



**ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ
ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Τίτλος: Η προθυμοσίνη α ως προβλεπτικός βιοδείκτης της
ανταπόκρισης στην αντικαρκινική θεραπεία**

ΑΝΤΩΝΗΣ ΚΑΚΑΛΗΣ

A.M. : 7113042000019

ΓΕΩΠΟΝΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

Μέλη εξεταστικής επιτροπής:

Δρ. Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ (Επιβλέπουσα)

Δρ. Παναγιώτα Παπαζαφείρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Δρ. Δημήτριος Στραβοπόδης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) είναι μια νεοπλασματική νόσος που οφείλεται στην υπερπλασία παθολογικών πλασματοκυττάρων, γεγονός που την κατατάσσει στο φάσμα των πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών. Τα παθολογικά πλασματοκύτταρα διηθούν τον μυελό των οστών και εκκρίνουν μια παθολογική ανοσοσφαιρίνη η οποία ονομάζεται Μ-πρωτεΐνη ή παραπρωτεΐνη στον ορό ή/και στα ούρα του ασθενούς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα πλασματοκύτταρα παράγουν ανοσοσφαιρίνες, δηλαδή αντισώματα (πρωτεΐνες), με ειδικότητα προσκόλλησης σε συγκεκριμένα αντιγόνα μικροβίων, ιών κ.ά., με αποτέλεσμα να τα απενεργοποιούν. Στο ΠΜ τα κακοήθη πλασματοκύτταρα παράγουν παθολογική ανοσοσφαιρίνη μη ικανή να επιτελέσει την προαναφερθείσα φυσιολογική λειτουργία.

Η επιστημονική κοινότητα έχει συμβάλλει δραστικά στον σχεδιασμό και την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών, ικανών να συμβάλλουν στην καταπολέμηση της νόσου, και ένα νέο φάρμακο που πρόσφατα προστέθηκε στο κλινικό οπλοστάσιο είναι το Belantamab MafoDOTIN (BMF). Το BMF είναι ένα σύζευγμα μονοκλωνικού αντισώματος τάξης IgG1κ και τοξίνης (μαλεϊμιδοκαπροϋλική-μονομεθυλαυριστατίνη-F), που στοχεύει το αντιγόνο ωρίμανσης των Β κυττάρων (BCMA) και έχει δειχθεί, σύμφωνα με αρκετές μελέτες, ότι επάγει ανοσογονικού τύπου κυτταρικό θάνατο (ICD).

Απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του BMF σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) *ex vivo*, καθώς και σε μυελωματικές σειρές (H929 και L363) *in vitro*, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του BCMA στην επιφάνειά τους. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα τριών DAMP μορίων, του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου της προθυμοσίνης α (προΤα(100-109)), της πρωτεΐνης υψηλής κινητικότητας-1 (HMGB1) και της καλρετικουλίνης (CRT). Πιο συγκεκριμένα, το προΤα(100-109) αποτελεί μέρος του πολυπεπτιδίου προθυμοσίνη α (προΤα) και η αποκοπή του από αυτό προκύπτει μετά την δράση των κασπασών 3 και 7 κατά την απόπτωση, η HMGB1 είναι μια μη ιστονική πυρηνική πρωτεΐνη που συμμετέχει στη γονιδιακή έκφραση αλληλοεπιδρώντας με τη χρωματίνη, ενώ η CRT είναι μια πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου η οποία υπό φυσιολογικές καταστάσεις αποτρέπει διαταραχές στην ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου. Η μελέτη των τριών βιοδεικτών ICD πραγματοποιήθηκε σε δύο κυτταρικές σειρές μετά την έκθεσή τους στο BMF, καθώς και σε δείγματα ασθενών πριν και

24 ώρες μετά την χορήγηση δύο κύκλων BMF. Οι συγκεντρώσεις των προΤα(100-109) και HMGB1 προσδιορίστηκαν με ανοσοδοκιμασία ELISA. Τα επίπεδα απόπτωσης και έκφρασης της CRT προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής.

Σε ένα μικρό μέρος των ασθενών με ΠΜ με ανιχνεύσιμα κλωνικά πλασματοκύτταρα στο περιφερικό αίμα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της CRT 24 ώρες μετά τη χορήγηση BMF, ενώ στην πλειονότητα των ασθενών παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των προΤα(100-109) και HMGB1 στο πλάσμα και στον ορό, αντίστοιχα. Παρόμοια δράση του BMF παρατηρήθηκε και *in vitro*, σε καλλιέργειες μυελωματικών σειρών. Τα αυξημένα επίπεδα των DAMPs προΤα(100-109) και HMGB1, και η έκφραση της CRT στην επιφάνεια των κλωνικών πλασματοκυττάρων που παρατηρήθηκαν μετά τη χορήγηση του BMF τόσο *ex vivo* όσο και *in vitro*, επιβεβαιώνουν τη δράση του στην επαγωγή ICD, που πιθανά συσχετίζεται με τη θεραπευτική του αποτελεσματικότητα. Η μέτρηση των παραπάνω βιοδεικτών μετά τη χορήγηση του πρώτου/δεύτερου κύκλου BMF, φαίνεται να συσχετίζεται με την ανταπόκριση των ασθενών με ΠΜ στη θεραπεία, με την πλειοψηφία των ασθενών με αυξημένους βιοδείκτες να εμφανίζουν μεγαλύτερη ύφεση της νόσου. Παράλληλα επισημαίνεται η ανάδειξη του προΤα(100-109) ως προβλεπτικού βιοδείκτη στην αντικαρκινική θεραπεία, όπως άλλωστε έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες, καθώς παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ υψηλότερων επιπέδων του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου με μεγαλύτερη ύφεση της νόσου.

Λέξεις – Κλειδιά: Πολλαπλούν μυέλωμα, Belantamab Mafodotin, Καλρετικουλίνη, HMGB1, προθυμοσίνη α

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a neoplastic disease, caused by abnormal plasma cell hyperplasia, thus it is classified in the spectrum of plasma cell dyscrasias. The abnormal plasma cells infiltrate the bone marrow and secrete a pathological immunoglobulin called M-protein or paraprotein in patient's serum and/or urine. Under normal conditions, plasma cells produce immunoglobulins, i.e. antibodies (proteins), capable of binding to specific antigens on microbes, viruses, etc., thus contributing to their inactivation. In multiple myeloma, the aberrant plasma cells produce pathological immunoglobulin which is incapable to function physiologically.

The scientific community has shown great progress in designing and developing innovative therapies capable to help fight the disease. A novel drug which has been recently added to the clinical armamentarium is Belantamab Mafodotin (BMF). BMF is a conjugate of an IgG1 κ monoclonal antibody and a toxin (maleimidocaproyl-monomethylauristatin-F), which targets the B cell maturation antigen (BCMA) and has been shown, according to multiple studies, to induce type I immunogenic cell death.

The ultimate aim of the present study was to investigate the effect of BMF in patients with multiple myeloma (MM) *ex vivo*, as well as in myeloma cell lines (H929 and L363), which exhibited different levels of BCMA expression. The levels of three DAMP molecules were determined, of the immunoreactive decapeptide of prothymosin α , proT α (100-109), the high-motility group box-1 (HMGB1) and the expression levels of calreticulin (CRT). The immunoreactive decapeptide proT α (100-109) is a fragment of the polypeptide prothymosin α (proT α) and is cleaved during apoptosis by activated caspases 3 and 7; HMGB1 is a non-isotonic nuclear protein that contributes to gene expression; while CRT is an endoplasmic reticulum protein, which, under normal conditions, prevents deviations of calcium ion homeostasis. The study of the three biomarkers was performed in two cell lines after their exposure to BMF, as well as in samples from patients before and 24h after the administration of two BMF cycles. The concentrations of proT α (100-109) and HMGB1 were determined by ELISA. Moreover, the expression levels of CRT were determined with the use of flow cytometry.

In a small number of patients with MM, with detectable malignant plasma cells in their peripheral blood, an increase of the expression of CRT was observed 24 hours after the

administration of BMF, and moreover, the majority of patients exhibited increased levels of proT α (100-109) and HMGB1 in their plasma and serum, respectively. A similar activity of BMF was observed in cultures of myeloma cell lines. Increased levels of proT α (100-109) and HMGB1, as well as the expression of CRT on plasma cell membrane after the administration of BMF were observed both *in vitro* and *ex vivo*, confirming the main role of BMF in ICD induction, which possibly correlates with its therapeutic efficacy. The determination of the afore mentioned biomarkers correlates with the *ex vivo* induction of ICD after the first/second circle of BMF administration and seems to be related with the response of patients to therapy, since most of patients with higher levels of the biomarkers showed greater remission of the disease. Furthermore, the role of proT α (100-109) as a potential biomarker in anti-cancer therapy was revealed, due to the correlation of its high concentrations in plasma and the greater remission of the disease. The potential use of proT α (100-109) as a biomarker has been highlighted lately in other studies as well.

Key – Words : Multiple Myeloma, Belantamab Mafodotin, Calreticulin, HMGB1, prothymosin α

Στην οικογένειά μου...

Βασίλη

Αναστασία

Νίκο

Μύριαμ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου της Σχολής Βιολογίας ΕΚΠΑ για την παροχή εργαστηριακού εξοπλισμού και κυρίως τη Καθηγήτρια Δρ. Ουρανία Τσιτσιλώνη για την εμπιστοσύνη της αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική εργασία μου στο παρόν εργαστήριο.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Ε. Καστρίτη της Θεραπευτικής–Παθολογίας/Ογκολογίας, στην Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, (ΠΓΝΑ «Αλεξάνδρα») για την παροχή των δειγμάτων των ασθενών.

Ακόμα, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή, Δρ. Ι. Κωστόπουλο και στον υποψήφιο διδάκτορα Α. Μπιρμπίλη για την ακάματη υποστήριξή τους, την πολύπλευρη εκπαίδευση και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν, τις χρήσιμες συμβουλές τους και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς επίσης και για τη φιλική τους συμπαράσταση και την διαρκή άοκνή τους υποστήριξη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο για την άψογη συνεργασία μας και τη βοήθεια που μου παρείχαν σε οποιαδήποτε δυσκολία αντιμετώπισα καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αγάπη τους και τη συμπαράσταση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής καθώς και για τις αξίες στις οποίες με γαλούχησαν.

Ιούνιος, 2022

Αντώνης Κακαλής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Πολλαπλούν μύελωμα.....	2
1.1.1 Ιστορικά στοιχεία.....	2
1.1.2 Γενικές πληροφορίες.....	3
1.1.3 Γενετική προσέγγιση της νόσου.....	5
1.1.4 Επιδημιολογικά στοιχεία.....	6
1.1.5 Διάγνωση-θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	7
1.2 Blenrep, INN-Belantamab Mafodotin.....	11
1.2.1 Αντιγόνο ωρίμανσης Β λεμφοκυττάρων.....	12
1.2.2 Αυρισταίνη - Κυτταροτοξικός παράγοντας.....	14
1.3 Ανοσογονικού τύπου κυτταρικός θάνατος (ICD).....	15
1.3.1 Τρόποι επαγωγής ανοσογονικού τύπου κυτταρικού θανάτου.....	18
1.3.2 Τύποι ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου.....	20
1.3.2.1 Απόπτωση.....	21
1.3.2.2 Πυρόπτωση.....	22
1.3.2.3 Φερρόπτωση.....	24
1.3.2.4 Παρθάνατος.....	25
1.3.2.5 Νεκρόπτωση.....	26
1.4 Σημαντικά DAMP μόρια.....	27
1.4.1 Καλρετικουλίνη - CRT.....	27
1.4.2 Πρωτεΐνη Ομάδας Υψηλής Κινητικότητας - HMGB1.....	29
1.4.3 Προθυμοσίνη α - προΤα(100-109).....	31
1.5 Κυτταρομετρία ροής.....	35
1.5.1 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα.....	36
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	37
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
3.1 Κυτταρικές σειρές.....	41
3.2 Καλλιέργειες κυττάρων.....	42
3.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υλικού ή πλήρες RPMI 1640.....	42
3.2.2 Απόψυξη κυττάρων.....	43
3.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	43

3.2.4 Κρυοσυντήρηση κυττάρων	44
3.2.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.....	44
3.3 Μέθοδος εκτίμησης ποσοστού έκφρασης του BCMA στις κυτταρικές σειρές H929 και L363.....	46
3.4 Μέθοδος Υπολογισμού συγκέντρωσης ημίσειας αναστολής (IC ₅₀) θεραπευτικού παράγοντα BMF σε μυελωματικές σειρές.....	47
3.4.1 Δοκιμασία MTT	47
3.5 Μέθοδος εκτίμησης απόπτωσης/νέκρωσης κυτταρικών σειρών με χρώση Αννεξίνης-V και PI	49
3.6 Μέθοδος Μελέτης έκφρασης του βιοδείκτη CRT μετά την δράση του BMF.....	51
3.6.1 Μέθοδος <i>in vitro</i> ελέγχου έκφρασης επιφανειακού αποπτωτικού βιοδείκτη CRT σε μυελωματικές κυτταρικές σειρές H929 και L363	51
3.6.2 Μεθοδος <i>ex vivo</i> ελέγχου έκφρασης επιφανειακού αποπτωτικού βιοδείκτη CRT σε δείγματα ασθενών με κυτταρομετρία ροής.....	52
3.6.2.1 Κατεργασία δειγμάτων ασθενών	52
3.6.2.2 Ανάλυση δεδομένων κυτταρομετρίας ροής.....	54
3.6.2.3 Στρατηγική ανάλυσης	55
3.7 Μέθοδος ποσοτικής ανίχνευσης προΤα(100-109) με ELISA ανταγωνιστικού τύπου	58
3.8 Μέθοδος ποσοτικής ανίχνευσης μορίου HMGB1 με ELISA τύπου Sandwich.....	62
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
4.1 <i>In vitro</i> αποτελεσματα.....	67
4.1.1 Προσδιορισμός έκφρασης του δείκτη BCMA στις μυελωματικές κυτταρικές σειρές H929 και L363.....	67
4.1.2 Προσδιορισμός της IC ₅₀ για τις κυτταρικές σειρές H929 και L363 μέσω δοκιμασίας MTT	69
4.1.3 Εκτίμηση αποπτωτικού/νεκρωτικού θανάτου στις κυτταρικές σειρές L363 και H929	71
4.1.4 Εκτίμηση του ποσοστού έκφρασης του βιοδείκτη CRT στις μυελωματικές κυτταρικές σειρές H929 και L363 μετά την δράση του BMF.....	72
4.1.5 Ποσοτικός προσδιορισμός της HMGB1 στην κυτταρική σειρά L363.....	74
4.1.6 Ποσοτικός προσδιορισμός της προΤα(100-109) στην κυτταρική σειρά L363	75
4.2 <i>Ex vivo</i> αποτελέσματα	77
4.2.1 Προσδιορισμός έκφρασης του βιοδείκτη CRT σε κλωνικά πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ.....	77

4.2.1.1 Εκτίμηση του ποσοστού των υποπληθυσμών για του ασθενείς πριν και 24 ώρες μετά την θεραπεία με BMF.....	79
4.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός HMGB1 σε ορό ασθενών με ΠΜ.....	81
4.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός προΤα(100-109) σε πλάσμα ασθενών με ΠΜ.....	82
4.2.4 Συσχέτιση ανταπόκρισης των ασθενών στην θεραπεία με BMF και επαγωγής ICD.....	83
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	92
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	101

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<i>Συνομογραφία</i>	<i>Ελληνική απόδοση</i>
ABTS	2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλβενζοθειαζολιν-6-σουλφονικό οξύ
ACD	Τυχαίος/Νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος
ADC	Σύζευγμα μονοκλωνικού αντισώματος-φαρμάκου
APCs	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
APRIL	Συνδέτης που επάγει πολλαπλασιασμό
ASC	Πρωτεΐνη τύπου Speck σχετιζόμενη με την απόπτωση
ASCT	Μεταμόσχευση αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BAFF	Παράγοντας ενεργοποίησης Β κυττάρου
BAX	BCL2-σχετιζόμενη πρωτεΐνη Χ
BCL-2	Οικογένεια αποπτωτικών πρωτεϊνών
BCMA	Αντιγόνο ωρίμανσης των Β κυττάρων
Blenrep	Εμπορική ονομασία του φαρμάκου Belantamab Mafodotin
BMF	Μπελαταμάμπη μαφοντοτίνη (Belantamab Mafodotin)
CAR-Ts	T κύτταρα με χιμαιρικούς υποδοχείς αντιγόνου
CD	Αντιγονικό μόριο ομάδας διαφοροποίησης
CR	Πλήρης ανταπόκριση
CRT	Καλρετικουλίνη
CTLs	Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα
DAMP	Μοτίβα σχετιζόμενα με βλάβη
DC	Δενδριτικά κύτταρα
ER33	Τσαπερόνη του ενδοπλασματικού δικτύου
FBS	Ορός μόσχου

FCS	Πρόσθια σκέδαση
GLOBOCAN	Παγκόσμια βάση στατιστικών στοιχείων του καρκίνου
GSDMD	Πρωτεΐνη γκασδερίνη D
H1	Ιστόνη 1
HDAC	Αναστολέας της αποακετυλάσης των ιστονών
HMGB1	Ομάδα πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας 1
HRP	Υπεροξειδάση ραπανιού
HSP	Πρωτεΐνη θερμικού σοκ
IC₅₀	Συγκέντρωση ημίσειας αναστολής
ICD	Ανοσογονικός κυτταρικός θάνατος
IgG/H	Βαριά αλυσίδα ανοσοσφαιρίνη τάξης G
IL	Ιντερλευκίνη
IMWG	Διεθνής ομάδα μελέτης του ΠΜ
JNK	Αμινοτελικό άκρο κινάσης τύπου Jun
LAK	Ενεργοποιημένα από λεμφοκίνες φονικά κύτταρα
L-PAM	Μελφαλάνη
LPS	Λιποσακχαρίτης
MFI	Μέση ένταση φθορισμού
MGUS	Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας
MLKL	Ψευδοκινάση μικτής γενεαλογίας
MMAE/F	Μονομεθυλική αυριστατίνη E/F
NF-κB	Πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας - κB
NK	Φυσικά φονικά κύτταρα
OS	Συνολική επιβίωση
PAMPs	Μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα

pI	Ισοηλεκτρικό σημείο
PI	Ιωδιούχο προπίδιο
PRRs	Υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων
PR	Μερική ανταπόκριση
RCD	Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος
RIPK3	Πρωτεϊνική κινάση υποδοχέα σερίνης/θρεονίνης
RRMM	Ανθεκτικό ή υποτροπιάζον ΠΜ
SCC	Πλάγια σκέδαση
SLAMF7	Μέλος 7 της οικογένειας των μορίων ενεργοποίησης κυτταροκινών
sMM	Υφέρπον πολλαπλούν μύελωμα
TCEs	Βιοειδικά αντισώματα που δεσμεύουν T κύτταρα
TFV	Θυμοσίνη-κλάσμα V
TLR4	Υποδοχέας τύπου Toll 4
TNF	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων
UPR	Απόκριση μη αναδιπλωμένης πρωτεΐνης
VGPR	Πολύ καλή μερική ανταπόκριση
XPO-1	Εξπορτίνη 1
ΕΔ	Ενδοπλασματικό δίκτυο
ΚΚΚ	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
ΠΜ	Πολλαπλούν μύελωμα
ΠροΤα	Προθυμοσίνη α
ΠροΤα(100-109)	Ανοσοδραστικό δεκαπεπτίδιο της προθυμοσίνης α
ΧΛΛ	Χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ

1.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Παρότι το πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) υπάρχει ως ασθένεια εδώ και χιλιάδες χρόνια, το πρώτο ιστορικά καταγεγραμμένο περιστατικό αποτέλεσε η 39-χρονη γυναίκα Sarah Newbury, το 1844. Η συγκεκριμένη ασθενής βίωνε έντονο πόνο στην πλάτη κάθε φορά που έσκυβε και μια περίεργη αίσθηση στο δεξί της πόδι. Δεκαοκτώ μήνες αργότερα, η ίδια η ασθενής περιέγραψε οξύ πόνο στα οστά και στα άκρα της. Το περπάτημα της ήταν δύσκολο λόγω αδυναμίας του δεξιού ποδιού. Αφόρητος πόνος αναπτύχθηκε στους μηρούς της τον Απρίλιο του 1842, καθώς ο σύζυγός της τη σήκωσε για να τη μεταφέρει στο κρεβάτι **(36)**.

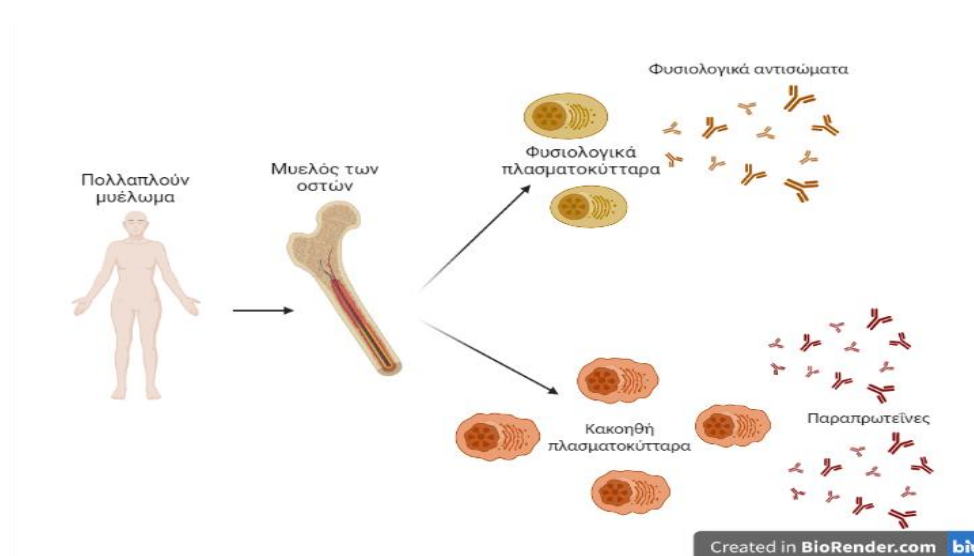
Τέσσερα χρόνια μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων, κατά την διάρκεια της αυτοψίας της από τον χειρουργό Samuel Solly, βρέθηκε πως ο μυελός των οστών είχε αντικατασταθεί από μια κόκκινη ουσία, της οποίας τα κύτταρα είχαν μεγάλη ομοιότητα με εκείνα που βρέθηκαν σε μια παλιότερη περίπτωση ενός άλλου ασθενούς, του Thomas Alexander McBean. Η περίπτωση του McBean αποτελεί το πιο γνωστό περιστατικό ΠΜ. Αφού εξετάστηκαν τα ούρα του και κατόπιν απόφασης του γιατρού του, Δρ. William Macintyre, στάλθηκε δείγμα από τα ούρα του ασθενούς στον παθολόγο Henry Bence Jones. Ο Jones μελέτησε πολύ ενδελεχώς το δείγμα του ασθενούς και επιβεβαίωσε τις παρατηρήσεις που είχε κάνει και ο ίδιος ο Macintyre. Ο Jones κατέληξε να περιγράψει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη που παρατήρησε σε αφθονία στα ούρα ως «ενυδατωμένο δευτοξείδιο του λευκώματος». Αργότερα η συγκεκριμένη πρωτεΐνη θα έπαιρνε το όνομά του **(36, 37)**.

Ο όρος «πλασματοκύτταρο» εισήχθη πρώτη φορά από τον Γερμανό ανατόμο Waldeyer-Hartz το 1875, ωστόσο είναι πολύ πιθανό να περιέγραψε εν' αγνοία του ιστιοκύτταρα αντί για πλασματοκύτταρα. Η πρώτη τεκμηριωμένη περιγραφή πλασματοκυττάρων δόθηκε από τον παθολογοανατόμο Santiago Ramón y Cajal. Το 1929, η εισαγωγή της αναρρόφησης μυελού των οστών από τον M. I. Arinkin συνέβαλλε στην αναγνώριση του όρου «πολλαπλούν μυέλωμα». Ωστόσο, ορόσημο αποτέλεσε η εισαγωγή της έννοιας των μονοκλωνικών και των πολυκλωνικών γαμμαπαθειών που παρουσιάστηκε στη σειρά διαλέξεων Harvey από τον Jan Waldenström το 1961. Ο συγκεκριμένος αναφέρθηκε στους ασθενείς, οι οποίοι

εμφάνιζαν μια στενή ζώνη υπεργασμασφαιριναιμίας στα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης ως έχοντες μονοκλωνική πρωτεΐνη. Πολλοί από αυτούς τους ασθενείς είχαν ΠΜ, ενώ άλλοι δεν είχαν ενδείξεις κακοήθειας, συνεπώς θεώρησε πως είχαν «ουσιώδη υπεργασμασφαιριναιμία» ή «καλοήγη μονοκλωνική πρωτεΐνη». Σήμερα, ο ενδεδειγμένος όρος είναι το MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance), επειδή μπορεί στη συνέχεια να αναπτυχθεί σε ΠΜ, αμυλοείδωση εσ' ελαφριών αλυσίδων (AL) ή άλλη σχετική διαταραχή (36).

1.1.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Το ΠΜ είναι ένα ανιάτο κακοήθες νεόπλασμα και αποτελεί μία δυσκρασία πλασματοκυττάρων, κατά την οποία τα κακοήγη πλασματοκύτταρα συσσωρεύονται στον μυελό των οστών, πολλαπλασιάζονται και υπερπαράγουν μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη ή τμήματά της και είναι γνωστή ως πρωτεΐνη-M ή παραπρωτεΐνη (Εικόνα 1). Οι πλασματοκυτταρικές δυσκαρσίες περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα νοσημάτων με ποικίλη κλινική πορεία όπως η μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS), το μονήρες πλασματοκύττωμα, το υφέρπον ΠΜ (smoldering Multiple Myeloma, sMM), το κλασικό ΠΜ αλλά και σπάνια την πλασματοκυτταρική λευχαιμία (43).



ΕΙΚΟΝΑ 1: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΜΕ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΑΡΑΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (ΣΧΕΔΙΑΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑΣ BIORENDER.COM).

Το ΠΜ είναι η δεύτερη πιο συχνή λεμφοϋπερπλαστική διαταραχή και χαρακτηρίζεται από ανώμαλη επέκταση των μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων. Εξελικτικά, το ΠΜ θεωρείται ότι εμφανίζεται στο βλαστικό κέντρο, στο οποίο λαμβάνουν χώρα και τα βασικά εναρκτήρια συμβάντα-οδηγοί. Τα συμβάντα οδηγούν στην αθανатоποίηση του προ-κακοήθους κλώνου και στη συνέχεια πραγματοποιείται η μετανάστευσή του στον μυελό των οστών, όπου επεκτείνεται, νόσο και μπορεί να αναγνωριστεί κλινικά ως MGUS ή sMM, το οποίο είναι ανιχνεύσιμο σχεδόν σε όλους τους ασθενείς, χρόνια έως και δεκαετίες πριν από τη τελική διάγνωση του ΠΜ. Ασθενείς με MGUS εμφανίζουν κλασικό ΠΜ με ρυθμό περίπου 1% ετησίως. Το sMM εξελίσσεται με ρυθμό 10% ετησίως για τα πρώτα πέντε χρόνια, ενώ στη συνέχεια ο ρυθμός μειώνεται. Στους παράγοντες κινδύνου για την εξέλιξη της νόσου περιλαμβάνονται η έλλειψη υποτύπων της IgG, τα υψηλότερα επίπεδα μονοκλωνικής πρωτεΐνης και ορισμένες γενετικές αλλοιώσεις **(42)**.

Το sMM είναι μια δεύτερη πρόδρομη κατάσταση του ΠΜ στο οποίο οι ασθενείς έχουν υψηλότερα ποσοστά κλωνικών κυττάρων στο μυελό των οστών από τους ασθενείς με MGUS, οι οποίοι όμως δεν έχουν ακόμα αναπτύξει συμπτώματα σχετιζόμενα με βλάβες οργάνων. Η εμφάνιση της συγκεκριμένης κακοήθειας είναι συνέπεια ενός συνδυασμού παραγόντων που περιλαμβάνουν πρωτογενή και δευτερογενή γενετικά γεγονότα και γενετική ετερογένεια που έχει ως επακόλουθο την εξέλιξη της κλωνικότητας και τις αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του μυελού. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος σε ασθενείς με ΠΜ, εγείροντας το ερώτημα εάν η ανοσολογική διαφυγή είναι ένας πρόσθετος μηχανισμός εξέλιξης της νόσου **(44)**.

Η μη ολοκληρωμένη εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων οδηγεί σε ένα σύστημα ισορροπίας, κατά το οποίο τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος διατηρούν τα καρκινικά κύτταρα σε φάση “λειτουργικής αδράνειας”. Τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν από τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω γενετικών αλλαγών, της απαλοιφής αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων και της δημιουργίας ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος. Επιστημονικά δεδομένα προτείνουν πως οι MGUS και sMM πιθανότατα αποτελούν καταστάσεις ανοσολογικής ισορροπίας η οποία ακολούθως διαταράσσεται κατά τη μετάβαση στο κλασικό ΠΜ. Κατά τη διάρκεια της αλληλούχισης όλων των εξονίων του γονιδιώματος από δείγματα ασθενών στη διάγνωση MGUS/sMM και αργότερα στη διάγνωση κλασικού ΠΜ **(69, 13)** βρέθηκε πως

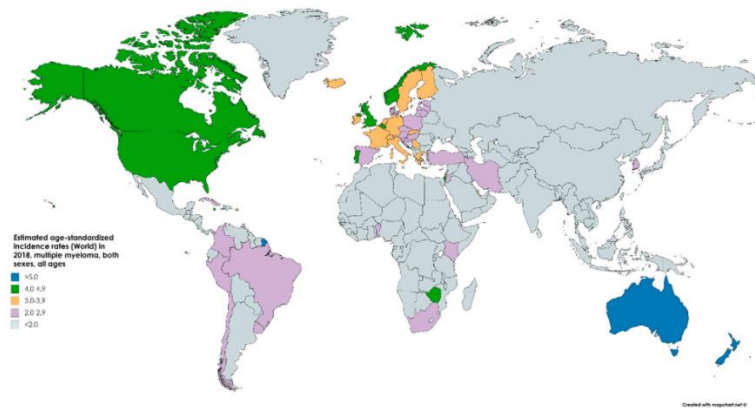
ορισμένες σωματικές μεταλλάξεις προηγήθηκαν εκείνων που βρέθηκαν κατά τη διάγνωση του κλασικού ΠΜ, με αποτέλεσμα να θεωρείται πως η ύπαρξη γενετικών μεταλλάξεων είναι απαραίτητη, αλλά όχι αρκετή, για να εξηγήσει αυτήν την μετάβαση κατά την πορεία της καρκινογένεσης. Επιπλέον, βρέθηκε πως το φορτίο των γενετικών εξαλλαγών των ασθενών με MGUS/sMM που δεν εμφάνισαν κλινικό ΠΜ ήταν παρόμοιο με εκείνο που βρέθηκε στους ασθενείς που είχαν εκδηλώσει τη νόσο. Σύμφωνα με το γεγονός αυτό, ισχυροποιείται η άποψη πως εξωγενείς παράγοντες είναι πιθανώς ένα επιπλέον καθοριστικό στοιχείο της κλωνικής εξέλιξης και της μετάβασης από προ-κακοήθεις καταστάσεις σε κλινικό ΠΜ **(44)**.

1.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Τα γενετικά γεγονότα που παρατηρούνται στην κατάσταση της MGUS, καθώς και εκείνα που παρατηρούνται στο ΠΜ και δεν ανιχνεύονται στην περίπτωση της MGUS, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν πρωταρχικά και δευτερεύοντα γενετικά γεγονότα, αντίστοιχα. Πιστεύεται πως και οι δύο περιπτώσεις συμβάλλουν στην εξέλιξη της κακοήθειας. Στις πρωταρχικές γενετικές ανωμαλίες περιλαμβάνονται μετατοπίσεις και τρισωμίες, οι οποίες αφορούν την εμφάνιση περιττού αριθμού χρωμοσωμάτων, ενώ το καθένα από αυτά εμφανίζει μερική επικάλυψη περίπου στο 40% των ασθενών. Οι μετατοπίσεις (>90%) συνήθως περιλαμβάνουν τον γενετικό τόπο του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (IgH) στο χρωμόσωμα 14 (14q32.33) και ένα από τα σχετιζόμενα χρωμοσώματα 4, 6, 11, 14 και 20. Οι τρισωμίες τυπικά περιλαμβάνουν τα χρωμοσώματα 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 και/ή 21 που οδηγούν σε υπερδιπλοειδή καρυότυπο. Έχει παρατηρηθεί πως οι τρισωμίες 3 ή 5 έχουν σημαντικά καλύτερη συνολική επιβίωση, ενώ η τρισωμία 21 σχετίζεται με χειρότερη έκβαση της νόσου. Τα δευτερεύοντα γενετικά γεγονότα περιλαμβάνουν μεταθέσεις χρωμοσωμάτων, παραλλαγές αριθμού αντιγράφων και μεταλλάξεις ενός νουκλεοτιδίου. Η μονοσωμία του χρωμοσώματος 13 και η διαγραφή του μακρού βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 13 είναι οι πιο συχνές δευτερεύουσες κυτταρογενετικές ανωμαλίες στο ΠΜ που ανιχνεύονται στο 35-40% και στο 6-10% των ασθενών, αντίστοιχα. Η μονοσωμία 13 ή η διαγραφή 13q συσχετίζονται με χειρότερη έκβαση της νόσου **(10)**.

1.1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το ΠΜ είναι η δεύτερη πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια και αντιπροσωπεύει το 10% όλων των αιματολογικών κακοηθειών. Στην Ευρώπη περίπου 40.000 άτομα διαγνώστηκαν με ΠΜ το 2015 και ο αριθμός αυτός προβλέπεται να αυξηθεί σε έως 46.000 μέχρι το 2025 **(33)**.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Ο ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΣΤΟΝ ΟΠΟΙΟ ΑΠΟΤΥΠΩΝΟΝΤΑΙ ΤΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ ΜΥΕΛΩΜΑΤΟΣ ΑΝΑ 100.000 ΑΤΟΜΑ ΓΙΑ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΗΛΙΚΙΕΣ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΑ ΔΥΟ ΦΥΛΑ (PADALA ET AL., 2021)

Σύμφωνα με τα τελευταία στατιστικά στοιχεία του GLOBOCAN (παγκόσμια βάση δεδομένων στατιστικών στοιχείων περί του καρκίνου), εκτιμήθηκε ότι υπήρχαν 160.000 περιπτώσεις ΠΜ παγκοσμίως το 2018, αποτελώντας το 0,9% όλων των διαγνώσεων καρκίνου. Περίπου 90.000 από αυτές τις περιπτώσεις αφορούσαν άνδρες και 70.000 ήταν γυναίκες, γεγονός που ισοδυναμεί με μια συχνότητα εμφάνισης 2,1/100.000 και 1,4/100.000, αντίστοιχα. Ο αθροιστικός κίνδυνος διάγνωσης από τη γέννηση έως τα 74 έτη ζωής είναι 0,24% στους άνδρες και 0,17% στις γυναίκες, καθιστώντας τη νόσο περίπου 1,5 φορές πιο πιθανή στους άνδρες. Από το 1990 έως το 2016, οι παγκόσμιες περιπτώσεις ΠΜ αυξήθηκαν κατά 126% **(50)**.

1.1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Για τη διάγνωση του ΠΜ, σύμφωνα με τα κριτήρια της Διεθνούς Ομάδας Μελέτης του ΠΜ (International Myeloma Working Group, IMWG) (**Εικόνα 3**), απαιτούνται:

- Παρουσία στον ορό ή/και στα ούρα μονοκλωνικής πρωτεΐνης
- Κλωνικά πλασματοκύτταρα στο μυελό των οστών ή πλασματοκύττωμα μαλακών μορίων
- Παρουσία βλαβών σε όργανα (**67**).

Ο χαρακτηρισμός της MGUS ορίζεται από την ύπαρξη της πρωτεΐνης M σε ποσότητα μικρότερη των 30 g/L στον ορό ασθενών και ποσοστό κλωνικών πλασματοκυττάρων μικρότερο του 10% στον μυελό των οστών, ενώ, τέλος δεν παρατηρείται σχετιζόμενη με την πάθηση δυσλειτουργία σε άλλα όργανα. Η συγκεκριμένη δυσλειτουργία μπορεί να χαρακτηριστεί και από την απουσία των συμπτωμάτων που στην διεθνή βιβλιογραφία έχουν το ακρωνύμιο CRAB (hypercalcemia, renal insufficiency, anemia, bone lesions) (**38**).

Τα κριτήρια για την ταυτοποίηση του sMM είναι η ανεύρεση πρωτεΐνης M σε ποσότητα ≥ 30 g/L στον ορό των ασθενών και ≥ 500 mg/24h στα ούρα του ασθενή και/ή η παρουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών σε ποσοστό 10-60%. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η απουσία του χαρακτηρισμού SLiM-CRAB ή αμυλοείδωσης. Οι τρεις δείκτες που χαρακτηρίζουν το ακρωνύμιο SLiM είναι οι κάτωθι:

- $S \geq 60\%$ κλωνικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών
- $Li = \text{οι λόγοι των ελαφρών αλυσίδων } \kappa(\text{kappa})/\lambda(\text{lambda}) \text{ ή } \lambda(\text{lambda})/\kappa(\text{kappa}) \geq 100$
- $M \geq 1$ εστιακή βλάβη στη μαγνητική τομογραφία (**4**)

TABLE 1			
Diagnostic criteria of the International Myeloma Working Group (e18)			
	MGUS	Smoldering myeloma	Symptomatic multiple myeloma
Proportion of plasma cells in bone marrow	<10%	≥ 10%	≥ 10%
M protein in serum	<30 g/L	≥ 30 g/L	Detectable in serum and/or urine
End-organ damage (CRAB)	No	No	Present

CRAB criteria: hypercalcemia, renal insufficiency, anemia, bone lesions
 MGUS, monoclonal gammopathy of uncertain significance

ΕΙΚΟΝΑ 3: ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΚΡΙΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ MGUS, ΤΟ SMM ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ ΟΠΩΣ ΕΧΟΥΝ ΟΡΙΣΤΕΙ ΑΠΟ ΤΟ IMWG (GERECKE ET AL., 2016)

Αρχικά, θα πρέπει να καταστεί σαφές το γεγονός πως η θεραπεία για τον κάθε ασθενή είναι διαφορετική και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία, το στάδιο της νόσου, αλλά και η δυνατότητα μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Επίσης, καθοριστικό παράγοντα αποτελούν οι διαγνωστικές εξετάσεις και οι βιοδείκτες του ασθενούς που καθορίζουν την επικινδυνότητα και την πρόγνωση της νόσου.

Στο πεδίο της θεραπείας για το ΠΜ έχουν εγκριθεί και χρησιμοποιούνται κλινικά πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα, με αποτέλεσμα την ύπαρξη πολυάριθμων σχημάτων θεραπείας, τα οποία περιλαμβάνουν τον συνδυασμό δύο ή περισσότερων φαρμάκων για την αντιμετώπιση της νόσου. Τα φαρμακευτικά σκευάσματα διακρίνονται σε ποικίλες κατηγορίες με κυριότερες τους αλκυλιωτικούς παράγοντες μελφαλάνη (melphalan, L-PAM), κυκλοφωσφαμίδη (cyclophosphamide), τα κορτικοστεροειδή δεξαμεθαζόνη (dexamethasone), πρεδνιζόνη (prednisone), τα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα θαλιδομίδη (thalidomide), λεναλιδομίδη (lenalidomide), πομαλιδομίδη (pomalidomide) και τους αναστολείς πρωτεασώματος βορτεζομίμη (bortezomib), καρφιλζομίμη (carfilzomib), ιξαζομίμη (ixazomib). Από την άλλη, η δαρατουμουμάμη (daratumumab) και η ισατουξιμάμη (isatuximab) είναι μονοκλωνικά αντισώματα, που στοχεύουν ειδικά το αντιγόνο CD38, και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του ΠΜ. Άλλοι εγκεκριμένοι θεραπευτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την ελοτουζουμάμη (elotuzumab), ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που ενεργοποιεί τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού ώστε να επιτεθούν στα κλωνικά πλασματοκύτταρα. Η ελοτουζουμάμη δρα μέσω της στόχευσης της πρωτεΐνης-μέλους 7 της οικογένειας των

μορίων ενεργοποίησης κυτταροκινών (SLAMF7), μιας πρωτεΐνης που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, πυροδοτώντας την στοχευμένη εξάλειψη των παθολογικών πλασματοκυττάρων και, ως εκ τούτου, την επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου. Η ελοτουζουμάμπη συνδέεται επίσης στην SLAMF7 των καρκινικών κυττάρων, καθιστώντας τα με αυτό τον τρόπο πιο ευάλωτα στην καταστροφή από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η πανομπινοστάτη (panobinostat) είναι ένας αναστολέας της αποακετυλάσης των ιστονών (HDAC). Δρα αναστέλλοντας τη δράση των εν λόγω ενζύμων, τα οποία συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση των κυτταρικών γονιδίων. Η σελινεξόρη (selinexor) αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνης εξπορτίνη 1 (XPO1). Η XPO1 ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα σε πολλά καρκινικά κύτταρα και εμποδίζει την αντικαρκινική δράση διαφόρων πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν φυσιολογικά στην αναστολή της εξέλιξης του καρκίνου. Παρεμποδίζοντας τη δράση της XPO1, το φάρμακο ενισχύει τη λειτουργία των αντικαρκινικών πρωτεϊνών και συμβάλλει στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων **(56, 1)**.

Η L-PAM άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως πριν από μισό αιώνα για την θεραπεία του ΠΜ, ως εκ τούτου αποτελεί μία καλώς καθιερωμένη θεραπευτική επιλογή. Μεταξύ των διαφόρων θεραπευτικών παραγόντων, η L-PAM αποτελεί «πρότυπη θεραπεία», με εμφανή αποτελέσματα στην ύφεση των συμπτωμάτων της νόσου, αλλά χωρίς καμία επίδραση στην εξέλιξή της. Παρόλο που η L-PAM έχει πλέον αντικατασταθεί από πιο σύγχρονα θεραπευτικά εργαλεία, η συμμετοχή της στο τετραπλό θεραπευτικό σχήμα με δαρατουμουμάμπη, βορτεζομίμπη και πρεδνιζόνη, καθιστά τη χρήση του εν λόγω θεραπευτικού σκεύασματος σημαντική ακόμα και σήμερα. Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί πως ο έλεγχος της νόσου έχει αναμφίβολα βελτιωθεί χρησιμοποιώντας τους θεραπευτικούς συνδυασμούς, συμπεριλαμβανομένης της L-PAM. Τέλος, η υψηλή δόση L-PAM παραμένει στο τυπικό θεραπευτικό σχήμα της μεταμόσχευσης αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ASCT) για ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια κατά τη διάγνωση του ΠΜ **(46)**.

Οι αναστολείς του πρωτεασώματος, οι ανοσοτροποποιητικές ουσίες και οι κλασικοί παράγοντες χημειοθεραπείας παίζουν κρίσιμο ρόλο στη θεραπεία του ΠΜ. Αναλυτικότερα, η βορτεζομίμπη είναι μεταξύ άλλων το σκεύασμα που χρησιμοποιείται συχνότερα σε ασθενείς με ΠΜ. Επιπροσθέτως, η βορτεζομίμπη σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή ή άλλες ουσίες (π.χ. βενδαμουστίνη) έχει δοκιμαστεί για τη

θεραπεία υποτροπών της νόσου. Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει πως η βορτεζομίμη μπορεί να είναι αποτελεσματική ακόμα και σε ασθενείς που είχαν προηγουμένως λάβει αποτελεσματική θεραπεία με τον εν λόγω παράγοντα. Οι νέοι αναστολείς πρωτεασώματος όπως για παράδειγμα η καρφιλζομίμη και η ιξαζομίμη, αποτελούν και αυτές με την σειρά τους υποσχόμενα φάρμακα, χρήσιμα σε διάφορους θεραπευτικούς συνδυασμούς σε ασθενείς με ανθεκτικό ή υποτροπιάζον ΠΜ (relapsed or refractory multiple myeloma, RRMM). Σε μια πρόσφατη δημοσίευση, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς με ανθεκτικό ή υποτροπιάζον ΠΜ που έλαβαν καρφιλζομίμη σε συνδυασμό με λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη σε σχέση με αυτούς που έλαβαν μόνο λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη. Το παραπάνω θεραπευτικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε για ιατρική χρήση σε ανθεκτικό ΠΜ τον Δεκέμβριο του 2015. Παράλληλα δύο μεγάλες τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές έδειξαν πως η θεραπεία με λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη είναι πιο αποτελεσματική, επιτυγχάνοντας καλύτερη συνολική επιβίωση (OS) σε σχέση με την αποκλειστική χρήση δεξαμεθαζόνης σε ασθενείς **(24)**.

Πλέον, η ASCT θεωρείται θεραπεία εκλογής για ασθενείς ηλικίας 65 ετών και νεότερους, διότι έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερα ποσοστά ύφεσης και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επιβίωσης σε σχέση με τη συμβατική χημειοθεραπεία **(41)**. Η ASCT αποτελεί μία προηγμένη θεραπεία για το ΠΜ που χρησιμοποιείται τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες. Ωστόσο, εξαιτίας των τοξικών ανεπιθύμητων ενεργειών σε συνδυασμό με τη μεγάλη, συνήθως, ηλικία των ασθενών έχουν θεσπιστεί κριτήρια για την εφαρμογή της. Ο ασθενής, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, θα πρέπει να είναι το πολύ 65 ετών, να μην είναι διαβητικός και να μην εμφανίζει καρδιακή, πνευμονική, νεφρική ή ηπατική δυσλειτουργία. Πριν τη μεταμόσχευση, τα άτομα που τηρούν τα συγκεκριμένα κριτήρια λαμβάνουν θεραπεία με L-PAM σε δοσολογία της τάξης των 200 mg/m². Ηλικιωμένοι ασθενείς ή άτομα με οργανικές βλάβες λαμβάνουν μικρότερες δόσεις της συγκεκριμένης αγωγής (100 – 140 mg/m²). Η αγωγή που χορηγείται στην αρχή μπορεί να περιλαμβάνει και τριπλό σχήμα με βορτεζομίμη **(3)**.

Παρόλο που η εμφάνιση των νέων θεραπευτικών παραγόντων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιβίωσης για την συγκεκριμένη νόσο και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής, η νόσος παραμένει ανίατη μέχρι και σήμερα. Σχεδόν χωρίς εξαίρεση οι ασθενείς εμφανίζουν υποτροπή ή/και γίνονται ανθεκτικοί στις θεραπείες που χρησιμοποιούνται, καθιστώντας την αναζήτηση καινοτόμων φαρμάκων ακόμα πιο επιτακτική **(1)**.

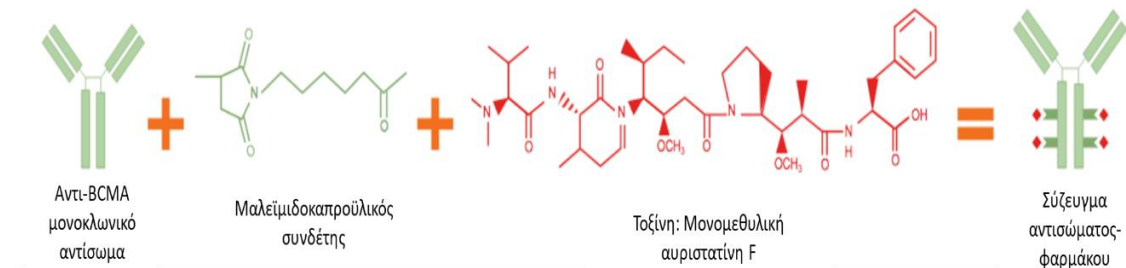
1.2 BLENREP, INN-BELANTAMAB MAFODOTIN

Στα σχήματα χημειοθεραπείας για νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς (NDMM) και στην περίπτωση του RRMM, η εμφάνιση αντοχής στα φάρμακα παραμένει μια υπαρκτή πρόκληση. Ωστόσο, το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, όταν οι θεραπείες είναι περιορισμένες και η πρόγνωση για τον ασθενή δυσοίωνη. Όμως, νέα μόρια και θεραπευτικές προσεγγίσεις περνούν από τις διάφορες φάσεις των κλινικών δοκιμών, στην προσπάθεια αναζήτησης και ανάπτυξης νέων φαρμάκων και θα μπορούσαν να καλύψουν την ανάγκη για νέες θεραπευτικές επιλογές. Το Belantamab Mafodotin (BMF), με την εμπορική ονομασία Blenrep®, εγκρίθηκε για κλινική χρήση στις ΗΠΑ και την Ευρωπαϊκή Ένωση τον Αύγουστο του 2020 **(49)** και αποτελεί ένα πολύ ελπιδοφόρο παράδειγμα ανοσοθεραπείας, επάγοντας αποτελεσματική και ανθεκτική ανταπόκριση έναντι της νόσου. Ανήκει στην κατηγορία συζεύγματος μονοκλωνικού αντισώματος-φαρμάκου (ADC) και στοχεύει το αντιγόνο ωρίμανσης των Β-κυττάρων (BCMA).

Το BMF ενδείκνυται ως μονοθεραπεία για την αντιμετώπιση του RRMM σε ενήλικες ασθενείς, οι οποίοι έχουν λάβει τουλάχιστον τέσσερις προηγούμενες γραμμές θεραπείες. Το κριτήριο για τη χορήγηση του BMF είναι η προηγούμενη μη απόκριση στη θεραπεία με τουλάχιστον έναν αναστολέα πρωτεασώματος, έναν ανοσορρυθμιστικό παράγοντα και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD38, με τους ασθενείς να έχουν εμφανίσει εξέλιξη της νόσου κατά τη διάρκεια της τελευταίας θεραπείας **(39)**.

Αναλυτικότερα, το BFM αποτελείται από το belantamab, ένα αφουκοζυλιωμένο ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα τάξης IgG1κ, ειδικό για το BCMA, που παράγεται μέσω της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA σε κυτταρική σειρά θηλαστικών (ωοθήκη κινεζικού κρικητού/χάμστερ) και είναι συζευγμένο με το χημικό μόριο μαλεϊμιδοκαπροϋλική μονομεθυλαυριστατίνη F (maleimidocaproyl monomethylauristatin F, mcMMAF) **(49)**.

Το αφουκοζυλιωμένο ανθρωποποιημένο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με τον τοξικό παράγοντα μέσω ενός μαλεϊμιδοκαπροϋλικού συνδέτη ανθεκτικού στην πρωτεόλυση **(Εικόνα 4)**. Η δράση του συγκεκριμένου φαρμάκου πραγματοποιείται με αρκετούς τρόπους όπως μέσω φαγοκυττάρωσης, απευθείας θανάτωσης των κυττάρων αλλά και μέσω της επαγωγής ανοσογονικού τύπου κυτταρικού θανάτου (ICD) **(45)**.



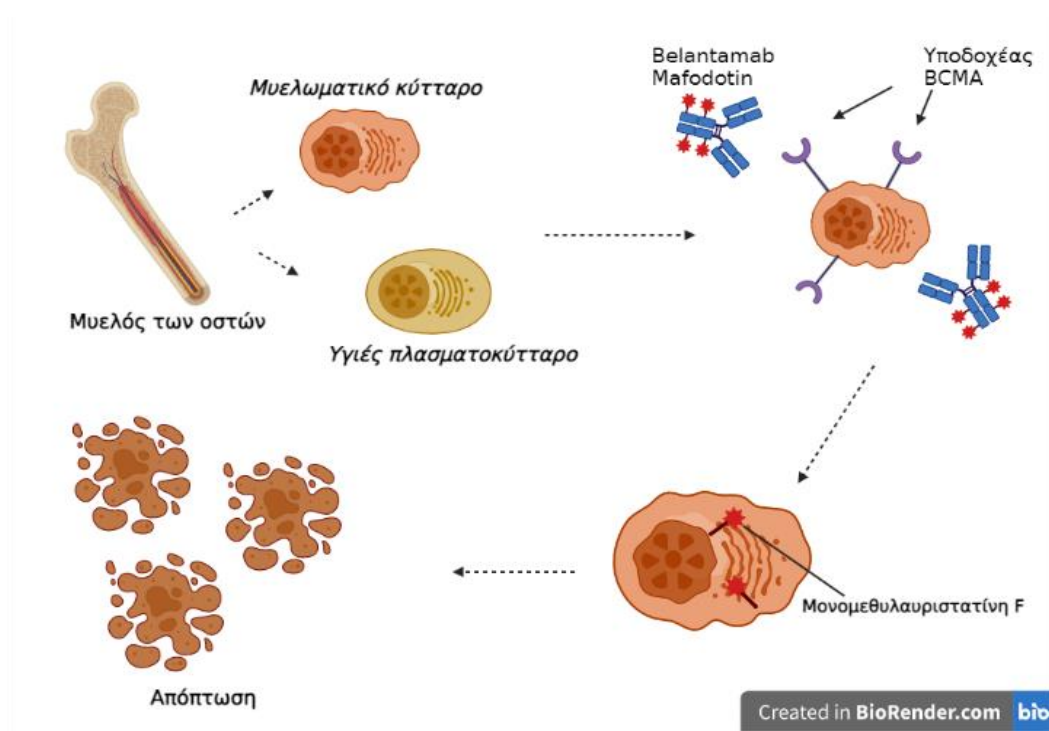
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΒΜΦ. ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΕΝΑ ΣΥΖΕΥΓΜΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΚΑΙ Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ ΤΟΞΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΜΕΣΩ ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΣΥΝΔΕΤΗ (ΜΑΛΕΪΜΙΔΟΚΑΠΡΟΪΛΙΚΟ).

1.2.1 ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το BCMA είναι μία τύπου III διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF). Εκφράζεται κατά αποκλειστικότητα στην επιφάνεια των πλασμαβλαστών και των ώριμων πλασματοκυττάρων. Ο συνδέτης που επάγει πολλαπλασιασμό (APRIL) και ο παράγοντας ενεργοποίησης του Β κυττάρου (BAFF) λειτουργούν ως αγωνιστές ως προς την πρόσδεση στον συγκεκριμένο υποδοχέα. Συγκεκριμένα, η σύνδεση του BAFF με το BCMA στα φυσιολογικά Β κύτταρα οδηγεί στη διαφοροποίησή τους και τελικά στην παραγωγή αντισωμάτων. Από την άλλη, η σύνδεση του APRIL ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων και οδηγεί σε καταστολή του μυελού των οστών (64). Έρευνες έχουν δείξει πως η έλλειψη ιντερλευκίνης (IL-6) και στεροειδών έχει ως αποτέλεσμα την αθανатоποίηση των μυελωματικών κυτταρικών σειρών με τη σύνδεση των δύο αυτών αγωνιστών στο BCMA. Ο συνδέτης APRIL χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη συγγένεια ως προς το BCMA σε σχέση με τον BAFF. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα αυτού επάγει την ανάπτυξη και επιβίωση των πλασματοκυττάρων μέσω της ενεργοποίησης διάφορων μονοπατιών όπως των MEK/ERK και της p38 κινάσης (61, 31).

Η ιδιαιτερότητα και ο ρόλος του BCMA το καθιστά ως ένα αξιοσημείωτο και ελκυστικό στόχο θεραπείας για το RRMM. Άλλωστε, έρεισμα των προαναφερθέντων αποτελεί το γεγονός της ανάδειξης πολυάριθμων θεραπευτικών εργαλείων τα οποία βρίσκονται υπό μελέτη και έχουν ως στόχο την εν λόγω πρωτεΐνη. Κάποια παραδείγματα, τα οποία έχουν επιδείξει αξιολογικά θετικά στοιχεία σε πρωταρχικές κλινικές δοκιμές αποτελούν τα γενετικά τροποποιημένα Τ κύτταρα με χιμαιρικούς

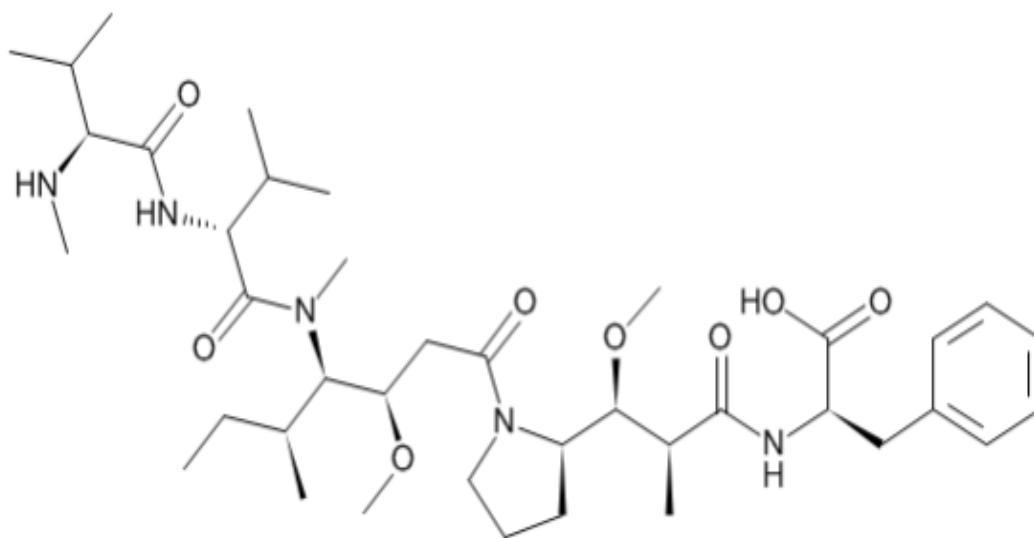
αντιγονικούς υποδοχείς (CAR-Ts), βιοειδικά αντισώματα που δεσμεύουν τα T κύτταρα (TCEs) καθώς και ανοσοθεραπείες με τη χρήση ADC. Το BMF, όπως αναφέρθηκε εξαιτίας της ειδικότητας του μονοκλωνικού αντισώματος, δεσμεύει το BCMA καθιστώντας το μόνο πρώτης γραμμής φάρμακο με τη μορφή ADC που ενδείκνυται για την θεραπεία του ΠΜ μέσω στόχευσης του BCMA (5).



ΕΙΚΟΝΑ 5: ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΒΜΦ. ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΔΕΙΚΤΗ BCMA, ΠΡΟΣΔΕΝΕΤΑΙ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΣΤΑ ΚΑΚΟΗΘΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ, ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΝΕΤΑΙ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΝΕΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΜΕΣΩ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΣΜΟΥ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ, ΕΠΑΓΟΝΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ (Η ΕΙΚΟΝΑ ΣΧΕΔΙΑΣΤΗΚΕ ΑΠΟ ΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΤΗΣ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑΣ BIORENDER.COM)

1.2.2 ΑΥΡΙΣΤΑΤΙΝΗ – ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Η αυριστατίνη είναι ένας τοξικός παράγοντας που διαθέτει την ικανότητα να καταστρέφει τους μικροσωληνίσκους του κυττάρου, αναστέλλοντας την κυτταρική διαίρεση. Εμπεριέχεται σε ένα σύνολο φυσικών ενώσεων, που απομονώθηκαν από το θαλάσσιο μαλάκιο *Dolabella auricularia*, τις λεγόμενες δολαστατίνες. Έχουν πραγματοποιηθεί ενδελεχείς μελέτες των εφαρμογών των δολαστατινών στην θεραπεία του καρκίνου, της ελονοσίας και των μυκητιάσεων. Μετά την επιτυχή ολική σύνθεση της δολαστατίνης 10, προέκυψαν διάφορα παράγωγα, όπως η μονομεθυλική αυριστατίνη Ε (ΜΜΑΕ) και η μονομεθυλική αυριστατίνη F (ΜΜΑF). Η τοξική δράση των ΜΜΑF και ΜΜΑΕ παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η ΜΜΑΕ διαπερνά χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και έχει χαμηλότερο IC₅₀ από την ΜΜΑF. Ωστόσο, η ΜΜΑF είναι πιο υδρόφιλη και έχει χαμηλότερη τάση συσσωμάτωσης εμφανίζοντας χαμηλότερη συστηματική τοξικότητα σε σύγκριση με την ΜΜΑΕ (51).



ΕΙΚΟΝΑ 6: ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΤΟΞΙΝΗΣ ΜΟΝΟΜΕΘΥΛΑΥΡΙΣΤΑΤΙΝΗΣ F (ΜΜΑF)

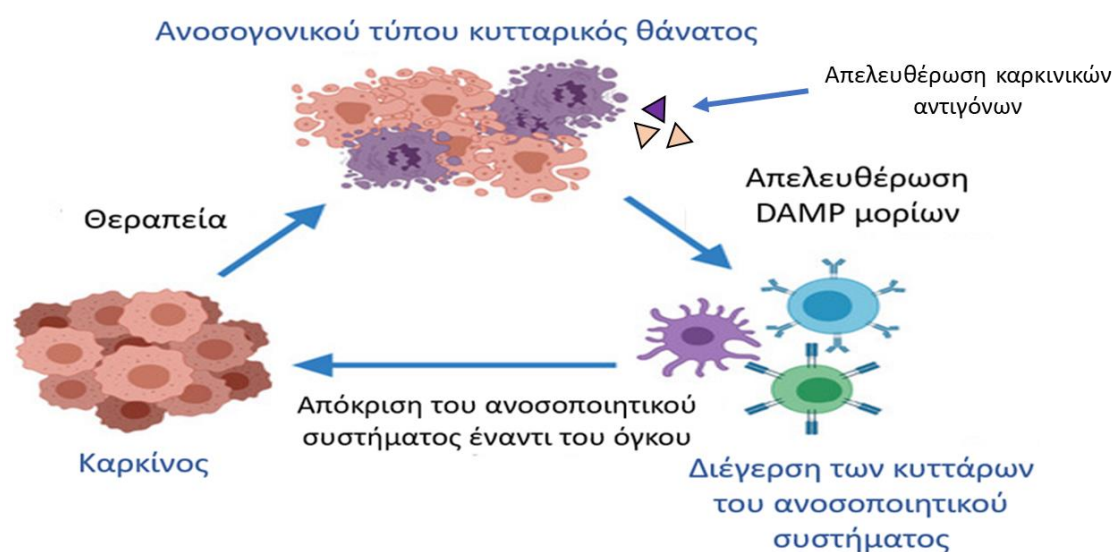
1.3 ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ (ICD)

Η ιδέα της κυτταρικής ανοσίας καθιερώθηκε για πρώτη φορά από τον βραβευμένο με Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής ζωολόγο Ilya Metchnikoff. Μάλιστα, χαρακτηρίστηκε ως «ο πατέρας της κυτταρικής ανοσίας» και του έχει αποδοθεί η ανακάλυψη των φαγοκυττάρων τα οποία αποτελούν τον κύριο αμυντικό μηχανισμό της φυσικής (εγγενούς) ανοσίας. Συγκεκριμένα, μέσω της μελέτης του σε έμβρυα αστερία (Ομοταξία: Asteroidea) ανακάλυψε τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης ξένου υλικού και περιέγραψε έναν μοναδικό μηχανισμό έμφυτης ανοσίας. Για πολλά χρόνια η συγκεκριμένη παρατήρηση ερμηνευόταν ως μία απόκριση του οργανισμού σε ένα ξένο στοιχείο, ωστόσο σύμφωνα με τα σημερινά δεδομένα είναι εύλογο να θεωρηθεί και ως μια απόκριση του οργανισμού σε κάποιο τραυματισμό. Το 1994, η Polly Matzinger διατύπωσε την «θεωρία του κινδύνου», η οποία αναφέρει πως το ανοσοποιητικό σύστημα διαθέτει την ικανότητα της διάκρισης των ενδογενών βιολογικών σημάτων σε επικίνδυνα και μη. Έχει καταστεί σαφές πως τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση stress, εκείνα που πεθαίνουν βίαια ή έχουν τραυματιστεί απελευθερώνουν ή εκφράζουν στην επιφάνειά τους μόρια και πρωτεΐνες τα οποία λειτουργούν ως σήματα κινδύνου για το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα λεγόμενα «σήματα κινδύνου» μεταγενέστερα ονομάστηκαν μοτίβα σχετιζόμενα με βλάβες (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs). Υπό κατάλληλες προϋποθέσεις μπορεί να παρατηρηθεί απελευθέρωση ή έκκριση DAMPs, όπως του μορίου ATP και της πρωτεΐνης ομάδας υψηλής κινητικότητας 1 (HMGB1), ενώ σε άλλη περίπτωση, εκφράζονται στο εξωτερικό στρώμα της πλασματικής μεμβράνης όπως στην περίπτωση της καλρεκτουλίνης (CRT) και των μελών της ομάδας πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP), όπως η HSP90. Άλλα DAMPs απελευθερώνονται σε μεταγενέστερο στάδιο αποικοδόμησης του κυττάρου κατά την διαδικασία του κυτταρικού θανάτου, με το ουρικό οξύ να αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα. Σ' αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί πως πολλά από τα παραπάνω μόρια έχουν ως επί το πλείστον μη ανοσολογικές λειτουργίες πριν από την έκθεσή τους στην κυτταρική επιφάνεια ή την εξωκυττάρωσή τους, δηλαδή δρουν με διαφορετικό τρόπο όσο παραμένουν στο εσωτερικό του κυττάρου **(35)**.

Η φράση «ανοσογονικός κυτταρικός θάνατος» χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια λειτουργικά ιδιόμορφη κατάσταση ρυθμιζόμενου κυτταρικού θανάτου (RCD), η οποία έχει την ικανότητα να εγείρει σε ανοσοεπαρκείς ξενιστές ειδική ανοσολογική απόκριση έναντι

αντιγόνων προερχόμενων από νεκρά ή υπό θάνατο κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί πως ο ICD χαρακτηρίζεται από αποπτωτικά μορφολογικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 7) (6).

Έχουν περάσει περίπου δύο δεκαετίες από την πρώτη περιγραφή της σημασίας των DAMPs για την επιβίωση και την ομοίωση των πολυκύτταρων οργανισμών υπό συνθήκες στρες (52). Αρχικά, η έκκριση ή/και η έκφραση των DAMPs είχε συνδεθεί αποκλειστικά με την νέκρωση ως αποτέλεσμα κάποιου φυσικού τραυματισμού ιστών και κυττάρων. Ωστόσο, πρόσφατα δείχτηκε πως τα DAMPs αποτελούν ενεργά προϊόντα κυττάρων που οδηγούνται σε RCD και παίζουν ευεργετικό ρόλο στην αντικαρκινική θεραπεία μέσω της πολύπλοκης αλληλεπίδρασής τους με το ανοσοποιητικό σύστημα (2).



ΕΙΚΟΝΑ 7: ΠΕΡΙΛΗΠΤΙΚΗ ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ICD ΜΕ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΟ ΤΗΝ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ. ΠΡΟΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΙ Η ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ DAMP ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΥΠΟ ΘΑΝΑΤΟ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ. ΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΔΕΣΜΕΥΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΑ

Επειδή στο παρελθόν η απόπτωση θεωρήθηκε ανοσολογικά σιωπηλή και δεδομένου ότι οι κατευθυντήριες γραμμές του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου των ΗΠΑ για τον έλεγχο φαρμάκων για την αντικαρκινική θεραπεία απαιτούν δοκιμή σε ανθρώπινους όγκους που έχουν μεταμοσχευθεί επιτυχώς σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην αντικαρκινική θεραπεία είχε αγνοηθεί συστηματικά. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, μέσω της εδραίωσης της έννοιας του ICD, η εν λόγω θεώρηση άλλαξε, υπογραμμίζοντας παράλληλα τον σημαντικό ρόλο του ανοσοποιητικού

συστήματος στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας έναντι του καρκίνου όχι μόνο σε ποντίκια, αλλά και σε ανθρώπους **(35)**.

Τα τελευταία είκοσι χρόνια η βιοϊατρική επιστημονική κοινότητα έχει καταβάλλει φιλόδοξες προσπάθειες για την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών στόχευσης οδών σηματοδότησης κυτταρικού θανάτου με απώτερο σκοπό την κυτταροπροστασία στην περίπτωση ισχαιμικών διαταραχών και την κυτταροτοξικότητα σε ογκολογικές καταστάσεις. Η συγκεκριμένη «επιστημονική επένδυση» οδήγησε σε μερική επιτυχία, όπως αποδείχθηκε σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΧΛΛ), οι οποίοι μέχρι στιγμής επωφελούνται από το θεραπευτικό όφελος που τους παρέχει η χορήγηση ενός αναστολέα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2, με την ονομασία βενετοκλάξη (venetoclax). Οι όροι νεκρόπτωση, φερρόπτωση και έντωση αφορούν μορφές RCD που εκτελούν το δικό τους πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου μέσω διαφορετικών μοριακών μονοπατιών. Ο καθορισμός του τρόπου δράσης αυτών των μηχανισμών, ο ρόλος που πιθανά διαδραματίζουν σε παθολογικές καταστάσεις, η σηματοδότηση και η πολυπλοκότητα της επαγωγής τους, έχουν ζωτική σημασία από θεραπευτικής απόψεως **(53)**.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες προσυμπτωματικού ελέγχου για την εύρεση αξιόπιστων επαγωγέων ICD και την αποκάλυψη της εγγενούς ικανότητας μιας μεγάλης ποικιλίας φαρμάκων να προκαλούν έκθεση σημάτων κινδύνου τα οποία σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο και επιφέρουν *in vivo* αντικαρκινικές ανοσοαποκρίσεις. Επιστημονικά δεδομένα υποδηλώνουν πως το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) αποτελεί τον πυρήνα όλων των πιθανών σεναρίων όπου εμφανίζεται ο ICD. Επομένως, το στρες στο οποίο υποβάλλεται το ΕΔ και η ενεργοποίηση της απόκρισης στη μη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών (UPR) έχουν καταστεί σημαντικοί στόχοι σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους. Συγκεκριμένα, στο ΠΜ τα υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρινών αναγκάζουν τα πλασματοκύτταρα να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό αποκλειστικά από τον μηχανισμό της UPR. Για το λόγο αυτό, φάρμακα που διαταράσσουν την ομοιόσταση του ΕΔ και επιφέρουν κυτταρικό θάνατο σχετιζόμενο με στρες του ΕΔ, όπως οι αναστολείς του πρωτεασώματος, καθώς και νέοι στρεσογόνοι παράγοντες του ΕΔ, αποτελούν πολλά υποσχόμενους θεραπευτικούς παράγοντες έναντι του ΠΜ **(63)**.

Μέχρι στιγμής έχουν ανακαλυφθεί τουλάχιστον τέσσερις τρόποι επαγωγής ICD, καθένας από τους οποίους βασίζεται στην έκκριση και έκφραση μιας συγκεκριμένης ομάδας DAMPs.

1.3.1 ΤΡΟΠΟΙ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

Επιγραμματικά αυτοί οι τρόποι είναι:

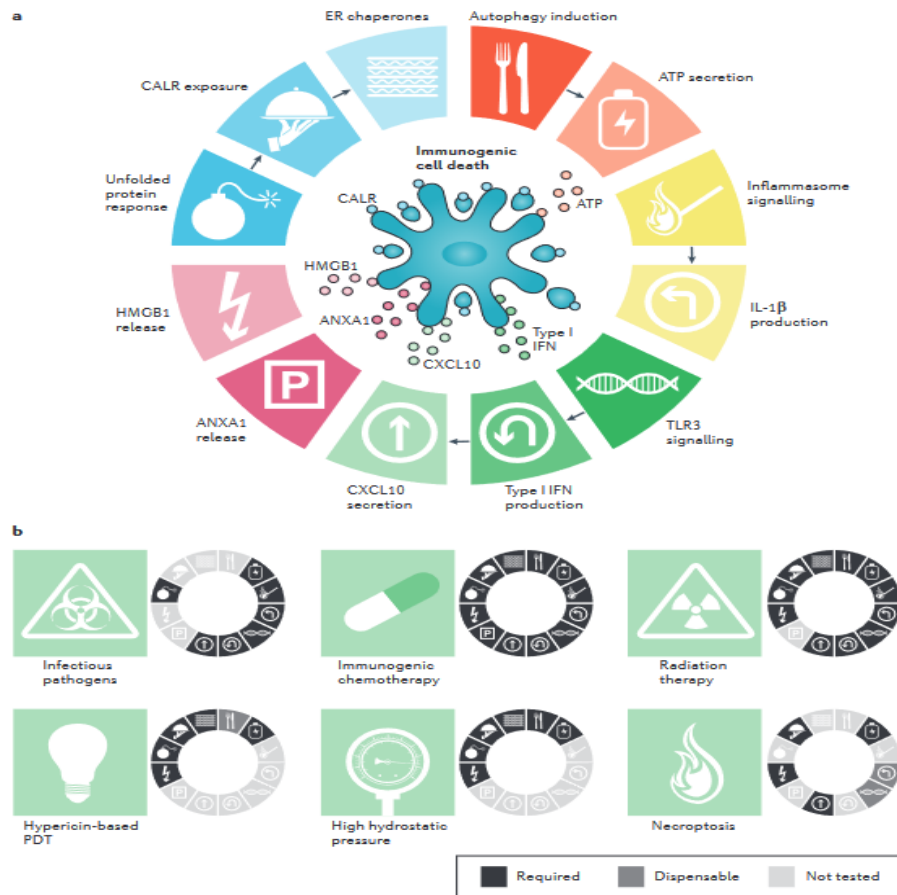
- **ICD επαγόμενος από παθογόνα.**

Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί έναν από τους πιο εξελικτικά συντηρημένους μηχανισμούς άμυνας έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Η καθυστέρηση του κυτταρικού θανάτου των μολυσμένων κυττάρων μπορεί να ευνοεί την εξάπλωση του παθογόνου παροδικά, ωστόσο, τόσο οι ιοί όσο και οι άλλοι υποχρεωτικά ενδοκυτταριοί μικροοργανισμοί όπως η *Salmonella enterica* απαιτούν διαρκώς ζωντανά και μεταβολικά ενεργά κύτταρα για τον πολλαπλασιασμό τους (τουλάχιστον στις πρώτες φάσεις της μόλυνσης).

- **ICD επαγόμενος από χημειοθεραπευτικά φάρμακα.**

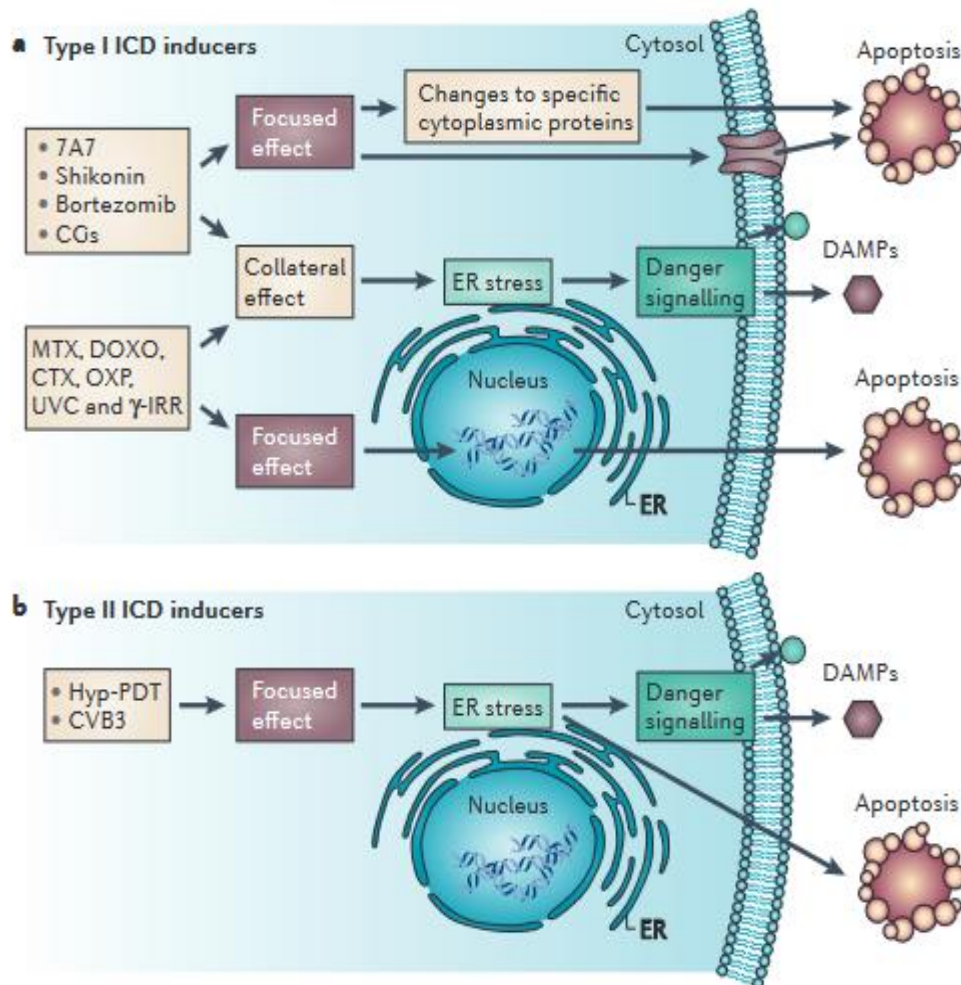
Τα καρκινικά κύτταρα ποντικού που εκτίθενται σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες οι οποίοι χρησιμοποιούνται επί του παρόντος σε κλινικές περιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένης της δοξορουβικίνης, της μιτοξανθρόνης, της οξαλιπλατίνης και της βορτεζομίμπης, οδηγούνται σε ICD, όπως άλλωστε αποδεικνύεται και από εργαστηριακά πειράματα. Τουναντίον, οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που είναι εγγενώς ανίκανοι να προάγουν την απελευθέρωση ενός ή περισσότερων μορίων DAMP αποτυγχάνουν να επιφέρουν ICD. Για παράδειγμα, η σισπλατίνη υστερεί στην ικανότητα της επαγωγής του μηχανισμού της UPR και την επακόλουθη μετατόπιση της CRT στο εξωτερικό στρώμα της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων που οδηγούνται σε θάνατο, σε αντίθεση με το παράγωγό της, την οξαλιπλατίνη (**Εικόνα 8**). Επιπροσθέτως, εμβόλιο προερχόμενο από καρκινικά κύτταρα ποντικού που καλλιεργήθηκαν παρουσία σισπλατίνης, απέτυχε να προστατεύσει συγγενείς ποντικούς, ενώ ποντικοί που εμβολιάστηκαν με καρκινικά κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία οξαλιπλατίνης παρείχαν αποτελεσματική προστασία.

- **ICD επαγόμενος από σωματικές ενδείξεις.**



ΕΙΚΟΝΑ 8: ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ICD ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ Σ' ΑΥΤΟΥΣ. ΓΙΑ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ CRT ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΕΙ ΩΣ ΣΗΜΑ "ΦΑΕ ΜΕ" ΓΙΑ ΤΑ ΓΕΙΤΟΝΙΚΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Οι περισσότεροι επαγωγείς ICD στοχεύουν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες πλασματικής μεμβράνης ή πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μηχανισμό του διπλασιασμού της έλικας του DNA, ενώ δεν πραγματοποιείται στόχευση της τσαπερόνης ER33. Πράγματι, η δοξορουβικίνη και η μιτοξανθρόνη εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και μόνο ένα μικρό ποσοστό τους βρίσκεται στα εξωπυρηνικά διαμερίσματα. Συνεπώς, είναι εύλογη η ταξινόμηση αυτών των παραγόντων. Οι παράγοντες που επάγουν αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο μέσω στόχων που δεν σχετίζονται ή δεν ανευρίσκονται στο ΕΔ, δηλαδή μέσω έμμεσης επαγωγής στρες του ΕΔ, ονομάζονται επαγωγείς ICD τύπου I. Αντιθέτως, οι επαγωγείς ICD τύπου II διαθέτουν την ικανότητα επιλεκτικής στόχευσης του ΕΔ και μπορούν να πραγματοποιήσουν ανοσογονική απόπτωση διαταράσσοντας με άμεσο τρόπο την ομοίωση του ΕΔ (**Εικόνα 9**) (35).



ΕΙΚΟΝΑ 9: Η ΠΥΡΟΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ICD ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΣΥΜΒΕΙ ΜΕΣΩ ΕΜΜΕΣΗΣ Η΄ ΑΜΕΣΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΔ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΥΠΟΥ Ι Η΄ ΙΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΕΠΑΓΩΓΕΑ ΤΥΠΟΥ Ι ΑΠΟΤΕΛΕΙ Η ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΜΠΗ (Α), ΕΝΩ ΕΠΑΓΩΓΕΑΣ ΤΥΠΟΥ ΙΙ ΘΕΩΡΕΙΤΑΙ Ο ΙΟΣ CVB3 (Β)

Σύμφωνα με την διάκριση των επαγωγών του ICD, το BMF ανήκει στην κατηγορία τύπου Ι καθώς διαταράσσει έμμεσα το ΕΔ μέσω παρεμπόδισης του πολυμερισμού της τουμπουλίνης και ως επακόλουθο της κατασκευής των μικροσωληνίσκων. Με αυτό τον τρόπο αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου, το οποίο οδηγείται σε θάνατο (68).

1.3.2 ΤΥΠΟΙ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

Σε αντίθεση, με τον τυχαίο/νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (ACD) που προκαλείται από διάφορους φυσικούς, χημικούς και μηχανικούς κυτταρικούς τραυματισμούς, ο RCD ελέγχεται από μια πληθώρα οδών μοριακής σηματοδότησης. Διάφοροι καλά

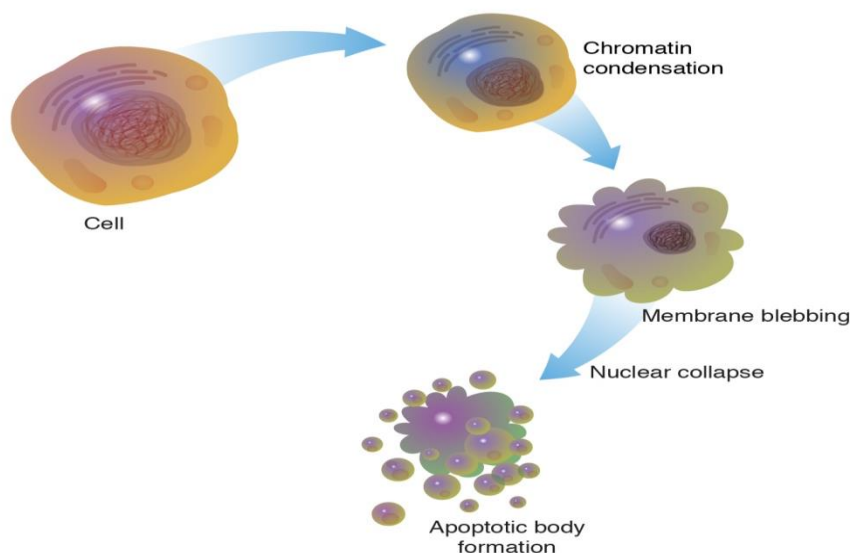
χαρακτηρισμένοι τρόποι επαγωγής RCD που διεγείρουν τις ανοσογονικές ιδιότητες μέσω της απελευθέρωσης DAMPs, αποτελούν οι:

1.3.2.1 Απόπτωση

Η θανάτωση των καρκινικών κυττάρων με κυτταροτοξικές θεραπείες, για παράδειγμα, χημειοθεραπεία, ακτινοβολία, ανοσοθεραπεία ή γονιδιακή θεραπεία, διεκπεραιώνεται κυρίως από την ενεργοποίηση της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα. Η απόπτωση είναι ένα ξεχωριστό, εγγενές πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί για την έναρξη της απόπτωσης σε μια κυτταροτοξική θεραπεία μπορεί να εξαρτώνται από το μεμονωμένο αυτό ερέθισμα και δεν έχουν προσδιοριστεί ακριβώς. Ωστόσο, η βλάβη στο DNA ή σε άλλα λειτουργικά μόρια θεωρείται ότι είναι ένα κοινό αρχικό γεγονός το οποίο οδηγεί σε κυτταρικό στρες. Το κυτταρικό στρες θα σηματοδοτήσει την έναρξη της παραγωγής κάποιων συγκεκριμένων μορίων όπως το αμινοτελικό άκρο της κινάσης τύπου JIN (JNK), MAPK/ERK, τον πυρηνικό παράγοντα κB (NFκB) ή το κεραμίδιο τα οποία μάλιστα έχουν χαρακτηριστεί ως υπαίτια για την ρύθμιση της απόπτωσης. Επιπλέον, τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs) ή τα φυσικά φονικά (NK) κύτταρα μπορεί να συμβάλλουν στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω έκκρισης κυτταροτοξικών μορίων όπως η θρυμματίνη B (granzyme B), η οποία ενεργοποιεί άμεσα τους μηχανισμούς απόπτωσης στο εσωτερικό του κυττάρου. Δύο κατεξοχήν μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά που απαντώνται στην περίπτωση της απόπτωσης είναι η κυτταρική συρρίκνωση και ο κατακερματισμός του πυρηνικού DNA (**Εικόνα 10**). Επιπροσθέτως, πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως οι κασπάσες, είναι σημαντικά μόρια-τελεστές της απόπτωσης. Επειδή, η μη επιθυμητή ενεργοποίηση του μηχανισμού απόπτωσης μπορεί να επιφέρει επιζήμιες αν όχι καταστροφικές επιπτώσεις στην επιβίωση του κυττάρου, η μοριακή σηματοδότηση και γενικά ο μηχανισμός της απόπτωσης ελέγχεται αυστηρά από σημεία ελέγχου του κυττάρου. Επιπροσθέτως οι αντι-αποπτωτικοί μηχανισμοί οι οποίοι ρυθμίζουν τον κυτταρικό θάνατο έχουν ενοχοποιηθεί για την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στα θεραπευτικά φάρμακα (**19**).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων είναι σπάνια ενώ η παρουσία τους έχει συνδεθεί με πολλές διαφορετικές ασθένειες που περιλαμβάνουν

φλεγμονή, αυτοανοσία, καρκίνο, κ.α.. Η άμεση εκκαθάριση των αποπτωτικών κυττάρων είναι απώτερος στόχος του οργανισμού καθώς και η διαδικασία αποτροπής εμφάνισης φλεγμονής. Αυτό επιβεβαιώνεται από μια πληθώρα επιστημονικών δεδομένων που συνδέουν την μειωμένη κάθαρση αποπτωτικών κυττάρων με πολλές περιπτώσεις ανθρώπινων ασθενειών και επιδείνωσης της παθογένειας (55).



ΕΙΚΟΝΑ 10: ΠΡΟΟΔΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΤΑ ΔΙΑΚΡΙΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΥ ΕΠΙΦΕΡΕΙ Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μία από τις βασικές ανακαλύψεις στην έρευνα για τον καρκίνο ήταν η αναγνώριση πως η αντικαρκινική χημειοθεραπεία σκοτώνει τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιώντας την ενδογενή ή/και την εξωγενή οδό απόπτωσης. Παρόλο που αρκετά δεδομένα υποδεικνύουν πως το μονοπάτι του CD95 και του προσδέτη του CD95L παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία αντικαρκινικών φαρμάκων που επάγουν την απόπτωση, τουλάχιστον υπό ορισμένες περιπτώσεις, τα περισσότερα κυτταροτοξικά φάρμακα θεωρείται ότι ξεκινούν πρωτίστως τον κυτταρικό θάνατο, πυροδοτώντας μια μοριακή οδό που αφορά κυρίως το κυτόχρωμα c, την πρωτεΐνη Araf1 και την κασπάση-9 (20).

1.3.2.2 Πυρόπτωση

Ο όρος πυρόπτωση (pyroptosis) αποτελεί ένα σύνθετο όρο και προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «πῦρ» που σημαίνει φωτιά και την λέξη «πτώση», περιγράφοντας μια προ-

φλεγμονώδη κατάσταση προγραμματισμένου θανάτου. Η απόπτωση και η πυρόπτωση παρουσιάζουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά όπως είναι οι νουκλεοτιδικές βλάβες, η πυρηνική συμπύκνωση και η μη εξάρτηση από το σύστημα της ομάδας των κασπασών, ωστόσο η διάκριση της πυρόπτωσης από τους υπόλοιπους τύπους RCD μπορεί να γίνει μέσω των ιδιαίτερων μορφολογικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζει. Αρχικά, παρατηρείται ένα διαφορετικό μοτίβο βλάβης στο DNA σε σχέση με την αντίστοιχη περίπτωση της απόπτωσης και παρά την θραυσματοποίηση του DNA και την συμπύκνωση της χρωματίνης, στην πυρόπτωση ο πυρήνας παραμένει ακέραιος. Επίσης, η συνολική πυκνότητα των πυροπρωτικών κυττάρων είναι μικρότερη σε σχέση με εκείνη των αποπρωτικών κυττάρων όταν υφίστανται βλάβες στο DNA και είναι αρνητικά στην χρώση TUNEL, η οποία αποτελεί μια ανοσοϊστοχημική μέθοδο για την ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA **(14)**.

Ο πυροπρωτικός κυτταρικός θάνατος κανονικής οδού επάγεται από την αρχική συγκρότηση του φλεγμονοσώματος, την μετέπειτα θραυσματοποίηση της GSDMD και απελευθέρωση των ιντερλευκινών 1β/18. Τα φλεγμονοσώματα είναι πολυμοριακά σύμπλοκα τα οποία συγκροτούνται και ενεργοποιούνται όταν ο ξενιστής εμφανίζει ανθεκτικότητα σε κάποια μικροβιακή λοίμωξη διευκολύνοντας και την ανάπτυξη προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Επίσης, ερευνητικά στοιχεία αναφέρουν πως τα φλεγμονοσώματα μαζί με της σχετιζόμενες με αυτά ιντερλευκίνες παίζουν καίριο ρόλο στην ανάπτυξη της ογκογένεσης, της μετάστασης και της διήθησης. Η συγκρότηση του φλεγμονοσώματος ξεκινά με την δράση των υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων του παθογόνου (PRRs), οι οποίοι διαθέτουν την ικανότητα αναγνώρισης μοτίβων σχετιζόμενων με παθογόνα (PAMPs) και DAMPs. Η ενεργοποίηση των PRRs προάγει ένα καταρράκτη σηματοδοτικών μονοπατιών και προκαλεί την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I και την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Εν συντομία, οι PRRs συγκροτούν τα φλεγμονοσώματα μαζί με την προ-κασπάση 1 έπειτα από διέγερση των κυττάρων από σηματοδοτικά μόρια βακτηρίων ή ιών. Στην συνέχεια ενεργοποιείται η κασπάση 1 και υδρολύεται σε δύο σημεία της, δημιουργώντας ένα διμερές από το οποίο θα προκύψει η ώριμη υδρολυμένη ενεργός πλέον κασπάση 1. Αυτή με την σειρά της θραυσματοποιεί την πρωτεΐνη GSDMD στο σημείο του αμινοξικού καταλοίπου Asp275 δημιουργώντας ένα καρβοξυτελικό θραύσμα της πρωτεΐνης GSDMD (C-GSDMD) 22kDa και ένα αμινοτελικό θραύσμα 31 kDa (N-GSDMD). Το N-GSDMD διαρρηγνύει την πλασματική μεμβράνη δημιουργώντας έναν μη-εκλεκτικό πόρο διαμέτρου 10-14 nm, οδηγώντας σε κυτταρική

διόγκωση και εν τέλει σε πυρόπτωση με παράλληλη απελευθέρωση των IL-1β/-18 και της HMGB1 (72).

Ένα σύνολο στοιχείων δείχνει πως τόσο η πυρόπτωση όσο και η νεκρόπτωση αντιπροσωπεύουν μονοπάτια λυτικού κυτταρικού θανάτου που έχουν φλεγμονώδη φύση. Ωστόσο, σύμφωνα με τους διαφορετικούς γενετικούς παράγοντες που τις καθορίζουν, η πυρόπτωση και η νεκρόπτωση μπορούν να εξυπηρετούν διακριτούς σκοπούς. Για παράδειγμα, η νεκρόπτωση παρατηρείται ως επί το πλείστον ως ένας εφεδρικός αμυντικός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που ενεργοποιείται όταν παρεμποδίζεται η απόπτωση, όπως κατά τη διάρκεια μόλυνσης από παθογόνο, η οποία χαρακτηρίζεται από την αναστολή της νεκροπρωτικής σηματοδότησης από την κασπάση-8. Από την άλλη πλευρά, η πυρόπτωση είναι μια πρωτογενής κυτταρική απόκριση μετά την αναγνώριση DAMPs και PAMPs μορίων (15).

1.3.2.3 Φερρόπτωση

Η φερρόπτωση (ferroptosis) είχε παρατηρηθεί αρκετές φορές ως φαινόμενο πολύ πριν την λεπτομερή διερεύνηση του μηχανισμού για τον συγκεκριμένο τύπο κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, μέχρι και την εδραίωση του συγκεκριμένου βιολογικού όρου το 2012, οποιοδήποτε στοιχείο αυτού που αποκαλούμε σήμερα φερροπρωτικό χαρακτηριστικό, αποδιδόταν σε μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου ή δεν χαρακτηριζόταν καν ως βιολογικής σημασίας. Για παράδειγμα, η εξάρτηση από χρήσιμα μεταβολικά στοιχεία που η έλλειψη τους οδηγούσε σε κυτταρικό θάνατο, σημειώθηκαν δεκαετίες πριν την ανακάλυψη της φερρόπτωσης. Συγκεκριμένα, στις αρχές της δεκαετίας του 1950, πραγματοποιήθηκαν μελέτες από τον Harry Eagle και τους συνεργάτες του για να ελέγξουν τις απαιτήσεις για συγκεκριμένους μεταβολίτες, όπως αμινοξέα, βιταμίνες και άλλα θρεπτικά συστατικά για την υποστήριξη της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού κυττάρων θηλαστικών σε καλλιέργειες. Αυτές οι έρευνες έδειξαν πως η απουσία ενός μόνο αμινοξέος από τα 13 συνολικά διαφορετικά αμινοξέα που δοκιμάστηκαν, ανέστειλε την ανάπτυξη των καλλιιεργήσιμων κυττάρων που προέρχονταν από άνθρωπο και ποντικό. Τα κύτταρα που στερήθηκαν την κυστεΐνη εμφάνισαν μια μικροσκοπική μορφολογία που ήταν διαφορετική από εκείνες που παρατηρήθηκαν κατά τη στέρηση άλλων αμινοξικών καταλοίπων. Οι ερευνητές ανέφεραν πως τα συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά ήταν παρόμοια με

εκείνα που παρατηρήθηκαν σε περιπτώσεις κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από ιογενή λοίμωξη **(26)**.

Σήμερα είναι καλά τεκμηριωμένο πως ο RCD είναι ανοσογονικός, απελευθερώνοντας DAMP μόρια. Ορισμένοι αναστολείς της φερρόπτωσης έχει αποδειχθεί ότι ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση σε πειραματικά μοντέλα διάφορων ασθενειών. Ωστόσο, αν και υπάρχουν ισχυρά στοιχεία που το υποδεικνύουν δεν είναι σαφές εάν οι αναστολείς της φερρόπτωσης επηρεάζουν την ανοσογονικότητα που βασίζεται στην πρόκληση φλεγμονής **(65)**.

1.3.2.4 Παρθάνατος

Ο παρθάνατος (parthanatos) αποτελεί έναν ακόμα τύπο RCD. Η αλόγιστη ενεργοποίηση συγκεκριμένων συστατικών που απαντούν στις περιπτώσεις βλάβης του DNA προκαλούν σοβαρή αλκυλίωση της δίκλωνης αλυσίδας του DNA, οδηγώντας το κύτταρο σε παρθάνατο. Επίσης, έχει φανεί πως εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η ισχαιμία, η υποξία, η φλεγμονή, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η νόσος του Πάρκινσον **(22)**.

Σε κύτταρα που αντιμετωπίζουν εκτενείς βλάβες του DNA, η διαρκής ενεργοποίηση του μορίου πολυμεράση-1 της πολυ(ADP-ριβόζης) (PARP-1) οδηγεί τελικά τα κύτταρα σε RCD. Μάλιστα σε αυτό παίζει ρόλο η εξάντληση της ενέργειας του κυττάρου, της μιτοχονδριακής απελευθέρωσης του AIF και της παραγωγής περίσσειας πολυμερών πολυ(ADP-ριβόζης) (PAR). Η ενεργοποίηση του PARP-1 επάγει την απελευθέρωση ανοσογόνων αλαρμινών, κυρίως της HMGB1 **(11)**.

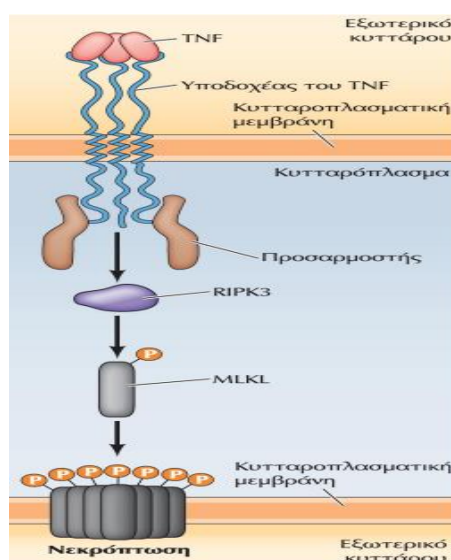
Η PARP-1 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA, τη γονιδιωματική σταθερότητα και τη μεταγραφή, και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μόρια που εμπλέκονται στον μηχανισμό του παρθάνατου **(58)**.

Συνολικά, με βάση αυτά τα στοιχεία, διάφορες διαδικασίες RCD μπορούν πιθανώς να θεωρηθούν ως μορφές ICD. Μερικοί πρόσθετοι τύποι κυτταρικού θανάτου περιλαμβάνουν τον ανοϊκό θάνατο (μια αποπτωτική μέθοδο RCD), τη νέκρωση που προκαλείται από τη μετάβαση της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων (MPT), τον εντωτικό κυτταρικό θάνατο (entosis), τον κυτταρικό θάνατο μέσω δημιουργίας εξωκυτταρικής παγίδας ουδετερόφιλων

(NET) ή νέτωση (netosis) , τον εξαρτώμενο από το λυσόσωμα κυτταρικό θάνατο (LDCD), τον εξαρτώμενο από την αυτοφαγία κυτταρικό θάνατο (ADCDC), τον αυτοοικό θάνατο (autosis), την αλκαλιπτώση (alkalipitosis) και τέλος την οξειπτώση (Oxeiptosis) (8).

1.3.2.5 Νεκρόπτωση

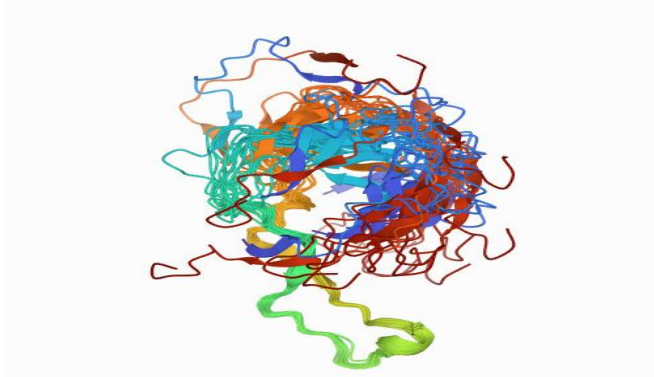
Η νεκρόπτωση είναι μια μορφή RCD που επιτυγχάνεται μέσω της φωσφορυλίωσης της ψευδοκινάσης μικτής γενεαλογίας MLKL από την πρωτεϊνική κινάση υποδοχέα σερίνης/θρεονίνης (RIPK3). Η φωσφορυλίωση οδηγεί στον σχηματισμό ολιγομερών πρωτεϊνικών μορίων MLKL τα οποία διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη (Εικόνα 11). Παρόλο που η νεκρόπτωση αναγνωρίστηκε ως μια εξαιρετικά προφλεγμονώδης μορφή κυτταρικού θανάτου, η ικανότητά της να εμπλέκει τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος και να προκαλεί μια ειδική για κάποιο αντιγόνο ανοσοαπόκριση δεν είχε εξακριβωθεί μέχρι πρόσφατα. Δοκιμές σε κύτταρα λεμφώματος TC-1 και καρκινώματος πνεύμονα ποντικού EL4 (τα οποία εκφράζουν φυσικά υψηλά επίπεδα RIPK3) εκτέθηκαν σε καταστάσεις που προκαλούν νεκρόπτωση. Τα κύτταρα παρουσίασαν έκθεση της CRT στην επιφάνεια της πλασματικής τους μεμβράνης, απελευθέρωση ATP και εξωκυττάρωση της HMGB1, τρία κατεχοχόν μόρια η παρουσία των οποίων υποδηλώνει την επαγωγή ICD (21).



ΕΙΚΟΝΑ 11: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΝΕΚΡΟΠΤΩΣΗΣ. ΑΝΑΠΑΡΙΣΤΑΤΑΙ Ο ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MLKL ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ RIPK3

1.4 ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ DAMP ΜΟΡΙΑ

1.4.1 ΚΑΛΡΕΤΙΚΟΥΛΙΝΗ - CRT



ΕΙΚΟΝΑ 12 ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ P-ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΛΡΕΤΙΚΟΥΛΙΝΗΣ. ΠΗΓΗ: PROTEIN DATA BANK (PDB)

Οι δύο κύριοι ρόλοι της πρωτεΐνης CRT, η οποία εδράζεται στο ΕΔ, είναι η ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου εντός του κυττάρου καθώς και η μεταφορά και η σωστή αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνικών μορίων (δρώντας δηλαδή ως

τσαπερόνη). Το συγκεκριμένο μόριο εκτός από το ΕΔ απαντάται στην μεμβράνη και άλλων κυτταρικών οργανιδίων, στην πλασματική μεμβράνη και στο εξωκυττάριο περιβάλλον συμμετέχοντας σε διάφορες παθολογικές και φυσιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική προσκόλληση, διάφορες μεταγραφικές λειτουργίες, στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και στην αναγνώριση και απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων. Ωστόσο, τελευταία η CRT έχει τραβήξει τα βλέμματα της επιστημονικής κοινότητας λόγω της συμβολής της στην επούλωση δερματικών πληγών και κυρίως λόγω του πιθανού διαγνωστικού χαρακτήρα που τείνει αποκτήσει **(73)**. Η CRT αποτελεί μια πρωτεΐνη δέσμησης ιόντων ασβεστίου και προέρχεται από το γονίδιο που κωδικοποιεί την καλρετικουλίνη (*CALR*), το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, συγκεκριμένα στην θέση 19p13.2. Είναι παρούσα σ' όλα τα κύτταρα των ανώτερων οργανισμών, το μοριακό της βάρος είναι 46 kDa και αποτελείται από 417 αμινοξικά κατάλοιπα, παρουσιάζοντας υψηλή εξελικτική συντήρηση ανάμεσα στα διάφορα είδη. Η συγκεκριμένη τσαπερόνη εμφανίζει τρεις διακριτές δομικές και λειτουργικές περιοχές: την αμινοτελική σφαιρική περιοχή (*N-globular domain*), την περιοχή του P-βραχίονα, και την καρβοξυτελική περιοχή (**Εικόνα 12**). Η αμινοτελική περιοχή της CRT είναι μία σφαιροειδής όμοια με λεκτίνη περιοχή και αποτελείται από 8 αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, ολιγοσακχαρικές και πολυπεπτιδικές θέσεις πρόσδεσης καθώς και μία θέση ανίχνευσης για την διεργασία της πρωτεόλυσης. Πρόσθετες λειτουργίες που επιτελεί η CRT είναι η αλληλεπίδραση με το

DNA, την α -ιντεγκρίνη αλλά και η δέσμευση ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+}). Όσον αφορά την P-περιοχή, είναι πλούσια σε προλίνη, βρίσκεται ενδιάμεσα της συνολικής αμινοξικής αλληλουχίας και διαθέτει δύο ή τρεις επαναλαμβανόμενες περιοχές. Οι επαναλαμβανόμενες περιοχές φαίνεται να εμπλέκονται στην δέσμευση ολιγοσακχαριδίων μαζί με την βοήθεια της αμινοτελικής περιοχής, προσδίδοντας έτσι την ικανότητα στην CRT για σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνικών μορίων. Επιπροσθέτως, είναι γνωστή η σύνδεση των ιόντων ασβεστίου στην P-περιοχή με υψηλή συγγένεια **(34)**.

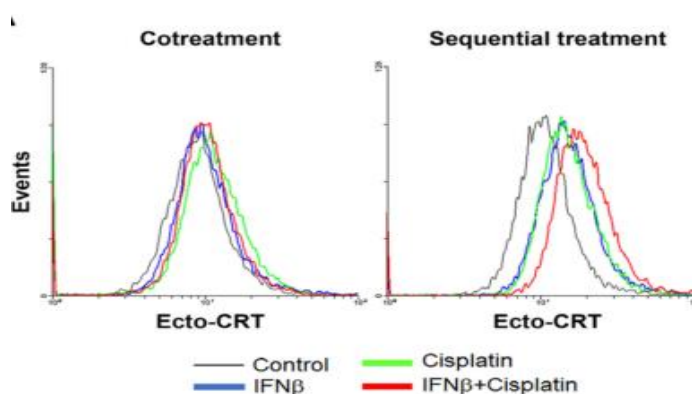
Τα κύτταρα τα οποία οδηγούνται σε ICD εκφράζουν στην επιφάνειά τους CRT. Η εκφραζόμενη CRT μπορεί να δράσει ως σήμα πρόσληψης από τα δενδριτικά κύτταρα (DC), διευκολύνοντας έτσι τη μεταφορά αντιγόνων που σχετίζονται με όγκους στα DC και τελικά την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTLs). Η θετική ανοσιακή συμβολή της CRT επιβεβαιώνεται και από τα μεταλλάγματα του γονιδίου *CALR* στα οποία πραγματοποιείται εξωκυττάρωση μεταλλαγμένων πρωτεϊνικών μορίων της, τα οποία δεσμεύονται από τα DCs και αναστέλλουν την φαγοκυττάρωση. Ο παραπάνω μηχανισμός επιφέρει ανοσοκατασταλτικές επιδράσεις, ανατρέποντας έτσι και οποιοδήποτε αποτέλεσμα κάποια αντικαρκινικής θεραπείας **(40)**.

Ο μοριακός μηχανισμός που οδηγεί στην έκφραση της CRT στην περίπτωση ICD περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2 α , συνοδευόμενο από μία απότομη διακοπή μετάφρασης της πρωτεΐνης και την ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής κασπάσης 8, την διάσπαση της πρωτεΐνης 31 που σχετίζεται με τον υποδοχέα των B κυττάρων (BCAP31), την συσσώρευση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, που αποτελούν μέλη της οικογένειας Bcl-2, την BCL2-σχετιζόμενη πρωτεΐνη X (BAX) και την πρωτεΐνη BCL2-ανταγωνιστή/φονική πρωτεΐνη 1 (BAK1) στην εξωτερική στοιβάδα του μιτοχονδρίου. Στην συνέχεια μεσολαβεί η μεταφορά της πρωτεΐνης στην συσκευή Golgi και η εξωκυττάρωσή της **(17)**.

Η CRT που εκτίθεται στην κυτταρική επιφάνεια, όπως έχει αναφερθεί, παρέχει ισχυρά προ-φαγοκυτταρικά σήματα στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) συμπεριλαμβανομένων των DCs και των πρόδρομων κυττάρων τους, ξεκινώντας μια *de facto* πρόσληψη των νεκρών κυττάρων. Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη μίας στοχευμένης έναντι του όγκου ανοσοαπόκρισης. Τα άγριου τύπου καρκινικά κύτταρα ποντικού που εκτίθενται σε κάποιο επαγωγέα ICD *in vitro* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια για τη δημιουργία μακροπρόθεσμης προφυλακτικής ανοσίας έναντι των ζωντανών καρκινικών κυττάρων του ίδιου τύπου σε ανοσοεπαρκή συγγενή

ποντίκια, ωστόσο έχει παρατηρηθεί πως χάνουν το εμβολιαστικό δυναμικό τους όταν η CRT χαθεί, μειωθεί ή μπλοκαριστεί (18).

Ορισμένα παραδείγματα *in vitro* δοκιμών από την διεθνή βιβλιογραφία αναφέρουν την μεταφορά της πρωτεΐνης και την έκφρασή της στην πλασματική μεμβράνη σε κύτταρα της σειράς HeLa έπειτα από έκθεση τους σε συνδυασμούς συγκεντρώσεων παραγόντων όπως η IFN-β και σισπλατίνη, αφού πρώτα επιβεβαιώθηκε η επαγωγή του ICD στα κύτταρα. Τα ευρήματα προέκυψαν μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 13) (71). Σε μία άλλη περίπτωση, παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική έκφραση της CRT στην κυτταρική σειρά MC38 έπειτα από επώαση με τον παράγοντα ADI-PEG 20. Παράλληλα, βρέθηκε και αύξηση των επιπέδων της HMGB1 και του ATP επιβεβαιώνοντας έτσι την επαγωγή του ICD. Επιπλέον, καταγράφηκε και αύξηση της φαγοκυττάρωσης (28).



ΕΙΚΟΝΑ 13: ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HELA. ΕΚΦΡΑΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ CRT ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ. ΣΤΟ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΗΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΥ DAMP ΜΟΡΙΟΥ ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΝΑ ΕΠΙΦΕΡΕΙ Η ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ

ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΙΣΠΛΑΤΙΝΗ ΚΑΙ IFN-β (YANG ET AL., 2020)

1.4.2 ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΟΜΑΔΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ 1 - HMGB1

Στο ερευνητικό πεδίο των πρωτεϊνών HMG, πρωτοπόρος εξακολουθεί να είναι μέχρι και σήμερα ο Ernest Johns από το Ερευνητικό Ινστιτούτο Chester Beatty στο Λονδίνο. Το 2001, ο Michael Bustin από το Εθνικό Ινστιτούτο για τον Καρκίνο, στις ΗΠΑ, οργάνωσε την Επιτροπή Ονοματολογίας Χρωμοσωμικών Πρωτεϊνών HMG και τις κατηγοριοποίησε σε τρεις μεγάλες υπερικογένειες, αλλάζοντας παράλληλα την ονομασία τους σε HMGA (παλιότερα γνωστές ως HMG-14/-17), σε HMGB (παλιότερα γνωστές ως HMG-1/-2) και HMGN (παλιότερα γνωστές ως HMG-I/-Y). Η οικογένεια των πρωτεϊνών της ομάδας υψηλής κινητικότητας Β είναι η πιο πολυπληθής μεταξύ των HMGs. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας

HMGBs είναι υψηλά συντηρημένες και διαθέτουν τέσσερα μέλη (HMGB1, HMGB2, HMGB3 και HMGB4). Είναι ενδιαφέρον πως τα ποντίκια στα οποία έχει ανασταλεί η έκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών HMGB1, HMGB2 και HMGB3 οδηγεί σε ξεκάθαρα αναγνωρίσιμους φαινοτύπους, παρόλο που οι κωδικοποιημένες πρωτεΐνες μοιράζονται περίπου το 80% της αλληλουχίας των αμινοξέων τους. Κάθε μέλος της οικογένειας HMGB διαθέτει δύο περιοχές πρόσδεσης στο DNA και η HMGB4 σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη δεν διαθέτει όξινο καρβοξυτελικό άκρο. Οι HMGB πρωτεΐνες προσδένονται στην διπλή έλικα του DNA χωρίς κάποια ιδιαίτερη προτίμηση στην αλληλουχία, προκαλώντας διαταξικές και δομικές αλλαγές **(32)**.

Υψηλά επίπεδα της εξωκυτταρικής HMGB1, που απελευθερώνονται μετά τον κυτταρικό θάνατο ή μέσω ενεργού έκκρισης, προκαλούν φλεγμονή. Ο υποδοχέας που προκαλεί φλεγμονή εξαρτάται πλήρως από το εάν η HMGB1 δρα μόνη της ή συμπλοκοποιημένη με άλλα μόρια. Η HMGB1 είναι επιρρεπής στο να δεσμεύει άλλα προφλεγμονώδη μόρια όπως DNA, RNA, ιστόνες, νουκλεοσώματα, λιποπολυσακχαρίτες (LPS), SDF-1, IL-1α, IL-1β και άλλους παράγοντες. Αυτά τα σύμπλοκα δρουν σε συνέργεια με συγγενείς υποδοχείς ως προς τα μόρια HMGB1. Η ισομορφή της οξειδοαναγωγικής HMGB1 παίζει βασικό ρόλο όταν η HMGB1 δρα μόνη της ως προφλεγμονώδης μεσολαβητής. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των 3 κυστεϊνών που υπάρχουν στο μόριο της HMGB1 καθορίζει την βιοδραστικότητά της. Η πυρηνική HMGB1 σε ένα κύτταρο σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται πάντα σε πλήρως ανηγμένη μορφή. Το πλήρως ανηγμένο μόριο της HMGB1 που απελευθερώνεται στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου σχηματίζει σύμπλοκο με τη χημειοκίνη CXCL12 (SDF-1) και επάγει αυξημένη χημειοταξία μέσω του CXCR4. Ακόμα, και αν ο κατάλογος των αναφερόμενων υποδοχέων για την HMGB1 είναι αρκετά εκτενής, μόνο δύο συστήματα υποδοχέων, ο RAGE και ο TLR4, είναι πλήρως επιβεβαιωμένο ότι δρουν ως καθιερωμένοι υποδοχείς της HMGB1. Πολλά από τα συστήματα υποδοχέων που υποστηρίζεται ότι λειτουργούν ως υποδοχείς της HMGB1 είναι στην πραγματικότητα υποδοχείς για μόρια που συνδέονται μαζί της σχηματίζοντας τα προαναφερθέντα σύμπλοκα **(70)**.

Η HMGB1 δεν ανήκει στην ομάδα των ιστονών, αλλά εκφράζεται σχεδόν όλα τα είδη των κυττάρων. Η HMGB1 παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής της χρωματίνης, στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας και στην επιδιόρθωση του DNA στον πυρήνα. Από την άλλη πλευρά, η HMGB1 θεωρείται, όπως και η CRT που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, ως ένα κατεξοχήν DAMP μόριο μιας και εξωκυτταρώνεται και αποκτά ανοσορυθμιστική δράση **(48)**.

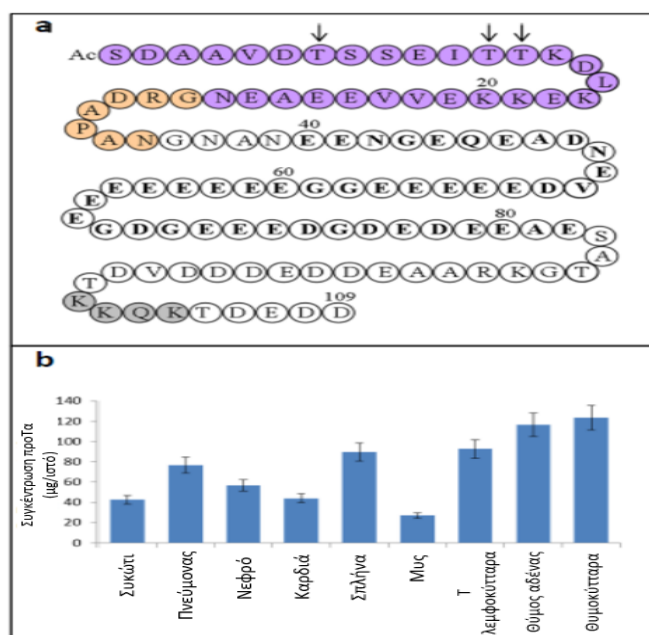
Εν κατακλείδι, παρατίθεται ένα παράδειγμα ως προς την *in vitro* μελέτη της HMGB1. Το ASTX660 αποτελεί έναν ανταγωνιστή αποπτωτικών πρωτεϊνών-αναστολέων, των XIAP και cIAP, και χορηγείται σε περιπτώσεις συμπαγών όγκων και λεμφωμάτων. Έχει δειχθεί πως η δράση του βοηθά στην μείωση του όγκου με παράλληλη αύξηση της λειτουργίας ορισμένων ανοσοποιητικών κυττάρων. Μάλιστα, ο Wenda Ye και η ομάδα του έδειξαν πως με συνδυασμό χρήσης IR ανεβαίνουν τα επίπεδα DAMP μορίων, συγκεκριμένα της CRT, του ATP και της HMGB1 στην κυτταρική σειρά MOC-1, επισημαίνοντας έτσι και την θετική συμβολή της ακτινοθεραπείας στην επαγωγή αποπτωτικού θανάτου σε καρκινικά κύτταρα (74).

1.4.3 ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ α - ΠΡΟΤ α (100-109)

Ο θύμος αδένας αποτελεί ένα πρωτογενές λεμφικό όργανο και είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των T λεμφοκυττάρων, τα οποία αποτελούν ακρογωνιαίο λίθο στο πεδίο του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος. Η ανάπτυξη των T κυττάρων στον θύμο αδένά ρυθμίζεται χωρικά. Βασικά σημεία ελέγχου στην ωρίμανση και την επιλογή των T λεμφοκυττάρων συμβαίνουν σε περιοχές του φλοιού και του μυελού για την εξάλειψη των αυτοδραστικών T κυττάρων, την καθιέρωση κεντρικής ανοχής και την έξοδο των ανώριμων T κυττάρων στο περιφερικό αίμα με τη δυνατότητα αναγνώρισης διαφορετικών παθογόνων (66).

Στο θύμο συντίθεται μία μεγάλη ποικιλία βιολογικά ενεργών πολυπεπτιδίων με ορμονική δράση και διαφορετική χημική δομή. *In vivo* και *in vitro* μελέτες επισήμαναν την ανοσολογική ιδιαιτερότητα ενός θυμικού εκχυλίσματος. Μετά από καθαρισμό, συγκεκριμένα πέντε σταδίων, απομονώθηκε ένα ιδιαίτερα ενεργό εκχύλισμα το οποίο ονομάστηκε «θυμοσίνη-κλάσμα V» (TFV). Η TFV αποτελείται από τουλάχιστον 40 μικρού μεγέθους πολυπεπτίδια, με σχετικά όξινο χαρακτήρα και μοριακό βάρος από 1.000 έως 15.000 Da. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των συγκεκριμένων πεπτιδίων, μέσω του οποίου επιτελείται η διάκρισή τους, είναι το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) που διαθέτουν. Με βάση το pI διακρίνονται σε τρεις ομάδες, που τους έχουν αποδοθεί τρία ελληνικά γράμματα α , β ή γ . Έτσι, στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα πεπτίδια με $pI < 5$, στη δεύτερη αυτά με $5 < pI < 7$, ενώ στην τρίτη όσα έχουν $pI > 7$. Ένας επιπλέον αριθμός, ο οποίος χρησιμοποιείται ως δείκτης, δηλώνει τη σειρά με την οποία απομονώθηκε το κάθε πεπτίδιο από την TFV και

αναγράφεται δίπλα από το γράμμα της εκάστοτε ομάδας. Τα πεπτίδια χαρακτηρίζονται ως θυμοσίνες ή απλώς πολυπεπτίδια, ανάλογα με το αν είναι βιολογικά ενεργά ή όχι, αντίστοιχα. Η οικογένεια των α-θυμοσινών εκπροσωπείται κυρίως από τη θυμοσίνη α1 (Τα1) και την προθυμοσίνη α (προΤα). Η προΤα είναι το πρόδρομο μόριο της Τα1 και αποτελείται από 109-110 αμινοξικά κατάλοιπα στον άνθρωπο από τα οποία τα 28 πρώτα αποτελούν την Τα1 (**Εικόνα 14**). Θεωρείται ένα από τα βασικότερα πολυπεπτίδια υπεύθυνα για την ανοσολογική δραστικότητα του εκχυλίσματος TFV και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο έχει αποτελέσει αξιοσημείωτο πεδίο έρευνας αρκετών μελετών (**60**).



ΕΙΚΟΝΑ 14: Α) ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ α ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΗΣ. Β) ΟΙ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΣΤΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΕΧΕΙ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ (FREIRE, 2018)

Επιπροσθέτως, η δομή της προΤα παρουσίασε μεγάλη ομοιότητα σε όλα τα είδη θηλαστικών από τα οποία απομονώθηκε και παράλληλα εμφάνισε πολυάριθμα άτυπα χαρακτηριστικά. Φυσικό επακόλουθο αποτελεί ο όξινος χαρακτήρας (με pI 3,55) και η υδροφιλικότητα του πεπτιδίου εξαιτίας της απουσίας καταλοίπων ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέος. Επίσης, στερείται του θετικά φορτισμένου αμινοξέος ιστιδίνης, θεικών και αρωματικών καταλοίπων καθώς και υδρόφοβων περιοχών που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως εκκριτικά σήματα. Το *PTMA* αποτελεί το ανθρώπινο γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη προΤα και συγκαταλέγεται σε μια υπεροικογένεια γονιδίων αποτελούμενη από έξι μέλη. Συγκεκριμένα, τα πέντε από τα προαναφερθέντα μέλη αποτελούν ψευδογονίδια και μόνο το έκτο μέλος είναι το λειτουργικό γονίδιο για την

κωδικοποίηση του πολυπεπτιδίου. Η κωδικοποίηση πραγματοποιείται μέσω κανονικού ματίσματος ή μέσω κρυφών θέσεων ματίσματος, μέσω των οποίων προκύπτουν δύο mRNAs και ακολούθως δύο παραλλαγές μεταφραζόμενης πρωτεΐνης, διαφέροντας ως προς την έλλειψη και μη ενός γλουταμινικού οξέος. Η μεταγραφόμενη ομάδα του γονιδίου επιδεικνύει μια τυπική δομή εναλλαγής εξωνίων και εσωνίων και χωρίζεται σε πέντε εξώνια μήκους περίπου 3 kb. Το γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 2. (62).

Η προΤα ως πρωτεΐνη διαθέτει την δυνατότητα να δρα τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά, ένα χαρακτηριστικό που της προσάπτει διττό ρόλο.

Σύμφωνα με μελέτες φαίνεται πως η συγκέντρωση των μορίων mRNA και του πολυπεπτιδίου παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με τον ιστό που μελετάται (**Εικόνα 14**). Πιο συγκεκριμένα, η δημιουργία ανθρώπινης γονιδιωματικής βιβλιοθήκης cDNA απέδειξε πως η προΤα συγκαταλέγεται στις πρωτεΐνες που ανευρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις, παρόμοιες με αυτές της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 (HSP90), της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης καθώς και των ριβοσωμικών πρωτεϊνών. Η αφθονία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης επισήμανε την πιθανή ύπαρξη ενός ακόμα πιθανού μηχανισμού-ρόλου εκτός από τον ήδη γνωστό ανοσολογικό της ρόλο. Ο επιπλέον ρόλος φάνηκε πως είναι η συμμετοχή της πρωτεΐνης στον μιτωτικό μηχανισμό και ως εκ τούτου τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση. Αυτό φάνηκε κυρίως μετά την συσσώρευση υψηλών επιπέδων του mRNA της προΤα σε λεμφοκύτταρα τα οποία διεγέρθηκαν μετά την παρουσία διάφορων αντιγόνων, γεγονός που οδήγησε και στον πολλαπλασιασμό τους. Επίσης, έχει εξακριβωθεί η παρουσία της προΤα στον πυρήνα και η αλληλεπίδρασή της με την ιστόνη 1 (H1) της χρωματίνης (**54**).

Αφετέρου, ο εξωκυτταρικός ρόλος της προΤα είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την ανοσορυθμιστική της δράση επάγοντας ανοσοδιεγερτικές καταστάσεις. Το συγκεκριμένο φαινόμενο επιβεβαιώνεται από την διέγερση της κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονικών κυττάρων (NK κυττάρων), την επαγωγή της δραστηριότητας των ενεργοποιημένων από λεμφοκίνες φονικών (LAK) κυττάρων καθώς και την αύξηση της έκφρασης των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II σε πληθυσμούς μονοκυττάρων. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί σε *in vivo* μελέτες η προστασία που προσδίδει η προΤα σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια τα οποία έχουν μολυνθεί από το μύκητα *Candida albicans* (ένας μύκητας που αποτελεί φυσιολογική χλωρίδα του κόλπου) καθώς και από άλλα παθογόνα (**29**).

Η γεφύρωση του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού ρόλου της προΤα επέρχεται μέσω του μηχανισμού της διάσπασης της πρωτεΐνης που συμβαίνει κατά την διάρκεια της απόπτωσης. Η προΤα κατά την διάρκεια του RCD και κυρίως κατά την απόπτωση εξέρχεται του πυρήνα και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα στο οποίο δέχεται διάσπαση στο αμινοξικό κατάλοιπο D99 και σε άλλα δευτερογενή σημεία στην αλληλουχία της. Το κύριο ένζυμο για την διάσπαση του συγκεκριμένου πεπτιδίου αποτελεί η κασπάση-3, ενώ και η κασπάση-7 είναι πολύ πιθανό να εμπλέκεται στην συγκεκριμένη διεργασία. Από την διάσπαση στο συγκεκριμένο σημείο προκύπτει το ανοσοδραστικό δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), τα οποία μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού εξέρχεται του κυττάρου και ξεκινά την ανοσορρυθμιστική του δράση. Δεδομένης αυτής της σειράς γεγονότων και λαμβάνοντας υπόψη τις ομοιότητες μεταξύ τόσο του ενδοκυτταρικού όσο και του εξωκυτταρικού ρόλου της προΤα και της HMGB1, υποθέτουμε ότι η προΤα και το ανοσοαντιδραστικό της πεπτίδιο μπορούν να ταξινομηθούν ως DAMPs **(8)**.

Τόσο η προΤα όσο και το προΤα(100-109) εξωκυτταρικά αποκτούν πλειοτροπικό ανοσορρυθμιστικό ρόλο. Αναλυτικότερα, και τα δύο μόρια είναι ικανά να οδηγήσουν στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων επάγοντας ανοσοαποκρίσεις τύπου TH1, να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των μονοπύρηνων κυττάρων, να ενισχύσουν την κυτταροτοξικότητα των NK και των LAK κυττάρων και να ενεργοποιούν τις λειτουργίες των ουδετερόφιλων. Ωστόσο, το προΤα(100-109) φαίνεται να αποτελεί το κύριο ανοσοδραστικό τμήμα ολόκληρου του πολυπεπτιδίου. Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν πως η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα τύπου Toll 4 (TLR4) φαίνεται να διακατέχει καίρια σημασία στην δραστηριότητα και των δύο πεπτιδίων **(59)**.

Συμπληρωματικά, δείχθηκε *in vivo* η δράση των προΤα και προΤα(100-109) ως ανοσοενισχυτικών αλλά και η βελτίωση της ανοσογονικότητας των αντικαρκινικών εμβολίων βασισμένα σε πολυπεπτίδια. Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας *in vivo* καρκινικά κύτταρα μελανώματος ποντικού. Το συγκεκριμένο θεραπευτικό πρωτόκολλο περιόρισε την ανάπτυξη των όγκων του μελανώματος στα ποντίκια, αλλά δεν οδήγησε στην καθολική εξάλειψη του καρκίνου **(7)**.

1.5 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Με την ανάπτυξη της κυτταρομετρίας ροής επισκιάστηκε το πρόβλημα της απόκτησης ποσοτικών δεδομένων που αδυνατούσαν να παρέχουν οι παλαιότερες τεχνικές φθορισμού με τη χρήση αντισωμάτων. Μέσω της τεχνολογίας αυτής επιτεύχθηκε η αυτοματοποίηση της ανάλυσης και του διαχωρισμού κυττάρων, σημασμένων με φθορίζοντα αντισώματα. Η απλούστερη μορφή του μηχανήματος μετρά το κάθε κύτταρο καθώς περνά από μια δέσμη laser και καταγράφει το επίπεδο του φθορισμού που εκπέμπει. Με την διέλευση ενός άθικτου κυττάρου μπροστά από την δέσμη πραγματοποιείται ανάκλαση του σήματος, διέγερση του ανιχνευτή και καταγραφή της διακοπής στην δέσμη laser. Επιπλέον, τα κύτταρα που έχουν δεσμευμένα αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες στα αντιγόνα της κυτταρικής τους επιφάνειας διεγείρονται από το laser και εκπέμπουν φως, το οποίο καταγράφεται από ένα δεύτερο σύστημα ανίχνευσης που βρίσκεται σε κατάλληλη γωνία σε σχέση με την δέσμη laser. Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω ενός συνδεδεμένου συστήματος υπολογιστή σε μια γραφική παράσταση στην οποία στον άξονα Y τοποθετείται ο κυτταρικός αριθμός ενώ στον άξονα X η ένταση του φθορισμού από το κάθε γεγονός. Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των κυττάρων ενός πληθυσμού που δεσμεύουν αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές ονομάζεται ανάλυση. Υπάρχει ένα τεράστιο φάσμα εφαρμογών της κυτταρομετρίας ροής σε κλινικά και ερευνητικά θέματα.

Μία κοινή κλινική εφαρμογή είναι ο προσδιορισμός του είδους και του αριθμού των λευκοκυττάρων σε δείγματα αίματος. Με την προσθήκη αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσες ουσίες σε κατάλληλα επεξεργασμένα δείγματα αίματος και πραγματοποιώντας κυτταρομετρία ροής μπορούν να συλλεγούν πολλές χρήσιμες πληροφορίες όπως : το πόσα κύτταρα εκφράζουν το προς διερεύνηση αντιγόνο σε απόλυτο αριθμό (με τη χρήση ειδικών σφαιριδίων βαθμονόμησης) και ως ποσοστό των συνολικών κυττάρων, την κατανομή των κυττάρων σε ένα δείγμα όπως αναλύεται σύμφωνα με την ένταση έκφρασης του φθορισμού, το μέγεθος και την πολυπλοκότητα των κυττάρων κ.α. Επίσης δίνεται η επιλογή το εκάστοτε δείγμα να έχει σημανθεί με δύο ή και περισσότερα διαφορετικά φθορίζοντα αντισώματα με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη ανάλυση διαφορετικών πληθυσμών στο κυτταρικό εναιώρημα.

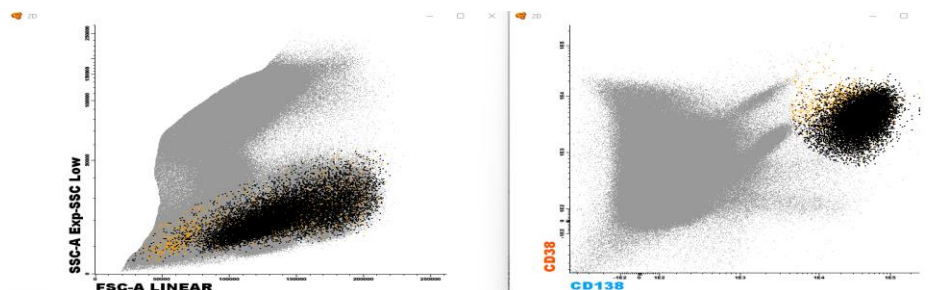
Το σίγουρο είναι πως η κυτταρομετρία ροής καταλαμβάνει μια εξέχουσα θέση στο πεδίο της βιολογίας και ειδικότερα της ανοσολογίας αποτελώντας ένα πολύτιμο εργαλείο (75).

1.5.1 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (ΚΚΚ) είναι σπάνια κύτταρα που ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα και προέρχονται από πρωτοπαθείς και μεταστατικούς όγκους. Τα κύτταρα αυτά έχουν αποκτήσει την ικανότητα εισόδου στην κυκλοφορία του αίματος, μπορούν να εξαγγειωθούν και να προκαλέσουν την ανάπτυξη μεταστάσεων σε διάφορα όργανα.

Έχει καταστεί σαφές πως η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα χρήσιμο και απαραίτητο εργαλείο για την διάκριση παθολογικών πλασματοκυττάρων από τα υγιή πλασματοκύτταρα στα κλινικά εργαστήρια. Ένας ιδιαίτερα μεγάλος όγκος πληροφοριών και αποτελεσμάτων υποδεικνύουν πως στα πλασματοκύτταρα εκφράζεται μια πληθώρα διαφορετικών αντιγόνων-επιτόπων, όπως είναι τα CD19, CD20, CD27, CD33, CD38, CD45, CD56, CD117, και CD138. Τα καρκινικά πλασματοκύτταρα και τα υγιή εμφανίζουν διακριτούς, τις περισσότερες φορές, ανοσοφαινότυπους. Τα υγιή πλασματοκύτταρα χαρακτηρίζονται κυρίως από χαμηλό πρόσθιο/πλάγιο σκεδασμό (FCS/SCC), με υψηλή έκφραση του επιτόπου CD38 και ανοσοφαινότυπο CD19+/CD56-. Σε αντίθεση, τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα έχουν φαινότυπο CD19-/CD56+ ή - και υψηλό FCS/SCC και σχετικά χαμηλή έκφραση του CD38 (**Εικόνα 15**). Το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Μυελώματος (EMN) έχει προτείνει τα πιο χρήσιμα αντιγόνα για την ανίχνευση παθολογικών πλασματοκυττάρων στην περίπτωση του ΠΜ (**30**). Αυτά μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες σύμφωνα με τις απαιτήσεις για διάγνωση και παρακολούθηση:

- Τα CD19 και CD56 τα οποία είναι «ουσιώδη»
- Τα CD117, CD20, CD28 και CD27 τα οποία «συνιστώνται» για τον χαρακτηρισμό των κλωνικών κυττάρων
- Τα CD81 και CD200 τα οποία "προτείνονται", αλλά είναι μικρότερης πληροφοριακής αξίας (**30**).



ΕΙΚΟΝΑ 15: ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΕΝΤΟΠΙΣΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ INFINICYT®. ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΙΚΟΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΔΥΟ ΣΤΙΚΤΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΤΗΝ ΑΡΙΣΤΕΡΗ ΕΙΚΟΝΑ ΣΥΝΔΥΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΙΑ ΚΑΙ ΠΛΑΓΙΑ ΣΚΕΔΑΣΗ ΕΝΩ ΣΤΗΝ ΔΕΞΙΑ ΤΗΝ ΕΝΤΑΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΕΠΙΤΟΠΟΥΣ CD38 ΚΑΙ CD138

2. ΣΚΟΠΟΣ

Με κεντρικό γνώμονα την προαναφερθείσα θεωρητική ανάλυση, το ΠΜ είναι η δεύτερη πιο συχνή λεμφοϋπερπλαστική διαταραχή **(42)**, μέχρι και σήμερα θεωρείται ένα ανιάτο κακοήθες νεόπλασμα με κύρια χαρακτηριστικά του να αποτελούν η συσσώρευση των κακοήθων πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών και η υπερπαραγωγή μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης ή τμημάτων της **(43)**. Στο πεδίο της θεραπείας για το ΠΜ έχουν εγκριθεί και εδραιωθεί πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα, με αποτέλεσμα την ύπαρξη πολυάριθμων σχημάτων θεραπείας **(56)**.

Το BMF αποτελεί το μόνο πρώτης γραμμής φάρμακο τύπου ADC που ενδείκνυται ως μονοθεραπεία για την αντιμετώπιση του ΠΜ μέσω στόχευσης του BCMA **(5)**. Εγκρίθηκε για ιατρική χρήση στις ΗΠΑ και την Ευρωπαϊκή Ένωση τον Αύγουστο του 2020 **(49)** και αποτελεί έναν πολύ ελπιδοφόρο παράγοντα ανοσοθεραπείας, επάγοντας αποτελεσματική και παρατεταμένη απόκριση των ασθενών έναντι της νόσου.

Ένα χαρακτηριστικό του BMF, και συγκεκριμένα ένας από τους μηχανισμούς δράσης του που φαίνεται να συμβάλλει στην αποτελεσματικότητά του, είναι η επαγωγή ICD στα καρκινικά κύτταρα **(45)**. Ο ICD και, πολλές φορές, ο αποπτωτικός θάνατος οδηγεί στην απελευθέρωση DAMPs με τρία χαρακτηριστικά παραδείγματα να αποτελούν η CRT, η HMGB1 και το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109).

Η CRT υπό φυσιολογικές συνθήκες εδράζεται στο ΕΔ και έχει δύο βασικούς λειτουργικούς ρόλους: την ομοίωση των ιόντων ασβεστίου εντός του κυττάρου καθώς και τη μεταφορά και τη σωστή αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνικών μορίων **(73)**. Τα κύτταρα τα οποία οδηγούνται σε ICD εκφράζουν στην επιφάνειά τους CRT **(40)**.

Η HMGB1 δεν ανήκει στην ομάδα των ιστονών, εκφράζεται όμως σχεδόν όλα τα είδη των κυττάρων. Συμμετέχει στην μεταγραφική δραστηριότητα και στην επιδιόρθωση του DNA. Η εξωκυττάρωση του εν λόγω μορίου, του προσδίδει ανοσορυθμιστική δράση **(48)**.

Η προΤα είναι ένα πολυπεπτίδιο το οποίο εδράζεται φυσιολογικά στον πυρήνα και κατέχει κρίσιμο ρόλο τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά. Ενδοκυτταρικά, αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την ανάπτυξη και την επιβίωση του κυττάρου καθώς συμμετέχει σε διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η αναστολή της απόπτωσης. Ο ανοσορυθμιστικός του ρόλος παρατηρείται με την έξοδό του από το κύτταρο μετά την δράση των κασπασών 3 και 7 σε κύτταρα που οδηγούνται σε απόπτωση. Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι το καρβοξυτελικό άκρο της, το δεκαπεπτίδιο προΤα(100-109), είναι υπεύθυνο για την ανοσοτροποποιητική δράση ολόκληρου του μορίου **(60)**.

Απώτερος σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν αρχικά, η επιβεβαίωση της επαγωγής ICD σε μυελωματικές κυτταρικές σειρές, με διαφορετική έκφραση του BCMA, 24 ώρες μετά την δράση του BMF και σε κλωνικά πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ 24 ώρες μετά την χορήγηση του θεραπευτικού παράγοντα σε δύο κύκλους θεραπείας, μέσω της μελέτης των προαναφερθέντων τριών βιοδεικτών. Μεταξύ των δύο κύκλων θεραπείας μεσολαβεί χρονικό διάστημα 60 ημερών. Επιπλέον, μελετήθηκε και ένα ενδιάμεσο χρονικό σημείο (Ημέρα 30), στο οποίο οι ασθενείς δεν έλαβαν κάποια δόση, μόνο ως προς τους βιοδείκτες HMGB1 και προΤα(100-109). Εν κατακλείδι, ελέγχθηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της επαγωγής ICD και της αποτελεσματικότητας του BMF ως θεραπευτικού εργαλείου και τελικώς η πιθανή ανάδειξη του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) ως προβλεπτικού βιοδείκτη στην αντικαρκινική θεραπεία.

Συνοψίζοντας, η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματεύεται τα εξής:

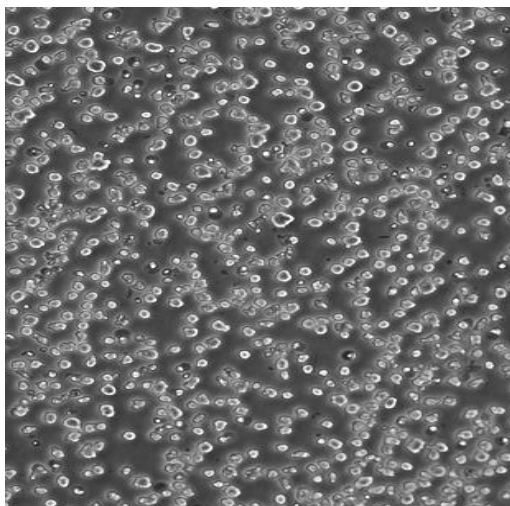
- Μελέτη της έκφρασης του δείκτη BCMA για την κάθε κυτταρική σειρά, συγκρίνοντας τις μέσες τιμές φθορισμού (MFI) για την κάθε περίπτωση.
- Τον προσδιορισμό της IC_{50} ως προς τον θεραπευτικό παράγοντα BMF για 24 ώρες σε δύο μυελωματικές κυτταρικές σειρές, την H929 και την L363.
- Την *in vitro* ποσοτικοποίηση DAMP μορίων στις κυτταρικές σειρές μετά την επώαση τους για 24 ώρες με το αντικαρκινικό φάρμακο BMF. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής σε εναιωρήματα καλλιεργείων για τον προσδιορισμό του βιοδείκτη CRT και ELISA σε υπερκείμενα καλλιεργείων για την ποσοτικοποίηση των DAMPs προΤα(100-109) και HMGB1. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως για την περίπτωση του προΤα(100-109) χρησιμοποιήθηκε ανταγωνιστικού τύπου ELISA, το πρωτόκολλο της οποίας αναπτύχθηκε στο δικό μας εργαστήριο.
- Την *ex vivo* ανίχνευση του αποπτωτικού δείκτη CRT σε κλωνικά πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ πριν και 24 ώρες μετά την θεραπεία.
- Την *ex vivo* μέτρηση των DAMPs προΤα(100-109) και HMGB1 σε πλάσμα και ορό ασθενών μέσω ELISA, αντίστοιχα.
- Την σύγκριση της ανταπόκρισης ασθενών στην θεραπεία με την επαγωγή ICD.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

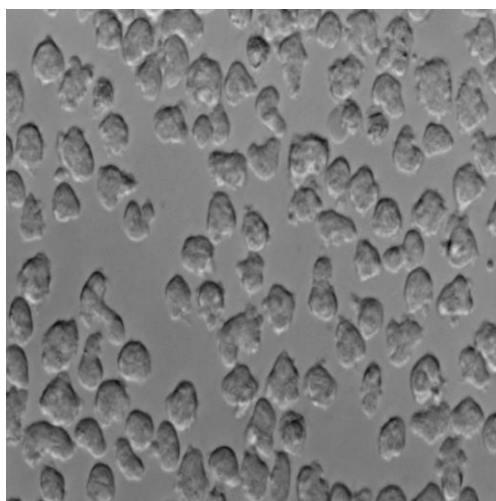
Χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινων αθανатоποιημένων κυττάρων ΠΜ:

- Η **NCI-H929** είναι μυελωματική σειρά κύτταρων προερχόμενα από κακοήγη υπεζωκοτική συλλογή από γυναίκα ασθενή 62 ετών, με IgA kappa (**Εικόνα 16**) (23).



ΕΙΚΟΝΑ 16: ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ NCI-H929 ΣΕ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ. ΠΗΓΗ: ATCC

- Η **L363** είναι πλασματοκύτταρα προερχόμενα από το περιφερικό αίμα γυναίκας ασθενούς με IgG πλασματοκυτταρική λευχαιμία, ηλικίας 36 ετών (**Εικόνα 17**) (12).



ΕΙΚΟΝΑ 17: ΕΙΚΟΝΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ L363 ΣΕ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ. ΠΗΓΗ DSMZ

3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κατά την διάρκεια της πλειονότητας των πειραματικών διαδικασιών η χρήση των κυτταρικών σειρών ήταν αναγκαία. Τα κύτταρα αναπτύσσονται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και συγκεκριμένα σε θερμοκρασία 37 °C και 5% CO₂. Οι συνθήκες αυτές παρέχονται με την βοήθεια κλιβάνου επώασης. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει και η επιλογή του σωστού θρεπτικού υλικού, για την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων, το οποίο θα πρέπει να είναι εμπλουτισμένο με όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και τους αυξητικούς παράγοντες καθώς και κατάλληλα αντιβιοτικά για την αποτροπή ανάπτυξης επιμολύνσεων. Για τις ανάγκες των πειραματικών διαδικασιών που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκαν μόνο αιωρούμενες κυτταρικές σειρές και ο έλεγχος της βιωσιμότητας έγινε μέσω χρώσης με κυανούν του τρυπανίου (Trypan Blue).

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά, αναλώσιμα και όργανα:

- RPMI-1640 (Lonza, Germany)
- FBS θερμικά απενεργοποιημένο στους 56 °C για 30 λεπτά (FBS, Lonza)
- Πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας με φίλτρο (Greiner, Bio-One)
- Υδατόλουτρο
- Σωληνάρια κρυοσυντήρησης των 2 mL (cryovials, Greiner, Bio-One)
- Καταψύκτης -20 °C
- Καταψύκτης -80 °C
- Δοχείο αζώτου
- Κυτταρικό εναιώρημα του δείγματος
- Trypan Blue σε διάλυμα 0,4% w/v (Sigma-Aldrich)
- Μικροπλάκα ELISA 96 φρεατίων με πυθμένα σχήματος U (Greiner, Bio-One)
- Αντικειμενοφόρος πλάκα αιμοκυτταρομέτρησης Neubauer (Sigma-Aldrich)
- Καλυπτρίδα
- Επωαστικός κλίβανος 37 °C και 5% CO₂ (Sanyo Electric Co, Japan)

3.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ Η ΠΛΗΡΗΣ RPMI 1640

Σε ένα μπουκάλι θρεπτικού υλικού RPMI-1640 (Lonza, Germany) των 500 mL προστίθενται τα παρακάτω συστατικά:

- 5 mL Penicillin 10.000 U/mL, Streptomycin 10.000 mg/mL και Gentamycin 10 mg/mL (Lonza, Germany)
- 5 mL HEPES 1 M (Lonza, Germany)
- FBS με τελική συγκέντρωση 10% w/v

Για την καλλιέργεια κάθε κυτταρικής σειράς απαντώνται τρεις βασικές διαδικασίες, η απόψυξη των κυττάρων, η ανακαλλιέργεια και η κρυοσυντήρηση.

3.2.2 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα παγωμένα κύτταρα περιέχουν DMSO, το οποίο είναι κρυοπροστατευτικό και θα πρέπει να αφαιρεθεί άμεσα, καθώς είναι τοξικό για τα κύτταρα.

Πρωτόκολλο διαδικασίας

1. Προσθήκη 9-10 mL πλήρες θρεπτικό υλικό σε κωνικό σωληνάριο 15 mL.
2. Προσεχτική μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος (cell suspension) που μόλις έχει ξεπαγώσει σε υδατόλουτρο
3. Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C όπου τα κύτταρα καθιζάνουν με την μορφή ιζήματος (pellet).
4. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναίωρηση με 1 mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
5. Έλεγχος της βιωσιμότητας με τη χρήση πλάκας Neubauer.
6. Μεταφορά 1 mL σε φλάσκα και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού.
7. Η φλάσκα καλλιέργειας φυλάσσεται σε επωαστικό κλίβανο.
8. Επώαση μέχρι να αναπτυχθεί ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων.

3.2.3 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Πρωτόκολλο διαδικασίας

1. Μεταφορά όλης της ποσότητας του υλικού με τα κύτταρα που περιέχεται στη φλάσκα, σε ένα κωνικό σωληνάριο 15 mL και προσθήκη 5-6 mL πλήρες RPMI-1640.
2. Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C.
3. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση σε 1 mL πλήρους RPMI-1640, σπάζοντας το ίζημα με ήπια ανάδευση.
4. Το υλικό διαμοιράζεται στον επιθυμητό αριθμό από φλάσκες καλλιέργειας.

Τα βήματα 1-3 δεν είναι απαραίτητο να ακολουθούνται σε κάθε διαδικασία ανακαλλιέργειας στην περίπτωση των αιωρούμενων κυττάρων. Μια εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί:

1. Ήπια ανάδευση του εναιωρήματος των κυττάρων μέσα στην φλάσκα καλλιέργειας
2. Μεταφορά επιθυμητής ποσότητας κυττάρων σε καινούρια φλάσκα και συμπλήρωση με πλήρες θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 5-6 mL.

3.2.4 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την κρυοσυντήρηση των κυτταρικών σειρών πραγματοποιείται αποθήκευσή τους στους -80°C στον καταψύκτη, ενώ για μακροχρόνια συντήρηση των κυττάρων επιβάλλεται η αποθήκευσή τους σε δεξαμενή υγρού αζώτου. Είναι επιθυμητό να αποφεύγεται η δημιουργία πάγου και απώλεια νερού, ενώ σημαντική είναι η χρήση του DMSO το οποίο παρέχει κρυοπροστασία.

Πρωτόκολλο διαδικασίας

1. Συλλογή του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας και ακολούθως φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά.
2. Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1 mL πλήρους RPMI-1640.
3. Παρατήρηση της βιωσιμότητας, η οποία θα πρέπει να είναι $\geq 95\%$ και καταμέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer.
4. Σημειώνεται σε ένα cryovial το όνομα της σειράς, ο αριθμός των κυττάρων και τοποθετείται σε ειδικό δοχείο.
5. Γενικά τα κύτταρα μοιράζονται με τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε cryovial ο συνολικός αριθμός τους να είναι μέχρι 10×10^6 κύτταρα σε 1 mL διαλύματος αποτελούμενο από 0,1 mL DMSO και 0,9 mL ορό (FBS)/mL παγώματος.

3.2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER

Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων ενός πληθυσμού, καθώς και ο έλεγχος της βιωσιμότητάς τους, χρησιμοποιείται ευρύτατα, σε πληθώρα περιπτώσεων, όπως η ανάπτυξη και η διατήρηση κυτταροκαλλιιεργιών, σε αναλύσεις αίματος, κ.α.. Καθίσταται σαφές πως η μέτρηση όλων των κυττάρων ενός πληθυσμού είναι μία επίπονη διαδικασία. Μπορεί όμως να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων σε ένα μικρό δείγμα γνωστού όγκου και στη συνέχεια να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που εμπεριέχεται στο αρχικό εναιώρημα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες, τα αιμοκυτταρόμετρα (haemocytometers) (**Εικόνα 18**) τα οποία διαθέτουν κατάλληλα επεξεργασμένες και βαθμονομημένες λείες επιφάνειες.

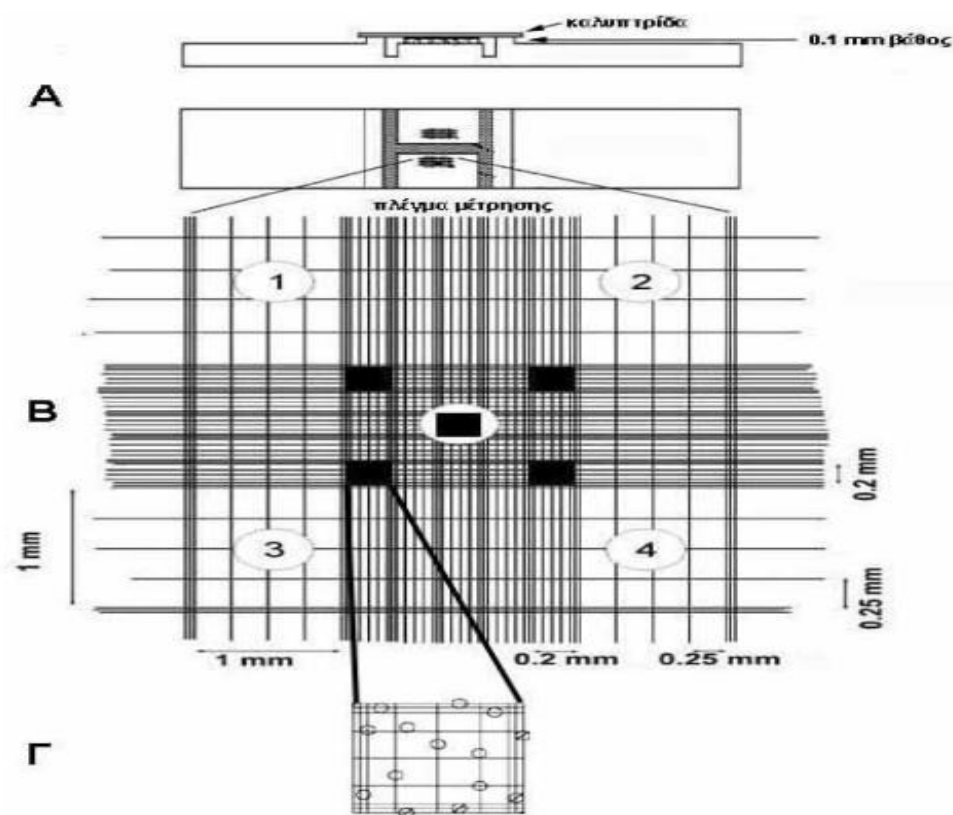
Η διαδικασία βασίζεται σε χρωστικές οι οποίες δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, σε αντίθεση με τα νεκρά κύτταρα, τα οποία βάφονται με τη χρωστική. Η πιο γνωστή χρωστική είναι το Trypan Blue.

Ο υπολογισμός της βιωσιμότητας πραγματοποιείται με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Βιωσιμότητα} = \frac{\text{Ολικός αριθμός αχρωμάτιστων κυττάρων}}{\text{Ολικός αριθμός κυττάρων}} \times 100$$

Ενώ ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων στο εναιώρημα πραγματοποιείται από τον τύπο:

$$C \text{ (κύτταρα/mL)} = \text{Ολικός αριθμός αχρωμάτιστων κυττάρων} \times \text{Συντελεστής αραιώσης} \times 10^4 \quad (1)$$



ΕΙΚΟΝΑ 18: Α. ΠΛΑΓΙΑ ΟΨΗ ΚΑΙ ΚΑΤΟΨΗ ΤΥΠΙΚΟΥ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟΥ ΠΟΥ ΦΕΡΕΙ ΔΥΟ ΠΛΕΓΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ. Β. ΜΕΓΕΘΥΜΕΝΗ ΑΠΟΨΗ ΤΟΥ ΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ. Γ. ΜΕΓΕΘΥΜΕΝΟ ΜΙΚΡΟ ΤΕΤΡΑΓΩΝΟ.

Πρωτόκολλο διαδικασίας

1. Μεταφορά 50 μL από το κυτταρικό εναιώρημα σε ένα φρεάτιο μικροπλάκας 96 φρεατίων.
2. Προστίθεται ίσος όγκος Trypan blue, οπότε το δείγμα αραιώνεται με αραιώση 1:2. Σε περίπτωση που το δείγμα μας είναι αρκετά πυκνό πραγματοποιούμε μεγαλύτερη αραιώση (πχ. 1:5, 1:9). Ωστόσο ανάλογα τον τρόπο αραιώσης που θα

χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να επιλεγθεί και ο αντίστοιχος συντελεστής αραίωσης κατά την επίλυση της εξίσωσης της βιωσιμότητας (**1**).

3. Τοποθετείται μια τετράγωνη καλυπτρίδα στην πλάκα Neubauer και πληρώνονται οι ειδικές θέσεις με το αραιωμένο δείγμα. Η βαθμονομημένη θέση πληρώνεται με τη βοήθεια του τριχοειδούς φαινομένου.
4. Με την χρήση αντικειμενικού φακού εστιάζεται η βαθμονομημένη περιοχή, η οποία αποτελείται από κάθετες και οριζόντιες γραμμές, σχηματίζοντας μια τετράγωνη περιοχή, εμβαδού 1 mm^2 , και όγκου $0,1 \text{ mm}^3$.
5. Καταμετρείται ο αριθμός των κυττάρων (ζωντανών και νεκρών) στην περιοχή αυτή. Για να θεωρηθεί κατάλληλη μια καλλιέργεια για περαιτέρω χρήση της σε πειράματα, πρέπει η βιωσιμότητά της να είναι $\geq 95\%$.

3.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ BCMA ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ H929 ΚΑΙ L363

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά, αναλώσιμα και όργανα:

- Annexin/PI kit (BioLegend, USA)
- Διάλυμα PBS-FBS 0,5% (BioLegend's Cell Staining Buffer)
- Πλαστικά σωληνάρια FACS tubes κατάλληλα για χρήση σε κυτταρομετρητή ροής (Corning, USA)
- Πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας με φίλτρο (Greiner, Bio-One)
- Κυτταρόμετρο BD FACSCanto II

Πρωτόκολλο διαδικασίας

- Συλλογή μικρής ποσότητας δείγματος από την φλάσκα καλλιέργειας και μεταφορά του σε πλαστικά σωληνάρια FACS tubes.
- Πραγματοποίηση 2 πλύσεων με διάλυμα PBS-FBS, για να ξεπλυθούν τα κύτταρα από το θρεπτικό υλικό
- Επαναιώρηση στα 150 μL Binding Buffer και πραγματοποίηση χρώσης με 5 μL από το αντίσωμα για το δείκτη BCMA, το οποίο είναι συζευγμένο με το φθοριόχρωμα PE.
- Επώαση για 15 λεπτά σε συνθήκη σκότους και σε θερμοκρασία δωματίου
- Μετά την επώαση, προστίθενται περίπου 400 μL Binding Buffer και ακολουθεί η ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής.

3.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΗΜΙΣΕΙΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (IC₅₀) ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΒΜΦ ΣΕ ΜΥΕΛΩΜΑΤΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ημίσειας αναστολής σε κυτταρικές σειρές, συγκεκριμένα των L363 και NCI-H929, επιστρατεύτηκε η (βίο)δοκιμασία MTT, κατά την οποία τα κύτταρα επάζονται σε ένα φάσμα συγκεντρώσεων του ΒΜΦ για 24 ώρες. Με αυτό το τρόπο αποτυπώνεται η ανταπόκριση της κάθε κυτταρικής σειράς στην δόση.

Το MTT είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας τετραζολίου και το χρώμα του είναι κίτρινο. Σχηματίζει αδιάλυτους κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι έχουν πορφυρό χρώμα, λόγω της οξειδωσής τους από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων. Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου (47). Η αναγωγή τους γίνεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στην κυτταρική μεμβράνη (σε μικρότερο βαθμό). Τα ένζυμα και τα συστατικά του κυττάρου που συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία είναι τα NADH και NADPH, η μιτοχονδριακή ρεδουκτάση του σουκινικού και το κυτόχρωμα C. Από την αναγωγή παράγονται υδρόφοβοι κρύσταλλοι ιώδους χρώματος, οι οποίοι διαλυτοποιούνται με οργανικούς διαλύτες (π.χ. ισοπροπανόλη, DMSO, 10% SDS, Nonident P40, TritonX-100) (57).

3.4.1 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΤΤ

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά, αναλώσιμα και όργανα:

- Μικροπλάκα 96 φρεατίων
- Μονή πιπέτα (όγκου 10/200/1000 μL) (Gilson Inc, WI, USA)
- Πολυκάναλη πιπέτα (όγκου 200 μL) (Corning HTL SA, Poland)
- RPMI-1640 (Lonza, Germany) (10% FBS)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Novex, Italy)
- Πλακίδιο Neubauer
- MTT, σκόνη (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-προπανόλη(C₃H₈O)
- Υδροχλώριο (HCl 12N)
- PBS Tablets (Sigma-Aldrich, USA)
- Υπερκαθαρό νερό (Milli-Q™ Direct Water Purification System)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorfs 1,5/2 mL
- Διάλυμα γνωστής αρχικής συγκέντρωσης του παράγοντα που θα χρησιμοποιηθεί
- Ζυγός ακριβείας (4 δεκαδικών ψηφίων)

- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

1. Για την παρασκευή του διαλύματος MTT, διαλύονται 50 mg σκόνης σε 50 mL αποστειρωμένο διάλυμα PBS για την δημιουργία τελικής συγκέντρωσης 1 mg/mL και αποθηκεύτηκε στους 4 °C στο σκοτάδι.
2. Για το διάλυμα της 2-προπανόλης προστίθενται 0,833 mL HCl 12N, σταγόνα-σταγόνα μέσα σε απαγωγό εστία, σε 99,17 mL ισοπροπανόλης για την δημιουργία διαλύματος τελικού όγκου 100 mL (0,84% v/v).

Πρωτόκολλο διαδικασίας

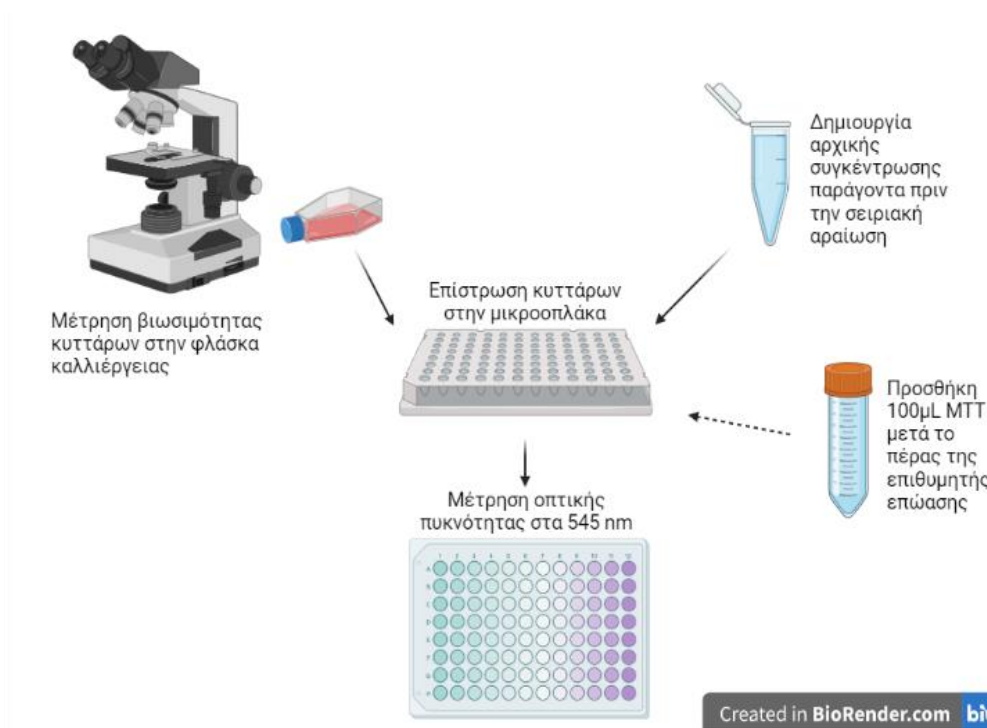
Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο υλοποιείται σε διάστημα δύο ημερών (αν ο υπό μελέτη χρόνος επώασης είναι οι 24 ώρες).

Ημέρα πρώτη

1. Αφού καθοριστούν τα φρεάτια της μικροπλάκας που θα χρησιμοποιηθούν, προστίθενται στο καθένα 100 μL RPMI 1640 (10% FBS).
2. Παρασκευάζονται σε ξεχωριστά Eppendorfs οι αρχικές συγκεντρώσεις των παραγόντων που θα χρησιμοποιηθούν και στην συνέχεια μέσω σειριακών αραιώσεων (μέσα στα φρεάτια της πλάκας) δημιουργούνται οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις.
3. Στην καλλιέργεια που θα χρησιμοποιηθεί, προσδιορίζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων
4. Μέτρηση απαραίτητου αριθμού κυττάρων για να πραγματοποιηθεί η επίστρωση, για το συγκεκριμένο πείραμα επιστρώθηκαν 30.000 κύτταρα/φρεάτιο.
5. Επώαση στους 37 °C.

Ημέρα δεύτερη

6. Φυγοκέντρηση μικροπλάκας στις 1250 rpm για 5 λεπτά
7. Αφαίρεση 100 μL θρεπτικού υλικού από το κάθε πηγάδι και προσθήκη 100 μL διαλύματος MTT, επώαση στους 37 °C στο σκοτάδι για 4 ώρες.
8. Φυγοκέντρηση μικροπλάκας στις 1250 rpm για 5 λεπτά
9. Αφαίρεση 150 μL υπερκείμενου και προσθήκη διαλύματος 2-προπανόλης-HCl 12N για την υδρόλυση των κρυστάλλων που έχουν δημιουργηθεί. Καθίσταται απαραίτητο σ' αυτό το βήμα να μην πραγματοποιηθεί αναρρόφηση των κρυστάλλων.
10. Συνεχόμενη ανάδευση με την βοήθεια πολυκάναλης πιπέτας για την ολική διάλυση των κρυστάλλων σε κάθε φρεάτιο
11. Μέτρηση απορρόφησης στα 545 nm (**Εικόνα 19**).



ΕΙΚΟΝΑ 19: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΒΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΜΤΤ. ΕΙΝΑΙ ΕΠΙΤΑΚΤΙΚΟΣ Ο ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ. ΔΗΜΙΟΥΡΓΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΓΙΑ ΝΑ ΕΠΙΣΤΡΩΘΟΥΝ ΣΤΗΝ ΣΥΝΕΧΕΙΑ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟ ΕΠΙΘΥΜΗΤΟ ΦΑΣΜΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ. Η ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΜΤΤ ΒΟΗΘΑ ΣΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ (ΕΙΚΟΝΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΗΘΗΚΕ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑΣ BIORENDER.COM)

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Στην συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω συνήθως κάποιου λογισμικού.

1. Εξάγεται ο μέσος όρος τιμών απορρόφησης για τα φρεάτια με όμοιες συνθήκες
2. Αφαιρείται από αυτές τις τιμές, ο μέσος όρος των τυφλών (σκέτο διάλυμα ΜΤΤ)
3. Τα δεδομένα εισάγονται σε εργαλείο υπολογισμού IC_{50} (στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το atbio.com) και εξάγεται η σιγμοειδής καμπύλη από την οποία μπορούμε να υπολογίζουμε την IC_{50} αλλά και οποιαδήποτε άλλη συγκέντρωση αναστολής (πχ IC_{20} , IC_{80}).

3.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ/ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΜΕ ΧΡΩΣΗ ΑΝΝΕΞΙΝΗΣ-V ΚΑΙ ΡΙ

Σε αυτό το πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν εναιωρήματα κυττάρων μυελωματικών σειρών, συγκεκριμένα των L363 και NCI-H929 προς μέτρηση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων, μέσω επώασής τους με τις συγκεντρώσεις IC_{50} που προέκυψαν από την δοκιμασία ΜΤΤ για την κάθε κυτταρική σειρά.

Κατά την απόπτωση, το κύτταρο υπόκειται σε χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές μεταξύ των οποίων είναι η απώλεια της ασυμμετρίας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Στα αποπτωτικά κύτταρα παρουσιάζεται μετατόπιση του μεμβρανικού φωσφολιπιδίου φωσφατιδυλοσερίνη (PS) από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης στην εξωτερική, με αποτέλεσμα την έκθεσή του στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η αννεξίνη V είναι μέλος της οικογένειας των αννεξινών, μιας οικογένειας ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, που δεσμεύουν την φωσφατιδυλοσερίνη, μέσω μιας εξαρτώμενης από ασβέστιο (Ca^{2+}) διαδικασίας. Η σημασμένη με φθοριόχρωμα αννεξίνη V μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σήμανση και αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, η αννεξίνη από μόνη της δεν μπορεί να ξεχωρίσει τα αποπτωτικά από τα νεκρωτικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται επικουρικά διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (PI), μιας φθορίζουσας χρωστικής που δεσμεύεται στο DNA. Τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, δεν δεσμεύουν το PI, ενώ τα όψιμα αποπτωτικά και τα νεκρωτικά βάφονται θετικά λόγω της εισόδου της χρωστικής στο εσωτερικό του πυρήνα, όπου δεσμεύεται στο DNA.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά, αναλώσιμα και όργανα:

- Annexin/PI kit (BioLegend, USA)
- Διάλυμα PBS-FBS (BioLegend's Cell Staining Buffer)
- Πλαστικά σωληνάρια FACS tubes κατάλληλα για χρήση σε κυτταρομετρητή ροής (Corning, USA)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6/24/48 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (Greiner Bio-one, UK)
- Κυτταρόμετρο BD FACSCanto II

Πρωτόκολλο διαδικασίας

- Επίστρωση κυττάρων σε μικροπλάκα 24 φρεατίων και επώαση με την αντίστοιχη IC_{50} ως προς το BMF για 24 ώρες
- Τα κυτταρικά εναιωρήματα συλλέγονται και τοποθετούνται σε πλαστικά σωληνάρια FACS tubes
- Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά
- Πραγματοποίηση 2 πλύσεων με Cell Staining Buffer, για να ξεπλυθούν τα κύτταρα από το θρεπτικό υλικό
- Επαναιώρηση στα 150 μL Binding Buffer και πραγματοποίηση χρώσης με 5 μL και 10 μL αννεξίνης V και PI, αντίστοιχα.
- Επώαση για 15 λεπτά σε συνθήκη σκότους και σε θερμοκρασία δωματίου
- Μετά την επώαση, προστίθενται περίπου 400 μL Binding Buffer και ακολουθεί η ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής

Για την εύρεση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων και τον έλεγχο της δράσης της IC₅₀ ως προς το BMF, παρατηρούμε στο σικτόγραμμα για την αννεξίνη και το PI το πρώτο τεταρτημόριο στο οποίο τα κύτταρα που αποτυπώνονται είναι αρνητικά ως προς και τους δύο δείκτες (**Εικόνα 20**).



ΕΙΚΟΝΑ 20: ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΜΕΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΣΤΟΝ ΟΠΟΙΟ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ

3.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ CRT ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ BMF

Τα δείγματα ασθενών παραχωρήθηκαν από τον Καθηγητή Θεραπευτικής-Παθολογίας/Ογκολογίας Δρ. Ευστάθιο Καστρίτη, από την Αιματολογική/Ογκολογική Μονάδα της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΠΓΝΑ «Αλεξάνδρα»). Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι NCI-H929 και L363.

3.6.1 ΜΕΘΟΔΟΣ *in vitro* ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ CRT ΣΤΙΣ ΜΥΕΛΩΜΑΤΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ H929 ΚΑΙ L363

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά, αναλώσιμα και όργανα:

- Πυκνό διάλυμα αντισώματος anti-CRT, 0,5 mg/mL
- Διάλυμα PBS- 0,5% FBS
- Πλαστικά σωληνάρια FACS tubes κατάλληλα για χρήση σε κυτταρομετρητή ροής (Corning, USA)

- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6/24/48 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (Greiner Bio-one, UK)
- Κυτταρόμετρο BD FACSCanto II

Πρωτόκολλο διαδικασίας

- Επίστρωση κυττάρων σε μικροπλάκα 6 φρεατίων (500.000 κύτταρα/φρεάτιο) ή 24 φρεατίων (120.000 κύτταρα/φρεάτιο) και επώαση με την αντίστοιχη IC₅₀ του BMF για 24 ώρες
- Τα κυτταρικά εναιωρήματα συλλέγονται και τοποθετούνται σε πλαστικά σωληνάρια FACS tubes
- Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά
- Πραγματοποίηση 2 πλύσεων με διάλυμα PBS-0,5% FBS, για να ξεπλυθούν τα κύτταρα από το θρεπτικό υλικό
- Επαναιώρηση σε 450 µL διαλύματος PBS-0,5% FBS και στην συνέχεια το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται σε τρία FACS tubes (CRT/Ισοτυπικό/unstained) όπου πραγματοποιείται χρώση με 2,5 µL CRT και 2,5 µL ισοτυπικού αντισώματος.
- Επώαση για 1 ώρα σε συνθήκη σκότους μέσα σε πάγο και ήπια ανάδευση κάθε 15 λεπτά.
- Μετά την επώαση, ακολουθεί το πρωτόκολλο χρώσης με Αννεξίνη V (βλ. προηγούμενη ενότητα).

3.6.2 ΜΕΘΟΔΟΣ *ex vivo* ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ CRT ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

3.6.2.1 Κατεργασία δειγμάτων ασθενών

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο εργασίας πραγματοποιήθηκε για την απομόνωση κυττάρων από αίμα ασθενών με ΠΜ πριν και 24 ώρες μετά την χορήγηση του φαρμάκου BMF. Η ανάλυση του κάθε δείγματος έγινε με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή ροής BD FACSCANTO II (BD, USA) με δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης 8 σημάτων φθορισμού.

Πριν την κατεργασία του κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε συλλογή πλάσματος και ορού από το αίμα των ασθενών.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά, αναλώσιμα και όργανα:

- Πιπέτες μεταβλητού όγκου 2, 20, 200 και 1000 μL (Gilson Inc, WI, USA)
- Ρύγχι πιπετών 10, 200 και 1000 μL (Greiner Bio-one, UK)
- Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης 1, 2, 5, 10 και 25 mL (Greiner Bio-one, UK)
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur (Greiner Bio-One, UK)
- Κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρησης 50 mL (Greiner Bio-one, UK)
- Φυγόκεντρος ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας με αποσπώμενες κεφαλές (Jouan, DJB Labcare, UK)
- Θάλαμος νηματικής ροής (Laminar Flow) BH-EN-2004 (Faster, Italy)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Novex, Italy)
- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's (DPBS), χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} (Lonza, Italy)
- Διάλυμα λύσης ερυθρών BD FACS lysing solution (BD, USA)
- Διάλυμα κυανού του τρυπανίου (trypan blue) 0,4% (w/v) (Sigma-Aldrich, Germany)
- Αιμοκυτταρομετρική αντικειμενοφόρος πλάκα τύπου Neubauer (Sigma-Aldrich, Germany)
- Αναδευτήρας Vortex
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5/2 mL
- Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα σε ταμπλέτες (Phosphate Buffer Saline tablets, PBS tablets) (Sigma Chemical, USA)
- Διάλυμα PBS – 0,5% FBS (FACS washing buffer)
- Πλαστικά σωληνάρια FACS tubes κατάλληλα για χρήση σε κυτταρομετρητή ροής (Corning, USA)
- Διάλυμα λύσης χλωριούχου αμμωνίου NH_4Cl
- Όργανο orbital shaker

Απομόνωση πλάσματος και ορού

1. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 1500 rpm για 2 λεπτά, έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένας αρχικός διαχωρισμός του πλάσματος με το αίμα.
2. Το πλάσμα συλλέχθηκε με προσοχή με την χρήση πλαστικής πιπέτας Pauster (3mL) και τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωληνάριο FACS tube
3. Το πλάσμα μαζί με τα δείγματα αίματος για την συλλογή του ορού φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm για 20 λεπτά.
4. Τα υπερκείμενα μετά την φυγοκέντρηση αποθηκεύτηκαν στους $-80\text{ }^\circ\text{C}$ μέχρι και την ανάλυσή τους.

Πρωτόκολλο διαδικασίας

1. Προσθήκη ορισμένης ποσότητας αίματος, η οποία δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 3mL, σε κωνικά σωληνάρια 50 mL
2. Άμεση προσθήκη διαλύματος λύσης χλωριούχου αμμωνίου μέχρι και τα 50 mL και ανάδευση για 15 λεπτά σε orbital shaker στις 35-40 στροφές
3. Φυγοκέντρηση στις 1750 rpm για 10 λεπτά
4. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναίωση κυττάρων σε 30 mL διαλύματος PBS – 0,5% FBS
5. Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά
6. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναίωση κυττάρων σε 1 mL διαλύματος PBS – 0,5% FBS, μεταφορά του αιωρήματος σε πλαστικό σωληνάριο FACS tube, πλύση του

κωνικού σωληναρίου με 1 mL διαλύματος PBS – 0,5% FBS για την μεταφορά των εναπομείναντων κυττάρων στο FACS tube.

7. Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά
8. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναιώρηση σε 500 μL για να πραγματοποιηθεί η καταμέτρηση των κυττάρων. Απαιτείται η χρώση 12×10^6 κυττάρων.
9. Μετά την καταμέτρηση διαχωρίζονται στην μέση τα κύτταρα σε δύο ξεχωριστά FACS tubes κάνοντας χρώση με το πάνελ 1 και 2, αντίστοιχα
10. Η χρώση των κυττάρων γίνεται με τους παρακάτω συνδυασμούς μονοκλωνικών αντισωμάτων και φθορίζουσών χρωστικών (**Πίνακας 1**)

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΠΑΡΑΘΕΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ. ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΔΕΙΓΜΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ FACS TUBES ΓΙΑ ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙ-CRT ΚΑΙ ΜΕ ΙΣΟΤΥΠΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ

Μονοκλωνικό Αντίσωμα	Φθορίζουσα χρωστική		Ποσότητα (μL)	Τύπος δείκτη (S) surface
	Πάνελ 1	Πάνελ 2		
CD38	FITC	FITC	5	Επιφανειακός (S)
CD138	Pacific Blue	Pacific Blue	5	Επιφανειακός (S)
CD19	PECy7	PECy7	5	Επιφανειακός (S)
CD45	PerCPCy5.5	PerCPCy5.5	2,5	Επιφανειακός (S)
CD56	PE	PE	2,5	Επιφανειακός (S)
anti-CRT	APC		2,5	Επιφανειακός (S)
Isotype		APC	2,5	Επιφανειακός (S)

11. Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα σε σκοτάδι μέσα σε πάγο με ανάδευση κάθε 15 λεπτά
12. Μετά την επώαση ακολουθεί προσθήκη 2 mL FACS Lysing και επώαση για 10 λεπτά στο σκοτάδι μέσα σε πάγο
13. Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 λεπτά
14. Απόρριψη υπερκειμένου και πλύση με διάλυμα PBS – 0,5% FBS (1500 rpm/5 λεπτά)
15. Απόρριψη υπερκειμένου και στο ίζημα των κυττάρων κάνουμε την τελική ανασύσταση με 600 μL διαλύματος PBS – 0,5% FBS
16. Αναλύουμε στον κυτταρομετρητή ροής.

3.6.2.2 Ανάλυση δεδομένων κυτταρομετρίας ροής

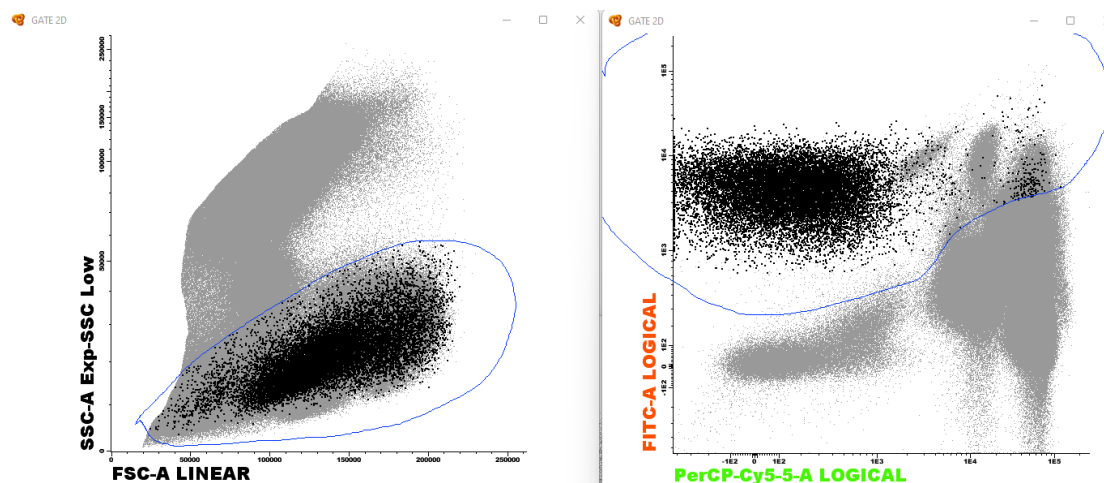
Τα σήματα που προσλαμβάνονται από το οπτικό σύστημα του κυτταρομετρητή ροής ψηφιοποιούνται με τη βοήθεια ολοκληρωμένων κυκλωμάτων. Η ένταση (αριθμός) των προσλαμβανόμενων φωτονίων μετατρέπεται σε ηλεκτρόνια, στη συνέχεια σε ηλεκτρικούς παλμούς και τελικώς, με την ψηφιοποίηση του αναλογικού σήματος, σε μία ψηφιακή τιμή που αντικατοπτρίζει την ένταση του αρχικού σήματος. Με τη βοήθεια του λογισμικού μπορεί να γίνει εύκολος ο χειρισμός μεγάλης πληροφορίας, καθώς για κάθε κύτταρο που

διέρχεται από το σημείο εξέτασης είναι διαθέσιμες όλες οι τιμές έντασης κάθε φθορίζουσας χρωστικής. Η απεικόνιση των δεδομένων κυτταρομετρίας γίνεται σε σύστημα καρτεσιανών αξόνων, όπου οι συντεταγμένες του κάθε σημείου/κυττάρου αντιστοιχούν στην ένταση φθορισμού. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης οι πληθυσμοί σημείων/κυττάρων περιχαρακώνονται και εξετάζονται για την έκφραση περισσότερων δεικτών. Η κάθε ανάλυση που πραγματοποιείται ακολουθεί συγκεκριμένη στρατηγική, η οποία είναι μοναδική για κάθε πρωτόκολλο και αποτυπώνεται στη συνέχεια ξεχωριστά.

3.6.2.3 Στρατηγική ανάλυσης

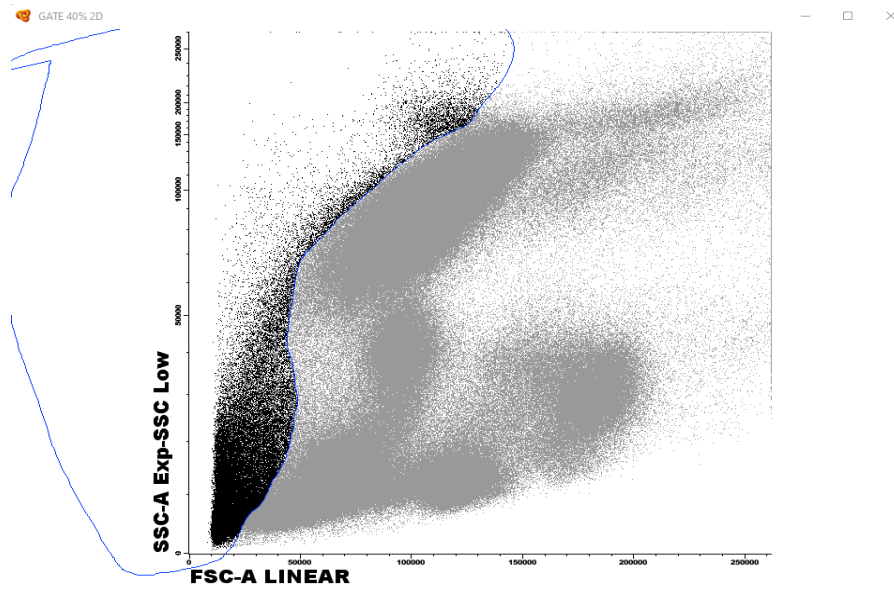
Ακολουθεί ανάλυση των στικτογραμμάτων που προκύπτουν με το λογισμικό Infinicyt® το οποίο παρέχεται από την εταιρεία Cytognos, Flow Cytometry Solutions.

Η επιλογή των κυτταρικών πληθυσμών ενδιαφέροντος γίνεται με περιχαρακωση (gating) μέσω του λογισμικού. Αυτό δίνει τη δυνατότητα της απομόνωσης πληθυσμών ενδιαφέροντος για περαιτέρω ανάλυση (**Εικόνα 21**).

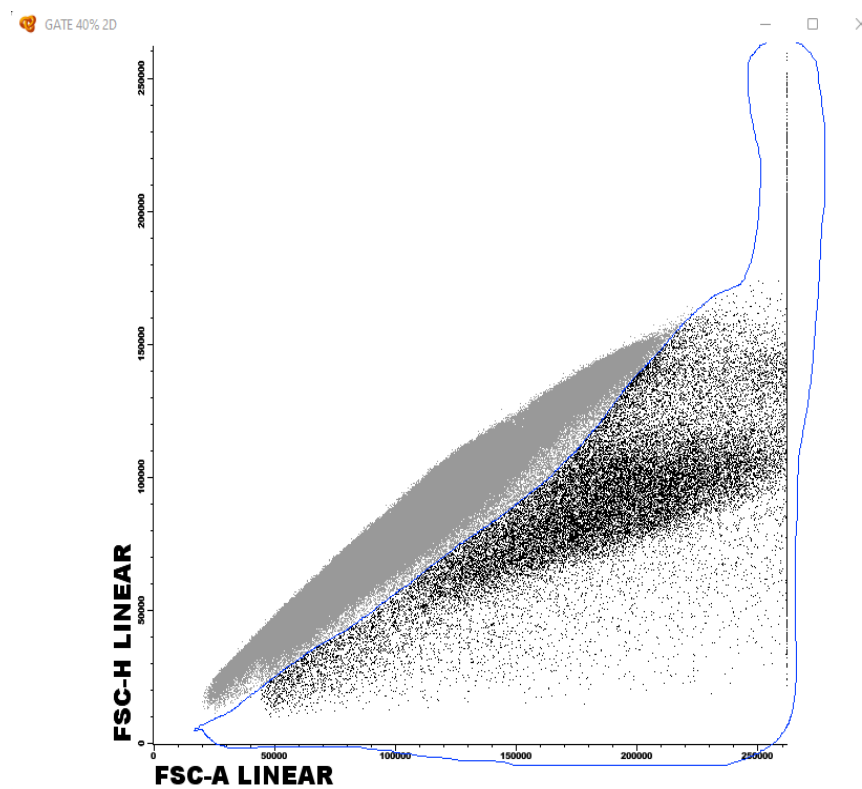


ΕΙΚΟΝΑ 21 : ΠΕΡΙΧΑΡΑΚΩΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ ΣΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ INFINICYT®

Αρχικά, με χρήση διαγράμματος FSC/SSC επιλέγονται τα εμπύρνηνα κύτταρα (πχ λευκά αιμοσφαίρια), αποκλείοντας κυτταρικά θραύσματα, θόρυβο και μικροσωματίδια. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποκλεισμός των πολλαπλών συγκολλημένων κυττάρων (κυρίως διπλετών, doublets) με τη χρήση του πρόσθιου (FSC) σκεδασμού (**Εικόνα 22, 23**).

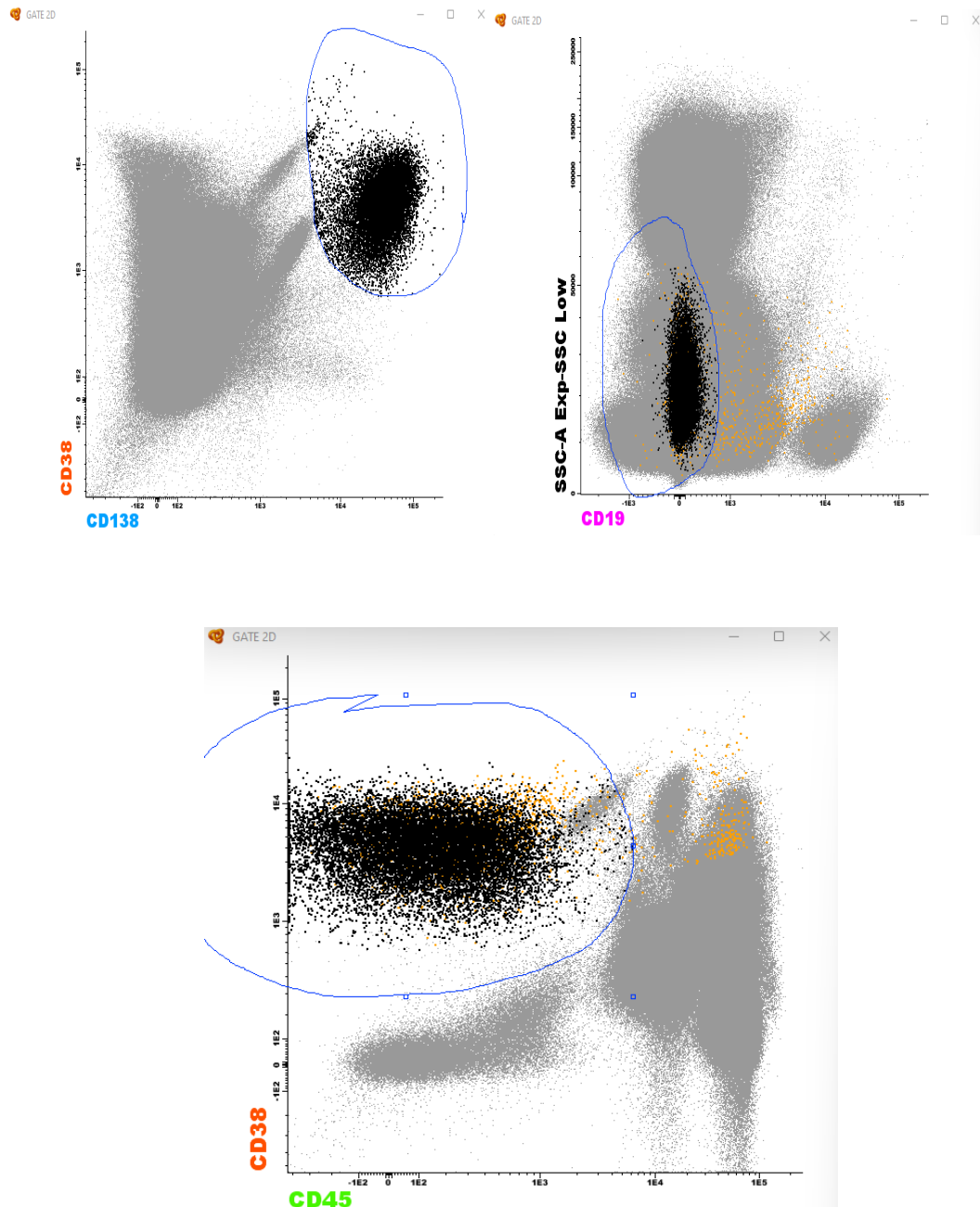


ΕΙΚΟΝΑ 22: ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ, ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

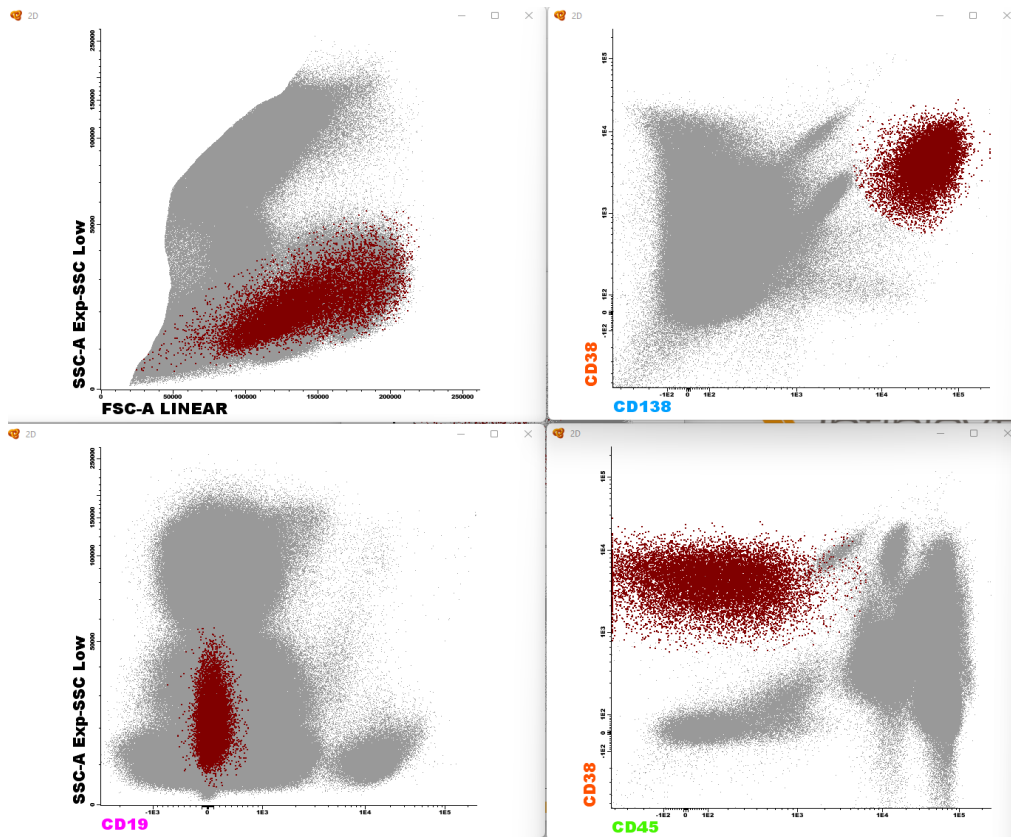


ΕΙΚΟΝΑ 23: ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΣ ΔΙΠΛΕΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΣΚΕΔΑΣΜΟΥ

Αφού έχουμε επιλέξει τα κύτταρα ενδιαφέροντος, τα αναλύουμε σε διαγράμματα συνδυασμών διάφορων δεικτών της επιλογής μας (π.χ. CD38/CD138, CD45/CD38 κλπ.) (Εικόνα 24, 25).



ΕΙΚΟΝΑ 24: ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ. Ο ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΟΥ ΕΧΕΙ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙ ΣΤΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΣΤΙΚΤΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΙΝΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΜ, ΟΠΟΥ ΑΠΟΤΕΛΟΥΝ ΤΟ 0,00065% ΤΩΝ ΣΥΝΟΛΙΚΩΝ ΕΜΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ. ΜΕ ΓΚΡΙ ΧΡΩΜΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΕΜΠΥΡΗΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ, ΜΕ ΠΟΡΤΟΚΑΛΛΙ ΤΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΜΕ ΜΑΥΡΟ ΤΑ ΚΚΚ.



ΕΙΚΟΝΑ 25: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ. Ο ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΟΥ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΖΕΙ ΕΙΝΑΙ CD138+,CD38+,CD19-,CD45-. ΜΕ ΓΚΡΙ ΧΡΩΜΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΝΑΙ ΤΑ ΕΜΠΥΡΗΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ, ΜΕ ΚΟΚΚΙΝΟ ΤΑ ΚΚΚ.

3.7 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ προΤα(100-109) ΜΕ ELISA ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ

Για την ποσοτική μέτρηση του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο ELISA ανταγωνιστικού τύπου, το οποίο σχεδιάστηκε από την εργαστηριακή μας ομάδα (in-house ELISA). Για τις ανάγκες της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν αντι-προΤα(100-109) πολυκλωνικά αντισώματα τα οποία καθαρίστηκαν από τον ορό ανοσοποιημένων κουνελιών.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανοσοποίηση λευκών κουνελιών Νέας Ζηλανδίας με προΤα(100-109) συζευγμένο με κυστεΐνη και στη συνέχεια συλλέχθηκαν οι πολυκλωνικοί αντι-οροί τους. Στην συνέχεια, καθαρίστηκε το κλάσμα IgG με χρήση ειδικής στήλης, από το οποίο απομονώθηκαν τα αντι-προΤα(100-109) πολυκλωνικά αντισώματα μετά από διαδοχικές εκπλύσεις.

Η διαδικασία της συγκεκριμένης ELISA περιλαμβάνει την συνεπώαση του δείγματος με τα πολυκλωνικά IgG αντισώματα έναντι του ελεύθερου αντιγόνου proTa(100-109), και του βιοτινυλιωμένου αντιγόνου proTa(100-109). Το σημασμένο (βιοτινυλιωμένου) αντιγόνο ανταγωνίζεται με το αντιγόνο του δείγματος (μη σημασμένο) για τις θέσεις πρόσδεσης στο αντίσωμα. Συνεπώς, όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του δείγματος σε proTa(100-109) τόσες περισσότερες θέσεις δέσμησης μένουν ελεύθερες για να δεσμευτεί το βιοτινυλιωμένο – proTa(100-109) και άρα, τόσο πιο ισχυρό θα είναι και το παραγόμενο σήμα μετά την μέτρηση. Το σήμα προκύπτει μέσω του συστήματος βιοτίνη-στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση (Horse radish peroxidase, HPR) - ABTS. Η στρεπταβιδίνη βρίσκεται συζευγμένη με υπεροξειδάση και δεσμεύει με μεγάλη συγγένεια τη βιοτίνη (η βιοτίνη παρέχει 4 θέσεις δέσμησης της στρεπταβιδίνης) (59).

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά, αναλώσιμα και όργανα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Washing Buffer) – (8 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl και 0,24 g KH₂PO₄ σε 1 L νερό με pH 7,4 στο οποίο προστίθεται 0,05% v/v Tween 20)
- PBS Tablets (Sigma-Aldrich, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (Dilution Buffer) – (0,5% w/v BSA σε Washing Buffer)
- BSA κλάσμα V με pH 7,0 (PAA, Austria)
- Ρυθμιστικό διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer) – (2% w/v BSA σε PBS)
- Πρωτεΐνη A, από το βακτήριο *Staphylococcus aureus* (Calbiochem, Darmstadt, Germany)
- Στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση (HPR) – (Jackson Immuno research, Dianova, Germany)
- Διάλυμα υποστρώματος [10 mg ABTS διαλυμένα σε 1 mL απεσταγμένου νερού αραιώνονται με 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (2,1 g κιτρικού οξέος διαλυμένα σε 100 mL νερού) και προστίθενται 10 μL H₂O₂ (30%), pH 4,5]
- Κιτρικό οξύ
- 2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλβενζοθειαζολιν-6-σουλφονικό οξύ)-2NH₄ άλας (ABTS) χρωμογόνο για την υπεροξειδάση (SERVA, Heidelberg, Germany)
- Μικροπλάκες 96 φρεατίων, Maxisorp (VWR International, Pennsylvania, USA)
- Eppendorf 1,5 και 2,0 mL (Greiner, Austria)
- Αναδευτήρας DTS-2 (Neolab, Heidelberg, Germany)
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών
- Κυκλικός ομογενοποιητής υγρών (Lab net, USA)

Η ποσοτική ανίχνευση του δεκαπεπτιδίου proTa(100-109) με την *in-house* ELISA απαιτεί τρεις διαδοχικές ημέρες εργασίας.

Ημέρα πρώτη

Γίνεται κατακρήμνιση πρωτεϊνών από :

- ✓ Πλάσμα ασθενών ή υγιών δοτών, αν το δείγμα προς μελέτη προέρχεται από ανθρώπινο πλάσμα.
- ✓ Πλήρες RPMI-1640, αν το δείγμα προέρχεται από κυτταρικές καλλιέργειες.

Μέθοδος κατακρήμνισης πρωτεϊνών από ανθρώπινο πλάσμα με ακετόνη

Το ανθρώπινο πλάσμα αποτελείται από μια πληθώρα πρωτεϊνών, ορισμένες εκ των οποίων βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση (κυρίως η αλβουμίνη). Η παρουσία τους, καθιστά δύσκολη την ανίχνευση μικρών πεπτιδίων και η απομάκρυνσή τους ενδείκνυται για την αύξηση της ειδικότητας ανίχνευσής τους, ή για την αποφυγή μη ειδικών δεσμεύσεων.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά, αναλώσιμα και όργανα:

- Παγωμένη καθαρή ακετόνη (Chem-Lab, Belgium)
- Συσκευή εξάτμισης Savant Speedvac (Thermo Fisher, USA)
- Eppendorf (Greiner, Austria)

Πρωτόκολλο διεργασίας

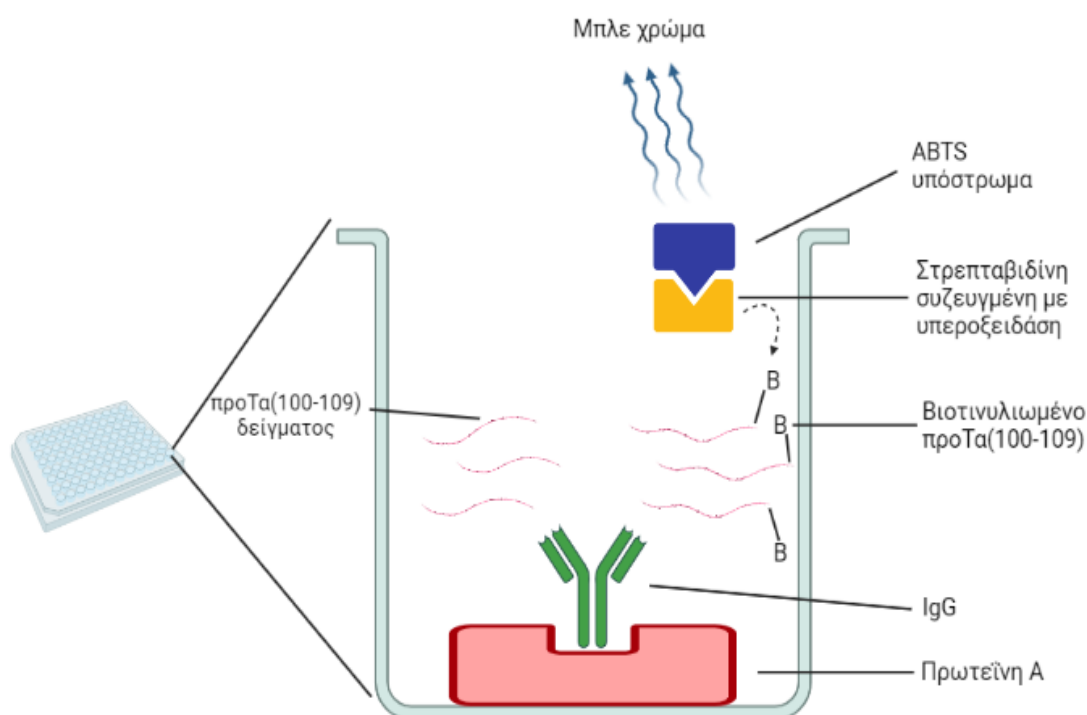
1. Μικρή ποσότητα από το κάθε δείγμα μεταφέρεται σε Eppendorfs.
2. Προστίθενται 3 όγκοι κρύας ακετόνης. Το δείγμα αποκτά νεφελώδη σύσταση.
3. Το δείγμα ομογενοποιείται μετά από ανάδευση στην συσκευή Vortex και φυλάσσεται για 12 ώρες στους -20°C .

Ημέρα δεύτερη

1. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 10.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και τα υπερκείμενα συλλέγονται σε νέα Eppendorfs.
2. Η ακετόνη εξατμίζεται, με τη βοήθεια της συσκευής speed vac, σε χαμηλή ταχύτητα για την αποφυγή υπερθέρμανσης.
3. Τη συγκεκριμένη ημέρα εργασίας γίνεται η επίστρωση της μικροπλάκας με πρωτεΐνη A (1 mg/mL, 1% του τελικού όγκου πρωτεΐνη A σε DPBS) 100 μL /φρεάτιο και επώαση όλη τη νύχτα στους 4°C (ή εναλλακτικά 1 ώρα, στους 37°C).
4. Παράλληλα, επωάζονται οι ειδικές για το δεκαπεπτίδιο IgG (0,375 $\mu\text{g}/\text{mL}$) με βιοτινυλιωμένο προΤα(100-109) (5 ng/mL) και :
 - ✓ Το ελεύθερο προΤα(100-109) (0,1 ng/mL – 1000 ng/mL) προς ανταγωνισμό, για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης, όλη νύχτα στους 4°C .
 - ✓ Το εξεταζόμενο δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης προΤα(100-109) προς ανταγωνισμό, όλη νύχτα στους 4°C .

Ημέρα Τρίτη

1. Η πλάκα ξεπλένεται με DPBS και οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης καλύπτονται με διάλυμα κορεσμού (200 μL/φρεάτιο) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προστίθενται 100 μL του προεπωασμένου μείγματος στην μικροπλάκα, η οποία επωάζεται για 75 λεπτά στους 37 °C σε αναδευτήρα στις 150 στροφές.
3. Ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα πλύσης και προστίθενται 100 μL/φρεάτιο συζευγμένης με υπεροξειδάση (HPR) στρεπταβιδίνης (σε διάλυμα αραιώσης 1/5000) και η πλάκα επωάζεται περαιτέρω για 90 λεπτά στους 37 °C. Η στρεπταβιδίνη είναι απομονωμένη από το βακτήριο *Streptomyces avidinii* και δεσμεύει τη βιοτίνη (ικανότητα σύνδεσης 10 mg βιοτίνης ανά mg στρεπταβιδίνης).
4. Μετά από εντατική έκπλυση με διάλυμα πλύσης, προστίθενται στη πλάκα 100 μL/φρεάτιο διαλύματος ενζυμικού υποστρώματος ABTS και η πλάκα επωάζεται για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Η οπτική πυκνότητα μετρείται σε μετρητή ELISA στα 405 nm (**Εικόνα 26**).



Created in BioRender.com bto

ΕΙΚΟΝΑ 26 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΒΙΤΙΝΥΛΩΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ. ΑΠΟ ΤΗΝ ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ELISA ΣΥΝΑΓΕΤΑΙ ΤΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ ΠΩΣ ΟΣΟ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΕΙΝΑΙ Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΤΟ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑ ΤΟΣΟ ΜΙΚΡΟΤΕΡΗ ΘΑ ΕΙΝΑΙ Η ΤΙΜΗ ΤΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ. Η ΕΙΚΟΝΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΗΘΗΚΕ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑΣ BIORENDER.COM

3.8 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΗΜGB1 ΜΕ ELISA ΤΥΠΟΥ SANDWICH

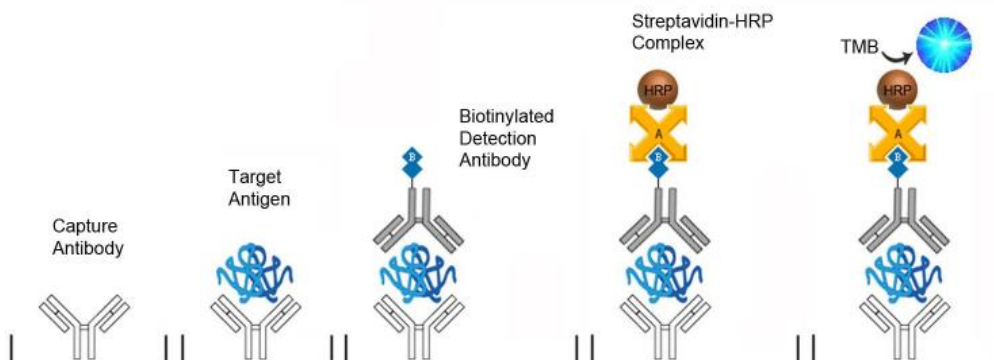
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DAMP ΗΜGB1 χρησιμοποιήθηκε διαθέσιμο εμπορικό kit ELISA (ΗΜGB1: UsclnLifeScience Inc., Wuhan, China) (Εικόνα 27). Πρόκειται για ELISA τύπου Sandwich διπλού αντισώματος (Εικόνα 28), με εύρος ανίχνευσης 62,5-4.000 pg/mL και η ελάχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα είναι τα 28,3 pg/mL. Σύμφωνα με τις οδηγίες του εμπορικού kit προτείνεται να χρησιμοποιηθεί ορός από το δείγμα αίματος για μεγαλύτερη ποσοτική ακρίβεια των αποτελεσμάτων μετά την ανάλυση.



ΕΙΚΟΝΑ 27: ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΚΙΤ ELISA ΗΜGB1. ΠΗΓΗ: CLOUD-CLONE CORP.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά, αναλώσιμα και όργανα:

- Προ-επωασμένη μικροπλάκα 96 φρεατίων
- Μονή πιπέτα (όγκου 10/200/1000 μ L) (Gilson Inc, WI, USA)
- Eppendorfs 1,5 και 2,0 mL
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Wash Buffer 30x concentrate)
- PBS Tablets (Sigma-Aldrich, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης για το stock διάλυμα της πρότυπης καμπύλης (Standard diluent)
- Απιονισμένο/Απεσταγμένο νερό, MilliQ water
- Αρχικό stock διάλυμα για την καμπύλη αναφοράς (standard)
- Απορροφητικό χαρτί
- Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος (Detection reagent A)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης για το διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος (Assay diluent A)
- Ρυθμιστικό διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (Detection reagent B)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης για το διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (Assay diluent B)
- Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος TMB
- Ρυθμιστικό διάλυμα τερματισμού (Stop solution)



ΕΙΚΟΝΑ 28 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ELISA ΤΥΠΟΥ SANDWICH. ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΔΕΣΜΕΥΕΤΑΙ ΣΤΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΜΕΝΟ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑ (ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ) ΚΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΜΕΝΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ (ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΣ). ΤΟ ΣΗΜΑ ΠΡΟΕΡΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ TMB ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΤΙΝΗΣ-ΣΤΡΕΠΤΑΒΙΔΙΝΗΣ-ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

Αρχικά, το kit μαζί με όλα τα αντιδραστήρια μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, και στην συνέχεια πραγματοποιείται προετοιμασία όλων των αντιδραστηρίων του εμπορικού kit.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

1. Προσθήκη 500 μL διαλύματος Standard diluent στο αρχικό stock για την πρώτη και μεγαλύτερη συγκέντρωση της πρότυπης καμπύλης και το διάλυμα που προκύπτει μετά την προσθήκη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στην συνέχεια, αναδεύεται προσεκτικά χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Το διάλυμα θα έχει συγκέντρωση 4.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ακολουθεί σειριακή αραιώση σε εξωτερικά Eppendorfs στα οποία έχουν προστεθεί 250 μL διαλύματος Standard diluent σε στείρες συνθήκες, με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν οι εξής συγκεντρώσεις:
- 2.

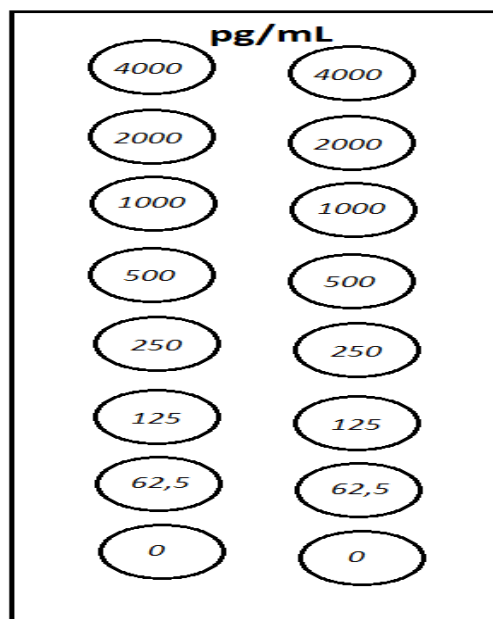
Συγκεντρώσεις πρότυπης καμπύλης αναφοράς	
Συγκέντρωση HMGB1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	4000
	2000
	1000
	500
	250
	125
	62,5
	0*

*το τελευταίο Eppendorf περιέχει σκέτο διάλυμα αραιώσης και λειτουργεί ως τυφλό δείγμα στο φρεάτιο για την μετέπειτα μέτρηση των απορροφήσεων της πλάκας.

3. Γρήγορη φυγοκέντρηση των ρυθμιστικών διαλυμάτων του πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος, για την αποφυγή παραμονής σταγονιδίων στα τοιχώματα και έπειτα αραιώνονται 100 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης Assay diluent A και Assay diluent B, αντίστοιχα.
4. Πραγματοποιείται αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 30 φορές με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό και του δείγματος που θα αναλυθεί με 0,01 mol/L PBS (pH 7-7,2). Στην περίπτωση των δειγμάτων, η αραιώση που πραγματοποιείται είναι 100 φορές (πχ. 10 μL δείγματος + 990 μL PBS).

Πρωτόκολλο διαδικασίας

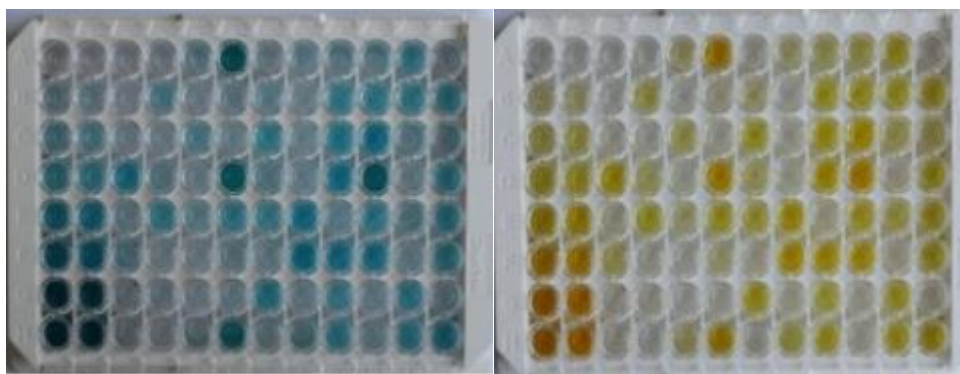
1. Αφού ετοιμαστούν οι συγκεντρώσεις για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς σε ξεχωριστά Eppendorfs μεταφέρονται 100 μL στα αντίστοιχα φρεάτια στην μικροπλάκα (**Εικόνα 29**). Επίσης, μεταφέρονται και 100 μL αραιωμένου δείγματος στα επόμενα φρεάτια εις διπλούν (duplicates).



ΕΙΚΟΝΑ 29: ΟΙ ΘΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΦΡΕΑΤΙΩΝ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑΣ ΜΕ ΤΙΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΗΜGB1, ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

2. Η μικροπλάκα σφραγίζεται με έτοιμο κάλυπτρο που παρέχεται από το kit και επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C.
3. Αφαιρείται το υγρό από κάθε φρεάτιο χωρίς να ακολουθήσει πλύση.
4. Προστίθενται 100 μL/φρεάτιο ρυθμιστικού διαλύματος πρωτογενούς αντισώματος (detection reagent A), σφραγίζεται η μικροπλάκα και επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C.

5. Αφαιρείται το υγρό από κάθε φρεάτιο και ακολουθούν 3 πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (350 μ L/φρεάτιο). Πριν αφαιρεθεί το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης από όλα τα φρεάτια μετά από την κάθε πλύση, πραγματοποιείται μια μικρή επώαση 1-2 λεπτά.
6. Προστίθενται 100 μ L/φρεάτιο ρυθμιστικού διαλύματος δευτερογενούς αντισώματος (detection reagent B), σφραγίζεται η μικροπλάκα και επώαζεται για 30 λεπτά στους 37 $^{\circ}$ C.
7. Ακολουθούν πέντε πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης όπως στο βήμα (4).
8. Προστίθενται 90 μ L/φρεάτιο ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος TMB σε στείρες συνθήκες χωρίς φως, η μικροπλάκα καλύπτεται με καινούριο κάλυπτρο και επώαζεται για 10-20 λεπτά στους 37 $^{\circ}$ C. Στο στάδιο αυτό είναι απαραίτητο ο χρόνος επώασης να μην υπερβεί τα 30 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης θα παρατηρηθεί μπλε χρώμα τα φρεάτια που ανιχνεύθηκε το μόριο της HMGB1 (**Εικόνα 30**).
9. Πραγματοποιείται προσθήκη 50 μ L/φρεάτιο ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού (stop solution). Στο στάδιο αυτό το μπλε χρώμα που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο θα γίνει κίτρινο. Με την αλλαγή του χρώματος η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται άμεσα στα 450 nm (**Εικόνα 30**).



ΕΙΚΟΝΑ 30 ΑΛΛΑΓΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ TMB (ΑΠΙΣΤΕΡΑ) ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ (ΔΕΞΙΑ). ΠΗΓΗ: CLOUD-CLONE CORP.

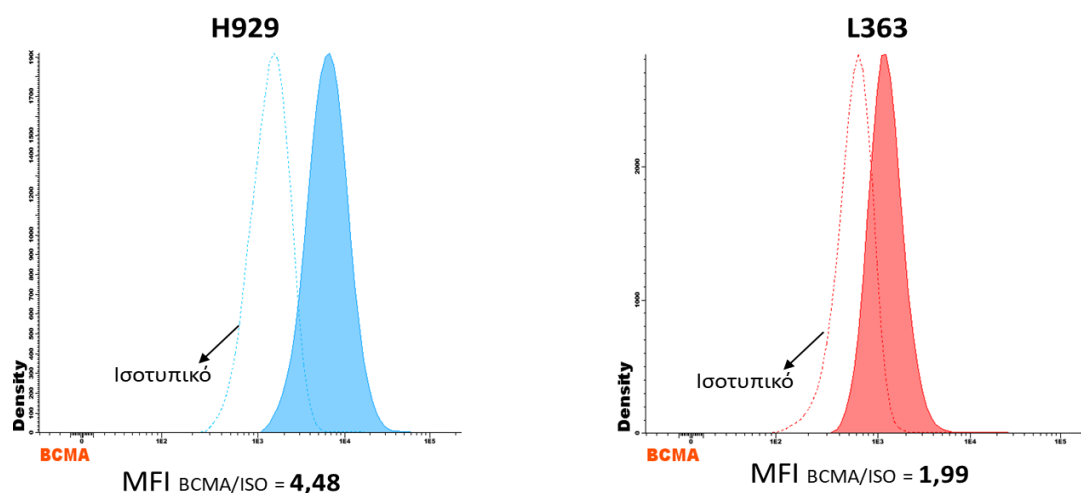
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 *In vitro* ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ BCMA ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΜΥΕΛΩΜΑΤΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ H929 ΚΑΙ L363

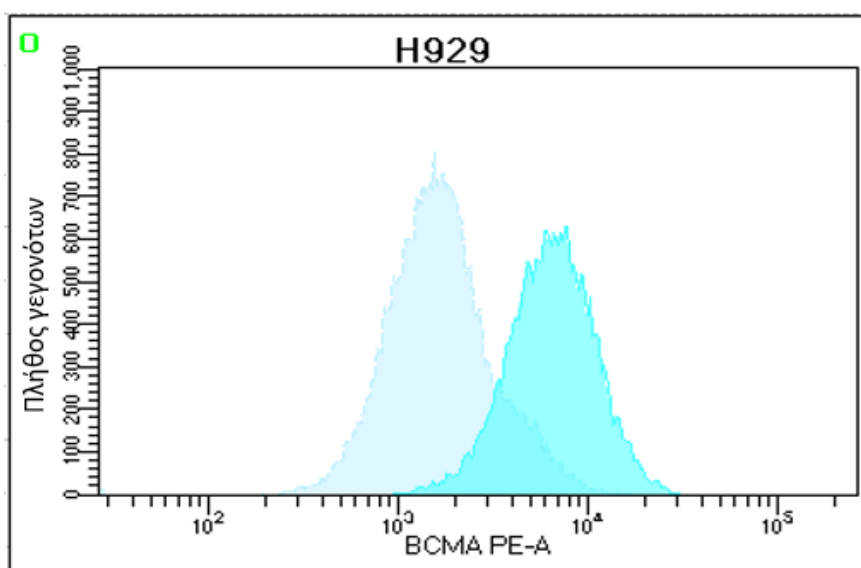
Όπως αναφέρθηκε στην θεωρητική ανάλυση της πρώτης ενότητας (Ενότητα 1.2.1), η έκφραση του δείκτη BCMA κατέχει μια ιδιαίτερη θέση στο κομμάτι της δράσης του φαρμάκου BMF, και όπως θα καταστεί σαφές στη συνέχεια, και στην αποτελεσματικότητά του. Η έκφραση του συγκεκριμένου δείκτη δεν είναι ίδια σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ωστόσο σύμφωνα πάντα με την διεθνή βιβλιογραφία προκύπτει το γεγονός πως οι δύο μυελωματικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας (H929 και L363) εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του BCMA (9, 25). Πρωταρχικός στόχος ήταν ο έλεγχος των εν λόγω επιπέδων έκφρασης.

Πραγματοποιώντας χρώση με αντίσωμα ειδικό για τον δείκτη BCMA σε δείγμα από την συνολική καλλιέργεια της κάθε κυτταρικής σειράς, όπως περιγράφηκε στην ενότητα των μεθόδων (Ενότητα 3.3) αναλύσαμε τα αποτελέσματά μας σε κυτταρομετρητή ροής. Επιπροσθέτως πραγματοποιήθηκε χρήση ισοτυπικού αντισώματος που συντέλεσε στο πείραμα ως αρνητικός μάρτυρας. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν μέσω του λογισμικού Infinicyt® (Εικόνα 31) και του BD FACSDiva™ (Εικόνα 32).

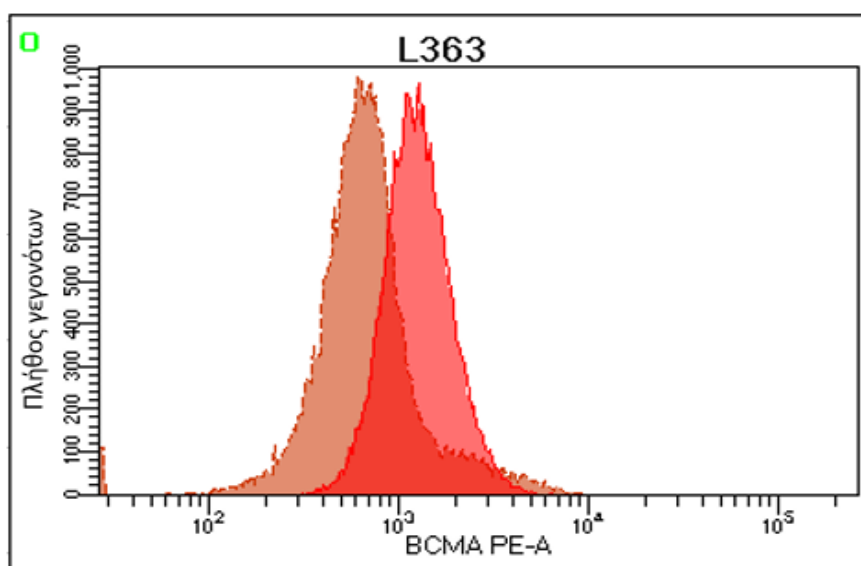


ΕΙΚΟΝΑ 31: ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ MFI ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΣΕ ΔΥΟ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ H929 (ΑΡΙΣΤΕΡΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ, ΜΠΛΕ ΧΡΩΣΗ) ΚΑΙ L363 (ΔΕΞΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ, ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΡΩΣΗ). ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ MFI ΓΙΑ ΤΟ ΔΕΙΚΤΗ BCMA ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΗ ΤΟΥ ΙΣΟΤΥΠΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ (ΣΤΙΚΤΗ ΓΡΑΜΜΗ). ΓΙΑ ΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ INFINICYT®

A.



B.



ΕΙΚΟΝΑ 32: ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜFI ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ Η929 (Α) ΚΑΙ ΤΗΣ L363 (Β). ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΚΤΗΘΗΚΑΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ BD FACSDIVA™. ΤΟ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑ ΜΕ ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΕΙΝΑΙ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΟ ΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ BCMA ΗΤΑΝ Η ΦΥΚΟΕΡΥΘΡΙΝΗ (PE).

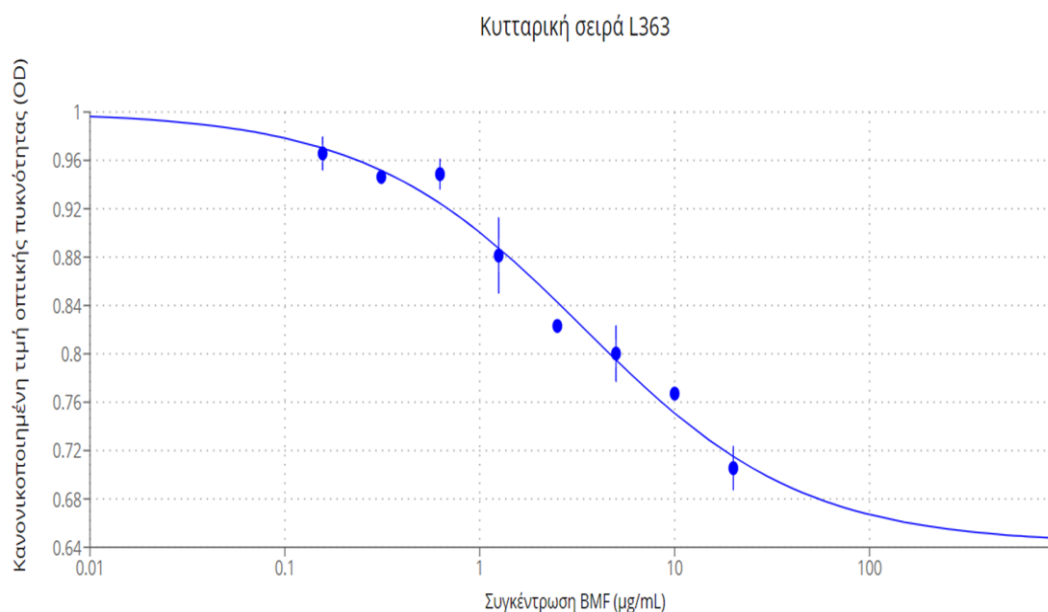
Τόσο στην **εικόνα 31** όσο και στην **εικόνα 32** αποτυπώνεται το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης για τον δείκτη BCMA στην κάθε κυτταρική σειρά. Πιο συγκεκριμένα συγκρίθηκε ο λόγος της MFI για το BCMA προς την αντίστοιχη MFI για το ιστυπικό ($MFI_{BCMA/ISO}$). Όπως παρατηρείται το $MFI_{BCMA/ISO}^{H929} = 4,48$ είναι περίπου διπλάσιο από το $MFI_{BCMA/ISO}^{L363} = 1,99$,

με αποτέλεσμα να επιβεβαιώνεται η μεγαλύτερη έκφραση του BCMA από τα κύτταρα της σειράς H929 σε σχέση με εκείνα της σειράς L363.

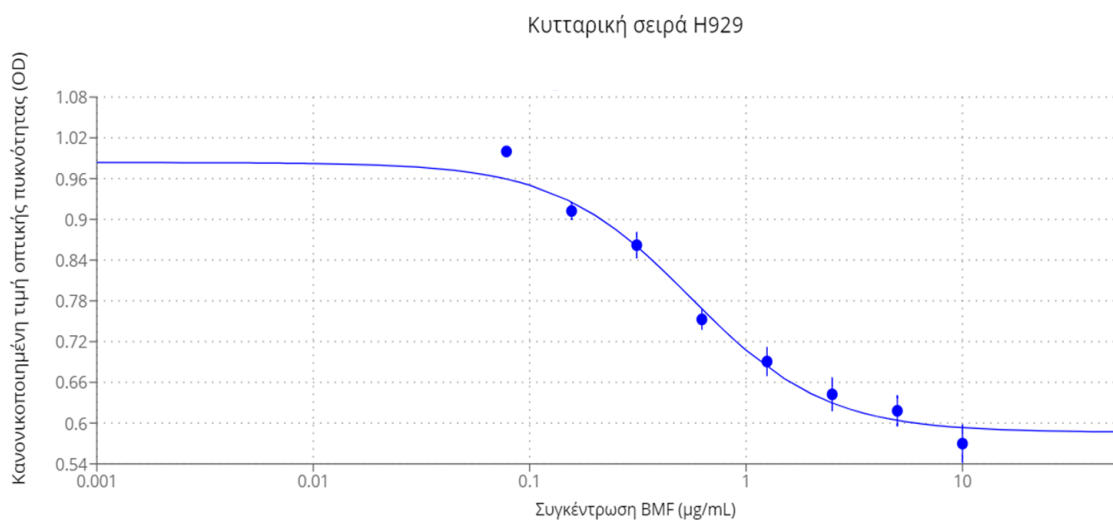
4.1.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ IC₅₀ ΓΙΑ ΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ H929 ΚΑΙ L363 ΜΕΣΩ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΜΤΤ

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας για την κάθε κυτταρική σειρά μέσω της δοκιμασίας ΜΤΤ με απώτερο σκοπό την εύρεση της IC₅₀ ως προς το BMF για 24 ώρες. Χρησιμοποιήθηκε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων του παράγοντα BMF όπως αναγράφεται στην ενότητα των μεθόδων (Ενότητα 3.3.1).

Αναλυτικότερα, στην περίπτωση της H929 χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 10 μg/mL έως 0,078 μg/mL, ενώ στην περίπτωση της L363 χρησιμοποιήθηκε το φάσμα 20 μg/mL έως 0,15 μg/mL. Ως θετικός μάρτυρας επιλέχθηκε ο αναστολέας πρωτεασώματος βορτεζομίπη, ενώ αρνητικό μάρτυρα αποτέλεσαν επιστρωμένα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς την παρουσία κάποιου παράγοντα, παρά μόνο με πλήρες θρεπτικό υλικό. Τέλος η βιωσιμότητα των κυττάρων για την κάθε περίπτωση πριν την έναρξη του πειράματος εκτιμήθηκε σε ποσοστό άνω του 94%. Παρουσιάζονται δύο ενδεικτικές καμπύλες δόσης-απόκρισης που ανακτήθηκαν από τα πειράματα για την κάθε κυτταρική σειρά (**Εικόνες 33 και 34, Πίνακας 2**).



ΕΙΚΟΝΑ 33: ΚΑΜΠΥΛΗ ΔΟΣΗΣ-ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΒΜΦ ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΙΜΗ ΤΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ 545 ΝΜ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ L363. Η ΟΠΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΕΧΕΙ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΘΕΙ ΔΗΛΑΔΗ ΕΧΕΙ ΔΙΑΙΡΕΘΕΙ Η ΚΑΘΕ ΤΙΜΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΤΙΜΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΠΟΥ ΑΝΑΚΤΗΘΗΚΕ



ΕΙΚΟΝΑ 34 : ΚΑΜΠΥΛΗ ΔΟΣΗΣ-ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΒΜΦ ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΙΜΗ ΤΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ 545 ΝΜ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ Η929.

Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα για την εύρεση της IC_{50} .

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΗΜΙΣΕΙΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΒΜΦ ΣΤΗΝ ΣΕΙΡΑ L363 (Α) ΚΑΙ Η929 (Β).

A.

Δοκιμή ΜΤΤ L363				
	<i>Πείραμα 1</i>	<i>Πείραμα 2</i>	<i>Πείραμα 3</i>	
Χρόνος επώασης	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}	Μ.Ο. IC_{50} (μg/ml) (Mean \pm SD*)
24 ώρες	3,88	3,50	5,35	4,24 \pm 0,98

B.

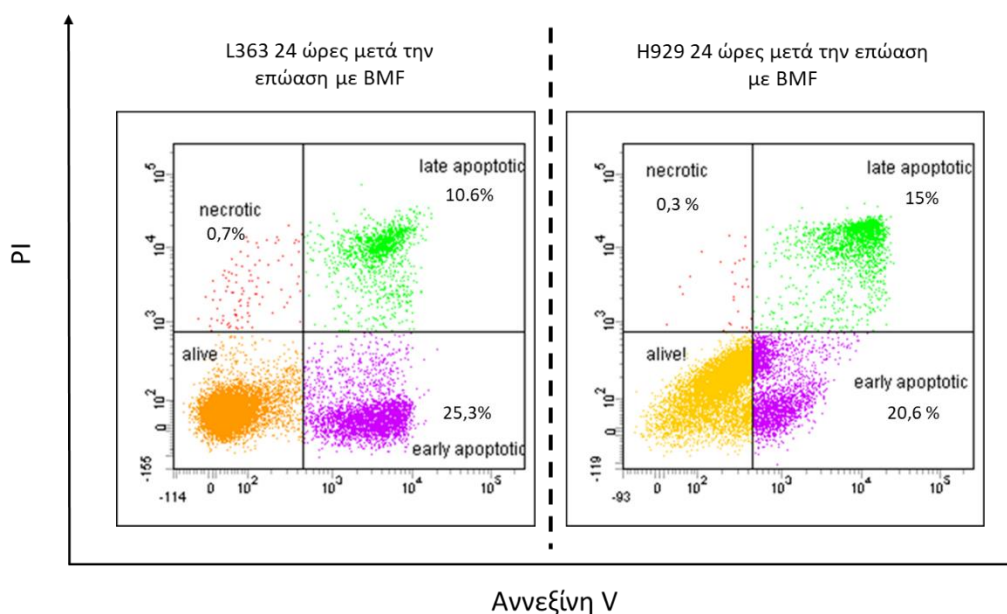
Δοκιμή ΜΤΤ Η929				
	<i>Πείραμα 1</i>	<i>Πείραμα 2</i>	<i>Πείραμα 3</i>	
Χρόνος επώασης	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}	Μ.Ο. IC_{50} (μg/ml) (Mean \pm SD*)
24 ώρες	0,36	0,40	0,60	0,45 \pm 0,13

* μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (SD), όπως υπολογίστηκαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα συνάγεται το συμπέρασμα πως η κυτταρική σειρά L363 παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή στο φάρμακο (μεγαλύτερη ανθεκτικότητα) σε σχέση με την H929 εξαιτίας της διακριτής διαφοράς που υφίσταται ανάμεσα στις τιμές IC₅₀. Πιο συγκεκριμένα, η L363 έδωσε σχεδόν δεκαπλάσια IC₅₀. Η ανθεκτικότητα και η ευαισθησία στο BMF των κυτταρικών σειρών L363 και H929, αντίστοιχα, αποδίδεται στην υπεροχή της έκφρασης του BCMA στα κύτταρα της σειράς H929 (**Εικόνες 31,32**), και με αυτό τον τρόπο επισημαίνεται και η υψηλή ειδικότητα του φαρμάκου.

4.1.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ/ΝΕΚΡΩΤΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ L363 ΚΑΙ H929

Η εκτίμηση του αποπτωτικού θανάτου πραγματοποιήθηκε μέσω της χρώσης των κυττάρων με Αννεξίνη V και PI. Ως πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων χαρακτηρίζεται ο διπλά αρνητικός σημασμένος ως προς Αννεξίνη V και PI. Τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα είναι θετικά μόνο σε Αννεξίνη V, τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα αποτελούν τα διπλά θετικά σημασμένα κύτταρα και με τους δύο δείκτες, ενώ τέλος ο πληθυσμός των νεκρωτικών κυττάρων είναι τα θετικά μόνο ως προς τον δείκτη PI (**Εικόνα 35**).



ΕΙΚΟΝΑ 35: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ (L363 ΚΑΙ H9292) ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΑΠΟ ΤΟ BMF

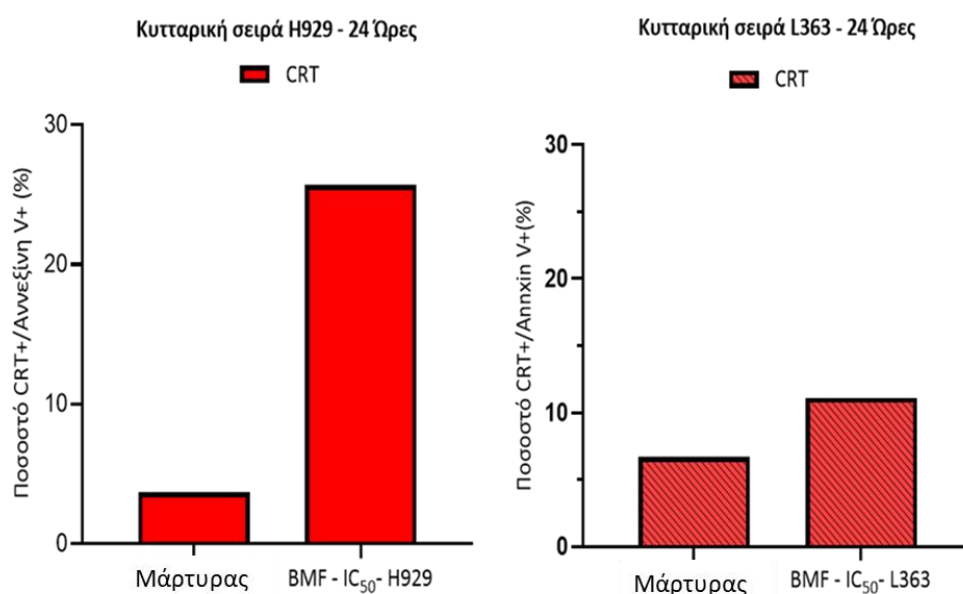
Καταγράφηκε μεγαλύτερο ποσοστό των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων της σειράς H929 σε σύγκριση με την L363 μετά την επώαση των κυττάρων με BMF, συγκέντρωσης ίσης με

την IC₅₀ για 24 ώρες. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην μεγαλύτερη έκφραση του δείκτη BCMA στην μυελωματική κυτταρική σειρά H929, επιβεβαιώνοντας την ευαισθησία των συγκεκριμένων κυττάρων στο φάρμακο.

4.1.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ CRT ΣΤΙΣ ΜΥΕΛΩΜΑΤΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ H929 ΚΑΙ L363 ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ BMF

Μετά την επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών με την αντίστοιχη IC₅₀ για την κάθε κυτταρική σειρά πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο της χρώσης των καρκινικών κυττάρων με CRT και Αννεξίνη V (Ενότητα 3.4.1). Ως αρνητικός μάρτυρας για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα της κάθε κυτταρικής σειράς τα οποία δεν επώαστηκαν με τον παράγοντα. Τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών αποθηκεύτηκαν στους -80 °C για τον μετέπειτα ποσοτικό προσδιορισμό της προΤα(100-109) και της HMGB1 μέσω ELISA.

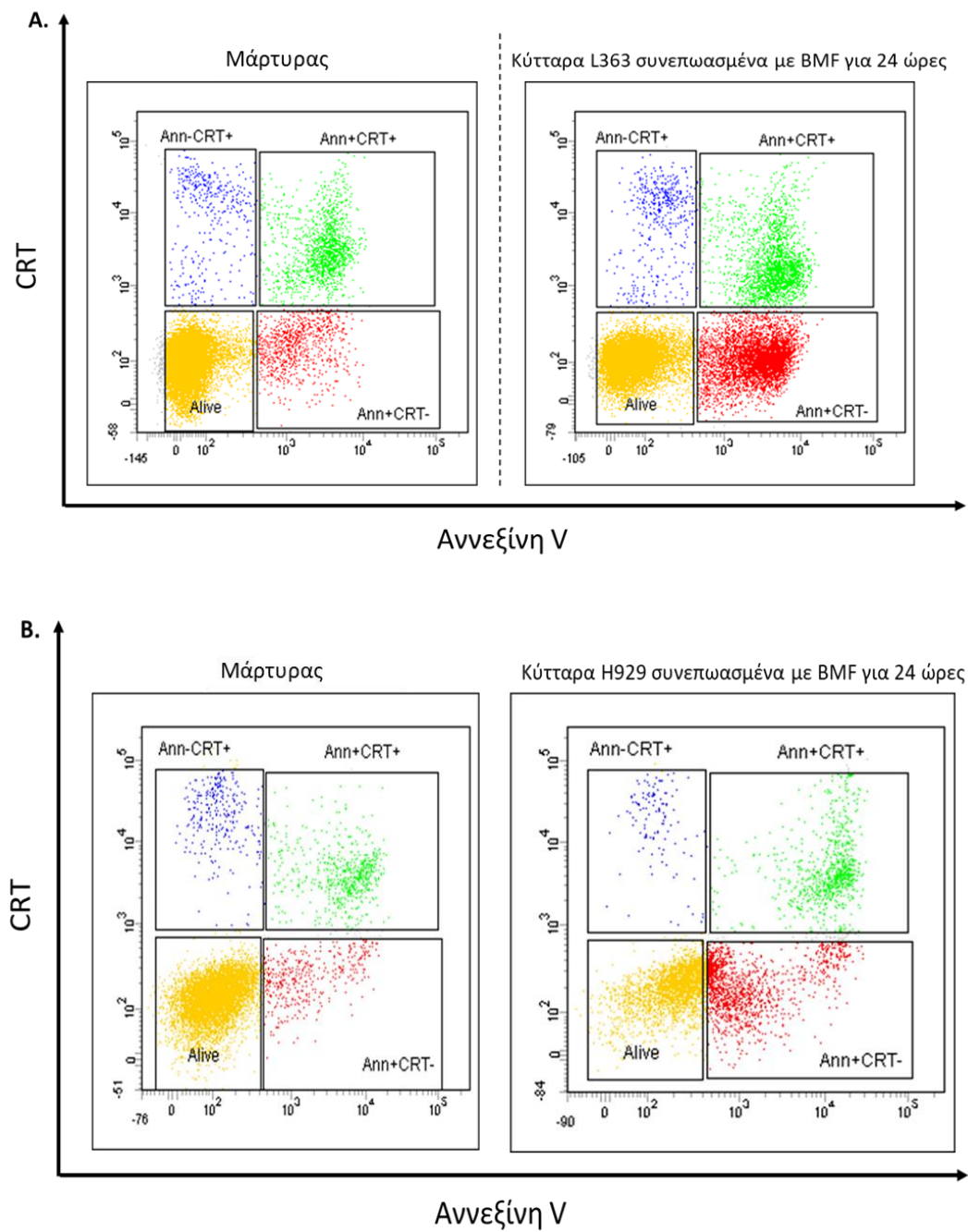
Από το κυτταρόμετρο ροής ανακτήθηκαν τα εξής αποτελέσματα (**Εικόνα 35**):



ΕΙΚΟΝΑ 35: ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΤΩΝ ΔΙΠΛΑ ΘΕΤΙΚΑ ΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ H929 (ΑΡΙΣΤΕΡΑ) ΚΑΙ ΤΗΣ L363 (ΔΕΞΙΑ) ΜΕ CRT ΚΑΙ ΑΝΝΕΞΙΝΗ V. ΩΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΕΠΩΑΣΤΗΚΑΝ ΜΕ BMF

Παρατηρείται πως το ποσοστό των διπλά θετικά σημασμένων κυττάρων (CRT/Αννεξίνη V) είναι περίπου 2,5 φορές υψηλότερο για την κυτταρική σειρά H929 σε σχέση με το

αντίστοιχο της L363. Επιπροσθέτως, παρατίθενται και τα ανάλογα σικτογράμματα για το κάθε πείραμα (Εικόνα 36).

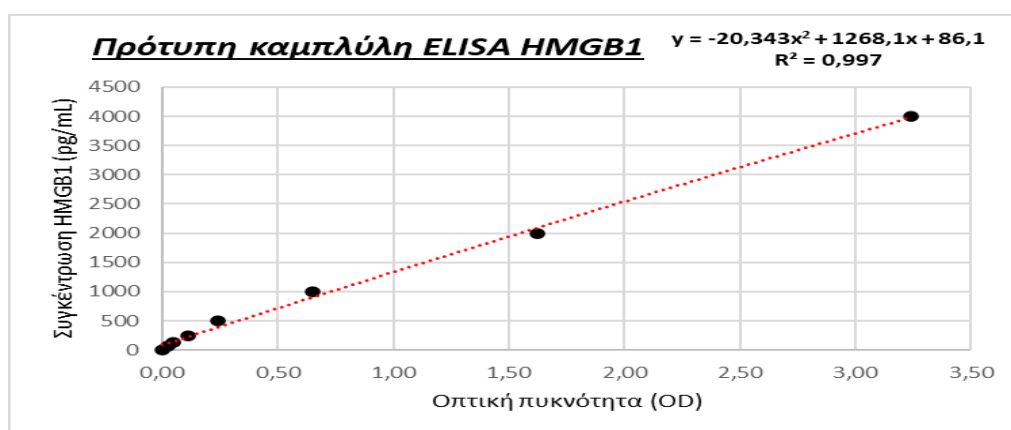


ΕΙΚΟΝΑ 36: ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΜΥΕΛΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ L363 (Α) ΚΑΙ H929 (Β) ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ 24 ΩΡΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΒΜΦ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΠΩΑΣΤΗΚΑΝ ΜΕ ΤΟ ΒΜΦ

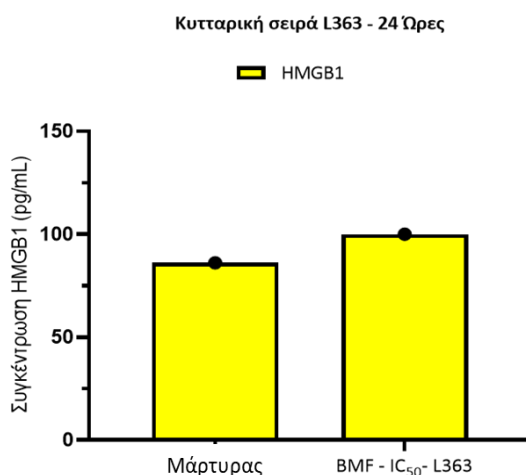
4.1.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΗΜGB1 ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ L363

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του αποπτωτικού βιοδείκτη ΗΜGB1 εκτιμήθηκαν σε υπερκείμενα καλλιιεργειών της κυτταρικής σειράς L363. Τα επίπεδα εκτιμήθηκαν με την βοήθεια εμπορικού kit ELISA. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης που παρατηρήθηκαν ανήκουν στην κλίμακα των πικογραμμαρίων (pg) και όσον αφορά την αύξηση της συγκέντρωσης δεν ήταν ιδιαίτερα αισθητή.

Παρατίθενται η πρότυπη καμπύλη του πειράματος, η οποία όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα (3.6) έχει εύρος 62,5-4.000 pg/mL (*Εικόνα 37*) και το γράφημα για τα επίπεδα της συγκέντρωσης του μορίου μετά την ανάλυση (*Εικόνα 38*).



ΕΙΚΟΝΑ 37: Η ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΗΜGB1 ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ L363

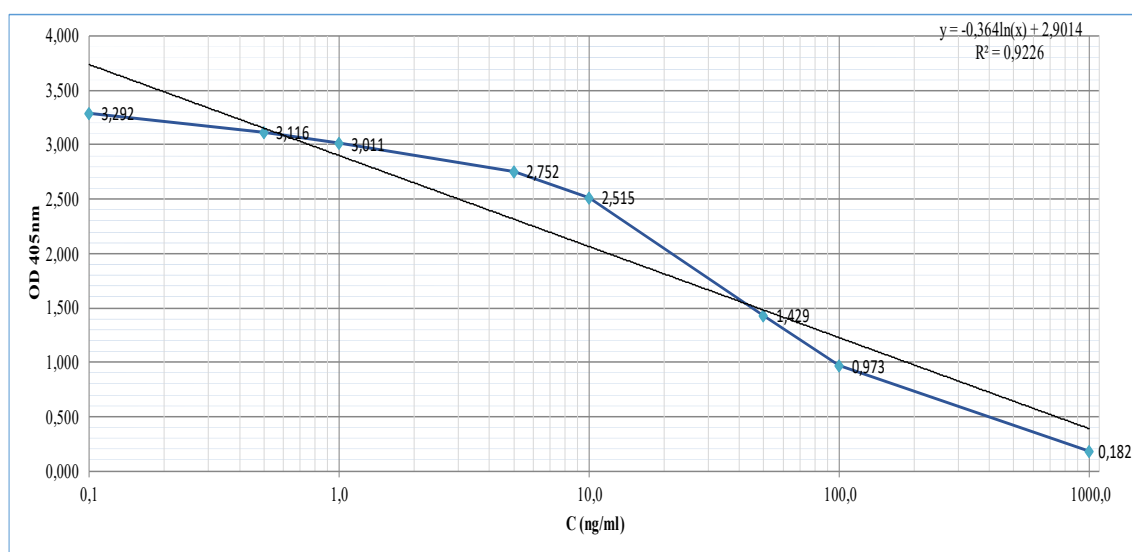


ΕΙΚΟΝΑ 38: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΗΜΒ1 ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΝ ΜΑΡΤΥΡΑ ΚΑΙ ΤΑ ΕΠΩΑΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΤΗΝ IC₅₀ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΒΜF

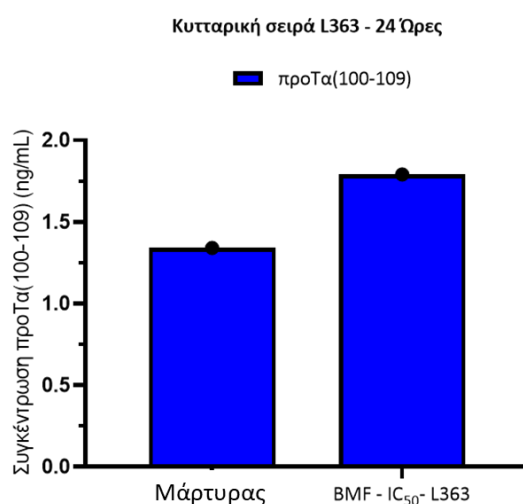
4.1.6 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΤα(100-109) ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ L363

Εν συνεχεία, μελετήθηκαν ξανά τα υπερκείμενα καλλιεργειών για την ανθρώπινη μυελωματική κυτταρική σειρά L363 ως προς την συγκέντρωση του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου προΤα(100-109) μέσω ανταγωνιστικού τύπου ELISA.

Ενδεικτικά και σε αυτή την περίπτωση παρατίθεται η καμπύλη του πειράματος (Εικόνα 40) και τα μετρηθέντα επίπεδα (Εικόνα 41).

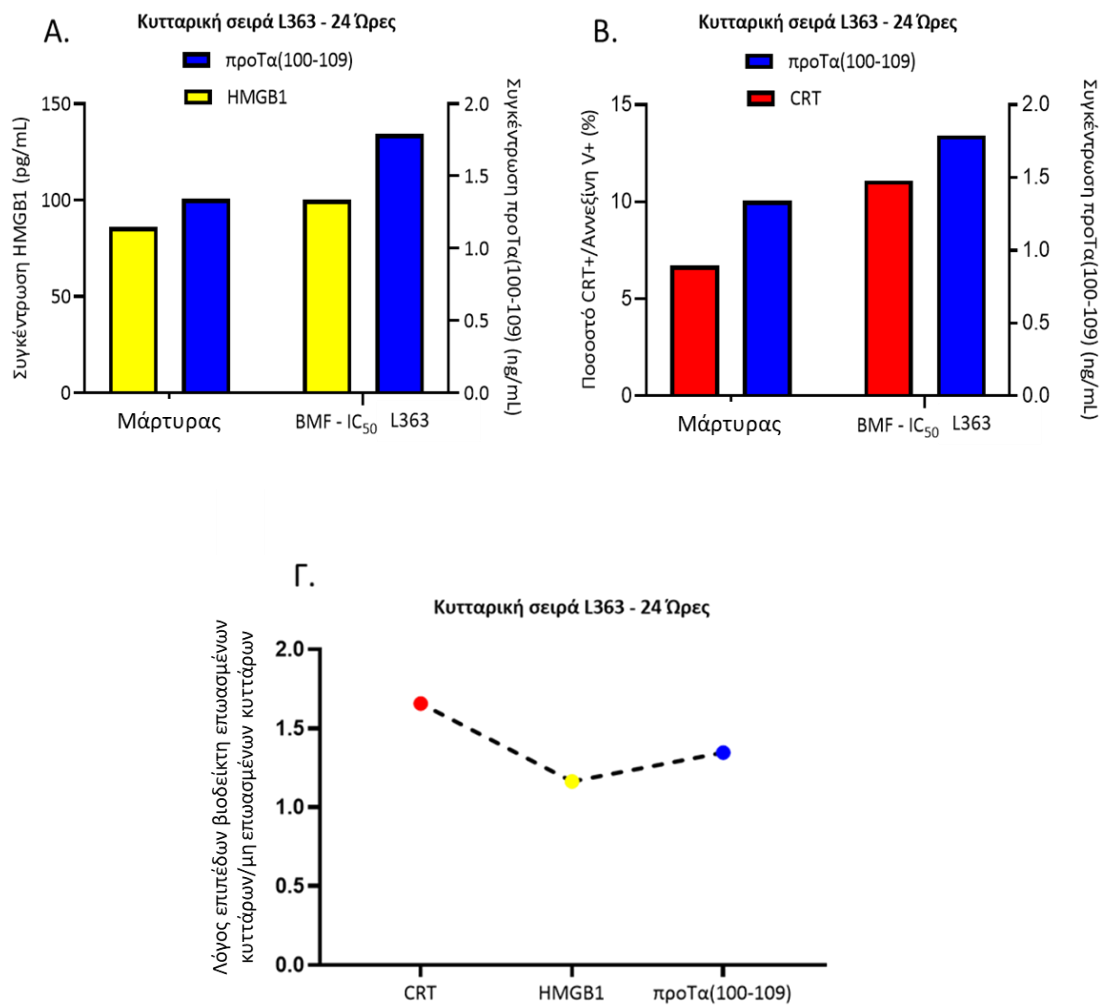


ΕΙΚΟΝΑ 40: ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ELISA ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ προΤα(100-109). Η ΚΑΜΠΥΛΗ ΣΧΕΔΙΑΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ EXCEL



ΕΙΚΟΝΑ 41: ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ L363 ΕΠΩΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΒΜF 24 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ ΜΑΡΤΥΡΑ. ΠΑΡΑΤΗΡΕΙΤΑΙ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΕΡΙΠΟΥ 1,5 ΦΟΡΕΣ

Σ' αυτό το σημείο, παρουσιάζονται σε δύο ξεχωριστά διαγράμματα η σύγκριση των επιπέδων των βιοδεικτών CRT και HMGB1 με το πεπτίδιο προΤα(100-109), καθώς και ο λόγος των επιπέδων του κάθε βιοδείκτη για τα επωασμένα κύτταρα προς τα αντίστοιχα των μη επωασμένων (**Εικόνα 42**). Στο τρίτο διάγραμμα (Γ) φαίνεται πως μεγαλύτερη διαφορά στον λόγο αποτυπώνεται στην περίπτωση της CRT μετά ακολουθεί το προΤα(100-109) και τέλος η HMGB1.



ΕΙΚΟΝΑ 42: (Α.) ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ HMGB1(ΑΡΙΣΤΕΡΟ ΚΑΘΕΤΟ ΑΞΟΝΑ) ΚΑΙ προΤα(100-109) (ΔΕΞΙΟ ΚΑΘΕΤΟ ΑΞΟΝΑ). (Β.) ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRT ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ προΤα(100-109). (Γ.) ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΛΟΓΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ΚΑΘΕ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΣΥΝΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΤΟ ΒΜΦ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ

4.2 *Ex vivo* ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

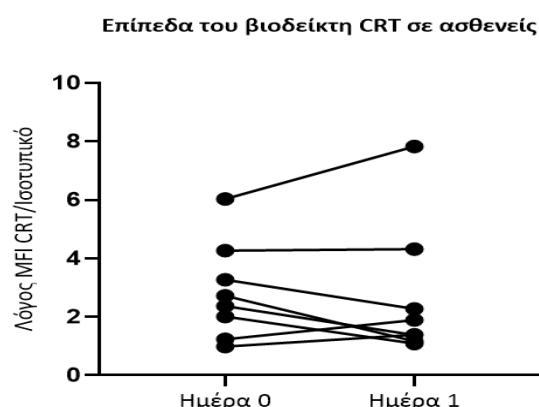
4.2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ CRT ΣΕ ΚΛΩΝΙΚΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΜ

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα του σκοπού, ένας από τους κύριους στόχους της συγκεκριμένης μελέτης αποτέλεσε η ανίχνευση και η παρατήρηση της αύξησης των επιπέδων του πρώιμου αποπτωτικού βιοδείκτη CRT σε κλωνικά πλασματοκύτταρα στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ πριν και 24 ώρες μετά την χορήγηση της θεραπείας με BMF.

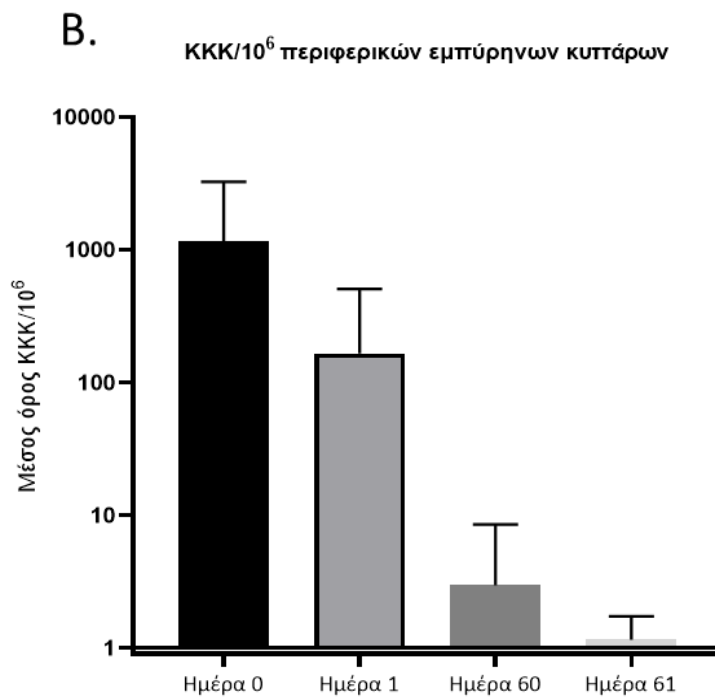
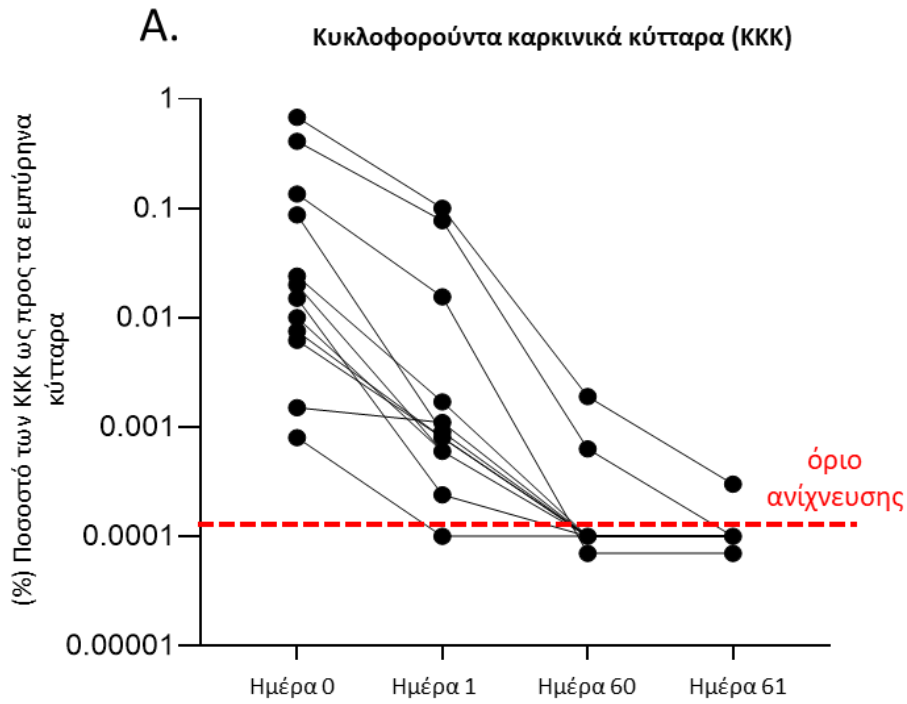
Για την επίτευξη του ανωτέρω, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής και συγκρίθηκαν τα MFI του βιοδείκτη CRT στο κάθε χρονικό σημείο (time point) για τον κάθε ασθενή ξεχωριστά.

Παράλληλα μελετήθηκε και η τάση των υπόλοιπων υποπληθυσμών (B κύτταρα, T κύτταρα, NK κύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα), καθώς και του αριθμού/ποσοστού των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (ΚΚΚ) για τον κάθε ασθενή και στους δύο κύκλους θεραπείας.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται ως προς την έκφραση της CRT, αφορούν τους ασθενείς που εμφάνισαν επαρκή αριθμό κακοηθών πλασματοκυττάρων πριν και 24 ώρες μετά την θεραπεία, ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη αξιοπιστία (**Εικόνα 43**).



ΕΙΚΟΝΑ 43: ΣΤΗΝ ΕΙΚΟΝΑ ΑΠΟΤΥΠΩΝΕΤΑΙ Η ΤΑΣΗ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΜFI ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CRT ΚΑΙ ΤΟΥ ΙΣΟΤΥΠΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ (ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΩΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ). ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ Χ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ, ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ Η ΗΜΕΡΑ 0 ΑΦΟΡΑ ΤΟ ΣΗΜΕΙΟ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ Η ΗΜΕΡΑ 1 ΑΦΟΡΑ ΤΟ ΣΗΜΕΙΟ ΤΩΝ 24 ΩΡΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΟΥ ΒΜΦ. ΚΑΘΕ ΣΗΜΕΙΟ ΑΦΟΡΑ ΕΝΑΝ ΑΣΘΕΝΗ ΚΑΙ ΟΙ ΓΡΑΜΜΕΣ ΣΥΝΔΕΟΥΝ ΤΑ ΔΙΑΔΟΧΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΙΔΙΟΥ ΑΣΘΕΝΟΥΣ



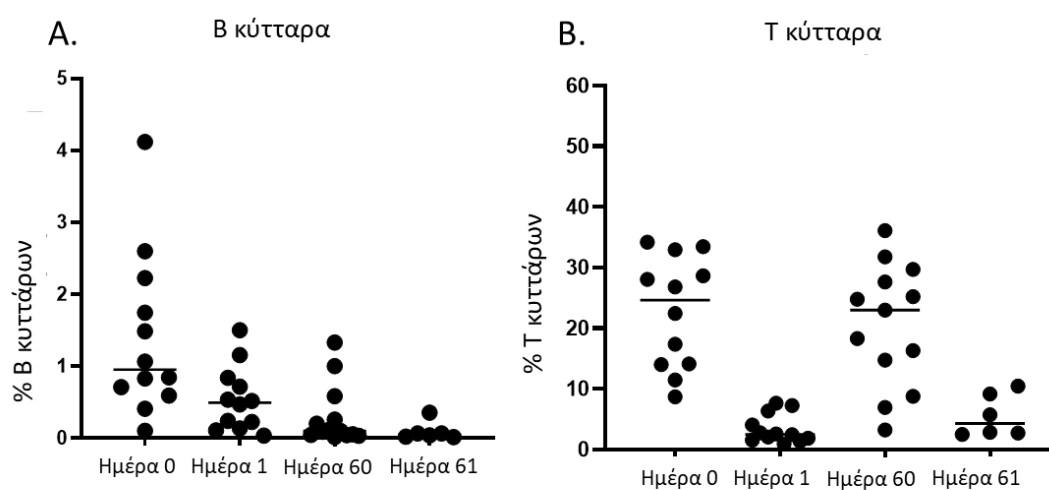
ΕΙΚΟΝΑ 44: Α) ΠΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ ΤΕΣΣΕΡΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΕ ΑΣΘΕΝΗ. ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ Υ ΑΝΑΠΑΡΙΣΤΑΤΑΙ ΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΩΝ ΕΜΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ. Β) ΣΤΟ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΓΡΑΦΗΜΑ ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ Υ ΑΝΑΠΑΡΙΣΤΑΤΑΙ Ο ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΝΑ ΕΚΑΤΟΜΜΥΡΙΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ Χ ΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ. ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΑΠΟ N= 12 ΑΣΘΕΝΕΙΣ.

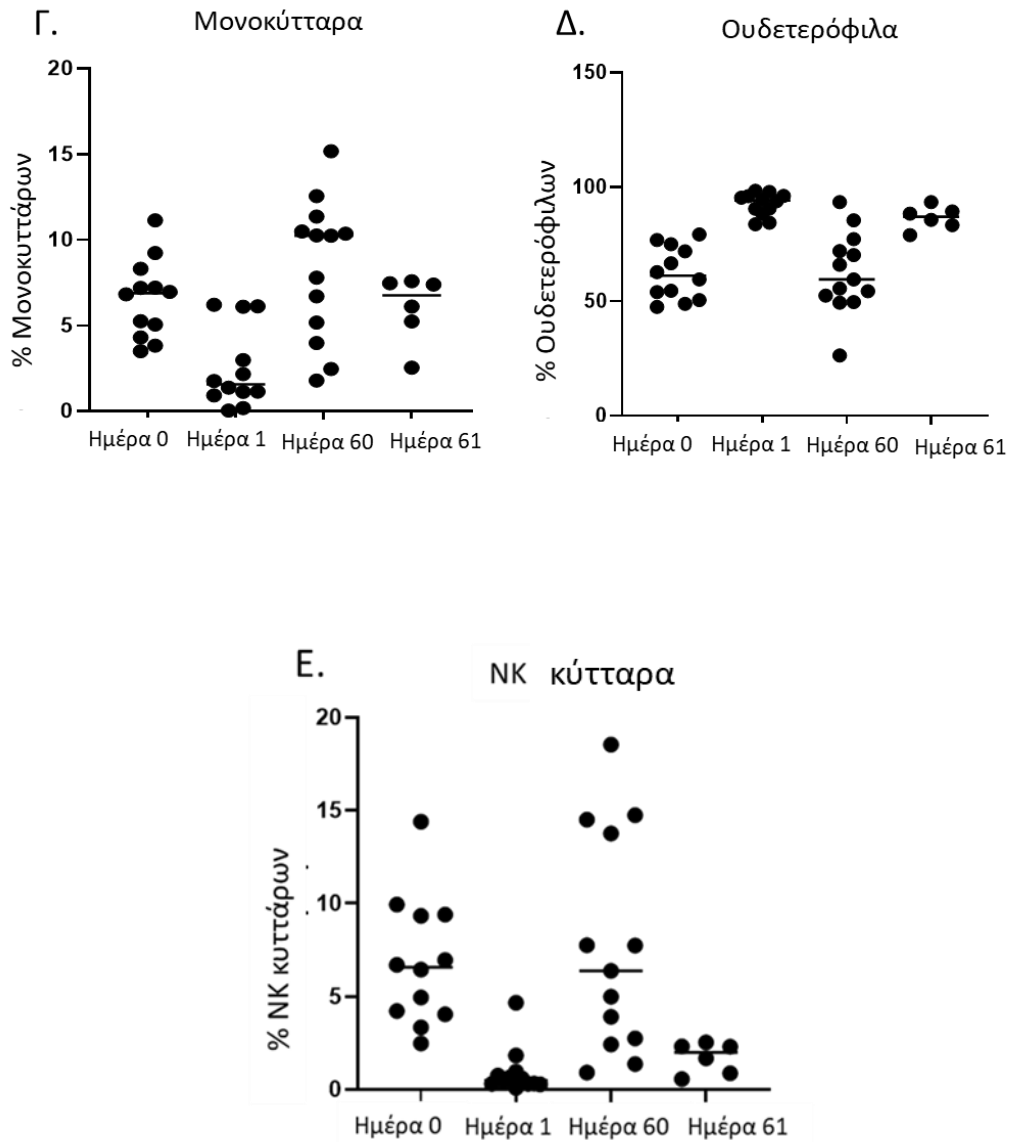
4.2.1.1 Εκτίμηση του ποσοστού των υποπληθυσμών για τους ασθενείς πριν και 24 ώρες μετά την θεραπεία με BMF

Μέσω του πάνελ που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο της κατεργασίας του δείγματος (Ενότητα 3.4.2.1) κάθε ασθενούς για την ανίχνευση της CRT απομονώθηκαν πέντε ακόμα υποπληθυσμοί όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα (4.2.1).

Πιο αναλυτικά, για την απομόνωση αξιοποιήθηκαν οι εξής πληροφορίες:

- Τα B κύτταρα είναι θετικά ως προς τον δείκτη CD19
- Τα T κύτταρα είναι θετικά ως προς τον δείκτη CD45 και αρνητικά στο CD19
- Τα NK κύτταρα είναι θετικά ως προς τον δείκτη CD56
- Τα μονοκύτταρα είναι θετικά ως προς τον δείκτη CD45 και τον CD38
- Τα ουδετερόφιλα εμφανίζουν ενδιάμεση ένταση (dim) ως προς τον δείκτη CD45

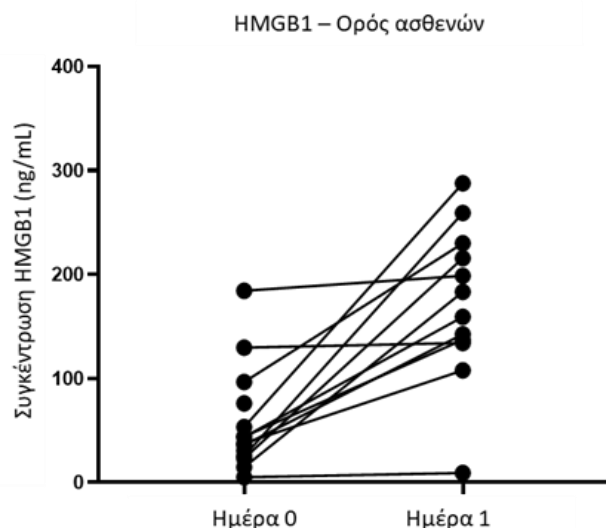




ΕΙΚΟΝΑ 45: ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΣΟΣΤΩΝ ΓΙΑ ΠΕΝΤΕ ΞΕΧΩΡΙΣΤΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΑ ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΕΜΠΥΡΗΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ. ΣΤΑ Β ΚΥΤΤΑΡΑ (Α), ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΗΚΕ ΡΑΓΔΑΙΑ ΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΤΟ ΓΕΓΟΝΟΣ ΑΥΤΟ ΔΙΚΑΙΟΛΟΓΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΒCΜΑ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ. ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΩΝ Τ, ΝΚ ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (Β, Ε, Γ) ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΗΚΕ ΠΤΩΣΗ 24 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΟΣΗ, ΩΣΤΟΣΟ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΟΣΗ ΥΠΗΡΞΕ ΕΜΦΑΝΗΣ ΑΝΑΚΑΜΨΗ ΤΩΝ ΠΟΣΟΣΤΩΝ. Η ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΒΜΦ ΔΕΝ ΦΑΝΗΚΕ ΝΑ ΕΧΕΙ ΚΑΠΟΙΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ (Δ). ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΗΜΕΡΑΣ 30 ΔΕΝ ΣΥΜΠΕΡΙΛΗΦΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΣΩ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΑΥΤΟ ΔΕΝ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ

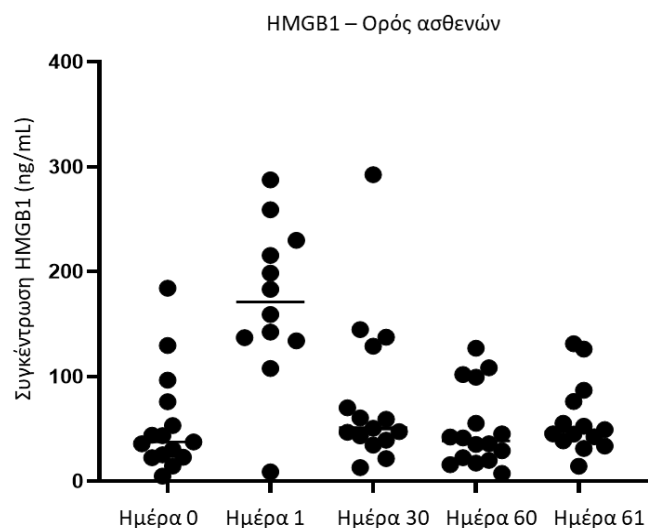
4.2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΗΜGB1 ΣΕ ΟΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΜ

Η συγκέντρωση του DAMP ΗΜGB1 παρατηρείται πως αυξάνεται 24 ώρες μετά την πρώτη δόση για την πλειονότητα των ασθενών, επιβεβαιώνοντας με αυτό τον τρόπο την επαγωγή του ICD (**Εικόνα 46**).



ΕΙΚΟΝΑ 46: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΗΜGB1 ΠΡΙΝ ΚΑΙ 24 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΟΥ ΒΜΦ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΩΤΟ ΚΥΚΛΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Παρατίθενται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα για τα 5 χρονικά σημεία που μελετήθηκαν για όλους τους ασθενείς (**Εικόνα 47**).

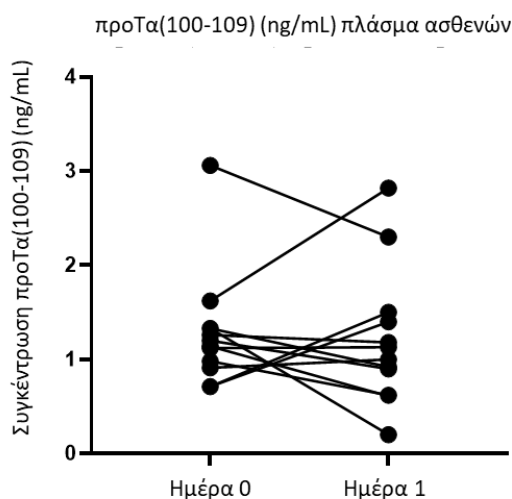


ΕΙΚΟΝΑ 47: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΗΜGB1 ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ, ΔΗΛΑΔΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΔΥΟ ΚΥΚΛΟΥΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΟ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ ΣΗΜΕΙΟ (ΗΜΕΡΑ 30)

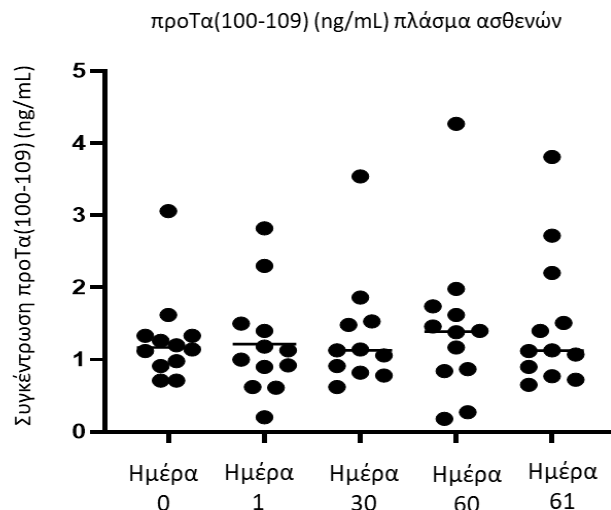
Είναι αρκετά ξεκάθαρη η ανοδική τάση του βιοδείκτη στον πρώτο κύκλο θεραπείας 24 ώρες μετά την χορήγηση BMF, με των μέσο όρο των τιμών για την Ημέρα 1 να αγγίζει τα 200 ng/mL. Παράλληλα παρατηρείται πτώση των συγκεντρώσεων στο ενδιάμεσο σημείο και ξανά αύξηση, μικρότερου βεληνεκούς μετά την δεύτερη δόση. Σ' αυτό το σημείο πρέπει να επισημανθεί πως, ιδιαίτερα στο δεύτερο κύκλο θεραπείας η πλειονότητα των ασθενών παρουσίασε ελάχιστα ΚΚΚ λόγω της υψηλής τοξικότητας του φαρμάκου και με αυτό τον τρόπο εξηγείται η μικρή εναλλαγή τιμών από την Ημέρα 60 στην Ημέρα 61.

4.2.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΤα(100-109) ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΜ

Η προΤα(100-109) ποσοτικοποιήθηκε στα δείγματα ασθενών μέσω ανταγωνιστικού τύπου ELISA. Παρόλο που η αύξηση των επιπέδων για το πεπτιδίο δεν είναι ίδια με την αντίστοιχη περίπτωση της HMGB1, αξίζει να επισημανθεί πως παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου στον πρώτο κύκλο θεραπείας για αρκετούς ασθενείς (**Εικόνα 48**).



ΕΙΚΟΝΑ 48: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤα(100-109) ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΜ ΣΤΟΝ ΠΡΩΤΟ ΚΥΚΛΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΜΕ ΒΜΦ ΠΡΙΝ (ΗΜΕΡΑ 0) ΚΑΙ 24 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ (ΗΜΕΡΑ 1) ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ



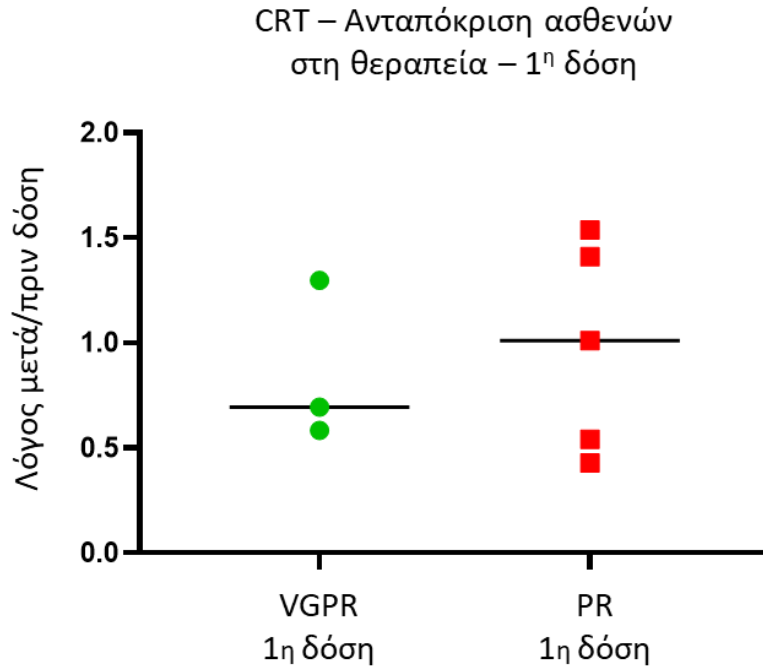
ΕΙΚΟΝΑ 49: ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΕ ΑΣΘΕΝΗ

4.2.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΒΜΦ ΚΑΙ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ICD

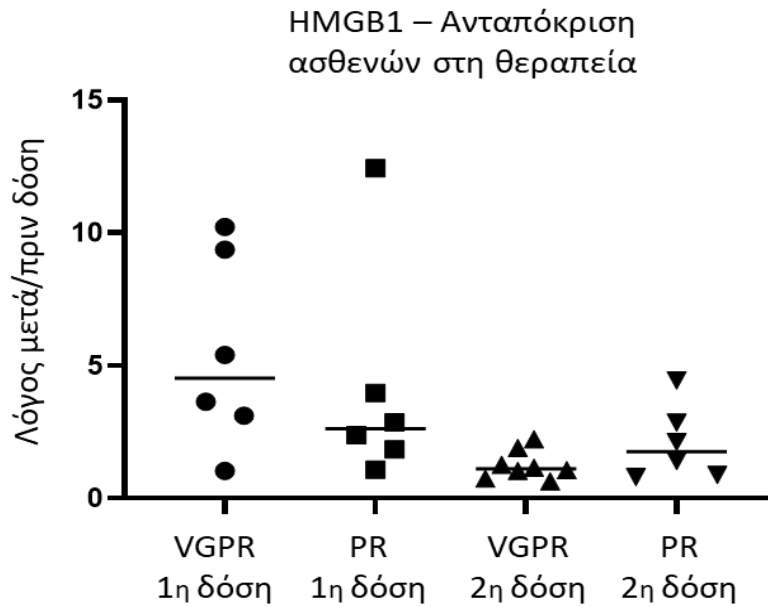
Συνολικά ανακτήθηκαν δείγματα 17 ασθενών αλλά αναλύθηκαν και παρουσιάστηκαν δείγματα 12 ασθενών με συμπληρωμένα όλα τα χρονικά σημεία της μελέτης (Ημέρα 0/1/30/60/61). Από όλους τους ασθενείς (17) μόνο ένας εμφάνισε πλήρη ύφεση των συμπτωμάτων τρεις μήνες μετά την θεραπεία και η ανταπόκρισή του χαρακτηρίστηκε ως πλήρης ανταπόκριση (CR) ωστόσο δεν υπήρχε διαθέσιμο δείγμα από όλα τα προκαθορισμένα χρονικά σημεία, ως εκ τούτου δεν συμπεριλήφθηκε στα αποτελέσματα.

Η ανταπόκριση των 6 από τους 12 ασθενείς χαρακτηρίστηκε ως πολύ καλή μερική ανταπόκριση (VGPR), ενώ για τους υπόλοιπους 6 ως μερική ανταπόκριση (PR). Προκειμένου να επιτευχθεί η συσχέτιση της ανταπόκρισης των ασθενών στην θεραπεία με την επαγωγή ICD και σε μετέπειτα στάδιο με την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου υπολογίστηκε ο λόγος των τιμών για τον κάθε βιοδείκτη που μελετήθηκε (CRT, HMGB1, προΤα(100-109) μετά και πριν τη χορήγηση κάθε δόσης.

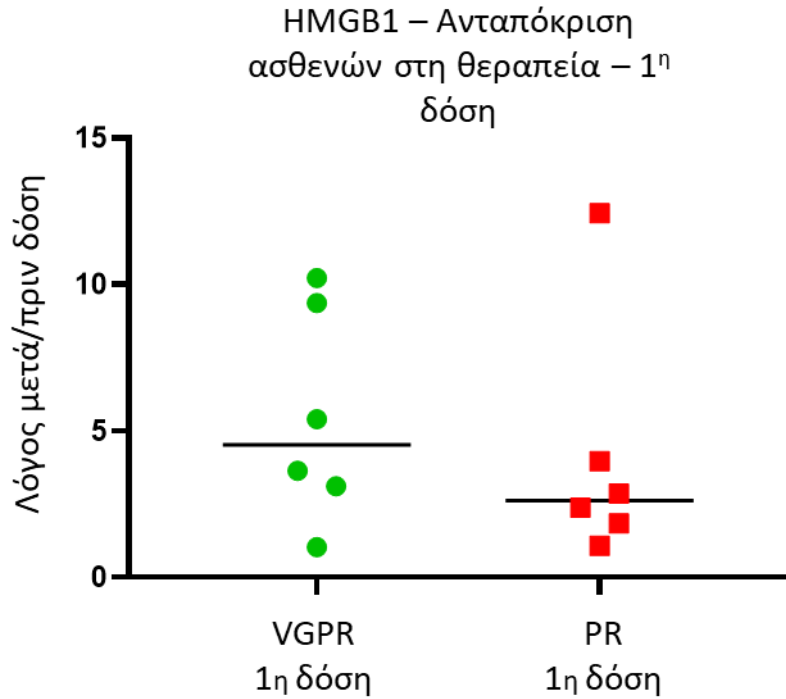
Κάτωθι παρατίθενται με την σειρά τα αποτελέσματα για τον κάθε βιοδείκτη που μελετήθηκε (*Εικόνες 50, 51, 52, 53, 54*). Στην περίπτωση της CRT μελετήθηκε μόνο ο πρώτος κύκλος θεραπείας καθώς η εξάλειψη του αριθμού των ΚΚΚ κατέστησε αδύνατη την μελέτη του συγκεκριμένου βιοδείκτη στα υπόλοιπα χρονικά σημεία.



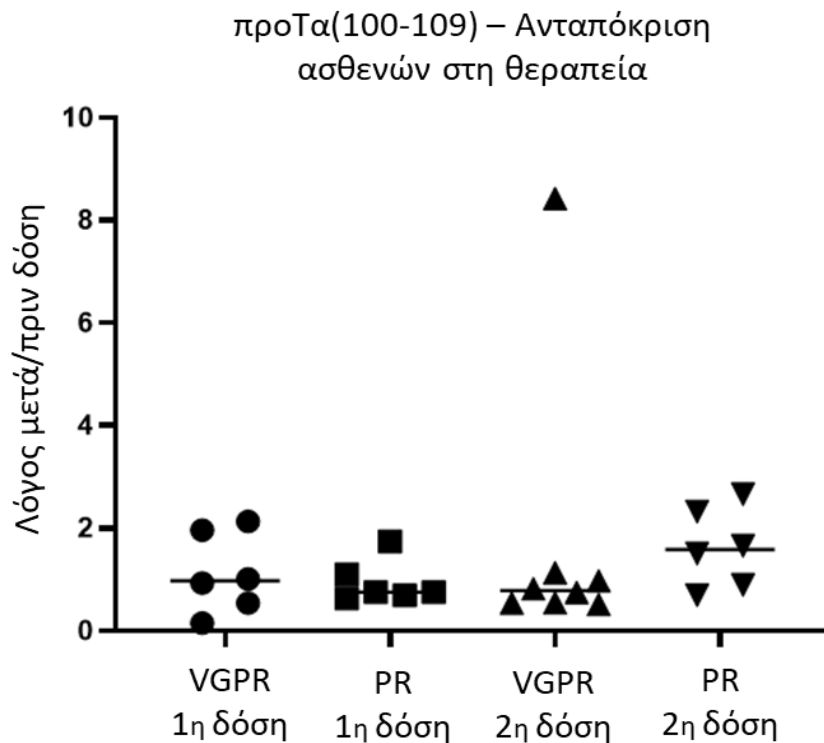
ΕΙΚΟΝΑ 50: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΤΟΥ ΜΦΙ ΓΙΑ ΤΗΝ CRT ΜΕΤΑ ΠΡΟΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΔΟΣΗ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ.



ΕΙΚΟΝΑ 51: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΗΜGB1 ΜΕΤΑ ΠΡΟΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΔΟΣΗ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΔΥΟ ΚΥΚΛΟΥΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.

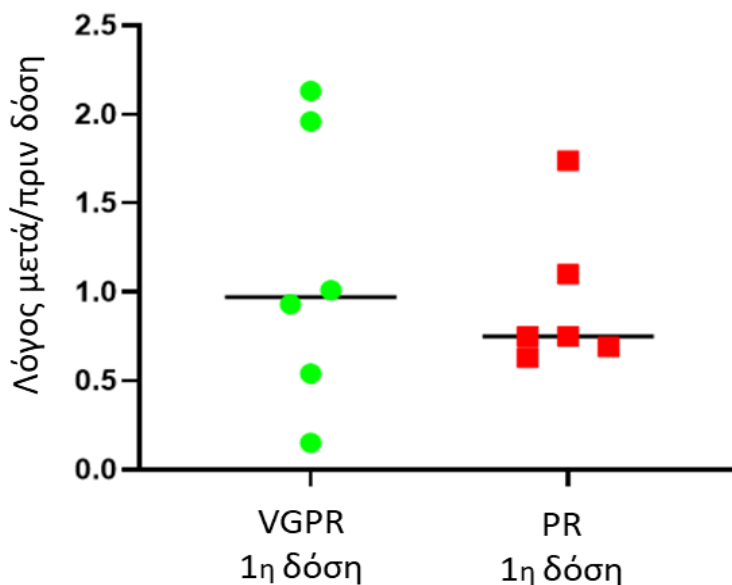


ΕΙΚΟΝΑ 52: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΗΜGB1 ΜΕΤΑ ΠΡΟΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΔΟΣΗ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΩΤΟ ΚΥΚΛΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.



ΕΙΚΟΝΑ 53: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ προΤα(100-109) ΜΕΤΑ ΠΡΟΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΔΟΣΗ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΔΥΟ ΚΥΚΛΟΥΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.

προΤα(100-109) – Ανταπόκριση
ασθενών στη θεραπεία – 1^η δόση



ΕΙΚΟΝΑ 54: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ προΤα(100-109) ΜΕΤΑ ΠΡΟΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΔΟΣΗ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΩΤΟ ΚΥΚΛΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.

Τόσο στην **εικόνα 52** όσο και στην **εικόνα 54** παρατηρείται πως ο μέσος όρος των λόγων για τους ασθενείς με ανταπόκριση που χαρακτηρίστηκαν ως VGPR ήταν εμφανώς μεγαλύτερος από τον μέσο όρο των λόγων των ασθενών με ανταπόκριση PR. Η συγκεκριμένη παρατήρηση υποδεικνύει μια πιθανή συσχέτιση της επαγωγής του ICD και της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία και πιο συγκεκριμένα στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Ωστόσο, κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση της CRT και αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Επιπροσθέτως, αξίζει να σημειωθεί πως η υψηλή δραστικότητα του BMF έναντι των παθολογικών πλασματοκυττάρων μπορεί να οδήγησε τα λίγα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα ορισμένων ασθενών να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στο φάρμακο, γεγονός που δυσκόλεψε ακόμα περισσότερο την μελέτη της CRT στην επιφάνεια των κακοηθών πλασματοκυττάρων.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ΠΜ είναι μια συχνή πλασματοκυτταρική δυσκρασία η οποία εμφανίζεται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο ηλικίας. Γενικότερα θεωρείται ένα ανιάτο κακοήθες νεόπλασμα με αποτέλεσμα να επιτελείται μια διαρκής αναζήτηση φαρμακευτικών εργαλείων με στόχο να συμβάλλουν εποικοδομητικά στην θεραπεία της νόσου και να συμπληρώσουν το ήδη υπάρχον οπλοστάσιο των κλινικών γιατρών για την αντιμετώπιση της συγκεκριμένης νόσου.

Οι αναδυόμενες θεραπείες δεν σταματούν να απασχολούν την επιστημονική κοινότητα η οποία εστιάζει στην περαιτέρω ανάλυση και μελέτη των εν λόγω θεραπευτικών προσεγγίσεων, ώστε να διασφαλιστεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά τους. Ένα πολύ πρόσφατο παράδειγμα αποτελεί το χημειοθεραπευτικό φάρμακο BMF, για το οποίο δόθηκε έγκριση τον Αύγουστο του 2020. Το BMF συγκεντρώνει αρκετά αξιολογικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν θετικά στην αντιμετώπιση της νόσου. Εκτός από την ειδικότητα που το χαρακτηρίζει, καθώς μιλάμε για ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τον δείκτη BCMA, μία πρωτεΐνη η οποία φαίνεται να υπερεκφράζεται στην επιφάνεια των κακοηθών πλασματοκυττάρων **(27)**, αναφέρεται πως ένας από τους μηχανισμούς δράσης του είναι η επαγωγή ICD, το οποίο επισημαίνεται από διάφορες μελέτες **(45, 49, 68)**.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται η ραγδαία ανάπτυξη θεραπειών παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, με πολυάριθμες ερευνητικές και κλινικές μελέτες να εστιάζουν στην θετική εμπλοκή της επαγωγής του ICD στην αντικαρκινική θεραπεία μέσω των ανοσοβιολογικών ιδιοτήτων που τον χαρακτηρίζουν. Στην επαγωγή του ICD συμμετέχουν διάφοροι τύποι κυττάρων που αφορούν ως επί το πλείστον το ανοσοποιητικό σύστημα με καταληκτική διεργασία την ενεργοποίηση ειδικών T κυττάρων έναντι του όγκου. Ωστόσο προαπαιτούμενα της τελικής αυτής διεργασίας φαίνεται να αποτελούν η ωρίμανση των APCs του οργανισμού και κυρίως των δενδριτικών κυττάρων μετά την έκθεση σε DAMPs καθώς και η αντιγονοπαρουσίαση των καρκινικών αντιγόνων από τα APCs.

Η προΤα αποτελεί από τα κυριότερα ενεργά συστατικά του κλάσματος TFV με ιδιαίτερα χαμηλό pI και απαντάται σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών. Εδράζεται στον πυρήνα και συναντάται σε αφθονία στα κύτταρα του θύμου αδένος. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 109-110 αμινοξικά κατάλοιπα στον άνθρωπο και επιτελεί κρίσιμο ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό ρόλο. Εξωκυτταρικά το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, το προΤα(100-109), συμμετέχει σε καταστάσεις κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας με προϋπόθεση αυτής της κατάστασης να αποτελεί η αποκοπή του καρβοξυτελικού άκρου του μορίου της προΤα από την κασπάση 3 και 7. Ενδοκυτταρικά, η ακέραιη προΤα εμπλέκεται

σε διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση αποτελώντας κομβικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την επιβίωση του κυττάρου.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω είναι εύκολο να θεωρηθεί πως η προΤα και το προΤα(100-109) πληρούν όλες τις προϋποθέσεις οι οποίες δικαιολογούν την ανοσοενισχυτική τους δράση και παράλληλα μπορούν να θεωρηθούν πως συγκαταλέγονται στα DAMPs μόρια. Επιπλέον, έχει δειχθεί από *in vitro* πειράματα η συσχέτιση του προΤα(100-109) με την επαγωγή του ICD καθώς στην μυελωματική κυτταρική σειρά H929 παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της συγκέντρωσης του πεπτιδίου μετά την επώασή της με διάφορες συγκεντρώσεις των θεραπευτικών παραγόντων δοξορουβικίνη και βορτεζομίμη (**8**). Αναλυτικότερα η βορτεζομίμη αποτελεί επαγωγέα ICD τύπου I.

Δεδομένου της παραπάνω θεώρησης θελήσαμε να διερευνήσουμε τη δυνατότητα της χρήσης του προΤα(100-109) ως ενός εν δυνάμει βιοδείκτη ICD και κατά συνέπεια, την ανάδειξη της προβλεπτικής αξίας του μορίου κατά την αντικαρκινική θεραπεία σε ασθενείς με ΠΜ μετά από χορήγηση με BMF.

Για την ανάλυση και την μελέτη των ανωτέρω διεκπεραιώθηκε μια σειρά από *ex vivo* και *in vitro* πειράματα. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε:

- *In vitro* μελέτη της έκφρασης του δείκτη CRT σε δύο κυτταρικές σειρές με διαφορετική έκφραση του δείκτη BCMA καθώς και ποσοτική ανίχνευση των μορίων HMGB1 και προΤα (100-109) στην κυτταρική σειρά L363 μετά την επώαση με τον θεραπευτικό παράγοντα BMF.
- *Ex vivo* μελέτη των βιοδεικτών CRT, HMGB1 και προΤα (100-109) σε ασθενείς με ΠΜ πριν και μετά την χορήγηση BMF σε δύο κύκλους θεραπείας καθώς και σε ένα ενδιάμεσο σημείο μεταξύ των δύο κύκλων.

Από τα αποτελέσματα των παραπάνω *in vitro* πειραμάτων αφού πρώτα εξακριβώθηκε η διαφορετική έκφραση του δείκτη BCMA στις δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, αποδείχθηκε η επαγωγή του ICD μετά την επώαση τους με τον παράγοντα BMF μέσω της έκφρασης του καθιερωμένου πλέον προ-αποπτωτικού δείκτη CRT και στις δύο κυτταρικές σειρές. Παράλληλα βρέθηκε αύξηση των επιπέδων συγκέντρωσης τόσο του μορίου HMGB1 όσο και του προΤα(100-109) στην κυτταρική σειρά L363 μετά την δράση του BMF. Το

τελευταίο αποτέλεσμα ουσιαστικά επιβεβαιώνει για ακόμα μια φορά την θεώρηση πως το προΤα(100-109) μπορεί να θεωρηθεί DAMP μόριο.

Από την άλλη στα *ex vivo* αποτελέσματα συμπεραίνεται πως η κυτταροτοξικότητα του BMF μπορεί να φανεί και σε άλλους τύπους κυττάρων εκτός από τα κακοήθη πλασματοκύτταρα. Το συγκεκριμένο επισημαίνεται από την ραγδαία πτώση των άλλων πληθυσμών πέρα από τα ΚΚΚ σε όλους τους ασθενείς μόλις 24 ώρες μετά την χορήγηση του φαρμάκου. Παράλληλα επιβεβαιώθηκε και σ' αυτήν την περίπτωση η επαγωγή του ICD εξαιτίας της ανοδικής τάσης των επιπέδων κυρίως της HMGB1 24 ώρες μετά την δράση του BMF. Ακόμα και στην περίπτωση της προΤα(100-109) είχαμε αυξημένα επίπεδα σε αρκετούς ασθενείς αλλά όχι στα ίδια επίπεδα με την HMGB1.

Επιπροσθέτως, σε μια εκτενής *in vitro* και *in vivo* μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την Rocío Montes de Oca και την ομάδα της **(45)** εξακριβώθηκε η επαγωγή ICD σε μυελωματικές κυτταρικές σειρές καθώς και σε ζωντανούς ποντικούς μετά τον «εμβολιασμό» τους με την καρκινική κυτταρική σειρά EL4, στην οποία πραγματοποιήθηκε έκφραση ανθρώπινης πρωτεΐνης BCMA (hBCMA) μετά από γενετικό μετασχηματισμό. Πιο συγκεκριμένα, για να μπορέσουν να αξιολογήσουν την ανοτροποιητική δράση του BMF πραγματοποιήθηκε συνεπώαση προ-επωασμένων με BMF κυττάρων της σειράς H929 με ανώριμα DCs, τα οποία συλλέχθηκαν από τρεις υγιείς δότες. Η διάκριση των ώριμων DCs από τα H929 μετά την δράση 24 ωρών του BMF πραγματοποιήθηκε μέσω των δεικτών CD11c και HLA-DR η έκφραση των οποίων ήταν εμφανώς μικρότερη στην περίπτωση των H929 σε σχέση με τα ώριμα DCs. Η ωρίμανση των DCs σ' αυτό το χρονικό διάστημα (24 ώρες) σε συνδυασμό με την ανίχνευση των βιοδεικτών στην περίπτωση των ασθενών της παρούσας εργασία συνηγορούν στην επαγωγή του ICD.

Επίσης, στην παραπάνω μελέτη, όπως αναφέρθηκε, μελετήθηκε η έκφραση του βιοδείκτη CRT και η έκκριση της HMGB1 στην κυτταρική σειρά H929. Αναλυτικότερα, η έκφραση της CRT στα καρκινικά κύτταρα μετά την επώασή τους με BMF 48 ώρες μετά ανέρχεται στα επίπεδα του 20-30%. Στα δικά μας πειράματα που η δράση του φαρμάκου παρατηρήθηκε για 24 ώρες και τα επίπεδα του μορίου άγγιξαν περίπου το 22%. Από την άλλη, εμφανής ήταν η διαφορά στα επίπεδα του μορίου της HMGB1 καθώς στα πειράματα της Rocío Montes de Oca και την ομάδα της τα επίπεδα του βιοδείκτη ανέρχονται στα 8 ng/mL 48 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με BMF, στα δικά μας πειράματα μετά από 24 ώρες τα επίπεδα έφτασαν τα 100 pg/mL, η συγκεκριμένη διαφορά πιθανότητα να αποδίδεται στον χρόνο επώασης ή ακόμα και στην εκάστοτε κυτταρική σειρά που

χρησιμοποιήθηκε. Ωστόσο, μεγαλύτερα επίπεδα παρατηρήθηκαν στην περίπτωση της προΤα(100-109) στα δικά μας πειράματα σε σχέση με την HMGB1 στο *in vitro* κομμάτι.

Επιπλέον, παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση της έκφραση του BCMA στην επιφάνεια της σειράς H929 καθώς στα πειράματα της έρευνας που εξετάζεται, η MFI βρέθηκε μεταξύ των τιμών 10^4 - 10^5 ενώ στα δικά μας πειράματα άγγιξε το 10^4 . Στην περίπτωση των ποντικών η χορήγηση του BMF φάνηκε να οδηγεί στην μείωση του όγκου και στην βελτίωση του ποσοστού επιβίωσης ενώ στα δικά μας αποτελέσματα παρατηρήθηκε ραγδαία πτώση των ΚΚΚ στο περιφερικό αίμα των ασθενών και ύφεση των συμπτωμάτων της νόσου μετά από τρεις μήνες από την θεραπεία.

Εν κατακλείδι, μετά την σύγκριση της ανταπόκρισης των ασθενών στην θεραπεία και των επιπέδων ICD τόσο στην περίπτωση της προΤα(100-109) όσο και στην περίπτωση της HMGB1 μπορούμε να πούμε πως πρώτον υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο μεταβλητών και ως εκ τούτου ο ICD φαίνεται να παίζει καίριο ρόλο στην αποτελεσματικότητα που επιφέρει το BMF και δεύτερον επισημαίνεται η ανάδειξη του προΤα(100-109) ως πιθανού προβλεπτικού βιοδείκτη στην θεραπεία υποστηρίζοντας και άλλες μελέτες με παρόμοιο σκοπό **(8, 60)**.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abramson N, Hanley. Immunotherapy of Multiple Myeloma: Promise and Challenges. *Immuno Targets and Therapy*, 10:343–371, 2021.
2. Ahmed A., Tait S.W.G. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Molecular Oncology*, 14:2994–3006, 2020
3. Al Hamed R., Bazarbachi A.H., Malard F., Harousseau J.L., Mohty M.. Current status of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 9:1-10, 2019
4. Amaador K., Peeters H., Minnema M.C., Nguyen T.Q., Dendooven A., Vos J.M.I., Croockewit A.J.. Monoclonal gammopathy of renal significance (MGRS): histopathologic classification, diagnostic workup, and therapeutic options. *Netherlands Journal Medicine*, 77:243-254, 2019
5. Becnel M.R., Lee H.C.. The role of belantamab mafodotin for patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Therapeutic Advances in Hematology*, 11:1-11, 2020
6. Bezu L., Gomes-de-Silva L.C., Dewitte H., Breckpot K., Fucikova J., Spisek R., Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G.. Combinatorial Strategies for the induction of Immunogenic cell death. *Frontiers in Immunology*, 6, 2015
7. Birmpilis A.I., Karachaliou C.E., Samara P., Ioannou K., Selemenakis P., Kostopoulos I.V., Kavrochorianou N., Kalbacher H., Livaniou E., Haralambous S., Kotsinas A., Farzaneh F., Trougakos I.P., Voelter W., Dimopoulos M.-A., Bamias A., Tsitsilonis O.. Antitumor reactive T-cell responses are enhanced *in vivo* by DAMP prothymosin alpha and Its C-terminal decapeptide. *Cancers*, 11, 2019
8. Birmpilis A.I., Paschalis A., Mourkakis A., Christodoulou P., Kostopoulos I.V., Antimissari E., Terzoudi G., Georgakilas A.G., Armpilia C., Papageorgis P., Kastritis E., Terpos E., Dimopoulos M.A., Kalbacher H., Livaniou E., Christodoulou M.I., Tsitsilonis O.E.. Immunogenic cell death, DAMPs and prothymosin α as a putative anticancer immune response biomarker. *Cells*, 11, 2022
9. Bluhm J., Kieback E., Marino S.F., Oden F., Westermann J., Chmielewski M., Abken H., Uckert W., Höpken U.E., Rehm A.. CAR T Cells with Enhanced Sensitivity to B Cell Maturation Antigen for the Targeting of B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma and Multiple Myeloma. *Molecular Therapy*, 26:1906–1920, 2018
10. Castaneda O., Baz R.. Multiple myeloma genomics – A concise review. *Acta Medica Academica*, 48:57-67, 2019

11. David K.K., Andrabi S.A., Dawson M.T., Dawson V.L.. Parthanatos, a messenger of death. *Frontiers in Bioscience*, 14:1116-1128, 2009
12. Diehl V., Schaadt M., Kirchner H., Hellriegel K.-P., Gudat F., Fonatsch C., Laskewitz C., Guggenheim R.. Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) *in vitro*: A comparative study. *Blut.*, 36:331–338, 1978
13. Dutta A.K., Fink J.L., Grady J.P., Morgan G.J., Mullighan C.G., To L.B., Hewett D.R., Zannettino A.C.W., 2019. Subclonal evolution in disease progression from MGUS/SMM to multiple myeloma is characterised by clonal stability. *Leukemia*, 33:457–468, 2019
14. Fang Y., Tian S., Pan Y., Li W., Wang Q., Tang Y., Yu T., Wu X., Shi Y., Ma P., Shu Y.. Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 121, 2020
15. Frank D., Vince J.E.. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death & Differentiation*, 26:99-114, 2019
16. Freire M., Barbeito P., Sarandesses C.S., Díaz-Jullien C., Muras J., Guillermo C., Moreira D., Freire-Cobo C.. Prothymosin α , a protein implicated in the proliferation and survival of lymphocytes. *Journal of Immunological Sciences*, 2:19–25, 2018
17. Fucikova J., Kepp O., Kasikova L., Petroni G., Yamazaki T., Liu P., Zhao L., Spisek R., Kroemer G., Galluzzi L.. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death and Disease*, 11, 2020
18. Fucikova J., Spisek R., Kroemer G., Galluzzi L.. Calreticulin and cancer. *Cell Research*, 31:5–16, 2021
19. Fulda S., Debatin K.M.. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Annals New York Academy of Sciences*, 1028:150–156, 2004
20. Fulda S., Debatin K.M.. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25:4798–4811, 2006
21. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O., Zitvogel L., Kroemer G.. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 17:97–111, 2017
22. Galluzzi L., Vitale I., et al.. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differentiation*, 25:486–541, 2018

23. Gazdar A., Oie H., Kirsch I., Hollis G.. Establishment and characterization of a human plasma cell myeloma culture having a rearranged cellular myc proto-oncogene. *Blood*, 67:1542–1549, 1986
24. Gerecke C., Fuhrmann S., Striffler S., Schmidt-Hieber M., Einsele H., Knop S.. The diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Deutsches Ärzteblatt International*, 113:470-476, 2016
25. Goldstein R.L., Goyos A., Li, C.-M., Deegen P., Bogner P., Sternjak A., Thomas O., Klinger M., Wahl J., Friedrich M., Rattel B., Lamas E., Min X., Sudom A., Farshbaf M., Coxo A., Balazs M., Arvedson T.. AMG 701 induces cytotoxicity of multiple myeloma cells and depletes plasma cells in cynomolgus monkeys. *Blood Advances*[®], 4:4180–4194, 2020
26. Hirschhorn T., Stockwell B.R.. The development of the concept of ferroptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 133:130–143, 2019
27. Hosoya, H., Sidana, S.. Antibody-Based Treatment Approaches in Multiple Myeloma. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 16:183–191, 2021
28. Huang Z., Hu H.. Arginine Deiminase induces immunogenic cell death and is enhanced by N-acetylcysteine in murine MC38 colorectal cancer cells and MDA-MB-231 human breast cancer cells *in vitro*. *Molecules*, 26:1-16, 2021
29. Ioannou K., Samara P., Livaniou E., Derhovanessian E., Tsitsilonis O.E.. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61:599–614, 2012
30. Jeong T.D., Park C.J., Shim H., Jang S., Chi H.S., Yoon D.H., Kim D.Y., Lee Jung-Hee, Lee Je-Hwan, Suh C., Lee K.H.. Simplified flow cytometric immunophenotyping panel for multiple myeloma, CD56/CD19/CD138(CD38)/CD45, to differentiate neoplastic myeloma cells from reactive plasma cells. *The Korean Journal Hematology*, 47:260-266, 2012
31. Kampa M., Notas G., Stathopoulos E.N., Tsapis A., Castanas, E.. The TNFSF members APRIL and BAFF and their receptors TACI, BCMA, and BAFFR in oncology, with a special focus in breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 10:1-13, 2020
32. Kang R., Chen R., Zhang Q., Hou W., Wu S., Cao L., Huang J., Yu Y., Fan X., Yan Z., Sun X., Wang H., Wang Q., Tsung A., Billiar T.R., Zeh H.J., Lotze M.T., Tang D., 2014. HMGB1 in health and disease. *Mol. Aspects Med*, 40:1–116, 2014

33. Kazandjian D.. Multiple myeloma epidemiology and survival, a unique malignancy. *Semin Oncol.*, 43:676–681, 2016
34. Kielbik M., Szulc-Kielbik I., Klink M., 2021. Calreticulin—multifunctional chaperone in immunogenic cell death: potential significance as a prognostic biomarker in ovarian cancer patients. *Cells*, 10, 2021
35. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P.. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 12:860–875, 2012
36. Kyle A.. Multiple myeloma: An odyssey of discovery. *British Journal of Hematology*, 111:1035-1044, 2000
37. Kyle R.A., Rajkumar S.V.. Multiple myeloma. *Blood*, 111:2962–2972, 2008
38. Kyle R.A., Durie B.G.M., Rajkumar S.V., Landgren O., Blade J., Merlini G., et al.. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*, 24:1121–1127, 2010
39. Lassiter G., Bergeron C., Guedry R., Cucarola J., Kaye A.M., Cornett E.M., Kaye A.D., Varrassi G., Viswanath O., Urits I.. Belantamab Mafodotin to treat multiple myeloma: A comprehensive review of disease, drug efficacy and side effects. *Current Oncology* 28:640–660, 2021
40. Liu P., Zhao L., Kroemer G., Kepp O.. Secreted calreticulin mutants subvert anticancer immunosurveillance. *Oncotmunology*, 9, 2020
41. Malhotra P., Yanamandra U., Khadwal A., Prakash G., Lad D., Law A.D., Khurana H., Sachdeva M.U.S., Bose P., Das R., Varma N., Varma S.. Autologous stem cell transplantation for multiple myeloma: single centre experience from North India. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 34:261–267, 2018
42. Maura F., Rustad E.H., Boyle E.M., Morgan G.J., 2020. Reconstructing the evolutionary history of multiple myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 33:1-14, 2020
43. Michels T.C., Petersen K.E.. Multiple myeloma: Diagnosis and treatment. *American Family Physician*, 95: 373–383, 2017

44. Minnie S.A., Hill G.R.. Immunotherapy of multiple myeloma. *The Journal of Clinical Investigation*, 130:1565–1575, 2020

45. Montes de Oca R., Alavi A.S., Vitali N., Bhattacharya S., Blackwell C., Patel K., Seestaller-Wehr L., Kaczynski H., Shi H., Dobrzynski E., Obert L., Tsvetkov L., Cooper D.C., Jackson H., Bojczuk P., Forveille S., Kepp O., Sauvat A., Kroemer G., Creighton-Gutteridge M., Yang J., Hopson C., Yanamandra N., Shelton C., Mayes P., Opalinska J., Barnette M., Srinivasan R., Smothers J., Hoos A.. Belantamab Mafodotin (GSK2857916) Drives Immunogenic Cell Death and Immune-mediated Antitumor Responses *In Vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics* 20, 1941–1955, 2021

46. Morabito F., Tripepi G., Martino E.A., Vigna E., Mendicino F., Morabito L., Todoerti K., Al-Janazreh H., D'Arrigo G., Canale F.A., Cutrona G., Neri A., Martino M., Gentile M.. Spotlight on melphalan flufenamide: An up-and-coming therapy for the treatment of myeloma. *Drug Design, Development and Therapy*, 15:2969–2978, 2021

47. Mosmann T.. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*, 65:55-63, 1983

48. Nishibori M., Wang D., Ousaka D., Wake H.. High Mobility Group Box-1 and blood–brain barrier disruption. *Cells*, 9:1-23, 2020

49. Offidani M., Corvatta L., Morè S., Olivieri A.. Belantamab Mafodotin for the treatment of multiple myeloma: An overview of the clinical efficacy and safety. *Drug Design, Development and Therapy*, 15:2401–2415, 2021

50. Padala S.A., Barsouk Adam., Barsouk Alexander, Rawla P., Vakiti A., Kolhe R., Kota V., Ajebo G.H.. Epidemiology, staging, and management of multiple myeloma. *Medical Sciences* 9:1-14, 2021

51. Park M.-H., Lee I.B., Shin S.-H., Choi J., Park Y., Shin Y.G.. Pharmacokinetic and metabolism studies of monomethyl auristatin F via liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight Mass Spectrometry. *Molecules*, 24, 2019

52. Pavlopoulou A., Karaca E., Balestrazzi A., Georgakilas A.G.. In silico phylogenetic and structural analyses of plant endogenous danger signaling molecules upon stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019:1–14, 2019

53. Pentimalli F., Grelli S., Di Daniele N., Melino G., Amelio I.. Cell death pathologies: targeting death pathways and the immune system for cancer therapy. *Genes & Immunity*, 20:539–554., 2019
54. Piñeiro A., Cordero O. J., Nogueira M.. Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons. *Peptides*, 21:1433–1446, 2000
55. Poon I.K.H., Lucas C.D., Rossi A.G., Ravichandran K.S.. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, 14:166–180, 2014
56. Rajkumar S.V., Kumar S.. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer Journal*, 10, 2020
57. Riss T.L., Moravec R. A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L.. Cell viability assays. *The Assay Guidance Manual*, 25, 2013
58. Robinson N., Ganesan R., Hegedús C., Kovács K., Kufer T.A., Virág L.. Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biology*, 26, 2019
59. Samara P., Kalbacher H., Ioannou K., Radu D.L., Livaniou E., Promponas V.J., Voelter W., Tsitsilonis O.. Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin $\alpha(100-109)$ in sera of mice infected with bacteria. *Journal of Immunological Methods* 395:54–62, 2013
60. Samara P., Ioannou K., Tsitsilonis O.E.. Prothymosin alpha and immune responses: Are we close to potential clinical application?. *Vitamins and Hormones*, 102:179–207, 2016
61. Sanjo H., Hikida M., Aiba Y., Mori Y., Hatano N., Ogata M., Kurosaki T.. Extracellular signal-regulated protein kinase 2 is required for efficient generation of B cells bearing antigen-specific immunoglobulin G. *Molecular and Cellular Biology*, 27:1236–1246, 2007
62. Segade F., Jaime G.M.. Molecules in focus: Prothymosin a. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31:1243-1248, 1999
63. Serrano-del Valle A., Anel A., Naval J., Marzo I.. Immunogenic cell death and immunotherapy of multiple myeloma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7:50, 2019

64. Shah N., Chari A., Scott E., Mezzi K., Usmani S.Z., 2020. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*, 34:985–1005, 2020
65. Sun Y., Chen P., Zhai B., Zhang M., Xiang Y., Fang J., Xu S., Gao Y., Chen X., Sui X., Li G.. The emerging role of ferroptosis in inflammation. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 127, 2020
66. Thapa P., Farber D.L.. The role of the thymus in the immune response. *Thoracic Surgery Clinics*, 29:123–131, 2019
67. The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal Haematology* 121:749–757, 2003
68. Tzogani K., Penttilä K., Lähteenvuo J., Lapveteläinen T., Lopez Anglada L., Prieto C., Garcia-Ochoa B., Enzmann H., Gisselbrecht C., Delgado J., Pignatti F.. EMA review of Belantamab Mafodotin (Blenrep) for the treatment of adult patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *The Oncologist*® 26:70–76, 2021
69. Walker B.A., Wardell C.P., Melchor L., Brioli A., Johnson D.C., Kaiser M.F., Mirabella F., Lopez-Corral L., Humphray S., Murray L., Ross M., Bentley D., Gutiérrez N.C., Garcia-Sanz R., San Miguel J., Davies F.E., Gonzalez D., Morgan G.J.. Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*, 28:384–390, 2014
70. Yang H., Wang H., Andersson U., 2020. Targeting inflammation driven by HMGB1. *Frontiers in Immunology*, 11, 2020
71. Yang P.-M., Hsieh Y.-Y., Du J.-L., Yen S.-C., Hung C.-F.. Sequential interferon β -cisplatin treatment enhances the surface exposure of calreticulin in cancer cells via an interferon regulatory factor 1-dependent manner. *Biomolecules*, 10, 2020
72. Yu P., Zhang X., Liu N., Tang L., Peng C., Chen X.. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 2021
73. Zamanian M., Veerakumarasivam A., Abdullah S., Rosli R.. Calreticulin and cancer. *Pathology Oncology Research*, 19:149–154, 2013
74. Zhu M., Yang M., Zhang J., Yin Y., Fan X., Zhang Y., Qin S., Zhang H., Yu F.. Immunogenic cell death induction by ionizing radiation. *Frontiers in Immunology*, 12, 2021

75. Kuby J., Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.. Ανοσολογία, 2^η ελληνική έκδοση,
Εκδόσεις Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, σελ. 190-191, 2013

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΕΩΣ 1835

**48^ο ΕΤΗΣΙΟ
ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ
ΙΑΤΡΙΚΟ
ΣΥΝΕΔΡΙΟ**

12-14 ΜΑΪΟΥ 2022

**ΞΕΝΟΔΟΧΕΙΟ DIVANI CARAVEL
ΑΘΗΝΑ**

Πληροφορίες: **ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ**, Μαιάνδρου 23, 115 28 Αθήνα
τηλ.: 210 7211845, 210 7243161 | email: iea@mednet.gr, mednet@mednet.gr
www.mednet.gr |  **Ιατρική Εταιρεία Αθηνών-Athens Medical Society**

Το Belantamab Mafodotin επάγει ανοσογονική απόπτωση σε ανθρώπινα μυελωματικά κύτταρα *in vitro* και *in vivo*

A. Κακαλής¹, A. Μπιρμπίλης¹, A. Πασχάλης¹, I.B. Κωστόπουλος¹, H. Kalbacher², M.A. Δημόπουλος³, E. Καστρίτης³, O. Τσιτσώνη¹

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ, ²Interfaculty Institute of Biochemistry, University of Tuebingen, Germany, ³Θεραπευτική Κλινική ΓΝΑ «Αλεξάνδρα», Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

ΣΚΟΠΟΣ: Το Belantamab Mafodotin (BMF) είναι σύζευγμα μονοκλωνικού αντισώματος IgG1k/τοξίνης (μαλεϊμιδοκαπροϋλική-μονομεθυλαυριστατίνη-F), που στοχεύει το αντιγόνο ωρίμανσης των B κυττάρων (BCMA) και έχει δειχθεί να επάγει ανοσογονικού τύπου κυτταρικό θάνατο (ICD). Μελετήθηκε η επίδραση του BMF σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) *ex vivo*, καθώς και σε μυελωματικές σειρές *in vitro*.

ΥΛΙΚΟ: Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα τριών DAMPs, του ανοσοδραστικού δεκαπεπτιδίου της προθυμοσίνης α, προΤα(100-109), της πρωτεΐνης υψηλής κινητικότητας-1 (HMGB1) και της καλρετικουλίνης (CRT) σε δείγματα ασθενών πριν και 24h μετά την χορήγηση δύο κύκλων BMF, και σε μυελωματικές σειρές που εκτέθηκαν στο φάρμακο. Οι συγκεντρώσεις των προΤα(100-109) και HMGB1 προσδιορίστηκαν με ELISA. Τα επίπεδα απόπτωσης και έκφρασης της CRT προσδιορίστηκαν με FACS.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Στην πλειονότητα των ασθενών με ΠΜ με ανιχνεύσιμα κλωνικά πλασματοκύτταρα στο περιφερικό αίμα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της CRT 24 ώρες μετά τη χορήγηση BMF, αλλά και των επιπέδων των προΤα(100-109) και HMGB1 στο πλάσμα. Αντίστοιχη δράση του BMF παρατηρήθηκε και *in vitro*, σε καλλιέργειες μυελωματικών σειρών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Τα αυξημένα επίπεδα των DAMPs προΤα(100-109) και HMGB1, και η έκφραση της CRT στην επιφάνεια των κλωνικών πλασματοκυττάρων που παρατηρήθηκαν μετά τη χορήγηση του BMF τόσο *ex vivo* όσο και *in vitro*, επιβεβαιώνουν το ρόλο του στην επαγωγή ICD, που πιθανά συσχετίζεται με τη θεραπευτική του αποτελεσματικότητα. Η πρώιμη μέτρηση των παραπάνω βιοδεικτών μετά τη χορήγηση του πρώτου/δεύτερου κύκλου BMF, φαίνεται να συσχετίζεται με την ανταπόκριση των ασθενών με ΠΜ στη θεραπεία, με την πλειοψηφία των ασθενών με αυξημένους βιοδείκτες να εμφανίζουν μεγαλύτερη ύφεση της νόσου.

«Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον» υπογραφή μεταπτυχιακού φοιτητή: Αντώνης Κακαλής