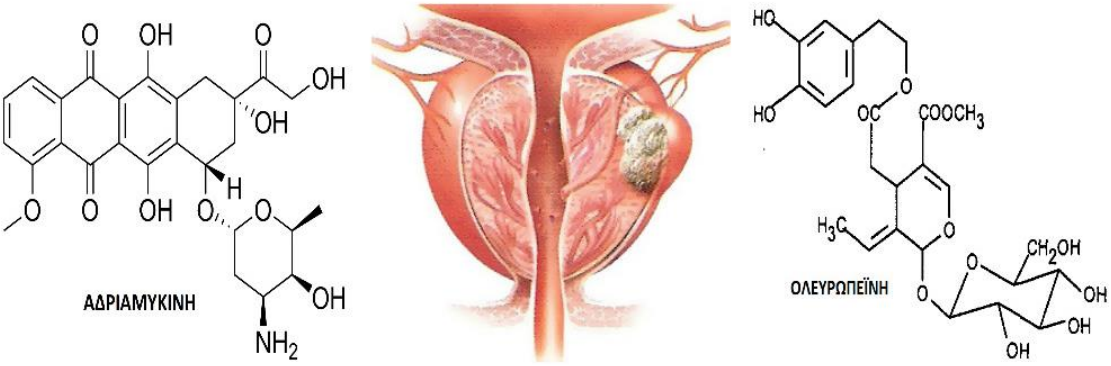
Χ Α Ρ Ο Κ Ο Π Ε Ι Ο  Π Α Ν Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Ι Ο
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ




**Γκιώνη Θέκλα**

*Τριμελής επιτροπή:*
*Ρωξάνη Τέντα (επιβλέπουσα)*
*Νεκτάριος Αληγιάννης*
*Τζώρτζης Νομικός*

**ΑΘΗΝΑ 2015**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Σκοπός της μελέτης ήταν η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών p62 και NBR1 σε καρκινικά κύτταρα PC-3, ύστερα από χορήγηση αδριαμυκίνης, ολευρωπεΐνης και συγχορήγησης αυτών και η συσχέτιση της δράσης τους με τον μηχανισμό της αυτοφαγίας.

**Μεθοδολογία:** Καλλιεργήθηκαν κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-3 προερχόμενα από προστατικό αδενοκαρκίνωμα. Τα κύτταρα PC-3 επωάστηκαν με ολευρωπεΐνη 200μg/mL, με αδριαμυκίνη 50nM, και με συγχορήγηση αδριαμυκίνης και ολευρωπεΐνης και προσδιορίστηκε η έκφραση των πρωτεϊνών NBR1 και p62.

**Αποτελέσματα:** Η μονο-χορήγηση αδριαμυκίνης και ολευρωπεΐνης αναστέλλει την έκφραση των πρωτεϊνών NBR1 και p62 στα προστατικά καρκινικά κύτταρα PC-3, σε αντίθεση με τη συγχορήγηση αδριαμυκίνης και ολευρωπεΐνης η οποία οδηγεί σε επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών.

**Συμπεράσματα:** Η αδριαμυκίνη αποτελεί έναν ισχυρό χημειοθεραπευτικό παράγοντα, η χρήση της οποίας όμως περιορίζεται λόγω των κυτταροτοξικών παρενεργειών της. Η ταυτόχρονη χορήγηση ενός φυσικού συστατικού ενδεχομένως να ελαττώνει τον κίνδυνο παρενεργειών χωρις να ελαττώνει την κυτταροστατική/κυτταροτοξική δράση του φαρμάκου.

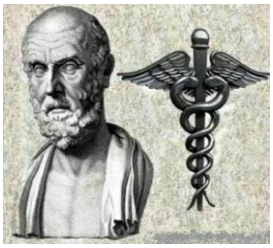
**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... 1
ΚΕΦ. 1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ..... 4
1.1 Ιστορική Αναδρομή ..... 4
1.2 Θεωρίες για τον Καρκίνο ..... 5
1.3 Επιδημιολογικά Στοιχεία Καρκίνου του προστάτη ..... 6
1.4 Διάγνωση και Σταδιοποίηση ..... 7
1.5 Θεραπεία ..... 8
1.6 Ανατομία Προστάτη ..... 9
1.7 Λειτουργίες Προστάτη ..... 11
ΚΕΦ. 2 ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ..... 12
ΚΕΦ. 3 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ..... 13
3.1 Τα στάδια της αυτοφαγίας ..... 14
3.2 Ο ρόλος της αυτοφαγίας ..... 15
3.3 Αυτοφαγία και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ..... 16
3.4 Η αυτοφαγία ως ογκοκατασταλτική διαδικασία ..... 17
3.5 Η αυτοφαγία ως ογκογόνος διαδικασία ..... 17
3.6 Ρύθμιση της αυτοφαγίας ..... 18
3.7 Πρωτεΐνη LC-3 ..... 19
ΚΕΦ. 4 ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗ ..... 20
ΚΕΦ. 5 ΟΛΕΥΡΩΠΕΪΝΗ ..... 21
5.1 Ιδιότητες Ολευρωπεΐνης ..... 22
ΚΕΦ. 6 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ p62, NBR1 ..... 23
ΚΕΦ. 7 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ..... 25
ΚΕΦ. 8 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ..... 25
8.1 Κυτταρική σειρά PC-3 ..... 25
8.3 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας MTT ..... 26
8.5 Δοκιμασία προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford ..... 27
8.6 Ανίχνευση της πρωτεΐνης NBR1 με τη μέθοδο Elisa ..... 27
8.7 Ανίχνευση της πρωτεΐνης p62 με τη μέθοδο Elisa ..... 29
8.8 Στατιστική ανάλυση ..... 31
ΚΕΦ. 9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ..... 31

9.1 Κυτταροτοξικότητα ..... 31
9.2 Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών NBR1 και p62 ..... 31
ΚΕΦ. 10 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ..... 33
Ευχαριστίες ..... 36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ..... 37

## ΚΕΦ. 1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### 1.1 Ιστορική Αναδρομή



Η παλαιότερη περιγραφή του καρκίνου ως έννοια χρονολογείται περίπου στο 3000 π.Χ. στην Αίγυπτο, όπου αναφέρονται 8 περιπτώσεις ελκών ή όγκων μαστού. [1] Γύρω στο 1600 π.Χ. βρέθηκαν τα πρώτα στοιχεία του ανθρώπινου καρκίνου των οστών σε μούμιες και σε παλιά χειρόγραφα στην αρχαία Αίγυπτο. Σύμφωνα με επιγραφές, οι όγκοι είχαν αφαιρεθεί με χειρουργική παρέμβαση. [2] Ο Ιπποκράτης (460-370 π.Χ.), ο οποίος πρώτος ανέφερε στα γραπτά του τον όρο «καρκίνος», [3] περιέφραψε λεπτομερώς τον καρκίνο, χρησιμοποιώντας τους ελληνικούς όρους «καρκίνος» και «καρκίνωμα» για να αναφερθεί σε χρόνια έλκη ή διογκώσεις που φαίνονταν να είναι κακοήθεις όγκοι. Ο Κέλσος (28 π.Χ. - 50 μ.Χ.), ένας ρωμαίος γιατρός, τόνισε ότι ο ελληνικός όρος «cacoethes» αναφέρεται σε όγκους σε πρώιμο στάδιο και σημαίνει «ολέθρια, κακοήθης» όταν χρησιμοποιείται ως επίθετο και «όγκος που είναι δύσκολο να διακριθεί από το καρκίνωμα», όταν χρησιμοποιείται ως ουσιαστικό. Η λέξη «Cacoethes» προέρχεται από την ελληνική λέξη «cacos», που σημαίνει «κακό, βρώμικο». Ο Galien (130-200 μ.Χ.) χρησιμοποίησε την ελληνική λέξη «oncos» για να αναφερθεί σε μια διόγκωση ή έναν όγκο που φαινόταν κακοήθης. Στις αρχές του 19ου αιώνα η λέξη «καρκίνωμα» έγινε συνώνυμο του «καρκίνος» και η κατάληξη «-ωμα» χρησιμοποιήθηκε για να ορίσει κάποιες καρκινικές βλάβες. Ενώ από τα πολύ αρχαία χρόνια χρησιμοποιείται η λέξη «καρκίνος», η σύγχρονη τάση είναι να χρησιμοποιείται η ονομασία «ογκολογικές παθήσεις». Στην πραγματικότητα, η ογκολογία είναι η επιστήμη που μελετά τη φύση, την αιτιολογία, την πρόληψη, τη διάγνωση, τη θεραπεία, την αποκατάσταση και την παρηγορητική φροντίδα του φάσματος των ασθενειών που ονομάζεται «καρκίνος».

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου στον κόσμο, μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα, καθώς το ήμισυ των ανδρών και το ένα τρίτο των γυναικών στις Ηνωμένες Πολιτείες θα αναπτύξει καρκίνο στη διάρκεια της ζωής τους. Σήμερα, εκατομμύρια άνθρωποι με καρκίνο παρατείνουν το προσδόκιμο επιβίωσής τους λόγω της έγκαιρης διάγνωσης και της θεραπείας.

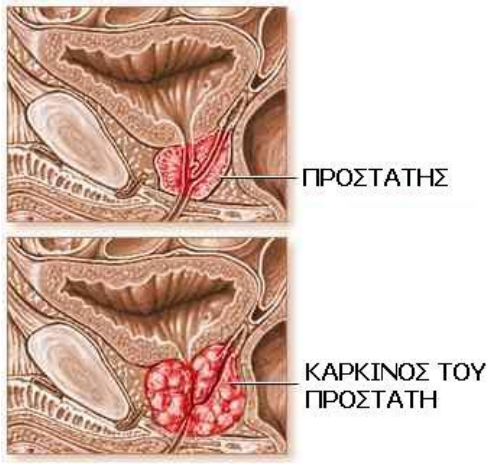
Ο καρκίνος αναπτύσσεται όταν φυσιολογικά κύτταρα αρχίζουν να αναπτύσσονται χωρίς έλεγχο. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι καρκίνων, όπου όλοι όμως οι τύποι συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται αντί να πεθαίνουν. Ορισμένοι τύποι καρκινικών κυττάρων συχνά μεταναστεύουν σε άλλα μέρη του σώματος μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή των λεμφαγγείων (μετάσταση), όπου αρχίζουν να αναπτύσσονται. Οι άνθρωποι μπορούν επίσης να κληρονομήσουν κατεστραμμένο DNA από τους γονείς τους. Πολλές φορές όμως το DNA ενός ατόμου καταστρέφεται από την έκθεση σε βλαπτικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα. [4]

## 1.2 Θεωρίες για τον Καρκίνο

Υπάρχουν πολλές θεωρίες τόσο για το σχηματισμό του καρκίνου, όσο και για την εξάπλωσή του. Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με τη Χυμική Θεωρία, ο Ιπποκράτης πίστευε ότι το σώμα περιείχε 4 χυμούς (σωματικά υγρά), (α) το αίμα, (β) το φλέγμα, (γ) τη κίτρινη χολή και (δ) τη μαύρη χολή και οτι οποιαδήποτε ανισορροπία αυτών, θα οδηγούσε σε ασθένεια, με την περίσσεια της μαύρης χολής σε ένα συγκεκριμένο όργανο να προκαλεί καρκίνο. Σύμφωνα όμως με τη θεωρία Lymph η λέμφος οφειλόταν για το σχηματισμό του καρκίνου, ενώ μέσω της θεωρίας βλαστήματος ο Muller κατέδειξε, το 1838, ότι ο καρκίνος δημιουργείται από κύτταρα και όχι με τη λέμφο. Ο Virchow, με τη θεωρία του Χρόνιου Ερεθισμού, πρότεινε ότι ο χρόνιος ερεθισμός ήταν η αιτία του καρκίνου. Αργότερα ο Thiersch τόνισε ότι οι καρκίνοι κάνουν μετάσταση μέσω της εξάπλωσης των κακοήθων κυττάρων και όχι μέσω κάποιου άγνωστου υγρού. Από τα τέλη του 1800 μέχρι τη δεκαετία του 1920 θεωρούσαν οτι ο καρκίνος προκαλείται από τραύμα, γνωστή και ως θεωρία του τραύματος, και μέχρι το 18ο αιώνα οι επιστήμονες πίστευαν ότι ο καρκίνος ήταν μεταδοτικός και εξαπλωνόταν μέσω κάποιου παρασίτου (θεωρία των παρασίτων). Ύστερα από την ανακάλυψη της ελικοειδούς δομής του DNA από τους Watson και Crick, οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι ο καρκίνος μπορεί να προκληθεί από χημικές ουσίες (καρκινογόνες ουσίες), ακτινοβολία, ιούς και επίσης να κληρονομηθεί από τους προγόνους. Οι περισσότερες καρκινογόνες ουσίες βλάπτουν το DNA και οδηγούν σε μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970, οι επιστήμονες ανακάλυψαν 2 σημαντικές οικογένειες γονιδίων, τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα πρώτα προκαλούν ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των φυσιολογικών κυττάρων και μετατροπή τους σε καρκινικά κύτταρα. Δημιουργούνται από τις μεταλλάξεις ορισμένων φυσιολογικών γονιδίων των κυττάρων που ονομάζεται πρωτοογκογονίδια (γονίδια που φυσιολογικά ελέγχουν πόσο συχνά ένα κύτταρο διαιρείται). Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση, την επιδιόρθωση του DNA και καθορίζουν πότε θα πεθάνουν τα κύτταρα. Όταν ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο δεν λειτουργεί σωστά, τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς έλεγχο, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία καρκίνου.

Τουλάχιστον πέντε μοντέλα καρκινογένεσης έχουν προταθεί στην ιστορία της έρευνας για τον καρκίνο τον τελευταίο αιώνα. Η $1^{η}$ θεωρία επικεντρώνεται κυρίως στις μεταλλάξεις, στο χημικό περιβάλλον, στην ακτινοβολία και στους ιούς. Η $2^{η}$ θεωρία αφορά κυρίως την αστάθεια του γονιδιώματος, ενώ η $3^{η}$ θεωρία βασίζεται σε μη γονοτοξικούς μηχανισμούς με κύρια χαρακτηριστικά της την κλωνική επέκταση και την επιγενετική. Η $4^{η}$ θεωρία βασίζεται στην έννοια της «σωματικής κυτταρικής επιλογής» και η $5^{η}$ θεωρία στην έννοια της «οργάνωσης του ιστού». Τα πέντε μοντέλα μπορούν να συμπεριληφθούν σε ένα απλούστερο σύστημα, που περιλαμβάνει δυο τύπους μοντέλων: (i) Οι βιολογικές αλλαγές στο επιθήλιο οδηγούν από μόνες τους σε κακοήθεια και (ii) Οι μεταβολές στο στρώμα / εξωκυττάρια μήτρα είναι απαραίτητες (μαζί με τις αλλαγές στο επιθήλιο) για τη δημιουργία κακοηθειών. [3] [5] [6]

## 1.3 Επιδημιολογικά Στοιχεία Καρκίνου του προστάτη




Ο καρκίνος του προστάτη (PCa) παραμένει μια από τις πιο συχνά διαγνωσθείσες κακοήθειες του κόσμου, με συχνότητα εμφάνισης στην Ευρώπη 214 περιπτώσεις ανά 1000 άνδρες. Το 70% των ανδρών που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του προστάτη είναι πάνω από 65 ετών. [7] [8] Οι άνδρες με έναν αδελφό ή με πατέρα που πάσχει από καρκίνο του προστάτη έχουν σχεδόν διπλάσιο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη και οι ίδιοι. Ο κίνδυνος αυξάνεται καθώς αυξάνεται και ο αριθμός των προσβεβλημένων μελών της οικογένειας. Επιπλέον, οι άνδρες, οι οποίοι έχουν συγγενή με καρκίνο του μαστού ή και των ωοθηκών μπορεί επίσης να διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του προστάτη. [9] Αυξημένες πιθανότητες προσβολής από τη νόσο εμφανίζουν και οι άντρες, οι οποίοι ανήκουν σε κατώτερες κοινωνικές και οικονομικές ομάδες και κατοικούν σε αστικές περιοχές, ενώ παράλληλα φαίνεται ότι οι μαύροι προσβάλλονται πιο συχνά από τους λευκούς. Έχει παρατηρηθεί ότι οι πρόσφυγες, οι οποίοι μετακινούνται σε περιοχές με αυξημένη θνητότητα από καρκίνο του προστάτη, παρουσιάζουν και αυτοί αυξημένη θνησιμότητα. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη σημαντικότητα της επίδρασης των περιβαλλοντικών και διατροφικών παραγόντων στην εμφάνιση καρκίνου του προστάτη. [10]

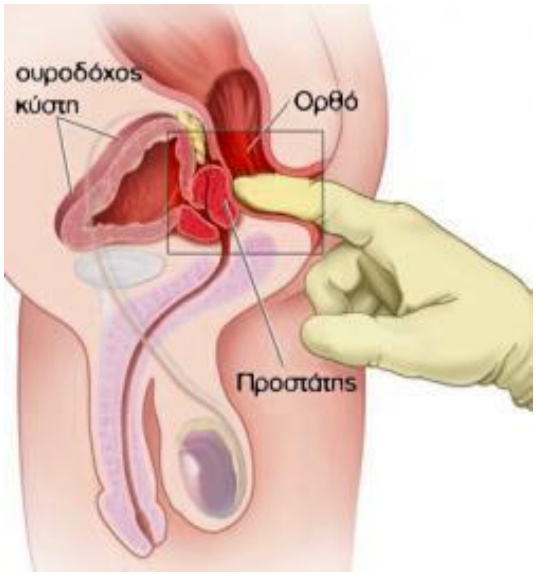
Οι παράγοντες που καθορίζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη δεν είναι απολύτως γνωστές. Ωστόσο οι τρείς κύριες αιτίες φαίνεται να είναι η ηλικία, η εθνική καταγωγή και η κληρονομικότητα. [11] Ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου φαίνεται να είναι η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού της νόσου, με μελέτες σε διδύμους να δείχνουν ότι περίπου το 42% του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη μπορεί να αποδοθεί σε κληρονομικούς παράγοντες. [12] Άλλες αιτίες εμφάνισης αποτελούν η υιοθέτηση δυτικού τύπου διατροφής, η καλοήθης υπερτροφία του προστάτη και η έκθεση σε παράγοντες κινδύνου, όπως ο μόλυβδος και το κάδμιο. Επιπλέον, ο καθιστικός τρόπος ζωής, η υψηλή πρόσληψη αλκοόλης, η παχυσαρκία και το κάπνισμα μετά τη διάγνωση του καρκίνου, σχετίζονται με επιδείνωση της πρόγνωσης. [13] Ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην κατανόηση του ρόλου του τρόπου ζωής και διατροφής σχετικά με τη συχνότητα και την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη. [10] [14]

Τόσο η ACS (American Cancer Society) όσο και η NCCN (National Comprehensive Cancer Network) προτείνουν παρακολούθηση μέσω δακτυλικής εξέτασης και ελέγχου του ειδικού προστατικού αντιγόνου στους άνδρες ηλικίας 45 ετών και άνω, εάν έχουν 2 ή περισσότερους προσβεβλημένους συγγενείς πρώτου βαθμού. Η Αμερικάνικη Ένωση Ουρολογίας (AUA) συνιστά επιτήρηση από την ηλικία των 40 ετών

για τους άνδρες με 1 προσβεβλημένο συγγενή πρώτου βαθμού. Ανεξάρτητα από το πότε θα ξεκινήσει η παρακολούθηση, όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να ενημερώνονται σχετικά με τους κινδύνους, τα οφέλη και τις αβεβαιότητες των διαφόρων τρόπων παρακολούθησης του καρκίνου του προστάτη. [9]

### 1.4 Διάγνωση και Σταδιοποίηση

Δεν υπάρχει σήμερα πρόγραμμα προσυμπτωματικού ελέγχου βάσει πληθυσμού για την έγκαιρη διάγνωση του προστάτη σε όλους τους άνδρες. Για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του προσυμπτωματικού ελέγχου, έχουν δημοσιευθεί δύο μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες: Η δοκιμασία ελέγχου για τον προστάτη, τον πνεύμονα, το παχύ έντερο και τις ωοθήκες (PLCO) στις Ηνωμένες Πολιτείες και η Ευρωπαϊκή τυχαιοποιημένη μελέτη του προσυμπτωματικού ελέγχου για τον καρκίνο του προστάτη (ERSPC) στην Ευρώπη.




Τα κύρια εργαλεία για τη διάγνωση του προστάτη περιλαμβάνουν τη δακτυλική εξέταση (DRE), τη συγκέντρωση του PSA (προστατικό αντιγόνο) στον ορό και τη βιοψία. Το προστατικό αντιγόνο (PSA) είναι μια πρωτεΐνη, η οποία παράγεται από τον προστάτη και κύρια λειτουργία της είναι να ρευστοποιεί το σπέρμα. Έτσι τα σπερματοζωάρια κινούνται πιο γρήγορα για να γονιμοποιήσουν το ωάριο. Το επίπεδο του PSA είναι μια συνεχής παράμετρος και όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη. [8]

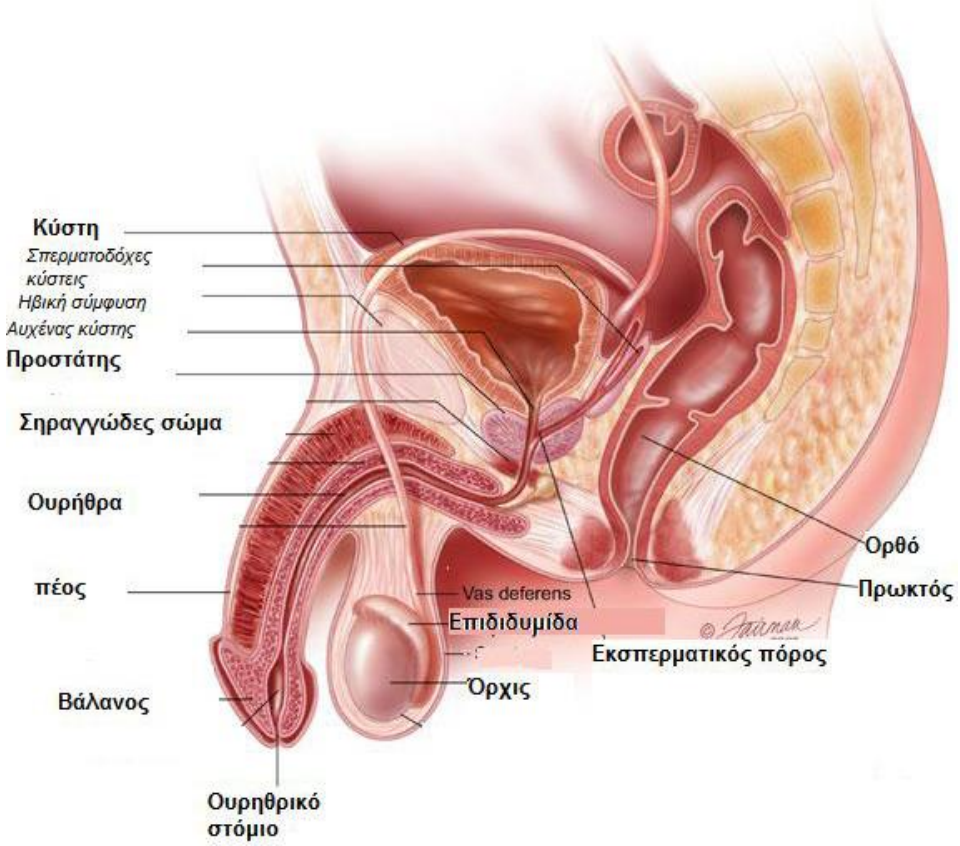
| Τιμή PSA (ng/ml) | Κίνδυνος Εμφάνισης Καρκίνου Προστάτη (%) |
|---|---|
| 0–0.5 | 6,6 |
| 0.6–1 | 10,1 |
| 1.1–2 | 17 |
| 2.1–3 | 23,9 |
| 3.1–4 | 26,9 |

Πίνακας 1: Κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε σχέση με τις τιμές του PSA.

### 1.5 Θεραπεία

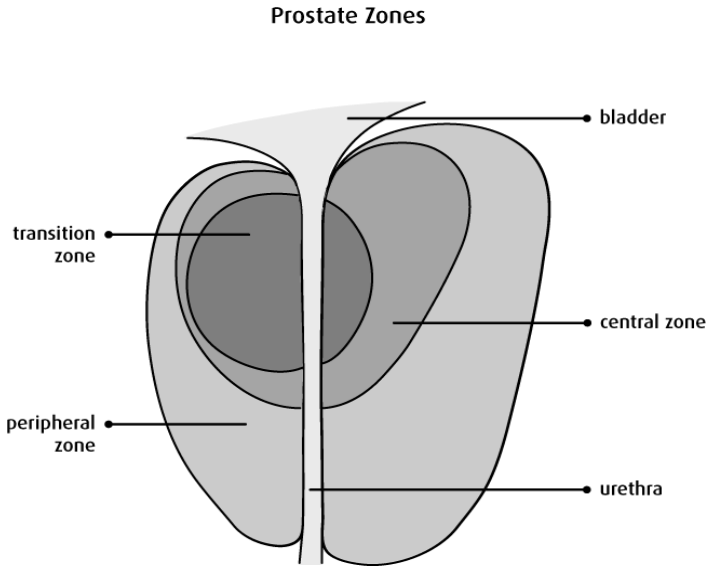
Υπάρχουν αρκετοί τρόποι θεραπείας του καρκίνου του προστάτη. Συνεπώς, ο κλινικός γιατρός αποφασίζει για την καταλληλότερη μέθοδο ή το συνδυασμό των μεθόδων ανάλογα με τον ασθενή. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η προστατεκτομή, η ακτινοθεραπεία, η χημειοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία και η θεραπεία με ανδρογονικό αποκλεισμό. [15] [16] [17]

## 1.6 Ανατομία Προστάτη




Ο προστάτης είναι ένας μικρός μυώδης αδένας, ο οποίος εντοπίζεται κάτω από την ουροδόχο κύστη, στην πυελική κοιλότητα του σώματος. Έχει σχήμα ανεστραμμένης πυραμίδας και τυλίγει την προστατική ουρήθρα και τους αγωγούς εκσπερμάτωσης. Οι μέσες διαστάσεις του προστάτη στον ενήλικα άντρα είναι 4,1 εκατοστά πλάτος, 3,3 εκατοστά ύψος και 2,4 εκατοστά πάχος. [18] [19] Το πραγματικό μέγεθος του προστάτη ποικίλλει από άνθρωπο σε άνθρωπο και μπορεί να κυμαίνεται από το μέγεθος ενός καρυδιού έως το μέγεθος ενός μικρού μήλου. Ο αδένας του προστάτη καλύπτεται από ένα στρώμα συνδετικού ιστού που ονομάζεται προστατική κάψα. [20][21]

Σύμφωνα με την μελέτη του McNeal, ο προστάτης μπορεί να διαιρεθεί σε πέντε ζώνες: το μη αδενικό πρόσθιο ινομυϊκό στρώμα και τέσσερα αδενικά συστατικά: την περιφερική ζώνη (περίπου 70% του αδενικού προστάτη), την κεντρική ζώνη (25%), τη ζώνη μετάβασης (5%) και τον περιουρηθρικό αδενικό ιστό (<1%). [22] Αυτές οι διαφορετικές ζώνες συντήκονται σφικτά μεταξύ τους με ένα κοινό περίβλημα ινομυϊκού ιστού. [23]




Η περιφερική ζώνη:

Η περιφερική ζώνη είναι η περιοχή του προστάτη που είναι πιο κοντά στον πρωκτό και αποτελεί περισσότερο από το 70% του αδενικού προστάτη. [24] Μπορεί εύκολα να γίνει αισθητή από τον ιατρό κατά τη διάρκεια της δακτυλικής εξέτασης. Το μεγαλύτερο ποσοστό των καρκίνων του προστάτη εντοπίζονται στην περιφερική ζώνη (70%) [20] [21] [25]

Μεταβατική ζώνη:

Η μεταβατική ζώνη είναι η μεσαία περιοχή του προστάτη, μεταξύ της περιφερικής και κεντρικής ζώνης, και περιβάλλει την ουρήθρα καθώς περνά μέσω του προστάτη. Όσο μεγαλώνουν οι άντρες, τόσο μεγαλώνει και η ζώνη μετάβασης, μέχρι να γίνει η μεγαλύτερη περιοχή του προστάτη. Το γεγονός αυτό ονομάζεται καλοήθης υπερπλασία του προστάτη. Όταν η μεταβατική ζώνη διευρυνθεί, ωθεί την περιφερική ζώνη του προστάτη προς το ορθό. Το 20% των καρκίνων του προστάτη εμφανίζονται στη μεταβατική ζώνη. [20] [21][25] [26]

Κεντρική ζώνη:

Η κεντρική ζώνη βρίσκεται μπροστά από τη μεταβατική ζώνη και αποτελεί το 25% του αδενικού προστάτη. [24] Είναι το μέρος του προστάτη που είναι το πλέον απομακρυσμένο από το ορθό και περιβάλλει τους αγωγούς εκσπερμάτωσης. Ως εκ τούτου, οι όγκοι του προστάτη σε αυτή τη ζώνη, οι οποίοι αποτελούν μόνο το 1-5 % των καρκίνων του προστάτη [24], δεν μπορούν να γίνουν αισθητοί από τον ιατρό με τη δακτυλική εξέταση. [20] [21][26]

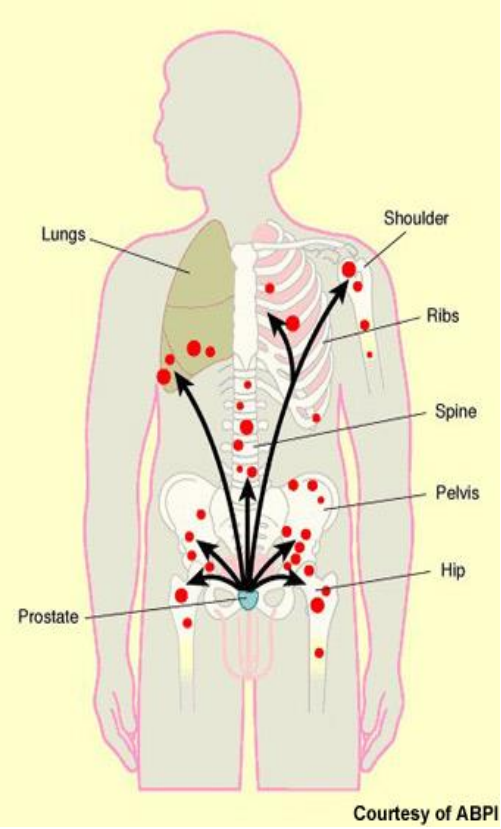
Ο προστάτης περιέχει δύο βασικά είδη ιστών, τον εξωκρινή αδενικό ιστό και τον ινομυϊκό ιστό. Ο εξωκρινής αδενικός ιστός του προστάτη είναι επιθηλιακός ιστός εξειδικευμένος για την έκκριση των συστατικών του σπέρματος. Ο ινομυϊκός ιστός είναι ένα μίγμα από λείο μυϊκό ιστό και πυκνό ακανόνιστο συνδετικό ιστό που περιέχει πολλές ίνες κολλαγόνου. Οι ίνες κολλαγόνου του ιστού παρέχουν δύναμη στον ιστό, ενώ οι λείες μυϊκές ίνες επιτρέπουν στον ιστό να συρρικνωθεί για την αποβολή υγρών. Ο ινομυϊκός ιστός σχηματίζει το εξωτερικό στρώμα του προστάτη και του ιστού που περιβάλλει την ουρήθρα. [27]

## 1.7 Λειτουργίες Προστάτη

Ο προστάτης εκκρίνει ένα γαλακτώδες λευκό μίγμα, το οποίο αποτελείται από απλά σάκχαρα (όπως φρουκτόζη και γλυκόζη), ένζυμα και αλκαλικά χημικά στοιχεία. Το υγρό αυτό τρέφει και προστατεύει το σπέρμα. Ο προστάτης περιέχει τον αγωγό εκσπερμάτωσης που απελευθερώνει σπέρμα κατά την εκσπερμάτωση. Ο αγωγός ανοίγει για να επιτρέψει το σπέρμα να περάσει από τον εκσπερματικό πόρο εντός της ουρήθρας και τελικά έξω από το σώμα. Όταν ένας άνδρας διεγείρεται σεξουαλικά, ο προστάτης παράγει μεγαλύτερες ποσότητες αυτού του υγρού. Κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτωσης, ο λείος μυϊκός ιστός συστέλλεται προκειμένου να προωθήσει το σπέρμα μέσω της ουρήθρας.

Σημαντικός είναι ο ρόλος του προστάτη και στον έλεγχο της ροής των ούρων. Η ουρήθρα διέρχεται από την ουροδόχο κύστη, δια μέσου του προστάτη, και έξω από το πέος. Οι μυϊκές ίνες του προστάτη είναι τυλιγμένες γύρω από την ουρήθρα και βρίσκονται υπό τον ακούσιο έλεγχο του νευρικού συστήματος. Αυτές οι ίνες είναι δυνατόν να επιβραδύνουν ή ακόμη και να σταματήσουν τη ροή των ούρων.[20] [21][27]

## ΚΕΦ.2 ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ




Η σκελετική μετάσταση είναι μια αρκετά συχνή κλινική εκδήλωση σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη σε προχωρημένο στάδιο (65-75% των ασθενών), φανερώνοντας ότι το μικροπεριβάλλον του οστού μπορεί να παρέχει πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη των κυττάρων του όγκου. Αλλοιώσεις των οστών συνήθως παρατηρούνται στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης, στις πλευρές και στη λεκάνη και μπορούν να προκαλέσουν πληθώρα σκελετικών επιπλοκών, συμπεριλαμβανομένων των παθολογικών καταγμάτων, της συμπίεσης του νωτιαίου μυελού, και του ανυπόφορου πόνου στα οστά. Ο τύπος των μεταστατικών αλλοιώσεων στα οστά μπορεί να είναι οστεοβλαστικός, οστεολυτικός ή συνδιασμός (οστεοβλαστικός και οστεολυτικός). Ο σχηματισμός νέου οστού στις οστεοβλαστικές μεταστάσεις πραγματοποιείται μέσω ενός οστεοβλαστικού-εξαρτώμενου μηχανισμού. Η οστική απορρόφηση μπορεί να συμβεί με την μεσολάβηση των οστεοκλαστών.

Τρεις θεωρίες έχουν προσπαθήσει να εξηγήσουν την πορεία των μεταστάσεων στους σπονδύλους. Η πρώτη προτείνει ότι τα κύτταρα του όγκου φτάνουν στη σπονδυλική στήλη αφού περάσουν πρώτα από τους πνεύμονες μέσω της κοίλης φλέβας. Η δεύτερη προτείνει ότι τα κύτταρα του όγκου μεταφέρονται στους σπονδύλους μέσω του λεμφικού συστήματος και η τρίτη προτείνει την άμεση μεταφορά καρκινικών κυττάρων στη σπονδυλική στήλη μέσω ανεπτυγμένων αναστομώσεων μεταξύ του πυελικού φλεβικού πλέγματος και του σπονδυλικού φλεβικού συστήματος. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα μεταστατικά κύτταρα μπορούν να κινούνται ελεύθερα μεταξύ του λεμφικού και του αγγειακού συστήματος. [28] [29]

Η ανάπτυξη της μετάστασης στα οστά είναι μια διαδικασία, η οποία αποτελείται από πολλά στάδια και την ακόλουθη αλληλουχία γεγονότων: (1) Ανάπτυξη του όγκου, (2) Αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων, (3) Αγγειογένεση, (4) Διαφυγή από τον προστάτη μέσω ενδαγγείωσης, (5) Επιβίωση στην κυκλοφορία, (6) Χημειοπροσέλκυση και προσκόλληση στο ενδοθηλιακό αγγειακό τοίχωμα του μυελού των οστών, (7) Εξαγγείωση και (8) Οστεοβλαστική μετάσταση. [30]

## ΚΕΦ. 3 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Η λέξη «αυτοφαγία» (autophagy) είναι ελληνική και σημαίνει να φάει («phagy») τον εαυτό του («Auto»). [31] Υπάρχουν τρεις τύποι αυτοφαγίας, η αυτοφαγία μέσω τσαπερονίων, η μικροαυτοφαγία και η μακροαυτοφαγία. [32] Η μακροαυτοφαγία και μικροαυτοφαγία διαφέρουν σε σχέση με την οδό με την οποία το κυτταροπλασματικό υλικό παραδίδεται στο λυσόσωμα. Η μικροαυτοφαγία περιλαμβάνει την εγκόλπωση του κυτταροπλάσματος κατευθείαν στη λυσοσωματική επιφάνεια, με εγκόλπωση, προεξοχή, ή/και διαφραγματοποίηση της λυσοσωματικής περιοριστικής μεμβράνης. Αντίθετα, η μακροαυτοφαγία εμπλέκει το σχηματισμό κυτταροπλασματικών κυστιδίων διπλής μεμβράνης, τα οποία εγκλωβίζουν τμήματα του κυτταροπλάσματος. Η σύντηξη του ολοκληρωμένου κυστιδίου, αυτοφαγόσωμα, με το λυσόσωμα έχει σαν αποτελέσματα την παράδοση ενός κυστιδίου ή αυτοφαγικού σώματος μέσα στον αυλό του αποικοδομητικού διαμερίσματος. [33]

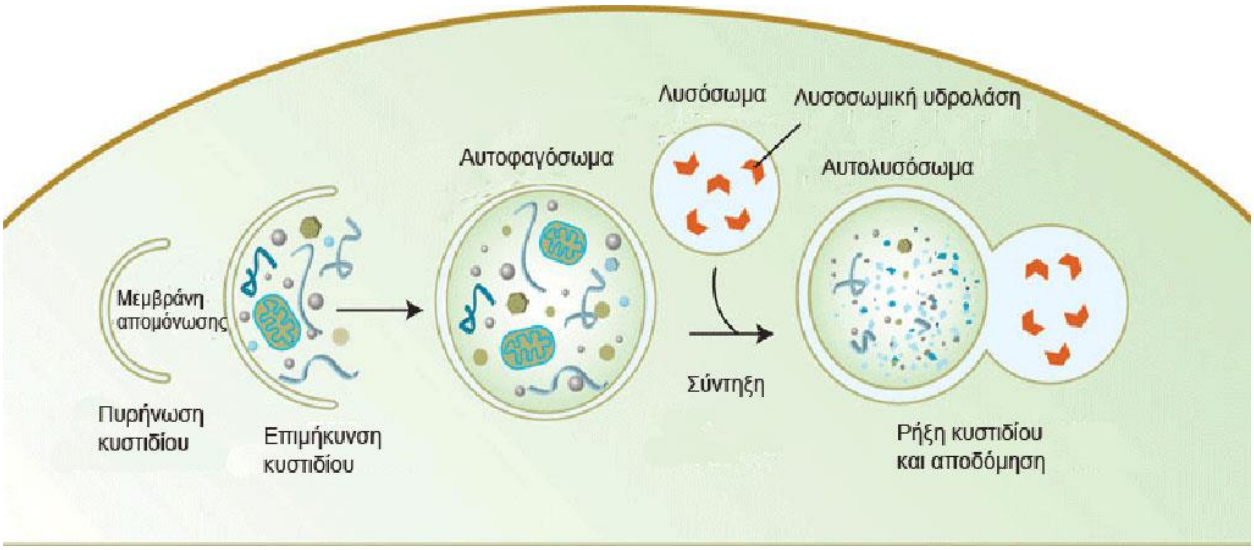
Η μακροαυτοφαγία, στο εξής αποκαλούμενη αυτοφαγία, διαδραματίζει έναν άμεσο ή έμμεσο ρόλο στην υγεία και την ασθένεια του ανθρώπου. Ορίζεται ως μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, η οποία καταστέλλει τα τροποποιημένα, περιττά ή κατεστραμμένα κυτταρικά μακρομόρια και ολόκληρα οργανίδια χρησιμοποιώντας υδρολυτικά ένζυμα στα λυσοσώματα. [34] [35] Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και ρυθμίζεται μέσω της δράσης διαφόρων κινασών, φωσφατασών, και γουανοσίνο-τριφωσφατασών. Ο βασικός πρωτεϊνικός μηχανισμός, ο οποίος είναι απαραίτητος για το σχηματισμό και την κατανάλωση ενδιάμεσων στο μονοπάτι της μακροαυτοφαγίας, περιλαμβάνει ένα πρωτεϊνικό σύστημα σύζευξης και ένα σύμπλοκο πρωτεΐνης που κατευθύνει τη μεμβρανική σύνδεση και σύντηξη στο λυσόσωμα ή στο χυμοτόπιο. Η μακροαυτοφαγία διαδραματίζει, επιπροσθέτως, σημαντικό ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες, στις ανθρώπινες ασθένειες και στις κυτταρικές αποκρίσεις όταν παρατηρείται διατροφική υποθρεψία. [36]

Αυτή η οδός (μακροαυτοφαγία) μπορεί να διεγερθεί από πολλές μορφές κυτταρικού στρες, συμπεριλαμβανομένων της έλλειψης θρεπτικών συστατικών, της υποξίας, των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, των βλαβών του DNA, των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, των βλαβών οργανιδίων και των ενδοκυτταρικών παθογόνων οργανισμών. Συνεπώς, η αυτοφαγία είναι μία κυτταρική βιολογική διαδικασία η οποία αποτελεί κεντρική συνιστώσα της ολοκληρωμένης απόκρισης στο στρες. [37]

### 3.1 Τα στάδια της αυτοφαγίας

Το μονοπάτι της αυτοφαγίας στα θηλαστικά ξεκινά με το σχηματισμό μιας μεμβράνης απομόνωσης και περιλαμβάνει τουλάχιστον πέντε μοριακά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων (1) του Atg1/unc-51 συμπλέγματος κινάσης (ULK) (2) της Beclin 1/class III φωσφατιδυλινοσιτόλη-3-κινάσης (3) δύο διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (Atg9 και βακουολικής μεμβρανικής πρωτεΐνης 1 (VMP1)) (4) δύο ουβικουϊτίνο-πρωτεϊνικών συστημάτων σύζευξης (Atg12 και Atg8 / LC3) και (5) πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν τη σύντηξη μεταξύ αυτοφαγοσωμάτων και λυσοσωμάτων. [37]

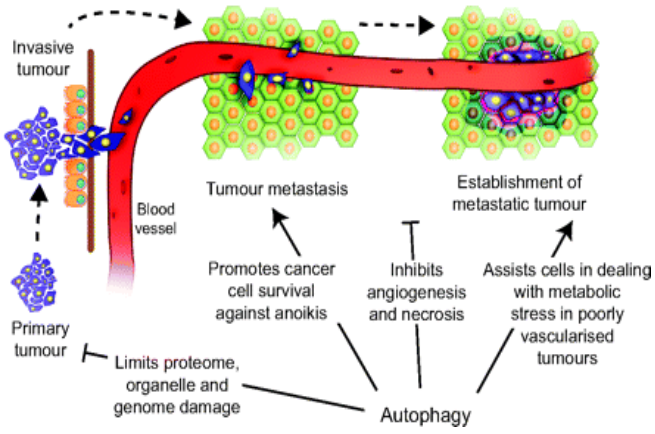
Κατά τη διαδικασία της αυτοφαγίας, διπλά μεμβρανώδη κυστίδια που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα, περιβάλλουν τα κυτταρικά οργανίδια που προορίζονται για αποικοδόμηση. Μόλις διαμορφωθούν πλήρως τα αυτοφαγοσώματα, η εξωτερική μεμβράνη συγχωνεύεται με τη λυσοσωμική μεμβράνη απελευθερώνοντας την εσωτερική κύστη, η οποία στη συνέχεια διασπάται. Τέλος επέρχεται ρήξη του κυστιδίου και αποδόμηση του περιεχομένου του.




Η αυτοφαγία είναι μια δυναμική διαδικασία και μπορεί θεωρητικά να διαιρεθεί στα εξής επτά διακριτά στάδια: 1) Το αρχικό ερέθισμα για να ξεκινήσει ο σχηματισμός των κυστιδίων, 2) Η επιλογή και το πακετάρισμα του περιεχομένου, 3) Η έναρξη του σχηματισμού κυστιδίων (πυρήνων), 4) Η επέκταση και η ολοκλήρωση των κυστιδίων, 5) Η ανάκτηση ορισμένων αυτοφαγικών πρωτεϊνών κατά τη διάρκειά της ή μετά την ολοκλήρωση των κυστιδίων, 6) Η σύντηξη του ολοκληρωμένου κυστιδίου με το λυσόσωμα και 7) Η κατανομή της εσωτερικής μεμβράνης των κυστιδίων και του περιεχομένου τους εντός του λυσοσωματικού αυλού. [38]

### 3.2 Ο ρόλος της αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ενέργειας και στην επιβίωση των κυττάρων σε κατάσταση στρες. Επίσης εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, σε αρκετές καταβολικές διαδικασίες, στην αυτοανοσία, στην αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών οργανιδίων και μακρόβιων πρωτεϊνών και στον κυτταρικό θάνατο. Το σύστημα της αυτοφαγίας ενεργοποιείται όταν τα κύτταρα αντιμετωπίζουν στρεσογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η μόλυνση από παθογόνο ή από χημειοθεραπευτικούς παραγόντες, και όταν παρατηρείται έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Μολονότι η αυτοφαγία ξεκινάει ως μια προστατευτική απόκριση στο στρες, η συστηματική ενεργοποίησή της είναι ικανή να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο μέσω αυτοαποικοδόμησης σημαντικών κυτταρικών συστατικών. [39] Επιπλέον, η αυτοφαγία συμβάλλει στη ρύθμιση της καρδιακής ομοιόστασης και μπορεί να εμπλέκεται σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένης της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, της καρδιακής υπερτροφίας και της καρδιακής ανεπάρκειας. [40]




Ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο είναι πολύπλοκος, καθώς φαίνεται να έχει επίδραση τόσο στην προαγωγή, όσο και στην πρόληψη του καρκίνου, ενώ ο ρόλος της μπορεί να μεταβληθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου. Από τη μία πλευρά, η αυτοφαγία είναι ικανή να εμποδίζει τη συσσώρευση των τοξικών κυτταρικών αποβλήτων, μερικά από τα οποία μπορούν να είναι καρκινογόνα, και συνεπώς μπορεί να δράσει ως καταστολέας του όγκου. Από την άλλη πλευρά, όμως η ικανότητά της να υποστηρίζει την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας και θρεπτικής στέρησης μπορεί να συμβάλλει στην επιβίωση του όγκου. Συνεπώς, η αναστολή της αυτοφαγίας μπορεί να επιτρέψει τη συνεχή ανάπτυξη προκαρκινικών κυττάρων, ενώ αντίθετα μπορεί να δράσει και ως καταστολέας του όγκου.

Εν συνεχεία, καθώς ο όγκος αναπτύσσεται, τα καρκινικά κύτταρα πιθανόν να χρειαστούν την αυτοφαγία για να επιβιώσουν υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών και χαμηλού οξυγόνου, ιδιαίτερα στην εσωτερική περιοχή του όγκου όπου η αγγείωση είναι ελάχιστη. Επιπλέον, η αυτοφαγία μπορεί να προστατεύσει ορισμένα καρκινικά κύτταρα από τις ιονίζουσες ακτινοβολίες, ενδεχομένως μέσω της απομάκρυνσης των κατεστραμμένων μακρομορίων ή οργανιδίων.

Η αυτοφαγία έχει θεωρηθεί από καιρό ότι είναι μια μη εκλεκτική οδός αποδόμησης. Ωστόσο, πρόσφατα, έχουν προσδιοριστεί διάφορες μορφές επιλεκτικής αυτοφαγίας, οι οποίες οδηγούν σε υποβάθμιση συγκεκριμένων οργανιδίων, πρωτεϊνών, παθογόνων ζυμομυκήτων, μυγών και θηλαστικών. [41] [42] [43]

### 3.3 Αυτοφαγία και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Η αυτοφαγία εμπλέκεται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD). Η απόπτωση αποτελεί τον τύπου I PCD και χαρακτηρίζεται από συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος και της χρωματίνης, κατακερματισμό του DNA και απομάκρυνση των πεθαμένων κυττάρων με φαγοκυττάρωση. Ο τύπου II PCD είναι η αυτοφαγία και χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση αυτοφαγικών κυστιδίων (αυτοφαγοσώματα και αυτοφαγολυσοσώματα). Παρατηρείται όταν απαιτείται μαζική εξάλειψη των κυττάρων ή όταν τα φαγοκύτταρα δεν έχουν εύκολη πρόσβαση στα κύτταρα που πεθαίνουν. Ένα χαρακτηριστικό που διακρίνει την απόπτωση από την αυτοφαγία είναι η πηγή των λυσοσωμικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται. Τα αποπτωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν φαγοκυτταρικά λυσοσώματα για αυτή τη διαδικασία, ενώ τα κύτταρα στην αυτοφαγία χρησιμοποιούν τον ενδογενή λυσοσωμικό μηχανισμό των κυττάρων που πεθαίνουν. Είναι ασαφές κατά πόσον η αυτοφαγία εκτελεί απευθείας τον κυτταρικό θάνατο ή είναι το δευτερεύον φαινόμενο της απόπτωσης.

Η ενεργοποίηση του αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου συνήθως λαμβάνει χώρα σε κύτταρα όπου η απόπτωση έχει αποκλειστεί μέσω της χρήσης αναστολέων. Έτσι, η πραγματική φυσιολογική σημασία της αυτοφαγίας στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο δεν είναι σαφής. Η αυτοφαγία μπορεί όχι μόνο να είναι η αιτία του κυτταρικού θανάτου, αλλά μπορεί επίσης να προηγείται της απόπτωσης ως μηχανισμός άμυνας. [43]

### 3.4 Η αυτοφαγία ως ογκοκατασταλτική διαδικασία

Διάφοροι είναι οι μηχανισμοί, οι οποίοι συμβάλλουν στην καταστολή του όγκου λόγω της αυτοφαγίας. Υπό συνθήκες στρες, η αυτοφαγία ενεργοποιείται για να απομακρύνει τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες και τα οργανίδια, συμπεριλαμβανομένων και των μιτοχονδρίων. Η αναστολή ή η έλλειψη της δράσης της αυτοφαγίας σε παρόμοιες συνθήκες μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του DNA, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει υψηλότερη ευαισθησία για την έναρξη του καρκίνου και την ανάπτυξή του. Η p62 (επίσης γνωστή ως sequestosome-1, SQSTM1) είναι μία συνοδός πρωτεΐνη, τα επίπεδα της οποίας συχνά υπερεκφράζονται σε ανθρώπους με καρκίνο και θεωρείται ότι η πρωτεΐνη αυτή προάγει την ογκογένεση. Στο πλαίσιο της αυτοφαγίας, η p62 δρα ως πρωτεΐνη-προσαρμοστής που συνδέει LC-3 με τμήματα ουμπικουϊτίνης. Ως εκ τούτου, η αυτοφαγία συμβάλλει στην κάθαρση της p62 από την ουμπικουϊτίνη. Η καταστολή της αυτοφαγίας, ως εκ τούτου οδηγεί σε συσσώρευση της p62 και συμβάλλει στην ογκογένεση. [44]

### 3.5 Η αυτοφαγία ως ογκογόνος διαδικασία

Η αυτοφαγία ενεργοποιείται ως ένας προσαρμοστικός μηχανισμός όταν το ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον είναι ανεπαρκή και όταν τα κύτταρα είναι μεταβολικά στρεσαρισμένα. Κατά την αρχική φάση σχηματισμού του όγκου, τα καρκινικά κύτταρα συχνά βιώνουν υποξία και βρίσκονται σε ένα περιβάλλον ελλιπές σε θρεπτικά συστατικά. Τα καρκινικά κύτταρα βασίζονται στην αυτοφαγία ως στρατηγική επιβίωσης και μπορούν να συνεχίσουν τον πολλαπλασιασμό τους όταν το στρεσογόνο περιβάλλον έχει βελτιωθεί. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα που παρακάμπτουν τον μηχανισμό της απόπτωσης, μπορούν να αποφύγουν τη νέκρωση μέσω της ενεργοποίησης του μηχανισμού της αυτοφαγίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η καταστολή της αυτοφαγίας προάγει το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. [44]

### 3.6 Ρύθμιση της αυτοφαγίας

Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που ρυθμίζει την έκφραση ενός φάσματος γονιδίων που συμβάλλουν στην καταστολή του όγκου. Η σημασία του στην πρόληψη της ανάπτυξης του καρκίνου εξηγείται από το γεγονός ότι η p53 υφίσταται μετάλλαξη στο 50% των ανθρώπινων καρκίνων. Βασικά επίπεδα της p53 έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλουν την αυτοφαγία σε διάφορους οργανισμούς. Ως απάντηση στο στρες, η p53 μπορεί να ενεργοποιήσει το ULK1 και το ULK2, τα οποία αποτελούν τα κύρια συστατικά του μηχανισμού της αυτοφαγίας. Στο πλαίσιο αυτό, η αυξημένη συγκέντρωση των ULK1 και ULK2 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας και τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Η p53, που λειτουργεί ως πρωτεϊνικός καταστολέας όγκου, μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω διάφορων ειδών στρες και πιθανόν να έχει αρνητική επίδραση στην αυτοφαγία λόγω κάποιων κυτταροπλασματικών λειτουργιών του. Υπάρχουν ορισμένα είδη κυττάρων, όπως τα PC-3, τα οποία δεν εκφράζουν το γονίδιο p53. [45]

Η mTOR είναι μια σερίνη / θρεονίνη πρωτεϊνική κινάση, η οποία διακρίνεται σε δύο διακριτά σύμπλοκα. Το ένα ονομάζεται mTOR1 (mTORC1) και το δεύτερο mTORC2. Τα συγκεκριμένα συμπλέγματα αντιλαμβάνονται μια ποικιλία μηνυμάτων, όπως τα σήματα ανάπτυξης, τα θρεπτικά συστατικά και την κατάσταση ενέργειας. Το mTORC1 αποτελείται από τα συστατικά του πυρήνα, mTOR, ραπαμυκίνη που σχετίζεται με πρωτεΐνη TOR (Raptor) και mLST8 (επίσης γνωστή ως GbetaL). Σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών ουσιών και ενέργειας, το mTORC1 είναι ενεργοποιημένο και εξασφαλίζει ότι η αυτοφαγία αναστέλλεται. Παρά το γεγονός αυτό, ένα χαμηλό βασικό επίπεδο της αυτοφαγίας εξακολουθεί να εμφανίζεται ακόμη και όταν θρεπτικές ουσίες είναι άφθονες,.

Η αυτοφαγία ελέγχεται επιπλέον και μέσω των κινασών ULK1 και VPS34. Η ενεργοποίηση των ULK1 και VPS34 προωθεί την αυτοφαγοσωμική ωρίμανση, καθώς φαίνεται να επηρεάζει και τη μεταγωγή σήματος μέσω του mTORC1. [37][44]

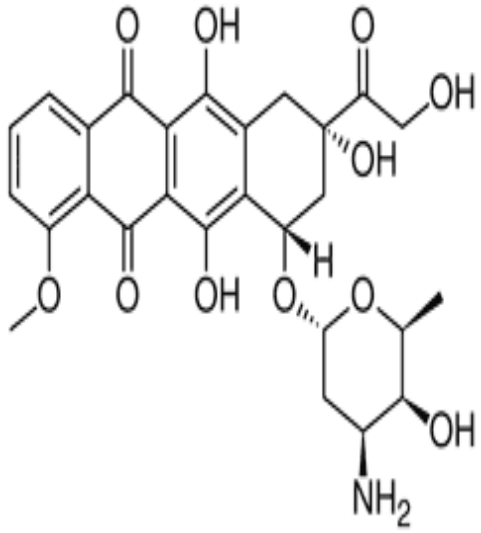
Οι πρωτεΐνες Beclin 1 και ULK1 / Atg1 οδηγούν τις πρωτεΐνες ATG σε σχηματισμό αυτοφαγικών μεμβρανών και αυτοφαγοσωμάτων. Οι map1-LC3 / Atg8 (AC) είναι οι βασικές δομικές πρωτεΐνες των αυτοφαγοσωμάτων και χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες για τη μελέτη της αυτοφαγίας. [46]

### 3.7 Πρωτεΐνη LC-3

Η LC-3 είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 17 kDa και ανευρίσκεται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών. Κατά τη διάρκεια της αυτοφαγίας τα αυτοφαγοσώματα περικλείουν κυτταροπλασματικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και οργανιδίων. Η LC-3 υφίσταται επεξεργασία στο καρβοξυτελικό της άκρο από την Atg4 και μετατρέπεται σε LC3-I. Η LC3-I εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Όταν αυτή ενωθεί με φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη σχηματίζεται η LC3-φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (LC3-II), η οποία εντοπίζεται τόσο στην εξωτερική όσο και στην εσωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος. Μετά τη σύντηξη με το λυσόσωμα, η LC-3 στην εξωτερική μεμβράνη διασπάται από το Atg4 και η LC-3 στην εσωτερική μεμβράνη αποικοδομείται από λυσοσωματικά ένζυμα, με αποτέλεσμα την πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε LC-3 στο αυτολυσόσωμα. Η αποικοδόμηση του LC3-II, πραγματοποιείται λόγω στέρησης θρεπτικών συστατικών, δηλαδή λόγω επαγόμενης αυτοφαγίας. Συνεπώς, για την παρακολούθηση της αυτοφαγίας αλλά και του κυτταρικού θανάτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι ανίχνευσης της LC-3 με ανοσοφθορισμό ή ανοσοαποτύπωση. [47] [48] [49]

## ΚΕΦ.4 ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗ

Οι ανθρακυκλίνες είναι φυσικά προϊόντα που απομονώνονται από μια μεταλλαγμένη καλλιέργεια του μύκητα Streptomyces peucetius [50] και χρησιμοποιούνται εκτενώς εδώ και 40 χρόνια στη χημειοθεραπεία για τη θεραπεία των συμπαγών όγκων και της λευχαιμίας. Η αδριαμυκίνη (ADM), ένα φάρμακο της οικογένειας ανθρακυκλίνης, απομονώθηκε το 1967 και είναι πολύ αποτελεσματική έναντι ευρείας ποικιλίας ανθρώπινων όγκων.




Η αδριαμυκίνη επάγει την απόπτωση σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα, έχει ισχυρές ιδιότητες αναστολής της ανάπτυξης του όγκου και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στις κακοήθειες της παιδικής ηλικίας. Ωστόσο, η χρήση της περιορίζεται λόγω της καρδιοτοξικότητάς της, μίας παρενέργειας που προκαλείται από την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η προκαλούμενη από την αδριαμυκίνη καρδιακή τοξικότητα χαρακτηρίζεται από μυοκαρδιακή δυσλειτουργία και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. [51] [52] [53] Επιπρόσθετες παρενέργειες που έχουν παρατηρηθεί μετά από τη λήψη αδριαμυκίνης είναι η εμφάνιση αλωπεκίας, λευκοπενίας, στοματίτιδας, γαστρεντερικών και δερματικών διαταραχών αλλά και τοξικών φαινομένων σε όργανα όπως στο ήπαρ, στους νεφρούς και στον εγκέφαλο. [54][55] Στοχεύοντας στη μείωση της καρδιοτοξικότητάς της εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές μεταξύ των οποίων, η μείωση της δόσης της, ο εγκλεισμός της σε λιποσώματα, η συγχορήγηση καρδιοπροστατευτικών ουσιών και η συγχορήγηση φυσικών προϊόντων όπως ολευρωπεΐνης ή κερκετίνης. [51] [52] [53][56]

Παρά την εκτεταμένη χρήση των ανθρακυκλινών, η δράση της αδριαμυκίνης συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο συζήτησης και φαίνεται να είναι ένας συνδυασμός πολλών διαφορετικών μηχανισμών, που ευθύνονται για την υψηλή απόδοσή της. Όλες αυτές οι οδοί επάγουν την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με καταστροφή των κυττάρων κατά τρόπο που να προάγεται ο κυτταρικός θάνατος. Η αδριαμυκίνη συμπεριφέρεται διαφορετικά ανάλογα με τη συγκέντρωση, το χρόνος επώασης, και το είδος των κυττάρων. Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών των μηχανισμών είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη βελτίωση των θεραπειών. [57] [58]

Δυστυχώς, η συνεχόμενη θεραπεία με αδριαμυκίνη επάγει συνήθως την ανάπτυξη ανοχής στο φάρμακο, η οποία παρεμποδίζει την συνέχιση της χορήγησής της στους καρκινοπαθείς. Στο μηχανισμό αυτό εμπλέκονται πολλαπλές βιολογικές αλλαγές, όπως για παράδειγμα η διαταραχή των οδών κυτταρικού θανάτου, οι διαταραχές στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η ανωμαλία στις οδούς μεταβολισμού. [59]

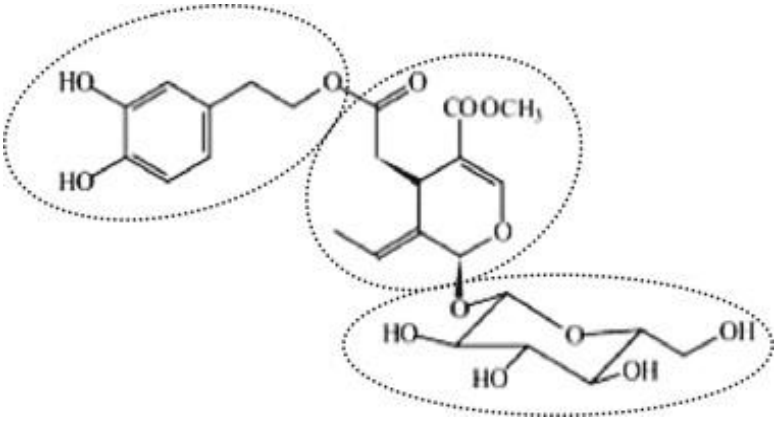
Επιπροσθέτως, οι ανθρακυκλίνες επάγουν την αναστολή της τοποϊσομεράσης ΙΙ, γεγονός που τελικά οδηγεί σε κυτταροτοξική βλάβη του DNA και στον κυτταρικό θάνατο. Οι ανθρακυκλίνες είναι ικανές να παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου από τουλάχιστον δύο διακριτές οδούς. Η ανοχή στα φάρμακα μπορεί επίσης να οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου ή καταστολή της έκφρασης της τοποϊσομεράσης ΙΙ. [53]

## ΚΕΦ. 5 ΟΛΕΥΡΩΠΕΪΝΗ

Οι μεσογειακοί πληθυσμοί, μέσω των διατροφικών τους συνηθειών, φαίνεται να προστατεύονται από τη στεφανιαία νόσο (CHD) και από ορισμένες μορφές καρκίνου. Μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες που περιέλαβαν αρκετές χώρες υπογράμμισαν ότι η περιοχή της Μεσογείου εμφανίζει σημαντικά μειωμένο ποσοστό θνησιμότητας από όλα τα αίτια, που αποδίδεται κυρίως στη μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νόσων και περιστατικών καρκίνου. Η προστατευτική επίδραση αποδόθηκε στη μεσογειακή διατροφή, η οποία είναι πλούσια σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά ολικής άλεσης και προϊόντα ελαίου. Η Lyon Heart Study, μια μεγάλη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή, παρατήρησε ότι μια τροποποιημένη δίαιτα που βασίζεται στο μεσογειακό πρότυπο οδηγεί σε μείωση του συνολικού αριθμού θανάτων κατά 56% και μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου κατά 61% σε 4 χρόνια παρακολούθησης. Στους πληθυσμούς αυτούς έχει παρατηρηθεί χαμηλή πρόσληψη κορεσμένων και πολυακόρεστων λιπών, αλλά υψηλή πρόσληψη σε ελαϊκό οξύ, ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, ίνες, φυσικά αντιοξειδωτικά και βιταμίνες της ομάδας Β.



Το ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της μεσογειακής διατροφής και συνιστά ένα υψηλής αξίας βρώσιμο έλαιο που εκτιμάται για τη γεύση του, καθώς και για τα οφέλη που προσδίδει στην υγεία. Το ελαιόλαδο είναι περισσότερο αποτελεσματικό έναντι του καρκίνου σε σύγκριση με άλλες μορφές προστιθέμενων λιπιδίων, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και φαίνεται να συνδέεται με τη μικρότερη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και νευρολογικών διαταραχών. Αυτές οι βιολογικές ιδιότητες αποδόθηκαν στα λιπαρά οξέα και στις φαινολικές ενώσεις που περιέχει.




Η ολευρωπεΐνη, η οποία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintilesco, είναι ένας φαινολικός σεκο-ιριδοειδής γλυκοζίτης και αποτελείται από μια πολυφαινόλη, κοινώς γνωστή ως υδροξυτυροσόλη, ελενολικό οξύ και ένα μόριο γλυκόζης. Είναι ένα από τα πιο άφθονα βιοενεργά συστατικά που περιέχονται στα φύλλα της ελιάς. Το περιεχόμενο σε ολευρωπεΐνη ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία, το προϊόν της ελιάς, το κλίμα, την ωριμότητα των ελιών κατά τη συγκομιδή, καθώς και το σύστημα επεξεργασίας που χρησιμοποιείται. [60] [61] [62] [63]

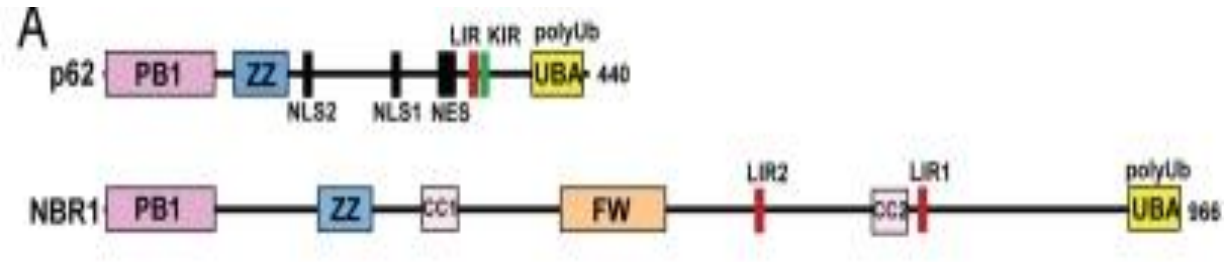
Αρκετές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση των πολυφαινολών της ελιάς. Αυτές οι τεχνικές είναι κυρίως η εκχύλιση, η φυγοκέντρηση, και οι διαδικασίες χρωματογραφίας. Τα αποτελέσματα αυτών των μηχανισμών εξαρτώνται από το κόστος, τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους και από την τοξικότητα και την ευφλεκτότητα του οργανικού διαλύτη που απαιτείται. [64]

### 5.1 Ιδιότητες Ολευρωπεΐνης

Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει τις φυσιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες της ολευρωπεΐνης. Οι ελιές και το ελαιόλαδο είναι πλούσια σε ισχυρά αντιοξειδωτικά, όπως οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή, τα οποία προστατεύουν από βλάβες του DNA. Η ολευρωπεΐνη είναι η πιο άφθονη από τις φαινολικές ενώσεις στον καρπό της ελιάς. Μερικές από τις ευεργετικές της ιδιότητες είναι η αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή, αντικαρκινική, υπολιπιδαιμική, αντιαρρυθμική, σπασμολυτική, αντιφλεγμονώδης, υποτασική, και καρδιοπροστατευτική ιδιότητά της. [60][61][65] Μελέτες έχουν δείξει ότι η ολευρωπεΐνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και τη διεισδυτικότητα των κυττάρων και επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα μαστού, παχέος εντέρου και θυρεοειδούς.

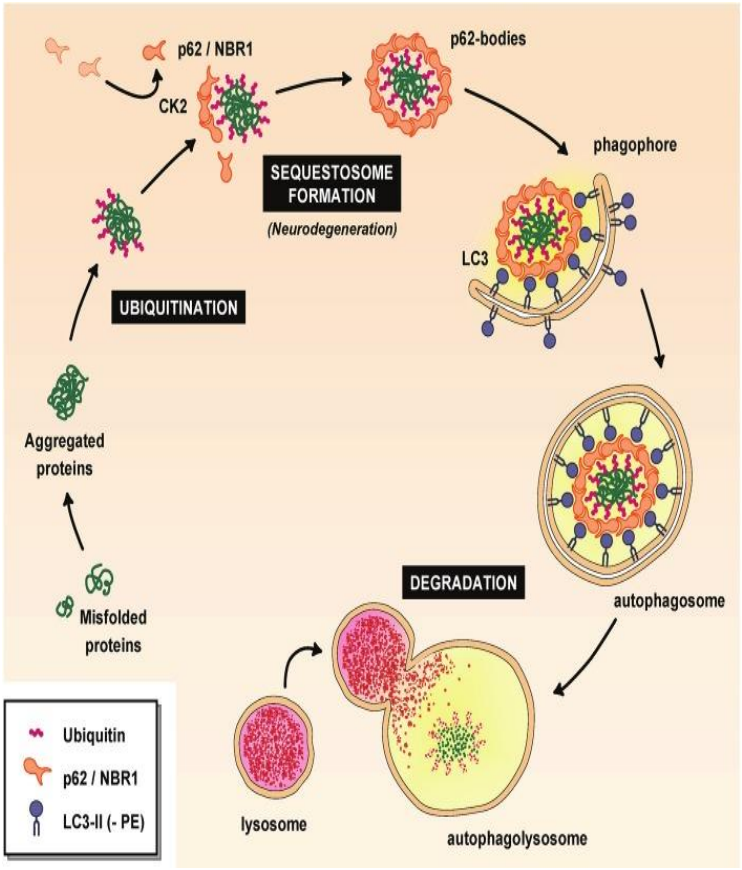
Ως αντιοξειδωτικό, έχει την ικανότητα να προστατεύει τα κύτταρα από το να υφίστανται γενετικές βλάβες που οδηγούν σε ογκογένεση. Ως παράγοντας που καταστέλλει την αγγειογένεση, μπορεί να αποτρέψει την εξέλιξη του όγκου. Τέλος, μέσω άμεσης αναστολής καρκινικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε υποχώρηση του όγκου. [63] [66]

**ΚΕΦ. 6 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ p62, NBR1**




Η ανθρώπινη πρωτεΐνη p62, η οποία ονομάζεται επίσης sequestosome 1 (SQSTM1), χρησιμεύει ως ένας δείκτης για τη μελέτη του μηχανισμού της αυτοφαγίας. Όταν η αυτοφαγία αναστέλλεται, η p62 συσσωρεύεται, ενώ όταν η αυτοφαγία επάγεται, παρατηρείται μείωση των ποσοτήτων p62. Αποτελείται από 440 αμινοξέα και φέρει στο αμινοτελικό της άκρο την περιοχή PBI η οποία της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με τις κινάσες PKCζ, PKCλ/ι, MEKK3, MEK5 αλλά και με την πρωτεΐνη NBR1. Ύστερα ακολουθεί μια περιοχή τύπου δακτυλίου ψευδαργύρου (ZZ), περιοχές για μηνύματα πυρηνικής εντόπισης (NLS), για έξοδο μηνυμάτων από τον πυρήνα (NES), μια περιοχή αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη LC-3 (LIR), και μοτίβα KIR. Στο καρβοξυτελικό της άκρο φέρει μια περιοχή UBA, η οποία της επιτρέπει να αλληλοεπιδρά με ένα ή περισσότερα μόρια ουμπικουϊτίνης και να δημιουργεί ομοδιμερή τα οποία αποτρέπουν τη σύνδεση της ουμπικουϊτίνης. Η πρωτεΐνη p62, είναι επίσης δυνατόν να ομοπολυμεριστεί μέσω της περιοχής PBI. [67] [68] [69] [70] [71] [72]

Η πρωτεΐνη NBR1 αποτελείται από 966 αμινοξέα, και έχει μεγάλη ομολογία με την p62. Οι κοινές περιοχές τους είναι οι PB1, ZZ και UBA, ενώ η NBR1 φέρει επιπλέον μια περιοχή για το διμερισμό του NBR1 και μια νέα, εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία άγνωστης λειτουργίας, γνωστή ως FW περιοχή. Άλλη μια διαφορά με την p62 είναι ότι η NBR1 δεν μπορεί να πολυμεριστεί μέσω του πεδίου PB1, αλλά μπορεί να συνδεθεί με την πρωτεΐνη p62 μέσω αυτού. [73] [74] [75] Παρά τις ομοιότητες μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, p62 και NBR1, δεν απαιτεί η μια την άλλη για τη λειτουργικότητα της. [75]



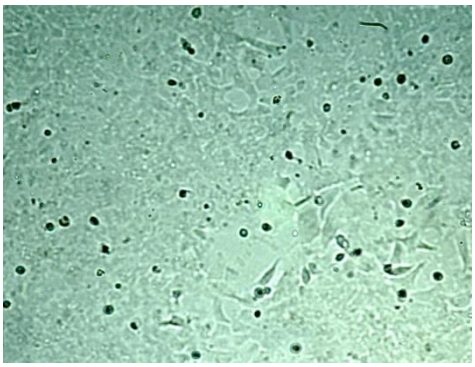

Ένα απλοποιημένο γενικό μοντέλο για τη p62 και την NBR1 διαμεσολαβούμενη αυτοφαγία είναι το εξής: Αρχικά, οι πρωτεΐνες προς αποικοδόμηση αναγνωρίζονται από τα τσαπερόνια ή άλλα κυτταρικά συστήματα και στη συνέχεια υφίστανται τη δράση της ουμπικουϊτίνης. Στη συνέχεια, σχηματίζουν τα σωμάτια p62, γνωστά και ως ALIS, με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 1 μm. Ύστερα αυτά τα σωμάτια είναι δυνατόν είτε να αποδομηθούν από το πρωτεόσωμα είτε να μετατραπούν σε αυτοφαγοσώματα για να επέλθει η λύση τους από τα λυσοσώματα. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών p62 και NBR1 με την πρωτεΐνη LC-3 και της πρωτεΐνης ALFY με την πρωτεΐνη ATG5, καθορίζει αν θα πραγματοποιηθεί η αυτοφαγία. [73] [76] [77] [78] [79]

## ΚΕΦ. 7 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών p62 και NBR1 σε καρκινικά κύτταρα PC-3, ύστερα από χορήγηση αδριαμυκίνης, ολευρωπεΐνης και συγχορήγησης αυτών και η συσχέτιση της δράσης τους με τον μηχανισμό της αυτοφαγίας.

## ΚΕΦ. 8 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 8.1 Κυτταρική σειρά PC-3

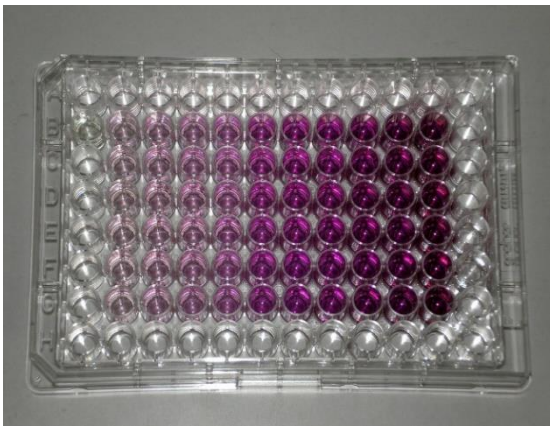


Η κυτταρική σειρά PC-3 προέρχεται από οστική μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος. Τα κύτταρα αυτά έχουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης και δεν εκφράζουν το γονίδιο p53. Έχουν πάντα ενεργοποιημένο το μονοπάτι της κινάσης 3-φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K)/Akt, το οποίο σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση, το μεταβολισμό και την κυτταρική ανάπτυξη. [80] [81] Διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα προστατικά κύτταρα, καθώς η ανάπτυξή τους δεν εξαρτάται σημαντικά από τον ορό και είναι πλήρως ανεξάρτητα από την επίδραση των ανδρογόνων, γλυκοκορτικοειδών, επιδερμικών αυξητικών παραγόντων και αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών. Επίσης παρουσιάζουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης και έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο K-ras που είναι απαραίτητο για τη σωστή μετάδοση του σήματος στους φυσιολογικούς ιστούς. Η κυτταρική σειρά PC-3 αποτελεί χρήσιμο μοντέλο για τη διερεύνηση των βιοχημικών αλλαγών σε κύτταρα προχωρημένου καρκίνου του προστάτη και στην αξιολόγηση της απόκρισής τους σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. [81]

### 8.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Τα κύτταρα PC-3 (American Type Cell Culture ATCC) καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες κυτταροκαλλιεργειών επιφάνειας 75m2. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν Dulbecco's modified Eagle's medium F/12 HEPES (DMEM/F12) εμπλουτιμένο με γλουταμίνη 2mM, στρεπτομυκίνη 100μg/ml, πενικιλλίνη 100U/ml καθώς και εμβρυϊκό βόειο ορό 5% (FBS). Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας στους 37 °C και σε 5% CO2.

### 8.3 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας MTT



Η μέθοδος για την ποσοτική αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας βασίζεται στην ικανότητα του μιτοχονδριακού ενζύμου ηλεκτρικής - αφυδρογονάσης να μετατρέπει το MTT άλας τετραζολίου σε μπλέ παράγωγο φορμαζανίου. Η μετατροπή λαμβάνει χώρα μόνο σε ζωντανά κύτταρα και η ποσότητα φορμαζάνης που παράγεται είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Το γεγονός ότι αυτό το ένζυμο δεν ανιχνεύεται στον ορό επέτρεψε την ανάπτυξη μιας ταχείας και απλής δοκιμασίας, η οποία είχε χρησιμοποιηθεί αρχικά για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Τ-κυττάρων και των λεμφοτοξινών. [82] [83]

Σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι είναι λιγότερο χρονοβόρα, φθηνότερη και η χρήση των φασματοφωτομέτρων σάρωσης με πολλές εκβαθύνσεις επιτρέπει την επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων. [84] Επίσης τα πλεονεκτήματα της χρωματομετρικής δοκιμασίας MTT περιλαμβάνουν την εξοικονόμηση κόστους, αντιδραστηρίων και εξοπλισμού, καθώς και την αποφυγή χρήσης των ραδιοϊσοτόπων [85]

Τα κύτταρα PC-3 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM 10% FBS σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Υποβλήθηκαν σε 96 ώρες επώαση υπό την επίδραση αδριαμυκίνης (50nM) και ολευρωπεΐνης (200μg/mL). Με την παρέλευση των 96 ωρών, σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκε ποσότητα 15 μL (συγκέντρωσης 5mg/mL) φιλτραρισμένου διαλύματος MTT και ακολούθησε επώαση στον κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για 4 ώρες. Αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 150 μL DMSO για να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζανίου. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 590 nm με τη χρήση Elisa reader.

### 8.4 Απομόνωση Πρωτεϊνών

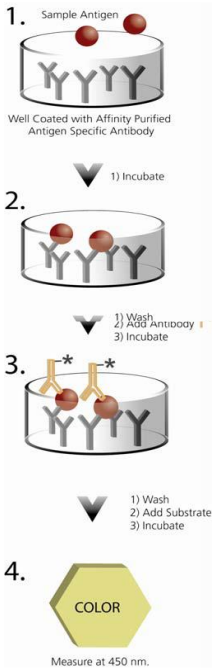
Τα κύτταρα PC-3 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM 10% FBS σε φλάσκες κυτταροκαλλιεργειών. Υποβλήθηκαν σε 48 ώρες επώαση υπό την επίδραση αδριαμυκίνης (50nM), ολευρωπεΐνης (200μg/mL) και συγχορήγησης αδριαμυκίνης (50nM) + ολευρωπεΐνης (200μg/mL). Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με θρυψίνη και φυγοκεντρήθηκαν προκειμένου να καθιζάνουν και να απομακρυνθεί το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο λύσης κυττάρων ώστε να απελευθερωθούν οι προς μελέτη πρωτεΐνες οι οποίες έχουν κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Έτσι προστέθηκε lysis buffer (RIPA και 5% αναστολείς) που περιείχε μείγμα πρόσφατα παραχθέντων αναστολέων. Τέλος, εφαρμόζεται η παρακάτω δοκιμασία Bradford ώστε να προσδιοριστεί η πρωτεϊνική συγκέντρωση σε κάθε δείγμα. Έχοντας διενεργήσει αυτά τα προκαταρτικά στάδια ακολουθεί η ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Elisa.

## 8.5 Δοκιμασία προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η δοκιμασία Bradford αποτελεί φασματοσκοπική αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Βασίζεται στην μετατόπιση της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία σε όξινες συνθήκες μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε καθώς δεσμεύεται στις προς προσδιορισμό πρωτεΐνες. Η απορρόφηση μετράται στα 595 nm.

Έτσι, σε πλάκα μικροτιτλοποίησης αρχικά προστέθηκε ποσότητα ορού βόειας αλβουμίνης, BSA (Bovine Serum Albumin) σε αρχική συγκέντρωση 1mg/mL σταδιακά αραιωμένη με απιονισμένο νερό έως συγκέντρωση 0,03125 mg/mL για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Τα δείγματα αραιώθηκαν με dH2O σε αναλογία 1:5 (2 μl δείγματος και 8 μl νερού) και τέλος προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι ποσότητα Dye Reagent. Ένα πηγαδάκι χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό. Η χρωστική Dye Reagent που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford δημιουργεί σύμπλοκα με τα βασικά και αρωματικά αμινοξέα που εμπεριέχονται στις πρωτεΐνες. Έτσι μετατοπίζεται το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της ακτινοβολίας από τα 465 nm στα 595 nm. Τελικά μετρήθηκε η απορρόφηση των συμπλόκων στα 595 nm. Από την καμπύλη αναφοράς και μέσω της μετρούμενης απορρόφησης, υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

## 8.6 Ανίχνευση της πρωτεΐνης NBR1 με τη μέθοδο Elisa




1. Τα δείγματα και τα πρότυπα προστίθενται σε πλάκα με πηγαδάκια επικαλυμμένα με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα προς NBR1 και η πλάκα επωάζεται για 1 ώρα.

2. Η πλάκα πλένεται, αφήνοντας μόνο δεσμευμένο NBR1 σε αυτήν. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα υπεροξειδάσης συζευγμένο με μονοκλωνικό αντίσωμα για την NBR1. Αυτό προσδένεται στο NBR1, που βρίσκεται στην πλάκα και στη συνέχεια η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά.

3. Η πλάκα πλένεται προς απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος, προστίθεται το υπόστρωμα και στη συνέχεια η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά. Τότε λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση και εμφανίζεται μπλε χρώμα.

4. Προστίθεται διάλυμα για να σταματήσει η αντίδραση. Το προκύπτον κίτρινο χρώμα διαβάζεται σε 450 nm και η ποσότητα του σήματος είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του NBR1 στο δείγμα.

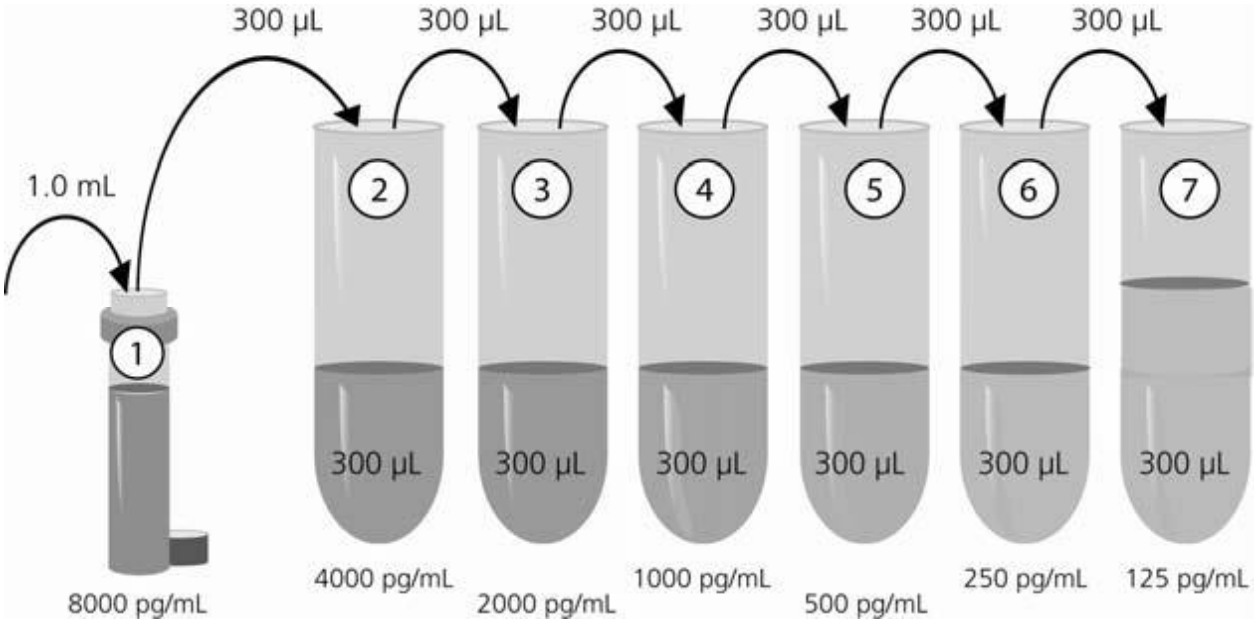
Προετοιμασία αντιδραστηρίων

1. Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης

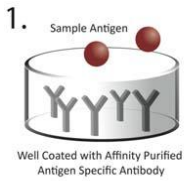
Προετοιμάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης με αραίωση 30 ml από το παρεχόμενο πυκνό διάλυμα πλύσης με 570 mL απιονισμένου νερού.

2. Καμπύλη αναφοράς για NBR1

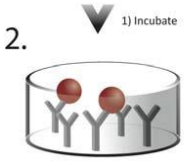
Γίνεται ανασύσταση (με Assay Buffer) ενός φιαλιδίου των 8 ng πρότυπου NBR1 με 1,0 ml πρότυπου διαλύματος. Γίνεται καλή ανάδευση (vortex), η οποία επαναλαμβάνεται και ύστερα από 5 λεπτά. Το φιαλίδιο αυτό επισημαίνεται ως # 1. Επισημαίνονται έξι 12 x 75 mm σωλήνες μιας χρήσης # 2 έως # 7. Προστίθεται 300 μL διαλύτης σε κάθε σωληνάριο. Αφαιρούνται 300 μL από το #1 φιαλίδιο, προστίθενται στο σωλήνα # 2 και αναμειγνύονται καλά με vortex. Αφαιρούνται 300 μL από το σωλήνα # 2, προστίθενται στο σωλήνα # 3 και αναμειγνύονται καλά με vortex. Η διαδικασία συνεχίζεται και για τους υπόλοιπους σωλήνες # 4 έως # 7. Η συγκέντρωση του NBR1 στους σωλήνες # 1 έως # 7 θα είναι 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 pg / mL, αντίστοιχα.



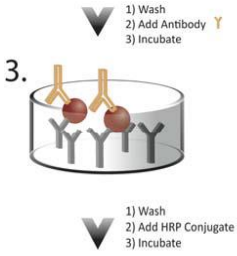
## 8.7 Ανίχνευση της πρωτεΐνης p62 με τη μέθοδο Elisa



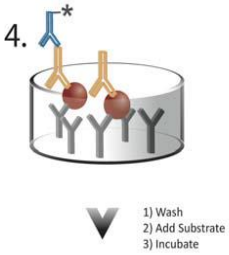

1. Τα δείγματα και τα πρότυπα προστίθενται σε πλάκα με πηγαδάκια επικαλυμμένα με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα προς p62 και η πλάκα επωάζεται για 1 ώρα.




2. Η πλάκα πλένεται, αφήνοντας μόνο δεσμευμένο p62 σε αυτήν. Στη συνέχεια προστίθεται το πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για την p62. Αυτό προσδένεται στην p62, που βρίσκεται στην πλάκα και στη συνέχεια η πλάκα επωάζεται για 1 ώρα.




3. Η πλάκα πλένεται προς απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα υπεροξειδάσης, το οποίο συνδέεται με το πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού p62 και στη συνέχεια η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά.




4. Η πλάκα πλένεται προς απομάκρυνση της περίσσειας, προστίθεται το υπόστρωμα και στη συνέχεια η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά. Τότε λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση και εμφανίζεται μπλε χρώμα.




5. Προστίθεται διάλυμα για να σταματήσει η αντίδραση. Το προκύπτον χρώμα διαβάζεται σε 450 nm και η ποσότητα του σήματος είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του p62 στο δείγμα.

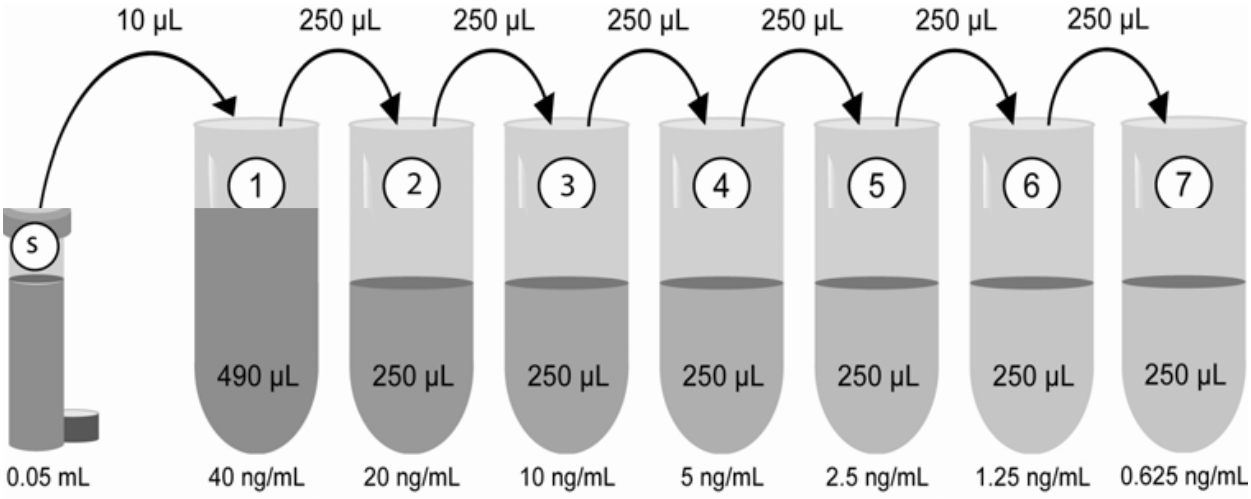
Προετοιμασία αντιδραστηρίων

1. Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης

Προετοιμάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης με αραίωση 30 ml από το παρεχόμενο πυκνό διάλυμα πλύσης με 570 mL απιονισμένου νερού.

2. Καμπύλη αναφοράς για p62

Αναγράφονται οκτώ 12 x 75 mm σωλήνες πολυπροπυλενίου μιας χρήσης # 1 έως # 7. Μεταφέρονται 490 μl πρότυπου διαλύματος (Assay Buffer) στο σωλήνα # 1 και 250 μL πρότυπου διαλύματος (Assay Buffer) στους σωλήνες # 2 με # 7. Προστίθενται 10 μl του προτύπου p62 στον σωλήνα # 1 και αναμειγνύονται καλά με vortex. Αφαιρούνται 250 μL από το σωλήνα # 1 και προστίθενται στο σωλήνα # 2. Γίνεται καλή ανάδευση με vortex. Συνεχίζεται η ίδια διαδικασία για τους σωλήνες # 3 έως # 7. Η συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης p62 στους σωλήνες # 1 έως # 7 θα είναι 40, 20, 10, 5, 2.5,1.25 και 0.625 ng / mL, αντίστοιχα. Τα πρότυπα θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν εντός 60 λεπτών.



### 8.8 Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS PASW Statistics 18 (© 2009 SPSS Inc.) για τη στατιστική επεξεργασία και την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας που ελήφθη υπόψη είναι $p< 0,05$.

## ΚΕΦ.9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 9.1 Κυτταροτοξικότητα

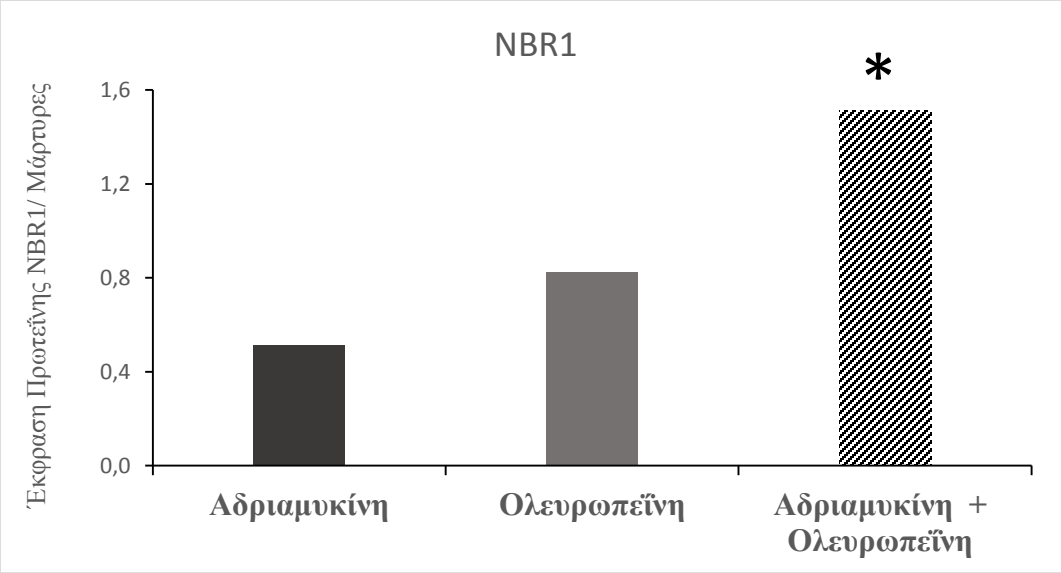
Με τη μέθοδο MTT προσδιορίζεται η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3 μετά από επίδραση διαλύματος αδριαμυκίνης, ολευρωπεΐνης και συγχορήγησης αυτών. Η αδριαμυκίνη ελέγχθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 6-100 nM και η ολευρωπεΐνη σε εύρος συγκεντρώσεων 3-400μg/ mL.

Η μέση ανασταλτική συγκέντρωση ($IC_{50}$: median inhibition concentration) είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Δείχνει πόση ποσότητα από ένα συγκεκριμένο φάρμακο ή άλλη ουσία (αναστολέας) είναι απαραίτητη για να αναστείλει μια δεδομένη βιολογική διεργασία κατά το ήμισυ. Σύμφωνα με το FDA, το $IC_{50}$ αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για 50% αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

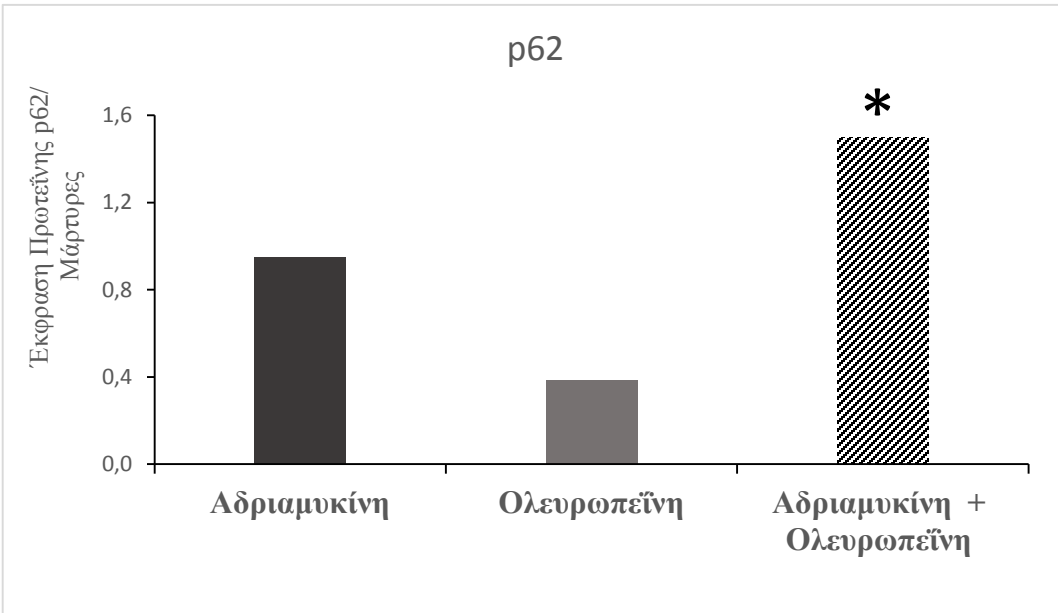
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, χρειάζονται 35 nM αδριαμυκίνης για να ελαττωθεί ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων PC-3 κατά το ήμισυ. Αντίστοιχα, απαιτούνται 160 μg ολευρωπεΐνης για να ανασταλεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός κατά 50 %.

### 9.2 Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών NBR1 και p62

Όπως φαίνεται από τους παρακάτω πίνακες, ύστερα από τη χορήγηση αδριαμυκίνης παρατηρείται καταστολή της έκφρασης τόσο της NBR1, όσο και της p62, γεγονός που συνεπάγεται διέγερση του μηχανισμού της αυτοφαγίας και στις δύο περιπτώσεις. Το ίδιο παρατηρείται και ύστερα από τη χορήγηση ολευρωπεΐνης. Ωστόσο η χορήγηση αδριαμυκίνης φαίνεται να μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης NBR1 κατά 50% και της p62 κατά 10% , ενώ η ολευρωπεΐνη μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης NBR1 κατά 20% και της p62 κατά 60%, αντίστοιχα. Η συγχορήγηση αδριαμυκίνης και ολευρωπεΐνης φαίνεται ότι όχι μόνο δεν καταστέλλει την έκφραση των πρωτεϊνών, αλλά αντιθέτως την αυξάνει και το γεγονός αυτό υποδηλώνει την επαγόμενη από τη συγχορήγηση καταστολή του μηχανισμού της αυτοφαγίας.




Διάγραμμα 1 : Συγκριτική επίδραση αδριαμυκίνης 50 nM, ολευρωπεΐνης 200 μg/mL και συγχορήγησης αδριαμυκίνης 50 nM + ολευρωπεΐνης 200 μg/mL στην έκφραση της πρωτεΐνης NBR1, ύστερα από 48ωρη επώαση PC-3 κυττάρων με τις συγκεκριμένες ουσίες.




Διάγραμμα 2 : Συγκριτική επίδραση αδριαμυκίνης 50 nM, ολευρωπεΐνης 200 μg/mL και συγχορήγησης αδριαμυκίνης 50 nM + ολευρωπεΐνης 200 μg/mL στην έκφραση της πρωτεΐνης p62, ύστερα από 48ωρη επώαση PC-3 κυττάρων με τις συγκεκριμένες

* Στατιστικά σημαντικό, $p<0,05$

## ΚΕΦ. 10 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη η συγχορήγηση ενός χημειοθεραπευτικού παράγοντα (αδριαμυκίνη) και ενός φυσικού προϊόντος (ολευρωπεΐνη) μπορεί να οδηγεί σε διαφορετικό αποτέλεσμα από τη μονοχορήγηση του κάθε συστατικού. Ενώ η χορήγηση του κάθε παράγοντα μεμονωμένα επάγει τον μηχανισμό της αυτοφαγίας, η συχορήγησή τους τον καταστέλλει

Η αδριαμυκίνη αποτελεί έναν αντινεοπλασματικό παράγοντα, η χρήση του οποίου περιορίζεται λόγω της καρδιοτοξικότητάς του. [86] Η ολευρωπεΐνη είναι μια φυσική φαινολική ένωση, η οποία δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητά της αδριαμυκίνης στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αλλά ωστόσο προσδίδει προστασία έναντι της καρδιοτοξικότητας που επάγεται από αυτήν. [87] Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους αποκαλύφτηκε ότι οι διαφορές στο μεταβολικό προφίλ μεταξύ αρουραίων μαρτύρων και αρουραίων στους οποίους είχε χορηγηθεί αδριαμυκίνη οφείλεται σε διάφορους μεταβολίτες. Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα οξικού και ηλεκτρικού αυξήθηκαν μετά από χορήγηση αδριαμυκίνης σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Αυτά τα αποτελέσματα συσχετίζονται με τη μη ενζυματική μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε οξικό άλας και του α-κετογλουταρικού προς ηλεκτρικό λόγω των ελεύθερων ριζών που σχηματίζονται από τη χορήγηση της αδριαμυκίνης. Η ολευρωπεΐνη φάνηκε στη συγκεκριμένη μελέτη ότι έχει την ικανότητα να αποκαθιστά πλήρως τις συγκεκριμένες αλλαγές των μεταβολιτών. [86] Οι αρουραίοι, στους οποίους χορηγείται αδριαμυκίνη εμφανίζουν πολύ εκτεταμένο κυτταροπλασματικό σχηματισμό κενοτοπίων και μία σημαντική αύξηση των καρδιακών ενζύμων στη συστηματική κυκλοφορία. Με την χορήγηση ολευρωπεΐνης είναι δυνατόν να επιτευχθεί μείωση των επιπέδων CPK, CPK-MB, LDH, AST και ALT στον ορό, καθώς και της επαγόμενης από την αδριαμυκίνη υπεροξείδωση των λιπιδίων, του οξειδωτικού στρες και της συνθάσης νιτρικού οξειδίου (iNOS) σε καρδιομυοκύτταρα. Φάνηκε δηλαδή ότι η ολευρωπεΐνη ασκεί μία προστατευτική επίδραση εξαλείφοντας την καρδιοτοξικότητα της αδριαμυκίνης μέσω της μεταβολής ενδοκυτταρικών και περιφερικών δεικτών. Συνεπώς η συγχορήγηση ολευρωπεΐνης και αδριαμυκίνης βελτιώνει το θεραπευτικό αποτέλεσμα με την παράλληλη πρόληψη της ανεπιθύμητης τοξικότητας. [88]

Εκτός από τη συγκεκριμένη δράση της, η ολευρωπεΐνη διαθέτει ευεργετικές φαρμακολογικές δράσεις όπως καρδιοπροστατευτική, αντιοξειδωτική, [89][90] νευροπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση [91], αντιαθηρογόνο δραστηριότητα [92][93], αντικαρκινικές [63] και αντιμικροβιακές ιδιότητες [94] ενώ αναστέλλει και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [95]. Μια επιπρόσθετη ιδιότητά της είναι ότι μπορεί να μειώσει την κυτταροτοξική επίδραση της αμυλίνης στα β-κύτταρα του παγκρέατος και το γεγονός αυτό δίνει το έναυσμα για περαιτέρω μελέτες σχετικά με την πιθανή φαρμακολογική χρήση της ολευρωπεΐνης στην παρεμπόδιση ή στην επιβράδυνση της εξέλιξης του διαβήτη τύπου ΙΙ. [96]

Όλο και μεγαλύτερο είναι το ενδιαφέρον των μελετητών για την εύρεση τόσο ουσιών με αντικαρκινική δράση, όσο και ουσιών που μειώνουν τις αρνητικές επιπτώσεις των φαρμάκων. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι το εκχύλισμα της γλυκύρριζας (Glycyrrhiza uralensis) είναι δυνατόν

να προκαλέσει ελάττωση της επιβίωσης καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου, μαστού και προστάτη και να αποτελέσει δυνητικά ένα δραστικό παράγοντα για τη μείωση της επαγόμενης από την αδριαμυκίνη καρδιοτοξικότητας. [97] Η Υδροξυτυροσόλη, ένα άλλο βιοενεργό μόριο που βρίσκεται στο ελαιόλαδο, έχει παρόμοιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες με την ολευρωπεΐνη και σύμφωνα με έρευνες προστατεύει τους αρουραίους από την καρδιοτοξικότητα της αδριαμυκίνης. [98] Σε αρουραίους έχει επίσης παρατηρηθεί η καρδιοπροστατευτική επίδραση εκχυλισμάτων από Aerva lanata έναντι της επαγόμενης από τη χορήγηση αδριαμυκίνης μυοκαρδιοπάθειας. [99][100][101] Ένα επιπλέον προστατευτικό ανοσοενισχυτικό κατά της τοξικότητας της αδριαμυκίνης αποτελεί και η Ατορβαστατίνη, της οποίας η δράση επιτυγχάνεται μέσω αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιαποπτωτικών μηχανισμών. [102] Σύμφωνα με μια ακόμη μελέτη που έγινε σε ποντίκια, η κανναβιδιόλη αντιπροσωπεύει ένα δυνητικό προστατευτικό παράγοντα έναντι της καρδιακής βλάβης λόγω χρήσης αδριαμυκίνης. [103] Επιπροσθέτως, η δεξραζοξάνη, ένα προφάρμακο της ένωσης σιδήρου-χηλικού ADR-925 είναι ένα φάρμακο με ισχυρές ενδείξεις όσον αφορά την ελάττωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιας καρδιοτοξικότητας από ανθρακυκλίνη. [104]

Πλήθος φυσικών προϊόντων ερευνώνται για τη πιθανή αντικαρκινική τους δράση. Πιο συγκεκριμένα, αποτελέσματα δείχνουν ότι η μέντα και οι βιοδραστικές ενώσεις του CGE (ακατέργαστο εκχύλισμα σκόρδου) [105] περιέχουν ορισμένα συστατικά με κυτταροτοξικές ιδιότητες οι οποίες μπορούν να βρουν χρήση στην ανάπτυξη αντικαρκινικών παραγόντων. [106] Τα κασσινοειδή επάγουν εκλεκτική κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του προστάτη και αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων LNCaP. [107] Ικανές να θανατώσουν καρκινικά κύτταρα προστάτη μέσω επαγωγής της απόπτωσης είναι και οι βιοδραστικές ενώσεις που βρίσκονται στον πράσινο φλοιό των καρυδιών. [108] Επιπλέον τα υδατικά εκχυλίσματα του φαρμακευτικού φυτού Ocimum gratissimum αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των διαφόρων κυτταρικών σειρών καρκίνου, ειδικά των PC-3 κυττάρων. [109]

Δύο βιοδραστικά εκχυλίσματα μανιταριών, τα PL-ES και PL-I-ES, έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ η αντικαρκινική τους δράση πιθανώς να οφείλεται στο οξειδωτικό στρες, το οποίο οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. [110] Πεπτίδια από τα προϊόντα μελισσών επάγουν επίσης τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο *in vitro* σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προέρχονται από καρκίνο στους νεφρούς, στον πνεύμονα, στο ήπαρ, στον προστάτη και στην ουροδόχο κύστη. Αυτά τα βιοδραστικά φυσικά προϊόντα μπορεί, επομένως, να αποδειχθούν χρήσιμα ως μέρος μιας νέας στοχευμένης θεραπείας για ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως του προστάτη και του καρκίνου του μαστού. [111]

Όλο και περισσότερες μελέτες εστιάζουν στην αντικαρκινική δράση ορισμένων συστατικών των φυτών. Για παράδειγμα, η συγχορήγηση κερκετίνης με αδριαμυκίνη αποτελεί έναν αξιόλογο χημειοθεραπευτικό συνδυασμό για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. [112] Έχουν τονιστεί επίσης οι αντικαρκινικές ιδιότητες του αιθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων, του πολτού και των σπόρων του φυτού Annona glabra, αλλά και οι θεραπευτικές δράσεις της κουρκουμίνης στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. [113] Άλλα δύο συστατικά τα οποία δρούν

συνεργικά και συμβάλλουν στη μείωση του πολλαπλασιασμού των PC-3 κυττάρων είναι η υπερφορίνη και η υπερικίνη. Το μασλινικό οξύ, ένα τριτερπένιο της ελιάς, έχει φανεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ανθρώπινου ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος (HT29) κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο. [114] Τα αφεψήματα από δεντρολίβανο, κρητικό δίκταμο, βαλσαμόχορτο, φασκόμηλο, μαντζουράνα και θυμάρι έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη και να μειώνουν τα επίπεδα της IL-8 σε καρκινικά κύτταρα εντέρου HT29 και στα προστατικά καρκινικά κύτταρα (PC-3). [115] Το Ginseng, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως σε λειτουργικά τρόφιμα και ως φυτικό φάρμακο, έχει αναφερθεί ότι μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καρκίνου του προστάτη με μηχανισμούς που δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. [116] Το Coibamide A είναι ένα N-μεθυλο-σταθεροποιημένο πεπτίδιο που απομονώθηκε από ένα θαλάσσιο κυανοβακτήριο στον Παναμά και είναι μια αρκετά ισχυρή και αποτελεσματική κυτταροτοξίνη. Φάνηκε ότι το coibamide A προκαλεί συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων σε τύπους κυττάρων ανθρώπινου γλοιοβλαστώματος ενώ επάγει επίσης μορφολογικά και βιοχημικά διακριτές μορφές κυτταρικού θανάτου ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. [117]

Εκτεταμένες έρευνες τα τελευταία χρόνια, έδειξαν ότι η τακτική κατανάλωση ορισμένων φρούτων και λαχανικών μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. [118][119][120][121] Φυτοχημικά που προέρχονται από τέτοια φρούτα και λαχανικά, τα οποία αναφέρονται ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, περιλαμβάνουν τη ρεσβερατρόλη, το λυκοπένιο, την καψαϊκίνη, την κουρκουμίνη, την 6-τζιντζερόλη, το ελλαγικό οξύ, το ουρσολικό οξύ, τη σιλυμαρίνη, την ανεθόλη, τις κατεχίνες και την ευγενόλη. Αυτοί οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες έχει βρεθεί ότι μπορούν να αναστρέψουν τη χημειοαντοχή και τη ραδιοαντοχή σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία για τον καρκίνο και συνεπώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επικουρικά στα χημειοθεραπευτικά σχήματα. [122]

Όπως παρατηρήθηκε υπάρχει πληθώρα τόσο φυσικών όσο και συνθετικών παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν διάφορα μονοπάτια της αυτοφαγίας, επάγοντας ή καταστέλλοντάς την. Επίσης η συγχορήγηση ουσιών μπορεί να βελτιώσει την απόκριση του οργανισμού σε ένα φάρμακο αλλά και να μειώσει τις παρενέργειές του. Συνεπώς κρίνεται απαραίτητη η συνεχής έρευνα για την ενδελεχή εξακρίβωση του μηχανισμού δράσης των παραγόντων αυτών και την ενδεχόμενη ένταξη τους σε θεραπευτικά πρωτόκολλα.

**Ευχαριστίες**

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κα. Τέντα Ρωξάνη κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την υπομονή, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Φαρμακογνωσίας κ.Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη και τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακογνωσίας κ.Νεκτάριο Αληγιάννη, της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ για το εκχύλισμα της ολευρωπεΐνης και για την αδριαμυκίνη, καθώς και για την πολύ εποικοδομητική συνεργασία.

Τέλος οφείλω να αναγνωρίσω την αμέριστη συμβολή της οικογένειάς μου στην ολοκλήρωση των σπουδών μου και να τους ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου για την οικονομική και ηθική στήριξη που συνεχώς μου προσφέρουν προκειμένου να προχωρώ και να υπερπηδώ κάθε εμπόδιο για να πετυχαίνω τους στόχους μου.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ


[1] The history of cancer, American Cancer Society, 2009.

[2] A. Sudhakar, History of cancer, ancient and modern treatment methods, Journal of Cancer Science & Therapy, 1(2):1-4, 2009.

[3] SI. Hajdu, Greko-Roman thought about cancer, Cancer, 100(10):2048-2051, 2004.

[4] W.R Raven, The theory and practice of oncology - Historical evolution and present principles, The New England Journal of Medicine, 324:133-134, 1991.

[5] P. Vineis, A. Schatzkin, Models of carcinogenesis: an overview, Carcinogenesis, 31(10):1703-1709, 2010.

[6] R. Siegel, Cancer treatment and survivorship statistics, A Cancer Journal for Clinicians, 62(4):220-241, 2012.

[7] N. Srinivas, L. WK Chung, Prostate cancer progression and metastasis: potential regulatory pathways for therapeutic targeting, American Journal of Clinical and Experimental Urology, 2(2):92–101, 2014

[8] A. Heidenreich, EAU Guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent, European Urology, 65(1):124-137, 2014.

[9] M. Eberl, Patients with a family history of cancer: Identification and management, The Journal of the American Board of Family Medicine, 18(3):211-217, 2005.

[10] Doll Richard, The epidemiology of cancer, Cancer, 45(10):2475-2485, 1980.

[11] XQ. Yu, Prostate cancer prevalence in new south wales Australia: A population-based study, Cancer Epidemiology, 39(1):29-36, 2014.

[12] V. Hale, W. Maren, CHEK2 ,1100delC mutation and risk of prostate cancer, Prostate Cancer, 2014:1-9, 2014.

[13] McGeagh Hackshaw, E. Lucy, Physical activity, alcohol consumption, BMI and smoking status before and after prostate cancer diagnosis in the ProtecT trial: Opportunities for lifestyle modification, International Journal of Cancer, 2015.

[14] M. Zaccagnini, Prostate cancer, American Journal of Nursing, 99(4):34-35, 1999.

[15] O. Sartor, Health-related quality of life in advanced prostate cancer and its treatments: Biochemical failure and metastatic disease populations, Clinical Genitourinary Cancer, 13(2):101-112, 2015.

[16] D. J. Gómez-Millán, Advances in the treatment of prostate cancer with radiotherapy, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2015.

[17] F. Labrie, Hormonal therapy of prostate cancer, Progress in Brain Research, Prostate Knowledge, 182:321-341, 2010.

[18] D. Fornage Bruno, Normal US anatomy of the prostate, Ultrasound in Medicine and Biology, 12(12):1011-1021, 1986.

[19] E. Harold, Anatomy of the urinary bladder, prostate and male urethra, Surgery, 23(3):97-98, 2005.

[20] F. Martini, Human anatomy, San Francisco, 2012

[21] D. Shier, Hole's essentials of human anatomy and physiology, 1998.

[22] M. Villeirs Geert, Magnetic resonance imaging anatomy of the prostate and periprostatic area: A guide for radiotherapists, Radiotherapy and Oncology, 76(1):99-106, 2005.

[23] W. Samson Fine, Anatomy of the prostate revisited implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer, Histopathology, 60(1):142-152, 2012.

[24] JE. McNeal, The zonal anatomy of the prostate, Prostate, 2(1):35-49, 1981.

[25] "urologymatch" Available: http://www.urologymatch.com/ProstateAnatomy.htm.

[26] Patrick W McLaughlin., Functional anatomy of the prostate: Implications for treatment planning, International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 63(2):476-491, 2005.

[27] Tim Taylor, "innerbody", Available:http://www.innerbody.com/image_repmov/repo09-new4.html.

[28] M. Koutsilieris, Skeletal metastases in advanced prostate cancer: cell biology and therapy, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 18:51-64, 1995.

[29] P. A. Abrahamsson, Pathophysiology of bone metastases in prostate cancer, European Urology Supplements, 3(5):3-9, 2004.

[30] P. Msaouel, Mechanisms of bone metastasis in prostate cancer: clinical implications, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 22(2):341-355, 2008.

[31] D. J. Klionsky, B. Levine, Development by self-digestion: Review molecular mechanisms and biological functions of autophagy, Developmental Cell, 6(4):463-477, 2004.

[32] A. Nagelkerke, Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part II: Pharmacological modulation of treatment-induced autophagy, Seminars in Cancer Biology, 31:99–105, 2015.

[33] B. Levine, Development by self-digestion: Review molecular mechanisms and biological functions of autophagy, Developmental Cell, 6:463–477, 2004.

[34] M. Hayat, Chapter 1 – Introduction to autophagy: Cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging, in regulation of autophagy and selective autophagy, Autophagy, 7:1-51, 2015.

[35] H.-Z. Yang, Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment, Cancer Letters, 361(1):128-136, 2015.

[36] D. J. Klionsky, Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, Science, 290:1717-1721, 2000.

[37] G. Kroemer, Autophagy and the integrated stress response, Molecular Cell, 40(2):280-293, 2010.

[38] D. J. Klionsky, U. Nair, Molecular mechanisms and regulation of specific and nonspecific autophagy pathways in yeast, The Journal of Biological Chemistry, 280:41785–41788, 2005.

[39] D. Kumar, Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, Cancer Letters, 343(2):179-189, 2014.

[40] Q. Zheng, Inhibition of AMPK accentuates prolonged caloric restriction-induced change in cardiac contractile function through disruption of compensatory autophagy, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1852(2):332-342, 2015.

[41] B. Ravikumar, Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology, Physiological Reviews, 90(4):1383-1435, 2010.

[42] E. Tran, Context-dependent role of ATG4B as target for autophagy inhibition in prostate cancer therapy, Biochemical and Biophysical Research Communications, 441(4):726-731, 2013.

[43] T. Shintani, Autophagy in health and disease: a double-edged sword, Science, 306(5698):990-995, 2004.

[44] E. Dunlop, mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy, Seminars in Cell & Developmental Biology, 36:121-129, 2014.

[45] KM. Ryan, EY. Liu, Autophagy and cancer-issues we need to digest, Journal of Cell Science, 125(10):2349-2358, 2012.

[46] A. Giatromanolaki, Autophagy proteins in prostate cancer: Relation with anaerobic metabolism and Gleason score, Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 32(1):11-39, 2014.

[47] I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami., LC3 and autophagy, Methods in Molecular Biology, 445:77-88, 2008.

[48] N. Mizushima, T. Yoshimorim, Methods in mammalian autophagy research, Cell, 140(3):313-326, 2010.

[49] I. Tanida, T. Ueno, E. Kominam, LC3 conjugation system in mammalian autophagy, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36(12):2503-2518, 2004.

[50] H. Cortés-Funes, C. Coronado, Role of anthracyclines in the era of targeted therapy, Cardiovascular Toxicology, 7(2):56-60, 2007.

[51] A. Bravo-Cuellar, In vivo modification of adriamycin-induced apoptosis in L-5178Y lymphoma cell-bearing mice by (+)-α-tocopherol and superoxide dismutase, Cancer Letters, 229(1):59-65, 2005.

[52] G. Bonadonna, S. Monfardini, Clinical evaluation of adriamycin, a New Antitumour Antibiotic, British Medical Journal, 3(5669):503-506, 1969.

[53] S. Nobili, D. Lippi, Natural compounds for cancer treatment and prevention, Pharmacological Research, 59(6):365-378, 2009.

[54] O.Tacar, P.Sriamornsak, Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 65(2):157-70, 2013.

[55] F. Ezquer, J. Gutiérrez, Mesenchymal stem cell therapy for doxorubicin cardiomyopathy: hopes and fears, Stem Cell Research and Therapy, 6(1):116, 2015

[56] D.Staedler, E.Idrizi, Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 68:1161-1172, 2011.

[57] A. Bravo-Cuellar, In vivo modification of adriamycin-induced apoptosis in L-5178Y lymphoma cell-bearing mice by (+)-α-tocopherol and superoxide dismutase, Cancer Letters, 229:59-65, 2005.

[57] J. Savatier, Adriamycin dose and time effects on cell cycle, cell death, and reactive oxygen species generation in leukaemia cells, Leukemia Research, 36(6):791-798, 2012.

[58] C. C. Cortés-Funes H1, Role of anthracyclines in the era of targeted therapy, Cardiovascular Toxicology, 7(2):56-60, 2007.

[59] M. Jiang, A novel long non-coding RNA-ARA: Adriamycin resistance associated, Biochemical Pharmacology, 87(2):254-283, 2014.

[60] H. Casabianca, I. Hassen, Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review, Journal of Functional Foods, 2014.

[61] R. Acquaviva, C. Di Giacomo, Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines, International Journal of Oncology, 20(2):2903-2921, 2015.

[62] J.-J. Yuan, C.-Z. Wang, Enzymatic hydrolysis of oleuropein from olea europea (olive) leaf extract and antioxidant activities, Molecules, 20(2):2903-2921, 2012.

[63] H. Castellon, Oleuropein, A non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor, Biochemical and Biophysical Research Communications, 334(3):769-778, 2005.

[64] M. A. Neves, I. Dammak, Transport properties of oleuropein through nanofiltration membranes, Food and Bioproducts Processing, 94:342-353, 2015.

[65] A.De Leonardis, V. Macciola, Evidence of oleuropein degradation by olive leaf protein extract, Food Chemistry, 175:568-574, 2015.

[66] C. M. Yan, E.Q. Chai, Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line, Molecular Medicine Reports, 11(6):4617-4624, 2015.

[67] T. Johansen, T. Lamark, Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins, Autophagy, 7(3):279-296, 2011.

[68] J. Long, TP. Garner, MJ Pandya, Dimerisation of the UBA domain of p62 inhibits ubiquitin binding and regulates NF-kappaB signalling, Journal of Molecular Biology, 396(1):178-194, 2010.

[69] T. Lamark, M. Perander, Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins, The Journal of Biological Chemistry, 278(36):34568–34581, 2003.

[70] P. Sanchez, G. De Carcer, Localization of atypical protein kinase C isoforms into lysosome-targeted endosomes through interaction with p62, Molecular and Cellular Biology, 18(5):3069–3080, 1998.

[71] MI. Wilson, DJ. Gill, PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62, Molecular Cell, 12(1):39–50, 2003.

[72] K. Nakamura, AJ. Kimple, PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NFκB activation, The Journal of Biological Chemistry, 285(3):2077–2089, 2010.

[73] V. Kirkin, DG. McEwan, A role for ubiquitin in selective autophagy, Molecular Cell, 34(3):259-269, 2009.

[74] C. Kraft, M. Peter, K. Hofmann, Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond, Nature Cell Biology, 12:836–841, 2010.

[75] V. Kirkin, T. Lamark, A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates, Molecular Cell, 33(4):505-516, 2009.

[76] G. Bjorkoy, T. Lamark, p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death, The Journal of Cell Biology , 171(4):603-614, 2005.

[77] PK. Kim, DW. Hailey, RT. Mullen, Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes, Proceedings of the National Academy of Sciences Journal, 105(52):20567-20574, 2008.

[78] S. Pankiv, TH. Clausen, Protein synthesis, post-translational modification, and degradation, The Journal of Biological Chemistry, 282:24131-24145, 2007.

[79] S. Pankiv, p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy, The Journal of Biological Chemistry, 282(33):24131-24145, 2007.

[80] S.A. Beresford, Differential effects of phosphatidylinositol-3/Akt-kinase inhibition on apoptotic sensitization to cytokines in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells, Journal of Interferon & Cytokine Research, 21(5):313-322, 2001.

[81] ME. Kaighn, KS. Narayan, Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3), Investigate Urology, 17(1):16-23, 1979

[82] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, Journal of Immunological Methods, 89(2):271-277, 1986.

[83] M. Ferrari, M.C. Fornasiero, MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro, Journal of Immunological Methods, 131(2):165-172, 1990.

[84] D. Gerlier, N. Thomasset, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, Journal of Immunological Methods, 94(1-2):57-63, 1986.

[85] A.A. van de Loosdrecht, R.H.J. Beelenb, A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia, Journal of Immunological Methods, 174(1-2):311-320, 1994.

[86] I Andreadou, M. Papaefthimiou, Metabonomic identification of novel biomarkers in doxorubicin cardiotoxicity and protective effect of the natural antioxidant oleuropein, NMR in Biomedicine, 22(6):585-592, 2009.

[87] I. Andreadou, E.Mikros, Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 69:4-16, 2014.

[88] I. Andreadou, F. Sigala, Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 42(3):549-558, 2007.

[89] SH. Omar, Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive, Saudi Pharmaceutical Journal, 18(3):111-121, 2010.

[90] I. Andreadou, EK. Iliodromitis, The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits, The Journal of Nutrition, 136(8):2213-2219, 2006.

[91] F. Visioli, S. Bellosta, Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages, Life Science, 62(6):541-546, 1998.

[92] C. Manna, V. Migliardi, Oleuropein prevents oxidative myocardial injury by ischemia and reperfusion, The Journal of Nutritional Biochemistry, 15(8):461-468, 2004.

[93] G. Calli, F. Visioli, Antiatherogenic components of olive oil, Current Atherosclerosis Reports, 3(1):64-67, 2001.

[94] G. Bisignano, A. Tomaino, On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51(8):971-974, 1999.

[95] A. Petroni, M. Blasevich, Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil, Thrombosis Research, 78(2):151-160, 1995.

[96] S.Rigaccia, V. Guidottia, Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin, The Journal of Nutritional Biochemistry, 21(8):726-735, 2010.

[97] HJ1 Choi, MR Seon, Hexane/ethanol extract of Glycyrrhiza uralensis licorice suppresses doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 rat cardiac myoblasts, Experimental Biology and Medicine, 233(12):1554-1560, 2008.

[98] S. Granados-Principala, N. El-azem, Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer, Biochemical Pharmacology, 90(1):25-33, 2014.

[99] P. Ragavendran, S. Dominic, Cardioprotective effect of aqueous, ethanol and aqueous ethanol extract of Aerva lanata (Linn.) against doxorubicin induced

cardiomyopathy in rats, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(1):212-218, 2012.

[100] R. Takeda, T. Koike, Double-blind placebo-controlled trial of hydroxytyrosol of Olea europaea on pain in gonarthrosis, Phytomedicine, 20(10):861-864, 2013.

[101] J. Han, T. P. N. Talorete, Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells, Cytotechnology, 59(1):45-53, 2008.

[102] A. Mohamed, Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity, Biomedicine & Pharmacotherapy, 68(1):101-110, 2014.

[103] A. A. Fouada, W. H. Albualib, Cardioprotective effect of cannabidiol in rats exposed to doxorubicin toxicity, Environmental Toxicology and Pharmacology, 36(2):347-357, 2013.

[104] M. Štěrba, O. Pop, Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: A study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH), Toxicology, 235(3):150-166, 2007.

[105] S.V, Hussain S, G. M Saxena, In vitro anticancer activity of extracts of Mentha Spp. against human cancer cells, Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 51(5):416-419, 2014.

[106] M. Bagul, S. Kakumanu, TA. Wilson, Crude garlic extract inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis of cancer cells in vitro, Journal of Medical Food, 18(7):731-737, 2015.

[107] KL1. Tong, KL2. Chan, The in vitro and in vivo anti-cancer activities of a standardized quassinoids composition from Eurycoma longifolia on LNCaP human prostate cancer cells, PLoS One, 10(3), 2015.

[108] AA. Alshatwi, TN. Hasan, Validation of the antiproliferative effects of organic extracts from the green husk of juglans regia L. on PC-3 human prostate cancer cells by assessment of apoptosis-related genes, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012.

[109] I. Ekunwe, MS. Thomas, Potential cancer-fighting Ocimum gratissimum (OG) leaf extracts: increased anti-proliferation activity of partially purified fractions and their spectral fingerprints, Ethnicity and Disease, 20(1):12-16, 2010.

[110] S. Konno, K. Chu, Potent anticancer effects of bioactive mushroom extracts (Phellinus linteus) on a variety of human cancer cells, Journal of Clinical Medicine Research, 7(2):76-82, 2015.

[111] P. Premratanachai, C. Chanchao, Review of the anticancer activities of bee products, Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine, 4(5):337-344, 2014.

[112] H. Qiana, Y. Yangb, Curcumin enhanced adriamycin-induced human liver-derived Hepatoma G2 cell death through activation of mitochondria-mediated apoptosis and autophagy, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 43(3):125-131, 2011.

[113] W. Fernando, H. P. V. Rupasinghe, Anticancer properties of phytochemicals present in medicinal plants of north America, in using old solutions to new problems - natural drug discovery in the 21st century, chapter 6, 159-180, 2013.

[114] F. J. Reyes-Zurita, EE. Rufino-Palomares, Maslinic acid, a natural triterpene from Olea europaea L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway, Cancer Letters, 273(1):44-54, 2009

[115] A. C. Kalioraa, D. A.A. Kogiannoua, Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention, Food Chemistry, 142:233-241, 2014.

[116] J.Y. Park1, a, P.Choi2, a, H.K. Kim, Increase in apoptotic effect of Panax ginseng by microwave processing in human prostate cancer cells: in vitro and in vivo studies, Journal of Ginseng Research, 2015.

[117] M. Hau Andrew, A.G. Jeffrey, Coibamide A induces mTOR-independent autophagy and cell death in human glioblastoma cells, PLoS One, 8(6), 2013.

[118] M. Timothy, S. Kapoor, L. Bielory, Complementary and alternative medicine: Herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects, The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 123(2):283-294, 2009.

[119] V. Goulas, V. Exarchou, Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells, Molecular Nutrition and Food Research, 53(5):600-608, 2009.

[120] S.J. Jeong, W. Koh, Are there new therapeutic options for treating lung cancer based on herbal medicines and their metabolites?, Journal of Ethnopharmacology, 138(3):652-661, 2011.

[121] A. de la Taile, R. Buttyan, O. Hayek, Herbal therapy pc-spesq In vitro effects and evaluation of its efficacy in 69 patients with prostate cancer, The Journal of Urology, 164(4):1229-1234, 2000.

[122] T. Dorai, BB. Aggarwal, Role of chemopreventive agents in cancer therapy, Cancer Letters, 215(2):129-140, 2004.