



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΟΥΣΙΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ:
ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ
ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NF-KB**

**ΕΥΡΥΣΘΕΝΗΣ ΒΑΡΘΟΛΟΜΑΟΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΟΥΣΙΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ:
ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ
ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NF-KB**

**ΕΥΡΥΣΘΕΝΗΣ ΒΑΡΘΟΛΟΜΑΟΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Βαρθολομάτου Ευρυσθένη: 24-10-2016

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 791α/1-11-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Κυρίτσης Αθανάσιος, Καθηγητής Νευρολογίας, επιβλέπων

Μέλη:

Βούλγαρης Σπυρίδων, Καθηγητής Νευροχειρουργικής

Λάζαρη Διαμάντω, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακευτικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Α.Π.Θ.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 7-11-2016

«Μελέτη διαφόρων ουσιών φυτικής προέλευσης με αντικαρκινική δράση σε κυτταρικές σειρές όγκων εγκεφάλου»

Ημερομηνία τροποποίησης ορισμού θέματος: 949α/30-11-2020

«Μελέτη του Μηχανισμού αντικαρκινικής δράσης ουσιών φυτικής προέλευσης στο γλοιοβλάστωμα: Αναστολή του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 970^α/29-6-2021

1. Κυρίτσης Αθανάσιος, Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Βούλγαρης Σπυρίδων, Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Κονιτσιώτης Σπυρίδων, Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Λάζαρη Διαμάντω, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ
6. Σιόκα Χρύσα, Επίκουρη Καθηγήτρια Πυρηνικής Ιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Αλεξίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 26-07-2021

Ιωάννινα 25-8-2021

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Αφιερώσεις

Στους ανθρώπους που πίστεψαν και πιστεύουν σε μένα.

Πρόλογος

Πρόλογος

Θα ήθελα να παραθέσω τις ευχαριστίες μου, ως μικρή ανταπόδοση στην πολύτιμη βοήθειά τους, σε όλους όσους συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Φαρμακογνωσίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κ. Διαμάντω Λάζαρη, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου από τα φοιτητικά μου χρόνια και μου έδωσε τη δυνατότητα να γνωρίσω την φαρμακογνωσία μέσα από την πτυχιακή μου εργασία, ενώ στη συνέχεια μου επέτρεψε να αναπτύξω περισσότερο τη συνεργασία αυτή ως θέμα διδακτορικής διατριβής στο Νευροχειρουργικό Ινστιτούτο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τον Καθηγητή Νευρολογίας κ. Αθανάσιο Κυρίτση, που δέχθηκε να είναι ο επιβλέπων καθηγητής και με φιλοξένησε στο Νευροχειρουργικό Ινστιτούτο προκειμένου να εργαστώ στα πλαίσια των ερευνητικών μου ενδιαφερόντων. Τον ευχαριστώ επίσης και για τη συνεχή και αδιάλειπτη υποστήριξη που μου παρείχε στην οργάνωση και τον προγραμματισμό του ερευνητικού μου έργου. Επίσης, ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Νευροχειρουργικής κ. Σπυρίδωνα Βούλγαρη, για τη συνεχή προτροπή και ενθάρρυνση στην πορεία προς την ολοκλήρωση της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή Νευρολογίας κ. Σπυρίδωνα Κονιτσιώτη, τον Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής κ. Ιωάννη Γεωργίου, την Επίκουρο Καθηγήτρια Πυρηνικής Ιατρικής κ. Χρύσα Σιόκα και τον Επίκουρο Καθηγητή Νευροχειρουργικής κ. Γεώργιο Αλεξίου για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να επισημάνω τη συμπαράσταση που μου προσέφερε ο Δρ. Γεώργιος Μαρκόπουλος και να τον ευχαριστήσω για την υπομονή που έδειξε, καθώς και για την ιδιαίτερη βοήθειά του σε πρακτικό και θεωρητικό επίπεδο σε καθημερινή βάση σε όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου προσπάθειας.

Ανάλογες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Αλεξίου που, με τη γνώση του αντικειμένου των γλοιοβλαστωμάτων, συνέβαλε στη συγγραφή των δημοσιεύσεων, καθώς και στην πραγμάτωση αυτής της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευάγγελο Κωλλέτα για τη φιλοξενία που μου πρόσφερε στο Εργαστήριο Βιολογίας και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια της έρευνας αυτής.

Η παρούσα επιστημονική έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών στα πλαίσια του επιχειρησιακού προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» - MIS 5000432, περίοδος 24/4/2018 – 04/2021, ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΥΜΒΑΣΗΣ, 2018-050-0502-12952.

Από την έρευνα αυτή προέκυψε η παρούσα διδακτορική διατριβή και δύο δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά με κριτές:

1. **Vartholomatos E**, Alexiou GA, Markopoulos GS, Lazari D, Tsiftoglou O, Chousidis I, Leonardos I, Kyritsis AP. Deglucohelebrin: A Potent Agent for Glioblastoma Treatment. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020; 20 (1):103-110.
2. **Vartholomatos E**, Vartholomatos G, Alexiou GA, Markopoulos GS. The Past, Present and Future of Flow Cytometry in Central Nervous System Malignancies. *Methods Protoc*. Review, 2021: 26; 4(1):11.

Ευρυσθένης Γ. Βαρθολομάτος

Ιούλιος 2021

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Περιεχόμενα

Περιεχόμενα

1.	Εισαγωγή	15
1.1	Κακοήθειες εγκεφάλου	15
1.1.1	Ταξινόμηση κακοηθειών εγκεφάλου	16
1.1.2	Επιδημιολογία όγκων εγκεφάλου	21
1.1.3	Προγνωστικοί δείκτες όγκων εγκεφάλου	24
1.1.4	Κλινική εικόνα όγκων εγκεφάλου	25
1.2	Θεραπευτικές προσεγγίσεις όγκων εγκεφάλου- γλοιοβλαστώματος	26
1.3	Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης και χημειοαντοχής στο γλοιοβλάστωμα	31
1.3.1	Η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	32
1.3.2	Μοριακά μονοπάτια στο γλοιοβλάστωμα	34
1.4	Το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον καρκίνο και το γλοιοβλάστωμα	36
1.4.1	Οι οικογένειες των πρωτεϊνών NF-κΒ	37
1.4.2	Οι πορείες ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κΒ	39
1.4.3	Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον καρκίνο	42
1.4.4	Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στις κακοήθειες εγκεφάλου	42
1.5	Φαρμακευτικά φυτά με αντικαρκινική και αντιγλοιοματική δράση	45
1.5.1	Φυτικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	46
2.	Υλικά και μέθοδοι	51
2.1.1	Αναλώσιμα	51
2.1.2	Λοιπά αντιδραστήρια	51
2.1.3	Εξοπλισμός	51
2.1.4	Ουσίες απομονωμένες από φυτά	52
2.1.5	Υλικά καλλιέργειας βακτηρίων	53
2.1.6	Υλικά καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων	53
2.2	Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA	54
2.2.1	Πλασμίδια	54
2.2.2	Βακτηριακά στελέχη	54
2.2.3	Βακτηριακός μετασχηματισμός	54
2.2.4	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας	56
2.2.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας	57

2.2.6	Ηλεκτροφόρηση	58
2.2.7	Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης	58
2.2.8	Καθαρισμός τμημάτων DNA από διαλύματα	59
2.2.9	Κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA – Κλωνοποίηση	59
2.2.10	Κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pBabe-puro/NF-κB:EGFP	61
2.3	Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών	62
2.3.1	Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές	62
2.3.2	Επανακαλλιέργεια κυττάρων	63
2.3.3	Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer	64
2.3.4	Αποθήκευση κυττάρων στο υγρό άζωτο	64
2.3.5	Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (transfection)	65
2.3.6	Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου και μικροσκοπία φθορισμού	65
2.3.7	Ανάλυση κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο σύστημα xCELLigence	66
2.3.8	Δοκιμασίες βιωσιμότητας	66
2.4	Κυτταρομετρία Ροής (FACS)	67
2.4.1	Ποσοτικοποίηση της έκφρασης EGFP	68
2.4.2	Κυτταρικός κύκλος	68
2.4.3	Κυτταρομετρική ανάλυση απόπτωσης μέσω ποσοτικοποίησης της αννεξίνης και της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης	68
2.4.4	Κυτταρομετρική ανάλυση της δραστικότητας της κασπάσης-8	69
2.4.5	Κυτταρομετρική ανάλυση του δυναμικού της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (ΔΨn)	69
2.4.6	Ανάλυση των δεικτών CDs με κυτταρομετρία ροής	70
2.5	Μελέτες στο <i>in vivo</i> σύστημα <i>Danio rerio</i> (ιχθύς ζέβρα)	71
3.	Αποτελέσματα	75
3.1	Μελέτη αντιγλοιωματικής δράσης ουσιών φυσικής προέλευσης	75
3.1.1	Μελέτη του μηχανισμού αντιγλοιωματικής δράσης της μοσχαμίνης	75
3.1.2	Μελέτη του μηχανισμού δράσης της N-P-κουμαροϋλ-σεροτονίνης	86
3.1.3	Μελέτη του μηχανισμού αντιγλοιωματικής δράσης της δεγλουκοελλεβρίνης	94
3.2	Μελέτη του μονοπατιού του παράγοντα NF-κB στη δραστικότητα ουσιών φυσικής προέλευσης	100
3.2.1	Ενεργότητα του NF-κB σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος	101
3.2.2	Υποδοχείς CDs ως πιθανοί στόχοι του NF-κB	104

4.	Συζήτηση	109
4.1	Μηχανισμοί αντιγλοιωματικής δράσης φυσικών ενώσεων	110
4.2	Μεθοδολογική προσέγγιση μελέτης	118
4.3	Αντιγλοιωματική δράση φυσικών ενώσεων και ενεργότητα του μονοπατιού του παράγοντα NF-κB	120
	Συμπεράσματα	123
	Περίληψη	125
	Abstract	127
	Βιβλιογραφία	129

- Ενότητα 1 -

Εισαγωγή

1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως με περίπου 14 εκατομμύρια νέα περιστατικά και 8.2 εκατομμύρια θανάτους ετησίως. Υπάρχουν πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου (1). Ανάμεσά τους, οι κακοήθειες εγκεφάλου αποτελούν μία από τις πιο κοινές αιτίες θανάτου από καρκίνο στις ηλικίες 15-39 ετών. Τα γλοιώματα ανέρχονται στο 27% των όγκων εγκεφάλου και το 80% των κακοήθων όγκων και προκύπτουν από τη νευρογλοία. Ειδικότερα, τα γλοιοβλαστώματα αριθμούν το 55.1% των γλοιωμάτων και είναι ο τύπος καρκίνου με τα περισσότερα νεοδιαγνωσθέντα κακοήγη περιστατικά και ανάμεσα σε αυτούς με την πιο ραγδαία εξέλιξη. Υπολογίζεται ότι ο μέσος όρος επιβίωσης νεοδιαγνωσθέντων ατόμων με γλοιοβλάστωμα δεν ξεπερνά τους 15 μήνες. Η χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση, κυρίως με τεμοζολομίδη συνήθως δεν προσφέρει όφελος στη συνολική επιβίωση μεγαλύτερο των δύο μηνών. Η εξέλιξη του καρκίνου συνδέεται άρρηκτα με τη συσσώρευση χαρακτηριστικών που αφενός οδηγούν στην εξέλιξη της νόσου και αφετέρου επιτρέπουν τη χημειοαντοχή. Σε αυτό το πλαίσιο η εύρεση νέων ουσιών με αντιγλοιοματική δράση αποτελεί επιτακτική ανάγκη στην αντιμετώπιση αυτής της πολύ σοβαρής νόσου. Οι ουσίες με φυσική προέλευση αποτελούν μία σημαντική πηγή αυτών και η αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης τους μπορεί να μας φέρει πιο κοντά στην κατανόηση των μηχανισμών εξέλιξης του καρκίνου και της επίκτητης χημειοαντοχής (1-5).

1.1 Κακοήθειες εγκεφάλου

Τα κακοήγη γλοιώμα, είναι ένα εξαιρετικά διηθητικό καρκίνωμα. Πρόκειται για μία κατηγορία διηθητικών όγκων του εγκεφάλου σε ενήλικες. Λόγω της επιθετικότητάς τους, το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών σήμερα κυμαίνεται μεταξύ 12 και 15 μηνών. Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στη βασική επιστήμη, η συμβολή στην αντιμετώπιση του όγκου αυτού είναι πτωχή. Αυτό οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Η ανατομική τους θέση είναι ένας καθοριστικός παράγοντας, αφού πρόκειται για σαφώς αφοριζόμενο χώρο. Η οστέινη δομή του κρανίου καθιστά τους όγκους δύσκολα προσπελάσιμους, δίνοντάς τους την ευκαιρία να προσβάλουν τους παρακείμενους ιστούς. Επίσης, η ίδια η δομή των όγκων αυτών δημιουργεί πιεστικά φαινόμενα μέσα σε μια σαφώς αφοριζόμενη περιοχή. Η επεκτατική τάση, που τους χαρακτηρίζει, δυσκολεύει την εξαίρεσή τους επί υγείων ορίων. Από την άλλη πλευρά, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ΑΕΦ) λειτουργεί σε μεγάλο βαθμό αποτρεπτικά στη

συγκέντρωση των χημειοθεραπευτικών ουσιών στο σημείο της νεοπλασίας. Όσον αφορά τις βασικές επιστήμες, μεταξύ άλλων, ο ρόλος των προγονικών νευρικών κυττάρων (stem cells) η συσχέτιση μεταξύ των μοριακών μονοπατιών, ο ρόλος του ενδοθηλίου καθώς και το γενετικό προφίλ των όγκων αποτελούν σημαντικά αντικείμενα μελέτης. Τα παραπάνω θα βοηθήσουν ώστε να διερευνηθούν καλύτερα οι συνθήκες δημιουργίας των όγκων αυτών **(6-8)**.

1.1.1 Ταξινόμηση κακοηθειών εγκεφάλου

Υπάρχουν διάφοροι τύποι όγκων, οι οποίοι εξορμούνται από διαφορετικές δομές – κύτταρα του ΚΝΣ, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν στοιχεία καλοήθειας ή κακοήθειας ανάλογα με την ιστοπαθολογική εικόνα τους **(9)**. Οι όγκοι του εγκεφάλου μπορεί να είναι είτε καλοήθεις είτε κακοήθεις, σύμφωνα με τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά. Οι κακοήθεις όγκοι διαβαθμίζονται με βάση τη βιολογική συμπεριφορά τους, τη μορφολογία, την πιθανή κλινική έκβαση και την ηλικία του ασθενούς.

Σύμφωνα με τον WHO (World Health Organization, Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας), στην αναθεωρημένη ταξινόμηση των όγκων εγκεφάλου γίνεται μια προσπάθεια κατάταξής τους σε μια κλίμακα διαβαθμιζόμενης κακοήθειας (grades I - IV) κυρίως με βάση την βιολογική συμπεριφορά τους, τη μορφολογία, την πιθανή κλινική έκβαση, την ηλικιακή κατανομή και χωρίς περιορισμούς από αυστηρά παθολογοανατομικά κριτήρια. Λιγότερο διαφοροποιημένοι φαινότυποι με συνέπεια μεγαλύτερο δυναμικό κακοήθειας, αντιστοιχούν σε υψηλότερη κλίμακα (grade). Ταυτόχρονα, γίνεται εισαγωγή νέων όρων αναλόγως της θέσης και των κυττάρων από όπου εξορμούνται οι εκάστοτε όγκοι (π.χ. υποφυσιοκύττωμα, αγγειοκεντρικό γλοίωμα κ.α.) **(10)**. Αναμφισβήτητα, η νεώτερη κατάταξη από τον WHO του 2016 είναι ευρέως διαδεδομένη και η μόνη αποδεκτή από όλες τις ειδικότητες που ασχολούνται με το συγκεκριμένο αντικείμενο **(11)**.

Μια σύνοψη της κλίμακας κακοήθειας κατά WHO είναι η εξής:

- WHO grade I: νεοπλάσματα μη διηθητικά με χαμηλό δυναμικό μιτώσεων και πιθανότητα ίασης μετά από χειρουργική εξαίρεση και μόνο.
- WHO grade II: νεοπλάσματα γενικώς διηθητικά, χαμηλής μιτωτικής δραστηριότητας τα οποία μπορούν να μεταπίπτουν σε μεγαλύτερης κακοήθειας νεοπλασίες (π.χ. χαμηλής βαθμίδος διάχυτο αστροκύττωμα που μεταπίπτει σε αναπλαστικό αστροκύττωμα και εν συνεχεία σε γλοιοβλάστωμα).

- WHO grade III: νεοπλάσματα κακοήγη, με έντονη μιτωτική δραστηριότητα και ατυπία πυρήνων.
- WHO grade IV: νεοπλάσματα με ενεργό μιτωτική δραστηριότητα, με τάση νέκρωσης και ραγδαία εξέλιξη της νόσου σε προεγχειρητικό και μετεγχειρητικό επίπεδο. Εκσεσημασμένη διήθηση παρακείμενων ιστών και επινέμηση του νωτιαίου μυελού.

Οι όγκοι κατατάσσονται επίσης βάσει της προέλευσής τους σε:

1. Αστροκυτταρικοί όγκοι:

- 1.1. Πιλοκυτταρικό Αστροκύττωμα (grade I)
- 1.2. Αναπλαστικό Αστροκύττωμα (grade III)
- 1.3. Διάχυτο Αστροκύττωμα (grade II)
- 1.4. Πλοιομόρφο Ξανθοαστροκύττωμα (grade II)
- 1.5. Υποεπενδυματικό γιγαντοκυτταρικό αστροκύττωμα (grade I)
- 1.6. Γλοιοβλάστωμα (grade IV)

2. Ολιγοδενδρογλοιακοί Όγκοι:

- 2.1. Ολιγοδενδρογλοίωμα (grade II)
- 2.2. Αναπλαστικό Ολιγοδενδρογλοίωμα (grade III)

3. Ολιγοαστροκυτταρικοί Όγκοι:

- 3.1. Ολιγοαστροκύττωμα (grade II)
- 3.2. Αναπλαστικό Ολιγοαστροκύττωμα (grade III)

4. Επενδυματικοί Όγκοι:

- 4.1. Υποεπενδύωμα (grade I)
- 4.2. Μυξοθηλοειδές επενδύωμα (grade I)
- 4.3. Επενδύωμα (grade II)
- 4.4. Αναπλαστικό επενδύωμα (grade III)

5. Ολιγοαστροκυτταρικοί Όγκοι:

- 5.1. Ολιγοαστροκύττωμα (grade II)
- 5.2. Αναπλαστικό Ολιγοαστροκύττωμα (grade III)

6. Άλλοι Νευροεπιθηλιακοί Όγκοι:

- 6.1. Αστροβλάστωμα
- 6.2. Χορδοειδές γλοίωμα 3ης κοιλίας (grade II)
- 6.3. Εγκεφαλική γλοιωματώση

7. Νευρωνικοί και Μικτοί Όγκοι νευρώνων Γλοίας:

- 7.1. Γαγγλιοκύττωμα (grade I)
- 7.2. Γαγγλιογλοίωμα (grade I)
- 7.3. Αναπλαστικό γαγγλιογλοίωμα (grade III)
- 7.4. Δεσμοπλαστικό βρεφικό Αστροκύττωμα (grade I)
- 7.5. Δυσπλαστικό γαγγλιοκύττωμα της παρεγκεφαλίδας
- 7.6. Δυσεμβριοπλαστικός Νευροεπιθηλιακός Όγκος (grade I)
- 7.7. Κεντρικό Νευροκύττωμα (grade II)
- 7.8. Εξωκοιλιακό νευροκύττωμα (grade II)
- 7.9. Παρεγκεφαλιδικό Λιπονευροκύττωμα (grade II)
- 7.10. Παραγαγγλίωμα (grade I)
- 7.11. Θηλωματώδης γλοιονευρωνικός όγκος (grade I)
- 7.12. Γλοιονευρωνικός Όγκος της 4ης κοιλίας σε διάταξη ροζέτας (Rosette)

8. Παραγαγγλίωμα (grade I)

9. Όγκοι Χοριοειδούς Πλέγματος:

- 9.1. Θήλωμα χοριοειδούς Πλέγματος (grade I)
- 9.2. Άτυπο Θήλωμα Χοριοειδούς Πλέγματος (grade II)
- 9.3. Καρκίνωμα Χοριοειδούς Πλέγματος (grade III)

10. Εμβρυονικοί Όγκοι:

- 10.1. Μυελοβλάστωμα (grade IV)
- 10.2. Αρχέγονοι νευροεξωδερματικοί Όγκοι ΚΝΣ (grade IV)
- 10.3. Άτυποι τερατοειδείς Όγκοι (grade IV)

11. Όγκοι της περιοχής της Επίφυσης:

- 11.1. Επιφυσεοκύττωμα (grade I)
- 11.2. Επιφυσεοβλάστωμα (grade II)
- 11.3. Επιφυσιακοί όγκοι διάμεσης διαφοροποίησης (grade II)
- 11.4. Θηλοειδής όγκος της περιοχής της επίφυσης (grade II & III)

B. ΟΓΚΟΙ ΤΩΝ ΜΗΝΙΓΓΩΝ

1. Μηνιγγίωμα (grade I)
2. Μεσεγγυματικοί Όγκοι (grade II & III)
3. Αιμαγγειοβλάστωμα (grade I)
4. Πρωτοπαθείς μελανοκυτταρικές βλάβες

Γ. ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

1. Κακοήγη Λεμφώματα
2. Πλασματοκύττωμα
3. Κοκκιοκυτταρικό Σάρκωμα

Δ. ΟΓΚΟΙ ΠΑΡΑΣΠΟΝΔΥΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΡΑΝΙΑΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝ

1. Σβάνωμα (grade I)
2. Νευρίνωμα (grade I)
3. Περινευρίνωμα (grade I, II & III)
4. Κακοήθεις όγκοι του περιβλήματος των νευρικών κυττάρων

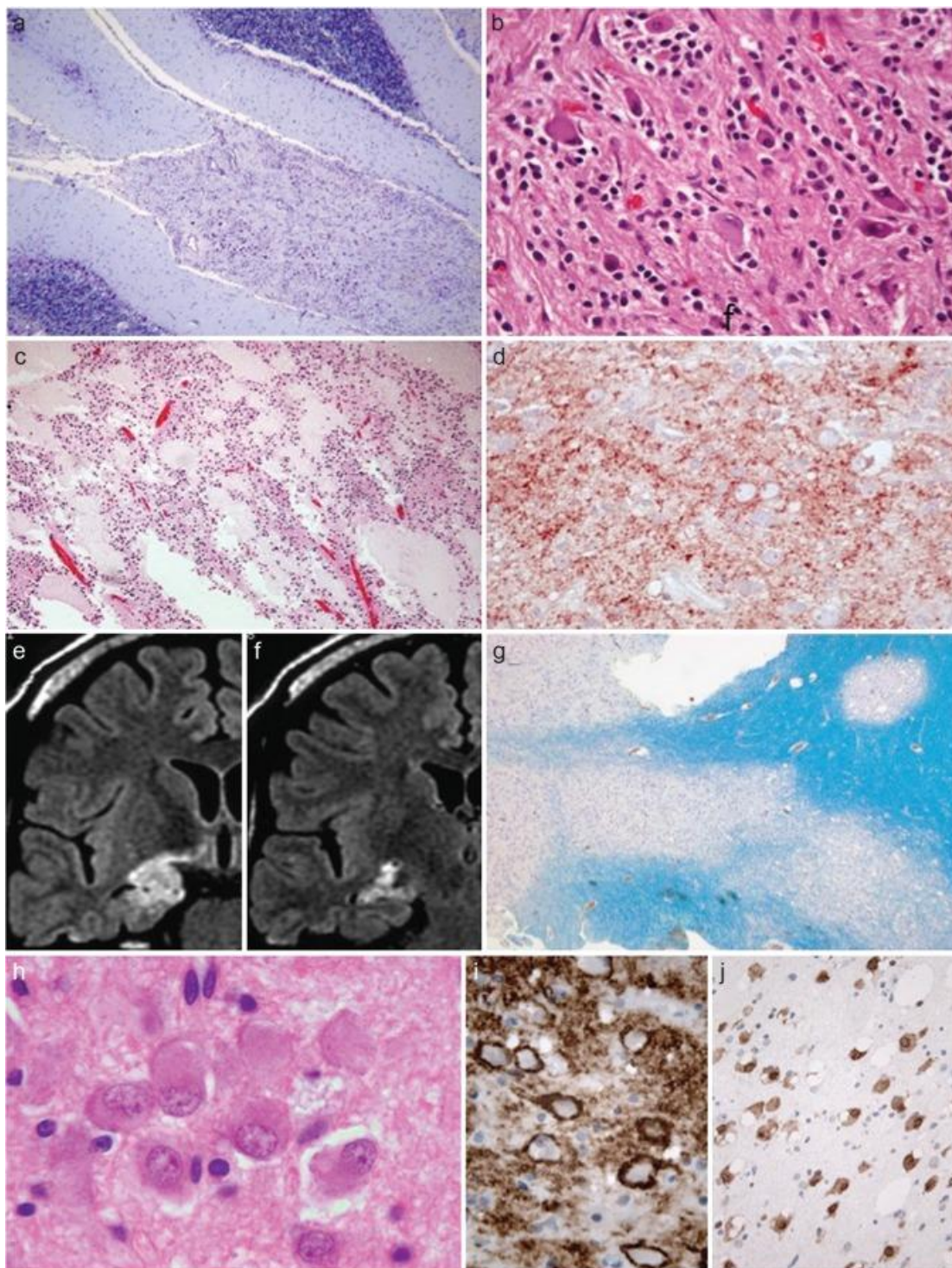
Ε. ΟΓΚΟΙ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Γερμίνωμα
2. Εμβρυωνικό καρκίνωμα
3. Όγκος ενδοδερμικού κόλπου(Yolk Sac)
4. Χοριοκαρκίνωμα
5. Τεράτωμα
6. Όγκοι μεικτών αρχέγονων κυττάρων

ΣΤ. ΟΓΚΟΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΕΦΙΠΠΙΟΥ

1. Κρανιοφαρυγγίωμα (grade I)
2. Ογκοκύττωμα της αδενουπόφυσης (grade I)
3. Υποφυσιοκύττωμα (grade I)
4. Όγκοι κοκκιωδών κυττάρων (grade I)

Ζ. ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ



Εικόνα 1.1. παραδείγματα παθολογικής αξιολόγησης όγκων του ΚΝΣ. [τροποποιημένη από (11)].

Εδώ και δεκαετίες γίνεται προσπάθεια να απλουστευθεί και να εξορθολογιστεί η κατάταξη κακοήθειας των όγκων του ΚΝΣ. Ως κριτήρια χρησιμοποιήθηκαν οι μιτώσεις, η κυτταρική ανάπτυξη, οι ανωμαλίες των πυρήνων, η παρουσία νέκρωσης και η διήθηση των παρακείμενων φυσιολογικών δομών. Η πρόγνωση εξαρτάται κυρίως από τα ιστολογικά ευρήματα **(11)**. Εκτός από την κατά WHO κατάταξη, ιδιαιτέρως για την κατηγορία των γλοιοβλαστωμάτων - τα οποία αποτελούν αντικείμενο αυτής της μελέτης - έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη συγκρότηση της πιο ορθής και απλουστευμένης κλίμακας κακοήθειας των όγκων αυτών, οι οποίες ξεκινάνε πριν από πολλές δεκαετίες με μελέτες των Kernohan et al., Ringertz, και φτάνουν ως πρόσφατα με την μελέτη Daumas-Duport et al. **(12-14)**. Σε όλες τις περιπτώσεις συμπεριλαμβάνονται τα κριτήρια του ποσοστού μιτώσεων, του βαθμού κυτταρικής ανάπτυξης, της παρουσίας νέκρωσης, των ανωμαλιών της δομής των πυρήνων καθώς και της διήθησης παρακείμενων φυσιολογικών κυτταρικών δομών. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά συνήθως προεξάρχουν της πρόγνωσης. Τα τελευταία έτη - και καθώς αναμένεται η επόμενη έκδοση κατά WHO - έχει διατυπωθεί η ανάγκη της ταυτοποίησης και του περαιτέρω διαχωρισμού των όγκων με βάση συγκεκριμένα μόρια τα οποία αποτελούν τη «σφραγίδα» του κάθε τύπου όγκου πέραν της υπάρχουσας μορφολογικής ταξινόμησης. Έχει διαπιστωθεί ότι αλλαγές στην έκφραση κάποιων μορίων, ή σε επίπεδο χρωμοσωμάτων όπως η μετάλλαξη του γονιδίου της ισοκυτρικής δευδρογενάσης IDH-1, η παρουσία/απουσία της διαγραφής των περιοχών 1q/19q, η υπερμεθυλίωση του εκκινήτη της O6 μεθυλγουανίνης της DNA μεθυλτρανσφεράσης (MGMT) και η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη του υποδοχέα του EGFR (EGFRvIII) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί και διαγνωστικοί παράγοντες που θα προβλέπουν και θα καθορίζουν τη διαδικασία της λήψης κλινικών αποφάσεων. Με αυτό τον τρόπο θα γίνει μια δυναμική επαναταξινόμηση των όγκων εγκεφάλου και θα αναδειχτούν νέοι μοριακοί βιοδείκτες οι οποίοι πιθανότατα θα αποτελέσουν και μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους **(15-17)**.

1.1.2 Επιδημιολογία όγκων εγκεφάλου

α. Παρελθοντικά στοιχεία:

Συχνότητα εμφάνισης: Κατά τα έτη 2005-2009 καταγράφηκαν 311.202 περιστατικά όγκων εγκεφάλου (109.695 κακοήθεις και 201.507 μη κακοήθεις) μεταξύ 293.011.631 άτομων τα οποία αντιπροσωπεύουν περίπου το 97% του συνολικού πληθυσμού όλων των πολιτειών της Αμερικής. Από αυτούς, οι 99.063 όγκοι ήταν νευροεπιθηλιακής προέλευσης με

προσβολή των ανδρών κατά 1,4 φορές συχνότερη από των γυναικών, ενώ σχεδόν οι μισοί - σε απόλυτο αριθμό 49.088- αφορούσαν το γλοιοβλάστωμα. Μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης όλων των πρωτοπαθών όγκων εγκεφάλου και ΚΝΣ ήταν τα 59 έτη. Αντίστοιχα σε δεδομένα που αφορούν τα ποσοστά θνησιμότητας σε όγκους εγκεφάλου από πηγές που προέρχονται από το Ηνωμένο Βασίλειο, παρατηρούμε ότι προκύπτει μια καμπύλη αναλόγως της ηλικίας, στην οποία υπάρχουν 2 κορυφές, μια στα 70 έτη, με πολύ μεγάλο απόλυτο αριθμό περιστατικών, και άλλη μια στην παιδική ηλικία (περίπου 4-5 ετών), με σαφέστατα μειωμένο αριθμό κρουσμάτων. Παρόλα αυτά, για την παιδική ηλικία αυτοί οι όγκοι θεωρούνται ως οι δεύτεροι σε συχνότητα, μετά τις λευχαιμίες **(18)**.

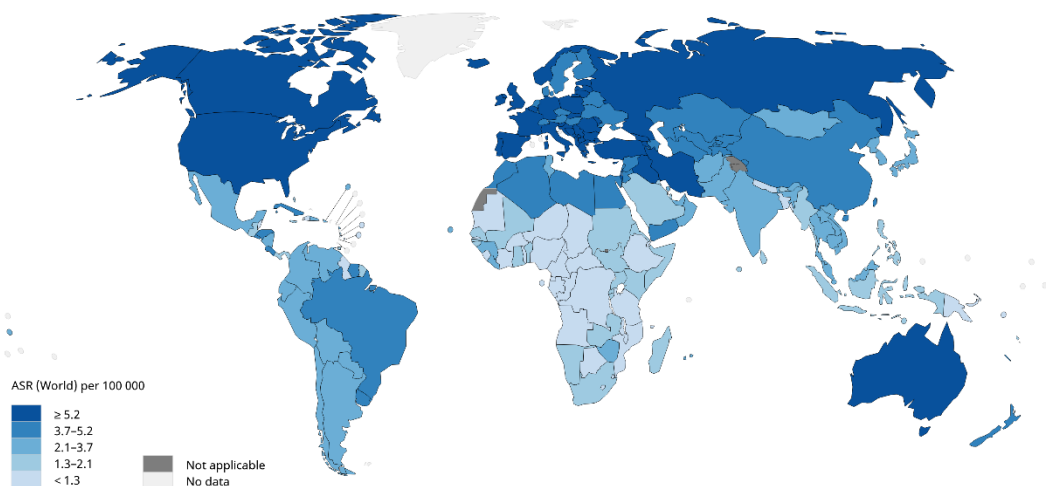
Παγκοσμίως, οι πρωτοπαθείς όγκοι εγκεφάλου και ΚΝΣ ανέρχονται στο 3,5 ανά 100.000 άτομα ετησίως **(19)**. Με βάση στατιστικά μοντέλα, και χωρίς να έχει γίνει επεξεργασία των καταγεγραμμένων στοιχείων, οι εκτιμήσεις για τις ΗΠΑ των ετών 2012 και 2013 αφορούν την εμφάνιση 68.530 και 69.720 αντίστοιχα, νέων περιπτώσεων όγκων εγκεφάλου και ΚΝΣ.

Θνησιμότητα: Το 2010 στο Ηνωμένο Βασίλειο καταγράφηκαν περίπου 4.900 θάνατοι από όγκους εγκεφάλου με ποσοστό 6,1 ανά 100.000 πληθυσμού. Για το έτος 2012, έχει εκτιμηθεί ότι στις ΗΠΑ 13.700 θάνατοι θα αποδοθούν σε κακοήθεις όγκους εγκεφάλου και ΚΝΣ. Ταυτόχρονα σε παγκόσμιο επίπεδο θεωρείται ότι οι θάνατοι σε αυτή την κατηγορία όγκων ανέρχονται σε 2,6 ανά 100.000 ετησίως, ενώ θεωρείται ότι κατέχουν την 14η θέση στη σειρά των πιο συχνά εμφανιζόμενων θανατηφόρων όγκων. Ενθαρρυντικό είναι το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί μείωση του ποσοστού θανάτων στις ηλικίες άνω των 20 ετών.

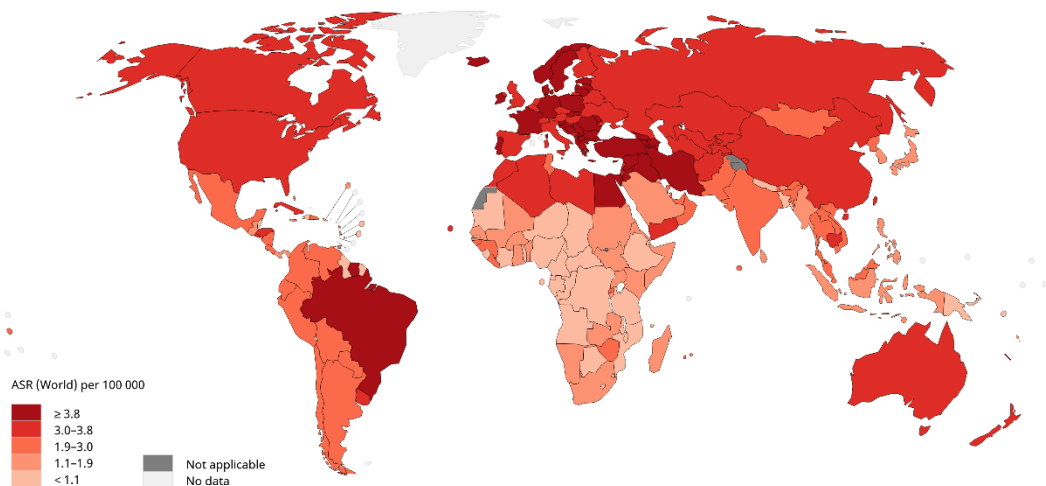
Δια βίου Κίνδυνος: Για τους άνδρες, ο κίνδυνος να εμφανίσουν κάποιον όγκο του εγκεφάλου ή του ΚΝΣ ανέρχεται σε ποσοστό 0,7% ενώ η πιθανότητα να αποβιώσουν από αυτή την αιτία είναι 0,5%. Για τις γυναίκες αντίστοιχα ο κίνδυνος εμφάνισης τέτοιων όγκων είναι 0,6% με πιθανότητα θανάτου από αυτή την αιτία περίπου 0,4% **(20)**.

Επιβίωση και προγνωστικοί παράγοντες: Κατά τα έτη 2005- 2009 η 5ετής επιβίωση για όλους τους όγκους του ΚΝΣ και εγκεφάλου ανέρχεται στο 33,8%. Μόνο για το γλοιοβλάστωμα, η 5ετής επιβίωση μειώνεται δραματικά σε ποσοστό της τάξης του 4,7%, όντας πολύ χειρότερη από το αναπλαστικό αστροκύτωμα όπου είναι 25,9%.

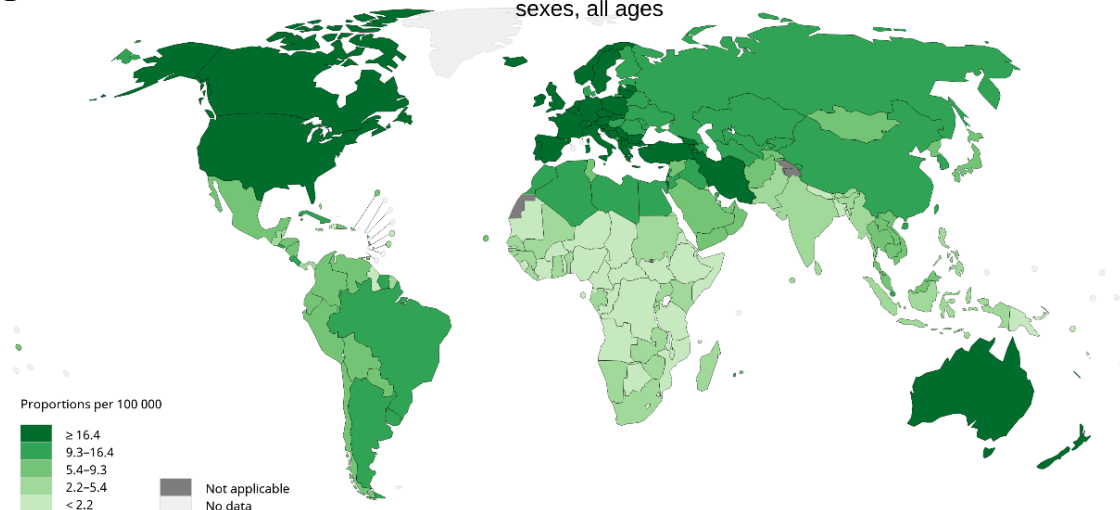
A Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, brain, central nervous system, both sexes, all ages



B Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, brain, central nervous system, both sexes, all ages



Γ Estimated number of prevalent cases (5-year) as a proportion in 2020, brain, central nervous system, both sexes, all ages



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Data source: GLOBOCAN 2020
Graph production: IARC
(<http://gco.iarc.fr/today>)
World Health Organization

World Health Organization
© International Agency for Research on Cancer 2021

Εικόνα 1.2: Νέα περιστατικά (Α), θνησιμότητα (Β) και επιπολασμός (Γ) κακοηθειών εγκεφάλου

β. Σημερινά στοιχεία.

Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Παρατηρητήριο Καρκίνου (Global Observatory of Cancer-GLOBOCAN) **(21)**, κατά το 2020 σημειώθηκαν παγκοσμίως 308.102 νέα περιστατικά καρκίνου κεντρικού νευρικού συστήματος (κωδικός ICD C70-72), με συχνότητα ~4 άτομα ανά 100.000 και σωρευτικό κίνδυνο 0,35.

Η θνησιμότητα κατά το ίδιο έτος ήταν 251.329 άτομα με συχνότητα 3,2 ανά 100.000 άτομα και σωρευτικό κίνδυνο 0,30. Ο επιπολασμός της νόσου κατά την τελευταία πενταετία αντιστοιχεί σε 837.152 άτομα και αναλογία 10,7 ανά 100.000 άτομα **(21)**. Η Ελλάδα εμφανίζει σημαντικά υψηλότερο ποσοστό νέων περιστατικών (7 νέα περιστατικά ανά 100.000 άτομα) και θνησιμότητας (4,7 ανά 100.000 άτομα) σε σχέση με τον παγκόσμιο μέσο όρο. Μαζί με την ευρύτερη περιοχή των Βαλκανίων κατατάσσεται πολύ υψηλά στις περιοχές με τον μεγαλύτερο σωρευτικό κίνδυνο για τη νόσο.

1.1.3 Προγνωστικοί δείκτες όγκων εγκεφάλου

Σημαντικότερα στοιχεία για τον καθορισμό της πρόγνωσης είναι η ιστολογική εικόνα, η γενική και η κλινική κατάσταση του ασθενούς, το μέγεθος του όγκου, το εύρος της χειρουργικής εκτομής, η θεραπευτική δόση της ακτινοθεραπείας και η χημειοθεραπεία. Λιγότερο σημαντικά προγνωστικά στοιχεία είναι το φύλο, η περιοχή του εγκεφάλου όπου βρίσκεται ο όγκος και η τεχνική ακτινοβολήσης. Εκτός από την ιστολογική εικόνα που επηρεάζει σαφώς την πρόγνωση έχει βρεθεί ότι τόσο για το διάστημα επιβίωσης ελεύθερας νόσου PFS (progression free survival), όσο και για τη συνολική επιβίωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, σημαντικό ρόλο παίζουν διάφορες παράμετροι όπως η ηλικία του ατόμου, η γενική του κατάσταση (performance status) κατά τη διάγνωση της νόσου, το μέγεθος του όγκου, το εύρος της χειρουργικής εκτομής, η θεραπευτική δόση της ακτινοβολίας και η χημειοθεραπεία που ακολουθεί. Από την άλλη πλευρά, το φύλο, η περιοχή του εγκεφάλου όπου βρίσκεται ο όγκος και η τεχνική της ακτινοβολήσης, δεν αποτελούν στατιστικώς σημαντικά προγνωστικά στοιχεία για την επιβίωση ή το PFS. Δεν πρέπει να παραληφθεί η σημασία των μοριακών «υπογραφών» των όγκων οι οποίες ομολογουμένως καθορίζουν την πρόγνωση με το διαχωρισμό των ατόμων με εξαιρετικά μεγάλη επιβίωση (long term survivors, 3%-5%) με μέσο όρο επιβίωσης τα 3 χρόνια, από το υπόλοιπο σύνολο ασθενών όπου η επιβίωση δεν ξεπερνά τους 12-15 μήνες [18-20].

Το γλοιοβλάστωμα είναι ο δεύτερος συχνότερα απαντώμενος όγκος (16%) μετά το μηνιγγίωμα (35%) στο σύνολο των όγκων του εγκεφάλου και η πιο συχνή κακοήθεια. Το γλοιοβλάστωμα αφορά κυρίως ενήλικες (75-85 ετών) και σπανίως παιδιά. Πενταετής επιβίωση σημειώνεται κυρίως στα παιδιά. Στους ενήλικες η μακροπρόθεσμη επιβίωση είναι μικρότερη του 5%. Μικρό ποσοστό ασθενών μικρότερων των 20 ετών (8%) θα επιβιώσουν άνω της δεκαετίας από τη διάγνωση της ασθένειας. Το αντίστοιχο ποσοστό των ενηλίκων είναι μικρότερο του 1%. Επιγραμματικά, το γλοιοβλάστωμα αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνά απαντούμενη ιστολογική οντότητα (16%) μετά το μηνιγγίωμα (35%) στο σύνολο των όγκων εγκεφάλου και ταυτόχρονα την πιο συχνή κακοήθεια. Αφορά κυρίως ενήλικες μεγάλων ηλικιών (75-84 ετών) και πολύ λιγότερο τα παιδιά. Απαντάται 2 έως 3 φορές συχνότερα σε καυκάσιους από ότι σε ασιατές ή νέγρους. Η 5ετής επιβίωση είναι μικρότερη του 5%, ενώ είναι σαφώς καλύτερη στις ηλικίες κάτω των 20 ετών. Περίπου το 8% των ασθενών με γλοιοβλάστωμα κάτω των 20 ετών έχει δεκαετές προσδόκιμο επιβίωσης. Αντίστοιχα, στους ενήλικες και γηραιότερους, για το ίδιο χρονικό διάστημα, το ποσοστό αυτό θα είναι μικρότερο του 1% [14, 21].

1.1.4 Κλινική εικόνα όγκων εγκεφάλου

Η συμπτωματολογία των όγκων του εγκεφάλου μπορεί να προέρχεται είτε από την αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης (ICP), είτε από την ανατομική περιοχή στην οποία εντοπίζεται ο όγκος και η οποία οδηγεί στην απορρύθμιση κάποιων φυσιολογικών λειτουργιών. Συνεπώς οι ενδοκράνιοι όγκοι προκαλούν δυο βασικές κατηγορίες ενοχλημάτων –συμπτωμάτων: α) αυτά τα οποία προέρχονται από αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης (ICP) και β) τα εντοπισμένα συμπτώματα αναλόγως της ανατομικής περιοχής όπου βρίσκεται ο όγκος ή/και της απορρύθμισης των διαφόρων φυσιολογικών/ενδοκρινικών λειτουργιών.

Κεφαλαλγία: είναι η πιο συχνή εκδήλωση και αποτελεί το χειρότερο σύμπτωμα για τους ασθενείς. Ως προς τον χαρακτήρα, το άλγος είναι βύθιο και μόνιμο και περιστασιακά μπορεί να γίνει σφύζον.

Ναυτία και Έμετοι: Η αυξομείωση της ενδοκράνιας πίεσης οδηγεί σε διαταραχή των ρυθμιστικών μηχανισμών της ενδοκράνιας πίεσης. Το αποτέλεσμα είναι να γίνονται εμφανή συμπτώματα όπως ναυτία, έμετοι, οπτικές διαταραχές (διπλωπία και οίδημα οπτικής θηλής) (22).

Επιληπτικές Κρίσεις: μπορεί να είναι εστιακές ή γενικευμένες. Είναι πιο συχνές (65%-95%) σε χαμηλού βαθμού κακοήθειας γλοιώματα και κυρίως στο ολιγοδενδρογλοίωμα, παρά στο γλοιοβλάστωμα. Αναλόγως της εντόπισης του όγκου στον εγκέφαλο, υπάρχουν διαφορετικές πιθανότητες να εμφανιστούν επιληπτικές κρίσεις στο άτομο, ο κίνδυνος είναι αυξημένος σε περιπτώσεις εντοπισμού στο βρεγματικό και στον κροταφικό λοβό (23, 24).

Συγκοπή: λόγω της αύξησης της ενδοκράνιας πίεσης (intracranial pressure, ICP), μπορεί να προκληθεί ακόμη και εγκολασμός του στελέχους του εγκεφάλου με την μετάπτωση του ασθενούς σε κώμα ή/και θάνατο εξαιτίας της διακοπής των ζωτικών λειτουργιών της καρδιάς και του πνεύμονα.

Διαταραχές από τη νοητική - γνωσιακή σφαίρα: αλλαγή στην προσωπικότητα του ασθενούς, αλλαγή στο συναίσθημα, ακόμη και προβλήματα μνήμης. Πολλές φορές μπορεί αυτά τα συμπτώματα να μην αξιολογηθούν λόγω της μη ειδικότητάς τους (25).

Εστιακά συμπτώματα: αναλόγως της περιοχής εντόπισης του όγκου παρουσιάζονται σε διαφορετικό βαθμό ή και μεμονωμένα διάφορες αισθητικές διαταραχές (γραφαισθησία, στερεοαγνοσία κ.α.), γενικευμένη αδυναμία, αφασία εκπομπής ή/και διαταραχές των οπτικών πεδίων από προσβολή κατά μήκος του οπτικού μονοπατιού, από το οπτικό χίασμα μέχρι και τον ινιακό λοβό (26).

1.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις όγκων εγκεφάλου- γλοιοβλαστώματος

Οι θεραπευτικές οδοί που ακολουθούνται στην αντιμετώπιση των όγκων του εγκεφάλου ποικίλουν ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας και τη βιολογική συμπεριφορά τους. Τα κακοήγη γλοιώματα θεραπευτικά αντιμετωπίζονται χειρουργικά, με χημειοθεραπεία και με ακτινοθεραπεία. Στόχοι της χειρουργικής αντιμετώπισης είναι να μειωθούν τα συμπτώματα από πίεση, καθώς και η πιθανή μετακίνηση της μέσης γραμμής, να αποδώσουν στο μέγιστο δυνατό βαθμό η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία, καθώς και η λήψη ιστοτεμαχίου για βιοψία. Παλαιότερα χημειοθεραπευτικά σχήματα (βινκριστίνη, προκαρβαζίνη και λομουστίνη) έδωσαν φτωχά αποτελέσματα σε ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και αναπλαστικά γλοιώματα.

Σήμερα χρησιμοποιείται το θεραπευτικό πρωτόκολλο του Stupp et al. (27). Προέρχεται από μία μελέτη φάσης III σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, η οποία έδειξε βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών. Του πρωτοκόλλου προηγείται η μέγιστη χειρουργική εκτομή του

όγκου, ούτως ώστε να διατηρηθούν οι νευρολογικές λειτουργίες. Μετά την εκτομή ακολουθεί χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη (TMZ) με ταυτόχρονη ακτινοθεραπεία. Η δοσολογία της TMZ όταν συνυπάρχει με την ακτινοθεραπεία είναι 75mg/m² ανά ημέρα καθημερινά. Μετά το πέρας των κύκλων της ακτινοθεραπείας, η δόση της TMZ διαμορφώνεται σε 150-200mg/m² ανά ημέρα για 5 ημέρες ανά 28 ημέρες και για 6 συνολικά κύκλους θεραπείας. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της χημειοθεραπείας με TMZ περιλαμβάνουν ναυτία, μυελοτοξικότητα, αρθραλγίες και θρομβοεμβολικά επεισόδια. Για τη θεραπευτική ακτινοβολία χρησιμοποιείται τμηματική λήψη 60Gy σε 30 συνεδρίες εντός 6 εβδομάδων. Σε ασθενείς που υποτροπιάζουν γίνεται μετά το δεύτερο χειρουργείο χρήση δομικών αναλόγων της νιτροζουρίας. Τα ανάλογα αυτά βρέθηκε ότι βελτιώνουν την εξάμηνη επιβίωση των ασθενών αυτών Συγκεκριμένα η εξάμηνη επιβίωση ανέρχεται σε 64% έναντι 44% σε ασθενείς που λάμβαναν placebo **(28)**.

Λόγω του μεγάλου αριθμού των διαφορετικών ιστολογικών τύπων όγκων εγκεφάλου και των διαφορετικών στρατηγικών που ακολουθούνται αναλόγως βαθμού κακοήθειας και της βιολογικής συμπεριφοράς τους, δεν είναι εφικτό να αναλυθεί η θεραπεία του καθενός χωριστά. Γνωρίζουμε όμως ότι εξέχοντα ρόλο έχουν η χειρουργική αντιμετώπιση, η χημειοθεραπεία καθώς και η ακτινοθεραπεία, με διαφορετική σειρά - σημαντικότητα σε κάθε περίπτωση. Επιλεκτικά αναφέρονται παρακάτω τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που ακολουθούνται για τους όγκους των γλοιοβλαστωμάτων, στα οποία και μόνο θα γίνονται αναφορές εφεξής.

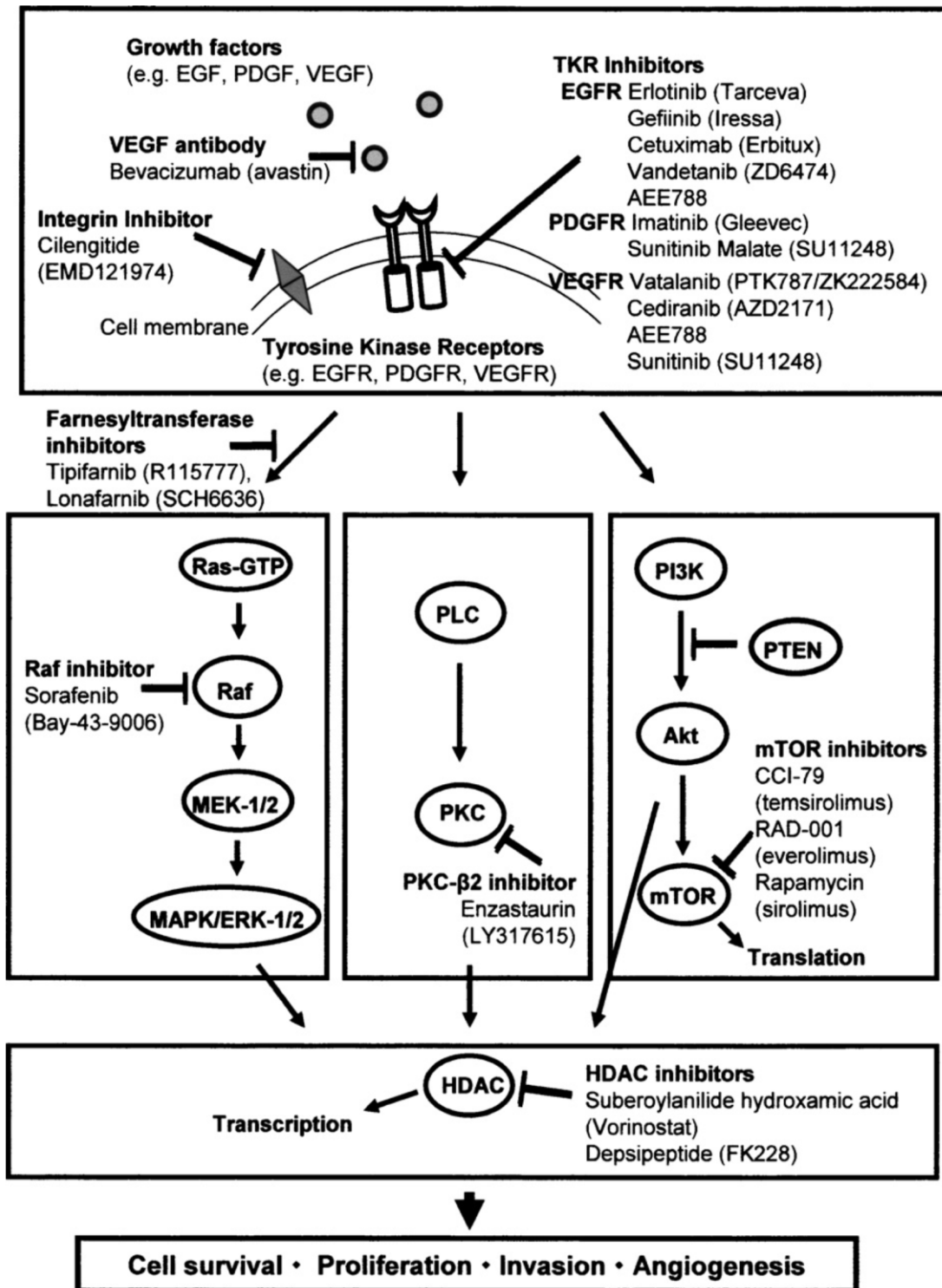
Από τη στιγμή που η ακτινολογική εικόνα δίνει στοιχεία για υψηλής κακοήθειας γλοιώμα, ο ασθενής πρέπει να υποβληθεί σε χειρουργική αντιμετώπιση του όγκου. Στόχος είναι να μειωθούν τα συμπτώματα από την πίεση (mass effect) και η πιθανή μετακίνηση της μέσης γραμμής, η αποτελεσματικότερη δράση των βοηθητικών - υποστηρικτικών θεραπειών καθώς και η λήψη ιστού για την τεκμηρίωση της ιστοπαθολογικής ταυτότητας του όγκου **(29)**. Παλαιότερες προσπάθειες με χημειοθεραπευτικά σχήματα όπως προκαρβαζίνη, λομουστίνη και βινκριστίνη αν και έδειξαν αξιόλογη αποτελεσματικότητα στο PFS απέτυχαν να βελτιώσουν την ολική επιβίωση των ασθενών τόσο σε ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα όσο και σε ασθενείς με αναπλαστικά γλοιώματα **(30)**.

Τα τελευταία 10-15 έτη έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να ανευρεθούν νέα μόρια στη θεραπευτική των όγκων του ΚΝΣ και συγκεκριμένα του γλοιοβλαστώματος. Στόχοι των θεραπευτικών προσεγγίσεων είναι η διαδικασία της αγγειογένεσης του όγκου, οι διάφοροι ανοσολογικοί μηχανισμοί και τα αρχικά κύτταρα της καρκινογένεσης, ενώ ακόμη και

γονιδιακές θεραπείες έχουν διερευνηθεί για την αντιμετώπιση αυτών των όγκων. Αξίζει να αναφέρουμε ότι πολλά υποσχόμενα μόρια είναι οι αναστολείς των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι θεωρητικά στοχεύουν στα μοριακά μονοπάτια που καθορίζουν τον πολλαπλασιασμό (proliferation), την μετανάστευση (migration) και την αποφυγή της απόπτωσης (evasion of apoptosis). Αυτά τα μόρια, έχουν επιφέρει επανάσταση στη μοριακή βιολογία για την εκλεκτικότητα της δράσης τους, την ικανότητά τους να λαμβάνονται από του στόματος, ενώ εμφανίζουν πρακτικά ηπιότερες ανεπιθύμητες ενέργειες συγκριτικά με την κλασική συμβατική χημειοθεραπεία. Από την έρευνα, έχουν προκύψει διάφορα μόρια με ικανότητα απευθείας αναστολής των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης αλλά και αντισώματα την αναστολή της δράσης των μονοπατιών με στόχευση των προσδετών των υποδοχέων.

Ένα από αυτά τα αντισώματα, το Bevacizumab (Avastin)- μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF - έχει πάρει έγκριση μόνο στις ΗΠΑ από τον FDA (Μάιος 2009) για την αντιμετώπιση της υποτροπής των γλοιοβλαστωμάτων, είτε μόνο του, είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Από διάφορες κλινικές μελέτες φάσης II εμφανίζεται βελτίωση της επιβίωσης σε ασθενείς που έλαβαν το αντίσωμα μόνο του ή σε συνδυασμό με ιρινοτεκάνη ή τεμοζολομίδα. Η συνολική επιβίωση αυξήθηκε κατά 9 περίπου μήνες σε σχέση με τους ασθενείς που λάμβαναν την κλασική χημειοθεραπεία (control), ενώ σημειώθηκε μια τάση μείωσης της δόσης των στεροειδών για τη θεραπεία του οιδήματος. Δεν έλλειπαν βεβαίως οι παρενέργειες όπως η εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση, η πνευμονική εμβολή, τα ισχαιμικά αγγειακά επεισόδια και η αιμορραγία εντός των όγκων **(31, 32)**.

Οι έρευνες αποδεικνύουν πως σημειώνεται βελτιωμένη ανταπόκριση σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών με γλοιοβλάστωμα, όπως σε αυτούς που τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν αυξημένη δραστηριότητα στα μονοπάτια Ras/MAPK και PI3K/AKT/mTOR **(33)**.



Εικόνα 1.3: Σηματοδοτικά μονοπάτια των αυξητικών παραγόντων και η αναστολή αυτών από συγκεκριμένους παράγοντες [τροποποιημένη από (34)].

Έτσι αναδεικνύεται η ανάγκη για σχεδίαση στοχευμένων και εξατομικευμένων θεραπειών για κάθε ασθενή, με βάση το μοριακό προφίλ των όγκων.

Η συνεχής ανακάλυψη και διερεύνηση μορίων – αναστολέων με διαφορετική δράση και στόχευση, όπως οι αναστολείς κινάσης τυροσίνης (erlotinib, gefitinib, imatinib, vatalanib, sunitinib, pazopanib, lapatinib, sunitinib), οι αναστολείς μεταβίβασης σήματος σε ενδοκυττάριο επίπεδο (everolimus, sirolimus, enzastaurin), οι αναστολείς ιντεγκρινών (cilengitide), ακόμη και οι αναστολείς τροποποιητών πρωτεϊνών (tipifarnib, lonaferinib), έχουν οδηγήσει σε πολλές προκλινικές μελέτες *in vitro* αλλά και *in vivo*. Σταδιακά εξετάζεται η δράση τους είτε ως μονοθεραπείες ή/και σε συνδυασμό μεταξύ τους καθώς και ταυτόχρονα με ακτινοθεραπεία ή/και τεμοζολομίδη, σε μελέτες φάσης I, II και III, με ποικίλα αποτελέσματα (35).

Σκοπός είναι τα νέα μόρια, που κατασκευάζονται, να έχουν πολλαπλούς μοριακούς στόχους, όπως οι αναστολείς πολλαπλών κινάσων τυροσίνης (multi-targeted receptor tyrosine kinases inhibitors, multi-RTKIs). Πιο κάτω γίνεται σαφές ότι, στη μοριακή βιολογία των γλοιοβλαστωμάτων, η βάση των παρατηρούμενων αλλαγών – μεταλλάξεων είναι οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούνται συνεχώς και μεταβιβάζουν σήματα ανάπτυξης και μετανάστευσης. Τα ενδοκυττάρια μόρια των μονοπατιών, αν και εμφανίζουν μεταλλάξεις που τους επιτρέπουν να ενεργοποιούνται αυτόματα, ελάχιστα συνεισφέρουν στον κακοήγη φαινότυπο σε σχέση με τους υποδοχείς.

Άλλες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί στην ποσοτικοποίηση της ανάλυσης της περιεκτικότητας σε DNA σε διάφορες θεραπείες καρκίνων του ΚΝΣ, αποκαλύπτοντας, τις αντιγλοιοματικές επιδράσεις, μεταξύ άλλων, της κουρκουμίνης (36), της κερσετίνης (37), του γλυκυρριζικού οξέος (38) και της palbociclib (39). Πρόσφατα, έχει δοκιμαστεί η επίδραση φαρμάκων της κατηγορίας των αντιψυχωσικών, χρησιμοποιώντας και τεχνικές κυτταρομετρίας ροής. Έχει προταθεί ότι ο επαναπροσδιορισμός της χρήσης των αντιψυχωσικών φαρμάκων, όπως η αλοπεριδόλη (40) και η φαινοθειαζίνη (41) μπορεί να είναι μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για τη θεραπεία των όγκων του ΚΝΣ. Μια άλλη πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποιεί κυτταρομετρία μάζας, αποκάλυψε την επιλεκτική στόχευση των βλαστοκυττάρων γλοιώματος (που χαρακτηρίζονται ως CD98⁺ κύτταρα που συνεκφράζουν δείκτες βλαστοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των Oct3/4, Nestin, SOX2, Musashi-1, PDGFR α , Notch2, Nanog, STAT3 και C-myc) από την P-βορονοπενυλαλανίνη (BPA), μια χημική ένωση που χρησιμοποιείται στη θεραπεία

σύλληψης νετρονίων του Βορίου (42). Συνολικά, ο επαναπροσδιορισμός χρήσης αποτελεί μία σημαντική στρατηγική, καθώς επιτρέπει τη χρήση ουσιών που έχουν εγκριθεί μετά από κλινικές μελέτες και οι οποίες, ως επακόλουθο της μακροχρόνιας χρήσης τους, έχουν γνωστές αντενδείξεις και παρενέργειες.

1.3 Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης και χημειοαντοχής στο γλοιοβλάστωμα

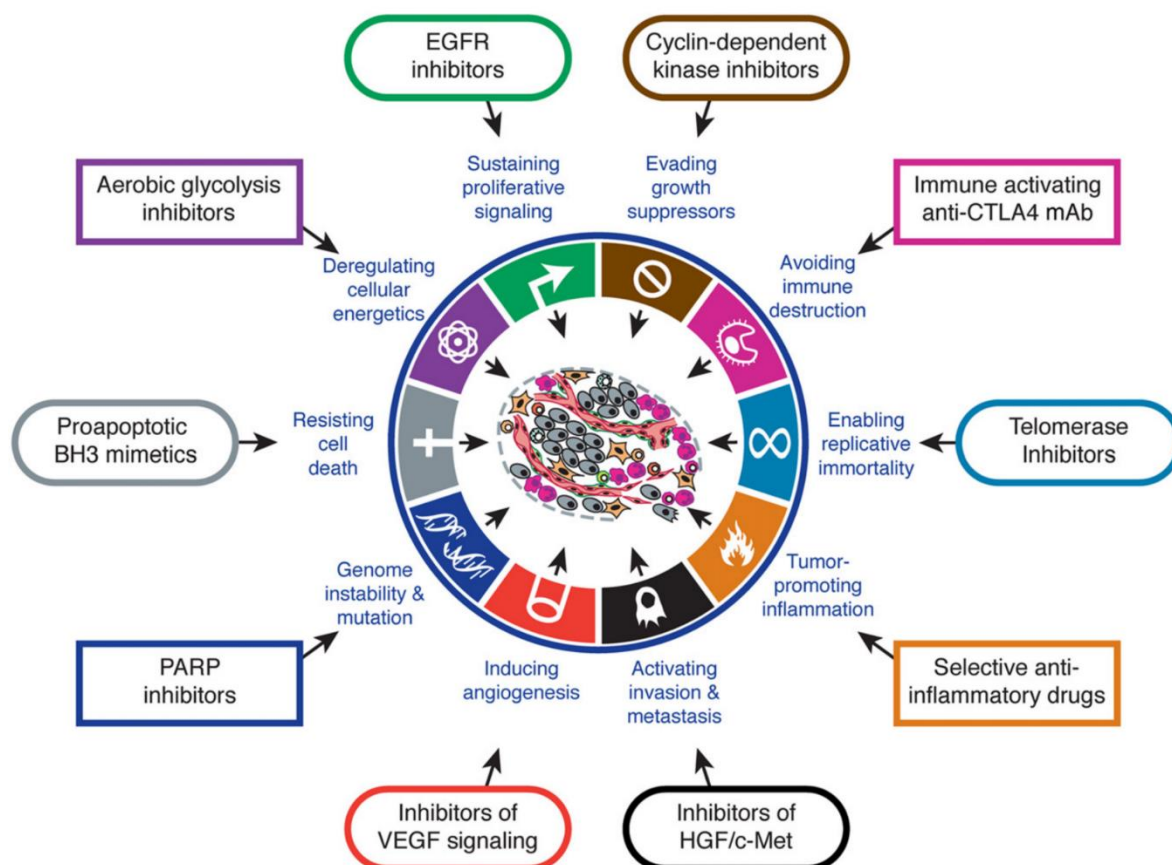
Η νεοπλασία προκύπτει ως αποτέλεσμα μιας διαδικασίας η οποία περιλαμβάνει πολλαπλά «βήματα». Κάθε βήμα αντανakλά σε μια γενετική μεταβολή που, σταδιακά, μπορεί να οδηγήσει το φυσιολογικό κύτταρο σε κακοήγη εξαλλαγή. Μία σειρά από βασικά χαρακτηριστικά εξαλλαγής ενός φυσιολογικού σε καρκινικό κύτταρο έχουν προταθεί το 2001 από τους Hanahan και Weinberg ως «Hallmarks of Cancer». Τα χαρακτηριστικά αυτά μελετήθηκαν και στη συνέχεια οδήγησαν στη νέα έκδοση του συγγράμματός τους, το 2011, (43-45).

Τα βασικά αυτά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν:

1. Απευαισθητοποίηση αναστολής ανάπτυξης
2. Αδυναμία απόπτωσης
3. Ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό
4. Αυτόνομη ανάπτυξη
5. Νεοαγγειογένεση
6. Διθητική ικανότητα

Τα επιπλέον επιπλέον χαρακτηριστικά:

1. Μεταβολικές αλλαγές
2. Μηχανισμοί αντοχής έναντι των ανοσοποιητικών μηχανισμών
3. Επαγόμενη αγγειογένεση
4. Εισχώρηση σε παρακείμενους ιστούς



Εικόνα 1.4: Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου (Hallmarks of Cancer). Παρουσιάζονται τα κύρια χαρακτηριστικά του καρκίνου καθώς και προτεινόμενες θεραπευτικές στρατηγικές, που στοχεύουν σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά [τροποποιημένη από (45)].

1.3.1 Η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος του ευκαρυωτικού κυττάρου συντελείται σε τέσσερις φάσεις: την G0/G1, την S όπου γίνεται η σύνθεση του DNA, τη φάση G2/ M όπου γίνεται η μίτωση με την παραγωγή των δύο νέων πανομοιότυπων θυγατρικών κυττάρων. Η ρύθμισή του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται μέσω ενός συμπλέγματος κυκλινών (cyclin)-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Cyclin-dependent kinases, CDKs). Οι κυκλίνες αυτές αποτελούν τη ρυθμιστική υπομονάδα, ενώ οι CDKs συμμετέχουν με την καταλυτική υπομονάδα ενός ενεργοποιημένου ετεροδιμερούς συμπλέγματος, το οποίο έχει δράση κινάσης. Σε περίπτωση απουσίας των κυκλινών, οι CDKs είναι αδρανείς. Όταν όμως τα κύτταρα λάβουν προμιτωτικά εξωκυττάρια σήματα, το σύμπλοκο αυτό ενεργοποιείται και καταλύει την φωσφορυλίωση διαφόρων πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν ώστε να συντονίσουν και να προάγουν τον κυτταρικό κύκλο (46).

Οι βασικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο είναι το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb) που είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο (“tumor suppressor” gene) (RB) και το γονίδιο p53 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P53 (πρώην TP53 Tumor Protein p53). Η φωσφορυλίωση του γονιδίου του RB από το σύμπλεγμα CDK4/6 – Cyclin D1 προάγει την έκφραση μερικών μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι ο E2F. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούν τα γονίδια που είναι απαραίτητα για τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου μετά από το σημείο ελέγχου της φάσης G0/G1, στην φάση G2. Από την άλλη πλευρά, το γονίδιο p53 προφυλάσσει τα κύτταρα από την «ανάρμοστη/κακοήγη» προώθηση του κυτταρικού κύκλου πέρα από τα σημεία ελέγχου στις φάσεις G1 και G2. Στα πλαίσια αυτά, η πρωτεΐνη P53 μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση, προκειμένου να το διαφυλάξει από πιθανό ανώμαλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες RB και P53, ελέγχονται η καθεμία μεμονωμένα από δύο άλλες ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, την p16 και την p14ARF (ARF tumor suppressor, Alternate Reading Frame protein product) που κωδικοποιούνται από την ίδια γενετική περιοχή CDKN2A. Συγκεκριμένα η p16 αναστέλλει την φωσφορυλίωση του γλοιοβλαστώματος ενώ η p14ARF αποτρέπει την αποδόμηση του p53 από την MDM-2 (Mouse Double Minute 2).

Η γλοιοματογένεση είναι αποτέλεσμα της διάσπασης της συνοχής όλων αυτών των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, που προέρχεται από την απορρύθμιση βασικών ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών. Έχει αποδειχθεί ότι στα γλοιώματα και ιδιαίτερα στα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα το γονίδιο p53 είναι μεταλλαγμένο ή έχει υποστεί αποσιώπηση, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι εύκολα παρακάμπτεται η δράση του λόγω της υπερέκφρασης του γονιδίου mdm-2. Επίσης, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB), είναι μεταλλαγμένο σε ποσοστό 10-15% σε υψηλού βαθμού κακοήθειας αστροκυττώματα. Η σίγαση του γονιδίου του RB παρατηρείται επίσης και σε ένα άλλο ποσοστό της τάξης του 15% των αστροκυττωμάτων μέσω της ενίσχυσης του CDK4, που είναι ανταγωνιστής του πρώτου. Έχει βρεθεί ότι περίπου τα μισά αστροκυττώματα και ολιγοδενδρογλοιώματα δεν διαθέτουν τη γενετική περιοχή (CDKN2A), που κωδικοποιεί το p16 και p14ARF, τα τελευταία ρυθμίζουν θετικά τα μονοπάτια του RB και του p53. Το ίδιο ισχύει και για τα *de novo* γλοιοβλαστώματα (47-49).

1.3.2 Μοριακά μονοπάτια στο γλοιοβλάστωμα

Εκτός από τις ενδοκυττάριας οδούς παραγωγής και μετάδοσης σημάτων οι οποίες καθορίζουν τον κυτταρικό κύκλο και τη μίτωση, όπως ήδη αναφέραμε υπάρχει και η ρύθμιση αυτών των διαδικασιών από το εξωκυττάριο περιβάλλον μέσω αλληλεπίδρασης προσδετών. Οι τελευταίοι μπορεί να είναι ορμόνες, νευροδιαβιβαστές ή ακόμη και αυξητικοί παράγοντες, που διαθέτουν συγκεκριμένους υποδοχείς οι οποίοι εδράζουν στην εξωκυττάρια μεμβράνη των κυττάρων. Από αυτή τη διακυτταρική αντίδραση προκύπτει η ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μορίων με διαδοχικές φωσφορυλιώσεις και αποφωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών, που τελικό στόχο έχουν τη ρύθμιση ζωτικών λειτουργιών του κυττάρου. Έχει βρεθεί ότι στο γλοιοβλάστωμα, πολλά μοριακά μονοπάτια - και κυρίως αυτά των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων με δράση κινάσης τυροσίνης - αποτελούν ιδιαίτερο σημείο αναφοράς λόγω της υπερδραστηριότητας που εμφανίζουν.

Οι υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης είναι τα γλυκοπρωτεϊνικά μόρια, που αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο το οποίο διαθέτει την περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη, και από μία διαμεμβρανική α έλικά που είναι το σημείο πρόσδεσης του υποδοχέα στη λιπιδιακή μεμβράνη. Τέλος ένα ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο, που κατέχει την κεντρική καταλυτική περιοχή, με δράση κινάσης τυροσίνης αποτελεί το σύμπλεγμα δράσης και ελέγχου της τελικής πορείας του κυτταρικού κύκλου (50). Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια, που εμπλέκονται, είναι οι «πρωτεϊνικοί καταρράκτες σηματοδότησης» RAS/RAF/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases, (ERK, Extracellular Signal-Regulated Kinases),) και PI3K/AKT, οι οποίοι έχουν συνδεθεί με τη μετανάστευση, το μεταβολισμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τέλος με τον κυτταρικό θάνατο των νευρογλοιακών - προγονικών και μη - κυττάρων (51, 52).

Το γλοιοβλάστωμα μπορεί να είναι πρωτοπαθές ή δευτεροπαθές. Τα πρωτοπαθή (de novo) αφορούν συνήθως ηλικιωμένους ασθενείς, οι οποίοι υπερεκφράζουν το EGFR, έχουν μεταλλάξεις του PTEN και 51 απαλειφή του γονιδίου της κινάσης CDKN2A (p16). Όσον αφορά τα δευτεροπαθή, αυτά εμφανίζονται σε νέους ασθενείς και φέρουν μεταλλάξεις συνήθως του p53, και των γονιδίων της ισοκυτρικής δεϋδρογονάσης IDH-1 και IDH-2. Το πρωτοπαθές και το δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα μπορεί να μη φέρουν ίδιες γενετικές μεταλλάξεις, όμως μακροσκοπικά και φαινοτυπικά φέρουν τα ίδια χαρακτηριστικά. Με τη βοήθεια των microarrays σε μοριακό επίπεδο μπορούμε να ταυτοποιήσουμε ποια γονίδια εκφράζονται σε κάθε περίπτωση, μέσω των διαφορετικών mRNA. Παρόμοια αποτελέσματα μπορούν να ληφθούν με ανάλυση του αριθμού των αντιγράφων (CNAs) ογκογονιδίων και

ογκοκατασταλτικών γονιδίων (άμεση εξάρτηση από τις μεταθέσεις χρωμοσωμάτων). Ανάλογα με το ποια γονίδια εκφράζονται κάθε φορά μπορούμε να διακρίνουμε τα γλοιοβλαστώματα σε 3 επιπλέον τύπους: προνευρικό, πολλαπλασιαστικό και μεσεγχυματικό.

Οι πιο συχνές περιοχές του γονιδιώματος που χάνονται είναι: 1p, 6q, 9p, 10p, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19q, 22q, και ολόκληρο το χρωμόσωμα Y.

Έχει διαπιστωθεί ότι τα γλοιοβλαστώματα μπορεί να είναι πρωτοπαθή, δηλαδή να εμφανίζονται *de novo* - χωρίς κλινική, ακτινολογική ή μορφολογική απόδειξη κάποιας προϋπάρχουσας ηπιότερης μορφής κακοήθειας - ή δευτεροπαθή, ακολουθώντας μια συγκεκριμένη πορεία από διαδοχικές αλλοιώσεις σε γενετικό επίπεδο με μετάλλαξη γονιδίων ή/και διαγραφές/προσθήκες διαφόρων χρωμοσωμάτων. Τα πρωτοπαθή γλοιοβλαστώματα έχουν την τάση να εμφανίζονται σε ηλικιωμένους ασθενείς και εμφανίζουν υπερέκφραση του EGFR, μεταλλάξεις του PTEN και απαλοιφή του γονιδίου της κινάσης CDKN2A (p16). Αντίστοιχα, στα δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα, οι μεταλλάξεις του p53 είναι οι πιο πρώιμα εντοπιζόμενες αλλαγές, με μεγαλύτερη επίπτωση αυτών σε πιο νέους ασθενείς. Επίσης συχνές είναι και οι μεταλλάξεις του γονιδίου της ισοκιτρικής δεϋδρογενάσης IDH-1 και IDH-2. Μακροσκοπικά, δεν εμφανίζουν ιστοπαθολογικές διαφορές, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζουν τον ίδιο κακοήγη φαινότυπο με διήθηση των παρακείμενων δομών, αποφυγή της απόπτωσης και διαρκή πολλαπλασιασμό.

Αν όμως αναλυθούν σε μοριακό επίπεδο με τη βοήθεια των *microarrays*, το μοριακό προφίλ των μεταγραφικών προϊόντων τους διαφέρει σε μεγάλο βαθμό λόγω της έκφρασης διαφορετικών mRNAs. Το ίδιο προκύπτει και από την ανάλυση του αριθμού των αντιγράφων (CNAs) ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τα οποία εξαρτώνται πρωτίστως από τις μεταθέσεις χρωμοσωμάτων. Ορισμένα γονίδια εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό ή/και αποσιωπούνται, δίνοντας με αυτόν τον τρόπο την δυνατότητα της επιπλέον κατηγοριοποίησής τους σε προνευρικού τύπου (έκφραση γονιδίων για ανάπτυξη νευρικών κυττάρων), μεσεγχυματικού τύπου (γονίδια που απαντούν στα σήματα της εξωκυτταρίου ουσίας) και πολλαπλασιαστικού τύπου (γονίδια που εξυπηρετούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [47]). Εκτεταμένες αναλύσεις σε γενετικό επίπεδο από τα γλοιοβλαστώματα, δείχνουν ότι οι απώλειες του γενετικού υλικού είναι «διασκορπισμένες» κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος και επηρεάζουν σχεδόν όλα τα χρωμοσώματα σε συχνότητες που κυμαίνονται από 2 μέχρι και 80%. Ιδιαίτερα συχνά παρατηρείται η απώλεια περιοχές είναι οι εξής: 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19q, 22q και το χρωμόσωμα Y.

Ο μέσος όρος επιβίωσης ατόμων διαγνωσθέντων με γλοιοβλάστωμα είναι 15 μήνες (53). Καθώς ίαση δεν υφίσταται, η πρώτη γραμμή αντιμετώπισης είναι η όσο το δυνατόν ριζικότερη χειρουργική εξαίρεση ακολουθούμενη από ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία (54). Παρόλη την εξέλιξη νέων μεθόδων τα κύτταρα που δεν εκριζώνονται από τη χειρουργική εξαίρεση καθίστανται, τελικά, ανθεκτικά στην ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία (55). Σε μία συστηματική ανασκόπηση 12 τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών, υπολογίστηκε ότι το σύνολο των χημειοθεραπευτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στο γλοιοβλάστωμα, αυξάνει μόλις κατά 2 μήνες τη μέση επιβίωση (56). Η τεμοζολομίδη, το μόνο ευρέως χρησιμοποιούμενο χημειοθεραπευτικό πρώτης γραμμής αύξησε το μέσο όρο επιβίωσης μόλις κατά 2.5 μήνες, όταν χορηγήθηκε ταυτόχρονα με ακτινοθεραπεία (27). Ένα επιπλέον πρόβλημα αποτελεί η ύπαρξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που εμποδίζει την είσοδο ουσιών με μεγάλο μοριακό βάρος (>600). Συνεπώς υπάρχει ανάγκη εύρεσης νέων θεραπευτικών μοριών με μικρό μοριακό βάρος, ικανών να διέρχονται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

1.4 Το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον καρκίνο και το γλοιοβλάστωμα

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ ελέγχει σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως για παράδειγμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και την κυτταρική διαφοροποίηση. Επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και στην ανοσιακή απόκριση του οργανισμού στην παρουσία αντιγόνων.

Η εμπλοκή τους σε τόσο σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, αλλά και ο μεγάλος αριθμός γονιδίων των οποίων ελέγχουν την έκφραση, έχει ως αποτέλεσμα η απορρύθμισή τους να συσχετίζεται με μία πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι καθώς και ο σακχαρώδης διαβήτης.

Με δεδομένο το σημαντικό ρόλο τους στην κυτταρική φυσιολογία, η ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα, με κυριότερο το επίπεδο μετατόπισης τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

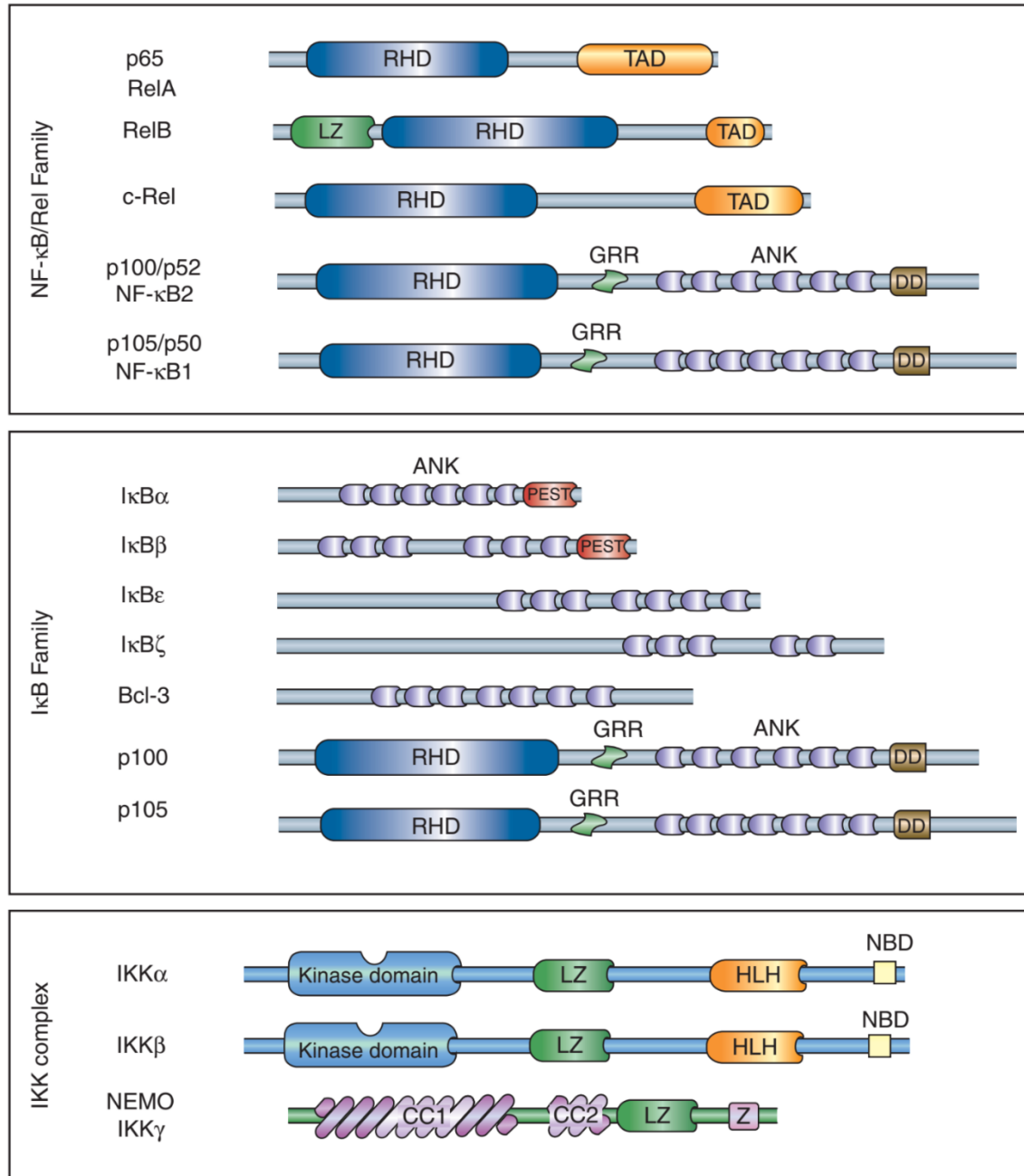
1.4.1 Οι οικογένειες των πρωτεϊνών NF-κB

Στα θηλαστικά η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB αποτελείται από πέντε μέλη, που αποτελούν υπομονάδες ομο- ή ετεροδιμερών παραγόντων που προσδένονται στο DNA. Τα γονίδια των υπομονάδων αυτών είναι τα RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) και p52/p100 (NF-κB2) [Εικόνα 1.5] τα οποία όταν σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή σύμπλοκα μπορούν να ρυθμίσουν θετικά ή αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων στόχων τους (57-63).

Κοινό χαρακτηριστικό των υπομονάδων του NF-κB είναι ότι διαθέτουν μια συντηρημένη περιοχή 300 αμινοξέων που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο τους και ονομάζεται Rel Homology Domain (RHD).

Η περιοχή RHD είναι υπεύθυνη για τη σύνδεσή τους με το DNA, επιτρέπει το διμερισμό τους, καθώς και την αλληλεπίδραση με μέλη της οικογένειας των IκBs, που δρουν κατασταλτικά στην ενεργοποίηση τους. Περιέχουν επίσης, μια περιοχή η οποία αποτελεί ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού (Nuclear Localization Sequence, NLS), που επιτρέπει τη μετατόπισή τους στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα (64).

Τρία από τα μέλη της οικογένειας Rel (p65, RelB, c – Rel) συντίθενται ως ώριμα πρωτεϊνικά προϊόντα. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι περιέχουν περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Transactivation Domains, TADs) στο καρβοξυτελικό τους άκρο οι οποίες κυρίως ευθύνονται για την ιδιότητα των μορίων αυτών να δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων-στόχων [Εικόνα 1.5] (65).



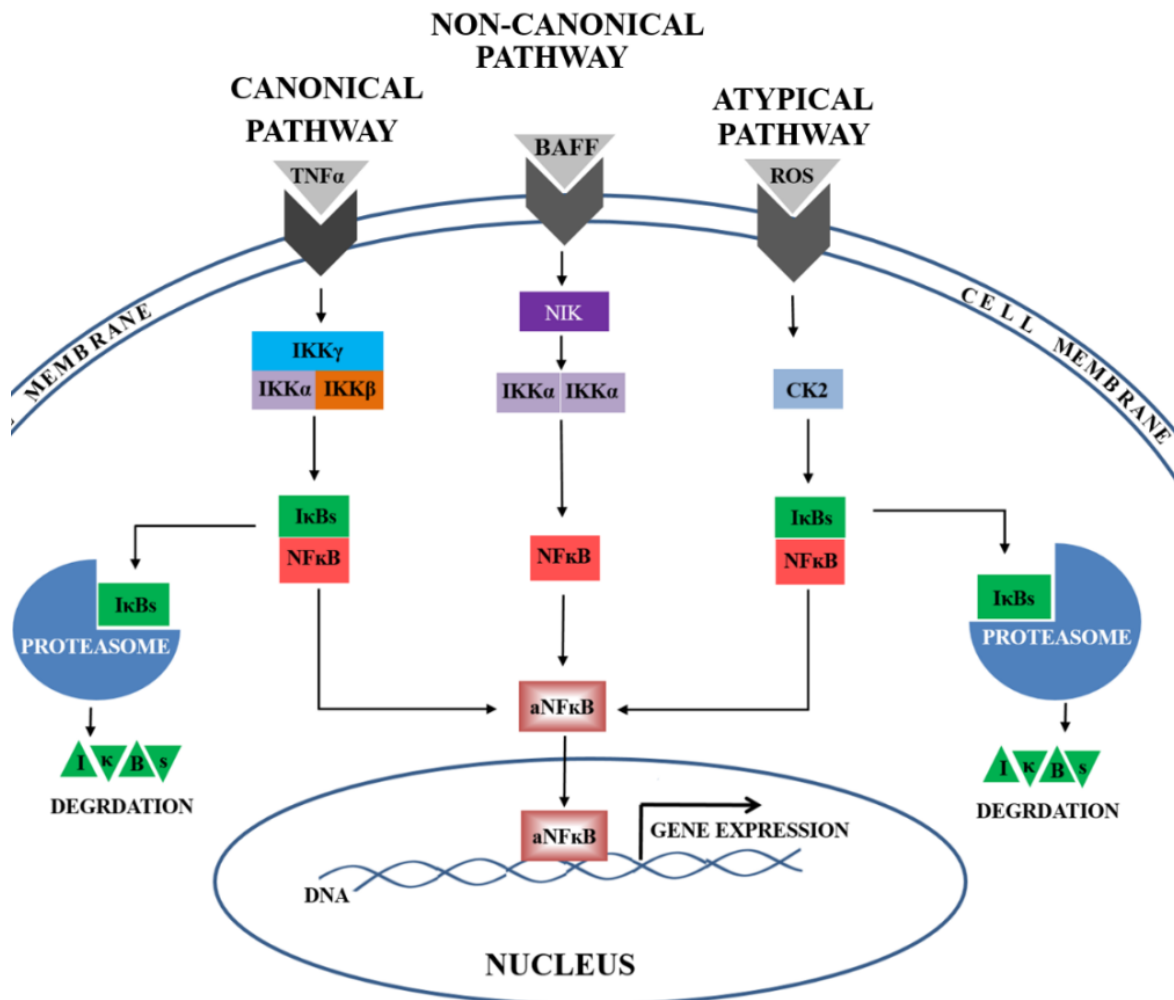
Εικόνα 1.5: Τα μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB. Η οικογένεια των υπομονάδων NF-κB αποτελείται από τις πρωτεΐνες RelA (p65), RelB, Rel (c-Rel) καθώς και τις πρωτεΐνες p52 και p50, οι οποίες προέρχονται από τα πρόδρομα μόρια p100 και p105 αντίστοιχα. Όλα τα μέλη της οικογένειας διαθέτουν τη συντηρημένη περιοχή RHD, στην οποία βρίσκεται και η αλληλουχία NLS, η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεσης του μεταγραφικού στο DNA. Ενώ οι πρωτεΐνες Rel (RelA, RelB, c-Rel), διαθέτουν την αλληλουχία TAD. Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών I-κB περιέχουν επαναλήψεις ανκυρίνης (ANK), οι οποίες και είναι χαρακτηριστικές για αυτή την οικογένεια πρωτεϊνών. Οι πρόδρομες πρωτεΐνες p100 και p105 μπορούν συναντώνται και είναι λειτουργικές και στις δύο οικογένειες των πρωτεϊνών NF-κB και I-κB. Κάθε πρωτεΐνη έχει ένα μοτίβο που τη χαρακτηρίζει όπως φαίνεται και στην εικόνα. Η οικογένεια των κινασών IKKs, IKKα και IKKβ φέρουν δραστικότητα κινάσης, ενώ η πρωτεΐνη NEMO δεν έχει ενζυμική δραστικότητα. Συναντώνται τα μοτίβα CC, σπειροειδές πηνίο. DD, περιοχή θανάτου, GRR, περιοχή πλούσια σε γλυκίνη, HLH, έλικα-βρόγχος-έλικα μοτίβο, LZ, φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper domain), NBD, περιοχή πρόσδεσης της NEMO, PEST, περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης, γλουταμικού οξέος, σερίνης και θρεονίνης, TAD, τομέας διενεργοποίησης. ZF, περιοχή πλούσια σε ψευδάργυρο [Τροποποιημένη από (66)].

Σε καταστάσεις ηρεμίας του κυττάρου, ο NF-κΒ εντοπίζεται σαν ετεροδιμερές στο κυτταρόπλασμα σε σύνδεση με τον αναστολέα του IκΒ, ο οποίος εμποδίζει την ενεργοποίηση του συμπλόκου αποτρέποντας την μετατόπισή του στον πυρήνα. Κοινό χαρακτηριστικό των αναστολέων του NF-κΒ είναι ότι έχουν επαναλήψεις αγκυρίνης, που κυμαίνονται από τρεις έως επτά [Εικόνα 1.5]. Οι επαναλήψεις αγκυρίνης είναι αυτές που αλληλεπιδρούν με το RHD και καλύπτουν το NLS του NF-κΒ. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν επίσης αναδείξει ότι οι πρωτεΐνες IκΒ έχουν έναν πιο σύνθετο ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση, πέρα από την δράση τους ως καταστολείς του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, φαίνεται να είναι η ικανότητα σταθεροποίησης διμερών NF-κΒ, όπως είναι αυτά που περιέχουν τις υπομονάδες RelB (67).

1.4.2 Οι πορείες ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κΒ

Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κΒ ενεργοποιούνται μέσω τριών βασικών πορειών ενεργοποίησης οι οποίες απαντούν σε πλήθος εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων ερεθισμάτων. Οι πορείες αυτές αναφέρονται ως κανονική πορεία, μη κανονική πορεία και άτυπη πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ (Εικόνα 3) (68-71). Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησής τους, οι παράγοντες NF-κΒ προσδένονται στο DNA ως διμερή που προέρχονται από 5 υπομονάδες: RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 και p52.

Κανονική πορεία: Ενεργοποιείται ως απόκριση σε κυτταροκίνες όπως για παράδειγμα ο παράγοντας TNF-α και η ιντερλευκίνη IL-1, καθώς και διαμέσω σημάτων που μεταβιβάζονται μέσω των υποδοχέων Toll (Toll-like receptors; TLRs). Πριν την ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κΒ, σε συνθήκες κυτταρικής ηρεμίας και απουσία κάποιου εξωτερικού ερεθίσματος ή κατάστασης στρες, τα ετεροδιμερή RelA/p65-p50 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, καθώς είναι προσδεμένα με την κατασταλτική πρωτεΐνη IκΒα.



Εικόνα 1.5: Σύνοψη των πορειών ενεργοποίησης του NF- κ B. Οι κανονικές, μη κανονικές και άτυπες οδούς σηματοδότησης NF κ B ενεργοποιούνται από πολλαπλά διεγερτικά, π.χ. $TNF-\alpha$, BAFF ή ROS. Στην κανονική διαδρομή, το σύμπλεγμα των ενεργοποιητών, συμπεριλαμβανομένων των: IKK γ , IKK β και IKK α , είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση NF κ B με πρωτεόλυση σε έναν από τους ακόλουθους αναστολείς (I κ Bs): I κ B α ή I κ B β . Στο μη κανονικό μονοπάτι, το IKK α , υποστηριζόμενο από τη NIK, είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του NF κ B. Στις άτυπες οδούς, η κινάση καζεΐνης 2 (CK2) προκαλεί πρωτεόλυση της I κ B (I κ B α ή I κ B β) [Τροποποιημένη από (72)].

Η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF- κ B απαιτεί αρχικά τη φωσφορυλίωση και επομένως την ενεργοποίηση της κινάσης IKK β του πρωτεϊνικού συμπλέγματος των κινασών IKK σε αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης που εντοπίζονται στις θέσεις των αμινοξέων 177/181. Τα αμινοξικά κατάλοιπα αυτά εντοπίζονται στον βρόγχο ενεργοποίησης T της κινάσης και αυτή η ενεργοποίηση εξαρτάται από την ενεργοποίηση της NEMO/IKK γ . Η ενεργοποίηση είναι αποτέλεσμα ενός εξωτερικού προφλεγμονώδους ή στρεσογόνου ερεθίσματος. Η ενεργοποιημένη IKK β φωσφορυλιώνει σε ένα επόμενο στάδιο την κατασταλτική πρωτεΐνη I κ B α σε κατάλοιπα σερίνης στις αμινοξικές θέσεις 32 και 36 (Ser32/36), και στη συνέχεια

η IκBa ουβικιτινιώνεται στα κατάλοιπα λυσίνης 19 και 21 και τελικά οδηγείται προς αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα 26 S. Τελικό αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η απελευθέρωση του ετεροδιμερούς συμπλόκου RelA/p65-p50 ώστε αυτό να μετατοπισθεί στον πυρήνα και να ρυθμίσει (είτε επάγοντας είτε καταστέλλοντας) τη μεταγραφή των γονιδίων- στόχων του (66, 69, 73-75).

Μη κανονική ή εναλλακτική πορεία: Η μη κανονική ή εναλλακτική πορεία ενεργοποίησης επάγεται από μια σειρά ερεθισμάτων, όπως η λεμφοτοξίνη β (LTβ) ή ο παράγοντας ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων. Ο τελευταίος διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων. Κατά την ενεργοποίηση αυτής της πορείας του NF-κΒ, κεντρικό ρόλο έχει η α υπομονάδα του συμπλέγματος IKK (κινάση IKKα). Ομοδιμερή της κινάσης IKKα ενεργοποιούνται ύστερα από φωσφορυλίωσή τους σε κατάλοιπα σερίνης στις αμινοξικές θέσεις 176/180 στο βρόγχο ενεργοποίησης T που καταλύονται από την κινάση ενεργοποίησης του NF-κΒ ή NIK (NF-κΒ Inducing Kinase), και σε αντίθεση με την κανονική πορεία κατά την οποία ενεργοποιείται η IKKβ, δεν εξαρτάται από την ενεργοποίηση της NEMO/IKKγ. Το ενεργοποιημένο ομοδιμερές IKKα φωσφορυλιώνει στη συνέχεια το πρόδρομο μόριο p100/NF-κΒ2 με αποτέλεσμα το σχηματισμό της υπομονάδας p52, έπειτα από πρωτεολυτική επεξεργασία της p100, η οποία σχηματίζει το ετεροδιμερές σύμπλοκο p52-RelB. Το σύμπλοκο p52-RelB μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί ή καταστέλλει την έκφραση γονιδίων στόχων του (63, 74, 76-79).

Άτυπες πορείες: Η άτυπες ή μη τυπικές πορείες ενεργοποίησης επάγονται ως απάντηση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων και σε κάποιες περιπτώσεις δεν εξαρτώνται από την ενεργοποίηση του συμπλόκου των IKKs. Παρόλα αυτά, σημαντικό στάδιο αποτελεί η σύγκλιση τους στην ενεργοποίηση του διμερούς συμπλόκου p50-p65/RelA και στη συνέχεια η μετατόπισή του στον πυρήνα. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκBa στην τυροσίνη 42, προκαλεί την αποδόμηση ή την αποδέσμευσή της από το σύμπλοκο του NF-κΒ, και συμβαίνει συνήθως όταν το κύτταρο βρεθεί σε συγκεκριμένες συνθήκες στρες, όπως η υποξία ή η επαγωγή οξειδωτικού στρες από υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), η έκφραση του ογκογονιδίου HER2. Όλα τα ανωτέρω ερεθίσματα έχουν σαν αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της IκBa από την κινάση της καζεΐνης-II (casein kinase-II; CK2) σε κατάλοιπα της καρβοξυτελικής επικράτειας της πρωτεΐνης PEST. Αντίθετα, η άτυπη πορεία, που ενεργοποιείται υπό την επίδραση γονοτοξικού στρες και χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και στην οποία κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η μη καταλυτική υπομονάδα NEMO/IKKγ, προσομοιάζει περισσότερο της κανονικής πορείας ενεργοποίησης (63, 73, 80, 81).

1.4.3 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον καρκίνο

Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κΒ ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους σε διαφορετικά φυσιολογικά συστήματα. Η διαταραχή του μονοπατιού παίζει ρόλο σε μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις **(82-84)**. Η ενεργοποίηση της πορείας IKKβ/NF-κΒ επηρεάζει τις λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων **(70, 71, 84)**, προάγει χρόνια φλεγμονή η οποία σχετίζεται άμεσα με την έναρξη και την εξέλιξη της καρκινογένεσης **(85-90)** και ελέγχει τις ανοσοαποκρίσεις του οργανισμού στα καρκινικά κύτταρα **(69, 88-96)**. Επίσης η ενεργοποίηση του NF-κΒ σχετίζεται με την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου **(97-102)**, ενώ επιπλέον έχει συσχετιστεί με δείκτες κακής κλινικής πρόγνωσης για επιβίωση **(103-105)**.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ συμβάλλει σημαντικά στη διαδικασία της ογκογένεσης, καθώς προάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων **(75, 106)**. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο NF-κΒ εμπλέκεται στην εξέλιξη του καρκίνου. Ιδιοστατική ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ έχει παρατηρηθεί σε αρκετές μορφές επιθηλιακών καρκίνων καθώς και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές **(107, 108)**. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν το σημαντικό ρόλο του NF-κΒ σε μια σειρά φυσιολογικών διαδικασιών **(109, 110)**. Διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών για τη μελέτη της διαδικασίας της καρκινογένεσης κατέδειξαν ότι η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη διάφορων τύπων καρκίνου **(111, 112)**.

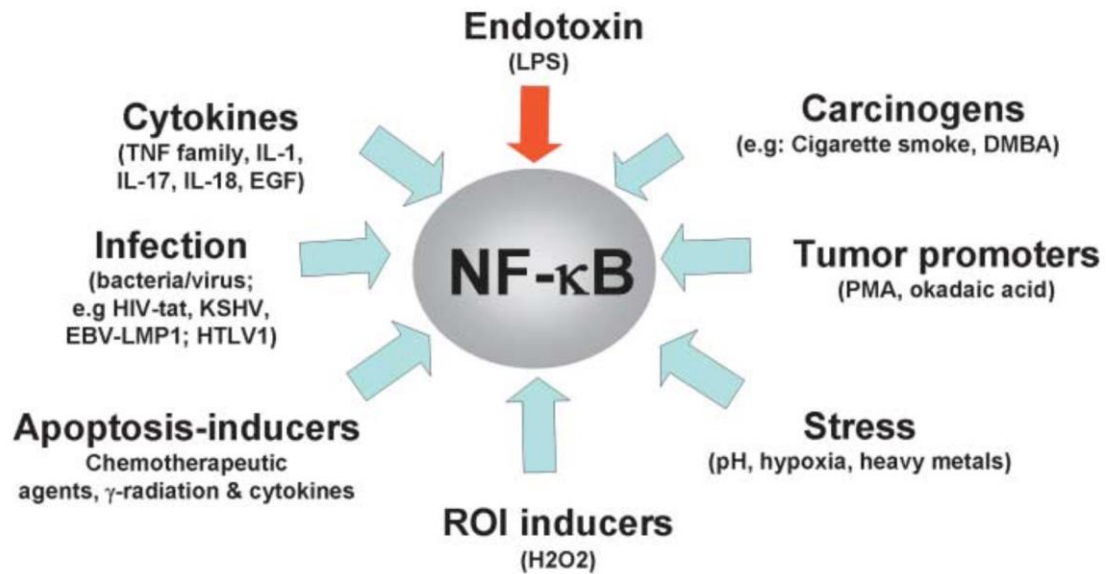
1.4.4 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στις κακοήθειες εγκεφάλου

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ περιλαμβάνει τις υπομονάδες Rel A/p65, NF-κΒ1, NF-κΒ2, cRel και RelB οι οποίες σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Λειτουργώντας ως διμερές ο NF-κΒ ρυθμίζει την έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων απαρτίζοντας έτσι πληροφορίες που φθάνουν στον πυρήνα προερχόμενες από κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες, μόρια προσκόλλησης ή άλλα μιτογόνα ερεθίσματα. Αρνητικός ρυθμιστής της λειτουργίας του NF-κΒ είναι η ομάδα των πρωτεϊνών IκΒ οι οποίες δεσμεύουν τον NF-κΒ, αυξάνουν τη συσσώρευσή του στο κυτταρόπλασμα και παρεμποδίζουν τη δράση του στον πυρήνα. Ως θετικοί ρυθμιστές του NF-κΒ λειτουργούν οι κινάσες των IκΒ (IKK), οι οποίες φωσφορυλιώνοντας τις IκΒ επάγουν την αποδόμησή τους από το σύστημα της ubiquitin και ως συνέπεια απελευθερώνεται ο NF-κΒ **[Εικόνα 1.6]**. Με τη δράση τους αυτή αυξάνεται η

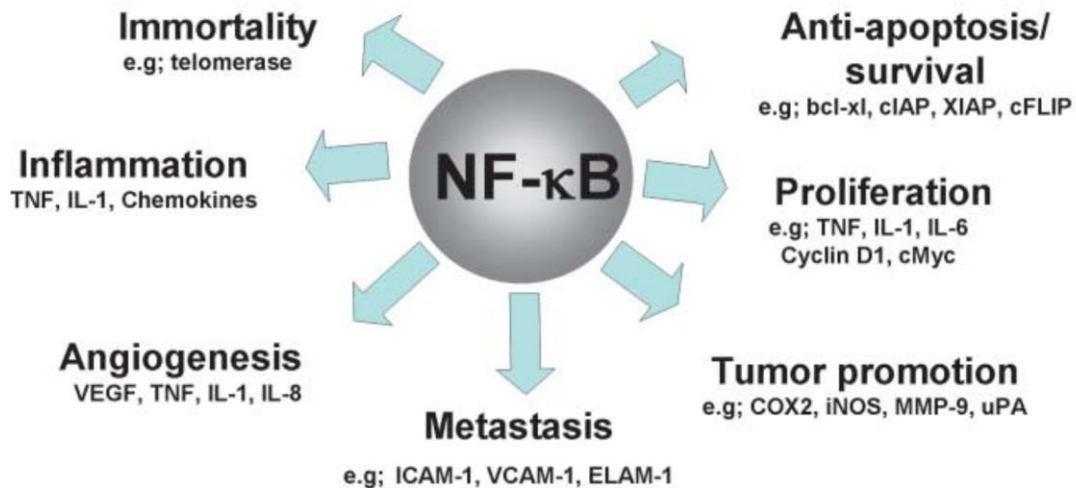
συγκέντρωση του NF-κB στον πυρήνα. Ο NF-κB ως διμερές συνδέεται στο D.N.A. και επάγει την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες όπως η ανοσολογική απάντηση, η αγγειογένεση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η κυτταρική διήθηση κ.α **(113)**. Είναι σαφές ότι ο NF-κB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκκριση ενζύμων που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία συμμετέχοντας έτσι στις διεργασίες προαγωγής του όγκου. Πολλές πειραματικές μελέτες παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του NF-κB σε μια πληθώρα νεοπλασιών μεταξύ των οποίων και τα αστροκυττώματα. Το γεγονός αυτό καθιστά τον NF-κB κεντρικό ρυθμιστή της κακοήθους συμπεριφοράς των όγκων αυτών **(114)**. Πολλά από τα ένζυμα που σχετίζονται με την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και την κυτταρική διήθηση εμφανίζουν στους υποκινητές τους αλληλουχίες πρόσδεσης για τον NF-κB με σημαντικότερους εκπροσώπους την MMP-2, την MMP-9, και το u-PA **(115)**.

Στο επιθετικό γλοιοβλάστωμα ο παράγοντας NF-κB δρα ογκογόνα και θεωρείται σημαντικός τόσο στην επιβίωση όσο και την χημειοανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων κατά τη θεραπεία **(116-118)**. Επομένως, η ενεργότητα του μπορεί να σχετίζεται με την επίκτητη χημειοαντοχή των γλοιοβλαστωμάτων, η οποία οδηγεί στην κακή κλινική πρόγνωση που εμφανίζει ο συγκεκριμένος τύπος κακοήθειας. Είναι άρα φανερό ότι η καταστολή της ενεργοποίησης του NF-κB θα μπορούσε να παρέχει μια μέθοδο ενίσχυσης της αποτελεσματικότητας της αντικαρκινικής θεραπείας. Σήμερα υπάρχουν αρκετοί μη ειδικοί αναστολείς της πορείας IKK/NF-κB, και συγκεκριμένα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) όπως η ασπιρίνη, αναστολείς πρωτεασών και γλυκοκορτικοειδή. Δεδομένου του κεντρικού ρόλου του NF-κB στην ανοσολογική απόκριση, η μη εξειδικευμένη αναστολή των πορειών ενεργοποίησής του εμφανίζει αντίκτυπο και στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού **(111)**. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι διάφορα φυσικά προϊόντα με γνωστές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, όπως η μεθυλαλπινουισοφλαβόνη **(119)**, η απινδόλη H **(120)** και η κερσετίνη **(121)** δρουν κατασταλτικά για τον NF-κB. Η παρουσία τέτοιων ουσιών αφενός αυξάνει την προοπτική χρήσης τους ως αντικαρκινικά φάρμακα, ενώ αφ'ετέρου η αναστολή του μονοπατιού του NF-κB μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική πιθανότητα για την αντιγλοιοματική δράση του.

A.



B.



Εικόνα 1.6. Αιτίες αυξημένης δραστηριότητας του NF-κB (A) και οι σημαντικότερες λειτουργίες καθώς και τα γονίδια των οποίων ρυθμίζει την έκφραση (B) [τροποποιημένη από (115)].

1.5 Φαρμακευτικά φυτά με αντικαρκινική και αντιγλοιοωματική δράση

Κάποια από τα σημαντικότερα χημειοθεραπευτικά έχουν απομονωθεί από φυτά, όπως η πακλιταξέλη, η βινκριστίνη, η ετοποσίδη, και κάποια ανάλογα της ιρινοτεκάνης (122, 123). Η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την ανακάλυψη τέτοιων φαρμάκων, καινοτόμων δηλαδή χημικών ενώσεων είναι η κλασμάτωση συνοδευόμενη από μελέτη βιοδραστικότητας (122), στην οποία ειδικά βιολογικά τεστ δείχνουν το αν νέες ουσίες είναι βιοδραστικές και στη συνέχεια αποκαλύπτουν τους μηχανισμούς δράσης τους.

Η δυναμική των φυτικών ενώσεων αποτυπώνεται σε πλήθος βιοδραστικών φυτών, καθώς και στις απομονωμένες ενώσεις από αυτά, που εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (124). Σε αυτό το πλαίσιο η μελέτη φαρμακευτικών φυτών και η συστηματική ανάλυση νέων ουσιών μπορεί να αποτελεί πηγή νέων, αποτελεσματικών και με λιγότερες παρενέργειες χημειοθεραπευτικών ουσιών (125, 126). Η ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει πληθώρα ενδημικών φαρμακευτικών φυτών, όπως το τσάι του βουνού (*Sideritis sp.*) και το θυμάρι (*Thymus sp.*), που περιέχουν ενώσεις με ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (127, 128). Μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει εκτενής έρευνα της δράσης ουσιών φυτικής προέλευσης στο γλοιοβλάστωμα. Μεταξύ άλλων έχει αποδειχθεί ότι η εβοδιαμίνη έχει *in vitro* αντιγλοιοωματική δράση (129). Με δεδομένη την επίκτητη χημειοαντοχή των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, η μελέτη ανάλογων ουσιών έχει προταθεί ως μία σημαντική πηγή για την εξέλιξη της νέας γενεάς αντιγλοιοωματικών παραγόντων (130).

Παρατίθενται κάποια παραδείγματα ενώσεων με ενδιαφέρουσες ιδιότητες, οι οποίες όμως πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω και συστηματικά πριν εισέλθουν στην κλινική πράξη.

Η κουρκουμίνη έχει προταθεί ως πρόσθετη θεραπεία για το γλοιοβλάστωμα. Η βιβλιογραφία έδειξε τη συνεργιστική επίδραση του συνδυασμού κουρκουμίνης και τεμοζολομίδης στη θεραπεία του γλοιώματος. Η κουρκουμίνη ενισχύει την κυτταροτοξική δράση της τεμοζολομίδης μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης του Akt και του mTOR (131).

Οι πρωτεΐνες BCRP και P-gp παίζουν ζωτικό ρόλο στην αποτυχία της θεραπείας του γλοιώματος μέσω του μηχανισμού εκροής τους στον BBB, η οποία έχει επίσης σημαντική συμβολή στην αντοχή στα φάρμακα. Η γλυκεολίνη έχει ανασταλτικές επιδράσεις στις BCRP και P-gp, και η χρήση της θα μπορούσε να έχει αξιοσημείωτη επίδραση στην απορρόφηση φαρμάκων από τον εγκέφαλο (132).

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs) είναι κυρίως υπεύθυνα για υποτροπή όγκου στο γλοιώμα. Η Eckol, μια φλοροταννίνη, παρουσιάζει αντιγλοιωματική δράση, στοχεύοντας CSCs σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος U87 και U373 (133). Η πιπερίνη είναι μια άλλη φυσική ένωση που έχει επίσης ανασταλτική επίδραση στα CSC (134). Η ουσία αυτή καταστέλλει το σχηματισμό μαμμοσφαιρών και μειώνει την δραστικότητα της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (135). Το Sulforaphane είναι μια άλλη φυσική ένωση που υπάρχει στην ανθρώπινη διατροφή. Το R-ισομερές του έχει βρεθεί ότι είναι χημειοπροληπτικό και εμφανίζει αντικαρκινική δραστικότητα καταστέλλοντας τα CSCs και παρεμβαίνοντας στα μονοπάτια σηματοδότησης NF-κΒ και Wnt / β-κατενίνης (136, 137). Το β-καροτένιο καταστέλλει επίσης την ικανότητα αυτοανανέωσης των CSCs στο νευροβλάστωμα και αναστέλλει την υποτροπή και τη μετάσταση (137). Η Oxymatrine είναι ένα αλκαλοειδές κινολιζιδίνης, το οποίο αναφέρθηκε ότι επηρεάζει τη δημιουργία CSC, αλλά ο μηχανισμός της δράσης του δεν έχει αποκαλυφθεί (138). Η καψαϊκίνη αναστέλλει την ανάπτυξη των CSC, παρεμβαίνοντας στο μονοπάτι σηματοδότησης Notch (139).

Συνολικά, μια μεγάλη ποικιλία φυσικών ενώσεων έχει εν δυνάμει δράση κατά του γλοιώματος, αλλά πρέπει να ακολουθήσουν πολλά βήματα μέχρι τη μεταφορά τους στην κλινική. Κάποιες φυσικές ενώσεις δείχνουν να έχουν άμεση χημειοπροληπτική δράση στο γλοιώμα. Άλλες ενώσεις που μπορούν να βοηθήσουν να ξεπεραστούν κάποιοι από τους σημαντικούς περιορισμούς της θεραπείας του γλοιώματος με την ευαισθητοποίηση των κυττάρων γλοιώματος ή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, την παρουσία πρωτεϊνών χημειοανθεκτικότητας ή τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (130).

1.5.1 Φυσικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Μοσχαμίνη

Απομονώνεται από τρία είδη του γένους *Centaurea*: *C. moschata* L. (140), *C. montana* L. (141) and *C. nigra* L. (142). Μέσω φαρματοσκοπικής ανάλυσης (¹H and ¹³C NMR), η ένωση χαρακτηρίζεται ως N-(3-μεθοξυ-4-υδροξυκινναμοϋλο)-5-υδροξυτρυπταμίνη και είναι αλκαλοειδές ινδόλης (143).

N-p-Coumaroyl-serotonin

Απομονώθηκε από το γένος *Centaurea*, στα είδη *C. Nigra* και *C. montana* **(141, 142)**. Έχει επίσης απομονωθεί και από άλλα είδη όπως: *Phyllostachys bambusoides Sieb. et Zucc.* **(144)**, *Carthamus tinctorius L.* **(145, 146)**, *Croton menyharthii Pax* **(147)**, *Ipomoea obscura (L.) Ker-Gawl.* **(148)** και *Amorphophallus konjac K. Koch.* **(149)**. Μέσω φαρματοσκοπικής ανάλυσης (^1H and ^{13}C NMR), η ένωση χαρακτηρίζεται ως N- (4-υδροξυκινναμοϋλ) -5-υδροξυτρυπταμίνη και είναι αλκαλοειδές ινδόλης **(143)**.

Δεγλουκοελλεβρίνη

Απομονώθηκε από φυτά του γένους *Helleborus* της οικογένειας *Ranunculaceae* και του είδους *H. Thibetanus Franch* **(150, 151)**. Είναι τριτερπένιο και συγκεκριμένα βουφαδιενολίδιο. Η ταυτοποίηση της δομής της ένωσης έγινε με τη χρήση φασματοσκοπίας ^1H and ^{13}C NMR.

Σκοπός της μελέτης

Το γλοιοβλάστωμα αποτελεί μία επιθετική μορφή καρκίνου με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης. Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται δεν αυξάνουν την επιβίωση πάνω από 2.5 μήνες, διατηρώντας το προσδόκιμο ζωής κατά μέσο όρο σε 15 μήνες από την αρχική διάγνωση.

Σκοπός στην παρούσα μελέτη είναι η ανάδειξη νέων χημειοθεραπευτικών ενώσεων για το γλοιοβλάστωμα, από φυσικές ενώσεις, απομονωμένες από φυτά της ευρύτερης περιοχής των Βαλκανίων.

Για την προσέγγιση του σκοπού, οι επιμέρους στόχοι της παρούσας διατριβής είναι:

β) η μελέτη της δράσης του κυτταρικού φαινοτύπου και την επαγωγή κυτταρικού θανάτου, σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος,

α) την ανάπτυξη *in vitro* μοντέλων ποσοτικοποίησης της ενεργότητας του NF-κΒ έπειτα από επίδραση φυσικών ενώσεων

γ) μοριακές τεχνικές για επιβεβαίωση των παρατηρήσεων σε επίπεδο RNA και πρωτεΐνης και δ) χρήση του *in vivo* μοντέλου ιχθύων *Danio rerio* (zebrafish) για ταυτόχρονη μελέτη κυτταροτοξικότητας, ανάλυση δραστηριότητας και της ενεργότητας του NF-κΒ.

- Ενότητα 2 -

Υλικά και Μέθοδοι

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1.1 Αναλώσιμα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αναλώσιμα υλικά των κάτωθι εταιριών: Φλάσκες πολυστυρενίου κυτταροκαλλιέργειας: Corning®, Cellstar®, Greiner Bio-one. Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας: (διαμέτρου 2, 6 και 10 cm) Cellstar®, Greiner Bio-one, Orange Scientific. Βακτηριακά τρυβλία: Greiner Bio-one Πιπέτες Pasteur: Brand GMBH. Πιπέτες πλαστικές κυτταροκαλλιέργειας: (Χωρητικότητας 5 και 10 ml) Corning®. Φυγοκεντρικοί σωλήνες UNIVERSAL: Greiner Bio-one. Φιαλίδια 1 ml για φύλαξη κυττάρων σε δοχείο υγρού αζώτου: NUNC International. Φυγοκεντρικοί σωλήνες 15 ml: Orange Scientific.

2.1.2 Λοιπά αντιδραστήρια

Απομόνωση RNA: QIAamp RNA Blood Mini Kit της QIAGEN. Παρασκευή cDNA: Hemavision RT της DNA Technology A/S. Ταυτοποίηση χρωμοσωμικών μετατοπίσεων: Hemavision Screen της DNA Technology A/S. Απομόνωση DNA από πηκτική αгарόζης: MiniElute Gel Extraction Kit της QIAGEN. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA: Plasmid DNA Purification NucleoSpin της Macherey-Nagel. DNA Πολυμεράσες: Taq DNA polymerase της Invitrogen.

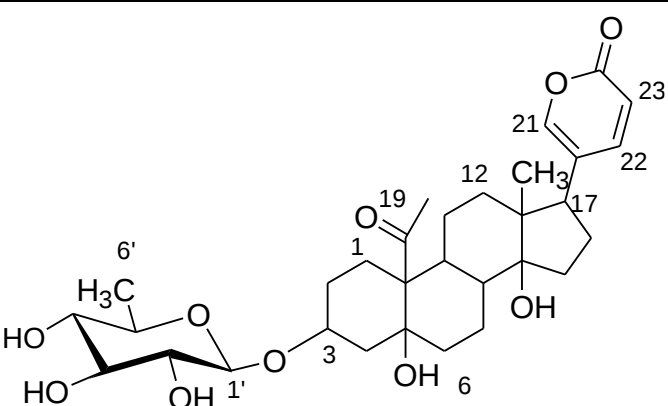
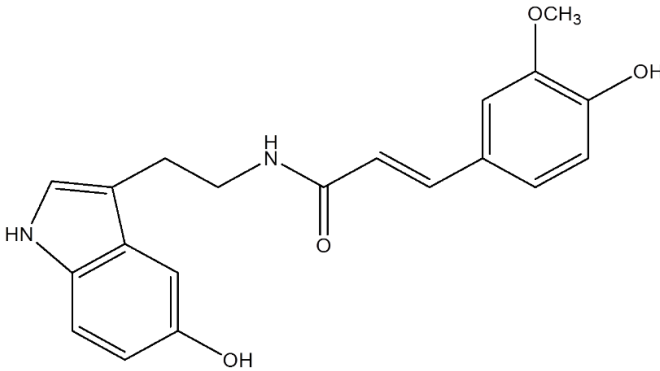
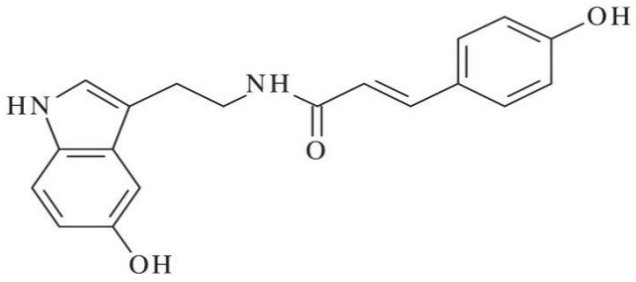
2.1.3 Εξοπλισμός

Αυτόκαυστο: AES, Raypa. Τροχιακός επωαστήρας: G25, New Brunswick Scientific co. Inc. Ξηρός κλίβανος: Memmert. Υδατόλουτρο: JULABO 7A. Επιτραπέζια φυγόκεντρος: Hettich, Universal II. Μικροφυγόκεντρος: Centrifuge 5415D, Eppendorf. Φωτόμετρο: Gene-Quant, Pharmacia. Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας: UV transilluminator, Ultra Violet Products Inc. Φωτογραφική μηχανή: Nikon CoolPix 990. Επωαστικός κλίβανος ευκαρυωτικών κυττάρων: Forma Scientific, CO2 Water-jacketed Incubator. Εστία κάθετης νηματικής ροής: AURA 200 MAC, BioAir Instruments. Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης (Electroporator): BTX ECM 630. Κυτταρομετρητής ροής: FACS Calibur, Becton Dickinson. Μικροσκόπιο φθορισμού: Nikon eclipse E400. Φασματοφθορισμόμετρο: F-2500 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer. Θερμοκυκλοποιητής: DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer. Ηλεκτροφορητική συσκευή: Biorad. Συσκευή εμφάνισης μεμβρανών ανοσοαποτύπωσης κατά Western: Molecular Imager ChemiDoc XRS, Biorad.

2.1.4 Ουσίες απομονωμένες από φυτά

Έγινε μελέτη της δράσης των φυσικών ενώσεων (απομονωμένων στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας-Φαρμακογνωσίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Δ. Λάζαρη) μοσχαμίνη (1), n-p-κουμαροϋλο-σεροτονίνη (2) και δεγλουκοελλεβρίνη (3) (143, 152).

Πίνακας 2.1: Σύνοψη πληροφοριών για ουσίες απομονωμένες από φυτά.

Δομή	Όνομα / Μοριακός τύπος	Μοριακό Βάρος
	Deglucohellebrin $C_{30}H_{42}O_{10}$	MW 562
	μοσχαμίνη	MW 352,3
	N-p-Κουμαροϋλ- σεροτονίνη	MW 322,4

2.1.5 Υλικά καλλιέργειας βακτηρίων

α. Θρεπτικά υλικά

Για την καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων σε υγρή φάση χρησιμοποιείται το πλήρες θρεπτικό υλικό LB (Luria ή Lenox Broth) [1% (w/v) θρυπτόνη, 0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης 1% (w/v) NaCl]. Το θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (AES, Raypa, R.Espinar S.L.) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1 bar. Για την ανάπτυξη βακτηρίων σε στερεή φάση, στο ανωτέρω θρεπτικό υλικό προστίθεται επιπλέον 1.5% (w/v) άγαρ, αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και αφήνεται να μειωθεί η θερμοκρασία του σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55°C. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό LB/άγαρ διαμοιράζεται σε τρυβλία τύπου Petri.

β. Αντιβιοτικά

Στις βακτηριακές καλλιέργειες, για την επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων που φέρουν πλασμίδια χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό αμικικιλίνη (Sigma Aldrich Fine Chemicals) σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml.

2.1.6 Υλικά καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων

α. Θρεπτικά υλικά

Για την ανάπτυξη κυττάρων U251-MG, U-87MG και T98G χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM (BioChrom) στο οποίο προστέθηκαν επιπλέον 2 mM γλουταμίνης καθώς και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (PAA) (συγκέντρωσης 100x) για την αποφυγή μικροβιακών μολύνσεων. Πριν τη χρήση του, το θρεπτικό υλικό εμπλουτίστηκε με 10% v/v ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum – FBS), που περιέχει απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της καλλιέργειας.

β. Διάλυμα έκπλυσης

Για τις εκπλύσεις κυττάρων χρησιμοποιείται αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1xPBS (139 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.37 mM Na₂HPO₄, 0.44mM KH₂PO₄, 4.16mM NaHCO₃, pH=7.3) το οποίο έχει έλλειψη από δισθενή ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺.

γ. Διάλυμα θρυψίνης/EDTA

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, μέχρι την πλήρωση του χώρου ανάπτυξης, καθιστά αναγκαία την επανακαλλιέργειά τους. Η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA (PAA) συγκέντρωσης 0.01%/0.05% (w/v), αντίστοιχα, και επιτρέπει την επανακαλλιέργεια σε επιθυμητές συγκεντρώσεις.

2.2 Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA

2.2.1 Πλασμίδια

pNFκB:EGFP. Το πλασμίδιο pNFκB:EGFP **(153)** (διαθέσιμο από το αποθετήριο πλασμιδίων Addgene με αριθμό καταλόγου #44922) φέρει το γονίδιο EGFP υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών αλληλουχιών αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.

pSL301. Το πλασμίδιο pSL301 (Invitrogen) χρησιμοποιείται κυρίως ως ενδιάμεσος φορέας κλωνοποίησης λόγω ενός superlinker, μίας περιοχής κλωνοποίησης που περιέχει κατά σειρά θέσεις αναγνώρισης για 52 περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

pBabe-Puro. Ο ρετροϊκός φορέας pBabe-Puro επιτρέπει την κλωνοποίηση και την έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών, μετά από επιλογή με το αντιβιοτικό πουρομυκίνη.

2.2.2 Βακτηριακά στελέχη

Η ανάπτυξη των πλασμιδιακών φορέων έγινε σε χαρακτηρισμένα στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*, Top10f.

2.2.3 Βακτηριακός μετασχηματισμός

Προκειμένου να εισαχθεί πλασμιδιακό DNA σε βακτηριακά κύτταρα, αρχικά αυτά καθίστανται επιδεκτικά μετασχηματισμού μέσω κατεργασίας με διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου και σε επόμενο στάδιο ακολουθεί βακτηριακός μετασχηματισμός, σύμφωνα με τα παρακάτω στάδια.

α. Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων δεκτικών μετασχηματισμού

Για να καταστούν δεκτικά μετασχηματισμού, βακτηριακά κύτταρα *top10f* που φυλάσσονται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C), εμβολιάζονται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού LB σε φυγοκεντρικό σωλήνα Universal υπό στείρες συνθήκες (λύχνος Bunsen) και καλλιεργούνται ολονύκτια σε τροχιακό επωαστήρα, στους 37°C , υπό ανάδευση (210 rpm). Την επομένη, 100 μl βακτηριακής καλλιέργειας στατικής φάσης, αραιώνεται 1:100 και επωάζεται εκ νέου στους 37°C μέχρι να φτάσει στην εκθετική φάση ανάπτυξης ($\text{OD}_{590\text{nm}}=0.4$). Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυστυρενίου και ακολουθεί επώαση 10 λεπτών στον πάγο και φυγοκέντρωση 10 λεπτών, στις 2000xg, σε επιτραπέζια φυγόκεντρο που βρίσκεται σε ψυχρό θάλαμο (4°C). Αποχύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί έκπλυση του ιζήματος με 2 ml παγωμένου διαλύματος CaCl_2 (60mM CaCl_2 , 15% v/v γλυκερόλη, 10mM PIPES, pH7.0) για την διάνοιξη πόρων στο κυτταρικό τοίχωμα. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 1100xg για 8 λεπτά, επαναιώρηση σε 2 ml παγωμένου διαλύματος CaCl_2 και το προκύπτον εναιώρημα επωάζεται για 30 λεπτά στον πάγο, με σκοπό της διάνοιξη πόρων στα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα. Μετά το πέρας της επώασης, το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 1100xg για 8 λεπτά και το ίζημα επαναιωρείται ήπια σε 1ml διαλύματος CaCl_2 . Τέλος, το κυτταρικό εναιώρημα διαμοιράζεται σε μερίσματα των 100 μl , που αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι τη χρήση τους.

β. Βακτηριακός μετασχηματισμός (εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε βακτηριακά κύτταρα)

Ο βακτηριακός μετασχηματισμός πραγματοποιείται είτε σε επιδεκτικά κύτταρα μετασχηματισμού, που προκύπτουν από το προηγούμενο στάδιο, είτε σε εμπορικά διαθέσιμα κύτταρα. Αρχικά γίνεται ανάμειξη 100 μl εναιωρήματος βακτηρίων με 5 μl (~50 ng) από τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και τοποθέτηση του μείγματος στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το μείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 42°C για 2 λεπτά και επανατοποθετείται στον πάγο. Σε επόμενο στάδιο προστίθεται 1 ml LB και το τελικό μείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 60 λεπτά. Με το πέρας των 60 λεπτών, τα βακτήρια επιστρώνονται σε διαφορετικές ποσότητες με κεκλιμένη πιπέτα Pasteur σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ (LB + 1,5% άγαρ) που περιέχει 100 $\mu\text{g/ml}$ αμπικιλίνη. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες, παρουσία λύχνου Bunsen. Τα τρυβλία επωάζονται ολονύκτια στους 37°C .

2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

α. Μέσω λυσοζύμης και βρασμού

Για την ταχεία ανάλυση πλασμιδιακού DNA ανθεκτικών, αντιβιοτικά επιλεγμένων βακτηριακών κλώνων, χρησιμοποιείται η μέθοδος απομόνωσης DNA με λυσοζύμη και βρασμό. Συγκεκριμένα, μονήρεις βακτηριακοί κλώνοι μεταφέρονται υπό ασηπτικές συνθήκες (λύχνος Bunsen) σε ξεχωριστούς πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες χωρητικότητας 15 ml, που περιέχουν 3 ml θρεπτικού υλικού LB και 100 µg/ml αμπικιλίνη. Η υγρή καλλιέργεια αναπτύσσεται ολονύκτια σε τροχιακό επωαστήρα, στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm). Την επομένη, 1.5 ml καλλιέργειας μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 1.5 ml, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε μικροφυγόκεντρο στις 13000×g, σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο αποχύνεται. Ακολουθεί προσεκτική επαναιώρηση του ιζήματος σε 70 µl διαλύματος STET (8% w/v σακχαρόζη, 5% v/v Triton X-100, 50 mM EDTA pH 8.0 και 50 mM Tris-HCl pH 8.0), με προσθήκη 25 µl από διάλυμα 10 mg/ml λυσοζύμης και το προκύπτον εναιώρημα επωάζεται για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση στους 100°C για 45'' (όπου και λαμβάνει χώρα η πλήρης λύση των βακτηριακών τοιχωμάτων) και, με το πέρας του χρόνου αυτού, το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 13000xg σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα και προστίθενται 100 µl ισοπροπανόλης. Έπειτα από ανάδευση με χρήση Vortex, ψύχεται στους -70°C για 15 λεπτά για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA. Αμέσως μετά φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13000×g, σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται το υπερκείμενο, το ίζημα ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού για 15 λεπτά και τελικώς επαναιωρείται σε 20 µl διαλύματος T.E. (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Το προκύπτον DNA μπορεί να αποθηκευθεί και να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για περιοριστική ενζυμική ανάλυση ή PCR. Η μέση απόδοση της μεθόδου είναι 0,5-1,5 µg πλασμιδιακού DNA για κάθε ml βακτηριακής καλλιέργειας.

β. Μέσω στηλών

Η απομόνωση καθαρού πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο *Plasmid DNA Purification NucleoSpin* της Macherey-Nagel. Αρχικά φυγοκεντρούνται 4 ml ολονύκτιας βακτηριακής καλλιέργειας στα 11.000×g για 30 δευτερόλεπτα. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 250 µl ρυθμιστικού διαλύματος A1. Ακολουθεί προσθήκη 250 µl ρυθμιστικού διαλύματος A2 και ήπια ανάδευση. Το μείγμα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 11.000×g για 10 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το

υπερκείμενο συλλέγεται, μεταφέρεται σε στήλη NucleoSpin Plasmid και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα $11.000\times g$. Το υποκείμενο της στήλης διάλυμα απορρίπτεται και προστίθενται 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος A4. Έπεται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στα $11.000\times g$, απόρριψη του διαλύματος και επαναφυγοκέντρωση της στήλης για 2 λεπτά (χωρίς προσθήκη διαλύματος). Το πλασμιδιακό DNA εκλούεται με προσθήκη 50 μl ρυθμιστικού AE στο κέντρο της στήλης. Επώάζεται 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα $11.000\times g$ και φυλάσσεται στους -20°C .

2.2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για απομόνωση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας σε ποσότητες $\sim 250\text{ }\mu\text{g}$. Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών της Macherey-Nagel, *NucleoBond[®] Xtra Midi Preparation Kit*.

Αρχικά, όγκος 50 μl βακτηριακής καλλιέργειας, που έχει αναπτυχθεί ολονύκτια, εμβολιάζεται σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB, που περιέχει και 100 $\mu\text{g/ml}$ αμπικιλίνη, και αφήνεται 24 ώρες για ανάπτυξη. Όγκος LB 300 ml με 100 $\mu\text{g/ml}$ αμπικιλίνη εμβολιάζεται με 2 ml της προηγούμενης καλλιέργειας και ακολουθεί ολονύκτια ανάπτυξη. Την επομένη, απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για να καθαριστεί περαιτέρω, το πλασμιδιακό DNA έπειτα από την κατακρήμνισή του επαναωρεείται σε 300 μl διαλύματος TE 1x (pH 8.0) και έπειτα προστίθενται 18 μl διαλύματος 5M NaCl και 640 μl αιθανόλης. Ακολουθεί ανάδευση με Vortex και ολονύκτια επώαση στους -20°C . Την επομένη, φυγοκεντρείται στις $13.000\times g$ για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στο ίζημα προστίθενται 800 μl παγωμένης αιθανόλης 70% v/v. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες με τις παραπάνω και το ίζημα ξηραίνεται σε εστία κάθετης νηματικής ροής για 20 λεπτά. Τέλος, επαναδιαλύεται σε όγκο 200 μl διαλύματος TE 1x (pH 8.0).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του καθαρισμένου πλασμιδιακού DNA πραγματοποιείται με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 260nm σε φωτόμετρο GeneQuant και με βάση την ακόλουθη σχέση:

$1\text{ μονάδα οπτικής πυκνότητας} = 50\mu\text{g DNA}$
--

Ακολουθεί περιοριστική ενζυμική ανάλυση για έλεγχο της ορθότητας της αναμενόμενης πλασμιδιακής κατασκευής και το DNA αποθηκεύεται σε κατάψυξη (-20°C) μέχρι τη χρήση του.

2.2.6 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία απλή και δυναμική μέθοδο για ανάλυση, διαχωρισμό και απομόνωση μορίων DNA βάσει του μοριακού μεγέθους τους. Στηρίζεται στη μετακίνηση του ηλεκτραρνητικού μορίου του DNA σε ημιστερεό μέσο πολυμερούς πηκτής αγαρόζης με τη χρήση ηλεκτρικού πεδίου.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αγαρόζης 0.7% και 1.2% (w/v) με προσθήκη 0.4 µg/ml βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα αγαρόζης. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα και να καθιστά δυνατή την παρατήρησή τους σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Ως φορέας ηλεκτρονίων για τη δημιουργία τάσης και διαλύτης για την αγαρόζη, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα TBE σύστασης 89 mM σε Tris, 89 mM σε βορικό οξύ και 2 mM σε EDTA (pH 8). Ως δείκτης μοριακών μεγεθών χρησιμοποιείται pBR322/Hinfi (πλήρης πέψη του DNA του πλασμιδίου pBR322 με περιοριστική ενδονουκλεάση Hinfi – 0.5µg/µl) ή λ/EcoRI (πλήρης πέψη DNA λ-φάγου με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI – 0.5µg/µl). Το διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων αποτελείται από τις χρωστικές ουσίες βρωμοφαινόλη (0.4% w/v), κυανούν ξυλόλης (0.4% w/v) καθώς και φικόλη (25% w/v) και προστίθεται σε συγκέντρωση 10x (συνήθως 2 µl σε 18 µl δείγματος). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε τάση 40V και, μετά το πέρας της διαδικασίας, η πηκτή αγαρόζης εκτίθεται σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) και φωτογραφίζεται.

2.2.7 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

Η απομόνωση DNA γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του *MinElute Gel Extraction Kit* της εταιρείας *QIAGEN*. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η ζώνη ενδιαφέροντος αποκόπτεται από την πηκτή, ζυγίζεται και 3 μέρη ρυθμιστικού διαλύματος QG προστίθενται σε 1 μέρος πηκτής. Το μείγμα επωάζεται στους 50°C για 10 λεπτά ώστε το κομμάτι πηκτής να διαλυθεί πλήρως. Στη συνέχεια, ένα μέρος ισοπροπανόλης προστίθεται σε ένα μέρος πηκτής και, ύστερα από ανάδευση, το μείγμα φορτώνεται σε στήλη MinElute. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 13,000×g για 1 λεπτό, το υποκείμενο της στήλης διάλυμα απορρίπτεται και προστίθενται 500µl ρυθμιστικού διαλύματος QG. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 13,000×g για 1 λεπτό, το υποκείμενο της στήλης διάλυμα απορρίπτεται και προστίθενται 750µl ρυθμιστικού διαλύματος PE. Έπειτα από χρόνο 2-5 λεπτών, ακολουθεί φυγοκέντρωση 1 λεπτού στα 13,000×g και απόρριψη του υποκειμένου της στήλης διαλύματος. Το DNA εκλούεται με

προσθήκη 20μl TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) και μετά από επώαση 1 λεπτού, φυγοκέντρωση στα $13,000\times g$. Εν τέλει, 1 και 4 μl απομονωθέντος DNA ποσοτικοποιούνται μέσω ηλεκτροφόρησης, παράλληλα με δείγματα που περιέχουν γνωστή ποσότητα DNA.

2.2.8 Καθαρισμός τμημάτων DNA από διαλύματα

Ο καθαρισμός τμημάτων DNA από διαλύματα, έπειτα από πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση ή αποφοσφωρυλίωση, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για το τελικό στάδιο έκλουσης DNA ακολουθήθηκε ίδια διαδικασία με αυτή της ενότητας 2.2.6.

2.2.9 Κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA – Κλωνοποίηση

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, κατασκευάστηκαν ανασυνδυασμένα μόρια DNA, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της γενετικής μηχανικής και την τεχνική της κλωνοποίησης. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει μία σειρά από τεχνικές που οδηγούν στην ελεγχόμενη κατασκευή νέων μορίων DNA μέσω της χρήσης περιοριστικών ενδονουκλεασών, αλκαλικής φωσφατάσης και της DNA λιγάσης σύμφωνα με τις ακόλουθες διαδικασίες:

α. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η διαδικασία χρησιμοποιείται για την επιλεκτική αποκοπή τμημάτων DNA ώστε αυτά να χρησιμοποιηθούν είτε για την κατασκευή ανασυνδυασμένων DNA, μέσω αντίδρασης σύνδεσης λιγάσης, είτε για να γίνει περιοριστική ανάλυση σε βακτηριακούς κλώνους, που φέρουν ανασυνδυασμένα DNA. Μία τυπική αντίδραση πέψης είναι η εξής (Πίνακας 2.1):

Πίνακας 2.1

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Πλασμιδιακό DNA	όγκος που αντιστοιχεί σε 1μg
10X Ρυθμιστικό διάλυμα	5μl
10 mg/ml (100X) Αλβουμίνη Ορού Βοός (BSA) (όπου απαιτείται)	0.5μl
Περιοριστικό ένζυμο	10U
ddH ₂ O	ως τα 50μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα KpnI, EcoRI και BamHI από τη New England Biolabs. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται ολονύκτια σε υδατόλουτρο, ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία κάθε ενζύμου. Τα προϊόντα της πέψης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης. Τα προς κλωνοποίηση τμήματα DNA, του φορέα και του προς κλωνοποίηση ενθέματος, απομονώνονται είτε από πηκτή αγαρόζης (2.2.7) είτε από διάλυμα (2.2.8). Αν κριθεί απαραίτητο, προηγείται αντίδραση αποφωσφορυλίωσης.

β. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης

Η αποφωσφορυλίωση των άκρων με τη χρήση του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση εντέρου μόσχου (Calf Intestine Alkaline Phosphatase – CIAP) πραγματοποιείται στα μόρια DNA του πλασμιδιακού φορέα αν έχει υποστεί πέψη με ένα ή με περισσότερα ένζυμα που δίνουν ίδια μονόκλινα άκρα, ώστε να αποφευχθεί η περίπτωση να επανενωθούν μόρια φορέα με τον εαυτό τους κατά την αντίδραση λιγάσης με το ένθεμα. Προστίθενται 0,5U ενζύμου ανά 1μg DNA, το δείγμα επώαζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η αντίδραση τερματίζεται με άμεσο καθαρισμό του προϊόντος όπως στην *Ενότητα 2.2.7*.

γ. Αντίδραση συνένωσης με DNA λιγάση

Η αντίδραση συνένωσης γίνεται ανάμεσα σε γραμμικά μόρια DNA του προς κλωνοποίηση ενθέματος με μόρια του επιθυμητού φορέα. Η αναλογία ανάμεσα στα μόρια του ενθέματος και του φορέα για την αντίδραση καθορίζεται από τη σχέση:

$$\text{Αναλογία άκρων ενθέματος/φορέα} = \frac{\text{ποσότητα φορέα (ng) x μέγεθος ενθέματος (bp)}}{\text{ποσότητα ενθέματος (ng) x μέγεθος φορέα (bp)}}$$

Για την εύρεση της ποσότητας ενθέματος από την παραπάνω σχέση, χρησιμοποιήθηκαν ως ποσότητα αναφοράς τα 50 ng φορέα. Η αντίδραση πραγματοποιείται στον τελικό όγκο των 10 μl (Πίνακας 2.2) και ακολουθεί επώαση στους 14°C για 4 τουλάχιστον ώρες (κατά προτίμηση ολονύκτια).

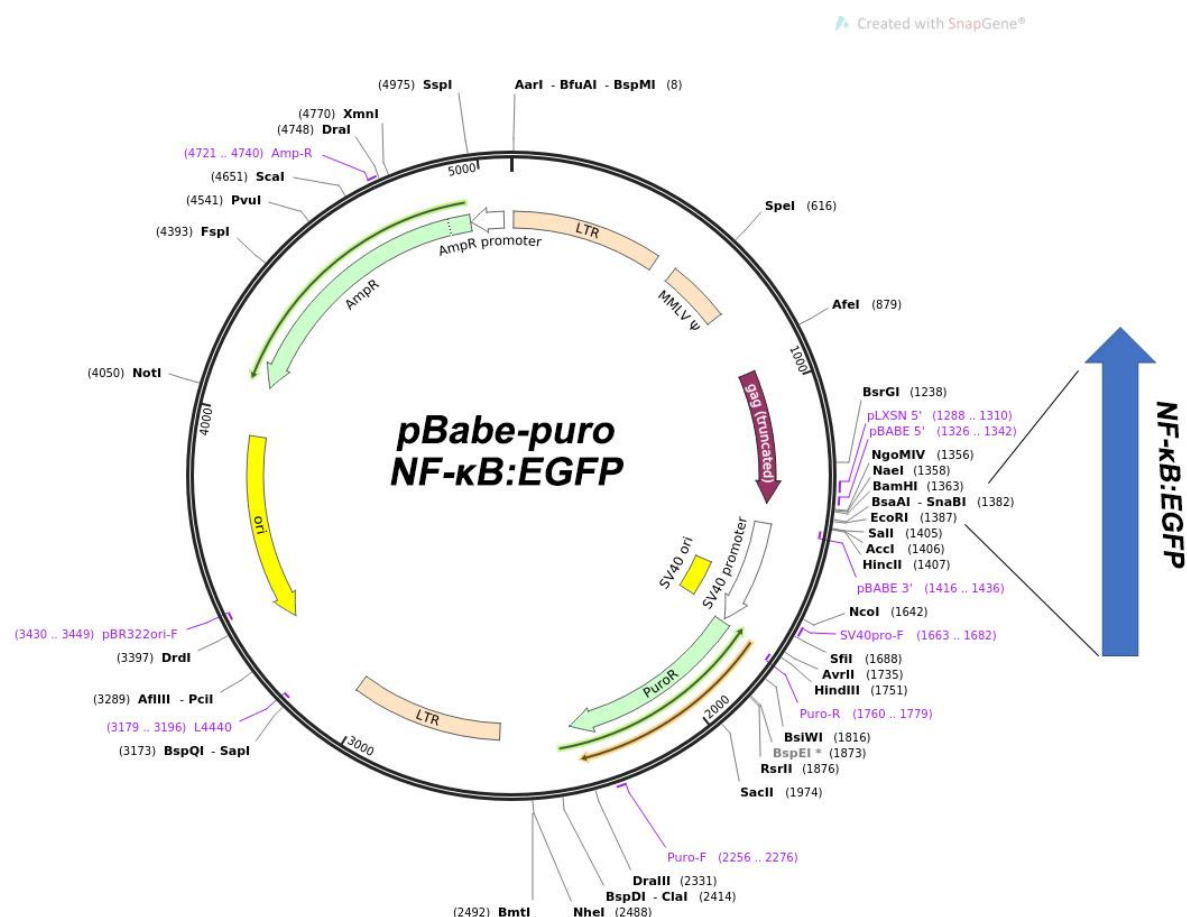
Πίνακας 2.2

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Τμήμα DNA ή προϊόν PCR	y μl
10X Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	1μl
T ₄ DNA λιγάση (Fermentas)	1μl
ddH ₂ O	ως τα 10μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 μl

Η διαδικασία της κλωνοποίησης ολοκληρώνεται με βακτηριακό μετασχηματισμό με τα προϊόντα της αντίδρασης συνένωσης και απομόνωση ανθεκτικών κλώνων έπειτα από αντιβιοτική επιλογή. Η επιτυχία της διαδικασίας ελέγχεται έπειτα από απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (2.2.3) και περιοριστική του ανάλυση με τα κατάλληλα ένζυμα. Τελικό στάδιο της διαδικασίας είναι η αποθήκευση των έγκυρων κλώνων για την πλασμιδιακή κατασκευή και παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας (2.2.4).

2.2.10 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pBabe-puro/NF-κB:EGFP

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης κατασκευάστηκε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBabe-puro/NF-κB:EGFP.



Εικόνα 2.1: Χάρτης του πλασμιδίου pBabe-puro/NF-κB:EGFP. Εμφανίζονται οι θέσεις περιορισμού, καθώς και τα σημεία κλωνοποίησης στο αρχικό πλασμίδιο pBabe-puro.

Η διαδικασία κατασκευής περιλαμβάνει τα στάδια κλωνοποίησης που περιγράφονται παρακάτω.

Αρχικά το πλασμίδιο pNF-κB:EGFP (Addgene), επώαστηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και BglII και το τμήμα που περιέχει την κασέτα έκφρασης NF-κB:EGFP. Κλωνοποιήθηκε αρχικά στο πλασμίδιο pSL301, το οποίο επώαστηκε με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Σε ένα επόμενο βήμα, το τμήμα NF-κB:EGFP αποκόπηκε από το φορέα pSL301 με τη χρήση των BglII-EcoRI και κλωνοποιήθηκε στον ρετροϊκό φορέα pBabe-puro, ο οποίος επώαστηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI-EcoRI (οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και BglII δημιουργούν συμβατά μονόκλωνα άκρα) προς δημιουργία του φορέα pBabe-puro/NF-κB:EGFP [Εικόνα 2.1].

2.3 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών

Η *in vitro* κυτταρική καλλιέργεια επιτρέπει τη μελέτη των ιδιοτήτων των κυττάρων σε συνθήκες που προσομοιάζουν τις φυσιολογικές ενός οργανισμού. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται **α.** σε ειδικά καταγεγραμμένα πλαστικά σκεύη, στην περίπτωση των κυττάρων που αναπτύσσονται σχηματίζοντας κυτταρικό ταπήτιο, όπου τα κύτταρα προσκολλώνται στην επιφάνεια αυτών και **β.** σε βακτηριακά τρυβλία στην περίπτωση των κυττάρων που αναπτύσσονται άνευ προσκόλλησης ή στην περίπτωση ελέγχου της ικανότητας ανάπτυξης των κυττάρων άνευ προσκόλλησης. Η ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific, CO₂ Water-jacketed Incubator) σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% (v/v) CO₂ για τη διατήρηση σταθερού pH. Προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μολύνσεις, ο χειρισμός των κυττάρων γίνεται σε εστία κάθετης νηματικής ροής (AURA 200 MAC, BioAir Instruments) και ο ειδικά διαμορφωμένος χώρος καλλιέργειας (Tissue Culture Room) αποστειρώνεται με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.3.1 Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές

Κύτταρα U251-MG. Κύτταρα από ανθρώπινο γλοιοβλάστωμα, με προέλευση αστροκύτωμα. Προέρχονται από κακοήγη όγκο γλοιοβλαστώματος και απομονώθηκαν με την τεχνική της εμφύτευσης. Τα κύτταρα U-251 είχαν προηγουμένως διανεμηθεί και ως U-373 MG έως ότου η μοριακή ανάλυση επιβεβαίωσε την ταυτότητα με τα U-251 (Πηγή ATCC).

Κύτταρα U87-MG. Κύτταρα από ανθρώπινο γλοιοβλάστωμα, με προέλευση αστροκύττωμα. Προέρχονται από κακοήγη όγκο γλοιώματος από γυναίκα ασθενή με τεχνική εμφύτευσης. Αναφέρεται ότι προκαλούν κακοήγη όγκο σύμφωνα με το γλοιοβλάστωμα σε γυμνούς ποντικούς (πηγή ATCC).

Κύτταρα T98G. Κύτταρα από ανθρώπινο γλοιοβλάστωμα. Προέρχονται από πολύμορφο όγκο γλοιοβλαστώματος από έναν 61χρονο Καυκάσιο άνδρα. Αόριστη διάρκεια ζωής και ανάπτυξη ανεξάρτητη προκλήσης, ενώ μπορούν να εισέλθουν σε στάση κυτταρικού κύκλου στην G0 όταν στερούνται ορού (πηγή ATCC).

Κύτταρα HFL1 (ATCC CCL-153). Φυσιολογικοί ανθρώπινοι διπλοειδείς ινοβλάστες πνεύμονα. Υφίστανται αναδιπλαστατική γήρανση (πηγή ATCC).

Κύτταρα HFL1 (ATCC CCL-171). Φυσιολογικοί ανθρώπινοι διπλοειδείς ινοβλάστες πνεύμονα. Υφίστανται αναδιπλαστατική γήρανση (πηγή ATCC).

2.3.2 Επανακαλλιέργεια κυττάρων

Για τη συντήρηση της κυτταροκαλλιέργειας, όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και καταλαμβάνουν πλήρως την επιφάνεια του δοχείου όπου αναπτύσσονται, γίνεται θρυψινοποίηση. Η διαδικασία για φλάσκα πολυστυρενίου των 75 cm² έχει ως εξής: Αρχικά γίνεται αναρρόφηση του υπάρχοντος θρεπτικού υλικού με πιπέτα Pasteur και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων PBS. Στη συνέχεια αφαιρείται το PBS και προστίθεται 1 ml από το διάλυμα θρυψίνης 1x. Τα κύτταρα επωάζονται για 3 min στους 37°C και, με ελαφρά χτυπήματα, υποβοηθάται η αποκόλλησή τους από το υπόστρωμα. Έπειτα προστίθεται θρεπτικό υλικό, που αδρανοποιεί το ένζυμο και αποτελεί το μέσο επαναιώρησης των κυττάρων. Τα κύτταρα αραιώνονται κατά το επιθυμητό ποσοστό και η περίσσεια αφαιρείται ή μεταφέρεται σε άλλη φλάσκα ή τρυβλίο. Στη φλάσκα προστίθεται ποσότητα θρεπτικού, ως και τελικό όγκο 10 ml και τα κύτταρα αφήνονται για ανάπτυξη στον κλίβανο, στους 37°C.

Στην περίπτωση των κυττάρων που αναπτύσσονται άνευ προσκόλλησης, η αραιώση των κυττάρων αν αυτά έχουν καταλάβει τον όγκο του δοχείου γίνεται μέσω αναρρόφησης της επιθυμητής ποσότητας με πλαστική πιπέτα. Ο όγκος, που έχει αφαιρεθεί, συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό ως τα 10ml.

2.3.3 Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer

Ο αριθμός κυττάρων υπολογίζεται με μέτρηση 10μl θρυψινοποιημένου εναιωρήματος κυττάρων, που τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο Neubauer, και με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου, εφαρμόζεται ο νόμος της αραιώσης:

$$\text{Κύτταρα} = \frac{N \times V}{10^{-4}} \quad \text{όπου:}$$

N, ο αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν

V, ο συνολικός όγκος του δείγματος σε ml

10^{-4} , ο όγκος σε ml που αντιστοιχεί σε 16 τετράγωνα.

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων βοηθά στην επιλογή του κατάλληλου αριθμού (ανάλογα με την ταχύτητα πολλαπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς), που πρέπει να καλλιεργείται για να επιτυγχάνεται ιδανική πληρότητα για την πραγματοποίηση πειραμάτων.

2.3.4 Αποθήκευση κυττάρων στο υγρό άζωτο

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μακροπρόθεσμη φύλαξη κυττάρων σε υγρό άζωτο (-196°C) ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία: Κυτταρικά ταπήτια που βρίσκονται σε τουλάχιστον σε πληρότητα 80%, θρυψινοποιούνται (2.3.2), μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα (UNIVERSAL) και μετράται ο αριθμός τους. Στην περίπτωση των κυττάρων που αναπτύσσονται σε εναιώρημα, μεταφέρεται μια ποσότητα του θρεπτικού υλικού σε φυγοκεντρικό σωλήνα. Σε κάθε περίπτωση, 3×10^6 κύτταρα φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά σε 300xg και στο κυτταρικό ίζημα προστίθεται θρεπτικό υλικό κατάψυξης [90% (v/v) FCS, 10%(v/v) DMSO], που έχει αφεθεί στον πάγο για 10 λεπτά. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε φιαλίδιο κατάψυξης (Cryovial, Falcon) και άμεσα σε βαθιά κατάψυξη -80°C. Έπειτα από ολονύκτια επώαση, τα κύτταρα μεταφέρονται στο υγρό άζωτο. Για την ανάσυρση κυττάρων από το υγρό άζωτο, γίνεται άμεση μεταφορά τους σε υδατόλουτρο 37°C μέχρι τήξεως του κυτταρικού εναιωρήματος και εισαγωγή σε φλάσκα 75 cm², που περιέχει 10 ml θρεπτικού υλικού, με σκοπό την έναρξη της καλλιέργειας.

2.3.5 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (transfection)

α. Μέσω λιπιδίων

Η διαμόλυνση έγινε με χρήση πολυαιθυλενιμίου (PEI). Το πολυμερές αυτό βρίσκεται σε μορφή σκόνης και διαλύεται σε H₂O σε συγκέντρωση 1mg/ml. Τα κύτταρα, τα οποία καλλιεργούνται σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας, θρυψινοποιούνται την προηγούμενη ώστε τη μέρα της διαμόλυνσης να πληρούν το 50-70% του ταπητίου. Πριν τη διαμόλυνση, όλα τα υλικά πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και σε αυτά τοποθετείται, ανάλογα με τη διάμετρο του τρυβλίου, η απαιτούμενη ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού. Σε αποστειρωμένο Eppendorf τοποθετούνται 50μL DMEM χωρίς ορό – αντιβιοτικό, μέσα στο οποίο διαλύονται 2-5μg από το επιθυμητό DNA συν 8μg από το πολυμερές PEI. Το μείγμα επωάζεται για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε αυτό προστίθενται 450μL DMEM+10% FBS. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και το μείγμα μεταφέρεται στάγδην στο τρυβλίο με παράλληλη ανακίνησή του. Έπειτα από επώαση 2 ωρών, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS, τοποθετείται σε αυτά πλήρες θρεπτικό υλικό και επωάζονται επί τουλάχιστον 24 ώρες.

2.3.6 Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου και μικροσκοπία φθορισμού

Για να επιτευχθεί η ανίχνευση κυττάρων ή φθοριζόντων κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου και της μικροσκοπίας φθορισμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: Τα προς εξέταση κύτταρα ενοφθαλμίζονται και αφήνονται προς ανάπτυξη σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες σε τρυβλίο διαμέτρου 6 cm. Την ημέρα της ανάλυσης, τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 3 ml διαλύματος PBS και μονιμοποιούνται με 3 ml διαλύματος παραφορμαλδεΐδης [3.8% (w/v) σε PBS] για χρονικό διάστημα 10 λεπτών, σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας του χρόνου, αναρροφάται το υλικό μονιμοποίησης και τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά σε 3 ml διαλύματος σβέσης (quenching) 50 mM NH₄Cl σε PBS σε θερμοκρασία δωματίου (προκειμένου να απενεργοποιηθεί η παραφορμαλδεΐδη και να απομακρυνθεί η περίσσειά της από το κυτταρικό ταπήτιο). Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκπλένονται με 3 ml διαλύματος PBS. Οι καλυπτρίδες, πάνω στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα, μεταφέρονται και, με τη χρήση διαλύματος επικάθησης 50% γλυκερόλης σε PBS, τοποθετούνται ανάποδα σε

αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα δείγματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού με λάμπα υψηλής πίεσης και φίλτρο FITC (530 nm μέγιστο διέγερσης) και φωτογραφίζονται με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής σε μεγέθυνση 40x.

2.3.7 Ανάλυση κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο σύστημα xCELLigence

Ο αναλυτής κυττάρων πραγματικού χρόνου xCELLigence (Roche Diagnostics) χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της βιολογικής κατάστασης των κυττάρων και του πολλαπλασιαστικού τους δυναμικού. Αυτό το σύστημα μετρά τον αριθμό των κυττάρων και την κυτταρική πρόσφυση, υπολογίζοντας την ηλεκτρική αντίσταση στο υπόστρωμα μιας κυτταρικής καλλιέργειας, που αναπτύσσεται σε ειδικά φρεάτια (E-plates), σε πλάκες που περιέχουν πηγάδια ισοδύναμα σε επιφάνεια με αυτά των πλακών 96 φρεατίων. Ο αναλυτής μετρά αυτόματα την ηλεκτρική αντίσταση, υπολογίζοντας ένα κυτταρικό δείκτη (Cell Index-CI). Καθώς περισσότερα κελιά προσαρτώνται στο κάτω μέρος των E-plates, η τιμή αντίστασης αυξάνεται, οδηγώντας σε μεγαλύτερο δείκτη CI. Έτσι, ο CI αναλογεί στην προσκόλληση και την εξάπλωση των κυττάρων. Οι καλλιέργειες κυττάρων υποβλήθηκαν σε επώσεις για 24 ώρες μετά τη σπορά των κυττάρων στα πηγάδια των ηλεκτρονικών πλακών E-plates και παρακολουθούνταν για επιπλέον 3 ημέρες. Οι τιμές του κανονικοποιημένου CI παρουσιάζονται ως μέσος όρος τριών ανεξάρτητων μετρήσεων.

2.3.8 Δοκιμασίες βιωσιμότητας

Καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων γλοιώματος υποβλήθηκαν σε επώαση με DMSO (0.126μM) ή ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις από ουσίες απομονωμένες από φυτά. Η κυτταρική βιωσιμότητα αξιολογήθηκε με δοκιμή αποκλεισμού έπειτα από χρώση trypan blue (154). Σε αυτή τη μεθοδολογία, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται, επωάζονται με ίσο όγκο trypan blue για 3 λεπτά και παρατηρούνται απευθείας σε φωτονικό μικροσκόπιο, όπου γίνεται μέτρηση των ζωντανών (μη χρωσμένων) και νεκρών (χρωσμένων μπλε) κυττάρων, τα οποία επιτρέπουν την είσοδο της χρωστικής λόγω διάρρηξης της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης. Αντίστοιχα, η μελέτη κυτταροτοξικότητας έγινε με την χρωστική ουσία MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (155). Η συγκεκριμένη ουσία έχει την ιδιότητα να ανάγεται από κυτταρικά ένζυμα σε μωβ. Η βιωσιμότητα είναι ανάλογη της παρουσίας της μωβ χρωστικής, η οποία στοιχειομετρικά

είναι αντίστοιχα ανάλογη της ποσότητας των ενζύμων που την ανάγουν και τελικά με τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Κάθε δοκιμασία εκτελέστηκε τουλάχιστον τρεις φορές και αντιπροσωπεύεται ως μέσο διαφορετικών πειραμάτων. Οι κυτταρικές καλλιέργειες παρατηρούνταν καθημερινά με ελαφριές μικροσκοπικές δοκιμές παρατήρησης και βιωσιμότητας σε 24 και 72 ώρες μετά την επώαση.

2.4 Κυτταρομετρία Ροής (FACS)

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί τεχνική που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση παραμέτρων φθορισμού μονήρων κυττάρων που βρίσκονται σε ένα κυτταρικό εναιώρημα. Λόγω του ότι ο φθορισμός χρησιμοποιείται για την ανάλυση των κυττάρων, η κυτταρομετρία ροής αναφέρεται και ως φθορισμοενεργοποιούμενη κυτταρική σάρωση (Fluorescence Activated Cell Scanning- FACS). Η μέτρηση των κυτταρικών εναιωρημάτων απαιτεί την υδροδυναμική εστίαση σε μια κεντρική ροή και εισαγωγή των κυττάρων ένα-ένα σε μία κυψελίδα ροής και από μια πηγή προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η ανάλυση των δειγμάτων αξιοποιεί τη σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και την παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία, οι οποίες μετρώνται από ειδικούς ανιχνευτές. Η ακτινοβολία, που συνήθως προέρχεται από ένα ή περισσότερα laser, είναι απαραίτητη για τη διέγερση των φθορίζουσων χρωστικών, και μετράται από το κυτταρόμετρο ροής. Ο κυτταρικός πληθυσμός ενός δείγματος διαχωρίζεται σύμφωνα με την πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FSC), η οποία μετράται σε μικρή γωνία 1-19° και καθορίζει το μέγεθος των κυττάρων και την πλευρική σκέδαση (Side Scatter, SSC), που μετράται στις 90° και καθορίζει την κοκκίωσή τους. Η ταυτόχρονη ανάλυση πρόσθιας και πλευρικής σκέδασης σε ένα ιστόγραμμα δύο διαστάσεων επιτρέπει να διαχωριστεί ο πληθυσμός ενδιαφέροντος από ένα ετερογενές μείγμα ή από θραύσματα νεκρών κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να απομονωθεί ηλεκτρονικά ο κυτταρικός πληθυσμός ενδιαφέροντος, εφαρμόζοντας γύρω από αυτόν μια περίφραξη (gating). Η ανάλυση των υπολοίπων παραμέτρων μπορεί να γίνει με ιστογράμματα έντασης φθορισμού.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για την μέτρηση φθορισμού από την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP), για χρώση και ποσοτικοποίηση της ποσότητας DNA με ιωδιούχο προπύδιο αλλά και για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό με δευτερεύοντα αντισώματα συζευγμένα με χρωμογόνο ουσία (FITC).

2.4.1 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης EGFP

Η ικανότητα της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής να μετρά την ένταση φθορισμού ενός κυτταρικού δείγματος, μας παρέχει τη δυνατότητα να ποσοτικοποιήσουμε την έκφραση της EGFP, που σηματοδοτεί την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB. Η πειραματική πορεία ανίχνευσης της ενεργότητας του NF-κB μέσω κυτταρομετρίας ροής έχει ως εξής:

Τα προς μελέτη κύτταρα, καθώς και τα κύτταρα μάρτυρες, θρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε 4 ml θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρούνται σε 300xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κυτταρικά ιζήματα εκπλένονται με 100 όγκους διαλύματος PBS και φυγοκεντρούνται όπως προηγουμένως. Τέλος, επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος PBS και μεταφέρονται σε σωληνάρια πολυστυρενίου των 5ml (Becton Dickinson), προκειμένου να αναλυθούν στο κυτταρόμετρο ροής. Αμεταχείριστα κύτταρα χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας εκτίμησης του αυτοφθορισμού (background fluorescence). Τα κατώφλια της έντασης φθορισμού ορίζονται βάσει της κατανομής της έντασης φθορισμού του μάρτυρα. Οι κατανομές φθορισμού απεικονίζονται ως ιστογράμματα φθορισμού και πραγματοποιείται επικάλυψη (overlay) μεταξύ του ιστογράμματος του δείγματος ως προς αυτό του μάρτυρα.

2.4.2 Κυτταρικός κύκλος

Αρχικά τα κύτταρα μάρτυρες και οι προς μελέτη διαμολυσμένοι κλώνοι θρυψινοποιούνται. Τα κύτταρα συλλέγονται σε 5 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Universal. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1.500xg, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα εκπλένονται με 2 ml PBS. Έπεται φυγοκέντρηση, όπως και προηγουμένως, και το προκύπτον ίζημα επαναιωρείται σε 500μL διαλύματος PI Ioannina Protocol (156). Ακολουθεί επώαση 20 λεπτών στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

2.4.3 Κυτταρομετρική ανάλυση απόπτωσης μέσω ποσοτικοποίησης της αννεξίνης και της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης

Επαγωγή απόπτωσης σε κύτταρα μάρτυρα, κύτταρα που επώαστηκαν με DMSO (0.126μM) ή με προς ανάλυση φυσικές ουσίες, επιτεύχθηκε με την ανίχνευση της εξωτερίκευσης της φωσφατιδυλοσερίνης με τη σειρά αντιδραστηρίων annexin V–FITC/PI apoptosis detection

kit I (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA). Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι αναλύσεις έγιναν 24-72 ώρες μετά την έναρξη της επώασης. Τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στις 15000 RPM για 5 λεπτά, εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και επώαστηκαν με αννεξίνη-FITC, ιωδιούχο προπίδιο (50 mg/ml) και ριβονουκλεάση A (20 mg/ml) για 20 λεπτά στους 37°C. 10.000 κύτταρα αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.4.4 Κυτταρομετρική ανάλυση της δραστικότητας της κασπάσης-8

Η μελέτη δραστικότητας της κασπάσης-8 πραγματοποιήθηκε με το πακέτο αντιδραστηρίων Fluorescein Active Caspase-8 Staining Kit και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Abnova, Taiwan). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 24 πλάκες φρεατίων και αντιμετωπίστηκαν όπως περιγράφεται στην εκάστοτε δοκιμασία βιωσιμότητας. Στη συνέχεια, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και 1 μl από το αντιδραστήριο FITC-IETD-FMK προστέθηκε σε κάθε σωλήνα και επώαστηκε για 0,5-1 ώρα στους 37°C σε επωαστήρα με 5% CO₂. Μετά από φυγοκέντρηση σε 3000 rpm για 5 λεπτά, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 0,5 ml διαλύματος πλύσης και φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις ίδιες συνθήκες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυττάρων φθορισμού έγινε με κυτταρομετρία ροής όπως περιγράφεται παραπάνω. Ο αναστολέας της κασπάσης-8, Z-VAD-FMK, που προστέθηκε στην τελική συγκέντρωση των 1 μL/mL χρησιμοποιήθηκε επίσης ως αρνητικός μάρτυρας, εμποδίζοντας αποτελεσματικά την ενεργοποίηση της κασπάσης-8.

2.4.5 Κυτταρομετρική ανάλυση του δυναμικού της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (ΔΨ_n)

Το μιτοχονδριακό δυναμικό μελετήθηκε με το πακέτο αντιδραστηρίων BD mitoscreen Mitochondrial membrane Potential Detection kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, τα κύτταρα προς ανάλυση επώαστηκαν για 15 λεπτά με διάλυμα JC-1, εκπλύθηκαν 3 φορές και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Ο πράσινος και κόκκινος φθορισμός από 10.000 κύτταρα αναλύθηκε για να γίνει διάκριση μεταξύ κυττάρων με άθικτα μιτοχόνδρια (υψηλό δυναμικό μεμβράνης) και κυττάρων που υποβάλλονται σε απόπτωση (σημαντικά χαμηλότερο δυναμικό μεμβράνης), χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες κυτταρικές περιφράξεις.

2.4.6 Ανάλυση των δεικτών CDs με κυτταρομετρία ροής

Κύτταρα επώαστηκαν με DMSO (0.126μM) ή φυσικές ουσίες σε ενδεδειγμένες συγκεντρώσεις. Κύτταρα μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, εκπλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, επώαστηκαν με 10% ορό αίματος για 20 λεπτά σε παγόλoutρο, για την κάλυψη των Fc υποδοχέων. Ακολούθησε επώαση με αντισώματα που αναγνωρίζουν υποδοχείς CD [Πίνακας 2.3] για 20 λεπτά, στο σκοτάδι. Τα κύτταρα αναλύθηκαν άμεσα σε κυτταρομετρητή FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, California, USA). Με τη χρήση του λογισμικού CellQuest V3.1 (BD Biosciences) επιτεύχθηκε η ανάλυση της έκφρασης του εκάστοτε υποδοχέα. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης υπολογίστηκε ως ο γεωμετρικός μέσος της κατανομής φθορισμού. Η ποσοτική μέτρηση των δεσμευμένων αντι-CD24, αντι-CD44, αντι-CD15, αντι-CD56 και αντι-CD71 αντισωμάτων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τη βασισμένη σε κυτταρομετρία ροής QIFIKIT® δοκιμασία (DAKO, Glostrup, Denmark), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μια πρότυπη καμπύλη, που συγκρίνει τον γεωμετρικό μέσο φθορισμού με τη γνωστή περιεκτικότητα σε FITC των σφαιριδίων Quantibrite, κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό QuantiCALC (BD Biosciences).

Πίνακας 2.3 Αντισώματα για κυτταρομετρική ανάλυση (εταιρία: BD pharmingen)

Αντίσωμα	κλώνος
FITC Mouse Anti-Human CD24	(ML5)
PE Mouse Anti-Human CD24	(ML5)
FITC Mouse Anti-Human CD44	(Leu-44)
FITC Mouse Anti-Human CD56	(NCAM16.2)
FITC Mouse Anti-Human CD15	(W6D3)
FITC Mouse Anti-Human CD71	(M-A712)
PE Mouse Anti-Human CD71	(M-A712)

2.5 Μελέτες στο *in vivo* σύστημα *Danio rerio* (ιχθύς ζέβρα)

Το Zebrafish (*Danio rerio*) διατηρήθηκε σύμφωνα με τα τυπικά πρωτόκολλα φροντίδας των ζώων και χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας. Τα έμβρυα ελήφθησαν με τυχαίο ζευγάρι Zebrafish σε έναν υγραμένο επωαστήρα, στους 28,5 °C. Τα έμβρυα διατηρήθηκαν σε νερό εμβρύου στους 28 °C. Η τοξικότητα των ουσιών φυσικής προέλευσης αξιολογήθηκε μετά από έκθεση 96 ωρών, 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hours post fertilization-hpf) έως 5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (days post fertilization-dpf), όπως περιγράφεται προηγουμένως. Τα υγιή έμβρυα φορτώθηκαν σε πλάκες 24 φρεατίων με 2 έμβρυα / φρεάτιο και επώαστηκαν στους 28 °C για 96 ώρες σε 0,5 ml νερού εμβρύου. Στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε επώαση με ουσίες. Χρησιμοποιήθηκαν 10 έμβρυα για κάθε συγκέντρωση και 10 για την ομάδα ελέγχου, στην οποία επιδράσαμε μόνο με DMSO. Έμβρυα των Zebrafish (*Danio rerio*), 24-48 ώρες μετά την γονιμοποίηση (157), εκτέθηκαν στις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και έγινε συγκριτική μελέτη της τοξικότητας σε διάστημα 96h. Χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις, που περιλαμβάνουν την τιμή IC50 και πολλαπλάσια αυτής. Έπειτα από το διάστημα των 96h μελετήθηκε η θνησιμότητα των ιχθύων. Όλες οι ανωμαλίες, που τυχόν προέκυψαν στην ανάπτυξη των ιχθύων μετά από την έκθεση, παρατηρήθηκαν μέσω ανάλυσης εικόνας και μορφομετρίας, προκειμένου να δειχθεί ποιες ουσίες δεν οδηγούν σε τοξικότητα ή αναπτυξιακές δυσλειτουργίες.

- Ενότητα 3 -

Αποτελέσματα

3. Αποτελέσματα

3.1 Μελέτη αντιγλοιοωματικής δράσης ουσιών φυσικής προέλευσης

Ένας σημαντικός αριθμός ουσιών με αντικαρκινική δράση έχουν απομονωθεί από φαρμακευτικά φυτά. Η δυναμική των φυτικών ενώσεων αποτυπώνεται στο πλήθος βιοδραστικών φυτών και των απομονωμένων ενώσεων από αυτά, που εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (124).

Η ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει πληθώρα ενδημικών φαρμακευτικών φυτών, όπως το τσάι του βουνού (*Sideritis sp.*) και το θυμάρι (*Thymus sp.*), που περιέχουν ενώσεις οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (127, 128). Μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει εκτενής και συστηματική έρευνα της δράσης ουσιών φυτικής προέλευσης στο γλοιοβλάστωμα. Ο πρώτος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αποσαφήνιση της αντιγλοιοωματικής δράσης τριών ουσιών φυτικής προέλευσης, που απομονώθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας-Φαρμακογνωσίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Δ. Λάζαρη. Οι ουσίες που μελετήθηκαν είναι η μοσχαμίνη(MM), η n-p-κουμαροϋλ-σεροτονίνης(CS) και η δεγλουκοελλεβρίνης(DGH).

3.1.1 Μελέτη του μηχανισμού αντιγλοιοωματικής δράσης της μοσχαμίνης

Η μοσχαμίνη είναι ένα αλκαλοειδές ινδόλης, που απομονώνεται κυρίως από τους σπόρους φυτών του γένους *Centaurea* (140-142, 158). Από την αρχαιότητα, πολλά είδη *Centaurea* έχουν χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική, τις εμμηνορροϊκές διαταραχές, την κολπική καντιντίαση, ως καθαρτικό, τονωτικό, διουρητικό και διεγερτικό για τη λειτουργία του ήπατος και της χοληδόχου κύστης (159). Το μοριακό βάρος (MW) της μοσχαμίνης είναι 352,3, έτσι μπορεί να διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood-Brain-Barrier, BBB) (160). Ως εκ τούτου ερευνήθηκαν οι αντιγλοιοωματικές επιδράσεις της μοσχαμίνης, η οποία απομονώθηκε από τα σπέρματα του *Centaurea vlachorum* (143), σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος.

Προκειμένου να διερευνηθεί η ευαισθησία στη μοσχαμίνη των κυτταρικών σειρών U251MG και T98G χρησιμοποιήθηκε το σύστημα xCELLigence. 2×10^3 από U251MG και T98G κύτταρα προστέθηκαν σε φρεάτιο και, 24 ώρες αργότερα, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε

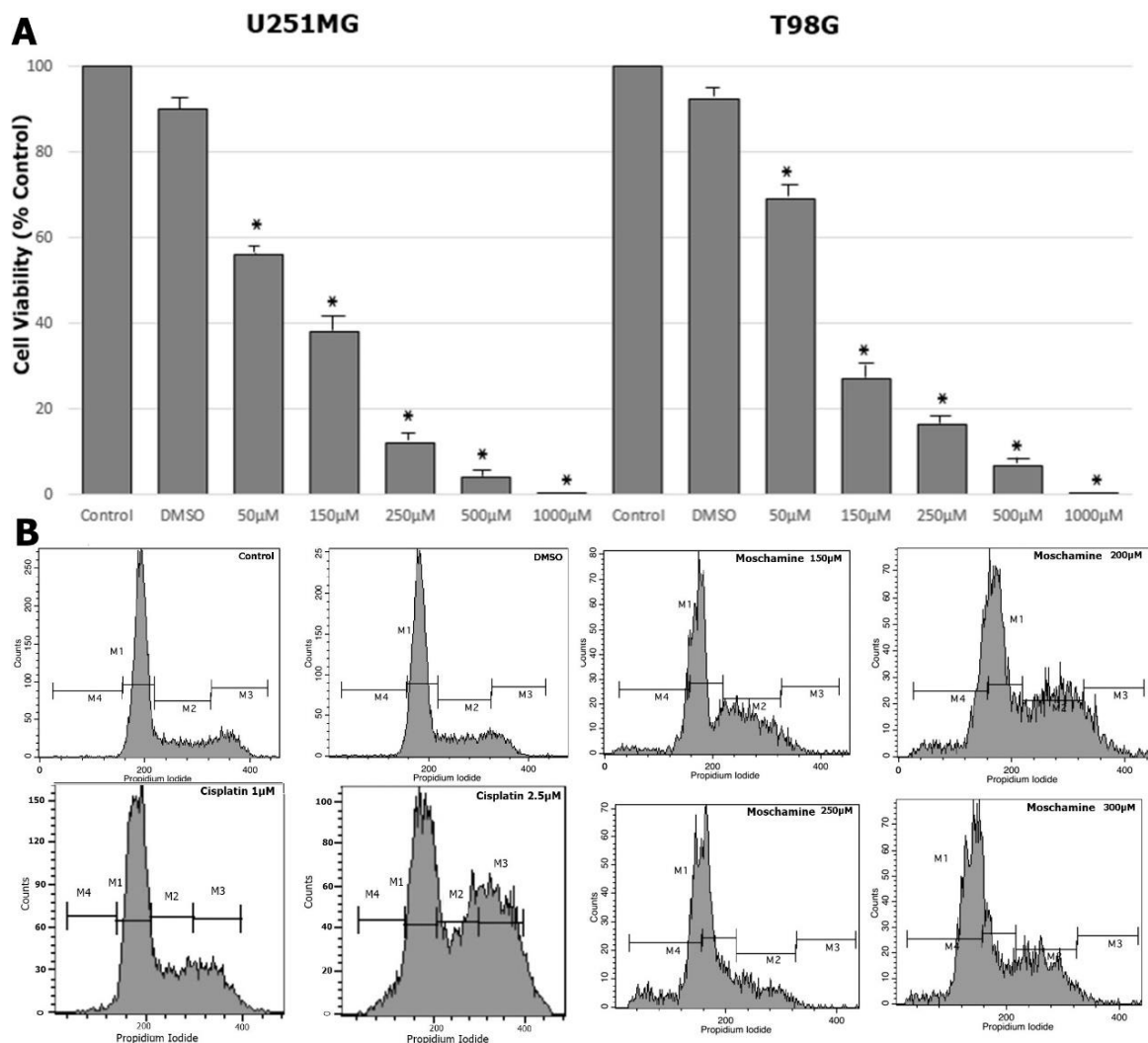
αυξανόμενες συγκεντρώσεις μοσχαμίνης (50, 150, 250, 500 και 1000 μM). Και οι δύο κυτταρικές σειρές εμφάνισαν ευαισθησία έπειτα από επώαση με μοσχαμίνη κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αναλύθηκε στο σύστημα xCELLigence για 72h [Εικόνα 3.1A]. Η τιμή IC-50 του μειωμένου πολλαπλασιαστικού δυναμικού για τη μοσχαμίνη ήταν $59 \times 10^{-5}\text{M}$ στα κύτταρα U251MG και $73 \times 10^{-5}\text{M}$ στα κύτταρα T98G κατά τη διάρκεια της επώασης 72 ωρών. Φυσιολογικές ανθρώπινες διπλοειδείς ινοβλάστες πνεύμονα (Κυτταρικά στελέχη HFL1 και MRC-5) επώαστηκαν απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μοσχαμίνης για 72 ώρες και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης τοξικότητας.

Η μοσχαμίνη είχε ελάχιστη επίδραση στις μη καρκινικούς ανθρώπινους ινοβλάστες MRC-5 ($\text{IC}_{50}=343 \times 10^{-5}\text{M}$) και HFL1 ($\text{IC}_{50}=290 \times 10^{-5}\text{M}$). Συμπερασματικά, η μοσχαμίνη εμφανίζει ειδική κυτταροστατική δράση σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος και ελάχιστη δράση σε φυσιολογικά κύτταρα.

Για να εξετάσουμε την επίδραση της μοσχαμίνης στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, όπου βασίζονται οι παρατηρούμενες ανασταλτικές επιδράσεις ανάπτυξης, αξιολογήσαμε την επίδραση της μοσχαμίνης στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων U251MG και T98G. Και οι δύο κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν μόνο σε DMSO, αυξάνοντας τη συγκέντρωση μοσχαμίνης (150, 200, 250 και 300 μM) για 72 ώρες [Εικόνα 3.1B].

Ελλείψει ουσίας, το DMSO από μόνο του δεν είχε καμία επίδραση στην κατανομή του κυτταρικού κύκλου και των δύο κυτταρικών σειρών. Στα κύτταρα U251MG και T98G η μοσχαμίνη προκάλεσε αύξηση των κυτταρικών πληθυσμών στην υπο-G0/G1 (M4) και τη συσσώρευση στη φάση S με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Σε συγκέντρωση 300 μM σημειώθηκε αποπτωτική κορυφή και στις δύο κυτταρικές σειρές [Πίνακας 3.1].



Εικόνα 3.1. Η μοςχαμίνη δρα αντιγλοιοματικά. (Α) Μελέτη κυτταροστατικότητας με τη χρήση της τεχνολογίας Xceligence. Με * παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην κυτταρική επιβίωση ($p < 0.05$). (Β) Μελέτη της επίδρασης της μοςχαμίνης στην κατανομή φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Η cis-πλατίνα χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας επαγωγής στάσης του κυτταρικού κύκλου στη φάση S.

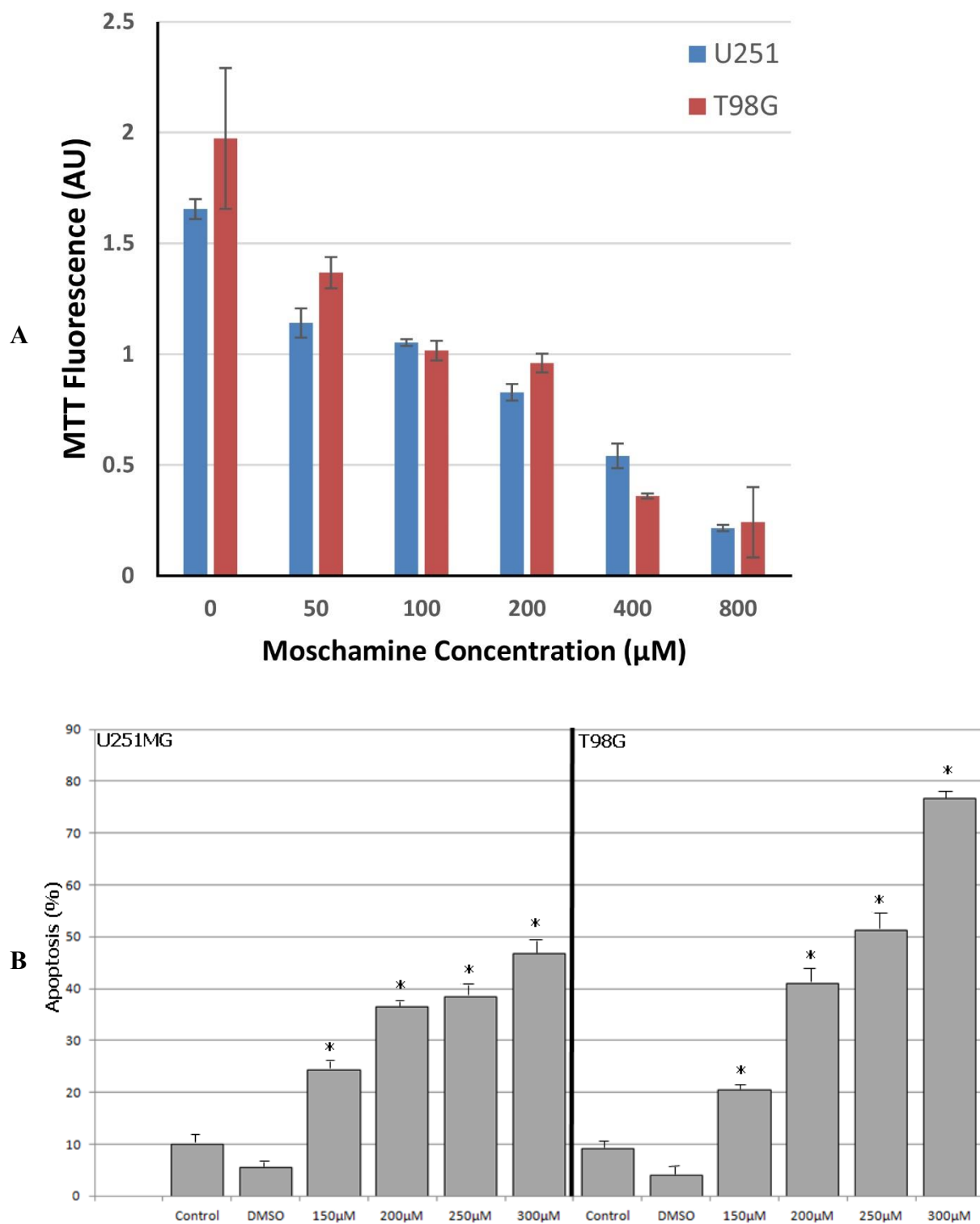
Πίνακας 3.1. Επίδραση της μοσχαμίνης στην κατανομή φάσεων του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα U251MG και T98G. Τα δεδομένα δίνονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση και είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

	Φάση ΚΚ	0 μ M	DMSO	150 μ M	200 μ M	250 μ M	300 μ M
U251MG	Sub-G0/G1	0.3 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3	12.6 $\pm$ 0.8**	19.2 $\pm$ 0.8**	41.5 $\pm$ 1.4**	48.4 $\pm$ 1.7**
	G0/G1	70.3 $\pm$ 2.3	69.7 $\pm$ 2.1	51.3 $\pm$ 1.3**	36.2 $\pm$ 1.1**	38.7 $\pm$ 1.2**	22.8 $\pm$ 0.7**
	S	16.7 $\pm$ 1.1	17.7 $\pm$ 1.2	32.2 $\pm$ 1.1**	32.6 $\pm$ 0.9**	16.2 $\pm$ 0.7**	25.3 $\pm$ 0.8**
	G2/M	13.3 $\pm$ 0.9	10.1 $\pm$ 1.1	3.1 $\pm$ 0.3**	7.7 $\pm$ 0.6**	1.5 $\pm$ 0.3**	1.9 $\pm$ 0.4**
T98G	Sub-G0/G1	2.4 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.7	3.7 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.7*	26.1 $\pm$ 1.7**	27.8 $\pm$ 0.9**
	G0/G1	68 $\pm$ 1.9	68 $\pm$ 1.7	57.8 $\pm$ 0.7**	55.8 $\pm$ 0.9**	37.7 $\pm$ 0.7**	39.7 $\pm$ 1.1**
	S	14.3 $\pm$ 0.9	14.2 $\pm$ 0.5	17.5 $\pm$ 1.1**	20.3 $\pm$ 0.4**	24.9 $\pm$ 0.5**	25.3 $\pm$ 0.6**
	G2/M	14.9 $\pm$ 1.3	14.9 $\pm$ 1.9	19.4 $\pm$ 0.5	18.1 $\pm$ 0.8	11.8 $\pm$ 0.6*	9.4 $\pm$ 0.5**
Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται με έντονη γραφή							
*P<0.05							
**P<0.01							

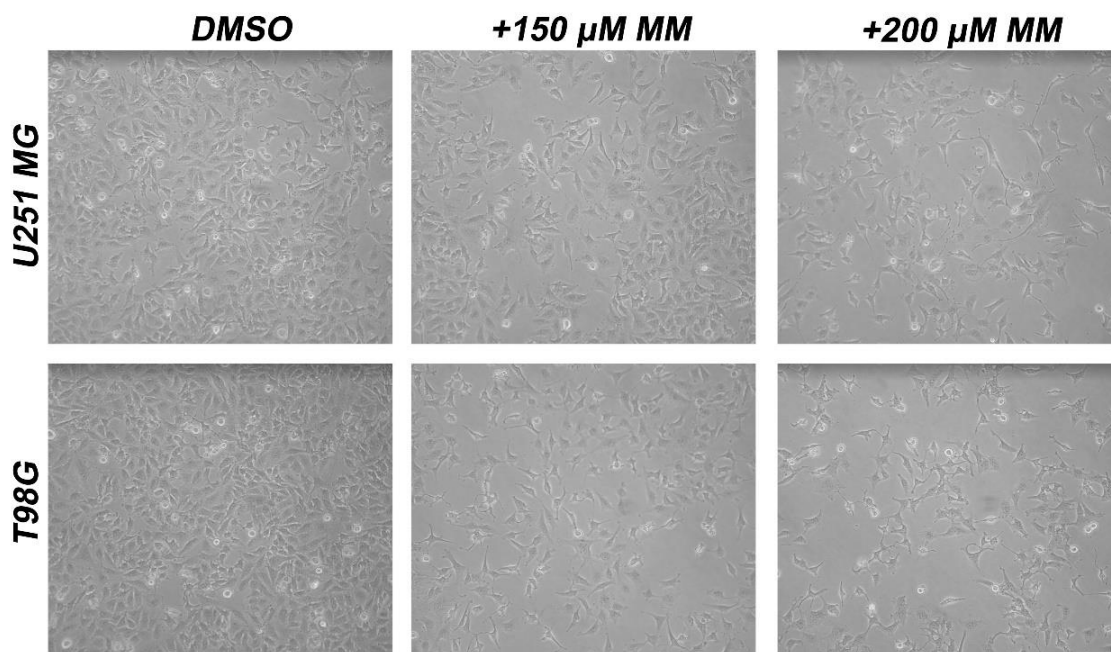
Σε ένα επόμενο στάδιο, έγινε επαλήθευση της αντιγλοιωματικής δράσης της μοσχαμίνης με χρήση της δοκιμασίας MTT και της χρώσης trypan blue.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία MTT για τον υπολογισμό των επιδράσεων κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα U251MG και T98G, μετά από επίδραση με μοσχαμίνη. Η δοκιμασία MTT επιτρέπει την ποσοτικοποίηση κυτταροτοξικών φαινομένων. Κύτταρα U251MG και T98G επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μοσχαμίνης (0-800 μ M). Διαπιστώθηκε ότι η μοσχαμίνη προκαλεί δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα, σε διάστημα 72 ωρών μετά την επώαση [Εικόνα 3.2Α]. Οι τιμές IC 50 της κυτταροτοξικότητας που προκλήθηκε από μοσχαμίνη, με βάση τη δοκιμασία MTT, ήταν παρόμοιες και για τις δύο κυτταρικές σειρές U251MG (IC₅₀=238 μ M) και T98G (IC₅₀=193 μ M).

Προκειμένου να επαληθεύσουμε τις κυτταροτοξικές επιδράσεις της μοσχαμίνης χρησιμοποιήσαμε επίσης τη δοκιμή αποκλεισμού trypan blue, όπου ποσοτικοποιείται το ποσοστό νεκρών κυττάρων επί του συνόλου ενός κυτταρικού πληθυσμού. Καθορίσαμε το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων, το οποίο ορίστηκε ως ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων σε 72 ώρες μετά την έκθεση σε κλιμακούμενες δόσεις μοσχαμίνης σε σύγκριση με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων ελέγχου. [Εικόνα 3.2Β].



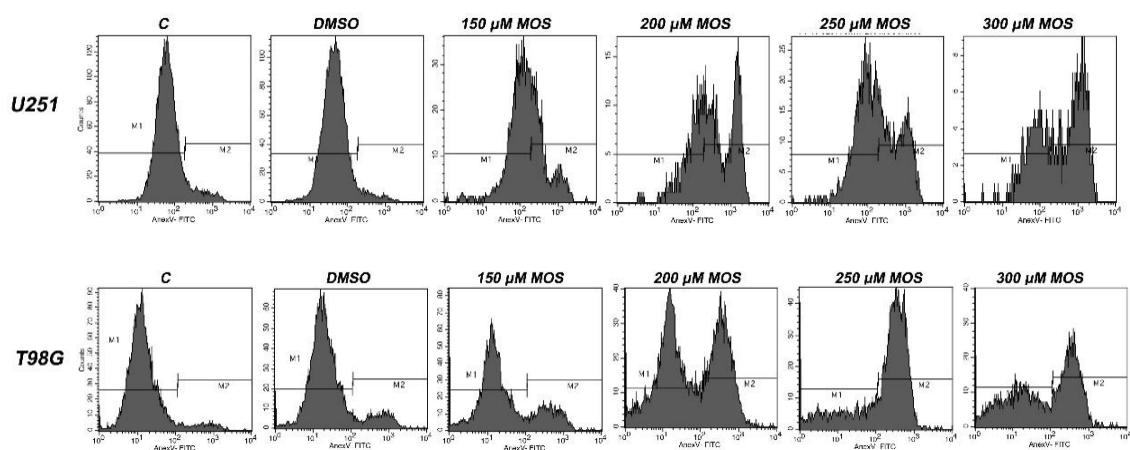
Εικόνα 3.2: Η μοσχαμίνη εμφανίζει κυτταροτοξική αντιγλοιοματική δράση. Η δοκιμασία MTT (A) και η χρώση trypan blue (B) αναδεικνύουν δόσοεξαρτώμενη επαγωγή κυτταροτοξικότητας στις κυτταρικές σειρές U251MG και T98G.



Εικόνα 3.3: Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου για την φαινοτύπικη ανάλυση κυτταροτοξικής αντιγλοιοματικής δράσης της μοσχαμίνης.

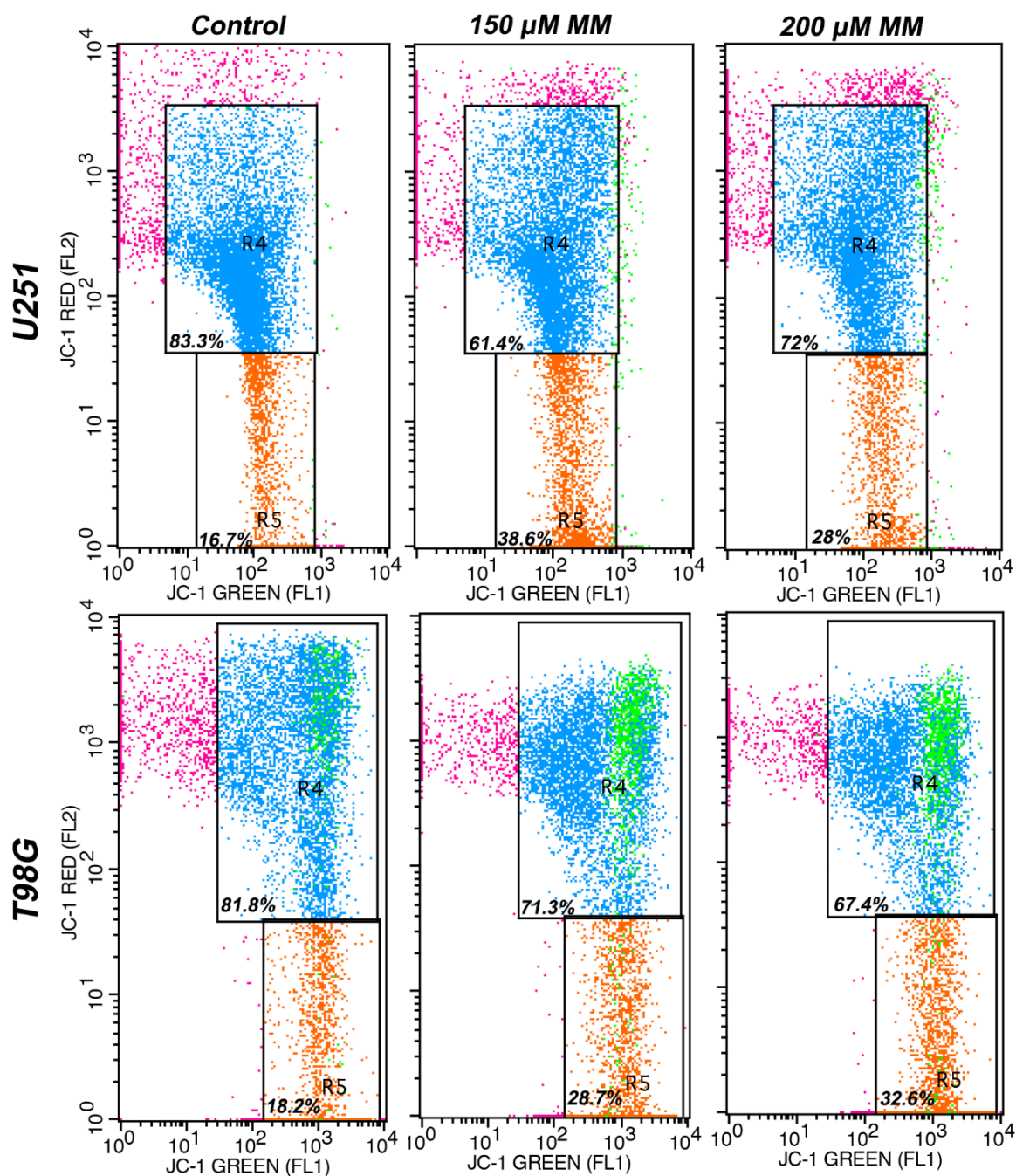
Ο αριθμός τόσο των κυττάρων U251MG, όσο και των κυττάρων T98G μειώθηκε σημαντικά ακόμη και μετά την επώαση με 50μM μοσχαμίνης. Συνολικά, η μοσχαμίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προκαλεί κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα γλοιώματος. Η κυτταροτοξική δράση της μοσχαμίνης παρατηρήθηκε επίσης με μικροσκοπία φωτεινού πεδίου. Κύτταρα U251MG και T98G παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο (μεγέθυνση 40X) μετά από επίδραση με 150 μM ή 200 μM μοσχαμίνης. Κύτταρα μάρτυρες προετοιμάστηκαν μετά από επώαση με DMSO. Διαπιστώθηκε ότι η μοσχαμίνη προκαλεί κυτταροτοξικότητα, με την παρουσία στρογγυλοποιημένων κυττάρων, αλλά και το μικρότερο ποσοστό κάλυψης της κυτταρικής επιφάνειας, κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο [Εικόνα 3.3].

Στη συνέχεια εξετάσαμε την ικανότητα της μοσχαμίνης να προάγει απόπτωση στις κυτταρικές σειρές U251MG και T98G. Τα αποπτωτικά κύτταρα προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής μετά από επώαση 72 ωρών, με τη χρήση χρώσης PI/Annexin-V. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η μοσχαμίνη προκάλεσε απόπτωση κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο και το φαινόμενο εμφανίστηκε σε συγκεντρώσεις 150μM και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η απόπτωση ήταν πιο έντονη στην κυτταρική σειρά T98G [Εικόνα 3.4].



Εικόνα 3.4: Η μοσχαμίνη επάγει απόπτωση κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Για να μελετηθεί κατά πόσον η απόπτωση, που προκαλείται από τη μοσχαμίνη, σχετίζεται με μειωμένο δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης, μη επεξεργασμένα κύτταρα U251MG ή κύτταρα που υποβάλλονται σε αγωγή με μοσχαμίνη (150 και 200μm για 24h) κηλιδώθηκαν με JC-1 και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής [Εικόνα 3.5].

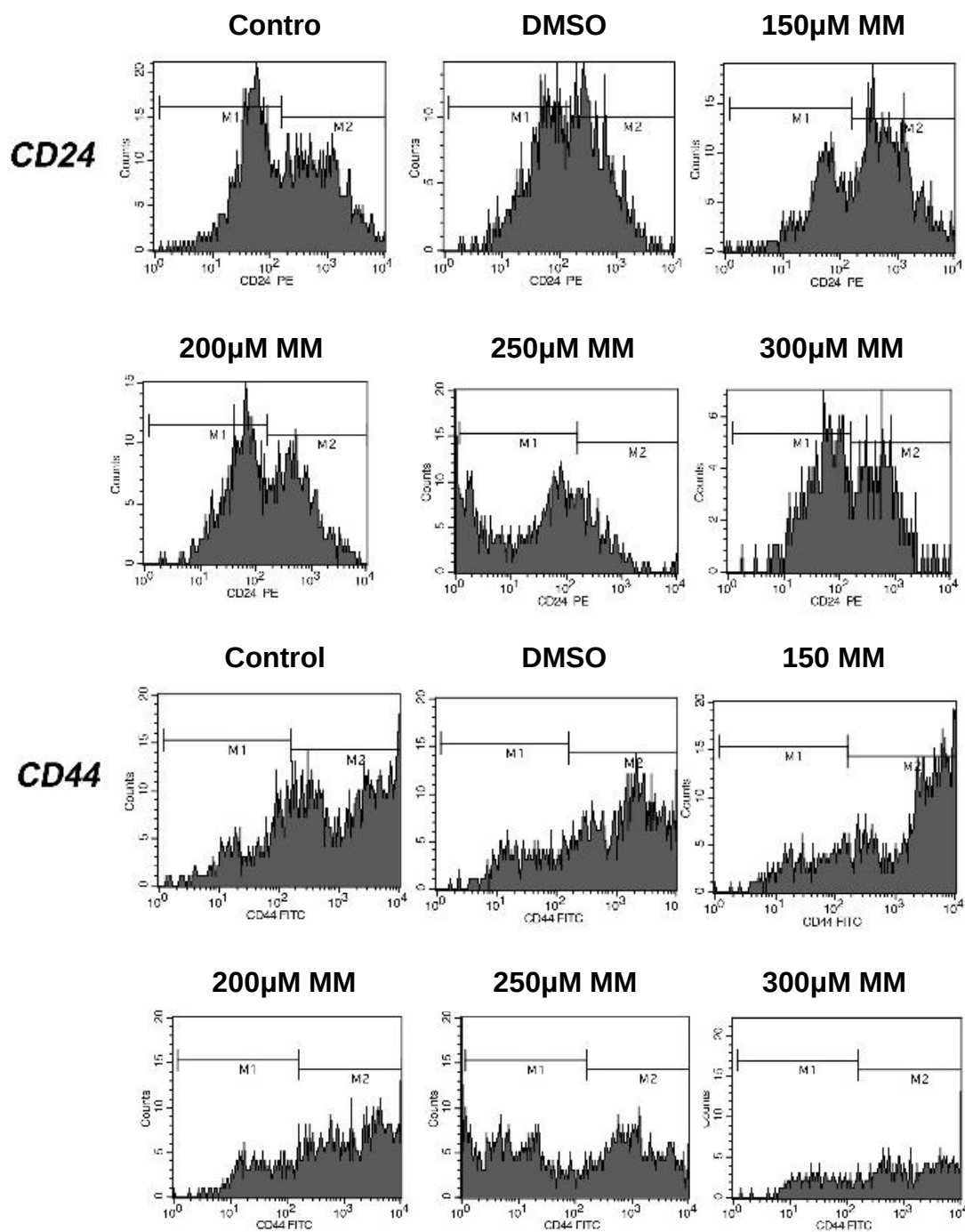


Εικόνα 3.5: Η μισχαμίνη επάγει το μιτοχονδριακό μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου.

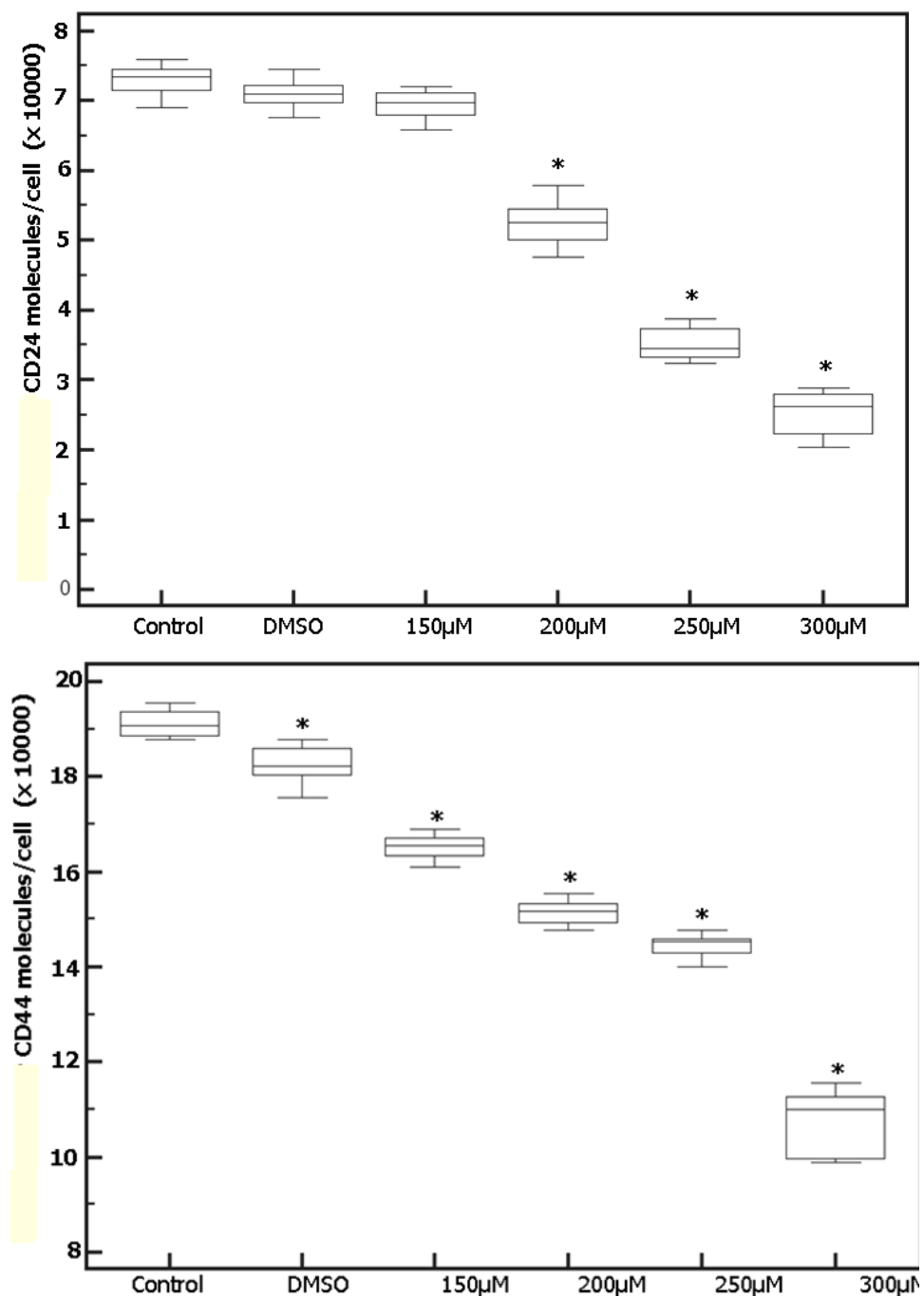
Ο φθορισμός JC-1 στα κανάλια FL-2 και FL-1 αντιστοιχεί σε μιτοχόνδρια με αυξημένο $\Delta\psi$ (περιφραγμένη περιοχή R4), τα οποία έχουν άθικτη την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αντίθετα, η χρωστική JC-1, που φθορίζει σε κύτταρα μόνο στο κανάλι FL-1 και στερείται φθορισμού στο κανάλι FL-2, αντιστοιχεί σε μιτοχόνδρια με μειωμένο $\Delta\psi$ (περιφραγμένη περιοχή R5), που αντιστοιχεί σε διάρρηξη της εσωτερικής μιτοχονδριακής

μεμβράνης, ενδεικτικής της επαγωγής μιτοχονδριακού κυτταρικού θανάτου. Η επώαση με μοσχαμίνη οδήγησε σε σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων με μειωμένο κόκκινο φθορισμό, 38,6% στα 150 μM και 28% στα 200 μM , σε σύγκριση με 16,7 σε μη επεξεργασμένα κύτταρα ελέγχου. Συμπερασματικά, ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από τη μοσχαμίνη συνδέεται με την αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενδεικτική της εγγενούς, μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού.

Σε ένα επόμενο βήμα αναλύσαμε την έκφραση των δεικτών καρκινικών βλαστικών κυττάρων, CD24 και CD44 με κυτταρομετρία ροής. Ο δείκτης CD24 είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη επιφάνειας κυττάρων, που εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε διάφορες κακοήθειες. Η υψηλή έκφραση του CD24 συνδέεται με ενισχυμένη διεισδυτικότητα και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επώασαμε κύτταρα U251 ή T98G με 150-300 μM MM και ποσοτικοποιήσαμε την έκφραση των δεικτών CD24 και CD44 με κυτταρομετρία ροής [Εικόνα 3.6].



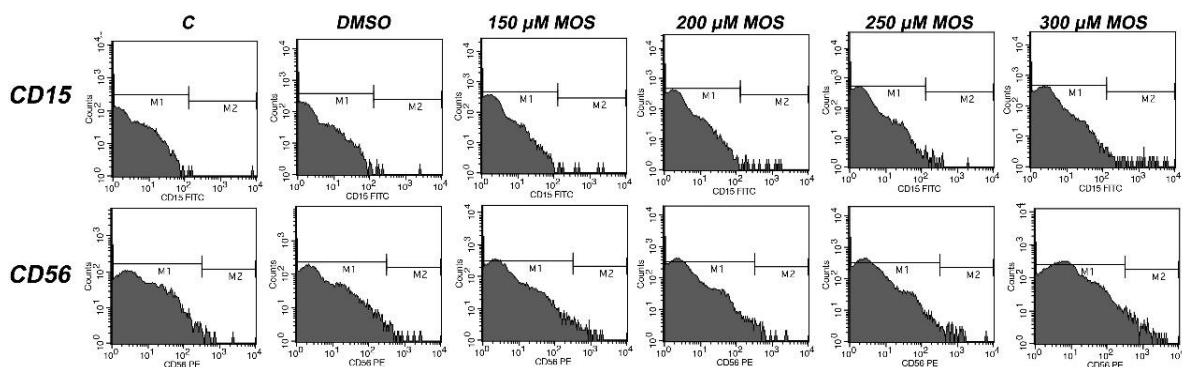
Εικόνα 3.6: Ανάλυση της έκφρασης των δεικτών CD44/CD24 έπειτα από επώαση με μοσχαμίνη.



Εικόνα 3.7: Η έκφραση των δεικτών CD44/CD24 μειώνεται έπειτα από επώαση με μοσχαμίνη. Υπολογίζεται ο μέσος όρος τριών βιολογικών επαναλήψεων. Με * παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην έκφραση ($p < 0.05$).

Τα αποτελέσματα έκφρασης σε κάθε συγκέντρωση, έπειτα από 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις, αναλύθηκαν συγκριτικά για κάθε πειραματική συνθήκη [Εικόνα 3.7]. Ο μέσος αριθμός των μορίων CD24 στην επιφάνεια των κυττάρων T98G ήταν 73.000 μόρια/κύτταρο και ο μέσος αριθμός CD44 στην επιφάνεια των κυττάρων T98G ήταν

191.000 μόρια/κύτταρο. Βρήκαμε μια εξαρτώμενη από τη δόση μείωση του αριθμού των μορίων CD24 / κυττάρων μετά τη θεραπεία με μοσχαμίνη, η οποία ήταν σημαντική σε συγκέντρωση ίση ή πάνω από 200μM. Για την έκφραση CD44, διαπιστώσαμε μείωση του αριθμού των μορίων/κυττάρων CD44 που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση μετά από επώαση με μοσχαμίνη, η οποία ήταν σημαντική ακόμη και σε συγκέντρωση 150μM.



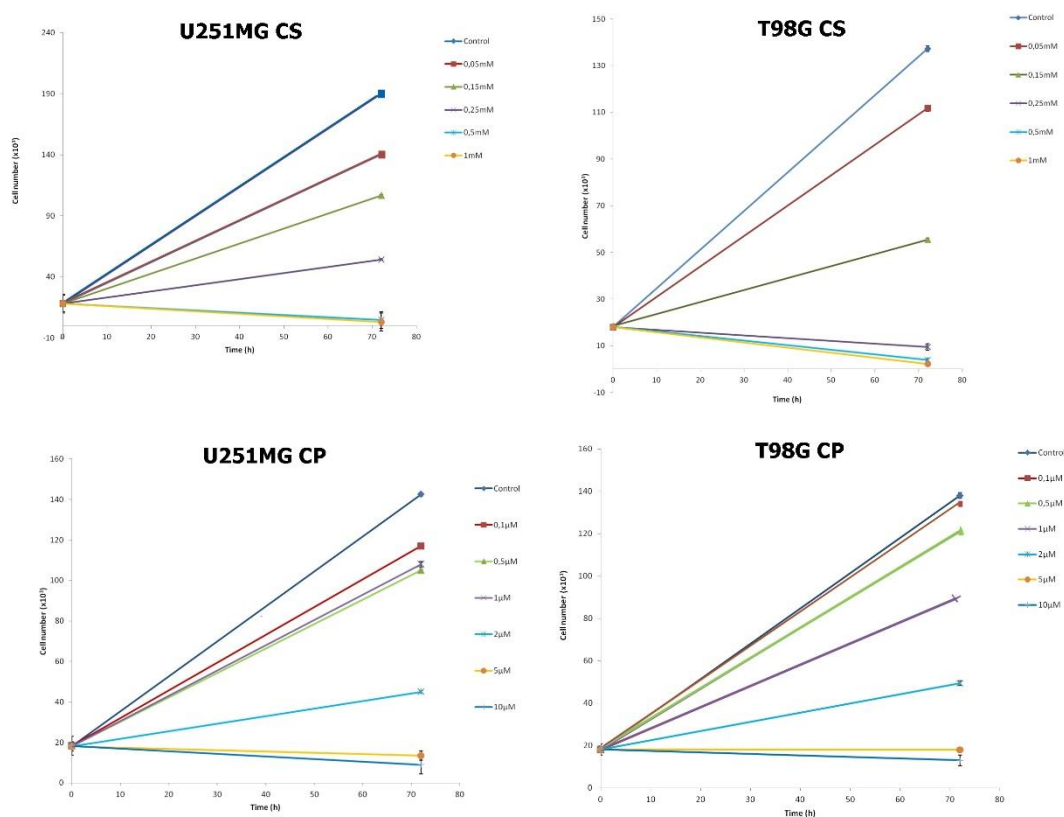
Εικόνα 3.8: Ανάλυση της έκφρασης των δεικτών CD15/CD56 έπειτα από επώαση με μοσχαμίνη.

Στη συνέχεια, αναλύσαμε την έκφραση των δεικτών CD56 και CD15 με κυτταρομετρία ροής. Ο μέσος αριθμός των μορίων CD56 στην επιφάνεια των κυττάρων T98G ήταν 1100 μόρια/κύτταρο και ο μέσος αριθμός CD15 στην επιφάνεια των κυττάρων T98G ήταν 210 μόρια/κύτταρο. Η επώαση με μοσχαμίνη δεν τροποποίησε την έκφραση των CD56 και CD15 [Εικόνα 3.8].

3.1.2 Μελέτη του μηχανισμού δράσης της N-P-κουμαροϋλ-σεροτονίνης

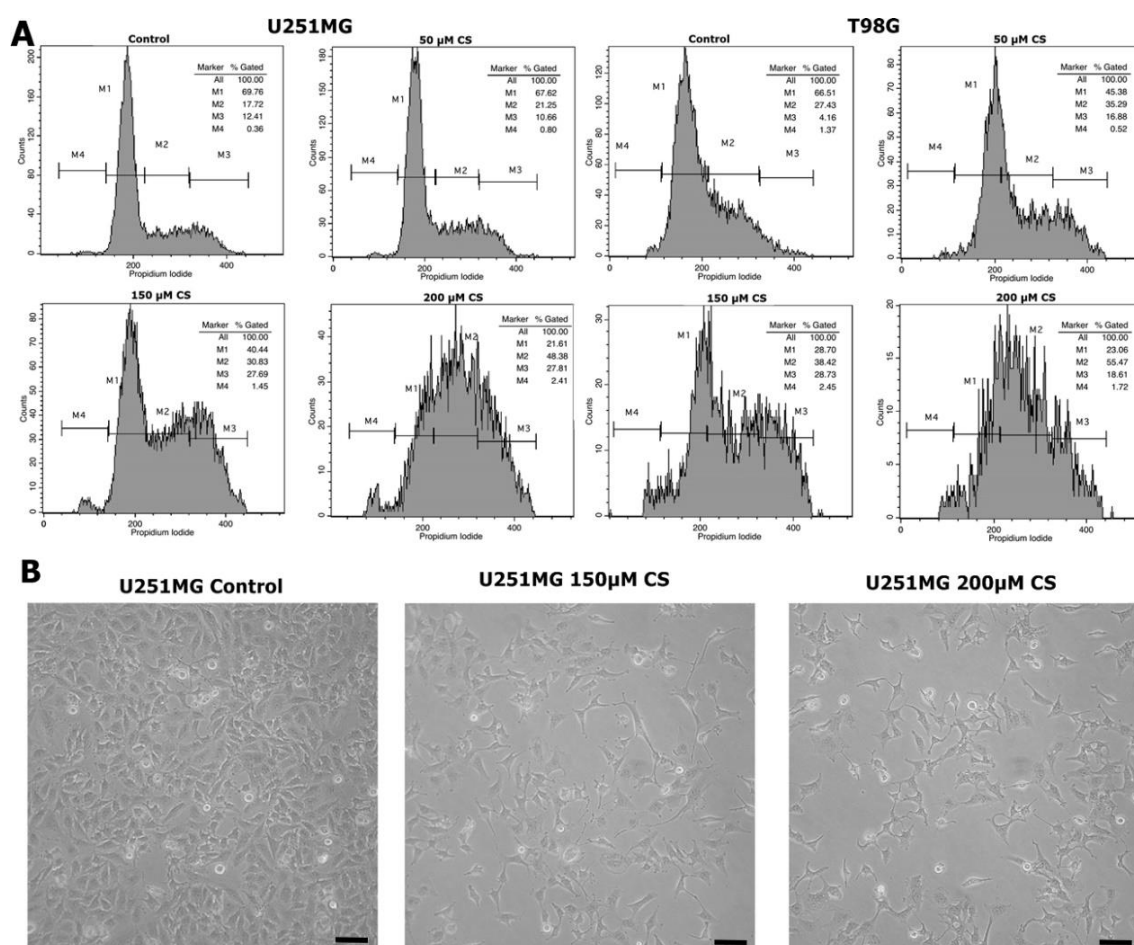
Η N-(p-κουμαροϋλ) σεροτονίνη (CS) αποτελεί ανάλογο συζευγμένης σεροτονίνης που βρίσκεται στα φυτά, συμπεριλαμβανομένων των σπόρων του γένους *Centaurea*. Η CS έχει αποδειχθεί ότι ασκεί αντιοξειδωτική, καρδιοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση [5-11]. Το μοριακό βάρος (MW) του CS είναι 352,3, μέγεθος που επιτρέπει να διασχίσει τον άθικτο αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB). Πριν την παρούσα διδακτορική μελέτη, δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη δράση της CS σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Ερευνήσαμε την αντιγλοιοματική επίδραση της CS.

Προκειμένου να διερευνήσουμε την ευαισθησία στο CS των κυτταρικών σειρών U251MG και T98G, χρησιμοποιήσαμε το σύστημα xCELLigence, 2×10^3 κύτταρα U251MG και T98G σπαρμένα και, 24 ώρες αργότερα, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε CS (50, 150, 250, 500 και 1000 μM) για 72 ώρες. Και οι δύο κυτταρικές σειρές ήταν ευαίσθητες στη θεραπεία με CS με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Για να εξετάσουμε τις κυτταροτοξικές επιδράσεις του CS χρησιμοποιήσαμε επίσης τη δοκιμή αποκλεισμού trypan blue. Καθορίσαμε το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων, το οποίο ορίστηκε ως ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων σε 72 ώρες μετά την έκθεση σε κλιμακούμενες δόσεις CS σε σύγκριση με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων ελέγχου. Ο αριθμός τόσο των κυττάρων U251MG όσο και των κυττάρων T98G μειώθηκε δοσοεξαρτώμενα μετά από επώαση με CS. Η κυτταρική σειρά T98G ήταν πιο ευαίσθητη σε επώαση με CS από τα κύτταρα U251MG. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας σισπλατίνη. 2×10^3 κύτταρα U251MG και T98G εκτέθηκαν σε σισπλατίνη (0,1, 0,5, 1, 2, 5 και 10 μM) για 72 ώρες. Και οι δύο κυτταρικές σειρές ήταν ευαίσθητες στην σισπλατίνη κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση [Εικόνα 3.9].



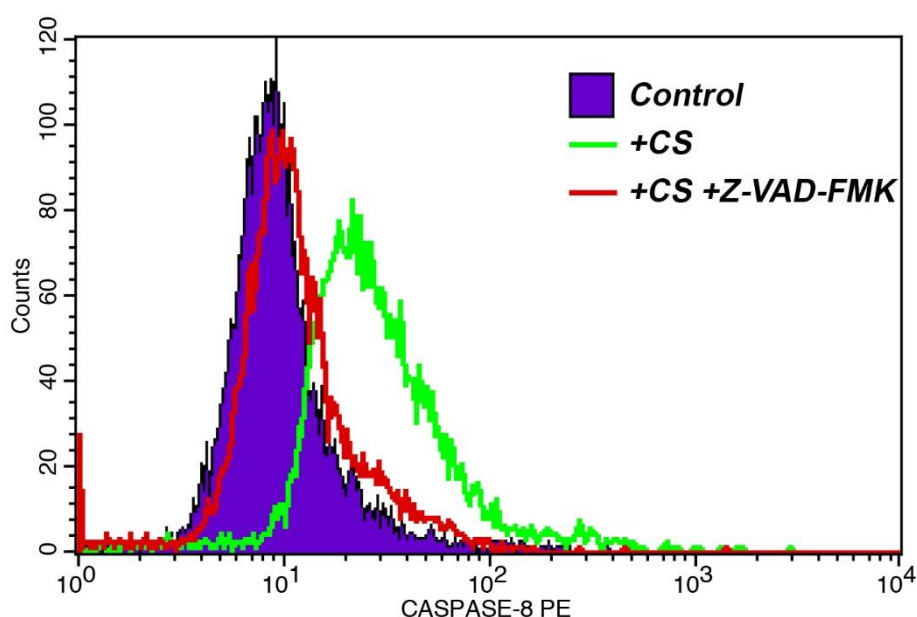
Εικόνα 3.9. Ρόλος της CS στον πολλαπλασιασμό κυττάρων γλοιώματος

Για να εξετάσουμε τα συμβάντα κυτταρικού κύκλου στα οποία βασίζονται αυτές οι παρατηρούμενες ανασταλτικές επιδράσεις ανάπτυξης, αξιολογήσαμε την επίδραση του CS στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων U251MG και T98G. Και οι δύο κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν είτε μόνο σε DMSO ή σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις CS (50, 150 και 200 μ M) για 72 ώρες [Εικόνα 3.10]. Ελλείψει φαρμάκου, το DMSO από μόνο του δεν είχε καμία επίδραση στην κατανομή του κυτταρικού κύκλου και των δύο κυτταρικών σειρών. Στα κύτταρα U251MG και T98G η CS προκάλεσε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στο subG0/G1 (M4) κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο, που υποδηλώνει επαγωγή απόπτωσης. Η CS προκάλεσε μια αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η σισπλατίνη, ως θετικός μάρτυρας, προκάλεσε στάση στη φάση G2/M στα κύτταρα U251MG και τη φάση S στα κύτταρα T98G [Εικόνα 3.10].



Εικόνα 3.10: Η κυτταροτοξική επίδραση της N-p-κουμαροϋλ-σεροτονίνης σε κύτταρα U251-MG και T98G. (A) Αναλύσεις κυτταρικού κύκλου (B) Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου.

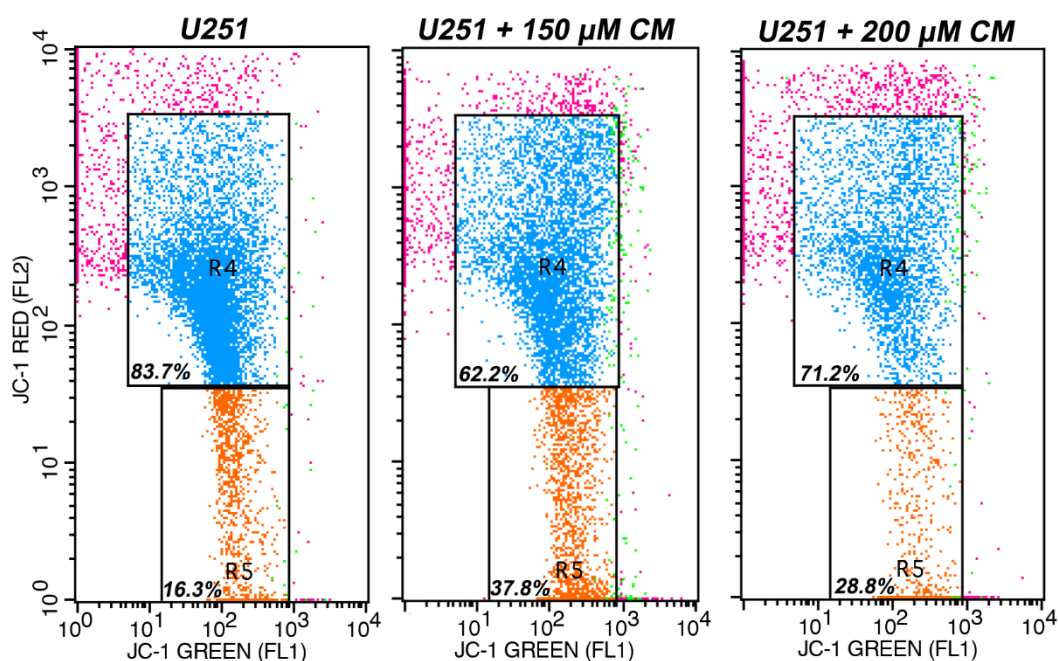
Στη συνέχεια, ερευνήσαμε αν η ενισχυμένη απόπτωση που παρατηρήθηκε στην ανάλυση κυτταρικού κύκλου από το CS, σχετίζεται με την ενεργοποίηση της κασπάσης-8. 10^4 κύτταρα U251MG εκτέθηκαν σε CS σε τιμή IC_{50} (77 μ M) και CS με τον αναστολέα κασπάσης-8 Z-VAD-FMK. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η CS παρήγαγε σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της κασπάσης-8 σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρα ($12,4 \pm 2,1\%$ έναντι $4,1 \pm 0,8\%$, αντίστοιχα). Ο αναστολέας της κασπάσης-8 (Z-VAD-FMK) ήταν σε θέση να εμποδίσει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 μετά από χορήγηση CS [Εικόνα 3.11].



Εικόνα 3.11. Η επίδραση της CS στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8.

Για να μελετηθεί περαιτέρω κατά πόσον η απόπτωση, που προκαλείται από CS, σχετίζεται με αποπόλωση μιτοχονδριακής μεμβράνης, μη επεξεργασμένα κύτταρα U251MG ή κύτταρα που έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία με CS (150 και 200 μ m για 24h) χρώστηκαν με JC-1 και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής [Εικόνα 3.12]. Το JC-1 εκπέμπει φθορισμό τόσο στα κανάλια FL-2 όσο και στα FL-1 και θεωρείται ότι αντιστοιχεί σε μιτοχόνδρια με πολωμένο Δββ. JC-1, που φθορίζει στο κανάλι FL-1 και στερείται φθορισμού στο κανάλι FL-2, θεωρείται ότι αντιστοιχεί σε μιτοχόνδρια με αποπόλωση Δβ. Στην ανάλυσή μας, περιφραγμένη περιοχή R4 στον έλεγχο είναι ο πληθυσμός κυττάρων με υψηλό μιτοχονδριακό δυναμικό μεμβράνης, ενώ ένα μικρό ποσοστό (16.3%) παρουσιάζει μειωμένο φθορισμό στο κανάλι FL-2 (περιφραγμένη περιοχή R5), που αντιστοιχεί στην αποπόλωση της μεμβράνης.

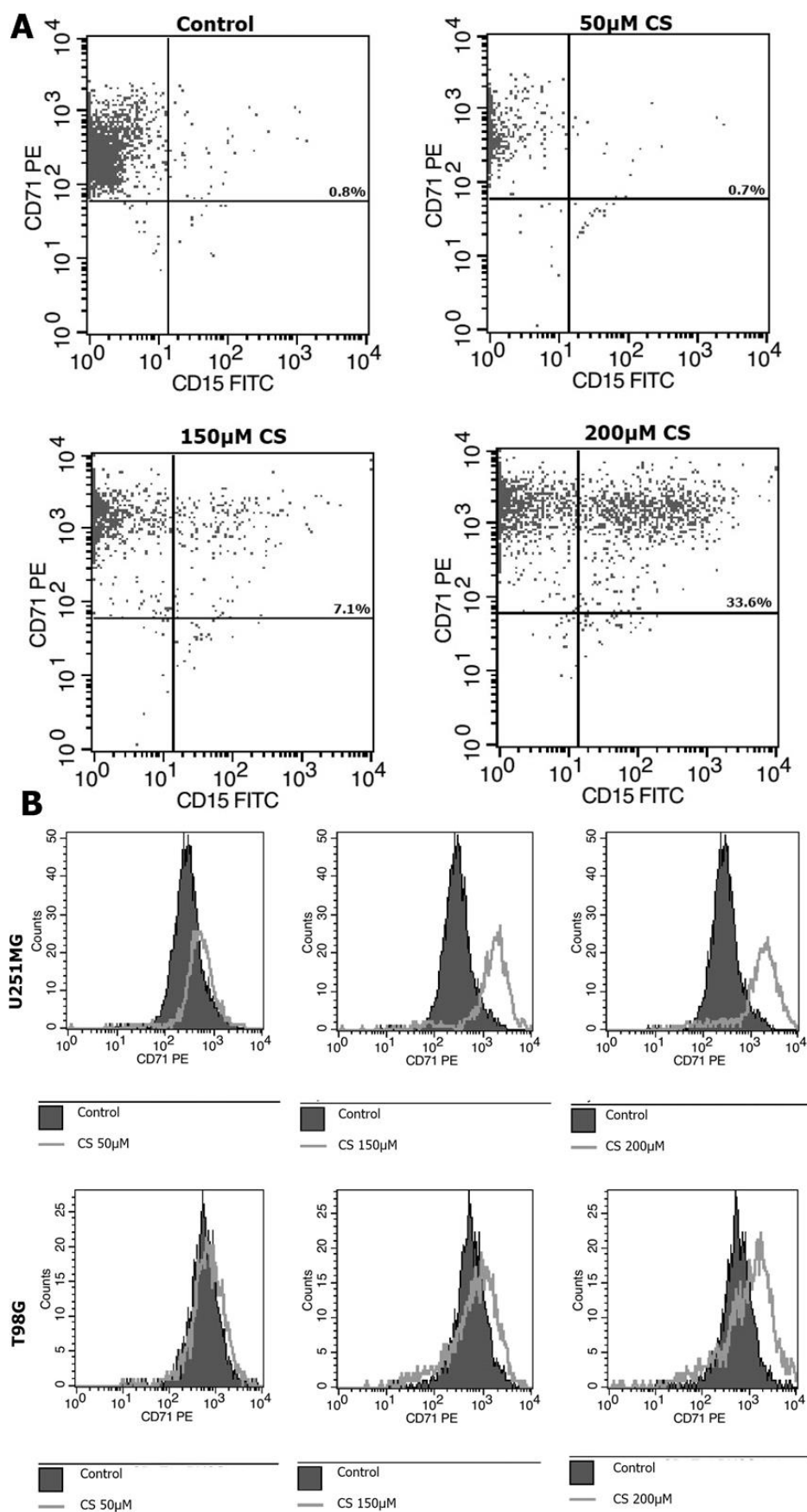
Μετά την επώαση με CS, υπάρχει σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων με χαμηλότερο κόκκινο φθορισμό (37, 8% στα 150 μ M CS και 28, 8% το 200 μ M CS), ενδεικτική αλλαγής του $\Delta\Psi$ στους πληθυσμούς που συμβαίνει επαγωγή της απόπτωσης. Έτσι, η επαγωγή απόπτωσης από CS συσχετίστηκε με αποπόλωση του $\Delta\Psi$.



Εικόνα 3.12: Επίδραση της CS οδηγεί στην επαγωγή μιτοχονδριακού θανάτου.

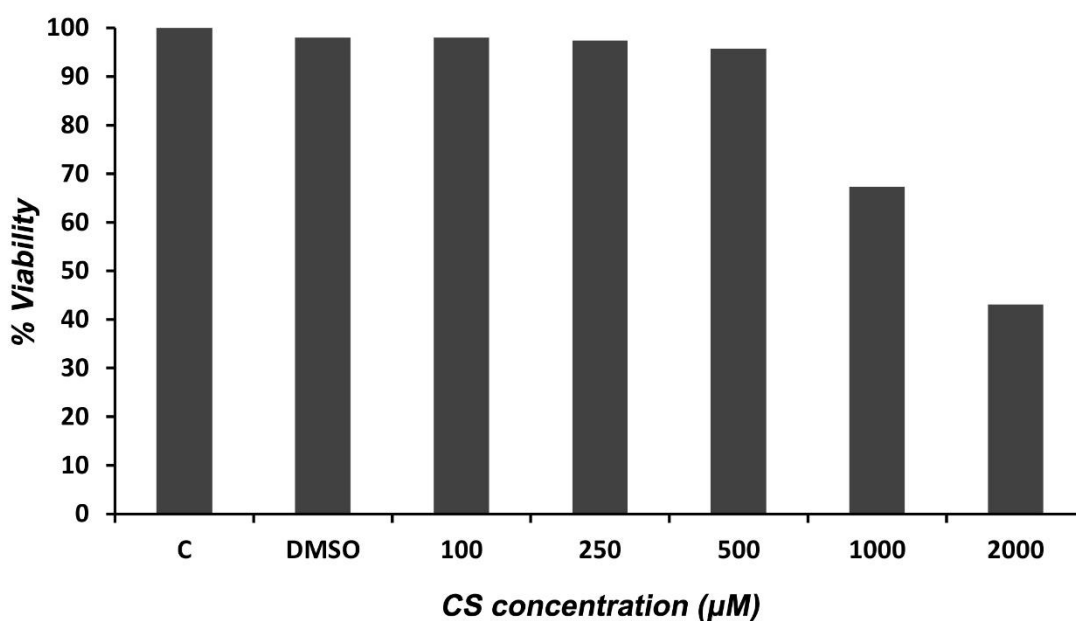
Στη συνέχεια αναλύσαμε την έκφραση του CD71 και του CD15 με κυτταρομετρία ροής. Ο μέσος αριθμός μορίων CD71 στην επιφάνεια των κυττάρων U251MG ήταν 26,400 μόρια/κύτταρο και στην επιφάνεια των κυττάρων T98G ήταν 43.900 μόρια/κύτταρο. Μετά τη θεραπεία με CS υπήρξε μια εξαρτώμενη από τη δόση σημαντική αύξηση του αριθμού των μορίων CD71 και στις δύο κυτταρικές σειρές. Στα κύτταρα U251MG σε συγκέντρωση CS 50 μ M υπήρχαν 47.300 μόρια/κύτταρα, στα 150 μ M CS 143.000 μόρια/κύτταρα και στα 200 μ M CS 155.000 μόρια/κύτταρα. Στα κύτταρα T98G σε συγκέντρωση CS 50 μ M υπήρχαν 59.800 μόρια/κύτταρα, στα 150 μ M CS 62.500 μόρια/κύτταρα και στα 200 μ M CS 89.100 μόρια/κύτταρο. Ο μέσος αριθμός CD15 στην επιφάνεια του U251MG ήταν 480 μόρια/κύτταρο και στην επιφάνεια των κυττάρων T98G ήταν 250 μόρια/κύτταρο. Μετά τη θεραπεία με CS υπήρξε σημαντική αύξηση του αριθμού των μορίων/κυττάρων CD15 σε συγκέντρωση 150 μ M και 200 μ M [Εικόνα 3.13].

Στη συνέχεια, αναλύσαμε την έκφραση των δεικτών για τα βλαστοκύτταρα του καρκίνου, CD24 και CD44, με κυτταρομετρία ροής. CD24 είναι μια βαριά γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη επιφάνειας κυττάρων, που είναι αυξημένη σε διάφορες κακοήθειες. Η υψηλή έκφραση του CD24 συνδέεται με ενισχυμένη επεμβατικότητα και πολλαπλασιασμό. Ο μέσος αριθμός των μορίων CD24 στην επιφάνεια των κυττάρων U251MG ήταν 25.200 μόρια/κύτταρο και στα κύτταρα T98G ήταν 33.400 μόρια/κύτταρο. Ο μέσος αριθμός CD44 στην επιφάνεια των κυττάρων U251MG ήταν 148.600 μόρια/κύτταρο και στα κύτταρα T98G ήταν 113.900 μόρια/κύτταρο. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή στην έκφραση CD24 και CD44 μετά τη θεραπεία με CS και στις δύο κυτταρικές σειρές. Στη συνέχεια, αναλύσαμε την έκφραση του επιφανειακού δείκτη CD56 (NCAM-1). Ο μέσος αριθμός των μορίων CD56 στην επιφάνεια των κυττάρων U251MG ήταν 2.400 μόρια/κύτταρο και στα κύτταρα T98G ήταν 1200 μόρια/κύτταρο. Η θεραπεία με CS δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση CD56.



Εικόνα 3.13. Η CS επηρεάζει την έκφραση ανοσοφαινοτυπικών δεικτών κυττάρων γλοιοβλαστώματος.

Μία σημαντική παράμετρος για την επιλογή μίας χημειοθεραπευτικής ουσίας για περαιτέρω διερεύνηση της δράσης της σε κλινικές μελέτες, είναι η αποφυγή κυτταροτοξικών επιδράσεων. Πρόσφατο *in vivo* προκλινικό σύστημα μελέτης κυτταροτοξικότητας αποτελεί ο οργανισμός μοντέλο Zebrafish.



Εικόνα 3.14: Η CS δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα ιχθύων Zebrafish σε συγκεντρώσεις που δρα αντιγλοιοματικά.

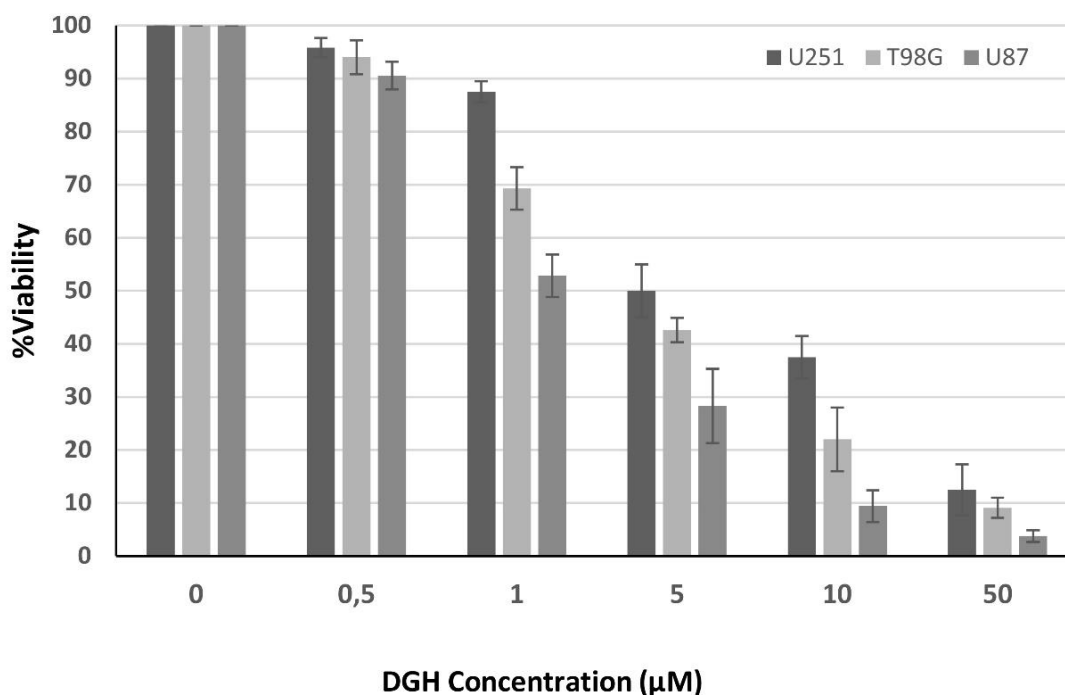
Για να αξιολογήσουμε την πιθανή τοξικότητα της έκθεσης των εμβρύων Zebrafish στην CS, μετρήσαμε τη θνησιμότητα κατά τη διάρκεια μιας συνεχιζόμενης περιόδου παρατήρησης. Η θνησιμότητα των ιχθύων την πέμπτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση ήταν μηδέν, ακόμη και για 500 μM συγκέντρωσης CS [Εικόνα 3.14].

Φαινόμενα κυτταροτοξικότητας εμφανίστηκαν σε συγκεντρώσεις που αποτελούν πολλαπλάσιο της τιμής IC₅₀, στο επίπεδο του 30% σε συγκέντρωση 1mM και στο επίπεδο του 50% στη συγκέντρωση 2 mM.

3.1.3 Μελέτη του μηχανισμού αντιγλοιωματικής δράσης της δεγλουκοελλεβρίνης

Η δεγλουκοελλεβρίνη (DGH) (βλέπε υλικά και μέθοδοι) μπορεί να εξαχθεί από τις ρίζες του *Helleborus* (152). Πρόσφατα, οι Martucciello et al διερεύνησαν φυσικές ενώσεις που είχαν εξαχθεί από τον *Helleborus caucasicus*, και μεταξύ αυτών την DGH, για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Η DGH έδειξε μια ισχυρή κυτταροτοξική επίδραση σε κυτταρικές σειρές καρκίνων του πνεύμονα, ήπατος και του παχέος εντέρου (161). Σύμφωνα με τα ανωτέρω δεδομένα που υποστηρίζουν την αντικαρκινική επίδραση της DGH, ερευνήσαμε για πρώτη φορά την αντιγλοιωματική δράση της σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος.

Αρχικά, οι κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος U251MG, U87G και T98G επώαστηκαν με DGH σε διάφορες συγκεντρώσεις για 72h και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε δοκιμασία MTT για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας [Εικόνα 3.15]. Η τιμή IC₅₀ της αυξανόμενης κυτταροτοξικότητας της DGH υπολογίστηκε σε $7 \times 10^{-5} \text{M}$ σε κύτταρα U251MG, $5 \times 10^{-5} \text{M}$ για τα κύτταρα T98G και $4 \times 10^{-5} \text{M}$ για τα κύτταρα U87G κατά τη διάρκεια επώασης 72h. Συνολικά, η DGH έχει κυτταροτοξική επίδραση σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος.

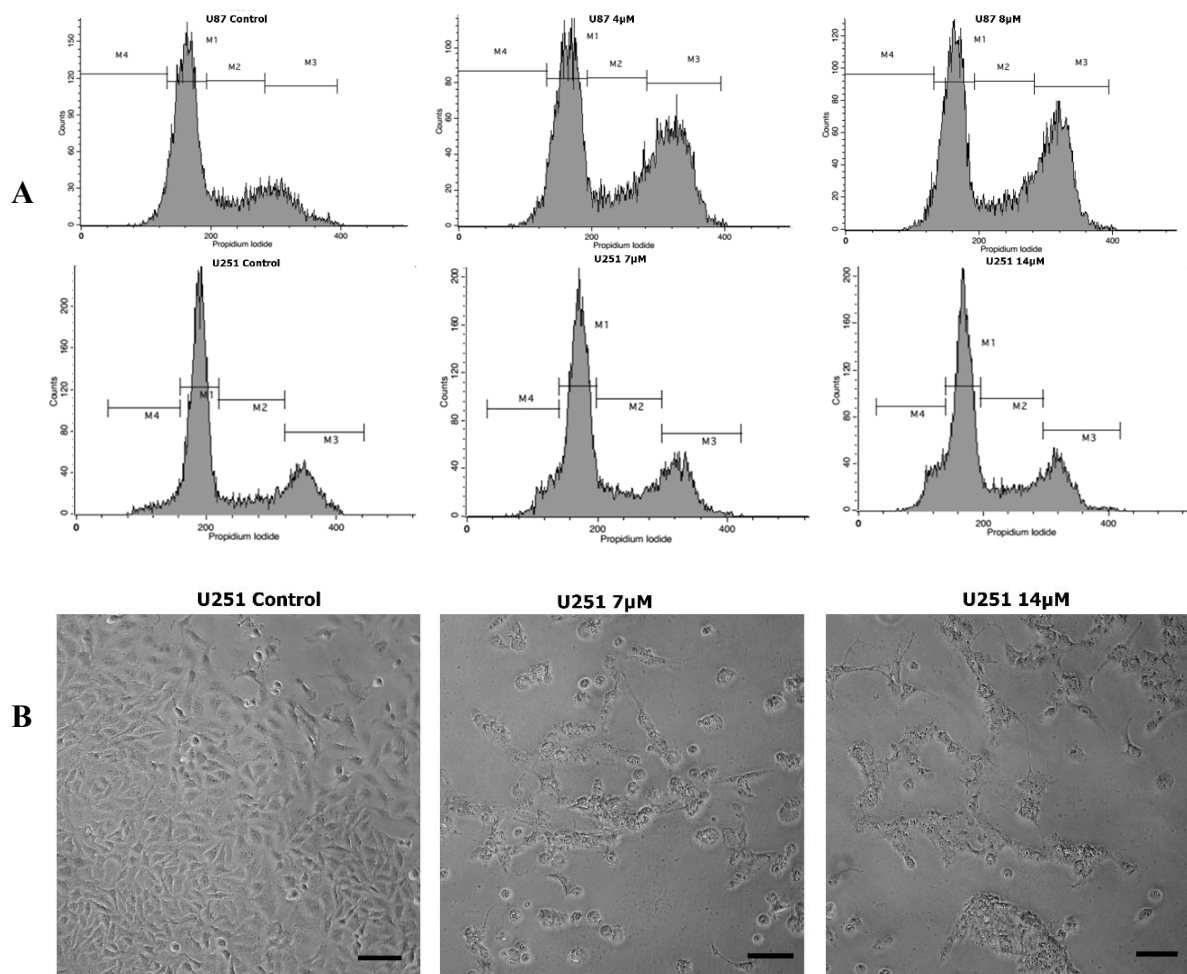


Εικόνα 3.15: Κυτταροτοξική επίδραση της DGH.

Σε ένα επόμενο στάδιο διερευνήσαμε την επίδραση της DGH στην κατανομή των φάσεων κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος, ως ενός μηχανισμού στον οποίο μπορεί να βασίζονται οι παρατηρούμενες ανασταλτικές επιδράσεις της DGH. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση της DGH στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων U251MG και U87. Και οι δύο κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν σε DGH, σε συγκεντρώσεις ίσης της IC_{50} και διπλάσιας της IC_{50} .

Και στις δύο κυτταρικές σειρές U251MG και U87, η DGH οδήγησε σε συσσώρευση των κύτταρων στη φάση του κυτταρικού κύκλου G2/M. Το ποσοστό των κυττάρων U87 στη φάση G2/M αυξήθηκε από 16,54% σε 35,19% και 36,92%, έπειτα από επώαση με συγκέντρωση 4 μ M και 8 μ M DGH, αντίστοιχα. Στα κύτταρα U251MG, ποσοστό των κυττάρων στη φάση G2/M αυξήθηκε από 19,15% σε 23,94% και 24,92%, έπειτα από επώαση με συγκέντρωση 7 μ M και 14 μ M DGH, αντίστοιχα. Στα κύτταρα U251MG σημειώθηκε πρόσθετη αύξηση του κλάσματος του κυτταρικού κύκλου sub-G0/G1 από 3,20% σε 6,13% και 7,91% σε 7 μ M και 14 μ M DGH, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την επαγωγή φαινομένων κυτταρικής θνησιμότητας [Εικόνα 3.16A]. Συνολικά, η DGH επηρεάζει την κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Η συσσώρευση στη φάση G2/M εξηγεί την κυτταροστατική δράση της DGH, ενώ η παρουσία κυττάρων στη φάση subG1, υποδηλώνει την παρουσία κυτταροτοξικών φαινομένων κυτταρικού θανάτου.

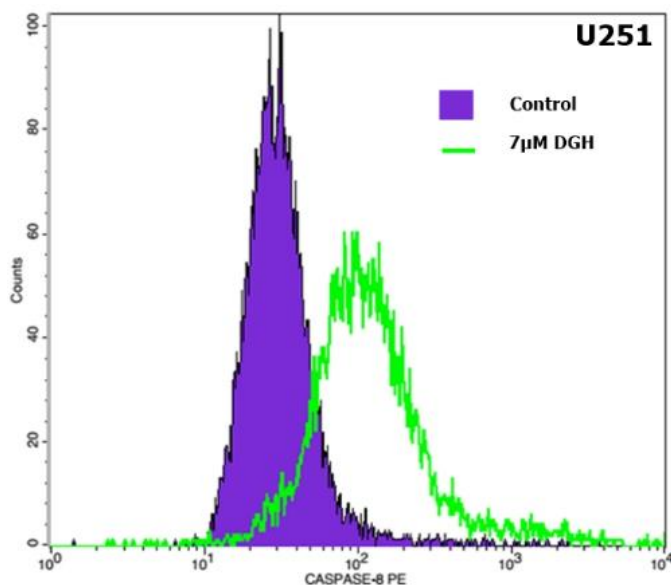
Η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και η επαγωγή κυτταροτοξικότητας επαληθεύθηκε μετά από παρατήρηση με μικροσκοπία φωτεινού πεδίου. Σε κύτταρα U251MG, επώαση με 7 και 14 μ M DGH, οδήγησε σε μείωση του αριθμού κυττάρων, όπως εμφανίζεται από την κάλυψη της επιφάνειας του τρυβλίου ιστοκαλλιέργειας. Επίσης, παρατηρήθηκαν κυτταροτοξικά φαινόμενα, που εμφανίζονται ως στρογγυλοποιημένα κύτταρα, παρουσία κυτταρικών θραυσμάτων, καθώς και η παρουσία πολλαπλών υποκυτταρικών κοκκίων στα ζωντανά κύτταρα [Εικόνα 3.16B]. Επομένως, η DGH παρατηρείται να δρα τόσο κυτταροστατικά όσο και κυτταροτοξικά σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος.



Εικόνα 3.16: επίδραση της DGH στον κυτταρικό κύκλο και τον φαινότυπο κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος.

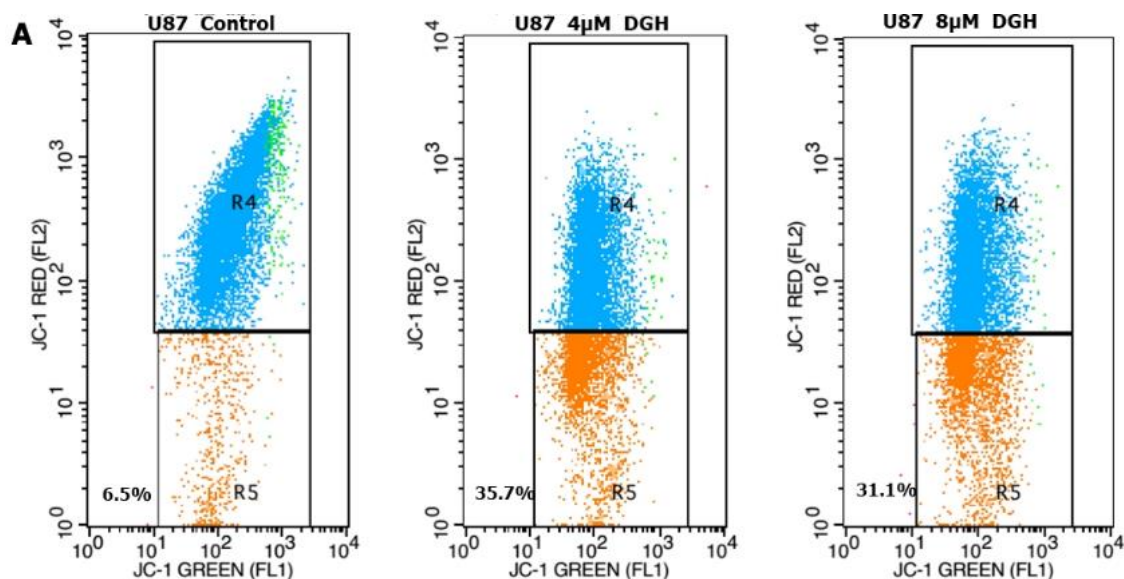
Η επαγωγή απόπτωσης αποτελεί μία καθορισμένη αλληλοδιαδοχή βημάτων, που οδηγεί στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο συχνά ως απόκριση σε παράγοντες έντονου στρες (162). Οι κασπάσες αποτελούν σημαντικά ρυθμιστικά και εκτελεστικά μόρια στην επαγωγή της απόπτωσης και η κασπάση-8 αποτελεί ένα κεντρικό μόριο στο εξωγενές μονοπάτι επαγωγής κυτταρικού θανάτου (163).

Στη συνέχεια εξετάσαμε την ικανότητα της DGH να προωθήσει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 στην κυτταρική σειρά U251MG, ως ένας πιθανός μηχανισμός δράσης της στο γλοιοβλάτωμα. 10^4 κύτταρα U251MG σπαρμένα και 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα εκτέθηκαν σε DGH σε συγκέντρωση ίση με την IC₅₀ (7μM). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η DGH παρήγαγε σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα της κασπάσης-8 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου ($63,7\% \pm 8,9\%$ έναντι $2,1 \pm 0,4$, αντίστοιχα, $p < 0,005$) [Εικόνα 3.17]. Συμπερασματικά, η DGH επάγει το εξωγενές μονοπάτι κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 3.17: Η DGH επάγει την ενεργότητα της κασπάσης 8.

Η επαγωγή του εξωγενούς μονοπατιού απόπτωσης συχνά συνοδεύεται από ακόλουθη επαγωγή του ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης, ως ενός μηχανισμού ενίσχυσης των αποπτωτικών σημάτων. Αυτός ο μηχανισμός έχει συνδεθεί με την αντικαρκινική δράση ουσιών φυσικής προέλευσης (164). Για να μελετηθεί εάν η απόπτωση, που προκαλείται από DGH, σχετίζεται με μειωμένο δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, μη επεξεργασμένα κύτταρα U87G ή κύτταρα που υποβλήθηκαν σε επώαση με DGH (4 και 8μM για 24 ώρες) χρώστηκαν με JC-1 και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Η DGH οδήγησε σε σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων με χαμηλωμένο κόκκινο φθορισμό, 35,7% στα 4 μM και 31,1% σε 8μM, σε σύγκριση με 6,5% σε μη επεξεργασμένα κύτταρα ελέγχου σε κύτταρα U87G [Εικόνα 3.18].



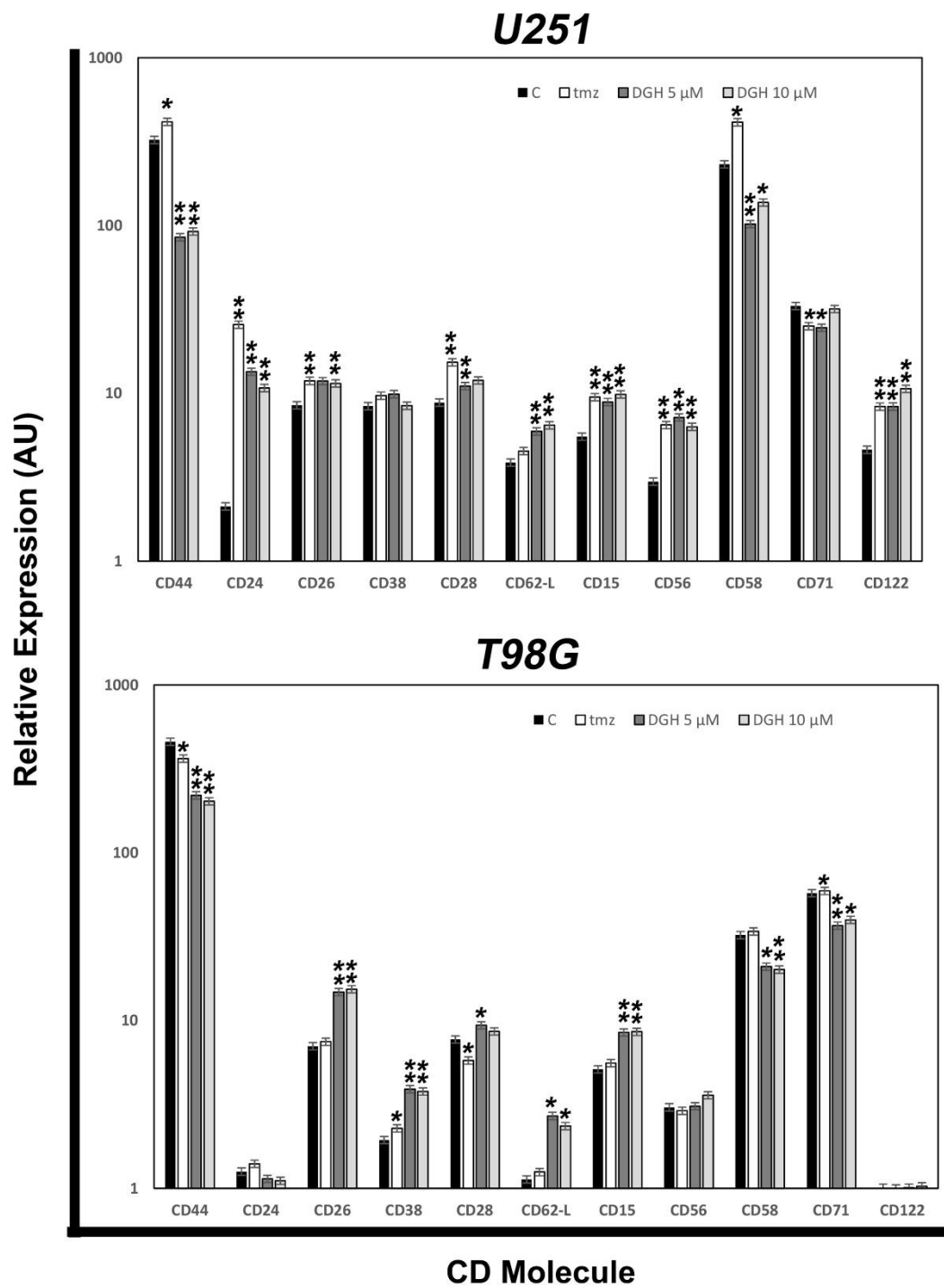
Εικόνα 3.18: η DGH επηρεάζει το δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Έτσι, ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από τη DGH συνδέεται με την αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενδεικτική της ενεργοποίησης της ενδογενούς αποπτωτικής οδού, η οποία εξαρτάται από την αποπόλωση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Στη συνέχεια ερευνήσαμε την επίδραση της DGH στην έκφραση δεικτών CDs τόσο στα κύτταρα U251 όσο και στα κύτταρα T98G σε σύγκριση με το TMZ. 10^4 κύτταρα U251MG και T98G αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας και μετά από 24h εκτέθηκαν σε DGH σε συγκεντρώσεις ίσες ή διπλάσιες από την τιμή IC₅₀. Κύτταρα που επώαστηκαν με τεμοζολομίδη (TMZ), σε συγκέντρωση 0.5mM, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας [Εικόνα 3.19].

Στην κυτταρική σειρά U251MG, η επώαση με DGH προκάλεσε σημαντική αύξηση στην έκφραση των δεικτών CD26, CD24, CD28, CD62-L, CD15, CD56 και CD122. Αντίθετα, η επώαση με DGH οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης των δεικτών CD44, CD58 και CD71. Το TMZ, σε αντίθεση με την DGH, προκάλεσε αυξημένη έκφραση των δεικτών CD44 και CD58 και σημαντική μείωση του δείκτη CD71.

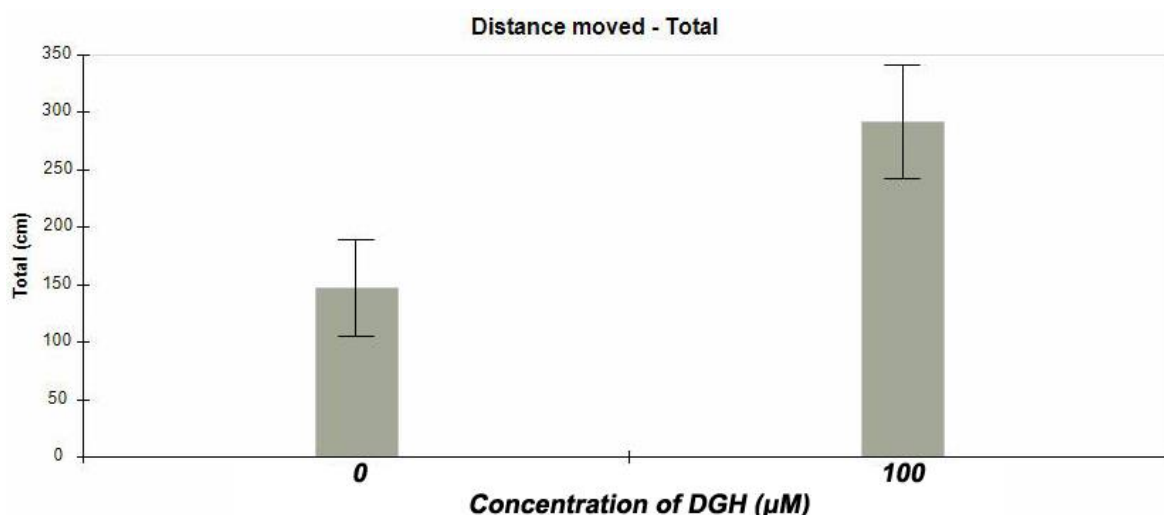
Στην κυτταρική σειρά T98G, η DGH προκάλεσε σημαντική αύξηση στην έκφραση των δεικτών CD26, CD28, CD38, CD62-L και CD15, ενώ μόνο σε συγκέντρωση διπλάσια της τιμής IC₅₀, προκάλεσε επίσης σημαντική αύξηση του δείκτη CD56. Αντίθετα, η DGH προκάλεσε σημαντική μείωση στην έκφραση των δεικτών CD44, CD58 και CD71. Στα κύτταρα T98G το TMZ προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκφρασης των δεικτών CD38 και CD71 και σημαντική μείωση της έκφρασης των δεικτών CD44 και CD28.



Εικόνα 3.19: Η DGH επιδρά στον φαινότυπο καρκινικών σειρών γλοιοβλαστώματος.

Στη συνέχεια, έγινε μελέτη της δράσης της DGH σε ιχθύες Zebrafish, ως ενός προκλινικού, *in vivo* μοντέλου μελέτης κυτταροτοξικότητας.

Για την ανάλυση της συμπεριφοράς των ιχθύων έπειτα από επώαση με DGH, χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα παρακολούθησης DanioVision, το οποίο δεν ανίχνευσε στατιστικά σημαντικές αλλαγές συμπεριφοράς, σε συγκέντρωση τουλάχιστον 10 φορές άνω της IC50. Η υψηλή συγκέντρωση της DGH θεωρήθηκε αβλαβής και ασφαλής για τους ιχθύες [Εικόνα 3.20]. Συνολικά, η αρχική μας υπόθεση, ότι δεν υπήρχαν ανεπιθύμητες ενέργειες από το φαρμακευτικό προϊόν στις καλλιέργειες κυττάρων, επιβεβαιώθηκε και επικυρώθηκε στο *in vivo* μοντέλο Zebrafish.



Εικόνα 3.20: Η επίδραση της DGH στη συμπεριφορά ιχθύων Zebrafish.

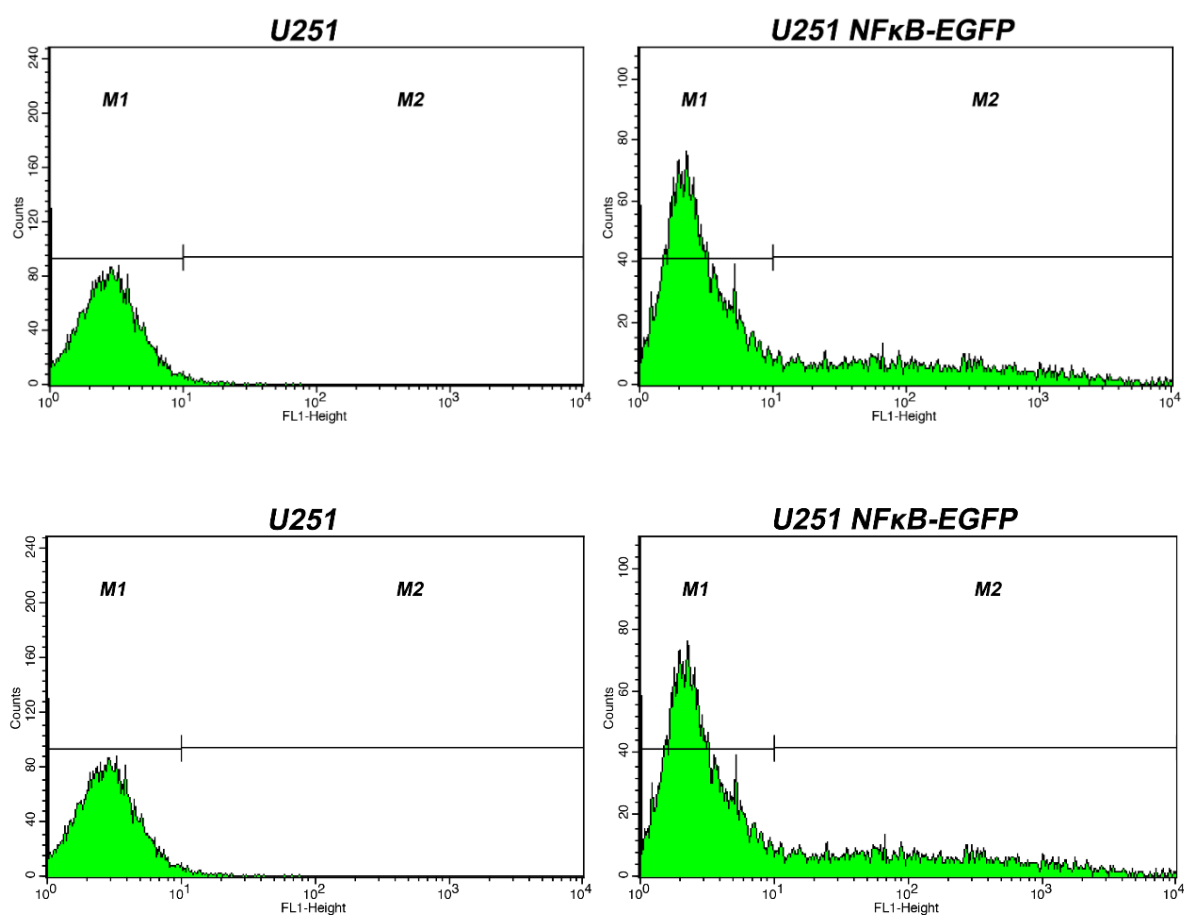
3.2 Μελέτη του μονοπατιού του παράγοντα NF-κB στη δραστηριότητα ουσιών φυσικής προέλευσης

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στο γλοιοβλάστωμα (165), την επαγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων (166) και επιθετικού φαινοτύπου (167, 168). Επίσης, επάγει τη διεισδυτικότητα (169) και μεταστατικότητα κυττάρων γλοιοβλαστώματος (116, 170). Η αναστολή της δράσης του παράγοντα NF-κB συνδέεται με αυξημένη ευαισθησία σε χημειοθεραπεία (118, 171). Με βάση τα ανωτέρω δεδομένα, στην παρούσα ενότητα μελετήθηκε αν το μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB από φυσικές ενώσεις, σχετίζεται με την αντιγλοιοωματική τους δράση.

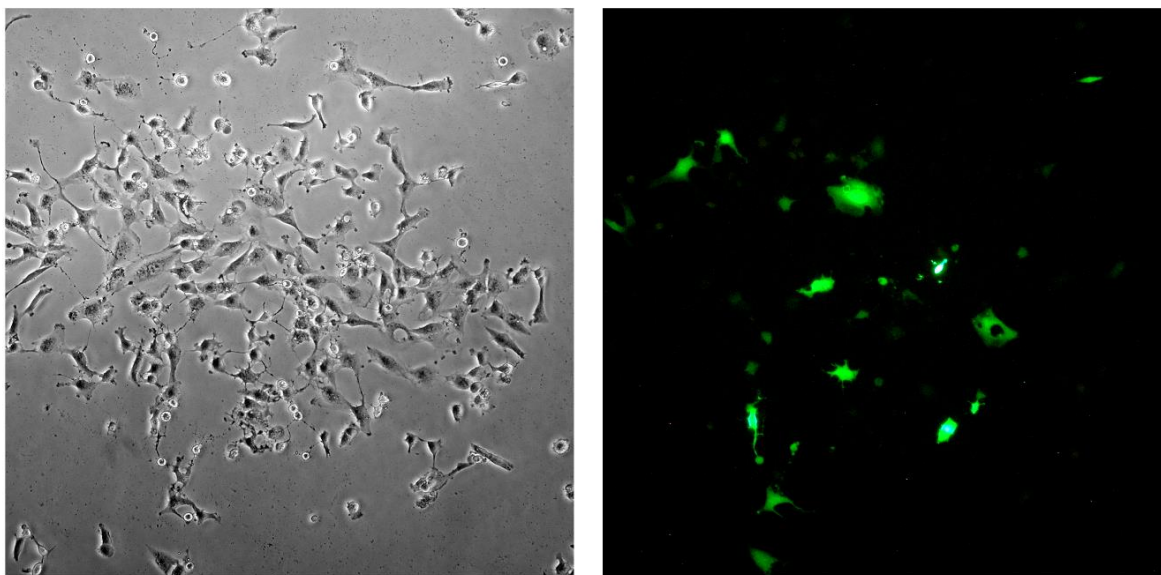
3.2.1 Ενεργότητα του NF-κB σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος

Κοινό χαρακτηριστικό των μονοπατιών ενεργοποίησης του NF-κB, είναι η μετατόπιση τους στον πυρήνα και η πρόσδεσή τους σε στοιχεία κB και ανάλογες αλληλουχίες, με τελικό αποτέλεσμα την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (172). Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση στη μελέτη ενεργότητας μεταγραφικών παραγόντων, είναι η μελέτη τους μέσω κυτταρικών συστημάτων αναφοράς.

A



B



Εικόνα 3.21: Ο παράγοντας NF-κB είναι ενεργός σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος. (Α) Ποσοτικοποίηση της ενεργότητας του NF-κB μέσω μελέτης της έκφρασης EGFP σε κύτταρα U251, τα οποία διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pNFκB:EGFP (που φέρει θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα NF-κB) **(Β)** Μικροσκοπία φθορισμού σε κύτταρα U251, που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pNFκB:EGFP για την παρατήρηση EGFP-θετικών κυττάρων.

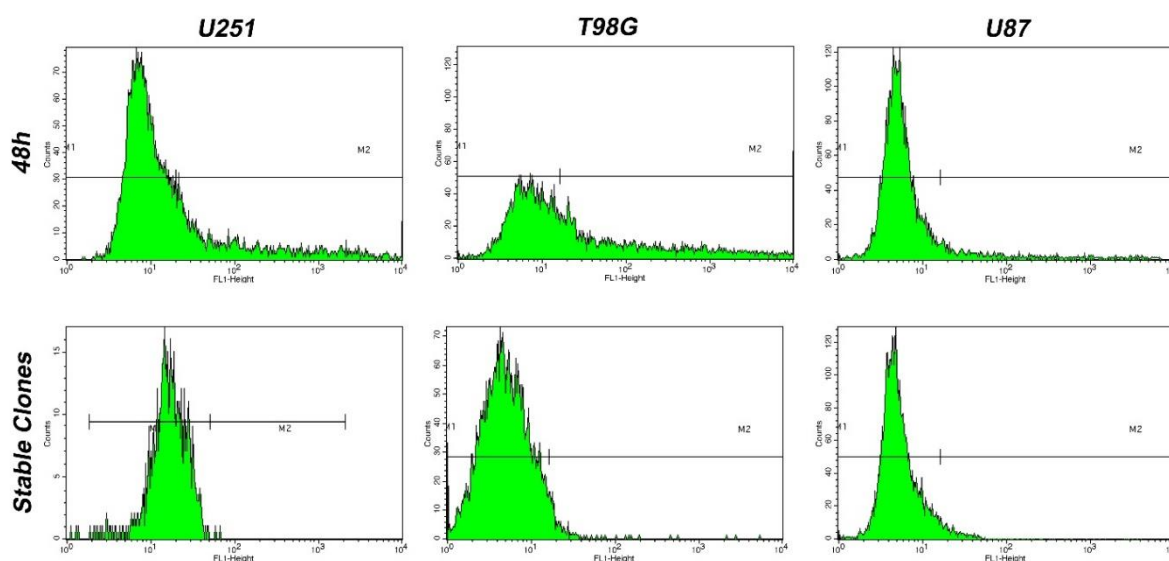
Σε αυτή την περίπτωση, ένα γονίδιο αναφοράς όπως η λουσιφεράση ή η EGFP, το οποίο φέρει στον υποκινητή του θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα που μελετάμε, έχει ως αποτέλεσμα η ενεργοποίησή του να είναι ανάλογη της ποσότητας ή ενεργότητας του «γονιδίου-στόχου». Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε η ενεργοποίηση του NF-κB μέσω του πλασμιδίου αναφοράς pNFκB:EGFP **(153)** (διαθέσιμο από το αποθετήριο πλασμιδίων Addgene), που φέρει το γονίδιο EGFP υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών αλληλουχιών αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.

Κύτταρα U251MG διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pNFκB:EGFP και, μετά από 48 ώρες, έγινε μελέτη της έκφρασης της EGFP μετά από ανάλυση της έντασης του πράσινου φθορισμού με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής [**Εικόνα 3.21**].

Παρατηρούμε κύτταρα θετικά στην EGFP στο κατώφλιο φθορισμού M2, τα οποία εκφράζουν EGFP από ~10-10.000 μονάδες φθορισμού. Δεδομένης της ετερογένειας της έκφρασης της EGFP, συμπεραίνουμε ότι ο NF-κB είναι ενεργός και η ενεργότητά του ποικίλει σημαντικά στον εξεταζόμενο κυτταρικό πληθυσμό. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν και επαληθεύσαμε ότι η ενεργότητα του NF-κB ποικίλει σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος.

Ένα σημαντικό συμπέρασμα από την ανωτέρω σειρά πειραμάτων είναι ότι ο αριθμός διαμολυσμένων κυττάρων ποικίλει σημαντικά ανά πείραμα, καθιστώντας το σύστημα της έκτοπης έκφρασης του NF-κΒ μη κατάλληλο για αξιόπιστη συγκριτική μελέτη της δραστηριότητας του NF-κΒ, παρουσία ή μη ουσιών φυσικής προέλευσης.

Το πλασμίδιο αναφοράς pNFκΒ:EGFP δεν φέρει κάποιο φορέα επιλογής για κύτταρα θηλαστικών. Προκειμένου να κατασκευάσουμε κατάλληλα κυτταρικά συστήματα, κλωνοποιήσαμε το τμήμα του πλασμιδίου αναφοράς pNFκΒ:EGFP, που φέρει τον υποκινητή με τις θέσεις πρόσδεσης του NF-κΒ, και την κωδικεύουσα αλληλουχία της EGFP σε πλασμίδιο, που φέρει γονίδιο επιλογής για ευκαρυωτικά κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, δημιουργήσαμε το πλασμίδιο pBabe-puro/NFκΒ:EGFP το οποίο αφενός φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη για επιλογή σε κύτταρα θηλαστικών και αφετέρου την κατασκευή NFκΒ:EGFP (βλέπε υλικά και μέθοδοι).



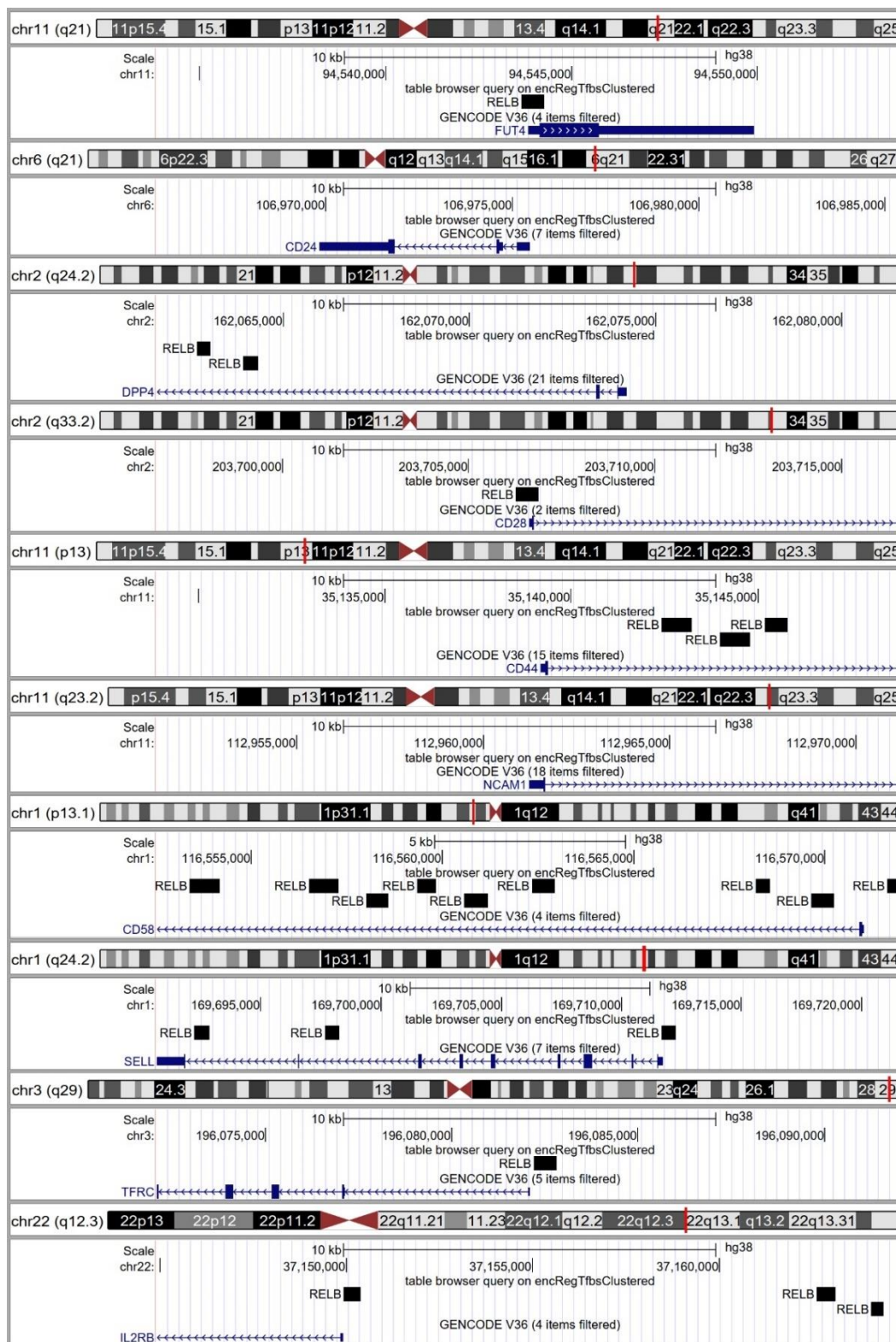
Εικόνα 3.22: Ποσοτικοποίηση της ενεργότητας του NF-κΒ μέσω μελέτης της έκφρασης της EGFP σε κύτταρα U251, T98G και U87 που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pBabe-puro/pNFκΒ:EGFP.

Το πλασμίδιο pBabe-puro/NFκΒ:EGFP διαμολύνθηκε σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος U251MG, T98G και U87G, προς δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών αναφοράς NF-κΒ. Οι ανθεκτικοί κυτταρικοί κλώνοι, που απομονώθηκαν μετά από 10 ημέρες επιλογής με 4 $\mu\text{g/ml}$ πουρομυκίνη, αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την

ποσοτικοποίηση του πράσινου φθορισμού, σε σύγκριση με U251MG, T98G και U87G τα οποία διαμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή pBabe-puro/NFκB:EGFP και αναπτύχθηκαν για 48 ώρες [Εικόνα 3.22]. Παρατηρήσαμε ότι οι κλώνοι δεν εξέφραζαν την EGFP, σε αντίθεση με τα κύτταρα που εξέφρασαν έκτοπα την πλασμιδιακή κατασκευή. Συμπερασματικά, η διαδικασία δημιουργίας κλώνων για σταθερή έκφραση της κατασκευής NFκB:EGFP, οδήγησε σε σταδιακή αποσιώπησή της, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η ποσοτικοποίηση της ενεργότητας του NF-κB σε αυτούς.

3.2.2 Υποδοχείς CDs ως πιθανοί στόχοι του NF-κB

Στα πλαίσια της μελέτης της αντιγλοιωματικής δράσης των φυτικών ουσιών της παρούσας μελέτης, παρατηρήσαμε ότι η δράση τους σχετίζεται με μεταβολές στην έκφραση σημαντικών μορίων του συμπλόκου διαφοροποίησης (cluster of differentiation), που συμμετέχουν μεταξύ άλλων στην κυτταρική πρόσφυση, την επικοινωνία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Η σημαντικοί αυτοί ρόλοι εξηγούν την υψηλή έκφραση συγκεκριμένων CDs σε φυσιολογικά αλλά και καρκινικά βλαστικά κύτταρα (173).



Εικόνα 3.21: Υποδοχείς CDς καρκινικών κυττάρων αποτελούν στόχους των παραγόντων της οικογένειας NF-κΒ. Θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα RELB της οικογένειας του NF-κΒ, ελήχθησαν από τον UCSC Table Browser (174) και έγινε ανάλυση της σχετικής τους θέσης στο ανθρώπινο γονιδίωμα σε σχέση με τις θέσεις έναρξης αντιγραφής των παραγόντων Cluster of Differentiation (CDs): CD15, CD24, CD26, CD28, CD44, CD56, CD62L, CD58, CD71 και CD122. Οι σχετικές θέσεις επιβεβαιώθηκαν και απεικονίστηκαν στον UCSC Genome Browser (175, 176).

Δεδομένης της σημαντικότητας των CD's στην καρκινογένεση, μελετήσαμε την πιθανή στόχευσή τους από την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, ως ενός κοινού μηχανισμού μεταβολής της έκφρασής τους από ουσίες φυσικής προέλευσης.

Η πρόσδεση ενός μεταγραφικού παράγοντα στη γονιδιωματική θέση ενός υποκινητή ή ενισχυτή αποτελεί το πρώτο βήμα για τη δράση του στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Αρχικά αναζητήσαμε τα δεδομένα αλληλουχίας πρόσδεσης έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing/ ChIP-Seq) για παράγοντες της οικογένειας των NF-κB. Η βάση δεδομένων UCSC Table Browser (174) περιείχε υψηλής ποιότητας δεδομένα πρόσδεσης ChIP-Seq στο ανθρώπινο γονιδίωμα για τον παράγοντα RELB της οικογένειας του NF-κB. Τα δεδομένα εξήχθησαν από τη βάση δεδομένων και παρατηρήθηκαν στον περιηγητή γονιδιώματος UCSC Genome Browser, σε σχέση με τις γονιδιωματικές θέσεις των δεικτών CD's που αναλύθηκαν στην ενότητα 3.1 [Εικόνα 3.23].

Παρατηρούμε ότι 8/10 από τις γονιδιωματικές θέσεις των γονιδίων φέρουν θέσεις πρόσδεσης για την RELB, με εξαίρεση τα γονίδια για τα CD24 και CD56 (NCAM1). Οι υποκινητές/ενισχυτές των CD15, CD28 και CD71 φέρουν μοναδικές θέσεις RELB. Αντίστοιχα, το γονίδιο CD26 φέρει δύο θέσεις, τα γονίδια CD44, CD62L και CD122 τρεις θέσεις και το γονίδιο CD58 εννέα θέσεις πρόσδεσης RELB. Συνολικά, η πρόσδεση του παράγοντα RELB στην πλειοψηφία των γονιδίων CD's που εκφράζονται στο γλοιοβλάστωμα, αποτελεί μία ισχυρή ένδειξη για την κοινή ρύθμισή τους από την οικογένεια των παραγόντων του NF-κB.

- Ενότητα 4 -

Συζήτηση

4. Συζήτηση

Οι καρκίνοι του ΚΝΣ αποτελούν απειλητικές για τη ζωή νεοπλασίες. Το γλοιοβλάστωμα, ο πλέον κακοήθης καρκίνος του ΚΝΣ είναι ένας ετερογενής όγκος με χαρακτηριστικά γενετικά και επιγενετικά προφίλ, τα οποία σχετίζονται με την αντίσταση στη θεραπεία **(10, 177-182)**. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός που εμποδίζει την είσοδο ουσιών υψηλού μοριακού βάρους είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που θέτει προβλήματα στη θεραπεία. Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στην κλινική πρακτική είναι περιορισμένοι σε σύγκριση με άλλους τύπους όγκων. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη νέων θεραπειών είναι μια αναγκαία προσέγγιση για την καλύτερη αντιμετώπιση αυτών των νεοπλασιών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η αντιγλοιοωματική δράση τριών ουσιών φυσιικής προέλευσης της μοσχαμίνης (MM), της n-p-κουμαροϋλ-σεροτονίνης (CS) και της δεγλουκοελεβρίνης (DGH). Αρχικά, αποδείξαμε την κυτταροστατική και κυτταροτοξική τους δράση, η οποία παρατηρήσαμε ότι σχετίζεται με αναστολή του κυτταρικού κύκλου **(183)** καθώς και την επαγωγή κυτταρικού θανάτου που σε κάθε περίπτωση σχετίζεται με την μιτοχονδριακό/ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης, ενώ στην περίπτωση των CS και DGH γίνεται επαγωγή και του εξωγενούς μονοπατιού, εξαρτώμενου από την ενεργοποίηση της κασπάσης 8. Μία σημαντική παράμετρος του μηχανισμού δράσης τους είναι η επίδραση τους στην έκφραση χαρακτηρισμένων επιφανειακών δεικτών (CDs), που εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα (*CD15, CD24, CD26, CD28, CD44, CD56, CD62L, CD58, CD71 και CD122*). Μελέτη τοξικότητας των ουσιών στο *in vivo* μοντέλο του ιχθύος ζέβρα, ανέδειξε ότι οι ουσίες εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα και σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από την τιμή IC₅₀ στην οποία δρουν αντιγλοιοωματικά. Τέλος, παρατηρήσαμε ότι το μονοπάτι του παράγοντα NF-κB είναι ενεργό στο γλοιοβλάστωμα και ότι η πλειοψηφία των ανωτέρω δεικτών CDs φέρουν θέσεις πρόσδεσης του NF-κB, όπως αποκαλύπτουν πειράματα ανοσοκατακρίμνησης χρωματίνης. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας παρέχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την περαιτέρω μελέτη των ουσιών ως εν δυνάμει θεραπείες και την εμπλοκή του μονοπατιού NF-κB ως ενός κοινού πιθανού μηχανισμού δράσης τους.

4.1 Μηχανισμοί αντιγλοιωματικής δράσης φυσικών ενώσεων

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε για πρώτη φορά ότι οι φυσικές ενώσεις MM, CS και DGH μπορούν να μελετηθούν περαιτέρω ως εν δυνάμει θεραπείες για κακοήθεις κυτταρικές σειρές γλοιώματος *in vitro* και εμφανίζουν ελάχιστη τοξικότητα *in vivo* **(184-186)**.

Παρατηρήσαμε ότι η μοσχαμίνη προκάλεσε καταστολή της ανάπτυξης, αναστολή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση τόσο στην κυτταρική σειρά U251MG όσο και στην T98G. Η μοσχαμίνη μείωσε επίσης την έκφραση των δεικτών CD24/CD44 στα κύτταρα T98G. Η μοσχαμίνη είναι ένα αμίδιο του φαινυλπροπενόϊκού οξέος που μπορεί να απομονωθεί από φυτά. Οι Csapi et al μελέτησαν τις βιολογικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων που παρασκευάζονται από ολόκληρο το φυτό της *Centaurea arearia*. Η προπαρασκευαστική εργασία είχε μεταξύ άλλων, ως αποτέλεσμα την απομόνωση της μοσχαμίνης, η οποία διαπιστώθηκε ότι είχε αντικαρκινική δράση σε μια κυτταρική σειρά επιδερμοειδούς καρκινώματος (A431), αλλά όχι στο επιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας (HeLa) ή στο επιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα του μαστού (MCF7) κύτταρο lines **(187)**. Μια άλλη μελέτη έχει επίσης αποδείξει ότι η μοσχαμίνη μπορεί να είναι ένας πολλά υποσχόμενος κυτταροτοξικός παράγοντας στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (CaCo2) **(141)**. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η μοσχαμίνη κατέχει σεροτονονεργική και κατασταλτική δραστηριότητα έναντι των COX-1 και COX-2, καταστέλλοντας το σχηματισμό cAMP, μέσω σύνδεσης με τους υποδοχείς 5-HT1 **(188)**. Η πρωτεΐνη COX-2 είναι ενεργοποιημένη σε κύτταρα γλοιώματος, ενώ η ενεργότητα της COX-2 σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου **(189)**. Αναστολείς της COX-2 όπως ο NS-398, ο Celecoxib και ο Meloxicam έχουν αποδειχθεί ότι κατέχουν αντιγλοιωματικές δραστηριότητες όταν κυτταρικές σειρές γλοιώματος επώαστηκαν με αυτούς πριν την έκθεσή τους σε ακτινοβολία **(190, 191)**. Δεδομένου ότι η μοσχαμίνη αναστέλει τις COX, αυτός μπορεί να είναι ένας πιθανός μηχανισμός δράσης για αυτή την ένωση και υποστηρίζει την περαιτέρω μελέτη της ουσίας στη ραδιοευαισθητοποίηση. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός δράσης αποτελεί μία σημαντική ιδιότητα για ουσίες που χρησιμοποιούνται ως χημειοθεραπευτικά **(192)**. Πιο πρόσφατα έχει επίσης αναδειχθεί και ως ένας πρόσθετος μηχανισμός χημειοευαισθητοποίησης σε συνδυαστικά χημειοθεραπευτικά σχήματα **(193)**.

Η CS προκάλεσε καταστολή της ανάπτυξης γλοιώματος, στάση του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση τόσο στις κυτταρικές σειρές U251MG όσο και στις κυτταρικές σειρές T98G, που σχετίζονται επίσης με την ενεργοποίηση της κασπάσης-8. Η CS αύξησε επίσης την

έκφραση των δεικτών CD71 και CD15 τόσο στα κύτταρα U251MG όσο και στα T98G. Το εκχύλισμα σπόρων Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) περιέχει CS **(194)**. Οι Takimoto et al απέδειξαν ότι η CS έχει αντιαθηρογενείς ιδιότητες, εμποδίζοντας την αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} ή/και αναστολή της σηματοδότησης PDGF **(195)**. Σε μια μελέτη σε μοντέλο υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών Kurosawa-Kusanagi, αποδείχθηκε ότι η επώαση με CS οδηγεί σε βελτίωση της αγγειακής διαστολής και σε ταυτόχρονη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων **(196)**. Η επώαση με CS, σε μικρομοριακή δοσολογία μέχρι και τη συγκέντρωση 100μM, ανέστειλε την παραγωγή προφλεγμονώδων κυτταροκινών από ανθρώπινα μονοκύτταρα *in vitro*. Επίσης, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η CS επήγαγε τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών ινοβλαστών ανθρώπου και ποντικού, αλλά όχι άλλων φυσιολογικών ή καρκινικών κυτταρικών τύπων **(197)**. Αντίθετα, σε συγκέντρωση άνω του κατωφλίου των 100μM η επίδραση της ήταν ανασταλτική για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ανωτέρω κυτταρικών τύπων, με αποτελέσματα παρόμοια με αυτά της παρούσας διατριβής. Το εκχύλισμα σπόρων Safflower έχει επίσης αναφερθεί ότι ασκεί αντικαρκινική δράση, χωρίς ωστόσο να γίνει περαιτέρω διερεύνηση των υποκείμενων μηχανισμών, ή απομόνωση μεμονωμένων ουσιών. Η CS δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν σε γλοιώματα και η παρούσα διατριβή αποτελεί την πρώτη αναφορά στην αντιγλοιωματική της επίδραση **(198, 199)**.

Η παρούσα μελέτη είναι επίσης η πρώτη που καθιερώνει την αντιγλοιωματική δραστηριότητα της DGH. Διαπιστώσαμε ότι η DGH έχει μια δόσοεξαρτώμενη δράση σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και προκαλεί απόπτωση μέσω ταυτόχρονης ενεργοποίησης της εξωγενούς, εξαρτώμενης της κασπάσης-8 αλλά και της ενδογενούς, μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού. Η DGH προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και αλλαγές στην έκφραση CDs των καρκινικών κυττάρων, ενώ δεν προκάλεσε τοξικότητα ή αλλαγές συμπεριφοράς στον ιχθύ ζέβρα. Πρόσφατα, οι Martucciello et al διερεύνησαν φυσικές ενώσεις που είχαν εξαχθεί από τον *Helleborus caucasicus*, μεταξύ αυτών DGH, για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Η DGH έδειξε μια ισχυρή κυτταροτοξική επίδραση σε κυτταρικές σειρές καρκίνων του πνεύμονα, ήπατος και του παχέος εντέρου **(161)**. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι DGH προκάλεσε κυτταρική απόπτωση μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και μειορύθμισης της πρωτεϊνικής έκφρασης του GRP78, ενός γενικού ρυθμιστή της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο **(161, 200)**. Η DGH είναι μια φυσική ένωση που απομονώνεται από τα υπόγεια μέρη του *Helleborus odorus* subsp. *cyclophyllus*, ένα φυτό ενδημικό στην

περιοχή των Βαλκανίων. Το γένος αποτελείται από περίπου 20 είδη **(201)**. Εκχυλίσματα από το φυτό *Helleborus* έχουν χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα στην παραδοσιακή ιατρική και έχει περιγραφεί ότι έχουν καρδιοπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ακόμη και σήμερα σε ορισμένες περιοχές εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του πονόδοντου **(201)**. Η DGH έχει ένα χαμηλό μοριακό βάρος 562 Daltons και κατά συνέπεια μέγεθος που εν δυνάμει επιτρέπει την διέλευση του από τον BBB.

A. Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου είναι η διαφυγή από μηχανισμούς επιτήρησης στα διάφορα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως αυτά των φάσεων G1/S και G2/M **(46, 202)**. Αυτή η απορύθμιση επιτρέπει τον αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, ο οποίος είναι κρίσιμος κατά την εξέλιξη της κακοήθειας.

Όσον αφορά τους καρκίνους του ΚΝΣ, η απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου οδηγεί σε ανάλογη αύξηση του κυτταρικού κλάσματος στις φάσεις S και G2/M, το σύνολο των οποίων αποτελεί τον tumor-index, ένα δείκτη με διαγνωστική και προγνωστική αξία **(156, 183, 203, 204)**. Αρκετά φυσικά φυτοχημικά έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων μέσω της επαγωγής αναστολής του κυτταρικού κύκλου **(205)**. Αποδείξαμε ότι η MM και η CS προκάλεσαν στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Η DGH προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M. Παρατηρήσαμε επίσης ότι η επώαση και με τις τρεις ουσίες είχε ως αποτέλεσμα μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση subG0/G1, υποδηλώνοντας την επαγωγή κυτταρικού θανάτου.

Η στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S είναι ένας καλά μελετημένος μηχανισμός χημειοθεραπευτικής δράσης και έχει παρατηρηθεί κατά τη χρήση γνωστών χημειοστατικών ουσιών όπως η πλατίνα, η 5-fluoro-uracil και η 7-hydroxystaurosporine **(206, 207)**.

Αντίστοιχα, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M είναι ένας κοινός μηχανισμός δράσης για χημειοθεραπευτικούς παράγοντες με αντιμιτωτική δράση. Για παράδειγμα, η ετοποσίδη δρα χημειοθεραπευτικά κυρίως μέσω της αναστολής της τοποϊσομεράσης II, ενζύμου που δρα κατά την αντιγραφή του DNA αλλά και κατά το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά τη μιτωτική διαίρεση **(208)**. Αντίστοιχα, η ταξόλη δρα σταθεροποιώντας τους μικροσωληνίσκους, προκαλώντας σταθεροποίηση της μιτωτικής ατράκτου και αδυναμία εισόδου στην ανάφαση, οδηγώντας σταδιακά σε κυτταρικό θάνατο **(209, 210)**.

B. Επαγωγή μονοπατιών απόπτωσης

Η απόπτωση αποτελεί τον κύριο τύπο κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών και παίζει σημαντικούς ρόλους κατά την ανάπτυξη και την διατήρηση της ομοιόστασης αλλά και ως αποτέλεσμα κυτταρικών βλαβών **(162)**. Τα δύο κύρια μονοπάτια απόπτωσης είναι το ενδογενές και το εξωγενές και ενεργοποιούνται ως αποτέλεσμα διακριτών ερεθισμάτων.

Το ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης εξαρτάται από την διαπερατότητα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, κατά την οποία εκκρίνεται το κυτόχρωμα c, επιτρέποντας τη δημιουργία μίας δομής που είναι γνωστή ως αποπτώσωμα. Το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιείται κυρίως ως αποτέλεσμα ενδογενών σημάτων, όπως διάφοροι τύποι στρες αλλά και εκτενείς βλάβες στο DNA **(211, 212)**. Μέσω μελέτης του δυναμικού της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με κυτταρομετρία ροής, αποδείξαμε ότι η αντιγλοιωματική δράση και των τριών ουσιών μείωσε σημαντικά το δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στα κύτταρα U251MG, αποδεικνύοντας την επαγωγή του ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης. Είναι γνωστό ότι η αντικαρκινική δράση πλήθους φυσικών ουσιών συνδέεται με το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης **(213)**. Η κερσετίνη, ένα φυσικό φλαβονοειδές ασκεί την αντικαρκινική της δράση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, σε *in vitro* μοντέλα λευχαιμίας και καρκίνου του μαστού αλλά και σε *in vivo* ξеноμοσχέυματα ποντικού **(214)**. Ανάλογη δράση έχουν, μεταξύ άλλων, το βετουλινικό οξύ **(215, 216)**, η στεβιοσίδη **(217)** και η κουρκουμίνη **(218)**. Οι μελέτες που προαναφέρθηκαν, συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η επαγωγή του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης από τα καρκινικά κύτταρα είναι ένας ουσιώδης μηχανισμός χημειοευσαισθησίας για ουσίες με εν δυνάμει ρόλο ως νέα χημειοθεραπευτικά.

Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης εξαρτάται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς, τους υποδοχείς θανάτου **(219)**, όπως για παράδειγμα τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωση όγκων TNFα (TNFRα) **(220)**. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης αυτών των υποδοχέων είναι η σηματοδότηση που συγκλίνει στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8, η οποία έχει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του εξωγενούς μονοπατιού απόπτωσης **(163, 221)**. Το ενδογενές μονοπάτι παίζει ρόλο σε μία σειρά από φυσιολογικές διαδικασίες επαγωγής απόπτωσης, όπως ο κυτταρικός θάνατος στα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killers-NK) ως αποτέλεσμα της δράσης του παράγοντα TNFα **(222)**. Η κασπάση 8 ενεργοποιεί επιτελικές κασπάσες, όπως η κασπάσες 3 και 7. Επιπλέον, η ενεργοποιημένη κασπάση-8 μπορεί να ενεργοποιήσει και το ενδογενές μονοπάτι, ως ένας μηχανισμός ενίσχυσης της

αποτελεσματικότητας του φαινομένου της απόπτωσης. Στην παρούσα διατριβή αποδείξαμε ότι η κασπάση 8 ενεργοποιείται από τις CS και DGH, που σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού, υποστηρίζει την σημαντική αντιγλοιοματική δράση τους. Το εξωγενές μονοπάτι επάγεται από μία σειρά ενώσεων με κυτταροστατική δράση όπως για παράδειγμα το κεραμίδιο (223) και οι τοκοτριενόλες (224). Η δράση των CS και DGH να επάγουν και τα δύο μονοπάτια απόπτωσης συνάδει με τη δράση άλλων φυσικών ενώσεων με καθιερωμένη αντικαρκινική δράση όπως η ρεσβερατρόλη (225), η εμοντίνη (226) και η εσπεριδίνη (227).

Γ. Σύγκριση δραστηριότητας με αυτή της τεμοζολομίδης

Η τεμοζολομίδα (TMZ), ένας από του στόματος αλκυλιωτικός παράγοντας, είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής για το γλοιοβλάστωμα, καθώς παρατείνει την επιβίωση και καθυστερεί την εξέλιξη χωρίς να επηρεάζει την ποιότητα ζωής, ακόμη και σε ηλικιωμένους (228). Ωστόσο, η αντοχή στην TMZ που ελέγχεται από την πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA μεθυλτρανσφεράση του Ο6-μεθυλγουανίνης-DNA (MGMT), αποτελεί σημαντικό εμπόδιο για την μακροχρόνια επιτυχία της θεραπείας (229). Δεδομένου ότι το TMZ δρα ως αλκυλιωτικός παράγοντας, το γλοιοβλάστωμα αποκτά αντίσταση στο TMZ, που ελέγχεται από την έκφραση της MGMT, η οποία αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στη θεραπεία (27, 230). Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MGMT έχει τόσο διαγνωστική όσο και προγνωστική σημασία, καθώς έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία και ακόλουθα σε χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδα (231).

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήσαμε δύο κυτταρικές σειρές γλοιώματος, τις U251MG και T98G. Στα κύτταρα U251MG δεν υπάρχει πρωτεϊνική έκφραση της MGMT και είναι ευαίσθητα στην τεμοζολομίδα, ενώ στα κύτταρα T98G υπάρχει έκφραση MGMT που τα καθιστά ανθεκτικά στην τεμοζολομίδα (232). Η πολυπλοκότητα διευκολύνει την ταχεία εξέλιξη και την απόκτηση ανθεκτικών στη θεραπεία φαινοτύπων, επομένως αυτό μπορεί να είναι ένας άλλος λόγος για τη σημαντική αντίσταση στη θεραπεία που εμφανίζει η κυτταρική σειρά T98G (233).

Οι MM, CS και DGH δρουν τόσο στα ευαίσθητα στην τεμοζολομίδα U251MG όσο και στα ανθεκτικά T98G. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τη χρήση τους είτε ως θεραπείες πρώτης γραμμής είτε ως πρόσθετες/συνδυαστικές θεραπείες σε όγκους ανθεκτικούς στην τεμοζολομίδα.

Δ. Επιρροή στην έκφραση δεικτών επιφανείας CDs

Οι καρκίνοι του ΚΝΣ και κυρίως το γλοιοβλάστωμα αποτελούν εξαιρετικά ετερογενείς όγκους, που αποτελούνται τόσο από διαφοροποιημένα όσο και από βλαστοκύτταρα. Μια πολύπλευρη προσέγγιση που συνδυάζει διάφορες στρατηγικές θεραπείας προτείνεται για καλύτερα αποτελέσματα.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την έκφραση χαρακτηρισμένων επιφανειακών δεικτών του συμπλέγματος διαφοροποίησης (CDs) που εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα και έχουν συσχετιστεί με τη μετανάστευση, την εισβολή και τη μετάσταση (*CD15, CD24, CD26, CD28, CD44, CD56, CD62L, CD58, CD71 και CD122*).

Ορισμένα CDs είναι γνωστό ότι εκφράζονται σε υποπληθυσμούς καρκινικών κυττάρων που παρουσιάζουν επιταχυνόμενες ιδιότητες ανάπτυξης και εισβολής [24]. Η ιδιαίτερη σημασία των δεικτών CDs μας προέτρεψε να ελέγξουμε εάν η έκφρασή τους αλλάζει μετά από επώαση με MM, CS ή DGH, καθώς είναι γνωστό ότι σχετίζονται με αντοχή στα φάρμακα και κακή πρόγνωση (**234, 235**). Η επίδραση του TMZ σε αυτούς τους δείκτες χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

Το CD15 είναι ένας δείκτης του καρκινικών βλαστικών κυττάρων γλοιώματος μαζί με τους CD133 και την nestin (**236**). Στην παρούσα μελέτη βρήκαμε ότι το CD15 έχει χαμηλή έκφραση του σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος U251MG και T98G. Αυτό το εύρημα είναι σύμφωνο με τη μελέτη των Reifenger et al. ο οποίοι διαπίστωσαν ότι αναπλαστικά γλοιώματα και γλοιοβλαστώματα δεν εξέφραζαν CD15 σε αντίθεση με χαμηλού βαθμού κακοήθειας γλοιώματα (**237**). Επιπλέον, η έκφραση του CD15, μπορεί να σχετίζεται με τη μετάσταση (**238**). Από τους παράγοντες που χρησιμοποιήσαμε οι CS και DGH προκάλεσαν αύξηση της έκφραση του CD15. Το TMZ, προκάλεσε επαγωγή του CD15, σε μικρότερο βαθμό από τις CS και DGH.

Ο δείκτης CD24 είναι μια βαριά γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη επιφάνειας που έχει σημαντικούς ρόλους στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-υποστρώματος και κυττάρου-κυττάρου, επιδρώντας έτσι στη μετάσταση και την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων (**239**). Ο Deng et al. ανέφερε υπερέκφραση του CD24 σε γλοιώματα υψηλότερου βαθμού, ενώ οι ασθενείς με CD24 θετικούς όγκους έδειξαν κακή προγνωστική έκβαση μετά από χειρουργική επέμβαση (**234**). Ο δείκτης CD44 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε σχεδόν κάθε κύτταρο και είναι υποδοχέας για το υαλουρονικό οξύ. Στα καρκινικά κύτταρα το CD44 παρέχει ένα πλεονέκτημα ανάπτυξης (**240**). Στο γλοιοβλάστωμα το CD44 έχει βρεθεί υπερεκφρασμένο, ενώ η μειορύθμιση του εμποδίζει την ανάπτυξη όγκων

και ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα σε κυτταροτοξικά φάρμακα *in vivo* (241). Τόσο το CD24 όσο και το CD44 σχετίζονται με τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs). Τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος μπορεί να υπάρχουν σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές καταστάσεις, με χαρακτηριστικά είτε νευρικών προγονικών κυττάρων (NPC), ολιγοδενδροκυττάρων, αστροκυττάρων ή μεσεγχυματικών κυττάρων (MSC) που σχετίζονται με διαφορετικές γενετικές αλλοιώσεις, καθένα ευνοεί μια συγκεκριμένη κυτταρική κατάσταση. (242). Η πιθανότητα ενός μόνο κυττάρου να δημιουργήσει και τις τέσσερις καταστάσεις έχει επίσης συσχετιστεί με τους δείκτες βλαστικών κυττάρων καρκίνου (CSC) CD24 και CD44, οι οποίοι συγκαταλέγονται μεταξύ των τεσσάρων γονιδίων κορυφαίας βαθμολογίας για τις καταστάσεις τύπου NPC και MSC, αντίστοιχα (242). Στην παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση των CD24 και CD44 από την CS και την TMZ. Η MM είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης CD24 και CD44. Τέλος, η DGH μείωσε σημαντικά την έκφραση CD44 και στις δύο κυτταρικές σειρές. Αυτό είναι ένα σημαντικό αποτέλεσμα δεδομένου ότι τα CSCs γλοιώματος παρουσιάζουν αντίσταση στη χημειοθεραπεία (243) και έχουν αποδειχθεί ότι ευθύνονται για δευτεροπαθείς εστίες γλοιοβλαστώματος μετά από χημειοθεραπεία (55), μέσω διακριτών μηχανισμών (244). Τα CD44+ κύτταρα παράγουν αυξημένα ποσοστά νευροσφαιρών, σχετιζόμενες με και την έναρξη όγκου *in vivo* (245). Έτσι, οι MM και DGH σχετίζονται με φαινοτυπικές αλλαγές στα κύτταρα γλοιοβλάστωμα που τα καθιστούν πιο ευαίσθητα στη θεραπεία.

Ο δείκτης NCAM-1, επίσης γνωστός ως CD56, εμπλέκεται στις διακυτταρικές συνδέσεις των νευρώνων και των κυττάρων της νευρογλοίας και εκφράζεται σε διάφορους όγκους εγκεφάλου συμπεριλαμβανομένων των γλοιωμάτων (203). Οι Todaro et al μελέτησαν αρκετούς όγκους στον εγκέφαλο και ανέφεραν έκφραση του NCAM-1 η οποία συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας (246). Το CD56 εμπλέκεται επίσης στις διακυτταρικές διασταυρώσεις των νευρώνων και των κυττάρων νευρογλοίας και εκφράζεται επίσης σε ένα υποσύνολο λεμφοκυττάρων, τα κύτταρα φυσικούς δολοφόνους (NK) (246). Διαπιστώσαμε ότι η MM δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση του CD56. Η DGH οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του CD56 και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν σε υψηλότερο βαθμό από TMZ. Η επίδραση της DGH, συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Knüpfner et al, οι οποίοι διερεύνησαν τη δράση του βαλπροϊκού οξέος στα κύτταρα γλοιώματος. Το βαλπροϊκό οξύ αύξησε σημαντικά το CD56 και μείωσε την έκφραση CD44 στα κύτταρα T98G (247), ενώ είχε μη σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Ο δείκτης CD58 (LFA-3) είναι ένα μόριο πρόσφυσης λεμφοκυττάρων, ενώ έχει βρεθεί υπερέκφραση του σε γλοιώματα που συνδέονται με φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό (248). Αυτό το μόριο είναι σημαντικό για τις ανοσολογικές αντιδράσεις στα γλοιώματα και βρέθηκε υπερέκφραση του στη μελέτη μας. CD58+ κύτταρα γλοιώματος είναι ικανά να προκαλέσουν τον αυξημένο σχηματισμό νευρώνων και έναρξη όγκου *in vivo* (245). Η θεραπεία με DGH, σε αντίθεση με την TMZ, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της έκφρασης του CD58 και στις δύο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, που προτείνει την πιθανή τροποποίηση των ανοσολογικών αποκρίσεων στα γλοιώματα.

Ο δείκτης CD62-L (L-selectin) εκφράζεται ισχυρά σε ένα μεγάλο πληθυσμό κυττάρων που διαμεσολαβούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις και είναι ένα μόριο αγγειακής πρόσφυσης. Η έκφραση του CD62-L δεν έχει μελετηθεί ποτέ μέχρι σήμερα σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Σε κύτταρα ουροθηλιακού καρκινώματος, το CD62-L βρέθηκε να χρησιμεύει ως βιοδείκτης για την πρόβλεψη της εμφάνισης ή όχι του κινδύνου ανάπτυξης μεταστάσεων (249). Η DGH, αύξησε την έκφραση της CD62-L, ενώ το TMZ όχι. Μελλοντικές μελέτες χρειάζονται για την διαλεύκανση της σημασίας αυτού του αποτελέσματος.

Ο δείκτης CD71, αντιστοιχεί στον υποδοχέα τρανσφερίνης- 1 (TfR1). Στην παρούσα μελέτη υπήρξε σημαντική αύξηση του CD71 σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος μετά τη δράση των CS και TMZ, ενώ μείωση προκλήθηκε από την δράση της DGH. Η μεταβολή της έκφρασης του CD71, αύξηση ή μείωση, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε διαταραχή των επιπέδων του ενδοκυτταρικού σιδήρου, που είναι γνωστό ότι σχετίζεται με την οξειδωτική επαγωγή στρες (250). Έτσι, για παράδειγμα η υπερφόρτωση σιδήρου μετά την αύξηση του CD71 μπορεί να είναι ένας πρόσθετος μηχανισμός CS να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα γλοιώματος σε κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα η ενδεχόμενη μείωση του ενδοκυτταρικού σιδήρου από την DGH, μπορεί να μην επιτρέπει στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος να επιτελέσουν σημαντικές βιοχημικές λειτουργίες. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή.

Τα CSCs του γλοιώματος, είναι ανθεκτικά στη θεραπεία, εμφανίζουν αυτοανανέωση και ογκογόνο δυναμικό και σχετίζονται με την υποτροπή του όγκου (251). Δείκτες βλαστοκυττάρων αποτελούν οι CD15, CD133, CD24, CD44 και nestin (252). Αντίστοιχα, επιπρόσθετοι δείκτες CDs όπως οι CD56, CD58 και CD71, μπορεί να παίζουν σημαντικούς ρόλους στη διατήρηση της ομοιόστασης καρκινικών κυττάρων. Συνολικά, οι αλλαγές στους δείκτες CDs που σχετίζονται είτε με CSCs είτε με διατήρηση της καρκινικής ομοιόστασης, αποτελούν σημαντική ιδιότητα για εν δυνάμει νέες αντικαρκινικές θεραπείες, όπως οι MM, CS και DGH.

E. Επιρροή στην ομοιόσταση ιχθύων Zebrafish

Σημαντική παράμετρος στην επιλογή της αντικαρκινικού φαρμακευτικού σκευάσματος για κλινική μελέτη και χρήση τελικά σε ασθενείς, είναι η επιλεκτική δράση όσον αφορά τα καρκινικά κύτταρα κ μη καρκινικά φυσιολογικά. Προς την κατεύθυνση αυτή η χρήση του τελεόστεου ιχθύος Zebrafish (*Danio rerio*) έχει αποδειχθεί ιδανική για τη μελέτη κυτταροτοξικότητας νέων φαρμάκων (253).

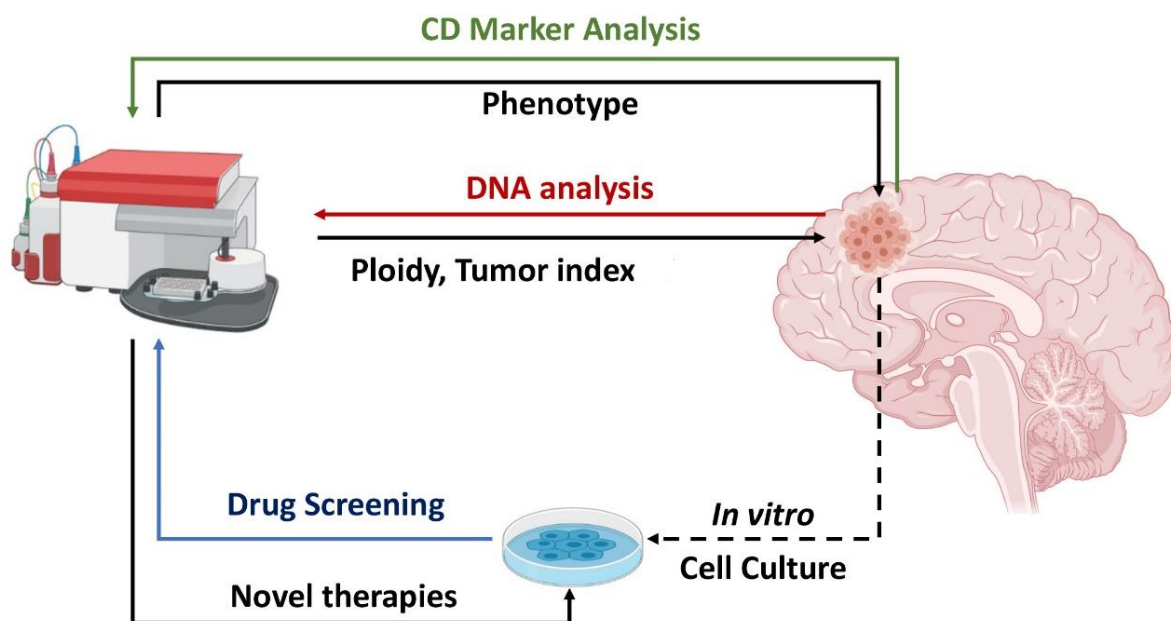
Στα πλεονεκτήματά του Zebrafish συμπεριλαμβάνονται τα ακόλουθα: i. Αποτελεί ένα πρότυπο σπονδυλωτό οργανισμό, ii. αναπαράγεται εύκολα, iii. Τα έμβρυα είναι διάφανα και iv. υπάρχει δυνατότητα μελέτης μεγάλου αριθμού ατόμων ώστε να εξαχθούν ποσοτικά δεδομένα/στατιστικά συμπεράσματα. Το Zebrafish παρέχει επίσης τη δυνατότητα ανάλυσης καρκινικών ξενομοσχευμάτων (254), με κύρια πλεονέκτημα την εύκολη μελέτη σε διάφανα έμβρυα (255) και την μελέτη επίδρασης σε μεγάλη κλίμακα (256).

Μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της παρούσας μελέτης είναι η δοκιμή *in vivo* τοξικότητας των ουσιών MM, CS και DGH. Η DGH μελετήθηκε επίσης σε ένα μοντέλο συμπεριφοράς στον zebrafish. Θεωρούνται τοξικά κυρίως στο γαστρεντερικό σύστημα και στο κεντρικό νευρικό σύστημα που παράγουν λήθαργο, σύγχυση και αδυναμία (257) Η πρωτοαναμονίνη έχει αναγνωριστεί ως μια ένωση αυτού του φυτού (201, 258). DGH δεν έδειξε καμία τοξικότητα ή αλλαγές συμπεριφοράς στο Zebrafish ακόμη και σε συγκέντρωση 1mM.

4.2 Μεθοδολογική προσέγγιση μελέτης

Η κυτταρομετρία ροής έχει αποδειχθεί πολύτιμο εργαλείο τόσο στον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό όσο και στην αποτελεσματικότητα διαφόρων χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Ενώ έχει υπάρξει εκτεταμένη έρευνα για νέα θεραπευτικά της GBM, αυτές οι θεραπείες δεν έχουν υποβληθεί σε κλινικές δοκιμές και ο αντίκτυπός τους παρατηρήθηκε κυρίως σε κυτταρικά μοντέλα γλοιοβλαστώματος. Με τη χρήση μεθοδολογιών κυτταρομετρίας ροής διαπιστώσαμε τους μηχανισμούς δράσης φυσικών ουσιών MM, CS και DGH (αποτελέσματα παρούσας διατριβής) του TMZ καθώς και της διφθορομεθυλορνιθίνης (DFMO) (184-186, 259).

Οι φαινοτυπικές αναλύσεις κυτταρομετρίας αποκάλυψαν τα αποτελέσματα διαφορετικών θεραπειών στην κατανομή του κυτταρικού κύκλου, και μια προσομοιωτική προσέγγιση στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου αλλά και της τροποποίησης του κυτταρικού φαινοτύπου [Εικόνα 4.1]. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν την συστηματική χρήση της κυτταρομετρίας ροής κατά τη μελέτη της αντιγλοιοματικής δράσης ουσιών φυσικής προέλευσης.



Εικόνα 4.2: Μεθοδολογική προσέγγιση ανάλυσης. Χρησιμότητα της κυτταρομετρίας ροής στην ανάλυση κακοήθειας του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΚΝΣ). Τα κύτταρα του ΚΚΝΣ μπορούν να αναλυθούν για το περιεχόμενο DNA (κόκκινο βέλος), προσφέροντας πληροφορίες σχετικά με την πλεοειδία αλλά και την κατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Η ανάλυση ΚΚΝΣ για δείκτες του συμπλέγματος διαφοροποίησης (CD) (πράσινο βέλος) μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον φαινότυπο του όγκου. Η ανάλυση των *in vitro* καλλιιεργειών του ΚΚΝΣ (μπλε βέλος) μπορεί να προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα των αντιγλοιοματικών θεραπειών, μέσω εύρεσης μηχανισμών κυτταρικού θανάτου. [Τροποποιημένη από (260)].

Η χρήση κυτταρομετρίας ροής στην ανάλυση είναι καθιερωμένη για διάστημα άνω των 30 ετών. Μέσω κυτταρομετρίας ροής πολλαπλών χρωμάτων αποκαλύφθηκε επίσης ένας χημειανθεκτικός πληθυσμός που είναι θετικός στο CD44 και ο οποίος συσχετίστηκε επίσης με σοβαρές εκβάσεις της νόσου (261).

Η πολυχρωματική κυτταρομετρίας ροής με χρήση πάνελ 9-δεικτών σε ασθενείς με GBM (CD133, CD44, CD15, A2B5, CD36, CXCR4, IL6R, L1CAM και ITGA6) αποκάλυψε μια φαινοτυπική υπογραφή των CD44 + / CD133 + / ITGA6 + / CD36 + των CSCs γλοιομάτων. Οι ασθενείς με έναν εμπλουτισμένο πληθυσμό της παραπάνω υπογραφής είχαν σημαντικά χειρότερο αποτέλεσμα επιβίωσης, αποκαλύπτοντας μια πιθανή νέα πορεία για στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις (262). Σε μια άλλη μελέτη, η πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής αποκάλυψε ότι τα κύτταρα CD8 + T λεμφοκύτταρα και CD38+, ανοσοποιητικοί τελεστές στη θέση του καρκίνου σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση, μετά τη θεραπεία (263).

4.3 Αντιγλοιοωματική δράση φυσικών ενώσεων και ενεργότητα του μονοπατιού του παράγοντα NF-κΒ

Ο ρόλος του NF-κΒ στον καρκίνο είναι πολυδιάστατος, καθώς σε συγκεκριμένα είδη καρκίνου μπορεί να δράσει ογκοκατασταλτικά, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις δρα ογκογόνα (59, 75, 264). Η πορεία IKKβ/NF-κΒ προάγει την καρκινογένεση, επηρεάζοντας τις λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων, τις ανοσοαποκρίσεις του οργανισμού στα καρκινικά κύτταρα (59, 69, 75, 265), ενώ ο NF-κΒ επίσης συνδέει τον καρκίνο με τη φλεγμονή (265-267).

Στο γλοιοβλάστωμα ο NF-κΒ δρα ογκογόνα και θεωρείται σημαντικός για την ομοιοστάση των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία (116-118). Συνολικά, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο:

- α. στην επιβίωση και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στο γλοιοβλάστωμα (165)
- β. την ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπεία (117, 118, 268)
- γ. την επαγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων (166) και επιθετικού φαινοτύπου (167, 168) και
- δ. τη διεισδυτικότητα (169) και μεταστατικότητα κυττάρων γλοιοβλαστώματος (116, 170).

Η αναστολή της δράσης του παράγοντα NF-κΒ συνδέεται με αυξημένη ευαισθησία σε χημειοθεραπεία (118) και για το λόγο αυτό έχει προταθεί ως στρατηγική αντιμετώπισης του γλοιοβλαστώματος (171).

Σημαντικό κριτήριο επιλογής για τις ενώσεις φυσικές προέλευσης που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, είναι το γεγονός ότι ενώσεις με παρόμοια χημική δομή, παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση (269, 270). Με βάση τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά, την ομοιότητα στη δράση *in vitro* (271, 272) και δεδομένου ότι η CS είναι γνωστό ότι αναστέλει τον NF-κΒ σε ανθρώπινα μονοκύτταρα (273), προτείνουμε ότι οι ουσίες αυτές μοιράζονται έναν κοινό μηχανισμό δράσης μέσω αναστολής του μονοπατιού σηματοδότησης NF-κΒ.

Το αποτέλεσμα ενεργοποίησης του NF-κΒ, είναι η μετατόπιση στον πυρήνα και η πρόσδεσή στο DNA των γονιδίων-στόχων τους (172). Στη μελέτη μας ποσοτικοποιήσαμε την ενεργοποίηση του NF-κΒ με χρήση του γονιδίου αναφοράς της EGFP, το οποίο φέρει στον υποκινητή ρυθμιστικές αλληλουχίες αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, στο πλασμίδιο αναφοράς pNFκΒ:EGFP (153). Παρατηρούμε κύτταρα θετικά στην

EGFP που επιβεβαιώνουν την ενεργότητα του NF-κB στο γλοιοβλάστωμα. Επίσης, παρατηρήσαμε ετερογένεια της έκφρασης της EGFP, που σημαίνει ότι η ενεργότητα του εμφανίζει σημαντική ετερογένεια στον εξεταζόμενο κυτταρικό πληθυσμό. Η παρατήρηση αυτή υπογραμμίζει για πρώτη φορά την ετερογένεια ενεργότητας του NF-κB σε καρκινικούς κυτταρικούς πληθυσμούς γλοιοβλαστώματος και συμφωνεί με την γνωστή ετερογένεια που εμφανίζουν τα γλοιοβλαστώματα και το ρόλο της στις διάφορες θεραπευτικές στρατηγικές (274, 275). Τέτοιου τύπου ετερογένεια μπορεί επίσης να σχετίζεται με τη διαφορική αλληλεπίδραση κυττάρων γλοιοβλαστώματος με το μικροπεριβάλλον του, που ρυθμίζει την διασπορά και την μετανάστευση (276).

Καθώς ο αριθμός διαμολυσμένων κυττάρων ποικίλει σημαντικά ανά πείραμα, το σύστημα της έκτοπης έκφρασης του NF-κB κρίθηκε ακατάλληλο για περαιτέρω μελέτη. Προκειμένου να δημιουργηθεί ένα κατάλληλο σύστημα σταθερής έκφρασης, κλωνοποιήσαμε το τμήμα του πλασμιδίου αναφοράς pNFκB:EGFP, που φέρει τον υποκινητή με τις θέσεις πρόσδεσης του NF-κB, και την κωδικεύουσα αλληλουχία της EGFP στο πλασμίδιο pBabe-puro, που φέρει γονίδιο επιλογής για ευκαρυωτικά κύτταρα, δημιουργώντας το πλασμίδιο pBabe-puro/NFκB:EGFP. Το πλασμίδιο, παρόλο που οδήγησε σε ανάλογη έκτοπη έκφραση με την πλασμιδιακή κατασκευή pNFκB:EGFP, μετά από επιλογή, δεν παρατηρήθηκε στη συνέχεια έκφραση. Η πιθανότερη εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι ότι κατά τη διαδικασία δημιουργίας κλώνων σταθερής έκφρασης της κατασκευής NFκB:EGFP, η γονιδιωματική περιοχή που ενσωματώθηκε το πλασμίδιο, υπέστη σταδιακή επιγενετική αποσιώπηση. Η παρατηρούμενη αποσιώπηση συμφωνεί με τα αποτελέσματα των El-Guendy και Sinai, που παρατήρησαν ότι η επιγενετική αποσιώπηση είναι ένα συχνό πρόβλημα κατά τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών κλώνων που εκφράζουν πλασμιδιακές κατασκευές ποσοτικοποίησης της ενεργότητας του παράγοντα NF-κB (277).

Όπως παρατηρήσαμε, η δράση των MM, CS και DGH σχετίζεται με σημαντικές μεταβολές στην έκφραση δεικτών CDs, που συμμετέχουν μεταξύ άλλων στην κυτταρική πρόσφυση, την επικοινωνία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Αυτοί οι ρόλοι εξηγούν εν μέρει την αντιγλοιοωματική δράση των MM, CS και DGH, κυρίως επηρεάζοντας την έκφραση συγκεκριμένων CDs που εκφράζονται σε φυσιολογικά αλλά και καρκινικά βλαστικά κύτταρα (173). Δεδομένης της σημαντικότητας των CDs στη δράση των MM, CS και DGH, μελετήσαμε την πιθανή στόχευσή τους από τους παράγοντες NF-κB, ως ενός κοινού μηχανισμού μεταβολής της έκφρασής τους από ουσίες φυσικής προέλευσης.

Πειράματα ανοσοκατακρίμνησης χρωματίνης και αλληλουχίσης (ChIP-Seq) τα οποία επιτελέστηκαν στα πλαίσια του προγράμματος ENCODE (278), περιλαμβάνουν πειράματα για την πρόσδεση της υπομονάδας RELB, τα οποία είναι υψηλής ποιότητας και έχουν στοιχιστεί στις θέσεις τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα (279). Παρατηρήσαμε ότι οι υποκινητές/ενισχυτές των δεικτών CD15, CD26, CD28, CD44, CD58, CD62L, CD71 και CD122 φέρουν θέσεις πρόσδεσης NF-κB. Το γονίδιο CD58 παρατηρήθηκε να φέρει εννέα θέσεις πρόσδεσης RELB, που υποδηλώνει την εν δυνάμει σημαντική ρυθμιστική επίδραση του NF-κB στην επαγόμενη έκφρασή του (280). Το γονίδιο CD58 έχει επαληθευθεί ως στόχος του NF-κB (281). Στη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το CD26 οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κB (282) και τα αποτελέσματά μας προτείνουν την παρουσία ενός βρόχου ανάδρασης, ο οποίος μπορεί να ενισχύει την ογκογόνο δράση του παράγοντα στο γλοιοβλάστωμα. Αντίστοιχα ο δείκτης CD28 είναι γνωστός στόχος του NF-κB, (283), οδηγώντας τελικά στην έκκριση της ιντερλευκίνης IL-2, εντείνοντας την φλεγμονώδη αντίδραση που σχετίζεται άμεσα με καρκινογένεση (284, 285). Ο δείκτης CD44 είναι γνωστός στόχος του NF-κB και σχετίζεται με τη δημιουργία καρκινικών βλαστικών κυττάρων μαστού (286), σε συνέργεια με παράγοντες όπως ο AP-1 (287) και η β-κατενίνη (288). Η πρόσδεση του παράγοντα RELB στην πλειοψηφία των γονιδίων CDs που εκφράζονται στο γλοιοβλάστωμα, αποτελεί μία ισχυρή ένδειξη για την κοινή ρύθμισή τους από την οικογένεια των παραγόντων του NF-κB και ένα κοινό μηχανισμό δράσης τους.

Συνολικά, ο NF-κB προάγει την επιβίωση και χημειοανθεκτικότητα του γλοιοβλάστωματος και υπάρχουν ενδείξεις πως η δράση του αυτή, μπορεί εν δυνάμει να ανασταλεί από φυσικές ενώσεις. Η μελέτη μας παραθέτει δεδομένα ότι η στόχευση και η αναστολή του μονοπατιού του NF-κB από τις φυσικές ενώσεις, σχετίζεται με την αντιγλοιοωματική τους δράση.

Συμπεράσματα

- Οι ουσίες Μοσχαμίνη, N-p-Κουμαροϋλ-σεροτονίνη και Δεγλουκοελλεβρίνη εμφανίζουν ισχυρή αντιγλοιωματική δράση
- Η Μοσχαμίνη προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου σε φάση S και επαγωγή μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης
- Η N-p-Κουμαροϋλ-σεροτονίνη προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου σε φάση S, G2/M και επαγωγή εξωγενούς και μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης
- Η Δεγλουκοελλεβρίνη προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και επαγωγή εξωγενούς και μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης
- Οι ουσίες N-p-Κουμαροϋλ-σεροτονίνη και Δεγλουκοελλεβρίνη δεν εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα στο *in vivo* μοντέλο των ιχθύων Zebrafish
- Η δράση των ουσιών συνδέεται με μεταβολή της έκφρασης σημαντικών δεικτών CDs
- Η Μοσχαμίνη μειώνει την έκφραση των δεικτών CD24 και CD44
- Η N-p-Κουμαροϋλ-σεροτονίνη αυξάνει την έκφραση των δεικτών CD15, CD56
- Η Δεγλουκοελλεβρίνη αυξάνει την έκφραση των δεικτών CD24, CD26, CD28, CD62-L, CD15, CD56 και CD122 και μείωση της έκφρασης των CD44, CD58 και CD71
- Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ είναι ενεργός στο γλοιοβλάστωμα
- Οι δείκτες CD15, CD24, CD26, CD28, CD44, CD56, CD62L, CD58, CD71 και CD122 αποτελούν στόχους του NF-κΒ
- Συνεπώς: Η δράση των ουσιών Μοσχαμίνη, N-p-Κουμαροϋλ-σεροτονίνη και Δεγλουκοελλεβρίνη συνδέεται με φαινοτυπικές αλλαγές που σχετίζονται με στόχους του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ

Περίληψη

Το γλοιοβλάστωμα είναι η συχνότερη και πιο επιθετική μορφή πρωτοπαθούς όγκου του εγκεφάλου στους ενήλικες. Παρά την εντατική κλινική έρευνα λίγες θεραπευτικές προσεγγίσεις υπάρχουν ως σήμερα και η μέση επιβίωση των ασθενών παραμένει στο εύρος των 15 μηνών. Η πλειοψηφία των όγκων υποτροπιάζουν καθίστανται ανθεκτικοί θεραπείας σε σύντομο χρονικό διάστημα, δημιουργώντας έτσι επιτακτική ανάγκη για νέες θεραπείες. Ένας σημαντικός αριθμός φαρμάκων με αντικαρκινική δράση έχουν απομονωθεί από φαρμακευτικά φυτά. Στη μελέτη μας έγινε χρήση των ουσιών φυσικής προέλευσης μοσχαμίνη (MM), n-p-κουμαροϋλ-σεροτονίνη (CS), και δεγλουκοελλεβρίνη (DGH) οι οποίες έχουν απομονωθεί από ενδημικά φυτά της πατρίδας μας. Οι ουσίες παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή τους και εν δυνάμει αντιφλεγμονώδη-αντιοξειδωτική δράση.

Παρατηρήσαμε ότι οι MM, CS και DGH παρουσιάζουν ισχυρή αντιγλοιωματική δράση στην κυτταρική σειρά U251MG που είναι ευαίσθητη στην TMZ, αλλά και την T98G που είναι ανθεκτική στην TMZ. Οι MM και CS οδήγησαν σε αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση S, ενώ η DGH στη φάση G2/M. Το σύνολο των ουσιών ενεργοποίησε το μιτοχονδριακό μονοπάτι απόπτωσης, ενώ οι CS και DGH ενεργοποίησαν επιπλέον και το εξωγενές, εξαρτώμενο της κασπάσης-8, μονοπάτι απόπτωσης. Οι ουσίες οδήγησαν σε διαφορετική έκφραση δεικτών επιφανείας CDs που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Οι ουσίες αποδείχθηκαν μη τοξικές στις μελετούμενες *in vitro* συγκεντρώσεις, σε ιχθύες Zebrafish.

Το μονοπάτι του NF-κB, δρα ογκογόνα στο γλοιοβλάστωμα και συμβάλει στη χημειοανθεκτικότητα. Επαληθεύσαμε ότι ο NF-κB είναι ενεργός στο γλοιοβλάστωμα και ότι οι δείκτες CDs: CD15, CD26, CD28, CD44, CD58, CD62L, CD71 και CD122 που στοχεύουν οι MM, CS και DGH, φέρουν θέσεις πρόσδεσης NF-κB. Η μελέτη μας παραθέτει δεδομένα ότι η στόχευση και η αναστολή του μονοπατιού του NF-κB από τις φυσικές ενώσεις MM, CS και DGH, σχετίζεται με την αντιγλοιωματική τους δράση.

Abstract

Glioblastoma is the most common and aggressive form of primary brain tumor in adults. Despite intensive clinical research, few therapeutic approaches exist to date and the average survival of patients remains in the range of 15 months. The majority of recurrent tumors soon become resistant to treatment, thus creating an urgent need for new treatments. A significant number of anticancer drugs have been isolated from medicinal plants. In our study we used the substances of natural origin moschamine (MM), n-p-coumaroyl-serotonin (CS), and delgucohelebrine (DGH) which have been isolated from endemic plants of our country. The substances show similarities in their structure and potentially anti-inflammatory and antioxidant action.

We observed that MM, CS and DGH show strong anti-glioma activity in the TMZ-sensitive U251MG cell line, but also in TMZ-resistant T98G. MM and CS led to cell cycle arrest in the S phase, while DGH in the G2/M phase. All substances activated the mitochondrial apoptosis pathway, while CS and DGH also activated the exogenous, caspase-8-dependent apoptosis pathway. The substances led to differential expression of carcinogen-related CD markers. The substances were shown to be non-toxic at the *in vitro* studied concentrations in Zebrafish.

The NF- κ B pathway has oncogenic action in glioblastoma and contributes to chemical resistance. We verified that NF- κ B is active in glioblastoma and that the CDs CD15, CD26, CD28, CD44, CD58, CD62L, CD71 and CD122 markers targeted by MM, CS and DGH contain NF- κ B binding sites. Our study provides data that the targeting and inhibition of the NF- κ B pathway by the natural compounds MM, CS and DGH, is related to their anti-glioma activity.

Βιβλιογραφία

1. Weinberg RA. The biology of cancer. Second edition. ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2014. xx, 876, A 6, G 30, I 28 pages p.
2. Stewart B, Wild CP. World cancer report 2014. World. 2016.
3. Ostrom QT, Gittleman H, de Blank PM, Finlay JL, Gurney JG, McKean-Cowdin R, et al. American Brain Tumor Association Adolescent and Young Adult Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncology*. 2016;18(suppl 1):i1-i50.
4. Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial biotechnology*. 2011;4(6):687-99.
5. Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(2):143-8.
6. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & development*. 2001;15(11):1311-33.
7. Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nature Reviews Genetics*. 2001;2(2):120-9.
8. Mangiola A, Anile C, Pompucci A, Capone G, Rigante L, De Bonis P. Glioblastoma therapy: going beyond Hercules Columns. *Expert review of neurotherapeutics*. 2010;10(4):507-14.
9. Robbins S, Kumar V. Robbins Basic Pathology. Philadelphia, Pa.: Saunders. Elsevier; 2007.
10. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
11. Komori T. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2017;57(7):301-11.
12. Jw K, RF M, editors. A simplified classification of the gliomas. Proceedings of the staff meetings Mayo Clinic; 1949.
13. Ringertz N. Grading of gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1950;27(1):51-64.
14. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas: a simple and reproducible method. *Cancer*. 1988;62(10):2152-65.

15. Huttner A. Overview of primary brain tumors: pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. *Hematology/Oncology Clinics*. 2012;26(4):715-32.
16. Olar A, Aldape KD. Biomarkers classification and therapeutic decision-making for malignant gliomas. *Current treatment options in oncology*. 2012;13(4):417-36.
17. Ducray F, El Hallani S, Idhahbi A. Diagnostic and prognostic markers in gliomas. *Current opinion in oncology*. 2009;21(6):537-42.
18. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-oncology*. 2012;14(suppl_5):v1-v49.
19. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*. 2010;127(12):2893-917.
20. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *The oncologist*. 2007;12(1):20-37.
21. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49.
22. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
23. Lynam LM, Lyons MK, Drazkowski JF, Sirven JI, Noe KH, Zimmerman RS, et al. Frequency of seizures in patients with newly diagnosed brain tumors: a retrospective review. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2007;109(7):634-8.
24. DeAngelis LM. Brain tumors. *New England journal of medicine*. 2001;344(2):114-23.
25. Pomeroy SL, Wen PY, Gajjar A. Clinical presentation, diagnosis, and risk stratification of medulloblastoma. Waltham, MA. 2014.
26. Flowers A. Brain tumors in the older person. *Cancer control*. 2000;7(6):523-38.
27. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):987-96.
28. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, Selker R, Vick NA, et al. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. *The Lancet*. 1995;345(8956):1008-12.

29. Stummer W, van den Bent MJ, Westphal M. Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta neurochirurgica*. 2011;153(6):1211-8.
30. van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(18):2715-22.
31. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(28):4733-40.
32. Desjardins A, Reardon DA, Coan A, Marcello J, Herndon JE, Bailey L, et al. Bevacizumab and daily temozolomide for recurrent glioblastoma. *Cancer*. 2012;118(5):1302-12.
33. Zhang W, Qiu X-g, Chen B-s, Li S-w, Yun C, Huan R, et al. Antiangiogenic therapy with bevacizumab in recurrent malignant gliomas: analysis of the response and core pathway aberrations. *Chinese medical journal*. 2009;122(11):1250-4.
34. Argyriou AA, Antonacopoulou A, Iconomou G, Kalofonos HP. Treatment options for malignant gliomas, emphasizing towards new molecularly targeted therapies. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2009;69(3):199-210.
35. Hadziahmetovic M, Shirai K, Chakravarti A. Recent advancements in multimodality treatment of gliomas. *Future oncology*. 2011;7(10):1169-83.
36. Su C-C, Wang M-J, Chiu T-L. The anti-cancer efficacy of curcumin scrutinized through core signaling pathways in glioblastoma. *International journal of molecular medicine*. 2010;26(2):217-24.
37. Pozsgai E, Bellyei S, Cseh A, Boronkai A, Racz B, Szabo A, et al. Quercetin increases the efficacy of glioblastoma treatment compared to standard chemoradiotherapy by the suppression of PI-3-kinase-Akt pathway. *Nutrition and cancer*. 2013;65(7):1059-66.
38. Li S, Zhu J-H, Cao L-P, Sun Q, Liu H-D, Li J-S, et al. Growth inhibitory in vitro effects of glycyrrhizic acid in U251 glioblastoma cell line. *Neurological Sciences*. 2014;35(7):1115-20.
39. Whittaker S, Madani D, Joshi S, Chung SA, Johns T, Day B, et al. Combination of palbociclib and radiotherapy for glioblastoma. *Cell death discovery*. 2017;3(1):1-6.

40. Papadopoulos F, Isihou R, Alexiou GA, Tsalios T, Vartholomatos E, Markopoulos GS, et al. Haloperidol Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma Cells. *Biomedicines*. 2020;8(12).
41. Omoruyi S, Ekpo O, Semenya D, Jardine A, Prince S. Exploitation of a novel phenothiazine derivative for its anti-cancer activities in malignant glioblastoma. *Apoptosis*. 2020:1-14.
42. Kondo N, Hikida M, Nakada M, Sakurai Y, Hirata E, Takeno S, et al. Glioma Stem-Like Cells Can Be Targeted in Boron Neutron Capture Therapy with Boronophenylalanine. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10).
43. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell*. 2000;100(1):57-70.
44. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Oxford Textbook of Oncology*. 2016.
45. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
46. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):316-23.
47. Network CGAR. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061.
48. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *science*. 2008;321(5897):1807-12.
49. He J, Olson JJ, James CD. Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines. *Cancer research*. 1995;55(21):4833-6.
50. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual review of biochemistry*. 2000;69(1):373-98.
51. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103(2):211-25.
52. Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nature genetics*. 2000;25(1):55-7.
53. Liu Y, Shete S, Etzel CJ, Scheurer M, Alexiou G, Armstrong G, et al. Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMGA2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(14):2467-74.

54. Alexiou GA, Tsamis KI, Vartholomatos E, Peponi E, Tzima E, Tasiou I, et al. Combination treatment of TRAIL, DFMO and radiation for malignant glioma cells. *Journal of neuro-oncology*. 2015;123(2):217-24.
55. Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012;488(7412):522-6.
56. Group GM-aTG. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *The Lancet*. 2002;359(9311):1011-8.
57. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(4):a000034-a.
58. Bren GD, Solan NJ, Miyoshi H, Pennington KN, Pobst LJ, Paya CV. Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB. *Oncogene*. 2001;20(53):7722-33.
59. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(1):17-26.
60. Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol*. 2004;1(5):343-50.
61. Karin M, Greten FR. NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5:749.
62. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(1):49.
63. Baud V, Jacque E. The alternative NF-kB activation pathway and cancer: friend or foe? *Medecine sciences: M/S*. 2008;24(12):1083-8.
64. Sankar Ghosh, Michael J. May a, Kopp EB. NF-κB AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annual Review of Immunology*. 1998;16(1):225-60.
65. Santoro MG, Rossi A, Amici C. NF-κB and virus infection: who controls whom. *The EMBO Journal*. 2003;22(11):2552-60.
66. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(4):a000034.
67. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*. 2006;25(51):6706-16.

68. Ghosh G, Wang VY-F, Huang D-B, Fusco A. NF- κ B regulation: lessons from structures. *Immunological reviews*. 2012;246(1):36-58.
69. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011;12(8):695-708.
70. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(2):121-32.
71. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1):49-62.
72. Sakowicz A, Bralewska M, Pietrucha T, Habrowska-Górczyńska DE, Piastowska-Ciesielska AW, Gach A, et al. Canonical, non-canonical and atypical pathways of nuclear factor κ b activation in preeclampsia. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(15):5574.
73. Sfikas A, Batsi C, Tselikou E, Vartholomatos G, Monokrousos N, Pappas P, et al. The canonical NF-kappaB pathway differentially protects normal and human tumor cells from ROS-induced DNA damage. *Cell Signal*. 2012;24(11):2007-23.
74. Araki K, Kawauchi K, Tanaka N. IKK/NF- κ B signaling pathway inhibits cell-cycle progression by a novel Rb-independent suppression system for E2F transcription factors. *Oncogene*. 2008;27(43):5696.
75. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431-6.
76. Vancurova I, Vancura A. Regulation and function of nuclear I κ B α in inflammation and cancer 2012. 56-66 p.
77. Shen RR, Hahn WC. Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene*. 2011;30(6):631-41.
78. Sun S-C. The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunological reviews*. 2012;246(1):125-40.
79. Natoli G, De Santa F. Shaping alternative NF-kappaB-dependent gene expression programs: new clues to specificity. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):693-6.
80. Kriete A, Mayo KL. Atypical pathways of NF- κ B activation and aging. *Experimental Gerontology*. 2009;44(4):250-5.
81. Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):773-84.

82. Araki K, Kawauchi K, Tanaka N. IKK/NF-kappaB signaling pathway inhibits cell-cycle progression by a novel Rb-independent suppression system for E2F transcription factors. *Oncogene*. 2008;27(43):5696-705.
83. Penzo M, Massa PE, Olivotto E, Bianchi F, Borzi RM, Hanidu A, et al. Sustained NF-kappaB activation produces a short-term cell proliferation block in conjunction with repressing effectors of cell cycle progression controlled by E2F or FoxM1. *J Cell Physiol*. 2009;218(1):215-27.
84. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012;26(3):203-34.
85. Sadikot RT, Han W, Everhart MB, Zoia O, Peebles RS, Jansen ED, et al. Selective I kappa B kinase expression in airway epithelium generates neutrophilic lung inflammation. *J Immunol*. 2003;170(2):1091-8.
86. Cheng DS, Han W, Chen SM, Sherrill TP, Chont M, Park GY, et al. Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF-kappa B pathway. *J Immunol*. 2007;178(10):6504-13.
87. Pantano C, Ather JL, Alcorn JF, Poynter ME, Brown AL, Guala AS, et al. Nuclear factor-kappaB activation in airway epithelium induces inflammation and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(9):959-69.
88. McLoed AG, Sherrill TP, Cheng DS, Han W, Saxon JA, Gleaves LA, et al. Neutrophil-Derived IL-1beta Impairs the Efficacy of NF-kappaB Inhibitors against Lung Cancer. *Cell Rep*. 2016;16(1):120-32.
89. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol*. 2011;12(8):715-23.
90. Caetano MS, Zhang H, Cumpian AM, Gong L, Unver N, Ostrin EJ, et al. IL6 Blockade Reprograms the Lung Tumor Microenvironment to Limit the Development and Progression of K-ras-Mutant Lung Cancer. *Cancer Res*. 2016;76(11):3189-99.
91. Chariot A. The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol*. 2009;19(8):404-13.
92. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*. 2012;246(1):379-400.
93. Baldwin AS. Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF-kappaB: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol Rev*. 2012;246(1):327-45.

94. Xia Y, Yeddula N, Leblanc M, Ke E, Zhang Y, Oldfield E, et al. Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. *Nat Cell Biol.* 2012;14(3):257-65.
95. Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH, Karin M. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell.* 2010;17(1):89-97.
96. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature.* 2008;453(7196):807-11.
97. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Cheng DS, Scoggins RM, Han W, Polosukhin VV, et al. Epithelial NF-kappaB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(47):18514-9.
98. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Han W, Sadikot RT, Yull FE, Blackwell TS, et al. Host nuclear factor-kappaB activation potentiates lung cancer metastasis. *Mol Cancer Res.* 2008;6(3):364-71.
99. Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, Shen L, Turk E, Ouyang C, et al. Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2009;462(7269):104-7.
100. Basseres DS, Ebbs A, Levantini E, Baldwin AS. Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 2010;70(9):3537-46.
101. Bivona TG, Hieronymus H, Parker J, Chang K, Taron M, Rosell R, et al. FAS and NF-kappaB signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR. *Nature.* 2011;471(7339):523-6.
102. Blakely CM, Pazarentzos E, Olivas V, Asthana S, Yan JJ, Tan I, et al. NF-kappaB-activating complex engaged in response to EGFR oncogene inhibition drives tumor cell survival and residual disease in lung cancer. *Cell Rep.* 2015;11(1):98-110.
103. Chen W, Li Z, Bai L, Lin Y. NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011;16:1172-85.
104. Giopanou I, Lilis I, Papaleonidopoulos V, Marazioti A, Spella M, Vreka M, et al. Comprehensive Evaluation of Nuclear Factor-kappaBeta Expression Patterns in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132527.
105. Batra S, Balamayooran G, Sahoo MK. Nuclear factor-kappaB: a key regulator in health and disease of lungs. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2011;59(5):335-51.

106. Aggarwal BB, Sung B. NF- κ B in cancer: a matter of life and death. *Cancer discovery*. 2011;1(6):469-71.
107. Tang X, Liu D, Shishodia S, Ozburn N, Behrens C, Lee JJ, et al. Nuclear factor- κ B (nf- κ B) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer*. 2006;107(11):2637-46.
108. Chen W, Li Z, Bai L, Lin Y. NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2011;16:1172-85.
109. Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W, et al. Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*. 2006;25(51):6781-99.
110. Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):861-72.
111. Van Waes C. Targeting NF- κ B in mouse models of lung adenocarcinoma. *Cancer discovery*. 2011;1(3):200-2.
112. Wong K-K, Jacks T, Dranoff G. NF-kappaB fans the flames of lung carcinogenesis. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2010;3(4):403-5.
113. Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death & Differentiation*. 2006;13(5):738-47.
114. Tsunoda K, Kitange G, Anda T, Shabani HK, Kaminogo M, Shibata S, et al. Expression of the constitutively activated RelA/NF- κ B in human astrocytic tumors and the in vitro implication in the regulation of urokinase-type plasminogen activator, migration, and invasion. *Brain tumor pathology*. 2005;22(2):79-87.
115. Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: the enemy within. *Cancer cell*. 2004;6(3):203-8.
116. Raychaudhuri B, Han Y, Lu T, Vogelbaum MA. Aberrant constitutive activation of nuclear factor κ B in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. *Journal of neuro-oncology*. 2007;85(1):39-47.
117. Bhat KP, Balasubramaniyan V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, et al. Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer cell*. 2013;24(3):331-46.
118. Coupienne I, Bontems S, Dewaele M, Rubio N, Habraken Y, Fulda S, et al. NF-kappaB inhibition improves the sensitivity of human glioblastoma cells to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Biochemical pharmacology*. 2011;81(5):606-16.

119. Lim JY, Hwang BY, Hwang KW, Park SY. Methylalpinumisoflavone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in microglial cells by the NF-kappaB and MAPK signaling pathway. *Phytotherapy Research*. 2012;26(12):1948-56.
120. Acuña UM, Mo S, Orjala J, de Blanco EC. Hapindole H NF-kappaB inhibitory activity and apoptotic effect on PC-3 prostate cancer cells. *Planta Medica*. 2014;80(10):PC14.
121. Zhang X-A, Zhang S, Yin Q, Zhang J. Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B Pathway. *Pharmacognosy magazine*. 2015;11(42):404.
122. Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. *Biochemical pharmacology*. 1997;53(2):121-33.
123. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(1):72-9.
124. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*. 2004;74(17):2157-84.
125. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical reviews*. 2009;109(7):3012-43.
126. Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Current medicinal chemistry*. 2001;8(12):1467-86.
127. Charami MT, Lazari D, Karioti A, Skaltsa H, Hadjipavlou-Litina D, Souleles C. Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*. 2008;22(4):450-4.
128. Kontogiorgis C, Ntella M, Mpompou L, Karallaki F, Athanasios P, Hadjipavlou-Litina D, et al. Study of the antioxidant activity of *Thymus sibthorpii* Benth (Lamiaceae). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016:1-6.
129. Liu A-J, Wang S-H, Chen K-C, Kuei H-P, Shih Y-L, Hou S-Y, et al. Evodiamine, a plant alkaloid, induces calcium/JNK-mediated autophagy and calcium/mitochondria-mediated apoptosis in human glioblastoma cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2013;205(1):20-8.
130. Kundu M, Das S, Dhara D, Mandal M. Prospect of natural products in glioma: a novel avenue in glioma management. *Phytotherapy Research*. 2019;33(10):2571-84.
131. Sordillo LA, Sordillo PP, Helson L. Curcumin for the Treatment of Glioblastoma. *Anticancer Res*. 2015;35(12):6373-8.

132. Schexnayder C, Stratford RE. Genistein and Glyceollin Effects on ABCC2 (MRP2) and ABCG2 (BCRP) in Caco-2 Cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;13(1):ijerph13010017.
133. Vengoji R, Macha MA, Batra SK, Shonka NA. Natural products: a hope for glioblastoma patients. *Oncotarget*. 2018;9(31):22194-219.
134. Issa ME, Cretton S, Cuendet M. Targeting Multiple Myeloma Cancer Stem Cells with Natural Products - Lessons from Other Hematological Malignancies. *Planta Med*. 2017;83(9):752-60.
135. Kakarala M, Brenner DE, Korkaya H, Cheng C, Tazi K, Ginestier C, et al. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(3):777-85.
136. Li Y, Wicha MS, Schwartz SJ, Sun D. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. *J Nutr Biochem*. 2011;22(9):799-806.
137. Scarpa ES, Ninfali P. Phytochemicals as Innovative Therapeutic Tools against Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):15727-42.
138. Hong M, Tan HY, Li S, Cheung F, Wang N, Nagamatsu T, et al. Cancer Stem Cells: The Potential Targets of Chinese Medicines and Their Active Compounds. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
139. Shim Y, Song JM. Quantum dot nanoprobe-based high-content monitoring of notch pathway inhibition of breast cancer stem cell by capsaicin. *Mol Cell Probes*. 2015;29(6):376-81.
140. Sarker SD, Savchenko T, Whiting P, Šik V, Dinan LN. Moschamine, cis-moschamine, moschamindole and moschamindolol: four novel indole alkaloids from *Centaurea moschata*. *Natural Product Letters*. 1997;9(3):189-99.
141. Shueb M, MacManus SM, Jaspars M, Trevidu J, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, et al. Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. *Tetrahedron*. 2006;62(48):11172-7.
142. Middleton M, Cox PJ, Jaspars M, Kumarasamy Y, Nahar L, Reid R, et al. Dibenzylobutyrolactone lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea nigra* (Asteraceae). *Biochemical systematics and ecology*. 2003;31(6):653-6.
143. Hodaj E, Tsiftoglou O, Abazi S, Hadjipavlou-Litina D, Lazari D. Lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea vlachorum* Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity. *Natural product research*. 2017;31(10):1195-200.

144. Tanaka E, Tanaka C, Mori N, Kuwahara Y, Tsuda M. Phenylpropanoid amides of serotonin accumulate in witches' broom diseased bamboo. *Phytochemistry*. 2003;64(5):965-9.
145. Sato H, Kawagishi H, Nishimura T, Yoneyama S, Yoshimoto Y, Sakamura S, et al. Serotobenine, a novel phenolic amide from safflower seeds (*Carthamus tinctorius* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*. 1985;49(10):2969-74.
146. Roh JS, Han JY, Kim JH, Hwang JK. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(12):1976-8.
147. Aderogba MA, Ndhlala AR, Rengasamy KR, Van Staden J. Antimicrobial and selected in vitro enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthii*. *Molecules*. 2013;18(10):12633-44.
148. Jenett-Siems K, Weigl R, Kaloga M, Schulz J, Eich E. Ipobscurines C and D: macrolactam-type indole alkaloids from the seeds of *Ipomoea obscura*. *Phytochemistry*. 2003;62(8):1257-63.
149. Niwa T, Murakami K, Ohtake T, Etoh H, Shimizu A, Shimizu Y, et al. Peroxynitrite scavenging activities of aromatic compounds isolated from konnyaku, *Amorphophallus konjac* K. Koch. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2002;66(6):1386-8.
150. Yang F-Y, Su Y-F, Wang Y, Chai X, Han X, Wu Z-H, et al. Bufadienolides and phytoecdystones from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* (Ranunculaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2010;38(4):759-63.
151. Cheng W, Tan Y-F, Tian H-Y, Gong X-W, Chen K-L, Jiang R-W. Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* with inhibitory activities against prostate cancer cells. *Natural product research*. 2014;28(12):901-8.
152. Tsiftoglou OS, Stefanakis MK, Lazari DM. Chemical constituents isolated from the rhizomes of *Helleborus odorus* subsp. *cyclophyllus* (Ranunculaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2018;79:8-11.
153. Kanther M, Sun X, Mühlbauer M, Mackey LC, Flynn EJ, Bagnat M, et al. Microbial Colonization Induces Dynamic Temporal and Spatial Patterns of NF- κ B Activation in the Zebrafish Digestive Tract. *Gastroenterology*. 2011;141(1):197-207.
154. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001:A3. B. 1-A3. B..

155. Jordan JP, Hand CM, Markowitz RS, Black P. Test for chemotherapeutic sensitivity of cerebral gliomas: use of colorimetric MTT assay. *Journal of neuro-oncology*. 1992;14(1):19-35.
156. Alexiou GA, Vartholomatos G, Goussia A, Batistatou A, Tsamis K, Voulgaris S, et al. Fast cell cycle analysis for intraoperative characterization of brain tumor margins and malignancy. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2015;22(1):129-32.
157. économiques Odcedd. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test: OECD Publishing; 2013.
158. Sarker SD, Laird A, Nahar L, Kumarasamy Y, Jaspars M. Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry*. 2001;57(8):1273-6.
159. Blumenthal N, Busse W, Goldberg A, Gruenewald J, Hall T, Riggins C, et al. The Complete German Commission E Monographs. American Botanical Council, Austin, Texas. Integrative Medicine Communications, Boston, Massachusetts. 1998.
160. Levin VA. Personalized medicine in neuro-oncology. *CNS oncology*. 2016;5(2):55-8.
161. Martucciello S, Paoella G, Muzashvili T, Skhirtladze A, Pizza C, Caputo I, et al. Steroids from *Helleborus caucasicus* reduce cancer cell viability inducing apoptosis and GRP78 down-regulation. *Chemico-biological interactions*. 2018;279:43-50.
162. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
163. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunological reviews*. 2017;277(1):76-89.
164. Basu A, Castle VP, Bouziane M, Bhalla K, Haldar S. Crosstalk between extrinsic and intrinsic cell death pathways in pancreatic cancer: synergistic action of estrogen metabolite and ligands of death receptor family. *Cancer research*. 2006;66(8):4309-18.
165. Ansari SA, Safak M, Del Valle L, Enam S, Amini S, Khalili K. Cell cycle regulation of NF- κ B-binding activity in cells from human glioblastomas. *Experimental cell research*. 2001;265(2):221-33.
166. Annabi B, Laflamme C, Sina A, Lachambre M-P, Béliveau R. A MT1-MMP/NF- κ B signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133 (+) U87 glioblastoma cells. *Journal of neuroinflammation*. 2009;6(1):8.
167. Jiang L, Wu J, Yang Y, Liu L, Song L, Li J, et al. Bmi-1 promotes the aggressiveness of glioma via activating the NF-kappaB/MMP-9 signaling pathway. *BMC cancer*. 2012;12(1):406.

168. Galardi S, Mercatelli N, Farace MG, Ciafre SA. NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells. *Nucleic acids research*. 2011;39(9):3892-902.
169. Jiang L, Wu J, Yang Y, Liu L, Song L, Li J, et al. Bmi-1 promotes the aggressiveness of glioma via activating the NF-kappaB/MMP-9 signaling pathway. *BMC cancer*. 2012;12(1):1.
170. Xie T-X, Xia Z, Zhang N, Gong W, Huang S. Constitutive NF- κ B activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncology reports*. 2010;23(3):725-32.
171. Nogueira L, Ruiz-Ontañón P, Vazquez-Barquero A, Moris F, Fernandez-Luna JL. The NF κ B pathway: a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget*. 2011;2(8):646.
172. Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, Franzoso G. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol*. 2012;22(11):557-66.
173. Kim W-T, Ryu CJ. Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB reports*. 2017;50(6):285.
174. Kuhn RM, Haussler D, Kent WJ. The UCSC genome browser and associated tools. *Briefings in bioinformatics*. 2012;14(2):144-61.
175. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome research*. 2002;12(6):996-1006.
176. Navarro Gonzalez J, Zweig AS, Speir ML, Schmelter D, Rosenbloom KR, Raney BJ, et al. The UCSC genome browser database: 2021 update. *Nucleic acids research*. 2021;49(D1):D1046-D57.
177. Tsamis KI, Alexiou GA, Vartholomatos E, Kyritsis AP. Combination treatment for glioblastoma cells with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and oncolytic adenovirus delta-24. *Cancer investigation*. 2013;31(9):630-8.
178. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell*. 2016;164(3):550-63.
179. Pisapia DJ. The updated World Health Organization glioma classification: cellular and molecular origins of adult infiltrating gliomas. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2017;141(12):1633-45.

180. Zacher A, Kaulich K, Stepanow S, Wolter M, Köhrer K, Felsberg J, et al. Molecular diagnostics of Gliomas using next generation sequencing of a Glioma-tailored gene panel. *Brain Pathology*. 2017;27(2):146-59.
181. Karsy M, Gelbman M, Shah P, Balumbu O, Moy F, Arslan E. Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: review of morphological and molecular features. *Folia Neuropathol*. 2012;50(4):301-21.
182. Bondy M, Wiencke J, Wrensch M, Kyritsis AP. Genetics of primary brain tumors: a review. *Journal of neuro-oncology*. 1994;18(1):69-81.
183. Alexiou GA, Vartholomatos G, Voulgaris S, Kyritsis AP. Letter to the Editor: Intraoperative detection of glioma cells by flow cytometry. *J Neurosurg*. 2016;124(2):587-8.
184. Alexiou GA, Lazari D, Markopoulos G, Vartholomatos E, Hodaj E, Galani V, et al. Moschamine inhibits proliferation of glioblastoma cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Tumor Biology*. 2017;39(5):1010428317705744.
185. Lazari D, Alexiou GA, Markopoulos GS, Vartholomatos E, Hodaj E, Chousidis I, et al. N-(p-coumaroyl) serotonin inhibits glioblastoma cells growth through triggering S-phase arrest and apoptosis. *Journal of neuro-oncology*. 2017;132(3):373-81.
186. Vartholomatos E, Alexiou G, Markopoulos G, Lazari D, Tsiftoglou O, Chousidis I, et al. Deglucochellebrin. A Potent Agent for Glioblastoma Treatment. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2019.
187. Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi Á, Forgo P, Szabó P, et al. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy Research*. 2010;24(11):1664-9.
188. Park JB. Synthesis, biological activities and bioavailability of moschamine, a safflomide-type phenylpropenoic acid amide found in *Centaurea cyanus*. *Natural product research*. 2012;26(16):1465-72.
189. Fujita M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, Hamilton RL, Komohara Y, Decker SA, et al. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*. 2011;71(7):2664-74.
190. Kuipers GK, Slotman BJ, Wedekind LE, Stoter TR, Van Den Berg J, Sminia P, et al. Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration. *International journal of radiation biology*. 2007;83(10):677-85.

191. Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft S-K, et al. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer research*. 2000;60(17):4926-31.
192. Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological reports*. 2010;62(2):233-44.
193. Li S, Jiang M, Wang L, Yu S. Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: Recent advancement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;129:110389.
194. Jin Q, Shan L, Yue J, Wang X. Spectrophotometric determination of total serotonin derivatives in the safflower seeds with Ehrlich's reagent and the underlying color reaction mechanism. *Food chemistry*. 2008;108(2):779-83.
195. Takimoto T, Suzuki K, Arisaka H, Murata T, Ozaki H, Koyama N. Effect of N-(p-coumaroyl) serotonin and N-feruloylserotonin, major anti-atherogenic polyphenols in safflower seed, on vasodilation, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Molecular nutrition & food research*. 2011;55(10):1561-71.
196. Katsuda S-i, Suzuki K, Koyama N, Takahashi M, Miyake M, Hazama A, et al. Safflower seed polyphenols (N-(p-coumaroyl) serotonin and N-feruloylserotonin) ameliorate atherosclerosis and distensibility of the aortic wall in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic (KHC) rabbits. *Hypertension Research*. 2009;32(11):944-9.
197. Takii T, Hayashi M, Hiroma H, Chiba T, Kawashima S, Zhang HL, et al. Serotonin derivative, N-(p-coumaroyl) serotonin, isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake augments the proliferation of normal human and mouse fibroblasts in synergy with basic fibroblast growth factor (bFGF) or epidermal growth factor (EGF). *The Journal of Biochemistry*. 1999;125(5):910-5.
198. Nagatsu A, Zhang H, Mizukami H, Okuyama H, Sakakibara J, Tokuda H, et al. Tyrosinase inhibitory and anti-tumor promoting activities of compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.) oil cakes. *Natural Product Letters*. 2000;14(3):153-8.
199. Bae S-J, Shim S-M, Park Y-J, Lee J-Y, Chang E-J, Choi S-W. Cytotoxicity of phenolic compounds isolated from seeds of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) on cancer cell lines. *Food Science and Biotechnology*. 2002;11(2):140-6.
200. Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Current opinion in cell biology*. 2011;23(2):150-6.

201. Maior MC, Dobrotă C. Natural compounds with important medical potential found in *Helleborus* sp. *Central European Journal of Biology*. 2013;8(3):272-85.
202. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews cancer*. 2009;9(3):153-66.
203. Vartholomatos G, Alexiou GA, Stefanaki K, Lykoudis EG, Tseka G, Tzoufi M, et al. The value of cell cycle analysis by propidium-iodine staining of CD56+ cells in pediatric brain tumors. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2015;133:70-4.
204. Alexiou GA, Vartholomatos G, Stefanaki K, Lykoudis EG, Patereli A, Tseka G, et al. The role of fast cell cycle analysis in pediatric brain tumors. *Pediatric neurosurgery*. 2015;50(5):257-63.
205. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
206. Fietkau R, Iro H, Altendorf-Hofmann A, Sauer R. Prognostic Value of Cellular DNA Content and S-Phase Fraction in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas in Relation to Different Treatment Modalities. *Radiation Oncology Investigations*. 1993;1(1): 50-62.
207. Shi Z, Azuma A, Sampath D, Li Y-X, Huang P, Plunkett W. S-Phase arrest by nucleoside analogues and abrogation of survival without cell cycle progression by 7-hydroxystaurosporine. *Cancer Research*. 2001;61(3):1065-72.
208. Hande K. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European journal of cancer*. 1998;34(10):1514-21.
209. Michalakis J, Georgatos SD, de Bree E, Polioudaki H, Romanos J, Georgoulas V, et al. Short-term exposure of cancer cells to micromolar doses of paclitaxel, with or without hyperthermia, induces long-term inhibition of cell proliferation and cell death in vitro. *Annals of surgical oncology*. 2007;14(3):1220-8.
210. Michalakis J, Georgatos SD, Romanos J, Koutala H, Georgoulas V, Tsiftsis D, et al. Micromolar taxol, with or without hyperthermia, induces mitotic catastrophe and cell necrosis in HeLa cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2005;56(6):615-22.
211. Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science*. 2005;310(5745):66-7.
212. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*. 2012;45(6):487-98.

213. Fulda S. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. *Planta medica*. 2010;76(11):1075-9.
214. Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M, et al. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-13.
215. Fulda S. Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *International journal of molecular sciences*. 2008;9(6):1096-107.
216. Fulda S, Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug discovery today*. 2009;14(17-18):885-90.
217. Paul S, Sengupta S, Bandyopadhyay T, Bhattacharyya A. Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutrition and cancer*. 2012;64(7):1087-94.
218. Karunagaran D, Rashmi R, Kumar T. Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy. *Current cancer drug targets*. 2005;5(2):117-29.
219. Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2000;32(11-12):1123-36.
220. Wang L, Du F, Wang X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 2008;133(4):693-703.
221. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):2942-55.
222. Jewett A, Cavalcanti M, Bonavida B. Pivotal role of endogenous TNF-alpha in the induction of functional inactivation and apoptosis in NK cells. *The Journal of Immunology*. 1997;159(10):4815-22.
223. Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002;1585(2-3):114-25.
224. Park SK, Sanders BG, Kline K. Tocotrienols induce apoptosis in breast cancer cell lines via an endoplasmic reticulum stress-dependent increase in extrinsic death receptor signaling. *Breast cancer research and treatment*. 2010;124(2):361-75.
225. Fulda S, Debatin K-M. Resveratrol-mediated sensitisation to TRAIL-induced apoptosis depends on death receptor and mitochondrial signalling. *European Journal of Cancer*. 2005;41(5):786-98.

226. Yaoxian W, Hui Y, Yunyan Z, Yanqin L, Xin G, Xiaoke W. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. *Cancer cell international*. 2013;13(1):1-8.
227. Banjerdpongchai R, Wudtiwai B, Khaw-On P, Rachakhom W, Duangnil N, Kongtawelert P. Hesperidin from Citrus seed induces human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis via both mitochondrial and death receptor pathways. *Tumor Biology*. 2016;37(1):227-37.
228. Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. *The Cochrane Library*. 2013.
229. Fan C, Liu W, Cao H, Wen C, Chen L, Jiang G. O 6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Cell death & disease*. 2013;4(10):e876.
230. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, De Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):997-1003.
231. Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, Nakamura T, Shimokawa A, Takami H, et al. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta neuropathologica communications*. 2016;4(1):79.
232. Van Nifterik KA, Van den Berg J, Slotman BJ, Lafleur MVM, Sminia P, Stalpers LJ. Valproic acid sensitizes human glioma cells for temozolomide and γ -radiation. *Journal of neuro-oncology*. 2012;107(1):61-7.
233. Coward J, Harding A. Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer. *Frontiers in oncology*. 2014;4:123.
234. Deng J, Gao G, Wang L, Wang T, Yu J, Zhao Z. CD24 expression as a marker for predicting clinical outcome in human gliomas. *BioMed Research International*. 2012;2012.
235. Knüpfer M, Hernaiz-Driever P, Poppenborg H, Wolff J, Cinatl J. Valproic acid inhibits proliferation and changes expression of CD44 and CD56 of malignant glioma cells in vitro. *Anticancer research*. 1998;18(5A):3585-9.
236. Assimakopoulos A, Polyzoidis K, Kyritsis A. Stem Cells in Gliomas. *J Stem Cells Res. Rev & Rep*. 2014;1(2):1009.
237. Reifenberger G, Sieth P, Niederhaus M, Wechsler W. Expression of CD15 in tumours of the nervous system. *The Histochemical journal*. 1992;24(11):890-901.

238. Martin K, Akinwunmi J, Rooprai H, Kennedy A, Linke A, Ognjenovic N, et al. Nonexpression of CD15 by neoplastic glia: a barrier to metastasis? *Anticancer research*. 1994;15(4):1159-66.
239. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012.
240. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function and association with the malignant process. *Advances in cancer research*. 1997;71:241-319.
241. Xu Y, Stamenkovic I, Yu Q. CD44 attenuates activation of the hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for glioblastoma. *Cancer research*. 2010;70(6):2455-64.
242. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell*. 2019;178(4):835-49. e21.
243. Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, et al. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death & Differentiation*. 2006;13(7):1238-41.
244. Suvà Mario L, Rheinbay E, Gillespie Shawn M, Patel Anoop P, Wakimoto H, Rabkin Samuel D, et al. Reconstructing and Reprogramming the Tumor-Propagating Potential of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell*. 2014;157(3):580-94.
245. Goodman LD, Gao F, Gumin J, Villareal D, Ezhilarasan R, Love P, et al. Refinement of the glioma cancer stem cell marker profile. *AACR*; 2010.
246. Todaro L, Christiansen S, Varela M, Campodónico P, Pallotta MG, Lastiri J, et al. Alteration of serum and tumoral neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in patients with brain tumors. *Journal of neuro-oncology*. 2007;83(2):135-44.
247. Knüpfer M, Hernaiz-Driever P, Poppenborg H, Wolff J, Cinatl J. Valproic acid inhibits proliferation and changes expression of CD44 and CD56 of malignant glioma cells in vitro. *Anticancer research*. 1997;18(5A):3585-9.
248. Mäenpää A, Kovanen PE, Paetau A, Jääskeläinen J, Timonen T. Lymphocyte adhesion molecule ligands and extracellular matrix proteins in gliomas and normal brain: expression of VCAM-1 in gliomas. *Acta neuropathologica*. 1997;94(3):216-25.
249. Choudhary D, Hegde P, Voznesensky O, Choudhary S, Kopsiaftis S, Claffey KP, et al., editors. Increased expression of L-selectin (CD62L) in high-grade urothelial carcinoma: A potential marker for metastatic disease. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*; 2015: Elsevier.

250. Weaver M, Laske DW. Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas. *Journal of neuro-oncology*. 2003;65(1):3-14.
251. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis*. 2014;36(2):177-85.
252. Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer science*. 2015;106(7):803-11.
253. Kari G, Rodeck U, Dicker AP. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2007;82(1):70-80.
254. Nicoli S, Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nature protocols*. 2007;2(11):2918-23.
255. Konantz M, Balci TB, Hartwig UF, Dellaire G, André MC, Berman JN, et al. Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1266(1):124-37.
256. Lessman CA. The developing zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2011;93(3):268-80.
257. Adams M, Alther W, Kessler M, Kluge M, Hamburger M. Malaria in the Renaissance: remedies from European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;133(2):278-88.
258. True B-L, Dreisbach RH. *Handbook of poisoning: prevention, diagnosis, and treatment*. 13th ed. Pearl River, N.Y.: Parthenon Pub. Group; 2001. viii, 696 p. p.
259. Alexiou GA, Vartholomatos E, Tsamis KI, Peponi E, Markopoulos G, Papathanasopoulou VA, et al. Combination treatment for glioblastoma with temozolomide, DFMO and radiation. *J BUON*. 2019;24(1):397-404.
260. Vartholomatos E, Vartholomatos G, Alexiou GA, Markopoulos GS. The Past, Present and Future of Flow Cytometry in Central Nervous System Malignancies. *Methods and Protocols*. 2021;4(1):11.
261. Gudbergsson JM, Christensen E, Kostrikov S, Moos T, Duroux M, Kjær A, et al. Conventional treatment of glioblastoma reveals persistent CD44⁺ subpopulations. *Molecular Neurobiology*. 2020;57(9):3943-55.
262. Erhart F, Blauensteiner B, Zirkovits G, Printz D, Soukup K, Klingenbrunner S, et al. Gliomasphere marker combinatorics: multidimensional flow cytometry detects CD 44⁺/CD 133⁺/ITGA 6⁺/CD 36⁺ signature. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2019;23(1):281-92.

263. Mostafa H, Pala A, Högel J, Hlavac M, Dietrich E, Westhoff MA, et al. Immune phenotypes predict survival in patients with glioblastoma multiforme. *Journal of hematology & oncology*. 2016;9(1):77.
264. Hunter JE, Leslie J, Perkins ND. c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists. *British Journal Of Cancer*. 2016;114:1.
265. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(10):749-59.
266. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF-κB and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews*. 2012;246(1):379-400.
267. Taniguchi K, Karin M. NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology*. 2018.
268. Jennewein C, Karl S, Baumann B, Micheau O, Debatin K, Fulda S. Identification of a novel pro-apoptotic role of NF-κB in the regulation of TRAIL-and CD95-mediated apoptosis of glioblastoma cells. *Oncogene*. 2012;31(11):1468.
269. Hamedeyazdan S, Niroumand F, Fathiazad F. Phytochemical analysis and antioxidative properties of *Centaurea albonitens*. *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*. 2017;4(4):57-64.
270. Khammar A, Djeddi S. Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. *European Journal of Scientific Research*. 2012;84(3):398-416.
271. Piga R, Naito Y, Kokura S, Handa O, Yoshikawa T. Inhibitory effect of serotonin derivatives on high glucose-induced adhesion and migration of monocytes on human aortic endothelial cells. *British journal of nutrition*. 2009;102(2):264-72.
272. Xia C, Tong X. Chapter Three - Moschamine-Related Indole Alkaloids. In: Knölker H-J, editor. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. 79: Academic Press; 2018. p. 139-89.
273. Kawashima S, Hayashi M, Takii T, Kimura H, Zhang HL, Nagatsu A, et al. Serotonin derivative, N-(p-coumaroyl) serotonin, inhibits the production of TNF-alpha, IL-1alpha, IL-1beta, and IL-6 by endotoxin-stimulated human blood monocytes. *J Interferon Cytokine Res*. 1998;18(6):423-8.
274. Nicholson JG, Fine HA. Diffuse Glioma Heterogeneity and Its Therapeutic Implications. *Cancer discovery*. 2021;11(3):575-90.
275. Bigner DD. Biology of gliomas: potential clinical implications of glioma cellular heterogeneity. *Neurosurgery*. 1981;9(3):320-6.

276. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(6):1046-69.
277. El-Guendy N, Sinai AP. Potential problems inherent in cell-based stable NF- κ B–GFP reporter systems. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008;312(1):147-55.
278. Consortium EP. A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). *PLoS biology*. 2011;9(4):e1001046.
279. Landt SG, Marinov GK, Kundaje A, Kheradpour P, Pauli F, Batzoglou S, et al. ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome research*. 2012;22(9):1813-31.
280. Veltroni M, De Zen L, Sanzari MC, Maglia O, Dworzak MN, Ratei R, et al. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2003;88(11):1245-52.
281. Schreiber J, Jenner RG, Murray HL, Gerber GK, Gifford DK, Young RA. Coordinated binding of NF- κ B family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(15):5899-904.
282. Blázquez M, Ortiz C, Aranda E, Collantes E, Israel A, Munoz E. NF- κ B activation by CD26 antigen is independent of dipeptidyl peptidase IV activity. *Protoplasma*. 1997;197(1):26-33.
283. Verweij C, Geerts M, Aarden LA. Activation of interleukin-2 gene transcription via the T-cell surface molecule CD28 is mediated through an NF- κ B-like response element. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(22):14179-82.
284. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity*. 2019;51(1):27-41.
285. Korniluk A, Koper O, Kemon H, Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer. *Irish Journal of Medical Science (1971-)*. 2017;186(1):57-62.
286. Smith SM, Lyu YL, Cai L. NF- κ B affects proliferation and invasiveness of breast cancer cells by regulating CD44 expression. *PloS one*. 2014;9(9):e106966.
287. Smith SM, Cai L. Cell specific CD44 expression in breast cancer requires the interaction of AP-1 and NF κ B with a novel cis-element. *PloS one*. 2012;7(11):e50867.
288. Bourguignon LY, Xia W, Wong G. Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates β -catenin signaling and NF κ B-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(5):2657-71.

