει τα μόρια της φθορίζουσας επισημασμένης φαρμακευτικής ουσίας TR4 Cy5, η οποία περνά μέσω της σχισμής διέγερσης που εστιάζεται σε όλο επιλεγμένο αιμοφόρο αγγείο στο αντί του αναισθητοποιημένου ζώου. Το σήμα φθορισμού (680nm - κόκκινο) ανιχνεύεται συνεστιακά από ένα φωτοπολλαπλασιαστή σωλήνα (photomultiplier tube - PMT) και ψηφιοποιείται σε πραγματικό χρόνο για περαιτέρω ανάλυση. Οι αλγόριθμοι οι οποίοι βασίζονται στη Matlab χρησιμοποιούνται για την ανάλυση και την ποσοτικοποίηση των κορυφών σήματος (Σχήμα 10) που αντιστοιχούν στην κυκλοφορία των φθορίζον μορίων και για την εξαγωγή ποσοτικών πληροφοριών σχετικά με τη ρευστότητα των κυττάρων που διέρχονται από το κανάλι ανίχνευσης (κυτταρική ροή ανά λεπτό) (Karnisis et al. 2016).



Σχήμα 9: Η διάταξη του *in vivo* συστήματος κυτταρομετρίας ροής.



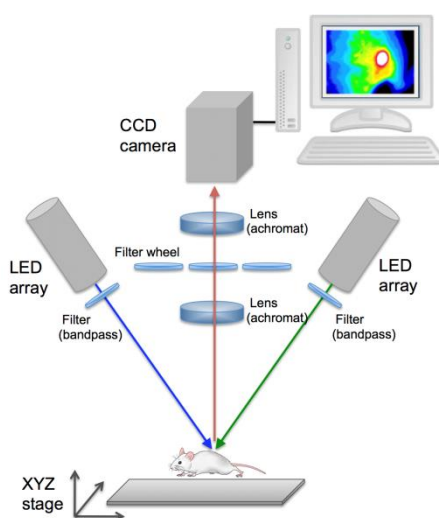
Σχήμα 10: Η ανίχνευση κυκλοφορούντων κυττάρων φθορισμού χρησιμοποιώντας το *in vivo* σύστημα κυτταρομετρίας ροής. Οι κορυφές σήματος αντιστοιχούν σε κυκλοφορούντα κύτταρα φθορισμού. Ο κάθετος άξονας αντιστοιχεί στην ένταση (volts) και ο οριζόντιος αντιστοιχεί στο χρόνο (s).

In vivo σύστημα απεικόνισης φθορισμού

Η εξωτερική απεικόνιση πλήρους σώματος των ποντικών με πρωτογενείς και μεταστατικούς όγκους οι οποίοι είναι γενετικά επισημασμένοι με τις φθορίζουσες πρωτεΐνες GFP και RFP είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη διερεύνηση της ανάπτυξης των όγκων. Η τεχνολογία βασίζεται στο φωτεινό ενδογενή φθορισμό της GFP και RFP, ο οποίος

προκαλείται εν μέρει από την υψηλή κβαντική απόδοση αυτών των φθοροφόρων (Heim et al. 1995; Matz et al. 1999). Μόλις οι όγκοι που εκφράζουν την GFP αναπτυχθούν πλήρως, τα μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ανιχνευθούν στο ζωντανό ποντίκι με τη χρήση της απεικόνισης πλήρους σώματος (Yang et al. 2000).

Η ανάπτυξη του όγκου καρκινικών κυττάρων στον αριστερό τέταρτο μαστό (L4) των ποντικών και η επίδραση της φαρμακευτικής ουσίας σ' αυτόν, παρακολούθηθηκε από το σύστημα απεικόνισης φθορισμού πλήρους σώματος (reflectance mode configuration) το οποίο αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Biolisys (Σχήμα 11). Το σύστημα παρέχει 2D χάρτες της έντασης φθορισμού της απεικονιζόμενης περιοχής ενδιαφέροντος. Τα απεικονιζόμενα ζώα αναισθητοποιήθηκαν και φωτίστηκαν με φως από μια εστιασμένη πηγή διόδου φωτοεκπομπής (light-emitting diode – LED) συντονισμένη με τα φάσματα διέγερσης του φθορίζον δείκτη στόχου (470nm – μπλε). Το εκπεμπόμενο φθορίζον σήμα (525nm - πράσινο) ανιχνεύθηκε από μια κάμερα CCD (Charge-coupled device) υψηλής ευαισθησίας και χαμηλού θορύβου με τη χρήση κατάλληλων φίλτρων και φακών μεγάλου ανοίγματος για την υψηλή απόδοση συλλογής φωτονίων (Leblond et al. 2010). Τα ποντίκια ακολούθησαν μια διατροφή με ζωοτροφή χαμηλή σε φθορισμό με σκοπό τη μείωση του αυτο-φθορισμού των ιστών. Τα ζώα φωτίζονται από μια LED πηγή διέγερσης 470 nm (μπλε). Οι εικόνες λήφθηκαν για σύντομους χρόνους έκθεσης (0,1-1 δευτερόλεπτα) και επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού ImageJ.

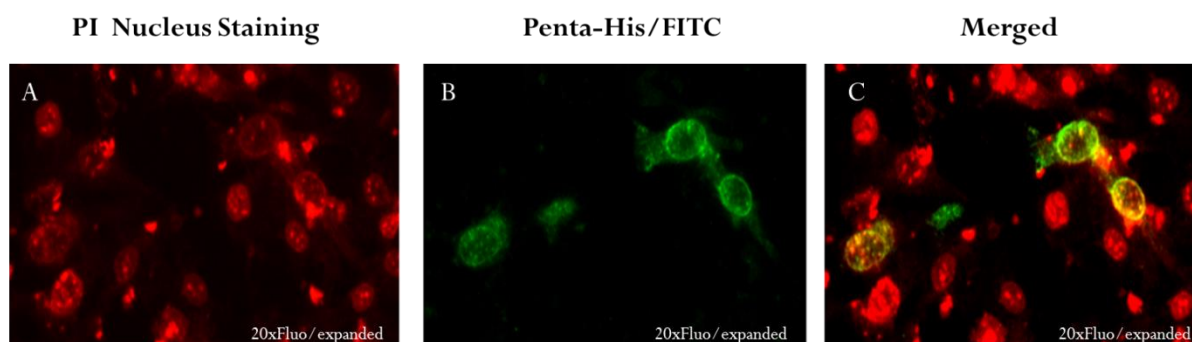


Σχήμα 11: Η διάταξη του *in vivo* συστήματος απεικόνισης φθορισμού.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ TR4 ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Προηγούμενες μελέτες της εταιρείας Trojantec Ltd, έδειξαν ότι η φαρμακευτική ουσία TR4 εισχωρεί στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε το πείραμα για τη μελέτη και επαλήθευση της εισχώρησης της ουσίας, ακολουθώντας τη διαδικασία η οποία παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν την επιτυχή εισαγωγή του TR4 στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων (Σχήμα 12). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε PI για την ανοσοβαφή του πυρήνα των καρκινικών κυττάρων (Σχήμα 12 A) και το αντίσωμα Penta-His/FITC για την ανοσοβαφή του TR4 (Σχήμα 12 B). Το αρχικό αντίσωμα Penta-His αναγνωρίζει το TR4 και το δευτερεύον αντίσωμα FITC, το οποίο προσδίδει το πράσινο χρώμα, αναγνωρίζει το σύμπλεγμα Penta-His- TR4. Η επιτυχής εισχώρηση του TR4 στον πυρήνα είναι εμφανής (Σχήμα 12 C), αφού είναι ξεκάθαρη η εισχώρηση του TR4 (πράσινο) στον πυρήνα (κόκκινο).

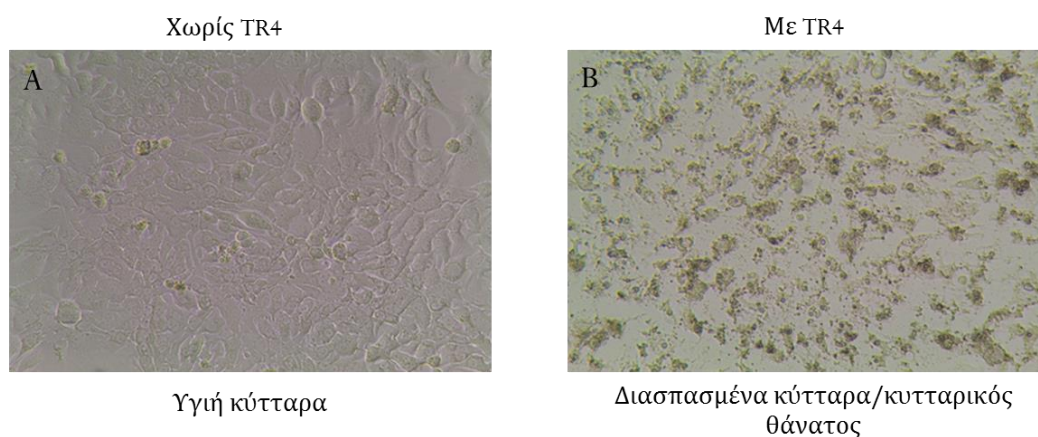


Σχήμα 12: Εισχώρηση της φαρμακευτικής ουσίας TR4 στον πυρήνα των MDA-MB-231 (non GFP) καρκινικών κυττάρων, A. Η ανοσοβαφή του πυρήνα των καρκινικών κυττάρων με PI (green channel-530nm), B. Η ανοσοβαφή του TR4 με Penta-His/FITC (blue channel-480nm), C. Η επιτυχής εισχώρηση του TR4 στον πυρήνα. Οι εικόνες λήφθηκαν 60 λεπτά μετά τη χορήγηση του TR4 με τη χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού Leica.

4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ (ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ΛΟΓΩ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ) ΤΟΥ TR4

Πείραμα ελέγχου του κυτταρικού θανάτου διεξήχθη για την εξακρίβωση της ελάχιστης ικανοποιητικής συγκέντρωσης της φαρμακευτικής ουσίας με την οποία επιτυγχάνεται κυτταρικός θάνατος, τουλάχιστον στο 50% του αριθμού των καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε η κοινώς αναγνωρισμένη χημειοθεραπεία μέσω του GSI ως δείγμα θετικού ελέγχου για σύγκριση σε ίδιες συγκεντρώσεις με το TR4. Επίσης, για δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το DMSO ο οποίος είναι τοξικός διαλύτης σε μεγάλες ποσότητες. Αφού η χημειοθεραπεία GSI διαλύθηκε στο DMSO, πρέπει να δειχθεί ότι δεν ευθύνεται το DMSO για την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας. Ακόμη για δείγμα αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα καρκινικά κύτταρα στο θρεπτικό τους μέσο, χωρίς κάποια θεραπεία.

Το TR4 όπως ήταν αναμενόμενο προκάλεσε κυτταρικό θάνατο, και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Σχήμα 13). Παρουσιάζονται τα καρκινικά κύτταρα στο θρεπτικό τους μέσο, χωρίς κάποια θεραπεία (Σχήμα 13 A) και ο κυτταρικός θάνατος με συγκέντρωση 10 μ M του TR4 (Σχήμα 13 B). Ο βαθμός του κυτταρικού θανάτου ήταν αντίστοιχος της συγκέντρωσης των θεραπευτικών ουσιών που εξετάστηκαν. Στον πίνακα 3, παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα που εξήχθησαν.



Σχήμα 13: Κυτταρικός θάνατος των MDA-MB-231 (non GFP) καρκινικών κυττάρων λόγω του TR4, A. τα καρκινικά κύτταρα στο θρεπτικό τους μέσο, χωρίς θεραπεία, B. ο κυτταρικός θάνατος με συγκέντρωση 10 μ M του TR4. Οι εικόνες λήφθηκαν με μικροσκόπιο BrightField.

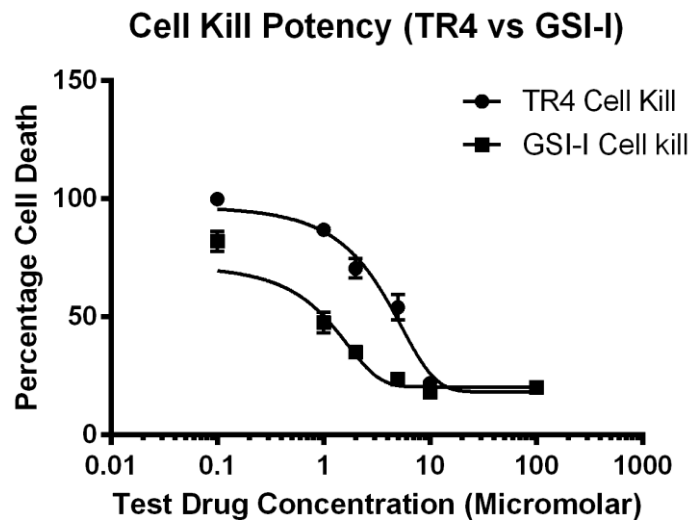
Πίνακας 3: Κυτταρικός θάνατος των MDA-MB-231 GFP καρκινικών κυττάρων ανάλογα με τη συγκέντρωση της φαρμακευτικής ουσίας

Drug Conc	Mean TR4	SD TR4	Mean GSI-I	SD GSI-I
0.1	99,78070	1,588203	81,98245	4,322553
0.5	93,75439	2,625301	60,74561	5,107185
1	86,85088	2,20116	47,42983	4,427496
2	70,43860	4,134957	34,87719	1,236935
5	53,97369	5,446859	23,50000	0,7586071
10	21,84211	1,622427	17,90351	0,950409
100	20,00000	2,00000	20,00000	2,00000

Η ανασταλτική ημιμέγιστη συγκέντρωση (IC_{50}) είναι ένα μέτρο εξέτασης της αποτελεσματικότητας του TR4 στον κυτταρικό θάνατο. Αυτό το ποσοτικό μέτρο δείχνει τη ελάχιστη ποσότητα του συγκεκριμένου φαρμάκου η οποία είναι απαραίτητη για να προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων κατά το ήμισυ. Οι τιμές συνήθως εκφράζονται ως μοριακή συγκέντρωση.

Τα αποτελέσματα του πίνακα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό GraphPad Prism και η τιμή του IC_{50} παρουσιάζεται στο Σχήμα 14.

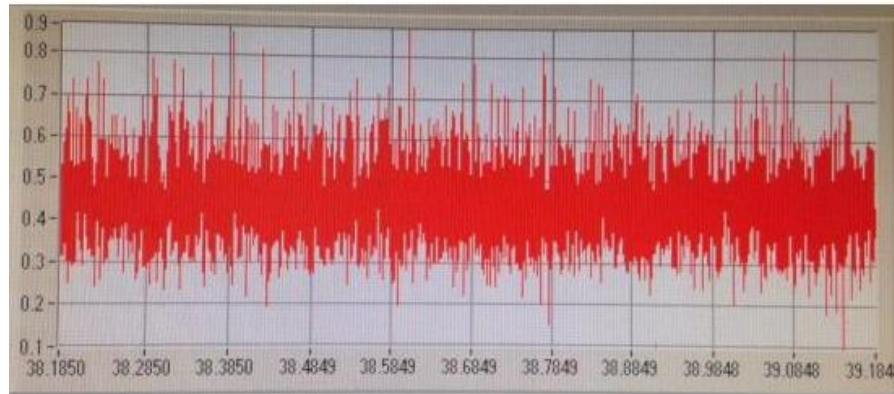
Το αποτέλεσμα για το IC_{50} του TR4 είναι 8.162 μ M και του GSI είναι 3.313 μ M. Η διαφορά των δύο τιμών είναι πολύ μικρή, γεγονός που αποδεικνύει ότι η πειραματική θεραπευτική ουσία TR4 είναι αρκετά δραστική. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, όταν η συγκέντρωση των θεραπειών είναι 5 μ M η διαφορά τους είναι 30.5, ενώ καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή τους, η διαφορά τους μειώνεται μέχρι τελικά να μηδενιστεί. Αυτό αποδεικνύει ότι το TR4 είναι εξίσου αποτελεσματικό με την κλασσική χημειοθεραπεία μέσω του GSI.



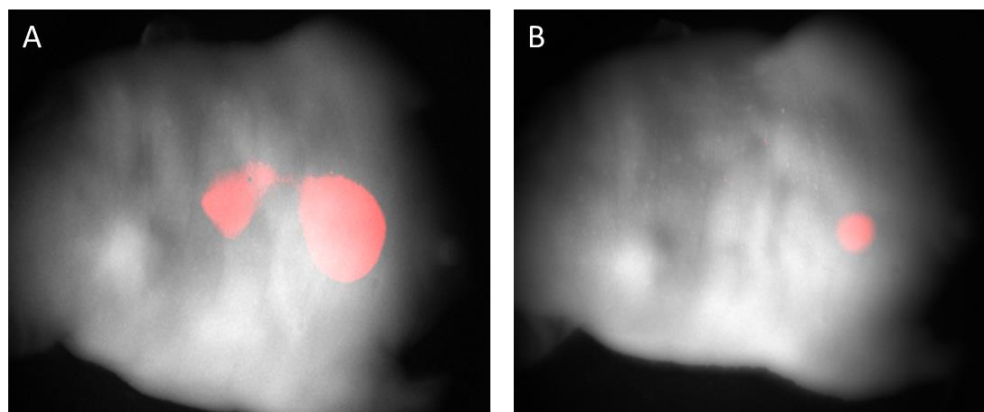
Σχήμα 14: Γραφική απεικόνιση του κυτταρικού θανάτου μέσω του TR4 και GSI. Η ελάχιστη ικανοποιητική συγκέντρωση του TR4, η οποία προκαλεί ποσοστό κυτταρικού θανάτου 50% είναι 8.162 μM .

4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΟΥ TR4 ΣΕ ΥΓΙΗ ΠΟΝΤΙΚΙΑ (BIO-DISTRIBUTION ASSAY)

Τα υγιή ποντίκια ($n=3$) παρακολούθηθηκαν μέσω του *in vivo* συστήματος κυτταρομετρίας, στις 2 και 24 ώρες μετά την ενέσιμη χορήγηση του TR4 στο κυκλοφορικό σύστημα και το σήμα του υποβάθρου (θόρυβος) που συλλέχθηκε από τα αιμοφόρα αγγεία δεν αυξήθηκε σημαντικά (Σχήμα 15). Έτσι, αποδείχθηκε ότι το ελεύθερο μόριο πρωτεΐνης του TR4 απομακρύνθηκε γρήγορα από την κυκλοφορία. Επιπρόσθετα, δεν ανιχνεύθηκαν τυχόν κύτταρα στα οποία να είχε ενσωματωθεί η TR4 πρωτεΐνη σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο κατά τη διάρκεια παρακολούθησης. Το *in vivo* σύστημα απεικόνισης φθορισμού έδειξε ότι το TR4-Cy5.5 συσσωρεύτηκε σε ορισμένα από τα απεικονισμένα όργανα/ιστούς (Σχήμα 16 A-B) και απορρίφθηκε εντός 24 ωρών μέσω της γαστρεντερικής οδού. Επομένως, η μελέτη βιοκατανομής έδειξε ότι το TR4 δεν προκαλεί οποιοσδήποτε τοξικές εκδηλώσεις στα ζώα, δεν ενσωματώνεται/στοχεύει φυσιολογικά κύτταρα και ούτε επηρεάζει την ομαλή λειτουργία των οργάνων καθώς και ούτε τη διάρκεια ζωής των ζώων.



Σχήμα 15: Το σήμα του υποβάθρου (θόρυβος) που συλλέχθηκε από τα αιμοφόρα αγγεία των υγιών ποντικών. Δεν ανιχνεύθηκαν φθορίζοντα κύτταρα/σωματίδια. . Ο κάθετος άξονας αντιστοιχεί στην ένταση (volts) και ο οριζόντιος αντιστοιχεί στο χρόνο (s).



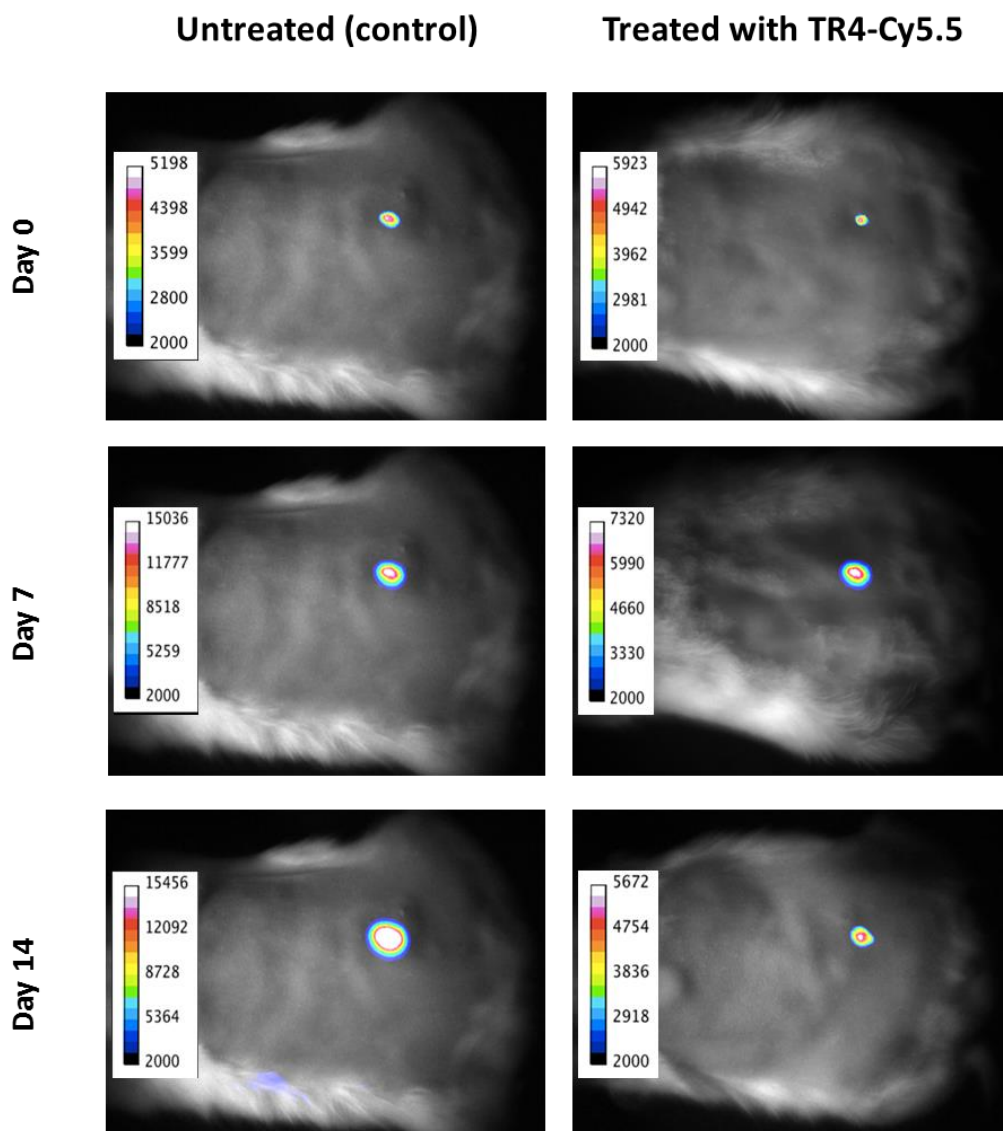
Σχήμα 16: Η βιοκατανομή του TR4 σε (A) 2 ώρες και (B) 24 ώρες μετά την ενέσιμη χορήγηση. (Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τα n=3 ποντίκια που εξετάστηκαν)

4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ TR4 ΣΕ ΟΡΘΟΤΟΠΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ

Μετά την ορθοτοπική ενέσιμη χορήγηση των MDA-MB-231 GFP καρκινικών κυττάρων, αναπτύχθηκαν επιτυχώς όγκοι στο μαστό έξι ποντικών. Η θεραπευτική ουσία TR4 χορηγήθηκε (ημέρα 0) στα τρία ποντίκια ενώ τα υπόλοιπα διατηρήθηκαν ως δείγματα ελέγχου (control) για την παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου. Η αξιολόγηση του όγκου πραγματοποιήθηκε μέσω του συστήματος *in vivo* απεικόνισης, μετρώντας την ένταση σήματος του όγκου το οποίο είναι ανάλογο του αριθμού των επισημασμένων καρκινικών κυττάρων που αναπτύχθηκαν στην περιοχή.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μια μείωση στην ανάπτυξη του όγκου συναρτήσει του χρόνου στους ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε θεραπευτική αγωγή με TR4 - Cy5.5 (n=3) σε σύγκριση με τους ποντικούς που δεν τους χορηγήθηκε θεραπεία (n=3).

Εφτά μέρες μετά την χορήγηση της θεραπείας με TR4 παρατηρήθηκε μείωση του σήματος στο 50% σε σχέση με το αντίστοιχο σήμα στο ποντίκι στο οποίο δεν χορηγήθηκε η θεραπεία. Ακόμη πιο έντονο ήταν το φαινόμενο στις 14 μέρες μετά τη θεραπεία αφού η ένταση σήματος ήταν περίπου 3 φορές μικρότερη (δεξιά στήλη) σε σχέση με το αντίστοιχο σήμα στο ποντίκι στο οποίο δεν χορηγήθηκε η θεραπεία (αριστερή στήλη) (Σχήμα 17).



Σχήμα 17: Η ανταπόκριση του όγκου σε ποντίκια χωρίς θεραπεία και σε ποντίκια με τη θεραπεία TR4-Cy5, 7 και 14 ημέρες μετά την ενέσιμη χορήγηση του TR4 (ημέρα 0). Η βαθμονομημένη κλίμακα υποδεικνύει τη σχετική ένταση του σήματος φθορισμού. (Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τα n=3 ποντίκια που εξετάστηκαν σε κάθε περίπτωση).

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος παγκοσμίως και η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνου (Ih 2013). Συνεπώς η ανάγκη για εύρεση αποτελεσματικής στοχευμένης θεραπείας με τις λιγότερο δυνατόν παρενέργειες είναι αναγκαία.

Έχει αποδειχθεί ότι η αυξημένη έκφραση των γονιδίων τα οποία σχετίζονται με το κυτταρικό μονοπάτι Notch και των συνδετών τους εμφανίζεται σε πολλά ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα και σε διάφορους τύπους καρκίνου. Έτσι το μονοπάτι Notch θεωρείται ένας πολύ ελκυστικός στόχος για μελέτη για τη θεραπεία συγκεκριμένων τύπων καρκίνου (Wang et al. 2008).

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μια καινοτόμος στοχευμένη θεραπεία, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της φαρμακευτικής ουσίας TR4, η οποία αναστέλλει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch, και το κύτταρο-διεισδυτικό πεπτίδιο Antennapedia (Antp), μειώνοντας έτσι την ανάπτυξη του όγκου. Ολοκληρωμένη μελέτη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων της ουσίας πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* για να προσδιοριστούν οι επιδράσεις του TR4 στον καρκίνο του μαστού. Η σύζευξη της πρωτεΐνης TR4 με τον κατάλληλο φθορίζον δείκτη (Cy5.5), επέτρεψε τη διερεύνηση της δυναμικής της συμπεριφοράς σε καρκινικά μοντέλα ζώων με τη χρήση *in vivo* απεικονιστικών μεθόδων.

Το *in vitro* πείραμα για τη μελέτη της επιλεκτικής συγκέντρωσης του TR4 στα καρκινικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε για να εξεταστεί κατά πόσο η ουσία εισχωρεί στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων στοχεύοντας το Notch κυτταρικό μονοπάτι. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την επιτυχή εισχώρηση του TR4 στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων.

Τα συγκεκριμένα θετικά αποτελέσματα μας ώθησαν στην περαιτέρω εξέταση της δράσης της φαρμακευτικής ουσίας. Το *in vitro* πείραμα για τη μελέτη της τοξικότητας (κυτταρικός θάνατος λόγω απόπτωσης) του TR4, πραγματοποιήθηκε για να εξεταστεί η ελάχιστη ικανοποιητική συγκέντρωση της φαρμακευτικής ουσίας με την οποία επιτυγχάνεται κυτταρικός θάνατος, τουλάχιστον στο 50% του αριθμού των καρκινικών κυττάρων (IC₅₀). Το αποτέλεσμα για την τιμή του IC₅₀ του TR4 σε σύγκριση με την τιμή του IC₅₀ της κοινής

χημειοθεραπείας GSI ήταν ελάχιστα πιο μεγάλη, αποδεικνύοντας ότι η πειραματική θεραπευτική ουσία TR4 είναι αρκετά δραστική. Λόγω του ότι, το πείραμα δεν επαναλήφθηκε αρκετές φορές ώστε τα αποτελέσματα να είναι στατιστικά αποδεκτά, η τιμή του IC₅₀ των δύο ουσιών μπορεί πραγματικά να είναι περισσότερο συγκλίνουσα, αποδεικνύοντας έτσι τη δραστικότητα και αποτελεσματικότητα του TR4.

Προχωρώντας στο επόμενο στάδιο μετά τα θετικά αποτελέσματα στο *in vitro* επίπεδο, η θεραπευτική συμπεριφορά της φαρμακευτικής ουσίας εξετάστηκε σε *in vivo* μοντέλα ζώων.

Η *in vivo* μελέτη βιοκατανομής σε υγιή ποντίκια μέσω του *in vivo* συστήματος κυτταρομετρίας και του *in vivo* συστήματος απεικόνισης φθορισμού, εξέτασε την κατανομή της φαρμακευτικής ουσίας στα ποντίκια προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσον η ουσία κυκλοφορεί ομοιόμορφα στα ποντίκια ή εάν έχει συλλεχθεί σε μια συγκεκριμένη περιοχή του σώματός τους. Αυτή η μέθοδος παρέχει ένα μη επεμβατικό τρόπο εξέτασης, εξαλείφοντας τον αριθμό των ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Είναι επίσης μια αξιόπιστη μέθοδος, επειδή τα ποντίκια μπορούν να παρακολουθούνται σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το TR4 δεν προκαλεί οποιεσδήποτε τοξικές εκδηλώσεις στα ζώα και δεν στοχεύει φυσιολογικά κύτταρα. Συμπερασματικά, αποδεικνύεται ότι το TR4 δεν επηρεάζει την ομαλή λειτουργία των οργάνων καθώς και ούτε τη διάρκεια ζωής των ζώων, υπόσχοντας μια μη τοξική για τα φυσιολογικά κύτταρα θεραπεία η οποία έρχεται σε αντίθεση με τις μέχρι τώρα συμβατικές θεραπείες οι οποίες κατέστρεφαν και τα φυσιολογικά κύτταρα σε ένα οργανισμό.

Τέλος, η θεραπευτική συμπεριφορά της φαρμακευτικής ουσίας εξετάστηκε σε *in vivo* ορθοτοπικά μοντέλα ζώων καρκίνου του μαστού, στα οποία ο όγκος αναπτύχθηκε μέσω της ενέσιμης χορήγησης των MDA-MB-231 GFP καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα ήταν σημασμένα με την GFP φθορίζουσα πρωτεΐνη έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η *in vivo* απεικόνιση και εκτίμηση της ανάπτυξης του όγκου. Η θεραπευτική ουσία TR4 χορηγήθηκε σε τρία ποντίκια με καρκινικούς όγκους ενώ ίσος αριθμός ποντικών διατηρήθηκαν ως δείγματα ελέγχου (control) για την παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου. Η αξιολόγηση του όγκου πραγματοποιήθηκε μέσω του συστήματος *in vivo* απεικόνισης, μετρώντας την ένταση σήματος του όγκου, στις 7 και 14 μέρες μετά τη χορήγηση της θεραπείας. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση στην ανάπτυξη του όγκου συναρτήσει του χρόνου στους ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε θεραπευτική αγωγή με TR4 - Cy5.5 (n=3) σε σύγκριση με τους ποντικούς που δεν τους χορηγήθηκε θεραπεία (n=3).

Εφτά μέρες μετά τη χορήγηση του TR4 παρατηρήθηκε αύξηση του σήματος του όγκου σε σχέση με την ημέρα 0, ωστόσο στο ποντίκι στο οποίο δεν χορηγήθηκε θεραπεία το σήμα τριπλασιάστηκε. Αντίθετα, 14 μέρες μετά τη χορήγηση του TR4 παρατηρήθηκε μείωση του σήματος του όγκου σε σχέση με την ημέρα 7, και το σήμα στο ποντίκι στο οποίο δεν χορηγήθηκε θεραπεία παρέμεινε σταθερό. Αυτό συνέβηκε λόγω του ότι, η αρχική δράση της θεραπείας είναι η μείωση της ανάπτυξης του όγκου (μέρα 7), στη συνέχεια η σταθεροποίηση του και τέλος η μείωση του (μέρα 14).

Οι περιορισμοί και τα μειονεκτήματα των *in vivo* πειραμάτων είναι ότι τα εξεταζόμενα ποντίκια ήταν μόνο τρία, το οποίο δεν είναι στατιστικά αποδεκτό. Για να μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτός ο αριθμός των εξεταζόμενων ποντικών πρέπει να είναι τουλάχιστον πέντε και το πείραμα να επαναληφθεί τουλάχιστον τρεις φορές.

Συνοψίζοντας όλα τα πιο πάνω, καταλήγουμε στην επικύρωση του TR4 ως μια αρκετά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική για την θεραπεία του αδενοκαρκινώματος του μαστού.

5.2 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Οι αλλοιώσεις των γονιδίων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προέλευση και παθογένεση του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού. Η ανάπτυξη και μετέπειτα εξέλιξη του καρκίνου του μαστού συμβαίνει μέσω μιας συσσωρευμένης σειράς γενετικών και φαινοτυπικών αλλαγών στα μονοπάτια που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Έτσι, μια από τις προκλήσεις που είχε να αντιμετωπίσει η επιστημονική κοινότητα είναι ο εντοπισμός των συγκεκριμένων γονιδίων στον καρκίνο του μαστού τα οποία παίζουν κάποιο ρόλο στην κλινική πρόοδο και συνεπώς είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για την ανάπτυξη στοχευμένων αντικαρκινικών φαρμάκων (Pegram et al. 2005).

Η μετάβαση από την κυτταροτοξική χημειοθεραπεία στη ανακάλυψη και ανάπτυξη μοριακά στοχευμένων φαρμάκων για τον καρκίνο, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των επιτυχών θεραπειών οι οποίες έχουν επηρεάσει θετικά τις ζωές αρκετών ασθενών με καρκίνο βελτιώνοντας το επίπεδο και το προσδόκιμο ζωής τους (Hoelder et al. 2012).

Οι καινούριες στοχευμένες θεραπείες που δημιουργούνται χρησιμοποιούν θεραπευτικά αντισώματα ή μικρά μόρια και έτσι η θεραπεία γίνεται πιο ειδική και λιγότερο τοξική (Wu et al. 2006), στοχεύοντας υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, μόρια σηματοδότησης, πρωτεΐνες

οι οποίες εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, ρυθμιστές της απόπτωσης και των μορίων που εμπλέκονται στην εισβολή των καρκινικών κυττάρων σε άλλους ιστούς και την αγγειογένεση (Widakowich et al. 2007).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν αναδειχθεί ως σημαντικοί θεραπευτικοί παράγοντες για αρκετές διαφορετικές κακοήθειες (Harris 2004), και έχει διαπιστωθεί ότι έχουν καλή αποτελεσματικότητα στη θεραπεία διαφορετικών καρκίνων. Εκτός από το ρόλο τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες, η ικανότητά τους να στοχεύουν όγκους, τους επιτρέπει επίσης να βελτιώνουν την επιλεκτικότητα άλλων τύπων αντικαρκινικών παραγόντων, οι οποίοι μερικοί από αυτούς δεν μπορούν να εφαρμοστούν αποτελεσματικά μόνοι. Παρόλ' αυτά, αυτοί οι παράγοντες είναι αποτελεσματικοί μόνο σε τύπους όγκων που εξαρτώνται από τα αντιγόνα του όγκου τα οποία εκφράζονται ή από τις κυτταρικά μονοπάτια τα οποία αναστέλλονται. Λόγω του ότι οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι είναι το αποτέλεσμα πολλών γενετικών μεταλλάξεων, αναστέλλοντας έτσι ένα κυτταρικό μονοπάτι δεν μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική θεραπευτική έκβαση. Έτσι, ο σχεδιασμός παραγόντων που στοχεύουν ένα αριθμό κυτταρικών μονοπατιών πιθανώς να αυξήσει τη θεραπευτική επίδραση, αλλά επίσης να αυξήσει τον κίνδυνο της τοξικότητας η οποία σχετίζεται με τη θεραπεία (Wu et al. 2006). Συγκρίνοντας με τη εξεταζόμενη στοχευμένη θεραπεία TR4, αν και στοχεύει μόνο ένα κυτταρικό μονοπάτι, το Notch, είναι περισσότερο αποτελεσματική αφού αυτό το κυτταρικό μονοπάτι είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της βλαστικής ικανότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού και στοχεύοντας το, ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες μετάστασης και υποτροπής του όγκου.

Μία από τις προκλήσεις για τη θεραπεία του καρκίνου, είναι η ενδεχόμενη ανάπτυξη αντοχής φαρμάκου από τα καρκινικά κύτταρα τα οποία λόγω του δυναμικού τους χαρακτηρίρα αναπτύσσουν γρήγορα μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να έχουν ανοχή στο φάρμακο με αποτέλεσμα η θεραπεία να σταματήσει να είναι αποτελεσματική (Hoelder et al. 2012). Επιπρόσθετα πρόκληση αποτελεί και η στόχευση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων τα οποία πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνα για την επανεμφάνιση της ασθένειας αφού πρόκειται για κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα αναγέννησης του όγκου μετά την θεραπεία (Klein & Levitzki 2007).

Πρόσφατα, έχουν σχεδιαστεί στρατηγικές με συγκεκριμένο στόχο την καταστροφή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος το οποίο δημιουργούν. Αυτές περιλαμβάνουν τη στόχευση ειδικών μορίων τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια των

κυττάρων, τη διαμόρφωση των κυτταρικών μονοπατιών, την προσαρμογή των σημάτων του μικροπεριβάλλοντος, την αναστολή των αντλιών εκροής φαρμάκου, το χειρισμό της έκφρασης miRNA και την επαγωγή απόπτωσης και διαφοροποίησης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Dragu et al. 2015).

Επί του παρόντος, μερικές από αυτές τις θεραπείες χρησιμοποιούνται με επιτυχία στην κλινική, κυρίως σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές θεραπείες, και άλλες είναι ακόμη υπό αξιολόγηση σε προκλινικές και κλινικές μελέτες (Dragu et al. 2015).

Η πειραματική στοχευμένη θεραπεία μέσω του TR4 που παρουσιάζει η παρούσα εργασία, η οποία βρίσκεται σε προκλινικό στάδιο, αναστέλλει τη σηματοδότηση του Notch στο μεταγραφικό επίπεδο με την πρωτεΐνη Antp-DNMAML, καταστέλλει την έκφραση των μεταγενέστερων στόχων Notch καθώς επίσης επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Ένα κίνητρο για έρευνα της αναστολής του κυτταρικού μονοπατιού Notch για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι ότι το μονοπάτι αυτό έχει προταθεί να διατηρεί τη βλαστική ικανότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού (Han et al. 2011), τα οποία είναι υπεύθυνα για την υποτροπή και τη μετάσταση των όγκων (Guo et al. 2014).

Λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα των *in vivo* πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, αποδείχθηκε ότι το TR4 αναστέλλει ή εξαλείφει την ανάπτυξη ανθρώπινου όγκου σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (nude) χωρίς να δημιουργείται τοξικότητα στο όργανο ή στο σύστημα. Έτσι, αυτή η προσέγγιση της ενδοκυτταρικής διανομής των κυρίαρχων-αρνητικών πρωτεϊνών μεταγραφικού συμπλόκου χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Antp, είναι μια καινοτόμος και ειδική θεραπεία του καρκίνου, η οποία είναι υποσχόμενη και για τις κλινικές μελέτες.

Οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην αύξηση της ειδικότητας και αποτελεσματικότητας της στόχευσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, αποφεύγοντας την τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα των φυσιολογικών ιστών και σε νέες στρατηγικές παράδοσης και κατακράτησης των θεραπευτικών ουσιών στο εσωτερικό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Αυτές οι καινοτόμες θεραπείες, στόχο έχουν να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα των υπαρχόντων φαρμάκων κατά των επιθετικών καρκίνων, και παράλληλα να αποφεύγουν την υποτροπή του όγκου και να ενισχύσουν την επιβίωση του ασθενούς (Dragu et al. 2015).

Η στοχευμένη θεραπεία μέσω της υβριδικής πρωτεΐνης TR4 προσφέρει μια εξειδικευμένη και καινοτόμο προοπτική στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού έστω και αν βρίσκεται ακόμα στο προκλινικό, πειραματικό στάδιο. Με βάση τα μέχρι στιγμής επιτυχή αποτελέσματα της θεραπείας, αναμένονται ανάλογα θετικά αποτελέσματα και στο κλινικό στάδιο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allenspach J. Eric, Maillard Ivan, Aster C. Jon, P.W., 2002. Notch Signaling in Cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 1(5), pp.466–476.
- Anon, 2014. ACS_Bone Cancer Detailed Guide.
- Anon, 2003. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Symptom Management in Cancer: Pain, Depression, and Fatigue, July 15-17, 2002. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 95(15), pp.1110–1117. Available at: <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/djg014>.
- Atena, M., Reza, A.M. & Mehran, G., 2014. A Review on the Biology of Cancer Stem Cells. , (October), pp.83–89.
- Balkwill, F.R., Capasso, M. & Hagemann, T., 2012. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(23), pp.5591–5596. Available at: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.116392>.
- Van den Beuken-van Everdingen, M.H.J. et al., 2007. Prevalence of pain in patients with cancer: A systematic review of the past 40 years. *Annals of Oncology*, 18(9), pp.1437–1449.
- Bibby, M.C., 2004. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 40(6), pp.852–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120041> [Accessed December 22, 2015].
- Cancer, A.J.C. on, 2010. Breast, AJCC Cancer Staging Manual. *New York: Springer*, pp.347–369.
- Cancer, B., 2015. What is breast cancer ? What causes breast cancer ? , pp.1–13.
- Cascades, G., 1980. Rediscovering Biology, cell biology and cancer. *Development*.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C., 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews. Cancer*, 2(8), pp.563–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154349> [Accessed July 14, 2014].
- Condeelis, J. & Weissleder, R., 2010. In vivo imaging in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(12).
- Daniel, V.C., Peacock, C.D. & Watkins, D.N., 2006. Developmental signalling pathways in lung cancer. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 11(3), pp.234–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635080> [Accessed March 2, 2016].

- Denlinger, C.S. et al., 2015. Survivorship:Fatigue, Version1.2014:Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.*, 12(6), pp.876–887.
- Devi, P., 2004. Basics of carcinogenesis. *Health Adm*, (1), pp.16–24. Available at: <http://medind.nic.in/haa/t05/i1/haat05i1p16.pdf>.
- Dragu, D.L. et al., 2015. Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World journal of stem cells*, 7(9), pp.1185–201. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4620424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 9, 2016].
- Ellisen, L.W. et al., 1991. TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 66(4), pp.649–661. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749190111B> [Accessed January 21, 2016].
- Esquela-Kerscher, A. & Slack, F.J., 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(4), pp.259–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557279>.
- Euhus, D.M. et al., 1986. Tumor measurement in the nude mouse. *Journal of surgical oncology*, 31(4), pp.229–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3724177> [Accessed April 21, 2016].
- Fan, Z. et al., 2010. In vivo tracking of “color-coded” effector, natural and induced regulatory T cells in the allograft response. *Nature medicine*, 16(6), pp.718–22. Available at: <http://www.readcube.com/articles/10.1038/nm.2155>.
- Guo, H. et al., 2014. Targeting the Notch signaling pathway in cancer therapeutics. *Thoracic Cancer*, 5(6), pp.473–486.
- Hahn, H. et al., 1996. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85(6), pp.841–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681379> [Accessed March 2, 2016].
- Han, J., Hendzel, M.J. & Allalunis-Turner, J., 2011. Notch signaling as a therapeutic target for breast cancer treatment? *Breast cancer research : BCR*, 13(3), p.210. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3218932&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. a, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74. Available at: <http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>.
- Harris, M., 2004. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *The Lancet. Oncology*, 5(5), pp.292–302. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120666> [Accessed April 25, 2016].

- Hayes, D.F., 2010. Tumor node metastasis (TNM) staging classification for breast cancer
Author. , pp.1–17.
- Heim, R., Cubitt, A.B. & Tsien, R.Y., 1995. Improved green fluorescence. *Nature*,
373(6516), pp.663–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7854443>
[Accessed January 29, 2016].
- Hejmadi, M., 2010. *introduction to cancer biology* 2th ed.,
- Hoelder, S., Clarke, P.A. & Workman, P., 2012. Discovery of small molecule cancer drugs:
Successes, challenges and opportunities. *Molecular Oncology*, 6(2), pp.155–176.
Available at: <http://www.moloncol.org/article/S1574789112000166/fulltext> [Accessed
January 11, 2016].
- Hoffman, R.M., 2002. GFP imaging in vivo Green fluorescent protein imaging of tumour
growth , metastasis , and angiogenesis in mouse models. *The lancet oncology*,
3(September), pp.546–556.
- Hoffman, R.M., 2001. Visualization of GFP-expressing tumors and metastasis in vivo.
BioTechniques, 30(5), pp.1016–1026.
- Ih, A., 2013. A Review on Aetio-Pathogenesis of Breast Cancer. *J Genet Syndr Gene Ther*,
4(5), pp.1–4.
- Iorns, E. et al., 2012. A new mouse model for the study of human breast cancer metastasis.
PloS one, 7(10), p.e47995. Available at:
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047995>.
- Junttila, M.R. & de Sauvage, F.J., 2013. Influence of tumour micro-environment
heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467), pp.346–354. Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12626>.
- Kalogerakos, K., Sofoudis, C. & Baltayiannis, N., 2008. Early breast cancer : A review
Review Article. *Therapy*, 6, pp.463–476.
- Kalra, J. & Edwards, L. a, 2012. Breast Cancer Therapies Present and Future. ,
2012(December), pp.1140–1150.
- Kapnisis, K.K. et al., 2016. *In vivo* monitoring of the inflammatory response in a stented
mouse aorta model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(1), pp.227–
238. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.35560>.
- Klein, S. & Levitzki, A., 2007. Targeted Cancer Therapy: Promise and Reality. *Advances in
Cancer Research*, 97(Cml), pp.295–319.
- Kreso, A. & Dick, J.E., 2014. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*,
14(3), pp.275–291. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590914000575>.

- Lawenda, B.D., Mondry, T.E. & Johnstone, P. a S., 2009. Lymphedema: a primer on the identification and management of a chronic condition in oncologic treatment. *CA: a cancer journal for clinicians*, 59(1), pp.8–24.
- Leblond, F. et al., 2010. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 98(1), pp.77–94. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.11.007>.
- Malinowsky, K. et al., 2011. Targeted therapies in cancer - challenges and chances offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues. *Journal of Cancer*, 2(1), pp.26–35.
- Mansfield, C.M., 1993. A review of the etiology of breast cancer. *Journal of the National Medical Association*, 85(3), pp.217–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2571884&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Matz, M. V et al., 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature biotechnology*, 17(10), pp.969–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504696> [Accessed February 9, 2016].
- McGill, M.A. et al., 2009. Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *The Journal of biological chemistry*, 284(39), pp.26427–38. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2785331&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 22, 2016].
- Moustafa, S., 2014. Cancer : Cells behaving badly. *Exploratorium.Edu*, pp.1–6.
- Nelson, W.J. & Nusse, R., 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), pp.1483–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3372896&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 20, 2016].
- Novak J., Georgakoudi I., Wei X., Prossin A., L.C.P., 2013. In vivo flow cytometer for real-time detection and quantification of circulating cells. , 18(9), pp.1199–1216.
- OmKárova, N.L. & Wodarz, D., 2010. Cancer as a microevolutionary process. *Evolution in Health and Disease*, (May 2014), pp.1–17.
- Ottewell, P.D., Coleman, R.E. & Holen, I., 2006. From genetic abnormality to metastases: murine models of breast cancer and their use in the development of anticancer therapies. *Breast cancer research and treatment*, 96(2), pp.101–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319986> [Accessed February 7, 2016].
- Pachman, D.R. et al., 2012. Troublesome symptoms in cancer survivors: Fatigue, insomnia, neuropathy, and pain. *Journal of Clinical Oncology*, 30(30), pp.3687–3696.

- Pece, S. et al., 2004. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *The Journal of cell biology*, 167(2), pp.215–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2172557&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 2, 2016].
- Pegram, M.D. et al., 2005. Targeted therapy: Wave of the future. *Journal of Clinical Oncology*, 23(8), pp.1776–1781.
- Phillips, T.M. et al., 2007. Effects of recombinant erythropoietin on breast cancer-initiating cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 9(12), pp.1122–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2134908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pitsillides, C.M. et al., 2011. Cell labeling approaches for fluorescence-based in vivo flow cytometry. *Cytometry Part A*, 79 A(10), pp.758–765.
- Pittillo, R.F. et al., 1965. Experimental evaluation of potential anticancer agents. XVI. Basic study of effects of certain anticancer agents on kinetic behavior of model bacterial cell populations. *Cancer chemotherapy reports. Part 1*, 47, pp.1–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5829425> [Accessed February 9, 2016].
- Polakis, P., 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes & development*, 14(15), pp.1837–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10921899> [Accessed February 19, 2016].
- Polyak, K., 2007. Science in medicine Breast cancer : origins and evolution. *Cell*, 117(11), pp.3155–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2045618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Quail, D. & Joyce, J., 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11), pp.1423–1437. Available at: <http://www.nature.com/nm/journal/v19/n11/abs/nm.3394.html>.
- Rabindra Tirouvanziam, Daisy Diaz, Yael Gernez, Julie Laval, Monique Crubezy, and M.M. 12. ., 2011. Advanced Optical Flow Cytometry. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527634286>.
- Reece B. Jane, Urry A. Lisa, Cain L. Michael, Wasserman A. Steven, Minorsky V. Peter, J.B.R., 2011. Campbell Biology (Ninth Edition).
- Reya, T. et al., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *nature*, 414(November), pp.105–111.
- Sarkar, S. & Mandal, M., 1990. Breast Cancer: Classification Based on Molecular Etiology Influencing Prognosis and Prediction. *Cdn.Intechweb.Org*. Available at: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/24877.pdf>.
- Scanlon C. Valerie, S.T., 2007. *Essentials of anatomy and physiology* fifth edit.,

- Sethi, N. et al., 2011. Tumor-Derived Jagged1 Promotes Osteolytic Bone Metastasis of Breast Cancer by Engaging Notch Signaling in Bone Cells. *Cancer Cell*, 19(2), pp.192–205. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3040415&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 10, 2016].
- Sharma, G.N. et al., 2010. Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1(2), pp.109–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3255438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 1, 2016].
- Sheikh, N., Shehzadi, S. & Batool, A., 2011. Treatment of Breast Cancer: New Approaches. *Cdn.Intechopen.Com*. Available at: http://cdn.intechopen.com/pdfs/37490/InTech-Treatment_of_breast_cancer_new_approaches.pdf.
- Skipper, H.E., 1971a. Cancer chemotherapy is many things: G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer research*, 31(9), pp.1173–80. Available at: https://www.researchgate.net/publication/18053883_Cancer_chemotherapy_is_many_things_G_H_A_Clowes_Memorial_Lecture [Accessed February 9, 2016].
- Skipper, H.E., 1979. Historic milestones in cancer biology: a few that are important in cancer treatment (revisited). *Seminars in oncology*, 6(4), pp.506–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/394332> [Accessed February 9, 2016].
- Skipper, H.E., 1971b. Kinetics of mammary tumor cell growth and implications for therapy. *Cancer*, 28(6), pp.1479–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5127796> [Accessed February 9, 2016].
- Skipper, H.E., 1974. Thoughts on Cancer Chemotherapy and Combination Modality Therapy (1974). *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 230(7), p.1033. Available at: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=358197> [Accessed February 9, 2016].
- Spillane, J.B. & Henderson, M. a., 2007. Cancer Stem Cells: a Review. *ANZ Journal of Surgery*, 77(6), pp.464–468. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1445-2197.2007.04096.x>.
- Teicher, B. a., 2006. Tumor models for efficacy determination. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(10), pp.2435–2443. Available at: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-06-0391>.
- Thakor, A.S. & Gambhir, S.S., 2013. Nanooncology: The future of cancer diagnosis and therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(6), pp.395–418. Available at: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21199>.
- Tomayko, M.M. & Reynolds, C.P., 1989. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 24(3), pp.148–54.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2544306> [Accessed March 23, 2016].

- Tortora J. Gerard, D.B., 2009. *Principles of anatomy and physiology* twelfth ed., wiley.
- Tuchin, V. V, Tárnok, A. & Zharov, V.P., 2011. In vivo flow cytometry: a horizon of opportunities. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 79(10), pp.737–45. Available at: https://www.researchgate.net/publication/51642118_In_Vivo_Flow_Cytometry_A_Horizon_of_Opportunities [Accessed February 8, 2016].
- Tuchin, V. V., Tárnok, A. & Zharov, V.P., 2009. Towards in vivo flow cytometry. *Journal of Biophotonics*, 2(8-9), pp.457–458.
- Undén, A.B. et al., 1997. Human patched (PTCH) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma. *Cancer research*, 57(12), pp.2336–40. Available at: https://www.researchgate.net/publication/14026053_Unden_AB_Zaphiropoulos_PG_Bruce_K_Toftgard_R_Stahle-Backdahl_MHuman_patched_PTCH_mRNA_is_overexpressed_consistently_in_tumor_cells_of_both_familial_and_sporadic_basal_cell_carcinoma_Cancer_Res_572336- [Accessed March 2, 2016].
- V., S. & Suhag, V., 2005. Palliative therapy in cancer patients: An overview. *JK Science*, 7(2), pp.67–72. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-20544462799&partnerID=40&md5=cdb9bc91b5c52b3593d123f6bdaffa44\nhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2005274721>.
- Wang, J. et al., 2010. PRECLINICAL STUDY A novel orthotopic and metastatic mouse model of breast cancer in human mammary microenvironment. , pp.337–344.
- Wang, Z. et al., 2008. Exploitation of the Notch signaling pathway as a novel target for cancer therapy. *Anticancer Res*, 28(6A), pp.3621–3630. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19189643.
- Widakowich, C. et al., 2007. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *The oncologist*, 12(12), pp.1443–55. Available at: <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/12/12/1443.full> [Accessed April 23, 2016].
- Wilcox, W.S., Schabel, F.M. & Skipper, H.E., 1966. Experimental Evaluation of Potential Anticancer Agents XV . On the Relative Rates of Growth and Host Kill Leukemia Cells that Survive in Vivo Cytosan Therapy1 of " Single. *Cancer Research*, (May), pp.1009–1014.
- Wu, H., Chang, D. & Huang, C., 2006. Targeted-therapy for cancer. *Journal of cancer molecules*, pp.57–66.

Xue, C. et al., 1999. Small Molecule Drugs and Targeted Therapies for Neuroblastoma.

Yang, M. et al., 2000. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), pp.1206–11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].

Yoon, S.K., 2012. The biology of cancer stem cells and its clinical implication in hepatocellular carcinoma. *Gut and liver*, 6(1), pp.29–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3286736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Zardawi, S.J. et al., 2009. Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer. *Histology and Histopathology*, 24(3), pp.385–398.

Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου, Φ., 2010. Το καρκινικό αρχέγονο κύτταρο. , pp.54–65.