

1° ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

§1. ΑΝΤΙΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΑ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ: ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ IN VITRO

Υπεύθυνος Άσκησης: *Ιωάννης Σ. Βιζιριανάκης, Ph.D., Αναπληρωτής καθηγητής Μοριακής Φαρμακολογίας & Φαρμακογονιδιωματικής*

Βοηθοί Εργαστηρίου: *Σύμφωνα με την ανακοίνωση του προγραμματισμού των ασκήσεων*

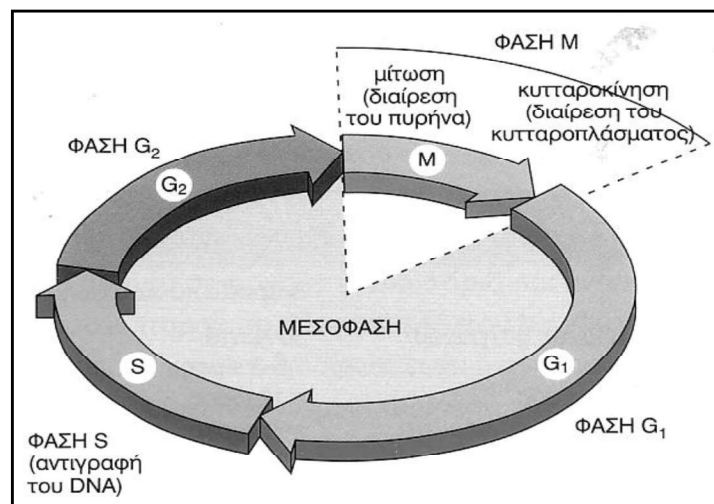
§1.1 Θεωρητικό μέρος

Ο καρκίνος αποτελεί μία πολύ μεγάλη ομάδα νεοπλασματικών νόσων, οι οποίες παρατηρούνται σε άτομα κάθε ηλικίας, ανεξαρτήτου φυλής και προέλευσης, όπως επίσης και σε πολλούς ζωικούς οργανισμούς. Από άποψη μάλιστα θνησιμότητας, αποτελεί τη δεύτερη κατά σειρά αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες στο δυτικό κόσμο. Ανεξάρτητα από την ποικιλία των αιτιολογικών παραγόντων που συμβάλλουν στην καρκινογένεση (χημικά καρκινογόνα, ρυπαντές, διαλύτες, ακτινοβολία, φάρμακα, ογκογόνοι ιοί, χημικά ανάλογα ορμονών, χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, μεταλλάξεις, κ.ά.) και οδηγούν στη νεοπλασματική εξαλλαγή ή μεταμόρφωση των φυσιολογικών κυττάρων (neoplastic cell transformation), τα νεοπλάσματα (neoplasms) αποτελούν παθοφυσιολογικές ανωμαλίες των μηχανισμών ελέγχου της κυτταρικής αναπαραγωγής (cell proliferation), της επιβίωσης (cell survival), της διαφοροποίησης (cell differentiation) και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death – apoptosis). Τα νεοπλασματικά κύτταρα, σε αντίθεση με αυτά των καλοηθών όγκων, μεταστατούν και δημιουργούν δευτερογενείς εστίες σε απομακρυσμένα όργανα (metastasis), γεγονός το οποίο οδηγεί σε περαιτέρω εξάπλωση του νεοπλάσματος και τελικά στο θάνατο του ασθενούς.

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί ιδιαίτερη πρόοδος στην κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών ελέγχου των νεοπλασμάτων. Το γεγονός αυτό βοήθησε σημαντικά την ανάπτυξη νέων καινοτόμων και εκλεκτικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στοχευμένης δράσης για τη θεραπεία των νεοπλασιών. Αξίζει να τονισθεί επίσης, πως αυτή η εξέλιξη στη φαρμακευτική αγωγή συνέβαλε ακόμη και στην πλήρη θεραπεία ορισμένων νεοπλασμάτων στη σημερινή εποχή.

Τα αντινεοπλασματικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στα διάφορα πρωτόκολλα χημειοθεραπευτικής αγωγής στην κλινική πράξη είναι διαφόρου δομής και προέλευσης και διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: 1) Αλκυλιωτικοί παράγοντες, 2) Αντιμεταβολίτες, 3) Αντιβιοτικά, 4) Αλκαλοειδή, 5) Ένζυμα, 6) Ορμόνες και χημικά ανάλογα, 7) Επαγωγείς της διαφοροποίησης (χημικοί διαφοροποιητές), 8) Αναστολείς της αγγειογένεσης, 9) Αναστολείς κινασών της τυροσίνης, 10) Επαγωγείς της απόπτωσης και 11) Μονοκλωνικά αντισώματα.

Για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης των αντινεοπλασματικών φαρμάκων είναι απαραίτητη η γνώση του κύκλου της κυτταρικής αναπαραγωγής (cell proliferation cycle) (**Εικόνα 1**). Κάθε κύτταρο, κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού του, διανύει έναν αναπαραγωγικό κύκλο συγκεκριμένης χρονικής διάρκειας πριν διαιρεθεί σε 2 θυγατρικά κύτταρα. Ο κύκλος αυτός χαρακτηρίζεται από βασικές διεργασίες, όπως η μίτωση, η σύνθεση του DNA, κλπ. Ο χρόνος του κύκλου ποικίλει ανάλογα με το είδος ή την προέλευση του κυττάρου και χωρίζεται σε 4 κυρίως φάσεις: G₁, G₂, S και M (**Εικόνα 1**). Τα κύτταρα που δεν διαιρούνται βρίσκονται στη φάση G₀ (φάση ηρεμίας). Η σύνδεση της φάσης G₁/G₀ με αποφάσεις του κυττάρου που συνδέονται με την έναρξη της απόπτωσης ή/και της διαφοροποίησης, επιτρέπει την περαιτέρω ανάλυση του μοριακού μηχανισμού δράσης των νέων καινοτόμων αντινεοπλασματικών φαρμάκων, τα οποία στοχεύουν σε αυτές ακριβώς τις διαδικασίες.



Εικόνα 1. Στο σχήμα διακρίνονται οι διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G₁, S, G₂, M), καθώς και οι κυτταρικές διαδικασίες που επιτελούνται σε αυτές.

Σε κάθε φάση ολοκληρώνονται οι απαραίτητες διαδικασίες για την είσοδο του κυττάρου στην επόμενη φάση. Έτσι, στη φάση G₁ δημιουργούνται όλα τα μεταβολικά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για το διπλασιασμό του DNA, ο οποίος γίνεται στη φάση S, ενώ στη φάση G₂ παράγονται οι πρωτεΐνες της μιτωτικής ατράκτου και στη φάση M πραγματοποιείται η διαίρεση

του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό, το κύτταρο είναι πλέον έτοιμο να ξεκινήσει έναν καινούργιο αναπαραγωγικό κύκλο. Εναλλακτικά, το κύτταρο καθώς βρίσκεται στη φάση G₁/G₀, μπορεί να πάρει απόφαση είτε να διαφοροποιηθεί είτε να ενεργοποιήσει τους μηχανισμούς της απόπτωσης.

Ενδεικτικά, τα φάρμακα που δρουν μέσω του κυτταρικού κύκλου είναι οι αντιμεταβολίτες, η μπλεομυκίνη, τα πεπτιδικά αντιβιοτικά, τα αλκαλοειδή της *Vinca* και της ποδοφυλλίνης. Τα φάρμακα που δρουν ανεξάρτητα του κύκλου είναι οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, τα αντιβιοτικά, η *cis-platin*, η νιτροζουρία και τα παράγωγά της.

Οι μηχανισμοί δράσης των κυριότερων αντινεοπλασματικών φαρμάκων είναι οι εξής:

- 1) **Αλκυλιωτικοί παράγοντες:** δρουν στο DNA προκαλώντας αλκυλίωση κυρίως της N⁷ θέσης στη γουανίνη ή σε 2 γειτονικές γουανίνες των 2 κλώνων του DNA, οπότε πραγματοποιείται γεφύρωση (cross-linking) του DNA, με αποτέλεσμα την ανικανότητα του πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό δρουν η νιτροζουρία, η μιτομυκίνη, η δακαρβαζίνη, η προκαρβαζίνη και η μπουσουλφάνη.
- 2) **Αντιμεταβολίτες:** αποτελούν χημικά ανάλογα κυρίως πουρινών και πυριμιδινών και ανταγωνίζονται τα φυσικά ανάλογά τους (μεταβολίτες) κατά την ενσωμάτωσή τους στο DNA. Επίσης, αναστέλλουν ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση των μεταβολιτών [μεθοτρεξάτη (MTX), 5-φθοροουρακίλη (5-FU), αραβινοκυτοσίνη (Ara-C)].
- 3) **Αλκαλοειδή και Αντιβιοτικά:** οι ενώσεις αυτές ποικίλουν αρκετά ως προς τη χημική τους δομή και δρουν απευθείας στο DNA, διεισδύοντας μεταξύ των βάσεων του (intercalation) και σταθεροποιώντας με πολλούς δεσμούς υδρογόνου τους 2 κλώνους (ακτινομυκίνη D, βινβλαστίνη, βινκριστίνη, ανθρακυκλίνες). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αδυναμία πολλαπλασιασμού των κυττάρων.
- 4) **Ένζυμα:** κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η ασπαραγινάση, η οποία δρα εξαντλώντας τα αποθέματα ασπαραγίνης από τους όγκους που έχουν χάσει την ικανότητα σύνθεσής της.
- 5) **Ορμόνες και χημικά ανάλογα:** Χρησιμοποιούνται κυρίως σε ορμονοεξαρτώμενους όγκους και δρουν μέσω κυτταροπλασματικών υποδοχέων (ταμοξιφαίνη, προγεστίνες).
- 6) **Επαγωγείς της διαφοροποίησης:** οι ουσίες αυτές ονομάζονται και χημικοί διαφοροποιητές (chemical inducers). Οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα σε μία πιο ώριμη αναπτυξιακή

κατάσταση, αφαιρώντας τους ταυτόχρονα την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται και να μεταστατούν.

- 7) **Αναστολείς της αγγειογένεσης:** ουσίες οι οποίες αναστέλλουν τη δράση μορίων υπεύθυνων για την αγγειογένεση κατά την ανάπτυξη σταθερών όγκων ή μεταστατικών εστιών.
- 8) **Αναστολείς κινασών της τυροσίνης (tyrosine kinase inhibitors):** καινοτόμα στοχευμένα φάρμακα που αντιδρούν με συγκεκριμένα μόρια και είτε ενεργοποιούν τους μηχανισμούς της απόπτωσης είτε συμβάλουν στην καταστροφή των κυττάρων (ιματινίβη, ερλοτινίβη).
- 9) **Επαγωγείς της απόπτωσης (inducers of apoptosis):** καινοτόμα φάρμακα στοχευμένης δράσης που δρουν σε συγκεκριμένα μόρια του κυττάρου και ενεργοποιούν τους μηχανισμούς της απόπτωσης.
- 10) **Μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies - mAbs):** Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα της κατηγορίας είναι η περτουζουμάμπη.

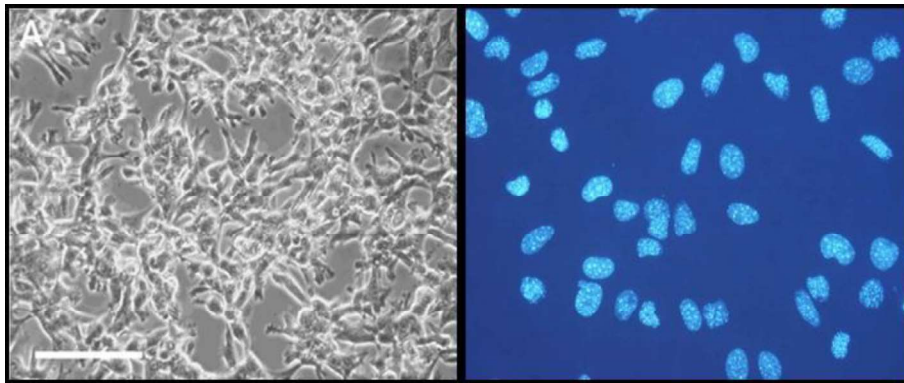
Σήμερα, η αντιμετώπιση των νεοπλασιών δεν επιτυγχάνεται με τη χορήγηση μόνο ενός φαρμάκου αλλά με συνδυασμένη χορήγηση 2 ή περισσότερων χημειοθεραπευτικών, η οποία αποσκοπεί: α) στην ταχύτερη, αποτελεσματικότερη και με λιγότερες παρενέργειες θεραπεία του νεοπλάσματος. Άλλωστε, είναι πλέον γνωστό πως η χρήση περισσότερων του ενός αντινεοπλασματικών φαρμάκων με «στοχευμένη» δράση σε διαφορετικό μοριακό επίπεδο είναι δυνατόν να “υπερνικήσει” τη μεγάλη κυτταρική ετερογένεια που παρατηρείται στις περισσότερες νεοπλασίες και β) στο να μειώσει την αντίσταση που αναπτύσσουν ορισμένα νεοπλάσματα στα γνωστά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Παρ’ όλ’ αυτά, τα αντινεοπλασματικά φάρμακα στην πλειονότητά τους αναστέλλουν και την ανάπτυξη των ταχέως αναπτυσσόμενων φυσιολογικών κυττάρων (π.χ. αιμοποιητικά κύτταρα, κύτταρα του μουκοειδούς επιθηλίου, κ.ά.), με άμεσα αποτελέσματα την καταστολή του μυελού των οστών, τις διαταραχές του ΓΕΣ και την αλωπεκία.

§1.2 Χρήση των καρκινικών κυτταρικών σειρών ως σύστημα – μοντέλο για την ανάπτυξη νέων αντινεοπλασματικών φαρμάκων

Η **κυτταροκαλλιέργεια** ή **ιστοκαλλιέργεια** (cell ή tissue culture) αποτελεί ένα *in vitro* σύστημα καλλιέργειας μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία προήλθαν από έναν αρχικό ιστό (primary tissue) ή από μία μητρική κυτταρική σειρά (primary cell line) ή από έναν κλώνο (clone) κυττάρων (νεοπλασματικών ή μη) έπειτα από ενζυμική, μηχανική ή χημική κατεργασία.

Οργανοκαλλιέργεια είναι η τρισδιάστατη (3D) καλλιέργεια ολόκληρου οργάνου που διατηρεί τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιστού *in vivo*.

Στις κυτταροκαλλιέργειες, τα κύτταρα αναπτύσσονται μέσα σε θρεπτικό υλικό, είτε σε στοιβάδες (monolayer cell culture) είτε σε αιωρήματα (suspension cell culture). Το θρεπτικό υγρό (culture medium) περιέχει αμινοξέα, άλατα, βιταμίνες, γλυκόζη, καθώς και αναπτυξιακούς παράγοντες (growth factors) οι οποίοι προέρχονται από διάφορες πηγές (π.χ. ορό εμβρύου μύσχου). Μερικές φορές, προστίθεται και κάποια πρωτεΐνη (π.χ. ινσουλίνη), επειδή τα συγκεκριμένα κύτταρα τη χρειάζονται για το συνεχή πολλαπλασιασμό τους. Στην **Εικόνα 2** φαίνονται φωτογραφίες κυτταροκαλλιεργειών από μικροσκόπιο, τόσο σε στοιβάδα (monolayer) (A) όσο και σε αιώρημα (suspension) (B).



Εικόνα 2. Κυτταροκαλλιέργειες σε στοιβάδα (A) και σε αιώρημα (B).

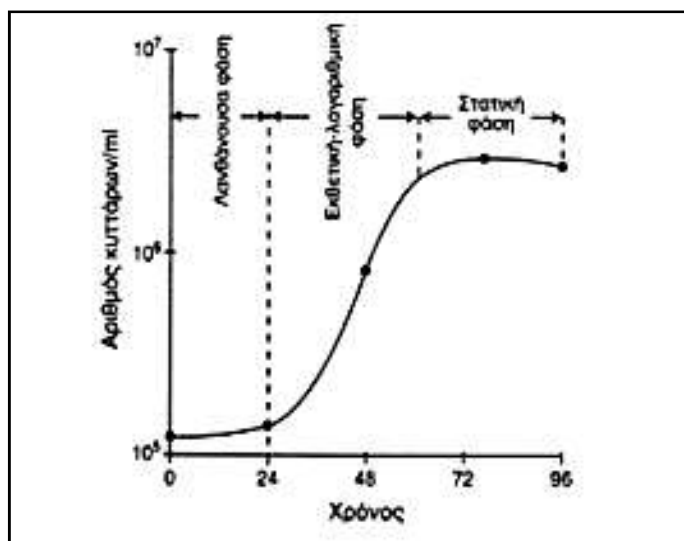
Η χρήση των καλλιεργειών καρκινικών κυττάρων *in vitro* ως πειραματικό σύστημα (μοντέλο) παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως: 1) επαρκής έλεγχος του περιβάλλοντος ανάπτυξης των κυττάρων, 2) ανάπτυξη σχετικά ομοιογενούς κυτταρικού πληθυσμού και διατήρησή του για μεγάλο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η επανάληψη πειραμάτων με αξιοπιστία, 3) παραγωγή και εύκολη απομόνωση μακρομορίων βιολογικού ενδιαφέροντος, 4) εκτίμηση της δράσης φαρμάκων και βιολογικών ή χημικών προϊόντων, και 5) τα συστήματα αυτά επιτρέπουν σε μεγάλο βαθμό τη διευκρίνιση του μηχανισμού δράσης φαρμάκων σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Δυστυχώς, δεν λείπουν και τα μειονεκτήματα: 1) οι κυτταροκαλλιέργειες δεν αντιπροσωπεύουν απόλυτα το φυσιολογικό περιβάλλον ενός συγκεκριμένου ιστού, αλλά κάτι ανάλογό του, 2) η ποσότητα των κυττάρων που παίρνουμε είναι σχετικά μικρή (περίπου 10 φορές μικρότερη από την περίπτωση που θα χρησιμοποιούσαμε τον αντίστοιχο ζωικό ιστό), και 3) ενίοτε παρατηρείται αστάθεια τόσο στο γενότυπο όσο και στο φαινότυπο των νεοπλασματικών κυττάρων, λόγω χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που συμβαίνουν κατά τη διατήρηση των ιστοκαλλιεργειών για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Στο πλαίσιο αυτό, οι καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων *in vitro* αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο στη σύγχρονη έρευνα της ογκολογίας, τόσο για τη μελέτη της βιολογίας του καρκινικού

κυττάρου, όσο και για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων στοχευμένης δράσης με αυξημένη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια.

§1.3 Πειραματικό μέρος

Πριν τον προσδιορισμό της αντινεοπλασματικής δράσης των υπό ανάπτυξη φαρμάκων, πρέπει να μελετηθεί η καμπύλη ανάπτυξης (αναπαραγωγής ή κινητικής) των συγκεκριμένων κυττάρων (cell kinetics curve) και η δυνατότητά τους να σχηματίζουν αποικίες (foci), κατά την επώασή τους σε ημιστερεά υποστρώματα (κλωνοποιητική ικανότητα – plating efficiency). Η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων μας δίνει χρήσιμα στοιχεία, όπως το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων (doubling time), το λανθάνοντα χρόνο (lag period), τον χρόνο εισόδου των κυττάρων στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης (log period), όπως και το χρόνο για την εμφάνιση στασιμότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων (plateau period), εξ' αιτίας της έλλειψης θρεπτικών υλικών στην καλλιέργεια και της κάλυψης όλου του διαθέσιμου χώρου ανάπτυξης. Μία κλασική καμπύλη κυτταρικής ανάπτυξης φαίνεται στην **Εικόνα 3**.



Εικόνα 3. Κλασική καμπύλη κυτταρικής ανάπτυξης (κινητική), στην οποία διακρίνονται οι αντίστοιχες φάσεις της.

Όταν, λοιπόν, χρησιμοποιούνται οι κυτταροκαλλιέργειες για τον προσδιορισμό της αντινεοπλασματικής δράσης νέων φαρμάκων, τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικά υποστρώματα (υλικά) παρουσία ή απουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των φαρμάκων και στη συνέχεια προσδιορίζεται ο αριθμός τους με τη χρήση του αιματοκυτταρομέτρου (hemocytometer) ή ο αριθμός των αποικιών που αναπτύχθηκαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου, αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται ο βαθμός κυτταροτοξικότητας των υπό μελέτη φαρμάκων και συνήθως τα

αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τοις εκατό ποσοστό (%), θεωρώντας την κυτταρική ανάπτυξη απουσία του φαρμάκου (καλλιέργεια αναφοράς) ως 100%.

Στη συγκεκριμένη εργαστηριακή άσκηση χρησιμοποιούνται ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικού MEL-745PC-4A (Murine ErythroLeukemia cells) για τον προσδιορισμό της δράσης μερικών γνωστών αντινεοπλασματικών φαρμάκων. Τα κύτταρα αυτά διατηρούνται και αναπτύσσονται σε αιώρημα (suspension culture) σε θρεπτικό υλικό, μέσα στους επωαστήρες (incubators) υπό συγκεκριμένες συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (37°C) και σε ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 5% v/v σε CO₂, κορεσμένη με υδρατμούς (**Εικόνα 4**). Στην άσκηση αυτή θα μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων MEL με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου στο μικροσκόπιο, από καλλιέργειες που έχουν επωασθεί για 48 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις (1×10^{-9} M – 1×10^{-3} M) αντινεοπλασματικών φαρμάκων. Θα γίνουν οι γραφικές παραστάσεις συσχέτισης της συγκέντρωσης των κυττάρων με τις διάφορες συγκεντρώσεις καθενός αντινεοπλασματικού φαρμάκου σε κάθε κυτταροκαλλιέργεια και θα εξαχθούν τα αντίστοιχα συμπεράσματα για τη δράση τους, έπειτα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κάθε φαρμάκου που προκαλεί 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων (IC₅₀).

§1.3.1 Υλικά – Εξοπλισμός

- Κυτταροκαλλιέργειες: MEL-745PC-4A ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικού
- Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης κυττάρων: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) που περιέχει 10% v/v ορό μόσχου και 100μg/ml μίγμα αντιβιοτικών (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη)
- Επώαση κυττάρων: υποδοχείς επώασης με 24 θέσεις (24-well plates) σε ειδικούς επωαστήρες (incubators) (**Εικόνα 4**)
- Αρχική συγκέντρωση κυττάρων: 1×10^5 κύτταρα/ml
- Διαλύματα αντινεοπλασματικών φαρμάκων: διάφορες συγκεντρώσεις (1×10^{-9} M – 1×10^{-3} M).



Εικόνα 4. (Α) Χώρος εργασίας κυτταροκαλλιιεργειών με ασηπτικές συνθήκες (laminar flow – hood). (Β) Χώρος επώασης (incubator) των κυτταροκαλλιιεργειών σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας. (Γ) Υποδοχέας επώασης των κυττάρων με 24 θέσεις (24-well plate).

§1.3.2 Στάδια εκτέλεσης της πειραματικής διαδικασίας

1. Κύτταρα MEL σε συγκέντρωση 1×10^5 κύτταρα/ml, τα οποία βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους, τοποθετούνται στους υποδοχείς επώασης (1ml / θέση).
2. Σε κάθε καλλιέργεια προστίθεται μία συγκεκριμένη συγκέντρωση αντινεοπλασματικού φαρμάκου σε κλίμακα συγκεντρώσεων 1×10^{-9} M – 1×10^{-3} M. Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου τοποθετείται εις διπλούν, ενώ υπάρχουν και καλλιέργειες που δεν έχουν καμία ποσότητα φαρμάκου και χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες αναφοράς (control).
3. Τα κύτταρα επωάζονται για 48 ώρες στους θαλάμους επώασης (incubators).
4. Μετράται ο αριθμός των κυττάρων με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου (πλάκα Neubauer) και μικροσκοπίου.
5. Κατασκευάζονται οι γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης των κυττάρων για κάθε καλλιέργεια, σε σχέση με τις διάφορες συγκεντρώσεις του αντινεοπλασματικού φαρμάκου.
6. Εξάγονται τα αποτελέσματα από τις γραφικές παραστάσεις (εύρεση της τιμής IC_{50} για κάθε φάρμακο), γίνεται συζήτηση επί της δράσης των φαρμάκων και συγκρίνεται το φαρμακολογικό τους αποτέλεσμα.

§1.3.3 Χρήση αιματοκυτταρομέτρου (πλάκα Neubauer) για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων

Η χρήση του αιματοκυτταρομέτρου (πλάκα Neubauer) είναι η πιο απλή, εύκολη και πρακτική μέθοδος για τη μέτρηση κυττάρων από καλλιέργειες (είτε σε αιώρημα είτε σε στοιβάδες), χωρίς τη χρήση πολύπλοκων οργάνων. Το αιματοκυτταρομέτρο έχει τη μορφή αντικειμενοφόρου πλάκας και αποτελείται από 2 μέρη, τα κάθε ένα από τα οποία διαιρείται σε 9

τετράγωνα του 1mm (**Εικόνα 5**). Όταν αυτά τα τετράγωνα καλύπτονται από μία καλυπτρίδα σχηματίζουν ύψος (βάθος) 0,1mm. Επομένως, ο συνολικός όγκος υγρού που εγκλωβίζεται είναι: $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3 = 10^{-4}\text{cm}^3$. Επειδή 1cm^3 είναι περίπου 1ml, η κυτταρική συγκέντρωση θα είναι:

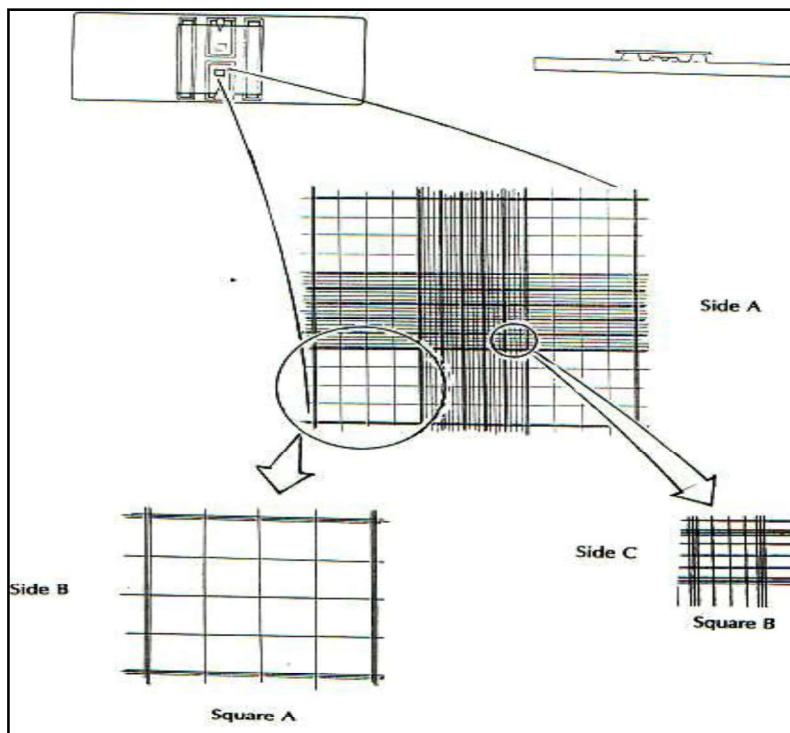
$$\text{Συγκέντρωση κυττάρων (κύτταρα/ml)} = \text{μετρηθέντα κύτταρα} / \text{τετράγωνο} \times 10^4$$

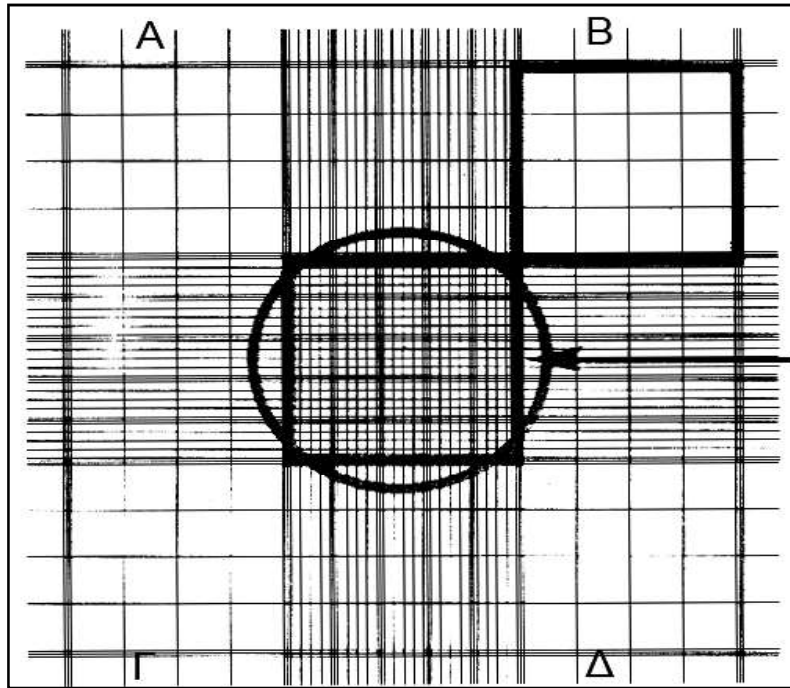
§1.3.4 Διαδικασία μέτρησης

- Η επιφάνεια του αιματοκυτταρομέτρου και η καλυπτρίδα καθαρίζονται πρώτα με νερό και αιθανόλη και στη συνέχεια αφήνονται να στεγνώσουν.
- Τοποθετείται η καλυπτρίδα στο κέντρο της επιφάνειας του αιματοκυτταρομέτρου.
- Αναδεύονται επαρκώς τα κύτταρα της κυτταροκαλλιέργειας με τη βοήθεια πιπέτας για να ομογενοποιηθούν (λόγω του βάρους τους τα κύτταρα καθιζάνουν).
- Λαμβάνεται με την πιπέτα μία μικρή ποσότητα καλλιέργειας και τοποθετείται προσεκτικά στο αιματοκυτταρομέτρο κάτω από την επιφάνεια της καλυπτρίδας. Απαιτείται να καλυφθεί όλη η επιφάνεια κάτω από την καλυπτρίδα και των 2 τμημάτων του αιματοκυτταρομέτρου, χωρίς να ξεχειλίσει το υγρό στις πλάγιες αύλακες και χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα.
- Τοποθετείται το αιματοκυτταρομέτρο στο μικροσκόπιο.
- Μετράται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στα τετράγωνα Α, Β, Γ και Δ (**Εικόνα 5**).
- Υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων στην καλλιέργεια ως εξής:

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων (A+B+Γ+Δ)} \times 10^4 = \text{κύτταρα / ml}$$

- Το αιματοκυτταρομέτρο καθαρίζεται με νερό και αιθανόλη και τοποθετείται στην ειδική θήκη του.





Εικόνα 5. Αιματοκυτταρόμετρο σε οπτικό πεδίο μικροσκοπίου. Ο κύκλος δείχνει το οπτικό πεδίο που καλύπτεται σε μεγέθυνση 100x. Διακρίνονται επίσης τα τετράγωνα του 1mm.

§1.4 Ερωτήσεις

1. Περιγράψτε την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη εργαστηριακή άσκηση.
2. Για ποιό λόγο έγινε το συγκεκριμένο πείραμα και ποιά είναι η φαρμακολογική του σημασία; Περιγράψτε το ρόλο του φαρμακολογικού ελέγχου (drug screening assay) κατά τη διαδικασία ανάπτυξης νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.
3. Συζητήστε διεξοδικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις γραφικές παραστάσεις και υπολογίστε τη συγκέντρωση κάθε φαρμάκου που προκαλεί 50% αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (IC_{50}). Ποιό αντινεοπλασματικό φάρμακο θα προτείνετε εσείς για τη θεραπεία του συγκεκριμένου νεοπλάσματος;
4. Συζητήστε την αντίσταση που αναπτύσσουν τα νεοπλάσματα κατά τη θεραπεία με κάποιο αντινεοπλασματικό φάρμακο. Τι θα προτείνετε για να αντιμετωπίσετε μία τέτοια κατάσταση;

2^ο ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

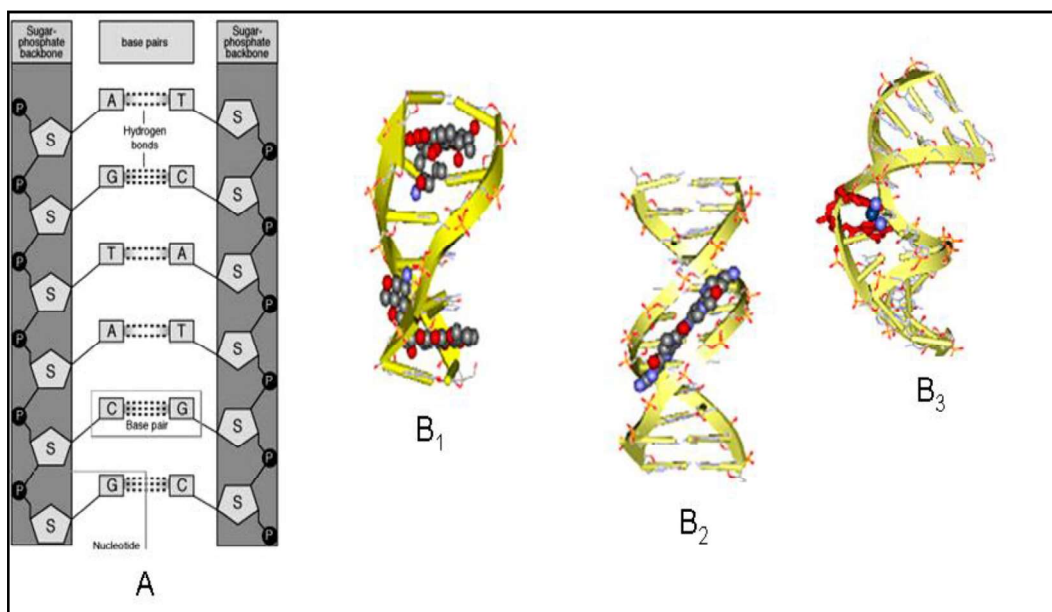
§2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Υπεύθυνος Άσκησης: *Ιωάννης Σ. Βιζιριανάκης, Ph.D., Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Φαρμακολογίας & Φαρμακογονιδιωμικής*

Βοηθεί Εργαστηρίου: *Σύμφωνα με την ανακοίνωση του προγραμματισμού των ασκήσεων*

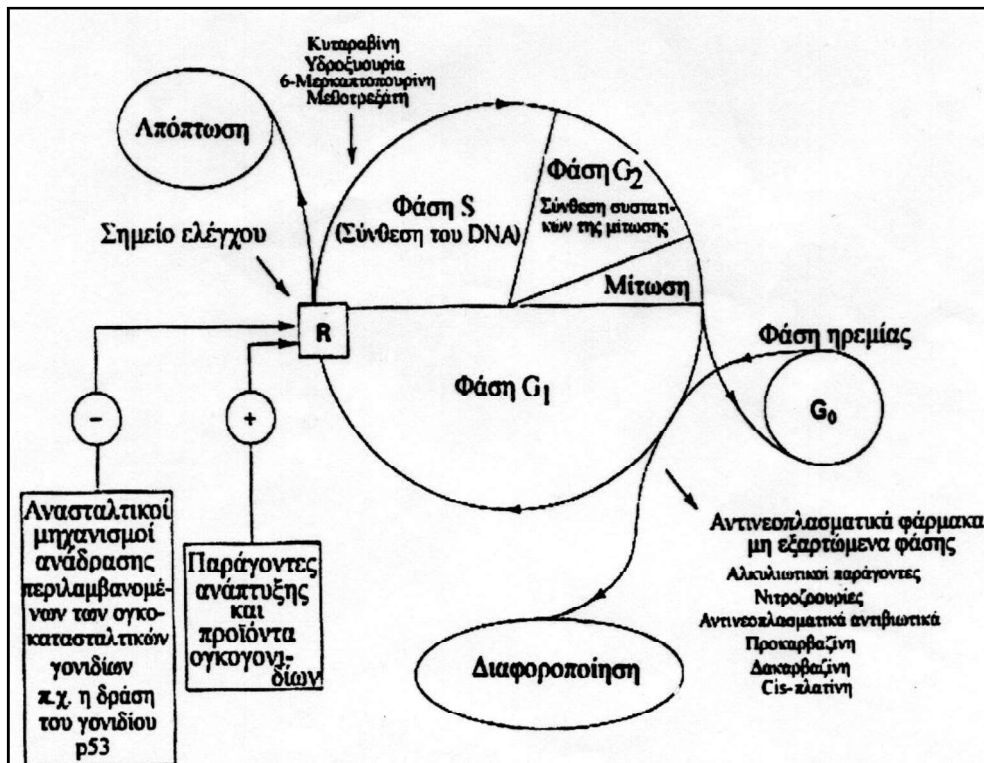
§2.1 Θεωρητικό μέρος

Το DNA των κυττάρων αποτελεί στόχο δράσης αρκετών φαρμακευτικών ουσιών και κυρίως των αντινεοπλασματικών – χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Η δομή του DNA, τόσο με την εναλλαγή των 4 δεοξυριβονουκλεοτιδικών βάσεων [αδενίνης (A), θυμίνης (T), κυτοσίνης (C), γουανίνης (G)] και τη δημιουργία της διπλής έλικας (**Εικόνα 1**), όσο και με την περαιτέρω ανάπτυξη των ανώτερων διαμορφώσεών του μέσα στον πυρήνα, αποτελεί την πηγή πληροφοριών της δομής και της λειτουργίας όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων.



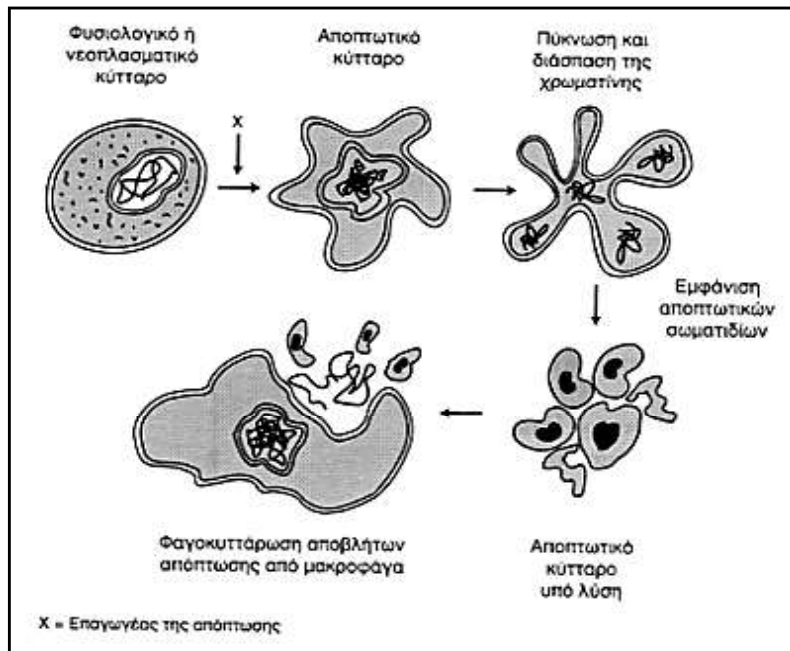
Εικόνα 6. Απεικόνιση της χημικής δομής του DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων (A). Σύμπλοκα του DNA με τα φάρμακα ακτινομυκίνη D (B₁; intercalation), νετροψίνη (B₂; minor groove binding) και σισπλατίνη (B₃; covalent binding).

Οποιαδήποτε παρέμβαση στη δομή του DNA επηρεάζει σε ένα βαθμό (μικρό ή μεγάλο) τη λειτουργικότητά του, με άμεση επίπτωση στη ζωή του κυττάρου. Όπως είναι γνωστό, κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο που έχει την ικανότητα πολλαπλασιασμού, διανύει έναν κύκλο ζωής (κυτταρικός κύκλος – cell cycle), ο οποίος διακρίνεται σε 4 φάσεις (G₁, S, G₂ και M) (Εικόνα 2). Ο κύκλος αυτός ολοκληρώνεται με το διπλασιασμό του DNA και τη διαίρεση του κυττάρου σε 2 πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ποικίλει από κύτταρο σε κύτταρο.



Εικόνα 7. Ο κυτταρικός κύκλος με τα θετικά (+) και τα αρνητικά (-) σημεία ελέγχου του και η συσχέτισή του με το μηχανισμό δράσης αντιπροσωπευτικών αντινεοπλασματικών φαρμάκων.

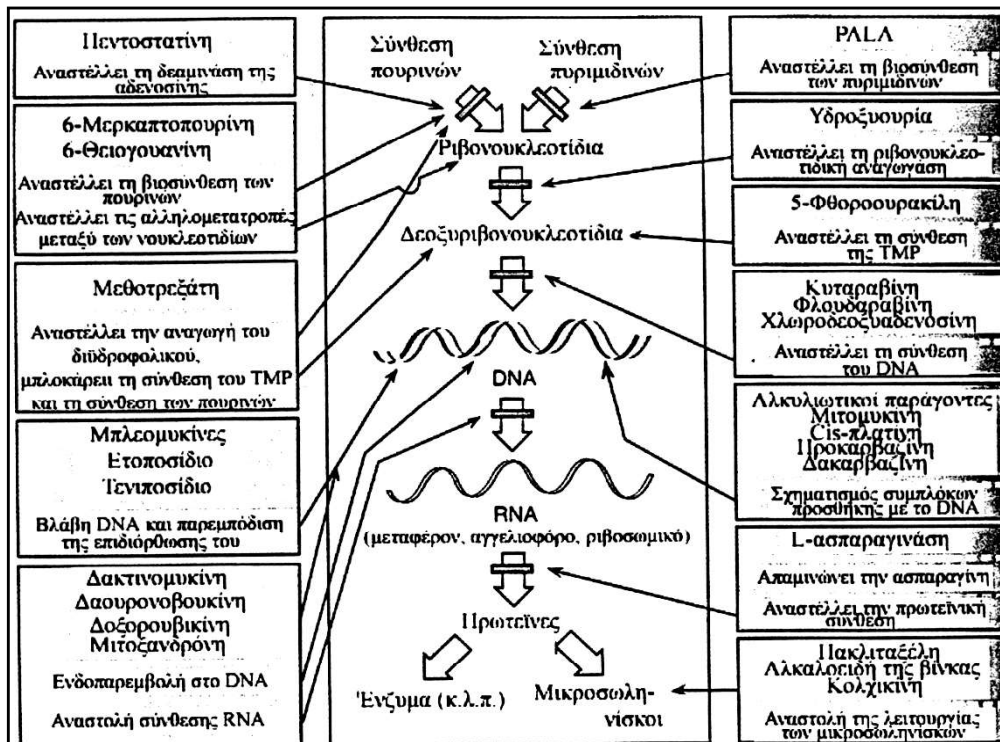
Με την επίδραση συγκεκριμένων παραγόντων (περιβαλλοντικών / χημικών / βιολογικών), το κύτταρο σε καθορισμένα χρονικά σημεία ελέγχου του κύκλου (checkpoints) αποφασίζει την είσοδό του είτε στη φάση G₁, είτε στη φάση ηρεμίας G₀ και διαμέσου της τελευταίας στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της διαφοροποίησής του (cell differentiation). Επίσης, στο λεγόμενο περιοριστικό σημείο ελέγχου (restriction point), το κύτταρο αποφασίζει εάν θα συνεχίσει φυσιολογικά τον κύκλο του προχωρώντας στη φάση S (σύνθεση του DNA), ή εάν θα διακόψει τη ροή του και θα ενεργοποιήσει τη διαδικασία της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος – apoptosis) (Εικόνα 3).



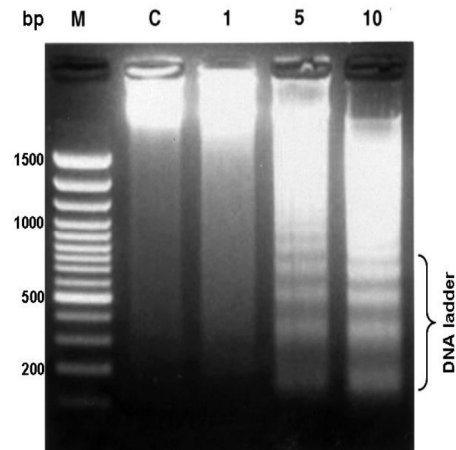
Εικόνα 8. Διαγραμματική αναπαράσταση του φαινομένου της απόπτωσης.

Από την ανάλυση του μηχανισμού δράσης των κυριότερων αντινεοπλασματικών φαρμάκων επί του γενετικού υλικού των κυττάρων, όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα της **Εικόνας 4**, γίνεται κατανοητό ότι αρκετά από αυτά επηρεάζουν τη δομή του DNA, είτε προκαλώντας σπάσιμο της διπλής έλικας (DNA break), είτε ενδοπαρεμβάλλονται (intercalation) σε αυτή και αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών υπό την επίδραση συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα, οδηγεί στη χαρακτηριστική εμφάνιση της “σκάλας του DNA” (DNA ladder) κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση του γενετικού τους υλικού (**Εικόνα 5**).

Η εργαστηριακή άσκηση που ακολουθεί, βασίζεται στην επίδραση γνωστών αντινεοπλασματικών ουσιών στη δομή του DNA καρκινικών κυττάρων, μετά από *in vitro* καλλιέργειά τους. Ο μηχανισμός δράσης των φαρμάκων αυτών αναλύεται ύστερα από απομόνωση και ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel) του μεγαλομοριακού DNA από ευκαρυωτικά ερυθρολευχαιμικά κύτταρα [MEL (ποντικίσια) ή K-562 (ανθρώπινα)].



Εικόνα 9. Μηχανισμοί και στόχοι δράσης των κυριότερων αντινεοπλασματικών – χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. (PALA: N-φωσφονο-ακετυλο-L-ασπαρτικό οξύ, TMP: Μονοφωσφορική θυμιδίνη).



Εικόνα 10. Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αгарόζης (agarose gel) μεγαλομοριακού DNA ευκαρυωτικών ερυθρολευχαιμικών κυττάρων, στην οποία φαίνεται η χαρακτηριστική εικόνα του DNA ladder (φαινόμενο απόπτωσης).
 (M: μάρτυρες DNA γνωστού μοριακού βάρους
 C: DNA από κύτταρα της καλλιέργειας αναφοράς
 1,5,10: δείγματα DNA από κύτταρα που έχουν επωαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις αντινεοπλασματικού φαρμάκου).

§2.2 Πειραματικό μέρος

Κύτταρα MEL στη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους επωάζονται απουσία (καλλιέργεια αναφοράς – control) ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αντινεοπλασματικών φαρμάκων (1×10^{-9} M – 1×10^{-3} M) στους 37°C για 48 ώρες. Ακολουθεί παραλαβή των κυττάρων από τις καλλιέργειες, απομόνωση του DNA τους και ηλεκτροφορητική του ανάλυση.

§2.3 Υλικά – Εξοπλισμός

- Κυτταροκαλλιέργειες: MEL-745PC-4A ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικού
- Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης κυττάρων: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) που περιέχει 10% v/v ορό μόσχου και 100μg/ml μίγματος αντιβιοτικών (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη)
- Επώαση κυττάρων: υποδοχείς επώασης (φλάσκες) σε ειδικούς επωαστήρες (incubators)
- Αρχική συγκέντρωση κυττάρων: 1×10^5 κύτταρα/ml
- Διαλύματα αντινεοπλασματικών φαρμάκων: σε διάφορες συγκεντρώσεις (1×10^{-9} M – 1×10^{-3} M).

Η διαδικασία της παραλαβής των κυττάρων, της απομόνωσης του DNA τους και της ηλεκτροφορητικής του ανάλυσης, έχει ως εξής:

- 1) Παραλαβή των κυττάρων ($\sim 1 \times 10^7$ κύτταρα) με πιπέτα και τοποθέτησή τους σε ειδικά σωληνάρια φυγοκέντρου. Τοποθέτηση των σωληναρίων με τα κύτταρα στον πάγο (0°C).
- 2) Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 1200 στροφές/λεπτό. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Ξέπλυμα των κυττάρων (ίζημα – pellet) με την προσθήκη 10ml παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS).
- 3) Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 1200 στροφές/λεπτό. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επανάληψη του πλυσίματος.
- 4) Λύση των κυττάρων με την προσθήκη στο ίζημά τους 0,5ml διαλύματος πέψης (lysis buffer: 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA pH 8, 0,5% w/v SDS, 0,2mg/ml proteinase-K) και τοποθέτησή τους σε σωληνάρια eppendorf του 1,5ml. Επώαση των δειγμάτων στους 50°C για 12-18 ώρες υπό ανακίνηση.
- 5) Εκχύλιση των νουκλεϊνικών οξέων με 0,5ml διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (σε αναλογία 25/24/1). Προσεκτική

- ανακίνηση για την ανάμιξη της φαινολικής με την υδατική στοιβάδα (οι πρωτεΐνες εκχυλίζονται στη φαινολική φάση, ενώ τα νουκλεϊνικά οξέα στην υδατική).
- 6) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000 στροφές/λεπτό. Μεταφορά της υδατικής φάσης (επάνω) σε νέα σωληνάκια erpendorf, προσθήκη 0,5ml διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης και επανάληψη της εκχύλισης.
 - 7) Παραλαβή της υδατικής στοιβάδας και τοποθέτησή της σε νέα σωληνάκια erpendorf. Προσθήκη 0,1 όγκου (του συνολικού όγκου διαλύματος) διαλύματος 3M CH₃COONa και 2,5 όγκων διαλύματος 100% v/v EtOH. Ανάμιξη με αναστροφή και ανακίνηση των σωληναρίων.
 - 8) Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4000 στροφές/λεπτό για την παραλαβή του ιζήματος του DNA. Προσθήκη 0,5ml διαλύματος 70% v/v EtOH για το πλύσιμο του ιζήματος.
 - 9) Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4000 στροφές/λεπτό και απομάκρυνση της EtOH. Αφεση του ιζήματος για ξήρανση στον αέρα για 5-10 λεπτά.
 - 10) Διαλυματοποίηση του ιζήματος σε 0,5-1ml διάλυμα TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8) ή απεσταγμένο H₂O. Για την πλήρη διαλυματοποίηση του DNA, τοποθέτηση των δειγμάτων στους 4°C για 12-24 ώρες.
 - 11) Η συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα υπολογίζεται με βάση την απορρόφησή του (OD) στα 260nm, ενώ η καθαρότητά του προσδιορίζεται από το λόγο OD_{260nm} / OD_{280nm} (ο λόγος θα πρέπει να κυμαίνεται στο 1,8-2 για να θεωρείται καθαρό το δείγμα). Πιο συγκεκριμένα, 5μl από το διάλυμα του DNA τοποθετούνται σε 995μl διαλύματος TE ή απεσταγμένο H₂O και μετράται η απορρόφηση του τελικού διαλύματος στα 260nm και στα 280nm, με τη χρήση φωτομέτρου UV-Vis. Η συγκέντρωση του DNA προκύπτει από τον παρακάτω υπολογισμό, θεωρώντας ότι το διάλυμα DNA με OD_{260nm} = 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA = 50μg/ml:

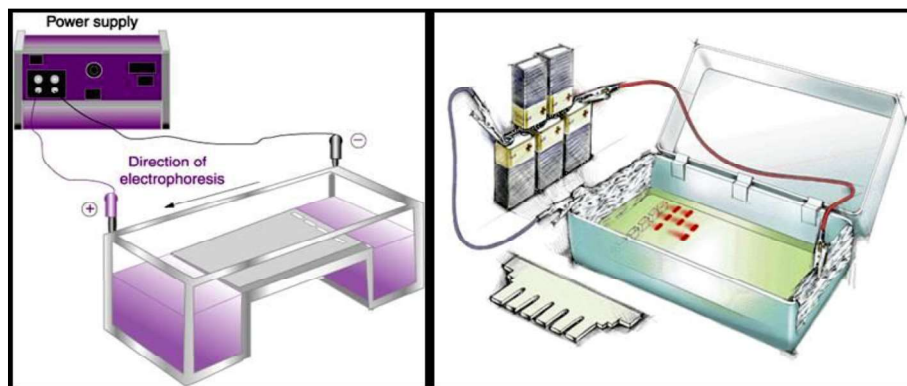
$$\frac{OD_{260nm} \times 1ml \times 50\mu g/ml}{5\mu l} = \mu g \text{ DNA} / \mu l \text{ διαλύματος}$$

5μl

- 12) Ετοιμασία 1% w/v διαλύματος αγαρόζης (0,4g αγαρόζης σε 40ml διαλύματος TAE). Τοποθέτηση του μείγματος στο φούρνο μικροκυμάτων στα 500W για 2 λεπτά για τη διάλυση της αγαρόζης και προσθήκη 2,5μl διαλύματος 10mg/ml EtBr.
- 13) Τοποθέτηση του ζεστού διαλύματος στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ειδική χτένα για τη δημιουργία των θέσεων – πηγαδιών (wells) τοποθέτησης των

δειγμάτων DNA, για το σχηματισμό της πηκτής (gel). Άφεση ~30-45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για πήξη (**Εικόνα 6**).

- 14) Η προετοιμασία των δειγμάτων DNA για ηλεκτροφόρηση γίνεται ως εξής: Παίρνεται τόσος όγκος διαλύματος που να αντιστοιχεί σε 10μg DNA και αραιώνεται με απεσταγμένο H₂O στα 20μl. Στη συνέχεια, προστίθενται 2μl διαλύματος βαφής (dye/loading buffer).
- 15) Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης, ενώ σε ένα πηγαδάκι τοποθετούνται μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους (DNA markers) για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των άγνωστων τμημάτων DNA που πιθανόν να προκύψουν μετά την επώαση των κυττάρων με τις ουσίες (**Εικόνα 6**).
- 16) Τρέξιμο της πηκτής σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE στα 100V για ~45 λεπτά.
- 17) Εξέταση του DNA κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV light) και λήψη φωτογραφίας.
- 18) Ανάλυση των αποτελεσμάτων. Σε περίπτωση ενεργοποίησης του μηχανισμού της απόπτωσης των κυττάρων, λαμβάνουμε εικόνα παρόμοια με αυτή της **Εικόνας 5**.



Εικόνα 11. Διάταξη συσκευής ηλεκτροφόρησης DNA.

§ 2.4 Ερωτήσεις

1. Περιγράψτε την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη εργαστηριακή άσκηση και αναλύστε διεξοδικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν.
2. Ποιος ο λόγος εκτέλεσης του συγκεκριμένου πειράματος και ποια η φαρμακολογική του σημασία;
3. Περιγράψτε αναλυτικά το φαινόμενο της απόπτωσης και αποδώστε τόσο τη βιολογική όσο και τη φαρμακολογική του σημασία, όσον αφορά στη δράση διαφόρων ουσιών (φαρμάκων) στον ανθρώπινο οργανισμό.