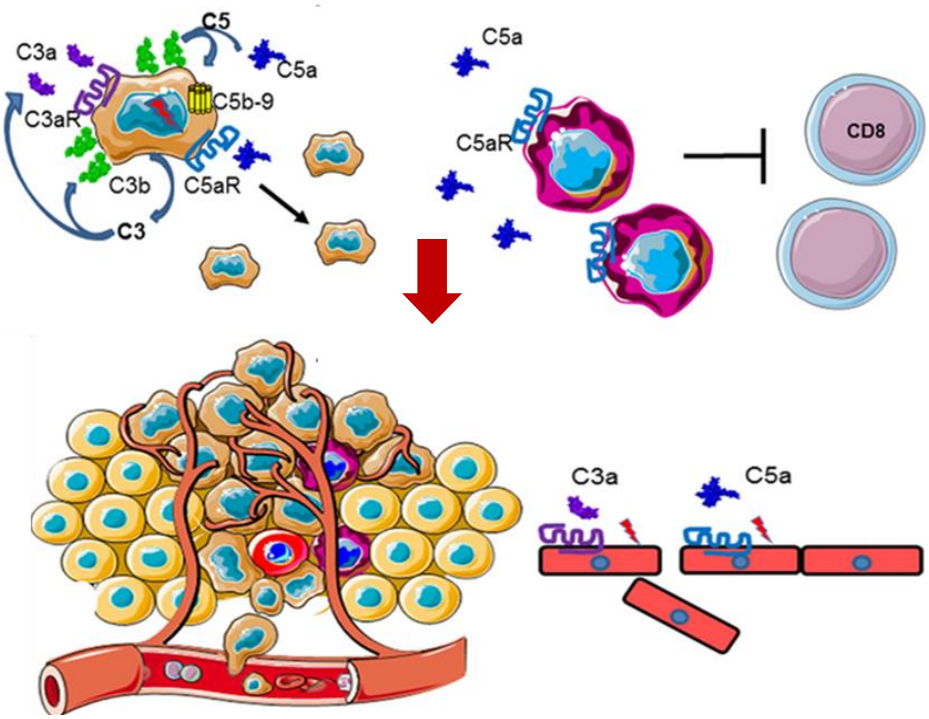
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ,
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ,
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ρόλος φλεγμονωδών μορίων του συμπληρώματος στον καρκίνο»

ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΤΖΕΛΕΦΑ ΑΜ: 41608

ΒΙΟΛΟΓΟΣ



Επιβλέπουσα: Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας
Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δημήτριος Μαστέλλος, Ερευνητής Α, Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ,
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ,
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ρόλος φλεγμονωδών μορίων του συμπληρώματος στον καρκίνο»

ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΤΖΕΛΕΦΑ ΑΜ: 41608

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπουσα: Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας, ΕΚΠΑ

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δημήτριος Μαστέλλος, Ερευνητής Α, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος

ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ: Εργαστήριο Μοριακής ανοσολογίας, Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) , Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Ο. Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας**
- **Δ. Μαστέλλος, Ερευνητής Α, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος**
- **Α. Σκορίλας, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας**

Ημερομηνία Εξέτασης

28/9/2018

Περιερχόμενα

Πρόλογος **5**

Περίληψη **7**

Abstract **8**

Συντμήσεις **9**

Κεφάλαιο Α: Εισαγωγή **12**

Α.1 Γλοιοβλάστωμα (GBM: Glioblastoma Multiforme) **13**

Α.1.1 Γλοιοβλάστωμα: Κακοήθης όγκος του εγκεφάλου 13

Α.1.2 Επιδημιολογία-Ιστολογικά χαρακτηριστικά-Ταξινόμηση του GBM 14

Α.1.3 Γενετική και Μοριακή παθογένεση του GBM 15

Α.1.4 Η κλινική εικόνα και η διάγνωση του GBM 19

Α.1.5 Τρέχουσες θεραπευτικές στρατηγικές για GBM 20

Α.2 Νευροβλάστωμα **23**

Α.2.1 Νευροβλάστωμα: Κακοήθης όγκος του ΠΝΣ 23

Α.2.2 Επιδημιολογία-Ιστολογικά χαρακτηριστικά-Ταξινόμηση του NB 25

Α.2.3 Γενετική και Μοριακή παθογένεση του NB 27

Α.2.4 Η κλινική εικόνα και η διάγνωση του NB 30

Α.2.5 Τρέχουσες θεραπευτικές στρατηγικές για NB 32

Α.3 Το σύστημα του συμπληρώματος **34**

Α.3.1 Οδοί ενεργοποίησης του συστήματος του συμπληρώματος 34

Α.3.2 Ρύθμιση του συστήματος του συμπληρώματος 38

Α.3.3 Βιολογικές λειτουργίες του συστήματος του συμπληρώματος 39

Α.3.4 Δομή και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C3 42

Α.3.5 Το μόριο C5a και ο υποδοχέας του C5aR1 (CD88) 43

Α.4 Ο ρόλος του συμπληρώματος στον καρκίνο **45**

Α.4.1 Ο ρόλος του συμπληρώματος στην εξάλειψη του καρκίνου 45

Α.4.2 Το συμπλήρωμα ευνοεί την ανάπτυξη του καρκίνου 49

Α.4.3 Το συμπλήρωμα και η ακτινοβολία στον καρκίνο 53

Α.4.4 Ενεργοποίηση του συμπληρώματος στο GBM 55

Α.4.5 Ενεργοποίηση του συμπληρώματος στο NB 57

Σκοπός της εργασίας **59**

Κεφάλαιο Β: Υλικά και Μέθοδοι……60

Β.1 Καλλιέργεια καρκινικών σειρών γλοιοβλαστώματος U87MG και νευροβλαστώματος SK-N-SH in vitro..... 61

Β.1.1 Απόψυξη κυττάρων από το υγρό άζωτο..... 61

Β.1.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων 63

Β.1.3 Μέτρηση κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer)..... 65

Β.1.4 Ψύξη και φύλαξη κυττάρων στο υγρό άζωτο (Κρυοσυντήρηση) 67

Β.2 Ακτινοβόληση κυττάρων σε πηγή κοβαλτίου..... 69

Β.3 Κυτταρομετρία ροής για έλεγχο της έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στις καρκινικές κυτταρικές σειρές U87MG, SK-N-SH 70

Β.3.1 Κυτταρομετρία ροής για έλεγχο της συνολικής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στα U87MG (ενδοκυττάρια και επιφανειακή χρώση) 72

Β.3.2 Κυτταρομετρία ροής για έλεγχο της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) σε U87MG και SK-N-SH 74

Β.4 Συλλογή και συγκέντρωση υπερκειμένων από καλλιέργεια κυττάρων U87MG για λειτουργικές μελέτες συμπληρώματος..... 77

Β.5 Ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος προσδιορισμού (ELISA)..... 80

Β.5.1 Δοκιμασία ELISA για ανίχνευση πρωτεΐνης C3 σε υπερκείμενα από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG 81

Β.5.2 Δοκιμασία ELISA για προσδιορισμό της ενεργοποίησης του συμπληρώματος σε υπερκείμενα από καλλιέργεια κυττάρων U87MG..... 84

Β.6 Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού (MTT assay)..... 87

Β.7 Δοκιμασία ανίχνευσης ενδοκυττάριων ROS..... 90

Κεφάλαιο Γ: Αποτελέσματα……92

Γ.1 Αποτελέσματα μελέτης των καρκινικών κυττάρων U87MG..... 93

Γ.1.1 Μέτρηση της συνολικής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στη καρκινική σειρά U87MG (ενδοκυττάρια και επιφανειακή χρώση) 93

Γ.1.2 Μέτρηση επιπέδων επιφανειακού εντοπισμού του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στη καρκινική σειρά U87MG 95

Γ.1.3 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης και ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C3 στη καρκινική σειρά U87MG μετά από επίδραση ακτινοβολίας..... 98

Γ.2 Αποτελέσματα μελέτης των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH 101

Γ.2.1 Μέτρηση επιπέδων επιφανειακού εντοπισμού του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στην καρκινική σειρά SK-N-SH 101

Γ.2.2 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH 103

Γ.2.3 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στην απελευθέρωση ενδοκυττάριων ROS στην καρκινική σειρά SK-N-SH.....104

Κεφαλαιο Δ: Συζήτηση……...106

Κεφάλαιο Ε: Βιβλιογραφία …….. 113

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ανοσολογίας, στο Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.), του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών Δημόκριτος. Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018 στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» με επιστημονικό υπεύθυνο τον Δρ. Δ. Μαστέλλο και επιβλέπουσα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας Ο. Τσιτσιλώνη. Αυτή η εργασία δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς τη συμβολή καθηγητών, συνάδελφων και συνεργατών.

Αρχικά οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον επιστημονικό υπεύθυνο της διπλωματικής μου εργασίας κ. Δημήτριο Μαστέλλο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ερευνητική του ομάδα και να ασχοληθώ με ένα επιστημονικό πεδίο, το οποίο με ενδιέφερε πολύ καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Οι γνώσεις, οι συμβουλές και η επιστημονική του καθοδήγηση έπαιξαν πολύτιμο ρόλο στην διεκπεραίωση των πειραμάτων και στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Επίσης θέλω να τον ευχαριστήσω για τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχε στη συγγραφή και διόρθωση της διπλωματικής εργασίας. Επιπλέον ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας κα. Ουρανία Τσιτσιλώνη, για την ανάθεση της παρούσας εργασίας, τις συμβολές της, τη στήριξη και τη βοήθεια της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της. Ακόμα την ευχαριστώ για την αισιοδοξία που μου ενέπνεε και την εκτίμηση που έδειξε στο πρόσωπο μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ανδρέα Σκορίλα για το χρόνο που διέθεσε και τη σημαντική του συμβολή, ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής, στην ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω πολύ θερμά τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Γιάννη Κωστόπουλο, για το πολύτιμο χρόνο που διέθεσε ώστε να πραγματοποιηθούν τα πειράματα κυτταρομετρίας, καθώς και για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Ταυτόχρονα θέλω να ευχαριστήσω θερμά τη κα. Γεωργία Τερζούδη, Ερευνήτρια Β στο εργαστήριο Βιοδοσιμετρίας και Ακτινοπροστασίας του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α, για τη πολύτιμη συμβολή της στη διεξαγωγή των πειραμάτων με ακτινοβόληση. Παράλληλα ευχαριστώ πολύ την υποψήφια διδάκτορα Αντιγόνη Σταυρίδου, η οποία μου μεταλαμπάδευσε τις πολύτιμές γνώσεις της στο πεδίο των κυτταροκαλλιεργειών, οι οποίες ήταν απαραίτητες για την διεξαγωγή της πλειοψηφίας των πειραματικών μεθόδων. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω ένα σημαντικό μέλος του εργαστηρίου, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρία Γεωργούτσου-Σπυρίδωνος, για τη καλή της διάθεση να μου προσφέρει οποιαδήποτε συμβουλή και βοήθεια καθόλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς και για τη στήριξη της όλα αυτά τα χρόνια που τη γνωρίζω.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους ανεξαιρέτως τους ανθρώπους που συνυπάρχουμε καθημερινά στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος για το καλό κλίμα που δημιουργούν και την άψογη συνεργασία που έχουμε σε καθημερινή βάση.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συμπαράστασή της, καθόλη τη διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας εργασίας, την υποστήριξη και κατανόηση τους καθώς και για όλα όσα μου προσφέρουν καθημερινά ώστε να επιτύχω τους στόχους μου.

Περίληψη

Το σύστημα του **συμπληρώματος** είναι μία πολύπλοκη ομάδα πρωτεϊνών, που ασκούν ποικίλες ανοσορυθμιστικές λειτουργίες προστατεύοντας τον οργανισμό από τα παθογόνα μικρόβια. Ωστόσο πολλά μόρια του συμπληρώματος (π.χ. C3, C5a, C5aR1) έχουν συσχετιστεί με την ογκογένεση σε διάφορους τύπους καρκίνου. Στη παρούσα εργασία ερευνήθηκε ο ρόλος φλεγμονωδών μορίων του συμπληρώματος σε δύο επιθετικούς καρκίνους νευρικής προέλευσης, το γλοιοβλάστωμα και το νευροβλάστωμα, σε συνδυασμό με επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Το γλοιοβλάστωμα είναι μία από τις πιο επιθετικές μορφές εγκεφαλικού καρκίνου με προσδόκιμο χρόνο επιβίωσης μόλις 12-15 μήνες μετά την πρώτη διάγνωση και πολύ υψηλά ποσοστά υποτροπών παρά τη συνεχή πρόοδο των ακτινο-χημειοθεραπευτικών σχημάτων, κυρίως λόγω της ισχυρής του αντίστασης στην ακτινοθεραπεία. Το νευροβλάστωμα είναι ο συνηθέστερος εξωκρανιακός κακοήθης όγκος του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (ΣΝΣ), που εμφανίζεται κατά την βρεφική και παιδική ηλικία. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη μοριακή ετερογένεια και παρά την εφαρμογή των θεραπειών πολλοί ασθενείς θα εμφανίσουν υποτροπή της νόσου. Η μελέτη της έκφρασης του C5aR1 έδειξε ότι η ιοντίζουσα ακτινοβολία (5 Gy) προκαλεί αυξορύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα στα καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87MG. Επίσης ανοσοενζυμικές δοκιμασίες έδειξαν ότι η επίδραση ακτινοβολίας επάγει αύξηση της ενδογενώς παραγόμενης πρωτεΐνης C3 από τα καρκινικά κύτταρα U87MG, καθώς και των ενεργοποιημένων θραυσμάτων του, υποδεικνύοντας αυτόλογη ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα καρκινικά κύτταρα. Παράλληλα βρέθηκε ότι και τα κύτταρα του νευροβλαστώματος SK-N-SH εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1. Τέλος βρέθηκε ότι το C5a μειώνει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH και ταυτόχρονα αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS, ως αποτέλεσμα επαγωγής διάφορων οξειδωτικών αποκρίσεων. Το σύνολο των ευρημάτων αυτών υποδεικνύει το διττό ρόλο του συμπληρώματος στη παθοφυσιολογία του καρκίνου και ενισχύει την προσπάθεια ανάπτυξης στοχευμένων θεραπειών που θα καταστήσουν τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στα σημερινά θεραπευτικά σχήματα.

National and Kapodistrian University of Athens
Master of Science: «Applications of Biology in Medicine»

Thesis Title

«The role of inflammatory complement molecules in cancer»

STYLIANI TZELEFA AM: 41608

BIOLOGIST

Abstract

The complement system is a complex group of proteins, that exerts a variety of immunoregulatory functions, protecting the body from pathogens. However, many complement molecules (e.g C3, C5a, C5aR1) have been associated with tumorigenesis in various types of cancer. In the present study, the role of inflammatory complement molecules was investigated in combination with radiotherapy, in two malignant tumors of nervous origin, the glioblastoma and neuroblastoma. Glioblastoma is one of the most malignant forms of brain tumors and median survival rates range from 12-15 months, after the first diagnosis. Despite recent advances in the therapeutic intervention, this brain tumor remains notorious for its extremely high recurrence rates, mainly due to its inherent resistance to radiotherapy. Neuroblastoma is the most common malignant solid tumor in the peripheral nervous system in infants and young children, with a high degree of malignancy. NB is characterized by high molecular heterogeneity and despite the application of many therapies, lots of patients will experience relapse of the disease. In this study, we have demonstrated that radiotherapy induces upregulation in the expression of C5aR1 in glioblastoma cells U87MG. In addition radiotherapy induces an increase in endogenously produced C3 by U87MG and also of its activated fragments, suggesting autologous complement activation by tumor cells. At the same time, it was found that neuroblastoma cells SK-N-SH also express the C5aR1. Moreover, cell proliferation assays indicated that C5a reduces the survival of SK-N-SH. Finally indicated an increase in intracellular levels of ROS in SK-N-SH, as a result of oxidative responses in the presence of C5a. Overall, our findings support the dual role of complement in the pathophysiology of cancer and whereby enhances the effort of developing targeted treatments that could make cancer cells more sensitive in current therapeutic strategies.

Συντμήσεις

ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα

AdV: adenovirus, αδενοϊός

ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase, αναπλαστική κινάση λεμφώματος

APC: Antigen-presenting cell, αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο

BMPs: Bone Morphogenetic Proteins, μορφογενετικές πρωτεΐνες οστών

C1-INH: C1 inhibitor, αναστολέας της γλυκοπρωτεΐνης C1

CARs: Chimeric Antigen receptors, χιμαιρικοί υποδοχείς αντιγόνων

CDC: Complement-dependent cytotoxicity, κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα

CDCC: Complement-dependent cell-mediated cytotoxicity, κυτταρομεσολαβούμενη τοξικότητα υποβοηθούμενη από το συμπλήρωμα

CRs: Complement Receptors, υποδοχείς του συμπληρώματος

CRIg: Complement receptor of the immunoglobulin family, υποδοχέας του συμπληρώματος της οικογένειας ανοσοσφαιρινών

CT: Computed Tomography, αξονική τομογραφία

CTLs: Cytotoxic T lymphocytes, κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα

DAF: Complement decay-accelerating factor, παράγοντας επιτάχυνσης της διάσπασης του συμπληρώματος

DAMPs: Damage-associated molecular patterns, μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με βλάβη

DCs: Dendritic cells, δενδριτικά κύτταρα

ECM: Extracellular matrix, εξωκυττάρια μήτρα

EGFR: Epidermal growth factor receptor, υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition, επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή

FGF: Fibroblast growth factor, αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια

GBM: Glioblastoma Multiforme, πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating Factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων

GPCRs: G protein-coupled receptors, υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνη

GRKs: G-protein coupled receptor kinases, κινάσες των υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνη

Gy: κλίμακα Grey (μέτρηση της δόσης ακτινοβολίας)

HIF-1: Hypoxia Inducible Factor-1, μεταγραφικός παράγοντας υποξίας-1

HRF: Homologous restriction factor, ομόλογος περιοριστικός παράγοντας

HRP: Horse Radish Peroxidase, υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού

HSV1: Herpes simplex virus, ιός του απλού έρπητα

IGF-1: Insulin-like growth factor 1

IL: Interleukin, ιντερλευκίνη

INPC: International Neuroblastoma Pathology Classification, Διεθνές Σύστημα Ταξινόμησης

INRGSS: International Neuroblastoma Risk Group Staging System, Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης των Ομάδων Κινδύνου του Νευροβλαστώματος

IR: Irradiation, ακτινοβολία

LPS: Lipopolysaccharides, λιποπολυσακχαρίτης

mAbs: monoclonal Antibodies, μονοκλωνικά αντισώματα

MAC: Membrane Attack Complex, σύμπλεγμα μεμβρανικής επίθεσης

MAPK: Mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνο

MASP-1, MASP-2: Mannose-associated serine protease 1, 2, MBL-σχετιζόμενες πρωτεάσες σερίνης 1, 2

MBL: Mannose Binding Lectin, λεκτίνη που δεσμεύει μαννόζη

MCP: Membrane cofactor protein, μεμβρανικός πρωτεϊνικός συμπαράγοντας

MDSCs: Myeloid-derived suppressor cells, κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης

MGMT: (O (6)-Methylguanine-DNA methyltransferase), DNA μεθυλοτρανσφεράση

MHC: Major histocompatibility complex, μόρια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας

MMPs: Matrix metalloproteinases, μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας μήτρας

MRI: Magnetic Resonance Imaging, μαγνητική τομογραφία

MVP: Microvascular Proliferation, μικροαγγειακός πολλαπλασιασμός

NB: Neuroblastoma, νευροβλάστωμα

NCCs: Neural Crest Cells, κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας

NGF: Nerve growth factor, νευρικός αυξητικός παράγοντας

NO: Nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου

NPC: Neural Precursor Cells, νευρικά προγονικά κύτταρα

NT: Neurotrophines, νευροτροφίνες

OVs: Oncolytic viruses, ογκολυτικοί ιοί

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns, μοριακά πρότυπα παθογόνων

PDGF: Platelet-derived growth factor, αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια

PD-1: Programmed cell death protein-1, πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1

PD-L1: Programmed death-ligand 1, προσδέτης προγραμματισμένου θανάτου-1

PG: Prostaglandins, προσταγλανδίνες

pNTs: Peripheral neuroblastic tumors**,** περιφερικοί νευροβλαστικοί όγκοι

PRMs: Pattern Recognition Molecules, μόρια αναγνώρισης προτύπων

PSG: Primary Sympathetic Ganglia, πρωταρχικά συμπαθητικά γάγγλια

RCA: Regulators of complement activation, ρυθμιστικές πρωτεΐνες ενεργοποίησης του συμπληρώματος

RNS: Reactive Nitrogen Species, δραστικές μορφές αζώτου

ROS: Reactive Oxygen Species, δραστικές μορφές οξυγόνου

TAMs: Tumor associated macrophages, μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο

TGF-α: Transforming growth factor alpha, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-α

TGF-β: Transforming growth factor beta, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β

TMZ: Temozolamide, τεμοζολομίδη

TNF-a: Tumor necrosis factor-a, παράγοντας νέκρωσης όγκων-α

VEGF: Vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

VIP: Vasoactive Intestinal Peptide, αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο

WHO: World Human Organization, παγκόσμιος οργανισμός υγείας

Κεφάλαιο Α: Εισαγωγή

A.1 Γλοιοβλάστωμα (GBM: Glioblastoma Multiforme)

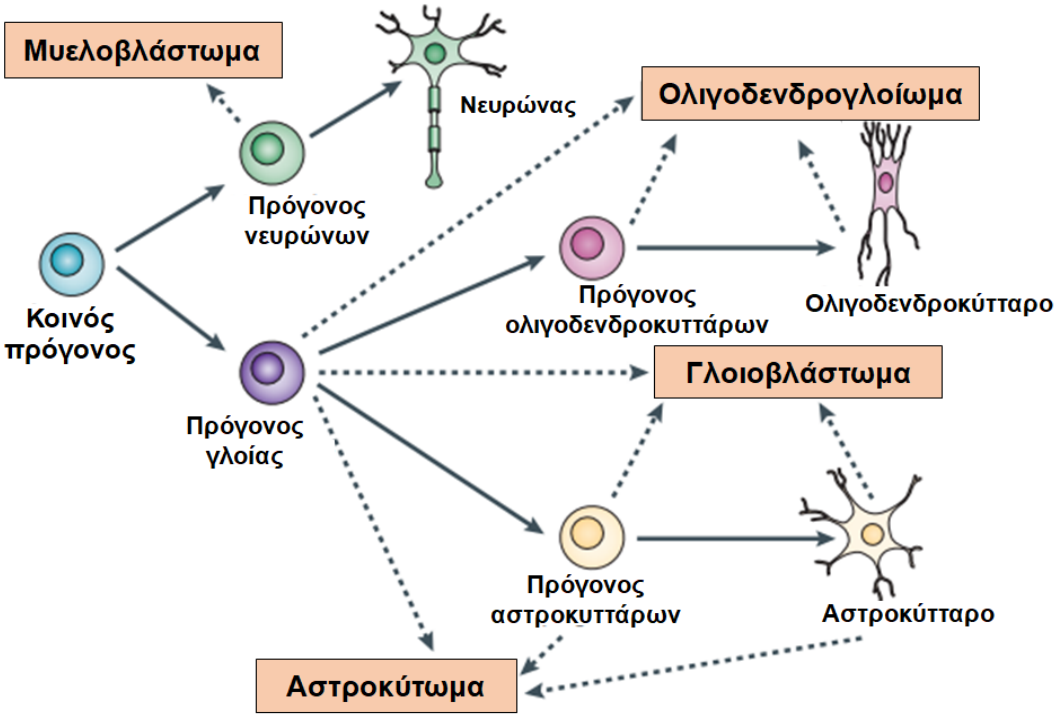
❖ A.1.1 Γλοιοβλάστωμα: Κακοήθης όγκος του εγκεφάλου

Το **γλοίωμα** είναι ο πιο κοινός κακοήθης πρωτογενής όγκος του εγκεφάλου. Μολονότι έχει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης (1 κρούσμα στα 10.000) σε σχέση με άλλους τύπους καρκίνου, η διάγνωση του γλοιώματος αποτελεί μια πολύ άσχημη είδηση για τους ασθενείς και τις οικογένειές τους. Τα κακοήθη γλοιώματα σε **μεγάλο ποσοστό παραμένουν ανίατα** παρά τη μεγάλη πρόοδο των χειρουργικών επεμβάσεων και των θεραπευτικών αγωγών (ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία). Αυτό συμβαίνει λόγω της αντοχής των γλοιωμάτων στις συμβατικές θεραπείες, καθώς και στη μεγάλη ικανότητα διείσδυσης αυτών των όγκων, καθιστώντας έτσι αδύνατη την πλήρη αφαίρεση του όγκου κατά τη χειρουργική επέμβαση. Η πιο επιθετική μορφή γλοιώματος, το **πολύμορφο γλοιοβλάστωμα** (GBM, βαθμός IV κατά WHO), έχει ένα μέσο ποσοστό επιβίωσης 12-15 μήνες μετά τη πρώτη διάγνωση. Ακόμη και τα γλοιώματα χαμηλότερου βαθμού (γλοιώματα βαθμού II και III κατά WHO), που εμφανίζονται λιγότερο επιθετικά κατά τη στιγμή της διάγνωσης τελικά προχωρούν στη κακοήθη φάση εντός του διαστήματος των 5-10 ετών. Εκτός από τον κίνδυνο θανάτου, η καταστροφική επίδραση τέτοιων όγκων στην εγκεφαλική λειτουργία συχνά οδηγεί σε γνωστικές και συναισθηματικές διαταραχές στους ασθενείς. Επομένως, απαιτούνται επειγόντως καινοτόμες διαγνωστικές και θεραπευτικές στρατηγικές για τη θεραπεία των γλοιωμάτων (Zong et al., 2012).

Τα κύτταρα προέλευσης των γλοιωμάτων, όπως αναφέρει και το όνομά τους, είναι τα νευρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου ή απλώς **γλοία**. Πρόκειται για κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, τα οποία παρέχουν μια μεγάλη ποικιλία λειτουργιών. Αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων του νευρικού συστήματος και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα **μακρογλοιακά** κύτταρα και τα **μικρογλοιακά** κύτταρα. Στα μακρογλοιακά περιλαμβάνονται **ολιγοδενδροκύτταρα**, **αστροκύτταρα**, **επενδυματικά κύτταρα**, **κύτταρα Schwann** και **δορυφορικά κύτταρα** (Εικόνα 1). Οι λειτουργίες των νευρογλοιακών κυττάρων είναι ποικίλες. Συνοπτικά, μερικοί ρόλοι των νευρογλοιακών κυττάρων είναι ότι περιβάλλουν τους νευρώνες, τους στηρίζουν μεταβολικά, συμβάλλουν στη μόνωσή τους, απομακρύνουν άχρηστες ουσίες από αυτούς, εξουδετερώνουν παθογόνα, συμμετέχουν στη συναπτογένεση και επιταχύνουν τη μεταφορά νευρικών ώσεων.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι υπάρχει μεγάλη δυσκολία στην ταυτοποίηση του κυττάρου προέλευσης των γλοιωμάτων, λόγω της πολύπλοκης κυτταρικής σύνθεσης αυτών των όγκων. Η ιστοπαθολογική ταξινόμηση των γλοιωμάτων βασίζεται στην μορφολογική ομοιότητα των καρκινικών κυττάρων με τους φυσιολογικούς κυτταρικούς τύπους του εγκεφάλου. Επομένως οι όγκοι με αστροκυτταρικά χαρακτηριστικά ταξινομούνται ως αστροκυτώματα, ενώ αυτοί με ολιγοδενδρογλοιακά χαρακτηριστικά ονομάζονται ολιγοδενδρογλοιώματα. Εντούτοις, τα

γλοιώματα είναι πιθανό να παρουσιάζουν **μικτά κυτταρικά χαρακτηριστικά**. Αυτοί οι όγκοι ταξινομούνται ως ολιγοαστροκυτώματα και **γλοιοβλαστώματα.** Δηλαδή το γλοιοβλάστωμα αναπτύσσεται από αστροκύτταρα ή άλλα κύτταρα γλοίας (π.χ. ολιγοδενδροκύτταρα) ή προγονικά τους κύτταρα (Εικόνα 1) (Zong et al., 2012).



Εικόνα 1: Το δέντρο της νευρογλοιακής διαφοροποίησης. Πιστεύεται ότι οι κοινοί πρόγονοι με δυνατότητα αυτοανανέωσης παράγουν νευρωνικούς και γλοιακούς προγόνους, που διαφοροποιούνται σε ώριμους νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. Ωστόσο τα κύτταρα προέλευσης των διαφορετικών μορφών γλοιώματος και μυελοβλαστώματος είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστα και για αυτό τα πιθανά κύτταρα προέλευσης απεικονίζονται με διακεκομμένες γραμμές (Huse and Holland, 2010).

❖ Α.1.2 Επιδημιολογία-Ιστολογικά χαρακτηριστικά-Ταξινόμηση του GBM

Παρόλο που το γλοιοβλάστωμα είναι σπάνιος όγκος με παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης κάτω των 10 κρουσμάτων ανά 100.000 άτομα, η κακή του πρόγνωση με ποσοστό επιβίωσης από 12 έως 15 μήνες μετά τη διάγνωση, το καθιστά ένα κρίσιμο ζήτημα δημόσιας υγείας (Thakkar et al., 2014). Αποτελεί το 50% όλων των γλοιωμάτων σε όλες τις ηλικιακές ομάδες (Rock et al., 2012). Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά συνήθως εμφανίζεται μεταξύ 55 και 60 ετών. Επίσης η συχνότητα εμφάνισης γλοιοβλαστώματος είναι υψηλότερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες (Ohgaki and Kleihues, 2005).

Ιστολογικά Χαρακτηριστικά:

Η συχνότερη θέση εμφάνισης του GBM με ποσοστό 95%, είναι τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, ενώ ένα μικρό ποσοστό όγκων εμφανίζεται στην παρεγκεφαλίδα, το στέλεχος και το νωτιαίο μυελό (Nakada et al., 2011).

Το καθοριστικό βιολογικό χαρακτηριστικό όλων των διάχυτων γλοιωμάτων είναι η ικανότητα διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να μεταναστεύουν σε μεγάλες αποστάσεις από τον τόπο προέλευσης τους. Μπορούν να μεταναστεύουν στο αντίθετο ημισφαίριο και να προκαλούν πρόσθετες εστίες όγκων (δηλ. πολυεστιακό γλοιοβλάστωμα). Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο δεν μπορεί ποτέ να επιτευχθεί πλήρης χειρουργική εκτομή των νεοπλασματικών κυττάρων με αποτέλεσμα τη συχνή υποτροπή της νόσου. Σε σύγκριση με άλλα διάχυτα γλοιώματα, το γλοιοβλάστωμα παρουσιάζει εξαιρετικά γρήγορη διεισδυτική ανάπτυξη (Louis et al., 2007). Ιστολογικά, το GBM μοιάζει με ένα αναπλαστικό (κακόηθες) αστροκύτωμα. Συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται από έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων (εξού και το όνομα **πολύμορφο γλοιοβλάστωμα**), ο οποίος κυμαίνεται από μικρά, χαμηλής διαφοροποίησης κύτταρα έως μεγάλα πολυπύρηνα κύτταρα (Hanif et al., 2017). Άλλα ιστολογικά χαρακτηριστικά του GBM είναι η έντονη μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων, οι εστίες νέκρωσης (Onishi et al., 2011) και ο μικροαγγειακός πολλαπλασιασμός (microvascular proliferation: MVP). Τα τελευταία δύο χαρακτηριστικά είναι σημαντικά για την ιστοπαθολογική διάγνωση του GBM (Nakada et al., 2011).

Ταξινόμηση:

Το ισχύον διεθνές πρότυπο για την ονοματολογία, την περιγραφή και τη διάγνωση των γλοιωμάτων είναι η ταξινόμηση βάση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), ο οποίος κατατάσσει τα γλοιώματα από βαθμό I έως IV, βάση του επιπέδου κακοήθειας, το οποίο καθορίζεται από ιστοπαθολογικά κριτήρια (έλλειψη διαφοροποίησης, μιτώσεις, νέκρωση κ.α.). Τα γλοιώματα βαθμού I σχετίζονται με βλάβες που έχουν χαμηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό και μπορούν να θεραπευτούν με χειρουργική επέμβαση, ενώ τα γλοιώματα βαθμού II έως IV είναι εξαιρετικά κακοήθη και διεισδυτικά. Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα είναι ο πιο επιθετικός, διεισδυτικός και αδιαφοροποίητος τύπος γλοιώματος και έχει χαρακτηριστεί βάση του WHO ως βαθμού IV (Hanif et al., 2017).

❖ Α.1.3 Γενετική και Μοριακή παθογένεση του GBM

Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί πολυάριθμες γενετικές και μοριακές ανωμαλίες των κυττάρων που σχετίζονται με την παθογένεση του γλοιοβλαστώματος. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες κινδύνου (π.χ. κληρονομούμενες γονιδιακές μεταλλάξεις, έκθεση σε καρκινογόνα κ.λπ.), που πιθανά σχετίζονται με τη δημιουργία γενετικών ανωμαλιών, χωρίς όμως να έχουν εξακριβωθεί τελείως. Μέχρι σήμερα, ο μόνος επιβεβαιωμένος παράγοντας κινδύνου του γλοιοβλαστώματος είναι η **έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία** υψηλής δόσης (Ohgaki, 2009). Ειδικότερα, έχει εκτιμηθεί ότι ο συνολικός κίνδυνος ανάπτυξης GBM ύστερα από ακτινοθεραπεία είναι περίπου 2,5% (Salvati et al., 2003). Ταυτόχρονα και η χαμηλή δόση ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται

θεραπευτικά για κάποιες ασθένειες της παιδικής ηλικίας (κεφαλαλγία, αιμαγγείωμα του δέρματος), έχει συσχετιστεί με κίνδυνο εμφάνισης γλοιοβλαστωμάτων (Wrensch et al., 2002). Ωστόσο δεν έχουν βρεθεί στοιχεία μεταξύ του κινδύνου ανάπτυξης γλοιοβλαστώματος και της διαγνωστικής ακτινοβολίας τόσο σε παιδιά, όσο και ενήλικες (Prasad and Haas-Kogan, 2009). Επίσης υπάρχουν περιπτώσεις εμφάνισης GBM σε οικογένειες, χωρίς όμως να έχει βρεθεί το γονίδιο που ευθύνεται για την κληρονομικότητα της νόσου (Fisher et al., 2007).

Στη συνέχεια αναφέρονται συνοπτικά οι σημαντικότεροι παθογενετικοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την παρουσία GBM (Εικόνα 2), οι οποίοι όμως συνδυαστικά και όχι μεμονωμένα προάγουν την εξάπλωση του γλοιοβλαστώματος (Nakada et al., 2011).

Αρχικά ένα σημαντικό γεγονός στην ανάπτυξη GBM είναι η **απώλεια ελέγχου** και **ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου**. Στα φυσιολογικά κύτταρα ο κυτταρικός κύκλος υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο. Τα νεοπλασματικά κύτταρα του γλοιοβλαστώματος έχουν αναπτύξει μηχανισμούς μέσω των οποίων έχουν τη δυνατότητα να παρακάμπτουν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, το οποίο τους παρέχει αναπτυξιακό όφελος. Το σημαντικότερο σημείο ελέγχου το οποίο απορρυθμίζεται, είναι το σημείο ελέγχου για μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη G1 φάση στην S (G1→S checkpoint). Το κυριότερο μονοπάτι σε αυτό το σημείο ελέγχου είναι το P16 INK4a, στο οποίο περιλαμβάνονται τα μόρια p16, CDK-4, D1 κυκλίνη και RB1 (Serrano et al., 1993). Ειδικότερα το σύμπλεγμα CDK/D1 κυκλίνης φωσφορυλιώνει το RB1, προκαλώντας έτσι απελευθέρωση του παράγοντα μεταγραφής E2F, ο οποίος επιτρέπει την έκφραση γονίδιων που συμμετέχουν στο διπλασιασμό του DNA κατά την S φάση (Sherr and Roberts, 1999).

Παράλληλα ένας άλλος παθογενετικός μηχανισμός του GBM είναι η υπερέκφραση διάφορων **αυξητικών παραγόντων** και των **υποδοχέων** τους. Μερικά λοιπόν από τα μόρια που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα του GBM είναι ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR, ο αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια (PDGF: Platelet-derived growth factor), ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF: Fibroblast growth factor), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-α (TGF-α: Transforming growth factor alpha) και ο IGF-1 (insulin-like growth factor 1). Γενικά, τα κύτταρα του γλοιώματος υπερεκφράζουν διάφορους αυξητικούς παράγοντες (προσδέτες) και τους υποδοχείς αυτών των παραγόντων, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας αυτοκρινής βρόχος προώθησης της ανάπτυξής τους (Nakada et al., 2011).

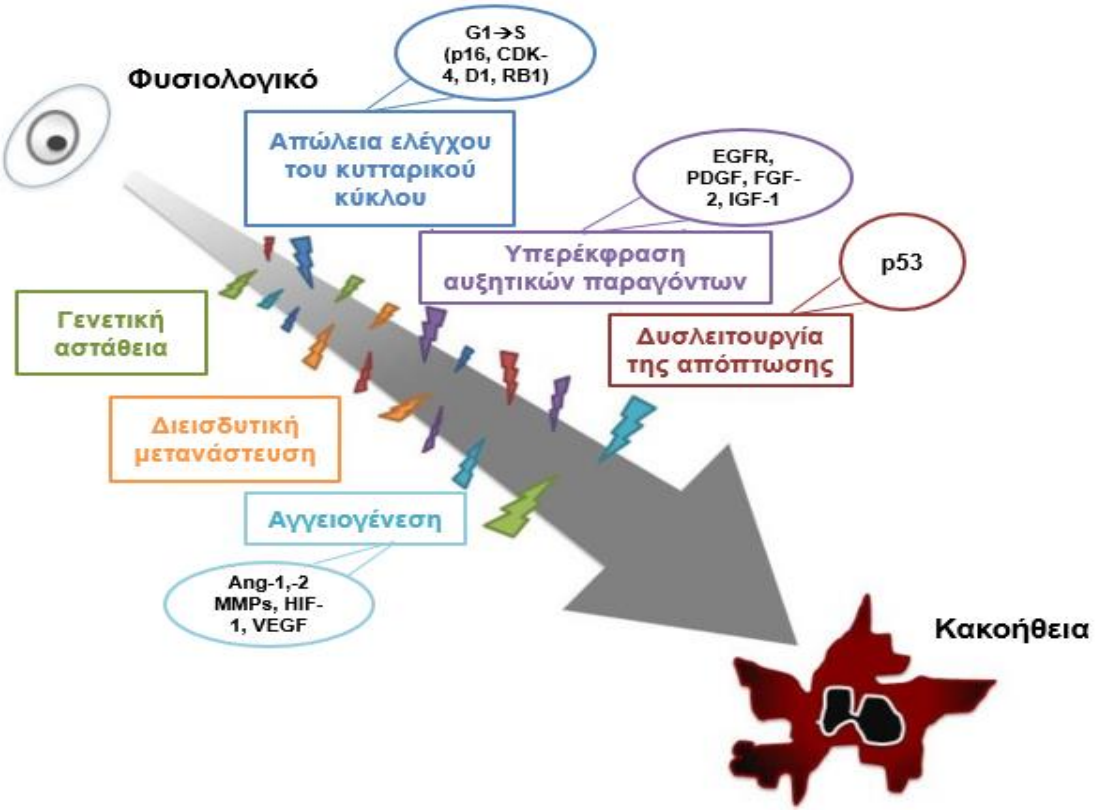
Ένα άλλο σημαντικό γνώρισμα για την εξέλιξη του GBM είναι η **αγγειογένεση**, ο σχηματισμός δηλαδή νέων αγγείων (Onishi et al., 2011), τα οποία είναι απαραίτητα για την τροφοδοσία του όγκου με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο σε **συνθήκες υποξίας** καθώς και τη διευκόλυνση της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων. Η αγγειογένεση λοιπόν περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (1) διάσπαση του αιμοφόρου αγγείου, (2) αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης του αγγείου και της περιβάλλουσας εξωκυττάριας μήτρας (ECM: Extracellular matrix), (3) μετανάστευση των

ενδοθηλιακών κυττάρων και σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων. Αρχικά στο πρώτο στάδιο (1) εμπλέκονται οι αγγειοποιητίνες Ang-1 και Ang-2 των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πρόκειται για σημαντικούς ενδοθηλιακούς αυξητικούς παράγοντες, που επάγουν τη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα Tie2. Στο δεύτερο στάδιο (2) τα συστατικά της ECM αποικοδομούνται κυρίως από μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), εκκρινόμενες από τα καρκινικά κύτταρα, όπως για παράδειγμα τις MMP-2 και MMP-9. Ταυτόχρονα, η αγγειογένεση στα αναπτυσσόμενα γλοιοβλαστώματα πιθανά επάγεται όταν τα προ-αγγειογόνα ερεθίσματα υπερτερούν έναντι των αντι-αγγειογόνων ερεθισμάτων. Ο ισχυρότερος ενεργοποιητής των αγγειογόνων μηχανισμών στους όγκους του εγκεφάλου είναι **η υποξία** των ιστών. Μάλιστα μια καλά μελετημένη οδός σε υποξικές συνθήκες είναι η οδός HIF-1/VEGF, η οποία οδηγεί σε πολλαπλασιασμό και μετανάστευση. Ειδικότερα σε περιβάλλον υποξίας αυξάνεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) και κατά συνέπεια υπερεκφράζεται ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF: Vascular endothelial growth factor), ο οποίος εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα καθώς και από άλλα κύτταρα (στρωματικά, φλεγμονώδη) (Onishi et al., 2011). Κατά την πρόσδεση του VEGF στον υποδοχέα του VEGFR που εκφράζεται από ενδοθηλιακά κύτταρα γειτονικά στον όγκο, ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/MAPK και κατά συνέπεια επάγεται η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευσή τους οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό νέου αγγείου (Nakada et al., 2011).

Επιπρόσθετα ένα ακόμη βασικό χαρακτηριστικό των κυττάρων του GBM, είναι η **διάχυτη διείσδυσή** τους στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, χωρίς όμως να μεταναστεύουν σε άλλα όργανα. Ειδικότερα η διείσδυση των κυττάρων του όγκου περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (1) αποκόλληση κυττάρων από τη μάζα του πρωτογενή όγκου, (2) προσκόλληση στην ECM, (3) αποικοδόμηση της ECM, (4) κυτταρική κινητικότητα και συσταλτικότητα. Σε αυτά τα στάδια συμβάλλουν διάφορα μοριακά μονοπάτια που λόγω της αποδιαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων έχει απορρυθμιστεί η λειτουργία τους. Συγκεκριμένα η αποκόλληση των κυττάρων από την κύρια μάζα του όγκου οφείλεται στη μειωμένη λειτουργία των καδερινών (διαμεμβρανικές πρωτεΐνες υπεύθυνες για την προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους), εξαιτίας της αποδιαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων, στη μειωμένη έκφραση της κοννεξίνης 43 (πρωτεΐνη χασμοσυνδέσμων) και στη διάσπαση του CD44, υπεύθυνο για την αγκυροβόληση του όγκου στην ECM. Ταυτόχρονα στην προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στην ECM εμπλέκονται κυρίως οι ιντεγκρίνες, των οποίων η έκφραση (αυξημένη ή μειωμένη) στα νεοπλασματικά κύτταρα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Παράλληλα η αποικοδόμηση της ECM είναι απαραίτητη για τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων και πραγματοποιείται από μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας μήτρας (MMP: Matrix metalloproteinases), κυρίως τις MMP-2 και MMP-3. Τέλος η κυτταρική κινητικότητα των καρκινικών κύτταρων του GBM επιτυγχάνεται διότι εκφράζουν τις A και B ισομορφές μυοσίνης II (Onishi et al., 2011).

Παράλληλα αξιοσημείωτο γεγονός στην παθογένεση του γλοιοβλαστώματος είναι η δυσλειτουργία της διαδικασίας της **απόπτωσης**. Η κυριότερη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην απόπτωση είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *TP53*, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17. Η p53 ενεργοποιείται παρουσία βλαβών DNA (ATM/ChK2/p53 μονοπάτι, p14ARF/MDM2/p53 μονοπάτι) και επάγει δύο διαφορετικά γεγονότα: τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου προκειμένου να επιδιορθωθεί η βλάβη ή την κυτταρική απόπτωση στην περίπτωση που δεν επιδιορθωθεί η βλάβη. Μεταλλάξεις λοιπόν στο γονίδιο *TP53* και απώλεια της λειτουργίας της p53 αναστέλλουν το μηχανισμό απόπτωσης και οδηγούν σε συσσώρευση μεταλλάξεων στα κύτταρα και τελικά στην καρκινογένεση. Μεταλλάξεις στη p53 ανιχνεύονται πολύ συχνά στα χαμηλού και υψηλού βαθμού διάχυτα αστροκυτώματα και στα δευτερογενή GBM (Watanabe et al., 1997) ενώ μεταλλάξεις στη p53 εμφανίζονται σε σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα (περίπου 25%) στα πρωτογενή γλοιοβλαστώματα (Ohgaki and Kleihues, 2007).

Το τελευταίο σημαντικό ενδοκυττάριο γεγονός στην ανάπτυξη GBM είναι η **γενετική αστάθεια**. Ένα βασικό χαρακτηριστικό των χαμηλού βαθμού γλοιωμάτων είναι η σχεδόν καθολική εξέλιξή τους σε καρκίνους με υψηλότερου βαθμού αλλοιώσεις με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η κακοήθης εξέλιξη σχετίζεται με την εμφάνιση περισσότερων κακοήθων κλώνων. Η γονιδιωματική αστάθεια, οδηγεί σε περαιτέρω γενωμική βλάβη, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν οι πιο ανθεκτικοί κλώνοι (Leung et al., 2000).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των σημαντικότερων παθογενετικών μηχανισμών που συμβάλλουν στη δημιουργία γλοιοβλαστώματος. Η ανάπτυξη του GBM αποδίδεται στην συσσώρευση πολλών ενδοκυτταρικών συμβάντων (Nakada et al., 2011).

Τέλος στην εξέλιξη του γλοιοβλαστώματος παίζει σημαντικό ρόλο η ύπαρξη **καρκινικών βλαστικών κυττάρων (cancer stem cells).** Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την παρουσία ενός μικρού πληθυσμού καρκινικών βλαστικών κυττάρων στο γλοιοβλάστωμα, τα οποία πιθανά σχετίζονται με την κακή πρόγνωση (Pallini et al., 2008). Πιστεύεται λοιπόν ότι σε συνθήκες παθολογικού στρες (ακτινοβόληση, υποξία, έκφραση ογκογονιδίων) τα σημεία ελέγχου της αναπτυξιακής πορείας των κυττάρων απορρυθμίζονται, οδηγώντας στον επαναπρογραμματισμό και αποδιαφοροποίηση των κυττάρων προς απόκτηση ιδιοτήτων πολυδύναμων αρχέγονων κυττάρων (βλαστοκυττάρων), όπως είναι η δυνατότητα αυτοανανέωσης, η πολυδυναμία και η έκφραση επιφανειακών δεικτών βλαστοκυττάρων (π.χ. CD133, nestin, κλπ.) (Lathia et al., 2011). Έτσι λοιπόν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα προκύπτουν μετά την απόκτηση γενετικών αλλαγών, είτε από φυσιολογικά νευρικά βλαστοκύτταρα (Alcantara Llaguno et al., 2009) είτε από ώριμα, διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, νευρώνες), τα οποία αποκτούν έναν πιο αρχέγονο φαινότυπο (Ignatova et al., 2002). Δεδομένου ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι ανθεκτικά στις τρέχουσες θεραπευτικές μεθόδους (Alcantara Llaguno et al., 2009), είναι πιθανό αυτά τα κύτταρα να είναι τουλάχιστον μερικώς υπεύθυνα για την υποτροπή του όγκου (Chen et al., 2012).

❖ Α.1.4 Η κλινική εικόνα και η διάγνωση του GBM

Κλινική εικόνα:

Αρχικά κατά την εξέλιξη του γλοιοβλαστώματος ο ιστός του εγκεφάλου καταστρέφεται ως αποτέλεσμα της νέκρωσης και κατά συνέπεια εμφανίζονται συμπτώματα όπως το εστιακό νευρολογικό έλλειμμα και οι γνωστικές διαταραχές. Τα συμπτώματα που προκαλούνται από την κακοήθεια εξαρτώνται από τις περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται σε κάθε περίπτωση. Για παράδειγμα, σε ασθενείς με προβλήματα ακοής και οράσεως ο όγκος βρίσκεται στην περιοχή του κροταφικού λοβού, ενώ σε ασθενείς με διαταραχές προσωπικότητας, ή με γνωστικές διαταραχές, ο όγκος εντοπίζεται στον μετωπιαίο λοβό. Ταυτόχρονα ένα άλλο σύμπτωμα του αυξημένου μεγέθους του όγκου είναι η αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, με αποτέλεσμα την ύπαρξη πονοκεφάλων που αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα στο 30-50% των περιπτώσεων γλοιοβλαστώματος. Οι πονοκέφαλοι είναι συνήθως μονόπλευροι και με προοδευτική σοβαρότητα (Hanif et al., 2017).

Διάγνωση:

Η διάγνωση της νόσου πραγματοποιείται με απεικονιστικές μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν επεμβατικές διαδικασίες, όπως είναι η αγγειογραφία και μη επεμβατικές εξετάσεις, όπως η αξονική τομογραφία (CT: Computed Tomography) και η μαγνητική τομογραφία (MRI: Magnetic

Resonance Imaging), οι οποίες χρησιμοποιούνται πιο συστηματικά για απεικόνιση των όγκων (Nelson and Cha, 2003). Η αξονική τομογραφία συνίσταται σε περιπτώσεις που ένας ασθενής δεν μπορεί να υποβληθεί σε σάρωση με MRI (π.χ. ασθενείς με βηματοδότη). Στην μαγνητική τομογραφία τα ευρήματα είναι πιο ξεκάθαρα, καθώς τα γλοιοβλαστώματα εμφανίζονται φωτεινά σε σχέση με τον υγιή ιστό, επιτρέποντας έτσι καλύτερη απεικόνιση της πολυπλοκότητας και της ετερογένειας της αλλοίωσης του ιστού (Hanif et al., 2017). Ωστόσο για την επιβεβαίωση της διάγνωσης είναι απαραίτητη και η μικροσκοπική ιστολογική εξέταση, ώστε να πιστοποιηθούν τα ευρήματα της μαγνητικής τομογραφίας, να βρεθούν τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου και να προσδιοριστεί ο βαθμός κακοήθειας (βλ. υποκεφάλαιο Α.1.3).

❖ Α.1.5 Τρέχουσες θεραπευτικές στρατηγικές για GBM

Παρά τις πολλές διεθνείς προσπάθειες, η θεραπεία του γλοιοβλαστώματος εξακολουθεί να είναι ένα πολύ δύσκολο εγχείρημα στην κλινική ογκολογία (Mrugala, 2013). Οι κυριότερες δυσκολίες στη θεραπεία του GBM σχετίζονται με το σημείο εμφάνισης της νόσου, τη σύνθετη και ετερογενή βιολογία της (Kesari, 2011). Η πρόοδος στις χειρουργικές προσεγγίσεις, στην ακτινοθεραπεία, στην χημειοθεραπεία καθώς και στην ανοσοθεραπεία οδηγούν σε σημαντικές βελτιώσεις στην επιβίωση και στην ποιότητα ζωής των ασθενών, αλλά παρόλα αυτά η πρόγνωση εξακολουθεί να είναι κακή.

Χειρουργική επέμβαση:

Το πρώτο βήμα στη θεραπεία των γλοιοβλαστωμάτων είναι η χειρουργική επέμβαση. Η εκτεταμένη χειρουργική εκτομή, αν και αντιπροσωπεύει τον αποτελεσματικότερο τρόπο αύξησης της επιβίωσης των ασθενών με GBM, είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί λόγω της θέσης του όγκου, ειδικότερα όταν εντοπίζεται σε πολύ εξειδικευμένες περιοχές του εγκεφάλου (Paolillo et al., 2018). Επίσης τα νεοπλασματικά κύτταρα του γλοιοβλαστώματος έχουν υψηλή διεισδυτική ικανότητα και μεταναστεύουν σε μεγάλες αποστάσεις από τον τόπο προέλευσης τους, με αποτέλεσμα να προκαλούνται πρόσθετες εστίες όγκων και άρα **υποτροπή** της νόσου (Louis et al., 2007). Συνεπώς δε μπορεί να επιτευχθεί πλήρης χειρουργική αφαίρεση όλων των καρκινικών κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια βέβαια η βελτίωση των απεικονιστικών μεθόδων καθιστούν δυνατή μια πιο επιθετική χειρουργική προσέγγιση, με περιορισμένες παρενέργειες για τους ασθενείς (Paolillo et al., 2018). Επομένως η χειρουργική επέμβαση του γλοιοβλαστώματος είναι βοηθητική και ανάλογα τον υπότυπο του όγκου, βελτιώνει την κλινική εικόνα και την ποιότητα ζωής των ασθενών (Hanif et al., 2017). Μετά τη χειρουργική εκτομή του όγκου ακολουθεί συνήθως ακτινοθεραπεία που συνδυάζεται με χημειοθεραπεία.

Ακτινοθεραπεία:

Στους ενήλικους μετά από τη λήψη βιοψίας και τη χειρουργική επέμβαση συνήθως ακολουθεί ακτινοθεραπεία προκειμένου να θανατωθούν τα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα. Η ακτινοθεραπεία ξεκινάει συνήθως 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση, προκειμένου να θεραπευτεί το τραύμα της κρανιακής τομής. Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία συνδυάζεται με λήψη τεμοζολομίδης δια της στοματικής οδού, αυξάνεται το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών και για αυτό έχει επικρατήσει το συγκεκριμένο θεραπευτικό σχήμα στην κλινική πράξη (Davis, 2016). Υπάρχουν διάφοροι τύποι ακτινοβολίας που μπορεί να δοθούν χρησιμοποιώντας ποικίλα θεραπευτικά σχήματα και δόσεις. Ο βασικός τύπος συμβατικής ακτινοθεραπείας χρησιμοποιεί ακτινοβολία εξωτερικής δέσμης, όμοια με αυτή που χρησιμοποιείται στην ακτινογραφία με ακτίνες Χ, στοχευμένη στη θέση του όγκου και στην γύρω περιοχή. Η τυπική συνολική δόση ακτινοθεραπείας που δίνεται είναι 60 Gy σε κλάσματα των 1,8-2 Gy που χορηγούνται 5 μέρες/εβδομάδα για 6 συνεχόμενες εβδομάδες. Παράλληλα για να ενισχυθεί η δράση της συμβατικής ακτινοβόλησης και να περιοριστεί τοπικά η τοξικότητα στον φυσιολογικό ιστό του εγκεφάλου, έχουν αναπτυχθεί και άλλες τεχνικές ακτινοθεραπείας με θετικά αποτελέσματα κυρίως στις **υποτροπιάζουσες μορφές GBM** και όχι στις πρόσφατα διαγνωσμένες. Μερικές από αυτές είναι η βραχυθεραπεία ιωδίου (τοποθέτηση ραδιενεργών πηγών μέσα στον όγκο ή δίπλα του), η ραδιοανοσοθεραπεία, η στερεοτακτική ακτινοχειρουργική (SRS), η κλασματοποιημένη ραδιοχειρουργική θεραπεία (FSRS), η διαμορφούμενης έντασης ραδιοθεραπεία (IMRT) και πολλές άλλες τεχνικές (Barani and Larson, 2015). Ωστόσο, παρά τις πολλές τεχνολογίες ακτινοθεραπείας που έχουν αναπτυχθεί, εξακολουθούν να υπάρχουν περιοριστικοί παράγοντες, που σχετίζονται με κακή πρόγνωση για την πλειοψηφία των ασθενών. Σε αυτούς συγκαταλέγονται η **διεισδυτική φύση** του γλοιοβλαστώματος, η **νέκρωση των ιστών** και οι **νευρωνικές βλάβες**, που προκαλούνται από την ακτινοβολία, καθώς και η **ανθεκτικότητα** των όγκων στην ακτινοβολία (Hanif et al., 2017). Επομένως γίνεται κατανοητό ότι εκτός από την ακτινοθεραπεία είναι σημαντικό να αναπτυχθούν εναλλακτικές θεραπευτικές στρατηγικές, όπως η χημειοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία και άλλες.

Χημειοθεραπεία:

Προκειμένου να αυξηθεί η επιβίωση των ασθενών έχουν δοκιμαστεί πολλοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος. Ωστόσο μόνο η χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη εφαρμόζεται στην κλινική πράξη σε ασθενείς με GBM. Η χορήγηση της TMZ μέσω της στοματικής οδού σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία αποτελεί ένα τυποποιημένο πρωτόκολλο θεραπείας για τους ασθενείς με GBM (Hanif et al., 2017). Ο κύριος μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την κυτταροτοξικότητα της TMZ είναι η **μεθυλίωση** του DNA στη N_7 και O_6 θέση της γουανίνης, με αποτέλεσμα την αποτυχία λειτουργίας του συστήματος

επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (miss match repair system). Έτσι αναστέλλεται ο κυτταρικός κύκλος στο σημείο ελέγχου G2-M, παρεμποδίζοντας τελικά την αντιγραφή του DNA και επάγοντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Hanif et al., 2017). Ωστόσο οι μεθυλιωμένες βάσεις μπορούν να επιδιορθωθούν από ενζυμικά συστήματα επιδιόρθωσης του DNA, αναστρέφοντας τη μεθυλίωση της γουανίνης που επάγεται από την TMZ και αποτρέποντας έτσι την ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών. Ένα από αυτά τα ένζυμα είναι η DNA μεθυλοτρανσφεράση MGMT (O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase), που εμπλέκεται σε διεργασίες επιδιόρθωσης και αντισταθμίζει τη μεταλλαξιγένεση από τους αλκυλιωτικούς παράγοντες. Τα υψηλά επίπεδα ενεργότητας MGMT σε καρκινικά κύτταρα οδηγούν σε κυτταρικό φαινότυπο ανθεκτικό στη TMZ με αποτέλεσμα την αποτυχία της θεραπείας (Paolillo et al., 2018)

Ανοσοθεραπεία:

Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να αναπτύσσεται ραγδαία ένα νέο πεδίο έρευνας, η ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Πρόκειται για μια μέθοδο θεραπείας στην οποία ενισχύεται το ανοσοποιητικό σύστημα του ίδιου του ασθενούς, προκειμένου να καταπολεμηθεί η ανάπτυξη του όγκου. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω (υποκεφάλαιο Α.1.1), ο εγκέφαλος διαθέτει κύτταρα με ανοσολογικές ιδιότητες (αστροκύτταρα, μικρογλοιακά κύτταρα), τα οποία μεταναστεύουν σε θέσεις φλεγμονής στο ΚΝΣ, συμπεριφέρονται σαν φαγοκύτταρα ή αντιγοπαρουσιαστικά, εκκρίνουν κυτταροκίνες και χημειοκίνες (Sehgal and Berger, 2000). Αυτή η εικόνα είναι διαφορετική στους ασθενείς με GBM, διότι εμφανίζουν συνθήκες ανοσοκατασολής, καθώς το μικροπεριβάλλον του όγκου είναι πλούσιο σε ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τον όγκο, όπως ο TGF-β (Transforming growth factor beta) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF, που καταστέλλει την κυτταροτοξική δράση των Τ κυττάρων (Li et al., 2018). Έτσι λοιπόν σε αυτό το πλαίσιο εξετάζονται καινοτόμες προσεγγίσεις (Paolillo et al., 2018).

Αναλυτικότερα, έχουν αναπτυχθεί κάποια μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του υποδοχέα EGFR, όπως είναι τα cetuximab, panitumumab και nimotuzumab, τα οποία έχουν ελεγχθεί σε κλινικές δοκιμές με ποικίλα αποτελέσματα. Επίσης έχουν αναπτυχθεί mAbs έναντι του υποδοχέα ανβ3 ιντεγκρίνης, ο οποίος υπερεκφράζεται στα γλοιοβλαστώματα. Παράλληλα μια άλλη προσέγγιση ανοσοθεραπείας είναι η παρεμπόδιση σηματοδότησης ανοσοκατασταλτικών μορίων (PD-1, PDL-1) με χρήση mAbs, δηλαδή των μορίων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος που οδηγούν στη διακοπή της ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων και στη καταστολή του πολλαπλασιασμού τους, και άρα στο τερματισμό της ανοσολογικής απάντησης έναντι του όγκου (Paolillo et al., 2018). Επιπρόσθετα, άλλες νέες θεραπείες περιλαμβάνουν τη χρήση γενετικώς τροποποιημένων Τ κυττάρων, που εκφράζουν χιμαιρικούς υποδοχείς αντιγόνων (CARs). Αυτά τα κύτταρα τροποποιούνται ειδικά για να αναγνωρίζουν αντιγόνα του

γλοιοβλαστώματος, (IL13Rα2, HER2, EphA2, EGFRvIII) πετυχαίνοντας έτσι μια πιο αποτελεσματική θεραπεία (Sarah, 2017).

Τέλος έχουν αναπτυχθεί οι ογκολυτικοί ιοί, προκειμένου να αξιοποιηθούν οι ογκοειδικές μεταλλάξεις ή μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται μόνο σε όγκους και οι οποίοι επιλέγονται να εισέλθουν σε κύτταρα του όγκου που υπερεκφράζουν καρκινικά αντιγόνα. Τα μολυνθέντα κύτταρα του όγκου υφίστανται αποπτωτικές διεργασίες ή νέκρωση με αποτέλεσμα το θάνατο των καρκινικών κυττάρων (Parato et al., 2005). Αρκετοί OV βρίσκονται υπό διερεύνηση για θεραπεία υψηλού βαθμού γλοιωμάτων, μεταξύ αυτών, δύο τύποι τροποποιημένου ιού HSV1 (Herpes simplex virus) και αδενοϊού (AdV) βρίσκονται σε φάσεις κλινικών δοκιμών (Kaufmann and Chiocca, 2014).

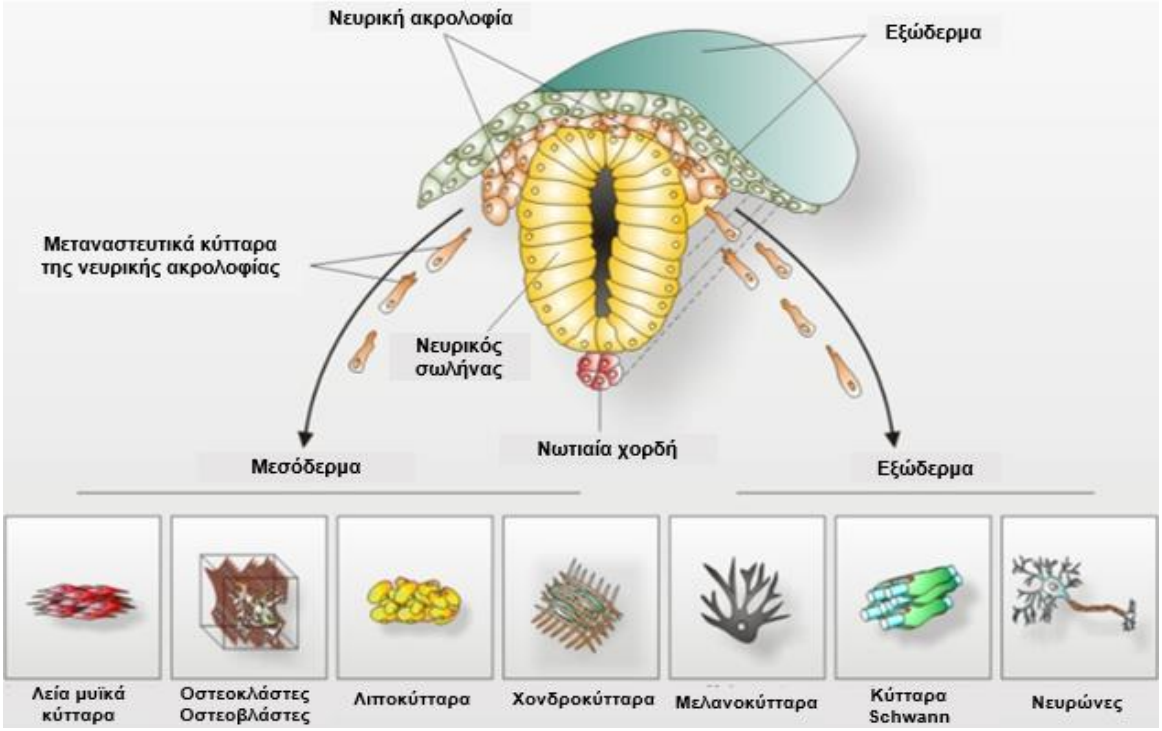
Συνοψίζοντας λοιπόν γίνεται κατανοητό ότι το γλοιοβλάστωμα είναι ένας επιθετικός κακοήθης όγκος του εγκεφάλου με κακή πρόγνωση για τους ασθενείς. Η πολύπλοκη μοριακή βιολογία του GBM αποτελεί μία κλινική πρόκληση, καθώς οι τρέχουσες θεραπευτικές στρατηγικές δεν ωφελούν όλους τους ασθενείς, με αποτέλεσμα την υποστροφή του όγκου και τελικά το θάνατο των ασθενών (Mrugala, 2013). Για αυτόν το λόγο είναι απαραίτητη η **πλήρης κατανόηση όλων των μοριακών μονοπατιών και ανωμαλιών** που οδηγούν στην εξέλιξη της νόσου, προκειμένου να βρεθούν νέοι θεραπευτικοί στόχοι.

Α.2 Νευροβλάστωμα

❖ Α.2.1 Νευροβλάστωμα: Κακοήθης όγκος του ΠΝΣ

Το **νευροβλάστωμα** είναι ο συνηθέστερος εξωκρανιακός κακοήθης όγκος του **συμπαθητικού νευρικού συστήματος (ΣΝΣ),** που εμφανίζεται κατά την βρεφική και παιδική ηλικία (Zhang et al., 2016). Ανήκει σε μια ομάδα όγκων γνωστή ως περιφερικοί νευροβλαστικοί όγκοι (pNTs: peripheral neuroblastic tumors), στην οποία συμπεριλαμβάνονται ακόμα το γαγγλιονευροβλάστωμα και το γαγγλιονεύρωμα (Colon and Chung, 2011). Πρόκειται για όγκους με κύτταρα προέλευσης τα αρχέγονα κύτταρα **της νευρικής ακρολοφίας** (**NCCs: neural crest cells**) (Papaioannou and McHugh, 2005). Αναλυτικότερα, τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, τα οποία είναι προγονικά κύτταρα του ΣΝΣ, είναι ένας πληθυσμός πολυδύναμων κυττάρων με ικανότητα αυτοανανέωσης, ο οποίος δημιουργείται κατά την εμβρυογένεση (στο τέλος της γαστριδίωσης) και εντοπίζεται στο όριο της νευρικής πλάκας και του μη νευρικού εξωδέρματος (Εικόνα 3). Κατά τη διαδικασία κλεισίματος του νευρικού σωλήνα, τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας χάνουν τις συνδέσεις τους με τα γειτονικά τους κύτταρα και από επιθηλιακά κύτταρα μετατρέπονται σταδιακά σε μεσεγχυματικά (EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition). Στη συνέχεια αφού αποκολληθούν από το νευροεπιθήλιο, τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας αρχίζουν να μεταναστεύουν, ακολουθώντας συγκεκριμένα μονοπάτια ανάλογα με

την αναπτυξιακή τους μοίρα, ώστε να δημιουργήσουν διάφορους πληθυσμούς μεσοδερμικών και εξωδερμικών κυττάρων όπως πληθυσμούς περιφερικών νευρώνων, χονδροκυττάρων, οστεοβλαστών, μελανοκυττάρων κλπ. (Εικόνα 3) (Huang and Saint-Jeannet, 2004).



Εικόνα 3: Τύποι ενήλικων κυττάρων προερχόμενοι από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Μετά την νευρογένεση αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν και διαφοροποιούνται σε τύπους κυττάρων όπως περιφερικά νεύρα, λιποκύτταρα, κύτταρα λείου μυός και κύτταρα Schwann. http://web.biologie.uni-bielefeld.de/cellbiology/index.php/research/neural-crest-derived-stem-cells

Οι μηχανισμοί που προκαλούν την παραμονή των **εμβρυϊκών κυττάρων** που αργότερα δημιουργούν τους περιφερικούς νευροβλαστικούς όγκους δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Πιστεύεται ότι μεταλλαγμένα εμβρυϊκά γονίδια που ελέγχουν την ανάπτυξη της νευρικής ακρολοφίας πιθανά να αποτελούν τη βάση για ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και ελαττώματα στη διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης (βλ. υποκεφάλαιο Α.2.3). Οι ιστοπαθολογικοί υπότυποι των pNTs (νευροβλάστωμα, γαγγλιονευροβλάστωμα και γαγγλιονεύρωμα) μπορεί να κυμαίνονται από όγκους με αδιαφοροποίητους νευροβλάστες μέχρι και όγκους με πλήρως διαφοροποιημένους νευρώνες (Park et al., 2010).

Το **νευροβλάστωμα** εμφανίζεται κατά την πρώιμη παιδική ηλικία, συνήθως σε παιδιά κάτω των 5 ετών. Ορισμένες φορές ο όγκος σχηματίζεται πριν τη γέννηση του παιδιού κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και η νόσος διαγιγνώσκεται αργότερα, όταν ο όγκος αρχίζει να αυξάνεται σε μέγεθος και να προκαλεί συμπτώματα. Η πρόγνωση σχετίζεται με την ηλικία, το στάδιο του όγκου, το βαθμό κυτταρικής διαφοροποίησης, τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου και τις γενετικές ανωμαλίες και για αυτό το λόγο τα αποτελέσματα της θεραπείας ποικίλλουν σε εντυπωσιακό βαθμό (Colon and Chung, 2011). Για παράδειγμα, η πλειοψηφία των παιδιών με

NB σταδίου 1 και 2 μπορεί να θεραπευτεί εξολοκλήρου μόνο με εγχείρηση. Επίσης βρέφη κάτω των 18 μηνών, ακόμα και με διάχυτο νευροβλάστωμα μπορεί να έχουν εξαιρετικά καλά αποτελέσματα ύστερα από θεραπεία που περιλαμβάνει εγχείρηση και χημειοθεραπεία. Ωστόσο η πλειοψηφία των παιδιών άνω των 18 μηνών, με υψηλού σταδίου νευροβλάστωμα εμφανίζουν μεταστατική νόσο και πεθαίνουν παρά την εφαρμογή πολλαπλών θεραπειών (Weinstein et al., 2003). Οι βασικές θεραπείες της κλινικής πράξης για το NB είναι η χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και χειρουργική εκτομή. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι τα επιθετικά νευροβλαστώματα είναι ανθεκτικά στις παραπάνω θεραπείες. Για αυτόν το λόγο, η έρευνα επικεντρώνεται στη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη παθογένεση του NB ώστε να αναπτυχθούν νέες θεραπείες (Colon and Chung, 2011).

❖ Α.2.2 Επιδημιολογία-Ιστολογικά χαρακτηριστικά-Ταξινόμηση του NB

Το νευροβλάστωμα είναι ο συνηθέστερος εξωκρανιακός στερεός όγκος σε βρέφη και παιδιά, αντιπροσωπεύοντας το 8%-10% όλων των όγκων της παιδικής ηλικίας. Είναι ένας επιθετικός καρκίνος, ο οποίος ευθύνεται για το 15% περίπου όλων των θανάτων από καρκίνο στον παιδικό πληθυσμό. Η συχνότητα του νευροβλαστώματος είναι 10,2 κρούσματα ανά ένα εκατομμύριο παιδιά κάτω των 15 ετών. Η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου είναι στην ηλικία των 22 μηνών. Σπάνια η νόσος εμφανίζεται στην εφηβική ηλικία και κατά την ενηλικίωση, όμως σε αυτή την ηλικιακή ομάδα η πρόγνωση είναι πολύ κακή. Η συχνότητα εμφάνισης του NB είναι λίγο υψηλότερη στους άνδρες (Park et al., 2010).

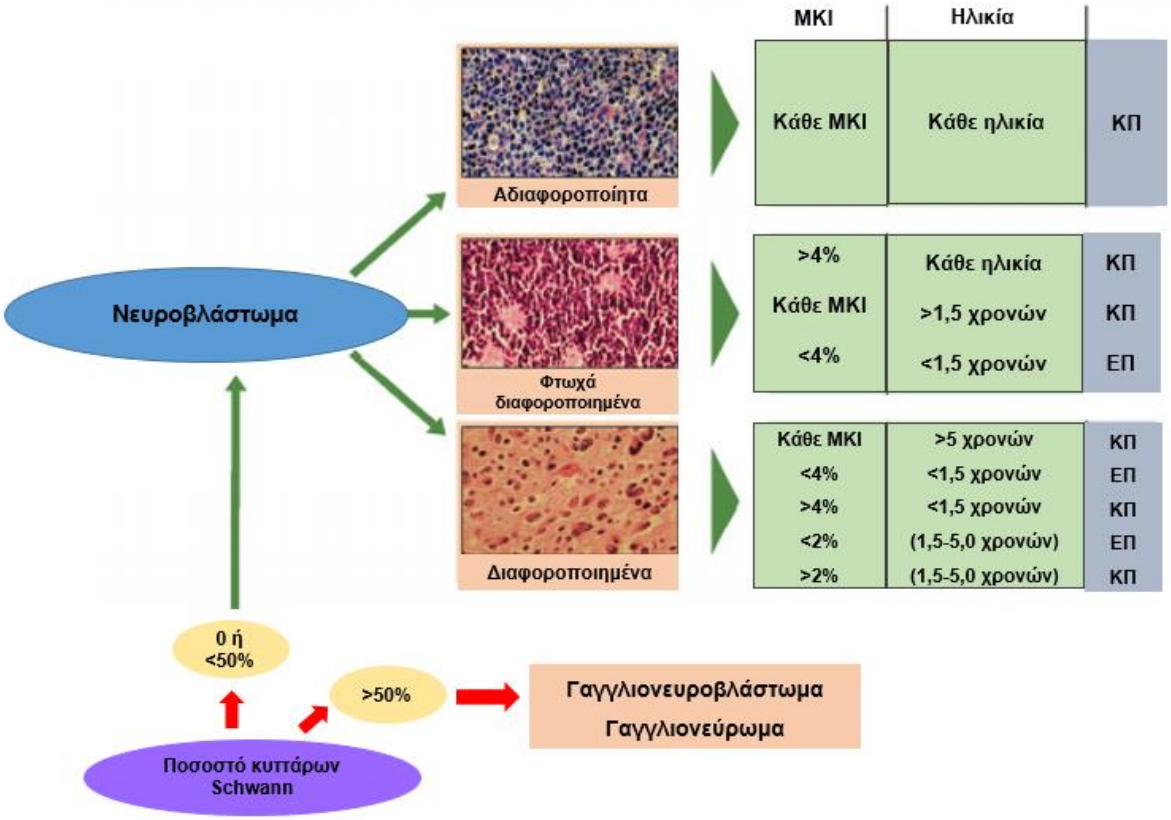
<u>Ιστολογικά Χαρακτηριστικά</u>

Οι συχνότερες πρωτογενείς θέσεις εμφάνισης του νευροβλαστώματος είναι η κοιλιά (65%), ο μυελός των επινεφριδίων (35%), τα εξω-επινεφριδιακά παρασπονδυλικά γάγγλια (30-35%) και το μεσοθωράκιο (20%). Λιγότερο συνηθισμένα σημεία εμφάνισης του νευροβλαστώματος είναι η λεκάνη και ο λαιμός. Ωστόσο έχουν αναφερθεί και ασυνήθιστα σημεία, όπως είναι ο θύμος αδένας, ο πνεύμονας, οι νεφροί και ο πρόσθιος μεσοθώρακας. Επίσης σπάνια ανιχνεύεται μεταστατική νόσος χωρίς να έχει βρεθεί ο πρωτογενής όγκος (Lonergan et al., 2002).

Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του NB είναι η κυριαρχία νευροβλαστών και η περιορισμένη παραγωγή κυττάρων Schwann (<50%) (Εικόνα 4). Οι νευροβλάστες είναι ανώριμα, αδιαφοροποίητα, μικρά, στρογγυλά κύτταρα, με μικρό κυτταρόπλασμα, σκούρους πυρήνες και μικρά ακαθόριστα πυρηνοειδή. Μερικές φορές σχηματίζουν κυτταρικές συστάδες (Horner–Wright rosettes) που είναι χαρακτηριστικές του συγκεκριμένου όγκου. Όπως αναλύεται και παρακάτω, τα ιστολογικά ευρήματα είναι απαραίτητα προκειμένου να γίνει η διάγνωση της νόσου, η εύρεση του σταδίου και της πρόγνωσης (Lonergan et al., 2002).

Ταξινόμηση και Σταδιοποίηση:

Για τη ταξινόμηση του NB χρησιμοποιείται το διεθνές σύστημα ταξινόμησης INPC (International Neuroblastoma Pathology Classification), το οποίο βασίστηκε στο σύστημα ταξινόμησης Shimada. Για την εύρεση της πρόγνωσης το INPC βασίζεται στην ιστοπαθολογία του όγκου και την ηλικία του ασθενούς. Αναλυτικότερα, το συγκεκριμένο σύστημα διαχωρίζει τις ομάδες ασθενών με ευνοϊκή πρόγνωση από τις ομάδες ασθενών με κακή πρόγνωση λαμβάνοντας υπόψιν το **βαθμό διαφοροποίησης** των κυττάρων, το **δείκτη MKI** (MKI: mitosis-karyorrhexis index), την **ηλικία** των ασθενών και την **παρουσία κυττάρων Schwann** (Εικόνα 4) (Janoueix-Lerosey et al., 2010).



Εικόνα 4: Ταξινόμηση του Νευροβλαστώματος βάση του INPC (The International Neuroblastoma Pathology Classification), *ΚΠ: κακή πρόγνωση, *ΕΠ: ευνοϊκή πρόγνωση (Park et al., 2010).

Παράλληλα, η σταδιοποίηση του NB υπαγορεύεται από το Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης του Νευροβλαστώματος (INSS: International Neuroblastoma Staging System), το οποίο σταδιοποιεί το νευροβλάστωμα σε 6 στάδια (1, 2A, 2B, 3, 4, 4S) ανάλογα με την ανατομική θέση στην οποία εμφανίζεται ο όγκος. Επειδή το σύστημα INSS βασίζεται στην αφαίρεση του όγκου, δημιουργήθηκε ένα νέο σύστημα, το Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης των Ομάδων Κινδύνου του Νευροβλαστώματος (INRGSS: International Neuroblastoma Risk Group Staging System), που αποσκοπεί στον καλύτερο δυνατό χαρακτηρισμό του κινδύνου του ασθενή, πριν την εφαρμογή θεραπευτικής αγωγής. Βασίζεται σε κλινικά κριτήρια και καθορισμένους παράγοντες κινδύνου από απεικονιστικές μεθόδους. Αυτό το σύστημα σταδιοποιεί το νευροβλάστωμα σε L1

(εντοπισμένη ασθένεια που δεν περιλαμβάνει ζωτικές δομές και περιορίζεται σε ένα σημείο του σώματος), L2 (εντοπισμένη ασθένεια με παράγοντες κινδύνου καθορισμένους από την εικόνα), M (απομακρυσμένη μεταστατική ασθένεια), και MS (μεταστατική ασθένεια που περιορίζεται στο δέρμα, το ήπαρ και/ή το μυελό των οστών σε παιδιά ηλικίας <18 μηνών). Με βάση λοιπόν αυτό το σύστημα, οι ασθενείς μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες **πολύ χαμηλού, χαμηλού**, **ενδιάμεσου** και **υψηλού κινδύνου** και ανάλογα την ομάδα κινδύνου να επιλέγεται η θεραπεία που θα λάβει ο κάθε ασθενής (Colon and Chung, 2011).

❖ Α.2.3 Γενετική και Μοριακή παθογένεση του NB

Οι αιτίες εμφάνισης του νευροβλαστώματος δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Η πλειοψηφία των μορφών νευροβλαστώματος είναι σποραδικές, ενώ οι κληρονομούμενες μορφές αποτελούν το 1-2% των κρουσμάτων. Ορισμένες κληρονομούμενες μορφές νευροβλαστώματος έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις γονιδίων. Μερικά από αυτά είναι το γονίδιο της αναπλαστικής κινάσης λεμφώματος ALK (anaplastic lymphoma kinase) (Mosse et al., 2008) καθώς και τα γονίδια P*HOX2B* και *KIF1B*.

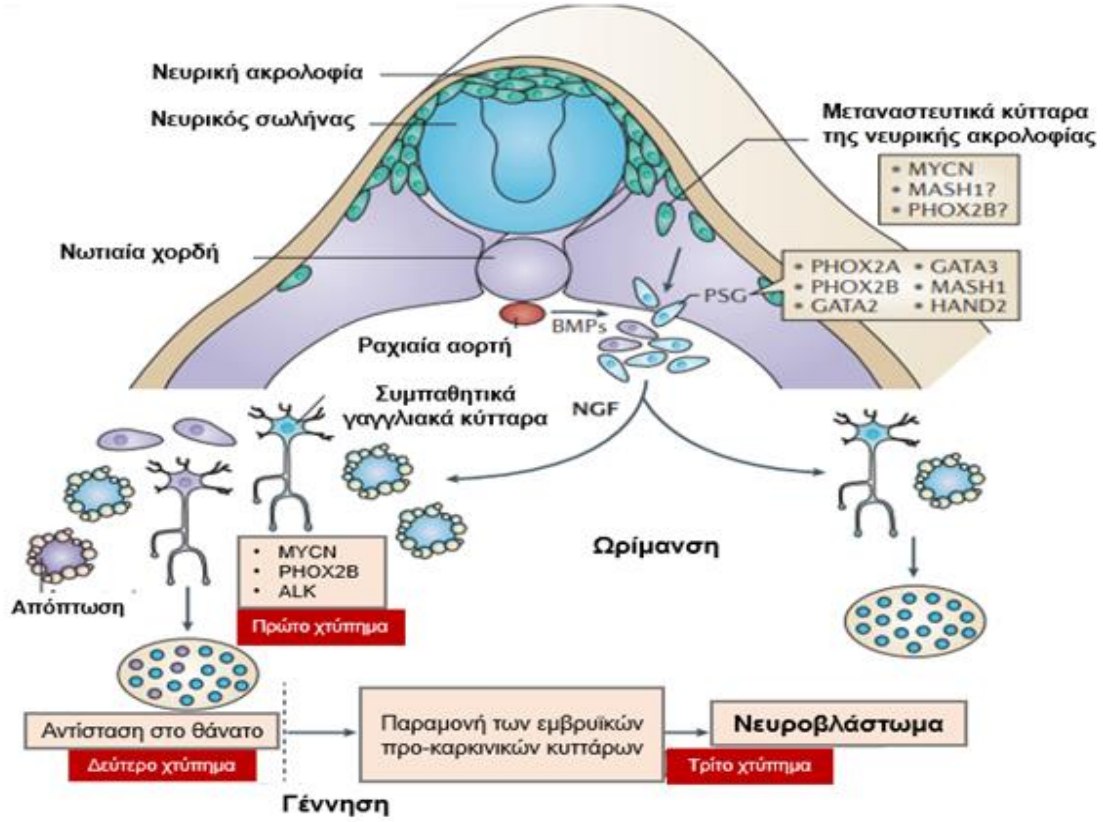
Τα αίτια εμφάνισης των σποραδικών μορφών νευροβλαστώματος δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Είναι γνωστό ότι εμφάνιση νευροβλαστώματος οφείλεται σε διαταραγμένη διαφοροποίηση και ωρίμανση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (NCCs: neural crest cells) που μεταναστεύουν από τον νευρικό σωλήνα κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης. Ωστόσο δεν έχει βρεθεί μία μοναδική γενετική μετάλλαξη, που να χαρακτηρίζει συστηματικά όλες τις μορφές NB. Έτσι αυτή η εκτεταμένη **μοριακή ετερογένεια** υποστηρίζει την ιδέα ότι το νευροβλάστωμα αντιπροσωπεύει ένα φάσμα ασθενειών. Κλινικά αυτή η ετερογένεια αποτελεί μια πρόκληση, καθώς οι όγκοι που είναι φαινοτυπικά και μορφολογικά πολύ παρόμοιοι μπορεί να οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα κατά την εφαρμογή των θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Συνεπώς, εκτεταμένες προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στον χαρακτηρισμό των ογκογόνων οδών που δραστηριοποιούνται στις πιο επιθετικές και θανατηφόρες μορφές NB (Louis and Shohet, 2015), μερικές από τις οποίες θα αναφερθούν συνοπτικά παρακάτω.

Αναλυτικότερα, μία αρκετά συχνή γενετική ανωμαλία που εντοπίζεται στο νευροβλάστωμα είναι η ενίσχυση του γονιδίου ***MYCN*** (περισσότερα από 10 αντίγραφα). Μάλιστα μελέτες σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικού επιβεβαιώνουν ότι η υπερέκφραση του *MYCN* αρκεί για να προκαλέσει καρκινογένεση (Hansford et al., 2004). Αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιεί και καταστέλλει πολλά μόρια στόχους, είτε μέσω δέσμευσης με το DNA, είτε μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Shohet et al., 2011). Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι το *MYCN* σχετίζεται με αντι-αποπτωτικές και πολλαπλασιαστικές λειτουργίες, καθώς και πρώιμη μεσεγχυματική μετατροπή (pro-EMT) (Huang and Weiss, 2013). Μάλιστα σε μοντέλα ποντικών

έχει βρεθεί ότι το MYCN αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση των γαγγλιακών κυττάρων κατά τη διαδικασία ωρίμανσής τους, που επάγεται παρουσία του νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF: Nerve growth factor) (Marshall et al., 2014) (Εικόνα 5). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης του ΣΝΣ, τα πρώιμα μεταναστευτικά NCCs χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου *MYCN* ώστε να ρυθμίζεται η μετανάστευσή τους. Φυσιολογικά λοιπόν, τα επίπεδα της πρωτεΐνης MYCN πρέπει να μειώνονται σταδιακά κατά τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των συμπαθητικών νευρώνων (Marshall et al., 2014). Επομένως δεν αποτελεί έκπληξη το να ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα MYCN σε ένα υποσύνολο χαμηλά διαφοροποιημένων επιθετικών νευροβλαστωμάτων (Fredlund et al., 2008). Κάποια από τα μόρια στόχους του μεταγραφικού παράγοντα MYCN είναι η p-53, *MDM2*, *ODC1*, mTOR (Bell et al., 2010) και αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους. Ωστόσο έχουν βρεθεί επιπρόσθετοι μηχανισμοί ογκογένεσης ανεξάρτητοι από την ενίσχυση του γονιδίου *MYCN* στους νευροβλάστες (Louis and Shohet, 2015).

Επιπρόσθετα, ένα άλλος μηχανισμός ογκογένεσης είναι οι γαμετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *PHOX2B* (Paired-like Homeobox 2B), οι οποίες ανιχνεύονται σε ένα υποσύνολο κληρονομούμενων μορφών νευροβλαστώματος και περίπου στο 4% των σποραδικών μορφών NB (Mosse et al., 2004). Ειδικότερα κατά την 5^{η} εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης επάγεται η έκφραση των γονίδιων *PHOX2B* και *PHOX2A*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την έκφραση των ενζύμων που βιοσυνθέτουν τις κατεχολαμίνες (αδρεναλίνη, ντοπαμίνη) καθώς και για τη διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας σε συμπαθητικούς νευρώνες. Μελέτες έχουν ανακαλύψει ότι μεταλλαγμένη πρωτεΐνη του *PHOX2B* προωθεί τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων της νευρικής σειράς διαφοροποίησης (Marshall et al., 2014).

Παράλληλα άλλοι ογκογόνοι παράγοντες που θεωρούνται υπεύθυνοι για τη δημιουργία νευροβλαστώματος είναι οι μεταλλάξεις στην ALK (anaplastic lymphoma kinase). Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ανιχνεύονται σχεδόν σε όλες τις κληρονομούμενες μορφές νευροβλαστώματος και σε κάποιες σποραδικές μορφές NB (6-10%). Επιπλέον πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει τις φυσιολογικές λειτουργίες της ALK με την ανάπτυξη συμπαθητικών νευρώνων, την επιβίωση των μεταναστευτικών NCCs, καθώς και με τη νευρογένεση σε μοντέλα Zebrafish. Το φυσιολογικό γονίδιο της ALK είναι σημαντικός ρυθμιστής των λειτουργιών των βλαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου και της εξαρτώμενης από STAT3 αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων. Ακόμα, πρόσφατα δεδομένα από μοντέλα ποντικού επιβεβαιώνουν ότι υπάρχει πιθανά μία συνεργασία μεταξύ ALK και MYCN με αποτέλεσμα την προώθηση της ογκογένεσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη κινάση αποτελεί ένα πιθανό θεραπευτικό στόχο και για αυτό έχει γίνει προσπάθεια να αναπτυχθούν ισχυροί αναστολείς της ALK, κάποιοι από τους οποίους βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές (Louis and Shohet, 2015).



Εικόνα 5: Απεικόνιση των πιθανών μηχανισμών που ευθύνονται για την παθογένεση του NB. Υπό την επίδραση του *MYCN* και των BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), οι προγονικοί νευροβλάστες μεταναστεύουν από τη νευρική ακρολοφία σε μία γειτονική περιοχή. Εκεί, τα κύτταρα ωριμάζουν σε πρωταρχικά συμπαθητικά γάγγλια (PSG), πριν ωριμάσουν σε νευρικά κύτταρα των συμπαθητικών γαγγλίων ή των κυττάρων του μυελού των επινεφριδίων. Μεταλλαγές σε *MYCN*, ALK, *PHOX2B* συνήθως είναι ένα «πρώτο χτύπημα» για ανάπτυξη NB. Η τοπική πρόσβαση στον NGF καθορίζει εάν ένα φυσιολογικό γαγγλιοκύτταρο (μπλε) θα ωριμάσει σε ένα τελικό κύτταρο γαγγλίων ή αν θα οδηγηθεί σε απόπτωση. Ένα «δεύτερο χτύπημα» είναι η αντίσταση των προ-καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση με αποτέλεσμα αυτά τα προ-καρκινικά κύτταρα που παραμένουν μετά τη γέννηση (τρίτο χτύπημα) πιθανά να οδηγούν στην εμφάνιση NB (Mrugala, 2013).

Επιπρόσθετα αξίζει να αναφερθεί ότι πολλά μη κωδικοποιητικά RNA (microRNA, lncRNAs, piRNAs) είναι σημαντικοί μεταγραφικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας. Σε επιθετικά νευροβλαστώματα έχουν βρεθεί απορυθμισμένα κάποια microRNA, τα οποία δρουν εμποδίζοντας τη λειτουργία της p53, προάγοντας τη μεσεγχυματική μετατροπή (EMT), τη μετάσταση και την ογκογένεση (Stallings, 2009). Μερικά από αυτά είναι τα LIN28, miR-9, miR-17-92a και η ομάδα miR-25-106b. Πολλές μελέτες σήμερα προσπαθούν να ανακαλύψουν όλα τα εμπλεκόμενα μη κωδικοποιητικά RNA στην παθογένεση του NB, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί και θεραπευτικοί στόχοι (Louis and Shohet, 2015).

Επίσης σε κάποιες μορφές NB έχουν ανιχνευτεί χρωμοσωμικές μεταλλαγές, όπως είναι για παράδειγμα η έλλειψη της χρωμοσωμικής περιοχής 1p36 και οι μετατοπίσεις της χρωμοσωμικής περιοχής 17q (Colon and Chung, 2011).

Ακόμα σε άλλες μελέτες παθογένεσης του νευροβλαστώματος έχει βρεθεί να εμπλέκονται σηματοδοτικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν τους Trk υποδοχείς νευροτροφινών (TrkA/NTRK1, TrkB/NTRK2, TrkC/NTRK3) και τους προσδέτες τους (NGF, BDNF, and NT-3) (Park et al., 2010). Οι υποδοχείς νευροτροφινών Trk παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία του ΚΝΣ και ΠΝΣ. Μελέτες υποστηρίζουν ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης TrkA συνδέονται με ευνοϊκά κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως η νεότερη ηλικία, το κατώτερο στάδιο και η απουσία ενίσχυσης MYCN και ότι αυτοί οι ασθενείς ανταποκρίνονται καλύτερα στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα. Αντίθετα, ο υποδοχέας TrkB και ο προσδέτης του BDNF έχουν υψηλή έκφραση σε όγκους με κακή πρόγνωση, ειδικότερα σε εκείνους που υπάρχει και ενίσχυση του γονιδίου *MYCN.* Η ενεργοποίηση της αυτοκρινής οδού TrkB-BDNF μπορεί να οδηγήσει σε διείσδυση, μετάσταση, αγγειογένεση και αντίσταση σε φάρμακα. Παράλληλα είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι διάφορες μελέτες αποδεικνύουν πως οι υποδοχείς TrkA και TrkC απουσία του προσδέτη τους ενεργοποιούν αποπτωτικά σήματα (Brodeur and Bagatell, 2014). Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στην ανάπτυξη Trk αναστολέων ως μια θεραπευτική προσέγγιση έναντι του νευροβλαστώματος.

Τέλος στην δημιουργία NB έχει βρεθεί να ευθύνονται και επιγενετικές αλλαγές όπως είναι η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση ιστονών και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Οι επιγενετικές αλλαγές επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων επηρεάζοντας ογκογόνα μονοπάτια και έχουν συσχετιστεί με την κακή πρόγνωση για την κλινική πορεία του ασθενούς (Brodeur and Bagatell, 2014).

Συνοψίζοντας στην παθογένεση αυτού του καρκίνου εμπλέκονται πολλές γενετικές και μοριακές ανωμαλίες και κατά συνέπεια το νευροβλάστωμα αντιπροσωπεύει ένα φάσμα ασθενειών. Κλινικά αυτή η ετερογένεια αποτελεί μια πρόκληση, και για αυτό οι μηχανισμοί παθογένεσης του NB μελετώνται συνεχώς προκειμένου να αποσαφηνιστούν πλήρως και να ανακαλυφθούν νέοι πιθανοί θεραπευτικοί και διαγνωστικοί στόχοι.

❖ Α.2.4 Η κλινική εικόνα και η διάγνωση του NB

<u>Κλινική Εικόνα:</u>

Όσον αφορά την κλινική εικόνα των ασθενών με νευροβλάστωμα υπάρχουν πολλοί παράγοντες που την επηρεάζουν και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ανατομική θέση και το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διήθησης, τις επιδράσεις που προκαλούνται από την έκκριση κατεχολαμινών κ.α. Κάποια από τα συμπτώματα είναι τα εξής: αίσθημα κακουχίας, πυρετός, απώλεια βάρους, πόνος, κοιλιακή διάταση, λεμφαδενοπάθεια, δευτερεύουσα αναπνευστική δυσχέρεια, ηπατομεγαλία. Οι πυελικές μάζες μπορεί να προκαλέσουν δυσκοιλιότητα ή δυσκολία στην ούρηση, ενώ όταν επηρεάζεται ο θώρακας μπορεί να προκληθεί δυσφαγία,

δύσπνοια κλπ. Όταν η μεταστατική οδός είναι η αιμοτογενής ή η λεμφική, μπορεί να εκδηλωθεί οίδημα στα μάτια («μάτια ρακούν»), ενώ όταν η μετάσταση γίνεται μέσω του δέρματος εμφανίζονται μπλε υποδόρια οζίδια γνωστά ως «σύνδρομο βατόμουρου». Παραδόξως, το συγκεκριμένο σύνδρομο έχει μία πιο ευνοϊκή πρόγνωση με πιθανή αυθόρμητη υποστροφή του όγκου (Colon and Chung, 2011). Ταυτόχρονα στους ασθενείς με νευροβλάστωμα επηρεάζεται η έκκριση κατεχολαμινών, με αποτέλεσμα να παρατηρείται ταχυκαρδία και υπέρταση. Τέλος οι ασθενείς με νευροβλάστωμα μπορεί να εμφανίζουν παρανεοπλασματικά σύνδρομα, όπως είναι η δυσλειτουργική διάρροια με ηλεκτρολυτικές διαταραχές λόγω απελευθέρωσης αγγειοδραστικού εντερικού πεπτιδίου (VIP: Vasoactive Intestinal Peptide), η εγκεφαλομυελίτιδα, ή αισθητική νευροπάθεια και το σύνδρομο OMS (opsoclonus-myoclonus syndrome), που οφείλεται στη διασταυρούμενη αντίδραση των αντισωμάτων με τον παραγκεφαλικό ιστό (Ishola and Chung, 2007).

Διάγνωση:

Αρχικά η κλινική εικόνα του ασθενούς παίζει σημαντικό ρόλο στη διάγνωση, καθώς μπορεί να δημιουργήσει υποψίες στους γιατρούς. Στη συνέχεια ακολουθούν διαγνωστικές εξετάσεις στις οποίες περιλαμβάνονται αιματολογικές εξετάσεις και ακτινογραφία θώρακα, η οποία μπορεί να αποκαλύψει ασβεστώσεις ή οπίσθια μεσοθωρακική μάζα. Επιπρόσθετα διαγνωστικά ευρήματα περιλαμβάνουν αυξημένα επίπεδα κατεχολαμινών στα ούρα ή στον ορό του αίματος ή μεταβολιτών των κατεχολαμινών (βανιλλυλομανδελικό οξύ και ομοβανιλικό οξύ) (Kim and Chung, 2006).

Παράλληλα η διαγνωστική απεικόνιση του NB πραγματοποιείται συνήθως με αξονική τομογραφία, η οποία επιτρέπει τον εντοπισμό του όγκου σε διάφορες περιοχές (λαιμός, θώρακας, κοιλιά), καθώς και την εύρεση του βαθμού διήθησης. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η μαγνητική τομογραφία όταν υπάρχει ανησυχία για μετάσταση στη σπονδυλική στήλη, καθώς και για απεικόνιση του εγκεφάλου όταν πρέπει να αντιμετωπιστούν νευρολογικά συμπτώματα (Colon and Chung, 2011). Ταυτόχρονα ένας εναλλακτικός τρόπος διάγνωσης ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος προσδιορισμός του πρωτογενούς όγκου και έλεγχος των μεταστάσεων είναι η σπινθηρογραφία των οστών.

Βέβαια για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση πρέπει να πραγματοποιηθεί μικροσκοπική ιστολογική εξέταση, ώστε να βρεθούν τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου και να προσδιοριστεί το στάδιο κακοήθειας (βλ. υποκεφάλαιο Α.2.2), το οποίο θα οδηγήσει και στην εφαρμογή της καταλληλότερης θεραπείας. Η βιοψία πραγματοποιείται είτε σε δείγμα του όγκου είτε σε δείγμα του μυελού των οστών.

❖ Α.2.5 Τρέχουσες θεραπευτικές στρατηγικές για NB

Η θεραπεία για το νευροβλάστωμα περιλαμβάνει τη **χημειοθεραπεία,** τη **χειρουργική αφαίρεση** και σε κάποιες περιπτώσεις την **ακτινοθεραπεία**. Ωστόσο πολλά επιθετικά νευροβλαστώματα έχουν ανθεκτικότητα σε κάποιους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες καθιστώντας έτσι υψηλή την πιθανότητα υποτροπής. Το πρωτόκολλο θεραπείας που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από τη **σταδιοποίηση του όγκου** και **την ομάδα κινδύνου** στην οποία κατηγοριοποιείται ο κάθε ασθενής (βλ. υποκεφάλαιο Α.2.2) (Colon and Chung, 2011).

Ασθενείς των ομάδων χαμηλού και ενδιάμεσου κινδύνου:

Μελέτες έχουν δείξει ότι η χειρουργική επέμβαση από μόνη της ακόμα και χωρίς πλήρη εκτομή του όγκου μπορεί να είναι θεραπευτική για σχεδόν όλους τους ασθενείς των ομάδων **χαμηλού** και **ενδιάμεσου** κινδύνου. Μάλιστα βρέφη με εντοπισμένους όγκους (κυρίως σταδίου 4s) θεραπεύονται χωρίς καμία θεραπεία λόγω αυθόρμητης υποστροφής του όγκου (Pinto et al., 2015). Πρόκειται για ένα πολύπλοκο μοριακό φαινόμενο, το οποίο μελετάται ώστε να κατανοηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί του και να βρεθούν νέοι πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι για τις επιθετικές μορφές νευροβλαστώματος.

Αναλυτικότερα **αυθόρμητη υποστροφή** του όγκου ορίζεται ως η μείωση του μεγέθους του, ή η εξαφάνιση ενός πρωτογενή όγκου, ή μιας μεταστατικής νόσου χωρίς θεραπευτική παρέμβαση. Στην περίπτωση του νευροβλαστώματος, αυθόρμητη υποστροφή μπορεί να συμβεί σε νευροβλάστωμα σταδίου 4s (μικροί πρωτογενείς όγκοι, με περιορισμένη διάδοση σε ήπαρ, δέρμα και καθόλου εμπλοκή του μυελού των οστών). Έχει βρεθεί λοιπόν ότι οι κύριοι μηχανισμοί που οδηγούν σε υποστροφή του όγκου είναι οι εξής (Brodeur and Bagatell, 2014):

- έλλειψη νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF) στο περιβάλλον του όγκου παρουσία του υποδοχέα TrkA επάγει την ενεργοποίηση αποπτωτικών οδών
- κυτταροτοξικότητα μεσολαβούμενη από αντισώματα (antibody-dependent cellular toxicity), ή από NK κύτταρα
- μείωση του μήκους των τελομερών και απόπτωση λόγω απουσίας τελομεράσης
- επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν σε αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης

Ασθενείς της ομάδας υψηλού κινδύνου:

Η θεραπεία που εφαρμόζεται στην κλινική πράξη για ασθενείς της ομάδας υψηλού κινδύνου είναι πολύπλευρη (Louis and Shohet, 2015). Σε γενικές γραμμές στα αρχικά στάδια εφαρμόζεται επαγωγική χημειοθεραπεία (κυκλοφωσφαμίδη, σισπλατίνη κ.α.), ώστε να μειωθεί το φορτίο του όγκου και να ακολουθήσει πληρέστερη χειρουργική απομάκρυνση του όγκου (Yalcin et al., 2010). Βέβαια σε πιο προχωρημένα στάδια η χειρουργική απομάκρυνση περιορίζεται σε μια ανοικτή βιοψία (Colon and Chung, 2011). Μετά την επαγωγική

χημειοθεραπεία ακολουθεί χημειοθεραπεία υψηλής δόσης (καρβοπλατίνη, ετοποσίδη και μελφαλάνη) και χορήγηση αυτόλογων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Pinto et al., 2015). Στη συνέχεια μπορεί να εφαρμοστεί ακτινοθεραπεία δόσης 2 Gy προκειμένου να ελεγχθεί η μεταστατική νόσος και να καταστραφούν εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός χημειοθεραπείας, χειρουργικής επέμβασης και ακτινοθεραπείας μειώνει το ποσοστό υποτροπής της νόσου (<10%) (Ishola and Chung, 2007). Επιπλέον για την εξάλειψη της υπολειμματικής νόσου μπορεί να χορηγηθεί υψηλή δόση 13-cis-ρετινοϊκού οξέος, το οποίο έχει βρεθεί να βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση (Reynolds et al., 2003), καθώς αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και επάγει τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων νευροβλαστών (Colon and Chung, 2011).

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι υπάρχουν διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα ανάλογα την ομάδα κινδύνου του ασθενή και το στάδιο της νόσου. Ωστόσο παρά την πρόοδο των θεραπευτικών μεθόδων πολλοί είναι ασθενείς που θα υποτροπιάσουν και τελικά θα πεθάνουν. Για αυτό υπάρχει η ανάγκη ανάπτυξης καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα οδηγήσουν στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του νευροβλαστώματος.

Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις:

Επειδή σχεδόν οι μισοί ασθενείς της ομάδας υψηλού κινδύνου μετά την κλινική ύφεση του νευροβλαστώματος θα εμφανίσουν υποτροπή και ανθεκτικότητα στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται διάφορα πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας τα οποία εφαρμόζονται σε κλινικές δοκιμές και έχει βρεθεί να αυξάνουν το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών (Yu et al., 2010). Έτσι λοιπόν μια προσέγγιση ανοσοθεραπείας έναντι του νευροβλαστώματος είναι η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν στην γαγγλιοσίδη GD2, η οποία έχει βρεθεί να εκφράζεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων του νευροβλαστώματος. Τα αντι-GD2 μονοκλωνικά αντισώματα είναι ειδικά, με μεγάλη συγγένεια και επάγουν την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος και κυτταρομεσολαβούμενης λύσης. Ακόμα μελέτες υποστηρίζουν ότι η χρήση του παράγοντα GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ενισχύει την αντικαρκινική δραστηριότητα αυξάνοντας τον αριθμό των κοκκιοκυττάρων (Kushner et al., 2001).

Παράλληλα μια ελπιδοφόρα θεραπευτική προσέγγιση για την επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης και της **υποστροφής του όγκου** είναι η χρήση **Trk αναστολέων** ώστε να εμποδιστεί η δέσμευση των προσδετών τους και η επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών (Brodeur and Bagatell, 2014) (βλ. υποκεφάλαιο Α.2.3). Ένας άλλος πιθανός θεραπευτικός στόχος είναι η ALK, καθώς μεταλλάξεις του γονιδίου της εντοπίζονται στη πλειοψηφία των κληρονομούμενων μορφών NB. Έτσι έχει γίνει προσπάθεια να αναπτυχθούν ισχυροί αναστολείς της ALK, κάποιοι από τους οποίους βρίσκονται ήδη σε κλινικές δοκιμές (Louis and

Shohet, 2015). Επιπρόσθετα ένας άλλος θεραπευτικός στόχος είναι το mTOR (mammalian target of rapamycin), μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα, το μεταβολισμό και την επιβίωση. Ακόμα, άλλοι πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι είναι τα MDM2, ένας αρνητικός ρυθμιστής της p53, και το ODC1 ένα ένζυμο που συνθέτει πολυαμίνες, σημαντικές για την κυτταρική επιβίωση (Colon and Chung, 2011).

Συνοψίζοντας λοιπόν το νευροβλάστωμα είναι ένας κακοήθης όγκος του ΠΝΣ με πολύ μεγάλη μοριακή ετερογένεια καθώς στην παθογένεση του εμπλέκονται πολλές γενετικές και μοριακές ανωμαλίες. Για αυτόν το λόγο έχουν γίνει προσπάθειες να αναπτυχθούν κατάλληλα συστήματα ταξινόμησης των ασθενών σε ομάδες κινδύνου τα οποία θα οδηγούν στην εφαρμογή καταλληλότερων και πιο εξατομικευμένων θεραπειών.

Α.3 Το σύστημα του συμπληρώματος

Το σύστημα του συμπληρώματος είναι ο κύριος δραστικός συντελεστής του χυμικού κλάδου του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος που οδηγεί στον **οψωνισμό** και τη **λύση** των παθογόνων. Είναι μία πολύπλοκη ομάδα πρωτεϊνών, περίπου 50 στο σύνολο τους, που ασκούν ποικίλες ανοσορυθμιστικές λειτουργίες στα όρια σύζευξης της έμφυτης και επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης.

Οι διαλυτές πρωτεΐνες και οι γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούν το σύστημα του συμπληρώματος συντίθενται κυρίως στα κύτταρα του ήπατος, αλλά παράγονται επίσης σε σημαντικές ποσότητες στα μονοκύτταρα του αίματος, τα μακροφάγα των ιστών και στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα και του ουρογεννητικού σωλήνα. Μάλιστα έχει δειχθεί πρόσφατα ένας νέος ενδοκυττάριος ρόλος των μορίων του συμπληρώματος C3 και C5, τα οποία συντίθενται από τα Β και Τ λεμφοκύτταρα και συμβάλλουν στη ομοιοστατική ρύθμιση λεμφοκυτταρικών αποκρίσεων (Arbore et al., 2016). Τα συστατικά αυτά συνιστούν το 5% του κλάσματος σφαιρινών του ορού. Τα περισσότερα κυκλοφορούν στον ορό σε λειτουργικά ανενεργές μορφές, ως προένζυμα ή ζυμογόνα, τα οποία παραμένουν ανενεργά μέχρι την πρωτεολυτική πέψη, η οποία απομακρύνει ένα ανασταλτικό τμήμα και εκθέτει το ενεργό κέντρο.

❖ Α.3.1 Οδοί ενεργοποίησης του συστήματος του συμπληρώματος

Το σύστημα του συμπληρώματος περιλαμβάνει ένα εκτεταμένο δίκτυο πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στην ανοσολογική αναγνώριση, κυτταρική διέγερση και στη ρύθμιση φλεγμονωδών αποκρίσεων. Δεδομένου ότι το συμπλήρωμα είναι ένας κρίσιμος μεσολαβητής της ανοσοεπιτήρησης των ιστών, αποκρίνεται γρήγορα σε σήματα μοριακού στρες, μέσω μιας

σειράς διαδοχικών πρωτεολυτικών αντιδράσεων που ξεκινούν από τη δέσμευση μορίων αναγνώρισης προτύπων (PRMs: pattern recognition molecules) (C1q, MBL, MASPs, φικολίνη, προπερδίνη) σε δομές κατεστραμμένων κυττάρων, μικροβιακούς εισβολείς ή επιφάνειες βιοϋλικών (Reis et al., 2018). Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος επιτυγχάνεται μέσω τριών διαφορετικών οδών: της **κλασικής**, της **εναλλακτικής** και της οδού της **λεκτίνης,** οι οποίες ενεργοποιούνται από διαφορετικά ερεθίσματα αλλά τελικά όλες οδηγούν στο σχηματισμό του συμπλέγματος μεμβρανικής επίθεσης ή σύμπλεγμα MAC (membrane attack complex).

Κλασική οδός (CP):

Το πρώτο συστατικό της κλασικής οδού είναι το μακρομοριακό σύμπλεγμα C1 ($C1qr_2s_2$). Το C1 είναι ένα μακρομοριακό σύμπλεγμα, το οποίο αποτελείται από το C1q και από δυο μόρια καθενός από τα συστατικά C1r και C1s και σταθεροποιείται από ιόντα Ca^{2+}. Συγκεκριμένα η κλασική οδός του συμπληρώματος ξεκινά όταν το C1q δεσμεύει ανοσοσυμπλέγματα (στην Fc περιοχή των αντισωμάτων IgM και IgG), καθώς και μοριακά πρότυπα παθογόνων (**PAMPs**: pathogen associated molecular patterns), ή μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με βλάβη (**DAMPs**: Damage-associated molecular patterns) (Ricklin et al., 2016). Το επακόλουθο αποτέλεσμα αυτής της δέσμευσης είναι μεταβολές στη στερεοδιαμόρφωση του C1r το οποίο ενεργοποιείται αυτοκαταλυτικά (με δράση πρωτεάσης σερίνης) και ενεργοποιεί το δεύτερο συστατικό C1r. Μαζί πρωτεολύουν και ενεργοποιούν το C1s (παρόμοιο ενεργό ένζυμο με το C1r), το οποίο διασπά το C4. Η διάσπαση του C4 οδηγεί στην έκθεση ενός θειοεστερικού δεσμού στο θραύσμα C4b, μέσω του οποίου προσδένεται ομοιοπολικά στην επιφάνεια του παθογόνου κοντά στο C1. Το C2 προσκολλάται στην εκτεθειμένη θέση δέσμευσης του C4b και στη συνέχεια διασπάται από το γειτονικό C1s. Το μικρότερο θραύσμα C2b απομακρύνεται και τελικά δημιουργείται το σύμπλεγμα **C4b2a**, η **C3 κονβερτάση** της κλασικής οδού. Η CP C3 κονβερτάση υδρολύει το C3 συστατικό του συμπληρώματος στο μικρό θραύσμα C3a και στο μεγάλο C3b. Ένα μόνο μόριο C3 κονβερτάσης μπορεί να παράγει πάνω από 200 θραύσματα C3b, προκαλώντας σημαντική ενίσχυση της ενεργοποίησης σε αυτό το βήμα της ακολουθίας. Τα θραύσματα C3b διαθέτουν εκτεθειμένο θειοεστερικό δεσμό και έτσι μερικά από αυτά δεσμεύονται στο C4b2a για τη δημιουργία του συμπλέγματος **C4b2a3b**, τη **CP C5 κονβερτάση** που υδρολύει το C5 συστατικό σε C5a και C5b, το οποίο προσδένεται στην αντιγονική επιφάνεια αρχίζοντας τη τελική φάση του λυτικού κύκλου (Εικόνα 6) (Kindt et al., 2013).

Οδός της λεκτίνης (LP):

Η οδός της λεκτίνης ενεργοποιείται με τη δέσμευση ειδικής λεκτίνης (MBL: Mannose Binding Lectin) σε κατάλοιπα μαννόζης, που υπάρχουν σε γλυκοπρωτεΐνες ή υδατάνθρακες της επιφάνειας των μικροοργανισμών. Τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα έχουν κατάλοιπα σιαλικού οξέος, τα οποία καλύπτουν τις υδατανθρακικές ομάδες που αναγνωρίζονται από την MBL και δε δεσμεύονται από αυτήν. Η MBL είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης, η οποία υπάρχει

διαρκώς στην κυκλοφορία του αίματος και τα επίπεδά της αυξάνονται σε καταστάσεις φλεγμονής. Η λειτουργία της MBL είναι παρόμοια με αυτήν του συστατικού C1q. Αφού λοιπόν η MPL προσδεθεί στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου ή του παθογόνου, οι MBL-σχετιζόμενες πρωτεάσες σερίνης (MASP-1, MASP-2) τη δεσμεύουν, παράγοντας ενεργοποιημένο σύμπλοκο παρόμοιο με το C1, το οποίο επάγει τη διάσπαση και την ενεργοποίηση των C2 και C4. Οι MBL-σχετιζόμενες πρωτεάσες σερίνης έχουν δομικές ομοιότητες με τα C1r και C1s και μιμούνται τη δράση τους (Kindt et al., 2013). Με τη διάσπαση και ενεργοποίηση των C2 και C4 επάγεται η δημιουργία της ίδιας C3 κονβερτάσης (C4b2a) με αυτής της κλασικής οδού. Στη συνέχεια όπως και στην κλασική οδό, υδρολύεται το C3 συστατικό και δημιουργείται η C5 κονβερτάση (Εικόνα 6).

<u>Εναλλακτική οδός (AP)</u>:

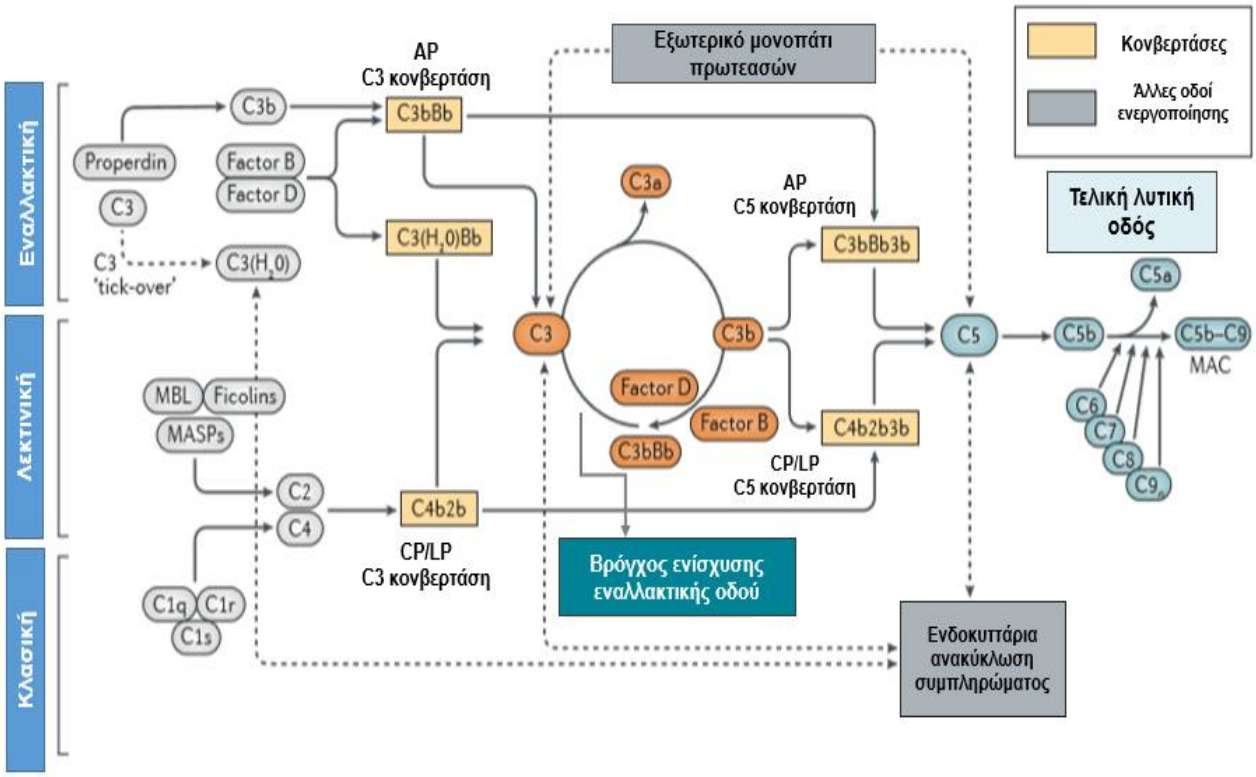
Η εναλλακτική οδός βρίσκεται σε διαρκή «επιφυλακή», με χαμηλά επίπεδα ενεργοποίησης στο αίμα, καθώς το συστατικό C3, το οποίο περιέχει ένα ασταθή θειοεστερικό δεσμό υφίσταται αργή, αυθόρμητη υδρόλυση **(tick-over)**, σχηματίζοντας το ενεργό προϊόν C3(H_2O), που έχει παρόμοια διαμόρφωση με το C3b. Ταυτόχρονα η φυσική προσρόφηση του C3 σε διάφορες επιφάνειες, όπως σε μικροβιακά κύτταρα που διαθέτουν λιποπολυσακχαρίτες (LPS) μπορεί επίσης να οδηγήσει σε παρόμοια ενεργοποιημένη διαμόρφωση (Ricklin et al., 2016). Παράλληλα τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι η **προπερδίνη** (θετικός ρυθμιστής του συμπληρώματος) δρα ως μόριο αναγνώρισης προτύπων και επιλεκτικά δεσμεύεται σε επιφάνειες προσλαμβάνοντας διαλυτά C3b ή C3(H_2O) στην επιφάνεια στόχο (Spitzer et al., 2007) (Εικόνα 6).

Αναλυτικότερα τα ενεργά προϊόντα C3b και C3(H_2O) λόγω έκθεσης του θειοεστερικού δεσμού προσκολλώνται στην επιφάνεια στόχο, με αποτέλεσμα παρουσία Mg^{+2} να εκθέτουν μια θέση δέσμευσης για τον παράγοντα B (FB) και ως αποτέλεσμα να αποκαλύπτεται η θέση δράσης για τον παράγοντα D (FD). Ο παράγοντας D διασπά τον συνδεδεμένο με το C3b, ή C3(H_2O) παράγοντα B σε ένα μικρό θραύσμα (Ba), το οποίο απομακρύνεται και τελικά δημιουργείται η C3 κονβερτάση της εναλλακτικής οδού (**C3bBb** ή **C3(H_2O)Bb,** AP C3 κονβερτάση) (Reynolds et al., 2003). Η AP C3 κονβερτάση έχει περιορισμένο χρόνο ημιζωής, η δέσμευση της όμως με τη προπερδίνη, σταθεροποιεί τη δράση της, αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής της. Η C3 κονβερτάση διασπά το C3 σε C3a και C3b. Η αναφυλατοξίνη C3a απελευθερώνεται ενώ κάποια από τα θραύσματα C3b δεσμεύονται στο C3bBb, δημιουργώντας το σύμπλεγμα **C3bBb3b**, τη AP C5 κονβερτάση, η οποία υδρολύει το C5 συστατικό σε C5a και C5b, το οποίο δεσμεύεται στην αντιγονική επιφάνεια αρχίζοντας τη τελική φάση του λυτικού κύκλου (Kindt et al., 2013). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η AP C3 κονβερτάση, μπορεί να ενεργοποιήσει μη υδρολυμένη φυσική C3 για την παραγωγή επιπλέον θραυσμάτων C3b, που μπορούν να σχηματίσουν νέες AP κονβερτάσες. Ως αποτέλεσμα, τα αρχικά στάδια επαναλαμβάνονται και ενισχύονται. Δηλαδή αυτή η οδός μπορεί να λειτουργήσει ως **βρόγχος ενίσχυσης** της

εναπόθεσης του C3b στην επιφάνεια του κυττάρου-στόχου ανεξάρτητα από την αρχική οδό ενεργοποίησης (πχ κλασική ή λεκτινική οδό) (Ricklin et al., 2016). Η ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού γίνεται επιλεκτικά στις επιφάνειες των παθογόνων και όχι στις μεμβράνες κυττάρων θηλαστικών καθώς έχουν υψηλά επίπεδα σιαλικού οξέος. Το σιαλικό οξύ δεσμεύει τον παράγοντα Η, έναν διαλυτό αναστολέα της C3 κονβερτάσης που με τη σειρά του απενεργοποιεί το C3b που έχει δεσμευθεί στα κύτταρα του ξενιστή προστατεύοντας τον από την κυτταρολυτική δράση του συμπλόκου MAC.

<u>Σχηματισμός του συμπλόκου λύσης:</u>

Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των τριών οδών του συμπληρώματος είναι η παραγωγή της C5 κονβερτάσης. Το ένζυμο αυτό διασπά το μόριο του συμπληρώματος C5 στα θραύσματα C5a και C5b. Το C5b δεσμεύεται στο C6 συστατικό του συμπληρώματος, ακολουθεί δέσμευση του C7, του C8 και τελικά στο σύμπλεγμα C5b678 δεσμεύεται το C9. Στο σύμπλεγμα C5b678 μπορούν να πολυμεριστούν και να δεσμευτούν από 10 μέχρι 17 μόρια. Το ολοκληρωμένο σύμπλεγμα μεμβρανικής επίθεσης MAC, αποτελείται από το C5b678 περικυκλωμένο από ένα poly-C9, διαθέτει κυλινδρική δομή και σχηματίζει πόρους (διάμετρος 70-100 Aº) στις επιφάνειες των παθογόνων, προκαλώντας τη λύση τους (Kindt et al., 2013) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των 3 κύριων οδών ενεργοποίησης του συμπληρώματος, της κλασικής, λεκτινικής και εναλλακτικής οδού, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία του συμπλέγματος MAC. Επίσης απεικονίζεται και η ενεργοποίηση του C3 από πρωτεάσες, μηχανισμός ανεξάρτητος από τις κονβερτάσες (Reis et al., 2018).

Άλλοι οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος:

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος εκτός από την κλασική, τη λεκτινική και την εναλλακτική οδό ενεργοποίησης, που είναι δηλαδή ανεξάρτητες από τη δράση των κονβερτασών. Είναι γνωστό ότι το C3 και C5 μπορεί να ενεργοποιηθούν και όταν διασπώνται απευθείας από πρωτεάσες σερίνης, όπως είναι τα ένζυμα πήξης (θρομβίνη, πλασμίνη) και οι καλλικρεΐνες των ιστών (Εικόνα 6) (Amara et al., 2010). Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί ότι η ακτινοθεραπεία του καρκίνου με ιοντίζουσα ακτινοβολία επάγει άμεση τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω της κλασικής και εναλλακτικής οδού και απελευθέρωση αναφυλατοξινών C5a και C3a, τα οποία φαίνονται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου (Surace et al., 2015).

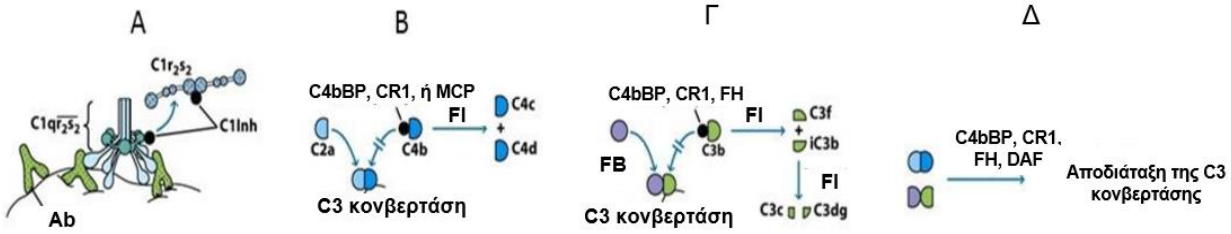
❖ Α.3.2 Ρύθμιση του συστήματος του συμπληρώματος

Επειδή πολλά στοιχεία του συμπληρώματος μπορούν να επιτεθούν σε κύτταρα του ξενιστή, όπως και σε ξένα κύτταρα ή μικροοργανισμούς, έχουν εξελιχθεί ρυθμιστικοί μηχανισμοί για να περιορίσουν τη δράση του συμπληρώματος σε συγκεκριμένους στόχους. Ένας παθητικός μηχανισμός ρύθμισης που χαρακτηρίζει όλες τις οδούς ενεργοποίησης, είναι η δημιουργία ασταθών συμπλόκων, τα οποία υφίστανται αυθόρμητη απενεργοποίηση αν δε σταθεροποιηθούν μέσω αντίδρασής τους με άλλα συστατικά.

Άλλος μηχανισμός ρύθμισης είναι η αναστολή της **συγκρότησης της C3 κονβερτάσης** από τον αναστολέα της γλυκοπρωτεΐνης C1 (C1 inhibitor ή C1-INH), που δρα στην κλασική και λεκτινική οδό και προκαλεί αποδέσμευση του συμπλόκου $C1r_2s_2$ από το μόριο C1q, αποτρέποντας την περαιτέρω ενεργοποίηση του C4 ή του C2 (Εικόνα 7Α). Επιπλέον σε αυτές τις οδούς, δρουν τρεις δομικά διακριτές RCA (Regulators of complement activation) ρυθμιστικές πρωτεΐνες που αποτρέπουν τη συγκρότηση C3 κονβερτάσης. Περιλαμβάνουν το C4bBP, τον υποδοχέα του συμπληρώματος τύπου 1 (CR1) και το μεμβρανικό πρωτεϊνικό συμπαράγοντα (MCP ή CD46). Κάθε μια από αυτές, δεσμεύονται στο C4b αποτρέποντας την αλληλεπίδραση του με το C2a. Το δεσμευμένο με κάποιον από τους παραπάνω αναστολείς C4b, διασπάται από τον παράγοντα I (FI) σε δεσμευμένο C4d και διαλυτό C4c (Εικόνα 7Β).

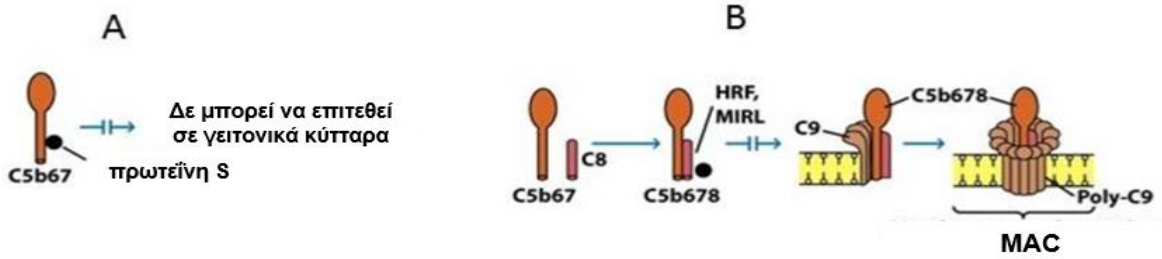
Παρόμοιος μηχανισμός λειτουργεί για να αποτρέψει τη συγκρότηση της C3 κονβερτάσης της εναλλακτικής οδού ενεργοποίησης. Σε αυτήν τη περίπτωση ο CR1, ο MCP (ή CD46) ή ο παράγοντας Η (FH), δεσμεύεται στο C3b και αποτρέπει την αλληλεπίδρασή του με τον παράγοντα Β. Το δεσμευμένο στον αναστολέα C3b διασπάται περαιτέρω από τον παράγοντα I (FI), σε ένα δεσμευμένο θραύσμα iC3b και ένα διαλυτό θραύσμα C3f. Το iC3b διασπάται περαιτέρω από τον παράγοντα I σε C3dg και C3c (Εικόνα 7Γ).

Επιπρόσθετα οι C3 κονβερτάσες αποδιατάσσονται από τα C4bBP, CR1, τον παράγοντα Η και τον παράγοντα επιτάχυνσης της διάσπασης (DAF ή CD55). Η διάσπαση της C3 κονβερτάσης επιτυγχάνεται με την απελευθέρωση του θραύσματος που φέρει ενζυμική δραστικότητα (C2a ή Bβ) από το δεσμευμένο στο κύτταρο θραύσμα C4b ή C3b. Όταν η C3 κονβερτάση διασπαστεί, ο παράγοντας Ι διασπά το υπόλοιπο δεσμευμένο στη μεμβράνη C4b ή C3b θραύσμα, απενεργοποιώντας μη αντιστρεπτά την κονβερτάση (Εικόνα 7Δ).



Εικόνα 7: Οι μηχανισμοί ρύθμισης του συμπληρώματος στο επίπεδο της κονβερτάσης (Kindt et al., 2013).

Τέλος υπάρχουν πρωτεΐνες που δεσμεύουν το απελευθερωμένο C5b67, αποτρέποντας την είσοδο του στη μεμβράνη γειτονικών κυττάρων. Μια από αυτές είναι η πρωτεΐνη S, η οποία δεσμεύεται στο C5b67, επάγει τη δομική του μετάπτωση και εμποδίζει την είσοδό του στη μεμβράνη (Εικόνα 8Α). Επίσης μια μεμβρανική πρωτεΐνη HRF (homologous restriction factor) δεσμεύεται στο C8, αποτρέποντας τη δημιουργία του poly-C9 και την είσοδο του στη μεμβράνη (Εικόνα 8Β).



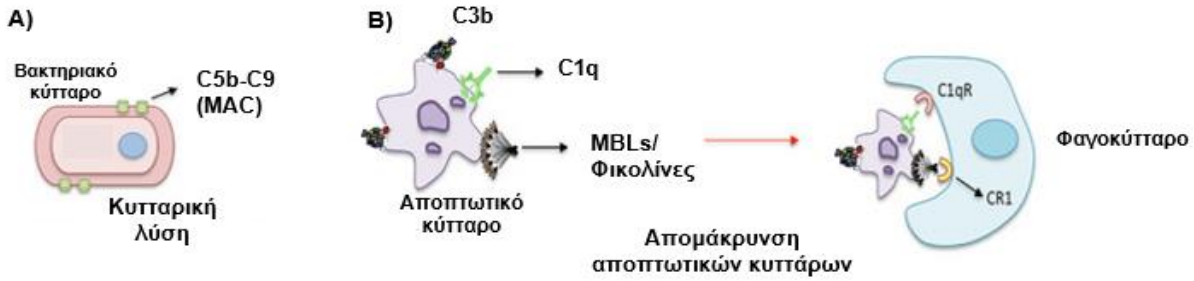
Εικόνα 8: Μηχανισμοί αναστολής της συγκρότησης του συμπλέγματος MAC (Kindt et al., 2013).

❖ Α.3.3 Βιολογικές λειτουργίες του συστήματος του συμπληρώματος

Το συμπλήρωμα είναι ένα φυλογενετικά συντηρημένο σύστημα που συμμετέχει στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στα παθογόνα, συνδέει τη φυσική με την επίκτητη ανοσία ρυθμίζοντας την ανοσολογική απάντηση και τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις.

Λύση παθογόνων μικροβίων: Μια από τις βασικές λειτουργίες του συστήματος του συμπληρώματος είναι η λύση των παθογόνων μικροβίων. Το σύμπλεγμα MAC, που δημιουργείται ύστερα από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, μπορεί να λύσει Gram-αρνητικά βακτήρια, παράσιτα, ιούς, μέσω δημιουργίας πόρων στη μεμβράνη τους (Εικόνα 9Α).

Απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων: Εκτός όμως από την απομάκρυνση των ξενικών εισβολέων, το συμπλήρωμα συμμετέχει στην απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων του οργανισμού. Ειδικότερα στα αποπτωτικά κύτταρα εναποτίθενται χαμηλά επίπεδα C3b. Ταυτόχρονα τα MBL, φικολίνες και C1q αναγνωρίζουν και δεσμεύουν υπολείμματα αποπτωτικών κυττάρων. Έτσι τα αποπτωτικά κύτταρα απομακρύνονται από φαγοκύτταρα μέσω σύνδεσης των παραπάνω μορίων με τους υποδοχείς τους C1qR και CR1 στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων (Εικόνα 9B) (Beltrame et al., 2014).



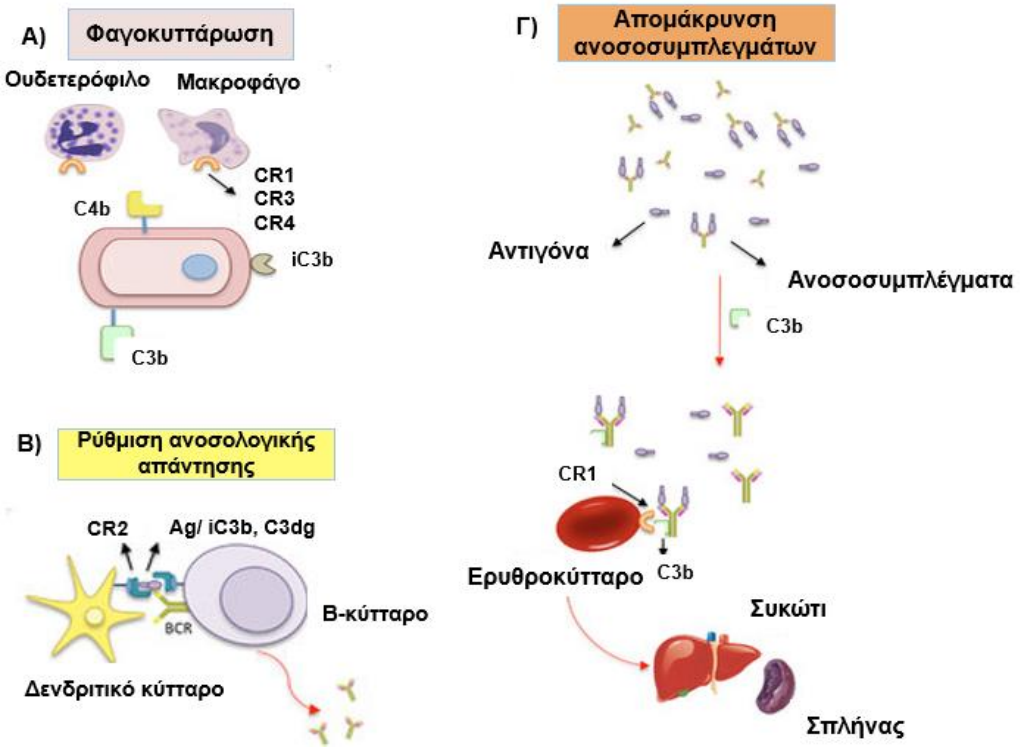
Εικόνα 9: Α) Κυτταρική λύση βακτηριακού κυττάρου πραγματοποιούμενη από τη δημιουργία του συμπλέγματος μεμβρανικής επίθεσης MAC. Β) Τα C1q, MBL, φικολίνες και C3b που παράγεται από την εναλλακτική οδό, δεσμεύονται σε αποπτωτικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα, αφού προηγηθεί σύνδεση των παραπάνω μορίων στους υποδοχείς τους (Beltrame et al., 2014).

Συμβολή στην οψωνοποίηση μη εαυτού υλικού: Ανεξάρτητα από την οδό ενεργοποίησης του συμπληρώματος, η οψωνοποίηση των παθογόνων προκαλεί τη φαγοκυττάρωση και την καταστροφή τους. Η κυριότερη οψωνίνη είναι το θραύσμα C3b, ωστόσο και τα θραύσματα C4b, iC3b και C3dg μεσολαβούν στην οψωνοποίηση των παθογόνων, μέσω δέσμευσης τους σε υποδοχείς του συμπληρώματος **CRs** (Complement Receptors), οι οποίοι εντοπίζονται στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων.

Η **κύρια οψωνίνη C3b** εκτός του να ενισχύει την απόκριση του συμπληρώματος μέσω του σχηματισμού των κονβερτασών, δρα και ως τελεστής που διαμεσολαβεί σε λειτουργίες της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας (Erdei et al., 2016). Ειδικότερα αντιγόνα επικαλυμμένα με C3b δεσμεύονται σε κύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα CR1/CD35 (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα) με αποτέλεσμα να ενισχύεται η φαγοκυττάρωσή τους από αυτά τα κύτταρα (Εικόνα 10A) και ως συνέπεια να επιτυγχάνεται αποτελεσματική αντιμετώπιση των παθογόνων. Εκτός από τη φαγοκυττάρωση, η αλληλεπίδραση του CR1 με τους προσδέτες του, παίζει περαιτέρω ρόλο στην άμυνα του ξενιστή έναντι της μόλυνσης με την προώθηση έκκρισης προφλεγμονωδών μορίων, όπως οι ιντερλευκίνες IL-1α, IL-1β και οι προσταγλανδίνες (Dunkelberger and Song, 2010). Επιπλέον μακροφάγα ιστών, όπως είναι τα κύτταρα Kupffer στο ήπαρ, εκφράζουν τον υποδοχέα του συμπληρώματος CRIg, που ανήκει στη οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και έχει αποδειχθεί ότι δεσμεύει το C3b, με αποτέλεσμα επίσης τη φαγοκυττάρωση των αντιγόνων. Ακόμα η σύνδεση των παραπάνω θραυσμάτων στον CR1, μεσολαβεί στην κάθαρση των ανοσοσυμπλεγμάτων από την κυκλοφορία και τους ιστούς, μετά

την ολοκλήρωση της ανοσολογικής απόκρισης και την εναπόθεσή τους στο σπλήνα και στο ήπαρ. Η επικάλυψη των διαλυτών ανοσοσυμπλεγμάτων με C3b διευκολύνει τη δέσμευσή τους στους CR1 υποδοχείς των ερυθροκυττάρων και αυτά με τη σειρά τους μεταφέρουν τα ανοσοσυμπλέγματα στο σπλήνα και στο ήπαρ. Εκεί πραγματοποιείται η φαγοκυττάρωσή τους αποτρέποντας την εναπόθεσή τους στους ιστούς (Εικόνα 10Γ). Επιπρόσθετα η πρόσδεση του C3b στον υποδοχέα CD46 (MCP) επηρεάζει τις αποκρίσεις των Τ-κυττάρων (Ricklin et al., 2016).

Παράλληλα το iC3b είναι ένας τελεστής με ικανότητα πρόσδεσης στον CRIg και στους υποδοχείς της οικογένειας των ιντεγκρινών CR3 και CR4 ενισχύοντας με αυτόν το τρόπο τη φαγοκυττάρωση των παθογόνων, τη διακίνηση λευκοκυττάρων, τη μετανάστευση και τη συν-διέγερση. Επιπλέον το iC3b καθώς και το C3dg δεσμεύονται στον υποδοχέα CR2 (CD21), ο οποίος εκφράζεται στα Β κύτταρα (και δενδριτικά κύτταρα) και αποτελεί μέρος του συμπλόκου του συν-υποδοχέα των Β κυττάρων. Η αλληλεπίδραση με τον CR2 μειώνει το κατώφλι ενεργοποίησης των Β κυττάρων, επηρεάζει την παραγωγή των κυττάρων μνήμης και την αλληλεπίδραση των Β και Τ κυττάρων (Εικόνα 10Β) (Ricklin et al., 2016).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των λειτουργιών των θραυσμάτων του συμπληρώματος C3b, C4b, iC3b, C3dg (Beltrame et al., 2014).

Μεσολάβηση στη φλεγμονή: Μια ακόμα λειτουργία του συμπληρώματος είναι η μεσολάβηση στη φλεγμονή. Τα μικρότερα θραύσμα C3a, C4a και C5a, καθώς και άλλα προϊόντα διάσπασης του C3, αποτελούν ένα σύνολο διαλυτών μεσολαβητών, τις αναφυλατοξίνες οι οποίες δεσμεύονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων, όπως είναι τα μαστοκύτταρα και βασεόφιλα επάγοντας την απελευθέρωση ισταμίνης,

TNF-a και άλλων αγγειοδραστικών μεσολαβητών. Παράλληλα σε απόκριση της ενεργοποίησης από αναφυλατοξίνες, τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν προσταγλανδίνες (PG) και δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS και RNS) και ταυτόχρονα αυξάνεται η έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και η χημειοταξία τους στις περιοχές μόλυνσης. Επίσης τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα έχουν παρόμοιες χημειοτακτικές αποκρίσεις, ενώ παράλληλα επάγεται αύξηση στην έκκριση IL-1 και IL-6 (Beltrame et al., 2014) (Εικόνα 11). Ειδικότερα το C5a είναι ένας ισχυρός χημειοτακτικός παράγοντας, ο οποίος δεσμεύεται στη N-τελική περιοχή δύο υποδοχέων C5aR1 (CD88) και C5aR2 (C5L2). Το C3a είναι ένα λιγότερο δραστικό μόριο, με περίπου 10 με 100 φορές λιγότερη δραστικότητα και παρόμοιο φάσμα δραστηριοτήτων σε σχέση με το C5a. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες φανέρωσαν νέα σηματοδοτικά μονοπάτια ως αποτέλεσμα της δέσμευσης του C3a στον υποδοχέα του C3aR. Μερικά από αυτά είναι η ανάπτυξη ιστών και η αναγέννηση (π.χ. στον αμφιβληστροειδή, ήπαρ), η επιστροφή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών, η μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και άλλα (Ricklin et al., 2016).

❖ Α.3.4 Δομή και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C3

Το μόριο C3 του συμπληρώματος παίζει κομβικό ρόλο στην ενεργοποίηση και των 3 οδών του συμπληρώματος και για αυτό έχει μονοπωλήσει το ενδιαφέρον πολλών ομάδων, για την ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων του με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 185 kDa, της οποίας το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 και εκκρίνεται στην πρόδρομη μορφή της αποτελούμενη από 1663 αμινοξέα (aa), στα οποία περιλαμβάνεται και ένα πεπτίδιο οδηγητής με 22 αμινοξέα (aa). Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση του μορίου οδηγεί τελικά στο σχηματισμό μιας α-αλυσίδας (110 kDa) και μιας β-αλυσίδας (75 kDa), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας δισουλφιδικής γέφυρας (de Bruijn and Fey, 1985). Η C3 γλυκοπρωτεΐνη διαθέτει δυο κύριες θέσεις γλυκοζυλίωσης και η ώριμη μορφή της πρωτεΐνης δε περιλαμβάνει το πεπτίδιο οδηγητή. Επίσης έχει βρεθεί ότι πολλές κινάσες φωσφορυλιώνουν το C3 σε διαφορετικές θέσεις, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση των λειτουργικών ιδιοτήτων ή της δραστικότητας του μορίου. Το αποτέλεσμα των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων της πρόδρομης μορφής της πρωτεΐνης είναι ο σχηματισμός ενός θειοεστερικού δεσμού, ο οποίος προστατεύεται στο εσωτερικό του μορίου.

Η αναδιάταξη της δομής της φυσικής C3 (13 δομικές επιφάνειες) κατά τη μετατροπή της σε ενεργό προϊόν C3(H_2O) ή σε C3b και η **έκθεση του θειοεστερικού δεσμού** αποτελούν το κλειδί για τη δραστικότητα αυτής της πρωτεΐνης και την ικανότητά της να λειτουργεί ως ένας αποτελεσματικός μεσολαβητής της ανοσολογικής επιτήρησης, με δυνατότητα αλληλεπίδρασης των θραυσμάτων της με μια πληθώρα μορίων (βλ. υποκεφάλαιο Α.3.3). Η πρωτεΐνη C3 πρέπει να είναι άμεσα διαθέσιμη σε υψηλή συγκέντρωση, ώστε να υπάρξει γρήγορη ανοσολογική

απάντηση για την αντιμετώπιση της απειλής. Επομένως τα σχετικά υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης του C3 στο πλάσμα του αίματος και η χαμηλή βιολογική δραστικότητα που χαρακτηρίζει τη φυσική του κατάσταση, επιτρέπουν στο C3 να ενεργεί ως «**φρουρός»**, ο οποίος βρίσκεται σε διαρκή επιφυλακή, οδηγώντας στην άμεση ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού, για την αντιμετώπιση των παθογόνων (Ricklin et al., 2016).

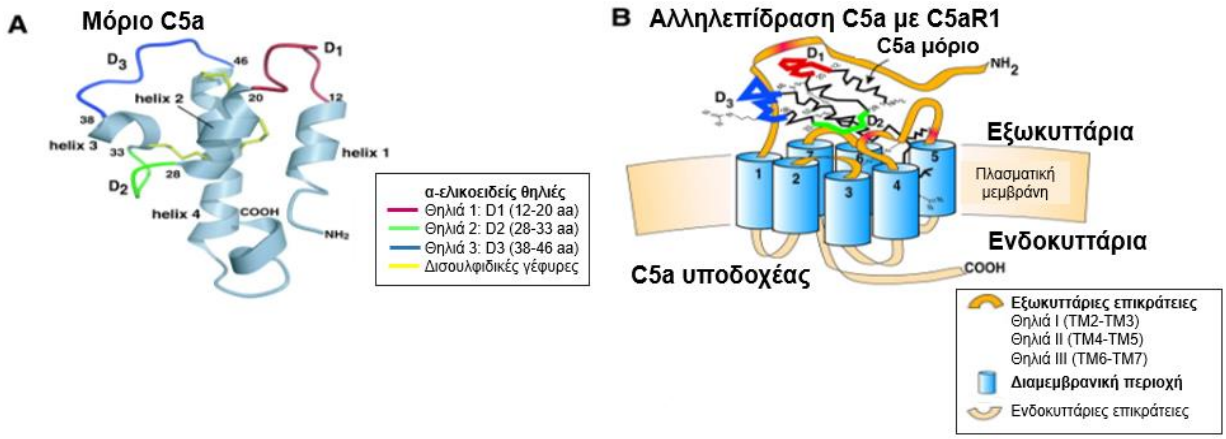
❖ A.3.5 Το μόριο C5a και ο υποδοχέας του C5aR1 (CD88)

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω (υποκεφάλαιο A.3.3) η αναφυλατοξίνη C5a δρα ως ένα ισχυρός φλεγμονώδης παράγοντας προκαλώντας αύξηση της έκφρασης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Επιπλέον επάγει αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων και των βασεόφιλων, με αποτέλεσμα την παραγωγή ισταμίνης και TNF-a. Ακόμα, το C5a είναι ένας αποτελεσματικός χημειοτακτικός παράγοντας, καθώς επιστρατεύει το συμπλήρωμα και τα φαγοκύτταρα σε περιοχές μόλυνσης, οδηγεί στη μετανάστευση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στους λεμφαδένες και ταυτόχρονα επάγει τη μετανάστευση και την προσκόλληση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων στα τοιχώματα των αγγείων. Τέλος ρυθμίζει την ενεργοποίηση των υποδοχέων Fcγ (FcγRs) επί των φαγοκυτταρικών κυττάρων, ενισχύοντας έτσι την ικανότητα φαγοκυττάρωσής τους (Manthey et al., 2009).

Το ανθρώπινο C5a είναι ένα πολυπεπτίδιο με 74 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 11 kDa. Προέρχεται από ενζυμική πέψη του αμινοτελικού άκρου της α-αλυσίδας του μορίου C5 από την C5 κονβερτάση ύστερα από την ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος. Το μόριο C5a αποτελείται από 4 έλικες που συνδέονται μεταξύ τους διαμορφώνοντας θηλιές με 3 δισουλφιδικούς δεσμούς (Εικόνα 12A). Η δραστικότητα του μορίου εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό του άκρο. Μετά τα σχηματισμό του, το μόριο υφίσταται γρήγορα πέψη από την καρβοξυπεπτιδάση-Β του ορού, προς σχηματισμό της πολύ λιγότερης δραστικής μορφής C5a des-Arg (Klos et al., 2013).

Η αναφυλατοξίνη C5a δεσμεύεται σε 2 υποδοχείς στον C5aR1 (CD88) και στον C5aR2 (ή C5L2). Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε ο C5aR1, ένας υποδοχέας μεγέθους 42 kDa που αποτελείται από 350 αμινοξέα (Klos et al., 2009). Ανήκει στην οικογένεια των GPCRs (G protein-coupled receptors) υποδοχέων, είναι δηλαδή συζευγμένος με G-πρωτεΐνη και διαθέτει 7 διαμεμβρανικά ελικοειδή τμήματα με υδρόφοβα κατάλοιπα τα οποία σχηματίζουν τρείς ενδοκυττάριες και τρείς εξωκυττάριες θηλιές με ένα εξωμεμβρανικό N-άκρο και ένα ενδομεμβρανικό C-άκρο (Εικόνα 12B) (Klos et al., 2013). Ο συγκεκριμένος υποδοχέας εντοπίζεται τόσο στην επιφάνεια όσο και στο κυτταρόπλασμα διάφορων κυττάρων. Δεσμεύει με

υψηλή συγγένεια το C5a και με χαμηλότερη συγγένεια το C5a desArg σε δύο διαφορετικές θέσεις δέσμευσης. Αναλυτικότερα πραγματοποιείται αλληλεπίδραση μεταξύ των βασικών αμινοξικών καταλοίπων του ελικοειδή πυρήνα του C5a και των όξινων καταλοίπων του εξωκυττάριου τμήματος του C5aR1, επιτρέποντας έτσι το C-άκρο του C5a να συνδεθεί με τα αμινοξικά κατάλοιπα των διαμεμβρανικών τμημάτων του υποδοχέα, οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση του υποδοχέα (Klos et al., 2009).



Εικόνα 12: Α) Τρισδιάστατη δομή του μορίου C5a. Β) Γραφική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης του C5a με τον υποδοχέα C5aR1 (Huber-Lang et al., 2003).

Η σηματοδότηση μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα εξαρτάται από τις G-πρωτεΐνες, οι οποίες είναι προ-συζευγμένες με τον υποδοχέα. Η δέσμευση του C5a στο C5aR1 προκαλεί ροή ασβεστίου τόσο από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες όσο και από το εξωκυττάριο μέσο. Μετά την ενεργοποίηση, οι β-αρρεστίνες 1 και 2 συνδέονται με τον C5aR1, επάγοντας την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα. Η σύνδεση των αρρεστίνων στον υποδοχέα εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση του C-τελικού άκρου του υποδοχέα, η οποία πραγματοποιείται από τις κινάσες GRKs (G-protein coupled receptor kinases). Εκτός από τη λειτουργία τους ως κινάσες, τα GRKs μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με άλλα συστατικά ενδοκυτταρικής σηματοδότησης όπως τα Akt, MAPK/ERK κινάση (MEK) και PI3K-γ, ενεργοποιώντας έτσι διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (Klos et al., 2009).

Αρχικά είχε δειχτεί ότι ο υποδοχέας C5aR1 εκφράζεται μόνο σε κύτταρα της μυελοειδούς σειράς (ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, μακροφάγα κλπ.), ωστόσο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι εκφράζεται σε μια ποικιλία κυττάρων συμπεριλαμβανομένου και των **νευρικών κύτταρων**, όπως είναι τα αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα (Klos et al., 2013), το οποίο αποτέλεσε το επίκεντρο της συγκεκριμένης εργασίας. Αξίζει να αναφερθεί ότι μελέτες έχουν βρει ότι η έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα αυξάνεται παρουσία φλεγμονωδών συνθηκών (O'Barr et al., 2001). Επίσης, μελέτες σε ζωικά μοντέλα καρκίνου έχουν δείξει ότι σηματοδοτικά μονοπάτια μεσολαβούμενα από τον C5aR1 ευνοούν την ογκογένεση (Hajishengallis et al., 2017) (βλ. υποκεφάλαιο Α.4.2).

Παράλληλα είναι σημαντικό να τονιστεί ότι και το C5a φαίνεται να είναι βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη της παθολογίας πολλών φλεγμονωδών ασθενειών που περιλαμβάνουν το σύστημα του συμπληρώματος, όπως είναι η σήψη, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση κ.α. Όπως περιγράφεται παρακάτω, τα τελευταία χρόνια η δράση του C5a έχει βρεθεί να εμπλέκεται και στην ανάπτυξη του καρκίνου (Pio et al., 2014) (Reis et al., 2018).

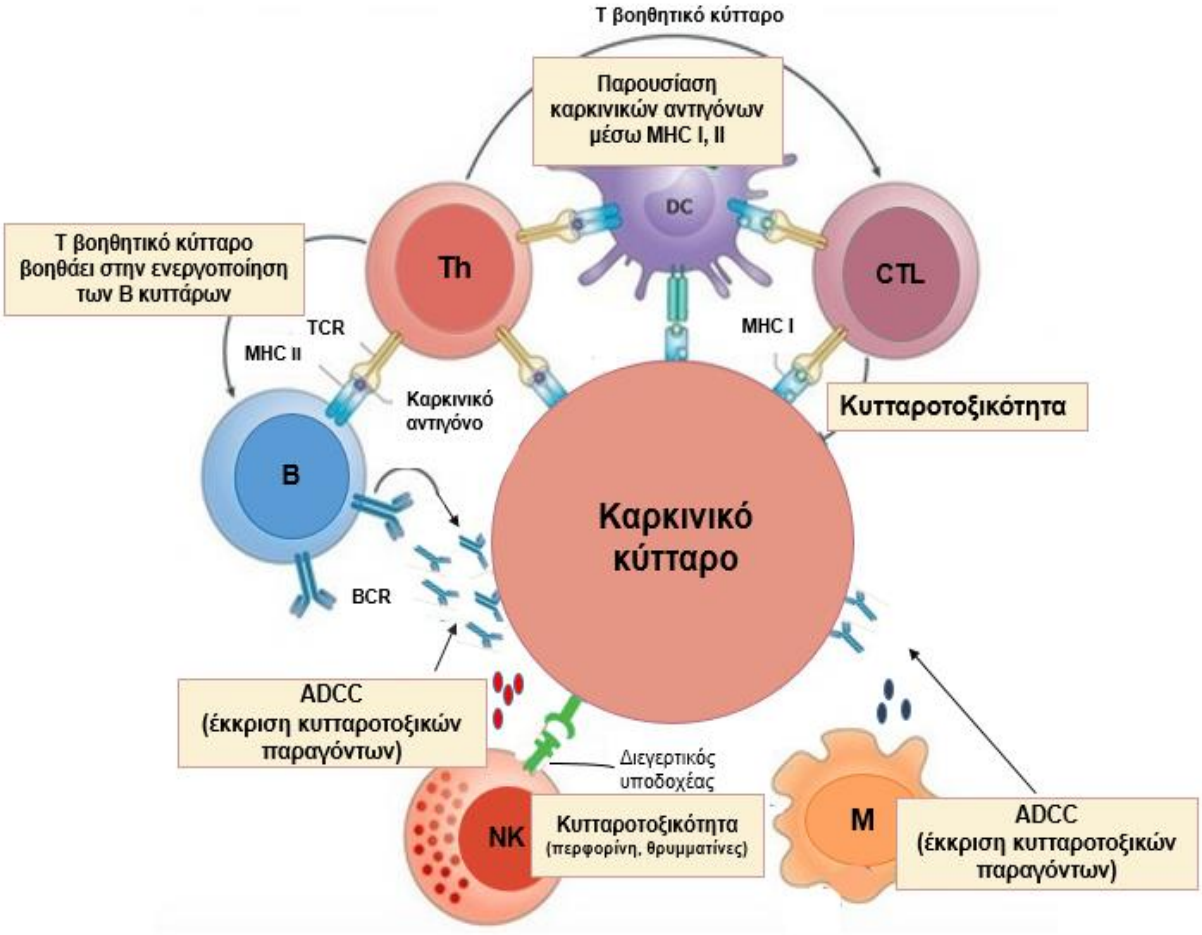
Α.4 Ο ρόλος του συμπληρώματος στον καρκίνο

❖ Α.4.1 Ο ρόλος του συμπληρώματος στην εξάλειψη του καρκίνου

Όλο και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να ανιχνεύει και να καταστρέφει τους όγκους χωρίς να προκαλείται τοξικότητα στους υγιείς γειτονικούς ιστούς. Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες μεταβάλλοντας τα μεμβρανικά τους αντιγόνα, με αποτέλεσμα να διαφέρουν από τα φυσιολογικά κύτταρα και έτσι να είναι δυνατή η ανίχνευση και ο έλεγχος της ανάπτυξής τους από την **έμφυτη** και **προσαρμοστική ανοσία** (Reis et al., 2018). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **ανοσοεπιτήρηση** και χωρίζεται στις εξής 3 φάσεις: την **εξάλειψη**, την **ισορροπία** και τη **διαφυγή**.

Αρχικά είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η κυτταρομεσολαβητική ανοσία αναλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της **εξάλειψης (elimination)** των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 13). Αναλυτικότερα τα δενδριτικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν, να επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν τα καρκινικά αντιγόνα μέσω των μορίων μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC I, II), επάγοντας έτσι την ενεργοποίηση των T_H βοηθητικών κυττάρων ($CD4^+$) και των ογκο-ειδικών κυτταροτοξικών Τ-κυττάρων (CTLs ή $CD8^+$). Στη συνέχεια οι υποδοχείς των ενεργοποιημένων CTLs αλληλεπιδρούν με συμπλέγματα επεξεργασμένων καρκινικών αντιγόνων-μορίων MHC τάξης I πάνω στα καρκινικά κύτταρα, δημιουργώντας ένα σύζευγμα CTL-καρκινικού κυττάρου. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η απελευθέρωση μονομερών περφορίνης και θρυμματινών (πρωτεάσες σερίνης), που οδηγούν το κύτταρο στόχο σε απόπτωση. Επίσης τα ενεργοποιημένα T_H βοηθητικά κύτταρα επάγουν την ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των Β-κυττάρων (αφού το T_H έχει αναγνωρίσει το σύμπλεγμα καρκινικού αντιγόνου-MHC II στη μεμβράνη του Β κυττάρου), με αποτέλεσμα την παραγωγή αντικαρκινικών αντισωμάτων. Ταυτόχρονα τα καρκινικά κύτταρα αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των NK κυττάρων επάγοντας ένα διεγερτικό σήμα που πυροδοτεί κυτταροτοξικό μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν των CTLs. Όταν τα καρκινικά κύτταρα έχουν μειωμένη έκφραση των εαυτών μορίων MHC τάξης I, υπερισχύει το διεγερτικό σήμα (ενώ στα εαυτά κύτταρα υπερισχύει το ανασταλτικό σήμα) και τελικά καταστρέφονται. Επιπλέον ανεξάρτητα από την έκφραση MHC I, τα NK κύτταρα μέσω των Fcγ υποδοχέων (FcγRs) τους

προσδένονται σε καρκινικά κύτταρα καλυμμένα με αντισώματα και τα καταστρέφουν μέσω της εξαρτώμενης από αντισώματα κυτταρομεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας (ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), κατά την οποία απελευθερώνονται κυτταροτοξικοί παράγοντες (π.χ. TNF-a) και λυτικά ένζυμα. Επίσης και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα μπορούν να καταστρέψουν κακοήθη κύτταρα μέσω της ADCC (Kindt et al., 2013) (Εικόνα 13).



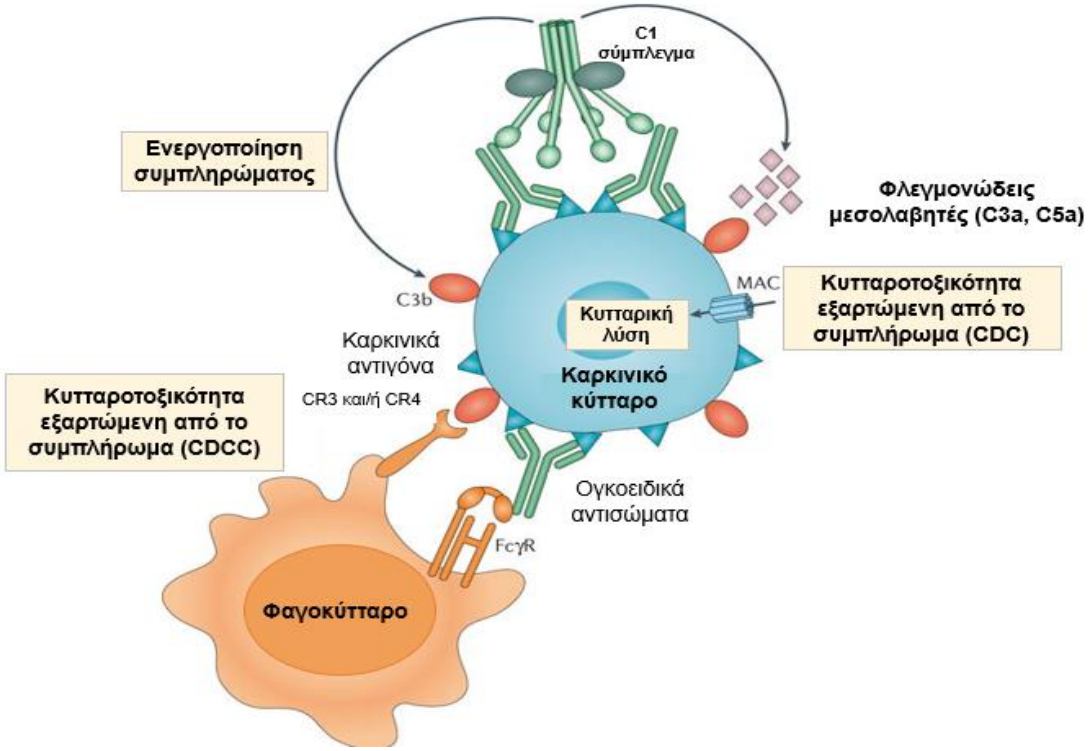
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της ανοσολογικής εξάλειψης των καρκινικών κυττάρων. Συμμετέχουν τόσο τα κύτταρα της προσαρμοστικής όσο και της έμφυτης ανοσίας (Walker and Yu, 2013).

Παράλληλα αξίζει να αναφερθεί ότι και το σύστημα του συμπληρώματος έχει σημαντικό ρόλο στην ανοσοεπιτήρηση και στην εξάλειψη των καρκινικών κύτταρων. Τα συστατικά του συμπληρώματος έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τα μη εαυτά στοιχεία, επομένως οι αλλαγές στην αντιγονική σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών καθιστούν τα καρκινικά κύτταρα έναν στόχο του συμπληρώματος (Pio et al., 2013). Για παράδειγμα τροποποιημένα γλυκολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες πιστεύεται ότι δρουν ως DAMPs και ενεργοποιούν το συμπλήρωμα (Reis et al., 2018). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι συστατικά του συμπληρώματος (π.χ. C3b, C5b-9) εναποτίθενται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει ενεργοποίηση του συμπληρώματος στον καρκινικό ιστό ή στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Markiewski and Lambris, 2009). Ταυτόχρονα σε βιολογικά υγρά (π.χ. ορό)

καρκινοπαθών ασθενών έχουν ανιχνευτεί αυξημένα επίπεδα ενεργοποιημένων θραυσμάτων του συμπληρώματος όπως τα C3a, C3c και C5a (Pio et al., 2014).

Δράση του συμπληρώματος: Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, παρουσία καρκινικών κυττάρων ενεργοποιούνται τα Β-λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα την έκκριση ογκοειδικών αντισωμάτων. Η δέσμευση των αντισωμάτων σε μεμβρανικά αντιγόνα του όγκου πυροδοτεί την ADCC, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Εικόνα 13) (Εικόνα 14), αλλά ταυτόχρονα πυροδοτεί και την κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (CDC: complement-dependent cytotoxicity) μέσω της κλασικής οδού ενεργοποίησης του συμπληρώματος καθώς και την κυτταρομεσολαβούμενη τοξικότητα υποβοηθούμενη από το συμπλήρωμα (CDCC: complement-dependent cell-mediated cytotoxicity),

Αναλυτικότερα το συμπλήρωμα συμμετέχει στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων, είτε μέσω συναρμολόγησης του MAC και απευθείας κυτταρικής λύσης (CDC), είτε μέσω στρατολόγησης μακροφάγων τα οποία μέσω των μεμβρανικών τους υποδοχέων του συμπληρώματος (CR1, CR3, CR4 ή CRIg) φαγοκυτταρώνουν καρκινικά κύτταρα επικαλυμμένα με οψωνίνες (C3b, iC3b και C3dg) (CDCC). Επιπλέον, η παραγωγή ισχυρών φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως τα C3a και C5a οδηγεί στη στρατολόγηση και ενεργοποίηση ανοσοκυττάρων με φαγοκυτταρικές ιδιότητες (ουδετερόφιλα και μακροφάγα). Ακόμα η αναφυλατοξίνη C5a ρυθμίζει εκ των προτέρων την ενεργοποίηση των υποδοχέων Fcγ (FcγRs) επί των φαγοκυτταρικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η φαγοκυττάρωση και η κυτταρική λύση των καρκινικών κυττάρων (Reis et al., 2018) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της λύσης των καρκινικών κυττάρων ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Η λύση των καρκινικών κυττάρων επιτυγχάνεται είτε μέσω του σχηματισμού του συμπλόκου MAC, είτε μέσω της CDCC. Παράλληλα η φαγοκυτταρική δράση των φαγοκυττάρων ενισχύεται από την ADCC (Reis et al., 2018).

Παράλληλα υπάρχουν ολοένα αυξανόμενες αποδείξεις ότι εκτός από την άμεση λύση των καρκινικών κυττάρων, το συμπλήρωμα μεσολαβεί σε μία πληθώρα ανοσορυθμιστικών μηχανισμών για την ανοσοεπιτήρηση και την ανοσία έναντι του όγκου. Θεμελιώδεις μέθοδοι όπως η επεξεργασία και η παρουσίαση των καρκινικών αντιγόνων από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), καθώς και η ενεργοποίηση, η επιβίωση των Β-λεμφοκυττάρων και η διαφοροποίηση των Τ βοηθητικών και κυτταροτοξικών κυττάρων επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση των μορίων τελεστών του συμπληρώματος με μοριακά μονοπάτια που ρυθμίζουν τις αποκρίσεις των Β και Τ κυττάρων. Για παράδειγμα, τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) εκφράζουν μια πληθώρα πρωτεϊνών και υποδοχέων του συμπληρώματος. Από αυτήν την άποψη, η ανεπάρκεια στο μόριο C3 έχει συσχετιστεί με μειωμένη ικανότητα παρουσίασης των αντιγόνων (χαμηλότερη έκφραση μορίων MHC τάξης II και εξασθενημένη συν-διέγερση μέσω CD80 και CD86), επιφέροντας αρνητικές επιπτώσεις στην ανοσία κατά του όγκου. Ακόμα, η απουσία διέγερσης των C3aR ή C5aR1 στη διεπιφάνεια APC-T έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει αρνητικά την επιβίωση των T_H κυττάρων και επίσης έχει συνδεθεί με την επαγωγή ενός ανοσοκατασταλτικού φαινοτύπου στα T_H κύτταρα, με τρόπο που θα μπορούσε να μειώσει τις αποκρίσεις των CTLs έναντι του όγκου (Reis et al., 2018). Εκτός από τα παραπάνω, η σημαντικότητα του συμπληρώματος στην καταπολέμηση του όγκου αντανακλάται στο γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την αποφυγή των βλαβών που προκαλούνται από το συμπλήρωμα. Ο πιο γνωστός μηχανισμός διαφυγής είναι η υπερέκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος (Kolev et al., 2011).

Ωστόσο από την άλλη πλευρά, μελέτες που δημοσιεύτηκαν τα τελευταία δέκα χρόνια υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου μπορεί να προωθεί την ανάπτυξη του όγκου διαιωνίζοντας την τοπική ανοσοκαταστολή των Τ κυττάρων και τη χρόνια φλεγμονή, επάγοντας την ανοσιακή διαφυγή του όγκου, την ογκογένεση και τη μετάσταση (Pio et al., 2013). Ο ρόλος του συμπληρώματος στην προώθηση της ανάπτυξης του όγκου αναλύεται στο υποκεφάλαιο Α.4.2.

Αν τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να περάσουν τη φάση εξάλειψης τότε εισέρχονται σε μία φάση **ισορροπίας**, κατά την οποία τα επιζώντα κύτταρα διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και αποκτούν επιπλέον γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες κάτω από την ανοσολογική πίεση. Αυτή η πίεση συμβάλλει στην θετική επιλογή εκείνων των καρκινικών κλώνων που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς **ανοσιακής διαφυγής** και ξεφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα (Pio et al., 2013).

❖ Α.4.2 Το συμπλήρωμα ευνοεί την ανάπτυξη του καρκίνου

Ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα καρκινικά κύτταρα:

Οι πληροφορίες σχετικά με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι συγκεχυμένες λόγω της μεγάλης ετερογένειας μεταξύ των διαφορετικών τύπων καρκίνου. Πιστεύεται, όπως ήδη έχει αναφερθεί, ότι το συμπλήρωμα ενεργοποιείται μέσω της κλασικής οδού, καθώς παράγονται IgM έναντι του όγκου. Μάλιστα σε ζωικά μοντέλα καρκίνου, έχει ανιχνευθεί το C1q, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεσμεύεται άμεσα (ανεξάρτητα παρουσίας αντισωμάτων) σε φωσφολιπίδια κυττάρων καρκινικής σειράς πνεύμονα (Markiewski et al., 2008). Παράλληλα ένα άλλο στοιχείο που υποστηρίζει την ενεργοποίηση της κλασικής οδού στον καρκίνο, είναι η ανίχνευση αυξημένων επιπέδων του θραύσματος C4d στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, καρκίνο του θυρεοειδούς, αστροκύτωμα, λέμφωμα και λευχαιμία (Ajona et al., 2013). Ακόμα σε διάφορους τύπους καρκίνου υπάρχουν ενδείξεις για ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω της εναλλακτικής και λεκτινικής οδού (Reis et al., 2018).

Ωστόσο το εύρημα μιας μελέτης ότι καρκινικές σειρές του πνεύμονα έχουν την ικανότητα να παράγουν C5a απουσία πηγής συστατικών συμπληρώματος (δηλ. ορού), έρχεται να περιπλέξει τα πράγματα υποδηλώνοντας ότι πέραν των παραδοσιακών οδών ενεργοποίησης του συμπληρώματος, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα μέσω **εξωγενών οδών ενεργοποίησης**, προς δικό τους όφελος (Corrales et al., 2012). Για παράδειγμα σε κάποια είδη καρκίνου έχει βρεθεί ότι πρωτεάσες σερίνης, που μοιάζουν με θρυψίνη, εκκρινόμενες από τα καρκινικά κύτταρα οδηγούν σε ενεργοποίηση των συστατικών C3 και C5 με απευθείας πέψη τους (Reis et al., 2018). Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι απαιτείται πιο συστηματική ανάλυση των οδών και των παραγόντων μέσω των οποίων τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, ώστε να εντοπιστούν νέοι διαγνωστικοί μοριακοί βιοδείκτες (Pio et al., 2013).

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος προωθεί την ογκογένεση:

Στη μελέτη του καρκίνου, οι ερευνητές είχαν επικεντρωθεί για πολλά χρόνια στον γνωστό ρόλο του συμπληρώματος, τη σήμανση και την εξάλειψη των κυττάρων του όγκου. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες αμφισβητούν αυτή τη συμβατική άποψη. Το γεγονός ότι ποντίκια με έλλειψη C3 ή C5aR εμφανίζουν μειωμένη ανάπτυξη όγκου σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, υποδεικνύει ότι συστατικά του συμπληρώματος μπορούν να προάγουν έναν κακοήθη φαινότυπο (Corrales et al., 2012). Στις μέρες μας είναι πλέον πολλές οι μελέτες που υποστηρίζουν ότι το συμπλήρωμα μπορεί να βοηθήσει στη **διαφυγή** των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση, να προάγει την **αγγειογένεση**, να ενεργοποιήσει **μιτογόνα μονοπάτια** σηματοδότησης, να ευνοεί τον **κυτταρικό πολλαπλασιασμό** και την αντίσταση στην απόπτωση και να συμμετέχει στην διείσδυση των καρκινικών κυττάρων σε περιφερικό υγιή ιστό και στη **μετανάστευση** τους (Εικόνα 15) (Rutkowski et al., 2010).

Συμμετοχή στη σχετιζόμενη με τον όγκο φλεγμονή: Ενώ οι οξείες αντιδράσεις φλεγμονής θεωρούνται μέρος της άμυνας έναντι του όγκου, η παρουσία **χρόνιας φλεγμονής** στο μικροπεριβάλλον του όγκου αυξάνει τον κίνδυνο νεοπλασματικού μετασχηματισμού και επάγει τη δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση (Shalapour and Karin, 2015). Έχει βρεθεί ότι παρουσία χρόνιας φλεγμονής επάγεται συσσώρευση κυτταροκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων, πρωτεασών μετασχηματισμού της εξωκυττάριας μήτρας και δραστικών μορφών οξυγόνου. Αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν την ομοιόσταση του ιστού και δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον που ευνοεί την ογκογένεση (de Visser et al., 2006). Ειδικότερα πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η απορυθμισμένη ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα καρκινικά κύτταρα και η αυξημένη συσσώρευση αναφυλατοξινών (C5a, C4a, C3a) στο περιβάλλον του όγκου, οδηγούν στη δημιουργία ενός φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος ευνοϊκό για την ανάπτυξη του όγκου (Εικόνα 15). Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι ποντίκια με έλλειψη C3 παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγή της φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6, η όποια έχει ένα ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων, όπως είναι η αναστολή της απόπτωσης και η αγγειογένεση (Pio et al., 2013).

Δημιουργία ανοσοκατασταλτικού περιβάλλοντος: Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν ανοσοκατασταλτικούς μηχανισμούς, ώστε να διαφύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα και να επιβιώσουν. Οι μηχανισμοί αυτοί συνοψίζονται στη μειωμένη έκφραση ή απουσία έκφρασης των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC, των καρκινικών αντιγόνων ή σημάτων κινδύνου καθώς και στην έκκριση ανοσοκατασταλτικών παραγόντων και κυτταροκινών, όπως ο VEGF, ο TGF-β, η IL-10, τα ROS και οι προσταγλανδίνες (Kim et al., 2006). Η ανοσοκαταστολή ενορχηστρώνεται από κύτταρα λεμφοειδούς ή μυελοειδούς προέλευσης, που επιστρατεύονται και ενεργοποιούνται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Σε αυτά τα κύτταρα περιλαμβάνονται ρυθμιστικά Τ κύτταρα, μακροφάγα (Tumor associated macrophages, TAMs), ρυθμιστικά/ανεργικά δενδριτικά κύτταρα και τα CD11b+ κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs: myeloid-derived suppressor cells) (Zou, 2005). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα MDSCs έχουν κεντρικό ρόλο στην ανοσοκαταστολή του όγκου, καθώς αναστέλλουν τη δράση των Τ κυττάρων ($CD4^+$, $CD8^+$) μέσω απελευθέρωσης NO, ROS και αγγειογόνων παραγόντων. Έχει βρεθεί λοιπόν ότι το C5a που παράγεται είτε από τις γνωστές οδούς του συμπληρώματος, είτε από εξωγενείς οδούς (π.χ. πρωτεάσες σερίνης), λειτουργεί ως **χημειοτακτικός παράγοντας** επάγοντας τη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση υποπληθυσμών των MDSCs στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Μάλιστα ο ρόλος του C5a στην ανοσοκατασταλτική λειτουργία των MDSCs έχει επιβεβαιωθεί και ex vivo, όταν απομονώθηκαν MDSCs από ποντίκια με έλλειψη C5aR, τα οποία δεν μπόρεσαν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των Τ-κυττάρων (Markiewski et al., 2008). Ακόμα έχει βρεθεί ότι το C5a ενισχύει την ογκογένεση καθώς επάγει αύξηση της

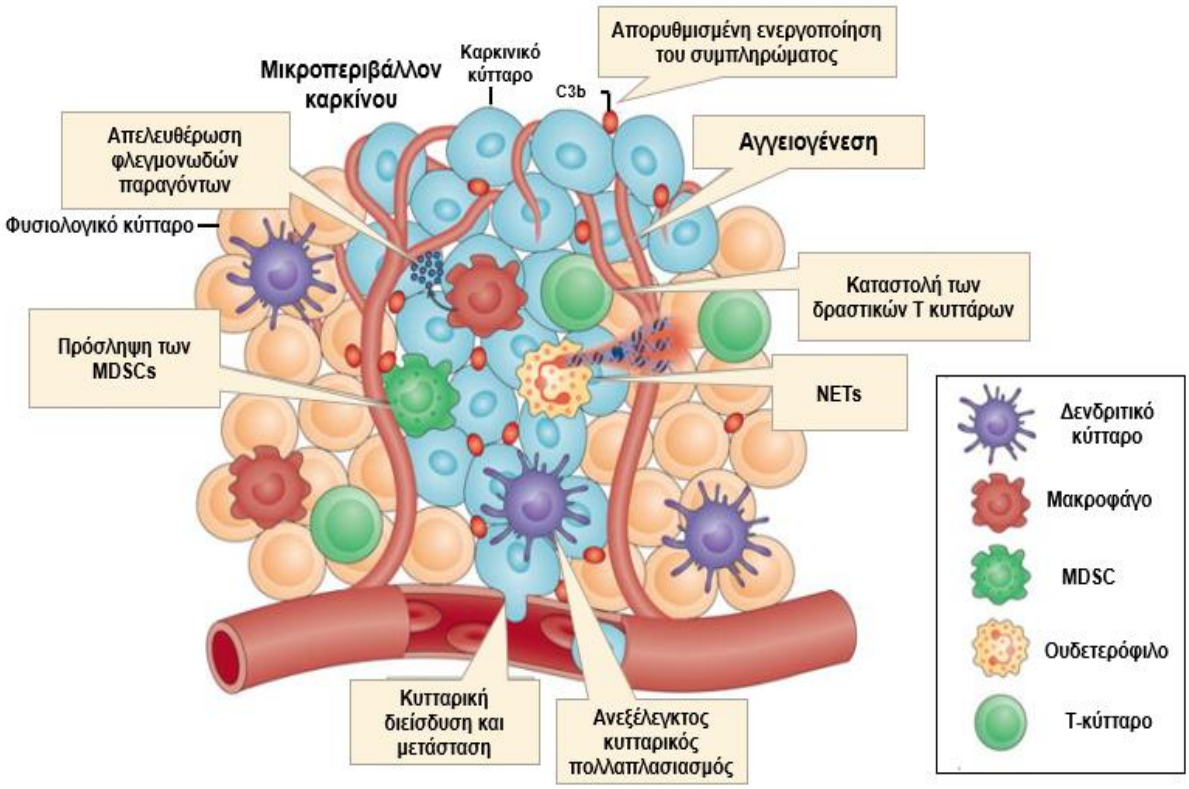
έκφρασης μορίων που καταστέλλουν τοπικά την ανοσολογική αντίδραση, όπως για παράδειγμα τα PDL1, TGF-β και IL-10, προωθεί τη διαφοροποίηση των ανοσοκατασταλτικών Tregs (Pio et al., 2014) και ρυθμίζει τις αποκρίσεις των $CD4^+$ T βοηθητικών κυττάρων εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, αλλάζοντας το προς ένα πιο ογκογόνο φαινότυπο (Reis et al., 2018).

Προώθηση τη αγγειογένεσης: Μελέτες υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι σημαντική στην προαγωγή της αγγειογένεσης κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου. Ειδικότερα η αναφυλατοξίνη C5a πυροδοτεί χημειοτακτικούς μηχανισμούς και δημιουργία σωληνοειδών δομών τόσο σε ομφαλικά όσο και σε μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Όπως συμβαίνει λοιπόν με τον TNF-a και τους λιποπολυσακχαρίτες, η απόκριση του ενδοθηλιακού κυττάρου στο C5a περιλαμβάνει την ενεργοποίηση γονιδίων που συμμετέχουν στην ενδοθηλιακή προσκόλληση, μετανάστευση και τελικά αγγειογένεση (Εικόνα 15) (Albrecht et al., 2004).

Επίδραση στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση: Διάφορα συστατικά του συμπληρώματος έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών στα καρκινικά κύτταρα, που επάγουν την παραγωγή αυξητικών παραγόντων ή κυτταροκινών ευνοώντας τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η σηματοδότηση μεσολαβούμενη από υποδοχείς αναφυλατοξινών C5aR1, C3aR είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ηπατικών κυττάρων και την ιστική αναγέννηση ύστερα από ηπατεκτομή, μια διαδικασία που σχετίζεται με έκκριση IL-6 και TNF-a και την ενεργοποίηση μονοπατιών παρόμοιων με αυτών την καρκινογένεσης (Markiewski et al., 2009). Ακόμα έχει βρεθεί ότι οι υποδοχείς C5aR1, C3aR που εκφράζονται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές επάγουν τη σηματοδότηση μέσω ενός αυτοκρινή μηχανισμού, ενεργοποιώντας τελικά το μονοπάτι PI3K-AKT που εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Cho et al., 2014). Επίσης η αλληλεπίδραση C3a/C3aR και C5a/C5aR1 ενεργοποιεί κινάσες της οικογένειας MAPK (mitogen-activated protein kinase) συμπεριλαμβανομένων των ERK και p38 (Rutkowski et al., 2010).

Επίδραση στη διείσδυση και μετάσταση: Μοντέλα ογκογένεσης διάφορων τύπων καρκίνου υποστηρίζουν ότι η απορυθμισμένη ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα καρκινικά κύτταρα και η δημιουργία χρόνιας φλεγμονής προάγουν τη διείσδυση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 15). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ένα από τα πιο σημαντικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στη μεταστατική διαδικασία είναι η δημιουργία μεσεγχυματικών κυττάρων από επιθηλιακά κύτταρα, γνωστή ως επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT), η οποία έχει αναφερθεί και παραπάνω. Για να πραγματοποιηθεί η EMT κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης απαιτείται σηματοδότηση μεταξύ του όγκου και των στρωματικών κυττάρων (ινοβλάστες, κοκκιοκύτταρα, μακροφάγα, μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα). Αυτά τα κύτταρα δημιουργούν ένα «στρώμα» το οποίο επάγει την απελευθέρωση σημάτων που προκαλούν

EMT. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από κύτταρα του όγκου, οδηγεί στη συσσώρευση αναφυλατοξινών, που μπορούν να στρατολογήσουν στρωματικά κύτταρα στο περιβάλλον του όγκου. Το επόμενο γεγονός της μεταστατικής διαδικασίας είναι η αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας από τα νεοπλασματικά κύτταρα, προκειμένου να διεισδύσουν και να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένες θέσεις. Πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι συστατικά του συμπληρώματος εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας (Rutkowski et al., 2010). Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η κυτταρική διείσδυση οφείλεται στην έκκριση μεταλλοπρωτεϊνασών από καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1, αφού έχει προηγηθεί η δέσμευση του C5a στον C5aR1 (Nitta et al., 2014). Συγκεκριμένα πιστεύεται ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος προκαλεί την απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνασών μήτρας, όπως οι MMP-2 και -9, πρωτεάσες, οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Bandyopadhyay and Rohrer, 2012).



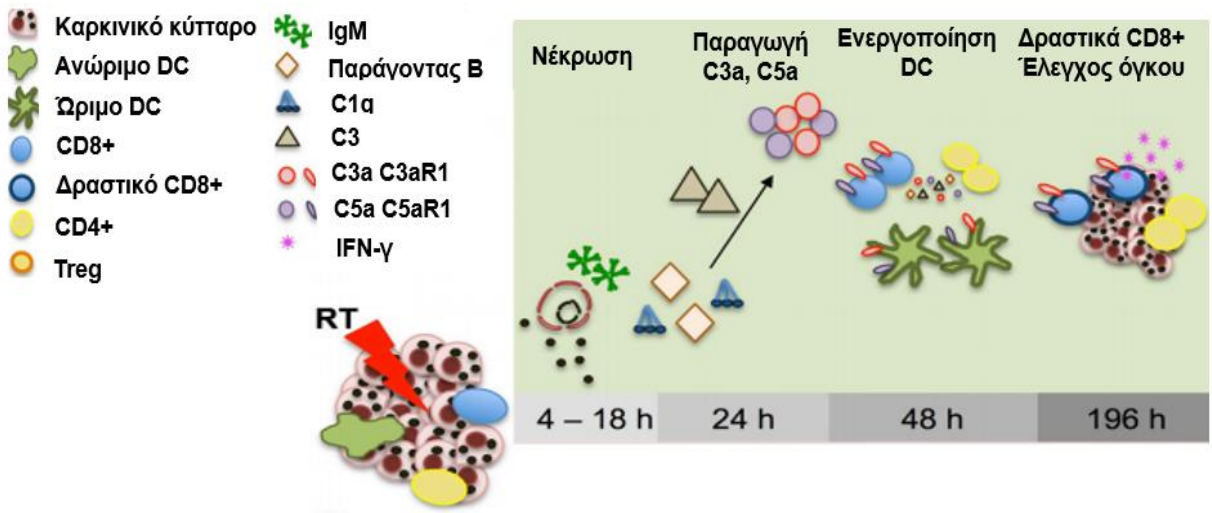
Εικόνα 15: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του συμπληρώματος, των καρκινικών κυττάρων και των ανοσοκυττάρων. Η τοπική απορυθμισμένη ενεργοποίηση του συμπληρώματος οδηγεί στην απελευθέρωση φλεγμονωδών παραγόντων τόσο από καρκινικά κύτταρα όσο και από μυελοειδή κύτταρα που διεισδύουν στον όγκο (π.χ. μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα). Η απελευθέρωση θραυσμάτων όπως το C5a επάγει την πρόσληψη MDSCs στον όγκο. Τα MDSCs καταστέλλουν τα CD8+ Τ κύτταρα. Τα προϊόντα ενεργοποίησης του συμπληρώματος προάγουν την αγγειογένεση ενισχύοντας την κυτταρική διείσδυση σε γειτονικούς ιστούς και τη μετάσταση του όγκου. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος έχει συνδεθεί με την επαγωγή συνθηκών πήξης σε κάποιους συμπαγείς όγκους, που καθοδηγείται από ουδετερόφιλα. Δηλαδή η ενεργοποίηση του συμπληρώματος πυροδοτεί τη συσσώρευση προ-ογκογονικών ουδετερόφιλων, ενισχύοντας τις αντιπηκτικές αντιδράσεις τους (π.χ. NETosis), δημιουργώντας έτσι μια σύνδεση μεταξύ της συσσωμάτωσης, της φλεγμονής και της εξέλιξης του όγκου (Reis et al., 2018).

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι το συμπλήρωμα έχει ένα **διττό ρόλο** στην ανοσολογία του καρκίνου, ο οποίος μάλιστα δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Ενώ λοιπόν οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις των ενεργοποιημένων μορίων συμπληρώματος μπορούν να προάγουν αντικαρκινικές ανοσολογικές απαντήσεις, η **χρόνια απορυθμισμένη ενεργοποίηση** του συμπληρώματος στο μικροπεριβάλλον του όγκου ευνοεί την ανάπτυξη του και τη μετάσταση. Για αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη και συνδυαστική χρήση αναστολέων του συμπληρώματος (π.χ. αναστολείς του C1 και C3, ανταγωνιστές του C5aR1) στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου μαζί με άλλα ανοσοτροποποιητικά μόρια (π.χ. αναστολείς PD-1/PD-L1), οι οποίοι στοχεύουν συγκεκριμένα στάδια των οδών του συμπληρώματος. Τέλος εξετάζεται το ενδεχόμενο οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες για τον καρκίνο καθώς έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα θραυσμάτων του C3 σε ορό ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου. Έτσι γίνονται προσπάθειες να αποσαφηνιστεί αν τα συστατικά του συμπληρώματος έχουν κλινική αξία ως βιοδείκτες και αν είναι αξιόπιστοι στη διάκριση των καλοηθών και κακοηθών όγκων (Reis et al., 2018).

❖ Α.4.3 Το συμπλήρωμα και η ακτινοβολία στον καρκίνο

Η ακτινοθεραπεία συγκαταλέγεται στο κλινικό θεραπευτικό πρωτόκολλο πολλών κακοηθειών και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με χειρουργική επέμβαση ή χημειοθεραπεία, ειδικά σε πολύ επιθετικούς όγκους με κακή πρόγνωση, όπως είναι το γλοιοβλάστωμα. Η άμεση θανάτωση των καρκινικών κυττάρων από την ακτινοθεραπεία οφείλεται σε μη αναστρέψιμες βλάβες του DNA, που προκαλούν κυτταρική γήρανση, μιτωτική καταστροφή, νέκρωση και/ή απόπτωση. Αν και ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να είναι φλεγμονώδης ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο ενεργοποιείται, κυρίως ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος οδηγεί σε παρατεταμένη και ισχυρή φλεγμονώδη απόκριση, με αυξημένη παραγωγή DAMPs και φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, που απελευθερώνονται από διεγερμένα φαγοκύτταρα. Δηλαδή η αναγνώριση και η απομάκρυνση των νεκρωτικών κυττάρων είναι μια ιδιαίτερα ανοσογόνος διαδικασία. Ταυτόχρονα οι έμμεσες αντικαρκινικές επιδράσεις της ακτινοθεραπείας εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς η ανοσοθεραπεία ρυθμίζει σε μεγάλο βαθμό την ανοσολογική απάντηση μέσω της επίδρασής της στην απελευθέρωση DAMPs. Ωστόσο οι μηχανισμοί με τους οποίους η ακτινοθεραπεία ρυθμίζει είτε μια έμφυτη, είτε μια προσαρμοστική αντικαρκινική ανοσολογική αντίδραση παραμένουν σε κάποιο βαθμό άγνωστοι και είναι πιθανό ότι λειτουργούν διαφορετικοί μηχανισμοί ανάλογα με τον **τύπο καρκίνου** και τη **δόση της ακτινοβολίας** (Elvington et al., 2014). Στη συγκεκριμένη εργασία θα εστιάσουμε στο διττό ρόλο του συμπληρώματος ανάλογα το πρωτόκολλο ακτινοθεραπείας.

Από τη μία πλευρά, υπάρχουν δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν μια σχέση μεταξύ της προκαλούμενης από ακτινοβολία βλάβης των καρκινικών κυττάρων, του φλεγμονώδους περιβάλλοντος που δημιουργείται από τον όγκο και της ενίσχυσης της αντικαρκινικής ανοσίας (Gupta et al., 2012). Μάλιστα σε μία μελέτη που εστιάζει σε πειραματικά μοντέλα μελανώματος, υποστηρίζεται ότι το αποτελεσματικότερο πρωτόκολλο ακτινοθεραπείας είναι η χορήγηση μιας **υψηλής δόσης ακτινοβολίας**, διότι η ακτινοθεραπεία που δίνεται σε επαναλαμβανόμενες δόσεις (κλάσματα) επάγει τη δημιουργία χρόνιας φλεγμονής, η οποία είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει τη δράση της προσαρμοστικής ανοσίας. Συγκεκριμένα, τα δεδομένα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι οι παράγοντες που απελευθερώνονται από νεκρωτικά κύτταρα του όγκου κατά την ακτινοθεραπεία είναι υπεύθυνοι για τη τοπική **ενεργοποίηση του συμπληρώματος**. Αναλυτικότερα έχει βρεθεί ότι τα ογκο-σχετιζόμενα Τ κύτταρα, τα DCs, και άλλα $CD45^+$ κύτταρα, καθώς και τα κύτταρα του όγκου μπορεί να αποτελούν πηγή συστατικών του συμπληρώματος, κυρίως των αναφυλατοξινών και των υποδοχέων τους ύστερα από την επίδραση ακτινοθεραπείας. Επίσης είναι λογικό να θεωρηθεί ότι και το ογκο-σχετιζόμενο στρώμα μπορεί να συμβάλει στην παραγωγή συμπληρώματος κατά την ακτινοθεραπεία. Ακόμα υποστηρίζεται ότι τα ογκο-σχετιζόμενα δενδριτικά κύτταρα απελευθερώνουν παράγοντες του συμπληρώματος και ρυθμίζουν την έκφραση των υποδοχέων C5aR1, C3aR κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας, γεγονός το οποίο φαίνεται να είναι σημαντικό, για την επαγόμενη από την ακτινοβολία, ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (Surace et al., 2015). Μάλιστα έχει αποδειχθεί in vitro ότι οι αναφυλατοξίνες μπορούν να προκαλέσουν άμεσα την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και ότι η αύξηση της έκφρασης του C3 προηγείται της έκφρασης IL-1, IL-2, και IL-23, (Strainic et al., 2008). Η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (DCs) είναι ύψιστης σημασίας για την ενεργοποίηση και διατήρηση των ογκοειδικών $CD8^+$ Τ κυττάρων, τα οποία καταστρέφουν στους ακτινοβολημένους όγκους (Εικόνα 16) (Surace et al., 2015).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων υψηλής δόσης ακτινοθεραπείας. Ύστερα από την ακτινοβολία προκαλείται νέκρωση, απελευθέρωση C3a και C5a, με αποτέλεσμα την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και την ενεργοποίηση των δραστικών CD8+ Τ κυττάρων (Surace et al., 2015).

Αντίθετα σε αυτήν την άποψη είναι τα ευρήματα μιας μελέτης, η οποία υποστηρίζει ότι η **αναστολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος** υπό την επίδραση τοπικής κλασματοποιημένης ακτινοθεραπείας, βελτιώνει το θεραπευτικό αποτέλεσμα σε μοντέλο λεμφώματος (ακτινοευαίσθητος τύπος καρκίνου). Η συγκεκριμένη μελέτη βασίστηκε σε στοιχεία που δείχνουν ότι τα αποπτωτικά κύτταρα που δεν έχουν απομακρυνθεί είναι ανοσογονικά και επάγουν ανοσολογικές απαντήσεις. Έτσι σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι η αναστολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, σε συνδυασμό με εντοπισμένη ακτινοθεραπεία, ενισχύει τη φλεγμονή στο μικροπεριβάλλον του όγκου, οδηγεί σε συσσώρευση ουδετερόφιλων και προάγει μια συστηματική αντικαρκινική ανοσολογική αντίδραση. Συγκεκριμένα, η αναστολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος (έλλειψη του C3 και των ενεργοποιημένων θραυσμάτων του) οδηγεί σε μειωμένη οψωνοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων και άρα μειωμένη φαγοκυττάρωσή τους (Elvington et al., 2014).

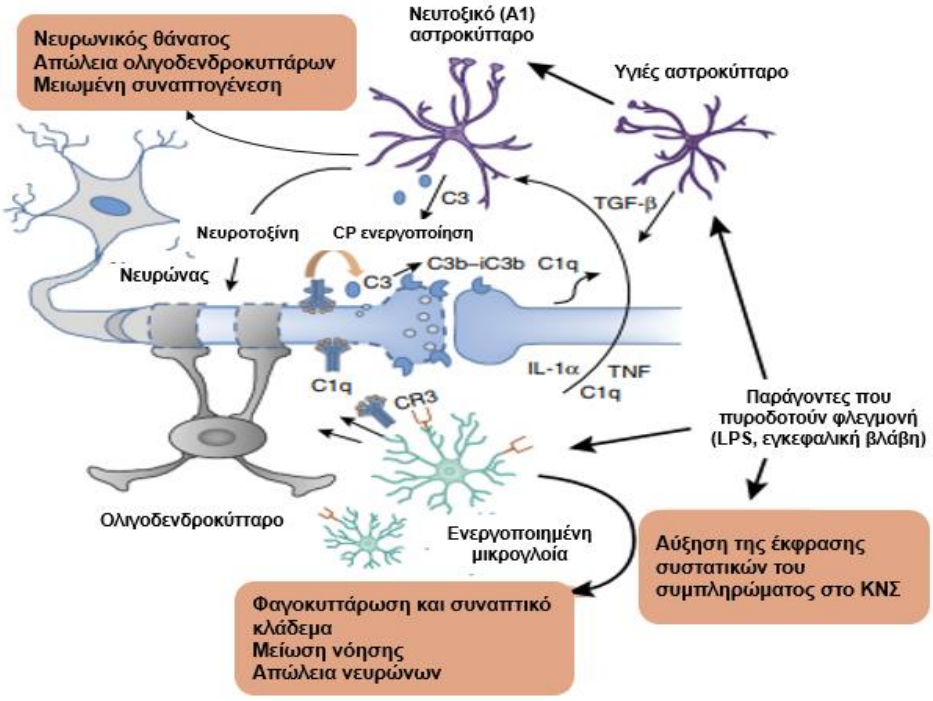
Με βάση τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι οι δράσεις του συμπληρώματος σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία μπορεί να διαφοροποιούνται ανάλογα με το θεραπευτικό πρωτόκολλο, τη **δόση ακτινοβολίας** και **τον καρκινικό τύπο**. Επομένως είναι πολύ σημαντικό να κατανοηθεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης του συμπληρώματος σε συνδυασμό με την ακτινοβολία, ειδικά σε καρκίνους που είναι ακτινοανθεκτικοί, όπως το γλοιοβλάστωμα.

❖ Α.4.4 Ενεργοποίηση του συμπληρώματος στο GBM

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός περιορίζει την εισροή κυττάρων και συστατικών του αίματος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η ανοσολογική επιτήρηση και η διάκριση εαυτών και μη εαυτών αντιγόνων επιτελείται από κύτταρα με ανοσολογικές ιδιότητες, όπως είναι τα αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν σε θέσεις φλεγμονής στο ΚΝΣ, συμπεριφέρονται σαν φαγοκύτταρα ή αντιγοπαρουσιαστικά, εκκρίνουν κυτταροκίνες και χημειοκίνες (Sehgal and Berger, 2000). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα γλοίας αλλά και οι νευρώνες μπορούν να παράγουν τοπικά παράγοντες του συμπληρώματος και ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Veerhuis et al., 1996). Ο καταρράκτης του συμπληρώματος είναι ο κύριος υπεύθυνος για την απομάκρυνση μικροοργανισμών και γηρασμένων ή μεταλλαγμένων κυττάρων στον υγιή εγκέφαλο.

Παράλληλα η ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι εμφανής σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι οι εγκεφαλικές βλάβες (λοίμωξη, τραύμα, εγκεφαλικό επεισόδιο) και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με χρόνιες φλεγμονώδεις επιπλοκές (Veerhuis et al., 2011). Μάλιστα έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος σε νευροεκφυλιστικές καταστάσεις εμπλέκεται στην διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των νευροφλεγμονωδών μικρογλοιακών κυττάρων και των αντιδραστικών αστροκυττάρων, που ευθύνονται για την ιστική

καταστροφή (Εικόνα 17) (Liddelow et al., 2017). Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα του ρόλου του συμπληρώματος σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι η νόσος Alzheimer, που χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση συστατικών του συμπληρώματος επί των αμυλοειδικών πλακών, καθώς και από την ισχυρή ενεργοποίηση των αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων (Heppner et al., 2015). Αναλυτικότερα, ενώ τα συστατικά του συμπληρώματος C1q και C3 έχουν συσχετιστεί με τη φαγοκυττάρωση και την απομάκρυνση των ινιδίων Αβ αμυλοειδούς, τα C5a και MAC έχουν συνδεθεί με **φλεγμονώδη** νευρωνική βλάβη (Brennan et al., 2016). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η απώλεια νευρικών συνάψεων, ένα πρώιμο συμβάν στην παθολογία του Alzheimer, που προηγείται της απόθεσης αμυλοειδών πλακών, απαιτεί συντονισμένη ενεργοποίηση της κλασικής οδού και της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των μικρογλοιακών κυττάρων που εκφράζουν το CR3 (Hong et al., 2016).



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση μιας επαναλαμβανόμενης σχέσης συμπληρώματος-μικρογλοίας που προωθεί τους νευροεκφυλιστικούς φαινοτύπους στο ΚΝΣ. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα διαφοροποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και αστροκυττάρων προς φλεγμονώδεις φαινοτύπους με αποτέλεσμα την καταστροφή των νευρώνων (Hajishengallis et al., 2017).

Εκτός από τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τα συστατικά του συμπληρώματος εμπλέκονται και στη παθογένεση όγκων του εγκεφάλου. Ειδικότερα, η ανοσοϊστοχημική χρώση ιστού **γλοιοβλαστώματος** έχει αποκαλύψει αυξημένα επίπεδα C1q τόσο στην περιοχή των καρκινικών κυττάρων όσο και των νεκρωτικών υπολειμμάτων. Η δέσμευση του C1q σε νεκρωτικά ή αποπτωτικά καρκινικά κύτταρα επάγει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και ως εκ τούτου την εναπόθεση των οψωνίνων οδηγώντας στη φαγοκυττάρωση τους. Ωστόσο η εναπόθεση C1q σε ιστό όγκου, μπορεί να ακολουθηθεί από απόθεση του παράγοντα H, μια διαλυτή ρυθμιστική πρωτεΐνη, η οποία αναστέλλει τη μετατροπή της AP C3 κονβερτάσης και

λειτουργεί ως συμπαράγοντας του παράγοντα I, ο οποίος ενισχύει την αποικοδόμηση των C3b και C4b. Έτσι λοιπόν πιστεύεται ότι η παρουσία του C1q θα μπορούσε να είναι ευεργετική ή επιζήμια όσον αφορά την ανάπτυξη του όγκου και δεν έχει κατανοηθεί πλήρως (Bouwens et al., 2015). Ακόμα σε άλλες μελέτες έχει βρεθεί εναπόθεση του παράγοντα B σε ιστό GBM, υποδηλώνοντας ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος στο γλοιοβλάστωμα. Η εναπόθεση του παράγοντα B πιστεύεται ότι μπορεί να συμβάλει στην αποικοδόμηση της ECM και επομένως να προωθεί την εισβολή και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (Andrades et al., 1996). Επιπλέον σε ιστό γλοιοβλαστώματος έχουν βρεθεί και αυξημένα επίπεδα C3 και C5b-9, τα οποία είναι ενδεικτικά της τοπικής ενεργοποίησης του συμπληρώματος στο μικροπεριβάλλον του γλοιοβλαστώματος (Bouwens et al., 2015).

Παράλληλα, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω (υποκεφάλαιο Α.4.2) η απελευθέρωση των C3a και C5a λόγω της τοπικής ενεργοποίησης του συμπληρώματος στο μικροπεριβάλλον του όγκου και η πρόσδεσή τους στους υποδοχείς τους C3aR και C5aR1 ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, που ευνοούν την καρκινογένεση. Αξίζει να αναφερθεί λοιπόν, ότι διαφορές μελέτες έχουν δείξει πως οι υποδοχείς C5aR1 και C3aR εκφράζονται στα αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου (in vivo και in vitro), καθώς και ότι η έκφραση τους αυξάνεται παρουσία φλεγμονωδών συνθηκών (O'Barr et al., 2001). Επίσης έχει βρεθεί ότι ο C5aR1 εκφράζεται σε καρκινικές σειρές αστροκυτώματος (T98G, U118MG) (Sayah et al., 1999). Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με το διφορούμενο ρόλο του συμπληρώματος υπό την επίδραση ακτινοβολίας και την ακτινοανθεκτικότητα του GBM, οδήγησαν τη παρούσα ερευνητική εργασία στη μελέτη της δράσης συστατικών του συμπληρώματος (C3, C5a, C5aR1) στη καρκινική σειρά γλοιοβλαστώματος U87MG σε συνδυασμό με την επίδραση ακτινοβολίας.

❖ Α.4.5 Ενεργοποίηση του συμπληρώματος στο NB

Αρχικά είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα **νευρικά προγονικά κύτταρα** (NPC) του εγκεφάλου εκφράζουν τον υποδοχέα C3aR. Η πρόσδεση του C3a στον υποδοχέα του, επάγει **μεταναστευτική** δραστηριότητα στους νευρωνικούς προγόνους, υποδηλώνοντας έναν πιθανό ρόλο του C3a στις αποκρίσεις των βλαστικών κυττάρων παρουσία νευρωνικής βλάβης σε εγκεφάλους ενηλίκων (Shinjyo et al., 2009). Το συγκεκριμένο εύρημα υποστηρίζεται και με in vivo μελέτες που αποδεικνύουν ότι η διακοπή της σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα C3aR έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της βασικής νευρογενέσης σε ενήλικους εγκεφάλους (Rahpeymai et al., 2006). Σε πιο πρόσφατη μελέτη έχει βρεθεί ότι ο υποδοχέας C3aR εκφράζεται και στα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (NCCs), αρχέγονα κύτταρα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Ταυτόχρονα στη συγκεκριμένη μελέτη υποστηρίζεται ότι η αλληλεπίδραση C3a/C3aR ελέγχει την αμοιβαία έλξη των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας

κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους, αποκαλύπτοντας έναν απροσδόκητο ρόλο των πρωτεϊνών του συμπληρώματος στην ανάπτυξη των σπονδυλωτών. Μάλιστα η απώλεια της αμοιβαίας έλξης διακόπτει τις συλλογικές και συντονισμένες κινήσεις αυτών των κυττάρων (Carmona-Fontaine et al., 2011).

Σε μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης, επάγεται και η έκφραση του υποδοχέα C5aR1 στα NPCs, τα οποία εδράζονται στον κορυφαίο πόλο της κοιλιακής ζώνης. Σε αυτά τα αναπτυξιακά στάδια ο υποδοχέας λειτουργεί ως ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων με τρόπο εξαρτώμενο από την πολικότητα (Coulthard and Woodruff, 2015). Με βάση τα παραπάνω ευρήματα πιστεύεται ότι υπάρχει ενεργοποίηση του συμπληρώματος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και άρα απελευθέρωση των C3a, και C5a, τα οποία παρέχουν μια ομοιοστατική ισορροπία που καθοδηγεί τους νευρωνικούς πληθυσμούς και τις αναπτυξιακές διεργασίες.

Εκτός όμως από τη συμμετοχή του συμπληρώματος στις αναπτυξιακές διεργασίες πιστεύεται ότι πιθανά εμπλέκεται και στη παθογένεση του νευροβλαστώματος, όγκος του ΣΝΣ με κύτταρα προέλευσης τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Ειδικότερα, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα C3 και C4 σε δείγματα ορού παιδιών με νευροβλάστωμα (Carli et al., 1979). Επίσης ένα άλλο σημαντικό εύρημα είναι ότι το C5a προάγει τον πολλαπλασιασμό αδιαφοροποίητων ανθρώπινων κυττάρων νευροβλαστώματος. Η επαγωγή του πολλαπλασιασμού λόγω της αλληλεπίδρασης C5a/C5aR πιστεύεται ότι προκαλείται από ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και NF-kB (O'Barr et al., 2001). Τα ευρήματα αυτά έστρεψαν το ενδιαφέρον της παρούσας εργασίας στη μελέτη των επιδράσεων του C5a και του υποδοχέα του στη καρκινική σειρά νευροβλαστώματος SK-N-SH.

Συνοψίζοντας λοιπόν πιστεύεται ότι το σύστημα του συμπληρώματος εμπλέκεται στην παθογένεση διάφορων τύπων καρκίνου, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η δράση του. Έτσι η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώθηκε στη μελέτη του ρόλου του συμπληρώματος στην παθογένεση του γλοιοβλαστώματος και του νευροβλαστώματος δυο πολύ επιθετικών νεοπλασιών νευρικής προέλευσης σε συνδυασμό με την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου συστατικών του συμπληρώματος σε καρκινικές κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος και νευροβλαστώματος υπό συνδυαστική επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Μεθοδολογική προσέγγιση:

- **Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος και νευροβλαστώματος ύστερα από επίδραση ακτινοβολίας.**

- **Ανίχνευση με ανοσοενζυμική μέθοδο (Elisa) των ολικών και ενεργοποιημένων επιπέδων του C3 σε υπερκείμενα από μέσο καλλιέργειας της καρκινικής κυτταρικής σειράς U87MG σε συνδυασμό με επίδραση ακτινοβολίας.**

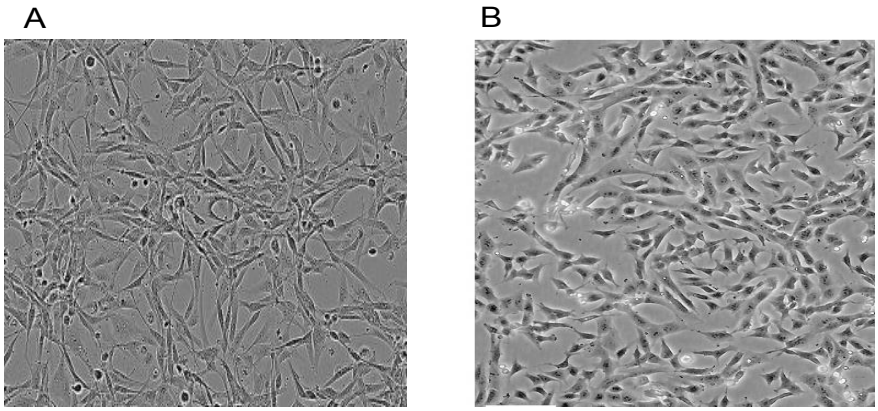
- **Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (MTT) στην καρκινική κυτταρική σειρά SK-N-SH ύστερα από επίδραση της αναφυλατοξίνης C5a.**

- **Ανίχνευση πιθανών οξειδωτικών αποκρίσεων μέσω αύξησης των ενδοκυττάριων επιπέδων ROS στην καρκινική κυτταρική σειρά SK-N-SH ύστερα από επίδραση της αναφυλατοξίνης C5a.**

Κεφάλαιο Β: Υλικά και Μέθοδοι

Β.1 Καλλιέργεια καρκινικών σειρών γλοιοβλαστώματος U87MG και νευροβλαστώματος SK-N-SH in vitro

Στη παρούσα εργασία για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιούνται δυο καρκινικές κυτταρικές σειρές νευρικής προέλευσης της ATCC, η κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος U87MG (γλοιοβλάστωμα-αστροκύτωμα βαθμού IV κατά WHO) (Εικόνα 18A) και η κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SK-N-SH (μεταστατικός καρκίνος προερχόμενος από το μυελό των οστών) (Εικόνα 18B). Τα κύτταρα καλλιεργούνται προσκολλώμενα σε τεχνητό υπόστρωμα.



Εικόνα 18: Α) Καλλιέργεια καρκινικής κυτταρικής σειράς γλοιοβλαστώματος U87MG (www.phe-culturecollections.org.uk). Β) Καλλιέργεια καρκινικής κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος SK-N-SH (www.atcc.org).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την διεξαγωγή των κυτταροκαλλιεργειών απαιτούνται ασηπτικές συνθήκες και πολύ προσεκτικοί χειρισμοί στα διαλύματα και υλικά προκειμένου να αποφευχθεί η ύπαρξη μολύνσεων στην καλλιέργεια. Για αυτόν το λόγο όλοι οι χειρισμοί των καλλιεργειών πρέπει να πραγματοποιούνται σε εργαστήριο που διαθέτει θάλαμο νηματικής ροής. Επιπλέον πρέπει να χρησιμοποιούνται στείρα υλικά και αποστειρωμένα διαλύματα ώστε να μειωθεί η πιθανότητα δημιουργίας μολύνσεων.

❖ Β.1.1 Απόψυξη κυττάρων από το υγρό άζωτο

Η απόψυξη κυττάρων από το υγρό άζωτο γίνεται με σκοπό να καλλιεργηθούν τα κύτταρα μέχρις ότου φτάσουν στην επιθυμητή συγκέντρωση κατάλληλη για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Η διαδικασία απόψυξης δημιουργεί συνθήκες στρες στα παγωμένα κύτταρα και για αυτό απαιτείται η εφαρμογή σωστής και ταχείας τεχνικής, ώστε να αυξηθεί το ποσοστό των κυττάρων που επιβιώνει από αυτήν τη διαδικασία.

Υλικά και Όργανα:

- Φλάσκες πολυστυρενίου 25 cm^2 με φίλτρο (μικρές φλάσκες) (Greiner)
- Στείρα σιφώνια (πιπέτες) μιας χρήσης των 2 ml και 5 ml (Greiner)
- Θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) w/o Ca^{2+}, Mg^{2+} (Biowest)

- Αντιβιοτικά Penicillin/Streptomycin (Biowest)
- Βόειος εμβρυϊκός ορός- Fetal bovine Serum (GIBCO)
- L-Γλουταμίνη 200 mM (Sigma)
- Αποστειρωμένα μπουκάλια φύλαξης θρεπτικού μέσου
- Υδατόλουτρο
- Πιπέτα καλλιεργειών (Pipettor)
- Επωαστικός κλίβανος (ρυθμίσεις θ=37 ºC, CO_2 =5%) (Smartcell-Healforce)
- Θάλαμος νηματικής ροής (HOOD)

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι για να χρησιμοποιηθεί ο ορός πρέπει να έχει προηγηθεί θερμική αδρανοποίησή του στους **56 ºC** για **1h**. Η διαδικασία αυτή εξουδετερώνει τη δράση πρωτεϊνών του συμπληρώματος που μπορεί να εμπεριέχονται στον ορό καθώς και ενζύμων, όπως για παράδειγμα πρωτεασών που θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν μόρια του συμπληρώματος και να επηρεάσουν τα επόμενα πειράματα.

Πειραματικό πρωτόκολλο:

Αρχικά γίνεται ρύθμιση του υδατόλουτρου στους 37 °C. Ακολουθεί άνοιγμα του DMEM μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής (HOOD) και προσθήκη αντιβιοτικών 1% (Penicillin/Streptomycin). Ύστερα πραγματοποιείται παρασκευή συγκεκριμένης ποσότητας θρεπτικού μέσου περιεκτικότητας 10% ορού (FBS) και 1% γλουταμίνης σε αποστειρωμένο μπουκάλι. Έπειτα προστίθεται θρεπτικό υλικό σε μία μικρή φλάσκα και αφήνεται να θερμανθεί στον επωαστικό κλίβανο.

Τα κύτταρα φυλάσσονται στο υγρό άζωτο σε ειδικά κρυοφιαλίδια, με μείγμα θρεπτικού μέσου με DMSO (βλ. υποκεφάλαιο Β.1.4). Επομένως μετά την απομάκρυνση των κρυοφιαλιδίων από το υγρό άζωτο, τα κρυοφιαλίδια εμβαπτίζονται απευθείας στο υδατόλουτρο μέχρις ότου τα κύτταρα επανακτήσουν τη μορφή υγρού εναιωρήματος. Κατόπιν με αποστειρωμένο σιφώνιο μεταφέρεται το αποψυγμένο εναιώρημα των κυττάρων σε μικρή φλάσκα που περιέχει προθερμασμένο θρεπτικό μέσο. Η φλάσκα τοποθετείται οριζοντίως στον επωαστικό κλίβανο και αφήνεται για επώαση για μια μέρα προκειμένου τα κύτταρα να προσκολληθούν στην επιφάνεια της φλάσκας.

Την επόμενη μέρα ελέγχεται η βιωσιμότητα των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Τα νεκρά κύτταρα δεν προσκολλώνται και εμφανίζονται ως αιωρούμενα στο θρεπτικό μέσο. Επομένως απορρίπτεται το θρεπτικό μέσο με τα νεκρά κύτταρα, γίνεται 2 φορές πλύση των κυττάρων με αποστειρωμένο PBS και προστίθεται νέο θρεπτικό μέσο με 10% FBS. Τα κύτταρα αφήνονται για επώαση στον κλίβανο μέχρι τα κύτταρα να καλύψουν σε σημαντικό βαθμό την επιφάνεια της φλάσκας.

❖ Β.1.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Με τον όρο ανακαλλιέργεια των κυττάρων εννοούμε την απομάκρυνση των κυττάρων από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας και τη μεταφορά τους σε νέο θρεπτικό μέσο, διαδικασία που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξή τους. Γενικά η ανάπτυξη των κυττάρων στην καλλιέργεια, μετά τη σπορά τους, προχωρά από τη φάση υστέρησης (ή λανθάνουσα) στην λογαριθμική φάση, όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά. Όταν τα κύτταρα καλύψουν όλο το διαθέσιμο υπόστρωμα και δεν αφήνουν χώρο για επέκταση ο πολλαπλασιασμός τους μειώνεται σημαντικά ή σταματά πλήρως (contact inhibition) (Stoker and Rubin, 1967). Ταυτόχρονα σε καλλιέργεια με υψηλή πυκνότητα κυττάρων παρατηρείται, εκτός από έλλειψη υποστρώματος, και πτώση του pH του θρεπτικού μέσου. Αυτή η μείωση του pH συνήθως υποδεικνύει συσσώρευση γαλακτικού οξέος, ένα παραπροϊόν του κυτταρικού μεταβολισμού, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα. Έτσι για να διατηρηθούν τα κύτταρα σε βέλτιστη πυκνότητα και να επιτευχθεί περαιτέρω ο πολλαπλασιασμός τους, η καλλιέργεια πρέπει να διαιρεθεί και να μεταφερθεί σε φρέσκο θρεπτικό μέσο.

Επομένως, η ανακαλλιέργεια πρέπει να γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, συνήθως όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει την επιφάνεια του υποστρώματος σε ποσοστό 70-80%, ή όταν βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους. Συνήθως λοιπόν τα κύτταρα αραιώνονται είτε μεταφερόμενα σε μεγαλύτερη φλάσκα, μία ή περισσότερες, είτε μεταφέροντας σε νέα φλάσκα μέρος μόνο των κυττάρων. Η διαδικασία που θα ακολουθηθεί εξαρτάται πάντα από τον σκοπό της καλλιέργειάς τους.

Η αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα είναι δυνατή με μηχανικό τρόπο ή με ενζυμική δράση, ανάλογα την κυτταρική σειρά. Στη παρούσα εργασία για την αποκόλληση των κυττάρων χρησιμοποιείται διάλυμα θρυψίνης, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με το στερεό τους υπόστρωμα. Ειδικότερα, η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, το οποίο καταλύει την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών των επιφανειακών μορίων προσκόλλησης των κυττάρων. Αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια είναι απαραίτητα προκειμένου τα κύτταρα να μένουν προσκολλημένα στην ειδική πλαστική επιφάνεια πολυστυρενίου της φλάσκας. Παράλληλα, το EDTA είναι ένας χηλικός παράγοντας που δεσμεύει τα ιόντα Ca^{2+}/Mg^{2+}. Αυτά τα ιόντα απαιτούνται προκειμένου οι ιντεγκρίνες της επιφάνειας των κυττάρων, να διατηρούν την ικανότητα προσκόλλησής τους στο υπόστρωμα μέσω δημιουργίας χηλικών συμπλόκων. Επομένως αφού αυτά τα ιόντα δεσμεύονται από το EDTA, τα κύτταρα τελικά αποκολλώνται πιο γρήγορα από την επιφάνεια της φλάσκας. Έτσι κατά την ανακαλλιέργεια προστίθεται στη φλάσκα συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος Trypsin-EDTA ανάλογα το μέγεθος της φλάσκας στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα, προκειμένου να αποκολληθούν.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το FBS του θρεπτικού μέσου στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα περιέχει αναστολείς πρωτεασών, όπως είναι η α1-αντιθρυψίνη και η

α2-μακροσφαιρίνη. Οι αναστολείς πρωτεασών αναστέλλουν την πρωτεολυτική δράση της θρυψίνης (van der Valk et al., 2010). Για αυτόν το λόγο πρέπει να πραγματοποιείται επαρκής πλύση των κυττάρων με PBS, πριν από την προσθήκη θρυψίνης, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ορού, τα οποία μπορεί να παρεμποδίσουν τη δράση του ενζύμου.

Υλικά και Όργανα:

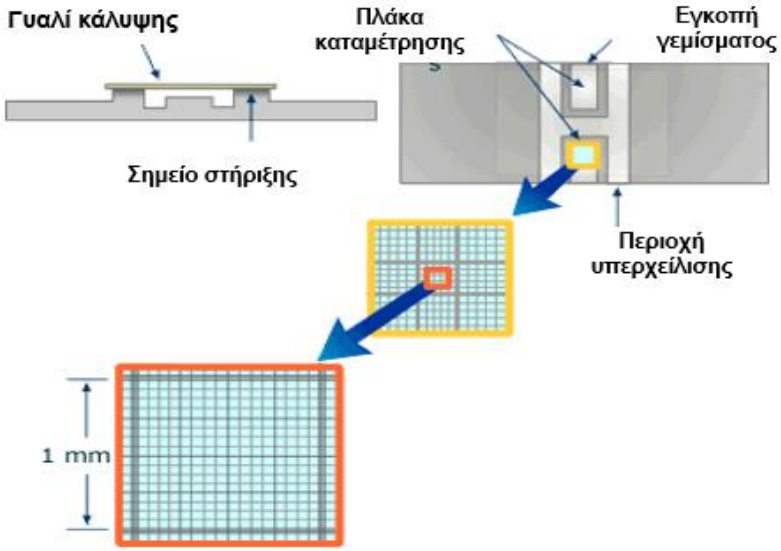
- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Saline, PBS: σε 1Lt δις απεσταγμένο H_2O διαλύονται 8,5 g NaCl, 2,27 g Na_2HPO_4, 0,47 g NaH_2PO_4, ρύθμιση pH=7,4)
- Θρεπτικό μέσο DMEM πλήρες σε ορό (10% FBS, 1% γλουταμίνη και 1% αντιβιοτικά Pen/Strep)
- Φλάσκες πολυστυρενίου για καλλιέργεια κυττάρων με φίλτρο (Greiner)
- Διάλυμα αποκόλλησης κυττάρων: Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} (Biowest)
- Στείρα σιφώνια (πιπέτες) των 5 και 10 ml (Greiner)
- Πιπέτα καλλιεργειών (Pipettor)
- Επωαστικός κλίβανος (ρυθμίσεις θ=37 ^oC, CO_2 =5%) (Smartcell-Healforce)
- Θάλαμος νηματικής ροής

Πειραματικό πρωτόκολλο:

Αρχικά πραγματοποιείται έλεγχος της φλάσκας σε ανάστροφο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων και απουσία συσσωματωμάτων. Ακολουθεί απόρριψη του θρεπτικού μέσου ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα, πλύση των κυττάρων δύο ή τρείς φορές με PBS και προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας διαλύματος θρυψίνης/EDTA, ανάλογα το μέγεθος της φλάσκας στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα. Επώαση των κυττάρων στους 37 ^oC για μερικά λεπτά μέχρι να αποκολληθούν. Είναι σημαντικό τα κύτταρα να μην παραμείνουν με θρυψίνη περισσότερο από δέκα λεπτά, διότι ευνοείται η δημιουργία συσσωματωμάτων και μειώνεται η βιωσιμότητά τους. Έπειτα ακολουθεί προσθήκη επαρκής ποσότητας φρέσκου θρεπτικού υλικού (σε όγκο 2 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τον όγκο της θρυψίνης) στη φλάσκα που περιέχει το διάλυμα θρυψίνης/EDTA, ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη και ύστερα ακολουθεί συλλογή του εναιωρήματος των κυττάρων. Στη συνέχεια λαμβάνεται το εναιώρημα με τα αποκολλημένα κύτταρα και μεταφέρεται σε καινούρια φλάσκα, που περιέχει νέο προθερμασμένο θρεπτικό υλικό σε ποσότητα εξαρτώμενη από το μέγεθος της. Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο μέχρι να καλύψουν την επιφάνεια της φλάσκας.

❖ Β.1.3 Μέτρηση κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer)

Σχεδόν σε κάθε πειραματικό πρωτόκολλο απαιτείται η ρύθμιση της συγκέντρωσης των κυττάρων. Για τη μέτρηση των κυττάρων συνήθως χρησιμοποιείται η πλάκα Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρο, που αποτελείται από τις επιφάνειες α και β, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά επίπεδα και χωρίζονται από ένα αυλάκι σε σχήμα Η (Εικόνα 19). Οι επιφάνειες α είναι πιο χαμηλές, ενώ οι β είναι υψηλότερες με διαφορά ύψους ίση με 0,1 mm. Στο κέντρο κάθε επιφάνειας υπάρχει μια περιοχή με εμβαδόν 9 mm^2 (3 mm X 3 mm), που έχει υποδιαιρεθεί σε τετράγωνα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 19. Η κεντρική περιοχή αποτελείται από 25 τετράγωνα που υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα. Αντίθετα η περιφερειακή περιοχή αποτελείται από 4 γωνιακά μεγάλα τετράγωνα (πεδία), τα οποία υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα και σε αυτά γίνεται η καταμέτρηση των κυττάρων μας (Μπέης and Γαϊτανάκη). Κατά τη διαδικασία της καταμέτρησης, τα κύτταρα βάφονται με τη χρωστική Trypan Blue, η οποία χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα, ενώ αντίθετα τα ζωντανά φαίνονται λευκά, καθώς διατηρούν τις κυτταρικές τους μεμβράνες ανέπαφες και έτσι αποκλείουν την είσοδο της χρωστικής. Άρα παράλληλα με τον έλεγχο του αριθμού των κυττάρων ελέγχεται και η ζωτικότητά τους (Strober, 2015).



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της πλάκας Neubauer, στην οποία πραγματοποιείται η καταμέτρηση των κυττάρων (http://simulab.ltt.com.au/4/laboratory/studynotes/SNHaemo.htm)

Υλικά και Όργανα:

- Εναιώρημα κυττάρων προς μέτρηση
- Θρεπτικό μέσο DMEM πλήρες σε ορό (10% ορό, 1% γλουταμίνη και 1% αντιβιοτικά Pen/Strep)
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss)
- Σωληνάρια των 50 ml με κωνική απόληξη

- Σωληνάρια των 1,5 ml (eppendorf)
- Στείρα σιφώνια (πιπέτες) των 5 και 10 ml (Greiner)
- Φυγόκεντρος Universal 320R (Hettich)
- Αιμοκυτταρόμετρο βάθους 0,1 mm (Sigma-Aldrich)
- Καλυπτρίδες
- Χρωστική Trypan blue 0,4% solution (MP Biomedicals)
- Αυτόματες πιπέτες 2-20 μl και 20-200 μl και απολήξεις πιπετών (tips)

Πειραματικό πρωτόκολλο:

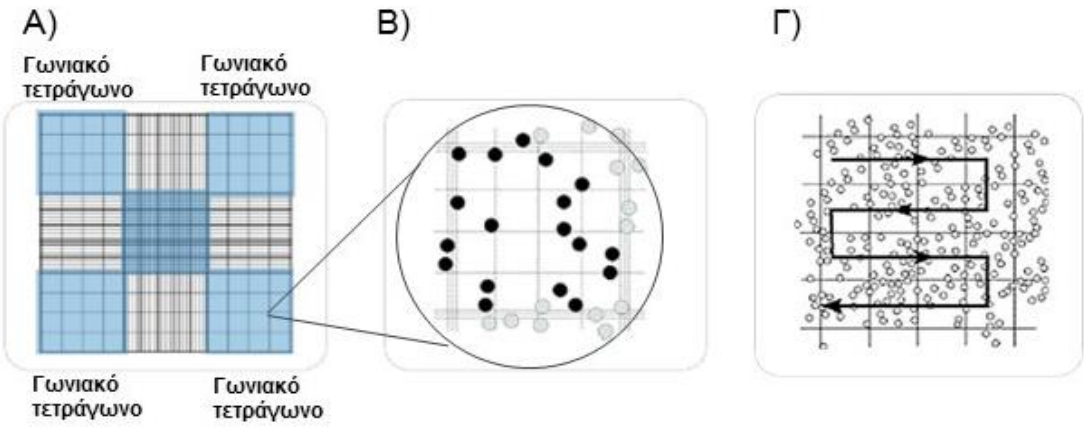
Αρχικά πραγματοποιείται πλύση και αποκόλληση των κυττάρων (υποκεφάλαιο Β.1.2). Στη συνέχεια αφού πραγματοποιηθεί λήψη του εναιωρήματος των κυττάρων σε κωνικό σωληνάριο των 50 ml, ακολουθεί φυγοκέντρηση του στις 1.100 rpm, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ύστερα το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά με σιφώνιο των 10 ml, ώστε να μη διαταραχθεί το ίζημα των κυττάρων. Έπειτα το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε κάποια ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού με τη βοήθεια σιφωνιού (η ποσότητα στην οποία επαναδιαλύεται το ίζημα εξαρτάται από τη πυκνότητα των κυττάρων).

Στη συνέχεια ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων. Αρχικά τοποθετείται η καλυπτρίδα στην πλάκα μέτρησης με στεγανό τρόπο. Για τη μέτρηση των κυττάρων η αναλογία χρωστικής Trypan Blue και κυτταρικού εναιωρήματος είναι 1:1. Επομένως με αυτόματη πιπέτα προστίθενται σε μικρό σωληνάριο 20 μl διαλύματος χρωστικής Trypan blue και 20 μl κυτταρικού εναιωρήματος. Ακολουθεί καλή ανάδευση και στη συνέχεια εισάγονται 10 μl ομοιογενούς διαλύματος κυτταρικού εναιωρήματος στην εσοχή της πλάκας Neubauer. Λόγω τριχοειδών φαινομένων τα κύτταρα εναποτίθενται στην επιφάνεια της πλάκας. Κατόπιν πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων σε τουλάχιστον 2 αντιδιαμετρικά πεδία και όχι στο κεντρικό τετράγωνο του νοητού σταυρού (Εικόνα 20Α). Δε προσμετρώνται κύτταρα εκτός ή στα κάτω όρια του πλαισίου των 16 τετραγώνων ή νεκρά κύτταρα, που είναι βαμμένα με μπλε χρώμα (Εικόνα 20Β, 20Γ). Για να υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων εφαρμόζεται ο παρακάτω τύπος:

$$Συνολικά\ κύτταρα/ml = \frac{αριθμός\ ζωντανών\ κυττάρων\ x\ dilution\ factor\ x\ 10.000}{αριθμός\ τετραγώνων}$$

Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο παράγοντας αραίωσης ισούται με 2 λόγω του ότι η αναλογία Trypan-Blue με κυτταρικό εναιώρημα είναι 1:1. Τέλος γνωρίζοντας το συνολικό όγκο του εναιωρήματός μας υπολογίζεται τελικά ο συνολικός αριθμός των κυττάρων. Έτσι η συγκέντρωση των κυττάρων μπορεί να ρυθμιστεί στην επιθυμητή, ανάλογα το πειραματικό πρωτόκολλο που θα ακολουθήσει. Αυτό το οποίο γίνεται συνήθως για τη ρύθμιση της

συγκέντρωσης είναι η μεταφορά συγκεκριμένης ποσότητας εναιωρήματος κυττάρων στον απαιτούμενο, για το εκάστοτε πειραματικό πρωτόκολλο, όγκο θρεπτικού υλικού.



Εικόνα 20: Α) Σχηματική αναπαράσταση των πεδίων (μπλε τετραγώνων) της πλάκας Neubauer στην οποία πραγματοποιείται η καταμέτρηση των κυττάρων. Β) Απεικόνιση των ζωντανών (λευκά) και νεκρών (χρωματισμένα) κυττάρων. Γ) Απεικόνιση του τρόπου καταμέτρησης κυττάρων υψηλής πυκνότητας. (http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cells-chamber-counting.php)

❖ Β.1.4 Ψύξη και φύλαξη κυττάρων στο υγρό άζωτο (Κρυοσυντήρηση)

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι κυτταρικές σειρές σε συνεχή καλλιέργεια είναι επιρρεπής σε γενετικές αλλοιώσεις που επιφέρουν αστάθεια, σε κυτταρική γήρανση και παρουσιάζουν ευαισθησία σε μικροβιακές μολύνσεις (Ulrich and Pour, 2001). Επειδή λοιπόν μια καθιερωμένη κυτταρική γραμμή είναι πολύτιμο εργαλείο και ταυτόχρονα η αντικατάστασή της είναι ιδιαίτερη δαπανηρή και χρονοβόρα, είναι ύψιστης σημασίας η κρυοσυντήρηση των κυττάρων, ώστε να διατηρηθούν μακροχρόνια. Μόλις λοιπόν γίνει διαθέσιμο ένα μικρό πλεόνασμα κυττάρων από ανακαλλιέργεια υπάρχει η δυνατότητα κατάψυξής τους.

Η καλύτερη μέθοδος κρυοσυντήρησης καλλιεργούμενων κυττάρων είναι η αποθήκευσή τους στο υγρό άζωτο. Τα κύτταρα φυλάσσονται σε ειδικά κουτιά φύλαξης (cryoboxes), σε θερμοκρασία χαμηλότερη από -130 ^{o}C (φάση ατμών πάνω από το επίπεδο της στάθμης του υγρού αζώτου στο δοχείο). Επιπλέον τα κύτταρα φυλάσσονται υπό μορφή εναιωρήματος, σε πλήρες θρεπτικό μέσο (10%) και παρουσία κρυοπροστατευτικού παράγοντα, όπως είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Γενικά οι κρυοπροστατευτικοί παράγοντες μειώνουν το σημείο πήξης του θρεπτικού μέσου και επιτρέπουν επίσης ένα βραδύτερο ρυθμό ψύξης, μειώνοντας σημαντικά τον κίνδυνο δημιουργίας κρυστάλλων πάγου και καταστροφής των μεμβρανικών δομών. Ωστόσο για να αποφευχθεί τελείως ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου και οσμωτικού σοκ, θα πρέπει τα κύτταρα να ψύχονται σταδιακά. Πρέπει δηλαδή να παραμένουν μια μέρα στους -80 ^{o}C πριν τη μεταφορά τους στο υγρό άζωτο. Με αυτόν το τρόπο προστατεύεται η βιωσιμότητα των κυττάρων σε συνθήκες φύλαξης με υγρό άζωτο (Pegg, 2007).

Υλικά και Όργανα:

- Κύτταρα σε καλλιέργεια που βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης
- Φιάλη υγρού αζώτου
- Δοχείο φύλαξης βιολογικών δειγμάτων με μετακινούμενα ράφια
- Κουτιά 81 θέσεων για φύλαξη στο υγρό άζωτο (cryoboxes)
- Φιαλίδια χωρητικότητας 1 ml με βιδωτό πώμα για φύλαξη κυττάρων (Cryovials -Greiner)
- Σωληνάρια των 50 ml με κωνική απόληξη (Greiner)
- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS με pH=7,4
- Θρεπτικό μέσο DMEM πλήρες σε ορό (10% ορό, 1% γλουταμίνη και 1% αντιβιοτικά)
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Biowest)
- Στείρα σιφώνια 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml (Greiner)
- Πιπέτα καλλιεργειών (Pipettor)
- Αποστειρωμένο διάλυμα DMSO
- Καταψύκτης –80 ^{o}C

Πειραματικό Πρωτόκολλο:

Αρχικά πραγματοποιείται πλύση και αποκόλληση των κυττάρων (υποκεφάλαιο Β.1.2). Κατόπιν ακολουθεί μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε κωνικό σωληνάριο των 50 ml και φυγοκέντρηση του στις 1.100 rpm, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ύστερα το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά με σιφώνιο των 10 ml, ώστε να μη διαταραχθεί το ίζημα των κυττάρων. Έπειτα τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε DMEM 10% με τη βοήθεια σιφωνιού (η ποσότητα των ml εξαρτάται από τη πυκνότητα των κυττάρων). Στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως (βλ. υποκεφάλαιο Β.1.3), ώστε να ρυθμιστεί η συγκέντρωση των κυττάρων σε $1x10^6$ κύτταρα/ml. Παράλληλα αναγράφονται πάνω στα ειδικά φιαλίδια (cryovials) τα στοιχεία και η ημερομηνία φύλαξης της κυτταρικής σειράς. Κατόπιν προστίθενται στα ειδικά φιαλίδια 900 μl εναιωρήματος κυττάρων (συγκέντρωσης $1x10^6$ κύτταρα/ml) και 100 μl DMSO (10% αναλογία με θρεπτικό). Τέλος τα κύτταρα μεταφέρονται όσον το δυνατόν γρηγορότερα στους -80 ^{o}C, όπου παραμένουν για μια μέρα και την επόμενη μέρα μεταφέρονται σε κουτιά στο υγρό άζωτο. Είναι πολύ σημαντικό να σημειώνεται πάντα η θέση των κυττάρων μέσα στο κουτί και ο αριθμός των φιαλιδίων που καταψύχθηκε.

Β.2 Ακτινοβόληση κυττάρων σε πηγή κοβαλτίου

Στην παρούσα εργασία όταν γίνεται ακτινοβόληση τα κύτταρα αναπτύσσονται συνήθως σε πλάκες καλλιέργειας 6 φρεατίων ή σε μικρές φλάσκες (μέγεθος 25 cm^2). Μετά την ακτινοβόληση ακολουθεί είτε επώαση των κυττάρων και εφαρμογή κάποιας πειραματικής τεχνικής, είτε συλλογή των υπερκειμένων των καλλιεργειών.

Για την ακτινοβόληση χρησιμοποιείται γ-ακτινοβολητής, με πηγή Co -60 (Gamma cell 220, Atomic Energy of Canada Ltd.Otawwa, Canada) (Εικόνα 21). Η ακτινοβόληση πραγματοποιείται πάντα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αναλόγως του πρωτοκόλλου μπορεί να χρησιμοποιηθούν διάφορες δόσεις ακτινοβόλησης της κλίμακας Gray. Ο ρυθμός έκθεσης δόσης της βαθμονομημένης πηγής ακτινοβόλησης υπαγορεύει και τον χρόνο έκθεσης των κυττάρων στην πηγή. Για πηγή με ρυθμό δόσης 16 cGy/min, τα κύτταρα πρέπει να παραμείνουν στην πηγή για περίπου 6 λεπτά προκειμένου να εκτεθούν σε συνολική δόση 1 Gy.

Εικόνα 21: Ακτινοβολητής γ-κοβαλτίου (https://www.researchgate.net/figure/Overall-view-of-gamma-cell-220_fig14_303501838).

Υλικά και Όργανα:

- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss)
- Θρεπτικό μέσο DMEM πλήρες σε ορό (10% ορό, 1% γλουταμίνη και 1% αντιβιοτικά)
- Αποστειρωμένο διάλυμα PBS με pH=7,4
- Φλάσκες πολυστυρενίου με φίλτρο (Greiner) ή πλάκες 6 φρεατίων
- Πιπέτες στείρες 5 ml, 10 ml
- Πιπέτα καλλιεργειών (Pipettor)

- Επωαστικός κλίβανος (ρυθμίσεις θ=37 ^{o}C, CO_2 =5%) (Smartcell-Healforce)
- Θάλαμος νηματικής ροής
- γ-ακτινοβολητής Co -60 (Gamma cell 220, Atomic Energy of Canada Ltd.Otawwa, Canada)

Πειραματικό πρωτόκολλο:

Αρχικά πριν πραγματοποιηθεί η ακτινοβόληση, τα κύτταρα παρατηρούνται στο ανάστροφο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί η παρουσία ομοιόμορφης κατανομής και η απουσία συσσωματωμάτων. Κατόπιν ακολουθεί απόρριψη του θρεπτικού μέσου, πλύση των κυττάρων μία φορά με αποστειρωμένο PBS και προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου (συνήθως 10%, ή 1% όταν κρίνεται απαραίτητο). Έπειτα ακολουθεί ακτινοβόληση των κυττάρων (είτε 3 Gy, είτε 5 Gy, είτε 10 Gy, ανάλογα με το πειραματικό πρωτόκολλο που θα ακολουθήσει). Πάντα μαζί με τα κύτταρα που ακτινοβολούνται, μεταφέρονται στην πηγή αντίστοιχα κύτταρα τα οποία δε θα ακτινοβοληθούν και τα οποία αποτελούν τους μάρτυρες κάθε πειραματικού πρωτοκόλλου. Είναι πολύ σημαντικό να υπάρχουν κατάλληλοι μάρτυρες (δηλ. φλάσκες με κύτταρα της ίδιας καλλιέργειας), διότι τα κύτταρα κατά τη μεταφορά τους από το εργαστήριο στην πηγή και όσο παραμένουν στην πηγή υπόκεινται σε έντονο στρες, αφού βρίσκονται εκτός του επωαστικού κλιβάνου.

Β.3 Κυτταρομετρία ροής για έλεγχο της έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στις καρκινικές κυτταρικές σειρές U87MG, SK-N-SH

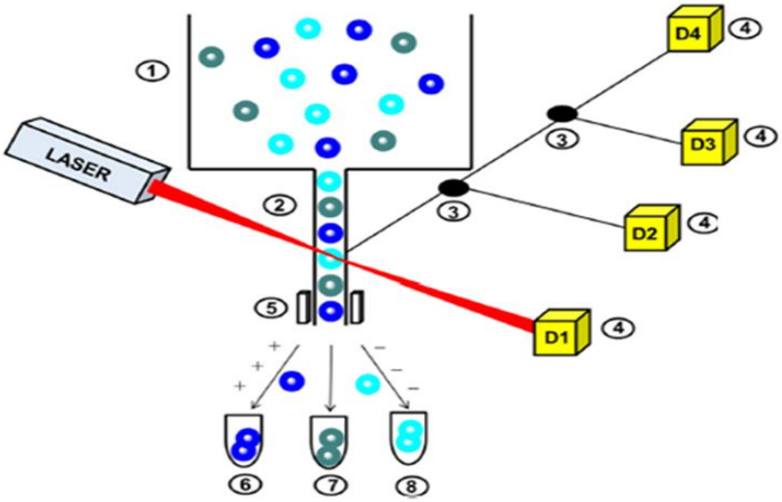
Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ποσοτική, πολυπαραμετρική, αυτοματοποιημένη μέθοδος μέτρησης κυττάρων με βάση συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και κοκκίωση), αλλά και την ένταση φθορισμού διαφορετικών φθοριοχρωμάτων, τα οποία είναι συζευγμένα με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι ποικίλων μορίων. Τα χαρακτηριστικά αυτά προσδιορίζονται άμεσα και ξεχωριστά πάνω σε καθένα από τα κύτταρα του υπό εξέταση δείγματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την υδροδυναμική διάταξη του κυτταρικού εναιωρήματος σε ρεύμα μονήρων κυττάρων που διασταυρώνονται κάθετα με τη δέσμη ακτινών Laser. Επιπλέον, η κυτταρομετρία ροής έχει τη δυνατότητα του ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλαπλών παραμέτρων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά η αναλυτική ικανότητα και αξιοπιστία αυτής της τεχνικής σε σύγκριση με άλλες συμβατικές τεχνικές (π.χ. μικροσκοπία). Τέλος η ταχύτητα με την οποία επιτυγχάνονται οι προσδιορισμοί είναι μεγάλη, επιτρέποντας έτσι τον έλεγχο μεγάλου αριθμού κυττάρων καθώς και την ανίχνευση μικρού αριθμού κυτταρικών υποπληθυσμών που μπορεί να εμπεριέχονται σε κάποιο εναιώρημα (Γαϊτανάκη et al., 2014).

Αρχή της μεθόδου:

Η κυτταρομετρία αντιπροσωπεύει το μέτρο της άμεσης αλληλεπίδρασης της φωτεινής δέσμης Laser με τα κύτταρα (σκεδασμός), αλλά και το αποτέλεσμα της επίδρασης του φωτός επί φθοριζουσών ουσιών με τις οποίες έχουν επισημανθεί ειδικά, συγκεκριμένα εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια μόρια. Ειδικότερα, οι υπό μελέτη υποπληθυσμοί του κυτταρικού εναιωρήματος σημαίνονται με μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Στη συνέχεια το εναιώρημα των κυττάρων συμπαρασυρόμενο από σημαντικά μεγαλύτερο όγκο φυσιολογικού ορού, ωθείται υπό πίεση σε μια στενή χοάνη ροής. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα συνεχές μονήρες ρεύμα ροής του ορού, με τα κύτταρα να περνούν μεμονωμένα και ανά ίσα χρονικά διαστήματα μεταξύ τους από τον αυλό της χοάνης (Γαϊτανάκη et al., 2014) (Εικόνα 22).

Καθώς το κάθε κύτταρο περνά μπροστά από το Laser σκεδάζει τη φωτεινή δέσμη και επιπλέον τα σημασμένα κύτταρα φθορίζουν. Οι ευαίσθητοι φωτοπολλαπλασιαστές του κυτταρομέτρου ανιχνεύουν (Γαϊτανάκη et al., 2014):

- τον **ευθύγραμμο σκεδασμό** του φωτός (forward scatter, FSC) από το κάθε κύτταρο χωριστά, ο οποίος δίνει πληροφορίες για το μέγεθος του κυττάρου
- τον **πλάγιο σκεδασμό** (δηλαδή την κατά ορθή γωνία εξασθένιση του φωτεινού σήματος, side scatter, SCC), που δίνει πληροφορίες για το σχήμα και την οπτική ομοιογένεια του κυττάρου
- τον **φθορίζοντα πλάγιο σκεδασμό**, ο οποίος δίνει πληροφορίες για μορφολογικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (έκφραση επιφανειακών ή ενδοκυττάριων πρωτεϊνών), που σχετίζονται με την ένταση και τη χρονική διάρκεια του σκεδαστικού σήματος



Εικόνα 22: Γραφική απεικόνιση της διάταξης του συστήματος του κυτταρομέτρου. Η διάταξη είναι η εξής: 1) Δοχείο εναιωρήματος κυττάρων, 2) Μονήρης κυτταρική ροή, 3) Διαχωριστής της δέσμης Laser, 4) D1: ανιχνευτής του ευθύγραμμου σκεδασμού φωτός (forward scatter, FSC), που ταξινομεί τα κύτταρα σύμφωνα με το μέγεθός τους, D2: ανιχνευτής του πλάγιου σκεδασμού (side scatter), που ταξινομεί τα κύτταρα ανάλογα τη πολυπλοκότητά τους, D3: ανιχνευτής πράσινου φθορισμού, που ταξινομεί τα κύτταρα ανάλογα με τους δείκτες κυτταρικής επιφάνειας, D4: ανιχνευτής κόκκινου φθορισμού, 5) Μονάδα φόρτισης χρώματος, 6) και 8) συλλέκτες δειγμάτων, 7) συλλέκτης αποβλήτων (Aebisher et al., 2017).

Στη συγκεκριμένη εργασία η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ανίχνευση ενδοκυττάριων και επιφανειακών μορίων σε καρκινικά κύτταρα με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων συζευγμένα με **φθοριοχρώματα**. Γενικά τα φθοριοχρώματα είναι χρωστικές ουσίες που έχουν την ικανότητα του φθορισμού και έτσι με φθορισμό μπορούν να γίνονται ορατές.

Οι πιο γνωστές φθορίζουσες ουσίες είναι η φυκοερυθρίνη (PE) και η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC). Και οι δύο χρωστικές έχουν μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης στα 490 nm, αλλά η PE εκπέμπει το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα σε μήκος κύματος 580 nm, ενώ η FITC εκπέμπει το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα της σε μήκος κύματος 520 nm. Επομένως λόγω αυτών των διαφορών στα μήκη κύματος εκπομπής του κάθε φθοριοχρώματος είναι δυνατή η συλλογή πληροφοριών για διαφορετικά κυτταρικά χαρακτηριστικά που έχουν ταυτόχρονα επισημανθεί με τα φθοριοχρώματα σε ένα κύτταρο (πολυχρωματική ανάλυση) (Γαϊτανάκη et al., 2014).

❖ Β.3.1 Κυτταρομετρία ροής για έλεγχο της συνολικής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στα U87MG (ενδοκυττάρια και επιφανειακή χρώση)

Ο σκοπός της συγκεκριμένης δοκιμασίας είναι να ελεγχθεί η συνολική (ενδοκυττάρια και επιφανειακή) έκφραση του υποδοχέα C5aR1 στα καρκινικά κύτταρα U87MG. Η συγκεκριμένη δοκιμασία συνδυάστηκε και με ακτινοβόληση των κυττάρων σε δόση 3 Gy. Επίσης με αυτήν την τεχνική ελέγχεται αν υπάρχει διαφορά στην έκφραση του υποδοχέα σε ακτινοβολημένα και μη ακτινοβολημένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος ύστερα από 6 ώρες επώασης μετά την ακτινοβόληση. Ο αρνητικός μάρτυρας της συγκεκριμένης δοκιμασίας είναι κύτταρα στα οποία δε προστίθεται αντίσωμα έναντι του υποδοχέα που μελετάται. Επίσης αρνητικοί μάρτυρες της κυτταρομετρίας ροής αποτελούν και τα ισοτυπικά αντισώματα **(isotype controls)**, τα οποία έχουν τον ίδιο ισότυπο (ίδια σταθερή περιοχή στη βαριά και ελαφριά αλυσίδα) με το αντίσωμα που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία και αντιπροσωπεύουν τη **μη ειδική δέσμευση** στα υπό μελέτη μόρια.

Υλικά και Όργανα:

- Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG σε εκθετική φάση ανάπτυξης
- Λοιπά υλικά που χρησιμοποιούνται για μέτρηση κυττάρων (υποκεφάλαιο Β.1.3)
- Πλάκες καλλιέργειας 6 φρεατίων (Greiner)
- Λοιπά υλικά που χρησιμοποιούνται για την ακτινοβόληση των κυττάρων (υποκεφάλαιο Β.2)
- Σωληνάρια των 50 ml με κωνική απόληξη
- Διάλυμα **PBS-EDTA 10 mM**, όγκου 50 ml

- Διάλυμα **FACS** (FACS Buffer): 1% BSA και 0,02% NaN_3 διαλύονται σε 80 ml PBS
- Διάλυμα μονιμοποίησης **(Fixation Buffer):** φορμαλδεΰδη 2% διαλύεται σε 50 ml PBS
- Διάλυμα διαπερατοποίησης **(Permeabilization buffer):** Tween-20 0,5% μεταφέρεται σε 60 ml PBS
- Μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό έναντι του ανθρώπινου υποδοχέα C5aR σημασμένο με **FITC** (αντίσωμα **anti-human CD88 FITC**) (Bio Rad)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα της κυτταρομετρίας: **isotype control antibody mouse IgG2a FITC** (Immunotools)
- Στείρα σωληνάρια με κυκλικό πυθμένα, των 14 ml (Greiner)
- Ειδικά σωληνάρια πολυστυρενίου με κυκλικό πυθμένα για μέτρηση στο κυτταρόμετρο (BD Bioscience), των 5 ml
- Αναδευτήρας (vortex)

Πειραματικό Πρωτόκολλο:

Αρχικά πραγματοποιείται καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG (υποκεφάλαιο Β.1.2), μέχρι να έχουν την επιθυμητή πυκνότητα για το πειραματικό πρωτόκολλο. Στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο (υποκεφάλαιο Β.1.3) και ρύθμιση της συγκέντρωσης του κυτταρικού εναιωρήματος ώστε σε κάθε φρεάτιο της πλάκας καλλιέργειας να στρωθούν 500.000 κύτταρα ανά 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου (10% FBS). Οι δύο πλάκες επωάζονται για 24 ώρες στον επωαστικό κλίβανο και την επόμενη μέρα, αφού προηγηθεί αλλαγή του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, πραγματοποιείται ακτινοβόληση δόσης 3 Gy στη μία από τις δύο πλάκες. Η δεύτερη πλάκα δεν ακτινοβολείται αλλά μεταφέρεται και αυτή μέχρι τον ακτινοβολητή. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της ακτινοβόλησης οι πλάκες μεταφέρονται στον κλίβανο, όπου επωάζονται για 6 ώρες.

Μετά την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης πραγματοποιείται το εξής πρωτόκολλο:

1. Αρχικά απορρίπτεται το θρεπτικό μέσο και πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με αποστειρωμένο διάλυμα PBS.
2. Στη συνέχεια μεταφέρονται 0,5 ml διαλύματος PBS-EDTA 10 mM ανά φρεάτιο. Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για 10 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί αποκόλληση τους από τα φρεάτια (η χρήση θρυψίνης αποφεύγεται για να μην επηρεαστεί η επιφανειακή χρώση για τον υποδοχέα). Κατόπιν λαμβάνεται το εναιώρημα των κυττάρων από τις δύο πλάκες και μεταφέρεται σε δυο σωληνάρια των 50 ml αντίστοιχα.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δύο σωληναρίων στις 1.100 rpm, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση των κυττάρων σε FACS buffer. Έπειτα λαμβάνεται μικρή ποσότητα από το εναιώρημα των κυττάρων, ώστε να πραγματοποιηθεί μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο προκειμένου να γνωρίζουμε τον συνολικό αριθμό των ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων κυττάρων.

4. Ύστερα το εναιώρημα από κάθε ομάδα κυττάρων (No IR, IR) χωρίζεται σε τρία σωληνάρια, άρα προκύπτουν τα εξής 6 δείγματα (περίπου $5*10^5$ κύτταρα ανά δείγμα): μη ακτινοβολημένα κύτταρα (No IR), μη ακτινοβολημένα κύτταρα (No IR) με IgG2a ισοτυπικό αντίσωμα, μη ακτινοβολημένα κύτταρα με anti-CD88, ακτινοβολημένα κύτταρα (IR), ακτινοβολημένα κύτταρα με IgG2a, ακτινοβολημένα κύτταρα με anti-CD88.
5. Στα 6 δείγματα προστίθενται επιπλέον 2 ml FACS buffer και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1.000 rpm για 5 λεπτά, **στους 4 ºC**. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο απορρίπτεται**.**
6. Κατόπιν προστίθενται **100 μl διαλύματος μονιμοποίησης (Fixation buffer)** και ακολουθεί καλή ανάδευση των δειγμάτων στον αναδευτήρα (vortex), ώστε να διαλυτοποιηθούν τα ιζήματα των κυττάρων. Τα δείγματα αφήνονται να επωαστούν για 15 λεπτά στο σκοτάδι.
7. Στη συνέχεια προστίθενται **100 μl διαλύματος διαπερατοποίησης (Permeabilization buffer)** στα δείγματα, αναδεύονται ελαφρώς με το χέρι και αφήνονται να επωαστούν για 15 λεπτά στο σκοτάδι.
8. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστίθενται 2 ml διαλύματος διαπερατοποίησης (PBS-Tween20) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και απόρριψη του υπερκειμένου. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται.
9. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, απομένει ένας μικρός όγκος από το διάλυμα (~100 μl). Σε αυτόν τον εναπομείναντα όγκο προστίθενται 10 μl του αντισώματος **anti-human CD88 FITC (συγκέντρωση 0,1 mg/ml)** σε 2 από τα 6 δείγματα. Ταυτόχρονα προστίθενται 5 μl από το ισοτυπικό αντίσωμα mouse **IgG2a FITC** σε 2 δείγματα, τα οποία αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες για την κυτταρομετρία ροής. Τα τελευταία 2 δείγματα που έχουν μόνο κύτταρα αποτελούν επίσης τους αρνητικούς μάρτυρες της πειραματικής δοκιμασίας. Η επώαση με τα αντισώματα πραγματοποιείται για 1 ώρα, στους 4 ^oC, στο σκοτάδι. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης προστίθενται 2 ml FACS buffer για να ακολουθήσει φυγοκέντρηση των δειγμάτων.
10. Τέλος το υπερκείμενο απορρίπτεται, τα ιζήματα των δειγμάτων επαναιωρούνται σε 350 μl FACS buffer και το εναιώρημα των δειγμάτων μεταφέρεται σε ειδικά σωληνάρια πολυστυρενίου με κυκλικό πυθμένα για να ακολουθήσει κυτταρομετρία ροής και επεξεργασία των αποτελεσμάτων (FACSDiva).

❖ Β.3.2 Κυτταρομετρία ροής για έλεγχο της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) σε U87MG και SK-N-SH

Ο σκοπός της συγκεκριμένης δοκιμασίας είναι να ελεγχθεί στις καρκινικές κυτταρικές σειρές U87MG και SK-N-SH αν υπάρχει διαφορά στην επιφανειακή έκφραση του υποδοχέα C5aR1 μεταξύ ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων κυττάρων. Το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές δόσεις ακτινοβόλησης (3 Gy και 5 Gy) και με

διαφορετικούς χρόνους επώασης των κυττάρων ύστερα από την ακτινοβόληση (6 ώρες επώασης και 24 ώρες επώασης). Επειδή λοιπόν η συγκεκριμένη δοκιμασία πραγματοποιήθηκε με διάφορες παραλλαγές θα αναφέρουμε εν συντομία το γενικό πειραματικό πρωτόκολλο.

Υλικά και Όργανα:

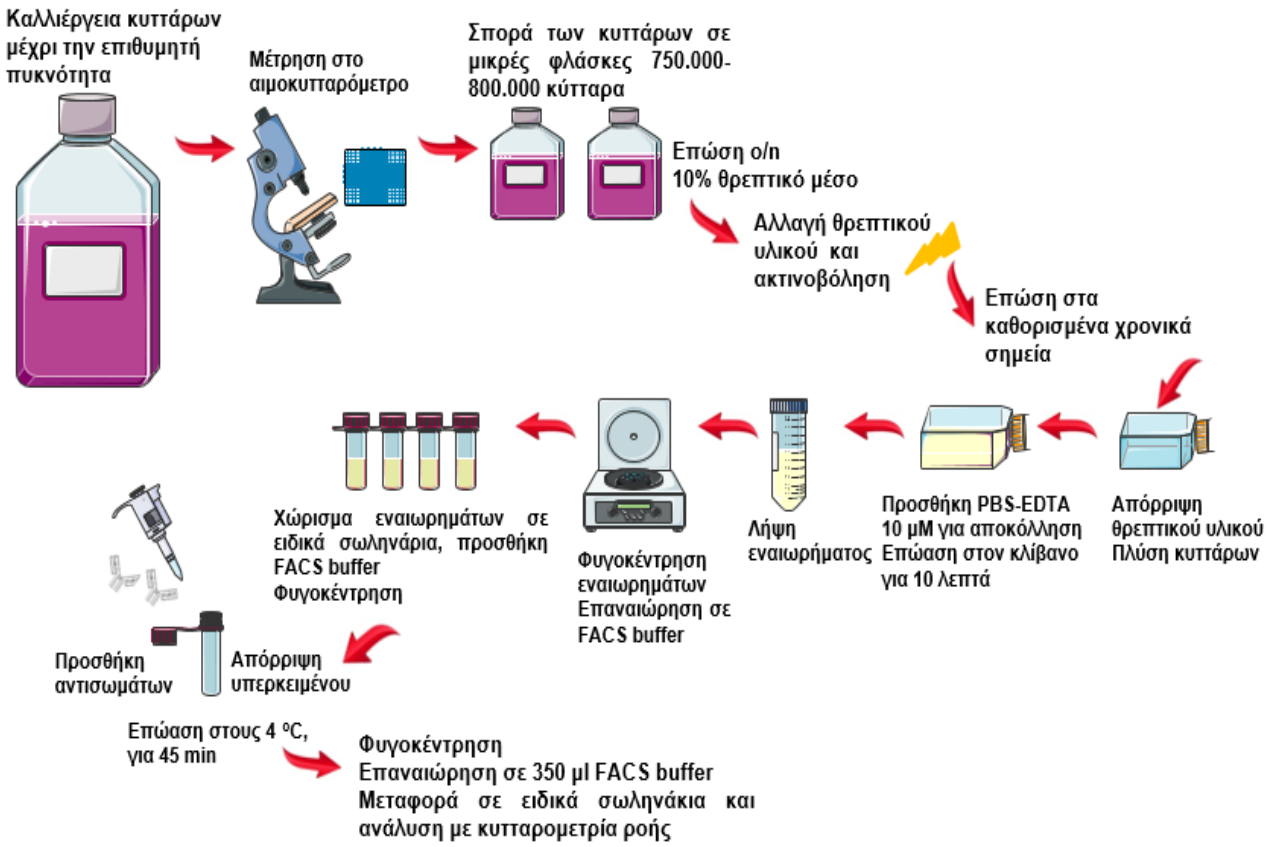
- Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων σε εκθετική φάση ανάπτυξης
- Λοιπά υλικά που χρησιμοποιούνται για μέτρηση κυττάρων (υποκεφάλαιο Β.1.3)
- Φλάσκες πολυστυρενίου μεγέθους 25 cm^2 ή πλάκες καλλιέργειας (6 φρεάτια) (Greiner)
- Λοιπά υλικά που χρησιμοποιούνται για την ακτινοβόληση των κυττάρων (υποκεφάλαιο Β.2)
- Σωληνάρια των 50 ml με κωνική απόληξη
- Διάλυμα **PBS-EDTA 10 mM**, όγκου 50 ml
- Διάλυμα **FACS** (FACS Buffer): 1% BSA και 0,02% NaN_3 διαλύονται σε 80 ml PBS
- Μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό έναντι του ανθρώπινου υποδοχέα C5aR σημασμένο με **FITC** (αντίσωμα **anti-human CD88 FITC**) (Bio Rad)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα: **isotype control antibody mouse IgG2a FITC** (Immunotools)
- Στείρα σωληνάρια με κυκλικό πυθμένα, των 14 ml (Greiner)
- Ειδικά σωληνάρια πολυστυρενίου με κυκλικό πυθμένα για μέτρηση στο κυτταρόμετρο (BD Bioscience), των 5 ml
- Αναδευτήρας (vortex)

Πειραματικό Πρωτόκολλο:

Αρχικά πραγματοποιείται καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων (είτε U87MG, είτε SK-N-SH), μέχρι τα κύτταρα να έχουν την επιθυμητή πυκνότητα για το πειραματικό πρωτόκολλο. Στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο (υποκεφάλαιο Β.1.3) και ρύθμιση της συγκέντρωσης του κυτταρικού εναιωρήματος ώστε σε κάθε μικρή φλάσκα να στρωθούν περίπου 750.000 κύτταρα ανά 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού (ή εναλλακτικά σε κάθε φρεάτιο πλάκας στρώνονται 500.000 κύτταρα ανά 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού). Τα κύτταρα επωάζονται για μία μέρα στον επωαστικό κλίβανο και την επόμενη μέρα, αφού γίνει αλλαγή του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, πραγματοποιείται ακτινοβόληση συγκεκριμένης δόσης. Οι φλάσκες (ή οι πλάκες) που δεν ακτινοβολούνται μεταφέρονται και αυτές μέχρι τον ακτινοβολητή. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της ακτινοβόλησης οι φλάσκες (ή οι πλάκες) μεταφέρονται στον επωαστικό κλίβανο, όπου αφήνονται για επώαση μέχρι το χρονικό σημείο που έχει οριστεί.

Μετά την ολοκλήρωση του καθορισμένου χρόνου επώασης πραγματοποιείται το εξής πρωτόκολλο (Εικόνα 23):

1. Αρχικά απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με αποστειρωμένο διάλυμα PBS.
2. Στη συνέχεια μεταφέρονται 4 ml διαλύματος PBS-EDTA 10 mM σε κάθε φλάσκα (ή 0,5 ml σε κάθε φρεάτιο). Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για 10 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί αποκόλληση τους (η χρήση θρυψίνης αποφεύγεται για να μην επηρεαστεί η επιφανειακή χρώση για τον υποδοχέα). Κατόπιν λαμβάνεται το εναιώρημα των κυττάρων και μεταφέρεται σε σωληνάρια των 50 ml.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 1.100 rpm, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση των κυττάρων σε FACS buffer (ο όγκος στον οποίο επαναιωρούνται τα κύτταρα εξαρτάται από την πυκνότητά τους). Έπειτα λαμβάνεται μικρή ποσότητα από το εναιώρημα των κυττάρων ώστε να πραγματοποιηθεί μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο προκειμένου να γνωρίζουμε τον ακριβή αριθμό των ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων κυττάρων.
4. Ύστερα τα εναιωρήματα από κάθε ομάδα κυττάρων (No IR, IR) χωρίζονται σε στείρα σωληνάρια με κυκλικό πυθμένα ώστε σε κάθε δείγμα να μεταφερθούν περίπου 500.000-1.000.000 κύτταρα.
5. Κατόπιν στα σωληνάρια προστίθενται επιπλέον 2 ml FACS buffer και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 1.000 rpm, για 5 λεπτά στους 4 ^{o}C.
6. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, απομένει ένας μικρός όγκος από το διάλυμα. Σε αυτόν τον εναπομείναντα όγκο προστίθενται 10 μl του αντισώματος **anti-human CD88 FITC (συγκέντρωση 0,1 mg/ml)**. Στα δείγματα που αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες της κυτταρομετρίας προστίθενται 5 μl από ισοτυπικό αντίσωμα mouse **IgG2a FITC**. Επίσης σε κάθε ομάδα δειγμάτων (No IR, IR) υπάρχουν και τα δείγματα που έχουν μόνο κύτταρα και επίσης αποτελούν αρνητικούς μάρτυρες της δοκιμασίας. Η επώαση με τα αντισώματα πραγματοποιείται για 45 λεπτά, στους 4 ^{o}C, στο σκοτάδι. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης προστίθενται 2 ml FACS buffer για να ακολουθήσει φυγοκέντρηση των δειγμάτων.
7. Τέλος το υπερκείμενο απορρίπτεται, τα ιζήματα των δειγμάτων επαναιωρούνται σε 350 μl FACS buffer και το εναιώρημα των δειγμάτων μεταφέρονται σε ειδικά σωληνάρια πολυστυρενίου με κυκλικό πυθμένα για να ακολουθήσει κυτταρομετρία ροής και επεξεργασία των αποτελεσμάτων (FACSDiva).



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού πρωτοκόλλου για τον έλεγχο της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1. Το πρωτόκολλο εφαρμόζεται σε καλλιέργειες κυττάρων γλοιοβλαστώματος και νευροβλαστώματος. Συνδυάζεται με ακτινοβόληση των κυττάρων σε διαφορετικές δόσεις. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε κυτταρόμετρο και τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε γραφήματα.

Β.4 Συλλογή και συγκέντρωση υπερκειμένων από καλλιέργεια κυττάρων U87MG για λειτουργικές μελέτες συμπληρώματος

Είναι γενικά γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα κύτταρα γλοιώματος (U11SMG, T193 και T98G) εκκρίνουν στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας συστατικά του συμπληρώματος (C3, C5, C5a) (Gasque et al., 1993). Βέβαια οι ενδογενώς παραγόμενες ποσότητες αυτών των μορίων στο θρεπτικό μέσο είναι πολύ μικρές (της τάξης των nM), άρα δεν είναι εύκολα ανιχνεύσιμες. Επομένως προκειμένου να είναι δυνατή η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των μορίων, που μελετώνται στη παρούσα εργασία, σε υπερκείμενα από θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων, πρέπει τα δείγματα των υπερκειμένων που συλλέγονται να συγκεντρώνονται σε μικρότερο όγκο δείγματος. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της διαδικασίας της **συγκέντρωσης**.

Κατά τη διαδικασία της συγκέντρωσης χρησιμοποιούνται ειδικά σωληνάρια, μεγέθους ανάλογου του αρχικού όγκου του δείγματος, τα οποία διαθέτουν φίλτρο με διαπερατότητα ανάλογης του

μεγέθους των μορίων που θα συγκεντρωθούν. Πάνω στο φίλτρο υπάρχουν πόροι συγκεκριμένου μεγέθους επιτρέποντας έτσι σε μικρά μόρια να διέλθουν μέσω αυτών και σε άλλα μεγαλύτερα μόρια να μη διέλθουν. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιείται φίλτρο με άνοιγμα πόρων 3 KDa. Επομένως μόρια μεγαλύτερα από 3 KDa (π.χ. C3, C5, C5a) παραμένουν πάνω στο φίλτρο, ενώ μικρότερα μόρια διέρχονται διαμέσου του φίλτρου.

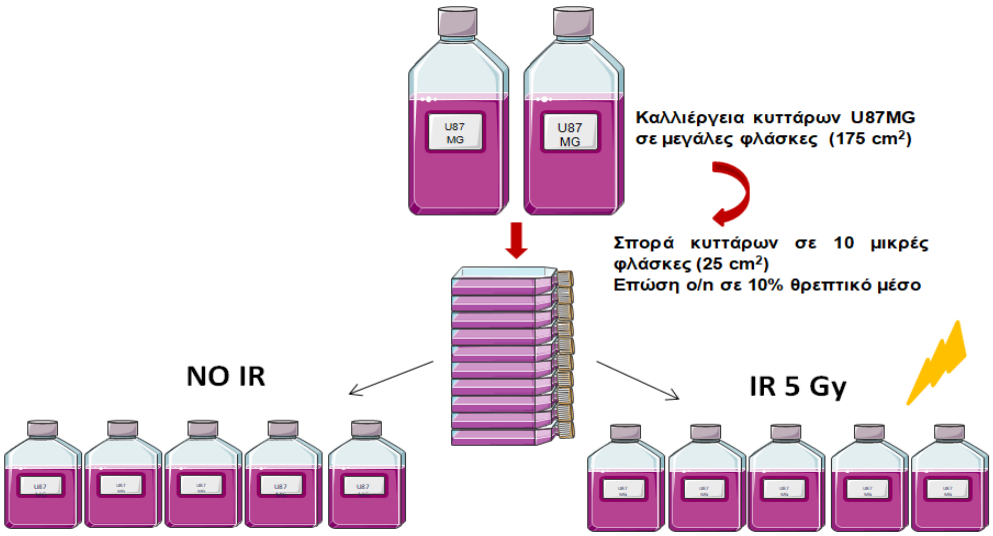
Παράλληλα είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι κατά τη διαδικασία συλλογής των θρεπτικών μέσων από τις καλλιέργειες κυττάρων γλοιοβλαστώματος πρέπει να χρησιμοποιηθεί **EDTA**, προκειμένου να ανασταλεί η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Γενικά είναι γνωστό, ότι όταν η πρωτεΐνη C3 έρθει σε επαφή με πλαστικά σωληνάρια υπάρχει η πιθανότητα αναδιάταξης της φυσικής δομής της και μετατροπής της σε ενεργό προϊόν C3b, το οποίο παρουσία ιόντων Mg^{2+} οδηγεί στο σχηματισμό της AP C3-κονβερτάσης και στην έναρξη της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (Ricklin et al., 2016). Προκειμένου λοιπόν να αποφευχθεί η ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού χρησιμοποιείται το EDTA, το οποίο δεσμεύει τα ιόντα Mg^{2+}, αναστέλλοντας με αυτόν το τρόπο την ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού. Μετά τη συλλογή των υπερκειμένων γίνεται μέτρηση των κυττάρων ώστε να είναι δυνατή η **κανονικοποίηση** των υπερκειμένων ως προς τον αριθμό των κυττάρων.

Υλικά και Όργανα:

- Λοιπά υλικά που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια των κυττάρων και τη μέτρησή τους (υποκεφάλαιο Β.1.2, Β.1.3)
- Λοιπά υλικά που χρησιμοποιούνται για την ακτινοβόληση των κυττάρων (υποκεφάλαιο Β.2)
- Υπερκείμενα από καλλιέργειες ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων καρκινικών κυττάρων
- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Saline, PBS: σε 1Lt δις απεσταγμένο H_2O διαλύονται 8,5 g NaCl, 2,27 g Na_2HPO_4, 0,47 g NaH_2PO_4, ρύθμιση pH=7,4)
- Σωληνάρια των 50 ml με κωνική απόληξη (Greiner)
- Αποστειρωμένο διάλυμα EDTA συγκέντρωσης 0,1 M (2,23 g EDTA μεταφέρονται σε 60 ml δις απεσταγμένο H_2O, ρυθμίζεται στο pH=8)
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης με φίλτρο **3000MWCO** χωρητικότητας 15 ml (Amicon-Millipore Ultra-15, centrifugal filter units, MERCK)
- Διάλυμα αζίδιο του Νατρίου (NaN_3) 0,02% σε PBS
- Φυγόκεντρος Universal 320R (Hettich)

Πειραματικό πρωτόκολλο:

Αρχικά πραγματοποιείται καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG (υποκεφάλαιο Β.1.2), μέχρι να έχουν την επιθυμητή πυκνότητα για το πειραματικό πρωτόκολλο. Στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο (υποκεφάλαιο Β.1.3) και ρύθμιση της συγκέντρωσης του κυτταρικού εναιωρήματος ώστε σε κάθε μικρή φλάσκα (10 μικρές φλάσκες συνολικά) να στρωθούν 700.000-800.000 κύτταρα ανά 5 ml **πλήρους θρεπτικού μέσου** (**10% FBS**) (Εικόνα 24). Οι φλάσκες επωάζονται για μία μέρα. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται ακτινοβόληση δόσης 5 Gy στις μισές φλάσκες, όπως αναφέρεται στο υποκεφάλαιο Β.2. Οι υπόλοιπες φλάσκες δεν ακτινοβολούνται αλλά μεταφέρονται μέχρι τον ακτινοβολητή (Εικόνα 24). Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της ακτινοβόλησης οι φλάσκες μεταφέρονται στον επωαστικό κλίβανο μέχρι τον καθορισμένο χρόνο επώασης (24h).



Εικόνα 24: Απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε προκειμένου να συλλεχθούν υπερκείμενα από ακτινοβολημένα και μη ακτινοβολημένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος. *No IR: μη ακτινοβολημένα, *IR: ακτινοβολημένα

Μόλις ολοκληρωθεί ο καθορισμένος χρόνος επώασης συλλέγεται το θρεπτικό μέσο (10% ορό) από τις φλάσκες που δεν ακτινοβολήθηκαν και μεταφέρεται σε ένα σωληνάριο των 50 ml. Αντίστοιχα σε δεύτερο σωληνάριο των 50 ml συλλέγεται το θρεπτικό μέσο από τις φλάσκες που ακτινοβολήθηκαν. Κατόπιν τα δυο σωληνάρια μεταφέρονται απευθείας στον πάγο και προστίθενται σε αυτά αποστειρωμένο διάλυμα **EDTA συγκέντρωσης 10 mM**, προκειμένου να ανασταλεί η ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Ύστερα γίνεται μέτρηση των κυττάρων, ώστε να βρεθεί ο ακριβής αριθμός κυττάρων της καλλιέργειας, από τα οποία προκύπτουν τα υπερκείμενα. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση των δυο σωληναρίων στις 3.000 rpm, για 5 λεπτά, στους 4 ^{o}C. Μόλις ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση των δειγμάτων συλλέγονται **τα υπερκείμενα** και μεταφέρονται στους -80 ^{o}C για φύλαξη μέχρι να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της συγκέντρωσής τους.

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία της συγκέντρωσης των υπερκειμένων πρέπει τα ειδικά σωληνάρια με το φίλτρο να εξισορροπηθούν με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Ειδικότερα, προστίθενται μερικά ml PBS στα ειδικά σωληνάρια και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 20 λεπτά, στους 4 ^{o}C. Στη συνέχεια απορρίπτεται το PBS που δε πέρασε διαμέσου του φίλτρου και ακολουθεί προσθήκη των δειγμάτων των υπερκειμένων (παραμένουν συνεχώς στον πάγο) στα ειδικά σωληνάρια με το φίλτρο. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις ίδιες συνθήκες και απόρριψη του υγρού που περνά από τα φίλτρα. Η φυγοκέντρηση των δειγμάτων επαναλαμβάνεται μέχρι το δείγμα να συγκεντρωθεί στον επιθυμητό όγκο. Μετά την ολοκλήρωση των φυγοκεντρήσεων λαμβάνονται με πολύ προσοχή τα υπερκείμενα που βρίσκονται πάνω από το φίλτρο και φυλάσσονται στους -80 ^{o}C. Έπειτα στα ειδικά σωληνάρια προστίθενται PBS και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση. Τέλος αφαιρείται το PBS που δε πέρασε από το φίλτρο και προστίθενται διάλυμα PBS-NaN_3 0,02% (έχει αντιμικροβιακή δράση) προκειμένου να αποθηκευτούν τα σωληνάρια στους 4 ^{o}C.

Β.5 Ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος προσδιορισμού (ELISA)

Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην τεχνική ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) παρέχουν εξαιρετική εξειδίκευση. Αυτή η δοκιμασία στηρίζεται στην ικανότητα αναγνώρισης και αντίδρασης μεταξύ αντιγόνου και ειδικού αντισώματος. Η ανίχνευση λοιπόν του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος (AgAb) πραγματοποιείται με τη χρήση συγκεκριμένου συμπλέγματος, το οποίο αποτελείται από ομόλογο αντίσωμα και ένα ένζυμο. Η ενζυμική δραστικότητα ανιχνεύεται με την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος μετά την προσθήκη και την οξείδωση κατάλληλου δείκτη του ενζύμου (χρωμογόνο, υπόστρωμα). Η ποσότητα του παραγόμενου έγχρωμου προϊόντος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου, η οποία με τη σειρά της είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος που συνδέθηκε με το αντιγόνο (Γαϊτανάκη et al., 2014).

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στις ELISA είναι η **υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού** (Horse Radish Peroxidase, **HRP**), η αλκαλική φωσφατάση (AP), η β-D-γαλακτοσιδάση (β-GAL) κλπ. Η επιλογή του ενζύμου γίνεται με βάση την πορεία της κάθε ELISA. Τα ένζυμα διακρίνονται σε εκείνα που δρουν έμμεσα στο υπόστρωμα (υπεροξειδάση) και εκείνα που δρουν άμεσα (αλκαλική φωσφατάση, β-D-γαλακτοσιδάση). Η υπεροξειδάση χρησιμοποιείται ευρύτατα γιατί έχει χαμηλό κόστος και δίνει γρήγορη αντίδραση. Μειονεκτεί όμως όσων αφορά το υπόστρωμά της, το οποίο παίρνει ηλεκτρόνιο από το υπεροξείδιο (H_2O_2) και τα δίνει στο χρωμογόνο, δίνοντας οξείδωση με το φως (Γαϊτανάκη et al., 2014).

Η επιτυχία της ELISA εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες: 1) το αντιδραστήριο που ακινητοποιείται στο στερεό υπόστρωμα, 2) το αντίσωμα που επιλέγεται, 3) την παρασκευή του

συζεύγματος, 4) το σύζευγμα και το σύστημα του ενζύμου-υποστρώματος και 5) τον τρόπο ανίχνευσης του τελικού προϊόντος (Γαϊτανάκη et al., 2014).

Υπάρχουν δύο τύποι ανοσοενζυμικών δοκιμασιών: ο ομογενής τύπος και ο ετερογενής τύπος. Οι ανοσοενζυμικές δοκιμασίες ετερογενούς τύπου διακρίνονται σε ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές (Γαϊτανάκη et al., 2014). Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε **μη ανταγωνιστική ELISA** και ειδικότερα **ELISA τύπου «σάντουιτς» (Double antibody sandwich method)**, προκειμένου να μελετηθούν συστατικά του συμπληρώματος (C3, C5a) σε υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87MG.

ELISA μη ανταγωνιστικού τύπου

Η ELISA τύπου «σάντουιτς» προϋποθέτει ακινητοποίηση του **αντισώματος κάλυψης** στη στερεά επιφάνεια της πλάκας μικροτιτλοδότησης, δηλαδή σε υπόστρωμα στερεής φάσης. Στη συνέχεια δείγματα που περιέχουν γνωστά ή άγνωστα αντιγόνα προστίθενται σε ρυθμιστικό διάλυμα που θα ελαχιστοποιήσει την προσάρτηση στη στερεά φάση. Μετά την απομάκρυνση με έκπλυση του αντιγόνου που δεν αντέδρασε προστίθεται δεύτερο αντίσωμα **(αντίσωμα ανίχνευσης),** που αναγνωρίζει έναν διαφορετικό επίτοπο του αντιγόνου σε σχέση με το αντίσωμα κάλυψης. Το αντίσωμα ανίχνευσης είναι συνδεδεμένο με ένζυμο που καταλύει την αντίδραση παραγωγής σήματος. Μετά την προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου μετράται η ενζυμική ενεργότητα (Σκορίλας, 2009). Γενικά πρόκειται για μία ευαίσθητη μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για την εύρεση της συγκέντρωσης του αντιγόνου σε ένα δείγμα. Πραγματοποιείται δηλαδή ποσοτικός προσδιορισμός αντιγόνων μεταξύ δύο στρωμάτων αντισωμάτων (δηλ. μεταξύ αντισώματος κάλυψης και αντισώματος ανίχνευσης). Είναι σημαντικό το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί να έχει τουλάχιστον δυο αντιγονικούς επίτοπους ικανούς για πρόσδεση με αντίσωμα, αφού τουλάχιστον δυο αντισώματα δρουν στην ELISA σάντουιτς. Τέλος μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε πολυκλωνικά είτε μονοκλωνικά αντισώματα ως αντισώματα κάλυψης και ανίχνευσης σε σύστημα ELISA σάντουιτς.

❖ Β.5.1 Δοκιμασία ELISA για ανίχνευση πρωτεΐνης C3 σε υπερκείμενα από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG

Ο σκοπός της συγκεκριμένης δοκιμασίας ELISA είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των επίπεδων της ενδογενώς παραγόμενης πρωτεΐνης C3 σε υπερκείμενα από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG, τα οποία είτε είχαν ακτινοβοληθεί (5 Gy) είτε δεν είχαν ακτινοβοληθεί, καθώς και να βρεθεί οποιαδήποτε ποσοτική διαφορά στη παραγόμενη C3 μεταξύ αυτών των δύο ομάδων. Αξίζει να τονιστεί ότι πριν ξεκινήσει η δοκιμασία ELISA τα συγκεντρωμένα δείγματα των υπερκειμένων κανονικοποιούνται, ώστε να προέρχονται από τον ίδιο αριθμό κυττάρων (υποκεφάλαιο Β.4). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, επειδή τα μη

ακτινοβολημένα κύτταρα ήταν περίπου διπλάσια σε αριθμό από τα ακτινοβολημένα, αραιώθηκαν (περίπου 1,7 φορές) με συγκεντρωμένο θρεπτικό υλικό (10% FBS), ώστε τα δύο δείγματα να προκύπτουν από τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Σαν θετικός μάρτυρας της δοκιμασίας χρησιμοποιείται καθαρή (απομονωμένη) πρωτεΐνη C3 σε διαδοχικές αραιώσεις, προκειμένου να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη και έτσι να πραγματοποιηθεί ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου C3 από τις καλλιέργειες των κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Ο αρνητικός μάρτυρας της συγκεκριμένης πειραματικής διάταξης είναι συγκεντρωμένο (20X) θρεπτικό υλικό, το οποίο ελέγχεται στην ίδια δοκιμασία για την παρουσία σήματος ανοσοδραστικότητας έναντι του C3.

Υλικά και Όργανα:

- Συγκεντρωμένα δείγματα υπερκειμένων (20X) από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG μη ακτινοβολημένα και ακτινοβολημένα στα 5 Gy
- Πρωτεΐνη C3 απομονωμένη από ανθρώπινο πλάσμα
- Μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό **8E11** έναντι των ανθρώπινων C3, C3b και iC3b
- Πολυκλωνικός ορός από αίγα έναντι του ανθρώπινου C3 (**goat anti-human-C3-HRP**), συζευγμένος με HRP (υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού) (Biorad)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS: σε 1 L δις απεσταγμένο νερό διαλύονται 8,5 g NaCl, 2,27 g Na_2HPO_4, 0,47 g NaH_2PO4, pH 7,4)
- **Διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων**: 1% BSA (w/v) (Bovine serum Albumin) σε PBS
- **Διάλυμα έκπλυσης**: 0,05% (v/v) Tween-20 σε PBS
- **Διάλυμα εμφάνισης**: 20 ml Citrate buffer, 20 μl H_2O_2, 10 mg ABTS (το υπόστρωμα-χρωμογόνο του ενζύμου HRP)
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης υψηλής δέσμευσης 96 φρεατίων (NUNC)
- Απορροφητικό χαρτί
- Ελαστική ταινία παραφίνης (parafilm)
- Ορθογώνια πλαστικά δοχεία
- Πολυπιπέτες και αυτόματες πιπέτες 50 και 200 μl
- Φασματοφωτόμετρο σάρωσης πλακών μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων (Spark 10M, TECAN)

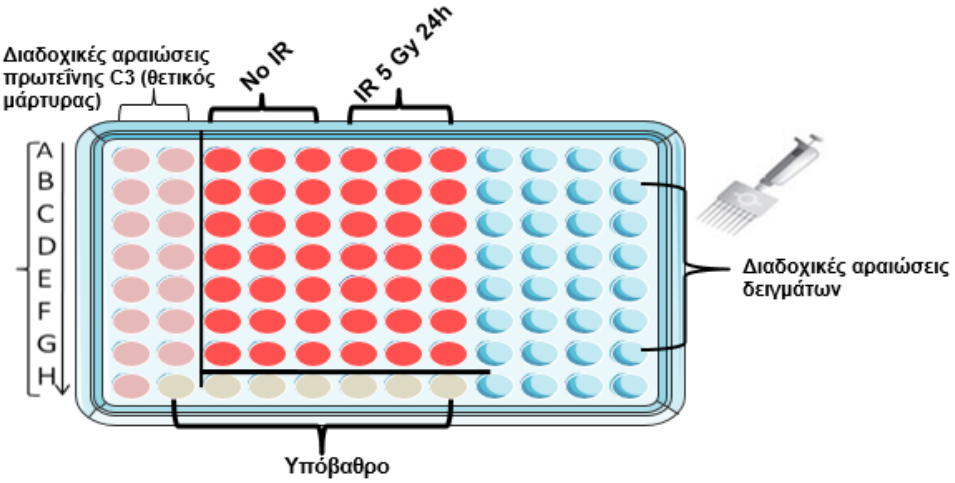
Πειραματικό πρωτόκολλο:

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής (Εικόνα 26):

1. Σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροτιτλοδότησης τοποθετούνται 50 μl διαλύματος **mouse mAb 8E11** (για την παρασκευή του διαλύματος χρησιμοποιείται PBS) σε τελική

συγκέντρωση 1 μg/ml. Η πλάκα καλύπτεται με ελαστική ταινία παραφίνης και επωάζεται για όλη τη νύχτα στους 4 ^{O}C.

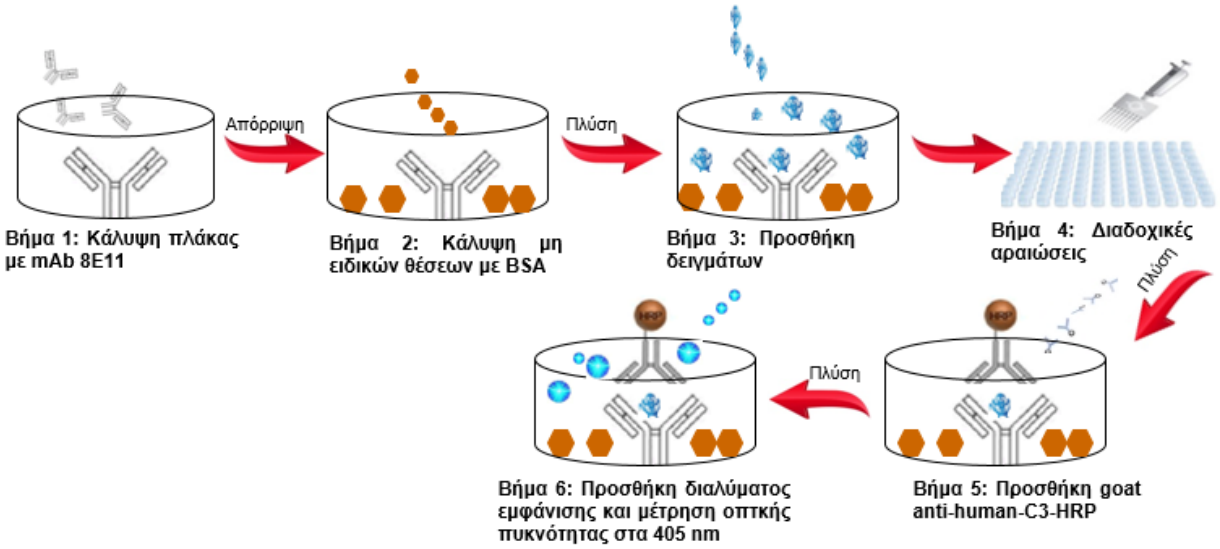
2. Την επόμενη μέρα το διάλυμα απομακρύνεται με απότομη αναστροφή της πλάκας και ακολουθεί στέγνωμα σε χαρτί.
3. Στη συνέχεια σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 200 μl διαλύματος δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων (BSA/PBS). Η πλάκα καλύπτεται και επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα δέσμευσης απομακρύνεται με αναστροφή της πλάκας και στεγνώνεται με απορροφητικό χαρτί.
4. Στη συνέχεια σε συγκεκριμένα φρεάτια (Εικόνα 25) προστίθενται 50 μl διαλύματος PBS, προκειμένου να πραγματοποιηθούν διαδοχικές αραιώσεις στα δείγματα.
5. Έπειτα στα φρεάτια από A3-A8 μεταφέρονται 100 μl των συγκεντρωμένων δειγμάτων υπερκειμένων (δείγματα No IR, IR 5 Gy προστίθενται στα φρεάτια της πλάκας σε τριπλέτες για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων) και ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων με πολυπιπέτα.
6. Κατόπιν στο φρεάτιο A1 μεταφέρονται 100 μl διαλύματος της πρωτεΐνης C3 **συγκέντρωσης 5 μg/ml**, το οποίο χρησιμοποιείται σαν **θετικός μάρτυρας** και επίσης αραιώνεται διαδοχικά ξεκινώντας από συγκέντρωση **5 μg/ml** (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των δειγμάτων στη πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων, όπου πραγματοποιήθηκε η ELISA τύπου «σάντουιτς» για ανίχνευση της πρωτεΐνης C3 σε υπερκείμενα από καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων U87MG. *No IR: μη ακτινοβολημένα, IR: ακτινοβολημένα

7. Η πλάκα καλύπτεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
8. Μετά τη λήξη του χρόνου επώασης το υγρό απομακρύνεται και η πλάκα πλένεται με το διάλυμα έκπλυσης 2 φορές (200 μl/φρεάτιο). Το διάλυμα έκπλυσης απομακρύνεται με αναστροφή της πλάκας και στεγνώνεται με απορροφητικό χαρτί.
9. Στη συνέχεια σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 50 μl πολυκλωνικού ορού **goat anti-human-C3-HRP** σε αραίωση 1:2.000. Η πλάκα καλύπτεται και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

10. Μετά τη λήξη του χρόνου επώασης το υγρό απομακρύνεται και η πλάκα πλένεται με διάλυμα έκπλυσης 3 φορές (200 μl/φρεάτιο). Το διάλυμα έκπλυσης απομακρύνεται με αναστροφή της πλάκας και στεγνώνεται με απορροφητικό χαρτί.
11. Τέλος σε όλα τα φρεάτια μεταφέρονται 50 μl από το διάλυμα εμφάνισης και ακολουθεί, μετά από 5 λεπτά, μέτρηση της οπτικής πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο σάρωσης πλακών μικροτιτλοδότησης (Spark 10M, TECAN) στα 405 nm, σε ποικίλα χρονικά σημεία. Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται στο excel (MS Office) και παρουσιάζονται σε γραφήματα (χρήση λογισμικού Graphpad-Prism).



Εικόνα 26: Συνοπτική απεικόνιση του πρωτοκόλλου της ELISA σάντουιτς για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του C3 σε συμπυκνωμένα δείγματα υπερκειμένων από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG μη ακτινοβολημένα και ακτινοβολημένα σε δόση 5 Gy.

❖ Β.5.2 Δοκιμασία ELISA για προσδιορισμό της ενεργοποίησης του συμπληρώματος σε υπερκείμενα από καλλιέργεια κυττάρων U87MG

Ο σκοπός αυτής της δοκιμασίας ELISA είναι να ανιχνευτούν σε υπερκείμενα από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG, τα οποία είτε είχαν ακτινοβοληθεί (5 Gy) είτε δεν είχαν ακτινοβοληθεί, τυχόν υπάρχοντα ενεργοποιημένα θραύσματα C3, όπως C3b, iC3b, C3c, τα οποία είναι **ενδεικτικά της ενεργοποίησης του συμπληρώματος** στο περιβάλλον των κυττάρων. Ο αρνητικός μάρτυρας (συγκεντρωμένο 20X θρεπτικό μέσο) παραλείπεται, γιατί όπως αναφέρθηκε και παραπάνω δεν έχει καθόλου σήμα για το C3. **Σαν θετικός μάρτυρας της δοκιμασίας** χρησιμοποιείται πλάσμα (δότης S.T), όπου έχει προστεθεί Zymosan προκειμένου να επιτευχθεί μέγιστη δυνατή ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Το Zymosan είναι μια γλυκάνη με επαναλαμβανόμενες μονάδες γλυκόζης συνδεδεμένες με β-1,3-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Παρασκευάζεται από το κυτταρικό τοίχωμα ζυμομύκητα και αποτελείται από σύμπλοκα πρωτεΐνης και υδατάνθρακα. Συνδέεται με τον υποδοχέα TLR2 και επάγει την ενεργοποίηση και των τριών οδών του συμπληρώματος (Sato et al., 2003). Το δείγμα πλάσματος με Zymosan αραιώνεται διαδοχικά, ώστε να προκύψει

πρότυπη καμπύλη, επιτρέποντας έτσι τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενεργοποιημένων θραυσμάτων του συμπληρώματος στα υπερκείμενα από καλλιέργεια κυττάρων γλοιοβλαστώματος.

Αξίζει να αναφερθεί ότι πριν ξεκινήσει η δοκιμασία της ELISA θα πρέπει να παρασκευαστεί το **δείγμα πλάσματος με Zymosan**, το οποίο αποτελεί το θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Αρχικά λοιπόν συλλέγεται από δότη (S.T) ανθρώπινο περιφερικό αίμα σε σωληνάριο, όπου έχει ήδη προστεθεί το αντιπηκτικό λεπιρουδίνη. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η λεπιρουδίνη είναι αναστολέας της θρομβίνης (ανάλογο της ιρουδίνης) και χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό, διότι σε αντίθεση με την ηπαρίνη, δεν παρεμβαίνει στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Mollnes et al., 2002). Ακολουθεί φυγοκέντρηση του αίματος στις 3.000 rpm, στους 4 ^{o}C, για 20 λεπτά, ώστε να διαχωριστεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Έπειτα, συλλέγεται το πλάσμα σε σωληνάριο και προστίθεται Zymosan σε συγκέντρωση 1 mg/ml. Κατόπιν, το δείγμα επωάζεται σε επωαστικό κλίβανο στους 37 ^{o}C, για 30 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθεί το συμπλήρωμα σε ποσοστό 100%. Μετά τη λήξη του χρόνου επώασης ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 4.000 rpm για 15 λεπτά και τελικά συλλέγεται το υπερκείμενο όπου φυλάσσεται στους -80 ^{o}C.

Υλικά και Όργανα:

- Συγκεντρωμένα δείγματα υπερκειμένων (20X) από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων U87MG μη ακτινοβολημένα και ακτινοβολημένα στα 5 Gy
- Δείγμα ανθρώπινου πλάσματος (δότης S.T) με Zymosan
- Το μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό **C3-9** έναντι των ενεργοποιημένων θραυσμάτων **C3b, iC3b, C3c** όχι όμως έναντι του μορίου C3
- Λοιπά υλικά για δοκιμασία ELISA, όπως αναφέρονται στο υποκεφάλαιο Β.5.1

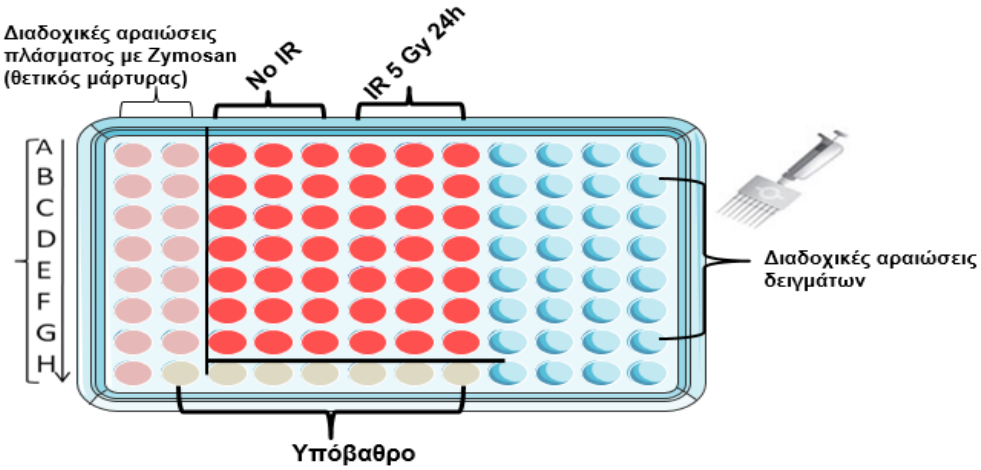
Πειραματικό πρωτόκολλο:

Το πρωτόκολλο για αυτήν τη δοκιμασία ELISA είναι παρόμοιο (Εικόνα 26) με αυτό που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο Β.1.2 με μικρές διαφορές και είναι το εξής:

1. Σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροτιτλοδότησης τοποθετούνται 50 μl διαλύματος **mouse mAb C3-9** (για την παρασκευή του διαλύματος χρησιμοποιείται PBS) σε τελική **συγκέντρωση 2 μg/ml**. Η πλάκα καλύπτεται με ελαστική ταινία παραφίνης και επωάζεται για όλη τη νύχτα στους 4 ^{O}C.
2. Την επόμενη μέρα το διάλυμα απομακρύνεται με απότομη αναστροφή της πλάκας και ακολουθεί στέγνωμα σε χαρτί.
3. Στη συνέχεια σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 200 μl διαλύματος δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων (BSA/PBS). Η πλάκα καλύπτεται και επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία

δωματίου. Το διάλυμα δέσμευσης απομακρύνεται με αναστροφή της πλάκας και στεγνώνεται με απορροφητικό χαρτί.

4. Στη συνέχεια σε συγκεκριμένα φρεάτια (Εικόνα 27) προστίθενται 50 μl διαλύματος PBS, προκειμένου να πραγματοποιηθούν διαδοχικές αραιώσεις στα δείγματα.
5. Έπειτα στα φρεάτια από A3-A8 μεταφέρονται 100 μl των συγκεντρωμένων δειγμάτων υπερκειμένων (δείγματα No IR, IR 5 Gy προστίθενται στα φρεάτια της πλάκας σε τριπλέτες για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων) και ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων με πολυπιπέτα.
6. Κατόπιν στο φρεάτιο A1 μεταφέρονται 100 μl του **πλάσματος με Zymosan**, όπου χρησιμοποιείται σαν **θετικός μάρτυρας** και επίσης αραιώνεται διαδοχικά ξεκινώντας από αρχική αραίωση 1/500 (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των δειγμάτων στη πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων, στην οποία πραγματοποιήθηκε η ELISA τύπου «σάντουιτς» για ανίχνευση ενεργοποιημένων θραυσμάτων C3, δηλαδή C3b, C3c σε υπερκείμενα από καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων U87MG. *No IR: μη ακτινοβολημένα, *IR: ακτινοβολημένα

7. Η πλάκα καλύπτεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
8. Μετά τη λήξη του χρόνου επώασης το υγρό απομακρύνεται και η πλάκα πλένεται με διάλυμα έκπλυσης 2 φορές (200 μl/φρεάτιο). Το διάλυμα έκπλυσης απομακρύνεται με αναστροφή της πλάκας και στεγνώνεται με απορροφητικό χαρτί.
9. Στη συνέχεια σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 50 μl πολυκλωνικού ορού **goat anti-human-C3-HRP** σε αραίωση 1:2.000. Η πλάκα καλύπτεται και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Μετά τη λήξη του χρόνου επώασης το υγρό απομακρύνεται και η πλάκα πλένεται με διάλυμα έκπλυσης 3 φορές (200 μl/φρεάτιο). Το διάλυμα έκπλυσης απομακρύνεται με αναστροφή της πλάκας και στεγνώνεται με απορροφητικό χαρτί.
11. Τέλος σε όλα τα φρεάτια μεταφέρονται 50 μl από το διάλυμα εμφάνισης και ακολουθεί, μετά από 5 λεπτά, μέτρηση της οπτικής πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο (Spark 10M, TECAN) στα 405 nm. Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται στο excel (MS Office) και παρουσιάζονται σε γραφήματα (Graphpad-Prism).

Β.6 Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού (MTT assay)

Η μέθοδος MTT είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία για την αξιολόγηση της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας. Το MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide: thiazolyl blue] είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας του τετραζολίου, το οποίο χρωματίζεται κίτρινο όταν διαλυθεί σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας χωρίς βασικό δείκτη ερυθρό της φαινόλης (RPMI). Το διαλυμένο MTT μετατρέπεται σε **αδιάλυτους μωβ κρυστάλλους φορμαζανίου**, όταν πραγματοποιείται διάσπαση του δακτυλίου του τετραζολίου από ενεργές αφυδρογονάσες. Οι αφυδρογονάσες είναι ένζυμα των μιτοχονδρίων, επομένως η διάσπαση του δακτυλίου πραγματοποιείται μόνο στα ζωντανά κύτταρα, ενώ στα νεκρά κύτταρα δε πραγματοποιείται αυτή η αναγωγή και επομένως το χρώμα του άλατος του τετραζολίου παραμένει κίτρινο. Οι αδιάλυτοι μωβ κρύσταλλοι του φορμαζανίου μπορούν στη συνέχεια να διαλυτοποιηθούν με οργανικό διαλύτη (εδώ χρησιμοποιείται ισοπροπανόλη) και το διάλυμα να φωτομετρηθεί. Η απορρόφηση αυτού του χρωματισμένου διαλύματος μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος με φασματοφωτόμετρο. Οι δοκιμασίες MTT συνήθως πραγματοποιούνται στο σκοτάδι, εφόσον το αντιδραστήριο MTT είναι ευαίσθητο στο φως (Mosmann, 1983).

Επομένως η μέθοδος MTT είναι μια εύκολη, ποσοτική μέθοδος, η οποία έχει πολλές εφαρμογές, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (όπως στη συγκεκριμένη εργασία), αλλά ακόμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας (απώλεια βιώσιμων κυττάρων), ή τη μέτρηση της κυτταροστατικής δράσης πιθανών φαρμακευτικών παραγόντων και τοξικών υλικών (Mosmann, 1983). Στις διάφορες μεθόδους MTT συνηθίζεται να καλλιεργούνται τα κύτταρα σε θρεπτικό μέσο με χαμηλό ορό (1%) ή καθόλου ορό, προκειμένου να παρατηρηθεί μόνο η επίδραση του εξωγενώς προστιθέμενου παράγοντα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και όχι των πρωτεϊνών του ορού.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής τεχνικής στην παρούσα εργασία είναι να μελετηθεί η επίδραση της αναφυλατοξίνης C5a στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων νευροβλαστώματος SK-N-SH.

Υλικά Όργανα:

- Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων SK-N-SH σε εκθετική φάση ανάπτυξης
- Λοιπά υλικά και όργανα για ανακαλλιέργεια και μέτρηση κυττάρων
- Αναφυλατοξίνη human C5a (Hycalt)
- Πλάκες καλλιέργειας 24 φρεατίων (Greiner)
- Αυτόματες πιπέτες ακριβείας και απολήξεις πιπετών (tips)
- Θρεπτικό μέσο DMEM χαμηλό σε ορό (1% FBS, 1% γλουταμίνη, 1% αντιβιοτικά)

- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS με pH=7,4
- Αντιδραστήριο MTT (C=1 mg/ml, ζύγιση σε ζυγό ακριβείας) (Applichen)
- Θρεπτικό μέσο RPMI χωρίς δείκτη ερυθρό της φαινόλης
- Διάλυμα ισοπροπανόλης
- Κωνικά σωληνάρια όγκου 1,5 ml
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (Zeiss)
- Orbital shaker (Bioline)
- Συσκευή αναρρόφησης θρεπτικού υλικού
- Φασματοφωτόμετρο σάρωσης πλακών μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων (Spark 10M,TECAN)

Πειραματικό πρωτόκολλο:

Μέρα 1η: Σπορά κυττάρων

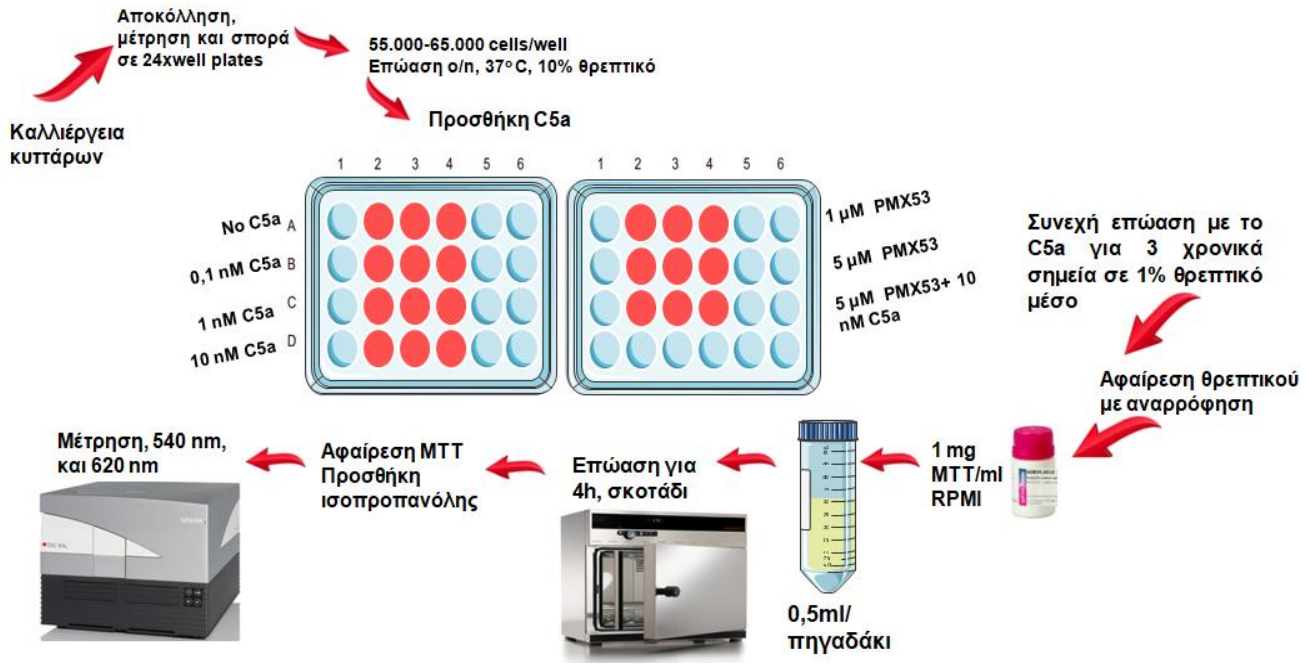
Τα κύτταρα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία MTT προέρχονται από 2η ή 3η ανακαλλιέργεια. Όταν λοιπόν τα κύτταρα φτάσουν την επιθυμητή πυκνότητα γίνεται πλύσιμο 2 φορές με PBS, αποκόλληση με Trypsin/EDTA και μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο σύμφωνα με το πρωτόκολλο όπως αναφέρεται στο υποκεφάλαιο Β.1.3. Γνωρίζοντας τον αριθμό των κυττάρων, ρυθμίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος ώστε να στρωθούν 55.000-65.000 κύτταρα ανά 0,5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου (10% ορό) σε κάθε φρεάτιο μιας πλάκας 24 φρεατίων. Αφού ολοκληρωθεί η σπορά των κυττάρων, επωάζονται στον κλίβανο όλη τη νύχτα.

Μέρα 2η: Προσθήκη του C5a

Την επόμενη μέρα παρατηρούνται τα κύτταρα στο ανάστροφο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί η ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων σε όλα τα φρεάτια. Ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα φρεάτια και πλύσιμο των κυττάρων 1 φορά με PBS. Έπειτα πραγματοποιείται προσθήκη 400 μl θρεπτικού μέσου χαμηλό σε ορό (1% FBS), που περιέχει C5a σε συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10 nM (Εικόνα). Για κάθε συγκέντρωση συνήθως χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον φρεάτια για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων. Σαν **αρνητικός μάρτυρας** χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό με 1% FBS χωρίς C5a. Ακόμα προκειμένου να διαπιστωθεί ότι η δράση του C5a είναι ειδική χρησιμοποιείται ένας αναστολέας της δράσης του C5a, ο **PMX53**, το οποίο είναι ένα κυκλικό εξαπεπτίδιο με δράση ανταγωνιστή που παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα του C5a, C5aR1. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο οι πλάκες επωάζονται στον κλίβανο παρουσία του C5a για 3 διαφορετικά χρονικά διαστήματα , για 24, 48 και 72 ώρες.

Για τη πλάκα κάθε χρονικού σημείου μετά την **ολοκλήρωση του καθορισμένου χρόνου επώασης** ακολουθείται η εξής διαδικασία (Εικόνα 28):

1. Διαλύεται η σκόνη MTT σε RPMI without phenol red, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος στα φρεάτια να είναι 1 mg/ml.
2. Έπειτα αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα φρεάτια με αναρρόφηση υπό κενό με ένα tip. Είναι πολύ σημαντικό να απομακρυνθεί όλο το θρεπτικό υλικό από τα φρεάτια.
3. Στη συνέχεια προστίθενται 500 μl διαλύματος MTT σε κάθε φρεάτιο.
4. Οι πλάκες επωάζονται στον κλίβανο (καλύπτονται με αλουμινόχαρτο) για 4 ώρες στους 37°C, προκειμένου να σχηματιστούν οι μωβ κρύσταλλοι.
5. Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση τα κύτταρα έχουν χρωματιστεί μωβ και ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύματος MTT με αναρρόφηση υπό κενό και κατόπιν προσθήκη ισοπροπανόλης. Ο όγκος της ισοπροπανόλης ρυθμίζεται ώστε να μη γίνει μεγάλη αραίωση στα δείγματα, συνήθως προστίθενται 0,5 ml διαλύματος ισοπροπανόλης ανά φρεάτιο.
6. Στη συνέχεια οι πλάκες αναδεύονται σε shaker σε υψηλές στροφές για περίπου 10 λεπτά προκειμένου να διαλυτοποιηθούν πλήρως οι κρύσταλλοι του φορμαζανίου.
7. Έπειτα λαμβάνεται το δείγμα από κάθε φρεάτιο, μεταφέρεται σε κωνικά σωληνάρια και αναδεύεται πολύ καλά σε vortex.
8. Κατόπιν τα δείγματα μεταφέρονται από τα κωνικά σωληνάρια στα φρεάτια μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων (3 μετρήσεις/δείγμα) και ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο σάρωσης πλακών μικροτιτλοδότησης (TECAN) στα 540 nm και με μήκος κύματος αναφοράς τα 620 nm. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται στο excel (MS Office) και παρουσιάζονται σε γραφήματα (Graphpad-Prism).



Εικόνα 28: Συνοπτική απεικόνιση του πρωτοκόλλου για τη δοκιμασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH σε συνεχή επώαση με το C5a.

Β.7 Δοκιμασία ανίχνευσης ενδοκυττάριων ROS

Μελέτες σε μονοκύτταρα και μακροφάγα έχουν δείξει ότι η δέσμευση του μορίου C5a στον υποδοχέα του C5aR1 μπορεί να προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης ενδοκυττάριων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Έτσι σκοπός της παρούσας δοκιμασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση του C5a στην ενδοκυττάρια παραγωγή ROS στα καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-SH.

Η συγκεκριμένη πειραματική δοκιμασία πραγματοποιείται με τη χρήση της κυτταροδιαπερατής χρωστικής διοξεική 2', 7'-διχλωροδιϋδροφλουορεσκεΐνη (**H2DCFDA**: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), η οποία είναι γνωστή και ως διχλωροφθόριο-δις οξικός εστέρας. Πρόκειται για μια λιγότερο χημικώς δραστική μορφή της φλουορεσκεΐνης, η οποία χρησιμοποιείται ως δείκτης των ROS σε κύτταρα. Για παράδειγμα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παραγωγής δραστικών ενδιάμεσων μορφών οξυγόνου σε ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Κατά την διάσπαση των οξεικών ομάδων από ενδοκυτταρικές εστεράσες και της οξείδωσης, η μη φθορίζουσα H2DCFDA μετατρέπεται στο εξαιρετικά φθορισμογενές προϊόν 2',7'-διχλωροφθορεσκεΐνη (DCF). Έτσι είναι δυνατή η φθορισμομετρική ανίχνευση των ROS. Ο **αρνητικός μάρτυρας** της δοκιμασίας είναι κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί μόνο η χρωστική και όχι το μόριο C5a, έτσι ώστε να βρεθεί το υπόβαθρο της δοκιμασίας και να αφαιρεθεί από τις υπόλοιπες τιμές της μέτρησης. Ο **θετικός μάρτυρας** της δοκιμασίας είναι κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο είναι ισχυρό οξειδωτικό, συμμετέχει σε οξειδωτικές αντιδράσεις και διασπάται σε οξυγόνο και νερό. Επομένως στα δείγματα με H_2O_2 πρέπει να ανιχνεύονται τα μεγαλύτερα επίπεδα ενδοκυττάριων ROS και έτσι ελέγχεται η λειτουργικότητα της δοκιμασίας.

Υλικά και Όργανα:

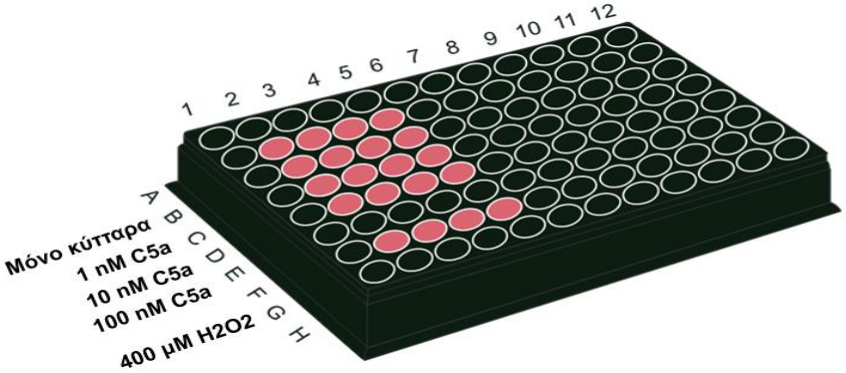
- Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων SK-N-SH σε εκθετική φάση ανάπτυξης
- Λοιπά υλικά και όργανα για ανακαλλιέργεια και μέτρηση κυττάρων
- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS με pH=7,4
- Αναφυλατοξίνη human C5a (Hycalt)
- Θρεπτικό μέσο DMEM χαμηλό σε ορό (1% FBS, 1% γλουταμίνη, 1% αντιβιοτικά)
- Χρωστική H2DCFDA (Invitorgen)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων με μαύρα τοιχώματα και διαυγή πυθμένα (Greiner)
- Αυτόματες πιπέτες ακριβείας και απολήξεις πιπετών (tips)
- Κωνικά σωληνάρια όγκου 1,5 ml

- Φασματοφωτόμετρο σάρωσης πλακών μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων (Spark 10M,TECAN)

Πειραματικό Πρωτόκολλο:

Αρχικά πραγματοποιείται καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH, μέχρι τα κύτταρα να έχουν την επιθυμητή πυκνότητα για το πειραματικό πρωτόκολλο. Στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο (υποκεφάλαιο Β.1.3) και ρύθμιση της συγκέντρωσης του κυτταρικού εναιωρήματος ώστε σε κάθε φρεάτιο της μαύρης πλάκας μικροτιτλοδότησης να σπαρούν περίπου 50.000 κύτταρα ανά 100 μl **πλήρους θρεπτικού μέσου (10% FBS)**. Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για μία μέρα.

Την επόμενη μέρα ελέγχεται η ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στα φρεάτια χρησιμοποιώντας ανάστροφο μικροσκόπιο. Ακολουθεί απόρριψη του θρεπτικού μέσου και πλύση με αποστειρωμένο διάλυμα PBS. Στη συνέχεια προστίθενται σε όλα τα φρεάτια 50 μl διαλύματος χρωστικής H2DCFDA **10 μM** σε θρεπτικό μέσο χαμηλού ορού (1% FBS). Τα κύτταρα επωάζονται με τη χρωστική για 30 λεπτά (η πλάκα μικροτιτλοδότησης καλύπτεται με αλουμινόχαρτο). Μετά τη λήξη της επώασης προστίθενται σε συγκεκριμένα φρεάτια (Εικόνα 29) 50 μl θρεπτικού μέσου (1% FBS) που περιέχει C5a στις συγκεντρώσεις **1**, **10** και **100 nM**. Για κάθε συγκέντρωση συνήθως χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον φρεάτια για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων. Ταυτόχρονα προστίθενται σε μια τετράδα φρεατίων 50 μl θρεπτικού μέσου (1% FBS) με H_2O_2 συγκέντρωσης 400 μM. Αυτή η σειρά φρεατίων αποτελεί το θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Ακόμα υπάρχει και μια τετράδα φρεατίων όπου έχει προστεθεί μόνο η χρωστική στα κύτταρα και κανένας άλλος παράγοντας, επομένως αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, το υπόβαθρο (background) της δοκιμασίας. Αφού λοιπόν προστεθούν τα παραπάνω, τα κύτταρα επωάζονται 30 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο. Τέλος μετά τη λήξη της επώασης απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται σε όλα τα φρεάτια 100 μl διαλύματος PBS. Τα κύτταρα αφήνονται για μερικά λεπτά στον κλίβανο ώστε να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες και πραγματοποιείται μέτρηση με το φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος διέγερσης τα 480 nm και μήκος κύματος εκπομπής στα 522 nm. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται στο excel (MS Office).



Εικόνα 29: Απεικόνηση του σχεδιασμού της πλάκας μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων για την πραγματοποίηση της ανίχνευσης ενδοκυττάριων ROS στα κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-SH με τη χρήση της χρωστικής H2DCFDA.

Κεφάλαιο Γ: Αποτελέσματα

Γ.1 Αποτελέσματα μελέτης των καρκινικών κυττάρων U87MG

❖ Γ.1.1 Μέτρηση της συνολικής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στη καρκινική σειρά U87MG (ενδοκυττάρια και επιφανειακή χρώση)

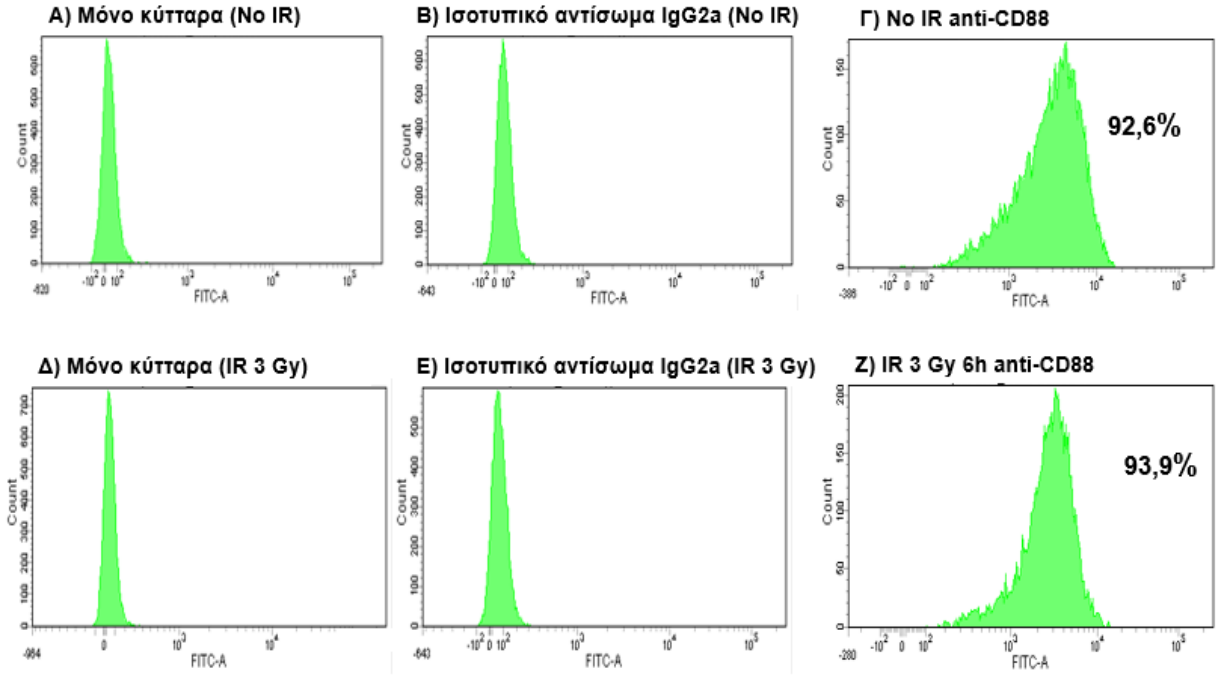
Μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας C5aR1 εκφράζεται στα αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου (in vivo και in vitro), καθώς και ότι η έκφραση του αυξάνεται παρουσία φλεγμονωδών παραγόντων (O'Barr et al., 2001). Επίσης έχει βρεθεί ότι ο C5aR1 εκφράζεται σε καρκινικές σειρές αστροκυτώματος (T98G, U118MG) (Sayah et al., 1999). Παράλληλα, μελέτες σε ζωικά μοντέλα καρκίνου έχουν δείξει ότι σηματοδοτικά μονοπάτια μεσολαβούμενα από τον C5aR1 (PI3K/AKT) επάγουν ένα **προ-ογκογόνο περιβάλλον**, ευνοώντας έτσι την ανάπτυξη του όγκου και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Hajishengallis et al., 2017). Ταυτόχρονα η ενεργοποίηση του συμπληρώματος σε συμπαγείς όγκους έχει συσχετιστεί με την απόκριση στην ακτινοθεραπεία (Surace et al., 2015) και η αλληλεπίδραση προϊόντων ενεργοποίησης του συμπληρώματος (C5a/C5aR1) με παράγοντες που επάγονται μετά από έκθεση καρκινικών κυττάρων σε ακτινοβολία δεν έχει διερευνηθεί.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το γλοιοβλάστωμα είναι ένας καρκίνος με αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα σε ακτινοθεραπείες έγινε προσπάθεια με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής να μελετηθεί η έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα σε πληθυσμούς κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87MG, σε συνδυασμό με **επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας**. Όλα τα πειράματα της κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ σε συνεργασία με τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Γιάννη Κωστόπουλο.

Αρχικά λοιπόν εξετάστηκε η υπόθεση αν τα κύτταρα της καρκινικής σειράς U87MG εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1 και αν αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζει (επιφανειακά και ενδοκυττάρια) τον υποδοχέα ύστερα από **6 ώρες μετά την ακτινοβόληση** στη θεραπευτική δόση των **3 Gy**. Έγινε λοιπόν ενδοκυττάρια χρώση του C5aR1, διότι ο υποδοχέας δεν εντοπίζεται μόνο στη μεμβράνη των κυττάρων, άλλα και σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα.

Στη συγκεκριμένη πειραματική δοκιμασία έγινε σπορά 500.000 κυττάρων ανά 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου (10% FBS) σε κάθε φρεάτιο της κάθε πλάκας καλλιέργειας (βλ. υποκεφάλαιο Β.3.1). Οι δύο πλάκες επωάστηκαν για μία μέρα στον επωαστικό κλίβανο και την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε ακτινοβόληση δόσης 3 Gy στη μία από τις δύο πλάκες. Μετά την ακτινοβόληση οι πλάκες μεταφέρθηκαν στον κλίβανο για 6 ώρες και ύστερα πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο χρώσης του υποδοχέα όπως αναφέρεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο Β.3.1. Για την ανίχνευση του υποδοχέα με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα **anti-human CD88 FITC (συγκέντρωση 0,1 mg/ml)**. Οι αρνητικοί μάρτυρες της μεθόδου ήταν δείγματα (No IR, IR) με το ισοτυπικό αντίσωμα mouse **IgG2a FITC** καθώς και δείγματα (No IR, IR) μόνο με κύτταρα. Ακόμα είναι σημαντικό να τονιστεί ότι προκειμένου να ανιχνευτεί ο

υποδοχέας εντός των ενδοκυττάριων διαμερισμάτων πρέπει η μεμβράνη των κυττάρων να γίνει διαπερατή σε μόρια. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος διαπερατοποίησης **(Permeabilization buffer).** Επιπλέον τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση διαλύματος μονιμοποίησης **(Fixation buffer)**, το οποίο ήταν εξίσου σημαντικό για την ενδοκυττάρια χρώση. Μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο (πρόγραμμα FACSDiva) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω Εικόνα 30.



Εικόνα 30: Αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για ανίχνευση της συνολικής (επιφανειακή και ενδοκυττάρια) έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) σε καρκινικά κύτταρα U87MG 6h μετά από ακτινοβόληση με δόση 3 Gy. Α), Δ) Ιστογράμματα αρνητικών μαρτύρων (No IR και IR 3 Gy 6h) που δείχνουν τον αυτοφθορισμό των κυττάρων. Β), Ε) Ιστογράμματα ισοτυπικού αντισώματος IgG_2a (No IR, IR 3 Gy 6h), μάρτυρας της μη ειδικής δέσμευσης. Γ) Ιστόγραμμα της έκφρασης (επιφανειακής και ενδοκυττάριας) του υποδοχέα C5aR1 σε μη ακτινοβολημένο κυτταρικό πληθυσμό των U87MG. Δ) Ιστόγραμμα της έκφρασης (επιφανειακής και ενδοκυττάριας) του υποδοχέα C5aR1 σε ακτινοβολημένο κυτταρικό πληθυσμό των U87MG. *No IR: μη ακτινοβολημένα, *IR: ακτινοβολημένα

Αρχικά βρέθηκε ότι σχεδόν όλα τα κύτταρα του κυτταρικού εναιωρήματος που ανιχνεύτηκαν στο κυτταρόμετρο εκφράζουν τον C5aR1. Τα ποσοστά έκφρασης του C5aR1 σε κάθε ομάδα κυττάρων (No IR, IR) υπολογίστηκαν αφαιρώντας το υπόβαθρο που προκύπτει από τους αντίστοιχους αρνητικούς μάρτυρες της δοκιμασίας (Εικόνα 30Α, 30Β, 30Δ, 30Ε). Ειδικότερα, πάνω από το 90% των κυττάρων U87MG στον ακτινοβολημένο και μη ακτινοβολημένο κυτταρικό πληθυσμό έδωσε σήμα για τον υποδοχέα C5aR1. Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό εύρημα, λαμβάνοντας υπόψιν τη μεγάλη ετερογένεια του συγκεκριμένου καρκίνου, καθώς χαρακτηρίζεται από πληθυσμό ανομοιόμορφων κυττάρων τόσο ως προς την αντιγονική τους υπογραφή όσο και το μεταγραφικό τους πρόγραμμα. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα μεταξύ του ακτινοβολημένου (93,9%) και μη ακτινοβολημένου κυτταρικού πληθυσμού (92,6%). Αυτό

πιθανά να οφείλεται στο σύντομο χρόνο επώασης των κυττάρων (μόνο 6 ώρες) ύστερα από την ακτινοβόληση. Δηλαδή είναι πιθανό ότι οι 6 ώρες δεν ήταν αρκετές προκειμένου να παρατηρηθεί κάποια σημαντική αλλαγή στην έκφραση του υποδοχέα. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του υποδοχέα C5aR1 και η επαγωγή διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών αρχίζει από τη μεμβράνη των κυττάρων, ύστερα από πρόσδεση του C5a στον υποδοχέα. Επομένως θεωρήσαμε σκόπιμο να εστιάσουμε στο αν αλλάζουν μόνο τα επίπεδα της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα και όχι συνολικά.

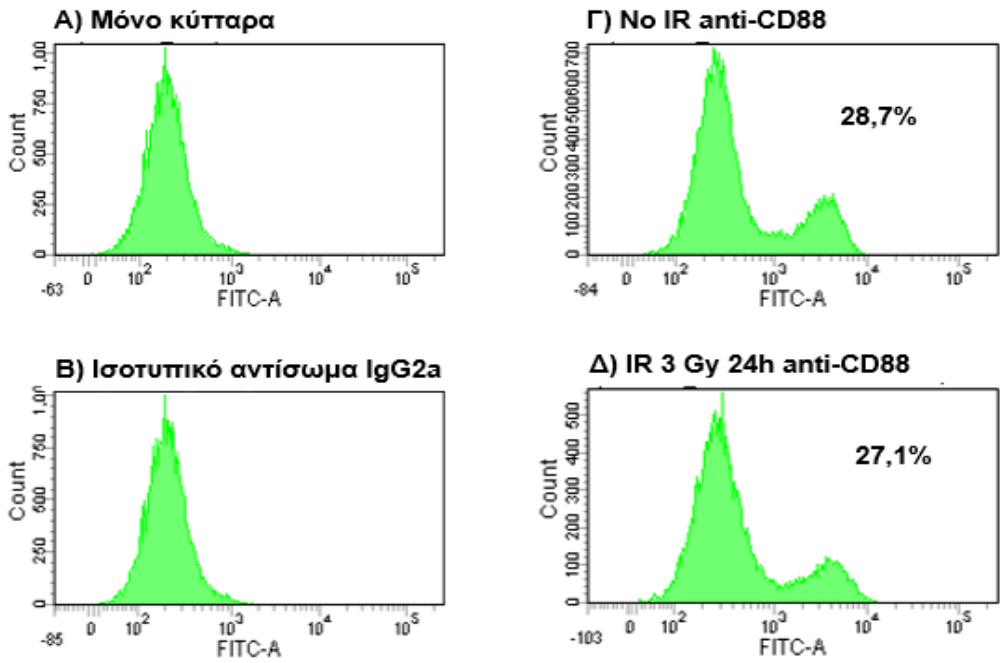
Άρα το επόμενο βήμα της μελέτης ήταν να εξεταστεί αν υπάρχει διαφορά στην επιφανειακή έκφραση του C5aR1 ύστερα από **24h** μετά την ακτινοβόληση δόσης 3 Gy (βλ. υποκεφάλαιο Γ.1.2)

❖ Γ.1.2 Μέτρηση επιπέδων επιφανειακού εντοπισμού του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στη καρκινική σειρά U87MG

Όπως αναφέρεται παραπάνω (υποκεφάλαιο Γ.1.1) το επόμενο βήμα στη μελέτη του C5aR1 ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν **επιφανειακά** τον υποδοχέα σε πληθυσμούς καρκινικών κυττάρων U87MG, που είτε ακτινοβολήθηκαν σε δόση 3 Gy, είτε δεν ακτινοβολήθηκαν (πληθυσμός-μάρτυρας). Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε **24 ώρες** μετά την ακτινοβόληση των κυττάρων, ένα χρονικό διάστημα αρκετό προκειμένου να παρατηρηθεί πιθανή διαφορά στην έκφραση του υποδοχέα, που να εξαρτάται από την παραγωγή φλεγμονωδών διαμεσολαβητών οι οποίοι επάγονται από την επίδραση ακτινοβολίας.

Αρχικά λοιπόν σε κάθε πλάκα (6 φρεατίων) έγινε σπορά 500.000 κυττάρων ανά 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού (10% FBS). Οι πλάκες επωάστηκαν για μία μέρα και την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε ακτινοβόληση δόσης 3 Gy. Μετά την ακτινοβόληση οι πλάκες μεταφέρθηκαν στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες και ύστερα πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο της επιφανειακής χρώσης για τον υποδοχέα, όπως αναφέρεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο Β.3.2. Για την ανίχνευση του υποδοχέα με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα **anti-human CD88 FITC (συγκέντρωση 0,1 mg/ml)**. Οι αρνητικοί μάρτυρες της μεθόδου ήταν ένα δείγμα με το ισοτυπικό αντίσωμα mouse **IgG2a FITC**, καθώς και ένα δείγμα μόνο με κύτταρα.

Στην συγκεκριμένη δοκιμασία δε χρησιμοποιήθηκε διάλυμα διαπερατοποίησης **(Permeabilization buffer),** διότι η χρώση για τον υποδοχέα ήταν μόνο επιφανειακή. Επιπλέον τα κύτταρα δε μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση διαλύματος μονιμοποίησης **(Fixation buffer).** Μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο (FACSDiva) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω Εικόνα 31.

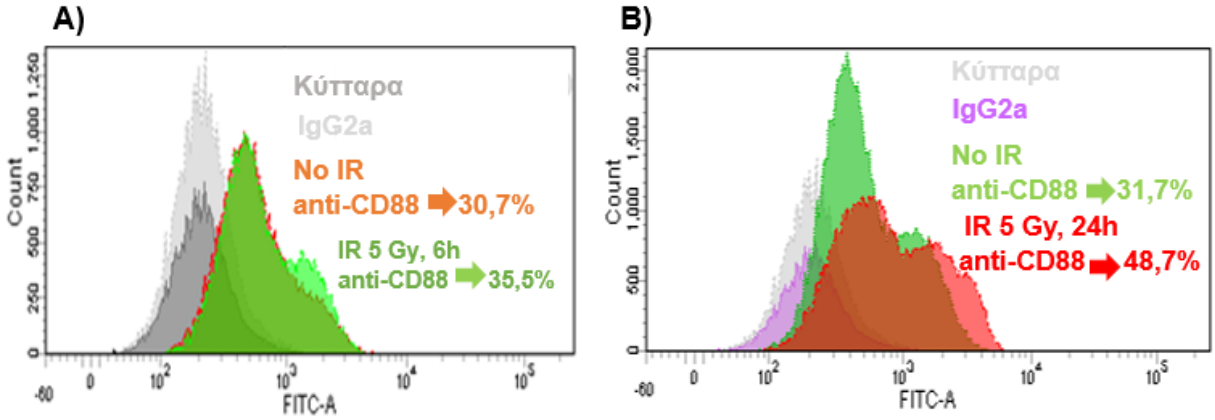


Εικόνα 31: Αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για ανίχνευση της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) σε καρκινικά κύτταρα U87MG 24h μετά από ακτινοβόληση με δόση 3 Gy. Α) Ιστόγραμμα αρνητικού μάρτυρα, που δείχνει τον αυτοφθορισμό των κυττάρων. Β) Ιστόγραμμα ισοτυπικού αντισώματος IgG_2a, μάρτυρας της μη ειδικής δέσμευσης. Γ) Ιστόγραμμα της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 σε μη ακτινοβολημένο κυτταρικό πληθυσμό των U87MG. Δ) Ιστόγραμμα της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 σε ακτινοβολημένο κυτταρικό πληθυσμό των U87MG. *No IR: μη ακτινοβολημένα, *IR: ακτινοβολημένα

Τα ποσοστά έκφρασης του C5aR1 σε κάθε ομάδα κυττάρων (No IR, IR) υπολογίστηκαν αφαιρώντας το υπόβαθρο που προέκυψε από τους αντίστοιχους αρνητικούς μάρτυρες της δοκιμασίας (Εικόνα 31Α, 31Β). Αρχικά βρέθηκε ότι περίπου το 30% των κυττάρων γλοιοβλαστώματος, των δύο υπό μελέτη πληθυσμών, εκφράζουν επιφανειακά των C5aR1. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τον C5aR1 μεταξύ του ακτινοβολημένου (27,1%) σε 5 Gy κυτταρικού πληθυσμού και του μη ακτινοβολημένου κυτταρικού πληθυσμού (28,7%). Το συμπέρασμα λοιπόν από τις παραπάνω μεθόδους είναι ότι δεν παρατηρείται διαφορά στα ποσοστά έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών που είτε είχαν ακτινοβοληθεί σε δόση 3 Gy, είτε δεν είχαν ακτινοβοληθεί, ύστερα από 6 και 24 ώρες από την ακτινοβόληση. Το επόμενο ερώτημα το οποίο τέθηκε στη παρούσα μελέτη ήταν αν αλλάζει η έκφραση του υποδοχέα στα U87MG παρουσία υψηλότερης δόσης ακτινοβολίας, που ωστόσο βρίσκεται μέσα στα όρια των θεραπευτικών δόσεων που έχουν εφαρμοστεί στην ακτινοθεραπεία τέτοιων όγκων.

Έτσι το επόμενο βήμα ήταν να εξεταστεί αν υπάρχει διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν **επιφανειακά** τον υποδοχέα σε πληθυσμούς καρκινικών κυττάρων U87MG, που είτε ακτινοβολήθηκαν σε δόση **5 Gy**, είτε δεν ακτινοβολήθηκαν (πληθυσμός-μάρτυρας). Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε **6 ώρες** και **24 ώρες** μετά την ακτινοβόληση των κυττάρων. Το πρωτόκολλο είναι παρόμοιο με αυτό που αναφέρεται παραπάνω. Αρχικά σε κάθε

φλάσκα έγινε σπορά 750.000-800.000 κυττάρων ανά 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού (10% FBS). Οι πλάκες επωάστηκαν για μία μέρα και την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε ακτινοβόληση δόσης 5 Gy. Ύστερα πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο της επιφανειακής χρώσης για τον υποδοχέα όπως αναφέρεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο Β.3.2. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής απεικονίζονται στην Εικόνα 32.



Εικόνα 32: Αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για ανίχνευση της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) σε καρκινικά κύτταρα U87MG 6h και 24h μετά από ακτινοβόληση δόσης 5 Gy. Α) Ιστογράμματα αρνητικού μάρτυρα (αυτοφθορισμός κυττάρων), ισοτυπικού αντισώματος IgG_2a (μάρτυρας μη ειδικής δέσμευσης), και επιφανειακής έκφρασης του C5aR1 σε κυτταρικούς πληθυσμούς No IR, IR 5 Gy 6h. Β) Ιστογράμματα αρνητικού μάρτυρα, ισοτυπικού αντισώματος IgG_2a και επιφανειακής έκφρασης του C5aR1 σε κυτταρικούς πληθυσμούς No IR, IR 5 Gy 24h. Η μετατόπιση των καμπυλών αντιστοιχεί σε αύξηση της μέσης τιμής έντασης του φθορισμού. *No IR: μη ακτινοβολημένα, IR: ακτινοβολημένα

Τα ποσοστά έκφρασης του C5aR1 σε κάθε κατηγορία κυττάρων (No IR, IR) υπολογίστηκαν αφαιρώντας το υπόβαθρο που προέκυψε από τους αντίστοιχους αρνητικούς μάρτυρες της δοκιμασίας. Όπως φαίνεται στα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρήθηκε διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τον C5aR1 μεταξύ του ακτινοβολημένου σε 5 Gy κυτταρικού πληθυσμού (35,5%) και μη ακτινοβολημένου κυτταρικού πληθυσμού (30,7%). Η συγκεκριμένη διαφορά παρατηρήθηκε σε κύτταρα που επωάστηκαν για **6 ώρες** μετά την ακτινοβόληση. Παράλληλα σε κύτταρα που επωάστηκαν για **24 ώρες** μετά την ακτινοβόληση παρατηρήθηκε ακόμα μεγαλύτερη διαφορά (17%) στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα μεταξύ του ακτινοβολημένου σε 5 Gy κυτταρικού πληθυσμού (48,7%) και μη ακτινοβολημένου κυτταρικού πληθυσμού (31,7%).

Συμπερασματικά λοιπόν, παρατηρήθηκε ότι η ακτινοβολία υψηλότερης θεραπευτικής δόσης (5 Gy) οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα τόσο στις 6 ώρες όσο και στις 24 ώρες μετά την ολοκλήρωση της ακτινοβόλησης. Επομένως επιβεβαιώνεται η υπόθεση μας ότι αυξάνεται ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR παρουσία γενοτοξικού-κυτταρικού στρες μετά από έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες.

❖ Γ.1.3 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης και ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C3 στη καρκινική σειρά U87MG μετά από επίδραση ακτινοβολίας

Αρχικά είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι καρκινικά κύτταρα γλοιώματος (U11SMG, T193 και T98G) παράγουν ενδογενώς συστατικά του συμπληρώματος όπως το C3, το C5 (Gasque et al., 1993), και τα ενεργοποιημένα θραύσματά τους (Cho et al., 2014). Επιπρόσθετα έχει βρεθεί από προηγούμενα πειράματα που διεξήχθησαν στο εργαστήριο, ότι και τα καρκινικά κύτταρα της σειράς U87MG έχουν την ικανότητα ενδογενής παραγωγής των C3 και C5a.

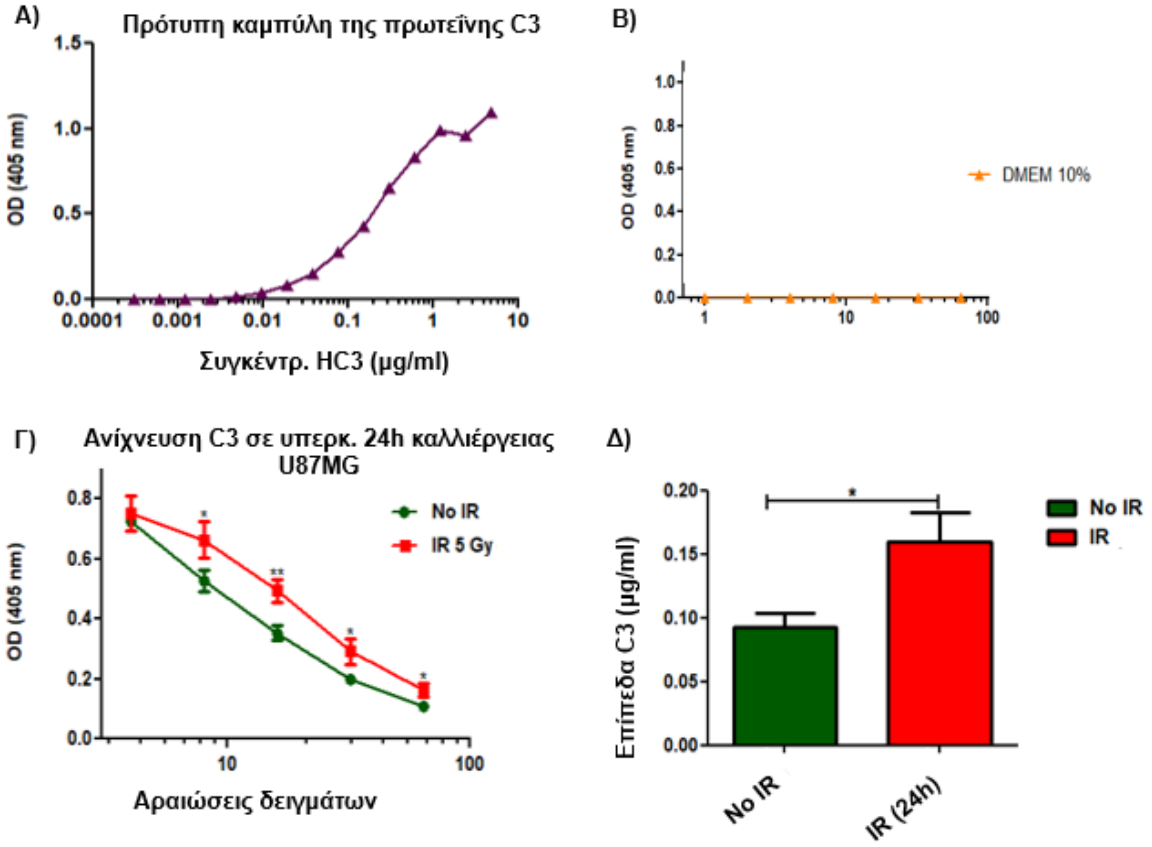
Ταυτόχρονα είναι γνωστό από διάφορες μελέτες ότι η ακτινοβολία, εκτός από την άμεση πρόκληση γενοτοξικών βλαβών στα κύτταρα έχει συσχετιστεί και με την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος στο μικροπεριβάλλον συμπαγών όγκων (Elvington et al., 2014). Παρότι πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος διευκολύνει την ανοσολογική αντίδραση έναντι του όγκου, υπάρχει ένα ολοένα αυξανόμενο σύνολο πειραματικών ευρημάτων που υποστηρίζει ότι η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος σχετίζεται με κακή πρόγνωση, καθώς εξυπηρετεί την ανάπτυξη του όγκου (Olcina et al., 2018). Για αυτόν το λόγο, εξετάστηκε στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος, αν αυξάνεται η παραγωγή συστατικών του συμπληρώματος και η ενεργοποίηση τους στο μικροπεριβάλλον του όγκου μετά από έκθεση σε ακτινοβολία.

Έτσι λοιπόν σε πρώτο στάδιο έγινε προσπάθεια να ελεγχθεί με δοκιμασία ELISA κατά πόσο η ακτινοβολία δόσης 5 Gy προκαλεί αύξηση της έκκρισης του C3 και στη συνέχεια μελετήθηκε η παρουσία ενεργοποιημένων θραυσμάτων του C3 (C3b/iC3b/C3c) σε υπερκείμενα καλλιέργειας U87MG. Αρχικά πραγματοποιήθηκε συλλογή υπερκειμένων **24h καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων U87MG** σε πλήρες θρεπτικό μέσο (10% FBS), τόσο ακτινοβολημένων στα **5 Gy** όσο και μη ακτινοβολημένων, και κατόπιν ακολούθησε συγκέντρωσή τους με φυγοκέντρηση σε ειδικά φίλτρα (υποκεφάλαιο Β.4). Τα δείγματα των υπερκειμένων συγκεντρώθηκαν **20 φορές** με φίλτρο AMICON (βλ. υποκεφάλαιο Β.4), ενώ το προς ανάλυση δείγμα από τα υπερκείμενα κανονικοποιήθηκε με βάση τον αριθμό των προσκολλημένων κυττάρων που μετρήθηκε στις φλάσκες κάθε κατηγορίας (δηλ. σε καλλιέργεια-μάρτυρα και ακτινοβολημένη καλλιέργεια). Αυτός ο χειρισμός κρίθηκε απαραίτητος γιατί η καλλιέργεια που εκτέθηκε σε ακτινοβολία 5 Gy παρουσίασε πτώση επιβίωσης κατά 40% σε σχέση με την καλλιέργεια-μάρτυρα.

ELISA ολικού C3:

Για την ανίχνευση των **ολικών επιπέδων του C3** πραγματοποιήθηκε ELISA όπου χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου C3, **8E11** (1 μg/ml), το οποίο αναγνωρίζει τόσο το ακέραιο C3, όσο και τα θραύσματά του C3b και iC3b. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM, στο οποίο δεν ανιχνεύεται καθόλου C3 (Εικόνα 33Β). Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης

και την ποσοτικοποίηση των υπό εξέταση δειγμάτων χρησιμοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος C3 (5 μg/ml) που έχει απομονωθεί από ανθρώπινο πλάσμα. Τα αποτελέσματα της μέτρησης σε φασματοφωτόμετρο σάρωσης πλακών μικροτιτλοδότησης (405 nm) απεικονίζονται στα παρακάτω γραφήματα (Εικόνα 33).

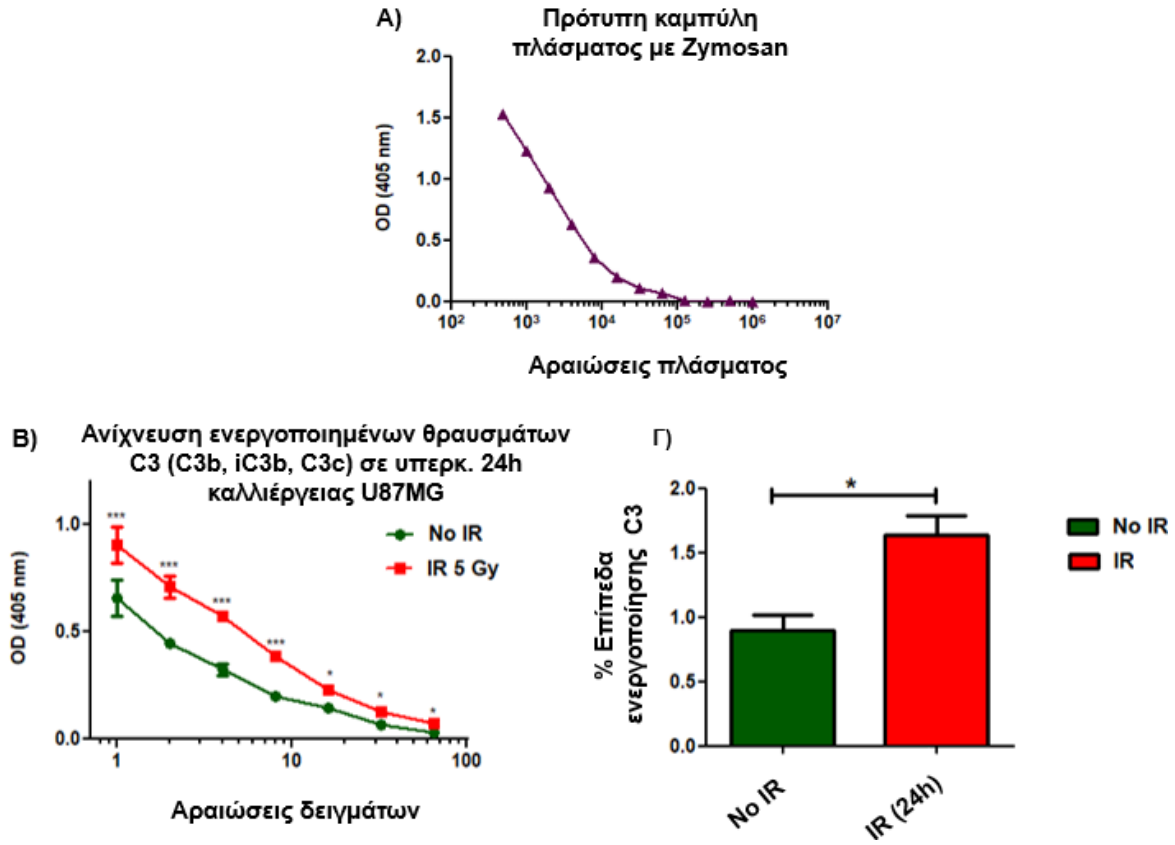


Εικόνα 33: Αποτελέσματα της ELISA ανίχνευσης ολικού C3 σε υπερκείμενα 24h καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων U87MG. Α) Η πρότυπη καμπύλη της πρωτεΐνης C3 γνωστής συγκέντρωσης. Χρησιμοποιώντας αυτήν την καμπύλη έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός του C3 στα υπερκείμενα. Β) Η καμπύλη του αρνητικού μάρτυρα της δοκιμασίας (DMEM). Γ) Καμπύλες οπτικής πυκνότητας του μορίου C3 στα υπερκείμενα καλλιεργειών (No IR, IR). Δ) Διάγραμμα των επιπέδων του παραγόμενου C3 (μg/ml) στα υπερκείμενα καλλιεργειών (No IR, IR). *No IR: μη ακτινοβολημένα, *IR: ακτινοβολημένα

Αναλύοντας τα αποτελέσματα του πειράματος, χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη του ανθρώπινου C3 και λαμβάνοντας υπόψιν το βαθμό συγκέντρωσης (20X) των δειγμάτων των υπερκειμένων, προσδιορίστηκαν σημαντικές ποσότητες ενδογενώς παραγόμενου μορίου C3 στα δείγματα των υπερκειμένων (Εικόνα 33Γ, 33Δ). Βρέθηκε **στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$, T-test) υψηλότερη ποσότητα εκκρινόμενου C3** στα υπερκείμενα ακτινοβολημένων κύτταρων και μάλιστα περίπου διπλάσια από την ποσότητα εκκρινόμενου C3 στα υπερκείμενα μη ακτινοβολημένων κυττάρων (Εικόνα 33Γ, 33Δ). Πρόκειται λοιπόν για ένα πολύ σημαντικό εύρημα, που επιβεβαιώνει εν μέρει την υπόθεση μας ότι η επίδραση ακτινοβολίας οδηγεί σε **αύξηση** της παραγωγής του C3 στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος, πιθανά αντανακλώντας μια προσαρμοστική αύξηση στην έκκριση φλεγμονωδών μεσολαβητών των κυττάρων γλοιοβλαστώματος μετά από την ακτινοβόληση.

ELISA ενεργοποιημένων θραυσμάτων C3:

Το επόμενο βήμα ήταν να ελεγχθεί η υπόθεσή μας ότι η ακτινοβόληση προάγει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (δηλ. την πρωτεολυτική θραύση του μορίου C3) από τα ίδια τα καρκινικά κυττάρα. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν με ELISA τα επίπεδα **των ενεργοποιημένων θραυσμάτων του C3** (C3b/iC3b/C3c) στα υπερκείμενα από καλλιέργειες μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κυττάρων U87MG. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν ELISA με τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος **mouse mAb C3-9** (2 μg/ml), το οποίο αναγνωρίζει και δεσμεύει εκλεκτικά μόνο τα ενεργοποιημένα θραύσματα C3b/iC3b/C3c. Ο αρνητικός μάρτυρας της συγκεκριμένης δοκιμασίας είναι το θρεπτικό μέσο, αλλά παραλήφθηκε διότι αποδείχθηκε σε προηγούμενη πειραματική δοκιμασία ότι δεν ανιχνευθεί καθόλου C3. Ο θετικός μάρτυρας της ELISA ήταν δείγμα πλάσματος με Zymosan προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Το Zymosan-πλάσμα αραιώθηκε διαδοχικά (αρχική αραίωση 1/500) προκειμένου να προκύψει πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των ενεργοποιημένων C3 θραυσμάτων στα υπερκείμενα. Τα αποτελέσματα της μέτρησης σε φασματοφωτόμετρο (405 nm) απεικονίζονται στα παρακάτω γραφήματα (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Αποτελέσματα της ELISA ανίχνευσης των επιπέδων των ενεργοποιημένων θραυσμάτων σε υπερκείμενα 24h καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων U87MG (No IR, IR 5 Gy). Α) Η πρότυπη καμπύλη του πλάσματος με Zymosan. Χρησιμοποιώντας αυτήν την καμπύλη έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός των C3b/iC3b/C3c στα υπερκείμενα. Β) Καμπύλες οπτικής πυκνότητας των C3b/iC3b/C3c στα υπερκείμενα (No IR, IR). Γ) Διάγραμμα των % επιπέδων ενεργοποίησης του C3. *No IR: μη ακτινοβολημένα, *IR: ακτινοβολημένα

Αναλύοντας λοιπόν τα αποτελέσματα του πειράματος, χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη του πλάσματος με Zymosan (34Α) και λαμβάνοντας υπόψιν το βαθμό συγκέντρωσης (20Χ) των δειγμάτων των υπερκειμένων, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ενεργοποιημένων θραυσμάτων του C3 στα δείγματα των υπερκειμένων (Εικόνα 34). Βρέθηκαν λοιπόν **στατιστικά σημαντικά (p<0.05, T-test) υψηλότερα επίπεδα ενεργοποιημένων θραυσμάτων C3** στα υπερκείμενα ακτινοβολημένων κύτταρων και μάλιστα περίπου διπλάσια από τα επίπεδα ενεργοποιημένων θραυσμάτων στα υπερκείμενα κυττάρων που δεν είχαν ακτινοβοληθεί (Εικόνα 34Β, 34Γ).

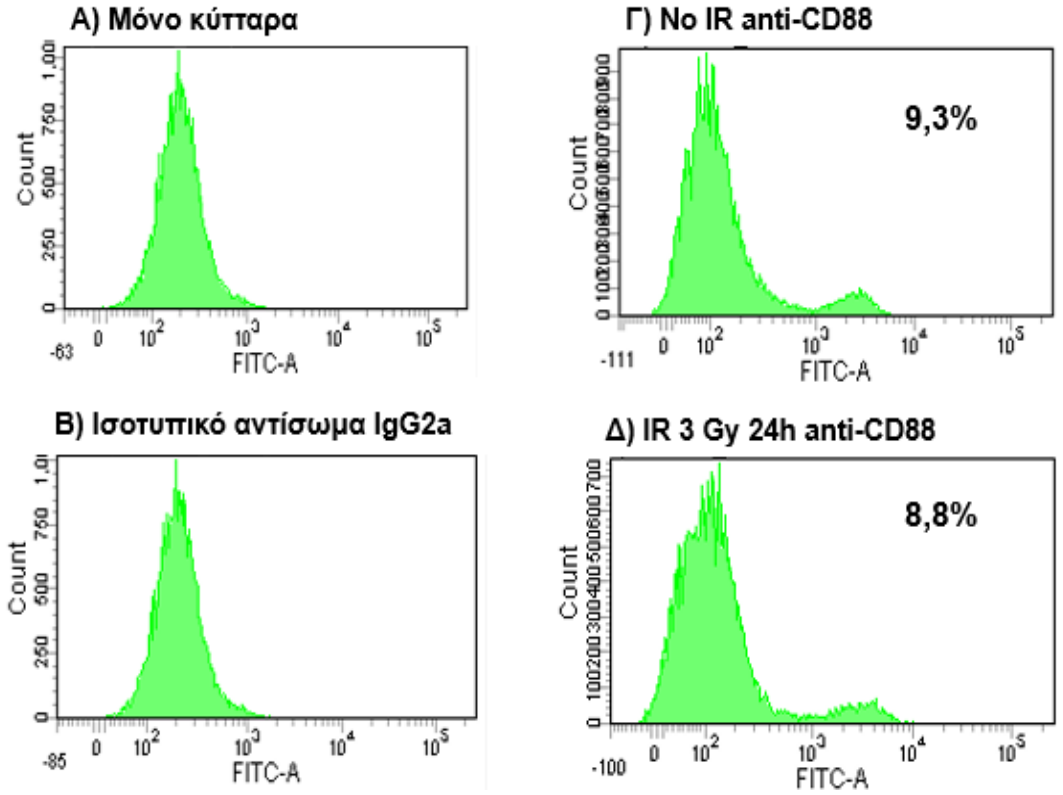
Γ.2 Αποτελέσματα μελέτης των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH

❖ Γ.2.1 Μέτρηση επιπέδων επιφανειακού εντοπισμού του υποδοχέα C5aR1 (CD88) στην καρκινική σειρά SK-N-SH

Ένα από τα σημαντικά συστατικά του συμπληρώματος, η αναφυλατοξίνη C5a και ο κύριος μεμβρανικός υποδοχέας της C5aR1, παίζουν κεντρικό ρόλο στη φλεγμονή και την ανοσολογική άμυνα, όπως είναι ευρέως γνωστό. Ωστόσο, αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ότι αυτό το σύστημα διαθέτει επίσης απροσδόκητους ρόλους στην ανάπτυξη, όπως στην μορφογένεση, νευρογένεση, μετανάστευση και δημιουργία νευρωνικών συνάψεων. Ειδικότερα έχει βρεθεί σε μελέτες, ότι ο υποδοχέας C5aR1 εκφράζεται από νευρικά προγονικά κύτταρα κατά το στάδιο της εμβρυογένεσης των θηλαστικών (Coulthard et al., 2017). Με βάση τα παραπάνω, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι ο C5aR1 εκφράζεται στην καρκινική σειρά νευροβλαστώματος SK-N-SH και πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για να ελεγχθεί η έκφραση του υποδοχέα. Η μέθοδος συνδυάστηκε και με ακτινοβολία, που όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως δημιουργεί συνθήκες γενοτοξικού στρες και φλεγμονής.

Έτσι λοιπόν εξετάστηκε αν κύτταρα της καρκινικής σειράς SK-N-SH εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1 και αν αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζει επιφανειακά τον υποδοχέα ύστερα από **24 ώρες μετά την ακτινοβόληση** στη θεραπευτική δόση των **3 Gy**. Αρχικά λοιπόν σε κάθε φρεάτιο μιας πλάκας καλλιέργειας 6 φρεατίων έγινε σπορά 600.000 κυττάρων ανά 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Οι πλάκες επωάστηκαν για μία μέρα και την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε ακτινοβόληση δόσης **3 Gy**. Μετά την ακτινοβόληση οι πλάκες μεταφέρθηκαν στον επωαστικό κλίβανο για **24 ώρες** και ύστερα πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο της επιφανειακής χρώσης για τον υποδοχέα όπως αναφέρεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο Β.3.2. Για την ανίχνευση του υποδοχέα με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα **anti-human CD88 FITC (συγκέντρωση 0,1 mg/ml)**. Οι αρνητικοί μάρτυρες της μεθόδου ήταν ένα δείγμα με το ισοτυπικό αντίσωμα mouse **IgG2a FITC** καθώς και ένα δείγμα

μόνο με κύτταρα. Μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω Εικόνα 35.



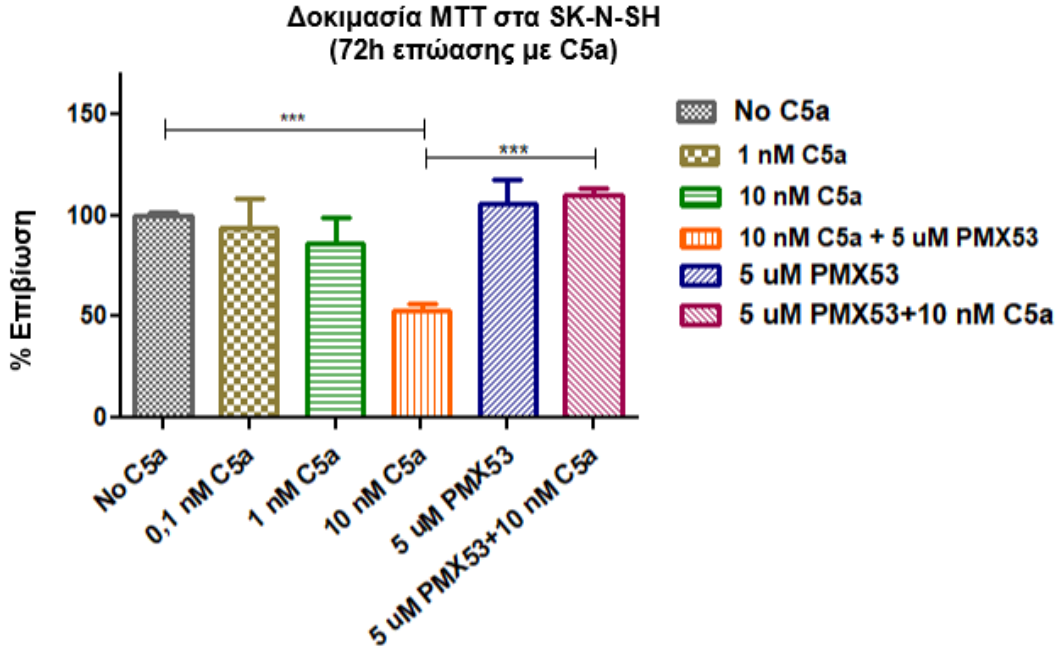
Εικόνα 35: Αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για ανίχνευση της έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) σε καρκινικά κύτταρα SK-N-SH 24h μετά από ακτινοβόληση με δόση 3 Gy. Α) Ιστόγραμμα αρνητικού μάρτυρα (αυτοφθορισμός κυττάρων). Β) Ιστόγραμμα ισοτυπικού αντισώματος IgG_2a (μάρτυρας μη ειδικής δέσμευσης). Γ) Ιστόγραμμα της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 σε μη ακτινοβολημένο κυτταρικό πληθυσμό των SK-N-SH. Δ) Ιστόγραμμα της επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 σε ακτινοβολημένο κυτταρικό πληθυσμό των SK-N-SH. No IR: μη ακτινοβολημένα, *IR: ακτινοβολημένα

Τα ποσοστά έκφρασης του C5aR1 σε κάθε κατηγορία κυττάρων (No IR, IR) υπολογίστηκαν αφαιρώντας το υπόβαθρο που προέκυψε από τους αντίστοιχους αρνητικούς μάρτυρες της δοκιμασίας. Όπως φαίνεται και στα παραπάνω αποτελέσματα, βρέθηκε ότι ένα μικρό ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων SK-N-SH (περίπου 9%), εκφράζει στην μεμβράνη του τον υποδοχέα. Ωστόσο 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τον C5aR1 μεταξύ του ακτινοβολημένου (8,8%) σε δόση **3 Gy** και μη ακτινοβολημένου κυτταρικού πληθυσμού (9,3%).

❖ Γ.2.2 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH

Σε διάφορους καρκινικούς τύπους έχει βρεθεί ότι η αναφυλατοξίνη C5a μπορεί να προάγει την ανάπτυξη του όγκου, τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την διεισδυτικότητά τους και την μεταναστευτική τους ικανότητα (Elvington et al., 2014). Επομένως έχοντας ελέγξει αρχικά ότι ένα ποσοστό του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1, θελήσαμε στη συνέχεια να διερευνήσουμε την επίδραση της αναφυλατοξίνης C5a στον πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος SK-N-SH.

Αρχικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (υποκεφάλαιο Β.6) έγινε σπορά 55.000-65.000 κυττάρων ανά 0,5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου (10% FBS) σε κάθε φρεάτιο μιας πλάκας 24 φρεατίων και επωάστηκαν στον κλίβανο για μία μέρα. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 400 μl θρεπτικού μέσου χαμηλό σε ορό (1% FBS), που περιείχε C5a σε συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10 nM. Για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία φρεάτια για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων. Σαν **αρνητικός μάρτυρας** χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό με 1% FBS χωρίς C5a. Ακόμα για να διαπιστωθεί ότι η δράση του C5a είναι ειδική, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της δράσης του C5a, ο **PMX53**, που δρα δηλαδή ως ανταγωνιστής του μορίου για την πρόσδεση στον υποδοχέα του C5aR1. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο οι πλάκες επωάστηκαν με συνεχή παρουσία του C5a (**0,1 1, 10 nM**) για 3 διαφορετικά χρονικά σημεία, για 24, 48 και 72 ώρες. Μετά την **ολοκλήρωση του καθορισμένου χρόνου επώασης** έγινε προσθήκη 500 μl διαλύματος MTT/RPMI (1 mg/ml) ανά φρεάτιο της πλάκας και οι πλάκες επωάστηκαν για 4 ώρες. Τέλος προστέθηκε ισοπροπανόλη για τη διαλυτοποίηση των μωβ δακτυλίων και ακολούθησε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο (540 nm, μήκος κύματος αναφοράς 620 nm). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στο excel (Εικόνα 36).



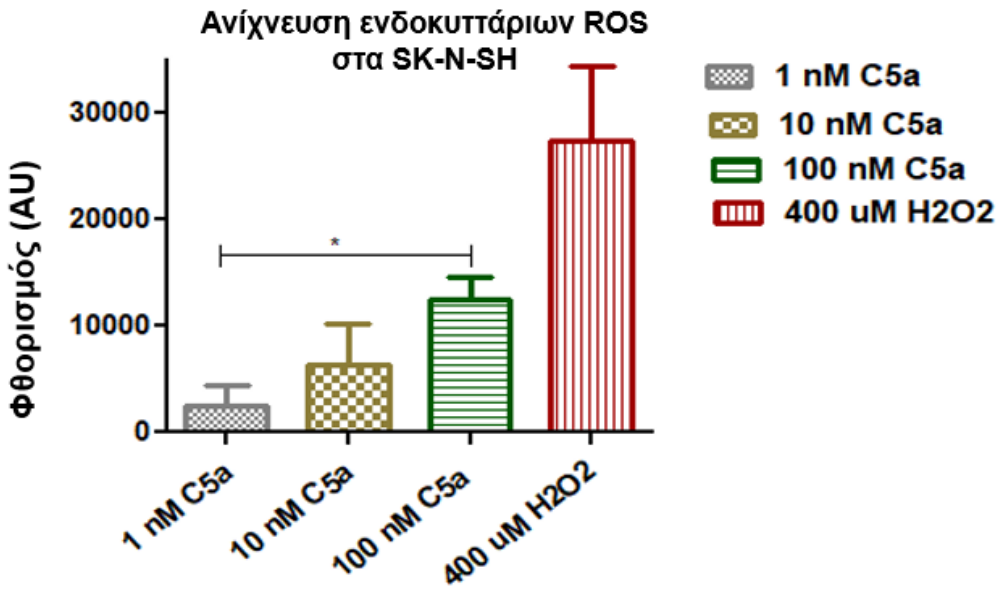
Εικόνα 36: Γράφημα του % ποσοστού επιβίωσης των SK-N-SH ύστερα από 72h επώασης με C5a στις συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10 nM σε θρεπτικό μέσο με 1% FBS.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα βρέθηκε ότι παρουσία του μορίου C5a στο θρεπτικό μέσο (1% FBS) **μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης** των κυττάρων SK-N-SH, συγκρίνοντάς το με το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων απουσία του C5a (αρνητικός μάρτυρας). Μάλιστα η μεγαλύτερη μείωση της επιβίωσης των κυττάρων παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση **των 10 nM C5a** και μάλιστα με **στατιστικά πολύ σημαντική** διαφορά **($p<0.05$, T-test)** σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Επιπλέον βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων έγινε φανερό ότι η επίδραση του C5a στα SK-N-SH είναι ειδική και όχι τυχαία, αφού τα κύτταρα που συνεπωάστηκαν με τον PMX53 (εκλεκτικός αναστολέας της δράσης του C5a) και το C5a βρέθηκε να έχουν περίπου το ίδιο ποσοστό επιβίωσης με τα κύτταρα-αρνητικούς μάρτυρες (απουσία του C5a). Δηλαδή παρουσία του PMX53 η επιβίωση των κυττάρων επανέρχεται στα ίδια ποσοστά επιβίωσης που έχουν τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 36).

❖ Γ.2.3 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στην απελευθέρωση ενδοκυττάριων ROS στην καρκινική σειρά SK-N-SH

Η συσσώρευση ROS εντός του κυττάρου οδηγεί στη δημιουργία ενός οξειδωτικού περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα τη πρόκληση βλάβης στο DNA είτε μέσω συσσώρευσης πολλών μεταλλάξεων, είτε μέσω ενίσχυσης του ογκογονικού φαινοτύπου, και επίσης δρώντας ως δευτερογενές σήμα σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης (Rinaldi et al., 2016). Παράλληλα είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα C5aR1 μέσω πρόσδεσης του C5a και η επακόλουθη επαγωγή διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών μπορεί να προκαλεί αύξηση της ενδοκυττάριας απελευθέρωσης ROS σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (Beltrame et al., 2014). Επομένως θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση του μορίου C5a στην καρκινική σειρά SK-N-SH και κατά επέκταση τη λειτουργικότητα του C5aR1 στη συγκεκριμένη καρκινική σειρά.

Αρχικά λοιπόν έγινε σπορά 50.000 κυττάρων ανά 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου (10% FBS) σε κάθε φρεάτιο μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων. Τα κύτταρα επωάζονται για μία μέρα. Την επόμενη μέρα προστέθηκε στα κύτταρα διάλυμα χρωστικής H2DCFDA (συγκέντρωσης 10 μM) σε θρεπτικό μέσο χαμηλού ορού (1% FBS) για 30 λεπτά και έπειτα προστέθηκε C5a στις συγκεντρώσεις **1**, **10** και **100 nM** (4 φρεάτια ανά συγκέντρωση για εξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων) για άλλα 30 λεπτά. Ο θετικός μάρτυρας της δοκιμασίας ήταν H_2O_2 συγκέντρωσης 400 μM. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία μόνο της χρωστικής H2DCFDA. Μετά τη λήξη της επώασης πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος διέγερσης τα 480 nm και μήκος κύματος εκπομπής στα 522 nm. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε στο excel και παρουσιάζονται στην παρακάτω Εικόνα 37.



Εικόνα 37: Γράφημα των επιπέδων ενδοκυττάριων ROS στην κυτταρική σειρά SK-N-SH υπό την επίδραση C5a στις συγκεντρώσεις 1, 10 και 100 nM C5a. Στο συγκεκριμένο γράφημα δεν απεικονίζεται το ιστόγραμμα του αρνητικού μάρτυρα διότι οι τιμές του συγκεκριμένου δείγματος χρησιμοποιήθηκαν ως υπόβαθρο και αφαιρέθηκαν από τις τιμές των άλλων δειγμάτων.

Αρχικά όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα (Εικόνα 37), παρατηρήθηκε ότι η συγκεκριμένη καρκινική σειρά νευροβλαστώματος έδωσε θετική δοκιμασία παρουσία της χρωστικής H2DCFDA. Συγκεκριμένα, καταγράφηκαν πολύ υψηλές τιμές φθορισμού στα κύτταρα (ως αποτέλεσμα οξείδωσης της χρωστικής H2DCFDA) μετά την προσθήκη H_2O_2, που αποτελεί το θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Επιπρόσθετα βρέθηκε σημαντική αύξηση **($p<0.05$, T-test)** των επιπέδων ROS σε κύτταρα που επωάστηκαν με C5a, με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων ROS ανιχνεύτηκε στη συγκέντρωση 100 nM C5a. Μάλιστα τα επίπεδα του συγκεκριμένου δείγματος διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα ROS των κυττάρων που επωάστηκαν με C5a συγκέντρωσης 1 nM.

Κεφάλαιο Δ: Συζήτηση

Το σύστημα του **συμπληρώματος** είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο δίκτυο πρωτεϊνών το οποίο λειτουργεί ως δραστικός συντελεστής του χυμικού κλάδου του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Στις λειτουργίες του συμπληρώματος περιλαμβάνονται η οψωνοποίηση και η λύση παθογόνων, η απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων και ανοσολογικών συμπλεγμάτων και η επαγωγή φλεγμονωδών αποκρίσεων. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα του συμπληρώματος εστιάζει στην κατανόηση της αναδυόμενης σχέσης καρκίνου-συμπληρώματος.

Αρχικά οι ερευνητές είχαν επικεντρωθεί στον γνωστό ρόλο του συμπληρώματος, τη σήμανση και την εξάλειψη των κυττάρων του όγκου ενισχύοντας έτσι την αντι-καρκινική ανοσία. Για πολύ καιρό πιστευόταν ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος δρα αποκλειστικά προς όφελος του πάσχοντα από καρκίνο, συμβάλλοντας στην αύξηση της κυτταρολυτικής ικανότητας των καρκινο-ειδικών αντισωμάτων σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας.

Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες αμφισβητούν αυτή τη συμβατική άποψη καθώς υπάρχουν ευρήματα τα οποία υποστηρίζουν ότι η **απορυθμισμένη ενεργοποίηση** του συμπληρώματος και η **αυξημένη έκφραση συστατικών** του συμπληρώματος πιθανά ευνοεί την καρκινογένεση (Reis et al., 2018). Αν και το εύρημα, ότι τα στοιχεία του συμπληρώματος μπορεί να επάγουν την ογκογένεση, θεωρείται απροσδόκητο, είναι σύμφωνο με τη θεωρία της ανοσοδιαμόρφωσης του καρκίνου. Βάση αυτής της θεωρίας υποστηρίζεται ότι η αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων από συστατικά του συμπληρώματος ασκεί μια εκλεκτική πίεση στο περιβάλλον του όγκου που οδηγεί στην επέκταση εκείνων των καρκινικών κλώνων που είναι σε θέση να ελέγξουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Pio et al., 2013). Πράγματι, σε διάφορες μελέτες καρκίνου έχει βρεθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα μέσω **εξωγενών οδών ενεργοποίησης** (π.χ. πρωτεάσες), προς δικό τους όφελος (Corrales et al., 2012). Επιπλέον πολλές είναι οι μελέτες που υποστηρίζουν ότι το συμπλήρωμα στα πλαίσια της **χρόνιας φλεγμονής** ευνοεί το **νεοπλασματικό μετασχηματισμό** και τη δημιουργία ενός **ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος**, την **αγγειογένεση** και τη **μετάσταση** (Pio et al., 2014). Ακόμα, έχει βρεθεί ότι διάφοροι τύποι καρκίνου έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ενδογενώς συστατικά του συμπληρώματος, όπως είναι για παράδειγμα τα C3, C5 και να εκφράζουν τους υποδοχείς C3aR, C5aR1. Για αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη και χρήση αναστολέων του συμπληρώματος (π.χ. αναστολείς του C1 και C3, ανταγωνιστές του C5aR1) στη συνδυαστική ανοσοθεραπεία του καρκίνου, οι οποίοι στοχεύουν συγκεκριμένα στάδια των οδών του συμπληρώματος (Reis et al., 2018).

Παράλληλα τα ευρήματα δύο μελετών σχετικά με τη δράση του συμπληρώματος σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία έρχονται να περιπλέξουν ακόμα περισσότερο τα πράγματα. Από τη μία πλευρά υπάρχει η μελέτη που υποστηρίζει ότι οι παράγοντες που απελευθερώνονται από νεκρωτικά κύτταρα κατά την ακτινοθεραπεία με επίδραση **υψηλής δόσης** ευθύνονται για τη τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος στη περιοχή του συμπαγούς όγκου **ενισχύοντας**

την αντικαρκινική ανοσία (Surace et al., 2015). Από την άλλη πλευρά υποστηρίζεται ότι χρήση αναστολέων έναντι του συμπληρώματος σε συνδυασμό με **κλασματοποιημένη ακτινοθεραπεία** προάγει μια συστηματική αντικαρκινική ανοσολογική αντίδραση (Elvington et al., 2014).

Γίνεται κατανοητό ότι είναι επιτακτική η ανάγκη κατανόησης του ρόλου του συμπληρώματος στην ανοσολογία του καρκίνου καθώς και η πλήρης κατανόηση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους το συμπλήρωμα ρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να διερευνηθεί **ο ρόλος των συστατικών του συμπληρώματος σε καρκινικές σειρές γλοιοβλαστώματος και νευροβλαστώματος υπό την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας**. Πρόκειται για καρκίνους νευρικής προέλευσης που εντοπίζονται όμως σε διαφορετικές ανατομικές θέσεις, που αντανακλούν και διαφορετικές λειτουργικές εξειδικεύσεις.

Το γλοιοβλάστωμα είναι ένας κακοήθης όγκος του εγκεφάλου, με κύτταρα προέλευσης τη γλοία και τα αστροκύτταρα του εγκεφάλου. Παρά τις πολλές διεθνείς προσπάθειες, η θεραπεία του γλοιοβλαστώματος εξακολουθεί να είναι ένα πολύ δύσκολο επίτευγμα στην κλινική ογκολογία. Οι κυριότερες δυσκολίες στη θεραπεία του GBM σχετίζονται με το σημείο εμφάνισης της νόσου, τη σύνθετη και ετερογενή βιολογία της. Η ακτινοθεραπεία έπειτα από χειρουργική αφαίρεση του όγκου σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία είναι η επικρατέστερη σύγχρονη στρατηγική αντιμετώπισης του γλοιοβλαστώματος. Επιπλοκές στην αποτελεσματικότητα αυτού του θεραπευτικού πρωτοκόλλου προκύπτουν εξαιτίας της ακτινοανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων (Hanif et al., 2017), της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία (Paolillo et al., 2018), καθώς και στην ύπαρξη καρκινικών βλαστικών κύτταρων τα οποία είναι ανθεκτικά στις τρέχουσες θεραπευτικές μεθόδους και πιθανά ευθύνονται για την υποτροπή του όγκου (Chen et al., 2012).

Το νευροβλάστωμα είναι ένας κακοήθης όγκος του Συμπαθητικού Νευρικού Συστήματος που εμφανίζεται κατά την βρεφική και παιδική ηλικία, με κύτταρα προέλευσης τα αρχέγονα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη **μοριακή ετερογένεια**, η οποία κλινικά αποτελεί μια πρόκληση, καθώς οι όγκοι που είναι φαινοτυπικά και μορφολογικά πολύ παρόμοιοι μπορούν να έχουν εξαιρετικά διαφορετικές αποκρίσεις στη θεραπεία. Υπάρχουν διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα ανάλογα την ομάδα κινδύνου του ασθενή και το στάδιο της νόσου. Η θεραπεία που εφαρμόζεται στην κλινική πράξη περιλαμβάνει τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, τη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Ωστόσο παρά την πρόοδο των θεραπευτικών μεθόδων, πολλοί είναι ασθενείς που θα υποτροπιάσουν και τελικά θα πεθάνουν (Colon and Chung, 2011).

Επομένως είναι απαραίτητο να κατανοηθούν πλήρως τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στη παθογένεση των παραπάνω τύπων καρκίνου ώστε να αναπτυχθούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις και να ανιχνευτούν νέοι διαγνωστικοί δείκτες.

Αρχικά σε πρώτη φάση της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η έκφραση (επιφανειακή και ενδοκυττάρια) του υποδοχέα C5aR1 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος U87MG και νευροβλαστώματος SK-N-SH ύστερα από επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας στις θεραπευτικές δόσεις των 3 και 5 Gy. Ακολούθησε ανίχνευση με ανοσοενζυμική μέθοδο των ολικών και ενεργοποιημένων επιπέδων του C3 σε υπερκείμενα από μέσο καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων U87MG σε συνδυασμό με επίδραση ακτινοβολίας σε δόση 5 Gy. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μέθοδοι για τη μελέτη της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH και την ανίχνευση των ενδοκυττάριων επιπέδων ROS σε αυτήν την καρκινική σειρά ύστερα από επίδραση με C5a.

Η μελέτη των μορίων του συμπληρώματος στη **καρκινική σειρά γλοιοβλαστώματος U87MG** οδήγησε στα παρακάτω συμπεράσματα:

Συμπεράσματα:

- Η μέτρηση της συνολικής έκφρασης (επιφανειακή και ενδοκυττάρια έκφραση) του υποδοχέα C5aR1 στα καρκινικά κύτταρα U87MG έδειξε ότι η **πλειοψηφία** των κυττάρων του υπό μελέτη κυτταρικού εναιωρήματος εκφράζει τον υποδοχέα, αν και σε μεγάλο βαθμό η έκφραση του ανιχνεύεται κυρίως ενδοκυττάρια (με βάση τη διαφορική ανάλυση των επιπέδων C5aR1 σε μελέτες κυτταρομετρίας με χρώση των καρκινικών κυττάρων τόσο επιφανειακά όσο και μετά από διαπερατοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών). Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό εύρημα, λαμβάνοντας υπόψιν τη μεγάλη ετερογένεια του συγκεκριμένου καρκίνου, καθώς χαρακτηρίζεται από πληθυσμό ανομοιόμορφων κυττάρων τόσο ως προς την αντιγονική τους υπογραφή όσο και το μεταγραφικό τους πρόγραμμα.
- Δεν παρατηρείται διαφορά στα ποσοστά των κυττάρων που εκφράζουν επιφανειακά τον υποδοχέα C5aR1 μεταξύ μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων στα 3 Gy κυτταρικών πληθυσμών, 6 και 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση. Ωστόσο βρέθηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν επιφανειακά τον υποδοχέα C5aR1 σε ακτινοβολημένο στα 5 Gy κυτταρικό πληθυσμό, 6 και 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση, σε σύγκριση με τον μη ακτινοβολημένο κυτταρικό πληθυσμό. Το εύρημα αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται αυξορύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 ύστερα από ακτινοβόληση σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο, είτε φυσιολογικό είτε καρκινικό. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η ακτινοβόληση με υψηλότερη δόση ακτινοβολίας πιθανά οδηγεί στη δημιουργία ενός πιο φλεγμονώδους περιβάλλοντος, υπεύθυνο για την αυξορύθμιση του C5aR1 στον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων. Υπάρχουν ευρήματα τα οποία υποστηρίζουν ότι η ακτινοθεραπεία προκαλεί εκτός από

γενοτοξικές βλάβες και έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων στο περιβάλλον του όγκου (π.χ. IL-6, IL-12, IL-1, TNF-a) (Gandhi and Chandna, 2017) και άλλα τα οποία υποστηρίζουν ότι παρουσία φλεγμονωδών παραγόντων (π.χ. IL-6) επάγεται αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα (Schlaf et al., 2003).

- Ένα άλλο σημαντικό συμπέρασμα της παρούσας εργασίας είναι ότι αυξάνεται σημαντικά η ενδογενής παραγωγή της πρωτεΐνης C3 και ταυτόχρονα αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα των ενεργοποιημένων θραυσμάτων του C3 στο υπερκείμενο καλλιέργειας ακτινοβολημένων κυττάρων U87MG στα 5 Gy, 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση. Αυτό το εύρημα είναι σε συμφωνία με ευρήματα άλλων μελετών που υποστηρίζουν ότι η ακτινοβολία σχετίζεται με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα καρκινικά κύτταρα (Elvington et al., 2014). Η ενεργοποίηση του C3 πιθανά συμβάλλει στην περαιτέρω ενεργοποίηση του συστήματος και στην επακόλουθη απελευθέρωση **βιοδραστικών μορίων του συμπληρώματος στο μικροπεριβάλλον** των ακτινοβολημένων κυττάρων (π.χ. της αναφυλατοξίνης C5a), λόγω της κομβικής θέσης που κατέχει το C3 στον βιοχημικό καταρράκτη του συμπληρώματος**,** τα οποία σε άλλες μελέτες έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην ογκογένεση (Reis et al., 2018). Υποθέτουμε ότι η επακόλουθη αύξηση των επιπέδων του C5a στο μικροπεριβάλλον του όγκου, λόγω της επαγόμενης από ακτινοβόληση ενεργοποίησης του συμπληρώματος μπορεί να σχετίζεται και με την αυξορύθμιση της έκφρασης του C5aR1 (αυτοκρινής μηχανισμός), όπως υποστηρίζεται σε άλλη μελέτη (Gasque et al., 1997).

Το συμπέρασμα της παρούσας μελέτης είναι ότι στα καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος η επίδραση της ακτινοβολίας οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής συστατικών του συμπληρώματος, όπως το C3, αυξορύθμιση της έκφρασης του C5aR1, καθώς και αυξημένη ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος από τα καρκινικά κύτταρα. Ακόμα παλιότερες μελέτες του εργαστηρίου έχουν δείξει ότι το C5a προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των U87MG, αυξάνει την ικανότητα επιβίωσης των ακτινοανθεκτικών καρκινικών κλώνων και την ικανότητα διείσδυσής τους στην εξωκυττάρια μήτρα. Όλα αυτά συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι το **σύστημα του συμπληρώματος ευνοεί την ανάπτυξη του γλοιοβλαστώματος.**

Η μελέτη των μορίων του συμπληρώματος στη **καρκινική σειρά νευροβλαστώματος SK-N-SH** οδήγησε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η μέτρηση της επιφανειακής έκφρασης του C5aR1 στα καρκινικά κύτταρα SK-N-SH έδειξε ότι ένα σχετικά μικρό ποσοστό του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων εκφράζουν επιφανειακά τον C5aR1, χωρίς να παρατηρηθεί διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα μεταξύ του πληθυσμού των ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων κυτταρικών πληθυσμών σε δόση 3 Gy, 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση.
- Το μόριο C5a μειώνει σημαντικά την **επιβίωση** των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH. Αυτό το εύρημα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μιας παλαιότερης μελέτης στην οποία βρέθηκε ότι ένα ολιγομερές ανάλογο του θραύσματος του C5a, το PL37 επάγει απόπτωση

σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος, μειώνοντας την επιβίωσή τους (Farkas et al., 1998). Ταυτόχρονα αυτό το εύρημα έρχεται σε αντιδιαστολή με παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου στην οποία είχε βρεθεί ότι το C5a αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των U87MG. Η αντίθετη αυτή επίδραση του C5a στην κυτταρική επιβίωση των δύο τύπων καρκίνου που μελετήθηκαν υπογραμμίζει τον διττό ρόλο του μονοπατιού C5a/C5aR1 στην παθοφυσιολογία του καρκίνου.

- Το μόριο C5a οδηγεί σε σημαντική αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ROS στα καρκινικά κύτταρα SK-N-SH. Έτσι παρουσία C5a και πρόσδεσης του τον υποδοχέα του πιθανά επάγεται δημιουργία ενός οξειδωτικού περιβάλλοντος στη περιοχή του όγκου και επακόλουθη πρόκληση βλαβών στο DNA των καρκινικών κυττάρων.

Το συμπέρασμα της παρούσας μελέτης είναι ότι στα καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος η επίδραση του C5a μειώνει την επιβίωση των κυττάρων και αυξάνει το οξειδωτικό στρες. Έτσι πιστεύεται ότι το σύστημα του συμπληρώματος επιδρά ανασταλτικά στην ανάπτυξη του νευροβλαστώματος. Ωστόσο θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες στη καρκινική σειρά SK-N-SH για να εξαχθεί με ασφάλεια το συγκεκριμένο συμπέρασμα.

Συνολικά τα ευρήματα της παρούσας εργασίας απεικονίζουν το **διττό ρόλο** του συμπληρώματος στη παθοφυσιολογία δυο καρκινικών τύπων νευρικής προέλευσης, που από τη μία πλευρά μπορεί να συμβάλλει στην αντικαρκινική ανοσία και από την άλλη να προωθεί την καρκινογένεση.

Επόμενα στάδια της μελέτης:

- Ανίχνευση των επιπέδων ενεργοποιημένων θραυσμάτων καταρροϊκά του κομβικού μορίου C3 (π.χ. C5a) στο καταρράκτη του συμπληρώματος μέσω διάφορων μεθόδων, όπως την ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδο προσδιορισμού (ELISA)

- In vivo μελέτες της δράσης των μορίων του συμπληρώματος σε ζωικά μοντέλα ανάπτυξης γλοιοβλαστώματος, με σκοπό την μελλοντική ανάπτυξη και χρήση θεραπευτικών ανασταλτικών μορίων που θα χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της ανοσοθεραπείας του γλοιοβλαστώματος

- Επέκταση των λειτουργικών πειραμάτων για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης συστατικών του συμπληρώματος και των ενεργοποιημένων θραυσμάτων στην καρκινική σειρά νευροβλαστώματος SK-N-SH σε υψηλότερες δόσεις ακτινοβολίας

- In vitro μελέτες της επίδρασης μορίων του συμπληρώματος (π.χ. C5a) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην ικανότητα διείσδυσης και μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων SK-N-SH σε συνδυασμό με έκθεση σε ακτινοβολία

Όλες αυτές οι μελέτες θα οδηγήσουν στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου του συμπληρώματος στη παθοφυσιολογία του καρκίνου και θα ενισχύσουν την προσπάθεια ανάπτυξης στοχευμένων θεραπειών που θα καταστήσουν τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στα σημερινά θεραπευτικά σχήματα.

Κεφάλαιο Ε: Βιβλιογραφία

Aebisher, D., Bartusik, D., and Tabarkiewicz, J. (2017). Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie *85*, 434-443.

Ajona, D., Pajares, M.J., Corrales, L., Perez-Gracia, J.L., Agorreta, J., Lozano, M.D., Torre, W., Massion, P.P., de-Torres, J.P., Jantus-Lewintre, E.*, et al.* (2013). Investigation of complement activation product c4d as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer. Journal of the National Cancer Institute *105*, 1385-1393.

Albrecht, E.A., Chinnaiyan, A.M., Varambally, S., Kumar-Sinha, C., Barrette, T.R., Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2004). C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. The American journal of pathology *164*, 849-859.

Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L.F. (2009). Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. Cancer cell *15*, 45-56.

Amara, U., Flierl, M.A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Bruckner, U.B., Nilsson, B., Gebhard, F., Lambris, J.D., and Huber-Lang, M. (2010). Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. J Immunol *185*, 5628-5636.

Andrades, J.A., Nimni, M.E., Becerra, J., Eisenstein, R., Davis, M., and Sorgente, N. (1996). Complement proteins are present in developing endochondral bone and may mediate cartilage cell death and vascularization. Experimental cell research *227*, 208-213.

Arbore, G., West, E.E., Spolski, R., Robertson, A.A.B., Klos, A., Rheinheimer, C., Dutow, P., Woodruff, T.M., Yu, Z.X., O'Neill, L.A.*, et al.* (2016). T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. Science *352*, aad1210.

Bandyopadhyay, M., and Rohrer, B. (2012). Matrix metalloproteinase activity creates pro-angiogenic environment in primary human retinal pigment epithelial cells exposed to complement. Investigative ophthalmology & visual science *53*, 1953-1961.

Barani, I.J., and Larson, D.A. (2015). Radiation therapy of glioblastoma. Cancer treatment and research *163*, 49-73.

Bell, E., Chen, L., Liu, T., Marshall, G.M., Lunec, J., and Tweddle, D.A. (2010). MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential. Cancer letters *293*, 144-157.

Beltrame, M.H., Catarino, S.J., Goeldner, I., Boldt, A.B., and de Messias-Reason, I.J. (2014). The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. Frontiers in pediatrics *2*, 148.

Bouwens, T.A., Trouw, L.A., Veerhuis, R., Dirven, C.M., Lamfers, M.L., and Al-Khawaja, H. (2015). Complement activation in Glioblastoma multiforme pathophysiology: evidence from serum levels and presence of complement activation products in tumor tissue. Journal of neuroimmunology *278*, 271-276.

Brennan, F.H., Lee, J.D., Ruitenberg, M.J., and Woodruff, T.M. (2016). Therapeutic targeting of complement to modify disease course and improve outcomes in neurological conditions. Seminars in immunology *28*, 292-308.

Brodeur, G.M., and Bagatell, R. (2014). Mechanisms of neuroblastoma regression. Nature reviews. Clinical oncology *11*, 704-713.

Carli, M., Bucolo, C., Pannunzio, M.T., Ongaro, G., Businaro, R., and Revoltella, R. (1979). Fluctuation of serum complement levels in children with neuroblastoma. Cancer *43*, 2399-2404.

Carmona-Fontaine, C., Theveneau, E., Tzekou, A., Tada, M., Woods, M., Page, K.M., Parsons, M., Lambris, J.D., and Mayor, R. (2011). Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. Developmental cell *21*, 1026-1037.

Chen, J., Li, Y., Yu, T.S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature *488*, 522-526.

Cho, M.S., Vasquez, H.G., Rupaimoole, R., Pradeep, S., Wu, S., Zand, B., Han, H.D., Rodriguez-Aguayo, C., Bottsford-Miller, J., Huang, J.*, et al.* (2014). Autocrine effects of tumor-derived complement. Cell reports *6*, 1085-1095.

Colon, N.C., and Chung, D.H. (2011). Neuroblastoma. Advances in pediatrics *58*, 297-311.

Corrales, L., Ajona, D., Rafail, S., Lasarte, J.J., Riezu-Boj, J.I., Lambris, J.D., Rouzaut, A., Pajares, M.J., Montuenga, L.M., and Pio, R. (2012). Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. J Immunol *189*, 4674-4683.

Coulthard, L.G., Hawksworth, O.A., Li, R., Balachandran, A., Lee, J.D., Sepehrband, F., Kurniawan, N., Jeanes, A., Simmons, D.G., Wolvetang, E., and Woodruff, T.M. (2017). Complement C5aR1 Signaling Promotes Polarization and Proliferation of Embryonic Neural Progenitor Cells through PKCzeta. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *37*, 5395-5407.

Coulthard, L.G., and Woodruff, T.M. (2015). Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. J Immunol *194*, 3542-3548.

Davis, M.E. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clinical journal of oncology nursing *20*, S2-8.

de Bruijn, M.H., and Fey, G.H. (1985). Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *82*, 708-712.

de Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. Nature reviews. Cancer *6*, 24-37.

Dunkelberger, J.R., and Song, W.C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. Cell research *20*, 34-50.

Elvington, M., Scheiber, M., Yang, X., Lyons, K., Jacqmin, D., Wadsworth, C., Marshall, D., Vanek, K., and Tomlinson, S. (2014). Complement-dependent modulation of antitumor immunity following radiation therapy. Cell reports *8*, 818-830.

Erdei, A., Sandor, N., Macsik-Valent, B., Lukacsi, S., Kremlitzka, M., and Bajtay, Z. (2016). The versatile functions of complement C3-derived ligands. Immunological reviews *274*, 127-140.

Farkas, I., Baranyi, L., Liposits, Z.S., Yamamoto, T., and Okada, H. (1998). Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells. Neuroscience *86*, 903-911.

Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Wrensch, M., and Wiemels, J.L. (2007). Epidemiology of brain tumors. Neurologic clinics *25*, 867-890, vii.

Fredlund, E., Ringner, M., Maris, J.M., and Pahlman, S. (2008). High Myc pathway activity and low stage of neuronal differentiation associate with poor outcome in neuroblastoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 14094-14099.

Gandhi, S., and Chandna, S. (2017). Radiation-induced inflammatory cascade and its reverberating crosstalks as potential cause of post-radiotherapy second malignancies. Cancer metastasis reviews *36*, 375-393.

Gasque, P., Ischenko, A., Legoedec, J., Mauger, C., Schouft, M.T., and Fontaine, M. (1993). Expression of the complement classical pathway by human glioma in culture. A model for complement expression by nerve cells. The Journal of biological chemistry *268*, 25068-25074.

Gasque, P., Singhrao, S.K., Neal, J.W., Gotze, O., and Morgan, B.P. (1997). Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. The American journal of pathology *150*, 31-41.

Gupta, A., Probst, H.C., Vuong, V., Landshammer, A., Muth, S., Yagita, H., Schwendener, R., Pruschy, M., Knuth, A., and van den Broek, M. (2012). Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8+ T cells via dendritic cell activation. J Immunol *189*, 558-566.

Hajishengallis, G., Reis, E.S., Mastellos, D.C., Ricklin, D., and Lambris, J.D. (2017). Novel mechanisms and functions of complement. Nature immunology *18*, 1288-1298.

Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S.M., and Simjee Sh, U. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP *18*, 3-9.

Hansford, L.M., Thomas, W.D., Keating, J.M., Burkhart, C.A., Peaston, A.E., Norris, M.D., Haber, M., Armati, P.J., Weiss, W.A., and Marshall, G.M. (2004). Mechanisms of embryonal tumor initiation: distinct roles for MycN expression and MYCN amplification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 12664-12669.

Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., and Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. Nature reviews. Neuroscience *16*, 358-372.

Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A*., et al.* (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. Science *352*, 712-716.

Huang, M., and Weiss, W.A. (2013). Neuroblastoma and MYCN. Cold Spring Harbor perspectives in medicine *3*, a014415.

Huang, X., and Saint-Jeannet, J.P. (2004). Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. Developmental biology *275*, 1-11.

Huber-Lang, M.S., Sarma, J.V., McGuire, S.R., Lu, K.T., Padgaonkar, V.A., Younkin, E.M., Guo, R.F., Weber, C.H., Zuiderweg, E.R., Zetoune, F.S., and Ward, P.A. (2003). Structure-function relationships of human C5a and C5aR. J Immunol *170*, 6115-6124.

Huse, J.T., and Holland, E.C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nature reviews. Cancer *10*, 319-331.

Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. Glia *39*, 193-206.

Ishola, T.A., and Chung, D.H. (2007). Neuroblastoma. Surgical oncology *16*, 149-156.

Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G., and Delattre, O. (2010). Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. Oncogene *29*, 1566-1579.

Kaufmann, J.K., and Chiocca, E.A. (2014). Glioma virus therapies between bench and bedside. Neuro-oncology *16*, 334-351.

Kesari, S. (2011). Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. Seminars in oncology *38 Suppl 4*, S2-10.

Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Arihiro, K. (2006). Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. Cancer research *66*, 5527-5536.

Kim, S., and Chung, D.H. (2006). Pediatric solid malignancies: neuroblastoma and Wilms' tumor. The Surgical clinics of North America *86*, 469-487, xi.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A., and Osborne, B.A. (2013). <<Ανοσολογία Kuby>>. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, Αθήνα *6η έκδοση*.

Klos, A., Tenner, A.J., Johswich, K.O., Ager, R.R., Reis, E.S., and Kohl, J. (2009). The role of the anaphylatoxins in health and disease. Molecular immunology *46*, 2753-2766.

Klos, A., Wende, E., Wareham, K.J., and Monk, P.N. (2013). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. Pharmacological reviews *65*, 500-543.

Kolev, M., Towner, L., and Donev, R. (2011). Complement in cancer and cancer immunotherapy. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis *59*, 407-419.

Kushner, B.H., Kramer, K., and Cheung, N.K. (2001). Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *19*, 4189-4194.

Lathia, J.D., Gallagher, J., Myers, J.T., Li, M., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Huang, A.Y., and Rich, J.N. (2011). Direct in vivo evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. PloS one *6*, e24807.

Leung, S.Y., Yuen, S.T., Chan, T.L., Chan, A.S., Ho, J.W., Kwan, K., Fan, Y.W., Hung, K.N., Chung, L.P., and Wyllie, A.H. (2000). Chromosomal instability and p53 inactivation are required for genesis of glioblastoma but not for colorectal cancer in patients with germline mismatch repair gene mutation. Oncogene *19*, 4079-4083.

Li, C., Zhu, H., Zong, X., Wang, X., Gui, S., Zhao, P., and Zhang, Y. (2018). History, Current Situation, and Future Development of Endoscopic Neurosurgery in China. World neurosurgery *110*, 270-275.

Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Munch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C.*, et al.* (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature *541*, 481-487.

Lonergan, G.J., Schwab, C.M., Suarez, E.S., and Carlson, C.L. (2002). Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc *22*, 911-934.

Louis, C.U., and Shohet, J.M. (2015). Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. Annual review of medicine *66*, 49-63.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta neuropathologica *114*, 97-109.

Manthey, H.D., Woodruff, T.M., Taylor, S.M., and Monk, P.N. (2009). Complement component 5a (C5a). The international journal of biochemistry & cell biology *41*, 2114-2117.

Markiewski, M.M., DeAngelis, R.A., Benencia, F., Ricklin-Lichtsteiner, S.K., Koutoulaki, A., Gerard, C., Coukos, G., and Lambris, J.D. (2008). Modulation of the antitumor immune response by complement. Nature immunology *9*, 1225-1235.

Markiewski, M.M., DeAngelis, R.A., Strey, C.W., Foukas, P.G., Gerard, C., Gerard, N., Wetsel, R.A., and Lambris, J.D. (2009). The regulation of liver cell survival by complement. J Immunol *182*, 5412-5418.

Markiewski, M.M., and Lambris, J.D. (2009). Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. Trends in immunology *30*, 286-292.

Marshall, G.M., Carter, D.R., Cheung, B.B., Liu, T., Mateos, M.K., Meyerowitz, J.G., and Weiss, W.A. (2014). The prenatal origins of cancer. Nature reviews. Cancer *14*, 277-289.

Mollnes, T.E., Brekke, O.L., Fung, M., Fure, H., Christiansen, D., Bergseth, G., Videm, V., Lappegard, K.T., Kohl, J., and Lambris, J.D. (2002). Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. Blood *100*, 1869-1877.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods *65*, 55-63.

Mosse, Y.P., Laudenslager, M., Khazi, D., Carlisle, A.J., Winter, C.L., Rappaport, E., and Maris, J.M. (2004). Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. American journal of human genetics *75*, 727-730.

Mosse, Y.P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K.A., Wood, A., Attiyeh, E.F., Laquaglia, M.J., Sennett, R., Lynch, J.E., Perri, P.*, et al.* (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. Nature *455*, 930-935.

Mrugala, M.M. (2013). Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. Discovery medicine *15*, 221-230.

Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I.V., and Hamada, J. (2011). Aberrant signaling pathways in glioma. Cancers *3*, 3242-3278.

Nelson, S.J., and Cha, S. (2003). Imaging glioblastoma multiforme. Cancer J *9*, 134-145.

Nitta, H., Murakami, Y., Wada, Y., Eto, M., Baba, H., and Imamura, T. (2014). Cancer cells release anaphylatoxin C5a from C5 by serine protease to enhance invasiveness. Oncology reports *32*, 1715-1719.

O'Barr, S.A., Caguioa, J., Gruol, D., Perkins, G., Ember, J.A., Hugli, T., and Cooper, N.R. (2001). Neuronal expression of a functional receptor for the C5a complement activation fragment. J Immunol *166*, 4154-4162.

Ohgaki, H. (2009). Epidemiology of brain tumors. Methods Mol Biol *472*, 323-342.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. Acta neuropathologica *109*, 93-108.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. The American journal of pathology *170*, 1445-1453.

Olcina, M.M., Kim, R.K., Melemenidis, S., Graves, E.E., and Giaccia, A.J. (2018). The tumour microenvironment links complement system dysregulation and hypoxic signalling. The British journal of radiology, 20180069.

Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K., and Date, I. (2011). Angiogenesis and invasion in glioma. Brain tumor pathology *28*, 13-24.

Pallini, R., Ricci-Vitiani, L., Banna, G.L., Signore, M., Lombardi, D., Todaro, M., Stassi, G., Martini, M., Maira, G., Larocca, L.M., and De Maria, R. (2008). Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *14*, 8205-8212.

Paolillo, M., Boselli, C., and Schinelli, S. (2018). Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. Brain sciences *8*.

Papaioannou, G., and McHugh, K. (2005). Neuroblastoma in childhood: review and radiological findings. Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society *5*, 116-127.

Parato, K.A., Senger, D., Forsyth, P.A., and Bell, J.C. (2005). Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. Nature reviews. Cancer *5*, 965-976.

Park, J.R., Eggert, A., and Caron, H. (2010). Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. Hematology/oncology clinics of North America *24*, 65-86.

Pegg, D. (2007). Principles of Cryopreservation. Cryopreservation and Freeze-Dying Protocols *pp 39-57*.

Pinto, N.R., Applebaum, M.A., Volchenboum, S.L., Matthay, K.K., London, W.B., Ambros, P.F., Nakagawara, A., Berthold, F., Schleiermacher, G., Park, J.R.*, et al.* (2015). Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *33*, 3008-3017.

Pio, R., Ajona, D., and Lambris, J.D. (2013). Complement inhibition in cancer therapy. Seminars in immunology *25*, 54-64.

Pio, R., Corrales, L., and Lambris, J.D. (2014). The role of complement in tumor growth. Advances in experimental medicine and biology *772*, 229-262.

Prasad, G., and Haas-Kogan, D.A. (2009). Radiation-induced gliomas. Expert review of neurotherapeutics *9*, 1511-1517.

Rahpeymai, Y., Hietala, M.A., Wilhelmsson, U., Fotheringham, A., Davies, I., Nilsson, A.K., Zwirner, J., Wetsel, R.A., Gerard, C., Pekny, M., and Pekna, M. (2006). Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. The EMBO journal *25*, 1364-1374.

Reis, E.S., Mastellos, D.C., Ricklin, D., Mantovani, A., and Lambris, J.D. (2018). Complement in cancer: untangling an intricate relationship. Nature reviews. Immunology *18*, 5-18.

Reynolds, C.P., Matthay, K.K., Villablanca, J.G., and Maurer, B.J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. Cancer letters *197*, 185-192.

Ricklin, D., Reis, E.S., Mastellos, D.C., Gros, P., and Lambris, J.D. (2016). Complement component C3 - The "Swiss Army Knife" of innate immunity and host defense. Immunological reviews *274*, 33-58.

Rinaldi, M., Caffo, M., Minutoli, L., Marini, H., Abbritti, R.V., Squadrito, F., Trichilo, V., Valenti, A., Barresi, V., Altavilla, D.*, et al.* (2016). ROS and Brain Gliomas: An Overview of Potential and Innovative Therapeutic Strategies. International journal of molecular sciences *17*.

Rock, K., McArdle, O., Forde, P., Dunne, M., Fitzpatrick, D., O'Neill, B., and Faul, C. (2012). A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme--the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival? The British journal of radiology *85*, e729-733.

Rutkowski, M.J., Sughrue, M.E., Kane, A.J., Mills, S.A., and Parsa, A.T. (2010). Cancer and the complement cascade. Molecular cancer research : MCR *8*, 1453-1465.

Salvati, M., Polli, F.M., Caroli, E., Frati, A., Missori, P., and Delfini, R. (2003). Radiation-induced schwannomas of the nervous system. Report of five cases and review of the literature. Journal of neurosurgical sciences *47*, 113-116; discussion 116.

Sarah, C. (2017). Immunotherapy: CAR T cells in glioblastoma. Nature reviews. Drug discovery *16*, 602.

Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., Takahashi, T., Imaizumi, H., Asai, Y., and Kuroki, Y. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. J Immunol *171*, 417-425.

Sayah, S., Ischenko, A.M., Zhakhov, A., Bonnard, A.S., and Fontaine, M. (1999). Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression. Journal of neurochemistry *72*, 2426-2436.

Schlaf, G., Schmitz, M., Rothermel, E., Jungermann, K., Schieferdecker, H.L., and Gotze, O. (2003). Expression and induction of anaphylatoxin C5a receptors in the rat liver. Histology and histopathology *18*, 299-308.

Sehgal, A., and Berger, M.S. (2000). Basic concepts of immunology and neuroimmunology. Neurosurgical focus *9*, e1.

Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature *366*, 704-707.

Shalapour, S., and Karin, M. (2015). Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. The Journal of clinical investigation *125*, 3347-3355.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes & development *13*, 1501-1512.

Shinjyo, N., Stahlberg, A., Dragunow, M., Pekny, M., and Pekna, M. (2009). Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. Stem Cells *27*, 2824-2832.

Shohet, J.M., Ghosh, R., Coarfa, C., Ludwig, A., Benham, A.L., Chen, Z., Patterson, D.M., Barbieri, E., Mestdagh, P., Sikorski, D.N.*, et al.* (2011). A genome-wide search for promoters that respond to increased MYCN reveals both new oncogenic and tumor suppressor microRNAs associated with aggressive neuroblastoma. Cancer research *71*, 3841-3851.

Spitzer, D., Mitchell, L.M., Atkinson, J.P., and Hourcade, D.E. (2007). Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. J Immunol *179*, 2600-2608.

Stallings, R.L. (2009). MicroRNA involvement in the pathogenesis of neuroblastoma: potential for microRNA mediated therapeutics. Current pharmaceutical design *15*, 456-462.

Stoker, M.G., and Rubin, H. (1967). Density dependent inhibition of cell growth in culture. Nature *215*, 171-172.

Strainic, M.G., Liu, J., Huang, D., An, F., Lalli, P.N., Muqim, N., Shapiro, V.S., Dubyak, G.R., Heeger, P.S., and Medof, M.E. (2008). Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. Immunity *28*, 425-435.

Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Current protocols in immunology *111*, A3 B 1-3.

Surace, L., Lysenko, V., Fontana, A.O., Cecconi, V., Janssen, H., Bicvic, A., Okoniewski, M., Pruschy, M., Dummer, R., Neefjes, J.*, et al.* (2015). Complement is a central mediator of radiotherapy-induced tumor-specific immunity and clinical response. Immunity *42*, 767-777.

Thakkar, J.P., Dolecek, T.A., Horbinski, C., Ostrom, Q.T., Lightner, D.D., Barnholtz-Sloan, J.S., and Villano, J.L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology *23*, 1985-1996.

Ulrich, A.B., and Pour, P.M. (2001). Cell lines. Encyclopedia of Genetics.

van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L.E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M.L., and Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA *24*, 1053-1063.

Veerhuis, R., Janssen, I., Hack, C.E., and Eikelenboom, P. (1996). Early complement components in Alzheimer's disease brains. Acta neuropathologica *91*, 53-60.

Veerhuis, R., Nielsen, H.M., and Tenner, A.J. (2011). Complement in the brain. Molecular immunology *48*, 1592-1603.

Walker, B.D., and Yu, X.G. (2013). Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. Nature reviews. Immunology *13*, 487-498.

Watanabe, K., Sato, K., Biernat, W., Tachibana, O., von Ammon, K., Ogata, N., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (1997). Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *3*, 523-530.

Weinstein, J.L., Katzenstein, H.M., and Cohn, S.L. (2003). Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. The oncologist *8*, 278-292.

Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., and Berger, M.S. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. Neuro-oncology *4*, 278-299.

Yalcin, B., Kremer, L.C., Caron, H.N., and van Dalen, E.C. (2010). High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. The Cochrane database of systematic reviews, CD006301.

Yu, A.L., Gilman, A.L., Ozkaynak, M.F., London, W.B., Kreissman, S.G., Chen, H.X., Smith, M., Anderson, B., Villablanca, J.G., Matthay, K.K.*, et al.* (2010). Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. The New England journal of medicine *363*, 1324-1334.

Zhang, Y., Huang, D., Zhang, W., Tang, S., Han, T., Zhu, X., Liu, A., and Zhi, T. (2016). Clinical characteristics of infant neuroblastoma and a summary of treatment outcome. Oncology letters *12*, 5356-5362.

Zong, H., Verhaak, R.G., and Canoll, P. (2012). The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. Expert review of molecular diagnostics *12*, 383-394.

Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. Nature reviews. Cancer *5*, 263-274.

Γαϊτανάκη, Α., Καραγκούνη, Ε., Παπαζαφείρη, Π., and Τσιτσιλώνη, Ο. (2014). Εργαστηριακές Ασκήσεις Ανοσολογίας. Εργαστηριακός οδηγός-Τμήμα Βιολογίας Τομέας Φυσιολογίας Ζωων & Ανθρώπου.

Μπέης, Ι., and Γαϊτανάκη, Α. Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυσιολογίας Ζώων

Σκορίλας, Α. (2009). Αρχές κλινικής χημείας και μοριακής διαγνωστικής. Εκδόσεις Συμμετρία.