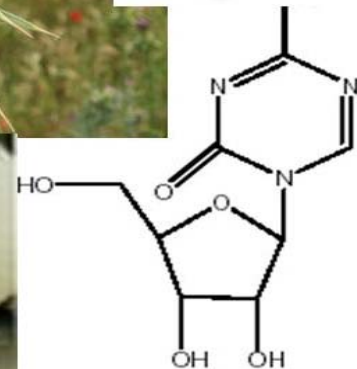


Οι επιδράσεις της silibinin και της 5'-azacytidine σε πειραματικό μοντέλο αδενοκαρκινώματος μαστού

Κουρέτα Μαρία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Επικ. Καθηγήτρια κ. Χλίχλια Αικατερίνη



• Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

Θεραπευτική δράση
έναντι
αδενοκαρκινώματος
μαστού

- Χημειοθεραπευτική ουσία 5' -
αζακυτιδίνη
- Φλαβονοειδές σιλιμπινίνη



in vitro μελέτη σε
καρκινικά κύτταρα
αδενοκαρκινώματος

- *in vitro* δοκιμές με επίδραση στις
καρκινικές κυτταρικές σειρές
MCF-7 και DA-3



in vivo μοντέλο
αδενοκαρκινώματος
μαστού

- συγγονικό μοντέλο
αδενοκαρκινώματος μαστού
ποντικού BALB/c

• Καρκίνος μαστού

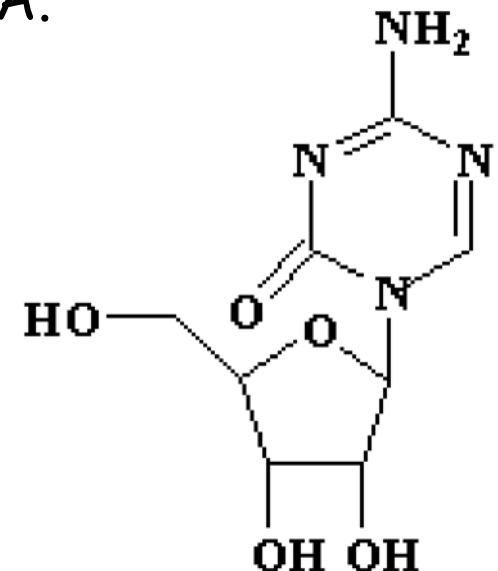


- Συνηθέστερος καρκίνος στις γυναίκες με συχνότητα εμφάνισης που αυξάνει σταθερά
- Στην Ευρώπη κάθε χρόνο γίνεται διάγνωση ~250.000 νέων περιστατικών και 175.000 περιστατικών στις Ηνωμένες Πολιτείες
- Ετήσια ποσοστά θανάτου είναι πάνω από 165.000 ασθενείς στην Ευρώπη και 44.000 στις Ηνωμένες Πολιτείες
- Αφορά το 10% των Ελληνίδων

• 5'-αζακυτιδίνη

- Η 5'-αζακυτιδίνη (5AzC) ανήκει στην κατηγορία των «αντιμεταβολιτών», είναι επιγενετικός παράγοντας, συντέθηκε το 1964 από τον *Piskala et al.*, ως αντικαρκινικό φάρμακο.
- Είναι ανάλογο της κυτιδίνης $\longrightarrow$ ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό των κυττάρων και δρα μεταβάλλοντας τον τρόπο με τον οποίο το κύτταρο ενεργοποιεί και απενεργοποιεί τα γονίδια και παρεμβαίνει στην παραγωγή νέου RNA και DNA.

Azacitidine



Δράσεις 5' -αζακυτιδίνης

- Οδηγεί το κύτταρο σε **απόπτωση** (*Kiziltepe et al., 2007; Jiemjit et al., 2008*).
- Παρεμβαίνει στην **υπομεθυλίωση του DNA** $\Rightarrow$ φυσιολογική και ελεγχόμενη ανάπτυξη και διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων (*Jones et al., 1983; Ghoshal and Bai, 2007; Quintas-Cardama et al., 2008*).
- **Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης** : ενσωματώνεται στο RNA και σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί μετατροπές στη σύνθεση και την επεξεργασία του RNA.
- Πιθανόν ενισχύει την **αντιγονοπαρουσίαση** μέσω επιγενετικών αλλαγών που προκαλεί, αντίστοιχα με την 5-AZA-CdR, που οδηγεί σε αποδεδειγμένη αύξηση της έκφρασης CTAs (*Coral et al., 2006*) και επακόλουθα στην **καταστροφή** των καρκινικών κυττάρων από τα ενεργοποιημένα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTL) (*Weber et al., 1994; Coral et al., 2002; Gattei et al., 2005; Sigalotti et al., 2005*).

Δράσεις 5'-αζακυτιδίνης

- Προκλινικά πρωτόκολλα για θεραπευτική δράση :

1. της 5'-αζακυτιδίνης σε πειραματικά μοντέλα **λεμφωμάτων και λευχαιμιών** (Sorm et al., 1964)
2. της 5-AZA-CdR σε **εγκεφαλικά γλοιώματα** (Natsume et al., 2008)
3. της 5' deoxy-azacytidine σε **μοντέλο μετάστασης πνεύμονα** (Guo et al., 2007)

➡ **ενθαρρυντικά θεραπευτικά αποτελέσματα και αξιοσημείωτες παρατηρήσεις για την επιγενετική τους δράση και την τροποποίηση ανοσορυθμιστικών παραγόντων.**

- Επιγενετικές αλλαγές 5'-αζακυτιδίνης :

1. ανοσορυθμιστικές τροποποιήσεις των Τ-λεμφοκυττάρων (Sanchez-Abarca et al., 2009)
2. *in vivo* επαγωγή της ανταλλαγής μεταξύ τμημάτων των αδερφών χρωματίδων (Morales-Ramirez et al., 2007).

Θεραπευτικές ενδείξεις 5'-αζακυτιδίνης

Σύμφωνα με τον Ε.Μ.Ε.Α ενδείκνυται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών που δεν είναι κατάλληλοι για μεταμόσχευση αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων με:

1. μεσαίου-2 και υψηλού κινδύνου μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα
2. χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία
3. οξεία μυελογενή λευχαιμία

Πειραματικό μέρος

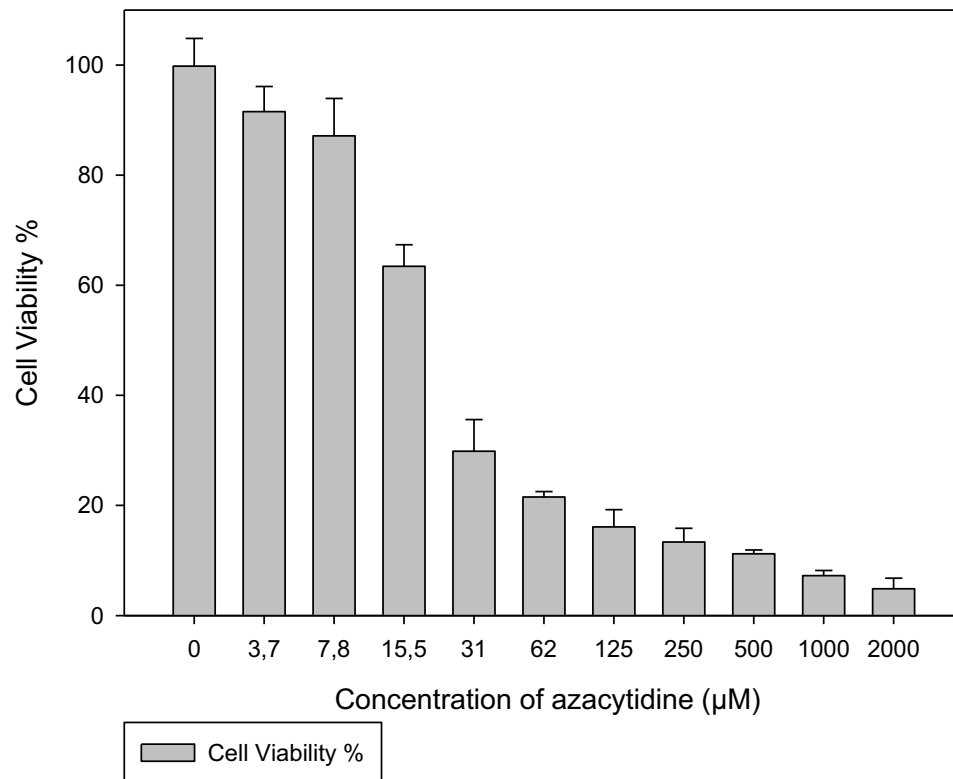


In vitro (καρκινικές κυτ.
σειρές DA-3 και MCF-7)

In vivo (μύες BALB/c, αρ. T/1773)

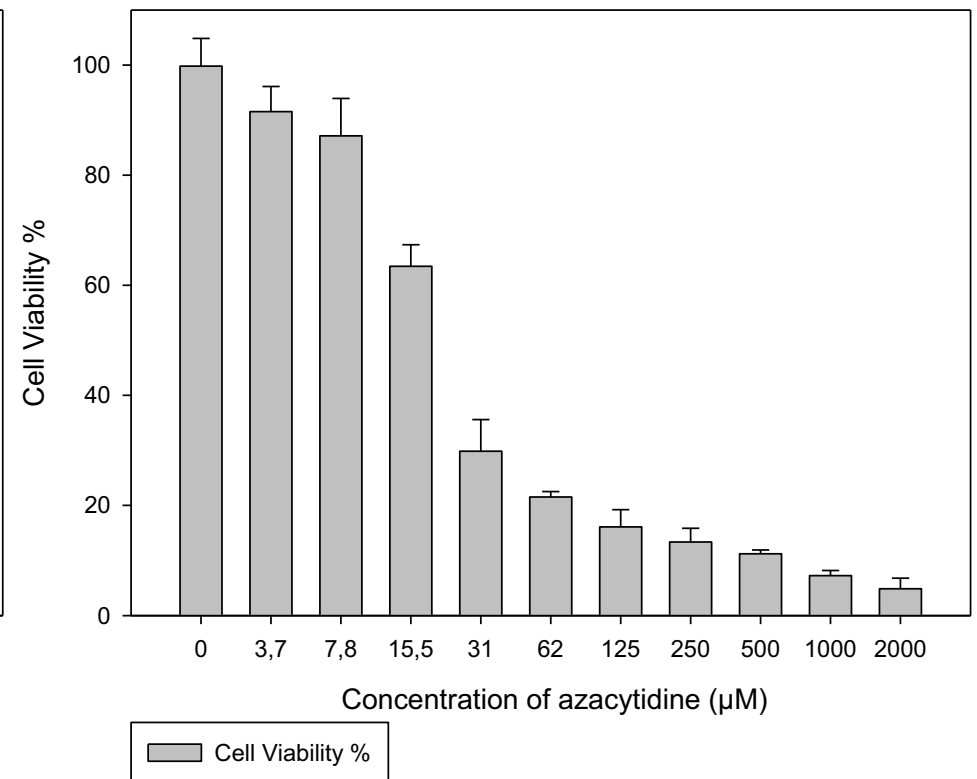
• *In vitro* - προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας των DA-3 υπό την επίδραση 5'-αζακυτιδίνης

24ωρή χορήγηση



EC50: $18,1 \pm 4,32 \mu\text{M}$

Εφάπαξ

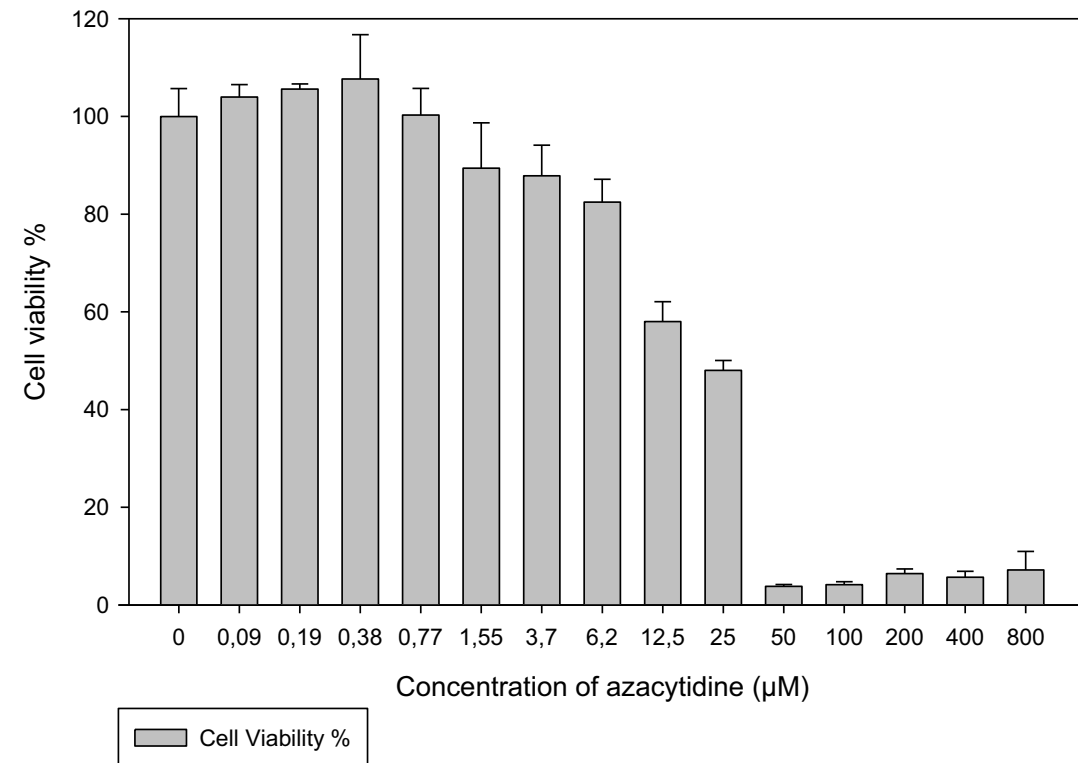


$30,54 \pm 5,66 \mu\text{M}$

($p < 0,01$)

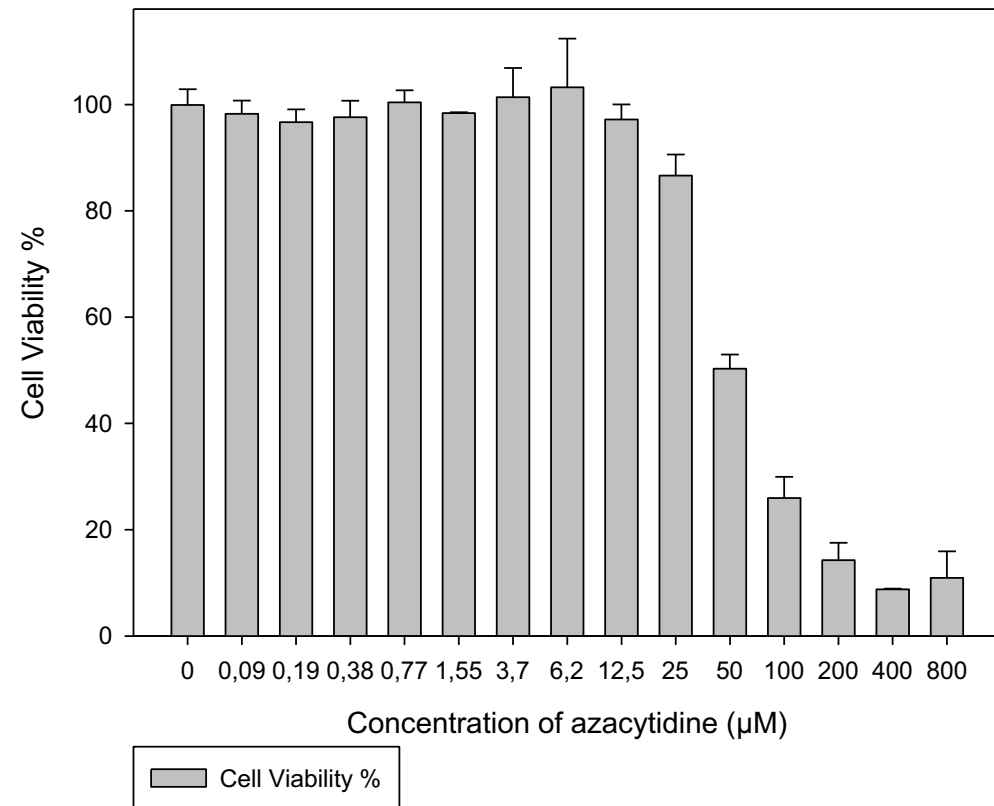
- *In vitro* - προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας των MCF-7 υπό την επίδραση 5'-αζακυτιδίνης

24ωρή χορήγηση



EC50: $18,87 \pm 3,82 \mu\text{M}$

Εφάπαξ

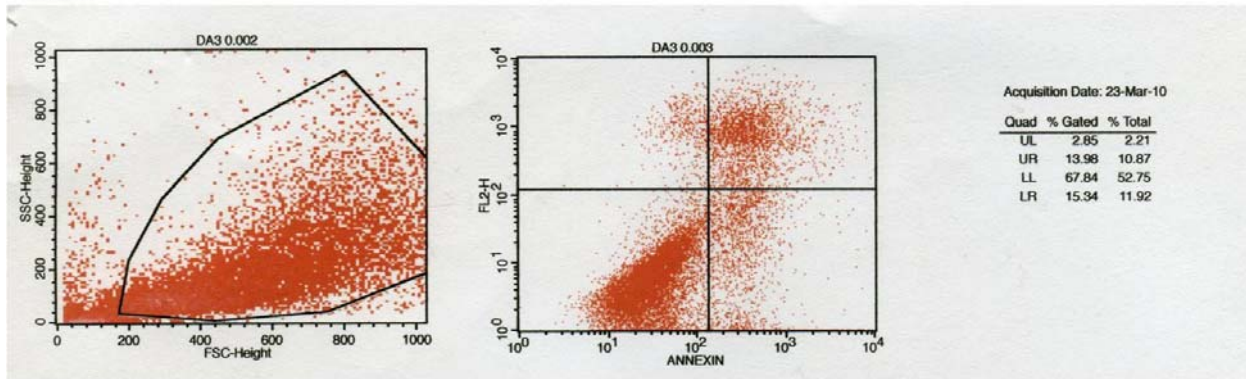


$32,75 \pm 1,80 \mu\text{M}$

($p < 0,01$)

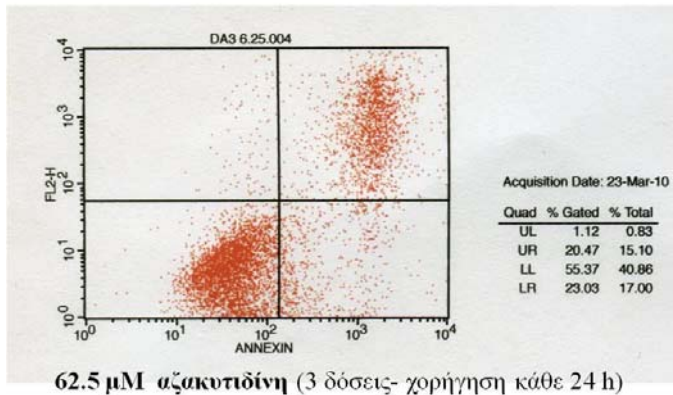
Κυτταρομετρία ροής - καρκινικά κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού ποντικού υπό την επίδραση 5'-αζακυτιδίνης

DA-3

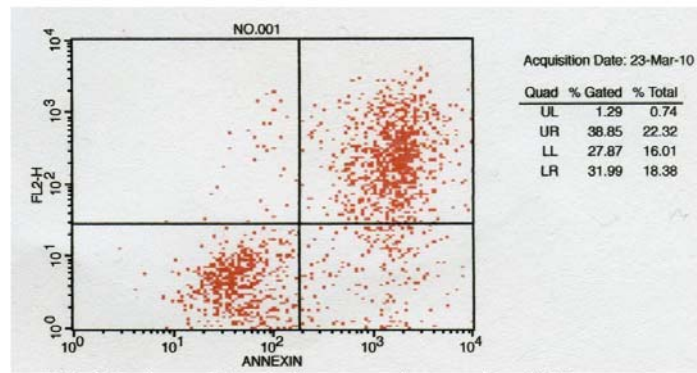


0 μ M αζακυτιδίνη (3 δόσεις- χορήγηση κάθε 24 h)

✓ Κυτταροτοξική δράση της 5'-azacytidine

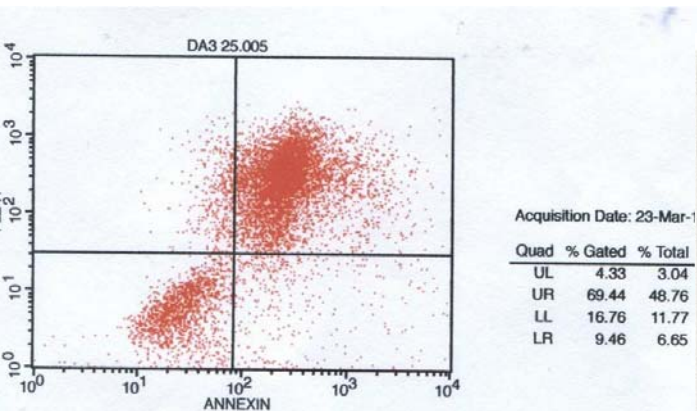


62.5 μ M αζακυτιδίνη (3 δόσεις- χορήγηση κάθε 24 h)

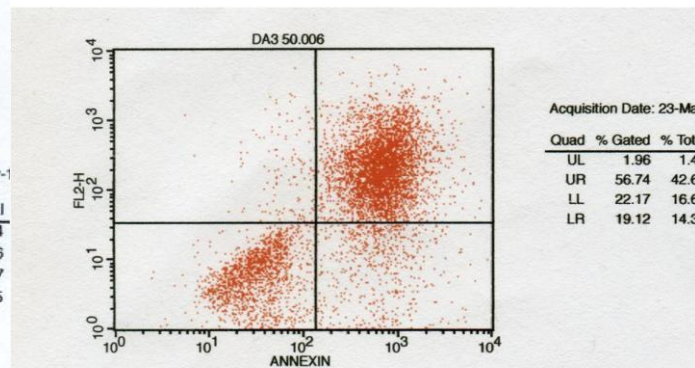


125 μ M αζακυτιδίνη (3 δόσεις- χορήγηση κάθε 24 h)

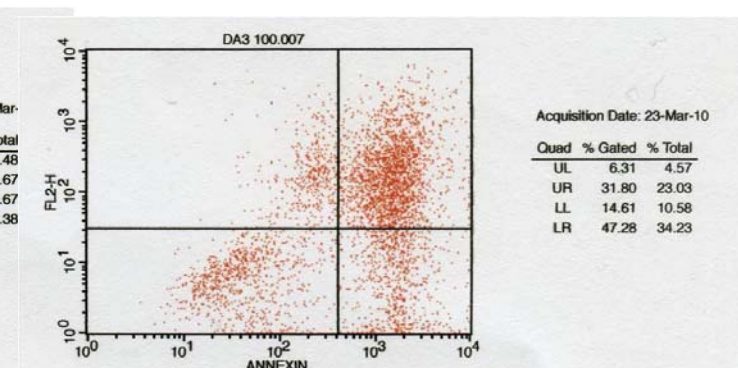
✓ Πιθανόν χωρίς ενεργοποίηση μονοπατιών απόπτωσης.



50 μ M αζακυτιδίνη (3 δόσεις- χορήγηση κάθε 24 h)



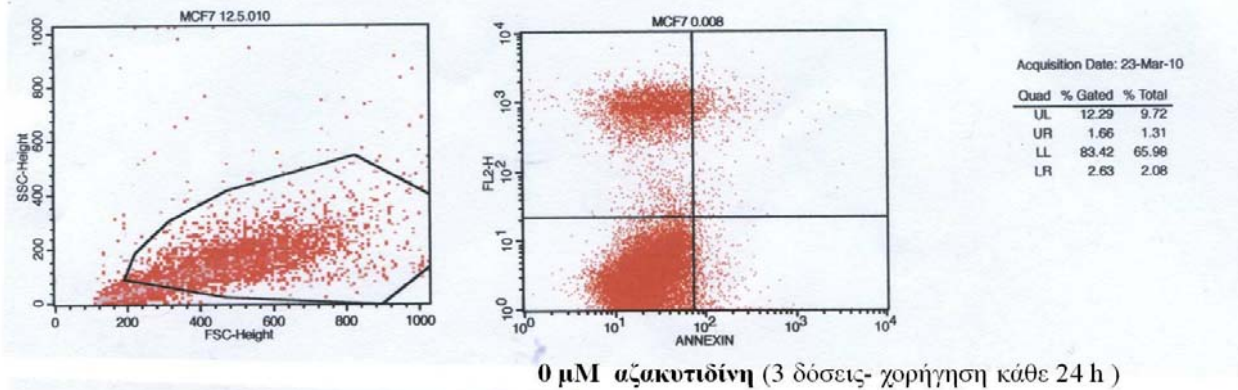
500 μ M αζακυτιδίνη (3 δόσεις- χορήγηση κάθε 24 h)



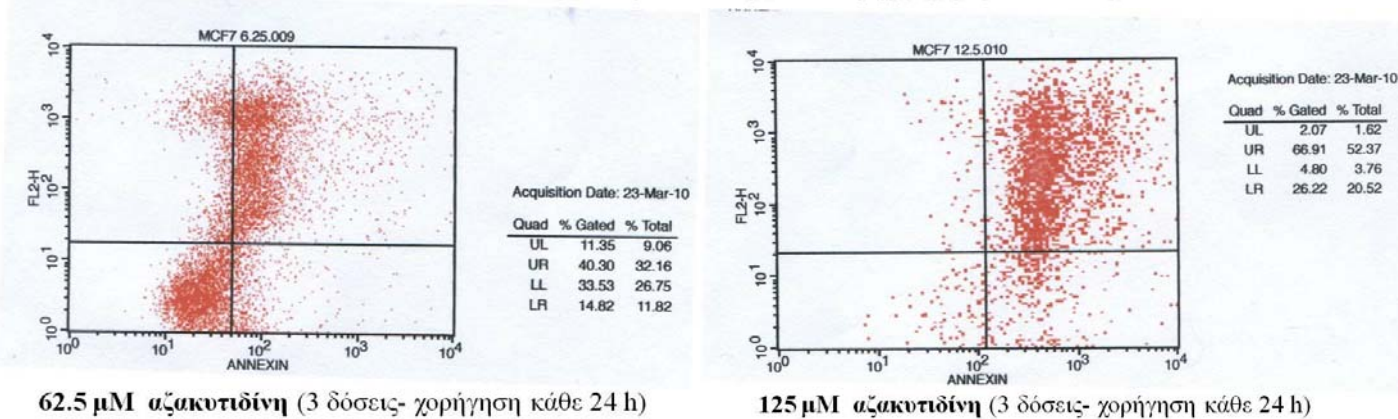
1000 μ M αζακυτιδίνη (3 δόσεις- χορήγηση κάθε 24 h)

Κυτταρομετρία ροής - καρκινικά κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού ανθρώπου υπό την επίδραση 5'-αζακυτιδίνης

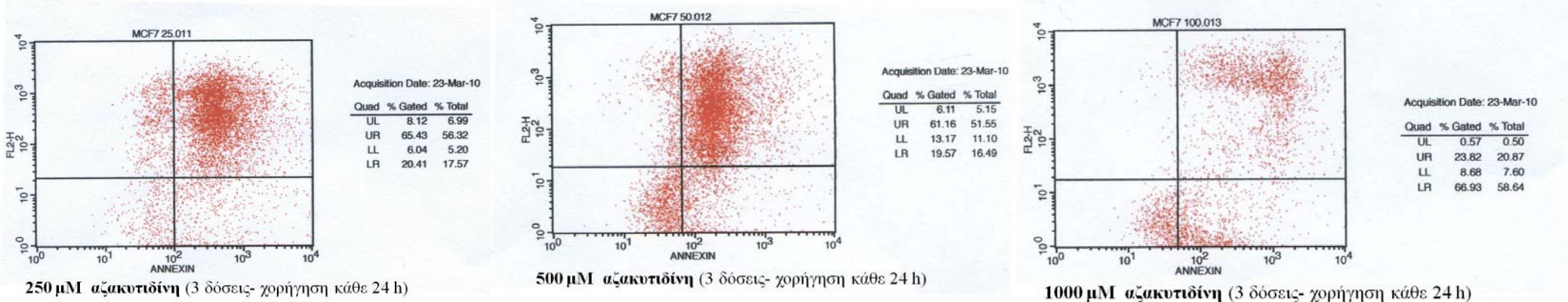
MCF-7



✓ Κυτταροτοξική δράση της 5'-azacytidine



✓ Πιθανόν χωρίς ενεργοποίηση μονοπατιών απόπτωσης.



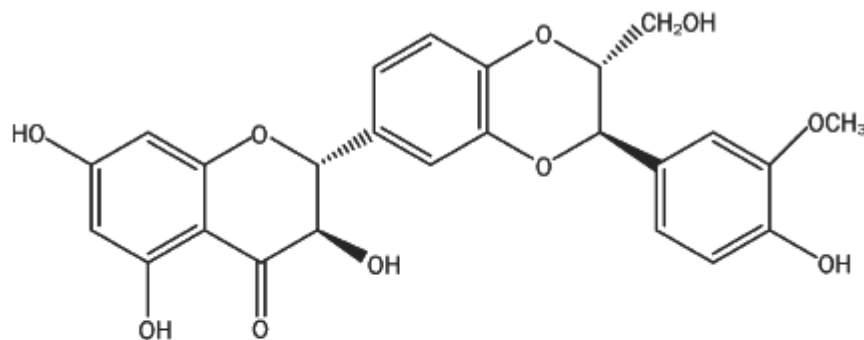
❑ Σιλιμπινίνη

- Συμπλήρωμα διατροφής που τα τελευταία χρόνια έχει γίνει ιδιαιτέρως γνωστό εξαιτίας της αποδεδειγμένης ικανότητάς του να προλαμβάνει ή να θεραπεύει κάποιες μορφές καρκίνου.

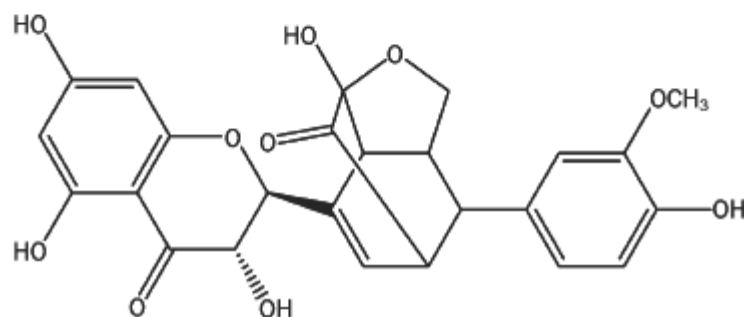
- Φλαβονοειδές το οποίο εκχυλίζεται ως γάλα από το φυτό «γαϊδουράγκαθο» (milk thistle) και την αγκινάρα.



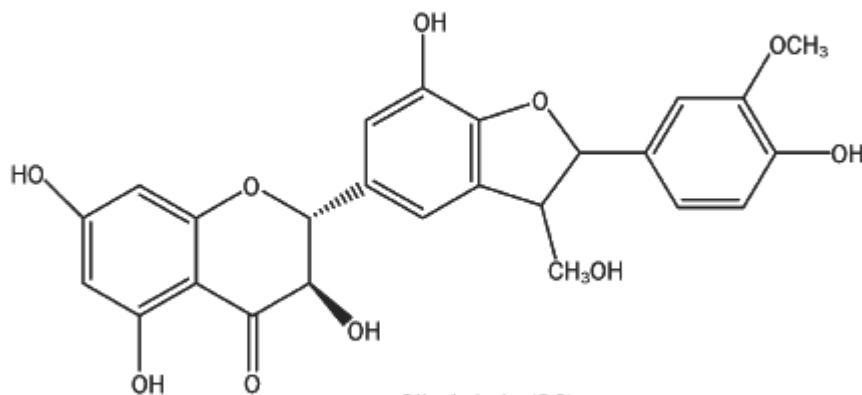
- Σημαντικότερο ενεργό συστατικό της σιλυμαρίνης, δηλ. αρχικού μίγματος φλαβονοειδών που εκχυλίζονται από το «γαϊδουράγκαθο» *Silybum marianum* (οικογένεια Asteraceae/Compositae) και αποτελείται από τη silibinin A και B, την isosibilinin A και B, τη silicristin και τη silidianin.



Silibinin (SB)



Silydianin (SD)

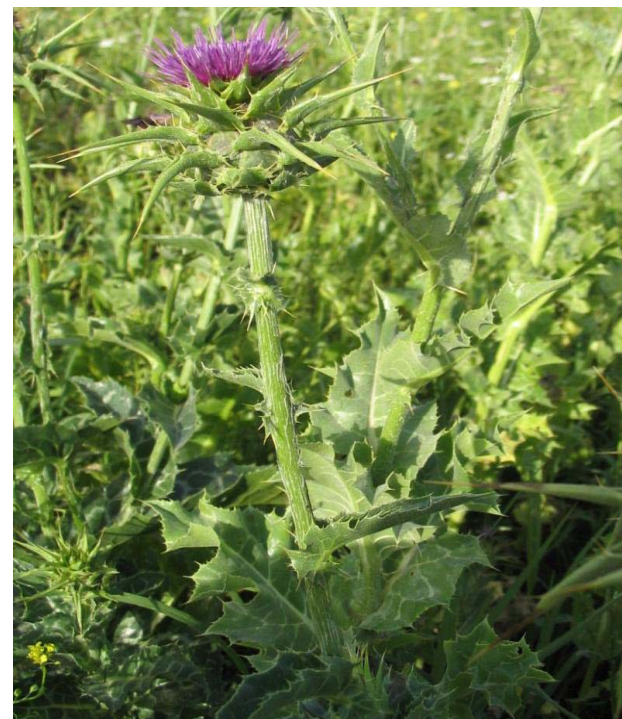


Silychristin (SC)

Figure 1. Chemical structures of silibinin (SB), silydianin (SD), and silychristin (SC).

• Η *σιλυμαρίνη* χρησιμοποιείται εδώ και 2000 χρόνια σαν φάρμακο για τη θεραπεία του ήπατος από δηλητηριάσεις που προέρχονται από χημικές και περιβαλλοντικές τοξίνες.

• Η *σιλυμαρίνη* αποτελείται κυρίως από silibinin (SB) μαζί με μικρά ποσοστά άλλων στερεοϊσομερών όπως σιλυδιανίνη- silydianin (SD) και σιλυκριστίνη- silychristin (SC)



❑ Αντικαρκινική δράση σιλιμπινίνης

- Έχει μελετηθεί σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όπως ήπατος, πνεύμονα, ουροδόχου κύστης, προστάτη και τραχήλου της μήτρας (Gazak et al., 2007), καθώς και αδενοκαρκινώματα και ανθρώπινα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα (Varghese L, 2005; Singh R. et al, 2008)
- Προστασία των κυττάρων του δέρματος από φωτοκαρκινογένεση από τις ακτινοβολίες UVA και UVB (Hung et al., 2010)
- Καταστολή της βλάβης από την ακτινοβολία UVA στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (Hung et al., 2010)

❑ Αντικαρκινική δράση σιλιμπινίνης

- Διακόπτει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων προστάτη *in vitro*, στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου
- Αύξηση της απόπτωσης και παρεμπόδιση της αγγειογένεσης *in vivo*
- Αναστολή σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως το PI3K-Akt και το MAPK (Handorean A. et al., 2009)

□ Σιλιμπινίνη

- Έχει χρησιμοποιηθεί με ιδιαίτερη ασφάλεια, αφού **δεν είναι τοξική** ούτε και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις εξαιτίας της πολύ χαμηλής διαλυτότητάς της (0.5 g/L H₂O) με χορήγηση από το στόμα ή ενδοφλέβια, όπως έχει αποδειχθεί σε πειραματικά *in vivo* μοντέλα (Wellington et al., 2001).
- Στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν το μείγμα φλαβονοειδών της σιλυμαρίνης (Flora et al., 1998) **στηρίζεται και η ηπατοπροστατευτική δράση της.**

□ Αντιοξειδωτική δράση σιλιμπίνης

- Σύμφωνα με *in vitro* πειράματα:

Διατηρεί τα επίπεδα
της γλουταθειόνης-
GSH στα ηπατικά
κύτταρα



Άμεση καταστολή
της δραστηριότητας
των ελευθέρων
ριζών οξυγόνου
(οξειδωτικό στρες)



Σταθεροποίηση της
κυτταρικής
μεμβράνης ηπατικών
κυττάρων

Kidd P., 2009 ; Mira et al., 1994

- Καταστολή της υπεροξειδωσης των μεμβρανικών λιπιδίων σε ηπατοκύτταρα επίμυων εμποδίζοντας την πρόκληση βλαβών του DNA, οι οποίες σχετίζονται με την επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και ανιόντων υπεροξειδίου (Bosisio et al., 1992)

Πειραματικό μέρος

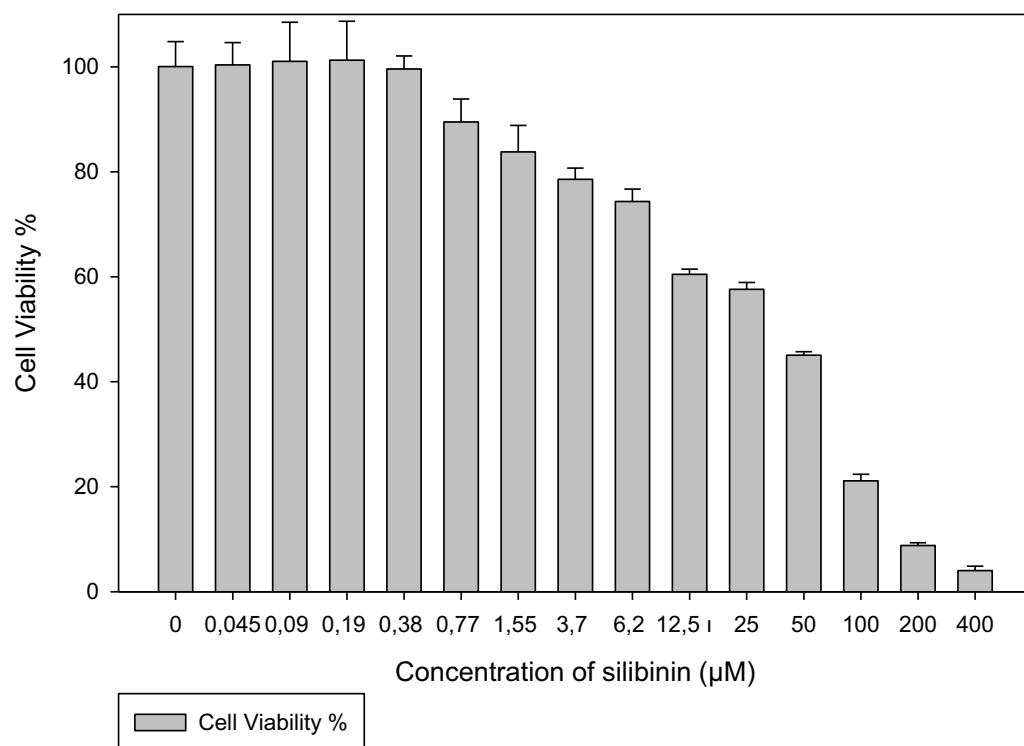


In vitro (καρκινικές κυτ.
σειρές DA-3 και MCF-7)

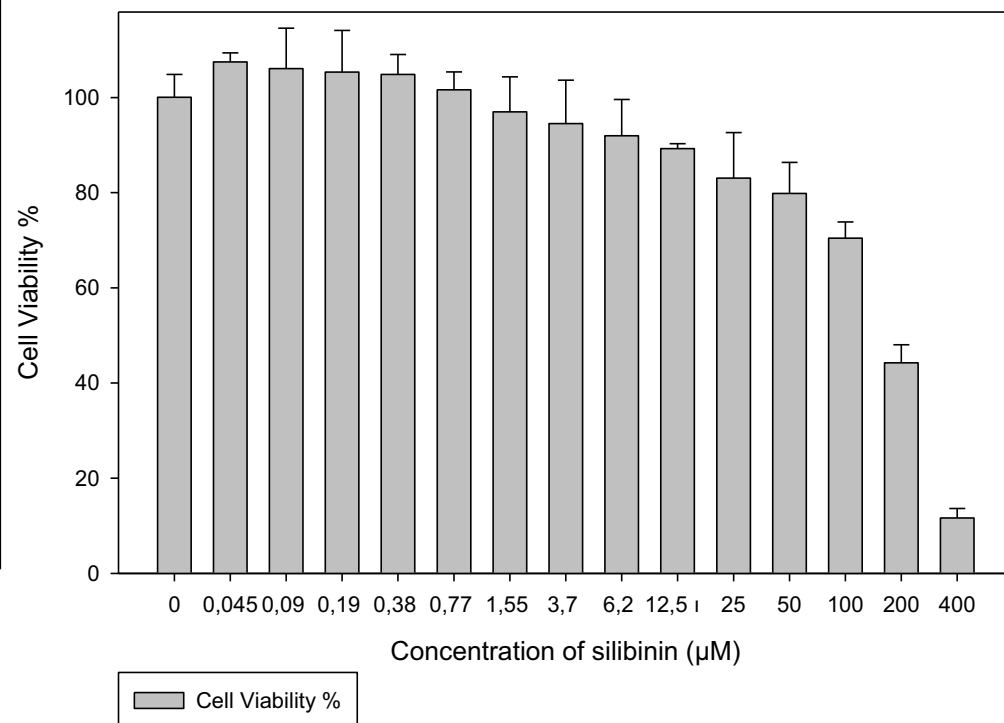
In vivo (μύες BALB/c, αρ. T/1773)

- *In vitro* - προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας των DA-3 υπό την επίδραση σιλιμπινίνης

24ωρη χορήγηση



Εφάπαξ



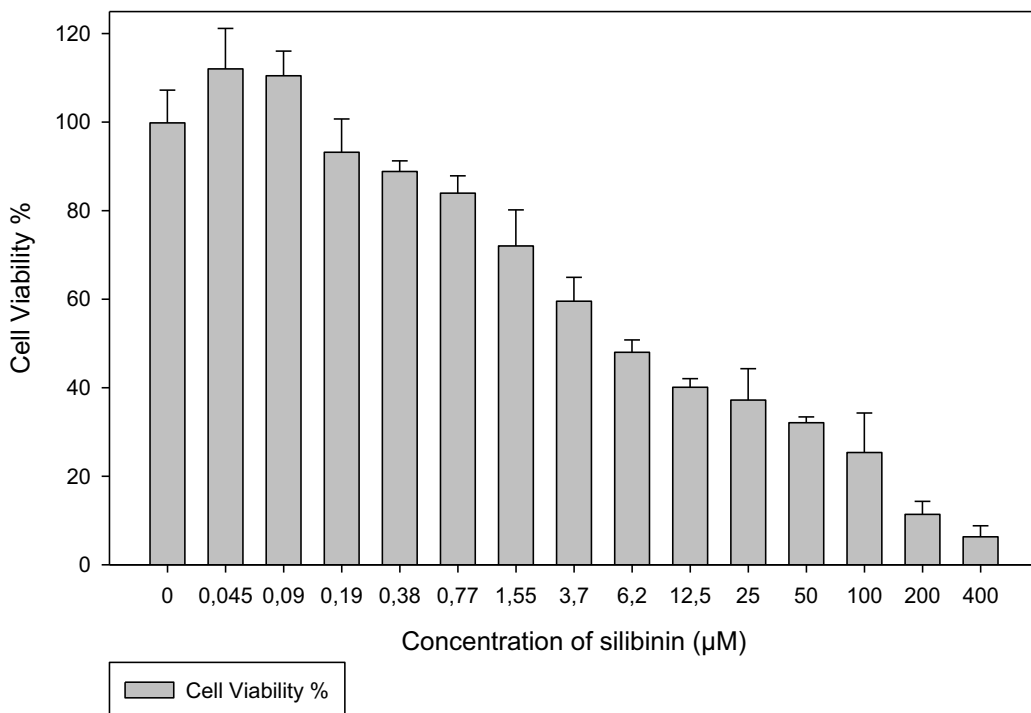
EC50: $45,05 \pm 4,41 \mu\text{M}$

$126,74 \pm 2,56 \mu\text{M}$

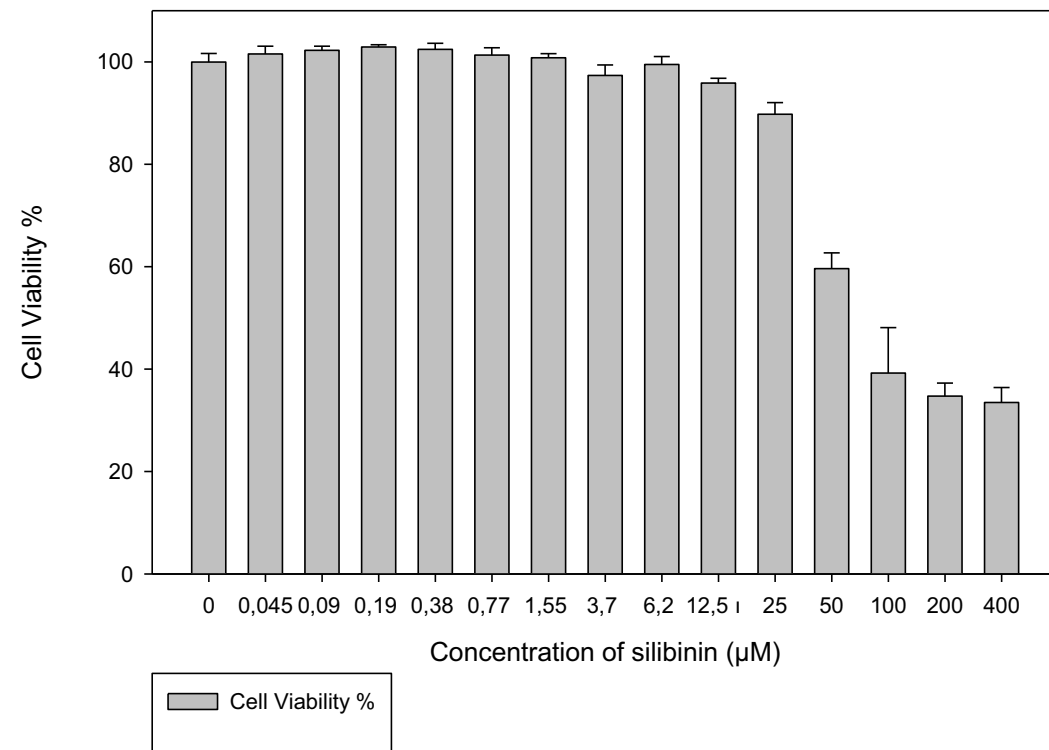
($p < 0,01$)

- *In vitro* - προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας των MCF-7 υπό την επίδραση σιλιμπινίνης

24ωρη χορήγηση



Εφάπαξ



EC50: $13,66 \pm 1,85 \mu\text{M}$

$48,26 \pm 5,46 \mu\text{M}$

($p < 0,01$)

Πειραματικό μέρος



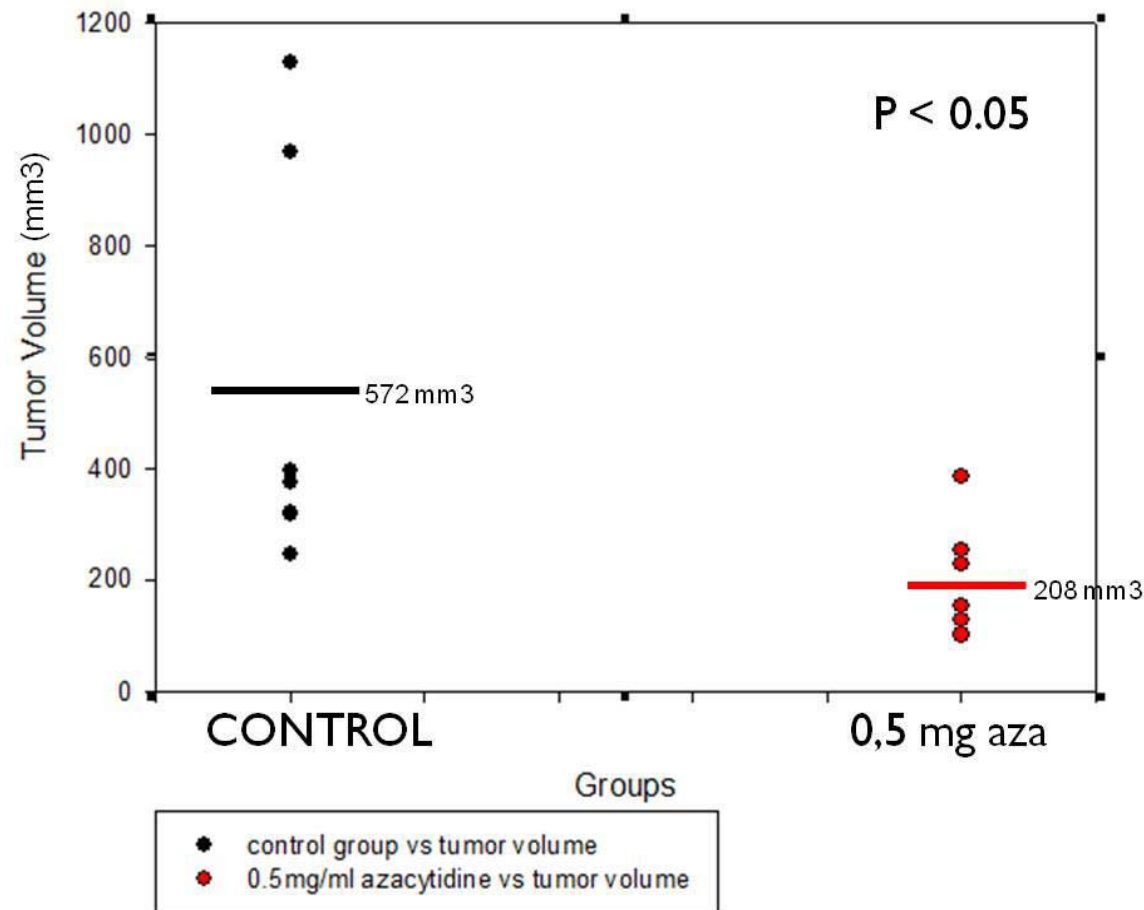
In vitro (καρκινικές κυτ. σειρές
DA-3 και MCF-7)



In vivo (μύες BALB/c)

(αρ. άδειας T/1773)

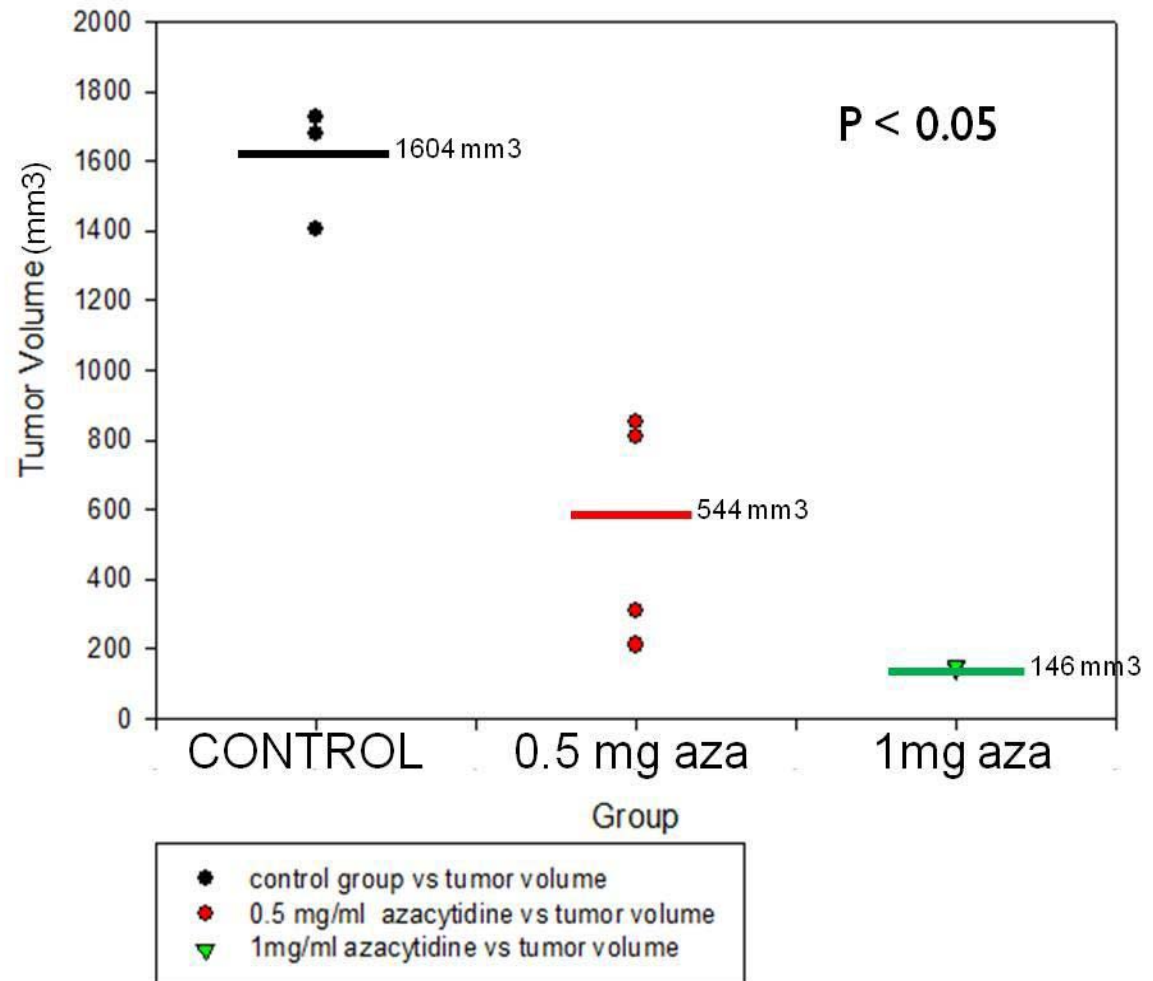
- *In vivo*- 5'-αζακυτιδίνη σε ζωικό συγγονικό μοντέλο αδενοκαρκινώματος μαστού



Ομάδα Α:

✓ Μείωση της τάξης του **64%** στο μέγεθος του όγκου ($p = 0,045 < 0,05$).

- *In vivo*- 5'-αζακυτιδίνη σε ζωικό συνγονικό μοντέλο αδενοκαρκινώματος μαστού



Ομάδα Α:

✓ Μείωση της τάξης του **66%** στο μέγεθος του όγκου ($p = 0,004 < 0,05$).

Ομάδα Β :

✓ Μείωση της τάξης του **90%** ($p = 0,004 < 0,05$).

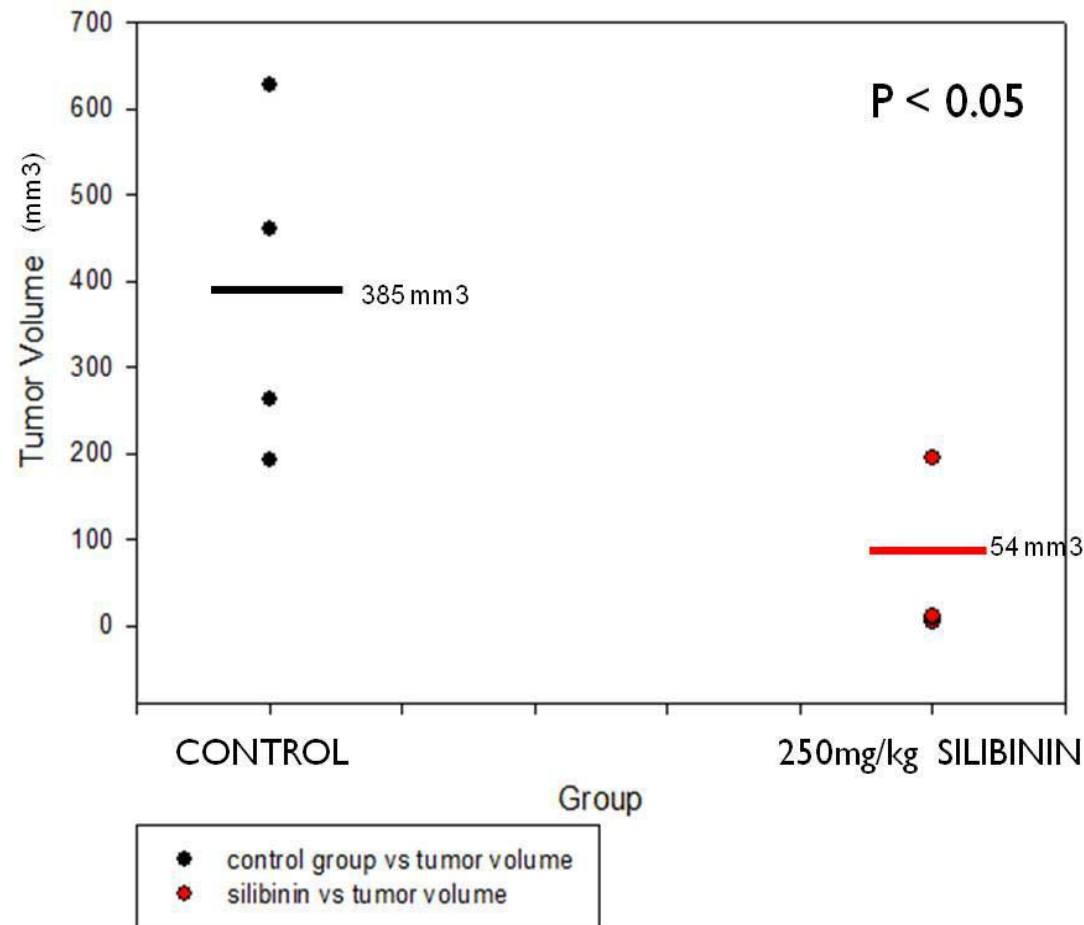
✓ Ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία έπειτα από μακροσκοπική εξέταση των οργάνων

Συμπεράσματα

5'-αζακυτιδίνη:

- Επιβεβαιώθηκε η κυτταροτοξική δράση της 5' αζακυτιδίνης
- Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση που οδηγεί σε μείωση στο 50% της κυτταρικής βιωσιμότητας (EC50) των καρκινικές κυτταρικών σειρών MCF-7 και DA-3.
- Παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 65% στο μέγεθος του όγκου σε δόσεις των 0,5 mg / πειραματόζωο (20 mg/kg σωματικού βάρους πειραματοζώου).
- Διαπιστώθηκε θεραπευτική δράση της 5-AZA ακόμα και σε πειραματικά εγκαθιδρυμένους όγκους.

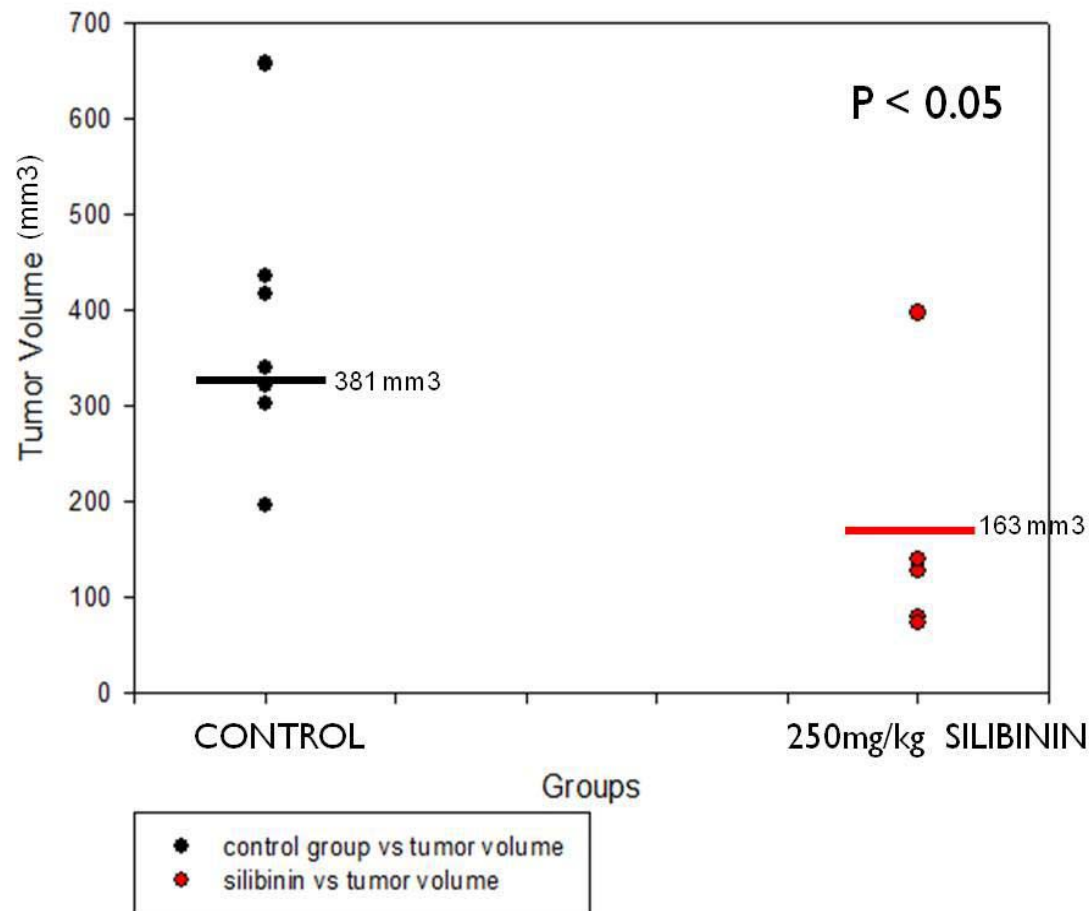
- *In vivo*- Σιλιμπινίνη σε ζωικό συγγονικό μοντέλο αδενοκαρκινώματος μαστού



Ομάδα Α:

- ✓ Μείωση της τάξης του 86% ($p = 0,023 < 0,05$).
- ✓ Απουσία τοξικότητας μετά από μακροσκοπική παρατήρηση των οργάνων
- ✓ Χημειοπροστατευτική / χημειοπροληπτική δράση

- *Ιn vivo*- Σιλιμπινίνη σε ζωικό συγγονικό μοντέλο αδενοκαρκινώματος μαστού



Ομάδα Α:

- ✓ Μείωση του όγκου στο **57%** ($p = 0,024 < 0,05$).
- ✓ Απουσία τοξικότητας μετά από μακροσκοπική παρατήρηση των οργάνων.

Συμπεράσματα

Σιλιμπινίνη:

- Επιβεβαιώθηκε η αρνητική δράση της σιλιμπινίνης στην ανάπτυξη κυττάρων αδеноκαρκινώματος μαστού.
- Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση που οδηγεί σε μείωση στο 50% της κυτταρικής βιωσιμότητας (EC50) των καρκινικές κυτταρικών σειρών MCF-7 και DA-3.
- Παρατηρήθηκε έντονη ανασταλτική δράση της σιλιμπινίνης έναντι του όγκου στο συνγονικό πειραματικό μοντέλο αδеноκαρκινώματος μαστού, όταν χορηγήθηκε απευθείας με την υποδόρια έγχυση των καρκινικών κυττάρων ή μία μέρα πριν από αυτή.
- Διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη μείωση του μεγέθους του όγκου στο 57-86%, ενώ **δεν παρατηρήθηκε** κανένα σύμπτωμα τοξικότητας.

Ευχαριστίες

- Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ανοσοβιολογίας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης στην Αλεξανδρούπολη σε διάστημα επτά μηνών, από το Φεβρουάριο έως το Σεπτέμβριο του 2010,

Υπό την επίβλεψη της:

Επικ. Καθ. κ. Αικατερίνης Χλίχλια, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δ.Π.Θ.

Σε συνεργασία με:

Επικ. Καθ. κ. Κοτσιανίδη Ιωάννη, Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης

Επικ. Καθηγήτρια κ. Παππά Αγλαΐα, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δ.Π.Θ.

Σας ευχαριστώ πολύ για την προσοχή σας!