

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ**

**“ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ  
ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ ”**

**ΠΑΠΑΚΟΤΟΥΛΑΣ ΠΑΥΛΟΣ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ, 2020**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ**

**“ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ  
ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ ”**

**ΠΑΠΑΚΟΤΟΥΛΑΣ ΠΑΥΛΟΣ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ, 2020**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής :**

Καραμούζης Μιχάλης (Επιβλέπων), Αν. Καθηγητής, Εργαστήριο Βιολογικής χημείας,  
Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Παπαβασιλείου Αθανάσιος, Καθηγητής, Διευθυντής Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας,  
Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Γκόγκα Ελένη, Καθηγήτρια, Διευθύντρια Α΄ Παθολογικής Κλινικής ΛΑΙΚΟ Νοσοκομείο,  
Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

**Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :**

Θεοχάρης Σταμάτης, Καθηγητής, Εργαστήριο Α΄ Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Πιτέρη Χριστίνα, Αν. Καθηγήτρια, Εργαστήριο Βιολογικής χημείας, Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Κασσή Ευανθία, Αν. Καθηγήτρια, Εργαστήριο Βιολογικής χημείας, Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Σχίζας Δημήτριος , Επίκουρος καθηγητής Χειρουργικής, Α΄ Χειρουργική Κλινική, Λαϊκό  
Νοσοκομείο Αθηνών, , Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

# Βιογραφικό Σημείωμα

## Παπακοτούλας Παύλος

Επώνυμο: Παπακοτούλας

Όνομα: Παύλος

Όνομα πατρός: Ιωάννης

Ημερ. Γέννησης: 28/01/1960

E-mail: [papakotoulas@gmail.com](mailto:papakotoulas@gmail.com)

Πτυχίο Ιατρικής, 01/08/1984, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (λίαν καλώς 8)

Απόκτηση της ειδικότητας του Ειδικού Παθολόγου (Γ2 / 22660 / 23-7-1993, Νομ. Θεσσαλονίκης)

Απόκτηση της ειδικότητας του Παθολόγου – Ογκολόγου (Γ2 / 12407 / 28-7-2005, Νομ. Θεσσαλονίκης)

Άδεια άσκησης επαγγέλματος, ΤΥ/ 9343 / 4-9-84 / Νομ. Κοζάνης

Ιατρικός Σύλλογος Θεσσαλονίκης, ΑΜ 8863 / 27-5-88

Παρούσα θέση: Διευθυντής Ογκολόγος Παθολόγος στην Α΄ Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο».

### Προϋπηρεσία

1. Στο στρατό ως οπλίτης (γραφέας Ιατρός) από 18/11/1984 έως 18/9/1985.
2. 403 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο ως εσωτερικός βοηθός – ένας χρόνος ειδικότητα χειρουργικής - από 18/9/1985 έως 18/9/1986.

3. Αγροτικός Ιατρός - Αγροτικό Ιατρείο Βατολάκκου Γρεβενών - από 13/11/1986 έως 29/2/1988.
4. Ειδίκευση στην εσωτερική Παθολογία - Θεαγένειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης από 31/3/1988 έως 29/5/1989.
5. Ειδίκευση στην εσωτερική Παθολογία - Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης από 30/5/1989 έως 3/4/1993.
6. Ελεύθερο Επάγγελμα, ως Ειδικός Παθολόγος, από 23/7/1993 έως 18/8/1986.
7. Επιμελητής Β΄ Παθολόγος στο Παθολογικό τμήμα του Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Βέροιας από 19/8/1996 έως 31/1/2000.
8. Επιμελητής Β΄ Παθολόγος στο Β΄ τμήμα Κλινικής Ογκολογίας του Θεαγένειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης από 1/2/2000 έως 28/7/2005.
9. Επιμελητής Β΄ Παθολόγος Ογκολόγος στο Β΄ τμήμα Κλινικής Ογκολογίας του Θεαγένειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης από 28-7-2005 έως 2/4/2006.
- ,
10. Επιμελητής Α΄ Παθολόγος - Ογκολόγος στο Β΄ τμήμα Κλινικής Ογκολογίας του Θεαγένειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης από 3/4/2006 έως 16/1/2012 .
11. Διευθυντής Παθολόγος – Ογκολόγος στο Β΄ τμήμα Κλινικής Ογκολογίας του Θεαγένειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης από 16/1/2012 έως Φεβρουάριο 2016.
12. Διευθυντής Παθολόγος – Ογκολόγος στο Α΄ τμήμα Παθολογικής Ογκολογίας του Θεαγένειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης από Φεβρουάριο 2016 έως σήμερα.

## Μετεκπαιδεύσεις

Μετεκπαίδευση ενός έτους στον καρκίνο του πνεύμονος, από 5-1-04 έως 5-1-05 στο τμήμα Κλινικής Ογκολογίας του Νοσοκομείου Christie του Manchester, UK, υπό τον καθηγητή N. Thatcher.

CPD course by University of Liverpool and the University of Athens. Duration 20 hours.

***Introduction to Health Economics and Health technology Assessment in Oncology.***

15-17 March 2019. Hesseloniki.

## 37 Εργασίες σε Διεθνή Περιοδικά

## Υποτροφίες - Διακρίσεις

Υποτροφία ενός έτους (2004) από την Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας (ΕΟΠΕ) για την παραπάνω μετεκπαίδευση στα πλαίσια του προγράμματος υποτροφιών εξωτερικού της ΕΟΠΕ.

Ανάδειξη ως International Health Professional of the year 2004, από το International Biographical Centre του Cambridge, England.

Συμμετοχή σε 25 ερευνητικά πρωτόκολλα διεθνή ή ελληνικά σαν principal investigator ή sub-investigator

## Μέλος σε Εταιρείες, Επιστημονικές Ομάδες

Μέλος της Εταιρείας Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας (ΕΟΠΕ).

Πλήρες certified μέλος της ESMO (European Society for Medical Oncology) από τον Ιανουάριο 2001, μετά από επιτυχία στις εξετάσεις Κλινικής Ογκολογίας της European Society for Medical Oncology (ESMO), που έγιναν τον Οκτώβριο 2001 στη Λισαβώνα. Απόκτηση και κατοχή του ESMO Certificate στην Κλινική Ογκολογία.

Επιτυχία στις εξετάσεις Κλινικής Ογκολογίας της European Society for Medical Oncology (ESMO), που έγιναν στις 30 Οκτωβρίου 2005 στο Παρίσι. Recertified ESMO member.

## Ευχαριστίες

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου **Αν. Καθηγητή Μιχάλη Καραμούζη** για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την πορεία της διδακτορικής μου διατριβής και για την πολύτιμη στήριξη και καθοδήγησή του, χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής τον **Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας, Καθηγητή Αθανάσιο Παπαβασιλείου** και την **Καθηγήτρια Ελένη Γκόγκα** για τις χρήσιμες συμβουλές τους και τη συνεργασία τους.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ομάδας Μοριακής Ογκολογίας του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για το κλίμα συνεργασίας καθώς και για την υπομονή και τη στήριξη που επέδειξαν.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πιο συχνό είδος καρκίνου του παγκρέατος είναι το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος. Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα είναι η 4η κύρια αιτία των θανάτων από καρκίνο παγκοσμίως. Περίπου 60-80% των ασθενών έχουν τη στιγμή της διάγνωσης προχωρημένη νόσο, επειδή ο καρκίνος εισβάλλει στους περιβάλλοντες ιστούς έξω από το πάγκρεας (τοπικά προχωρημένος), ή έχει δώσει μεταστάσεις έξω από το πάγκρεας (μεταστατικός). Καθώς η νόσος παρουσιάζει πολύ υψηλό ποσοστό θνητότητας, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ανεύρεσης νέων αποτελεσματικότερων θεραπειών. Με τη ανάπτυξη της μοριακής και βιολογικής κατανόησης της ογκογενετικής εξέλιξης, εφαρμόστηκαν νέες στρατηγικές στην αντιμετώπιση του καρκίνου και κατ' επέκταση σε αυτόν της ανοσοθεραπείας του καρκίνου. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανοσοδιαφυγή των όγκων, αλλά και την αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, έχει δώσει τεράστια ώθηση στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου την τελευταία δεκαετία. Τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού βρίσκονται υπό διαρκή ανοσιακή επιτήρηση και το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί αποτρεπτικό μηχανισμό στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό και τη δημιουργία νεοπλασιών. Κλινικό σημείο που επιβεβαιώνει τη θεωρία της ανοσοεπιτήρησης είναι η διαπίστωση της παρουσίας CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων μέσα στους όγκους (Tumor Infiltrating Lymphocytes – TILs). Συνέπεια αυτού είναι και οι θεραπείες που βασίζονται στην καταστολή των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (Immune Checkpoint Inhibitors).

Είναι γνωστό ότι φάρμακα με αντιμυκητιακές ιδιότητες συμβάλλουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κυκλοπιροξολαμίνη (Ciclopirox Olamine, CPX), που χορηγείται σε άτομα που ταλαιπωρούνται από μυκητιάσεις. Σύμφωνα με την παρούσα διατριβή η συγκεκριμένη θεραπεία μπορεί να μειώσει δραστικά την ταχύτητα εξέλιξης των καρκινικών όγκων, αλλά παράλληλα ενισχύει τη δράση των κυτταροστατικών που χορηγούνται στον ασθενή. Επίσης, η τινζαπαρίνη (Ηπαρίνη Χαμηλού Μοριακού Βάρους) χρησιμοποιείται για την πρόληψη και την αντιμετώπιση της φλεβικής

θρομβοεμβολής, αλλά από τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής φαίνεται ότι μπορεί να διαδραματίζει ρόλο στην αντιμετώπιση του όγκου. Οι μηχανισμοί στους οποίους οφείλονται τα σημαντικά *in vivo* αποτελέσματα, είναι η αύξηση της IFN- $\gamma$ , η αύξηση των CD8<sup>+</sup> κυττάρων, η μείωση των Tregs κυττάρων, η μείωση της έκφρασης του VEGFR-2 και η αύξηση της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα.

Στην παρούσα διατριβή, προτείνεται πως η συνδυαστική θεραπεία με τη συμμετοχή της ανοσοθεραπείας, έχει προφανώς υψηλότερη αντινεοπλασματική επίδραση στη μείωση της ανάπτυξης του όγκου, υποδηλώνοντας μια συνεργική δράση. Αυτή η συνεργική στρατηγική μπορεί να ανοίξει νέους δρόμους για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος.

## **ABSTRACT**

The most common type of pancreatic cancer is pancreatic adenocarcinoma. Pancreatic adenocarcinoma is the 4th leading cause of death worldwide. About 60-80% of patients have advanced cancer at the time of diagnosis because it invades the surrounding tissues outside the pancreas (locally advanced), or has metastasized outside the pancreas (metastatic). As the disease has a very high mortality rate, it is imperative to find new and more effective treatments. With the development of a molecular and biological understanding of oncogenetic evolution, new strategies have been implemented in the treatment of cancer and, consequently, in the treatment of cancer immunotherapy. Understanding the molecular mechanisms that govern tumor immunodeficiency, as well as the interaction of cancer cells with immune system cells, has given a huge boost to cancer immunotherapy in the last decade. The cells of the human body are under constant immune surveillance. The immune system is a deterrent to neoplastic transformation and neoplasms. A clinical point that confirms the theory of immunoassay is the presence of CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in the tumors (Tumor-Infiltrating Lymphocytes - TILs). The result is treatments based on the suppression of the immune system's control points (Immune Checkpoint Inhibitors).

It is known that drugs with antifungal properties help to strengthen the immune system. A typical example is cyclopiroxamine (Ciclopirox Olamine, CPX), given to people suffering from fungal infections. According to current thesis, this treatment can drastically reduce the rate of progression of cancerous tumors, since the substances it reduces the volume but at the same time enhance the action of the chemicals in anti-cancer drugs that have been administered to the patient. Tinzaparin (Heparin Low Molecular Weight) is also used to prevent and treat venous thromboembolism, but the results of this thesis show that may play a role in the treatment of the tumor. The mechanisms by which the important *in vivo* results are due are the increase in IFN- $\gamma$ , the increase in CD8<sup>+</sup> cells, the decrease in Tregs cells,

the decrease in the expression of VEGFR-2 and the increase in the apoptosis in cancer cells.

In the present thesis, it is suggested that combination therapy with the involvement of immunotherapy has a significant anti-tumor effect. This synergistic strategy may represent new avenues for the treatment of patients with pancreatic cancer.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Πάγκρεας: ανάπτυξη, ανατομία και φυσιολογία</b> .....	<b>17</b>
1.1.1 Ανάπτυξη .....	17
1.1.2 Ανατομία.....	21
1.1.3 Φυσιολογία.....	24
<b>1.2 Καρκίνος του Παγκρέατος</b> .....	<b>27</b>
1.2.1 Επιδημιολογία.....	27
1.2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ	29
<b>ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ</b> .....	<b>29</b>
<b>1.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στον παγκρεατικό καρκίνο</b> .....	<b>34</b>
1.3.1 Υποδοχείς αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (VEGFR)	34
1.3.2 Το γονίδιο Ras .....	42
1.3.4 Το μονοπάτι BRAF/MEK/ERK .....	50
1.3.5 Το μονοπάτι Akt/mTOR/PI3K.....	54
<b>1.4 Κυκλοπιροξολαμίνη (CICLOPIROX OLAMINE, CPX)</b> .....	<b>56</b>
<b>1.5 Τινζαπαρίνη</b> .....	<b>59</b>
<b>1.6 Χημειοθεραπευτικά φάρμακα</b> .....	<b>63</b>
1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου Gemcitabine.....	63
1.6.2 Γενικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου Abraxane .....	67
<b>1.7 Ανοσοθεραπεία και καρκίνος</b> .....	<b>70</b>
<b>1.8 Μικροπεριβάλλον του όγκου (TME - tumor microenvironment)</b> .....	<b>74</b>
<b>1.9 Αναστολείς σημείων ελέγχου (Check-point inhibitors)</b> .....	<b>79</b>
<b>2. Σκοπός Διδακτορικής Διατριβής</b> .....	<b>84</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>85</b>
<b>3.1 Κυτταροκαλλιέργειες</b> .....	<b>86</b>
3.1.1 Χαρακτηριστικά ανθρώπινων καρκινικών παγκρεατικών σειρών .....	86
3.1.2 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών in vitro	88
3.1.3 Φύλαξη, κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων .....	89

3.1.4 Κλωνογονική δοκιμασία (Clonogenic assay).....	91
3.1.5 Χρωματομετρική ανάλυση μεταβολικής δραστηριότητας MTT .....	92
3.2 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	92
3.2.1 Λύση κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνικών λυμάτων .....	92
3.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε gel SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) .....	93
3.2.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών .....	94
3.2.4 Ανίχνευση ανοσοαποτύπωσης .....	95
3.3. Ιστολογικές και ανοσολογικές τεχνικές .....	96
3.3.1 Έγκλειση ιστών και λήψη τομών.....	96
3.3.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ .....	98
3.3.3 Κυτταρομετρία ροής.....	99
3.3.4 Ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) .....	100
3.4 <i>In vivo</i> πειράματα.....	101
3.4.1 NOD/SCID μύες .....	101
3.4.2 <i>In vivo</i> πειράματα με ξενομοσχεύματα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών παγκρέατος .....	102
3.4.3 Humanized NOD/SCID μύες .....	102
3.5 Μοριακές τεχνικές.....	103
3.5.1 Απομόνωση DNA από ουρές ποντικών .....	103
3.5.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	103
3.5.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	107
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	109
4.1 Μικρότερη επιβίωση καρκινικών παγκρεατικών σειρών έπειτα από χρήση CPX (μέτρηση με MTT) .....	110
4.2 Μείωση της δημιουργίας αποικιών των παγκρεατικών καρκινικών σειρών με τη χρήση CPX.....	111
4.3 Η CPX παράγει υπερβολικά επίπεδα ROS σε σύγκριση με τη γεμισταβίνη .....	112
4.4 Η CPX ενισχύει την επαγωγή της γεμισταβίνης στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος .....	113
4.5 Η CPX αναστέλλει το Bcl-xL και τη survivin και αυξάνει τη διάσπαση των επιπέδων της πρωτεΐνης της κασπάσης-3, με αποτέλεσμα την απόπτωση ..	114

4.6 Η CPX υποεκφράζει τη σηματοδότηση EGFR σε σύγκριση με τη γεμισταβίνη, σε ανθρώπινες παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές ...	116
4.7 Η CPX ενισχύει την αντικαρκινική δράση της γεμισταβίνης: αναστέλλει την υποδόρια ανάπτυξη ξενομοσχεύματος όγκου και παρατείνει την επιβίωση σε μοντέλα ποντικών ξενομοσχεύματος καρκίνου του παγκρέατος .....	117
4.8 Ανασταλτικές επιδράσεις της CPX στο μέγεθος του όγκου ποντικών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.....	119
4.9 Ανασταλτικές επιδράσεις του CPX σε επίπεδα επιβίωσης με δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο σε προϊόντα λύσης όγκων ποντικών ξενομοσχεύματος BxPc3, PANC-1 και MIA-PACA.....	119
4.10 Η CPX προκαλεί μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ανθρώπινες παγκρεατικές καρκινικές σειρές .....	121
4.11 Η CPX αναστέλλει τη σηματοδότηση EGFR σε σύγκριση με τη γεμισταβίνη in vivo .....	122
4.12 Η θεραπεία με CPX όχι μόνο δεν επηρεάζει τα βασικά επίπεδα ROS, αλλά καταργεί τα επίπεδα ROS που προκαλούνται από γεμισταβίνη σε παγκρεατικούς ιστούς, in vivo.....	123
4.13 Το τεστ βιωσιμότητας σε mtKRAS παγκρεατικές σειρές με χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και ανοσοθεραπείας έδειξε μείωση κατά 25% σε τριπλούς συνδυασμούς.....	124
4.14 Η μείωση στη βιωσιμότητα των mtKRAS παγκρεατικών σειρών οφείλεται στην απόπτωση .....	125
4.15 Ο συνδυασμός χημειοθεραπείας με ανοσοθεραπεία μειώνει την έκφραση του VEGFR σε mtKRAS παγκρεατικές σειρές.....	126
4.16 Η CPX αυξάνει την ποσότητα του PD-L1 σε ανθρώπινη παγκρεατική καρκινική σειρά.....	127
4.17 Σε in vivo πειράματα PANC-1 xenografts σε humanized NOD/SCID μύες στον τετραπλό συνδυασμό υπάρχει μεγαλύτερη μείωση όγκου συγκριτικά με τους άλλους συνδυασμούς, όπως και μεγαλύτερη επιβίωση των πειραματοζώων.....	128
Εικόνα 32: Το χρονοδιάγραμμα που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία του ξενομοσχεύματος, των PBMCs και των θεραπευτικού πρωτοκόλλου. Επίσης, διακρίνονται οι δόσεις που χορηγήθηκαν για κάθε ουσία. ....	128
4.18 Ο τετραπλός συνδυασμός αυξάνει την έκκριση της IFN-γ τόσο στην κυκλοφορία του αίματος όσο και στο TME. ....	129

4.19 Ο τετραπλός συνδυασμός αυξάνει τα CD8 <sup>+</sup> και τα Tregs στο μικροπεριβάλλον του όγκου .....	131
4.20 Οι τριπλοί συνδυασμοί (τινζαπαρίνης + ipillimumab + nivolumab/rembrolizumab) αποφέρουν μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων κατά 20-40% .....	133
4.21 Η μείωση στη βιωσιμότητα φαίνεται πως πραγματοποιείται μέσω απόπτωσης .....	135
4.22 Ο τριπλός συνδυασμός τινζαπαρίνης + ipillimumab + rembrolizumab παρουσίασε την μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση του VEGFR2 .....	135
4.23 Ο συνδυασμός PE + IPI + Nab-P + Τινζαπαρίνη οδηγεί σε μείωση του μεγέθους του όγκου σε σχέση με το control κατά 51% και σε σχέση με το συνδυασμό χωρίς Τινζαπαρίνη κατά 18% .....	136
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	138
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	145
7.ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ .....	162



# **1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

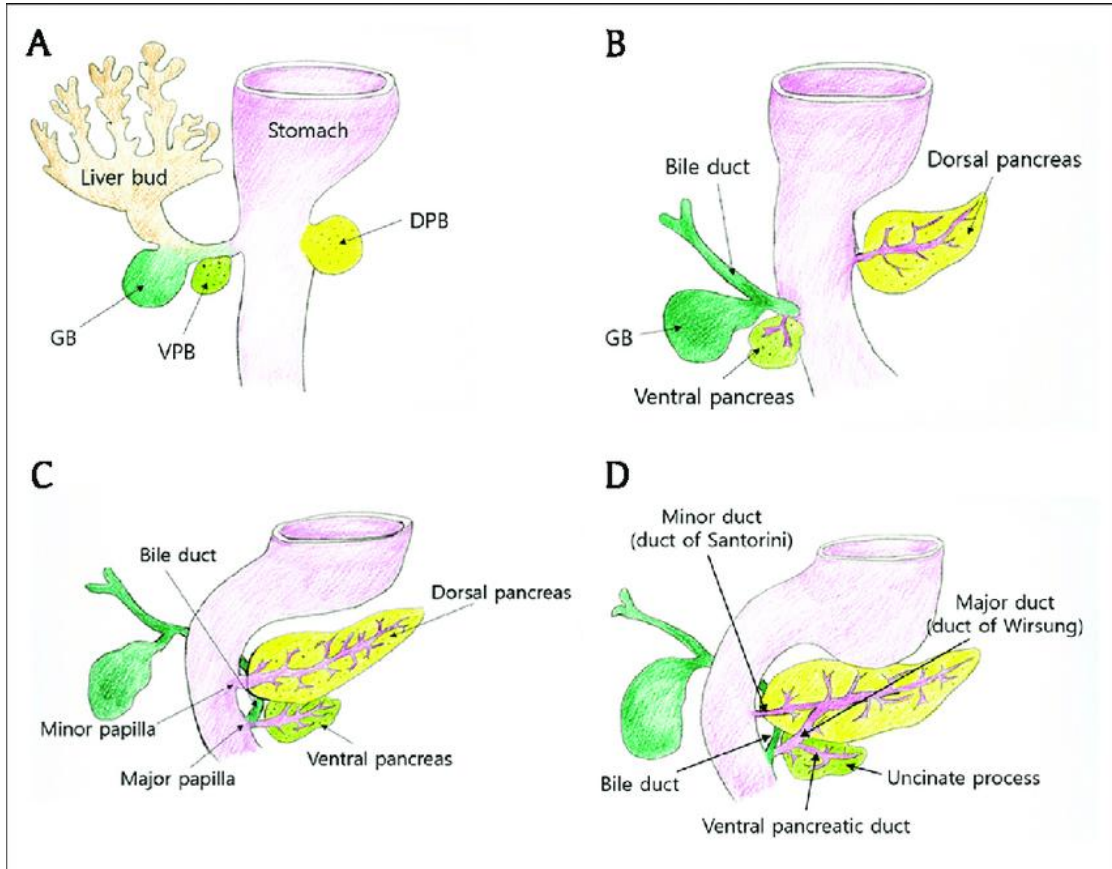
## **1.1 Πάγκρεας: ανάπτυξη, ανατομία και φυσιολογία**

### **1.1.1 Ανάπτυξη**

Παλαιότερες μελέτες εμβρυονικών παγκρεατικών ιστών, που δημοσιεύθηκαν πριν από τέσσερις δεκαετίες έχουν δείξει ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιθηλιακών μεσεγχυματικών κυττάρων ρυθμίζουν την ανάπτυξη, την επιθηλιακή μετάβαση και την κυτταρική διαφοροποίηση στο εμβρυϊκό πάγκρεας. Οι σύγχρονες μελέτες έχουν αποκαλύψει επιπρόσθετες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, που περιλαμβάνουν το παγκρεατικό επιθήλιο και ιστούς που προέρχονται από το μεσόδερμα, ως ουσιώδεις για τη φυσιολογική ανάπτυξη του παγκρέατος. Πρόσφατα, πολλά από τα μονοπάτια σηματοδότησης που είναι πιθανό να επηρεάσουν τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις στο αναπτυσσόμενο πάγκρεας έχουν εντοπιστεί, επιτρέποντας λεπτομερείς μελέτες της γενετικής, μοριακής και κυτταρικής βάσης της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης που δημιουργεί σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του παγκρέατος. Τα μονοπάτια αυτά περιλαμβάνουν τους παράγοντες μετασχηματισμού TGF, Notch, Hedgehog, τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (FGF) και τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) (Wood and Hruban, 2012).

Η πρώτη μορφολογική απόδειξη του παγκρέατος, είναι η συμπύκνωση του μεσεγγύματος που υπερκαλύπτει τη ραχιαία όψη του ενδοδερμικού σωλήνα του εντέρου στο δωδεκαδακτυλικό ανάγλυφο του στομάχου. Λίγο μετά τη συμπύκνωση αυτή, την 26η ημέρα της κύησης σε ανθρώπους και περίπου 9,5 ημέρες κύησης σε ποντικούς, το ενδόδερμα εισέρχεται στο υπερκείμενο μεσέγγυμα. Στα ποντίκια, ο ραχιαίος οφθαλμός συνεχίζει να επιμηκύνεται, με ευρύ άνοιγμα και εμφανή έλλειψη κυτταρικής διαίρεσης. Εμφανίζεται λίγο πριν την απώλεια της επαφής του ραχιαίου σωλήνα του εντέρου με τη νωτιαία χορδή, λόγω σύντηξης της ραχιαίας αορτής στη μέση γραμμή. Το συνολικό επιθήλιο, που σε αυτό το χρονικό διάστημα

δημιουργεί το μοναδικό μεσεγχυματικό σύστημα γύρω από το πάγκρεας, κινείται ραχιαία και αρχίζει να διαμερισματοποιεί το πάγκρεας και το έντερο μακριά από τη ραχιαία αορτή και από τις άλλες ραχιαίες μη-εντερικές δομές. Περίπου 12 ώρες μετά την αποκοπή του ραχιαίου οφθαλμού στο ποντίκι και 6 ημέρες μετά την αποβολή του ραχιαίου οφθαλμού στους ανθρώπους, ο κοιλιακός οφθαλμός αρχίζει να προκύπτει από την ουρική πτυχή του ηπατικού / χολικού οφθαλμού. Αφού εξαφανιστούν, υφίστανται επιμήκυνση και μορφογένεση μέσω της διαδικασίας της διακλάδωσης, η οποία φαίνεται να ακολουθεί ένα μοναδικό μοτίβο. Σε αντίθεση με τον πιο συνηθισμένο τρόπο μορφογένεσης, τη διακλάδωση, δηλαδή σε 90 ° που παρατηρείται στην ανάπτυξη πνευμόνων, νεφρών και σιελογόνων αδένων, το πάγκρεας υφίσταται οξεία γωνιακή διακλάδωση, αφού λόγω της εγγύτητας μεταξύ των νέων παρακείμενων κλάδων, τείνει να αποκλείει την παρέμβαση του μεσεγχύματος (Εικόνα 1). Αυτός ο αποκλεισμός του μεσεγχύματος μπορεί με τη σειρά του να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιθηλιακών-μεσεγχυματικών κυττάρων (Bardeesy and DePinho, 2002) (Kim, Shin and Hwang, 2019).

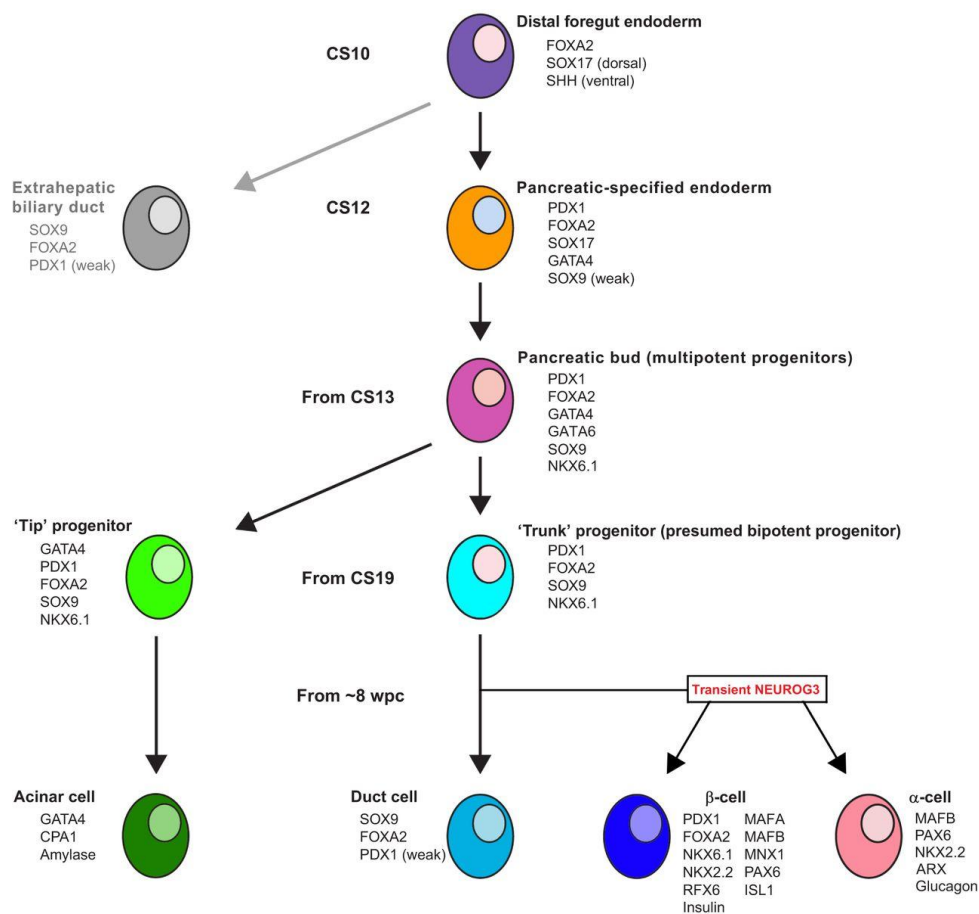


Εικόνα 1: απεικόνιση της κανονικής ανάπτυξης του παγκρέατος. (A, B) Ο ραχιαίος οφθαλμός του παγκρέατος αναπτύσσεται από το ραχιαίο έπαρμα και ο κοιλιακός οφθαλμός προέρχεται από το κοιλιακό έπαρμα. Το ήπαρ, η χοληδόχος κύστη και ο χοληφόρος πόρος επίσης προκύπτουν από το κοιλιακό έπαρμα. (C, D) Καθώς το δωδεκαδάκτυλο περιστρέφεται, το κοιλιακό πάγκρεας κινείται πίσω από το δωδεκαδάκτυλο. Το ραχιαίο πάγκρεας γίνεται το ανώτερο τμήμα του κεφαλιού, του σώματος και του τμήματος ουράς του παγκρέατος. Αντίθετα, η διαδικασία της ακτινοβολίας και το κάτω μέρος του κεφαλιού προέρχονται από το κοιλιακό πάγκρεας. Τέλος, οι ραχιαίοι και κοιλιακοί αγωγοί του παγκρέατος διασυνδέονται. Ο κοιλιακός αγωγός του παγκρέατος γίνεται μεγάλος αγωγός (αγωγός Wirsung), ο οποίος ανοίγει στην κύρια θηλή με τον κοινό χολικό αγωγό. Ο μικρός ραχιαίος πόρος του παγκρέατος (αγωγός Santorini) αποστραγγίζεται μέσω της δευτερεύουσας θηλής. DPB ραχιαίος παγκρεατικός οφθαλμός, VPB κοιλιακός οφθαλμός στο πάγκρεας, GB χοληδόχος κύστη (Kim, Shin and Hwang, 2019).

Κατά τη διάρκεια αυτής της πρώιμης φάσης, ως αποτέλεσμα τόσο της περιστροφής του εντέρου όσο και της επιμήκυνσης του ραχιαίου και, ιδιαίτερα, του κοιλιακού μίσχου, οι κοιλιακοί και ραχιαίοι οφθαλμοί έρχονται σε επαφή μεταξύ τους εντός του διαμορφωτικού κυκλώματος C του δωδεκαδακτυλικού σχηματισμού. Η συνένωση των δυο οφθαλμών οδηγεί στη σύντηξη του αγωγού του κοιλιακού οφθαλμού με το περιφερικό τμήμα του ραχιαίου σωλήνα. Αυτός ο αγωγός διαστέλλεται σε όλο το μήκος του παγκρέατος και ονομάζεται αγωγός Wirsung. Κατά την ημέρα 13 έως 14, στο ποντίκι, εμφανίζονται δραματικές αλλαγές στην κυτταρική αρχιτεκτονική του παγκρέατος. Εκτός από τα ενδοκρινή κύτταρα που παράγουν γλυκαγόνο, υπάρχει μία σημαντική ενίσχυση των ενδοκρινών κυττάρων, ιδιαίτερα των β-κυττάρων. Επιπλέον, η ταχεία μορφογένεση συνοδεύεται από εκθετικές αυξήσεις στην ανάπτυξη μεγάλων ποσοτήτων του λείου ενδοπλασματικού δικτύου και στο σχηματισμό κόκκων. Εξαιτίας των μεγάλων ποσοτήτων κόκκων το πάγκρεας γίνεται αδιαφανές στο γυμνό μάτι, ενώ τα επίπεδα της γλυκαγόνης είναι υψηλότερα συγκριτικά με αυτά της ινσουλίνης (Cowan and Maitra, 2014).

Η εξειδίκευση των πρόδρομων α- και β-κυττάρων βασίζεται στην αμοιβαία καταστολή μεταξύ αντίθετων προσδιοριστικών παραγόντων. Οι παράγοντες μεταγραφής Pax4, Nkx2.2 και Nkx6.1 είναι άμεσοι μεταγραφικοί καταστολείς του Arx, οι οποίοι καθορίζουν τη μοίρα των α-κυττάρων και αντιστρόφως, το Arx καταστέλλει τα Pax4, Nkx6.1 και Pdx1, τα οποία καθορίζουν τη μοίρα των β-κυττάρων (Jennings *et al.*, 2015). Η επακόλουθη ωρίμανση των θετικών ως προς την ινσουλίνη κυττάρων σε λειτουργικά β-κύτταρα που ανταποκρίνονται στη γλυκόζη χαρακτηρίζεται από τη μετάβαση της έκφρασης από MafB σε MafA σε ποντικούς.

Είναι σημαντικό ότι οι παράγοντες μεταγραφής Pax6 και Nkx2.2 δεν είναι μόνο κρίσιμοι για τον σχηματισμό και τη λειτουργία της σειράς των β-κυττάρων, αλλά και για την καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων των μη β-κυττάρων, μια απαίτηση για διατήρηση της ταυτότητας των β-κυττάρων. Ενώ οι παράγοντες μεταγραφής που καθορίζουν τη μοίρα α- και β-κυττάρων είναι γνωστοί, ο σχηματισμός των λιγότερο συχνών γ / PP, δ- και ε-κυττάρων δεν είναι καλά κατανοητός και η μοίρα τους μπορεί να προσδιοριστεί με συνδυαστική δράση διαφορετικών παραγόντων μεταγραφής (Xie and Xie, 2015) (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2:** Παράγοντες μεταγραφής και άλλοι σημαντικοί δείκτες που διακρίνουν διαφορετικούς τύπους κυττάρων και στάδια κατά τη διάρκεια των πρώτων διαμορφώσεων του παγκρέατος. Ανατύπωση : (Jennings et al., 2015)

Το ώριμο πάγκρεας έχει μορφολογικά και λειτουργικά διακριτά ενδοκρινικά και εξωκρινή συστατικά. Η εξωκρινής μοίρα αποτελεί το 95% -99% του παγκρέατος και παράγει πεπτικά ένζυμα, που προωθούν την πέψη και την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών στο έντερο. Τα ώριμα ενδοκρινικά κύτταρα βρίσκονται στις νησίδες του

Langerhans, διακεκριμένα συσσωματώματα κυττάρων προερχόμενα από το ενδόδερμα, διάσπαρτα σε όλο το εξωκρινικό πάγκρεας. Οι νησίδες του Langerhans περιέχουν τέσσερις κύριους τύπους ενδοκρινών κυττάρων, οι οποίοι ορίζονται από τις ορμόνες που εκκρίνουν. Αυτά περιλαμβάνουν τα β-κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη, τα α-κύτταρα που παράγουν γλυκαγόνη, τα δ-κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη και τα PP-κύτταρα που παράγουν παγκρεατικά πολυπεπτίδια. Η πρόωμη ανάπτυξη του παγκρέατος έχει μελετηθεί ιδιαίτερα καλά στα ποντίκια, όπου παρουσιάζονται ομοιότητες με αυτή του ανθρώπου. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, το πάγκρεας αναπτύσσεται ξεχωριστά ραχιαία και κοιλιακά, όπου πριν μετατραπεί σε μια ραχιαία παγκρεατική μοίρα, το ενδόδερμα της μέσης γραμμής είναι ένα μόνο στρώμα επιθηλιακών κυττάρων. Ο ενδοδερμικός τύπος σχηματίζεται από το κοιλιακό πάγκρεας, που είναι δίπλα στα αμφιβληστροειδή μεσοδερμικά και αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Ύστερα από την ενεργοποίηση από μεσεγχυματικά σήματα, τα παγκρεατικά επιθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διακλαδίζονται. Σε ποντίκια, αμέσως μετά την εξειδίκευση των παγκρεατικών ενδοδερμικών κυττάρων, το mRNA της σωματοστατίνης καθίσταται ανιχνεύσιμο, σημειώνοντας την αρχή της διαφοροποίησης των ενδοκρινών κυττάρων (Cowan and Maitra, 2014).

### **1.1.2 Ανατομία**

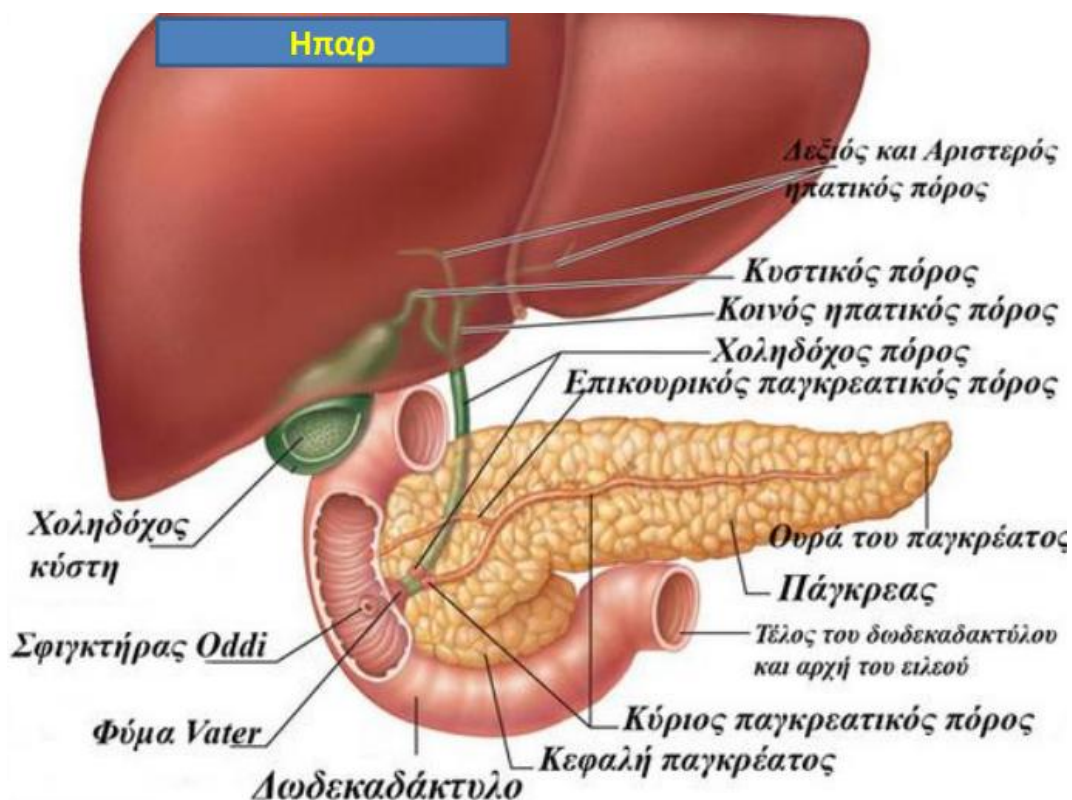
Το πάγκρεας έχει μήκος 12-15 cm και βάρος περίπου 85 gr. Φέρεται εγκαρσίως και εμφανίζει τρία μέρη, την κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Όριο μεταξύ του σώματος και της ουράς δεν υπάρχει, ανάμεσα όμως στην κεφαλή και το σώμα βρίσκεται μια στενότερη μοίρα, που λέγεται ισθμός ή αυχέννας του παγκρέατος. Το πάγκρεας βρίσκεται στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, αντίστοιχα προς το ιδίως επιγάστριο και το αριστερό υποχόνδριο. Η κεφαλή αυτού περιβάλλεται από το δωδεκαδάκτυλο, το σώμα ακουμπά την σπονδυλική στήλη (1ος και 2<sup>ος</sup> οσφυϊκός σπόνδυλος) και τον αριστερό νεφρό, ή δε ουρά του φθάνει μέχρι το σπλήνα. Καλύπτεται από εμπρός από το στομάχι, από το οποίο χωρίζεται με τον επιπλοικό θύλακο. Η κεφαλή του παγκρέατος είναι αποπλατυσμένη, από εμπρός προς τα πίσω

περιβάλλεται από την αγκύλη του δωδεκαδακτύλου και εμφανίζει δύο επιφάνειες, την πρόσθια και την οπίσθια. Η πρόσθια επιφάνεια καλύπτεται από το περιτόναιο και διασταυρώνεται με την πρόσφυση του εγκάρσιου μεσόκολου. Η οπίσθια επιφάνεια εμφανίζει προς τα δεξιά αύλακα, μέσα στην οποία κατέρχεται ο χοληδόχος πόρος. Από την κάτω και αριστερή μοίρα της κεφαλής εκπορεύεται η αγκιστροειδής απόφυση. Η αγκιστροειδής απόφυση είναι μια προέκταση της κεφαλής του παγκρέατος στο κάτω πλάγιο τμήμα της. Προεκτείνεται προς τα κάτω και αριστερά, πίσω από τα άνω μεσεντέρια αγγεία και μπροστά από την κοιλιακή αορτή και την κάτω κοίλη φλέβα. Προς τα κάτω η αγκιστροειδής απόφυση οριοθετείται από την άνω επιφάνεια της τρίτης μοίρας του δωδεκαδακτύλου.

Ο αυχέννας του παγκρέατος είναι το τμήμα που ενώνει την κεφαλή με το σώμα. Το τμήμα αυτό του παγκρέατος έχει μήκος 1,5 με 2 cm. Εμφανίζει στην οπίσθια επιφάνεια μια κάθετη αύλακα, μέσα στην οποία προς τα κάτω μεν πορεύεται η άνω μεσεντέρια φλέβα, προς τα άνω δε η πυλαία φλέβα που σχηματίζεται από την συνένωση της προηγούμενης με την σπληνική φλέβα. Το σώμα του παγκρέατος είναι τρίγωνο, πρισματικό και εμφανίζει τρεις επιφάνειες (πρόσθια, οπίσθια και κάτω) και τρία χείλη, το άνω, το πρόσθιο και το κάτω. Η πρόσθια και η κάτω επιφάνεια καλύπτονται από το περιτόναιο. Η οπίσθια επιφάνεια είναι ακάλυπτη από περιτόναιο, κατά μήκος δε αυτής και κοντά στο άνω χείλος πορεύεται η σπληνική φλέβα, πάνω δε από αυτή η σπληνική αρτηρία.

Η ουρά του παγκρέατος συνήθως ακουμπά στην γαστρική επιφάνεια του σπληνός. Περιλαμβάνεται ανάμεσα στα δύο πέταλα του γαστροσπληνικού συνδέσμου μαζί με τα σπληνικά αγγεία. Το πάγκρεας εμφανίζει δύο εκφορητικούς πόρους, το μείζονα και τον ελάσσονα ή επικουρικό. Ο μείζων πόρος φέρεται εγκάρσια σε όλο το πάγκρεας, από τα αριστερά προς τα δεξιά και υποδέχεται σε όλη την διαδρομή του τους μεσολόβιους εκφορητικούς πόρους του αδένου. Κοντά στο δωδεκαδάκτυλο έρχεται σε στενή σχέση με το χοληδόχο πόρο, από το σημείο δε αυτό, οι δύο πόροι μπαίνουν μέσα στο τοίχωμα του δωδεκαδακτύλου, όπου ενώνονται και σχηματίζουν τη λήκυθο του Vater και τελικά εκβάλλουν στη μείζονα θηλή του δωδεκαδακτύλου. Ο μείζων παγκρεατικός πόρος αθροίζει παγκρεατικό υγρό από την ουρά, το σώμα και από το μεγαλύτερο μέρος της κεφαλής του παγκρέατος. Ο επικουρικός πόρος αθροίζει παγκρεατικό υγρό από την άνω μοίρα

της κεφαλής. Με το ένα άκρο αναστομώνεται με τον μείζονα παγκρεατικό πόρο και με το άλλο εκβάλλει στην ελάσσονα θηλή του δωδεκαδακτύλου (Talathi and Bhimji, 2018) (Longnecker, 2014) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Τοπογραφική ανατομική παγκρέατος σε σχέση με τα παρακείμενα σπλάχνα  
Ανατύπωση:<http://physiology.med.uoa.gr/fileadmin/physiology.med.uoa.gr/uploads/Parousiaseis/Vaiopoulos/4.pdf>

Αρτηρίες του παγκρέατος είναι η άνω και κάτω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία για την κεφαλή και η σπληνική αρτηρία για το σώμα και την ουρά. Οι φλέβες εκβάλλουν στην σπληνική, στην άνω μεσεντέρια, μερικές δε απ'ευθείας στην πυλαία φλέβα. Τα λεμφαγγεία εκβάλλουν στα παγκρεατοσπληνικά, παγκρεατοδωδεκαδακτυλικά και στα παραορτικά λεμφογάγγλια. Τα νεύρα προέρχονται από το πνευμονογαστρικό και από τα σπλαχνικά νεύρα (σπληνικό πλέγμα) (Kulenović and Sarač-Hadžihalilović, 2010).

### 1.1.3 Φυσιολογία

Το πάγκρεας έχει ενδοκρινική και εξωκρινική λειτουργία. Το τελικό προϊόν της παγκρεατικής εξωκρινικής λειτουργίας, προέρχεται από την αλληλεπίδραση του πολύπλοκου συστήματος των λοβιακών κυττάρων και των κυττάρων των πόρων. Το τελικό προϊόν έκκρισης της εξωκρινούς μοίρας είναι ένα καθαρό ισοτονικό διάλυμα με pH που κυμαίνεται γύρω στο 8 και ειδικό βάρος από 1.007 έως 1.035. Στο διάλυμα αυτό διακρίνουμε δύο ξεχωριστά συστατικά: την ενζυμική έκκριση που προέρχεται από τα λοβιακά κύτταρα και την έκκριση του ύδατος και των ηλεκτρολυτών, που προέρχεται από τα κεντρολοβιακά και τα εμβόλιμα κύτταρα των πόρων. Η ποσότητα της βασικής έκκρισης της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος ανέρχεται από 0.2 έως 0.3 ml/min, που μπορεί να φθάσει στα 5 ml/min μετά από μέγιστη εκκριτική διέγερση. Η έκκριση του ύδατος και των ηλεκτρολυτών ελέγχεται από το παρασυμπαθητικό, καθώς και από χυμικά ερεθίσματα. Οι ηλεκτρολύτες που περιέχονται στο διάλυμα της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος είναι το Na, K, HCO<sub>3</sub> και Cl<sup>-</sup>. Η σεκρετίνη αποτελεί το ισχυρότερο ενδογενές ερέθισμα που διεγείρει την έκκριση του παγκρεατικού HCO<sub>3</sub>. Η σεκρετίνη είναι πεπτίδιο που αποτελείται από 27 αμινοξέα και εκκρίνεται από τα κύτταρα S του βλεννογόνου των κρυπτών του Lieberkuhn στο εγγύς λεπτό έντερο, απελευθερώνεται δε μετά από την παρουσία οξέων και χολής στον αυλό του εντέρου. Κυκλοφορεί στο αίμα και δεσμεύεται στους υποδοχείς της σεκρετίνης στα παγκρεατικά κύτταρα των πόρων. Η επαγωγή του ερεθίσματος προκαλείται μέσω του συστήματος της ενδοκυτταρικής αδενύλ-κυκλάσης προκαλώντας αύξηση του κυκλικού cAMP.

Τα πεπτικά ένζυμα εκκρίνονται από τα λοβιακά παγκρεατικά κύτταρα. Τα πεπτικά ένζυμα σχηματίζονται στην συσκευή του Golgi με την μορφή προενζύμων (ζυμογόνων κοκκίων), τα οποία αποθηκεύονται μέσα σε μια γλυκοπρωτεϊνική, κυψελιδική μεμβράνη. Τα ζυμογόνα κοκκία, ακολούθως, μεταναστεύουν στην κορυφή των λοβιακών κυττάρων, όπου η μεμβράνη τους συντήκεται με τη λοβιακή κυτταρική μεμβράνη (εξωκύττωση), προκαλώντας εξώθηση των ζυμογόνων κοκκίων στο κεντρολοβιακό τμήμα του εκφορητικού πόρου. Τα ένζυμα τα οποία συντίθενται και απελευθερώνονται είναι ενδοπεπτιδάσες όπως η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη, η ελαστάση, και η καλλικρεΐνη, διάφορες εξωπεπτιδάσες όπως η καρβοξυπεπτιδάση



A και B. Άλλα ένζυμα που συντίθενται είναι η φωσφολιπάση, η λιπάση, η κολιπάση, η μη ειδική καρβοξυλεστεράση, η αμυλάση, η ριβονουκλεάση και η δεοξυριβονουκλεάση. Οι πεπτιδάσες που συντίθενται στο παγκρεατικό λοβιακό κύτταρο απελευθερώνονται στο παγκρεατικό εκφορητικό σύστημα σε αδρανή μορφή. Η ενεργοποίησή τους επιτελείται μετά από την είσοδο τους στο δωδεκαδάκτυλο, όπου η βλεννογονική εντεροκινάση μετατρέπει το θρυψινογόνο σε θρυψίνη, ενώ ακολούθως η θρυψίνη θα ενεργοποιήσει τις άλλες πεπτιδάσες. Αντίθετα με τις πεπτιδάσες, η ριβονουκλεάση, η δεοξυριβονουκλεάση, η αμυλάση και η λιπάση εκκρίνονται στο παγκρεατικό εκφορητικό σύστημα στην δραστική μορφή τους. Η έκκριση των λοβιακών παγκρεατικών κυττάρων ελέγχεται από ειδικούς σεκρεταγωγούς που δρουν στους υποδοχείς των λοβιακών κυττάρων (Chang and Leung, 2014).

Τέτοιοι σεκρεταγωγοί είναι η **χολοκυστοκινίνη (CCK)** και η **ακετυλοχολίνη** που διεγείρουν την ενζυμική έκκριση των παγκρεατικών λοβιακών κυττάρων μέσω της ενδοκυττάριας αύξησης του cGMP και την κινητοποίηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Η χολοκυστοκινίνη αποτελεί την πιο δραστική ενδογενή ορμόνη που διεγείρει την παγκρεατική ενζυμική έκκριση. Η ενδοκρινική λειτουργία του οργάνου είναι περίπλοκη. Το πάγκρεας παράγει μια σειρά από ουσίες που εμπλέκονται στην ομοιόσταση του οργανισμού με κυριότερες την ινσουλίνη, τη γλουκαγόνη, το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (PP), το αγγειοδραστικό εντερικό πολυπεπτίδιο και τη σωματοστατίνη.

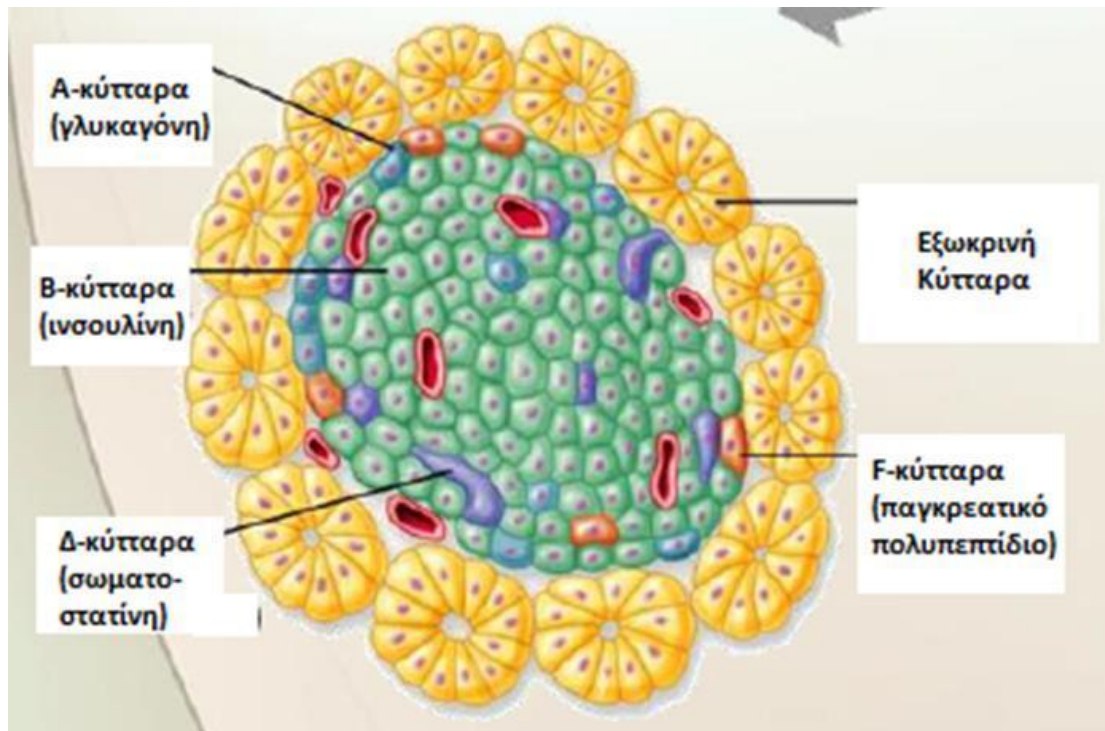
Η **ινσουλίνη** αποτελεί το εκκριτικό προϊόν των β-κυττάρων που ευρίσκονται στα νησίδια του Langerhans. Η ινσουλίνη αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικές γέφυρες. Η ινσουλίνη βρίσκεται στα β- κύτταρα, αποθηκευμένη σε εκκριτικά κοκκία και η απελευθέρωση της από αυτά στην πυλαία κυκλοφορία ελέγχεται από πολλούς παράγοντες, όπως τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, την αλληλεπίδραση του παρασυμπαθητικού, καθώς και τις τοπικές συγκεντρώσεις της σωματοστατίνης.

Η **γλουκαγόνη** είναι πεπτίδιο που αποτελείται από μία μονή αλυσίδα αμινοξέων, συντίθεται δε και απελευθερώνεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος. Το κύριο ερέθισμα για την έκκριση της είναι η ουσιαστική πτώση της γλυκόζης του ορού. Η γλουκαγόνη προκαλεί υπεργλυκαιμία, διεγείροντας την

ηπατική γλυκογονόλυση και την νεογλυκογένεση από πρωτεΐνες. Αν και η κύρια δράση της γλουκαγόνης σχετίζεται με την ομοίωση της γλυκόζης έχουν διερευνηθεί και άλλες δράσεις της, που περιλαμβάνουν την αναστολή έκκρισης του γαστρικού οξέος από τον στόμαχο, την αναστολή της γαστρεντερικής κινητικότητας, την διέγερση της έκκρισης της χολής, καθώς και τη λιπόλυση των τριγλυκεριδίων.

Το **παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (PP)** αποτελείται από μία ευθεία αλυσίδα 36 αμινοξέων και εντοπίζεται κυρίως στα μη β-κύτταρα της κεφαλής και της αγκιστροειδούς αποφύσεως του παγκρέατος. Η έκκριση του PP στο αίμα έχει διφασική μορφή, γίνεται μετά από το γεύμα, ακολουθώντας χολινεργική και αδρενεργική ρύθμιση. Σε φυσιολογικά επίπεδα, το PP έχει αναφερθεί ότι μειώνει την παγκρεατική εξωκρινική λειτουργία και αναστέλλει την κινητικότητα του χοληφόρου δέντρου. Παράλληλα ο ρόλος του εμπλέκεται και με την ρύθμιση της γλυκόζης. Σε καταστάσεις έλλειψης του PP, όπως μετά από παγκρεατεκτομή ή χρόνια παγκρεατίτιδα, έχει παρατηρηθεί ηπατική αντοχή στην ινσουλίνη η οποία αντιστρέφεται μετά από χρόνια χορήγηση PP.

Η **σωματοστατίνη** είναι ένα κυκλικό 14πεπτίδιο που συντίθεται και απεκκρίνεται από τα δ-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος, όπως επίσης και από άλλες πηγές, δηλαδή τον εγκέφαλο και το έντερο. Ο γαστρεντερικός σωλήνας περιέχει το 70% της σωματοστατίνης του σώματος. Ερεθίσματα για την έκκριση της στη συστηματική κυκλοφορία αποτελούν τα γεύματα, η διέγερση του πνευμονογαστρικού, η πομπενσίνη, η χολοκυστοκίνη, η γαστρίνη και η σεκρετίνη. Η δράση της σωματοστατίνης στον γαστρεντερικό σωλήνα περιλαμβάνει την αναστολή της έκκρισης ορμονών, όπως της γαστρίνης, της σεκρετίνης, του VIP, του PP, της ινσουλίνης και της γλουκαγόνης, την αναστολή της έκκρισης του γαστρικού οξέος και της πεψίνης, την αναστολή της εξωκρινικής παγκρεατικής λειτουργίας, την αναστολή της γαστρεντερικής κινητικότητας, καθώς και τη μείωση της αιμάτωσης του γαστρεντερικού σωλήνα (Morisset, 2014) (Chang and Leung, 2014)(Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Αντιστοιχία τύπου κυττάρου και ουσιών που εκκρίνονται. Ανατύπωση : <https://docplayer.gr/68447226-Diatrofiki-antimetopisi-karkinoy-pagkreatos.html>

## 1.2 Καρκίνος του Παγκρέατος

### 1.2.1 Επιδημιολογία

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου, μετά τις καρδιοπάθειες. Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί την τέταρτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο με μέση επιβίωση 6 μηνών και ένα πενταετές ποσοστό επιβίωσης 3-5%. Οι δύο κύριοι τύποι καρκίνου είναι το αδενοκαρκίνωμα (που αντιπροσωπεύει περίπου το 85% των περιπτώσεων), και οι παγκρεατικοί ενδοκρινικοί όγκοι (που συνιστούν λιγότερο από το 5% όλων των περιπτώσεων). Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι συνήθως μια ασθένεια των ηλικιωμένων. Είναι εξαιρετικά σπάνιο να γίνεται διάγνωση ασθενών πριν από την ηλικία των 30 ετών και το 90% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών είναι ηλικίας άνω των 55 ετών, με την πλειοψηφία στην 7η και 8η δεκαετία της ζωής τους. Η ηλικία κατά την οποία γίνονται εμφανή τα συμπτώματα ποικίλλει μεταξύ

των χωρών. Στην Ινδία, για παράδειγμα, υπάρχει μέγιστη συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς στην έκτη δεκαετία της ζωής τους, ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες στην έβδομη δεκαετία της ζωής. Για το 2017, το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου είχε εκτιμήσει ότι ο καρκίνος του παγκρέατος θα αντιπροσωπεύει το 3,2% όλων των καρκίνων και το 7,2% όλων των θανάτων από καρκίνο. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος αυξάνει συνεχώς τα τελευταία χρόνια και προβλέπεται ότι έως το 2030, ο καρκίνος του παγκρέατος θα είναι η δεύτερη αιτία θανάτου έως το 2030 (Miller *et al.*, 2016). Σχεδόν 60% -70% των περιπτώσεων προέρχονται από την κεφαλή του παγκρέατος και αυτές οι περιπτώσεις συνήθως διαγιγνώσκονται νωρίτερα από τους όγκους που προκύπτουν από το σώμα και την ουρά, καθώς η κεφαλή του παγκρέατος περιέχει τον κοινό χοληδόχο πόρο (Porta *et al.*, 2005) (Sarantis *et al.*, 2020). Οι όγκοι του σώματος και της ουράς συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση. Η απώλεια βάρους, ο κοιλιακός πόνος και ο ίκτερος είναι τα πιο συνηθισμένα συμπτώματα που παρατηρούνται σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο, ενώ λιγότερο συνηθισμένα συμπτώματα είναι ο διαβήτης τύπου 2 και η θρομβοεμβολική νόσος. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος είναι περίπου τριπλάσιος στους καπνιστές, σε σχέση με τους μη καπνιστές και το 5-10% των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος έχει οικογενειακό ιστορικό της νόσου. Αυτός ο όγκος χαρακτηρίζεται από γρήγορη εξάπλωση, με τοπική διήθηση και μεταστάσεις σε μακρινά όργανα και οι περισσότεροι ασθενείς φθάνουν στην κλινική διάγνωση με μη χειρουργήσιμη νόσο: στην πραγματικότητα περίπου 80% των ασθενών διαγιγνώσκονται με τοπικά προχωρημένη ή μεταστατική νόσο. Οι ασθενείς αυτοί έχουν ταχεία εξέλιξη της νόσου και λίγοι από αυτούς επιβιώνουν περισσότερο από ένα χρόνο. Ακόμη και για τους ασθενείς με εντοπισμένη ασθένεια κατά τη διάγνωση οι οποίοι υποβάλλονται σε ριζική χειρουργική επέμβαση, η μέση επιβίωση παραμένει χαμηλή και είναι περίπου 18 μήνες. Συνεπώς, παρά την πρόοδο στην κατανόηση της βασικής βιολογίας της νόσου, τα ποσοστά επιβίωσης παρέμειναν βασικά αμετάβλητα κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 ετών (Mayo *et al.*, 2012). Επομένως, υπάρχει απόλυτη ανάγκη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών (Adamska, Domenichini and Falasca, 2017).

## **1.2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ**

### **ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ**

Το πάγκρεας, ως λειτουργικά μεικτός αδένας, αποτελείται από δύο διακριτές μοίρες: την ενδοκρινή, οι λειτουργικές μονάδες της οποίας είναι τα νησίδια του Langerhans και τη εξωκρινή μοίρα, οι λειτουργικές μονάδες της οποίας είναι οι αδενοκυψέλες και οι εκφορητικοί τους πόροι. Αντικατοπτρίζοντας τη σύνθετη αυτή ιστοική σύνθεση, οι όγκοι που αναπτύσσονται πρωτοπαθώς στο πάγκρεας εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Για την ταξινόμηση τους ακολουθείται η ταξινόμηση της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας-WHO (2000) που βασίζεται στην διαφοροποίηση (και όχι στην πιθανή προέλευση) κάθε όγκου προς μία από τις τρεις βασικές παγκρεατικές δομές. Οι κατηγορίες που προκύπτουν είναι τέσσερις : όγκοι με εξωκρινή διαφοροποίηση, όγκοι με ενδοκρινή διαφοροποίηση, όγκοι με μεικτή διαφοροποίηση και όγκοι με όχι σαφή (ενδιάμεση) διαφοροποίηση. Οι όγκοι με εξωκρινή διαφοροποίηση είναι οι συχνότεροι και ταξινομούνται, είτε ως καλοήθεις (ορώδες κυσταδένωμα, βλεννώδες κυσταδένωμα, ενδοπορικό θηλώδες-βλεννώδες αδένωμα και ώριμο τεράτωμα), είτε ως οριακοί/αβέβαιου κακοήθους δυναμικού (βλεννώδης κυστικός όγκος με μέτρια δυσπλασία, ενδοπορικός θηλώδης-βλεννώδης όγκος με μέτρια δυσπλασία και συμπαγής ψευδοθηλώδης όγκος) είτε ως κακοήθεις (πορικό αδενοκαρκίνωμα και οι ποικιλίες του, ορώδες κυσταδενοκαρκίνωμα, βλεννώδες κυσταδενοκαρκίνωμα-διηθητικό και μη-, ενδοπορικό θηλώδες βλεννώδες καρκίνωμα διηθητικό και μη-, κυψελιδικό καρκίνωμα- αμιγές ή μεικτό κυψελιδικό-ενδοκρινές, παγκρεατοβλάστωμα, συμπαγές ψευδοθηλώδες καρκίνωμα). Ο συχνότερος όγκος είναι το πορικό αδενοκαρκίνωμα η ονομασία του οποίου προέρχεται από την ιστολογική του ομοιότητα προς τα κύτταρα των παγκρεατικών πόρων, με την έννοια του κυτταρικού σχήματος, την παραγωγή βλέννας, την έκφραση πορικών αντιγόνων και την ανάπτυξή του με μορφή σωληνωδών δομών (Haeberle and Esposito, 2019). Στο συγκεκριμένο μόνο καρκίνωμα, εφαρμόζεται η ιστολογική βαθμοποίηση της κακοήθειας (grade) σύμφωνα με την WHO ή εναλλακτικά με βάση το ποσοστό των σωληνωδών βλαστών, το σχήμα και το μέγεθός τους, την παραγωγή βλέννας, την κυτταρική ατυπία και την παρουσία άτυπων πυρηνοκινήσιων. Η κλίμακα που

προκύπτει είναι τετράβαθμη: όγκοι υψηλής, μέσης και χαμηλής διαφοροποίησης (grade 1, 2, 3) και grade 4 για το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα. Ασυνήθεις υπότυποι του πορικού αδενοκαρκινώματος είναι οι εξής:

1. Το αδενοπλάκωδες καρκίνωμα, που αποτελείται από αδενικά και πλακώδη στοιχεία. Τα τελευταία μπορεί να εμφανίζουν ποικίλη διαφοροποίηση, από υψηλή έως και τη χαμηλή ή ακόμη και βασικοειδή μορφολογία. Το συγκεκριμένο καρκίνωμα έχει χειρότερη πρόγνωση από το σύνηθες πορικό αδενοκαρκίνωμα.

2. Το κολλοειδές (βλεννώδες μη-κυστικό) καρκίνωμα, που συνήθως αναπτύσσεται σε έδαφος ενδοπορικών θηλωδών - βλεννώδων όγκων, βλεννώδων κυστικών νεοπλασμάτων και λυκηθικών/δωδεκαδακτυλικών σωληνολαχνωτών αδενωμάτων. Χαρακτηρίζεται από τη παρουσία άφθονου ποσού βλέννας (> 50% της μάζας του) με μορφή λιμνών στις οποίες αναγνωρίζονται ελεύθερες, μικρές αθροίσεις έντονα άτυπων κυττάρων. Το συγκεκριμένο καρκίνωμα φαίνεται κατά μερικούς συγγραφείς να έχει εξαιρετική πρόγνωση, σε σχέση με το σύνηθες πορικό αδενοκαρκίνωμα (5ετής επιβίωση 57% έναντι 5%).

3. Το μυελοειδές καρκίνωμα που αποτελείται από συγκυτιακές αθροίσεις κυττάρων χαμηλής διαφοροποίησης, που συνοδεύονται από χρόνια φλεγμονώδη κυτταρική διήθηση. Εμφανίζει εκτεταμένη νέκρωση, απωθητικά όρια και ελάχιστη στρωματική δεσμοπλαστική αντίδραση.

4. Το καρκίνωμα από κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet-ring) που ιστολογικά μοιάζει με το λοβιακό καρκίνωμα του μαστού.

5. Το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα με τρεις υποποικιλίες: α. απλαστικού τύπου, που μοιάζει με το γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα και αποτελείται από έντονα πολύμορφα κύτταρα συνοδευόμενα από πυκνή φλεγμονώδη πολυμορφοπυρηνική διήθηση. Το συγκεκριμένο καρκίνωμα εμφανίζει εξαιρετικά κακή πρόγνωση. β. οστεοκλαστικού τύπου, που μοιάζει με το γιγαντοκυτταρικό όγκο των οστών και αποτελείται από ένα πολύμορφο πληθυσμό - γιγαντοκύτταρα τύπου οστεοκλάστης, πολύμορφα μεγάλα κύτταρα, μονοπύρρηνα ιστοκυτταροειδή κύτταρα, άτυπα μονοπύρρηνα κύτταρα και κύτταρα πορικού καρκινώματος. Το συγκεκριμένο καρκίνωμα έχει καλύτερη πρόγνωση από τον προηγούμενο τύπο του αδιαφοροποίητου καρκινώματος και γ. καρκινοσάρκωμα/ σαρκωματοειδές

καρκίνωμα σπανιότατο νεόπλασμα που αποτελείται από επιθηλιακή και σαρκωματώδη συνιστώσα (με πιθανή ετερόλογη διαφοροποίηση προς χόνδρο, οστούν, γραμμωτό μυ) και χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά κακή πρόγνωση. Το κυψελιδικό καρκίνωμα είναι σχετικά ασυνήθης όγκος (1-2% όλων των παγκρεατικών καρκινωμάτων) και αποτελείται από κύτταρα ομοιόμορφα, με ζυμογόνα κυτταροπλασματικά κοκκία και ελάχιστο, μη-δεσμοπλαστικό στρώμα. Σε ποσοστά 30-50%, είναι μεικτό, με ενδοκρινή συνιστώσα. Το παγκρεατοβλάστωμα αποτελείται από αναμειγμένους κυψελιδικούς, ενδοκρινείς ή και πορικούς σχηματισμούς και από σωματίδια πλακοειδών κυττάρων (χαρακτηριστικό ιστολογικό στοιχείο). Από τους λοιπούς τύπους του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος, το ορώδες κυσταδενοκαρκίνωμα, το βλενώδες κυσταδενοκαρκίνωμα, το ενδοπορικό θηλώδες-βλενώδες αδενοκαρκίνωμα και το συμπαγές-ψευδοθηλώδες καρκίνωμα, αναπτύχθηκαν στην ενότητα των κυστικών όγκων του παγκρέατος. Οι μεικτοί παγκρεατικοί όγκοι μπορεί να είναι πορικοί-ενδοκρινείς, κυψελιδικοί ενδοκρινείς και πορικοί-κυψελιδικοί-ενδοκρινείς. Κάθε ιστολογική συνιστώσα οφείλει να αντιπροσωπεύεται τουλάχιστον κατά 25%. Η πρόγνωσή τους εξαρτάται, με σειρά βαρύτητας, από την ύπαρξη πορικού ή κυψελιδικού στοιχείου (Klörpel, 2011).

Η έλλειψη βιοδεικτών, η ασυμπτωματική φύση της νόσου, καθώς και η σύνθετη βιολογία και αρχιτεκτονική του όγκου, καθιστούν δυσκολότερη την ανίχνευση του Καρκίνου του παγκρέατος σε πρώιμο στάδιο. Η ανάπτυξη και η εξέλιξη του καρκίνου του παγκρέατος οφείλεται στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων, στην απενεργοποίηση γονιδίων που καταστέλλουν τον όγκο, και στην απορρύθμιση πολλών οδών σηματοδότησης. Η πλήρης ανάλυση του εξωμικού καρκίνου του παγκρέατος, όπου αλληλουχήθηκαν οι περιοχές κωδικοποίησης > 29.000 γονιδίων σε παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα, παρουσίασε κατά μέσο όρο 63 γονιδιωματικές αλλοιώσεις, οι οποίες ήταν σημειακές μεταλλάξεις σε μεγάλη πλειοψηφία. Αυτές οι μεταβολές καθόρισαν ένα σύνολο πυρήνων από 12 κυτταρικές οδούς σηματοδότησης και διεργασίες που αλλοιώθηκαν στην πλειονότητα των παγκρεατικών αδενοκαρκινωμάτων. Μεταξύ αυτών, οι πιο αξιοσημείωτες ήταν η σηματοδότηση KRAS, η ρύθμιση της μετάπτωσης κυτταρικού κύκλου G1 / S, η σήμανση του παράγοντα TGF-β, η σηματοδότηση ιντεγκρίνης και η μικρή σηματοδότηση εξαρτώμενη από την τριφωσφορική γουανίνη (GTPase). Η

θανατηφόρος φύση του προέρχεται από την ικανότητά του να διασπείρεται στο λεμφικό σύστημα και σε απομακρυσμένα όργανα (Jones *et al.*, 2008).

Στους επιδημιολογικούς παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο αυτό περιλαμβάνονται το κάπνισμα, η χρόνια παγκρεατίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και η παχυσαρκία. Περίπου το 5-10% των καρκίνων συνδέονται με το οικογενειακό ιστορικό και τα κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου, όπως το σύνδρομο Peutz-Jeghers και την κληρονομική παγκρεατίτιδα.

Έχει χαρακτηριστεί ως ένας από τους πιο ενδογενώς ανθεκτικούς σε φάρμακα όγκους και η ανθεκτικότητά του σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες είναι μία βασική αιτία για την αποτυχία της θεραπείας. Η υποξία συμβάλει κυρίως στην θεραπευτική αντίσταση που αναπτύσσεται, μέσω ανεξάρτητων και εξαρτημένων μηχανισμών από τον παράγοντα HIF. Ένας από τους ανεξάρτητους μηχανισμούς HIF-1<sup>α</sup>, είναι η σταθεροποίηση της κινάσης PIM1 από το αντιγόνο HuR, που μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα μετά από υποξία. Επιπλέον ρόλο παίζουν και μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί στους οποίους συμμετέχουν πρωτεΐνες που προσδέονται στο RNA. Η γεμισταβίνη είναι το κοινό χημειοθεραπευτικό φάρμακο για ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο, όπου σε μια δοκιμή φάσης III το 1997 δείχθηκε πλεονέκτημα επιβίωσης και ανακούφιση των συμπτωμάτων σε σχέση με την 5-FU (Burris *et al.*, 1997). Πολύ πρόσφατα, μια συνδυαστική θεραπεία με τις ουσίες 5-FU, ιρινοτεκάνη και οξαλιπλατίνη (FOLFIRINOX) οδήγησε σε μεγαλύτερη επιβίωση κατά 4,3 μήνες, αλλά αυξημένη τοξικότητα, κυρίως εξαιτίας της εμφάνισης παρενεργειών, όπως ουδετεροπενία, λευκοπενία, κόπωση και περιφερική νευροπάθεια σε ποσοστό 30% (Amrutkar and Ivar P Gladhaug, 2017) (Sarantis *et al.*, 2020).

Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα αναπτύσσεται ακολουθώντας μια σειρά διαδοχικών μεταλλάξεων από φυσιολογικό βλεννογόνο σε συγκεκριμένες πρόδρομες αλλοιώσεις και τελικά διηθητική κακοήθεια. Οι τρεις καλύτερα χαρακτηρισμένες πρόδρομες αλλοιώσεις αυτής της κακοήθειας είναι η παγκρεατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (PanIN), τα θηλωτικά νεοπλάσματα βλεννογόνου (IPMN) και τα βλενώδη κυστικά νεοπλάσματα (MCN). Η παγκρεατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία είναι μια μικροσκοπική αλλοίωση που εμφανίζεται στους μικρούς (συνήθως λιγότερο από 0,5 cm) παγκρεατικούς αγωγούς. Έχει προταθεί ότι μπορεί



να έχει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη της εντοπισμένης παγκρεατίτιδας και ότι οι κύκλοι επιθηλιακής βλάβης και επιδιόρθωσης που προκύπτουν μπορεί περαιτέρω να δώσουν τη νεοπλασματική διαδικασία. Αποτελεί τη συνηθέστερη προγονική μορφή του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος, καθώς αυτές οι βλάβες έχουν γενετικές ανωμαλίες που είναι κοινές στο γειτονικό παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα και η ιστολογική εξέλιξη του PanIN συμπίπτει με τη συσσώρευση μοριακών ανωμαλιών. Οι αλλοιώσεις του PanIN έχουν μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο KRAS και παρουσιάζουν μείωση των τελομερών, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για πρώιμες αλλαγές στο μονοπάτι της διηθητικής κακοήθειας (Iovanna *et al.*, 2012).

Φυσιολογικά, το στρώμα του παγκρέατος είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ομοιόστασης του παγκρεατικού ιστού, όπως αντανακλάται από την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του παγκρέατος και του μικροπεριβάλλοντος, καθώς και από την επικοινωνία με την εξωκυτταρική μήτρα (ECM) μέσω υποδοχέων, ορμονών και άλλων διαλυτών παραγόντων (Corbo, Tortora and Scarpa, 2012). Το φυσιολογικό στρώμα μπορεί να προστατεύσει τα μη κακοήθη παγκρεατικά κύτταρα από την ανάπτυξη σε κακοήθη κύτταρα. Για παράδειγμα, η υπερπλασία του παγκρεατικού πόρου, που συνήθως θεωρείται προκαρκινική κατάσταση, προηγείται του παγκρεατικού καρκίνου. Παρόλο που η υπερπλασία του παγκρεατικού πόρου έχει γενετικές αλλοιώσεις, μερικές από τις οποίες είναι ακόμη πιο χαοτικές από εκείνες των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων, δεν μετατρέπεται σε κακοήθεια στις περισσότερες περιπτώσεις. Δεδομένης της ζωτικής σημασίας της επίδρασης του στρώματος στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος, καθώς και των ομοιοτήτων μεταξύ της ανάπτυξης των οργάνων και της καρκινογένεσης, είναι εύλογο να δηλώνεται ότι οι αλλοιώσεις του στρώματος συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου του παγκρέατος (Iovanna *et al.*, 2012).

Αρκετές μελέτες υποστήριξαν την κατασταλτική επίδραση του φυσιολογικού στρώματος στον καρκίνο του παγκρέατος. Σε ένα μοντέλο τρισδιάστατου συστήματος ιστοκαλλιέργειας, η συν-καλλιέργεια παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων με "φυσιολογικά" στρωματικά κύτταρα μείωσε τον συνολικό αριθμό των καρκινικών κυττάρων, δείχνοντας τις προστατευτικές επιδράσεις του φυσιολογικού στρώματος κατά του καρκίνου του παγκρέατος. Επομένως, τα φυσιολογικά στρωματικά κύτταρα θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ως

κυτταροτοξικοί παράγοντες που στοχεύουν σε κακοήθη κύτταρα των πόρων για τη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος (Erkan, 2013).

### **1.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στον παγκρεατικό καρκίνο**

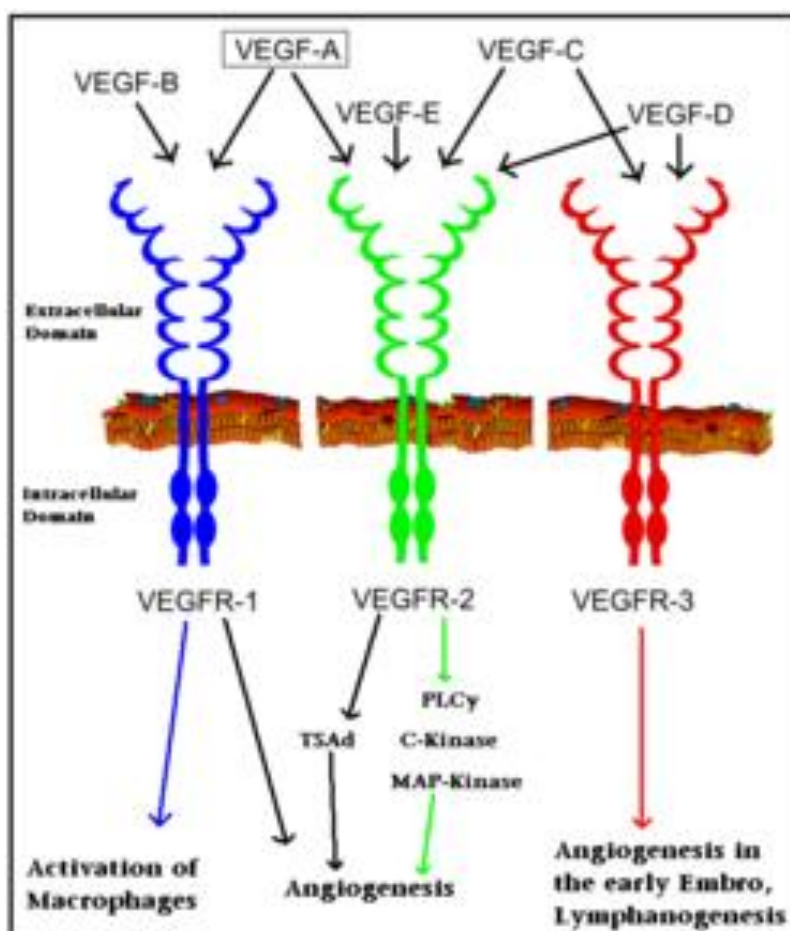
#### **1.3.1 Υποδοχείς αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (VEGFR)**

##### **1.3.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων**

Η αγγειογένεση, ο σχηματισμός και η διατήρηση των δομών των αιμοφόρων αγγείων είναι απαραίτητα όχι μόνο για τις φυσιολογικές λειτουργίες των ιστών, αλλά είναι σημαντικά και για την πρόοδο ασθενειών όπως ο καρκίνος (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006). Τις τελευταίες δεκαετίες, μια ποικιλία σηματοδοτικών μορίων έχουν αναγνωριστεί ότι συμμετέχουν στην αγγειογένεση, όπως οι αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες (VEGFs) και οι υποδοχείς τους (VEGFRs), οι οποίοι ρυθμίζουν τόσο την ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων από τα πρόδρομα κύτταρα κατά την πρώιμη εμβρυογένεση, όσο και το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία σε μεταγενέστερο στάδιο. Η οικογένεια γονιδίων των VEGF περιέχει τουλάχιστον 7 μέλη, συμπεριλαμβανομένου του παραγόμενου από ιικό γονιδίωμα VEGF-E, ενώ η οικογένεια γονιδίων των VEGFR έχει 3 έως 4 μέλη ανάλογα με τα είδη σπονδυλωτών. Ο VEGF-A και οι υποδοχείς του VEGFR-1 και VEGFR-2, διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο τόσο στη φυσιολογική, όσο και στην παθολογική αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένης της αγγειογένεσης των όγκων (Alitalo and Carmeliet, 2002).

Οι αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες (VEGFs) είναι ομοδιμερή πολυπεπίδια, ευαίσθητα σε εναλλακτικό μάτισμα, γεγονός που ρυθμίζει την ικανότητά τους να δεσμεύονται με τους υποδοχείς τους, καθώς και με τους πυρηνικούς υποδοχείς HS και NRP (Grünewald *et al.*, 2010). Οι VEGFs ασκούν τη δράση τους μέσω της δέσμευσής τους με τους VEGFRs. Οι VEGFRs αποτελούν

υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης, που αποτελούνται από τρία μέλη: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, με διαφορετικό μοτίβο έκφρασης και λειτουργίας (Εικόνα 5). Όλοι οι υποδοχείς μοιράζονται μια παρόμοια δομή, που χαρακτηρίζεται από βρόχους τύπου ανοσοσφαιρίνης στην εξωκυτταρική περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή, μια παραμεμβρανική περιοχή, μια περιοχή κινάσης τυροσίνης και μια ουρά Ο-τερματικού (Koch *et al.*, 2011). Οι VEGF μπορούν να παρουσιαστούν σε cis ισομορφή στους VEGFRs, όταν ο συνυποδοχέας τους εκφράζεται μαζί με τον VEGFR στο ενδοθηλιακό κύτταρο ή σε trans ισομορφή, όταν ο συνυποδοχέας τους εκφράζεται σε ένα διαφορετικό ενδοθηλιακό κύτταρο ή σε άλλο τύπο κυττάρου (Jakobsson *et al.*, 2006). Η δέσμευση αυτή επάγει το διμερισμό των υποδοχέων, δημιουργώντας ομο- ή ετεροδιμερή (Lemmon and Schlessinger, 2010). Ο διμερισμός ακολουθείται από αλλαγές διαμόρφωσης που επιτρέπουν την επακόλουθη ενεργοποίηση και την αυτοφωσφορυλίωση της τυροσινικής κινάσης.



Εικόνα 5: Οι υποδοχείς VEGFR και οι λειτουργίες με τις οποίες σχετίζονται. Ανατύπωση : (Shibuya, 2006)

### **1.3.1.2 Οι υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-3**

Ο υποδοχέας VEGFR-1 εκφράζεται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα. Το εναλλακτικό μάτισμά του οδηγεί στην παραγωγή μίας διαλυτής μορφής του, sVEGFR-1. Η δέσμευση των προσδετών του σε αυτόν, όπως οι VEGFA, VEGFB ή PlGF, ενεργοποιεί μία ασθενή δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο VEGFR-1 μεταφέρει σήματα που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων, μέσω της ρύθμισης του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Lemmon and Schlessinger, 2010)(Rahimi, Dayanir and Lashkari, 2000). Σε ποντίκια, τα έμβρυα χωρίς τον υποδοχέα πέθαιναν, λόγω του αυξημένου πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και της επακόλουθης αποδιοργάνωσης και δυσλειτουργίας του αγγειακού δικτύου (Fong *et al.*, 1995). Τα ετεροδιμερή των υποδοχέων VEGFR-1/VEGFR-2 έχουν ταυτοποιηθεί και διερευνηθεί *in vitro* και *in vivo*, υποδηλώνοντας τη συντονισμένη δράση τους. Επιπροσθέτως, ο προσδέτης VEGFA όταν συνδέεται με ομοδιμερή VEGFR-1 πλήρους μήκους και ετεροδιμερή VEGFR-1/VEGFR-2, οδηγεί σε μείωση της διαθέσιμης ποσότητάς του ώστε να δεσμευτεί με τον υποδοχέα VEGFR-2. Φαίνεται έτσι πώς ο VEGFR-1 εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης και λειτουργίας του VEGFR-2 (Karpas *et al.*, 2008) (Cudmore *et al.*, 2012). Επιπλέον, η έκφραση του VEGFR-1 στα μονοκύτταρα ρυθμίζει τη χημειοταξία τους (Tchaikovski, Fellbrich and Waltenberger, 2008) και ποντίκια που εκφράζουν έναν μεταλλαγμένο υποδοχέα ο οποίος στερείται της ενδοκυτταρικής τυροσινικής κινάσης, έχουν κατασταλαμμένα φλεγμονώδη κυτταρομεσολαβούμενα αγγειογένεση (Fischer *et al.*, 2008).

Ο υποδοχέας VEGFR-3 εκφράζεται κυρίως στα λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά η έκφρασή του επάγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα στον αναπτυσσόμενο αμφιβληστροειδή και στα καρκινικά αγγεία (Tammela *et al.*, 2008)(Benedito *et al.*, 2012). Η δέσμευση σε αυτόν των προσδετών VEGFC και VEGFD, τον ενεργοποιούν και προάγουν τη μετανάστευση των λεμφοντεροθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό του αυλού κατά τη διάρκεια της λεμφαγγειογένεσης (Mäkinen *et al.*,

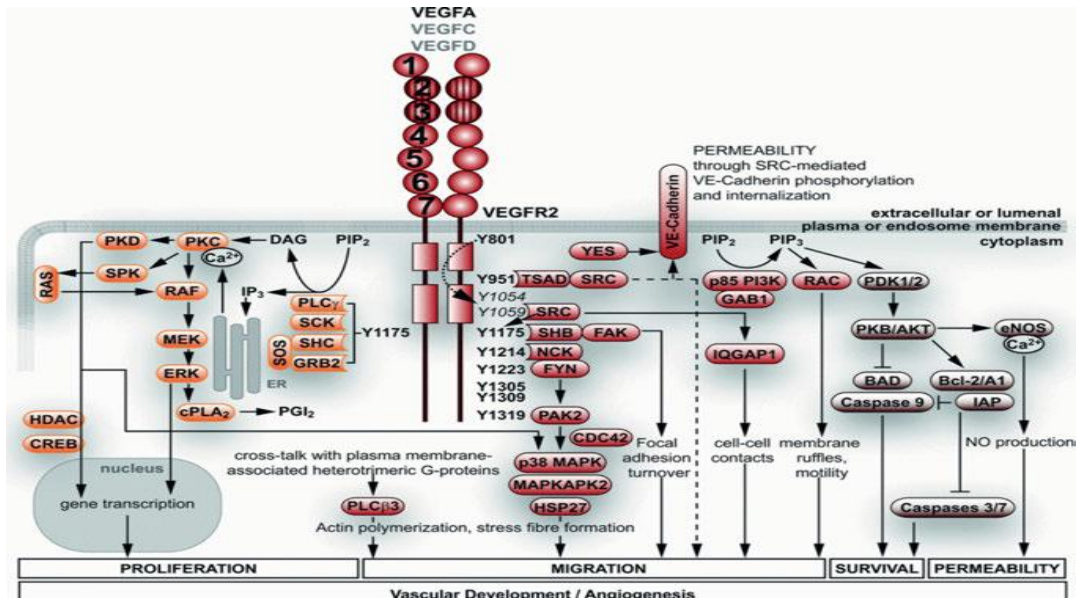
2001). Τα ετεροδιμερή των υποδοχέων VEGFR-3/VEGFR-2 εμπλέκονται στην ανάπτυξη της αγγειογένεσης *in vitro* (Nilsson *et al.*, 2010) και *in vivo* (Tvorogon *et al.*, 2010). Υποδηλώνεται επομένως ο σημαντικός ρόλος του VEGFR-3 στο σχηματισμό των αιμοφόρων αγγείων τόσο σε φυσιολογική ανάπτυξη όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Yao *et al.*, 2014). Μάλιστα σε πειράματα με ποντίκια, η στόχευση του γονιδίου του VEGFR-3 οδήγησε στον εμβρυϊκό θάνατο των ποντικιών, εξαιτίας της καρδιαγγειακής ανεπάρκειας και της εξασθενημένης αγγειακής οργάνωσης (Dumont *et al.*, 1998).

### **1.3.1.3. Ο υποδοχέας VEGFR-2**

Ο υποδοχέας VEGFR-2 εκφράζεται τόσο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όσο και σε άλλα, όπως τα νευρωνικά και τα καρκινικά κύτταρα. Η αγγειακή διαπερατότητα αποτελεί μια *in vivo* συνέπεια της ενεργοποίησης του υποδοχέα. Αρκετοί μικρού μοριακού βάρους αναστολείς της δραστηριότητας κινάσης του VEGFR-2 έχουν αναπτυχθεί κλινικά, ώστε να παρεμποδιστεί η παθολογική αγγειογένεση στον καρκίνο. Ο VEGFR-2 διαδραματίζει έναν ιδιαίτερα κρίσιμο ρόλο στην αγγειογένεση και τη νεοαγγειοποίηση σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο καρκίνος, ενώ εμπλέκεται στην ομοιόσταση του αγγειακού δικτύου, διατηρώντας την ενδοθηλιακή επιβίωση μέσω της αντι-αποπτωτικής σηματοδότησής του (Potente, Gerhardt and Carmeliet, 2011) (Εικόνα 6).

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα VEGFR-2 επάγεται από τη δέσμευση των προσδετών του, όπως του VEGFA, μέσω της εξωκυτταρικής Ig-like περιοχής 1 και 2, καθώς και των πρωτεολυτικώς επεξεργασμένων VEGFC και VEGFD (Potente, Gerhardt and Carmeliet, 2011). Το εναλλακτικό μάτισμα του VEGFR-2 οδηγεί στην παραγωγή της διαλυτής μορφής του sVEGFR-2, η οποία ανταγωνίζεται τον VEGFR-3 για τη δέσμευση του VEGFC (Albuquerque *et al.*, 2009). Η πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα VEGFR-2 επάγει αλλαγές στη διαμόρφωσή του, επιτρέποντας τη φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων της ενδοκυττάριας τυροσίνης και τη μεταγωγή σημάτων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Υπάρχουν πέντε θέσεις φωσφορυλίωσης της τυροσίνης (Y): Y949 (Y951 στον άνθρωπο), Y1052 (Y1154),

Y1057 (Y1159), Y1173 (1175) και Y1212 (Y1214), όπου καθεμιά από αυτές ενεργοποιεί διαφορετικές οδούς σηματοδότησης, επάγοντας αντίστοιχα μια διαφορετική εξειδικευμένη λειτουργία του υποδοχέα (Koch *et al.*, 2011).



Εικόνα 6: Απεικόνιση του υποδοχέα VEGFR-2 και το μεταβολών που σχετίζονται με την ενεργοποίησή του.

Η θέση φωσφορυλίωσης Y949 (Y951 στην Εικόνα 6) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαπερατότητα των κυττάρων που προκαλείται από τον VEGFR-2. Η περιοχή Src Homology 2 (SH2) του T-λεμφοκυττάρου (TSAd) δεσμεύει τη φωσφορυλιωμένη Y949, ενεργοποιώντας τις πρωτεϊνικές κινάσες Src και N3 (Matsumoto *et al.*, 2005)(Galvagni *et al.*, 2010). Οι Src και Ne φωσφορυλιώνουν τις VE-καρδερίνη και β-κατενίνη, προκαλώντας διασταυρούμενη αναδιάταξη και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Η επαγόμενη από τον VEGFR-2 φωσφορυλίωση της Src προκαλεί αυξημένη διαπερατότητα του ενδοπλασματικού δικτύου με την ενεργοποίηση της μικρής GTPase Rac και την ενδοκυττάρωση της VE-καρδερίνης (Gavard and Gutkind, 2006). Επιπλέον, προκαλείται παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) από την ενδοθηλιακή συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (eNOS). Η ενεργοποίηση του eNOS συμβαίνει με έναν τρόπο που εξαρτάται από τη

φωσφολιπάση Cy (PLCy)-Ca<sup>2+</sup> ή με φωσφορυλίωση σερίνης, που προκαλείται από την κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt (Fukumura *et al.*, 2001).

Οι θέσεις φωσφορυλίωσης Y1052 και Y1057 (Y1054 και Y1059 στην Εικόνα 6) βρίσκονται στην περιοχή της κινάσης και σχετίζονται με την ενεργοποίηση της κινάσης από τον υποδοχέα, μέσω της σταθεροποίησης του βρόχου ενεργοποίησης κινάσης (Koch *et al.*, 2011).

Η ενεργοποίηση της θέσης φωσφορυλίωσης Y1173 ρυθμίζει την αιμοποιητική και ενδοθηλιακή κυτταρική διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Sakurai *et al.*, 2005), καθώς και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την ενηλικίωση. Η φωσφορυλιωμένη Y1173 δεσμεύει δευτερεύοντες διαμεσολαβητές, όπως η PLCγ και τους προσδέτες SHB, Sck και SHC. Η δέσμευση PLCγ-pY1173 ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), και το downstream μονοπάτι της εξωκυτταρικής κινάσης Erk 1/2, το οποίο είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η δέσμευση της πρωτεΐνης SHB στην pY1173, η οποία με τη σειρά της δεσμεύει το FAK, συμβάλλει στην προσκόλληση και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Holmqvist *et al.*, 2004). Η δέσμευση των Sck και SHC, ίσως ελέγχει την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης Erk 1/2 μέσω της ενεργοποίησης της Ras. Η σημασία της θέσης Y1173 επισημαίνεται σε knock-in ποντίκια, στα οποία η τυροσίνη έχει αντικατασταθεί με φαινυλαλανίνη. Η μειωμένη ενδοθηλιακή επιβίωση και διαφοροποίηση τους, τα οδήγησε στο θάνατο (Sakurai *et al.*, 2005).

Η φωσφορυλίωση της θέσης Y1212 (Y1214 στην Εικόνα 6) επιδρά στην αναδιαμόρφωση της ακτίνης και στο σχηματισμό ινών στρες (Lamallice, Houle and Huot, 2006). Η φωσφορυλιωμένη Y1212 δεσμεύει την περιοχή SH2 της Nck, η οποία *in vitro*, μεσολαβεί στην πρόσληψη της τυροσινικής κινάσης Fyn. Η ενεργοποίηση της Fyn προκαλεί φωσφορυλίωση της p21-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (PAK) και ενεργοποίηση της Rho GTPase Cdc42, ενεργοποιώντας τελικά την πρωτεϊνική κινάση p38MAPK. Η Cdc42 είναι απαραίτητη για την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση και η απώλειά της διαταράσσει το σχηματισμό αυλού και την πολικότητα του ενδοπλασματικού δικτύου (Abraham *et al.*, 2015)(Barry *et al.*, 2015). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του υποδοχέα Robo από τον συνδέτη του Slit, προκαλεί

δέσμευση της Nck στον VEGFR-2, ρυθμίζοντας downstream την ενεργοποίηση της Cdc42 (Dubrac *et al.*, 2016).

Η ενεργοποίηση του VEGFR-2 συμβαίνει και μέσω μη κανονικών οδών σηματοδότησης, όπου δεν απαιτείται η δέσμευση ενός VEGF προσδέτη. Διάφοροι παράγοντες μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα, όπως η γκρελίνη, οι γαλακτίνες, η λακτάση και οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDLs) (Ruan and Kazlauskas, 2013). Οι δυνάμεις shear stress έχει παρατηρηθεί ότι είναι ικανές να προκαλέσουν φωσφορυλίωση του VEGFR-2, μεσολαβώντας στον σχηματισμό ενός συμπλόκου που περιλαμβάνει τους VEGFR-2, VEGFR-3, PECAM-1 και VE-καντερίνη (Tzima *et al.*, 2005). Η φωσφορυλίωση της Y1212 και η ενεργοποίηση της σηματοδότησης των Cdc42 και p38MAPK αυξάνεται κατά επέκταση (Collins and Tzima, 2014). Επιπλέον, προκαλείται απελευθέρωση του VEGFA από το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενισχύοντας την άμεση ενεργοποίηση του VEGFR-2 (dela Paz, Melchior and Frangos, 2013).

#### **1.3.1.4 Ρύθμιση των οδών σηματοδότησης του υποδοχέα VEGFR-2**

Το τελικό αποτέλεσμα της επαγόμενης σηματοδότησης εξαρτάται από ένα εύρος ρυθμιστικών μηχανισμών που δρουν τόσο στο επίπεδο της αλληλεπίδρασης συνδέτη / υποδοχέα, όσο και στα καθοδικά μονοπάτια σηματοδότησης.

Η εσωτερίκευση του υποδοχέα VEGFR-2 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητάς του. Μόλις ενεργοποιηθεί, ο VEGFR-2 διαχωρίζεται από την caveolin-1 (Labrecque *et al.*, 2003) και ενδοκυτταρώνεται μέσω μιας διαδικασίας στην οποία μεσολαβεί η κλαθρίνη. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ NPR1, GIPC/συνεκτίνης και μυσίνης VI απαιτούνται για τη διαδικασία της ενδοκύτωσής του, η οποία ελέγχεται από την αλληλεπίδραση του με την VE-cadherin, υπεύθυνη για την αδρανή κατάστασή του (Lanahan *et al.*, 2013). Μόλις εσωτερικευτεί, ο VEGFR-2 μετακινείται στα EEA1-θετικά ενδοσώματα κατά τρόπο εξαρτώμενο από την Rab5 (Ballmer-Hofer *et al.*, 2011).



Η ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της εσωτερίκευσης του υποδοχέα. Ενώ το PLCγ μονοπάτι ενεργοποιείται από τον VEGFR-2 που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου, η ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης Erk1/2 και Akt απαιτεί την εσωτερίκευσή του (Lampugnani *et al.*, 2006). Η φωσφορυλιωμένη Erk1/2 υπάρχει στα πρώιμα ενδοσώματα Rab5 και καθυστερεί τη μετακίνηση του VEGFR-2 στα EEA1-θετικά ενδοσώματα. Τα πρώιμα ενδοσώματα περιέχουν επίσης τις πρωτεΐνες PI3K και pAkt, υποδηλώνοντας ότι η διέγερση της οδού PI3K/Akt ρυθμίζεται με τρόπο παρόμοιο με την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης Erk1/2 (Wang *et al.*, 2010). Σε αντίθεση, η σηματοδότηση της Src ρυθμίζεται διαφορετικά. Η ανενεργή Src βρίσκεται στα Rab7-θετικά περιπυρηνικά όψιμα ενδοσώματα, και μόλις φωσφορυλιωθεί και ενεργοποιηθεί, μετατοπίζεται στη μεμβράνη των Rab11-θετικών ενδοσωμάτων (Sandilands *et al.*, 2004).

Ύστερα από την εσωτερίκευσή του, ο ενεργοποιημένος VEGFR-2 φωσφορυλιώνεται στα υπολείμματα τυροσίνης. Τέτοιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις δημιουργούν θέσεις σύνδεσης για μια ποικιλία ρυθμιστικών πρωτεϊνών που περιέχουν SH2 ή φωσφοτυροσινικές περιοχές πρόσδεσης. Η PLCγ1 δεσμεύεται στη θέση pY1175 και στον φωσφοτυροσινικό επίτοπο εντός του VEGFR-2 (Roskoski, 2007) και η πρόσληψή του στην πλασματική μεμβράνη ενεργοποιεί την υδρόλυση της φωσφατιδυλινοσιτόλης-4,5-διφωσφορικού σε διακυγλυκερόλη (DAG) και 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3). Η δημιουργία IP3 ενεργοποιεί τον υποδοχέα IP3, ο οποίος ενεργεί ως κανάλι ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μεταφέροντας ιόντα ασβεστίου στο κυτοσόλιο. Αντίθετα, η DAG ενεργοποιεί το ένζυμο της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), ενεργοποιώντας ως επακόλουθο το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK. Επιπροσθέτως, η φωσφορυλίωση του VEGFR-2 διεγείρει την ενεργοποίηση της φωσφατιδυλινοσιτολικής 3-κινάσης (PI3K), οδηγώντας σε αυξημένη δραστηριότητα της c-Akt (πρωτεϊνική κινάση B), φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (eNOS) και παραγωγή νιτρικών οξειδίων (NO). Το νιτρικό οξείδιο (NO) διεγείρει την έκφραση και μεταγραφική δραστηριότητα σε κατάσταση υποξίας, μεταγράφοντας το mRNA του προσδέτη VEGF-A. Τα ενεργοποιημένα ένζυμα PKC ενεργοποιούν τις MAPK και ERK κινάσες, οι οποίες στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν το p42/44

MARK μονοπάτι, προκαλώντας αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Karar and Maity, 2011).

### **1.3.2 Το γονίδιο Ras**

#### **1.3.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης Ras**

Η οδός σηματοδότησης του γονιδίου Ras αποτελεί στόχο για αντικαρκινική θεραπεία εξαιτίας του σημαντικού ρόλου του στην καρκινογένεση. Η οικογένεια πρωτεϊνών Ras περιλαμβάνει διάφορα μέλη, όπως οι Ras (H, K, M, N, και R), οι Rap και οι Ral πρωτεΐνες. Τα μέλη αυτά παρουσιάζουν 30% ομοιότητα αλληλουχίας με αρκετές άλλες μικρές μονομερείς οικογένειες πρωτεϊνών G, όπως οι οικογένειες Rho/Rac/CDC42, Rab/Ypt, Ran, Arf και Rad. Η πρωτεΐνη Ras σε αντίθεση με τις κλασσικές ετεροτριμερικές πρωτεΐνες G, υπάρχει ως μονομερές. Κάθε πρωτεΐνη Ras αποτελείται από περίπου 190 αμινοξέα, τα οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένα στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό τους άκρο. Οι περισσότερες διαφορές μεταξύ τους εμφανίζονται στην υπερμεταβλητή περιοχή περίπου 25 αμινοξέων κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για τις διάφορες λειτουργίες των Ras πρωτεϊνών (Normanno *et al.*, 2009).

Το γονίδιο Ras κωδικοποιεί μία μονομερή GTPase πρωτεΐνη G, μεγέθους 21kd, η οποία εντοπίζεται στη μεμβράνη και λειτουργεί ως ένας μοριακός διακόπτης που συνδέει τον υποδοχέα με μία τυροσινική κινάση, μεταφέροντας σήματα από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα. Αυτά τα σήματα οδηγούν σε πρωτεϊνική σύνθεση και ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Η πρωτεΐνη Ras παραμένει στην αδρανή μορφή της όταν είναι συνδεδεμένη με το GDP, και στη δραστική μορφή της όταν δεσμεύεται με GTP. Στην κατάσταση ηρεμίας, η Ras είναι συνδεδεμένη με το GDP (Lièvre *et al.*, 2006). Μετά τη δέσμευση ενός εξωτερικού συνδέτη στον υποδοχέα του, γίνεται διμερισμός του υποδοχέα και ενεργοποιείται η ενδογενής τυροσινική κινάση του. Ακολουθεί αυτοφωσφορύλιωση συγκεκριμένων υπολειμμάτων τυροσίνης στο ενδοκυττάριο

τμήμα του υποδοχέα. Τα υπολείμματα φωσφορυλιωμένης τυροσίνης δεσμεύονται στην περιοχή SH2 πρωτεϊνών-υποδοχέων, όπως η Grb-2. Η πρωτεΐνη Grb-2 είναι ένα μόριο-κλειδί για την Ras και αποτελείται από μια SH2 και δύο SH3 περιοχές. Συνδέει τον ενεργοποιημένο υποδοχέα προς την κυτοσολική πρωτεΐνη SOS, έναν παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GNEF), αλληλοεπιδρώντας και δεσμεύοντας την Ras στην πλασματική μεμβράνη. Η δέσμευση αυτή προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της Ras και διάσπαση του GDP, επιτρέποντας στη Ras να δεσμευτεί με το GTP και να ενεργοποιηθεί. Η ενεργοποιημένη Ras ενεργοποιεί διάφορα μόρια, όπως την κινάση σερίνης-θρεονίνης Raf-1, την φωσφοϊνοσιτιδική 3'-κινάση (PI3-K) και την RalGDS. Τέτοια μόρια ενεργοποιούν διαφορετικούς καταρράκτες σηματοδότησης, που οδηγούν είτε στην ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων, όπως εκείνων που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες που μετασχηματίζουν τον αυξητικό παράγοντα-α και τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), είτε σε μεταβολές στον κυτταροσκελετό ακτίνης ενεργοποιώντας τις πρωτεΐνες G της οικογένειας Rho. Οι ογκογονικές μεταλλάξεις των Ras όχι μόνο μειώνουν τη χαμηλή ενδογενή δραστικότητα της GTPase που έχουν, αλλά καταργούν πλήρως την ενεργοποίηση της GTPase, που προκαλείται από GAP πρωτεΐνες. Έτσι οι ογκογονικές μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Ras παραμένουν συνεχώς συνδεδεμένες στην GTP μορφή τους, ενεργοποιώντας διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (Prior, Lewis and Mattos, 2012).

### **1.3.2.2 Λειτουργίες της πρωτεΐνης Ras**

Οι πρωτεΐνες Ras συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην κυτταρική επιβίωση και στην αγγειογένεση.

- Μια πληθώρα ερεθισμάτων ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες Ras, επηρεάζοντας την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων. Φαίνεται πώς οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν βασικά συστατικά των μιτογονικών σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τυροσινικές κινάσες, καθώς μετά από κάποια μιτογονική διέγερση είναι ενεργοποιημένες στο 50% των κυττάρων.

Ο τύπος του κυττάρου και του διαμεμβρανικού υποδοχέα, καθορίζει εάν θα συμβεί διαφοροποίηση ή πολλαπλασιασμός. Για παράδειγμα, στους ινοβλάστες εμφανίζεται μιτογόνο δράση, ενώ προκαλείται αναστολή της ανάπτυξης και επέκταση των διαδικασιών τύπου νευρίτη στο φωτοχρωμοκύτωμα PC12 αρουραίου. Ακόμα, οι ογκογονικές Ras πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα με τις JNK/jun, παρακάμπτοντας τους κανονικούς μηχανισμούς ελέγχου. Η φυσιολογική πρωτεΐνη ενεργοποιεί το μονοπάτι κινάσης Raf/MEK/MAP και την κυκλίνη, ενώ και η οδός Rac/Rho/CDC42 διεγείρεται, ενεργοποιώντας κατά επέκταση την JNK (Tsai *et al.*, 2015).

- Η ενεργοποίηση του μονοπατιού MEK/MAP κινάσης αυξάνει τα κυτταρικά επίπεδα της κυκλίνης D1, προάγοντας την εξέλιξη των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό. Η ενεργοποίηση των οδών PI3-K και RalGDS οδηγεί στο ίδιο αποτέλεσμα. Η ενεργοποίηση του PI3-K είναι απαραίτητη για την έκφραση της ενδογενούς κυκλίνης D1 και για την είσοδο στη φάση S μετά από διέγερση στους NIH 3T3 ινοβλάστες. Κάτι τέτοιο οφείλεται εν μέρει, στην ενεργοποιημένη κινάση σερίνης-θρεονίνης Akt/PKB και, σε μικρότερο βαθμό, στην GTPase Rac (Hoogwater *et al.*, 2010).
- Οι ογκογονικές μεταλλάξεις της Ras εμπλέκονται σε μεταστατικούς όγκους και στην αγγειογένεση. Τα δεδομένα δείχνουν ότι αυτό είναι άμεσο αποτέλεσμα της Ras ογκοπρωτεΐνης και όχι απλά μια έμμεση συνέπεια. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων με ογκογονικές μεταλλάξεις Ras έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών, όπως η ζελατινάση, που εμπλέκεται στη μετάσταση του όγκου. Η έκφραση της θρομβοσπονδίνης, ενός εξωκυτταρικού μορίου που μειώνεται σε μεταστατικούς όγκους, μειώνεται επίσης ύστερα από τη διαμόλυνση κυττάρων με ιικό K-Ras. Η έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF αυξήθηκε σε μετασχηματισμένα επιθηλιακά κύτταρα με μεταλλάξεις K-Ras και H-Ras μέσω της οδού Raf. Επιπλέον, γενετική διαταραχή του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου K-Ras σε ανθρώπινα

καρκινικά κύτταρα συσχετίστηκε με μείωση της δραστηριότητας του VEGF (Hatley *et al.*, 2010).

- Δεδομένα υποστηρίζουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των ιντεγκρινών μοιράζεται κοινά στοιχεία με αυτό των Ras πρωτεϊνών. Έχει αποδειχθεί ότι το μονοπάτι Raf/MEK/MAPK ενεργοποιείται μετά από τη μεσολάβηση της ιντεγκρίνης στους ινοβλάστες NIH3T3 ποντικού. Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μια οικογένεια υποδοχέων προσκόλλησης, που παράγουν σήματα που επηρεάζουν κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Οι ιντεγκρίνες ρυθμίζουν την κυτταροπλασματική τυροσινική κινάση FAK και ενεργοποιούν έτσι τις κινάσες MAP. Ενδιαφέρον είναι ακόμα, ότι η R-Ras πρωτεΐνη ρυθμίζει τη συγγένεια με τις ιντεγκρίνες, προκαλώντας αύξηση στην κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση στο κολλαγόνο, μέσω της PI3-K και της πρωτεϊνικής κινάσης C (Kamerkar *et al.*, 2017).

### **1.3.3.3 Μεταλλάξεις των πρωτεϊνών Ras**

Κάθε κύτταρο θηλαστικού περιέχει τουλάχιστον τρία πρωτο-ογκογονίδια Ras (K-Ras, H-Ras, N-Ras στον άνθρωπο) που κωδικοποιούν στενά συγγενικές, αλλά διακριτές πρωτεΐνες. Η ενεργοποίηση μεταλλάξεων σε αυτές τις πρωτεΐνες Ras οδηγεί σε συνεχή σηματοδότηση, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αναστέλλοντας την απόπτωση. Ογκογονικές μεταλλάξεις στο γονίδιο Ras υπάρχουν σε περίπου 30% όλων των καρκίνων του ανθρώπου. Οι μεταλλάξεις στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του παγκρέατος εντοπίζονται μόνο στο γονίδιο K-Ras. Σε καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος και της ουροδόχου κύστης, οι μεταλλάξεις είναι κυρίως στο γονίδιο H-Ras. Μεταλλάξεις στο γονίδιο N-Ras βρίσκονται στη λευχαιμία, στο μελάνωμα, σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και σε αιματολογικές κακοήθειες. Τα καρκινώματα θυρεοειδούς είναι μοναδικά στο να έχουν μεταλλάξεις και στα τρία Ras γονίδια. Οι μεταλλάξεις εμφανίζονται συχνότερα σε K-Ras και λιγότερο συχνά σε H-Ras (Kamerkar *et al.*, 2017) (Εικόνα 7).

Έχει βρεθεί μια υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων των γονιδίων Ras σε διάφορους τύπους όγκων, τόσο σε φυσική όσο και πειραματικά επαγόμενη κατάσταση. Οι αναγνωρισμένες μεταλλάξεις περιορίζονται σε έναν πολύ μικρό αριθμό θέσεων (αμινοξέα 12, 13, 59 και 61), με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες Ras να χάνουν την ιδιότητά τους να επάγουν την υδρόλυση του GTP από την GAP. Τέτοιες σημειακές μεταλλάξεις οδηγούν στη συστηματική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras. Αυτές οι μεταλλαγμένες μορφές Ras έχουν μειωμένη δραστικότητα GTPase, όπου αν και εξακολουθούν να δεσμεύουν το GAP, δεν υπάρχει σήμα απενεργοποίησής τους, αφού η GTPase δεν είναι πλέον ενεργοποιημένη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Castellano and Santos, 2011). Οι διαταραχές στη ρύθμιση του GTP-GDP, η απώλεια των GAP ή η επίμονη ενεργοποίηση των GEFs, είναι πρόσθετοι μηχανισμοί δράσης του RAS γονιδίου στον καρκίνο. Πρόσφατες μελέτες μάλιστα υποστηρίζουν ότι οι υπόλοιπες μη μεταλλαγμένες πρωτεΐνες RAS που υπάρχουν σε καρκίνους με μεταλλαγμένο RAS, συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου (Young, Lou and McCormick, 2013), αν και άλλες μελέτες υποδηλώνουν ότι αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να δράσουν ως καταστολείς όγκων (Weyandt *et al.*, 2015).

Οι μεταλλάξεις συχνά περιορίζονται σε μόνο ένα από τα γονίδια Ras και η συχνότητα εξαρτάται από τον τύπο ιστού και όγκου. Έτσι, οι μεταλλάξεις του γονιδίου Ras είναι σπάνιες σε καρκίνους του μαστού, των ωοθηκών, του στομάχου, του οισοφάγου και του προστάτη. Ωστόσο, υπάρχουν σε όλα σχεδόν τα αδενοκαρκινώματα του παγκρέατος και στο 50% των καρκίνων του παχέος εντέρου και του θυρεοειδούς. Σύμφωνα με τον κατάλογο σωματικών καρκινικών μεταλλάξεων (COSMIC), το K-Ras είναι η πιο συχνά μεταλλαγμένη ισομορφή σε καρκίνους (86%), ακολουθούμενη από N-Ras (11%) και H-Ras (3%). Σημαντικό είναι πως, το 98% των μεταλλάξεων του ογκογονιδίου Ras εντοπίζονται στα υπολείμματα αμινοξέος της δραστικής θέσης G12, G13 και Q61. Οι K-Ras G12 μεταλλάξεις (89%) κυριαρχούν σε ανθρώπινους καρκίνους, ακολουθούμενες από τις μεταλλάξεις του G13 (9%) και Q61 (1%) (Wang *et al.*, 2013).

Το γονίδιο K-RAS κωδικοποιεί δύο γονιδιακά προϊόντα με εναλλακτικό μάτισμα, τις ισομορφές K-Ras4A και K-Ras4B, οι οποίες διαφέρουν σε τέσσερα εξώνια. Τα εναλλακτικά αυτά τέσσερα εξώνια κωδικοποιούν τις υπερμεταβλητές περιοχές

HVRs των πρωτεϊνών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μεμβρανική στόχευση. Ενώ το K-Ras4B στερείται ενός σημείου παλμιτυλίωσης, το K-Ras4A είναι παλμιτυλιωμένο. Το mRNA του K-Ras4A εκφράζεται νωρίς στην εμβρυογένεση και διαφοροποιείται σε ενήλικους ιστούς. Στον άνθρωπο, το K-Ras4A εκφράζεται στο γαστρεντερικό ιστό και σε μικρότερο βαθμό, στο νεφρικό και πνευμονικό ιστό, αλλά καθόλου σε νευρικό σύστημα ή σκελετικό μυ (You *et al.*, 2016).

Η K-Ras4A ισομορφή είναι συντηρημένη σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η διατήρηση των δύο παραλλαγών ματίσματος του K-RAS γονιδίου κατά τη διάρκεια της εξέλιξης υποδηλώνει ξεχωριστές λειτουργίες, χωρίς όμως να έχουν αναφερθεί σαφείς αποδείξεις. Έχει δειχθεί ότι το ενεργοποιημένο K-Ras4A είναι ικανό να μετασχηματίζει κύτταρα (Han *et al.*, 2012). Ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης Raf-1 και μεταδίδει σήμα μέσω του μονοπατιού MAPK πολύ πιο αποτελεσματικά από ότι τα ογκογονίδια H-Ras και N-Ras. Ακόμα έχει μεγαλύτερη ικανότητα να επάγει την ανάπτυξη όγκων συγκριτικά με το K-Ras4B, που εκφράζεται στο ίδιο επίπεδο (Liu *et al.*, 2015). Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στον καρκίνο, οι οποίες καθιστούν το K-Ras γονίδιο ενεργό, βρίσκονται στα εξώνια 1 και 2, και οι δύο παραλλαγές ματίσματος κωδικοποιούν ογκογονικές πρωτεΐνες. Η K-Ras4B ισομορφή διαθέτει μια θέση φωσφορυλίωσης (S181) εντός της υπερμεταβλητής περιοχής HVR, η οποία ενεργεί ως ηλεκτροστατικός διακόπτης προκαλώντας τη μετατόπιση του από την πλασματική μεμβράνη σε ενδομεμβρανικά διαμερίσματα (Barceló *et al.*, 2014). Αυτή η αλλαγή θέσης επηρεάζει τη δέσμευση του προσδέτη και τη βιολογική δραστηριότητα του KRAS4B.

Το ογκογονίδιο KRAS έχει μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο του παγκρέατος εξαιτίας του υψηλού επιπολασμού των μεταλλάξεων του. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS ανιχνεύονται σε ~ 30% των πρώιμων νεοπλασμάτων με τη συχνότητα να ανέρχεται σε ~ 95% σε προχωρημένο παγκρεατικό καρκίνο. Οι μεταλλάξεις που ουσιαστικά οδηγούν στην ενεργοποίηση του γονιδίου KRAS είναι οι σημειακές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο G12 (GGT προς GAT / GTT / CGT) με αποτέλεσμα την υποκατάσταση της γλυκίνης με ασπαρτάτη, βαλίνη ή αργινίνη. Αυτές οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 αντιπροσωπεύουν τις κύριες σημειακές μεταλλάξεις (~ 98%) με ορισμένες μεταλλάξεις να έχουν αναφερθεί επίσης στα κωδικόνια 13 και 61. Το μεταλλαγμένο γονίδιο KRAS έχει ως αποτέλεσμα τη συστηματική ενεργοποίηση της

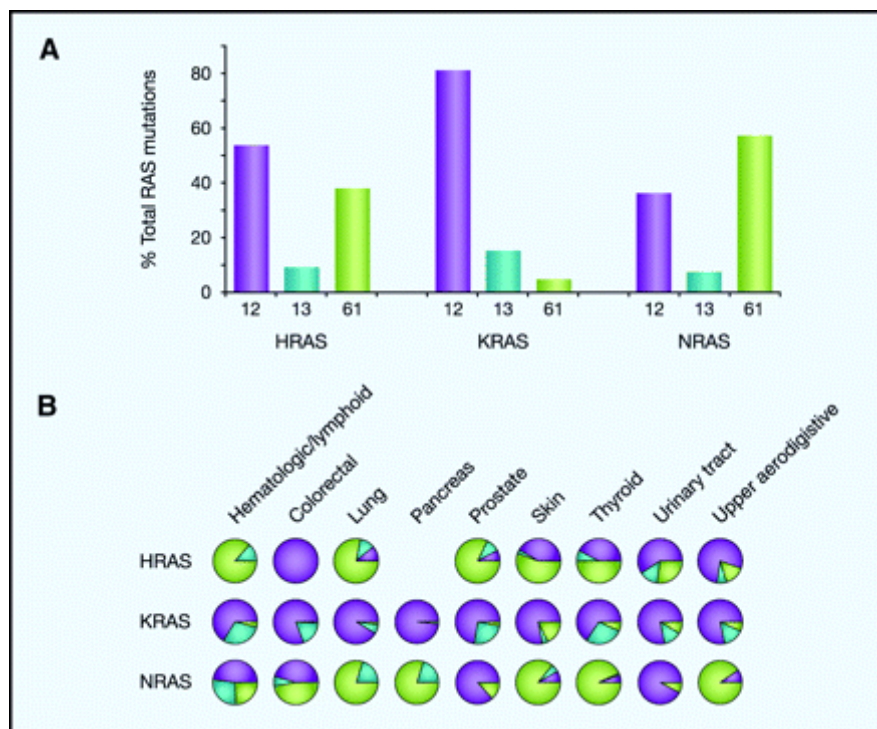
ογκογονικής σηματοδοτήσεώς του (Eser *et al.*, 2014). Έχει προταθεί ότι απαιτείται η ογκογενής σηματοδότηση του γονιδίου KRAS για την έναρξη, την πρόοδο και τη συντήρηση του παγκρεατικού καρκίνου (Guerra and Barbacid, 2013). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του KRAS έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των παγκρεατικών κυττάρων stellate και των ανοσοκυττάρων, συμβάλλοντας έτσι περαιτέρω στη νεοπλασματική εξέλιξή του (Di Magliano and Logsdon, 2013). Παρά το γεγονός ότι έχει αναγνωριστεί ένας κρίσιμος ρόλος της πρωτεΐνης KRAS, αυτό δεν έχει ως αποτέλεσμα κάποιο θεραπευτικό πλεονέκτημα, καθώς το KRAS δεν μπορεί να στοχευθεί αποτελεσματικά. Αυτό έχει οδηγήσει σε προσπάθειες για την ανάπτυξη θεραπειών που στοχεύουν σηματοδότηση προς τα πάνω ή προς τα κάτω του μονοπατιού του KRAS (Bournet *et al.*, 2016). Σε προκλινικά μοντέλα ποντικών, έχει αναφερθεί επιτυχής στόχευση του KRAS. Για παράδειγμα, μέσω της συστηματικής χορήγησης νανοσωματιδίων που περιέχουν ειδικά για το KRAS μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA), παρατηρήθηκε υποχώρηση των καρκινωμάτων που κατευθύνονται από KRAS (Zeng *et al.*, 2014). Αρκετά φάρμακα ακόμα ελέγχονται σε κλινικές δοκιμές, τα οποία στοχεύουν στην πρωτεΐνη MAPK και στην κινάση PI3K (Collins and di Magliano, 2014).

Μία στρατηγική για θεραπείες βασισμένες στη γονιδιωματική, είναι η επαγωγή της θνησιμότητας σε καρκινικά κύτταρα, στα οποία εάν ορισμένα κυτταρικά συμβάντα συνυπάρξουν, έχουν ως αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου. Στον καρκίνο, ο στόχος είναι να ανακαλυφθούν παράγοντες οι οποίοι, με την παρουσία συγκεκριμένων μεταλλάξεων, προκαλούν αυτό το φαινόμενο (Makohon-Moore, Brosnan and Iacobuzio-Donahue, 2013). Εάν καταστεί δυνατόν, φαίνεται ότι ο τελικός στόχος για θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος είναι η ίδια η πρωτεΐνη KRAS, δεδομένου ότι είναι ογκογόνος, μεταλλάσσεται σχεδόν παντού στον καρκίνο του παγκρέατος και είναι μια μετάλλαξη που βρίσκεται στον γονικό κλώνο, και κατά επέκταση σε όλα τα κύτταρα του καρκίνου. Ωστόσο, η στόχευση της αποτελεί μέχρι και τώρα ένα ανυπέρβλητο εμπόδιο. Το ίδιο το γονίδιο KRAS δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματικός θεραπευτικός στόχος. Παρ' όλα αυτά, σε άλλα συστήματα μοντέλων έχουν εντοπιστεί γονίδια, των οποίων η αναστολή είναι θανατηφόρα σε μεταλλαγμένο KRAS, συμπεριλαμβανομένου του TBK1 (που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του NF-κB), του STK33 (κινάση σερίνης / θρεονίνης που ενεργοποιεί



το S6K1), PLK1 (μια σερίνη / κινάση που εμπλέκεται στη μίτωση) και μέλη του συμπλόκου APC / C (σύμπλεγμα προαγωγής αναφορικής) (Marcotte *et al.*, 2012).

Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η στόχευση των καθοδικών τελεστών του μπορεί να αποδειχθεί πιο αποτελεσματική. Σε πρόσφατη έρευνα αναφέρθηκε επιτυχία στη θεραπεία ενός μοντέλου καρκίνου του παγκρέατος με συνδυασμό αναστολέων της οδού. Η παρεμπόδιση της οδού σηματοδότησης MEK/ERK/MAPK ήταν αποτελεσματική σε κυτταρικές σειρές παγκρεατικού καρκίνου και σε ορθοτοπικούς όγκους. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς των MEK και AKT, παρατηρήθηκε συνεργιστική επίδραση στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Δεδομένου ότι και οι δύο αυτές οδοί ενεργοποιούνται από το ογκογονίδιο KRAS, φαίνεται πώς η στόχευση των τελεστών που βρίσκονται προς τα κάτω στο μονοπάτι σηματοδότησης του KRAS αποτελούν την παράκαμψη στην ανικανότητα στόχευσης του ίδιου του μεταλλαγμένου KRAS (Collisson *et al.*, 2012).



Εικόνα 7: Α) Τα 3 γονίδια RAS και τα εξώνια που συμβαίνουν οι μεταλλάξεις τους Β) Η συσχέτισή τους με τους αντίστοιχους καρκίνους. Ανατύπωση: (Shibuya, 2006)

### **1.3.4 Το μονοπάτι BRAF/MEK/ERK**

#### **1.3.4.1 Σηματοδότηση του μονοπατιού BRAF/MEK/ERK**

Παρόλο που τα κύτταρα περιβάλλονται από μια μεμβράνη που διαχωρίζει το εξωτερικό από το εσωτερικό τους περιβάλλον, μπορούν να ανταποκριθούν σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα και να μετατρέπουν τα σήματα τους σε κυτταρικές διαδικασίες. Αυτή η μετατροπή συνήθως διαμεσολαβείται από τη δέσμευση εξωκυτταρικών προσδετών σε συγκεκριμένους διαμεμβρανικούς υποδοχείς, ενεργοποιώντας περαιτέρω τη μετάδοση σημάτων μέσω μονοπατιών ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Τα μονοπάτια αυτά μεταδίδουν τα σήματα σε ενδοκυτταρικούς στόχους, ρυθμίζοντας κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες. Το μονοπάτι BRAF/MEK/ERK διαδραματίζει βασικό ρόλο στη μετάδοση πολλαπλασιαστικών σημάτων από υποδοχείς που συνδέονται με τη μεμβράνη, καθώς οι μεταλλάξεις οι οποίες εμφανίζονται στα γονίδια που κωδικοποιούν τα συστατικά του μονοπατιού έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του παγκρέατος. Κεντρικό δομικό στοιχείο αποτελεί η οδός πρωτεϊνικής κινάσης MAPK, όπου η μετάδοση σημάτων μέσω αυτής αρχίζει συνήθως με την ενεργοποίηση μίας μικρής πρωτεΐνης, όπως της πρωτεΐνης Ras (Εικόνα 8). Η ενεργοποίηση της οδού BRAF / MEK / ERK από έναν αυξητικό παράγοντα σε έναν συγκεκριμένο υποδοχέα μεσολαβείται μέσω της φωσφορυλίωσης κατάλληλων παραγόντων μεταγραφής στον πυρήνα, οι οποίοι διαμορφώνουν την έκφραση γονιδίων-κλειδιών (Rubinfeld and Seger, 2005).

Μετά την διέγερση του αυξητικού παράγοντα του κατάλληλου (συγγενικού) υποδοχέα, μία πρωτεΐνη προσαρμογής πρωτεΐνης (Shc) με Src ομολογία 2 συσχετίζεται με το καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα του ειδικού ενεργοποιημένου αυξητικού παράγοντα, όπως του υποδοχέα των αγγειακών αυξητικών παραγόντων VEGFR. Η πρωτεΐνη Shc προσλαμβάνει την πρωτεΐνη Grb2 και την ομόλογη πρωτεΐνη SOS, με αποτέλεσμα η δεσμευμένη στη μεμβράνη πρωτεΐνη Ras να συνδέεται με το GTP. Η πρωτεΐνη Ras μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από κινάσες

τυροσίνης υποδοχέα αυξητικού παράγοντα (GFRTK), όπως ο υποδοχέας ινσουλίνης (IR), μέσω ενδιάμεσων προϊόντων όπως οι πρωτεΐνες του υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης (IRS). Το σύμπλοκο Ras:GTP στη συνέχεια στρατολογεί τη Raf στη μεμβράνη όπου ενεργοποιείται, πιθανώς μέσω μιας Src κινάσης τυροσίνης [9]. Η Raf φωσφορυλιώνει μέσω σερίνης / θρεονίνης την πρωτεΐνη MEK1, η οποία αντίστοιχα φωσφορυλιώνει τις ERK1 και ERK2 σε συγκεκριμένα υπολείμματα τυροσίνης, ενεργοποιώντας μία ποικιλία υποστρωμάτων (Wellbrock, Karasarides and Marais, 2004).

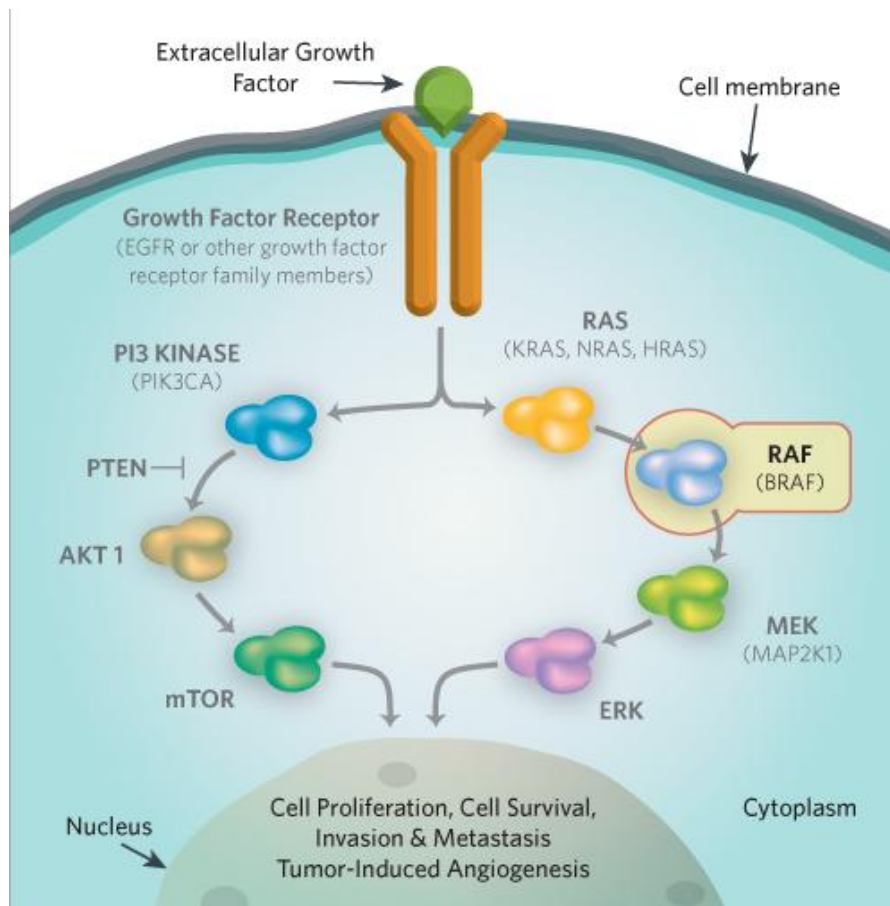
Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών ERK φωσφορυλιώνει τις B-Raf, Raf-1 και MEK1, οι οποίες μεταβάλλουν τη δραστηριότητά τους. Ανάλογα με τη θέση που φωσφορυλιώνεται σε Raf-1, η φωσφορυλίωση της ERK μπορεί είτε να ενισχύσει είτε να αναστείλει τη δραστηριότητα της Raf-1. Αντίθετα, όταν η B-Raf ή η MEK1 φωσφορυλιώνονται από την ERK, η δραστηριότητα τους μειώνεται. Αυτά τα γεγονότα φωσφορυλίωσης χρησιμεύουν για να μεταβάλλουν τη σταθερότητα και / ή τις δραστηριότητες των πρωτεϊνών. Η ενεργοποιημένη ERK μπορεί να μετατοπιστεί στον πυρήνα και να φωσφορυλιώσει επιπρόσθετους παράγοντες μεταγραφής, όπως ο παράγοντας 1 μεταγραφής του Elk-1, CREB, Fos και της σφαιρίνης (Gata-1), που συνδέουν προαγωγούς πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων αυξητικού παράγοντα και κυτοκινών που είναι σημαντικά για την προαγωγή της ανάπτυξης και την πρόληψη της απόπτωσης πολλαπλών κυτταρικών τύπων. Υπό ορισμένες συνθήκες, η παρεκκλίνουσα ρύθμιση αυτής της οδού μπορεί να συμβάλει στον μη φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε πολλές ανωμαλίες συμπεριλαμβανομένων του αυτοκρινούς μετασχηματισμού, της αντοχής στα φάρμακα ή της πρόωρης γήρανσης (Morrison and Davis, 2003).

Οι κινάσες MAPK αποτελούν κινάσες σερίνης-θρεονίνης και μεσολαβούν στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση που σχετίζεται με μια ποικιλία κυτταρικών δραστηριοτήτων, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η απόπτωση και ο μετασχηματισμός. Η οικογένεια MAPK περιλαμβάνει την εξωκυτταρική κινάση ERK, την p38 και c-Jun NH2 κινάση (JNK/SAPK). Κάθε MAPK μονοπάτι περιλαμβάνει τουλάχιστον τρία συστατικά: τις κινάσες MAP3K, MAP2K και MAPK. Οι MAP3Ks φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις MAP2Ks, οι

οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούν τις MAPK. Οι ενεργοποιημένες MAPK φωσφορυλιώνουν διάφορες πρωτεΐνες υποστρώματος που περιλαμβάνουν παράγοντες μεταγραφής, όπως οι ATF2 και p53. Το μονοπάτι MAPK ενεργοποιείται είτε ως αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κινασών είτε μέσω ενός συμπλόκου σηματοδότησης με πολλαπλές κινάσες που καθοδηγείται από μια πρωτεΐνη ικρίωματος, όπως ο καταστολέας κινάσης της Ras-1 (KSR) (Grabocka *et al.*, 2014).

Οι πρωτεΐνες MEK αποτελούν μια εξελικτικά διατηρημένη ομάδα τριών ομόλογων ανάμεσα στα θηλαστικά (~ 85%) ισομορφών. Αυτές οι ισομορφές είναι η 45 kDa MEK1, η MEK1b (43 kDa) που έχει υποστεί μάτισμα και πιστεύεται ότι είναι ανενεργή, και η 46kDa MEK2. Αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούνται από μια καταλυτική περιοχή κινάσης, η οποία περιβάλλεται από ένα ρυθμιστικό N-τελικό άκρο 80 αμινοξέων και ένα μικρότερο C-τελικό άκρο 30 αμινοξέων. Ενεργοποιούνται από φωσφορυλίωση δύο υπολειμμάτων σερίνης στον βρόχο ενεργοποίησής τους (Ser218 και Ser222 σε MEK1) εντός ενός Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr μοτίβου. Αυτή η φωσφορυλίωση μπορεί να ρυθμιστεί είτε εν μέρει με άμεση αλληλεπίδραση της ευπροσάρμοστης περιοχής σύνδεσής τους (DVD) είτε από επιπρόσθετες διαδικασίες φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης. Μεταξύ αυτών είναι η φωσφορυλίωση της Ser386 από τις πρωτεΐνες ERK, όπου είτε αναστέλλεται η λειτουργία των ERK, είτε υπό άλλες συνθήκες, διευκολύνεται η ενεργοποίησή τους ενισχύοντας τη δέσμευση της MEK1 στην πρωτεΐνη ικρίωμα Grb10 (McCubrey *et al.*, 2012). Κατά την ενεργοποίησή τους, οι MEK δρουν ως κινάσες διπλής ειδικότητας και φωσφορυλιώνουν τα ρυθμιστικά υπολείμματα τυροσίνης (Tyr) και θρεονίνης (Thr) των ERK, προκαλώντας την ενεργοποίησή τους. Είναι σημαντικό ότι οι ERK φαίνεται να είναι το μόνο φυσιολογικό υπόστρωμα των MEKs, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι κινάσες καθορίζουν την εξειδίκευση των ERK. Εκτός από το ρόλο τους ως ενεργοποιητές των πρωτεϊνών ERK, οι MEK φαίνονται να λειτουργούν ως πρωτεΐνες κυτταροπλασματικής άγκυρας για τις ERK. Επιπλέον, οι MEK μεταφέρονται στον πυρήνα και εξάγονται άμεσα μέσω του N-τελικού τους άκρου, λειτουργώντας ως πλατφόρμα εξαγωγής πυρηνικών πρωτεϊνών, ενώ αυτή η μετατόπιση είναι πιθανώς απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση των ισομορφών ERK1b και ERK1c της πυρηνικής πρωτεΐνης ERK (Lindberg *et al.*, 2014).

Οι πρωτεΐνες ERK αποτελούν τα εξελικτικά διατηρημένα προϊόντα των δύο γονιδίων, *erk1* (Mapk3) και *erk2* (Mapk1). Εκτός από τα δύο τα κύρια πρωτεϊνικά προϊόντα, τις 44 kDa ERK1 και 42 kDa ERK2 πρωτεΐνες, έχουν περιγραφεί αρκετές άλλες εναλλακτικά ματισμένες μορφές, όπως η 46kDa ERK1b, η ERK1c και η ERK2b κινάση. Όλες αυτές οι κινάσες αποτελούνται από μία  $\alpha$ -καταλυτική περιοχή κινάσης και μια μοναδική αλληλουχία ένθεσης εντός της περιοχής κινάσης τους. Η ενεργοποίησή τους μέσω φωσφορυλίωσης φαίνεται να προκαλείται μόνο με τη μεσολάβηση των πρωτεϊνών MEK, οι οποίες αναγνωρίζουν τη φυσική μορφή τους. Σημαντική για αυτή την αλληλεπίδραση είναι η C-τελική περιοχή των ERK (αμινοξέα 312-320 στο ERK2), γνωστή ως CRS/CD περιοχή, η οποία λειτουργεί ως σημείο πρόσδεσης της κινάσης με διάφορες πρωτεΐνες (Shimizu *et al.*, 2012). Τρία όξινα αμινοξέα (Asp316, Asp819 και Glu320 στην ERK2), καθώς και μερικά υδρόφοβα είναι εκείνα που φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τρία βασικά και δύο υδρόφοβα υπολείμματα στο N-τελικό άκρο των MEK, που ονομάζεται περιοχή D. Η δέσμευση της D περιοχής των MEKs στην περιοχή CRS/CD των ERKs επάγει μια μετασχηματιστική μεταβολή που εκθέτει τα ρυθμιστικά κατάλοιπα Thr και Tyr στο περιβάλλον, επιτρέποντας στις MEK να φωσφορυλιώσουν τις ERK. Η φωσφορυλίωση αυτή επιτρέπει στις ERK να συνδεθούν με τα υποστρώματά τους και να ασκήσουν την καταλυτική τους δράση, ρυθμίζοντας διάφορες διεργασίες. Μερικά από αυτά τα υποστρώματα εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, ενώ άλλα είναι φωσφορυλιωμένα στον πυρήνα από μόρια ERK που έχουν μετατοπιστεί σε οργανίδια. Οι πρωτεΐνες ERK φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως το Elk1, το c-Fos, το p53, το Ets1/2, σημαντικά για τη ρύθμιση της διαφοροποίησης και του μετασχηματισμού του όγκου. Εναλλακτικά, μπορούν να μεταδώσουν το σήμα περαιτέρω φωσφορυλιώνοντας και ενεργοποιώντας άλλες κινάσες, κάποιες από τις οποίες σχετίζονται με το στρες, είτε άλλες όπως τις 90 kDa ριβοσωμικές S6 κινάσες RSKs, οι οποίες μετατοπίζονται ανεξάρτητα στον πυρήνα και φωσφορυλιώνουν ένα ξεχωριστό σύνολο υποστρωμάτων εκεί (Williams *et al.*, 2012).



Εικόνα 8: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια BRAF/MEK/ERK, Akt/mTOR/PI3K και οι λειτουργίες που επηρεάζουν. Ανατύπωση: [http://targetedcancercare.massgeneral.org/My-Trial Guide/Diseases.aspx](http://targetedcancercare.massgeneral.org/My-Trial-Guide/Diseases.aspx)

### 1.3.5 Το μονοπάτι Akt/mTOR/PI3K

#### 1.3.5.1 Σηματοδότηση του μονοπατιού Akt/mTOR/PI3K

Η οδός σηματοδότησης Akt/mTOR/PI3K διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο μεταβολισμός, η μετανάστευση, η επιβίωση, η αυτοφαγία και η ανάπτυξη των κυττάρων. Μεσολαβεί στο σχηματισμό παγκρεατικού καρκίνου και έχει βρεθεί ενεργή σε παγκρεατικές βλάβες και ιστούς. Αυτή η οδός απορρυθμίζεται σε περίπου 30% όλων των μορφών καρκίνου, μέσω διαφόρων γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών, οδηγώντας σε ένα ευρύ φάσμα όγκων (Williams *et al.*, 2012) (Εικόνα 8).

Η πρωτεΐνη PI3K είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τις καταλυτικές υπομονάδες p85 και p1010. Η κατηγορία IA PI3K αποτελείται από την p85a

υπομονάδα και τις παραλλαγές ματίσματός της p50α και p55α, τις p85β και p55γ υπομονάδες και μία από τις αρκετές καταλυτικές υπομονάδες p110 (α, β ή δ). Οι ρυθμιστικές υπομονάδες p85α, p50α και p55α κωδικοποιούνται από το γονίδιο PIK3R1. Μελέτες δείχνουν ότι η υπομονάδα p85α είναι η πλέον ρυθμιστική ισομορφή της πρωτεΐνης PI3K και οι p55α και p50α δύο δευτερεύουσες εναλλακτικές ισομορφές ματίσματος (Jimenez *et al.*, 2002). Η υπομονάδα p110 κωδικοποιείται από το γονίδιο PIK3CA και έχει τρεις ισομορφές: α, β και δ. Η ισομορφή p110α είναι η πιο κοινή και αποτελείται από μία N-τελική περιοχή της p85 (p85BD), μία περιοχή δέσμευσης RAS (RBD), μία περιοχή πρωτεϊνικής κινάσης-C (C2), μία ελικοειδή περιοχή και C-τελική περιοχή κινάσης. Η κατηγορία IB PI3K περιλαμβάνει την p101 ρυθμιστική και p110γ καταλυτική υπομονάδα, οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοια δραστηριότητα. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη φωσφορυλίωση φωσφατιδυλοϊνοσιτολών, όπως οι PI(4)P και PI(4,5) στη θέση D3 και το προκύπτον προϊόν είναι PI-3,4,5-P3, ενεργοποιεί τις καθοδικές οδούς σηματοδότησης μέσω φωσφορυλίωσης αρκετών κινασών. Στις κινάσες αυτές περιλαμβάνονται οι Akt και PDK ρυθμίζοντας διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις σε πολλούς τύπους κυττάρων (Sos *et al.*, 2009).

Η κατηγορία IA PI3K κινάσης ενεργοποιείται από τους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTK), ώστε να συνδεθεί με τον αντίστοιχο υποδοχέα μέσω ενός ή δύο SH2 περιοχών με μοτίβα φωσφοτυροσίνης. Προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η αλλοστερική ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της PI3K κινάσης με τον τρόπο αυτό οδηγεί σε παραγωγή του PI-3,4,5-P3 μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα. Η επίδραση του πολυφωσφοϊνοσιτιδίου στα κύτταρα διαμεσολαβείται μέσω ειδικής δέσμευσης σε τουλάχιστον δύο περιοχές δέσμευσης πρωτεΐνης-λιπιδίου, όπως οι περιοχές Fab-1, YGL023, Vps27 και EEA1 (FYVE). Η ενεργοποίηση υποδοχέων πρωτεϊνικής τυροσινικής κινάσης και οι συζευγμένοι υποδοχείς είτε με G-πρωτεΐνες είτε με ιντεγκρίνες, έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PI3K κινάσης. Μια τέτοια ενεργοποίηση μπορεί να συμβεί ανεξάρτητα από τον υποδοχέα, όπως συμβαίνει στα κύτταρα που εκφράζουν την ενεργό Ras πρωτεΐνη, καθώς και από την παρουσία επιλεγμένων οικογενειών υποδοχέων (π.χ. EGF, FGF) από τις οποίες απουσιάζει η συναινετική αλληλουχία της

p85 ρυθμιστικής υπομονάδας, απαραίτητη για την ενεργοποίηση της PI3K (Chalhoub and Baker, 2009).

#### 1.4 Κυκλοπιροξολαμίνη (CICLOPIROX OLAMINE, CPX)

Η κυκλοπιροξολαμίνη (Ciclopirox Olamine, CPX), είναι η μορφή άλατος του ciclopirox, ενός συνθετικού, ευρέος φάσματος αντιμυκητιακού παράγοντα με επιπλέον αντιβακτηριακές και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες (Εικόνα 9). Η κυκλοπιροξολαμίνη ασκεί τη δράση του μέσω δέσμευσης και χηλοποίησης τρισθενών κατιόντων, όπως  $Fe^{3+}$  και  $Al^{3+}$ , αναστέλλοντας έτσι τη διαθεσιμότητα βασικών συν-παραγόντων για τα ένζυμα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια δραστηριότητας των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τον κυτταρικό μεταβολισμό, την οργάνωση της κυτταρικής δομής του τοιχώματος και άλλες κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες. Επιπλέον, το ciclopirox ασκεί την αντιφλεγμονώδη δράση του, αναστέλλοντας την 5-λιποξυγενάση και την κυκλοοξυγενάση (COX) (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Ciclopirox olamine, CID=38911, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciclopirox-olamine>).

Η CPX συμβάλλει στον κυτταρικό θάνατο είτε μέσω υπερπαραγωγής ROS είτε μέσω μεσολαβητών ROS που σχετίζονται με κυτταρικό θάνατο (Dixon and Stockwell, 2014). Αυτό υποδεικνύεται ως ο σημαντικότερος μηχανισμός της δράσης της CPX (Carlson-Banning *et al.*, 2013). Επιπλέον, οι μηχανιστικές μελέτες έδειξαν ότι, εκτός από τις επιδράσεις του σιδήρου, η CPX αναστέλλει τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια και τον mTOR και επίσης προάγει την αυτοφαγία σε κύτταρα ανοσίας (Zhou *et al.*, 2014). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η χηλοποίηση της CPX αναστέλλει την σηματοδότηση Wnt και την κυτταρική ανάπτυξη (Dihazi *et al.*, 2013) και ταυτόχρονα καταστέλλει την survivin, η οποία εμπλέκεται στη σηματοδότηση προ-επιβίωσης (Zhou *et al.*, 2010a).

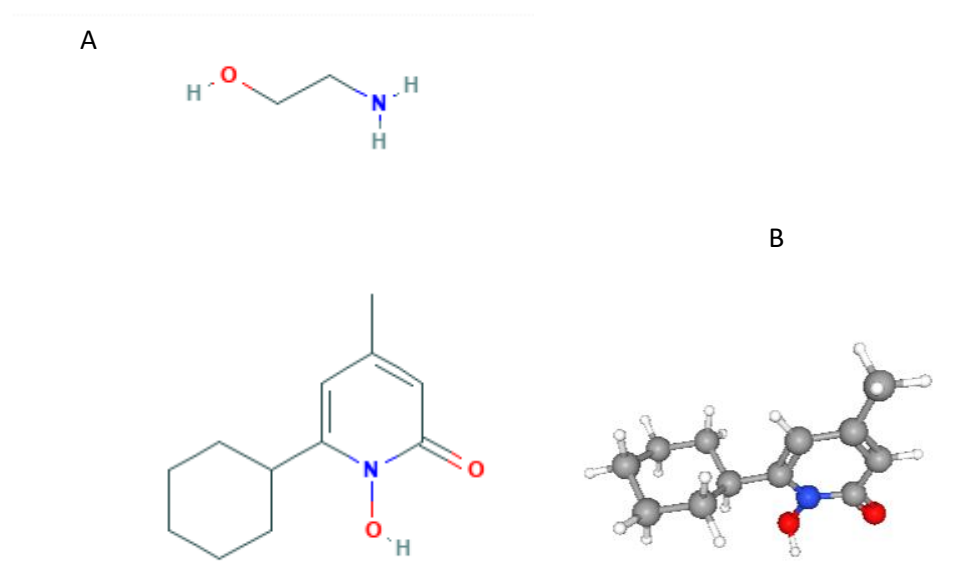
Επιπλέον, η CPX αναγνωρίστηκε προσφάτως ότι διαθέτει αντικαρκινική δράση σε πολλά προκλινικά μοντέλα καρκίνου, όπως αυτό του καρκινώματος του μαστού,



ραβδομυοσαρκώματος, αδενοκαρκινώματος του κόλου και αιματολογικών κακοηθειών, όπως στο πολλαπλό μυέλωμα και οξείας λευχαιμίας (Sen *et al.*, 2013). Πρόσφατη έρευνα αποκάλυψε ότι η CPX προήγαγε την απόπτωση σε κύτταρα AML (Οξεία Μυελοειδή Λευχαιμία) και κατέστειλε τη μεταμόσχευση πρωτογενών κυττάρων AML σε ποντίκια NOD / SCID χωρίς ενδείξεις τοξικότητας ή απώλειας βάρους (Weir *et al.*, 2011). Μια μελέτη που διεξήχθη από τον Zhou και την ομάδα του έδειξε ότι η CPX μείωσε την κυκλίνη A, B1, D1, E, CDK2 (εξαρτώμενη από κυκλίνη κινάση 2), CDK4 (εξαρτώμενη από κυκλίνη κινάση 4), Bcl-xL και survivin (Zhou *et al.*, 2010a). Επιπλέον, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η CPX συνεργάζεται με την παρθενολίδη για περαιτέρω ενίσχυση της αντιλευκωματικής δράσης. Ο συνδυασμός αμφοτέρων των φαρμάκων επέδειξε ανασταλτική δραστηριότητα mTOR ενεργοποιώντας αυτοφαγία σε κύτταρα θηλαστικών (Sen *et al.*, 2013).

Η ταχεία έγκριση της CPX για τοπική αγωγή λόγω ισχυρής μυκητοκτόνου δράσης υποστηρίζεται από μεταβολικά, φαρμακοκινητικά, φαρμακοδυναμικά, κλινικά και τοξικολογικά δεδομένα. Η CPX χορηγείται σήμερα τοπικά. Ωστόσο, λόγω της επανατοποθέτησης της CPX ως πιθανού θεραπευτικού παράγοντα για τη θεραπεία ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες, η συστηματική χορήγηση αυτού του παράγοντα αξιολογήθηκε εντατικά (Weir *et al.*, 2011). Μεγαλύτερες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η από του στόματος χορήγηση CPX σε ποντίκια, κουνέλια και αρουραίους σε επίπεδα δόσης κυμαινόμενα από 1700 έως 3290 mg / kg δεν έδειξε συστηματικές τοξικές επιδράσεις (Alpermann and Schütz, 1981). Επίσης, η επαναλαμβανόμενη χορήγηση της CPX στα 10 μM ήταν ανεκτή σε σκύλους και αρουραίους χωρίς τοξικότητα (Kellner *et al.*, 1981). Επιπρόσθετα, οι μελέτες σε ζώα (Weir *et al.*, 2011)(Zhou *et al.*, 2010a) και μια μελέτη σε ανθρώπους, δείχνουν ότι η ασφάλεια του φαρμάκου CPX, χορηγούμενου από το στόμα, είναι ικανοποιητική για κλινικές δοκιμές στον άνθρωπο (Minden *et al.*, 2014). Ο Keller και η ομάδα του έδειξαν ότι μετά από χορήγηση από το στόμα ραδιοσημασμένης CPX σε ανθρώπους, το 96% της χορηγούμενης CPX αποβλήθηκε από τα ούρα. Αυτή η ομάδα ερευνών έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου (CPX) είναι φαρμακολογικώς εφικτές, αν και ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι βραχύς και απαιτεί δοσολογία αρκετές φορές την ημέρα (Kellner *et al.*, 1981). Παρατήρησαν, ωστόσο, ότι το φάρμακο φαίνεται να απορροφάται καλά. Ο Minden και η ερευνητική του

ομάδα διεξήγαγαν μία κλινική δοκιμή φάσης I (NCT00990587) για τη θεραπεία ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες. Έδειξαν ότι η CPX (χορήγηση από το στόμα) σε δόση 40 mg / m<sup>2</sup> για 5 ημέρες (ανά κύκλο) είναι καλά ανεκτή σε όλους τους ασθενείς χωρίς σημαντική τοξικότητα. Επιπλέον, αναφέρθηκε σταθεροποίηση της νόσου, επιτρέποντας σε αυτή την ομάδα ασθενών να πάρει πρόσθετους κύκλους θεραπείας. Μια αιματολογική βελτίωση καταγράφηκε στα δύο τρίτα των 23 ασθενών που έλαβαν την θεραπεία. Η καταστολή της έκφρασης της *survivin* σε PBMCs (μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος) που απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο, παρατηρήθηκε μετά από τη θεραπεία με CPX μία φορά ημερησίως σε δόσεις μεγαλύτερες από 10 mg / m<sup>2</sup>, υποδεικνύοντας βιολογική και φαρμακοδυναμική δράση αυτού του επανατοποθετημένου φαρμάκου. Η γαστρεντερική τοξικότητα αναφέρθηκε μόνο σε ασθενείς που έλαβαν τη μεγαλύτερη δόση (80mg / m<sup>2</sup>), που χορηγήθηκε με υψηλότερη συχνότητα (τέσσερις φορές την ημέρα), αλλά όχι σε χαμηλότερες δόσεις ή σε λιγότερο συστηματικό δοσολογικό σχήμα (Minden *et al.*, 2014).



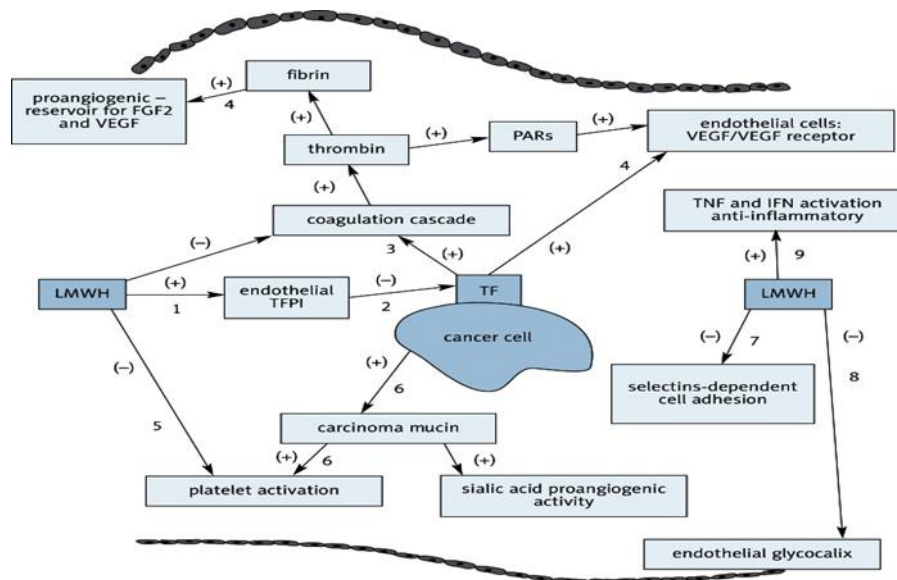
Εικόνα 9: Απεικόνιση της μοριακής δομής της κυκλοπιροξολαμίνης σε A. 2D και B. 3D

## 1.5 Τινζαπαρίνη

Η τινζαπαρίνη, μαζί με τις dalteparin και enoxaparin, ανήκει στις Ηπαρίνες Χαμηλού Μοριακού Βάρους (Low Molecular Weight Heparines, LMWH), οι οποίες είναι παράγωγα των μη κλασματοποιημένων ηπαρινών (Unfractionated Heparines, UFH), μέσω του αποπολυμερισμού της ηπαρίνης από το ένζυμο ηπαρινάση. Αποτελεί μία αντιπηκτική ουσία, η οποία συμπεριλαμβάνεται στην ομάδα των γλυκοζαμινογλυκανών. Οι Ηπαρίνες Χαμηλού Μοριακού Βάρους διαφέρουν μεταξύ τους εξαιτίας των φαρμακοκινητικών και αντιπηκτικών ιδιοτήτων τους. Το μέσο μοριακό τους βάρος είναι 4500-5000 Daltons (Da), με εύρος από 1000 έως 10000 Da. Δεν έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη θρομβίνη, καθώς απουσιάζει η ειδική αλληλουχία πεντασακχαριτών που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με την αντιθρομβίνη III, ενώ μπορούν να αναστέλλουν τον παράγοντα πήξης Χα (Bochenek, Püsküllüoglu and Krzemieniecki, 2013).

Οι Ηπαρίνες έχουν την ιδιότητα να προάγουν την απελευθέρωση του παράγοντα TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) από το αγγειακό ενδοθήλιο και μέσω της σύνδεσής τους με τον πλασματικό αναστολέα πρωτεάσης αντιθρομβίνη να αναστέλλουν τους παράγοντες F(X)a και FIIa (Εικόνα 10). Αυτό το γεγονός είναι εκείνο που καθορίζει την αντιπηκτική τους δράση. Έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν αιμοπετάλια, αναστέλλοντας ή διεγείροντας τη συσσωμάτωσή τους, ανάλογα βέβαια με τις εκάστοτε συνθήκες. Στις λειτουργίες τους περιλαμβάνονται ακόμα η επίδραση στην αγγειακή διαπερατότητα, η αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυών του ενδοθηλίου, ο σχηματισμός των οστεοβλαστών και η ενεργοποίηση της παραγωγής των οστεοκλαστών. Επιπλέον ιδιότητές τους είναι ο αλλοιωμένος αριθμός θέσεων δέσμευσης της θέσης AT-III, ο αλλοιωμένος βαθμός θείωσης και οι τροποποιημένες ανασταλτικές δραστηριότητες πρωτεάσης σερίνης (anti-Xa, anti-IIa, anti-Xaa, anti-IIa) (Dolovich *et al.*, 2000). Προσφέρουν θεραπευτικό πλεονέκτημα, αφού έχουν μια πιο προβλέψιμη δόσο-απόκριση στην αντιπηκτική θεραπεία, βελτιωμένη υποδόρια βιοδιαθεσιμότητα, δόσοεξαρτώμενη κάθαρση, μεγαλύτερο

χρόνο ημιζωής, χαμηλότερη συχνότητα θρομβοκυτοπενίας, και μειωμένη απαίτηση για εργαστηριακή παρακολούθηση ρουτίνας σε σύγκριση με την μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη (Bokas *et al.*, 2020).



Εικόνα 10: Απεικόνιση του μονοπατιού της δράσης των LMWH στα καρκινικά κύτταρα (Bochenek *et al.*, 2013).

Η χορήγηση Ηπαρινών έχει αξιολογηθεί εκτενώς ως θεραπεία για σύνδρομα, όπως η οξεία στεφανιαία νόσος, η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT) και η πνευμονική εμβολή (PE), ενώ μελετήθηκε για την πρόληψη της φλεβικής θρομβοεμβολής (VTE) σε αρκετούς πληθυσμούς υψηλού κινδύνου (Amirkhosravi *et al.*, 2003). Η συχνή συσχέτισή της όμως με επιπλοκές, όπως η αιμορραγία, η οστεοπόρωση και η υπερκαλιαιμία, εγείρει ανησυχίες για τη χρήση της. Δυο τύποι θρομβοπενίας έχουν περιγραφεί ύστερα από χορήγηση ηπαρίνης: η ανοσολογική (θρομβοκυτοπενία που προκαλείται από ηπαρίνη) και η μη ανοσολογική. Σε αυτές τις επιπλοκές ιδιαίτερα ευάλωτοι είναι οι ηλικιωμένοι ασθενείς με ιστορικό κακοήθειας, που λαμβάνουν πρόσθετη θεραπεία (Bochenek, Püsküllüoglu and Krzemieniecki, 2013).

Οι Ηπαρίνες Χαμηλού Μοριακού Βάρους (LMWH) μεταβολίζονται μερικώς με αποπολυμερισμό ή/και αποθείωση και απεκκρίνονται μέσω των νεφρών. Ο μεταβολισμός τους μπορεί να μειωθεί σε άτομα με μειωμένη νεφρική λειτουργία, και

η συσσώρευσή τους αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία, όπως στους ηλικιωμένους και στους ασθενείς με καρκίνο. Το εάν η μείωση της νεφρικής απέκκρισης θα οδηγήσει σε συσσώρευση των αντιπηκτικών δραστικών ουσιών και κατά επέκταση σε αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας μετά από επαναλαμβανόμενες δόσεις, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της σοβαρότητας της νεφρικής δυσλειτουργίας, της χορηγούμενης δόσης, της διάρκειας της θεραπείας και της συχνότητας της δοσολογίας. Αυτοί οι παράγοντες δεν είναι απαραίτητως εξίσου σημαντικοί στον ίδιο βαθμό για κάθε LMWH (Johansen and Balchen, 2013).

Τα τελευταία χρόνια οι Ηπαρίνες Χαμηλού Μοριακού Βάρους (LMWH) έχουν αντικαταστήσει επιτυχώς τις μη κλασματοποιημένες Ηπαρίνες (UFH) τόσο στη θρομβοπροφύλαξη όσο και στην αρχική θεραπεία του φλεβικού θρομβοεμβολισμού (VTE). Ωστόσο, η χρήση των ανταγωνιστών της βιταμίνης Κ παραμένει πρότυπο για τη θεραπεία της VTE. Από το 1987 αρκετές αναδρομικές μελέτες αξιολόγησαν τη μακροχρόνια χρήση των LMWH. Επίσης πρόσφατες μελέτες της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας της Τινζαπαρίνης στην εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αποτελεί λύση για τη δευτερογενή πρόληψη των θρομβοεμβολικών επεισοδίων (Mousa and Petersen, 2009).

Σύμφωνα με τον Virchow, τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της θρόμβωσης είναι παθολογικές αλλαγές στη ροή και πήξη του αίματος και στην κατάσταση του τοιχώματος του αγγείου. Οι ασθενείς με καρκίνο παρουσιάζουν και τις τρεις αυτές αλλαγές. Ορισμένοι από τους προτεινόμενους μηχανισμούς για να εξηγηθεί η υπερπηκτικότητα η οποία παρατηρείται σε καρκινικές καταστάσεις, περιλαμβάνουν: α) γενικούς παράγοντες, που σχετίζονται με την ανταπόκριση του ξενιστή στον όγκο, όπως η ανώμαλη πρωτεϊνική σύνθεση, η αγγειογένεση και η νεοαγγειοποίηση, η νέκρωση κυττάρων και νέες αιμοδυναμικές ρυθμίσεις, και β) πιο συγκεκριμένους παράγοντες, που σχετίζονται με τον αιμοστατικές ιδιότητες μεσολαβούμενες από όγκο στις οποίες τα καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με μονοκύτταρα, αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και τα συστήματα θρόμβωσης και ινωδόλυσης (Sideras *et al.*, 2006). Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες συσχετίζονται με θρομβωτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι

περιλαμβάνουν την απελευθέρωση προπηκτικών ουσιών και κυτοκινών από τα κύτταρα του όγκου, την παραγωγή τοξικών παραγόντων που δρουν άμεσα στο ενδοθήλιο και μείωση των επιπέδων φυσικών αντιπηκτικών ουσιών, όπως είναι οι πρωτεΐνες C, S, AT. Η χειρουργική επέμβαση, η οποία αποτελεί θεραπεία πρώτης γραμμής για πολλούς ασθενείς με καρκίνο, είναι γνωστό πώς ενεργοποιεί το αιμοστατικό σύστημα. Με τον τρόπο αυτό, οι θεραπείες του καρκίνου ενεργοποιούν τον καταρράκτη της πήξης, προωθώντας τη θρόμβωση και την ανάπτυξη του όγκου (Mousa, 2004).

Η πρόληψη της φλεβικής θρομβοεμβολής σε καρκινοπαθείς παρουσιάζει αρκετές προκλήσεις. Ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι δεν υπάρχουν σταθερά αξιόπιστοι δείκτες για τον ακριβή προσδιορισμό του κινδύνου που διατρέχουν οι ασθενείς. Συνεπώς, οι αποφάσεις σχετικά με τα ειδικά μέτρα θρομβοπροφύλαξης πρέπει να είναι προσαρμοσμένα στον εκάστοτε ασθενή (Bokas *et al.*, 2020). Προκλήσεις ενέχονται βέβαια και στη διάγνωσή της, καθώς πολλοί ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί, υποδεικνύοντας πώς πρέπει να χρησιμοποιούνται ευαίσθητες μέθοδοι. Το τεστ του D-διμερούς μάλιστα μερικές φορές μπορεί να είναι προβληματικό, κάτι που μπορεί να οφείλεται σε ινωδολυτικό αποκλεισμό που σχετίζεται με ορισμένους τύπους όγκων. Όπως έχουν δείξει μελέτες, στη θεραπεία της φλεβικής θρομβοεμβολής χρησιμοποιούνται οι Ηπαρίνες Χαμηλού Μοριακού Βάρους, οι οποίες έχουν μειωμένη συγγένεια για σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και των κυττάρων, προσφέροντας ένα ευνοϊκότερο φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ σε σύγκριση με τους ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ. Η μεγαλύτερη συγγένεια των μη κλασματοποιημένων ηπαρινών για δέσμευση με πρωτεΐνες του πλάσματος περιορίζει την αντιπηκτική δραστηριότητά τους και, μαζί με τις διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις τους, εξηγούν την ασταθή αντιπηκτική τους δράση (Lyman, 2009).

Έχει διαπιστωθεί τόσο από πειράματα *in vivo* όσο και *in vitro* ότι οι ηπαρίνες συμμετέχουν στην αγγειογενετική διαδικασία. Οι όγκοι απελευθερώνουν αγγειακούς αυξητικούς παράγοντες, όπως ο VEGF και ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF), οι οποίοι μαζί με άλλες κυτοκίνες, διεγείρουν την αγγειογένεση μέσω αλληλεπιδράσεων με τους υψηλής συγγένειας υποδοχείς

τους με ενδοκυτταρική δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Στον άνθρωπο, οι θεραπευτικές δοσολογίες των UFN πράγματι προκαλούν αύξηση των επιπέδων αυξητικών παραγόντων, όπως ο bFGF στο πλάσμα.

Οι ηπαρίνες επηρεάζουν τη δραστικότητα και άλλων παραγόντων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση και την ανάπτυξη των όγκων, εκτός του VEGF και του bFGF. Ο αυξητικός παράγοντας TGF είναι ένας ισχυρά ανοσοκατασταλτικός και σημαντικός ρυθμιστής της ανάπτυξης, διαφοροποίησης και προσκόλλησης διαφόρων κυττάρων, καθώς εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και η υπερπαραγωγή του συσχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση. Σε συνεργασία με τους VEGF και bFGF, ο TGF προκαλεί αγγειογένεση που συνδέεται με τον όγκο. Από τη μελέτη τους οι Lyon et al., συμπέραναν ότι οι TGF- $\beta$ 1 και - $\beta$ 2 δεσμεύονται στην ηπαρίνη και στα θειικά άλατα, όπου αυτοί οι πολυσακχαρίτες ενισχύουν τη βιολογική δραστικότητα μόνο του TGF- $\beta$ 1, και όχι των άλλων ισομορφών. Η ενίσχυση οφείλεται στον ανταγωνισμό της δέσμευσης και απενεργοποίησης του TGF- $\beta$ 1 από την  $\alpha$ 2-μακροσφαιρίνη. Το σύμπλοκο αυτό που δημιουργείται είναι ανθεκτικό στην ηπαρίνη. Οι επιδράσεις των ηπαρίνων στην αγγειογένεση οφείλονται κυρίως στο γεγονός ότι παρεμβαίνουν στη δραστηριότητα των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων, αλλά και στο ότι ρυθμίζουν την αγγειογένεση μέσω της αντιπηκτικής λειτουργίας τους, παρεμβαίνοντας στη δραστηριότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων, που συνδέονται με συστατικά της ECM. Οι LMWH εμποδίζουν τη δέσμευση των αυξητικών παραγόντων με τους υποδοχείς τους, ενώ επηρεάζουν παράλληλα και άλλα στάδια της αγγειογένεσης, όπως τον σχηματισμό του ινώδους, τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη την αποδόμηση της ECM (Castelli, Porro and Tarsia, 2004).

## **1.6 Χημειοθεραπευτικά φάρμακα**

### **1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου *Gemcitabine***

Ο καρκίνος του παγκρέατος αντιπροσωπεύει περίπου το 3% όλων των νεοδιαγνωσθεισών κακοηθειών στις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ σχεδόν το 90% αυτών είναι παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα (PDAC). Παρά την εκτεταμένη έρευνα των τελευταίων δεκαετιών για τη βελτίωση των διαγνωστικών τεχνικών, των χειρουργικών επεμβάσεων και της χημειοθεραπείας, η συνολική πρόγνωση ασθενών με PDAC παραμένει εξαιρετικά δυσμενής (Kamisawa *et al.*, 2016). Η εξέλιξη του σε διηθητικό καρκίνωμα σχετίζεται με τη συσσώρευση διαδοχικών γενετικών μεταλλάξεων, ενώ σχεδόν όλοι οι ασθενείς φέρουν τουλάχιστον μία ή περισσότερες μεταλλάξεις στα τέσσερα γνωστά συχνά μεταλλαγμένα γονίδια, το ογκογονίδιο K-RAS και τους ογκογονικούς καταστολείς CDKN2A, TP53 and SMAD4/DPC4 (Oldfield, Connor and Gallinger, 2017). Ενώ η χειρουργική επέμβαση προσφέρει τη μόνη δυνατή θεραπευτική αγωγή μόνο το 15-20% των ασθενών έχουν χειρουργήσιμη νόσο τη στιγμή της διάγνωσης, ενώ οι περισσότεροι ασθενείς αναπτύσσουν υποτροπή της νόσου εντός ενός έτους. Ως αιτίες της πτωχής επιβίωσης θεωρούνται η χαμηλή αποτελεσματικότητα της επικουρικής χημειοθεραπείας στη χειρουργική επέμβαση, οι μη ανιχνεύσιμες μικρο-μεταστάσεις και η ανάπτυξη κυτταρικής αντοχής στα φάρμακα (Labori *et al.*, 2016).

Η γεμισταβίνη αποτελεί σήμερα την τυπική επιλογή θεραπείας για τον προχωρημένο και μεταστατικό καρκίνο του παγκρέατος PDAC, για τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και τον καρκίνο του μαστού. Η γεμισταβίνη (επίσης γνωστή ως dFdC: 20,20-διφθλουοροδεοξυκυτιδίνη), αποτελεί ένα νουκλεοσιτιδικό ανάλογο της δεοξυκυτιδίνης, και διαφέρει δομικά από την κυτοσίνη αραβιδοσύνη (Ara-C) εξαιτίας των υποκατάστατων φλουορίνης στη θέση 2' του δακτυλίου φουρανόζης. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τις αντικές της ιδιότητες, ενώ αργότερα ευρέως ως αντικαρκινικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας για διάφορους συμπαγείς όγκους και σε ορισμένα λεμφώματα. Παρά την επιτυχία της ως φάρμακο, το γεγονός ότι η δραστηριότητά της κατά του όγκου και η τοξικότητά της ποικίλλουν από ασθενή σε ασθενή, όπως και η ανάπτυξη αντοχής σε αυτήν, παραμένουν σημαντικές αιτίες χαμηλών ποσοστών ανταπόκρισης και έλλειψης αποτελεσματικότητας σε υποτροπιάζοντες όγκους, καθώς και σοβαρών τοξικών επιδράσεων. Τέτοια φαινόμενα πιστεύεται ότι σχετίζονται με τις μεταβολές των επιπέδων του



ενδοκυττάριου μεταβολισμού του φαρμάκου και τις δραστηριότητες των μεταφορέων του, των ενζύμων που μεταβολίζουν το φάρμακο, των ενζύμων στόχων και των ενζύμων που εμπλέκονται στο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Wong *et al.*, 2009).

Οι αντινεοπλασματικές ιδιότητες της γεμισιταβίνης εξαρτώνται από διάφορες ανασταλτικές δράσεις στη σύνθεση του DNA, εμποδίζοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/S. Προκειμένου η γεμισιταβίνη να ασκήσει τη δραστηριότητά της ύστερα από την ενδοκυττάρια πρόσληψή της, απαιτείται φωσφορυλίωση. Έτσι, η μεταφορά νουκλεοσιδίων αποτελεί προϋπόθεση για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και την κλινική της αποτελεσματικότητα (Young *et al.*, 2013). Το μόριο είναι υδρόφιλο και μεταφέρεται στα κύτταρα από διάφορους ανθρώπινους μεταφορείς νουκλεοσιδίων (NTs), όπως τον μεταφορέα SLC28, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των διαλυτών φορέων συμπύκνωσης ανθρώπινων νουκλεοσιδίων (hCNTs) και τον μεταφορέα SLC29, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια εξισορροπητικών μεταφορέων νουκλεοσιδίων (hENTs). Τα μέλη της οικογένειας hCNTs είναι συμμεταφορείς που εξαρτώνται από το νάτριο και μεσολαβούν στη μεταφορά των νουκλεοσιδίων στα κύτταρα προς μία μόνο κατεύθυνση. Τα μέλη της οικογένειας hENTs μεσολαβούν στην αμφίδρομη μεταφορά νουκλεοσιδίων ανάμεσα σε βιολογικές μεμβράνες κάτω από μια βαθμίδα συγκέντρωσης (Kleeff *et al.*, 2016).

Οι μεταφορείς hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 και hENT2 συμβάλλουν στη μεταφορά της γεμισιταβίνης μέσα στα κύτταρα. Ύστερα από τρεις διαδοχικές φωσφορυλιώσεις, μετατρέπεται σε τριφωσφορική γεμισιταβίνη (dFdCTP) από το ένζυμο διφωσφορικής κινάσης (NDPK). Η γεμισιταβίνη dFdCTP αποτελεί τον κύριο κυτταρικό μεταβολίτη της γεμισιταβίνης και δρα ως ανταγωνιστικό υπόστρωμα της τριφωσφορικής δεοξυκυτιδίνης (dCTP). Αυτό επιτρέπει στην dFdCTP να ενσωματωθεί στο DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, αναστέλλοντας την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA και προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο με απόπτωση. Η διαδικασία του «τερματισμού της καλυμμένης αλυσίδας» φαίνεται να κλειδώνει τη γεμισιταβίνη στο DNA, με την ενσωμάτωση της dFdCTP στο τέλος του επιμήκους κλώνου DNA. Μόλις προστεθεί ένα δεοξυνουκλεοτίδιο, οι DNA πολυμεράσες δεν μπορούν να προχωρήσουν και οι εξωνουκλεάσες δεν μπορούν να

απομακρύνουν το νουκλεοτίδιο γεμισιαβίνης από αυτήν την προτελευταία θέση. Κατά τη διάρκεια αυτού του μονοπατιού ενδοκυτταρικής ενεργοποίησης, η φωσφορυλίωση της dFdC σε dFdCMP με τη μεσολάβηση του dCK θεωρείται το στάδιο περιορισμού της παραγωγής ενεργών μεταβολιτών της γεμισιαβίνης, οι οποίοι στη συνέχεια αποικοδομούνται. Το μεγαλύτερο μέρος της χορηγούμενης γεμισιαβίνης απενεργοποιείται εντούτοις με ταχεία απομάκρυνση που προκαλείται από την κυταδινική δεαμινάση (CDA), παράγοντας έτσι υψηλές συγκεντρώσεις των λιγότερο ενεργών μεταβολιτών της γεμισιαβίνης (dFdU). Παρόλο αυτά, η γεμισιαβίνη διαθέτει ένα μοναδικό μηχανισμό αυτό-ρύθμισης, για να ενισχύει την ενεργοποίησή της. Ο μεταβολίτης dFdCDP αναστέλλει τη ριβονουκλεοσιδική αναγωγή (RR), ένα ένζυμο που ρυθμίζει τη βιοσύνθεση του DNA μέσω του ελέγχου του σχηματισμού τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων (NTPs). Το RR μετατρέπει το CDP σε dCDP και η αναστολή του διευκολύνει την ενσωμάτωση του dFdCTP στο DNA (De Sousa Cavalcante and Monteiro, 2014).

Η ισχυρή κυτταροτοξική δράση της γεμισιαβίνης είναι το αποτέλεσμα διάφορων ενεργειών στη σύνθεση DNA. Ο μεταβολίτης dFdCTP ανταγωνίζεται την τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη (dCTP) ως ασθενής αναστολέας της DNA πολυμεράσης. Το dFdCTP ενσωματώνεται στο DNA και μετά την ενσωμάτωση ενός ακόμη νουκλεοτιδίου οδηγεί στον τερματισμό του πολυμερισμού και στη θραύση της μονής έλικας. Αυτό το «έξτρα» νουκλεοτίδιο μπορεί να είναι σημαντικό για την απόκρυψη του dFdCTP από τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA, επειδή η ενσωμάτωση της γεμισιαβίνης στο DNA φαίνεται να είναι ανθεκτική στους φυσιολογικούς μηχανισμούς της επιδιόρθωσης του DNA (Mini *et al.*, 2006).

Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) δεσμεύεται με τον υποδοχέα του VEGFR και σηματοδοτεί γεγονότα, τα οποία αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μετανάστευση στον καρκίνο PDAC. Μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύντηξης, η aflibercept, που περιλαμβάνει τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2, χρησιμοποιήθηκε σε μια τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης III συνδυαστικά με γεμισιαβίνη για ασθενείς με APC, αλλά σταμάτησε λόγω ανεπιθύμητων παρενεργειών (Rougier *et al.*, 2013). Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-VEGF-A bevacizumab μαζί με γεμισιαβίνη σε σύγκριση με τη γεμισιαβίνη μόνη της στην APC

δεν βελτίωσε το OS ή το PFS στη μελέτη φάσης III CALGB 80303. Το sorafenib, που στοχεύει στη σηματοδότηση εξαρτώμενη από το Ras και στις αγγειογενετικές οδούς, έδειξε σημαντική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια μαζί με τη γεμισιταβίνη σε μια δοκιμή φάσης I. Ωστόσο, στη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III BAYPAN, δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση στο OS μετά την προσθήκη του sorafenib μαζί με γεμισιταβίνη (Gonçalves *et al.*, 2012). Ενώ υπάρχει αντίθεση μεταξύ προκλινικών μελετών και κλινικών δοκιμών, επειδή το 35% των PDACs είναι του αγγειογενετικού φαινοτύπου, είναι πιθανό μια υποομάδα ασθενών να επωφεληθεί από τέτοιες αντιαγγειογενετικές θεραπείες (Craven *et al.*, 2016).

Η γεμισιταβίνη είναι μεταβολικά ασταθής και η χαμηλή θεραπευτική αποτελεσματικότητάς της οφείλεται στην απαμίνωσή της και την ταχεία κάθαρσή της στην κυκλοφορία του αίματος. Η διαπερατότητά της διαμέσου της μεμβράνης είναι χαμηλή και εξαρτάται από μεταφορείς για να προσληφθεί ενδοκυτταρικά, περιορίζοντας έτσι τις επιθυμητές κυτταροτοξικές της δράσεις στα κύτταρα-στόχους. Για να αντισταθμιστούν αυτοί οι περιορισμοί, συνήθως χορηγείται υψηλή δόση γεμισιταβίνης (περίπου 1000 mg / m<sup>2</sup>), η οποία όμως προκαλεί σοβαρές παρενέργειες, όπως δύσπνοια, ουδετεροπενία, ναυτία και νεφρική ανεπάρκεια. Η τροποποίηση του μορίου της γεμισιταβίνης με στόχο τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας και αποτελεσματικότητάς της, καθώς και νέες στρατηγικές για τη βελτίωση της χορήγησης φαρμάκων διερευνώνται για να επεκταθεί η χρήση της γεμισιταβίνης στη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος. Οι τροποποιήσεις του μορίου της γεμισιταβίνης βασίζονται κυρίως σε προσεγγίσεις προφαρμάκων και μορίων νανομεταφορέων (Amrutkar and Ivar P. Gladhaug, 2017).

### **1.6.2 Γενικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου *Abiraterone***

Τα αποτελεσματικά φάρμακα έναντι στον καρκίνο του παγκρέατος επί δεκαετίες ήταν λίγα. Η γεμισιταβίνη θεωρήθηκε ως η μόνη διαθέσιμη επιλογή με μέση επιβίωση 5.4 μηνών. Η ανάπτυξη παρόλο αυτά αντίστασης των παγκρεατικών κυττάρων στη γεμισιταβίνη μέσω διάφορων μηχανισμών, έχει ωθήσει στην αναζήτηση καινούργιων θεραπευτικών προσεγγίσεων (Abbruzzese, 2008).

Ο συνδυασμός της γεμισταβίνης με την Abraxane έδειξε υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης και επιβίωσης στη θεραπεία ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο. Η Nab-paclitaxel ή αλλιώς Abraxane, όπως είναι το εμπορικό της όνομα, είναι ένα κολλοειδές εναιώρημα σωματιδίων ομοιογενοποιημένο σε αλβουμίνη ανθρώπινου ορού, δεσμευμένο σε πακλιταξέλη. Τα νανοσωματίδια πακλιταξέλης τα οποία είναι συνδεδεμένα με λευκωματίνη έχουν μέσο μέγεθος 130 nm και διαχωρίζονται στο αιμοφόρο αγγείο σε μεμονωμένα σύμπλοκα λευκωματίνης-πακλιταξέλης περίπου 10 nm. Σε μοντέλα ποντικών, η συνδυασμένη θεραπεία της γεμισταβίνης και της nab-paclitaxel έδειξε αυξημένη συγκέντρωση της γεμισταβίνης στο πλάσμα και στους όγκους (Awasthi *et al.*, 2013). Τα αυξημένα ενδο-νεοπλασματικά επίπεδα και η δραστηριότητα της γεμισταβίνης οφείλονταν σε σημαντική μείωση των επιπέδων του πρωτεύοντος ενζύμου του μεταβολισμού της γεμισταβίνης CDA. Η μείωση του ενζύμου CDA αποδίδεται στην nab-paclitaxel, καθώς τα *in vitro* πειράματα σε παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα του ποντικού απέδειξαν ότι η nab-paclitaxel μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του CDA ενζύμου σε καλλιεργημένα κύτταρα. Αυτό υποδηλώνει ότι τα υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης και τα οφέλη επιβίωσης που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο κατά τη διάρκεια της συγχορήγησης σχετίζονται με μειωμένα επίπεδα CDA, μείωσαν την απαμίνωση της γεμισταβίνης και συνεπώς προκάλεσαν αυξημένη δραστηριότητα (Al-Batran *et al.*, 2014)(Von Hoff *et al.*, 2011).

Η χορήγηση της nab-paclitaxel σχετίζεται με τον υποδοχέα λευκωματίνης gp60 καθώς και με την εκκρινόμενη όξινη και πλούσια σε κυστεΐνη πρωτεΐνη SPARC, η οποία εκφράζεται σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Επειδή η SPARC έχει υψηλή συγγένεια με την αλβουμίνη, η nab-paclitaxel κατά επέκταση έχει αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση σε ασθενείς με καρκίνο (Rueff and Rodrigues, 2016). Η SPARC είναι μία πρωτεΐνη που δεσμεύεται με το ασβέστιο και εντοπίζεται στα καρκινικά κύτταρα και στους στρωματικές ινοβλάστες, προάγωντας την μετάπτωση των επιθηλιακών σε μεσεγχυματικά κύτταρα και την διέλευσή τους μέσω της μεταλλοπρωτεάσης. Η υπερέκφραση της SPARC στο στρώμα προωθεί την διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Οι παγκρεατικοί καρκίνοι επομένως με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της SPARC συσχετίστηκαν με βελτιωμένη επιβίωση

στους ασθενείς που έλαβαν τον συνδυασμό nab-paclitaxel και gemcitabine σε πρώιμες κλινικές δοκιμές (Pothula *et al.*, 2016)(von Ahrens *et al.*, 2017).

Σε πειραματόζωα, ο συνδυασμός gemcitabine και nab-paclitaxel αύξησε τη συγκέντρωση της γεμισιταβίνης στο πλάσμα και στους ιστούς του όγκου (Awasthi *et al.*, 2013). Τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριας γεμισιταβίνης ήταν αποτέλεσμα μιας αξιοσημείωτης μείωσης της αποαμινάσης της κυτιδίνης, του πρωτεύοντος ενζύμου του μεταβολισμού της γεμισιταβίνης. Αυτό αποδόθηκε στην nab-paclitaxel καθώς τα πειράματα είχαν δείξει ότι η πακλιταξέλη μείωσε στην πραγματικότητα το ένζυμο αυτό σε κύτταρα (Al-Batran *et al.*, 2014).

Το στρώμα των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων λειτουργεί ως μηχανικός φραγμός και προάγει τον σχηματισμό του όγκου, την εξέλιξη, την εισβολή και τη μετάστασή του (Neuzillet *et al.*, 2013b). Οι Von Hoff *et al.*, διερεύνησαν το μοριακό προφίλ διαφορετικών συμπαγών όγκων από 91 ασθενείς για τον εντοπισμό πιθανών στόχων και μηχανισμών αντοχής στους τρέχοντες χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του συνδυασμού γεμισιταβίνης με διαφορετικούς πιθανώς συνεργιστικούς παράγοντες. Επίσης, έδειξαν πώς η κυταδινοαμινάση, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη μεταβολική απενεργοποίηση της γεμισιταβίνης, θα μπορούσε να ανασταλεί από την nab-paclitaxel. Τα προκλινικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη SPARC υπερεκφράζεται σε δείγματα παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Στη μεγαλύτερη κλινική μελέτη φάσης III, MPACT, από τον Von Hoff, ο συνδυασμός nab-paclitaxel και gemcitabine που χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με προχωρημένο μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο, είχε ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Η μέση συνολική επιβίωση ήταν 8,5 μήνες, η μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη ήταν 5,5 μήνες και το συνολικό ποσοστό ετήσιας επιβίωσης ήταν 35% (Gardner *et al.*, 2008).

Ο συνδυασμός όμως των δυο χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, της nab-paclitaxel και της γεμισιταβίνης, έχειδειχθεί ότι αυξάνει την αιματολογική τοξικότητα σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία. Η καταστολή του μυελού των οστών ήταν εξαρτώμενη τόσο από την περιοριστική δόση όσο και από την τοξικότητα. Σοβαρή ουδετεροπενία παρατηρήθηκε στο 38% των περιπτώσεων, ενώ η εμπύρετη ουδετεροπενία ήταν σπάνια. Το κύρια συμπτώματα μη-αιματολογικής τοξικότητας

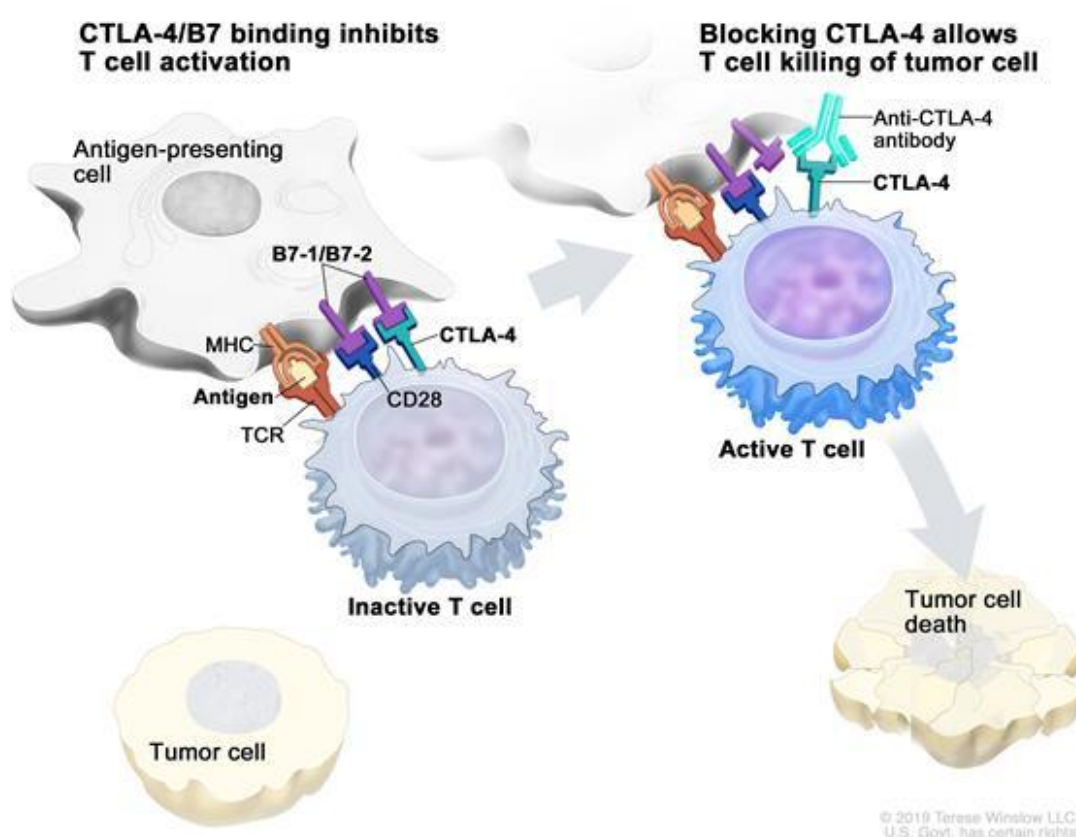
που παρατηρήθηκαν, ήταν η νευροπάθεια που σχετίζεται με την nab-paclitaxel και η κόπωση. (Cunningham *et al.*, 2009)(Von Hoff *et al.*, 2011).

## 1.7 Ανοσοθεραπεία και καρκίνος

Το πλαίσιο της ανοσοθεραπείας για την καταπολέμηση του καρκίνου περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1890 από τον W. Colley, ο οποίος παρακολούθησε την εξέλιξη του όγκου, μετά από εμβολιασμό ασθενών με σάρκωμα με καλλιέργειες ερυσίπελων (Decker *et al.*, 2017). Από τότε έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος και έχει δώσει μια εις βάθος κατανόηση της βιολογίας του όγκου και των αλληλεπιδράσεων με το ανοσοποιητικό σύστημα. Περαιτέρω γνώση της σχέσης μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του καρκίνου μπορεί να προκύψει από τη διαδικασία της ανοσοδιαμόρφωσης, η οποία περιλαμβάνει τρεις διακριτές φάσεις: εξάλειψη, ισορροπία και διαφυγή (Beatty and Gladney, 2015). Ένα άθικτο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ικανό να αναγνωρίζει τα αντιγόνα των καρκινικών κυττάρων ως «μη-εαυτών» και έτσι να απελευθερώνει επαρκείς ανοσολογικές αποκρίσεις για να προκαλέσει εξάλειψη τους. Τα καρκινικά κύτταρα που επιβιώνουν στη φάση εξάλειψης μπορεί να βρίσκονται σε αδρανή κατάσταση, ανίκανα να αναπτυχθούν υπό την παρουσία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Στη φάση διαφυγής, τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να τροποποιήσουν τα χαρακτηριστικά τους με απώλεια αντιγονικότητας και / ή απώλεια ανοσογονικότητας. Επίσης, τα κακοήγη κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν πρόσθετες ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες, όπως έκφραση PD-L1 ή έκκριση κατασταλτικών κυτοκινών, με αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση της ανοσογονικότητάς τους, εκφράζοντας ένα χαμηλότερο φορτίο αντιγόνου, το οποίο τους βοηθά να αναπτυχθούν και τελικά να δώσουν μεταστάσεις (Helmy *et al.*, 2013) (Gonzalez, Hagerling and Werb, 2018).

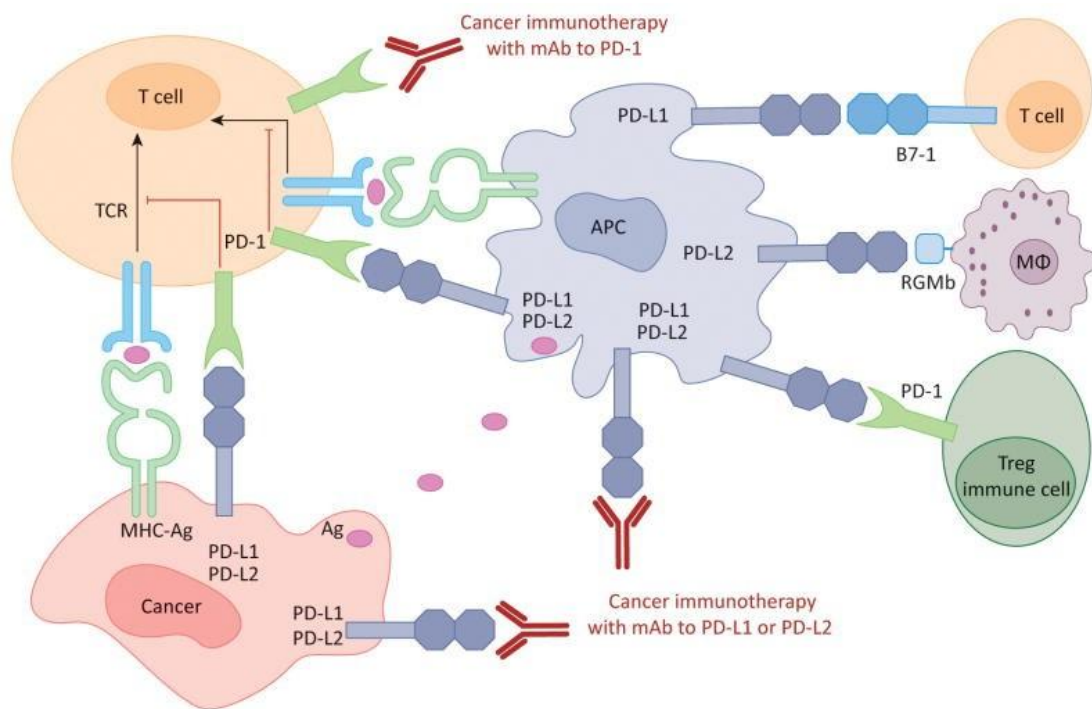
Η βάση μιας ανοσολογικής απόκρισης είναι η παρουσίαση αντιγόνου και η επακόλουθη ενεργοποίηση T κυττάρων, μια διαδικασία που κυρίως προκαλείται από κυτοκίνες που αλληλεπιδρούν με κυτταρικούς υποδοχείς για να επάγουν επαρκή αντινεοπλασματική δραστηριότητα. Αντιγόνα όγκου παρουσιάζονται σε T-

κύτταρα από τα κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο (APCs) και υποδοχείς T-κυττάρων, παρέχοντας το πρωτεύον σήμα για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Η πλήρης ενεργοποίηση και επέκταση των T-κυττάρων απαιτεί επιπρόσθετα διεγερτικά σήματα, ενώ πολλοί συν-υποδοχείς δρουν ως αρνητικοί διαμορφωτές της ανοσοαπόκρισης σε διάφορα σημεία ελέγχου. Το CTLA-4 επάγεται σε T-κύτταρα τη στιγμή της αρχικής απόκρισης τους στο αντιγόνο, μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια όπου δεσμεύεται στο B7 και οδηγεί σε απενεργοποίηση συγκεκριμένων T-κυττάρων (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Όταν ο υποδοχέας T-κυττάρου (TCR) συνδέεται με πρωτεΐνες αντιγόνου και κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στο APC και το CD28 συνδέεται με το B7-1 / B7-2 στο APC, το T-κύτταρο μπορεί να ενεργοποιηθεί. Ωστόσο, η σύνδεση του B7-1 / B7-2 με το CTLA-4 διατηρεί τα T-κύτταρα σε ανενεργή κατάσταση, ώστε να μην είναι σε θέση να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα στο σώμα (αριστερό πλαίσιο). Ο αποκλεισμός της δέσμευσης του B7-1 / B7-2 στο CTLA-4 με έναν αναστολέα ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου (αντίσωμα αντι-CTLA-4) επιτρέπει στα T-κύτταρα να είναι ενεργά και να σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα (δεξί πλαίσιο). Ανατύπωση: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/ctla-4>.

Από την άλλη πλευρά, η οδός PD-1 / PD1-L1 εμπλέκεται σε μεταγενέστερα στάδια όπου τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα ρυθμίζουν προς τα πάνω την PD-1 και τα φλεγμονώδη σήματα διεγείρουν την έκφραση PD1-L1 με αποτέλεσμα μειωμένη δραστικότητα T-κυττάρων. Αυτός ο μηχανισμός χρησιμοποιείται από τα καρκινικά κύτταρα για να ξεφύγουν από την αναγνώρισή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που αναστέλλουν τη δράση είτε τα CTLA-4 είτε τα PD1 / PD1-L1 αυξάνουν την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, αυξάνουν την κυτταροτοξική δραστικότητα των T-κυττάρων διευρύνοντας την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων (Seidel, Otsuka and Kabashima, 2018) (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12: Ανθρώπινη ανοσοθεραπεία καρκίνου με αντισώματα αντι-PD-1 και αντι-PD-L1 / L2:** Τα κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο (APC) προσλαμβάνουν αντιγόνα (Ag) που απελευθερώνονται από καρκινικά κύτταρα και είναι παρόντα σε T-κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να παρουσιάσουν Ag σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα στο MHC. Κατά την ενεργοποίηση των T-κυττάρων, οι υποδοχείς PD-1 εκφράζονται σε κύτταρα-T και αναστέλλουν την ανοσοαπόκριση μέσω εμπλοκής των PD-L1 και PD-L2 σε APC και PD-L1 σε καρκινικά κύτταρα. Επομένως, ο αποκλεισμός που προκαλείται από μονοκλωνικά αντισώματα (mAb) της οδού PD-1 / PD-L1 / PD-L2 μπορεί να ενισχύσει την αντι-καρκινική ανοσία. Ανατύπωση: (Ohaegbulam *et al.*, 2015)



Ο κύριος τρόπος δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η αναγνώριση από τα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, η απελευθέρωση διαφόρων κυτοκινών, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η συνακόλουθη φαγοκυττάρωση. Η ανάπτυξη όγκων μπορεί να ελεγχθεί από κυτταροτοξικά ανοσοκύτταρα, αλλά καθώς ο όγκος εξελίσσεται, τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς που τροποποιούν την περιφερική ανοσολογική ανοχή για να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να δώσουν μεταστάσεις (Pio *et al.*, 2019).

Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού είναι υπό αυστηρό έλεγχο από ανασταλτικά σημεία ελέγχου που αποτρέπουν την υπερδιέγερση που θα είχε ως αποτέλεσμα την αυτοανοσία και την εκτεταμένη βλάβη σε υγιή κύτταρα (Sharma *et al.*, 2017). Δυστυχώς, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εξελιχθούν για να σχηματίσουν πρωτεύοντες και μεταστατικούς όγκους παρά την ύπαρξη αποτελεσματικού ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα του όγκου αποφεύγουν την επίθεση του ανοσοποιητικού συστήματος χρησιμοποιώντας δύο κύριες στρατηγικές: αποφεύγοντας την ανοσολογική αναγνώριση και υποκινώντας την δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού περιβάλλοντος (TME-tumor microenvironment). Κατά την πρώτη, τα καρκινικά κύτταρα μειώνουν ταχύως την έκφραση αντιγόνων όγκου στην κυτταρική επιφάνεια, αποφεύγοντας έτσι την αναγνώριση από κυτταροτοξικά T κύτταρα. Περαιτέρω, στο δεύτερο, τα καρκινικά κύτταρα υποκινούν το TME με (α) έκκριση κατασταλτικών μορίων (β) έκφραση ανασταλτικών μορίων σημείου ελέγχου και (γ) επαγωγή της πρόσληψης TAM, MDSCs και Tregs (Gonzalez, Hagerling and Werb, 2018). κυρίως εκμεταλλευόμενοι μια ποικιλία μηχανισμών που τους επιτρέπουν να αποφύγουν την εξόντωση, ενώ η ανάπτυξη του όγκου μπορεί επίσης να ευνοηθεί από τα διαφοροποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Kitamura, Qian and Pollard, 2015). Προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή από το ανοσοποιητικό σύστημα, τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν ανασταλτικά σημεία ελέγχου που διεγείρουν την ανοσοκαταστολή, έναν μηχανισμό που διερευνήθηκε διεξοδικά και οδήγησε στην ανάπτυξη αρκετών μορίων ικανών να περιορίσουν την προκαλούμενη από καρκίνο ανοσοκαταστολή (π.χ. αντι-CTLA4, αντι-PD-1 και αντι-PDL1) . Αυτοί οι ανοσοποιητικοί αναστολείς σημείων ελέγχου σχηματίζουν τώρα ένα νέο τοπίο στην

θεραπευτική του καρκίνου και έχουν ήδη δείξει αξιοσημείωτη ανταπόκριση και ποσοστά επιβίωσης σε μια ποικιλία όγκων. Ωστόσο, πολλοί από τους ασθενείς με καρκίνο δεν αποκομίζουν όφελος από τους αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού, μια παρατήρηση που οδήγησε στην υπόθεση ότι υπάρχει αντίσταση στην ανοσοθεραπεία (Young *et al.*, 2018a) (Fares *et al.*, 2019).

Η αντίσταση στην ανοσοθεραπεία μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως πρωτογενής ή και να αποκτηθεί, ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία αρχικής απόκρισης και επακόλουθης υποτροπής μετά την επίτευξη της αντίστασης. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας περιλαμβάνουν εγγενείς και εξωγενείς παράγοντες όγκου-κυττάρου οι οποίοι είτε αλληλεπιδρούν με την επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνου είτε επιτρέπουν στους όγκους να στρατολογήσουν κύτταρα που καταστέλλουν την ανοσία τα οποία ανταγωνίζονται τη δραστικότητα των κυτταροτοξικών κυττάρων (Sharma *et al.*, 2017). Αυτό έχει οδηγήσει στην αναγνώριση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (TME) ως σημαντικού παράγοντα που υποστηρίζει την ανάπτυξη όγκου και την μετάσταση, αλλά επίσης συμβάλλει στην ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία. Στο πλαίσιο της ανοσοθεραπείας, το TME θεωρείται ως ένας κρίσιμος μεσολαβητής της επαγόμενης από όγκο ανοσοκαταστολής μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών με αποτέλεσμα την καθοδική ρύθμιση της δραστικότητας T-κυττάρου τελεστή και την συσσώρευση ανοσοκατασταλτικών κυττάρων (Whiteside, 2008).

## **1.8 Μικροπεριβάλλον του όγκου (TME - tumor microenvironment)**

Η τρέχουσα γνώση υποστηρίζει την ιδέα ότι ο παγκρεατικός καρκίνος (PC-pancreatic cancer) αποτελείται από μια μειοψηφία νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλεται από ένα υψηλής πυκνότητας δεσμοπλαστικό στρώμα που αντιπροσωπεύει το 60-90% της συνολικής μάζας του όγκου (Rucki *et al.*, 2017). Η παρουσία της δεσμοπλασίας αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της παθογένεσης και της εξέλιξης του PC και μπορεί να αναγνωριστεί τόσο στον πρωτοπαθή όγκο, όσο και στις μεταστάσεις (Uzunparmak and Sahin, 2019)(Erkan *et*

*al.*, 2012). Ο όρος TME χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα σύνολο στοιχείων που σχηματίζουν την παγκρεατική νεοπλασία και αποτελείται από κύτταρα όγκου, διάφορα μη κακοήθη στρωματικά κύτταρα και ενεργούς παράγοντες (Oliver *et al.*, 2018). Οι ινοβλάστες είναι ο κυρίαρχος τύπος κυττάρων εντός του TME όπου σχηματίζουν μια ετερογενή ομάδα κυττάρων που συμβάλλουν στο σχηματισμό ECM και υποστηρίζουν την ανάπτυξη όγκου (Koustas *et al.*, 2019). Τα παγκρεατικά κύτταρα stellate αντιπροσωπεύουν ένα υποσύνολο σχετιζόμενων με τον καρκίνο ινοβλάστες που υπάρχουν σε μια κατάσταση ηρεμίας σε υγιή παγκρεατικό ιστό. Μόλις ενεργοποιηθούν, δηλαδή ως αποτέλεσμα φλεγμονής, τραυματισμού ή σχηματισμού όγκου, υιοθετούν ένα φαινότυπο τύπου μυοϊνοβλάστη με υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού και αυξημένη έκκριση πρωτεϊνών εξωκυτταρικής μήτρας (Feig *et al.*, 2012)(Son *et al.*, 2017).

Τα ανοσοκύτταρα που βρίσκονται στο TME είναι κατά κύριο λόγο μυελοειδικά κατασταλτικά κύτταρα (MDSCs), μακροφάγα που σχετίζονται με όγκους (TAM) και λεμφοκύτταρα που διεισδύουν στον όγκο. Τα Tregs έχουν την ικανότητα να διεισδύουν σε μεγάλο βαθμό σε διάφορους τύπους όγκων όπως ο καρκίνος του παγκρέατος και οι προχωρημένοι καρκίνοι εμφανίζουν συχνά υψηλότερα επίπεδα συσσώρευσης Tregs. Επιπλέον, οι χημειοκίνες που παράγονται από τον όγκο παίζουν σημαντικό ρόλο, όπως η CCL22 που είναι ικανή να διεγείρει το CCR4. Τα Tregs καταστέλλουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις T κυττάρων και των κυττάρων που παρουσιάζουν αντιγόνα, συμπεριλαμβανομένων DCs και μακροφάγων. Τα Tregs μπορούν να καταστρέψουν τα τελεστικά κύτταρα T εντός των όγκων μέσω της οδού σηματοδότησης FasL-Fas, καθώς και μέσω της κυτταροτοξικότητας με τη μεσολάβηση του granzyme B και της περφορίνης με μείωση της IL-2 και της διαφοροποίησης / ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων. Τα ανοσοκατασταλτικά ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs) εμφανίζονται σε αφθονία σε σύγκριση με τα λιγότερα τελεστικά κύτταρα T και δενδριτικά κύτταρα, ενώ η παρουσία NK είναι ασυνήθιστη (Wang, Franco and Ho, 2017) (Εικόνα 13).

Βασικά στοιχεία της ECM είναι το κολλαγόνο, η ινωδονεκτίνη, οι πρωτεογλυκάνες και το υαλουρονικό οξύ, τα ενεργά ένζυμα και οι πρωτεΐνάσες, που μετασχηματίζουν τον φυσιολογικό ιστό σε δεσμοπλαστική νεοπλασία με αγγειακές και λεμφικές ανωμαλίες Το γεγονός ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου

είναι μια δυναμική οντότητα μπορεί να εξηγήσει την ποικιλομορφία που παρατηρείται σε διαφορετικούς ιστούς. Ωστόσο, τα κύρια χαρακτηριστικά όπως η δεσμοπλασία, η μη φυσιολογική αγγειογένεση και η ενεργοποίηση των ινοβλαστών είναι σχεδόν πάντα παρόντα (Dougan, 2017). Το TME ασκεί μια πληθώρα δράσεων που κυμαίνονται από τον σχηματισμό όγκου, τη διάδοση του καρκίνου και την αντίσταση στη θεραπεία (Vennin *et al.*, 2018).

Τα συμβατικά φάρμακα, όπως η γεμισιταβίνη, δεν μπορούν να διεισδύσουν στο πλούσιο και παχύ στρώμα του TME και συνεπώς οδηγούν σε αντοχή στα φάρμακα. (Binenbaum, Na'ara and Gil, 2015) Η στόχευση του TME έχει δείξει αντιφατικά αποτελέσματα στις προκλινικές μελέτες. Μια μελέτη από τους Olive *et al* (Olive *et al.*, 2009) σε μοντέλα ποντικών έδειξε ότι η αναστολή της εξαρτώμενης από το Sonic Hedgehog δεσμοπλασίας, αύξησε τη διαπερατότητα της γεμισιταβίνης και τη συνολική επιβίωση. Ωστόσο, η αναστολή του Shh μείωσε τον σχηματισμό στρώματος, προκάλεσε έναν πιο επιθετικό φαινότυπο και μειώθηκε η επιβίωση (Rhim *et al.*, 2014)(Cheng *et al.*, 2016). Το TME χαρακτηρίζεται περαιτέρω από έντονη υποξία και όταν συνδυάζεται με αγγειακή συμπίεση που προκαλείται από τη δεσμοπλασία, προκαλεί τη διαδικασία της αγγειογένεσης για να υποστηρίξει τη συνεχή ανάγκη θρεπτικών συστατικών για τον όγκο. Συνεπώς, η περιορισμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου στο μικροπεριβάλλον και η ελάχιστη αγγειοποίηση που ανιχνεύθηκε αναγνωρίστηκαν ως πολλά υποσχόμενοι στόχοι για τη θεραπεία. Ωστόσο, οι κλινικές δοκιμές που επικεντρώθηκαν στην αναστολή του VEGF-A σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Το πυκνό ECM προκάλεσε αυξημένη ενδοιστική πίεση που ρυθμίζει αρνητικά την αγγείωση και τη διάχυση. Το φαινόμενο αυτό αντιστράφηκε με τη χρήση υαλουρονιδάσης, αλλά είχε περιορισμένο ευεργετικό αποτέλεσμα λόγω του αυξημένου κινδύνου για θρόμβο (Provenzano *et al.*, 2012). Επιπλέον, η εκτεταμένη ανοσοκαταστολή που παρατηρείται στον παγκρεατικό καρκίνο προέρχεται από τη συντονισμένη δράση των ρυθμιστικών T κυττάρων (Treg), των μυελοειδών κατασταλτικών κυττάρων (MDSCs) και των μακροφάγων, τα οποία εμποδίζουν τα CD8 + T από την αναγνώριση και την εξάλειψη του όγκου (Wang, Franco and Ho, 2017).

Η χημειοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο σε όγκους, και την απελευθέρωση νεοαντιγόνων, τα οποία θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Η γεμισταβίνη μπορεί να επηρεάσει το TME μέσω της αναστολής της επέκτασης των MDSCs και της επαγωγής των κυττάρων T2H. Περαιτέρω, άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως η σισπλατίνη ή η καρβοπλατίνη, έχουν ταυτοποιηθεί ως επαγωγείς IL-6 και προσταγλανδίνης E2 και IL-10 (Dijkgraaf *et al.*, 2013).

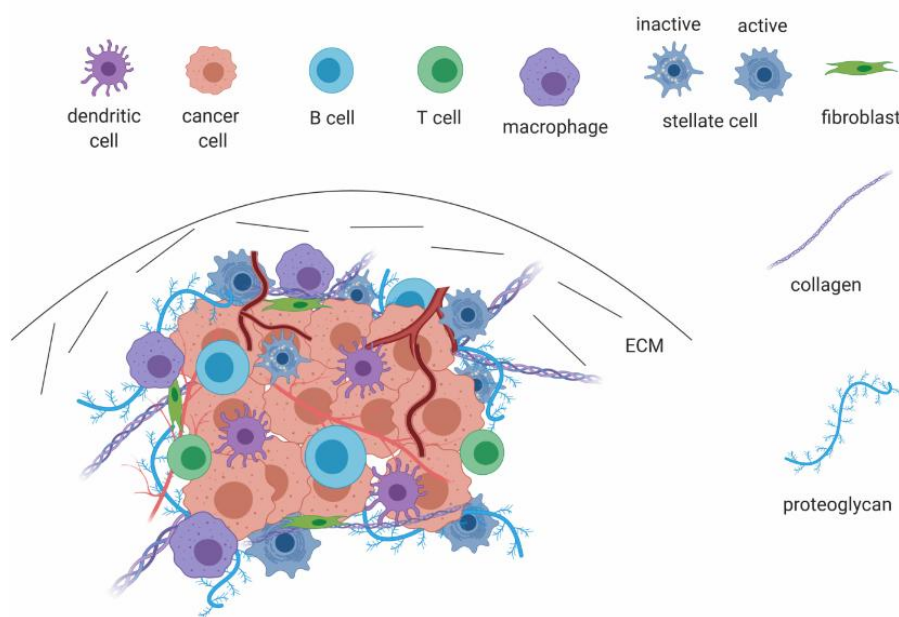
Ένας εξαιρετικά ετερογενής υποπληθυσμός κυττάρων είναι το κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου του παγκρέατος. Αυτή η σύνθετη δομή των καρκινικών κυττάρων και των στρωματικών και ανοσοκατασταλτικών κυττάρων μεταβάλλει συνεπώς την επίδραση της ανοσοθεραπείας. Οι κυρίαρχοι τύποι κυττάρων στο TME είναι τα MDSCs, Tregs και μακροφάγα (Aliru *et al.*, 2018). Επιπλέον, αρκετοί άλλοι τύποι κυττάρων έχουν επίσης ταυτοποιηθεί όπως ινοβλάστες, ECM και PSCs. Υπάρχει επίσης υψηλή αναλογία Treg / Teffs. Ο συσσωρευμένος πληθυσμός των T κυττάρων οδηγεί τα T κύτταρα σε εξάντληση κατά τη διάρκεια μιας ανοσοαπόκρισης (Sarantis *et al.*, 2020).

Επιπλέον, περίπου το 50% των όγκων χαρακτηρίζεται από την εισβολή των MDSCs και την αύξηση της ρύθμισης του PD-L1 μέσω της IFN- $\gamma$  (Karakhanova *et al.*, 2015). Έτσι, οι όγκοι δημιουργούν ένα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον (Young *et al.*, 2018b). Σε πιο προχωρημένους όγκους, μερικές μελέτες έχουν εντοπίσει ότι τα Tregs και τα Teffs αναστέλλουν την κανονική λειτουργία των T κυττάρων και ενισχύουν το ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον του TME (Sanford *et al.*, 2013).

Αρκετές μελέτες υπογραμμίζουν επίσης την έλλειψη αναγνώρισης από τα κύτταρα T, καρκινικών αντιγόνων μέσω της υποβάθμισης του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I σε καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, μια μετάλλαξη στο γονίδιο 1 ή 2 του υποδοχέα της IFN αυξάνει την ανοσοκαταστολή στο TME και βοηθά τα καρκινικά κύτταρα να ξεφύγουν από την αντινεοπλασματική απόκριση των T κυττάρων (Amedei *et al.*, 2013). Επιπλέον, δύο φαινότυποι, συχνά αποκαλούμενοι "κρύοι" και "ζεστοί" όγκοι, ταξινομούνται βάσει του βαθμού ανοσοποιητικής διήθησης των T-λεμφοκυττάρων (Gao *et al.*, 2016). Οι ζεστοί όγκοι χαρακτηρίζονται από μια μεταβολή των CD8<sup>+</sup> και Tregs, μετά τη χορήγηση ανοσοθεραπευτικών φαρμάκων και δείνουν μια απάντηση της τάξης 20%-40%

στους αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (Hilmi, Bartholin and Neuzillet, 2018).

Το TME αντιπροσωπεύει μια δυναμική οντότητα που μπορεί να τροποποιήσει τη σύνθεσή της, ιδιαίτερα σε προχωρημένα στάδια καρκινογένεσης. Η πρόοδος του όγκου σε προχωρημένα στάδια και η αύξηση της ικανότητας για μετάσταση συμπίπτει με μια διαδικασία που ονομάζεται μετάπτωση επιθηλιακή-μεσεγχυματική (EMT). Το EMT είναι μια διαδικασία όπου τα επιθηλιακά κύτταρα μετατρέπονται σταδιακά σε μεσεγχυματικά κύτταρα με κινητικά χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να μεταναστεύουν σε μακρινές θέσεις. Μόλις μετεγκατασταθούν, το EMT αντιστρέφεται και τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται και δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον παρόμοιο με τον πρωτεύοντα τόπο. Ο φυσιολογικός παγκρεατικός ιστός έχει τη δυνατότητα να αναγεννηθεί μετά από βλάβη σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση κυττάρων stellate και ίνωσης που απομονώνει την πληγείσα περιοχή, προστατεύει τους υγιείς ιστούς και λύεται μετά την αποκατάσταση ιστού. Τα καρκινικά κύτταρα διαταράσσουν αυτή την αναγεννητική διαδικασία προκαλώντας τη συνεχή ενεργοποίηση των κυττάρων stellate με επακόλουθη υπερβολική παραγωγή στρώματος, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του όγκου και στην εξέλιξη της νόσου (Evan *et al.*, 2017).



Εικόνα 13: Το μικροπεριβάλλον του όγκου του παγκρέατος (TME).

Ένα σύνθετο σύνολο καρκινικών κυττάρων, μεσεγχυματικών κυττάρων, φλεγμονωδών και ανοσολογικών κυττάρων, ανώμαλης αγγειογένεσης και περίσσειας εξωκυτταρικής μήτρας (ECM). Η υποξία και η υπερβολική δεσμοπλασία αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά που οδηγούν στη νεο-αγγειογένεση, στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και στην ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Ανατύπωση: (Evan *et al.*, 2017)

## 1.9 Αναστολείς σημείων ελέγχου (Check-point inhibitors)

Η σημαντική πρόοδος των αναστολέων σημείων ελέγχου (anti-CTLA4, anti-PD1 / PDL1) έχει αποτελέσει μια ελπιδοφόρα θεραπευτική επιλογή σε αρκετούς συμπαγείς όγκους. Τα αντισώματα CTLA4, όπως το ipilimumab και το tremelimumab, αναστέλουν τον υποδοχέα CTLA4 να ενωθεί με το B7 και ενισχύουν την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Η έκφραση του CTLA-4 σε όγκους έχει συνδεθεί με την κακή επιβίωση στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα (Huang *et al.*, 2016) και την αυξημένη επιβίωση στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) (Salvi *et al.*, 2012). Όταν τα PD1 / PDL1 που εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων. Τα υψηλά επίπεδα PD-1 / PD-L1 μπορεί να συσχετιστούν με κακή πρόγνωση σε μερικούς καρκίνους (μελάνωμα, οισοφάγο, καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων, καρκίνο ωοθηκών) και με καλύτερη πρόγνωση σε άλλους (π.χ. αγγειοσάρκωμα και γαστρικό καρκίνο) (Seidel, Otsuka and Kabashima, 2018). Τα αντισώματα PD1 (όπως το nivolumab και pembrolizumab) και το PDL1 (όπως το atezolizumab) διακόπτουν την αλληλεπίδραση του PD1 με το PDL1. Την τελευταία δεκαετία, πολλοί αναστολείς σημείων ελέγχου (π.χ. ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab) έχουν λάβει έγκριση σε διάφορους συμπαγείς όγκους όπως το μελάνωμα, τον πνεύμονα, τον νεφρό και την ουροδόχο κύστη (Soliman, 2017).

Ειδικότερα, το 2011, το ipilimumab ήταν ο πρώτος εγκεκριμένος αναστολέας σημείων ελέγχου, σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα που έδωσε μεγαλύτερη επιβίωση. Το pembrolizumab και το nivolumab ήταν επίσης μεταξύ των εγκεκριμένων αναστολέων PD1 για προχωρημένο μελάνωμα. Η συνεργική θεραπεία με ipilimumab και nivolumab οδήγησε σε μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς την

επανεμφάνιση της νόσου, σε σύγκριση με κάθε φάρμακο που χορηγήθηκε χωριστά (11,5 έναντι 2,9 μήνες μόνο με ipilimumab και 6,9 μήνες μόνο με nivolumab) (Valsecchi, 2015).

Η πρώτη ανοσοθεραπεία που επιτράπηκε (2015) ήταν το Nivolumab για τη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό NSCLC. Μεταξύ ασθενών με προχωρημένο μη-πλακώδες NSCLC που είχαν πρόοδο νόσου κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνη, η επιβίωση ήταν καλύτερη κατά 41% (nivolumab έναντι docetaxel) [16]. Επιπλέον, η θεραπεία πρώτης γραμμής με το nivolumab μαζί με ipilimumab είχε ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη επιβίωση από ό,τι μόνο η χημειοθεραπεία, σε ασθενείς με NSCLC, ανεξάρτητα από την έκφραση PD-L1 (Borghaei *et al.*, 2015).

Επιπλέον, ο συνδυασμός του nivolumab και του ipilimumab έναντι του sunitinib έδωσε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε θεραπεία 1<sup>ης</sup> γραμμής, ασθενών με προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (Motzer *et al.*, 2019).

Το pembrolizumab χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη θεραπεία δεύτερης γραμμής, ασθενών με NSCLC που εκφράζουν PDL1. Επιπρόσθετα, έχει λάβει έγκριση για την αντιμετώπιση ασθενών με προχωρημένο NSCLC και υψηλή έκφραση PDL1, ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα και ασθενών με μεταστατικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου (Soliman, 2017).

Το atezolizumab (αναστολέας PDL1), που επιτρέπεται για τη θεραπεία ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνωμα του ουροθηλίου λόγω του ευνοϊκού προφίλ ασφάλειας σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία (Powles *et al.*, 2018). Επιπλέον, η χορήγηση του atezolizumab έναντι του bevacizumab μαζί με χημειοθεραπεία βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση μεταξύ ασθενών με μεταστατικό μη-πλακώδες NSCLC, ανεξάρτητα από την έκφραση PD-L1 (Socinski *et al.*, 2018).

Παρά τις ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τις προαναφερθείσες μελέτες, αυτές οι θεραπείες παρουσίασαν μικρή αποτελεσματικότητα στον καρκίνο του παγκρέατος όταν χορηγήθηκε μόνη της η ανοσοθεραπεία. Σε μια μελέτη φάσης II, το ipilimumab δεν ήταν σε θέση να επάγει ανταπόκριση όγκου σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παγκρέατος και το μονοκλωνικό αντίσωμα BMS-93655 (αντι-PD-L1) δεν είχε αποτελεσματικότητα σε μία μελέτη φάσης I (Winograd *et al.*, 2015) (Foley *et al.*, 2016). Η αδυναμία αυτών να προκαλέσουν αναστολή της



ανάπτυξης του όγκου οφειλόταν πιθανότατα στην ανοσοποιητική διακοπή, στην υπερβολική δεσμοπλασία και στην έλλειψη έκφρασης του PD-L1 σε αυτόν τον τύπο καρκίνου. Συνεπώς, η ενσωμάτωση πρόσθετων θεραπειών για τη χορήγηση συνδυαστικών στρατηγικών φαίνεται να είναι η ιδανική προσέγγιση για την επίτευξη της πιο αποτελεσματικής απόκρισης. Ένα ευρύ φάσμα κλινικών δοκιμών στον καρκίνο του παγκρέατος έχει ολοκληρωθεί ή βρίσκεται σε εξέλιξη χρησιμοποιώντας μονοθεραπείες ανοσολογικού ελέγχου, συνδυασμούς θεραπείας και αναστολείς σημείων ελέγχου σε συνδυασμό με εμβόλια, κυτταροτοξική χημειοθεραπεία και άλλους ανασταλτικούς παράγοντες. Παρακάτω, υπάρχουν μερικά παραδείγματα των θεραπευτικών στρατηγικών που ακολουθήθηκαν σε αυτές τις κλινικές δοκιμές: (1) Οι μονοθεραπείες περιλαμβάνουν τη χορήγηση διαφόρων αναστολέων έναντι των CTL-4 (ipilimumab, tremelimumab) και PD-1 (pembrolizumab, MPDL3280A, MEDI4736) αναστολή που περιλαμβάνει τους συνδυασμούς αυτών των παραγόντων μεταξύ τους ή με άλλους παράγοντες όπως το mogamulizumab (αντι-CCR-5). (2) Οι αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Αποτελούνται από συνδυασμούς αναστολέων CTL4 και / ή PD-1 με συμβατικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως η γεμισιταβίνη, η Nab-paclitaxel, η FOLFOX και η καρβοπλατίνη (Nomi *et al.*, 2007). Μια κλινική μελέτη φάσης I που διερεύνησε την αποτελεσματικότητα της γεμισιταβίνης και του tremelimumab σε μεταστατικό καρκίνο του παγκρέατος έδειξε μερική απόκριση σε ορισμένους ασθενείς και η ασθένεια παρέμεινε σταθερή για περισσότερο από δέκα εβδομάδες. Σε άλλη μελέτη, η συνδυαστική αγωγή με ipilimumab και γεμισιταμπίνη είχε παρόμοια αποτελέσματα (Kamath *et al.*, 2019). Επίσης δύο πιλοτικές προκλινικές μελέτες βασισμένες στον συνδυασμό χημειοθεραπείας και αντι-PD-1 αντισωμάτων (pembrolizumab και FOLFOX για προχωρημένο καρκίνο του γαστρεντερικού και pidilizumab και γεμισιταβίνης για καρκίνο του παγκρέατος έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα (Nomi *et al.*, 2007). (3) Η ανοσοθεραπεία εμβολίου βασίζεται στην παροχή αντιγόνων όγκου σε APCs και στην επακόλουθη επαγωγή μιας ενορχηστρωμένης ανοσοαπόκρισης. Ειδικές μεταβολές DNA του καρκίνου δημιουργούν νεο-αντιγόνα, τα οποία οδηγούν σε μια μοναδική αλληλουχία πεπτιδίων. Οι ανοσοθεραπείες εμβολίων περιλαμβάνουν τα εμβόλια ολόκληρων

κυττάρων, τα εμβόλια DC, τα εμβόλια DNA και πεπτιδίων, αλλά παρά τα βελτιωμένα ανοσοπροφίλ έχουν δείξει κακή κλινική έκβαση (Jaffee *et al.*, 2002). Το πλέον ευρέως διερευνημένο εμβόλιο στον καρκίνο του παγκρέατος είναι το GVAX, ένα αλλογενές ακτινοβολημένο πλήρες κυτταρικό εμβόλιο όγκου γενετικά τροποποιημένο ώστε να εκκρίνει τον παράγοντα διέγερσης αποικιών μακροφάγων (GM-CSF) και να διεγείρει την κυτταρολυτική δράση κατά των όγκων (Thomas *et al.*, 2004). Σε μια κλινική μελέτη φάσης I, η χορήγηση GVAX σε καρκίνο του παγκρέατος πριν και μετά την ακτινοθεραπεία έδειξε αύξηση στην επιβίωση χωρίς την επανεμφάνιση της νόσου (Jaffee *et al.*, 2001) και στις κλινικές μελέτες φάσης II, το GVAX σε συνδυασμό με χημειοακτινοθεραπεία με βάση το κυκλοφωσφαμίδιο ή 5-FU εμφάνισε παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά την επιβίωση (Eric *et al.*, 2011). Όταν συνδυάστηκε με τον προαναφερθέντα αναστολέα το ipilimumab σε μια δοκιμή φάσης I σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παγκρέατος, το GVAX είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της επιβίωσης συγκριτικά με το ipilimumab, γεγονός που συσχετίστηκε με την εκτεταμένη παρουσία των T κυττάρων (Le *et al.*, 2013). Άλλα εμβόλια που στοχεύουν το KRAS, το MUC1, το VEGF-R ή τη survivin μόνο ή σε συνδυασμό με GVAX βρίσκονται επίσης υπό κλινική έρευνα (Thind *et al.*, 2017). (4) Η ανοσοθεραπεία με αποδέκτες T κυττάρων βασίζεται στην τροποποίηση των αυτόλογων T κυττάρων, σχεδιασμένων να εκφράζουν έναν χιμαιρικό υποδοχέα αντιγόνου (CAR) και να διεγείρουν την ανοσοαπόκριση έναντι του όγκου. Παρά τα εντυπωσιακά αποτελέσματα μιας κλινικής μελέτης που χρησιμοποίησε την τεχνολογία CAR-T για να στοχεύσει τη λευχαιμία (Maude *et al.*, 2014)(Beatty, 2014), η πλειονότητα των ασθενών που έλαβαν κύτταρα CAR-T που στοχεύουν στη μεσοθηλίνη, ένα αντιγόνο μεμβράνης που υπερεκφράζεται στον καρκίνο του παγκρέατος, έδειξε ικανοποιητική ανοχή αλλά όχι σημαντική βελτίωση. Εκτός από τη μεσοθηλίνη και άλλα συναφή με τον καρκίνο αντιγόνα δοκιμάζονται σε συνεχιζόμενες κλινικές δοκιμές ως δυνητικοί στόχοι των θεραπευτικών σχημάτων που βασίζονται σε CAR-T (αντι-CEA, αντι-CD-133, αντι-ROR1, αντι-WT1) σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία (Thind *et al.*, 2017) (5) Παράγοντες ανοσοδιαμορφώσεως που στοχεύουν στο πυκνό παγκρεατικό μικροπεριβάλλον, μπορούν επίσης να ασκήσουν ουσιαστική αντικαρκινική δράση. Τα ελπιδοφόρα δεδομένα προέκυψαν από τη χρήση αντι-CD40 αντισωμάτων μαζί με γεμισταβίνη

σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο, όπου η μείωση του όγκου αποδόθηκε σε στρωματικές αλλοιώσεις που προκλήθηκαν από την επίδραση του αντι-CD40 αντισώματος (Le *et al.*, 2013)(Beatty *et al.*, 2011). Ένα άλλο μόριο που εξετάζεται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές έναντι του παγκρεατικού καρκίνου είναι το CCR2, ένας υποδοχέας χημειοκίνης που μεσολαβεί στη χημειοταξία των ανοσοκυττάρων. Σε μια κλινική δοκιμή φάσης 1, οι μισοί ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με PF-04136309, (αναστολέας της CCR2), σε συνδυασμό με το FOLFIRINOX, παρουσίασαν μερική απόκριση και σταθερή κλινική εικόνα (Nywening *et al.*, 2016).

## 2. Σκοπός Διδακτορικής Διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως στόχο την ανάπτυξη στρατηγικών άρσης της προκαλούμενης από τον όγκο ανοσοδιαφυγής και ανοσοκαταστολής μέσω συνδυασμένης ανοσοθεραπείας (συνδυασμό αντισωμάτων κατά του CTLA-4 και του PD-1/PD-L1) με σκοπό την ώθηση στη θεραπευτική (καλύτερη κλινική εικόνα αλλά και μεγαλύτερη επιβίωση του ασθενούς) του παγκρεατικού καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα θα μελετηθεί η «συνδυασμένη ανοσοθεραπεία» (double immune checkpoint inhibition), δηλαδή ο συνδυασμός αντισωμάτων κατά του CTLA-4 και του PD-1/PD-L1. Το θεωρητικό πλεονέκτημα έγκειται στο γεγονός ότι, καθώς προκαλούν άρση της ανοσοκαταστολής μέσω διαφορετικών στόχων, ενδεχομένως να έχουν αθροιστική ή και συνεργική δράση όταν συγχρηγοούνται. Τα συνδυασμένα θεραπευτικά σχήματα αφορούν την ανοσοθεραπεία με τη χημειοθεραπεία, την κυκλοπιροξολαμίνη και την τινζαπρίνη. Η κυκλοπιροξολαμίνη είναι ένα αντιμυκητιασικό φάρμακο, και θα χρησιμοποιηθεί, καθότι ουσίες με αντιμυκητιακές ιδιότητες συμβάλλουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπρόσθετα, θα δοκιμαστεί και η Ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους, τινζαπαρίνη. Η τινζαπαρίνη εκτός από την πρόληψη και την αντιμετώπιση της φλεβικής θρομβοεμβολής, έχει αναφερθεί πως μπορεί να διαδραματίζει ρόλο στην αντιμετώπιση του όγκου. Τέλος, σκοπό της παρούσας διατριβής αποτελεί η διερεύνηση και η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την πιθανή ογκοσταλτική δράση των θεραπευτικών σχημάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### 3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

#### 3.1.1 Χαρακτηριστικά ανθρώπινων καρκινικών παγκρεατικών σειρών

Οι καρκινικές παγκρεατικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν οι

1. Η BxPC-3 καλλιεργήθηκε από αδenoκαρκίνωμα του σώματος του παγκρέατος από γυναίκα ασθενή 61 ετών. Ο ασθενής πέθανε 6 μήνες αργότερα παρά την υποβολή σε θεραπεία με ακτίνες και χημειοθεραπεία. Δεν βρέθηκαν στοιχεία μετάστασης. Οι όγκοι που αναπτύσσονται σε μύες μοιάζουν με τον πρωτογενή όγκο του ασθενούς και παράγουν καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο (αντιγόνο που σχετίζεται με τον καρκίνο του ανθρώπινου παγκρέατος) και ίχνη βλεννίνης.
2. Η MIA PaCa-2 προήλθε από αδenoκαρκίνωμα του παγκρέατος ενός 65χρονου άνδρα που παρουσίασε κοιλιακό άλγος για 6 μήνες και μια ψηλαφητή άνω κοιλιακή μάζα. Ο όγκος ανιχνεύθηκε στο σώμα και την ουρά του παγκρέατος και είχε διεισδύσει στην περιτομική περιοχή. Ο όγκος δεν εξέφρασε μετρήσιμες ποσότητες καρκινοεμβρυονικού αντιγόνου και η αλκαλική χρώση φωσφατάσης ήταν αρνητική.
3. Η PANC-1 καλλιεργήθηκε από άνδρα 56 ετών με αδenoκαρκίνωμα στο κεφάλι του παγκρέατος που εισέβαλε στο δωδεκαδακτύλιο. Κατά τη διάρκεια της εκτομής ανακαλύφθηκαν μεταστάσεις σε έναν περιπαγκρεατικό λεμφαδένα. Στην καλλιέργεια, η κυτταρική σειρά δεν βρέθηκε να εκκρίνει μεγάλες ποσότητες καρκινοεμβρυονικού αντιγόνου (Deer *et al.*, 2010).

**Πίνακας 1: Τα χαρακτηριστικά των 3 παγκρεατικών καρκινικών σειρών**

*HD: Homozygous Deletion*

	<b>BxPC-3</b>	<b>PANC-1</b>	<b>MIA PACA-2</b>
<b>Histology</b>	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Carcinoma
<b>Primary or Metastatic</b>	Primary	Primary	Primary
<b>Grade</b>	High	High	High
<b>Proliferation</b>	48-60 hrs	52hrs	40hrs
<b>Differentiation</b>	moderate to poor	poor	Poor
<b>Stromal Content</b>	Unknown	Low	Unknown
<b>KRAS genetic alteration</b>	wt	mut	mut
<b>p53 genetic alteration</b>	mut	mut	mut
<b>CDKN2A/p16 genetic alteration</b>	HD	HD	HD
<b>Smad4 (DPC4) genetic alteration</b>	HD	wt	Wt

### 3.1 .2

#### **Διατήρηση και ανακαλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro***

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε συγκεκριμένες και ελεγχόμενες συνθήκες, μέσα σε ειδικό επωαστικό κλίβανο (incubator-chamber), όπου επιτυγχάνεται σταθερή θερμοκρασία στους 37<sup>0</sup>C, 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) και σχετική υγρασία υψηλότερη από 95% (Εικόνα 2.2). Η εύρυθμη ανάπτυξη όλων των κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) σε τελική συγκέντρωση 1X, εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS: Fetal Bovine Serum), 2 mM L-γλουταμίνη (L-glutamine), 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο (Sodium pyruvate), 50 mM όξινο δισανθρακικό νάτριο (Sodium bicarbonate), 1X διαλύματος μη-απαραίτητων αμινοξέων (Non-essential amino acids) και ένα κοκτέιλ αντιβιοτικών πενικιλίνης (Penicillin) (100 U/ml)/στρεπτομυκίνης (Streptomycin) (100 µg/ml) για την αποφυγή ενδεχόμενων βακτηριακών μολύνσεων. Το αναλυτικό πρωτόκολλο για την παρασκευή ενός τέτοιου θρεπτικού υλικού παρατίθεται ως ακολούθως:

**Πίνακας 2: Απαραίτητα συστατικά για την ανακαλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών**

Διάλυμα DMEM 10X	50 ml
Διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS)	50 ml
Διάλυμα άλατος όξινου δισανθρακικού νατρίου	28,65 ml
Διάλυμα L-γλουταμίνης	10 ml
Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης	5 ml
Διάλυμα μη-απαραίτητων αμινοξέων	5 ml
Διάλυμα άλατος πυροσταφυλικού νατρίου	5 ml
Αποστειρωμένο νερό (H <sub>2</sub> O)	346,35 ml
Τελικός όγκος	500 ml



Το νερό που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του υλικού καλλιέργειας είναι συγκεκριμένης ωσμωριακότητας, ενώ η αποστείρωσή του πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 120°C για 30 λεπτά. Το διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS), πριν χρησιμοποιηθεί, απενεργοποιείται με επώαση σε θερμοκρασία 55°C για 30 λεπτά. Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού, καθώς και οι χειρισμοί των κυττάρων διενεργούνται κάτω από πλήρως αποστειρωμένες συνθήκες που εξασφαλίζονται μέσα στους ειδικούς θαλάμους νηματικής ροής (laminar flow) τάξης II, οι οποίοι περιέχουν ειδικά φίλτρα απολύμανσης και βιολογικής διήθησης σωματιδίων του αέρα, ευρέως γνωστά ως φίλτρα HEPA. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται όπως περιγράφεται από τους (Hayflick and Moorhead, 1961) και για την επίτευξή της είναι απαραίτητη η ελεγχόμενη θρυψινοποίηση μέσω χρήσης διαλύματος 0,10% θρυψίνης/0,02% EDTA όπου καταστρέφονται παροδικά τα μόρια προσκόλλησης της επιφάνειας των κυττάρων με το στερεό υπόστρωμα του δοχείου στο οποίο αναπτύσσονται, αλλά και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο να εναιωρηθούν στο διάλυμα και να διαμοιραστούν σε περισσότερα του ενός θυγατρικά δοχεία φύλαξης και κυτταρικής αύξησης. Κατόπιν, τα κύτταρα του εναιωρήματος καταμετρώνται με ειδικό αιμοκυτταρόμετρο, έτσι ώστε να μεταφέρεται στα θυγατρικά δοχεία ανακαλλιέργειας συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων στη συγκέντρωση που απαιτείται κάθε φορά. Ανάλογα με την κυτταρική σειρά και το μιτωτικό δυναμικό αυτής, η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (είθισται, κάθε δύο ημέρες). Τα «δοχεία» ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως φλάσκες (φέρουσες ειδικά φίλτρα στο πώμα) ή τρυβλία petri, όταν αυτό απαιτείται, από ειδικό υλικό (πολυστυρένιο), το οποίο βοηθάει στην προσκόλληση των κυττάρων σε αυτά.

### **3.1.3 Φύλαξη, κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων**

Η φύλαξη των καρκινικών σειρών πραγματοποιείται με κατάψυξη των κυττάρων σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια και ακόλουθη μεταφορά τους σε δοχεία που

περιέχουν υγρό άζωτο (liquid nitrogen). Η διαδικασία κατάψυξης γίνεται σταδιακά και περιγράφεται ως ακολούθως: Πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, η οποία έχει αποκτήσει την απαιτούμενη πυκνότητα κυττάρων (~80%).

Εν συνεχεία, προστίθεται ποσότητα διαλύματος θρυψίνης και ακολουθεί επώαση για λίγα λεπτά (ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο) στον κλίβανο CO<sub>2</sub> με τους 37<sup>0</sup>C.

Τα κύτταρα αποκολλώνται από το υπόστρωμα και η απενεργοποίηση της θρυψίνης επιτυγχάνεται με την προσθήκη διπλάσιας, τουλάχιστον, ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM 1X, ενώ ακολούθως τα κύτταρα μεταφέρονται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon (15 ml). Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1000 στροφές/λεπτό (rpm), σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup>C για 5 λεπτά. Κατόπιν, αφαιρείται το υπερκείμενο υλικό και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε ειδικό θρεπτικό μέσο κατάψυξης (freezer medium) και μεταφέρονται σε ειδικό πλαστικό φιαλίδιο το οποίο τοποθετείται ακολούθως σε δοχείο που περιέχει ισοπροπανόλη 100% επιτρέποντας την ελάττωση της θερμοκρασίας κατά 1<sup>0</sup>C ανά λεπτό, και μεταφέρεται σε καταψύκτη -80<sup>0</sup>C.

Τέλος, ακολουθεί η τοποθέτηση των φιαλιδίων κρυο-φύλαξης (cryopreservation) στα ειδικά δοχεία αποθήκευσης υγρού αζώτου, όπου η θερμοκρασία αγγίζει τους -196<sup>0</sup>C, για μακροχρόνια φύλαξη.

Η χημική σύσταση του θρεπτικού μέσου κατάψυξης, σε τελικό όγκο 5 ml, είναι η ακόλουθη:

***Πίνακας 3: Σύσταση του θρεπτικού μέσου κατάψυξης***

Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM 1X	3,5 ml
Διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS)	1,0 ml
Διάλυμα DMSO	0,5 ml
Τελικός όγκος	5 ml

Το DMSO (Dimethyl sulfoxide) συνιστά έναν ισχυρό κρυο-προστατευτικό παράγοντα που βοηθάει την ψύξη των κυττάρων, αποφεύγοντας τη διάτρησή τους από την αλλαγή θερμοκρασίας, αλλά και από τους κρυστάλλους του εκάστοτε υδατικού διαλύτη που θα δημιουργηθούν στο υλικό φύλαξης στις τόσο χαμηλές θερμοκρασίες. Σε αντιδιαστολή, η διαδικασία της απόψυξης πραγματοποιείται πιο γρήγορα εφαρμόζοντας την ως ακολούθως περιγραφόμενη πορεία:

Η ειδική φιάλη μεταφέρεται από το υγρό άζωτο στο υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup>C και ακολουθεί ολιγόλεπτη επώαση.

Αφού ολοκληρωθεί η ταχεία απόψυξη και το περιεχόμενο του φιαλιδίου έχει επανέλθει σε υγρή κατάσταση, πραγματοποιείται μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα τύπου falcon (15 ml) και προστίθεται ποσότητα φρέσκου DMEM 1X.

Εν συνεχεία, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 1000 στροφές/λεπτό (rpm) για 5 λεπτά, ενώ το υπερκείμενο υλικό αφαιρείται και τα κύτταρα (ίζημα) επαναιωρούνται σε 5 ml φρέσκου, πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM 1X.

Διεξάγεται εκ νέου φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 1000 στροφές/λεπτό (rpm) για 5 λεπτά. Έπειτα, το υπερκείμενο υλικό αφαιρείται και τα κύτταρα (ίζημα) επαναιωρούνται σε 5 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού (DMEM 1X) και μεταφέρονται σε φλάσκα καλλιέργειας.

Ακολουθεί τοποθέτησή τους στον επωαστικό θάλαμο κυτταρικής καλλιέργειας και διατήρησή τους σε συνθήκες 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία > 95%.

### **3.1.4 Κλωνογονική δοκιμασία (Clonogenic assay)**

Η κλωνογονική δοκιμασία (Clonogenic assay) επιτρέπει τον έλεγχο της επιβίωσης των κυττάρων και της ικανότητάς τους να μπορούν να αναπτυχθούν σε μια αποικία και να διαιρούνται απεριόριστα, χωρίς να είναι νεκρά αναπαραγωγικά. Ύστερα από την καλλιέργεια των τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών σε τρυβλία για 10 ημέρες, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού και πλύση των κυττάρων με 1 ml HBSS. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων στο τρυβλίο με την προσθήκη μεθανόλης και οξικού οξέος σε αναλογία 3:1 και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Μετά

από πλύση των κυττάρων με 1 ml HBSS για την απομάκρυνση της περίσσειας του μονιμοποιητικού διαλύματος, προστέθηκε αιματοξυλλίνη και επακολούθησε επώαση των τρυβλίων για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Αφού αφαιρέθηκε το διάλυμα της αιματοξυλλίνης από τα τρυβλία και πλύθηκαν με νερό βρύσης, μετρήθηκαν οι αποικίες τους.

### **3.1.5 Χρωματομετρική ανάλυση μεταβολικής δραστηριότητας MTT**

Τα κύτταρα BxPC-3, PANC-1 και MIA PaCa-2 ποθετήθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων στα αντίστοιχα μέσα καλλιέργειας, σε πυκνότητα  $1 \times 10^4$  κύτταρα / φρεάτιο (εις τριπλούν) σε διάλυμα 100  $\mu$ L. Την επόμενη μέρα, επώαστηκαν με τις κατάλληλες ουσίες για κάθε πείραμα. Μετά από 72 ώρες, προστέθηκε MTT (5 mg / mL) στα φρεάτια και στη συνέχεια τα τρυβλία 96 φρεατίων επώαστηκαν για 4 ώρες. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100  $\mu$ L DMSO. Η απορρόφηση (OD) μετρήθηκε στα 570 nm σε έναν φασματόμετρο.

## **3.2 Ανοσοαποτύπωση κατά Western**

### **3.2.1 Λύση κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνικών λυμάτων**

Κατά τη διαδικασία της λύσης, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού από το τρυβλίο και πλύση των κυττάρων με 1 ml ψυχρού διαλύματος PBS που περιείχε αναστολείς πρωτεασών, προκειμένου να αποφευχθεί η υδρόλυση των πρωτεϊνών από τα ίδια τα ένζυμα των κυττάρων, τις πρωτεϊνάσες. Ακολούθησε προσθήκη 500  $\mu$ l του διαλύματος λύσης RIPA (4 °C) που περιείχε μείγμα αλάτων, απορρυπαντικό (ώστε να σπάσουν οι μεμβράνες των κυττάρων) και αναστολείς πρωταεασών, ώστε να μη διαλυθούν οι πρωτεΐνες. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τον πάτο του τρυβλίου με τη χρήση μιας ειδικής ξύστρας, συλλέχθηκαν σε σωλήνες erpendorf, όπου

ομογενοποιήθηκαν με πιπέτας και επωάστηκαν στον πάγο για 20 λεπτά. Ακολούθησε κατακρήμνιση των κυτταρικών μεμβρανών και οργανιδίων με φυγοκέντρηση (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) και συλλογή του υπερκειμένου σε νέους σωλήνες erppendorf, στο οποίο περιέχονταν οι ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων. Στη συνέχεια, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα από διάλυμα Sample buffer 1X (100 mM Tris-HCl pH=6.8, 4% w/v SDS, 20% v/v γλυκερόλη, 0.02% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 200 mM β-μερκαπτοαιθανόλη), έγινε βρασμός όλων των δειγμάτων για 3 min στους 95 °C, και αποθήκευσή τους στην κατάψυξη στους -20 °C.

### **3.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε gel SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)**

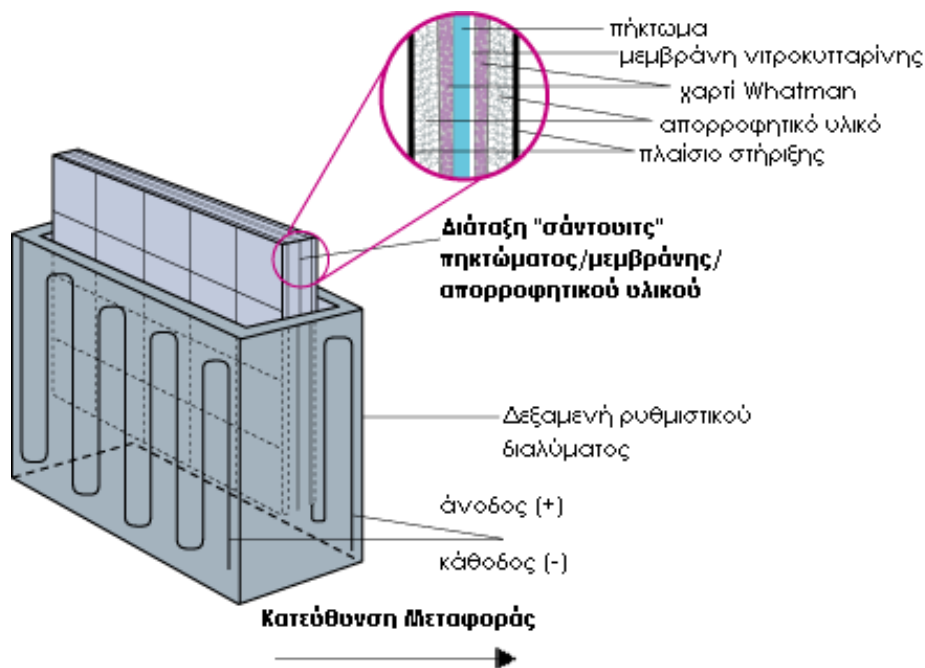
Η ηλεκτροφόρηση σε gel SDS-πολυακρυλαμίδης επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ενός διαλύματος βάσει του μεγέθους τους. Η παρουσία του απορρυπαντικού SDS προκαλεί την αποδιάταξη και αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών, οι οποίες κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο, με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του μεγέθους τους. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε δύο φάσεις, αφού δημιουργούνται δύο τμήματα του gel με αντίστοιχα διαφορετική σύσταση. Το άνω μέρος του gel αποτελεί το stacking gel στο οποίο επιστοιβάζονται οι πρωτεΐνες ώστε να εισέρθουν ταυτόχρονα στο κάτω μέρος του gel, που αποτελεί το separation gel, ώστε να διαχωριστούν ταυτόχρονα όλα τα δείγματα. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στις διαφορές στο pH και στη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης μεταξύ των δύο gels. Έπειτα από τη συναρμολόγηση του ειδικού εκμαγείου, έγινε παρασκευή των μειγμάτων του separation και του stacking gel, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Πρώτα παρασκευάζεται το separation gel, το οποίο καλύπτεται από ισοπροπανόλη ώστε η ανώτερη επιφάνεια του gel να είναι λεία και να μην χάσει αυτό την υγρασία του. Αφού πήξει το separation gel εξαιτίας του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης παρουσία των παραγόντων APS και TEMED, η ισοπροπανόλη απομακρύνθηκε και ακολούθησε προσθήκη του stacking gel και τοποθέτηση της ειδικής χτένας ώστε να σχηματιστούν οι οπές φόρτωσης.

**Πίνακας 4: Σύσταση των απαραίτητων gel για την ανοσοαποτύπωση κατά Western**

	<b>Seperation gel (12%)</b>	<b>Stacking gel (5%)</b>
<b>30% Acrylamide/Bis</b>	3 ml	0.63 ml
<b>1.5 M Tris/HCl pH 8.8 / 0.5 M Tris/HCl pH 6.8</b>	2.5 ml	2.5 ml
<b>dd H<sub>2</sub>O</b>	4.3 ml	1.77 ml
<b>10% SDS</b>	100 μl	50 μl
<b>TEMED</b>	10 μl	5 μl
<b>APS (0.1 g/ml)</b>	100 μl	50 μl

### **3.2.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών**

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται μεταφορά των πρωτεϊνών που είχαν διαχωριστεί στο gel, σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης που οδηγεί στην μετακίνηση των πρωτεϊνών από το gel (αρνητικός πόλος) στη μεμβράνη (θετικός πόλος). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπως και τα υπόλοιπα συστατικά της κασέτας μεταφοράς επάζονται σε Blotting buffer 1x (Tris 25 mM, γλυκίνη 200 mM). Η μεταφορά πραγματοποιείται σε 1 ώρα και 30 λεπτά, στον πάγο, στα 300 mA (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανατύπωση: <https://blottingtechnique.weebly.com/western-blot.html>

### 3.2.4 Ανίχνευση ανοσοαποτύπωσης

Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, ακολούθησε επώαση της μεμβράνης για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε Blocking buffer που ορίζεται από τον κατασκευαστή κάθε αντισώματος (γάλα σε PBS Tween 0.1%), προκειμένου να καλυφθούν οι ελεύθερες θέσεις των μεμβρανών από την πρωτεΐνη του Blocking buffer, BSA (Bovine Serum Albumin). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε στους 4°C overnight με το πρώτο ειδικό αντίσωμα. Την επόμενη ημέρα, ακολούθησαν δυο εκπλύσεις της ανά 10 λεπτά με διάλυμα TBS Tween 0.1% (1 ltr TBS 0,1% και 1 ml Tween) και επώασή της με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit σε αραιώση 1:500, που αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή του πρώτου αντισώματος, για μία ώρα (RT).

Η ανίχνευση των θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων βασίζεται στην παρουσία του ενζύμου υπεροξειδάση στη σταθερή περιοχή του δευτερογενούς αντισώματος. Όταν γίνει η προσθήκη των αντιδραστηρίων Peroxide Solution και Luminol Enhancer Solution σε αναλογία 1:1 (σύστημα ECL, Lumiglo Cell Signaling), η υπεροξειδάση προκαλεί μία φωτοαντίδραση. Αφού η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωαστεί με το ECL, ακολούθησε η εμφάνισή της σε x-ray film.

### **3.3. Ιστολογικές και ανοσολογικές τεχνικές**

#### **3.3.1 Έγκλειση ιστών και λήψη τομών**

Οι όγκοι (ξενομοσχεύματα) που ελήφθησαν από τους μύες, τοποθετήθηκαν σε PBS και έπειτα μονιμοποιήθηκαν με PFA 4% για 16 ώρες στους 4°C. Η περαιτέρω επεξεργασία τους σχετίζεται με το αν προορίζονται για λήψη κρουτομών ή τομών παραφίνης.

##### **A. Λήψη τομών με κρουτόμο**

Για να προστατευθούν ευαίσθητοι επίτοποι που καταστρέφονται (cross-linking) με την παραφινολοποίηση, προτιμάται η λήψη κρουτομών. Μετά τη μονιμοποίηση, τα δείγματα εκπλένονται με PBS και εν συνεχεία διατηρούνται για 1-2 μέρες σε σουκρόζη 30% η οποία λειτουργεί κρουπροστατευτικά. Έπειτα, τοποθετούνται σε ειδικές θήκες-μήτρες και εμποτίζονται με το ειδικό υλικό OCT για φύλαξη σε χαμηλές θερμοκρασίες (Optimal Cutting Temperature) και φυλάσσονται στους -80°C. Η μήτρα ιστού-OCT κόβεται στον κρουστάτη σε τομές 10-20 μm, οι οποίες τοποθετούνται σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες (cryofrost plus). Αφήνονται για 45' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυλάσσονται στους -80°C. Πριν την εφαρμογή του ανοσοφθορισμού αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 ώρες. Οι τομές μονιμοποιήθηκαν αφού εμβαπτίσθηκαν σε κρύα ακετόνη (-20°C) για 5', στέγνωσαν σε θερμοκρασία δωματίου 5-10' και ύστερα έγιναν πλύσεις σε PBS.

##### **B. Λήψη τομών με μικροτόμο**

Έπειτα της μονιμοποίησης, ακολουθείται έκπλυση με PBS και εν συνεχεία τοποθέτηση των ιστών σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 1-2 μέρες. Ακολουθεί σταδιακή αφυδάτωση του ιστού με μια σειρά από διαδοχικές επώσεις σε



αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH), ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση της παραφίνης.

Η πορεία των επώασεων είναι η εξής:

EtOH 70% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά

EtOH 85% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά

EtOH 95% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά

EtOH 100% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά

Τα διαλύματα αιθανόλης παρασκευάζονται φρέσκα, ώστε να μην τροποποιείται η συγκέντρωση της αιθανόλης λόγω εξάτμισης.

Παράλληλα η λιωμένη παραφίνη φιλτράρεται μέσα από χαρτί χρωματογραφίας Whatman 3M, ώστε να συγκρατηθούν τυχόν αδιάλυτα τμήματα και σκουπίδια. Συγχρόνως προθερμαίνεται κατάλληλη ποσότητα ξυλενίου για το επόμενο στάδιο.

Ο αφυδατωμένος ιστός επωάζεται στη συνέχεια 2 φορές με 100% ξυλένιο, σε απαγωγό, για 20 λεπτά (RT).

Ακολουθεί επώαση με διάλυμα ξυλενίου / παραφίνης (1:1), στους 65°C για 45 λεπτά.

Τελικά ο ιστός εμβαπτίζεται σε 100% παραφίνη (x 3) στους 65°C και επωάζεται για 20 λεπτά ανά εμβάπτιση. Η τελευταία επώαση με την παραφίνη πραγματοποιείται στο δοχείο όπου θα παραμείνει για να σχηματιστεί το καλούπι ιστού-παραφίνης. Όσο η παραφίνη είναι ακόμα υγρή, διευθετείται ο ιστός στο κέντρο του δοχείου και αφήνεται μετά το τέλος της τελευταίας 20λεπτης επώασης να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (O/N).

Τα καλούπια φυλλάσσονται στους 4°C όπου διατηρούνται για αρκετό διάστημα

Για τη λήψη τομών ακολουθούνται τα εξής στάδια :

Τοποθετούμε το καλούπι με τον ιστό στην ειδική υποδοχή του μικροτόμου παραφίνης.

Ρυθμίζουμε το πάχος των τομών που θέλουμε να πάρουμε (5μm-15μm)

Οι τομές αυτές τοποθετούνται αρχικά σε κρύο νερό. Εν συνεχεία τις μεταφέρουμε με τη βοήθεια ενός πινέλου σε ένα υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50°C, προκειμένου να ξετυλιχτούν και να τοποθετηθούν στις αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης. τομές αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου (25° C) για 24 ώρες.

Για να πραγματοποιηθεί ο ανοσοφθορισμός, πρέπει πρώτα να γίνει η αποπαραφινοποίηση. Για την αποπαραφινοποίηση των ιστών οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές τοποθετούνται σε ένα γυάλινο δοχείο με ξυλένιο όπου και παραμένουν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα οι ιστοί ενυδατώνονται σταδιακά με εμβάπτιση σε μια σειρά από διαδοχικές ελατούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH), ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση του υδατικού διαλύματος μέσα στους ιστούς.

Η πορεία των επώσεων είναι η εξής:

EtOH 100 % RT, 10 λεπτά

EtOH 95 % RT, 10 λεπτά

EtOH 70 % RT, 10 λεπτά

EtOH 50 % (x 2 φορές), RT, 10 λεπτά

PBS 1X , RT, 10 λεπτά

### **3.3.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ**

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ικανότητα των ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η σήμανση του αντισώματος με την κατάλληλη ουσία-ετικέτα καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ορατό. Ανάλογα με τη φύση της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής και το είδος της ουσίας-ετικέτας που χρησιμοποιείται, η αντίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος ελέγχεται με κοινό, φθορίζον, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ή συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (confocal). Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε το 1941 από τον Albert Coons και τους συνεργάτες του.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

10 λεπτά PFA 4% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (50 μl σε κάθε τομή)

3 X 5 λεπτά ξεπλύματα με PBST

60 λεπτά επώση με BSA 4% σε διαλύτη PBST (για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Νυχτερινή επώαση στους 4<sup>0</sup> C του πρωτογενούς αντισώματος (σε κατάλληλη αραιώση με BSA 4%) και επικάλυψη των τομών με parafilm (δεν επιτρέπει την εξάτμιση του διαλύματος αντίσωμα-BSA 4%)

Αφαίρεση του πρωτογενούς αντισώματος και 3 X 5 ξεπλύματα με PBST

Επώαση για 2 ώρες του δευτερογενούς αντισώματος (αναγνωρίζει τη βαριά αλυσίδα του πρώτου αντισώματος με εξειδίκευση στον οργανισμό που έχει παρασκευαστεί το πρωτογενές αντίσωμα και είναι συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και με προστασία από το φως.

3 X 5 λεπτά ξεπλύματα με PBST.

Κάλυψη των τομών με υγρό μέσο προστασίας φθορισμού.

Τοποθέτηση καλυπτρίδας και στεγανοποίηση με βερνίκι.

### **3.3.3 Κυτταρομετρία ροής**

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κυττάρων και σωματιδίων, της ποσοτικής έκφρασης κυτταρικών συστατικών, των κυτταρικών λειτουργιών και των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων με βάση τη σκέδαση και το φθορισμό. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι το δείγμα να βρίσκεται σε μορφή εναιωρήματος. Μία δέσμη φωτός λέιζερ ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση

"FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.

Σχετικά με το πρωτόκολλο, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, μονιμοποιήθηκαν σε παραφορμαλδεΐδη 1% (20 λεπτά, 20°C), επώαστηκαν με διάλυμα 5% FBS (20 λεπτά, 20°C) και ακολούθως με διάλυμα διαπερατότητας 1% Triton-X100 (20 λεπτά, 20°C). Έγινε επώαση για μία ώρα με τα πρωτογενή αντισώματα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση με τα δευτερογενή, συζευγμένα με τα φθοριοχρώματα, αντισώματα. Η απόκτηση και ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο τύπου FACSCalibur μέσω του λογισμικού CellQuest Pro (BD Biosciences).

### **3.3.4 Ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)**

Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (ή Δοκιμασία Ενζυμοσυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης) πρωτοπεριγράφηκε από τους Engvall και Perlman το 1971 και αποτελεί μία ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο τόσο για ερευνητικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς. Η ELISA είναι μέθοδος υψηλής ευαισθησίας, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά με τη χρήση ενζυμοσυζευγμένων 10<sup>7</sup> αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Τα βασικά πλεονεκτήματά της έναντι των άλλων ανοσοδοκιμασιών είναι: (α) κυρίως, η υψηλότερη ευαισθησία της και η επαναληψιμότητά της και (β) η μη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας, όπως στις μεθόδους RIA (Radioimmunoassay). Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Η ELISA αποτελεί μία

ιδιαίτερα προσαρμόσιμη τεχνική δεδομένου ότι ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει πολλαπλές παραλλαγές, όπως η έμμεση ELISA, η ELISA τύπου Sandwich, η ανταγωνιστική ELISA, η άμεση και η έμμεση κυτταρική ELISA. Σε όλες τις παραλλαγές της μεθόδου, τα βασικά στοιχεία που τη χαρακτηρίζουν είναι: (1) η πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, ImmunoSorbent), (2) η χρήση ενζυμο-συζευγμένου (Enzyme-Linked) αντισώματος και (3) η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο προϊόν (χρώμα ή φθορισμό) επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.

### **3.4 *In vivo* πειράματα**

#### **3.4.1 *NOD/SCID* μύες**

Το γενετικό υπόβαθρο των *NOD/SCID* μυών προσδίδει εγγενή ελαττώματα στην έμφυτη ανοσία, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης δραστηριότητας των NK κυττάρων, μειωμένα επίπεδα ενεργοποίησης μακροφάγων, μη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων και απουσία συμπληρώματος. Ο συνδυασμός αυτών των έμφυτων ανοσολογικών ελαττωμάτων με την κατάλυση της προσαρμοστικής ανοσίας χρησιμοποιώντας συνδυασμό μεταλλάξεων, οδήγησε σε έναν ξενιστή ποντικού πιο δεκτό για ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα και πρωτογενείς όγκους. Σε σύγκριση απευθείας με τα ποντίκια *C.B17-scld*, τα ποντίκια *NOD/SCID* εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα υποστήριξης της εμφύτευσης συμπαγών ανθρώπινων καρκίνων και μεταμοσχεύσιμα λεμφώματα και λευχαιμίες που είτε απέτυχαν να αναπτυχθούν είτε αναπτύχθηκαν σε μικρό ποσοστό σε ποντίκια *C.B17-scld*.

Η φροντίδα των ζώων και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των εργαστηριακών εγκαταστάσεων ζώων (Εθνικό και Καποδιστριακό

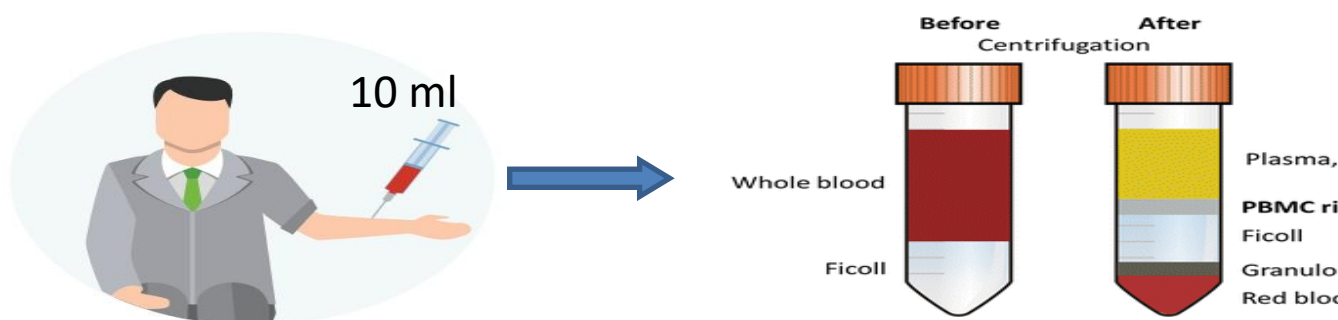
Πανεπιστήμιο Αθηνών), Επιτροπή Ιατρικής Σχολής Βιοηθικής σε συμφωνία με την Ευρωπαϊκή Ένωση (αρ. Έγκρισης 7924/12/12/2014).

### 3.4.2 *In vivo* πειράματα με ξενομοσχεύματα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών παγκρέατος

Σε NOD/SCID μύες 6-8 εβδομάδων, εγχύθηκε υποδορίως δεξιά στο ύψος των πλευρών  $2,5 \times 10^6$  BxPC-3, PANC-1 και MIA PaCa-2 καρκινικά κύτταρα παγκρέατος αντίστοιχα, σε 100 μl PBS. Το μέγεθος του όγκου προσδιορίστηκε με τη σχέση =  $[(\text{μήκος} \times \text{πλάτος}^2) / 2]$ . Όταν το μέγεθος του όγκου ανά ποντίκι ήταν μεταξύ 80 και 100 mm<sup>3</sup>, χωρίστηκαν στις κατάλληλες για κάθε πείραμα ομάδες που θα τους χορηγηθεί και η αντίστοιχη θεραπεία.

### 3.4.3 *Humanized NOD/SCID* μύες

Για τις ανάγκες της ανοσοθεραπείας απαιτείται να υπάρχει ανοσοποιητικό σύστημα. Για το λόγο αυτό στα μοντέλα μυών που θα αναπτυχθούν οι όγκοι (xenograft) θα γίνει έκχυση PMBC κυττάρων ( $10^7$ ) που θα απομονωθούν από αίμα υγιών ατόμων, ώστε να δημιουργηθεί ανοσολογική απάντηση και μικροπεριβάλλον γύρω από τον όγκο (Εικόνα 15). Έπειτα, θα ακολουθηθεί το θεραπευτικό πρωτόκολλο που περιλαμβάνει την ανοσοθεραπεία.



Εικόνα 15: Για τις ανάγκες της ανοσοθεραπείας απαιτείται να υπάρχει ανοσοποιητικό σύστημα. Για το λόγο αυτό στα μοντέλα μυών που θα αναπτυχθούν οι όγκοι (xenograft) θα γίνει έκχυση PMBC κυττάρων που θα απομονωθούν από αίμα υγιών ατόμων, ώστε να δημιουργηθεί

ανοσολογική απάντηση και μικροπεριβάλλον γύρω από τον όγκο. Η απομόνωση γίνεται με τη βοήθεια του Ficoll και φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, με i.p. ένεση χορηγούνται τα κύτταρα στο ποντίκι. Έπειτα, θα ακολουθηθεί το θεραπευτικό πρωτόκολλο που περιλαμβάνει την ανοσοθεραπεία.

### **3.5 Μοριακές τεχνικές**

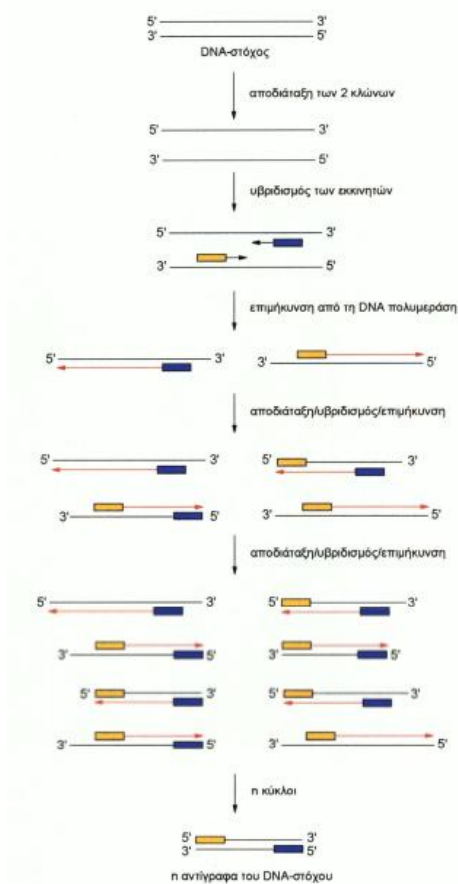
#### **3.5.1 Απομόνωση DNA από ουρές ποντικών**

- Κόβεται περίπου 1 cm από ουρά ποντικού ηλικίας 10 ημερών σε erpendorf σωλήνα χωρητικότητας 1.5 ml που φέρει κλείσιμο ασφαλείας (safe-lock).
- Προστίθενται 0.4 ml διαλύματος (Tris 1M pH: 8.0, EDTA 0,5M, SDS 10%) και 3 μl διαλύματος πρωτεϊνάσης K (10 mg/ml) και αφήνονται για επώαση στους 55 ° C για 12-16 ώρες.
- Γίνεται σύντομη ανάδευση σε vortex.
- Προστίθενται 400 μl διαλύματος φαινόλης και αναδεύονται ισχυρά σε vortex για 10 λεπτά.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε 12000 rpm για 10 λεπτά.
- Χρησιμοποιώντας κομμένο ακρορύγχιο (tip) απομονώνονται 340 μl από την υδατική φάση αποφεύγοντας την μεσόφαση η οποία περιέχει πρωτεϊνικά κατάλοιπα.
- Η υδατική φάση προστίθεται σε 0,290 ml ισοπροπανόλης και αναποδογυρίζοντας το σωλήνα, το DNA καταβυθίζεται σε μορφή «σύννεφου».
- Το DNA τυλίγεται στην άκρη μιας πιπέτας Pasteur και ξεπλένεται από το αλάτι καθώς βυθίζεται σε 70% αιθανόλη και στη συνέχεια σε 100% αιθανόλη. Τέλος, αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για περίπου 20 λεπτά.
- Η άκρη της πιπέτας Pasteur τοποθετείται σε 300 μl ddH<sub>2</sub>O για να διαλυθεί το DNA για περίπου 30 λεπτά και στο τέλος απομακρύνεται προσεκτικά.
- Το DNA φυλάσσεται στους -20°C.

#### **3.5.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) αναπτύχθηκε από τον Kary B. Mullis στη δεκαετία του 1980 και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως από τους ερευνητές μετά την αυτοματοποίησή της. Η τεχνική βασίζεται στην θερμοανθεκτικότητα της Taq DNA πολυμεράσης, ένζυμο που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Με την PCR, επιτυγχάνεται ο εκθετικός πολλαπλασιασμός (από  $10^6$ - $10^9$  φορές) ενός συγκεκριμένου τμήματος γονιδίου υπό την προϋπόθεση ότι είναι γνωστή η αλληλουχία του. Το γνωστό κομμάτι της αλληλουχίας χρησιμοποιείται για τον σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ένα για κάθε κλώνο της διπλής έλικας, που ονομάζονται εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι μικρές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων συμπληρωματικές με τα δύο απέναντι άκρα (5' και 3' άκρα) της περιοχής DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Με βάση τα δύο αυτά μόρια η Taq DNA πολυμεράση ξεκινά την *in vitro* αντιγραφή και σύνθεση του DNA (Mullis et al, 1987). Το μικρότερο τμήμα DNA που μπορεί να συντεθεί μέσω PCR είναι μεγέθους 40-50 bp ενώ το μεγαλύτερο μπορεί να έχει μέγεθος μέχρι και 10.000 bp. Η PCR αποτελείται από 20-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών βασικών σταδίων: αποδιάταξη του DNA (denaturation), υβριδισμός των εκκινητών (annealing), και επιμήκυνση των δύο αλυσίδων (extension) (Εικόνα 16). Στο πρώτο στάδιο γίνεται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε υψηλή θερμοκρασία (συνήθως στους 95°C). Ακόλουθη μείωση της θερμοκρασίας (συνήθως στους 55-65°C) επιτρέπει στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στη συμπληρωματική περιοχή του κάθε κλώνου του DNA. Η περιοχή σύνδεσης των εκκινητών αποτελεί το σημείο εκκίνησης για την Taq DNA πολυμεράση, η οποία αντιγράφει κάθε κλώνο προστίθοντας τα συμπληρωματικά δεοξυριβονουκλεοτίδια με κατεύθυνση από το 5' στο 3' άκρο. Η αντιγραφή αυτή γίνεται στους 72-75°C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δραστηριότητας του ενζύμου. (Alberts et al., 1994)





**Εικόνα 16:** Σχηματική απεικόνιση της PCR. Με κόκκινο βέλος συμβολίζεται ο νέος κλώνος που συντίθεται σε κάθε νέο κύκλο.

Τα συστατικά και οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι οι ακόλουθοι:

**Στόχος-μήτρα DNA (template):** Η ποσότητα που χρησιμοποιείται για μία αντίδραση κυμαίνεται από 10-500 ng, αναλόγως με το αν ο στόχος DNA βρίσκεται σε πολλά ή λίγα αντίγραφα μέσα στο γονιδίωμα. Όταν η ποσότητα του DNA είναι μεγάλη (>1000 ng), υπάρχει πιθανότητα να ενισχυθούν προϊόντα-αλληλουχίες που δεν αντιστοιχούν στον επιθυμητό στόχο (non specific amplification). Επιπλέον, θα πρέπει, το DNA να μην είναι αποδομημένο (degraded) στην περιοχή του στόχου, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή και ταυτόχρονα να είναι υψηλής καθαρότητας απουσία φαινολών, πολυσακχαριτών, EDTA ή άλλων χημικών που μπορούν να έχουν ανασταλτική επίδραση στην αντίδραση.

**Εκκινητές (primers):** Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές αντιπαράλληλης κατεύθυνσης, συμπληρωματικοί για κάθε μία αλυσίδα σε

ποσότητα 10-50 pmoI ανάλογα με τον όγκο και τις συνθήκες της αντίδρασης. Όταν η συγκέντρωση είναι πολύ υψηλή αυξάνεται η πιθανότητα να δημιουργηθούν μη ομόλογοι υβριδισμοί μεταξύ εκκινητή και DNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία DNA τμημάτων που δεν αντιστοιχούν στα αναμενόμενα προϊόντα. Το μήκος τους κυμαίνεται από 18-35 βάσεις και κατά το σχεδιασμό τους πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη κυρίως το ποσοστό σε G+C που περιέχουν και η συμπληρωματικότητα μεταξύ τους κυρίως στο 3' άκρο. Το σημείο τήξης του κάθε εκκινητή δίνεται από την εταιρεία που παρασκευάστηκε ή μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:  $T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T)$ , όπου (G+C) και (A+T) ο αριθμός των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων που εμπεριέχονται στον εκκινητή.

**Συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου ( $Mg^{+2}$ ):** Από τη συγκέντρωση των ιόντων Mg εξαρτάται η εξειδίκευση της αντίδρασης. Συνήθως χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις από 1-5 mM διαλύματος  $MgSO_4$  ή  $MgCl_2$ , αλλά η άριστη συγκέντρωση για κάθε αντίδραση καθορίζεται ύστερα από δοκιμαστικές αντιδράσεις. Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στην αλληλουχία-στόχο του DNA. Αντιθέτως, η πολύ χαμηλή συγκέντρωση μειώνει την απόδοση της αντίδρασης, διότι τα  $Mg^{+2}$  λειτουργούν ως συνένζυμο στη δράση της πολυμεράσης.

**Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs):** Τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια dATP, dCTP, dGTP, dTTP είναι απαραίτητα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Είναι σημαντικό τα δεοξυνουκλεοτίδια να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους ώστε να μη γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η συγκέντρωσή τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20-200  $\mu M$ .

**Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (10X buffer):** Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται συνήθως σε τελική συγκέντρωση 1X και έχει σκοπό τη δημιουργία ιοντικού περιβάλλοντος το οποίο να διευκολύνει τόσο τη σταθεροποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο όσο και τη δράση της πολυμεράσης.

**Πολυμεράση (polymerase):** Το ένζυμο πολυμερισμού που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο είναι η θερμοανθεκτική Taq DNA polymerase. Το προαναφερόμενο ένζυμο δρα στους 68-72°C και δεν καταστρέφεται στη θερμοκρασία αποδιάταξης. Η συγκέντρωσή του στην αντίδραση εξαρτάται τόσο από τον όγκο της αντίδρασης όσο

και την ίδια την εφαρμογή. Θα πρέπει όμως να τονισθεί ότι η πολύ υψηλή συγκέντρωση ενζύμου δρα ανασταλτικά για την αντίδραση.

### **3.5.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση πεδίου (volts/cm πηκτώματος) ρυθμίζονται με βάση τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται κύρια από τους παρακάτω παράγοντες :

- Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά και δίκλινα DNA κινούνται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους.

**Πίνακας 5: Συγκέντρωση της αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίζουμε μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.**

<i>% Αγαρόζης στο πήκτωμα</i>	<i>Καλός διαχωρισμός γραμμικών DNA (Kb)</i>
0,3	60 - 5
0,6	20 - 1
0,7	10 - 0,9
0,8	7 - 0,5
0,9	6 - 0,4
1,2	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοικτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους δεν έχουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κύρια από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα αλλά επίσης επηρεάζονται από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και από το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I

- Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση (μικρή ένταση) η κινητικότητα των γραμμικών DNA είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης. Παραπέρα αύξηση της

τάσης σηματοδοτεί αύξηση της κινητικότητας των μεγάλων κομματιών DNA με διαφορετικό συντελεστή για το καθένα. Γι' αυτό το λόγο μειώνονται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης καθώς αυξάνεται η εφαρμοζόμενη τάση.

Τέλος, σε αντίθεση με αυτό που συμβαίνει στα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του DNA δεν επηρεάζεται αισθητά ούτε από το ποσοστό των διαφορετικών βάσεων σε κάθε DNA ούτε από τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η ηλεκτροφόρηση (μεταξύ 4° και 30°C). (Sambrook et al., 1989).

Η διαδικασία παρασκευής έχει ως εξής:

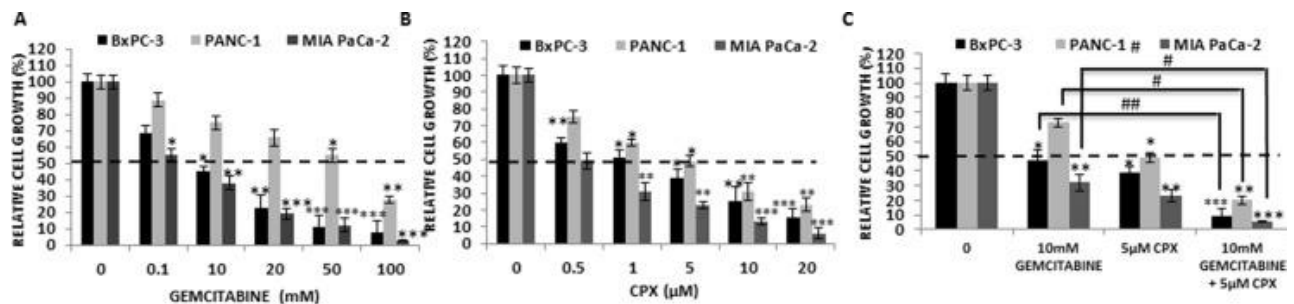
1. Προσθήκη 1,0 g (1%) αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος 1X TAE (0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA, pH 8) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιείται με βρασμό για περίπου 2 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων ισχύος 800 Watt. Στη συνέχεια αφήνεται μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται με προσοχή στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, ώστε να σχηματισθεί το πήκτωμα.
3. Εφαρμόζεται η κατάλληλη χτένα για το σχηματισμό των οπών φόρτωσης.
4. Το πήκτωμα σταθεροποιείται και μετά τη βύθισή του σε διάλυμα 1X TAE και αφαιρείται η χτένα.
5. Σε κάθε οπή τοποθετείται ποσότητα δείγματος που έχει αναμειχθεί με διάλυμα χρωστικής για την καταβύθισή του. Στην πρώτη οπή φόρτωσης τοποθετείται κατάλληλος δείκτης μοριακού βάρους.
6. Τα ηλεκτρόδια συνδέονται στους υποδοχείς της συσκευής και ρυθμίζεται η τάση στα 80 V.
7. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας ώστε να μπορούν να διακριθούν και να φωτογραφηθούν οι ζώνες των τμημάτων που διαχωρίστηκαν.

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **4.1 Μικρότερη επιβίωση καρκινικών παγκρεατικών σειρών έπειτα από χρήση CPX (μέτρηση με MTT)**

Αρχικός σκοπός ήταν να δειχθεί αν η CPX έχει ογκοκατασταλτική δράση, δρώντας μόνο του ή συνδυαστικά με χρήση γνωστού χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (γεμισιταβίνη). Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις βιωσιμότητας των 3 κυτταρικών σειρών BxPC-3, PANC- 1 και MIA-PaCa-2 έπειτα από τη χορήγηση CPX (0 – 20  $\mu$ M) και Γεμισιταμίνης (0 – 100 mM). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο MTT και η επώαση διήρκησε 72 ώρες. Τα κύτταρα MIA-PaCa-2 επέδειξαν την μεγαλύτερη ευαισθησία στην γεμισιταβίνη με IC50 (μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση) σε συγκέντρωση ίση με 0,1 mM. Τα κύτταρα BxPC-3 εμφάνισαν ήπια ευαισθησία με IC50 ίσο με 10 mM. Τα κύτταρα PANC-1 ήταν τα πιο ανθεκτικά και διατηρούν το υψηλότερο IC50 σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 50mM. Για την CPX τα κύτταρα MIA-PaCa-2 επέδειξαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη CPX με IC50 σε συγκέντρωση 0,5 $\mu$ M. Τα κύτταρα BxPC-3 παρουσίασαν επίσης μέτρια ευαισθησία με IC50 σε συγκέντρωση ίση με 1  $\mu$ M. Τα κύτταρα PANC-1 απέκτησαν ευαισθησία με IC50 σε συγκέντρωση ίση με 5  $\mu$ M.

Η θεραπεία με γεμισιταβίνη (10 mM) μόνο ή CPX (5  $\mu$ M) μόνο για 72 ώρες μείωσε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων BxPC3, PANC-1 και MIA PaCa-2 κυττάρων με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση, που διαφέρει μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Η CPX και η γεμισιταβίνη ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ανθρώπινων παγκρεατικών κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο αλλά με διαφορετικές αποκρίσεις. Για τη διερεύνηση της βελτίωσης της αντικαρκινικής επίδρασης της γεμισιταβίνης με τη στρατηγική συνδυασμού CPX, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε γεμισιταβίνη που συν-καλλιεργήθηκαν με CPX. Τα κύτταρα BxPc3, PANC-1 και MIA PaCa-2 ήταν πολύ ευαίσθητα στην απόκριση στη συνδυασμένη στρατηγική. Αυτό το πείραμα προτείνει υψηλότερη *in vitro* κυτταροτοξική δράση της CPX και της γεμισιταβίνης σε σύγκριση με την CPX μόνο ή τη γεμισιταβίνη μόνο. Αυτή η δοκιμασία με το MTT επισήμανε ότι η CPX αύξησε την ευαισθησία της γεμισιταβίνης αυτών των τριών παγκρεατικών κυτταρικών σειρών (Εικόνα 17).

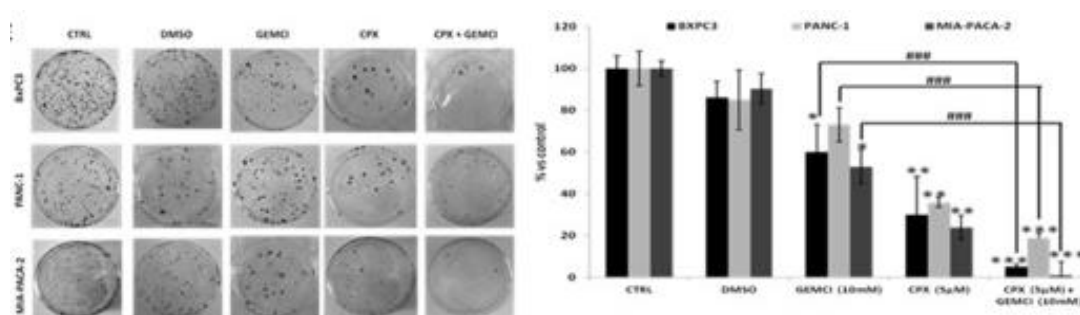


Εικόνα 17: Κύτταρα BxPC-3, PANC-1 και MIA-PaCa-2 επώαστηκαν με (A) CPX (0 – 20  $\mu$ M) και (B) γεμισαβίνη (0 - 100 mM). Στη συνέχεια, η κυτταρική βιωσιμότητα αναλύθηκε χρησιμοποιώντας χρωματομετρική ανάλυση μεταβολικής δραστηριότητας MTT. (C) Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε γεμισαβίνη συν-επώαστηκαν με CPX, σε συγκέντρωση 10 mM και 5  $\mu$ M αντίστοιχα, και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας χρωματομετρική ανάλυση μεταβολικής δραστηριότητας MTT.

#### 4.2 Μείωση της δημιουργίας αποικιών των παγκρεατικών καρκινικών σειρών με τη χρήση CPX

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από κλωνογονικούς προσδιορισμούς επιβίωσης για να εκτιμήσουμε την ευαισθησία των κυττάρων BxPc3, PANC-1 και MIA PaCa-2 στη CPX (5  $\mu$ M) μόνο ή σε συνδυασμό με γεμισαβίνη (10 mM). Μετά από 7 ημέρες, οι αποικίες μετρήθηκαν από κάθε ομάδα και μετά κανονικοποιήθηκαν στην ομάδα ελέγχου. Η γεμισαβίνη μείωσε την κλωνογονικότητα περισσότερο σε MIA PaCa-2 (47%,  $p < 0,05$ ), σε σύγκριση με εκείνη στα κύτταρα PANC-1 (26,92%) και BxPc3 (29,8%,  $p < 0,05$ ), έναντι ομάδων που δεν έλαβαν θεραπεία. Η CPX κατέστειλε την κλωνογονικότητα πολύ περισσότερο από την αγωγή με γεμισαβίνη σε MIA PaCa-2 (76,2%,  $p < 0,01$ ), PANC-1 (64,1%,  $p < 0,01$ ) και σε κύτταρα BxPc3 (70,85%,  $p < 0,01$ ). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η CPX μείωσε αποτελεσματικότερα τον αριθμό των αποικιών έναντι της γεμισαβίνης. Ο συνδυασμός της γεμισαβίνης με τη CPX είχε μια πιο ισχυρή απόκριση που προκαλείται από τη γεμισαβίνη στην σειρά MIA PaCa-2 (98,1%,  $p < 0,001$ ), από ότι στη PANC-1 (54,28%,  $p < 0,001$ ) και στη σειρά BxPc3 (55,3%,  $p < 0,001$ ), όσον αφορά την απώλεια κλωνογένεσης. Η συνδυασμένη έκθεση τόσο στη γεμισαβίνη όσο και στη CPX μείωσε δραματικά την επιβίωση των παγκρεατικών κυττάρων,

υποδηλώνοντας ότι υπάρχει συνεργιστική δραστηριότητα μεταξύ γεμισταβίνης και CPX (Εικόνα 18).

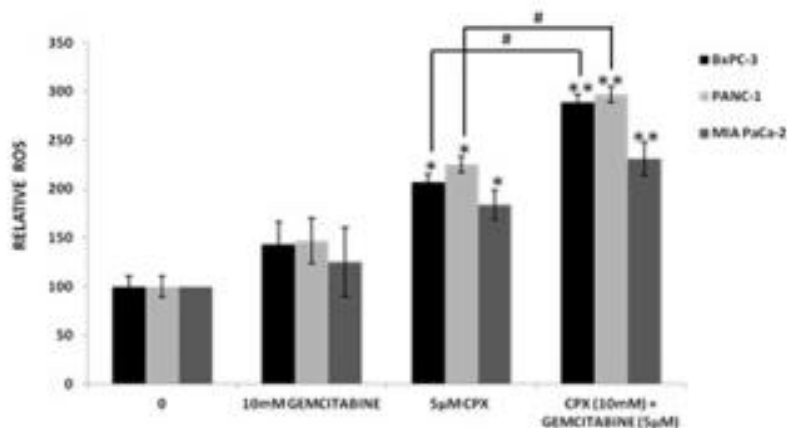


Εικόνα 18: Κλωνογονική επιβίωση των BxPC-3, PANC-1 και MIA-PaCa-2 μετά από έκθεση σε γεμισταβίνη (10 nM) και CPX (5 μM) μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά έναντι των control. Μέσες τιμές τριών πειραμάτων ± S.D (n = 3). \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001; διαφορά έναντι ομάδας ελέγχου, #P <0,05; ## P <0,01; ### P <0,001; διαφορά έναντι της ομάδας γεμισταβίνης.

#### 4.3 Η CPX παράγει υπερβολικά επίπεδα ROS σε σύγκριση με τη γεμισταβίνη

Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS-Reactive Oxygen Species) προκαλούν βλάβες στο DNA. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα υψηλά επίπεδα ROS μπορούν να προκαλέσουν θάνατο καρκινικών κυττάρων μέσω απόπτωσης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 19 η γεμισταβίνη διέγειρε την παραγωγή ROS σε ανθρώπινες παγκρεατικές κυτταρικές σειρές BxPC-3, PANC-1 και MIA-PaCa-2. Η θεραπεία με CPX σημαντικά (P <0,05) τόνωσε περαιτέρω την παραγωγή ROS. Η συγκαλλιέργεια γεμισταβίνης και CPX έχει ακόμη πιο σημαντικά στατιστικά αποτελέσματα (P <0,01).

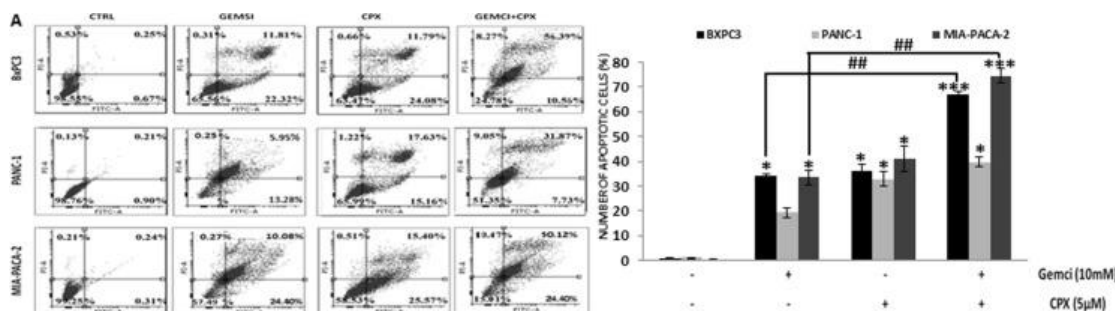




Εικόνα 19: Τα κύτταρα BxPC-3, PANC-1 και MIA-PaCa-2 επωάστηκαν με 5  $\mu$ M CPX και / ή 10 mM γεμισιταβίνη για 4 ώρες για να εκτιμηθεί η παραγωγή ROS. Τα αποτελέσματα αφορούν μετρήσεις OHdG. Η ανίχνευση απορρόφησης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας \* P <0,05, \*\* P <0,01 έναντι ομάδας ελέγχου. #, P <0,05 vs. CPX ομάδα, (Student's t-test). Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  S.D. (n = 3).

#### 4.4 Η CPX ενισχύει την επαγωγή της γεμισιταβίνης στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος

Για να εξεταστεί εάν τα ανασταλικά αποτελέσματα της CPX συσχετίζονται με την επαγωγή απόπτωσης των κυττάρων καρκίνου του παγκρέατος, τα κύτταρα BxPc3, PANC-1 και MIA PaCa-2 υποβλήθηκαν σε αγωγή με CPX (5 $\mu$ M) και γεμισιταβίνη (10mM), μόνα τους ή σε συνδυασμό για 48 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής διπλής χρώσης με αννεξίνη V-FITC / PI. Η θεραπεία με CPX έδειξε αύξηση του αποπτωτικού αποτελέσματος, σε σύγκριση με τη γεμισιταβίνη. Η συγχορήγηση της γεμισιταβίνης με CPX είχε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης για τα κύτταρα BxPc3, PANC-1 και MIA PaCa-2 σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου και γεμισιταβίνης, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η CPX συνέβαλε σημαντικά στη μείωση του πολλαπλασιασμού, αποδεικνύοντας ότι η CPX έχει ρόλο στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 20).

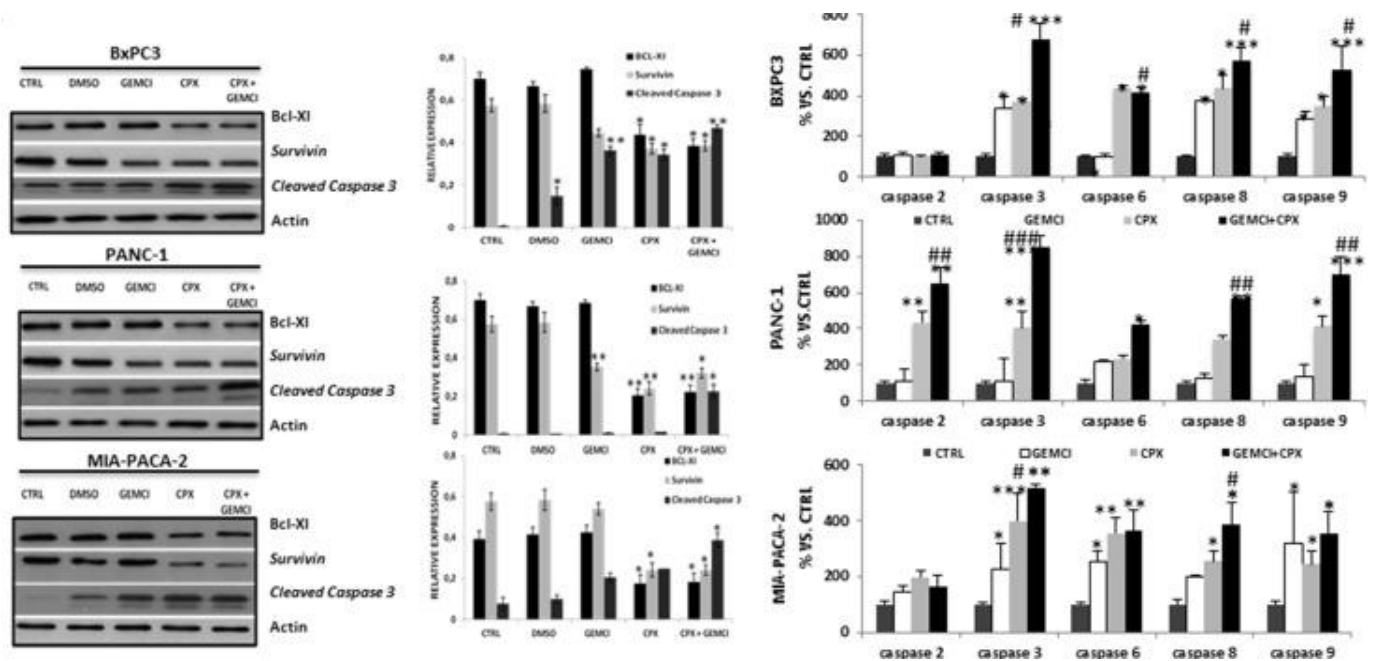


Εικόνα 20: Τα κύτταρα BxPC-3, PANC-1 και MIA-PaCa-2 καλλιεργήθηκαν με 5  $\mu$ M CPX και / ή 10 mM γεμισαβίνης για 48 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για προσδιορισμό απόπτωσης χρησιμοποιώντας το κιτ ανίχνευσης ανεξίνης V-FITC / PI. Το συνολικό ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων παρουσιάζεται από τρία ανεξάρτητα πειράματα που απέδωσαν παρόμοια αποτελέσματα με το μέσο όρο  $\pm$  S.D. (n = 3). \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001, διαφορά έναντι ομάδας ελέγχου, #P <0,05; ## P <0,01 διαφορά έναντι της ομάδας που έλαβε γεμισαβίνη.

#### 4.5 Η CPX αναστέλλει το Bcl-xL και τη survivin και αυξάνει τη διάσπαση των επιπέδων της πρωτεΐνης της κασπάσης-3, με αποτέλεσμα την απόπτωση

Για να διευκρινιστεί περαιτέρω ο μηχανισμός με τον οποίο η CPX επάγει την απόπτωση των κυττάρων καρκίνου του παγκρέατος, εξετάστηκε η έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (Bcl-xL, survivin και διασπασμένη κασπάση-3). Η CPX μείωσε σημαντικά τα επίπεδα Bcl-xL και survivin και αύξησε τη διάσπαση της κασπάσης-3, υποδεικνύοντας απόπτωση που εξαρτάται από την κασπάση. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε στις τρεις κυτταρικές σειρές παγκρέατος. Επιπλέον, τόσο η CPX όσο και η γεμισαβίνη προκάλεσαν έντονη μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης Bcl-XL και survivin και σημαντική αύξηση στα επίπεδα της διασπασμένης πρωτεΐνης κασπάσης-3 σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία της γεμισαβίνης.

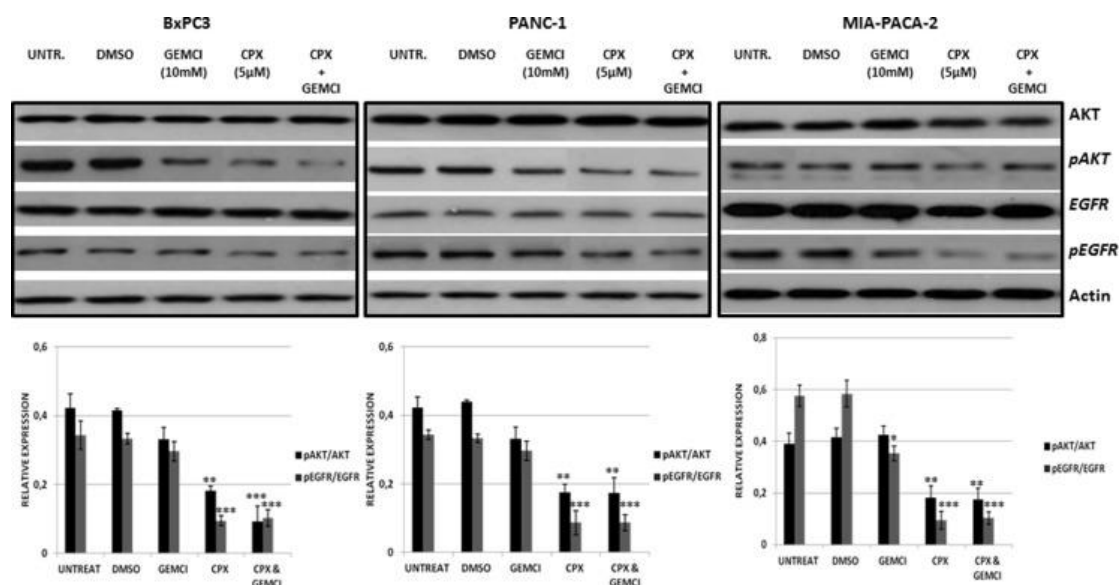
Για περαιτέρω διερεύνηση για το ρόλο των κασπασών, ελέγχθηκαν οι κασπάσες-2, -3, -6, -8, -9. Με εξαίρεση την κασπάση-2, όλες οι κασπάσες ανιχνεύονται. Επιπλέον, η κασπάση-3 έδειξε σημαντική υψηλότερη δραστηριότητα όταν η CPX συν-επώαστηκε με γεμισαβίνη (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Τα κύτταρα BxPC-3, PANC-1 και MIA-PaCa-2 υποβλήθηκαν σε επώαση με 5  $\mu$ M CPX και / ή 10 mM γεμισαβίνη για 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Η πυκνομετρική ποσοτικοποίηση των επιπέδων πρωτεΐνης που σχετίζονται με την απόπτωση (ομαλοποιείται στα επίπεδα ακτίνης) δείχνεται δίπλα σε κάθε ανοσοκλιίδα και αντανακλά μέσες τιμές  $\pm$  SEM τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. \*  $p < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  έναντι ομάδας ελέγχου. (Γ) Σχετικές δραστηριότητες κασπάσες -2, -3, -6, -8, -9 μετά από θεραπεία κυττάρων BxPC-3, PANC-1 και MIA-PaCa-2 με 5  $\mu$ M CPX και / ή 10 mM γεμισαβίνη. Μέσες τιμές τριών επαναληπτικών πειραμάτων  $\pm$  S.D. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , διαφορά έναντι ομάδας ελέγχου, #  $P < 0,05$ ; ##  $P < 0,01$ ; ###  $P < 0,001$ ; διαφορά έναντι της γεμισαβίνης (T-test).

#### 4.6 Η CPX υποεκφράζει τη σηματοδότηση EGFR σε σύγκριση με τη γεμισαβίνη, σε ανθρώπινες παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση της γεμισαβίνης και της CPX στη σηματοδότηση EGFR στα κύτταρα BxPc3, PANC-1 και MIA PaCa-2. Αυτές οι κυτταρικές σειρές υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για 2 ώρες μόνο με γεμισαβίνη, μόνο με CPX ή σε συνδυασμό. Η φωσφορυλίωση του EGFR στη θέση Tyr1068 μειώθηκε στα κύτταρα BxPc3, PANC-1 και MIA-PACA-2 σε απόκριση μόνο στη CPX. Επιπλέον, βρήκαμε ότι η συγχορήγηση της γεμισαβίνης με CPX εμπόδισε την επαγωγή του pEGFR. Εξετάσαμε επίσης τα επίπεδα φωσφορυλιωμένου AKT (pAKT (S473)) τα οποία επίσης μειώθηκαν μετά τη θεραπεία με CPX ενώ μετά τη θεραπεία με γεμισαβίνη, δεν επηρεάστηκαν. Στα κύτταρα BxPc3, PANC-1 και MIA PaCa-2, η θεραπεία με CPX ή ο συνδυασμός και των δύο, είχε ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα pAKT (S473). Αντιθέτως, τα επίπεδα pEGFR και pAKT (S473) ήταν ανθεκτικά μόνο στη γεμισαβίνη (Εικόνα 22). Η CPX μπορεί δυνητικά να έχει θεμελιώδη επίδραση στο μονοπάτι σηματοδότησης EGFR.

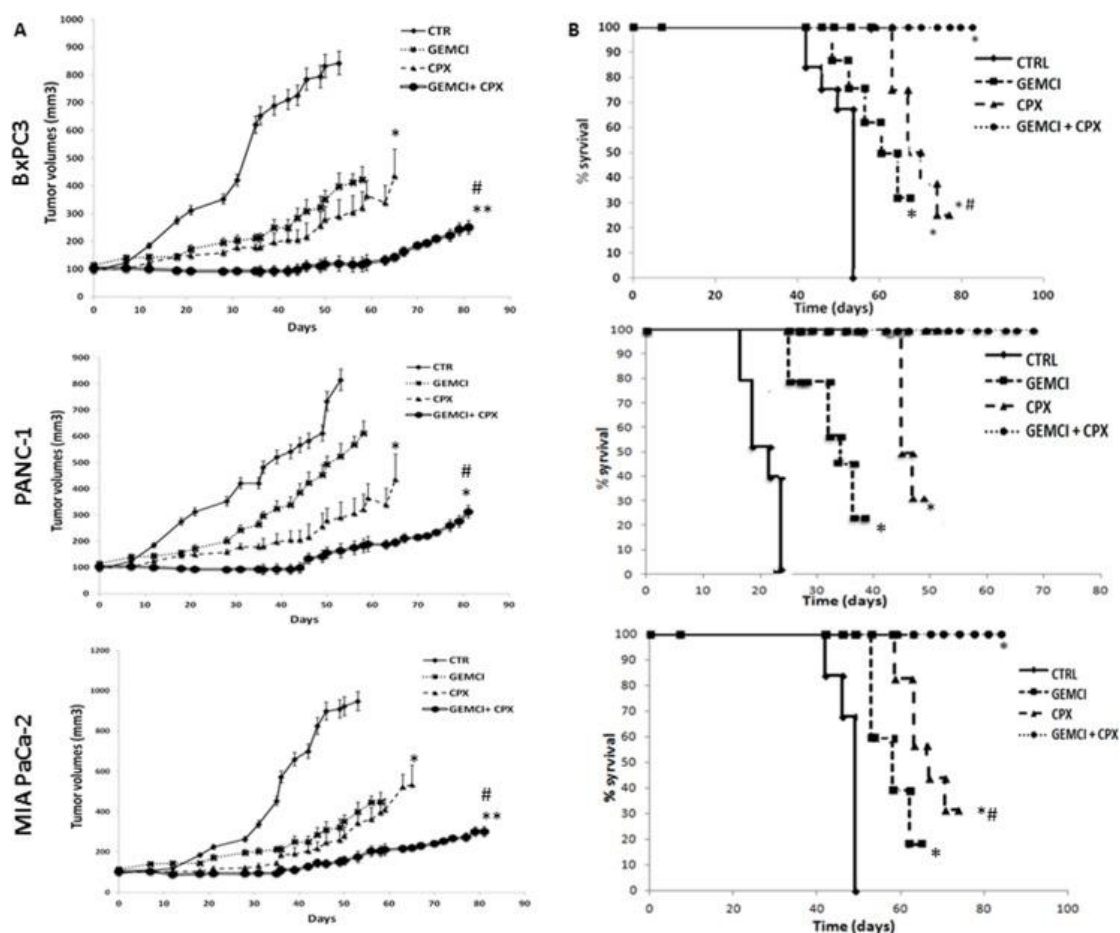


Εικόνα 22: Η θεραπεία CPX ρυθμίζει πιο αποτελεσματικά το pEGFR και το pAKT (S473) πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με τη θεραπεία με γεμισαβίνη. Κύτταρα BxPC-3, PANC-1 και MIA-PaCa-2 υποβλήθηκαν σε προ-επεξεργασία για 2 ώρες με 5 μM CPX και / ή 10 mM γεμισαβίνη και στη συνέχεια συλλέχθηκαν για προσδιορισμό με ανοσοαποτύπωση. Οι λόγοι των pEGFR (Y1068) / συνολικού EGFR και pAKT (S473) / συνολικού AKT σε κύτταρα που δεν έχουν υποστεί επώαση/κατεργασία με γεμισαβίνη (10 mM), με / χωρίς CPX (5 μM) απεικονίζονται στα γραφήματα που εμφανίζονται στο κάτω πλαίσιο και αντανακλούν μέσες τιμές ± SEM τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001, διαφορά έναντι DMSO ομάδας.

#### **4.7 Η CPX ενισχύει την αντικαρκινική δράση της γεμισαβίνης: αναστέλλει την υποδόρια ανάπτυξη ξενομοσχεύματος όγκου και παρατείνει την επιβίωση σε μοντέλα ποντικών ξενομοσχεύματος καρκίνου του παγκρέατος**

Έχοντας δείξει πως η CPX ενισχύει την ενεργοποίηση και την αποτελεσματικότητα της γεμισαβίνης *in vitro*, στη συνέχεια εξετάστηκε *in vivo* η αποτελεσματικότητα, χρησιμοποιώντας μοντέλα ξενομοσχεύματος όγκου με τις κυτταρικές σειρές BxPc3, PANC-1 και MIA PaCa-2 σε ποντίκια SCID (ανεπάρκεια ανοσοποιητικού). Προκειμένου να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα της στρατηγικής θεραπείας CPX στις κυτταρικές σειρές που είναι ευαίσθητες στη γεμισαβίνη (MIA PaCa-2, BxPc3) και ανθεκτικών (PANC-1), δημιουργήθηκαν μοντέλα εξανθρωπισμένων υποδόριων όγκων. Διερευνήσαμε εάν η χορήγηση CPX αυξάνει την αντικαρκινική δράση της γεμισαβίνης σε ζώα που φέρουν όγκο. Όταν οι όγκοι των όγκων έφτασαν περίπου τα 100 mm<sup>3</sup>, τα ποντίκια τυχαιοποιήθηκαν και χωρίστηκαν σε τέσσερις υποομάδες για κάθε κυτταρική σειρά. ομάδα ελέγχου, ομάδα θεραπείας με γεμισαβίνη, ομάδα θεραπείας CPX και ομάδα γεμισαβίνης και CPX. Στη συνέχεια, τα ποντίκια στην ομάδα θεραπείας με CPX υποβλήθηκαν σε καθημερινή αγωγή *per os* με CPX (25 mg / kg), ποντίκια στην ομάδα θεραπείας με γεμισαβίνη (60 mg / kg) υποβλήθηκαν σε αγωγή τρεις φορές την εβδομάδα με ενδοπεριτοναϊκή διάχυση της γεμισαβίνης (60 mg / kg). Όπως φαίνεται στο Σχήμα οι θεραπείες ανέστειλαν σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου στα τρία μοντέλα όγκου του παγκρέατος, με τη συνδυαστική θεραπεία να δείχνει αυξημένη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με είτε το CPX είτε τη γεμισαβίνη όταν

χορηγούνται μεμονωμένα. Περαιτέρω, η θεραπεία παρέτεινε σημαντικά την επιβίωση των ζώων που φέρουν όγκο, με συνδυαστική θεραπεία, ουσιαστικά αποτρέποντας το θάνατο των ζώων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η μέση επιβίωση ήταν 22 ημέρες για PANC-1, 47 ημέρες για MIA PaCa-2, 54 ημέρες για ξενομοσχεύματα BxPc3 για την ομάδα χωρίς θεραπεία. Μέση επιβίωση αυξήθηκε σε 40 ημέρες για PANC-1, 65 ημέρες για MIA PaCa-2 και 63 ημέρες για ξενομοσχεύματα BxPc3 για την ομάδα που έλαβε γεμισαβίνη ( $P < 0,05$ ), η οποία αυξήθηκε περαιτέρω σε 53 ημέρες για PANC-1, 78 ημέρες για MIA PaCa-2 και 77 ημέρες για ξενομοσχεύματα BxPc3 για την ομάδα που έλαβε CPX (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Η μονοθεραπεία CPX βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της μονοθεραπείας με γεμισαβίνη στην ανάπτυξη καθιερωμένων τοπικών παγκρεατικών όγκων σε μοντέλα ξενομοσχεύματος BxPC-3 PANC-1 και MIA PaCa-2. (A) Ποντικοί SCID εμφυτεύθηκαν με κύτταρα BxPC-3 PANC-1 και MIA PaCa-2. Όταν διαπιστώθηκαν τοπικοί όγκοι, τα ζώα υποδιαιρέθηκαν τυχαία σε τέσσερις ομάδες (i) Control (ii) Γεμισαβίνης (60 mg / kg) · (iii) CPX (25 mg / kg) · (iv) Συνδυασμός γεμισαβίνης (60 mg / kg) και CPX (25 mg / kg) κάθε καρκινικής κυτταρικής σειράς, αντίστοιχα. Οι διαστάσεις του όγκου σε κάθε ομάδα θεραπείας υπολογίστηκαν (τρεις φορές /

εβδομάδα) και παρουσιάστηκε στα γραφήματα.  $n = 6-8$ . \* Σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$ ), \*\* Σημαντική διαφορά ( $P < 0,01$ ) έναντι controls. Η συνδυαστική θεραπεία ήταν σημαντικά πιο ισχυρή και η διαφορά έφτασε στη σημασία σε σύγκριση με τη θεραπεία με γεμισιταβίνη μόνο μετά από 31 ημέρες για MIA PaCa-2 και 35 ημέρες για BxPC-3 και 46 ημέρες PANC-1 ( $\#P < 0,05$  Student's t-test). (B) Η μέση επιβίωση των παγκρεατικών όγκων BxPC-3, PANC-1 και MIA PaCa-2 σε κάθε ομάδα θεραπείας κατασκευάστηκε σύμφωνα με την καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier.  $n = 6$  ποντίκια σε κάθε υπο-ομάδα. Οι τιμές P (\* P, 0,05, \*\* P, 0,01 έναντι της ομάδας ελέγχου) για τις διαφορές επιβίωσης εφαρμόστηκε η δοκιμή log-rank.

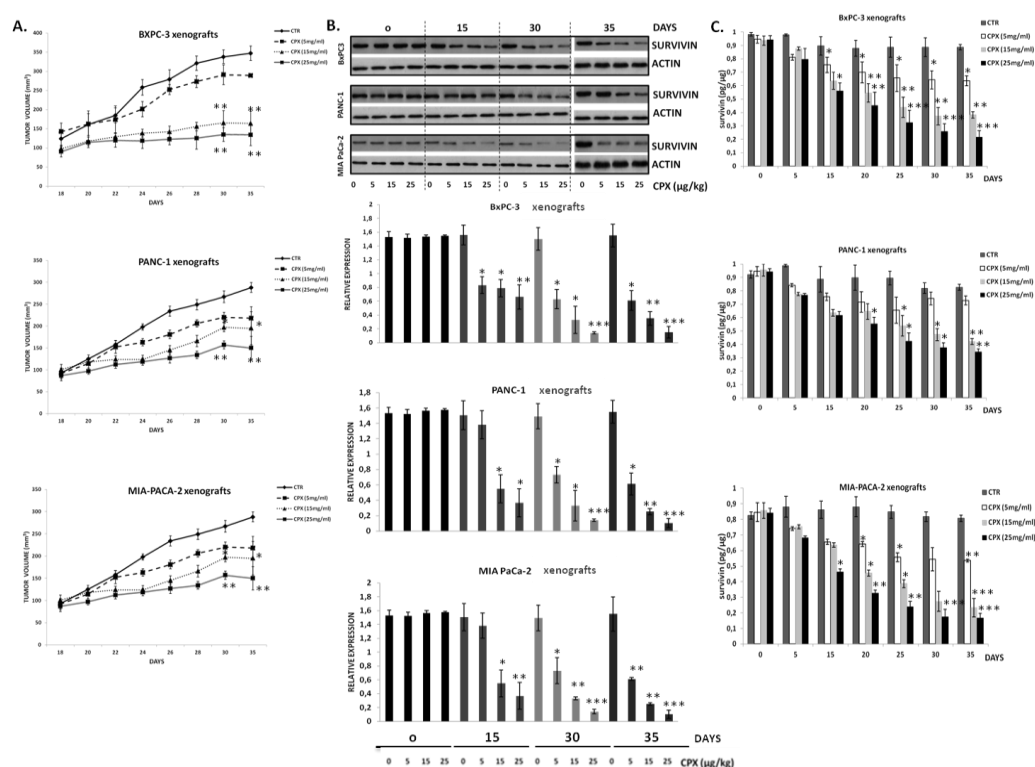
#### **4.8 Ανασταλτικές επιδράσεις της CPX στο μέγεθος του όγκου ποντικών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο**

Η Εικόνα 24A δείχνει τις ανασταλτικές επιδράσεις των αυξανόμενων δόσεων CPX στην ανάπτυξη όγκων σε ποντικούς με ξενομόσχευμα από τις κυτταρικές σειρές BxPc3, PANC-1 και MIA-PACA-2. Οι ομάδες που έλαβαν CPX (5,0 mg / kg, 15 mg / kg και 25 mg / kg) έναντι των ομάδων ελέγχου (χωρίς θεραπεία) σε ενδεικνυόμενα χρονικά σημεία έδειξαν αυξημένη αναστολή της ανάπτυξης όγκου που σχετίζεται με αυξανόμενες δόσεις CPX. Σε σύγκριση με τα ποντίκια που δεν είχαν υποστεί αγωγή, η καθημερινή θεραπεία με CPX προκάλεσε έντονη υποχώρηση του όγκου σε δόση 15 mg / kg και υψηλότερη.

#### **4.9 Ανασταλτικές επιδράσεις του CPX σε επίπεδα επιβίωσης με δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο σε προϊόντα λύσης όγκων ποντικών ξενομοσχεύματος BxPc3, PANC-1 και MIA-PACA**

Μία από τις βιολογικές αποκρίσεις των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία με CPX ήταν η καταστολή των επιπέδων έκφρασης του mRNA της survivin. Η survivin είναι πρωτεΐνη που αναστέλλει την απόπτωση, συνεπώς ευνοεί την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Για αυτόν τον λόγο, διερευνήθηκαν οι ανασταλτικές επιδράσεις της θεραπείας CPX εξετάζοντας τα επίπεδα πρωτεϊνών survivin από ιστούς όγκων πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τη χορήγηση CPX, ως φαρμακοδυναμικός δείκτης για επιβεβαίωση της βιολογικής απόκρισης όγκου. Σε σύγκριση με τα ποντίκια που δεν είχαν υποστεί αγωγή, η καθημερινή θεραπεία με CPX προκάλεσε έντονη μείωση της επιβίωσης σε δόση 15 mg / kg και υψηλότερη.

Κατά τη διάρκεια της θεραπείας, παρατηρήθηκε μια μέγιστη μείωση την ημέρα 30 και δεν παρατηρήθηκε σημαντική καταστολή τις ημέρες 2 έως 22. Τα μειωμένα επίπεδα της επιβίωσης διατηρήθηκαν για τουλάχιστον 5 ημέρες μετά τη διακοπή της θεραπείας με CPX (Εικόνα 24). Η αναστολή των επιπέδων survivin ενισχύθηκε σε συνδυασμό με την αύξηση της δόσης και του χρόνου θεραπείας. Τα αποτελέσματα του ανοσοαποτυπώματος κατά Western επαληθεύονται με εκείνα της ανάλυσης Elisa.



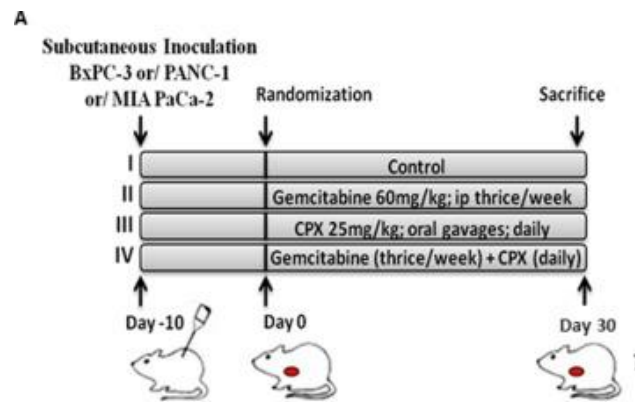
Εικόνα 24: Θηλυκά ποντίκια SCID εμβολιάστηκαν υποδορίως με BxPC-3 ( $3 \times 10^6$  κύτταρα / ποντίκι) ή PANC-1 ( $3 \times 10^6$  κύτταρα / ποντίκι) ή MIA PaCa-2 ( $3 \times 10^6$  κύτταρα / ποντίκι) καρκινικά κύτταρα. Όταν διαπιστώθηκαν τοπικοί όγκοι, τα ποντίκια υποδιαιρέθηκαν τυχαία σε ομάδες μετά από ημερήσια εφάπαξ από του στόματος κοιλότητα CPX σε συγκέντρωση 5 mg / kg, 15 mg / kg και 25 mg / kg. Οι ιστοί όγκου εκτομήθηκαν εκ νέου στις 0, 5, 15, 30η ημέρα μετά την καθημερινή χορήγηση CPX. Οι ιστοί όγκου εκτομήθηκαν επίσης την 35η ημέρα (5 ημέρες μετά τη διακοπή της χορήγησης CPX). (A) Οι όγκοι του όγκου σε κάθε ομάδα κυτταρικής γραμμής υπολογίστηκαν (τρεις φορές / εβδομαδιαίως) μετά από στοματική μέτρηση CPX στα 5, 15 και 25 mg / kg ημερησίως. (n = 6) \* Σημαντική διαφορά (P <0,05), \*\* Σημαντική διαφορά (P <0,01) έναντι controls (χωρίς θεραπεία) ανά χρονικό σημείο. (B) Ακολούθησε ανάλυση ανοσοαποτυπώματος κατά Western για ανίχνευση επιπέδων πρωτεΐνης survivin σε ιστούς όγκου (άνω πάνελ). Η πυκνομετρική ποσοτικοποίηση της survivin αντανακλά τις μέσες τιμές  $\pm$  SD (n = 3) τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. \* p <0,05 \*\* P <0,01 \*\*\* P <0,001 έναντι ομάδας ελέγχου του υποδεικνυόμενου χρονικού σημείου (κάτω πλαίσιο). (C) Επίπεδα Survivin όπως μετρήθηκαν με ELISA μετά από αύξηση των δόσεων CPX στα 5, 15, 25 mg / kg (n = 3 ανά χρονικό σημείο). Η Survivin

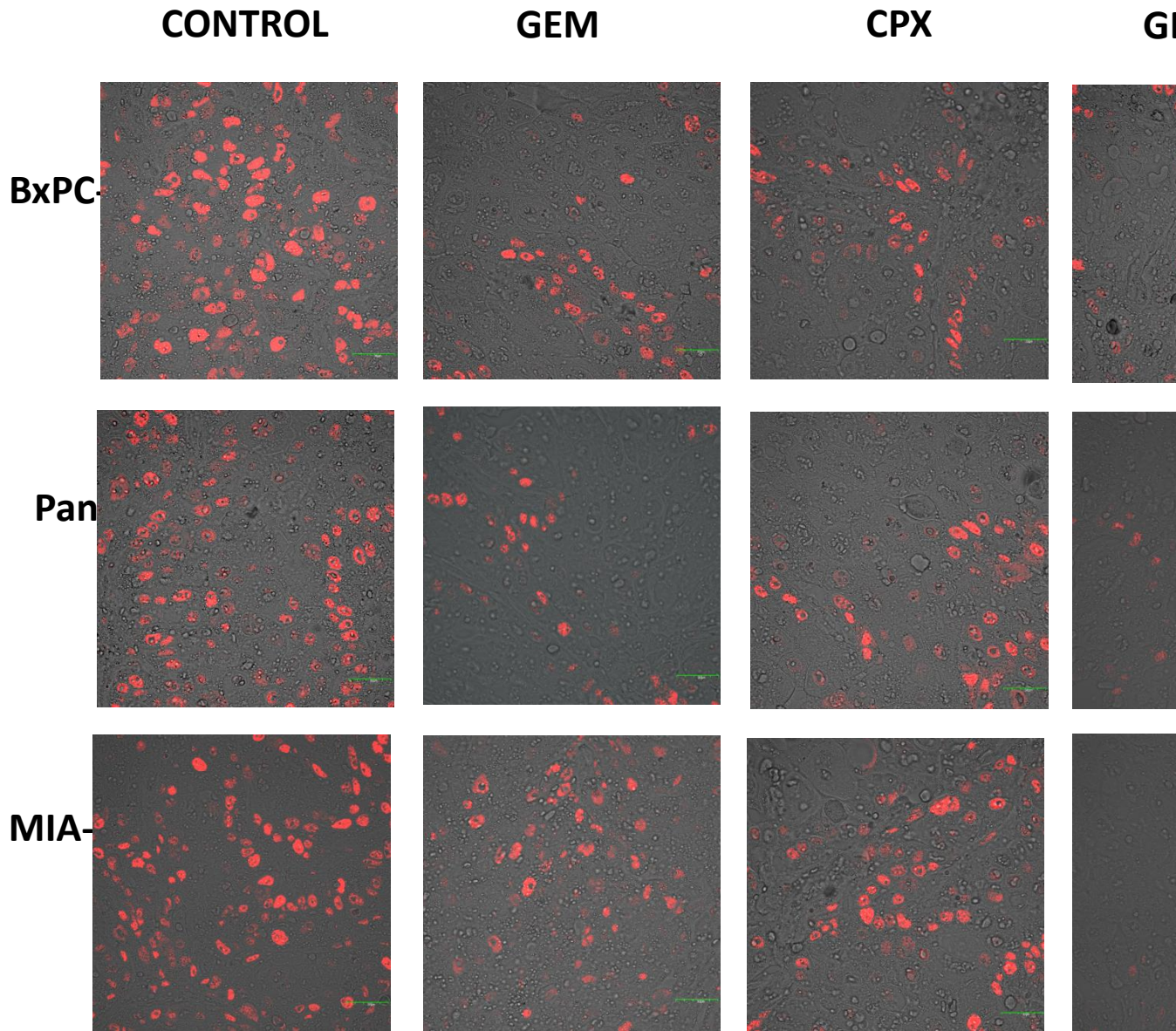


αντικατοπτρίζει μέσες τιμές  $\pm$  SEM τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. \*  $p < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$  έναντι της ομάδας ελέγχου του υποδεικνυόμενου χρονικού σημείου.

#### 4.10 Η CPX προκαλεί μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ανθρώπινες παγκρεατικές καρκινικές σειρές

Οι τρεις ανθρώπινες παγκρεατικές καρκινικές σειρές ενήθησαν σε control SCID ποντίκια και χωρίστηκαν σε τρεις θεραπευτικές κατηγορίες : α) θεραπεία με γεμισταβίνη β) θεραπεία με CPX και γ) θεραπεία με τον διπλό συνδυασμό. Στην ημέρα 30 τα ποντίκια θανατώθηκαν και ελήφθησαν οι όγκοι για προσδιορισμό του πολλαπλασιαστικού δυναμικού με τον δείκτη Ki-67 με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης (confocal) και της τεχνικής του ανοσοφθορισμού. Όπως παρατηρείται, ο συνδυασμός των 2 θεραπειών προκαλεί τη μεγαλύτερη μείωση του πολλαπλασιασμού. Μεγάλη μείωση παρατηρείται και στις μονοθεραπείες γεμισταβίνης και CPX (Εικόνα 25).



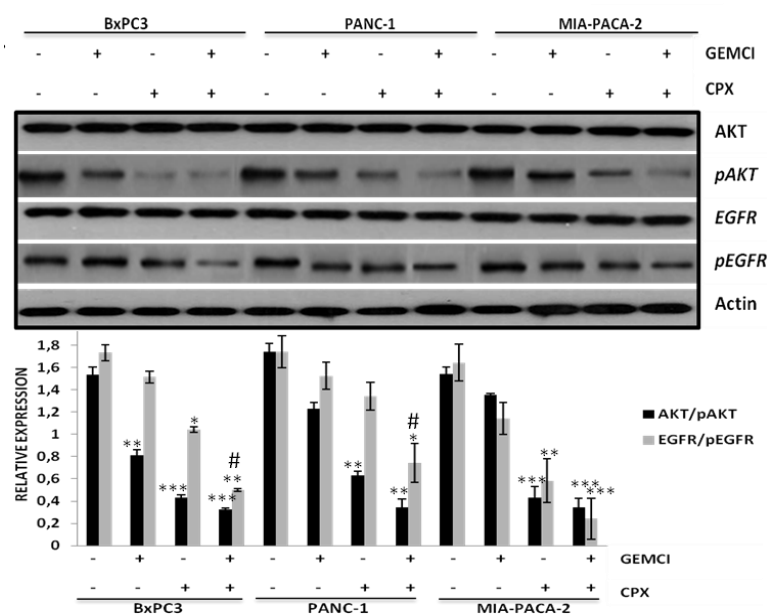


Εικόνα 25: (Α) Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου πειράματος · Ποντικοί SCID που φέρουν υποδόρια ξενομοσχεύματα όγκου BxPC-3 PANC-1 και MIA PaCa-2, ομαδοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες, αντίστοιχα (i) φορέα (n = 6). (ii) Γεμισταβίνη (60 mg / kg) (n = 6) · (iii) CPX (25 mg / kg) (n = 6) · (iv) Συνδυασμός γεμισταβίνης (60 mg / kg) και CPX (25 mg / kg) (n = 6) · (Β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες θετικών σε Κί67 κυττάρων σε ιστούς όγκων από ξενομοσχεύματα όγκου BxPC-3 PANC-1 και MIA PaCa-2, την ημέρα 30 μετά την έναρξη της θεραπείας.

#### 4.11 Η CPX αναστέλλει τη σηματοδότηση EGFR σε σύγκριση με τη γεμισταβίνη *in vivo*

Χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο, για να χαρακτηριστεί ο μοριακός φαινότυπος των όγκων που υποβλήθηκαν σε αγωγή με CPX και γεμισταβίνη, αναλύσαμε τη σηματοδότηση EGFR σε ξενομοσχεύματα BxPC-3, PANC-1 και MIA-

PACA-2 στο τέλος (ημέρα 30) της θεραπείας. Σύμφωνα με τα *in vitro* ευρήματά μας, διαπιστώσαμε ότι η φωσφορυλίωση του EGFR στη θέση Y1068 και AKT (Ser473) μειώθηκε σημαντικά μετά τη θεραπεία με CPX την ημέρα 30, ενώ η θεραπεία με γεμισταβίνη δεν το έκανε. Επιπλέον, η συγχορήγηση CPX με γεμισταβίνη μείωσε σημαντικά περαιτέρω το EGFR (Y1068) και το AKT (Ser473) στις 30 ημέρες (Εικόνα 26).

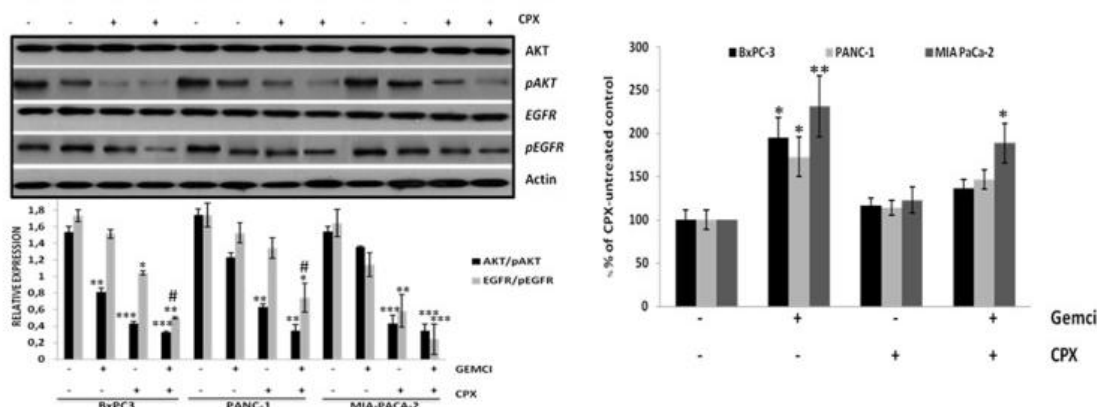


Εικόνα 26: Οι όγκοι συλλέχθηκαν την ημέρα 30 της θεραπείας και οι υποδεικνυόμενες ολικές και φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες εκτιμήθηκαν με ανάλυση ανοσοαποτυπώματος κατά Western τριών ανεξάρτητων πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα.

#### 4.12 Η θεραπεία με CPX όχι μόνο δεν επηρεάζει τα βασικά επίπεδα ROS, αλλά καταργεί τα επίπεδα ROS που προκαλούνται από γεμισταβίνη σε παγκρεατικούς ιστούς, *in vivo*

Λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα της CPX να απομακρύνει τις ROS, αξιολογήσαμε τα επίπεδα της 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανωσίνης (8-OHdG) στον ιστό του παγκρέατος ποντικών με ξενομοσχεύματα ανθρώπινου παγκρεατικού όγκου που τους έχει χορηγηθεί μόνο CPX ή γεμισταβίνη μόνο ή σε συνδυασμό με CPX. Όπως φαίνεται στην Εικόνα η γεμισταβίνη προκάλεσε μια ισχυρή επαγωγή συσσώρευσης ROS (για BxPC-3, PANC-1,  $P < 0,05$ , για MIA-PACA-2;  $P < 0,01$ ), ενώ ο

παράγοντας CPX δεν επηρέασε τα ROS επίπεδα. Η CPX έχει δείξει ότι μετριάζει τα επίπεδα των ROS στους ιστούς του παγκρέατος ποντικών που έλαβαν γεμισταβίνη (Εικόνα 27).

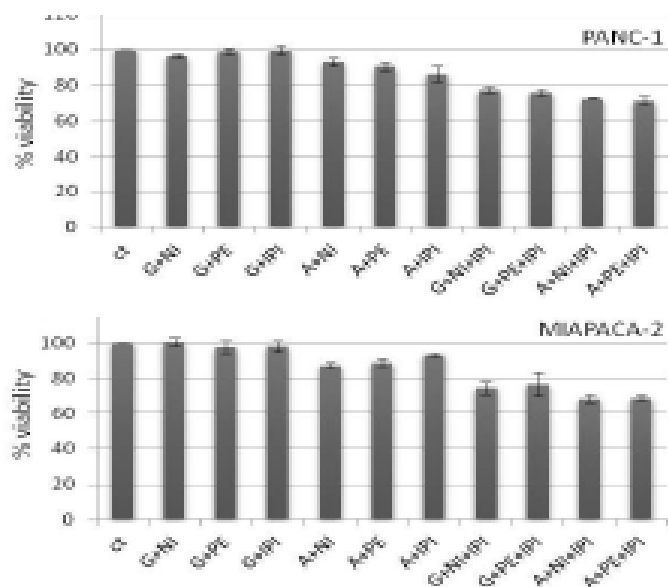


Εικόνα 27: Τα επίπεδα της 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανουσίνης (8-OHdG0 (αυθαίρετες μονάδες, AU) μετρήθηκαν στους παγκρεατικούς ιστούς ποντικών με ξενομοσχεύματα BxPc3, PANC-1 και MIA PaCa-2, που υποβλήθηκαν σε αγωγή με CPX και / ή γεμισταβίνη την 30η ημέρα. (n = 6 ανά πειραματική ομάδα). \* P < 0,05 (Student's t-test). Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD.

#### 4.13 Το τεστ βιωσιμότητας σε *mtKRAS* παγκρεατικές σειρές με χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και ανοσοθεραπείας έδειξε μείωση κατά 25% σε τριπλούς συνδυασμούς.

Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα Γεμισταμβίνη και Nab-Paclitaxel σε συνδυασμό με τα anti-PD-1 Nivolumab, Pembrolizumab και anti-CTL4 το Ipilimumab. Δοκιμάστηκαν σε διπλούς και τριπλούς συνδυασμούς με τις εξής συγκεντρώσεις: 1 μM Nab-Paclitaxel (A), 1 μM Gemcitabine (G), 1 μM Nivolumab (NI), 1 μM Pembrolizumab (PE), 1 μM Ipilimumab (IPI).

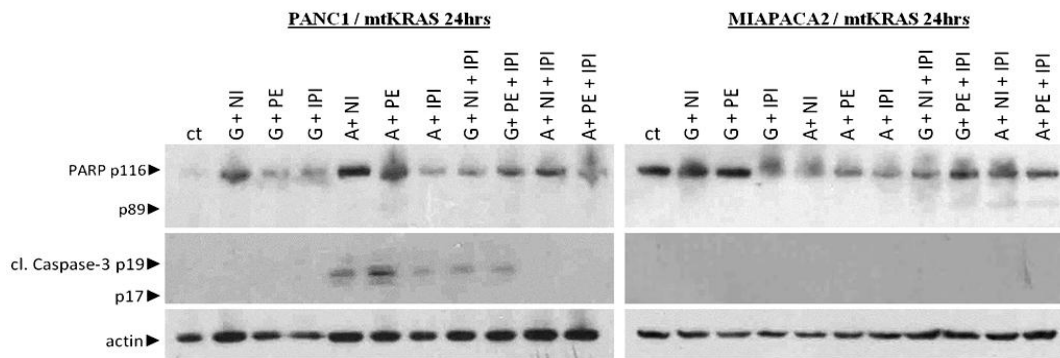
Οι τριπλοί συνδυασμοί G + A και με κάποιο από τα 3 ανοσοφάρμακα, επέφεραν μείωση κατά 25% στη βιωσιμότητα των παγκρεατικών κυτταρικών σειρών που φέρουν μετάλλαξη στο KRAS γονίδιο (PANC-1, MIA-PaCa-2) (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Κύτταρα PANC-1 και MIA-PaCa-2 επωάστηκαν με 1  $\mu$ M Nab-Paclitaxel (A), 1  $\mu$ M Gemcitabine (G), 1  $\mu$ M Nivolumab (NI), 1  $\mu$ M Pembrolizumab (PE), 1  $\mu$ M Ipilimumab (IPI) σε ποικίλους συνδυασμούς όπως φαίνεται στα διαγράμματα για 24 ώρες. Στη συνέχεια, η κυτταρική βιωσιμότητα αναλύθηκε χρησιμοποιώντας χρωματομετρική ανάλυση μεταβολικής δραστηριότητας MTT.

#### 4.14 Η μείωση στη βιωσιμότητα των *mtKRAS* παγκρεατικών σειρών οφείλεται στην απόπτωση

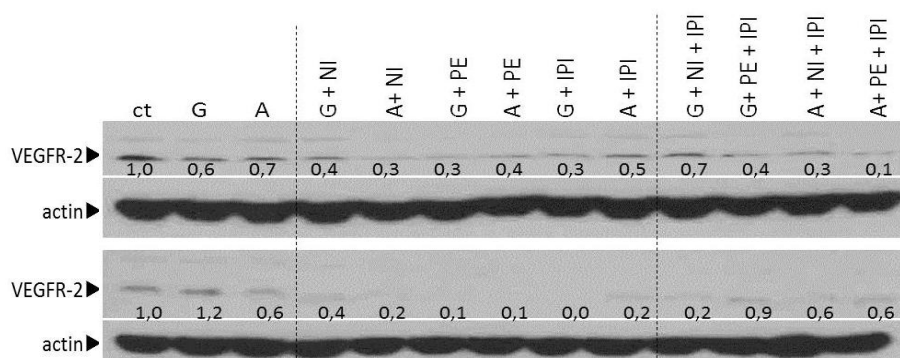
Για να διαπιστώσουμε ποιος μηχανισμός εμπλέκεται στη μείωση της βιωσιμότητας μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, από εκχύλισμα κυττάρων του προηγούμενου πειράματος, ελέγχθηκαν οι πρωτεΐνες PARP και κασπάση-3 οι οποίες είναι δείκτες απόπτωσης. Πράγματι, δείχθηκε πως η απόπτωση είναι ο υπεύθυνος μηχανισμός (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Έπειτα από απομόνωση των πρωτεϊνών του προηγούμενου πειράματος και με τη βοήθεια της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, αποδείχθηκε πως ο μηχανισμός που ευθύνεται για τη μείωση της βιωσιμότητας είναι η απόπτωση.

#### 4.15 Ο συνδυασμός χημειοθεραπείας με ανοσοθεραπεία μειώνει την έκφραση του VEGFR σε mtKRAS παγκρεατικές σειρές.

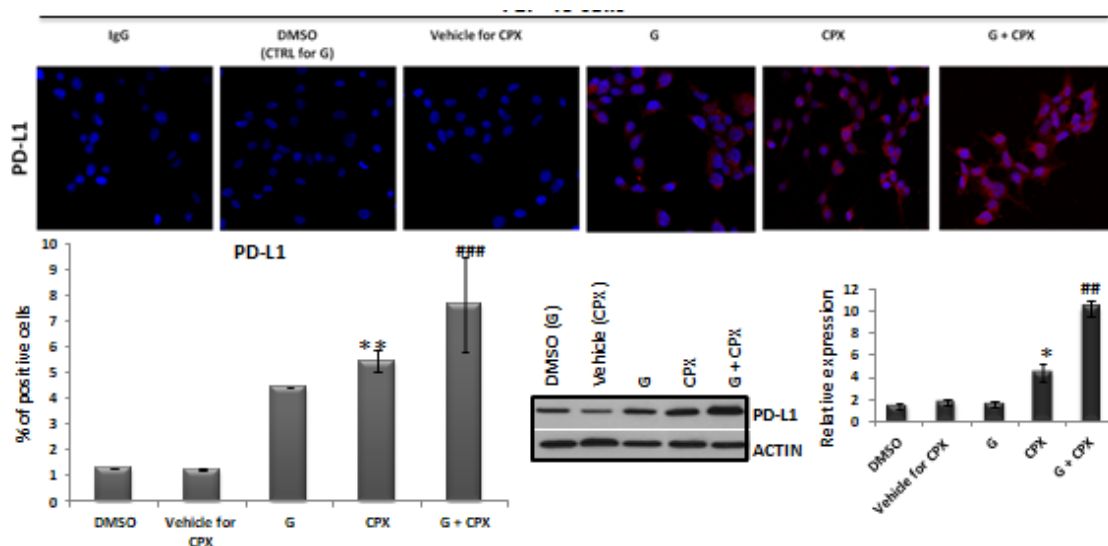
Με τις ίδιες συγκεντρώσεις και επώαση 24 ωρών σε μονούς, διπλούς και τριπλούς συνδυασμούς ελέγχθηκε στις 2 mtKRAS παγκρεατικές σειρές αν έχει μειωθεί η έκφραση του VEGFR-2. Το σηματοδοτικό μονοπάτι VEGFR είναι πολύ σημαντικό για την θρέψη και μετάσταση του όγκου. Παρατηρείται πως η μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης παρατηρείται όταν υπάρχει συνδυασμός χημειοθεραπείας με την ανοσοθεραπεία (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Με ανοσοαποτύπωση κατά Western από πρωτεΐνες των κυτταρικών σειρών PANC-1 και MIA-PaCa-2 που επώαστηκαν σε ποικίλους συνδυασμούς με 1  $\mu$ M Nab-Paclitaxel (A), 1  $\mu$ M Gemcitabine (G), 1  $\mu$ M Nivolumab (NI), 1  $\mu$ M Pembrolizumab (PE), 1  $\mu$ M Ipilimumab (IPI). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 2 φορές και έδειξε πως οι συνδυασμοί χημειοθεραπείας με ανοσοθεραπεία μειώνουν έως και 5 φορές την έκφραση του VEGFR-2. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς.

#### 4.16 Η CPX αυξάνει την ποσότητα του PD-L1 σε ανθρώπινη παγκρεατική καρκινική σειρά

Η αύξηση του PD-L1 είναι πολύ σημαντική διότι σημαίνει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος για αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων. Επομένως, άμεσος στόχος ήταν να διαπιστωθεί αν η CPX αυξάνει το PD-L1 και συνεπώς μπορεί να δοκιμαστεί στη συνέχεια στη ανοσοθεραπεία. Με τη χρήση της σειράς PANC-1 και επώαση με γεμισταβίνη και CPX μεμονωμένα ή σε συνδυασμό τους. Και με ανοσοαποτύπωση κατά Western αλλά και με ανοσοφθορισμό παρατηρήθηκε πως η CPX αυξάνει το PD-L1 (Εικόνα 31).

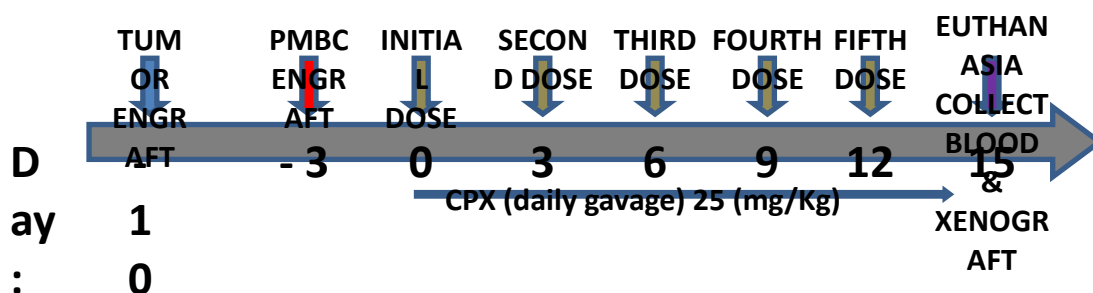


Εικόνα 31: Κύτταρα PANC-1 επώαστηκαν με γεμισταβίνη και CPX μεμονωμένα και σε συνδυασμό. Στο πάνω πάνελ εικόνες από Confocal, με μπλε η φαλλοϊδίνη και κόκκινο το PD-L1. Ο συνδυασμός εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό PD-L1 κάτι που επιβεβαιώνεται και με την ανοσοαποτύπωση κατά Western. \* Σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$ ), \*\* Σημαντική διαφορά ( $P < 0,01$ ) έναντι controls. Μέσες τιμές τριών επαναληπτικών πειραμάτων.



**4.17 Σε *in vivo* πειράματα PANC-1 xenografts σε humanized NOD/SCID μύες στον τετραπλό συνδυασμό υπάρχει μεγαλύτερη μείωση όγκου συγκριτικά με τους άλλους συνδυασμούς, όπως και μεγαλύτερη επιβίωση των πειραματοζώων.**

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν *in vivo* πειράματα με PANC-1 xenografts σε NOD/SCID μύες. Η δημιουργία του ξενομοσχεύματος πραγματοποιείται όπως έχει ήδη περιγραφεί. Σε αυτά πριν την έναρξη της θεραπείας χορηγήθηκαν  $10^7$  PBMC κύτταρα από υγιείς ανθρώπους ώστε να αποκτήσουν σε ένα ποσοστό ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα για να μπορεί να δράσει η ανοσοθεραπεία. Αφού ο όγκος γίνει ψηλαφητός, τα ποντίκια χωρίζονται σε ομάδες των 5-6 ατόμων και χορηγούνται σε ποικίλους συνδυασμούς χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, ανοσοθεραπείας και CPX και σε control ομάδα. Το θεραπευτικό σχήμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στην Εικόνα 32.



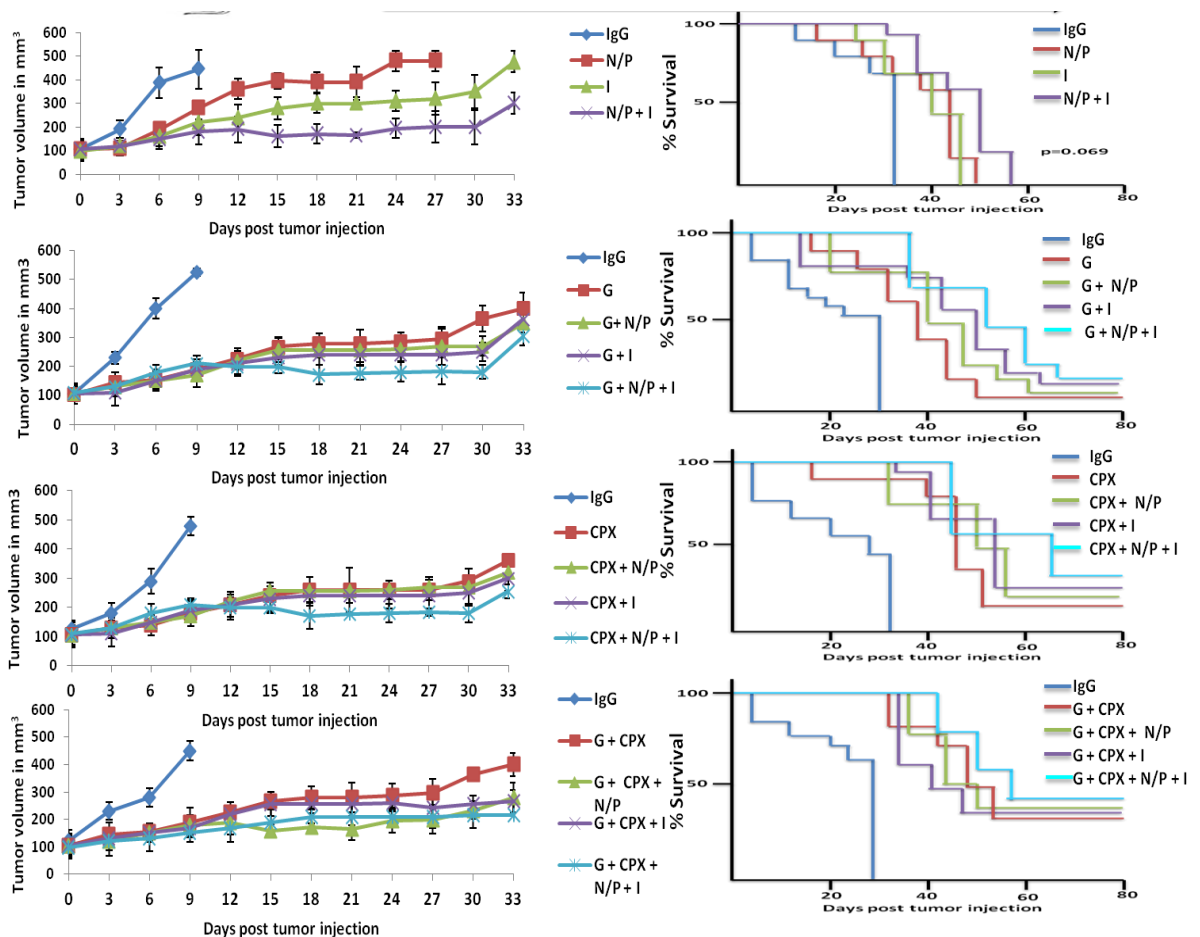
**DOSES : SIMPLE OR COMBINED**  
**NAB-PACLITAXEL : 205MG/KG**  
**GEMCITABINE : 160 mg/Kg**  
**NIVOLUMAB : 10 mg/Kg**  
**PEMBROLIZUMAB : 10 mg/Kg**  
**IPILIMUMAB : 10mg/Kg**

Εικόνα 32: Το χρονοδιάγραμμα που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία του ξενομοσχεύματος, των PBMCs και των θεραπευτικού πρωτοκόλλου. Επίσης, διακρίνονται οι δόσεις που χορηγήθηκαν για κάθε ουσία.

Παρατηρείται πως με τον τετραπλό συνδυασμό (G + N/P + IPI + CPX) υπάρχει μεγαλύτερη μείωση όγκου συγκριτικά με τους άλλους συνδυασμούς (σε σχέση με



το control κατά 250%), όπως και μεγαλύτερη επιβίωση των πειραματοζώων (επιβιώνουν ακόμη και μετά την πάροδο 60 ημερών) (Εικόνα 33).

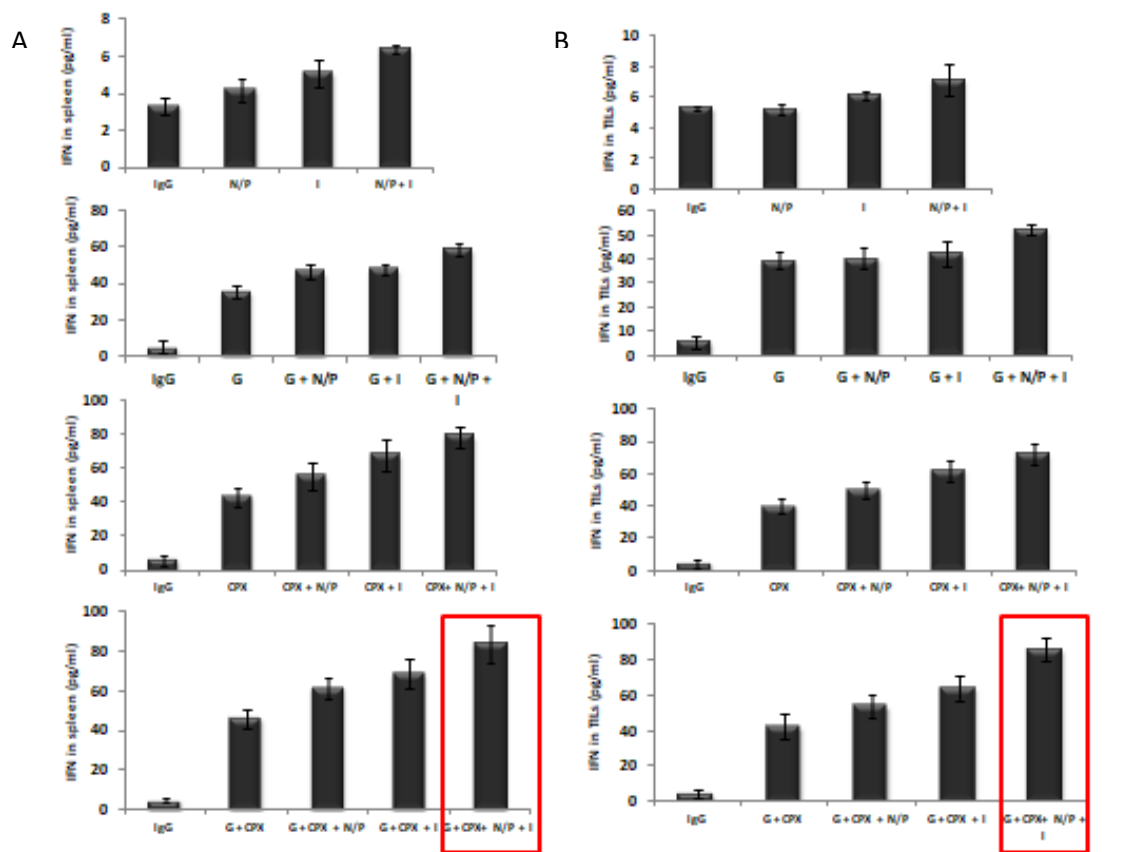


Εικόνα 33: Ξενομοσχεύματα με PANC-1 σε humanized NOD/SCID ποντίκια και με θεραπευτικά σχήματα με G, CPX και ανοσοφαρμάκων σε διάφορους συνδυασμούς. Στα controls δόθηκαν ενέσεις IgG. Σε κάθε ομάδα υπήρχαν 5 μύες. Μετρήθηκαν α) το μέγεθος των όγκων και β) η επιβίωσή τους. Οι διαστάσεις του όγκου σε κάθε ομάδα θεραπείας υπολογίστηκαν (τρεις φορές / εβδομάδα) και παρουσιάστηκε στα γραφήματα. Παρατηρείται πως με τον τετραπλό συνδυασμό υπάρχει μεγαλύτερη μείωση όγκου συγκριτικά με τους άλλους συνδυασμούς, όπως και μεγαλύτερη επιβίωση των πειραματοζώων.

#### 4.18 Ο τετραπλός συνδυασμός αυξάνει την έκκριση της IFN- $\gamma$ τόσο στην κυκλοφορία του αίματος όσο και στο TME.

Από τα ποντίκια του προηγούμενου πειράματος ελήφθησαν αίμα και ο όγκος (παγκρεατικό ξενομόσχευμα από PANC-1 κύτταρα). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ELISA ώστε να μετρηθεί η συγκέντρωση της IFN- $\gamma$  στην κυκλοφορία του αίματος αλλά και στο TME. Η IFN- $\gamma$  είναι σημαντική καθότι συντελεί στην αντιμετώπιση του όγκου.

Η ELISA έδειξε πως στον τετραπλό συνδυασμό (G + N/P + IPI + CPX) υπάρχει η μεγαλύτερη αύξηση στην συγκέντρωση της IFN- $\gamma$  που παράγεται από τα CD8<sup>+</sup> κύτταρα και μάλιστα κατά 22,5 φορές σε σύγκριση με το control (3,75  $\mu\text{g/ml}$  vs 83  $\mu\text{g/ml}$ ) (Εικόνα 34).

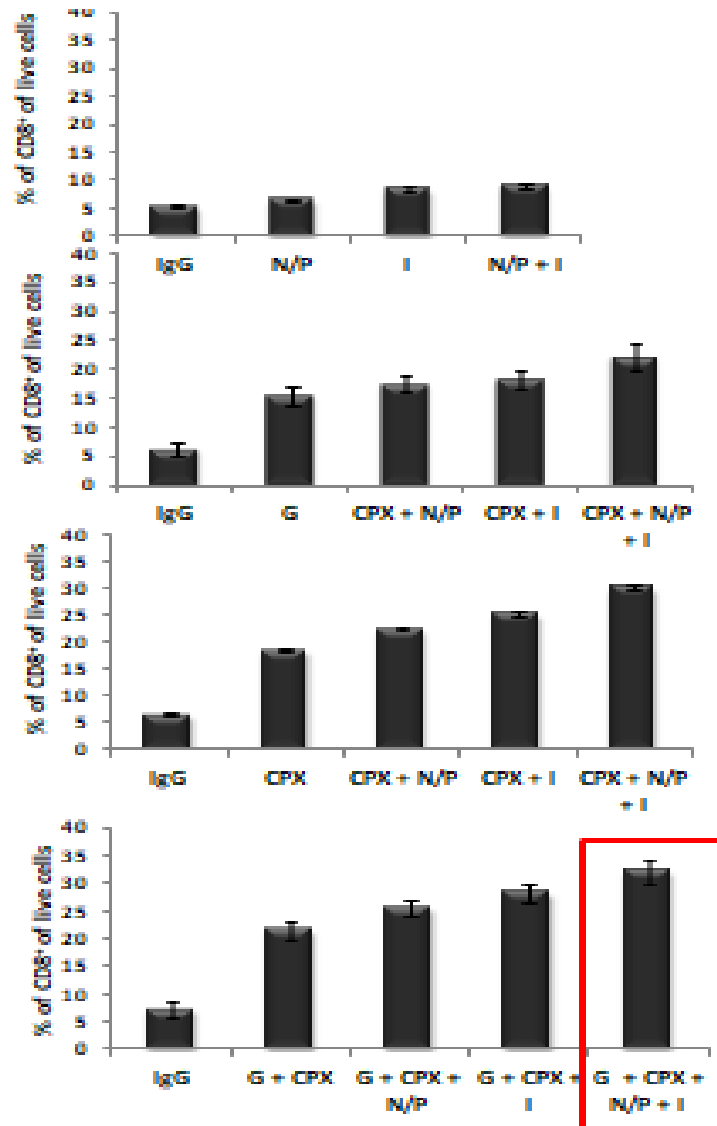


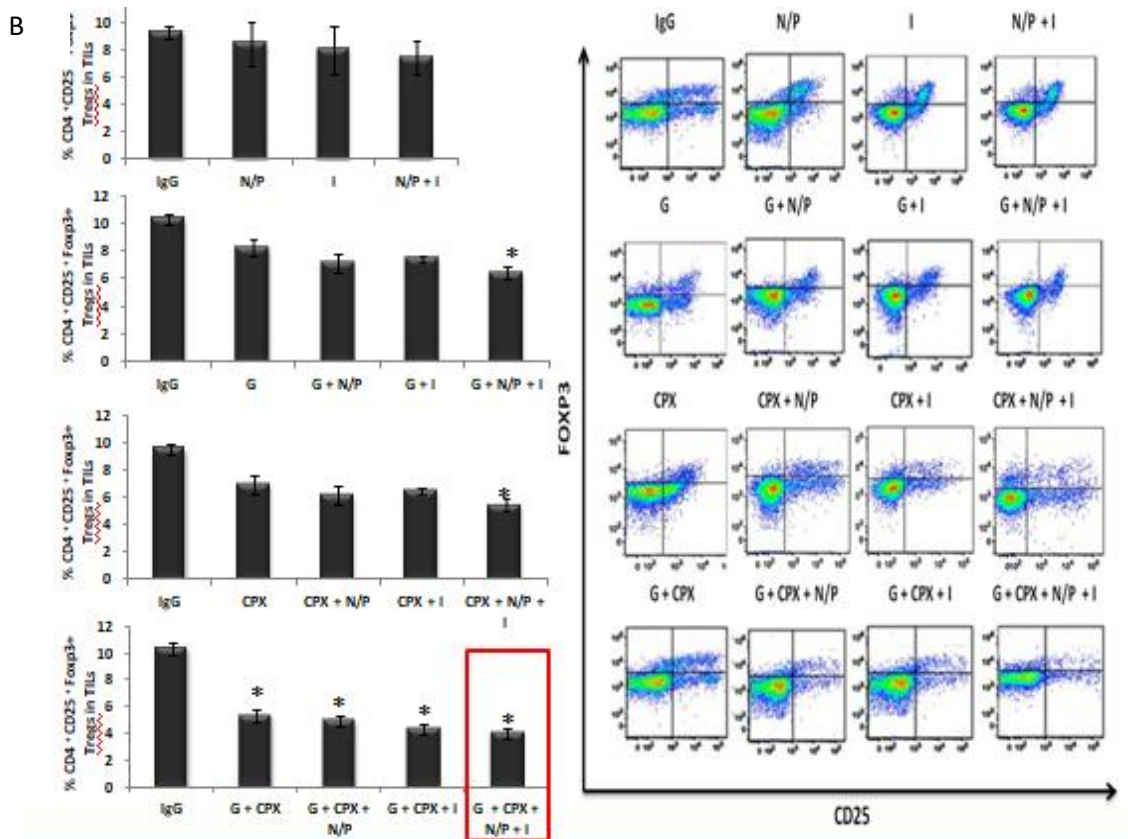
Εικόνα 34: Διαγράμματα που προέκυψαν από μετρήσεις με τη μέθοδο της ELISA της IFN- $\gamma$  Α) στο αίμα και Β) στο TME. Όπως παρατηρείται στον τετραπλό συνδυασμό (G + N/P + IPI + CPX) υπάρχει η μεγαλύτερη αύξηση της IFN- $\gamma$  και στις 2 περιπτώσεις. Οι τιμές προέρχονται από τη μέση τιμή των μετρήσεων των 5 μυών.

#### **4.19 Ο τετραπλός συνδυασμός αυξάνει τα CD8<sup>+</sup> και τα Tregs στο μικροπεριβάλλον του όγκου**

Στη συνέχεια από το αρχικό *in vivo* πείραμα που ελήφθησαν τα ξενομοσχεύματα από τους μύες, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για να μετρηθούν τα CD8<sup>+</sup> και τα Tregs. Στον παγκρεατικό καρκίνο τα CD8<sup>+</sup> βοηθούν στην καταστολή και εξάλειψη του όγκου, ενώ τα Tregs μέσα στον όγκο (TILs) συντελούν αρνητικά για τον ασθενή διότι καταστέλλουν την ανοσοαπόκριση. Το πείραμα έδειξε πως ο τετραπλός συνδυασμός (G + N/P + IPI + CPX) αυξάνει το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> κυττάρων από 5% στους control μύες στο 32% στον τετραπλό συνδυασμό (Εικόνα.35A). Σχετικά με τα Tregs υπήρξε μείωση από 9,5% σε 4% (Εικόνα 35B).

A



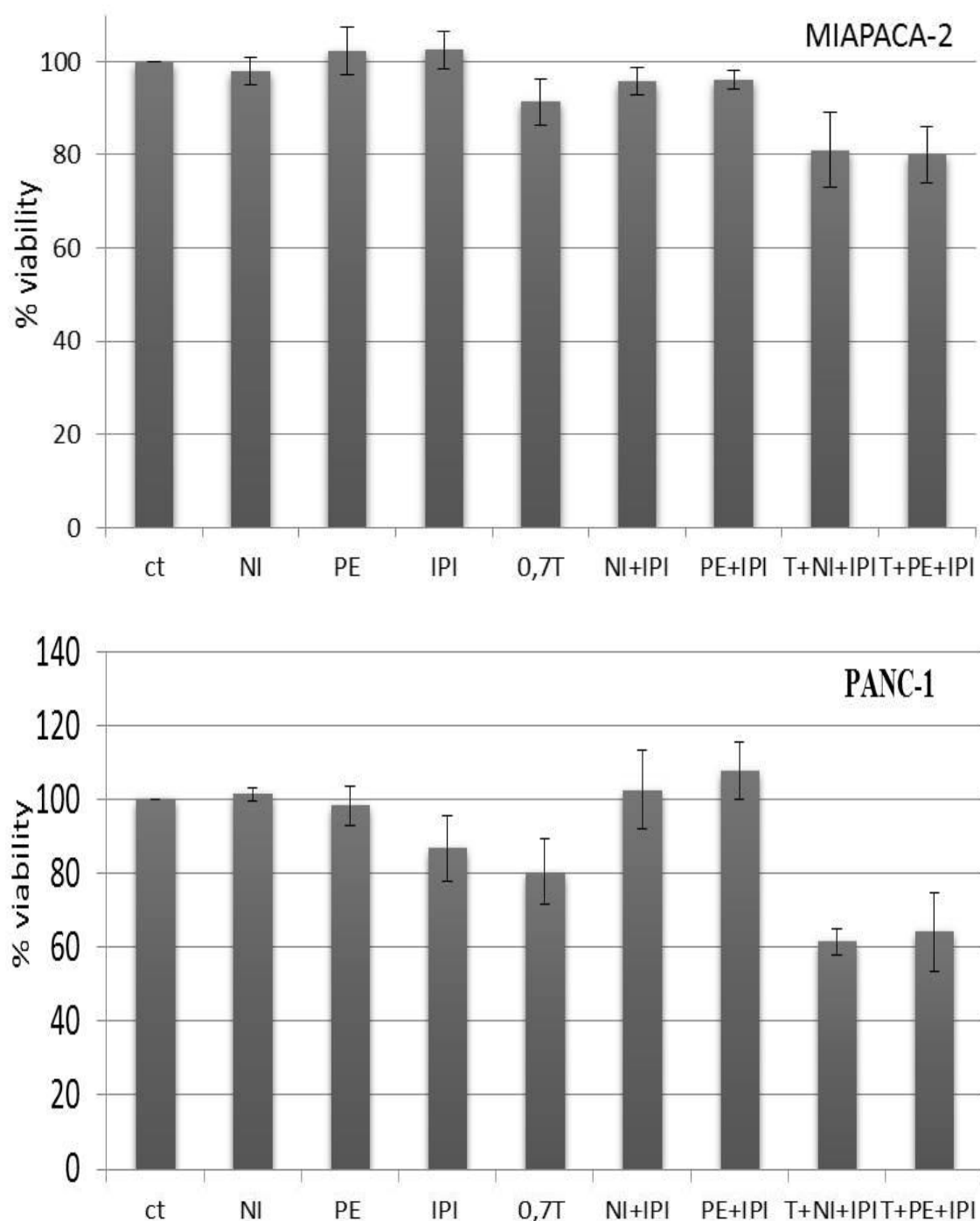


Εικόνα 35: Διαγράμματα που προέκυψαν από μετρήσεις με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής Α) αποτελέσματα για CD8<sup>+</sup> κύτταρα Β) για Tregs. Διαπιστώνεται πως υπάρχει αύξηση στο ποσοστό των CD8<sup>+</sup> κυττάρων κατά 6 φορές στον τετραπλό συνδυασμό σε σύγκριση με τα controls που τους είχε χορηγηθεί IgG. Στα Tregs παρατηρήθηκε μείωση στον τετραπλό συνδυασμό κατά 2,5 φορές σε σχέση με τα controls. . Οι τιμές προέρχονται από τη μέση τιμή των μετρήσεων των 5 μυν. \* Σημαντική διαφορά (P <0,05).

#### 4.20 Οι τριπλοί συνδυασμοί (τινζαπαρίνης + ipillimumab + nivolumab/rembrolizumab) αποφέρουν μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων κατά 20-40%

Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε η τινζαπαρίνη σαν μια ουσία η οποία θα μπορούσε να βοηθήσει ώστε να ξεπεραστεί το εμπόδιο του TME στον παγκρεατικό καρκίνο και να βοηθήσει κατά συνέπεια στην αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας. Πειράματα του εργαστηρίου έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα της τινζαπαρίνης σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία. Αρχικά, με το MTT τεστ δοκιμάστηκε η επιβίωση των mtKRAS παγκρεατικών σειρών σε μονούς, διπλούς και τριπλούς συνδυασμούς με τινζαπαρίνη, ipillimumab, nivolumab, rembrolizumab. Τα

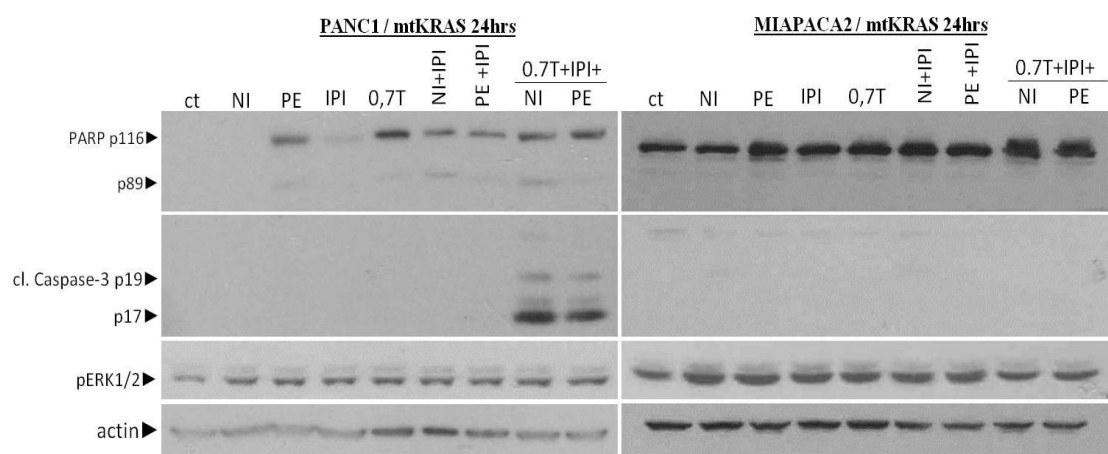
αποτελέσματα έδειξαν πως στον τριπλό συνδυασμό (T + I + N/P) η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μειώθηκε κατά 40% (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Χρωματομετρική ανάλυση μεταβολικής δραστηριότητας MTT σε κύτταρα MIA-PaCa-2 και PANC-1. Δοκιμάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί με τινζαπαρίνη, ipillimumab, nivolumab, pembrolizumab και επώαση 24 ωρών. Οι τριπλοί συνδυασμοί ειδικά στην PANC-1 έφεραν μείωση των κυττάρων κατά 40%. 1  $\mu$ M nivolumab (NI), 1  $\mu$ M pembrolizumab (PE), 1  $\mu$ M ipilimumab (IPI), τινζαπαρίνη 2 U/ml.

#### 4.21 Η μείωση στη βιωσιμότητα φαίνεται πως πραγματοποιείται μέσω απόπτωσης

Τα κύτταρα του παραπάνω πειράματος και με τους αντίστοιχους συνδυασμούς, απομονώθηκαν ώστε να ληφθεί η πρωτεΐνη και να διαπιστωθεί αν οφείλεται στην απόπτωση. Ελέγχθηκαν η πρωτεΐνη PARP και η κασπάση-3 με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Πράγματι, σε όλες τις περιπτώσεις που μειώνεται η επιβίωση των κυττάρων, υπάρχει παρουσία PARP πρωτεΐνης. Μάλιστα στους τριπλούς συνδυασμούς στην PANC-1 σειρά έχουμε και την παρουσία της κασπάσης-3 (Εικόνα 37).

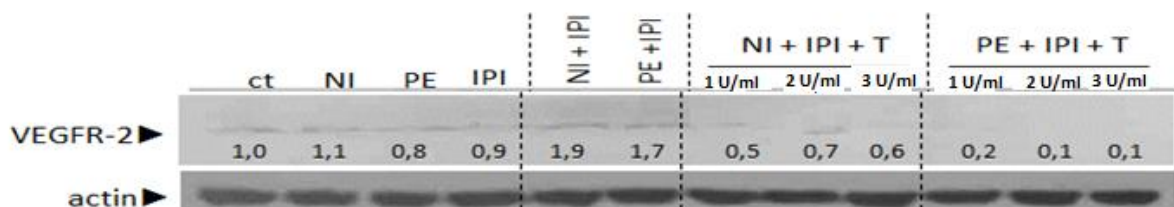


Εικόνα 37: Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε mtKRAS παγκρεατικές σειρές έπειτα από επώαση 24 ωρών με συνδυασμούς τινζαπαρίνης και ανοσοθεραπείας. Η παρουσία των αποπτωτικών πρωτεϊνών PARP και κασπάσης-3 επιβεβαιώνει πως η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων οφείλεται στην απόπτωση. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε σαν το γονίδιο ελέγχου.

#### 4.22 Ο τριπλός συνδυασμός τινζαπαρίνης + ipillimumab + pembrolizumab παρουσίασε την μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση του VEGFR2

Κύτταρα της παγκρεατικής σειράς PANC-1 επώαστηκαν όπως και στα προηγούμενα πειράματα, με τινζαπαρίνη και τους checkpoint inhibitors ipillimumab, nivolumab, pembrolizumab σε συνδυασμούς μεταξύ τους. Για την

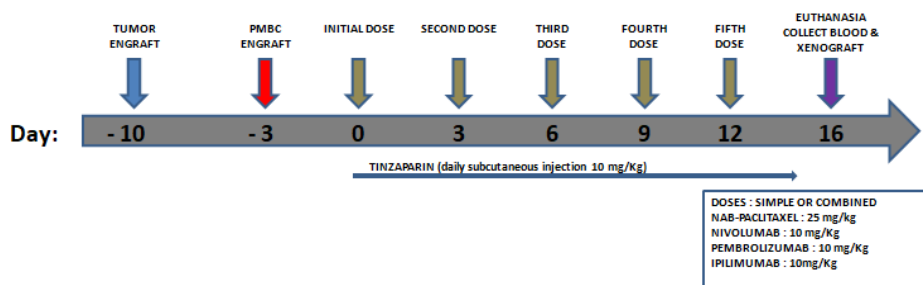
τινζαπαρίνη χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 1 U/ml, 2 U/ml και 3 U/ml. Έπειτα από απομόνωση των πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western μετρήθηκε η έκφραση του υποδοχέα VEGFR-2. Τη μεγαλύτερη έκφραση έδειξε ο τριπλός συνδυασμός T + I + P στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της τινζαπαρίνης (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: Έλεγχος της έκφρασης του VEGFR-2 με ανοσοαποτύπωση κατά Western στην καρκινική παγκρεατική σειρά PANC-1 έπειτα από επώαση 24 ωρών με συνδυασμούς τινζαπαρίνης και ανοσοθεραπείας. Ο τριπλός συνδυασμός T + IPI + PE είχε τη μεγαλύτερη μείωση κατά 10 φορές στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της τινζαπαρίνης. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε σαν το γονίδιο ελέγχου. 1 μM nivolumab (NI), 1 μM pembrolizumab (PE), 1 μM ipilimumab (IPI), τινζαπαρίνη (T) 1, 2 και 3 U/ml.

#### 4.23 Ο συνδυασμός PE + IPI + Nab-P + Τινζαπαρίνη οδηγεί σε μείωση του μεγέθους του όγκου σε σχέση με το control κατά 51% και σε σχέση με το συνδυασμό χωρίς Τινζαπαρίνη κατά 18%.

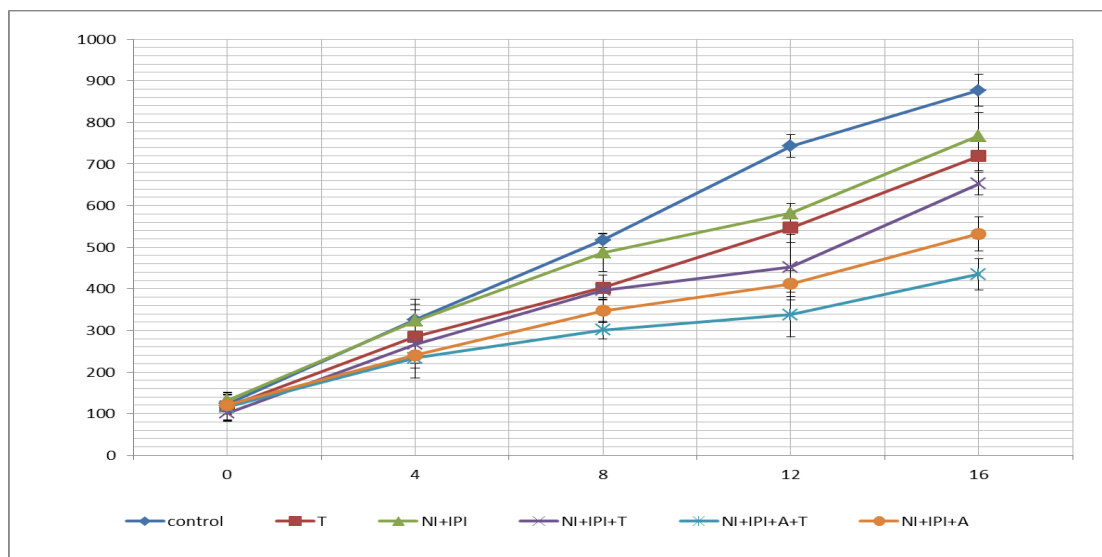
Τέλος, πραγματοποιήθηκαν *in vivo* πειράματα σε humanized NOD/SCID ώστε να ελεγχθεί η επίδραση της τινζαπαρίνης σε συνδυασμό με τη Nab-paclitaxel, το pembrolizumab και το ipilimumab. Το πρωτόκολλα και οι δοσολογίες όπως στην Εικόνα 39. Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά PANC-1 για τα ξενομοσχεύματα.



Εικόνα 39: Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τα *in vivo* πειράματα με την τινζαπαρίνη, καθώς και οι δοσολογίες που ακολουθήθηκαν.



Από τα αποτελέσματα της μείωσης του όγκου παρατηρείται πως η τινζαπαρίνη βοηθάει και στους συνδυασμούς μόνο με την ανοσοθεραπεία αλλά και σε τετραπλά σχήματα με χημειοθεραπεία. Μάλιστα, και στις 2 περιπτώσεις η διαφορά με την προσθήκη της τινζαπαρίνης αγγίζει το 20% (Εικόνα 40).



**Εικόνα 40:** *In vivo* πειράματα σε humanized NOD/SCID ποντίκια με ξεχομοσχεύματα από κύτταρα PANC-1. Δοκιμάστηκε η ανοσοθεραπεία με και χωρίς τινζαπαρίνη, καθώς και οι συνδυασμοί με τη Nab-panitumumab, την ανοσοθεραπεία και με την παρουσία ή όχι της τινζαπαρίνης. Υπήρχε επίσης και η ομάδα ελέγχου. n = 5 για κάθε ομάδα. Η τινζαπαρίνη διαπιστώνεται από το διάγραμμα πως έχει συνεργιστική δράση και στις 2 περιπτώσεις στη μείωση του όγκου (20%). Η μείωση του τετραπλού συνδυασμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου είναι 51%.

## **5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι μία από τις πιο θανατηφόρες ασθένειες, με μέσο ποσοστό επιβίωσης 5 ετών μικρότερο από 10%. Δυστυχώς, η πλειονότητα των ασθενών έχει μη θεραπεύσιμη, τοπικά προχωρημένη ή μεταστατική νόσο κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Επιπλέον, παραδοσιακές θεραπείες όπως χημειοθεραπεία, η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοβολία δεν έχουν αποδειχθεί ότι βελτιώνουν σημαντικά την επιβίωση. Πρόσφατα, σημειώθηκε μια γρήγορη αύξηση στις θεραπείες για τον καρκίνο που ενσωματώνουν στρατηγικές που βασίζονται σε ανοσοθεραπεία. Τα αποτελέσματα στο μελάνωμα, τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και το καρκίνωμα των νεφρικών κυττάρων είναι πολύ ενθαρρυντικά. Δυστυχώς, η εφαρμογή αναστολέων σημείου ελέγχου, συμπεριλαμβανομένων των αντισωμάτων αντι-CTLA4, αντι-PD-1 και αντι-PD-L1, στον καρκίνο του παγκρέατος ήταν απογοητευτική (Sarantis *et al.*, 2020).

Στα πλαίσια βελτίωσης της θεραπείας του παγκρεατικού καρκίνου αναζητήθηκαν διάφορες λύσεις που μπορούν να συνδυαστούν και το τελικό αποτέλεσμα να είναι η καλύτερη κλινική εικόνα αλλά και η μεγαλύτερη επιβίωση του ασθενούς. Προς αυτήν την κατεύθυνση στην παρούσα διδακτορική μελέτη μελετήθηκε η κυκλοπιροξολαμίνη (Cicloripirox Olamine, CPX). Η CPX έχει επανατοποθετηθεί πρόσφατα ως πιθανός θεραπευτικός παράγοντας για τη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από ανθρώπινη οξεία μυελογενή λευχαιμία (Eberhard *et al.*, 2009), καρκίνο του μαστού, ραβδομυοσάρκωμα και καρκίνο του παχέος εντέρου (Zhou *et al.*, 2010b). Σε προκλινικές μελέτες, οι αντικαρκινικές ιδιότητες της CPX εξαρτώνται τουλάχιστον εν μέρει από τη χηλίωση του ενδοκυτταρικού σιδήρου, με αποτέλεσμα τη διακοπή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου (Chen *et al.*, 2010). Λαμβάνοντας υπόψη τα ευρήματα των πειραμάτων της παρούσης διατριβής, επισημαίνονται τα οφέλη της CPX και διευκρινίζονται πιθανές επιδράσεις και μηχανισμοί της CPX σε μοντέλα καρκίνου του παγκρέατος και σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία αλλά και ανοσοθεραπεία.

Η απόπτωση είναι μια πολύπλοκη ενορχηστρωμένη διαδικασία που ρυθμίζεται αυστηρά από αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bcl-xL και η survivin. (Jain *et al.*,

2013). Η υπερέκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-xL και survivin προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την απόπτωση (Takahashi *et al.*, 2013). Η μελέτη μας δείχνει ότι το CPX μείωσε σημαντικά τα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών. Επιπλέον, η αποπτωτική διαδικασία διαμεσολαβείται από κασπάσες, μια μεγάλη εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης (Gray, Mahrus and Wells, 2010). Πράγματι, η απόπτωση των παγκρεατικών κυττάρων που προκαλείται από την CPX, πραγματοποιείται μέσω του καταρράκτη κασπασών και ειδικά της κασπάσης-3. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν σαφώς, ότι τα κύτταρα που υπέστησαν αγωγή με CPX εξέφρασαν υψηλά επίπεδα διάσπασης της προκασπάσης-3 πιο αποτελεσματικά από τα κύτταρα που έλαβαν γεμισιταβίνη. Επιπλέον, η βιωσιμότητα των κυττάρων και οι κλωνογονικοί προσδιορισμοί υποδηλώνουν ότι η σχετιζόμενη με την CPX καταστολή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ήταν πιο ισχυρή από την καταστολή που σχετίζεται με τη γεμισιταβίνη. Αυτά τα δεδομένα συνάδουν με την ιδέα ότι η μονοθεραπεία CPX προκαλεί σημαντικά υψηλότερο ποσοστό απόπτωσης από τη μονοθεραπεία γεμισιταβίνης. Επιπλέον, η συνδυαστική θεραπεία της CPX και της γεμισιταβίνης μειώνει σημαντικά τη Bcl-xL και τη survivin, που προκάλεσαν απόπτωση κυττάρων καρκίνου του παγκρέατος σε ακόμη υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με τη θεραπεία με ένα φάρμακο. Τέλος, παρατηρήθηκε πως ο συνδυασμός χημειοθεραπείας με ανοσοθεραπεία οδήγησε τις κυτταρικές σειρές σε απόπτωση.

Αυξανόμενες ενδείξεις υποστηρίζουν ότι τα μοντέλα ξενομοσχεύματος ποντικού καρκίνου του παγκρέατος μιμούνται την έντονα προοδευτική φύση του καρκίνου του παγκρέατος (Fox *et al.*, 2016). Οι προκλινικές φαρμακοδυναμικές δοκιμασίες μας εμφάνισαν ανασταλτικές δράσεις ανάπτυξης της CPX στο μέγεθος του όγκου με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση, σε μύες ξενομοσχεύματος BxPc3, PANC-1 και MIA-PACA-2. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η survivin είναι ένας αποτελεσματικός βιολογικός / φαρμακοδυναμικός βιοδείκτης για την απόδειξη της αντικαρκινικής αποτελεσματικότητας της CPX.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η CPX προκάλεσε αυτοφαγία (μια εξελικτικά καταβολική διαδικασία που περιλαμβάνει την αποδόμηση των κυττάρων των δυσλειτουργικών / περιττών συστατικών ενός κυττάρου μέσω του λυσοσωμικού μηχανήματος) μέσω της παραγωγής επιπέδων ROS (Gomez-Lazaro *et*

*al.*, 2007) σε ανθρώπινα κύτταρα με ραβδομυοσάρκωμα (Mah and Ryan, 2012). Αυξανόμενες ενδείξεις υποστηρίζουν επίσης ότι η CPX μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω παραγωγής ROS, ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από την κασπάση δίκτυο μιτοχονδριακού κυτταρικού θανάτου μέσω ενεργοποίησης της p38 (Gomez-Lazaro *et al.*, 2007). Η υπερβολική παραγωγή ROS αλλάζει τη μιτοχονδριακή μορφολογία. Αυτό το γεγονός αντιπροσωπεύει ένα κρίσιμο βήμα για την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτοσόλιο, προκαλώντας την ενεργοποίηση της διασπασμένης κασπάσης 3 (Du *et al.*, 2004). Στη μελέτη μας, παρατηρήσαμε επαγόμενα επίπεδα ROS στην ομάδα που έλαβε CPX σε σύγκριση με τη γεμισταβίνη στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος.

Επιπρόσθετα, έχουμε δείξει *in vitro* ότι η CPX μπορεί να ενισχύσει την κυτταροτοξικότητα της γεμισταβίνης, υποδηλώνοντας ότι η παραγωγή ROS καταστρέφει τα κακοήθη κύτταρα με απόπτωση που προκαλείται από CPX. Διερευνώντας περαιτέρω τον ρόλο της CPX στη δημιουργία ROS σε παγκρεατικούς ιστούς ποντικού, διαπιστώθηκε ότι η CPX αύξησε την παραγωγή ROS σε παγκρεατικούς ιστούς *in vivo*. Επομένως, αυτά τα *in vivo* αποτελέσματα περιγράφουν ότι η CPX μπορεί να είναι μια υποψήφια ουσία για τη βελτίωση της επιβίωσης του οργανισμού από τον καρκίνο του παγκρέατος.

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι ο EGFR (υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα) είναι ένας βασικός ρυθμιστής στην ογκογένεση και την ανάπτυξη όγκου που προκαλείται από διαφοροποίηση, απόπτωση και απόκριση βλάβης στο DNA (Karamouzis, Konstantinopoulos and Papavassiliou, 2009)(Koustas *et al.*, 2017). Η αντίσταση στη γεμισταβίνη συσχετίζεται με την υπερέκφραση του pEGFR και κατά συνέπεια την υπερδιέγερση του δικτύου σηματοδότησης PI3K / AKT (Morgan *et al.*, 2008). Η μελέτη μας διαπίστωσε ότι η CPX ήταν ικανή να μειώσει τον EGFR στα σημεία Y1068 και pAKT (S473) στα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος, τα οποία, διαδοχικά, αναστέλλουν την ανάπτυξη των παγκρεατικών κυττάρων, στο τέλος της *in vivo* θεραπείας. Αυτά τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με τα *in vitro* ευρήματά μας. Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η CPX αυξάνει τη συσσώρευση ROS σε καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος, που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδότησης EGFR / AKT και τελικά, τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

Επιπλέον, η ανοσοθεραπεία φάνηκε πως μειώνει την έκφραση του VEGFR-2 και συνεπώς τη δυνατότητα του όγκου να τρέφεται αλλά και να δημιουργεί μεταστάσεις. Ο συνδυασμός μάλιστα της χημειοθεραπείας μαζί με την ανοσοθεραπεία και τη CPX οδήγησε σε αύξηση σημαντικά μόρια για την ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού και την καταπολέμηση του όγκου. Ένα από αυτά είναι η IFN- $\gamma$  που επιτίθεται στους όγκους αλλά και δημιουργεί ισχαιμία σε αυτούς. Πιθανότατα, ο μηχανισμός που πραγματοποιείται η αύξηση της IFN- $\gamma$  είναι δια μέσου της αύξησης των CD8<sup>+</sup> κυττάρων, καθώς αυτά είναι που την παράγουν (Ni and Lu, 2018). Διαπιστώθηκε μέσα από μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής πως υπάρχει αύξηση των CD8<sup>+</sup> κυττάρων που έχουν την ικανότητα να επιτίθενται και να εξουδετερώνουν τους όγκους (Gao *et al.*, 2016).

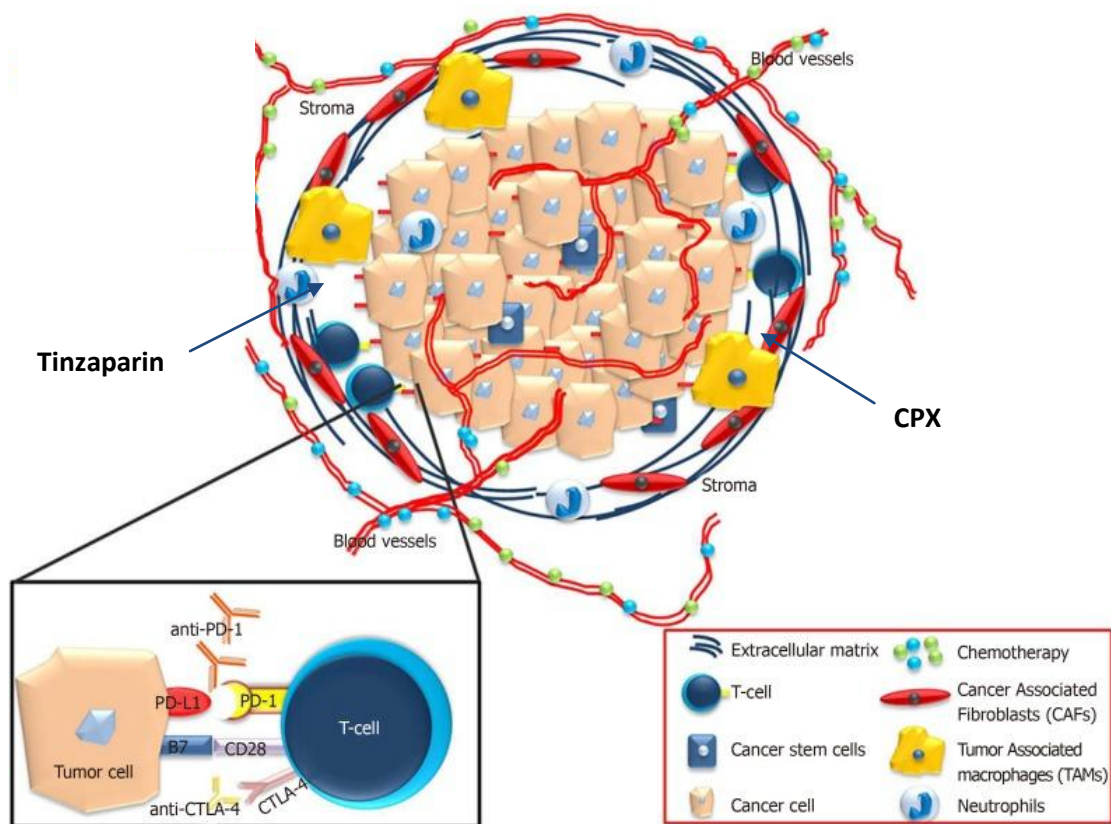
Πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα Tregs, μια κατηγορία CD4<sup>+</sup> κυττάρων τα οποία ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και προλαμβάνουν τα αυτοάνοσα νοσήματα από τη στιγμή που δρουν ως ανοσοκαταστολείς (Wang, Franco and Ho, 2017). Στον καρκίνο έχουν διπλό ρόλο μιας και σε καρκίνους όπως του παχέος εντέρου που είναι ενεργοποιητής η φλεγμονή, η παρουσία τους είναι επιθυμητή καθώς μειώνει την φλεγμονή και κατά συνέπεια τον όγκο. Αντίθετα, σε όγκους όπως του παγκρέατος, των νεφρών και του μαστού, η παρουσία των Tregs στο TME είναι αρνητική για τον ασθενή διότι προκαλεί ανοσοκαταστολή με αποτέλεσμα να μην μπορεί ο οργανισμός να επιτεθεί και να εξουδετερώσει τον όγκο. Στην παρούσα διατριβή φάνηκε πως οι συνδυαστικοί συνδυασμοί και μάλιστα ο τετραπλός (G + N/P + IPI + CPX) μείωνε κατά 2,5 φορές το ποσοστό των Tregs.

Τα *in vivo* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε humanized NOD/SCID μύες χρησιμοποιώντας χημειοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και CPX συμφωνούν με τα προηγούμενα ευρήματά μας. Οι συνδυαστικές θεραπείες και μάλιστα ο τετραπλός συνδυασμός επιφέρει μείωση στον όγκο και συνεπώς μεγαλύτερη επιβίωση στους μύες. Άρα, μερικοί από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλονται τα σημαντικά *in vivo* αποτελέσματα, είναι η αύξηση της IFN- $\gamma$ , η αύξηση των CD8<sup>+</sup> κυττάρων, η μείωση των Tregs κυττάρων, η μείωση της έκφρασης του VEGFR-2 και η αύξηση της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα.

Τη σημασία της ανοσοθεραπείας επιβεβαιώνει και η δράση της τινζαπαρίνης. Από τα *in vitro* και *in vivo* πειράματα συνδυαστικής δράσης ανοσοθεραπείας και

τινζαπαρίνης διαπιστώθηκε πως υπάρχει μείωση των καρκινικών κυττάρων ή μείωση του μεγέθους των όγκων, αντίστοιχα. Αυτό συμβαίνει γιατί φαίνεται πως ξεπερνιέται το εμπόδιο του TME λόγω των επιμέρους αντινεοπλασματικών χαρακτηριστικών της τινζαπαρίνης (Bokas *et al.*, 2020) με συνέπεια να μπορούν να εισχωρήσουν οι θεραπευτικές ουσίες στον όγκο και να το εξουδετερώσουν. Ένα από αυτά τα χαρακτηριστικά, η μείωση της έκφρασης του VEGFR-2 επιβεβαιώθηκε από τα πειράματα της διατριβής.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, προτείνεται πως η συνδυαστική θεραπεία με τη συμμετοχή της ανοσοθεραπείας έχει προφανώς υψηλότερη αντινεοπλασματική επίδραση, υποδηλώνοντας μια συνεργιστική δράση. Αυτή η συνεργιστική στρατηγική μπορεί να δημιουργήσει νέους δρόμους για την αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος, επιτυγχάνοντας καλύτερη κλινική εικόνα αλλά και μεγαλύτερη επιβίωση (Εικόνα 41).



**Εικόνα 41:** Το μικροπεριβάλλον του παγκρεατικού καρκίνου, αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για την αποτελεσματική εφαρμογή φαρμάκων χημειοθεραπείας ή της ανοσοθεραπείας. Οι συνδυασμένες θεραπείες χημειοθεραπείας, ανοσοθεραπείας, CPX, τινζαπαρίνης θα μπορούσαν να

καταστήσουν το μικροπεριβάλλον του παγκρεατικού καρκίνου πιο ευάλωτο και να αποτελέσουν αποτελεσματικές στρατηγικές θεραπείας.



## **6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Abbruzzese, J. L. (2008) 'Adjuvant therapy for surgically resected pancreatic adenocarcinoma', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 5 March, pp. 1066–1067. doi: 10.1001/jama.299.9.1066.
- Abraham, S. *et al.* (2015) 'A Rac/Cdc42 exchange factor complex promotes formation of lateral filopodia and blood vessel lumen morphogenesis.', *Nature communications*. Nature Publishing Group, 6, p. 7286. doi: 10.1038/ncomms8286.
- Adamska, A., Domenichini, A. and Falasca, M. (2017) 'Pancreatic ductal adenocarcinoma: Current and evolving therapies', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms18071338.
- von Ahrens, D. *et al.* (2017) 'The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer.', *Journal of hematology & oncology*. BioMed Central Ltd., 10(1), p. 76. doi: 10.1186/s13045-017-0448-5.
- Al-Batran, S.-E. *et al.* (2014) 'Nab-paclitaxel for metastatic pancreatic cancer: clinical outcomes and potential mechanisms of action.', *Oncology research and treatment*. S. Karger AG, 37(3), pp. 128–34. doi: 10.1159/000358890.
- Albuquerque, R. J. C. *et al.* (2009) 'Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth.', *Nature medicine*, 15(9), pp. 1023–30. doi: 10.1038/nm.2018.
- Aliru, M. L. *et al.* (2018) 'Radiation therapy and immunotherapy: What is the optimal timing or sequencing?', *Immunotherapy*. Future Medicine Ltd., pp. 299–316. doi: 10.2217/imt-2017-0082.
- Alitalo, K. and Carmeliet, P. (2002) 'Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease', *Cancer Cell*. Cell Press, pp. 219–227. doi: 10.1016/S1535-6108(02)00051-X.
- Alpermann, H. G. and Schütz, E. (1981) '[Studies on the pharmacology and toxicology of ciclopiroxolamine (author's transl)].', *Arzneimittel-Forschung*, 31(8A), pp. 1328–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7197539> (Accessed: 24 April 2020).
- Amedei, A. *et al.* (2013) 'Ex vivo analysis of pancreatic cancer-infiltrating T lymphocytes reveals that ENO-specific Tregs accumulate in tumor tissue and inhibit Th1/Th17 effector cell functions.', *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 62(7), pp. 1249–60. doi: 10.1007/s00262-013-1429-3.
- Amirkhosravi, A. *et al.* (2003) 'Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(9), pp. 1972–1976. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00341.x.
- Amrutkar, M. and Gladhaug, Ivar P (2017) 'Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine.', *Cancers*. MDPI AG, 9(11). doi: 10.3390/cancers9110157.

- Amrutkar, M. and Gladhaug, Ivar P. (2017) 'Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine', *Cancers*. MDPI AG. doi: 10.3390/cancers9110157.
- Awasthi, N. *et al.* (2013) 'Comparative benefits of nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer', *Carcinogenesis*, 34(10), pp. 2361–2369. doi: 10.1093/carcin/bgt227.
- Ballmer-Hofer, K. *et al.* (2011) 'Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output.', *Blood*, 118(3), pp. 816–26. doi: 10.1182/blood-2011-01-328773.
- Barceló, C. *et al.* (2014) 'Phosphorylation at Ser-181 of oncogenic KRAS is required for tumor growth.', *Cancer research*, 74(4), pp. 1190–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1750.
- Bardeesy, N. and DePinho, R. A. (2002) 'Pancreatic cancer biology and genetics', *Nature Reviews Cancer*, pp. 897–909. doi: 10.1038/nrc949.
- Barry, D. M. *et al.* (2015) 'Cdc42 is required for cytoskeletal support of endothelial cell adhesion during blood vessel formation in mice', *Development (Cambridge)*. Company of Biologists Ltd, 142(17), pp. 3058–3070. doi: 10.1242/dev.125260.
- Beatty, G. L. *et al.* (2011) 'CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans', *Science*, 331(6024), pp. 1612–1616. doi: 10.1126/science.1198443.
- Beatty, G. L. (2014) 'Engineered chimeric antigen receptor-expressing T cells for the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Oncolmmunology*. Landes Bioscience, 3(4). doi: 10.4161/onci.28327.
- Beatty, G. L. and Gladney, W. L. (2015) 'Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy', *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., pp. 687–692. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1860.
- Benedito, R. *et al.* (2012) 'Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling.', *Nature*, 484(7392), pp. 110–4. doi: 10.1038/nature10908.
- Binenbaum, Y., Na'Ara, S. and Gil, Z. (2015) 'Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma', *Drug Resistance Updates*. Churchill Livingstone, 23, pp. 55–68. doi: 10.1016/j.drup.2015.10.002.
- Bochenek, J., Püsküllüoğlu, M. and Krzemieniecki, K. (2013) 'The antineoplastic effect of lowmolecularweight heparinsa literature review', *Wspolczesna Onkologia*, pp. 6–13. doi: 10.5114/wo.2013.33766.
- Bokas, A. *et al.* (2020) 'Mechanisms of the antitumor activity of low molecular weight heparins in pancreatic adenocarcinomas', *Cancers*. MDPI AG. doi: 10.3390/cancers12020432.
- Borghaei, H. *et al.* (2015) 'Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer', *New England Journal of Medicine*. Massachussetts Medical Society, 373(17), pp. 1627–1639. doi: 10.1056/NEJMoa1507643.
- Bournet, B. *et al.* (2016) 'Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities.', *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. Elsevier Ltd, 54, pp. 75–83. doi: 10.1016/j.ejca.2015.11.012.

Carlson-Banning, K. M. *et al.* (2013) 'Toward Repurposing Ciclopirox as an Antibiotic against Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*', *PLoS ONE*, 8(7). doi: 10.1371/journal.pone.0069646.

Castellano, E. and Santos, E. (2011) 'Functional specificity of Ras isoforms: So similar but so different', *Genes and Cancer*, 2(3), pp. 216–231. doi: 10.1177/1947601911408081.

Castelli, R., Porro, F. and Tarsia, P. (2004) 'The heparins and cancer: Review of clinical trials and biological properties', *Vascular Medicine*, pp. 205–213. doi: 10.1191/1358863x04vm566ra.

Chalhoub, N. and Baker, S. J. (2009) 'PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Annual Reviews, 4(1), pp. 127–150. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311.

Chang, E. B. and Leung, P. S. (2014) 'Pancreatic physiology', in *The Gastrointestinal System: Gastrointestinal, Nutritional and Hepatobiliary Physiology*. Springer Netherlands, pp. 87–105. doi: 10.1007/978-94-017-8771-0\_4.

Chen, Y. W. *et al.* (2010) 'Inorganic mercury causes pancreatic beta-cell death via the oxidative stress-induced apoptotic and necrotic pathways.', *Toxicology and applied pharmacology*, 243(3), pp. 323–31. doi: 10.1016/j.taap.2009.11.024.

Cheng, X. *et al.* (2016) 'Methylisoidigo preferentially kills cancer stem cells by interfering cell metabolism via inhibition of LKB1 and activation of AMPK in PDACs', *Molecular Oncology*. Elsevier B.V., 10(6), pp. 806–824. doi: 10.1016/j.molonc.2016.01.008.

Collins, C. and Tzima, E. (2014) 'Rac[e] to the pole: setting up polarity in endothelial cells.', *Small GTPases*, 5, p. e28650. doi: 10.4161/sgtp.28650.

Collins, M. A. and di Magliano, M. P. (2014) 'Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer', *Frontiers in Physiology*. doi: 10.3389/fphys.2013.00407.

Collisson, E. A. *et al.* (2012) 'A central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma.', *Cancer discovery*, 2(8), pp. 685–93. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0347.

Corbo, V., Tortora, G. and Scarpa, A. (2012) 'Molecular Pathology of Pancreatic Cancer: From Bench-to-Bedside Translation', *Current Drug Targets*. Bentham Science Publishers Ltd., 13(6), pp. 744–752. doi: 10.2174/138945012800564103.

Cowan, R. W. and Maitra, A. (2014) 'Genetic progression of pancreatic cancer.', *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. Lippincott Williams and Wilkins, 20(1), pp. 80–4. doi: 10.1097/PPO.000000000000011.

Craven, K. E. *et al.* (2016) 'Angiogenic gene signature in human pancreatic cancer correlates with TGF-beta and inflammatory transcriptomes', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 7(1), pp. 323–341. doi: 10.18632/ONCOTARGET.6345.

Cudmore, M. J. *et al.* (2012) 'The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis.', *Nature communications*, 3, p. 972. doi: 10.1038/ncomms1977.

Cunningham, D. *et al.* (2009) 'Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer', *Journal of*

- Clinical Oncology*, 27(33), pp. 5513–5518. doi: 10.1200/JCO.2009.24.2446.
- Decker, W. K. *et al.* (2017) 'Cancer immunotherapy: Historical perspective of a clinical revolution and emerging preclinical animal models', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2017.00829.
- Deer, E. L. *et al.* (2010) 'Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines', *Pancreas*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 425–435. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181c15963.
- Dihazi, G. H. *et al.* (2013) 'Impact of the antiproliferative agent ciclopirox olamine treatment on stem cells proteome.', *World journal of stem cells*. Baishideng Publishing Group Inc., 5(1), pp. 9–25. doi: 10.4252/wjsc.v5.i1.9.
- Dijkgraaf, E. M. *et al.* (2013) 'Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting m2 macrophages in the tumor microenvironment', *Cancer Research*, 73(8), pp. 2480–2492. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3542.
- Dixon, S. J. and Stockwell, B. R. (2014) 'The role of iron and reactive oxygen species in cell death', *Nature Chemical Biology*, pp. 9–17. doi: 10.1038/nchembio.1416.
- Dolovich, L. R. *et al.* (2000) 'A meta-analysis comparing low-molecular-weight heparins with unfractionated heparin in the treatment of venous thromboembolism: Examining some unanswered questions regarding location of treatment, product type, and dosing frequency', *Archives of Internal Medicine*. American Medical Association, 160(2), pp. 181–188. doi: 10.1001/archinte.160.2.181.
- Dougan, S. K. (2017) 'The pancreatic cancer microenvironment', *Cancer Journal (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 321–325. doi: 10.1097/PPO.0000000000000288.
- Du, J. *et al.* (2004) 'Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions', *Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation, 113(1), pp. 115–123. doi: 10.1172/JCI18330.
- Dubrac, A. *et al.* (2016) 'Targeting NCK-Mediated Endothelial Cell Front-Rear Polarity Inhibits Neovascularization.', *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, 133(4), pp. 409–21. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017537.
- Dumont, D. J. *et al.* (1998) 'Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3.', *Science (New York, N.Y.)*, 282(5390), pp. 946–9. doi: 10.1126/science.282.5390.946.
- Eberhard, Y. *et al.* (2009) 'Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopirox olamine induces cell death in leukemia and myeloma cells', *Blood*, 114(14), pp. 3064–3073. doi: 10.1182/blood-2009-03-209965.
- Eric, L. *et al.* (2011) 'A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma: A phase II trial of safety, efficacy, and immune activation', *Annals of Surgery*, 253(2), pp. 328–335. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181fd271c.
- Erkan, M. *et al.* (2012) 'The role of stroma in pancreatic cancer: Diagnostic and therapeutic implications', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, pp. 454–467. doi: 10.1038/nrgastro.2012.115.

- Erkan, M. (2013) 'Understanding the stroma of pancreatic cancer: Co-evolution of the microenvironment with epithelial carcinogenesis', *Journal of Pathology*, pp. 4–7. doi: 10.1002/path.4213.
- Eser, S. *et al.* (2014) 'Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 817–822. doi: 10.1038/bjc.2014.215.
- Evan, G. I. *et al.* (2017) 'Re-engineering the pancreas tumor microenvironment: A "regenerative program" hacked', *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 23(7), pp. 1647–1655. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3275.
- Fares, C. M. *et al.* (2019) 'Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients?', *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. American Society of Clinical Oncology (ASCO), (39), pp. 147–164. doi: 10.1200/edbk\_240837.
- Feig, C. *et al.* (2012) 'The pancreas cancer microenvironment', *Clinical Cancer Research*, pp. 4266–4276. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3114.
- Fischer, C. *et al.* (2008) 'FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?', *Nature reviews. Cancer*, 8(12), pp. 942–56. doi: 10.1038/nrc2524.
- Foley, K. *et al.* (2016) 'Current progress in immunotherapy for pancreatic cancer', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 244–251. doi: 10.1016/j.canlet.2015.12.020.
- Fong, G. H. *et al.* (1995) 'Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium.', *Nature*, 376(6535), pp. 66–70. doi: 10.1038/376066a0.
- Fox, R. G. *et al.* (2016) 'Image-based detection and targeting of therapy resistance in pancreatic adenocarcinoma', *Nature*. Nature Publishing Group, 534(7607), pp. 407–411. doi: 10.1038/nature17988.
- Fukumura, D. *et al.* (2001) 'Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), pp. 2604–9. doi: 10.1073/pnas.041359198.
- Galvagni, F. *et al.* (2010) 'Endothelial cell adhesion to the extracellular matrix induces c-Src-dependent VEGFR-3 phosphorylation without the activation of the receptor intrinsic kinase activity.', *Circulation research*, 106(12), pp. 1839–48. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206326.
- Gao, J. *et al.* (2016) 'Loss of IFN- $\gamma$  Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy', *Cell*. Cell Press, 167(2), pp. 397-404.e9. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.069.
- Gardner, E. R. *et al.* (2008) 'Randomized crossover pharmacokinetic study of solvent-based paclitaxel and nab-paclitaxel.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(13), pp. 4200–5. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4592.
- Gavard, J. and Gutkind, J. S. (2006) 'VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin.', *Nature cell biology*, 8(11), pp. 1223–34. doi: 10.1038/ncb1486.
- Gomez-Lazaro, M. *et al.* (2007) 'Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response

to malonate.', *Molecular pharmacology*, 71(3), pp. 736–43. doi: 10.1124/mol.106.030718.

Gonçalves, A. *et al.* (2012) 'BAYPAN study: a double-blind phase III randomized trial comparing gemcitabine plus sorafenib and gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer.', *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 23(11), pp. 2799–805. doi: 10.1093/annonc/mds135.

Gonzalez, H., Hagerling, C. and Werb, Z. (2018) 'Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression', *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1267–1284. doi: 10.1101/GAD.314617.118.

Grabocka, E. *et al.* (2014) 'Wild-type H- and N-Ras promote mutant K-Ras-driven tumorigenesis by modulating the DNA damage response.', *Cancer cell*, 25(2), pp. 243–56. doi: 10.1016/j.ccr.2014.01.005.

Gray, D. C., Mahrus, S. and Wells, J. A. (2010) 'Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease', *Cell*, 142(4), pp. 637–646. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.014.

Grünewald, F. S. *et al.* (2010) 'Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, pp. 567–580. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.09.002.

Guerra, C. and Barbacid, M. (2013) 'Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma', *Molecular Oncology*. John Wiley and Sons Ltd, pp. 232–247. doi: 10.1016/j.molonc.2013.02.002.

Haeberle, L. and Esposito, I. (2019) 'Pathology of pancreatic cancer', *Translational Gastroenterology and Hepatology*. AME Publishing Company. doi: 10.21037/tgh.2019.06.02.

Han, Z. *et al.* (2012) 'MicroRNA-622 functions as a tumor suppressor by targeting K-ras and enhancing the anticarcinogenic effect of resveratrol', *Carcinogenesis*, 33(1), pp. 131–139. doi: 10.1093/carcin/bgr226.

Hatley, M. E. *et al.* (2010) 'Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21', *Cancer Cell*. Cell Press, 18(3), pp. 282–293. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.013.

Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961) 'The serial cultivation of human diploid cell strains', *Experimental Cell Research*. Academic Press, 25(3), pp. 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

Heinemann, V. *et al.* (2014) 'Tumour-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma: rationale and current evidence for new therapeutic strategies.', *Cancer treatment reviews*, 40(1), pp. 118–28. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.04.004.

Helmy, K. Y. *et al.* (2013) 'Cancer immunotherapy: Accomplishments to date and future promise', *Therapeutic Delivery*, pp. 1307–1320. doi: 10.4155/tde.13.88.

Hilmi, M., Bartholin, L. and Neuzillet, C. (2018) 'Immune therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma: Where are we now?', *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited, pp. 2137–2151. doi: 10.3748/wjg.v24.i20.2137.

Von Hoff, D. D. *et al.* (2011) 'Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: A phase I/II trial', *Journal of Clinical Oncology*, 29(34), pp. 4548–4554. doi: 10.1200/JCO.2011.36.5742.

- Holmqvist, K. *et al.* (2004) 'The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration.', *The Journal of biological chemistry*, 279(21), pp. 22267–75. doi: 10.1074/jbc.M312729200.
- Hoogwater, F. J. H. *et al.* (2010) 'Oncogenic K-Ras turns death receptors into metastasis-promoting receptors in human and mouse colorectal cancer cells.', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 138(7), pp. 2357–67. doi: 10.1053/j.gastro.2010.02.046.
- Huang, P. Y. *et al.* (2016) 'Tumor CTLA-4 overexpression predicts poor survival in patients with nasopharyngeal carcinoma', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 7(11), pp. 13060–13068. doi: 10.18632/oncotarget.7421.
- Iovanna, J. *et al.* (2012) 'Current knowledge on pancreatic cancer', *Frontiers in Oncology*, p. 6. doi: 10.3389/fonc.2012.00006.
- Jaffee, E. M. *et al.* (2001) 'Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: A phase I trial of safety and immune activation', *Journal of Clinical Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins, 19(1), pp. 145–156. doi: 10.1200/JCO.2001.19.1.145.
- Jaffee, E. M. *et al.* (2002) 'Focus on pancreas cancer', *Cancer Cell*. Cell Press, pp. 25–28. doi: 10.1016/S1535-6108(02)00093-4.
- Jain, M. V. *et al.* (2013) 'Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: Implications for cancer therapy development', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, pp. 12–29. doi: 10.1111/jcmm.12001.
- Jakobsson, L. *et al.* (2006) 'Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis.', *Developmental cell*, 10(5), pp. 625–34. doi: 10.1016/j.devcel.2006.03.009.
- Jennings, R. E. *et al.* (2015) 'Human pancreas development', *Development (Cambridge)*. Company of Biologists Ltd, pp. 3126–3137. doi: 10.1242/dev.120063.
- Jimenez, C. *et al.* (2002) 'The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras.', *The Journal of biological chemistry*, 277(44), pp. 41556–62. doi: 10.1074/jbc.M205893200.
- Johansen, K. B. and Balchen, T. (2013) 'Tinzaparin and other low-molecular-weight heparins: what is the evidence for differential dependence on renal clearance?', *Experimental Hematology & Oncology*. Springer Science and Business Media LLC, 2(1). doi: 10.1186/2162-3619-2-21.
- Jones, S. *et al.* (2008) 'Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses', *Science*, 321(5897), pp. 1801–1806. doi: 10.1126/science.1164368.
- Kamath, S. D. *et al.* (2019) 'Ipilimumab and Gemcitabine for Advanced Pancreatic Cancer: A Phase Ib Study', *The Oncologist*. Alphamed Press. doi: 10.1634/theoncologist.2019-0473.
- Kamerkar, S. *et al.* (2017) 'Exosomes-KRAS-panc cancer', *Nature*. Nature Publishing Group, 546(7659), pp. 498–503. doi: 10.1038/nature22341.
- Kamisawa, T. *et al.* (2016) 'Pancreatic cancer', *The Lancet*. Lancet Publishing Group, pp. 73–85. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00141-0.



- Kappas, N. C. *et al.* (2008) 'The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching.', *The Journal of cell biology*, 181(5), pp. 847–58. doi: 10.1083/jcb.200709114.
- Karakhanova, S. *et al.* (2015) 'Characterization of myeloid leukocytes and soluble mediators in pancreatic cancer: importance of myeloid-derived suppressor cells.', *Oncoimmunology*. Taylor and Francis Inc., 4(4), p. e998519. doi: 10.1080/2162402X.2014.998519.
- Karamouzis, M. V, Konstantinopoulos, P. A. and Papavassiliou, A. G. (2009) 'Targeting MET as a strategy to overcome crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors.', *The Lancet Oncology*, 10(7), pp. 709–17. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70137-8.
- Karar, J. and Maity, A. (2011) 'PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis', *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media SA, 4, p. 51. doi: 10.3389/fnmol.2011.00051.
- Kellner, H. M. *et al.* (1981) '[Pharmacokinetics and biotransformation of the antimycotic drug ciclopiroxolamine in animals and man after topical and systemic administration].', *Arzneimittel-Forschung*, 31(8A), pp. 1337–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7197541> (Accessed: 24 April 2020).
- Kim, S. S., Shin, H. C. and Hwang, J. A. (2019) 'Various Congenital Abnormalities and Anatomic Variants of the Pancreas: A Pictorial Review', *Journal of the Belgian Society of Radiology*. Ubiquity Press, Ltd., 103(1). doi: 10.5334/jbsr.1780.
- Kitamura, T., Qian, B. Z. and Pollard, J. W. (2015) 'Immune cell promotion of metastasis', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 73–86. doi: 10.1038/nri3789.
- Kleeff, J. *et al.* (2016) 'Pancreatic cancer', *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group, 2. doi: 10.1038/nrdp.2016.22.
- Klöppel, G. (2011) 'Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms', *Endocrine-Related Cancer*, 18(SUPPL. 1), pp. S1-16. doi: 10.1530/ERC-11-0013.
- Koch, S. *et al.* (2011) 'Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors', *Biochemical Journal*, pp. 169–183. doi: 10.1042/BJ20110301.
- Koustas, E. *et al.* (2017) 'Co-targeting of EGFR and autophagy signaling is an emerging treatment strategy in metastatic colorectal cancer.', *Cancer letters*. Elsevier Ireland Ltd, 396, pp. 94–102. doi: 10.1016/j.canlet.2017.03.023.
- Koustas, E. *et al.* (2019) 'The interplay of autophagy and tumor microenvironment in colorectal cancer—ways of enhancing immunotherapy action', *Cancers*. MDPI AG, 11(4). doi: 10.3390/cancers11040533.
- Kulenović, A. and Sarač-Hadžihalilović, A. (2010) 'Blood vessels distribution in body and tail of pancreas - A comparative study of age related variation', *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. Association of Basic Medical Sciences of FBiH, 10(2), pp. 89–93. doi: 10.17305/bjbms.2010.2700.
- Labori, K. J. *et al.* (2016) 'Impact of early disease progression and surgical complications on adjuvant chemotherapy completion rates and survival in patients undergoing the surgery first approach for resectable pancreatic ductal adenocarcinoma - A population-based cohort study', *Acta Oncologica*. Taylor and Francis Ltd, 55(3), pp. 265–277. doi: 10.3109/0284186X.2015.1068445.

- Labrecque, L. *et al.* (2003) 'Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol', *Molecular Biology of the Cell*, 14(1), pp. 334–347. doi: 10.1091/mbc.E02-07-0379.
- Lamallice, L., Houle, F. and Huot, J. (2006) 'Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF.', *The Journal of biological chemistry*, 281(45), pp. 34009–20. doi: 10.1074/jbc.M603928200.
- Lampugnani, M. G. *et al.* (2006) 'Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments.', *The Journal of cell biology*, 174(4), pp. 593–604. doi: 10.1083/jcb.200602080.
- Lanahan, A. *et al.* (2013) 'The neuropilin 1 cytoplasmic domain is required for VEGF-A-dependent arteriogenesis.', *Developmental cell*, 25(2), pp. 156–68. doi: 10.1016/j.devcel.2013.03.019.
- Le, D. T. *et al.* (2013) 'Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer', *Journal of Immunotherapy*, 36(7), pp. 382–389. doi: 10.1097/CJI.0b013e31829fb7a2.
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. (2010) 'Cell signaling by receptor tyrosine kinases', *Cell*, pp. 1117–1134. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
- Lièvre, A. *et al.* (2006) 'KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer', *Cancer Research*, 66(8), pp. 3992–3995. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0191.
- Lindberg, J. M. *et al.* (2014) 'Co-treatment with panitumumab and trastuzumab augments response to the MEK inhibitor trametinib in a patient-derived xenograft model of pancreatic cancer.', *Neoplasia (New York, N.Y.)*. Elsevier Inc., 16(7), pp. 562–71. doi: 10.1016/j.neo.2014.06.004.
- Liu, Ruilei *et al.* (2015) 'Hsa-miR-1 suppresses breast cancer development by down-regulating K-ras and long non-coding RNA MALAT1.', *International journal of biological macromolecules*. Elsevier B.V., 81, pp. 491–7. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.08.016.
- Longnecker, D. (2014) 'Anatomy and Histology of the Pancreas', *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*. Michigan Publishing, University of Michigan Library, pp. 1–26. doi: 10.3998/panc.2014.3.
- Lyman, G. H. (2009) 'Thromboprophylaxis with low-molecular-weight heparin in medical patients with cancer', *Cancer*, pp. 5637–5650. doi: 10.1002/cncr.24665.
- Di Magliano, M. P. and Logsdon, C. D. (2013) 'Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 144(6), pp. 1220–1229. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.071.
- Mah, L. Y. and Ryan, K. M. (2012) 'Autophagy and cancer', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a008821.
- Mäkinen, T. *et al.* (2001) 'Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3', *EMBO Journal*, 20(17), pp. 4762–4773. doi: 10.1093/emboj/20.17.4762.

- Makohon-Moore, A., Brosnan, J. A. and Iacobuzio-Donahue, C. A. (2013) 'Pancreatic cancer genomics: insights and opportunities for clinical translation.', *Genome medicine*, 5(3), p. 26. doi: 10.1186/gm430.
- Marcotte, R. *et al.* (2012) 'Essential gene profiles in breast, pancreatic, and ovarian cancer cells', *Cancer Discovery*, 2(2), pp. 172–189. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0224.
- Matsumoto, T. *et al.* (2005) 'VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis.', *The EMBO journal*, 24(13), pp. 2342–53. doi: 10.1038/sj.emboj.7600709.
- Maude, S. L. *et al.* (2014) 'Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 371(16), pp. 1507–1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
- Mayo, S. C. *et al.* (2012) 'Conditional survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma resected with curative intent.', *Cancer*, 118(10), pp. 2674–81. doi: 10.1002/cncr.26553.
- McCubrey, J. A. *et al.* (2012) 'Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, pp. 954–987. doi: 10.18632/oncotarget.652.
- Miller, K. D. *et al.* (2016) 'Cancer treatment and survivorship statistics, 2016', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. Wiley, 66(4), pp. 271–289. doi: 10.3322/caac.21349.
- Minden, M. D. *et al.* (2014) 'Oral ciclopirox olamine displays biological activity in a phase I study in patients with advanced hematologic malignancies.', *American journal of hematology*. Wiley-Liss Inc., 89(4), pp. 363–8. doi: 10.1002/ajh.23640.
- Mini, E. *et al.* (2006) 'Cellular pharmacology of gemcitabine.', *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 17 Suppl 5, pp. v7-12. doi: 10.1093/annonc/mdj941.
- Morgan, M. A. *et al.* (2008) 'The combination of epidermal growth factor receptor inhibitors with gemcitabine and radiation in pancreatic cancer', *Clinical Cancer Research*, 14(16), pp. 5142–5149. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4072.
- Morisset, J. (2014) 'Seventy years of pancreatic physiology take a look back', *Pancreas*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1172–1184. doi: 10.1097/MPA.0000000000000226.
- Morrison, D. K. and Davis, R. J. (2003) 'Regulation of MAP Kinase Signaling Modules by Scaffold Proteins in Mammals', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annual Reviews, 19(1), pp. 91–118. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111401.091942.
- Motzer, R. J. *et al.* (2019) 'Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: extended follow-up of efficacy and safety results from a randomised, controlled, phase 3 trial', *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group, 20(10), pp. 1370–1385. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30413-9.
- Mousa, S. A. (2004) 'Low-molecular-weight heparins in thrombosis and cancer: Emerging links', *Cardiovascular Drug Reviews*, pp. 121–134. doi: 10.1111/j.1527-3466.2004.tb00135.x.
- Mousa, S. A. and Petersen, L. J. (2009) 'Anti-cancer properties of low-molecular-weight heparin: Preclinical evidence', *Thrombosis and Haemostasis*, pp. 258–267. doi:

10.1160/TH08-12-0832.

Neuzillet, C. *et al.* (2013a) 'Targeting the Ras-ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma.', *Cancer metastasis reviews*, 32(1–2), pp. 147–62. doi: 10.1007/s10555-012-9396-2.

Neuzillet, C. *et al.* (2013b) 'Targeting the Ras-ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma', *Cancer and Metastasis Reviews*, pp. 147–162. doi: 10.1007/s10555-012-9396-2.

Ni, L. and Lu, J. (2018) 'Interferon gamma in cancer immunotherapy', *Cancer Medicine*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 4509–4516. doi: 10.1002/cam4.1700.

Nilsson, I. *et al.* (2010) 'VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts.', *The EMBO journal*, 29(8), pp. 1377–88. doi: 10.1038/emboj.2010.30.

Nomi, T. *et al.* (2007) 'Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(7), pp. 2151–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2746.

Normanno, N. *et al.* (2009) 'Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC', *Nature Reviews Clinical Oncology*, pp. 519–527. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.111.

Nywening, T. M. *et al.* (2016) 'Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: A single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial', *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group, 17(5), pp. 651–662. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00078-4.

Ohaegbulam, K. C. *et al.* (2015) 'Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway', *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd, pp. 24–33. doi: 10.1016/j.molmed.2014.10.009.

Oldfield, L. E., Connor, A. A. and Gallinger, S. (2017) 'Molecular Events in the Natural History of Pancreatic Cancer', *Trends in Cancer*. Cell Press, pp. 336–346. doi: 10.1016/j.trecan.2017.04.005.

Olive, K. P. *et al.* (2009) 'Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer', *Science*, 324(5933), pp. 1457–1461. doi: 10.1126/science.1171362.

Oliver, A. J. *et al.* (2018) 'Tissue-dependent tumor microenvironments and their impact on immunotherapy responses', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2018.00070.

del a Paz, N. G., Melchior, B. and Frangos, J. A. (2013) 'Early VEGFR2 activation in response to flow is VEGF-dependent and mediated by MMP activity.', *Biochemical and biophysical research communications*. Academic Press Inc., 434(3), pp. 641–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.134.

Pio, R. *et al.* (2019) 'Complementing the cancer-immunity cycle', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2019.00774.

Porta, M. *et al.* (2005) 'Exocrine pancreatic cancer: Symptoms at presentation and their

relation to tumour site and stage', *Clinical and Translational Oncology*, 7(5), pp. 189–197. doi: 10.1007/BF02712816.

Potente, M., Gerhardt, H. and Carmeliet, P. (2011) 'Basic and therapeutic aspects of angiogenesis', *Cell*, pp. 873–887. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039.

Pothula, S. P. *et al.* (2016) 'Key role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 194–200. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.035.

Powles, T. *et al.* (2018) 'Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial', *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 391(10122), pp. 748–757. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33297-X.

Prior, I. A., Lewis, P. D. and Mattos, C. (2012) 'A comprehensive survey of ras mutations in cancer', *Cancer Research*, pp. 2457–2467. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.

Provenzano, P. P. *et al.* (2012) 'Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Cancer Cell*, 21(3), pp. 418–429. doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.007.

Rahimi, N., Dayanir, V. and Lashkari, K. (2000) 'Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells.', *The Journal of biological chemistry*, 275(22), pp. 16986–92. doi: 10.1074/jbc.M000528200.

Rhim, A. D. *et al.* (2014) 'Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma', *Cancer Cell*. Cell Press, 25(6), pp. 735–747. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.021.

Roskoski, R. (2007) 'Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, pp. 179–213. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.01.006.

Rougier, P. *et al.* (2013) 'Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer.', *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(12), pp. 2633–42. doi: 10.1016/j.ejca.2013.04.002.

Ruan, G.-X. and Kazlauskas, A. (2013) 'Lactate engages receptor tyrosine kinases Axl, Tie2, and vascular endothelial growth factor receptor 2 to activate phosphoinositide 3-kinase/Akt and promote angiogenesis.', *The Journal of biological chemistry*, 288(29), pp. 21161–72. doi: 10.1074/jbc.M113.474619.

Rubinfeld, H. and Seger, R. (2005) 'The ERK cascade: A prototype of MAPK signaling', *Molecular Biotechnology*, pp. 151–174. doi: 10.1385/MB:31:2:151.

Rucki, A. A. *et al.* (2017) 'Heterogeneous stromal signaling within the tumor microenvironment controls the metastasis of pancreatic cancer', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 77(1), pp. 41–52. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1383.

Rueff, J. and Rodrigues, A. S. (2016) 'Cancer Drug Resistance: A Brief Overview from a Genetic Viewpoint.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Humana Press Inc., 1395, pp. 1–18. doi: 10.1007/978-1-4939-3347-1\_1.

- Sakurai, Y. *et al.* (2005) 'Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), pp. 1076–81. doi: 10.1073/pnas.0404984102.
- Salvi, S. *et al.* (2012) 'Evaluation of CTLA-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(9), pp. 1463–1472. doi: 10.1007/s00262-012-1211-y.
- Sandilands, E. *et al.* (2004) 'RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane.', *Developmental cell*, 7(6), pp. 855–69. doi: 10.1016/j.devcel.2004.09.019.
- Sanford, D. E. *et al.* (2013) 'Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(13), pp. 3404–15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0525.
- Sarantis, P. *et al.* (2020) 'Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy', *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. Baishideng Publishing Group Co, pp. 173–181. doi: 10.4251/wjgo.v12.i2.173.
- Seidel, J. A., Otsuka, A. and Kabashima, K. (2018) 'Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations', *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fonc.2018.00086.
- Sen, S. *et al.* (2013) 'Novel mTOR inhibitory activity of ciclopirox enhances parthenolide antileukemia activity.', *Experimental hematology*. Elsevier Inc., 41(9), pp. 799-807.e4. doi: 10.1016/j.exphem.2013.04.012.
- Sharma, P. *et al.* (2017) 'Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy', *Cell*. Cell Press, pp. 707–723. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017.
- Shibuya, M. (2006) 'Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis', *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 469–478. doi: 10.5483/bmbrep.2006.39.5.469.
- Shibuya, M. and Claesson-Welsh, L. (2006) 'Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis', *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc., pp. 549–560. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012.
- Shimizu, T. *et al.* (2012) 'The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(8), pp. 2316–25. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2381.
- Sideras, K. *et al.* (2006) 'Low-molecular-weight heparin in patients with advanced cancer: A phase 3 clinical trial', *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd, 81(6), pp. 758–767. doi: 10.4065/81.6.758.
- Socinski, M. A. *et al.* (2018) 'Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 378(24), pp. 2288–2301. doi: 10.1056/NEJMoa1716948.
- Soliman, H. H. (2017) 'nab-Paclitaxel as a potential partner with checkpoint inhibitors in solid tumors.', *OncoTargets and therapy*. Dove Medical Press Ltd., 10, pp. 101–112. doi:

10.2147/OTT.S122974.

Son, B. *et al.* (2017) 'The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 8(3), pp. 3933–3945. doi: 10.18632/oncotarget.13907.

Sos, M. L. *et al.* (2009) 'Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), pp. 18351–18356. doi: 10.1073/pnas.0907325106.

De Sousa Cavalcante, L. and Monteiro, G. (2014) 'Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, pp. 8–16. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.041.

Takahashi, H. *et al.* (2013) 'Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis through Bax activation in pancreatic cancer cells', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), pp. 2980–2987. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.08.006.

Talathi, S. N. and Bhimji, S. S. (2018) *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas, StatPearls*. StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30422507> (Accessed: 11 April 2020).

Tammela, T. *et al.* (2008) 'Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation.', *Nature*, 454(7204), pp. 656–60. doi: 10.1038/nature07083.

Tchaikovski, V., Fellbrich, G. and Waltenberger, J. (2008) 'The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(2), pp. 322–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.158022.

Thind, K. *et al.* (2017) 'Immunotherapy in pancreatic cancer treatment: A new frontier', *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. SAGE Publications Ltd, pp. 168–194. doi: 10.1177/1756283X16667909.

Thomas, A. M. *et al.* (2004) 'Mesothelin-specific CD8+ T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients', *Journal of Experimental Medicine*, 200(3), pp. 297–306. doi: 10.1084/jem.20031435.

Tsai, F. D. *et al.* (2015) 'K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 112(3), pp. 779–84. doi: 10.1073/pnas.1412811112.

Tvorogov, D. *et al.* (2010) 'Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization.', *Cancer cell*, 18(6), pp. 630–40. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.001.

Tzima, E. *et al.* (2005) 'A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress', *Nature*. Nature Publishing Group, 437(7057), pp. 426–431. doi: 10.1038/nature03952.

Uzunparmak, B. and Sahin, I. H. (2019) 'Pancreatic cancer microenvironment: a current dilemma', *Clinical and Translational Medicine*. Springer Science and Business Media LLC, 8(1). doi: 10.1186/s40169-019-0221-1.

Valsecchi, M. E. (2015) 'Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated

- melanoma', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, pp. 1270–1271. doi: 10.1056/NEJMc1509660.
- Vennin, C. *et al.* (2018) 'Reshaping the Tumor Stroma for Treatment of Pancreatic Cancer', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, pp. 820–838. doi: 10.1053/j.gastro.2017.11.280.
- Wang, H., Franco, F. and Ho, P. C. (2017) 'Metabolic Regulation of Tregs in Cancer: Opportunities for Immunotherapy', *Trends in Cancer*. Cell Press, pp. 583–592. doi: 10.1016/j.trecan.2017.06.005.
- Wang, Y. *et al.* (2010) 'Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis.', *Nature*, 465(7297), pp. 483–6. doi: 10.1038/nature09002.
- Wang, Y. *et al.* (2013) 'Targeting mutant KRAS for anticancer therapeutics: a review of novel small molecule modulators.', *Journal of medicinal chemistry*, 56(13), pp. 5219–30. doi: 10.1021/jm3017706.
- Weir, S. J. *et al.* (2011) 'The repositioning of the anti-fungal agent ciclopirox olamine as a novel therapeutic agent for the treatment of haematologic malignancy.', *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 36(2), pp. 128–34. doi: 10.1111/j.1365-2710.2010.01172.x.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. and Marais, R. (2004) 'The RAF proteins take centre stage.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(11), pp. 875–85. doi: 10.1038/nrm1498.
- Weyandt, J. D. *et al.* (2015) 'Wild-type hras suppresses the earliest stages of tumorigenesis in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(10), p. e0140253. doi: 10.1371/journal.pone.0140253.
- Whiteside, T. L. (2008) 'The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth', *Oncogene*, pp. 5904–5912. doi: 10.1038/onc.2008.271.
- Williams, T. M. *et al.* (2012) 'Cotargeting MAPK and PI3K signaling with concurrent radiotherapy as a strategy for the treatment of pancreatic cancer.', *Molecular cancer therapeutics*, 11(5), pp. 1193–202. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0098.
- Winograd, R. *et al.* (2015) 'Induction of T-cell immunity overcomes complete resistance to PD-1 and CTLA-4 blockade and improves survival in pancreatic carcinoma', *Cancer Immunology Research*. American Association for Cancer Research Inc., 3(4), pp. 399–411. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0215.
- Wong, A. *et al.* (2009) 'Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine', *Drug Metabolism Reviews*, pp. 77–88. doi: 10.1080/03602530902741828.
- Wood, L. D. and Hruban, R. H. (2012) 'Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms', *Cancer Journal (United States)*, pp. 492–501. doi: 10.1097/PPO.0b013e31827459b6.
- Xie, D. and Xie, K. (2015) 'Pancreatic cancer stromal biology and therapy', *Genes and Diseases*. Chongqing Medical University, pp. 133–143. doi: 10.1016/j.gendis.2015.01.002.
- Yao, L. C. *et al.* (2014) 'Pulmonary lymphangiectasia resulting from vascular endothelial growth factor-C overexpression during a critical period', *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, 114(5), pp. 806–822. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303119.
- You, C. *et al.* (2016) 'Deregulation of the miR-16-KRAS axis promotes colorectal cancer.',



- Scientific reports*. Nature Publishing Group, 6, p. 37459. doi: 10.1038/srep37459.
- Young, A., Lou, D. and McCormick, F. (2013) 'Oncogenic and wild-type Ras play divergent roles in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling.', *Cancer discovery*, 3(1), pp. 112–23. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0231.
- Young, J. D. *et al.* (2013) 'The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29', *Molecular Aspects of Medicine*, pp. 529–547. doi: 10.1016/j.mam.2012.05.007.
- Young, K. *et al.* (2018a) 'Immunotherapy and pancreatic cancer: unique challenges and potential opportunities', *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. SAGE Publications Inc. doi: 10.1177/1758835918816281.
- Young, K. *et al.* (2018b) 'Immunotherapy and pancreatic cancer: unique challenges and potential opportunities', *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. SAGE Publications Inc., p. 1758835918816281. doi: 10.1177/1758835918816281.
- Zeng, L. *et al.* (2014) 'Combination of siRNA-directed Kras oncogene silencing and arsenic-induced apoptosis using a nanomedicine strategy for the effective treatment of pancreatic cancer.', *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 10(2), pp. 463–72. doi: 10.1016/j.nano.2013.08.007.
- Zhou, H. *et al.* (2010a) 'The antitumor activity of the fungicide ciclopirox', *International Journal of Cancer*, 127(10), pp. 2467–2477. doi: 10.1002/ijc.25255.
- Zhou, H. *et al.* (2010b) 'The antitumor activity of the fungicide ciclopirox', *International Journal of Cancer*, 127(10), pp. 2467–2477. doi: 10.1002/ijc.25255.
- Zhou, H. *et al.* (2014) 'Ciclopirox induces autophagy through reactive oxygen species-mediated activation of JNK signaling pathway.', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 5(20), pp. 10140–50. doi: 10.18632/oncotarget.2471.

## **7.ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

## Superior efficacy of the antifungal agent ciclopirox olamine over gemcitabine in pancreatic cancer models

Chrysovalantou Mihailidou<sup>1</sup>, Pavlos Papakotoulas<sup>1,2</sup>, Athanasios G. Papavassiliou<sup>1</sup> and Michalis V. Karamouzis<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology Unit, Department of Biological Chemistry, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece

<sup>2</sup>2<sup>nd</sup> Department of Medical Oncology, Theagenion Hospital, 54007 Thessaloniki, Greece

<sup>3</sup>First Department of Internal Medicine, Laiko Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece

Correspondence to: Michalis V. Karamouzis, email: m\_karam@otenet.gr; mkaramouz@med.uoa.gr

**Keywords:** pancreatic cancer; ciclopirox olamine; pharmacodynamic activity; gemcitabine; human pancreatic tumor xenograft models

Received: August 21, 2017

Accepted: November 17, 2017

Published: December 08, 2017




Copyright: Mihailidou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

Ciclopirox olamine (CPX) is an antifungal agent that has recently demonstrated promising anti-neoplastic activity against hematologic and solid tumors. Here, we evaluated CPX compared with gemcitabine alone as well as their combination in human pancreatic cancer cell lines; BxPC-3, Panc-1, and MIA PaCa-2 and in humanized xenograft mouse models. We also examined the preclinical pharmacodynamic activity of CPX. CPX caused a pronounced decrease in cell proliferation and clonogenic growth potential. These inhibitory effects were accompanied by induction of reactive oxygen species (ROS), which were strongly associated with reduced Bcl-xL and survivin levels and activation of a panel of caspases, especially caspase-3, and finally resulted in apoptotic death. CPX-induced apoptosis was associated with reduced pEGFR (Y1068) and pAkt (Ser473) protein levels. Additionally, decreased proliferation was observed in CPX-treated xenograft tumors, demonstrating unique tumor regression and a profound survival benefit. Finally, we showed that CPX significantly abrogated gemcitabine-induced ROS levels in pancreatic tissues. These pre-clinical results have verified the superior antitumor efficacy of CPX over gemcitabine alone, while their combination is even more effective, providing the rationale for further clinical testing of CPX plus gemcitabine in pancreatic cancer patients.

Review

# Mechanisms of the Antitumor Activity of Low Molecular Weight Heparins in Pancreatic Adenocarcinomas

Alexandros Bokas <sup>1,2</sup>, Pavlos Papakotoulas <sup>1,2</sup>, Panagiotis Sarantis <sup>2</sup> ,  
Adriana Papadimitropoulou <sup>3</sup>, Athanasios G Papavassiliou <sup>2</sup>  and Michalis V Karamouzis <sup>2,4,\*</sup> 

<sup>1</sup> 1st Department of Medical Oncology, Theagenion Hospital, 54007 Thessaloniki, Greece; alexanderbokas@outlook.com (A.B.); papakotoulas@gmail.com (P.P.)

<sup>2</sup> Molecular Oncology Unit, Department of Biological Chemistry, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece; panayotissarantis@gmail.com (P.S.); papavas@med.uoa.gr (A.G.P.)

<sup>3</sup> Center of Basic Research, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 11527 Athens, Greece; adapapadim@gmail.com

<sup>4</sup> First Department of Internal Medicine, 'Laiko' General Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece

\* Correspondence: mkaramouz@med.uoa.gr; Tel.: +30-210-746-2508/9, Fax: +30-210-746-2703

Received: 22 December 2019; Accepted: 10 February 2020; Published: 13 February 2020



**Abstract:** Immune checkpoint inhibitors have revolutionized cancer treatment in the last decade. Despite the progress in immunotherapy, most pancreatic cancer patients still do not derive benefit when receiving immune-based therapies. Recently, resistance mechanisms to immune therapies have been mainly focused on tumor microenvironment properties. Pancreatic cancer is considered one of the most lethal and difficult to treat tumors due to its highly immunosuppressive and desmoplastic microenvironment. Low molecular weight heparins (LMWHs) have been used for the treatment and prevention of thromboembolic disease in these patients. However, many nonanticoagulant properties attributed to LMWHs have been described. Exploiting LMWH properties in a combined treatment modality with immune checkpoint inhibition and chemotherapy could provide a new approach in the management of pancreatic adenocarcinoma patients. The ability of LMWH to interfere with various aspects of the tumor microenvironment could result in both the alleviation of immunosuppression and improvement in drug delivery within the tumor, leading to higher cancer cell destruction rates and more potent immune system activity that would, ultimately, lead to better patient outcomes.

**Effect of Ciclopirox Olamine in immunotherapy effect by stimulating immunogenic cell death in pancreatic cancer (74P)**

C. Mihailidou, P. Papakotoulas, D. Schizas, A. Papalampros, M. Vailas, E. Felekouras, T. Liakakos, A. Papavassiliou, M.V. Karamouzis

Annals of Oncology (2017) 28 (suppl\_11): xi6-xi29. 10.1093/annonc/mdx711

ESMO Immuno-Oncology Congress 2017

.....

**Low molecular weight heparin (LMWH) enhances immunotherapy (I) activity in pancreatic cancer cells.**

Michalis Karamouzis, Alexandros Bokas, Georgia Kyriakopoulou, Evangelos Koustas, Panagiotis Sarantis, Pavlos Papakotoulas, Dimitrios Schizas, Alexandros Papalampros, Evangelos Felekouras, Theodoros Liakakos, Athanasios G. Papavassiliou

ASCO-SITC Scientific Symposium 2019