

Βιολογικές Δοκιμασίες για τον Προκλινικό Ελεγχο Νέων Μορίων με Αντικαρκινική Δραστηριότητα: το Παράδειγμα Ημισυνθετικών Αναλόγων της Ολευρωπεΐνης

Ευαγγελία Νίκου^{1*}, Νικόλαος Αγγέλης¹, Οδυσσεύς Λιάγκας¹, Παναγιώτα Παπακότση², Γεωργία Σαδικάκη², Ευθύμιος Παρώνης¹, Νικόλαος Ωρολογάς-Σταύρου¹, Ιωάννης Κωστόπουλος¹, Παντελής Ρουσακής¹, Χρυσάνθη Παντελή¹, Γεωργία Δημητρακοπούλου¹, Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης², Ιωάννης Κ. Κωστάκης^{3*}, Ουρανία Τσιτσιλώνη^{1*}

¹Μονάδα Κυτταρομετρίας Ροής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ²Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής και ³Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, 15784, Ιλίσια, Αθήνα, Ελλάδα

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:
ανάπτυξη νέων φαρμάκων; αντικαρκινική δράση; *in silico* έλεγχος; *in vitro* έλεγχος; *in vivo* έλεγχος

ARTICLE INFO:
Received: May 22, 2023
Accepted: May 30, 2023
Available on line: July, 28, 2023

ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑ:
Ευαγγελία Νίκου
eunikou@med.uoa.gr;
Ιωάννης Κωστάκης
ikkostakis@pharm.uoa.gr;
Ουρανία Τσιτσιλώνη
rtsitsil@biol.uoa.gr

ABSTRACT

Η τοξικότητα και η περιορισμένη αποτελεσματικότητα πολλών παραδοσιακών χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων καθιστούν επιτακτική την ανάγκη ανεύρεσης νέων στόχων και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου. Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων με αντικαρκινική δραστηριότητα αποτελεί μια επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία και απαιτεί το συνδυασμό μιας πληθώρας *in silico*, *in vitro*, και *in vivo* τεχνικών και κλινικών δοκιμών. Η ραγδαία ανάπτυξη της πληροφορικής παρέχει τρομερές δυνατότητες και τα *in silico* προγράμματα χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανακάλυψη νέων στόχων. Παράλληλα, με τις *in vitro* δοκιμασίες αξιολογούνται οι αλληλεπιδράσεις των πιθανών φαρμακευτικών ουσιών σε κυτταρικά συστήματα. Στο τελευταίο στάδιο του προκλινικού ελέγχου που αφορά τα *in vivo* μοντέλα, μελετάται η φαρμακοκινητική, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των υποψήφιων μορίων σε πειραματόζωα. Η συγκεκριμένη ανασκόπηση αποσκοπεί να παρουσιάσει μια σειρά από *in silico*, *in vitro* και *in vivo* τεχνικές που χρησιμοποιούνται στον προκλινικό έλεγχο για την αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης ουσιών. Παρουσιάζονται οι πιο συνηθισμένες *in silico* προσεγγίσεις, καθώς και *in vitro* τεχνικές για τον έλεγχο της δραστηριότητας των ουσιών, τον επαγόμενο τύπο κυτταρικού θανάτου, το βαθμό μεταβολής του κυτταρικού διπλασιασμού και των αλλαγών στον κυτταρικό κύκλο, κάποια *in vivo* μοντέλα για

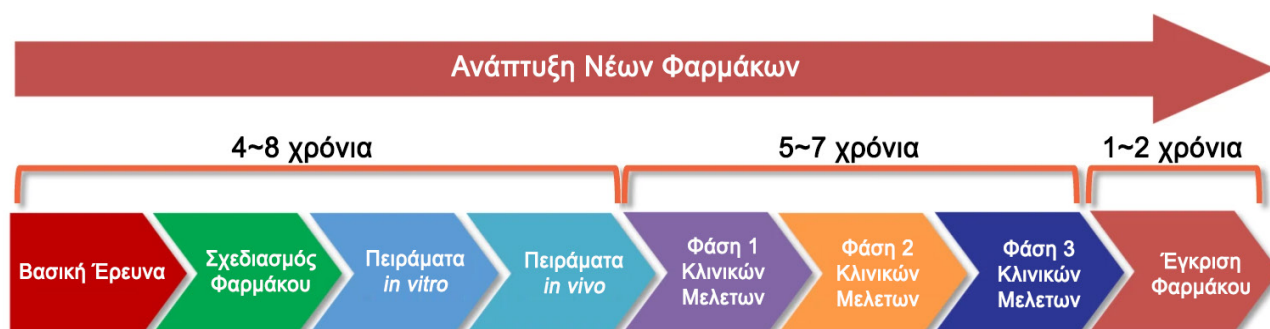
τον έλεγχο της ανάπτυξης του όγκου, αλλά και η αξιολόγηση της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος *ex vivo*. Τέλος, παρουσιάζεται επιγραμματικά η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται στη Μονάδα Κυτταρομετρίας Ροής του Τμήματος Βιολογίας σε συνεργασία με το Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ για την αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης ενός νέου αναλόγου της ολευρωπεΐνης, παραθέτοντας ορισμένα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

1. Εισαγωγή

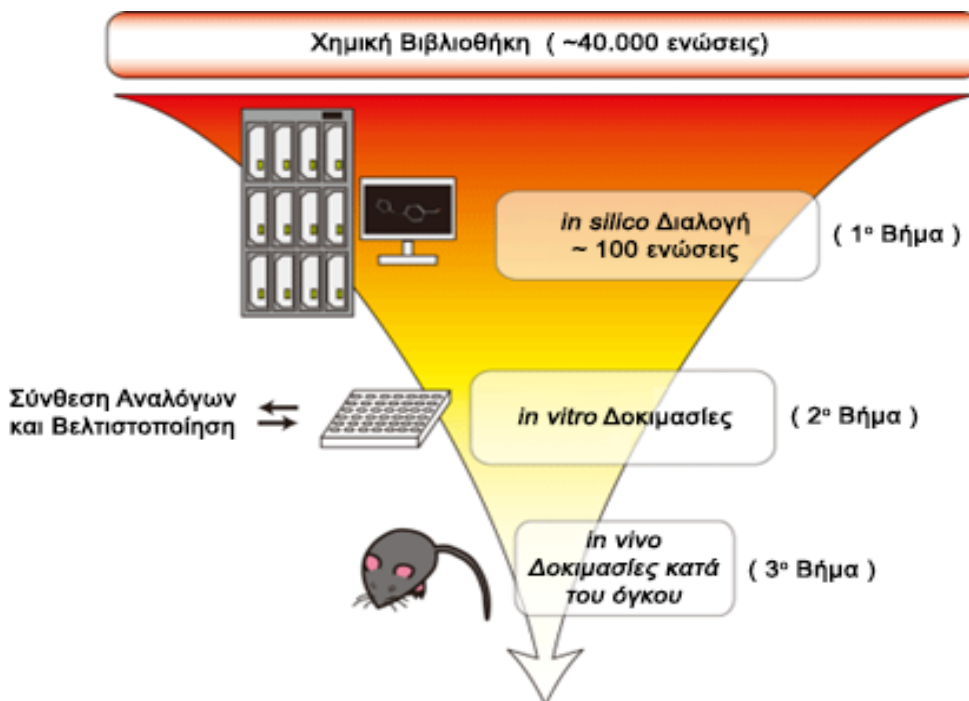
Παρόλη τη σημαντική πρόοδο στην αντιμετώπιση και διαχείριση των νεοπλασιών τις τελευταίες τρεις δεκαετίες ¹, ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως ². Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) υπολογίζει ότι μέχρι το 2040 θα έχουν προκύψει παγκοσμίως 30,2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου και 16,3 εκατομμύρια νέοι θάνατοι ³. Ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας και του θυρεοειδούς είναι οι πιο συχνοί τύποι καρκίνου που εμφανίζονται στις γυναίκες, ενώ ο καρκίνος του προστάτη, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, της ουροδόχου κύστης και το μελάνωμα είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι στους άντρες ⁴.

Οι θεραπείες που εφαρμόζονται διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου και το στάδιο της νόσου και περιλαμβάνουν τη χειρουργική εκτομή του όγκου, τη χημειοθεραπεία, την ακτινοθερα-

πεία, την ορμονοθεραπεία, την ανοσοθεραπεία, καθώς και άλλες στοχευμένες θεραπείες. Οι καρκίνοι που διαγιγνώσκονται σε αρχικό στάδιο συνήθως είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμοι, όμως ο μεταστατικός καρκίνος είναι πολύ δύσκολο να αντιμετωπιστεί με τις κλασικές θεραπείες ⁵. Η διαδικασία για την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών φαρμάκων είναι επίπονη, χρονοβόρα και ιδιαίτερα ακριβή. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τον προκλινικό έλεγχο μέχρι να διατεθεί ένα συγκεκριμένο φάρμακο στην αγορά μπορεί να διαρκέσει 10-17 χρόνια και το συνολικό κόστος να κυμανθεί μεταξύ 2-3 δισεκατομμυρίων δολαρίων ^{6,7} (Εικόνα 1). Έχει υπολογιστεί ότι για κάθε 5.000 ουσίες που ελέγχονται προκλινικά, μόνο μία ή δύο θα λάβουν τελική έγκριση για κλινική χρήση ⁸. Μέσα στις τελευταίες έξι δεκαετίες έχει ανακαλυφθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός αντικαρκινικών φαρμάκων, πολλά από τα οποία όμως δεν έχουν καταφέρει να εκπληρώσουν τις προσδοκίες των ερευνητών σε κλινικό επίπεδο,



Εικόνα 1. Το χρονικό διάστημα και τα κύρια στάδια της διαδικασίας ανάπτυξης νέων αντικαρκινικών φαρμάκων. Απαιτούνται 10-17 χρόνια για τη βασική έρευνα, το σχεδιασμό, τα *in vitro* και *in vivo* πειράματα (συμπεριλαμβανομένων των ελέγχων ασφάλειας και αποτελεσματικότητας), τις κλινικές δοκιμές και τέλος την έγκριση και κυκλοφορία του νέου φαρμάκου στην αγορά (Προσαρμοσμένο από την παραπομπή¹⁰).



Εικόνα 2. Διάγραμμα ροής προκλινικού ελέγχου. Από μία χημική βιβλιοθήκη που μπορεί να περιλαμβάνει αρκετές χιλιάδες ενώσεις, γίνεται *in silico* διαλογή ώστε να επιλεγούν λίγες δεκάδες (1ο Βήμα). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται *in vitro* δοκιμασίες φαρμακολογικής σάρωσης για να ελεγχθεί η κυτταροτοξικότητα των ουσιών και επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις τους με τα κύτταρα (2ο Βήμα). Οι λίγες ουσίες που ικανοποιούν τα κριτήρια ελέγχονται σε *in vivo* μοντέλα όγκων σε πειραματόζωα (3ο Βήμα) (Προσαρμοσμένο από την παραπομπή¹⁵).

καθώς προκαλούν αρκετές παρενέργειες ή δεν είναι τόσο αποτελεσματικά στον άνθρωπο⁹. Συνεπώς, η αναζήτηση για την ανάπτυξη καινοτόμων, αποτελεσματικών και προσιτών αντικαρκινικών φαρμάκων παραμένει μια πρόκληση.

Στο πλαίσιο αυτής της ζήτησης, τα τελευταία χρόνια τα φυσικά προϊόντα και τα ανάλογά τους έχουν συγκεντρώσει το επιστημονικό ενδιαφέρον για τις πιθανές αντικαρκινικές θεραπευτικές τους ιδιότητες. Περίπου το 60% των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή για τη θεραπεία του καρκίνου είναι τροποποιημένα φυσικά προϊόντα¹¹, απομονωμένα κυρίως από φυτά. Η πακλιταξέλη, η βινκριστίνη και η δοξορουβικίνη είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων που προέρχονται από φυσικά προϊόντα¹².

Συχνά, οι επιστήμονες που ασχολούνται με την ανακάλυψη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων συνθέτουν σειρές μορίων (χημικές βιβλιοθήκες) με διαφορετική δομή μεταξύ τους, βασιζόμενοι σε υπολογιστικά προγράμματα σχεδιασμού φαρμάκων (*in silico* drug design), στην πρωτεϊνική δομή του μορίου-στόχου (συνήθως ένας υποδοχέας), και στις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη χημική δομή των ομάδων που προστίθενται στο αρχικό ικρίωμα. Στη συνέχεια, ακολουθεί η διαδικασία της φαρμακολογικής σάρωσης *in vitro*, που εστιάζει στην ανάδειξη νέων μορίων με αυξημένη κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων. Όσο μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα έχει ένα μόριο, και ειδικά αν είναι κοντά ή παρόμοια με την αντίστοιχη του θετικού μάρτυρα, τόσο πιο δραστικό θεωρείται^{13,14}. Τη διαλογή αυτή ακολουθεί περαιτέρω ανάλυση σε *in vitro*

κυτταρικά συστήματα, όπου τα πειράματα εστιάζουν στην αλληλεπίδραση του νέου μορίου με τα κύτταρα. Και αυτό γιατί η ικανοποιητική κυτταροτοξικότητα δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που καθιστά μια νέα ουσία ένα δυνητικά υποσχόμενο αντικαρκινικό φάρμακο. Απαιτούνται συμπληρωματικά *in vitro* πειράματα ώστε να ελεγχθεί, για παράδειγμα, η κυτταροτοξικότητά της και έναντι φυσιολογικών, μη καρκινικών κυττάρων, η πιθανή κυτταροστατική της δραστηριότητα και ο επαγόμενος τύπος κυτταρικού θανάτου. Στο τελικό στάδιο του προκλινικού ελέγχου, η δραστική ουσία ελέγχεται σε *in vivo* μοντέλα όγκων σε πειραματόζωα (συνήθως σε ποντικούς ή αρουραίους), στα οποία μελετάται κυρίως η φαρμακοκινητική της σε ένα ζωντανό οργανισμό, εστιάζοντας στο μεταβολισμό, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά της (Εικόνα 2).

Συνολικά, εφόσον τα αποτελέσματα στα κυτταρικά συστήματα είναι ενθαρρυντικά και η αποτελεσματικότητα επιβεβαιωθεί και *in vivo*, τότε πιθανά η συγκεκριμένη ουσία να έχει φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Στην ανασκόπηση αυτή, θα αναφερθούμε στα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα προκλινικά (*in silico*, *in vitro* και *in vivo*) πειραματικά μοντέλα για την αξιολόγηση νέων αντικαρκινικών μορίων και, στο τέλος, θα παραθέσουμε ένα ενδεικτικό παράδειγμα από τη ροή των πειραμάτων ελέγχου της αντικαρκινικής δραστηριότητας ενός νέου ημισυνθετικού αναλόγου της ολευρωπεΐνης.

2. *In silico* προσεγγίσεις για την ανάλυση νέων αντικαρκινικών μορίων

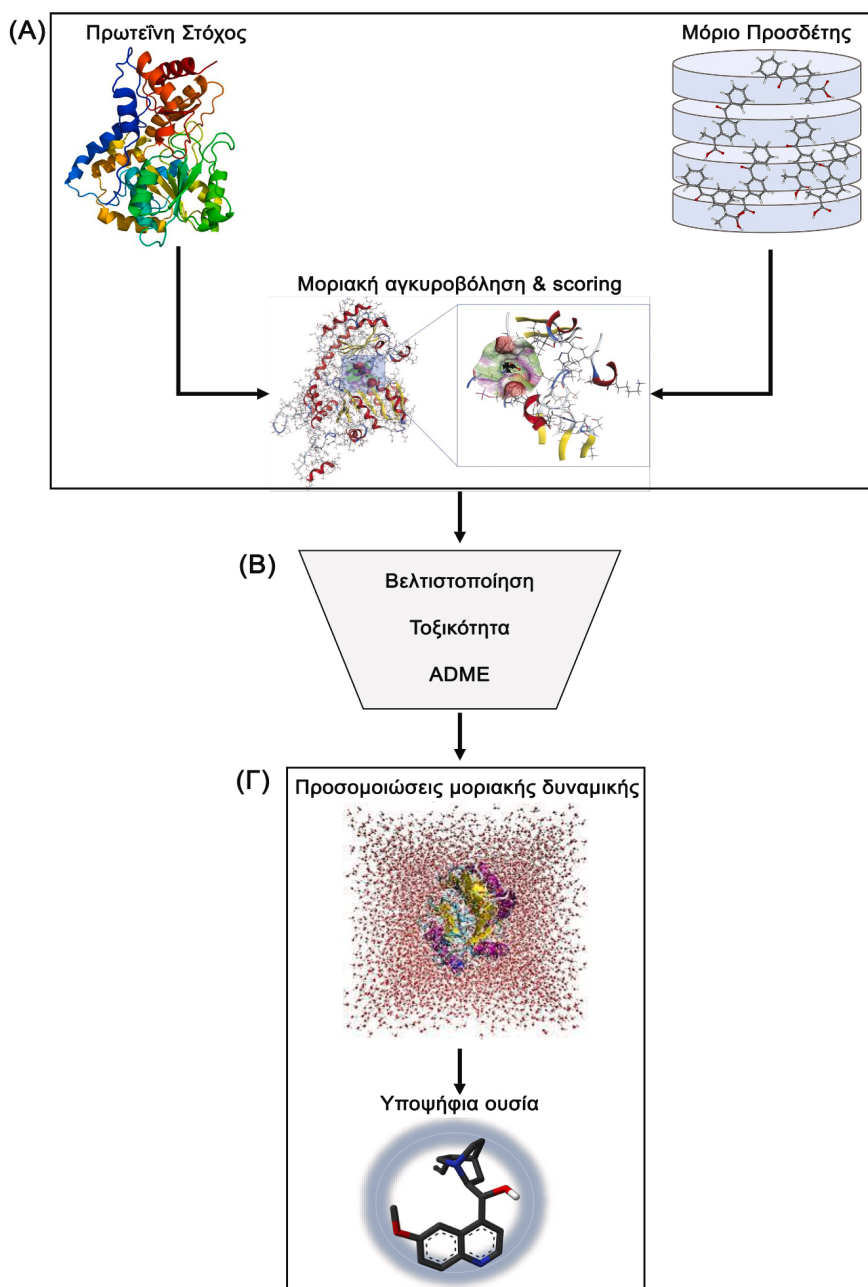
Η επανάσταση που έχει προκληθεί στους τομείς της βιολογίας, χημείας, αλλά και της πληροφορικής μέσω της τεχνητής νοημοσύνης, έχει δημιουργήσει νέες προοπτικές και δυνατότητες στη διαδικασία της ανάπτυξης φαρμάκων. Οι *in silico* τεχνικές είναι μέθοδοι μοριακού σχεδιασμού με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων και βασίζονται σε αρχές και μεθόδους της κβαντικής χημείας. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, έχουν δημιουργηθεί δεδομένα μεγάλης κλίμακας για πάνω από 1 εκατομμύριο χημικά μόρια¹⁶, τα οποία έχουν συγκεντρω-

θεί σε βάσεις δεδομένων χημικών βιβλιοθηκών. Συνεπώς, η χρήση των *in silico* τεχνικών έχει γίνει απαραίτητη στη διαδικασία της ανάπτυξης νέων φαρμάκων, με αποτέλεσμα να βρισκόμαστε πλέον στην εποχή του Ορθολογικού Σχεδιασμού Φαρμάκων (Rational Drug Design) ή της Ανακάλυψης Φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή (Computer-aided Drug Discovery, CADD). Μέσω της CADD μπορεί να επιτευχθεί υπολογιστική ταυτοποίηση πιθανών φαρμακευτικών στόχων, εικονική σάρωση από τις μεγάλες χημικές βιβλιοθήκες για πιθανά υποψήφια φάρμακα, βελτιστοποίηση των υποψήφιων μορίων, καθώς και *in silico* αξιολόγηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και της τοξικότητάς τους. Με αυτόν τον τρόπο, μειώνεται ο αριθμός των χημικών μορίων που θα αξιολογηθούν στη συνέχεια πειραματικά και, παράλληλα, αυξάνεται το ποσοστό επιτυχίας στις μετέπειτα κλινικές δοκιμές, καθώς αποκλείονται από τον έλεγχο τα μη αποτελεσματικά και τοξικά παράγωγα¹⁷.

Στην CADD υπάρχουν 2 προσεγγίσεις: η ανακάλυψη νέων φαρμάκων βασισμένων στη δομή τους (Structure-based Drug Discovery, SBDD)¹⁸ (Εικόνα 3) και βασισμένων στον προσδέτη τους (Ligand-based Drug Discovery, LBDD)¹⁹. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται από το αν είναι διαθέσιμη ή όχι η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης-στόχου. Η χρήση της προσέγγισης SBDD στηρίζεται στη γνώση της δομής της πρωτεΐνης-στόχου, η οποία μπορεί να προκύψει πειραματικά ή μέσω *in silico* μεθόδων όπως η μοντελοποίηση ομολογίας (homology modeling). Αντίθετα, όταν η δομή δεν είναι γνωστή, χρησιμοποιείται συχνά ως εναλλακτική η προσέγγιση LBDD.

Οι πρωτεΐνες-στόχοι μπορούν να προκύψουν υπολογιστικά μέσα από πειραματικά δεδομένα²⁰,²¹ ή να εξαχθούν από πρωτεϊνικά δίκτυα²² ή μέσω αναζήτησης καταγραφών από τη βιβλιογραφία (text mining)²³. Υπάρχουν ορισμένοι διακομιστές (servers) όπως το Harmonizome²⁴ και το Open Targets Platform²⁵, που προσφέρουν σειρές πιθανών φαρμακευτικών στόχων οι οποίες προκύπτουν χρησιμοποιώντας διάφορες βάσεις δεδομένων, όπως είναι η ChEMBL και η DrugBank²⁶.

Εκτός από το χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης-στό-



Εικόνα 3. Διάγραμμα ροής της διαδικασίας ανακάλυψης νέων φαρμάκων βασισμένων στη δομή (Structure-based Drug Discovery, SBDD). **(Α)** Πραγματοποιείται έλεγχος της μοριακής αγκυροβόλησης μεταξύ του μορίου-προσδέτη και της πρωτεΐνης-στόχου και εντοπίζονται οι ουσίες με τις καλύτερες διαμορφώσεις με βάση τη συγγένεια σύνδεσης. **(Β)** Τα μόρια βελτιστοποιούνται με βάση τις φυσικοχημικές και φαρμακολογικές τους ιδιότητες και τον έλεγχο απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME) και τοξικότητας. **(Γ)** Εφαρμόζονται επιπρόσθετες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι διαμορφώσεις και τελικά, επιλέγονται τα υποψήφια μόρια τα οποία θα αξιολογηθούν στη συνέχεια πειραματικά (Προσαρμοσμένο από την παραπομπή³³).

χου είναι σημαντικό να εντοπιστούν και οι προσδέτες της με αποτελεσματικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες και χαμηλή κυτταροτοξικότητα. Ο συνδυασμός της μηχανικής μάθησης και των χημικών βιβλιοθηκών επιτρέπει τη δημιουργία υπολογιστικών μεθόδων προκειμένου να επιτευχθεί μια εικονική σάρωση ενός τεράστιου αριθμού χημικών μορίων και στη συνέχεια, να αξιολογηθούν γρήγορα και για τις υπόλοιπες ιδιότητές τους^{27,28}.

Η προσέγγιση LBDD χρησιμοποιεί πρότερη γνώση από ήδη υπάρχοντα φάρμακα (όπως τα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους) για να προβλέψει νέες ουσίες με παρόμοια βιολογικά χαρακτηριστικά²⁹. Η πρόβλεψη βασίζεται στην ομοιότητα των χαρακτηριστικών (αρωματικότητα, υδροφοβικότητα, κατάλοιπα ανιόντων και κατιόντων) μεταξύ των χημικών μορίων, με βάση την υπόθεση ότι μόρια που έχουν έντονες δομικές και φυσικοχημικές ομοιότητες είναι πιο πιθανό να έχουν και παρόμοια βιολογική δραστηριότητα²⁹. Με βάση αυτήν την υπόθεση χρησιμοποιούνται μαθηματικά μοντέλα όπως τα μοντέλα ποσοτικής σχέσης δομής-δράσης (quantitative structure-activity relationship, QSAR). Για την εικονική σάρωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ένα πλήθος από χημικές βιβλιοθήκες οι οποίες είναι δημόσια διαθέσιμες, όπως είναι η PubChem³⁰, και η Zinc15³¹.

Αντίθετα, η προσέγγιση SBDD υπολογίζει τη συγγένεια σύνδεσης μεταξύ ενός προσδέτη και της πρωτεΐνης-στόχου, χρησιμοποιώντας τις δομές του προσδέτη και της πρωτεΐνης-στόχου που είναι ήδη γνωστές³² (Εικόνα 3). Η μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η μοριακή αγκυροβόληση (molecular docking).

Οι μέθοδοι της αγκυροβόλησης χρησιμοποιούν μια διαδικασία βαθμολόγησης (scoring), στην οποία η κάθε διαφορετική διαμόρφωση πρωτεΐνης-προσδέτη παίρνει διαφορετικό βαθμό ανάλογα με την ενέργεια των αλληλεπιδράσεων. Οι αλγόριθμοι της μοριακής αγκυροβόλησης προβλέπουν το βέλτιστο προσανατολισμό του προσδέτη και υπολογίζουν τη συγγένεια των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και των δυνάμεων van der Waals³⁴⁻³⁷. Με τη μοριακή αγκυροβόληση, ένας τεράστιος αριθμός προσδετών μπορεί να σαρωθεί εικονικά και να βρεθούν εκείνοι με την υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης με την

πρωτεΐνη-στόχο. Ορισμένα παραδείγματα εργαλείων μοριακής αγκυροβόλησης είναι το DOCK³⁸ και το Glide³⁹.

Παρόλα αυτά, οι περίπλοκες ατομικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών-στόχων και των προσδετών μπορούν να δημιουργήσουν ορισμένες ανακρίβειες οι οποίες πολλές φορές παρακάμπτονται με τη μοριακή δυναμική. Οι προσομοιώσεις της μοριακής δυναμικής παρέχουν μια καλύτερη κατανόηση όσον αφορά στα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών και στη σταθερότητα των συνδέσεων πρωτεϊνών-προσδετών. Επίσης, βοηθούν στην ταυτοποίηση επιπλέον περιοχών πρόσδεσης, όπως για παράδειγμα αλλοστερικών θέσεων, και συνεπώς οδηγούν στο σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών φαρμακευτικών ουσιών^{40,41}.

Ένα επιπλέον βήμα στη διαδικασία είναι να αξιολογηθούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των ουσιών, όπως με τον έλεγχο απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME) και τοξικότητας. Τα φαρμακευτικά μόρια χρειάζεται να διαπεράσουν διάφορους φυσιολογικούς φραγμούς μέσα στο ανθρώπινο σώμα προκειμένου να φτάσουν στους βιολογικούς στόχους τους. Προβλήματα στη φαρμακοκινητική και η εμφάνιση τοξικότητας είναι υπεύθυνα για το 40-60% των αποτυχιών στα επόμενα στάδια⁴². Έχουν αναπτυχθεί πλήθος μοντέλων βασισμένων στη μηχανική μάθηση προκειμένου να προβλεφθεί το φαρμακοκινητικό προφίλ, όπως τα PreADMET⁴³ και SwissADME⁴⁴, ώστε να προκύπτουν υποψήφια φάρμακα με υψηλή αποδοτικότητα και χαμηλή τοξικότητα.

3. Κυτταρικά μοντέλα για την *in vitro* ανάλυση νέων αντικαρκινικών μορίων

Η *in silico* ανάλυση αποτελεί το πρώτο βήμα από το οποίο προκύπτουν δυνητικά τα πιο δραστικά μόρια. Στη συνέχεια, αυτά τα μόρια ελέγχονται *in vitro* σε κυτταρικά συστήματα προκειμένου να διαπιστωθεί, μεταξύ άλλων, η κυτταροτοξικότητά τους έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών και φυσιολογικών κυττάρων, ο τύπος του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου και η κυτταροστατική τους δράση. Οι καρκιני-

Πίνακας 1. Κατάλογος των ανθρώπινων καρκινικών σειρών που χρησιμοποιείται από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ	
Είδος Καρκίνου	Κυτταρική Σειρά
Λευχαιμία	CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226, SR, P388, P388/ADR
Μη Μικροκυτταρικός Πνεύμονα	A549/ATCC, EK VX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H322M, NCI-H460, NCI-H522, LXFL 529
Παχέος Εντέρου	COLO 205, HCC-2998, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW-620, DLD-1, KM20L2
Κεντρικού Νευρικού Συστήματος	SF-268, SF-295, SF-539, SNB-19, SNB-75, U251, SNB-78, XF 498
Μελάνωμα	LOX IMVI, MALME-3M, M14, MDA-MB-435, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62, RPMI-7951, M19-MEL
Ωοθηκών	IGR-OV1, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, NCI/ADR-RES, SK-OV-3
Νεφρού	786-0, A498, ACHN, CAKI-1, RXF 393, SN12C, TK-10, UO-31, RXF-631, SN12K1
Προστάτη	PC-3, DU-145
Μαστού	MCF7, MDA-MB-231/ATCC, MDA-MB-468, HS 578T, MDA-N, BT-549, T-47D
Μικροκυτταρικός Πνεύμονα	DMS 114, SHP-77

κές κυτταρικές σειρές είναι τα πιο συνηθισμένα κυτταρικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται στην έρευνα του καρκίνου και στη διαδικασία ανάπτυξης των φαρμάκων. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι πιο συνηθισμένες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ (NIH) ⁴⁵.

3.1. Εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης μέσω ελέγχου της βιωσιμότητας

Το πρώτο στάδιο στη διαδικασία του προκλινικού ελέγχου είναι να αξιολογηθεί η κυτταροτοξική δράση των προς μελέτη ουσιών και να γίνει μια διαλογή, ώστε να επιλεγούν αρχικά μόνο οι πιο κυτταροτοξικές έναντι σειράς καρκινικών κυττάρων. Στις περισσότερες από τις δοκιμασίες που εφαρμόζονται, ένα υπόστρωμα μετασχηματίζεται σε ένα έγχρωμο προϊόν από ενδοκυτταρικά ένζυμα που υπάρχουν στα

ζωντανά κύτταρα και το χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο του αριθμού των ζωντανών κυττάρων ⁴⁶. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται εν συντομία ορισμένες από τις πιο συνηθισμένες δοκιμασίες.

Μία από τις πιο συχνά εφαρμοζόμενες μεθόδους είναι η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT με τη χρήση της ουσίας 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-βρωμιούχο διφαινυλτετραζόλιο, που είναι μια ποσοτική χρωματομετρική μέθοδος ^{47, 48}. Στηρίζεται στην εκτίμηση της δραστηριότητας των NAD(P)H-εξαρτώμενων ενζύμων της οξειδοαναγωγής, τα οποία ανάγουν την κίτρινη ένωση MTT σε μωβ αδιάλυτους κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι στη συνέχεια μπορούν να διαλυτοποιηθούν με κάποιον οργανικό διαλύτη, όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ή την ισοπροπανόλη, και να αναλυθούν φωτομετρικά ^{47, 48} στα 570 nm ⁴⁹. Επειδή η διαδικασία αυτή συντελείται μόνο στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, η δοκιμασία MTT χρησι-

μπορείται για να υπολογιστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων και κατ' επέκταση η κυτταροτοξική δράση των ουσιών. Η διαδικασία συνήθως πραγματοποιείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων (96-well plates). Αφού γίνει η κατάλληλη προετοιμασία των κυττάρων και η έκθεσή τους στις προς εξέταση ουσίες, προστίθεται το MTT σε κάθε φρεάτιο και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα διαλυτοποίησης ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης και με τη χρήση των κατάλληλων μαρτύρων, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση της απορρόφησης σε ένα φωτόμετρο μικροπλακών (ELISA reader).

Εκτός από το MTT υπάρχουν και άλλα ανάλογα του τετραζολίου, όπως το MTS [3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-5-(3-καρβοξυμεθοξυφαινυλ)-2-(4-σουλφοφαινυλ)-2H-τετραζόλιο] και το ΧΤΤ [2,3-δισ-(2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλ)-2H-τετραζόλιο-5-καρβοξαμίδιο], η χρήση των οποίων επίσης παράγει φορμαζάνη μετά από αναγωγή από οξειδοαναγωγάσες ή αφυδρογονάσες⁴⁶. Κατ' αναλογία με το MTT, οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας MTS και ΧΤΤ περιλαμβάνουν ένα στάδιο επώασης 4 ωρών, όμως η ειδοποίησή τους με το MTT είναι ότι η διαλυτοποίηση της φορμαζάνης γίνεται μέσα στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας των κυττάρων. Συνεπώς, με τις μεθόδους ΧΤΤ και MTS εξοικονομείται χρόνος και, παράλληλα, μειώνεται η πιθανότητα λάθους ή απώλειας έγχρωμου προϊόντος, καθώς δεν υπάρχει το στάδιο της διαλυτοποίησης. Και οι τρεις προαναφερθείσες μέθοδοι έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι χαμηλού κόστους και εύκολες να πραγματοποιηθούν, αφού ως εξοπλισμό απαιτούν ένα φωτόμετρο μικροπλακών (ELISA reader) και για αυτόν το λόγο χρησιμοποιούνται ευρέως.

Η δοκιμασία SRB (σουλφοροδαμίνης Β)⁵⁰ είναι άλλη μία κοινή χρωματομετρική μέθοδος που εκτιμά τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων. Η χρωστική SRB προσδένεται σε πρωτεΐνες των ζωντανών κυττάρων κάτω από ήπια όξινες συνθήκες και για αυτόν το λόγο προστίθεται στα κύτταρα τριχλωροοξικό οξύ (TCA) και ακολουθεί επώαση 1 ώρας. Στη συνέχεια, μετά από διαδοχικές πλύσεις προστίθεται η χρωστική και ακολουθεί επώαση 30

λεπτών έως 1 ώρα. Τέλος, η χρωστική διαλυτοποιείται με την προσθήκη Tris Base (2-αμινο-2-(υδροξυμεθυλ)προπανο-1,3-διόλη) και μετράται η απορρόφηση στα 510 nm⁵¹. Τη συγκεκριμένη δοκιμασία προτείνει και εφαρμόζει και το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI) των ΗΠΑ.

Μια επιπρόσθετη μέθοδο αποτελεί η δοκιμασία LDH (γαλακτικής αφυδρογονάσης)⁵². Κατά τη συγκεκριμένη δοκιμασία, όταν τα προς εξέταση μόρια διαρρήξουν την πλασματική μεμβράνη, τα κύτταρα απελευθερώνουν LDH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και η απελευθερωμένη LDH μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με φωτομέτρηση στα 490 nm⁵³. Ο χρόνος επώασης του διαλύματος με τα κύτταρα είναι 30 λεπτά, ενώ, όπως και στις δοκιμασίες ΧΤΤ και MTS, δεν υπάρχει ανάγκη διαλυτοποίησης⁴⁹.

Η δοκιμασία ATP (τριφωσφορικής αδενοσίνης) είναι μια επιπλέον διαδοσμένη δοκιμασία ελέγχου της κυτταρικής βιωσιμότητας που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια⁵⁴. Όταν τα κύτταρα οδηγούνται προς απόπτωση ή νέκρωση μετά από επώαση με μια δυνητικά κυτταροτοξική ουσία, το κυτταρικό περιεχόμενο σε ATP μειώνεται και μπορεί να ποσοτικοποιηθεί⁵⁴. Η δοκιμασία CellTiter-Glo (της εταιρείας Promega Corporation, Madison, WI) αποτελεί παράδειγμα της πιο πρόσφατης τεχνικής, όπου μετράται το κυτταρικό περιεχόμενο ATP χρησιμοποιώντας το ένζυμο λουσιφεράση⁵⁵. Το σήμα χημειοφωταύγεια σταθεροποιείται μέσα σε 10 λεπτά από την προσθήκη του αντιδραστηρίου και μπορεί να μετρηθεί με λουμινόμετρο στα 560 nm. Η συγκεκριμένη δοκιμασία παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και καλύτερη επαναληψιμότητα συγκριτικά με τις πιο παραδοσιακές δοκιμασίες⁵⁵.

Εφαρμόζοντας κάποια από τις παραπάνω τεχνικές καθίσταται εφικτό να υπολογιστεί ο δείκτης IC50 (half maximal inhibitory concentration, μέση ανασταλτική συγκέντρωση). Ο δείκτης IC50 είναι η συγκέντρωση της υπό μελέτη κυτταροτοξικής ουσίας που προκαλεί το θάνατο στο 50% του αριθμού των κυττάρων και προκύπτει από τη σύγκριση της οπτικής απορρόφησης ή του φθορισμού του πληθυσμού των κυττάρων που έχουν εκτεθεί στην ουσία σε σχέση με τον αντίστοιχο κυτταρικό πληθυσμό που δεν έχει εκτεθεί στην ουσία. Όσο μικρότερη

Πίνακας 2. Βασικά χαρακτηριστικά των πιο συνηθισμένων δοκιμασιών κυτταροτοξικότητας

	MTT	MTS/ XTT	SRB	LDH	ATP
Μήκος Κύματος (nm)	570	492/510	510	490	560
Χρόνος Επώασης	4 ώρες	4 ώρες	1 + 1 ώρα	30 λεπτά	10 λεπτά
Ανάγκη Επαναδιάλυσης	Ναι με οργανικό διαλύτη (DMSO ή ισοπροπανόλη)	Όχι	Ναι με Tris-Base	Όχι	Όχι
Μέθοδος	Φωτομετρία	Φωτομετρία	Φωτομετρία	Φωτομετρία	Χημειοφωταύγεια

τιμή έχει ο δείκτης IC50, τόσο μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα εμφανίζει η ουσία.

3.2 Αξιολόγηση του επαγόμενου τύπου κυτταρικού θανάτου

Ένα επόμενο βήμα είναι να διερευνηθεί ο τύπος κυτταρικού θανάτου που επάγεται από τις ουσίες που επιλέχθηκαν μετά την αρχική σάρωση. Είναι πολύ σημαντικό να εντοπιστεί αφενός, το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που πεθαίνουν, γιατί τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφεύγουν της απόπτωσης για να επιβιώνουν έναντι των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή⁵⁶. Αφετέρου, χρειάζεται να διερευνηθεί ποιο είδος κυτταρικού θανάτου επάγεται από τις υπό μελέτη ουσίες, απόπτωση ή νέκρωση, διότι πρόκειται για δύο διαδικασίες με διαφορετικά χαρακτηριστικά που μπορούν να έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στον οργανισμό (Εικόνα 4).

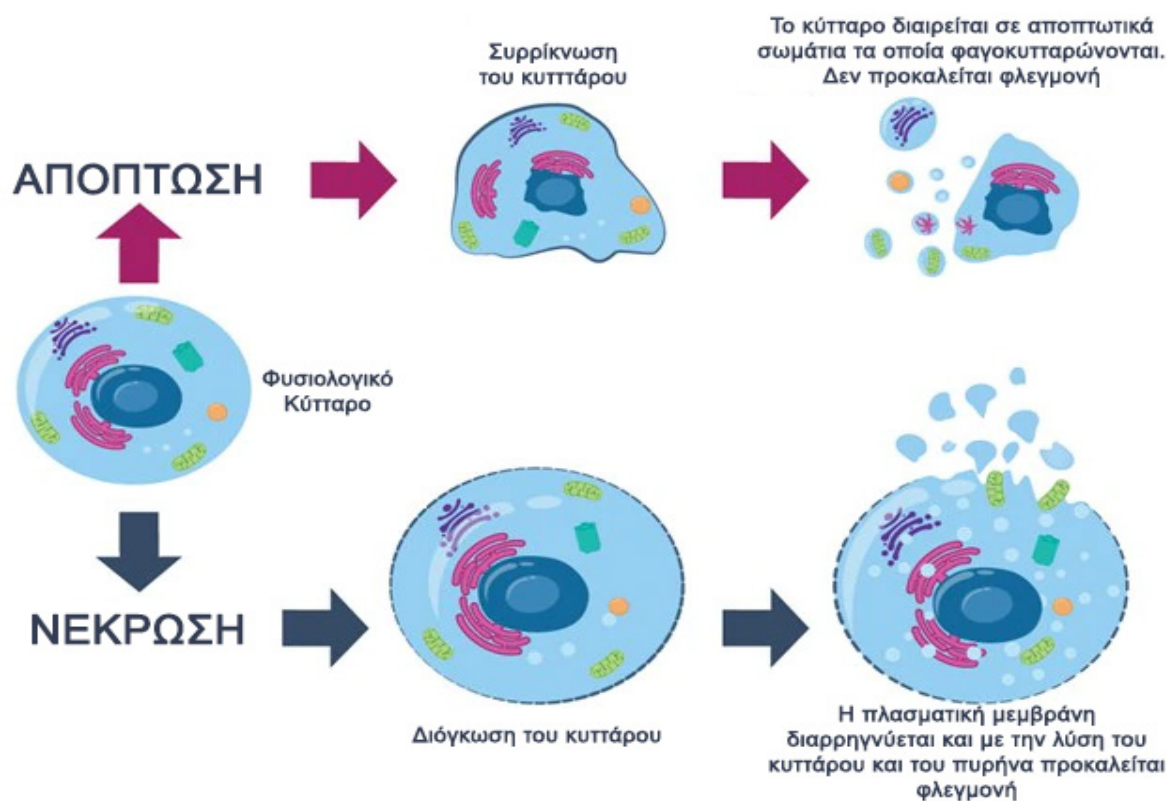
Συγκεκριμένα, η απόπτωση, ή αλλιώς ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, συνιστά μια φυσιολογική διεργασία του οργανισμού που συμμετέχει καταλυτικά στην ομαλή ανάπτυξη και λειτουργία σχεδόν όλων των ιστών. Χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση του κυττάρου, αποσύνθεση του πυρηνικού φακέλου, συμπύκνωση της χρωματίνης και κατακερματισμό του DNA. Η επιφάνεια των κυττάρων συχνά σχηματίζει χαρακτηριστικά εξογκώματα και, εάν το κύτταρο είναι μεγάλο, διασπάται

σε θραύσματα που περικλείονται από μεμβράνη και ονομάζονται αποπτωτικά σωμάτια. Τα αποπτωτικά σωμάτια φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά φαγοκύτταρα και ειδικότερα από μακροφάγα, χωρίς να απελευθερώνεται κυτταρικό περιεχόμενο στην περιοχή και συνεπώς, δεν προκαλείται φλεγμονώδης αντίδραση⁵⁸.

Σε αντίθεση με την απόπτωση, τα ζωικά κύτταρα που πεθαίνουν ως απόκριση σε οξεία προσβολή, όπως συμβαίνει σε έναν τραυματισμό ή λόγω έλλειψης παροχής αίματος, συνήθως πεθαίνουν μέσω της διαδικασίας της κυτταρικής νέκρωσης. Κατά τη νέκρωση, τα νεκρωτικά κύτταρα διογκώνονται και εκρήγνυνται, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό τους στον περιβάλλοντα χώρο, προκαλώντας έτσι έντονη φλεγμονώδη απόκριση⁵⁸.

Για τον προσδιορισμό της απόπτωσης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως η φωτονική μικροσκοπία⁵⁹. Φαινόμενα που χαρακτηρίζουν την απόπτωση, όπως η αλλαγή στο σχήμα και στον όγκο των κυττάρων, η συρρίκνωση του κυττάρου και ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωματίων, μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν μέσω της φωτονικής μικροσκοπίας⁶⁰. Παρόλο που η φωτονική μικροσκοπία είναι μια χαμηλού κόστους και εύκολη μέθοδος, το κύριο μείονέ της είναι η χαμηλή ευαισθησία της.

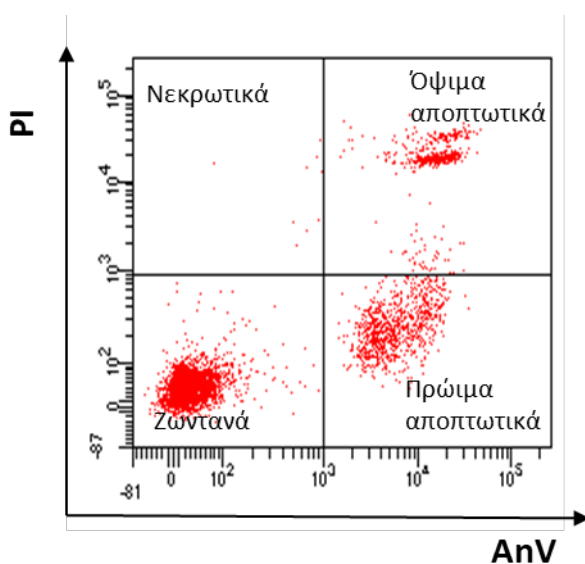
Για αυτόν το λόγο, χρησιμοποιείται ευρέως πλέον στην έρευνα του καρκίνου και συγκεκριμένα για τον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου, η μικροσκοπία φθορισμού^{61, 62, 63}. Το παρατηρούμενο δείγμα αρχι-



Εικόνα 4. Οι κυριότερες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την απόπτωση και τη νέκρωση (Προσαρμοσμένο από την παραπομπή⁵⁷).

κά διεγείρεται με φως μικρού μήκους κύματος και μπορεί να οπτικοποιηθεί μέσω φίλτρων⁶¹⁻⁶³. Καθώς το φθορίζον σήμα ανιχνεύεται ως φωταύγεια σε ένα σκοτεινό περιβάλλον, είναι δυνατό να ανιχνευθούν ακόμα και πολύ μικρά φθορίζοντα μέρη του δείγματος. Ένας φθορίζων ανιχνευτής που εντοπίζει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή ένα στόχο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανάλυση με μικροσκοπία φθορισμού. Ένα παράδειγμα αποτελεί η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), που είναι φυσική πρωτεΐνη της μέδουσας *Aequorea victoria*, η οποία συνδέεται με τον πρωτεϊνικό υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Η GFP χρησιμοποιείται ως δείκτης για τον εντοπισμό του υποδοχέα στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα, ανάλογα με την ύπαρξη στεροειδούς ή όχι, αντίστοιχα⁶⁴.

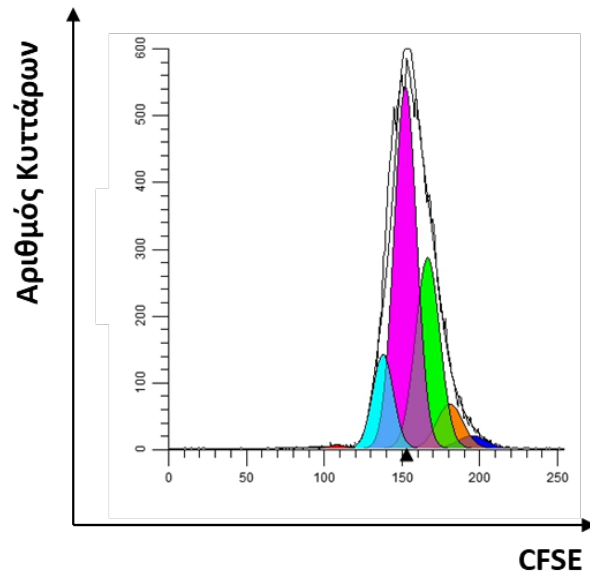
Παρόλα αυτά, ένας ταχύς και ακριβής τρόπος για την ποσοτικοποίηση του κυτταρικού θανάτου είναι η κυτταρομετρία ροής^{65, 66}. Ο έλεγχος του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου πραγματοποιείται σε κυτταρόμετρο ροής μετά από χρώση των κυττάρων με αννεξίνη V και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Στα αποπτωτικά κύτταρα, το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο φωσφατιδυλοσερίνη (PS) μετατοπίζεται από την εσωτερική προς την εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι εκτίθεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η αννεξίνη V είναι μια εξαρτώμενη από το ασβέστιο (Ca²⁺) πρωτεΐνη δέσμησης φωσφολιπιδίων (35-26 kDa), η οποία εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τη PS και συνδέεται με τα κύτταρα που την εκθέτουν στην επιφάνειά τους. Η αννεξίνη V είναι συζευγμένη με φθοριοχρώματα, όπως η φλουορεσκεΐνη (FITC), και συνεπώς μπορεί να



Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτική εικόνα ανάλυσης μέσω κυτταρομετρίας ροής μετά από χρώση με αννεξίνη V σημασμένη με FITC (AnV, οριζόντιος άξονας) και ιωδιούχο προπιδιο (PI, κάθετος άξονας). Τα κύτταρα σε κάθε τεταρτημόριο χαρακτηρίζονται ως ζωντανά (AnV-PI-, κάτω αριστερό τεταρτημόριο), πρώιμα αποπτωτικά (AnV+PI-, κάτω δεξί τεταρτημόριο), όψιμα αποπτωτικά (AnV+PI+, πάνω δεξί τεταρτημόριο) και νεκρωτικά (AnV-PI+, πάνω αριστερό τεταρτημόριο).

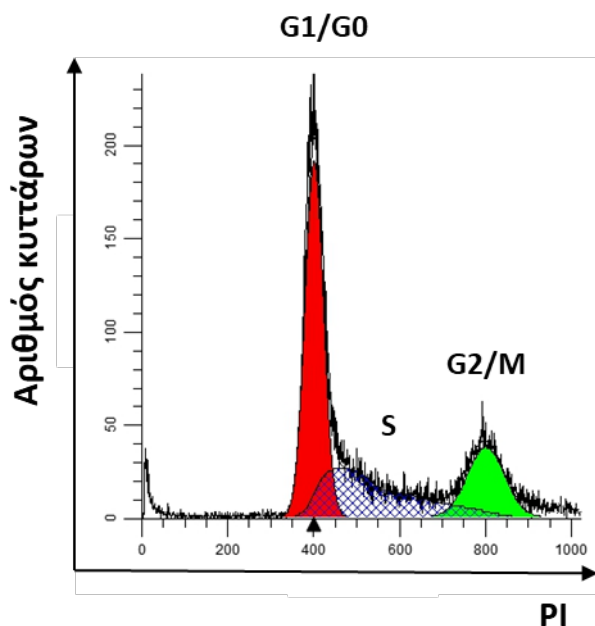
λειτουργήσει ως ένας ευαίσθητος ανιχνευτής των κυττάρων που οδηγούνται σε απόπτωση μέσω κυτταρομετρίας ροής. Η χρώση με αννεξίνη V προηγείται της απώλειας της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τη νέκρωση. Επιπλέον, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες χρωστικές, όπως το PI, για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αποπτωτικών κυττάρων από τα νεκρωτικά κύτταρα. Σε ζωντανά κύτταρα με άθικτη μεμβράνη το PI παραμένει εξωκυτταρικά, ενώ οι μεμβράνες των νεκρών και κατεστραμμένων κυττάρων είναι διαπερατές σε αυτό. Επομένως, τα κύτταρα χαρακτηρίζονται ως ζωντανά (AnV-PI-), πρώιμα αποπτωτικά (AnV+PI-), όψιμα αποπτωτικά (AnV+PI+) και νεκρωτικά (AnV-PI+) (Εικόνα 5).

Η ισχυρή κυτταροτοξικότητα όμως από μόνη



Εικόνα 6. Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα μετά από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, που απεικονίζει τη μεταβολή του πληθυσμού των γενεών των κυττάρων καρκίνου του μαστού SKBR3 μετά από χρώση με CFSE και επώαση με μια δυναμικά αντικαρκινική ουσία. Τα διαφορετικά χρώματα στο γράφημα αντιστοιχούν σε διαφορετικές γενεές, ξεκινώντας από δεξιά με τη μητρική γενεά (μπλε σκούρο) και συνεχίζοντας προς τα αριστερά με τις θυγατρικές της (πορτοκαλί, πράσινο, ροζ, γαλάζιο), με το ύψος της κάθε καμπύλης να αντιστοιχεί στον αριθμό των κυττάρων κάθε γενεάς.

της δεν αρκεί. Μια ουσία που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί δυναμικά ως αντικαρκινικό φάρμακο θα πρέπει, εκτός από κυτταροτοξική, να είναι και εκλεκτική, δηλαδή να είναι τοξική μεν για τα καρκινικά κύτταρα, όμως ταυτόχρονα να μη δρα έναντι των υγιών κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εργασία των Vega-Perez και συνεργατών⁶⁷ όπου ελέγχθηκαν για την αντικαρκινική τους δράση μια σειρά παραγώγων της αζιριδίνης. Στη συγκεκριμένη εργασία, το πιο κυτταροτοξικό παράγωγο ενάντια στην ανθρώπινη σειρά καρκίνου του πνεύμονα A549 δεν ήταν εκλεκτικό, καθώς ήταν 7 φορές περισσότερο τοξικό έναντι των υγιών κυττάρων. Για περαιτέρω μελέτες επιλέχθηκε ένα άλλο παράγωγο λιγότερο τοξικό απέναντι στην καρκινική σειρά, όμως παράλληλα πιο εκλεκτικό. Μάλιστα, η εκλε-



Εικόνα 7. Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα μετά από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, που απεικονίζει την κατανομή ενός πληθυσμού από τα κύτταρα καρκίνου του μαστού SKBR3 μετά από επώαση με μια δυναμικά αντικαρκινική ουσία και χρώση με PI. Τα διαφορετικά χρώματα στο γράφημα αντιστοιχούν σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου, ξεκινώντας από αριστερά με τη φάση G1/G0 (κόκκινο χρώμα), δεξιά με τη φάση G2/M (πράσινο χρώμα) και με τη φάση S (σκιαγραφημένη περιοχή) να εκτείνεται μεταξύ των δύο πρώτων.

κτικότητα του ήταν 50-100 φορές μεγαλύτερη ενάντια στις καρκινικές σειρές του μαστού συγκριτικά με τα υγιή κύτταρα.

Γίνεται επομένως αντιληπτή η σημασία να ελέγχεται η τοξικότητα και στα υγιή κύτταρα. Επειδή η πλειοψηφία των αντικαρκινικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται κλινικά εισάγονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω ενδοφλέβιας χορήγησης, τα φυσιολογικά μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBCs) είναι συνήθως τα πρώτα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τις πιο υψηλές συγκεντρώσεις των φαρμάκων. Συνεπώς, τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για να αξιολογηθεί η τοξικότητα των προς εξέταση ουσιών

⁶⁸ και χρησιμοποιούνται συχνά για τον έλεγχο της τοξικότητας νέων ουσιών, όπως από τους Samara και συνεργάτες ⁶⁹. Τα PBCs απομονώνονται συνήθως από υγιείς δότες και επωάζονται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των προς μελέτη ουσιών. Οι τιμές των συγκεντρώσεων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε να συμπεριλαμβάνουν τις τιμές IC₅₀ (που υπολογίστηκαν μέσω της αντίστοιχης δοκιμασίας ελέγχου βιωσιμότητας για τα καρκινικά κύτταρα), καθώς και να τις υπερβαίνουν για να προσδιοριστεί καλύτερα το εύρος της τοξικότητάς τους.

3.3 Έλεγχος επαγωγής κυτταροστατικότητας

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που αξίζει να ελεγχθεί είναι η κυτταροστατικότητα μέσω του βαθμού μεταβολής του διπλασιασμού των κυττάρων. Η αξιολόγησή της γίνεται συνήθως μετά από χρώση με τη φθορίζουσα χρωστική CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) και ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής. Η συγκεκριμένη χρωστική απορροφάται πλήρως από κάθε κύτταρο, και η ποσότητά της ημιδιπλασιάζεται με κάθε κυτταρική διαίρεση, κάτι το οποίο ανιχνεύεται εύκολα μέσω του μειωμένου φθορισμού της. Έτσι καθίσταται εφικτός ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών γενεών, καθώς η χρωστική κατανέμεται ισόποσα μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση (Εικόνα 6).

3.4 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο προς αξιολόγηση είναι η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, για την οποία ανάλυση επίσης χρησιμοποιείται συνήθως η κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με PI. Το PI αποτελεί μία παρεμβαλλόμενη στο δίκλωνο μόριο DNA χρωστική, η οποία, μέσω του φθορισμού της, μας δίνει τη δυνατότητα εκτίμησης της ποσότητας του DNA σε κάθε κύτταρο και, κατ' επέκταση, της φάσης του κύκλου που αυτό διανύει. Ο αρνητικός μάρτυρας παρουσιάζει μια συγκεκριμένη κατανομή των κυττάρων στις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, επομένως οποιαδήποτε αλλαγή στο διάγραμμα υποδηλώνει και έναν διαφορετικό μηχανισμό

σμό δράσης της υπό μελέτη αντικαρκινικής ουσίας (Εικόνα 7).

Ο κατάλληλος συνδυασμός των *in vitro* δοκιμασιών μπορεί να παρέχει πολύ σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την κυτταροτοξικότητα και τους μηχανισμούς δράσης των υποψήφιων φαρμακευτικών μορίων και να αυξήσει τις πιθανότητες επιτυχίας στα μετέπειτα κλινικά στάδια. Εξάλλου, η μείωση των ζωικών δοκιμών αποτελεί ιατρική αναγκαιότητα και κατ' επέκταση, οι *in vitro* δοκιμασίες είναι ζωτικής σημασίας προτού ξεκινήσει ο έλεγχος των φαρμάκων σε πειραματικά μοντέλα ζώων.

4. *In vivo* μοντέλα για την ανάλυση νέων αντικαρκινικών μορίων

Οι μελέτες σε κυτταρικά συστήματα *in vitro* παρέχουν πολύ σημαντικές πληροφορίες, όμως, δεν είναι αρκετές για να αντικατοπτρίσουν τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε έναν ζωντανό οργανισμό. Για αυτόν το λόγο, η ανάπτυξη ζωικών μοντέλων για τον έλεγχο νέων αντικαρκινικών ουσιών και *in vivo* έχει μεγάλη σημασία. Μάλιστα, στην έρευνα του καρκίνου, πάνω από το 95% των *in vivo* μελετών χρησιμοποιούν μοντέλα όγκων σε ποντικούς⁷⁰.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μοντέλα αφορούν είτε ανοσοκατεσταλμένους είτε ανοσοϊκανούς ποντικούς, στους οποίους εγχέονται υποδόρια ή ορθοτοπικά αλλομοσχεύματα ή ξενομοσχεύματα όγκων⁷¹. Το χαμηλό κόστος και η ευκολία στη χρήση καθιστούν αυτά τα μοντέλα τα πιο διαδεδομένα.

Ένας ακόμα τύπος μοντέλου που χρησιμοποιείται στην προκλινική έρευνα είναι οι γενετικά τροποποιημένοι ή διαγονιδιακοί ποντικοί, στους οποίους μπορούν να διερευνηθούν οι δράσεις και οι λειτουργίες των σχετιζόμενων ογκογονιδίων. Τα διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών χρησιμοποιούνται, όπως και τα μοντέλα μοσχευμάτων, για την *in vivo* μελέτη θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Τα διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών είναι γενικά πολύ χρονοβόρα και ακριβά στη δημιουργία τους, και απαιτούν για τη χρήση τους ένα υψηλά καταρτισμένο προσωπικό.

Επιπλέον, υπάρχουν και τα προερχόμενα από ασθενείς μοντέλα ξενομοσχευμάτων (patient-

derived xenograft, PDX), στα οποία γίνεται εμφύτευση ανθρώπινων όγκων σε ποντικούς με εξανθρωποποιημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτοί οι ποντικοί αποτελούν πρότυπους οργανισμούς, οι οποίοι προσομοιάζουν τις συγκεκριμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου του ασθενούς, γεγονός που τους καθιστά κατάλληλα εργαλεία μελέτης των καρκίνων του ανθρώπου⁷².

Μετά την ολοκλήρωση του *in vivo* μοντέλου, μπορεί επιπλέον να διερευνηθεί αν η προς μελέτη ουσία επάγει ειδικές ή/και μη ειδικές αντικαρκινικές ανοσοαπαντήσεις στα ποντίκια.

Ιστορικά, η πιο διαδεδομένη μέθοδος για να υπολογιστεί η επαγωγή κυτταροτοξικότητας από τα λεμφοκύτταρα είναι μέσω της δοκιμασίας απελευθέρωσης του ραδιενεργού χρωμίου (51Cr). Κατά τη διαδικασία αυτή, τα κύτταρα-στόχοι σημαίνονται ενδοκυτταρικά με 51Cr, συνεπώς αζονται με τα δραστικά κύτταρα και η κυτταρική λύση των κυτάρων-στόχων από τα δραστικά κύτταρα οδηγεί στην απελευθέρωση ραδιενέργειας στο κυτταρικό υπερκείμενο, η οποία ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται μέσω μετρητών γ-ακτινοβολίας⁷³. Αν και χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αρκετά μειονεκτήματα συμπεριλαμβανομένων της έλλειψης πληροφοριών για την συμπεριφορά των κυττάρων μετά τη σήμανσή τους με το ραδιενεργό στοιχείο, του υψηλού κόστους, της ανάγκης για ειδικό εξοπλισμό, του μικρού χρόνου ημιζωής των ραδιενεργών στοιχείων, καθώς και της παραγωγής επικίνδυνων αποβλήτων⁷⁴.

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα, έχουν αναπτυχθεί καινούριες μέθοδοι με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Μία από αυτές είναι η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του μορίου CD107 (anti-CD107). Κατά την αποκοκκίωση των δραστικών κυττάρων, το CD107 εκτίθεται στην επιφάνειά τους, εντοπίζεται από σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές αντισώματα και έτσι, καθίσταται εφικτό να ανιχνευθεί η ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών (CD8+ T και NK) λεμφοκυττάρων. Τα συγκεκριμένα λεμφοκύτταρα περιέχουν εκκριτικά λυσοσώματα ή λυτικά κοκκία, στο εσωτερικό των οποίων

υπάρχουν κυτταροτοξικά μόρια (κυρίως περφορίνη και θρυμματίνες). Όταν αναγνωρίσουν ένα κύτταρο-στόχο, τα κοκκία τους συσσωρεύονται προς την περιοχή που προσεγγίζει την κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, συντήκονται στην περιοχή της ανοσολογικής σύναψης με τη μεμβράνη του δραστικού κυτταροτοξικού κυττάρου και το περιεχόμενό τους απελευθερώνεται με εξωκύτωση στο μεσοκυττάριο χώρο, οδηγώντας τελικά τα κύτταρα-στόχους σε απόπτωση^{75,76}.

Παράλληλα, εκτός από την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων, εκφράζονται στην επιφάνεια του δραστικού κυτταροτοξικού κυττάρου και οι γλυκοπρωτεΐνες του λυσοσώματος (CD107a και CD107b), που ανιχνεύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Είναι σημαντικό επίσης να αποσαφηνιστεί ότι η δοκιμασία του 51Cr εξετάζει το βαθμό θανάτωσης των κυττάρων-στόχων, ενώ η δοκιμασία αποκοκκίωσης με ανίχνευση του CD107 ελέγχει το βαθμό ενεργοποίησης των δραστικών (κυτταροτοξικών) κυττάρων.

5. Παράδειγμα ροής πειραμάτων για τον έλεγχο της αντικαρκινικής δράσης μιας νέας ημισυνθετικής ουσίας

Έχοντας ήδη περιγράψει τις τεχνικές που εφαρμόζονται, παρακάτω παρουσιάζεται η προτυποποιημένη διαδικασία που εφαρμόζεται στη Μονάδα Κυτταρομετρίας Ροής του Τμήματος Βιολογίας σε συνεργασία με το Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ.

Αρχικά, γίνεται σάρωση της σειράς των νέων αντικαρκινικών ουσιών (στο συγκεκριμένο παράδειγμα των παραγώγων της ολευρωπεΐνης A, B, Γ, Δ και E), παράλληλα με το θετικό μάρτυρα (στη συγκεκριμένη περίπτωση το χημειοθεραπευτικό δοξορουβικίνη), με τη δοκιμασία MTT σε ένα σύνολο 3 ανθρώπινων καρκινικών σειρών [μαστού SKBR3 (κυτταρική σειρά που στη βιβλιογραφία έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί για τη σάρωση αναλόγων της ολευρωπεΐνης), ωοθηκών SKOV3 (παρεμφερής με την SKBR3 ως προς την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και HER2), και τραχήλου της μήτρας HeLa (ως πρότυπη σειρά αναφο-

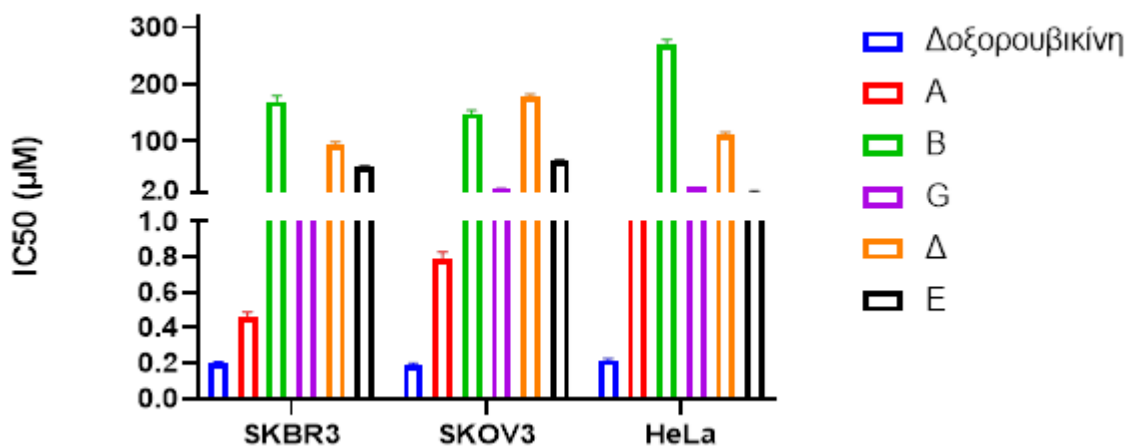
ράς που χρησιμοποιείται ευρέως)]. Από τα αποτελέσματα (Εικόνα 8) προέκυψε ότι τα ανάλογα A και Γ παρουσιάζουν την καλύτερη κυτταροτοξικότητα (δηλαδή έχουν τιμές $IC_{50} < 10 \mu M$) και στις 3 κυτταρικές σειρές. Το ανάλογο E έχει μεν χαμηλή τιμή IC_{50} στην κυτταρική σειρά HeLa, αλλά στις υπόλοιπες καρκινικές σειρές η τιμή IC_{50} είναι μεγαλύτερη των $50 \mu M$ οπότε θεωρήθηκε μη δραστικό. Το ίδιο ισχύει και για τα ανάλογα B και Δ, καθώς δεν είναι δραστικά σε καμία από τις 3 κυτταρικές σειρές (Εικόνα 8).

Όσον αφορά στον επαγόμενο τύπο κυτταρικού θανάτου για τα ανάλογα A και Γ που επελέγησαν από την δοκιμασία MTT, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής μετά από επώαση των κυττάρων με τα A και Γ και χρώση τους με αννεξίνη V-PI, τα αποτελέσματα έδειξαν για το ανάλογο A ότι θανατώνει την πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων (61,9%) και υπάρχει μια σαφής μετατόπιση προς την αποπτωτική περιοχή (61,7%), ενώ το ποσοστό της νέκρωσης είναι αμελητέο (0,2%) (Εικόνα 9). Συνεπώς, η συγκεκριμένη ουσία επάγει αποπτωτικό τύπο θανάτου στα καρκινικά κύτταρα και όχι νέκρωση.

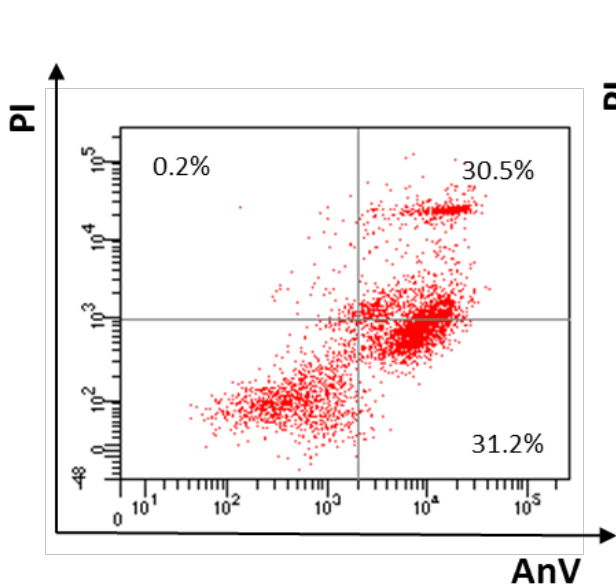
Επιπλέον, ο έλεγχος του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου από το ανάλογο A σε PBMCs απομονωμένα από υγιείς δότες, έδειξε ότι προκαλεί εξαιρετικά χαμηλή τοξικότητα, καθώς το 98,2% των υγιών κυττάρων παρέμειναν ζωντανά (Εικόνα 10, κάτω αριστερό τεταρτημόριο). Συνεπώς, αυτό το θετικό αποτέλεσμα επιτρέπει την περαιτέρω διερεύνηση του αναλόγου A.

Αναφορικά με την κυτταροστατικότητα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν (Εικόνα 11) ήταν τα εξής: στα καρκινικά κύτταρα που επώαστηκαν απουσία αναλόγου A (αρνητικός μάρτυρας), ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός προχώρησε ανεμπόδια μέχρι την 5η γενεά, ενώ επώαση των ίδιων κυττάρων με το ανάλογο A φαίνεται να οδηγεί σε στάση του διπλασιασμού, καθώς τα κύτταρα φτάνουν μέχρι την 4η γενεά, πράγμα που υποδεικνύει την επαγωγή κυτταροστατικότητας από το συγκεκριμένο ανάλογο A.

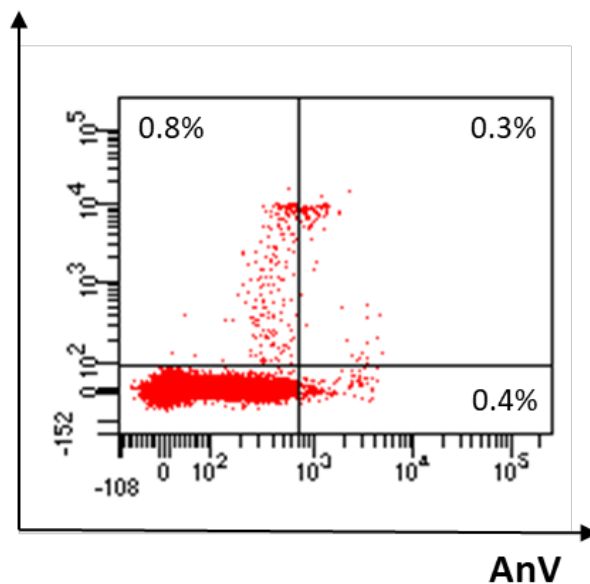
Όσον αφορά στην ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα καρκινικά



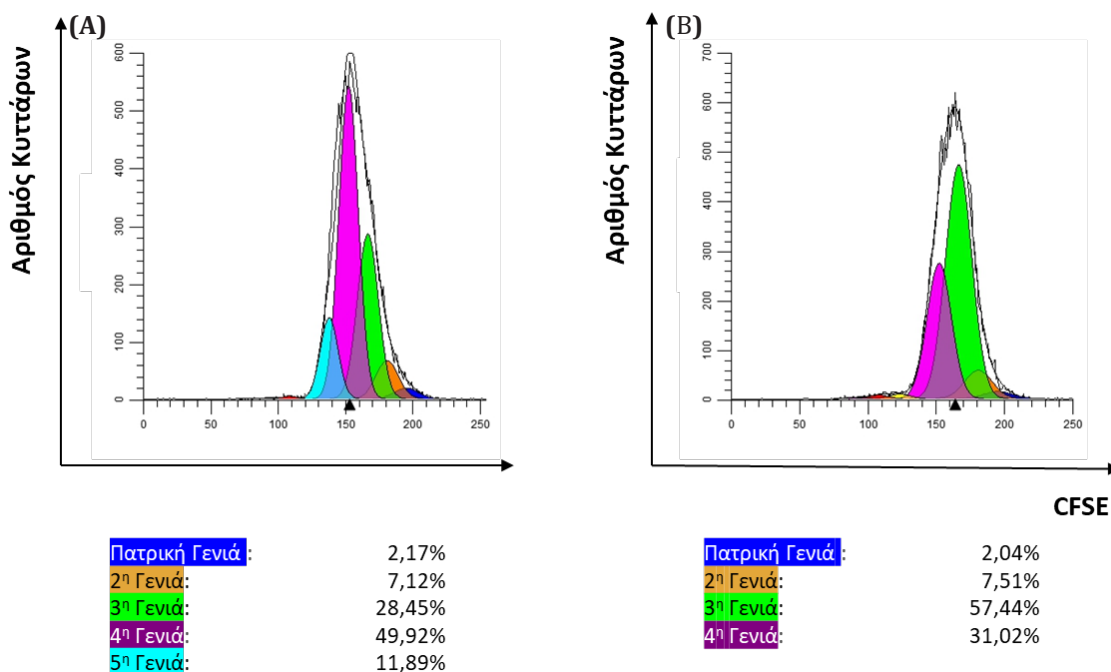
Εικόνα 8. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας μέσω της δοκιμασίας MTT, όπου απεικονίζονται οι μέσες τιμές IC50 5 διαφορετικών παραγώγων της ολευρωπεΐνης (A-E) έπειτα από επώαση 72 ωρών με τις 3 ανθρώπινες καρκινικές σειρές SKBR3, SKOV3 και HeLa. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη (μπλε στήλης).



Εικόνα 9. Αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα κυτταρομετρίας ροής μετά από επώαση 72 ωρών της κυτταρικής σειράς SKBR3 με το ανάλογο A και χρώση των κυττάρων με αννεξίνη V (AnV) και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα ποσοστά των κυττάρων ανά τεταρτημόριο.



Εικόνα 10. Αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα κυτταρομετρίας ροής για τον έλεγχο της τοξικότητας έναντι PBMCs απομονωμένων από υγιή δότη. Τα PBMCs επώαστηκαν για 24 ώρες με το ανάλογο A στην προσδιορισθείσα από τη δοκιμασία MTT συγκέντρωση IC50, και ακολούθησε χρώση με αννεξίνη V (AnV) και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα ποσοστά των κυττάρων ανά τεταρτημόριο.



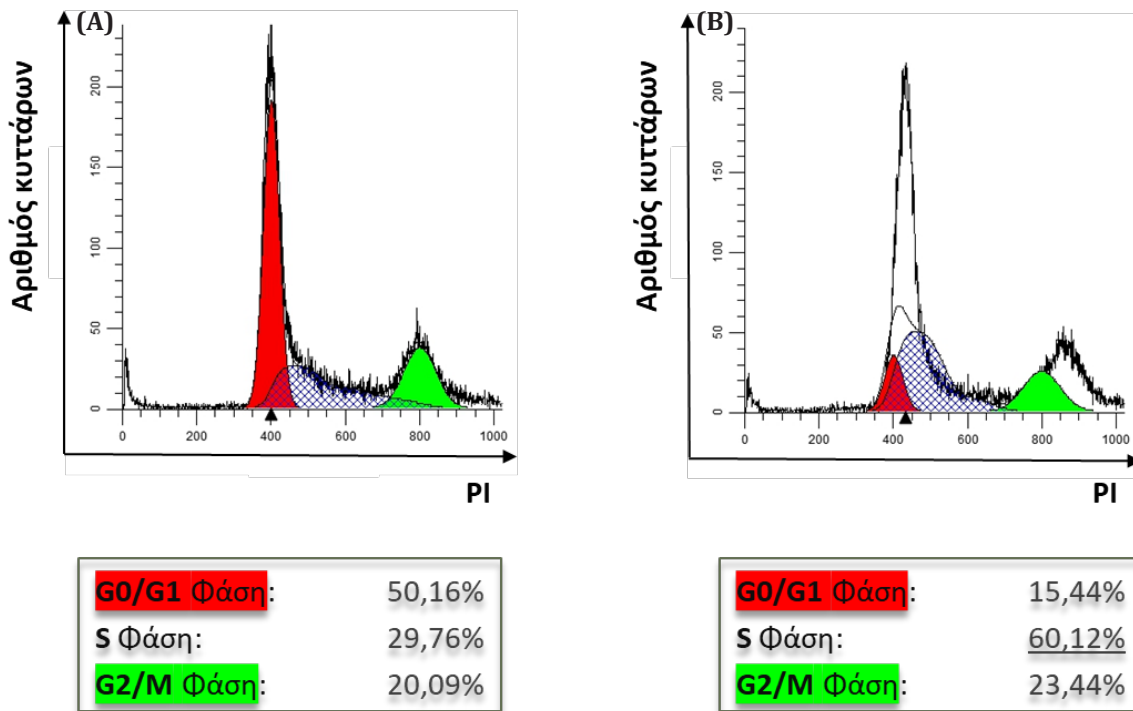
Εικόνα 11. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ελέγχου της κυτταροστατικότητας μετά από χρώση με CFSE. Απεικονίζονται ιστογράμματα της έντασης φθορισμού της χρωστικής CFSE (οριζόντιος άξονας) συναρτήσει του αριθμού των κυττάρων (κάθετος άξονας), με τη μεταβολή του πληθυσμού των γενεών κυττάρων SKBR3 μετά από επώαση 72 ωρών **(A)** απουσία αναλόγου (αρνητικός μάρτυρας) όπου παρατηρούμε τη διαίρεση των κυττάρων για 5 γενεές (γαλάζια κορυφή), και **(B)** παρουσία της κυτταροστατικής ουσίας A, όπου η κυτταρική διαίρεση σταματά στην 4η γενεά (ροζ κορυφή). Οι αριθμοί αναφέρονται σε ποσοστά κυττάρων ανά γενεά.

κύτταρα που επώαση απουσία του αναλόγου A (αρνητικός μάρτυρας) παρουσιάζουν μια φυσιολογική κατανομή στις 3 φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 12). Αντίθετα, μετά από επώαση με το ανάλογο A, τα ίδια κύτταρα παρουσιάζουν μια εντελώς διαφορετική εικόνα και παρατηρείται στάση τους στη φάση S, κάτι που προφανώς οφείλεται στον μηχανισμό δράσης του αναλόγου A που εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

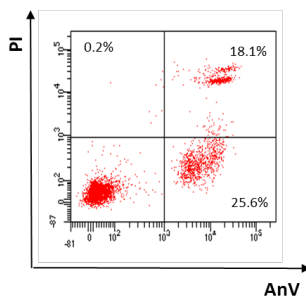
Επιπλέον, το εργαστήριο έλεγξε τον τύπο κυτταρικού θανάτου που επάγει το ανάλογο A στην ποντική καρκινική σειρά μελανώματος B16.F1, η οποία χρησιμοποιείται στα *in vivo* πειράματα που ακολουθούν. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 13) έδειξαν ότι η δραστηριότητα του αναλόγου A έναντι και των κυττάρων ποντικού είναι ανάλογη αυτής στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές, καθώς, στο 43,9% των

μελανωματικών κυττάρων B16.F1 επάγεται απόπτωση, ενώ μόλις στο 0,2% νέκρωση.

Για τα *in vivo* πειράματα χρησιμοποιήθηκε θεραπευτικό μοντέλο όγκου, όπου στη ραχιαία περιοχή ποντικών της φυλής C57BL/6J ενοφθαλμίστηκαν υποδόρια κύτταρα της συγγενικής σειράς μελανώματος B16.F1, και όταν οι όγκοι έγιναν ψηλαφητοί, χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά το ανάλογο A. Οι μετρήσεις που καταγράφηκαν έδειξαν μείωση του ρυθμού αύξησης των όγκων στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε το ανάλογο A σε 2 διαφορετικές δόσεις (4 και 8 μg/ζώο) σε σύγκριση με τα ποντικά-μάρτυρες στα οποία χορηγήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (PBS). Η μείωση των όγκων ήταν στατιστικά σημαντική ήδη από τις ημέρες 25 και 19 για τις ποσότητες των 4 και 8 μg/ζώο, αντίστοιχα (Εικόνα 14).

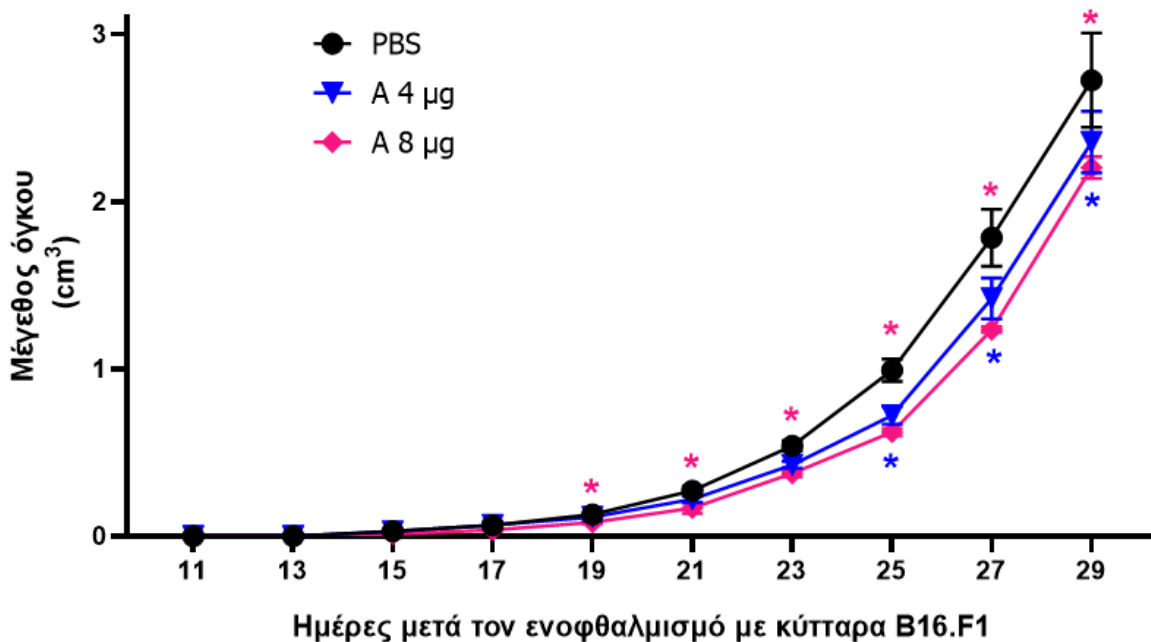


Εικόνα 12. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου κυττάρων SKBR3 μετά από επώαση 72 ωρών με το ανάλογο A και χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI). Στο ιστόγραμμα (A), απουσία αναλόγου A (αρνητικός μάρτυρας), τα κύτταρα κατανομούνται φυσιολογικά και στις 3 φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Στο ιστόγραμμα (B), μετά από επώαση με το ανάλογο A, το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων (60, 12%) έχει σταματήσει στη φάση S. Οι αριθμοί στον πίνακα αναφέρονται σε ποσοστά κυττάρων ανά φάση του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 13. Αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα κυτταρομετρίας ροής μετά από επώαση 72 ωρών της κυτταρικής σειράς μελανώματος ποντικού B16.F1 με το ανάλογο A και χρώση των κυττάρων με αννεξίνη V (AnV) και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα ποσοστά των κυττάρων ανά τεταρτημόριο.

Μετά το πέρας του πειράματος, τα ποντίκια ευθανατώθηκαν και τα όργανά τους συλλέχθηκαν για περαιτέρω αναλύσεις. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ιστολογική χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H&E) και πλήθος ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε τομές των όγκων από ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε το ανάλογο A, για να ελεγχθεί η διήθηση των όγκων από ανοσοκύτταρα, συγκεκριμένα από CD3+, CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Εικόνα 15), στις ομάδες που έλαβαν τις θεραπευτικές δόσεις του αναλόγου A παρατηρήθηκε διάχυτη διήθηση από CD3+ T λεμφοκύτταρα, αλλά και από CD4+ βοηθητικά και CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά καθώς η πυκνή διήθηση από λεμφοκύτταρα είναι ένα κοι-



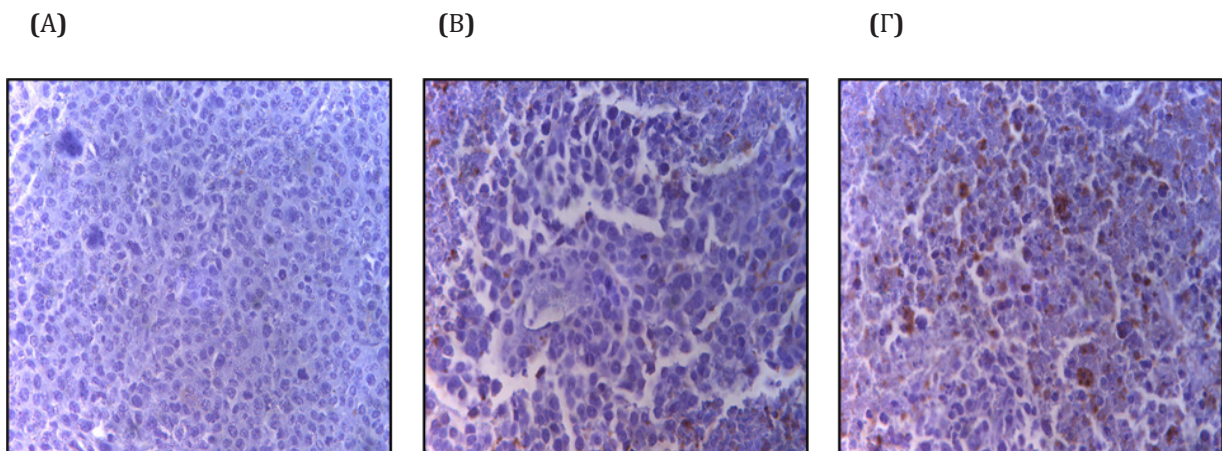
Εικόνα 14. Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα του μεγέθους των μετρηθέντων όγκων μελανώματος σε ποντικούς C57BL/6J (κάθετος άξονας) από την 11η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των ποντικών με τα κύτταρα B16.F1, όπου οι όγκοι ήταν ψηλαφητοί, μέχρι την 29η ημέρα, όπου τα ζώα ευθανατώθηκαν. Στα ποντίκια χορηγήθηκε το ανάλογο A σε δόσεις 4 μg/ζώο (μπλε γραμμή) και 8 μg/ζώο (κόκκινη γραμμή). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε ισόποσο ρυθμιστικού διαλύματος αλάτων (PBS, μαύρη γραμμή). Απεικονίζονται οι μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση. *, $p < 0,05$.

νό χαρακτηριστικό των όγκων με ανοσο-ανεκτικό (immune-permissive) μικροπεριβάλλον, που έχουν ευνοϊκότερη εξέλιξη και καλύτερη πρόγνωση⁷⁷⁻⁷⁹.

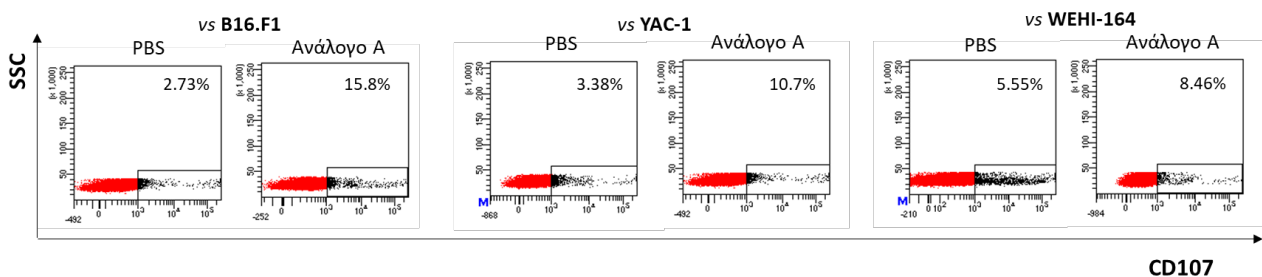
Η επιβράδυνση που παρατηρήθηκε στην ανάπτυξη των όγκων *in vivo* μετά τη χορήγηση του αναλόγου A, καθώς και η διήθησή τους από ανοσοκύτταρα μετά από ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, οδήγησε στη διερεύνηση για την επαγωγή ειδικών ή/και μη ειδικών αντικαρκινικών ανοσοαπαντήσεων στα ποντίκια. Μετά την ευθανασία των ζώων, απομονώθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες τα σπληνοκύτταρά τους και ελέγχθηκαν *ex vivo* ως προς την ικανότητά τους να λύουν τα συγγενικά κύτταρα μελανώματος B16.F1, καθώς και τα καρκινικά κύτταρα των σειρών YAC-1 [ευαίσθητα σε λύση από φυσικά φονικά (NK) κύτταρα] και WEHI 164 [ευαίσθητα σε λύση

από ενεργοποιημένα με λεμφοκίνες (LAK) κύτταρα] μέσω της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής και αντισωμάτων έναντι του μορίου CD107 (anti-CD107).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σπληνοκύτταρα από τους ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε δόση του αναλόγου A 8 μg/ζώο, παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του δείκτη CD107, συνεπώς υψηλότερη κυτταροτοξικότητα έναντι όλων των κυττάρων-στόχων, και κυρίως έναντι των συγγενικών κυττάρων B16.F1 (Εικόνες 16 και 17). Συγκεκριμένα, το ποσοστό των CD107+ λεμφοκυττάρων μετά από επώαση με τα κύτταρα B16.F1 ήταν 15,8%, ενώ τα ποσοστά για τις άλλες 2 κυτταρικές σειρές, YAC-1 και WEHI 164, ήταν 10,7% και 8,46%, αντίστοιχα (Εικόνες 16 και 17). Το γεγονός ότι τα



Εικόνα 15. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τομές όγκων του *in vivo* μοντέλου μελανώματος σε ποντικούς C57BL/6J μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του CD3 σε μεγέθυνση $\times 40$, όπου με καφέ χρώμα απεικονίζονται τα CD3+ T λεμφοκύτταρα. Οι όγκοι αντιστοιχούν σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε (Α) PBS (αρνητικός μάρτυρας), (Β) το ανάλογο Α σε δόση 4 $\mu\text{g}/\zeta\omega\omicron$ και (Γ) το ανάλογο Α σε δόση 8 $\mu\text{g}/\zeta\omega\omicron$.



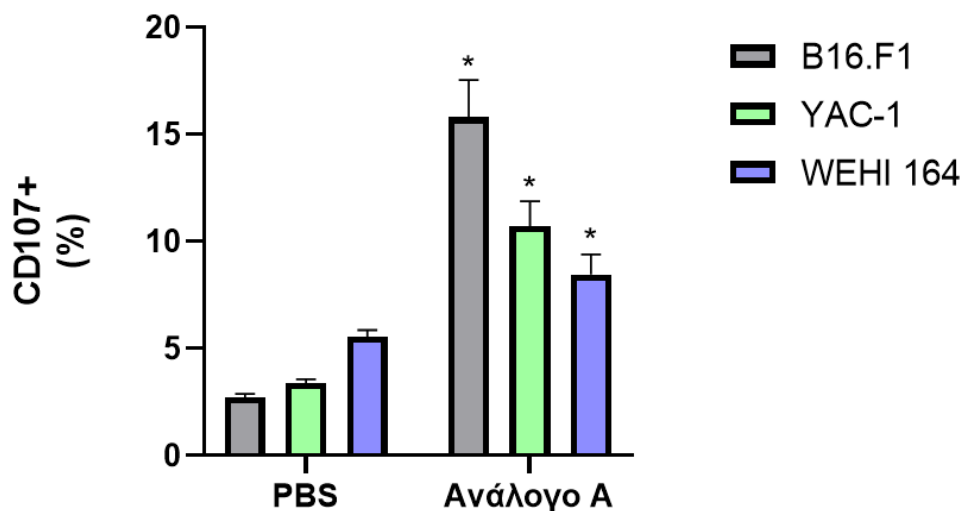
Εικόνα 16. Αντιπροσωπευτικά στικτογράμματα του πλάγιου σκεδασμού (SSC, κάθετος άξονας) σε σχέση με την ένταση φθορισμού του σημασμένου αντισώματος έναντι του CD107 (οριζόντιος άξονας), όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση σπληνοκυττάρων ποντικών με κυτταρομετρία ροής. Τα σπληνοκύτταρα συνεπωάστηκαν με καρκινικά κύτταρα των σειρών B16.F1 (αριστερά), YAC-1 (μέση) και WEHI 164 (δεξιά). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σπληνοκύτταρα ποντικών στους οποίους χορηγήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (PBS). Οι αριθμοί υποδεικνύουν τα ποσοστά των CD107+ λεμφοκυττάρων (γεγονότα εντός μαύρης περιφράξης) στο σύνολο των σπληνοκυττάρων των ποντικών.

συγγενικά κύτταρα της σειράς B16.F1 προκάλεσαν τη μεγαλύτερη διέγερση των δραστικών κυττάρων υποδεικνύει ότι τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή των όγκων μελανώματος *in vivo*, στοχεύθηκαν από κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα κυρίως ειδικά (CD8+ T κύτταρα) και, σε μικρότερο βαθμό, μη ειδικά (NK και LAK κύτταρα), με αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους των όγκων

στα ποντίκια που έλαβαν το ανάλογο Α.

6. Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου είναι μια πολύ επίπονη, χρονοβόρα και κοστοβόρα διαδικασία. Ο προκλινικός έλεγχος αποτελεί το πρώτο βήμα πριν μια ουσία εισέλθει στις κλινικές μελέτες. Επομένως,



Εικόνα 17. Ραβδόγραμμα των ποσοστών των CD107+ λεμφοκυττάρων που ανιχνεύθηκαν μετά από συνεπάωση σπληνοκυττάρων ποντικών με κύτταρα των καρκινικών σειρών B16.F1, YAC-1 και WEHI 164. Απεικονίζονται οι μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση από συνολικά 5 ποντίκια/ομάδα, στα οποία χορηγήθηκε *in vivo* ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (PBS) ή το ανάλογο A. *, $p < 0,05$.

είναι πολύ σημαντικό το στάδιο αυτό να είναι σωστά δομημένο και να εξετάζει μια πληθώρα παραμέτρων και χαρακτηριστικών, ώστε όταν η ουσία χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες να υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες επιτυχίας. Η συγκεκριμένη ανασκόπηση έχει στόχο να παρουσιάσει ορισμένες από τις κυριότερες τεχνικές που εφαρμόζονται *in silico*, *in vitro*, και *in vivo* και να αναδείξει τη λογική πίσω από κάθε δοκιμασία που χρησιμοποιείται.

Χρηματοδότηση

Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ, συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ-02423). □

Biological Assays for the Preclinical Evaluation of New molecules with Anticancer Activity: the Example of Semisynthetic Analogues of Oleuropein

Evangelia Nikou^{1*}, Nikolaos Angelis¹, Odyssefs Liagkas¹, Panagiota Papakotsi², Georgia Sarikaki², Efthimios Paronis¹, Nikolas Orologas-Stavrou¹, Ioannis Kostopoulos¹, Pantelis Rousakis¹, Chrysanthi Panteli¹, Georgia Dimitrakopoulou¹, Alexios-Leandros Skaltsounis², Ioannis K. Kostakis^{3*}, Ourania Tsitsilonis^{1*}

¹Flow Cytometry Unit, Section of Animal and Human Physiology, Department of Biology; ²Department of Pharmacognosy & Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy; and ³Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, 15784, Ilissia, Athens, Greece

KEYWORDS:
anticancer activity;
drug development;
***in silico* testing;**
***in vitro* testing;**
***in vivo* testing**

**CORRESPONDING
AUTHORS:**

Evangelia Nikou
eunikou@med.uoa.gr
Ioannis Kostakis
ikkostakis@pharm.uoa.gr
Ourania Tsitsilonis
rtsitsil@biol.uoa.gr

ABSTRACT

The toxicity and limited efficacy of many traditional chemotherapeutic formulations has rendered imperative the need to identify new targets and develop novel drugs for the treatment of cancer. The development of new drugs with anticancer activity is a tedious and time-consuming process and requires the combination of a multitude of *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* techniques and clinical trials. The rapid development of computer science provides tremendous potential, and *in silico* programs are widely used for the discovery of new targets. At the same time, *in vitro* assays are used to evaluate the interactions of potential drugs with cells. At the last stage of pre-clinical testing, *in vivo* models are used to study the pharmacokinetics, safety and efficacy of candidate molecules in experimental animals. This review aims to present a series of *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methodologies applied during the preclinical testing for the evaluation of the anticancer activity of compounds. The most common *in silico* approaches are presented, as well as assays for testing the cytotoxicity of substances, the type of cell death induced, the degree of changes in cell division and the cell cycle, some *in vivo* models for assessing tumor growth, as well as the *ex vivo* evaluation of the activation of the immune system. Lastly, we briefly present the experimental procedure for the evaluation of the anticancer activity of an oleuropein analogue, including some representative results, conducted in the Flow Cytometry Unit of the Department of Biology in collaboration with the Faculty of Pharmacy of NKUA.

References

1. Miller K. D., Siegel R. L., Lin C. C., Mariotto A. B., Kramer J. L., Rowland J. H., Stein D. S., Alteri R., Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: Cancer J. Clin.* 66, 271–89, 2016.
2. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: Cancer J. Clin.* 68, 7–30, 2018.
3. Global Cancer Observatory, *Cancer Tomorrow*. [online] 2020, Accessed December 5, 2022. Available from Internet: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>.
4. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: Cancer J. Clin.* 66, 7–30, 2016.
5. Schnipper L. E., Davidson N. E., Wollins D. S., Tyne C., Blayney D. W., Blum D., Dicker A. P., Ganz P. A., Hoverman J. R., Langdon R., Lyman G. H., Meropol N. J., Mulvey T., Newcomer L., Peppercorn J., Polite B., Raghavan D., Rossi G., Saltz L., Schrag D., Smith T. J., Yu P. P., Hudis C. A., Schilsky R. L. American Society of Clinical Oncology Statement: A Conceptual Framework to Assess the Value of Cancer Treatment Options. *J. Clin. Oncol.* 33, 2563–77, 2015.
6. Su M., Zhang Q., Bai X., Wu C., Li Y., Mossialos E., Menshah G. A., Masoudi F. A., Lu J., Li X., Salas-Vega S., Zhang A., Lu Y., Nasir K., Krumholz H. M., Jiang L. Availability, cost, and prescription patterns of antihypertensive medications in primary health care in China: a nationwide cross-sectional survey. *Lancet.* 390, 2559–68, 2017.
7. Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature.* 534, 314–6, 2016.
8. Stone P. (2010). Pharmaceutical Products and Chemical Intermediates. Fourth Review: Advice Concerning the Addition of Certain Products to the Pharmaceutical Appendix to the HTS. *USITC Publication 4181*, pp. 13.
9. Carelle N., Piotto E., Bellanger A., Germanaud J., Thuillier A., Khayat D. Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy. *Cancer.* 95, 155–63, 2002.
10. Zhang Z., Zhou L., Xie N., Nice E. C., Zhang T., Cui Y., Huang C. Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Sig. Transduct. Target Ther.* 5, 2020.
11. Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 767–76, 2007.
12. Cragg G. M., Grothaus P. G., Newman D. J. Impact of natural products on developing new anticancer agents. *Chem. Rev.* 109, 3012–43, 2009.
13. Cheng W. H., Cao B., Shang H., Niu C., Zhang L. M., Zhang Z. H., Tian D. L., Zhang S., Chen H., Zou, Z. M. Synthesis and evaluation of novel podophyllotoxin derivatives as potential antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* 85, 498–507, 2014.
14. Rodrigues F. A., Bomfim I. S., Cavalcanti B. C., Pessoa C. O., Wardell J. L., Wardell S. M. S. V., Pinheiro A. C., Kaiser C. R., Nogueira T. C. M., Low J. N., Gomes L. R., de Souza M. V. Design, synthesis and biological evaluation of (E)-2-(2-arylhydrazinyl) quinoxalines, a promising and potent new class of anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 934–9, 2014.
15. Kataoka T., Shima F. *In Silico Drug Discovery Based on the Identification of a Novel “Druggable” Surface Pockets on the Ras Oncogene Products*. [online] 2013, Accessed March 15, 2022. Available from Internet: http://www.springer.jp/en/news_publications/press_release/2013/130430_2/.
16. Brandish P. E., Chiu C. S., Schneeweis J., Brandon N. J., Leech C. L., Kornienko O., Scolnick E. M., Strulovici B., Zheng W. A cell-based ultra-high-throughput screening assay for identifying inhibitors of D-amino acid oxidase. *J. Biomol. Screen.* 11, 481–7, 2006.
17. Segall M. D., Barber C. Addressing toxicity risk when designing and selecting compounds in early drug discovery. *Drug Discov. Today.* 19, 688–93, 2014.

18. Zhang K. Y. J., Milburn M. V., Artis D. R. Scaffold-based Drug Discovery, In: Jhoti H., Leach A. R. eds. *Structure-based Drug Discovery*, The Netherlands, Springer (2007) pp. 129-50.
19. Vidal D., Garcia-Serna R., Mestres J., Ligand-based approaches to in silico pharmacology, chemoinformatics and computational chemical biology. *Springer*. 672, 489-502, 2011.
20. Ezzat A., Wu M., Li X. L., Kwok C. K. Computational prediction of drug-target interactions using chemogenomic approaches: an empirical survey. *Brief Bioinform*. 20, 1337-57, 2019.
21. Cichonska A., Ravikumar B., Parri E., Timonen S., Pahikkala T., Airola A., Wennerberg K., Rousu J., Aittokallio T. Computational-experimental approach to drug-target interaction mapping: a case study on kinase inhibitors. *PLoS Comput. Biol.* 13, 2017.
22. Agamah F. E., Mazandu G. K., Hassan R., Bope C. D., Thomford N. E., Ghansah A., Chimusa E. R. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Brief Bioinform*. 21, 1663-75, 2020.
23. Zheng S., Dharssi S., Wu M., Li J., Lu Z. Text mining for drug discovery. *Method Mol. Biol.* 1939, 231-52, 2019.
24. Rouillard A. D., Gunderson G. W., Fernandez N. F., Wang Z., Monteiro C. D., McDermott M. G., Ma'ayan A. The Harmonizome: a Collection of Processed Datasets Gathered to Serve and Mine Knowledge about Genes and Proteins. *Database*. 2016, 2016.
25. Ochoa D., Hercules A., Carmona M., Suveges D., Gonzalez-Uriarte A., Malangone C., Miranda A., Fumis L., Carvalho-Silva D., Spitzer M. Open Targets Platform: supporting systematic drug-target identification and prioritization. *Nucleic Acids Res.* 49, 1302-10, 2021.
26. Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker B. A., Thiessen P. A., Yu B. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* 47, 1102-09, 2019.
27. Norinder U., Bergstrom C. A. Prediction of ADMET properties. *ChemMedChem*. 1, 920-37, 2006.
28. Shaker B., Yu M. S., Lee J., Lee Y., Jung C., Na D. User guide for the discovery of potential drugs via protein structure prediction and ligand docking simulation. *J. Microbiol.* 58, 235-44, 2020.
29. Martin Y. C., Kofron J. L., Traphagen L. M. Do structurally similar molecules have similar biological activity? *J. Med. Chem.* 45, 4350-8, 2002.
30. Kim S., Thiessen P. A., Bolton E. E., Chen J., Fu G., Gindulyte A., Han L., He J., He S., Shoemaker B. A. PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res.* 44, 1202-13, 2016.
31. Sterling T., Irwin J. J. ZINC 15-ligand discovery for everyone. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 2324-37, 2015.
32. Rognan D. Structure-based approaches to target fishing and ligand profiling. *Mol. Inform.* 29, 176-87, 2010.
33. Shaker B., Ahmad S., Lee J., Jung C., Na D. In silico methods and tools for Drug Discovery. *Comput. Biol. Med.* 137, 2021.
34. Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 935-49, 2004.
35. Combs A. P. Structure-based drug design of new leads for phosphatase research. *IDrugs*. 10, 112-5, 2007.
36. Coumar M. S., Leou J. S., Shukla P., Wu J. S., Dixit A. K., Lin W. H., Chang C. Y., Lien T. W., Tan U. K., Chen C. H. Structure-based drug design of novel Aurora kinase A inhibitors: structural basis for potency and specificity. *J. Med. Chem.* 52, 1050-62, 2009.
37. Gohlke H., Klebe G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 2644-76, 2002.
38. Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*

- 161, 269–88, 1982.
39. Friesner R. A., Banks J. L., Murphy R. B., Halgren T. A., Klicic J. J., Mainz D. T., Repasky M. P., Knoll E. H., Shelley M., Perry J. K. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* 47, 1739–49, 2004.
 40. Grant B. J., Lukman S., Hocker H. J., Sayyah J., Brown J. H., McCammon J. A., Gorfie A. A. Novel allosteric sites on Ras for lead generation. *PLoS One.* 6, 2011.
 41. Nair P. C., Malde A. K., Drinkwater N., Mark A. E. Missing fragments: detecting cooperative binding in fragment-based drug design. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 322–6, 2012.
 42. Venkatesh S., Lipper R. A. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *J. Pharm. Sci.* 89, 145–54, 2000.
 43. Viana Nunes A. M., das Chagas Pereira de Andrade F., Filgueiras L. A., de Carvalho Maia O. A., Cunha R. L. O. R., Rodezno S. V. A., Maia Filho A. L. M., de Amorim Carvalho F. A., Braz D. C., Mendes A. N. preADMET analysis and clinical aspects of dogs treated with the Organotellurium compound RF07: a possible control for canine visceral leishmaniasis? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 80, 2020.
 44. Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 2017.
 45. National Cancer Institute, *Cell Lines in the In Vitro Screen*. [online] 2015, Accessed March 15, 2023. Available from Internet: https://dtp.cancer.gov/discoverydevelopment/nci-60/cell_list.htm.
 46. Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S. eds. *Assay Guidance Manual* [Online]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences (2004). Available from Internet <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
 47. Berridge M. V., Tan A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474–82, 1993.
 48. Gerlier D., Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Meth.* 94, 57–63, 1986.
 49. Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Front. Nutr.* 1, 332–49, 2020.
 50. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107–12, 1990.
 51. Vichai V., Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1, 1112, 2006
 52. Decker T., Lohmann-Matthes M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Meth.* 115, 61–9, 1988.
 53. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6, 465–8, 2018.
 54. Strehler B. L., McElroy W. D. Assay of adenosine triphosphate. In Colwick S. P., Kaplan N. O. eds *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press (1957) 3, 871–3.
 55. Hannah R., Beck M., Moravec R., Riss T. CellTiter-Glo™ Luminescent cell viability assay: a sensitive and rapid method for determining cell viability. *Promega Cell Notes.* 2, 11–3, 2001.
 56. Lowe S. W., Lin A. W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 21, 485–95, 2000.
 57. *What is the difference between necrosis and*

- apoptosis?* Proteintech Group. [online] 2022, Accessed March 15, 2023. Available from Internet: <https://www.ptglab.com/news/blog/what-is-the-difference-between-necrosis-and-apoptosis>
58. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2018), Μοριακή Βιολογία του ΚΥΤΤΑΡΟΥ, Μετάφραση της 6ης Αμερικανικής Έκδοσης, Αθήνα, Εκδόσεις Utopia, pp. 976
 59. Taatjes D. J., Sobel B. E., Budd R. C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem. Cell Biol.* 129, 33–43, 2008.
 60. Bottone M. G., Santin G., Aredia F., Bernocchi G., Pellicciari C., Scovassi, A. I. Morphological features of organelles during apoptosis: an overview. *Cells.* 2, 294–305, 2013.
 61. Combs C. A. Fluorescence microscopy: a concise guide to current imaging methods. *Curr. Protoc. Neurosci.*, Chapter 2, Unit 2.1, 2010.
 62. Pringle J. R., Preston R. A., Adams A. E., Stearns T., Drubin D. G., Haarer B. K., Jones E. W. Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.* 31, 357–435, 1989.
 63. Renz M. Fluorescence microscopy – A historical and technical perspective. *Cytometry Part A.* 83, 767–9, 2013.
 64. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., Stryer, L. (2017), Βιοχημεία, Μετάφραση της 8ης Αμερικανικής Έκδοσης- 3η Ελληνική Έκδοση, Αθήνα, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, pp. 87.
 65. Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 163–76, 2017.
 66. Henel G., Schmitz J. L. Basic theory and clinical applications of flow cytometry. *Lab. Med.* 38, 428–36, 2007.
 67. Vega-Perez J. M., Palo-Nieto C., Vega-Holm M., Góngora-Vargas P. Calderón-Montaña J. M., Burgos-Morón E., Lopez-Lazaro M., Iglesias-Guerra F. Aziridines from alkenyl-β-D-galactopyranoside derivatives: Stereoselective synthesis and in vitro selective anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* 70, 380-92, 2013.
 68. Pourahmad J., Salimi A. Isolated human peripheral blood mononuclear cell (PBMC), a cost-effective tool for predicting immunosuppressive effects of drugs and xenobiotics. *Iran. J. Pharm. Res.* 14, 979-80, 2015.
 69. Samara P., Christoforidou N., Lemus C., Argyropoulou A., Ioannou K., Vougianniopoulou K., Aligiannis N., Paronis E., Gaboriaud-Kolar N., Tsitsilonis O., Skaltsounis A. L. New semi-synthetic analogs of oleuropein show improved anticancer activity in vitro and in vivo. *Eur. J. Med. Chem.* 137, 11–29, 2017.
 70. Workman P., Aboagye E. O., Balkwill F., Balmain A., Bruder G., Chaplin D. J., Double J. A., Everitt J., Farningham D. A. H., Glennie M. J., Kelland L. R., Robinson V., Stratford I. J., Tpzzer G. M., Watson S., Wedge S. R., Eccles S. A., An Ad Hoc Committee of the National Cancer Research Institute. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br. J. Cancer.* 102, 1555–77, 2010.
 71. House C. D., Hernandez L. F., Annunziata C. M. Recent Technological Advances in Using Mouse Models to Study Ovarian Cancer. *Front. Oncol.* 4, 26, 2014.
 72. Κοκκινογένης Ε. Π., Δελή Μ., Παπακωστοπούλου Σ., Κότσαρη Μ., Ζουμπουρλής Π., Γουλιελμάκη Μ., Ζουμπουρλής Β. Ανασκόπηση των εφαρμογών των μοντέλων ποντικών στην έρευνα του καρκίνου. *Arch. Hell. Med.* 38, 166–76, 2021.
 73. Brunner K. T., Mauel J., Cerottini J. C., Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.* 14, 181–96, 1968.
 74. Zaritskaya L., Shurin M. R., Sayers T. J., Malyguine A. M. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Exp. Rev. Vaccines.* 9, 601–16, 2010.
 75. Trapani J. A., Smyth M. J. Functional significance

- of the perforin/ granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 735–47, 2002.
76. Davis D. M., Dustin M. L., What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* 25, 323–7, 2004.
77. Fridman W. H., Galon J., Pagès F., Tartout E., Sautès-Fridman C., Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 71, 5601-5, 2011.
78. Fridman W. H., Pagès F., Sautès-Fridman C., Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer.* 12, 298-306, 2012.
79. Fridman W. H., Dieu-Nosjean M. C., Pagès F., Cremer I., Damotte D., Sautès-Fridman C., Galon J. The Immune Microenvironment of Human Tumors: General Significance and Clinical Impact. *Cancer Microenviron.* 6, 117-22, 2013.