



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΣΙΚΟΥ ΚΑΙ ΕΔΩΔΙΜΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ
ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ. ΜΕΛΕΤΗ
ΜΟΝΟΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΜΕ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΦΑΡΜΑΚΟ»**

**Αικατερίνη Γιώτη
Βιολόγος, MSc**

Αθήνα, 2019



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Η Διδακτορική Διατριβή εξετάστηκε από την κάτωθι Επταμελή Επιτροπή:

Ρωξάνη Τέντα

Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο (Επιβλέπουσα)

Εμμανουήλ Μικρός

Καθηγητής Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

Νεκτάριος Αληγιάννης

Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

Δημήτριος Κλέτσας

Ερευνητής Α', Διευθυντής Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

Σοφία Χαβάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια, Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Τομέας Βασικών Επιστημών, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ελισάβετ Φραγκοπούλου

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Γεώργιος Παπανικολάου

Επίκουρος Καθηγητής Παθοφυσιολογίας-Γενετικής του Ανθρώπου, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου δεν
υποδηλώνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

Η Αικατερίνη Γιώτη δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα 087 αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επιβλέπουσα του ερευνητικού έργου που μου ανατέθηκε είναι η Ρωξάνη Τέντα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ανθρώπου στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, την οποία ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε, για την γενική επίβλεψη και καθοδήγηση καθώς και για την ηθική στήριξη κατά την διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Εμμανουήλ Μικρό, Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας στο Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, για τη διάθεση του εργαστηρίου του για την διεξαγωγή των πειραμάτων φασματοσκοπίας NMR, για την ουσιαστική συμβολή του στην ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων και για την βοήθειά του στον σχεδιασμό και στην συγγραφή και παρουσίαση της παρούσας διατριβής.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Νεκτάριο Αληγιάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ καθώς και τον Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, για την απομόνωση, ταυτοποίηση και διάθεση των φυσικών εκχυλισμάτων, χωρίς τα οποία δεν θα μπορούσε να εκπονηθεί η παρούσα μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Σοφία Χαβάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ, για τη διάθεση του εργαστηρίου της, για την ουσιαστική συμβολή της στην πραγματοποίηση και επεξεργασία των πειραμάτων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και για την βοήθειά της στην συγγραφή των αποτελεσμάτων της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

Οφείλω να ευχαριστήσω, επίσης, την Δήμητρα Μπενάκη, Ε.Τ.Ε.Π στο Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, για την πολύτιμη συμβολή της στην λήψη των φασματικών δεδομένων, στην στατιστική επεξεργασία και στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων NMR.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δημήτριο Κλέτσα, Ερευνητή Α', Διευθυντή στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών στο ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος", την Ελισάβετ Φραγκοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών προϊόντων στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και τον Γεώργιο Παπανικολάου, Επίκουρο Καθηγητή Παθοφυσιολογίας-Γενετικής του Ανθρώπου στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για την διάθεση και τον χρόνο τους να αποτελέσουν μέλη της επταμελούς επιτροπής κρίσης της παρούσας μελέτης.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ελένη Σοφού, γραμματέα του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για την διεκπεραίωση όλων των “γραφειοκρατικών” υποχρεώσεων κατά την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Εύη Μήτσου και Γιώτα Λιανέα του Εργαστηρίου Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών, με τις οποίες είχα μια εξαιρετική συνεργασία κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Αναστασία Παπαχριστοδούλου, διδάκτορα του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, με την οποία πορευτήκαμε από κοινού τα περισσότερα χρόνια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής έχοντας μια ουσιαστική συνεργασία και επικοινωνία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της οικογένειάς μου και τους στενούς μου φίλους για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την ηθική τους υποστήριξη σε όλες τις προσπάθειές μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά.....	1-2
Περίληψη στα Αγγλικά.....	3-4
Κατάλογος Εικόνων.....	5-9
Κατάλογος Πινάκων.....	10
Συντομογραφίες.....	11-12
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	13-46
1.1.1. Καρκίνος.....	13
1.1.2. Διήθηση και μετάσταση.....	14-15
1.1.3. Διαβάθμιση (<i>Grading</i>) και Σταδιοποίηση (<i>Staging</i>) του καρκίνου.....	15-16
1.1.4. Αιτιολογία του καρκίνου.....	16
1.2.1. Καρκίνος του προστάτη.....	17-18
1.2.2. Παράγοντες Κινδύνου.....	18-20
1.3.1. Αυτοφαγία.....	21
1.3.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά της αυτοφαγίας.....	22
1.3.3. Μοριακά μονοπάτια της αυτοφαγίας.....	22-26
1.3.4. Οι πρωτεΐνες LC-3 και η αυτοφαγία.....	26-27
1.3.5. Οι πρωτεΐνες p62, NBR1 και η αυτοφαγία.....	27-29
1.4. Η κυτταρική σειρά PC-3.....	30
1.5. Αδριαμυκίνη.....	31-33
1.6. Φυσικά προϊόντα και καρκίνος.....	34-36
1.6.1. Σιλυμαρίνη.....	37-40
1.6.2. Φυσικά προϊόντα προερχόμενα από το φυτό <i>Glycyrrhiza glabra</i>	41-43
1.7. Μεταβολικές ιδιαιτερότητες στον καρκίνο.....	43-44
1.7.1. Μεταβολομική.....	44
1.7.2. Μεταβολομική και καρκίνος του προστάτη.....	44-47
Κεφάλαιο 2: Σκοπός.....	48

Κεφάλαιο 3: Πειραματικό μέρος.....	49-86
3.1. Κυτταροκαλλιέργειες.....	52
3.2. Παρασκευή του εμπλουτισμένου εκχυλίσματος Σιλυμαρίνης (Silymarin Enriched Extract: SEE) και απομόνωση της σιλιμπινίνης και της σιλικριστίνης.....	52-53
3.3. Παραλαβή εμπλουτισμένου κλάσματος σε γκλαμπριδίνη (GGE) από το φυτό <i>Glycyrrhiza glabra</i>	54-56
3.4. Δοκιμασία αναστολής πολλαπλασιασμού (MTT assay).....	56-58
3.5. Επίδραση εκχυλισμάτων – καθαρών ουσιών στα κύτταρα.....	58-59
3.6. Κυτταρομετρία ροής.....	59-64
3.7. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (qReal Time-PCR).....	64-68
3.8. Λύση των κυττάρων.....	69-70
3.9. Δοκιμασία προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	70-71
3.10. Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA).....	72-73
3.11. Μέθοδος Ανοσοαποτύπωσης (Western blotting).....	73-77
3.12. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	77
3.13. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία.....	77-79
3.14.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	80-84
3.14.2. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων NMR.....	84-86
 Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα.....	 87-120
4.1. Αποτελέσματα αναστολής πολλαπλασιασμού	
4.1.1. Αδριαμυκίνη.....	87
4.1.2. Εκχύλισμα SEE.....	88
4.1.3. Σιλιμπινίνη-Σιλυκριστίνη-Εκχύλισμα SEE.....	89
4.1.4. Συγχορήγηση Αδριαμυκίνης - Εκχυλίσματος SEE.....	90
4.1.5. Συγχορήγηση Αδριαμυκίνης - Σιλιμπινίνης.....	91
4.1.6. Εμπλουτισμένο κλάσμα γκλαμπριδίνης GGE.....	92
4.1.7. Συγχορήγηση Αδριαμυκίνης-Εμπλουτισμένου κλάσματος γκλαμπριδίνης	93
4.2. Μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο	
4.2.1. Αδριαμυκίνη-Εκχύλισμα SEE.....	94-95
4.2.2. Αδριαμυκίνη- Εμπλουτισμένο κλάσμα γκλαμπριδίνης GGE.....	96-97

4.3. Μεταβολές στην απόπτωση	
4.3.1. Αδριαμυκίνη-Εκχύλισμα SEE.....	98-99
4.3.2. Αδριαμυκίνη- Εμπλουτισμένο κλάσμα γκλαμπριδίνης GGE.....	100-101
4.4. Ποσοτικοποίηση αυτοφαγικών δομών.....	102
4.5. Έκφραση γονιδίων που σηματοδοτούν την έναρξη της αυτοφαγίας	
4.5.1. Αδριαμυκίνη-Εκχύλισμα SEE.....	103-104
4.5.2. Αδριαμυκίνη- Εμπλουτισμένο κλάσμα γκλαμπριδίνης GGE.....	105-106
4.6. Έκφραση των πρωτεϊνών LC3B	
4.6.1. Αδριαμυκίνη-Εκχύλισμα SEE.....	107-108
4.6.2. Αδριαμυκίνη- Εμπλουτισμένο κλάσμα γκλαμπριδίνης GGE.....	108-109
4.7. Έκφραση των πρωτεϊνών NBR1 και p62	
4.7.1. Αδριαμυκίνη-Εκχύλισμα SEE.....	109
4.7.2. Αδριαμυκίνη- Εμπλουτισμένο κλάσμα γκλαμπριδίνης GGE.....	109-110
4.8. Αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.....	111-112
4.9. Μεταβολικό προφίλ	
4.9.1. Αδριαμυκίνη-Εκχύλισμα SEE.....	113-116
4.9.2. Αδριαμυκίνη- Εμπλουτισμένο κλάσμα γκλαμπριδίνης GGE.....	117-120
Κεφάλαιο 5: Συζήτηση.....	121-130
Πίνακες.....	131-142
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	143-156

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον δεύτερο πιο συχνό καρκίνο και την έκτη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες. Η αδριαμυκίνη χρησιμοποιείται ευρέως ως χημειοθεραπευτικό φάρμακο σε μια πληθώρα νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη, όμως προκαλεί πολλές παρενέργειες στους ασθενείς οι οποίες εκδηλώνονται ακόμα και μετά από δεκαετίες. Για το λόγο αυτό, αποτελεί επιτακτική ανάγκη, η ανάδειξη μορίων τα οποία θα μειώνουν την τοξικότητα της αδριαμυκίνης στα φυσιολογικά κύτταρα χωρίς να επηρεάζουν τη δράση της έναντι των καρκινικών κυττάρων, και αν είναι δυνατό, ακόμα και να την ενισχύουν. Τις τελευταίες δεκαετίες, μια πληθώρα φυσικών προϊόντων έχουν μελετηθεί για την πιθανή αντικαρκινική τους δράση, όταν χορηγούνται είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.

Σκοπός: Στην παρούσα μελέτη παρασκευάστηκαν δύο φυτικά προϊόντα, το SEE (*Silymarin Enriched Extract* = Εμπλουτισμένο Εκχύλισμα Σιλυμαρίνης) και το GGE (*Glycyrrhiza Glabra Extract* = Εμπλουτισμένο Κλάσμα σε Γκλαμπριδίνη από το φυτό *Glycyrrhiza Glabra*), από τα φυτά *Silybum marianum* (Asteraceae) και *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae) αντίστοιχα, με απώτερο στόχο να μελετηθεί η επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό των ανδρογονο-ανεξάρτητων καρκινικών προστατικών κυττάρων (PC-3), όταν χορηγούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό με την αδριαμυκίνη. Παράλληλα, μελετήθηκαν κάποιες παράμετροι του μηχανισμού δράσης των δύο εκχυλισμάτων, δίνοντας έμφαση στη μελέτη του μηχανισμού της αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό αποδόμησης συστατικών του κυττάρου μέσω των λυσοσωμάτων, ενώ μέχρι σήμερα ο ρόλος της αυτοφαγίας στην εξέλιξη ή αναστολή του καρκίνου παραμένει διφορούμενος.

Μεθοδολογία: Πραγματοποιήθηκε επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων SEE και GGE, καθώς και των καθαρών ουσιών σιλίμπινη και σιλικριστίνη (δραστικές ουσίες του εκχυλίσματος SEE), είτε ως μονοχορήγηση είτε ως συγχορήγηση με την αδριαμυκίνη και εκτιμήθηκε η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της δοκιμασίας MTT. Ακολούθως, μελετήθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής, πιθανές μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο, στην απόπτωση και στην αυτοφαγία, ενώ παράλληλα αξιολογήθηκε η έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών – δεικτών της αυτοφαγίας, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και μεθόδων ανοσοαποτύπωσης. Με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης αποτυπώθηκαν

αυτοφαγικές δομές, ενώ παράλληλα με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR εκτιμήθηκαν αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των κυττάρων.

Αποτελέσματα: Η μονοχορήγηση με αδριαμυκίνη, SEE, σιλιμπινίνη ή σιλυκριστίνη αναστέλλει δοσο-εξαρτώμενα τον πολλαπλασιασμό των PC-3 κυττάρων. Ειδικότερα, η σιλιμπινίνη είναι πιο δραστική από την σιλυκριστίνη, ενώ παράλληλα η κυτταροστατική της δράση είναι ανάλογη του ολικού εκχυλίσματος SEE, υποδηλώνοντας ότι η δράση του SEE οφείλεται κυρίως στην σιλιμπινίνη. Επιπλέον, οι συγχορηγήσεις αδριαμυκίνης-SEE, αδριαμυκίνης-σιλιμπινίνης και αδριαμυκίνης-σιλυκριστίνης παρουσιάζουν αθροιστική κυτταροστατική δράση έναντι των PC-3 κυττάρων, μειώνοντας σημαντικά την απαιτούμενη δραστική συγκέντρωση της αδριαμυκίνης. Ειδικότερα, η συγχορήγηση Αδριαμυκίνης-SEE, σε ένα πρώτο χρόνο ενισχύει την επαγόμενη από την Αδριαμυκίνη προστατευτική αυτοφαγία των κυττάρων, στην συνέχεια όμως προκαλεί αναστολή της λύσης των αυτοφαγο-λυσosσωμάτων, οδηγώντας τελικά τα κύτταρα σε θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης.

Αντίστοιχα, το εκχύλισμα GGE αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα τον πολλαπλασιασμό των PC-3 κυττάρων ενώ η συγχορήγηση αδριαμυκίνης-GGE παρουσιάζει σημαντική αθροιστική δράση, μειώνοντας επίσης την απαιτούμενη δραστική συγκέντρωση της αδριαμυκίνης. Η συγχορήγηση αδριαμυκίνης-GGE ενισχύει σημαντικά τόσο την αυτοφαγία όσο και την απόπτωση των κυττάρων οδηγώντας σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο.

Καταλήγοντας, και τα δύο εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη, ενισχύουν σημαντικά την επίδραση της αδριαμυκίνης έναντι των PC-3 κυττάρων, προσβλέποντας πιθανώς μελλοντικά στη χορήγηση μικρότερης δόσης Αδριαμυκίνης στους ασθενείς, ώστε να περιοριστούν οι παρενέργειες διατηρώντας όμως την επιθυμητή φαρμακολογική δράση.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος προστάτη, αδριαμυκίνη, σιλυμαρίνη, γλυκόριζα, αυτοφαγία

Abstract

Introduction: Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer and the sixth most common cause of death from cancer in men, being a major public health concern. Adriamycin (ADR) is an anthracycline widely used as a chemotherapeutical agent against a variety of cancers, including prostate cancer. However, Adriamycin causes severe cardiotoxic and nephrotoxic side effects to the patients, shown even after decades. Hence, there is an urgent need to discover new supplementary treatments in order to reduce ADR cytotoxicity in normal cells without affecting and even enhancing its antitumor potential. Over the last years, several natural dietary compounds have been tested for their anticancer activity, either alone or in combination with chemotherapeutical agents.

Goal: Two natural extracts, SEE (Silymarin Enriched Extract) and GGE (Glycyrrhiza Glabra Extract), were isolated from the plant *Silybum marianum* (Asteraceae) and the plant *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae), respectively, in order to evaluate their effect on the proliferation of androgen-independent prostate cancer cells (PC-3), when they are administrated alone or in combination with Adriamycin. In addition, some aspects of the implicated mechanism of action of the two extracts were investigated, focusing on autophagy. Autophagy is an endogenous mechanism of cells delivering their own cytoplasmic materials and organelles to lysosomes for degradation and the role of autophagy in growth progression or prevention of cancer cells still remains controversial.

Methodology: PC-3 cells were treated with SEE or GGE alone, with silibinin or silychristine (major bioactive compounds of SEE extract) alone and in combination with Adriamycin (ADR) and cell proliferation inhibition was evaluated by the MTT assay. Cell cycle alterations, apoptosis and autophagy rates were measured through flow cytometry while expression levels of autophagy related genes and proteins were evaluated by Real Time PCR, specific ELISA kits and western blotting. TEM (Transmission Electron Microscopy) was used to reveal ultrastructural features of autophagy while NMR spectrometry was used in order to determine the metabolic profile of cells after each treatment.

Results: Treatment of PC3 cells with ADR, SEE, silibin and silychristine inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner, with silibinin being more bioactive than silychristine. Moreover, silibin antiproliferative effect is comparable to SEE, suggesting that the overall effect of SEE extract is mainly attributed to silibin. Furthermore, SEE extract and its bioactive compounds

exert an additive effect when combined with ADR, reducing the pharmacologically efficient dosage of ADR. In particular, the combinational scheme of ADR+SEE enhances the ADR induced protective autophagy in its initiative steps, yet it finally suppresses the autophagolysosome degradation, leading to an excessive cell death through the induction of apoptosis.

GGE alone also has antiproliferative properties against PC-3 cells. GGE in co-treatment with ADR shows an additive effect, also reducing the pharmacologically efficient dosage of ADR. ADR+GGE co-treatment enhances both the autophagic and apoptotic machinery of PC-3 cells, leading to excessive cell death.

In conclusion, both natural extracts tested (SEE and GGE) highly sensitize ADR-mediated cytotoxicity in PC-3 cells, suggesting the possibility of decreasing the ADR dosage, in order to reduce the side effects without reducing the pharmacological potential.

Keywords: prostate cancer, adriamycin, silymarin, glycyrrhiza, autophagy

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Επίπτωση PCa.....	17
Εικόνα 2: Στάδια PCa.....	18
Εικόνα 3: Μορφές αυτοφαγίας.....	21
Εικόνα 4: Μηχανισμός αυτοφαγίας.....	23
Εικόνα 5: Οι τρεις κύριες πρωτεΐνες της οικογένειας LC3.....	27
Εικόνα 6: Οι πρωτεΐνες p62 και NBR1.....	28
Εικόνα 7: Ο μηχανισμός δράσης των p62 και NBR1 στην αυτοφαγία.....	29
Εικόνα 8: Η κυτταρική σειρά PC-3	30
Εικόνα 9: Αδριαμυκίνη.....	31
Εικόνα 10: Μηχανισμοί δράσης της Αδριαμυκίνης.....	31
Εικόνα 11: Φαρμακοδυναμική της Αδριαμυκίνης και παρενέργειες.....	32
Εικόνα 12: Διασπορά του <i>Silybum marianum</i>	36
Εικόνα 13: <i>Silybum marianum</i>	36
Εικόνα 14: Παγκόσμια κατανομή του <i>Glycyrrhiza glabra</i>	40
Εικόνα 15: <i>Glycyrrhiza glabra</i>	40
Εικόνα 16: Μεταβολικές ιδιαιτερότητες του καρκίνου του προστάτη.....	44
Εικόνα 17: Μεταβολίτες-πιθανοί βιοδείκτες του PCa.....	45
Εικόνα 18: α) Σιλιμπίνη Α β) Σιλιμπίνη Β γ) Σιλυκριστίνη.....	52
Εικόνα 19: α) Γκλαμπριδίνη β) Φάσμα ¹ H-NMR καθαρότητας γκλαμπριδίνης.....	54
Εικόνα 20: Αρχές κυτταρομετρίας ροής.....	59
Εικόνα 21: Η σχέση ανάμεσα στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου και το ιστόγραμμα του DNA.....	59
Εικόνα 22: Sandwich ELISA.....	71
Εικόνα 23: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με ADR (3-100 nM) για 96 ώρες.....	86

Εικόνα 24: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με το εκχύλισμα SEE (6.25-200 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες.....	87
Εικόνα 25: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με σιλιμπινίνη (6.25-100 $\mu\text{g/mL}$) ή σιλυκριστίνη (6.25-100 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες, και σύγκρισή τους με το εκχύλισμα SEE (3-100 $\mu\text{g/mL}$).....	88
Εικόνα 26: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με ADR (3-100 nM) και συγχορήγηση με SEE (50 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες.....	89
Εικόνα 27: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με ADR (3-100 nM) και συγχορήγηση με Silibinin (50 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες.	90
Εικόνα 28: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με το εμπλουτισμένο κλάσμα GGE (6.25-200 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες.....	91
Εικόνα 29: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με ADR (3-100 nM) και συγχορήγηση του GGE (35 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες.....	92
Εικόνα 30: α) Ποσοστά των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), SEE (50 $\mu\text{g/mL}$) και ADR (25 nM) + SEE (50 $\mu\text{g/mL}$) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες και γ) 72 ώρες, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς Αντιπροσωπευτικά γραφήματα του ποσοστού των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), SEE (50 $\mu\text{g/mL}$) και ADR (25 nM) + SEE (50 $\mu\text{g/mL}$) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες γ) 72 ώρες, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς.....	93
Εικόνα 31: α) Ποσοστά των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), GGE (35 $\mu\text{g/mL}$) και ADR (25 nM) + GGE (35 $\mu\text{g/mL}$) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες και γ) 72 ώρες, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς β) Αντιπροσωπευτικά γραφήματα του ποσοστού των φάσεων του	

κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες γ) 72 ώρες, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς	95
Εικόνα 32: Τα ποσοστά απόπτωσης και νέκρωσης εκτιμήθηκαν στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες γ) 72 ώρες.....	97
Εικόνα 33: Γράφημα του ποσοστού της συνολικής απόπτωσης σε σχέση με το χρόνο. ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL).....	98
Εικόνα 34: Τα ποσοστά απόπτωσης και νέκρωσης εκτιμήθηκαν στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες γ) 72 ώρες.....	99
Εικόνα 35: α) Γράφημα του ποσοστού της συνολικής απόπτωσης σε σχέση με το χρόνο ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) β) Γράφημα του ποσοστού της νέκρωσης σε σχέση με το χρόνο ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL).....	100
Εικόνα 36: Αντιπροσωπευτικό γράφημα των τιμών ΔMFI Cyto-ID των PC-3 κυττάρων μετά από επώαση τους με ραπαμυκίνη (Rap) 100 nM, χλωροκίνη (CQ) 10 µM, ADR 25 nM, SEE 50 µg/mL, GGE 35µg/mL, ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) . ΔMFI Cyto-ID= MFI Cyto-ID (με επίδραση) - MFI Cyto-ID (κύτταρα αναφοράς).....	101
Εικόνα 37: α) Ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων LC3A και Beclin1 μετά από έκθεση των κυττάρων σε ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για 48 ώρες. β) Ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων ULK1, AMBRA1 και BNiP3L μετά από έκθεση των κυττάρων σε ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για 48 ώρες.....	102
Εικόνα 38: α) Ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων LC3A και Beclin1 μετά από έκθεση των κυττάρων σε ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) για 48 ώρες β) Ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων ULK1, AMBRA1 και BNiP3L μετά από έκθεση των κυττάρων σε ADR (25 nM), GGE	

(35 µg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL).....	104
Εικόνα 39: α) Ανοσοαποτύπωση κατά Western, της έκφρασης της μη-συζευγμένης (LC3-I) και της συζευγμένης (LC3-II) μορφής της πρωτεΐνης LC-3 στα κύτταρα PC-3. Η μεταβολή στην έκφραση των μορφών β) LC3-I και γ) LC3-II καθώς και ο λόγος δ) LC3-II/LC3-I υπολογίστηκαν σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL).....	106
Εικόνα 40: α) Ανοσοαποτύπωση κατά Western, της έκφρασης της μη-συζευγμένης (LC3-I) και της συζευγμένης (LC3-II) μορφής της πρωτεΐνης LC-3 στα κύτταρα PC-3. Τα γραφήματα απεικονίζουν την μεταβολή στην έκφραση των μορφών β) LC3-I και γ) LC3-II καθώς και τον λόγο δ) LC3-II/LC3-I. ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL).....	107
Εικόνα 41: α) Γράφημα της έκφρασης της πρωτεΐνης NBR1 μετά από τις χορηγήσεις με ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL). β) Γράφημα της έκφρασης της πρωτεΐνης p62 μετά από τις χορηγήσεις με ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL).....	109
Εικόνα 42: Αυτοφαγικές δομές όπως παρατηρήθηκαν με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο. α) Κύτταρα αναφοράς: λίγα αυτοφαγοσώματα β) Επίδραση με ADR (25 nM): πληθώρα αυτοφαγοσωμάτων και πολυμεμβρανικών κυστιδίων γ) Επίδραση με SEE (50 µg/mL): λίγα αυτοφαγοσώματα δ) Συγχορήγηση ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL): εκτεταμένη κυστιδιοποίηση συνδυασμένη με πλειομορφικά κυστίδια που φέρουν σταγονίδια λιπιδίων.....	111
Εικόνα 43: Αντιπροσωπευτικό φάσμα ¹ H 1D NMR με τους αναγνωρισμένους μεταβολίτες από δείγμα με επίδραση με το εκχύλισμα SEE (1-5.2 ppm: αλκοφατική περιοχή, 5.2-9 ppm: αρωματική περιοχή).....	112
Εικόνα 44: Ανάλυση PCA (Ctrl, ADR, SEE, ADR+SEE).....	113
Εικόνα 45: α) Ανάλυση PLS-DA β) Δοκιμή μεταθέσεων με 100 μεταθέσεις για το μοντέλο PLS-DA. (Ctrl, ADR, SEE, ADR+SEE).....	114

Εικόνα 46: Θηκογράμματα που απεικονίζουν τις στατιστικά σημαντικές σχετικές συγκεντρώσεις μεταβολιτών (Ctrl, ADR, SEE, ADR+SEE).....	115
Εικόνα 47: Αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H 1D NMR με τους αναγνωρισμένους μεταβολίτες από δείγμα με επίδραση με το εκχύλισμα GGE (1-5.2 ppm: αλοιφατική περιοχή, 5.2-9 ppm: αρωματική περιοχή).....	116
Εικόνα 48: Ανάλυση PCA (Ctrl, ADR, GGE, ADDR+GGE).....	117
Εικόνα 49: α) Ανάλυση PLS-DA β) Έλεγχος μεταθέσεων με 100 μεταθέσεις για το μοντέλο PLS-DA. (Ctrl, ADR, GGE, ADDR+GGE).....	117
Εικόνα 50: Θηκογράμματα που απεικονίζουν τις στατιστικά σημαντικές σχετικές συγκεντρώσεις μεταβολιτών (Ctrl, ADR, GGE, ADR+GGE).....	118

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 1:</i> Εμπορικά διαθέσιμα αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία είτε προέρχονται από φυσικά προϊόντα, είτε στηρίζονται ως προς τη χημική δομή σε φυσικά προϊόντα ή μιμούνται φυσικά προϊόν.....	35
<i>Πίνακας 2:</i> Ουσίες που έχουν απομονωθεί απο φυτά και έχουν μελετηθεί για την κυταροτοξική τους δράση έναντι του καρκίνου του προστάτη.....	130-135
<i>Πίνακας 3:</i> Μέθοδοι για την μελέτη της αυτοφαγίας-Ερμηνεία των αποτελεσμάτων.....	136-137
<i>Πίνακας 4:</i> Μεταβολικά Μονοπάτια και Αυτοφαγία.....	138
<i>Πίνακας 5:</i> Κορυφές μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν.....	139-141

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AKT/PKB	Protein Kinase B	Πρωτεϊνική Κινάση Β
ALFY	Autophagy Linked FYVE-domain protein	Σχετιζόμενη με την αυτοφαγία πρωτεΐνη με FYVE περιοχή
ALIS	Aggresome-Like Induced Structures	Επαγόμενες δομές που μοιάζουν στο αγγρέσωμα
AMBRA	Autophagy/Beclin 1 Regulator 1	Ρυθμιστής 1 της αυτοφαγίας/Beclin 1 πρωτεΐνης
AMP	Adenoside monophosphate	Μονοφωσφορική Αδενοσίνη
AMPK	AMP kinase	Κινάση AMP
AR	Androgen Receptor	Υποδοχέας ανδρογόνων
ATG	Autophagy related protein	Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την αυτοφαγία
Bax	Bcl-2 associated X protein	Πρωτεΐνη X σχετιζόμενη με τη Bcl-2
BCAA	Branched Chain Amino Acids	Αμινοξέα βραχείας αλυσίδας
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2 protein	Πρωτεΐνη 2 λεμφώματος Β λεμφοκυττάρων
BIF1	Endophilin B1	Ενδοφιλίνη Β1
CAM	Cell Adhesion Molecules	Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης
CCRC2	C Chemokine Receptor 2	Υποδοχέας των χυμοκινών 2
CJM	Cell Junction Molecules	Μόρια κυτταρικής σύνδεσης
CDNK1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1 gene	Γονίδιο κυκλino-εξαρτώμενου αναστολέα των κινασών
CMA	Chaperone Mediated Autophagy	Αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες-συνοδούς
CQ	Chloroquine	Χλωροκίνη
CREB3L	cAMP Responsive Element Binding protein 3 Ligand	Συνδέτης της πρωτεΐνης πρόσδεσης 3 στο στοιχείο απόκρισης του κυκλικού AMP.
DU145		Ανδρογόνο-εξαρτώμενη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη
EGF	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases	Εξωκυτταρικές σηματο-ελεγχόμενες κινάσες
erbB1	Recombinant human EGFR (epidermal growth factor receptor) 1	Ανασυνδυασμένος ανθρώπινος EGFR (υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 1)
GSH	Glutathione	Ανηγμένη γλουταθειόνη
FGF	Fibroblast Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
HIF-1A	Hypoxia-inducible Factor 1	Παράγοντας 1 επαγόμενος από την υποξία
IGF	Insulin-like Growth Factor	Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας
IGFBP-3	Insulin-like Growth factor Binding Protein 3	Πρωτεΐνη πρόσδεσης 3 στον Ινσουλινομιμητικό αυξητικό παράγοντα
LC-3	microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3	Πρωτεΐνη 1A/1B σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους - ελαφριά αλυσίδα 3
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate	Καρκινική κυτταρική σειρά από λεμφαδενικό καρκίνωμα του προστάτη
MEKK	Mitogen-activated protein/Erk	Πρωτεΐνη ενεργοποιημένη από μιτογόνα/ κινάση

mTOR	Kinases Kinase	της ERK κινασών
mTORC1	mammalian Target of Rapamycin mammalian Target of Rapamycin Complex 1	Στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά Σύμπλοκο στόχου της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά
NFkB	Nuclear Factor kappa B	Πυρηνικός παράγοντας κάππα Β
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene	Αλληλουχία δίπλα στο γονίδιο BRCA1
p62	nucleoPorin 62	Νουκλεοπορίνη 62
PCA	Principle Component Analysis	Ανάλυση κυρίων Συνιστωσών
PCa	Prostate Cancer	Καρκίνος Προστάτη
PC-3	human Prostate Cancer cell line 3	Ανδρογόνο-ανεξάρτητη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη
PDEF	Prostate Derived Epithelial Factor	Επιθηλιακός παράγοντας προερχόμενος από προστάτη
PDGF	Platelet Derived Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια
PIN	Prostatic Intraepithelial neoplasia	Προστατική ενδοθηλιακή νεοπλασία
PKCζ	Protein Kinase C isotype ζ	Πρωτεϊνική κινάση C ισομορφή ζ
PLS-DA	Partial Least Squares-Discriminant Analysis	Μερική ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων
PSA	Prostate Specific Antigen	Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο
Rap	Rapamycin	Ραπαμυκίνη
Rb	Retinoblastoma protein	Πρωτεΐνη του Ρετινοβλαστώματος
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Σηματοδοτικός επαγωγέας και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3
TCA cycle	Tricarboxylic acid cycle	Κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέως
TGF-b	Transforming Growth Factor beta	Μετατρεπτικός Αυξητικός Παράγοντας βήτα
TNFalpha	Tumor Necrosis Factor alpha	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων άλφα
TNFR6-E3 ligase	(TNFR)-associated factor 6 E3 ligase	E3 λιγάση-Παράγοντας 6 σχετιζόμενος με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων
TRAMP	Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate	Διαγονιδιακό Αδενοκαρκίνωμα του Προστάτη σε Ποντικό
UDP-GlcNac	Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine	Διφωσφορική ουριδίνη-N-ακετυλογλυκοσαμίνη
ULK1	Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase	Κινάση ενεργοποίησης της αυτοφαγίας τύπου Unc-51
UVRAG	UV-Radiation resistance Associated Gene	Γονίδιο σχετιζόμενο με την αντίσταση στην υπεριώδη ακτινοβολία
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας
VIP	Variable Importance Projection value	Τιμή προβολής μεταβλητής σημαντικότητας
ZEB1	Zinc finger E-box Binding homeobox 1 protein	Πρωτεΐνη δακτυλίων ψευδαργύρου συνδεόμενη στην περιοχή homeobox 1 του E-box

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1.1. Καρκίνος

Ο καρκίνος αποτελεί ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν ποικίλο βαθμό πιστότητας με τα προγονικά φυσιολογικά κύτταρα του ιστού από τον οποίο προήλθαν. Τις περισσότερες φορές η αλλοίωση έχει την μορφή διόγκωσης ενός ιστού, έτσι ώστε ο όρος «όγκος» να χρησιμοποιείται ως συνώνυμος με το νεόπλασμα. Αυτό όμως δεν είναι απόλυτα ορθό γιατί είναι δυνατόν τα νεοπλάσματα να μην σχηματίζουν μακροσκοπικά ορατό όγκο, ενώ ταυτόχρονα μια ογκόμορφη αλλοίωση δεν είναι απαραίτητα νεοπλασματική (π.χ. μπορεί να οφείλεται σε φλεγμονή)[1]. Τα νεοπλάσματα διακρίνονται σε καλοήθη και κακοήθη.

Τα καλοήθη νεοπλάσματα μορφολογικά μιμούνται το φυσιολογικό ιστό και ταυτόχρονα διατηρούν παρόμοια λειτουργικότητα με τον ιστό προέλευσης. Συνήθως, στερούνται ουσιώδους κυτταρικής ατυπίας, φέρουν πυρήνες με φυσιολογικά πυρήνια και παρατηρούνται σχετικά λίγες και φυσιολογικές μιτώσεις. Μακροσκοπικά, είναι περίγραπτα και διαθέτουν περιφερικά ινώδη κάψα. Αναπτύσσονται γενικά αργά, απωθώντας τους γύρω ιστούς και δεν προκαλούν μεταστάσεις.

Στα κακοήθη νεοπλάσματα ιστολογικά παρατηρείται κυτταρική ατυπία, η οποία περιγράφεται ως ποικιλία στο μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων και των πυρήνων τους. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται διογκωμένοι και υπερχρωματικοί πυρήνες, με αδρή κατανομή της χρωματίνης και προέχοντα πυρήνια, ενώ γενικά έχει διαταραχθεί η σχέση πυρήνα και κυτταροπλάσματος προς όφελος του πυρήνα. Στους περισσότερους όγκους παρατηρούνται συχνές μιτώσεις που, εν μέρει, έχουν και ανώμαλη μορφολογία. Η γενικότερη οργάνωση των κυττάρων διαφέρει από τον φυσιολογικό ιστό, γεγονός που συνδυάζεται και με αλλαγή στην λειτουργικότητα των κυττάρων ή ακόμα και με οριστική απώλεια λειτουργιών του αρχικού ιστού προέλευσης. Μακροσκοπικά, καθώς δεν φέρουν κάψα, παρουσιάζουν ασαφή περιφέρεια. Το βασικό όμως χαρακτηριστικό των κακοήθων νεοπλασμάτων είναι πως διαθέτουν την ιδιότητα να επεκτείνονται διηθητικά στους γύρω ιστούς καταστρέφοντάς τους και να μεθίστανται σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος [2].

1.1.2. Διήθηση και μετάσταση

Με τον όρο μετάσταση, καλούμε την μετανάστευση κακοήθων κυττάρων από μια πρωτογενή εστία σε μια άλλη θέση που δεν βρίσκεται σε επαφή με την πρωτογενή εστία, στην οποία αναπτύσσεται ένας νέος όγκος, που με την σειρά του μπορεί να προκαλέσει μια νέα μετάσταση [1].

Προκειμένου να εδραιωθεί μια μετάσταση από τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να ακολουθηθεί μια σειρά βημάτων που περιλαμβάνει:

1. Διήθηση της βασικής μεμβράνης που υπόκειται του όγκου.

Το πρώτο στάδιο για την πραγματοποίηση της διήθησης της βασικής μεμβράνης αποτελεί η ανεξαρτητοποίηση μεμονωμένων νεοπλασματικών κυττάρων από την κύρια μάζα του όγκου, προκειμένου να έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν και να κινηθούν ανεξέλεγκτα. Στο στάδιο αυτό, παρατηρείται στα μεταστατικά κύτταρα καταστολή ή και αλλοίωση των επιφανειακών μορίων συνοχής όπως είναι τα CAM και CJM. Τα μόρια αυτά είναι απαραίτητα για την σύνδεση και επικοινωνία γειτονικών κυττάρων, η δε έλλειψή τους εξασφαλίζει στα μεταστατικά κύτταρα την αυτοδυναμία τους, προκειμένου να εγκαταλείψουν τον ιστό προέλευσης.

Σε ένα δεύτερο στάδιο, τα μεταστατικά κύτταρα προσκολλώνται πάνω στην βασική μεμβράνη, μέσω ιντεγκρινών που υπερεκφράζονται στην κυτταρική τους επιφάνεια. Στη συνέχεια, ακολουθεί η απελευθέρωση ισχυρών πρωτεολυτικών ενζύμων από τα μεταστατικά κύτταρα, τα οποία διασπούν κατά τόπους την βασική μεμβράνη δημιουργώντας οδούς διαφυγής [2].

2. Μετακίνηση μέσω της εξωκυττάριας ουσίας (Φάση διήθησης του υποστρώματος).

Αφού τα μεταστατικά κύτταρα περάσουν στην εξωκυττάρια ουσία, την διασχίζουν με έντονη πρωτεολυτική δράση και ζωηρή αμοιβαδοειδή κινητικότητα. Η κινητικότητά τους αυτή, οφείλεται σε αλλοιώσεις της κυτταρικής επιφάνειας, σε αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και σε ταυτόχρονη έκκριση κυτταροκινών από τα ίδια τα μεταστατικά κύτταρα (αυτοκρινής επίδραση) [1].

3. Διείσδυση και διασπορά στις αγγειακές και λεμφαγγειακές οδούς.

Κατά την πορεία τους στο υπόστρωμα, τα μεταστατικά κύτταρα προσκρούουν στα τοιχώματα αγγείων ή λεμφαγγείων, τα οποία διηθούν και βρίσκουν τελικά πρόσβαση στον αγγειακό αυλό. Η διήθηση του τοιχώματος των αγγείων γίνεται με μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς της διήθησης της βασικής μεμβράνης [2]. Τα μεταστατικά κύτταρα ταξιδεύουν κατά μήκος των αγγείων κυρίως με την μορφή νεοπλασματικών θρόμβων. Παγιδεύονται μηχανικά στα τριχοειδή και τα φλεβίδια και προσδένονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στο σημείο αυτό, διηθούν αντίστροφα την βασική μεμβράνη από το αγγείο προς το παρέγχυμα, όπου θα εγκατασταθούν [2].

4. Επιβίωση και ανάπτυξη ως μετάσταση.

Στη νέα θέση εγκατάστασης τα μεταστατικά κύτταρα προκειμένου να επιβιώσουν και να αναπτύξουν ένα νέο όγκο χρειάζονται αυξητικούς παράγοντες για τον πολλαπλασιασμό τους, τους οποίους εκκρίνουν τα ίδια, καθώς και αγγείωση. Ο σχηματισμός νέων αγγείων είναι απαραίτητος για την επιβίωση και ανάπτυξη του νέου όγκου και επιτυγχάνεται από διάφορα πολυπεπτίδια όπως PDGF, FGF, TGF- β , που εκκρίνουν τα μεταστατικά κύτταρα.

1.1.3. Διαβάθμιση (Grading) και Σταδιοποίηση (Staging) του καρκίνου

Διαβάθμιση (Grading)

Η διαβάθμιση ενός όγκου αποτελεί ένα βαθμό της ιστολογικής επιθετικότητάς του και βασίζεται στο βαθμό της κυτταρικής ατυπίας και στον αριθμό των αναπτυσσόμενων κυττάρων. Έτσι, η κυτταρική ατυπία καθορίζεται από το σχήμα, τον αριθμό των πυρήνων των κυττάρων και από την παρουσία ευδιάκριτων στοιχείων διαφοροποίησης. Η δε ταχεία ή μη φυσιολογική αύξηση καθορίζεται από τον αριθμό και την ατυπία των μιτώσεων καθώς και από την παρουσία πυρηνικού πολυμορφισμού και κακοήθων γιγαντοκυττάρων. Παρά τις γενικές αυτές κατευθύνσεις, το σύστημα βαθμολόγησης των όγκων στηρίζεται σε συγκεκριμένα κριτήρια για κάθε όργανο ξεχωριστά.

Στους περισσότερους όγκους, η διαβάθμισή τους περιλαμβάνει τρεις ή τέσσερις βαθμίδες που αντιστοιχούν σε προοδευτικά αυξανόμενο βαθμό κακοήθειας. Για ορισμένους όγκους, ο

βαθμός κακοήθειας βρίσκεται σε καλή συσχέτιση με την πρόγνωση ενώ για άλλους λιγότερο, αποτελώντας πάντως έναν αδρό προγνωστικό δείκτη [3].

Σταδιοποίηση (Staging)

Η σταδιοποίηση ενός όγκου αποτελεί μια εκτίμηση της ανατομικής έκτασης της νόσου τη στιγμή της διάγνωσης προσφέροντας την απαραίτητη πληροφόρηση για την επιλογή των ορθών θεραπευτικών χειρισμών. Η σταδιοποίηση του όγκου είναι ανεξάρτητη από την διαβάθμισή του. Στα περισσότερα όργανα εφαρμόζεται το σύστημα TNM που εξετάζει το μέγεθος του όγκου (T: Tumor = όγκος), την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (N: Nodes = λεμφαδένες) και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις (M: Metastases = μεταστάσεις). Από τον συνδυασμό αυτών των παραμέτρων προκύπτουν, για τα διάφορα όργανα, συγκεκριμένα στάδια που παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την πορεία της νόσου. Τα περισσότερα επιδημιολογικά δεδομένα, που σχετίζονται με την επιβίωση των ασθενών με καρκίνο, βασίζονται περισσότερο στην σταδιοποίηση του όγκου παρά στην διαβάθμισή του [1, 3].

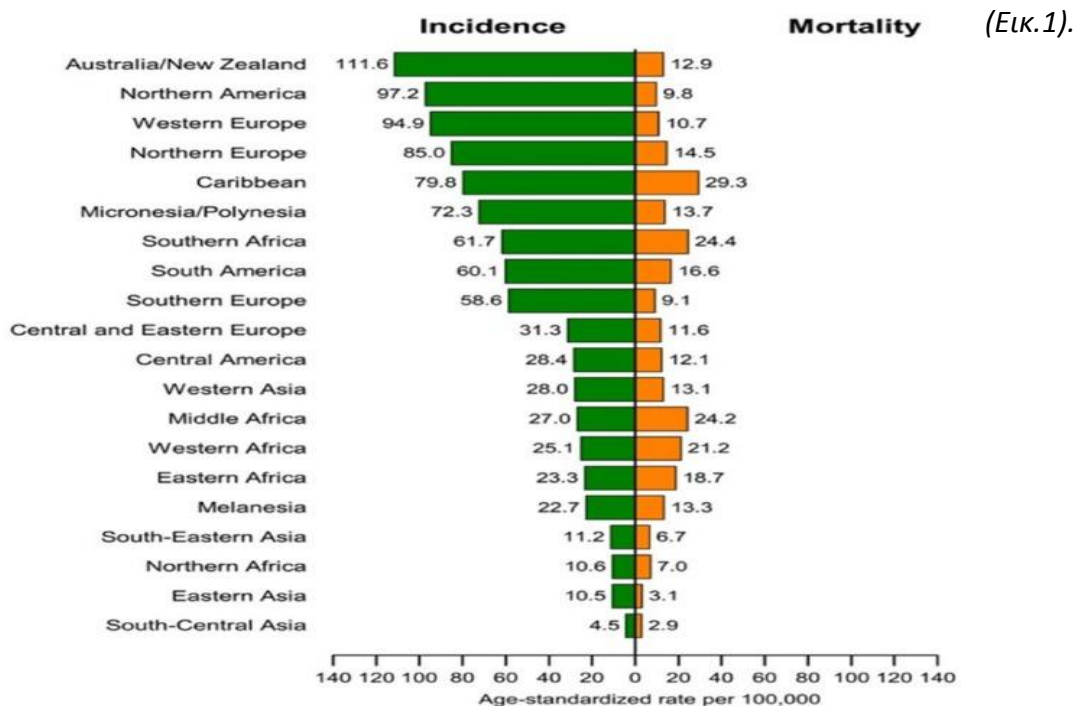
1.1.4. Αιτιολογία του καρκίνου

Η ανεξέλεγκτη αύξηση των καρκινικών κυττάρων προέρχεται από την σταδιακή απόκτηση σωματικών μεταλλάξεων στα γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση (ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια) ή στα γονίδια που διατηρούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος. Παρόμοιες μεταλλάξεις μπορεί επίσης να είναι παρούσες στο γονιδίωμα ανθρώπων με κληρονομική προδιάθεση για διάφορες μορφές καρκίνου.

Οι μεταλλάξεις των κρίσιμων γονιδίων μπορούν να προκληθούν από περιβαλλοντικά μεταλλαξιογόνα, όπως χημικές ουσίες ή ακτινοβολίες, ή ως επιπλοκή του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού (ελεύθερες ρίζες) ενώ ο συνηθέστερος μηχανισμός σχετίζεται με σημειακές μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή ή επιδιόρθωση του DNA, με αποτέλεσμα η επίπτωση της νόσου να αυξάνει με την ηλικία [3].

1.2.1. Καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί το δεύτερο πιο συνήθη καρκίνο στους άντρες παγκοσμίως και τον πρώτο πιο συνήθη καρκίνο στους άντρες σε Ευρωπαϊκό επίπεδο. Αποτελεί συνήθως νόσο των ηλικιωμένων ανδρών, καθώς το 75% των ασθενών έχουν ηλικία μεταξύ 60 και 80 ετών



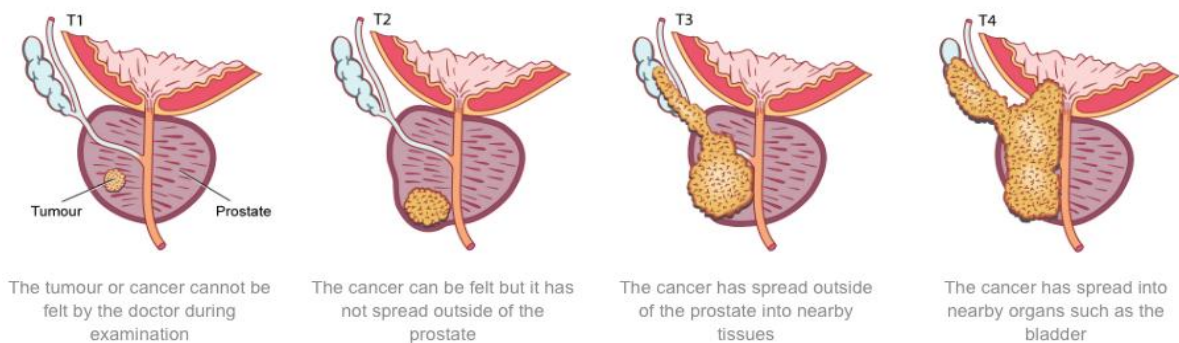
Εικόνα 1: Επίπτωση PCa. Harold Evelyn Taitt. *Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence, Detection, and Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location* Am J Mens Health. 2018 Nov; 12(6): 1807–1823.

Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισής του παρουσιάζεται στις ΗΠΑ και τις Σκανδιναβικές χώρες, με την υψηλότερη επίπτωση παγκοσμίως να καταγράφεται στην Αμερική, ενώ μικρότερα ποσοστά παρατηρούνται στο Μεξικό, την Ελλάδα και την Ιαπωνία (Εικ.1). Αν και η αιτία του προστατικού αδενοκαρκινώματος είναι άγνωστη, θεωρείται πως αποτελεί ενδοκρινική διαταραχή [4].

Το προστατικό αδενοκαρκίνωμα αντιστοιχεί στο 98% όλων των προστατικών όγκων και είναι συνήθως πολυεστιακό, εντοπισμένο στις περιφερικές ζώνες του οργάνου. Στην επιφάνεια διατομής, ο όγκος παρουσιάζει λευκο-κίτρινη χροιά με ανώμαλη περιφέρεια και σκληρή σύσταση. Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο σύστημα διαβάθμισης των προστατικών όγκων είναι το σύστημα βαθμού κακοήθειας κατά Gleason, το οποίο στηρίζεται σε 5 ιστολογικά πρότυπα

αδενικού σχηματισμού και διήθησης. Έτσι, οι όγκοι με την καλύτερη διαφοροποίηση έχουν άθροισμα κατά Gleason ίσο με 2 (1+1), ενώ εκείνοι με την χειρότερη διαφοροποίηση έχουν άθροισμα 10 (5+5), με τους περισσότερους όγκους να κυμαίνονται από βαθμό 4 έως 7. Ο βαθμός κακοήθειας κατά Gleason, σε συνδυασμό με το στάδιο του όγκου έχουν προγνωστική αξία, καθώς όσο μικρότερο είναι το άθροισμα τόσο καλύτερη είναι η πρόγνωση (Εικ.2).

Το προστατικό αδενοκαρκίνωμα παρουσιάζει υψηλή συχνότητα διήθησης της προστατικής κάψας, ενώ πολύ συχνά παρατηρείται περινευρική διήθηση του όγκου εντός του προστάτη και των παρακείμενων ιστών, καθώς και διήθηση των σπερματικών κύστεων. Στο τελικό στάδιο της νόσου, παρατηρείται διάχυτη εξάπλωση με οστικές μεταστάσεις κυρίως στα οστά της πυέλου, στη σπονδυλική στήλη και στις πλευρές του θωρακικού τοιχώματος [4].



Εικόνα 2: Στάδια PCa.

Ο καρκίνος του προστάτη αντιμετωπίζεται θεραπευτικά με ριζική προστατεκτομή ή με ακτινοθεραπεία. Σε ασθενείς στους οποίους ο όγκος εκδηλώνεται κλινικά ή εμφανίζει μεταστάσεις επιλέγεται ορμονική θεραπεία με ανδρογονικό αποκλεισμό, που πραγματοποιείται είτε μέσω ορχεκτομής είτε με τη χορήγηση ανταγωνιστών της απελευθέρωσης ωχρινικής ορμόνης από την υπόφυση.

1.2.2. Παράγοντες Κινδύνου

Διάφοροι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη. Η μεγάλη ηλικία αποτελεί ίσως τον καθοριστικότερο παράγοντα για την εμφάνιση της νόσου. Σπάνια, πραγματοποιείται διάγνωση καρκίνου του προστάτη σε

άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών, ενώ η θνησιμότητα είναι σχετικά σπάνια σε άτομα ηλικίας μικρότερης των 50 ετών. Όπως με όλους τους όγκους επιθηλιακής προέλευσης, η επίπτωση του καρκίνου του προστάτη αυξάνει εκθετικά σε ηλικίες από 55 ετών και άνω.

Διαφορές στα ποσοστά θνησιμότητας παρουσιάζονται ανάλογα με τη φυλή και την εθνικότητα. Έτσι, τα υψηλότερα ποσοστά καρκίνου του προστάτη εμφανίζονται σε Αμερικανούς αφρικανικής καταγωγής (2,4 φορές υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με άτομα της Καυκάσιας φυλής) ενώ τα μικρότερα ποσοστά παρατηρούνται σε άτομα Ασιατικής καταγωγής [5].

Άνδρες, με συγγενή πρώτου βαθμού που παρουσίασε καρκίνο του προστάτη, έχουν αυξημένη πιθανότητα κατά 20-50 % να παρουσιάσουν και οι ίδιοι [6, 7]. Πιο συγκεκριμένα, άντρες των οποίων ο πατέρας εμφάνισε PCa έχουν διπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν και οι ίδιοι, ενώ αν η ασθένεια παρουσιάστηκε σε αδερφό τους έχουν τριπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν και οι ίδιοι [8]. Οι παραπάνω πιθανότητες δικαιολογούνται από το γεγονός ότι ο καρκίνος του προστάτη παρουσιάζει αυξημένη κληρονομική προδιάθεση σε σχέση με άλλες νεοπλασίες. Μελέτες του γονιδιώματος αποκαλύπτουν πως μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια σχετίζονται με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης PCa, με κυριότερες τις μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA2, οι οποίες προδιαθέτουν για εμφάνιση του καρκίνου σε ηλικία μικρότερη των 65 ετών [9, 10]. Επίσης, άντρες με χρόνια προστατίτιδα έχουν αυξημένο κίνδυνο κατά 60-80 % για εμφάνιση της νόσου [11]. Τέλος, το υπερβολικό βάρος προδιαθέτει κατά 9-15 % για εμφάνιση πολύ επιθετικών μορφών PCa και μειωμένων πιθανοτήτων επιβίωσης [12, 13]. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση στην πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη κατά 15 % για κάθε 5 kg/m² αύξηση στο δείκτη μάζας σώματος [14].

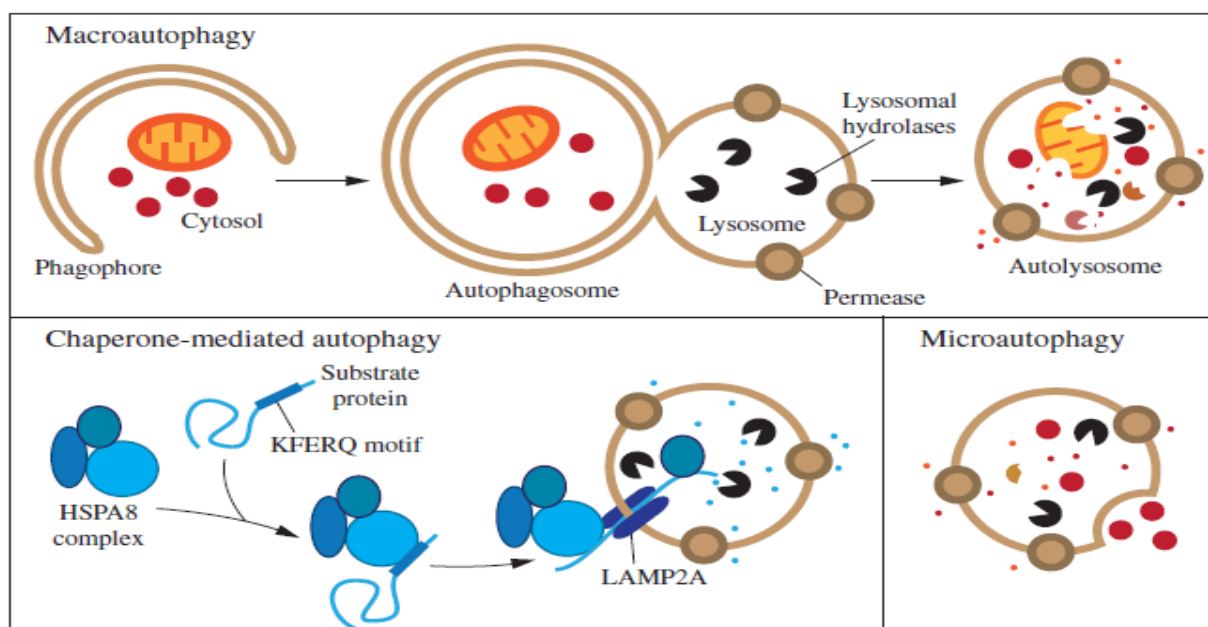
Οι διατροφικές συνήθειες επηρεάζουν την πιθανότητα εμφάνισης PCa. Έτσι, τα αυξημένα ποσοστά ασβεστίου στον ορό του αίματος σχετίζονται με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του προστάτη [15, 16]. Ο προτεινόμενος μηχανισμός αναφέρει ότι το ασβέστιο περιορίζει τα επίπεδα της ενεργής μορφής της διυδρόξυ-βιταμίνης D (ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D) στην κυκλοφορία του αίματος, η οποία σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση πολλών τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου και του προστατικού επιθηλίου [17]. Ταυτόχρονα, οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα αυξάνουν τα επίπεδα του IGF και έμμεσα και την πιθανότητα εμφάνισης PCa [18].

Η αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος, και μάλιστα υπερβολικά ψημένου ή ψητού στα κάρβουνα οδηγεί σε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης PCa. Όταν το κρέας ψήνεται σε υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα, η κρεατινίνη που περιέχει αντιδρά με τα αμινοξέα και τα σάκχαρα και παράγονται ετεροκυκλικές αμίνες, οι οποίες είναι ισχυρά μεταλλαξιγόνα και προκαλούν οξειδωτικό στρες στα κύτταρα του προστάτη άρα αυξάνουν και τις πιθανότητες για καρκινογένεση [19-21]. Για το λόγο αυτό, συνιστάται η κατανάλωση μόλις 500 γραμμαρίων κόκκινου κρέατος εβδομαδιαίως [22]. Επίσης, η αυξημένη πρόσληψη ζωικού λίπους (η οποία σχετίζεται και με την κατανάλωση κόκκινου κρέατος) προδιαθέτει την εμφάνιση PCa καθώς επηρεάζει το σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει τον υποδοχέα των χυμοκινών 2 (CCRC2) [23].

1.3. Αυτοφαγία

Ο όρος αυτοφαγία αναφέρεται σε οποιοδήποτε μοριακό μονοπάτι που σχετίζεται με την αποδόμηση συστατικών του κυττάρου μέσω της μεταφοράς τους προς το λυσοσώμα, το οποίο τελικά είναι αυτό που πραγματοποιεί την αποδόμηση. Έχουν αναφερθεί τρεις μορφές αυτοφαγίας, η μικρο-αυτοφαγία, η αυτοφαγία μέσω πρωτεϊνών συνοδών (CMA: chaperone mediated autophagy), και η μακρο-αυτοφαγία ή απλά αυτοφαγία (Εικ.3). Η τελευταία αποτελεί το βασικό καταβολικό μηχανισμό των ευκαρυωτικών κυττάρων για την αποδόμηση και καταστροφή "γερασμένων" πρωτεϊνών και οργανιδίων [24].

Κατά την μικρο-αυτοφαγία, περιοχές της μεμβράνης του λυσοσώματος εγκολπώνουν τα υλικά προς αποδόμηση, ακόμα και ολόκληρα άθικτα οργανίδια του κυττάρου [25]. Κατά την CMA, τα τσαπερόνια (πρωτεΐνες-συνοδοί) αναγνωρίζουν πρωτεΐνες που φέρουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία πέντε αμινοξέων, και τις οδηγούν στα λυσοσώματα προς αποδόμηση [26]. Σε αντίθεση με τους δύο προηγούμενους τύπους αυτοφαγίας, κατά την μακρο-αυτοφαγία, πραγματοποιείται η *de novo* σύνθεση ενός διπλομεμβρανικού οργανιδίου, του αυτοφαγοσώματος, το οποίο αναλαμβάνει την εγκόλπωση των συστατικών και οργανιδίων προς αποδόμηση και την τελική τους μεταφορά στα λυσοσώματα προς ολοκλήρωση της διαδικασίας [24].



Εικόνα 3: Μορφές αυτοφαγίας. Katherine R. Parzych and Daniel J. Klionsky. *An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism and Regulation. Antioxidants and redox signaling.* 2014; 20(3): 460–473

1.3.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά αυτοφαγίας

Η μακρο-αυτοφαγία χαρακτηρίζεται από μια σειρά μορφολογικών χαρακτηριστικών. Έτσι, κατά τα πρώιμα στάδιά της, από διάφορες θέσεις του κυτταροπλάσματος, δημιουργείται και επιμηκύνεται μια μεμβράνη απομόνωσης, το φαγοφόρο. Η πηγή αυτής της μεμβράνης δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί, καθώς διάφορες μελέτες θεωρούν πως η έναρξη σχηματισμού της μεμβράνης του φαγοφόρου μπορεί να βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, στο σύμπλεγμα Golgi, στα μιτοχόνδρια ή στα ομεγασώματα, ειδικές δομές που βρίσκονται συνδεδεμένες με το ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικ. 4) [27].

Στη συνέχεια, η μεμβράνη του φαγοφόρου επεκτείνεται ενώ τα άκρα του φαγοφόρου συντήκονται και εγκλωβίζουν το κυτταροπλασματικό συστατικό προς αποδόμηση, σχηματίζοντας ένα διπλομέμβρανο κυστίδιο, το αυτοφαγόσωμα. Η μεμβράνη του φαγοφόρου και κατόπιν του αυτοφαγοσώματος, περικυκλώνει το φορτίο προς αποδόμηση άρα προσαρμόζει και το μέγεθός της σε αυτό του φορτίου, έχοντας τελικά μέγεθος από 0.5 μm έως 1.5 μm (Εικ.4) [27].

Αφού ο σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος έχει ολοκληρωθεί, ακολουθεί η μετακίνησή του προς το λυσόσωμα. Εκεί, η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος συντήκεται με την μεμβράνη του λυσοσώματος προς σχηματισμό του αυτοφαγολυσοσώματος. Στο εσωτερικό του αυτοφαγο-λυσοσώματος, τόσο η εσωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος όσο και τα φορτία προς αποδόμηση, εκτίθενται σε ένα ισχυρά όξινο περιβάλλον και σε μια σειρά από υδρολυτικά ένζυμα με αποτέλεσμα να αποδομούνται. Τα συστατικά που προκύπτουν μετά την αποδόμηση, απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα από διάφορες λυσοσωματικές περμεάσες, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε βιοσυνθετικές διαδικασίες ή στην παραγωγή ενέργειας (Εικ.4) [27].

Στα θηλαστικά, η μακρο-αυτοφαγία συχνά συγκλίνει με το μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης. Έτσι, πριν τη σύντηξη με το λυσόσωμα, το αυτοφαγόσωμα μπορεί να συντηχθεί με ένα πρώιμο ή ώριμο ενδόσωμα προς σχηματισμό του αμφισώματος και κατόπιν να συντηχθεί με το λυσόσωμα [27].

1.3.3. Μοριακά μονοπάτια της αυτοφαγίας

Τα μοριακά μονοπάτια και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην έναρξη και ολοκλήρωση του μηχανισμού της αυτοφαγίας έχουν χαρακτηριστεί την τελευταία δεκαετία. Έτσι, ο μηχανισμός της αυτοφαγίας στηρίζεται κατά κύριο λόγο στο σχηματισμό τεσσάρων μεγαλομοριακών

Εικόνα 4: Μηχανισμός αυτοφαγίας. Beth Levine and Guido Kroemer. *Autophagy in the Pathogenesis of Disease.* Cell 2008; 132(1): 27–42



Σύμπλοκο Beclin1/PI3KIII:

Κατά την έναρξη της αυτοφαγίας απαιτείται η ύπαρξη μιας σημαντικής συγκέντρωσης φωσφορικής φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης 3, η οποία είναι καθοριστική για το σχηματισμό του φαγοφόρου [29]. Στα θηλαστικά, το σύμπλοκο Beclin1/PI3KIII είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της PI3P, δρώντας ως επαγωγέας της αυτοφαγίας και αποτελείται από την κινάση mVPS34, την διαμεμβρανική πρωτεΐνη mVPS15, και την Beclin1. Διάφορες πρωτεΐνες έχουν βρεθεί να προσδένονται στο σύμπλοκο Beclin1/PI3KIII επάγοντας ή αναστέλλοντας την δράση του (Εικ.4).

Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη AMBRA1 προσδένεται άμεσα με την Beclin1, συμβάλλοντας, με αυτό τον τρόπο, στην πρόσδεση του συμπλόκου Beclin1/PI3KIII στο σύμπλοκο δυνεΐνης, εμποδίζοντάς το να προσδεθεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο και να παράγει PI3P, αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την αυτοφαγία. Κατά την επαγωγή της αυτοφαγίας, η AMBRA1 φωσφορυλιώνεται και απελευθερώνει το σύμπλοκο Beclin1/PI3KIII προς το ενδοπλασματικό δίκτυο για παραγωγή PI3P [30]. Παράλληλα, η πρόσδεση της πρωτεΐνης AMBRA1 με την Beclin1, αυξάνει την αλληλεπίδραση της Beclin1 με την κινάση mVPS34, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιείται και επάγει τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος [30]. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης AMBRA1, και η επακόλουθη επαγωγή ή αναστολή της αυτοφαγίας, πραγματοποιείται από τα σύμπλοκα κινασών ULK1 και mTORC και αντίστοιχα (Εικ.4) [31].

Σύμπλοκο ULK1

Στα θηλαστικά, το σύμπλοκο ULK1 είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της αυτοφαγίας. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τις πρωτεΐνες ULK1 ή ULK2 (Unc-51-like kinase family), ATG13 και RB1CC1/FIP200 και σχηματίζεται ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι θρεπτικών συστατικών μέσα στο κύτταρο. Η ενεργοποίησή του όμως ή η καταστολή του καθορίζεται από το σύμπλοκο mTORC1.

Η πρωτεΐνη ULK1 αποτελεί μια κινάση της σερίνης / θρεονίνης. Σε περίπτωση έλλειψης σημαντικών αμινοξέων, η ULK1 φωσφορυλιώνει την AMBRA1 πρωτεΐνη, η οποία με τη σειρά της απελευθερώνει τα σύμπλοκο AMBRA1-Beclin1-mVPS34 από τη δυνεΐνη του κυτταροσκελετού και διευκολύνει την μετακίνησή του προς το ενδοπλασματικό δίκτυο, προς σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος, όπως περιγράφηκε προηγουμένως [30]. Παράλληλα, η AMBRA1 διαμεσολαβεί και για την ουβικιτινίωση της πρωτεΐνης ULK1 από την (TRAF6) E3

λιγάση, με αποτέλεσμα την αυτο-συσχέτιση της ULK1 και την επαγωγή της αυτοφαγίας (Εικ.4) [32].

Σύμπλοκο mTORC1

Το σύμπλοκο mTORC αποτελείται από μια σειρά από πρωτεΐνες, όπως οι mTOR, RAPTOR και MLST8, και λειτουργεί ως καταστολέας της αυτοφαγίας στα θηλαστικά. Η πρωτεΐνη mTOR αποτελεί μια υψηλά συντηρημένη κινάση της σερίνης/θρεονίνης η οποία συντονίζει μια σειρά σημάτων που διατηρούν την ομοιόσταση του κυττάρου [33]. Έτσι, σε συνθήκες περίσσειας θρεπτικών συστατικών, το σύμπλοκο mTORC, σε ένα πρώτο επίπεδο φωσφορυλιώνει άμεσα την ULK1 πρωτεΐνη σε συγκεκριμένες θέσεις, αναστέλλοντας την ικανότητά του να επάγει την αυτοφαγία [34]. Σε ένα δεύτερο επίπεδο, το σύμπλοκο mTORC συνδέεται απευθείας με την πρωτεΐνη AMBRA1 και την φωσφορυλιώνει στη σερίνη 52 οδηγώντας επίσης σε αναστολή της αυτοφαγίας [32]. Αντίθετα, σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, το mTORC1, αποφωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες ULK1 και AMBRA1 στις συγκεκριμένες θέσεις, οδηγώντας σε επαγωγή της αυτοφαγίας (Εικ.4) [31].

Σε ένα δεύτερο στάδιο, η επιμήκυνση του φαγοφόρου, προς σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος, απαιτεί δύο συστήματα σύζευξης με παράγοντες παρεμφερείς της ουμπικουιλίνης. Στο ένα σύστημα, τα ένζυμα ATG7 και ATG10 επάγουν τη σύζευξη των πρωτεϊνών ATG12 και ATG5, οι οποίες κατόπιν σχηματίζουν σύμπλοκο με την ATG16L και τελικά επάγουν το σχηματισμό αυτοφαγοσώματος. Στο δεύτερο σύστημα, η πρόδρομη μορφή της LC3 πρωτεΐνης, μέσω της πρωτεάσης ATG4B, ωριμάζει προς την LC3-I μορφή. Η LC3-I μορφή συνδέεται με την κυτταρική λιπιδική φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη (PE) προς σχηματισμό της LC3-II συζευγμένης μορφής, η οποία είναι καθοριστικής σημασίας για το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος (Εικ.4) [35].

Ο ρόλος της αυτοφαγίας στην καρκινογένεση φαίνεται να είναι διττός. Η αυτοφαγία αποτελεί ένα αντικαρκινικό μηχανισμό σε πρωταρχικά φυσιολογικά κύτταρα καθώς τα προστατεύει από μεταβολικό στρες. Η έλλειψη αυτοφαγικών πρωτεϊνών οδηγεί σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, αυξημένο οξειδωτικό στρες, δεκτικότητα των κυττάρων σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα, που τελικά επιτρέπουν βλάβες στο DNA και επακόλουθη γενετική αστάθεια, καθοριστικούς παράγοντες για την καρκινογένεση [36].

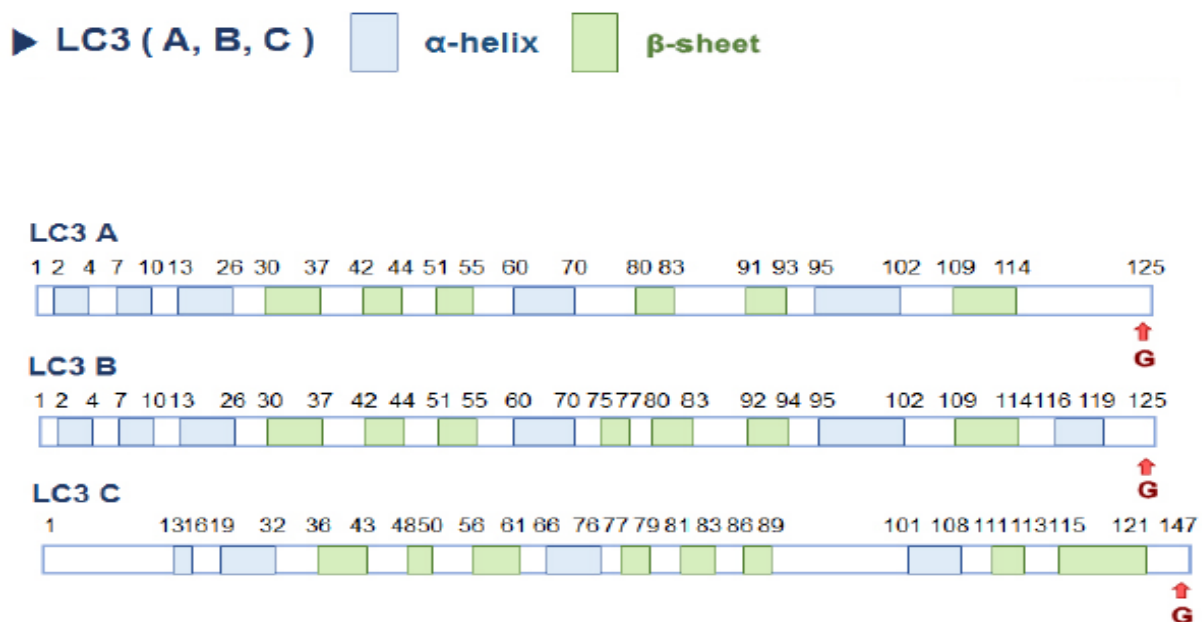
Ωστόσο, σε ήδη εγκατεστημένους όγκους, η αυτοφαγία προσφέρει πλεονέκτημα επιβίωσης στα καρκινικά κύτταρα που υφίστανται μεταβολικό στρες και βρίσκονται σε συνθήκες υποξίας. Επίσης, η αυτοφαγία φαίνεται να συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα έναντι των χημειοθεραπευτικών ουσιών, καθώς η γενετική καταστολή διάφορων αυτοφαγικών πρωτεϊνών (ATG5, ATG7) αυξάνει την κυτταροτοξικότητα των χημειοθεραπευτικών ουσιών [36].

Η επίδραση όμως της αυτοφαγίας στα καρκινικά κύτταρα δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένη και περιπλέκεται ακόμα περισσότερο από το γεγονός ότι η έλλειψη του γονιδίου για την πρωτεΐνη Beclin1 παρατηρείται σε υψηλό ποσοστό σε καρκίνους μαστού, ωοθηκών και προστάτη ενώ παράλληλα, ποντίκια με μονοαλληλική έλλειψη του γονιδίου της Beclin1 ή της Atg4C, είναι επιρρεπή σε όγκους [37-40]. Η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι, στα καρκινικά κύτταρα, η αυτοφαγία αποτελεί κυρίως μηχανισμό επιβίωσης, αν όμως υπάρξει μια ανισορροπία στον κυτταρικό μεταβολισμό, όπου η κυτταρική αποδόμηση μέσω αυτοφαγίας υπερβαίνει την κυτταρική σύνθεση, τότε το κύτταρο οδηγείται στο θάνατο.

1.3.4. Οι πρωτεΐνες LC3 και η αυτοφαγία

Οι LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) πρωτεΐνες αποτελούν διαλυτές πρωτεΐνες που εντοπίζονται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών καθώς και σε κυτταροκαλλιέργειες ενώ η οικογένεια των LC3 γονιδίων στον άνθρωπο περιλαμβάνει τουλάχιστον τρία μέλη, τα LC3A, LC3B και LC3C (*Εικ.5*) [41, 42]. Οι LC3 πρωτεΐνες εμφανίζουν δύο ισομορφές, την LC3-I και LC3-II, με την τελευταία (LC3A-II, LC3B-II και LC3C-II) να αποτελεί βασικό συστατικό της διπλής μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος. Η ισομορφή LC3-II προκύπτει από μια πρόδρομη πρωτεΐνη περίπου 30 kDa, την proLC3. Η proLC3 υφίσταται αποκοπή αμινοξέων, μέσω της πρωτεΐνης Atg4, αποκαλύπτοντας ένα κατάλοιπο γλυκίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της και παράγοντας τελικά την κυτταροπλασματική ισομορφή LC3-I (~17 kDa). Η LC3-I κατόπιν ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη Atg7 και μεταφέρεται στην πρωτεΐνη Atg3 η οποία καταλύει τη σύνδεση του καρβοξυτελικού άκρου της LC3-I με φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη, μετατρέποντάς την στην ισομορφή LC3-II (~15 kDa) [43]. Η LC3-II συμμετέχει στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος από το φαγοφόρο και εντοπίζεται τόσο

στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος. Μετά τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος, η LC3-II, που βρίσκεται στην εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης, απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ η LC3-II που εντοπίζεται στην εσωτερική στιβάδα της μεμβράνης αποδομείται από τις υδρολάσες του λυσοσώματος [44]. Καθώς λοιπόν η LC3-II εντοπίζεται στην μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων και αυτοφαγολυσοσωμάτων, χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης της αυτοφαγικής διαδικασίας [44]. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν πως υπάρχουν διακριτά αυτοφαγόσωματα που δομούνται είτε από την LC3A-II είτε από την LC3B-II. Κατά την επαγωγή της αυτοφαγίας παρατηρείται συσσώρευση και της LC3A-II και της LC3B-II, οπότε και οι δύο μορφές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αυτοφαγίας [45].



Εικόνα 5: Οι τρεις κύριες πρωτεΐνες της οικογένειας LC3. You-Kyung Lee, Jin-A Lee. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatio-temporal regulation of autophagy. *BMB Rep.* 2016; 49(8): 424-430

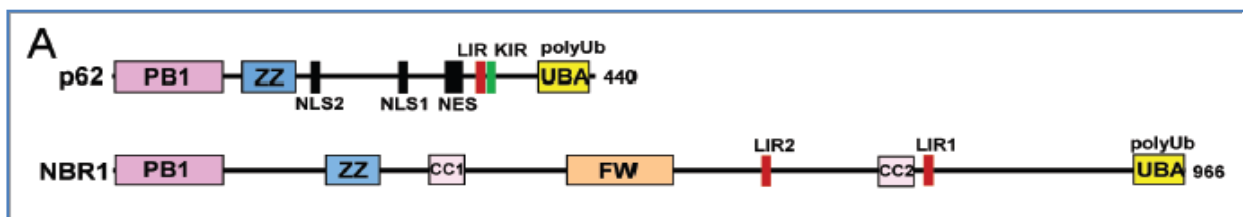
1.3.5. Οι πρωτεΐνες p62, NBR1 και η αυτοφαγία

Οι πρωτεΐνες p62 και NBR1 αποτελούν υποδοχείς πρωτεϊνών που πρόκειται να αποδομηθούν μέσω της αυτοφαγίας και ταυτόχρονα αποτελούν υποστρώματα για το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος.

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη p62 αποτελείται από 44 αμινοξέα. Στο αμινοτελικό της άκρο φέρει την περιοχή PBI, η οποία της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με τις κινάσες PKCζ, PKCλ/ι, MEKK3, MEK5 αλλά και με την πρωτεΐνη NBR1. Ακολουθεί μια περιοχή τύπου δακτύλου ψευδαργύρου (ZZ-type), ενώ φέρει επίσης περιοχές για μηνύματα πυρηνικής εντόπισης (NLS:nuclear localization signals), για έξοδο μηνυμάτων από τον πυρήνα (NES: nuclear export signals), μια περιοχή αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη LC3 (LIR:LC3 interacting region), και μοτίβα KIR (KEAP interacting region: περιοχές αλληλεπίδρασης με την KEAP1). Στο καρβοξυτελικό της άκρο φέρει μια περιοχή UBA (Ub-associated), που της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με την ουβικουΐνη [46-48].

Η περιοχή PBI επιτρέπει τον ομοπολυμερισμό της πρωτεΐνης, ενώ η περιοχή UBA μπορεί να αλληλεπιδρά με ένα ή περισσότερα μόρια ουβικουΐνης [46-48]. Παράλληλα, η περιοχή UBA μπορεί να δημιουργεί ομοδιμερή τα οποία αποτρέπουν τη σύνδεση της ουβικουΐνης (Εικ.6) [49].

Η πρωτεΐνη NBR1 αποτελείται από 966 αμινοξέα. Παρουσιάζει κοινές περιοχές με την p62, όπως οι PBI, ZZ και UBA όμως έχει διπλάσιο μήκος από την p62 φέροντας έτσι κάποιες επιπλέον περιοχές. Σε αυτές συγκαταλέγονται μια περιοχή για το διμερισμό της NBR1, και μια συντηρημένη αλληλουχία με τέσσερα κατάλοιπα τρυπτοφάνης (FW) άγνωστης λειτουργίας. Μέσω της περιοχής PBI δεν πολυμερίζεται, αλλά συνδέεται με την πρωτεΐνη p62 (Εικ.6) [50-52].

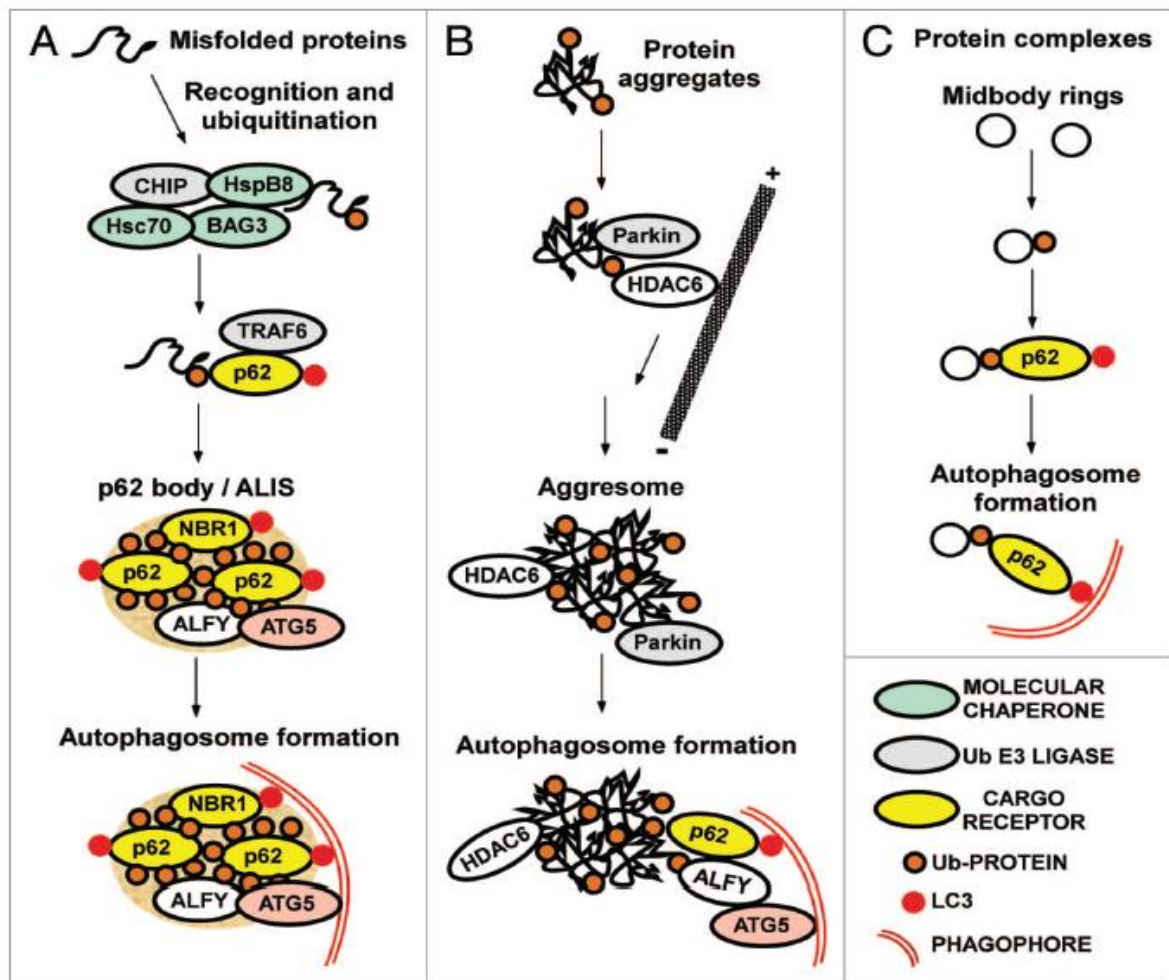


Εικόνα 6: Οι πρωτεΐνες p62 και NBR1. Terje Johansen, Trond Lamark. *Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins*, Autophagy 2011; 7(3): 279-296.

Το μοντέλο που περιγράφει την σχέση των πρωτεϊνών p62 και NBR1 με τον μηχανισμό της αυτοφαγίας είναι το εξής: Οι πρωτεΐνες προς αποδόμηση αρχικά αναγνωρίζονται από τις πρωτεΐνες συνοδούς και υφίστανται τη δράση της ουβικουΐνης. Κατόπιν, στρατολογούνται οι πρωτεΐνες p62 και NBR1 (καθώς και η πρωτεΐνη ALFY) και σχηματίζουν τα λεγόμενα p62 σωμάτια ή αλλιώς ALIS τα οποία έχουν διάφορα μεγέθη (διάμετρος από 0,5-1 μm). Τα σωμάτια αυτά στη συνέχεια είτε θα αποδομηθούν από το πρωτεάσωμα είτε θα μετατραπούν σε αυτοφαγοσώματα προκειμένου να ακολουθήσει η λύση τους από τα λυσοσώματα. Το αν

τελικά θα επιλεγεί η αυτοφαγία καθορίζεται από αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών p62 και NBR1 με την πρωτεΐνη LC3, καθώς και της πρωτεΐνης ALFY με την πρωτεΐνη ATG5. Η ίδια η πρωτεΐνη p62 αφού αλληλεπιδράσει μέσω της LIR περιοχής της με την πρωτεΐνη LC3 αποτελεί υπόστρωμα για την αυτοφαγία (Εικ.7) [53-55].

Παρόμοιες διαδικασίες ακολουθούνται και στην περίπτωση αποικοδόμησης μικρομοριακών ή μεγαλομοριακών συμπλόκων όπου η συμμετοχή κυρίως της πρωτεΐνης p62 είναι καθοριστικής σημασίας για τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος (Εικ.7) [53-55].



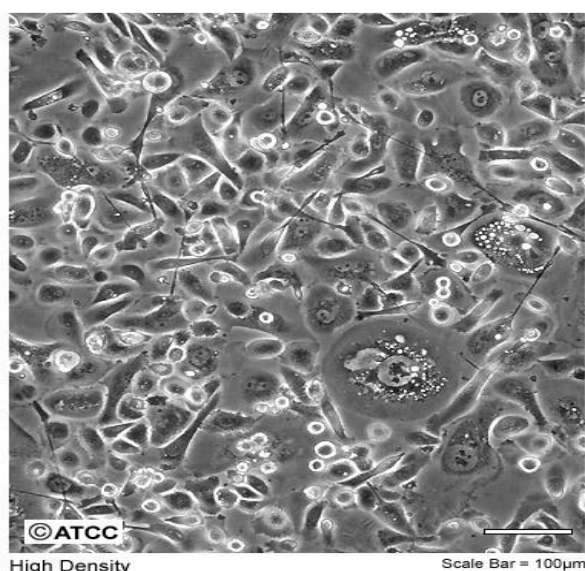
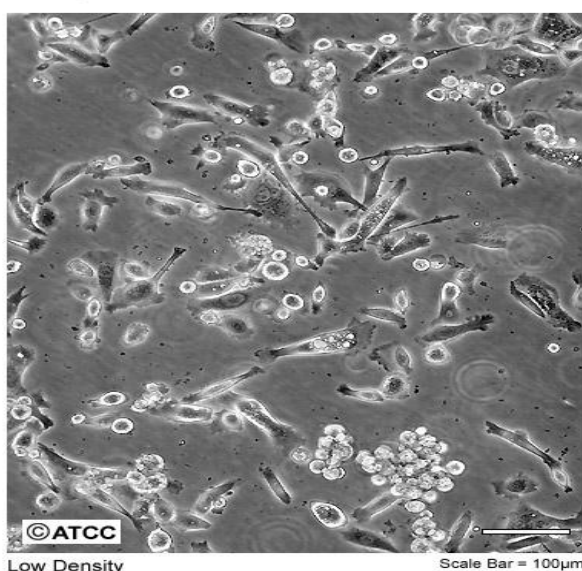
Εικόνα 7: Ο μηχανισμός δράσης των p62 και NBR1 στην αυτοφαγία. Terje Johansen, Trond Lamark. *Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins*, Autophagy 2011; 7(3): 279-296

1.4. Η κυτταρική σειρά PC-3

Η κυτταρική σειρά PC-3 προέρχεται από οστική μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος βαθμού IV από άνδρα της Καυκάσιας φυλής ηλικίας 62 ετών. Η καρυστυπική ανάλυση δείχνει πως τα κύτταρα είναι σχεδόν τριπλοειδή, καθώς φέρουν από 62 έως 55 χρωμοσώματα μεταξύ της 5^{ης} και 50^{ης} γενιάς, με ένα μέσο όρο 62 χρωμοσωμάτων, ενώ τα φυσιολογικά χρωμοσώματα 2, 3, 5, 12, 15 και Y λείπουν εντελώς. Ταυτόχρονα, οι λειτουργικές περιοχές οργάνωσης πυρηνίσκων είναι ανάλογες των ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων που ανιχνεύονται σε κάθε γενιά. Η κυτταρική δομή προσομοιάζει με νεοπλαστικά κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης καθώς φέρουν πολυάριθμες μικρολάχνες, ανώμαλους πυρήνες και πυρηνίσκους, ανώμαλα μιτοχόνδρια, δακτυλιοειδή ελάσματα και λιποειδή σωματίδια, αποτελώντας ένα αδενοκαρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης (Εικ.8) [56, 57].

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες αλλά και σε εναιώρημα με άγαρ. Η ανάπτυξή τους παρουσιάζει μειωμένη εξάρτηση από τον ορό σε σχέση με τα φυσιολογικά επιθηλιακά προστατικά κύτταρα και είναι ανεξάρτητη από την επίδραση ανδρογόνων, γλυκοκορτικοειδών, επιδερμικών αυξητικών παραγόντων ή αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών, καθιστώντας την ιδανική κυτταρική σειρά για την μελέτη της επίδρασης διαφόρων χημειοθεραπευτικών παραγόντων [56, 57].

ATCC Number: **CRL-1435**
Designation: **PC-3**

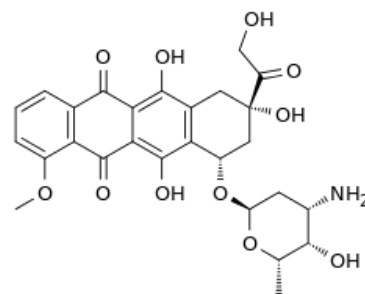


Εικόνα 8: Η κυτταρική σειρά PC-3

<https://www.atcc.org> (PC-3 - ATCC® CRL-1435™)

1.5. Αδριαμυκίνη

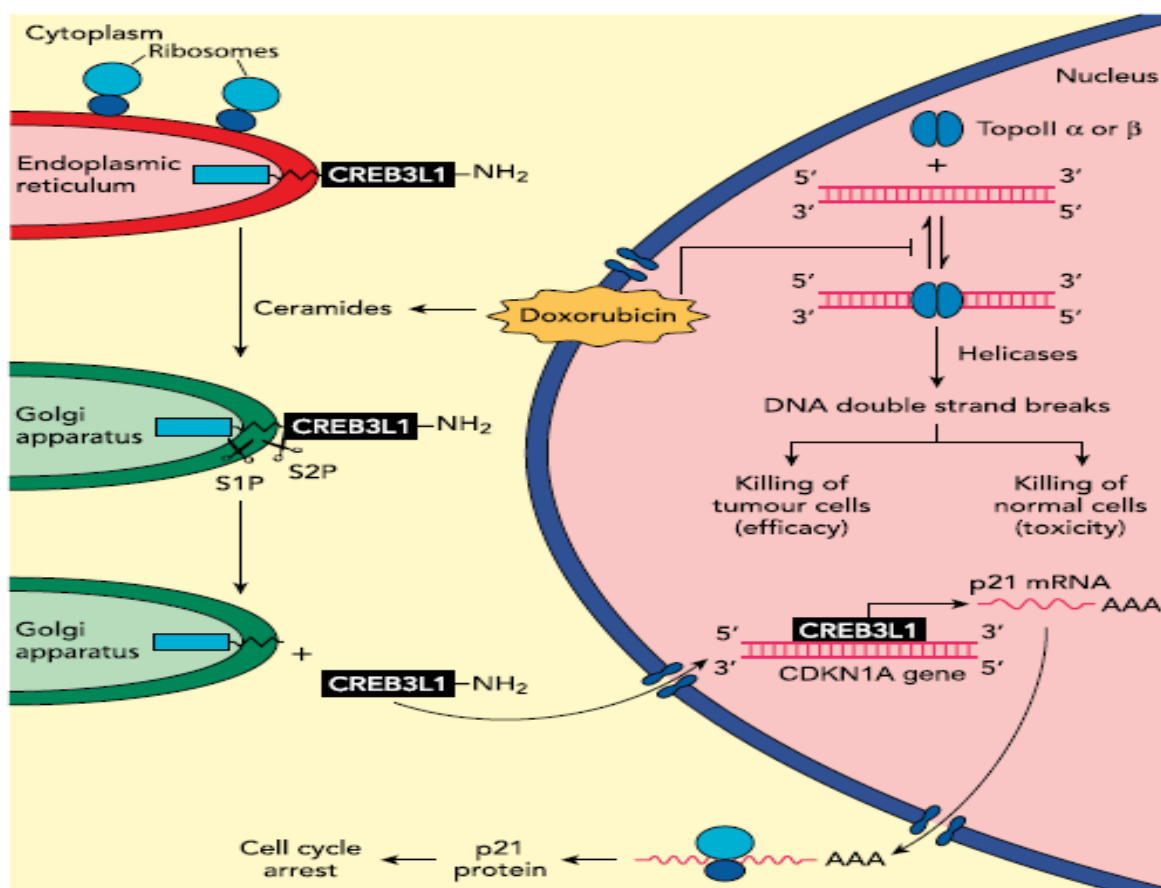
Η αδριαμυκίνη ανήκει σε μια κατηγορία αντιβιοτικών που ονομάζονται ανθρακυκλίνες και προέρχονται από τα βακτήρια του γένους *Streptomyces* (Εικ.7). Μια σειρά από κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει πως η αδριαμυκίνη είναι δραστική έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου (μαστού, προστάτη, ωοθηκών, ήπατος, παγκρέατος κ.ά.) παρουσιάζει όμως σημαντικές παρενέργειες όπως η καρδιοτοξικότητα, η οποία εξαρτάται από τη δοσολογία του φαρμάκου και μπορεί να εμφανιστεί ακόμα και δεκαετίες μετά την έκθεση [58, 59].



Εικόνα 9: Αδριαμυκίνη

<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.29400.html>

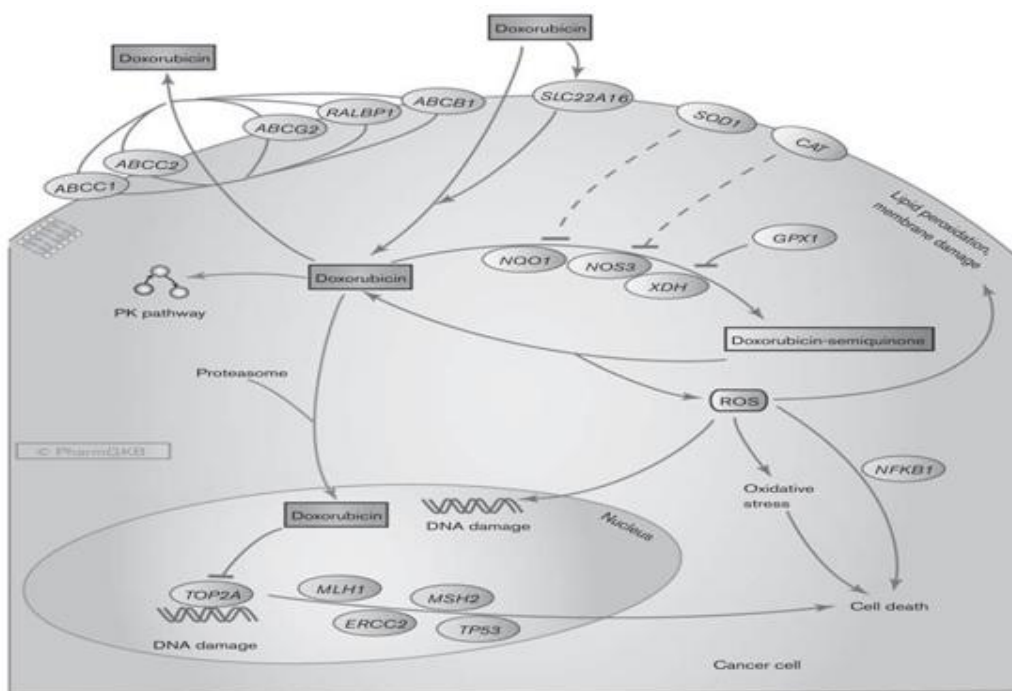
Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για τον τρόπο με τον οποίο δρα η αδριαμυκίνη, όπως η αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης II ή η ενδοπαρεμβολή εντός της διπλής έλικας του DNA.



Εικόνα 10. Μηχανισμοί δράσης της Αδριαμυκίνης. Anand G Patel, Scott H Kaufmann. A new mechanism involving cleavage of a transcription factor called CREB3L1 has been proposed to explain the anti-tumour effects of doxorubicin. *eLife* 2012;1:e00387

Σύμφωνα με ένα από αυτά τα μοντέλα, η αδριαμυκίνη βοηθά στη σταθεροποίηση ενός συμπλόκου μεταξύ της διπλής έλικας του DNA και του ενζύμου τοποϊσομεράση II. Στη συνέχεια το ένζυμο κόβει τις δύο αλυσίδες του DNA με αποτέλεσμα το θάνατο τόσο των φυσιολογικών κυττάρων (δρα κυρίως η τοποϊσομεράση IIβ) όσο και των καρκινικών κυττάρων (δρα κυρίως η τοποϊσομεράση IIα) (Εικ.8) [60].

Ένα δεύτερο μοντέλο, προτείνει ότι η αδριαμυκίνη αυξάνει τα επίπεδα των κηραμιδίων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων με αποτέλεσμα την μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα CREB3L από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύμπλεγμα Golgi. Κατόπιν, δύο πρωτεάσες (S1P και S2P) κόβουν την πρωτεΐνη CREB3L1, και το αμινοτελικό κομμάτι που προκύπτει μεταναστεύει προς τον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί το CDKN1A στοιχείο μιας σειράς γονιδίων-στόχων. Έτσι, αυξάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης p21 και άλλων ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών οι οποίες εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Εικ.8) [61]. Παράλληλα, η αδριαμυκίνη οξειδώνεται σε ημικινόνη, έναν ασταθή μεταβολίτη ο οποίος μετατρέπεται ξανά σε αδριαμυκίνη με μια διαδικασία που απελευθερώνει ROS. Τα αυξημένα επίπεδα των ελευθέρων ριζών οδηγούν σε οξείδωση των λιπιδίων καταλήγοντας σε καταστροφή των μεμβρανών, οξειδωτικό στρες και τελικά απόπτωση (Εικ.9) [62, 63].



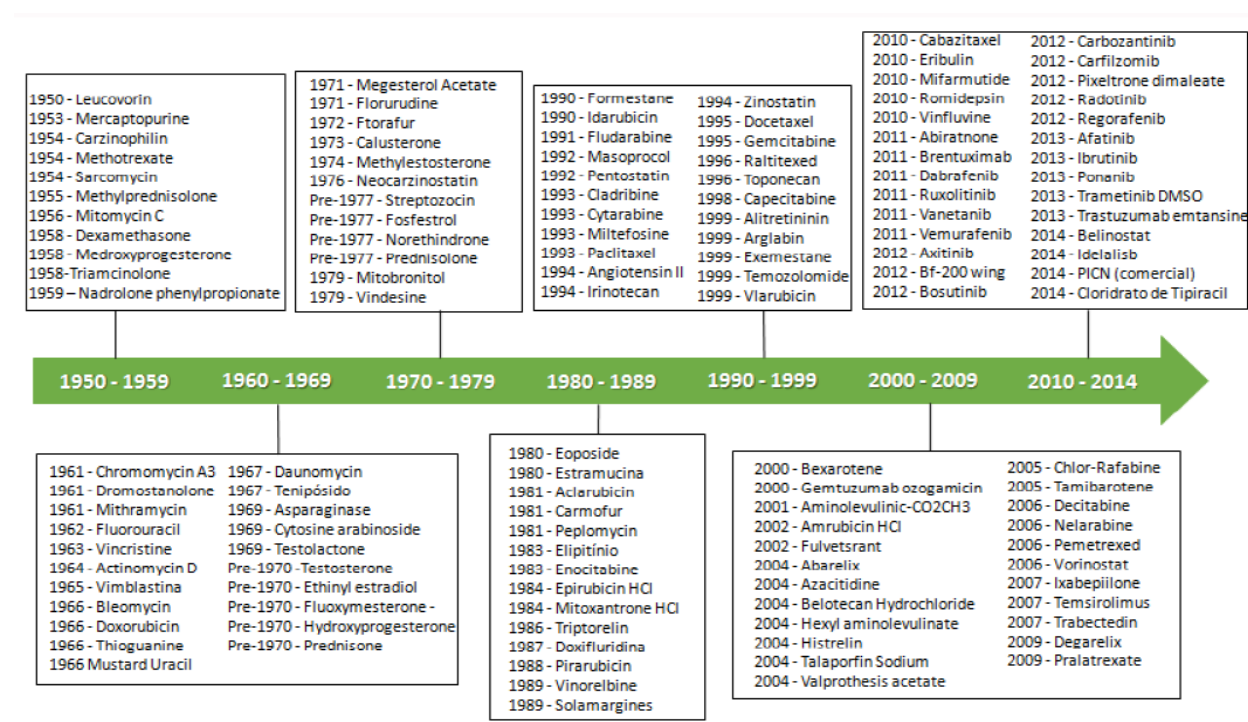
Εικόνα 11: Φαρμακοδυναμική της Αδριαμυκίνης και παρενέργειες. Caroline F. Thorn, Connie Oshiro, Sharon Marsh, Tina Hernandez-Boussard, Howard McLeod, Teri E. Klein, and Russ B. Altman. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21(7): 440–446.

Παρόλο που ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης της αδριαμικίνης, οι παρενέργειές της είναι έκδηλες, με κυριότερη την εμφάνιση καρδιοτοξικότητας, η οποία συνήθως σχετίζεται με κακή πρόγνωση και είναι θανατηφόρα. Σε ποσοστό 11 % των ασθενών παρατηρείται άμεση καρδιοτοξικότητα, μόλις 2-3 μέρες μετά την έναρξη της θεραπείας, η οποία εκδηλώνεται με συμπτώματα περικαρδίτιδας και κολπικής ταχυκαρδίας που οφείλονται σε οίδημα του μυοκαρδίου. Σε ποσοστό 1,7 % των ασθενών παρατηρείται χρόνια καρδιοτοξικότητα η οποία εκδηλώνεται μέσα σε 30 μέρες έως 6-10 χρόνια μετά από την τελευταία χορήγηση του φαρμάκου [64, 65]. Η εμφάνιση καρδιοτοξικότητας σχετίζεται άμεσα με τη δοσολογία του φαρμάκου. Έτσι, η πιθανότητα εμφάνισης καρδιοτοξικότητας είναι 4 % για δοσολογία 500-550 mg/m², 18 % για δοσολογία 551-600 mg/m², και 36 % για δοσολογία μεγαλύτερη από 600 mg/m² [66]. Παράλληλα, ο συνδυασμός της αδριαμικίνης με άλλα κυτταροτοξικά φάρμακα ή ακτινοβολία καθώς και η πολύ μικρή ή πολύ μεγάλη ηλικία του ασθενή μπορούν να αυξήσουν την πιθανότητα εμφάνισης καρδιοτοξικότητας [67].

Δεδομένης της τοξικότητας της αδριαμικίνης αποτελεί επιτακτική ανάγκη η μείωση της δοσολογίας της σε τιμές < 450 mg/m², χωρίς να μειώνεται όμως η φαρμακολογική της δράση [65]. Για το σκοπό αυτό, έχουν προταθεί διάφορες εναλλακτικές, όπως η χρήση αναλόγων της αδριαμικίνης καθώς και διαφορετικοί τρόποι χορήγησής της π.χ. μέσω νανοσφαιριδίων [68]. Μια εναλλακτική προσέγγιση, η οποία διερευνάται τα τελευταία χρόνια από την επιστημονική κοινότητα, είναι η συγχορήγηση της αδριαμικίνης με φυσικά προϊόντα τα οποία θα ενισχύουν τη φαρμακολογική δράση της, με ταυτόχρονη όμως ελάττωση της δοσολογίας της προκειμένου να περιοριστούν οι επικείμενες παρενέργειές της [69]. Στο πλαίσιο αυτής της προσπάθειας, στην παρούσα εργασία, μελετώνται σε κυτταρικό επίπεδο, δύο φυσικά προϊόντα που θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη δράση της αδριαμικίνης στον καρκίνο του προστάτη, ενώ ταυτόχρονα μελετώνται και κάποιες πτυχές των πιθανών μηχανισμών δράσης τους.

1.6. Φυσικά προϊόντα και καρκίνος

Από την αρχαιότητα, η προσπάθεια αντιμετώπισης των διάφορων ασθενειών του ανθρώπου στηριζόταν στην κατανάλωση εδώδιμων φυσικών προϊόντων με θεραπευτική δράση. Τα φρούτα, τα λαχανικά, οι ξηροί καρποί, οι ολόκληροι σπόροι και τα αφεψήματα περιέχουν μια σειρά από ουσίες οι οποίες παρουσιάζουν αντί-φλεγμονώδη, αντί-ική ακόμα και αντι-καρκινική δράση καθώς μπορούν και παρεμβαίνουν στις κυτταρικές διεργασίες, επηρεάζοντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την ομοιοστάση των ιστών και την γενικότερη ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών [70].



Πίνακας 1: Εμπορικά διαθέσιμα αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία είτε προέρχονται από φυσικά προϊόντα, είτε στηρίζονται ως προς τη χημική δομή σε φυσικά προϊόντα ή μιμούνται φυσικά προϊόντα. Ricardo Guimarães Amaral, Sara Albuquerque dos Santos, Luciana Nalane Andrade, Patrícia Severino and Adriana Andrade Carvalho. *Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision. Clinics in Oncology. 2019; 4: 1-5*

Από τη δεκαετία του 1950, έχει ξεκινήσει μια εκτεταμένη προσπάθεια από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα για την εύρεση φυσικών προϊόντων με αντικαρκινική δράση. Στον πίνακα 1, παρουσιάζονται όλα τα εμπορικά διαθέσιμα αντικαρκινικά φάρμακα, από το 1950 έως σήμερα, τα οποία είτε προέρχονται απευθείας από φυσικά προϊόντα, είτε στηρίζονται ως προς τη χημική δομή ή μιμούνται τη δράση φυσικών προϊόντων.

Ειδικότερα, από το 1981 έως το 2014, συνολικά 174 σκευάσματα έχουν εγκριθεί για την εμπορική χρήση τους στην θεραπεία του καρκίνου, από τα οποία τα 56 (32 %) αποτελούν είτε καθαρά φυσικά προϊόντα είτε παράγωγά τους, και 37 (21 %) έχουν σχεδιαστεί με βάση τη δομή φυσικών προϊόντων. Έτσι, συνολικά 93 (53 %) σκευάσματα έναντι του καρκίνου, αποτελούν ή προέρχονται από φυσικά προϊόντα [71].

Οι μελέτες που έχουν γίνει στις ουσίες αυτές για να προσδιορίσουν τη δράση τους έναντι των καρκινικών κυττάρων έχουν αποκαλύψει, ότι πολλά και διαφορετικής χημικής σύστασης φυσικά προϊόντα αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο και επάγουν την απόπτωση και την αυτοφαγία των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα να δρουν χημειοθεραπευτικά ή προστατευτικά έναντι των παρενεργειών της χημειοθεραπείας [72].

Τα περισσότερα από τα φυσικά προϊόντα που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής συγκαταλέγονται στα φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, τερπενοειδή, κατεχίνες και τις απλές φαινολικές ενώσεις. Σχεδόν όλα έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των κυκλινών καθώς και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών οδηγώντας τελικά σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε διάφορες φάσεις (συνήθως αναστολή στη φάση G1 ή G2/M). Ειδικά στον καρκίνο του προστάτη, η κυτταρική ανάπτυξη αναστέλλεται από μια σειρά από φυσικά προϊόντα τα οποία περιορίζουν την έκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) ή του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) [72].

Η επαγωγή της απόπτωσης επιτυγχάνεται με την παρεμβολή των φυσικών προϊόντων σε μοριακά μονοπάτια που φυσιολογικά ρυθμίζονται από αυξητικούς παράγοντες (IGF, EGF), ενώ συχνά παρατηρούνται αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Bax, Bcl-2, p53, p21) μεταβάλλοντας τη μεταξύ τους ισορροπία υπέρ της απόπτωσης. Η επαγόμενη απόπτωση συχνά συνδέεται με παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), με διαταραχές του δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, με την ενεργοποίηση των κασπασών καθώς και με πληθώρα μοριακών μονοπατιών (Akt, Wnt) που τη ρυθμίζουν, ενώ ο κυτταρικός θάνατος μέσω αυτοφαγίας συχνά σχετίζεται με αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των mTOR, Beclin1 και ATGs [72].

Έχει βρεθεί επίσης ότι πολλά φυσικά προϊόντα αποτρέπουν τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, περιορίζοντας την έκφραση πρωτεϊνών απαραίτητων τόσο για τη σηματοδότηση όσο και για την πραγματοποίηση αυτών των διαδικασιών όπως ο αγγειακός

ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), η αγγειοποιητίνη, η βιμεντίνη και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP2, MMP9) [72].

Μελέτες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται μεταμοσχευμένα σε ποντίκια (xenografts) καθώς και μελέτες στα ποντίκια TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate), δείχνουν επίσης ότι τα φυσικά προϊόντα αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Σε κάποιες περιπτώσεις, φυσικά προϊόντα έχουν μελετηθεί σε επίπεδο κλινικών δοκιμών με θετικά αποτελέσματα ενώ μελετώνται τρόποι για την από του στόματος χορήγηση των προϊόντων που θα εξασφαλίζουν καλύτερη απορρόφηση και κινητική στους ιστούς του ασθενή για μεγιστοποίηση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων [72].

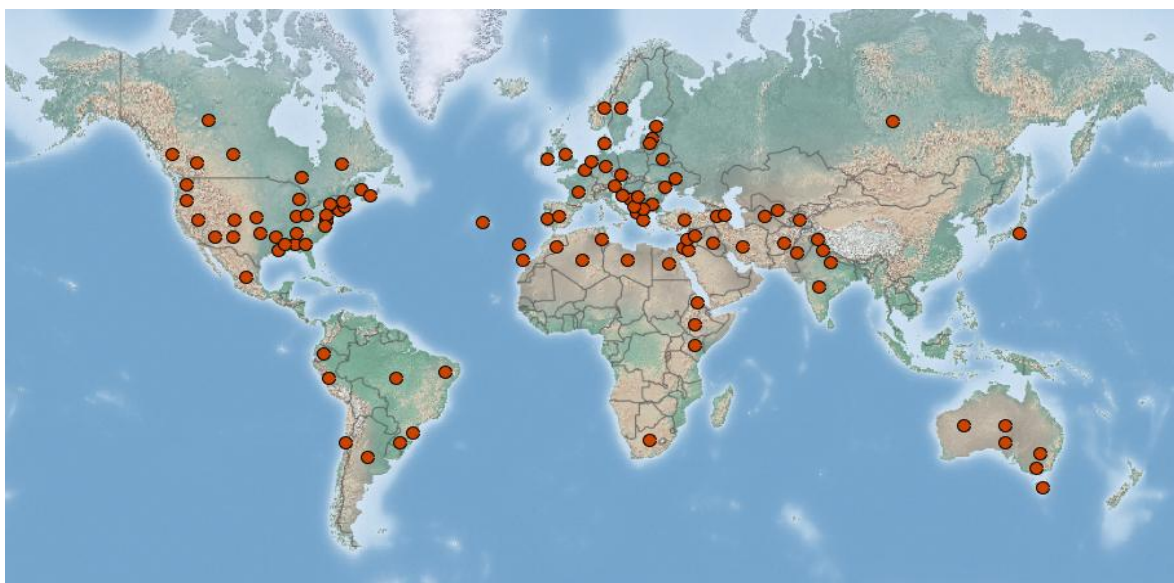
Σε αρκετές περιπτώσεις έχει μελετηθεί η συνδυασμένη χορήγηση φυσικών προϊόντων με γνωστά χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπου έχει βρεθεί είτε ενίσχυση της δράσης του φαρμάκου είτε προστασία των φυσιολογικών ιστών (καρδιάς, ήπατος, νεφρών) από τις παρενέργειες του φαρμάκου, ευρήματα που και στις δύο περιπτώσεις ενισχύουν την τάση για συγχορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και φυσικών προϊόντων [73, 74].

Για τους λόγους αυτούς, η σύγχρονη έρευνα εστιάζει στην εύρεση νέων φυσικών προϊόντων τα οποία μόνα τους ή σε συνδυασμό με ήδη γνωστά χημειοθεραπευτικά φάρμακα μπορούν να χρησιμοποιηθούν έναντι του καρκίνου.

Στον πίνακα 2 παρατίθενται διάφορα φυσικά προϊόντα που έχουν δοκιμαστεί σε καρκινικές σειρές αλλά και σε *in vivo* μοντέλα καρκίνου του προστάτη και παρουσιάζουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα.

1.6.1. Σιλυμαρίνη

Η σιλυμαρίνη αποτελεί εκχύλισμα που προέρχεται από τους σπόρους του γαϊδουράγκαθου (*Silybum marianum*). Το *S. marianum* ευδοκίμει στην Ελλάδα και σε κάποιες άλλες περιοχές της Ευρώπης, στη Μέση Ανατολή, στην Ινδία, στην Αραβική Χερσόνησο και στη Βόρεια Αφρική, ενώ έχει εισαχθεί στην υπο-σαχάρια Αφρική, στην Αμερική, στην Αυστραλία και στην Ιαπωνία (Εικ.12) [75].



Εικόνα 12: Διασπορά του *Silybum marianum*.

Αποτελεί μονοετές ή διετές φυτό, ύψους 0,5-2 m, πλατύφυλλο με ελλειπτικά έως λογχοειδή οδοντωτά φύλλα πράσινου χρώματος με λευκές περιοχές κατά μήκος των αγγείων, με μονήρη ακραία άνθη χρώματος κόκκινο-μοβ (Εικ.13) [76].



Εικόνα 13: *Silybum marianum*

Αναπτύσσεται σε περιοχές με υπο-τροπικό και ξηρό κλίμα, μέσα σε δάση, βοσκοτόπια, καλλιεργήσιμες εκτάσεις, κατά μήκος των ακτογραμμών ή σε πλευρές δρόμων, παρουσιάζοντας καλύτερη ανάπτυξη σε εδάφη με αυξημένη γονιμότητα [75]. Οι σπόροι του *S. marianum* βλαστάνουν σε ένα εύρος θερμοκρασιών (από 5° C έως 40° C) με βέλτιστη θερμοκρασία τους 15° C, ενώ κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, οι βλαστοί του φυτού ξεραίνονται, παραμένοντας όμως όρθιοι για αρκετούς μήνες [77].

Το εκχύλισμα σιλυμαρίνης προέρχεται από τους σπόρους του γαϊδουράγκαθου και αποτελεί το 1,5-3 % του ξηρού βάρους του σπόρου [78]. Περιέχει μικρά ποσά φλαβονοειδών, 25-30 % λιπαρά οξέα και άλλες πολυφαινολικές ενώσεις, ενώ σε ποσοστό 65-80 % περιέχει ένα μείγμα από φλαβονολιγνάνες, με κυριότερες την σιλιμπινίνη (silibin), την ισοσιλιμπίνη (isosilibin), την σιλυκριστίνη (silycristin), την σιλιδιανίνη (silidianin), με βασικό όμως ενεργό συστατικό την σιλιμπινίνη [79].

Το εκχύλισμα σιλυμαρίνης έχει χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα για την θεραπεία ασθενειών του ήπατος και τις χολής, ενώ σύγχρονες μελέτες αναφέρουν πως παρουσιάζει και ηπατοπροστατευτική δράση [78]. Οι πιο πρόσφατες μελέτες εστιάζουν στην δράση του εκχυλίσματος της σιλυμαρίνης ως κυτταροστατικού - κυτταροτοξικού φαρμάκου έναντι του καρκίνου, καθώς έχει βρεθεί πως η σιλυμαρίνη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως ωοθηκών, μαστού, πνευμόνων, δέρματος, ουροδόχου κύστης και προστάτη [80]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η σιλυμαρίνη εμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων στις φάσεις G1 ή/και G2/M του κυτταρικού κύκλου μειώνοντας την έκφραση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs), ενώ παράλληλα επάγει τους αναστολείς των CDKs [81, 82]. Η σιλυμαρίνη επάγει επίσης την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων επιδρώντας σε μόρια στόχους (FASL, Stat3, Akt), τα οποία τελικά ενισχύουν τη δράση των κασπασών [83, 84]. Παράλληλα, η συγχορήγηση της σιλυμαρίνης με τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα αδριαμυκίνη και σισπλατίνη παρουσιάζει συνεργιστική δράση έναντι κυτταρικών σειρών καρκίνου μαστού και ωοθηκών [85].

Αναφορικά με τον καρκίνο του προστάτη, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει πως η σιλυμαρίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, τόσο των ανδρογόνο-εξαρτώμενων (LNCaP) όσο και των ανδρογόνο-ανεξάρτητων (PC3, DU145) προστατικών κυτταρικών σειρών, στις φάσεις G1 ή/και G2/M του κυτταρικού κύκλου [81, 86]. Παράλληλα, η σιλυμαρίνη επάγει την απόπτωση των LNCaP και 22RV1 κυττάρων, μέσω του μονοπατιού κασπάση 9- κασπάση 3- PARP, καθώς και των DU145 κυττάρων, μέσω αναστολής της πρωτεΐνης Stat3 [81, 87].

Η δράση της σιλιμπινίνης έχει επίσης μελετηθεί σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη. Οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και ταυτόχρονη μείωση των ενδοκυτταρικών και εκκρινόμενων επιπέδων του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) στην καρκινική κυτταρική σειρά LNCaP, γεγονός που αποδίδεται σε αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης και φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος

(Rb) καθώς και σε μειωμένη δράση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) [88, 89]. Περαιτέρω μελέτες στα LNCaP κύτταρα, αποκάλυψαν ότι η μείωση των επιπέδων του PSA καθορίζεται από την μειωμένη έκφραση του ενεργοποιητή του υποδοχέα των ανδρογόνων (androgen receptor coactivator) καθώς και του PDEF μεταγραφικού παράγοντα [90, 91]. Η σιλιμπινίνη φαίνεται να καταστέλλει την διαδικασία της μετάφρασης στα κύτταρα με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης του HIF-1α και της δράσης της τελομεράσης. Επίσης, ως λιπόφιλο συστατικό, η σιλιμπινίνη ανταγωνίζεται την αλληλεπίδραση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) με την erbB1 πρωτεΐνη, παρεμβαίνοντας έτσι στη σύνθεση του DNA και τη σηματοδότηση προς μίτωση τόσο σε ανδρογόνο-εξαρτώμενες όσο και σε ανδρογόνο-ανεξάρτητες κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη [92].

Περαιτέρω, η σιλιμπινίνη προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και στις κυτταρικές σειρές DU145 και 22RV1, μέσω μείωσης της έκφρασης των πρωτεϊνών p21 και p27 [91]. Στα DU145 κύτταρα, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου οδηγεί σε απόλυτη καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης που οφείλεται σε υποφωσφορυλίωση των σχετιζόμενων με την Rb πρωτεϊνών [93]. Η σιλιμπινίνη εμποδίζει επίσης το Wnt/LRp6 σηματοδοτικό μονοπάτι, επάγει την απόπτωση μέσω συνεχούς αναστολής της πρωτεΐνης Stat3, ενώ ταυτόχρονα ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση επαγόμενη από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFα) [94-96].

Στην κυτταρική σειρά PC-3, συγκεκριμένα, η σιλιμπινίνη προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2/M καθώς εμπλέκεται στην έκφραση των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs), ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει την έκφραση του HIF-1α και το μοριακό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/LRp6 [89, 96, 97].

Η σιλιμπινίνη φαίνεται επίσης να περιορίζει το δυναμικό διήθησης και μετάστασης των κυτταρικών σειρών PC-3, PC-3MM2, C4-2B, LNCaP και DU145 [98, 99]. Γενικά, εμποδίζει την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση των προστατικών καρκινικών κυττάρων, παρεμβαίνοντας στο σηματοδοτικό μονοπάτι του NFκB, με επακόλουθη μείωση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων ZEB1, SLUG καθώς και της βιμεντίνης (vimentin) και της μεταλλοπρωτεΐνης 2 (MMP2) [100].

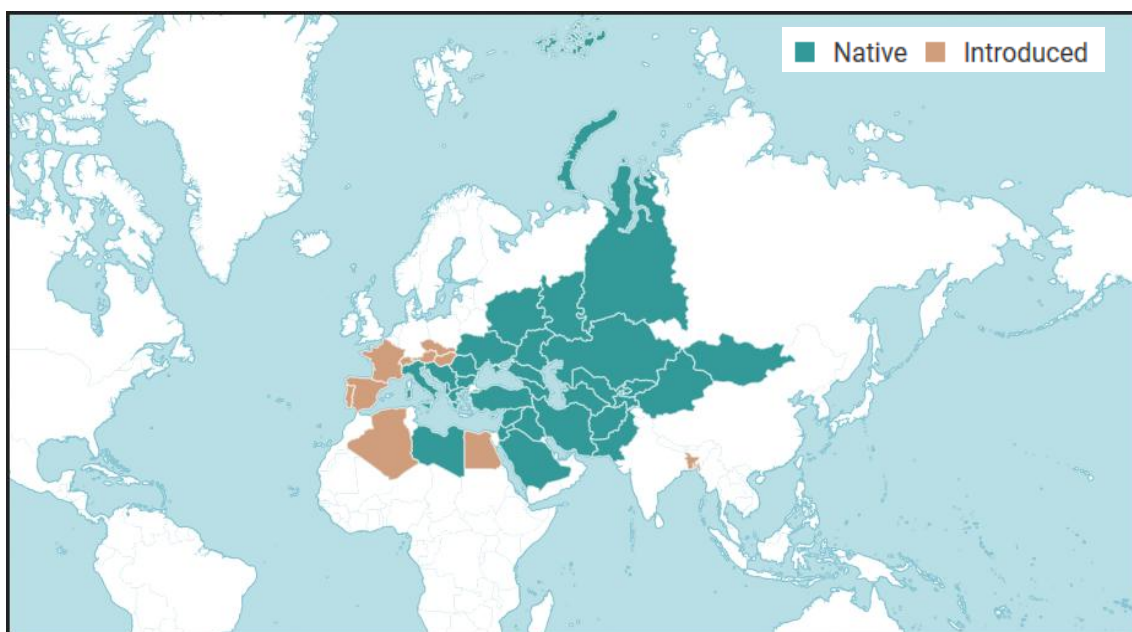
Μελέτες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα που έχουν μεταμοσχευθεί σε ποντίκια (xenograft), δείχνουν πως η σιλιμπινίνη δρα αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αγγειογένεση του όγκου, ενώ ταυτόχρονα προάγει την απόπτωση [101]. Πιο συγκεκριμένα,

μελέτες σε PC-3 κύτταρα μεταμοσχευμένα σε αθυμικά ποντίκια, έδειξαν ότι οι δράσεις της σιλιμπινίνης οφείλονται σε αύξηση των πρωτεϊνών IGFBP-3, Cip1/p21, Kip1/p27, ενεργοποίηση των ERK1/2 και μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-2, survivin και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) [102, 103]. Σε διαγονιδιακά ποντίκια με καρκίνο προστάτη (TRAMP), η σιλιμπινίνη αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και εμποδίζει τη μετάβασή τους στο καρκινικό στάδιο PIN (prostatic intraepithelial neoplasia), μέσω τροποποιήσεων στον άξονα των αυξητικών παραγόντων IGF-IGFB-3 και καταστολής της μικροαγγειακής πυκνότητας του όγκου, μέσω μείωσης της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα VEGF και του υποδοχέα του VEGFR-2, των snail-1, vimentin και μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) [104-106]. Στις πρώτες κλινικές δοκιμές στις οποίες έγινε χορήγηση σιλιμπινίνης από το στόμα στους ασθενείς, φάνηκε ότι η σιλιμπινίνη διεισδύει ελάχιστα στους ιστούς αλλά είναι ανεκτή από τον οργανισμό [107]. Σε μεταγενέστερες μελέτες, η χορήγηση σιλιμπινίνης μέσω του στόματος με τη μορφή φυτοσώματος (Siliphos = phytosome silibinin) έδειξε ότι η συγκέντρωση της ελεύθερης σιλιμπινίνης στο πλάσμα των ασθενών φτάνει τα 100 μM [108]. Σε κλινική δοκιμή φάσης III, η χορήγηση σιλυμαρίνης σε συνδυασμό με λυκοπένιο, σόγια και άλλα αντιοξειδωτικά καθυστερεί την αύξηση της έκκρισης του ειδικού προστατικού αντιγόνου, μετά από προστατεκτομή και ακτινοθεραπεία [109].

Τέλος, η χορήγηση της σιλυμαρίνης σε συνδυασμό με την αδριαμυκίνη παρουσιάζει έντονη συνεργιστική δράση έναντι κυτταρικών σειρών καρκίνου μαστού, ωοθηκών και εντέρου [110, 111]. Η συγχορήγηση επίσης της σιλιμπινίνης με την Αδριαμυκίνη αυξάνει την κυτταροτοξική δράση του φαρμάκου έναντι των DU145 κυττάρων καρκίνου του προστάτη, αναστέλλοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και επάγοντας την απόπτωση, ενώ σε κύτταρα με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα αντιστρέφει την ανθεκτικότητα στην ADR παρουσιάζοντας προ-αποπτωτική δράση [112, 113]. Τέλος, σε *in vivo* μελέτη, η χορήγηση της σιλιμπινίνης από το στόμα σε αθυμικά ποντίκια με καρκίνο πνευμόνων, σε συνδυασμό με την ADR, εμποδίζει την ανάπτυξη των όγκων, μειώνει την ανθεκτικότητα στην ADR, ενώ παράλληλα μειώνει τη συστηματική τοξικότητα που προκαλείται από την ADR [114].

1.6.2. Φυσικά προϊόντα προερχόμενα από το φυτό *Glycyrrhiza glabra*

Το φυτό *Glycyrrhiza glabra* (γλυκόριζα) ανήκει στην οικογένεια Fabaceae και είναι ευδοκιμεί στην Νότια και Ανατολική Ευρώπη συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, στην Βόρεια Αφρική και στη Δυτική Ασία ενώ φυτρώνει σε υψόμετρο έως 1200 μέτρα από την επιφάνεια της θάλασσας. Έχει επίσης εισαχθεί σε διάφορες χώρες της Βόρειας Αφρικής και της κεντρικής Ευρώπης, ενώ στην Ισπανία καλλιεργείται συστηματικά (Εικ.14).



Εικόνα 14 : Παγκόσμια κατανομή του *Glycyrrhiza glabra*

Το *Glycyrrhiza glabra* αποτελεί ένα πολυετές φυτό που αναπτύσσει υπέργειους και υπόγειους βλαστούς (ριζώματα). Οι υπέργειοι βλαστοί του φέρουν τριχίδια, είναι κολλώδεις και αναπτύσσονται σε ύψος έως 1 μέτρο. Τα φύλλα του εκφύονται σε ζεύγη και είναι μήκους 2-4 cm, ενώ τα άνθη του είναι χρώματος ανοιχτού γαλάζιου έως βιολετί (πολύ σπάνια λευκά). Οι καρποί του είναι χρώματος κόκκινο – καφέ, μήκους 1-3 cm και πλάτους 4-5 mm και φέρουν από 2-5 σπόρους χρώματος καφέ-μαύρο (Εικ.15) [115].



Εικόνα 15: *Glycyrrhiza glabra*

Μια σειρά από ουσίες έχουν απομονωθεί από τις ρίζες του *Glycyrrhiza glabra* συμπεριλαμβανομένου και ενός υδατοδιαλυτού συμπλόκου που αντιστοιχεί στο 40-50 % της ξηρής μάζας. Το σύμπλοκο αυτό περιλαμβάνει σαπωνίνες, φλαβονοειδή, πολυσακχαρίτες, αμινοξέα, λίπη, μόρια με οιστρογονική δράση, στερόλες, ταννίνες και γλυκοζίτες [115]. Από αυτά, η γλυκυριζίνη αποτελεί ένα τριτερπένιο το οποίο είναι υπεύθυνο για την γλυκιά γεύση της γλυκόριζας καθώς και για την πρόκληση υπέρτασης. Η γλυκυριζίνη αποτελεί ένα μείγμα αλάτων του γλυκυρικού οξέως με τα κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο και εντοπίζεται σε ποσοστό 2-25 % του συμπλόκου, ενώ το γλυκυρικό οξύ αποτελείται από ένα υδρόφιλο τμήμα και από ένα υδρόφοβο τμήμα, το γλυκυρετινικό οξύ (glycyrrhetic acid) [116]. Το χρώμα της γλυκόριζας οφείλεται στα φλαβονοειδή που περιέχει με κυριότερες την λικοχαλκόνη (licochalcone) και την ισολικιριτιγενίνη [117].

Επίσης, το μεθανολικό εκχύλισμα από τις ρίζες του φυτού *Glycyrrhiza glabra* περιέχει μια σειρά από ουσίες οι οποίες έχουν μελετηθεί για την πιθανή αντικαρκινική δράση τους. Έτσι, η λικοχαλκόνη (licochalcone) αποτελεί ένα οιστρογονικό φλαβονοειδές το οποίο προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M στα PC-3 κύτταρα συνοδευόμενη από καταστολή της κυκλίνης B1 και της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 1 (CDK1)[118]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι επάγει την απόπτωση μέσω κασπασών αλλά και τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο των κυττάρων LNCaP [119].

Το γλυκυρετινικό οξύ (glycyrrhetic acid) αποτελεί ένα τριτερπένιο που εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες στο εκχύλισμα των ριζών του φυτού. Το γλυκυρετινικό οξύ εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των DU145 κυττάρων με επαγωγή της απόπτωσης. Επίσης, αναστέλλει την αγγειογένεση και εμποδίζει τη διήθηση των κυττάρων μέσω μείωσης της έκφρασης των NFκΒ, VEGF και της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 (MMP9) [120]. Στα LNCaP κύτταρα, το γλυκυρετινικό οξύ μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και την παραγωγή του ειδικού προστατικού αντιγόνου [121].

Η ισολικιριτιγενίνη (isoliquiritigenin) αποτελεί ένα φλαβονοειδές που εντοπίζεται στο εκχύλισμα των ριζών και το οποίο δοσο- και χρόνο- εξαρτώμενα εμποδίζει το πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων DU145 και LNCaP [122].

Τέλος, η γκλαμπριδίνη αποτελεί μια ισοφλαβόνη η οποία εντοπίζεται στο εκχύλισμα των ριζών του φυτού και έχει βρεθεί να αναστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών σειρών καρκίνου μαστού

μέσω επαγωγής της απόπτωσης, ενώ παράλληλα ενισχύει την δραστικότητα της αδριαμυκίνης έναντι του καρκίνου του μαστού [123, 124]. Σε κυτταρικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκίνου, η γκλαμπριδίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων επάγοντας την απόπτωση και την αυτοφαγία ενώ σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του πνεύμονα έχει βρεθεί να αναστέλλει την διήθηση και μετάσταση των κυττάρων [125-127]. Παρόλο που η γκλαμπριδίνη μέχρι στιγμής έχει τραβήξει το επιστημονικό ενδιαφέρον για την πιθανή χρήση της ως αντι-καρκινικού παράγοντα, δεν υπάρχουν καθόλου βιβλιογραφικά δεδομένα για την χρήση της έναντι του καρκίνου του προστάτη.

1.7. Μεταβολικές ιδιαιτερότητες στον καρκίνο

Οι κακοήθεις όγκοι μοιράζονται έναν κοινό φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από ταχεία κυτταρική διαίρεση, φτωχή διαφοροποίηση, περιορισμένη απόπτωση και εξαιρετικά διαφοροποιημένο μεταβολικό προφίλ κυρίως της γλυκόζης, της γλουταμίνης και των λιπαρών οξέων, καθώς έχουν αυξημένες ανάγκες για ενέργεια. Αυτή η τροποποιημένη μεταβολική συμπεριφορά έχει γονιδιακό υπόβαθρο καθώς σχετίζεται με ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και αναστολή της έκφρασης των όγκο-κατασταλτικών γονιδίων [128].

Πιο συγκεκριμένα, ο σημαντικά διαφοροποιημένος μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων, σε σχέση με τα φυσιολογικά, τους επιτρέπει την επιβίωση σε δυσμενείς συνθήκες, όπως η υποξία, ενώ ταυτόχρονα ενισχύει τον πολλαπλασιασμό, την εξέλιξη, την διεισδυτικότητα και την ακόλουθη μεταστατική ικανότητά τους. Συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένο ρυθμό ενδοκυττάριας πρόσληψης γλυκόζης, υψηλό ρυθμό γλυκόλυσης συνδυασμένο με μειωμένη οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος και αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος. Επιπλέον, παρουσιάζουν αυξημένη γλυκονεογένεση δηλαδή παραγωγή γλυκόζης από μη υδατανθρακούχες πηγές, υψηλή γλουταμινολυτική δραστηριότητα, μειωμένη οξείδωση λιπαρών οξέων με παράλληλη αυξημένη *de novo* σύνθεση αυτών, αυξημένο μεταβολισμό της γλυκερόλης, τροποποιημένο μεταβολισμό των αμινοξέων και υψηλή δραστηριότητα του μονοπατιού των φωσφο-πεντοζών [129].

Η μεταβολική λοιπόν ιδιαιτερότητα των καρκινικών κυττάρων καθιστά επιτακτική την ανάγκη της μελέτης του μεταβολικού προφίλ τους με στόχο την ανίχνευση συγκεκριμένων βιοδεικτών οι οποίοι θα καταγραφούν και θα χρησιμεύσουν για την έγκαιρη πρόληψη, διάγνωση αλλά και σταδιοποίηση των νεοπλασιών.

Επίσης, η γνώση των μεταβολικών μονοπατιών που παρέχουν την ενέργεια και τις απαραίτητα βιομόρια για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση νέων θεραπειών. Οι θεραπείες αυτές επιδρούν στα σημεία ελέγχου του μεταβολικού δικτύου, τα οποία συνήθως είναι ρυθμιστικά ένζυμα, και τροποποιούν τη δράση τους οδηγώντας σε θεραπευτική αντιμετώπιση των νεοπλασιών.

1.7.1. Μεταβολομική

Η μεταβολομική αποτελεί την ποσοτική αποτύπωση των αλλαγών που συμβαίνουν στους μεταβολίτες σε ένα οργανισμό, ως αποτέλεσμα των γενετικών αλλά και των περιβαλλοντικών αλλαγών (διατροφή, φάρμακα, τρόπος διαβίωσης κ.ά) όπως αυτά προσδιορίζονται σε βιολογικά υγρά, ιστούς κ.ά. Επειδή το σύνολο των μεταβολιτών εξαρτάται, εκτός από το γενετικό υπόβαθρο, και από το χρόνο μέτρησης σε συνάρτηση με διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους, για το λόγο αυτό, η αποτύπωση του μεταβολικού προτύπου για κάθε οργανισμό είναι μοναδική.

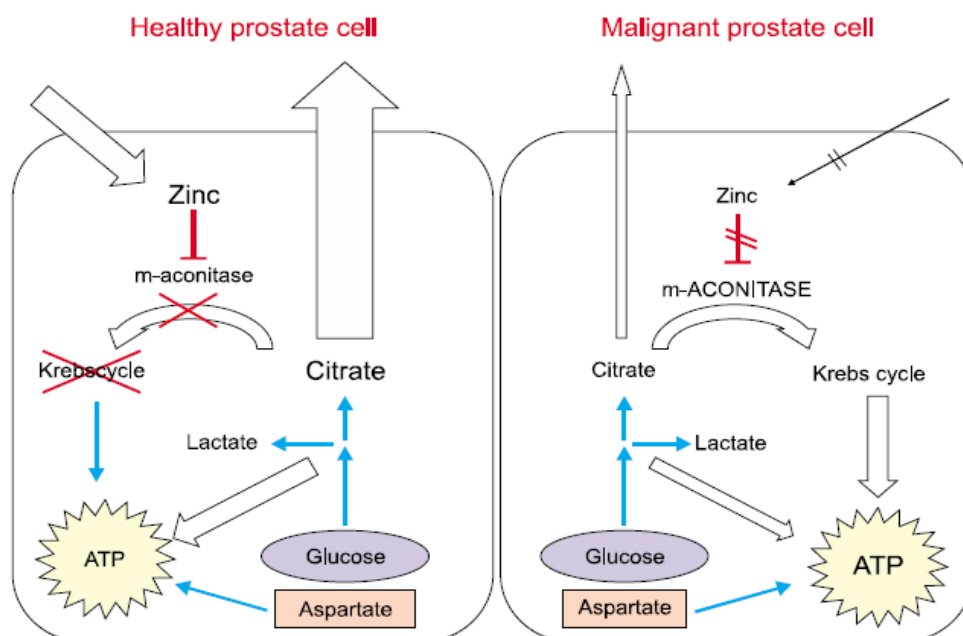
Η μεταβολομική δίνει μια σαφή εικόνα για έναν οργανισμό καθώς προσδιορίζει όλους τους μεταβολίτες του, τόσο ενδοκυττάριους όσο και εξωκυττάριους των οποίων η συγκέντρωση στα βιολογικά υγρά μεταβάλλεται σε περιπτώσεις ασθένειας, προσβολής τοξινών ή χρήσης φαρμάκων. Αυτή η μεταβολή αποτελεί χαρακτηριστικό "αποτύπωμα" της εκάστοτε περίπτωσης και είναι καθοριστική για τον διαχωρισμό μεταξύ υγείας και νοσηρότητας για τον ζωντανό οργανισμό. Η μεταβολομική επιτρέπει την λήψη ολοκληρωμένης μεταβολικής απόκρισης για έναν οργανισμό δίνοντας την δυνατότητα διερεύνησης μεταβολικών μονοπατιών και δικτύων και καθιστώντας πιο απλή την κατανόηση των περίπλοκων διεργασιών που συμβαίνουν σε επίπεδο ιστών και κυττάρων [130].

1.7.2. Μεταβολομική και καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη παρουσιάζει μια σημαντική μεταβολική ιδιαιτερότητα. Κατά τον σχηματισμό των καρκινικών κυττάρων διαφοροποιείται η έκκριση του κιτρικού οξέος σε σχέση με τα φυσιολογικά προστατικά κύτταρα. Στην περιφερική ζώνη του προστάτη εμφανίζεται το 75 % των περιστατικών κακοήθειας σε σύγκριση με τις άλλες περιοχές του προστατικού αδένα. Τα επιθηλιακά κύτταρα της περιφερικής ζώνης είναι εξειδικευμένα στην έκκριση κιτρικού

οξέος. Αποθηκεύουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες ψευδαργύρου από τα επιθηλιακά κύτταρα της κεντρικής περιοχής καθώς έχουν υποδοχείς για την πρόσληψή του. Τα υψηλά ποσοστά του ψευδαργύρου αναστέλλουν την δραστηριότητα της μιτοχονδριακής ακονιτάσης (m-aconitase) εμποδίζοντας έτσι την οξείδωση του κιτρικού οξέος στον κύκλο του Krebs. Η μη οξείδωση του κιτρικού οξέως έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λιγότερης ενέργειας από τα προστατικά κύτταρα (60 % λιγότερο ATP), ενώ ταυτόχρονα το κιτρικό οξύ που αναγκαστικά συσσωρεύεται στα κύτταρα, εκκρίνεται στο προστατικό υγρό [131-133].

Κατά την μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων του προστάτη σε καρκινικά συμβαίνει μια μεταβολική αλλαγή καθώς τα φυσιολογικά κύτταρα με ανεπαρκή ποσοστά ενέργειας, μετατρέπονται σε κύτταρα με υψηλές ενεργειακές δυνατότητες. Το γεγονός αυτό ως ένα βαθμό οφείλεται στη μειωμένη λειτουργικότητα του γονιδίου που κωδικοποιεί τους υποδοχείς πρόσληψης ψευδαργύρου στα καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας τελικά σε πολύ χαμηλά επίπεδα απορρόφησης ψευδαργύρου. Τα χαμηλά επίπεδα του ψευδαργύρου δεν επηρεάζουν την δραστηριότητα της μιτοχονδριακής ακονιτάσης και οδηγούν στην οξείδωση του κιτρικού οξέος στον κύκλο του Krebs παράγοντας περισσότερα μόρια ATP και παρέχοντας ενέργεια. Έτσι, τα επίπεδα του κιτρικού οξέος στα καρκινικά κύτταρα είναι πολύ χαμηλά ή και ανύπαρκτα συγκριτικά με τα καλοήγη επιθηλιακά κύτταρα (Εικ.16) [134].



Εικόνα 16: Μεταβολικές ιδιαιτερότητες του καρκίνου του προστάτη. Matthew J. Roberts, Horst J. Schirra, Martin F. Lavin, Robert A. Gardiner. *Metabolomics: A Novel Approach to Early and Noninvasive Prostate Cancer Detection*. Korean J Urol 2011;52:79-89

Εκτός όμως από το κιτρικό οξύ και άλλοι μεταβολίτες έχουν οριστεί ως πιθανοί δείκτες καρκίνου του προστάτη οι οποίοι και συνοψίζονται στην εικόνα 17. Οι αλλαγές των μεταβολιτών σχετίζονται με τον συγκεκριμένο μεταβολισμό που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα και τις ανάγκες τους. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη μεμβρανική σύνθεση που έχει ως αποτέλεσμα υψηλές απαιτήσεις σε χολίνη, με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης των μεταβολιτών που περιέχουν χολίνη. Επιπλέον, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα αλανίνης και γαλακτικού οξέος λόγω του φαινομένου Warburg, κατά το οποίο η γλυκόζη μεταβολίζεται κυρίως μέσω αερόβιας γλυκόλυσης παράγοντας μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέως. [135]

Metabolite	Context	Status in PCa	Sample	Reference
Citrate	Normally high levels in prostate tissue and prostatic fluid	↓ - metastasis < PCa < BPH < healthy	Prostatic fluid	[18,41-44]
		↓ - metastasis < PCa < BPH < healthy	Prostate tissue	[47,55,57,95]
Choline-containing compounds	Pre-cursors and products of membrane phospholipids	↑ - metastasis > PCa > BPH > healthy	Prostate tissue	[19,55,57,61,79]
Spermine	Proposed endogenous inhibitor to PCa growth	↓ - metastasis < PCa < healthy	Prostatic fluid	[18,41]
		↓ - metastasis < PCa < healthy	Prostate tissue	[80,95]
Myo-inositol	Osmoregulation	↓	Prostatic fluid	[18,41]
		↑	Prostate tissue	[57,81]
Lactate	Increased glycolysis (Warburg effect)	↑ - PCa > BPH > healthy	Prostate tissue	[19,52,55]
Alanine	Increased glycolysis (Warburg effect)	↑ - PCa > BPH > healthy	Prostate tissue	[19,52,55]
Omega-6 fatty acids	Promote PCa development	↑	Prostate tissue	[54]
Sarcosine	Activation of prostate cancer cells	↑ - correlated with invasiveness	Urine and prostate tissue	[22]
Choline + creatine/ citrate	Metabolite ratio	↑ - PCa > BPH > healthy - significant correlation with Gleason score	Prostate tissue	[51,97]
Citrate/spermine		↓	Prostatic fluid	[41]
		↓	Prostate tissue	[97]
Total choline/citrate		↑ - PCa > BPH > healthy - significant correlation with Gleason score	Prostate tissue	[51]
Choline/creatine		↑ - PCa > BPH > healthy - significant correlation with Gleason score	Prostate tissue	[51]
Citrate/creatine		↓ - significant correlation with Gleason score	Prostate tissue	[51]

Εικόνα 17: Μεταβολίτες-πιθανοί βιοδείκτες του PCa. Matthew J. Roberts¹, Horst J. Schirra, Martin F. Lavin, Robert A. Gardiner. *Metabolomics: A Novel Approach to Early and Noninvasive Prostate Cancer Detection*. Korean J Urol 2011;52:79-89

Καθώς λοιπόν, ο καρκίνος του προστάτη είναι πλήρως ιάσιμος εάν ανιχνευθεί έγκαιρα και αποτελεί μια κακοήθεια με πληθώρα αντικρουόμενων απόψεων σε σχέση με την θεραπευτική

της προσέγγιση, η επιστήμη της μεταβολομικής βασιζόμενη στην NMR φασματοσκοπία, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο που μπορεί να συμβάλλει στην καλύτερη διάγνωση, σταδιοποίηση και πρόγνωση αυτής της νεοπλασίας. Μέχρι στιγμής, η αποτίμηση του προστατικού αντιγόνου PSA στον ορό αποτελεί το κύριο διαγνωστικό μέσο το οποίο όμως δεν διαφοροποιεί ιστοπαθολογικά τα διάφορα περιστατικά με αποτέλεσμα την λανθασμένη επιλογή θεραπείας. Επίσης σε περιπτώσεις καλοήθους υπερτροφίας του προστατικού αδένος αλλά και σε άνδρες μεγάλης ηλικίας, η τιμή του PSA είναι αυξημένη, οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα χωρίς να υπάρχει κακοήθεια, και σε μη αναγκαία φαρμακευτική αντιμετώπιση με τις ανεπιθύμητες επιπτώσεις που αυτή συνεπάγεται [136]. Η μεταβολομική μπορεί να συμβάλλει καθοριστικά στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, αφού εξετάζει ταυτόχρονα πλήθος μεταβολιτών που αποτελούν υποψήφιους βιοδείκτες με μη επεμβατικό τρόπο και σε εξαιρετικά σύντομο χρόνο, διευκολύνοντας την πρόγνωση και την επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας.

Κεφάλαιο 2: Σκοπός

Οι συμβατικές αντικαρκινικές ουσίες, παρά την δυναμική τους στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων η οποία εξαρτάται από την δόση, τη χρονική διάρκεια της θεραπείας και τον τύπο της κακοήθειας, δεν έχουν εκλεκτικότητα στην δράση τους. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια να προκαλούν πολλές φορές παρενέργειες όπως οι γαστρεντερικές διαταραχές, αλωπεκία, νεφροτοξικότητα καθώς και μη αναστρέψιμη υπολειτουργία του μυοκαρδιακού ιστού, οπότε και περιορίζεται η χρήση τους εξαιτίας των ανεπιθύμητων ενεργειών τους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι: α) η εύρεση φυσικών προϊόντων που ενισχύουν τη δράση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων έναντι του καρκίνου του προστάτη καθώς και β) η διερεύνηση παραμέτρων του μηχανισμού δράσης τους.

Έτσι, σε ένα πρώτο στάδιο γίνεται επιλογή και χορήγηση δύο φυσικών και εδώδιμων προϊόντων, τόσο αυτόνομα όσο και σε συνδυασμό με γνωστό αντικαρκινικό παράγοντα (αδριαμυκίνη) προκειμένου να διαπιστωθεί α) η επίδραση των φυσικών προϊόντων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PC-3 κυττάρων και β) η ικανότητά τους να ενισχύουν τη δράση της αδριαμυκίνης έναντι των PC-3 κυττάρων. Σε ένα δεύτερο στάδιο, μελετάται ο μηχανισμός της αθροιστικής δράσης αδριαμυκίνης-φυσικού προϊόντος, μέσω μοριακών και ανοσοχημικών τεχνικών, φασματοσκοπίας NMR και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στη μελέτη της ενδεχόμενης αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης και στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας.

Κεφάλαιο 3: Πειραματικό μέρος

Η συλλογιστική των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν περιλαμβάνει τα εξής:

A) Εύρεση φυσικών προϊόντων που ενισχύουν τη δράση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου αδριαμυκίνη (ADR).

1. Επιλέγονται τα υπό μελέτη φυσικά προϊόντα [ενισχυμένο εκχύλισμα Σιλυμαρίνης (SEE) και εμπλουτισμένο κλάσμα σε γκλαμπριδίνη (GGE)] και μέσω της δοκιμασίας MTT προσδιορίζονται τα IC₅₀ αυτών, δηλαδή οι συγκεντρώσεις στις οποίες προκαλείται 50 % αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

2. Πραγματοποιείται η συγχορήγηση των δυο υπό μελέτη φυσικών προϊόντων (SEE και GGE) με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο αδριαμυκίνη και μέσω της δοκιμασίας MTT εκτιμάται αν το φυσικό προϊόν τροποποιεί τη δράση της αδριαμυκίνης.

B) Προσδιορισμός παραμέτρων του μηχανισμού δράσης.

3. Με απώτερο στόχο τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης τους, πραγματοποιείται μονο-χορήγηση των φυσικών προϊόντων, μονο-χορήγηση της αδριαμυκίνης και συγχορήγηση αδριαμυκίνης-φυσικού προϊόντος σε κύτταρα PC-3 για 24, 48 και 72 ώρες. Τα κύτταρα συλλέγονται και ακολουθεί κυτταρομετρία ροής για να μελετηθεί η επίδραση των παραγόντων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου καθώς και την πιθανή επαγωγή των μηχανισμών της απόπτωσης ή αυτοφαγίας.

4. Τα κύτταρα επωάζονται για 48 ώρες με τους παραπάνω παράγοντες και ακολουθεί:

α) η λύση τους προκειμένου να γίνει μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών - δεικτών της αυτοφαγίας NBR1 και p62 με την μέθοδο ενζυμικής ανοσο-προσρόφησης ELISA, καθώς και των ισομορφών της πρωτεΐνης LC3B μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

β) απομόνωση του ολικού RNA με σκοπό τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων επαγωγέων της αυτοφαγίας Beclin1, ULK1, AMBRA1, του γονιδίου δείκτη της αυτοφαγίας LC3A καθώς και του γονιδίου δείκτη της μιτοφαγίας BNiP3L μέσω qPCR.

γ) η παρατήρηση χαρακτηριστικών δομών της αυτοφαγίας (αυτοφαγοσώματα-αυτοφαγολυσοσώματα) μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

δ) η λύση των κυττάρων και προσδιορισμός μεταβολιτών (μέσω NMR φασματοσκοπίας) χαρακτηριστικών για τον καρκίνο του προστάτη και σχετικών με τον μηχανισμό της αυτοφαγίας.

Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας της παρούσας μελέτης

Αρχικό screening φυτικών εκχυλισμάτων μέσω δοκιμασίας MTT και επιλογή φυσικού προϊόντος

Δοκιμασία MTT → Προσδιορισμός IC_{50} φυσικού προϊόντος

Φυσικό προϊόν + Αδριαμυκίνη

Δοκιμασία MTT → Επηρεάζεται η δράση της αδριαμυκίνης;

Χορηγήσεις φυτικών προϊόντων ή/και Αδριαμυκίνης σε κύτταρα PC-3

Φυσικό προϊόν

Φυσικό προϊόν + Αδριαμυκίνη

Αδριαμυκίνη

Κυτταρομετρία ροής

Μελέτη απόπτωσης

Μελέτη κυτταρικού κύκλου

Μελέτη αυτοφαγίας

Χορηγήσεις φυτικών προϊόντων ή/και Αδριαμυκίνης σε κύτταρα PC-3

Απομόνωση RNA

Απομόνωση πρωτεϊνών

Απομόνωση κυττάρων

Ποσοτικός προσδιορισμός
LC3A, Beclin1, ULK1, AMBRA1
(Real Time qPCR)

Ποσοτικός προσδιορισμός
NBR1 και p62 (ELISA)

Ημι-Ποσοτικός
προσδιορισμός LC3
(Western blotting)

Μεταβολομική
φασματοσκοπία NMR και
Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

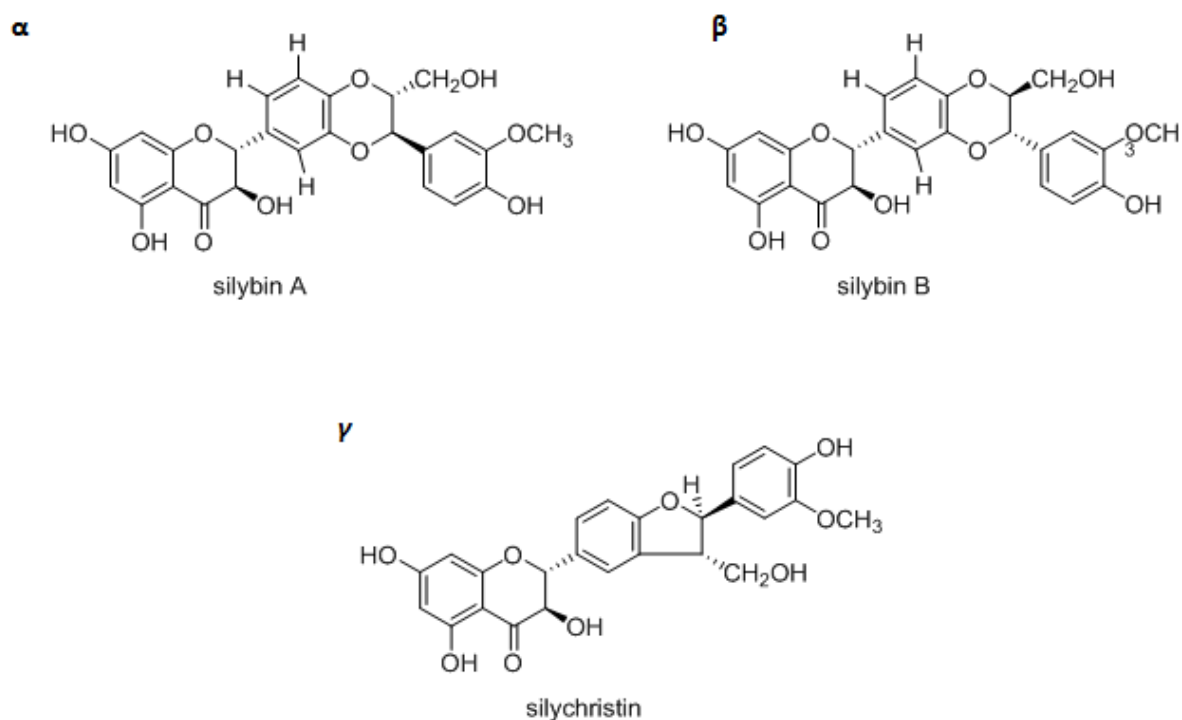
3.1. Κυτταροκαλλιέργειες

Τα κύτταρα PC-3 καλλιεργούνται σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειών επιφάνειας 75 cm². Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι το Dulbecco's modified Eagle's medium F/12 (DMEM/F12, Lonza) εμπλουτισμένο με γλουταμίνη 2 mM, στρεπτομυκίνη 100 µg/mL, πενικιλίνη 100 U/mL καθώς και εμβρυϊκό βόειο ορό 10 % (FBS, Biosera). Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας στους 37° C και σε 5% CO₂.

3.2. Παρασκευή του εμπλουτισμένου εκχυλίσματος Σιλυμαρίνης (Silymarin Enriched Extract: SEE) και απομόνωση της σιλιμπινίνης και της σιλυκριστίνης

Ξηροί σπόροι του φυτού *Silybum marianum* L. αγοράστηκαν από την τοπική αγορά (οδός Αθηνάς, Αθήνα, Ελλάδα). Ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα σπόρων (περίπου 200 γραμμάρια) κοσκινίστηκε ώστε να διαθέτουν μέγεθος έως 0,4 mm. Για την παρασκευή του εμπλουτισμένου εκχυλίσματος σιλυμαρίνης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE (Accelerated Solvent Extraction) σύμφωνα με προηγούμενη αναφορά και μικρές τροποποιήσεις [137]. Το πρωτόκολλο εκχύλισης που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνει τη χρήση 2.5 g σπόρων, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε ανοξείδωτο κελί όγκου 100 mL με σκοπό την ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης οργανικών διαλυτών. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε απολίπανση του φυτικού υλικού, εκχυλίζοντας με διαλύτη η-εξάνιο στους 50° C και πίεση 1500 psi για 20 min. Ακολούθησε εκχύλιση με χρήση διαλύτη ακετόνης στους 70° C για 15 min στα 1500 psi, με σκοπό την παραλαβή της πλειονότητας των επιθυμητών μεταβολιτών. Πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι εκχύλισης, ενώ κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποκαταστάθηκε αδρανής ατμόσφαιρα χρησιμοποιώντας αέριο N₂, ώστε να αποφευχθεί η οξειδωτική αλλοίωση των περιεχόμενων μεταβολιτών. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές και τα παραγόμενα υγρά εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό κενό σε συσκευή Rotavapor (Buchi) παραλαμβάνοντας τελικά 0.6 g εκχυλίσματος SEE. Το SEE περιέχει μια σημαντική ποσότητα σιλυμαρίνης (> 60 %), η οποία αποτελεί ένα μείγμα τουλάχιστον έξι флаβονο-λιγνανών, της σιλιδιανίνης (silydianin), της σιλιμπίνης A (silybin A) (Εικ.18α), της σιλιμπίνης B (silybin B) (Εικ.18β), της ισοσιλιμπίνης A (isolisibin A), της ισοσιλιμπίνης B (isosilybin B) και της σιλυκριστίνης (silychristin) (Εικ.18γ). Η σιλυκριστίνη και οι σιλιμπίνες (σιλιμπίνη A και B) αποτελούν τα βασικά συστατικά του εκχυλίσματος αφού ανιχνεύονται σε ποσοστό 13 % και 30 %, αντίστοιχα [138]. Προκειμένου να απομονωθούν τα δύο παραπάνω συστατικά, 0.5 g του εκχυλίσματος SEE υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία

στήλης (Silica flash column chromatography). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ αυξανόμενης πολικότητας και παραλήφθηκαν συνολικά 80 κλάσματα τα οποία αναλύθηκαν με χρωματογραφία TLC. Το πέμπτο κλάσμα (98 mg) το οποίο εκλούστηκε με κινητή φάση $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97/3, ταυτοποιήθηκε ως σιλμπινίνη. Το δέκατο τρίτο κλάσμα (28.3 mg) που εκλούστηκε με $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5, υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία TLC (preparative TLC chromatography) χρησιμοποιώντας $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10 ως κινητή φάση και πλάκα TLC κανονικής φάσης, οδηγώντας τελικά στην απομόνωση της σιλυκριστίνης (11.2 mg). Όλοι οι μεταβολίτες ταυτοποιήθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, HMQC, HMBC, 2DNMR), φασματομετρία μάζας (MS), καθώς και με άμεση σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα [138, 139].



Εικόνα 18: α) Σιλμπινίνη Α β) Σιλμπινίνη Β γ) Σιλυκριστίνη

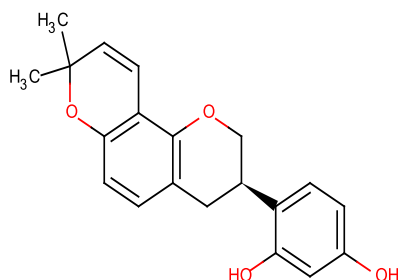
3.3. Παραλαβή εμπλουτισμένου κλάσματος σε γκλαμπριδίνη (GGE) από το φυτό *Glycyrrhiza glabra* και απομόνωση του μεταβολίτη.

Η συλλογή των ριζών του φυτού *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae), πραγματοποιήθηκε το φθινόπωρο του 2013 σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις του Αργοστολίου, στο νησί της Κεφαλονιάς (Ελλάδα). Το φυτικό υλικό αποξηράνθηκε με λυοφιλοποίηση, κονιορτοποιήθηκε και αποθηκεύτηκε σε δοχείο σε χαμηλή θερμοκρασία (~ 4° C). Για την παρασκευή του εκχυλίσματος του φυτού χρησιμοποιήθηκε και πάλι η τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE, όπου 20 g φυτικού υλικού εκχυλίστηκαν με αιθανόλη (150 mL) στους 70°C και πίεση 1500 psi. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό κενό σε συσκευή Rotavapor (Buchi) παραλαμβάνοντας τελικά 1.85 g ξηρού εκχυλίσματος (απόδοση 9.25 %). Ακολούθησε κλασμάτωση του ξηρού εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας την τεχνική φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής (FCPC). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (FCPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 200 mL και το διφασικό σύστημα διαλυτών Hex:EtOAc:MeOH:H₂O (3:7:3:7). Αναλύθηκε δείγμα βάρους 600 mg, τα οποία διαλύθηκαν σε μίγμα των δύο φάσεων σε αναλογία περίπου 50:50. Από τις δύο φάσεις του συστήματός μας, η πάνω (οργανική) αποτέλεσε την κινητή φάση και η κάτω (υδατική) τη στατική. Αρχικά, τόσο στη στήλη, όσο και στο 'loop' της συσκευής υπήρχε σύστημα διαλυτών MeOH:H₂O 50:50 (σύστημα φύλαξης), το οποίο απομακρύνθηκε με την εισαγωγή της στατικής φάσης. Στη συνέχεια, διοχετεύτηκε η κινητή φάση μέσα στη στήλη με ταχύτητα περιστροφής 1000 στροφές/min και ροή 10 mL/min και μετά την εξισορρόπηση του συστήματος (σημείο στο οποίο η φάση που εισέρχεται στη στήλη εξέρχεται κιάλας διατηρώντας την αναλογία των δύο φάσεων σταθερή) ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και η συλλογή των κλασμάτων καθορισμένου όγκου (5 mL). Η ροή της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού ήταν 5 mL/min σε ascending mode και η περιστροφή 1100 rpm. Έπειτα από χρωματογραφικό έλεγχο των κλασμάτων προέκυψαν 5 νέα συνενωμένα κλάσματα (A-E). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αναστροφή των φάσεων, με την υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή σε 'descending mode' μέχρι το τέλος της ανάλυσης με ροή 5 mL/min και περιστροφή 1100 rpm, απ' όπου συνολικά προέκυψαν 2 ακόμη συνενωμένα κλάσματα (F,G).

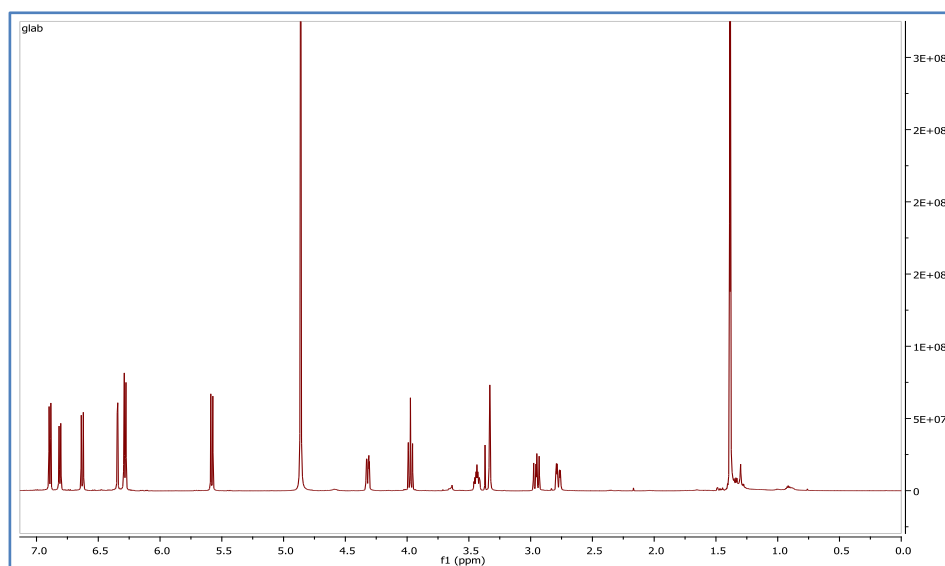
Ακολούθησε βιολογική αξιολόγηση του δεύτερου κλάσματος (B=GGE, 0.35 g), το οποίο με βάση την χρωματογραφία TLC ήταν πλούσιο σε γκλαμπριδίνη (Εικ.19α). Με σκοπό την απομόνωση σε καθαρή μορφή του μεταβολίτη γκλαμπριδίνη, προχωρήσαμε σε

παρασκευαστική χρωματογραφία TLC του εμπλουτισμένου κλάσματος GGE. Μία ποσότητα 20 mg του κλάσματος επιστρώθηκε σε πλάκα TLC κανονικής φάσης και κινητή φάση μίγμα Hexane/EtOAc 30/70. Τελικά παραλήφθηκαν 11 mg γκλαμπριδίνης (Εικ.19α) με καθαρότητα μεγαλύτερη από 95 % όπως εκτιμήθηκε από τη μελέτη του φάσματος πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ (Εικ.19β).

α



β



Εικόνα 19: α) Γκλαμπριδίνη β) Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ καθαρότητας γκλαμπριδίνης

Γενικά για τις ενότητες 3.2 & 3.3:

Η αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) πραγματοποιήθηκε σε πλάκες Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ ή RP-8 F₂₅₄. Τα σήματα οπτικοποιήθηκαν με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (254 και 365 nm) ή/και με ψεκασμό με αντιδραστήριο εμφάνισης θειϊκή βανιλίνη και θέρμανση για 2 λεπτά στους 110⁰C. Τα χρωματογραφήματα αποτυπώθηκαν σε συσκευή CAMAG TLC Visualizer. Η παρασκευαστική χρωματογραφία TLC πραγματοποιήθηκε σε πλάκες (PLC Silica gel 60 F254, 1 mm) όπου η επιθυμητή ζώνη απορρόφησης παραλήφθηκε με απόξεση και ο μεταβολίτης εκχυλίστηκε από το προσροφητικό υλικό (silica gel) με διαλύτη

οξικό αιθυλεστέρα. Τα χημικά, οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany). Οι εκχυλίσεις των φυτικών ειδών πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE (Accelerated Solvent Extraction) Dionex 300. Η εξάτμιση των διαλυτών πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό αποστακτήρα κενού (Rotavapor R-3000r, Buchi, Switzerland). Η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (Centrifugal Partition Chromatography) πραγματοποιήθηκε στο όργανο Kromaton FCPC το οποίο είναι εξοπλισμένο με στήλη 200 mL, προσαρμοζόμενη περιστροφή 200-2000 rpm και προπαρασκευασμένη εργαστηριακή αντλία (Alliance), με όριο ασφαλείας για πίεση 50 bar. Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματογράφο 600 MHz (Bruker Advance III 600 MHz and DRX 400) με χρήση δευτεριωμένης μεθανόλης (MeOD) ως διαλύτη.

3.4. Δοκιμασία αναστολής πολλαπλασιασμού (MTT)

α. Αρχή της μεθόδου

Πρόκειται για χρωματομετρική δοκιμή με την ουσία MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για μελέτες αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Είναι γρήγορη και ακριβής, δεν απαιτεί την χρήση ραδιοϊσοτόπων και μπορεί να μετρήσει ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Το άλας του τετραζολίου διασπάται μέσω του ενζύμου διϋδρογενάση που εντοπίζεται στα ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων και παράγονται οι κρύσταλλοι φορμαζανίου οι οποίοι έχουν σκούρο μπλε-μωβ χρώμα. Καθώς η διάσπαση του άλατος του τετραζολίου πραγματοποιείται μόνο σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα, η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που βρίσκονται στην καλλιέργεια και κατ'αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται προσδιορισμός του ποσοστού τους και ποσοτικοποίηση της αποτελεσματικότητας των επιδράσεων στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [140].

β. Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

- Καταγραφέας απορρόφησης ELISA (Elisa reader Powerwave, BioTek)
- Αυτόματες πιπέτες
- Tips (10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)
- Πλακίδια 96 θέσεων (Corning)
- Dulbecco's modified Eagle's medium F/12 (DMEM/F12, Lonza)-10% FBS (Biosera)
- MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Fischer)

γ. Πρωτόκολλο

Τα κύτταρα PC-3 καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10 % FBS σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 750 κύτταρα σε τελικό όγκο 150 μ L και υποβάλλονται σε 96 ώρες επώαση υπό την επίδραση των παρακάτω παραγόντων:

Αδριαμυκίνη - SEE

Αδριαμυκίνη: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM

SEE: 400, 200, 150, 100, 75, 50, 37.5, 25, 12.5, 6.25 μ g/mL

Σιλιμπίνες: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 μ g/mL

Σιλυκριστίνη: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 μ g/mL

Συγχορήγηση αδριαμυκίνης και SEE όπου γίνεται επίδραση σταθερής δόσης SEE **50 μ g/mL** σε PC-3 κύτταρα σε σταδιακά μειούμενες συγκεντρώσεις αδριαμυκίνης 100, 50, 25, 12.5, 6.25 και 3.125 nM.

Αδριαμυκίνη- GGE

Αδριαμυκίνη: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM

GGE: 400, 200, 150, 100, 75, 50, 37.5, 25, 12.5, 6.25 μ g/mL

Συγχορήγηση αδριαμυκίνης και GGE με επίδραση σταθερής δόσης GGE **35 μ g/mL** σε PC-3 κύτταρα σε σταδιακά μειούμενες συγκεντρώσεις αδριαμυκίνης 100, 50, 25, 12.5, 6.25 και 3.125 nM.

Μετά την παρέλευση 96 ωρών, σε κάθε πηγαδάκι προστίθεται ποσότητα 15 μL (συγκέντρωσης 5 mg/mL) φιλτραρισμένου διαλύματος MTT και ακολουθεί επώαση στον κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για 4 ώρες. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται 100 μL DMSO για να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζανίου. Τέλος, μετράται η απορρόφηση στα 540 nm με τη χρήση του καταγραφέα απορρόφησης ELISA ενώ η συλλογή των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση του λογισμικού Gen5.

3.5. Επίδραση ουσιών στα κύτταρα

α. Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

- Φυγόκεντρος
- Φλάσκες 25 cm^2 (Corning)
- Αυτόματες πιπέτες
- Tips (200 μL , 1000 μL)
- Dulbecco's modified Eagle's medium F/12 (DMEM/F12)-10% FBS
- PBS (Phosphate buffered saline)
- Θρυψίνη (Trypsin-EDTA 1x) (Sigma)

β. Πρωτόκολλο

Τα κύτταρα πλένονται με 5 mL PBS, αποκολλώνται με 1 mL θρυψίνη και συλλέγονται με 3 mL DMEM. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 1500 στροφές και αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό. Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL DMEM και μέτρηση του αριθμού τους. Τα κύτταρα PC-3 (100.000 κύτταρα) κατόπιν μεταφέρονται σε φλάσκες 25 cm^2 , με θρεπτικό υλικό DMEM F-12 και καλλιεργούνται για 24 ώρες. Στη συνέχεια, σε κάθε φλάσκα πραγματοποιείται μία επίδραση και ακολουθεί επώαση για 48 ώρες. Οι επιδράσεις είναι οι ακόλουθες:

Μονοχορηγήσεις: Αδριαμυκίνη 25 nM, Αδριαμυκίνη 50 nM,
SEE 50 $\mu\text{g/mL}$, GGE 35 $\mu\text{g/mL}$

Συγχορηγήσεις: Αδριαμυκίνη 25 nM + SEE 50 µg/mL,

Αδριαμυκίνη 25 nM + GGE 35 µg/mL

Η αδριαμυκίνη χορηγείται σε υδατικό διάλυμα ενώ το SEE και το GGE είναι διαλυμένα σε DMSO (Dimethyl Sulfoxide).

Μετά από την 48ωρη επώαση με τους παραπάνω παράγοντες, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα πλένονται με PBS (Phosphate buffered saline) και αποκολλώνται με θρυψίνη. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά σε 1550 g και αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό. Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL PBS και δεύτερη φυγοκέντρωση σε 1550 g για 5 λεπτά. Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και τα κύτταρα φυλάσσονται στους -80° C.

γ. Διαλύματα

➤ Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH = 7.4)

NaCl 8 g (137 mM)

KCl 0.2 g (2.7 mM)

Na₂HPO₄ 1.44 g (10 mM)

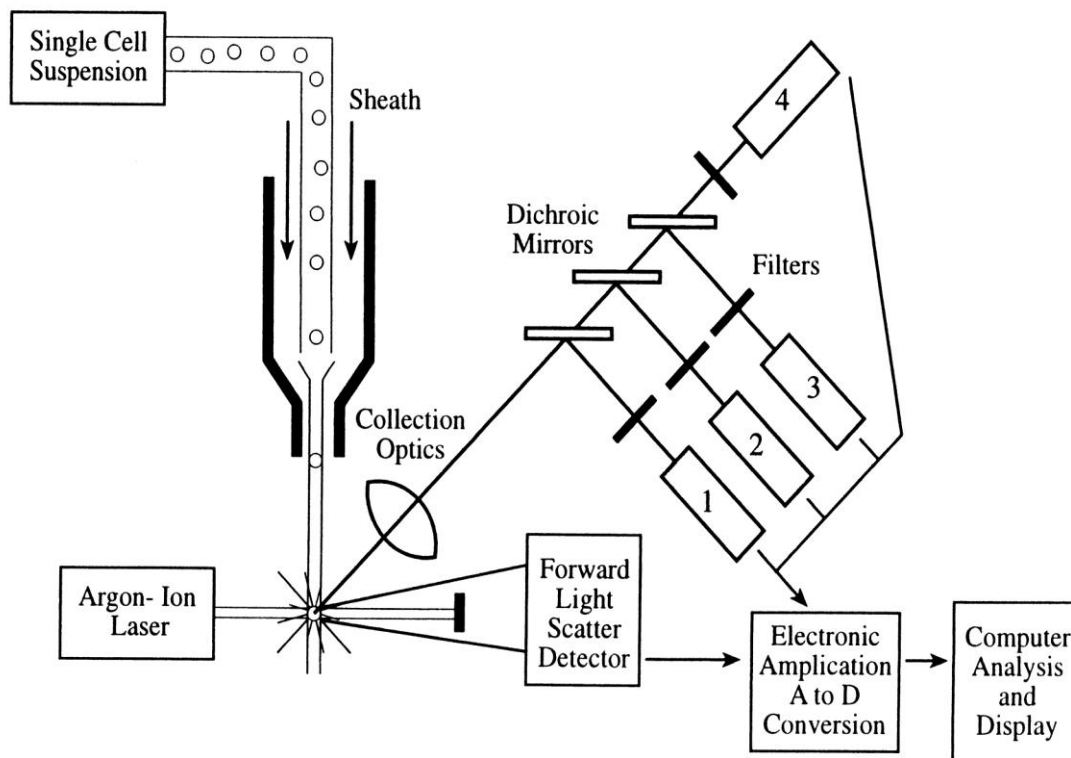
KH₂PO₄ 0.25gr (1.8 mM) Τελικός όγκος 1L σε ddH₂O

3.6. Κυτταρομετρία ροής

α. Αρχή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια τεχνολογία κατά την οποία μετρώνται και αναλύονται πολλά φυσιολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων καθώς κινούνται μέσα σε ένα υγρό ρεύμα διαπερνώντας μια ακτίνα φωτός. Τα χαρακτηριστικά που μετρώνται είναι το μέγεθος του κυττάρου, η εσωτερική πολυπλοκότητα του, η υφή της εξωτερικής μεμβράνης (πόσο κοκκιώδης είναι) καθώς και η σχετική ένταση του φθορισμού που εκπέμπει. Πιο συγκεκριμένα, μέσα στον κυτταρομετρητή ροής τα κύτταρα κινούνται μέσω ενός υγρού ρεύματος ισοτονικών διαλυμάτων τα οποία σχηματίζουν μια ελασματοειδή ροή επιτρέποντας στα κύτταρα να διαπερνούν ένα-ένα την ακτίνα φωτός laser. Μόλις τα κύτταρα δεχθούν το φως, το διαθλούν υπό διάφορες γωνίες ανάλογα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, ενώ αν υπάρχουν φθορίζοντα συστατικά εκπέμπουν φθορισμό. Το διαθλώμενο και φθορίζον φως συλλέγονται

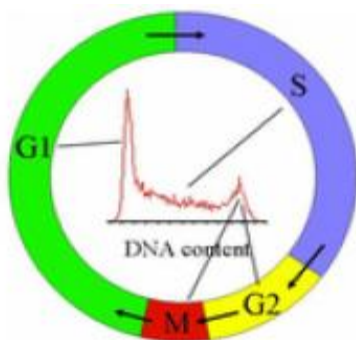
από φακούς και κατόπιν διέρχονται από ειδικά φίλτρα και καθρέπτες και τελικά μετατρέπονται σε ηλεκτρονικό σήμα που απεικονίζεται στην οθόνη του υπολογιστή (Εικ.20) [141].



Εικόνα 20: Αρχές κυτταρομετρίας ροής. Michael Brown, Carl Wittwer, *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. Clinical Chemistry* 2000;46:1221-122.

Χρωστικές και κυτταρομετρία ροής

Propidium Iodide (PI): Το PI αποτελεί μια φθορίζουσα χρωστική η οποία προσδένεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων του DNA και είναι διαπερατή μόνο από νεκρά κύτταρα, ενώ εκπέμπει σε μήκος κύματος 617 nm. Έτσι, στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, το PI διαπερνά τα νεκρά μονιμοποιημένα κύτταρα και προσδένεται στο DNA τους, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση του και κατ'έπекταση τον προσδιορισμό της φάσης του κυτταρικού κύκλου (Εικ.21) [142].



Εικόνα 21: Η σχέση ανάμεσα στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου και το ιστόγραμμα του DNA.

Annexin V-FITC: Κατά τα πρώιμα στάδια της απόπτωσης όπου ξεκινάει η αποδιοργάνωση της πλασματικής μεμβράνης, το φωσφολιπίδιο φωσφατιδυλο-σερίνη (PS) μετακινείται από την εσωτερική προς την εξωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης και εκτίθεται στον εξωκυττάριο χώρο. Η Annexin V-FITC είναι μια πρωτεΐνη 35-36 KDa συζευγμένη με το χρωμοφόρο FITC (εκπέμπει φθορισμό σε μήκος κύματος 350 nm) η οποία προσδένεται ισχυρά με την εκτεθειμένη φωσφατιδυλο-σερίνη, λειτουργώντας ως ανιχνευτής των κυττάρων που βρίσκονται στα πρώιμα στάδια της απόπτωσης [143].

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD): Αποτελεί μια φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA (σε περιοχές πλούσιες σε GC) και εκπέμπει σε μήκος κύματος 647 nM. Το 7AAD είναι διαπερατό από την κυτταρική μεμβράνη των κατεστραμμένων ή νεκρών κυττάρων ενώ δεν διαπερνά την άθικτη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων [144].

Ο συνδυασμός των δύο χρωστικών Annexin V-7AAD, επιτρέπει τη διάκριση των ζωντανών κυττάρων (αρνητική Annexin V, αρνητικό 7AAD), από κύτταρα που βρίσκονται σε πρώιμη απόπτωση (θετική Annexin V, αρνητικό 7AAD) ή που έχουν ήδη πεθάνει (θετική Annexin V, θετικό 7AAD) [145].

CYTO-ID detection kit Enzo: Το Enzo Life Sciences CYTO-ID® Autophagy Detection Kit είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αυτοφαγικών δομών μέσω κυταρομετρίας ροής. Το CYTO-ID® Autophagy Detection Kit περιλαμβάνει μια πράσινη φθορίζουσα χρωστική, η οποία εκπέμπει στα 488nm όταν προσδένεται στα κυστίδια που παράγονται κατά την αυτοφαγία. Ο παραδοσιακός τρόπος ανίχνευσης της αυτοφαγίας περιελάμβανε την μέτρηση του αυξημένου αριθμού αυτοφαγοσωμάτων που παράγονται μετά την επαγωγή της αυτοφαγίας. Παρόλα αυτά, τα αυτοφαγοσώματα αποτελούν ένα ενδιάμεσο στάδιο της όλης διαδικασίας. Η συσσώρευση των αυτοφαγοσωμάτων μπορεί να υποδηλώνει την αυξημένη επαγωγή της αυτοφαγίας ή την αναστολή της δημιουργίας των αυτοφαγο-λυσωμάτων. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να γίνεται μέτρηση τόσο της παραγωγής των αυτοφαγοσωμάτων όσο και της σύντηξής τους με το λυσόσωμα. Για το σκοπό αυτό, σε αυτό το κιτ χρησιμοποιούνται η ραπαμυκίνη ως θετικός μάρτυρας σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων και η χλωροκίνη ως μάρτυρας αναστολής του σχηματισμού των αυτοφαγο-λυσωμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, η ραπαμυκίνη αποτελεί ένα λιποφιλικό αντιβιοτικό το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως αναστολέας του συμπλόκου mTOR, λειτουργώντας έτσι ως

επαγωγέας της αυτοφαγίας σε μια πληθώρα κυττάρων και κυτταρικών σειρών. Το σύμπλοκο mTOR εμποδίζει την αυτοφαγία φωσφορυλιώνοντας πρωτεΐνες της οικογένειας ATG. Η ραπαμυκίνη σχηματίζει σύμπλοκο με έναν ενδοκυτταρικό υποδοχέα της, τον FKBP12, ο οποίος αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του mTOR συμπλόκου εμποδίζοντας την περαιτέρω μεταγωγή σήματος για αναστολή της αυτοφαγίας. Η επαγόμενη από την ραπαμυκίνη αυτοφαγία χαρακτηρίζεται από συσσώρευση αυτοφαγικών κυστιδίων και έντονο σχηματισμό αυτοφαγο-λυσosσωμάτων.

Η χλωροκίνη αποτελεί ένα αντι-φλεγμονώδες φάρμακο το οποίο χρησιμοποιείται για την θεραπεία της ελονοσίας. Καταστέλλει τη φλεγμονή αυξάνοντας το pH στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων, αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την δράση τους. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, η χλωροκίνη χρησιμοποιείται ως δείκτης αναστολής του σχηματισμού αυτοφαγο-λυσosσωμάτων.

β. Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

- Κυτταρομετρητής ροής BD Accuri C6 sampler
- Φυγόκεντρος
- Αυτόματες πιπέτες
- Tips (200 μ L, 1000 μ L)
- PBS
- Θρυψίνη (Sigma)
- Ακιουτάση (Accutase) (Sigma)
- Απόλυτη αιθανόλη
- Staining Solution
- PI (Propidium Iodide) (BD Pharmingen)
- Staining Buffer (BD Pharmingen)
- Annexin V-FITC (BD Pharmingen)
- 7AAD (BD Pharmingen)

γ.Ι. Πρωτόκολλο για μελέτη των φάσεων του κυτταρικού κύκλου

Μετά από την 48ωρη επώαση των κυττάρων με τους παραπάνω παράγοντες, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα πλένονται με 3 mL PBS, αποκολλώνται με 0.5 mL θρυψίνη στους 37° C, και συλλέγονται με 2 mL θρεπτικό υλικό DMEM-10% FBS. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις σε 1550 g και αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό. Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL PBS και δεύτερη φυγοκέντρωση στις σε 1550 g για 5 λεπτά. Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και τα κύτταρα μονιμοποιούνται με προσθήκη 1 mL κρύου PBS και 1 mL παγωμένης αιθανόλης (Absolute ethanol) και φυλάσσονται στους 4°C. Πριν τη μέτρηση, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις σε 1550 g για 5 λεπτά, αποχύνεται το υπερκείμενο και επαναδιαλύονται σε 400 µL staining buffer όπου και επωάζονται για 15 λεπτά στο σκοτάδι. Ακολουθεί η μέτρηση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω του κυτταρομετρητή ροής BD Accuri C6 sampler, στο κανάλι FL2, μέσω του λογισμικού BD Accuri CSampler.

γ.ΙΙ. Πρωτόκολλο για την μελέτη της απόπτωσης

Μετά από την 48ωρη επώαση των κυττάρων με τους παραπάνω παράγοντες, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα πλένονται με 3 mL PBS, αποκολλώνται με 0.5 mL ακιουτάση σε θερμοκρασία δωματίου και συλλέγονται με 2 mL θρεπτικό υλικό DMEM-10% FBS. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις σε 1550 g και αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό. Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL PBS και δεύτερη φυγοκέντρωση στις σε 1550 g για 5 λεπτά. Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 500 µL staining buffer (BD Pharmingen) στα οποία προστίθενται 5 µL Annexin V-FITC (BD Pharmingen) και 5 µL 7AAD (BD Pharmingen) και επωάζονται για 15 λεπτά στο σκοτάδι. Ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων που βρίσκονται σε απόπτωση (early και late) ή νέκρωση μέσω του κυτταρομετρητή ροής BD Accuri C6 sampler και του λογισμικού BD Accuri CSampler. Η ανεξίτη μετράται στο κανάλι FL1 ενώ το 7AAD στο κανάλι FL3.

γ.ΙΙΙ Πρωτόκολλο για την ανίχνευση αυτοφαγικών δομών

Χρησιμοποιήθηκε το Enzo Life Sciences CYTO-ID® Autophagy Detection Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

δ. Διαλύματα

➤ Staining Solution

Stock solution	μL σε 5mL PBS	Τελική Συγκέντρωση
PI* (4 mg/mL σε DMSO)	62	50 μg/mL
Tris HCl (pH 7.5) 1 M	50	10 mM
MgCl₂ 1 M	25	5 mM
RNase A (10 mg/mL)	5	10 μg/mL

3.7. Real time qPCR

α. Αρχή της μεθόδου

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) πραγματοποιείται η λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας ενίσχυσης, οι δύο κλώνοι της αλληλουχίας του DNA αποδιατάσσονται μέσω αύξησης της θερμοκρασίας. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας για την πρόσδεση των εκκινητών και κατόπιν η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου. Μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους της διαδικασίας παρατηρείται λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας [146].

Η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time quantitative PCR,) αποτελεί μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδο, η οποία επιτρέπει επιπλέον την ποσοτικοποίηση της συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια

καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση όλης της διαδικασίας της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος [147].

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς βρίσκονται σε περίσσεια όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση). Ακολουθεί η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται αναστολείς και τελικά η αντίδραση σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau) [148].

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση γίνονται στην εκθετική φάση της αντίδρασης όπου απαραίτητη παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος, καθώς όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος [148].

Στο παρόν πρωτόκολλο χρησιμοποιείται η χρωστική SYBR green η οποία ενσωματώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA). Η SYBR green διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm ενώ δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα [147].

β. Όργανα-Αναλώσιμα-Αντιδραστήρια

Για την απομόνωση RNA

- Φυγόκεντρος
- Nanophotometer (Implen)
- Tips (200 µL, 1000 µL)
- Nucleozol (Macherey-Nagel)
- RNase free water (Gibco)
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 75 %

Για την RT-PCR

- PCR System (PTC-200, MJ Research)
- Σωληνάκια τύπου Eppendorf (500 µL)
- Tips (10 µL)
- Prime Script RT Reagent Kit (Takara)

Για την qPCR

- StepOnePlus-Real time PCR System (Applied Biosystems)
- Πλακίδια 96 θέσεων (Applied Biosystems)
- Tips (10 µL)
- POWERUP SYBR green master mix (Fisher)
- RNase free water (Gibco)

γ. Πρωτόκολλο

- Απομόνωση RNA

Το ολικό RNA των κυττάρων απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Nucleozol (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1) Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και προστίθεται 1 mL Nucleozol. Με επαναλαμβανόμενο πιπετάρισμα εξασφαλίζεται η διάσπαση των κυττάρων. Το διάλυμα μεταφέρεται σε eppendorf.

2) Προστίθενται 400 µL RNAase free H₂O και το διάλυμα ανακινείται έντονα για 15 δευτερόλεπτα και κατόπιν επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12000 g σε θερμοκρασία δωματίου.

3) 500 µL από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε νέο eppendorf και προστίθενται 500 µL ισοπροπανόλης. Το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 g για 10 λεπτά.

4) Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500 µL 75 % αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 7000 g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται το βήμα.

5) Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το RNA που έχει απομονωθεί επαναδιαλύεται σε 20 μL RNase free H_2O .

- 1 μL από το ολικό RNA που απομονώθηκε, ποσοτικοποιείται μέσω μέτρησης στο νανοφωτόμετρο (Nanophotometer, Implen)

- Σύνθεση cDNA

1 μg RNA χρησιμοποιείται για τη σύνθεση cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής σύμφωνα με τις οδηγίες του Prime Script RT reagent kit (Takara).

Για κάθε αντίδραση (10 μL τελικός όγκος) χρησιμοποιούνται:

5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μL
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5 μL
Random 6 mers (100 μM)	0.5 μL
total RNA	1 μL
RNase Free dH_2O	5.5 μL

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι: 37° C για 15 λεπτά, 85° C για 15 sec, 4° C διατήρηση.

- Real time qPCR

Οι αλληλουχίες των γονιδίων-στόχων ενισχύονται χρησιμοποιώντας το POWERUP SYBR green master mix (Fisher) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται στο StepOnePlus-Real time PCR System (Applied Biosystems) και η συλλογή των δεδομένων γίνεται με τη χρήση του λογισμικού StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems).

Για κάθε αντίδραση (τελικός όγκος 10 μL) χρησιμοποιούνται:

1 μL cDNA

0.6 μM από κάθε εκκινητή

5 μL POWERUP SYBR green master mix

2.8 μL RNAase free H_2O

ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης είναι:

50° C για 2 min

95° C για 2 min

95° C για 15 sec

Θερμοκρασία τήξης ανάλογα με το κάθε ζευγάρι των εκκινητών για 30 sec

72° C για 45 sec

} 40 κύκλοι

Όλα τα δείγματα αναλύονται σε 2 αντίγραφα ενώ η ΑΤΡάση χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Για κάθε δείγμα παράγονται καμπύλες τήξης προκειμένου να ανιχνευτεί η δημιουργία διμερών των εκκινητών καθώς και να πιστοποιηθεί η ειδικότητα των παραγόμενων κορυφών για τα γονίδια-στόχους. Η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης γίνεται χρησιμοποιώντας τη συγκριτική μέθοδο $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι θερμοκρασίες τήξης τους.

Αλληλουχία εκκινητή	Tm
LC3A forward 5'-CGTCCTGGACAAGACCAAGT-3'	60° C
LC3A reverse 5'-CTCGTCTTTCTCCTGCTCGT-3'	60° C
Beclin1 forward 5'- GATGGAAGGGTCTAAGACG TCCAA-3'	51° C
Beclin1 reverse 5'-TTTCGCCTGGGCTGTGGTAAG-3'	51° C
AMBRA1 forward 5'- ATACTACGCCAGAGGATGA-3'	56° C
AMBRA1 reverse 5'-GAAGAAGAGGAGGTGGAAGAAC-3'	56° C
ULK1 forward 5'- TCGAGTTCTCCGCAAGG -3'	57° C
ULK1 reverse 5'- CGTCTGAGACTTGGCGAGG -3'	57° C
ATPase forward 5'-GCCAAGTATTGAAATTGGAGGC-3'	55° C
ATPase reverse 5'-TCGCCAATGCGCACAA-3'	55° C

3.8. Λύση των κυττάρων-Απομόνωση πρωτεϊνών

Σε φλάσκες 25 cm², τοποθετούνται 75.000 κύτταρα και επωάζονται για 48 ώρες με ADR, SEE, GGE, ADR+SEE, ADR+GGE. Προκειμένου να απελευθερωθούν οι προς μελέτη πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν κυτταροπλασματικό εντοπισμό, πραγματοποιείται πρωτόκολλο λύσης των κυττάρων.

α. Όργανα-Αναλώσιμα-Αντιδραστήρια

- Φυγόκεντρος
- Tips (200 µL)
- Falcon tubes (15 mL)
- Σωληνάκια τύπου Eppendorf (500 µL)
- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Cell Lysis Buffer)

β. Πρωτόκολλο

Τα κύτταρα διαλύονται στο διάλυμα λύσης και ηρεμούν για 15 λεπτά σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 15200 g και θερμοκρασία 4° C για 15 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό το οποίο φυλάσσεται στους -80° C. Το ίζημα με τα υπολείμματα των κυττάρων απορρίπτεται.

γ. Διαλύματα

Το διάλυμα λύσης αποτελείται από RIPA buffer και 5 % πρόσφατα παραχθέντων αναστολέων ώστε να ανασταλεί η πρωτεόλυση, η αποφωσφορυλίωση κλπ.

➤ RIPA buffer

- Tris-HCl 0.05 M (Tris-HCl 0.4728 g)
- 0.1 % SDS (προαιρετικά) (600 µL SDS 10 %)
- 0.15 M NaCl (0.526 g NaCl)
- Ρύθμιση pH σε 7.6
- 1 % Igepal (600 µL Igepal CA-630 solution)
- 0.3 g Na-DOC

Φύλαξη στους 4° C

➤ Διάλυμα λύσης κυττάρων (Cell Lysis Buffer)

Σε 2 mL RIPA Buffer προστίθενται οι παρακάτω αναστολείς

Αναστολέας	M.B.	Διαλύτης	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος
Λευπεπτίνη	463	dH ₂ O	10 mg/mL	10 µg/mL	2 µL
Πεπστατίνη	685.9	EtOH	1 mg/mL	10 µg/mL	20 µL
Απροτινίνη	6511.2	Hepes 1 M ή dH ₂ O	7 mg/mL	10 µg/mL	2,8 µL
PMSF	174.2	Isopropanol	100 mM	1 mM	20 µL
NaF	41.99	dH ₂ O	10 mM	1 mM	2 µL
Na ₃ VO ₄	183.9	dH ₂ O (pH = 10)	100 mM	1 mM	20 µL

Οι αναστολείς παραμένουν ενεργοί σε υδατικό διάλυμα μόνο για 20 λεπτά οπότε το cell lysis buffer χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του.

3.9. Δοκιμασία προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

α. Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμασία Bradford αποτελεί φασματοσκοπική αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 έχει την ικανότητα να προσδένεται στις πρωτεΐνες, και πιο συγκεκριμένα στα βασικά και αρωματικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών. Η χρωστική εμφανίζεται σε τρεις μορφές: την κατιονική που φέρει κόκκινο χρώμα, την ουδέτερη με πράσινο χρώμα και την ανιονική με μπλε χρώμα. Υπό όξινες συνθήκες, η χρωστική είναι διπλά πρωτονιωμένη και βρίσκεται στην κατιονική μορφή της με κόκκινο χρώμα και έχει μέγιστη απορρόφηση στα 470 nm. Όταν όμως συνδεθεί με τις πρωτεΐνες μετατρέπεται στην σταθερή μη πρωτονιωμένη μορφή της που φέρει μπλε χρώμα και έχει μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm [149].

β. Όργανα-Αναλώσιμα-Αντιδραστήρια

- Καταγραφέας απορρόφησης ELISA (Elisa reader Powerwave, BioTek)
- Αυτόματες πιπέτες
- Tips (10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)
- Πλακίδια 96 θέσεων (Corning)
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- dH₂O
- Dye Reagent (Biorad)

γ. Πρωτόκολλο

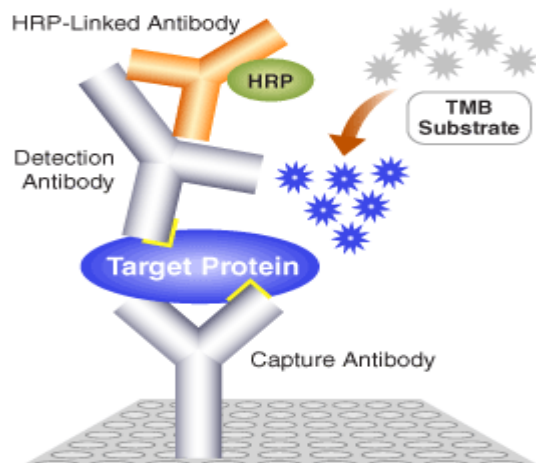
- Σε πλάκα μικρο-τιτλοποίησης προστίθεται ποσότητα ορού βόειας αλβουμίνης, BSA (Bovine Serum Albumin) σε αρχική συγκέντρωση 1 mg/mL σταδιακά αραιωμένη με απιονισμένο νερό έως συγκέντρωση 0.03125 mg/mL για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.
- Τα δείγματα αραιώνονται με dH₂O σε αναλογία 1:5 (2 μ L δείγματος και 8 μ L νερού)
- Προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι ποσότητα 200 μ L Dye Reagent.
- Μετράται 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.

3.10. Μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA)

α. Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) συνδυάζει την ειδικότητα και την ευαισθησία των αντισωμάτων προκειμένου να ανιχνευθεί και να βρεθεί η συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου αντιγόνου-ουσίας προς μελέτη. Παρόλο που υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της μεθόδου τα βασικά βήματα περιλαμβάνουν:



Εικόνα 22: Sandwich ELISA

1) Επώαση της πλάκας μικρό-τιτλοποίησης με το αντιγόνο 2) Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο προσδένεται ειδικά στο αντιγόνο 3) Προσθήκη δευτερογενούς αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρωτογενές αντίσωμα ενώ ταυτόχρονα φέρει συνδεδεμένο ειδικό ένζυμο 4) Επώαση με το υπόστρωμα του ενζύμου και 5) Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η παραγωγή έγχρωμου προϊόντος, η απορρόφηση του οποίου είναι ανάλογη της ποσότητας του υπό μελέτη αντιγόνου. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή της μεθόδου είναι η sandwich ELISA κατά την οποία στην πλάκα μικρο-τιτλοποίησης υπάρχει εξ'αρχής προσδεμένο αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο (Εικ.21). Τα δείγματα επωάζονται στην πλάκα και κατόπιν ξεπλένονται, οπότε μόνο το υπό μελέτη αντιγόνο μένει προσκολλημένο στην πλάκα επιτρέποντας έτσι τη μελέτη δειγμάτων χωρίς να έχει προηγηθεί ο καθαρισμός τους. Τα βήματα που ακολουθούνται στη συνέχεια είναι παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω [150].

β. Όργανα-Αναλώσιμα-Αντιδραστήρια

- Καταγραφέας απορρόφησης ELISA (Elisa reader Powerwave, BioTek)
- Αυτόματες πιπέτες
- Tips (10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)
- Πλακίδια 96 θέσεων (ENZO Life Sciences)

γ. Πρωτόκολλο

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται τα ELISA kits της εταιρείας ENZO Life Sciences. Πιο συγκεκριμένα, για την ανίχνευση της πρωτεΐνης NBR1 χρησιμοποιείται το NBR1 ELISA kit

Catalog # ADI-900-211 ενώ για την πρωτεΐνη p62 χρησιμοποιείται το p62 ELISA kit Catalog # ADI-900-212 και μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 450 nm.

3.11. Western blotting

α. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Western Blotting χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα από ένα μείγμα με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Καθώς κάθε πρωτεΐνη έχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων μπορεί να αναγνωριστεί από ένα αντίσωμα σχεδιασμένο να προσδένεται ειδικά με την συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, το μείγμα των πρωτεϊνών αρχικά αποδιατάσσεται και ηλεκτροφορείται σε γέλη SDS-πολυακρυλαμιδίου. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες λόγω της πρόσδεσής τους με το SDS και κινούνται προς το θετικό πόλο κατά μήκος των πόρων που φέρει η γέλη πολυακρυλαμιδίου όπου σταδιακά διαχωρίζονται σε ζώνες με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες με μικρότερο μοριακό βάρος κινούνται ταχύτερα μέσω των πόρων της γέλης ενώ οι πρωτεΐνες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος κινούνται πιο αργά και αποτελούν την αρχή του μετώπου.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Με την ολοκλήρωση της μεταφοράς, η μεμβράνη πλένεται και επώαζεται με διάλυμα μη ειδικής πρωτεΐνης με σκοπό η μη ειδική πρωτεΐνη να προσδεθεί σε περιοχές της μεμβράνης όπου δεν υπάρχουν πρωτεΐνες του μετώπου. Με τον τρόπο αυτό, αποτρέπεται η πιθανότητα το αντίσωμα να συνδεθεί μη ειδικά πάνω στη μεμβράνη δίνοντας ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στην υπό μελέτη πρωτεΐνη. Η μεμβράνη πλένεται και κατόπιν γίνεται επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό έναντι του πρωτογενούς αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα προσδένεται στο πρωτογενές αντίσωμα και ταυτόχρονα φέρει ένα ένζυμο (π.χ. horse radish peroxidase) το οποίο μετά από αντίδραση με ειδικό υπόστρωμα (π.χ. chemiluminiscent substrate) οδηγεί στην παραγωγή φωτός. Η

παραγωγή φωτός αποτυπώνεται σε φιλμ και πραγματοποιείται ημι-ποσοτική μέτρηση με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού (GelDoc) [151].

β. Όργανα-Αναλώσιμα-Αντιδραστήρια

- Biospectrum 515 Imaging System UVP (AnalytikJena)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad)
- Tips (10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)
- Σωληνάκια τύπου Eppendorf (500 μ L)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης-pads (Biorad)
- Separating gel-stacking gel
- 2X Sample buffer
- Running buffer
- Transfer buffer
- Blocking solution
- Πρωτογενή αντισώματα anti-LC3B (Novus), anti-GAPDH (Santa Cruz)
- Δευτερογενή αντισώματα anti-mouse (Santa Cruz), anti-rabbit (Santa Cruz)
- Αντιδραστήρια εμφάνισης SuperSignal West Pico Chemiluminenscent (Thermoscientific)

γ. Πρωτόκολλο

1^η ημέρα

- 20 μ g πρωτεΐνη από κάθε δείγμα υφίσταται βρασμό για 5 λεπτά στους 95° C μαζί με ίση ποσότητα Sample buffer. (Το sample buffer περιέχει Tris-HCL που ενδείκνυται για κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και SDS που προκαλεί αποδιάταξη αυτών).
- Τα δείγματα φορτώνονται στα κανάλια της γέλης πολυακρυλαμιδίου, η συσκευή γεμίζει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στα 100 Volts για περίπου μια ώρα.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, αφαιρείται η γέλη και ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Συναρμολογείται η συσκευή, γεμίζει με Transfer buffer και ακολουθεί η μεταφορά των διαχωρισμένων από την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με εφαρμοζόμενη τάση 250 mA για 80 λεπτά.

- Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη, αυτή κόβεται σε δύο τμήματα με βάση το μοριακό βάρος των προς αναζήτηση πρωτεϊνών. Έτσι, το ένα τμήμα περιέχει την πρωτεΐνη LC3B και το άλλο την GAPDH.
- Το τμήμα για την LC3B, επωάζεται με διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων (Blocking solution) (1 % skim milk in TBS/T) για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απορρίπτεται το Blocking solution, ξεπλένεται η μεμβράνη με TBS/T και ακολουθεί επώαση με το 1^ο αντίσωμα για την LC3B (Rabbit, Anti-LC3, Novus) overnight στους 4^ο C.

2^η ημέρα

- Το τμήμα της μεμβράνης με την GAPDH επωάζεται με Blocking solution (1 % skim milk in TBS/T) για 1 ώρα στους 4^ο C.
- Απορρίπτεται το Blocking solution, ξεπλένεται η μεμβράνη με TBS/T και ακολουθεί επώαση με το 1^ο αντίσωμα για GAPDH (Mouse, Anti-GAPDH, sc-32233) για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η GAPDH χρησιμεύει ως εσωτερικό πρότυπο (loading control). Το εσωτερικό πρότυπο είναι απαραίτητο καθώς μέσω αυτού διασφαλίζεται η <<φόρτωση>> της γέλης με ίση ποσότητα πρωτεϊνών, ώστε να είναι δυνατή η μετέπειτα σύγκριση των επιπέδων έκφρασης μιας πρωτεΐνης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων.
- Τα δύο τμήματα της μεμβράνης ξεπλένονται 3 φορές επί 5 λεπτά με TBS/T και ακολουθεί επώαση με το 2^ο αντίσωμα για την LC3 και για την GAPDH για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Τα δύο τμήματα της μεμβράνης ξεπλένονται με TBS/T (3 φορές επί 5 λεπτά/φορά).
- Τα δύο τμήματα της μεμβράνης καλύπτονται με ECL για 1 min και στη συνέχεια μεταφέρονται στο Biospectrum Imaging System UVP όπου πραγματοποιείται η ανάλυση και η ποσοτικοποίηση των ζωνών .

δ. Γέλη-Διαλύματα

➤ *Separating Gel (12 %)*

▪ dH ₂ O	1658 μL
▪ Tris-HCl 1.5M	1250 μL
▪ SDS 10%	50 μL
▪ Acryl/Bis 30%	200 μL
▪ APS 10%	50 μL
▪ TEMED	5 μL

➤ *Stacking Gel (4 %)*

▪ dH ₂ O	1325 μL
▪ Tris-HCl 0.5M	750 μL
▪ SDS 10%	25 μL
▪ Acryl/Bis 30%	330 μL
▪ APS 10%	50 μL
▪ TEMED	10 μL

➤ *Tris-HCl 1.5 M (pH = 8.8)*

9.08 g TrisBase

50 mL dH₂O

HCl

Φύλαξη στους 4° C

➤ *Tris-HCl 0.5 M (pH = 6.8)*

3.027 g TrisBase

50 mL dH₂O

HCl

Φύλαξη στους 4° C

➤ *Electrophoresis Running Buffer 10x (pH = 8.3)*

15.15 g TrisBase (25 mM)

71.3 g Glycine (192 mM)

1 g SDS (0.1 %)

Τελικός όγκος 1000 mL

Ρύθμιση pH

Φύλαξη στους 4° C

➤ *Electrophoresis Transfer Buffer (pH = 8.1-8.4)*

3.03 g TrisBase (25 mM)

14.4 g Glycine (192 mM)

200 mL Methanol (20 %)

Τελικός όγκος 1000 mL

Ρύθμιση pH

Φύλαξη στους 4° C

➤ *TBS 10x (pH = 7.6)*

12 g TrisBase (100 mM)

43.5 g NaCl (1500 mM)

500 mL H₂O

Φύλαξη στους 4° C

➤ *TBS/T*

1 mL Tween 20 σε 1000 mL TBS 1X

Φύλαξη στους 4° C

➤ **2x Sample Buffer**

1 mL 0.5 Tris-HCl pH = 6.8

1 mL 10% SDS

1 mL Glycerol

0.1 mL β-Mercaptoethanol (Serva)

Bromophenol Blue (ίχνη)

Φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου

3.12. Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Για κάθε πειραματική διαδικασία πραγματοποιούνται τρεις επαναλήψεις μετρήσεων. Όλες οι μεταβλητές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση της μέσης τιμής. Η σύγκριση ανάμεσα στις διάφορες ομάδες γίνεται με τη χρήση του έλεγχου μέσων τιμών t (t-test) καθώς και με την χρήση Ανάλυσης Διασποράς κατά ένα παράγοντα (One-way Analysis of Variance model- one way ANOVA) με διόρθωση Bonferroni και post-hoc ανάλυση Tukey χρησιμοποιώντας το λογισμικό IBM SPSS Statistics v. 21. Η τιμή $p < 0.05$ ορίστηκε ως στατιστικά σημαντική.

3.13. Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Πρωτόκολλο επεξεργασίας κυττάρων σε καλλιέργεια για υπερμικροσκοπική μελέτη αυτοφαγοσωμάτων με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (HM)

Για την παρατήρηση αυτοφαγικών δομών, 500.000 κύτταρα PC-3 τοποθετούνται σε ειδικά τρυβλία petri. Τα κύτταρα επωάζονται για 48 ώρες με ADR, SEE και ADR+SEE και κατόπιν ακολουθεί το πρωτόκολλο μονιμοποίησης που περιγράφεται παρακάτω.

α. Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης
- Φυγόκεντρος
- Υπερμικροτόμος Reichert Ultra Cut
- Κλίβανος
- Ξύστρα αποκόλλησης κυττάρων
- Σωληνάκια τύπου Eppendorf (500 μ L)
- Επίπεδα ελαστικά εκμαγεία πολλαπλής χρήσης
- Παραφορμαδεΰδη 3 %
- Γλουταραλδεΰδη 0.5 %
- Φωσφορικό Διάλυμα (Phosphate Buffer, PB)
- Ζελατίνα
- OsO_4
- Εποξικές ρητίνες
- Αιθυλική αλκοόλη (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %)
- Διάλυμα οξικού ουρανυλίου
- Διάλυμα κιτρικού μολύβδου

β. Πρωτόκολλο

- 1) Αφαιρείται το καλλιεργητικό μέσο από το τρυβλίο και ακολουθεί πρώτη μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 3 % παραφορμαδεΰδης και 0.5 % γλουταραλδεΰδης σε 0.1 M PB (φωσφορικό διάλυμα), pH 7.4 για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Το μονιμοποιητικό διάλυμα είναι προθερμασμένο στους 37° C για να βρίσκεται στην ίδια θερμοκρασία με αυτήν των κυττάρων. Στη συνέχεια η μονιμοποίηση γίνεται σε RT.
- 2) Τα κύτταρα ξεπλένονται με 0.1 PB, pH 7.4, 3 x 5min
- 3) Τα κύτταρα αποκολλώνται με ξύστρα και συλλέγονται με 0.1 PB μέσα σε eppendorf.
- 4) Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 800 g για 5 min.
- 5) Αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται το κομβίο των κυττάρων που έχει σχηματισθεί σε 1 mL υδατικού διαλύματος ζελατίνας 4 %. Το διάλυμα της ζελατίνας έχει ήδη θερμανθεί στους 37-40° C, ώστε να είναι υδαρές.
- 6) Γίνεται φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 800 g για 5 min και μεταφορά του eppendorf στον πάγο ώστε να στερεοποιηθεί η ζελατίνα.

7) Ακολουθεί επιλογή των περιοχών των κυττάρων εγκλεισμένων στη ζελατίνα κάτω από το στερεοσκόπιο και τα «ιστοτεμάχια κυττάρων-ζελατίνας» φυλάσσονται σε 0.1 PB pH 7.4 στους 4° C.

8) Ακολουθεί η κλασσική διαδικασία επεξεργασίας ιστών για HM. Πιο συγκεκριμένα,

- ✓ Γίνεται συμπληρωματική μονιμοποίηση των δειγμάτων με 1 % υδατικό διάλυμα OsO₄ για 1 ώρα στους 4° C.
- ✓ Τα δείγματα αφυδατώνονται με διαδοχική επώασή τους σε διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (30 % - 100 %).
- ✓ Τα δείγματα εμποτίζονται σταδιακά, αρχικά με οξείδιο του προπυλενίου (P.O.) και στη συνέχεια με μίγμα εποξικών ρητινών / P.O. σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ως προς το μίγμα των εποξικών ρητινών. Τελικά, τα δείγματα επωάζονται σε καθαρό μίγμα εποξικών ρητινών.
- ✓ Τα δείγματα σκηνώνονται σε επίπεδα ελαστικά εκμαγεία πολλαπλής χρήσεως και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 60° C για 24 ώρες, ώστε να πολυμεριστεί το μίγμα των εποξικών ρητινών.
- ✓ Το κάθε παρασκεύασμα των κυττάρων (εγκλεισμένων σε εποξικές ρητίνες) κόβεται σε υπερμικροτόμο Reichert Ultra Cut, σε τομές πάχους 60-90 nm, οι οποίες τοποθετούνται σε μεταλλικά πλέγματα χαλκού.
- ✓ Οι τομές των παρασκευασμάτων βάφονται με διαλύματα οξικού ουρανυλίου και κιτρικού μολύβδου και παρατηρούνται στο HM διέλευσης.

3.14.1. Μεταβολομική-Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)

α. Αρχή της μεθόδου

Η μελέτη διαφόρων ουσιών με τη χρήση τεχνικών πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στηρίζεται στη λήψη φασμάτων από τις ουσίες ύστερα από διέγερση του δείγματος. Η διέγερση γίνεται με τη χρήση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου σε ένα εύρος συχνοτήτων που εξαρτάται από τα στοιχεία που αποτελούν το υλικό καθώς και σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Η μελέτη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων οδηγεί στην αποκάλυψη της σύστασης και της δομής του δείγματος. Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού οφείλονται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων που βρίσκονται σε ισχυρό ομογενές μαγνητικό πεδίο B_0 . Η συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που προκαλεί τις διεγέρσεις αυτές βρίσκεται στην περιοχή των βραχέων ραδιοκυμάτων και είναι της τάξης 1000 – 10 MHz εξαρτώμενη από την ισχύ του πεδίου. Η συχνότητα διέγερσης των διαφόρων πυρήνων π.χ. 1H δεν είναι σταθερή αλλά εξαρτάται από το ηλεκτρονιακό περιβάλλον τους. Η ιδιότητα αυτή καθιστά την φασματοσκοπία NMR ως την πλέον ισχυρή μεθοδολογία μελέτης της ύλης σε μοριακό επίπεδο στη βιοχημεία, βιολογία και ιατρική.

Η τεχνική NMR επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση μεγάλου αριθμού μεταβολιτών σε μία μόνο μέτρηση χωρίς να χρειάζεται “προεπιλογή” των μεταβολιτών που θα ανιχνευθούν. Επιπλέον, είναι δυνατός ο προσδιορισμός της δομής των μεταβολιτών καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους.

Η τεχνική NMR είναι αρκετά επαναλήψιμη και διαθέτει διεργαστηριακή ανθεκτικότητα (robustness) επιτρέποντας τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Ταυτόχρονα είναι ταχύτατη μέθοδος καθώς τόσο η προετοιμασία όσο και η δειγματοληψία έχουν σε μεγάλο βαθμό αυτοματοποιηθεί. Πλεονεκτεί στο γεγονός ότι το βιολογικό δείγμα απαιτεί ελάχιστη ή καθόλου επεξεργασία πριν τη λήψη του φάσματος και δεν καταστρέφεται οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για άλλα πειράματα. Παρόλα αυτά, δεν έχει μεγάλη ευαισθησία και συχνά απαιτεί τη λήψη δισδιάστατων φασμάτων για την κατανόηση της δομής των μορίων που ανιχνεύει [152].

β. Όργανα- Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια

- Φασματοσκόπιο Bruker Avance III 600 MHz (Karlsruhe, Germany), εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (Universal 32R Hettich)
- Λυοφιλοποιητής
- Λουτρό υπερήχων (Transonic 460 Elma)
- Vortex (IKA MS 3 Basic)
- Σωληνάκια τύπου Eppendorf (1.5 mL)
- NMR tubes
- Μεθανόλη
- Χλωροφόρμιο
- Οξείδιο του Δευτερίου (D₂O)
- TSP (Trimethylsilyl Propanoic acid)

γ. Πρωτόκολλο

1. Καλλιέργειες

Τα κύτταρα PC-3 καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM F-12 σε κλίβανο κυτταροκαλλιιεργειών. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 80 % της επιφάνειας της φλάσκας, πραγματοποιείται η επίδραση των διάφορων παραγόντων. Σε κάθε φλάσκα γίνεται μία επίδραση και ακολουθεί επώαση για 48 ώρες. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα πλένονται με PBS (Phosphate Buffered Saline) και αποκολλώνται με θρυψίνη. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 1170 g, απόχυση του υπερκείμενου υγρού και φύλαξη σε erpendorfs στους -80° C για εκχύλιση και μέτρηση των εκχυλισμάτων με NMR φασματοσκοπία.

2. Εκχύλιση

Τα κύτταρα PC-3 εκχυλίζονται ακολουθώντας το πρωτόκολλο μεθανόλης-χλωροφορμίου-νερού που είναι ενδεδειγμένο για μελέτες μεταβολομικής με NMR καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη

παραλαβή τόσο των υδατοδιαλυτών όσο και των λιποδιαλυτών μεταβολιτών χρησιμοποιώντας μικρούς όγκους διαλυτών [152].

- Προστίθεται ποσότητα μεθανόλης-χλωροφορμίου σε αναλογία 2:1 στα παγωμένα κύτταρα
- Ακολουθεί έκθεση σε υπερήχους για 5 λεπτά
- 15 λεπτά αναμονής
- Προστίθεται ποσότητα χλωροφορμίου-απιονισμένου νερού σε αναλογία 1:1 στο προηγούμενο μείγμα που οδηγεί το σχηματισμό γαλακτώματος.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για 20 λεπτά σε 12500 g

Η ανώτερη στοιβάδα (υδατική), αποτελούμενη από μεθανόλη και νερό, μεταφέρεται σε νέο errendorf με τη βοήθεια σύριγγας ενώ η κατώτερη στοιβάδα (οργανική) παραμένει ως έχει.

Η παραπάνω πορεία εφαρμόζεται και για δεύτερη φορά μόνο στην οργανική φάση ώστε να παραλειφθούν τυχόν υπολείμματα υδατοδιαλυτών ουσιών. Το δεύτερο κλάσμα υδατικής φάσης κατόπιν ενώνεται με το πρώτο.

- Και τα δυο κλάσματα, υδατικό και οργανικό, υφίστανται ξήρανση σε ρεύμα αέριου αζώτου για την απομάκρυνση του διαλύτη.
- Αποθήκευση στους -80°C .

3. Προετοιμασία εκχυλισμάτων για φασματοσκοπία NMR

Λίγες ώρες πριν τη λήψη των φασμάτων τα εκχυλίσματα αφήνονται να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθεί η παρακάτω προετοιμασία:

- Σε κάθε errendorf υδατικού δείγματος προστίθεται με τη βοήθεια πιπέτας ακριβείας, ποσότητα 630 μL D_2O και 70 μL ρυθμιστικού διαλύματος.
- 550 μL (ώστε να υπάρχει καλή επαναληψιμότητα) από το παραπάνω μείγμα δείγματος- ρυθμιστικού διαλύματος μεταφέρεται με πιπέτα στο ειδικό σωληνάκι του NMR διαμέτρου 5 mm (NMR tubes)
- Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με δημιουργία δίνης (vortex) και λουτρό υπερήχων.

Διαλύματα

➤ Ρυθμιστικό διάλυμα

1,5 M KH_2PO_4 / D_2O , pH 7.4 (με KOH / D_2O)

2 mM NaN_3

0.1 % TSP / D_2O (sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$)-1-propionate, Aldrich 269913)

- 10.2 g KH_2PO_4 διαλυτοποιούνται σε 40 mL D_2O και προστίθεται ποσότητα TSP 50 mg διαλυτοποιημένη σε 4 mL D_2O . Το μίγμα αναμιγνύεται με τη βοήθεια υπερήχων.

- Για τη ρύθμιση του pH στα 7.4 προστίθεται KOH .

- Το διάλυμα συμπληρώνεται με D_2O έως τελικό όγκο 50 mL και προστίθεται 0.0065 g NaN_3 .

Προκειμένου να μην καλυφθεί φασματική πληροφορία από το σήμα του νερού, ως διαλύτης χρησιμοποιείται δευτεριωμένο νερό, D_2O . Το D_2O δεν μετέχει στον συντονισμό του υδρογόνου και δεν παρουσιάζει κορυφή. Όμως λόγω της μη πλήρους δευτερίωσης (99.9 % άτομα D), εμφανίζεται και το σήμα των πρωτονίων του νερού στα 4.8 ppm.

Το TSP είναι το trimethylsilyl propanoic acid και χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο σε φάσματα NMR για υδατικούς διαλύτες.

4. Λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$

Τα πειράματα NMR πραγματοποιούνται σε φασματοσκόπιο Bruker Avance III 600 MHz (Karlsruhe, Germany), εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60). Για το σύνολο των μετρήσεων χρησιμοποιείται ανιχνευτής αντίστροφης ανίχνευσης (5 mm) με z-gradients στους 300 K (27° C). Όλα τα δείγματα αφήνονται για 300 s έπειτα από την εισαγωγή τους στο μαγνήτη ώστε να ισορροπήσουν στην προ-ρυθμισμένη θερμοκρασία των 300 K. Η διαδικασία του κλειδώματος, του tuning και matching, καθώς και του shimming πραγματοποιούνται μέσω της ICONNMR suite (TOPSPIN 1.2 version, Bruker BioSpin GmbH), με βάση προκαθορισμένες τιμές shim που βελτιστοποιούνται για το πρώτο δείγμα ούρων που χρησιμοποιήθηκε. Φάσματα 1D $^1\text{H-NMR}$ λαμβάνονται με την εφαρμογή παλμικής αλληλουχίας

1D NOESY (noesygppr1D), η οποία συμπεριλαμβάνεται στη βιβλιοθήκη του οργάνου, με κορεσμό της κορυφής του νερού (water presaturation) (25 Hz) κατά τη διάρκεια της αποδιέγερσης και του χρόνου μίξης για τον κορεσμό του νερού. Ένας παραγοντικός συντελεστής βαρύτητας συσχετισμένος με διεύρυνση των φασματικών γραμμών (line broadening) 0.3 Hz εφαρμόζεται σε όλα τα ληφθέντα Σήματα Εξασθένησης Ελεύθερης Επαγωγής (Free Induction Decay) πριν από το μετασχηματισμό Fourier. Η πλήρως αυτοματοποιημένη επεξεργασία των φασμάτων εμπεριέχει την τοποθέτηση του ^1H μορίου αναφοράς TSP στα 0.0 ppm και τη διόρθωση της γραμμής βάσης και της φάσης.

3.14.2. Στατιστική Επεξεργασία Πειραματικών Δεδομένων NMR

Η στατιστική επεξεργασία των φασματικών δεδομένων της φασματοσκοπίας NMR έγινε με πολυμεταβλητή (multivariate, MV) και μονομεταβλητή (univariate) ανάλυση. Για τη στατιστική ανάλυση φασματικών δεδομένων απαιτείται η μαθηματική προεπεξεργασία τους, η οποία περιλαμβάνει τη μετατροπή τους σε αριθμητικά δεδομένα και τη μείωση του όγκου πληροφορίας. Λόγω της υψηλής ανάλυσης της φασματοσκοπίας NMR (High Resolution-NMR) είναι σκόπιμο να μειωθεί ο όγκος των δεδομένων προκειμένου να είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμα, χωρίς όμως να αλλοιώνεται ούτε και να μειώνεται η πληροφορία (data reduction). Η μείωση του όγκου των δεδομένων επιτυγχάνεται με τον χωρισμό των φασμάτων σε φασματικές περιοχές με εύρος που καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά των υπό μελέτη βιολογικών δειγμάτων-φάσματα. Η μείωση της ανάλυσης των φασματικών δεδομένων NMR και η μετατροπή σε αριθμητικά έγινε με το λογισμικό AMIX Statistics v.3.9.14 (Analysis of MIXtures, Bruker BioSpin). Κάθε φάσμα μίας διάστασης (ανάλυσης 64 k σημείων) χωρίζεται σε περιοχές φασματικού εύρους 0.02 ppm (750 περιοχές για ένα φάσμα εύρους 15 ppm). Κάθε φασματική περιοχή αντιστοιχίζεται στην τιμή του ολοκληρώματος των κορυφών συντονισμού που περιλαμβάνονται σε αυτή, με αποτέλεσμα το πλήθος 64 k μεταβλητών να μειώνεται σε 750. Φασματικές περιοχές που δεν περιέχουν πληροφορία (περιοχή συντονισμού του διαλύτη) και περιοχές με επιμολύνσεις (σύγκριση με φάσματα δειγμάτων μαρτύρων) εξαιρούνται από το σύνολο των νέων μεταβλητών. Τελευταίο στάδιο της μαθηματικής προεπεξεργασίας των δεδομένων αποτελεί η κανονικοποίηση με την οποία επιτυγχάνεται διόρθωση μικροδιαφορών που πιθανόν να παρατηρούνται στη συγκέντρωση δειγμάτων της ίδιας ομάδας (διαφορετικός

αριθμός κυττάρων). Η κανονικοποίηση έγινε ανά δείγμα-φάσμα με τη διαίρεση της κάθε τιμής με το άθροισμα του συνόλου των τιμών (κανονικοποίηση ως προς την συνολική ένταση, normalization to total intensity). Από τη μαθηματική προεπεξεργασία των δεδομένων προκύπτει ένας πίνακας διαστάσεων $n \times m$, όπου η τιμή n αντιστοιχεί στον αριθμό των δειγμάτων-φασμάτων και η τιμή m αντιστοιχεί στις νέες μεταβλητές, δηλαδή τις τιμές που προκύπτουν από την ολοκλήρωση των κορυφών των επιμέρους τμημάτων στα οποία έχει χωριστεί το κάθε φάσμα [153].

Η πολυμεταβλητή ανάλυση των δεδομένων έγινε με το λογισμικό SIMCA-P+ 11.5 (Umetrics, Sweden) και η μονο-μεταβλητή ανάλυση με το λογισμικό GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) [154].

Η πολυ-μεταβλητή στατιστική ανάλυση των φασματικών δεδομένων έγινε με μη επιβλεπόμενες και με επιβλεπόμενες μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα, με τη μη επιβλεπόμενη μέθοδο προβολής της Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών (Principal Components Analysis-PCA) γίνεται η ανίχνευση της τάσης ομαδοποίησης των δειγμάτων και έλεγχος εκτροπών τιμών χωρίς καμία πληροφορία ταξινόμησης των δειγμάτων [155]. Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται Ανάλυση Διακριτών Μεταβλητών Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis-PLS-DA) η οποία αποτελεί μια επιβλεπόμενη μέθοδο ανάλυσης που χρησιμοποιείται προκειμένου να προσδιοριστούν οι φασματοσκοπικές μεταβλητές που συμβάλλουν στο διαχωρισμό των ομάδων. Τα μοντέλα που δημιουργούνται από την PCA και την PLS-DA παρουσιάζονται ως διαγράμματα αντικειμένων των δειγμάτων σε ένα νέο σύστημα αξόνων που περιγράφουν τις μεταξύ τους διαφορές. Τα μοντέλα που δημιουργούνται αξιολογούν ως προς την περιγραφική ικανότητα (παράγοντας R^2_{cum}) και ως προς την προβλεπτική ικανότητα (παράγοντας Q^2_{cum}) [156].

Η επικύρωση των μοντέλων που προκύπτουν από την επιβλεπόμενη ανάλυση πραγματοποιείται με την τεχνική των τυχαίων μεταθέσεων (permutation) χρησιμοποιώντας ικανοποιητικό αριθμό μεταθέσεων (100 μεταθέσεις). Οι μεταβλητές-μεταβολίτες με τιμή VIP (variable influence on projection) > 1.5 είναι αυτές που συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των ομάδων [156].

Η μονομεταβλητή ανάλυση πραγματοποιείται για κάθε μεταβολίτη ξεχωριστά για τον έλεγχο στατιστικά σημαντικής μεταβολής του μεταξύ των διαφορετικών ομάδων εργασίας με τη μέθοδο της Ανάλυσης Διασποράς ή Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) με το λογισμικό GraphPad. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μορφή θηκογράμματος στο οποίο

διακρίνονται η διάμεσος, τα τεταρτημόρια και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος, η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή και οι ακραίες τιμές της μεταβλητής-μεταβολίτη [157].

Ως βιοδείκτες χαρακτηρίζονται οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των ομάδων βάσει της πολυμεταβλητής ανάλυσης και παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μεταβολή σύμφωνα με την μονομεταβλητή ανάλυση [128].

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

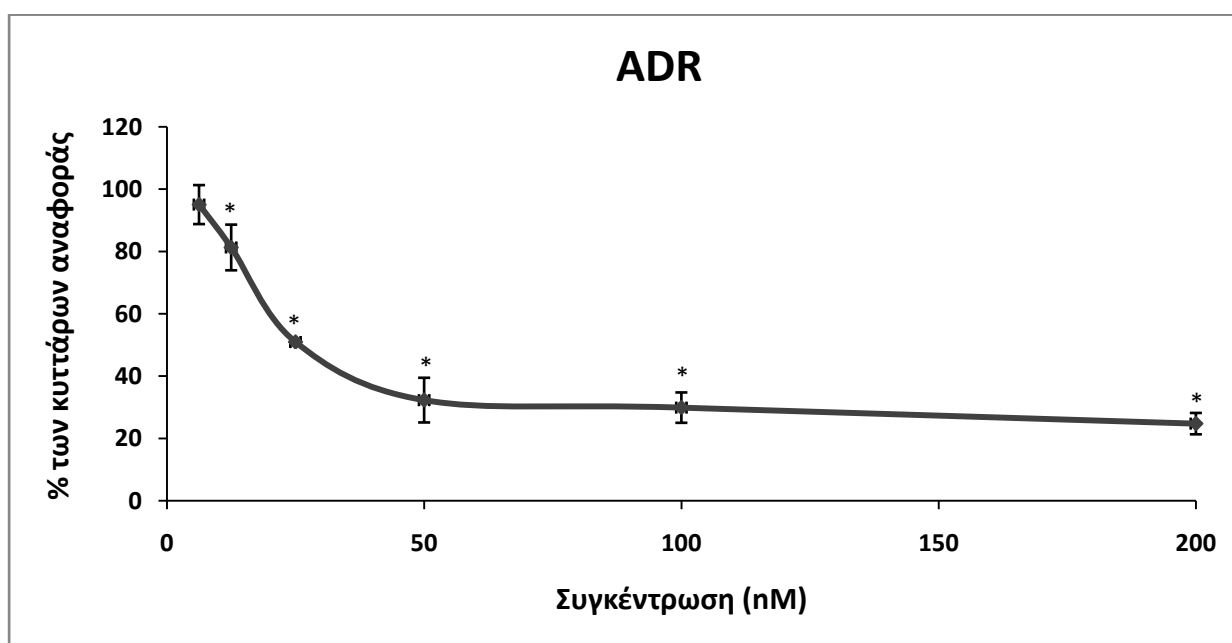
4.1. Αποτελέσματα αναστολής πολλαπλασιασμού

Με τη μέθοδο MTT διερευνάται η επίδραση της αδριαμικίνης, του εκχυλίσματος SEE, των σιλιμπινών, της σιλυκριστίνης, του GGE καθώς και της συγχορήγησης του χημειοθεραπευτικού με κάθε ένα φυσικό προϊόν, επί των κυττάρων της καρκινικής σειράς PC-3.

4.1.1. Αδριαμικίνη

Με τη μέθοδο MTT προσδιορίζεται η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3 μετά από επίδραση υδατικού διαλύματος αδριαμικίνης στις συγκεντρώσεις των 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 nM. Παρατηρείται μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά 87 %, 75 %, 75 %, 58 %, 26 % και 15 % αντίστοιχα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Στο διάγραμμα δίνεται η τυπική απόκλιση (standard deviation error bars) από 3 τουλάχιστον επαναλήψεις του πειράματος (Εικ.23).

Να σημειωθεί ότι μεταξύ συγκεντρώσεων 50 nM και 100 nM δεν παρατηρείται διαφορά στην ανασταλτική δράση της αδριαμικίνης. Παράλληλα, σε συγκέντρωση 20 - 25 nM της ADR παρατηρείται 50 % αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (IC_{50}).

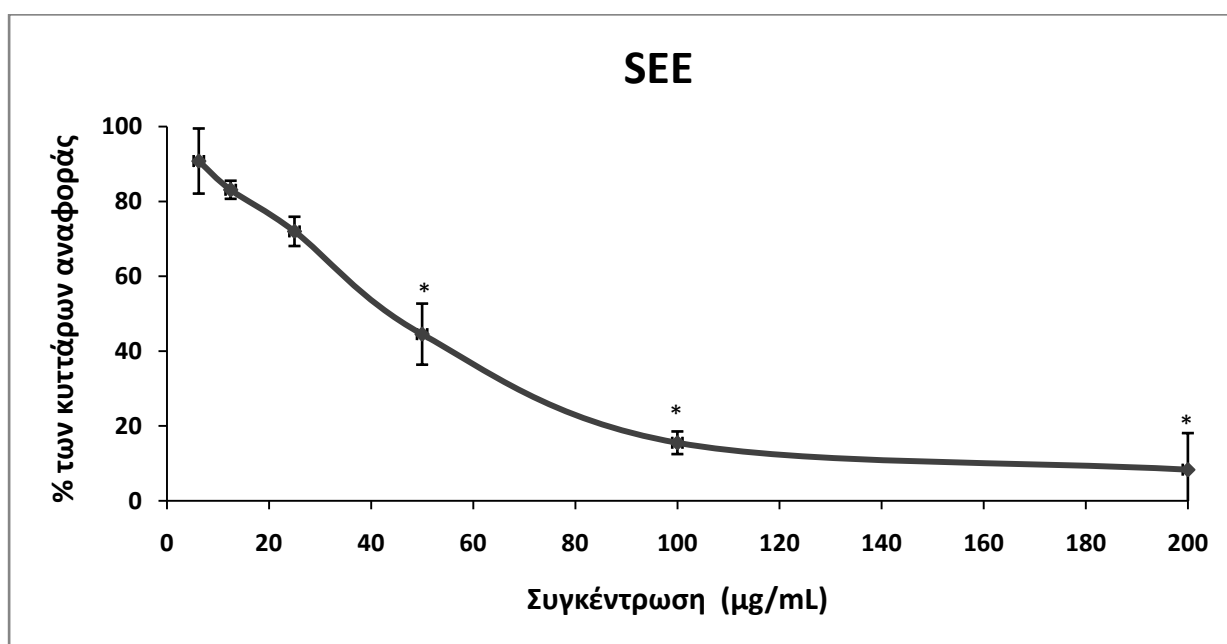


Εικόνα 23: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με ADR (3-100 nM) για 96 ώρες. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς χωρίς επίδραση (100%).

4.1.2. Εκχύλισμα SEE

Με τη μέθοδο MTT προσδιορίζεται η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3 μετά από επίδραση διαλύματος SEE στις συγκεντρώσεις των 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Στις συγκεντρώσεις αυτές, παρατηρείται δόσο-εξαρτώμενη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά 91,5 %, 81 %, 53 %, 37 %, 16 %, 2 % αντίστοιχα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικ.24).

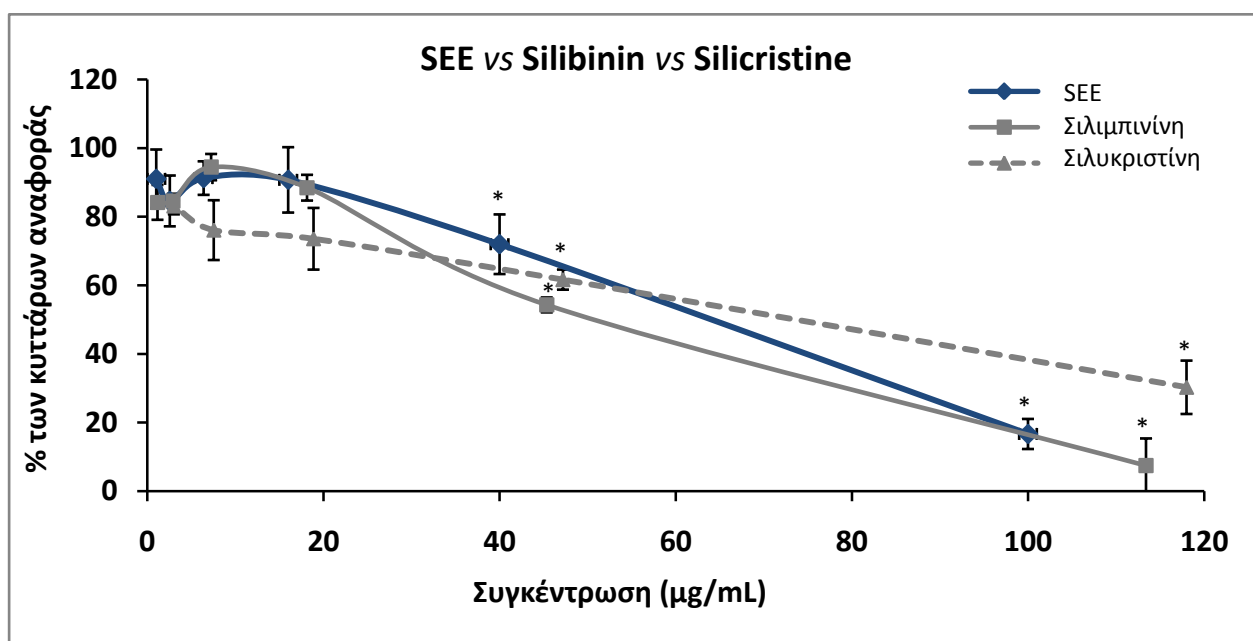
Μεταξύ των συγκεντρώσεων 6.25 έως και 100 $\mu\text{g/mL}$ SEE παρατηρούνται ανασταλτικά αποτελέσματα. Δόση μεγαλύτερη των 100 $\mu\text{g/mL}$ προκαλεί αναστολή αλλά είναι τοξική για τα κύτταρα. Σε συγκέντρωση 50 ± 0.9 $\mu\text{g/mL}$ SEE παρατηρείται 50 % αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (IC_{50}), οπότε επιλέγεται αυτή η συγκέντρωση για τη συνέχιση των πειραμάτων.



Εικόνα 24: Δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με το εκχύλισμα SEE (6.25-200 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς χωρίς επίδραση (100%).

4.1.3. Εκχύλισμα SEE – Σιλιμπινίνη - Σιλυκριστίνη

Προκειμένου να βρεθεί η δραστική ουσία του εκχυλίσματος SEE, προσδιορίζεται η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3 μετά από επίδραση με σιλιμπινίνη (Silibin: Silibin A και Silibin B) ή με σιλυκριστίνη (Silychristine) στις συγκεντρώσεις των 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Στις συγκεντρώσεις αυτές, παρατηρείται δόσο-εξαρτώμενη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων τόσο μετά την επίδραση με τη σιλιμπινίνη όσο και με σιλυκριστίνη. Για την σιλιμπινίνη η τιμή IC_{50} προσδιορίζεται στα $51.7 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$ ενώ για την σιλυκριστίνη στα $100 \pm 4.7 \mu\text{g/mL}$. Επιπλέον, η σιλιμπινίνη ακολουθεί παρόμοιο πρότυπο αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με το εκχύλισμα SEE, υποδηλώνοντας ότι η δραστική ουσία του εκχυλίσματος SEE είναι η σιλιμπινίνη (Εικ.25).



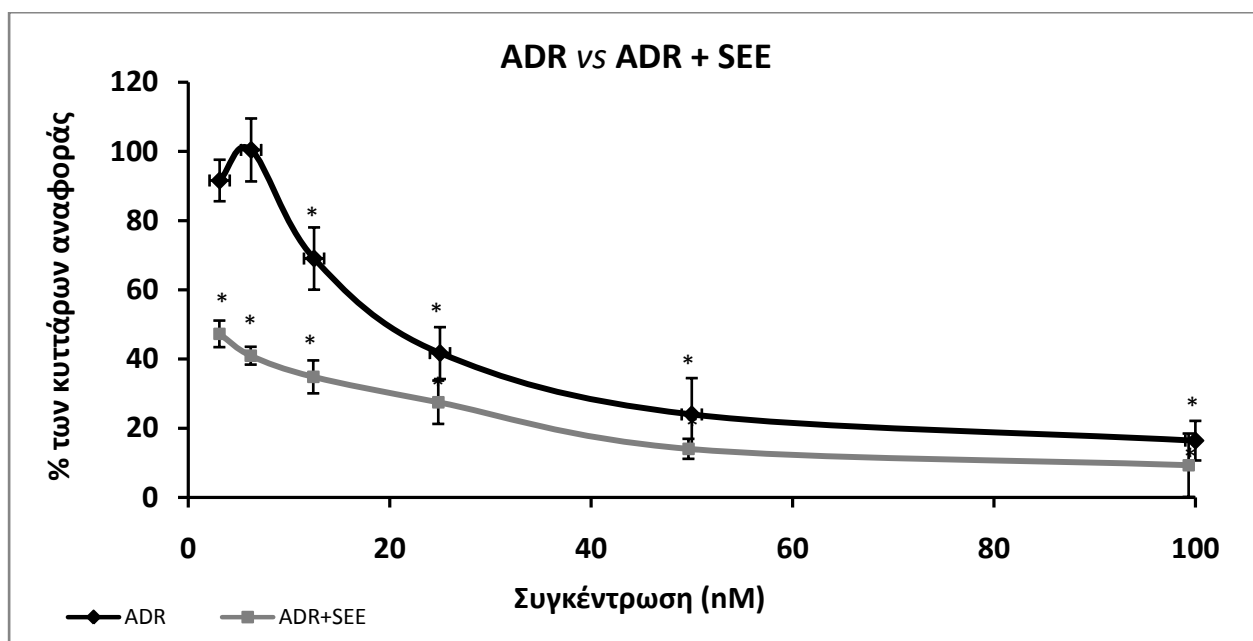
Εικόνα 25: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με Σιλιμπινίνη (6.25-100 $\mu\text{g/mL}$) ή Σιλυκριστίνη (6.25-100 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες, και σύγκρισή τους με το εκχύλισμα SEE (3-100 $\mu\text{g/mL}$). $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς χωρίς επίδραση (100%).

4.1.4. Συγχορήγηση Αδριαμυκίνης - SEE

Πραγματοποιείται συγχορήγηση με σταθερή δόση εκχυλίσματος SEE 50 $\mu\text{g/mL}$ σε συνδυασμό με μειούμενες συγκεντρώσεις αδριαμυκίνης στα 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM αντίστοιχα. Παρατηρείται μείωση στο ποσοστό των ζωντανών κυττάρων κατά 91 %, 86 %, 73 %, 65 %, 60 % και 53% αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικ.26).

Από τις συγκεντρώσεις 3.125 nM έως 25 nM αδριαμυκίνης, η συγχορήγηση με SEE, ενισχύει σημαντικά την κυτταροστατική/κυτταροτοξική δράση της. Σημαντική είναι η μείωση στο ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στη συγκέντρωση των 12.5 nM αδριαμυκίνης, καθώς η μονοχορήγηση αδριαμυκίνης σε αυτή τη συγκέντρωση μειώνει το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων κατά 30 %, ενώ η συγχορήγηση της με SEE μειώνει το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων κατά 65 %.

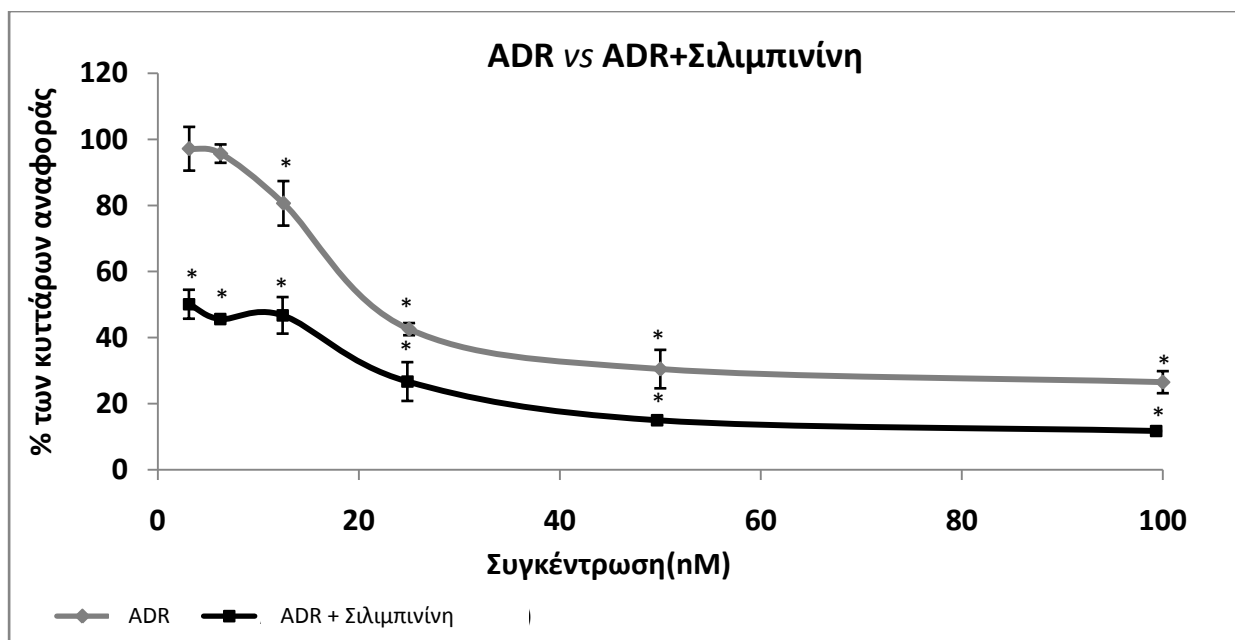
Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός, ότι ακόμη και σε πολύ μικρές δόσεις αδριαμυκίνης, πολύ κάτω των 12.5 nM, η συγχορήγηση με SEE 50 $\mu\text{g/mL}$ προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού σε ποσοστά 53 - 60 %. Έτσι, η συγχορήγηση ADR+SEE μειώνει σημαντικά την τιμή IC_{50} της Αδριαμυκίνης, από IC_{50} ADR = 20 - 25 nM σε IC_{50} ADR+SEE < 3 nM.



Εικόνα 26: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με ADR (3-100 nM) και συγχορήγηση με SEE (50 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς χωρίς επίδραση (100%).

4.1.5. Συγχορήγηση Αδριαμυκίνης - Σιλιμπινίνης

Πραγματοποιείται συγχορήγηση με σταθερή δόση σιλιμπινίνης (silibinin) 50 $\mu\text{g/mL}$ σε συνδυασμό με μειούμενες συγκεντρώσεις αδριαμυκίνης στα 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM αντίστοιχα. Παρατηρείται μείωση στο ποσοστό των ζωντανών κυττάρων κατά 88 %, 85 %, 73 %, 53 %, 55 % και 50 % αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικ.27). Η συγχορήγηση ADR+σιλιμπινίνη παρουσιάζει ενισχυμένη κυτταροστατική/κυτταροτοξική δράση σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR, καθώς μειώνεται σημαντικά η τιμή IC_{50} , από IC_{50} ADR = 20 - 25 nM σε IC_{50} ADR+σιλιμπινίνη = 3.1 ± 0.2 nM. Παράλληλα, η συγχορήγηση ADR+σιλιμπινίνη παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο αναστολής πολλαπλασιασμού με την συγχορήγηση ADR+SEE, ενισχύοντας την εκτίμηση ότι η δραστική ουσία του εκχυλίσματος SEE είναι η σιλιμπινίνη.



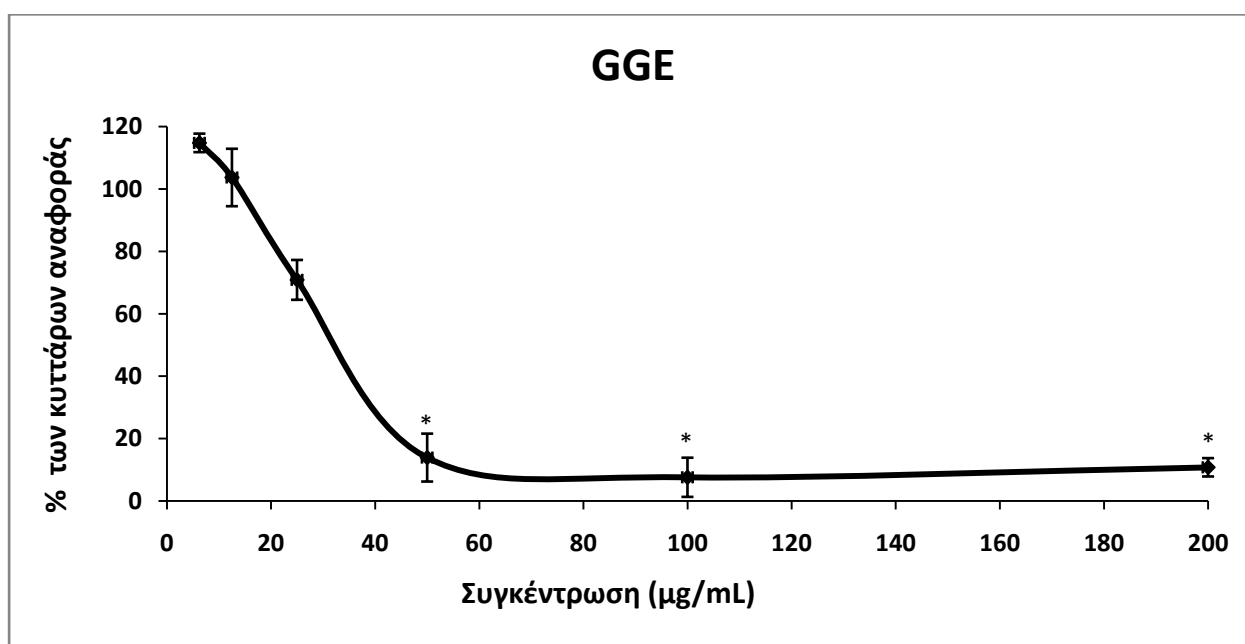
Εικόνα 27: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με ADR (3-100 nM) και συγχορήγηση με Silibinin (50 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς χωρίς επίδραση (100%).

4.1.6. Εμπλουτισμένο κλάσμα GGE

Με τη μέθοδο MTT προσδιορίζεται η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3 μετά από επίδραση του GGE στις συγκεντρώσεις των 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Στις συγκεντρώσεις από 200 έως 25 $\mu\text{g/mL}$, παρατηρείται μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά 85 %, 90 %, 83 %, 21 % αντίστοιχα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις 12.5 $\mu\text{g/mL}$ έως 3.125 $\mu\text{g/mL}$ προκαλούν αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά 27 %, 32 % και 34 % αντίστοιχα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικ.28).

Η μέγιστη αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων παρατηρείται στα 100 $\mu\text{g/mL}$ ενώ από τα 50 $\mu\text{g/mL}$ στα 25 $\mu\text{g/mL}$ παρατηρείται απότομη μείωση στην κυτταροστατική δράση της ουσίας.

Καθώς το 50 % των κυττάρων πεθαίνει στα 35 ± 2 $\mu\text{g/mL}$ του κλάσματος GGE, επιλέγεται αυτή η συγκέντρωση για τη συνέχιση των πειραμάτων.

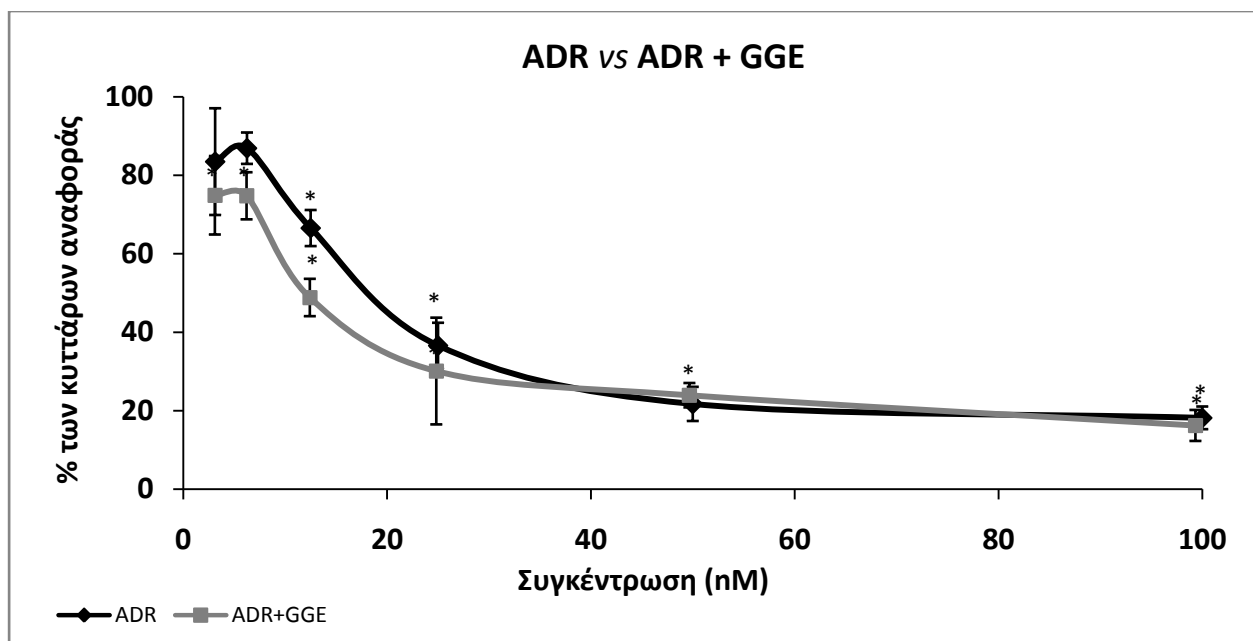


Εικόνα 28: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με το GGE (6.25-200 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς χωρίς επίδραση (100%).

4.1.7. Συγχορήγηση Αδριαμικίνης - GGE

Πραγματοποιείται συγχορήγηση με σταθερή δόση GGE 35 $\mu\text{g/mL}$ σε συνδυασμό με μειούμενες συγκεντρώσεις αδριαμικίνης στα 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM αντίστοιχα. Παρατηρείται μείωση στο ποσοστό των ζωντανών κυττάρων κατά 84 %, 76 %, 70 %, 52 %, 26 % και 25 % αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικ.29).

Η συγχορήγηση ADR+GGE ενισχύει τη δραστικότητα της ADR σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η μονοχορήγηση αδριαμικίνης στις συγκεντρώσεις 25 nM και 12.5 nM μειώνει το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων κατά 63 % και 33 % αντίστοιχα, ενώ η συγχορήγηση της με το εκχύλισμα GGE μειώνει το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων κατά 70 % και 52 % αντίστοιχα. Στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις της αδριαμικίνης, η συγχορήγηση με GGE δεν φαίνεται να ενισχύει την δραστικότητά της.



Εικόνα 29: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των PC-3 κυττάρων μετά από επίδραση με ADR (3-100 nM) και συγχορήγηση του εμπλουτισμένου κλάσματος GGE (35 $\mu\text{g/mL}$) για 96 ώρες. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς χωρίς επίδραση (100%).

4.2. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής-Κυτταρικός κύκλος

4.2.1. Αδριαμυκίνη - Εκχύλισμα SEE

Η μελέτη των φάσεων του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται μετά από επώαση των κυττάρων με α) ADR (25 nM), β) SEE (50 µg/mL) και γ) ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για 24 h, 48 h και 72 h, αντίστοιχα.

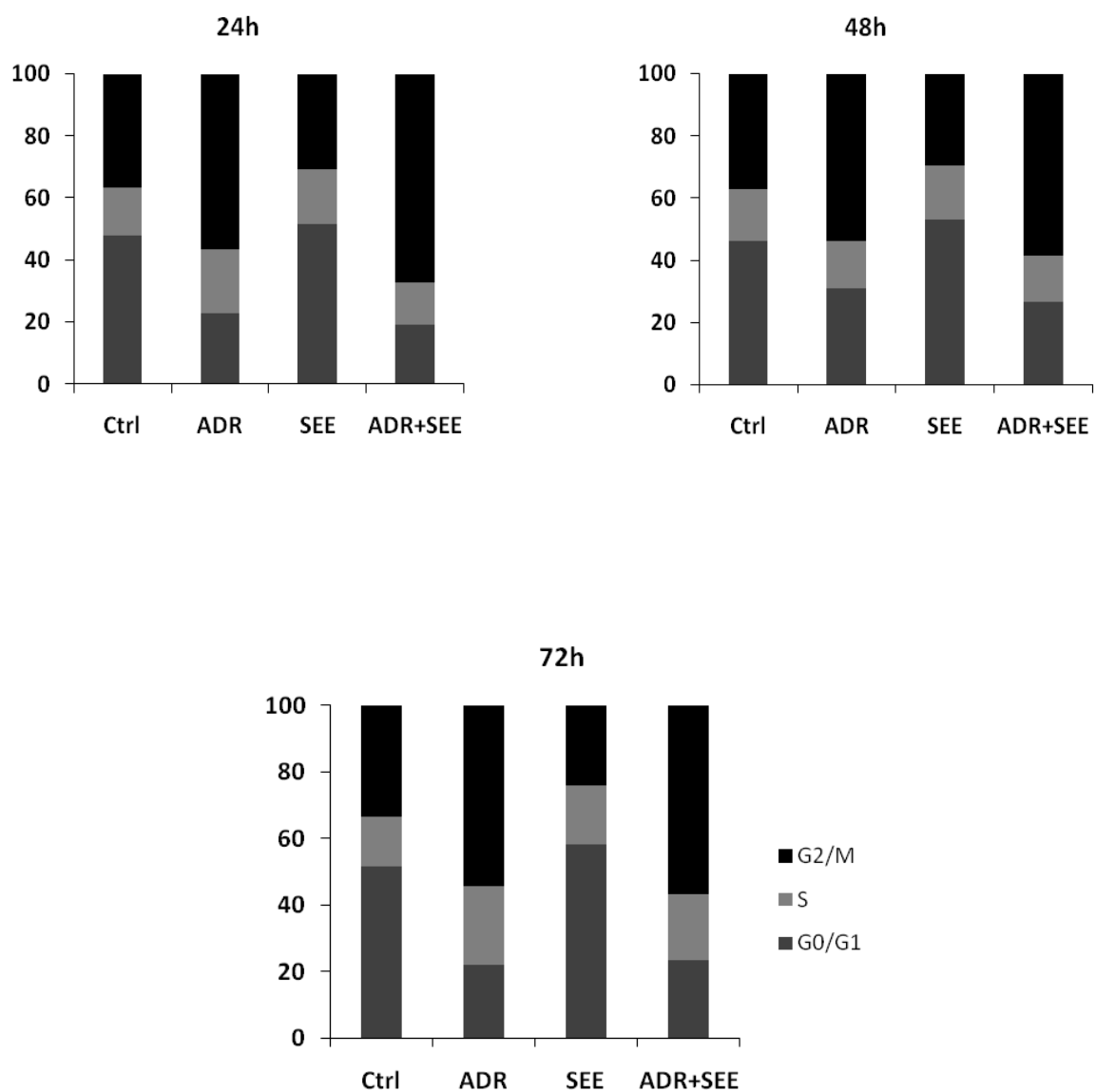
Τα ποσοστά (%) των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα αναφοράς προσδιορίζονται σε: G0/G1=48.3 ± 4.3 S=15.3 ± 1.2 G2/M=36.5 ± 5 στις 24 h.

Η επίδραση με ADR προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M από τις πρώτες 24 h, με το φαινόμενο να διατηρείται σταθερό μέχρι και τις 72 h (G0/G1=26.4 ± 1.5 S=21.2 ± 3.6 και G2/M=52.5 ± 2.2). Η επίδραση με SEE προκαλεί μια μικρή αύξηση στο ποσοστό της G0/G1 με ταυτόχρονη μείωση της φάσης G2/M μετά από τις 48 h και 72 h, ενώ η συγχωρήγηση ADR+SEE ακολουθεί το πρότυπο της ADR προκαλώντας αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M (Εικ.30α, β).

Επίδραση	Χρόνος	Μέσο G0/G1	T.A	Μέσο S	T.A	Μέσο G2/M	T.A
ctrl	24h	48,3	4,3	15,3	1,2	36,5	5,5
ADR	24h	26,4	1,5	21,2	3,6	52,5	2,2
SEE	24h	52,0	4,1	14,7	0,3	33,3	4,4
ADR + SEE	24h	19,0	5,4	16,6	2,1	64,5	3,4
ctrl	48h	49,4	3,4	15,4	1,3	35,3	2,1
ADR	48h	33,7	10,5	15,0	5,3	51,4	5,2
SEE	48h	54,5	0,5	16,9	0,1	28,7	0,4
ADR + SEE	48h	20,0	5,7	21,9	4,2	58,2	1,6
ctrl	72h	51,6	2,6	15,8	0,1	32,7	2,7
ADR	72h	19,6	2,1	21,1	5,4	59,4	7,4
SEE	72h	60,6	7,8	16,4	0,2	23,1	7,6
ADR + SEE	72h	30,8	2,2	21,1	6,7	46,7	6,6

Εικόνα 30: α) Ποσοστά των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες γ) 72 ώρες, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς

T.A= Τυπική Απόκλιση



Εικόνα 30: β) Αντιπροσωπευτικά γραφήματα του ποσοστού των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες γ) 72 ώρες, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς

4.2.2. Αδριαμυκίνη - GGE

Η μελέτη των φάσεων του κυτταρικού κύκλου γίνεται μετά από επώαση των κυττάρων με α) ADR (25 nM), β) GGE (35 µg/mL) και γ) ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) για 24 h, 48 h και 72 h, αντίστοιχα.

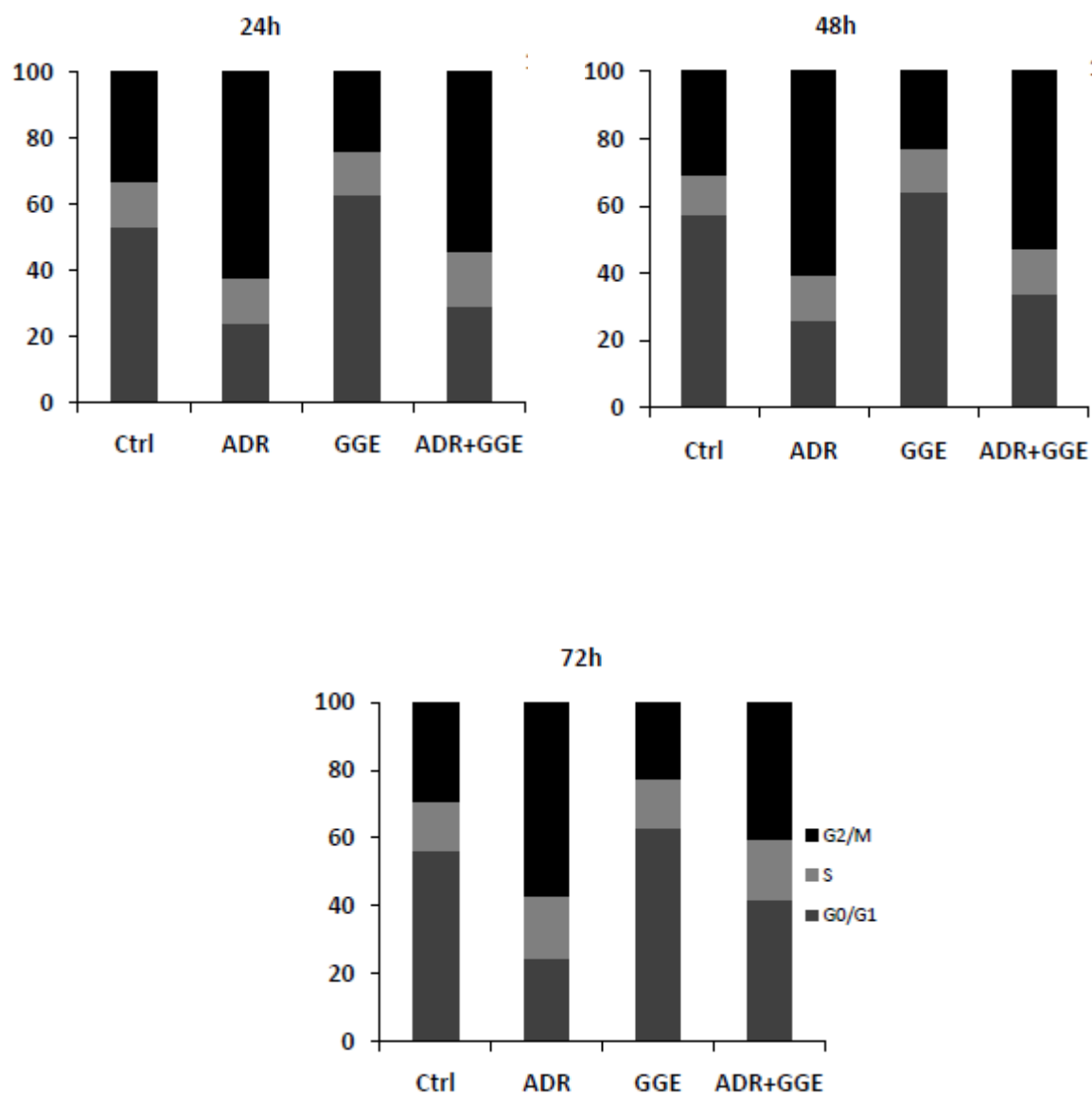
Τα ποσοστά (%) των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα αναφοράς προσδιορίζονται σε: $G0/G1=53.5 \pm 5.7$ $S=13.5 \pm 3$ $G2/M=33.1 \pm 2.7$ στις 24 h.

Η επίδραση με ADR προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M από τις πρώτες 24 h, με το φαινόμενο να διατηρείται σταθερό μέχρι τις 72 h ($G0/G1=23.8 \pm 2.8$ $S=13.8 \pm 3.3$ και $G2/M=62.5 \pm 6.2$ στις 24 h). Η επίδραση με GGE προκαλεί μια μικρή αύξηση στο ποσοστό της φάσης G0/G1 με ταυτόχρονη στατιστικά σημαντική μείωση της φάσης G2/M από τις πρώτες 24 h, τάση η οποία διατηρείται και μετά τις 48 h και 72 h χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Η συγχορήγηση ADR+GGE προκαλεί αναστολή του κύκλου στη φάση G2/M στις πρώτες 24 h, πιο ήπια όμως σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR, ενώ το φαινόμενο δείχνει να υποχωρεί με την παρέλευση του χρόνου (48 h, 72 h) (Εικ.31α, β).

Επίδραση	Χρόνος	Μέσο G0/G1	T.A	Μέσο S	T.A	Μέσο G2/M	T.A
Ctrl	24h	53,5	5,7	13,5	3,0	33,1	2,7
ADR	24h	23,8	2,8	13,8	3,3	62,5	6,2
GGE	24h	62,9	1,8	13,2	1,5	24,0	0,4
ADR+GGE	24h	29,5	0,7	16,3	0,4	54,2	1,1
Ctrl	48h	57,6	2,1	11,8	1,6	30,7	3,7
ADR	48h	26,3	8,6	13,3	5,2	60,5	13,8
GGE	48h	64,3	4,5	12,7	0,1	23,1	4,5
ADR+GGE	48h	34,1	2,4	13,1	1,1	52,9	1,3
Ctrl	72h	56,5	4,5	14,4	0,8	29,1	3,7
ADR	72h	24,7	3,0	18,3	3,9	57,1	0,9
GGE	72h	63,0	5,9	14,8	0,7	22,3	5,2
ADR+GGE	72h	41,9	2,0	17,6	1,0	40,5	3,0

Εικόνα 31: α) Ποσοστά των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες και γ) 72 ώρες, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς.

T.A = Τυπική Απόκλιση



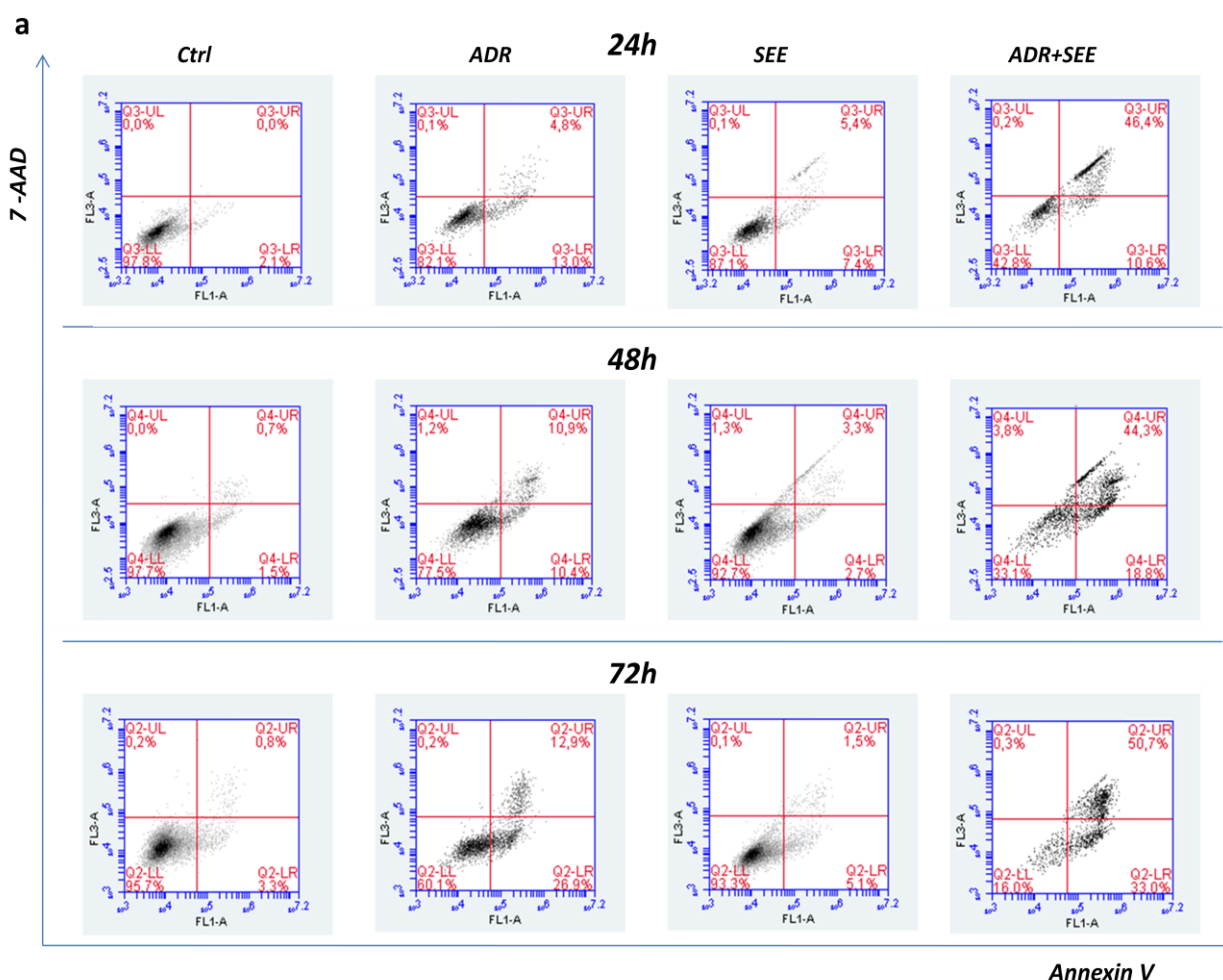
Εικόνα 31: β) Αντιπροσωπευτικά γραφήματα του ποσοστού των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες και γ) 72 ώρες, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς.

4.3. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής-Απόπτωση

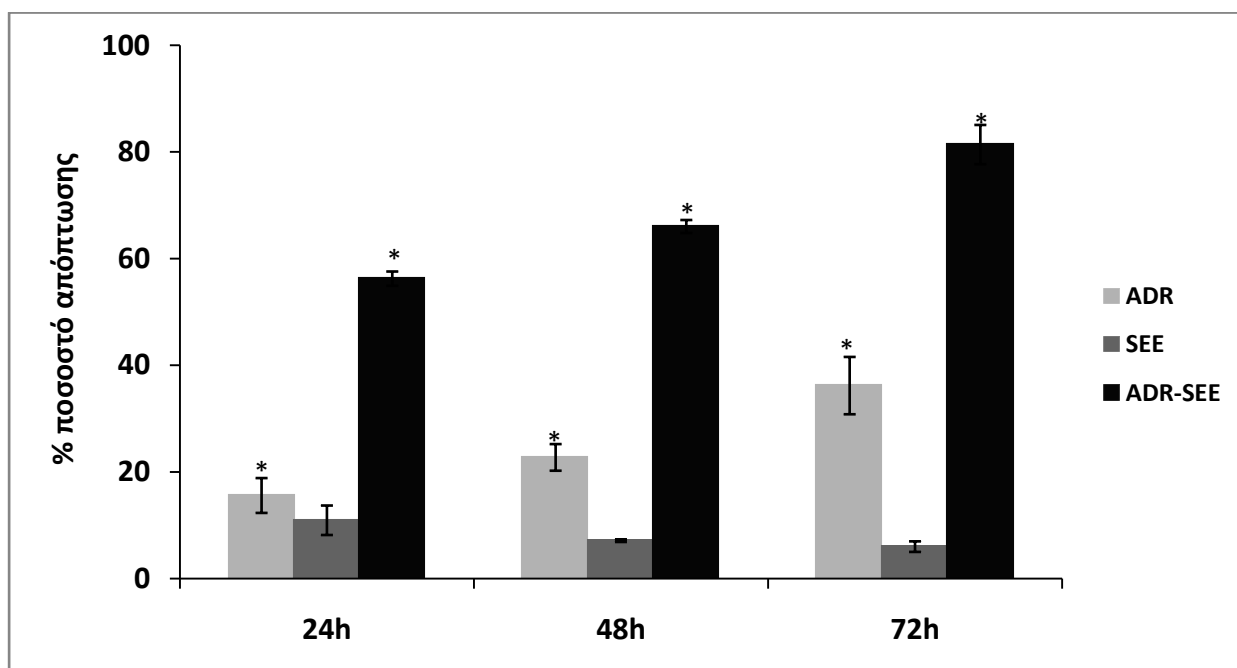
4.3.1. Αδριαμυκίνη - Εκχύλισμα SEE

Η μελέτη της απόπτωσης έγινε μετά από επώαση των PC-3 κυττάρων με α) ADR (25 nM), β) SEE (50 µg/mL) και γ) ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για 24 h, 48 h και 72 h, αντίστοιχα.

Η ADR επάγει με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο την απόπτωση των PC-3 κυττάρων (17.9 %, 22.5 %, 40 % μετά από 24 h, 48 h και 72 h, αντίστοιχα). Αντίθετα, το εκχύλισμα SEE δεν επάγει την απόπτωση των κυττάρων ενώ η συγχρόνηση ADR+SEE όχι μόνο επάγει την απόπτωση αλλά την ενισχύει σημαντικά σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR. Έτσι, τα ποσοστά της απόπτωσης μετά από 24 h, 48 h και 72 h συγχρόνησης ADR+SEE διαμορφώνονται σε 57.2 %, 66.9 % και 84 %, αντίστοιχα με μια χαρακτηριστική έξαρση του φαινομένου κυρίως μετά τις 48 h (Εικ.32, 33). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε όλες οι επόμενες επωάσεις με τους παραπάνω παράγοντες να πραγματοποιούνται για 48 h.



Εικόνα 32: Τα ποσοστά απόπτωσης και νέκρωσης εκτιμήθηκαν στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες γ) 72 ώρες.



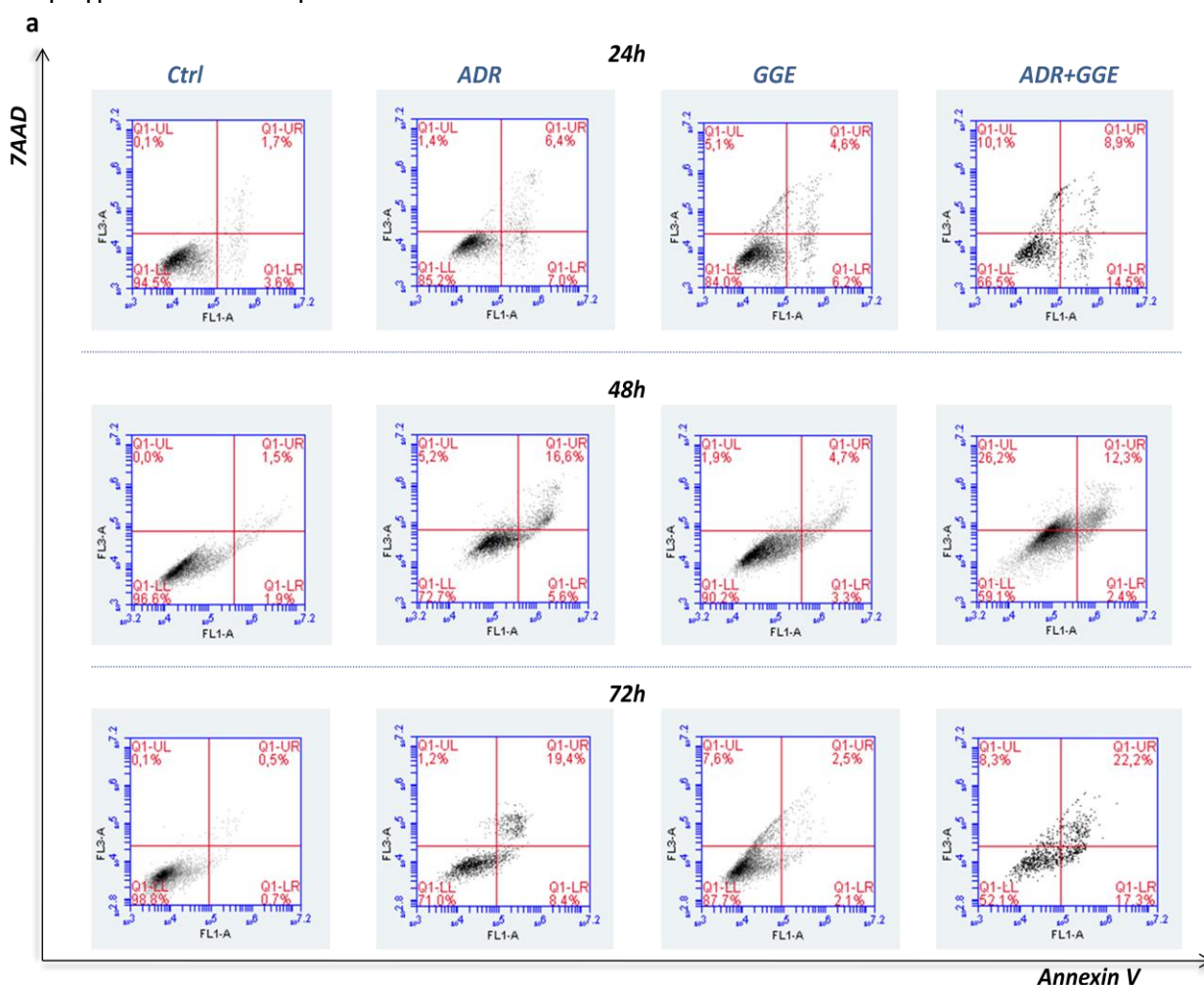
Εικόνα 33: Γράφημα του ποσοστού της συνολικής απόπτωσης σε σχέση με το χρόνο. ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL). $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς.

Οι επιδράσεις με ADR και ADR+SEE δεν προκάλεσαν επαγωγή της νέκρωσης. Το εκχύλισμα Σιλυμαρίνης επάγει μικρά ποσοστά νέκρωσης 1.2 %, 1.3 % και 3.8 % μετά από 24, 48 και 72 ώρες, αντίστοιχα.

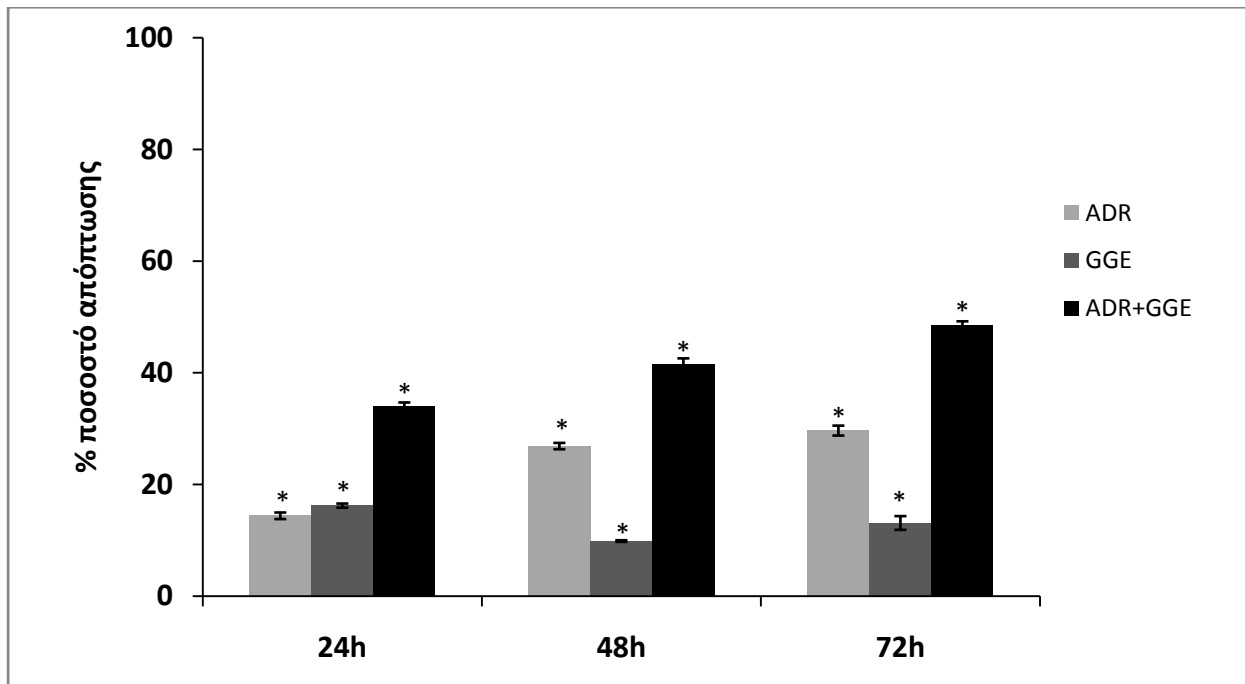
4.3.2. Αδριαμυκίνη - GGE

Η μελέτη της απόπτωσης έγινε μετά από επώαση των PC-3 κυττάρων με α) ADR (25 nM), β) GGE (35 µg/mL) και γ) ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) για 24 h, 48 h και 72 h, αντίστοιχα.

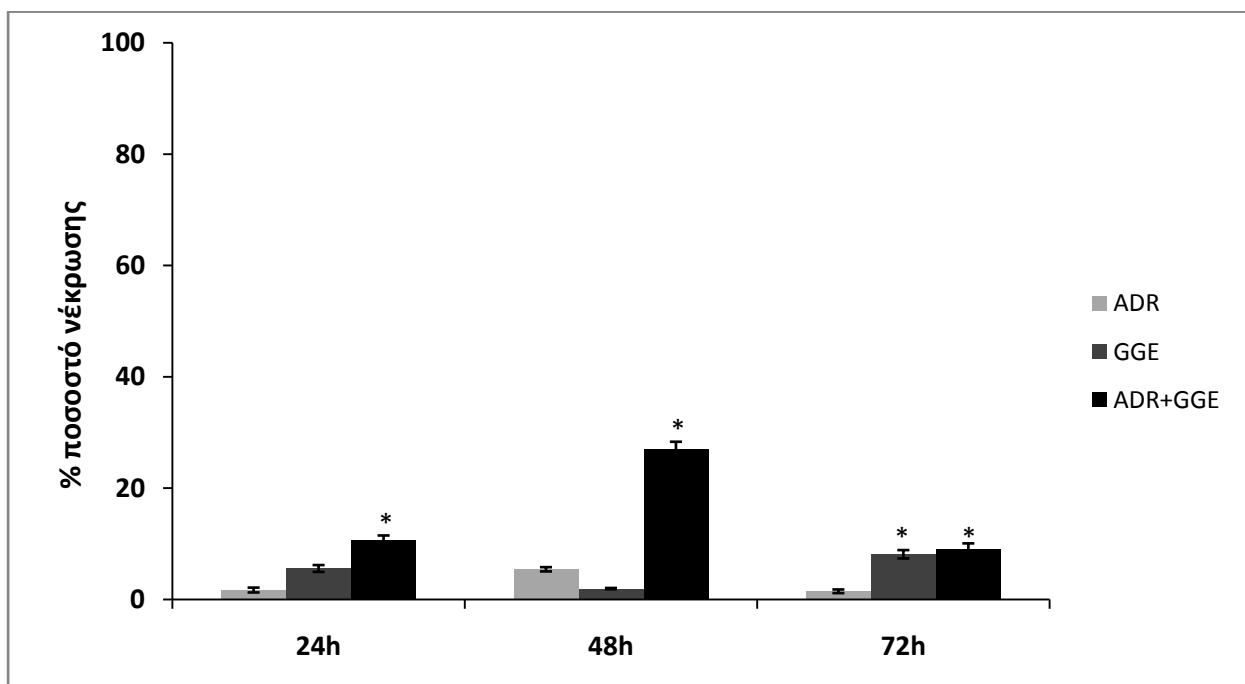
Η ADR επάγει με χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο την απόπτωση των PC-3 κυττάρων (14.83 %, 27 % και 29 % μετά από 24 h, 48 h και 72 h, αντίστοιχα). Το GGE παρουσιάζει ένα σχετικά σταθερό, σε σχέση με το χρόνο, ποσοστό στην επαγωγή της απόπτωσης που κυμαίνεται από 9.79 % έως 15.98 %. Η συγχορήγηση ADR+GGE ενισχύει σημαντικά την απόπτωση σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR (33.51 %, 40.86 % και 47.88 % μετά από 24 h, 48 h και 72 h αντίστοιχα). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η συγχορήγηση ADR+GGE επάγει και νέκρωση των κυττάρων με το υψηλότερο ποσοστό να παρουσιάζεται μετά από τις 48 h (Εικ.34, 35α, β). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε όλες οι επόμενες επώσεις με τους παραπάνω παράγοντες να πραγματοποιούνται για 48 h.



Εικόνα 34: Τα ποσοστά απόπτωσης και νέκρωσης εκτιμήθηκαν στα PC-3 κύτταρα μετά από έκθεση τους σε ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) για α) 24 ώρες β) 48 ώρες γ) 72 ώρες.



Εικόνα 35: α) Γράφημα του ποσοστού της συνολικής απόπτωσης σε σχέση με το χρόνο. ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL), $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς.

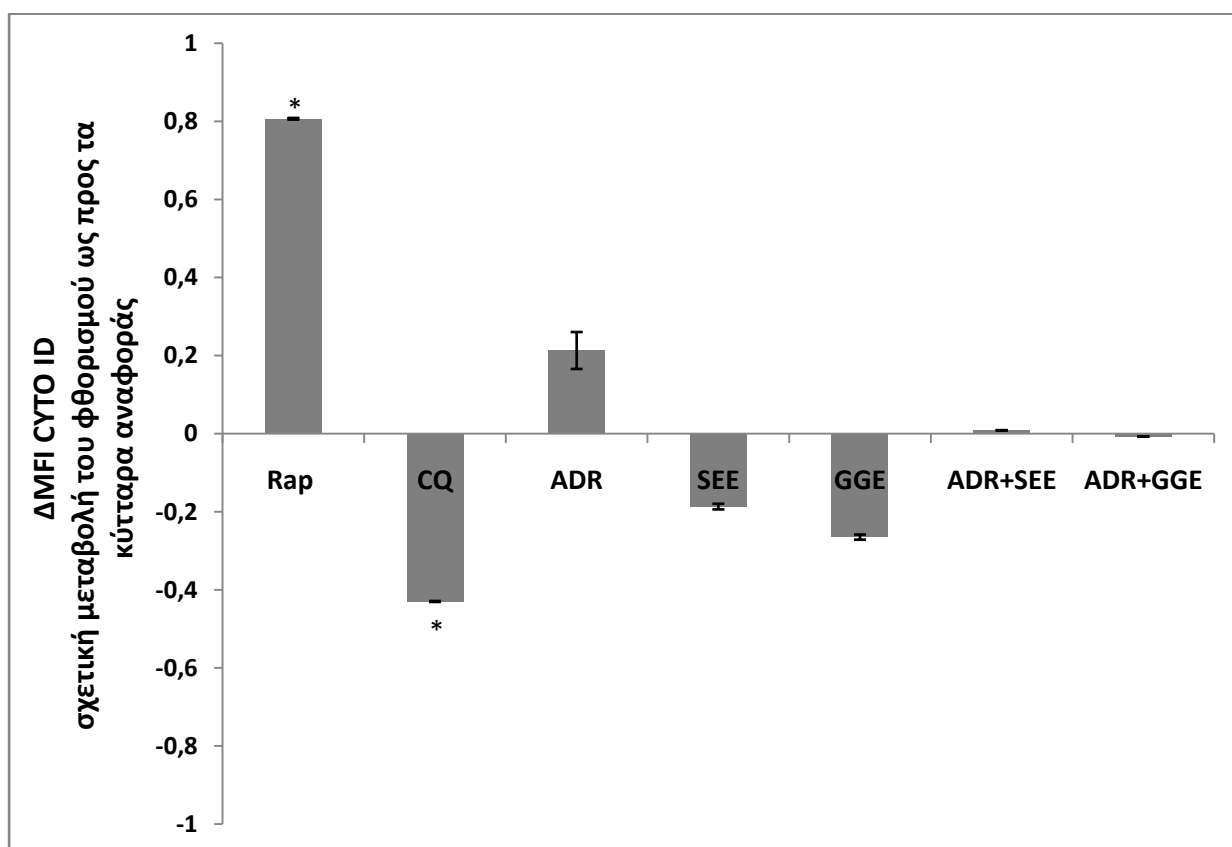


Εικόνα 35: β) Γράφημα του ποσοστού της νέκρωσης σε σχέση με το χρόνο. ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL), $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς.

4.4. Κυτταρομετρία ροής - Ποσοτικοποίηση αυτοφαγικών δομών

Η σχετική ποσοτικοποίηση αυτοφαγικών δομών μέσω κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως θετικό μάρτυρα την ραπαμυκίνη (Rap) (επαγωγέας αυτοφαγίας) με τιμή φθορισμού $\Delta\text{MFI} = 0.8 \pm 0.02$, και ως αρνητικό μάρτυρα την χλωροκίνη (CQ) (αναστολέας της σύντηξης των αυτοφαγοσωμάτων με το λυσόσωμα) με τιμή φθορισμού $\Delta\text{MFI} = -0.42 \pm 0.01$.

Η επίδραση με ADR ενισχύει το σήμα φθορισμού της χρωστικής CYTO-ID ($\Delta\text{MFI} = 0.21 \pm 0.04$), αποτέλεσμα ενδεικτικό επαγωγής της αυτοφαγίας. Αντίθετα, η επίδραση με το εκχύλισμα SEE ή το GGE δίνει αρνητικές τιμές φθορισμού ($\Delta\text{MFI} = -0.19 \pm 0.007$ και -0.26 ± 0.006 , αντίστοιχα), οι οποίες είναι ενδεικτικές της αναστολής της αυτοφαγίας. Οι συγχορηγήσεις ADR+SEE και ADR+GGE οδηγούν σε παρόμοια τιμή φθορισμού με τα κύτταρα αναφοράς ($\Delta\text{MFI} = 0.009$ και -0.007 αντίστοιχα) (Εικ.36).



Εικόνα 36: Αντιπροσωπευτικό γράφημα των τιμών $\Delta\text{MFI Cyto-ID}$ των PC-3 κυττάρων μετά από επώαση τους με ραπαμυκίνη (Rap) 100 nM, χλωροκίνη (CQ) 10 μM , ADR 25 nM, SEE 50 $\mu\text{g/mL}$, GGE 35 $\mu\text{g/mL}$, ADR+SEE και ADR+GGE. $\Delta\text{MFI Cyto-ID} = \text{MFI Cyto-ID (με επίδραση)} - \text{MFI Cyto-ID (κύτταρα αναφοράς)}$. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς.

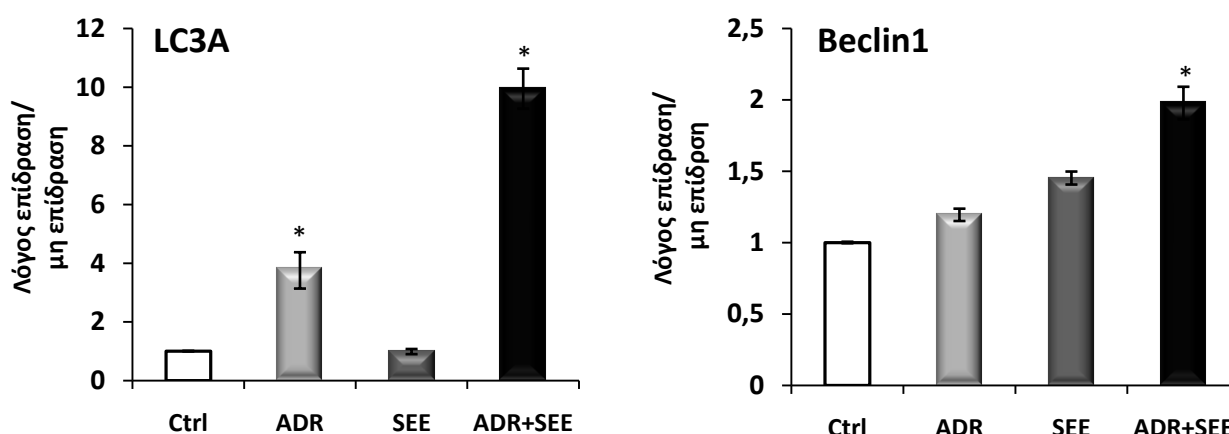
4.5. Έκφραση των γονιδίων που σηματοδοτούν την έναρξη της αυτοφαγίας

Ως γονίδιο αναφοράς για την σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των mRNA των γονιδίων δεικτών έναρξης της αυτοφαγίας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ΑΤΡάσης. Τα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων δεικτών της αυτοφαγίας μεταβλήθηκαν μετά από τις διάφορες επιδράσεις σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης της ΑΤΡάσης.

4.5.1. Αδριαμυκίνη - Εκχύλισμα SEE

Η έκφραση του mRNA του γονιδίου LC3A αυξάνεται μετά από την επίδραση της ADR (4 φορές). Παρόλο που η επίδραση με το εκχύλισμα SEE δεν επηρεάζει την έκφραση του LC3A mRNA, η συγχορήγηση ADR+SEE επάγει μια σημαντική αύξηση της έκφρασης του (10 φορές) (Εικ.37α).

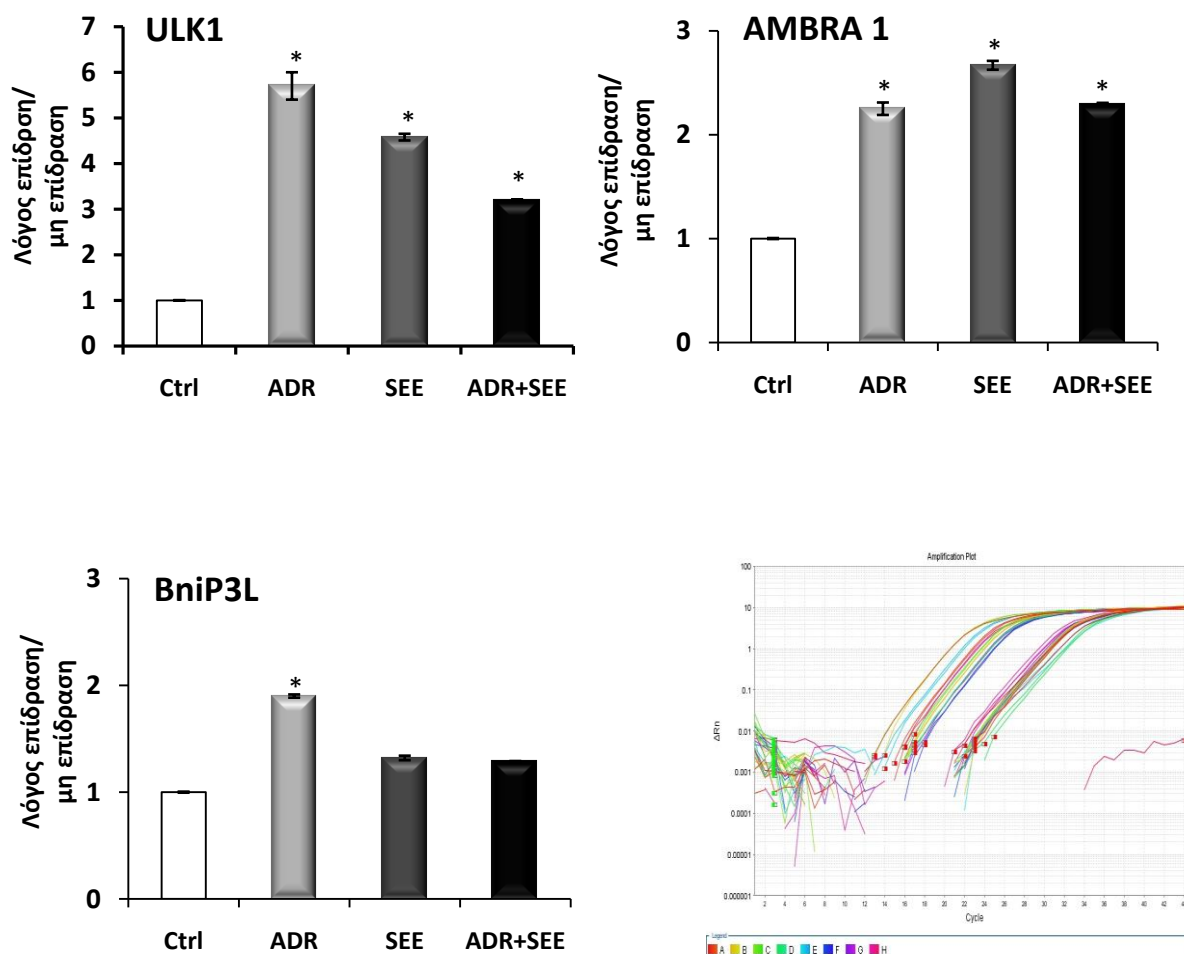
Τα επίπεδα έκφρασης του Beclin1 mRNA αυξάνονται ελαφρώς μετά από τις μονοχορήγήσεις με ADR ή SEE (1.2 φορές και 1.5 φορές, αντίστοιχα), ενώ η συγχορήγηση με ADR+SEE οδηγεί σε διπλάσια έκφραση του Beclin1 mRNA (2 φορές) (Εικ.37α).



Εικόνα 37: α) Ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων LC3A και Beclin1 μετά από έκθεση των κυττάρων σε ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για 48 ώρες. $p < 0.05$ ως προς τα κύτταρα αναφοράς.

Η έκφραση των ULK1 και AMBRA1 mRNA παρουσιάζει κοινό πρότυπο. Έτσι, η μονοχορήγηση με ADR προκαλεί μια μικρή αύξηση της έκφρασής τους (2 φορές και 1.2 φορές) σε σχέση με την σημαντική αύξηση της έκφρασής του μετά από την μονοχορήγηση με SEE (4.6 φορές και 2.7 φορές) και την συγχορήγηση με ADR+SEE (3.2 φορές και 2.3 φορές). Τέλος, το mRNA του

γονιδίου δείκτη της μιτοφαγίας BNiP3L παρουσιάζει μικρή αύξηση μετά την μονοχορήγηση με SEE (1.32 φορές) και την συγχορήγηση με ADR+SEE (1.28 φορές) (Εικ.37β).



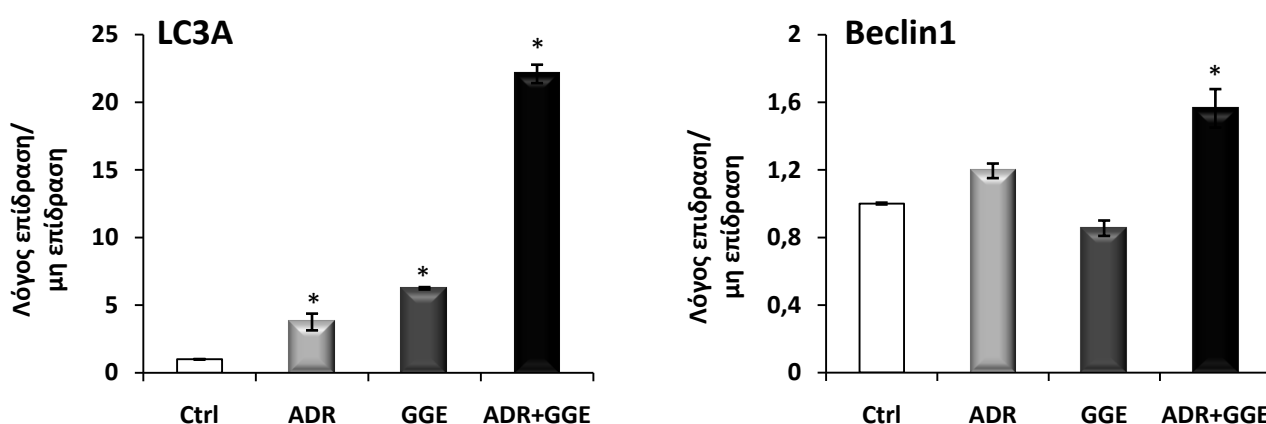
Εικόνα 37: β) Ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων *ULK1*, *AMBRA1* και *BNiP3L* μετά από έκθεση των κυττάρων σε ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) για 48 ώρες. $p < 0.05$.

Επομένως, η μονοχορήγηση με ADR ή SEE επάγει την αυτοφαγία. Παράλληλα, η συγχορήγηση με ADR+SEE ενισχύει την επαγωγή της αυτοφαγίας σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR [158].

4.5.2. Αδριαμυκίνη - GGE

Η έκφραση του LC3A mRNA αυξάνεται μετά από τις δύο μονοχορηγήσεις με ADR ή GGE κατά 3.7 και 6.2 φορές αντίστοιχα, ενώ παράλληλα η συγχορήγηση ADR+GGE οδηγεί σε μεγάλη αύξηση της έκφρασής του κατά 22 φορές (Εικ.38α).

Η έκφραση του Beclin1 mRNA μεταβάλλεται ελαφρώς μετά από τις μονοχορηγήσεις με ADR ή GGE (1.2 και 0.9 φορές, αντίστοιχα) προσομοιάζοντας με τα κύτταρα αναφοράς, ενώ η συγχορήγηση ADR-GGE προκαλεί μια ξεκάθαρη αύξηση της έκφρασής του (1.6 φορές) (Εικ.38α).

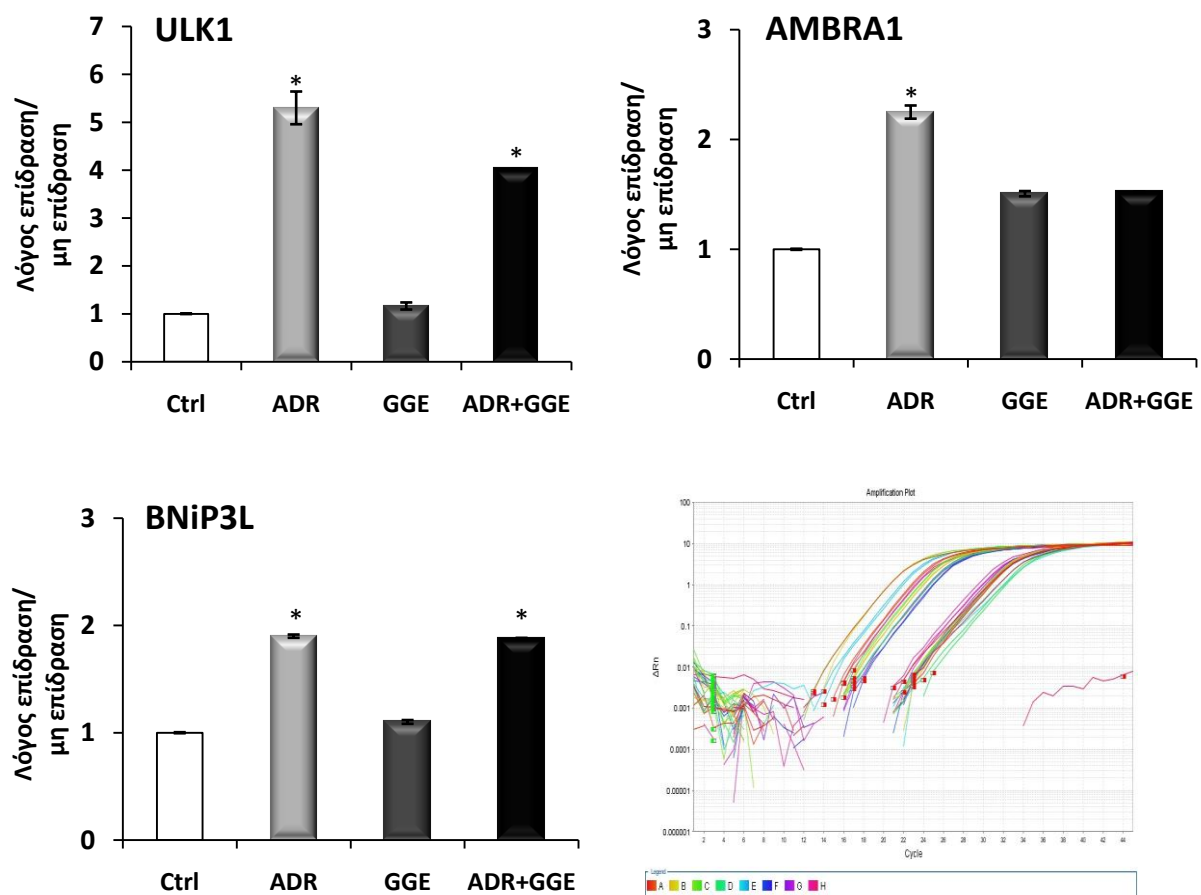


Εικόνα 38: α) Ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων LC3A και Beclin1 μετά από έκθεση των κυττάρων σε ADR (25 nM), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL) για 48 ώρες. $p < 0.05$

Το ULK1 mRNA παρουσιάζει σημαντική αύξηση μετά από την επίδραση με ADR (9 φορές) ή την συγχορήγηση ADR+GGE (4 φορές), χωρίς όμως να επηρεάζεται από την μονοχορήγηση με GGE (1.1 φορές) (Εικ.38β).

Το AMBRA1 mRNA ενισχύεται σημαντικά με την επίδραση της ADR (3.4 φορές), ενώ οι επιδράσεις με GGE ή ADR+GGE αυξάνουν με παρόμοιο και σαφώς λιγότερο ισχυρό τρόπο την έκφραση του (1.5 φορές). Τέλος, η έκφραση του mRNA του BNiP3L ενισχύεται σημαντικά μετά την επίδραση με ADR (2.4 φορές) και ADR+GGE (1.9 φορές), ενώ παραμένει σχεδόν αμετάβλητη μετά από την μονοχορήγηση με GGE (1.1 φορές) (Εικ.38β).

Συμπεραίνουμε, ότι η μονοχορήγηση με ADR ή GGE επάγει την αυτοφαγία. Ενδεχομένως η επαγωγή της αυτοφαγίας από το GGE να μην πραγματοποιείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού ULK1-AMBRA1. Παράλληλα, η συγχορήγηση με ADR+GGE ενισχύει την επαγωγή της αυτοφαγίας σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR.



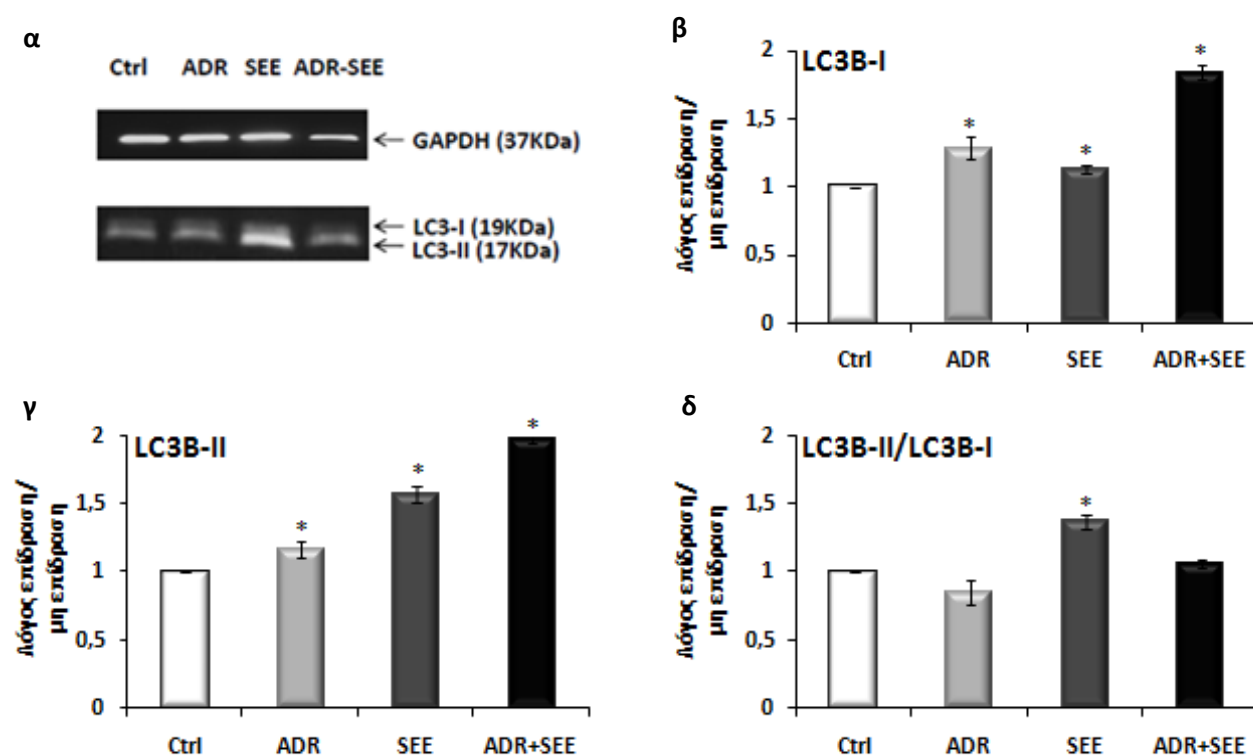
Εικόνα 38: β) Ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων *ULK1*, *AMBRA1* και *BNIP3L* μετά από έκθεση των κυττάρων σε ADR (25 nM), GGE (35 μg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 μg/mL) για 48 ώρες. $p < 0.05$

4.6. Έκφραση των πρωτεϊνών LC3B-I και LC3B-II

Η μη συζευγμένη (LC3B-I) και η συζευγμένη μορφή (LC3B-II) της πρωτεΐνης LC3B διαχωρίστηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης ως δύο διακριτές ζώνες, όπως φαίνεται στις εικόνα 39α. Για την ισόποση φόρτωση των δειγμάτων όσο και για την επακόλουθη ποσοτικοποίηση της έκφρασης των δύο μορφών της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH (Εικ.39α). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης LC3B-II είναι ενδεικτική επαγωγής της αυτοφαγίας ενώ η αύξηση του λόγου LC3B-II/LC3B-I αποτελεί δείκτη της σύντηξης του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα. Αντίθετα, η αύξηση των επιπέδων και των δύο μορφών της πρωτεΐνης LC3B συνήθως συνεπάγεται κάποια εμπλοκή στην διαδικασία ωρίμανσης και λύσης του αυτοφαγοσώματος [159, 160].

4.6.1. Αδριαμυκίνη - Εκχύλισμα SEE

Η επίδραση με ADR οδηγεί σε μικρή αύξηση της πρωτεΐνης LC3B-II, ενώ η επίδραση με SEE αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα LC3B-II.



Εικόνα 39: α) Ανοσοαποτύπωση κατά Western, της έκφρασης της μη-συζευγμένης (LC3B-I) και της συζευγμένης (LC3B-II) μορφής της πρωτεΐνης LC3B στα κύτταρα PC-3. Η μεταβολή στην έκφραση των μορφών LC3B-I (β) και LC3B-II (γ) καθώς και ο λόγος and LC3B-II/LC3B-I (δ) υπολογίστηκαν σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL). $p < 0.05$

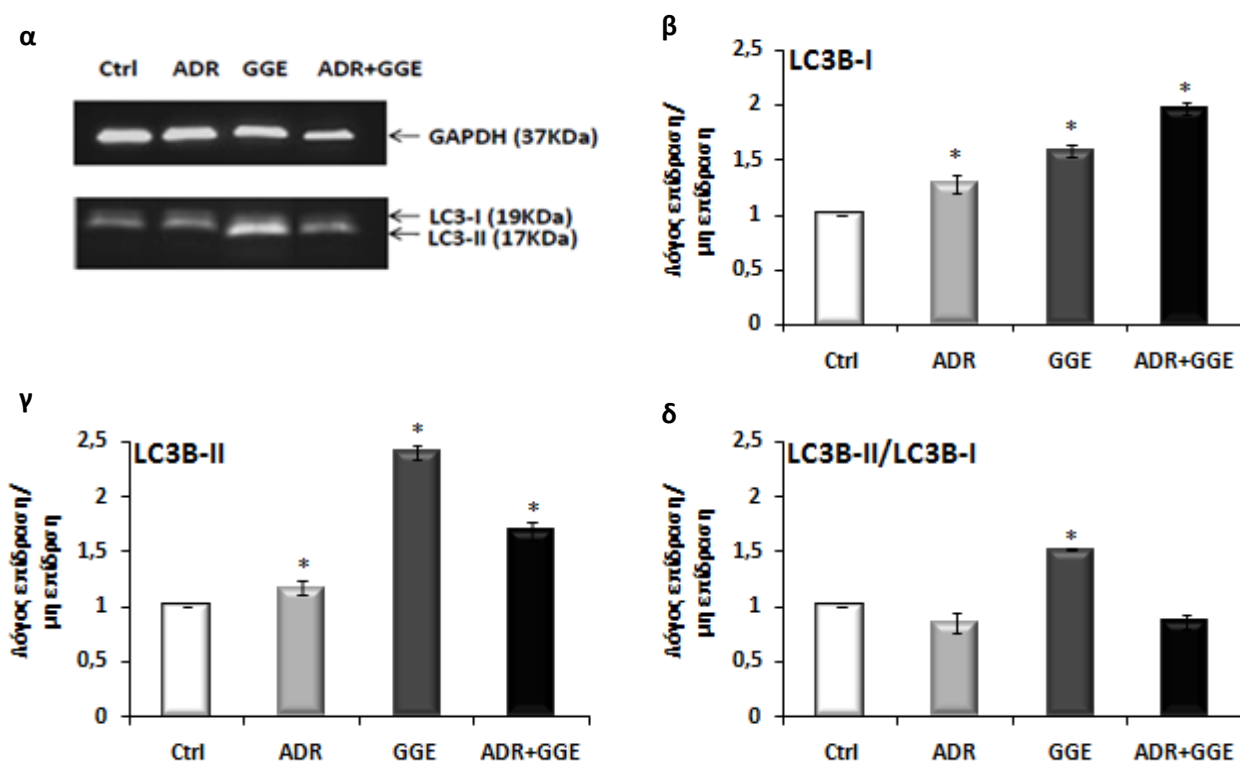
Ακόμα πιο στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα της LC3B-II (1.9 φορές) παρατηρείται μετά από την συγχορήγηση ADR+SEE, η οποία όμως συνοδεύεται και με σημαντική αύξηση της πρωτεΐνης LC3B-I (1.8 φορές) (Εικ.38γ).

Ο λόγος LC3B-II/LC3B-I παρουσιάζει αύξηση μετά την επίδραση με SEE (1.33 φορές) ενώ παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο με τα κύτταρα αναφοράς μετά την επίδραση με την ADR (0.9 φορές) και την συγχορήγηση με ADR+SEE (1.08 φορές) (Εικ.38δ).

Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε πως οι επιδράσεις με SEE και ADR+SEE ενισχύουν το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων σε σχέση με την μονοχορήγηση με την ADR.

4.6.2. Αδριαμυκίνη - GGE

Τα επίπεδα έκφρασης της ισομορφής LC3B-II παρουσιάζουν πολύ μικρή αύξηση μετά από την επίδραση με ADR (1.2 φορές). Η επίδραση με GGE και η συγχορήγηση ADR+GGE ενισχύουν τόσο την έκφραση της LC3B-II πρωτεΐνης κατά 2.3 και 1.7 φορές αντίστοιχα, όσο και της LC3B-I κατά 1.5 και 1.9 φορές αντίστοιχα (Εικ.40γ).



Εικόνα 40: α) Ανοσοαποτύπωση κατά Western, της έκφρασης της μη-συζευγμένης (LC3-I) και της συζευγμένης (LC3-II) μορφής της πρωτεΐνης LC-3 στα κύτταρα PC-3. Τα γραφήματα απεικονίζουν την μεταβολή στην έκφραση των μορφών β) LC3-I και γ) LC3-II (γ) καθώς και τον λόγο δ) LC3-II/LC3-I. ADR (25 nM), GGE (35 μg/mL), ADR (25 nM) + GGE (35 μg/mL). $p < 0.05$

Σημαντική αύξηση του λόγου LC3B-II/LC3B-I παρατηρείται μόνο μετά από την επίδραση με GGE (1.5 φορές), ενώ οι ADR και ADR+GGE παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές με τα κύτταρα αναφοράς (*Εικ.40δ*). Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε πως οι επιδράσεις με GGE και ADR+GGE ενισχύουν το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων σε σχέση με την μονοχορήγηση με την ADR.

4.7. Έκφραση των πρωτεϊνών NBR1 και p62

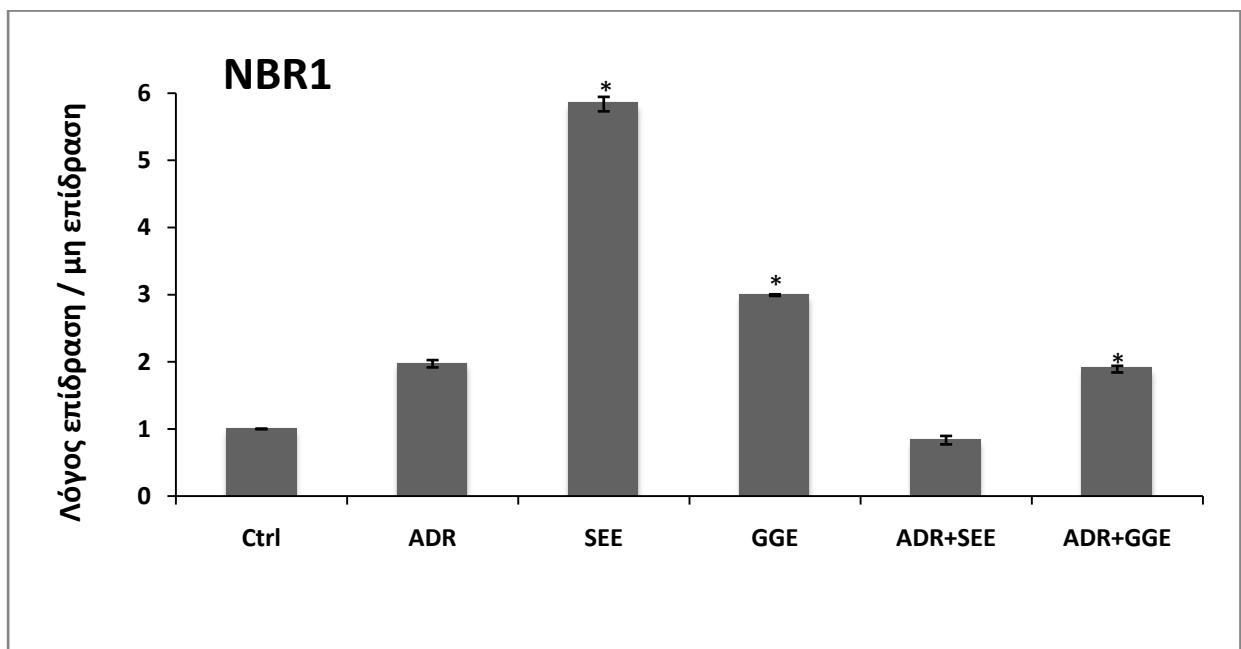
Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των πρωτεϊνών NBR1 και p62 είναι ενδεικτική της σύντηξης του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα. Έτσι, κατά το σχηματισμό του αυτοφαγο-λυσόσωματος και της επερχόμενης λύσης του, παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνών NBR1 και p62 [161].

4.7.1. Αδριαμυκίνη - Εκχύλισμα SEE

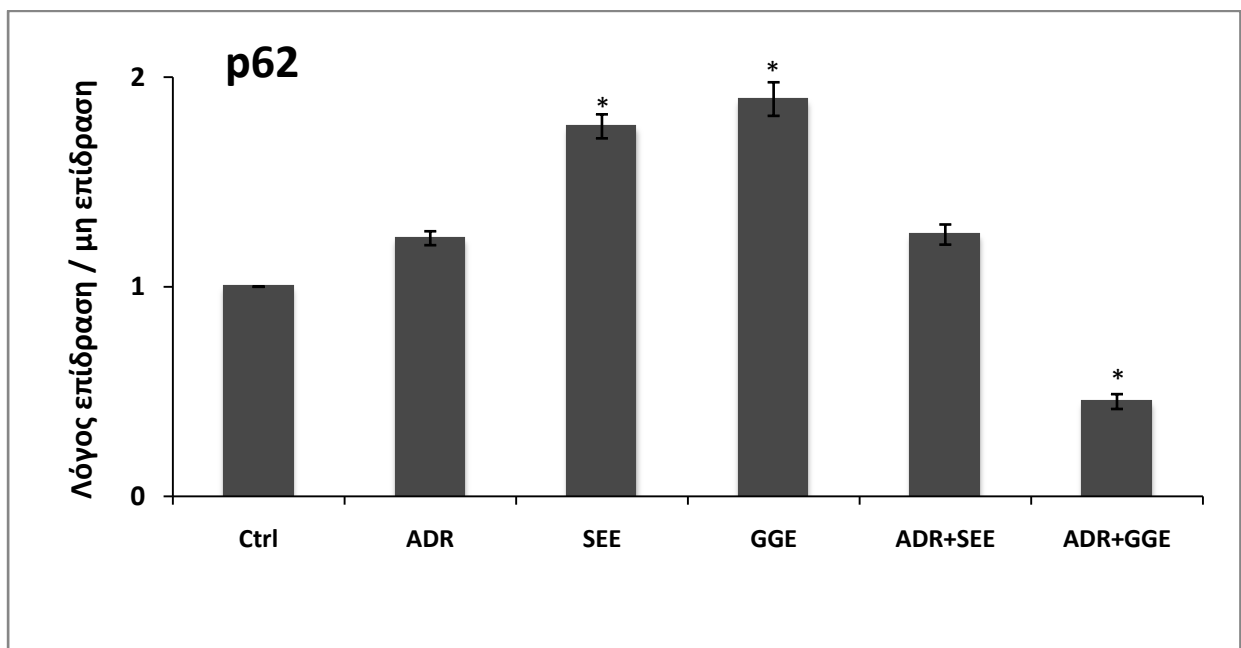
Η έκφραση της NBR1 πρωτεΐνης παρουσιάζει μικρή αύξηση μετά από την επίδραση με ADR (1.9 φορές). Το εκχύλισμα SEE οδηγεί σε μια σημαντική αύξηση της NBR1 πρωτεΐνης (6 φορές) ενώ αντίθετα η συγχορήγηση ADR+SEE παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο με τα κύτταρα αναφοράς (0.9 φορές) (*Εικ.41α*). Η έκφραση της p62 πρωτεΐνης αυξάνεται μόνο μετά από την επίδραση με το εκχύλισμα SEE (1.8 φορές) ενώ οι επιδράσεις με ADR και ADR+SEE οδηγούν σε στατιστικά μη σημαντικές μεταβολές (1.2 και 1.3 φορές αντίστοιχα), προσομοιάζοντας με τα κύτταρα αναφοράς (*Εικ.41β*). Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν πως η χορήγηση με SEE ενδεχομένως επηρεάζει αρνητικά την σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα καθώς και την επερχόμενη λύση του αυτοφαγικού περιεχομένου.

4.7.2. Αδριαμυκίνη - GGE

Η έκφραση της NBR1 πρωτεΐνης αυξάνεται εξίσου τόσο μετά από την επίδραση με ADR καθώς και μετά από τη συγχορήγηση ADR+GGE (1.9 φορές), ενώ η μονοχορήγηση με GGE ενισχύει ακόμα περισσότερο την έκφραση της (3 φορές). (*Εικ.40α*). Η έκφραση της πρωτεΐνης p62 δεν παρουσιάζει αξιόλογη μεταβολή μετά από την δράση της ADR. Αντίθετα, η έκφραση της p62 ενισχύεται σημαντικά με την επίδραση του εκχυλίσματος GGE (1.8 φορές), ενώ η συγχορήγηση ADR+GGE οδηγεί σε σημαντική μείωση της έκφρασης κατά 50 % (*Εικ.40β*), υποδηλώνοντας τον σχηματισμό και τη λύση του αυτοφαγο-λυσόσωματος.



Εικόνα 41: α) Γράφημα της έκφρασης της πρωτεΐνης NBR1 μετά από τις χορηγήσεις με ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL). $p < 0.05$

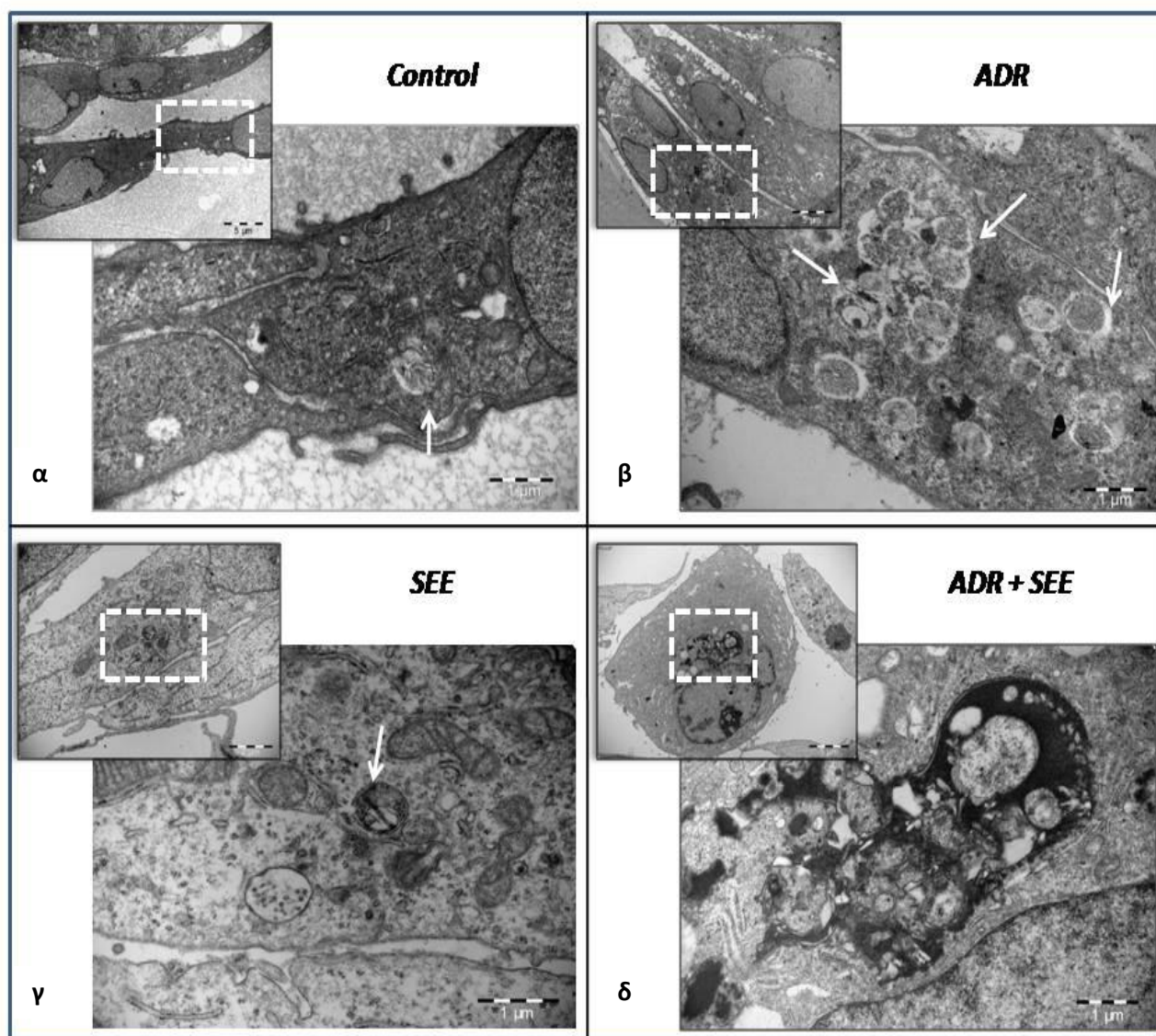


Εικόνα 41: β) Γράφημα της έκφρασης της πρωτεΐνης p62 μετά από τις χορηγήσεις με ADR (25 nM), SEE (50 µg/mL), GGE (35 µg/mL), ADR (25 nM) + SEE (50 µg/mL) και ADR (25 nM) + GGE (35 µg/mL). $p < 0.05$

4.8. Αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

Η TEM αποτελεί τη πιο διαδεδομένη και ευαίσθητη τεχνική για την απεικόνιση της αυτοφαγίας. Τα αυτοφαγοσώματα αποτελούν διπλομεμβρανικά κυστίδια, με τα ανώριμα αυτοφαγοσώματα να έχουν μια οπτική πυκνότητα μικρότερη ή ίση με αυτή του κυτταροπλάσματος ενώ τα ώριμα αυτοφαγολυσosώματα έχουν μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα [162, 163]. Παράλληλα, μέσω της TEM μπορούν να παρατηρηθούν μια σειρά από άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων τα οποία αντανakλούν τα επίπεδα της αυτοφαγίας. Έτσι, στην παρούσα μελέτη τα PC-3 κύτταρα αναφοράς εμφανίζουν λίγα ανώριμα και ώριμα αυτοφαγοσώματα (*Εικ.42α*). Τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί στην ADR εμφανίζουν πολυάριθμα αυτοφαγοσώματα (πρόδρομα και ώριμα), πολύ-ελασματώδη κυστίδια και αυξημένη εκκριτική δραστηριότητα, όλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ενδεικτικά της επαγωγής και ολοκλήρωσης της αυτοφαγίας (*Εικ.42β*).

Αντίθετα, τα PC-3 κύτταρα που επώαστηκαν με το εκχύλισμα SEE εμφανίζουν λίγα αυτοφαγοσώματα, ανάλογα με αυτά των κυττάρων αναφοράς (*Εικ.42γ*). Τα κύτταρα που επώαστηκαν με ADR+SEE εμφανίζουν μεγάλα συσσωματώματα από αυτοφαγικά κυστίδια τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων και μεμβρανικού υλικού, με μια παράλληλη αποδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων, ευρήματα συνήθως ενδεικτικά για την ύπαρξη κάποιας βλάβης στην ωρίμανση των αυτοφαγοσωμάτων και πιθανής αναστολής της αυτοφαγίας (*Εικ.42δ*).

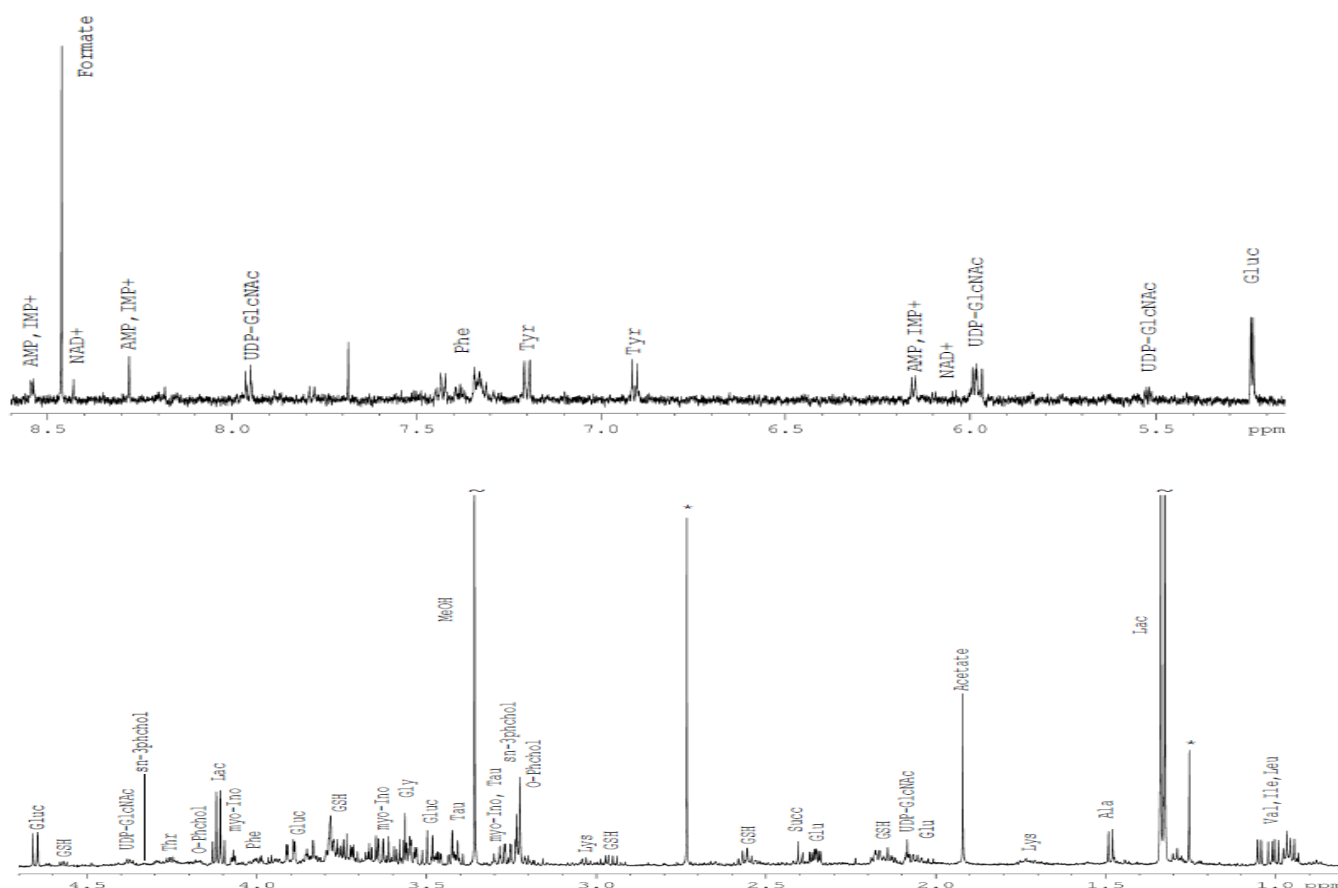


Εικόνα 42: Αυτοφαγικές δομές όπως παρατηρήθηκαν με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο. α) Κύτταρα αναφοράς: λίγα αυτοφαγοσώματα β) Επίδραση με ADR (25 nM): πληθώρα αυτοφαγοσωμάτων και πολυμεμβρανικών κυστιδίων γ) Επίδραση με SEE (50 $\mu\text{g/mL}$): λίγα αυτοφαγοσώματα δ) Συγχορήγηση ADR (25 nM) + SEE (50 $\mu\text{g/mL}$): εκτεταμένη κυστιδιοποίηση συνδυασμένη με πλειομορφικά κυστίδια που φέρουν σταγονίδια λιπιδίων.

4.9. Μεταβολικό προφίλ

4.9.1. Αδριαμυκίνη - Εκχύλισμα SEE

Το μεταβολικό προφίλ των τεσσάρων ομάδων δειγμάτων (Ctrl, ADR, SEE, ADR+SEE) μελετήθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR. Αρχικά προσδιορίστηκαν 34 κυτταρικοί μεταβολίτες. Στην εικόνα 43 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H 1D NMR καθώς και οι κορυφές των μεταβολιτών που αναγνωρίστηκαν, προερχόμενο από ένα δείγμα επίδρασης με SEE.

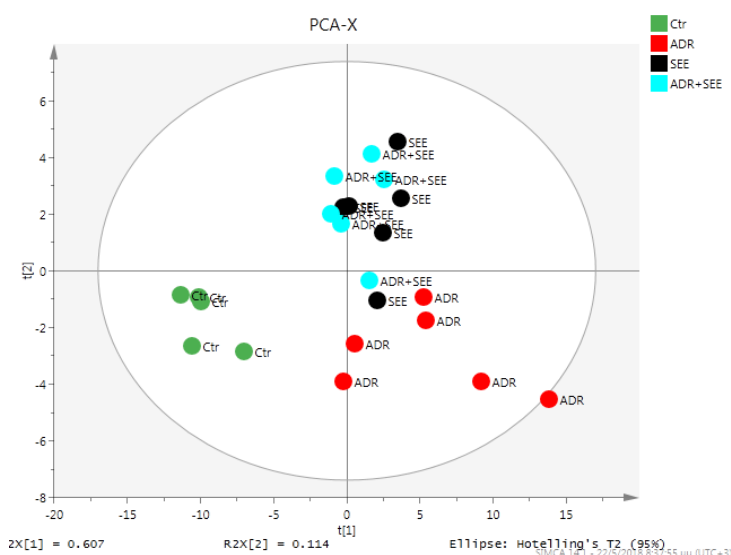


Εικόνα 43: Αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H 1D NMR με τους αναγνωρισμένους μεταβολίτες από δείγμα με επίδραση με το εκχύλισμα SEE (1-5.2 ppm: αλκοφατική περιοχή, 5.2-9 ppm: αρωματική περιοχή).

Πολυ-μεταβλητή ανάλυση

Ακολούθησε πολυμεταβλητή στατιστική επεξεργασία των απλών και κανονικοποιημένων δεδομένων. Τα φασματικά δεδομένα κανονικοποιήθηκαν ως προς τη συνολική ένταση (total intensity) του κάθε φάσματος. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA: principle component analysis) η οποία αποτελεί μια μη επιβλεπόμενη μέθοδο στατιστικής ανάλυσης που επιτρέπει την ανίχνευση τάσεων ομαδοποίησης των δειγμάτων. Από την PCA

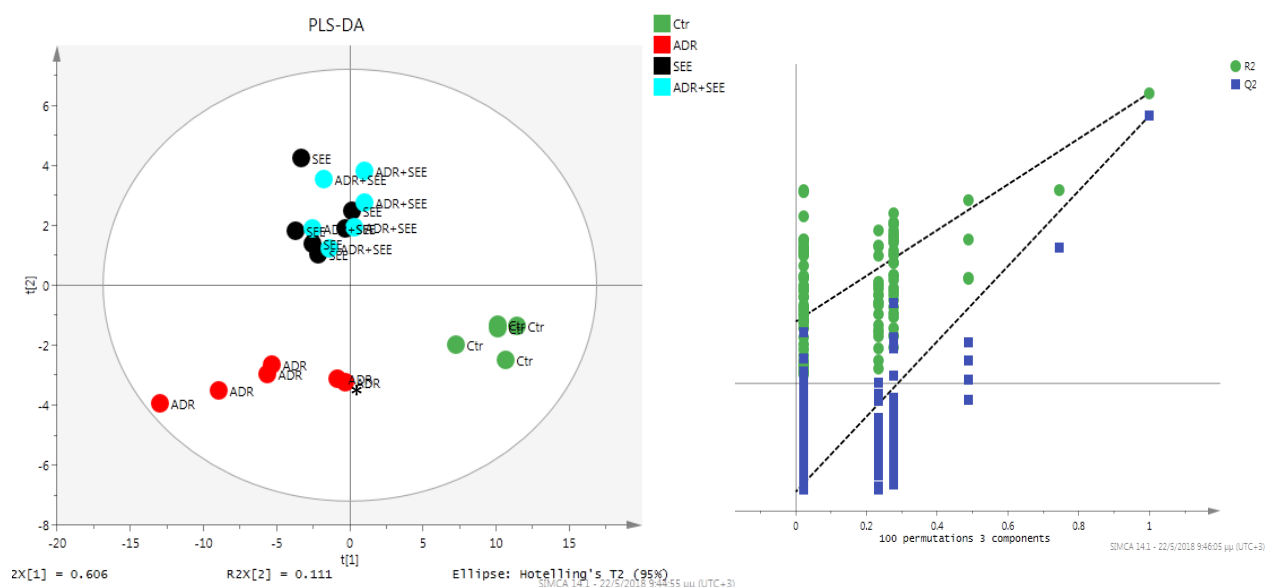
προέκυψε ένα μοντέλο τριών συνιστωσών με ικανοποιητική περιγραφική και προβλεπτική ικανότητα (Εικ.44). Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι το μεταβολικό προφίλ χαρακτηρίζεται από υψηλή συνέπεια μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ομάδας και διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Επίσης, στη συνιστώσα PC1 (R^2X 0.564; Q^2 0.474) παρατηρείται διαχωρισμός της ομάδας Ctrl από τις υπόλοιπες, ενώ στη συνιστώσα PC2 (R^2X 0.129; Q^2 0.193), διαχωρίζονται οι ομάδες με βάση την επίδραση με SEE, δηλ. οι SEE και ADR+SEE αποτελούν κοινή ομάδα δεδομένων και διαχωρίζονται από τις ομάδες Ctrl και ADR. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ομοιότητα του μεταβολικού προφίλ των ομάδων SEE και ADR+SEE. Οι ομάδες των Ctrl και ADR δειγμάτων παρουσιάζουν την μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ τους. Συνολικά, το μοντέλο περιγράφει το 0.78 της μεταβολής των δειγμάτων (R^2X_{cum} : 0.781) και η προβλεπτική του ικανότητα είναι 0.64 (Q^2_{cum} : 0.645).



Εικόνα 44: Ανάλυση PCA (Ctrl, ADR, SEE, ADR+SEE).

Η ανάλυση των δεδομένων με επιβλεπόμενες μεθόδους και συγκριμένα με εφαρμογή της μερικής ανάλυσης ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA: Partial least squares-discriminant analysis) δεν αποκάλυψε κάποιο διαφορετικό πρότυπο ομαδοποίησης, αλλά βελτίωσε το υπάρχον μοντέλο που είχε προκύψει από την ανάλυση PCA. Το μοντέλο που δημιουργήθηκε από την PLS-DA περιγράφεται από δύο συνιστώσες με R^2_{cum} : 0.68, Q^2_{cum} : 0.49 και το διάγραμμα αντικειμένων παρουσιάζεται στην εικόνα 45α. Η επιβλεπόμενη ανάλυση επιτυγχάνει να διαχωρίσει την ομάδα ADR από τις SEE και ADR+SEE στην πρώτη συνιστώσα. Η ύπαρξη μιας ομάδας που περιλαμβάνει όλα τα δείγματα στα οποία έχει γίνει επίδραση με SEE, δηλαδή τα SEE και ADR+SEE δείγματα, και στην ανάλυση PLS-DA αποτελεί μια ξεκάθαρη ένδειξη της ισχυρής επίδρασης του SEE στα κύτταρα PC-3, η οποία σχεδόν καλύπτει την επίδραση της ADR

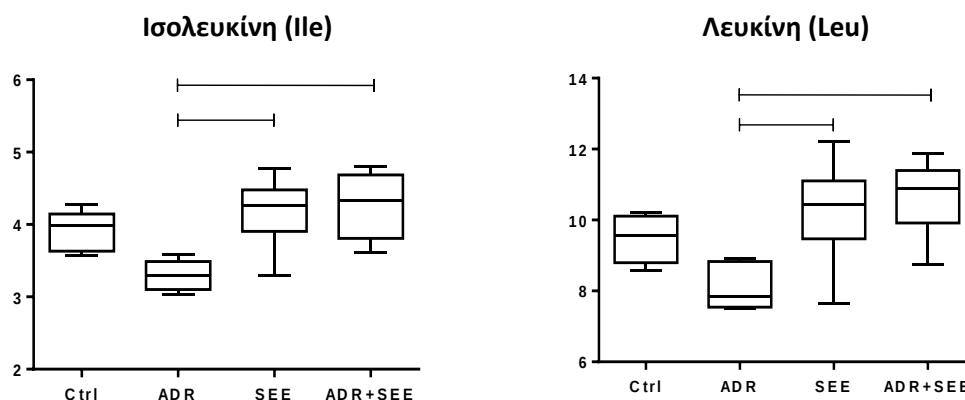
στο μεταβολικό φαινότυπο των κυττάρων. Το μοντέλο επικυρώθηκε με τη μέθοδο τυχαίων μεταθέσεων με 100 μεταθέσεις (Εικ.45β).

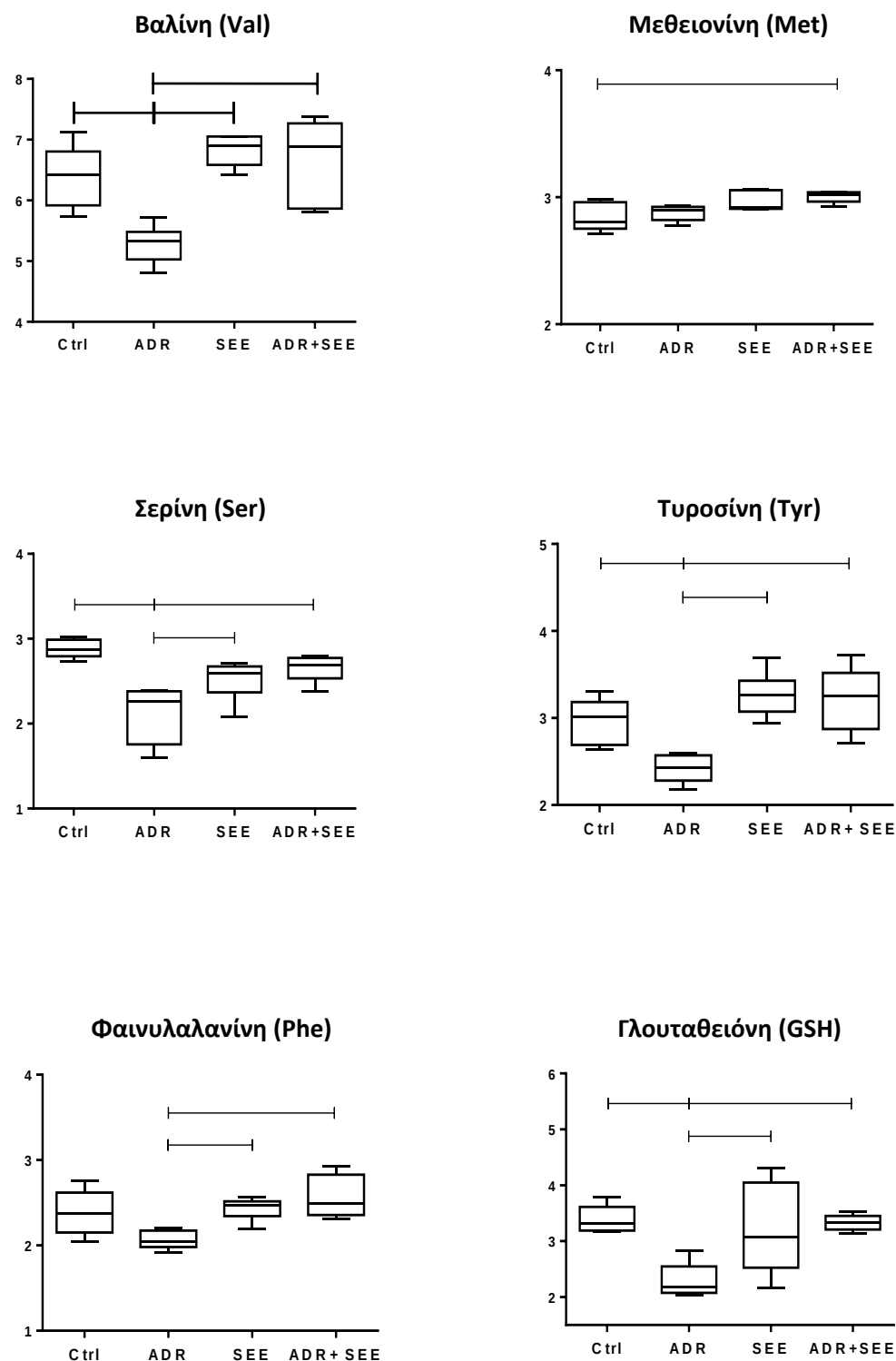


Εικόνα 45: α) Ανάλυση PLS-DA β) Δοκιμή μεταθέσεων με 100 μεταθέσεις για το μοντέλο PLS-DA (Ctrl, ADR, SEE, ADR+SEE).

Μονο-μεταβλητή ανάλυση

Οι μεταβολίτες μελετήθηκαν με μονο-μεταβλητή ανάλυση ώστε να προσδιοριστούν οι στατιστικά σημαντικές ποσοτικές μεταβολές τους μεταξύ των ομάδων. Στην εικόνα 46 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεταβολιτών που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε μορφή θηκογραμμάτων. Παρατηρούμε πως οι επιδράσεις με SEE και ADR+SEE, σε σύγκριση με την μονοχορήγηση με ADR, οδηγούν σε αύξηση των αμινοξέων ισολευκίνη, λευκίνη, βαλίνη ενώ μόνο η συγχορήγηση ADR+SEE αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της μεθειονίνης. Σημαντική αντιστροφή της επίδρασης της ADR στο μεταβολικό προφίλ των κυττάρων PC-3 παρατηρείται μετά την συγχορήγηση ADR+SEE για τους μεταβολίτες σερίνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και γλουταθειόνη (Εικ.46).

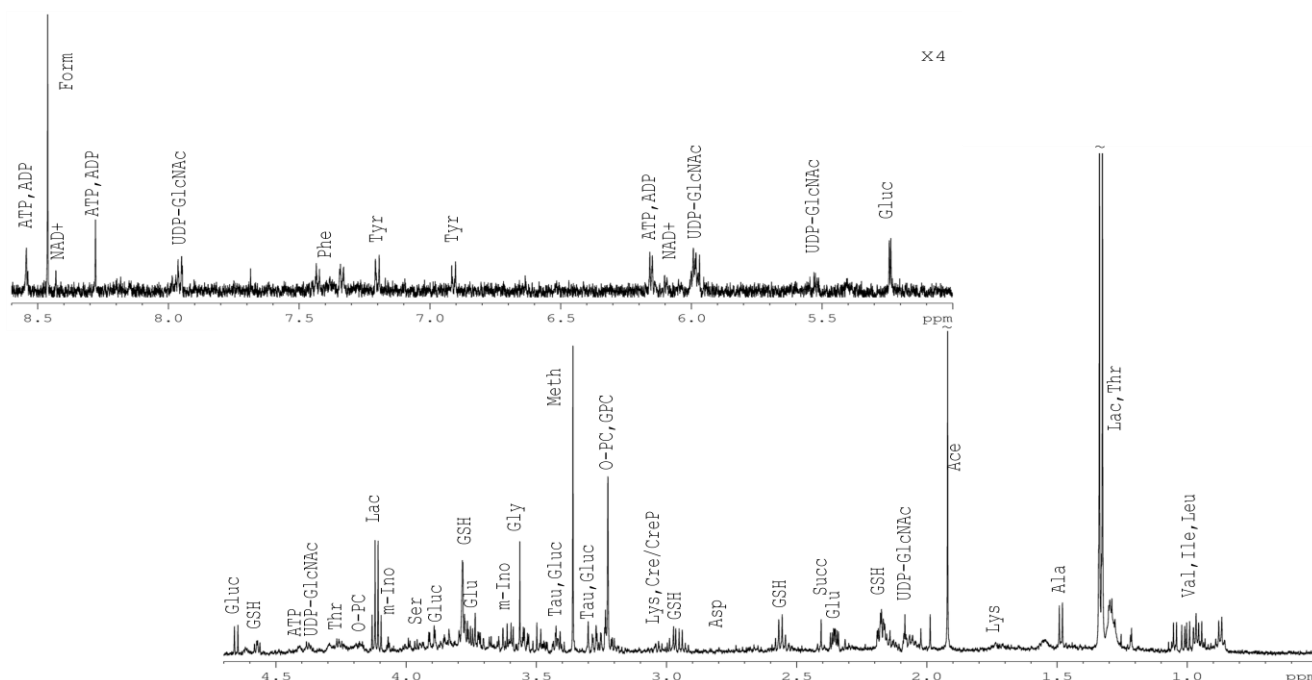




Εικόνα 46: Θηκογράμματα που απεικονίζουν τις στατιστικά σημαντικές σχετικές συγκεντρώσεις μεταβολιτών (Ctrl, ADR, SEE, ADR+SEE).

4.9.2. Αδριαμυκίνη - GGE

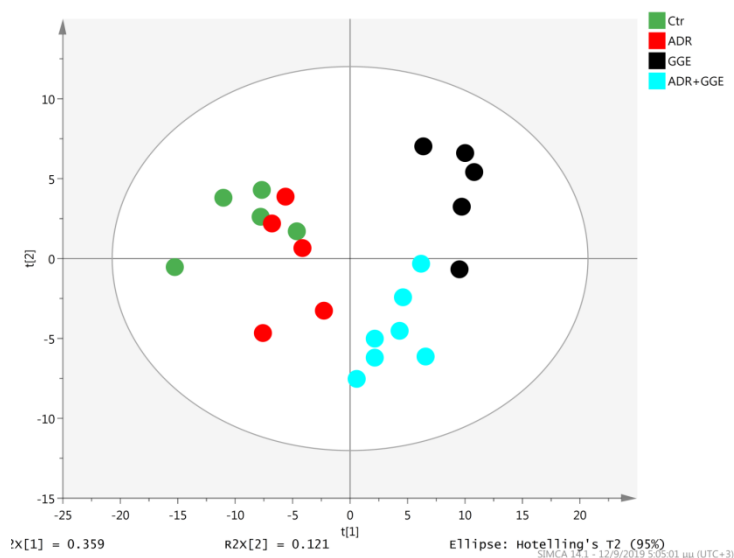
Το μεταβολικό προφίλ των τεσσάρων ομάδων δειγμάτων (Ctrl, ADR, GGE, ADR+GGE) μελετήθηκε με φασματοσκοπία NMR. Προσδιορίστηκαν 31 κυτταρικοί μεταβολίτες οι οποίοι παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 3. Στην εικόνα 47 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H 1D NMR καθώς και οι κορυφές των μεταβολιτών που αναγνωρίστηκαν, προερχόμενο από ένα δείγμα επίδρασης με GGE.



Εικόνα 47: Αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H 1D NMR με τους αναγνωρισμένους μεταβολίτες από δείγμα με επίδραση με το εκχύλισμα GGE (1-5.2 ppm: αλικοφατική περιοχή, 5.2-9: ppm αρωματική περιοχή).

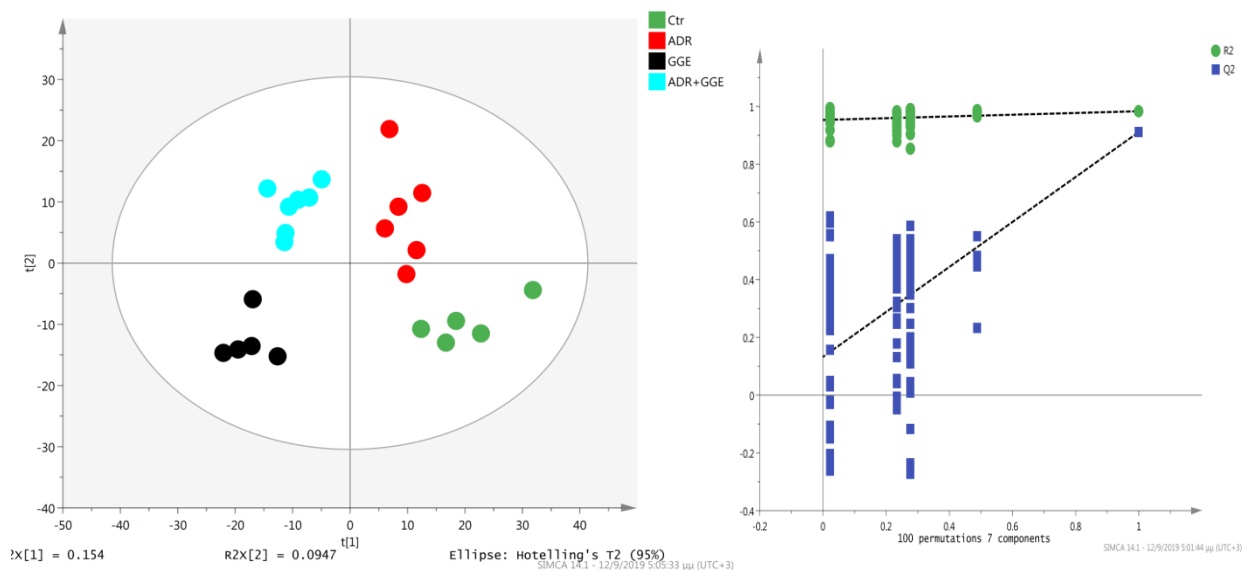
Πολυ-μεταβλητή ανάλυση

Ακολούθησε πολυ-μεταβλητή ανάλυση των κανονικοποιημένων δεδομένων ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη έκτροπων τιμών και πιθανή ομαδοποίηση των δειγμάτων. Το μοντέλο που πρόέκυψε από την μη επιβλεπόμενη ανάλυση PCA περιγράφεται από τρεις συνιστώσες με περιγραφική ικανότητα R^2_{cum} 0.56 και προβλεπτική Q^2_{cum} 0.38 και το διάγραμμα αντικειμένων του παρουσιάζεται στην εικόνα 48. Τα δείγματα της ομάδας ADR χαρακτηρίζονται από μεγάλη διασπορά. Η επίδραση του εκχυλίσματος GGE στο μεταβολικό προφίλ των κυττάρων PC-3 φαίνεται να είναι πολύ ισχυρή καθώς στην πρώτη συνιστώσα του μοντέλου, ο διαχωρισμός των δειγμάτων οφείλεται μόνο στην επίδραση του εκχυλίσματος της GGE (PC1 axis, R^2 : 0.39). Στη δεύτερη συνιστώσα του μοντέλου, τα δείγματα χωρίζονται με βάση τη χορήγηση ADR.



Εικόνα 48: Ανάλυση PCA (Ctrl, ADR, GGE, ADR+GGE).

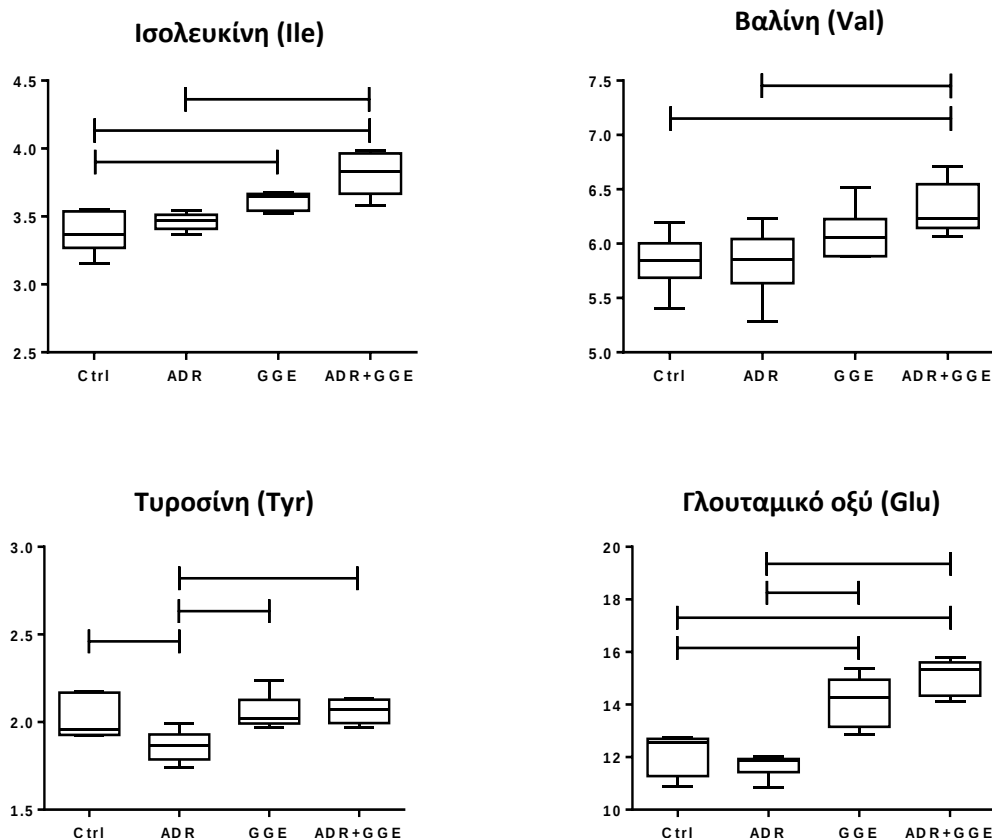
Η εφαρμογή επιβλεπόμενης ανάλυσης PLS-DA, οδήγησε σε μοντέλο έξι συνιστωσών με R^2_{cum} 0.99 και Q^2_{cum} 0.83. Το διάγραμμα αντικειμένων του παρουσιάζεται στην εικόνα 49α. Οι ομάδες παρουσιάζουν πολύ καλό διαχωρισμό, με την πρώτη συνιστώσα να περιγράφει τη διαφορά της επίδρασης της GGE και τη δεύτερη τη διαφορά της επίδρασης της ADR. Ο έλεγχος της αξιοπιστίας του μοντέλου με τη μέθοδο τυχαίων μεταθέσεων με 100 μεταθέσεις παρουσιάζεται στην εικόνα 49β. Στο μοντέλο αυτό, κάποιες από τις τυχαίες μεταθέσεις προκύπτουν με συγκρίσιμη περιγραφική ικανότητα με αυτή του πραγματικού μοντέλου ενώ η προβλεπτική του ικανότητα είναι υψηλότερη σε σχέση με το πραγματικό μοντέλο.

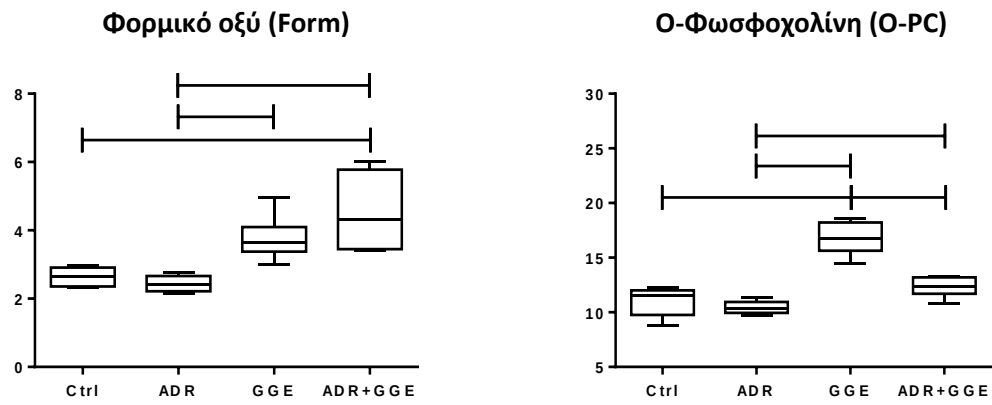


Εικόνα 49: (α) Ανάλυση PLS-DA (β) Έλεγχος μεταθέσεων με 100 μεταθέσεις για το μοντέλο PLS-DA (Ctrl, ADR, GGE, ADR+GGE).

Μονο-μεταβλητή ανάλυση

Μονομεταβλητή ανάλυση έγινε για τους μεταβολίτες που παρουσιάζουν την υψηλότερη επίδραση στο διαχωρισμό των ομάδων (κριτήριο $VIP > 1$, Variable Importance to Projection) και παρουσιάζεται στην εικόνα 49 σε μορφή θηκογραμμάτων. Παρατηρείται ότι η μονοχορήγηση με ADR ενισχύει σημαντικά την γλυκόζη, την μυο-ινοσιτόλη, το γαλακτικό οξύ, την sn-3-φωσφοχολίνη και το ATP. Η συγχορήγηση ADR+GGE αυξάνει την συγκέντρωση πληθώρας αμινοξέων όπως η ισολευκίνη, η λευκίνη, η βαλίνη, η αλανίνη, η γλυκίνη, η σερίνη, το γλουταμικό οξύ, η γλουταθειόνη καθώς και των μεταβολιτών φορμικό οξύ και η ο-φωσφοχολίνη σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR. Εκτός από τους παραπάνω μεταβολίτες, η θρεονίνη και η UDP-GlcNAc φαίνεται να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο διαφοροποίηση του μεταβολικού προφίλ των κυττάρων PC-3 στα οποία έχει γίνει συγχορήγηση ADR+GGE σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, τα οποία χαρακτηρίζονται κυρίως από αυξημένη γλυκόζη και γαλακτικό οξύ. Από όλα τα παραπάνω, τελικά προκύπτει πως η επίδραση του εκχυλίσματος GGE στην συγχορήγηση ADR+SEE είναι καθοριστική στη μεταβολή της συγκέντρωσης των BCAAs αμινοξέων καθώς και της αλανίνης, της σερίνης, του γλουταμικού και του φορμικού οξέως, καθώς παρουσιάζουν σημαντική αύξηση μετά την συγχορήγηση ADR+GGE ενώ δεν παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές μετά από την μονοχορήγηση ADR (Εικ.50).





Εικόνα 50: Θηκογράμματα που απεικονίζουν τις στατιστικά σημαντικές σχετικές συγκεντρώσεις μεταβολιτών (Ctrl, ADR, GGE, ADR+GGE).

Κεφάλαιο 5: Συζήτηση

Η Αδριαμυκίνη χρησιμοποιείται ως χημειοθεραπευτικό φάρμακο τα τελευταία 40 χρόνια για την αντιμετώπιση πολλών μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη. Παρόλα αυτά, η χρήση της στην κλινική πράξη είναι περιορισμένη καθώς παρατηρούνται φαινόμενα περιορισμένης απορρόφησης από τους ιστούς και φαινόμενα χημείο-αντοχής. Παράλληλα, εμφανίζονται πολλές παρενέργειες στους ασθενείς, όπως η καρδιοτοξικότητα και η νεφροτοξικότητα, ακόμα και 10 χρόνια μετά την χορήγηση [11]. Τα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία δείχνουν ότι η ταυτόχρονη χορήγηση φυσικών προϊόντων με χημειοθεραπευτικά φάρμακα ενισχύει τη δράση των χημειοθεραπευτικών, απαιτώντας έτσι μικρότερες συγκεντρώσεις τους για επίτευξη της φαρμακολογικής δράσης, περιορίζοντας ταυτόχρονα τις παρενέργειές τους [164]. Στην παρούσα λοιπόν μελέτη διερευνήθηκε η δράση δύο φυτικών εκχυλίσμάτων, των SEE και GGE, καθώς και η συγχορήγησης τους με την ADR έναντι της κυτταρικής σειράς καρκίνου του προστάτη PC-3.

Αδριαμυκίνη - Εκχύλισμα SEE

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν πως το φυσικό εκχύλισμα SEE αναστέλλει με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Παράλληλα, οι δραστικές ουσίες σιλιμπινίνη και σιλυκριστίνη, που αποτελούν τα δύο κυριότερα συστατικά του εκχυλίσματος SEE, παρουσιάζουν επίσης δοσο-εξαρτώμενη ανασταλτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με τη σιλιμπινίνη να αποτελεί την κύρια δραστική ουσία του εκχυλίσματος. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν προκύψει σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλες μορφές καρκίνου. Πιο συγκριμένα, στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη DU145 και LNCaP, η σιλιμπινίνη προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μεταξύ των συγκεντρώσεων 50-200 μM , επιδρώντας στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση, ενώ στα PC-3 κύτταρα η επίδραση με σιλιμπινίνη σε συγκεντρώσεις από 0.02-20 μM παρουσιάζει αντίστοιχα αποτελέσματα [88, 97, 165].

Στη συνέχεια της μελέτης, διαπιστώθηκε ότι η συγχορήγηση ADR+SEE καθώς και η συγχορήγηση ADR+σιλιμπινίνης ενισχύουν σημαντικά την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3 σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της ADR ($<3 \text{ nM}$). Το γεγονός αυτό αποκαλύπτει μια σημαντική αθροιστική δράση των συγχορηγήσεων ADR+SEE και ADR+σιλιμπινίνη, η οποία επιτρέπει την μείωση της

δόσης του χημειοθεραπευτικού. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε αντιστοιχία και με άλλες μελέτες που υποστηρίζουν την αθροιστική δράση μεταξύ ADR+SEE και ADR+σιλιμπινίνη. Έτσι, μια πρόσφατη μελέτη σε χημειο-ανθεκτικά κύτταρα από καρκίνο του μαστού (MDA-MB-435) δείχνει πως 200 μ M σιλιμπινίνης μειώνουν το IC₅₀ της αδριαμυκίνης από 71 σε 10 μ g/mL [166]. Μια πρωθύστερη μελέτη σε κυτταρική σειρά από καρκίνο του μαστού επίσης αναφέρει ότι η επίδραση σιλυμαρίνης σε συγκέντρωση 75 μ g/mL σε συνδυασμό με 25 nM αδριαμυκίνης διπλασιάζει το ποσοστό θανάτου των κυττάρων σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR [111]. Αντίστοιχη αθροιστική δράση μεταξύ ADR και εκχυλίσματος SEE έχει βρεθεί και έναντι της κυτταρικής σειράς LoVo από καρκίνο του παχέως εντέρου καθώς και της κυτταρικής σειράς HerG2 από ήπατο-κυτταρικό καρκίνο [110, 167]. Ειδικότερα για τον καρκίνο του προστάτη, μια μελέτη αναφέρει την αθροιστική δράση 25 nM αδριαμυκίνης σε συνδυασμό με 50 μ M σιλιμπινίνης έναντι της κυτταρικής σειράς DU145.

Πολλές από τις μελέτες που έχουν γίνει σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του ήπατος, του μαστού και του προστάτη (DU145 και LNCaP) έχουν δείξει ότι η αθροιστική επίδραση του εκχυλίσματος SEE στην κυτταροτοξική δράση της ADR σχετίζεται κυρίως με αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση των κυττάρων [113, 166, 168]. Κατ'αντιστοιχία, στην παρούσα μελέτη η συγχορήγηση ADR+SEE ενισχύει σημαντικά την παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M καθώς και την απόπτωση των κυττάρων σε σύγκριση με την μονοχορήγηση με ADR. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η μονοχορήγηση με το εκχύλισμα SEE δεν επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο ούτε επάγει την απόπτωση των PC-3 κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως εμπλέκεται κάποιος άλλος μηχανισμός που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, και αυτός θα μπορούσε να είναι ο μηχανισμός της αυτοφαγίας.

Η αυτοφαγία ενεργοποιείται από τα κύτταρα κάτω υπό ακραίες συνθήκες, όπως για παράδειγμα η έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, ο ρόλος της αυτοφαγίας ως μηχανισμός προστασίας-επιβίωσης των κυττάρων ή ως προ-άγγελος του κυτταρικού θανάτου παραμένει διφορούμενος. Η αυτοφαγία ρυθμίζεται κυρίως από γονίδια όπως τα Beclin1, ULK1 και AMBRA1, τα οποία σχετίζονται με την σηματοδότηση για το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Παράλληλα, η συμμετοχή των πρωτεϊνών της οικογένειας LC-3 είναι καθοριστική για τον σχηματισμό της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος, με τις μορφές LC3A και LC3B να χρησιμοποιούνται εξίσου ως δείκτες για την επαγωγή της αυτοφαγίας [169]. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες p62 και NBR1 χρησιμοποιούνται ως δείκτες επαγωγής και ολοκλήρωσης της λύσης των αυτοφαγο-λυσσώματων. Προκειμένου λοιπόν να διαλευκανθεί

η πιθανή εμπλοκή του μηχανισμού της αυτοφαγίας στην αθροιστική δράση της συγχορήγησης ADR+SEE πραγματοποιήθηκε ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση των αυτοφαγικών δομών καθώς και ποσοτική εκτίμηση των γονιδίων και πρωτεϊνών που αποτελούν δείκτες της αυτοφαγίας.

Η ποσοτική εκτίμηση των αυτοφαγικών δομών μέσω κυτταρομετρίας ροής αποκάλυψε πως η επίδραση με ADR επάγει την αυτοφαγία των κυττάρων. Παράλληλα, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ULK1, AMBRA1, Beclin1 και LC3A, σε συνδυασμό με την μεταβολή της έκφρασης των πρωτεϊνών LC3B-II, p62 και NBR1 καταδεικνύει περαιτέρω την επαγωγή και ολοκλήρωση του μηχανισμού της αυτοφαγίας στα PC-3 κύτταρα μετά από την επίδραση με ADR.

Αντίθετα, η ποσοτική εκτίμηση της αυτοφαγίας μετά από την μονοχορήγηση με το εκχύλισμα SEE έδωσε αποτελέσματα που συνάδουν περισσότερο με αναστολή του σχηματισμού των αυτοφαγο-λυσosσωμάτων. Πράγματι, μετά από την μονοχορήγηση με SEE, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ULK1, AMBRA1, Beclin1 και της πρωτεΐνης LC3B-II είναι χαρακτηριστικά της επαγωγής του μηχανισμού της αυτοφαγίας. Εντούτοις, η ταυτόχρονη αύξηση των πρωτεϊνών p62 και NBR1 υποδηλώνει μια πιθανή εμπλοκή είτε στη σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα είτε στη λύση του αυτοφαγο-λυσosσωματος, καθώς η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει πως κατά τη διάρκεια λύσης τους αυτοφαγο-λυσosσωματος η ποσότητα της πρωτεΐνης p62 σχεδόν μηδενίζεται ενώ η συσσώρευσή της είναι χαρακτηριστική της μη ολοκλήρωσης του μηχανισμού της αυτοφαγίας [170].

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι η ποσοτική εκτίμηση των αυτοφαγικών δομών μετά από την συγχορήγηση με ADR+SEE έδωσε αποτελέσματα παρόμοια με τα κύτταρα αναφοράς. Μετά τη συγχορήγηση ADR+SEE, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ULK1, AMBRA1, Beclin1, LC3A, της πρωτεΐνης LC3B-II καθώς και του λόγου LC3B-II/ LC3B-I είναι σαφώς περισσότερο αυξημένα σε σχέση με την μονοχορήγηση ADR, γεγονός που υποδηλώνει μια πιο ισχυρή επαγωγή του αυτοφαγικού μηχανισμού. Παρόλα αυτά, μετά από την συγχορήγηση ADR+SEE παρατηρείται συσσώρευση των πρωτεϊνών LC3 και p62, η οποία είναι ενδεικτική της αναστολής της λύσης του αυτοφαγο-λυσosσωματος [171]. Καταλήγουμε λοιπόν, πως αν και η συγχορήγηση ADR+SEE ενισχύει την επαγωγή της αυτοφαγίας στα αρχικά της στάδια σε σύγκριση με την επίδραση μόνο με ADR, συμβαίνει κάποια εμπλοκή στον αυτοφαγικό μηχανισμό με αποτέλεσμα να μην ολοκληρώνεται και τα κύτταρα τελικά να αποπίπτουν.

Το συμπέρασμα αυτό συνάδει με μια πρόσφατη μελέτη σε προστατικά καρκινικά κύτταρα στην οποία προτείνεται ότι η αδριαμυκίνη επάγει την αυτοφαγία ως μηχανισμό επιβίωσης των κυττάρων με αποτέλεσμα η αναστολή του αυτοφαγικού μηχανισμού να αυξάνει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων [172]. Με παρόμοιο προσανατολισμό, μια παλαιότερη μελέτη αναφέρει πως στις κυτταρικές σειρές PC-3MM2 (ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη προερχόμενη από οστική μετάσταση ομόζυγη για TP53) και DU-145 η αναστολή της αυτοφαγίας, που επάγεται από τον παράγοντα EGFR, αυξάνει την ευαισθησία τους στη δράση της αδριαμυκίνης [173].

Η υπόθεση ότι η αναστολή της αυτοφαγίας, ως μηχανισμού επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων από την δράση της ADR, τελικά αυξάνει την θνησιμότητά τους μέσω απόπτωσης έχει μελετηθεί και σε άλλες κυτταρικές σειρές. Έτσι, σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος το φυσικό προϊόν danthron από το φυτό *Rheum palmatum* L. (Polygonaceae) αναστέλλει την προστατευτική αυτοφαγία που επάγεται μετά τη δράση της ADR και τελικά αυξάνει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων [174]. Αντίστοιχα, σε κύτταρα οστεοσαρκώματος το φυσικό προϊόν EGCG (epigallocatechin gallate) αναστέλλει την επαγόμενη από την ADR αυτοφαγία αυξάνοντας την απόπτωση των κυττάρων [175].

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο παραπάνω ισχυρισμός, ακολούθησε παρατήρηση των αυτοφαγικών δομών με τη χρήση ΗΜ. Τα κύτταρα, μετά την επίδραση με ADR εμφάνισαν αυξημένο αριθμό αυτοφαγοσωμάτων και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που συνάδουν με την επαγωγή και ολοκλήρωση του αυτοφαγικού μηχανισμού. Αντίθετα, τα κύτταρα εμφάνισαν ελάχιστα αυτοφαγοσώματα μετά την επίδραση με SEE και η εικόνα τους ήταν ανάλογη των κυττάρων αναφοράς, υποστηρίζοντας την πεποίθηση ότι ο αυτοφαγικός μηχανισμός τελικά αναστέλλεται μετά την επίδραση με SEE. Η συγχορήγηση ADR+SEE οδήγησε σε μια εικόνα των κυττάρων εντελώς διαφορετική τόσο σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς όσο και με τα κύτταρα μετά από τις μονοχορηγήσεις με ADR ή SEE. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα εμφάνισαν μεγάλα συσσωματώματα αυτοφαγικών δομών τα οποία περιείχαν σταγονίδια λιπιδίων, καθώς και μια αποσυναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα χαρακτηριστικά αυτά συνδέονται συνήθως με την αναστολή της ωρίμανσης των αυτοφαγοσωμάτων και της επερχόμενης λύσης τους, γεγονός που οδηγεί στην επαγωγή της απόπτωσης [176]. Επίσης, στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, η αυτοφαγία βοηθά την επιβίωση των κυττάρων διαμεσολαβώντας στην λιπόλυση. Η αναστολή της αυτοφαγίας, περιορίζει την λιπόλυση και τελικά την ανάπτυξη των κυττάρων [170]. Έτσι, τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν

περισσότερο τον ισχυρισμό ότι το εκχύλισμα SEE αναστέλλει την επαγόμενη από την ADR προστατευτική αυτοφαγία οδηγώντας τελικά σε αυξημένη απόπτωση των κυττάρων.

Επιπρόσθετα, μέσω της μεταβολομικής μελέτης έγινε μια προσπάθεια να συσχετισθεί το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων με τις πιθανές αλλαγές στον αυτοφαγικό μηχανισμό. Στη διεθνή βιβλιογραφία παρουσιάζονται μια σειρά από δεδομένα που συσχετίζουν τα επίπεδα διαφόρων μεταβολιτών του κυττάρου με την επαγωγή ή την αναστολή της αυτοφαγίας [177]. Πιο συγκεκριμένα:

- Στα καρκινικά κύτταρα, η γλυκόζη μεταβολίζεται κυρίως μέσω αερόβιας γλυκόλυσης (Warburg effect) παράγοντας μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέως [178]. Η μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέως με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης υποδηλώνει περιορισμό του Warburg effect, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερες ποσότητες πυροσταφυλλικού οξέως που εισέρχονται στον κύκλο TCA, με αποτέλεσμα το κύτταρο να μην στηρίζεται πλέον μεταβολικά στην αερόβια γλυκόλυση και έτσι να χρησιμοποιεί τον μηχανισμό της αυτοφαγίας για την αποδόμηση θρεπτικών συστατικών [179].

- Μεταβολές στα επίπεδα της γλυκόζης και στην λειτουργικότητα των γλυκολυτικών ενζύμων επηρεάζουν την αυτοφαγία. Έτσι, η 3-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε 1,3 διφωσφογλυκερικό με τη δράση του ενζύμου αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), με αποτέλεσμα τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης να αυξάνουν την αλληλεπίδραση του ενζύμου GAPDH με το σύμπλοκο mTOR, ενεργοποιώντας τον μηχανισμό της αυτοφαγίας ενώ αντίθετα τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης αυξάνουν το GAPDH και ενισχύουν την γλυκόλυση [180].

- Ο μεταβολισμός της γλυκόζης μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των εξωζαμινών, οδηγεί στην παραγωγή του UDP-GlcNac το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για την Ο-ακετυλίωση της Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης στα μόρια διάφορα πρωτεϊνών. Έτσι, η συγκέντρωση του UDP-GlcNac επηρεάζει άμεσα την Ο-ακετυλίωση πολλών πρωτεϊνών ως απάντηση σε διάφορους τύπους κυτταρικού στρες (ER, οξειδωτικό, ωσμωτικό, κ.α) και συνδέεται άμεσα με την επαγωγή της αυτοφαγίας και την βιωσιμότητα του κυττάρου [181].

- Η γλυκόζη είναι απαραίτητη για την γλυκοζυλίωση διάφορων αμινοξέων των πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο την λειτουργικότητά τους. Έχει δειχθεί πως η μείωση της

γλυκόζης οδηγεί σε περιορισμένη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, αυξημένο ER στρες και τελικά ενίσχυση της αυτοφαγίας [182].

- Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (PPP) συνδέεται με την οξείδωση καθώς και με τη ρύθμιση της αυτοφαγίας. Το πρώτο ένζυμο του PPP μονοπατιού, η G-6-P αφυδρογονάση, καταλύει την παραγωγή του NADPH το οποίο είναι απαραίτητο για να διατηρείται η γλουταθειόνη (GSH) στην ανηγμένη της μορφή [183]. Αλλαγές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα της γλουταθειόνης επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την σύνθεση της GSH και την οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου, επιδρώντας τελικά στον μηχανισμό της αυτοφαγίας, καθώς η ισορροπία ανάμεσα στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών που παράγονται και των επιπέδων της γλουταθειόνης ρυθμίζουν την αυτοφαγία. Έτσι, η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της γλουταθειόνης, οδηγεί σε αύξηση της LC3-II πρωτεΐνης και επαγωγή της αυτοφαγίας [184].

- Τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ανιχνεύονται από το σύμπλοκο mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) το οποίο ρυθμίζει την σύνθεση των πρωτεϊνών και λιπιδίων, την μεταγραφή και την αυτοφαγία [185]. Η ενεργοποίηση του mTORC1 εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των αμινοξέων και κυρίως των αμινοξέων BCCAs (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη) [186]. Μελέτες δείχνουν ότι η έλλειψη των BCCAs αναστέλλει τη δράση του mTORC1 και επάγει την αυτοφαγία [187]. Πιο πρόσφατα, αναδείχθηκε πως τα αυξημένα επίπεδα λευκίνης επάγουν την μετακίνηση του ανενεργού mTORC1 στα λυσοσώματα όπου ενεργοποιείται και αναστέλλει την αυτοφαγία [188].

- Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη πρόσληψη γλουταμίνης η οποία μέσω της γλουταμινόλυσης μετατρέπεται σε γλουταμικό οξύ και κατόπιν σε α-κετογλουταρικό. Το α-κετογλουταρικό είναι ο κύριος τελεστής για την μεταφορά του ανενεργού mTORC1 στο λυσόσωμα, την επερχόμενη ενεργοποίησή του και τελικά την αναστολή της αυτοφαγίας. Έτσι, τα αυξημένα επίπεδα γλουταμίνης και γλουταμινόλυσης τελικά αναστέλλουν τον μηχανισμό της αυτοφαγίας [188].

- Τα επίπεδα της μεθειονίνης ρυθμίζουν την αυτοφαγία. Χαμηλά επίπεδα μεθειονίνης επάγουν την αυτοφαγία με αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερης μεθειονίνης. Κατόπιν τα υψηλά επίπεδα μεθειονίνης καταστέλλουν την αυτοφαγία ενεργοποιώντας μια σειρά από μεταβολικά μονοπάτια όπως αυτό που συνδέεται με το σύμπλοκο mTORC1 [189, 190].

- Μελέτες δείχνουν πως τα αυξημένα επίπεδα ταυρίνης οδηγούν σε καταστολή της αυτοφαγίας [191].

- Μελέτες σε μύκητες δείχνουν πως τα αυξημένα επίπεδα θρεονίνης επάγουν τον μηχανισμό της αυτοφαγίας και οδηγούν τελικά τα κύτταρα σε γήρανση [192].

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αποτυπώνεται η ύπαρξη ενός κοινού μεταβολικού προφίλ των κυττάρων μετά την επίδραση με SEE είτε ως μονοχορήγηση είτε ως συγχορήγηση με την ADR. Η δράση του εκχυλίσματος SEE είναι τόσο ισχυρή που καλύπτει τις όποιες αλλαγές παρατηρούνται στο μεταβολικό προφίλ των κυττάρων μετά την επίδραση με ADR, ενώ παράλληλα οι μεταβολές σε συγκεκριμένους μεταβολίτες ενισχύουν περισσότερο το προτεινόμενο μοντέλο δράσης. Έτσι, το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων μετά την μονοχορήγηση με ADR (μείωση της συγκέντρωσης αμινοξέων) είναι συμβατό με την επαγωγή της αυτοφαγίας. Αντίθετα, το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων μετά την επίδραση με SEE ή ADR+SEE προσομοιάζει με αυτό των κυττάρων αναφοράς που εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά αυτοφαγίας, υποδηλώνοντας την αναστολή της επαγόμενης από την ADR αυτοφαγίας.

Καταλήγοντας, το εκχύλισμα SEE καθώς και οι δραστικές του ουσίες σιλιμπινίνη και σιλυκριστίνη αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των PC-3 κυττάρων, ενώ η κύρια δραστική ουσία τους εκχυλίσματος SEE είναι η σιλιμπινίνη. Παράλληλα, η σιλυμαρίνη και η σιλιμπινίνη παρουσιάζουν αθροιστική δράση όταν συνδυάζονται με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο ADR. Αναφορικά με τον πιθανό μηχανισμό δράσης, το εκχύλισμα SEE αρχικά ενισχύει την επαγόμενη από την ADR προστατευτική αυτοφαγία των κυττάρων αλλά τελικά εμποδίζει την ωρίμανση και λύση των αυτοφαγο-λυσσωμάτων, αυξάνοντας έτσι δραστικά τον θάνατο των κυττάρων μέσω απόπτωσης. Για το λόγο αυτό, το εκχύλισμα SEE αποτελεί ένα υποσχόμενο εκχύλισμα που αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω ως πιθανής συμπληρωματικής χορήγησης στον καρκίνο του προστάτη.

Αδριαμυκίνη – Εμπλουτισμένο κλάσμα GGE

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποκαλύπτουν πως το GGE προκαλεί δοσο-εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των PC-3 κυττάρων. Η συγχορήγηση ADR+GGE παρουσιάζει αθροιστική δράση ενισχύοντας την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μειώνοντας σημαντικά το IC₅₀ της ADR.

Τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής αποκάλυψαν πως επίδραση με ADR προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και ταυτόχρονα επάγει την απόπτωση, συμφωνώντας με τα δεδομένα από την διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με το μηχανισμό δράσης της ADR [193]. Αν και το GGE προκαλεί αναστολή στη φάση G0/G1, η συγχορήγηση ADR+GGE οδηγεί τελικά σε εμπλοκή του κύκλου στη φάση G2/M ακολουθώντας το πρότυπο της μονοχορήγησης με ADR. Επιπλέον, η μονοχορήγηση με GGE επάγει την απόπτωση των κυττάρων, και παράλληλα η συγχορήγηση ADR+GGE αυξάνει σημαντικά την απόπτωση των κυττάρων σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR. Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το γεγονός πως τόσο η επίδραση με GGE όσο και με ADR+GGE οδηγεί σε νέκρωση των κυττάρων, υποδηλώνοντας πως ενδεχομένως εμπλέκεται και κάποιος άλλος μηχανισμός στο θάνατο των κυττάρων, όπως η αυτοφαγία.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που επισημαίνουν την κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος γλυκόριζας έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου, σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα γλυκόριζας σε συγκεντρώσεις 50-200 $\mu\text{g/mL}$ προκαλεί δοσο-εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης έναντι της σειράς HT-29 από καρκίνο του παχέως εντέρου [194]. Επίσης, δραστικά μόρια που έχουν απομονωθεί από το εκχύλισμα γλυκόριζας όπως η λικοχαλκόνη (5-20 μM), η γλαμπριδίνη (0-40 μM), η γλυκιριζίνη (20-640 μM) και η ισοαγκουστόνη (10-20 μM) αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και την μετάσταση σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από καρκίνο του πνεύμονα, ήπατος, τραχήλου της μήτρας και μελανώματος αντίστοιχα, με μηχανισμούς όπως η καταστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και η επαγωγή της απόπτωσης [126, 195-197].

Ειδικότερα στον καρκίνο του προστάτη, η δραστική ουσία ισολικιρετιγενίνη (0-20 μM και 10-100 μM) παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών DU145 και C4-2, LNCaP αντίστοιχα, καθώς οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού στις φάσεις S και G2/M και επάγει την απόπτωση [122, 198-200]. Αντίστοιχα, η ισολικιρετιγενίνη (25-50 μM) οδηγεί σε παύση στη φάση G2/M και επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα PC-3 [201]. Μια άλλη δραστική ουσία του εκχυλίσματος GGE, η λικοχαλκόνη, έχει βρεθεί πως σταματά τον κύκλο στις φάσεις G1 και G2/M στα PC-3 κύτταρα ενώ στην κυτταρική σειρά LNCaP επάγει την απόπτωση και την αυτοφαγία των κυττάρων [118, 119].

Αν και τα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία επισημαίνουν την κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος γλυκόριζας και των δραστικών ουσιών του έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου,

στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται για πρώτη φορά η κυτταροτοξική δράση του εμπλουτισμένου κλάσματος γκλαμπριδίνης GGE καθώς και η αθροιστική δράση του με την αδριαμυκίνη έναντι του καρκίνου του προστάτη, η οποία θα μπορούσε ενδεχομένως και μετά από τις κατάλληλες κλινικές μελέτες να οδηγήσει στη χορήγηση του χημειοθεραπευτικού σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις προκειμένου να περιοριστούν οι παρενέργειές του. Επιπλέον, οι μέχρι τώρα μελέτες για τον εμπλεκόμενο μηχανισμό δράσης του εκχυλίσματος γλυκόριζας και των δραστικών ουσιών έναντι του καρκίνου του προστάτη εστιάζουν κυρίως σε μεταβολές του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης με ελάχιστα δεδομένα αναφορικά με τον μηχανισμό της αυτοφαγίας. Στην παρούσα όμως εργασία παρουσιάζεται για πρώτη φορά η εμπλοκή του μηχανισμού της αυτοφαγίας στην αθροιστική δράση των ADR+GGE έναντι των PC-3 κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα δεδομένα από την ανάλυση της έκφρασης γονιδίων και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αυτοφαγία, δείχνουν πως η επίδραση με ADR επάγει την αυτοφαγία των κυττάρων PC-3 ως προστατευτικό μηχανισμό. Η μονοχορήγηση με GGE δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των ULK1, AMBRA1 και Beclin1 γονιδίων αλλά αυξάνει σημαντικά την έκφραση του LC3A mRNA και της LC3B-II πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας μεν την επαγωγή της αυτοφαγίας μέσω όμως κάποιου άλλου σηματοδοτικού μονοπατιού και όχι του ULK1-AMBRA1-Beclin1. Παράλληλα, η συγχορήγηση ADR+GGE παρουσιάζει ένα πρότυπο έκφρασης των παραπάνω γονιδίων και πρωτεϊνών ανάλογο του συνδυασμού των δύο μονοχορηγήσεων. Έτσι, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ULK1 και AMBRA1 είναι αυξημένα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς αλλά σαφώς μειωμένα σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR. Αντίθετα, η έκφραση των Beclin1 και LC3A mRNA καθώς και της πρωτεΐνης LC3B-II είναι σαφώς αυξημένη σε σύγκριση με την μονοχορήγηση με ADR, με την έκφραση του LC3A mRNA μάλιστα να είναι πολύ ενισχυμένη (22 φορές), καταδεικνύοντας πως η συγχορήγηση ADR+GGE ενισχύει την επαγωγή της αυτοφαγίας σε σχέση με την μονοχορήγηση με ADR.

Επιπρόσθετα, τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών NBR1 και p62 εμφανίζουν μικρή αύξηση μετά από την επίδραση με GGE. Συνήθως, η αύξηση της έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών σχετίζεται είτε με ελαττωματική αυτοφαγία είτε με ένα πρώιμο στάδιο αυτής κατά το οποίο δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμα η λύση του αυτοφαγοσώματος [171, 202]. Επιπλέον, κάποιες πρόσφατες μελέτες αναφέρουν πως η συσσώρευση της p62 πρωτεΐνης είναι ενδεικτική της επαγόμενης από στρες αυτοφαγίας [203, 204]. Αντίθετα, η συγχορήγηση ADR+GGE αν και αυξάνει την έκφραση της NBR1 πρωτεΐνης, μειώνει σημαντικά την έκφραση της p62 πρωτεΐνης

δείχνοντας πως ο ενισχυμένος αυτοφαγικός μηχανισμός τελικά ολοκληρώνεται με τη λύση του αυτοφαγο-λυσσώματος.

Άλλωστε, πρόσφατες μελέτες σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του παχέως εντέρου, ήπατος και προστάτη (LNCaP) επίσης αναφέρουν την επαγωγή της αυτοφαγίας ως έναν από τους μηχανισμούς δράσης του εκχυλίσματος γλυκόριζας και των δραστικών συστατικών του, ο οποίος τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο [119, 125, 205].

Τέλος, για την αποσαφήνιση της συμμετοχής του μηχανισμού της αυτοφαγίας, μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων, καθώς οι αλλαγές στο μεταβολισμό συνδέονται με μεταβολές σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού ή θανάτου των κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως μια σειρά από αλλαγές στα επίπεδα συγκεκριμένων μεταβολιτών σχετίζονται με την επαγωγή ή την αναστολή της αυτοφαγίας. Ειδικότερα, η μείωση συγκεκριμένων ομάδων αμινοξέων, όπως τα αμινοξέα BCCAs (ισολευκίνη, λευκίνη, βαλίνη) αναστέλλει τη δράση του συμπλόκου mTORC1 και επάγει τη αυτοφαγία [185-188]. Επιπλέον, τα λιπίδια διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε διάφορα στάδια του αυτοφαγικού μονοπατιού, είτε ρυθμίζοντας την έναρξη της αυτοφαγίας είτε συμμετέχοντας στην βιογένεση και ωρίμανση των αυτοφαγοσωμάτων [206].

Στην παρούσα μελέτη, οι επιδράσεις με GGE και ADR+GGE παρουσιάζουν κοινό μεταβολικό προφίλ σε συγκεκριμένους μεταβολίτες που σχετίζονται με την αυτοφαγία σε σχέση με τη μονοχορήγηση με ADR. Έτσι, η επίδραση με ADR δεν επηρεάζει την συγκέντρωση των BCAAs καθώς και της αλανίνης, της τυροσίνης, του γλουταμικού οξέως, του φορμικού οξέως και της φωσφοχολίνης ενώ οι επιδράσεις με GGE και ADR+GGE οδηγούν σε μία στατιστικά σημαντική αύξηση αυτών των μεταβολιτών, υποδηλώνοντας τροποποιήσεις στον αυτοφαγικό μηχανισμό των κυττάρων. Η συσσώρευση αυτών των μεταβολιτών στο κυτταρόπλασμα υποδηλώνει την ενίσχυση της αυτοφαγίας, προκειμένου να εφοδιαστεί το κύτταρο με την ενέργεια που χρειάζεται, η οποία οδηγεί σε μια μεταβολική ανισορροπία και τελικά τον θάνατο των κυττάρων μέσω απόπτωσης.

Καταλήγοντας, το GGE έχει αθροιστική επίδραση στην κυτταροτοξική δράση του χημειοθεραπευτικού ADR έναντι της κυτταρικής σειράς PC-3, προκαλώντας επαγωγή της αυτοφαγίας η οποία τελικά οδηγεί στον θάνατο των κυττάρων μέσω απόπτωσης. Για το λόγο αυτό, το εκχύλισμα GGE θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω ως πιθανή συμπληρωματική χορήγηση έναντι του καρκίνου του προστάτη.

Πίνακας 2 Ουσίες που έχουν απομονωθεί από φυτά και έχουν μελετηθεί για την κυταροτοξική τους δράση έναντι του καρκίνου του προστάτη.

Απιγενίνη Apigenin φλαβονοειδές	DU145 LNCaP PC-3 22Rv1		G1 cell cycle arrest Apoptosis Epigenetic effects No invasion Anti-angiogenesis	Cyclin D1, D2, E Bax/Bcl-2 ratio, NF- κ B, ROS, IGF-IGF-IR, PI3k/Akt HDACs Actin, FAK/scr TGF- β , $\downarrow$ VEGF IGF-I/IGFBP-3, PI3K/Akt/FoxO	<i>Anthemis sp</i>
Αρτεμισίνη Artemisin	LNCaP PC-3 DU145		G1 cycle arrest G2/M cycle arrest Apoptosis	CDK4 Caspases 8,9	<i>Artemisia annua</i>
Διϋδρο-αρτεμισίνη Dihydro-artemisin	PC-3 C4-2 LNCaP		Cell cycle arrest		
Βαϊκαλεΐνη baicalein φλαβονοειδές	DU145, PC-3 LNCaP CA-HPV-10	xenografts	G1 cycle arrest Apoptosis Anti-angiogenesis	P27 (kip1) Bcl-2, Bax, Fas	<i>Scutellaria baicalensis</i>
Βερβερίνη Berberine αλκαλοειδές	DU145 PC-3 LNCaP	LNCaP xenografts	G1 cycle arrest Apoptosis $\downarrow$ Tumor growth	Cyclins, CDKs, CDKs inhibitors Bax/Bcl2 ratio, caspases, cytochrome c $\downarrow$ AR expression	<i>Berberis sp.</i>
Βετουλινικό οξύ Betulinic acid τριτερπένιο	LNCaP PC-3 DU145	TRAMP mice	Apoptosis, Anti-angiogenesis $\downarrow$ Tumor growth Anti-angiogenesis	NF- κ B, Survivin, VEGF Cyclin D, $\downarrow$ AR	<i>Betula papyrifera</i>
Καψαϊκίνη Capsaicin βανιλοειδές	PC-3 DU145 LNCaP	PC-3 xenografts	Apoptosis	ROS, JNK, ERK, $\uparrow$ p53, p21, Bax $\downarrow$ PSA, AR	<i>Capsicum sp.</i>

Κουρκουμίνη Curcumin διφαινυλ-επτανοειδές	PC-3 LNCaP	LNCaP xenografts Curcumin-loaded PLGA nanospheres Cellulose nanoparticles Lipid-based carriers	Cycle arrest Apoptosis Metabolism ↓ Angiogenesis ↓ Growth	Cyclins, Cdks, Akt EGF-R, Bcl, ROS, AIF ↓ AR, NF-κB, AP-1, CREB, PSA Glyoxylase VEGF, MMPs β-catenin, NF-κB	<i>Curcuma longa</i>
Δαϊδεζίνη Daidzein ισοφλαβόνη	PC-3 DU145 LNCaP		↓ Cell growth Apoptosis	CDKs, IGF, EGF, VEGF Akt Epigenetic modifications	<i>Glycine max</i>
Δελφινιδίνη Delphinidin ανθοκυανιδίνη	LNCaP C4-2 22Rnu1 PC-3	PC-3 xenografts	↓ Cell growth Apoptosis ↓ Tumor growth	Caspases, NF-κB/PI3K, Notch-1, Wnt/β-catenin	<i>Delphinium sp.</i>
Ελαγικό οξύ Ellagic acid πολυφαινόλη	LNCaP DU145 PC-3		Apoptosis Anti-angiogenesis S cycle arrest, Apoptosis No-invasion	SIRT1, p21, AIF, ROS, caspases ↓ Eicosanoid, HO system Cyclin D1, B1 Bcl2/Bax, caspases MMP-2	<i>Rubus sp.</i>
Epigallocatechin -3-gallate κατεχίνη	LNCaP DU145 PC-3	CWR22R xenografts, TRAMP mice	G0/G1 cycle arrest Apoptosis ↓ Invasion- Metastasis Apoptosis	↑ WAF1/p21, KIP1/p27, INK4, ↓ Cyclins, CDKs p53, NF-kappaB, Bax/Bcl-2 ratio, caspases, COX-2, PI3K AR antagonist VEGF, MMPs, uPA, c-Met, angiopoietins ↓ IGF-1,MAPK	<i>Camellia sinensis</i>

Φισετίνη Fisetin φλαβονοειδές	PC-3 LNCaP	CWR22Rupsil on1 human xenograft	Cell cycle arrest No adhesion, Migration Autophagy ↓ Tumor growth	Cyclins, Cdks, ↓ AR NF-kappaB, MMP2, MMP9 mTOR, PI3K/Akt ↓ PSA	<i>Acacia geggii</i>
Φορμονονετίνη Formononetin ισοφλαβόνη	PC-3 LNCaP DU145		Apoptosis	ERK1/2 MAPK-Bax, IGF, Bax/Bcl-2 ratio, p38/Akt ↑ RASD1	<i>Trifolium pretense</i>
Γαλλικό οξύ Gallic acid πολυφαινόλη	DU145 LNCaP PC-3	TRAMP mice DU145, 22Rv1 xenografts	G2/M cycle arrest Apoptosis No migration ↓ Tumor growth Apoptosis	ATM-Chk2 ROS, caspases 3, 9 PI3K/AKT, NF-κB, MMP-2 Cdks, cyclin B1, E	<i>Vitis vinifera</i>
Γκαμπογκικό οξύ Gambogic acid ξανθίνη	PC-3	xenografts	Apoptosis, No invasion Anti-angiogenesis	NF-κB, PI3K/Akt VEGFR-2, c-Scr, Akt	<i>Gamboge hanburyi</i>
Γενιστεΐνη Genistein φλαβόνη	DU145 PC-3 ND1 LNCaP ALVA31 JCA1	PC-3, DU145 xenografts Lobund-Wistar rats, TRAMP mice Cabazitaxel + genistein, Genistein – loaded liposomes	Cycle arrest, Growth inhibition Apoptosis ↓ Angiogenesis No metastasis Growth inhibition Chemoprevention Apoptosis	↑ p21WAF1, ↓ Cdks, cyclins, survivin, DNA topoisomerase II, ↓ IGF-1/IGF-1R NF-κB, Akt, caspases IL-10 MMP-9, protease M, uPAR, VEGF Epigenetic modifications	<i>Glycine max</i>

Ginsenoside Rg3	PC-3 LNCaP		G1 cycle arrest Apoptosis Cell detachment No metastasis	p 21, p 27 Caspase-3 MAP kinases p 38 MAPK	<i>Panax sp.</i>
Ginsenoside Rh2	PC-3 LNCaP	PC-3 xenograft	↓ Cell proliferation, Detachment Apoptosis	MAP kinases	<i>Panax sp.</i>
25-OH-PPD 25-OCH3-PPD	PC-3 LNCaP	PC-3, LNCaP xenografts	G1 cycle arrest Apoptosis Tumor growth	p 21, p 27, Bax	<i>Panax sp.</i>
Γλυκυρετινικό οξύ Glycerrhitinic acid τριτερπένιο	DU145 LNCaP		Apoptosis, No invasion, Cell proliferation	NF-κB, VEGF, MMP-9 PSA	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
Ισοανγκουστόνη A Isoangustone A φλαβονοειδές	DU145		G1 cycle arrest Apoptosis	Cdks, cyclin A, D1 Caspases	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Λικοχαλκόνη Licochalcone φλαβονοειδές	PC-3 LNCaP		G2/M cycle arrest Apoptosis, Autophagy	Cyclin B1, cdc2	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
Γκοσσυπόλη Gossypol πολυφαινολική αλδεϋδη	PC-3, BPH DU145 docetaxel + gossypol sorafenib+ gossypol	PC-3 xenograft	G0/G1 cycle arrest Apoptosis, No invasion Apoptosis Autophagy Anti-angiogenesis Apoptosis Apoptosis, Autophagy	TGF-1 Bcl-X/Bcl-2, NF-κB, AP1 p53, Bcl-2, Bcl-xL, caspases Beclin1, Bcl-2/Bcl-xL VEGFR-2, Akt, Scr Noxa , Puma	<i>Gossypium hirsutum</i>
Χονοκιόλη Honokiol λιγνάνη	PC-3 LNCaP C4-2		G0/G1 cycle arrest Apoptosis	Bax, Bak, Bcl-xL	<i>Magnolia officinalis</i>
Λουτεολίνη Luteolin φλαβονοειδές	PC-3 DU145 LNCaP PC-3	PC-3 xenograft	Cell growth Apoptosis Anti- angiogenesis, No invasion	IGF-1, Akt, EGFR, MAPK/ERK DR5 VEGF-2R, AR, PSA	<i>Terminalia chebula</i>

Λυκοπένιο Lycopene καροτενοειδές	LNCaP PC-3 LNCaP DU145 LNCaP PC-3	PC-3 DU145 xenografts TRAMP mice Clinical trials	Cell cycle arrest ↓ Cholesterol synthesis Apoptosis ↓ Invasion Apoptosis Chemoprevention Chemoprevention	Cdk4, cyclins D1, E and Rb PPAR γ -LXR α -ABCA1 p21, p27, p53, Bax/Bcl-2, IGF integrins ↓ ROS, ↑ detoxification proteins PSA, androgen-estrogen metabolism	<i>Solanum lycopersicum</i>
Μανολόλη Magnolol διφαινόλη	PC-3		Apoptosis, No invasion	EGFR	<i>Magnolia officinalis</i>
Ομποβατόλη Obovatol διφαινόλη	LNCaP PC-3		Apoptosis	NF- κ B	<i>Magnolia obovata</i>
Οριδονίνη Oridonin ισοπρενοειδές	LNCaP PC-3		G2/M cycle arrest Apoptosis- Autophagy	p21	<i>Rabdosia rubescens</i>
PEITC ισοθειοκυανούχο	DU145 C4-2B LNCaP PC-3 PEITC + docetaxel PEITC+ etoposide + adriamycin	PC-3, LNCaP xenografts TRAMP mice	G2/M cycle arrest Apoptosis Autophagy No migration ↓ Tumor growth Autophagy Apoptosis Apoptosis	JAK/STAT-3, p53 ROS, survivin, caspases ATg5 Akt, VEGF, Notch PECAM1-CD31 E-cadherin ↓ protein kinase C, telomerase	<i>Brassica oleracea</i>
Κερσετίνη Quercetin πολυφαινόλη	LNCaP DU145 PC-3		Cell cycle arrest Apoptosis ↓ Adhesion, Metastasis ↓ Angiogenesis	Cyclins, Cdks, Rb, ErbB Bax, Bcl, caspases, IGF, ↓ fatty acid synthase, ↓ HS90, ↓ AR MMPs, uPA, uPAR, EGF, EGF-R	<i>Vitis sp.</i>

		LAPC-4 xenografts	↓ Tumor growth	AKT/mTOR/P70S6K	
Σανγκουϊναρίνη Sanguinarine αλκαλοειδές	LNCaP DU145 PC-3 C4-2B	DU145 xenografts	G0-G1 cycle arrest Apoptosis No invasion, Metastasis ↓ Tumor growth	p21/WAF1, p27/KIP1, Cdks survivin Stat3	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Σιλμπινίνη Silibinin φλαβονολιγνάνη	LNCaP DU145 22Rv1 PC-3 PC-3MM2 C4-2B	PC-3 xenografts DU145 xenografts, TRAMP Clinical trial	G1 cycle arrest G1, G2/M cycle arrest No invasion, Metastasis ↓ tumor growth Apoptosis, Angiogenesis ↓ Tumor growth ↓ Angiogenesis	Rb, Cdks, PDEF, ↓ PSA p21,p27, Wnt/LRp6 HIF1,Wnt/LRp6, cyclins, Cdks NF-κB, vimentin, MMP2 ↑ IGFBP-3, Cip1/p21, Kip1/p27, ↓ Bcl-2 IGF-IGFB-3 VEGF, vimentin, MMPs	<i>Silybum marianum</i>
Σουλφοραφάνη Sulforaphane ισοθειοκυανούχο	LNCaP PC-3 DU145	PC-3 xenografts, TRAMP	G1 cycle arrest G2/M cycle arrest Apoptosis ↓ Angiogenesis No migration ↓ Tumor growth	Methyltransferase, cyclins ROS, caspases, HDAC6, ↓ AR HIF-1, VEGF Notch HDAC	<i>Brassica oleracea</i>
Θυμοκινόνη Thymoquinone μονοτερπένιο	LNCaP C4-2B PC-3 DU145	LNCaP,C4-2B PC-3, DU145 xenografts	↓ Growth Apoptosis ↓ Angiogenesis	E2F-1, AR,AKT ROS VEGF	<i>Nigella sativa</i>
Ουρσολικό οξύ Ursolic acid τριτερπένιο	PC-3 LNCaP DU145	TRAMP mice	Apoptosis ↓ Angiogenesis No metastasis	JNK, caspases NF-κB, STAT3 CXCR4	<i>Corni fructus</i>

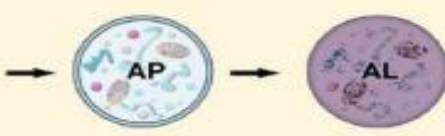
Gioti, K. and R. Tenta, Bioactive natural products against prostate cancer: mechanism of action and autophagic/apoptotic molecular pathways. *Planta Med*, 2015. 81(7): 543-62

Πίνακας 3

Μέθοδοι για την μελέτη της αυτοφαγίας - Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά οι πιο συνήθεις μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την μελέτη της αυτοφαγίας καθώς και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές που παρουσιάζονται στα A, C, D, E.

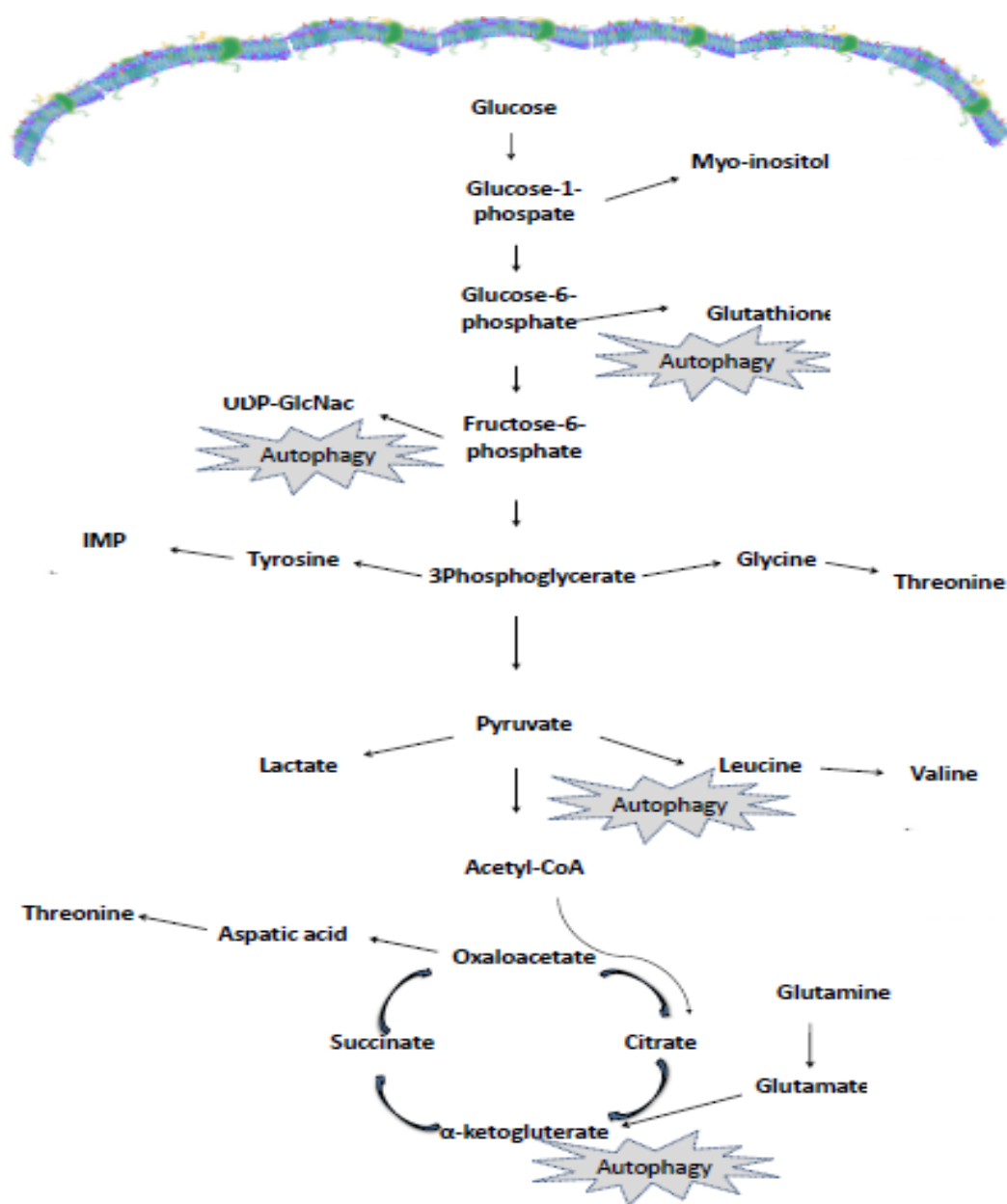
Assays		DETECTION METHODS	Typical Results			
CONVENTIONAL MORPHOLOGY	A AP/AL detection		BASAL	INDUCTION	SUPPRESSION (EARLY)	SUPPRESSION (LATE)
		EM	→ AP → AL	↑↑ AP ↑↑ AL	↓ AP ↓ AL	↑↑ AP ↓ AL
NUMBER OF AUTOPHAGOSOMES	B Number of LC3 or GFP-LC3 puncta per cell	FM	→	↑↑	↓	↑↑
	C LC3-II amount (LC3-conversion)	IB	→	↑↑	↓	↑↑
AUTOPHAGIC FLUX	D LC3 turnover assay Lysosomal inhibitors - + LC3-I LC3-II Difference in LC3-II levels	IB	→	↑↑	↓	↓
	E Amount of total LC3, GFP-LC3, p62 (selective substrates)	IB FC FM	→	↓	↑	↑
	F mRFP-GFP-LC3 color change	FM	→ R → Y	↑↑ R ↑↑ Y	↓ R ↓ Y	↓ R ↑↑ Y
	G GFP-LC3 cleavage	IB	→	↑↑	↓	↓

Noboru Mizushima et al. *Methods in mammalian autophagy research*. Cell 2010;5; 140 (3) 313-326

- A:** Παρατήρηση αυτοφαγοσωμάτων (AP) και αυτοφαγολυσωμάτων μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.
- B:** Παρατήρηση GFP-LC3 σημείων ανά κύτταρο με μικροσκόπιο φθορισμού.
- C:** Ποσοτική εκτίμηση της LC3-II πρωτεΐνης.
- D:** Ποσοτική εκτίμηση της μετατροπής της LC3-I ισομορφής στην LC3-II.
- E:** Ποσοτική εκτίμηση της συνολικής LC3-II πρωτεΐνης καθώς και της p62 πρωτεΐνης.
- F:** Ανίχνευση των αυτοφαγοσωμάτων σημασμένων με κίτρινη χρωστική mRFP-GFP-LC3 και των αυτοφαγο-λυσωμάτων σημασμένων με κόκκινη χρωστική (γιατί το GFP αποδομείται από το λυσόσωμα).
- G:** Ανίχνευση του θραύσματος GFP μετά από την αποδόμηση του GFP-LC3 στα λυσωσώματα, μέσω ανοσο-αποτύπωσης με τη χρήση anti-GFP αντισώματος.

Πίνακας 4

Μεταβολικά μονοπάτια και αυτοφαγία



Πίνακας 5. Κορυφές μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν

Μεταβολίτης	ppm	Πολλαπλότητα
Ισολευκίνη	0,94	t
	1,02	d
Λευκίνη	0,96	d
	0,97	d
Βαλίνη	1	d
	1,05	d
Γαλακτικό οξύ	1,33	d
	4,11	q
Θρεονίνη	1,34	d
	3,59	d
	4,26	m
Αλανίνη	1,49	d
Ακετικό οξύ	1,92	s
Γλουταμικό οξύ	2,05	m
	2,14	m
	2,34	m
	2,37	m
	3,75	dd
UDP-N-Ακετυλογλυκοσαμίνη	2,08	s
	5,52	m
	5,97	d
	5,99	d
	7,96	d
Γλουταμίνη	2,12	m
	2,16	m
	2,46	m
	2,48	m
Μεθειονίνη	2,14	s
	2,64	t
Γλουταθειόνη	2,16	m
	2,18	m
	2,54	m
	2,58	m
	2,93	m
	2,98	m
	4,57	m
Ακετόνη	2,24	s
Ηλεκτρικό	2,41	s
Κρεατίνη	3,04	s
	3,93	s

Φωσφορική Κρεατίνη	3,04	s
	3,94	s
Διμεθυλ-σουλφόνη	3,16	s
Ο-Φωσφοχολίνη	3,23	s
	4,17	m
sn-γλυκερό-3-φωσφοχολίνη	3,23	s
	4,33	m
Γλυκόζη	3,25	dd
	3,41	m
	3,42	m
	3,47	m
	3,5	m
	3,54	dd
	3,72	m
	3,73	m
	3,77	m
	3,83	m
	3,85	m
	3,9	dd
	4,65	d
	5,24	d
Ταυρίνη	3,27	t
	3,42	t
Μυο-Ινοσιτόλη	3,29	t
	3,54	dd
	3,63	t
	4,07	m
Μεθανόλη	3,36	s
Γλυκερόλη	3,56	dd
	3,66	dd
Γλυκίνη	3,56	s
NAD+	6,04	d
	6,1	d
	8,18	s
	8,20	m
	8,43	s
	8,84	m
	9,15	m
	9,35	m
XMP (IMP)	6,15	d
	8,28	s
	8,54	s
Τυροσίνη	6,91	d
	7,2	d

π-Μεθυλοιστιδίνη	7,1	s
	7,99	m
Φαινυλαλανίνη	7,34	m
	7,38	m
	7,44	m
Φορμικό	8,46	s

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Μπαρμπαλιάς, Γ.Α., ed. *Ουρολογία, Τυρογάτα, Ιατρική*.
2. Δημόπουλος, Κ.Α., ed. *Ουρολογία*. 4η Έκδοση ed. 1991, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη.
3. Rubin, E., ed. *Βασική Παθολογική Ανατομική*. Vol. I. 2002, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη. 112-122.
4. Rubin, E., ed. *Βασική Παθολογική Ανατομική*. Vol. II. 2002, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη. 625-627.
5. Metcalfe, C., et al., *Pathways to diagnosis for Black men and White men found to have prostate cancer: the PROCESS cohort study*. Br J Cancer, 2008. **99**(7): p. 1040-5.
6. Bruner, D.W., et al., *Relative risk of prostate cancer for men with affected relatives: systematic review and meta-analysis*. Int J Cancer, 2003. **107**(5): p. 797-803.
7. Johns, L.E. and R.S. Houlston, *A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk*. BJU Int, 2003. **91**(9): p. 789-94.
8. Hemminki, K. and K. Czene, *Attributable risks of familial cancer from the Family-Cancer Database*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(12): p. 1638-44.
9. Thompson, D. and D.F. Easton, *Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(18): p. 1358-65.
10. Thompson, D., et al., *Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 827-31.
11. Cheng, I., et al., *Prostatitis, sexually transmitted diseases, and prostate cancer: the California Men's Health Study*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8736.
12. Cao, Y. and J. Ma, *Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: a systematic review and meta-analysis*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(4): p. 486-501.
13. MacInnis, R.J. and D.R. English, *Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis*. Cancer Causes Control, 2006. **17**(8): p. 989-1003.
14. Cao, Y. and J. Ma, *Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: a systematic review and meta-analysis*. Cancer Prev Res (Phila). **4**(4): p. 486-501.
15. Skinner, H.G. and G.G. Schwartz, *Serum calcium and incident and fatal prostate cancer in the National Health and Nutrition Examination Survey*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(9): p. 2302-5.
16. Skinner, H.G. and G.G. Schwartz, *A prospective study of total and ionized serum calcium and fatal prostate cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(2): p. 575-8.
17. Ali, M.M. and V. Vaidya, *Vitamin D and cancer*. J Cancer Res Ther, 2007. **3**(4): p. 225-30.

18. Chan, J.M., et al., *Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(14): p. 1099-106.
19. Zheng, W. and S.A. Lee, *Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk*. Nutr Cancer, 2009. **61**(4): p. 437-46.
20. Cross, A.J. and R. Sinha, *Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer*. Environ Mol Mutagen, 2004. **44**(1): p. 44-55.
21. Felton, J.S., et al., *Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines*. Mutat Res, 2007. **616**(1-2): p. 90-4.
22. Arab, L., et al., *Adherence to World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research lifestyle recommendations reduces prostate cancer aggressiveness among African and Caucasian Americans*. Nutr Cancer. **65**(5): p. 633-43.
23. Huang, M., et al., *A high-fat diet enhances proliferation of prostate cancer cells and activates MCP-1/CCR2 signaling*. Prostate. **72**(16): p. 1779-88.
24. Yorimitsu, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy: molecular machinery for self-eating*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1542-52.
25. Mijaljica, D., M. Prescott, and R.J. Devenish, *Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum*. Autophagy, 2011. **7**(7): p. 673-82.
26. Massey, A., R. Kiffin, and A.M. Cuervo, *Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2420-34.
27. Parzych, K.R. and D.J. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxid Redox Signal, 2013. **20**(3): p. 460-73.
28. Abada, A. and Z. Elazar, *Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis*. EMBO Rep, 2014. **15**(8): p. 839-52.
29. Axe, E.L., et al., *Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 685-701.
30. Di Bartolomeo, S., et al., *The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy*. J Cell Biol, 2010. **191**(1): p. 155-68.
31. Nazio, F. and F. Cecconi, *mTOR, AMBRA1, and autophagy: an intricate relationship*. Cell Cycle, 2013. **12**(16): p. 2524-5.
32. Nazio, F., et al., *mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(4): p. 406-16.
33. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-93.

34. Hosokawa, N., et al., *Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 1981-91.
35. Ravikumar, B., et al., *Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1383-435.
36. White, E., *Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(6): p. 401-10.
37. Aita, V.M., et al., *Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21*. Genomics, 1999. **59**(1): p. 59-65.
38. Liang, X.H., et al., *Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 672-6.
39. Marino, G., et al., *Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18573-83.
40. Qu, X., et al., *Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1809-20.
41. Bai, H., et al., *A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers*. Oncogene, 2012. **31**(40): p. 4397-408.
42. He, H., et al., *Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 29278-87.
43. Ichimura, Y., et al., *A ubiquitin-like system mediates protein lipidation*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 488-92.
44. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. EMBO J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
45. Koukourakis, M.I., et al., *Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137675.
46. Nakamura, K., et al., *PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2009. **285**(3): p. 2077-89.
47. Sanchez, P., et al., *Localization of atypical protein kinase C isoforms into lysosome-targeted endosomes through interaction with p62*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 3069-80.
48. Wilson, M.I., et al., *PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62*. Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 39-50.
49. Long, J., et al., *Dimerisation of the UBA domain of p62 inhibits ubiquitin binding and regulates NF-kappaB signalling*. J Mol Biol, 2009. **396**(1): p. 178-94.
50. Kirkin, V., et al., *A role for ubiquitin in selective autophagy*. Mol Cell, 2009. **34**(3): p. 259-69.

51. Kraft, C., M. Peter, and K. Hofmann, *Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(9): p. 836-41.
52. Waters, S., et al., *Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover*. FEBS Lett, 2009. **583**(12): p. 1846-52.
53. Bjorkoy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. J Cell Biol, 2005. **171**(4): p. 603-14.
54. Kim, P.K., et al., *Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20567-74.
55. Pankiv, S., et al., *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24131-45.
56. Kaighn, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol, 1979. **17**(1): p. 16-23.
57. Ohnuki, Y., et al., *Chromosomal analysis of human prostatic adenocarcinoma cell lines*. Cancer Res, 1980. **40**(3): p. 524-34.
58. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(2): p. 185-229.
59. Kremer, L.C., et al., *Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study*. J Clin Oncol, 2001. **19**(1): p. 191-6.
60. Zhang, S., et al., *Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Nat Med, 2012. **18**(11): p. 1639-42.
61. Denard, B., C. Lee, and J. Ye, *Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1*. Elife, 2012. **1**: p. e00090.
62. Fogli, S., P. Nieri, and M.C. Breschi, *The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage*. FASEB J, 2004. **18**(6): p. 664-75.
63. Pawlowska, J., et al., *Differential ability of cytostatics from anthraquinone group to generate free radicals in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 reductase, and xanthine oxidase*. Oncol Res, 2003. **13**(5): p. 245-52.
64. Singal, P.K., C.M. Deally, and L.E. Weinberg, *Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review*. J Mol Cell Cardiol, 1987. **19**(8): p. 817-28.
65. Swain, S.M., F.S. Whaley, and M.S. Ewer, *Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials*. Cancer, 2003. **97**(11): p. 2869-79.
66. Lefrak, E.A., et al., *A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity*. Cancer, 1973. **32**(2): p. 302-14.
67. Broder, H., R.A. Gottlieb, and N.E. Lepor, *Chemotherapy and cardiotoxicity*. Rev Cardiovasc Med, 2008. **9**(2): p. 75-83.

68. Skalickova, S., et al., *Zinc-Modified Nanotransporter of Doxorubicin for Targeted Prostate Cancer Delivery*. Nanomaterials (Basel), 2018. **7**(12).
69. Gioti, K. and R. Tenta, *Bioactive natural products against prostate cancer: mechanism of action and autophagic/apoptotic molecular pathways*. Planta Med, 2015. **81**(7): p. 543-62.
70. Lowe, S.W. and A.W. Lin, *Apoptosis in cancer*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 485-95.
71. Ricardo Guimarães Amaral, S.A.d.S., Luciana Nalone Andrade, and P.S.a.A.A. Carvalho, *Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision*. Clin Onc, 2019(4): p. 1-5.
72. Surh, Y.J., *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 768-80.
73. Bharti Mangla, K.K., *Combination of Natural Agent with Synthetic Drug for the Breast Cancer Therapy*. Int J Drug Dev & Res 2018(10): p. 22-26.
74. Pezzani, R., et al., *Synergistic Effects of Plant Derivatives and Conventional Chemotherapeutic Agents: An Update on the Cancer Perspective*. Medicina (Kaunas), 2019. **55**(4).
75. Holm L, D.J., Holm E, Pancho J, Herberger J., *World weeds. Natural Histories and Distribution*. 1997, New York, USA: John Wiley and Sons, Inc.
76. Webb CJ, S.W., Garnock-Jones PJ, *Flora of New Zealand Vol IV: Naturalised Pteridophytes, Gymnosperms, Dicotyledons*. 1988: Christchurch, New Zealand: Botany Division, Department of Scientific and Industrial Research.
77. Gabay R, P.U., Danin A, *Factors affecting the dominance of Silybum marianum L. (Asteraceae) in its specific habitats*. Flora, 1994(189): p. 201-206.
78. Abenavoli, L., et al., *Milk thistle in liver diseases: past, present, future*. Phytother Res, 2010. **24**(10): p. 1423-32.
79. Kroll, D.J., H.S. Shaw, and N.H. Oberlies, *Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies*. Integr Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 110-9.
80. Ramasamy, K. and R. Agarwal, *Multitargeted therapy of cancer by silymarin*. Cancer Lett, 2008. **269**(2): p. 352-62.
81. Deep, G. and R. Agarwal, *Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer*. Integr Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 130-45.
82. Zi, X., D.K. Feyes, and R. Agarwal, *Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(4): p. 1055-64.
83. Tyagi, A., et al., *Silibinin activates p53-caspase 2 pathway and causes caspase-mediated cleavage of Cip1/p21 in apoptosis induction in bladder transitional-cell papilloma RT4 cells:*

- evidence for a regulatory loop between p53 and caspase 2. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(11): p. 2269-80.
84. Zhong, X., et al., *Silymarin causes caspases activation and apoptosis in K562 leukemia cells through inactivation of Akt pathway*. *Toxicology*, 2006. **227**(3): p. 211-6.
 85. Scambia, G., et al., *Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin*. *Eur J Cancer*, 1996. **32A**(5): p. 877-82.
 86. Davis-Searles, P.R., et al., *Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from Silybum marianum on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(10): p. 4448-57.
 87. Flaig, T.W., et al., *Silibinin synergizes with mitoxantrone to inhibit cell growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(9): p. 2028-33.
 88. Tyagi, A., C. Agarwal, and R. Agarwal, *Inhibition of retinoblastoma protein (Rb) phosphorylation at serine sites and an increase in Rb-E2F complex formation by silibinin in androgen-dependent human prostate carcinoma LNCaP cells: role in prostate cancer prevention*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(7): p. 525-32.
 89. Zi, X. and R. Agarwal, *Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(13): p. 7490-5.
 90. Thelen, P., et al., *Silibinin down-regulates prostate epithelium-derived Ets transcription factor in LNCaP prostate cancer cells*. *Planta Med*, 2004. **70**(5): p. 397-400.
 91. Thelen, P., et al., *Inhibition of telomerase activity and secretion of prostate specific antigen by silibinin in prostate cancer cells*. *J Urol*, 2004. **171**(5): p. 1934-8.
 92. Sharma, Y., et al., *Inhibitory effect of silibinin on ligand binding to erbB1 and associated mitogenic signaling, growth, and DNA synthesis in advanced human prostate carcinoma cells*. *Mol Carcinog*, 2001. **30**(4): p. 224-36.
 93. Tyagi, A., C. Agarwal, and R. Agarwal, *The cancer preventive flavonoid silibinin causes hypophosphorylation of Rb/p107 and Rb2/p130 via modulation of cell cycle regulators in human prostate carcinoma DU145 cells*. *Cell Cycle*, 2002. **1**(2): p. 137-42.
 94. Agarwal, C., et al., *Silibinin inhibits constitutive activation of Stat3, and causes caspase activation and apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(7): p. 1463-70.
 95. Dhanalakshmi, S., et al., *Silibinin inhibits constitutive and TNFalpha-induced activation of NF-kappaB and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNFalpha-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2002. **21**(11): p. 1759-67.

96. Lu, W., et al., *Silibinin inhibits Wnt/beta-catenin signaling by suppressing Wnt co-receptor LRP6 expression in human prostate and breast cancer cells*. Cell Signal. **24**(12): p. 2291-6.
97. Deep, G., et al., *Silymarin and silibinin cause G1 and G2-M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: a comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin*. Oncogene, 2006. **25**(7): p. 1053-69.
98. Deep, G., et al., *Role of E-cadherin in antimigratory and antiinvasive efficacy of silibinin in prostate cancer cells*. Cancer Prev Res (Phila). **4**(8): p. 1222-32.
99. Tyagi, A., et al., *Silibinin impairs constitutively active TGFalpha-EGFR autocrine loop in advanced human prostate carcinoma cells*. Pharm Res, 2008. **25**(9): p. 2143-50.
100. Wu, K., et al., *Silibinin reverses epithelial-to-mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by targeting transcription factors*. Oncol Rep. **23**(6): p. 1545-52.
101. Singh, R.P., et al., *Suppression of advanced human prostate tumor growth in athymic mice by silibinin feeding is associated with reduced cell proliferation, increased apoptosis, and inhibition of angiogenesis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(9): p. 933-9.
102. Jung, H.J., et al., *Silibinin inhibits expression of HIF-1alpha through suppression of protein translation in prostate cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(1): p. 71-6.
103. Singh, R.P., et al., *Silibinin suppresses in vivo growth of human prostate carcinoma PC-3 tumor xenograft*. Carcinogenesis, 2007. **28**(12): p. 2567-74.
104. Raina, K., et al., *Dietary feeding of silibinin inhibits prostate tumor growth and progression in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 11083-91.
105. Raina, K., et al., *Stage-specific inhibitory effects and associated mechanisms of silibinin on tumor progression and metastasis in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6822-30.
106. Singh, R.P., et al., *Silibinin inhibits established prostate tumor growth, progression, invasion, and metastasis and suppresses tumor angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model mice*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(23): p. 7773-80.
107. Flaig, T.W., et al., *A study of high-dose oral silybin-phytosome followed by prostatectomy in patients with localized prostate cancer*. Prostate. **70**(8): p. 848-55.
108. Flaig, T.W., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients*. Invest New Drugs, 2007. **25**(2): p. 139-46.
109. Schroder, F.H., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study in men with prostate cancer and rising PSA: effectiveness of a dietary supplement*. Eur Urol, 2005. **48**(6): p. 922-30; discussion 930-1.

110. Colombo, V., et al., *Chemotherapeutic activity of silymarin combined with doxorubicin or paclitaxel in sensitive and multidrug-resistant colon cancer cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 2010. **67**(2): p. 369-79.
111. Rastegar, H., et al., *The role of milk thistle extract in breast carcinoma cell line (MCF-7) apoptosis with doxorubicin*. Acta Med Iran, 2013. **51**(9): p. 591-8.
112. Sadava, D. and S.E. Kane, *Silibinin reverses drug resistance in human small-cell lung carcinoma cells*. Cancer Lett, 2013. **339**(1): p. 102-6.
113. Tyagi, A.K., et al., *Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(11): p. 3512-9.
114. Singh, R.P., et al., *Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor kappaB-mediated inducible chemoresistance*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8641-7.
115. PR, B., *British Herbal Compendium, Volume 1, BHMA, Bournemouth*. 1992.
116. Obolentseva GV, L.V., Ammosov AS, *Pharmacological and therapeutic properties of licorice preparations (a review)*. Pharm Chem J, 1999. **33**(24-31).
117. Yamamura, Y., et al., *Pharmacokinetic profile of glycyrrhizin in healthy volunteers by a new high-performance liquid chromatographic method*. J Pharm Sci, 1992. **81**(10): p. 1042-6.
118. Fu, Y., et al., *Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (Glycyrrhiza glabra), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(1): p. 263-70.
119. Yo, Y.T., et al., *Licorice and licochalcone-A induce autophagy in LNCaP prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression and the mTOR pathway*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(18): p. 8266-73.
120. Shetty, A.V., et al., *18alpha-glycyrrhetic acid targets prostate cancer cells by down-regulating inflammation-related genes*. Int J Oncol. **39**(3): p. 635-40.
121. Hawthorne, S. and S. Gallagher, *Effects of glycyrrhetic acid and liquorice extract on cell proliferation and prostate-specific antigen secretion in LNCaP prostate cancer cells*. J Pharm Pharmacol, 2008. **60**(5): p. 661-6.
122. Kanazawa, M., et al., *Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer*. Eur Urol, 2003. **43**(5): p. 580-6.
123. Qian, J., et al., *Glabridin resensitizes p-glycoprotein-overexpressing multidrug-resistant cancer cells to conventional chemotherapeutic agents*. Eur J Pharmacol, 2019. **852**: p. 231-243.
124. Zhu K, L.K., Wang H, Kang L, Dang C, Zhang Y, *Discovery of Glabridin as Potent Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor in SK-BR-3 Cell*. Pharmacology, 2019. **104**(3-4): p. 113-125.

125. Hsieh, M.J., et al., *Glabridin induces apoptosis and autophagy through JNK1/2 pathway in human hepatoma cells*. *Phytomedicine*, 2016. **23**(4): p. 359-66.
126. Hsieh, M.J., et al., *Glabridin inhibits migration and invasion by transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 through modulation of NF-kappaB and AP-1 activity in human liver cancer cells*. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(12): p. 3037-50.
127. Tsai, Y.M., et al., *Glabridin inhibits migration, invasion, and angiogenesis of human non-small cell lung cancer A549 cells by inhibiting the FAK/rho signaling pathway*. *Integr Cancer Ther*, 2010. **10**(4): p. 341-9.
128. Chiaradonna, F., et al., *From cancer metabolism to new biomarkers and drug targets*. *Biotechnol Adv*, 2011. **30**(1): p. 30-51.
129. Baenke, F., et al., *Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development*. *Dis Model Mech*, 2013. **6**(6): p. 1353-63.
130. Nicholson, J.K. and J.C. Lindon, *Systems biology: Metabonomics*. *Nature*, 2008. **455**(7216): p. 1054-6.
131. Costello, L.C., et al., *Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2004. **7**(2): p. 111-7.
132. Costello, L.C. and R.B. Franklin, *The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy*. *Oncology*, 2000. **59**(4): p. 269-82.
133. Costello, L.C., R.B. Franklin, and P. Narayan, *Citrate in the diagnosis of prostate cancer*. *Prostate*, 1999. **38**(3): p. 237-45.
134. Roberts, M.J., et al., *Metabolomics: a novel approach to early and noninvasive prostate cancer detection*. *Korean J Urol*, 2011. **52**(2): p. 79-89.
135. Gonzalez, C.D., et al., *Autophagy, Warburg, and Warburg Reverse Effects in Human Cancer*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 926729.
136. Cary, K.C. and M.R. Cooperberg, *Biomarkers in prostate cancer surveillance and screening: past, present, and future*. *Ther Adv Urol*, 2013. **5**(6): p. 318-29.
137. Wianowska, D. and M. Wisniewski, *Simplified procedure of silymarin extraction from *Silybum marianum* L. Gaertner*. *J Chromatogr Sci*, 2014. **53**(2): p. 366-72.
138. Cheilari, A., et al., *Head-to-Head Comparison of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection versus Quantitative Nuclear Magnetic Resonance for the Quantitative Analysis of the Silymarin Complex in *Silybum marianum* Fruit Extracts*. *J Agric Food Chem*, 2016. **64**(7): p. 1618-26.

139. Liu H., Y.Q., Li C.F., Huang T.X., *Isolation and purification of silychristin, silydianin and taxifolin in the co-products of the silybin refined process from the silymarin by high-speed counter-current chromatography*. Process Biochemistry, 2010. **45**: p. 799-804.
140. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
141. Brown, M. and C. Wittwer, *Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology*. Clin Chem, 2000. **46**(8 Pt 2): p. 1221-9.
142. Shankey, T.V., et al., *Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry*. International Society for Analytical Cytology. Cytometry, 1993. **14**(5): p. 472-7.
143. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1415-20.
144. Schmid, I., et al., *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry*. Cytometry, 1992. **13**(2): p. 204-8.
145. van Engeland, M., et al., *A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture*. Cytometry, 1996. **24**(2): p. 131-9.
146. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
147. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR--a perspective*. J Mol Endocrinol, 2005. **34**(3): p. 597-601.
148. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
149. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
150. Loizou, S., et al., *Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results*. Clin Exp Immunol, 1985. **62**(3): p. 738-45.
151. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
152. Le Belle, J.E., et al., *A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution 1H-NMR spectroscopy*. NMR Biomed, 2002. **15**(1): p. 37-44.
153. Craig, A., et al., *Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets*. Anal Chem, 2006. **78**(7): p. 2262-7.
154. Sadeghi-Bazargani H, B.A., Mohammadi A, *Using SIMCA statistical software package to apply orthogonal to latent structure modelling*. Conference Publication, 2009.

155. Madsen, R., T. Lundstedt, and J. Trygg, *Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis*. Anal Chim Acta, 2010. **659**(1-2): p. 23-33.
156. Barker M, R.W., *Partial Least Squares for discrimination*. Chemometrics, 2003(17): p. 166-173.
157. Nishimoto, N., *[Comparing multiple groups with continuous data -one-way analysis of variance]*. Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi, 2013. **69**(11): p. 1320-30.
158. Itakura, E. and N. Mizushima, *Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins*. Autophagy, 2010. **6**(6): p. 764-76.
159. Bhutia, S.K., et al., *Monitoring and Measuring Mammalian Autophagy*. Methods Mol Biol, 2018. **1854**: p. 209-222.
160. Yoshii, S.R. and N. Mizushima, *Monitoring and Measuring Autophagy*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9).
161. Jiang, P. and N. Mizushima, *LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells*. Methods, 2014. **75**: p. 13-8.
162. Eskelinen, E.L., *Fine structure of the autophagosome*. Methods Mol Biol, 2008. **445**: p. 11-28.
163. Eskelinen, E.L., *To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells*. Autophagy, 2008(4): p. 257-260.
164. Raina, K. and R. Agarwal, *Combinatorial strategies for cancer eradication by silibinin and cytotoxic agents: efficacy and mechanisms*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(9): p. 1466-75.
165. Roy, S., et al., *p21 and p27 induction by silibinin is essential for its cell cycle arrest effect in prostate carcinoma cells*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(10): p. 2696-707.
166. Molavi, O., et al., *Silibinin sensitizes chemo-resistant breast cancer cells to chemotherapy*. Pharm Biol, 2016. **55**(1): p. 729-739.
167. Yurtcu, E., O. Darcansoy Iseri, and F. Iffet Sahin, *Effects of silymarin and silymarin-doxorubicin applications on telomerase activity of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2*. J BUON, 2015. **20**(2): p. 555-61.
168. Li, W.G. and H.Q. Wang, *Inhibitory effects of Silibinin combined with doxorubicin in hepatocellular carcinoma; an in vivo study*. J BUON, 2016. **21**(4): p. 917-924.
169. Mizushima Noboru, Y.T., *How to interpret LC3 Immunoblotting*. Autophagy, 2015. **3**(6): p. 542-545.
170. Kaini, R.R., et al., *Autophagy regulates lipolysis and cell survival through lipid droplet degradation in androgen-sensitive prostate cancer cells*. Prostate, 2012. **72**(13): p. 1412-22.
171. Johansen, T. and T. Lamark, *Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins*. Autophagy, 2010. **7**(3): p. 279-96.

172. Wang, J., et al., *Inhibition of autophagy promotes apoptosis and enhances anticancer efficacy of adriamycin via augmented ROS generation in prostate cancer cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2016. **77**(Pt A): p. 80-90.
173. Xu, S. and Z. Weihua, *Loss of EGFR induced autophagy sensitizes hormone refractory prostate cancer cells to adriamycin*. Prostate, 2011. **71**(11): p. 1216-24.
174. Chen, H., et al., *Danthron suppresses autophagy and sensitizes pancreatic cancer cells to doxorubicin*. Toxicol In Vitro, 2018. **54**: p. 345-353.
175. Wang, W., D. Chen, and K. Zhu, *SOX2OT variant 7 contributes to the synergistic interaction between EGCG and Doxorubicin to kill osteosarcoma via autophagy and stemness inhibition*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 37.
176. Kuzu, O.F., et al., *Leelamine mediates cancer cell death through inhibition of intracellular cholesterol transport*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(7): p. 1690-703.
177. Rabinowitz, J.D. and E. White, *Autophagy and metabolism*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1344-8.
178. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
179. Lin, G., et al., *Dichloroacetate induces autophagy in colorectal cancer cells and tumours*. Br J Cancer, 2014. **111**(2): p. 375-85.
180. Lee, M.N., et al., *Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(14): p. 3991-4001.
181. de Queiroz, R.M., E. Carvalho, and W.B. Dias, *O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 132.
182. Xi H, K.L., H Wangpaichitr M You M, Liu X, Savaraj N, Lampidis TJ, *2- Deoxy-Dglucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion*. Cancer Chemother Pharmacol 2011: p. 899-910.
183. Wamelink, M.M., E.A. Struys, and C. Jakobs, *The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review*. J Inherit Metab Dis, 2008. **31**(6): p. 703-17.
184. Desideri, E., G. Filomeni, and M.R. Ciriolo, *Glutathione participates in the modulation of starvation-induced autophagy in carcinoma cells*. Autophagy, 2012. **8**(12): p. 1769-81.
185. Sengupta, S., T.R. Peterson, and D.M. Sabatini, *Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 310-22.
186. Kimball SR, J.L., *Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis*. J Nutr, 2006. **136**: p. 227S-231S.
187. Hara, K., et al., *Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14484-94.

188. Duran, R.V., et al., *Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling*. Mol Cell, 2012. **47**(3): p. 349-58.
189. Filteau, M., et al., *Systematic identification of signal integration by protein kinase A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(14): p. 4501-6.
190. Sutter, B.M., et al., *Methionine inhibits autophagy and promotes growth by inducing the SAM-responsive methylation of PP2A*. Cell, 2013. **154**(2): p. 403-15.
191. Zhang, Y., et al., *Inhibition of Starvation-Triggered Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Apoptosis in ARPE-19 Cells by Taurine through Modulating the Expression of Calpain-1 and Calpain-2*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
192. Mirisola, M.G., et al., *Serine- and threonine/valine-dependent activation of PDK and Tor orthologs converge on Sch9 to promote aging*. PLoS Genet, 2014. **10**(2): p. e1004113.
193. Bilim, V., et al., *Adriamycin induced G2/M cell cycle arrest in transitional cell cancer cells with wt p53 and p21(WAF1/CIP1) genes*. J Exp Clin Cancer Res, 2000. **19**(4): p. 483-8.
194. Nourazarian, S.M., et al., *Effect of Root Extracts of Medicinal Herb Glycyrrhiza glabra on HSP90 Gene Expression and Apoptosis in the HT-29 Colon Cancer Cell Line*. Asian Pac J Cancer Prev, 2016. **16**(18): p. 8563-6.
195. Farooqui, A., et al., *Glycyrrhizin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis and cell cycle arrest at G0/G1 in HPV18(+) human cervical cancer HeLa cell line*. Biomed Pharmacother, 2017. **97**: p. 752-764.
196. Kwon, S.J., et al., *Licochalcone E present in licorice suppresses lung metastasis in the 4T1 mammary orthotopic cancer model*. Cancer Prev Res (Phila), 2013. **6**(6): p. 603-13.
197. Song, N.R., et al., *Isoangustone A, a novel licorice compound, inhibits cell proliferation by targeting PI3K, MKK4, and MKK7 in human melanoma*. Cancer Prev Res (Phila), 2013. **6**(12): p. 1293-303.
198. Jung, J.I., et al., *Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells*. J Nutr Biochem, 2006. **17**(10): p. 689-96.
199. Kwon, G.T., et al., *Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(9): p. 663-76.
200. Zhang, X., et al., *Isoliquiritigenin, a natural anti-oxidant, selectively inhibits the proliferation of prostate cancer cells*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(8): p. 841-7.
201. Zhang, B., et al., *Antineoplastic activity of isoliquiritigenin, a chalcone compound, in androgen-independent human prostate cancer cells linked to G2/M cell cycle arrest and cell apoptosis*. Eur J Pharmacol, 2017. **821**: p. 57-67.
202. Daniel J Klionsky KA, A.A., Md Joynal Abedin et al, *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. Autophagy, 2016. **12**: p. 1-222.

203. Puissant, A. and P. Auberger, *AMPK- and p62/SQSTM1-dependent autophagy mediate resveratrol-induced cell death in chronic myelogenous leukemia*. *Autophagy*, 2010. **6**(5): p. 655-7.
204. Puissant, A., et al., *Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation*. *Cancer Res*, 2010. **70**(3): p. 1042-52.
205. Ji, S., et al., *Licoricidin inhibits the growth of SW480 human colorectal adenocarcinoma cells in vitro and in vivo by inducing cycle arrest, apoptosis and autophagy*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017. **326**: p. 25-33.
206. Dall'Armi, C., K.A. Devereaux, and G. Di Paolo, *The role of lipids in the control of autophagy*. *Curr Biol*, 2013. **23**(1): p. R33-45.