



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Πρόεδρος: Καθηγητής Πέτρος Σφηκάκης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Τζιούφας

**ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗΣ ΩΣ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Αθανάσιος Μπίκας

ΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Πρόεδρος: Καθηγητής Πέτρος Σφηκάκης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Τζιούφας

**ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗΣ ΩΣ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Αθανάσιος Μπίκας

ΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

Στοιχεία ταυτότητας της διδακτορικής διατριβής

Ημερομηνία ορισμού συμβουλευτικής επιτροπής: 09/04/2015

Ημερομηνία κατάθεσης θέματος: 11/07/2015

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 07/02/2020

Ημερομηνία υποστήριξης της διδακτορικής διατριβής: 19/05/2020

Βαθμός: Άριστα

Συμβουλευτική επιτροπή

Γ. Καλτσάς, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μ. Βουλγαρέλης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ε. Κασσή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Επιβλέπων

Γ. Καλτσάς, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

7μελής Εξεταστική Επιτροπή:

Γ. Καλτσάς, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μ. Βουλγαρέλης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ν. Σύψας, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ε. Κασσή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ε. Καψογεώργου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Α. Πρωτογέρου, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Σ. Σουγιουλτζής, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Θέμα διδακτορικής διατριβής

Αναζήτηση μηχανισμών για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της Μετοφομίνης ως φαρμακευτική θεραπεία για τον καρκίνο του θυρεοειδούς

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἄσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χριζόντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χριζῶσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χριζομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνωσ δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χριή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

**Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών
δε συνιστά αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.**

N. 5343/1932 άρθρο 202

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ο Αθανάσιος Μπίκας γεννήθηκε στην Αθήνα Αττικής από τους Νικόλαο Μπίκα και Ιωάννα Χατζηζήση. Πέρασε όλη την παιδική και εφηβική ηλικία στα Βριλήσσια Αττικής. Μέσω των Πανελληνίων Εξετάσεων άρχισε να σπουδάζει στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ το 2006, και ολοκλήρωσε την ιατρική του εκπαίδευση το 2012. Στη συνέχεια, ξεκίνησε την ερευνητική του καριέρα στην Αμερική, όπου δούλεψε με τους πολύ γνωστούς θυρεοειδολόγους Dr. Kenneth Burman και Dr. Leonard Wartofsky στον καρκίνο του θυρεοειδούς στην πόλη της Washington, DC, USA. Το διάστημα 2016 – 2019 έκανε την ειδικότητά του στην Παθολογία στο νοσοκομείο MedStar Georgetown University Hospital, από όπου απέσπασε βραβεία και επιλέχθηκε να δουλέψει ως Επικεφαλής Ειδικευόμενος του πρόγραμματος ειδικότητας το διάστημα 2019-2020. Τον Ιούλιο του 2020, θα αρχίσει την ειδικότητά του στην Ενδοκρινολογία στο νοσοκομείο Brigham and Women's Hospital του Harvard Medical School. Ερευνητικά, έχει παρουσιάσει εργασίες σε αμερικανικά και παγκόσμια συνέδρια για τις οποίες έχει αποσπάσει διάφορα βραβεία, και είναι συγγραφέας 10 συγγραμμάτων που εμφανίζονται στο PubMed.

Αφιερωμένη στον πατέρα μου, Νικόλαο Μπίκα

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα εργαστήρια του USUHS (Uniformed Services University of the Health Sciences) την περίοδο 2015-2019, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γ. Καλτσά, τον οποίο και θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την επιστημονική υποστήριξη αλλά και τη φιλική διάθεση, την εμπιστοσύνη και το αμείωτο ενδιαφέρον που επέδειξε όλα αυτά τα χρόνια κατά την επίβλεψη της διατριβής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Α. Τζιούφα, που υποστήριξε την πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής μου, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Ε. Κασσή και τον καθηγητή κ. Μ. Βουλγαρέλη, για την καλή τους διάθεση και το χρόνο που διέθεσαν κατά την παρακολούθηση της συγκεκριμένης μελέτης.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους από το εργαστήριο στο οποίο τόσα χρόνια εργαστήκαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια και τους στενούς μου φίλους για τη διαρκή υποστήριξη και ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής αυτής διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Καρκίνος
2. Καρκίνος του Θυρεοειδούς
 - 2.1 Γενικά
 - 2.2 Γενετικό υπόβαθρο
 - 2.2.1 Διαφοροποιημένος Καρκίνος του Θυρεοειδούς
 - 2.2.2 Μυελοειδής Καρκίνος του Θυρεοειδούς
 - 2.3 Επίπτωση
 - 2.4 Επιπολασμός
 - 2.5 Θνησιμότητα
 - 2.6 Επιδημιολογία Ανάλογα με Ιστολογικό Τύπο
 - 2.7 Παράγοντες Κινδύνου για την Ανάπτυξη Καρκίνου του Θυρεοειδούς
3. Μετορμίνη
 - 3.1 Η Μετορμίνη ως Αντιδιαβητική Θεραπεία
 - 3.2 Η Μετορμίνη ως Αντικαρκινική Θεραπεία
4. Βιβλιογραφία Γενικού Μέρους

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η Μείωση της Εξωκυττάριας Γλυκόζης Αυξάνει την Αποτελεσματικότητα της Μετορμίνης Εναντίον των Θυρεοειδικών Καρκινικών Κυττάρων
 - 1.1 Εισαγωγή
 - 1.2 Μέθοδοι και Υλικά
 - 1.2.1 Δείγματα από ανθρώπινους θυρεοειδικούς ιστούς
 - 1.2.2 Καρκινικές θυρεοειδικές σειρές και υλικά
 - 1.2.3 Πειράματα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική βιωσιμότητα και ενεργοποίηση κασπάσης
 - 1.2.4 Μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και του pH στο μέσο
 - 1.2.5 Εξαγωγή πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western blot)
 - 1.2.6 Εξαγωγή RNA και ποσοτική real-time PCR (quantitative real-time PCR)
 - 1.2.7 Ανοσοϊστοχημεία
 - 1.2.8 Συνεστιακή μικροσκοπηση

- 1.2.9 Μικροσκόπηση σε πραγματικό χρόνο
- 1.3 Αποτελέσματα
 - 1.3.1 Έκφραση του OCT1 στο Μυελοειδή Καρκίνο του Θυρεοειδούς
 - 1.3.2 Τροποποίηση της Εξωκυττάριας Συγκέντρωσης Γλυκόζης με Σκοπό την Αύξηση της Αποτελεσματικότητας της Μετοφομίνης
 - 1.3.3 Η Θεραπεία με Μετοφομίνη προκαλεί Όγκωση σε Κύτταρα που Προέρχονται από ΔΚΘ σε Συνθήκες Χαμηλής Συγκέντρωσης Εξωκυττάριας Γλυκόζης
 - 1.3.4 Ενεργοποίηση της AMP-Κινάσης (AMPK) στα Θυρεοειδικά Καρκινικά Κύτταρα που Καλλιεργούνται σε Συνθήκες Χαμηλής Συγκέντρωσης Γλυκόζης
 - 1.3.5 Η Εξάντληση της Εξωκυττάριας Γλυκόζης Αυξάνει τα Κυτταροτοξικά Αποτελέσματα της Μετοφομίνης στα Θυρεοειδικά Καρκινικά Κύτταρα
 - 1.3.6 Η Θεραπεία με 2-DG Αυξάνει την Αποτελεσματικότητα της Μετοφομίνης Εναντίον των Θυρεοειδικών Καρκινικών Κυττάρων
 - 1.3.7 Μείωση της Έκφρασης της Πυροσταφυλικής Κινάσης 2 (PKM2) των Θυρεοειδικών Καρκινικών Κυττάρων μετά από Θεραπεία με Μετοφομίνη σε Συνθήκες Χαμηλής Συγκέντρωσης Γλυκόζης
- 1.4 Συμπεράσματα/Συζήτηση
- 1.5 Βιβλιογραφία
- 2 Η Μιτοτάνη Προκαλεί Εκπόλωση της Μιτοχονδριακής Μεμβράνης και Απόπτωση στα Θυρεοειδικά Καρκινικά Κύτταρα
 - 2.1 Εισαγωγή
 - 2.2 Μέθοδοι και Υλικά
 - 2.2.1 Δείγματα από ανθρώπινους θυρεοειδικούς ιστούς
 - 2.2.2 Καρκινικές θυρεοειδικές σειρές και υλικά
 - 2.2.3 Πειράματα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική βιωσιμότητα και ανίχνευση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης
 - 2.2.4 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου
 - 2.2.5 Εξαγωγή RNA και ποσοτική real-time PCR (quantitative real-time PCR)
 - 2.2.6 Εξαγωγή πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western blot)

- 2.2.7 Ανοσοϊστοχημεία
- 2.2.8 Στατιστική ανάλυση
- 2.2.9 Μικροσκόπηση σε πραγματικό χρόνο
- 2.3 Αποτελέσματα
 - 2.3.1 Η Μιτοτάνη μειώνει τη βιωσιμότητα των θυρεοειδικών καρκινικών κυτταρικών σειρών
 - 2.3.2 Η επίδραση της Μιτοτάνης στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα και στους ινοβλάστες
 - 2.3.3 Η Μιτοτάνη προκαλεί ενδοπλασματικό κυτταρικό stress στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα
 - 2.3.4 Η επίδραση της Μιτοτάνης στον κυτταρικό κύκλο των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων
 - 2.3.5 Η Μιτοτάνη επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα
 - 2.3.6 Η Μιτοτάνη προκαλεί βλάβη στο DNA και απόπτωση στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα
 - 2.3.7 Η Μιτοτάνη επηρεάζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία και την έκφραση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών
 - 2.3.8 Η έκφραση του ATP5B σε ανθρώπινους καρκίνους του θυρεοειδή
- 2.4 Συμπεράσματα/Συζήτηση
- 2.5 Βιβλιογραφία

III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

IV. SUMMARY OF PHD THESIS

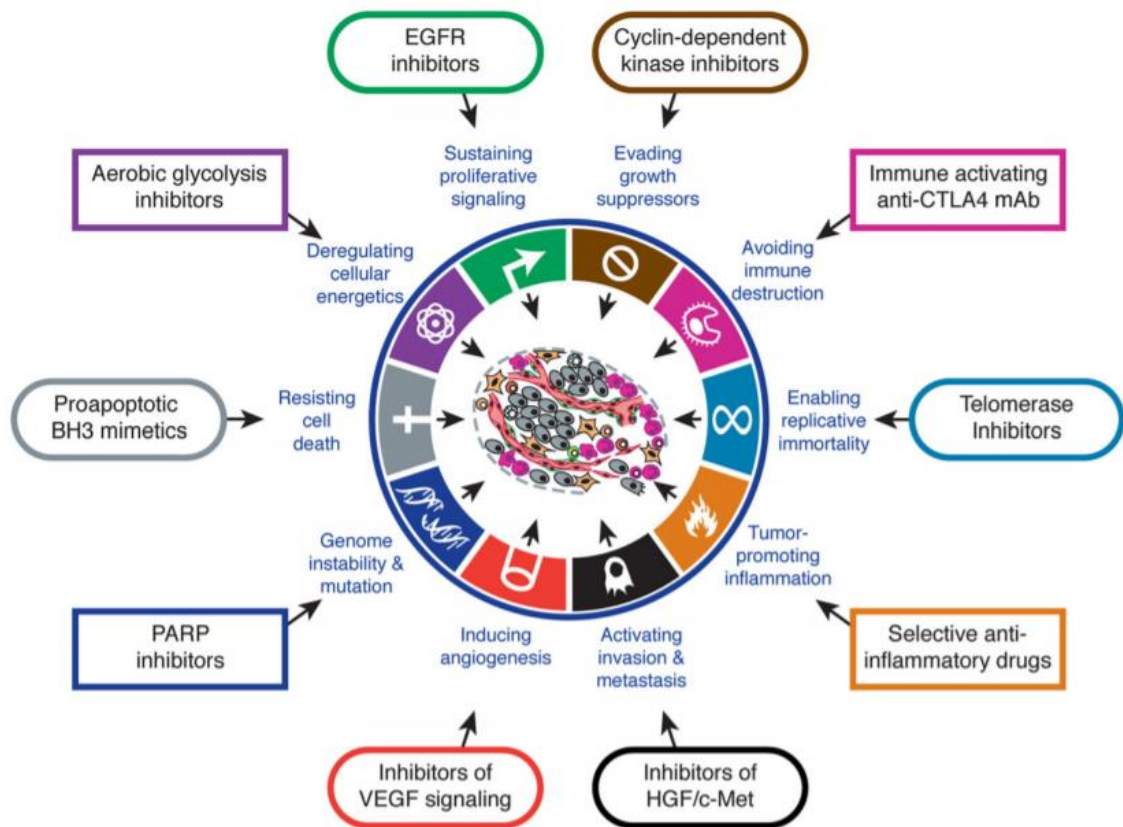
V. ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΣΥΓΓΡΑΜΑΤΑ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ (National Cancer Institute), ο όρος καρκίνος αναφέρεται σε ένα σύνολο παθήσεων που έχουν κύριο κοινό χαρακτηριστικό τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων του οργανισμού. Τα κύτταρα αυτά προκαλούν τοπική βλάβη στους γειτονικούς ιστούς και τελικά διηθούν απομακρυσμένους ιστούς οδηγώντας πολλές φορές στο θάνατο. Καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί πρακτικά σε οποιοδήποτε μέρος/ιστό του σώματος, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έχουν προσδιοριστεί πολλές διαφορετικές μορφές της νόσου. Οι διαφορετικές αυτές μορφές μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με τον ιστό στον οποίο αναπτύσσεται ο καρκίνος, και αυτή αποτελεί τη συχνότερη μορφή ταξινόμησης του καρκίνου. Επίσης, σε μια πιο γενική ταξινόμηση, μπορούν να διαχωριστούν σε συμπαγείς όγκους (όπως οι καρκίνοι του θυρεοειδούς, πνεύμονα, παγκρέατος) και μη συμπαγείς όγκους (όπως οι καρκίνοι του αίματος – λευχαιμίες). Είναι πολύ σημαντικό να αναφέρουμε ότι με τον όρο καρκίνος αναφερόμαστε σε κακοήθεις όγκους που παρουσιάζουν μεταστατικό δυναμικό (διήθηση των γειτνιαζόντων και απομακρυσμένων ιστών), και όχι σε καλοήθεις όγκους οι οποίοι μπορούν να αποκτήσουν μεγάλο μέγεθος, αλλά δε διαθέτουν μεταστατικό δυναμικό. Οι καλοήθεις όγκοι πολύ σπάνια είναι απειλητικοί για τη ζωή του ασθενούς, σε αντίθεση με τους κακοήθεις που αποτελούν μία από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου στο Δυτικό κόσμο.

Καθώς ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από τρισεκατομμύρια κύτταρα, ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού όλων αυτών των κυττάρων για να διατηρηθεί η ομοιόσταση και η υγεία είναι πολύ στενός και πολυεπίπεδος. Ωστόσο, ορισμένες φορές κάποια κύτταρα καταφέρνουν να ξεφύγουν από τους πολύπλοκους αυτούς μηχανισμούς και με αυτόν τον τρόπο οδηγούμαστε στην ανάπτυξη καρκίνου. Παρόλο που υπάρχουν εκατοντάδες

διαφορετικοί τύποι καρκίνου, εντούτοις όλοι τους μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά τα οποία τους επιτρέπουν να επιβιώσουν και να εξελιχθούν. Τα 6 βασικά αυτά χαρακτηριστικά περιγράφηκαν αρχικά το 2000 από τους Hanahan και Weinberg και εμπλουτίστηκαν από τους ίδιους λίγα χρόνια αργότερα με 4 νέα ‘αναδυόμενα’ στοιχεία, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



Σχήμα 1: Τα βασικά χαρακτηριστικά του καρκίνου και οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για καθένα από αυτά. Προσαρμογή και απόδοση από Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646-674.

Τα στοιχεία αυτά είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης πολλών και διαφορετικών μηχανισμών τα οποία προωθούν και συντηρούν την ανάπτυξη του καρκίνου, από την ογκογένεση μέχρι τη μετάσταση (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Το κλασικό παράδειγμα ανάπτυξης όγκων είναι οι μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, τόσο στα κύτταρα από τα οποία εν τέλει αναπτύσσεται ο όγκος όσο και στο μικροπεριβάλλον αυτών. Τα τελευταία χρόνια προβάλλεται όλο και περισσότερο η σημασία του μικροπεριβάλλοντος (Li et al. 2007). Μάλιστα, μια πραγματική επανάσταση συνέβη την τελευταία δεκαετία με την εφαρμογή της ανοσοθεραπείας στις συμπαγείς κακοήθειες, και είναι ξεκάθαρο ότι η ανοσοθεραπεία προϋποθέτει τη βαθιά κατανόηση των μηχανισμών του μικρο- και μακρο-περιβάλλοντος (Galon et al. 2020). Για την καταπολέμηση του καρκίνου, είναι απαραίτητη η αντιμετώπιση όλων αυτών των μηχανισμών τόσο ατομικά όσο και συλλογικά.

2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

2.1 Γενικά

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο συχνή ενδοκρινολογική κακοήθεια, καθώς περίπου 1% του συνολικού πληθυσμού θα διαγνωστούν με καρκίνο του θυρεοειδούς σε κάποιο σημείο της ζωής τους. Η ετήσια συχνότητα του καρκίνου του θυρεοειδούς έχει τριπλασιαστεί από 4,9 περιπτώσεις ανά 100.000 το 1975 σε 14,3 ανά 100.000 το 2009 (Davies et al. 2006). Παρόλο που αυτή η αύξηση έχει αποδοθεί στην αύξηση στην ανίχνευση μικρών θηλωδών καρκίνων του θυρεοειδούς (Ahn et al. 2014), μια αύξηση στην ανίχνευση πιο επιθετικών καρκίνων έχει επίσης παρατηρηθεί (Chen et al. 2009). Υπάρχουν 3 ιστολογικοί τύποι καρκίνου του θυρεοειδούς:

- 1) Διαφοροποιημένος Καρκίνος του Θυρεοειδούς: Ο Διαφοροποιημένος Καρκίνος του Θυρεοειδούς (ΔΚΘ) αποτελεί περισσότερο από 90% από το σύνολο των περιπτώσεων του καρκίνου του θυρεοειδούς. Ο ΔΚΘ προέρχεται από τα επιθηλιακά θυρεοειδικά κύτταρα και ιστολογικά ταξινομείται ως θηλώδης, θυλακιώδης, Hürthle cell καρκίνωμα ή οξύφιλου τύπου καρκίνωμα και καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης (Cooper et al. 2009). Μετά από την ολική θυρεοειδεκτομή, η οποία συνίσταται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων κακοήθειας (Burman et al. 2015), στους πιο επιθετικούς καρκίνους συνήθως χορηγείται ραδιενεργό ιώδιο. Γενικά, οι ασθενείς με ΔΚΘ έχουν εξαιρετική πρόγνωση με το 10-ετές ποσοστό επιβίωσης να κυμαίνεται ανάμεσα σε 80 και 95% (Sherman 2003, Schlumberger 1998). Ωστόσο, οι υποτροπές και οι μακρινές μεταστάσεις έχουν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση. Επίσης, 2-5% των ασθενών με αρχικά διαφοροποιημένους καρκίνους μπορεί να αναπτύξουν μεταστάσεις που δεν προσλαμβάνουν ιώδιο-131. Ο ορισμός της ανθεκτικότητας στο I-131 είναι αμφιλεγόμενος, αλλά τα πρόσφατα guidelines για τον καρκίνο του θυρεοειδούς της Αμερικάνικης Θυρεοειδικής Εταιρείας αναφέρουν ότι ένας καρκίνος είναι ανθεκτικός στο ιώδιο όταν δεν προσλαμβάνει ιώδιο, ή όταν υπάρχει σημαντική επιδείνωση της μεταστατικής νόσου παρά τη σημαντική πρόσληψη I-131 στο σπινθηρογράφημα (Haugen et al. 2016). Η απώλεια της διαφοροποίησης έχει γενικά συνδεθεί με χειρότερη πρόγνωση (Ricarte-Filho et al. 2009). Οι ασθενείς με μεταστάσεις που προσλαμβάνουν I-131 έχουν περίπου 60% ποσοστό επιβίωσης στα 10 έτη εν αντιθέσει με 10% για τους ασθενείς με μεταστάσεις που δεν προσλαμβάνουν I-131 (Durante et al. 2006).
- 2) Αναπλαστικός Καρκίνος του Θυρεοειδούς (ΑΚΘ): Ο ΑΚΘ είναι ένας σπάνιος τύπος καρκίνου του θυρεοειδούς που προέρχεται από τα επιθηλιακά θυρεοειδικά κύτταρα. Είναι

υπεύθυνος για περίπου 2% των συνολικών περιπτώσεων, αλλά είναι μια πολύ επιθετική κακοήθεια. Η μέση επιβίωση είναι περί τους 6 μήνες και μόλις 20% επιβιώνουν στον 1 χρόνο από τη διάγνωση (Neff et al. 2008, Smallridge et al. 2010). Κατά τη διάγνωση, περισσότερο από 33% των ασθενών έχουν τοπικές μεταστάσεις, ενώ μακρινές μεταστάσεις έχουν ήδη αναπτυχθεί σε 40% των ασθενών (Kebebew et al. 2005). Εξαιτίας της επιθετικότητας του ΑΚΘ, όλοι αυτοί οι καρκίνοι θεωρούνται ως Σταδίου IV κατά τη διάγνωση και απαιτείται μια πολύπλευρη προσέγγιση (Smallridge et al. 2012). Δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής θεραπείες που να έχουν δείχτει ότι βελτιώνουν την ποιότητα ζωής ή το προσδόκιμο επιβίωσης. Υπάρχουν πολυάριθμα ερευνητικά πρωτόκολλα, και τα guidelines συμφωνούν ότι οι ασθενείς με ΑΚΘ που επιθυμούν επιθετική αντιμετώπιση του καρκίνου θα πρέπει να εντάσσονται σε κάποιο από αυτά (Smallridge et al. 2012).

- 3) Μυελοειδής Καρκίνος του Θυρεοειδούς (ΜΚΘ): Ο ΜΚΘ αποτελεί περίπου το 3-5% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, αλλά είναι υπεύθυνος για περίπου το 15% όλων των θανάτων από καρκίνο του θυρεοειδούς (Nosé 2011). Το ΜΚΘ είναι ένας νευροενδοκρινής όγκος που προέρχεται από τα παραθυλακιδώδη C κύτταρα (Hadoux et al. 2016, Hyer et al. 2005, Cook et al. 2010). Περίπου 75% όλων των περιπτώσεων είναι σποραδικές ενώ το υπόλοιπο 25% είναι κληρονομικό και εμφανίζεται στο πλαίσιο των συνδρόμων πολλαπλής ενδοκρινολογικής νεοπλασίας (MEN) 2Α και 2Β. Το ΜΚΘ έχει καλή πρόγνωση με το 10-ετές ποσοστό επιβίωσης να κυμαίνεται ανάμεσα σε 70 και 80% αν ο καρκίνος διαγνωστεί και θεραπευτεί πριν ο όγκος εξαπλωθεί έξω από το θυρεοειδή αδέννα (Roman et al. 2006). Από την άλλη, οι ασθενείς με μεταστατικό ΜΚΘ έχουν ένα 10-ετές ποσοστό επιβίωσης της τάξης του 40% (Williams et al. 1986). Σε ασθενείς με ταχέως επιδεινούμενη νόσο, η δοκιμή κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας

μπορεί να είναι μια εναλλακτική. Ωστόσο, τα αποτελέσματα πολλαπλών ερευνών έδειξαν ότι προσφέρει πολύ μικρό όφελος (Williams et al. 1986, Nocera et al. 2000). Για το λόγο αυτό, καθώς επίσης και εξαιτίας του πολύ σημαντικού ρόλου του γονιδίου RET στην εξέλιξη της ασθένειας, οι στοχευμένες θεραπείες με κυρίως αναστολείς τυροσινικής κινάσης θα ήταν πιο κατάλληλες και αποτελεσματικές.

2.2 Γενετικό Υπόβαθρο

2.2.1 Διαφοροποιημένος Καρκίνος του Θυρεοειδούς

Στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί πολλαπλές γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του ΔΚΘ. Η γενετική μελέτη TCGA (Thyroid Cancer Genome Atlas) έχει συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη της γνώσης και της κατανόησης σχετικά με τους ακριβείς μοριακούς μηχανισμούς στο θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (Cancer Genome Atlas Research Network 2014), ενώ άλλες γενετικές μελέτες προσέφεραν σημαντικές πληροφορίες για τους άλλους τύπους καρκίνου του θυρεοειδή (Nikiforov et al. 2011). Μία πολύ σημαντική επισήμανση είναι ότι συσχετίσεις που έχουν καταγραφεί κατά καιρούς δε θα πρέπει να θεωρούνται μεταλλάξεις-οδηγοί, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι στην εξατομικευμένη θεραπεία (Bible et al. 2016). Οι μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί στον καρκίνο του θυρεοειδή παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα.

<u>Μετάλλαξη</u>	<u>Συχνότητα στους διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους</u>	<u>Στοχευμένη θεραπεία</u>
BRAF	Θηλώδης (45–60%)	Vemurafenib

	Αναπλαστικός (25–40%)	Dabrafenib
RAS	Θηλώδης (10–20%) Θυλακιώδης (30–50%) Αναπλαστικός (20–40%) Μυελοειδής (10–45%)	Selumetinib
PAX8/PPAR γ fusions	Θυλακιώδης (30–60%)	Efatutazone
RET	Μυελοειδής (>60%)	Vandetanib Cabozantinib
RET/PTC fusions	Θηλώδης (7–20%)	Vandetanib Cabozantinib
PIK3CA	Θυλακιώδης (5–15%) Αναπλαστικός (10–25%)	Αναστολείς mTOR (temsirolimus, everolimus)
AKT1	Αναπλαστικός (5–15%)	
PTEN	Θυλακιώδης (10–15%) Αναπλαστικός (10–20%)	
TP53	Αναπλαστικός (50–80%)	
TERT	Θηλώδης (20–30%)	

	Hurthle cell (20–30%) Αναπλαστικός (45–55%)	
ALK	Θηλώδης (1%) Αναπλαστικός (4–10%)	Crizotinib Ceritinib
NTRK fusions	Θηλώδης (2–15%)	LOXO-101 Entrectinib

Πίνακας 1: Οι μεταλλάξεις στον καρκίνο του θυρεοειδούς και οι στοχευμένες θεραπείες που μπορεί να χρησιμοποιηθούν.

Οι περισσότερες μεταλλάξεις αφορούν είτε το μονοπάτι του MAPK είτε το μονοπάτι του PI3K-AKT (Nikiforov et al. 2011). Οι πιο συχνές μεταλλάξεις παρατηρούνται μέσω του Ras-Raf-MEK-ERK (MAPK μονοπάτι), με την πιο συχνή να είναι η μετάλλαξη BRAF V600E που ανιχνεύεται σε περίπου 45% όλων των θηλωδών καρκίνων του θυρεοειδή, αλλά δεν είναι τόσο συχνή στο θυλακιώδη καρκίνο του θυρεοειδούς και στη θυλακιώδη ιστολογική παραλλαγή του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (Xing 2005). Η μετάλλαξη BRAF έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση καθώς επίσης και με υψηλότερα ποσοστά τοπικής μετάστασης, μετάστασης σε λεμφαδένες και υποτροπιάζουσας νόσου σε διάφορες μελέτες (Kebebew et al. 2007, Xing et al. 2005). Ένας λόγος για το παραπάνω γεγονός μπορεί να είναι η μειωμένη έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του ιωδίου που έχει παρατηρηθεί στους BRAF-θετικούς θηλώδεις καρκίνους (Durante et al. 2007). Ωστόσο, η προγνωστική σημασία του BRAF είναι υπό αμφισβήτηση και τα δεδομένα από τη μελέτη TCGA που δείχνουν σημαντική διακύμανση στην

έκφραση του γονιδίου μπορεί να αποτελέσουν μια εξήγηση για τη διχογνωμία που παρατηρείται στη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο του BRAF (Xing et al. 2013).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο RAS είναι πιο συχνές στο θυλακίωδη καρκίνο του θυρεοειδή, με τις μεταλλάξεις στα HRAS, NRAS, ή KRAS να παρατηρούνται σε περίπου 40-50% των θυλακιοδών καρκίνων (Fukahori et al. 2012, Esapa et al. 1999, Nikiforova et al. 2003). Οι μεταλλάξεις στο RAS έχουν ανιχνευτεί και σε θυλακίωδη αδενώματα (Motoi et al. 2000), και πιστεύεται ότι αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει μια προ-καρκινική αλλαγή. Ένα σημαντικό στοιχείο που πρέπει να τονιστεί είναι ότι οι διάφορες μεταλλάξεις στο μονοπάτι του MAPK είναι συχνά αλληλοαποκλειόμενες (Soares et al. 2003, Kimura et al. 2003). Η PAX8/PPAR γ αναδιάταξη συμβαίνει λόγω της σύντηξης του γονιδίου PAX8 με το γονίδιο PPAR γ (ενεργοποιημένος υποδοχέας υπεροξειδιοσωμάτων γ). Αυτή η μετάλλαξη ανιχνεύεται κυρίως σε θυλακίωδεις καρκίνους του θυρεοειδή, όπου εντοπίζεται σε περίπου 30-35% των καρκίνων (Dwight et al. 2003). Το γεγονός ότι οι PAX8/PPAR γ και οι RAS μεταλλάξεις σπάνια συνυπάρχουν στον ίδιο όγκο σημαίνει ότι πιθανότατα αποτελούν διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς στην ανάπτυξη των θυλακιοδών καρκίνων του θυρεοειδούς (Nikiforova et al. 2003).

Η χρωμοσωμική αναδιάταξη RET/PTC έχει παρατηρηθεί στο θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς, και προκύπτει όταν η τυροσινική κινάση της πρωτεΐνης RET ενώνεται με έναν υπερ-ενεργό υποκινητή. Οι RET/PTC1 και RET/PTC3 είναι ανάμεσα στις πιο συχνές αναδιατάξεις στις οποίες το RET συντήκεται είτε με το CCDC6 ή το NCOA4, αντίστοιχα (Grieco et al. 1990, Santoro et al. 1994). Οι RET/PTC αναδιατάξεις ανιχνεύονται σε 18-52% των ασθενών με θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδή (Nikiforov 1992, Cheung et al. 2001), και η μετάλλαξη αυτή έχει συσχετιστεί με νεότερη ηλικία κατά τη διάγνωση του καρκίνου, τη θηλώδη ιστολογία και το υψηλότερο ποσοστό λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Οι μεταλλάξεις στο μονοπάτι PI3K-AKT συναντούνται πιο συχνά σε προχωρημένους, χαμηλής διαφοροποίησης και αναπλαστικούς καρκίνους του θυρεοειδή. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια RAS, PTEN, PI3KCA, και AKT1 έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-AKT που οδηγεί στην υπερ-έκφραση των ογκογονιδίων (Saji et al. 2010). Το γονίδιο PTEN είναι μια πρωτεϊνική φωσφατάση που είναι σημαντικός αναστολέας του PI3K-AKT μονοπατιού και επομένως δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Η απώλεια της δράσης του PTEN μέσω μεταλλάξεων οδηγεί σε αύξηση της ενεργοποίησης του AKT (Saji et al. 2010). Αυτή η μετάλλαξη υπάρχει στο σύνδρομο Cowden που είναι ένα αυτοσωμικό επικρατές σύνδρομο που σχετίζεται με καρκίνους του θυρεοειδούς, του ενδομητρίου, των νεφρών και του μαστού (Dahia et al. 1997). Οι μεταλλάξεις στα γονίδια PIK3CA/B μπορούν να οδηγήσουν σε συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-AKT. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μετάλλαξη στο γονίδιο PIK3CA δεν είναι συχνή, αλλά η γονιδιακή του ενίσχυση (amplification) είναι σχετικά συχνή και μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα νέο μηχανισμό για την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-AKT σε ορισμένους θυρεοειδικούς καρκίνους (Wu et al. 2005).

Οι μεταλλάξεις που απενεργοποιούν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, που κωδικοποιεί το ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου p53, βρίσκονται συχνά στον ΑΚΘ, αλλά πολύ σπάνια σε καλά διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς. Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή του TERT πρόσφατα αναγνωρίστηκαν στον καρκίνο του θυρεοειδούς (Liu et al. 2016), και ο συνδυασμός των μεταλλάξεων TERT με τις μεταλλάξεις BRAF είναι ένας κακός προγνωστικός παράγοντας για τους ασθενείς με ΔΚΘ (Xing et al. 2014). Οι αναδιατάξεις που αφορούν το γονίδιο ALK (ειδικά με σύντηξη ανάμεσα στο ALK και το γονίδιο striatin (STRN)) έχουν καταγραφεί να είναι πιο συχνές σε επιθετικούς καρκίνους του θυρεοειδή και λιγότερο συχνές σε ΔΚΘ (Kelly et al. 2014).

2.2.2 Μυελοειδής Καρκίνος του Θυρεοειδούς

Οι μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο RET έχουν αναγνωρισθεί ως η αιτία του ΜΚΘ (Wells et al. 2009). Μία κληρονομική μετάλλαξη στο RET βρέθηκε στις έρευνες-σταθμούς που δημοσιεύτηκαν τη δεκαετία του 1990 (Donis-Keller et al. 1993, Mulligan et al. 1993), και ανιχνεύεται σε περίπου όλες τις οικογενείς μορφές του ΜΚΘ. Μια σποραδική μετάλλαξη στο RET ανιχνεύεται περίπου στο 50% των περιπτώσεων των σποραδικών ΜΚΘ (Elisei et al. 2007). Η πιο συχνή κληρονομική μετάλλαξη, μια αλλαγή από κυστεΐνη σε αργινίνη στο κωδικόνιο 634, είναι υπεύθυνη για τουλάχιστον τις μισές περιπτώσεις του συνδρόμου MEN 2A, ενώ μια αλλαγή από μεθειονίνη σε θρονίνη στο κωδικόνιο 918 είναι υπεύθυνη για τον πιο επιθετικό φαινότυπο του συνδρόμου MEN 2B. Παρομοίως, το 85% των σποραδικών μεταλλάξεων ανιχνεύονται στο κωδικόνιο 918, και επίσης έχουν κατά κανόνα χειρότερη πρόγνωση (Elisei et al. 2008). Οι μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο RAS έχουν ανιχνευθεί σε 68% των RET-αρνητικών ΜΚΘ, αλλά δεν ανιχνεύονται παρά σπανίως σε RET-θετικά ΜΚΘ (Moura et al. 2011, Boichard et al. 2012). Μια πλήρης ανάλυση της αλληλουχίας DNA όλων των εξονίων δεν αποκάλυψε καμία επιπλέον επαναλαμβανόμενη μετάλλαξη (Agrawal et al. 2013).

Εκτός από τις συχνές μεταλλάξεις που αναφέρονται παραπάνω, υπάρχουν και κάποιοι επιπλέον παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του θυρεοειδικού καρκίνου. Ο καρκίνος του θυρεοειδή βρίθκει αγγείων και η υπερ-έκφραση του VEGFR έχει καταγραφεί στο ΔΚΘ και το ΜΚΘ (Tuttle et al. 2002, Capp et al. 2010). Ο VEGFR έχει δείχτει ότι συμβάλλει στην επιδείνωση του καρκίνου του θυρεοειδή, και τα επίπεδά του έχουν συσχετιστεί με προχωρημένη νόσο (Bunone et al. 1999, Yu et al. 2005). Για το λόγο αυτό, οι στοχευμένες θεραπείες εναντίον του VEGFR έχουν δείχτει ότι μπορεί να είναι αποτελεσματικές στον καρκίνο του θυρεοειδούς (Bible et al. 2016).

2.3 Επίπτωση

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο συχνή ενδοκρινής κακοήθεια, όντας υπεύθυνος για το 2.1% όλων των καινούριων κακοηθειών (εξαιρώντας τους καρκίνους του δέρματος) που διαγιγνώσκονται παγκοσμίως, ενώ στις ΗΠΑ είναι ακόμα πιο συχνός καθώς είναι υπεύθυνος για το 3.2% όλων των καινούριων καρκίνων (Ferlay et al. 2013). Η ετήσια επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς είναι συνεχώς αυξανόμενη τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς έχει τριπλασιαστεί από 4,9 ανά 100.000 το 1975 σε 14,3 ανά 100.000 το 2009 (Davies et al. 2006). Το 2019, 52.070 καινούριες περιπτώσεις καρκίνου του θυρεοειδούς αναμένονταν να διαγνωστούν στις ΗΠΑ (SEER ιστοσελίδα). Όπως δείχνεται σε μία έρευνα από το Ηνωμένο Βασίλειο σχετικά με τις προβλέψεις για την επίπτωση του καρκίνου ως το 2035, ο καρκίνος του θυρεοειδούς αναμένεται να έχει τη μεγαλύτερη αύξηση (Smittenaar et al. 2016). Παρομοίως, ο καρκίνος του θυρεοειδούς μπορεί να γίνει ο τέταρτος πιο συχνός καρκίνος στις ΗΠΑ, εάν συνεχιστεί αυτό το μοτίβο (Rahib et al. 2013)

Η ετήσια επίπτωση διαφέρει ανάλογα με την περιοχή, την ηλικία και το φύλο. Παρά το γεγονός ότι η αυξανόμενη επίπτωση είναι ένα κοινό φαινόμενο σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές, υπάρχουν συγκεκριμένα μοτίβα ανά περιοχή (La Vecchia et al. 2015). Στη Δανία, η επίπτωση αυξήθηκε και στα δύο φύλα από το 1943 ως το 2008, στους άνδρες από 0,41 σε 1,57 ανά 100.000 και στις γυναίκες από 0,9 σε 4,11 ανά 100.000, το οποίο αντιστοιχεί σε μια σημαντική αύξηση κατά 1,7% και 1,8%, αντίστοιχα (Blomberg et al. 2012). Στο Λουξεμβούργο, η προσαρμοσμένη-στην-ηλικία επίπτωση σημείωσε αύξηση από τη πενταετία 1990-1994 στην πενταετία 1995-1999, από 7,4 σε 10,1 ανά 100.000 στις γυναίκες και από 2,3 σε 3,6 ανά 100,000 στους άνδρες (Scheiden et al. 2006). Το γεγονός ότι η επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς εξαρτάται από τη γεωγραφική περιοχή έχει δειχτεί σε πολλές έρευνες από την Ευρώπη (Colonna et al. 2010, Lise et

al. 2012), την Αυστραλία (Pandeya et al. 2015), την Ασία (Keinan-Boker et al. 2016, Wang et al. 2015, Ahn et al. 2014), τη Βόρεια Αμερική (Kent et al. 2007, Enewold et al. 2009) και τη Νότια Αμερική (Veiga et al. 2013).

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι πολύ σπάνιος σε παιδιά μικρότερα από 15 χρονών. Η ετήσια επίπτωση στις ΗΠΑ είναι 2,2/1.000.000 κορίτσια και 0,7/1.000.000 αγόρια (Parkin et al. 1988). Πιο πρόσφατα δεδομένα από τη στατιστική βάση πληροφοριών των ΗΠΑ (SEER database) αναφέρουν συνολικά 1753 παιδιατρικούς καρκίνους του θυρεοειδή από το 1973 μέχρι το 2004, με την ετήσια επίπτωση να ανέρχεται σε 0,54 περιπτώσεις ανά 100.000 ανθρώπους (Hogan et al. 2009). Η ετήσια επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς αυξάνεται με την ηλικία, και κορυφώνεται κατά την 5^η με 8^η δεκαετία της ζωής (Ries et al. 2001). Παρομοίως, δεδομένα από το Ηνωμένο Βασίλειο δείχνουν ότι ο αριθμός των διαγνωσμένων καρκίνων του θυρεοειδούς σε ασθενείς νεότερους των 20 χρόνων ήταν χαμηλός (δεδομένα από National Cancer Intelligence Network). Για τις γυναίκες που διαγνώστηκαν με καρκίνο του θυρεοειδούς μεταξύ του 2006 και του 2010, η επίπτωση κορυφώθηκε μεταξύ 40 και 44 χρονών και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή, ενώ για τους άντρες αυξανόταν σταδιακά με την ηλικία (δεδομένα από National Cancer Intelligence Network από το Ηνωμένο Βασίλειο).

Στις γυναίκες παρουσιάζεται μια 3- με 4-φορές υψηλότερη επίπτωση από τους άντρες, που ως ποσοστό έχει παραμείνει σταθερό κατά τη διάρκεια του χρόνου σε όλες τις χώρες (Kilfoy et al. 2009). Η αυξημένη επίπτωση στις γυναίκες παρατηρείται σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές, με το ποσοστό γυναικών/αντρών να κυμαίνεται από 1,44 στην Αυστραλία μέχρι 7,4 στην Ισπανία (Curado et al. 2007). Το ίδιο συμβαίνει και με τις διαφορετικές εθνικότητες, καθώς το ποσοστό στις ΗΠΑ κυμαίνεται από 2,88 σε Καυκάσιους μέχρι 3,57 σε Ισπανόφωνους (SEER ιστοσελίδα). Διάφορες πιθανές αιτιολογίες έχουν κατά καιρούς προταθεί για την εξήγηση αυτού του

φαινομένου, οι οποίες κυμαίνονται από καθαρά συμπεριφορικές (καθώς οι γυναίκες τείνουν να αναζητούν ιατρική βοήθεια περισσότερο από τους άνδρες καθώς και να είναι πιο ενεργά αναμειγμένες κατά τις ιατρικές επισκέψεις (Bertakis et al. 2000, Kaplan et al. 1995)) μέχρι βιολογικές διαφορές (αυξημένη έκθεση σε υψηλότερα επίπεδα TSH για περισσότερο καιρό, μεγαλύτερη ευπάθεια στην ανάπτυξη καρκίνων, παρουσία διαφορετικών ορμονών Yao et al. 2011)). Το γεγονός ότι η αυξανόμενη επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς είναι παρόμοια μεταξύ των διαφόρων φυλετικών και εθνικών ομάδων στις ΗΠΑ παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον (Aschebrook-Kilfo et al. 2013).

Πρόσφατα υπάρχει μεγάλη συζήτηση στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με τη διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς. Ο Davies και συνεργάτες ανέφεραν στην αναλυτική έρευνά τους ότι υπάρχει μια σημαντική αύξηση στην επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς ενώ η θνησιμότητα από τον καρκίνο του θυρεοειδούς παραμένει σταθερή, γεγονός που τους οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αυτό οφείλεται αποκλειστικά στις βελτιωμένες διαγνωστικές πρακτικές (Davies et al. 2006). Η διαδεδομένη χρήση και η βελτίωση στις τεχνικές δυνατότητες των απεικονιστικών μεθόδων, καθώς και της παρακέντησης των θυρεοειδικών όζων σίγουρα ευθύνονται ως ένα βαθμό για αυτή την αύξηση, ειδικά σε περιπτώσεις όπως της Νότιας Κορέας όπου ο υπέρηχος χρησιμοποιείται για έλεγχο (screening) και αυτό δυνητικά μπορεί να προκαλέσει την προκατάληψη του παρατηρητή μετά την ανακάλυψη μικρών, κλινικά-μη-σημαντικών θηλωδών καρκίνων του θυρεοειδούς (Ahn et al. 2014). Ωστόσο, σημαντικές αυξήσεις έχουν σημειωθεί και σε μεγαλύτερους (>4cm) θηλώδεις καρκίνους που είναι πιο προχωρημένου σταδίου (Enewold et al. 2009). Στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ, η επίπτωση των θηλωδών καρκίνων αυξήθηκε ανεξάρτητα του μεγέθους, του σταδίου και της κοινωνικο-οικονομικής κατάστασης των ασθενών (Horn-Ross et al. 2014). Επίσης, ο μοριακός χάρτης των θηλωδών καρκίνων αλλάζει συνεχώς με

τις διαφορετικές μεταλλάξεις που ανακαλύπτονται. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό ότι η αύξηση στην επίπτωση είναι αποτέλεσμα δύο φαινομένων: της βελτιωμένης ανίχνευσης, αλλά και της πραγματικής αύξησης των καρκίνων λόγω μη-αναγνωρισμένων ειδικών καρκινογόνων (Vigneri et al. 2015).

2.4 Επιπολασμός

Δεδομένης της αυξανόμενης επίπτωσης και της καλής πρόγνωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς, ο επιπολασμός της νόσου επίσης αναμένεται να αυξηθεί. Το 2016 υπολογίστηκε ότι υπήρχαν περίπου 822.242 ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς που ζούσαν στις ΗΠΑ (SEER ιστοσελίδα). Ο επιπολασμός του καρκίνου του θυρεοειδούς, όπως και η επίπτωση, διαφέρει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και τον πληθυσμό. Επίσης, ο επιπολασμός εξαρτάται σημαντικά από τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του. Δεδομένα από νεκροτομές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του επιπολασμού του καρκίνου του θυρεοειδούς, και τα ποσοστά κυμαίνονται από 0,03% ως 36% στη βιβλιογραφία (Mortensen et al. 1955, Harach et al. 1985, Martinez-Tello et al. 1993, Seta et al. 1976, Chong 1994, Lang et al. 1988, Mitselou et al. 2002, Silverberg et al. 1966). Σε μία από τις μεγαλύτερες σειρές, οι Mortensen και συνεργάτες ανέφεραν ότι σε 1000 διαδοχικές βιοψίες βρήκαν έναν επιπολασμό της τάξης του 2.8% (Mortensen et al. 1955). Σε μία άλλη έρευνα από το Ελσίνκι της Φινλανδίας, οι ερευνητές δημοσίευσαν ότι σε 101 διαδοχικές νεκροτομές ο επιπολασμός του καρκίνου του θυρεοειδούς ήταν 36% (Harach et al. 1985). Οι Kanamori και συνεργάτες δημοσίευσαν πρόσφατα μια μετά-ανάλυση από 35 έρευνες που περιελάμβανε 12.384 νεκροτομές που έγιναν από το 1949 ως το 2007 (Furuya-Kanamori et al. 2016). Ο επιπολασμός του καρκίνου του θυρεοειδούς που ανακαλύφθηκε τυχαία υπολογίστηκε στο 4,1% όταν έγινε μερική αυτοψία του θυρεοειδούς, ενώ

υπολογίστηκε στο 11,2% όταν εξετάστηκε ολόκληρος ο θυρεοειδής ανεξάρτητα από την παρουσία ή την απουσία στοιχείων για τη μακροσκοπική παρουσία της νόσου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η χρονική περίοδος κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν οι νεκροτομές δε συμπεριλαμβάνεται στους παράγοντες που επηρέασαν τον επιπολασμό του καρκίνου του θυρεοειδούς. Ως εκ τούτου, παρά το γεγονός ότι η επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς αυξάνεται από τη δεκαετία του 1980, δεν έχει παρατηρηθεί και μία αντίστοιχη αύξηση στον επιπολασμό της νόσου, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι γίνεται διάγνωση πολλών καρκίνων που προηγουμένως έμεναν αδιάγνωστοι. Το φαινόμενο της διάγνωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς συζητήθηκε εκτενώς προηγουμένως στη διατριβή αυτή.

Σε μία συστηματική ανασκόπηση 24 σειρών νεκροτομών από το 1970 ως το 2011, ο επιπολασμός του καρκίνου του θυρεοειδούς σημειώθηκε πως είναι 7.6%, ενώ ο επιπολασμός του μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδή 0,14% (Valle et al. 2011). Η συγκεκριμένη μελέτη ανέφερε ότι ένα μικρό ποσοστό του πληθυσμού έχει μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς χωρίς θνητότητα και θνησιμότητα. Το μέγεθος των όγκων ήταν μικρότερο του 1 εκατοστού, και δεν παρατηρήθηκαν στοιχεία πιο επιθετικών όγκων (όπως εξω-θυρεοειδική επέκταση, μακρινή μετάσταση, μετάσταση στους λεμφαδένες). Η παραπάνω παρατήρηση για αυτόν το σπάνιο υποκλινικό μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς είναι πολύ σημαντική για μελλοντικές μελέτες επιπολασμού.

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, ο επιπολασμός του καρκίνου του θυρεοειδούς είναι σημαντικά υψηλότερος από την επίπτωση, γεγονός που φανερώνει ότι πολλοί ασθενείς επιβιώνουν για αρκετές δεκαετίες μετά την αρχική διάγνωση της νόσου.

2.5 Θνησιμότητα

Το 2019 υπολογίζεται ότι θα υπάρχουν 2.170 θάνατοι από τον καρκίνο του θυρεοειδούς στις ΗΠΑ, που αντιστοιχεί στο 0,4% όλων των θανάτων από καρκίνο (SEER ιστοσελίδα). Οι Ferlay και συνεργάτες ανέφεραν ότι ο εκτιμώμενος αριθμός θανάτων από τον καρκίνο του θυρεοειδούς στην Ευρώπη το 2012 ήταν 6.300, με τον καρκίνο του θυρεοειδούς να παρουσιάζει μία από τις χαμηλότερες θνητότητες (0,6 ανά 100.000) μετά τη διόρθωση για την ηλικία (Ferlay et al. 2013). Η θνησιμότητα είναι σχετικά σταθερή στις ΗΠΑ από τη δεκαετία του 1970 (γύρω στις 0,5 περιπτώσεις ανά 100.000 (SEER ιστοσελίδα). Ωστόσο, από το 1992 ως το 2012 έχει παρατηρηθεί μία μέση ετήσια αύξηση της θνησιμότητας της τάξης του 0,82% (Howlader et al. 2016). Το 5-ετές ποσοστό επιβίωσης είναι εξαιρετικό αγγίζοντας το 98,2% το 2015, και έχοντας βελτιωθεί από 92,3% το 1975 (SEER ιστοσελίδα). Τα ποσοστά θνητότητας ανάλογα με την ηλικία στο Ηνωμένο Βασίλειο αυξάνονται σταδιακά από την ηλικία 40-44 (με την αύξηση να είναι πιο απότομη κατά την ηλικία 64-69) και να κορυφώνεται για τις γυναίκες όταν φτάνουν τα 85-89 έτη και για τους άντρες όταν φτάνουν τα 90 έτη (Cancer Research Database UK). Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται σε όλο τον κόσμο, με το πιο εντυπωσιακό παράδειγμα να είναι αυτό της Νότιας Κορέας όπου, παρά την αύξηση στην επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς 15 φορές από το 1993 ως το 2011, η θνησιμότητα έχει παραμείνει σταθερή (Ahn et al. 2014). Η πιο έγκαιρη διάγνωση, οι βελτιωμένες τεχνικές ανίχνευσης και η μειωμένη επίπτωση του αναπλαστικού καρκίνου ευθύνονται για τη σταθεροποίηση στη θνησιμότητα, παρά το γεγονός ότι η επίπτωση έχει αυξηθεί κατακόρυφα. Το φύλο, η ηλικία και οι μακρινές μεταστάσεις είναι μερικές από τις μεταβλητές που μπορεί να επηρεάσουν τη θνησιμότητα, με την απόκριση στο ραδιενεργό ιώδιο να είναι ο παράγοντας που σχετίζεται πιο σημαντικά με θετικά αποτελέσματα στο διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς (Sciuto et al. 2009). Παρ'όλα αυτά, ένας αυξανόμενος

αριθμός ερευνητών υποστηρίζει την απλά ενεργή παρακολούθηση για το χαμηλού-κινδύνου θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς που έχει διάμετρο μικρότερη του 1 εκατοστού (Oda et al. 2016). Η Αμερικανική Εταιρεία για το Θυρεοειδή (American Thyroid Association – ATA) προτείνει ότι οι όζοι που είναι μικρότεροι από 1 εκατοστό δε θα πρέπει να υπόκεινται σε βιοψία αλλά, φυσικά, η κάθε περίπτωση θα πρέπει να εξετάζεται ξεχωριστά καθώς υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία μακρινών μεταστάσεων που προήλθαν από καρκίνους του θυρεοειδή που ήταν μικρότεροι του 1 εκατοστού και οδήγησαν σε αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας (Haugen et al. 2016, Sarma et al. 2015).

2.6 Επιδημιολογία Ανάλογα με Ιστολογικό Τύπο

Όπως έχει αναλυθεί στη διατριβή, ο καρκίνος του θυρεοειδούς μπορεί να κατηγοριοποιηθεί στις παρακάτω ιστολογικές κατηγορίες: Διαφοροποιημένος, Μυελοειδής και Αναπλαστικός καρκίνος.

Ο διαφοροποιημένος καρκίνος του θυρεοειδή αποτελεί περισσότερο από το 90% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του θυρεοειδή, με τους δύο πιο συχνούς ιστολογικούς τύπους να είναι ο θηλώδης και ο θυλακιώδης καρκίνος. Και οι δύο τύποι είναι πιο συχνοί στις γυναίκες παρά στους άνδρες, με την επίπτωση να κορυφώνεται κατά την 4^η και 5^η δεκαετία της ζωής. Το ποσό της πρόσληψης ιωδίου από τη διατροφή είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδή ανά γεωγραφική περιοχή (Lohrs et al. 1977). Οι θηλώδεις καρκίνοι είναι πιο συχνοί σε περιοχές που είναι ιωδιο-επαρκείς, όπως στις ΗΠΑ ή την Ισλανδία όπου τα ποσοστά είναι 85% θηλώδεις – 15%

θυλακιώδεις (Hrafnkelsson et al. 1988). Αντιθέτως, σε περιοχές που δεν είναι ιωδιο-επαρκείς, το ποσοστό των θυλακιωδών όγκων αυξάνεται σε 30-40% (Lohrs et al. 1977).

Ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί περίπου το 3-5% όλων των θυρεοειδικών κακοηθειών. Η σποραδική μορφή της νόσου παρουσιάζεται συνήθως στην 5^η και 6^η δεκαετία της ζωής και είναι πιο συχνή στις γυναίκες με ποσοστό 1,5/1 (Emmertsen 1985). Οι ασθενείς με το σύνδρομο MEN2 συνήθως αναπτύσσουν μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς, συχνά σε νεαρή ηλικία (Wells et al. 2015). Όσον αφορά στο μυελοειδή καρκίνο που σχετίζεται με το σύνδρομο MEN2A, η επίπτωση συνήθως κορυφώνεται κατά την 3^η δεκαετία της ζωής, ενώ στο MEN2B ο καρκίνος συχνά εμφανίζεται στα πρώτα χρόνια της ζωής.

Ο αναπλαστικός καρκίνος συνήθως αποτελεί λιγότερο από 2% όλων των θυρεοειδικών καρκίνων, αλλά στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι μπορεί να φτάσει ως και 9,8% (Smallridge et al. 2010). Η επίπτωση του αναπλαστικού καρκίνου βρίσκεται σε πτώση παγκοσμίως, και αυτός είναι και ένας λόγος που η θνησιμότητα του καρκίνου του θυρεοειδούς έχει παραμείνει σχετικά σταθερή παρά την αυξανόμενη επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς γενικά, καθώς ο αναπλαστικός καρκίνος ευθύνεται για το 14-50% της θνησιμότητας (Nagaiiah et al. 2011). Οι περισσότεροι ασθενείς είναι 65 χρονών ή γηραιότεροι κατά τη στιγμή της διάγνωσης, και το 60-70% συμβαίνει σε γυναίκες (Kebebew et al. 2005, Nagaiiah et al. 2011).

Τελικά, τα θυρεοειδικά λεμφώματα θα πρέπει πάντα να βρίσκονται στη διαφορική διάγνωση για τους ταχύτατα αναπτυσσόμενους θυρεοειδικούς όγκους. Τα θυρεοειδικά λεμφώματα είναι σχεδόν πάντα μη- Hodgkin (non- Hodgkin), καθώς τα λεμφώματα Hodgkin είναι πολύ σπάνια (Wang et al. 2005). Η ετήσια επίπτωση είναι περίπου 2,1 περιπτώσεις ανά 1.000.000 ανθρώπους, ενώ είναι υπεύθυνα για λιγότερο από το 2% όλων των θυρεοειδικών καρκίνων

(Pedersen et al. 1996, Freeman et al. 1972). Η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση είναι παρόμοια με τον αναπλαστικό καρκίνο (μεταξύ 65 και 75 ετών), ενώ το ποσοστό των γυναικών προς τους άνδρες κυμαίνεται από 4/1 ως 8/1 (Pedersen et al. 1996, Logue et al. 1992, Skarsgard et al. 1991).

2.7 Παράγοντες Κινδύνου για την Ανάπτυξη Καρκίνου του Θυρεοειδούς

Η αυξανόμενη επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδή έχει πυροδοτήσει διάφορες προσπάθειες για την ανακάλυψη των παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου. Ωστόσο, υπάρχουν μόνο ορισμένοι καθολικώς αναγνωρισμένοι παράγοντες κινδύνου. Ανάμεσά τους, η έκθεση στην ακτινοβολία κατά την παιδική ηλικία είναι ο πιο καλά χαρακτηρισμένος περιβαλλοντικός παράγοντας που συνδέεται με την ανάπτυξη καλοήθων και κακοήθων θυρεοειδικών όγκων (Schneider et al. 2005). Πιθανές πηγές έκθεσης στην ακτινοβολία αποτελούν ατυχήματα σε πυρηνικούς αντιδραστήρες (Τσερνόμπιλ) ή ατομικές βόμβες (Χιροσίμα), καθώς και θεραπευτικές χρήσεις της ακτινοβολίας. Παθοφυσιολογικά, μία μετατόπιση στο γονίδιο RET έχει ανακαλυφθεί σε ασθενείς που ανέπτυξαν καρκίνο του θυρεοειδή μετά από το Τσερνόμπιλ και μετά από θεραπευτική ακτινοθεραπεία (Bounacer et al. 1997). Το γυναικείο φύλο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του θυρεοειδή, αλλά το αντρικό φύλο είναι παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη πιο επιθετικών όγκων (Yao et al. 2011). Το οικογενειακό ιστορικό είναι ένας καλά χαρακτηρισμένος παράγοντας κινδύνου. Ο καρκίνος του θυρεοειδούς μπορεί να αναπτυχθεί στο πλαίσιο οικογενών καρκινικών συνδρόμων (οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση, σύνδρομο Cowden, σύνδρομο Gardner, σύνδρομο Werner, σύνδρομο Carney) (Nosé 2011). Μπορεί επίσης να αναπτυχθεί στο πλαίσιο του οικογενούς μη-μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς, ο οποίος ορίζεται ως η παρουσία μη-μυελοειδούς καρκίνου σε δύο πρώτου

βαθμού συγγενείς του ασθενή. Η γενετική κληρονομήση του οικογενούς μη-μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς παραμένει αβέβαιη, αλλά πιστεύεται ότι είναι αυτοσωμική επικρατής με ημιτελή διεισδυτικότητα και ποικίλη έκφραση που επίσης επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Navas-Carillo et al. 2014). Όσον αφορά στα σύνδρομα του μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς, τα MEN2A και MEN2B έχουν συζητηθεί παραπάνω. Η παρουσία της θυρεοειδίτιδας Hashimoto είναι επίσης ένας καλά χαρακτηρισμένος παράγοντας για την ανάπτυξη θυρεοειδικού λεμφώματος, με τον κίνδυνο να είναι τουλάχιστον 60 φορές υψηλότερος σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς θυρεοειδίτιδα (Holm et al. 1985).

Εκτός από τους καλά χαρακτηρισμένους παράγοντες κινδύνου, υπάρχουν και μερικοί που άμεση συσχέτιση δεν έχει ακόμα αποδειχτεί. Η κατανάλωση ιωδίου μπορεί να επηρεάσει την επίπτωση και τον επιπολασμό των θυρεοειδικών κακοηθειών, και πιο συγκεκριμένα μπορεί να αυξάνει τον κίνδυνο για θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (Wartofsky 2010, Knobel et al. 2007). Επίσης, η υπερβολική κατανάλωση υδατανθράκων και πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς (Marcello et al. 2012). Το κάπνισμα έχει βρεθεί ότι έχει μία αρνητική συσχέτιση με το διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς σε μερικές έρευνες (Meinhold et al. 2010, Mack et al. 2003), αλλά υπάρχουν έρευνες που δείχνουν το αντίθετο (Sokić et al. 1994), και η επίδραση των τοξικών συστατικών στον καπνό δεν είναι απόλυτα κατανοητή. Η υψηλή επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς έχει περιγραφεί σε ηφαιστειογενείς περιοχές, με τα ιχνοστοιχεία που βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές να εμπλέκονται στην καρκινογένεση (Duntas et al. 2009). Διάφοροι ιοί επίσης έχουν συσχετιστεί με τη θυρεοειδική καρκινογένεση με τα περισσότερα δεδομένα να υπάρχουν για τους ερπητοϊούς και για τον EBV (Jensen et al. 2010, Almeida et al. 2013), αλλά περαιτέρω έρευνες είναι απαραίτητες για να επιβεβαιώσουν αυτά τα προκαταρκτικά αποτελέσματα. Τέλος, η παρουσία της νόσου

Grave's έχει προταθεί ως ένας παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του θυρεοειδή και όντως αποτελεί μία ενδιαφέρουσα θεωρία εφόσον τα TSI θα μπορούσαν να έχουν μια δράση παρόμοια της TSH. Ορισμένες έρευνες έχουν προτείνει ότι η νόσος Grave's σχετίζεται με μεγαλύτερους, πολυκεντρικούς και πιθανώς πιο επιθετικούς θυρεοειδικούς καρκίνους (Pazaitou-Panayiotou et al. 2012), ενώ άλλες αναφέρουν πολύ χαμηλά ποσοστά καρκίνου (0,06%) σε ασθενείς με νόσο του Graves (Sokal 1954). Τα δεδομένα για αυτούς τους παράγοντες κινδύνου παραμένουν μη καταληκτικά και επαγωγικές μελέτες είναι απαραίτητες για να αξιολογήσουν την παρουσία ή απουσία αιτιακής συσχέτισης με τον καρκίνο του θυρεοειδούς.

3. ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ

3.1 Η Μετφορμίνη ως Αντιδιαβητική Θεραπεία

Η συχνότητα του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2 έχει αυξηθεί σημαντικά και είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη νεφροπάθειας, νευροπάθειας και καρδιαγγειακής νόσου (Viollet et al. 2012, Pryor et al. 2015). Η Μετφορμίνη αποτελεί το πιο συχνά συνταγογραφούμενο αντιδιαβητικό φάρμακο, με το χαμηλό κόστος και τις λίγες παρενέργειες να παίζουν σημαντικό ρόλο (Viollet et al. 2012). Η Μετφορμίνη ανήκει στην οικογένεια των διγουανιδίων, μαζί με τη Φενφορμίνη. Η Φενφορμίνη αποσύρθηκε από την αγορά λόγω του γεγονότος ότι προκαλούσε γαλακτική οξέωση (Misbin et al. 2004). Παρ'όλα αυτά η Μετφορμίνη έχει δείξει από πολύ μεγάλες μελέτες ότι είναι πιο ασφαλές φάρμακο από τη Φενφορμίνη και μπορεί να προκαλέσει γαλακτική οξέωση μόνο κάτω από κάποιες πολύ συγκεκριμένες προϋποθέσεις (Knowler et al. 2002, UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998). Η Μετφορμίνη φυσικά μπορεί να προκαλέσει παρενέργειες, κυρίως

γαστρεντερολογικής φύσης σε περίπου 20-30% των ασθενών, που οδηγούν στη διακοπή της θεραπείας σε 5% των περιπτώσεων (Kirpichnikov et al. 2002, Rena et al. 2017). Στο Διαβήτη η Μετοφορμίνη μειώνει την παραγωγή γλυκόζης μέσω δύο μηχανισμών: α) μειώνει την ηπατική γλυκονεογένεση, και β) αυξάνει τη χρησιμοποίηση γλυκόζης από τους σκελετικούς μύες (Pernicova et al. 2014).

Οι κύριοι μοριακοί στόχοι της Μετοφορμίνης είναι το σύμπλεγμα I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, το AMPK (adenosine monophosphate activated protein kinase) και το mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1). Επίσης, η Μετοφορμίνη αναστέλλει τη μιτοχονδριακή GAPDH (g αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), ένα ένζυμο που είναι από τους κύριους συνεισφορείς ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Madiraju et al. 2014).

Στους ανθρώπους η Μετοφορμίνη χορηγείται ως θεραπεία διά του στόματος, και αποβάλλεται μέσω των νεφρών. Η συγκέντρωση στο πλάσμα σε ασθενείς που λαμβάνουν δόση 500 mg/ημέρα είναι περίπου 5 μM. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς που λαμβάνουν 2gm BID, υπολογίζεται ότι η συγκέντρωση στο πλάσμα φτάνει τα 40-50 μM (Tucker et al. 1981). Απεναντίας, στο ήπαρ η συγκέντρωση της Μετοφορμίνης μπορεί να φτάσει τα 50-100 μM (Gormsen et al. 2016). Εξαιτίας της υδροφιλικότητάς της, η Μετοφορμίνη δεν μπορεί να διαχυθεί μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και γι' αυτό το λόγο μεταφέρεται στο εσωτερικό των κυττάρων με ειδικούς μεταφορείς. Η Μετοφορμίνη χρησιμοποιεί τον οργανικό μεταφορέα κατιόντων-1 (OCT1), ο οποίος εκφράζεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα (Shu et al. 2007). Στο εσωτερικό των κυττάρων, η Μετοφορμίνη συγκεντρώνεται πλησίον των μιτοχονδρίων, πιθανότατα λόγω του θετικού φορτίου και της πόλωσης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Owen et al. 2000).

Ένας από τους λόγους που η Φενφορμίνη είναι πιο δραστικό φάρμακο, έχει να κάνει και με το γεγονός ότι το μόριο είναι πιο υδροφοβικό από τη Μετοφορμίνη και αυτό του επιτρέπει την παθητική διάχυση μέσω της κυτταρικής μεμβράνης χωρίς τη χρησιμοποίηση μεταφορέων.

Ο ακριβής μηχανισμός που η Μετοφορμίνη δρα στο Διαβήτη δεν έχει εξακριβωθεί. Στην παρούσα φάση υπάρχουν θεωρίες για το μηχανισμό δράσης, και αυτές χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: AMPK-εξαρτώμενος μηχανισμός ή AMPK-ανεξάρτητος μηχανισμός. Αναφορικά με τον AMPK-εξαρτώμενο μηχανισμό, η Μετοφορμίνη όταν φτάσει σε θεραπευτικά επίπεδα ενεργοποιεί το AMPK, γεγονός που προκαλεί τη φωσφορυλίωση του CREB [cAMP-response element-binding protein (CREB)-regulated transcriptional coactivator 2] και του CBP (CREB-binding protein), τη διάλυση του συμπλέγματος CREB, και την αναστολή της μεταγραφής των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη νεογλυκογένεση (He et al. 2009, Zhou et al. 2001, Shaw et al. 2005). Υποστηρικτικά προς αυτή τη θεωρία είναι τα δεδομένα που δείχνουν ότι η αναστολή της κινάσης LKB1 (liver kinase B1), που είναι μία από τις κινάσες που φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν το AMPK, εξαλείφει την αναστολή της ηπατικής γλυκονεογένεσης από τη μετοφορμίνη (Shaw et al. 2005). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια αμφισβητείται όλο και περισσότερο το γεγονός ότι η Μετοφορμίνη δρα αποκλειστικά μέσω του AMPK-εξαρτώμενου μηχανισμού. Σε μία πολύ σημαντική μελέτη δείχτηκε ότι η Μετοφορμίνη αναστέλλει την παραγωγή γλυκόζης σε ηπατοκύτταρα που τους έχει γίνει απαλοιφή του AMPK και του LKB1 (Foretz et al. 2010). Επίσης, η ενεργοποίηση του AMPK από ειδικούς παράγοντες δεν έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της γλυκόζης του πλάσματος ή της παραγωγής γλυκόζης (Miller et al. 2013, Hasenour et al. 2014), ενώ μπορεί να προκαλέσει αναστολή της λιπογένεσης και ενεργοποίηση του καταβολισμού των λιπών (Fullerton et al. 2013, Ford et al. 2015). Καταληκτικά, και λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα δεδομένα, είναι φανερό ότι η Μετοφορμίνη έχει ένα κεντρικό ρόλο στη θεραπεία του Διαβήτη

Τύπου 2, με το μηχανισμό να μην έχει διαλευκανθεί πλήρως αλλά με το AMPK και τη μιτοχονδριακή αλυσίδα να παίζουν σημαίνοντα ρόλο, γεγονός που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στη θεραπεία άλλων νόσων.

3.2 Η Μετοφορμίνη ως Αντικαρκινική Θεραπεία

Εκτός από το Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, η Μετοφορμίνη χρησιμοποιείται και σε διάφορες άλλες νόσους, και πιο συγκεκριμένα στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, στον προ-διαβήτη, παχυσαρκία και μεταβολικό σύνδρομο. Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η Μετοφορμίνη έχει συγκεντρώσει πολλή προσοχή για τις αντικαρκινικές της δράσεις. Από το Clinicaltrials.gov, βρίσκονται υπό εξέλιξη πάνω από 50 έρευνες που ερευνούν τη Μετοφορμίνη είτε ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία και/ή χημειοθεραπεία για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων. Οι κλινικές μελέτες αυτές βασίστηκαν στα πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τις προ-κλινικές μελέτες, και πραγματοποιούνται για διάφορα είδη καρκίνων, όπως μαστού, ενδομητρίου, προστάτη, παγκρέατος, αιματολογικών κακοηθειών και άλλων (Chae et al. 2016).

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η Μετοφορμίνη είναι το πιο συχνά συνταγογραφούμενο φάρμακο για το Διαβήτη. Είναι ευρέως γνωστό ότι ο μη ρυθμισμένος Διαβήτης Τύπου 2 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου, λόγω κυρίως των αυξητικών ιδιοτήτων της γλυκόζης και της ινσουλίνης στο πλάσμα (Viollet et al. 2012). Η Μετοφορμίνη έχει προσελκύσει ενδιαφέρον για την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου λόγω αρκετών αναδρομικών μελετών που έδειξαν ότι η χρήση Μετοφορμίνης σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά καρκίνου σε διαβητικούς ασθενείς (Zhou et al. 2017, Evans et al. 2005). Ωστόσο, η Μετοφορμίνη έχει χρησιμοποιηθεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα και σε μη διαβητικούς ασθενείς (Higurashi et al. 2016). Πολύ ενδιαφέρον

παρουσιάζει μία πρόσφατη έρευνα που δείχνει ότι η Μετφορμίνη μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα των ειδικών αναστολέων τυροσινικών κινασών (TKI- tyrosine kinase inhibitors) στον επιθετικό καρκίνο του πνεύμονα σε μη διαβητικούς ασθενείς (Arrieta et al. 2019). Εφόσον η Μετφορμίνη φαίνεται να είναι αποτελεσματική και σε ασθενείς που δεν είναι διαβητικοί, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι το φάρμακο επιδρά στο κυτταρικό/μοριακό επίπεδο, και όχι μόνο στο πλάσμα με τη μείωση της γλυκόζης και της αντίστασης στην ινσουλίνη.

Όπως και με τη δράση κατά του Διαβήτη, η Μετφορμίνη φαίνεται να είναι αποτελεσματική εναντίον του καρκίνου μέσω δύο (κυρίως) μηχανισμών: ενός που είναι AMPK- και mTORC1-εξαρτώμενος, και ενός που είναι AMPK- και mTORC1-ανεξάρτητος. Ο AMPK- και mTORC1-ανεξάρτητος μηχανισμός έχει αποδοθεί στα μειωμένα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης καθώς και στη μειωμένη παραγωγή προϊόντων από τον κύκλο του Crebs. Επίσης, η Μετφορμίνη με την αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας μειώνει την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species (ROS)), του οξειδωτικού stress και της βλάβης στο DNA (Pernicova et al. 2014). Η Μετφορμίνη επίσης προκαλεί μείωση της έκφρασης των παραγόντων μεταγραφής Sp1, Sp3, και Sp4, που έχουν βρεθεί ότι είναι πολύ αυξημένοι σε διάφορους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παγκρέατος (Safe et al. 2018). Ο AMPK-εξαρτώμενος μηχανισμός δράσης της Μετφορμίνης είναι μέσω της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης των υπομονάδων του mTORC1 subunits, της αναστολής της λιποσύνθεσης και του NFκB μονοπατιού. Αξίζει να αναφερθεί ότι η Μετφορμίνη μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση του mTOR ανεξάρτητα από το AMPK, καθώς έχει δειχτεί ότι μπορεί να προκαλέσει αύξηση της έκφρασης του REDD1 μέσω της αναστολής του mTOR από το p53 (Ben Sahra et al. 2011). Η στόχευση δύο κύριων ρυθμιστών της ανθρώπινης φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας επιτρέπει στη Μετφορμίνη να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία πολλαπλών καρκίνων. Τέλος, η

Μετφορμίνη έχει και συστημικές επιδράσεις κατά του καρκίνου με την αναστολή του αυξητικού παράγοντα IGF-1, τη μείωση των κυτταροκίνων που προάγουν τη φλεγμονή, τη μείωση της έκφρασης μορίων που είναι απαραίτητα για την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων, την αναστολή του Warburg effect και, ως εκ τούτου, της απελευθέρωσης γαλακτικού οξέος από τους καρκινικούς όγκους (Pryor et al. 2015, Pernicova et al. 2014).

Πρόσφατα δεδομένα από πειράματα με ζώα δείχνουν ότι η Μετφορμίνη μπορεί να έχει επιδράση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η Μετφορμίνη αναστέλλει την εξόντωση των CD8+ λεμφοκυττάρων διηθούντα τον όγκο (tumor induced lymphocytes – TIL), και ως αποτέλεσμα αυτού βελτιώνουν την T-κυτταρική ανοσοαπόκριση εναντίον του καρκινικού ιστού. Μειώνει την απόπτωση των CD8+ TIL, και επίσης αλλάζει τον ανοσοφαινότυπο με τα T λεμφοκύτταρα κεντρικής μνήμης (central memory T cells, που είναι ανενεργά εναντίον των καρκινικών κυττάρων) να μετατρέπονται σε ενεργά T λεμφοκύτταρα μνήμης (effector memory T cells- TEM, που είναι ενεργά εναντίον του καρκίνου). Η αύξηση στον πληθυσμό των TEM έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με την υποχώρηση των καρκινικών κυττάρων (Eikawa et al. 2015). Σε μία έρευνα ενός πειραματικού εμβολίου κατά του καρκίνου, η χορήγηση Μετφορμίνης μετά τον εμβολιασμό σε ζωικά μοντέλα οδήγησε σε μία αύξηση των CD8+ T κυττάρων μνήμης που προσέδωσε προστατευτική ανοσία κατά του καρκίνου (Pearce et al. 2009).

Η Μετφορμίνη συμπεριλαμβάνεται στην οικογένεια των μεταβολικών φαρμάκων, και έχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον η επίδρασή της στο μεταβολισμό του καρκίνου. Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η Μετφορμίνη ασκεί πολλές από τις δράσεις της μέσω του AMPK, το οποίο είναι ουσιαστικά ο ανιχνευτής ενέργειας του κυττάρου και ο κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού (Herzig et al. 2018). Το AMPK ενεργοποιείται όταν το ποσοστό ATP/AMP μειώνεται, και κατά

συνέπεια αναστέλλει τον αναβολισμό για να μειώσει τη σπατάλη ενέργειας και προάγει τον καταβολισμό για να αυξήσει την παραγωγή ATP. Φυσικά, κεντρικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία παίζουν τα μιτοχόνδρια. Το μικρο-περιβάλλον και το μακρο-περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων έχουν προταθεί ως σημαντικοί ρυθμιστικοί παράγοντες της ανάπτυξής τους. Οπότε εύλογα δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι η δράση της Μετφορμίνης μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες του περιβάλλοντος. Παρόλο που στοιχεία στον καρκίνο των ωοθηκών (Ma et al. 2019) δείχνουν ότι η δράση της Μετφορμίνης μπορεί να αυξηθεί μέσω της στέρησης της γλυκόζης, δεν υπάρχουν απ'οσο γνωρίζουμε διαθέσιμα δεδομένα για τον καρκίνο του θυρεοειδούς.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, et al. 2013 Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E364–69

Ahn HS, Kim HJ, and Welch HG 2014 Korea's thyroid-cancer 'epidemic' — screening and overdiagnosis. *N. Engl. J. Med.* 371:1765–1767

Almeida JM, Marcello M, Bufalo N, et al. 2013 EBV may play a role in the development of thyroid nodules. Presented in 83rd Annual Meeting of the American Thyroid Association, pp A-88. San Juan, Porto Rico: Thyroid

Arrieta O, Barrón F, Padilla MS et al. 2019 Effect of Metformin Plus Tyrosine Kinase Inhibitors Compared With Tyrosine Kinase Inhibitors Alone in Patients With Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated Lung Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* e192553

Aschebrook-Kilfoy B, Kaplan EL, Chiu BC, et al. 2013 The acceleration in papillary thyroid cancer incidence rates is similar among racial and ethnic groups in the United States. *Ann Surg Oncol* 20:2746-53

Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, et al. 2011 Metformin independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Research* 71 4366–4372.

Bertakis KD, Azari R, Helms J, et al. 2000 Gender differences in the utilization of health care services. *J. Fam. Pract* 49:147–152

Bible KC, and Ryder M 2016 Evolving molecularly targeted therapies for advanced-stage thyroid cancers. *Nat Rev Clin Oncol* 13:403-16

Blomberg M, Feldt-Rasmussen U, Andersen KK, et al. 2012 Thyroid cancer in Denmark 1943-2008, before and after iodine supplementation. *Int J Cancer*. 131:2360-6

Boichard A, Croux L, Al Ghuzlan A, et al. 2012 Somatic RAS mutations occur in a large proportion of sporadic RET-negative medullary thyroid carcinomas and extend to a previously unidentified exon. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E2031–35

Bounacer A, Wicker R, Caillou B, et al. 1997 High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 15:1263

Bunone G, Vigneri P, Mariani L, et al. 1999 Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 155:1967–76

Burman KD, and Wartofsky L 2015 CLINICAL PRACTICE. Thyroid Nodules. *N Engl J Med*. 373:2347-56

Cancer Genome Atlas Research Network 2014 Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 159:676–90

Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/thyroid-cancer/mortality#ref-1>.

Capp C, Wajner SM, Siqueira DR, et al. 2010 Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 20:863–71

Chae YK, Arya A, Malecek MK et al. 2016 Repurposing metformin for cancer treatment: current clinical studies. *Oncotarget* 7: 40767–40780

Chen AY, Jemal A, and Ward EM 2009 Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988–2005. *Cancer* 115:3801–7

Cheung CC, Carydis B, Ezzat S, et al. 2001 Analysis of ret/PTC gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2187-90

Chong PY 1994 Thyroid carcinomas in Singapore autopsies. *Pathology* 26:20-2

Colonna M, Bossard N, Guizard AV, et al. 2010 Descriptive epidemiology of thyroid cancer in France: incidence, mortality and survival. *Ann Endocrinol (Paris)*. 71:95-101

Cook M, Yu XM, and Chen H 2010 Notch in the development of thyroid C-cells and the treatment of medullary thyroid cancer. *Am J Transl Res*. 2:119–25

Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. 2009 Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19:1167–1214.

Curado MP, Edwards B, Shin HR et al. 2007 *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX*. IARC Scientific Publications No. 160. IARC Press, Lyon, France.

Dahia PL, Marsh DJ, Zheng Z, et al. 1997 Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Res* 57:4710-3

Davies L, and Welch HG 2006 Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 295:2164–2167

Donis-Keller H, Dou S, Chi D, et al. 1993 Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 2:851–6

Duntas LH, and Doumas C 2009 The ‘rings of fire’ and thyroid cancer. *Hormones (Athens)* 8:249-53

Durante C, Haddy N, Baudin E, et al. 2006 Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:2892-9

Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, et al. 2007 BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2840–3

Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, et al. 2003 Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4440–5

Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, et al. 2015 Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:1809–1814

Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. 2008 Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 93:682–7

Elisei R, Romei C, Cosci B, et al. 2007 RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4725–9

Emmertsen K 1985 Medullary thyroid carcinoma and calcitonin. *Dan Med Bull* 32:1–28.

Enewold L, Zhu K, Ron E, et al. 2009 Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980–2005. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18:784–791

Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, et al. 1999 Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50:529-35

Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM et al. 2005 Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Br. Med. J* 330:1304–1305

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. 2013 Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49:1374-403

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M et al. 2013 GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. World Health Organization http://globocan.iarc.fr/Pages/summary_table_pop_prev_sel.aspx

Ford RJ, Fullerton MD, Pinkosky SL et al. 2015 Metformin and salicylate synergistically activate liver AMPK, inhibit lipogenesis and improve insulin sensitivity. *Biochem. J* 468:125–132

Foretz M, Hébrard S, Leclerc J et al. 2010 Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest* 120:2355–2369

Freeman C, Berg JW, and Cutler SJ 1972 Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer* 29:252

Fukahori M, Yoshida A, Hayashi H, et al. 2012 The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid* 22:683–689

Fullerton MD, Galic S, Marcinko K et al. 2013 Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nature Medicine* 19:1649–1654

Furuya-Kanamori L, Bell KJ, Clark J, et al. 2016 Prevalence of Differentiated Thyroid Cancer in Autopsy Studies Over Six Decades: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol* 34:3672-3679

Galon J, and Bruni D 2020 Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity* 52:55-81

Gormsen LC, Sundelin EI, Jensen JB et al. 2016 In vivo imaging of human ¹¹C-metformin in peripheral organs: dosimetry, biodistribution, and kinetic analyses. *J. Nucl. Med* 57:1920–1926

Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, et al. 1990 PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60:557–63

Hadoux J, Pacini F, Tuttle RM, et al. 2016 Management of advanced medullary thyroid cancer. *Lancet Diabetes Endocrinol* 4:64–71

Hanahan D, and Weinberg RA 2000 The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70

Hanahan D, and Weinberg RA 2011 Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674

Harach HR, Franssila KO, and Wasenius VM 1985 Occult papillary carcinoma of the thyroid: A “normal” finding in Finland—A systematic autopsy study. *Cancer* 56:531-8

Hasenour CM, Ridley DE, Hughey CC et al. 2014 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) effect on glucose production, but not energy metabolism, is independent of hepatic AMPK in vivo. *J. Biol. Chem* 289:5950–5959

Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2016 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 26:1-133

He L, Sabet A, Djedjos S et al. 2009 Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell* 137:635–646

Herzig S and Shaw R 2018 AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 19:121–135

Higurashi T, Hosono K, Takahashi H, et al. 2016 Metformin for chemoprevention of metachronous colorectal adenoma or polyps in post-polypectomy patients without diabetes: a multicenter double-blind, placebo-controlled, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17:475–483

Hogan AR, Zhuge Y, Perez EA, et al 2009 Pediatric thyroid carcinoma: incidence and outcomes in 1753 patients. *J Surg Res* 156:167

Holm LE, Blomgren H, and Löwhagen T 1985 Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *N Engl J Med* 312:601

Horn-Ross PL, Lichtensztajn DY, Clarke CA, et al. 2014 Continued rapid increase in thyroid cancer incidence in California: trends by patient, tumor, and neighborhood characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:1067-79

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.

Hrafinkelsson J, Jonasson JG, Sigurdsson G, et al. 1988 Thyroid cancer in Iceland 1955-1984. *Acta Endocrinol* 118:566–572

Hyer SL, Newbold K, and Harmer C 2005 Familial medullary thyroid cancer: clinical aspects and prognosis. *Eur J Surg Oncol*. 31:415–9

Jensen K, Patel A, Larin A, et al. 2010 Human herpes simplex viruses in benign and malignant thyroid tumours. *J Pathol* 2010 221:193-200

Kaplan SH, Gandek B, Greenfield S, et al. 1995 Patient and visit characteristics related to physicians' participatory decision-making style. *Med. Care* 33:1176–1187

Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, et al. 2005 Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer* 103:1330–1335

Kebebew E, Weng J, Bauer J, et al. 2007 The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 246:466-71

Keinan-Boker L, and Silverman BG 2016 Trends of thyroid cancer in Israel: 1980–2012. *Rambam Maimonides Med. J.* 7, e0001

Kelly LM, Barila G, Liu P, et al. 2014 Identification of the transforming STRN-ALK fusion as a potential therapeutic target in the aggressive forms of thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4233-8

Kent WD, Hall SF, Isotalo PA et al. 2007 Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ* 177:1357–1361

- Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR et al. 2009 International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973–2002. *Cancer Causes Control* 20: 525–531
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al. 2003 High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: Genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63:1454–7
- Kirpichnikov D, McFarlane SI, and Sowers JR 2002 Metformin: an update. *Ann. Intern. Med* 137:25–33
- Knobel M, and Medeiros-Neto G 2007 Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51:701-12
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, et al. 2002 Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 346:393-403
- Lang W, Borrusch H, and Bauer L 1988 Occult carcinomas of the thyroid: Evaluation of 1,020 sequential autopsies. *Am J Clin Pathol* 90:72-6
- La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, et al. 2015 Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. *Int J Cancer*. 136:2187-95
- Li H, Fan X, and Houghton J 2007 Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*. 101:805-15
- Lise M, Franceschi S, Buzzoni C, et al. 2012 Changes in the incidence of thyroid cancer between 1991 and 2005 in Italy: a geographical analysis. *Thyroid* 22:27-34
- Liu R, and Xing M 2016 TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 23:R143-55
- Lohrs U, Permanetter W, Spelsberg F, et al. 1977 Investigation of frequency and spreading of the different histological types of thyroid cancer in an endemic goiter region. *Verhandl Dtsch Ges Pathol* 61:268–274
- Logue JP, Hale RJ, Stewart AL, et al. 1992 Primary malignant lymphoma of the thyroid: a clinicopathological analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22:929
- Ma L, Wei J, Wan J. et al. 2019 Low glucose and metformin-induced apoptosis of human ovarian cancer cells is connected to ASK1 via mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-associated pathways. *J. Exp. Clin. Cancer Res* 38:77
- Mack WJ, Preston-Martin S, Dal Maso L, et al. 2003 A pooled analysis of case–control studies of thyroid cancer: cigarette smoking and consumption of alcohol, coffee, and tea. *Cancer Causes Control* 14:773-85

- Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y et al. 2014 Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510:542–546
- Marcello MA, Sampaio AC, Geloneze B, et al. 2012 Obesity and excess protein and carbohydrate consumption are risk factors for thyroid cancer. *Nutr Cancer* 64:1190-5
- Martinez-Tello FJ, Martinez-Cabruja R, Fernandez-Martin J, et al. 1993 Occult carcinoma of the thyroid. A systematic autopsy study from Spain of two series performed with two different methods. *Cancer* 71:4022-9
- Mazzaferri EL 2001 Thyroid cancer. In Becker KL, editor. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 382–402
- Meinhold CL, Ron E, Schonfeld SJ, et al. 2010 Nonradiation risk factors for thyroid cancer in the US Radiologic Technologists Study. *Am J Epidemiol* 171:242-52
- Miller RA, Chu Q, Xie J et al. 2013 Biguanides suppress hepatic glucagon signaling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 494:256–260
- Misbin RI 2004 The phantom of lactic acidosis due to metformin in patients with diabetes. *Diabetes Care* 27:1791-3
- Mitselou A, Vougiouklakis T, Peschos D, et al. 2002 Occult thyroid carcinoma: A study of 160 autopsy cases—The first report for the region of Epirus-Greece. *Anticancer Res* 22:427-32
- Mortensen JD, Bennett WA, and Woolner LB 1955 Incidence of carcinoma in thyroid glands removed at 1000 consecutive routine necropsies. *Surg Forum* 5:659-63.
- Motoi N, Sakamoto A, Yamochi T, et al. 2000 Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol Res Pract* 196:1-7
- Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, et al. 2011 High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E863–68
- Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. 1993 Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363:458–460
- Nagaiah G, Hossain A, Mooney CJ, et al. 2011 Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Oncol* 2011:542358.

- Navas-Carrillo D, Ríos A, Rodríguez JM, et al. 2014 Familial nonmedullary thyroid cancer: screening, clinical, molecular and genetic findings. *Biochim Biophys Acta* 1846:468-76
- Neff RL, Farrar WB, Kloos RT, et al. 2008 Anaplastic thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37:525–538
- Nikiforov YE 2002 RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 13:3-16
- Nikiforov YE, Nikiforova MN 2011 Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 7:569–80
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, et al. 2003 RAS point mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2318-26
- Nocera M, Baudin E, Pellegriti G, et al. 2000 Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of doxorubicin-streptozocin and 5 FU-dacarbazine. *Groupe d'Etude des Tumeurs à Calcitonine (GETC). Br J Cancer* 83:715–8
- Nosé V 2011 Familial thyroid cancer: a review. *Mod Pathol.* 24 (Suppl 2):S19–S33
- Oda H, Miyauchi A, Ito Y, et al. 2016 Incidences of Unfavorable Events in the Management of Low-Risk Papillary Microcarcinoma of the Thyroid by Active Surveillance Versus Immediate Surgery. *Thyroid* 26:150-5
- Owen MR, Doran E, and Halestrap AP 2000 Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J* 348:607–614
- Pandeya N, McLeod DS, Balasubramaniam K, et al. 2015 Increasing thyroid cancer incidence in Queensland, Australia 1982-2008 - true increase or overdiagnosis? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 84:257-264
- Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, et al. 1988 International incidence of childhood cancer. *IARC Sci Publ* 87:1–401
- Pazaitou-Panayiotou K, Michalakis K, Paschke R 2012 Thyroid cancer in patients with hyperthyroidism. *Horm Metab Res* 44:255-62
- Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, et al. 2009 Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* 460:103–107

Pedersen RK, and Pedersen NT 1996 Primary non-Hodgkin's lymphoma of the thyroid gland: a population based study. *Histopathology* 28:25

Pernicova I and Korbonits M 2014 Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol* 10:143–156

Pryor R and Cabreiro F 2015 Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem. J* 471:307–322

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. 2014 Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74:2913–21

Rena G, Hardie DG, and Pearson ER 2017 The mechanism of action of metformin. *Diabetologia* 60: 1577–1585

Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, et al. 2009 Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res.* 69:4885-93

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al. 2001 SEER Cancer Statistics Review, 1973-1998, National Cancer Institute Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/Publications/CSR1973_1998/, 2001

Roman S, Lin R, and Sosa JA 2006 Prognosis of medullary thyroid carcinoma: demographic, clinical, and pathologic predictors of survival in 1252 cases. *Cancer* 107:2134-42

Safe S, Nair V, and Karki K 2018 Metformin-induced anticancer activities: recent insights. *Biol. Chem* 399: 321–335

Saji M, and Ringel MD 2010 The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol* 321:20-8

Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, et al. 1994 Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 9:509–16

Sarma M, Sonik B, Subramanyam P, et al. 2015 Isolated skeletal muscle metastatic deposit in a patient with micropapillary carcinoma thyroid identified by 18F FDG PET CT. *J Egypt Natl Canc Inst* 27:47-50

Scheiden R, Keipes M, Bock C, et al. 2006 Thyroid cancer in Luxembourg: a national population-based data report (1983-1999). *BMC Cancer* 6:102

Schlumberger MJ 1998 Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 338:297–306

Schneider AB, and Sarne DH 2005 Long-term risks for thyroid cancer and other neoplasms after exposure to radiation *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 1:82

Sciuto R, Romano L, Rea S, et al. 2009 Natural history and clinical outcome of differentiated thyroid carcinoma: a retrospective analysis of 1503 patients treated at a single institution. *Ann Oncol* 20:1728-35

SEER Stat Fact Sheets. Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>.

Seta K, and Takahashi S 1976 Thyroid carcinoma. *Int Surg* 61:541-4

Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D et al. 2005 The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310:1642–1646

Sherman SI 2003 Thyroid carcinoma. *Lancet* 361:501-11

Shu Y, Sheardown SA, Brown C et al. 2007 Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J. Clin. Invest* 117:1422–1431

Silverberg SG, and Vidone RA 1966 Carcinoma of the thyroid in surgical and postmortem material: Analysis of 300 cases at autopsy and literature review. *Ann Surg* 164:291-9

Skarsgard ED, Connors JM, and Robins RE 1991 A current analysis of primary lymphoma of the thyroid. *Arch Surg* 126:1199

Smallridge RC, Ain KB, Asa SL, et al. 2012 American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. *Thyroid* 22:1104-39

Smallridge RC, and Copland JA 2010 Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol* 22:486–497

Smittenaar CR, Petersen KA, Stewart K, et al. 2016 Cancer incidence and mortality projections in the UK until 2035. *Br J Cancer*.115:1147-1155

Soares P, Máximo V, and Sobrinho-Simões M 2003 Molecular pathology of papillary, follicular and Hurthle cell carcinomas of the thyroid. *Arkh Patol* 65:45–7

Sokal JE 1954 Incidence of malignancy in toxic and non-toxic nodular goiter. *JAMA* 154:1321–1325

Sokić SI, Adanja BJ, Vlajinac HD, et al. 1994 Risk factors for thyroid cancer. *Neoplasma* 41:371-4

Tucker GT, Casey C, Phillips PJ et al. 1981 Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br. J. Clin. Pharmacol* 12:235–246

Tuttle RM, Fleisher M, Francis GL et al. 2002 Serum vascular endothelial growth factor levels are elevated in metastatic differentiated thyroid cancer but not increased by short-term TSH stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1737–42

Valle LA, and Kloos RT 2011 The prevalence of occult medullary thyroid carcinoma at autopsy. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E109-13

Veiga LH, Neta G, Aschebrook-Kilfoy B et al. 2013 Thyroid cancer incidence patterns in Sao Paulo, Brazil, and the U.S. SEER program, 1997–2008. *Thyroid* 23:748–757

Vigneri R, Malandrino P, and Vigneri P 2015 The changing epidemiology of thyroid cancer: why is incidence increasing? *Curr Opin Oncol* 27:1-7

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. 1998 Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 352:854-65

Viollat B, Guigas B, Sanz Garcia N, et al. 2012 Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci. (Lond)* 122:253–270

Wang SA, Rahemtullah A, Faquin WC, et al. 2005 Hodgkin's lymphoma of the thyroid: a clinicopathologic study of five cases and review of the literature. *Mod Pathol* 18:1577

Wang Y, and Wang W 2015 Increasing incidence of thyroid cancer in Shanghai, China, 1983–2007. *Asia Pac. J. Public Health* 27: NP223–NP229

Wartofsky L 2010 Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure? *Hormones (Athens)* 9:103-8

Wells SA Jr, Asa SL, Dralle H, et al. 2015 Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 25:567

Wells SA Jr, and Santoro M 2009 Targeting the RET pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 15:7119–23

Williams SD, Birch R, and Einhorn LH 1986 Phase II evaluation of doxorubicin plus cisplatin in advanced thyroid cancer: a Southeastern Cancer Study Group Trial. *Cancer Treat Rep* 70:405–7

Wu G, Mambo E, Guo Z, et al. 2005 Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab 90:4688-93

Xing M 2005 BRAF mutation in thyroid cancer. Endocr Relat Cancer 12:245–262

Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. 2013 Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. JAMA 309:1493–501

Xing M, Liu R, Liu X, et al. 2014 BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. J Clin Oncol 32:2718-26

Xing M, Westra WH, Tufano RP, et al. 2005 BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 90:6373-9

Yao R, Chiu CG, Strugnelli SS, et al. 2011 Gender Differences in Thyroid Cancer. Expert Rev Endocrinol Metab 6:215-243

Yu XM, Lo CY, Chan WF, et al. 2005 Increased expression of vascular endothelial growth factor C in papillary thyroid carcinoma correlates with cervical lymph node metastases. Clin Cancer Res 11:8063–9

Zhou G, Myers R, Li Y et al. 2001 Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J. Clin. Invest 108:1167–1174

Zhou XL, Xue WH, Ding XF et al. 2017 Association between metformin and the risk of gastric cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies. Oncotarget 8:55622–55631

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΞΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗΣ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΩΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1.1 Εισαγωγή

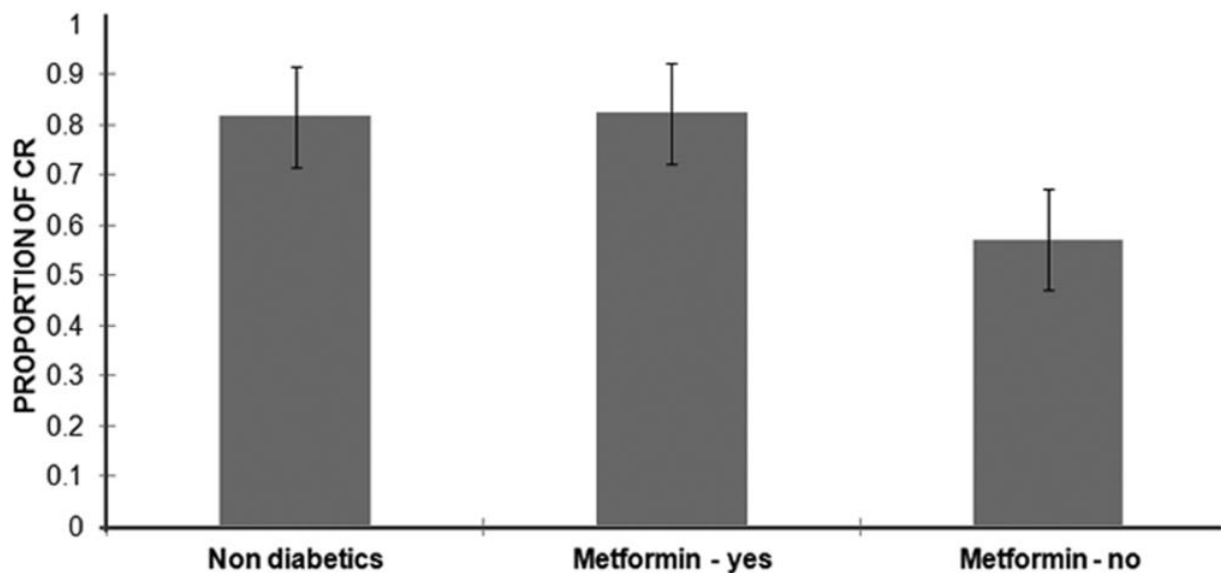
Η στόχευση του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων έχει αναδυθεί ως μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία του καρκίνου (Pollak 2012). Επιδημιολογικές και in vitro μελέτες, καθώς και ερευνητικά πρωτόκολλα πάνω σε ζώα, έχουν δείξει ότι το μεταβολικό φάρμακο μετοφορμίνη (που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου II) κατέχει αντι-νεοπλασματικές ιδιότητες σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους (Pollak 2012, Margel et al. 2013, Yin et al. 2013, Thompson 2014). Αυτή τη στιγμή υπάρχουν πάνω από 200 ενεργές κλινικές μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος, μαστού, παχέος εντέρου, ωοθηκών που ερευνούν τη Μετοφορμίνη μόνη ή σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες (Clinicaltrials.gov). Πρόσφατες μετα-αναλύσεις, ωστόσο, έχουν δείξει ότι η δράση της μετοφορμίνης στον καρκίνο δεν επηρεάζει όλους τους πληθυσμούς με τον ίδιο τρόπο (Gandini et al. 2014). Για αυτό το λόγο, είναι απαραίτητη η διευκρίνιση των μοριακών μηχανισμών που επηρεάζουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη μετοφορμίνη, καθώς μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες που θα καθοδηγήσουν την επιλεκτική χρήση της Μετοφορμίνης στις κλινικές μελέτες.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η Μετοφορμίνη μπορεί να επηρεάσει την ογκογένεση, τόσο έμμεσα (μέσω της συστημικής μείωσης των επιπέδων της ινσουλίνης), όσο και άμεσα μέσω της πρόκλησης ενεργειακού stress (Pernicova & Korbonits 2014). Η μετοφορμίνη έχει δειχτεί ότι έχει ισχυρή αντι-καρκινική δράση σε κυτταρικές σειρές λόγω της ενεργοποίησης της κινάσης AMP (AMPK), της αναστολής της δράσης του ενζύμου mammalian target of rapamycin (mTOR), και της αναστολής του κυτταρικού κύκλου (Ben Sahra et al. 2010, Choi & Park 2013). Η Μετοφορμίνη μπορεί επίσης να αναστείλει τη δράση του mTOR με τρόπο ανεξάρτητο του AMPK, μέσω της υπερ-έκφρασης του REDD1, που είναι ένας γνωστός αναστολέας του mTOR (Ben Sahra

et al. 2011). Η υπερ-έκφραση της αυτοφαγίας έχει δείξει σε καρκινικά κύτταρα μετά από θεραπεία με μετοφορμίνη, και η αναστολή της αυτοφαγίας ήταν επαρκής για να αντιστρέψει τις αντι-καρκινικές ιδιότητες της Μετοφορμίνης σε κύτταρα από καρκίνο του ενδομητρίου (Takahashi et al. 2014). Η μετοφορμίνη επίσης θεωρείται ένας μιτο-τοξικός παράγοντας με διάφορες μελέτες να έχουν δείξει την ανασταλτική της δράση στο μιτοχονδριακό σύμπλεγμα I (Wheaton et al. 2014).

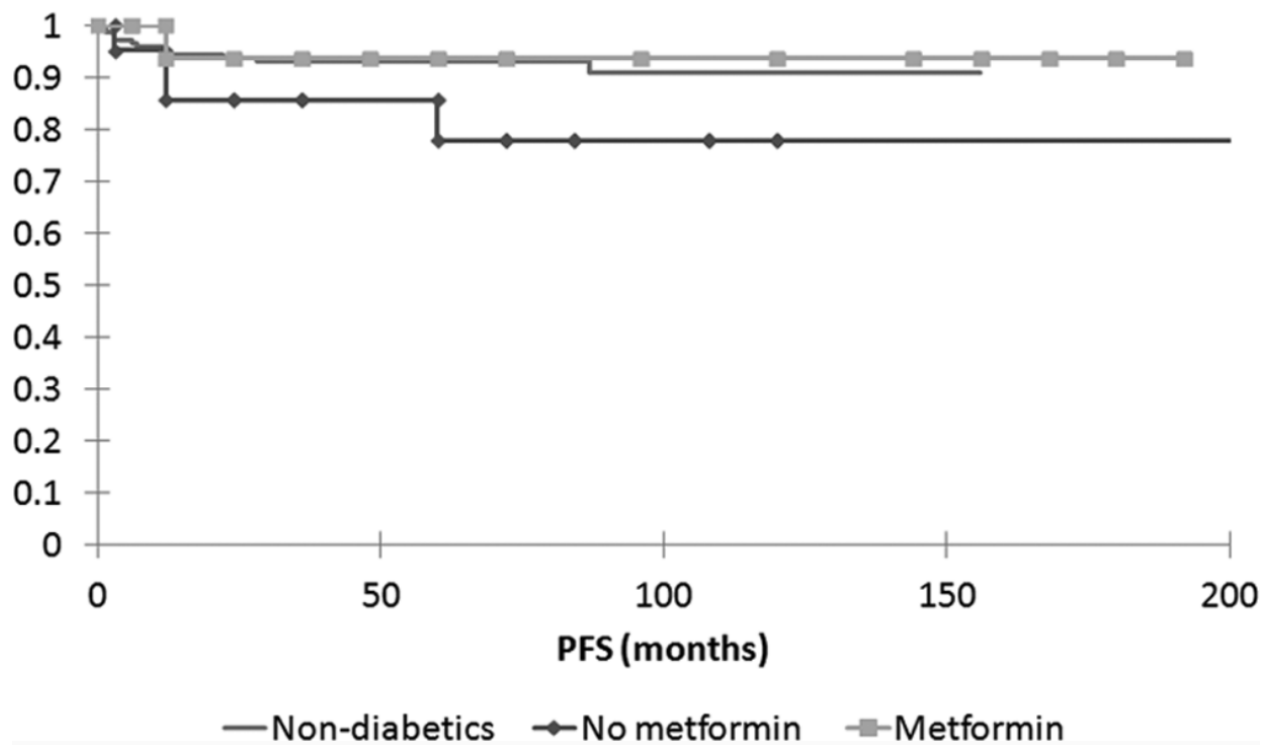
Σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από θηλώδεις και θυλακιώδεις καρκίνους του θυρεοειδή, η Μετοφορμίνη ανέστειλε την κλωνική κυτταρική ανάπτυξη, ενεργοποίησε το AMPK, προκάλεσε μείωση της έκφρασης του p70S6K/pS6 σηματοδοτικού μονοπατιού, ανταγωνίστηκε τις ογκο-γενετικές ιδιότητες της ινσουλίνης και μείωσε τη δημιουργία σφαιριδίων από τα καρκινικά κύτταρα (Chen et al. 2012, Klubo-Gwiezdzinska et al. 2013). Σε προκαταρκτικές μελέτες (Klubo-Gwiezdzinska et al. 2013) που έγιναν στο εργαστήριό μας πραγματοποιήσαμε μια αναδρομική ανάλυση των ιατρικών αρχείων των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με ταυτόχρονο διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς (ΔΚΘ) και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και δείξαμε ότι το ποσοστό πλήρους ύφεσης (CR) ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα που ήταν σε μετοφορμίνη σε σύγκριση με την ομάδα που δεν ήταν σε θεραπεία με μετοφορμίνη.

COMPLETE RESPONSE RATE



Group	Proportion of CR (%)	SD	P value (vs metformin)	P value (vs non-metformin)	Overall p value
Non-diabetics	81.6%	38.8%	0.921	0.009	
Metformin	82.4%	38.7%	-	0.044	
No metformin	57.1%	50.7%	0.044	-	0.029

Σχήμα 1.1.1. Στο παραπάνω Σχήμα απεικονίζεται το ποσοστό πλήρους ύφεσης (Complete Response -CR) σε ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς που ήταν I) μη διαβητικοί, II) διαβητικοί ασθενείς που δεν ήταν σε θεραπεία με Μετφορμίνη και III) διαβητικοί ασθενείς που ήταν σε θεραπεία με Μετφορμίνη. Οι διαβητικοί ασθενείς που δεν ήταν σε Μετφορμίνη παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μειωμένο ποσοστό CR.



Σχήμα 1.1.2. Στο παραπάνω Σχήμα απεικονίζεται μέσω της καμπύλης Kaplan-Meier ο χρόνος επιβίωσης (Progression Free Survival - PFS) χωρίς εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς που ήταν I) μη διαβητικοί, II) διαβητικοί ασθενείς που δεν ήταν σε θεραπεία με Μετφορμίνη και III) διαβητικοί ασθενείς που ήταν σε θεραπεία με Μετφορμίνη. Οι διαβητικοί ασθενείς που δεν ήταν σε Μετφορμίνη παρουσίασαν πιο σύντομη PFS.

Πραγματοποιήσαμε, επίσης, μια *in vitro* μελέτη χρησιμοποιώντας θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές για να διευκρινίσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς της μετφορμίνης. Παρατηρήσαμε αναστολή της ανάπτυξης σε όλες τις εξετασθείσες καρκινικές κυτταρικές σειρές μετά από θεραπεία με μετφορμίνη σε συγκέντρωση 5 mM επί 72 ώρες.

Η φαρμακοκινητική που μπορεί να επηρεάσει την δραστηριότητα της μετφορμίνης έχει μελετηθεί σε μη-καρκινικά, καθώς και σε καρκινικά κυτταρικά μοντέλα. Ο οργανικός μεταφορέας κατιόντων 1 (Organic Cation Transporter, OCT1) είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική πρόσληψη της μετφορμίνης (Shu et al. 2007). Ο OCT1 είναι μέλος της

οικογένειας πρωτεϊνών SLC22 και ένας μεταφορέας ηπατικής πρόσληψης που παίζει καθοριστικό ρόλο στη διάθεση και την ηπατική κάθαρση διαφόρων φαρμάκων και ενδογενών ενώσεων. Στους ανθρώπους, εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, και ειδικότερα, στην ημιτονοειδή μεμβράνη των ηπατοκυττάρων. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο OCT1 είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της απόκρισης των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία με μεθορμίνη (Segal et al. 2011).

Στην ογκολογική κοινότητα ο μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων θεωρείται ως ένας από τους ενδιαφέροντες στόχους για την καταπολέμηση των νεοπλασιών. Είναι λογικό η μεθορμίνη ως μεταβολικό φάρμακο αφενός να επηρεάζει την ενδοκυττάρια ενεργειακή κατάσταση μέσω του AMPK και αφετέρου η αποτελεσματικότητά της να εξαρτάται από τις μεταβολικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στο εσωτερικό του κυττάρου. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι ένας από τους μηχανισμούς δράσης της μεθορμίνης είναι μέσω της αναστολής του μιτοχονδριακού συμπλέγματος I της μιτοχονδριακής αλυσίδας. Έχειδειχθεί ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια του μιτοχονδριακού συμπλέγματος I καθορίζουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία με μεθορμίνη όταν τα κύτταρα διατηρούνται σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης (Birsoy et al. 2014). Αντίθετα, η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης μειώνει την αποτελεσματικότητα της μεθορμίνης σε κύτταρα που προέρχονται από καρκίνο του μαστού (Wahdan-Alaswad et al. 2013). Όλα αυτά τα ευρήματα υπονοούν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της δόσης της γλυκόζης και της αποτελεσματικότητας της μεθορμίνης μπορεί να έχει άμεσες επιπτώσεις στη χρήση της μεθορμίνης στην κλινική πράξη (Wahdan-Alaswad et al. 2013, Zordoky et al. 2014). Συγκεκριμένα, η διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν πολύ σημαντικό παράγοντα που θα καθορίζει την επιτυχία ή την αποτυχία της ογκολογικής θεραπείας με μεθορμίνη.

1.2 Μέθοδοι και Υλικά

1.2.1 Δείγματα από ανθρώπινους θυρεοειδικούς ιστούς

Δείγματα που ήταν ενσωματωμένα σε κύβους παραφίνης επιλέχθηκαν από 16 ασθενείς που ανέπτυξαν προοδευτική νόσο μετά την αρχική θεραπεία και υποβλήθηκαν σε δεύτερη επέμβαση για τους μεταστατικούς όγκους. Όλοι τα στοιχεία συλλέχθηκαν σε ανώνυμη βάση.

1.2.2 Καρκινικές θυρεοειδικές σειρές και υλικά

Ανθρώπινες θυρεοειδικές καρκινικές σειρές που προέρχονται από θυλακιώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (FTC133) και θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (BCPAP) αποκτήθηκαν από τον Dr. Motoyasu Saji (The Ohio State University) με άδεια από τους ερευνητές που αρχικά καθόρισαν τις κυτταρικές σειρές (Schweppe et al. 2008). Στο εργαστήριό μας, επιβεβαιώσαμε την παρουσία της μετάλλαξης BRAF στα BCPAP κύτταρα, καθώς και την απώλεια της έκφρασης του PTEN στα FTC133 κύτταρα.

Τα καρκινικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μέσο DMEM στο οποίο προστέθηκε 10% ορός από βοοειδή έμβρυα (fetal bovine serum – FBS), 100 U/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και βρίσκονταν σε incubator με 5% CO₂. Τα κύτταρα υπο-καλλιεργήθηκαν με 0.5% τρυψίνη και 0.02% EDTA (Sigma–Aldrich) όταν έφταναν στο 80% της χωρητικότητας του τριβλίου. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με θυρεοειδικές καρκινικές σειρές που είχαν περαστεί λιγότερες από 25 φορές. Για τα πειράματα στέρησης γλυκόζης, έγινε πλύση των κυττάρων δύο φορές με PBS, και στη συνέχεια το μέσο αντικαταστάθηκε από DMEM που δεν περιείχε γλυκόζη. Η συγκέντρωση της γλυκόζης διατηρήθηκε στο 0 mM ή τροποποιήθηκε για να είναι είτε 5 mM (χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη) είτε 20 mM (υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με είτε control μέσο είτε με μέσο που περιείχε Μετοφομίνη Sigma

Chemical Co.). Ο φαρμακευτικός αναστολέας της γλυκόλυσης 2-DG προέρχεται από τη Sigma Chemical Co.

1.2.3 Πειράματα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική βιωσιμότητα και ενεργοποίηση κασπάσης

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός καθορίστηκε μέσω κυτταρομετρίας με το Vi-CELL Cell Viability Analyzer από την εταιρία Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). Η κυτταρική βιωσιμότητα αξιολογήθηκε μέσω του Alamar Blue (Invitrogen). Η κυτταρική βιωσιμότητα επίσης αξιολογήθηκε μέσω της ανίχνευσης του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω του φθορίζοντος λιποφιλικού κατιόντος JC-1 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Η ανίχνευση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, και ακολουθήθηκε από φθορίζουσα μικροσκόπηση. Η κυτταροτοξικότητα εξετάστηκε χρησιμοποιώντας το LIVE/DEAD Cell Imaging Kit (Invitrogen). Η δοκιμασία FAM-FLICA Caspase 3/7 για την ανίχνευση της απόπτωσης μέσω των ενεργοποιημένων κασπασών 3 και 7 αποκτήθηκε από την εταιρία ImmunoChemistry Technologies, LLC (Bloomington, MN, USA). Τα νεκρά κύτταρα αναγνωρίστηκαν μέσω της χρώσης με προπίδιο του ιωδίου. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και ο μέσος όρος των τιμών από τα πειράματα αναφέρονται στην παρούσα εργασία.

1.2.4 Μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και του pH στο μέσο

Η συγκέντρωση της γλυκόζης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της οξείδωσης της γλυκόζης μέσω του μετρητή GlucCell, CescοBioproducts, Atlanta, GA, USA.

1.2.5 Εξαγωγή πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western blot)

Τα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα πλύθηκαν με παγωμένο διάλυμα λύσης των κυττάρων. 25 µg των διαλυμάτων πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (7%). Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροσελουλόζης (Invitrogen) μέσω ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού. Οι μεμβράνες αφέθηκαν σε διάλυμα με τα πρωτογενή αντισώματα phospho-p70S6K (Thr389), total-p70S6K, phospho-pS6 (Ser235/236), phospho-AMPK (Thr172), total AMPK, phospho-AKT (Ser473), poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), cleaved-caspase 3, LC3B, p62, BIP, PKM2 (Cell Signaling, Boston, MA, USA), cyclin D1, perforin, και b-actin (Santa Cruz Biotechnologies). Οι μεμβράνες μετά από πλύσιμο αφέθηκαν σε διάλυμα με τα δευτερογενή αντισώματα. Μετά από νέο πλύσιμο, οι μπάντες της πρωτεΐνης αποτυπώθηκαν μέσω του Li-COR Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Το λογισμικό Image Studio Lite version 3.1 (LI-COR) χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της πυκνότητας των μπαντών και την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών.

1.2.6 Εξαγωγή RNA και ποσοτική real-time PCR (quantitative real-time PCR)

Το ολικό RNA απομονώθηκε από τα καρκινικά θυρεοειδικά κύτταρα χρησιμοποιώντας το RNeasy Mini Kit (Qiagen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήσαμε qPCR master mixes με βάση το SYBR Green από την εταιρεία Qiagen. Η έκφραση των γονιδίων με καθορισμένο ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόλυσης εξετάστηκε μέσω των εμπορικών σειρών για τη γλυκόλυση (Glycolysis real-time PCR arrays) από την εταιρεία Qiagen. Η έκφραση των γονιδίων PKM (Pyruvate Kinase, με τις ισομορφές PKM1 και PKM2), glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PD*), και fructose-1,6-biphosphatase 1 (*FI*) εξετάστηκε με τη χρησιμοποίηση ειδικών εκκινητών.

1.2.7 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ιστών που ήταν ενσωματωμένα σε παραφίνη και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που καλλιεργήθηκαν σε SuperCell Culture Slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Η ενδογενής δραστηριότητα της περοξειδάσης απομακρύνθηκε με την εμβάπτυση σε διάλυμα 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα δείγματα και οι κυτταρικές σειρές επώαστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας με το πρωτογενές αντίσωμα αντι- PKM2 και η ανοσόχρωση πραγματοποιήθηκε με το DAKO Universal LSAB Kit (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Αρνητικά controls κατασκευάστηκαν με την παραπάνω διαδικασία με τη διαφορά ότι ο πρωτογενής αντιορός δε χρησιμοποιήθηκε. Υιοθετήσαμε μια ημι-ποσοτική διαδικασία βαθμολόγησης στην οποία λάβαμε υπόψιν την ένταση της χρώσης και την έκταση που καταλάμβανε. Κάθε όγκος βαθμολογήθηκε ανάλογα με την ένταση της χρώσης (0- καθόλου χρώση, 1- ελαφριά χρώση, 2- μέση χρώση, 3- ισχυρή χρώση) και την έκταση που καταλάμβανε η χρώση στους ιστούς (0- 0%, 1- 1-10%, 2- 11-50%, 3- 51%-80%, 4- 81-100%). Η τελική βαθμολογία καθορίστηκε μέσω του πολλαπλασιασμού των δύο παραπάνω υπο-σκορ με το ελάχιστο σκορ να είναι 0 και το μέγιστο σκορ να είναι 12.

1.2.8 Συνεστιακή μικροσκόπηση

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και στερεώθηκαν με 4% PFA σε PBS που ακολουθήθηκε από χρησιμοποίηση 0.2% Triton X-100 σε PBS. Τα δείγματα επώαστηκαν στο πρωτογενές αντίσωμα κατά της περφορίνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και οπτικοποιήθηκαν μέσω του AlexaFluor-488 (1: 300, Invitrogen). Anti-fade διάλυμα (SlowFade; Invitrogen) στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε στις αντικειμενοφόρους πλάκες και αυτές εξετάστηκαν σε ένα συνεστιακό μικροσκόπιο (Zeiss 700).

1.2.9 Μικροσκόπηση σε πραγματικό χρόνο

Η μικροσκόπηση και βιντεοσκόπηση των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Leica AF6000 Time-Lapse Imaging System.

1.3 Αποτελέσματα

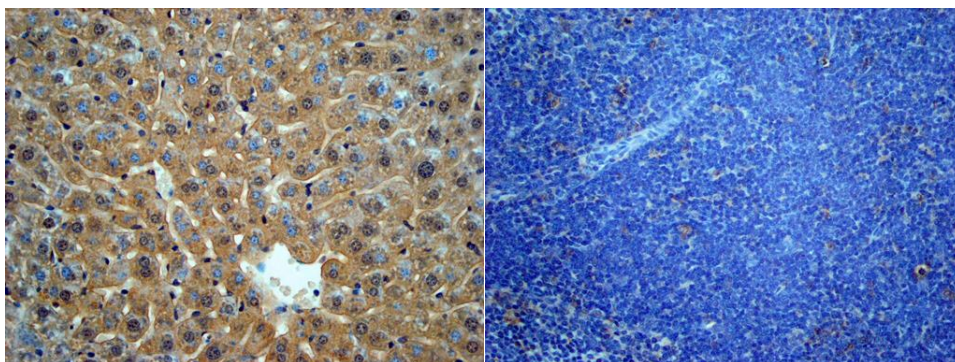
1.3.1 Έκφραση του OCT1 στο Μυελοειδή Καρκίνο του Θυρεοειδούς

Η έκφραση mRNA των μεταφορέων OCT1, OCT2 και OCT3 εξετάστηκε μέσω quantitative real time PCR σε δύο κυτταρικές σειρές MKΘ (TT και MZ-CRC-1). Η έκφραση της πρωτεΐνης του OCT1 καθορίστηκε μέσω Western blot. Τα αποτελέσματα των φαρμακευτικών παραγόντων ριφαμπικίνη (διεγέρτης PXR), U0126 (αναστολέας του MAPK/ERK) , Wortmannin (αναστολέας του PI3K/AKT) και Rapamycin (αναστολέας του mTOR) στην έκφραση του OCT1 καθορίστηκαν μέσω RT-PCR. Επίσης, πραγματοποιήσαμε πειράματα σίγασης του OCT1 με ειδικό shRNA για να αναστείλουμε την έκφραση του OCT1 στις κυτταρικές σειρές MKΘ. Χρησιμοποιήσαμε ειδικό αντι-OCT1 αντίσωμα για να ερευνήσουμε μέσω ανοσοϊστοχημείας την έκφραση του OCT1 σε δείγματα MKΘ διατηρημένα σε παραφίνη, τα οποία προήλθαν από 62 ασθενείς με MKΘ. Δείγματα από βιοψίες ήπατος και σπληνός χρησιμοποιήθηκαν ως θετικά και αρνητικά controls αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας ταξινομήθηκαν ως θετικά όταν εντοπίστηκε έκφραση του OCT1 στους καρκινικούς όγκους, ανεξάρτητα από την ένταση της χρώσης.

Η ανάλυση με real time PCR έδειξε έκφραση του OCT1, αλλά όχι των OCT2 και OCT3, στις δύο κυτταρικές σειρές. Το επίπεδο της έκφρασης του OCT1 ήταν 7.2 φορές υψηλότερο στην κυτταρική σειρά TT (που έχουμε δείξει σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας ότι είναι

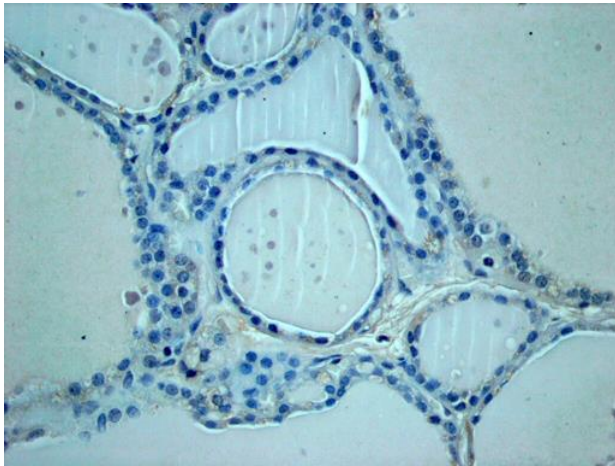
ευαίσθητη στη μετορφίνη) απ'ότι στην κυτταρική σειρά MZ-CRC-1 που είναι πιο ανθεκτική στη θεραπεία με μετορφίνη. Έχοντας δείξει ότι ο OCT1 εκφράζεται σε κύτταρα MKΘ, στη συνέχεια εξερευνήσαμε τους πιθανούς μηχανισμούς ρύθμισης των μεταφορέων OCT στα κύτταρα MKΘ. Πρώτα, εξερευνήσαμε τις επιδράσεις της ριφαμπικίνης που είναι ένας κλινικά διαθέσιμος και καλά χαρακτηρισμένος διεγέρτης της έκφρασης των OCT. Η θεραπεία με ριφαμπικίνη δεν είχε σημαντικές επιδράσεις στα επίπεδα mRNA των OCT1, 2 και 3 στις κυτταρικές σειρές TT και MZ-CRC-1. Εφόσον και οι δύο κυτταρικές σειρές φέρουν μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο RET, εξετάσαμε τις επιδράσεις των φαρμακευτικών αναστολέων του RET στην έκφραση του OCT1. Η θεραπεία των κυττάρων MKΘ με αναστολείς των MAPK/ERK, PI3K/AKT και mTOR σηματοδοτικών μονοπατιών δε βρέθηκε να σχετίζεται με αλλαγές στην έκφραση του OCT1. Τέλος, στα πειράματα σίγασης που πραγματοποιήσαμε η διαμόλυνση με GFP scramble shRNA δεν είχε σημαντικές επιπτώσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων MKΘ. Αντιθέτως, η αναστολή της έκφρασης του OCT1 μέσω ειδικού shRNA οδήγησε σε μαζικό θάνατο των κυττάρων MKΘ.

Στη συνέχεια, ερευνήσαμε εάν ο OCT1 εκφράζεται σε ανθρώπινους ιστούς. Αρχικά χρησιμοποιήσαμε ιστό από ήπαρ και σπλήνα σαν θετικό και αρνητικό control αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, η ανοσοϊστοχημεία μας ήταν άρτια τεχνικά με τον OCT1 να εκφράζεται στο ήπαρ, αλλά όχι στο σπλήνα.



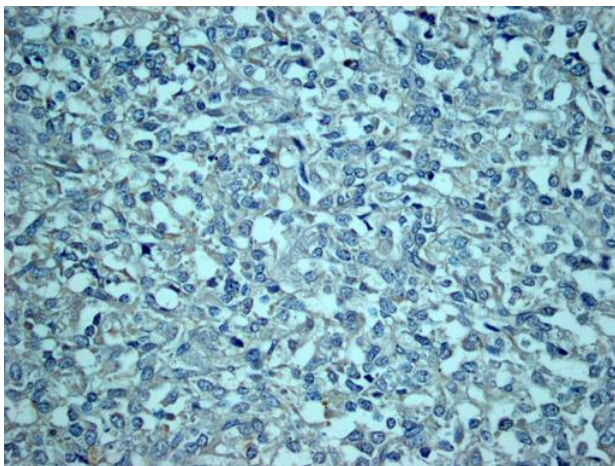
Σχήμα 1.3.1.1: Ανοσοϊστοχημεία με την έκφραση του OCT1 στο ήπαρ (αριστερά) και στο σπλήνα (δεξιά). Διακρίνεται η έντονη θετική χρώση στο ήπαρ, αλλά όχι στο σπλήνα.

Τα πειράματά μας έδειξαν ότι ο OCT1 δεν εκφράζεται σε φυσιολογικό θυροειδικό ιστό, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



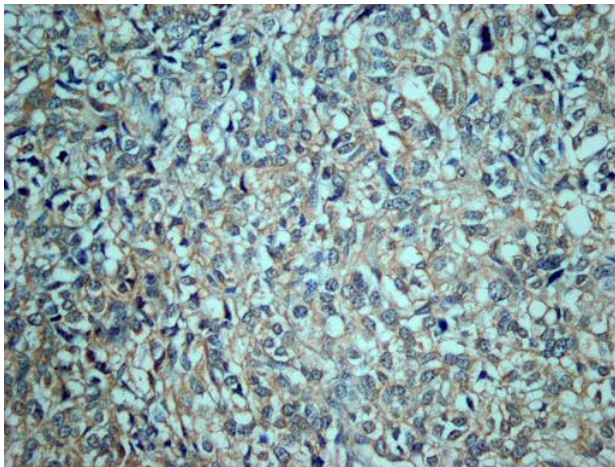
Σχήμα 1.3.1.2: Ανοσοϊστοχημεία με την έκφραση του OCT1 σε φυσιολογικό θυροειδικό ιστό. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση του OCT1 σε φυσιολογικό θυροειδικό ιστό.

Αντιθέτως, στα δείγματα ιστών από ΜΚΘ υπήρχε ετερογένεια στην έκφραση του OCT1. 33/62 όγκους δεν έδειξαν έκφραση του OCT1, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

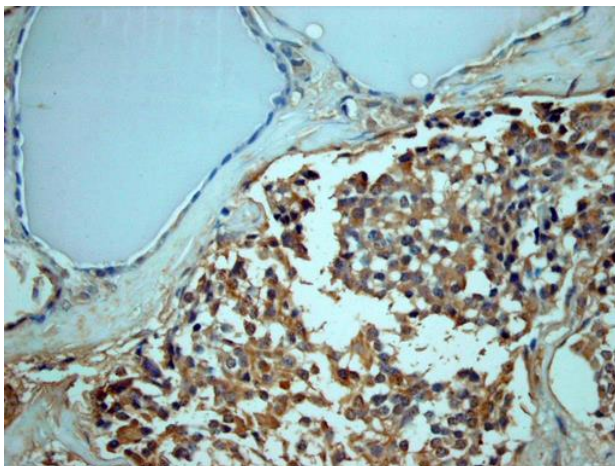


Σχήμα 1.3.1.3: Ανοσοϊστοχημεία με την έκφραση του OCT1 σε μυελογενές καρκίνο του θυρεοειδούς. Στο παραπάνω Σχήμα δεν παρατηρείται χρώση με OCT1.

29/62 όγκους έδειξαν διάφορα επίπεδα έκφρασης του OCT1, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Σε 9/62 όγκους η ένταση της χρώσης ήταν παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στον ηπατικό ιστό.



Σχήμα 1.3.1.4: Ανοσοϊστοχημεία με την έκφραση του OCT1 σε μυελογενές καρκίνο του θυρεοειδούς. Στο παραπάνω Σχήμα παρατηρείται θετική χρώση με OCT1.



Σχήμα 1.3.1.5: Ανοσοϊστοχημεία με την έκφραση του OCT1 σε μυελογενές καρκίνο του θυρεοειδούς. Στο παραπάνω Σχήμα παρατηρείται πολύ έντονη χρώση με OCT1, όμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στον ηπατικό ιστό.

Στη συνέχεια, προσπαθήσαμε να διαπιστώσουμε εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του OCT1 και των κλινικο-παθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ΜΚΘ που εξετάσαμε.

Χαρακτηριστικά	OCT1	
	Θετικά δείγματα	Αρνητικά δείγματα
Δημογραφικά		
Ηλικία (έτη)	62.7±9.4	52.5±4.4
Φύλο		
Άντρες	23	17
Γυναίκες	10	12
Παθολογοανατομικά		
Μέγεθος όγκου (cm)	2.3±1.2	2.7±1.3
Εστίες		
Μονοεστιακό	28	24
Πολυεστιακό	5	5
Αγγειακή διήθηση		

Ναι	6	10
Όχι	27	19
Μετάσταση σε λεμφαδένες		
Ναι	11	14
Όχι	22	15

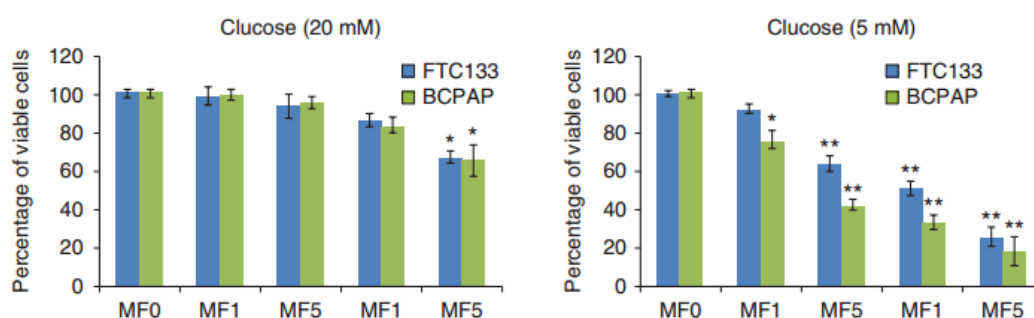
Πίνακας 1.3.1.1: Στον παραπάνω Πίνακα απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών με Μυελοειδή Καρκίνο του Θυρεοειδούς (ΜΚΘ). Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε εκείνους που ανοσοϊστοχημικά ανιχνεύτηκε OCT1 και σε εκείνους χωρίς έκφραση του OCT1. Paired t-test χρησιμοποιήθηκε για να συγκρίνουμε τις δύο ομάδες, αλλά δε βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά (p value > 0.05).

Δεν ανιχνεύτηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στο επίπεδο έκφρασης του OCT1 και των δημογραφικών-παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των εξετασθέντων ΜΚΘ. Το επίπεδο έκφρασης του OCT1 δεν ήταν σημαντικά διαφορετικό ανάμεσα στους σποραδικούς ΜΚΘ (N=54) και τους οικογενείς ΜΚΘ (N=8). Θετική χρώση με αντι-OCT1 εντοπίστηκε σε 8/13 όγκους που έφεραν μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο RET και σε 2/3 H2RAS θετικούς ΜΚΘ. Τέλος, δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους RET+ και τους RET- ΜΚΘ όσον αφορά στο επίπεδο έκφρασης του OCT1.

1.3.2 Τροποποίηση της Εξωκυτάρριας Συγκέντρωσης Γλυκόζης με Σκοπό την Αύξηση της Αποτελεσματικότητας της Μετοφομίνης

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε κυτταρικές σειρές που προήλθαν από θυλακιώδη καρκίνο του θυρεοειδή (FTC-133) και από θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδή (BCPAP). Τα κύτταρα

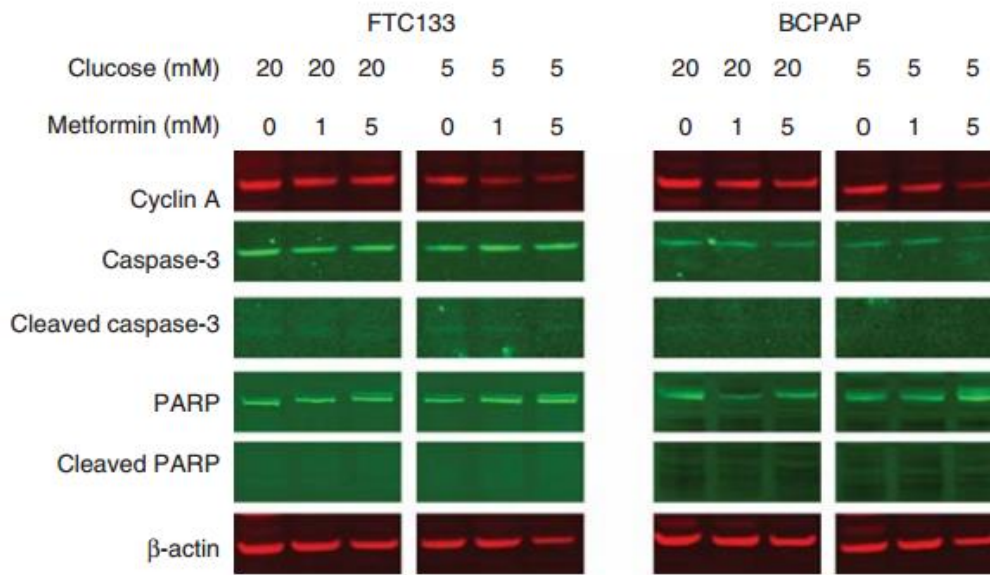
καλλιεργήθηκαν σε μέσο που περιείχε είτε 20 mM ή 5 mM γλυκόζης. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, στα 20 mM γλυκόζης η θεραπεία με μετφορμίνη είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και μόνο στην πολύ υψηλή δόση των 5 mM μετφορμίνης παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική διαφορά στη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με τα control κύτταρα. Αντιθέτως, στα 5 mM γλυκόζης η θεραπεία με 0.1 mM μετφορμίνης κατέληξε σε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων.



Σχήμα 1.3.2.1: Η εξωκυττάρια συγκέντρωση γλυκόζης σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της Μετφορμίνης. FTC-133 και BCPAP κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μέσο που περιείχε 20 mM γλυκόζης (αριστερά) είτε περιείχε 5 mM γλυκόζης (δεξιά). Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη με δύο δόσεις (1 mM και 5 mM). Τα ζωντανά κύτταρα υπολογίστηκαν μέσω της Alamar Blue assay, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παραπάνω στις 24 ώρες θεραπείας (δεύτερη και τρίτη στήλη στα υπο-σχήματα δεξιά και αριστερά), καθώς και στις 48 ώρες θεραπείας (τέταρτη και πέμπτη στήλη στα υπο-σχήματα δεξιά και αριστερά). Παρατηρείται σημαντική μείωση της βιωσιμότητας με τη μείωση της εξωκυττάριας γλυκόζης. *P value < 0.05 και **P value < 0.01.

Τα δεδομένα στο παραπάνω σχήμα παράχθηκαν μέσω της Alamar Blue assay, και καταδεικνύουν μια δοδο-εξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας και των δύο κυτταρικών σειρών που είναι πολύ πιο σημαντική όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 5 mM γλυκόζης (*P value < 0.05 και **P value < 0.01). Τα αποτελέσματα αυτά αναπαρήχθησαν και μέσω καταμέτρησης κυττάρων (τα αποτελέσματα δε δείχνονται εδώ, αλλά είναι διαθέσιμα).

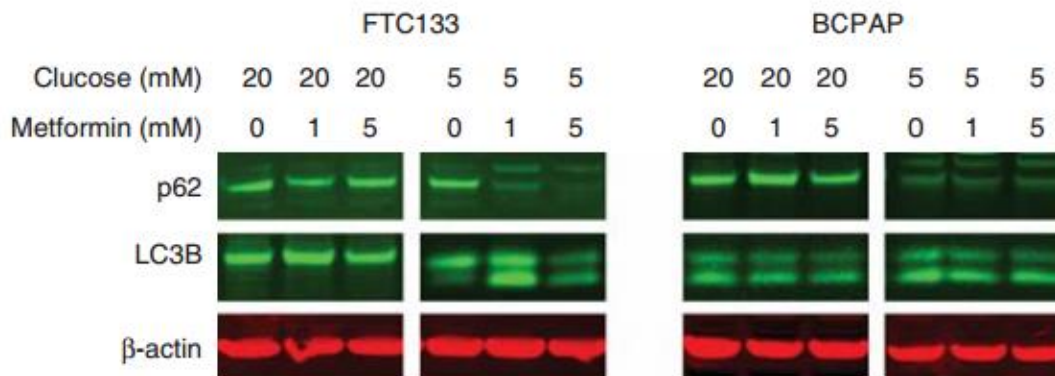
Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε ανάλυση στο επίπεδο των πρωτεϊνών σε αυτά τα κύτταρα μέσω Western Blot. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, υπήρχε μια δοσοεξαρτώμενη αναστολή της έκφρασης της Cyclin A, που συνεπάγεται με αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Παρ'όλο που στα 5 mM γλυκόζης μικροσκοπικά παρατηρήσαμε μαζικό κυτταρικό θάνατο μετά από θεραπεία με μετφορμίνη, στη Western Blot δεν παρατηρήσαμε αύξηση της έκφρασης της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και του PARP, γεγονός που υπονοεί ότι η απόπτωση δεν αποτελούσε μέρος της διαδικασίας θανάτου αυτών των κυττάρων.



Σχήμα 1.3.2.2: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται Western Blot που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 5 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη (0, 1, 5 mM). Παρατηρήθηκε αναστολή της Cyclin A και στις δύο κυτταρικές σειρές σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης μετά από θεραπεία με Μετφορμίνη.

Αντιθέτως, στα FTC-133 κύτταρα παρατηρήσαμε αύξηση της έκφρασης του LC3B με ταυτόχρονη μείωση (κατανάλωση) του p62, που υποδηλώνει την παρουσία αυτοφαγίας είτε ως μηχανισμού κυτταρικού θανάτου ή ως μηχανισμού κυτταρικής αυτοσυντήρησης. Ωστόσο, στο

μικροσκόπιο δεν παρατηρήσαμε την παρουσία των τυπικών αυτοφαγικών κενωτοπίων και των χαρακτηριστικών της αυτοφαγίας.

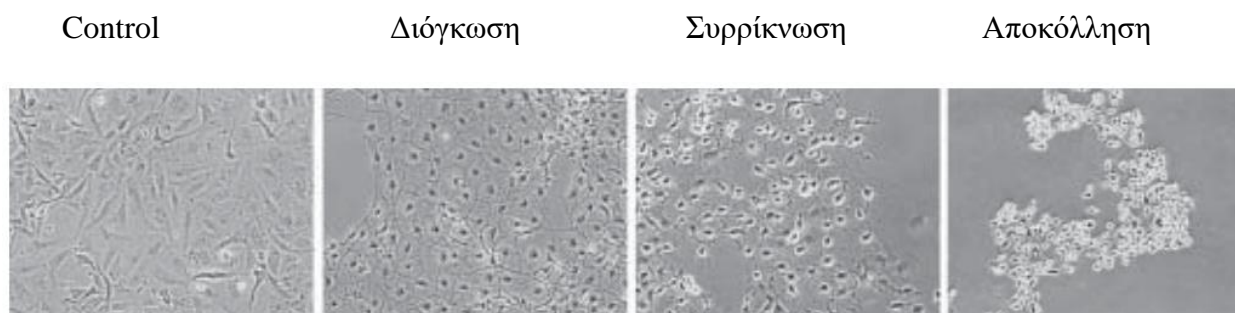


Σχήμα 1.3.2.3: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται Western Blot που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 5 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθησαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη (0, 1, 5 mM). Παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του LC3B με ταυτόχρονη μείωση (κατανάλωση) του p62, που υποδηλώνει την παρουσία αυτοφαγίας.

1.3.3 Η Θεραπεία με Μετφορμίνη προκαλεί Όγκωση σε Κύτταρα που Προέρχονται από ΔΚΘ σε Συνθήκες Χαμηλής Συγκέντρωσης Εξωκυττάριας Γλυκόζης

Προηγουμένως δείξαμε ότι στα κύτταρα που εκτίθενται σε μετφορμίνη σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης προκαλείται κυτταρικός θάνατος, αλλά αυτός δεν είναι αποπτωτικός (apoptosis) ή αυτοφαγικός (autophagy). Για να αποσαφηνίσουμε τα ακριβή αποτελέσματα της θεραπείας με μετφορμίνη προχωρήσαμε σε απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο (real-time) των κυττάρων. Σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, η μετφορμίνη (5 mM) δεν προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων. Σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης παρατηρήσαμε χρονο-εξαρτώμενες μορφολογικές αλλαγές στα

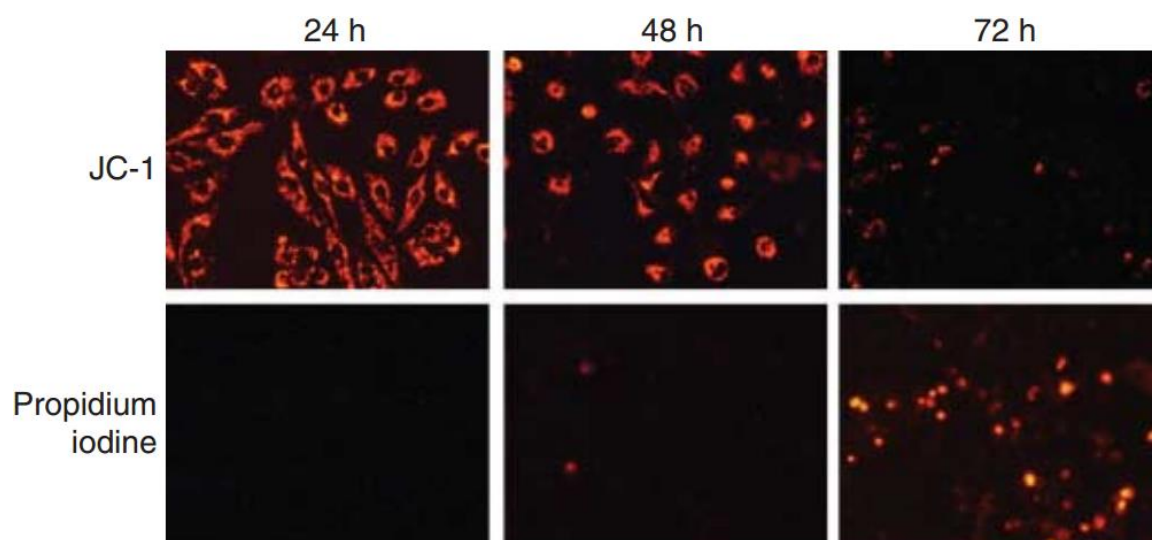
καρκινικά κύτταρα που εκτέθηκαν στη μετφορμίνη, οι οποίες ήταν ενδεικτικές της όγκωσης. Αυτές οι μορφολογικές αλλαγές συνέβησαν σταδιακά και τα παρακάτω διακριτά στάδια παρατηρήθηκαν: λανθάνον στάδιο (24 ώρες), κυτταρική διόγκωση (24-36 ώρες), κυτταρική συρρίκνωση (36-40 ώρες), “αγκιστρωμένη” αποκόλληση (40-48 ώρες), και δημιουργία μεμβρανωδών κύστεων με κυτταροπλασματικό οίδημα (48-72 ώρες). Αντιπροσωπευτικές εικόνες των μορφολογικών αλλαγών που συμβαίνουν στα καρκινικά κύτταρα μετά από θεραπεία με μετφορμίνη παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα. Επίσης, υπάρχουν διαθέσιμα τα βίντεο που δείχνουν τις χρονοεξαρτώμενες αλλαγές σε πραγματικό χρόνο.



Σχήμα 1.3.3.1: Στο παραπάνω Σχήμα απεικονίζονται FTC133 κύτταρα και οι εικόνες από real-time μικροσκόπηση. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μέσο με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (5 mM) και υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη 5 mM. Οι μορφολογικές αλλαγές συνέβησαν σταδιακά και τα παρακάτω διακριτά στάδια παρατηρήθηκαν: λανθάνον στάδιο (24 ώρες), κυτταρική διόγκωση (24-36 ώρες), κυτταρική συρρίκνωση (36-40 ώρες), “αγκιστρωμένη” αποκόλληση (40-48 ώρες), και δημιουργία μεμβρανωδών κύστεων με κυτταροπλασματικό οίδημα (48-72 ώρες).

Η ανάλυση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω της χρώσης με το δείκτη JC-1 έδειξε την κυτταροπλασματική συγκέντρωση των συσσωμάτων του JC-1 στα καρκινικά κύτταρα που δεν είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με μετφορμίνη. Αντιθέτως, στα κύτταρα που

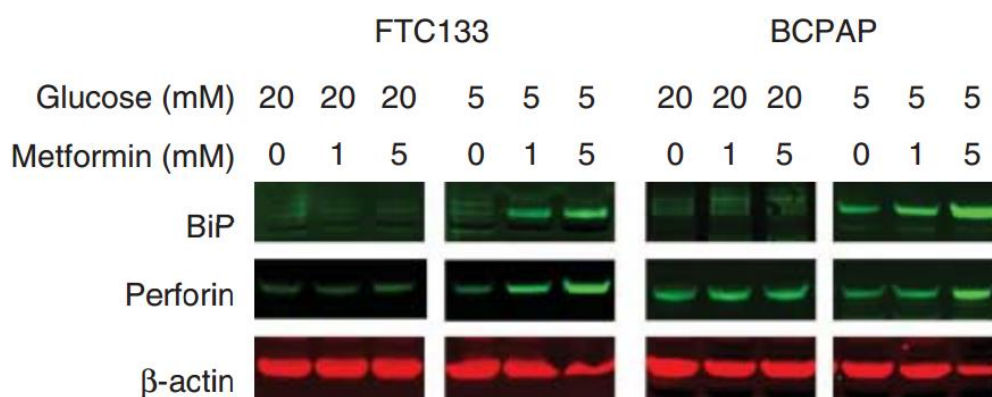
υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μετφορμίνη για 48 ώρες παρατηρήθηκε περι-πυρηνική συγκέντρωση των συσσωμάτων του JC-1, υποδηλώνοντας ότι η μετφορμίνη επηρεάζει τη θέση και το σχηματισμό των μιτοχονδρίων στα κύτταρα που προέρχονται από ΔΚΘ. Η απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης στα κύτταρα που αποκολλήθηκαν από τα τριβλία μετά από θεραπεία με μετφορμίνη για 72 ώρες συνοδεύτηκε από την πυρηνική χρώση με το προπίδιο του ιωδίου, γεγονός που υποδηλώνει κυτταρικό θάνατο.



Σχήμα 1.3.3.2: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται το πείραμα με χρώση των κυττάρων BCPAP με τους δείκτες JC-1 και PI (Propidium Iodine). Τα κύτταρα που παρουσιάζονται εδώ υποβλήθησαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη 5 mM σε συνθήκες χαμηλής περιεκτικότητας γλυκόζης (5 mM). Παρατηρήθηκε περι-πυρηνική συγκέντρωση των συσσωμάτων του JC-1 στις 48 ώρες, ενώ η αντίχνευση του PI στις 72 ώρες υποδηλώνει κυτταρικό θάνατο. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 φορές και στις 2 κυτταρικές σειρές, και είναι διαθέσιμα, αλλά δεν παρουσιάζονται εδώ.

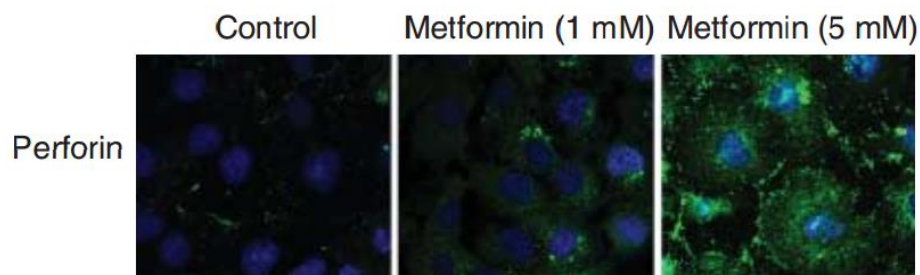
Εφόσον η αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) θεωρείται ως ένα από τα πρωταρχικά γεγονότα της όγκωσης, εξετάσαμε την έκφραση του BiP,

που είναι ένας πολύ καλά χαρακτηρισμένος ρυθμιστής της μεταφοράς μέσω της ΕΔ μεμβράνης. Η θεραπεία με μετφορμίνη για 48 ώρες συνδυάστηκε με υπερ-έκφραση του BiP σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης, αλλά όχι και σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υψηλής γλυκόζης. Αυτό φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα. Η έκφραση του μοριακού δείκτη της όγκωσης (περφορίνη-perforin) επίσης αυξήθηκε στα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μετφορμίνη όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



Σχήμα 1.3.3.3: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται Western Blot που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 5 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθησαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη (0, 1, 5 mM). Παρατηρείται αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του BiP (δείκτης ενδοκυττάριου stress) και της περφορίνης (δείκτης όγκωσης) στα κύτταρα που υποβλήθησαν σε θεραπεία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Μετφορμίνης σε συνθήκες χαμηλής περιεκτικότητας γλυκόζης.

Μέσω της συνεστιακής μικροσκόπησης δείξαμε ότι η περφορίνη εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων που εκτέθηκαν σε μετφορμίνη, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.

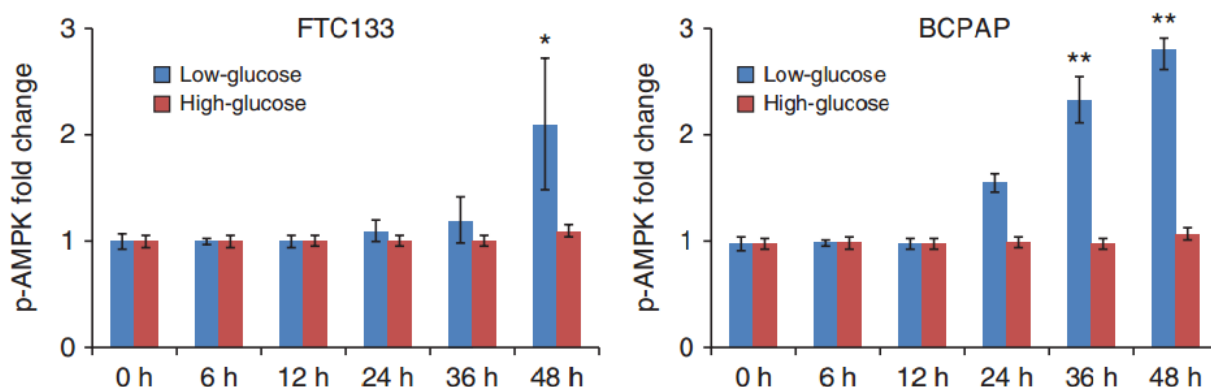


Σχήμα 1.3.3.4: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται πείραμα με κύτταρα FTC133, τα οποία υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη (1 και 5 mM) σε συνθήκες χαμηλής περιεκτικότητας γλυκόζης (5 mM). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και υπέστησαν χρώση με περφορίνη, και στη συνέχεια οι παραπάνω εικόνες τραβήχτηκαν μέσω συνεστιακής μικροσκοπησης.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η όγκωση αποτελεί ένα μηχανισμό κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται στα κύτταρα που υπόκεινται σε θεραπεία με μετφορμίνη.

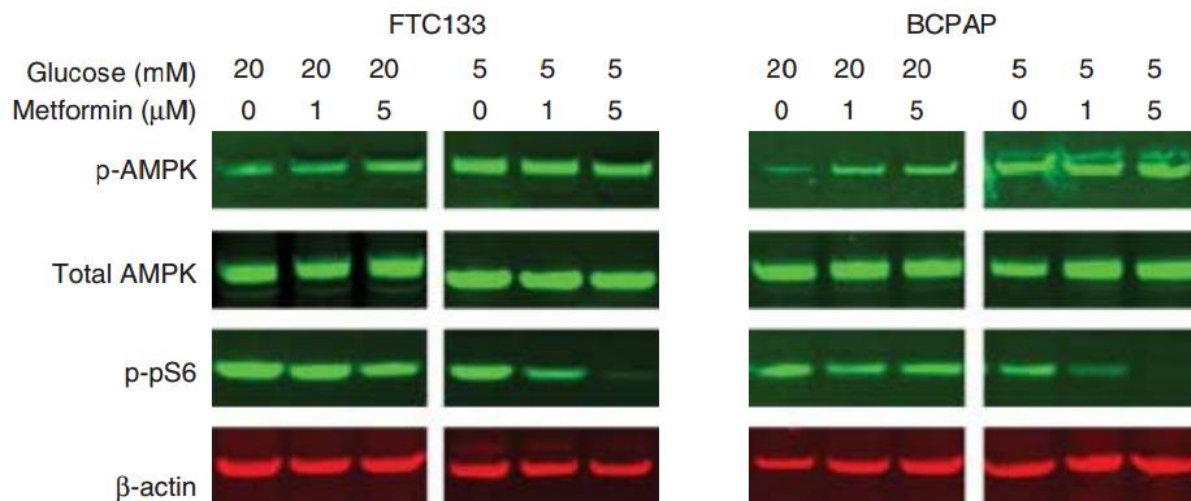
1.3.4 Ενεργοποίηση της AMP-Κινάσης (AMPK) στα Θυρεοειδικά Καρκινικά Κύτταρα που Καλλιεργούνται σε Συνθήκες Χαμηλής Συγκέντρωσης Γλυκόζης

Ο κυτταρικός θάνατος μέσω της όγκωσης πυροδοτείται από την εξάντληση του ATP, και η AMPK είναι ένας καλά αναγνωρισμένος αισθητήρας της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου ο οποίος αυξάνεται με τη μείωση της αναλογίας AMP/ATP. Ως εκ τούτου, εξετάσαμε την επίδραση της μετφορμίνης στη φωσφορυλίωση της AMPK και την ενεργοποίηση του pS6 στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης.



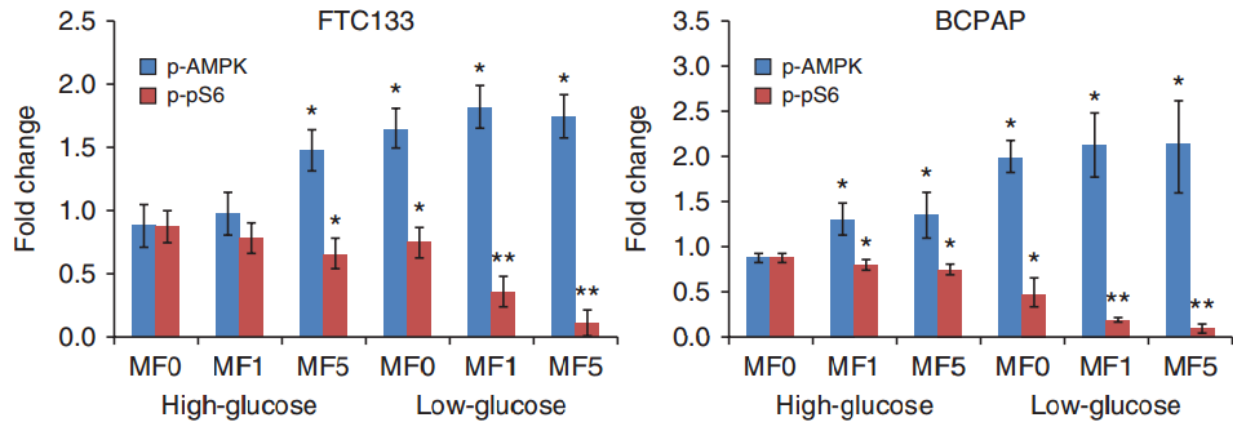
Σχήμα 1.3.4.1: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται ποσοτικοποίηση πειραμάτων Western Blot που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 5 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη (0, 1, 5 mM). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 φορές και ο μέσος όρος των ποσοτικοποιημένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του παραπάνω Σχήματος. Το παραπάνω Σχήμα παρουσιάζει τη μεταβολή της έκφρασης της p-AMPK πρωτεΐνης σε σχέση με την έκφραση των κυττάρων Control στις 0 ώρες. Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η καλλιέργεια των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης για ως 48 ώρες δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στο p-AMPK. Αντιθέτως, σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης παρατηρήθηκε μία σταδιακή αύξηση του p-AMPK, ειδικά στα κύτταρα BCPAP. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η καλλιέργεια των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης για ως 48 ώρες δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στο p-AMPK. Αντιθέτως, σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης παρατηρήθηκε μία σταδιακή αύξηση του p-AMPK, ειδικά στα κύτταρα BCPAP. Στις 48 ώρες, το επίπεδο έκφρασης του p-AMPK αυξήθηκε περισσότερο από 2-φορές σε σύγκριση με τα control κύτταρα.



Σχήμα 1.3.4.2: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται Western Blot που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 5 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθησαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη (0, 1, 5 mM). Η έκφραση των πρωτεϊνών p-AMPK, AMPK, p-pS6 παρουσιάζει μία δοσο-εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του p-AMPK και μείωση του p-pS6, στις συνθήκες υψηλής και χαμηλής περιεκτικότητας γλυκόζης.

Σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, η θεραπεία με μετφορμίνη για 48 ώρες συνδυάστηκε με μία δοσο-εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του p-AMPK και μείωση του p-pS6. Σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, η μετφορμίνη αύξησε το επίπεδο έκφρασης του p-AMPK με μία συνεπαγόμενη μείωση του επιπέδου έκφρασης του p-pS6 στις 24 και 36 ώρες (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται στο παρόν σε Σχήμα). Στις 48 ώρες, ωστόσο, το επίπεδο της έκφρασης του p-AMPK δεν ήταν στατιστικά διαφορετικό ανάμεσα στα κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε μετφορμίνη και σε αυτά που δεν είχαν εκτεθεί αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, παρά τη μη-σημαντική επίδραση της μετφορμίνης στο p-AMPK στις 48 ώρες, παρατηρήσαμε σημαντική μείωση του επιπέδου έκφρασης του p-pS6.



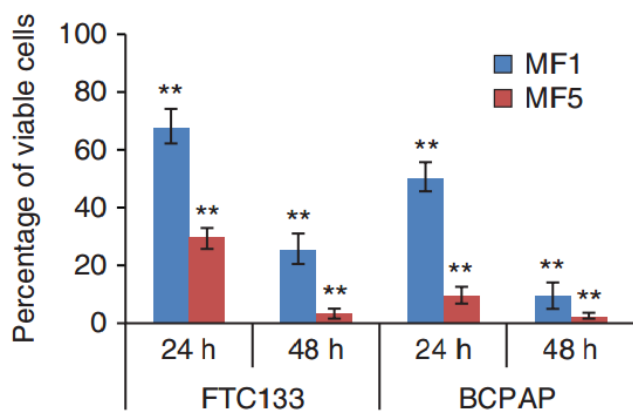
Σχήμα 1.3.4.3: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται ποσοτικοποίηση πειραμάτων Western Blot που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 5 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη (0, 1, 5 mM). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 φορές και ο μέσος όρος των ποσοτικοποιημένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του παραπάνω Σχήματος. Το παραπάνω Σχήμα παρουσιάζει τη μεταβολή της έκφρασης της p- AMPK και της p-pS6 πρωτεΐνης σε σχέση με την έκφραση των κυττάρων Control (0 mM Μετφορμίνη, 20 mM γλυκόζη). Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η καλλιέργεια των θυροειδικών καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης για ως 48 ώρες δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στο p-AMPK. Αντιθέτως, σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης παρατηρήθηκε μία σταδιακή αύξηση του p-AMPK, ειδικά στα κύτταρα BCPAP. Αντίστοιχα παρατηρήθηκε μείωση στην έκφραση του p-pS6, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η μετφορμίνη δρα στα θυροειδικά καρκινικά κύτταρα τόσο μέσω ενός AMPK-εξαρτώμενου μηχανισμού όσο και μέσω ενός AMPK-ανεξάρτητου μηχανισμού.

1.3.5 Η Εξάντληση της Εξωκυττάριας Γλυκόζης Αυξάνει τα Κυτταροτοξικά Αποτελέσματα της Μετφορμίνης στα Θυροειδικά Καρκινικά Κύτταρα

Εφόσον τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα της μετφορμίνης ήταν εμφανή στα καρκινικά

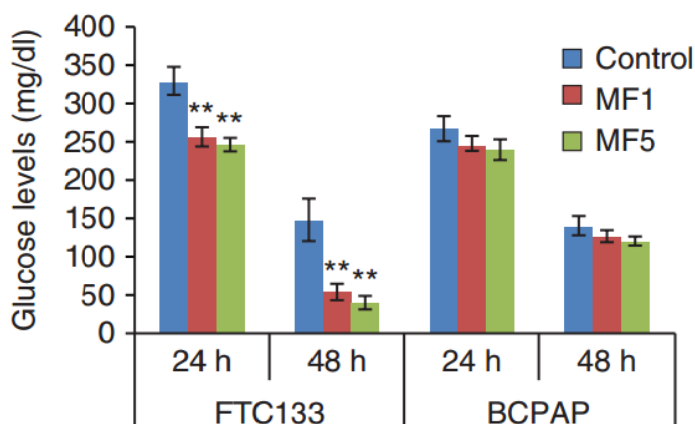
κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, στη συνέχεια διεξάγαμε πειράματα χρησιμοποιώντας μέσο που είχε μηδενική συγκέντρωση γλυκόζης (αφού είχε συμπληρωθεί με ορό από βοοειδή έμβρυα (Fetal Bovine Serum- FBS)). Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, η θεραπεία με μετοφορμίνη μείωσε σημαντικά τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων μέσα σε 24 ώρες. Τα κύτταρα BCPAP ήταν πιο ευαίσθητα στη δράση της μετοφορμίνης σε αυτές τις συνθήκες.



Σχήμα 1.3.5.1: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται πείραμα καταμέτρησης κυττάρων που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα FTC133 και BCPAP στις 24 και 48 ώρες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 0 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετοφορμίνη (1 , 5 mM). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πληθυσμού σε συνθήκες μηδενικής γλυκόζης (**p value < 0.01). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές και ο μέσος όρος των πειραμάτων παρουσιάζεται εδώ.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της εξωκυττάριας γλυκόζης στο μέσο μετά από θεραπεία με μετοφορμίνη έδειξε ότι τόσο στο μέσο με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης όσο και στο μέσο με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης, η μετοφορμίνη επιτάχυνε την κατανάλωση γλυκόζης από τα

κύτταρα. Δεδομένα από τις μετρήσεις σε μέσο με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα, με τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις στο μέσο με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης να είναι πανομοιότυπα.

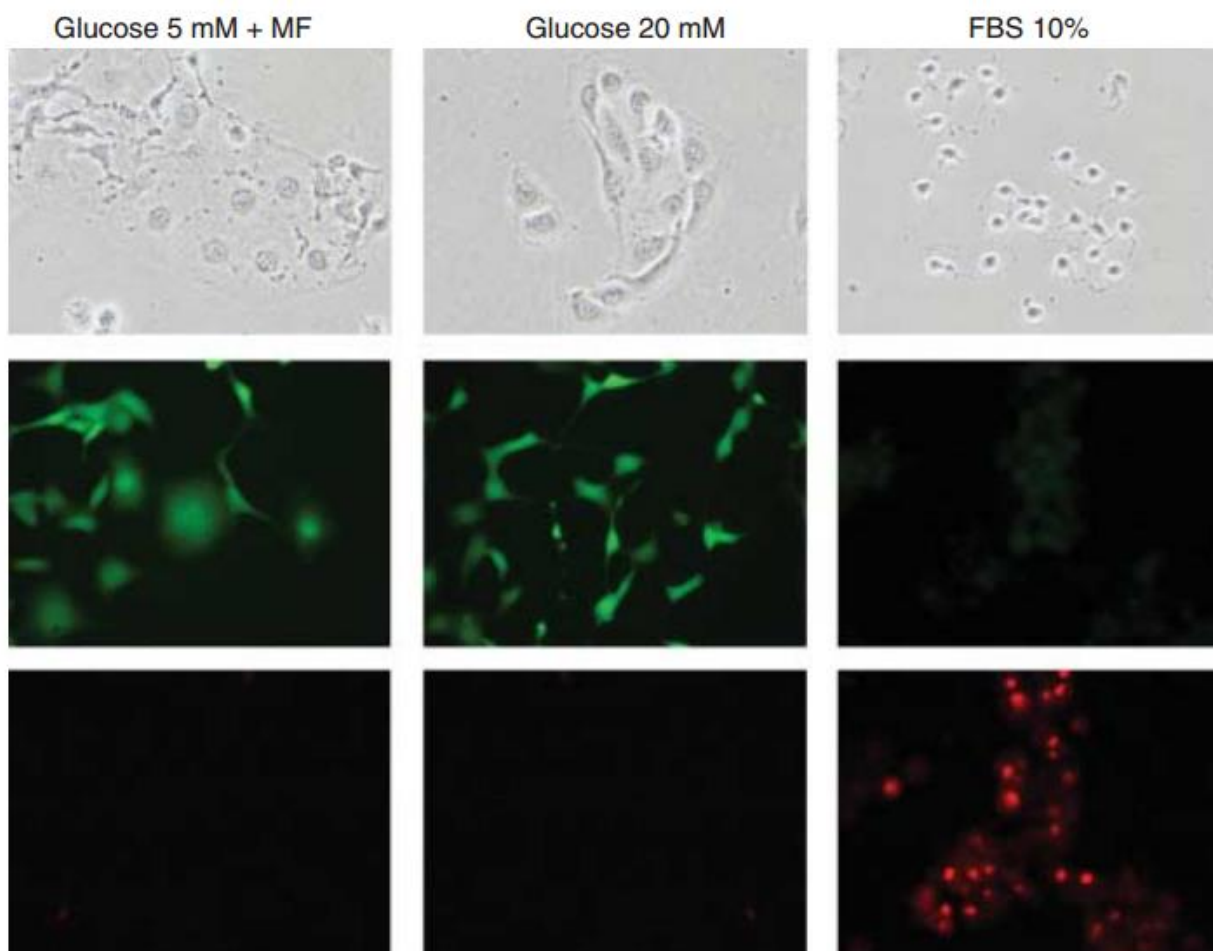


Σχήμα 1.3.5.2: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται πείραμα μέτρησης της γλυκόζης (mg/dl) του μέσου κυττάρων που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα FTC133 και BCPAP στις 24 και 48 ώρες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν αρχικά σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη (0, 1, 5 mM). Η γλυκόζη του μέσου μετρήθηκε στις 24 και 48 ώρες και παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική επιτάχυνση της κατανάλωσης γλυκόζης στα FTC133 κύτταρα, αλλά όχι και στα BCPAP (**p value < 0.01). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές και ο μέσος όρος των πειραμάτων παρουσιάζεται εδώ.

Η αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης από το μέσο μετά τη θεραπεία με μετφορμίνη ήταν εμφανής στα κύτταρα FTC133 αλλά όχι και στα κύτταρα BCPAP. Η θεραπεία με μετφορμίνη επίσης προκάλεσε τη μείωση του pH στο μέσο, γεγονός που συνάδει με την ενεργοποίηση της γλυκόλυσης. Στα κύτταρα FTC133 και BCPAP που εκτέθηκαν σε μετφορμίνη (1 mM για 48 ώρες), το pH μειώθηκε από 7.35 ± 0.02 σε 6.8 ± 0.12 ($P=0.01$) και από 7.25 ± 0.1 σε 6.8 ± 0.2 ($P=0.01$) αντίστοιχα.

Για να διευκρινίσουμε εάν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο μέσο είναι ένας παράγοντας

που επηρεάζει τη δράση της μετφορμίνης, προσαρμόσαμε το επίπεδο της γλυκόζης στο μέσο σε 20 mM προσθέτοντας γλυκόζη μετά από την καλλιέργεια των κυττάρων σε μέσο με μετφορμίνη και χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης για 48 ώρες. Η συμπλήρωση γλυκόζης ανέστρεψε τις μορφολογικές αλλαγές που προκλήθηκαν από τη μετφορμίνη, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα και απέτρεψε τον κυτταρικό θάνατο. Αντιθέτως, η συμπλήρωση του μέσου με FBS δεν ήταν επαρκής για να αποτρέψει τον κυτταρικό θάνατο αυτών των κυττάρων.



Σχήμα 1.3.5.3: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται πείραμα διάσωσης. Κύτταρα BCPAP καλλιιεργήθηκαν σε συνθήκες χαμηλής περιεκτικότητας γλυκόζης (5 mM) και Μετφορμίνη για 48 ώρες. Στη συνέχεια στο control μέσο (1^η στήλη) προστέθηκε γλυκόζη (200 mM) (2^η στήλη) ή Fetal Bovine Serum – FBS (3^η στήλη). Η πάνω σειρά

αντιπροσωπεύει τη μικροσκόπηση των κυττάρων 24 ώρες μετά την παραπάνω τροποποίηση (72 ώρες από την έναρξη του πειράματος). Τα control κύτταρα βρίσκονται στη διαδικασία της όγκωσης, αλλά η προσθήκη γλυκόζης (αλλά όχι FBS) επανέφερε τα κύτταρα στη κανονική τους μορφολογία. Η μεσαία σειρά αντιπροσωπεύει τη χρώση με καλσεΐνη που αντιπροσωπεύει τα ζωντανά κύτταρα, και η τρίτη σειρά χρώση με βρωμίδιο του εθιδίου που αντιπροσωπεύει τα νεκρά κύτταρα.

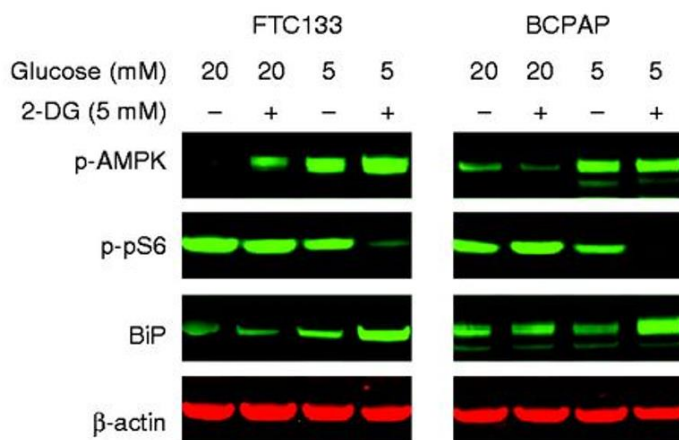
Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζονται τα πειράματα διάσωσης που πραγματοποιήσαμε με τη συμπλήρωση γλυκόζης στη δεύτερη στήλη και FBS στην τρίτη στήλη. Η πρώτη σειρά αντιπροσωπεύει απλή μικροσκόπηση BCPAP κυττάρων, η δεύτερη σειρά χρώση με καλσεΐνη που αντιπροσωπεύει τα ζωντανά κύτταρα, και η τρίτη σειρά χρώση με βρωμίδιο του εθιδίου που αντιπροσωπεύει τα νεκρά κύτταρα.

Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης στο μέσο είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη δράση της μετορμίνης ενάντια στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα.

1.3.6 Η Θεραπεία με 2-DG Αυξάνει την Αποτελεσματικότητα της Μετορμίνης Εναντίον των Θυρεοειδικών Καρκινικών Κυττάρων

Για να αποδείξουμε ότι η ενεργοποίηση της γλυκόλυσης είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς για την επιβίωση των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων μετά τη θεραπεία με μετορμίνη, χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα της γλυκόλυσης 2-DG (2-Δεοξυ-γλυκόζη). Σε μέσο με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (20 mM), η θεραπεία με 2-DG για 48 ώρες δεν είχε σημαντικά αποτελέσματα στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Στα FTC133 κύτταρα (που προέρχονται από θυλακιώδη καρκίνο του θυρεοειδούς), η θεραπεία με 2-DG αύξησε την έκφραση του p-AMPK ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση γλυκόζης στο μέσο, και μείωσε την έκφραση του

p-pS6, ιδιαίτερα στο μέσο με τη χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης. Στα BCPAP κύτταρα (που προέρχονται από θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς), το p- AMPK αυξήθηκε στο μέσο με τη χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης και δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη θεραπεία με 2-DG. Ωστόσο, η θεραπεία με 2-DG (5 mM) μείωσε την έκφραση του p-pS6 στα BCPAP κύτταρα σε μέσο με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.

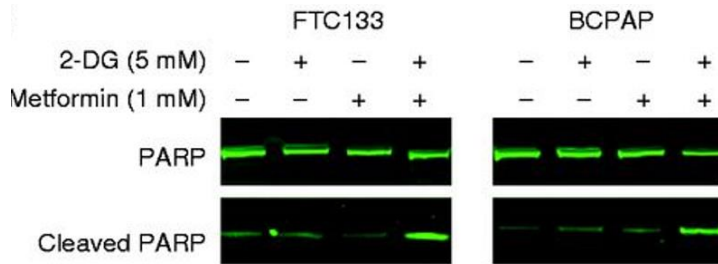


Σχήμα 1.3.6.1: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται Western Blot που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 5 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 2- DG (deoxyglucose, 5 mM). Στο Σχήμα απεικονίζεται η επίδραση του 2-DG στην ενεργοποίηση του AMPK/pS6K και την έκφραση του BiP.

Η θεραπεία με 2-DG (5 mM) επίσης αύξησε την έκφραση του BiP στα FTC133 και τα BCPAP κύτταρα. Η ανάλυση των δεικτών απόπτωσης έδειξε ότι το 2-DG ως μόνη θεραπεία δεν είχε σημαντικά αποτελέσματα στην έκφραση της κασπάσης-3 και του PARP σε 24 ώρες. Η θεραπεία με 2-DG (5 mM) για 36 και 48 ώρες προκάλεσε μια ελαφρά αύξηση στην έκφραση της κασπάσης-3.

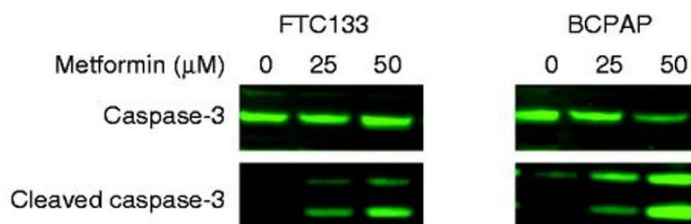
Σε περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, ο συνδυασμός μετοφομίνης και 2-DG

κατέληξε σε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του p- AMPK και μείωση του p-pS6 σε 6 ώρες από την έναρξη της θεραπείας. Ο συνδυασμός του 2-DG (5 mM) και της μετφορμίνης (1 mM) για 24 ώρες κατέληξε στην ενεργοποίηση της απόπτωσης όπως φαίνεται από τη western blot (παρακάτω Σχήμα) με τα αντισώματα κατά της κασπάσης-3 και του PARP.



Σχήμα 1.3.6.2: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται Western Blot που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 20 mM είτε σε μέσο με περιεκτικότητα γλυκόζης 5 mM. Τα κύτταρα στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 2- DG (deoxyglucose, 5 mM). Στο Σχήμα απεικονίζεται η επίδραση του 2-DG στην ενεργοποίηση του AMPK/pS6K και την έκφραση του BiP.

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε πειράματα με διαφορετικές δόσεις στα οποία δείξαμε ότι η προ-θεραπεία των καρκινικών κυττάρων με 2-DG για 24 ώρες, τα έκανε πιο ευάλωτα στη θεραπεία με μετφορμίνη σε συγκεντρώσεις που είναι κλινικά επιτεύξιμες. Σε αυτές τις συνθήκες, η θεραπεία με μετφορμίνη σε πολύ μικρές δόσεις (25 μM) κατέληξε σε ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και του PARP σε 24 ώρες (όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα) και οδήγησε σε μαζικό κυτταρικό θάνατο σε 48 ώρες όλων των υπό εξέταση θυρεοειδικών κυτταρικών σειρών.



Σχήμα 1.3.6.3: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται Western Blot που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Τα κύτταρα υπέστησαν προ-θεραπεία με 2- DG (deoxyglucose, 5 mM) για 24 ώρες, και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετοφορμίνη (0, 25 και 50 μM). Στο Σχήμα απεικονίζεται η επίδραση η ενεργοποίηση της Κασπάσης-3 σε αυτές τις συνθήκες.

Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η αναστολή της γλυκολυτικής διαδικασίας μέσω του 2-DG καθιστά τα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα πιο ευάλωτα στη δράση της μετοφορμίνης, και ότι, τουλάχιστον εν μέρει, η αντι-καρκινική δράση της μετοφορμίνης προέρχεται από τον έλεγχο των γονιδίων που εμπλέκονται στη γλυκόλυση.

1.3.7 Μείωση της Έκφρασης της Πυροσταφυλικής Κινάσης 2 (PKM2) των Θυρεοειδικών Καρκινικών Κυττάρων μετά από Θεραπεία με Μετοφορμίνη σε Συνθήκες Χαμηλής Συγκέντρωσης Γλυκόζης

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε RealTime-PCR για 84 γονίδια των οποίων ο ρόλος έχει καθοριστεί και περιγραφεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. mRNA από φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό χρησιμοποιήθηκε ως control. Τα γονίδια στα οποία παρατηρήθηκε σημαντική (κοινή) αύξηση ή μείωση της έκφρασης στις θυρεοειδικές καρκινικές σειρές σε σχέση με το φυσιολογικό θυρεοειδή παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα.

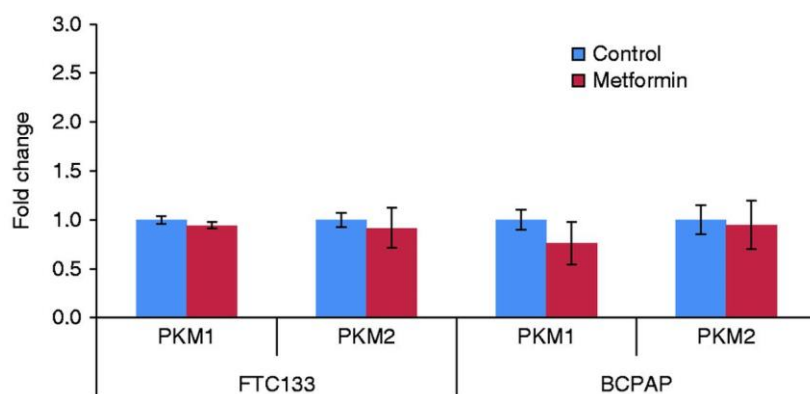
Target	Description	FTC133 vs normal		BCPAP vs NT	
		Fold change	P value	Fold change	P value
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	6.8685	0.0000	7.4024	0.0001
PKM2	Pyruvate kinase muscle 2	5.5404	0.0000	4.2029	0.0001
G6PC3	Glucose-6-phosphatase, catalytic, 3	4.7404	0.0000	5.2162	0.0001
PGM1	Phosphoglucomutase 1	4.1554	0.0045	20.5776	0.0001
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4.1125	0.0010	9.3050	0.0001
ENO2	Enolase 2 (gamma, neuronal)	3.9041	0.0031	5.5906	0.0001
PYGM	Phosphorylase, glycogen, muscle	-5.6765	0.0000	-35.1877	0.0000
SUCLG2	Succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit	-5.7358	0.0000	-9.2663	0.0001
ALDOC	Aldolase C, fructose-bisphosphate	-7.2350	0.0000	-26.3002	0.0000
GALM	Galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	-64.8934	0.0000	-7.8462	0.0001
F1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	-65.1187	0.0000	-99.5259	0.0000

Πίνακας 1.3.7.1: Στον παραπάνω Πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από RealTime-PCR με την οποία συγκρίναμε την έκφραση σε φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό και σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Στον Πίνακα παρουσιάζουμε τα γονίδια που βρήκαμε στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση σε σχέση το το φυσιολογικό θυρεοειδή.

Στα FTC133 και τα BCPAP κύτταρα παρατηρήθηκε μια κοινή υπερ-έκφραση των γονιδίων που έχουν περιγραφεί σε καρκινικά κύτταρα που είναι «επιρρεπή στη στέρηση γλυκόζης» (7). Επίσης, πραγματοποιήσαμε qRT-PCR στα γονίδια PKM2, G6PD, και F1 χρησιμοποιώντας RNA από 15 δείγματα από ανθρώπινο θυρεοειδικό καρκίνο και φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό. Σε σχέση με το φυσιολογικό θυρεοειδή, η έκφραση των PKM2 και G6PD στο mRNA ήταν αυξημένη σε 14/15 θηλώδεις καρκίνους (μέσος όρος $2,59 \pm 1,3$, $P=0,003$) και 13/15 θηλώδεις καρκίνους (μέσος όρος $3,6 \pm 2$, $P=0,007$), αντίστοιχα. Ωστόσο, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($P= 0,08$).

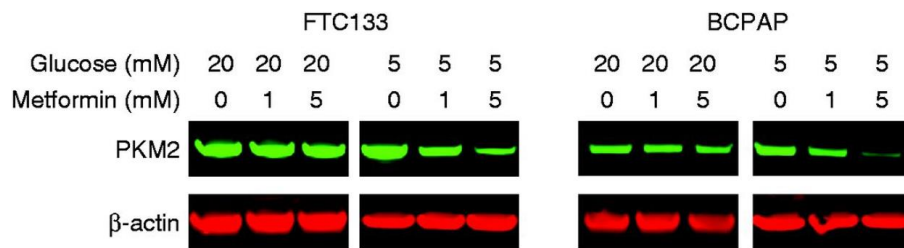
Εφόσον το επίπεδο έκφρασης του PKM2 ήταν σημαντικά αυξημένο στα δείγματα από ανθρώπινο θηλώδη θυρεοειδικό καρκίνο, επικεντρώσαμε τις ερευνητικές μας προσπάθειες σε

αυτό το ρυθμιστή της γλυκόλυσης. Μια εναλλαγή στις δύο ισομορφές της πυροσταφυλικής κινάσης είναι αρκετή για τη στροφή του κυτταρικού μεταβολισμού σε αερόβια γλυκόλυση (5). Επομένως, στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση της μετφορμίνης στην έκφραση του PKM1 και του PKM2 στα FTC133 και τα BCPAP κύτταρα. Η ανάλυση μέσω RT-PCR έδειξε ότι η εναλλαγή από συνθήκες υψηλής σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης στο μέσο δεν επηρέασε την έκφραση των ισομορφών του PKM. Η θεραπεία με μετφορμίνη δε συσχετίστηκε με σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα mRNA του PKM στα FTC133 και τα BCPAP κύτταρα, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



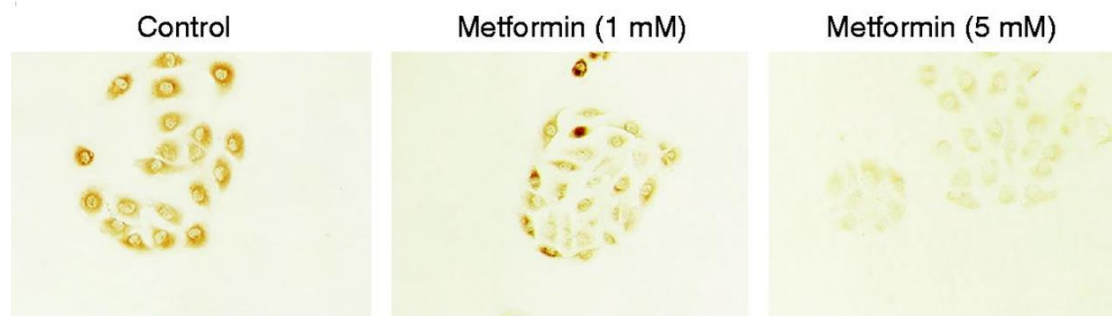
Σχήμα 1.3.7.2: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται ποσοτικοποίηση από 3 διαφορετικά πειράματα qRT-PCR που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Παρουσιάζονται τα επίπεδα mRNA έκφρασης των δύο ισομορφών του PK (πυροβική κινάση) PKM1 και PKM2 των δύο κυτταρικών σειρών. Οι αλλαγές στο επίπεδο καθορίστηκαν μέσω υπολογισμού των $\Delta\Delta C_q$ τιμών σε κύτταρα control και κύτταρα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μετφορμίνη μετά τη νορμαλοποίηση των επιπέδων του mRNA για το διαχειριστικό (housekeeping) γονίδιο (18S).

Η ανάλυση μέσω Western blot έδειξε ότι η θεραπεία με μετφορμίνη δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης PKM2 σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, αλλά προκάλεσε τη μείωση της έκφρασης του PKM2 σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



Σχήμα 1.3.7.3: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται Western blot με το αντίσωμα anti-PKM2 που δείχνει ότι η θεραπεία με Μετφορμίνη μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του PKM2 σε κύτταρα FTC133 και BCPAP.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν μέσω ανοσοϊστοχημείας, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.

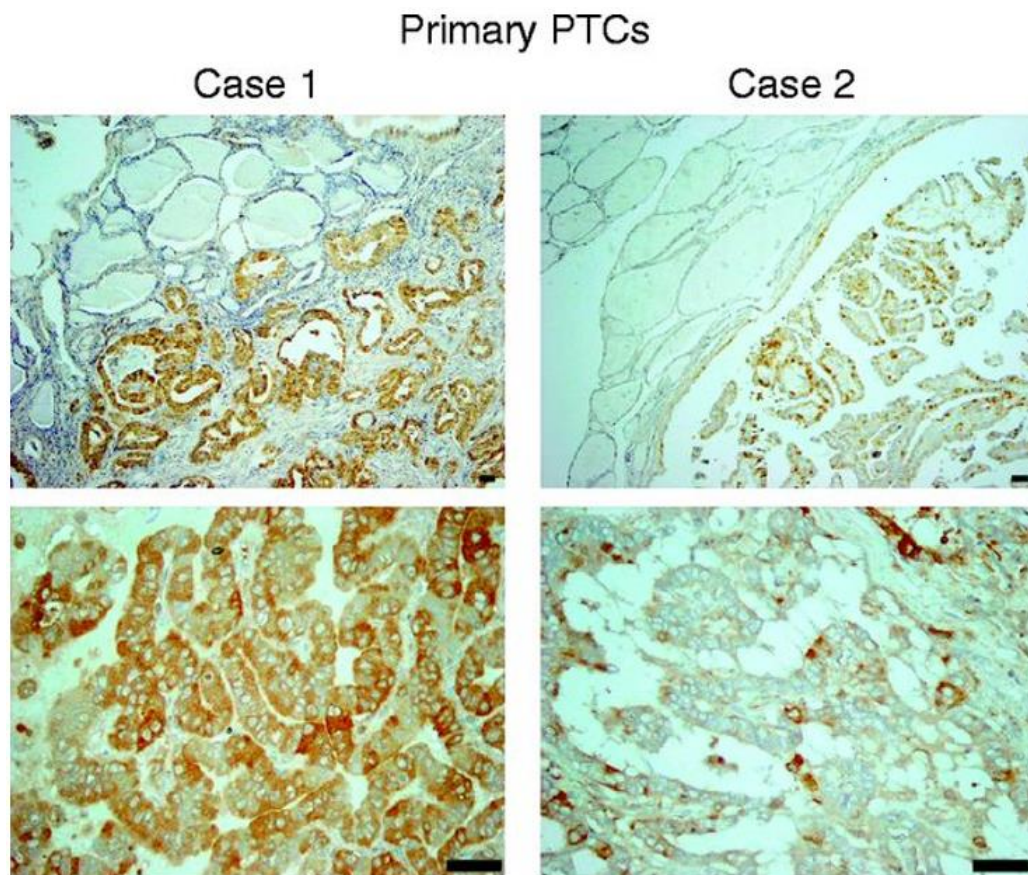


Σχήμα 1.3.7.4: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται πείραμα ανοσοϊστοχημείας με αντίσωμα anti-PKM2 σε κύτταρα FTC133 που δείχνει την αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης μετά τη θεραπεία με Μετφορμίνη (1 και 5mM).

Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η θεραπεία με μετφορμίνη προκαλεί τη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης PKM2 σε θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα, και πιθανότατα η διαδικασία αυτή συμβαίνει μέσω του ελέγχου της πρωτεϊνικής διασπάσης του PKM2.

3) Αυξημένα Επίπεδα Έκφρασης του PKM2 σε Ανθρώπινους Θυρεοειδικούς Καρκίνους

Τα *in vitro* πειράματά μας έδειξαν ότι το PKM2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας δείκτης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας με μεθορμίνη στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Επομένως, το επόμενο μας βήμα ήταν να μελετήσουμε την έκφραση του PKM2 μέσω της ανοσοϊστοχημείας σε μια σειρά από μεταστατικούς καρκίνους του θυρεοειδή.



Σχήμα 1.3.7.5: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα anti-PKM2 που δείχνει την έκφραση του PKM2 σε θηλώδεις καρκίνους του θυρεοειδή. Παρατηρείται έντονη, ομοιογενής έκφραση anti-PKM2 στην περίπτωση 1, ενώ στην περίπτωση 2 η έκφραση είναι ετερογενής. Η μεγέθυνση για την πάνω σειρά είναι x10, ενώ για την κάτω σειρά είναι x40. Για λόγους σύγκρισης μεγέθους η μπάρα κάτω δεξιά αντιπροσωπεύει 50μΜ.

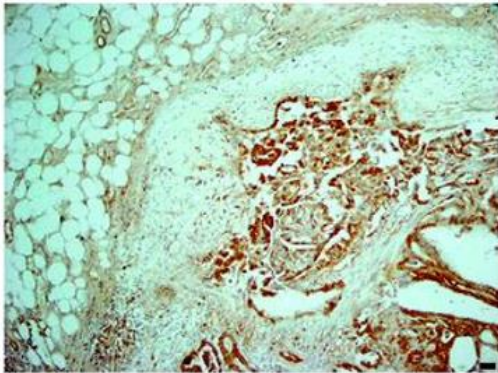
Όπως φαίνεται στο παραπάνω Σχήμα, το επίπεδο έκφρασης του PKM2 ήταν χαμηλό σε φυσιολογικά θυλακιδώδη κύτταρα, αλλά ήταν αυξημένο σε όλους τους πρωτοπαθείς θυρεοειδικούς

καρκίνους που εξετάστηκαν. Ωστόσο, το επίπεδο της έκφρασης διέφερε σημαντικά ανάμεσα στους καρκίνους που εξετάστηκαν. Σε 7/16 πρωτοπαθείς καρκίνους παρατηρήσαμε ομογενή, ισχυρή ιστοχημική χρώση, ενώ στους υπόλοιπους 9 θηλώδεις καρκίνους παρατηρήσαμε μια πιο ετερογενή κατανομή της χρώσης. Οι όγκοι με θηλώδη και θυλακιώδη στοιχεία συχνά είχαν μια πιο ετερογενή κατανομή της ιστοχημικής χρώσης με αντι-PKM2, και η χρώση ήταν συνήθως πιο έντονη στις περιοχές που υπήρχαν περισσότερα θηλώδη στοιχεία. Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι το επίπεδο έκφρασης του PKM2 ήταν διαφορετικό ανάμεσα σε γειτονικά κύτταρα που σχημάτιζαν την ίδια θηλή.

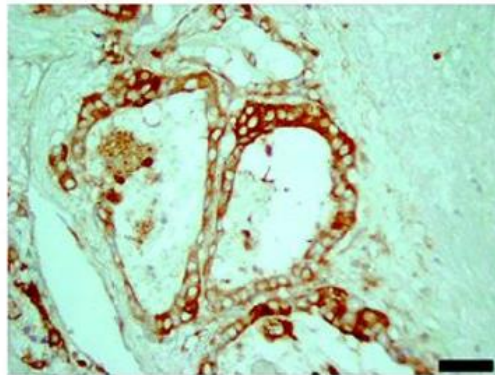
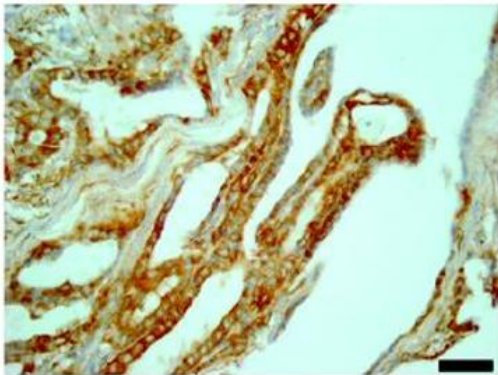
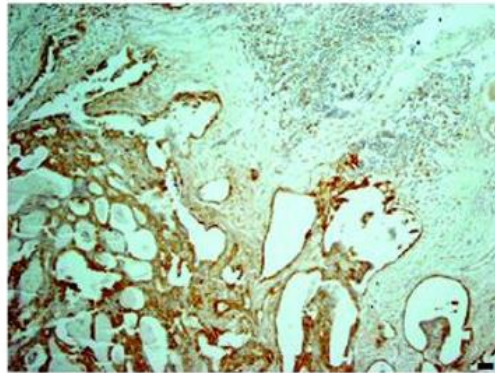
Στη συνέχεια εξετάσαμε το PKM2 σε μεταστατικούς καρκίνους (παρακάτω Σχήμα) που αναπτύχθηκαν μετά την αρχική θεραπεία. Έντονη, ομοιογενής ιστοχημική χρώση παρατηρήθηκε σε 12/16 καρκίνους. Οι επτά μεταστατικοί καρκίνοι που προήλθαν από καρκίνους με έντονη, ομοιογενή ιστοχημική χρώση του PKM2 διατήρησαν το ίδιο μοτίβο έκφρασης του PKM2. Στις μεταστάσεις που προήλθαν από πρωτογενείς όγκους με ετερογενή έκφραση του PKM2 παρατηρήσαμε: απώλεια της έκφρασης σε μια περίπτωση, ετερογένεια σε τρεις περιπτώσεις, και αυξημένη ιστοχημική χρώση με PKM2 σε 5 περιπτώσεις.

Metastatic lesions

Case 1

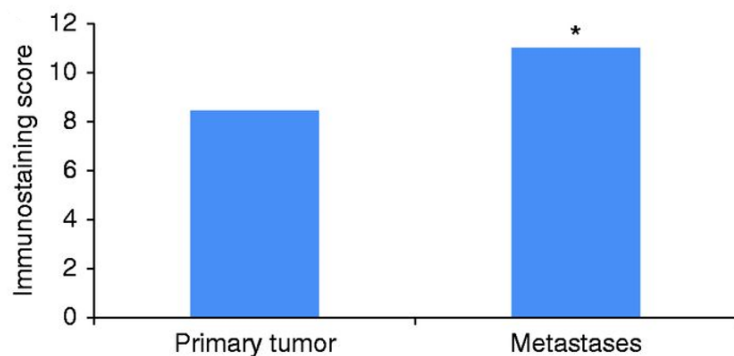


Case 2



Σχήμα 1.3.7.6: Στο παραπάνω Σχήμα παρουσιάζεται ανοσοϊστοχημία με αντίσωμα anti-PKM2 που δείχνει την έκφραση του PKM2 σε 2 περιπτώσεις μεταστατικού σε τραχηλικούς λεμφαδένες καρκίνου του θυρεοειδούς (οι περιπτώσεις είναι οι ίδιες με το προηγούμενο Σχήμα). Παρατηρείται έντονη, ομοιογενής έκφραση anti-PKM2 και στις 2. Η μεγέθυνση για την πάνω σειρά είναι x10, ενώ για την κάτω σειρά είναι x40. Για λόγους σύγκρισης μεγέθους η μπάρα κάτω δεξιά αντιπροσωπεύει 50μM.

Τα μέσα ανοσοϊστοχημικά σκορ στους πρωτοπαθείς θηλώδεις θυρεοειδικούς καρκίνους (μέσο σκορ 8,4) και στις μεταστάσεις (μέσο σκορ 11) ήταν υψηλότερα από το σκορ του φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού (μέσο σκορ 0,9). Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, η ιστοχημική χρώση του PKM2 στους μεταστατικούς καρκίνους ήταν σημαντικά υψηλότερη από τους πρωτοπαθείς όγκους ($P= 0,018$).



Σχήμα 1.3.7.7: Το παραπάνω Σχήμα παρουσιάζει ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημείας με αντίσωμα anti-PKM2. Παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση των μέσων ανοσοϊστοχημικών σκορ για τους πρωτοπαθείς και τους μεταστατικούς όγκους (**P* value <0.05).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι περισσότεροι μεταστατικοί θυρεοειδικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα έκφρασης του PKM2.

1.4 Συμπεράσματα/Συζήτηση

Για να επιβιώσουν σε ένα δυσμενές μικροπεριβάλλον με περιορισμένες θρεπτικές ουσίες, τα καρκινικά κύτταρα ανα-προγραμματίζουν τα κανονικά βιοχημικά μονοπάτια έτσι ώστε να έχουν πρόσβαση στα απαραίτητα συστατικά για την παραγωγή πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων μέσω αλλαγής από αναερόβια σε αερόβια γλυκόλυση (Vander Heiden et al. 2009). Στη διατριβή αυτή μελετήσαμε τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην απόκριση των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων στη στέρηση γλυκόζης, καθώς και στη θεραπεία με Μεθορμίνη. Συνοπτικά δείξαμε ότι: i) το επίπεδο γλυκόζης στο μέσο επηρεάζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της Μεθορμίνης σαν αντι-καρκινικό φάρμακο, ii) σε μέσο με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης, η Μεθορμίνη προκαλεί αυτοφαγία και όγκωση, μέσω AMPK-

εξαρτώμενων και AMPK-ανεξάρτητων μηχανισμών, iii) η Μετορμίνη αυξάνει τη γλυκολυτική δραστηριότητα στα καρκινικά θυρεοειδικά κύτταρα, αυξάνοντας παράλληλα την εξάρτηση από τη γλυκόζη στο εξωκυττάριο περιβάλλον, και την ευαισθησία σε φαρμακευτικούς αναστολείς της γλυκόλυσης, iv) η Μετορμίνη αναστέλλει την έκφραση του διαχειριστή της αερόβιας γλυκόλυσης PKM2 σε όλες τις κυτταρικές σειρές, v) υπάρχει αυξημένη έκφραση του PKM2 σε δείγματα ιστού από υποτροπιάζοντες καρκίνους του θυρεοειδή.

Στα αρχικά στάδια της διδακτορικής διατριβής, εξερευνήσαμε διάφορα μονοπάτια τα οποία θα μπορούσαν να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα της μετορμίνης ως αντινεοπλασματική θεραπεία στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Αρχικά ερευνήσαμε το ρόλο του μεταφορέα της μετορμίνης, OCT1. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι:

- 1) Η έκφραση του OCT1, αλλά όχι των μεταφορέων της ίδιας οικογένειας OCT2 και OCT3, ανιχνεύτηκε σε δύο κυτταρικές σειρές προερχόμενες από ΜΚΘ.
- 2) Το επίπεδο έκφρασης του OCT1 στο mRNA ήταν υψηλότερο στα ευαίσθητα στη μετορμίνη ΤΤ κύτταρα από ότι στα ανθεκτικά στη μετορμίνη MZ-CRC-1 κύτταρα.
- 3) Η έκφραση του OCT1 στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από ΜΚΘ δεν αυξήθηκε από τη θεραπεία με ριφαμπικίνη, και δεν επηρεάστηκε από τη φαρμακευτική αναστολή των MAPK/ERK, PI3K/AKT, mTOR/p70S6K σηματοδοτικών μονοπατιών.
- 4) Η σίγαση του OCT1 μέσω ειδικού shRNA κατέληξε σε μαζικό κυτταρικό θάνατο.
- 5) Σε δείγματα από ανθρώπους, ανιχνεύσαμε έκφραση του OCT1 σε 2/19 δείγματα από φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό και σε 29/62 δείγματα από ΜΚΘ.

Συμπερασματικά, δείξαμε ότι ένας μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει την κατασταλτική δράση της μετορμίνης στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι η ύπαρξη του OCT1, ο οποίος ευθύνεται για την κυτταρική πρόσληψη της μετορμίνης και την ενδοκυττάρια διανομή του

φαρμάκου. Δεν καταφέραμε να τροποποιήσουμε φαρμακολογικά την έκφραση του OCT1 για να αυξήσουμε την αποτελεσματικότητα της μετορμίνης. Παρ'όλα αυτά, τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας μας δείχνουν ότι ο OCT1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας δείκτης απόκρισης στη θεραπεία με μετορμίνη, και ότι περίπου 50% των ασθενών με ΜΚΘ θα μπορούσαν δυνητικά να επωφεληθούν από τη θεραπεία με μετορμίνη.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε εάν η τροποποίηση του εξωκυττάριου περιβάλλοντος θα μπορούσε να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της μετορμίνης στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Πιο συγκεκριμένα, επικεντρωθήκαμε στο ρόλο της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Οι προηγούμενες έρευνες στο εργαστήριό μας (Klubo-Gwiezdzinska et al. 2013) έδειξαν ότι η μετορμίνη σχετιζόταν μόνο με αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, όταν συνδυάσαμε τη μετορμίνη με μείωση της εξωκυττάριας γλυκόζης ήταν ξεκάθαρο ότι τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονταν σε μια διαδικασία κυτταρικού θανάτου. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζουμε είναι σύμφωνα με ευρήματα σε κύτταρα από καρκίνο του μαστού, στα οποία δείχτηκε ότι η μετορμίνη είχε προ-αποπτωτική δραστηριότητα σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, αλλά όχι και σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (Wahdan-Alaswad et al. 2013). Έχει επίσης δειχτεί ότι η Μετορμίνη οδηγεί σε μαζικό κυτταρικό θάνατο όταν εισάγεται σε ένα μικροπεριβάλλον σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης (Menendez et al. 2012).

Για να ερευνήσουμε το μηχανισμό που η Μετορμίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες χαμηλής περιεκτικότητας γλυκόζης, αρχικά εξετάσαμε το προ-αποπτωτικό μονοπάτι της κασπάσης. Η ανάλυση με Western Blot έδειξε ότι η απόπτωση δεν αποτελεί μέρος αυτής της διαδικασίας, εν αντιθέσει με την αυτοφαγία. Σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, η Μετορμίνη ενεργοποίησε την αυτοφαγία, μια διαδικασία που επιτρέπει την ανακύκλωση των κυτταρικών συστατικών σαν ενδογενείς πηγές ενέργειας όταν οι εξωγενείς πηγές είναι

περιορισμένες. Παρατηρήσαμε διαφορές στην έκφραση του LC3B μεταξύ των κυτταρικών σειρών FTC133 και BCPAP τόσο αρχικά όσο και μετά από έκθεση στη Μετοφορμίνη. Τα BCPAP κύτταρα φέρουν τη μετάλλαξη BRAFV600E που έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση του MAPK/ERK σηματοδοτικού μονοπατιού. Στο μελάνωμα, η μετάλλαξη BRAF έχει συσχετιστεί με την αναστολή του mTOR και την αύξηση της αυτοφαγίας (Maddodi et al. 2010). Είναι πιθανό ότι η αυτοφαγική δραστηριότητα είναι συνεχώς ενεργοποιημένη σε θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα που φέρουν μετάλλαξη στο BRAF. Ωστόσο, η ανάλυση στο μικροσκόπιο δεν ανέδειξε τα τυπικά χαρακτηριστικά της αυτοφαγίας σε αυτά τα κύτταρα. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, πιστεύουμε ότι εμπλέκεται ένας επιπλέον μηχανισμός κυτταρικού θανάτου.

Οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρήσαμε στα κύτταρα μετά από θεραπεία με Μετοφορμίνη ήταν χαρακτηριστικά της όγκωσης. Η όγκωση θεωρείται ως μία πολυ-επίπεδη διαδικασία και μία πρόσφατη μελέτη (Balvan et al. 2015) έδειξε ότι ο ογκωτικός κυτταρικός τύπος θανάτου μπορεί να διαχωριστεί από τον αποπτωτικό μέσω της χρήσης μικροσκοπησης σε πραγματικό χρόνο (real-time microscopy). Η μικροσκοπησης μας σε πραγματικό χρόνο όπως παρουσιάζεται παραπάνω έδειξε τα διάφορα στάδια πριν την οριστική αποκόλληση και το θάνατο, και κατέδειξε ότι η μετοφορμίνη μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω της όγκωσης.

Η όγκωση είναι ένας συγκεκριμένος τύπος κυτταρικής απορρύθμισης που πρωτοπεριγράφηκε σε καρδιομυοκύτταρα μετά από σημαντική μυοκαρδιακή ισχαιμία εξαιτίας απόφραξης των στεφανιαίων (Majno & Joris 1995). In vitro, η όγκωση περιγράφηκε σε μοντέλα στέρησης οξυγόνου που αναπτύχθηκαν για να προσομοιάσουν τα αποτελέσματα των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων. Έχει υποστηριχθεί ότι η όγκωση προκαλείται από την εξάντληση του ATP που προκαλεί προοδευτική απορρύθμιση της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη εισροή και εκροή ιόντων και νερού και το κυτταρικό οίδημα. Ως αποτέλεσμα,

αυξάνεται σταδιακά η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, που έχει ως τελικό στάδιο την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και τη νέκρωση (Weerasinghe & Buja 2012). Η ύπαρξη του ενδοκυττάριου stress σε συνδυασμό με το κυτταρικό οίδημα, και η επακόλουθη κυτταρική αποκόλληση και θάνατος, αποδεικνύουν ότι η μεταφορμίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα μέσω της όγκωσης. Δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν την αλληλεπίδραση ανάμεσα στους διάφορους τύπους κυτταρικού θανάτου. Μία πρόσφατη έρευνα (Del Nagro et al. 2014) έδειξε ότι στις καρκινικές κυτταρικές σειρές με χαμηλότερο ρυθμό εξάντλησης του ATP ενεργοποιείται η κασπάση-3 και υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν την ύπαρξη αποπτωτικού και αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου, ενώ αντίθετα στις καρκινικές κυτταρικές σειρές με υψηλότερο ρυθμό εξάντλησης του ATP δεν ενεργοποιείται η κασπάση-3 και δεν υπάρχουν στοιχεία υποστηρικτικά της ύπαρξης απόπτωσης ή αυτοφαγίας. Η όγκωση αναγνωρίστηκε ως ο κύριος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου όταν τα επίπεδα του ATP μειώνονταν περισσότερο από 20x. Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας δείχνουν ότι η μεταφορμίνη σε ένα περιβάλλον χαμηλής γλυκόζης μειώνει την ικανότητα των κυττάρων για παραγωγή ATP, γεγονός το οποίο οδηγεί στην πρόκληση της όγκωσης. Προς το παρόν, η βιβλιογραφία δεν έχει αναγνωρίσει πολλούς μοριακούς δείκτες της όγκωσης σε καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, η γονιδιακή απεικόνιση των αποπτωτικών και ογκωτικών μονοπατιών σε καρδιομυοκύτταρα έδειξε την υπερ-έκφραση της περφορίνης σε κύτταρα τα οποία είχαν αναγνωριστεί μικροσκοπικά ότι βρίσκονταν σε διαδικασία όγκωσης (Weerasinghe et al. 2013). Στην έρευνά μας, το επίπεδο έκφρασης της περφορίνης αυξήθηκε σημαντικά στα FTC133 και στα BCPAP κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε μέσο με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης και εκτέθηκαν σε μεταφορμίνη. Όλα τα παραπάνω δεδομένα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η όγκωση είναι ένας από τους μηχανισμούς που ευθύνονται για την αντι-

καρκινική δράση της μετορμίνης.

Εφόσον η εξάντληση του ATP είναι ένα από τα γεγονότα που προκαλούν όγκωση, στη συνέχεια εξερευνήσαμε το AMPK, που θεωρείται ως ένας δείκτης της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου. Βρήκαμε ότι η καλλιέργεια καρκινικών θυρεοειδικών κυττάρων σε μέσο με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης προκαλεί την ενεργοποίηση της AMPK. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης η θεραπεία με μετορμίνη δεν αύξησε περαιτέρω το επίπεδο του p-AMPK αλλά μείωσε το επίπεδο του p-pS6, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία AMPK-ανεξάρτητων μηχανισμών δράσης της μετορμίνης. Έχειδειχτεί ότι η μετορμίνη αναστέλλει άμεσα το mTOR με την ενίσχυση της σύνδεσης του PRAS40 με το RAPTOR (Liu et al. 2014). Έχει επίσηςδειχτεί ότι η μετορμίνη αναστέλλει το σήμα του mTORC1 μέσω των Rag GTPases εν τη απουσία της AMPK (Kalender et al. 2010).

Στη μελέτη μας, το επίπεδο της ενεργοποίησης του AMPK σχετιζόταν αντιστρόφως με τη συγκέντρωση της εξωκυττάριας γλυκόζης, και η μετορμίνη επιτάχυνε την κατανάλωση της γλυκόζης από το μέσο. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η μετορμίνη προκάλεσε μια μεταβολική αλλαγή προς τη γλυκόλυση και αύξησε την εξάρτηση στη γλυκόζη των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων. Τα πειράματα διάσωσης που πραγματοποιήσαμε έδειξαν ότι η όγκωση (και ο κυτταρικός θάνατος) που προκαλείται από τη μετορμίνη μπορεί να αντιστραφεί όταν στα αρχικά στάδια το μέσο συμπληρωθεί με επιπλέον γλυκόζη. Τα αποτελέσματά μας συνάδουν με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι σε λευχαιμικά κύτταρα η μετορμίνη αυξάνει τη γλυκόλυση, ενώ ταυτοχρόνως μειώνει τη δράση του συμπλέγματος I της μιτοχονδριακής αλυσίδας (Scotland et al. 2013).

Στην παρούσα μελέτη δείχνουμε ότι η συγκέντρωση γλυκόζης στο εξωκυττάριο περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει την αντι-καρκινική δράση της Μετοφορμίνης, και αυτό μπορεί να έχει αρκετές κλινικές προεκτάσεις. Χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης ορού σε ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς μπορεί να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με Μετοφορμίνη. Τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σε μη-διαβητικούς ασθενείς διατηρούνται ανάμεσα σε 4 και 5.5 mM (70–100 mg/dl), ενώ σε συνθήκες παρατεταμένης στέρησης θρεπτικών στοιχείων το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα μπορεί να μειωθεί σε 3.0–3.5 mM (55–65 mg/dl) (Haymond et al. 1982). Τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μειώνονται κατά περίπου 25% κατά τα αρχικά στάδια στην κετογονική διαίτα και διατηρούνται περίπου 15% κάτω από τις αρχικές τιμές (Phinney et al. 1983). Έχει επίσης παρατηρηθεί μείωση στη στρογγή προς το γλυκολυτικό μονοπάτι σε ποντικούς που ταΐζονταν κετογονική διαίτα. *In vivo* πειράματα έδειξαν ότι η αντικαρκινική δράση της Μετοφορμίνης στον καρκίνο του μαστού αυξήθηκε όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μειώθηκαν μέσω μιας κετογονικής διαίτας χαμηλής σε υδατάνθρακες (Zhuang et al. 2014).

Στην παρούσα μελέτη οι συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκαν (5 mM) αντιστοιχούν σε 90 mg/dl, δηλαδή σε επίπεδα που θεωρούνται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Αντιθέτως, οι συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης των 20 mM που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν σε 360 mg/dl που είναι εκτός του φυσιολογικού ορίου και μπορεί να συμβεί μόνο σε διαβητικούς (αν εξαιρεθεί η χρήση φαρμάκων που μπορεί να προκαλέσει υπεργλυκαιμία). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αν εξαχθούν στους ανθρώπους, είναι σχετικά τόσο για διαβητικούς όσο και για μη-διαβητικούς ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς.

Στην παρούσα μελέτη επίσης χρησιμοποιήσαμε μια στρατηγική υπερ-ευαισθητοποίησης εναντίον των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιώντας συνδυαστικά ένα μιτοχονδριακό αναστολέα

με ένα γλυκολυτικό αναστολέα. Εξετάσαμε το συνδυασμό της Μετορμίνης με το 2-DG, το οποίο φωσφορυλιώνεται από την εξοκινάση και στη συνέχεια αναστέλλει την παραγωγή ATP μέσω του γλυκολυτικού μονοπατιού. Η θεραπεία με 2-DG αύξησε δραματικά την αποτελεσματικότητα της Μετορμίνης εναντίον των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων. Ο συνδυασμός του 2-DG (5mM) με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις Μετορμίνης (25 μM) οδήγησε σε μαζικό κυτταρικό θάνατο σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάσαμε. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες σε μοντέλα καρκίνου του μαστού. Επίσης, έχειδειχτεί ότι ο συνδυασμός παραγόντων που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια (Mito-CP) με το 2-DG μπορεί να προκαλέσει σημαντική αναστολή της καρκινικής δραστηριότητας χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές στους νεφρούς, ήπαρ και καρδιά (Cheng et al. 2012). Τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι ο συνδυασμός Μετορμίνης με το 2-DG μπορεί να είναι αποτελεσματικός εναντίον του καρκίνου του θυρεοειδούς, και επιπλέον in vivo μελέτες είναι απαραίτητες για την εξακρίβωση αυτών των αποτελεσμάτων.

Ο χαρακτηρισμός των μοριακών μηχανισμών που καθορίζουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία με μεταβολικούς παράγοντες είναι σημαντικός για την ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας για τους ασθενείς με καρκίνο. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το PKM2 είναι ένα από τα σημαντικά ένζυμα που καθορίζουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη στέρηση γλυκόζης και στη θεραπεία με διγουανίδια (Birsoy et al. 2014). Δείξαμε ότι οι καρκινικές θυρεοειδικές σειρές χαρακτηρίζονται από υπερ-έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τη γλυκόλυση και ότι η Μετορμίνη προκάλεσε μείωση του πρωτεϊνικού επιπέδου του PKM2 στα κύτταρα FTC133 και BCPAP. Σε μελέτες έχειδειχτεί ότι στους ανθρώπινους θηλώδεις καρκινικούς όγκους υπάρχει αυξημένη έκφραση του PKM2, και ότι η υπερ-έκφρασή του συσχετίζεται με προχωρημένα στάδια καρκίνου και λεμφαδενικές μεταστάσεις (Feng et al. 2013).

Τα δεδομένα μας που δείχνουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του PKM2 σε υποτροπιάζοντες καρκίνους είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, και υποδεικνύουν τη χρησιμότητα της Μετοφορμίνης για τους ασθενείς με θηλώδεις καρκίνους του θυρεοειδή.

Κλινικές μελέτες σε γλοιώματα έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός του 2-DG (65mg/kg ημερησίως) με ακτινοθεραπεία είναι καλά ανεκτός χωρίς οξεία τοξικότητα ή δευτερεύουσα βλάβη στο φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό (Dwarakanath et al. 2009). Υπάρχουν αρκετές εν εξελίξει κλινικές μελέτες της θεραπείας με 2-DG στον καρκίνο του προστάτη και σε άλλους προχωρημένους συμπαγείς όγκους (πνεύμονα, μαστού, παγκρέατος, στομάχου, κεφαλής και τραχήλου). Η μείωση της διαθεσιμότητας της γλυκόζης έχει επίσης δοκιμασθεί σαν καρκινική θεραπεία. Τη στιγμή της συγγραφής αυτής της διατριβής υπάρχουν 12 κλινικές μελέτες (στην επίσημη ιστοσελίδα που ελέγχει τις κλινικές μελέτες στις ΗΠΑ - ClinicalTrials.gov) που μελετούν τη χρησιμότητα της κετογονικής διαίτας σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου.

Συμπερασματικά, σε αυτό το μέρος της διατριβής δείξαμε ότι η συγκέντρωση γλυκόζης στο εξωκυττάριο περιβάλλον είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αντι-καρκινική δράση της Μετοφορμίνης. Τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός της Μετοφορμίνης με αναστολείς της γλυκόλυσης μπορεί να είναι μια καινούρια εναλλακτική για τη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς.

1.5 Βιβλιογραφία

Balvan J, Krizova A, Gumulec J, et al. 2015 Multimodal holographic microscopy: distinction between apoptosis and oncosis. PLoS ONE 10 e0121674.

- Ben Sahra I, Tanti JF and Bost F 2010 The combination of metformin and 2-deoxyglucose inhibits autophagy and induces AMPK-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Autophagy* 6 670–671.
- Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, et al. 2011 Metformin independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Research* 71 4366–4372.
- Birsoy K, Sabatini DM and Possemato R 2012 Untuning the tumor metabolic machine: targeting cancer metabolism: a bedside lesson. *Nature Medicine* 18 1022–1023.
- Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, et al. 2014 Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature* 508 108–112.
- Chen AY, Jemal A, and Ward EM 2009 Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988–2005. *Cancer* 115:3801–7
- Chen G, Xu S, Renko K and Derwahl M 2012 Metformin inhibits growth of thyroid carcinoma cells, suppresses self-renewal of derived cancer stem cells, and potentiates the effect of chemotherapeutic agents. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 E510–E520.
- Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, et al. 2012 Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Research* 72 2634–2644.
- Cheong JH, Park ES, Liang J, et al. 2011 Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models. *Molecular Cancer Therapeutics* 10 2350–2362.
- Cho SW, Yi KH, Han SK, et al. 2014 Therapeutic potential of metformin in papillary thyroid cancer in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Endocrinology* 393 24–29.
- Choi YK and Park KG 2013 Metabolic roles of AMPK and metformin in cancer cells. *Molecules and Cells* 36 279–287.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. 2008 The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452 230–233.
- Del Nagro C, Xiao Y, Rangell L, et al. 2014 Depletion of the central metabolite NAD leads to oncosis-mediated cell death. *Journal of Biological Chemistry* 289 35182–35192.
- Dwarakanath BS, Singh D, Banerji AK, et al. 2009 Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: present status and future prospects. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 5 (Suppl 1) S21–S26.

Feng C, Gao Y, Wang C, et al. 2013 Aberrant overexpression of pyruvate kinase M2 is associated with aggressive tumor features and the BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 E1524–E1533.

Gandini S, Puntoni M, Heckman-Stoddard BM, et al. 2014 Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prevention Research* 7 867–885.

Haymond MW, Karl IE, Clarke WL, et al. 1982 Differences in circulating gluconeogenic substrates during short-term fasting in men, women, and children. *Metabolism* 31 33–42.

Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, et al. 2010 Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metabolism* 11 390–401.

Klubo-Gwiedzinska J, Costello J Jr, Patel A, et al. 2013 Treatment with metformin is associated with higher remission rate in diabetic patients with thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 3269–3279.

Liu X, Chhipa RR, Pooya S, et al. 2014 Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *PNAS* 111 E435–E444.

Maddodi N, Huang W, Havighurst T, et al. 2010 Induction of autophagy and inhibition of melanoma growth in vitro and in vivo by hyperactivation of oncogenic BRAF. *Journal of Investigative Dermatology* 130 1657–1667.

Majno G and Joris I 1995 Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology* 146 3–15.

Margel D, Urbach DR, Lipscombe LL, et al. 2013 Metformin use and all-cause and prostate cancer specific mortality among men with diabetes. *Journal of Clinical Oncology* 31 3069–3075.

Menendez JA, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, et al. 2012 Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. *Cell Cycle* 11 2782–2792.

Pernicova I and Korbonits M 2014 Metformin – mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews. Endocrinology* 10 143–156.

Phinney SD, Bistrrian BR, Evans WJ, et al. 1983 The human metabolic response to chronic ketosis without caloric restriction: preservation of submaximal exercise capability with reduced carbohydrate oxidation. *Metabolism* 32 769–776.

Pollak MN 2012 Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. *Cancer Discovery* 2 778–790.

Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, et al. 2008 Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*

93 4331–4341.

Scotland S, Saland E, Skuli N, et al. 2013 Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia* 27 2129–2138.

Segal ED, Yasmeeen A, Beauchamp MC, et al. 2011 Relevance of the OCT1 transporter to the antineoplastic effect of biguanides. *Biochem Biophys Res Commun.* 414:694-9

Shu Y, Sheardown SA, Brown C, et al. 2007 Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest.* 117:1422-31.

Takahashi A, Kimura F, Yamanaka A, et al. 2014 Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell International* 14 53.

Thompson AM 2014 Molecular pathways: preclinical models and clinical trials with metformin in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 20 2508–2515.

Vander Heiden MG, Cantley LC and Thompson CB 2009 Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324 1029–1033.

Wahdan-Alaswad R, Fan Z, Edgerton SM, et al. 2013 Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy. *Cell Cycle* 12 3759–3769.

Weerasinghe P and Buja LM 2012 Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death. *Experimental and Molecular Pathology* 93 302–308.

Weerasinghe P, Hallock S, Brown RE, et al. 2013 A model for cardiomyocyte cell death: insights into mechanisms of oncosis. *Experimental and Molecular Pathology* 94 289–300.

Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, et al. 2014 Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife* 3 e02242.

Yin M, Zhou J, Gorak EJ et al. 2013 Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist* 18 1248–1255.

Zhuang Y, Chan DK, Haugrud AB et al. 2014 Mechanisms by which low glucose enhances the cytotoxicity of metformin to cancer cells both in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 9 e108444.

Zordoky BN, Bark D, Soltys CL, et al. 2014 The antiproliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: implications for cancer therapy and prevention. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 1943–1957.

2. Η Μιτοτάνη Προκαλεί Εκπόλωση της Μιτοχονδριακής Μembrάνης και Απόπτωση στα Θυρεοειδικά Καρκινικά Κύτταρα

2.1 Εισαγωγή

Όπως αναλύθηκε εκτενώς στο Γενικό Μέρος αυτής της διατριβής, ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο συχνή ενδοκρινής κακοήθεια, και ευθύνεται για το 3.2% όλων των νέων κακοηθειών (εξαιρώντας τους καρκίνους του δέρματος) στις ΗΠΑ (Ferlay et al. 2012). Η αυξημένη συχνότητα του καρκίνου του θυρεοειδούς αποδίδεται κυρίως στα αυξημένα ποσοστά ανίχνευσης των μικρών θηλωδών καρκίνων (Ahn et al. 2014). Ωστόσο, παρατηρείται και αύξηση στα ποσοτά των πιο επιθετικών καρκίνων (Chen et al. 2009). Οι ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς έχουν εξαιρετική πρόγνωση, με τα ποσοστά επιβίωσης στα 10 έτη να κυμαίνονται μεταξύ 80% και 95% (Schlumberger 1998, Sherman 2003). Οι υποτροπές, καθώς και οι μακρινές μεταστάσεις τη στιγμή του χειρουργείου, ωστόσο, επιδεινώνουν σημαντικά την πρόγνωση. Οι μακρινές μεταστάσεις τη στιγμή του χειρουργείου φέρουν ένα 10-ετές ποσοστό επιβίωσης της τάξης του 40% (Muresan et al. 2008), ενώ η θνησιμότητα για τις υποτροπές έχει δείξει ότι είναι 69% (Tubiana et al. 1985). Ο αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ένας σπάνιος ιστολογικός τύπος καρκίνου του θυρεοειδούς, και θεωρείται ένας από τους πιο επιθετικούς όγκους με το ποσοστό επιβίωσης 1 έτους να είναι 20% (Smallridge et al. 2010). Διάφορες θεραπευτικές μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί για τον αναπλαστικό καρκίνο, αλλά καμία θεραπεία δεν έχει προσφέρει σημαντικά οφέλη στους ασθενείς. Ως εκ τούτου, σε όλους τους

ασθενείς με αναπλαστικό καρκίνο θα πρέπει να προσφέρεται η δυνατότητα να συμμετάσχουν σε κλινικές μελέτες (Smallridge et al. 2012). Ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί περίπου το 3-5% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς στις ΗΠΑ, αλλά είναι υπεύθυνος για το 15% όλων των θανάτων εξαιτίας του καρκίνου του θυρεοειδούς (Nose 2012). Ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς έχει χειρότερη πρόγνωση από το διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς όταν παρουσιάζεται με μακρινές μεταστάσεις (Williams et al. 1986). Ως εκ τούτου, νέες θεραπευτικές στρατηγικές είναι απαραίτητες για τους επιθετικούς διαφοροποιημένους και μυελοειδείς καρκίνους, καθώς και τους αναπλαστικούς καρκίνους του θυρεοειδούς.

Οι αναστολείς των τυροσινικών κινασών (tyrosine kinase inhibitors - TKI) είναι στο προσκήνιο της μάχης εναντίον του καρκίνου του θυρεοειδούς, με 4 αναστολείς να έχουν ήδη εγκριθεί για κλινική χρήση για το μεταστατικό, ανθεκτικό στο ραδιενεργό ιώδιο διαφοροποιημένο καρκίνο και για τον προχωρημένο μυελοειδή καρκίνο. Ορισμένοι άλλοι αναστολείς τυροσινικών κινασών είναι υπό εξέταση (Bikas et al. 2016). Ωστόσο, η θεραπεία με TKI έχει συχνά σημαντικές παρενέργειες και είναι δαπανηρή. Εξαιτίας αυτών των χαρακτηριστικών των TKI, είναι σημαντική η εξερεύνηση άλλων εναλλακτικών και στο πλαίσιο αυτό υπάγεται η χρησιμοποίηση παραγόντων που είναι ήδη εγκεκριμένοι για μη καρκινικούς σκοπούς, για τη θεραπεία νεοπλασιών. Η διαδικασία αυτή (γνωστή και ως repositioning στην αγγλική βιβλιογραφία) έχει πρόσφατα αναδυθεί ως μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς (Kushchayeva et al. 2014). Επί παραδείγματι, η Νελφίναβιρη, ένας αναστολέας πρωτεασών που χρησιμοποιείται στο HIV έχει δειχτεί ότι είναι αποτελεσματική εναντίον όλων των ιστολογικών τύπων του καρκίνου του θυρεοειδούς *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα, η Νελφίναβιρη έχει δειχτεί ότι μειώνει την έκφραση του RET, αναστέλλει τα PI3K/AKT και MAPK/ERK σηματοδοτικά μονοπάτια, και προκαλεί απόπτωση σε κύτταρα που προέρχονται από μυελοειδή καρκίνο του

θυρεοειδούς, ενώ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προκαλεί βλάβη στο DNA στα κύτταρα που προέρχονται από διαφοροποιημένο και αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς (Jensen et al. 2017, Kuschayeva et al. 2014). Επίσης η δράση της Μετοφομίνης στον καρκίνο του θυρεοειδούς έχει αναλυθεί εκτενώς στη διατριβή αυτή.

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η Μιτοτάνη, ένας αναστολέας της στεροειδογένεσης που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου των επινεφριδίων και της νόσου Cushing (Baudry et al. 2012, Berruti et al. 2012, Henley et al. 1983), έχει αντι-νεοπλασματική δράση μέσω της αναστολής των μιτοχονδριακών ενζύμων-κλειδιά (Hescot et al. 2013, Poli et al. 2013). Έχει περιγραφεί ότι η Μιτοτάνη επηρεάζει τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μέσω της αναστολής των υπομονάδων 2 και 4I της κυτοχρωμικής c οξειδάσης. Επίσης, η Μιτοτάνη έχει δείχτει ότι προκαλεί ενδοκυττάριο stress και απόπτωση σε κύτταρα που προέρχονται από επινεφριδιακό καρκίνο (Poli et al. 2013).

Εφόσον η αναστολή των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχει πρόσφατα χαρακτηριστεί ως μια πολλά υποσχόμενη για τη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς, υποθέσαμε ότι η Μιτοτάνη θα μπορούσε να είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας για τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Στην έρευνα που παρουσιάζουμε στο πλαίσιον αυτής της διατριβής, εξετάσαμε τα αποτελέσματα της Μιτοτάνης σε διάφορες θυρεοειδικές καρκινικές σειρές. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η Μιτοτάνη προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης και απόπτωση σε συγκεντρώσεις που είναι κλινικά επιτεύξιμες, και αυτά μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για την περαιτέρω χρησιμοποίηση αυτού του φαρμακευτικού παράγοντα σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του θυρεοειδούς.

2.2 Μέθοδοι και Υλικά

2.2.1 Δείγματα από ανθρώπινους θυρεοειδικούς ιστούς

Δείγματα που ήταν ενσωματωμένα σε κύβους παραφίνης επιλέχθηκαν από 16 ασθενείς που ανέπτυξαν προοδευτική νόσο μετά την αρχική θεραπεία και υποβλήθηκαν σε δεύτερη επέμβαση για τους μεταστατικούς όγκους. Όλοι τα στοιχεία συλλέχθηκαν σε ανώνυμη βάση.

2.2.2 Καρκινικές θυρεοειδικές σειρές και υλικά

Ανθρώπινες θυρεοειδικές καρκινικές σειρές που προέρχονται από θυλακιώδη (FTC133), θηλώδη (BCPAP), αναπλαστικό (SW1736 και C643) και μυελοειδή (TT) καρκίνο του θυρεοειδούς αποκτήθηκαν από τον Dr. Motoyasu Saji (The Ohio State University) με άδεια από τους ερευνητές που αρχικά καθόρισαν τις κυτταρικές σειρές. Οι ανθρώπινοι ινοβλάστες (NHDF κύτταρα) αγοράστηκαν από την εταιρεία Lonza Inc., Walkersville, MD, USA. Όλες οι καρκινικές θυρεοειδικές σειρές είχαν εξεταστεί και είχαν ταυτοποιηθεί ότι είναι θυρεοειδικής προέλευσης μέσω απλών σε σειρές επαναλήψεων (short tandem repeat- STR). Στο εργαστήριο, επιβεβαιώσαμε την παρουσία της μετάλλαξης BRAFV600E στα BCPAP και τα SW1736 κύτταρα, την απώλεια της έκφρασης του PTEN στα FTC133 κύτταρα, τη Asp259Tyr TP53 μετάλλαξη στα BCPAP κύτταρα, τη Arg248Gln TP53 μετάλλαξη στα C643 κύτταρα, τη HRAS μετάλλαξη στα C643 κύτταρα και τη C634W RET μετάλλαξη στα TT κύτταρα. Επίσης, εξετάσαμε την έκφραση γονιδίων- ειδικών στο θυρεοειδή μέσω PCR. Κατά τον έλεγχο μας, στα κύτταρα FTC133, BCPAP, SW1736 και C643 παρατηρήθηκε έκφραση των γονιδίων thyroid transcription factor 1 (TTF-1) και θυρεοσφαιρίνη (Tg). Τα TT κύτταρα που προέρχονται από μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς είχαν αυξημένη έκφραση θυρεοκαλσιτονίνης (TCT).

Τα καρκινικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μέσο RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, Carlsbad, CA) στο οποίο προστέθηκε 10% ορός από βοοειδή έμβρυα (fetal bovine serum – FBS), 100 U/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και βρίσκονταν σε

incubator με 5% CO₂. Τα κύτταρα υπο-καλλιεργήθηκαν με 0.5% τρυψίνη και 0.02% EDTA (Sigma–Aldrich) όταν έφταναν στο 80% της χωρητικότητας του τριβλίου. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με θυρεοειδικές καρκινικές σειρές που είχαν περαστεί λιγότερες από 20 φορές.

Για την παραγωγή κυττάρων που εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), οι κυτταρικές σειρές TT και BCPAP υπέστησαν προεργασία με σωματίδια lenti-ιού που δε στόχευαν κάποιο γνωστό mRNA θηλαστικού, και περιέχουν το copGFP κατασκεύασμα που κωδικοποιείται (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Μετά τη μεταγωγή, τα GFP+ κύτταρα επιλέχθηκαν μέσω της θεραπείας με πουρομυκίνη.

Η Μιτοτάνη (1-(2-Chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane) αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Η Μιτοτάνη διαλύθηκε σε DMSO και αποθηκεύτηκε σε συγκέντρωση 100mM. Η Μιτοτάνη 50μM είναι μία συγκέντρωση που είναι κλινικά επιτεύξιμη και χρησιμοποιείται συχνά στη θεραπεία του καρκίνου των επινεφριδίων και ήταν η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε κυρίως στα πειράματα αυτής της μελέτης. Το DMSO σε συγκέντρωση 0.1% δεν είχε καμία επίπτωση στις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν. Τα controls στα πειράματα με Μιτοτάνη περιείχαν DMSO στην ίδια συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε και για τη διάλυση της Μιτοτάνης έτσι ώστε να μην υπάρχουν αμφιβολίες για την πιστότητα των αποτελεσμάτων.

2.2.3 Πειράματα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική βιωσιμότητα και ανίχνευση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός καθορίστηκε μέσω κυτταρομετρίας με το Vi-CELL Cell Viability Analyzer από την εταιρία Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). Η μελέτη του

δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης έγινε μέσω του φθορίζοντος λιποφιλικού κατιόντος JC-1 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Η ανίχνευση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, και ακολουθήθηκε από φθορίζουσα μικροσκόπηση. Σε κύτταρα με πολωμένες μιτοχονδριακές μεμβράνες, το JC-1 δημιουργεί συμπλέγματα με έντονο φθορισμό. Αντιθέτως, σε κύτταρα με εκπολωμένες μιτοχονδριακές μεμβράνες, το JC-1 δε δημιουργεί συμπλέγματα και ως εκ τούτου δεν προκαλεί φθορισμό. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 φορές.

2.2.4 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

Τα κύτταρα FTC133, BCPAP, SW1736, C643 και TT υπέστησαν θεραπεία με Μιτοτάνη για 24 ώρες (25 μ M και 50 μ M). Στη συνέχεια έγινε η συλλογή τους: αρχικά έγινε πλύση με κρύο διάλυμα PBS (phosphate buffered saline), και τα κύτταρα επώαστηκαν σε μεθανόλη. Τα κύτταρα αυτά στη συνέχεια (1×10^6) επώαστηκαν με RNAάση A για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και έγινε χρώση με προπίδιο του ιωδίου. Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα BD LSRII. Η κατανομή των κυττάρων στις φάσεις G0/G1, S και G2/M του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού ανάλυσης ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME). Για να αξιολογηθεί η απόπτωση, το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων υπολογίστηκε στα ιστογράμματα DNA. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3 φορές.

2.2.5 Εξαγωγή RNA και ποσοτική real-time PCR (quantitative real-time PCR)

Το ολικό RNA απομονώθηκε από τα καρκινικά θυρεοειδικά κύτταρα χρησιμοποιώντας το AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η ποιότητα και η ποσότητα του ολικού RNA αξιολογήθηκε με το φασματόμετρο Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Ένα μ g RNA

χρησιμοποιήθηκε για την αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA με το miScript II RT kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήσαμε qPCR master mixes με βάση το SYBR Green από την εταιρεία Qiagen (Germantown, MD). Έλεγχος γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο έγινε με real-time qPCR χρησιμοποιώντας την προ-κατασκευασμένη συλλογή RT-PCR Human Cancer PathwayFinder Array (PAHS-033ZA; Cat. no. 330231; Qiagen, Germantown, MD). Τα πειράματα έγιναν στο θερμικό κυκλοποιητή Quantstudio Flex-6 (ThermoFisher, Waltham, MA). Οι κύκλοι-κατώφλι για το κάθε γονίδιο καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό του κατασκευαστή. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ένα πρόγραμμα ανάλυσης το οποίο παρείχε στατιστική ανάλυση για τις ΔΔCt τιμές. Η ανάλυση έγινε μετά την κανονικοποίηση σε 5 γονίδια-controls (ACTB Actin, beta; B2M Beta-2-microglobulin; GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and HPRT1 Hypoxanthine phosphoribosyltransferase). Οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων συγκρίθηκαν μεταξύ των κυττάρων controls και των κυττάρων που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με Μιτοτάνη. Η έκφραση των γονιδίων με καθορισμένο ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόλυσης εξετάστηκε μέσω των εμπορικών σειρών για τη γλυκόλυση (Glycolysis real-time PCR arrays) από την εταιρεία Qiagen.

Η έκφραση των γονιδίων NOXA (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein) μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τους παρακάτω εκκινητές: NOXA-F: GCAGAGCTGGAAGTCGAGTG; NOXA-R GAGCAGAAGAGTTTGGATATCAG. Για την ανάλυση του γονιδίου PUMA (που είναι ρυθμιστής της απόπτωσης) χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές: PUMA-F GACGACCTCAACGCACAGTA; PUMA-R AGGAGTCCCATGATGAGATTGT. Για την ανάλυση του γονιδίου ATP5B (υπομονάδα του γονιδίου ATP συνθάση) χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές: ATP5B-F TCACCCAGGCTGGTTCAGA; ATP5B-R AGTGGCCAGGGTAGGCTGAT. Για τα γονίδια

ATP5B, PUMA και NOXA, οι αντιδράσεις RT-qPCR πραγματοποιήθηκαν x3 στον κυκλοποιητή Lightcycler 96 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Οι καμπύλες αποδιάταξης αξιολογήθηκαν για να εξασφαλίσουμε ότι επιμήκυνση θα αφορά μόνο μία αλληλουχία. Αρνητικά cDNA controls χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Έγινε κανονικοποίηση στο ποσό των αλληλουχιών με αυτό του control γονιδίου 18S. Οι τιμές για το βασικό επίπεδο (baseline) και το κατώφλι (threshold) τέθηκαν από το λογισμικό του κυκλοποιητή Lightcycler και τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη ΔΔCT μέθοδο σχετικής ποσοτικοποίησης.

2.2.6 Εξαγωγή πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western blot)

Τα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα πλύθηκαν με παγωμένο διάλυμα λύσης των κυττάρων. 25 μg των διαλυμάτων πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (7%). Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροσελουλόζης (Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, Carlsbad, CA) μέσω ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού. Οι μεμβράνες αφήθηκαν σε διάλυμα με τα πρωτογενή αντισώματα κατά β-actin (Sigma-Aldrich), p-AKT1/2/3 (Ser473), ολικό AKT, p-ERK1/2, ολικό ERK, ενεργοποιημένη κασπάση-3, ηλεκτρική αφυδρογονάση succinate dehydrogenase subunit A (SDHA), κυτοχρωμική c οξειδάση, κυτοχρωμική c οξειδάση υπομονάδα 4 (COX4), endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 (ERO1), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), και HSP60 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). γH2AX, NADH διϋδρογονάση (NDUFA1) και ATP5B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Οι μεμβράνες μετά από πλύσιμο αφήθηκαν σε διάλυμα με τα δευτερογενή αντισώματα. Μετά από νέο πλύσιμο, οι μάντες της πρωτεΐνης αποτυπώθηκαν μέσω του Li-COR Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Το λογισμικό Image Studio Lite version 3.1 (LI-COR) χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της πυκνότητας των μάντων και την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών.

2.2.7 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ιστών τα οποία αγοράστηκαν από την εταιρεία US Biomax Inc., Rockville, MD. Τα δείγματα αποτελούνταν από 100 θυρεοειδικούς ιστούς (10 φυσιολογικούς θυρεοειδείς, 20 θυλακιώδεις καρκίνους του θυρεοειδή, 44 θηλώδεις καρκίνους του θυρεοειδή, 6 καρκίνους του θυρεοειδή με χαμηλή διαφοροποίηση και 20 μυελοειδείς καρκίνους του θυρεοειδή). Επίσης, μελετήθηκαν 16 δείγματα (3 φυσιολογικοί ιστοί, 12 από θηλώδη, 3 από θυλακιώδη και 1 από μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς) από την τράπεζα ιστών στο εργαστήριό μας.

Η παραφίνη από τα δείγματα απομακρύνθηκε με τη βοήθεια ξυλόλης, στη συνέχεια υπέστησαν πλύση με αλκοόλ, και τελικά τοποθετήθηκαν στο φούρνο μικροκυμάτων σε ειδικό διάλυμα για την παρουσίαση των αντιγόνων (Vector Labs, Burlingame, CA) για 10 λεπτά. Η ενδογενής δραστηριότητα της περοξειδάσης απομακρύνθηκε με την εμβάπτυση σε διάλυμα 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα δείγματα και οι κυτταρικές σειρές επώαστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας με το πρωτογενές αντίσωμα αντι- ATP5B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Η ανοσόχρωση πραγματοποιήθηκε με το Vectastain Universal Quick Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρνητικά controls κατασκευάστηκαν με την παραπάνω διαδικασία με τη διαφορά ότι ο πρωτογενής αντιορός δε χρησιμοποιήθηκε.

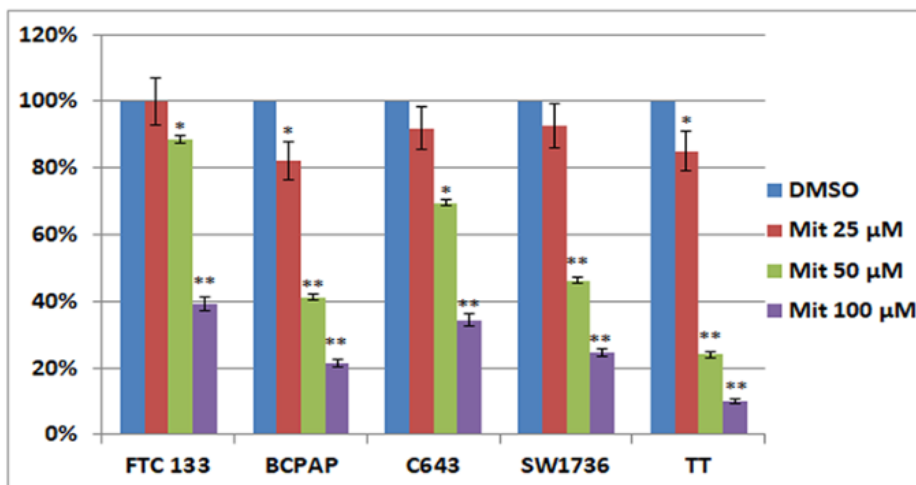
2.2.8 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS version 22 (2013). Για τα μη παραμετρικά δεδομένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Kruskal-Wallis μαζί με τη διόρθωση Bonferroni για τις πολλαπλές συγκρίσεις. Σημαντική θεωρήθηκε η διαφορά με $p < 0.05$.

2.3 Αποτελέσματα

2.3.1 Η Μιτοτάνη μειώνει τη βιωσιμότητα των θυρεοειδικών καρκινικών κυτταρικών σειρών

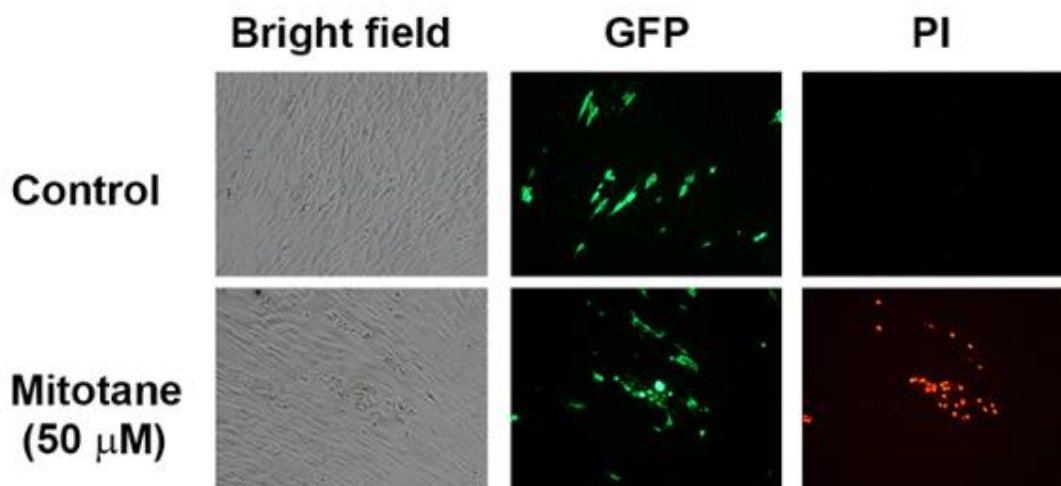
Τα FTC133, BCPAP, SW1736, C643 και TT κύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Μιτοτάνης για 24 ώρες, και ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων καθορίστηκε με άμεση κυτταρική μέτρηση χρησιμοποιώντας το Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer. Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, η θεραπεία με Μιτοτάνη προκάλεσε μείωση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν. Οι θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές είχαν μια δοσο-εξαρτώμενη απόκριση στη θεραπεία με Μιτοτάνη, και επέδειξαν διαφορετική ευαισθησία στη θεραπεία. Τα κύτταρα που έχουν μετάλλαξη στο BRAF (BCPAP και SW1736) και τα κύτταρα που έχουν μετάλλαξη στο RET (TT) ήταν πιο ευαίσθητα στη μιτοτάνη σε σχέση με τα FTC133 (που είναι PTEN-αρνητικά) και τα C643 (που έχουν μετάλλαξη στο HRAS). Η θεραπεία με μιτοτάνη (50 μ M για 24 ώρες) μείωσε τη βιωσιμότητα των FTC133, BCPAP, SW1736, C643 και TT κυττάρων κατά 12%, 59%, 54%, 31%, και 66% αντίστοιχα. Αυτός ο βαθμός αναστολής ήταν στατιστικά σημαντικός για τα BCPAP, SW1736 και TT κύτταρα ($p \leq 0.01$).



Σχήμα 2.3.1.1: Αναστολή της βιωσιμότητας των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων από τη θεραπεία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Μιτοτάνης (10, 50, 100 μM) στις 24 ώρες χρησιμοποιώντας το Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer. Παρατηρείται μεγαλύτερη ευαισθησία στη Μιτοτάνη στα κύτταρα BCPAP, SW1736 και TT. (*P value <0.05 και **P value <0.01). Mit: Μιτοτάνη

2.3.2 Η επίδραση της Μιτοτάνης στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα και στους ινοβλάστες

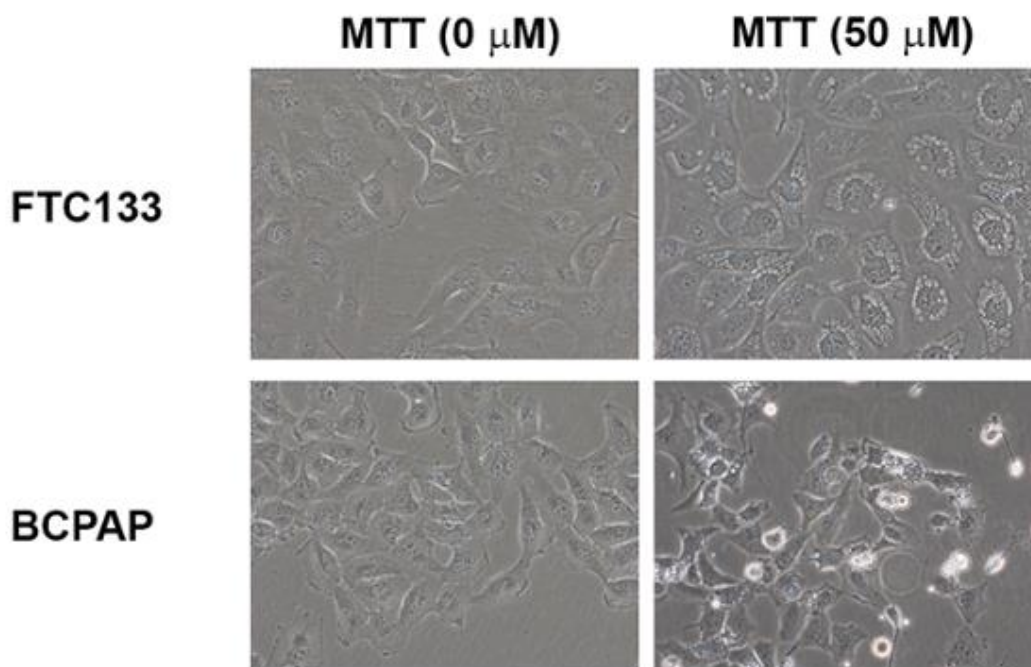
Για να επιβεβαιώσουμε ότι τα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στη μιτοτάνη, προχωρήσαμε σε πειράματα με μεικτές καλλιέργειες. Χρησιμοποιήσαμε TT κύτταρα που εκφράζουν μια πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (TT-GFP κύτταρα) και τα τοποθετήσαμε στην ίδια καλλιέργεια με ανθρώπινους ινοβλάστες, και εφαρμόσαμε θεραπεία με μιτοτάνη (50 μM για 24 ώρες). Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, τα TT-GFP κύτταρα σχημάτισαν κυτταρικά συμπλέγματα τα οποία δεν ήταν εύκολα διακριτά από τους ινοβλάστες με απλή μικροσκόπηση, αλλά μπορούσαν να ταυτοποιηθούν εύκολα με φθορίζουσα μικροσκόπηση. Η θεραπεία με μιτοτάνη προκάλεσε προοδευτική μείωση του αριθμού των TT-GFP κυττάρων. Για να δείξουμε ότι η θεραπεία με μιτοτάνη οδήγησε στο θάνατο των TT κυττάρων, αλλά όχι και των ινοβλαστών, κάναμε χρώση των κυττάρων με προπίδιο του ιωδίου. Πυρηνική συγκέντρωση του ΠΙ, φανερώνοντας νεκρά κύτταρα, ανιχνεύτηκε στα TT-GFP κύτταρα, αλλά όχι στους ινοβλάστες, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε με BCPAP-GFP κύτταρα και ινοβλάστες.



Σχήμα 2.3.2.1: TT κύτταρα που εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (TT-GFP κύτταρα) καλλιεργήθηκαν μαζί με ανθρώπινους ινοβλάστες στο ίδιο τριβλίο και υπέστησαν θεραπεία με 0 μM και 50 μM Μιτοτάνης για 24 ώρες. Τα TT-GFP κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν εύκολα από τους ανθρώπινους ινοβλάστες μέσω φθορίζουσας μικροσκοπίας (μεσαία στήλη). Η πυρηνική συσσώρευση του προπίδιου του ιωδίου, που φανερώνει κυτταρικό θάνατο, ανιχνεύτηκε στα TT-GFP κύτταρα, αλλά όχι και στους ινοβλάστες (δεξιά στήλη), αποδεικνύοντας πως τα δύο είδη κυττάρων δεν παρουσιάζουν την ίδια ευαισθησία στη θεραπεία με Μιτοτάνη 50 μM για 24 ώρες. MTT: Μιτοτάνη

2.3.3 Η Μιτοτάνη προκαλεί ενδοπλασματικό κυτταρικό stress στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα

Μέσω της μικροσκοπίας παρακολουθήσαμε τις μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα που υπέστησαν θεραπεία με μιτοτάνη. Η θεραπεία με μιτοτάνη (50 μM για 24 ώρες) προκάλεσε τη δημιουργία μεγάλων κυτταροπλασματικών κενотоπίων σε όλα τα εξετασθέντα θυρεοειδικά κύτταρα, που υποδηλώνει την πρόκληση κυτταρικού ενδοπλασματικού stress. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω Σχήμα.



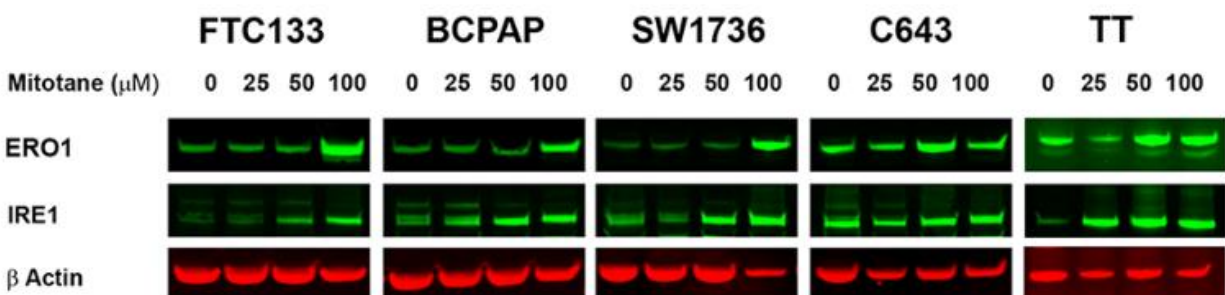
Σχήμα 2.3.3.1: Στο παραπάνω Σχήμα φαίνονται εικόνες άμεσης μικροσκόπησης σε κύτταρα FTC133 και BCPAP. Οι εικόνες είναι από 24ώρες μετά την έκθεση των κυττάρων σε Μιτοτάνη 0 μM και 50 μM . Παρατηρείται ο σχηματισμός μεγάλων κυτταροπλασματικών κενотоπιών (που είναι ενδεικτικά ενδοκυττάριου stress), στα κύτταρα FTC133 στα 50 μM . Κυτταρική συρρίκνωση, πυρηνικός κατακερματισμός, και κυτταρική αποκόλληση από το τριβλίο (στοιχεία ενδεικτικά απόπτωσης) παρατηρήθηκαν στα BCPAP cells. MTT: Μιτοτάνη

Επιπλέον, παρατηρήθηκαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης, όπως κυτταρική συρρίκνωση, πυρηνικός κατακερματισμός, και κυτταρική αποκόλληση από το τριβλίο στα BCPAP, SW1736 και TT κύτταρα μετά την έκθεση σε Μιτοτάνη (50 μM για 24 ώρες). Παρακολουθήσαμε τις μορφολογικές αυτές αλλαγές και εξετάσαμε την επίδραση που έχει η αφαίρεση της μιτοτάνης από το μέσο. Η θεραπεία με μιτοτάνη 50 μM στα FTC133 κύτταρα προκάλεσε τη δημιουργία κενотоπιών στο κυτταρόπλασμα σε 12 ώρες, και προοδευτικά ο αριθμός και το μέγεθος των κενотоπιών αυξήθηκε. Στα FTC133 κύτταρα που εκτέθηκαν σε Μιτοτάνη (50 μM για 16 ώρες), η αντικατάσταση του μέσου με μέσο χωρίς Μιτοτάνη προκάλεσε αντιστροφή του

κυτταρικού φαινότυπου. Στις 20 ώρες (4 ώρες μετά την αντικατάσταση του μέσου), τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων ήταν πανομοιότυπα με τα control FTC133 κύτταρα που δεν είχαν υποστεί θεραπεία με Μιτοτάνη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μετά την έκθεση σε Μιτοτάνη (50 μM) για 24 ώρες, η αλλαγή σε μέσο χωρίς Μιτοτάνη ήταν ικανή για την επιστροφή της φυσιολογικής μορφολογίας στα FTC133 και τα C643 κύτταρα, αλλά όχι και στα BCPAP, SW1736 και TT κύτταρα. Η θεραπεία με Μιτοτάνη 100 μM για 24 ώρες προκάλεσε ανεπανόρθωτες κυτταρικές αλλαγές σε όλες τις θυρεοειδικές κυτταρικές σειρές.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η Μιτοτάνη προκαλεί κυτταροπλασματικό stress στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα, εξετάσαμε μέσω Western Blot την έκφραση πρωτεϊνών που συνδέονται με το κυτταροπλασματικό stress σε κύτταρα που είχαν υποστεί θεραπεία με Μιτοτάνη. Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, η θεραπεία με Μιτοτάνη (50 μM για 24 ώρες) προκάλεσε αύξηση του επιπέδου πρωτεΐνης του ενζύμου IRE1a στα FTC133, BCPAP, SW1736 και TT κύτταρα, αλλά όχι και στα C643 κύτταρα. Σε όλες τις εξετασθείσες σειρές, η έκθεση στη Μιτοτάνη (100 μM για 24 ώρες) προκάλεσε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του ERO1, επιβεβαιώνοντας ότι το ενδοπλασματικό κυτταρικό stress παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην απόκριση στη θεραπεία με Μιτοτάνη των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων.



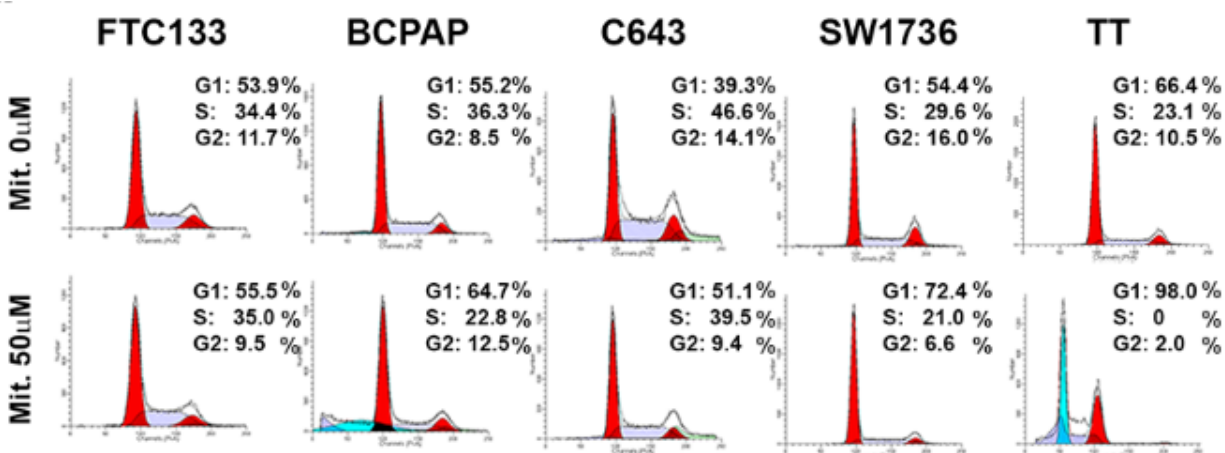
Σχήμα 2.3.3.2: Στο παραπάνω Σχήμα απεικονίζονται εικόνες από Western Blot. Η θεραπεία με Μιτοτάνη για 24 ώρες προκάλεσε αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών IRE1α (inositol-requiring enzyme 1α) και ERO1 (endoplasmic reticulum oxidoreductin-1) στα κύτταρα FTC133, BCPAP, SW1736 και TT, που είναι ενδεικτικό πρόκλησης ενδοκυττάρου stress.

2.3.4 Η επίδραση της Μιτοτάνης στον κυτταρικό κύκλο των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων

Η καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης στα καρκινικά κύτταρα συνήθως συνοδεύεται από ταυτόχρονη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την ενεργοποίηση των μονοπατιών κυτταρικού θανάτου. Εξετάσαμε, λοιπόν, τη συμβολή της αναστολής του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στην αναστολή της ανάπτυξης που παρατηρήθηκε μετά τη θεραπεία με Μιτοτάνη. Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, και σε σύγκριση με control κύτταρα, ο κυτταρικός κύκλος σταμάτησε στην G1 φάση όταν τα τα BCPAP, C643, SW1736 και TT κύτταρα υποβλήθησαν σε θεραπεία με Μιτοτάνη. Για τα FTC133 κύτταρα, η θεραπεία με Μιτοτάνη είχε πολύ μικρή επίδραση στον κυτταρικό κύκλο. Σε αυτήν την κυτταρική σειρά το ποσοστό της G1 φάσης αυξήθηκε από 53,9% σε 55,5%, και το ποσοστό των κυττάρων στην G2 φάση μειώθηκε από 11,7% σε 9,5%.

Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε κυτταρομετρία ροής για να ποσοτικοποιήσουμε την επίδραση της Μιτοτάνης στην απόπτωση στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα. Στα FTC133, C643 και SW1736 κύτταρα η θεραπεία με Μιτοτάνη 25 μM και 50 μM για 24 ώρες δε συνοδεύτηκε από την ενεργοποίηση της απόπτωσης. Στα BCPAP κύτταρα, η θεραπεία με Μιτοτάνη σε συγκεντρώσεις 25 και 50 μM συνοδεύτηκε από ενεργοποίηση της απόπτωσης, με τον εντοπισμό 21,2% και 24,9% αποπτωτικών κυττάρων, αντίστοιχα. Στα TT κύτταρα, η θεραπεία με Μιτοτάνη σε συγκεντρώσεις

25 και 50 μM συνοδεύτηκε από ενεργοποίηση της απόπτωσης, με τον εντοπισμό 48,2% και 55,4% αποπτωτικών κυττάρων, αντίστοιχα.



Σχήμα 2.3.4.1: Η Μιτοτάνη προκάλεσε παύση του κυτταρικού κύκλου στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα. Τα κύτταρα FTC133, BCPAP, C643, SW1736 και TT καλλιεργήθηκαν με ή χωρίς MTT (50 μM) για 24ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για να διερευνηθεί ο κυτταρικός κύκλος. Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα από την κυτταρομετρία ροής από κύτταρα που υπέστησαν θεραπεία με Μιτοτάνη φαίνονται στο παραπάνω Σχήμα, με την κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου να αναγράφεται.

2.3.5 Η Μιτοτάνη επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο στα

θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα

Για να αποσαφηνίσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν την απόκριση των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία με Μιτοτάνη, εξετάσαμε την έκφραση γονιδίων με γνωστό και καθορισμένο ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου χρησιμοποιώντας μια εμπορική RT-PCR Καρκινική Αλληλουχία (Cancer Array). Η λίστα όλων των γονιδίων παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα, μαζί με την αλλαγή (αναστολή ή υπερέκφραση) σε καρκινικές θυρεοειδικές

σειρές μετά από θεραπεία με Μιτοτάνη (50 μ M για 24 ώρες). Η θεραπεία με Μιτοτάνη προκάλεσε αλλαγές (που ήταν ειδικές για την κάθε κυτταρική σειρά) στο επίπεδο mRNA των καρκινογονιδίων. Μόνο 2 από τα 84 γονίδια που εξετάστηκαν (HMOX1 και DDIT3) επηρεάστηκαν από τη Μιτοτάνη σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Η έκθεση στη Μιτοτάνη προκάλεσε υπερ-έκφραση και των δυο γονιδίων, τα οποία είναι γνωστά ως διαμεσολαβητές-κλειδιά στην κυτταρική απόκριση στο stress και στη βλάβη του DNA.

Πίνακας 2.3.5.1. Αλλαγές στο επίπεδο mRNA των γονιδίων που εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας τη RT-PCR Cancer Array.

N	Symbol	Fold changes in mitotane-treated vs. control cells				
		BCPAP	SW 1736	FTC 133	C643	TT
1	ACLY	-1.58	-1.36	-1.17	1.42	1.46
2	ACSL4	1.34	1.27	1.44	1.51	1.12
3	ADM	1.39	1.29	1.62	-2.35	1.36
4	ANGPT1	1.22	-9.49	-1.95	-2.48	2.80
5	ANGPT2	-1.71	1.93	-3.04	1.01	2.89
6	APAF1	-1.84	-3.27	-1.25	-1.50	2.08
7	ARNT	1.81	-1.49	-1.31	1.54	2.57
8	ATP5A1	2.19	1.97	2.07	1.77	1.24

9	AURKA	-1.35	-1.18	-2.18	1.37	-19.69
10	BCL2L11	2.13	-7.08	-2.02	-1.06	3.15
11	BIRC3	1.38	-1.30	-3.39	5.48	9.55
12	BMI1	1.29	1.12	1.26	1.86	2.66
13	CA9	-1.22	-56.06	-4.02	1.80	2.44
14	CASP2	1.04	1.07	-1.59	1.23	-1.92
15	CASP7	2.71	1.07	1.52	1.65	1.33
16	CASP9	2.57	1.60	-1.03	2.65	1.24
17	CCL2	2.90	-59.40	1.82	1.80	1.53
18	CCND2	12.96	-8.70	-2.35	2.01	-2.23
19	CCND3	1.50	-1.64	-1.95	1.19	-1.63
20	CDC20	1.81	-1.42	-1.22	-1.13	-2.07
21	CDH2	-1.87	-2.86	2.07	-1.50	1.04
22	CFLAR	1.50	-2.49	1.66	1.52	2.72
23	COX5A	1.11	-1.38	1.14	-1.06	-1.31
24	CPT2	1.16	-1.23	-2.65	1.39	-1.26
25	DDB2	-1.64	-2.69	-1.84	-1.94	5.96

26	DDIT3	8.11	3.08	3.23	8.86	26.02
27	DKC1	5.02	1.47	2.32	1.69	1.73
28	DSP	2.11	-2.88	-56.57	2.27	1.24
29	E2F4	1.12	1.32	1.51	1.61	-1.05
30	EPO	2.90	1.47	1.82	1.80	2.50
31	ERCC3	1.14	1.26	-1.05	1.89	1.96
32	ERCC5	1.89	1.32	-1.03	4.38	3.93
33	ETS2	1.74	-1.09	-1.63	2.14	1.92
34	FASLG	2.90	1.47	1.82	1.80	-1.91
35	FGF2	7.18	1.68	1.00	1.36	-2.96
36	FLT1	2.90	-3.25	1.82	4.69	-2.08
37	FOXC2	-1.59	1.47	1.82	-1.70	9.12
38	G6PD	1.00	-1.44	-1.14	-2.19	1.32
39	GADD45G	2.90	1.47	1.82	1.80	1.21
40	GP2	-1.29	-1.12	-2.31	-1.57	1.81
41	GSC	2.90	1.47	1.82	1.80	2.50
42	HMOX1	7.00	23.76	10.07	3.42	21.58

43	IGFBP3	1.36	-1.12	1.09	2.24	1.43
44	IGFBP5	-4.69	-9.43	-16.10	-22.21	2.42
45	IGFBP7	1.43	-1.46	1.72	-1.76	1.16
46	KDR	-1.76	1.47	-4.35	1.80	-1.80
47	KRT14	-1.33	2.62	5.21	1.80	1.75
48	LDHA	-1.45	-2.45	-1.14	1.13	1.61
49	LIG4	3.33	1.62	-1.96	1.88	1.48
50	LPL	5.24	-4.64	-2.21	1.80	3.76
51	MAP2K1	1.28	1.15	2.39	3.87	3.36
52	MAP2K3	2.59	2.04	2.14	2.99	-1.33
53	MAPK14	-1.05	-1.57	-1.22	1.38	2.47
54	MCM2	1.34	1.11	-1.73	1.31	1.22
55	MKI67	-1.55	1.03	-1.69	-1.87	1.13
56	NOL3	1.12	-3.18	-1.25	1.45	1.25
57	OCN	1.44	-2.48	4.07	1.74	2.15
58	PFKL	-1.13	-1.81	1.21	1.67	1.64
59	PGF	1.75	-1.57	-1.04	1.65	-1.83

60	PINX1	-1.69	-1.85	-18.59	2.04	-2.73
61	POLB	1.11	-1.93	-1.70	-1.01	1.23
62	PPP1R15A	5.22	2.48	-1.21	6.14	45.75
63	SERPINB2	7.77	13.44	1.82	9.34	-1.33
64	SERPINF1	7.41	-1.03	-1.96	1.80	1.79
65	SKP2	-1.61	-1.32	-1.41	-1.44	-1.18
66	SLC2A1	-1.84	-2.25	1.85	-1.42	1.50
67	SNAI1	2.90	-8.64	-1.43	-1.42	2.37
68	SNAI2	1.51	11.87	-12.22	1.26	1.19
69	SNAI3	2.90	-1.63	1.82	1.80	-2.20
70	SOD1	1.50	-1.90	-1.27	-1.16	1.01
71	SOX10	2.90	2.36	1.82	2.46	1.79
72	STMN1	-1.42	-1.62	-1.92	-4.37	-374.29
73	TBX2	2.90	-1.57	2.11	2.10	-1.23
74	TEK	2.90	1.47	-1.22	1.80	1.37
75	TEP1	2.41	1.76	2.03	1.56	2.09
76	TERF1	1.11	-2.00	-1.14	1.58	-1.26

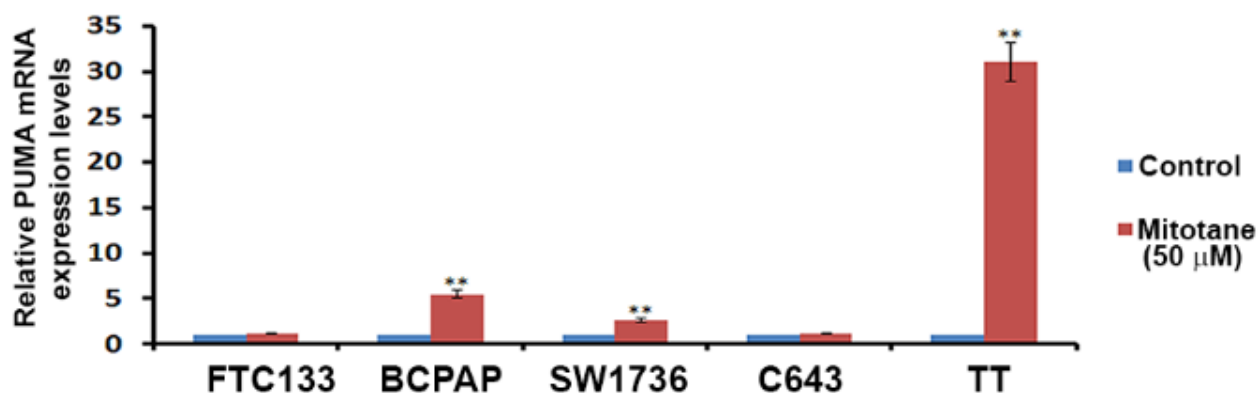
77	TERF2IP	4.01	1.84	1.60	3.53	3.21
78	TINF2	-1.38	-1.03	-1.04	1.38	-1.63
79	TNKS	1.01	-1.42	-2.57	1.68	2.04
80	TNKS2	1.15	1.09	1.45	1.86	4.21
81	UQCRFS1	1.74	-1.05	-1.80	1.35	1.71
82	VEGFC	1.21	2.13	-1.48	4.30	-2.86
83	WEE1	-1.18	-1.14	-1.41	1.11	6.83
84	XIAP	1.05	2.03	-1.47	1.48	-40.74

Τα ονόματα των γονιδίων παρουσιάζονται εδώ: 1- ATP citrate lyase; 2- Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4; 3-Adrenomedullin; 4-Angiotensin 1; 5- Angiotensin 2; 6- Apoptotic peptidase activating factor 1; 7-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; 8-ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle; 9- Aurora kinase A; 10-BCL2-like 11 (apoptosis facilitator); 11- Baculoviral IAP repeat containing 3; 12- BMI1 polycomb ring finger oncogene; 13- Carbonic anhydrase IX; 14- Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase; 15- Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase; 16- Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase; 17- Chemokine (C-C motif) ligand 2; 18- Cyclin D2; 19- Cyclin D3; 20- Cell division cycle 20 homolog (*S. cerevisiae*); 21- Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal); 22- CASP8 and FADD-like apoptosis regulator; 23- Cytochrome c oxidase subunit Va; 24- Carnitine palmitoyltransferase 2; 25- Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa; 26- DNA-damage-inducible transcript 3; 27- Dyskeratosis congenita 1, dyskerin; 28- Desmoplakin; 29- E2F transcription factor 4, p107/p130-binding; 30- Erythropoietin; 31- Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing); 32- Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5; 33- V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian); 34- Fas ligand (TNF superfamily, member 6); 35- Fibroblast growth factor 2 (basic);

36- Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor); 37- Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1); 38- Glucose-6-phosphate dehydrogenase; 39- Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma; 40- Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial); 41- Goosecoid homeobox; 42- Heme oxygenase (decycling) 1; 43- Insulin-like growth factor binding protein 3; 44- Insulin-like growth factor binding protein 5; 45- Insulin-like growth factor binding protein 7; 46- Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase); 47- Keratin 14; 48- Lactate dehydrogenase A; 49- Ligase IV, DNA, ATP-dependent; 50- Lipoprotein lipase; 51- Mitogen-activated protein kinase kinase 1; 52- Mitogen-activated protein kinase kinase 3; 53- Mitogen-activated protein kinase 14; 54- Minichromosome maintenance complex component 2; 55- Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67; 56- Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain); 57- Occludin; 58- Phosphofructokinase, liver; 59- Placental growth factor; 60- PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1; 61- Polymerase (DNA directed), beta; 62- Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A; 63- Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2; 64- Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1; 65- S-phase kinase-associated protein 2 (p45); 66- Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1; 67- Snail homolog 1 (Drosophila); 68- Snail homolog 2 (Drosophila); 69- Snail homolog 3 (Drosophila); 70- Superoxide dismutase 1, soluble; 71- SRY (sex determining region Y)-box 10; 72- Stathmin 1; 73- T-box 2; 74- TEK tyrosine kinase, endothelial; 75- Telomerase-associated protein 1; 76- Telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1; 77- Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein; 78- TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2; 79- Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase; 80- Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2; 81- Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1; 82- Vascular endothelial growth factor C; 83- WEE1 homolog (S. pombe); 84- X-linked inhibitor of apoptosis.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η Μιτοτάνη προκάλεσε σημαντική μείωση στην έκφραση του αναστολέα της απόπτωσης (XIAP γονίδιο) στα TT κύτταρα, αλλά όχι και στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές. Ως εκ τούτου κάναμε επιπλέον πειράματα για να αποσαφηνίσουμε την επίδραση της Μιτοτάνης στα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση. Εξετάσαμε την έκφραση των δεικτών απόπτωσης (NOXA και PUMA) μέσω της RT-PCR. Η έκφραση του NOXA δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη Μιτοτάνη στα FTC133, BCPAP, SW1736, και C643 κύτταρα

αλλά αυξήθηκε στα TT κύτταρα κατά 4,28 φορές. Μετά την έκθεση στη Μιτοτάνη, τα επίπεδα mRNA του PUMA δεν επηρεάστηκαν σημαντικά στα FTC133 και C643 κύτταρα, αλλά αυξήθηκαν σημαντικά στα BCPAP, SW1736 και TT κύτταρα κατά 5,5-, 2,6- και 31,5- φορές, αντίστοιχα.



Σχήμα 2.3.5.2: Η θεραπεία με Μιτοτάνη αυξάνει τα επίπεδα mRNA του προ-αποπτωτικού γονιδίου PUMA σε θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη (BCPAP και SW1736), καθώς και στα TT κύτταρα που προέρχονται από το μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς. Οι αλλαγές παρουσιάζονται στο παραπάνω Σχήμα (σε σύγκριση με τα controls που πάντα βρίσκονται στο 1. **P value <0.01).

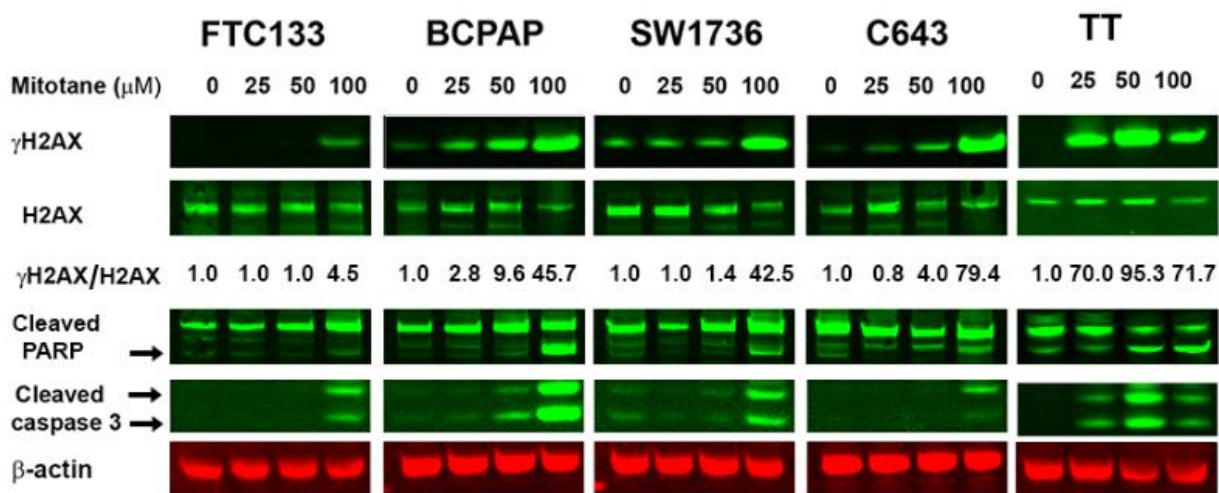
Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η έκθεση στη Μιτοτάνη προκαλεί αλλαγές στο επίπεδο του mRNA των γονιδίων που ελέγχουν την κυτταρική απόκριση στο stress, τη βλάβη στο DNA και την απόπτωση.

2.3.6 Η Μιτοτάνη προκαλεί βλάβη στο DNA και απόπτωση στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η τοξικότητα της μιτοτάνης στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με βλάβη στο DNA και απόπτωση, κάναμε Western Blot χρησιμοποιώντας

αντι- γ H2AX και αντι- ενεργοποιημένης κασπάσης-3 αντισώματα. Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, η θεραπεία με Μιτοτάνη προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του γ H2AX με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η αύξηση της έκφρασης του γ H2AX ήταν πιο έντονη στα BCPAP, SW1736, και TT κύτταρα, σε σχέση με τα FTC133 και τα C643 κύτταρα.

Η θεραπεία με Μιτοτάνη επίσης προκάλεσε μια αύξηση στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Στα TT κύτταρα, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 ανιχνεύτηκε μετά από έκθεση στη Μιτοτάνη σε συγκέντρωση 25 μ M για 24 ώρες. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 ανιχνεύτηκε στις κυτταρικές σειρές που είναι BRAF-θετικές (BCPAP και SW1736) μετά από θεραπεία με μιτοτάνη 50 μ M για 24 ώρες, και σε όλες τις κυτταρικές σειρές μετά από έκθεση στη μιτοτάνη σε συγκέντρωση 100 μ M για 24 ώρες.



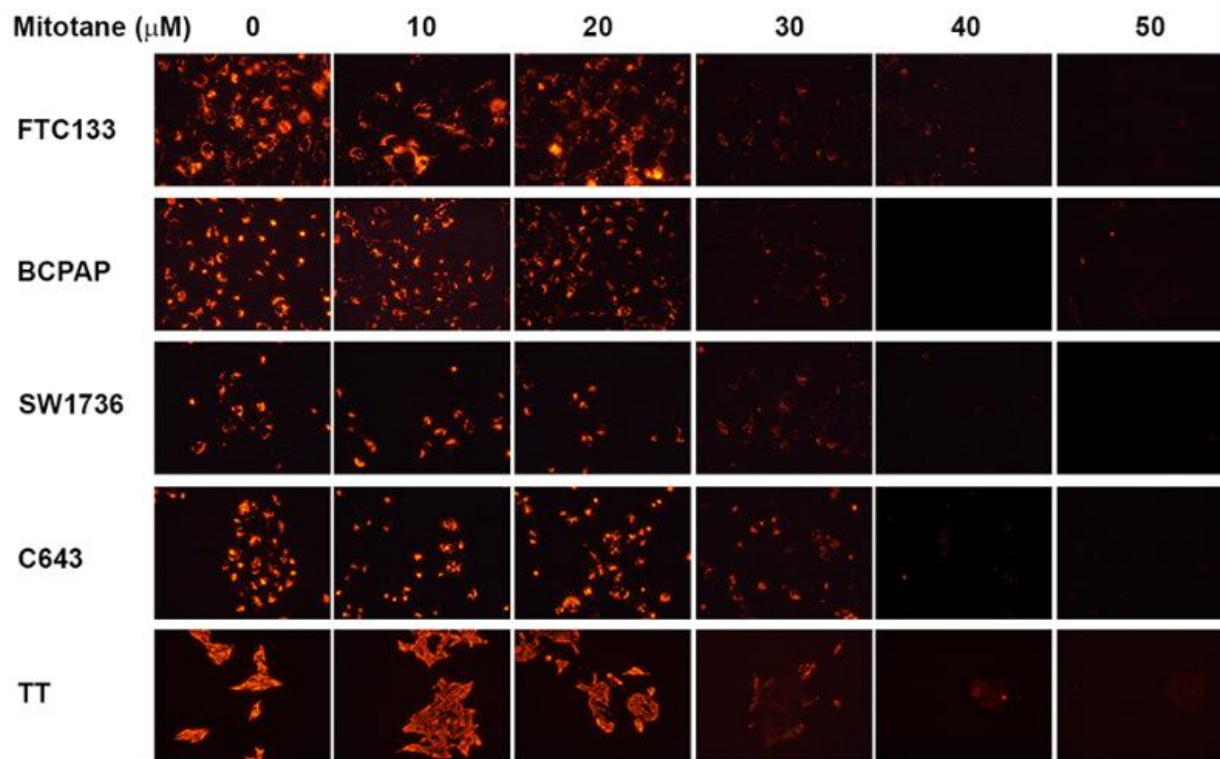
Σχήμα 2.3.6.1: Η θεραπεία με Μιτοτάνη προκαλεί βλάβη στο DNA με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο που είναι μοναδικός για κάθε κυτταρική σειρά στις 24 ώρες, όπως φαίνεται στο παραπάνω Σχήμα με την αύξηση έκφρασης του γ H2AX στη Western Blot. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν την ποσοτικοποίηση για τις πρωτεϊνικές μάντες (γ H2AX/H2AX στα κύτταρα που υπέστησαν θεραπεία με Μιτοτάνη προς το γ H2AX/H2AX στα control κύτταρα). Η θεραπεία με Μιτοτάνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο που είναι μοναδικός για κάθε κυτταρική σειρά στις 24 ώρες, όπως φαίνεται από την παραπάνω Western Blot και τους δείκτες cleaved PARP και

cleaved caspase-3. Τα κύτταρα TT ήταν τα πιο ευαίσθητα στη θεραπεία με Μιτοτάνη, όπως φαίνεται από την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 στις 24ώρες στα 25 μM .

Συνδυαστικά, τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η θεραπεία με μιτοτάνη προκαλεί βλάβη στο DNA και απόπτωση στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα, ειδικά σε εκείνα που φέρουν τις μεταλλάξεις BRAF και RET.

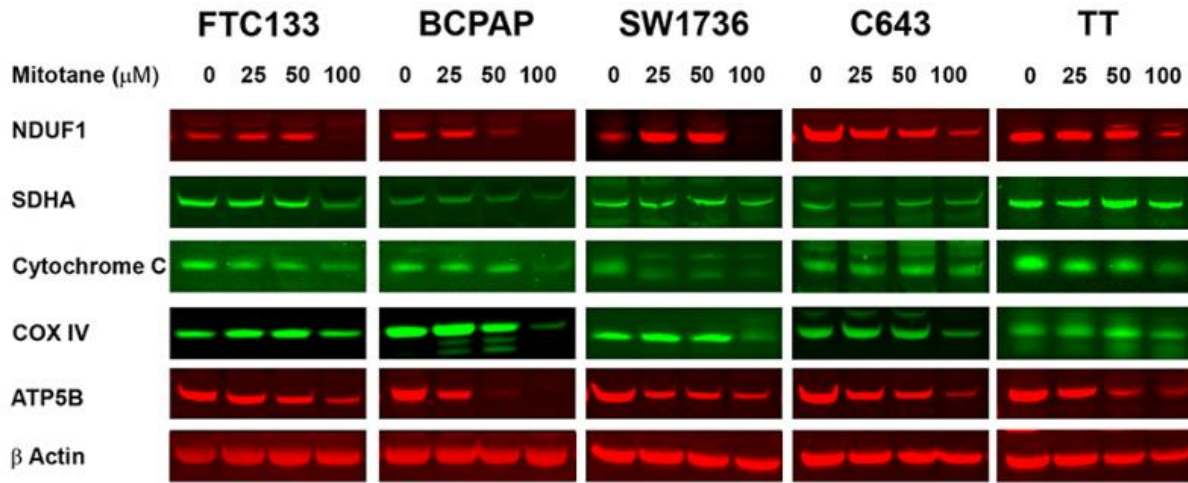
2.3.7 Η Μιτοτάνη επηρεάζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία και την έκφραση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών

Τα μιτοχόνδρια παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης, και πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει την επίδραση της Μιτοτάνης στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Ως εκ τούτου, εξετάσαμε το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε θυρεοειδικές κυτταρικές σειρές μετά από θεραπεία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μιτοτάνης (από 10 ως 50 μM). Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, η θεραπεία με μιτοτάνη προκάλεσε μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση της χρώσης JC-1, που είναι ενδεικτικό της προοδευτικής απώλειας της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Θεραπεία με Μιτοτάνη σε συγκέντρωση 30 μM ήταν αρκετή για να προκαλέσει αναστολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε όλες τις εξετασθείσες θυρεοειδικές καρκινικές σειρές.



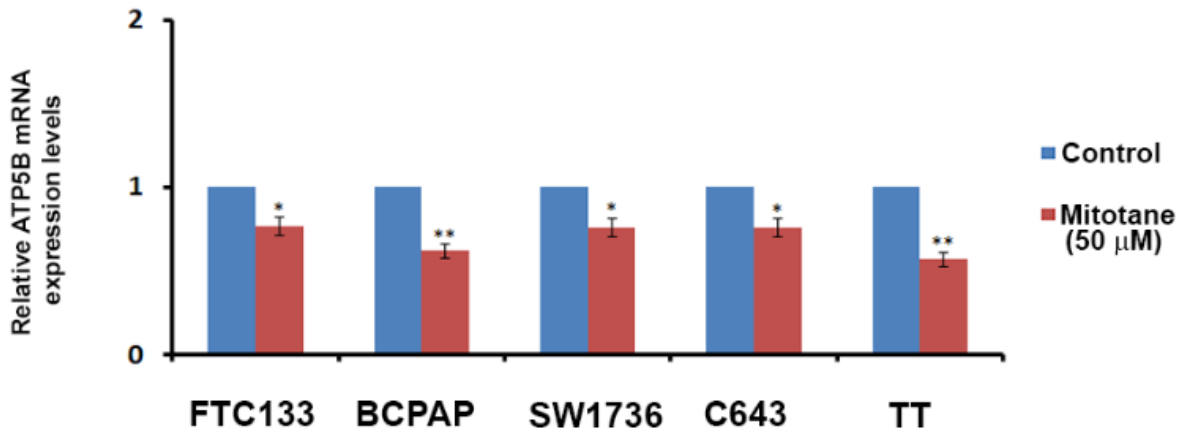
Σχήμα 2.3.7.1: Τα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μιτοτάνη (0-50 μM) και υπέστησαν χρώση με JC-1. Η θεραπεία με Μιτοτάνη προκάλεσε μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση στη χρώση με JC-1, που ήταν ενδεικτική της προοδευτικής απώλειας της μιτοχονδριακής δραστηριότητας. Η θεραπεία με Μιτοτάνη (30 μM) προκάλεσε μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε όλες τις καρκινικές σειρές που εξετάστηκαν.

Επίσης, εξετάσαμε τα επίπεδα πρωτεΐνης των μιτοχονδριακών μορίων μέσω της Western Blot με αντισώματα κατά του NDUFA1 (σύμπλεγμα 1), SDHA (σύμπλεγμα 2), cytochrome c (σύμπλεγμα 3-4), COX4 (σύμπλεγμα 4) and ATP5B (σύμπλεγμα 5). Στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα, η μιτοτάνη μείωσε τα επίπεδα της πρωτεΐνης των μορίων που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, που ήταν διαφορετικός ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα. Σε όλες τις εξετασθείσες κυτταρικές σειρές, η έκθεση στη Μιτοτάνη (50 μM) οδήγησε στη μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης του ATP5B.



Σχήμα 2.3.7.2: Η έκφραση των μιτοχondριακών μορίων μέσω πειραμάτων Western blot με anti-NDUFA1 (σύμπλεγμα 1), SDHA (σύμπλεγμα 2), anti-cytochrome c, anti-COX4 (σύμπλεγμα 4) and ATP5B (σύμπλεγμα 5) σε όλες τις θυρεοειδικές κυτταρικές σειρές μετά τη θεραπεία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Μιτοτάνης (0-100 μM) για 24-48 ώρες. Η Μιτοτάνη προκάλεσε μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών που ελέγχουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Επιπλέον, μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA του ATP5B μέσω qRT-PCR σε κύτταρα control και κύτταρα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μιτοτάνη. Η θεραπεία με Μιτοτάνη (50 μM για 24 ώρες) προκάλεσε μείωση της μετάφρασης του ATP5B στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα. Στα FTC133, BCPAP, SW1736, C643 και TT κύτταρα, τα επίπεδα του mRNA μειώθηκαν κατά 0,71-, 0,62-, 0,7-, 0,8- και 0,58- φορές, αντίστοιχα.



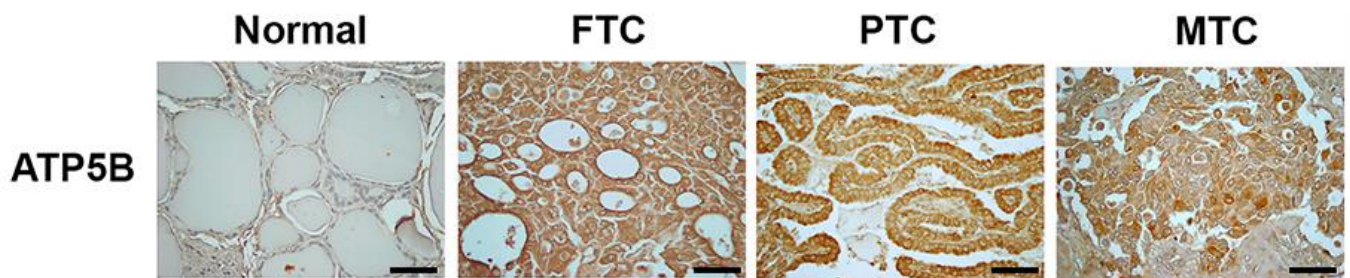
Σχήμα 2.3.7.3: Η επίδραση της Μιτοτάνης στο επίπεδο mRNA ATP5B στα καρκινικά θυρεοειδικά κύτταρα. Τα σχετικά mRNA επίπεδα του ATP5B υπέστησαν νορμαλοποίηση σε σχέση με τα επίπεδα mRNA του 18s. Η θεραπεία με Μιτοτάνη (50μΜ για 24 ώρες) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του ATP5B mRNA, με την πιο σημαντική μείωση να καταγράφεται στα κύτταρα TT. Οι αλλαγές παρουσιάζονται στο παραπάνω Σχήμα με τα controls να είναι πάντα στο 1. (*P <0.05 και **P <0.01).

Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η Μιτοτάνη στοχεύει τα μιτοχόνδρια στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα, και ότι η εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι ένα σύνηθες γεγονός μετά από την έκθεση σε Μιτοτάνη.

2.3.8 Η έκφραση του ATP5B σε ανθρώπινους καρκίνους του θυρεοειδή

Εφόσον τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα της Μιτοτάνης συσχετίστηκαν με μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης ATP5B σε θυρεοειδικές καρκινικές σειρές, στη συνέχεια εξετάσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης ATP5B σε δείγματα ανθρώπινων θυρεοειδικών ιστών. Ανοσοχρώση αντι-ATP5B πραγματοποιήθηκε σε 100 δείγματα ανθρώπινων θυρεοειδικών ιστών: 10 φυσιολογικού θυρεοειδή, 20 από θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς, 44 από θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς, 6 από μη διαφοροποιημένους καρκίνους του θυρεοειδή και 20 από μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

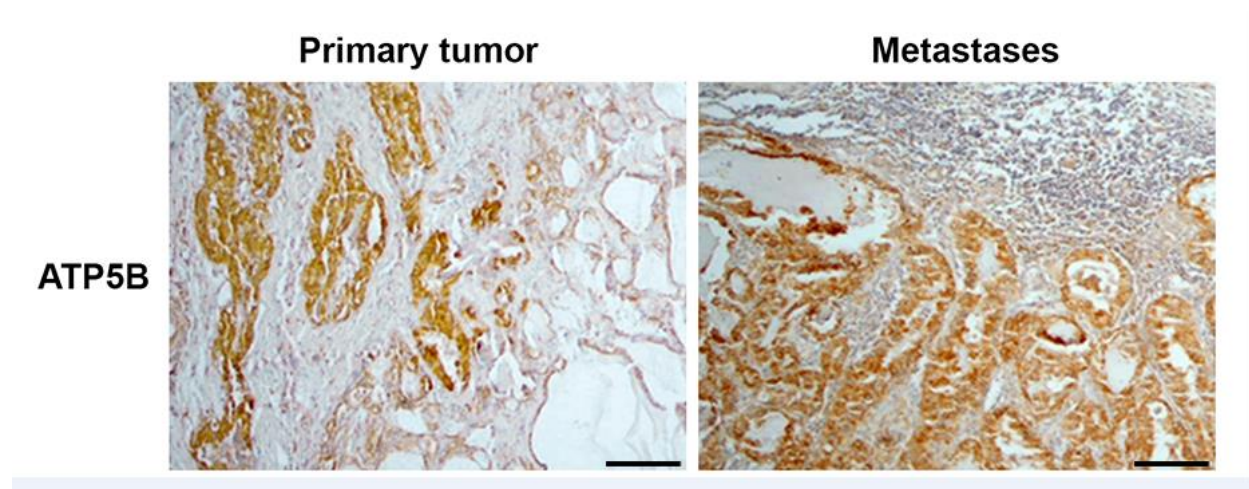
Έκφραση του ATP5B ανιχνεύτηκε στο κυτταρόπλσμα των φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων. Σε σχέση με το φυσιολογικό θυρεοειδή, η έκφραση του ATP5B ήταν αυξημένη σε 6/20 (30%) από τα θυλακιώδη, 29/44 (65%) από τα θηλώδη, 2/6 (33%) από τα μη διαφοροποιημένα, και 16/20 (80%) από τα μυελοειδή καρκινώματα, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα. Η ένταση της χρώσης με αντι-ATP5B ήταν σημαντικά αυξημένη στους καρκίνους σε σχέση με το φυσιολογικό θυρεοειδή ($p=0.001$). Δεν ανιχνεύσαμε σημαντικές συσχετίσεις του επιπέδου έκφρασης του ATP5B με το φύλο των ασθενών, το μέγεθος του όγκου, ή την παρουσία μεταστάσεων τη στιγμή της θυρεοειδεκτομής. Η ένταση της χρώσης με αντι-ATP5B δεν ήταν σημαντικά διαφορετική ανάμεσα στα θυλακιώδη, θηλώδη και μη διαφοροποιημένα καρκινώματα, αλλά ήταν σημαντικά υψηλότερη στα μυελοειδή καρκινώματα σε σχέση με τους άλλους όγκους ($p=0.001$).



Σχήμα 2.3.8.1: Ανοσοϊστοχημεία με αντι-ATP5B που δείχνει σχεδόν μηδαμινή έκφραση του ATP5B σε δείγματα φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού, σε σχέση με την έντονη, ομοιογενή, κυτταροπλασματική έκφραση του ATP5B σε δείγματα ιστού από θυλακιώδη, θηλώδη και μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς. Η μεγέθυνση για τις εικόνες είναι x400. Για λόγους σύγκρισης μεγέθους η μπάρα κάτω δεξιά αντιπροσωπεύει 100 μΜ.

Εξετάσαμε στη συνέχεια τα επίπεδα mRNA του ATP5B σε 16 θυρεοειδικούς όγκους (12 θηλώδη, 3 θυλακιώδη και 1 μυελοειδές). Τα επίπεδα του mRNA δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά ανάμεσα στα καρκινικά δείγματα και στον αντίστοιχο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό. Η ανάλυση του mRNA του ATP5B σε 5 περιπτώσεις από μεταστάσεις σε λεμφαδένες έδειξε ότι τα επίπεδα του mRNA δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά ανάμεσα στα δείγματα από τη μετάσταση και σε εκείνα από το πρωτοπαθές καρκίνωμα.

Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της ανοσόχρωσης με αντι-ATP5B στους όγκους και στον αντίστοιχο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό δε συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα από τη RT-PCR. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του ATP5B ήταν υψηλότερα σε 5/12 θηλώδη, 1/3 θυλακιώδη και 1/1 μυελοειδές σε σχέση με το αντίστοιχο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό. Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, υψηλά επίπεδα χρώσης ανιχνεύτηκαν στα καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι και στον γειτνιάζοντα φυσιολογικό θυρεοειδή. Η θετική χρώση με αντι-ATP5B επίσης βρέθηκε σε μεταστατικούς όγκους και η ένταση της χρώσης δε διέφερε από τους αντίστοιχους πρωτοπαθείς όγκους.



Σχήμα 2.3.8.2: Ανοσοϊστοχημεία με αντι-ATP5B που δείχνει σχεδόν έκφραση του ATP5B σε πρωτοπαθές θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδή και στην αντίστοιχη λεμφαδενική Η μεγέθυνση για τις εικόνες είναι x100. Για λόγους σύγκρισης μεγέθους η μπάρα κάτω δεξιά αντιπροσωπεύει 100 μΜ.

Τέλος, χρησιμοποιήσαμε το UCSC Xena (<https://xenabrowser.net/heatmap/>) για να αναλύσουμε τα γενετικά δεδομένα και να ερευνήσουμε αν υπάρχει συσχετισμός ανάμεσα στην έκφραση του ATP5B και την κλινική πρόγνωση. Ωστόσο, η ανάλυση αυτή δεν ανέδειξε κανένα συσχετισμό ανάμεσα στα επίπεδα του mRNA του ATP5B στους καρκίνους του θυρεοειδή και την πιθανότητα επιβίωσης (δεδομένα δεν εμφανίζονται).

2.4 Συμπεράσματα/Συζήτηση

Όπως έχει συζητηθεί εκτενώς σε όλη τη διδακτορική διατριβή, η χρησιμοποίηση θεραπευτικών παραγόντων για ένα καινούριο καρκινικό στόχο αποτελεί ένα τρόπο για να επιταχύνουμε την εφαρμογή των ερευνητικών προσπαθειών σε κλινική πράξη. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η Μιτοτάνη μελετήθηκε ως μια νέα θεραπεία ενάντια στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη που έδειξε ότι η Μιτοτάνη είναι αποτελεσματική ενάντια στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας έδειξαν ότι η Μιτοτάνη είναι τοξική για τα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα. Δείξαμε ότι η τοξικότητα που προκαλείται από τη Μιτοτάνη εμπλέκει πολλαπλούς μηχανισμούς, όπως το stress στο ενδοπλασματικό δίκτυο, την καταστολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τη βλάβη στο DNA, και την απόπτωση. Επίσης, παρέχουμε δεδομένα ότι ένας από τους μοριακούς στόχους της Μιτοτάνης, το μιτοχονδριακό ένζυμο ATP5B, φαίνεται να έχει υπερ-έκφραση στον καρκίνο του θυρεοειδούς στον άνθρωπο.

Η χρησιμοποίηση του θεραπευτικού παράγοντα για νέο στόχο είναι εφικτή μόνο εφόσον δειχτεί ότι το φάρμακο είναι αποτελεσματικό και ασφαλές στις δόσεις που χρησιμοποιείται ήδη στην κλινική πράξη. Η προτεινόμενη δοσολογία της Μιτοτάνης είναι 14-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Berruti et al. 2012, Schteingart et al. 2005). Ορισμένες έρευνες έχουν δείξει ότι η αποτελεσματικότητα της Μιτοτάνης συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του φαρμάκου στον ορό, με τις συγκεντρώσεις που είναι ίσες ή υψηλότερες από 14 mcg/mL να προβλέπουν επιμήκυνση της ζωής του ασθενούς και καλύτερη απόκριση στη θεραπεία (Haak et al. 1994, Hermsen et al. 2011, van Slooten et al. 1984). Φαρμακοκινητικές μελέτες έχουν δείξει ότι η θεραπευτική δοσολογία των 14 mcg/mL (που είναι αντίστοιχο των 50 μM) επιτυγχάνεται μόνο σε περίπου 50% των ασθενών με καρκίνο των επινεφριδίων, και για αυτό το λόγο ορισμένοι ειδικοί χρησιμοποιούν το θεραπευτικό εύρος των 10 με 30 mcg/mL , καθώς αυτό έχει δειχτεί ότι αποτελεί το μοναδικό παράγοντα που σχετίζεται με απόκριση στην αντι-καρκινική θεραπεία (Baudin et al. 2015).

Στην παρούσα μελέτη, τα πειράματα πολλαπλασιασμού και βιωσιμότητας των κυττάρων έδειξαν ότι η Μιτοτάνη είναι τοξική για τα καρκινικά θυρεοειδικά κύτταρα. Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν την τοξικότητα της Μιτοτάνης σε κύτταρα από καρκίνο των επινεφριδίων (Lehmann et al. 2013), αλλά και από καρκίνους του μαστού, πνεύμονα και παχέος εντέρου (Waszut et al. 2017). Στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε, χαμηλές συγκεντρώσεις Μιτοτάνης ήταν αρκετές για να προκαλέσουν ενδοπλασματικό stress, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις η Μιτοτάνη προκάλεσε βλάβη στο DNA και απόπτωση. Αυτά τα ευρήματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση ασβεστίου, το οποίο με τη σειρά του θα σηματοδοτήσει την έναρξη της απόπτωσης (Pinton et al. 2008). Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η Μιτοτάνη

προκάλεσε stress του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω της αναστολής του Sterol-O-Acyl/Acyl-coenzyme A Transferase 1 (SOAT1/ACAT1), το οποίο με τη σειρά του οδήγησε σε απόπτωση (Sbiera et al. 2015). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία είναι παρόμοια με τα δεδομένα από μικροσκοπηση που δείχνουν την τοξικότητα της Μιτοτάνης σε κύτταρα από επινεφριδιακό καρκίνο (κυτταροπλασματικά κενोटόπια, κυτταρική συρρίκνωση, μερική κυτταρική αποκόλληση) (Fang 1979).

Στη βιβλιογραφία υπάρχει ένας αυξανόμενος όγκος δεδομένων που δείχνει ότι η τοξικότητα της Μιτοτάνης σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια. Έχει περιγραφεί ότι η Μιτοτάνη μπορεί να προκαλέσει βλάβη στη μιτοχονδριακή αλυσίδα με την αναστολή του cytochrome c oxidase (COX), και πιο συγκεκριμένα των υπομονάδων 2 και 4I1 (COX2 and COX4I1) (Hescot et al. 2013). Η θεραπεία με Μιτοτάνη επίσης προκάλεσε αλλαγές στην έκφραση άλλων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, όπως οι ATPase family AAA domain containing 3A(ATAD3A), translocator protein/peripheral-type benzodiazepine receptor (TSPO) και dynamin 1 like (DNM1L) (SIGMAR1) (Hescot et al. 2017). Έχει προταθεί ότι η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS – reactive oxygen species) μπορεί να λειτουργήσει ως αγγελιοφόρος μεταξύ των μιτοχονδρίων, και να οδηγήσει σε εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και περαιτέρω απελευθέρωση ROS, και τελικά να προκαλέσει καθολική εκπόλωση εάν ο προκλητικός παράγοντας δεν απομακρυνθεί (Whelan et al. 2013).

Στην παρούσα μελέτη, δείξαμε ότι το πρωταρχικό γεγονός μετά την έναρξη θεραπείας με Μιτοτάνη ήταν η αναστολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 30 μM , που ήταν αρκετά χαμηλότερη από τη χρησιμοποιούμενη δόση στην κλινική πράξη για τον καρκίνο των επινεφριδίων (περί τα 50 μM), που δείχνει ότι η Μιτοτάνη μπορεί να είναι αποτελεσματική κατά του καρκίνου του

θυρεοειδούς σε συγκεντρώσεις που είναι κλινικά επιτεύξιμες. Τα αποτελέσματά μας από τις Western Blot και την ανοσοϊστοχημεία έδειξαν ότι τα ένζυμα της μιτοχονδριακής αλυσίδας είναι ξεκάθαροι στόχοι της Μιτοτάνης. Η τοπικοποίηση των μιτοχονδρίων άλλαξε σημαντικά μετά από την έκθεση των κυττάρων στη Μιτοτάνη, όπως φαίνεται από τη χρώση με JC1, γεγονός το οποίο συνάδει με τα αποτελέσματα που περιγράψαμε σε κύτταρα επινεφριδιακού καρκίνου. Τα κύτταρα από επινεφριδιακό καρκίνο που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Μιτοτάνη παρουσιάζουν ένα πιο διάτρητο μοτίβο στο μιτοχονδριακό διαμέρισμα, το οποίο θα μπορούσε να έχει προέλθει από μια δυσαναλογία ανάμεσα στη μιτοχονδριακή σχάση και σύντηξη (Chen et al. 2010, Hescot et al. 2013).

Ένα άλλο πολύ ενδιαφέρον στοιχείο της τρέχουσας εργασίας είναι η διαφορική απόκριση των διάφορων κυτταρικών σειρών στη θεραπεία με Μιτοτάνη. Τα BCPAP, SW1736, και TT κύτταρα ήταν τα πιο ευαίσθητα στη μιτοτάνη. Αυτές οι κυτταρικές σειρές χαρακτηρίζονται από τη στοιχειώδη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK/ERK ως αποτέλεσμα της BRAF (BCAP και SW1736 κύτταρα) ή της RET (TT κύτταρα) μετάλλαξης. Μία από τις πιο σημαντικές ερωτήσεις που θα πρέπει να απαντηθεί είναι εάν οι μεταλλάξεις στον καρκίνο του θυρεοειδούς παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση στη Μιτοτάνη. Θα είναι επίσης πολύ σημαντικό να καθοριστεί εάν τα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα που είναι πλούσια σε μιτοχόνδρια, όπως τα Hürthle καρκινώματα του θυρεοειδούς, θα είναι πιο ευαίσθητα στη θεραπεία με Μιτοτάνη.

Εφόσον τα *in vitro* δεδομένα που παρουσιάσαμε έδειξαν ότι οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μπορούν να αποτελούν μοριακό στόχο για τη Μιτοτάνη, εξετάσαμε την έκφραση του ATP5B σε ανθρώπινους θυρεοειδικούς καρκινικούς ιστούς. Δείξαμε ότι η έκφραση του ATP5B ήταν περισσότερο αυξημένη στον καρκινικό παρά στο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό, ειδικά στα

δείγματα από το μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς. Το γεγονός αυτό μπορεί να παρέχει μια εναλλακτική εξήγηση στο γιατί τα θυρεοειδικά καρκινικά που προέρχονται από ΜΚΘ (ΤΤ κύτταρα) ήταν τα πιο ευαίσθητα στην επίδραση της Μιτοτάνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η Μιτοτάνη μπορεί δυνητικά να αποτελέσει ένα αποτελεσματικό θεραπευτικό παράγοντα εναντίον του επιθετικού καρκίνου του θυρεοειδούς.

Παρά τη δεδομένη αποτελεσματικότητα στον επινεφριδιακό καρκίνο, η χρήση του φαρμάκου περιορίζεται από το εκτεταμένο προφίλ παρενεργειών. Οι πιο συχνές παρενέργειες είναι γαστρεντερολογικές (ναυτία, έμετος, διάρροια, ανορεξία) και παρουσιάζονται σε έως και 78% των ασθενών (Hutter et al. 1966). Άλλες παρενέργειες περιλαμβάνουν ενδοκρινολογικές (δευτεροπαθής επινεφριδιακή ανεπάρκεια, θυρεοειδική δυσλειτουργία), νευρολογικές (σύγχυση, τρόμος, αταξία) και μεταβολικές (υπερχοληστερολαιμία, υπερχολερυθριναιμία, εξάνθημα) διαταραχές (Veysman et al. 2009, Creemers et al. 2016). Φυσικά, η τοξικότητα στα επινεφρίδια θα οδηγήσει σε ανεπάρκεια κορτιζόλης, που αποτελεί και την πιο κλινικά σημαντική παρενέργεια της Μιτοτάνης.

Η πλειοψηφία των ερευνών στη Μιτοτάνη έχουν γίνει σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από επινεφριδιακό καρκίνο, όπως τα NCI-H295, H295R και τα Fang-8 κύτταρα, ή κύτταρα που προέρχονται από μεταστάσεις στα επινεφρίδια, όπως τα SW-13 κύτταρα. Ωστόσο, σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από επινεφρίδια από σκύλους έχει δειχτεί απώλεια στεροειδογένεσης και κυτταρικός θάνατος μετά από έκθεση σε Μιτοτάνη (Morishita et al. 2001). Λίγες μελέτες έχουν αναφερθεί και στη θυρεοειδική λειτουργία, και έχει δειχτεί ότι η Μιτοτάνη μπορεί να προκαλέσει κεντρικό υποθυρεοειδισμό με την αναστολή των θυρεοτρόφων κυττάρων και τη μειωμένη έκκριση TSH (Zatelli et al. 2010, Russo et al. 2016).

Παρά το γεγονός ότι η Μιτοτάνη παρουσιάζει ένα προφίλ με σημαντικές παρενέργειες, είναι πολύ σημαντικό να αναφέρουμε ότι αυτές είναι διαχειρίσιμες στην κλινική πράξη. Η επινεφριδιακή ανεπάρκεια είναι μακράν η πιο σημαντική παρενέργεια, αλλά μπορεί να αντιμετωπιστεί με θεραπεία υποκατάστασης υδροκορτιζόνης σε υψηλές δόσεις, καθώς η λειτουργία του ενζύμου cytochrome P450 3A4 προάγεται από τη Μιτοτάνη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το γρήγορο μεταβολισμό και την απενεργοποίηση του 50% της δοθείσας υδροκορτιζόνης (Chortis et al. 2013).

Τα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην τρέχουσα μελέτη μπορεί να αντιπροσωπεύουν χρήσιμα μοντέλα για τους αδιαφοροποίητους καρκίνους του θυρεοειδούς (van Staveren et al. 2007). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές οι κυτταρικές σειρές που προέρχονται από διαφοροποιημένους και αδιαφοροποίητους καρκίνους του θυρεοειδή έχουν εξελιχτεί *in vitro* αποκτώντας παρόμοιους φαινότυπους με τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης να τις φέρουν πιο κοντά στους *in vivo* αδιαφοροποίητους καρκίνους (van Staveren et al. 2007, Saiselet et al. 2012).

Υπάρχουν περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς με αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς (Smallridge et al. 2010, 2012). Διάφορες έρευνες έχουν χρησιμοποιήσει μια ποικιλία χημιοθεραπευτικών παραγόντων για τη θεραπεία ασθενών με ΑΚΘ. Οι περισσότερες όμως κατέληξαν ότι η χημειοθεραπεία δε βελτιώνει την επιβίωση των ασθενών. Οι ασθενείς με ΑΚΘ συνήθως έχουν περιορισμένο χρόνο επιβίωσης, και για πολλούς από αυτούς τους ασθενείς, μόνο παρηγορητική θεραπεία μπορεί να προσφερθεί για να αντιμετωπιστούν συμπτώματα όπως ναυτία, πόνος, δύσπνοια, αιμορραγία και κατάθλιψη.

Παρόλο που τα παραπάνω αποτελέσματα της τρέχουσας έρευνας θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν στο πλαίσιο της συζήτησης ανάμεσα στη θεραπευτική ομάδα και τον ασθενή, πιστεύουμε

ότι ασθενείς με πολύ επιθετικούς μυελοειδείς, αδιαφοροποίητους, και αναπλαστικούς καρκίνους του θυρεοειδούς θα μπορούσαν να ωφεληθούν από τη θεραπεία με Μιτοτάνη, λαμβάνοντας υπόψιν το σημαντικό, αλλά διαχειρίσιμο, προφίλ παρενεργειών του φαρμάκου.

Η τρέχουσα μελέτη είναι η πρώτη που δείχνει την *in vitro* αποτελεσματικότητα της Μιτοτάνης εναντίον του καρκίνου του θυρεοειδούς. Ωστόσο, ένας περιοριστικός παράγοντας της τωρινής μελέτης είναι ότι δεν περιλαμβάνει *in vivo* πειράματα σε ένα ζωικό μοντέλο το οποίο θα μπορούσε να προσομοιάσει καλύτερα το ανθρώπινο μακρο-περιβάλλον. Ως επόμενα βήματα, το εργαστήριό μας σκοπεύει να πραγματοποιήσει *in vivo* πειράματα σε ένα ζωικό μοντέλο μεταστατικού καρκίνου του θυρεοειδούς για να ξεκαθαρίσουμε τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα της Μιτοτάνης. Επιπλέον, στις μελλοντικές μελέτες μας σκοπεύουμε να πραγματοποιήσουμε μια πιο άμεση αξιολόγηση της λειτουργικής μιτοχονδριακής δραστηριότητας σε θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα καθώς στην τωρινή μελέτη δείξαμε ότι η Μιτοτάνη προκαλεί αλλαγές στην έκφραση διάφορων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Επίσης σκοπεύουμε να ερευνήσουμε την υπόθεση ότι η Μιτοτάνη είναι πιο αποτελεσματική απέναντι στα κύτταρα που στηρίζονται περισσότερο σε οξειδωτική φωσφορυλίωση παρά στη γλυκόλυση.

Συνοπτικά, τα πειράματα που παρουσιάζονται στην τωρινή μελέτη δείχνουν ότι η Μιτοτάνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, προάγει την απόπτωση, και προκαλεί βλάβη στο DNA στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα. Η μιτοτάνη επίσης προκαλεί stress ενδοπλασματικού δικτύου και μειώνει την έκφραση των ενζύμων της μιτοχονδριακής μεμβράνης, και ειδικά του ATP5B. Με βάση αυτά τα ευρήματα, προτείνουμε ότι η Μιτοτάνη, ένα φάρμακο που ήδη χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη για τον επινεφριδιακό καρκίνο, μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί και εναντίον του επιθετικού καρκίνου του θυρεοειδή και περαιτέρω κλινικές μελέτες θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πάνω στο αντικείμενο.

2.5 Βιβλιογραφία

- Ahn HS, Kim HJ and Welch HG 2014 Korea's thyroid-cancer "epidemic"--screening and overdiagnosis. *New Eng J Med* 371: 1765-1767
- Baudin E and Endocrine Tumor Board of Gustave R 2015 Adrenocortical carcinoma. *Endocrinol Metab Clin North Am* 44: 411-434
- Baudry C, Coste J, Bou Khalil R, et al. 2012 Efficiency and tolerance of mitotane in Cushing's disease in 76 patients from a single center. *Eur J Endocrinol* 167: 473-481
- Berruti A, Baudin E, Gelderblom H, et al. 2012 Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 23 Suppl 7: vii131-138
- Bikas A, Vachhani S, Jensen K, Vasko V and Burman KD 2016 Targeted therapies in thyroid cancer: an extensive review of the literature. *Expert Rev Clin Pharmacol*: 1-15
- Chen H and Chan DC 2010 Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann NY Acad Sci* 1201: 21-25
- Chen AY, Jemal A and Ward EM 2009 Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. *Cancer* 115: 3801-3807
- Chortis V, Taylor AE, Schneider P, et al. 2013 Mitotane therapy in adrenocortical cancer induces CYP3A4 and inhibits 5 α -reductase, explaining the need for personalized glucocorticoid and androgen replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 98:161-71
- Creemers SG, Hofland LJ, Korpershoek E, et al. 2016 Future directions in the diagnosis and medical treatment of adrenocortical carcinoma. *Endocr Rel Cancer* 23: R43-69
- Fang VS 1979 Cytotoxic activity of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (mitotane) and its analogs on feminizing adrenal neoplastic cells in culture. *Cancer Res* 39: 139-145
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. 2015 Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136: E359-386
- Haak HR, Hermans J, van de Velde CJ, et al. 1994 Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients. *Br J Cancer* 69: 947-951
- Henley DJ, van Heerden JA, Grant CS, Carney JA and Carpenter PC 1983 Adrenal cortical carcinoma--a continuing challenge. *Surgery* 94: 926-931

Hermesen IG, Fassnacht M, Terzolo M, et al. 2011 Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study. *J Clin Endocrinol Metabol* 96: 1844-1851

Hescot S, Amazit L, Lhomme M, et al. 2017 Identifying mitotane-induced mitochondria-associated membranes dysfunctions: metabolomic and lipidomic approaches. *Oncotarget* 8: 109924-109940

Hescot S, Slama A, Lombes A, et al. 2013 Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells. *Endocr Relat Cancer* 20: 371-381

Hutter AM, Jr. and Kayhoe DE 1966 Adrenal cortical carcinoma. Clinical features of 138 patients. *The Am J Med* 41: 572-580

Jensen K, Bikas A, Patel A, et al. 2017 Nelfinavir inhibits proliferation and induces DNA damage in thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 24: 147-156

Klubo-Gwiedzinska J, Jensen K, Costello J, et al. 2012 Metformin inhibits growth and decreases resistance to anoikis in medullary thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 19: 447-456

Kushchayeva Y, Jensen K, Burman KD and Vasko V 2014 Repositioning therapy for thyroid cancer: new insights on established medications. *Endocr Relat Cancer* 21: R183-194

Kushchayeva Y, Jensen K, Recupero A, et al. 2014 The HIV protease inhibitor nelfinavir down-regulates RET signaling and induces apoptosis in medullary thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 99: E734-745

Lehmann TP, Wrzesinski T and Jagodzinski PP 2013 The effect of mitotane on viability, steroidogenesis and gene expression in NCIH295R adrenocortical cells. *Mol Medicine Rep* 7: 893-900

Morishita K, Okumura H, Ito N, and Takahashi N 2001 Primary culture system of adrenocortical cells from dogs to evaluate direct effects of chemicals on steroidogenesis. *Toxicology* 165: 171-178

Muresan MM, Olivier P, Leclere J, et al. 2008 Bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 15: 37-49

Nose V 2011 Familial thyroid cancer: a review. *Mod Pathol* 24 Suppl 2: S19-33

Pinton P, Giorgi C, Siviero R, et al. 2008 Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27: 6407-6418

Poli G, Guasti D, Rapizzi E, et al. 2013 Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 20: 537-550

Russo M, Scollo C, Pellegriti G, et al. 2016 Mitotane treatment in patients with adrenocortical cancer causes central hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 84:614-9

Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, et al. 2012 Thyroid cancer cell lines: an overview. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:133

Sbiera S, Leich E, Liebisch G, et al. 2015 Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Endocrinology* 156: 3895-3908

Schlumberger MJ 1998 Papillary and follicular thyroid carcinoma. *New Eng J Med* 338: 297-306

Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, et al. 2005 Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer* 12: 667-680

Sherman SI 2003 Thyroid carcinoma. *Lancet* 361: 501-511

Smallridge RC, Ain KB, Asa SL, et al. 2012 American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. *Thyroid* 22: 1104-1139

Smallridge RC and Copland JA 2010 Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 22: 486-497

Thakur S, Daley B, Gaskins K, et al. 2018 Metformin targets Mitochondrial Glycerophosphate Dehydrogenase (mGPDH) to control Rate of Oxidative Phosphorylation and Growth of Thyroid Cancer In Vitro and In Vivo. *Clin Cancer Res* 24:4030-4043

Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P, et al. 1985 Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 55: 794-804

van Slooten H, Moolenaar AJ, van Seters AP and Smeenk D 1984 The treatment of adrenocortical carcinoma with o,p'-DDD: prognostic implications of serum level monitoring. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20: 47-53

van Staveren WC, Solís DW, Delys L, et al. 2007 Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. *Cancer Res* 67: 8113-20

Veytsman I, Nieman L and Fojo T 2009 Management of endocrine manifestations and the use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma. *J Clin Oncol* 27: 4619-4629

Waszut U, Szyszka P and Dworakowska D 2017 Understanding mitotane mode of action. *J Physiol Pharmacol* 68: 13-26

Whelan SP and Zuckerbraun BS 2013 Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 351613

Williams SD, Birch R and Einhorn LH 1986 Phase II evaluation of doxorubicin plus cisplatin in advanced thyroid cancer: a Southeastern Cancer Study Group Trial. *Cancer Treat Rep* 70: 405-407

Zatelli MC, Gentilin E, Daffara F, et al. 2010 Therapeutic concentrations of mitotane (o,p'-DDD) inhibit thyrotroph cell viability and TSH expression and secretion in a mouse cell line model. *Endocrinology* 151:2453-61

III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τίτλος: ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗΣ ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Συγγραφέας: Αθανάσιος Μπίκας

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί την πιο συχνή ενδοκρινική κακοήθεια. Ο καρκίνος του θυρεοειδή μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε ξεχωριστές ιστολογικές οντότητες, το διαφοροποιημένο, το μυελοειδή και τον αναπλαστικό, που η καθεμία έχει διαφορετική πρόγνωση. Τη χειρότερη πρόγνωση παρουσιάζει ο αναπλαστικός καρκίνος, ενώ ο διαφοροποιημένος (συνήθως) έχει εξαιρετική πρόγνωση. Είναι γεγονός ότι η επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδή αυξάνεται συνεχώς, ενώ αύξηση παρουσιάζουν και οι πιο επιθετικοί όγκοι. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η ανακάλυψη καινούριων θεραπειών.

Η Μετφορμίνη είναι το πιο συχνά συνταγογραφούμενο αντιδιαβητικό φάρμακο, και την τελευταία δεκαετία έχουν δημοσιευτεί πολλές μελέτες για την αντικαρκινική της δράση. Διάφορες αναδρομικές μελέτες ανέφεραν ότι οι διαβητικοί ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με Μετφορμίνη έχουν καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στην πρόληψη και την καταπολέμηση διαφόρων ειδών καρκίνου. Έρευνες που έγιναν *in vitro* μελέτησαν τον αντικαρκινικό μηχανισμό δράσης της Μετφορμίνης, και ανέφεραν ότι κυρίως βασιζόταν στην αύξηση της έκφρασης του AMPK, που είναι ο συντονιστής ενέργειας του κυττάρου, και την αναστολή του mTOR. Κάποιες προκαταρκτικές μελέτες στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι η Μετφορμίνη ήταν αποτελεσματική εναντίον του καρκίνου του θυρεοειδούς. Ωστόσο, η μεγαλύτερη κριτική όλων των *in vitro* μελετών για τη Μετφορμίνη ήταν ότι χρησιμοποιούνταν πολύ υψηλές δόσεις (mM) που δεν ήταν

κλινικά επιτεύξιμες στον ανθρώπινο οργανισμό (όπου η μέγιστη συγκέντρωση είναι 50-100 μM). Για αυτό το λόγο, στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εξερεύνηση μεθόδων για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της Μετοφορμίνης *in vitro*.

Αρχικά, προσπαθήσαμε να τροποποιήσουμε το μεταφορέα της Μετοφορμίνης OCT1 για να αυξήσουμε την ενδοκυττάρια μεταφορά του φαρμάκου. Παρά την ανίχνευση του μεταφορέα, δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στα παθολοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών που εξετάστηκαν, και γι' αυτό το λόγο δεν προχωρήσαμε στη φαρμακολογική στόχευση του OCT1. Το επόμενο βήμα ήταν η στόχευση του μεταβολισμού των κυττάρων, και πιο συγκεκριμένα το μικροπεριβάλλον και η συγκέντρωση γλυκόζης στο μέσο. Τα αρχικά πειράματα έδειξαν ότι η Μετοφορμίνη σε συνθήκες χαμηλής γλυκόζης 5 mM (που αντιστοιχούν σε νορμογλυκαιμικές συνθήκες στον άνθρωπο 100 mg/dl) προκάλεσε όχι μόνο αναστολή του πολλαπλασιασμού των θυρεοειδικών καρκινικών σειρών, αλλά και εμφανή κυτταρικό θάνατο. Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας δεν ήταν επαρκής για να εξηγήσει το φαινόμενο, και ως εκ τούτου, ανακαλύφθηκε ένα σπάνιο είδος κυτταρικού θανάτου, η όγκωση. Η όγκωση είναι μία πολυεπίπεδη διαδικασία κυτταρικού θανάτου, το χαρακτηριστικό της οποίας είναι το κυτταρικό οίδημα, και εφόσον δεν αντιστραφεί η διαδικασία με χορήγηση γλυκόζης, η διάλυση της κυτταρικής μεμβράνης και η νέκρωση. Κεντρικό ρόλο στην όγκωση βρέθηκε ότι παίζει η εξάντληση του ATP, και όπως δείξαμε στην έρευνά μας η ενεργοποίηση του AMPK, γεγονός που ενισχύει την υπάρχουσα αντίληψη ότι η Μετοφορμίνη ασκεί πολλές από τις δράσεις μέσω του μεταβολισμού των κυττάρων.

Έχοντας δείξει ότι η μειωμένη γλυκόζη αυξάνει την αποτελεσματικότητα της Μετοφορμίνης, στη συνέχεια αποδείξαμε ότι η ολική στέρηση γλυκόζης μπορεί να παρουσιάσει ακόμα πιο εντυπωσιακά αποτελέσματα. Στη συνέχεια, στραφήκαμε στο μοριακό μηχανισμό δράσης της Μετοφορμίνης, που ως γνωστόν είναι ένας αναστολέας του συμπλέγματος I της

μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Συνδυάσαμε, λοιπόν, τη Μετοφορμίνη με έναν αναστολέα της γλυκόλυσης (2-deoxy-glucose/2-DG) και δείξαμε ότι ο θεραπευτικός συνδυασμός μπορεί να αυξήσει κατακόρυφα την αποτελεσματικότητα της Μετοφορμίνης. Σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, ο θεραπευτικός συνδυασμός (25 μ M Μετοφορμίνης και 5mM 2DG) προκάλεσε αποπτωτικό θάνατο στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα, αποδεικνύοντας ότι η Μετοφορμίνη μπορεί να είναι αποτελεσματική σε συγκεντρώσεις που είναι κλινικά επιτεύξιμες στον άνθρωπο.

Στη συνέχεια παραγματοποιήσαμε μέσω qRT-PCR και ανοσοϊστοχημείας έναν έλεγχο για να εντοπίσουμε ποια μεταβολικά ένζυμα εμπλέκονται στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Η Πυροσταφυλική Κινάση (PKM) επιλέχθηκε μέσω του screening, και περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι η έκφραση του PKM2 μειώνεται σημαντικά μετά από θεραπεία με Μετοφορμίνη σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την ανοσοϊστοχημεία που έδειξε αυξημένη έκφραση του PKM2 σε επιθετικούς καρκίνους του θυρεοειδούς, μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το PKM2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί δυνητικά ως ένας δείκτης για την απόκριση στη θεραπεία με Μετοφορμίνη ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς.

Στα πειράματα που πραγματοποιήσαμε με τη Μετοφορμίνη, ανακαλύψαμε ότι τα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα η κυτοχρωμική c οξειδάση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του θυρεοειδούς. Η Μετοφορμίνη ως μεταβολικό φάρμακο επηρεάζει τη μιτοχονδριακή ισορροπία, αλλά επίσης στραφήκαμε σε ένα πιο ειδικό αναστολέα της κυτοχρωμικής c οξειδάσης. Η Μιτοτάνη είναι ένας παράγοντας που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου των επινεφριδίων. Μέχρι πρόσφατα δεν ήταν ξεκάθαρος ο μηχανισμός

δράσης της, αλλά πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι μοριακός στόχος της είναι η υπομονάδα 4 της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (COX4). Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε πειράματα με Μιτοτάνη.

Αρχικά δείξαμε ότι η Μιτοτάνη είναι κυτταροτοξική εναντίον των θυρεοειδικών καρκινικών σειρών που προέρχονται από όλους τους ιστολογικούς τύπους (ΔΚΘ, ΜΚΘ, ΑΚΘ). Η Μιτοτάνη ήταν πιο αποτελεσματική εναντίον των κυττάρων που φέρουν τη μετάλλαξη BRAFV600E (BCPAP και SW1736) και των κυττάρων που προέρχονται από ΜΚΘ (ΤΤ). Κυτταρομετρία ροής των κυττάρων έδειξε ότι η Μιτοτάνη προκάλεσε απόπτωση στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα. Ο μηχανισμός δράσης εικάζουμε ότι σχετίζεται με την πρόκληση ενδοκυττάρου stress, όπως φάνηκε από τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε.

Στη συνέχεια εξετάσαμε τη μιτοχονδριακή αλυσίδα, και δείξαμε ότι η θεραπεία με Μιτοτάνη μειώνει το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης καθώς και προκαλεί μεταβολές στην έκφραση των ενζύμων της μιτοχονδριακής μεμβράνης, με κυριότερη τη μείωση της έκφρασης του ATP5B. Τέλος σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας δείξαμε την έκφραση του ATP5B σε καρκίνους του θυρεοειδούς από όλους τους ιστολογικούς τύπους, με το ΜΚΘ να παρουσιάζει την υψηλότερη έκφραση, γεγονός που επιβεβαιώνει τη μεγαλύτερη εξάρτηση των μυελοειδών κυττάρων από τα μιτοχόνδρια, όπως είχε φανεί και στα *in vitro* πειράματα με τα ΤΤ κύτταρα. Φυσικά, η τοξικότητα της Μιτοτάνης περιορίζει τη χρήση της, αλλά σε πειράματα που πραγματοποιήσαμε, η Μιτοτάνη ήταν πιο τοξική για τα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα παρά για τους ανθρώπινους ινοβλάστες.

Συμπερασματικά, η διδακτορική διατριβή έδειξε ότι η Μετοφομίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μάχη εναντίον του καρκίνου του θυρεοειδούς, και ότι είναι πιο αποτελεσματική σε συνθήκες νορμό- ή/και υπό-γλυκαιμίας. Το γεγονός ότι η Μετοφομίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω της όγκωσης και ότι μπορεί να συνδυαστεί με άλλα μεταβολικά

φάρμακα για την αύξηση της αποτελεσματικότητάς της είναι σίγουρα πολύ ενθαρρυντικό και το επόμενο βήμα θα είναι κλινικές μελέτες για την εφαρμογή σε ασθενείς. Παρομοίως, η Μιτοτάνη φάνηκε στην προκλινική μελέτη μας ότι είναι αποτελεσματική εναντίον των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων, και αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για κλινικές μελέτες σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του θυρεοειδούς.

IV. SUMMARY OF PhD THESIS

Title: Identification of Mechanisms to Improve Metformin's Efficacy Against Thyroid Cancer

Author: Athanasios Bikas

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy, and it can be categorized into distinct histologic variants: differentiated, medullary and anaplastic, each of which confers a different prognosis. Anaplastic thyroid cancer has the worst prognosis, while differentiated has (usually) an excellent prognosis. Thyroid cancer incidence is constantly rising, but so are the more aggressive cancers. Hence there is a clear need for discovering new treatment modalities.

Metformin is the most commonly prescribed anti-diabetic medication, and there have been multiple studies published in the last decade regarding its' anticancer activity. Several retrospective studies have reported that diabetic patients on Metformin have better cancer outcomes than diabetic patients not on Metformin. *In vitro* studies have shown that Metformin's anticancer activity is mainly because of the increased expression of AMPK, which is the master energy regulator of the cell, as well as the inhibition of mTOR. Preliminary studies in our lab

showed that Metformin was also effective against thyroid cancer. However, as with all *in vitro* Metformin studies, the doses used were very high (in the mM range) and not clinically achievable in humans (where the max concentration is 50-100 μ M). As a result, the objective of the current study was to identify methods to increase Metformin's efficacy *in vitro*.

Initially, we attempted to alter the expression of the transporter of Metformin OCT1 to increase the intracellular drug delivery. Despite detecting the transporter, no significant changes were observed in the pathologic characteristics of the patients that were examined and for that reason we did not proceed to the pharmacologic regulation of OCT1. Next step was targeting cell metabolism, and more specifically the micro-environment and the glucose concentration in the medium. The initial experiments demonstrated that Metformin in low glucose conditions 5mM (which corresponds to normoglycemia in humans – 100 mg/dl) did not only cause inhibition of cell proliferation, but also cell death. Activation of autophagy could not fully explain the phenomenon, and we went on to discover a rare type of cell death called oncosis. Oncosis is a multi-level process of cell death characterized by cellular swelling. If the process is not reverted by adding glucose to the medium, the cellular membrane disintegrates and necrosis occurs. Oncosis is caused by ATP depletion, which in turn causes activation of AMPK as shown in our study.

We next showed that glucose deprivation can augment Metformin's efficacy significantly. We then turned to the molecular mechanism of Metformin, which is a mitochondrial complex I inhibitor. We combined Metformin with a glycolytic inhibitor (2-deoxy-glucose/2-DG) and demonstrated that the therapeutic combination can increase Metformin's efficacy dramatically. In low glucose conditions, the therapeutic combination of 25 μ M Metformin and 5mM 2DG caused

an apoptotic cell death in thyroid cancer cells, proving that Metformin can be effective in concentrations that are clinically achievable in humans.

We then performed a screening via qRT-PCR and immunochemistry to identify the metabolic enzymes that are more heavily implicated in thyroid cancer. Pyruvate Kinase (PKM) was selected and further experiments showed that the expression of PKM2 is significantly reduced by Metformin in low glucose conditions. These results, in conjunction with immunohistochemistry results showing increased expression of PKM2 in aggressive thyroid cancers, suggest that PKM2 can potentially be used as a marker for response to the treatment with Metformin in patients with thyroid cancer.

In our Metformin experiments, we identified that the mitochondria, and more specifically cytochrome c oxidase plays an important role in the progression of thyroid cancer. Metformin can affect the mitochondria as a metabolic agent, but we also tried a more specific inhibitor of cytochrome c oxidase. Mitotane is a therapeutic agent mainly used for the treatment of adrenal carcinoma. Its' mechanism of action is not fully understood, but recent studies have shown that its' molecular target is cytochrome c oxidase subunit 4 (COX4). Hence, we proceeded with Mitotane experiments.

Initially we showed that Mitotane is cytotoxic for all thyroid cancer cell lines that were examined and that derive from all histologic types. Mitotane was more effective against cells harboring the BRAFV600E mutation (BCPAP και SW1736) and cells that derive from medullary thyroid cancer (TT). Flow cytometry demonstrated that Mitotane causes apoptosis in thyroid cancer cells. The mechanism of action is probably induction of ER stress, that in turn causes DNA damage.

We then examined the mitochondrial respiratory chain, and showed that Mitotane inhibits the mitochondrial membrane potential as well as alters the expression of the enzymes of the mitochondrial chain, mainly down regulates ATP5B. Finally, through immunohistochemistry experiments we showed that ATP5B is expressed in all human thyroid cancers, but mainly in medullary cancer. These data suggest that medullary thyroid cancer relies more heavily on mitochondria, which corroborates our previous findings that TT cells were more sensitive to Mitotane. Certainly Mitotane's toxicity can limit its' use, but we showed that Mitotane was more toxic and specific for thyroid cancer cells than for human fibroblasts.

In conclusion, the current study demonstrates that Metformin can be used against thyroid cancer, and that it is more effective in normo- or hypo-glycemic conditions. The fact that Metformin causes an oncotic cell death and that it can be combined with other metabolic agents is certainly very promising and the next step should be clinical trials in thyroid cancer patients. Similarly, Mitotane was shown in our preclinical study to be effective against thyroid cancer cell lines, and these results could form the basis for clinical trials in patients with advanced thyroid cancer.