

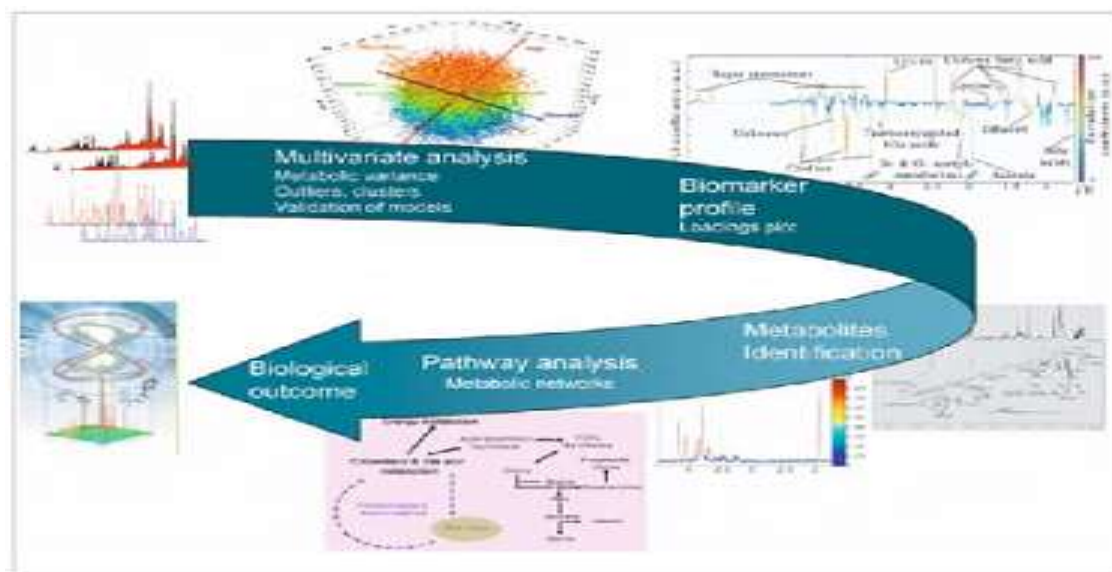


ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΜΕ NMR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ



ΤΣΟΥΚΑΛΑ ΜΑΓΚΑΦΟΥΛΑ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ Ε.Κ.Π.Α

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον καθηγητή κ. Μικρό Εμμανουήλ, επιβλέποντα καθηγητή μου και μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την ανάθεση του πολύ καινοτόμου και ενδιαφέροντος επιστημονικά θέματος, την συνεχή στήριξη και παροχή συμβουλών, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την κατανόηση του σε ενδοεργαστηριακά και εξωεργαστηριακά ζητήματα χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσας εργασίας,

την επίκουρη καθηγήτρια κ. Τέντα Ρωξάνη για την επι διετίας καθημερινή ενασχόληση της μαζί μου, την μύηση στον εκπληκτικό μικρόκοσμο των κυττάρων, την συνεχή εκπαίδευση σε βιολογικές τεχνικές, την επίλυση των επιστημονικών ανησυχιών μου και την κατανόηση και ανοχή της σε διάφορα θέματα,

τον διδάκτορα κ. Κωστίδη Σαράντο για την πολύωρη ενασχόληση του μαζί μου στην διεξαγωγή των πειραμάτων, την εκμάθηση της προσέγγισης των φασματικών δεδομένων, την επεξήγηση στατιστικών διαδικασιών και γενικότερα την προθυμία του στην παροχή στήριξης και βοήθειας σε κάθε επίπεδο,

τα δύο μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον καθηγητή κ. Φώσκολο Γεώργιο και τον καθηγητή κ. Κουππάρη Μιχαήλ για την εποικοδομητική καθοδήγησή τους,

τον επίκουρο καθηγητή κ. Αληγιάννη Νεκτάριο για την παροχή ολειτουργιακής και τις συμβουλές του σε γενικότερα θέματα που την αφορούν,

την επίκουρη καθηγήτρια κ. Ανδρεάδου Ιωάννα για την παροχή βιβλιογραφικού υλικού,

τον λέκτορα κ. Γκίκα Ευάγγελο για την πολύπλευρη στήριξη,

τους κ. Κλέτσα Δημήτρη και Πρατσίνη Χάρη για τα πειράματα του κυτταρικού κύκλου (ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος)

τον λέκτορα κ. Toby Athersuch για την υπόδειξη διαφορετικών προσεγγίσεων και την παροχή συμβουλών σε στατιστικά ζητήματα,

όλους όσοι συνέβαλλαν στην παροχή οργάνων για την υλοποίηση των πειραμάτων στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, στην Ευρωκλινική Αθηνών, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών,

τους συναδέλφους στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας για την ευχάριστη συνύπαρξη,

τους κοντινούς μου ανθρώπους για την αμέριστη συμπαράσταση σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου στην πολυδιάστατη Φαρμακευτική Επιστήμη.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ με τίτλο «Παραγωγή και Έλεγχος Φαρμακευτικών Ενώσεων» με ειδίκευση στην Φαρμακευτική Ανάλυση, του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας της Φαρμακευτικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η τριμελής επιτροπή απαρτίζεται από: τον καθηγητή κ.Εμμανουήλ Μικρό (επιβλέποντα), τον καθηγητή κ.Γεώργιο Φώσκολο και τον καθηγητή κ.Μιχαήλ Κουττάρη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Πραγματοποιήθηκε χρονο και δοσο- εξαρτώμενη επίδραση της ολεωρωπαΐνης, αδριαμυκίνης και συνδυασμού αυτών σε κύτταρα PC-3 με στόχο: Τον προσδιορισμό των μεταβολιτών που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων και την μεταβολή τους μετά την χορήγηση των επιδράσεων. Την μελέτη της κυτταροστατικότητας των επιδράσεων και της επίπτωσης τους στον κυτταρικό κύκλο. Την διερεύνηση του μηχανισμού δράσης τους μέσω του προσδιορισμού της θέσης και της έκφρασης της LC3 πρωτεΐνης.

Μεθοδολογία: Καλλιεργήθηκαν κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-3 προερχόμενα από προστατικό αδενοκαρκίνωμα και επωάστηκαν με τον αντικαρκινικό παράγοντα αδριαμυκίνη 100nM και το φυσικό συστατικό ολεωρωπαΐνη 100μg/mL για 48 ώρες σε μονοχορήγηση και συγχορήγηση. Λήφθησαν τα οργανικά και υδατικά τους εκχυλίσματα με φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού. Ακολούθησε επεξεργασία των υδατικών εκχυλισμάτων με ταυτοποίηση των μεταβολιτών και στατιστική ανάλυση με τις μεθόδους PCA, PLS-DA και z-score. Παράλληλα, αξιολογήθηκε η δοσοεξαρτώμενη 96 ωρών κυτταροστατική επίδραση ολεωρωπαΐνης σε συγκεντρώσεις: 400, 200, 150, 100, 75, 50, 37.5, 25, 12.5, 6.25 μg/mL, αδριαμυκίνης σε δόσεις 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM και συγχορήγησης των παραπάνω δόσεων αδριαμυκίνης με ολεωρωπαΐνη 100 μg/mL και 200 μg/mL, επί των κυττάρων PC-3 μέσω δοκιμασιών MTT.

Για την μελέτη της επίδρασης επί των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, ολεωρωπαΐνη 100μg/mL, αδριαμυκίνη 100nM και συνδυασμός ολεωρωπαΐνης 100μg/mL & αδριαμυκίνης 100nM, χορηγήθηκαν στα κύτταρα για 24, 48, 72 ώρες. Το περιεχόμενο τους σε γενετικό υλικό αναλύθηκε σε κυτταρομετρητή ροής.

Μέσω της τεχνικής του ανοσοφθορισμού έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της θέσης της LC3 πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα PC-3 επωάστηκαν για 24 ώρες με τους παράγοντες: ολεωρωπαΐνη 200μg/mL, αδριαμυκίνη 50nM, αδριαμυκίνη 50nM & ολεωρωπαΐνη 100μg/mL, αδριαμυκίνη 50nM & ολεωρωπαΐνη 200μg/mL, χλωροκίνη 50μM και αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Τέλος κύτταρα PC3 επωάστηκαν με τους παράγοντες ολεωρωπαΐνη 200μg/mL, αδριαμυκίνη 50nM, αδριαμυκίνη 50nM & ολεωρωπαΐνη 200μg/mL και αναλύθηκαν με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης για την διερεύνηση της έκφρασης της LC3 πρωτεΐνης.

Αποτελέσματα: Μέσω NMR μεταβολομικής ανάλυσης, συνολικά ταυτοποιήθηκαν 39 μεταβολίτες και προσδιορίστηκαν εκείνοι που είναι υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων των επιδράσεων τόσο μεταξύ τους όσο και από την ομάδα αναφοράς.

Από τις δοκιμασίες MTT, φάνηκε πως η ολευρωπαΐνη είχε ανασταλτική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις όπως και η αδριαμυκίνη (πλην της 6.25nM). Η συγχορήγηση αδριαμυκίνης με σταθερή δόση ολευρωπαΐνης 100 µg/mL δεν εμφάνισε διαφορά στην αναστολή συγκριτικά με την μονοχορήγηση αδριαμυκίνης. Τέλος, η συγχορήγηση ολευρωπαΐνης 200µg/mL με αδριαμυκίνη κατέληξε σε ικανοποιητική ανασταλτική δράση για όλες τις συγκεντρώσεις με την συγχορήγηση ολευρωπαΐνης 200µg/mL με αδριαμυκίνη 3 έως 12.5nM, να δίνει υψηλά ποσοστά αναστολής. Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου αποκάλυψε την επαγόμενη από την αδριαμυκίνη και την συγχορήγηση στάση του κύκλου στην φάση G2/M και από την ολευρωπαΐνη στην φάση G0/G1. Με τον ανοσοφθορισμό και την ανοσοαποτύπωση, παρατηρήθηκε περιπυρηνική εμφάνιση της LC3 πρωτεΐνης και επαγωγή της έκφρασης της LC3-II στα κύτταρα που δέχτηκαν ολευρωπαΐνη, αδριαμυκίνη και συνδυασμό αυτών.

Συμπεράσματα: Από τους μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν, οι εμπλεκόμενοι στην παραγωγή ενέργειας και δομικών μονάδων των ταχέως διαιρούμενων καρκινικών κυττάρων καθώς και στο οξειδωτικό τους προφίλ, φαίνεται να πρωταγωνιστούν στον διαχωρισμό των ομάδων αδριαμυκίνης, ολευρωπαΐνης, συνδυασμού αδριαμυκίνης-ολευρωπαΐνης και κυττάρων αναφοράς. Τα πειράματα MTT δείχνουν πως η συγχορήγηση αδριαμυκίνης με ολευρωπαΐνη 200µg/mL, προκαλεί την μεγαλύτερη αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Όλες οι επιδράσεις φαίνεται να επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο σε διαφορετικές όμως φάσεις αυτού. Τέλος ως μηχανισμός δράσης των παραγόντων αδριαμυκίνης και ολευρωπαΐνης, προτείνεται η αυτοφαγία καθώς παρατηρείται περιπυρηνική θέση της LC3 πρωτεΐνης και επαγωγή της έκφρασης της LC3-II ισομορφής έναντι της LC3-I.

SUMMARY

Objective: There was time and dose-dependent administration of the factors oleuropein, adriamycin and their combination on PC-3 cells with the aim of: Identification of the metabolites involved in the metabolism of cancer cells and their change after the treatment with these factors. Evaluation of their cytostatic action and impact on cell cycle. Investigation of their mechanism of action by identifying the location and expression of LC3 protein.

Methodology: In this study, PC-3 androgen independent prostate cancer cells were incubated with the anticancer agent adriamycin 100nM and the natural component oleuropein 100ug/mL for 48 hrs alone and in coadministration. The organic and aqueous extracts were analyzed with the nuclear magnetic resonance spectroscopy. Processing of the aqueous extracts with identification of metabolites and statistical analysis methods PCA, PLS-DA and z-score, was followed. Furthermore, the 96 hour cytostatic effect of the previous factors upon the PC-3 cells was assessed through MTT tests. The factors were: oleuropein in concentrations: 400, 200, 150, 100, 75, 50, 37.5, 25, 12.5, 6.25 ug/mL, adriamycin at doses of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM and the combination of the above doses of adriamycin with oleuropein 100 ug/mL and 200 ug/mL.

To study the effect upon the cell cycle phases, oleuropein 100ug/mL, adriamycin 100nM and combination of oleuropein 100ug/mL and adriamycin 100nM, were administered to the cells for 24, 48, 72 hours. The cell content in genetic material was analyzed by flow cytometry.

Through the technique of immunofluorescence the detection of position of LC3 protein was attempted. For this purpose, PC-3 cells were incubated for 24 h with the agents: oleuropein 200ug/mL, adriamycin 50nM, adriamycin 50nM & oleuropein 100ug/mL, adriamycin 50nM & oleuropein 200ug/mL, 50uM chloroquine 50uM and analyzed by fluorescence microscopy.

Finally, the PC-3 cells were incubated with the factors oleuropein 200ug/mL, adriamycin 50nM, adriamycin 50nM & oleuropein 200ug/mL and analyzed using the technique of immunoblotting in order to investigate the expression of LC3 protein.

Results: Through metabonomic NMR analysis a total number of 39 metabolites were identified and those responsible for the separation of groups of effects both among themselves and from the reference group, were recognized.

From the MTT tests, it seemed that oleuropein had inhibitory effect at all concentrations as well as adriamycin (excluding 6.25nM). Coadministration of adriamycin fixed dose with oleuropein 100 ug / mL showed no difference in inhibition compared to adriamycin alone. Finally, coadministration of oleuropein 200ug/mL with adriamycin, resulted in satisfactory inhibitory effect for all concentrations with the cotreatment oleuropein 200ug/mL with adriamycin 3 -12.5nM, giving high inhibition. The study of the cell cycle revealed induced stop cycle by adriamycin and the coadministration in phase G2 / M and by oleuropein in phase G0/G1. With immunofluorescence and immunoblotting, there was noticed perinuclear appearance of LC3 protein and induction of expression of LC3-II respectively, in cells that received oleuropein, adriamycin and their combination.

Conclusions: Among the identified metabolites, those involved in energy production and membrane building of rapidly dividing tumor cells as well as in oxidative profile, seemed to be starring in separating the groups adriamycin, oleuropein, oleuropein-adriamycin combination and control. From MTT experiments, it appeared that coadministration with adriamycin and oleuropein 200ug/mL, causes the greatest inhibition of proliferation of cancer cells. All effects appear to affect the cell cycle but at different phases of him. Finally, the autophagy was proposed as mechanism of action of the agents adriamycin and oleuropein, as perinuclear position of LC3 protein and induction of expression of LC3-II against LC3-I, was observed.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου κακοήθους αιτιολογίας στους άρρενες. Καθώς η κατάσταση υγείας και νοσηρότητας επηρεάζεται από μια μεγάλη και ετερογενή ομάδα παραγόντων, είναι απαραίτητο να ληφθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης που τελικά καθορίζει την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Μια τέτοια εικόνα λαμβάνεται από την επιστήμη της μεταβιονομικής, μιας ολιστικής και μη στοχευμένης αναλυτικής πλατφόρμας που επιτρέπει μέσω των υψηλών δυνατοτήτων της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, την κατανόηση της διαταραχής στο επίπεδο των μεταβολιτών στα βιολογικά συστήματα, ανιχνεύοντας στον ίδιο χρόνο ένα μεγάλο πλήθος μεταβολιτών. Η διαταραχή αυτή μπορεί να είναι ενδεικτική για τους βιοχημικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην κακοήγη μετατροπή των προστατικών κυττάρων και των σταδίων αυτής όπως και για τους μηχανισμούς δράσης των χημειοθεραπευτικών ουσιών που χορηγούνται σε αυτά, μέσω του προσδιορισμού συγκεκριμένων βιοδεικτών. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα για έγκαιρη διάγνωση της νόσου και προσεκτικό σχεδιασμό και επιλογή της θεραπευτικής προσέγγισης γεγονότα που αυξάνουν τις πιθανότητες θετικής πρόγνωσης.

Παράλληλα, τις τελευταίες δεκαετίες γίνεται όλο και περισσότερο λόγος για τα προϊόντα φυτικής προέλευσης και την πιθανή αντικαρκινική τους δυναμική. Η χρήση τους είναι ευρύτατα διαδεδομένη τόσο σε χημειοθεραπευτικό όσο και χημειοπροστατευτικό επίπεδο με ιδιαίτερη αναφορά στην αντιμετώπιση των ανεπιθύμητων ενεργειών των αντικαρκινικών φαρμάκων.

Έτσι, στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση ενός φυσικού προϊόντος, αυτού της ολεωρωπαΐνης γίνεται τόσο αυτόνομα όσο και σε συνδυασμό με τον γνωστό αντικαρκινικό παράγοντα αδριαμυκίνη και μελετάται η επίδραση τους στα καρκινικά κύτταρα PC-3 μέσω NMR φασματοσκοπικής ανάλυσης, μοριακών και ανοσοχημικών τεχνικών.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	II
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	IV
SUMMARY	VI
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	VIII
ΚΕΦ 1. ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ	1
1.1 Εισαγωγή στη μεταβολομική.....	1
1.2 Γενικές αρχές μεταβολομικής μελέτης.....	3
1.3 Γενικές εφαρμογές της μεταβολομικής με NMR φασματοσκοπία.....	5
ΚΕΦ 2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ	8
2.1 Καρκίνος	9
2.2 Καρκίνος προστάτη.....	9
2.3 Κυτταρική σειρά PC-3 καρκίνου προστάτη	14
ΚΕΦ 3. ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	14
3.1 Μεταβολικές ιδιαιτερότητες στον καρκίνο	14
3.2 Εφαρμογές της μεταβολομικής στον καρκίνο με διάφορες αναλυτικές τεχνικές.	15
3.3 Εφαρμογές της μεταβολομικής στον καρκίνο με NMR φασματοσκοπία... ..	16
3.4 Μεταβολομική προσέγγιση καρκίνου του προστάτη	19
ΚΕΦ 4. ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗ	25
ΚΕΦ 5. ΟΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ	29
ΚΕΦ 6. ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ	32
6.1 LC3 πρωτεΐνη	34

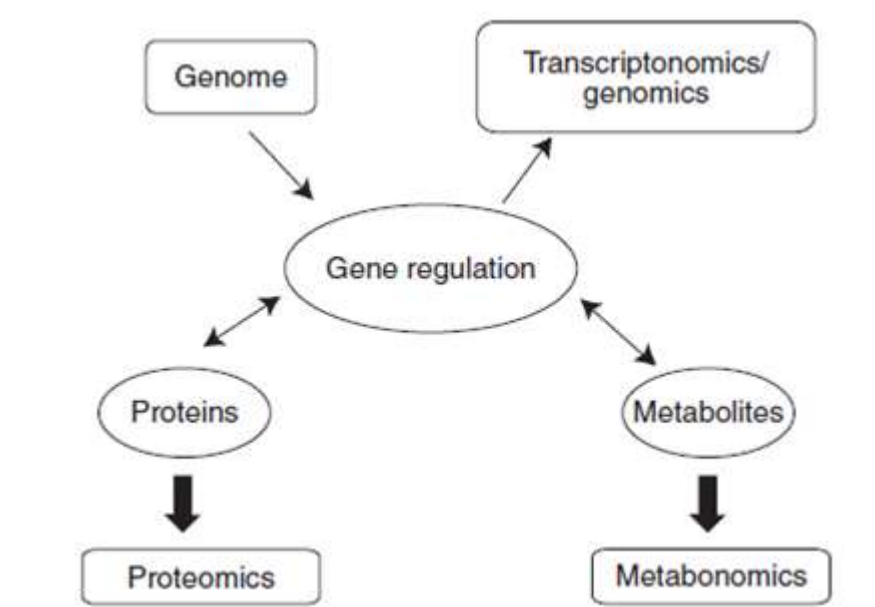
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	35
ΚΕΦ 7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΥΤΤΑΡΑ	36
7.1 Κυτταροκαλλιέργειες	36
7.2 Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT.....	37
7.3 Μελέτη κυτταρικού κύκλου	40
7.4 Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence).....	42
7.5 Δοκιμασία προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	43
7.6 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting).....	44
ΚΕΦ 8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ NMR	47
8.1 Προετοιμασία δειγμάτων	47
8.2 Λήψη φασμάτων ¹ H-NMR	49
8.3 Προετοιμασία για χημειομετρικό μέρος	55
ΚΕΦ 9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
9.1 Αποτελέσματα MTT κυτταροτοξικών δοκιμασιών	65
9.1.1 Αδριαμυκίνη	65
9.1.2 Ολευρωπαΐνη	66
9.1.3 Συγχορήγηση ολευρωπαΐνης και αδριαμυκίνης	68
9.2 Αποτελέσματα κυτταρικού κύκλου	70
9.2.1 Επίδραση 24 ώρες	70
9.2.2 Επίδραση 48 ώρες	72
9.2.3 Επίδραση 72 ώρες	73
9.3 Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού	75
9.4 Αποτελέσματα ανάλυσης NMR	79
9.4.A Ταυτοποίηση μεταβολιτών	79
9.4.B Στατιστική επεξεργασία	89
9.4.B1 Ομάδες αδριαμυκίνης (adr) – αναφοράς (ctrl)	92
9.4.B2 Ομάδες ολευρωπαΐνης (oleu) – αναφοράς (ctrl).....	95
9.4.B3 Ομάδες συγχορήγησης ολευρωπαΐνης και αδριαμυκίνης (adr+oleu) – αναφοράς (ctrl)	98
9.4.B4 Ομάδες αδριαμυκίνης (adr) – ολευρωπαΐνης (oleu)	102

9.4.B5 Ομάδες αδριαμυκίνης (adr) – συγχορήγησης αδριαμυκίνης και ολευρωπαΐνης (adr+oleu)	104
9.4.B6 Ομάδες συγχορήγησης αδριαμυκίνης και ολευρωπαΐνης (adr+oleu) – ολευρωπαΐνης (oleu)	107
9.5 Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης.....	111
ΚΕΦ 10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	112
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	127

ΚΕΦ 1. ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ

1.1 Εισαγωγή στη μεταβονομική

Το ανθρώπινο είδος βρίσκεται συνεχώς αντιμέτωπο με πληθώρα παραγόντων που απειλούν την υγεία και την ευεξία του. Τέτοιοι παράγοντες είναι η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά από μικροβιακά στελέχη, η αντίσταση στην ινσουλίνη, οι νέοι ιοί, η ραγδαία αύξηση περιστατικών καρκίνου και νευροεκφυλιστικών νόσων και πολλοί άλλοι. Αυτά τα προβλήματα καθώς ανακύπτουν από αλληλεπίδραση γενετικών διαδικασιών και περιβαλλοντικών συνθηκών, καθιστούν επιτακτική την ανάγκη μελέτης του μηχανισμού τους¹. Έτσι για την κατανόηση αυτών των μηχανισμών αναπτύχθηκαν νέες αναλυτικές προσεγγίσεις - πλατφόρμες όπως <<genomics>>, <<proteomics>> που επιτρέπουν την παροχή πληροφοριών σε μοριακό επίπεδο αφού μελετούν την απόκριση του οργανισμού στην χορήγηση φαρμάκων σε επίπεδο γονιδίων και έκφρασης πρωτεϊνών αντίστοιχα² ενώ εισήχθη και ο όρος <<global systems biology>> για να περιγράψει αυτή ακριβώς την προηγούμενη αλληλεπίδραση. Ένας οργανισμός λειτουργεί ως ένα βιολογικό σύστημα, το οποίο όντας εγγενώς πολυδιάστατο απαιτεί ένα εύρος επιστημονικών τεχνικών για την μελέτη του. Έτσι σήμερα υπάρχουν περίπου 200 διαφορετικά <<omics>>¹.



Εικ 1: Αλληλεπίδραση όλων των omics σε έναν ζωντανό οργανισμό και άρα η ανάγκη ταυτόχρονης μελέτης τους³.

Ήδη από τα 1980 όμως, πριν από την έκρηξη των <<omics>>, είχε πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού μεταβολιτών σε

βιολογικά υγρά με ^1H -NMR φασματοσκοπία με ακόλουθη ερμηνεία του πολύπλοκου συνόλου δεδομένων με χημειομετρικές μεθόδους. Τότε γεννήθηκε η ιδέα <<metabonomics>> παρόλο που σαν όρος δεν είχε ακόμη καθιερωθεί¹.

Οι πρώτες μελέτες σχετικά με εφαρμογή NMR φασματοσκοπίας σε βιολογικά υγρά σε συνδυασμό με μεθόδους αναγνώρισης προτύπων ξεκίνησε το 1990 με τις πρώτες μελέτες να αφορούν σε προσδιορισμό της τοξικότητας των ξενοβιοτικών σε ζωικά μοντέλα.

Οι Lindon et al, όρισαν λίγο αργότερα την μεταβονομική ως: *την ποσοτική μέτρηση της πολυπαραμετρικής μεταβολικής απόκρισης οργανισμών σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα ή γενετικές τροποποιήσεις*¹.

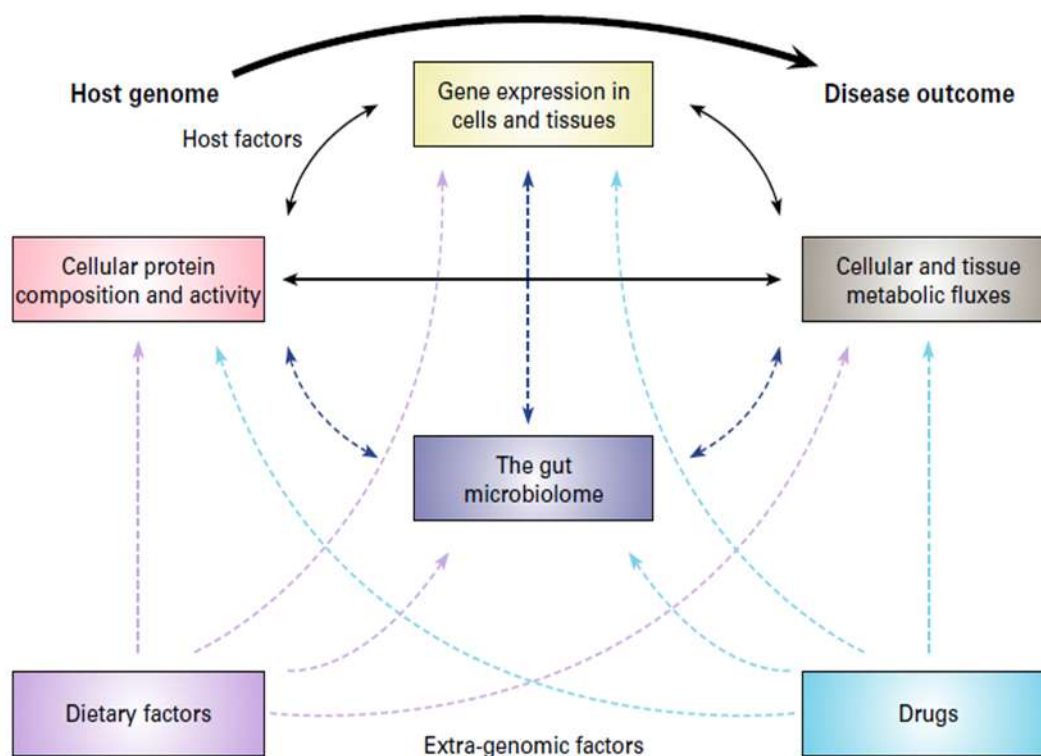
Η μεταβονομική συμπληρώνει τις πλατφόρμες genomics and proteomics καθώς δίνει πληροφορίες και για την δυναμική μεταβολική κατάσταση ολόκληρου του οργανισμού σε πραγματικό χρόνο². Η μεταβονομική δίνει μια σαφή εικόνα για έναν οργανισμό καθώς προσδιορίζει όλους τους μεταβολίτες του, τόσο ενδοκυττάριους 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 το <<κλειδί>> για τον διαχωρισμό μεταξύ υγείας και νοσηρότητας για τον ζωντανό οργανισμό. Οι μεταβολίτες δηλαδή είναι ουσιαστικά <<βιοδείκτες>> του βιολογικού συστήματος³. Η μεταβονομική 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.

Η βιολογία ενός ζωντανού συστήματος είναι ιδιαίτερα περίπλοκη καθώς τα προϊόντα μιας μεταβολικής διαδικασίας είναι ουσιαστικά το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πληθώρας παραγόντων όπως γονιδιακή έκφραση, διατροφή, περιβαλλοντικές επιδράσεις, συνήθειες και τρόπος ζωής καθώς και ξενοβιοτικών ουσιών όπως φαρμάκων και τοξινών.

Η μελέτη μικροβιολογικών συστημάτων και η ανάλυση φυτικών δειγμάτων με τη χρήση κυρίως φασματομετρίας μαζών, εισήγαγαν σχεδόν την ίδια χρονική περίοδο και την έννοια της μεταβολομικής⁴.

Πολύ συχνά οι όροι <<μεταβονομική>> και <<μεταβολομική>> συγχέονται και όχι άδικα. Η διαφορά τους είναι περισσότερο φιλοσοφική και λιγότερο τεχνική. Η μεταβονομική επιδίδεται στην σφαιρική μέτρηση της μεταβολικής απόκρισης του οργανισμού σε βιολογικά ερεθίσματα ή γενετική τροποποίηση με στόχο την κατανόηση της αλλαγής των μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο σε πολυκυττάρια συστήματα. Αντιθέτως η μεταβολομική στοχεύει στον

χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση όλων των μικρών μορίων σε ένα δείγμα⁵. Στην ουσία δηλαδή η μεταβολομική μπορεί να θεωρηθεί <<υποσύνολο>> της μεταβολομικής η οποία έχει ευρύτερη, <<ολιστική>> προσέγγιση των μεταβολιτών του οργανισμού³.



Εικ 2: Πολυπλοκότητα της βιολογίας των θηλαστικών : μια σύνοψη ορισμένων βασικών παραγόντων που περιορίζουν ή αυξάνουν την ατομική γενετική προδιάθεση και μπορούν να επηρεάσουν την πιθανότητα εμφάνισης συγκεκριμένης ασθένειας αργότερα στη ζωή τους¹³¹.

1.2 Γενικές αρχές μεταβολομικής μελέτης

Διεξαγωγή

Οι μεταβολομικές μελέτες διεξάγονται ως επί το πλείστον σε βιολογικά υγρά τα οποία μπορούν να ληφθούν είτε καθόλου επεμβατικά όπως τα ούρα, είτε ελάχιστα επεμβατικά όπως αίμα και τα παράγωγά του ορός και πλάσμα. Χρησιμοποιούνται όμως και άλλα βιολογικά υλικά όπως εγκεφαλονωτιαίο υγρό, χολή, υπερκείμενο κυτταροκαλλιιεργειών, εκχυλίσματα κυττάρων και ιστών³. Όλα τα παραπάνω απαιτούν ιδιαίτερο χειρισμό κατά την λήψη και αποθήκευση τους ώστε να επιτευχθεί η εξαγωγή της καλύτερης δυνατής ποιοτικά πληροφορίας με τον μικρότερο αριθμό πειραμάτων κατά την ακόλουθη φασματοσκοπική ανάλυση^{6,7,8,9}.

Αναλυτικές τεχνικές

Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στις μελέτες μεταβολομικής καλύπτουν ευρύ φάσμα με κυριότερες την Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) και την Φασματομετρία Μαζών (Mass Spectrometry). Και με τις δύο επιτυγχάνεται ταυτόχρονη ανίχνευση μεγάλου αριθμού μεταβολιτών σε μία μόνο μέτρηση χωρίς να χρειάζεται <<προεπιλογή>> των μεταβολιτών που θα ανιχνευθούν. Επιπλέον και με τις δύο μεθόδους είναι δυνατός ο προσδιορισμός της δομής των μεταβολιτών και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους.

NMR

Η τεχνική NMR δεν έχει μεγάλη ευαισθησία και συχνά απαιτεί τη λήψη δισδιάστατων φασμάτων για την κατανόηση της δομής των μορίων που ανιχνεύει. Όμως είναι αρκετά επαναλήψιμη, έχει διεργαστηριακή ανθεκτικότητα (robustness) στα αποτελέσματά της επιτρέποντας τη σύγκριση αυτών και είναι ταχύτερη 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. Η τελευταία αυτή ιδιότητα επιτρέπει τη χρήση της τεχνικής NMR στην ανάλυση ιστών απευθείας όπως σε δείγματα από βιοψία και την παρατήρηση της αλληλεπίδρασης των μεταβολιτών στους ιστούς.

Νέα τεχνολογικά επιτεύγματα δίνουν στην τεχνική καλύτερες ιδιότητες όπως οι κρυογενικοί ανιχνευτές (cryoprobes) με τους οποίους βελτιώθηκε η ευαισθησία της ενώ με την υψηλής ανάλυσης (high-resolution magic angle spinning MAS-NMR) ξεπεράστηκαν οι δυσκολίες της ετερογένειας του δείγματος και του μικρού χρόνου αποδιέγερσης, δύο παράγοντες που προκαλούσαν διεύρυνση των κορυφών¹⁰.

MS

Η Φασματομετρία Μαζών είναι πιο ευαίσθητη τεχνική ανιχνεύοντας μικρότερου μοριακού βάρους ενώσεις αλλά είναι καταστρεπτική για το δείγμα. Πριν την εφαρμογή της στο δείγμα απαιτείται να διαχωριστούν οι μεταβολίτες που υπάρχουν σε αυτό με τη χρήση κάποιας χρωματογραφικής τεχνικής συνήθως Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography). Εναλλακτικά, οι μεταβολίτες, εφόσον το επιτρέπει η φύση τους (μη θερμοευαίσθητοι) μπορούν να ιονιστούν και να μελετηθούν με συνδυασμό Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μαζών (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)⁵.

Η τεχνική που τελικά θα επιλεγεί εξαρτάται από το είδος των μεταβολιτών και από την φύση του προς επίλυση προβλήματος με το συνδυασμό NMR και MS να είναι συχνά απαραίτητος για μία πλήρη μεταβολομική μελέτη³.

1.3 Γενικές εφαρμογές της μεταβολομικής με NMR φασματοσκοπία

Οι εφαρμογές της μεταβολομικής σε πολλά επιστημονικά πεδία είναι όλο και αυξανόμενες δεδομένου ότι με την εξέλιξη της τεχνολογίας οι αναλυτικές δυνατότητες φτάνουν σε νέα επίπεδα όπως για παράδειγμα με τη χρήση των κρυογενικών ανιχνευτών, εξέλιξη η οποία ενισχύει την ευαισθησία της NMR φασματοσκοπίας. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες αυτές τις εφαρμογές.

Αρχικά είναι αναγκαίο να τονιστεί πως οποιαδήποτε μελέτη σε επίπεδο μεταβολιτών προϋποθέτει την *a priori* γνώση του φυσιολογικού μεταβολικού προφίλ ενός πληθυσμού ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός όποιων παρεκκλίνουσας από το φυσιολογικό κατάστασης και η ακόλουθη σύγκριση και εξαγωγή συμπερασμάτων. Προς αυτή την κατεύθυνση έχει διεξαχθεί ένα εύρος μελετών σε πειραματόζωα για να προσδιοριστούν μεταβολικές διαφορές προερχόμενες είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς παράγοντες οι οποίες ενδεχομένως να εξηγούν και τις διαφοροποιημένες αποκρίσεις τόσο στη θεραπευτική όσο και στην τοξικολογική απόκριση μεταξύ ατόμων ξεχωριστών πληθυσμών όσο και μεταξύ των ατόμων του ίδιου πληθυσμού. Έτσι προσδιορίστηκαν μεταβολικές διαφορές οφειλόμενες σε διαφορετικό φύλο, ηλικία διατροφικές συνήθειες κ.λ.π.¹⁹. Καθοριστικής σημασίας είναι η συμβολή της μεταβολομικής στην πειραματική τοξικολογία καθώς παρέχει την δυνατότητα πρόβλεψης της τοξικότητας ενός φαρμάκου (προκλινικού ή ήδη κυκλοφορούντος) καθώς και των πιθανών ανεπιθύμητων επιδράσεων του. Με την H^1 NMR φασματοσκοπία έχει μελετηθεί μεγάλη γκάμα βιολογικών υγρών πριν και μετά την χορήγηση τοξικών παραγόντων. Οποιαδήποτε επαγόμενη από την τοξίνη απόκλιση από το φυσιολογικό μεταβολικό προφίλ οδηγεί σε αλλαγές στην <<εικόνα>> του φάσματος αφού ο οργανισμός προσπαθεί να διατηρήσει την ομοιόστασή του και μπορεί να μετρηθεί και να αξιολογηθεί με τις διάφορες μεθόδους αναγνώρισης προτύπου²⁰.

Προγνωστικά στατιστικά μοντέλα έχουν κατασκευαστεί για να αξιολογήσουν τοξικολογικές επιδράσεις σε τρία επίπεδα. Στο πρώτο επίπεδο απλά ξεκαθαρίζεται εάν το δείγμα είναι φυσιολογικό ενώ στο δεύτερο επίπεδο διερευνάται σε πιο όργανο προκαλείται η βλάβη και κατατάσσονται τα δείγματα με βάση το όργανο στόχο τους. Στο τρίτο επίπεδο προσδιορίζονται οι φασματικές περιοχές που είναι υπεύθυνες για την απόκλιση από το κανονικό προφίλ και καθορίζονται οι τοξικοί βιοδείκτες που βρίσκονται σε αυτές παρέχοντας τα εφόδια κατανόησης των μηχανισμών τοξικότητας ιστών και οργάνων.

Η μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση της εν δυνάμει τοξικότητας πολλών τοξινών στηριζόμενη στο γεγονός ότι κάθε τοξίνη προκαλεί μια ξεχωριστή αλληλουχία μεταβολικών διαταραχών χαρακτηριστική, τόσο της φύσης της τοξίνης αυτής καθ'αυτής όσο και του μηχανισμού πρόκλησης της τοξικότητας. Σημαντικό στοιχείο αποτελεί και ο χρόνος εμφάνισης κάθε μεταβολικής απόκρισης μετά την προσβολή που είναι επίσης χαρακτηριστικός της φύσης της τοξίνης και του βαθμού της βλάβης που έχει επέλθει. Αυτές οι μεταβολικές διαταραχές, μεταβαλλόμενες χρονικά, μπορεί να είναι αναστρέψιμες ή μη, ανάλογα με την έκταση της οργανικής αλλοίωσης που έχει επέλθει¹².

Εκτεταμένα έχει μελετηθεί η τοξικότητα στους νεφρούς και το ήπαρ ενώ σε μικρότερη κλίμακα αξιολογήθηκε η τοξική επίδραση διάφορων παραγόντων σε καρδιολογικό, νευρολογικό και άλλα συστήματα^{21,22}.

Το ενδιαφέρον στη χρήση της H^1 -NMR μεταβολομικής στον τομέα της διερεύνησης της ασφάλειας των φαρμάκων αποδεικνύεται από την δημιουργία της ένωσης: <<Κοινοπραξία για την μεταβολική Τοξικολογία>>, Consortium on Metabolic Toxicology (COMET) με τη σύμπραξη πέντε φαρμακοβιομηχανιών και του Imperial College (London). Η σύμπραξη αυτή οδήγησε στην δημιουργία μιας βάσης δεδομένων που αφορά στην τοξικολογική επίδραση μεγάλου αριθμού ενώσεων τοξινών και φαρμάκων και είναι συνδεδεμένη με εξειδικευμένα υπολογιστικά συστήματα για την πρόβλεψη της τοξικότητας αυτών.

Οι βάσεις αυτές δημιουργήθηκαν συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα της μεταβολομικής μελέτης με H^1 -NMR φασματοσκοπία από ούρα, ορό αίματος και εκχυλίσματα ιστών λαμβανόμενα από ποντίκια και αρουραίους στα οποία στη συνέχεια εφαρμόστηκε χημειομετρική επεξεργασία.

Παράλληλα, με την συνεργασία και της COMET, αναπτύχθηκε μια πρωτοποριακή μέθοδος ταξινόμησης της τοξικής δυνατότητας ουσιών βασισμένη στις πιθανότητες, η <<Ταξινόμηση των αγνώστων με Υπέρθεση Πυκνότητας>>, Classification of Unknowns by Density Superposition (CLOUDS) που συμβάλλει σημαντικά στην όλη προσπάθεια επίτευξης της μέγιστης ασφάλειας νέων φαρμακευτικών ενώσεων^{23,24}. Έτσι στα πλαίσια της <<φαρμακογενομικής>> και της φιλοδοξίας της εξατομικευμένης θεραπείας, εισάγεται ο όρος <<φαρμακομεταβολομική>>. Κάθε άτομο έχοντας συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο, έχει διαφορετικές δυνατότητες διαχείρισης τόσο μιας τοξικής κατάστασης όσο και μίας θεραπευτικής προσέγγισης. Η γνώση λοιπόν του γονιδιώματος ενός ατόμου καθώς και των περιβαλλοντικών επιδράσεων σε αυτό οι οποίες καθορίζουν ισοδύναμα το μεταβολικό του προφίλ και δίνουν το <<μεταβολικό του αποτύπωμα>>, θα μπορούσε μελλοντικά να οδηγήσει στην επίτευξη μέγιστης ασφάλειας και αποτελεσματικότητας ενός φαρμάκου που θα του χορηγηθεί.

Μια ακόμη σημαντική έκφανση της επιστήμης της μεταβολομικής αποτελεί η διάγνωση της ασθένειας, η πρόγνωση και η σταδιοποίηση της. Ερευνώντας ποικίλα βιολογικά υγρά μελετήθηκαν η νόσος Alzheimer και άλλες νευρολογικές νόσοι, ο διαβήτης, οι καρδιοπάθειες, η αρθρίτιδα, οι νεφρικές διαταραχές, οι ηπατοπάθειες, οι μολυσματικές ασθένειες και πληθώρα κακοηθειών όπως θα αναφερθεί παρακάτω²⁵.

Σε πρόσφατη μελέτη δείγματα από εγκεφαλονωτιαίο υγρό λαμβανόμενα από ομάδα υγιών ατόμων και ομάδα με μηνιγγίτιδα διαχωρίστηκαν επιτυχώς²⁶.

Επίσης μέσω NMR μεταβολομικής αναπτύχθηκε νέα μέθοδος διάγνωσης της στεφανιαίας νόσου, μη επεμβατικά με απλή ανάλυση ορού αίματος των ασθενών²⁷.

Σημαντική είναι η συμβολή στη μελέτη μεταβολικών νοσημάτων των νεογνών που οφείλονται σε μη φυσιολογική λειτουργία συγκεκριμένων γονιδίων υπεύθυνων για την έκφραση ενζύμων καθοριστικής σημασίας. Η διάγνωση αυτών γίνεται λαμβάνοντας το φάσμα ούρων, πλάσματος ή ορού αίματος ή εγκεφαλονωτιαίου υγρού των νεογνών στο οποίο διακρίνονται μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις μεταβολιτών ή παρουσία κάποιου μεταβολίτη που δεν θα έπρεπε να βρίσκεται σε αυτό το βιολογικό υγρό²⁸. Τα μεταβολικά νοσήματα των νεογνών, είναι σχετικά σπάνιες περιπτώσεις αλλά δεδομένου ότι περιλαμβάνουν διαταραχές στο μεταβολισμό πουρινών, πυριμιδινών, αμινοξέων, λιπιδίων, στεροειδών και άλλων σημαντικών ουσιών, επιβάλλεται να μελετηθούν αφού σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγούν σε κώμα ή θάνατο²⁹.

Η μεταβολομική εκτεταμένα εφαρμόζεται στον έλεγχο και την ανίχνευση παράνομων ουσιών στα ούρα αθλητών (antidoping control) καθώς συνεχώς παρασκευάζονται αναβολικές ουσίες που ανιχνεύονται δύσκολα και δίνουν πλασματικά αθλητικά επιτεύγματα και διακρίσεις στους χρήστες τους³⁰.

Επίσης έχει ερευνηθεί η δυναμική της μεταβολομικής σε μελέτες μεγάλων πληθυσμών στις οποίες θίγονται ζητήματα όπως πιθανότητα νόσησης από κάποια ασθένεια, επίδραση φυσικών και ψυχοκοινωνικών παραγόντων στο μεταβολικό προφίλ, μεταβολικές διαφορές σε πληθυσμούς διάφορων εθνικοτήτων αλλά και μεταξύ ατόμων της ίδιας εθνικότητας³¹.

Η μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της περιβαλλοντικής μόλυνσης έχοντας ερευνήσει το βιοχημικό προφίλ γεωσκωλήκων που είναι ενδεικτικό της μόλυνσης του χώματος όπως και αυτό τρωκτικών που ζουν σε περιοχές με υψηλά επίπεδα ρυπαντών κυρίως βαρέων μετάλλων καθώς και στην επιστήμη των φυτών δημιουργώντας βάσεις δεδομένων για το σύνολο των μεταβολιτών τους³².

Όσον αφορά στο πεδίο της παρασιτολογίας, η μεταβολομική προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ληφθεί το μεταβολικό προφίλ σε ούρα

ποντικών που είχαν μολυνθεί με το παράσιτο *Schistosoma mansoni cercariae* και να συγκριθεί με το προφίλ μη μολυσμένων ποντικών. Η μελέτη αποκάλυψε ότι η λοίμωξη από *Schistosoma mansoni cercariae*, συνεπάγεται μεταβολικές διαταραχές σε ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (κιτρικό, ηλεκτρικό), διαταραχές στον μεταβολισμό κάποιων αμινοξέων (ταυρίνη, 2-οξογλουταρικό, τρυπτοφάνη) καθώς και στα επίπεδα των συν-μεταβολιτών που παράγονται από την μικροβιακή εντερική χλωρίδα (ιππουρικό, τριμεθυλαμίνη), υποδεικνύοντας ότι η λοίμωξη επηρεάζει τόσο τον μεταβολισμό του ξενιστή όσο και τον μεταβολισμό της εντερικής μικροχλωρίδας αυτού. Η μελέτη έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση μέσω της μεταβολομικής και άλλων παρασιτικών λοιμώξεων σε ποντικούς, όπως λοιμώξεις από *Trichinella spiralis*, *S. japonicum*, *Echinostoma caproni* και *Trypanosoma brucei brucei*, με στόχο τον χαρακτηρισμό των μεταβολικών αποκρίσεων των ξενιστών σε αυτά τα παράσιτα σε μοριακό επίπεδο και την καθιέρωση ευαίσθητων και ειδικών πιθανών διαγνωστικών βιοδεικτών στα βιολογικά υγρά¹³¹.

Καθώς η διατροφή διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην διατήρηση καλής υγείας για τον άνθρωπο, ένας νέος τομέας της μεταβολομικής επιστήμης αναδύεται, αυτός της <<διατροφομεταβολομικής>> (nutrimetabonomics) παρέχοντας μια συστημική προσέγγιση για τον χαρακτηρισμό μεταβολικής υγείας και φαινοτύπων των ατόμων. Παρά το γεγονός ότι κάθε μεμονωμένος ανθρώπινος φαινότυπος προσδιορίζεται από μια σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδίων, περιβαλλοντικών παραγόντων, τρόπου ζωής καθώς και μικροοργανισμών του εντέρου, εντούτοις η διατροφομεταβολομική έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την ταξινόμηση των διατροφικών αποκρίσεων σε πληθυσμούς και για εξατομικευμένη διατροφική υποστήριξη. Συμπερασματικά, η εφαρμογή της μεταβολομικής στις σχετικές με την διατροφή επιστήμες, προσπαθεί να αποκρυπτογραφήσει μεταβολικές επιδράσεις συγκεκριμένων συστατικών σε διάφορες κατηγορίες ανθρώπινου πληθυσμού¹³².

Τέλος ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρόσφατη εφαρμογή της μεταβολομικής στην χειρουργική και στην εξατομικευμένη φροντίδα του ασθενούς, από τον καθηγητή Jeremy Nicholson και την ομάδα του στο Imperial College του Λονδίνου. Για πρώτη φορά η μεταβολομική θα χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την παροχή στους κλινικούς γιατρούς, σε πραγματικό χρόνο, διαγνωστικών πληροφοριών καθώς και πληροφοριών της μεταβολικής κατάστασης των ασθενών, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τη χειρουργική έκβαση και το θεραπευτικό αποτέλεσμα¹³³.

ΚΕΦ 2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

2.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος ή κακοήθης νεοπλασία αναφέρεται σε παπύρους των Αρχαίων Αιγυπτίων γραμμένους περί τα 3000-1500 π.Χ. αφορώντας όγκους στο στήθος. Ως όρος πρωτοεμφανίστηκε την εποχή του Ιπποκράτη (460-370 π.Χ) για να χαρακτηρίσει μια ομάδα νόσων και προέρχεται εννοιολογικά από τον όρο καβούρι που περιγράφει το αντίστοιχο καρκινοειδές δεκάποδο. Ο όρος χρησιμοποιήθηκε στην προσπάθεια του αρχαίου επιστήμονα να περιγράψει μεταφορικά το <<σκληρό κέντρο και τις προεκτάσεις>> των όγκων που μελετούσε.

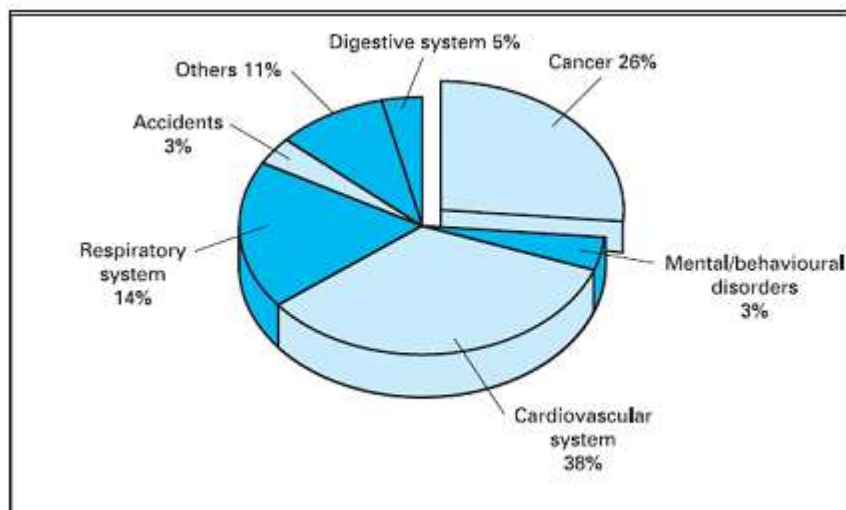
Ο καρκίνος αποτελεί αναμφισβήτητη την πλέον μελετώμενη νόσο των τελευταίων δεκαετιών. Παρ'όλα αυτά όμως οι γνώσεις μας πάνω στην κυτταρική και μοριακή παθοφυσιολογία του μετασχηματισμού ενός καλοήθους ιστού σε κακοήγη είναι ακόμη ατελείς⁴⁵.

Πρόκειται για μια νόσο με δυνατότητα μετάστασης και με δύο βασικά χαρακτηριστικά. Αφενός χαρακτηρίζεται από τον άναρχο πολλαπλασιασμό των κυττάρων που δεν υπόκεινται σε κανενός είδους έλεγχο και ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου που επιτελείται από το σύμπλεγμα CDK {(Cyclin-Dependent Kinase)-Cyclin} και από τα σημεία ελέγχου (checkpoint control). Αφετέρου χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων σε συνδυασμό με την μη έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως το p53 (tumor suppressor genes)⁴⁶.

Κληρονομικοί, περιβαλλοντικοί, διατροφικοί παράγοντες καθώς και συνήθειες του σύγχρονου τρόπου ζωής αποτελούν κάποιες από τις αιτίες εμφάνισης του⁴⁷.

2.2 Καρκίνος προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου κακοήθους αιτιολογίας στους άρρενες μετά τις καρδιοαγγειακές δυσλειτουργίες⁴⁸.

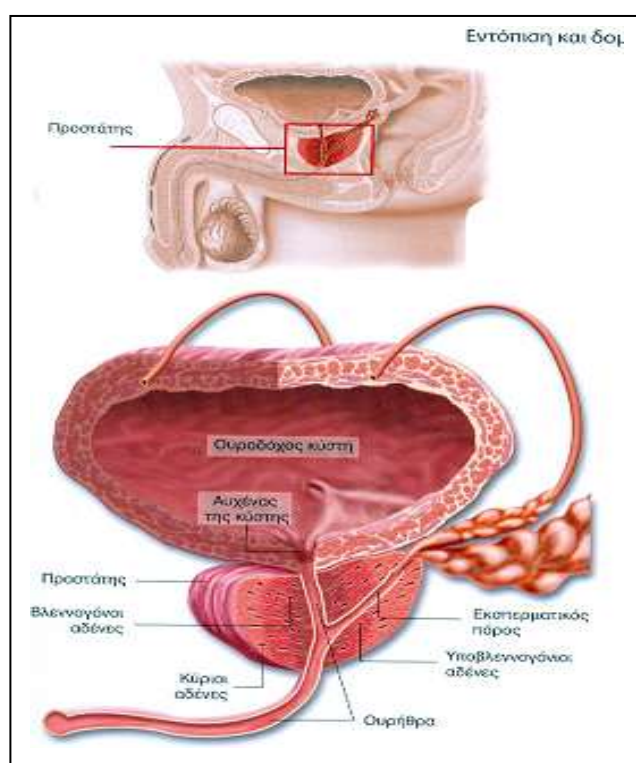


Εικ 3: Τα περιστατικά προσβολής από καρκίνο έχουν αυξηθεί δραματικά καθιστώντας τον μια από τις σοβαρότερες νόσους του Δυτικού κόσμου

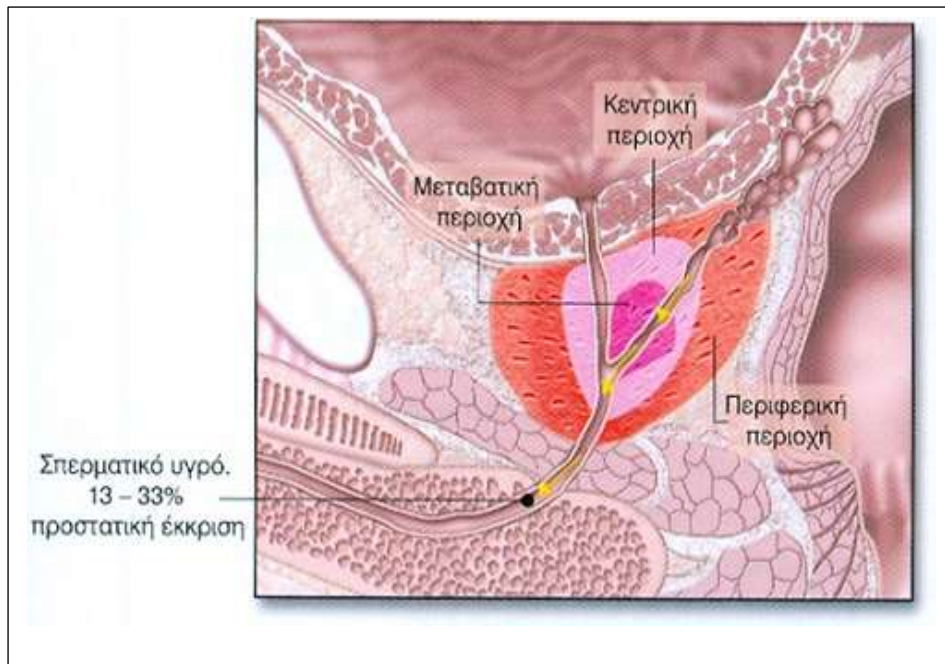
Επιδημιολογικά στοιχεία

Πρόκειται για πάθηση που εμφανίζεται σε άνδρες κατά βάση άνω των 60ετών. Οι αιτίες εμφάνισης του δεν έχουν προσδιοριστεί αλλά υπάρχουν συσχετισμοί που, πέρα από τη γενετική προδιάθεση, περιλαμβάνουν διατροφικούς παράγοντες, την καλοήγη υπερτροφία αυτού του οργάνου καθώς και την έκθεση σε παράγοντες κινδύνου, όπως μόλυβδος και κάδμιο, στο εργασιακό περιβάλλον^{49,50}.

Η νόσος εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις κατώτερες κοινωνικά και οικονομικά ομάδες, στον αστικό πληθυσμό και παρουσιάζει ιδιαίτερη γεωγραφική κατανομή (χαμηλή στην Ιαπωνία, υψηλή στη Σουηδία). Προσβάλλει τους μαύρους περισσότερο από τους λευκούς ενώ η αυξημένη θνησιμότητα των προσφύγων που μετακινούνται σε υψηλότερης θνητότητας περιοχές καταδεικνύει την επίδραση των περιβαλλοντικών και διατροφικών παραγόντων στην εξέλιξη της⁴⁹.



Εικ 4: Εντόπιση και δομή του προστατικού αδένος στο ανδρικό σώμα. Ο προστάτης είναι αδένος του ανδρικού γεννητικού συστήματος που συνορεύει με την ουροδόχο κύστη. Το έκκριμά του ενώνεται με αυτό των σπερματοδόχων κύστεων. (andrologia.gr)



Εικ 5: Οι διακριτές περιοχές του προστατικού αδένος. Η περιφερική ζώνη αποτελεί την εστία εντοπισμού των περισσότερων κακοηθειών. (andrologia.gr)

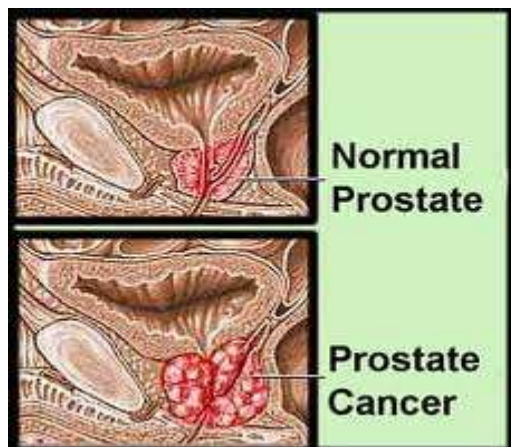
Παθολογοανατομικά στοιχεία

Ο προστάτης είναι ένα όργανο αποτελούμενο από αδένες που περιβάλλει την αρχική μοίρα της ουρήθρας. Βρίσκεται κάτω από την ουροδόχο κύστη, πάνω στο πυελικό έδαφος, μπροστά από το ορθό και πίσω από την ηβική σύμφυση, περιβάλλει την προστατική μοίρα της ουρήθρας και τους σπερματικούς πόρους. Ο προστάτης είναι ένας αδένας που έχει κωνικό σχήμα, με την κορυφή προς τα πάνω και την επιφάνειά του αποπλατυσμένη από εμπρός προς τα πίσω. Το σχήμα του θυμίζει κάστανά. Περιβάλλεται από ινώδη κάψα. Αφορίζεται από τον προστατικό υμένα (περιτονία του Zuckerkandl) στην πρόσθια επιφάνειά του, από την περιτονία του Denonvillier στην οπίσθια επιφάνειά του και από την πλάγια προστατική περιτονία στις πλευρές του.

Ο προστάτης είναι ένας αδένας του ανδρικού γεννητικού συστήματος, του οποίου το έκκριμα αποθηκεύεται με το αντίστοιχο έκκριμα των σπερματοδόχων κύστεων, ώστε να αυξηθεί ο όγκος του σπέρματος που αποβάλλεται κατά την εκσπερμάτιση, να επιτευχθεί αλκαλικό pH που προστατεύει το σπέρμα από το όξινο pH των υγρών της μήτρας και να παρέχονται τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για αυτό⁵¹.

Τα αδενικά στοιχεία του προστάτη ταξινομούνται σε μια στενή περιουθρική ζώνη (κεντρική περιοχή) και σε μια ευρύτερη εξωτερική ζώνη. Τα αδενοκαρκινώματα εντοπίζονται στην εξωτερική ζώνη ενώ τα καλοήγη βρίσκονται στην κεντρική περιοχή. Οι προστατικοί όγκοι μπορεί να είναι διαφοροποιημένοι, οπότε και διακρίνονται τα αδενικά στοιχεία του προστάτη και αδιαφοροποίητοι, με τον βαθμό της διαφοροποίησης να είναι σημαντικός για την πρόγνωση της νόσου^{52,53}.

Διαγνωστικές μέθοδοι



Εικ 6: Χαρακτηριστικές εικόνες εμφάνισης φυσιολογικού και κακοήθους προστατικού ιστού. Η κακοήθης μετατροπή οδηγεί στον σχηματισμό μάζας άναρχα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία συμπαγούς όγκου.
(prostatecanceroptions911.com)

Η νεοπλασία στον προστατικό αδένα είναι ιάσιμη εφόσον διαγνωστεί έγκαιρα. Επειδή όμως είναι ασυμπτωματική στα πρώτα στάδια, συχνά η διάγνωση είναι τυχαία και γίνεται στα πλαίσια περιοδικής εξέτασης, ενώ πολύ συχνά ο ασθενής παρουσιάζει δυσκολίες διούρησης και άλλα συμπτώματα καλοήθους υπερτροφίας που τελικά αποτελούν ενδείξεις πρώιμων σταδίων της νόσου⁴⁷.

Αρκετά σημαντική διαγνωστική μέθοδο αποτελεί η δακτυλική εξέταση του προστάτη κατά την οποία ενδέχεται να υπάρχουν ψηλαφητά ογκίδια καθώς και η ανίχνευση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) στον ορό σε τιμές πέραν των φυσιολογικών. Άλλες κλινικο-εργαστηριακές μέθοδοι είναι η βιοψία του προστάτη, η αξονική και μαγνητική τομογραφία, η διορθική υπερηχοτομογραφία, η ακτινογραφία θώρακος και οστών, το σπινθηρογράφημα οστών⁵³⁻⁵⁶.

Σταδιοποίηση και πρόγνωση

Δύο είναι τα σημαντικά στοιχεία για την πρόγνωση της νόσου: ο βαθμός της ιστολογικής διαφοροποίησης και το στάδιο της νόσου.

Ένα σύστημα που κατηγοριοποιεί την διαφοροποίηση του ιστού σε κλίμακα από το 1 έως το 5 ανάλογα με την ομοιότητα του ή μη, ως προς τον κανονικό προστατικό ιστό, είναι αυτό του Gleason. Ο καλά διαφοροποιημένος ιστός έχει κατάταξη από 1 έως 2 και δίνει καλή πρόγνωση ενώ ο αδιαφοροποίητος ιστός βαθμολογείται υψηλότερα και είναι πιο επιθετικός με μεγαλύτερη πιθανότητα να δώσει μεταστάσεις.

Το δεύτερο σύστημα αφορά στην σταδιοποίηση της νόσου και προτάθηκε από την <<Κοινή Αμερικανική Επιτροπή για τον Καρκίνο>> {American Joint Committee on Cancer (AJCC)} βασισμένο τόσο σε κλινικά όσο και

ιστοπαθολογικά ευρήματα. Τα στάδια συμβολίζονται με γράμματα της λατινικής αλφαβήτου ενώ καθορίζονται επιπλέον η έκταση προσβολής των λεμφαδένων και ο βαθμός μεταστατικότητας⁴⁷.

Καθοριστικής σημασίας γεγονός για την πορεία εξέλιξης της νόσου και κατ'επέκταση την επιβίωση του ασθενούς αποτελεί η μετάστασή της σε ιστούς και όργανα απομακρυσμένα από τον πρωτοπαθή όγκο. Η δημιουργία μεταστατικών εστιών απαιτεί την αλληλουχία πολλών και συντονισμένων διεργασιών από την αγγειογένεση μέχρι την εγκατάσταση στα προς προσβολή όργανα⁵⁷.

Τα οστά αποτελούν τον κατεξοχήν μεταστατικό προορισμό των προστατικών καρκινικών κυττάρων καθώς το μικροπεριβάλλον τους είναι ιδιαίτερα ευνοϊκό για την εγκατάστασή τους^{57,58}. Σ'αυτό το γεγονός συμβάλλουν οι αυξητικοί παράγοντες που βρίσκονται εκεί: ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) και μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας βήτα 1 (TGFβ1), οι οποίοι δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες που επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να ξεφεύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης και της συνακόλουθης απόπτωσης παρουσιάζοντας παράλληλα αντίσταση στη χημειοθεραπεία^{59,60}.

Επιλογές θεραπείας

Λαμβάνοντας υπόψη πληθώρα παραγόντων όπως η ηλικία, το στάδιο της νόσου, η γενική κατάσταση της υγείας του ασθενούς καθώς και ενδεχόμενες συνυπάρχουσες νόσους ο κλινικός ιατρός επιλέγει την καταλληλότερη θεραπεία. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται η προστατεκτομή, η ακτινοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία και η χρήση κυτταροτοξικών χημικών παραγόντων. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονο ενδιαφέρον για τη χρήση φυσικών προϊόντων με πιθανή αντικαρκινική δράση όπως τα μανιτάρια Reishi (*Ganoderma lucidum*) προερχόμενα από την κινεζική παραδοσιακή ιατρική⁴⁷.

Ιδιαιτερότητες προστατικού αδενοκαρκινώματος

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ορμονοεξαρτώμενη κακοήθεια και δη ανδρογόνο-εξαρτώμενη. Λόγω της παρουσίας ανδρογονικών υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων, η θεραπεία ανδρογονικού αποκλεισμού είναι αποτελεσματική ακόμη και μετά την δημιουργία μεταστάσεων⁶¹. Σε μεταγενέστερο όμως στάδιο, τα καρκινικά κύτταρα για άγνωστο λόγο καθίστανται ανδρογόνο-ανεξάρτητα και έτσι το κλασικό θεραπευτικό σχήμα με αντιανδρογόνα και ορχιεκτομή, δεν αποφέρει καρπούς⁶².

Όπως είναι φανερό λοιπόν πρόκειται για μια νόσο περίπλοκη και πολυδιάστατη που απαιτεί καλύτερη γνώση όλων των μηχανισμών που εμπλέκονται στη γέννηση και εξέλιξη της ώστε να είναι δυνατός ο σχεδιασμός αποτελεσματικών μεθόδων τόσο για την διάγνωση όσο και την θεραπευτική της προσέγγιση.

2.3 Κυτταρική σειρά PC-3 καρκίνου προστάτη

Η κυτταρική σειρά PC-3 προέρχεται από οστική μετάσταση ανθρώπινου προστατικού αδενοκαρκινώματος και χαρακτηρίζεται ως ανδρογόνο-ανεξάρτητη κυτταρική σειρά καθώς δεν απαντά στα ανδρογόνα⁶⁶.

Πρόκειται για ένα πολυχρησιμοποιούμενο μοντέλο για την *in vitro* μελέτη του επιθετικού καρκίνου του προστάτη. Πιο αναλυτικά τα κύτταρα PC-3 έχουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης, δεν εκφράζουν το γονίδιο p-53 που συρρικνώνει τους όγκους⁶³, έχουν μεταλλαγμένο το γονίδιο K-ras που είναι απαραίτητο για τη σωστή μετάδοση του σήματος στους φυσιολογικούς ιστούς⁶⁴ και τέλος έχουν ενεργοποιημένο πάντοτε το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K)/Akt που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση, στον μεταβολισμό, καθώς και στην κυτταρική ανάπτυξη και από μελέτες φάνηκε ότι σχεδόν σε όλους τους τύπους καρκίνου που εμφανίζονται στον άνθρωπο υπάρχει υπέρ-ενεργοποίηση του⁶⁵.

ΚΕΦ 3. ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

3.1 Μεταβολικές ιδιαιτερότητες στον καρκίνο

Οι προχωρημένοι κακοήθεις όγκοι μοιράζονται έναν κοινό φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από ταχεία κυτταρική διαίρεση, φτωχή διαφοροποίηση και αντίσταση στην απόπτωση και στην αντικαρκινική θεραπεία³³. Επίσης γενικά τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν εξαιρετικά διαφοροποιημένο μεταβολικό προφίλ κυρίως της γλυκόζης, της γλουταμίνης και των λιπαρών οξέων έχοντας αυξημένες ανάγκες για ενέργεια. Αυτή η τροποποιημένη μεταβολική συμπεριφορά έχει γονιδιακό υπόβαθρο καθώς σχετίζεται και με την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και την αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων^{34,10}.

Επομένως είναι πιθανόν η ευαισθησία των όγκων σε εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες και κατ'επέκταση το κλειδί για την αντιμετώπισή τους να είναι <<κρυμμένα>> σε μεταβολικά μονοπάτια που παρέχουν αυτήν την ενέργεια και τις απαραίτητες ουσίες για την επιβίωσή τους. Έτσι προκύπτουν οι μεταβολικά στοχευμένες θεραπείες που στοχεύουν τα σημεία ελέγχου του μεταβολικού δικτύου τα οποία συνήθως είναι ειδικά ένζυμα³³.

Πράγματι όπως περιγράφει ήδη από το 1956 ο Otto Warburg, με το λεγόμενο <<φαινόμενο Warburg>> και αργότερα ο Peter Pedersen δίνοντας το μοριακό μηχανισμό, τα καρκινικά κύτταρα έχουν σημαντικά διαφοροποιημένο μεταβολισμό από τα φυσιολογικά. Αυτός τους επιτρέπει την επιβίωση σε

δυσμενείς συνθήκες όπως υποξία ενώ ενισχύει τον πολλαπλασιασμό, την εξέλιξη, την διεισδυτικότητα και την ακόλουθη μεταστατική ικανότητά τους. Συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά, τα καρκινικά κύτταρα έχοντας υποστεί την <<κακοήθη>> μετατροπή, χαρακτηρίζονται από αυξημένο ρυθμό ενδοκυττάριας πρόσληψης γλυκόζης, υψηλό ρυθμό γλυκόλυσης συνδυασμένο με μειωμένη οξείδωση πυρουβικού 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, αυξημένη μετατροπή της γλυκερόλης, τροποποιημένο μεταβολισμό των αμινοξέων και υψηλή δραστηριότητα του μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης.

Ο τροποποιημένος αυτός μεταβολικός φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς, προγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς³⁴.

Αυτό το γεγονός καθιστά επιτακτική την ανάγκη της μελέτης του μεταβολικού προφίλ καρκινικών και προκαρκινικών κυττάρων με στόχο την ανίχνευση συγκεκριμένων βιοδεικτών οι οποίοι θα καταγραφούν και θα χρησιμεύσουν για την έγκαιρη πρόληψη και διάγνωση αλλά και σταδιοποίηση αυτών των νοσηρών καταστάσεων.

3.2 Εφαρμογές της μεταβονομικής στον καρκίνο με διάφορες αναλυτικές τεχνικές.

Σε μελέτη του 2008 χρησιμοποιήθηκαν ριβονουκλεοζίτες σε δείγματα ούρων με σκοπό των διαχωρισμό ασθενών με καρκίνο του μαστού και υγιών εθελοντών. Οι νουκλεοζίτες εκχυλίσθηκαν από τα δείγματα ούρων χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας και στην συνέχεια αναλύθηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρία μάζας με αναλυτή παγίδας ιόντων και ιονισμό με ηλεκτροδιάχυση (LC-ESI-IT-MS). Έγινε κανονικοποίηση των φασμάτων με βάση την κρεατινίνη. Εξετάστηκαν 113 δείγματα ούρων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού (στάδιο Tis-T4) και 99 δείγματα ελέγχου από υγιείς εθελοντές με την ταξινόμηση των δεδομένων να γίνεται μέσω μοντέλων SVM (Support Vector Machines). Τα επίπεδα ευαισθησίας ήταν 88% και ειδικότητας ήταν 90% για 31 νουκλεοτίδια αποκαλύπτοντας ότι η μεταβονομική αυτή προσέγγιση, παρέχει μια σημαντικά βελτιωμένη ταξινόμηση σε σύγκριση με επί του παρόντος εφαρμοζόμενους βιοδείκτες για την διάγνωση του καρκίνου του μαστού, όπως ο δείκτης CA15-3 (ειδικότητα 90- 95%, ευαισθησία 50%)¹³⁴.

Σε μελέτη του 2004, αναπτύχθηκε μια μεταβονομική προσέγγιση με βάση την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε δείγματα ούρων, για την

διάκριση μεταξύ ασθενών με κίρρωση του ήπατος και ηπατίτιδα από εκείνους με καρκίνο του ήπατος. Όλες οι κορυφές των μεταβολιτών του ουροποιητικού με δομή cis-διόλης, περιλαμβανομένων των νουκλεοσιδίων, συγκρίθηκαν μεταξύ τους και κατηγοριοποιήθηκαν με την μέθοδο της Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή της μεταβολομικής σε συνδυασμό με την PCA μέθοδο θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για την διάκριση μεταξύ των ασθενών με κίρρωση του ήπατος και ηπατίτιδα από ασθενείς με ηπατικό καρκίνο δίνοντας λιγότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν επίσης ότι ένα υποσύνολο των ουροφόρων νουκλεοζιτών που ταυτοποιούνται μέσω μεταβολομικής, συσχετίζονται καλύτερα με τη διάγνωση του καρκίνου από ότι ο παραδοσιακός ενιαίος δείκτης AFP¹³⁵.

Μία ακόμη μελέτη με αντικείμενο τον καρκίνο του μαστού δημοσιεύθηκε το 2005 και αφορούσε στην εφαρμογή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με υπολογιστικές διαδικασίες σε δείγματα ούρων με στόχο τον διαχωρισμό των υγιών ατόμων από εκείνα που έπασχαν από καρκίνο. Πράγματι, ο ρυθμός πρόβλεψης του βασισμένου σε SVM (Support Vector Machines) μοντέλου ήταν 100% για την ομάδα αναφοράς και το 93,2% για την ομάδα ελέγχου και υπήρξε επιτυχής διαχωρισμός των δυο περιπτώσεων¹³⁶.

3.3 Εφαρμογές της μεταβολομικής στον καρκίνο με NMR φασματοσκοπία

Η μεταβολομική προσέγγιση του καρκίνου με NMR φασματοσκοπία παρέχει την δυνατότητα διαχωρισμού υγιών από ασθενή άτομα, προσδιορισμού του σταδίου της νόσου και της πιθανής μεταστατικής δραστηριότητας και παρακολούθηση της επίδρασης διαφόρων θεραπευτικών σχημάτων για την αντιμετώπιση του.

Υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφία για αρκετούς τύπους κακοηθειών. Σε πρόσφατη μελέτη με H^1 -NMR φασματοσκοπία και ακόλουθη στατιστική επεξεργασία με PCA και το στατιστικό λογισμικό SIMCA, αξιολογήθηκαν δείγματα ορού αίματος από γυναίκες με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, υγιείς και γυναίκες με καλοήθεις ωοθηκικές κύστες. Η μέθοδος πέτυχε να διαχωρίσει τα καλοήθη από τα κακοήθη περιστατικά με ποσοστό επιτυχίας 100% ενώ με λεπτομερή παρατήρηση βρέθηκαν και οι φασματικές περιοχές που ήταν υπεύθυνες για τον διαχωρισμό τους²⁵.

Επίσης μελετήθηκε η αντίσταση στη φαρμακευτική αγωγή τεσσάρων κυτταρικών σειρών καρκίνου του πνεύμονα μετρώντας τα επίπεδα διάφορων μεταβολιτών σε ολόκληρα κύτταρα καθώς και σε υδατικά και οργανικά

κυτταρικά εκχυλίσματα. Με τη μέθοδο της PCA έγινε διάκριση των κυτταρικών σειρών και προσδιορισμός των υπεύθυνων μεταβολιτών³⁵.

Όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού ενδεικτικά παρατίθεται η παρακάτω έρευνα στην οποία NMR φασματοσκοπική ανάλυση σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού προσδιόρισε διαφορές στον μεταβολισμό των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων προοδευτικά κατά την μετάβαση από φυσιολογικό σε κακοήγη φαινότυπο. Έτσι τα επιθηλιακά κύτταρα κατά τη μετατροπή τους σε αθανатоποιημένα καρκινικά κύτταρα παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα φωσφοχολίνης σχετικά με αυτά της γλυκεροφωσφοχολίνης ενώ στα καλοήγη επιθηλιακά μαστικά κύτταρα η σχέση αυτή είναι αντίστροφη. Αυτή η διαπίστωση είναι σημαντική για την διάγνωση της νόσου και την επιλογή της σωστής θεραπευτικής αγωγής³⁶.

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μαζί με τον καρκίνο του μαστού τις δυο πιο συνήθεις κακοήθειες του γυναικείου φύλου. Σε πολύ πρόσφατη μελέτη (2012), ερευνήθηκε ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας και πιο συγκεκριμένα επιδιώχθηκε διάκριση μεταξύ της προκαρκινικής βλάβης νεοπλασίας του ενδοεπιθηλίου του τραχήλου της μήτρας {(cervical intraepithelial neoplasia (CIN))}, από τον καρκίνο των πλακωδών κυττάρων του τραχήλου {cervical squamous cell carcinoma (CSCC)} και από υγιείς γυναίκες. Σε αυτή τη μελέτη, δείγματα πλάσματος από ασθενείς με CSCC ή CIN καθώς και από υγιείς μάρτυρες υποβλήθηκαν σε μεταβολομικές αναλύσεις με ¹H-NMR φασματοσκοπία ακολουθούμενη από PCA και OPLS-DA στο προφίλ της συγκέντρωσης και της σύνθεσης των μεταβολιτών του πλάσματος. Βρέθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των τριών ομάδων γεγονός που καταδεικνύει την σημαντικότητα της ανάλυσης φασμάτων πλάσματος με NMR φασματοσκοπία σε συνδυασμό με μεθόδους αναγνώρισης προτύπου για αποτελεσματική απεικόνιση της βιοχημείας των όγκων¹³⁷.

Ο οισοφαγικός καρκίνος είναι ιδιαίτερα δεδομένος με μόνο 5ετή επιβίωση στους διαγνωσθέντες ασθενείς. Επομένως η έγκαιρη διάγνωση είναι επιτακτική και προς αυτή την κατεύθυνση κινείται η μελέτη των Ayshamgul Hasim και συνεργατών. Σε αυτήν, ¹H-NMR βασιζόμενη μεταβολομική ανάλυση εφαρμόστηκε για τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ του καρκίνου του οισοφάγου στο πλάσμα και τα ούρα, προκειμένου αφενός να εκτιμηθούν οι διαγνωστικές δυνατότητες αυτής της προσέγγισης και αφετέρου να αποκτηθούν νέες γνώσεις σχετικά με το μεταβολισμό του καρκίνου του οισοφάγου. Έτσι, πλάσμα και ούρα από ασθενείς με καρκίνο του οισοφάγου (n = 108) και από μια ομάδα υγιών ελέγχου (n = 40), αναλύθηκαν με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και το φασματικό προφίλ τους υπεβλήθη σε OPLS-DA στατιστική επεξεργασία. Σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, οι πάσχοντες από καρκίνο είχαν υψηλότερα επίπεδα διμεθυλαμίνης, α-γλυκόζης, β-γλυκόζης, κιτρικού οξέος μαζί με

χαμηλότερα επίπεδα λευκίνης, αλανίνης, ισολευκίνης και άλλων. Συμπερασματικά, επιτεύχθηκε πολύ καλή διάκριση μεταξύ του καρκίνου και των ομάδων ελέγχου αποδεικνύοντας την καταλληλότητα της NMR φασματοσκοπικής ανάλυσης για την έγκαιρη διάγνωση και την κατανόηση των μηχανισμών του οισοφαγικού καρκίνου¹³⁸.

Η χρήση της μεταβολομικής επιστήμης με φασματοσκοπία NMR στην διερεύνηση του καρκίνου του ήπατος και του διαχωρισμού του από την ηπατική κίρρωση μελετήθηκε από Κινέζους επιστήμονες. Στην έρευνά τους, δείγματα αίματος αναλύθηκαν με σκοπό τον χαρακτηρισμό του μεταβολικού προφίλ ασθενών με κίρρωση του ήπατος (LC) και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) σε σύγκριση με υγιή άτομα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ασθενείς με κίρρωση του ήπατος (LC) και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα των μεταβολιτών πυρουβικό, γλουταμίνη, α-κετογλουταρικό, γλυκερόλη, τυροσίνη, 1-μεθυλιστιδίνη και φαινυλαλανίνη μαζί με χαμηλότερα επίπεδα σε χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, ισολευκίνη, βαλίνη, ακετοξικό, κρεατίνη, χολίνη. Το διάγραμμα φορτίων της μεθόδου αναγνώρισης προτύπου πέτυχε διαχωρισμό των ασθενών με LC και HCC από υγιείς ανθρώπους υποδεικνύοντας την παραπάνω τεχνική ως κατάλληλη (που είναι και ελάχιστα παρεμβατική) για την έγκαιρη διάγνωση των κακοήθων νεοπλασιών¹³⁹.

Επιστήμονες στην Πορτογαλία ερεύνησαν με NMR βασιζόμενη μεταβολομική προσέγγιση την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο, τον καρκίνο του πνεύμονα, του οποίου η κακή πρόγνωση σχετίζεται με καθυστερημένη ανίχνευση. Δείγματα από ούρα και αίμα ελήφθησαν από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (n = 73) και υγιή άτομα (n = 56) και αναλύθηκαν με ¹H-NMR φασματοσκοπία (500 MHz), ενώ τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών και OPLS-DA. Από το φασματικό προφίλ των δειγμάτων ούρων, ήταν δυνατός ο διαχωρισμός των ομάδων καρκίνου και ελέγχου με ευαισθησία και ειδικότητα της τάξης του 93% και 94% αντίστοιχα και ο προσδιορισμός των υπεύθυνων για τον διαχωρισμό μεταβολιτών. Τα δείγματα αίματος επίσης διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά και η μέθοδος θεωρήθηκε πολλά υποσχόμενη για προγνωστικούς και διαγνωστικούς σκοπούς στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα¹⁴⁰.

Ο καρκίνος της στοματικής κοιλότητας αποτελεί την όγδοη πιο συχνή κακοήθεια και απαιτεί γρήγορη ανίχνευση στα πρωταρχικά στάδια ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα καλής πρόγνωσης. Στην προσπάθεια εύρεσης βιοδεικτών για έγκαιρη διάγνωση κινήθηκε η παρακάτω μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2009. Σε αυτήν, δείγματα αίματος ασθενών με καρκίνο του στόματος και υγιών ατόμων αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Εφαρμόζοντας χημειομετρική πολύ-παραγοντική ανάλυση των φασματικών δεδομένων, επιτεύχθηκε εξαιρετική διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων καθώς και μεταξύ των διαφόρων σταδίων

της νόσου. Μάλιστα το μεταβολικό προφίλ που λαμβάνεται για τον καρκίνο του στόματος είναι σημαντικό, ακόμη και για πρώιμο στάδιο της νόσου και σχετικά μικρούς όγκους¹⁴¹.

Η μεταβολομική βασισμένη στην φασματοσκοπία NMR αποτελεί μέθοδο επιλογής όπως φαίνεται και από την προηγούμενη μελέτη όχι μόνο για την διάγνωση της νόσου αλλά και την σταδιοποίηση αυτής. Η επόμενη μελέτη παρουσιάζει μία ακόμη δυνατότητα της στο πεδίο του καρκίνου, αυτήν της πρόβλεψης πιθανής μετάστασης του όγκου σε παρακείμενους ιστούς.

Πράγματι, στη μελέτη των Hongchang και της ομάδας του, δείγματα ιστών από όγκους ασθενών με καρκίνωμα των νεφρικών κυττάρων (RCC) συγκρίθηκαν με δείγματα παρακείμενων των όγκων ιστών με NMR φασματοσκοπική και ακόλουθη πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση. Προέκυψε ότι το μεταβολομικό προφίλ των ατόμων με RCC, με ή χωρίς μεταστάσεις, ήταν σημαντικά διαφοροποιημένο από εκείνο των παρακείμενων ιστών τους. Επιπλέον, οι ασθενείς RCC με μεταστάσεις ήταν ευδιάκριτα διαχωρισμένοι ως προς τον μεταβολικό τους χαρακτήρα από τους ασθενείς RCC χωρίς μεταστάσεις. Σε σύγκριση με τους παρακείμενους ιστούς, οι RCC όγκοι είχαν αυξημένα επίπεδα σε γαλακτικό οξύ, γλουταμικό οξύ, πυροσταφυλικό, γλουταμίνη και κρεατίνη αλλά μειωμένα επίπεδα σε οξικό, μηλικό και αμινοξέα όπως βαλίνη, αλανίνη και ασπαρτικό¹⁴².

3.4 Μεταβολομική προσέγγιση καρκίνου του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη, που είναι το αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας αποτελεί την κακοήθεια εκείνη με τις πλέον αντικρουόμενες απόψεις όσον αφορά στην θεραπευτική της προσέγγιση. Σε μελέτη αναφέρεται ότι το έτος 2005, 635 άνθρωποι διαγιγνώσκονταν ημερησίως με την νόσο, με 83 να καταλήγουν εξαιτίας της. Πολλοί όμως ασθενείς υπέστησαν προστατεκτομή με τις συνακόλουθες ανεπιθύμητες επιδράσεις της για όγκους που ποτέ δεν θα απειλούσαν τη ζωή τους αφού δεν θα είχαν περαιτέρω εξέλιξη³⁷.

Επιπλέον παρά την αναμφισβήτητη σημασία της εξέτασης του προστατικού αντιγόνου PSA στον ορό για την διάγνωση της ασθένειας, αυτό δεν διαφοροποιεί ιστοπαθολογικά τα διάφορα περιστατικά με αποτέλεσμα την λανθασμένη θεραπεία τους όσον αφορά και στην επιλογή του φαρμάκου αλλά και στην δόση αυτού, όπως υποστηρίζει η Αμερικανική ένωση για τον καρκίνο του προστάτη του Εθνικού Ιδρύματος Καρκίνου³⁸. Επιπλέον επειδή σε περιπτώσεις καλοήθους υπερτροφίας του προστατικού αδένα αλλά και σε άνδρες μεγάλης ηλικίας η τιμή του PSA είναι αυξημένη, λαμβάνονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα χωρίς να υπάρχει κακοήθεια, οδηγώντας σε μη αναγκαία φαρμακευτική αντιμετώπιση και στις ανεπιθύμητες επιπτώσεις που

αυτή συνεπάγεται. Το PSA είναι κυρίως αντιγόνο σχετιζόμενο με τον προστάτη αυτόν καθ'αυτόν ως όργανο και όχι ειδικά με τον καρκίνο του προστάτη.

Η ίδια ένωση θίγει το ζήτημα της ανάγκης για ανακάλυψη <<νέων και καλύτερων δεικτών από το PSA για την έγκαιρη διάγνωση των περιπτώσεων που υποκρύπτουν ραγδαία εξέλιξη και επιθετικές μορφές της νόσου ώστε να γίνει ένα ξεκαθάρισμα των περιστατικών>>. Έτσι δίνεται η δυνατότητα να επιλέγεται το καταλληλότερο θεραπευτικό σχήμα, να αποφεύγονται οι παρενέργειες και να μειώνεται το οικονομικό κόστος για το κοινωνικό σύνολο που θα προέκυπτε από λανθασμένες προσεγγίσεις του προβλήματος. Ο τρόπος για την εύρεση αυτών των νέων δεικτών είναι ουσιαστικά το πεδίο ενδιαφέροντος των προσεγγίσεων omics³⁹.

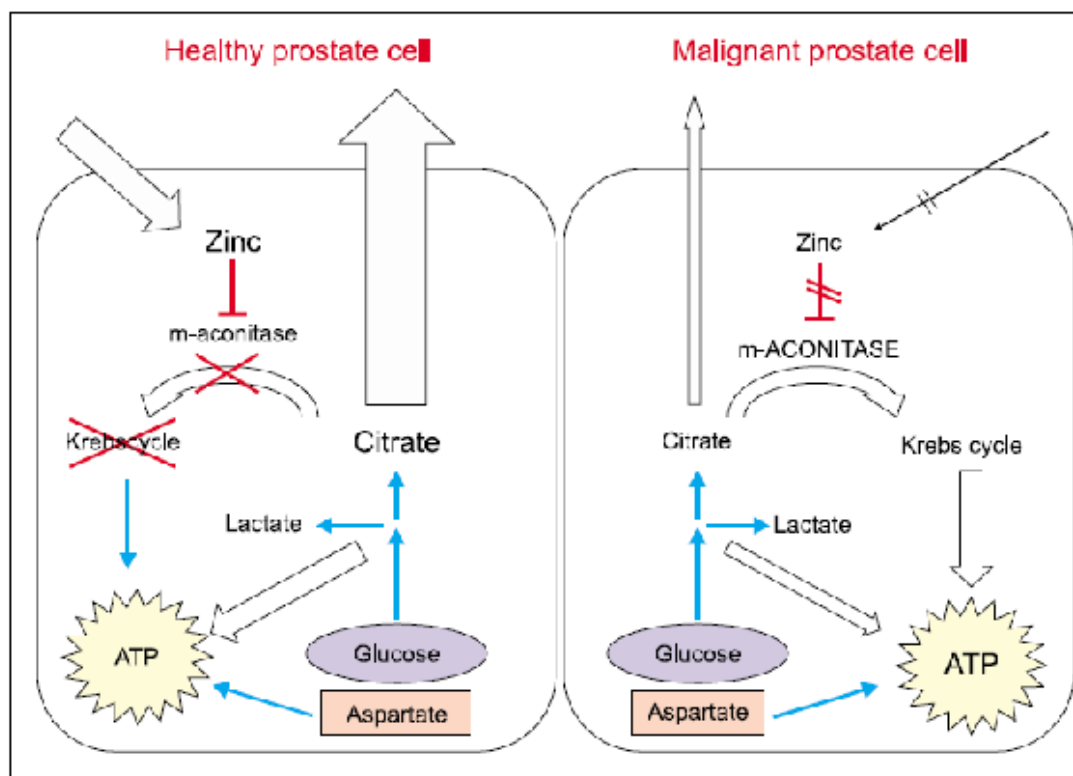
Σύμφωνα με τις παραπάνω διαπιστώσεις η επιστήμη της μεταβολομικής βασιζόμενης στην NMR φασματοσκοπία, είναι πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη, σε όλα τα στάδια της εξέλιξής του, από την διάγνωση μέχρι την σταδιοποίηση του και την πρόγνωση του.

Ο καρκίνος του προστάτη παρουσιάζει μια μεταβολική ιδιαιτερότητα καθώς κατά τον σχηματισμό των καρκινικών κυττάρων υπάρχει μια σημαντική διαφοροποίηση στην έκκριση του κιτρικού οξέος σε σχέση με ότι ισχύει στα καλοήθη. Αυτή η ιδιαιτερότητα έγινε αντιληπτή από τους ερευνητές Leslie C. Costello and Renty B. Franklin οι οποίοι την υπέδειξαν ως <<στοιχείο κλειδί>> για την πρώιμη ανίχνευση, διάγνωση, χημειοπροφύλαξη και θεραπεία του καρκίνου του προστάτη και η οποία συνοπτικά παρατίθεται παρακάτω⁴⁰⁻⁴³.

Στην περιφερική ζώνη του προστάτη εμφανίζεται το 75 % των περιστατικών κακοήθειας σε σύγκριση με τις άλλες περιοχές του προστατικού αδένος. Τα επιθηλιακά κύτταρα της περιφερικής ζώνης είναι εξειδικευμένα στην έκκριση κιτρικού οξέος. Αποθηκεύουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες ψευδαργύρου απ'ότι τα επιθηλιακά κύτταρα της κεντρικής περιοχής καθώς έχουν υποδοχείς για την πρόσληψη του. Τα υψηλά ποσοστά του ψευδαργύρου στα μιτοχόνδρια των επιθηλιακών κυττάρων της περιφερικής ζώνης αναστέλλουν την δραστηριότητα της μιτοχονδριακής ακονιτάσης (m-aconitase) μπλοκάροντας έτσι την οξείδωση του κιτρικού οξέος στον κύκλο του Krebs. Κατά συνέπεια το συσσωρευμένο κιτρικό οξύ εκκρίνεται στο προστατικό υγρό, δεν οξειδώνεται με αποτέλεσμα μικρότερη αναπνευστική λειτουργία και λιγότερη ενέργεια (60% λιγότερο ATP).

Παραδόξως κατά την μετατροπή των καλοήθων επιθηλιακών κυττάρων σε καρκινικά συμβαίνει μια μεταβολική αλλαγή αφού κύτταρα με ανεπαρκή ποσοστά ενέργειας μετατρέπονται σε κύτταρα με υψηλές ενεργειακές δυνατότητες. Μια ένδειξη αυτής της αλλαγής είναι η μειωμένη λειτουργικότητα του γονιδίου που κωδικοποιεί τους υποδοχείς πρόσληψης ψευδαργύρου στα

νέα <<τροποποιημένα κύτταρα>>, οδηγώντας σε πολύ χαμηλά επίπεδα αυτού⁴⁴. Τα χαμηλά επίπεδα του ψευδαργύρου στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων δεν επηρεάζουν την δραστικότητα της μιτοχονδριακής ακονιτάσης και οδηγούν στην οξείδωση του κιτρικού οξέος στον κύκλο του Krebs παράγοντας περισσότερα μόρια ATP και παρέχοντας ενέργεια³⁴. Έτσι, τα επίπεδα του κιτρικού οξέος στα καρκινικά κύτταρα είναι πολύ χαμηλά ή και ανύπαρκτα συγκριτικά με τα καλοήγη επιθηλιακά κύτταρα.



Εικ 7: Σύνοψη της φυσιολογίας του προστάτη σε κατάσταση υγείας (αριστερά) και νόσου (δεξιά). Η φυσιολογία του προστάτη περιλαμβάνει συσσώρευση του κιτρικού οξέος μέσω της ψευδάργυρο-εξαρτώμενης αναστολής της m-aconitase με αποτέλεσμα αφενός την μειωμένη παραγωγή ATP μέσω του κύκλου του Krebs και αφετέρου την μεγαλύτερη εξάρτηση από την γλυκόζη και ασπαρτικό για την παραγωγή ATP. Αντιθέτως στην περίπτωση της κακοήθειας, τα περιφερειακά κύτταρα του προστάτη χάνουν την ικανότητά τους να συσσωρεύουν ψευδάργυρο με αποτέλεσμα την ισομερίωση του κιτρικού οξέος μέσω της m-aconitase για το μεταβολισμό στον κύκλο του Krebs και την μειωμένη συσσώρευση και παραγωγή αυτού¹⁴⁴.

Εκτός όμως από το κιτρικό οξύ και άλλοι μεταβολίτες έχουν οριστεί σαν πιθανοί δείκτες καρκίνου του προστάτη οι οποίοι και συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Οι αλλαγές των μεταβολιτών σχετίζονται με τον συγκεκριμένο μεταβολισμό που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα και τις ανάγκες τους. Έτσι η μεμβρανική σύνθεση στα νέα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα υψηλές απαιτήσεις σε χολίνη που σε συνδυασμό με τον τροποποιημένο μεταβολισμό αυτής

οδηγούν σε αύξηση της συγκέντρωσης των μεταβολιτών που περιέχουν χολίνη.

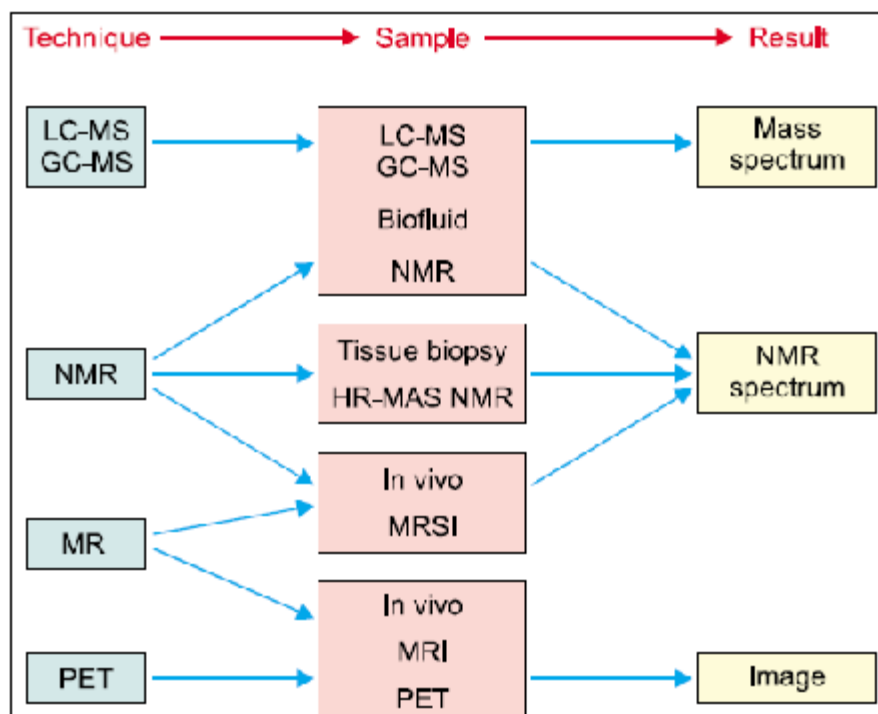
Επιπλέον λόγω του φαινομένου του Warburg παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα αλανίνης και γαλακτικού οξέος. Η δε σαρκosίνη αποτελεί έναν αμφισβητούμενο δείκτη καθώς τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα.

Metabolite	Context	Status in PCa	Sample
Citrate	Normally high levels in prostate tissue and prostatic fluid	↓ - metastasis < PCa < BPH < healthy	Prostatic fluid
		↓ - metastasis < PCa < BPH < healthy	Prostate tissue
Choline-containing compounds	Pre-cursors and products of membrane phospholipids	↑ - metastasis > PCa > BPH > healthy	Prostate tissue
Spermine	Proposed endogenous inhibitor to PCa growth	↓ - metastasis < PCa < healthy	Prostatic fluid
		↓ - metastasis < PCa < healthy	Prostate tissue
Myo-inositol	Osmoregulation	↓	Prostatic fluid
		↑	Prostate tissue
Lactate	Increased glycolysis (Warburg effect)	↑ - PCa > BPH > healthy	Prostate tissue
Alanine	Increased glycolysis (Warburg effect)	↑ - PCa > BPH > healthy	Prostate tissue
Omega-6 fatty acids	Promote PCa development	↑	Prostate tissue
Sarcosine	Activation of prostate cancer cells	↑ - correlated with invasiveness	Urine and prostate tissue
Choline+ creatine/ citrate	Metabolite ratio	↑ - PCa > BPH > healthy - significant correlation with Gleason score	Prostate tissue
Citrate/spermine		↓	Prostatic fluid
		↓	Prostate tissue
Total choline/citrate		↑ - PCa > BPH > healthy - significant correlation with Gleason score	Prostate tissue
Choline/creatine		↑ - PCa > BPH > healthy - significant correlation with Gleason score	Prostate tissue
Citrate/creatine		↓ - significant correlation with Gleason score	Prostate tissue

Πιν 1: Ο πίνακας δείχνει μια σύνοψη των πιθανών βιοδεικτών για καρκίνο του προστάτη που προσδιορίζονται από in vitro μεταβολομικές μεθόδους, το περιεχόμενό τους, το στάδιο του καρκίνου του προστάτη στο οποίο εμφανίζονται και τον τύπο του δείγματος που χρησιμοποιείται. PCa: καρκίνος του προστάτη, BPH: καλοήγη υπερπλασία του προστάτη 144.

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των μεταβολιτών εντός του προστάτη και των βιολογικών του υγρών έχει χρησιμοποιηθεί μια ποικιλία τεχνικών. Για τα δείγματα που έχουν μορφή διαλύματος, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ή αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS). Άλλες μέθοδοι ανάλυσης περιλαμβάνουν (HR-MAS) NMR και φασματομετρία μαγνητικού συντονισμού (MRS)

σε ιστό / in vivo καθώς και τεχνικές απεικόνισης όπως η μαγνητική τομογραφία ή PET. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους συμβάλλει στη λήψη ενός στιγμιότυπου του μεταβολικού προφίλ υγιούς ή ασθενούς προστατικού αδένα.



Εικ 8: Οι βασικές τεχνικές ποσοτικού προσδιορισμού παρατίθενται στα αριστερά, οι σχέσεις και οι συνδυασμοί τους εμφανίζονται στη μέση του διαγράμματος και το αποτέλεσμα αυτών των σχέσεων δείχνεται στη δεξιά πλευρά. Αυτές είναι οι κύριες μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού των μεταβολιτών στον καρκίνο του προστάτη¹⁴⁴.

Οι μελέτες που διεξήχθησαν με τις παραπάνω μεθόδους αποκάλυψαν και τις αλλαγές στα επίπεδα των βασικών μεταβολιτών που αφορούν στον προστατικό αδένα και σε όλες τις εκφάνσεις του, τόσο σε φυσιολογική κατάσταση όσο και ασθένεια. Από τα παραπάνω καταφαίνεται ότι έχει ιδιαίτερη σημασία ο προσδιορισμός των μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα που προέρχονται από τον προστατικό αδένα.

Οι περισσότερες μελέτες αφορούν σε ανάλυση προστατικού καρκινικού ιστού με HR-MAS NMR φασματοσκοπία. Βιβλιογραφία σχετική με NMR φασματοσκοπική ανάλυση σε επίπεδο μεταβολομικής προσέγγισης σε εκχυλίσματα από κυτταρικές σειρές είναι αρκετά περιορισμένη.

Ενδεικτικά παρατίθεται η παρακάτω μελέτη στην οποία αναλύονται μεν εκχυλίσματα ιστού και όχι κυττάρων αλλά με NMR φασματοσκοπία και που παρότι χρονολογείται από το 1991 επιδιώκει την διαφοροποίηση των περιπτώσεων με βάση το μεταβολικό τους προφίλ. Έτσι, στην μελέτη αυτή, δείγματα από 7 ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, 13 με καλοήγη υπερτροφία και 3 και με τις δύο συνθήκες, ελήφθησαν και εκχυλίστηκαν με

υπερχλωρικό οξύ ενώ στη συνέχεια αναλύθηκαν με NMR φασματοσκοπία. Τα φασματικά δεδομένα υπέστησαν επεξεργασία και προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων καρκίνου και καλοήθους υπερτροφίας όσον αφορά στις αναλογίες των ακόλουθων μεταβολιτών: κιτρικό οξύ, κρεατίνη, φωσφορυλχολίνη, αλανίνη, και γλουταμικό οξύ¹⁴⁵.

Συμπερασματικά πρέπει να λεχθεί πως δεδομένου του γεγονότος ότι ο καρκίνος του προστάτη είναι ιάσιμος πλήρως εάν ανιχνευθεί εγκαίρως σε συνδυασμό με τον χαμηλό ρυθμό εξέλιξης του, βιοδείκτες όπως το κιτρικό οξύ είναι σημαντικό να ανακαλύπτονται και να καταγράφονται καθώς καθορίζουν την πορεία της νόσου και την επιβίωση του ασθενούς.

Η μεταβολομική συμβάλλει καθοριστικά προς αυτήν την κατεύθυνση αφού εξετάζει ταυτόχρονα πλήθος μεταβολιτών που αποτελούν υποψήφιους βιοδείκτες με μη επεμβατικό τρόπο και σε εξαιρετικά σύντομο χρόνο.

Μεταβολομική σε κυτταρικές σειρές

Οι μεταβολομικές μελέτες σε κυτταρικές σειρές είναι αρκετά περιορισμένες και τα τελευταία μόνο χρόνια παρατηρείται μια αύξηση στις σχετικές δημοσιεύσεις. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται από το πλήθος των δυσκολιών που παρουσιάζονται κατά την διεξαγωγή τους. Ενδεικτικά αναφέρονται οι εξής: διακοπή της μεταβολικής διαδικασίας, τρόπος συλλογής των δειγμάτων, και χειρισμού αυτών ώστε να μην επιμολυνθούν κατά την διαδικασία της εκχύλισης, επίδραση του θρεπτικού υλικού και των συστατικών του στους ρυθμούς ανάπτυξης των διαφόρων κυτταρικών σειρών. Εντούτοις, η μεταβολομική ανάλυση των κυτταρικών σειρών παρέχει πληροφορίες, είτε ανεξάρτητα είτε σε συνδυασμό με άλλες μελέτες <<omics>>, που είναι απαραίτητες για την ανάλυση σε επίπεδο βιολογίας συστήματος.

Επιπλέον πλεονεκτούν σημαντικά σε σχέση με τις μεταβολομικές μελέτες που διεξάγονται σε ανθρώπους και ζώα. Είναι ευκολότερο να ελεγχθούν, λιγότερο δαπανηρές και απλούστερες στην ερμηνεία τους. Επιπλέον, ατομικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του δείγματος καθώς και παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η γενική υγεία, το περιβάλλον δεν είναι θέματα που απασχολούν τους ερευνητές σε εφαρμογές κυτταρικής καλλιέργειας.

Οι δημοσιεύσεις σχετικά με την μεταβολομική προσέγγιση κυτταρικών σειρών εστιάζουν σε ένα μικρό αριθμό των πλέον άφθονων μεταβολιτών του κυττάρου, όμως η τεχνολογική πρόοδος αφήνει αισιόδοξα μηνύματα για καλύτερες επιδόσεις. Έτσι θα μπορούσε να αποτελέσει αξιόλογο επιστημονικό υπόβαθρο για την μελέτη της φυσιολογίας των κυτταρικών σειρών¹⁶².

ΚΕΦ 4. ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗ

Εισαγωγή

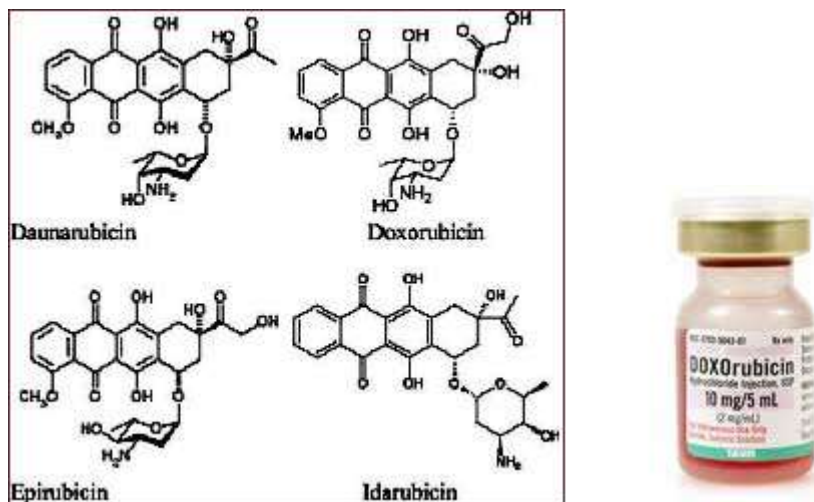
Οι συμβατικές αντικαρκινικές ουσίες σε μια κλασική κατηγοριοποίηση ταξινομούνται με βάση τον μηχανισμό δράσης τους σε αλκυλιούντες παράγοντες, αντιμεταβολίτες, αναστολείς λειτουργίας χρωματίνης, στεροειδείς ορμόνες και κυτταροτοξικά αντιβιοτικά⁶⁷.

Λόγω όμως των πολλών ανεπιθύμητων δράσεων των παραπάνω ουσιών όπως γαστρεντερικές διαταραχές, αλωπεκία, νεφρο- και καρδιο-τοξικότητα έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια νεώτεροι αντικαρκινικοί παράγοντες όπως αναστολείς κυτταρικού κύκλου, αναστολείς μεταγωγής σήματος, ρυθμιστές απόπτωσης, αναστολείς αγγειογένεσης και αναστολείς διήθησης^{67,68}.

Δομή

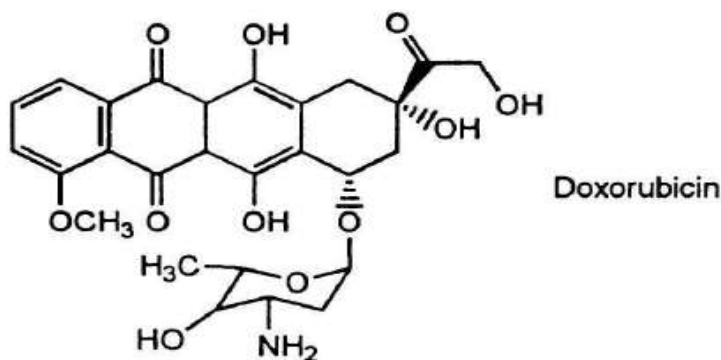
Στην κατηγορία των κυτταροτοξικών αντιβιοτικών ανήκει η δοξορουμπικίνη ή αδριαμυκίνη όπως θα καλείται στο εξής. Πρωτοανακαλύφθηκε το 1967 στα εργαστήρια *Farmitalia Research Laboratories* καθώς απομονώθηκε από μια μεταλλαγμένη καλλιέργεια του μύκητα *Streptomyces peucetius* που παράγει την νταουνορουμπικίνη, πρότυπη ένωση της κατηγορίας των ανθρακυκλινών. Η υδροχλωρική αδριαμυκίνη είναι κόκκινου χρώματος κρυσταλλική κόνις που διαλύεται στο νερό οπότε και λαμβάνει πορτοκαλοκόκκινο χρώμα (σε αυτή τη μορφή χορηγήθηκε στα κύτταρα όπως φαίνεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο)⁶⁹.

Η αδριαμυκίνη είναι παρεμφερής δομικά με την νταουνορουμπικίνη, είναι το 14-υδρόξυ παράγωγο της αλλά εμφανίζει υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη από αυτήν στους ίδιους όγκους στα ζώα σε χαμηλότερες δόσεις⁷⁰. Η αδριαμυκίνη ανήκει στην κατηγορία των ανθρακυκλινών που χαρακτηρίζονται από άκαμπτη επίπεδη δομή αρωματικού δακτυλίου που περιέχει κινόνη συνδεδεμένη με Ο-γλυκοσιδικό δεσμό με ένα αμινοσάκχαρο⁷¹.



Εικ 9: Βασικοί εκπρόσωποι των ανθρακυκλινών⁷³.

Ο δακτύλιος της κινόνης είναι σε θέση να μετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις παράγοντας υψηλής αντιδραστικότητας χημικές ρίζες που είναι υπεύθυνες για την καρδιοτοξικότητα των ανθρακυκλινών⁷².



Εικ 10: Χημική δομή της δοξορουμπικίνης⁷⁴.

Η αδριαμυκίνη αποτελεί υπόστρωμα για την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, γεγονός που εξηγεί την μειωμένη ευαισθησία των ανθεκτικών στην φαρμακευτική αγωγή κυττάρων απέναντι της, καθώς η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη είναι ένας ATP-εξαρτώμενος μεταφορέας φαρμάκων γνωστός σαν δείκτης φαρμακοαντοχής (multidrug resistance marker)⁷⁵.

Μεταβολισμός

Ο χρόνος ημιζωής της αδριαμυκίνης κυμαίνεται μεταξύ 24-36 ωρών που σημαίνει ότι παραμένει αρκετό χρονικό διάστημα στους ιστούς, ικανό για να προκαλέσει τοξικά φαινόμενα. Μαζί με τον βασικό μεταβολίτη της, δοξορουμπικινόνη, δεσμεύονται στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Ο τρόπος εισόδου στα κύτταρα είναι αυτός της παθητικής διάχυσης ενώ η βασική βιομετατροπή της πραγματοποιείται στο ήπαρ⁷⁶.

Μηχανισμός δράσης

Τα κυτταροτοξικά αντιβιοτικά κυρίως δρουν αλληλεπιδρώντας με ένζυμα (πολυμεράση, τοποϊσομεράση) που εμπλέκονται στον διπλασιασμό του DNA και ασκούν την δράση τους ανεξάρτητα με την φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκονται τα κύτταρα στόχοι παρά το γεγονός πως σε γενικά πλαίσια η χημειοθεραπευτική αγωγή στοχεύει τα κύτταρα που βρίσκονται στην φάση της μίτωσης⁷⁷.

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσεις από πολλά ερευνητικά κέντρα όπως συσσώρευση των ανθρακυκλινών στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων και ακόλουθη απόπτωση, αντιαγγειογενετική δράση, επαγωγή αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης p53 και DNA με ακόλουθη απόπτωση, δημιουργία ελευθέρων ριζών κ.α⁷³.

Εντούτοις οι επικρατέστεροι μηχανισμοί αφορούν σε δύο περιπτώσεις:

Αφενός στην απευθείας παρένθεση στο DNA, δηλαδή στην εμβόλιμη είσοδο μεταξύ των βάσεων της διπλής έλικας με ταυτόχρονη αναστολή DNA και RNA πολυμεράσης διακόπτοντας τον διπλασιασμό του DNA και την μεταγραφή του RNA αντίστοιχα⁷⁶.

Αφετέρου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην αλληλεπίδραση με το ένζυμο τοποϊσομεράση II το οποίο στοχεύουν γενικά πολλοί κυτταροστατικοί παράγοντες. Η τοποϊσομεράση II δρώντας στην τοπολογία του DNA, μετέχει στην αντίδραση επανασύνδεσης της διπλής έλικας του DNA κατά τον διπλασιασμό αυτού. Η αδριαμικίνη το αδρανοποιεί και έτσι προκαλεί συσσώρευση μονόκλωνων ή δίκλωνων κομματιών αλυσίδας DNA-ενζύμου με αποτέλεσμα καταστροφή του DNA και στη συνέχεια απόπτωση αφού είναι αδύνατη η επιδιόρθωση του DNA^{78,79}.

Θεραπευτικό προφίλ-Ανεπιθύμητες ενέργειες-Ανάπτυξη αντοχής

Η αδριαμικίνη έχει ευρύτατο θεραπευτικό εύρος γι'αυτό και είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά για περισσότερα από 30 χρόνια τόσο μόνη της όσο και σε συνδυασμό με άλλους αντινεοπλασματικούς παράγοντες.

Κατά βάση χρησιμοποιείται στην θεραπεία καρκίνου του μαστού, ωοθηκών, παγκρέατος, προστάτη, θυρεοειδούς. Επίσης σε σάρκωμα Kaposi, οστεοσάρκωμα, πολλαπλούν μυέλωμα, λευχαιμίες καθώς και σε πλήθος άλλων κακοηθειών.

Παρά την δυναμική της στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων η οποία εξαρτάται από την δόση, τη χρονική διάρκεια της θεραπείας και τον τύπο της κακοήθειας, η αδριαμικίνη δεν έχει εκλεκτικότητα στην δράση της με συνέπεια τον περιορισμό στην χρήση της εξαιτίας των ανεπιθύμητων δράσεών της

όπως επίσης τις συνεχείς προσπάθειες σύνθεσης μη τοξικών της παραγώγων^{76,80}.

Επιδρά και στα διαφοροποιημένα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού με αποτέλεσμα γαστρεντερικές (ναυτία, έμετο) και δερματικές διαταραχές, αλωπεκία, λευκοπενία, στοματίτιδα. Προκαλεί τοξικά φαινόμενα σε σημαντικά όργανα όπως συκώτι, νεφρούς, εγκέφαλο καθώς και στην καρδιά οδηγώντας σε μη αναστρέψιμη υπολειτουργία του μυοκαρδιακού ιστού και ακόλουθη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια^{76,81}. Για την αντιμετώπιση της καρδιοτοξικότητας γίνεται πολλές φορές συγχορήγηση αδριαμυκίνης και φυσικών προϊόντων όπως ολεωρωπαΐνη ή κερκετίνη με ελπιδοφόρα αποτελέσματα^{82,83}. Επιπλέον στοχεύοντας στην μείωση της τοξικότητάς της εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές μεταξύ των οποίων: προσπάθεια μείωσης της δόσης, εγκλεισμός σε λιποσώματα, συγχορήγηση καρδιοπροστατευτικών ουσιών κ.α.⁸⁴.

Δυστυχώς πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν αντίσταση στην θεραπεία με αδριαμυκίνη εξαιτίας τόσο γενετικών μεταλλάξεων και μειωμένης ρύθμισης της τοποϊσομεράσης II, όσο και λόγω της λειτουργίας της ως υποδοχέα της P-gp μορίου που όπως ήδη αναφέρθηκε, η υπερέκφρασή του, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς αντίστασης^{85,86}.

ΚΕΦ 5. ΟΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ



Εικ 11: *Olea europaea*, Oleaceae. Δέντρο της ελιάς,. Αειθαλής, αιωνόβιο, καρποφόρο. (elea creta.gr)



Εικ 12: Η διατροφική και βιολογική για τον ανθρώπινο οργανισμό αξία του ελαιολάδου και της ελιάς είναι πολύ σημαντική. Αποτελεί πηγή υγείας και μακροζωίας για τους μεσογειακούς λαούς εδώ και χιλιάδες χρόνια.

Εισαγωγή

Η Μεσογειακή διατροφή έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας εξαιτίας της θετικής επίδρασής της στην υγεία και την μακροζωία. Θεμελιώδες συστατικό της αποτελεί το ελαιόλαδο και γενικά τα προϊόντα που προέρχονται από την ελιά, *Olea europaea* οικ *Oleaceae*, αφού έχουν ποικίλες προστατευτικές ενδείξεις απέναντι στον καρκίνο, στις καρδιοπάθειες και σε άλλες παθήσεις⁸⁷⁻⁹¹.

Το ελαιόλαδο περιέχει ποσότητες τριγλυκεριδίων όπως το γνωστό ελαϊκό οξύ (μονοακόρεστο ωμέγα-9 λιπαρό οξύ), ελεύθερα λιπαρά οξέα, γλυκερόλη, χρωστικές, αρωματικές ενώσεις, στερόλες, τοκοφερόλες, φαινολικά παράγωγα, σκουαλένιο και άλλες ενώσεις. Οι βασικές φαινολικές ενώσεις είναι η ολευρωπαΐνη και τα προϊόντα υδρόλυσής της τυροσόλη και υδροτυροσόλη, οι οποίες και ευθύνονται για την πικρή γεύση και τις φαρμακολογικές δράσεις του ελαιολάδου⁹².

Εντόπιση

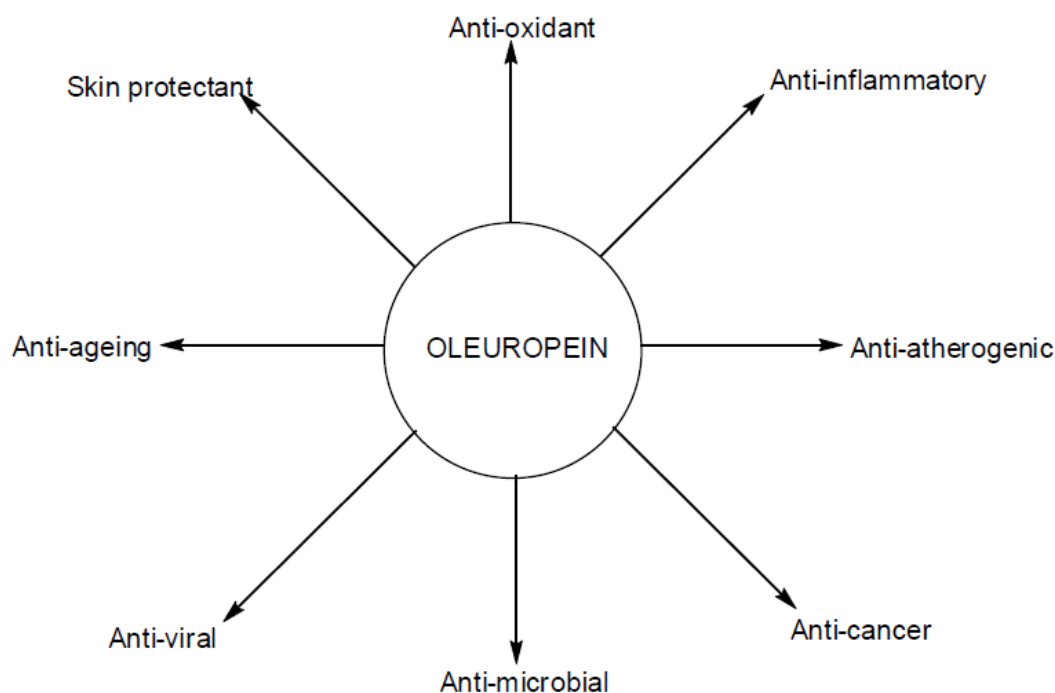
Οι φαινολικές ενώσεις κατανέμονται σε όλα τα μέρη του φυτικού συστήματος της ελιάς με τις συγκεντρώσεις τους να ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων ιστών. Η ολευρωπαΐνη μπορεί να φτάσει σε συγκέντρωση τα 140 mg/g σε ξηρή βάση στις νεαρές ελιές και στα 60-90 mg/g επί ξηρού στα φύλλα.

Χημεία-βιοσύνθεση-βιοδιαθεσιμότητα

Chemical structures of Oleuropein and Oleuropein aglycon are shown. Oleuropein is a glucuronide conjugate of oleuropein aglycon. Oleuropein aglycon is a flavonoid derivative with a 3,4-dihydroxybenzyl group, a methoxycarbonyl group, and a hydroxyl group.

Η ολευρωπαΐνη συντίθεται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος καταλήγοντας στο σχηματισμό των ολεοσιδών. Όσον αφορά στη βιοδιαθεσιμότητα της μετά από χορήγηση σε ανθρώπους, έρευνα των Vissers et al έχει καταδείξει ότι είναι αρκετά υψηλή φτάνοντας μέχρι και το 55- 60%⁹⁵.

Φαρμακολογικές δράσεις



Εικ 14: Πολυδιάστατη δράση της ολευρωπαΐνης στην ανθρώπινη υγεία⁹⁴.

Η ολευρωπαΐνη έχει πλήθος φαρμακολογικών δράσεων γεγονός που την καθιστά από τα πλέον μελετημένα και εμπορικά εκμεταλλεύσιμα μόρια φυσικής προέλευσης.

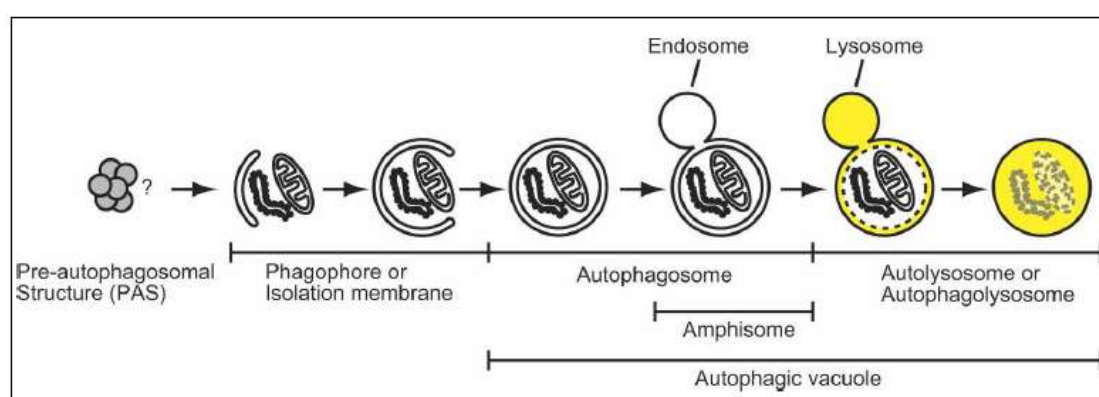
Μεταξύ των άλλων παρουσιάζει αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντι-αθηρωματική και αντιϊική δράση, αντι-ισχαιμική και υπολιπιδαιμική με υψηλή καρδιοπροστατευτική επίδραση έναντι της καρδιοτοξικότητας της αδριαμικίνης. Επίσης εμφανίζει νευροπροστατευτική δράση, αντιγηραντική και επουλωτική για το δέρμα⁹⁴. Η αντικαρκινική της ιδιότητα έχει δειχθεί ερευνητικά τα τελευταία χρόνια με την δημοσίευση πλήθους μελετών.

Τέλος μελέτη των Hamdi και Castellon πρότεινε την ολευρωπαΐνη ως μέλος μιας νέας κατηγορίας αντικαρκινικών ενώσεων που στοχεύουν σε κάθε στάδιο της εξελικτικής διαδικασίας του καρκίνου. Πράγματι μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό προστατεύοντας τα κύτταρα από το να υποστούν γενετικές βλάβες που οδηγούν σε ογκογένεση. Επιπλέον ως αντι-αγγειογόνος παράγοντας μπορεί να αποτρέψει την εξέλιξη του όγκου. Τέλος αναστέλλει άμεσα τα καρκινικά κύτταρα και έτσι μπορεί να οδηγήσει σε υποχώρηση του όγκου. Ο μοναδικός συνδυασμός αυτών των ιδιοτήτων σε ένα μόνο μόριο μπορεί να αναβαθμίσει την ολευρωπαΐνη από ένα διαιτητικό συστατικό σε ένα δραστικό αντικαρκινικό φάρμακο γεγονός που απαιτεί βέβαια κλινικές μελέτες σε ανθρώπους¹⁴⁷.

ΚΕΦ 6. ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Η αυτοφαγία είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει την αποικοδόμηση των κυτταροπλασματικών συστατικών εντός του λυσοσώματος. Παρά την φαινομενική απλότητα της ως διαδικασία, φαίνεται να εμπλέκεται σε πλήθος φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών λειτουργιών. Μεταξύ αυτών είναι η επιβίωση σε συνθήκες στέρξης θρεπτικών συστατικών και υποξίας, η εκκαθάριση ενδοκυττάρων ελαττωματικών ή πλεοναζόντων πρωτεϊνών και οργανιδίων, η απομάκρυνση μικροοργανισμών, ο κυτταρικός θάνατος και η καταστολή των όγκων.

Η αυτοφαγία πραγματοποιείται σε διαδοχικά στάδια. Βασικός παράγοντας που πυροδοτεί την έναρξή της είναι η έλλειψη διατροφικών στοιχείων απαραίτητων για τη ανάπτυξη του κυττάρου. Κάθε κυτταρική σειρά επηρεάζεται αρνητικά από διαφορετικό αμινοξύ ή ομάδα αμινοξέων. Στη συνέχεια, τα κυτταροπλασματικά συστατικά απομονώνονται με τη βοήθεια μιας μοναδικής μεμβρανικής δομής που καλείται φαγοφώρο ή μεμβράνη απομόνωσης. Όταν έχει ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία σχηματίζεται μια κυκλική δομή, το αυτοφαγόσωμα, στο εσωτερικό του οποίου βρίσκονται τα διάφορα συστατικά και οργανίδια περικλειόμενα από διπλή μεμβράνη. Ακολούθως πραγματοποιείται σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα προς σχηματισμό του αυτοφαγολυσώματος ή αυτολυσώματος και αποικοδόμηση του περιεχομένου του με τη δράση των λυσοσωμικών υδrolασών. Τα προϊόντα της αποικοδόμησης όπως για παράδειγμα τα αμινοξέα, απελευθερώνονται εκ νέου στο κυτταρόπλασμα με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή τους από το κύτταρο για την κάλυψη των αναγκών του.



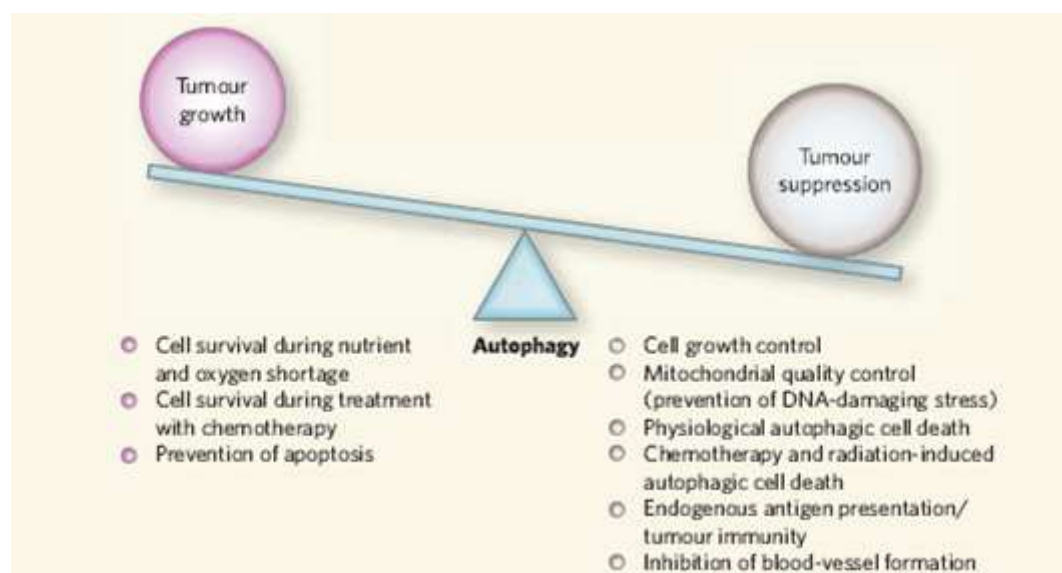
Εικ 15: Η διαδικασία της αυτοφαγίας σε κύτταρα θηλαστικών. Ένα τμήμα του κυτταροπλάσματος, συμπεριλαμβανομένων οργανιδίων, περικλείεται από το φαγοφώρο ή τη μεμβράνη απομόνωσης για να σχηματίσει ένα αυτοφαγόσωμα. Η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος στη συνέχεια συντίκεται με το λυσόσωμα σχηματίζοντας το αυτοφαγολυσόσωμα και παράλληλα το εσωτερικό υλικό αποικοδομείται¹¹⁶.

Στην διπλοειδή μεμβράνη του αυτοφαγосώματος, η σύσταση της εξωτερικής μεμβράνης είναι διαφορετική από της εσωτερικής. Μόνο η LC3 πρωτεΐνη εντοπίστηκε στην εσωτερική μεμβράνη και λειτουργεί σαν υποδοχέας του υποστρώματος p62/SQSTM1 το οποίο εμπλέκεται σε πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών. Γι'αυτό το λόγο σε πολλές δοκιμασίες επιδιώκεται η ανίχνευση της LC3 πρωτεΐνης ως δείκτη ύπαρξης αυτοφαγικής δραστηριότητας στο κύτταρο.

Η σχέση μεταξύ αυτοφαγίας και καρκίνου είναι περίπλοκη και αμφιλεγόμενη δεδομένου του γεγονότος ότι κάθε στάδιο της αυτοφαγικής πορείας διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο στην δημιουργία και στην εξέλιξη ενός όγκου. Άλλοτε λοιπόν απαιτείται η επαγωγή και άλλοτε η καταστολή της αυτοφαγίας.

Έτσι σε αρχικό στάδιο της καρκινογένεσης όπου τα καρκινικά κύτταρα στερούνται θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου λόγω της μη επαρκούς αγγειογένεσης, η αυτοφαγία αποδεικνύεται ένας σωτήριος, προστατευτικός μηχανισμός που επιτρέπει την επιβίωσή τους (Βέβαια υπάρχει και η αντίθετη άποψη που υποστηρίζει την καταστολή του όγκου μέσω της εξάλειψης μεταλλαξιόνων παραγόντων). Εφόσον όμως διασφαλιστεί η αιμάτωση του όγκου και άρα η ανάπτυξη του, περαιτέρω συνέχιση της αποικοδόμησης των κυτταροπλασματικών συστατικών μέσω της αυτοφαγίας είναι επιβλαβής και οδηγεί σε θάνατο του κυττάρου μέσω απόπτωσης.

Πολλοί αντικαρκινικοί παράγοντες οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο με τον μηχανισμό της αυτοφαγίας όπως ετοποσίδη, ραπαμυκίνη κ.λ.π.¹¹⁶.



Εικ 16: Αμφιλεγόμενος και περίπλοκος ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο.

6.1 LC3 πρωτεΐνη

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά τον σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων εντοπίζεται στην μεμβράνη αυτών η LC3 πρωτεΐνη.

Πρόκειται για την συνδεδεμένη με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη ελαφριάς αλυσίδας 3 με μοριακό βάρος περίπου 17kDa. Βρίσκεται σε τέσσερις ισομορφές LC3A, LC3B, LC3C, LC3D με την LC3B να είναι η συνηθέστερη. Αμέσως μετά την σύνθεση της, η LC3 υφίσταται κατεργασία στο καρβοξυτελικό της άκρο από την Atg4 και μετά την αφαίρεση 22 αμινοξέων, σχηματίζεται η LC3-I η οποία και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Στην συνέχεια, η LC3-I ενώνεται με την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και σχηματίζεται η LC3-II, που βρίσκεται και στην εξωτερική και στην εσωτερική μεμβράνη του αυτοφαγосώματος.

Κατά τον ακόλουθο σχηματισμό των αυτολυσωμάτων και την αποικοδόμηση του περιεχομένου τους, η LC3-II της εσωτερικής μεμβράνης αποικοδομείται στον λυσοσωμικό αυλό από λυσοσωματικά ένζυμα ενώ η LC3 στην εξωτερική μεμβράνη αποκόπτεται από την Atg4 με αποτέλεσμα την πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε ολική LC3.

Η λυσοσωμική μετατροπή του αυτοφαγοσωμικού δείκτη LC3-II αποτελεί ένδειξη επαγόμενης-από στέρηση θρεπτικών συστατικών-αυτοφαγίας. Επομένως η ανίχνευση της LC3 με ανοσοαποτύπωση ή ανοσοφθορισμό, αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο παρακολούθησης της αυτοφαγίας και των μηχανισμών που σχετίζονται με αυτήν, συμπεριλαμβανομένου και του κυτταρικού θανάτου^{117,118}.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο πρωτεύον στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση εκείνων των μεταβολιτών που διαδραματίζουν ρόλο στον μεταβολισμό των προερχόμενων από προστατικό αδενοκαρκίνωμα κυττάρων PC-3 και πως αυτοί μεταβάλλονται μετά την χορήγηση διαφόρων παραγόντων. Έτσι κύτταρα της σειράς PC-3, υφίστανται 48ωρη επίδραση συγκεκριμένων συγκεντρώσεων ολεωρωπαΐνης, αδριαμυκίνης και συνδυασμού αυτών, λαμβάνονται τα οργανικά και υδατικά τους εκχυλίσματα και αναλύονται με NMR φασματοσκοπική ανάλυση. Στη συνέχεια υφίστανται επεξεργασία μέσω στατιστικών μεθόδων πολυπαραμετρικής φύσης ώστε να προσδιοριστούν οι σημαίνοντες μεταβολίτες για τον διαχωρισμό των ομάδων των επιδράσεων τόσο μεταξύ τους όσο και με τα κύτταρα αναφοράς. Επιπλέον μελετώνται οι αυξομειώσεις των μεταβολιτών ανάμεσα στις διάφορες ομάδες και επιχειρείται επεξήγηση των βιοχημικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται.

Δευτερευόντως επιστρατεύονται μοριακές τεχνικές ώστε να δοθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα της επίδρασης των παραγόντων αδριαμυκίνης, ολεωρωπαΐνης και του συνδυασμού τους στα κύτταρα PC-3. Μέσω δοκιμασιών MTT διερευνάται η ενδεχόμενη κυτταροστατική δράση μετά από 96 ώρες επώασης με την κάθε επίδραση. Επιπλέον μελετάται η χρονοεξαρτώμενη επίδραση (24, 48, 72 ωρών) ολεωρωπαΐνης, αδριαμυκίνης και συγχορήγησης επί των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Μέσω του ανοσοφθορισμού διερευνάται η πιθανή πρόκληση αυτοφαγίας μετά την 24ωρη επώαση με τους παραπάνω παραγόντες, μέσω του προσδιορισμού της θέσης της LC3 πρωτεΐνης που σχετίζεται με την αυτοφαγία. Η προσπάθεια εύρεσης του μηχανισμού δράσης της ολεωρωπαΐνης και της αδριαμυκίνης συνεχίζεται με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης και την μέσω αυτής διερεύνηση της έκφρασης της LC3 πρωτεΐνης και συγκεκριμένα την έκφραση της ισομορφής LC3-II ως προς την έκφραση της ισομορφής LC3-I.

Εν κατακλείδι, η παρούσα εργασία επιχειρεί την διερεύνηση της συνολικής συμβολής της μεταβολομικής, μέσω NMR φασματοσκοπίας, προσέγγισης στην θεραπεία του καρκίνου του προστάτη με τον αντικαρκινικό παράγοντα αδριαμυκίνη και το φυσικό συστατικό ολεωρωπαΐνη. Η εικόνα της συμπεριφοράς του συγκεκριμένου αδενοκαρκινώματος συμπληρώνεται με την διεξαγωγή μοριακών και ανοσοχημικών τεχνικών που παρέχουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την δράση των παραγόντων αυτών στα καρκινικά κύτταρα PC-3.

ΚΕΦ 7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΥΤΤΑΡΑ

7.1 Κυτταροκαλλιέργειες

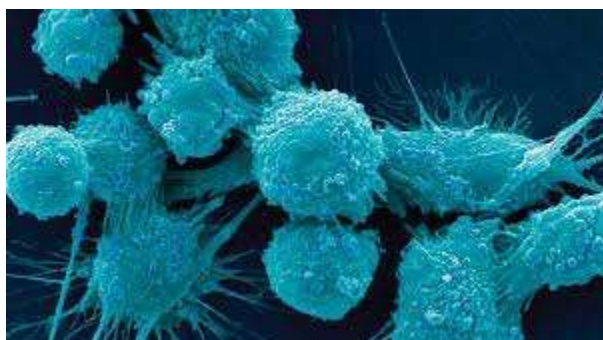
Τα κύτταρα PC-3 {American Type Cell Culture (ATCC)} καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες κυτταροκαλλιεργειών επιφάνειας 75 cm². Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν Dulbecco's modified Eagle's medium F/12 HEPES (DMEM/F12) εμπλουτισμένο με γλουταμίνη 2 mM, στρεπτομυκίνη 100 µg/mL, πενικιλίνη 100 U/mL καθώς και εμβρυϊκό βόειο ορό 5 % (FBS). Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας στους 37 βαθμούς Κελσίου και σε 5% CO₂. Κάθε 2 ημέρες γινόταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου και ανακαλλιέργεια των ζωντανών κυττάρων σε αναλογία 1/3.



Εικ 17: Φλάσκες και τριβλία κυτταροκαλλιεργειών στον επωαστικό θάλαμο



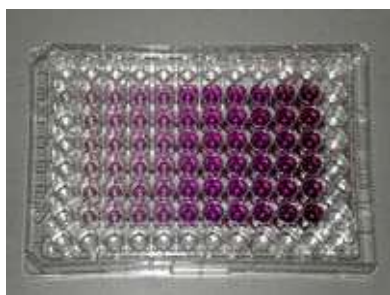
Εικ 18: Θάλαμος νηματικής ροής, Κυτταροκαλλιέργειες. Εργαστήριο ΕΒΒΙΦΑΜ, Τμήμα Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.



Εικ 19: Ανθρώπινα προστατικά καρκινικά κύτταρα (vicc.org)

7.2 Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT

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 κυτταροτοξικότητας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Είναι γρήγορη και ακριβής, δεν απαιτεί την χρήση ραδιοϊσοτόπων και μπορεί να μετρήσει ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Το άλας του τετραζολίου διασπάται από τα ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων και παράγει ένα σκούρο μπλε-μωβ χρώμα που είναι οι κρύσταλλοι φορμαζανίου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στην καλλιέργεια και κατ'αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται προσδιορισμός του ποσοστού των μεταβολικά ενεργών κυττάρων και ποσοτικοποίηση της κυτταροτοξικότητας των επιδράσεων⁹⁷.



Εικ 20: MTT plate και μεγέθυνση αυτού. Το μωβ χρώμα είναι οι κρύσταλλοι φορμαζανίου που σχηματίζονται από τα ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. (Wikipedia)

Τα κύτταρα PC-3 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM 10% FBS σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Υποβλήθηκαν σε 96 ώρες επώαση υπό την επίδραση των παρακάτω παραγόντων:

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

ολευρωπαΐνη: 400, 200, 150, 100, 75, 50, 37.5, 25, 12.5, 6.25 µg/mL

(αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη):

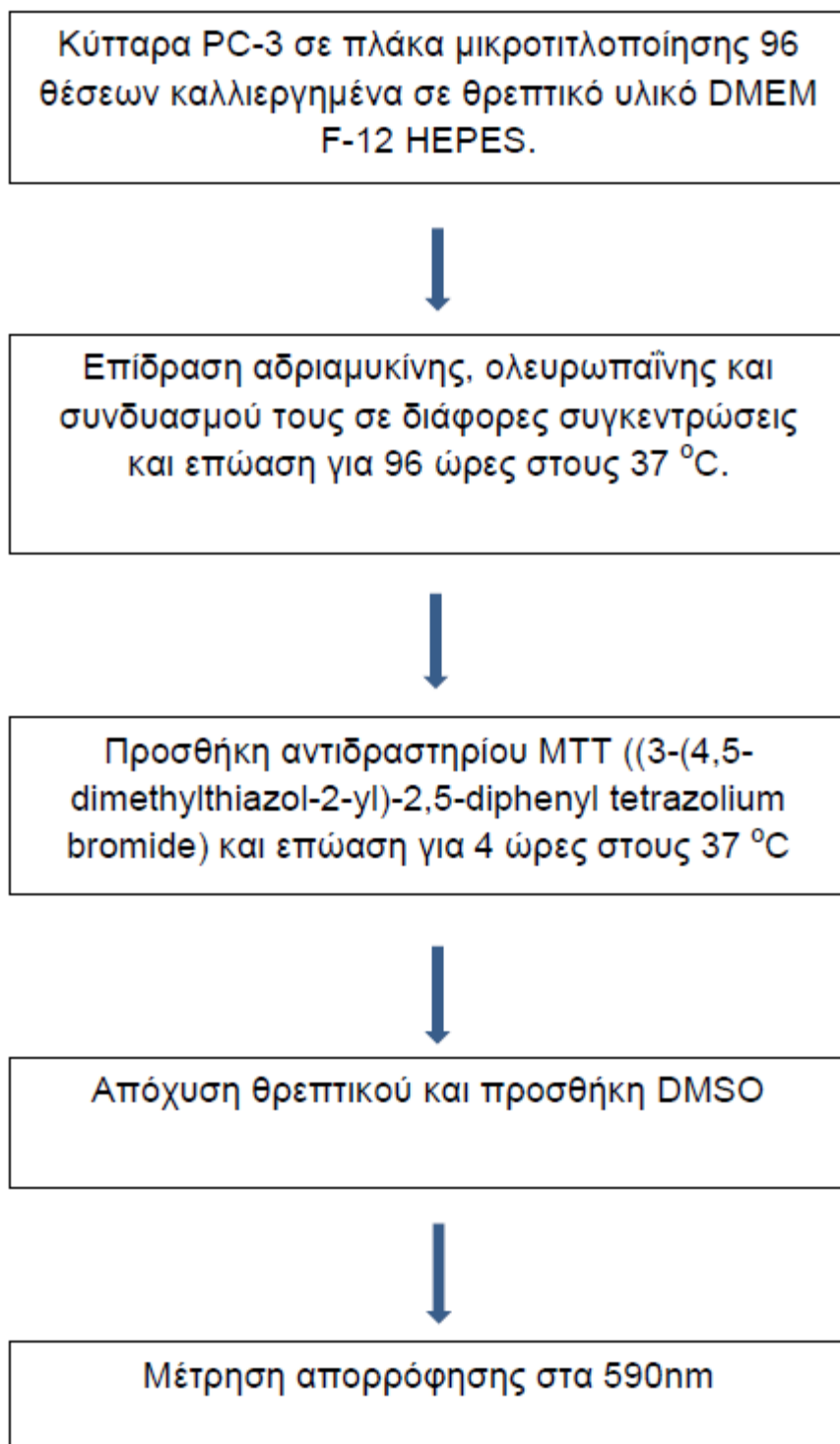
1) επίδραση σταθερής δόσης ολευρωπαΐνης 100µg/mL σε PC-3 κύτταρα στις σταδιακά μειούμενες συγκεντρώσεις αδριαμυκίνης 50, 25, 12.5, 6.25 και 3.125 nM και

2) επίδραση σταθερής δόσης ολευρωπαΐνης 200µg/mL σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις αδριαμυκίνης 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM.

Με την παρέλευση των 96 ωρών, σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκε ποσότητα 15 µl (συγκέντρωσης 5mg/ml) φιλτραρισμένου διαλύματος MTT και ακολούθησε επώαση στον κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για 4 ώρες. Αφαιρέθηκε το θρεπτικό και προστέθηκαν 150 µL DMSO για να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζανίου. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 590 nm με τη χρήση elisa reader.

Στην παρακάτω εικόνα παρατίθεται σχηματικά η ροή της δοκιμασίας MTT που ακολουθήθηκε, σύμφωνα με το πρωτόκολλο με το οποίο έγινε η διεξαγωγή του πειράματος στην παρούσα εργασία.

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΡΟΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ MTT



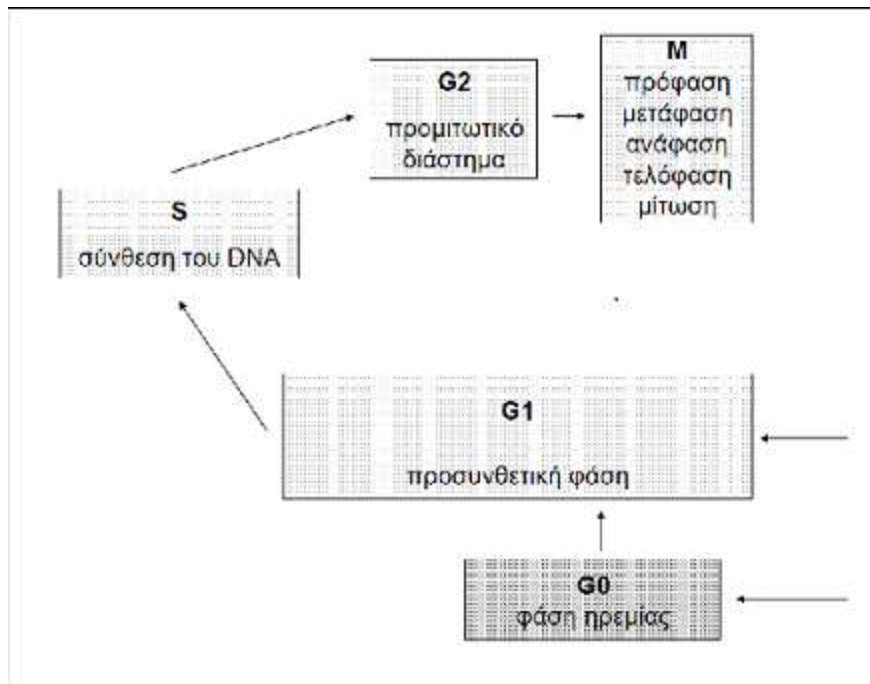
Εικ 21: Σχηματική ροή δοκιμασίας MTT στην παρούσα εργασία

7.3 Μελέτη κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος ορίζεται ως η διαδικασία μέσω της οποίας το κύτταρο αναπαράγει το γενετικό του υλικό και είναι το διάστημα μεταξύ δύο διαιρέσεων. Υπόκειται σε αυστηρούς ελεγκτικούς μηχανισμούς η δυσλειτουργία ή έλλειψη των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και νοσηρές καταστάσεις. Ο κυτταρικός κύκλος δεν έχει την ίδια διάρκεια για όλα τα είδη κυττάρων και διαιρείται σε τέσσερις φάσεις:

- ✓ **G1**: Πρόκειται για μεταβολικά ενεργή φάση στην διάρκεια της οποίας αναπαράγονται οργανίδια και συστατικά του κυτταροπλάσματος αλλά όχι το γενετικό υλικό.
- ✓ **S**: Λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA και του κεντροσώματος
- ✓ **G2**: Η αύξηση του κυττάρου συνεχίζεται ενώ συντίθενται ένζυμα και πρωτεΐνες. Προετοιμασία για την είσοδο στην μίτωση.
- ✓ **M**: Λαμβάνει χώρα η μίτωση και η κυτταροπλασματική διαίρεση. Υποδιαιρείται σε τέσσερις φάσεις: πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση, τελόφαση.

Επιπλέον υπάρχει και η λεγόμενη φάση ηρεμίας **G0** στην οποίαν μπορεί να εισέλθει το διαιρεμένο κύτταρο ανάλογα με τις συνθήκες και να μην προχωρήσει στην G1 φάση και σε νέα διαίρεση. Η μετάβαση από την G0 στην G1 φάση επηρεάζεται από εξωτερικά ερεθίσματα όπως επάρκεια ή έλλειψη εξωγενών μιτογόνων, αυξητικών παραγόντων κ.λ.π. Τα κυτταροτοξικά φάρμακα εφόσον επιδρούν στον κυτταρικό κύκλο, μπορούν είτε να δρουν σε μια συγκεκριμένη φάση αυτού οπότε λέγονται <<ειδικά της φάσης>> είτε να δρουν σε οποιαδήποτε φάση του κύκλου οπότε λέγονται <<μη ειδικά της φάσης>>^{99,100}.



Ο κυτταρικός κύκλος αποτελεί στόχο πολλών χημειοθεραπευτικών λόγω της σύνδεσής του με τον καρκίνο. Ο κυτταρικός κύκλος ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ στον καρκίνο υπάρχει ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση.

Εικ 22: Ο κυτταρικός κύκλος. Διακρίνονται οι φάσεις του¹⁰⁰.

Για την μελέτη του κυτταρικού κύκλου τα PC-3 κύτταρα επωάστηκαν με adriamycin, oleuropein και συνδυασμό αυτών για 24, 48 και 72 ώρες στις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

αδριαμυκίνη: 100nM

ολευρωπαΐνη: 100μg/mL

(αδριαμυκίνη 100nM + ολευρωπαΐνη 100μg/mL)

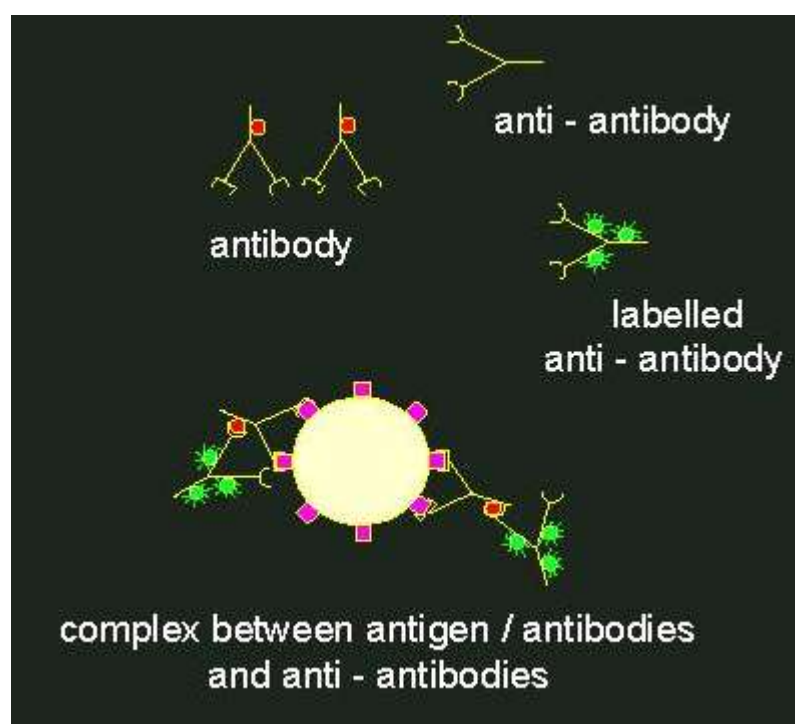
Ακολούθως τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS, μονιμοποιήθηκαν σε 50% αιθανόλη και τέλος χρωματίστηκαν με ένα διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (PI). Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας το λογισμικό ModFit (Verity Software House, Topsham, ME) το περιεχόμενό τους σε γενετικό υλικό (DNA) αναλύθηκε σε κυτταρομετρητή ροής (FACS Calibur).

7.4 Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence)

Η ανάλυση ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε με στόχο τον εντοπισμό της θέσης της LC3 πρωτεΐνης στα PC-3 κύτταρα. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και καθώς η πρωτεΐνη LC3 σχετίζεται με την αυτοφαγία, ο προσδιορισμός της θέσης εμφάνισής της είναι σημαντικός για την μελέτη του μηχανισμού δράσης των παραγόντων που χορηγήθηκαν στα κύτταρα.

Πράγματι με βάση τη βιβλιογραφία η μετακίνηση της από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα που έχει ως αποτέλεσμα την περιπυρηνική της εμφάνιση, είναι δείκτης αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία πιστεύεται ότι είναι ένας μηχανισμός αντίστασης του κυττάρου στο στρες, ή, εάν είναι παρατεταμένη, αποτελεί αιτία θανάτου του κυττάρου¹⁰⁹.

Ο ανοσοφθορισμός στηρίζεται στο γεγονός της ειδικότητας των αντισωμάτων απέναντι στο αντιγόνο τους. Έτσι, φθορίζουσες χρωστικές στοχεύουν σε συγκεκριμένους βιομοριακούς στόχους μέσα σε ένα κύτταρο, και ως εκ τούτου επιτρέπουν την απεικόνιση της κατανομής του μορίου στόχου μέσα στο δείγμα.



Εικ 23: Έμμεσος ανοσοφθορισμός. Πορεία :

1. Ειδικό αντίσωμα εναντίον του πρωτοταγούς αντιγόνου. Τα αντισώματα φέρουν συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης με το αντιγόνο (υποδεικνύονται με κόκκινο κύκλο). Κανονικά, τα αντισώματα αυτού του είδους παράγονται σε κουνέλια. 2. Αντι-αντίσωμα (που παράγεται, για παράδειγμα, με την ανοσοποίηση αίγας με αντισώματα κουνελιού). Αυτά τα αντι-αντισώματα (αίγας έναντι κουνελιού) συνδέονται προς τις καθοριστικές περιοχές πρόσδεσης με το αντιγόνο των αντισωμάτων κουνελιού. Εάν είναι επισημασμένο με μια

φθορίζουσα ετικέτα (πράσινο) (3), ένα φθορίζον σύμπλοκο στο πρωτοταγές αντιγόνο είναι το αποτέλεσμα (4) (<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e17/17j.htm>)

Τα κύτταρα PC-3 (20.000 cells/well) καλλιιεργήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες (Lab-Tek (Nalge Nunc, Naperville, IL) και επωάστηκαν για 24 ώρες με τους παράγοντες: ολεωρωπαΐνη 200μg/mL, αδριαμυκίνη 50nM, αδριαμυκίνη 50nM & ολεωρωπαΐνη 100μg/mL, αδριαμυκίνη 50nM & ολεωρωπαΐνη 200μg/mL, χλωροκίνη 50μM. Αφού αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε ice-cold 100 % μεθανόλη για 10 λεπτά στους – 20 °C. Στη συνέχεια πλύθηκαν με PBS για 5 λεπτά και επωάστηκαν με ορό (blocking buffer) για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε απόχυση του ορού και επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα για την πρωτεΐνη LC3, το (LC3B-FP) σε αραιώση 1:400 για 60 λεπτά στους 4°C.

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επωάστηκαν με το πρωτοταγές αντίσωμα.

Ακολούθησαν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με PBS και επώαση με το επισημασμένο με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) δευτεροταγές αντίσωμα (Alexa) σε αραιώση 1:200 για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα πλύθηκαν ξανά με PBS και σταθεροποιήθηκαν με Aqua Poly Mount. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο φθορισμού το οποίο είναι εξοπλισμένο με ειδικό πράσινο φίλτρο ευρέως φάσματος (Nikon).

7.5 Δοκιμασία προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η δοκιμασία Bradford αποτελεί φασματοσκοπική αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Βασίζεται στην μετατόπιση της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία σε όζινες συνθήκες μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε καθώς δεσμεύεται στις προς προσδιορισμό πρωτεΐνες απορρόφηση μετράται στα 595 nm⁹⁸.

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

συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα, η οποία και τελικά θα χρησιμοποιηθεί στο Western blotting.

7.6 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Η μέθοδος Western Blotting προσδιορίζει με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων, τις πρωτεΐνες που περιέχονται σε ένα μείγμα, οι οποίες προηγουμένως έχουν διαχωριστεί μεταξύ τους με ηλεκτροφόρηση με βάση το μέγεθος τους¹⁰⁶.

Έτσι, στους δοκιμαστικούς σωλήνες με τα κύτταρα PC-3 που είχαν υποστεί 48 ώρες επώαση, με τους ακόλουθους παράγοντες:

- αδριαμυκίνη 50nM
- ολευρωπαΐνη 200μg/mL
- (αδριαμυκίνη 50nM + ολευρωπαΐνη 200μg/mL)

Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο λύσης κυττάρων ώστε να απελευθερωθούν οι προς μελέτη πρωτεΐνες οι οποίες έχουν κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Έτσι προστέθηκε lysis buffer (RIPA και 5% αναστολείς) που περιείχε μείγμα πρόσφατα παραχθέντων αναστολέων ώστε να ανασταλεί η πρωτεόλυση, αποφωσφορυλίωση κ.λ.π.

Στη συνέχεια στα δείγματα που προέκυψαν εφαρμόζεται η παραπάνω δοκιμασία Bradford ώστε να προσδιοριστεί η πρωτεϊνική συγκέντρωση σε κάθε δείγμα. Έχοντας διενεργήσει αυτά τα προκαταρκτικά στάδια ακολουθεί η εφαρμογή του πρωτοκόλλου για Western blot ανάλυση.

Σε πρώτο στάδιο, η μέσω Bradford υπολογισμένη ποσότητα κάθε δείγματος που αντιστοιχεί σε 20mg πρωτεΐνη, υφίσταται βρασμό για 5 λεπτά στους 95°C μαζί με ίση ποσότητα Sample buffer (του οποίου βασικά συστατικά είναι αφενός το Tris-HCL που ενδείκνυται για κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και αφετέρου το SDS που προκαλεί αποδιάταξη αυτών).

Στη συνέχεια γίνεται η φόρτωση των δειγμάτων στα κανάλια της γέλης πολυακρυλαμιδίου, η συσκευή γεμίζει με Running buffer και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στα 100 Volts για περίπου μια ώρα.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, αφαιρείται η γέλη και ξεπλένεται με Transfer buffer. Συναρμολογείται η συσκευή, γεμίζει με Transfer buffer και ακολουθεί η μεταφορά των διαχωρισμένων από την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυταρίνης 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 LC3 και το άλλο την GAPDH. Το τμήμα για την LC3, επωάζεται με Blocking solution (1% skim milk in TBS/T) για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το Blocking solution είναι διάλυμα γάλακτος και χρησιμεύει στην δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης αποτρέποντας μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων στην μεμβράνη που θα οδηγούσε σε υψηλό background.

Απορρίπτεται το Blocking solution, ξεπλένεται η μεμβράνη με TBS/T και ακολουθεί επώαση με το 1^ο αντίσωμα για την LC3 (Rabbit, Anti-LC3, Novus) για όλη τη νύχτα στους 4 °C.

Την επόμενη μέρα, το τμήμα για την GAPDH επωάζεται με Blocking solution (1% skim milk in TBS/T) για 1 ώρα στους 4 °C και ακολούθως ξεπλένεται με TBS/T και επωάζεται με το 1^ο αντίσωμα για GAPDH (Mouse, Anti-GAPDH, sc-32233) για 1 ώρα επίσης 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 επιπέδων έκφρασης μιας πρωτεΐνης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων.

Σε προτελευταίο στάδιο, 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.

Το τελευταίο στάδιο περιελάμβανε την έκπλυση με TBS/T (3 φορές επί 5 λεπτά/φορά) και την αποστράγγιση των δύο τμημάτων της μεμβράνης. Στον σκοτεινό θάλαμο ακολουθεί η εμφάνιση των ζωνών με τη βοήθεια διαλυμάτων ECL, developer και fixer. Η επιφάνεια της μεμβράνης καλύπτεται με ECL για 1min και στη συνέχεια μεταφέρεται στην κασετίνα του film. Ένα κομμάτι film τοποθετείται επάνω στη μεμβράνη για καθορισμένο χρόνο, μεταφέρεται κατά σειρά στο υγρό ανάπτυξης (developer), στο υγρό σταθεροποίησης (fixer) και τέλος ξεπλένεται με H₂O και αφήνεται να στεγνώσει. Ακολουθεί επεξεργασία με κατάλληλο λογισμικό για ποσοτικοποίηση των ζωνών που προέκυψαν.

Πίνακας 2: Διαλύματα της ανοσοαποτύπωσης

<u>Πίνακας διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο Western blot</u>	
Διαλύματα	Αιτιολογία χρήσης τους
Sample buffer	Αποδιάταξη πρωτεϊνών
Running buffer	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και διαχωρισμός βάσει μεγέθους
Transfer buffer	Μεταφορά διαχωρισμένων πρωτεϊνών από gel στην μεμβράνη
Blocking solution	Δέσμευση ελεύθερων θέσεων μεμβράνης
TBS/T	Διαλύτης για τα αντισώματα Πλύσεις μεμβράνης

ΚΕΦ 8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ NMR

8.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Καλλιέργειες

Τα κύτταρα PC-3 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM F-12 HEPES σε κλίβανο κυτταροκαλλιιεργειών. Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 80 % της επιφάνειας της φλάσκας , έγινε η επίδραση των διάφορων παραγόντων. Σε κάθε φλάσκα πραγματοποιήθηκε μία επίδραση και ακολούθησε επώαση για 48 ώρες. Οι επιδράσεις ήταν οι ακόλουθες : Αδριαμυκίνη 100nM, Ολευρωπαΐνη 100μg/mL, (Αδριαμυκίνη 100nM + Ολευρωπαΐνη 100μg/mL). Η αδριαμυκίνη χορηγείται σε υδατικό διάλυμα ενώ η ολευρωπαΐνη είναι διαλυμένη σε DMSO (Dimethyl sulfoxide).

Μετά από την 48ωρη επώαση με τους παραπάνω παράγοντες, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS (Phosphate buffered saline) και αποκολλήθηκαν με θρυψίνη. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 1150 στροφές, αποχύθηκε το υπερκείμενο υγρό και φυλάχθηκαν σε errendorfs στους -80 °C για εκχύλιση και μέτρηση των εκχυλισμάτων με NMR φασματοσκοπία.

Εκχύλιση

Τα κύτταρα PC-3 εκχυλίστηκαν 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 διαλυτών⁹.

Έτσι ποσότητα μεθανόλης-χλωροφορμίου σε αναλογία 2 :1 προστέθηκε στα παγωμένα κύτταρα και ακολούθησε έκθεση σε υπερήχους για 5 λεπτά. Μετά από 15 λεπτά αναμονής, ποσότητα χλωροφορμίου-απιονισμένου νερού σε αναλογία 1:1 προστέθηκε στο προηγούμενο μείγμα με αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτώματος. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για 20 λεπτά στις 13000 στροφές. Η ανώτερη στοιβάδα, αποτελούμενη από μεθανόλη και νερό, δηλαδή η υδατική στοιβάδα, μεταφέρθηκε σε νέο errendorf με τη βοήθεια σύριγγας ενώ η κατώτερη δηλαδή η οργανική φάση παρέμεινε ως είχε.

Εφαρμόστηκε η παραπάνω πορεία για δεύτερη φορά μόνο στην οργανική φάση ώστε να παραλειφθούν τυχόν υπολείμματα υδατοδιαλυτών ουσιών και το δεύτερο κλάσμα υδατικής φάσης ενώθηκε με το πρώτο.

Και τα δυο κλάσματα, υδατικό και οργανικό, υπέστησαν ξήρανση σε ρεύμα αέριου αζώτου για την απομάκρυνση του διαλύτη. Τέλος, αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μελλοντική λήψη φασμάτων NMR.

Εκχυλίσματα

Τόσο τα υδατικά όσο και τα οργανικά εκχυλίσματα μετά την εκχύλιση παρέμειναν αποθηκευμένα στους -80°C . Λίγες ώρες πριν τη λήψη των φασμάτων αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Εν συνεχεία, η επεξεργασία τους ήταν διαφορετική.

Υδατικά εκχυλίσματα:

Σε κάθε erpendorf υδατικού δείγματος προστέθηκε με τη βοήθεια πιπέτας ακριβείας, ποσότητα 630 μl D_2O και 70 μl ρυθμιστικού διαλύματος. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ήταν η ακόλουθη:

- 1) 1,5 M KH_2PO_4 / D_2O , pH 7.4 (με KOH / D_2O)
- 2) 2 mM NaN_3
- 3) 0.1% TSP / D_2O (sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$)-1-propionate, Aldrich 269913)

Η πορεία παρασκευής του ρυθμιστικού διαλύματος ήταν η ακόλουθη: Ποσότητα KH_2PO_4 10.2 g διαλυτοποιήθηκε σε 40 ml D_2O και προστέθηκε ποσότητα TSP 50 mg διαλυτοποιημένη σε 4 ml D_2O . Το μίγμα αναμίχθηκε με τη βοήθεια υπερήχων. Στη συνέχεια για την ρύθμιση του pH στα 7.4 προστέθηκε KOH . Σε τελικό στάδιο το διάλυμα συμπληρώθηκε με D_2O έως τελικό όγκο 50 ml ενώ προστέθηκε ποσότητα 0.0065 g NaN_3 ως συντηρητικό μέσο.

Τελικά, 550 μl (ώστε να υπάρχει καλή επαναληψιμότητα) από το παραπάνω μείγμα δείγματος-ρυθμιστικού διαλύματος μεταφέρθηκε με πιπέτα στο ειδικό σωληνάκι του NMR διαμέτρου 5 mm (NMR tubes) ενώ ακολούθησε ισχυρή ανάδευση με δημιουργία δίνης (vortex) και λουτρό υπερήχων.

Προκειμένου να μην καλυφθεί φασματική πληροφορία από το σήμα του νερού εδώ ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε 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 διαλύτες¹⁰⁷.

Οργανικά εκχυλίσματα:

Σε κάθε errendorf οργανικού δείγματος προστέθηκε με τη βοήθεια πιπέτας ποσότητα 700 μl CDCl_3 0,01 % TMS. Ακολούθησε μονόλεπτη ανάδευση με δημιουργία δίνης (vortex)(IKA MS 3 basic), λουτρό υπερήχων (Transsonic 460 Elma) για 10 λεπτά και φυγοκέντρωση (Universal 32R Hettich) για 3 λεπτά στις 15000 στροφές σε θερμοκρασία 15 $^{\circ}\text{C}$. Λόγω μη διαύγειας στα διαλύματα πραγματοποιήθηκε επιπλέον φυγοκέντρωση στις 6000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 10 $^{\circ}\text{C}$. Τελικά 550 μl διαλύματος μεταφέρθηκαν με πιπέτα στο ειδικό σωληνάκι του NMR διαμέτρου 5 mm (NMR tubes).

Προκειμένου να μην καλυφθεί φασματική πληροφορία από το σήμα του διαλύτη χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl_3 . Επειδή όμως δεν επιτυγχάνεται δευτερίωση σε ποσοστό 100 % , παρατηρείται το σήμα των εναπομεινάντων πρωτονίων που στην προκειμένη περίπτωση πρόκειται για τα πρωτόνια του χλωροφορμίου, CHCl_3 , με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας απλής κορυφής στο φάσμα στα 7,26 ppm.

Το CDCl_3 είναι ένας συνηθισμένος διαλύτης για NMR αναλύσεις εξαιτίας κάποιων συγκριτικών πλεονεκτημάτων έναντι άλλων διαλυτών. Δεν εμφανίζει κορυφές στο φάσμα και δεν ανταλλάσει το δευτέριο του με πρωτόνια της μελετώμενης ένωσης. Επιπλέον είναι πτητικός, αδρανής και σε αυτόν διαλύονται εύκολα οι περισσότερες ενώσεις.

Το TMS είναι το tetramethylsilane $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Λειτουργεί ως εσωτερικό πρότυπο για την βαθμονόμηση του φάσματος NMR εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του. Πρόκειται για χημικά αδρανή ένωση, μαγνητικά ισότροπη δίνοντας μόνο μια κορυφή στην υψηλότερη τιμή πεδίου (0 ppm) από όλα τα πρωτόνια των μελετώμενων με NMR ενώσεων, οπότε δεν υπάρχουν προβλήματα επικάλυψης. Επίσης είναι πτητικό άρα απομακρύνεται εύκολα και επιτρέπει την ανάκτηση πολύτιμων δειγμάτων ενώ είναι διαλυτό σε πολλούς οργανικούς διαλύτες¹⁰⁸.

8.2 Λήψη φασμάτων ^1H -NMR

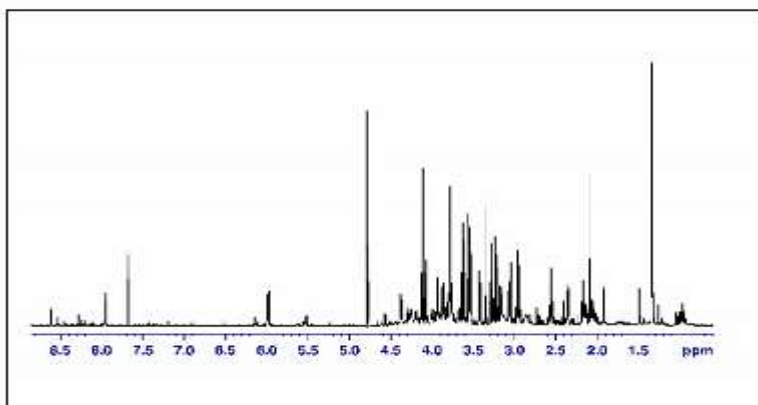
Όλα τα NMR πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε φασματοσκόπιο Bruker Avance III 600 MHz (Karlsruhe, Germany), εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60). Για το σύνολο των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής αντίστροφης ανίχνευσης (5 mm) με z-gradients στους 300 K (27 $^{\circ}\text{C}$).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

ούρων που χρησιμοποιήθηκε. Φάσματα 1D ^1H NMR ελήφθησαν με την εφαρμογή παλμικής αλληλουχίας 1D NOESY (noesygpr1D), 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. Συγκεκριμένα για το 1D NOESY συλλέχθηκαν 32 σαρώσεις δίνοντας 64K σημεία δεδομένων για φασματικό εύρος 12335,5 Hz, με επιτρεπόμενο χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) 4 s, χρόνο απόκτησης (acquisition time) 2.65 s και χρόνο μίξης (mixing time) 0.01 s. Ένας παραγοντικός συντελεστής βαρύτητας συσχετισμένος με διεύρυνση των φασματικών γραμμών (line broadening) 0.3 Hz εφαρμόστηκε σε όλα τα ληφθέντα Σήματα Εξασθένησης Ελεύθερης Επαγωγής (Free Induction Decay) πριν από το μετασχηματισμό Fourier. Η πλήρως αυτοματοποιημένη επεξεργασία των φασμάτων εμπεριείχε την τοποθέτηση του ^1H μορίου αναφοράς TSP στα 0.0 ppm και τη διόρθωση της γραμμής βάσης και της φάσης.



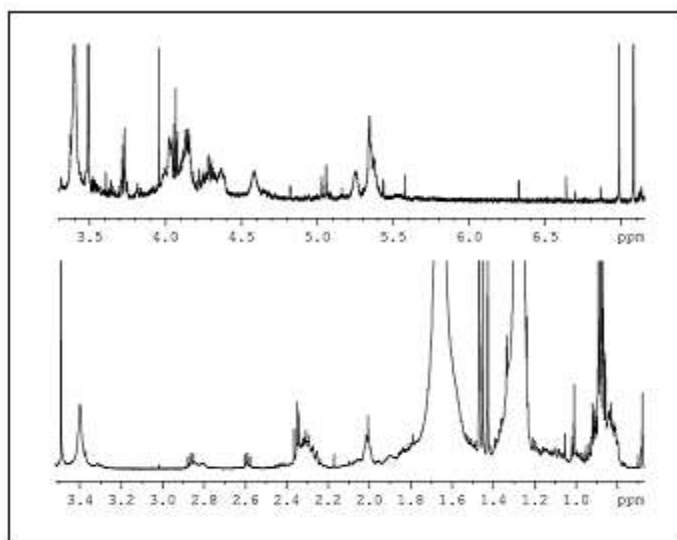
Εικ 24: Φασματοσκόπιο Bruker Avance III 600 MHz, εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60). Εργαστήριο NMR spectroscopy, Φαρμακευτική σχολή, ΕΚΠΑ.

Τα πρώτα φάσματα που ελήφθησαν ήταν μονοδιάστατα (1D) καθώς είναι απλά και λαμβάνονται σε σχετικά σύντομο χρόνο (μικρός χρόνος απόκτησης).



Εικ 25: Παράδειγμα μονοδιάστατου φάσματος υδατικού εκχυλίσματος PC-3 καρκινικών κυττάρων. Οι περισσότεροι μεταβολίτες <<συνωστίζονται>> στη φασματική περιοχή μεταξύ 1-5ppm.

Επειδή σε αρκετές περιπτώσεις τα μονοδιάστατα φάσματα είναι αρκετά πολύπλοκα καθώς οι κορυφές τους αλληλεπικαλύπτονται είναι δύσκολη η εξαγωγή πληροφοριών. Έτσι εισάγοντας περισσότερες διαστάσεις το φάσμα απλοποιείται και επιτυγχάνεται ευκολότερα και ακριβέστερα η λήψη πληροφοριών για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των κορυφών των μεταβολιτών.



Εικ 26 : Παράδειγμα μονοδιάστατου φάσματος λιπιδικού εκχυλίσματος PC-3 καρκινικών κυττάρων. Οι περισσότεροι μεταβολίτες <<συνωστίζονται>> στην φασματική περιοχή μεταξύ 1-2,5ppm και 3,3-5,5ppm.

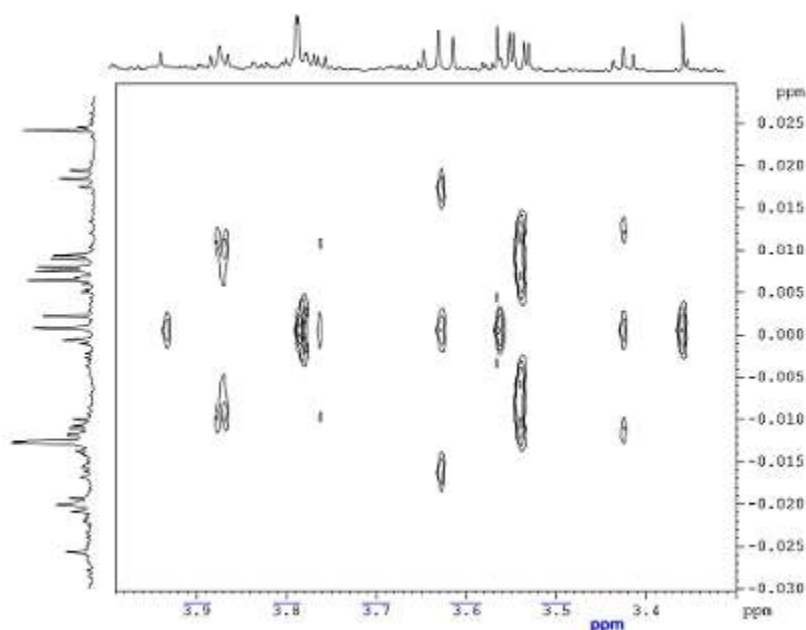
Τα δισδιάστατα λοιπόν φάσματα (2D spectra) είναι δύο κατηγοριών:

ομοπυρηνικά εφόσον αφορούν σε πυρήνες ίδιων ατόμων και ετεροπυρηνικά εφόσον εξετάζουν πυρήνες διαφορετικών ατόμων. Τα σήματα συντονισμού σε ένα πυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων παρέχουν την δυνατότητα αναγνώρισης των δομικών μονάδων των εξεταζόμενων μορίων καθώς και την εξακρίβωση της θέσης των δομικών αυτών μονάδων στην δομή των μορίων,

μέσω της συσχέτισης των πυρήνων της προηγούμενης με αυτούς της επόμενης δομικής μονάδας. Περιλαμβάνουν δύο άξονες συχνοτήτων αντί για έναν των μονοδιάστατων φασμάτων.

Παραδείγματα ομοπυρηνικών 2D πειραμάτων είναι τα: J-resolved, COSY, TOCSY ενώ ετεροπυρηνικών 2D είναι τα: HSQC, HMQC, HMBC^{23,101}.

Στην παρούσα εργασία αρχικά ελήφθη το ομοπυρηνικό 2D πείραμα J-resolved (Jres) από το οποίο είναι δυνατή η εξαγωγή πληροφοριών σχετικών με τις σταθερές σύζευξης των πυρήνων του πρωτονίου και την χημική τους μετατόπιση. Οι πληροφορίες της σταθεράς σύζευξης βρίσκονται σε διαφορετικό άξονα από τις πληροφορίες για την χημική μετατόπιση. Το J-resolved πείραμα λαμβάνεται σχετικά γρήγορα χρησιμοποιώντας την παλμική αλληλουχία jresgrrgrqf. Για κάθε φάσμα J-resolved μία μόνο σάρωση εφαρμόστηκε και συλλέχθηκε σε 64K σημεία δεδομένων σε ένα φασματικό εύρος 10000Hz, με χρόνο αποδιέγερσης 2 s και χρόνο απόκτησης 0.4 s. Στο J-resolved πείραμα η μαγνήτιση μεταφέρεται μεταξύ δύο γειτονικών πυρήνων.

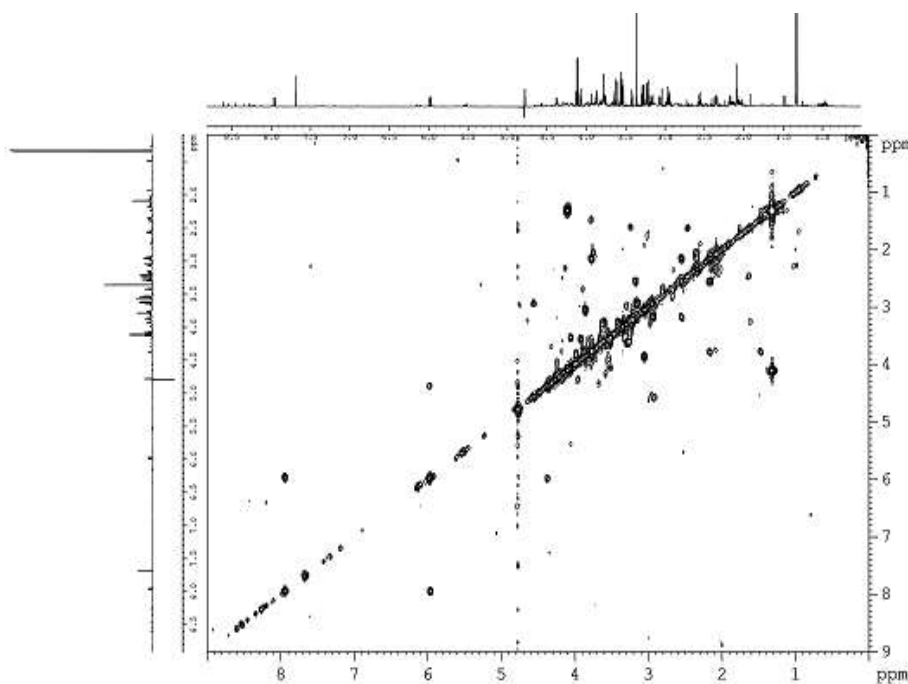


Εικ 27: Παράδειγμα 2D J-resolved φάσματος ^1H -NMR υδατικού εκχυλίσματος κυττάρων PC-3 . Διευκολύνει στον καθορισμό της πολλαπλότητας των κορυφών του μονοδιάστατου φάσματος.

Στη συνέχεια ελήφθησαν τα επίσης ομοπυρηνικά πειράματα ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy) και ^1H - ^1H TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) με προκορεσμό της κορυφής του νερού μέσω επιλεκτικής ακτινοβολήσης στην συχνότητα συντονισμού των πρωτονίων του. Έτσι μειώνεται η διαφορά στις πληθυσμιακές καταστάσεις των πυρήνων του υδρογόνου που βρίσκονται σε διαφορετικά ενεργειακά επίπεδα και καταστέλλεται το σήμα του νερού²³.

Στο 2D COSY η μαγνήτιση μεταφέρεται μεταξύ πυρήνων που βρίσκονται έως και 3 δεσμούς μακριά. Ένα φάσμα COSY παρουσιάζει κορυφές δύο τύπων, αυτές που βρίσκονται στην διαγώνιο (diagonal peaks) και τις διασταυρούμενες κορυφές (cross peaks). Οι διαγώνιες κορυφές έχουν την ίδια συχνότητα

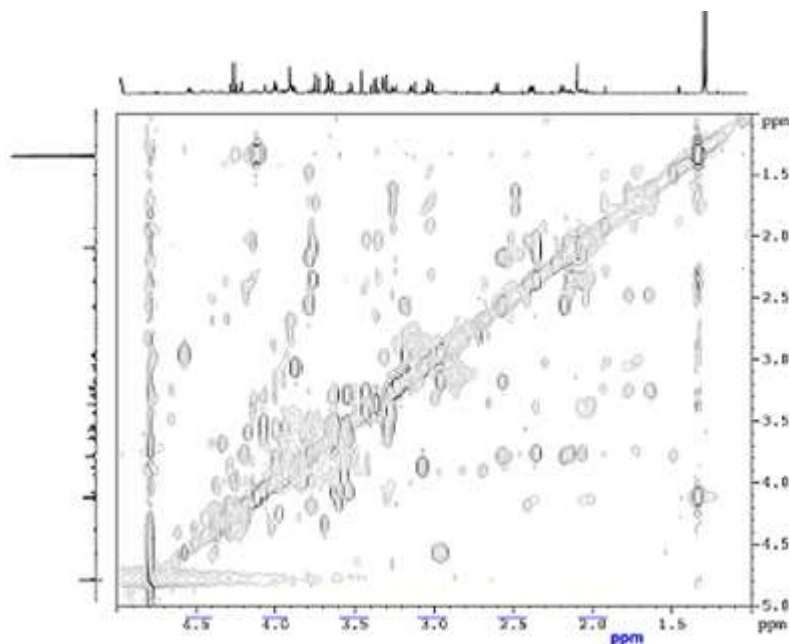
συντονισμού και στους δύο άξονες του διαγράμματος ενώ οι διασταυρούμενες κορυφές βρίσκονται εκατέρωθεν της διαγωνίου του διαγράμματος και εμφανίζουν διαφορετικές τιμές συχνοτήτων σε κάθε άξονα¹⁰¹. Το COSY φάσμα καταγράφηκε χρησιμοποιώντας κατάλληλη παλμική αλληλουχία εφαρμόζοντας βαθμιδωτό πεδίο σε σχήμα ημιτόνου (sine-shaped gradient pulse) χωρίς ευαισθησία φάσεως, με 2048 χρονικά σημεία και 256 FID στην δεύτερη διάσταση, ενώ 8 σαρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε FID. Το φασματικό εύρος επιλέχθηκε 12.019 Hz με 2 s επιτρεπόμενο χρόνο αποδιέγερσης και χρόνο απόκτησης 0.08 s.



Εικ 28 : Παράδειγμα φάσματος 2D COSY υδατικού εκχυλίσματος στο οποίο φαίνονται οι διασταυρούμενες και οι διαγώνιες κορυφές.

Στο 2D TOCSY πείραμα η μαγνήτιση διασπείρεται σε ολόκληρο το spin system οπότε όλα τα πρωτόνια του συστήματος σχετίζονται μεταξύ τους. Είναι όμοιο με το COSY αλλά παρατηρούνται διασταυρούμενες κορυφές όχι μόνο για πυρήνες που συνδέονται απ'ευθείας αλλά για πυρήνες που ανήκουν σε <<αλυσίδα>> σύζευξης¹⁰¹.

Το TOCSY φάσμα συλλέχθηκε με ευαισθησία φάσεως με την States-TPPI μέθοδο και παλμική αλληλουχία DIPSI2, με 4096 χρονικά σημεία και 256 FID στην δεύτερη διάσταση, ενώ 16 σαρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε FID. Το φασματικό εύρος ήταν 12019 Hz, με περίοδο αποδιέγερσης 4 s και χρόνο απόκτησης 0.17 s.

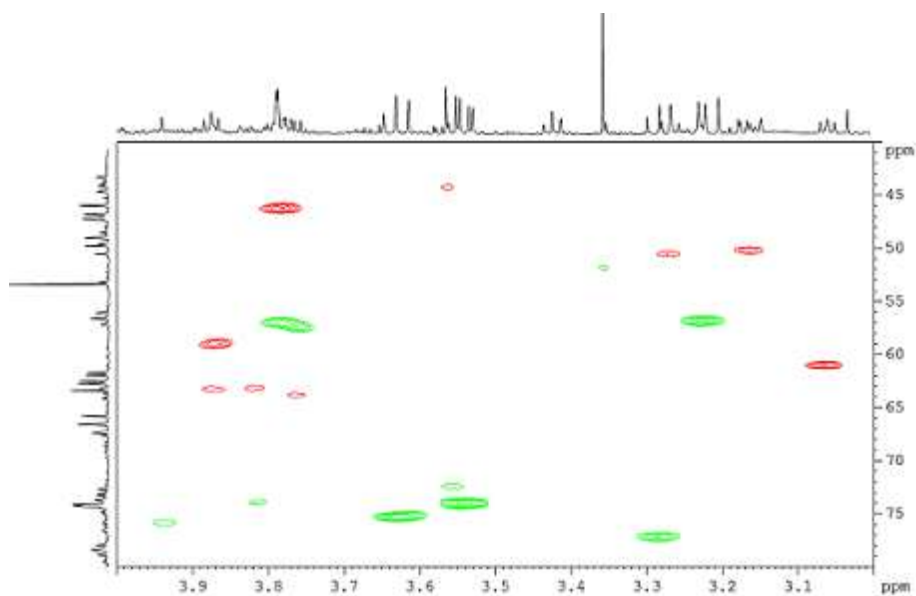


Εικ 29 : Παράδειγμα
φάσματος 2D-TOCSY
υδατικού
εκχυλίσματος.

Από τα ετεροπυρηνικά πειράματα πραγματοποιήθηκε το ^1H - ^{13}C DEPT 135-HSQC στο οποίο μεταφέρεται η μαγνήτιση από τον έναν πυρήνα (πρωτόνιο) στον άλλο (άνθρακα) μέσω INEPT παλμικής ακολουθίας. Το HSQC ανιχνεύει συσχετίσεις μεταξύ δύο πυρήνων που συνδέονται με έναν δεσμό και δίνει μια κορυφή για κάθε ζεύγος συζευγμένων πυρήνων των οποίων οι συχνότητες συντονισμού είναι οι χημικές μετατοπίσεις των συζευγμένων πυρήνων^{101,102}.

Το HSQC φάσμα καταγράφηκε με ευαισθησία φάσεως με την echo-antiecho-TPPI μέθοδο, με βαθμιδωτό πεδίο και επιλογή πολλαπλότητας και GARP αποσύζευξη άνθρακα. Το φασματικό εύρος ήταν 12019 Hz στην μία διάσταση και 99018 Hz στην άλλη, με 1024 χρονικά σημεία και 256 FID στην δεύτερη διάσταση, ενώ 80 σαρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε FID, με αδιαβατικό ανάστροφο παλμό και χρόνο αποδιέγερσης 1.5 s. Με το φάσμα HSQC παρατηρείται με μεγαλύτερη ευαισθησία ο συντονισμός του spin system και με μεγαλύτερη λεπτομέρεια η δομή του καθώς στηρίζεται στην ανίχνευση του πρωτονίου (υψηλότερο γυρομαγνητικό λόγο και αναλογία αυτού)¹⁰².

Το φάσμα HSQC συμβάλλει στην αποσαφήνιση μεταβολιτών των οποίων τα πρωτόνια εμφανίζονται σε πολύ κοντινές χημικές μετατοπίσεις στο 1D φάσμα και μη έχοντας κορυφές συσχέτισης δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός τους με COSY και TOCSY. Έτσι απαιτείται η μελέτη της μετατόπισης του άνθρακα στο HSQC φάσμα και χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν το ηλεκτρικό οξύ και το πυροσταφυλικό οξύ.



Εικ 30: HSQC
φάσμα υδατικού
εκχυλίσματος. Το
κόκκινα σημεία
δηλώνουν
σύστημα CH₂ ενώ
τα πράσινα CH ή
CH₃.

Για όλα τα υδατικά δείγματα ελήφθησαν απλά 1D φάσματα καθώς και τα 2D J-resolved ενώ για ένα επιλεγμένο υδατικό δείγμα το οποίο από το 1D φάσμα παρατηρήθηκε ότι είχε υψηλή συγκέντρωση μεταβολιτών, λήφθηκαν και τα COSY, TOCSY και HSQC.

Για τα οργανικά δείγματα ελήφθησαν μόνο απλά 1D φάσματα χωρίς να απαιτείται προκορεσμός του νερού καθώς και τα J-resolved.

8.3 Προετοιμασία για χημειομετρικό μέρος

Το αποτέλεσμα της φασματοσκοπικής ανάλυσης είναι αρκετά περίπλοκο και ενίοτε ανομοιογενές, όμως η επιστήμη της χημειομετρίας παρέχει τα εφόδια για την ερμηνεία του. Η χημειομετρία χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση των διαφόρων <<omics>> προσεγγίσεων, καθώς παρέχει μεθόδους ανθεκτικές όπως PCA και PLS που διαχειρίζονται αποτελεσματικά περίπλοκους βιοχημικούς πίνακες δεδομένων¹¹.

Αρχικά, τα φάσματα αμέσως μετά την λήψη τους πρέπει να υποστούν μια προεργασία ώστε να καταστούν αξιοποιήσιμα αργότερα με τη στατιστική ανάλυση.

Έτσι, πραγματοποιήθηκε αυτόματη διόρθωση φάσης και γραμμής βάσης για κάθε φάσμα, με βάση τα όσα ορίζονται από το πειραματικό πρωτόκολλο.

Για την αρχική επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το AMIX, Ver. 2.7, Bruker Analytik GmbH, Germany, 1999 .

Το πρώτο βήμα ήταν η επιλογή των φασματικών περιοχών που πρέπει να αποκλεισθούν από την ανάλυση καθώς την παρεμποδίζουν αφού δεν

περιέχουν σημαντική πληροφορία. Τα όρια του φάσματος που μετά από παρατήρηση φάνηκε ότι περιείχαν το σύνολο της πληροφορίας ήταν 9,01-0,60 ppm.

Ακολουθώς, αποκλείστηκε αρχικά η περιοχή συντονισμού του νερού καθώς παρά την διαδικασία προκορεσμού της κορυφής του, δεν υπάρχει πλήρης καταστολή του σήματός του. Εξαιρείται λοιπόν η περιοχή 4,7-5,0 ppm προκειμένου να μην αποκρύψει (η κορυφή του νερού) τις κορυφές άλλων μεταβολιτών.

Οι υπόλοιπες περιοχές που έχουν εξαιρεθεί είναι:

α) 0,20-0,12 ppm (το διάστημα αυτό δεν περιέχει σημαντική πληροφορία)

β) 1,22-1,16 ppm (περιλαμβάνει το σήμα της αιθανόλης στα 1,18 ppm που παρουσιάζει διακυμάνσεις και δεν εμφανίζεται σε όλα τα φάσματα)

γ) 2,25-2,21 ppm (περιλαμβάνει την κορυφή της ακετόνης στα 2,23 ppm που δεν εμφανίζεται σε όλα τα φάσματα)

Στη συνέχεια οι εναπομείνουσες φασματικές περιοχές υπέστησαν το λεγόμενο <<bucketing>> (ή binning) δηλαδή τον χωρισμό σε τμήματα συγκεκριμένου εύρους. Επειδή πολλές φορές στα φάσματα βιολογικών δειγμάτων παρουσιάζονται αλλαγές στην χημική μετατόπιση οι οποίες προκύπτουν από μικρές μεταβολές στο pH ή από άλλες πειραματικές συνθήκες όπως παρουσία ιόντων και θερμοκρασία, ένας από τους τρόπους διευθέτησης αυτού του θέματος είναι το bucketing. Με το bucketing ελαχιστοποιούνται οι επιπτώσεις στην ανάλυση από διακυμάνσεις στις θέσεις των κορυφών ενώ μειώνεται ο όγκος των δεδομένων που θα υποστούν χημειομετρική ανάλυση καθιστώντας την έτσι απλούστερη. Χρειάζεται όμως προσοχή κατά την διαδικασία του bucketing ώστε να μην χαθεί σημαντική πληροφορία όπως συμβαίνει όταν κορυφές πολλών ενώσεων βρίσκονται στο ίδιο bucket¹⁰³.

Τα τμήματα αυτά ήταν συνολικά 403 και το κάθε ένα είχε εύρος 0,02 ppm. Όλα τα τμήματα είχαν το ίδιο εύρος η τιμή του οποίου εξαρτάται από το πόσο πολύπλοκη είναι η εικόνα του σε εμπεριέχουσες κορυφές μεταβολιτών. Εξυπακούεται πως αυξανόμενου του αριθμού των μεταβολιτών ,μειώνεται το εύρος του κάθε τμήματος και αντίστροφα.

Το επόμενο στάδιο περιελάμβανε δύο διαδικασίες: την ολοκλήρωση των φασματικών περιοχών που προέκυψαν μετά την τμηματοποίηση και την ακόλουθη κανονικοποίηση των τιμών που προέκυψαν μετά την ολοκλήρωση. Σαν μέθοδο ολοκλήρωσης επιλέχθηκε η ρύθμιση <<sum of intensities>> ενώ για την κανονικοποίηση η ρύθμιση <<scaling to reference region>>, με ουσία αναφοράς το TSP. Με το πέρας της κανονικοποίησης τα αριθμητικά δεδομένα πολλαπλασιάστηκαν Χ1000 ώστε να είναι αναγνώσιμα μεγέθη.

Η κανονικοποίηση (normalization) είναι <<row operation>> δηλαδή είναι μια <<επεξεργασία σειράς>> ώστε να γίνουν όλα τα φάσματα συγκρίσιμα μεταξύ τους. Με την κανονικοποίηση γίνεται προσπάθεια εξάλειψης ή ελαχιστοποίησης των διαφορών μεταξύ των φασμάτων που προκύπτουν λόγω διαφορετικών συγκεντρώσεων αυτών. Στα κυτταρικά εκχυλίσματα, μεταξύ άλλων, η μέθοδος της εκχύλισης που ακολουθείται κάθε φορά μπορεί να οδηγήσει σε τέτοιες διαφοροποιήσεις¹⁰³.

Τα προηγούμενα στάδια της προεργασίας κατέληξαν στην δημιουργία πίνακα $n \times m$, στον οποίον n είναι οι παρατηρήσεις δηλαδή τα φάσματα και m είναι οι μεταβλητές δηλαδή οι τιμές που προκύπτουν από την ολοκλήρωση των κορυφών των επιμέρους τμημάτων στα οποία είχε χωριστεί το φάσμα. Ο πίνακας αυτός περιέχει πλέον την φασματική πληροφορία σε αριθμητικά δεδομένα και εισάγεται στο λογισμικό EXCEL του MICROSOFT OFFICE για να λάβει συγκεκριμένη μορφή.

Αφότου υπέστη επεξεργασία οπότε και έλαβε την τελική του μορφή, ο παραπάνω πίνακας εισήχθη στο στατιστικό λογισμικό SIMCA-P+ 11.5 όπου και πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση με τις χημειομετρικές μεθόδους PCA και PLS-DA^{104,105}.

Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών-Principal Component Analysis (PCA)

Από τις μεθόδους προβολής ευρύτατα χρησιμοποιείται η PCA, η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών. Η PCA αποτελεί μη επιβλεπόμενη μέθοδο προβολής και δίνει μια γενική εικόνα της μεταβολικής συμπεριφοράς για το σύνολο των δειγμάτων. Καθώς επιτρέπει την ανίχνευση ομάδων, τάσεων και έκτροπων τιμών είναι η ιδανική μέθοδος για μια πρώτη στατιστική επεξεργασία. Παρατηρήσεις που βρίσκονται σε κοντινές θέσεις θεωρείται ότι έχουν παρόμοιο μεταβολικό προφίλ¹³. Η PCA στηρίζεται στην εξαγωγή συμπερασμάτων και την ομαδοποίηση των παρατηρήσεων, μόνο από τις διαφορές που παρουσιάζουν τα δεδομένα χωρίς καμμία προηγούμενη ταξινόμηση των δειγμάτων. Ενδέχεται όμως να εγκυμονεί κινδύνους λάθους εκτίμησης των φασματικών δεδομένων όπως στην περίπτωση της ύπαρξης πολλών διαφορετικών πηγών διακύμανσης στα δείγματα της ίδιας ομάδας¹⁶².

Πριν την εφαρμογή της PCA πραγματοποιείται το scaling το οποίο είναι ένας τρόπος κάθετης προσαρμογής της κλίμακας των δεδομένων και πραγματοποιείται με τρεις τρόπους: mean centering, unit variance και pareto με τον τελευταίο να ενδείκνυται για μεταβιομικά δεδομένα. Αποτελεί τακτική για να μειωθεί ο θόρυβος και να ενισχυθεί το περιεχόμενο και η ποιότητα της πληροφορίας δίνοντας απλούστερο μοντέλο.

Αναλυτικότερα οι τρόποι αυτοί έχουν ως εξής:

1. mean centering = προσαρμογή στο μέσο όρο: όπου γίνεται υπολογισμός της μέσης τιμής κάθε στήλης και ακόλουθη αφαίρεση από αυτή τη στήλη. Έτσι βελτιώνεται η ερμηνευτική ικανότητα του μοντέλου.

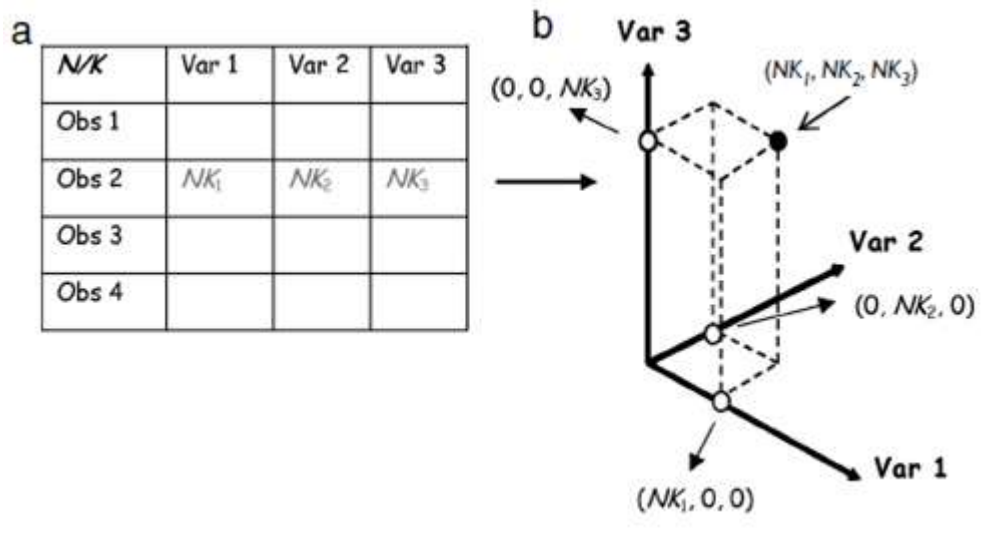
2. unit variance= προσαρμογή ανάλογα με τη διακύμανση των τιμών της ομάδας: αυτή υπολογίζεται ως $1/sd_j$, όπου sd η τυπική απόκλιση της μεταβλητής, υπολογιζόμενη γύρω από τη μέση τιμή.

3. pareto= προσαρμογή στην οποία κάθε μεταβλητή κεντράρεται και υπολογίζεται με βάση τον όρο $1/\sqrt{sd_j}$, όπου sd η τυπική απόκλιση της μεταβλητής, υπολογιζόμενη γύρω από τη μέση τιμή. Πρόκειται για ενδιάμεση των προηγούμενων προσαρμογή.

Μετά τις προσαρμογές που αναφέρθηκαν, όλες οι μεταβλητές θα έχουν το ίδιο <<μήκος>> και μέση τιμή μηδέν. Στη συνέχεια το σύνολο των δεδομένων είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των συνιστωσών και δη της πρώτης κύριας συνιστώσας¹⁶.

Στην PCA η πρώτη κύρια συνιστώσα περιγράφει την μεγαλύτερη διακύμανση στο σμήνος των σημείων, η δεύτερη κύρια συνιστώσα την δεύτερη μεγαλύτερη διακύμανση και ακολουθείται ανάλογη πορεία για τις επόμενες συνιστώσες. Οι συνιστώσες είναι κάθετες μεταξύ τους ενώ το διάγραμμα τιμών των δύο πρώτων συνιστωσών δίνει την καλύτερη αναπαράσταση από βιοχημικής πλευράς του συνόλου των δεδομένων¹⁵.

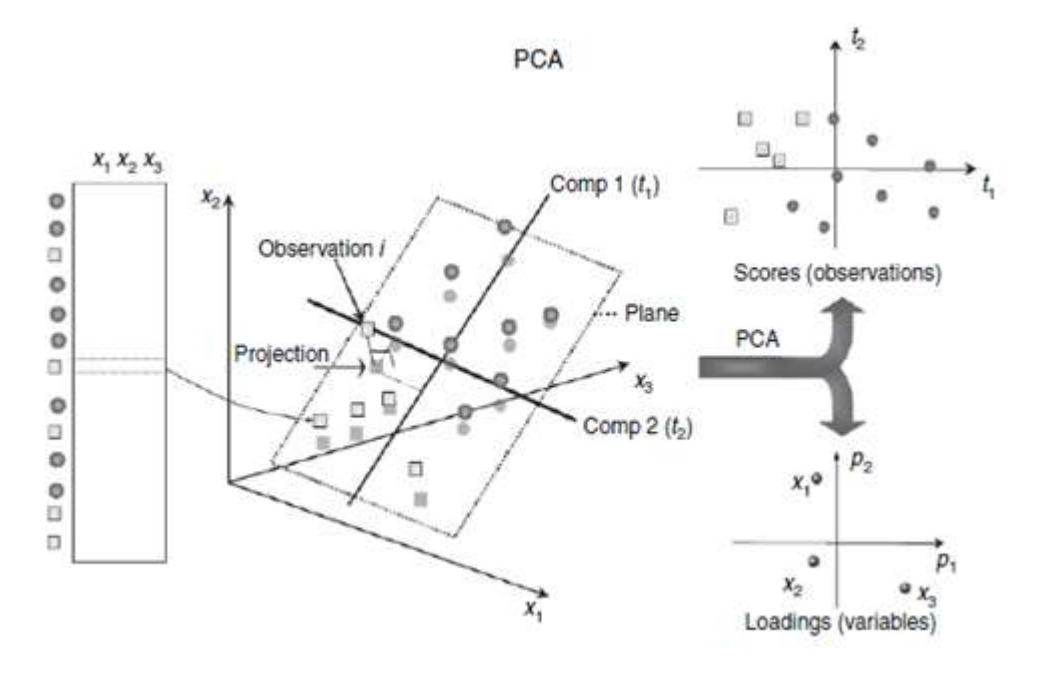
Οι δύο πρώτες συνιστώσες της PCA, ορίζουν ένα παράθυρο στον χώρο των K- διαστάσεων και δημιουργούν ένα μοντέλο, μειώνοντας αυτόματα τον μελετούμενο πολυδιάστατο χώρο σε ένα χώρο μικρότερων διαστάσεων. Προβάλλοντας όλες τις παρατηρήσεις σε αυτόν τον μικρότερο χώρο είναι δυνατό να οπτικοποιηθεί με γραφικό τρόπο η δομή του συνόλου των δεδομένων και να γίνει πιο κατανοητή η ερμηνεία τους¹⁶. Αξίζει να αναφερθεί ότι πολλές φορές απαιτείται να υπολογιστούν περισσότερες συνιστώσες προκειμένου να βελτιωθεί η περιγραφική ικανότητα του μοντέλου και να εξαχθεί μεγαλύτερος αριθμός πληροφοριών από το σύνολο των δεδομένων.



Εικ 31: Πίνακας όπου παριστάνεται το σύνολο της φασματικής πληροφορίας στον K-διάστατο χώρο. Οι γραμμές N αντιπροσωπεύουν τα φάσματα ενώ οι στήλες K είναι οι παράμετροι των φασμάτων¹¹⁹.

Η PCA εφαρμόζεται σε ενιαίο πίνακα μεταβλητών X , $N \times K$ όπου N: σειρές - αντικείμενα (παρατηρήσεις) και K: στήλες-μεταβλητές. Στην Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών ο αρχικός πίνακας X περιγράφεται από το γινόμενο ενός πίνακα μικρότερων διαστάσεων TP' συν τον πίνακα των υπολοίπων E . Δηλαδή: αρχικά $X = NK$ το οποίο γίνεται: $X = 1 \cdot X + TP' + E$ όπου T: ο πίνακας των νέων συντεταγμένων (scores), P' : ο πίνακας των φορτίων-διευθύνσεων των νέων μεταβλητών ως προς τις αρχικές (loadings) και X : ο μέσος όρος των μεταβλητών¹⁴.

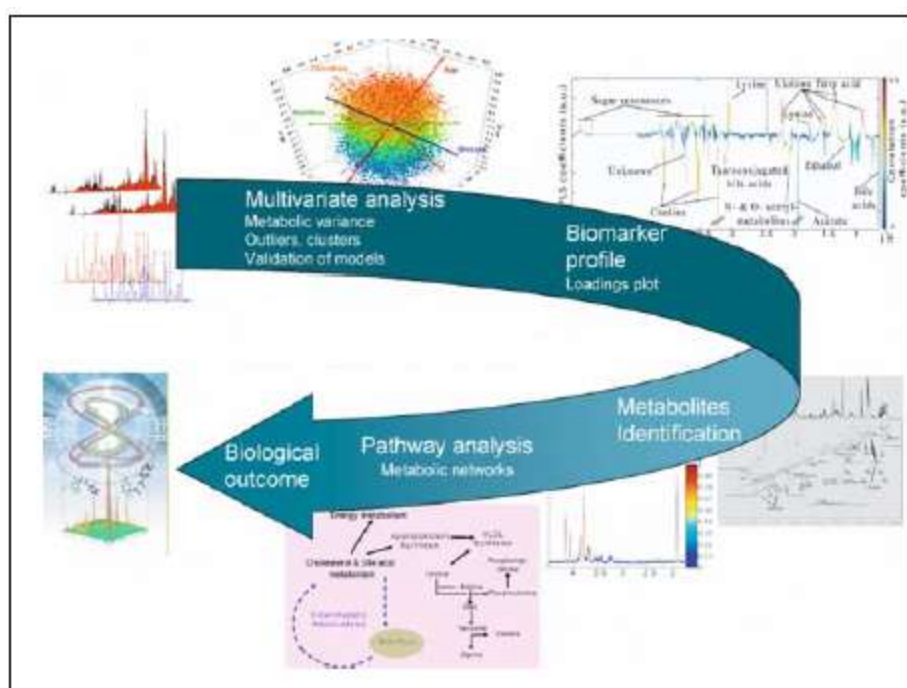
Η τελευταία ισότητα αποτελεί την βάση της PCA και στηρίζεται στην υπόθεση πως υπάρχει μια συνάφεια μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών¹⁶.



Εικ 32: Το μοντέλο Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών προσεγγίζει τη μεταβολή σε έναν πίνακα δεδομένων μέσα από ένα μοντέλο μικρότερων διαστάσεων. Το μοντέλο αυτό, παριστάνει μια δισδιάστατη προβολή των πολυδιάστατων δεδομένων αποκαλύπτοντας τη σχέση μεταξύ παρατηρήσεων και μεταβλητών. Μέσω του score plot φανερώνει τάσεις και έκτροπες τιμές ενώ μέσω του loading plot περιγράφει την επίδραση των μεταβλητών. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι κατευθύνσεις στο scores plot αντιστοιχούν στις κατευθύνσεις στο loadings plot¹¹.

Η PCA καταλήγει σε ένα διάγραμμα τιμών που καλείται scores plot, στο οποίο γίνεται ομαδοποίηση των δειγμάτων, εφόσον αυτή είναι δυνατή, με βάση τις παραμέτρους που τα χαρακτηρίζουν. Συμπληρωματικό του διαγράμματος scores plot είναι το διάγραμμα φορτίων loadings plot στο οποίο φαίνεται η διακύμανση μεταξύ μεταβλητών και συνιστωσών και διαπιστώνονται ποιες είναι εκείνες οι παράμετροι που καθορίζουν το διαχωρισμό και τις ομαδοποιήσεις που είναι ορατές στο scores plot. Εάν οι μεταβλητές που παρουσιάζονται στο loading plot βρίσκονται σε κοντινές θέσεις μεταξύ τους έχουν θετική συσχέτιση ενώ εάν είναι απομακρυσμένες σχετίζονται αρνητικά. Ακόμη, όσο πιο μακριά βρίσκονται οι μεταβλητές από το κέντρο του διαγράμματος τόσο μεγαλύτερη επίδραση ασκούν στο μοντέλο όσον αφορά στον διαχωρισμό των ομάδων. Το σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι οι διευθύνσεις στο scores plot ανταποκρίνονται στις διευθύνσεις στο loadings plot γεγονός που δίνει την δυνατότητα να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι μεταβλητές εκείνες που είναι υπεύθυνες για τον διαχωρισμό των δειγμάτων σε ομάδες. Υπάρχει και το λεγόμενο διάγραμμα φορτίων συσχέτισης (correlation loadings plot) το οποίο φανερώνει τη συσχέτιση μεταξύ μεταβλητών και συνιστωσών του scores plot επιτρέποντας πιο ξεκάθαρη εικόνα της μεταξύ τους σχέσης¹⁴.

Μία εμβόλιμη διαδικασία πριν την εφαρμογή των δύο μεθόδων αφορά στο λεγόμενο <<scaling>>. Πρόκειται για μία <<column operation>> δηλαδή μια <<επεξεργασία στήλης>> όπου η στήλη αντιπροσωπεύει την μεταβλητή του πίνακα δεδομένων και γίνεται ώστε οι άξονες όλων των μεταβλητών να ρυθμιστούν με βάση κάποιο προεπιλεγμένο κριτήριο ώστε να συμβάλλουν με τον ίδιο τρόπο στην δημιουργία του μοντέλου. Είναι ένας τρόπος προσαρμογής της κλίμακας των δεδομένων και πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο <<mean-centering>> και <<pareto>> όπου σε κάθε στήλη του πίνακα μπορεί να δοθεί μια μηδενική μέση τιμή αφαιρώντας την μέση τιμή όλης της στήλης από κάθε τιμή της στήλης¹⁰³.



Εικ 33: Σχηματική παράσταση της ροής μιας τυπικής ανάλυσης δεδομένων μεταβολομικής μελέτης¹³².

Τα μοντέλα που προκύπτουν δίνουν μια οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αξιοπιστία ενός μοντέλου είναι απαραίτητο να διεξαχθεί επικύρωση αυτού. Η επικύρωση ενός μοντέλου γίνεται με διάφορα βήματα. Μεταξύ αυτών είναι η <<εσωτερική >> επικύρωση (διασταυρούμενη επικύρωση = cross validation).

Βασικές παράμετροι της εσωτερικής επικύρωσης αποτελούν τα μεγέθη R^2 και Q^2 . Η παράμετρος R^2 αντιπροσωπεύει το πόσο καλά μπορεί το μοντέλο να περιγράψει και να αναπαράγει με μαθηματικό τρόπο το σύνολο των δεδομένων, πόσο καλά ταιριάζουν τα δεδομένα σε αυτό, ενώ η παράμετρος Q^2 αντιπροσωπεύει την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου.

Στο στατιστικό λογισμικό SIMCA υπολογίζεται για κάθε κύρια συνιστώσα ο συντελεστής συσχέτισης R^2 του οποίου η τιμή θα πρέπει να τείνει στο 1 για

να είναι ικανοποιητική. Η τιμή αυτή προσαρμόζεται και διορθώνεται ως προς τους βαθμούς ελευθερίας.

Οπότε προκύπτουν οι παρακάτω συσχετισμοί με τους δύο πρώτους να διαδραματίζουν ιδιαίτερη σημασία για την συμβολή της δεδομένης κύριας συνιστώσας στο περιγραφικό μοντέλο:

R^2X : το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύονται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα.

R^2X_{adj} : το ποσοστό της διακύμανσης όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύονται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα. Η διακύμανση είναι το άθροισμα των τετραγώνων διορθωμένο ως προς τους βαθμούς ελευθερίας.

$R^2X(cum)$: το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες.

$R^2X_{adj}(cum)$: το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες.

Επιπλέον υπολογίζεται η παράμετρος Q^2 ώστε να διαπιστωθεί το ποσοστό συμβολής της κάθε κύριας συνιστώσας στο μοντέλο.

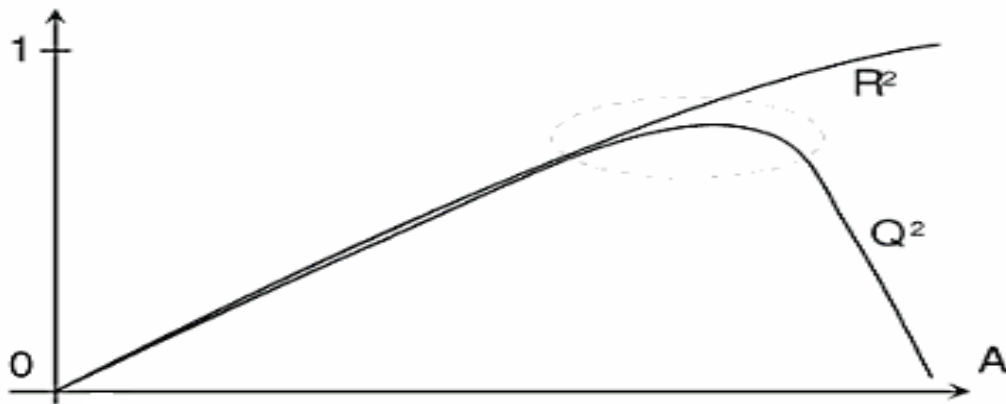
Όπου Q^2 είναι το κλάσμα της συνολικής διακύμανσης των X , που μπορεί να προβλεφθεί από μια συνιστώσα και $Q^2(cum)$ το συνολικό Q^2 για όλες τις συνιστώσες που έχουν υπολογιστεί.

Όταν η τιμή του Q^2 ξεπερνά ένα συγκεκριμένο όριο, τότε η συνιστώσα θεωρείται σημαντική ως προς την προγνωστική δυνατότητα της. Για να είναι σημαντική μία συνιστώσα πρέπει να συνεισφέρει στο μοντέλο σε ποσοστό τουλάχιστον 10% και η ιδιοτιμή της να είναι μεγαλύτερη από την τιμή 2.

Για τις μεταβλητές Y που υπάρχουν στα PLS-DA μοντέλα ορίζονται αντίστοιχα τα R^2Y κ.λ.π.

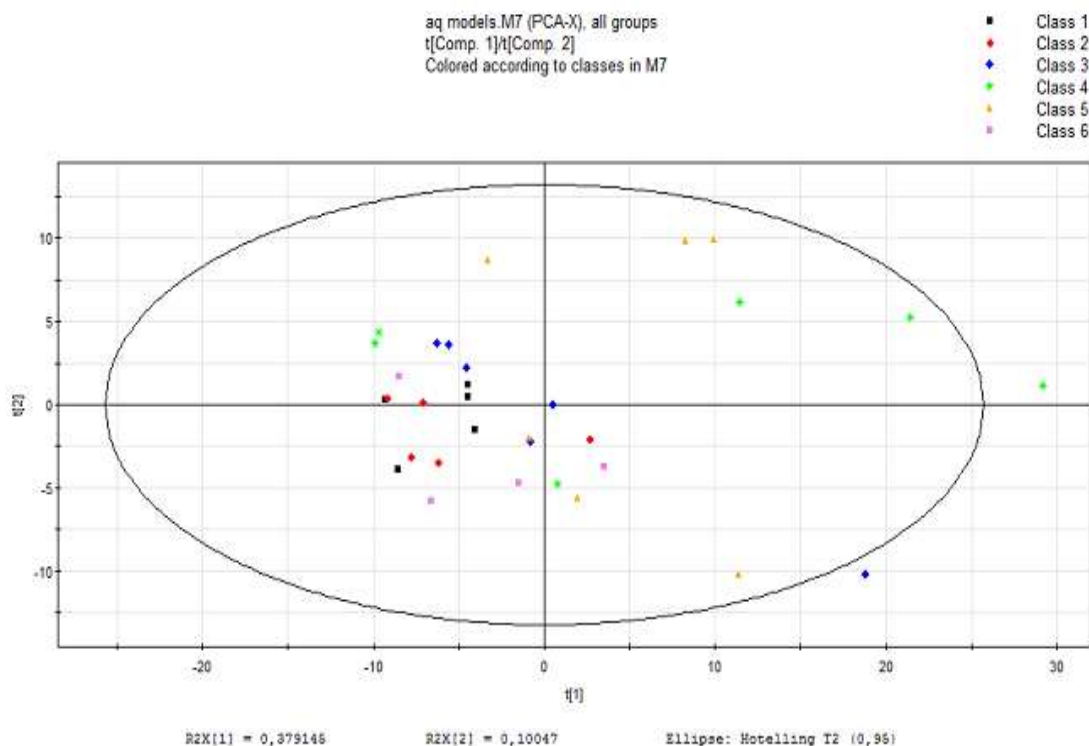
Ο αριθμός των κυρίων συνιστωσών που είναι απαραίτητες για την περιγραφή ενός μοντέλου εξαρτάται από την διαφορά μεταξύ των παραμέτρων R^2X και Q^2X δηλαδή του βαθμού της καταλληλότητας και της προβλεπτικής ικανότητας. Απαιτείται αριθμός συνιστωσών τέτοιος ώστε οι τιμές και των δύο παραμέτρων να είναι αποδεκτές, λαμβάνοντας υπόψη το ότι οι δύο παράμετροι εμφανίζουν τελείως διαφορετική συμπεριφορά αυξανόμενης της πολυπλοκότητας του μοντέλου. Η τιμή του R^2X κυμαίνεται μεταξύ 0 και 1, με τη μονάδα να είναι η βέλτιστη, γεγονός όμως που δεν αρκεί για να γίνει αποδεκτό το μοντέλο.

Το παρακάτω γράφημα δείχνει την ανάγκη επίτευξης ισορροπίας μεταξύ των παραμέτρων.



Εικ 34: Το <<δίλημμα>> μεταξύ ικανοποιητικού R^2X και Q^2X . Ο κάθετος άξονας αντιστοιχεί στο ποσό της ερμηνεύσιμης και της προβλέψιμης διασποράς ενώ ο οριζόντιος άξονας απεικονίζει την πολυπλοκότητα του μοντέλου. Σε ένα μοντέλο συγκεκριμένης πολυπλοκότητας, η τιμή ένα δίδεται στο μοντέλο με την βέλτιστη ισορροπία μεταξύ καταλληλότητας και προβλεπτικής ικανότητας¹⁶.

Πολλές φορές, με το διάγραμμα τιμών της PCA εμφανίζονται έκτροπες τιμές και ένα διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση τους αποτελεί η κατανομή Hotelling's T^2 που αποτελεί πολυπαραμετρική γενίκευση του Student's t-test και είναι ανάλογη της κατανομής F. Είναι ουσιαστικά η καμπύλη της έλλειψης η οποία εμφανίζεται στο διάγραμμα τιμών και ορίζει περιοχή στην οποία βρίσκονται οι παρατηρήσεις με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Ένα τέτοιο μοντέλο στο οποίο παρατηρούνται έκτροπες τιμές είναι το ακόλουθο.



Εικ 35: Μοντέλο PCA στο οποίο απεικονίζονται 6 διαφορετικές ομάδες δειγμάτων. Διακρίνονται εκτός της καμπύλης κάποια δείγματα τα οποία αποκλείονται από την ανάλυση, τα λεγόμενα outliers.

Διαχωριστική Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων-Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS DA)

Η μέθοδος Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων-Διαχωριστικής Ανάλυσης αποτελεί επιβεβλημένη μέθοδο ταξινόμησης όπου τα αντικείμενα χωρίζονται σε σειρά μεταβλητών και σειρά ελέγχου συνοδευόμενες από μια τρίτη σειρά που περιλαμβάνει τις ομάδες που είναι ταξινομημένες οι μεταβλητές.

Η σειρά ελέγχου (control set) δίνει την δυνατότητα δημιουργίας μοντέλου το οποίο θα προβλέπει την ομαδοποίηση των άγνωστων δειγμάτων. Εφόσον τα αντικείμενα είναι ήδη ομαδοποιημένα η μέθοδος αυτή επιδιώκει να ανακαλύψει εκείνες τις φασματοσκοπικές μεταβλητές που συνέβαλλαν στην ομαδοποίησή τους.

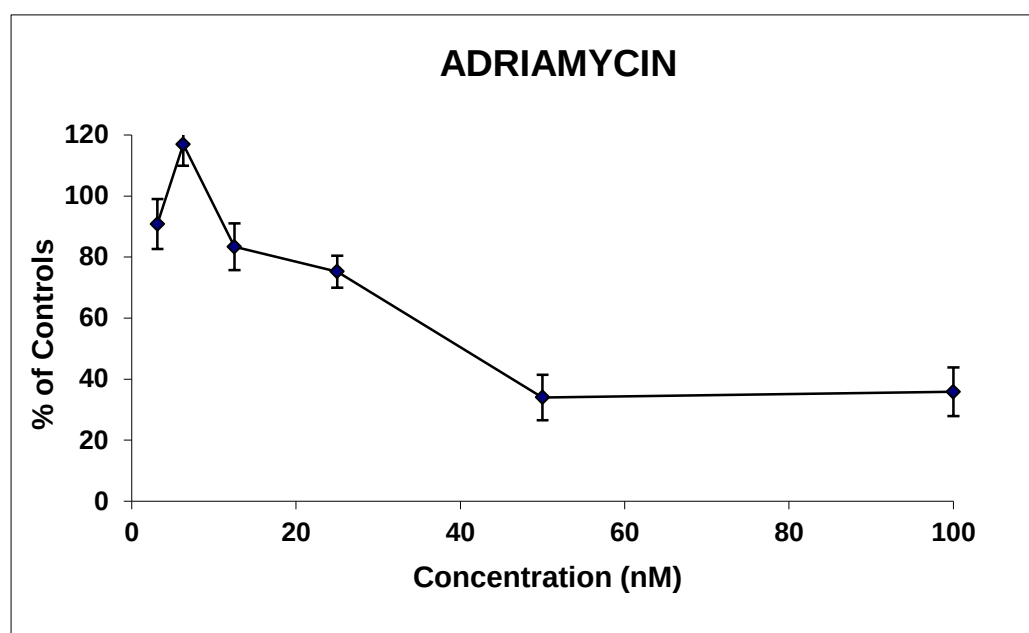
Προκειμένου να αξιολογηθεί η αξιοπιστία της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου αφαιρούνται κάποια αντικείμενα από την ομάδα ελέγχου και ακολούθως γίνεται πρόβλεψη για την ταξινόμηση τους μετρώντας το σφάλμα πρόβλεψης. Η διαδικασία αυτή είναι η λεγόμενη <<διασταυρούμενη επικύρωση>> και συνήθως είναι ενσωματωμένη στο στατιστικό λογισμικό που χρησιμοποιείται όπως π.χ στο SIMCA17. Τυπική κατάταξη των αντικειμένων σε δύο τάξεις δίνει ένα διάγραμμα τιμών (scores plot) μαζί με την τιμή Q² η οποία παρέχει την αξιοπιστία της διάκρισης¹⁸.

ΚΕΦ 9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1 Αποτελέσματα MTT κυτταροτοξικών δοκιμασιών

Με τη μέθοδο MTT πραγματοποιήθηκε πλήθος πειραμάτων με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης της αδριαμυκίνης, της ολεωρωπαΐνης και του συνδυασμού αυτών, επί των κυττάρων της καρκινικής σειράς PC-3.

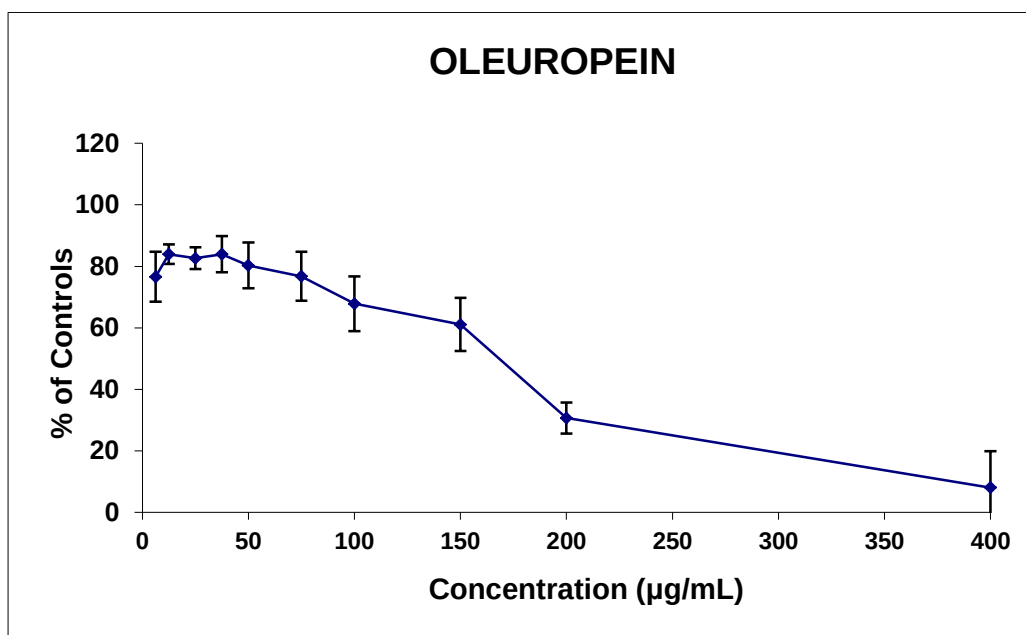
9.1.1 Αδριαμυκίνη



Διάγραμμα 1: Επίδραση αδριαμυκίνης σε εύρος συγκεντρώσεων 3-100nM επί του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3.

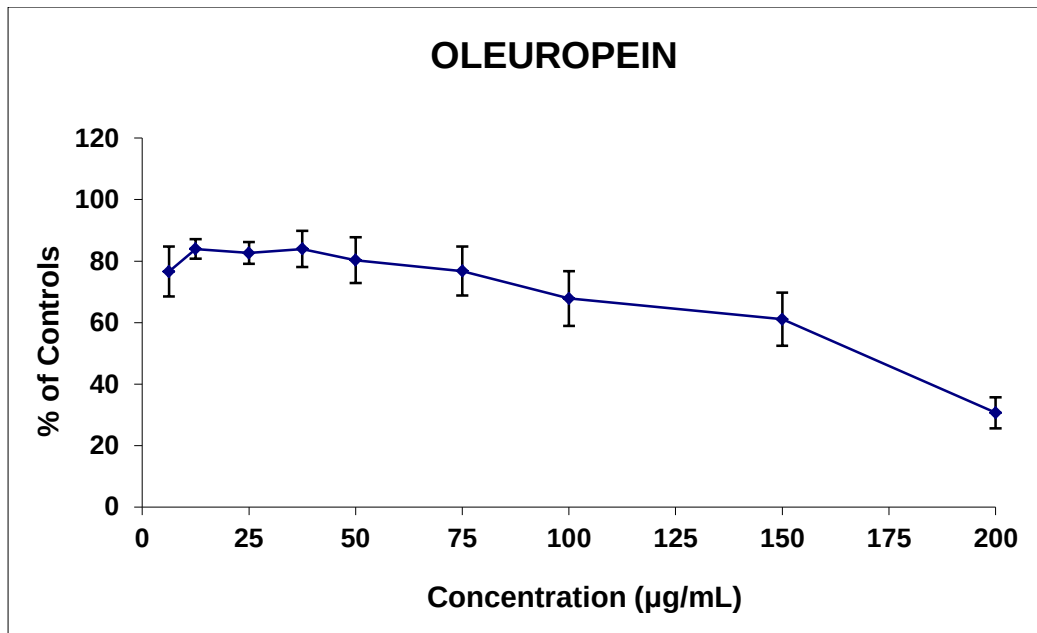
Με τη μέθοδο MTT προσδιορίστηκε η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3 μετά από επίδραση υδατικού διαλύματος αδριαμυκίνης στις συγκεντρώσεις των 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα [(σε όλα τα διαγράμματα δίνεται η τυπική απόκλιση (standard deviation error bars) από 3 τουλάχιστον πειράματα)] παρατηρήθηκε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις συγκεντρώσεις των 100, 50, 25, 12.5, και 3.125 nM κατά 64.2%, 66%, 24.8%, 16% και 9% αντίστοιχα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Να σημειωθεί ότι μεταξύ συγκεντρώσεων 50nM και 100nM δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφορά στην ανασταλτική δράση γεγονός που επιτρέπει τη χορήγηση της μικρότερης δόσης, αυτής των 50nM που σημαίνει μείωσης της τοξικότητας και των παρενεργειών της αδριαμυκίνης στα φυσιολογικά κύτταρα.

9.1.2 Ολευρωπαΐνη



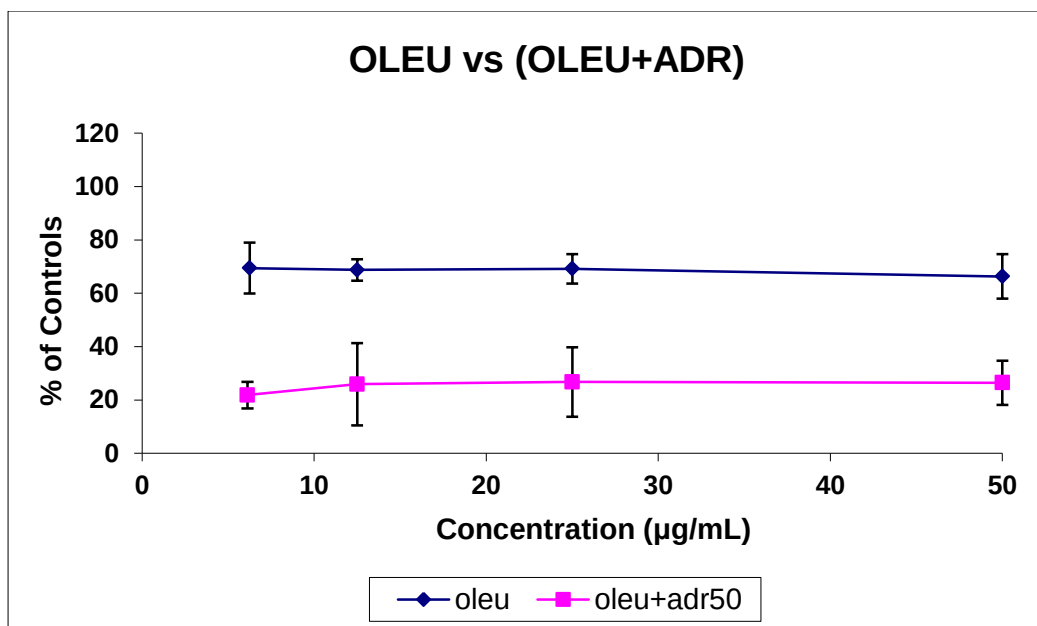
Διάγραμμα 2: Επίδραση ολευρωπαΐνης σε εύρος συγκεντρώσεων 6-400μg/mL επί του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3.

Με τη μέθοδο MTT προσδιορίστηκε η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3 μετά από επίδραση διαλύματος ολευρωπαΐνης στις συγκεντρώσεις των 400, 200, 150, 100, 75, 50, 37.5, 25, 12.5, 6.25 μg/mL. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα παρατηρήθηκε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις κατά 92%, 69%, 39%, 32%, 23%, 20%, 16%, 17%, 16%, 23% αντίστοιχα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Η ολευρωπαΐνη χορηγήθηκε διαλυμένη σε DMSO.



Διάγραμμα 3:
Επίδραση
ολευρωπαΐνης
σε εύρος
συγκεντρώσεων
6-200µg/mL επί
του πολ/σμού
των κυττάρων
της σειράς PC-3

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3, μεταξύ 100 και 200 µg/mL ολευρωπαΐνης παρατηρούνται θετικά ανασταλτικά αποτελέσματα. Γι'αυτό τον λόγο επιλέγεται αυτό το εύρος συγκεντρώσεων για την συνέχιση των πειραμάτων. Δόση μεγαλύτερη των 200µg/mL έως τα 400µg/mL προκαλεί αναστολή αλλά είναι τοξική για τα κύτταρα. Από την συγκέντρωση των 50µg/mL και κάτω παρατηρείται ένα <<πλατώ>> στην μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Πραγματοποιήθηκε συγχορήγηση ολευρωπαΐνης και αδριαμυκίνης για να διαπιστωθεί εάν παρουσιαστεί κάποια μεταβολή, γεγονός που παρατίθεται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 4:
Επίδραση
ολευρωπαΐνης
σε εύρος
συγκεντρώσεων
7.5-50µg/mL vs
συγχορήγησης
ολευρωπαΐνης
7.5-50µg/mL με
αδριαμυκίνη
50nM επί του
πολ/σμού των
κυττάρων PC-3

Η συνδυασμένη χορήγηση των δυο επιδράσεων ολεωρωπαΐνης και αδριαμυκίνης δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα. Όταν η ολεωρωπαΐνη χορηγείται μόνη της σε συγκεντρώσεις 50, 25, 12.5, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ αναστέλει τον πολλαπλασιασμό σε ποσοστό 30% κατά μέσο όρο. Σε σταθερή συγχωρηγούμενη δόση αδριαμυκίνης 50nM, οι συγκεντρώσεις της ολεωρωπαΐνης 50, 25, 12.5, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ οδήγησαν σε ελάττωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων κατά 74%, 73%, 74% και 78% αντίστοιχα αναφορικά με τα κύτταρα αναφοράς.

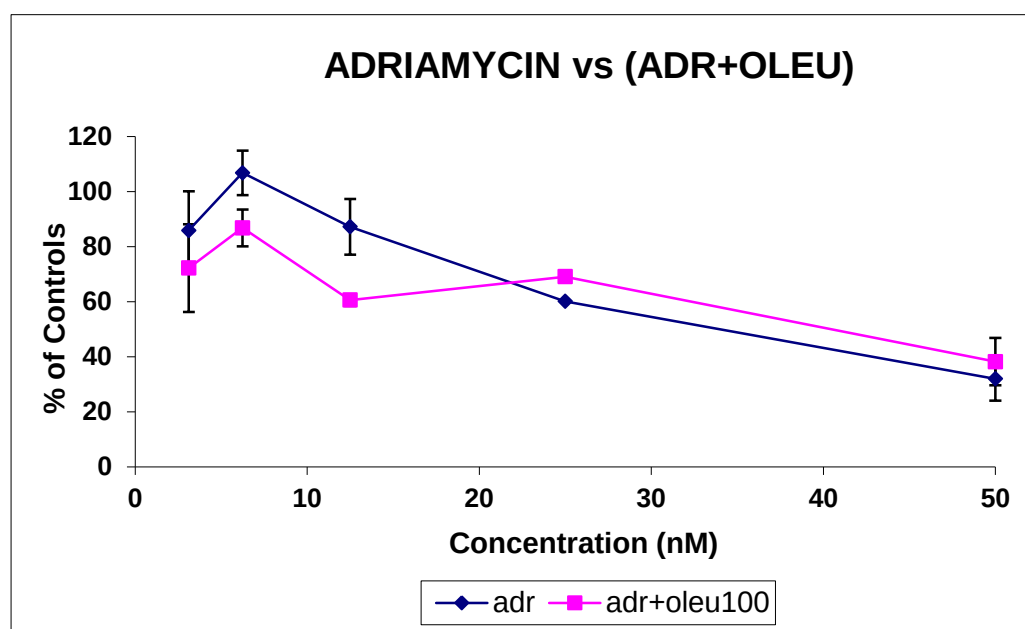
Όμως η συγχωρήγηση με ολεωρωπαΐνη δεν προσφέρει τίποτα περισσότερο σε σύγκριση με την χορήγηση μόνο αδριαμυκίνης η οποία σε συκέντρωση 50nM, αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων κατά 66% (διάγραμμα 1).

Δηλαδή η ανασταλτική δράση της ολεωρωπαΐνης 100 $\mu\text{g/mL}$ με αδριαμυκίνη 50nM είναι ισοδύναμη με την αδριαμυκίνη 50nM.

Η παρατήρηση αυτή έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της συγχωρήγησης των δύο παραγόντων. Πραγματοποιήθηκε πλήθος πειραμάτων MTT. Ενδεικτικά, παρατίθενται τα παρακάτω διαγράμματα.

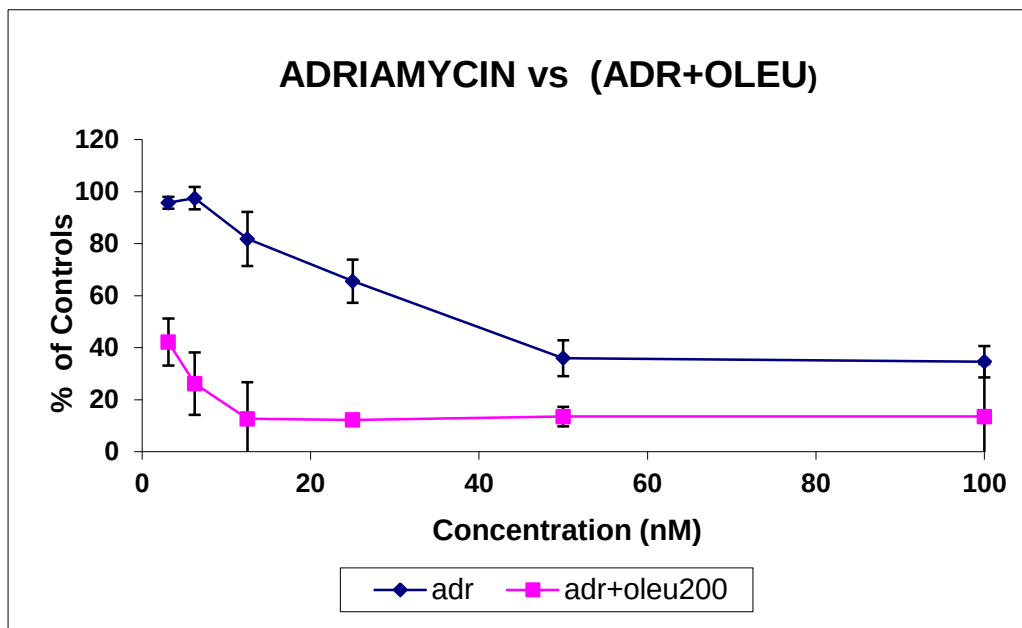
9.1.3 Συγχωρήγηση ολεωρωπαΐνης και αδριαμυκίνης

Η συγχωρήγηση έγινε αφενός με σταθερή δόση ολεωρωπαΐνης 100 $\mu\text{g/mL}$ και αφετέρου με σταθερή δόση ολεωρωπαΐνης 200 $\mu\text{g/mL}$.



Διάγραμμα 5: Επίδραση αδριαμυκίνης σε εύρος συγκεντρώσεων 3-50nM vs συγχωρήγησης αδριαμυκίνης με ολεωρωπαΐνη 100 $\mu\text{g/mL}$ επί του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3.

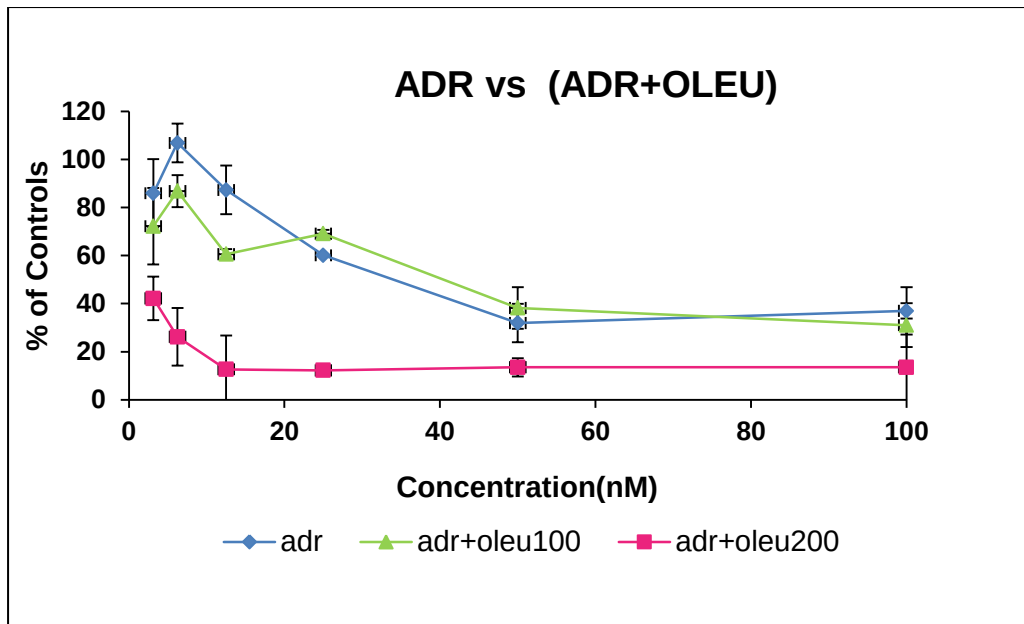
Έπειτα από επίδραση σταθερής δόσης ολεωρωπαΐνης 100μg/mL σε PC-3 κύτταρα (διάγραμμα 5) στις σταδιακά μειωμένες συγκεντρώσεις αδριαμικίνης 50, 25, 12.5, 6.25 και 3.125 nM έγινε η μέτρηση του πολλαπλασιασμού τους με τη μέθοδο MTT. Σημειώθηκε μια δόσοεξαρτώμενη μείωση στην βιωσιμότητα των κυττάρων στις συγκεντρώσεις 12.5, 6.25 και 3.125 nM κατά 39%, 13%, και 27% αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Ουσιαστικά δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ της συγχορήγησης αδριαμικίνης και ολεωρωπαΐνης 200μg/mL με την χορήγηση μόνο αδριαμικίνης.



Διάγραμμα 6 : Επίδραση αδριαμικίνης σε εύρος συγκεντρώσεων 3-100nM vs συγχορήγησης αδριαμικίνης με ολεωρωπαΐνη 200μg/mL επί του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3.

Στην επίδραση σταθερής δόσης ολεωρωπαΐνης 200μg/mL σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις αδριαμικίνης 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM στα κύτταρα PC-3 παρατηρήθηκε εντυπωσιακή μείωση στο ποσοστό των ζωντανών κυττάρων κατά 87%, 87%, 88%, 87%, 74% και 58% αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Οι αντίστοιχες μειώσεις επί του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων στην περίπτωση της χορήγησης μόνο αδριαμικίνης δεν ξεπερνούσαν το ποσοστό 65% που αντιστοιχεί στην συγκέντρωση 100 nM σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ακόμη και σε πολύ μικρές δόσεις κάτω των 12.5nM αδριαμικίνης, όταν υπάρχει συγχορήγηση με ολεωρωπαΐνη 200μg/mL παρατηρείται αναστολή του πολλαπλασιασμού σε ποσοστά από 60- 87%.

Τα παραπάνω συμπεράσματα γίνονται πιο κατανοητά στο επόμενο συνδυαστικό διάγραμμα όπου φαίνονται οι δύο συνδυασμοί συγχορήγησης.



Διάγραμμα 7: Συγκριτική επίδραση αδριαμικίνης σε εύρος συγκεντρώσεων 3-100nM vs συγχορήγησης αδριαμικίνης με ολεωρωπαΐνη 100μg/mL και ολεωρωπαΐνη 200μg/mL επί του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC-3.

Συμπερασματικά λοιπόν, η συγχορήγηση ολεωρωπαΐνης 200μg/mL με αδριαμικίνη ακόμη και σε εύρος συγκεντρώσεων από 3nM έως και 12.5 nM δίνει αξιόλογη ανασταλτική επίδραση επί του πολλαπλασιασμού των PC-3 κυττάρων.

9.2 Αποτελέσματα κυτταρικού κύκλου

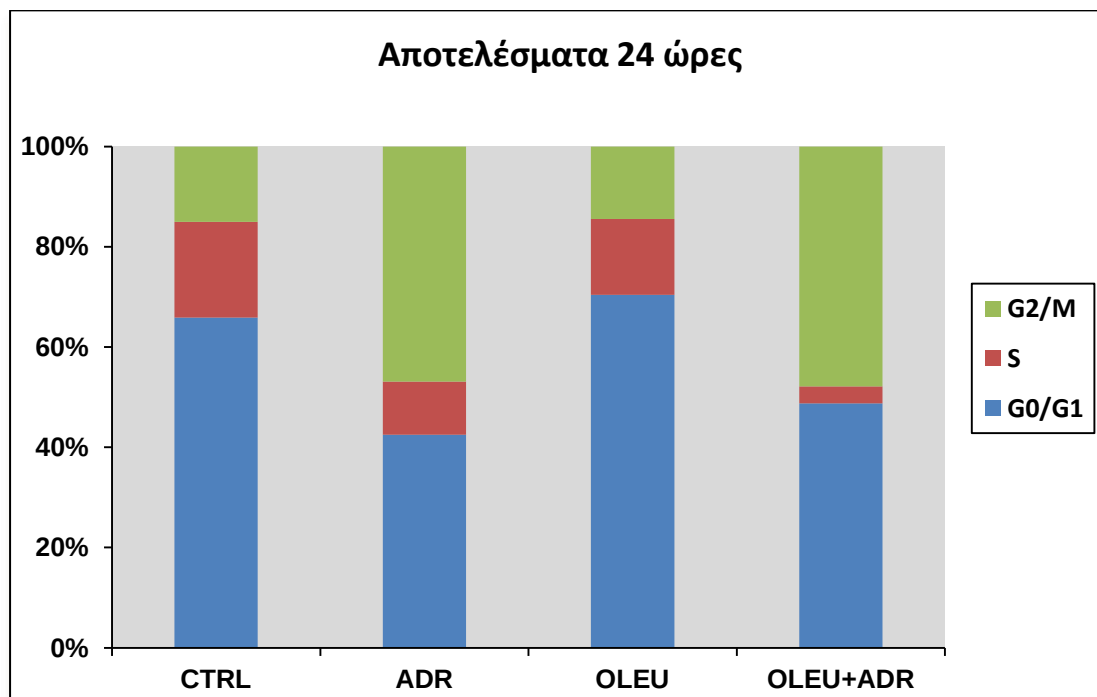
9.2.1 Επίδραση 24 ώρες

Στον παρακάτω πίνακα καθώς και στο αντίστοιχο διάγραμμα αυτού παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της 24ωρης επίδρασης των τριών παραγόντων στα PC-3 κύτταρα.

Μετά την μέτρηση της 24ωρης επίδρασης 100nM αδριαμικίνης παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονταν στην G0/G1 φάση καθώς και αυτών που βρίσκονταν στην S φάση κατά 23% και 8.5% αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Αντιθέτως παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της τάξης του 32% των κυττάρων της φάσης G2/M.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 24 ΩΡΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗΣ, ΟΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ (%)			
Δείγματα	G0/G1	S	G2/M
CTRL	66	19	15
ADR 100nM	42	11	47
OLEU 100μg/mL	70	15	14
OLEU (100μg/mL) + ADR (100nM)	49	3	48

Η 24ωρη επίδραση της ολευρωπαΐνης στη συγκέντρωση των 100μg/mL προκάλεσε αύξηση μόνο στα κύτταρα της φάσης G0/G1 κατά 4.56%, ενώ μικρή μείωση σημειώθηκε στις άλλες φάσεις με τα κύτταρα της S να ελαττώνονται κατά 4% και της G2/M μόνο κατά 0.54% σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς.



Εικ 36: 24ωρη συγχορήγηση αδριαμυκίνης (100nM) + ολευρωπαΐνης (100μg/mL)

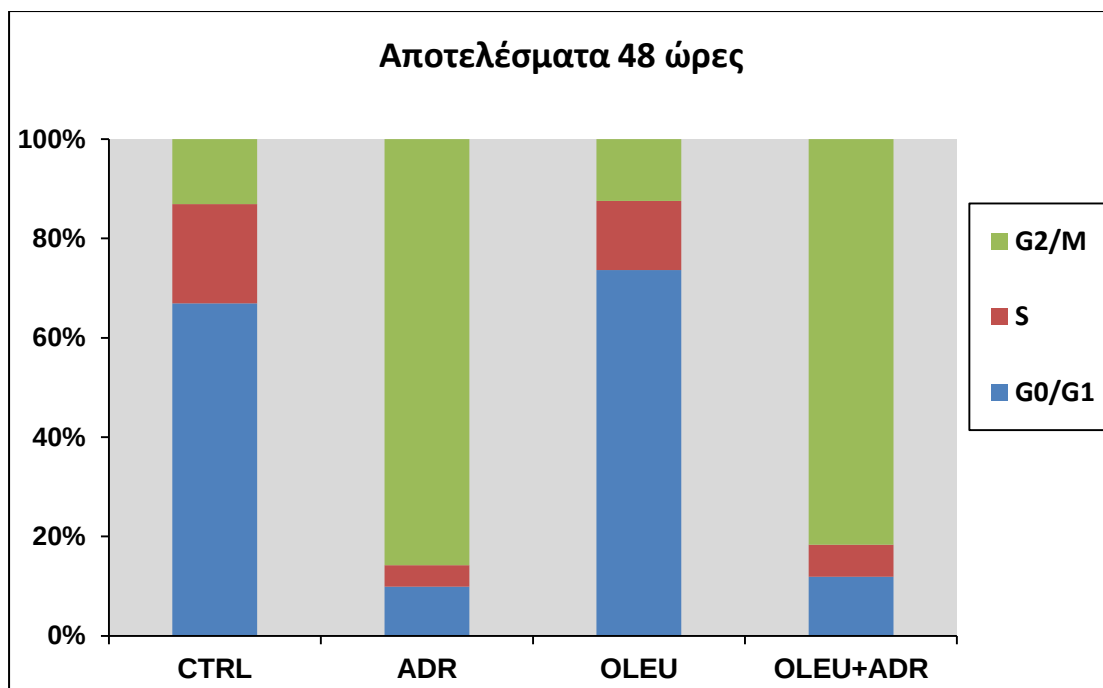
Τέλος μετά από 24ωρη συγχορήγηση (αδριαμυκίνης 100nM+ολευρωπαΐνης 100μg/mL) παρατηρήθηκε παρόμοια μεταβολή όπως αυτήν μετά από χορήγηση μόνο αδριαμυκίνης 100nM. Έτσι τα κύτταρα στις φάσεις G0/G1 και S μειώθηκαν σε ποσοστό 17% και 16% αντίστοιχα ενώ μόνο στην φάση G2/M υπήρξε μεγάλη αύξηση της τάξης του 33% σε σχέση πάντα με τα κύτταρα αναφοράς.

9.2.2 Επίδραση 48 ώρες

Μετά την μέτρηση της 48ωρης επίδρασης 100nM αδριαμυκίνης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της τάξης του 57% του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονταν στην G0/G1 φάση ενώ η μείωση για τα κύτταρα που βρίσκονταν στην S φάση ήταν μικρότερη και αντιστοιχούσε στο 16% των κυττάρων αναφοράς. Αντιθέτως παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της τάξης του 73% των κυττάρων που βρίσκονταν στην φάση G2/M.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4 48 ΩΡΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗΣ, ΟΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ (%)			
Δείγματα	G0/G1	S	G2/M
CTRL	67	20	13
ADR 100nM	10	4	86
OLEU 100μg/mL	74	14	12
OLEU (100μg/mL) + ADR (100nM)	12	6	82

Η 48ωρη επίδραση της ολευρωπαΐνης στη συγκέντρωση των 100μg/mL προκάλεσε αύξηση μόνο στα κύτταρα της φάσης G0/G1 κατά 6.7% , ενώ μικρή μείωση σημειώθηκε στις άλλες φάσεις με τα κύτταρα της S να ελαττώνονται κατά 6% και της G2/M μόνο κατά 0.68% σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς.



Εικ 37: 48ωρη συγχορήγηση αδριαμικίνης (100nM) + ολεωρωπαΐνης (100μg/mL)

Τέλος μετά από 48ωρη συγχορήγηση (αδριαμικίνης 100nM+ολεωρωπαΐνης 100μg/mL) παρατηρήθηκε παρόμοια μεταβολή όπως αυτήν μετά από χορήγηση μόνο αδριαμικίνης 100nM. Έτσι τα κύτταρα στις φάσεις G0/G1 και S μειώθηκαν σε ποσοστό 55% και 13% αντίστοιχα ενώ μόνο στην φάση G2/M υπήρξε μεγάλη αύξηση της τάξης του 68% σε σχέση πάντα με τα κύτταρα αναφοράς.

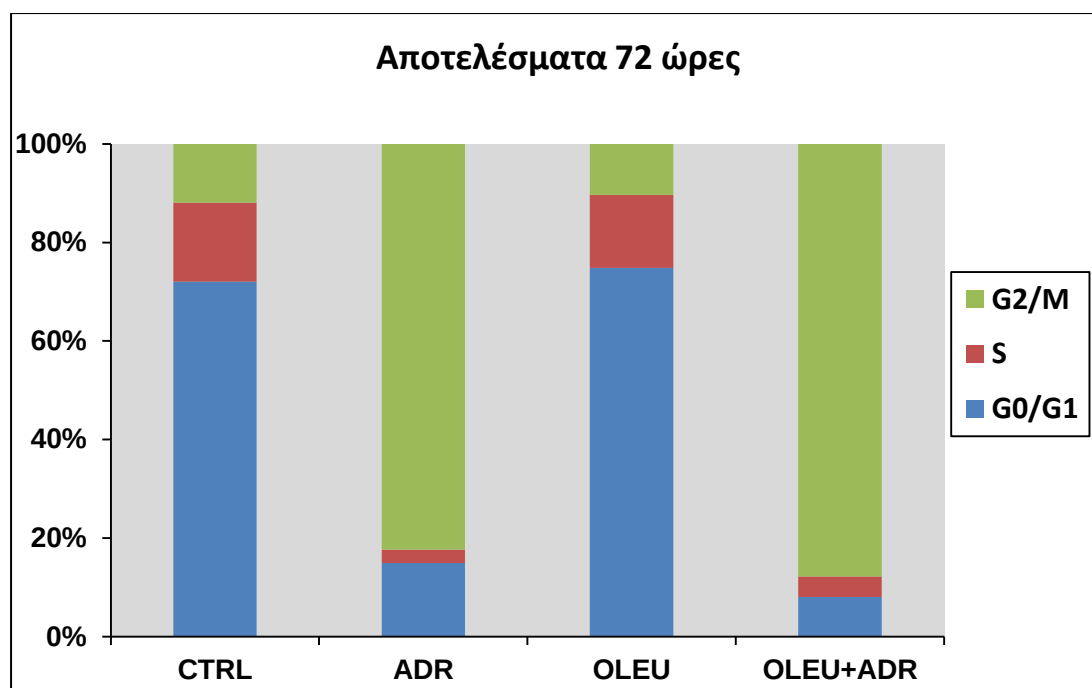
9.2.3 Επίδραση 72 ώρες

Μετά την μέτρηση της 72ωρης επίδρασης 100nM αδριαμικίνης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της τάξης του 57% του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονταν στην G0/G1 φάση ενώ η μείωση για τα κύτταρα που βρίσκονταν στην S φάση ήταν μικρότερη και αντιστοιχούσε στο 13% των κυττάρων αναφοράς. Αντιθέτως παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της τάξης του 70% των κυττάρων που βρίσκονταν στην φάση G2/M.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 72 ΩΡΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗΣ, ΟΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ (%)			
Δείγματα	G0/G1	S	G2/M
CTRL	72	16	12
ADR 100nM	15	3	82
OLEU 100μg/mL	75	15	10
OLEU (100μg/mL) + ADR (100nM)	8	4	88

Η 72ωρη επίδραση της ολευρωπαΐνης στη συγκέντρωση των 100μg/mL προκάλεσε μικρή αύξηση μόνο στα κύτταρα της φάσης G0/G1 κατά 2.7%, ενώ επίσης μικρή ήταν η μείωση που σημειώθηκε στις άλλες φάσεις με τα κύτταρα της S να ελαττώνονται κατά 1.2% και της G2/M κατά 1.6% σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς.

Τέλος μετά από 72ωρη συγχορήγηση (αδριαμυκίνης 100nM+ολευρωπαΐνης 100μg/mL) παρατηρήθηκε παρόμοια μεταβολή όπως αυτήν μετά από χορήγηση μόνο αδριαμυκίνης 100nM. Έτσι τα κύτταρα στις φάσεις G0/G1 και S μειώθηκαν σε ποσοστό 63.99% και 11.93% αντίστοιχα ενώ μόνο στην φάση G2/M υπήρξε μεγάλη αύξηση της τάξης του 75.93% σε σχέση πάντα με τα κύτταρα αναφοράς.

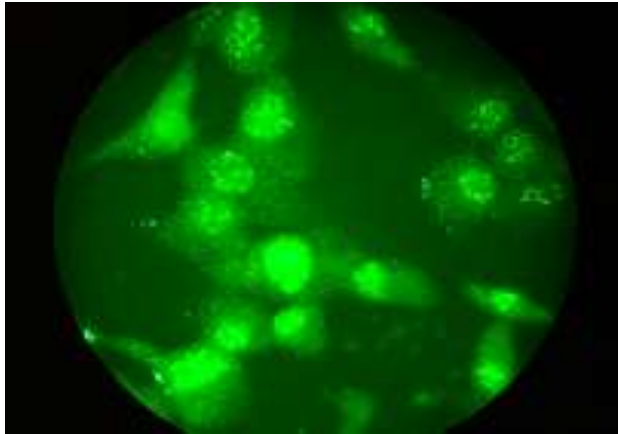


Εικ 38: 72ωρη συγχωρήγηση αδριαμυκίνης (100nM) + ολεωρωπαΐνης (100μg/mL)

9.3 Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού

Στόχος της ανάλυσης ανοσοφθορισμού είναι ο προσδιορισμός της θέσης της LC3 πρωτεΐνης που σχετίζεται με την αυτοφαγία. Κατά την αυτοφαγία σχηματίζονται τα αυτοφαγοσώματα και παρατηρείται περιπυρηνική εμφάνιση της LC3 όπως επίσης και τα χαρακτηριστικά διάστικτα σημάδια. Η επισήμανση με ανοσοφθορισμό είναι μια ευαίσθητη μέθοδος για να ανιχνεύσει πιθανή αυτοφαγική δράση των παραγόντων αδριαμυκίνης, ολεωρωπαΐνης ή συνδυασμού αυτών.

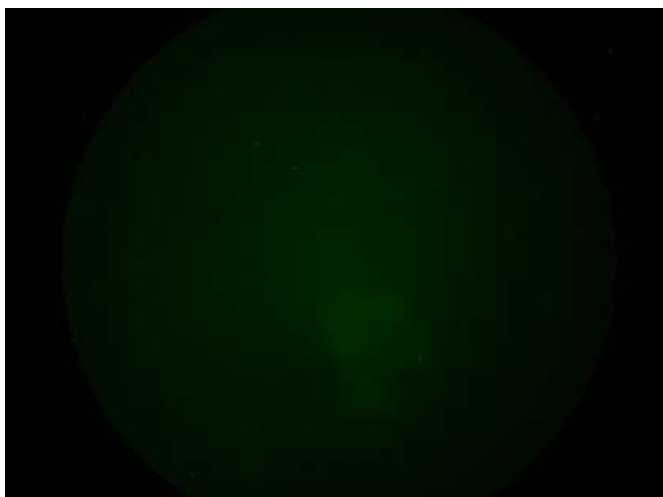
Έτσι, το μικροσκόπιο φθορισμού παρέχει τις εικόνες που ακολουθούν και βάσει των οποίων θα εξαχθούν τα συμπεράσματα περί του μηχανισμού τοξικότητας των ουσιών που αναφέρθηκαν.



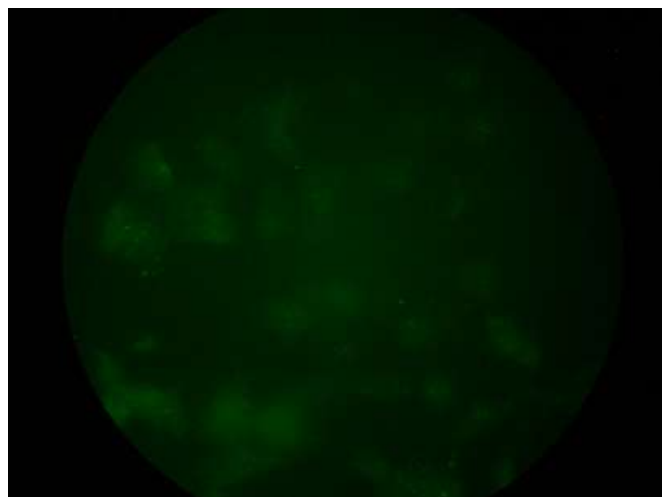
CHLOROQUINE 50 μ M

Για λόγους σύγκρισης,
παρατίθεται η εικόνα του
φθορισμού της χλωροκίνης 50 μ M.
Αναστέλλει την σύντηξη των
λυσοσομάτων με τα
αυτοφαγосώματα και
απενεργοποιεί τα λυσοσωμικά
ένζυμα. Έτσι αναστέλλει την
αποικοδόμηση της LC3 πρωτεΐνης
με αποτέλεσμα την συσσώρευση
και εμφάνιση της.

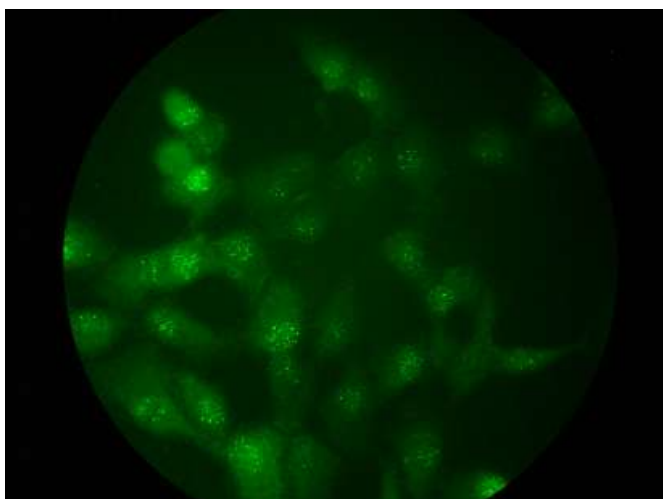
Αρνητικός μάρτυρας



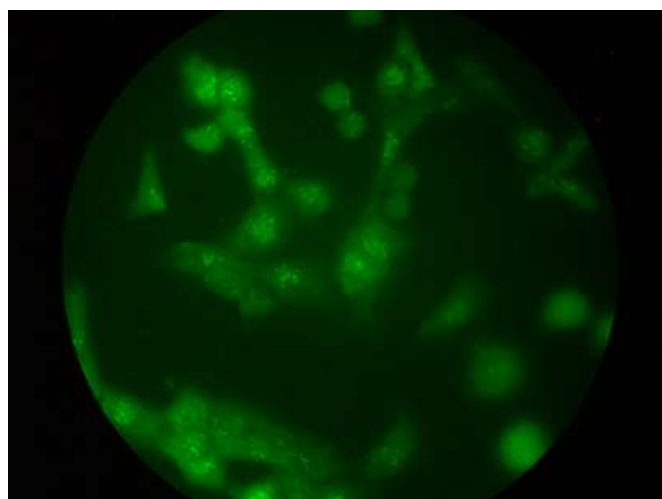
Θετικός μάρτυρας



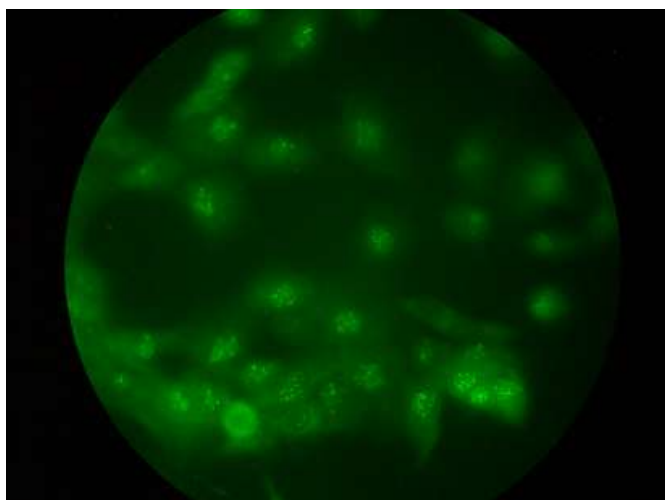
ADR (50nM)



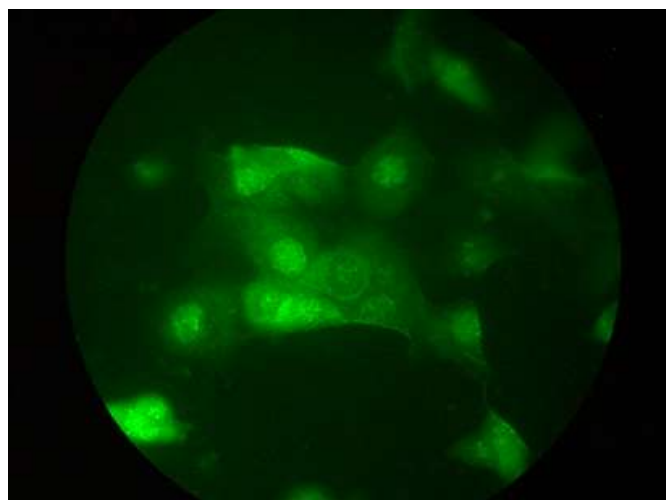
OLEU (200μg/mL)



ADR (50nM) + OLEU (100μg/mL)

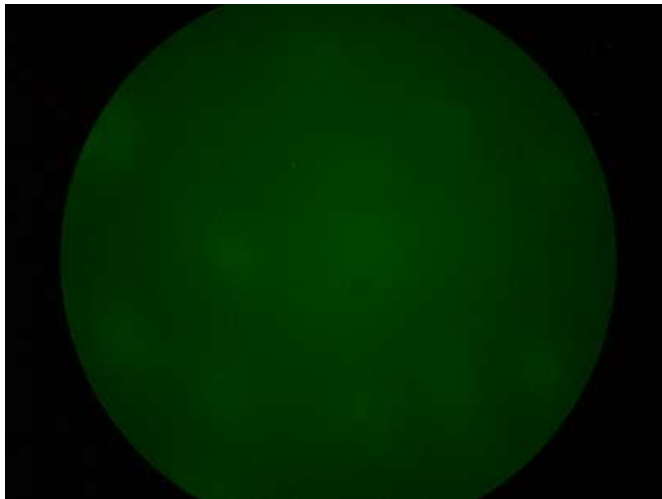


ADR (50nM) + OLEU (200μg/mL)

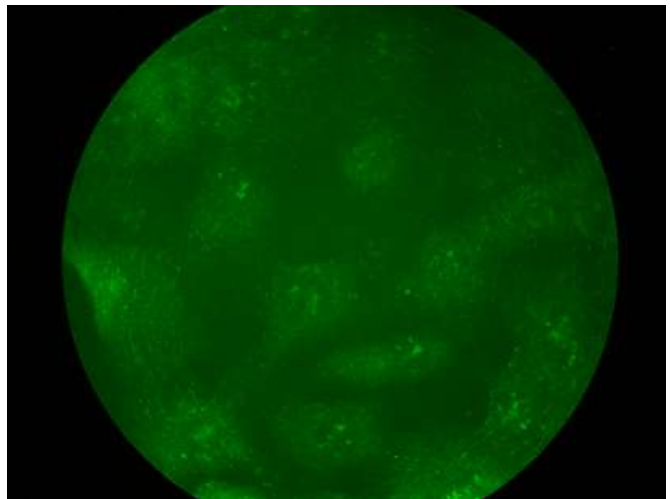


Εικ 39 : Ανίχνευση της LC3 και μελέτη της επίδρασης των διαφόρων παραγόντων στα ενδοκυττάρια επίπεδά της, στα κύτταρα PC-3 με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα-μάρτυρες (που δε δέχτηκαν καμία επίδραση) εμφανίζουν ασθενέστερο φθορισμό σε σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκαν οι μελετώμενες ουσίες και τα οποία εμφανίζουν ειδική περιπυρηνική εντόπιση της LC3. Οι αρνητικοί μάρτυρες δεν παρουσιάζουν ούτε πυρηνική ούτε κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού. Οι εικόνες ελήφθησαν με μεγέθυνση **60X**.

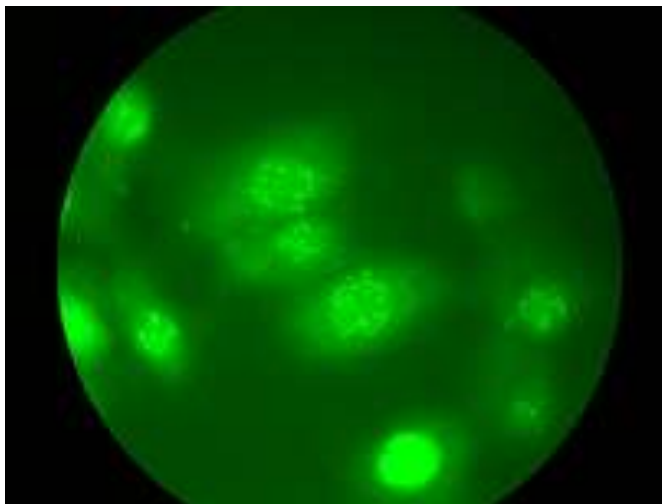
Αρνητικός μάρτυρας



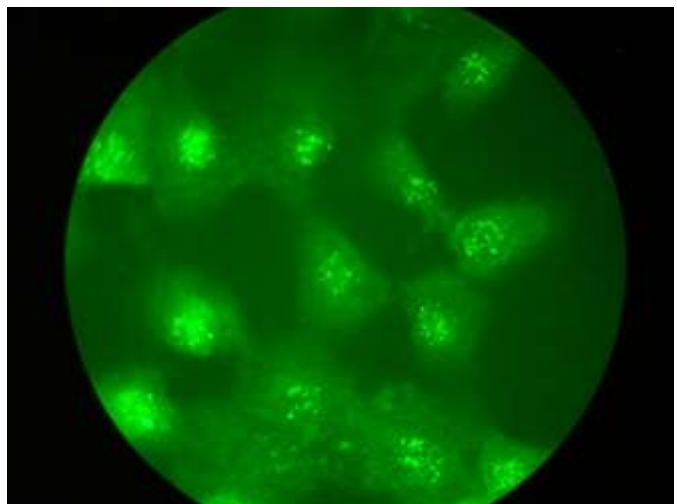
Θετικός μάρτυρας



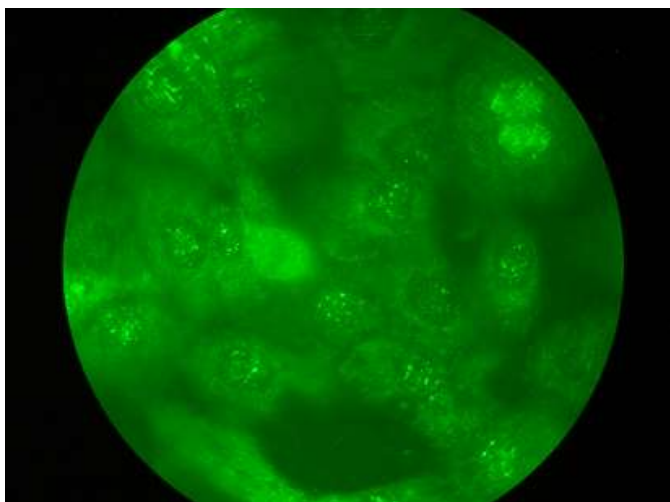
ADR (50nM)



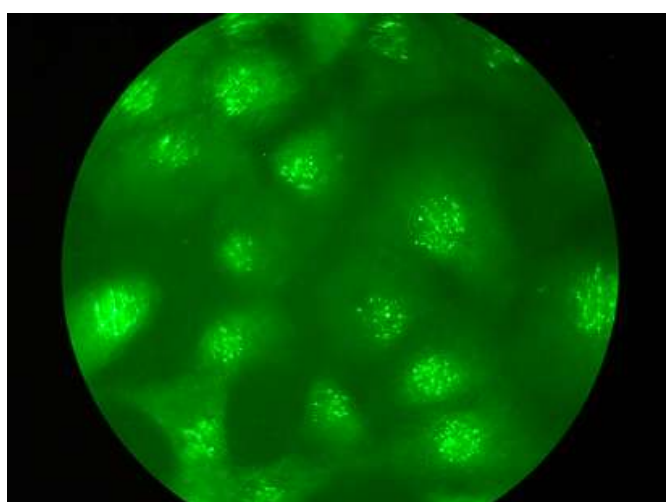
OLEU (200μg/mL)



ADR (50nM) + OLEU (100μg/mL)



ADR (50nM) + OLEU (200μg/mL)



Εικ 40: Ανίχνευση της LC3 και μελέτη της επίδρασης των διαφόρων παραγόντων στα ενδοκυττάρια επίπεδά της, στα κύτταρα PC-3 με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα-μάρτυρες (που δε δέχτηκαν καμία επίδραση) εμφανίζουν ασθενέστερο φθορισμό σε σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκαν οι μελετώμενες ουσίες και τα οποία εμφανίζουν ειδική περιπυρηνική εντόπιση της LC3. Οι αρνητικοί μάρτυρες δεν παρουσιάζουν ούτε πυρηνική ούτε κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού. Οι εικόνες ελήφθησαν με μεγέθυνση **100X**.

9.4 Αποτελέσματα ανάλυσης NMR

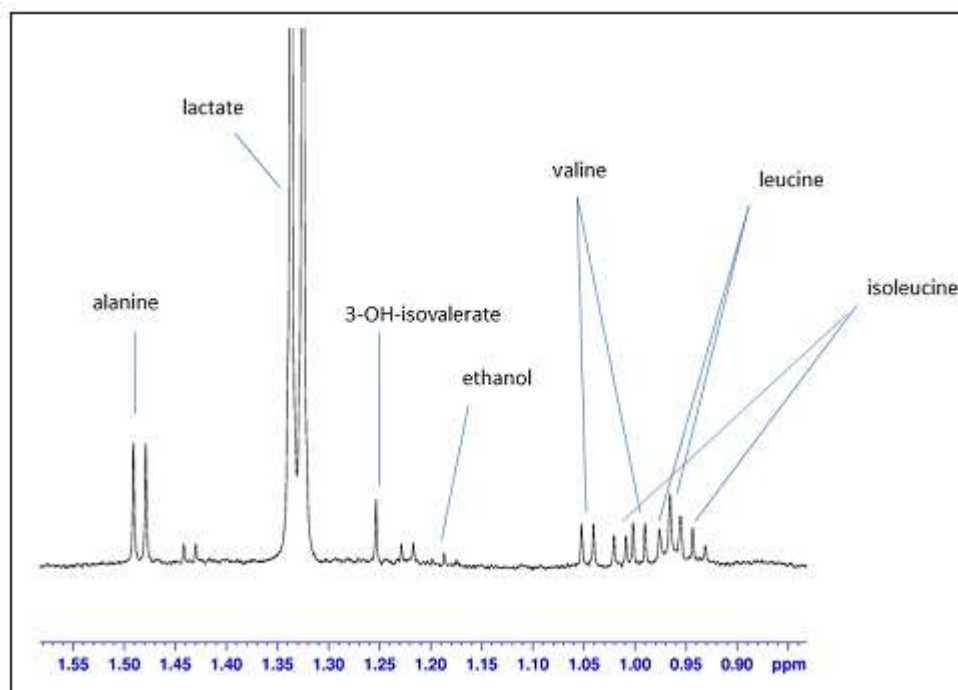
9.4.A Ταυτοποίηση μεταβολιτών

Πραγματοποιήθηκε η λήψη των φασμάτων NMR των υδατικών και οργανικών εκχυλισμάτων των κυττάρων της καρκινικής σειράς PC-3. Εν συνεχεία, μόνο τα υδατικά εκχυλίσματα υφίστανται επεξεργασία και ταυτοποίηση των μεταβολιτών που εμπεριέχονται σε αυτά. Είναι προφανές πως πρόκειται για μια περίπλοκη διαδικασία που απαιτεί ενδελεχή παρατήρηση τόσο των 1D όσο και των 2D φασμάτων και ταυτόχρονη μελέτη βιβλιογραφικών¹¹⁰⁻¹¹⁴ και ηλεκτρονικών¹¹⁵ βάσεων μεταβολιτών για την εξαγωγή της ακριβέστερης και ασφαλέστερης μεταβολικής πληροφορίας.

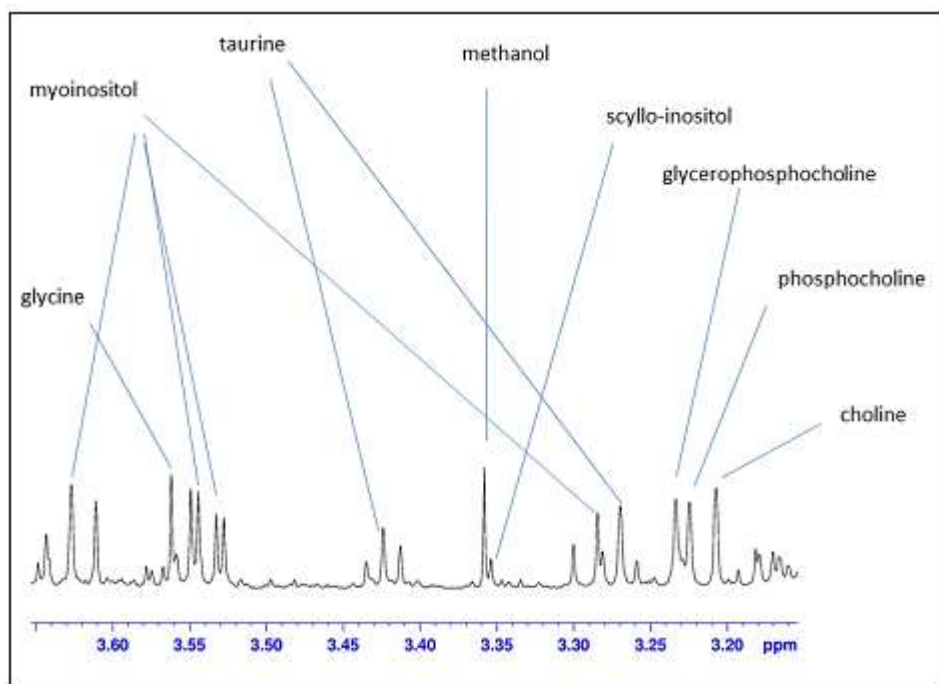
Συχνά στα μονοδιάστατα φάσματα NMR υπάρχει αλληλεπικάλυψη των κορυφών μεταβολιτών με παραπλήσιες χημικές μετατοπίσεις.

Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη σημασία της λήψης και δισδιάστατων φασμάτων J-resolved, COSY, TOCSY και HSQC-DEPT με στόχο την αποσαφήνιση της πολλαπλότητας των κορυφών του κάθε μεταβολίτη.

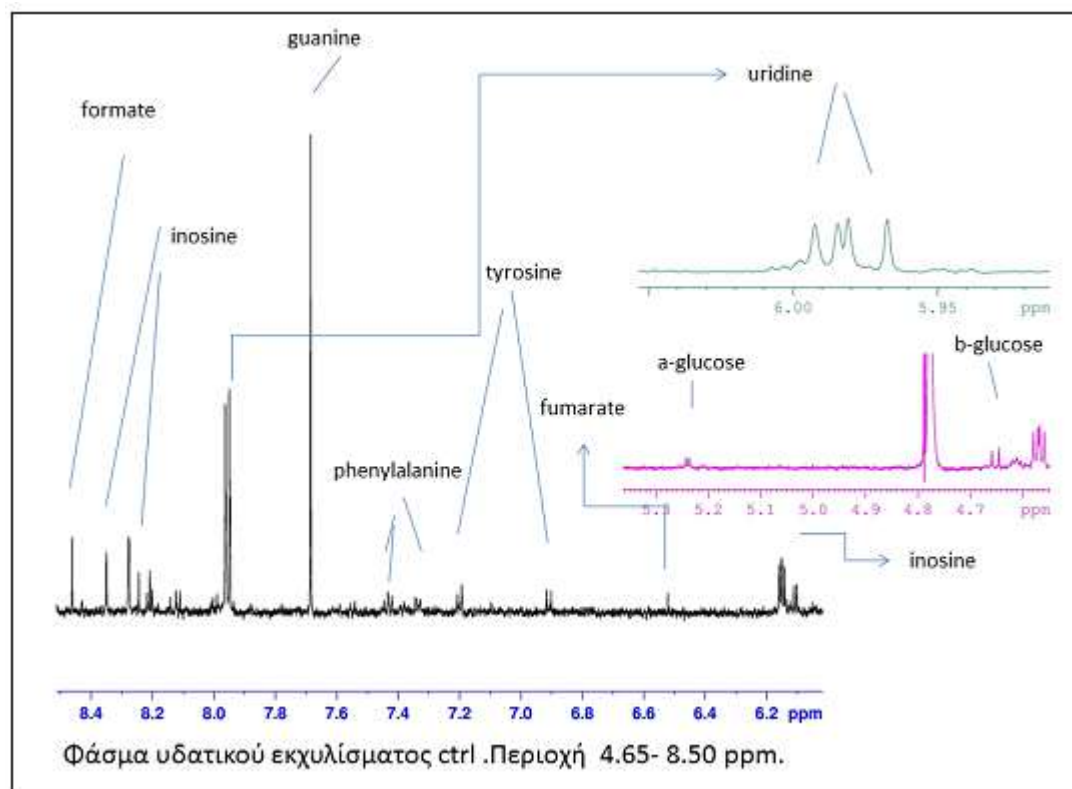
Για τα υδατικά εκχυλίσματα παρατίθενται ενδεικτικά οι παρακάτω εικόνες όπου σημειώνονται οι υπάρχοντες μεταβολίτες ενώ ακολουθεί και ο πίνακας που περιέχει το σύνολο αυτών.



Εικ 41: Φάσμα υδατικού εκχυλίσματος ομάδας αναφοράς. Περιοχή 0.90- 1.60 ppm. Διακρίνονται κατά σειρά αυξανόμενου πεδίου: ισολευκίνη, λευκίνη, βαλίνη, αιθανόλη, 3-OH-ισοβαλερικό οξύ, γαλακτικό οξύ, αλανίνη.

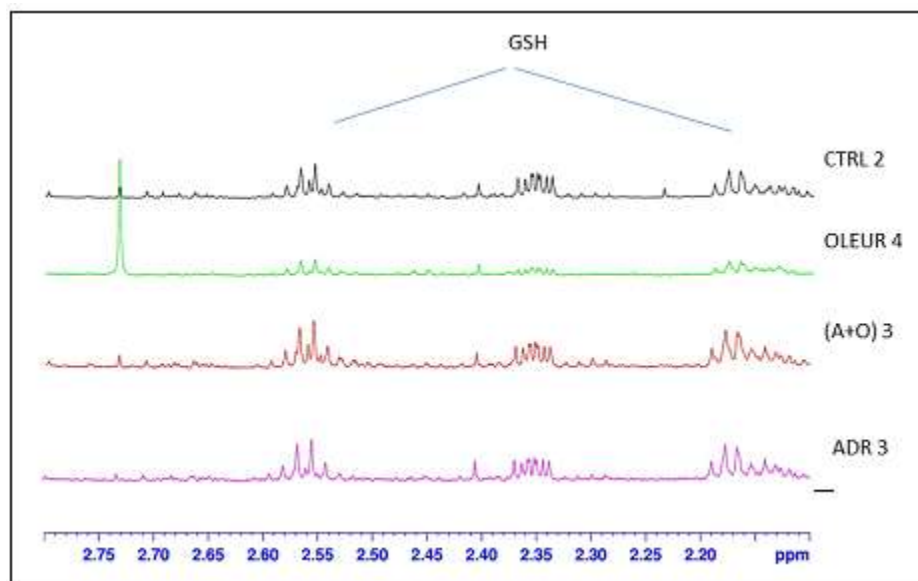


Εικ 42: Φάσμα υδατικού εκχυλίσματος ομάδας αναφοράς. Περιοχή 3.20- 3.65 ppm. Διακρίνονται: χολίνη, φωσφοχολίνη, γλυκεροφωσφοχολίνη, σκυλλο-ινοσιτόλη, μεθανόλη, ταυρίνη, μυο-ινοσιτόλη, γλυκίνη.



Εικ 43: Φάσμα υδατικού εκχυλίσματος ομάδας αναφοράς. Περιοχή 4.65-8.50 ppm. Διακρίνονται: γλυκόζη, φουμαρικό οξύ, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, διφωσφορικός γαλακτοζίτης ουριδίνης (uridine diphosphate galactose), γουανίνη, ινοσίνη, φορμικό οξύ.

Στην επόμενη εικόνα παρατίθενται τέσσερα φάσματα, ένα από κάθε μια από τις τέσσερις ομάδες που έχουν μελετηθεί: αναφοράς, ολεωρωπαΐνης, αδριαμυκίνης, ολεωρωπαΐνης και αδριαμυκίνης. Ακόμη και με απλή οπτική παρατήρηση διαφαίνεται η διαφορά στη συγκέντρωση του μεταβολίτη της ανοιγμένης γλουταθειόνης, ο οποίος έχει εξαιρετικά χαμηλή τιμή στην ομάδα της ολεωρωπαΐνης. Η διαπίστωση αυτή ερμηνεύεται αργότερα στο κεφάλαιο της συζήτησης.



Εικ 44: Ενδεικτικά φάσματα υδατικών εκχυλισμάτων προστατικών κυττάρων από όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν. Διαφορά στην γλουταθειόνη.

Ταυτοποιήθηκαν 39 μεταβολίτες ενώ βρέθηκαν ακόμη δυο (αιθανόλη: 1.18 ppm, acetone 2.23 ppm) σε περιοχές που αποκλείστηκαν από την ανάλυση και έτσι δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα ούτε συμμετέχουν στην εξαγωγή συμπερασμάτων στην στατιστική ανάλυση.

Πίνακας 6 : Ταυτοποιημένοι μεταβολίτες στα υδατικά εκχυλίσματα
προστατικών κυττάρων PC-3.

Metabolite	Assignment	Multiplicity	¹ H Chemical Shift (ppm)	¹³ C Chemical Shift (ppm)
isoleucine	δ-CH ₃	t	0.94	13,91
	β-CH ₃	d	1.01	
leucine	δ-CH ₃	d	0.96	23.57
	δ-CH ₃	d	0.97	24.79
	CH ₂	m	1.71	26.00
valine	CH ₃	d	0.99	
	CH ₃	d	1.04	
	β-CH	m	2.30	
	α-CH	d	3.62	
3 –hydroxy-isovalerate	CH ₃	s	1.25	
lactate	CH ₃	d	1.33	22.74
	CH	q	4.11	71.41
alanine	CH ₃	d	1.48	20.7
	CH	m	3.78	57.1
acetate	CH ₃	s	1.91	
glutamate	β-CH ₂	m	2.07	30
	γ-CH ₂	m	2.35	36.35
	α-CH	t	3.75	57.57
N-acetylcysteine	CH ₃	s	2.08	24.85
glutamine	β-CH ₂	m	2.13	29.9
	γ-CH ₂	m	2.44	33.0
	α-CH	t	3.77	55.0
glutathione reduced	CH ₂	m	2.17	28.99
	CH ₂	m	2.56	34.3
	CH ₂	dd	2.95	28.39
	CH, CH ₂	m	3.78	57.17,46.35
	CH	q	4.20	
pyruvate	CH ₃	s	2.40	30.6
succinate	CH ₂	s	2.42	
aspartate	β-CH ₂	dd	2.68	
	β-CH ₂	dd	2.82	
dimethylamine	CH ₃	s	2.73	37.77
dihydroorotate	CH ₂	dd	2.92	35.1
	CH ₂	dd	2.98	35.2
creatine/phosphocreatine	CH ₃	s	3.04	39.8
	CH ₂	s	3.93	56.78

Metabolite	Assignment	Multiplicity	¹ H Chemical Shift (ppm)	¹³ C Chemical Shift (ppm)
HEPES	CH ₂	t	3.06	59
	CH ₂	m	3.17	
	CH ₂	t	3.86	
malonate	CH ₂	s	3.15	50.3
choline	N(CH ₃) ₃	s	3.21	56.86
phosphocholine	N(CH ₃) ₃	s	3.22	56.8
glycerophosphocholine	N(CH ₃) ₃	s	3.23	56.8
taurine	CH ₂ SO ₃	t	3.27	50.6
	NCH ₂	t	3.43	38.17
myo-inositol	H5	t	3.28	76.9
	H1/H3	dd	3.53	74.14
	H4/H6	t	3.62	75.4
	H2	t	4.06	74.9
scyllo-inositol	CH	s	3.35	
methanol	CH ₃	s	3.36	52
glycine	CH ₂	s	3.56	44.29
α-glucose	H6/H5	dd	3.81	63,72
	H1	d	5.23	
β-glucose	H6	dd	3.88	63.2
	H1	d	4.65	
UDP-galactose	H6,H12,H13	m	4.24	105 91.37 144
	H6,H12,H13	m	4.30	
	H16,H17	m	4.37	
	H2	dd	5.52	
	H2	dd	5.55	
	H31	dd	5.97	
	H15	dd	5.98	
	H32	d	7.95	
AMP	H5	dd	4.37	72
	H3	m	4.53	
	H2	d	6.15	
	H12	s	8.21	
	H7	s	8.53	
inosine	H2	d	6.10	91.4
	H7	s	8.24	142
	H12	s	8.34	
3,5-ADP	H2	d	6.15	89.92
	H12	s	8.27	155
	H7	s	8.60	143
fumarate	CH	s	6.52	139

Metabolite	Assignment	Multiplicity	¹ H Chemical Shift (ppm)	¹³ C Chemical Shift (ppm)
tyrosine	H2/H6	d	6.91	120
	H3/H5	d	7.20	132
phenylalanine	H2/H6	d	7.33	
	H4	m	7.38	
	H3/H5	m	7.42	
guanine	CH	s	7.69	35.2
adenosine	H7	s	8.18	155
	H12	s	8.43	143
formate	CH	s	8.46	172

Επεξήγηση πίνακα: Στον πίνακα παρατίθενται τα ονόματα των μεταβολιτών, τα αντίστοιχα πρωτόνια που δίνουν τα σήματα των κορυφών, η πολλαπλότητα των κορυφών και οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και του άνθρακα.

Συντμήσεις: s: singlet= απλή κορυφή, d: doublet=διπλή κορυφή, dd:doublet of doublets=διπλή διπλών, t: triplet=τριπλή κορυφή, q: quartet=τετραπλή κορυφή, m: multiplet=πολλαπλή κορυφή.

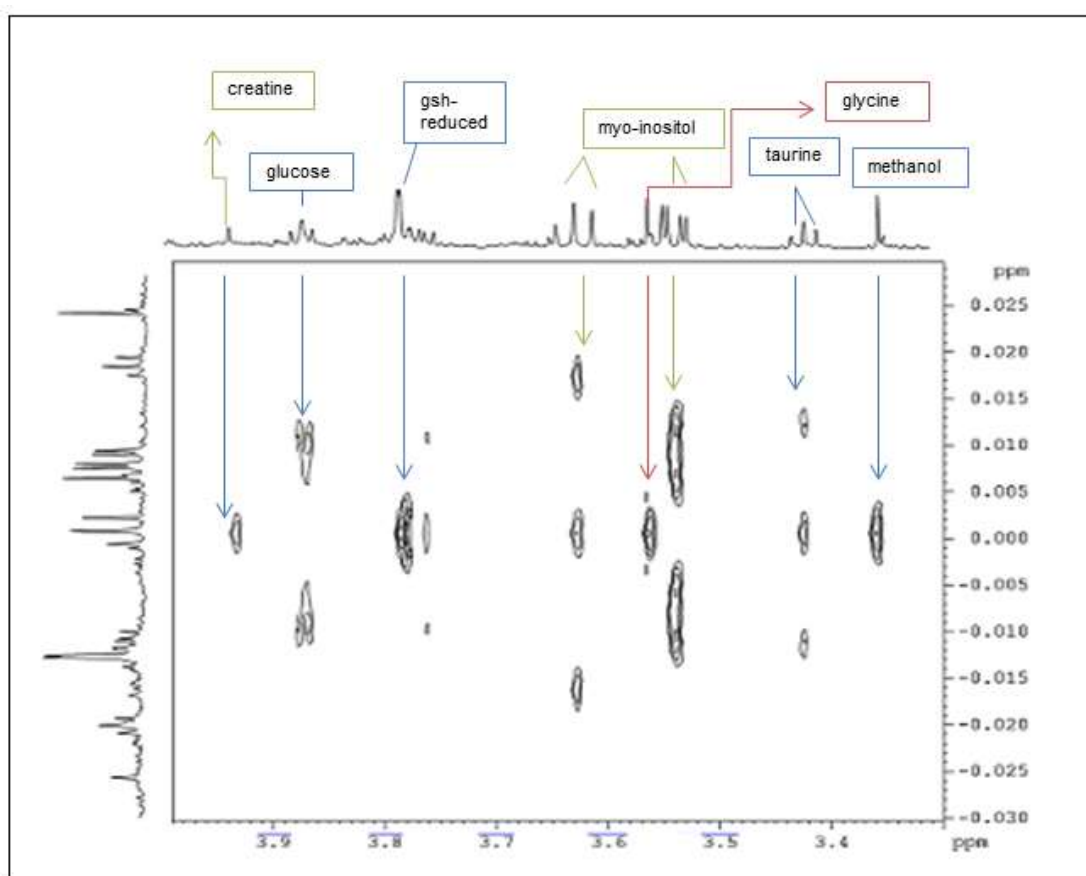
HEPES: {4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid}

UDP galactose: Uridine diphosphate galactose- διφωσφορικός γαλακτοζίτης ουριδίνης

AMP: Adenosine monophosphate- Μονοφωσφορική αδενοσίνη

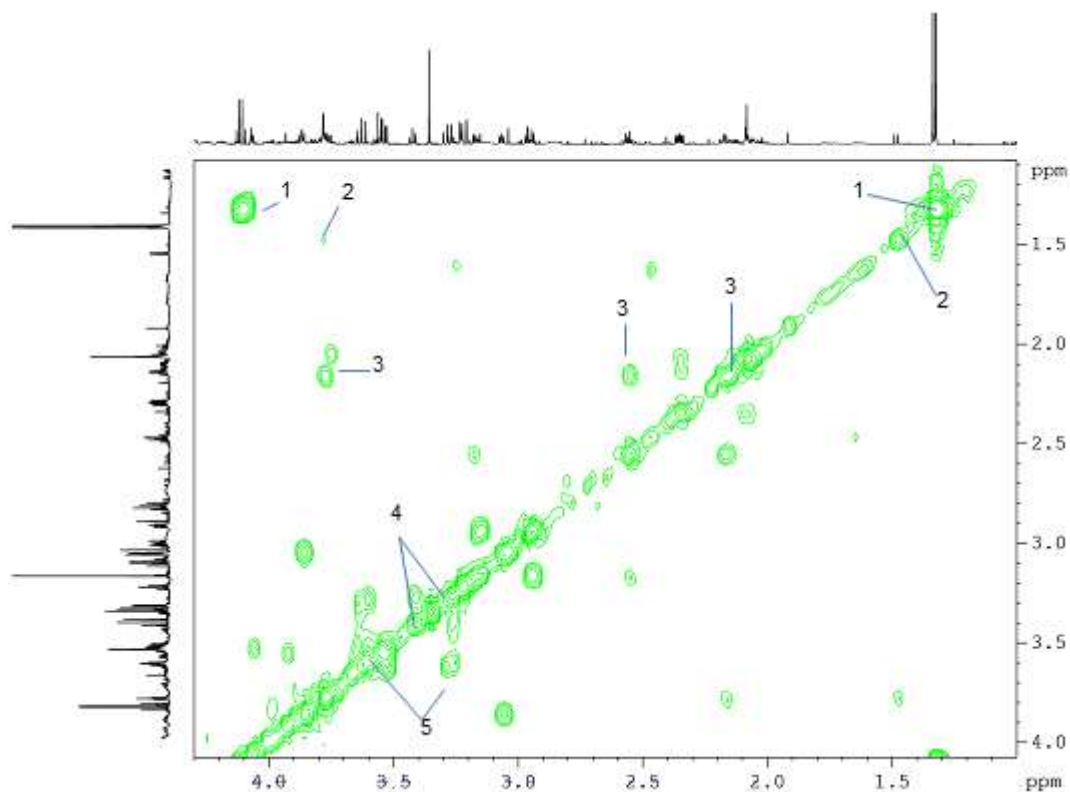
3,5-ADP: Adenosine 3',5'-diphosphate- Αδενοσίνη 3'-5' διφωσφορική

Παρακάτω παρατίθεται ένα φάσμα J-resolved της ομάδας αναφοράς στο οποίο αναγράφονται οι μεταβολίτες που αντιστοιχούν στις υπάρχουσες κορυφές και φαίνεται η σημασία της λήψης του στην αποσαφήνιση των αυτών, καθώς οι κορυφές της μυο-ινοσιτόλης και της γλυκίνης έχουν πολύ κοντινές χημικές μετατοπίσεις.



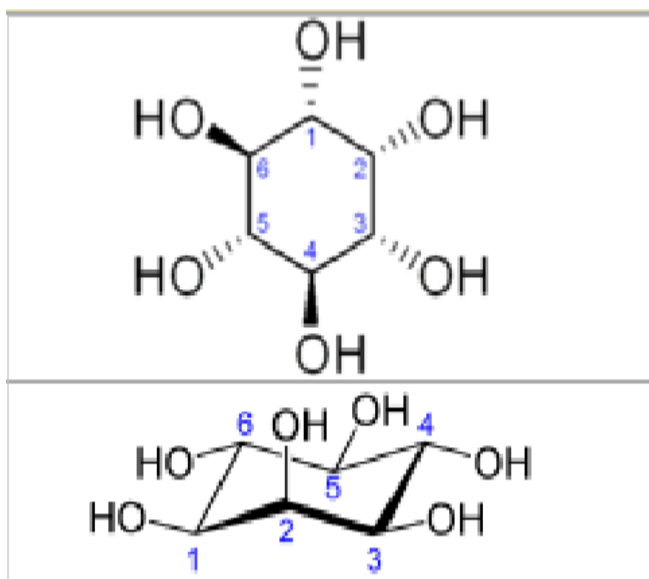
Εικ 45: J-resolved φάσμα υδατικού δείγματος ομάδας αναφοράς, εστιασμένο στην περιοχή 3.20-4.0 ppm. Σημειώνονται οι κορυφές και οι μεταβολίτες που τους αντιστοιχούν.

Στο φάσμα 2D COSY που ακολουθεί η αλειφατική περιοχή περιλαμβάνει πλήθος μεταβολιτών. Η προσεκτική παρατήρηση των κορυφών που βρίσκονται πάνω στην διαγώνιο και των κορυφών διασταύρωσης αποκαλύπτει συζεύξεις μεταξύ πρωτονίων του ίδιου μεταβολίτη διευκολύνοντας την ταυτοποίηση αυτών. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται και για την αρωματική περιοχή.

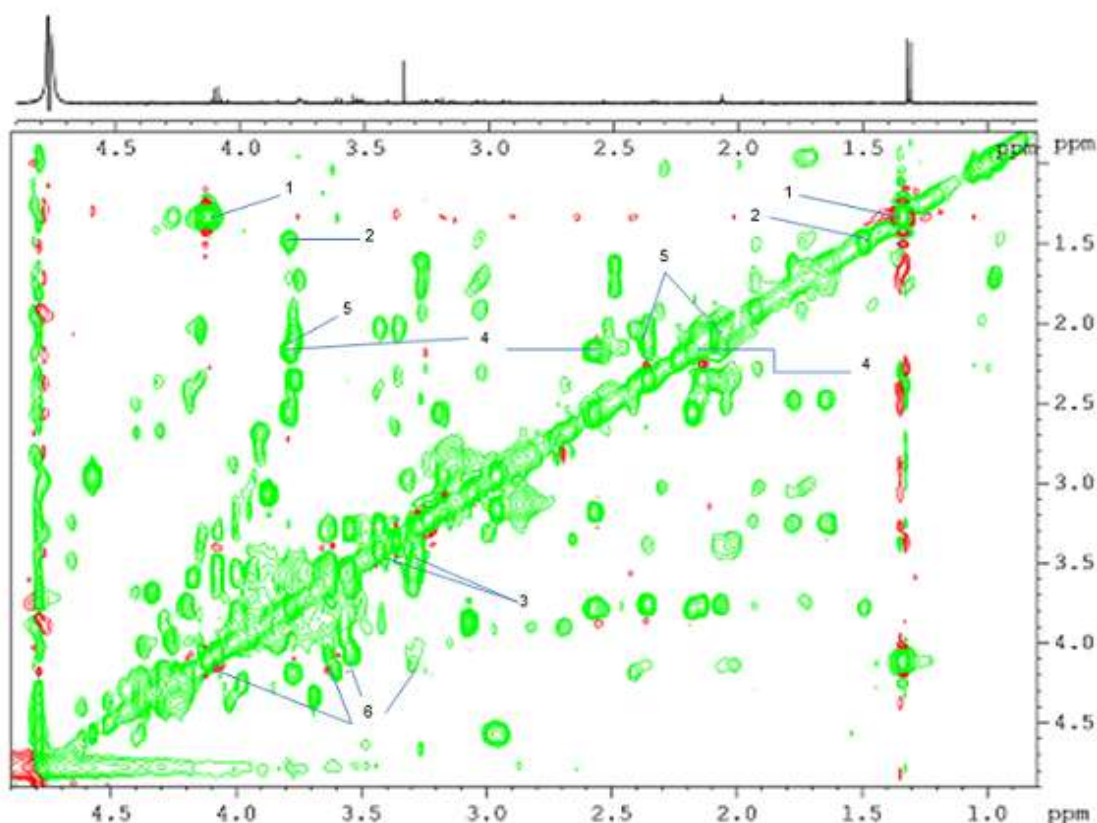


Εικ 46: ^1H - ^1H 2D COSY φάσμα υδατικού δείγματος της ομάδας αναφοράς, εστιασμένο στην περιοχή 1.0-4.20 ppm. Ενδεικτικά σημειώνονται μερικές μόνο από τις υπάρχουσες συσχετίσεις: 1.Γαλακτικό οξύ (σύζευξη 1.33-4.11ppm), 2.Αλανίνη (σύζευξη 1.48-3.76ppm), 3.Ανηγμένη γλουταθειόνη (σύζευξη 2.17-3.78ppm και 2.17-2.55ppm), 4.Ταυρίνη (σύζευξη 3.27-3.43ppm) και 5.Μυο-ινοσιτόλη(σύζευξη 3.28-3.62ppm).

Ακολουθεί ένα φάσμα 2D TOCSY με τους υπάρχοντες μεταβολίτες. Σε ένα φάσμα TOCSY είναι ορατές συζεύξεις όλου του spin system έως και 5 δεσμούς μακριά οι οποίες δεν φαίνονται στο φάσμα COSY. Έτσι σε αυτό περιέχονται σημαντικές -για την ταυτοποίηση-πληροφορίες στην περίπτωση αλληλεπικάλυψης πολλαπλών κορυφών. Επίσης παρατίθεται η δομή της μυο-ινοσιτόλης ώστε να γίνουν κατανοητές οι συζεύξεις που εντοπίζονται στο φάσμα.



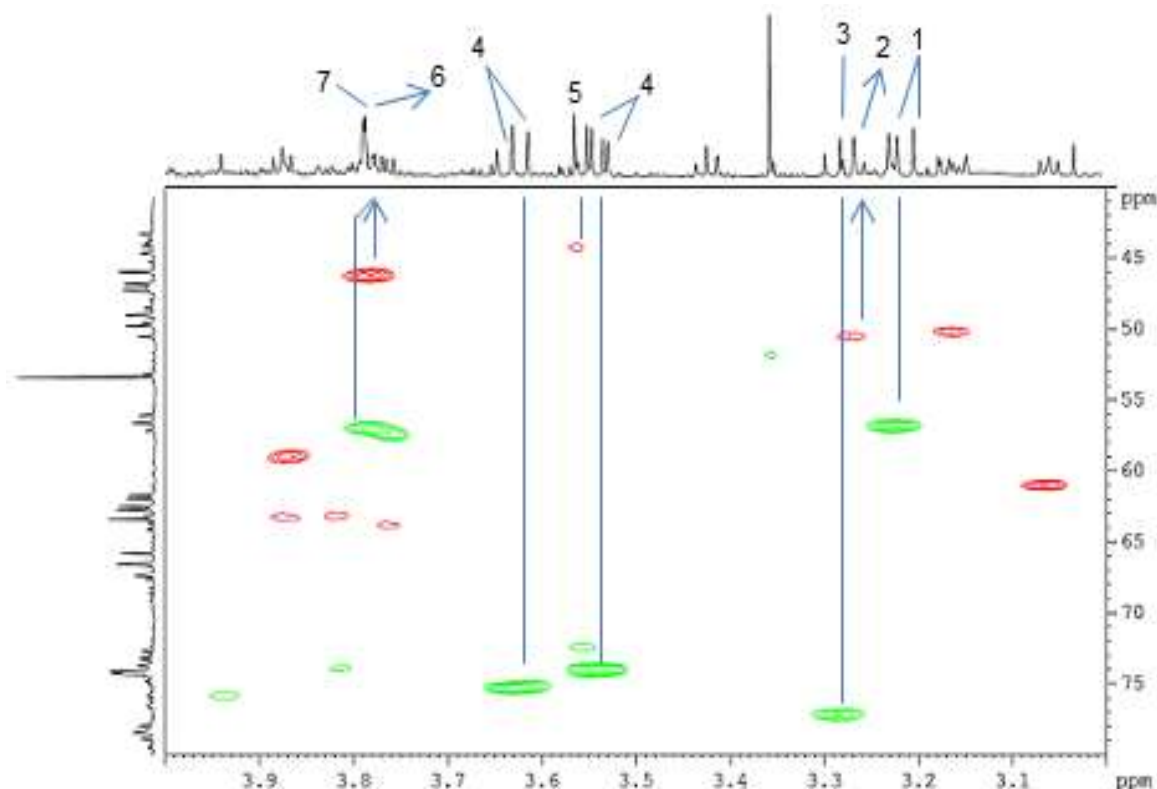
Εικ 47: Δομή μυο-ινοσιτόλης. Πρόκειται για μια κυκλική πολυαλκοόλη η οποία παρουσιάζει στο δισδιάστατο φάσμα TOCSY σύζευξη μεταξύ των κορυφών των πρωτονίων της στις παρακάτω μετατοπίσεις: 3.28-3.53-3.62-4.06ppm. Η σύζευξη αυτή επισημαίνεται με το νούμερο 6 στο φάσμα: 1H-1H 2D TOCSY που ακολουθεί.



Εικ 48: ^1H - ^1H 2D TOCSY φάσμα υδατικού δείγματος της ομάδας ctrl, εστιασμένο στην περιοχή 1.0-4.60 ppm. Ενδεικτικά σημειώνονται μερικές μόνο από τις υπάρχουσες συσχετίσεις: 1.Γαλακτικό οξύ (σύζευξη 1.33-4.11ppm), 2.Αλανίνη (σύζευξη 1.48-3.76ppm), 3.Ταυρίνη (σύζευξη 3.27-3.43ppm), 4.Ανηγμένη γλουταθειόνη (σύζευξη 2.17-2.55-3.78ppm), 5.Γλουταμικό οξύ (σύζευξη 2.07-2.35-3.77ppm) και **6.Μυο-ινοσιτόλη (σύζευξη 3.29-3.53-3.62-4.06ppm)**.

Τελευταίο παρατίθεται το ετεροπυρηνικό φάσμα ^1H - ^{13}C DEPT 135-HSQC στο οποίο η μαγνήτιση μεταφέρεται από το πρωτόνιο στον άνθρακα και μετά από χρόνο t_1 επιστρέφει σε αυτό. Το σύστημα CH_2 απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα ενώ τα συστήματα CH και CH_3 απεικονίζονται με πράσινο.

Πρόκειται για σημαντικό πείραμα που επιβεβαιώνει μέσω της συσχέτισης του πρωτονίου με τον αντίστοιχο άνθρακα, τις αμφιλεγόμενες περιπτώσεις μεταβολιτών όπως αυτούς στην περιοχή 3.75-3.78 ppm. Όπως φαίνεται στην εικόνα (οι αριθμοί 6 και 7), οι συσχετίσεις των gsh reduced και glutamate των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι παραπλήσιες (γύρω στα 3.76ppm), είναι αντίθετης φάσης και έτσι είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους.



Εικ 49: ^1H - ^{13}C DEPT 135-HSQC φάσμα υδατικού δείγματος της ομάδας ctrl, εστιασμένο στην περιοχή 3.1-3.9ppm. Σημειώνονται οι συσχετίσεις των πρωτονίων με τους αντίστοιχους άνθρακες. Οι μεταβολίτες είναι: 1.Ομάδα χολίνης (χολίνη, φωσφοχολίνη, γλυκεροφωσφοχολίνη) στα 56ppm, 2.Ταυρίνη στα 50.6ppm, 3.4. Μυο-ινοσιτόλη στα 77, 74 και 75ppm, 5.Γλυκίνη στα 44ppm, 6.Ανηγμένη γλουταθειόνη στα 46ppm και 7.Γλουταμικό οξύ στα 57ppm.

9.4.B Στατιστική επεξεργασία

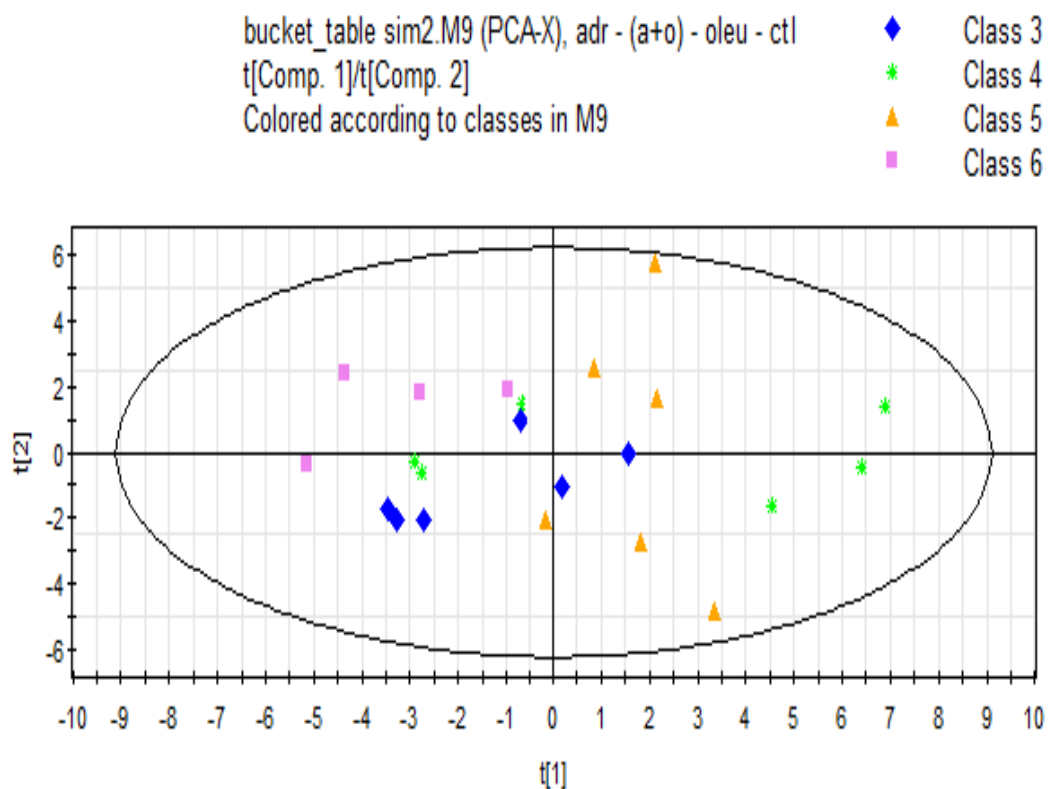
PCA ΚΑΙ PLS-DA διαγράμματα τιμών και φορτίων-Λίστες VIP

Μια μεταβιομική μελέτη ολοκληρώνεται με την χρήση στατιστικών μεθόδων που ομαδοποιούν τα περίπλοκα φασματικά δεδομένα και αποκαλύπτουν τους παράγοντες εκείνους που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των παρατηρήσεων επιτρέποντας την εξαγωγή συμπερασμάτων. Χωρίς την στατιστική επεξεργασία, δεν είναι δυνατόν να εξαχθεί σημαντική πληροφορία λόγω της πολυπλοκότητας των πειραματικών δεδομένων.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι προβολής PCA: Principal Component Analysis δηλαδή Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών και PLS-DA: Partial Least Squares Discriminant Analysis δηλαδή Μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων Διαχωριστικής Ανάλυσης σε εκχυλίσματα καρκινικών κυττάρων PC-3 που ελήφθησαν μετά από κυτταροκαλλιέργειες. Συνοπτικά να υπενθυμιστεί ότι μελετήθηκαν τέσσερις ομάδες εκχυλισμάτων. Ομάδα αναφοράς στην οποία τα κύτταρα δεν υπέστησαν καμμία επίδραση, ομάδα αδριαμικίνης στην οποία χορηγήθηκε στα κύτταρα δόση 100nM , ομάδα ολεωρωπαΐνης στην οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση 100ug/mL και τέλος ομάδα συγχορήγησης αδριαμικίνης 100nM και ολεωρωπαΐνης 100ug/mL. Οι επιδράσεις παρέμειναν στα κύτταρα για 48 ώρες και στη συνέχεια έγινε συλλογή αυτών και εκχύλιση.

Τα φάσματα των εκχυλισμάτων υπέστησαν μια αρχική επεξεργασία με την διαδικασία που ήδη έχει περιγραφεί οπότε και σχηματίστηκαν μητρικοί πίνακες δεδομένων και στη συνέχεια με το λογισμικό SIMCA P-11.5 εφαρμόστηκαν οι χημειομετρικές τεχνικές.

Αρχικά για να δοθεί μια γενική θεώρηση και εικόνα του πειράματος παρατίθεται το ακόλουθο διάγραμμα τιμών που περιλαμβάνει όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν. Σε αυτό φαίνεται μια τάση διαχωρισμού των ομάδων παρά την μεγάλη διασπορά των δειγμάτων.



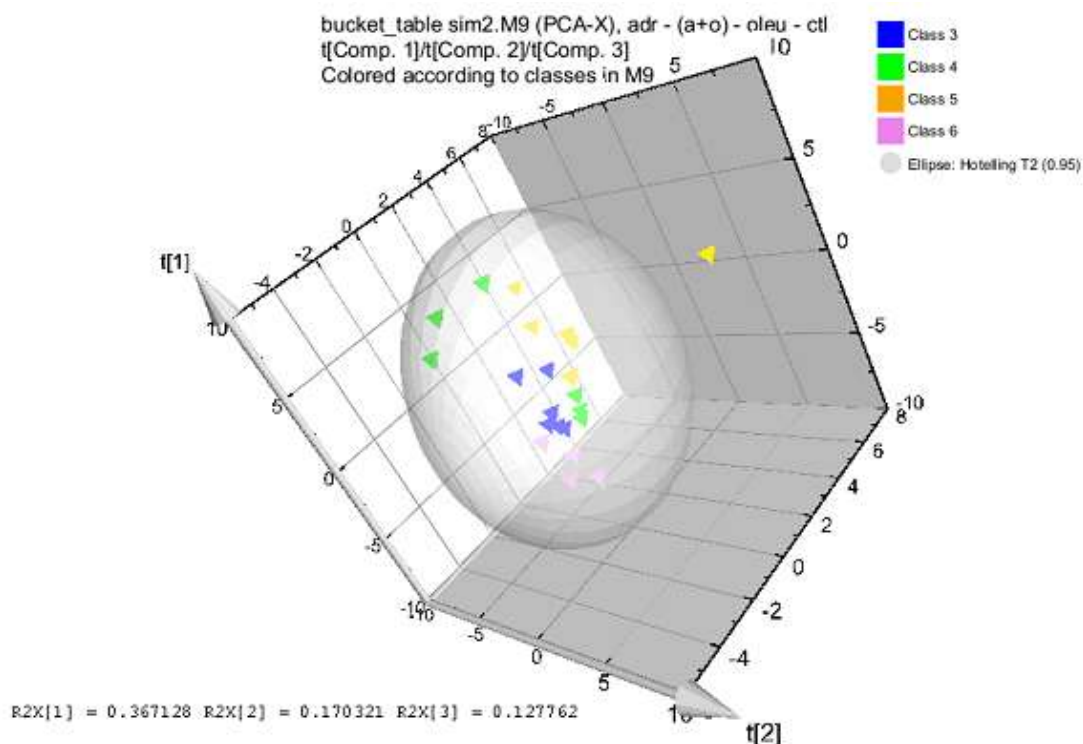
R2X[1] = 0.367128

R2X[2] = 0.170321

Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

Εικ 50: PCA διάγραμμα τιμών (par) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμκίνης (class 3), συγχωρήγησης αδριαμκίνης και ολευρωπαΐνης (class 4), ολευρωπαΐνης (class 5) και της ομάδας ελέγχου (class 6). $R2X(1)=0.367$ και $Q2(1)=0.26$. $R2X(2)=0.537$.

Στο αντίστοιχο τρισδιάστατο διάγραμμα, η ομαδοποίηση είναι πιο ευκρινής. Φαίνεται παρακάτω.

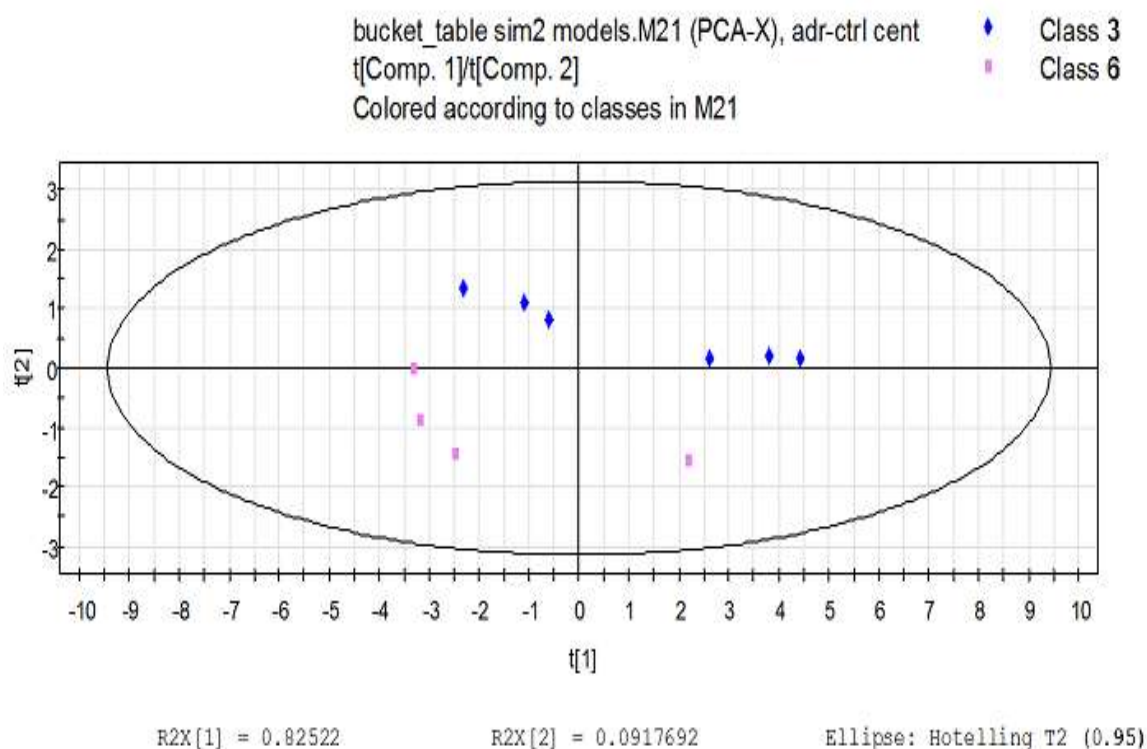


Εικ 51: Τρισδιάστατο PCA διάγραμμα τιμών (par) φασμάτων ^1H -NMR υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμκίνης (class 3), συγχορήγησης αδριαμκίνης και ολεωρωπαΐνης (class 4), ολεωρωπαΐνης (class 5) και της ομάδας ελέγχου (class 6). $R^2X(1)=0.367$ και $R^2X(2)=0.17$ και $R^2X(3)=0.128$.

Από τα διαγράμματα όλων των ομάδων φαίνεται μια τάση διαφοροποίησης αυτών. Στην συνέχεια παρατίθενται διαγράμματα που συγκρίνουν τις ομάδες ανα δύο μεταξύ τους.

9.4.B1 Ομάδες αδριαμυκίνης (adr) – αναφοράς (ctrl)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε Principal Component Analysis μεταξύ ομάδας αδριαμυκίνης και ομάδας αναφοράς, προκειμένου να διερευνηθεί κάποια τάση διαχωρισμού μεταξύ τους.



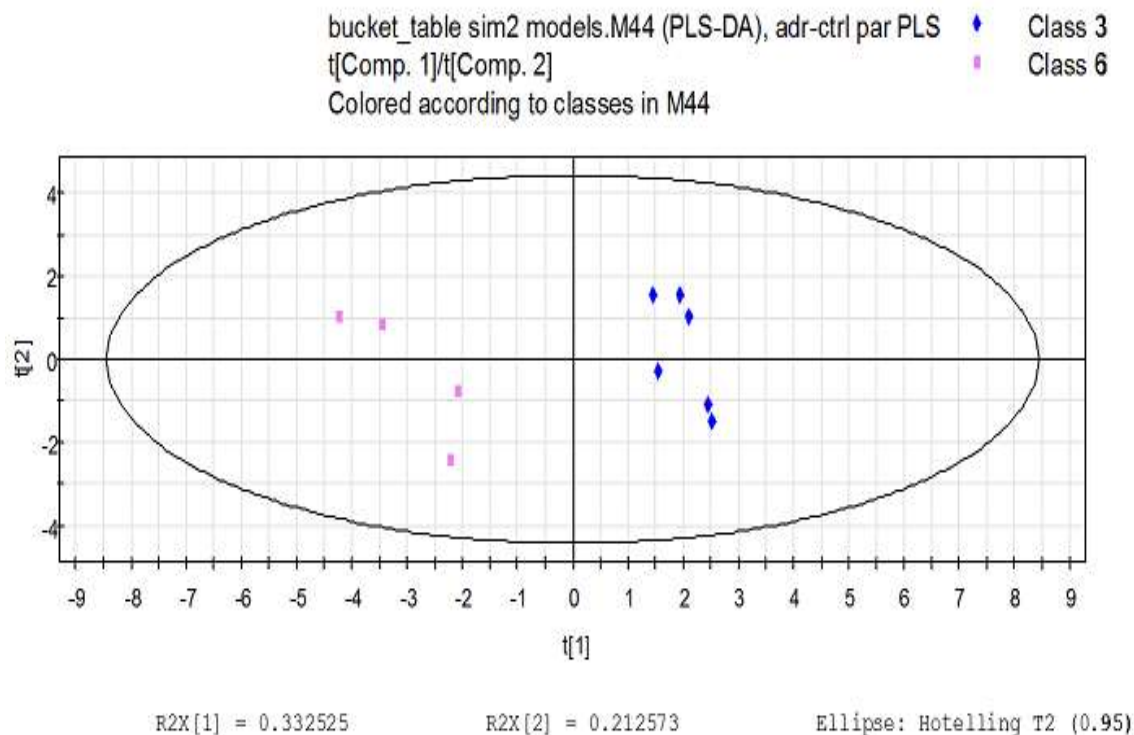
Εικ 52: PCA διάγραμμα τιμών (cent) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμυκίνης (class 3) και της ομάδας ελέγχου (class 6). $Q2(1)=0.15$, $Q2(2)=0.32$

Στο διάγραμμα τιμών (scatter plot) PCA μεταξύ ομάδας αδριαμυκίνης και ομάδας αναφοράς παρατηρείται μια τάση διαχωρισμού αυτών με τη δεύτερη συνιστώσα.

Ακολούθως, εφαρμόστηκε Partial Least Squares Discriminant Analysis αφού πρώτα ορίστηκαν οι δύο ομάδες.

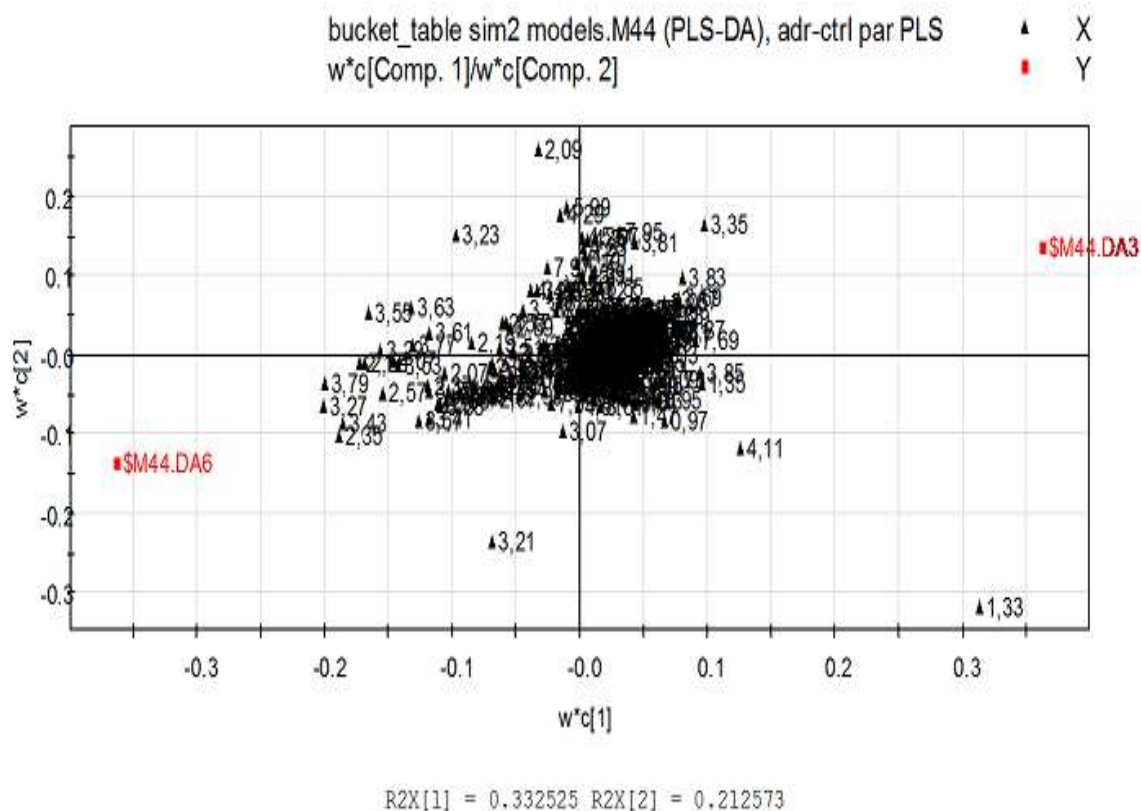
Στο αντίστοιχο διάγραμμα τιμών PLS-DA μεταξύ των ίδιων ομάδων παρατηρείται μικρότερη διασπορά των παρατηρήσεων και διαχωρισμός αυτών με την πρώτη συνιστώσα.

Και με τις δύο τεχνικές, τα δείγματα της κάθε ομάδας εμφανίζουν μεταξύ τους ανομοιογένεια και έναν βαθμό διασποράς. Αυτός δικαιολογείται από το γεγονός ότι πρόκειται για εκχυλίσματα από ζωντανά κύτταρα με ενεργό μεταβολισμό του οποίου η διακοπή όσο ταυτόχρονα και αν έγινε προσπάθεια να επιτευχθεί, δεν είναι δυνατόν να γίνει σε ποσοστό 100 %.



Εικ 53: PLS-DA διάγραμμα τιμών (par) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμυκίνης (class 3) και της ομάδας ελέγχου (class 6). $R^2Y(1)=0.935$ $Q^2(1)=0.78$. $R^2Y(2)=0.04$.

Στο συμπληρωματικό διάγραμμα φορτίων (loading plot) διακρίνονται εκείνες οι τιμές που είναι υπεύθυνες για τον διαχωρισμό των ομάδων στο διάγραμμα τιμών. Με την ταυτοποίηση των μεταβολιτών που έχει προηγηθεί, εντοπίζονται οι μεταβολίτες που αντιστοιχούν σε αυτές τις τιμές. Ενδεικτικά, στις δύο εξεταζόμενες ομάδες φαίνεται να διαδραματίζουν διαχωριστικό ρόλο μεταξύ άλλων οι παρακάτω: γαλακτικό οξύ (1.33 και 4.11 ppm), ταυρίνη (3.27) και ανηγμένη γλουταθειόνη (3.79ppm).



Εικ 54: PLS-DA διάγραμμα φορτίων φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμυκίνης (class 3) και της ομάδας ελέγχου (class 6).

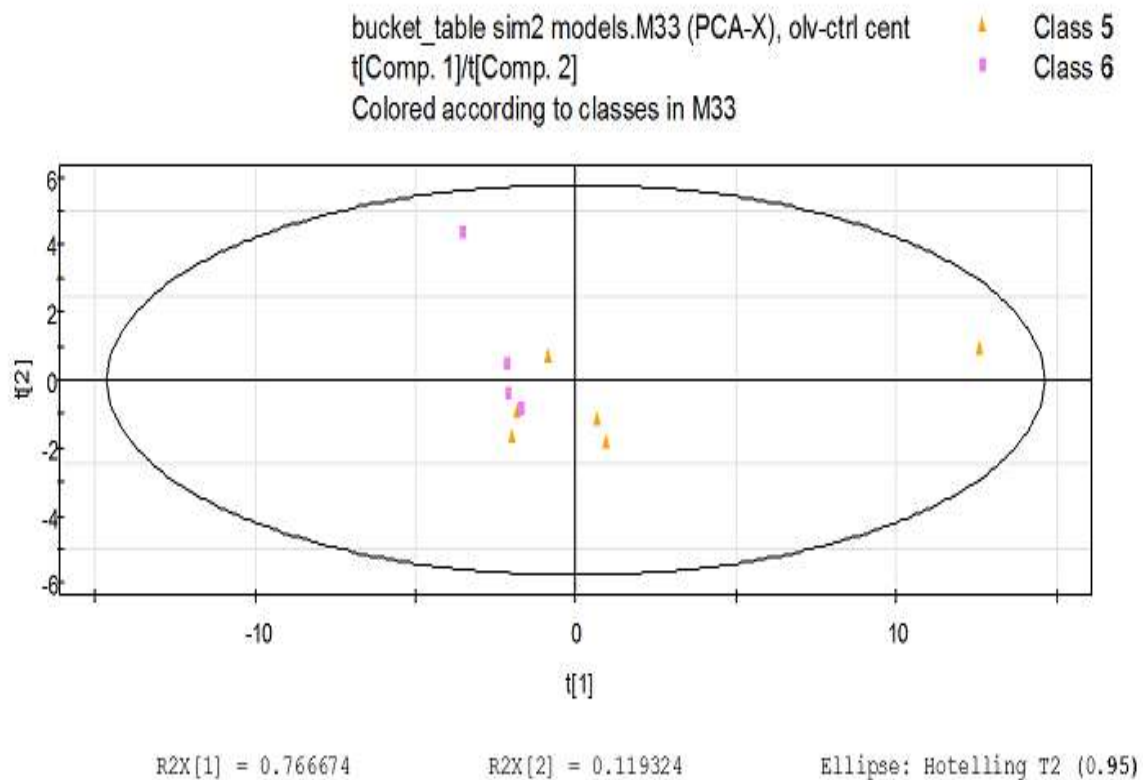
Προκειμένου να ληφθεί μία πιο λεπτομερής εικόνα των παραμέτρων που επηρεάζουν τον διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων αδριαμυκίνης και αναφοράς, χρησιμοποιείται η Λίστα Σημαντικών Μεταβλητών, η Variable Importance List, η οποία λαμβάνεται μέσω του λογισμικού SIMCA P-11.5. Η λίστα περιλαμβάνει με φθίνουσα σειρά επίδρασης (πάνω η μεταβλητή με την πιο σημαντική επίδραση ενώ κάτω η λιγότερο σημαντική μεταβλητή) τις δώδεκα πρώτες παραμέτρους που καθορίζουν τον διαχωρισμό. Η λίστα αυτή φαίνεται παρακάτω:

Var ID (Primary)	M44.VIP[3]	METABOLITES
1,33	6,37166	lactate
3,27	3,90903	taurine
3,79	3,8802	gsh reduced
2,35	3,68363	glutamate
3,43	3,61987	taurine
2,17	3,34019	gsh reduced
2,55	3,26849	gsh reduced
3,55	3,23152	myoinositol
3,29	3,03478	myoinositol
2,57	2,99384	gsh reduced
4,07	2,85356	myoinositol
3,53	2,77118	myoinositol
3,63	2,59561	

Εικ 55: Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στον διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων, αδριαμυκίνης (class 3) και ελέγχου (class 6), που διαφαίνονται στο PLS-DA διάγραμμα τιμών.

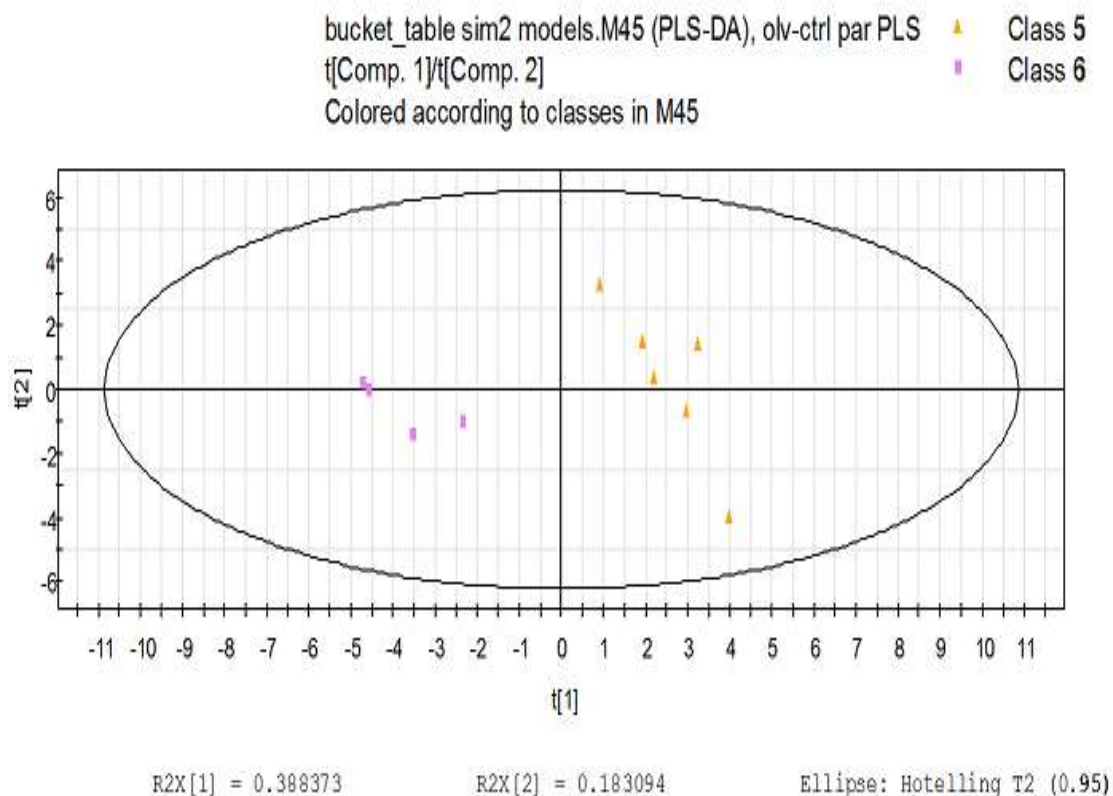
9.4.B2 Ομάδες ολεωρωπαΐνης (oleu) – αναφοράς (ctrl)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε Principal Component Analysis μεταξύ ομάδας ολεωρωπαΐνης και ομάδας αναφοράς, προκειμένου να διερευνηθεί κάποια τάση διαχωρισμού μεταξύ τους. Οι παρατηρήσεις της ομάδας της ολεωρωπαΐνης δεν φαίνεται να παρουσιάζουν σαφή διαχωρισμό από όλες τις παρατηρήσεις της ομάδας αναφοράς.

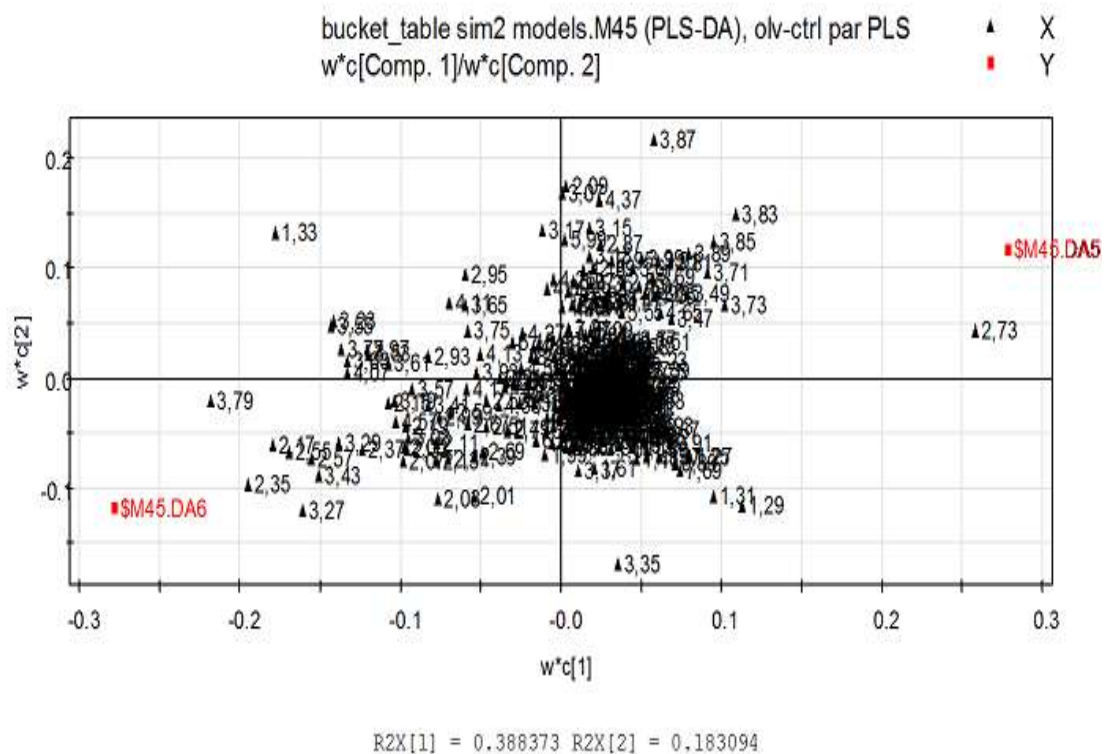


Εικ 56: PCA διάγραμμα τιμών (cent) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας ολεωρωπαΐνης (class 5) και της ομάδας ελέγχου (class 6).

Ακολουθώντας μετά την εφαρμογή της PLS-DA παρατίθεται το αντίστοιχο διάγραμμα τιμών στο οποίο φαίνεται σαφέστερα ο διαχωρισμός των δύο ομάδων καθώς και το διάγραμμα φορτίων.



Εικ 57: PLS-DA διάγραμμα τιμών (par) φασμάτων ^1H -NMR υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας ολεωρωπαίνης (class 5) και της ομάδας ελέγχου (class 6). $R^2Y(1)=0.91$ $Q^2(1)=0.86$. $R^2Y(2)=0.05$ $Q^2(2)=0.07$



Εικ 58: PLS-DA διάγραμμα φορτίων φασμάτων ¹H-NMR υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας ολεωρωπαΐνης (class 5) και της ομάδας ελέγχου (class 6).

Τελευταία παρατίθεται η VIP list των πιο σημαντικών για τον διαχωρισμό μεταβολιτών.

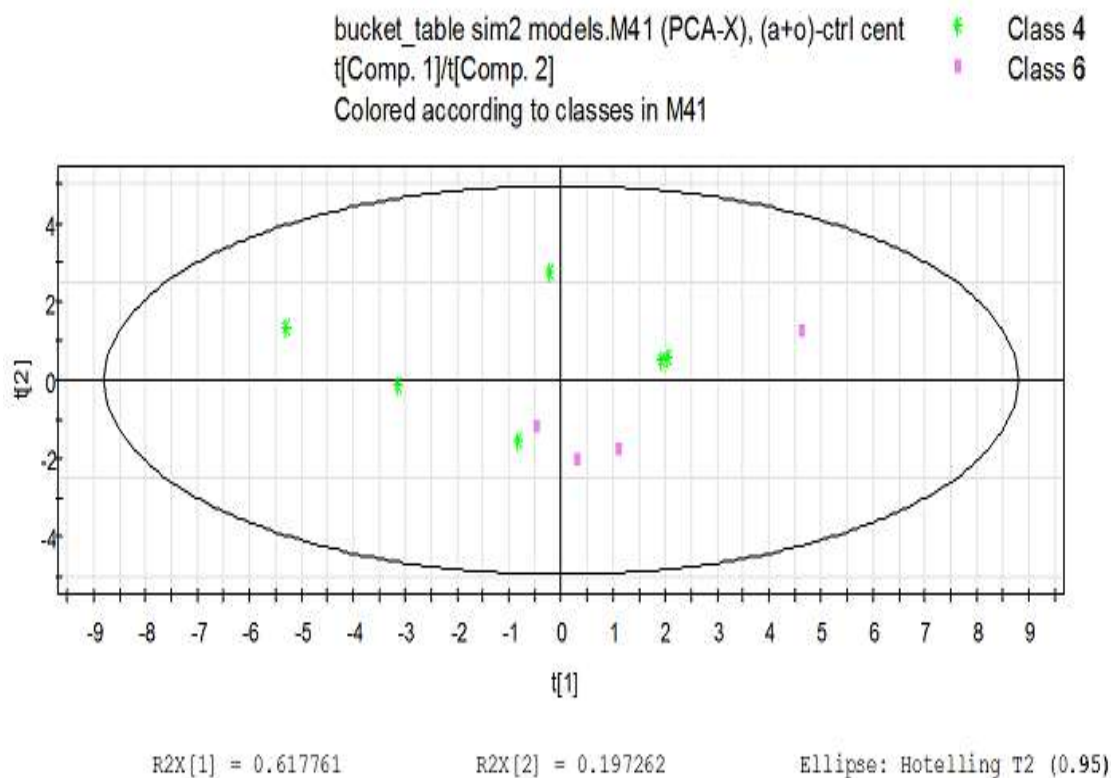
Var ID (Primary)	M45.VIP[3]	METABOLITES
2,73	5,27276	dimethylamine
3,79	4,21145	gsh reduced
2,35	3,77485	glutamate
1,33	3,63411	lactate
2,17	3,46703	gsh reduced
2,55	3,27695	gsh reduced
3,27	3,14703	taurine
2,57	3,01395	gsh reduced
3,43	2,9397	taurine
3,55	2,7812	myoinositol
3,23	2,75442	glucero-phospho choline
3,29	2,68134	myoinositol
3,77	2,65078	

Εικ 59: Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στον διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων, ολεωρωπαΐνης (class 5) και ελέγχου (class 6) που διαφαίνονται στο PLS-DA διάγραμμα τιμών.

9.4.B3 Ομάδες συγχωρήγησης ολεωρωπαΐνης και αδριαμυκίνης (adr+oleu) – αναφοράς (ctrl)

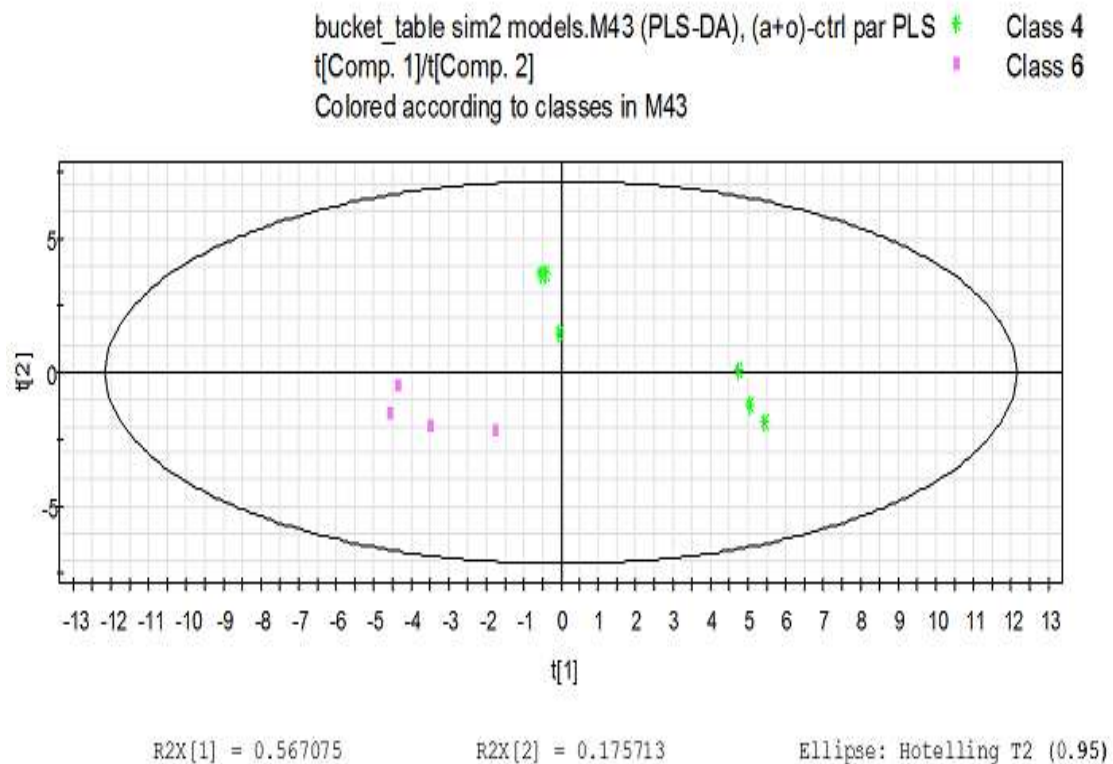
Με την εφαρμογή της Principal Component Analysis επιδιώκεται να ανιχνευθεί κάποια διαχωριστική τάση μεταξύ της ομάδας στην οποία έγινε συγχωρήγηση αδριαμυκίνης και ολεωρωπαΐνης και της ομάδας αναφοράς. Ένας στοιχειώδης διαχωρισμός υπάρχει, αλλά η ομάδα της συγχωρήγησης φαίνεται μοιρασμένη, καθώς σχεδόν τα μισά δείγματα της διαφοροποιούνται από τα άλλα μισά.

Πρόεκυψε το ακόλουθο διάγραμμα τιμών :



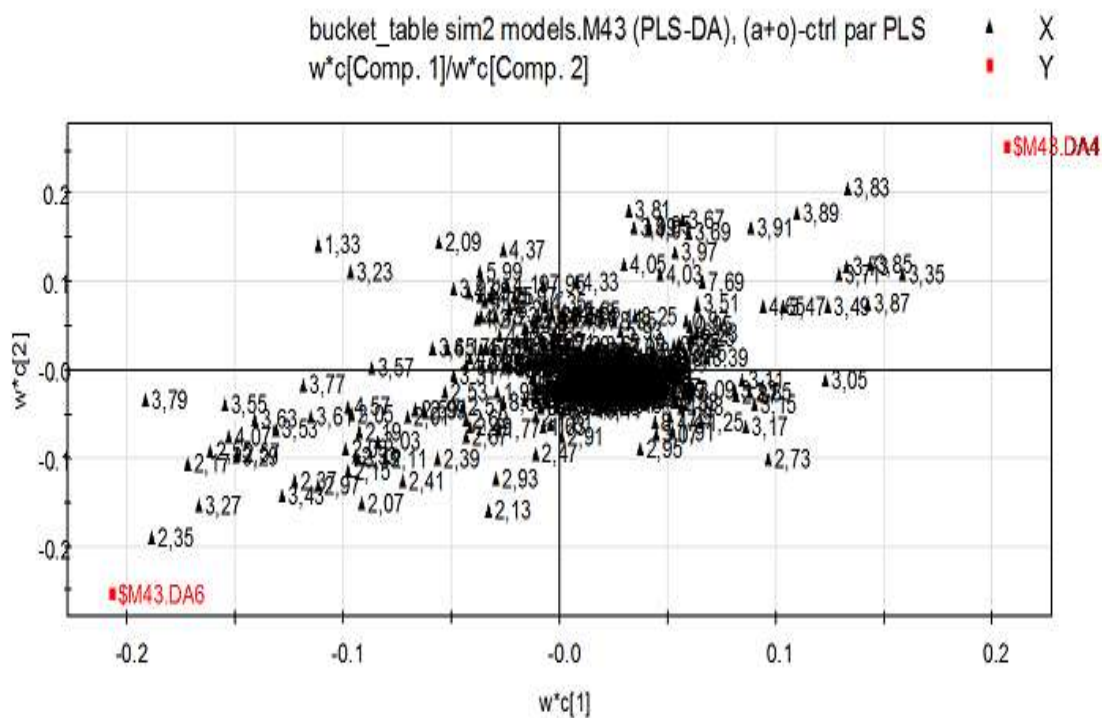
Εικ 60: PCA διάγραμμα τιμών (cent) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας συγχωρήγησης αδριαμυκίνης-ολευρωπαΐνης (class 4) και της ομάδας ελέγχου (class 6). $Q^2(1)=0.16$ $Q^2(2)=0.03$.

Στη συνέχεια το διάγραμμα τιμών με προσαρμογή κλίμακας pareto που προέκυψε από την εφαρμογή της PLS-DA δίνει μια πιο σαφή εικόνα για τις δύο ομάδες αλλά τα δείγματα της ομάδας της συγχωρήγησης φαίνεται και πάλι να διαφοροποιούνται μεταξύ τους.



Εικ 61: PLS-DA διάγραμμα τιμών (par) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας συγχωρήγησης αδριαμυκίνης-ολευρωπαΐνης (class 4) και της ομάδας ελέγχου (class 6). $R^2Y(1)=0.63$ $Q^2(1)=0.5$. $R^2Y(2)=0.33$ $Q^2(2)=0.8$.

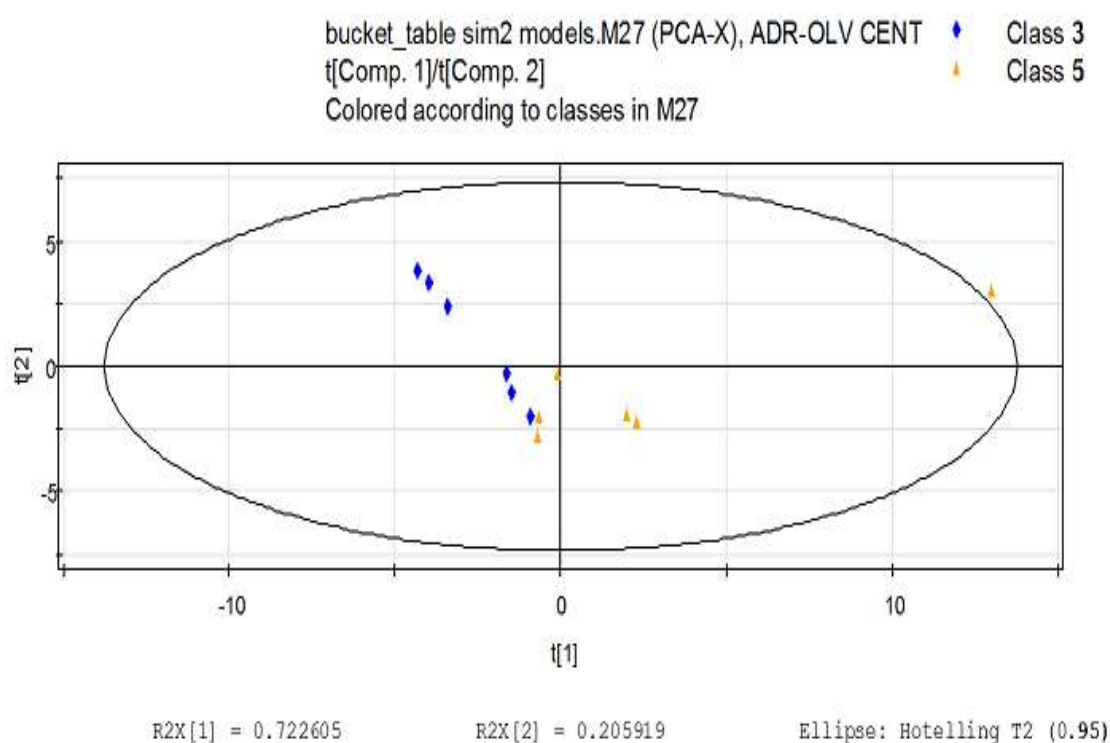
Ακολουθεί το συμπληρωματικό διάγραμμα φορτίων PLS-DA το οποίο επιβεβαιώνει ότι η μεγάλη διασπορά των δειγμάτων της ομάδας της συγχωρήγησης, ενδεχομένως να οφείλεται αφενός στο ότι δεν έχουν όλα κοινά χαρακτηριστικά και αφετέρου στο ότι διαφοροποιούνται από τα δείγματα της ομάδας αναφοράς εξαιτίας κάποιου μεταβολίτη που είναι διαφορετικός για το κάθε δείγμα, γεγονός που μπορεί να φανερώνει στοιχεία για τον μηχανισμό δράσης των δυο παραγόντων.



9.4.B4 Ομάδες αδριαμυκίνης (adr) – ολευρωπαΐνης (oleu)

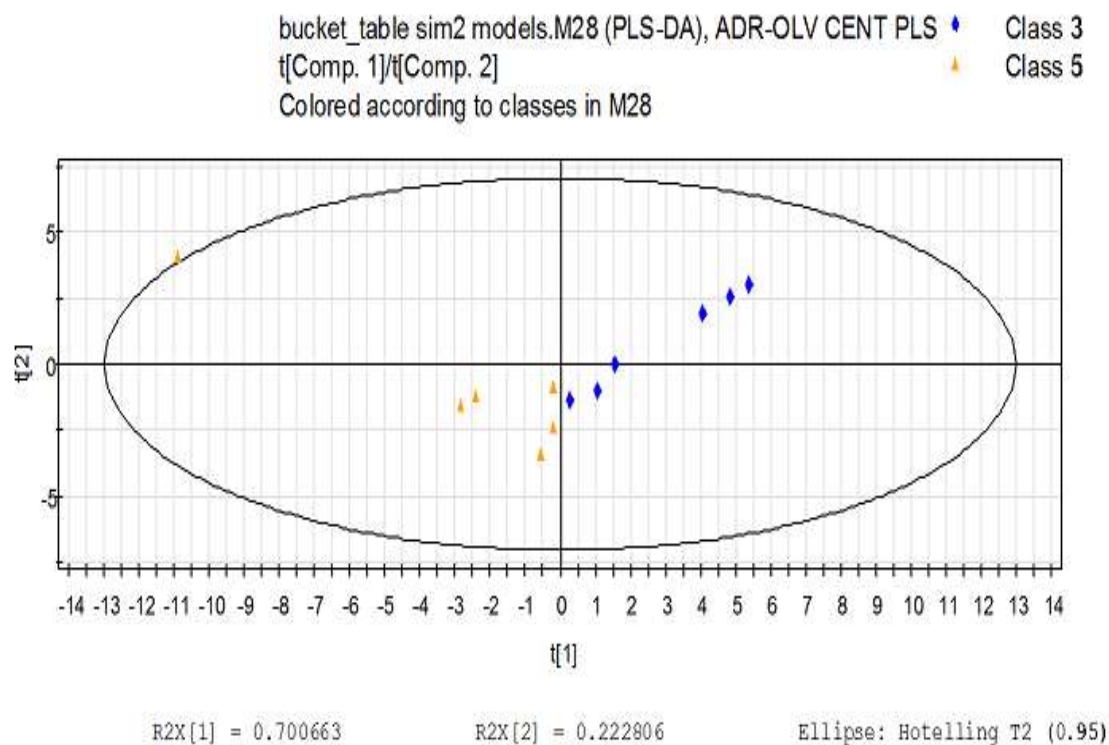
Αφού πραγματοποιήθηκε η σύγκριση όλων των ομάδων που δέχθηκαν επιδράσεις με τους παράγοντες αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη με την ομάδα αναφοράς, ακολούθησε σύγκριση των ομάδων αυτών μεταξύ τους.

Αρχικά μελετήθηκε η ύπαρξη διαφορών μεταξύ των ομάδων αδριαμυκίνης και ολευρωπαΐνης με την εφαρμογή της PCA οπότε και προέκυψε το διάγραμμα τιμών που ακολουθεί στο οποίο φαίνεται και η παρουσία μιας έκτροπης τιμής.



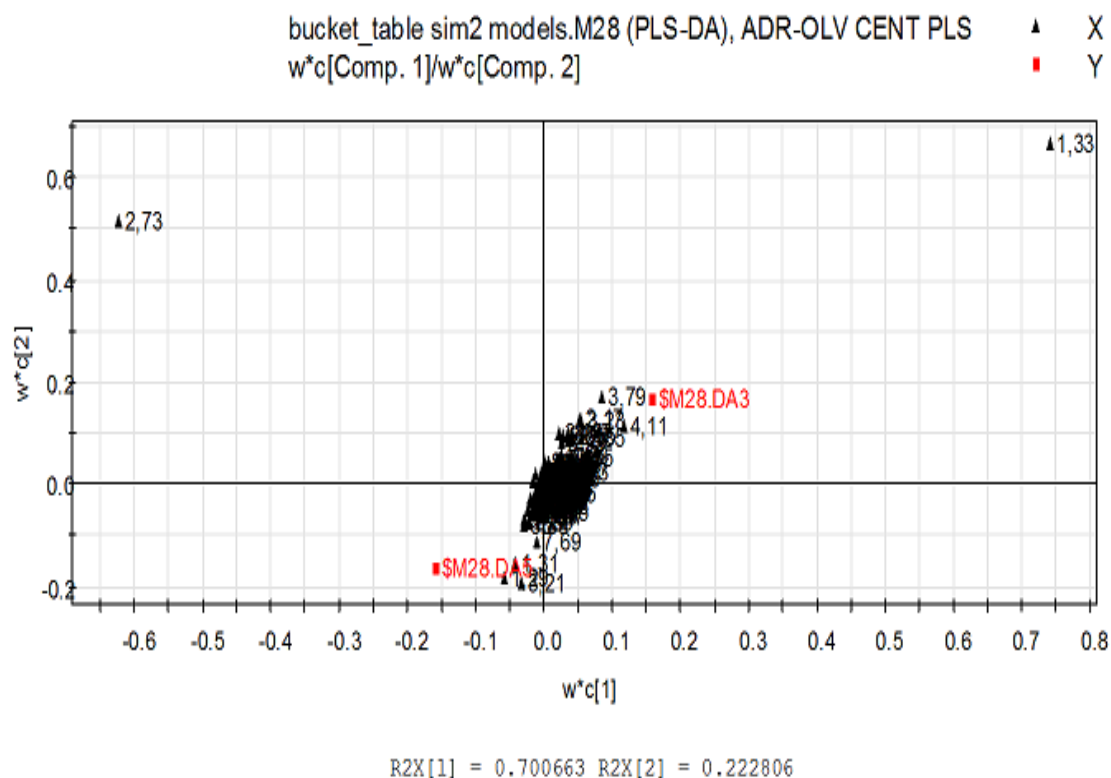
Εικ 64: PCA διάγραμμα τιμών (cent) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμυκίνης (class 3) και της ομάδας ολευρωπαΐνης (class 5).

Στη συνέχεια η εφαρμογή της PLS-DA οδήγησε στο ακόλουθο διάγραμμα τιμών όπου οι ομάδες διαχωρίζονται καλύτερα με την πρώτη συνιστώσα ενώ εντοπίζεται και η έκτροπη τιμή.



Εικ 65: PLS-DA διάγραμμα τιμών (cent) φασμάτων ^1H -NMR υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμυκίνης (class 3) και της ομάδας ολεωρωπαΐνης (class 5). $R2Y(1)=0.47$ $Q2(1)=0.41$. $R2Y(2)=0.15$ $Q2(2)=0.2$.

Το συμπληρωματικό του διάγραμμα φορτίων ακολουθεί παρακάτω.



Εικ 66: PLS-DA διάγραμμα φορτίων φασμάτων ^1H -NMR υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμυκίνης (class 3) και της ομάδας ολεωρωπαΐνης (class 5).

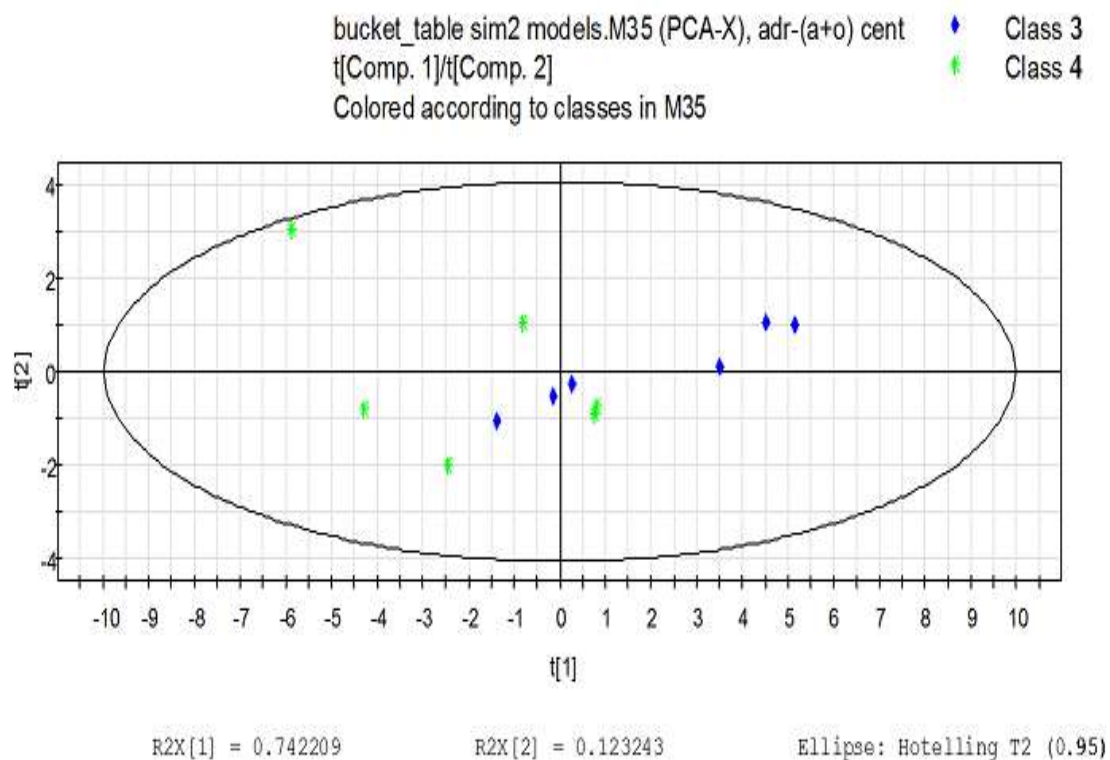
Μια πιο ενδελεχής μελέτη των μεταβολιτών που είναι υπεύθυνοι για την διαφοροποίηση των ομάδων προκύπτει από την Variable Importance List που ακολουθεί.

Var ID (Primary)	M28.VIP[6]	METABOLITES
1,33	11,4794	lactate
2,73	10,5957	dimethylamine
3,21	4,18927	choline
1,29	3,27059	
3,35	2,94646	scylloinositol
1,31	2,69485	lactate
3,07	2,36487	
3,79	2,25544	gsh reduced
2,17	2,05424	gsh reduced
3,05	2,0035	
3,87	1,93435	glucose
2,95	1,87632	gsh reduced
4,11	1,84142	lactate

Εικ 67: Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στον διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων, αδριαμυκίνης (class 3) και ολεωρωπαΐνης (class 5) που διαφαίνονται στο PLS-DA.

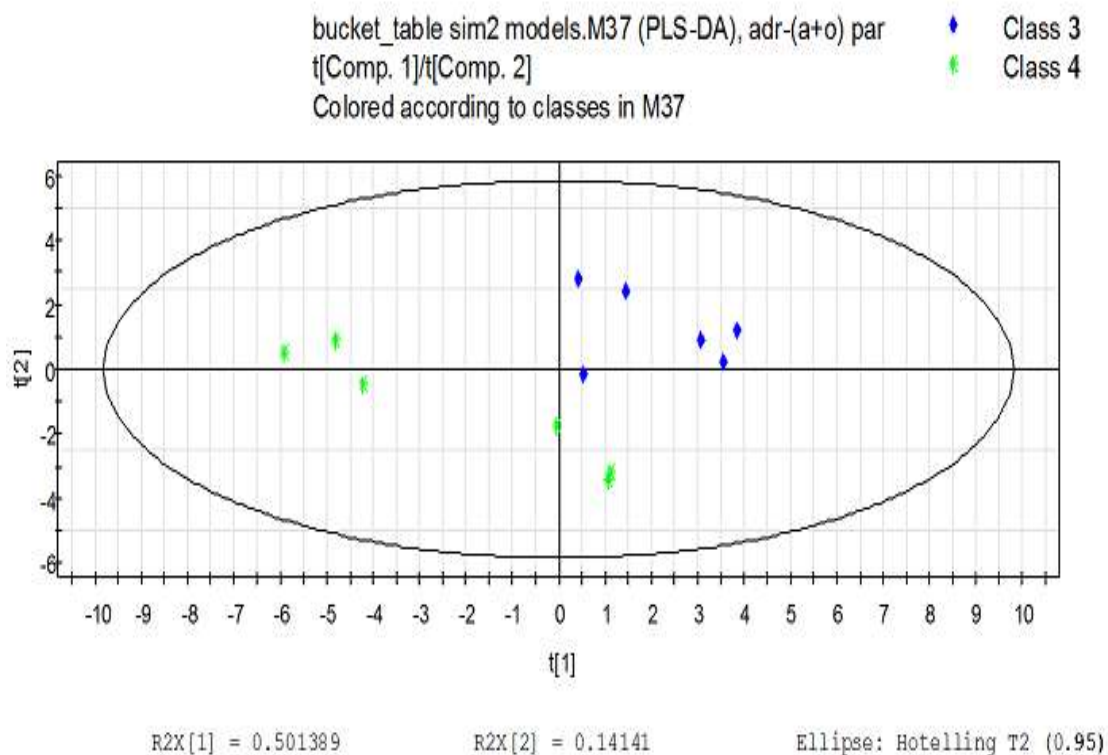
9.4.B5 Ομάδες αδριαμυκίνης (adr) – συγχορήγησης αδριαμυκίνης και ολεωρωπαΐνης (adr+oleu)

Η Principal Component Analysis εφαρμόστηκε για να συγκρίνει την ομάδα που δέχτηκε επίδραση μόνο αδριαμυκίνης με την ομάδα που δέχτηκε επίδραση συγχορηγούμενης δόσης αδριαμυκίνης και ολεωρωπαΐνης. Το διάγραμμα τιμών ακολουθεί παρακάτω.



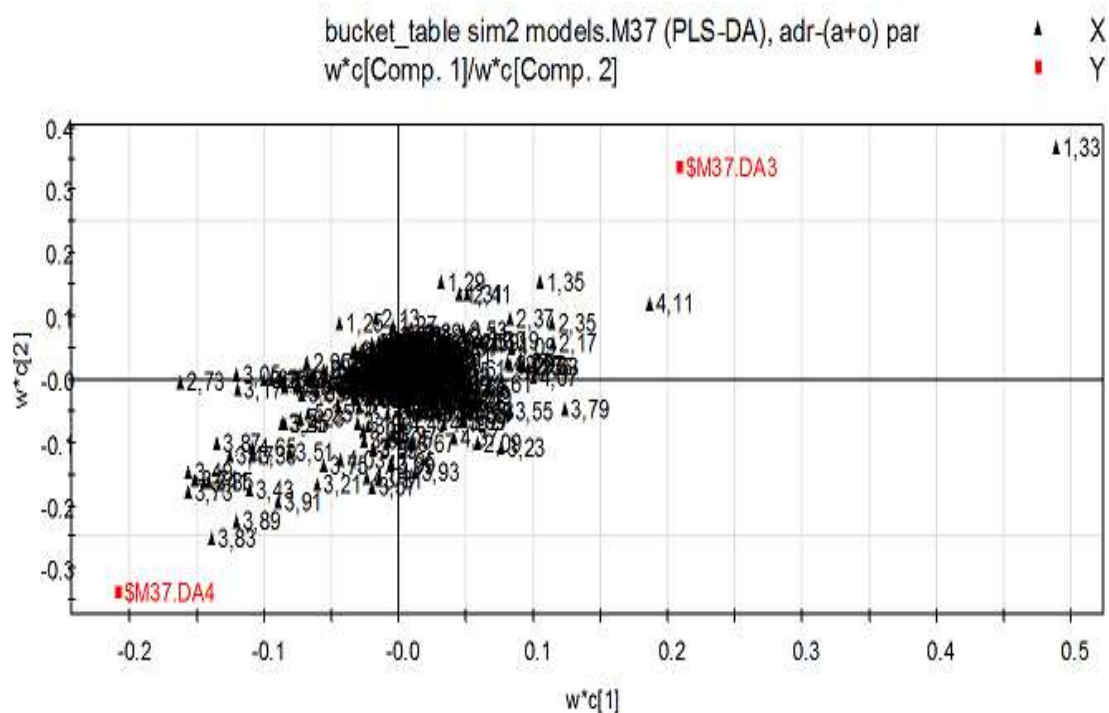
Εικ 68: PCA διάγραμμα τιμών (cent) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμυκίνης (class 3) και της ομάδας συγχωρήγησης αδριαμυκίνης- ολευρωπαΐνης (class 4).

Στη συνέχεια ακολουθεί με την τεχνική PLS-DA το διάγραμμα τιμών στο οποίο φαίνεται καλύτερα ο διαχωρισμός και το αντίστοιχο αυτού διάγραμμα φορτίων.



Εικ 69: PLS-DA διάγραμμα τιμών (par) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της

ομάδας αδριαμυκίνης (class 3) και της ομάδας συγχωρήγησης αδριαμυκίνης- ολευρωπαΐνης (class 4). $R^2Y(1)=0.47$ $Q^2(1)=0.34$. $R^2Y(2)=0.43$ $Q^2(2)=0.67$



$R^2X[1] = 0.501389$ $R^2X[2] = 0.14141$

Εικ 70: PLS-DA διάγραμμα φορτίων (par) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας αδριαμυκίνης (class 3) και της ομάδας συγχωρήγησης αδριαμυκίνης- ολευρωπαΐνης (class 4).

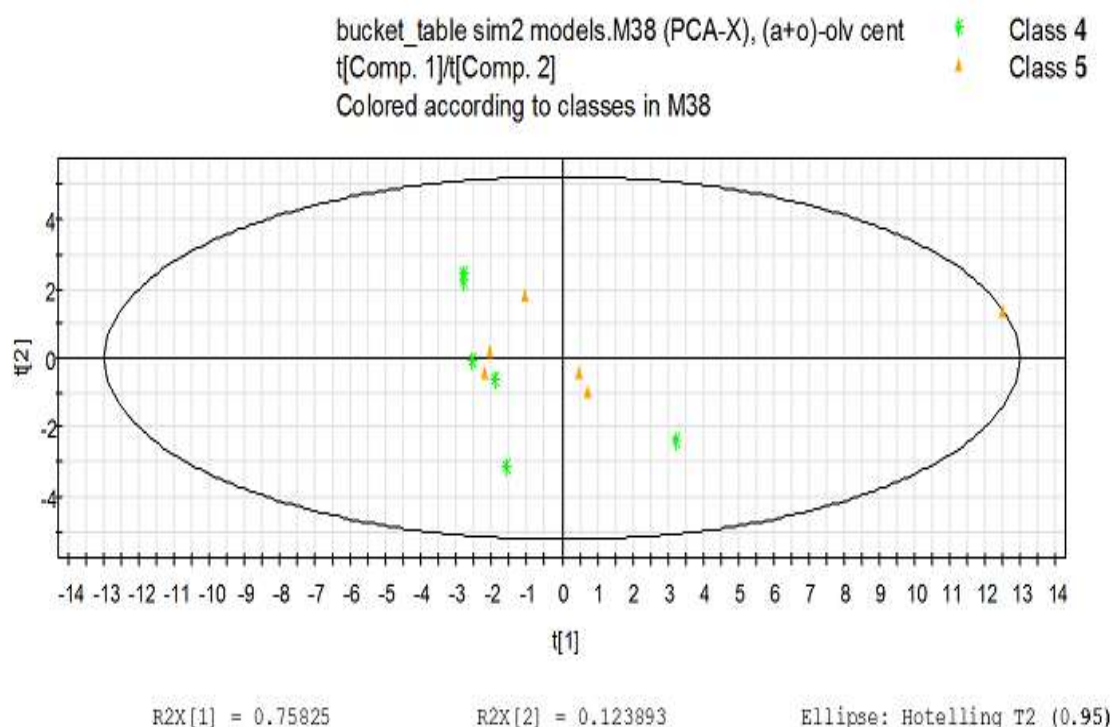
Στην λίστα VIP περιλαμβάνονται οι σημαντικοί για τον διαχωρισμό μεταβολίτες μεταξύ των ομάδων αδριαμυκίνης και συγχωρήγησης αδριαμυκίνης- ολευρωπαΐνης.

Var ID (Primary)	M56.VIP[3]	METABOLITEΣ
1,33	5,38911	lactate
3,21	2,9382	choline
3,35	2,80617	scylloinositol
3,83	2,78058	
3,49	2,66372	
2,09	2,66271	gsh reduced
3,73	2,63256	
3,87	2,62673	glucose
3,23	2,60069	glycerophosphocholine
3,71	2,56593	
3,85	2,52175	glucose

Εικ 71: Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στον διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων, αδριαμυκίνης (class 3) και συγχωρήγησης αδριαμυκίνης- ολευρωπαΐνης (class 4) που διαφαίνονται στο PLS-DA.

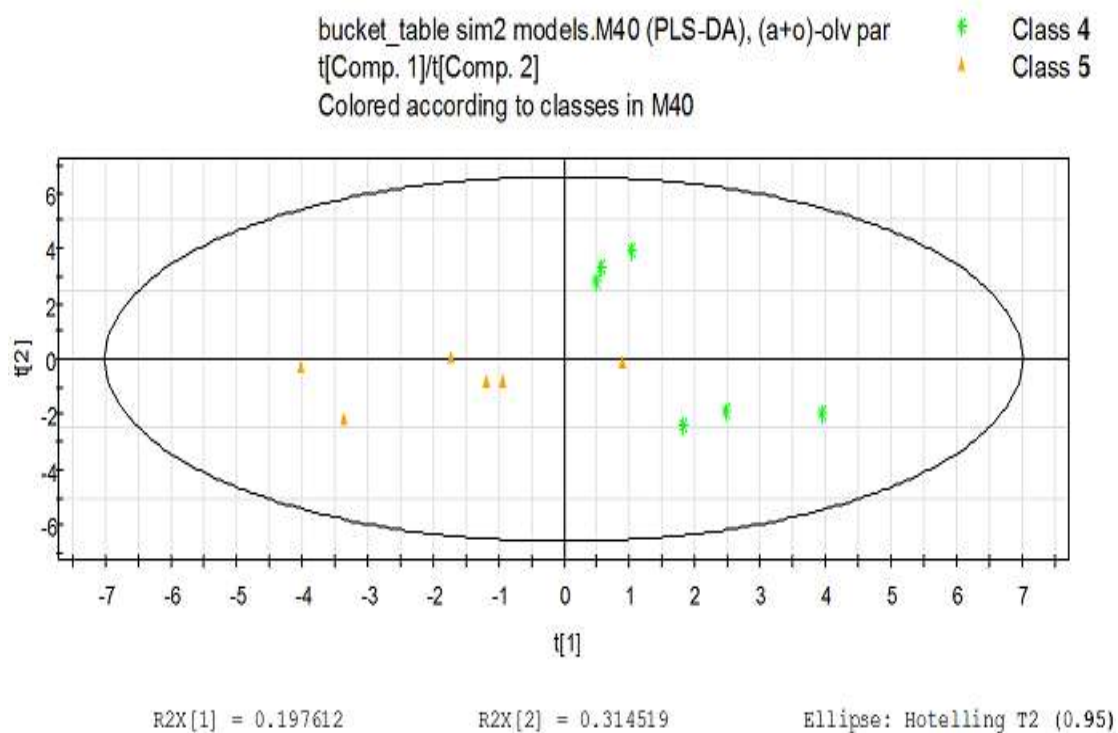
9.4.B6 Ομάδες συγχορήγησης αδριαμυκίνης και ολευρωπαΐνης (adr+oleu) – ολευρωπαΐνης (oleu)

Οι ομάδες συγχορήγησης και ολευρωπαΐνης δεν παρουσιάζουν καλή εικόνα διαχωρισμού στο μοντέλο που προκύπτει από την ανάλυση κυρίων συνιστωσών.

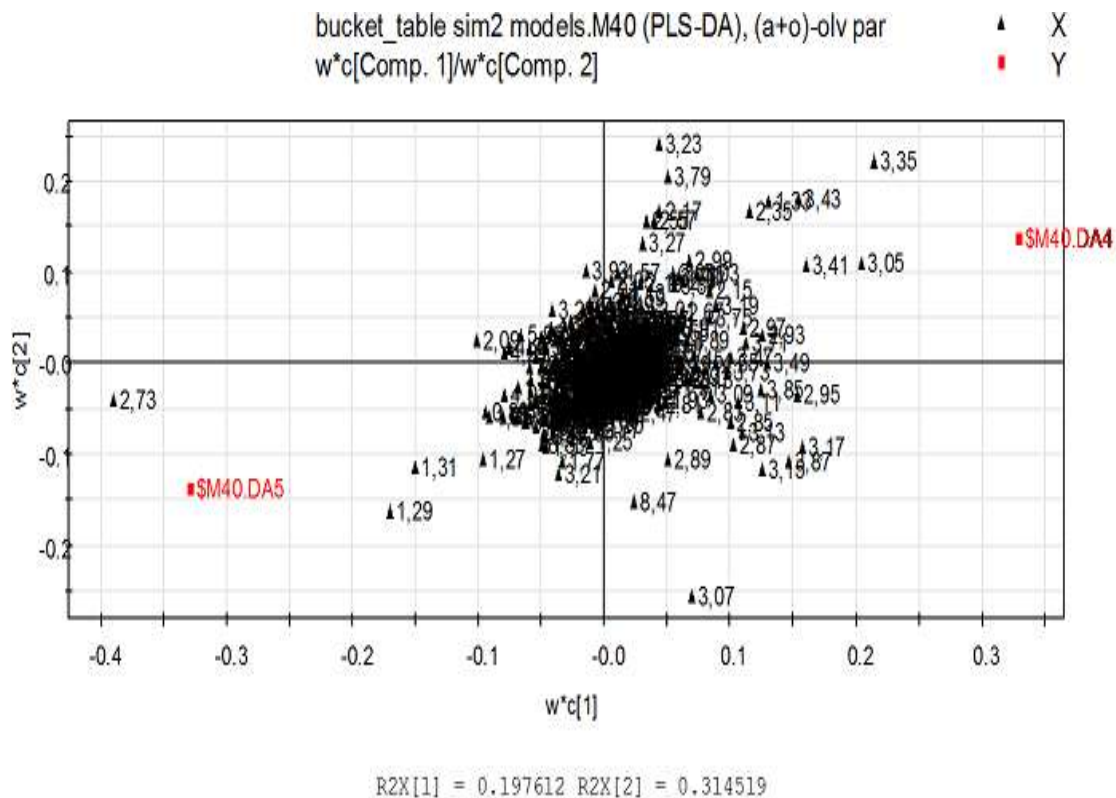


Εικ 72: PCA διάγραμμα τιμών (cent) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας συγχορήγησης αδριαμυκίνης- ολευρωπαΐνης (class 4) και της ομάδας ολευρωπαΐνης (class 5).

Ακολούθως, η ομάδα που δέχτηκε επίδραση συγχορηγούμενης δόσης αδριαμυκίνης και ολευρωπαΐνης συγκρίνεται με την ομάδα που δέχτηκε μόνο επίδραση ολευρωπαΐνης με την εφαρμογή της τεχνικής PLS-DA με προσαρμογή κλίμακας pareto. Οι δύο ομάδες διαχωρίζονται με την πρώτη συνιστώσα. Παρατίθενται το διάγραμμα τιμών και το αντίστοιχό του διάγραμμα φορτίων.



Εικ 73: PLS-DA διάγραμμα τιμών (par) φασμάτων ^1H -NMR υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας συγχρόρησης αδριαμυκίνης- ολευρωπαΐνης (class 4) και της ομάδας ολευρωπαΐνης (class 5). $R^2Y(1)=0.59$ $Q^2(1)=0.15$. $R^2Y(2)=0.09$.



Εικ 74: PLS-DA διάγραμμα φορτίων φασμάτων ^1H -NMR υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας συγχρόρησης αδριαμυκίνης- ολευρωπαΐνης (class 4) και της ομάδας ολευρωπαΐνης (class 5).

Η VIP λίστα δίνεται παρακάτω και περιέχει τους πιο σημαντικούς μεταβολίτες που καθορίζουν τον διαχωρισμό.

Var ID (Primary)	M40.VIP[3]	METABOLITES
2,73	6,84339	dimethylamine
3,35	3,92569	scylloinositol
3,05	3,58432	
3,07	2,97605	
1,29	2,87805	
3,87	2,85851	glucose
1,33	2,8259	lactate
3,17	2,74423	
3,43	2,65426	taurine
3,41	2,64231	taurine
2,95	2,5681	gsh reduced
1,31	2,54236	lactate
3,15	2,34316	

Εικ 75: Variable Importance List των 12 πρώτων παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στον διαχωρισμό των δύο ομάδων, αυτών της συγχωρήγησης και της χορήγησης μόνο ολευρωπαΐνης, που διαφαίνονται στο PLS-DA.

Z-Score

Προκειμένου να διαπιστωθούν οι αυξομειώσεις των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία z-score. Το z-score προκύπτει ως εξής: π.χ. έστω για τις δυο ομάδες ctrl-adr: $(\text{mean ctrl} - \text{mean adr}) / \text{standard deviation ctrl}$.

Έτσι προκύπτουν οι αυξομειώσεις που φαίνονται στους παρακάτω πίνακες, οι οποίες επισημάνθηκαν με χρωματική διαφοροποίηση ώστε να καταστούν ευκρινέστερες. Το μπλε χρώμα δηλώνει αύξηση των συγκεκριμένων μεταβολιτών στην ομάδα αναφοράς που δεν δέχτηκε καμμία επίδραση ενώ το κόκκινο χρώμα δηλώνει αύξηση των μεταβολιτών στις ομάδες που δέχτηκαν τις αντίστοιχες επιδράσεις. Οι μεταβολές που είναι στατιστικά σημαντικές έχουν τιμή πάνω από 1.2.

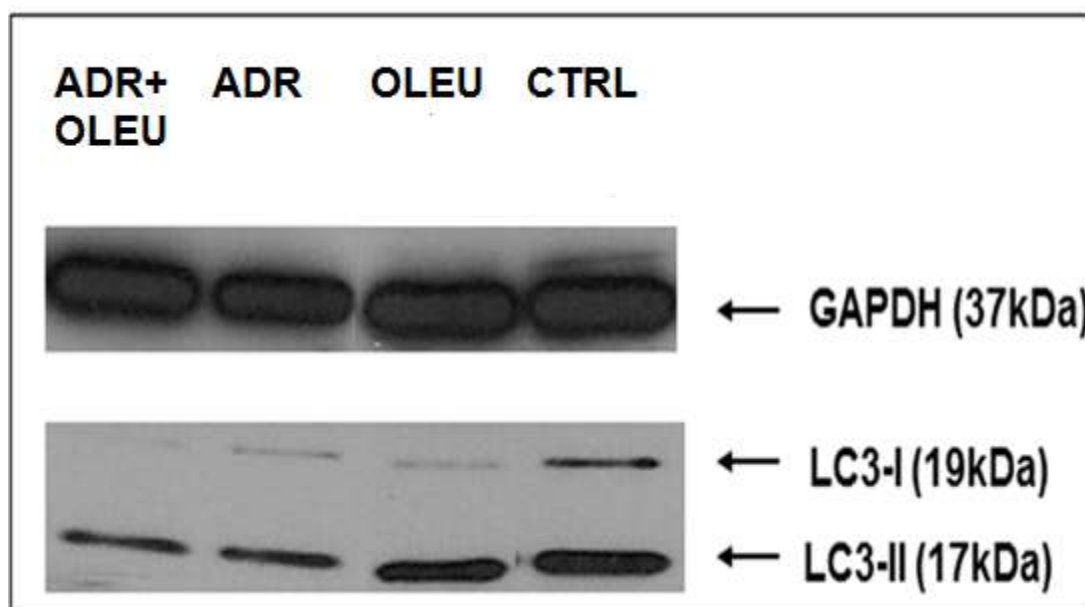
Metabolite	ctrl-adr	ctrl-(a+o)	ctrl-oleu
isoleucine	-3.81	-3.86	-6.51
leucine	-1.54	-1.48	-1.11
valine	-2.52	-4.06	-4.45
3-hydroxy-isovalerate	-1.05	-2.08	-2.29
lactate	-1.03	0.38	0.62
alanine	-1.01	-0.53	-0.31
acetate	0.12	-1.07	-0.42
glutamate	4.43	6.05	7.23
N-acetylcysteine	0.32	1.12	-0.05
glutamine	2.66	1.93	4.32
glutathione reduced	4.1	6.07	6.59
pyruvate	2.74	5.03	5.21
succinate	0.07	-0.86	-0.32
aspartate	0.85	-2.99	-0.91
dimethylamine	0.79	-4.75	-23.2
dihydroorotic acid	0.84	-0.05	1.65
creatine/phosphocreatine	9.11	8.11	11.04
HEPES	-1.36	-4.18	-0.16
malonate	-0.44	-1.9	-0.33
choline	5.5	4.9	7.08
phosphocholine	0.76	0.21	-0.07
glycerophosphocholine	0.98	2.05	2.56

Metabolite	ctrl-adr	ctrl-(a+o)	ctrl-oleu
taurine	6.08	6.03	6.41
myo-inositol	3.13	4.35	3.89
scyllo-inositol	-0.72	-1.39	-0.31
methanol	-0.72	-1.39	-0.31
glycine	3.17	2.77	2.86
a-glucose	-0.75	-3.03	-1.89
b-glucose	-0.86	-4.26	-2.32
UDP-galactose	0.13	1.04	-0.05
AMP	4.53	9.25	9.69
inosine	-1.88	-1.16	-2.04
adenosine 3'5' diphosphate	0.57	1.37	0.98
fumarate	-1.62	-3.37	-2.7
tyrosine	-1.99	-1.94	-1.19
phenylalanine	-3.08	-4.01	-3.46
guanine	-3.07	-2.35	-3.96
adenosine	-0.13	-0.14	-0.64
formate	-0.2	-1.71	-1.2

Πίνακας 7: z-score στο οποίο φαίνονται οι αυξομειώσεις των μεταβολιτών.

9.5 Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης

Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης οδήγησαν στην λήψη πληροφοριών σχετικά με την επίδραση των αδιαμυκίνης, ολευρωπαΐνης και συνδυασμού αυτών στην επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης LC3. Παρακάτω ενδεικτικά παρατίθεται εικόνα όπου φαίνεται η εμφάνιση των δύο ισομορφών LC3-I και LC3-II της LC3 στα 19kDa και 17kDa αντίστοιχα. Τα δείγματα ισοφορτώθηκαν στην γέλη πολυακρυλαμιδίου από την άποψη της ποσότητας της πρωτεΐνης που περιείχαν, γεγονός που φαίνεται από την έκφραση της πρωτεΐνης GAPDH που δεν παρουσιάζει μεταβολή εντός των ομάδων και λειτουργεί ως <<εσωτερικό πρότυπο>>. Απεικονίζονται κατά σειρά οι επιδράσεις: αδιαμυκίνη 50nM & ολευρωπαΐνη 200μg/mL, αδιαμυκίνη 50nM, ολευρωπαΐνη 200μg/mL, κύτταρα μάρτυρες (χωρίς επίδραση).



Εικ 76: Ζώνες εμφάνισης των ισομορφών της LC3 πρωτεΐνης σε κύτταρα PC-3 που επωάστηκαν με τους παράγοντες αδιαμυκίνη 50nM & ολευρωπαΐνη 200μg/mL, αδιαμυκίνη 50nM, ολευρωπαΐνη 200μg/mL καθώς και σε κύτταρα μάρτυρες. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων ελέγχθηκε με την εφαρμογή αντισώματος εναντίον της GAPDH.

ΚΕΦ 10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη είχε στόχο αφενός την εύρεση των σημαντικών μεταβολιών για την καρκινική σειρά PC-3 και την πιθανή μεταβολή τους μετά την χορήγηση αδριαμικίνης, ολεωρωπαΐνης και συνδυασμού αυτών με την αναλυτική τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και την ερμηνεία των φασματικών δεδομένων με χημειομετρικές τεχνικές.

Αφετέρου, μέσω διαφόρων μοριακών τεχνικών όπως ανοσοφθορισμός, ανοσοαποτύπωση, δοκιμασίες MTT και κυτταρικός κύκλος επιδιώχθηκε η μελέτη της κυτταροστατικής τους δράσης και ο μηχανισμός αυτής μέσω της διερεύνησης της θέσης και της έκφρασης της LC3 πρωτεΐνης στην συγκεκριμένη καρκινική σειρά. Ιδιαίτερα, ερευνήθηκε η επίδραση των παραγόντων αυτών στα καρκινικά κύτταρα με χρόνο (24, 48, 72 ώρες) και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Ο καρκίνος του προστάτη, περιλαμβάνεται στην ομάδα των πιο επικίνδυνων για το ανδρικό φύλο νεοπλασιών και τα περιστατικά της επίπτωσης του συνεχώς αυξάνονται. Απαιτείται λοιπόν να δοθεί η δέουσα προσοχή σε ερευνητικό επίπεδο για την εύρεση νέων μεθόδων και δεικτών που θα επιτρέψουν την διάγνωση του καθώς και για την μελέτη χημικών και φυσικών αντικαρκινικών παραγόντων για την αντιμετώπισή του.

Στην παρούσα μελέτη, το βιολογικό δείγμα ήταν κυτταρικά εκχυλίσματα της καρκινικής σειράς PC-3 καθώς σε αυτά βρίσκεται ένα μεγάλο πλήθος μεταβολιτών, τόσο υδατοδιαλυτών όσο και λιποδιαλυτών που παράγονται από τα κύτταρα. Οι μεταβολίτες αυτοί, αντικατοπτρίζουν σε μεγάλο βαθμό το εύρος των βιοχημικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε κυτταρικό επίπεδο πριν και μετά την χορήγηση των διαφόρων παραγόντων, δίνοντας συνολική εικόνα της επίδρασης τους στον κυτταρικό μεταβολισμό.

Η αναλυτική τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού επιλέχθηκε επειδή δίνει την δυνατότητα της ταυτόχρονης ανίχνευσης μεγάλου αριθμού μεταβολιτών καθώς είναι μη στοχευμένη επιτρέποντας ολιστική προσέγγιση της συμπεριφοράς των μελετούμενων ομάδων. Σε σχετικά σύντομο χρόνο είναι δυνατή η διεξαγωγή των πειραμάτων για την λήψη των φασμάτων ενώ τα δείγματα απαιτούν ελάχιστη προετοιμασία. Παράλληλα η NMR φασματοσκοπία είναι μια τεχνική που επιτρέπει την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και αναλυτών.

Η Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων χρησιμοποιήθηκε αρχικά καθώς είναι κατάλληλη για να δώσει μια πρώτη εικόνα της τάσης διαχωρισμού των ομάδων μεταξύ τους.

Η μέθοδος Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων-Διαχωριστικής Ανάλυσης ακολούθησε γιατί προσδιορίζει με μεγαλύτερη σαφήνεια τις διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ενώ το διάγραμμα φορτίων της, επισημαίνει τους σημαντικούς μεταβολίτες.

Οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, είναι ευρύτατα διαδεδομένες για την μελέτη της επίδρασης διαφόρων ουσιών επί του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης κυτταρικών καρκινικών σειρών.

Η αδριαμυκίνη είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα οπότε και γι αυτό τον λόγο επελέγη να μελετηθεί (κεφ 4).

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των συμπληρωμάτων διατροφής ως εναλλακτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος με το 80% του παγκόσμιου πληθυσμού να τα χρησιμοποιεί ενώ στις Η.Π.Α. οι ετήσιες δαπάνες για αυτά φτάνουν τα 34 δις δολάρια¹²⁰.

Ειδικά, στην αντικαρκινική έρευνα, μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η τακτική κατανάλωση ορισμένων φρούτων και λαχανικών μπορεί να οδηγήσει στη μείωση του κινδύνου επίπτωσης συγκεκριμένων μορφών καρκίνου. Μερικά μόνο από την πληθώρα φυτοχημικών που προέρχονται από φρούτα και λαχανικά, είναι: γενιστεΐνη, ρεσβερατρόλη, λυκοπένιο, κουρκουμίνη, σιλυμαρίνη, κατεχίνες, ευγενόλη. Οι παράγοντες αυτοί έχειδειχθεί ότι καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, επάγουν την απόπτωση, αναστέλλουν την αγγειογένεση, καταστέλλουν την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών κ.α. Επίσης πολύ πρόσφατα έχει βρεθεί ότι μπορούν να αναστρέψουν την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην χημειοθεραπεία και στην θεραπείες με ακτινοβολία, ανοίγοντας έτσι το δρόμο για την χρησιμοποίησή τους παράλληλα με τις κλασικές αντικαρκινικές προσεγγίσεις¹²¹.

Χαρακτηριστικό των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω αποτελεί μελέτη του 2010 στην οποία διερευνάται η αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης χορήγησης αδριαμυκίνης (δοξορουμπικίνης) και του φυσικού συστατικού κερκετίνης σε κύτταρα καρκίνου του μαστού. Τα αποτελέσματα ήταν ελπιδοφόρα καθώς η κερκετίνη αφενός ενίσχυσε την δράση της αδριαμυκίνης στα κακοήγη κύτταρα και αφετέρου προστάτευσε τα καλοήγη από τις ανεπιθύμητες ενέργειες και την τοξικότητα αυτής¹²².

Για τους παραπάνω λόγους, στην συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η ολεωρωπαΐνη αφού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα, καθώς οι φαρμακολογικές της ιδιότητες είναι πολύπλευρες. Ξεχωριστή σημασία έχει η αντιοξειδωτική και η αντικαρκινική της δράση η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς. Πρόσφατη μελέτη αναφέρει δράση κατά του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του προστάτη στις σειρές LNCaP και DU145¹²³.

Κυτταροτοξικές δοκιμασίες MTT

Στην περίπτωση της χορήγησης μόνο αδριαμικίνης (διάγραμμα 1) παρατηρείται μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις. Αξιοσημείωτο είναι πως οι συγκεντρώσεις 50 και 100nM παρουσιάζουν παρόμοια ποσοστά αναστολής, 66% και 64% αντίστοιχα, γεγονός που επιτρέπει την μείωση της δόσης του χημειοθεραπευτικού και συνακόλουθα την μείωση των ανεπιθύμητων δράσεών του.

Η ολεωρωπαΐνη, προκαλεί επίσης δόσοεξαρτώμενη αναστολή της αύξησης στα κύτταρα αναφοράς (διαγράμματα 2 και 3) με τις συγκεντρώσεις μεταξύ 100 και 200μg/mL να παρουσιάζουν ανασταλτικό αποτέλεσμα. Παρατηρείται μια στασιμότητα στην ανασταλτική επίδραση στις χαμηλές συγκεντρώσεις μέχρι 50μg/mL, η οποία δεν αίρεται με την συγχορήγηση με αδριαμικίνη 50nM (διάγραμμα 4) καθώς τα αποτελέσματα δεν είναι καλύτερα από εκείνα της αδριαμικίνης χορηγούμενης μόνη της (διάγραμμα 1).

Η συγχορήγηση δεν ευνοείται στην περίπτωση της αδριαμικίνης με σταθερή δόση ολεωρωπαΐνης 100μg/mL (διάγραμμα 5) αλλά παρουσιάζει σημαντικά ανασταλτικά αποτελέσματα στην περίπτωση δόσης ολεωρωπαΐνης 200μg/mL και αδριαμικίνης για όλες τις συγκεντρώσεις της τελευταίας. Πράγματι παρατηρείται εντυπωσιακή μείωση των ζωντανών κυττάρων όταν χορηγούνται σε συνδυασμό ακόμη και σε χαμηλές δόσεις αδριαμικίνης όπως αυτές μεταξύ 3- 12.5nM (διάγραμμα 6).

Συμπερασματικά, όλες οι επιδράσεις έχουν ανασταλτικό αποτέλεσμα με την χορήγηση ολεωρωπαΐνης 200μg/mL με αδριαμικίνη 3-12.5nM να δίνει υψηλά ποσοστά αναστολής για τα καρκινικά κύτταρα χωρίς τοξικότητα για τα φυσιολογικά καθώς η συγκέντρωση του χημειοθεραπευτικού είναι αρκετά χαμηλή.

Κυτταρικός κύκλος

Η μελέτη της επίδρασης διάφορων ουσιών στον κυτταρικό κύκλο είναι σημαντική καθώς πολλοί αντικαρκινικοί παράγοντες δρουν μόνο σε συγκεκριμένες φάσεις αυτού¹²⁷. Από την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου διαφαίνονται τα παρακάτω συμπεράσματα.

Η αδριαμικίνη, και στις τρεις περιπτώσεις της επίδρασης της, δηλαδή και στις 24, 48, 72 ώρες, παρουσιάζει μείωση του ποσοστού των κυττάρων στην φάση G0/G1 αλλά αύξηση της συσσώρευσης στις φάσεις S και G2/M σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Οι αλλαγές που προκαλεί είναι σημαντικές καθώς μειώνει το ποσοστό των κυττάρων στην φάση G0/G1 κατά 23%, 57% και 57% στις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα ενώ η αύξηση των κυττάρων στην

φάση G2/M είναι της τάξης του 32%, 73% και 70% στις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα (πίνακες 3,4,5).

Βιβλιογραφικά δεδομένα επιβεβαιώνουν την επίδραση της αδριαμικίνης στην G2 φάση του κύκλου στην καρκινική σειρά PC-3¹⁴⁶. Μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2008, παρουσιάζει την κυτταροστατικότητα/κυτταροτοξικότητα της αδριαμικίνης για τα PC-3 κύτταρα. Συγκεκριμένα η χορήγηση σε PC-3 κύτταρα αδριαμικίνης σε δόση 100nM και επίδραση 48 ωρών οδήγησε σε συσσώρευση των κυττάρων στην G2 φάση του κύκλου και ακόλουθη απόπτωση αυτών¹⁴⁶.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η αδριαμικίνη προκαλεί συσσώρευση των κυττάρων στην φάση G2/M πιθανότατα σχετίζεται με την αναστολή της δραστηριότητας της CDC2 πρωτεΐνης (που είναι το ανθρώπινο ομόλογο της CDK1) ή με την επαγωγή της δράσης της πρωτεΐνης p53. Μελέτες προτείνουν πως και οι δυο παραπάνω πρωτεΐνες μετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στο επίπεδο μετάβασης της φάσης G2/M^{128,129}.

Αντίθετα η ολεωρωπαΐνη προκαλεί μεν αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο αλλά μικρότερης εμβέλειας σε σχέση με την αδριαμικίνη. Σε όλες τις περιπτώσεις παρουσιάζει αύξηση της συσσώρευσης των κυττάρων στην G0/G1 φάση και μείωση στις φάσεις S και G2/M. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων της G0/G1 φάσης κατά 4%, 7% και 3% στις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα (πίνακες 3,4,5).

Παρατίθεται ενδεικτικά μια πρόσφατη μελέτη των Han et al, στην οποία η ολεωρωπαΐνη μειώνει την βιωσιμότητα των MCF-7 κυττάρων και τον αριθμό τους αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγοντας την κυτταρική απόπτωση. Επιπλέον επιδρά στον κυτταρικό κύκλο σταματώντας την μετάβαση από την G1 στην S φάση οδηγώντας σε αύξηση των κυττάρων που βρίσκονται στην G0 /G1 φάση⁹⁶.

Ο ακριβής μηχανισμός πρόκλησης της συσσώρευσης των κυττάρων στην φάση G0/G1 από την ολεωρωπαΐνη, ενδεχομένως να σχετίζεται με την αναστολή κάποιων από τους ρυθμιστές σε αυτήν την φάση. Πρωτεΐνες με ρυθμιστικό επί της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου, ρόλο αποτελούν: Rb, κυκλίνες, κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs), CDK αναστολείς (p21, p27 και p57) και p53¹³⁰.

Η συγχορήγηση αδριαμικίνης και ολεωρωπαΐνης ακολουθεί πορεία παρεμφερή με την αδριαμικίνη καθώς παρουσιάζει μείωση του ποσοστού των κυττάρων στην φάση G0/G1 αλλά αύξηση της συσσώρευσης στις φάσεις S και G2/M σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Η μεταβολή είναι μεγαλύτερη στην επίδραση των 72 ωρών όπου τόσο το ποσοστό μείωσης της G0/G1 φάσης (64%) όσο και το ποσοστό αύξησης της G2/M φάσης (76%) είναι μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα της αδριαμικίνης χορηγούμενης μόνη της.

Συμπερασματικά από την μελέτη του κυτταρικού κύκλου, φαίνεται μια βελτίωση της κυτταροστατικής δράσης της αδριαμυκίνης επί των κυττάρων PC-3 όταν χορηγηθεί μαζί με ολεωρωπαΐνη.

Ανοσοφθορισμός

Από τις φωτογραφίες που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού, γίνεται αρχικά αντιληπτό ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν το κατάλληλο για την ανίχνευση της LC3 πρωτεΐνης ως προς την οποία παρουσιάζει εκλεκτικότητα. Οι αρνητικοί μάρτυρες δεν εμφανίζουν καθόλου φθορισμό ενώ οι θετικοί εμφανίζουν ασθενή φυσιολογικό φθορισμό καθώς δεν έχουν υποστεί επιδράσεις. Στην 60X μεγέθυνση φαίνεται πως σε όλες τις επιδράσεις επάγεται η αυτοφαγία. Τόσο στην αδριαμυκίνη 50nM όσο και στην ολεωρωπαΐνη 200μg/mL καθώς και στους δυο συνδυασμούς συγχορήγησης αδριαμυκίνης (50nM) και ολεωρωπαΐνης (100μg/mL) και αδριαμυκίνης (50nM) και ολεωρωπαΐνης (200μg/mL), παρατηρούνται τα διάστικτα σημάδια περιπυρηνικά. Είναι γνωστό ότι ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται περισσότερο για να δώσει ποιοτική πληροφορία και όχι τόσο ποσοτική. Έτσι συμπεραίνεται η επαγωγή της αυτοφαγίας τόσο από την χορήγηση του κάθε παράγοντα μεμονωμένα όσο και στην συγχορήγηση. Από τις φωτογραφίες της μεγαλύτερης μεγέθυνσης 100X, επίσης φαίνεται αυτοφαγική επίδραση σε όλες τις περιπτώσεις με μόνη εξαίρεση την περίπτωση της συγχορήγησης αδριαμυκίνης (50nM) και ολεωρωπαΐνης (100μg/mL) όπου φαίνεται να αμβλύνεται αυτή η δράση. Ίσως για αυτήν την ασυμβατότητα να ευθύνεται ο διαφορετικός μηχανισμός δράσης των ουσιών αυτών αφού, όπως διαπιστώνεται από την βιβλιογραφία και από την παρούσα μελέτη μέσα από την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, η αδριαμυκίνη επιδρά στην G2/M φάση του κύκλου ενώ η ολεωρωπαΐνη στην φάση G0/G1. Τέλος, η χλωροκίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας αφού αναστέλλει την σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα, επιτρέποντας την παραμονή της LC3 πρωτεΐνης στην μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων και άρα την εμφάνιση και τον φθορισμό της.

Καταλήγοντας, μέσω της ανάλυσης με ανοσοφθορισμό φαίνεται επαγωγή της αυτοφαγίας στα PC-3 κύτταρα μετά την 24ωρη επίδραση των παραγόντων αδριαμυκίνης 50nM, ολεωρωπαΐνης 200μg/mL και συνδυασμένης χορήγησης αδριαμυκίνης 50nM και ολεωρωπαΐνης 200μg/mL.

Ανοσοαποτύπωση

Στο αντίστοιχο υποκεφάλαιο των αποτελεσμάτων (9.5), παρουσιάστηκε μια ενδεικτική εικόνα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης που διεξήχθησαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Διακρίνεται μια τάση ελάττωσης της έκφρασης της ισομορφής LC3-I με αντίστοιχη επαγωγή της έκφρασης της ισομορφής LC3-II ως αποτέλεσμα των επιδράσεων: συγχορήγησης

αδριαμυκίνης 50nM και ολευρωπαΐνης 200μg/mL, αδριαμυκίνης 50nM και ολευρωπαΐνης 200μg/mL. Περαιτέρω πειράματα είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν ώστε αφενός να επιβεβαιωθεί η επαγωγή της έκφρασης της LC3-II από τις παραπάνω επιδράσεις και αφετέρου να γίνει ποσοτικοποίηση αυτής.

Δεδομένα ανάλυσης NMR

Σε γενικές γραμμές, από τα στατιστικά μοντέλα που προέκυψαν, υπάρχει καλός διαχωρισμός των διάφορων ομάδων μεταξύ τους αν και παρατηρείται μεγάλη διασπορά μεταξύ των δειγμάτων ακόμη και της ίδιας ομάδας, όπως σε αυτήν της συγχωρήγησης. Αυτό συμβαίνει γιατί είναι πρακτικά αδύνατο να σταματήσει ταυτόχρονα η μεταβολική διαδικασία για όλα τα μελετούμενα δείγματα κυττάρων παρόλο που η επεξεργασία τους έγινε με τον ταχύτερο δυνατό τρόπο.

Στα μοντέλα PCA οι εικόνες είναι πιο περίπλοκες. Με την χρήση όμως της επιβλεπόμενης μεθόδου PLS, τα μοντέλα που προέκυψαν παρουσιάζουν καλύτερη εικόνα διαχωρισμού.

Από την στατιστική μελέτη και επεξεργασία των περίπλοκων φασματικών δεδομένων προσδιορίστηκαν όπως φαίνεται στις λίστες VIP, οι σημαντικότεροι μεταβολίτες που διαχωρίζουν τις ομάδες μεταξύ τους. Παρατηρώντας τις λίστες εξάγεται το συμπέρασμα πως υπάρχει ένα κοινό <<γκρουπ>> μεταβολιτών που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό όλων των ομάδων και περιλαμβάνει τους: γαλακτικό οξύ (lactate), ανηγμένη γλουταθειόνη (gsh reduced), ταυρίνη (taurine), γλουταμικό οξύ (glutamate) και τα δυο ισομερή της ινοσιτόλης: μυο-ινοσιτόλη (myo-inositol) και σκυλλο-ινοσιτόλη (scyllo-inositol). Πιο συγκεκριμένα, παρακάτω δίνονται οι σημαντικότεροι μεταβολίτες για κάθε διαχωρισμό, όπως προκύπτουν από τις λίστες :

- Κύτταρα με επίδραση αδριαμυκίνης-Κύτταρα αναφοράς: γαλακτικό οξύ, ανηγμένη γλουταθειόνη, ταυρίνη, γλουταμικό οξύ και μυο-ινοσιτόλη.
- Κύτταρα με επίδραση ολευρωπαΐνης-Κύτταρα αναφοράς: διμεθυλαμίνη, ανηγμένη γλουταθειόνη, γλουταμικό οξύ, γαλακτικό οξύ, ταυρίνη, μυο-ινοσιτόλη, γλυκεροφωσφοχολίνη.
- Κύτταρα με συνδυασμένη επίδραση αδριαμυκίνης και ολευρωπαΐνης-Κύτταρα αναφοράς: γαλακτικό οξύ, γλουταμικό οξύ, ανηγμένη γλουταθειόνη, ταυρίνη, μυο-ινοσιτόλη και σκυλλο-ινοσιτόλη.
- Κύτταρα με επίδραση αδριαμυκίνης-Κύτταρα με επίδραση ολευρωπαΐνης: γαλακτικό οξύ, διμεθυλαμίνη, χολίνη, ανηγμένη γλουταθειόνη, γλυκόζη, σκυλλο-ινοσιτόλη.

- Κύτταρα με επίδραση αδριαμυκίνης-Κύτταρα με συνδυασμένη επίδραση αδριαμυκίνης και ολεωρωπαΐνης: γαλακτικό οξύ, χολίνη, ανηγμένη γλουταθειόνη, γλυκόζη, σκυλλο-ινοσιτόλη, γλυκεροφωσφοχολίνη.
- Κύτταρα με συνδυασμένη επίδραση αδριαμυκίνης και ολεωρωπαΐνης-Κύτταρα με επίδραση ολεωρωπαΐνης: διμεθυλαμίνη, ταυρίνη, ανηγμένη γλουταθειόνη, γαλακτικό οξύ, γλυκόζη, σκυλλο-ινοσιτόλη.

Πράγματι, όπως παρουσιάζεται και από διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα, οι παραπάνω μεταβολίτες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις περιπτώσεις των καρκινικών κυττάρων όπως αποκάλυψε ο Otto Warburg δεκαετίες πριν καθώς σχετίζονται με ενεργειακό μεταβολισμό.

Από την μελέτη του πίνακα με τα z-score προκύπτει:

- Συμπερασματικά οι μεταβολίτες με την μεγαλύτερη αύξηση στην ομάδα των κυττάρων αναφοράς (ctrl) είναι: γλουταμικό οξύ, γλουταμίνη, γλουταθειόνη ανηγμένη, πυροσταφυλικό οξύ, κρεατίνη, χολίνη, ταυρίνη, μυο-ινοσιτόλη, γλυκίνη και AMP.
- Και στις τρεις ομάδες των επιδράσεων παρατηρείται αύξηση στους μεταβολίτες: ισολευκίνη, λευκίνη, βαλίνη, φουμαρικό οξύ, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, γουανίνη.
- Στην ομάδα μόνο της συγχωρήγησης της αδριαμυκίνης-ολεωρωπαΐνης παρατηρείται αύξηση στους μεταβολίτες: ασπαρτικό οξύ, HEPES, μηλονικό οξύ, φορμικό οξύ (μυρμηγκικό οξύ).
- Στην ομάδα της ολεωρωπαΐνης και της συγχωρήγησης αδριαμυκίνης-ολεωρωπαΐνης αυξάνονται οι μεταβολίτες: 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, διμεθυλαμίνη, α-γλυκόζη, β-γλυκόζη.

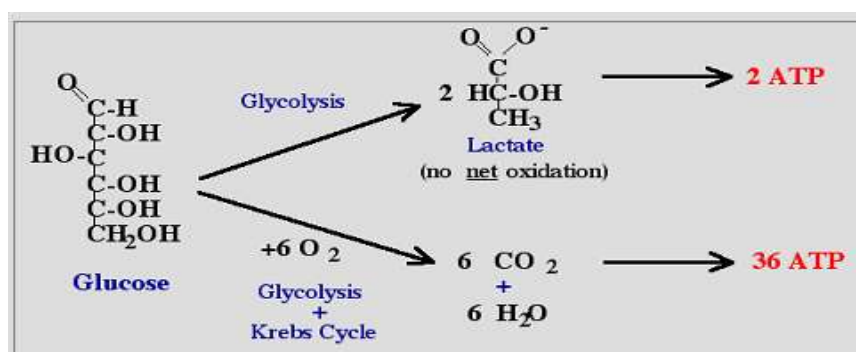
Γενικά παρατηρείται το φαινόμενο ότι οι μεταβολίτες είτε θα αυξάνονται στην ομάδα αναφοράς είτε θα αυξάνονται στις τρεις επιδράσεις. Λιγότερο ή περισσότερο στην καθεμία αλλά δίνοντας μια εικόνα που χαρακτηρίζει και τις τρεις. Από το γεγονός αυτό συμπεραίνεται πως η επίδραση της ολεωρωπαΐνης, αδριαμυκίνης και του συνδυασμού τους, διαφοροποιεί μεν το μεταβολικό προφίλ των καρκινικών κυττάρων που δεν δέχτηκαν καμία επίδραση από εκείνο των κυττάρων που δέχθηκαν, χωρίς όμως έντονη ιδιαίτερη διαφοροποίηση μεταξύ των τριών περιπτώσεων επίδρασης που ενδεχομένως να σχετίζεται με την δόση αυτών (Ισως σε υψηλότερη δόση να εμφανίζονταν πιο διακριτές διαφορές).

Η μετατροπή ενός καλοήθους κυττάρου σε καρκινικό περιλαμβάνει εκτός από γονιδιακή μετάλλαξη και πλήρη διαφοροποίηση του μεταβολικού του προφίλ

ως αναγκαία συνθήκη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Εξαιτίας της μεγάλης διασποράς μεταξύ των τύπων των όγκων, δεν είναι εφικτή η με σαφήνεια εξαγωγή ενός γενικευμένου μεταβολότυπου καθώς τόσο διαφορετικοί μεταβολίτες όσο και διαφορετικά μονοπάτια εμπλέκονται σε κάθε τύπο και κάθε στάδιο της εξέλιξης ενός νεοπλασματος.

Εντούτοις, συγκεκριμένες μεταβολικές τροποποιήσεις είναι γνωστές στην επιστημονική κοινότητα για την εμπλοκή τους στην καρκινική διαδικασία όπως έχει ήδη περιγραφεί στο κεφ 3.1 και με βάση αυτές θα επιχειρηθεί η ερμηνεία των αυξομειώσεων ορισμένων μεταβολιτών που προκύπτουν από τις λίστες VIP και το z-score.

Πιο συγκεκριμένα, η κακοήθης μετατροπή είναι συνδεδεμένη με αυξημένο ρυθμό ενδοκυττάριας πρόσληψης της γλυκόζης ώστε να καλυφθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις σύμφωνα με το φαινόμενο Warburg. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν επιλέξει να παράγουν το 50% της απαιτούμενης ενέργειας τους μέσω αερόβιας γλυκόλυσης, διαδικασία που για κάθε μόριο γλυκόζης αποδίδει 2 μόρια ATP, συγκριτικά με την αναπνευστική αλυσίδα που αποδίδει περίπου 36 μόρια ATP. Στην αερόβια γλυκόλυση, η γλυκόζη στο κυτταρόπλασμα καταλύεται από διάφορα ένζυμα δίνοντας πυροσταφυλικό το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε γαλακτικό δίνοντας μόρια ATP όπως φαίνεται στο σχήμα.



Εικ 77: Πορεία αποικοδόμησης της γλυκόζης για παραγωγή ενέργειας¹⁴⁸.

Τα καρκινικά κύτταρα εμμένουν σε αυτή την επιλογή ακόμη και σε υψηλότερα επίπεδα οξυγόνου γεγονός που δηλώνει ότι είναι αναγκαστικός τρόπος παραγωγής ενέργειας και ενδεχομένως να εξηγείται από την μη αντιστρεπτή βλάβη των μιτοχονδρίων που παρατηρείται σε πολλούς τύπους καρκίνου³⁴.

Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αλλαγές σε μεταβολικά μονοπάτια συνδεδεμένα με την γλυκόλυση. Έτσι, όπως φαίνεται στον πίνακα, οι παράγοντες που ρυθμίζουν την γλυκόλυση όπως hexokinase, PI3K/AKT, HIF υπερεκφράζονται στον καρκίνο οδηγώντας σε αυξημένη είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα. Ενδεικτικά, ο παράγοντας HIF, hypoxia induced factor, αυξάνει την έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης και όλων των γονιδίων των

γλυκολυτικών ενζύμων. Έτσι τα κύτταρα αναφοράς, έχουν χαμηλότερα ποσοστά α- και β- γλυκόζης. Τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος και της αλανίνης παρότι εμπλέκονται στην τροποποιημένη γλυκολυτική διαδικασία, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Παράλληλα ο παράγοντας HIF, επάγει την έκφραση της κινάσης της πυροσταφυλικής δεϋδρογενάσης [pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK 1)], η οποία αναστέλλει την πυροσταφυλική δεϋδρογενάση [pyruvate dehydrogenase (PDH)], που καταλύει την μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακέτυλο-συνένζυμοΑ (acetyl-CoA). Αυτό οδηγεί σε συσσώρευση του πυροσταφυλικού οξέος που δεν μπορεί να εισέλθει στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) και αποτελεί μια ερμηνεία για τα υψηλά επίπεδα πυροσταφυλικού οξέος στα κύτταρα αναφοράς¹⁰.

Table 2.1 Control of glycolysis in cancer cells

Regulatory factors	Function	Role in cancer cell	Glycolytic regulation
Hexokinase	Glycolytic enzyme; Converts glucose to glucose-6-phosphate	Expression is increased in several cancers	Rate-limiting enzyme and first to phosphorylate glucose once inside the cell. Enables more glucose entry into the cell via its concentration gradient
PI3K/AKT	Oncogene signaling pathway	Activated in cancer cells by several mechanisms, including <i>PTEN</i> mutations	Increases expression and plasma membrane clustering of glucose transporters Increases expression and activity of hexokinase II Promotes association of hexokinase with mitochondria Increases expression of phosphofructokinase
MYC and MondoA	Transcription factors		Induce expression of glycolytic genes such as hexokinase II, enolase, lactate dehydrogenase, and phosphofructokinase
HIF	bHLH transcription factors	Stabilized in cancer even under normoxic conditions	Increases expression of glucose transporters Induces expression of all glycolytic enzymes Induces expression of both lactate dehydrogenase and monocarboxylate transporter 4 Inhibits pyruvate dehydrogenase through activation of PDK1
P53	Tumor suppressor gene; guardian of the genome	Mutated in several cancers	Through loss of TIGAR and SCO2

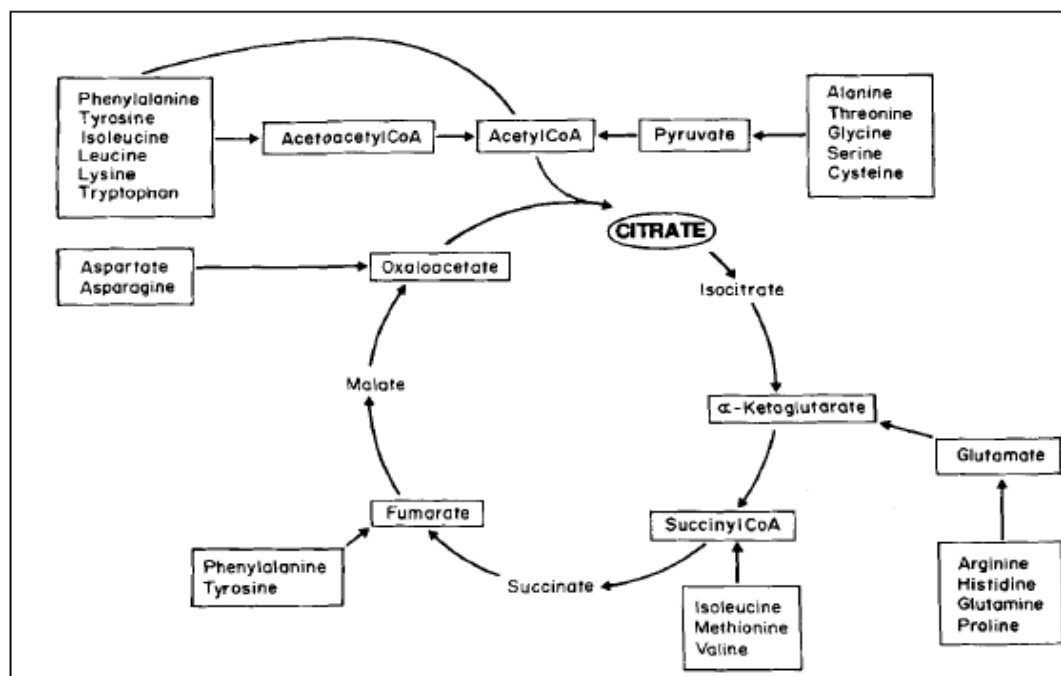
Πιν 8: Έλεγχος της γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα ³⁴.

Σε μελέτη των Yacoe et al¹⁴⁹, προτάθηκε η παρακάτω μεταβολική οδός (εικ 78) για το κιτρικό οξύ, η οποία εξηγεί κάποια από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Έτσι μπορούν να λεχθούν τα εξής :

Όπως ειπώθηκε ήδη δεν παράγεται ακέτυλο-συνένζυμοΑ (acetyl-CoA) από το πυροσταφυλικό οξύ (pyruvate). Προκειμένου αυτό να παραχθεί για να χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση του κιτρικού οξέος, χρησιμοποιούνται τα αμινοξέα: φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, ισολευκίνη και λευκίνη. Έτσι τα επίπεδα τους είναι μειωμένα στα κύτταρα αναφοράς και αυξημένα στις ομάδες των επιδράσεων. Επίσης αυτά τα αμινοξέα μαζί και με την βαλίνη μετέχουν και σε άλλα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του Krebs. Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και το ασπαρτικό οξύ που είναι το δομικό συστατικό του οξαλοξικού οξέος (oxaloacetate) και είναι αυξημένο κυρίως στην ομάδα της συγχωρήγησης.

Το ακέτυλο-συνένζυμοΑ (acetyl-CoA) επίσης είναι σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν γιατί μετατρέπεται σε μηλόνυλο-συνένζυμοΑ (malonyl-CoA) και περαιτέρω σε λιπαρά οξέα μέσω της FAS (fatty acid synthase) που υπερεκφράζεται σε κακοήθεις περιπτώσεις στις οποίες παρατηρείται de novo σύνθεση λιπαρών οξέων¹⁰.

Να σημειωθεί ότι λόγω της οξειδωσης στον κύκλο του Krebs³⁴ αλλά και της χρησιμοποίησής του στην σύνθεση κυτταρικών μεμβρανών των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων¹⁴³, το κιτρικό οξύ (citrate) δεν ανιχνεύεται καθόλου στην παρούσα μελέτη.



Εικ 78: Προτεινόμενη πορεία του κιτρικού οξέος στον καρκίνο του προστάτη¹⁴⁹.

Άλλη μια μεταβολική προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται με τον μεταβολισμό της γλουταμίνης και ορίζει την αυξημένη γλουταμινολυτική

δραστηριότητα λόγω ενίσχυσης της δράσης του ενζύμου γλουταμινάση (GLS) που παρατηρείται σε πολλούς όγκους. Η γλουταμίνη αποτελεί πρόδρομο μόριο για την σύνθεση αμινοξέων, νουκλεϊκών οξέων και γλουταμικού οξέος. Επιπλέον η οξειδωση του ανθρακικού σκελετού της στα μιτοχόνδρια, χρησιμεύει για την παραγωγή ενέργειας των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στα οποία περιλαμβάνονται και τα καρκινικά. Στην παρούσα μελέτη η γλουταμίνη υπάρχει μεν στα κύτταρα αναφοράς αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σχετικά με το γλουταμικό οξύ και την γλουταθειόνη, γεγονός που εξηγείται από τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα^{10,34}.

Συνακόλουθα, το γλουταμικό οξύ είναι αυξημένο στα κύτταρα αναφοράς. Μελέτες δείχνουν τα υψηλά ποσοστά γλουταμικού οξέος στα καρκινικά κύτταρα και ιδιαίτερα σε εκείνα τα οποία δίνουν οστικές μεταστάσεις. Η κυτταρική σειρά PC-3 προέρχεται από οστική μετάσταση ανθρώπινου προστατικού αδενοκαρκινώματος. Παράλληλα λόγω της γλουταμινόλυσης, που περιγράφηκε παραπάνω, αυξάνεται η συγκέντρωση του¹⁵⁰.

Ο μεταβολίτης εκείνος που έχει ιδιαίτερη σημασία και θίγεται λίγο περισσότερο στην μελέτη είναι η γλουταθειόνη και ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζονται τα επίπεδά της από την δράση της ολεωρωπαΐνης.

Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) σαν απάντηση στα υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών που παρουσιάζονται στις περιπτώσεις κακοήθων όγκων. Μελέτες επικαλούνται την χρησιμότητα πλήθους φυσικών παραγόντων όπως η κουρκουμίνη και η ετοπποσίδη στην αντιμετώπιση των όγκων. Αυτοί δρουν με την παρακάτω διαδικασία: Εξαντλούν τα ενδοκυττάρια αποθέματα της γλουταθειόνης και επάγουν τον θάνατο των κακοήθων κυττάρων με τον μηχανισμό της απόπτωσης ενισχύοντας την μιτοχονδριακή παραγωγή ελευθέρων ριζών, στην οποία τα κύτταρα δεν μπορούν να αντεπεξέλθουν. Πρόκειται δηλαδή για μια στρατηγική αύξησης της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων με στόχο την καταστροφή τους. Η επίδραση αυτή διαφέρει τόσο μεταξύ των καρκινικών σειρών όσο και μεταξύ των διάφορων παραγόντων. Συγκεκριμένα για την καρκινική σειρά PC-3 βρέθηκε πως τα φλαβονοειδή χρυσίνη και απιγενίνη μείωσαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα της γλουταθειόνης κατά 70% σε σχέση με τα ctrl μετά από 24 ώρες έκθεσης σε αυτά. Η μελέτη προτείνει ουσιαστικά έναν μηχανισμό που μειώνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα της γλουταθειόνης και έτσι το κύτταρο είναι <<απροστάτευτο>> απέναντι στις ελεύθερες ρίζες, τα υψηλά επίπεδα των οποίων οδηγούν προοδευτικά στον θάνατό του μέσω απόπτωσης¹²⁴.

Η γλουταθειόνη είναι μια μικρού μοριακού βάρους θειόλη, που δρα αμυντικά για τα κυτταρικά συστήματα αντιμετωπίζοντας ξενοβιοτικά όπως ελεύθερες ρίζες και υπεροξειδία, συμβάλλοντας στην διατήρηση της λειτουργικότητας και την επιβίωση του κυττάρου. Συντίθεται κυρίως με το ένζυμο συνθετάση της

γλουταθειόνης από τα αμινοξέα κυστεΐνη, γλυκίνη και γλουταμικό οξύ. Τα ενδοκυττάρια επίπεδα της είναι υψηλότερα από τα εξωκυττάρια, κυμαινόμενα μεταξύ 0.1 και 10 mM, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον ηπατικό ιστό. Βρίσκεται είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ως σύμπλοκο με πρωτεΐνες και παρατηρείται σε δύο μορφές. Η ανοιγμένη της μορφή GSH μετατρέπεται μέσω του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης και δίνοντας έναν ηλεκτρόνιο, στην οξειδωμένη μορφή, αυτή του δισουλφιδίου GSSG με την αντίδραση : $GSH + e^- = GSSG$. Το άθροισμα $GSH + 2GSSG$ δίνει την συνολική γλουταθειόνη του κυττάρου ενώ η αναλογία $GSH/GSSG$ προσδιορίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου και είναι ένδειξη του κυτταρικού οξειδωτικού επιπέδου. Σε παθολογικές καταστάσεις, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και έλλειψης θρεπτικών συστατικών η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της γλουταθειόνης μειώνεται δραματικά. Η έλλειψη γλουταθειόνης αποδυναμώνει την άμυνα του κυττάρου και το καθιστά ευάλωτο στο οξειδωτικό στρες και όλες τις καταστάσεις που σχετίζονται με αυτό όπως, νευροεκφυλιστικές νόσοι, AIDS, καρκίνος κ.λ.π. Για όλους τους παραπάνω λόγους προσελκύει το ενδιαφέρον των ερευνητών οι οποίοι έχουν ανακαλύψει αρκετούς τρόπους προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης της στα βιολογικά συστήματα όπως φασματοφωτομετρικές και φθορισμομετρικές τεχνικές^{125,126}.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η γλουταθειόνη εμπλέκεται σημαντικά στην διατήρηση της πολύ λεπτής ισορροπίας μεταξύ κυτταρικής επιβίωσης και κυτταρικού θανάτου διατηρώντας το κατάλληλο επίπεδο αντιοξειδωτικής κατάστασης στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα υψηλά της ενδοκυττάρια επίπεδα δρουν προστατευτικά, ενώ τα χαμηλά επάγουν τον κυτταρικό θάνατο¹⁵¹.

Έτσι στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα της ανοιγμένης γλουταθειόνης στα κύτταρα αναφοράς είναι υψηλά ενώ με την χορήγηση των τριών επιδράσεων μειώνονται. Ενδεχομένως η αδριαμυκίνη να προκαλεί εξάντληση των ενδοκυττάρια επιπέδων της γλουταθειόνης, όπως αναφέρεται παραπάνω, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Η δε ολεωρωπαΐνη, μειώνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης γεγονός που μπορεί να ερμηνευθεί με δύο υποθέσεις: είτε δρώντας η ίδια ως αντιοξειδωτικός παράγοντας οπότε το καρκινικό κύτταρο δεν χρειάζεται να παράγει γλουταθειόνη^{83,152}, είτε δρα και εκείνη με παρεμφερή μηχανισμό με τα φλαβονοειδή χρυσίνη και απιγενίνη.

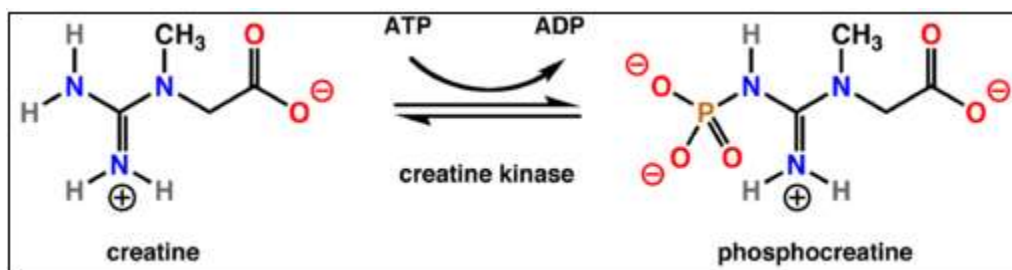
Η ταυρίνη είναι ένα οργανικό οξύ με πολλές και σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες όπως ωσμορύθμιση, σταθεροποίηση της μεμβράνης, ρύθμιση της σηματοδότησης του νατρίου. Εκείνη η ιδιότητα με ιδιαίτερη σημασία στην μελέτη, είναι η αντιοξειδωτική. Έτσι η ταυρίνη έχει υψηλά ποσοστά στα καρκινικά κύτταρα καθώς αποτελεί δείκτη τοξικότητας. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει την ταυρίνη ως πιθανό βιοδείκτη στα ούρα για καρκίνο της ουροδόχου κύστης¹⁵³. Στην παρούσα μελέτη ενδεχομένως η ταυρίνη, να έχει αντίστοιχο ρόλο για τον προστάτη, καθώς έχει υψηλή

συγκέντρωση στα κύτταρα αναφοράς. Επιπλέον έρευνα απαιτείται πάνω στον τομέα αυτό.

Μελέτες στον καρκίνο του προστάτη έδειξαν την αυξημένη ανάγκη για χολίνη και τα παράγωγα μόρια αυτής όπως γλυκεροφωσφοχολίνη καθώς είναι απαραίτητα για την σύνθεση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των ταχέως αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων. Έτσι, τα κύτταρα αναφοράς έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις αυτών των δύο μεταβολιτών¹⁵⁴.

Επίσης μελέτες ανέφεραν χαμηλή συγκέντρωση μυο-ινοσιτόλης στον καρκίνο του προστάτη σε προστατικά υγρά και υψηλές στον προστατικό ιστό¹⁴⁴. Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, ο συγκεκριμένος μεταβολίτης βρίσκεται σε αύξηση στα κύτταρα αναφοράς. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να αποσαφηνιστεί πότε και σε ποιες περιπτώσεις αυξάνεται και μειώνεται τελικά, καθώς είναι σημαντικός μεταβολίτης που διαδραματίζει ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια και είναι δομικό συστατικό των φωσφορικών της ινοσιτόλης που δομούν τα αντίστοιχα λιπίδια ενώ παράλληλα εμφανίζει και αντιοξειδωτική δράση.

Η κρεατίνη είναι ένα οργανικό οξύ που συσσωρεύεται κυρίως στους μυς με βασικό ρόλο την παραγωγή ενέργειας. Η κρεατίνη μέσω ATP κρεατινικής κινάσης [creatine kinase (CK)] ή κρεατινικής φωσφοκινάσης [creatine phosphokinase (CPK)] μετατρέπεται σε φωσφοκρεατίνη και ADP με αντιστρεπτή αντίδραση. Βιβλιογραφικά έχει βρεθεί συσχετισμός μεταξύ υψηλής συγκέντρωσης του ισοενζύμου της κρεατινικής κινάσης, creatine kinase isoenzyme CK-BB και του προστατικού αδενοκαρκινώματος.



Εικ 79:
Αλληλομετα-
τροπή
κρεατίνης/φωσ
φοκρεατίνης

Στα κύτταρα αναφοράς παρατηρείται υψηλή τιμή για την κρεατίνη/φωσφοκρεατίνη καθώς υπάρχουν υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις¹⁵⁵.

Η γλυκίνη είναι το μικρότερο αμινοξύ και πρωταρχικά χρησιμοποιείται για την σύνθεση πρωτεϊνών ενώ σε μετατρεπόμενη σε σερίνη τελικά παράγει πυροσταφυλικό οξύ. Είναι αυξημένη στα κύτταρα αναφοράς καθώς έχουν υψηλές απαιτήσεις πρωτεϊνοσύνθεσης¹⁵⁶.

Η μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) έχει υψηλά επίπεδα στα κύτταρα αναφοράς. Αυτό ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι σε ενδοκυττάριο επίπεδο μετέχει στην μεταγωγή του σήματος. Μαλιστα, βιβλιογραφικά δεδομένα για την κυκλική της μορφή, cAMP την συσχετίζουν με τον πολλαπλασιασμό των

κύτταρων και την ορίζουν ως πιθανό στόχο αντικαρκινικών θεραπειών, τους υποδοχείς της στο κύτταρο¹⁵⁷. Η δε, διφωσφονική 3'-5' αδενοσίνη (adenosine 3'5' diphosphate) δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Η γουανίνη παρουσιάζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στις ομάδες των επιδράσεων σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Αυτό το γεγονός ίσως σχετίζεται με την μη εκλεκτική χρησιμοποίηση της από τα καρκινικά κύτταρα στη σύνθεση των νουκλεοτιδίων τους καθώς μελέτη δείχνει πως δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι η βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων σε όγκους είναι διακριτή από εκείνη στους φυσιολογικούς ιστούς που ενσωματώνουν αδενίνη και όχι γουανίνη¹⁵⁸.

Ο μεταβολίτης HEPES {4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid} είναι ένας αμφοτερικός οργανικός ρυθμιστικός παράγοντας που χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιέργειες ως συστατικό του θρεπτικού υλικού για την διατήρηση σταθερού pH μεταξύ των τιμών 6-8. Η εκλεκτική του αύξηση στην ομάδα της συγχορήγησης ίσως οφείλεται στο διαφορετικό pH των φλασκών αυτής της ομάδας από τις υπόλοιπες¹⁵⁹.

Τέλος η διμεθυλαμίνη εμφανίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην ομάδα της ολευρωπαΐνης. Η διμεθυλαμίνη DMA (dimethylamine) με μοριακό τύπο $(CH_3)_2NH$ είναι μια δευτεροταγής αμίνη η οποία προκύπτει από την οξείδωση της τριμεθυλαμίνης (TMA trimethylamine) μέσω του ενζύμου trimethylamine monooxygenase δίνοντας οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO trimethyl amine oxide) και διμεθυλαμίνη. Η διμεθυλαμίνη έχει την ακόλουθη πορεία :

dimethylamine + H_2O + electron-transferring flavoprotein $\rightleftharpoons$ methylamine + formaldehyde + reduced electron-transferring flavoprotein.

Η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο δεϋδρογενάση της διμεθυλαμίνης (dimethylamine dehydrogenase). Ενδεχομένως η ολευρωπαΐνη να επηρεάζει τα ένζυμα που μετέχουν στις διαδικασίες μεταβολισμού της διμεθυλαμίνης με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της στο εκχύλισμα των κυττάρων που δέχτηκαν την επίδραση της^{160,161}.

Οι μεταβολίτες που είναι αυξημένοι στα κύτταρα αναφοράς, μετά την χορήγηση αδριαμυκίνης, ολευρωπαΐνης και του συνδυασμού αυτών, μειώνουν τα επίπεδά τους στα καρκινικά κύτταρα. Αυτό ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι υπό την επίδραση των ουσιών αυτών αλλάζουν τα οξειδωτικά επίπεδα του κυττάρου και τίθενται σε λειτουργία διάφορα συστήματα μέσω των συγκεκριμένων μηχανισμών με τους οποίους ασκεί κάθε παράγοντας την δράση του.

Τα παραπάνω ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των κακοήθων κυττάρων θα μπορούσαν να αποτελέσουν την βάση για την ανάπτυξη νέων πιο στοχευμένων και με λιγότερο κόστος και ανεπιθύμητες ενέργειες,

αντικαρκινικών φαρμάκων. Επιπλέον με τον συνδυασμό της γονιδιωματικής και των άλλων προσεγγίσεων omics, η εξατομικευμένη φαρμακευτική αγωγή τείνει περισσότερο από ποτέ, να γίνει πραγματικότητα. Η ταυτόχρονη χορήγηση κλασικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων και φυσικών προϊόντων θα ήταν χρήσιμη με γνώμονα το χαμηλότερο κόστος της θεραπείας και τις λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες λόγω της χρήσης μικρότερων δόσεων του αντικαρκινικού φαρμάκου. Η μεσογειακή διατροφή μπορεί να συμβάλλει προς αυτή την κατεύθυνση καθώς παρέχει όλα εκείνα τα συστατικά που μπορούν να δράσουν τόσο σε χημειοθεραπευτικό όσο και χημειοπροστατευτικό επίπεδο.

Το μέλλον στην πρόληψη και στην θεραπεία του καρκίνου του προστάτη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και είναι πολλά υποσχόμενο για θετικές προς όφελος των ασθενών εξελίξεις και προοπτικές. Η μεταβιομική επιστήμη συνδυαζόμενη με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, μεταξύ των άλλων λόγω της ολιστικής και μη στοχευμένης φύσης της μπορεί να αποτελέσει ένα επιπλέον εργαλείο στην φαρέτρα της σύγχρονης αντιμετώπισής του. Η διεξαγωγή και άλλων τεχνικών όπως ανοσοχημικές παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για μια ολοκληρωμένη εικόνα της συμπεριφοράς της νόσου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. J.K.Nicholson, E.Holmes and J.C.Lindon, Metabonomics and Metabolomics Techniques and Their Applications in Mammalian Systems, The Handbook of Metabonomics and Metabolomics, Chapter 1, Elsevier publications 2007.
2. J.C.Lindon, J.K.Nicholson, E.Holmes, J.R. Everett, Metabonomics: Metabolic Processes Studied by NMR Spectroscopy of Biofluids, Concepts in Magnetic Resonance, 12: 289–320, 2000.
3. V.S.Vaidya, J.K.Nicholson and H.M.Mehendale, Metabonomics, Elsevier 2005 .
4. J.Nielsen, M.C. Jewett, The role of metabolomics in systems biology, Metabolomics, Topics in Current Genetics, Vol 18, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007.
5. J.K.Nicholson and J.C. Lindon, Metabonomics, Nature, Vol 455|23 October 2008.
6. B.Alvarez-Sanchez, F.Priego-Capote, M.D.Luque de Castro, Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 29, No. 2, 2010.
7. B.Alvarez-Sanchez, F.Priego-Capote, M.D.Luque de Castro, Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 29, No. 2, 2010
8. X.Duportet, R.B.Mereschi Aggio, S.Carneiro, S.Granato Villas-Boas, The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used, Metabolomics, Springer Science and Business Media, LLC 2011.
9. J.E.Le Belle, N.G.Harris, S.R.Williams, K.K.Bhakoo, A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ^1H -NMR spectroscopy, NMR in Biomedicine, 15: 37-44, 2002.
10. F.Chiaradonna, R.M.Moresco, C.Airoidi, D.Gaglio, R.Palorini, F.Nicotra, C. Messa, L. Alberghina, From cancer metabolism to new biomarkers and drug targets, Biotechnology Advances 30, 30–51, Elsevier, 2012.
11. J.Trygg and T.Lundstedt, Chemometrics Techniques for Metabonomics, The Handbook of Metabonomics and Metabolomics, Chapter 6, Elsevier publications 2007.
12. J.Lindon, Metabonomics – Techniques and Applications, Technology & Services, Business briefing: Future Drug Discovery, 2004.
13. J.Trygg, E.Holmes, T.Lundstedt, Chemometrics in Metabonomics, Journal of Proteome Research, 6, 469-479, 2007.

14. J.Shlens, A Tutorial on Principal Component Analysis, Center for Neural Science, New York University. <http://www.sn1.salk.edu>
15. J.K.Nicholson, J.C.Lindon, E.Holmes, Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica*, Vol.29, No.11, 1181-1189, 1999.
16. Eriksson L, Johanson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikstrom C, Wold S, Multi- and Megavariate Data Analysis – Principles and Applications, Umetrics Academy, Sweden, 71-94, 2003.
17. Næs T, Martens H, Multivariate Calibration and Classification, NIR publications, Ch. 13-14, 1989.
18. Barker M, Rayens W, Partial least squares for discrimination, *J.Chemometrics*, 17: 166-173, 2003.
19. M.E.Bollard, E.G.Stanley, J.C.Lindon, J.K.Nicholson and E.Holmes, NMR-based metabonomics approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed*, 18, 143–162, 2005.
20. J.P.Shockcor and E.Holmes, Metabonomic Applications in Toxicity Screening and Disease Diagnosis, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2, 35-51, 2002.
21. E.Holmes, A.W.Nicholls, J.C.Lindon, S.Ramos, M.Spraul, P.Neidig, S.C.Connor, J.Connelly, S.J.P.Damment, J.Haselden and J.K.Nicholson, Development of a Model for Classification of Toxin-induced Lesions Using ¹H NMR Spectroscopy of Urine Combined with Pattern Recognition, *NMR in Biomedicine*, 11, pp. 235–244, 1998.
22. E.Holmes, J.K .Nicholson, A.W.Nicholls, J.C.Lindon, S.C.Connor, S.Polley and J.Connelly, The Identification of Novel Biomarkers of Renal Toxicity Using Automatic Data Reduction Techniques and PCA of Proton NMR Spectra of Urine, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44, pp. 245–255, 1998.
23. Lindon J.C, Nicholson J.K, Holmes E, *Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, 2007.
24. Lindon J, Robertso D.G, *Metabonomics in Toxicity Assessment*, 2005.
25. J.C. Lindon and E.Holmes, A Survey of Metabonomics Approaches for Disease Characterisation, *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, Chapter 15 , Elsevier publications 2007.
26. M.Coen, M.O’Sullivan, W.A.Bubb, P.W.Kuchel and T.Sorrell. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis, *Clin. Infect.Disease*, 41, 1582–1590, 2005.

27. G.L.A.H.Jones, E.Sang, C.Goddard, R.J.Mortishire-Smith, B.C.Sweatman, J.N.Haselden, K.Davies, A.A.Grace, K.Clarke and J.L.Griffin, A functional analysis of mouse models of cardiac disease through metabolic profiling, *J. Biol Chem*, 280, 7530–7539 2005.
28. U.F.H.Engelke, M.Oostendorp, R.A.Wevers, *NMR Spectroscopy of Body Fluids as a Metabolomics Approach to Inborn Errors of Metabolism*, *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, Chapter 14, Elsevier publications 2007.
29. M.A.Constantinou, E.Papakonstantinou, D.Benaki, M.Spraul, K.Shulpis, M.A.Koupparis, E.Mikros, Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with principal component analysis in detecting inborn errors of metabolism using blood spots: a metabonomic approach, *Analytica Chimica Acta*, 511:303–312, 2004.
30. Paris A, Dumas M.E, Vercauteren J, André F, Canlet C, Gottardi G, *Science & Sports*, 20, 222–225, 2005.
31. B.H.Singer, J.Utzinger, C.D.Ryff, Y.Wang and E.Holmes, Exploiting the Potential of Metabonomics in Large Population Studies: Three Venues, *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, Chapter 11, Elsevier publications 2007.
32. R.N.Trethewey and A.J.Krotzky, *Metabolic Profiling: Applications in Plant Science*, *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, Chapter 16, Elsevier publications 2007.
33. L.G.Boros, Metabolic targeted therapy of cancer: current tracer technologies and future drug design strategies in the old metabolic network, *Metabolomics*, Vol.1, No.1, January 2005.
34. G.D.Dakubo, *The Warburg Phenomenon and Other Metabolic Alterations of Cancer Cells*, *Mitochondrial Genetics and Cancer*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.
35. M.Gottschalk, G.Vanova, D.M.Collins, A.Eustace, R.O'Connor, D.F.Brougham, Metabolomic studies of human lung carcinoma cell lines using in vitro ¹H NMR of whole cells and cellular extracts, *NMR Biomed*, 2008.
36. E.O.Aboagye, Z.M.Bhujwalla, Malignant Transformation Alters Membrane Choline Phospholipid Metabolism of Human Mammary Epithelial Cells, *Cancer Research* 59, 80–84.
37. Jemal A, Tiwari R.C, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer E.J, Thun M.J, Cancer statistics, *CA Cancer J. Clin*, 54(1): 8–29, 2004.
38. National Institute of Cancer (NCI) - Prostate Cancer Progress Review Group (PRG).

39. L.L.Cheng and U.Pohl, The Role of NMR-based Metabolomics in Cancer, *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, Chapter 13, Elsevier publications 2007.
40. Costello LC and Franklin RB, The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy, *Oncology* 59, 269–282, 2000.
41. Costello LC, Franklin RB, and Narayan P, Citrate in the diagnosis of prostate cancer, *Prostate* 38, 237–245, 1999.
42. Costello LC, Feng P, Milon B, Tan M and Franklin RB, Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve, *Prostate Cancer Prostatic Dis* 7, 111–117, 2004.
43. Costello LC, Franklin RB, Feng P, Tan M and Bagasra O, Zinc and prostate cancer: a critical scientific, medical, and public interest issue (United States), *Cancer Causes Control* 16, 901–915, 2005.
44. Desouki MM, Geradts J, Milon B, Franklin RB, and Costello LC, hZip2 and hZip3 zinc transporters are down regulated in human prostate adenocarcinomatous glands, *Mol Cancer* 6, 37, 2007.
45. G.F.Weber, *Molecular Mechanisms of Cancer*, 2007 Springer.
46. K.Collins, T.Jacks, N.P.Pavletich, The cell cycle and cancer, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol 94, pp 2776-2778, 1997.
47. J.L Longe, *The Gale Encyclopedia of Cancer: A Guide to Cancer and Its Treatments*, Second Edition, Thomson Gale 2005.
48. R.J.B.King, M.W.Robins, *Cancer biology*, 3rd ed, Pearson Education Limited 2006.
49. Doll R, The Epidemiology of Cancer, *Cancer* 45, 2475-2485, 1980.
50. Zaccagnini M, Prostate cancer, *Am J Nurs* 99 (4), 34-35, 1999.
51. http://www.andrologia.gr/templates/articlescontinuous.asp?c=pathis_eisprostati.
52. McNeal J.E. et al, Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread, *Am J Surg Pathol* 12 (12), 897-906, 1998.
53. Villers A.A. et al, Development of prostatic carcinoma. Morphometric and pathologic features of early stages, *Acta Oncol* 30 (2), 145-151, 1991.
54. Tefilli M.V. et al, Role of radical prostatectomy in patients with prostate cancer of high Gleason score, *Prostate* 39 (1), 60-66, 1999.
55. Pontes J.E, Methods of early detection of prostate cancer: the role of prostatic specific antigen, transrectal ultrasound and digital rectal examination, *In Vivo* 8 (3), 413-414, 1994.
56. Stamey T.A, The role of prostate-specific antigen in the diagnosis and treatment of prostatic adenocarcinoma, *Urologe A* 29 (2), 52-64, 1990.

57. Koutsilieris M, Skeletal metastases in advanced prostate cancer: cell biology and therapy, *Crit Rev Oncol Hematol* 18 (1), 51-64, 1995.
58. Mitsiades C.S. and Koutsilieris M, Molecular biology and cellular physiology of refractoriness to androgen ablation therapy in advanced prostate cancer, *Expert Opin Investig Drugs* 10 (6), 1099-1115, 2001.
59. Reyes-Moreno C. et al, Osteoblast-derived survival factors protect PC-3 human prostate cancer cells from adriamycin apoptosis, *Urology* 52 (2), 341-347, 1998.
60. Cussenot O, Growth factors and prostatic tumors, *Ann Endocrinol (Paris)* 58 (5), 370-380, 1997.
61. Visakorpi T. et al, In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer, *Nat Genet* 9 (4), 401-406, 1995.
62. Feldman B.J. and Feldman D, The development of androgen-independent prostate cancer, *Nat Rev Cancer* 1 (1), 34-45, 2001.
63. Borner M.M. et al, Drug-induced apoptosis is not necessarily dependent on macromolecular synthesis or proliferation in the p53-negative human prostate cancer cell line PC-3, *Cancer Res* 55 (10), 2122-2128, 1995.
64. Pergolizzi R.G. et al, Mutational status of codons 12 and 13 of the N- and K-ras genes in tissue and cell lines derived from primary and metastatic prostate carcinomas, *Cancer Invest* 11 (1), 25-32, 1993.
65. Beresford S.A. et al, Differential effects of phosphatidylinositol-3/Akt-kinase inhibition on apoptotic sensitization to cytokines in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells, *J Interferon Cytokine Res* 21 (5), 313-322, 2001.
66. Kaighn M.E. et al, Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3), *Invest Urol* 17, 16-23, 1979.
67. C.Parnell, P.J.Woll, Principles of cancer treatment by chemotherapy, The Medicine Publishing Company Ltd, 2003.
68. Κατερίνα Τυλιγάδα, Αντικαρκινικά χημειοθεραπευτικά.
69. F.Arcamone, G.Cassinelli, G.Faktini, A.Grein, P.Orezzi, C.Pol and C.Spalla, Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a New Antitumor Antibiotic from *S. peuceetii* var. *Caesius*, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.XI, Pages 1101-1110, 1969..
70. G.Bonadonna, S.Monfardini, M.De Lena, F.Fossati-Bellani, Clinical Evaluation of Adriamycin, a New Antitumour Antibiotic, *British Medical Journal*, 3, 503-506, 1969.
71. Robert J, Anthracyclines, Chapter 9. In: Schellens JHM, McLeod HL, Newell DR, editors. *Cancer clinical pharmacol*, Oxford University Press, p. 117–33, 2005.

72. Cortes-Funes H, Coronado C, Role of anthracyclines in the era of targeted therapy, *Cardiovasc Toxicol*, 7: 56–60, 2007.
73. <http://chemoth.com>
74. M.Durica, A.Breier, Synthesis and Chemical Properties of Doxorubicin Derivates, *Chem Papers* 52 , 1998.
75. Vendrik C.P.J, Bergers J.J, De Jong W.H, Steerenberg P.A, *Cancer Chemother Pharmacol* 29, 413, 1992.
76. O.Tacar, P.Sriamornsak and C.R.Dass, Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Royal Pharmaceutical Society, 2012.
77. Gonzalez D et al, Hypersensitivity reactions to chemotherapy drugs, *Allergol Immunol Clin*, 15: 161–181, 2005.
78. Zunino F, Capranico G, DNA topoisomerasas II as the primary target of antitumoral anthracyclines, *Anticancer Drug Des*, 5: 307–17, 1990.
79. Tewey KM, Chen GL, Nelson EM, Liu LF, Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II, *J Biol Chem*, 259, 9182–7, 1984.
80. www.drugbank.ca
81. S.Nobili, D.Lippib, E.Witort, M.Donninic, L.Bausi, E.Minia, S.Capaccioli, Natural compounds for cancer treatment and prevention, *Pharmacological Research* 59, 365–378, 2009.
82. D.Staedler, E.Idrizi, B.Halamoda Kenzaoui, L.Juillerat-Jeanneret, Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells, *Cancer Chemother Pharmacol*, 68, 1161–1172, 2011.
83. I.Andreadou, E.K.Iliodromitis, E.Mikros, M.Constantinou, A.Agalias, P.Magiatis, A.L.Skaltsounis, E.Kamber, A.Tsantili-Kakoulidou and D.Th.Kremastinos, The Olive Constituent Oleuropein Exhibits Anti-Ischemic, Antioxidative, and Hypolipidemic Effects in Anesthetized Rabbits, *J. Nutr* 136, 2213–2219, 2006.
84. Cortes-Funes H. and C.Coronado, Role of anthracyclines in the era of targeted therapy, *Cardiovasc Toxicol*, 7(2), p. 56-60, 2007.
85. Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E, Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance, *Curr Drug Targets*, 7:861–79, 2006.
86. Friche E, Skovsgaard T, Nissen JI, Anthracycline resistance, *Acta Oncol*, 28: 877–81, 1989.
87. M.de Lorigeril, P.Salen, J.L.Martin, I.Monjaud, P.Boucher, N.Mamelle, Mediterranean dietary pattern in a randomized trial: prolonged survival and possible reduced cancer rate, *Arch. Intern.Med*, 158, 1181–1187, 1998.

88. A.Menotti, A.Keys, C.Aravanis, H.Blackburn, A.Dontas, F.Fidanza, M.J.Karvonen, D.Kromhout, S.Nedeljkovic, A.Nissinen et al, Seven Countries Study, First 20-year mortality data in 12 cohorts of six countries, *Ann. Med.* 21, 175–179, 1989.
89. A.Keys, A.Menotti, M.J.Karvonen, C.Aravanis, H.Blackburn, R.Buzina, B.S.Djordjevic, A.S.Dontas, F.Fidanza, M.H.Keys et al, The diet and 15-year death rate in the seven countries study, *Am. J. Epidemiol*, 124, 903–915, 1986.
90. A.Keys, C.Aravanis, H.Blackburn, R.Buzina, A.S.Dontas, F.Fidanza, M.J.Karvonen, A.Menotti, S.Nedeljkovic, S.Punsar et al, Serum cholesterol and cancer mortality in the Seven Countries Study, *Am. J. Epidemiol*, 121, 870–883, 1985.
91. S.Renaud, M.de Lorgeril, J.Delays, J.Guidollet, F.Jacquard, N.Mamelle, J.L.Martin, I.Monjaud, P.Salen, P.Toubol, Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease, *Am. J. Clin. Nutr*, 61, 1360S–1367S, 1995.
92. Kiritsakis A, Olive oil- Second Edition, From the tree to the table, Food and Nutrition Press, Inc., Trumbull, Connecticut, USA, 1998.
93. Soler-Rivas C, Espin J.C, Wichers H.J, Oleuropein and related compounds, *J Sci Food Agric*, 80: 1013–1023, 2000.
94. Syed Haris Omar, Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects, *Sci Pharm*, 78: 133–154, 2010.
95. Vissers M.N, Zock P.L, Roodenburg A.J.C, Leenen R, Katan M.B, Olive oil phenols are absorbed in humans, *J Nutr*, 132: 409–417, 2002.
96. Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H, Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells, *Cytotechnology*, 59: 45–53, 2009.
97. Tim Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63, 1983.
98. M.M.Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254, 1976.
99. Γ. Ρήγας, Α. Αθανασίου, Ο κυτταρικός κύκλος, Κεφ 9, Κλινική Ογκολογία, Τόμος Α, Γενικό Μέρος, Πρώτη έκδοση: Αθήνα Μάρτιος 2007, Ε.Ε.Π.Ο.Ε.
100. Χ.Ανδρεάδης, Αρχές αντινεοπλασματικής χημειοθεραπείας, Κεφ 37, Κλινική Ογκολογία, Τόμος Α', Γενικό Μέρος, Πρώτη έκδοση: Αθήνα Μάρτιος 2007, Ε.Ε.Π.Ο.Ε.
101. Two dimensional NMR spectroscopy-wikipedia.
102. P.L.Donald, L.M.Gary, K.S.George, V.R.James, Introduction to spectroscopy, Fourth Edition, Brooks/Cole.

103. A.Craig, O.Cloarec, E.Holmes, J.K.Nicholson and J.C.Lindon, Scaling and Normalization Effects in NMR Spectroscopic Metabonomic Data Sets, *Anal. Chem*, 78, 2262-2267, 2006.
104. H.Sadeghi-Bazargani, A.Banani, S.Mohammadi, Using SIMCA statistical software package to apply orthogonal projections to latent structures modeling, Conference Publications.
105. Umetrics, in: SIMCA-P + The standard multivariate technology, 2009.
106. www.abcam.com/technical
107. Pohl L, Eckle M, Sodium 3-(trimethylsilyl) tetrauteriopropionate, a new water-soluble standard for ¹H N.M.R, *Angewandte Chemie, International Edition in English* 8 (5): 381, 1969.
108. Θ.Π.Χατζηϊωάννου, Μ.Α.Κουππάρη, Ενόργανη Ανάλυση, Εκδ Μαυρομάτη, 5^η ανατύπωση, Αθήνα 2003.
109. Premo™ Autophagy Sensors (LC3B-FP) *BacMam 2.0*, <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/P36236>.
110. Lindon J.C, Nicholson J.K, Everett J.R, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 38, 2-87, 1999.
111. N.W. Lutz, A.Viola, I.Malikova, S.Confort-Gouny, J.P. Ranjeva, J.Pelletier, P.J. Cozzone, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354: 160-164, 2007.
112. *Analytical Chemistry*, Vol 67, No 5, 1995.
113. E. Holmes et al, *J. Pharm, Biomed. Anal*, 15: 1647-1659, 1997.
114. Lindon J. C, Nicholson J. K, Everett J. R, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 38, 2-87, 1999.
115. <http://www.hmdb.ca/> (Human Metabolome Database).
116. M.Noboru, Autophagy: process and function, *Genes Dev*, 21: 2861-2873, 2007.
117. I.Tanida, T.Ueno, E.Kominami, LC3 and autophagy, *Methods in Molecular Biology*, Vol 445, 77-88, Autophagosome and phagosome, 2008.
118. N.Mizushima, T.Yoshimori, B.Levine, *Methods in Mammalian Autophagy Research*, Cell, February 5, 140(3): 313–326, 2010.
119. M.Coen, P.W.Kuchel, *Chemistry in Australia*, 2004.
120. Mainardi T, Kapoor S, Bielory L, Complementary and alternative medicine: Herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(2), 283-294, 2009.
121. T.Dorai, B.B.Aggarwal, Role of chemopreventive agents in cancer therapy, *Cancer Letters* 215, 129–140, 2004.
122. D.Staedler, E.Idrizi, B.Halamoda Kenzaoui, Lucienne Juillerat-Jeanneret, Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells, *Cancer Chemother Pharmacol*, 68:1161–1172, 2011.

123. Acquaviva R, Giacomo Di C, Sorrenti V, Galvano F, Santangelo R, Cardile V, Gangia S, D'orazio N, Abraham G.N, Vanella L, Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines, *International Journal of Oncology* 41: 31-38, 2012.
124. R.Kachadourian, B.J.Day, Flavonoid-induced glutathione depletion: Potential implications for cancer treatment, *Free Radical Biology & Medicine* 41, 65–76, 2006.
125. G.Wu, Yun-Zhong Fang, S.Yang, J.R. Lupton, N.D. Turner, Glutathione Metabolism and Its Implications for Health, *Journal of Nutrition*, 2003.
126. A.Pastore, G.Federici, E.Bertini, F.Piemonte, Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification, *Clinica Chimica Acta* 333, 19–39, 2003.
127. K.A.Conklin, Dietary Antioxidants During Cancer Chemotherapy: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness and Development of Side Effects, *Nutrition and Cancer*, 37(1), 1–18, 2000.
128. Ling YH, El-Naggar AK, Priebe W, Perez-Soler R, Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells, *Mol Pharmacol*, 49(5): 832-841, 1996.
129. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE, p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents, *Cell*, 74(6): 957-967, 1993.
130. R.Abe, J.Beckett, A.Nixon, A.Rochier, N.Yamashita, B.Sumpio, Olive Oil Polyphenol Oleuropein Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation, *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 41, 814-820, 2011.
131. Ivan K S Yap, Why Metabonomics? *leJSME*, 5 (1): 17-26, 2011.
132. S.Rezzi, F-P.J.Martin, S.Kochhar, Defining Personal Nutrition and Metabolic Health Through Metabonomics, *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings*, Vol. 4, pp. 251–264.
133. Kinross J.M, Holmes E, Darzi A.W, Nicholson J.K, Metabolic phenotyping for monitoring surgical patients, *Lancet*, 377, (9780), 1817-9, 2011.
134. A.Frickenschmidt, H.Frohlich, D.Bullinger, A.Zell, S.Laufer, C.H.Gleiter, H.Liebich, B.Kammerer, Metabonomics in cancer diagnosis: mass spectrometry-based profiling of urinary nucleosides from breast cancer patients, *Biomarkers*, 13(4): 435-449, June 2008.
135. J.Yang, G.Xu, Y.Zheng, H.Kong, T.Pang, Shen Lv, Q.Yang, Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases, *Journal of Chromatography B*, 813, 59–65, 2004.
136. X.Fan, J.Bai, P.Shen, Diagnosis of breast cancer using HPLC metabonomics fingerprints coupled with computational methods,

- Proceedings of the 2005 IEEE, Engineering in Medicine and Biology, 27th Annual Conference, Shanghai, China, September 1-4, 2005.
137. A.Hasim, M.Ali, B.Mamtimin, Jun-Qi Ma, Qiao-Zhi Li, A.Abudula, Metabonomic signature analysis of cervical carcinoma and precancerous lesions in women by ^1H NMR spectroscopy, *Experimental and Therapeutic Medicine* 3: 945-951, 2012.
 138. A.Hasim, H.Ma, B.Mamtimin, A.Abudula, M.Niyaz, Li-wei Zhang, J.Anwer, I.Sheyhidin, Revealing the metabonomic variation of EC using ^1H -NMR spectroscopy and its association with the clinicopathological characteristics, *Mol Biol Rep*, 39: 8955–8964, 2012.
 139. H.Gao, Q.Lu, X.Liu, H.Cong, L.Zhao, H.Wang, D.Lin, Application of ^1H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis, *Cancer Sci*, vol. 100, no. 4, 782–785, April 2009.
 140. J.Carrola, C.M.Rocha, A.S.Barros, A.M.Gil, B.J.Goodfellow, I.M.Carreira, J.Bernardo, A.Gomes, V.Sousa, L.Carvalho, L.F.Duarte, NMR metabonomic study of lung cancer : metabolic profiling of urine and blood plasma, *BMC Proceedings*, 4(Suppl 2): P67, 2010.
 141. S.Tiziani, V.Lopes, U.L.Günther, Early Stage Diagnosis of Oral Cancer Using ^1H NMR–Based Metabolomics, Volume 11, Number 3, pp. 269–276, March 2009
 142. H.Gao, B.Dong, J.Jia, H.Zh, C.Diao, Z.Yan, Y.Huang, X.Li, Application of ex vivo ^1H NMR metabonomics to the characterization and possible detection of renal cell carcinoma metastases, *J Cancer Res Clin Oncol*, 138: 753–761, 2012.
 143. Costello L.C, Franklin R.B, Prostatic fluid electrolyte composition for the screening of prostate cancer: a potential solution to a major problem, *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 12: 17-24, 2009.
 144. M.J.Roberts, H.J.Schirra, M.F.Lavin, R.A.Gardiner, Metabolomics: A Novel Approach to Early and Noninvasive Prostate Cancer Detection, *Korean J Urol*, 52: 79-89, 2011.
 145. A.H.Fowler, A.A.Pappas, J.C.Holder, A.E.Finkbeiner, G.V.Dalrymple, M.S.Mullins, J.R.Sprigg, R.A.Komoroski, Differentiation of Human Prostate Cancer from Benign Hypertrophy by in Vitro ^1H NMR, *Magnetic resonance in medicine* 25, 140-147, 1992.
 146. C.Reyers-Moreno, A.Sourla, I.Choki, C.Doillon, M.Koutsilieris, Osteoblast-derived survival factors protect PC-3 human prostate cancer cells from Adriamycin apoptosis, *Urology* 52, 341–347, 1998.

147. H.K.Hamdi, R.Castellon, Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 769–778, 2005.
148. http://www.sci.sdsu.edu/class/bio202/TFrey/Glycolysis_TCA.html.
149. Marshalel Yacoe, Grahamso Mmer, Donnape Ehl, *In Vitro Proton Spectroscopy of Normal and Abnormal Prostate*, *Magnetic resonance in medicine* 19, 429-438, 1991.
150. E.P.Seidlitz, M.K.Sharma, Z.Saikali, M.Ghert, G.Singh, Cancer cell lines release glutamate into the extracellular environment, *Clin Exp Metastasis*, 26: 781–787, 2009.
151. C.L.Hammond, T.K.Lee, N.Ballatori, Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes, *Journal of Hepatology* 34, 946-954, 2001.
152. C.Manna, V.Migliardi, P.Golino, A.Scognamiglio, P.Galletti, M.Chiariello, V.Zappia, Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion, *Journal of Nutritional Biochemistry* 15, 461–466, 2004.
153. A.A.Sonkar, S.Srivastava, S.Singh, D.Dalela, S.N.Sankhwar, A.Goel, and R.Roy, Taurine- a possible biomarker in urine of Urinary Bladder Cancer by ¹H NMR Spectroscopy: A pilot study, *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 17, 2009.
154. B.J.Trock, Application of metabolomics to prostate cancer, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 29, 572–581, 2011.
155. L.M.Silverman, G.B.Dermer, M.H.Zweig, A.C.Van.Steirteghem, Z.A.Tokes, Creatine Kinase BB: A New Tumor-Associated Marker, *Clin Chem* 25/8, 1432-1435, 1979.
156. <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycine>.
157. Y.S.Cho-Chung, Role of Cyclic AMP Receptor Proteins in Growth, Differentiation, and Suppression of Malignancy: New Approaches to Therapy, *Cancer Research* 50, 7093-7100. November 15, 1990.
158. S.Graff, M.Engelman, H.B.Gillespie, A.M.Graff, Guanine in Cancer, *Cancer Res*, 11: 388-392, 1951.
159. <http://en.wikipedia.org/wiki/HEPES>.
160. http://en.wikipedia.org/wiki/Dimethylamine_dehydrogenase.
161. A.Q.Zhang, S.C.Mitchell, T.Barrett, R.Ayesh, R.L.Smith, Fate of dimethylamine in man, *Xenobiotica*, Vol 24, No 4, 379-387, 1994.
162. M.Cuperlovic-Culf, D.A.Barnett, A.S.Culf, I.Chute, Cell culture metabolomics: applications and future directions, *Drug Discovery Today*, Volume 15, Numbers 15/16, August 2010.