



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
(Δ.Π.Μ.Σ.) <<ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ>>

Νευροχειρουργικό Ινστιτούτο

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**<<Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης της κνικίνης σε
καρκινικές σειρές κυττάρων γλοιοβλαστώματος>>**

Τσιλίκας Αναστάσιος

Χημικός

A.M. 301

Επιβλέπων Καθηγητής : Αλεξίου Γεώργιος

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

Τριμελής επιτροπή:

Αλεξίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευροχειρουργικής

Βούλγαρης Σπυρίδων, Καθηγητής Νευροχειρουργικής

Κυρίτσης Αθανάσιος, Καθηγητής Νευρολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε το χρονικό διάστημα 2022-2023 στο πλαίσιο του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών <<Ιατρική Χημεία>> του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και εκπονήθηκε στο Νευροχειρουργικό Ινστιτούτο του τμήματος Ιατρικής υπό την επίβλεψη του κυρίου Αλεξίου Γεωργίου, Αναπληρωτή Καθηγητή Νευροχειρουργικής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Γεώργιο Αλεξίου, για την καθοδήγηση, την επιμονή και το ενδιαφέρον που έδειξε για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κύριο Βούλγαρη Σπυρίδων, καθηγητή νευροχειρουργικής και τον κύριο Κυρίτση Αθανάσιο, καθηγητή νευρολογίας και διευθυντή του Νευροχειρουργικού Ινστιτούτου για την προθυμία τους να βοηθήσουν στην επίλυση αποριών σχετικά με την παρούσα εργασία.

Ευχαριστώ επίσης, την κ. Λάζαρη Διαμάντω, καθηγήτρια και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου της για την άψογη συνεργασία μας στη μελέτη της φυτικής ουσίας κνικίνης που απομονώθηκε στο εργαστήριο της.

Ακόμα, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τους φίλους, τους συμφοιτητές και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την διαλλακτική συνεργασία μας καθώς και για την υποστήριξη σε διάφορους τομείς της διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου που με στηρίζει καθημερινά, ψυχολογικά και υλικά σε κάθε βήμα της ζωής μου.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Καρκίνος	9
1.2 Γλοιώματα	9
1.2.1 Κατηγορίες γλοιωμάτων	10
1.3 Γλοιοβλάστωμα και μορφές.....	11
1.3.1 Αιτίες πρόκλησης γλοιοβλαστώματος	13
1.3.1.1 Μεταλλαγμένα γονίδια	14
1.3.1.2 Μονοπάτι RTK	16
1.3.1.3 Μονοπάτι Ras	16
1.3.1.4 Μονοπάτι Ρετινοβλαστώματος.....	17
1.3.1.5 Μονοπάτι TP53.....	17
1.3.2 Θεραπευτική προσέγγιση γλοιοβλαστώματος	17
1.3.2.1 Χειρουργική επέμβαση	18
1.3.2.2 Συμπληρωματική θεραπεία	18
1.3.2.3 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός	20
1.3.3 Υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα	20
1.3.4 Μεταστάσεις	21
1.3.5 Εναλλακτικές μέθοδοι θεραπείας.....	21
1.3.5.1 Πεδία θεραπείας όγκου (TTFields).....	22
1.3.5.2 Καρμουσίνη	22
1.3.5.4 Φυτικές ενώσεις.....	23
1.4 Κνικίνη	26
1.5 Σκοπός	27
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Κυτταροκαλλιέργειες	27
2.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	28
2.3 Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο	29
2.4 Μέτρηση IC50 με χρωστική μικροσκοπίου κυανό του τρυπανίου (Trypan blue Exclusion Assay).....	29
2.5 Κυτταρομετρία ροής.....	30
2.6 Προσομοίωση τραύματος δι' αμυχής (scratch wound healing assay).....	30
2.7 Συνδυασμός με τεμοζολομίδη	31
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	31

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης της κνικίνης στην επιβίωση των κυτταρικών σειρών U87 και T98G	31
3.2 Διερεύνηση της επίδρασης της κνικίνης στον κυτταρικό κύκλο με κυτταρομετρία ροής.32	
3.3 Αξιολόγηση της επίδρασης της κνικίνης στη μετανάστευση των κυττάρων (Scratch Wound Healing Assay).....	34
3.4 Μελέτη της συνδυαστικής δράσης κνικίνης και τεμοζολομίδης σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος T98G	37
Συζήτηση/Συμπεράσματα	39
Σύνοψη	40
Περίληψη.....	40
Abstract	41
Βιβλιογραφία	42

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ

Σύντμηση	Ονομασία
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
GBM	Γλοιοβλάστωμα
IDH	Ισοκιτρική αφυδρογονάση
NOS Glioblastoma	Γλοιοβλάστωμα που δεν προσδιορίζεται διαφορετικά
CT	Αξονική Τομογραφία
MRI	Μαγνητική Τομογραφία
GSC	βλαστοκύτταρα γλοιώματος
PI3K	3-κινάση Φωσφοϊνοσιτίδιο
MAPK	Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνο
nGBM	Νεοδιαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα
MGMT	Ο6-μεθύλ-γουανινο-DNA μεθυλοτρανσφεράση
KPS	Βαθμολογία απόδοσης Karnofsky
EGFR	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
LFS	Σύνδρομο Li-Fraumeni
RTKs	Κινάσες του υποδοχέα της τυροσίνης
GFs	Αυξητικοί παράγοντες
RB	Ρετινοβλάστωμα
PTEN	Ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης διαγραμμένο στο χρωμόσωμα δέκα
Akt	Κινάση σερίνης/θρεονίνης
RT	Ακτινοθεραπεία
TMZ	Τεμοζολομίδα
EOR	Μέγεθος της εκτομής

FGS	Χειρουργική επέμβαση κατευθυνόμενη από φθορισμό
5-ALA	5-αμινολεβουλινικό οξύ
PFS	Επιβίωση χωρίς εξέλιξη
sdTMZ	Τεμοζολομίδα ορισμένης δόσης
OS	Ολική επιβίωση
FSRT	Κλασματοποιημένη στερεοτακτική ακτινοθεραπεία
SRS	Στερεοτακτική ακτινοθεραπεία
CTCs	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
MCSCs	Μεταστατικά καρκινικά βλαστοκύτταρα
dCSCs	Βλαστικά καρκινικά κύτταρα
TTFields	Θεραπευτικά πεδία όγκων
FDA	Οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων
STLs	Σεσκιτερπενικές λακτόνες
ROS	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
NF-κΒ	Πυρηνικός παράγοντας κάπα- ελαφριά αλυσίδα-ενισχυτής ενεργοποιημένων Β κυττάρων
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
PI	Ιωδιούχο προπίδιο
CI	Δείκτης συνδυασμού
NCI	Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι ένας γενικός όρος για μια μεγάλη ομάδα ασθενειών που μπορούν να επηρεάσουν οποιοδήποτε μέρος του σώματος. Καθοριστικό χαρακτηριστικό του, είναι η ταχεία δημιουργία μη φυσιολογικών κυττάρων που αναπτύσσονται σε ασυνήθιστα μεγάλες ποσότητες και μπορούν να εισβάλλουν σε παρακείμενα μέρη του σώματος και να εξαπλωθούν σε άλλα όργανα. Οι ευρέως διαδεδομένες μεταστάσεις είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο.

Τα νεοπλάσματα αυτά, αντιπροσωπεύουν σχεδόν έναν στους έξι θανάτους και είναι υπεύθυνα για σχεδόν δέκα εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως, σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα του Π.Ο.Υ. 2020. Τα συχνότερα περιλαμβάνουν τον καρκίνο του μαστού με 2,26 εκατομμύρια περιπτώσεις, τον καρκίνο του πνεύμονα με 2,21 εκατομμύρια περιπτώσεις και του παχέος εντέρου με 1,93 εκατομμύρια περιπτώσεις με τους δυο τελευταίους να επιφέρουν τους περισσότερους θανάτους από καρκίνο σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι συχνότερες μορφές διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας να είναι ο πιο συχνός και μάλιστα σε 23 χώρες. Κάθε χρόνο προσβάλλονται περίπου 400.000 παιδιά από κακοήθειες. [1,2]

Οι καρκίνοι είναι μεταβολές που προέρχονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών παραγόντων και τριών κατηγοριών εξωτερικών παραγόντων. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν φυσικές καρκινογόνες ουσίες, χημικές καρκινογόνες ουσίες και βιολογικές καρκινογόνες ουσίες. Οι βιολογικές καρκινογόνες ουσίες είναι οι σπανιότεροι παράγοντες εμφάνισης με μόλις 13% σύμφωνα με τις στατιστικές μελέτες του 2018. Η χρήση καπνού, η κατανάλωση αλκοόλ, η ανθυγιεινή διατροφή και η σωματική αδράνεια είναι επίσης κάποιοι από τους παράγοντες εμφάνισης καρκίνου.

Σήμερα, πολλές από αυτές τις κακοήθειες είναι θεραπεύσιμες, και μεταξύ του 30 και 50% μπορούν να προληφθούν αποφεύγοντας τους παράγοντες κινδύνου και εφαρμόζοντας τις υπάρχουσες στρατηγικές πρόληψης. Φυσικά η έγκαιρη διάγνωση καθίσταται απαραίτητη καθώς και η κατάλληλη θεραπεία και φροντίδα των ασθενών που εμφανίζουν καρκίνο. Τα στοιχεία της έγκαιρης ανίχνευσης είναι η πρόωμη διάγνωση και ο προσυμπτωματικός έλεγχος. [1]

1.2 Γλοιώματα

Ο όρος γλοιώμα αναφέρεται σε όλους τους όγκους που προέρχονται από γλοιακά κύτταρα. Τα γλοιακά ή νευρογλοιακά ή κύτταρα της γλοίας, είναι μια ευρύτερη κατηγορία κυττάρων με πολλούς υποτύπους, με κύριο σκοπό στους ενήλικες να περιβάλλουν τους νευρώνες με επικάλυψη μυελίνης, επιτρέποντας έτσι την μετάδοση της νευρικής ώσης. Στα έμβρυα, τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν ένα κυτταρικό περίγραμμα που επιτρέπει τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των νευρώνων, καθώς και την γενικότερη ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) οι κυριότεροι τύποι γλοιακών κυττάρων που εμφανίζονται, είναι τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα. [8]

Τα αστροκύτταρα είναι ο κύριος τύπος κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Φαίνεται ότι δεν μεταφέρουν ηλεκτρικά σήματα, αλλά εμπλέκονται στη συνεχή λειτουργία των σημάτων αναμετάδοσης. Σε γενικές γραμμές, εκτελούν πολυάριθμες δομικές, νευροπροστατευτικές, ομοιοστατικές και μεταβολικές διεργασίες. [7] Είναι εξοπλισμένα με κανάλια ιόντων, συνδέσεις χάσματος, και ποδίσκους που τα συνδέουν με τους νευρώνες και το αγγειακή παροχή εντός του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Με βάση τα παραπάνω χαρακτηριστικά, τα κύτταρα αυτά είναι ικανά: να συντονίζουν και να σταθεροποιούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, να ρυθμίζουν τη ροή του αίματος στον εγκέφαλο με βάση τις περιφερικές νευρικές ανάγκες, να εκκαθαρίζουν τους υπερβολικούς νευροδιαβιβαστές, να προάγουν τη νευρωνική επιβίωση, να διατηρούν την ομοιόσταση του ΚΝΣ ελέγχοντας το pH και τα επίπεδα υγρών, να σχηματίζουν συνάψεις, να απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες, να προωθούν την ανάπτυξη των νευρώνων και να εκκρίνουν τροφικούς παράγοντες για την καθοδήγηση των αξόνων.

Τα ολιγοδενδροκύτταρα από την άλλη, αφού δείχνουν να έχουν πιο εξειδικευμένο ρόλο, συγκαταλέγονται στα πιο ευάλωτα κύτταρα του εγκεφάλου. Είναι τα μυελινοποιητικά γλοία κύτταρα του ΚΝΣ. Αποτελούν το τελικό στάδιο μιας κυτταρικής διαδικασίας, κατά την οποία το νευρικό κύτταρο υποβάλλεται σε ένα πολύπλοκο και καθορισμένου χρόνου πλάνο πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης, διαφοροποίησης και μυελίνωσης για να παραχθεί τελικά το περίβλημα του άξονα. Χάρη σε αυτή τους τη δράση, επιτυγχάνεται η ταχεία μετάδοση ηλεκτρικών σημάτων στον εγκέφαλο. [6,8]

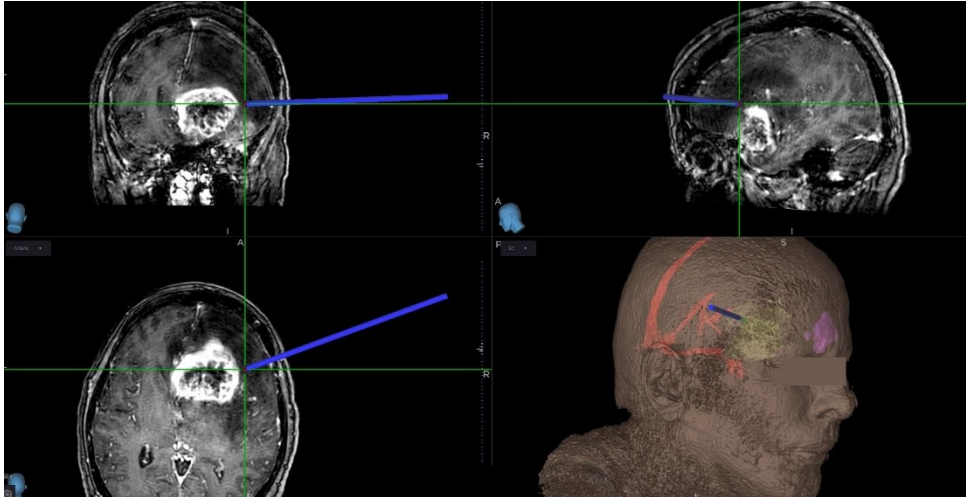
1.2.1 Κατηγορίες γλοιωμάτων

Τα γλοιώματα ανάλογα με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά τους ταξινομούνται σε 4 κατηγορίες (βαθμούς). Ο βαθμός 1, περιλαμβάνει το πιλοκυτταρικό (τριχοειδές ή νεανικό) αστροκύτωμα ενώ ο βαθμός 2 περιλαμβάνει το διάχυτο αστροκύτωμα, το επενδύωμα και το ολιγοδενδρογλοίωμα. Ακολουθώς, τα επιθετικότερα γλοιώματα είναι τα 3^{ου} και 4^{ου} βαθμού και οι κατηγορίες αυτές περιλαμβάνουν το αναπλαστικό αστροκύτωμα και το γλοιοβλάστωμα αντίστοιχα. Στον τελευταίο βαθμό έχει πλέον προστεθεί και το αστροκύτωμα μεταλλαγμένου-IDH σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. του 2021. Το γλοιοβλάστωμα ονομαζόταν στο παρελθόν και πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM- Glioblastoma Multiforme) λόγω της ετερογένειάς του και είναι το επιθετικότερο. [52]

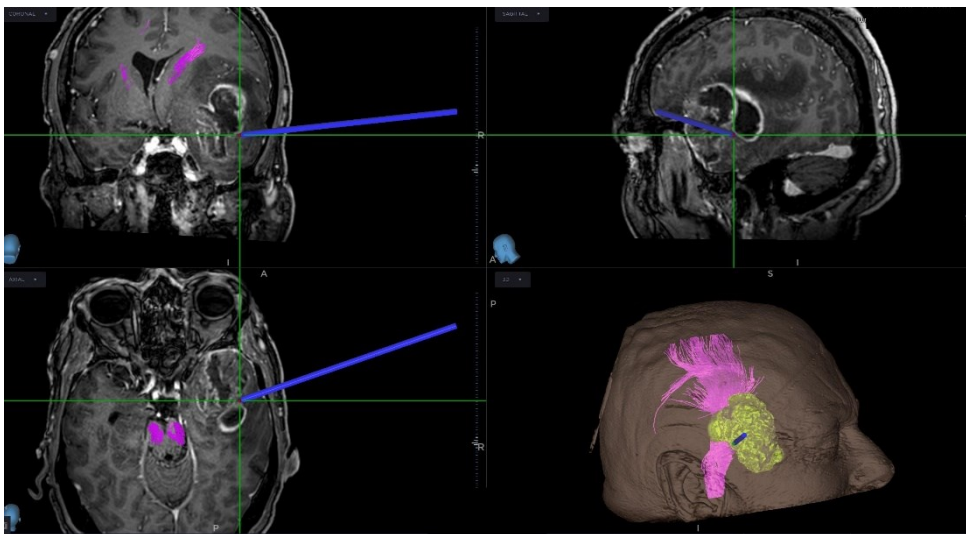
1.3 Γλοιοβλάστωμα και μορφές

Το γλοιοβλάστωμα (ή Glioblastoma Multiforme-GBM) είναι κακοήθεια του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και χαρακτηρίζεται από έντονη μορφολογική και γενετική ετερογένεια, καθώς και από χαμηλά ποσοστά επιβίωσης. [9] Σαν γλοιοβλάστωμα ορίζεται ένα διάχυτο γλοίωμα με υψηλή ικανότητα διείσδυσης στον περιβάλλοντα εγκεφαλικό ιστό (εικόνα 1,2). Η ανάλυση μεταγραφής σε όλο το γονιδίωμα, οδήγησε στην ταξινόμηση του γλοιοβλαστώματος σε τέσσερις ομοιογενείς υποτύπους. [26] Αυτοί οι τύποι είναι ο κλασσικός (CL), ο μεσεγχυματικός (MES), ο προνευρικός (PN) και ο νευρικός (NE). [18] Παρόλο που η κλινική σημασία του υποτύπου είναι ακόμα αβέβαιη, έχει επιβεβαιωθεί ότι υπάρχουν κύτταρα που σηματοδοτούν την έναρξη/ πολλαπλασιασμό του γλοιώματος ή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων εσωτερικά του γλοιοβλαστώματος. [26] Από το 2016 και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το γλοιοβλάστωμα υποδιαιρείται με βάση την κατάσταση της μετάλλαξης του γονιδίου *IDH* (ισοκιτρική αφυδρογονάση) σε γλοιοβλάστωμα *IDH*-άγριου τύπου, που αντιστοιχεί συχνότερα με το κλινικά καθορισμένο πρωτογενές ή *de novo* GBM, και σε γλοιοβλάστωμα *IDH*-μεταλλαγμένο που αντιστοιχεί στο δευτερογενές GBM (από χαμηλού βαθμού ή αναπλαστικά αστροκύτταρα) [14], ενώ υπάρχουν και γλοιώματα που δεν προσδιορίζονται διαφορετικά (NOS) αφού δεν είναι δυνατόν να ορισθεί η κατάσταση της αφυδρογονάσης. [16,18] Τα πρωτογενή και δευτερογενή γλοιοβλαστώματα εμφανίζουν παρόμοια ιστολογικά χαρακτηριστικά, αλλά διαφέρουν ως προς τα γενετικά και επιγενετικά προφίλ τους, τα οποία και πιστεύεται ότι αναπτύσσονται από διαφορετικά αρχικά κύτταρα. [18] Χαρακτηρίζονται από σημαντικά διαφορετική κλινική εξέλιξη με τα πρώτα να εμφανίζονται πιο συχνά σε ηλικιωμένους ενώ τα δευτερογενή κυρίως σε νεότερες ηλικίες. [9] Η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών, εμφανίζουν εξέλιξη του όγκου με σχεδόν καθολική θνησιμότητα. Η μέση επιβίωση από την αρχική διάγνωση είναι μικρότερη από 15 μήνες με ποσοστό επιβίωσης τα 2 χρόνια μεταξύ 26-33% των ασθενών. [5]

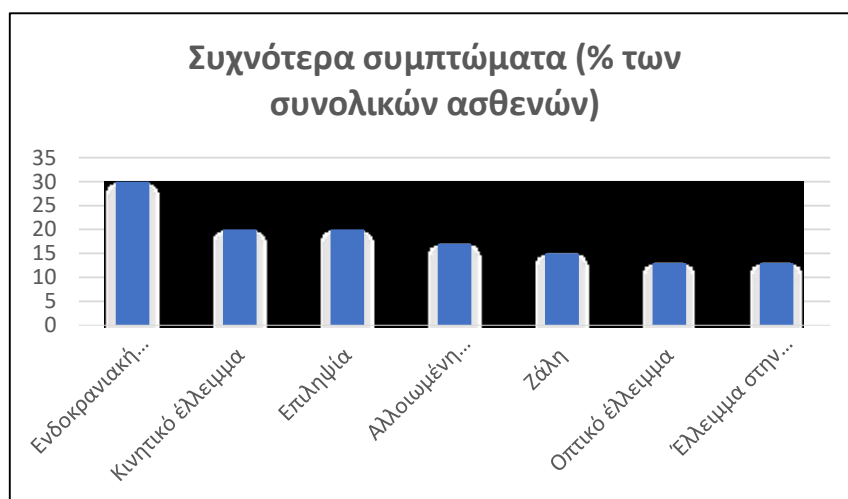
Το γλοιοβλάστωμα, όπως και κάθε γλοίωμα, τυπικά διαγνώζεται με βάση μια φυσική εξέταση που εντοπίζει χαρακτηριστικά συμπτώματα, καθώς και με διάφορες απεικονιστικές μελέτες, όπως η αξονική τομογραφία (CT) ή/ και η μαγνητική τομογραφία (MRI). Έπειτα, η ιστοπαθολογική ανάλυση θα αναδείξει τον τύπο του όγκου, καθώς και την επιθετικότητά του. [18] Τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με τη θέση και το μέγεθος του όγκου και συχνά περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, επιληπτικές κρίσεις, ναυτία, απώλεια μνήμης και δυσκολία στην όραση, στην κίνηση ή την ομιλία (εικόνα 3). Πολλά συμπτώματα σχετίζονται με αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση. [16,17]



Εικόνα 1: Περίπτωση γλοιοβλαστώματος σε ασθενή 62 ετών δεξιά μετωπιαία. Ο όγκος παρουσιάζει περιφερική πρόσληψη γαδολινίου και κεντρική νέκρωση και μετατόπιση της μέσης γραμμής.



Εικόνα 2: Περίπτωση γλοιοβλαστώματος σε ασθενή 67 ετών δεξιά κροταφικά. Ο ασθενής παρουσίασε επιληπτικές κρίσεις. Ο όγκος παρουσιάζει περιφερική πρόσληψη γαδολινίου και κεντρική νέκρωση και μετατόπιση της μέσης γραμμής.



Εικόνα 3: Τα συχνότερα συμπτώματα των γλοιωμάτων. [16]

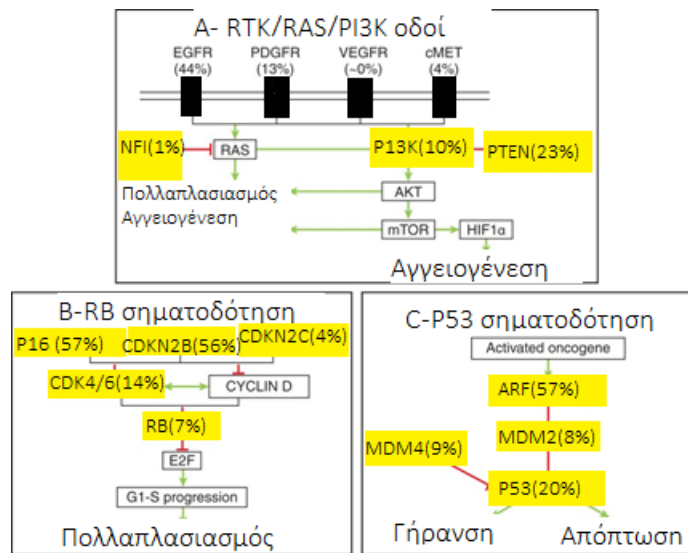
1.3.1 Αιτίες πρόκλησης γλοιοβλαστώματος

Η ανάπτυξη του γλοιοβλαστώματος πραγματοποιείται μέσω ενός πολύπλοκου δικτύου διαφορετικών γενετικών και μοριακών αλλαγών, οδηγώντας σε σημαντικές μεταβολές στα κύρια μονοπάτια σηματοδότησης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ακριβής υποκείμενη αιτία του γλοιοβλαστώματος είναι άγνωστη. [17] Η κακοήθεια αυτή, αποτελείται από διαφοροποιημένα και πλειομορφικά καρκινικά κύτταρα, ενώ κυριαρχεί η διαφοροποίηση των αστροκυττάρων. Σήμερα, έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα κύτταρα που καλούνται βλαστοκύτταρα γλοιώματος (Glioma Stem Cells- GSC) ευθύνονται για τη υποτροπή, την αντίσταση στη θεραπεία –μέσω απορρύθμισης πολλών οδών σηματοδότησης- και τη συντήρηση του όγκου. [26] Η τρέχουσα μοριακή ανάλυση του γλοιοβλαστώματος έχει αποκαλύψει απορρύθμιση κάποιων οδών σηματοδότησης του πυρήνα, συμπεριλαμβανομένων αυτών που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, την επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση. Ορισμένες από αυτές τις οδούς είναι η σηματοδότηση 3-κινάσης φωσφοϊνositιδίου (PI3K), η σηματοδότηση της κινάσης πρωτεΐνης ενεργοποιημένης με μιτογόνο (MAPK), η σηματοδότηση ρετινοβλαστώματος και η σηματοδότηση του p53 (εικόνα 4). [29] Στο πρόσφατα διαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα (nGBM), η μεθυλίωση του προαγωγέα μεθυλοτρανσφεράσης O6-μεθυλογουανίνης- DNA (MGMT)

έχει αποδειχθεί ότι είναι προβλεπτικός παράγοντας όσον αφορά την απόκριση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες, αλλά η κλινική του χρησιμότητα παραμένει φτωχική για ασθενείς με μη-μεθυλιωμένο προαγωγέα MGMT. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η διαχείριση ηλικιωμένων ασθενών. Η ηλικία, η νευρολογική κατάσταση (εξέταση με βαθμολογία KPS και εξέταση ρουτίνας ψυχικής υγείας), η χειρουργική εκτομή, η ισοκιτρική αφυδρογονάση και η μεθυλίωση της περιοχής προαγωγέα MGMT είναι καθιερωμένοι προγνωστικοί δείκτες σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα. [5] Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν κυτταρικό πλειομορφισμό, πυρηνική ατυπία, θρόμβωση των αγγείων, αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα, μικροαγγειακό πολλαπλασιασμό και νέκρωση. [16]

1.3.1.1 Μεταλλαγμένα γονίδια

Σήμερα έχουν βρεθεί πολλές μεταλλάξεις σε πλήθος γονιδίων στο γλοιοβλάστωμα (εικόνα 5). Όπως προαναφέρθηκε, ένα ενδιαφέρον γονίδιο που βρέθηκε να φέρει μεταλλάξεις, είναι το *IDH1* το οποίο κωδικοποιεί το IDH1 και συμμετέχει στον ενεργειακό μεταβολισμό. Άλλο συχνό γονίδιο, είναι το *EGFR* στο οποίο εντοπίζονται κυρίως σημειακές μεταλλάξεις. Επίσης, παρατηρούνται μεταλλάξεις σε κοινά καρκινικά γονίδια όπως το *TP53* και το *PTEN*, αλλά με ασήμαντη προγνωστική σημασία. Από την άλλη, ορισμένα ογκογονίδια, όπως πχ τα *BRAF* και *RAS*, υφίστανται μεταλλάξεις και διαγραφές στο ανασταλτικό τους ογκοκατασταλτικό γονίδιο *NF1* προκαλώντας νευροϊνωμάτωση τύπου 1. Άλλες μεταλλάξεις όπως στα *PIK3CA*, *PIK3R1* γονίδια, έχουν επίσης αναφερθεί σε διάφορες μελέτες. [25] Σπάνια, γλοιοβλάστωμα μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς με άλλα γενετικά σύνδρομα, όπως τα σύνδρομα Turcot και Li Fraumeni (LFS). Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι ασθενείς αποκτούν άλλα χαρακτηριστικά της πάθησης, εκ των οποίων όλα προκαλούνται από ένα συγκεκριμένο γονίδιο. [17]



Εικόνα 4: Γενετικές αλλοιώσεις σε κύριες βασικές οδούς, τροποποιημένες στο γλοιοβλάστωμα. [15]

Σύμβολο γονιδίου	Όνομα γονιδίου	Λειτουργία της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης	Σημείο μετάλλαξης (%)
EGFR	Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα	Ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων	14–15
ERBB2	Ομόλογο ιογενούς ογκογονιδίου V-erb-b2-ερυθροβλαστικής	Ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων	0–7
IDH1	Ισοκυτρική αφυδρογονάση 1	Παραγωγή NADPH	12–20
NF1	Νευροϊβρωμίνη 1	Ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων	15–17
PIK3CA	Καταλυτικό άλφα φωσφοϊνοσιτιδ-3-κινάσης	Ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων	7–10
PIK3R1	Ρυθμιστικό της φωσφοϊνοσιτιδ-3-κινάσης 1	Ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων	7–8
PTEN	Ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης	Ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων	24–37
PTPRD	Υποδοχέας πρωτεϊνικής φωσφατάσης τυροσίνης τύπου D	Ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων	0–6
RB1	Ρετινοβλάστωμα 1	Ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου	8–13
TP53	Πρωτεΐνη όγκου p53	Απόπτωση	31–38

Εικόνα 5: Τα συχνότερα μεταλλάσσόμενα γονίδια στο γλοιοβλάστωμα.

1.3.1.2 Μονοπάτι RTK

Η πιο συχνά επηρεαζόμενη οδός στο γλοιοβλάστωμα, περιλαμβάνει τον υποδοχέα κινάσεων της τυροσίνης (RTKs)- υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας που δεσμεύει αυξητικούς παράγοντες (GFs). Η αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιείται μέσω διασταύρωσης, προκαλώντας τον διμερισμό των δυο πλησιέστερων υποδοχέων και τη μετατόπιση του προσανατολισμού. Αυτή η μεταβολή ενεργοποιεί τη λειτουργία της κινάσης των RTK επιτρέποντας την διασταυρωμένη- φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων τυροσίνης για την έναρξη επόμενων οδών σηματοδότησης. Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR σηματοδοτεί τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση όλων των τύπων κυττάρου του νευρικού συστήματος. Στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, η σηματοδότησή του μπορεί να ενεργοποιηθεί με την υπερέκφραση του υποδοχέα ή του συνδέτη του, με ενίσχυση της περιοχής EGFR , και/ή μετάλλαξη υποδοχέα. Κάθε συνδυασμός των παραπάνω μεταλλάξεων μπορεί να συνυπάρχει στην ίδια κακοήθεια. Η πλειονότητα των μεταλλαγμένων κυττάρων του γλοιοβλαστώματος που υπερεκφράζουν τον EGFR υποδοχέα, φέρει επίσης μετάλλαξη του γονιδίου *EGFR*. Η συχνότερη μετάλλαξη είναι η *EGFRnIII*, που αντιστοιχεί στην απώλεια των εξονίων 2-7, όπου διαγράφονται 267 αμινοξέα στον εξωκυτταριο χώρο, καθιστώντας έτσι τον υποδοχέα ανεξάρτητο και ιδιοσυστατικά ενεργό, αφού δεν απαιτείται πια ο συνδέτης EGF για να συνδεθεί μαζί του. [25] Η μετάλλαξη δεν παρατηρείται σε υγιείς ιστούς και σε δευτερογενή γλοιοβλάστωμα. [15]

1.3.1.3 Μονοπάτι Ras

Άλλη οδός που τροποποιείται συχνά στο γλοιοβλάστωμα είναι το μονοπάτι Ras, με τη δραστηριότητά του, να αυξάνεται στους περισσότερους αντίστοιχους όγκους. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις Ras είναι σπάνιες σε αυτό τον πληθυσμό. Κατά την απουσία μεταλλαγμένου Ras, αυτά τα υψηλά επίπεδα, μπορούν να αποδοθούν σε αυξημένη ενεργοποίηση προγενέστερων παραγόντων, όπως ο EGFR παράγοντας. Η Ras είναι πρωτεΐνη που δεσμεύει τη γουανωσίνη (G πρωτεΐνη) που ανακυκλώνεται μέσω μιας ανενεργής κατάστασης, όταν συνδέεται με το GDP και μιας ενεργής μορφής όταν συνδέεται με το GTP. Κατά συνέπεια, έχει διττό ρόλο. Η ενεργή πρωτεΐνη προάγει την εξέλιξη (μέσω του κυτταρικού κύκλου), την επιβίωση, και τη μετανάστευση μέσω μιας ακολουθίας επακόλουθων παραγόντων. Το μονοπάτι φωσφατιδυλινοσιτόλη-4,5-διφωσφορική 3-κινάση/ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης/ κινάση σερίνης θρεονίνης Akt (PI3K/PTEN/Akt) ξεκινά επίσης από αλληλεπιδράσεις υποδοχέα αυξητικού παράγοντα. Κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα, το PI3K έλκεται στην κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του δευτερεύοντος αγγελιοφόρου φωσφοτιδυλινοσιτόλη (3,4,5)- τριφωσφορικού (PIP3). Το Akt είναι μεταγενέστερος παράγοντας του PIP3 που οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστολή της απόπτωσης. Επίσης, το *PTEN* λειτουργεί συνήθως ως αρνητικός ρυθμιστής του PI3K και τερματίζει το σήμα PIP3. Στο γλοιοβλάστωμα η ογκοκατασταλτική λειτουργία του PTEN αδρανοποιείται συχνά, με αποτέλεσμα την αυξημένη διαθεσιμότητα PI3K. Αυτό πραγματοποιείται είτε λόγω απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH) είτε λόγω μετάλλαξης επαγόμενη από συστατική ενεργοποίηση του PI3K. Η μη αντιδραστική σηματοδότηση διά της οδού PI3K, φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεια του γλοιοβλαστώματος. [15]

1.3.1.4 Μονοπάτι Ρετινοβλαστώματος

Η οδός του ρετινοβλαστώματος (RB) παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο. Σε αδρανή κύτταρα, το *RB* είναι υποφωσφορυλιωμένο και συνδέεται ενεργά με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F. Αυτή η δέσμευση εμποδίζει τη μεταγραφή γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη μίτωση και γίνεται στάση του κυτταρικού κύκλου στο G1/S σημείο. Σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, τα GFs επάγουν το σχηματισμό της D1 κυκλίνης και την ενεργοποίηση των εξαρτημένων από κυκλίνη συμπλόκων κινάσεων-κυκλίνης (CDK – κυκλίνης). Αφού αυτά τα σύμπλοκα φωσφορυλιώσουν το ρετινοβλάστωμα, απελευθερώνεται ο μεταγραφικός παράγοντας E2F. Με τη σειρά του, ο παράγοντας επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που προάγουν την σύνθεση DNA και κατά συνέπεια πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα. Η αρνητική ρύθμιση αυτής της οδού, μπορεί να πραγματοποιηθεί με πρωτεΐνες αναστολέα κινάσης εξαρτημένων από κυκλίνες (CDKN). Η αλλαγή της οδού RB οδηγεί σε σημαντικές ανισορροπίες του κυτταρικού κύκλου.

1.3.1.5 Μονοπάτι TP53

Άλλη οδός που παρεμβαίνει στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου είναι η οδός TP53, καθώς επίσης και στη ρύθμιση σφαλμάτων στο DNA, τον κυτταρικό θάνατο και τη διαφοροποίηση. Αναλυτικότερα, όταν υπάρχει βλάβη στο DNA, κάθε υγιές κύτταρο αναγκάζεται να ενεργοποιήσει το μονοπάτι TP53. Αρχικά το *TP53* αυξάνει τη μεταγραφή του *p21*, ενός αναστολέα κυκλινεξαρτώντων κινάσεων που δεσμεύει τις πρωτεΐνες κυκλίνης και αναστέλλει τις λειτουργίες τους για να σταματήσει την εξέλιξη μέσω της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Εάν η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη, τότε το TP53 θα προχωρήσει σε κυτταρικό θάνατο. Η πορεία TP53 έχει αρνητικούς αναδραστικούς κύκλους. Έτσι το μονοπάτι επάγει τη μεταγραφή του πρωτοογκογονιδίου *MDM2*, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στην αποικοδόμηση του *TP53* και την πρόληψη της επιδιόρθωσης του DNA. Για τη διατήρηση της δραστηριότητας του *TP53*, το *CDKN2A-p14^{ARF}* αδρανοποιεί το *MDM2* μέσω αποικοδόμησης. Ο ρυθμιστής του *TP53* *MDM4* αδρανοποιεί το *TP53* μέσω πρόσδεσης του τομέα ενεργοποίησης της μεταγραφής. Στα ανθρώπινα γλοιώματα, οι μεταλλάξεις του TP53 είναι συχνά μεταλλάξεις λανθασμένης αλληλουχίας που στοχεύουν σε κρίσιμα για τη δέσμευση του DNA εξόνια. Περαιτέρω μεταβολές που παρατηρούνται στα γλοιοβλαστώματα, είναι η ενίσχυση του *MDM2*, η ενίσχυση του *MDM4* και η διαγραφή του *CDKN2A-p14^{ARF}*. [15]

Επί του παρόντος, δεν υπάρχει καθορισμένη ακολουθία γεγονότων που να οδηγεί οριστικά στην ανάπτυξη γλοιοβλαστώματος. Οποιοσδήποτε αριθμός ή συνδυασμός των παραπάνω, μπορεί να συμβάλλει στον σχηματισμό του GBM. Αν και τα παραπάνω μονοπάτια είναι καλά καθορισμένα, η πολυπλοκότητα του GBM ενισχύεται από υψηλά επίπεδα μεταβλητότητας τόσο μεταξύ διαφορετικών όγκων, όσο και εντός ενός μεμονωμένου όγκου. [15]

1.3.2 Θεραπευτική προσέγγιση γλοιοβλαστώματος

Οι θεραπευτικές επιλογές πρέπει να σταθμίζονται προσεκτικά, λαμβάνοντας υπόψη τη θέση και το μέγεθος του όγκου, τη βαθμολογία απόδοσης Karnofsky (KPS), την ηλικία, τις προηγούμενες θεραπείες, τους προγνωστικούς παράγοντες καθώς και τα πρότυπα υποτροπής. Υπάρχει ένα συγκεκριμένο θεραπευτικό πλάνο όσον αφορά την αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος. Η ιδανική θεραπεία περιλαμβάνει τη μέγιστη χειρουργική εκτομή

(όταν καθίσταται εφικτή), συνοδευόμενη από ακτινοθεραπεία (RT) και ταυτόχρονα χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη (TMZ). [5] Το πρωτόκολλο αυτό όρισε το πείραμα του Stupp [3], το οποίο απέδειξε ότι σε διάστημα επιβίωσης δύο ετών το ποσοστό επιβίωσης για ασθενείς που δέχτηκαν ακτινοθεραπεία συνδυαστικά με τεμοζολομίδη, ήταν 26,5% με ελάχιστη τοξικότητα, ενώ σε ασθενείς με ακτινοθεραπεία μόνο, μόλις 10,4%. Η τυχαιοποιημένη αυτή δοκιμή δεν περιλάμβανε ασθενείς μεγαλύτερους των 70 ετών. Για τους ασθενείς που υπερβαίνουν το 70^ο έτος της ηλικίας τους, το πρότυπο περίθαλψης βασίζεται στην υποκλασματική ακτινοθεραπεία και την τεμοζολομίδη -όποτε είναι εφικτό-, αλλά η επιλογή θεραπείας εξαρτάται από τη γενικότερη κατάσταση του ασθενούς. Το δε πείραμα, αποτέλεσε σημαντικό παράγοντα για τη μελλοντική θεραπεία του γλοιοβλαστώματος.

1.3.2.1 Χειρουργική επέμβαση

Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί το πρωταρχικό στάδιο της θεραπείας του γλοιοβλαστώματος. Για την υλοποίηση του λαμβάνονται υπόψιν διάφορα προεγχειρητικά θέματα όπως οι κατάλληλες απεικονιστικές και λειτουργικές μελέτες, η νευροψυχολογική αξιολόγηση, το ιστορικό του ασθενούς και η χρήση κορτικοστεροειδών και αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Τα στεροειδή ελέγχουν το εγκεφαλικό οίδημα και τα συμπτώματα της ενδοκρανιακής υπέρτασης αφήνοντας έτσι περιθώριο για μεγαλύτερη και όσο το δυνατόν ασφαλέστερη χειρουργική εκτομή (EOR)- παράγοντα ισχυρά προγνωστικό για την έκβαση της θεραπείας. [5]

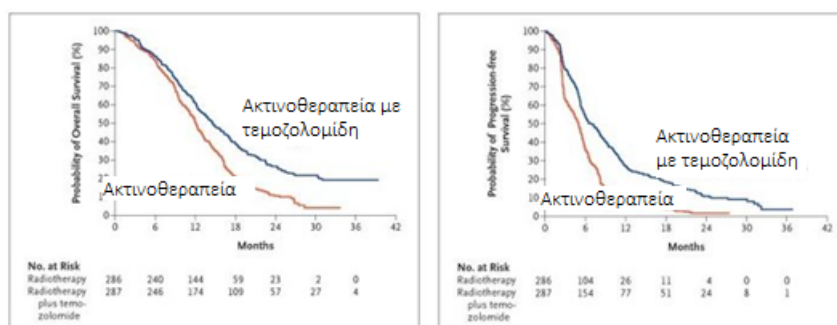
Η μέγιστη ασφαλής χειρουργική εκτομή είναι ζωτικής σημασίας για τον ασθενή. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τρόποι για την επίτευξή της. Για την οπτικοποίηση των ορίων του όγκου, χρησιμοποιούνται φθορίζουσες ουσίες με την κυρίαρχη να είναι το 5-αμινολεβουλινικό οξύ (5- ALA). Ο παράγοντας αυτός, εγκρίθηκε από τον FDA το 2017 και επιτρέπει τη διεγχειρητική απεικόνιση του κακοήθους γλοιώματος μέσω χειρουργικής επέμβασης κατευθυνόμενης από φθορισμό (FGS). Χορηγείται δια στόματος πριν το χειρουργείο και μεταβολίζεται σε πρωτοπορφυρίνη IX προκαλώντας φθορισμό στα μεταλλαγμένα κύτταρα. Η φύση αυτή του όγκου επιτρέπει στους χειρουργούς να επιτύχουν σημαντικά μεγαλύτερη εκτομή, σε σχέση με τη χρήση απλού λευκού φωτός κάτι που μπορεί να έχει αντίκτυπο στην επιβίωση. [28] Με ευαισθησία 91,4% και ειδικότητα 89,2%, ο παράγοντας αυτός, αυξάνει το ποσοστό ολικής εκτομής και το PFS σε τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές (65% έναντι 35%) καθώς και σε μελέτες παρατήρησης (από 25 σε 94,3%). Η φλουορεσκεΐνη είναι μια άλλη επιλογή, αλλά δεν έχει δοκιμαστεί σε ελεγχόμενες τυχαιοποιημένες μελέτες. Κατά τη χειρουργική εκτομή ανακουφίζονται παράλληλα και ασθενείς με εγκεφαλικό οίδημα και ενδοκρανιακή υπέρταση. [5]

1.3.2.2 Συμπληρωματική θεραπεία

Μετά το χειρουργείο, οι ασθενείς με γλοιοβλάστωμα ακολουθούν ένα πρωτόκολλο που περιλαμβάνει ταυτόχρονη θεραπεία με τεμοζολομίδη (TMZ) 75 mg/m² /το ημέρα για 6 εβδομάδες και ακτινοθεραπεία RT με ρυθμό 60 Gy σε 30 δόσεις των 2 Gy και στη συνέχεια

6 κύκλους συντήρησης με TMZ με 150-200 mg/m²/ ημέρα για τις πρώτες 5 ημέρες ενός κύκλου 28 ημερών –sdTMZ) . Οι συγγραφείς του QUANTEC τονίζουν ότι για τα περισσότερα γλοιώματα δεν υπάρχει κάποια κλινική ένδειξη που να υποστηρίζει τμηματική ακτινοβολήση υψηλότερη των 60 Gy, ενώ άλλα σχήματα ακτινοβολήσης έχουν διερευνηθεί χωρίς θεραπευτική αξία. Κατά την θεραπεία με ακτινοβολήση, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε κρίσιμα σημεία όπως τα οπτικά νεύρα, το οπτικό χίασμα και το εγκεφαλικό στέλεχος. Ο κίνδυνος νέκρωσης με ακτινοβολία αυξάνεται με ταυτόχρονη χημειοθεραπεία και μεγαλύτερο όγκο ακτινοβολημένου εγκεφάλου. [5]

Η τεμοζολομίδη είναι χημειοθεραπευτικό φάρμακο που λαμβάνεται από το στόμα και επάγει τη μεθυλίωση του DNA και την κυτταροτοξικότητα του γλοιώματος αφού διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο. [5] Αναλυτικότερα, το TMZ σχηματίζει το ενεργό ενδιάμεσο MTIC (methyl-triazene-1-yl)-imidazole-4-carboxamide), το οποίο μπορεί να μεθυλιώσει το 6-OH στη γουανίνη. Αυτή η μεθυλίωση προκαλεί λανθασμένη σύνδεση της γουανίνης με τη θυμίνη, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί θραύση στο διπλό κλώνο του DNA και τελικά κυτταρική απόπτωση. [15] Λόγω της μεθυλίωσης του προαγωγέα γονιδίου MGMT, η έκφρασή του μειώνεται και τα προϊόντα O6-methylguanine DNA δεν επιδιορθώνονται από μηχανισμούς του. [27] Επιπλέον, η τεμοζολομίδη δεν απαιτεί ηπατικό μεταβολισμό για να ενεργοποιηθεί, διαπερνά με ευκολία τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και φέρει γραμμική φαρμακοκινητική με εξαιρετική βιοδιαθεσιμότητα. Ωστόσο, ασθενείς αναφέρουν διάφορες λοιμώξεις, αιματολογικές επιπλοκές και κόπωση από τη χρήση της. [5] Πυκνότερες δόσεις τεμοζολομίδης δεν διέφεραν σημαντικά από τις καθορισμένες και για αυτό δεν χρησιμοποιούνται, ενώ παρατεταμένες θεραπείες με τεμοζολομίδη πέραν των 6 κύκλων αύξησαν ελάχιστα τα PFS και OS .



Εικόνα 6: Η σε βάθος χρόνου αύξηση της συνολικής επιβίωσης (αριστερά) και της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη (δεξιά) της τεμοζολομίδης συνδυαστικά με την ακτινοβολήση, σε σχέση με την ακτινοβολήση μόνο. [3]

1.3.2.3 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Ο κυριότερος λόγος που οι περισσότερες ουσίες δεν ανταποκρίνονται ικανά στην καταπολέμηση του γλοιοβλαστώματος είναι η ύπαρξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (Blood-Brain Barrier- BBB) είναι το εξειδικευμένο σύστημα των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου, το οποίο προστατεύει τον εγκέφαλο από τοξικές ουσίες στο αίμα, τροφοδοτεί τους εγκεφαλικούς ιστούς με θρεπτικά συστατικά και φιλτράρει επιβλαβείς ενώσεις από τον εγκέφαλο πίσω στην κυκλοφορία του αίματος. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων αυτών και άλλων συστατικών της νευροαγγειακής μονάδας, διασφαλίζει τη σωστή λειτουργία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Η μεταφορά διαμέσου του, περιορίζεται αυστηρά τόσο μέσω φυσικών (σφιχτών συνδέσμων) όσο και μεταβολικών φραγμών (ένζυμα, διαφορετικά συστήματα μεταφοράς). [56] Ως αποτέλεσμα της περιορισμένης διαπερατότητας, ο φραγμός είναι ένας σημαντικός αμυντικός μηχανισμός για την υγεία του εγκεφάλου και του ΚΝΣ.

1.3.3 Υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα

Όταν ο όγκος υποτροπιάσει, οι θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν επανεγχείρηση, επανακινοβόληση, υποστηρικτική φροντίδα και συνδυαστική θεραπεία. Ενώ κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι το όφελος της επανεπέμβασης παραμένει ασαφές, υπάρχουν άλλες που απέδειξαν ότι το κλινικό όφελος ενός επαναληπτικού χειρουργείου με μέγιστη χειρουργική εκτομή είναι η βελτιωμένη ολική επιβίωση, ακόμα και σε ασθενείς με ολική εκτομή κατά την πρώτη επέμβαση. Ο καλύτερος προγνωστικός παράγοντας από τον οποίο εξαρτάται το όφελος επιβίωσης και η έκβαση του επαναληπτικού χειρουργείου είναι η βαθμολογία κατά Karnofsky ($KPS \geq 70$), που σχετίζεται με βελτιωμένο PFS και OS. [5] Σημαντικός παράγοντας για την έκβαση της συνδυασμένης θεραπείας είναι επίσης η ηλικία του ασθενούς, με την ιδανική να είναι κάτω των 60 ετών. Όπως προαναφέρθηκε, ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δίνεται στις εύγλωττες περιοχές του εγκεφάλου για την αποφυγή τυχόν νευρολογικών ελλειμμάτων. [5]

Όσον αφορά την ακτινοβόληση, εφόσον δεν υπάρχει τυπική θεραπευτική προσέγγιση, οι τεχνικές περιλαμβάνουν βραχυθεραπεία, κλασματοποιημένη στερεοτακτική ακτινοθεραπεία (FSRT), ακτινοχειρουργική και σύμμορφη ή ρυθμισμένης έντασης ακτινοθεραπεία, με ή χωρίς νέους συστημικούς παράγοντες. Η σύγκριση αυτών των μελετών παραμένει δύσκολη, καθώς αυτές οι μελέτες αποτελούνται από διαφορετικά τελικά σημεία, ετερογενή δείγματα ενώ ορισμένοι ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία στην πρώτη, άλλοι στη δεύτερη και άλλοι στην τρίτη υποτροπή. Η παθοφυσιολογία της επαναληπτικής ακτινοβόλησης δεν είναι ακόμα εντελώς κατανοητή, αλλά υπάρχουν διάφορα στοιχεία που μπορούν να καθοδηγήσουν τη θεραπεία των ασθενών με υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα. [5] Οι Mayer και Sminia εκτίμησαν μεταξύ 21 μελετών ότι η συχνότητα της τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της ραδιονέκρωσης, μπορεί να μην έχει αναφερθεί, καθώς είναι πιθανό να καταγράφεται μόνο συμπτωματική νέκρωση, με τον κύριο παράγοντά της να είναι η συνολική δόση που λαμβάνεται. Μάλιστα, συνόψισαν τη θεωρία τους στο ότι η συχνότητα της νέκρωσης δεν αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό μέχρι η συνολική αθροιστική δόση να φθάσει τα 100 Gy. Σε ασθενείς μικρότερης ηλικίας με καλό PS η επαναακτινοβόληση με στερεοτακτική ακτινοχειρουργική, υποκλασματική στερεοτακτική ακτινοθεραπεία, HFSRT και SRS για υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την υποστηρικτική φροντίδα ή τη συστημική θεραπεία μεμονωμένα. [5]

1.3.4 Μεταστάσεις

Σύμφωνα με τους Welch και Hurst, οι ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα πλέον καρκινικά μεταστατικά κύτταρα είναι: 1) κινητικότητα και εισβολή, 2) υψηλή και αναστρέψιμη πλαστικότητα βλαστικών κυττάρων, 3) ικανότητα αποικισμού των δευτερογενών ιστών (πολλαπλασιασμός), και 4) ικανότητα ρύθμισης του τοπικού μεταστατικού μικροπεριβάλλοντος (s). Επισημαίνουν επίσης, ότι ένας καλοήθης όγκος διαφέρει από ένα κακοήγη μόνο στην εισβολή. Ωστόσο, η εισβολή δεν είναι επαρκής για την ανάπτυξη μεταστάσεων. Κατά την εισβολή, τα κύτταρα αυτά εμπλέκονται σε διαδοχικές διαδικασίες για την ανάπτυξη της μετάστασης. Τέτοιες διεργασίες περιλαμβάνουν την ενδοαγγείωση, την επιβίωση ως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) στα σωματικά υγρά, εξαγγείωση και κυτταρική αναπνοή. Έτσι σχηματίζεται μικρομεταστατικός όγκος και τελικά αποικισμός στο δευτερογενές όργανο. Κάποια κύτταρα μπορούν να μετακινούνται κατά μήκος των νεύρων και στον εγκέφαλο κατά μήκος των ινών μυελίνης. [13]

Το μικροπεριβάλλον του εγκεφαλικού όγκου, περιλαμβάνει διάφορα καρκινικά κύτταρα καθώς και ποικίλους υποτύπους μη καρκινικών στρωματικών κυττάρων, τα οποία υπάρχουν υπό φυσιολογικές συνθήκες στον εγκέφαλο, όπως αστροκύτταρα, μικρογλοία και νευρώνες ή υφίστανται διήθηση κατά την εξέλιξη του όγκου (μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα). Έτσι, τα λανθάνοντα βλαστικά καρκινικά κύτταρα dCSCs διάφορων κακοηθειών όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου ή το μελάνωμα μετασχηματίζονται σε μεταστατικά καρκινικά βλαστοκύτταρα mCSCs και δημιουργούν αποικίες στον εγκέφαλο καθιστώντας εκεί τις κόγχες τους. Αντίστροφα, τα λανθάνοντα βλαστικά καρκινικά γλοία κύτταρα dGSCs στεγάζονται υπό τις προστατευμένες τους θέσεις, αλλά πολλαπλασιάζονται και εισβάλλουν σε εξωγενή γεγονότα όπως, η χημειοθεραπεία, η ακτινοβολία, η υποξία και τα στοιχεία του ενδογενούς μικροπεριβάλλοντος. Η σηματοδότηση της κυτοκίνης ενεργοποιεί τον μετασχηματισμό από επιθηλιακά προς μεσεγχυματικά, που συνδέεται άμεσα με το σχηματισμό των λανθανόντων καρκινικών βλαστοκυττάρων προς μεταστατικά καρκινικά βλαστοκύτταρα. [13]

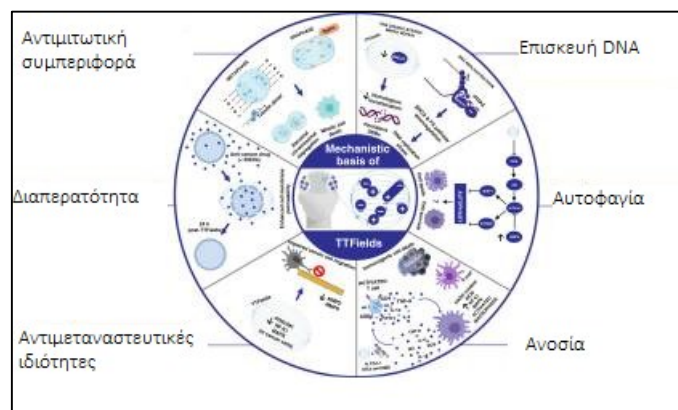
1.3.5 Εναλλακτικές μέθοδοι θεραπείας

Εναλλακτικές μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες για τη θεραπεία ή τη διασφάλιση της ποιοτικότερης ζωής για ασθενείς με γλοιοβλάστωμα. Όπως προαναφέρθηκε η ετερογένεια των γλοιωμάτων, μορφολογική και γενετική, καθώς και η θέση που εμφανίζονται, καθιστά δύσκολη τη διέλευση των μορίων από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και άρα την επιλογή θεραπείας τους. Επιπλέον, οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα δραστηριότητας MGMT δεν έχουν αποτέλεσμα στη θεραπεία με τεμοζολομίδη, ενώ ακόμη και ο προσδιορισμός της κατάστασης μεθυλίωσης του προαγωγέα MGMT δεν εγγυάται ότι οι ασθενείς θα έχουν σιγουρά καλή έκβαση με αυτό το χημειοθεραπευτικό. Καθίσταται σαφές λοιπόν, ότι δεν υπάρχει πάντα συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης αυτού του γονιδίου και την έκφραση της πρωτεΐνης που το κωδικοποιεί και

πρέπει νέες μελέτες να υποδείξουν νέες θεραπείες με βάση πιθανόν διαφορετικές οδούς θεραπείας. Πλήθος ουσιών όπως αναστολείς των υποδοχέων ανάπτυξης παραγόντων συνδυαστικά ή μεμονωμένα, και εξωτερικών μηχανισμών όπως τα πεδία θεραπείας όγκου (TTFields), ερευνηθήκαν, ενώ κάποια χρησιμοποιούνται πλέον σαν θεραπεία δεύτερης γραμμής. Επιπλέον, παρέχονται ολόένα και περισσότερες αναφορές σχετικά με φυτικές θεραπείες σε διάφορους όγκους, με την κατεύθυνση αυτή να είναι ακόμα αμφισβητήσιμη αλλά να μην έχει διερευνηθεί εις βάθος.

1.3.5.1 Πεδία Θεραπείας όγκου (TTFields)

Η προσθήκη πεδίων για τη θεραπεία του όγκου (TTFields) αποτελεί μια σύγχρονη προσέγγιση κατά την οποία τα εναλλασσόμενα ηλεκτρικά πεδία ασκούν βιοφυσική δύναμη σε φορτισμένα δίπολα στην προκαθορισμένη θεραπεία. Τα πεδία αυτά δείχνουν να αυξάνουν την επιβίωση σε πρόσφατα διαγνωσμένους ασθενείς, σε ασθενείς με υποτροπές και μεσοθελίωμα. Φαίνεται πως σχετίζονται με ένα ευρύ φάσμα ενδοκυττάρων μηχανισμών που καταπολεμούν έμμεσα την κακοήθεια. Συγκεκριμένα, εμφανίζουν αντιμιτωτική και αντιμεταναστευτική συμπεριφορά, δηλαδή ενεργοποιούν την αυτοφαγία και την αντινεοπλασματική ανοσία, ενώ επιδιορθώνουν το DNA (εικόνα 7). Το κυριότερο αρνητικό τους είναι η δερματίτιδα, στο σημείο τοποθέτησης του μηχανισμού, η οποία προκύπτει από την παρατεταμένη έκθεση σε κόλλα, υδρογέλες ή ιδρώτα, ακόμα και συνδυασμό αυτών. Το πιο διαδεδομένο σύστημα παροχής τέτοιων πεδίων είναι το Optune (Novocure™), και αποτελείται από τέσσερις συστοιχίες μετατροπών, μια γεννήτρια πεδίου και μια πηγή ισχύος. [11]



Εικόνα 7: Οι θεραπευτικές ιδιότητες των πεδίων (TTFields) για τη θεραπεία όγκων. [11]

1.3.5.2 Καρμουστίνη

Η καρμουστίνη είναι όπως και η τεμοζολομίδη, ένας αλκυλιωτικός παράγοντας που λειτουργεί ως προφάρμακο. Το Gliadel wafer είναι πολυμερές εμφύτευμα, με εμπορική ονομασία BiCNU που περιέχει 3.85% καρμουστίνη και τοποθετείται τοπικά σε εγχειρημένους ασθενείς. Χαρακτηριστικό του είναι ότι εκμεταλλεύεται μια αδυναμία στην επιδιορθωτική λειτουργία όταν χορηγείται σε ασθενείς με ανενεργό MGMT. Σε αντίθεση με

την τεμοζολομίδη, η καρμουστίνη κατά την ενεργοποίηση της, σχηματίζει ενεργούς μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες αυτοί είναι υπεύθυνοι για να αλκυλιώσουν το DNA και να διασυνδέσουν DNA και RNA, ενώ ευθύνονται και για την καρβαμυλίωση πρωτεϊνών. Τελικά, αυτή η νιτροζουρία αναστέλλει τη σύνθεση DNA, την παραγωγή RNA και την μετάφραση. Επίσης, συγκεκριμένα η καρβαμυλίωση μπορεί να αναστείλει τις ενζυμικές διεργασίες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση των κυττάρων. [15] Έπειτα από πρόσφατες μελέτες, αποδείχθηκε ότι ασθενείς με μεθυλιωμένο *MGMT* που έλαβαν θεραπεία με κάψουλες καρμουστίνης, συνδυασμένη με ακτινοθεραπεία και τεμοζολομίδη, απέκτησαν σημαντικά βελτιωμένη συνολική επιβίωση και επιβίωση χωρίς εξέλιξη, συγκριτικά με ασθενείς με ενεργό *MGMT*. [15] Άλλες νιτροζουρίες μελετήθηκαν επίσης, όπως η λομουστίνη (CCNU), νιμουστίνη (ACNU) και η φωτεμουστίνη και έδειξαν συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ τους στη μονοθεραπεία για υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα. Ωστόσο, παρουσιάζουν σημαντική τοξικότητα στο αίμα και ο συνδυασμός τους με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες δείχνει αβέβαιος.

1.3.5.3 Bevacizumab

Το bevacizumab (BVZ) είναι μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με τον VEGF-A και αναστέλλει τη βιολογική του δράση αφού αποτρέπει την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα VEGF. Τελικά, περιορίζεται ο πολλαπλασιασμός στο ενδοθήλιο και η αγγειακή ανάπτυξη του όγκου. Πολλαπλές δοκιμές έδειξαν ότι το BVZ συνδυασμένο με ακτινοβολία και χορήγηση TMZ για τη θεραπεία του νεοδιαγνωσμένου γλοιοβλαστώματος, οδήγησε σε βελτιωμένο PFS, χωρίς ωστόσο η ποιότητα ζωής των ασθενών να βελτιωθεί σημαντικά. Για το λόγο αυτό είναι εγκεκριμένο πλέον φάρμακο από τον FDA, και χρησιμοποιείται στην καταπολέμηση του γλοιοβλαστώματος.

1.3.5.4 Φυτικές ενώσεις

Ένα πεδίο, όχι και τόσο καλά μελετημένο, όσον αφορά την πιθανή χρήση του σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος είναι αυτό των φυσικών εκχυλισμάτων ή ουσιών. Τέτοιες ουσίες έχουν δοκιμαστεί σε διάφορες κλινικές μελέτες. Η τοξικότητα και η αποτυχία των κλασικών αντικαρκινικών φαρμάκων να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, σε συνδυασμό με την εγγενή αντίσταση των βλαστοκυττάρων γλοιοβλαστώματος στη χημειοακτινοβολία, οδήγησαν σε φυτικά σκευάσματα ή ουσίες. Συνδυασμένες ή όχι με τα ήδη καθορισμένα θεραπευτικά μέσα, οι ουσίες αυτές εμφάνισαν πλήθος πλεονεκτημάτων όταν χρησιμοποιήθηκαν σε μεταλλαγμένα γλοία κύτταρα. Στις διάφορες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, προέκυψαν κάποια ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Έντονο ενδιαφέρον αποτελεί η παρατήρηση ότι κάποιες φυτικές ουσίες εμφάνισαν έντονη κυτταροτοξικότητα και αποπτωτικά αποτελέσματα σε όγκους ανθεκτικούς σε τεμοζολομίδη και σε μεταλλαγμένες p53 καρκινικές σειρές.

Αρχικά, η ρεσβερατρόλη, η ικαρίνη, η κερσεντίνη, η πρόπολη, η Turmeric Force™ και η Withaferin A έδρασαν συνεργιστικά με την τεμοζολομίδη. Το αλκοολικό εκχύλισμα του *Zataria multiflora* και το Tet, αποδείχθηκε ότι αυξάνουν σημαντικά τη ραδιοευαισθησία σε

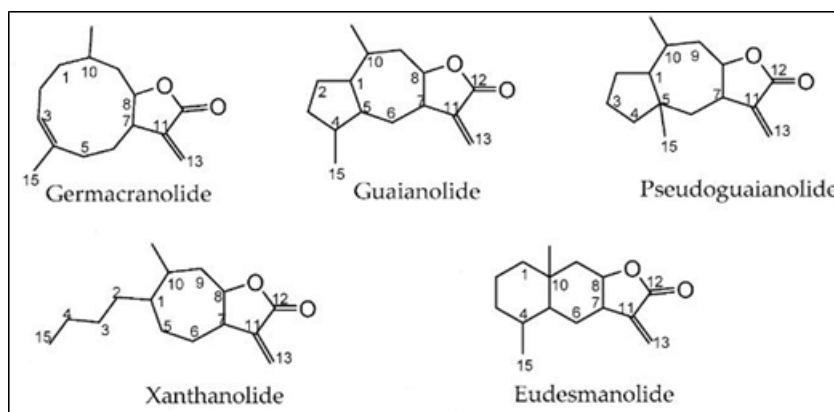
κυτταρικές γραμμές A172, U251 και U87. Μερικές ουσίες κατάφεραν να αναστείλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκάλεσαν απόπτωση όπως η βερβερίνη, το εκχύλισμα του γένους *Salvia menthaefolia* και η θυμοκινόνη, ακόμα και σε σειρές ανθεκτικές στο TMZ. Επιπλέον, η τοσεντανίνη του γένους *Melia tosendan* αύξησε την έκφραση του p53 και άρα μείωσε την αντίσταση σε τεμοζολομίδη. Από την άλλη, η διοσκινόνη του γένους *Diospyros tricolor*, το χλωροφορμικό εκχύλισμα της ρίζας *Angelica sinensis* και το βετουλινικό οξύ του *Betula rubescens* ακόμα και σε μεταλλαγμένες p53 σειρές επέφεραν σημαντική αύξηση στον κυτταρικό θάνατο. Άλλη μελέτη απέδειξε ότι η Withaferin A, η ardisinoloside 1, η βερβερίνη, η κουρκουμίνη και το χλωροφορμικό εκχύλισμα της ρίζας *Angelica sinensis* όχι απλά μείωσαν τη μάζα του συμπαγούς όγκου, αλλά προκάλεσαν αύξηση στο OS σε ένα ορθοτοπικό ζωικό μοντέλο με γλοιοβλάστωμα, υποδεικνύοντας ότι πιθανόν να μπορούν και να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Άλλες δράσεις των φυτικών ουσιών, είναι να μειώνουν αποτελεσματικά τον πληθυσμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Τέτοιες ουσίες είναι η κορεατική συνταγή MSC500, η κουρκουμίνη, η eckol και η ρεσβερατρόλη. [29]

Επιστημονικό όνομα	Ένωση	Λειτουργία
<i>Allium cepa</i>	Κερσετίνη	↓ Hsp27 and ↑ TMZ ευαισθησίας σε U87 και U251 σειρές γλοιοβλαστώματος
<i>Vitis vinifera</i>	Ρεσβερατρόλη	↓ MGMT έκφραση ↓ Nf-KB σηματοδότηση και ↑ TMZ ευαισθησίας σε T98G σειρές
<i>Vitis vinifera</i>	Ρεσβερατρόλη	↑ ROS έκφραση ↑ AMPK ενεργοποίηση, ↓ mTOR σηματοδότηση και ↑ TMZ ευαισθησία σε SHG44 σειρές
<i>Herba Epimedi</i>	Ικαρίνη	↓ Nf-KB σηματοδότηση, ↓ μετανάστευση
<i>Ficus carica</i>	Λατέξ	↑ TMZ ευαισθησία
<i>Apis mellifera</i>	Αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης	↓ Nf-KB σηματοδότηση and ↑ TMZ ευαισθησία σε U87 σειρές
<i>Apis mellifera</i>	Πρόπολη	↑ χημική ευαισθησία το TMZ
<i>Zataria multiflora</i>	Υδροαλκοολικό εκχύλισμα	↑ ακτινοευαισθησία σε A172 σειρές γλοιοβλαστώματος
<i>Stephania tetrandra</i> S. Moore	Τετραδρίνη	↑ G ₀ /G ₁ στάση κυτ. Κύκλου, ↑ ακτινοευαισθησία των U87 and U251 κυττάρων
<i>Withania somnifera</i>	Withaferin A	↑ TMZ ευαισθησία από ↓ MGMT έκφραση
<i>Curcuma longa</i>	Turmeric Force	↑ ευαισθησία TMZ σε U87 κυτταρικές σειρές

Εικόνα 8: Οι διάφορες λειτουργίες των φυτικών ουσιών σε σειρές γλοιοβλαστώματος. [29]

1.3.5.4.1 Σεσκιτερπενικές λακτόνες

Οι σεσκιτερπενικές λακτόνες (STLs) είναι μία από τις μεγαλύτερες γνωστές βιογενετικά ομοιογενείς ομάδες φυσικών προϊόντων, με περισσότερα από 11.000 γνωστά σεσκιτερπένια. Η ποσότητα και η ποικιλία τους αυτή, σχετίζεται με το ευρύ φάσμα των βιολογικών δραστηριοτήτων τους, καθιστώντας τις ένα πολύ σημαντικό αμυντικό εργαλείο για τους οργανισμούς που τις συνθέτουν. [33] Κατά την παραδοσιακή ιατρική τα βότανα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία συμπτωμάτων όπως ο πυρετός, διαταραχές της έμμηνου ρύσεως, κοιλική καντιντίαση, και ασθένειες του ήπατος, του έλκους, και των νεφρών. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν σαν ορεκτικό, τονωτικό και διουρητικό φάρμακο. [22,33] Πολλές από τις βιολογικές δραστηριότητες των πιο κοινών τύπων STL είναι γνωστό ότι διαμεσολαβούνται από ένα γενικό χημικό μηχανισμό που περιλαμβάνει την αλκυλίωση βιολογικών μακρομορίων κατά Michael. Σε μοριακό επίπεδο, οι σεσκιτερπενικές λακτόνες επηρεάζουν τρεις κυρίως οδούς φλεγμονώδους σήματος, τις NF-κΒ, MAPK και JAK-STAT των μη-ανοσοκυττάρων. [39] Κάποιες από αυτές περιλαμβάνουν την αύξηση των επιπέδων ROS, και την αναστολή του NF-κΒ. Η αύξηση των επιπέδων ROS αποσκοπεί στην επαγωγή του οξειδωτικού στρες και στην απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, η οποία με τη σειρά της αποσκοπεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άρα στην έναρξη της απόπτωσης. [34] Επιπλέον, είναι γνωστές κάποιες πολύ συγκεκριμένες δραστηριότητες που προκαλούνται από υποδοχείς λιγότερο συχνών τύπων σεσκιτερπενικών λακτονών. Δυστυχώς, η θεραπευτική τους χρήση ως καθαρές χημικές ουσίες, παρά την ευρεία χρήση τους με τη μορφή φυτών ή ακατέργαστων εκχυλισμάτων- περιορίζεται σε ελάχιστα παραδείγματα, γεγονός που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην έλλειψη γνώσης που κυριαρχεί όσον αφορά τις δομικές απαιτήσεις για επιλεκτικότητα σε σχέση με μια επιθυμητή βιολογική δραστηριότητα. Πολλά STL θα μπορούσαν να διαδραματίσουν πολύτιμο ρόλο ως δομές οδηγών σε νέους θεραπευτικούς παράγοντες. [33]



Εικόνα 9: Βασική χημική δομή από κάθε υποτύπο σεσκιτερπενικών λακτονών. [41]

1.4 Κνικίνη

Η κνικίνη είναι σεσκιτερπενική λακτόνη [21] που λαμβάνεται από τα περισσότερα φυτά του γένους *centaurea*, της οικογένειας *Asteraceae*. [20] Ανήκει στις γερμακρανολίδες και έχει χημικό τύπο $C_{20}H_{26}O_7$ και μοριακό βάρος 378,42 g/mol. [23] Η ένωση αυτή χαρακτηρίζεται από αντιφλεγμονώδεις, αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές, προ-αποπτωτικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες, και πιθανώς οι ιδιότητες των βοτάνων *centaurea* να οφείλονται σε αυτή. [31,24] Σαν σεσκιτερπενική λακτόνη, οι βιολογικές της δραστηριότητες έχει αναφερθεί ότι οφείλονται στην ύπαρξη της α-μεθυλένο-γ-λακτόνης που αντιδρά με βιολογικά πυρηνόφιλα, όπως υπολείμματα θειόλης μέσω προσθήκης τύπου Michael. [35,22] Ως εκ τούτου, η επίδραση της κνικίνης σε αντιφλεγμονώδεις στόχους, συνδέεται με ήπια τοξικότητα τόσο στα μακροφάγα όσο και στα χονδροκύτταρα. Η κνικίνη επιδράει αποτελεσματικότερα στον παράγοντα NF-κΒ παρά στα iNOS. [20]

Η δομή της αυτή, οφείλεται για την πλούσια κυτταροτοξική δράση της κνικίνης σε πλήθος μεταλλαγμένων κυττάρων. Μέχρι σήμερα η κνικίνη έχει δείξει θετικά αποτελέσματα σε διάφορες σειρές καρκινικών κυττάρων. Κάποιοι από αυτούς τους όγκους περιλαμβάνουν το αδеноκαρκίνωμα προστάτη PC-3 με $IC_{50}=31.5 \mu\text{g/ml}$ [22], το αδеноκαρκίνωμα μαστού MCF-7= $3.25 \mu\text{g/mL}$, το κακοήθες μελάνωμα SK-MEL= $5.3 \mu\text{g/mL}$, το καρκίνωμα πόρων μαστού BT-549= $6.9 \mu\text{g/mL}$, HeLa= $13.04 \mu\text{g/ml}$, A431= $6.75 \mu\text{g/ml}$ [20,22,35,39] κ.ο.κ. Μια σεσκιτερπενική λακτόνη που έχει δοκιμαστεί σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος είναι η κυναροπικρίνη. Κατάφερε μάλιστα να αυξήσει το επίπεδο των ROS τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις για μεγάλο και μικρό χρονικό διάστημα αντίστοιχα. Επίσης, προκάλεσε αποφωσφορυλίωση της ERK και μείωση της υπομονάδας NF-κΒ p65 και αποδείχθηκε ότι δρα συνεργιστικά με την τεμοζολομίδη. [34] Από τη διεθνή βιβλιογραφία δεν παρέχονται στοιχεία για την επίδραση της κνικίνης σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος έως σήμερα.



Εικόνα 10: Χαρακτηριστικά φυτά του γένους *Centaurea*. Αριστερά: *centaurea stoebe* , δεξιά : *centaurea cyanus*. [42,43]

1.5 Σκοπός

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της κυτταροτοξικής συμπεριφοράς της κνικίνης σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 και T98G.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, η T98G και η U87. Η κυτταρική καλλιέργεια των μεταλλαγμένων αυτών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό κλίβανο με ιδιαίτερα προσεγμένες συνθήκες. Αναλυτικότερα, ο κλίβανος είχε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή διοξειδίου του άνθρακα 5 % (v/v) για τη διατήρηση σταθερού pH. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την επώασή τους, είναι το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) εμπλουτισμένο με 1% αντιβιοτικούς παράγοντες στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη, καθώς και με 10% ορό FBS (Fetal Bovine Serum). Για την έκπλυση και τον καθαρισμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικών PBS (Phosphate buffer saline), ενώ για την αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα, θρυψίνη σε μορφή διαλύματος (θρυψίνη- EDTA in PBS). Οι

καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ειδικά τρυβλία που επιτρέπουν την εύκολη αποκόλληση των κυττάρων και η διαχείρισή τους πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (laminar flow hood) προς αποφυγή μολύνσεων.

U87: Προσφυόμενη κυτταρική σειρά με μορφολογία επιθηλιακών κυττάρων, προερχόμενη από όγκο αρρένος με μερική έκφραση MGMT και φυσιολογική έκφραση p53.

T98G: Προσφυόμενη κυτταρική σειρά με μορφολογία ινοβλάστη, που προέρχεται από εγκέφαλο γυναίκας ετών 61 και φέρει μεταλλαγμένο p53 και υψηλή έκφραση MGMT.

2.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Βασική αρχή για τη συντήρηση και εξέλιξη της πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η τεχνική των ανακαλλιεργιών. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά που η πληρότητα της κυτταρικής σειράς κατέφθανε στην προσκόλληση 80 με 90% της επιφάνειας του τρυβλίου. Για την αρχή της διαδικασίας τα προς χρήση υλικά θερμαίνονται σε ειδικά διαμορφωμένο υδατόλουτρο θερμοκρασίας δωματίου, ενώ παράλληλα τα φέροντα με κύτταρα τρυβλία μεταφέρονται στο θάλαμο. Με πλήρως στείρες συνθήκες ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού με πιπέτα Pasteur
- Έκπλυση με 2 ml PBS προς απομάκρυνση υπολειμμάτων ορού
- Αναρρόφηση των φωσφορικών με πιπέτα Pasteur
- Προσθήκη 800 μl θρυψίνης υπό μορφή διαλύματος ανά τρυβλίο των 100 mm για αποκόλληση των κυττάρων
- Επώαση στον κλίβανο για τουλάχιστον 3 min ώστε να δράσει η θρυψίνη
- Προσθήκη τουλάχιστον διπλάσιας ποσότητας θρεπτικής ουσίας για την απενεργοποίηση της δραστηριότητας της θρυψίνης
- Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε αποστειρωμένο σωλήνα χωρητικότητας 15 ml
- Προσθήκη 10 μl στην ειδική θέση της πλάκας neubauer
- Τοποθέτηση της πλάκας neubauer στην ειδική υποδοχή του αιματοκυττομέτρου για την κατά προσέγγιση μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στο δείγμα
- Επιλογή αναλογίας ανακαλλιέργειας με βάση την κυτταρική σειρά και το είδος των επερχόμενων πειραμάτων. Τα κύτταρα U87 πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα από τα T98G και συνήθως ανακαλλιεργούνται 1:2 ως 1:5. Τα δεύτερα καλλιεργούνται σαν 1:3 έως 1:10
- Προσθήκη της νέας ποσότητας κυττάρων σε νέα τρυβλία petri και εμπλουτισμός με νέο φρέσκο θρεπτικό υλικό έως ότου ο τελικός όγκος του τρυβλίου να φθάσει τα 10 ml.
- Επανατοποθέτηση στον κλίβανο για επώαση

2.3 Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται προσεγγιστικά με τη μέθοδο αιμοκυτταρόμετρο (neubauer)- μικροσκόπιο με x10 μεγέθυνση, ώστε να προσμετράται κάθε φορά η συγκέντρωση της καλλιέργειας σε κύτταρα ανά ml. Όπως προαναφέρθηκε, πριν από αυτό το στάδιο τα προς μέτρηση κύτταρα έχουν συλλεχθεί σαν εναιώρημα σε σωλήνα falcon των 15ml. Έπειτα, 10 μl από το εναιώρημα συλλέγονται (έπειτα από καλή ανάδευση του falcon) και τοποθετούνται στην ειδική εσοχή της πλάκας και έπειτα σκεπάζεται από την καλυπτρίδα. Η πλάκα ύστερα τοποθετείται σωστά στο μικροσκόπιο με την κατάλληλη μεγέθυνση.

Η πλάκα Neubauer είναι ειδικά σχεδιασμένη αντικειμενοφόρος πλάκα, με διαστάσεις 30x70x4mm. Η περιοχή μέτρησης αποτελείται από δύο λείες επιφάνειες, κάθε μία από τις οποίες φέρει ένα τετράγωνο πλέγμα το οποίο με τη σειρά του αποτελείται από εννέα κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Για την μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιούνται μόνο τα 4 γωνιακά τεταρτημόρια, κάθε ένα από τα οποία αποτελείται από 16 μικρά τετράγωνα. Από τα κύτταρα που εφάπτονται στην περίμετρο, μετρούμε μόνο εκείνα που υπάρχουν στην επάνω και στην αριστερή πλευρά του τετραγώνου. Μετά την συνολική καταμέτρηση σε κάθε τεταρτημόριο, ο μέσος όρος τους υπολογίζεται και πολλαπλασιάζεται με 10^4 και έτσι υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων σε 1 ml κυτταρικού εναιωρήματος.

2.4 Μέτρηση IC50 με χρωστική μικροσκοπίου κυανό του τρυπανίου (Trypan blue Exclusion Assay)

Η διαδικασία μέτρησης της κυτταροτοξικής επίδρασης της κνικίνης στις μεταλλαγμένες σειρές πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Στρώσιμο κυττάρων U87 και T98G σε μικροπλακίδια 12 ή 24ων φρεατίων με πυκνότητα 2×10^4 κύτταρα ανά θέση ή 10^4 αντίστοιχα
- Παραμονή στον κλίβανο για 24 ώρες
- Απόρριψη του θρεπτικού υλικού και άμεση προσθήκη νέου μαζί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις κνικίνης
- Παραμονή στον κλίβανο για 72 ώρες με σκοπό να δράσει σχολαστικά η ουσία
- Αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη και συλλογή του δείγματος σε 1,5 ml σωλήνα Eppendorf
- Λήψη 10 μl εναιωρήματος προς ισόποση ανάμιξη 1:1 με χρωστική trypan blue
- Επώαση για δύο λεπτά και μεταφορά 10 μl από το μίγμα σε πλάκα Neubauer
- Μέτρηση των κυττάρων σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία

Κατά τη διαδικασία αυτή, προσμετράται η ποσότητα ζώντων και νεκρών κυττάρων στην πλάκα Neubauer, και κατά συνέπεια και το ποσοστό βιωσιμότητας (IC50). Η χρωστική αυτή

βάφει αποτελεσματικά τα νεκρά κύτταρα και έτσι παρατηρούνται στο μικροσκόπιο. Τα υγιή κύτταρα δεν έχουν αλλοιωμένη μεμβράνη και η χρωστική δεν τα διαπερνά.

2.5 Κυτταρομετρία ροής

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της κυτταρομετρίας ροής, μια τεχνική που βασίζεται στην ανάλυση της σκέδασης του φωτός και στην εκπομπή φθορισμού από τα κύτταρα, όταν αυτά υφίστανται χρώση. Τα δεδομένα που λαμβάνονται από το κυτταρόμετρο αναπαρίστανται με τη μορφή ιστογραμμάτων, σκισσογραμμάτων και πυκνογραμμάτων. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του ποσοστού των κυττάρων στη φάση ηρεμίας (G0/G1), στη φάση αντιγραφής του DNA (S) και στη φάση μίτωσης (G2M), καθώς και των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση απόπτωσης (subG0/G1).

Τα κύτταρα επωάζονται με τη χρωστική ιωδιούχο προπίδιο (PI), το οποίο συνδέεται με το DNA και η ένταση του φθορισμού μετριέται με το περιεχόμενο του DNA. Η συγκεκριμένη ουσία έχει μέγιστο μήκος κύματος φθορισμού στα 610 nm όταν διεγείρεται με λείζερ 488 nm. Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε κυτταρόμετρο ροής της Cytognos S.L. . Αναλυτικότερα πραγματοποιείται η εξής πορεία:

- Στρώσιμο των κυττάρων σε μικροπλακίδια 12 φρεατίων σε συγκέντρωση 2×10^4 κύτταρα/φρεάτιο
- Επώαση για 24 ώρες
- Προσθήκη ποσοτήτων από τον κυτταροτοξικό παράγοντα ή συνδυασμούς αυτών
- Επώαση για 72 ώρες
- Θρυψινοποίηση και συλλογή σε σωληνάρια Eppendorf των 15 ml
- Προσθήκη 100 μl εναιωρήματος κυττάρων και 200 μl φθορίζουσας ουσίας σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα
- Ήπια ανάδευση του σωλήνα και επώαση για 10 λεπτά σε σκοτεινό περιβάλλον
- Ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο ροής

2.6 Προσομοίωση τραύματος δι' αμυχής (scratch wound healing assay)

Η μέθοδος της προσομοίωσης τραύματος δι' αμυχής ελέγχει την ικανότητα των κυτταροτοξικών παραγόντων να αναστέλλουν την μετανάστευση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, για τον έλεγχο της πιθανής μετανάστευσης δημιουργείται με αιχμηρό αποστειρωμένο αντικείμενο μια κάθετη γραμμή στη μέση του τρυβλίου σε κάθε φρεάτιο του μικροπλακιδίου. Το πείραμα ακολουθεί η προσθήκη του κυτταροτοξικού παράγοντα (κνικίνη) και παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες. Την παρατήρηση συνοδεύουν κατάλληλες φωτογραφίες σε $\times 10$ μεγέθυνση. Η διαδικασία που ακολουθείται στο εργαστήριο για κάθε μορφής κύτταρο περιλαμβάνει τα βήματα με την εξής σειρά:

- Στρώσιμο κυττάρων στο μικροπλακίδιο 6 φρεατίων σε συγκεντρώσεις 10^5 κύτταρα/φρεάτιο
- Επώαση για 24 ώρες
- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού , έκπλυση με 1 ml PBS
- Προσθήκη 2 ml/ φρεάτιο θρεπτικού εμπλουτισμένο με 1% FBS προς αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ώστε τα αποτελέσματα να αξιολογούν μόνο τη μεταναστευτική τους ικανότητα
- Επώαση για 24 ώρες στον κλίβανο (φάση starving)
- Αντικατάσταση θρεπτικού με νέο (1% FBS) και δημιουργία πληγής στον πάτο κάθε φρεατίου χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο tip πιπέτας 200 μl
- Προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων κνικίνης και λήψη φωτογραφιών ($t=0$)
- Λήψη φωτογραφιών στο ίδιο ακριβώς σημείο σε χρόνους $t=24$ h, $t=48$ h, $t=72$ h μετά τη δημιουργία πληγής
- Ανάλυση των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα ImageJ

2.7 Συνδυασμός με τεμοζολομίδη

Για τη μελέτη πιθανής ύπαρξης συνέργειας μεταξύ της κνικίνης και της τεμοζολομίδης, βρίσκεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων μέσω δοκιμασίας trypan blue exclusion assay. Ο δείκτης συνδυασμού (Combination Index, CI) των ουσιών προσδιορίζεται αυτόματα μέσω του προγράμματος CompuSyn. Οι τιμές μεγαλύτερες του 1 υποδεικνύουν ανταγωνιστική δράση, ενώ οι μικρότερες του 1 συνέργεια. Όταν $CI=1$, τότε η δράση είναι αθροιστική.

2.8 Στατιστική ανάλυση

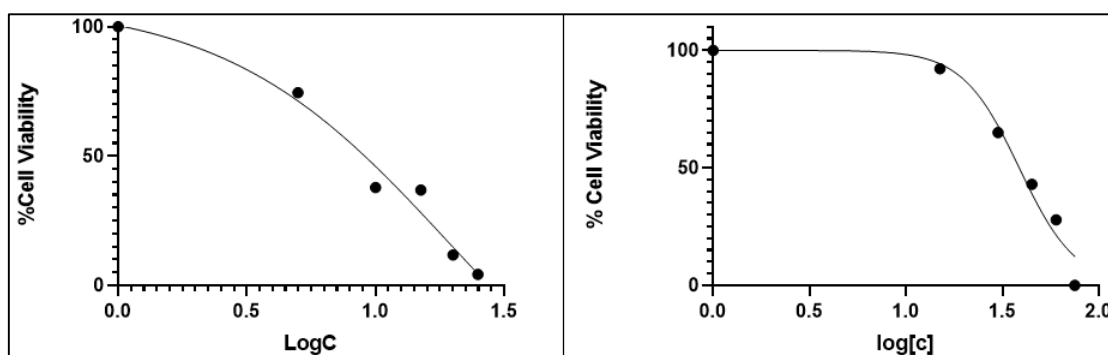
Τα δεδομένα στα γραφήματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα και αξιολογήθηκαν με Student's t-test. Ως επίπεδο σημαντικότητας των αναλύσεων καθορίστηκε το όριο μικρότερο ή ίσο του 0.05. Οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Graphpad Prism (v. 8.0.0, San Diego, California USA, Trial Version), ακολουθώντας μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης της κνικίνης στην επιβίωση των κυτταρικών σειρών U87 και T98G

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικής επίδρασης της κνικίνης, έγινε χρήση της χρωστικής μπλε του τρυπανίου. Πιο συγκεκριμένα, κάθε σειρά καρκινικών κυττάρων εκτέθηκε σε συγκεντρώσεις κνικίνης για 72 ώρες. Η σειρά U87 εκτέθηκε σε συγκεντρώσεις από 5 έως 25 μM ενώ η σειρά T98G σε συγκεντρώσεις από 15 έως 75 μM . Η μέση μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC_{50}) για τις δύο κυτταρικές σειρές βρέθηκε 19 μM για τα U87 και 38 μM για τα T98G κύτταρα (διάγραμμα 1).

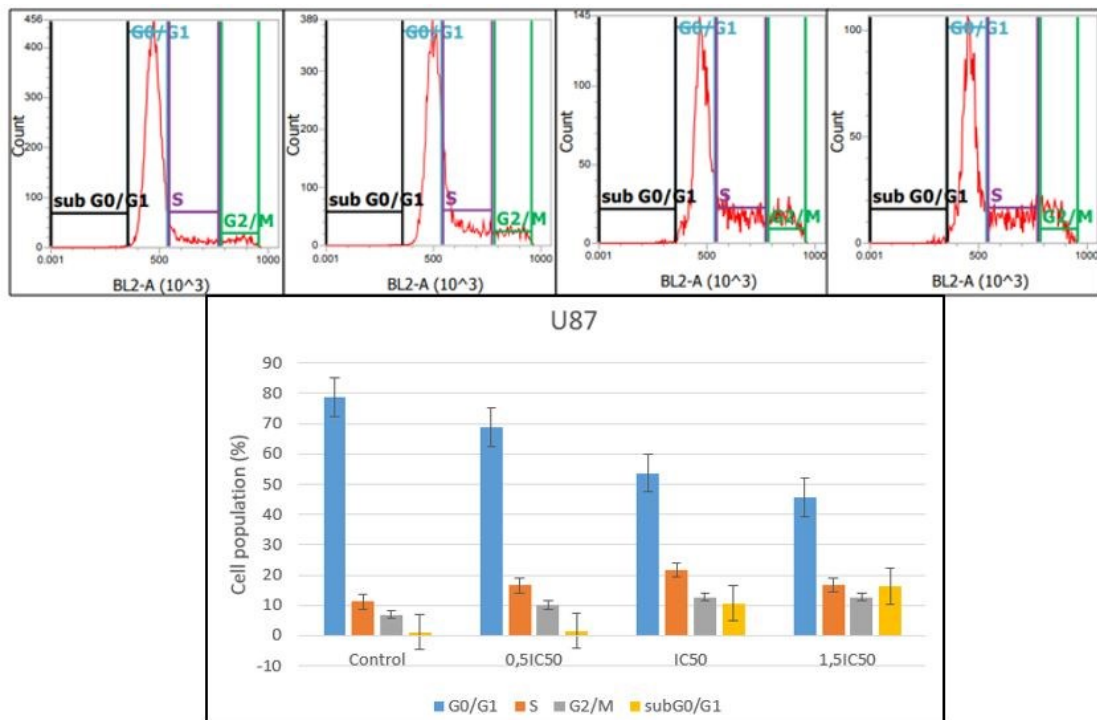
Διάγραμμα 1: Η επιβίωση των κυττάρων συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης. Τα κύτταρα U87 (αριστερή εικόνα) και τα κύτταρα T98G (δεξιά εικόνα). Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με trypan blue exclusion assay εις τριπλούν και οι τιμές εκφράστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση. Η τυπική απόκλιση για τις συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 20, 25 μ M της κνικίνης στα κύτταρα U87, βρέθηκε ± 43.52 , 14.24, 15.4, 8.99 και 2 αντίστοιχα. Για τις συγκεντρώσεις κνικίνης στα κύτταρα T98G η απόκλιση βρέθηκε ± 28.15 , 24.4, 20, 22 και 6.8 αντίστοιχα. Η ακριβής τιμή του ποσοστού επιβίωσης IC50 υπολογίστηκε με το μοντέλο μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης του λογισμικού Graphpad Prism.



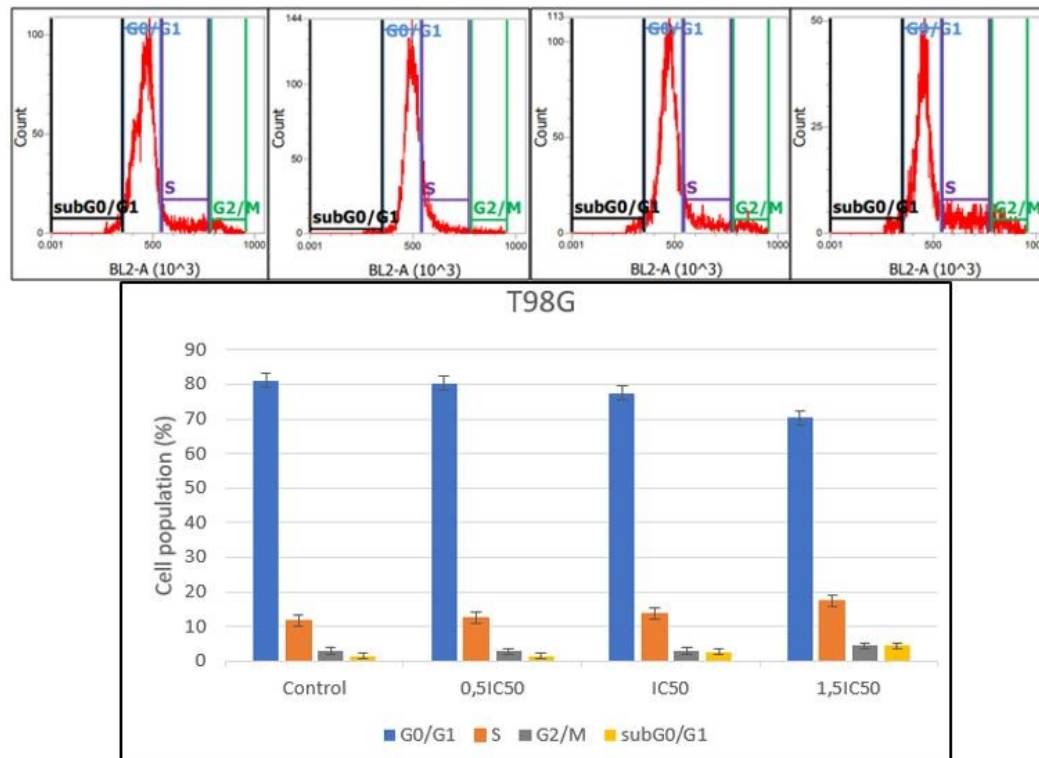
3.2 Διερεύνηση της επίδρασης της κνικίνης στον κυτταρικό κύκλο με κυτταρομετρία ροής.

Η κνικίνη μελετήθηκε για το αν προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest) με κυτταρομετρία ροής. Χρησιμοποιήθηκε βαφή χρώσης DNA ιωδιούχο προπίδιο (PI). Τοποθετήθηκαν συγκεντρώσεις κνικίνης 0.5 IC50, IC50 και 1.5 IC50 για κάθε κυτταρική σειρά, ενώ η σύγκριση έγινε με βάση το μάρτυρα (control). Συγκεκριμένα για την κυτταρική σειρά U87, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0, 9.5, 19 και 28.5 μ M ενώ για τη σειρά T98G χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0, 19, 38 και 57 μ M. Κάθε κυτταρική σειρά κατεργάστηκε για 72 ώρες με κνικίνη και έπειτα πραγματοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής. Από την ανάλυση κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω της κυτταρομετρίας ροής, παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της συγκέντρωσης της κνικίνης, αυξήθηκε η ποσοστιαία κατανομή των κυττάρων στις φάσεις S, G2/M και subG0/G1 για κάθε μεταλλαγμένη κυτταρική σειρά. Αναλυτικότερα, για την κυτταρική σειρά U87, ο μάρτυρας υπέδειξε ποσοστά φάσεων 78.8 ± 3 , 11.14 ± 2.2 , 6.97 ± 0.73 και 1.13 ± 0.63 (%) για τις φάσεις G0/G1, S, G2/M και subG0/G1, ενώ η κατανομή για τα φρεάτια με 28,5 μ M έδειξε 45.7 ± 13.3 , 16.5 ± 2.89 , 12.7 ± 1.84 και 16.3 ± 12.54 (%) για τις αντίστοιχες φάσεις (εικόνα 11). Παράλληλα, για την T98G κυτταρική σειρά, ο μάρτυρας βρέθηκε 81 ± 1.97 , 11.8 ± 1.49 , 2.92 ± 1.08 και 1.38 ± 0.68 (%) ενώ για τα τρυβλία με συγκεντρώσεις 57 μ M βρέθηκαν 70.3

± 2.1 , 17.2 ± 1.16 , 4.4 ± 0.8 και 4.5 ± 1.27 (%) για τις ίδιες φάσεις όπως περιγράφεται στην εικόνα 12.



Εικόνα 11: Επάνω: Αντιπροσωπευτική ανάλυση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου έπειτα από επίδραση συγκεντρώσεων κινκίνης 0, 9.5 , 19 και 28.5 μ M για την κυτταρική σειρά U87. Κάτω: Η ποσοστιαία κατανομή των κυττάρων ανά φάση, σε συγκεντρώσεις κινκίνης 0, 9.5 , 19 και 28.5 μ M για την κυτταρική σειρά U87. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα από τρία διαφορετικά πειράματα με * $p < 0,05$.

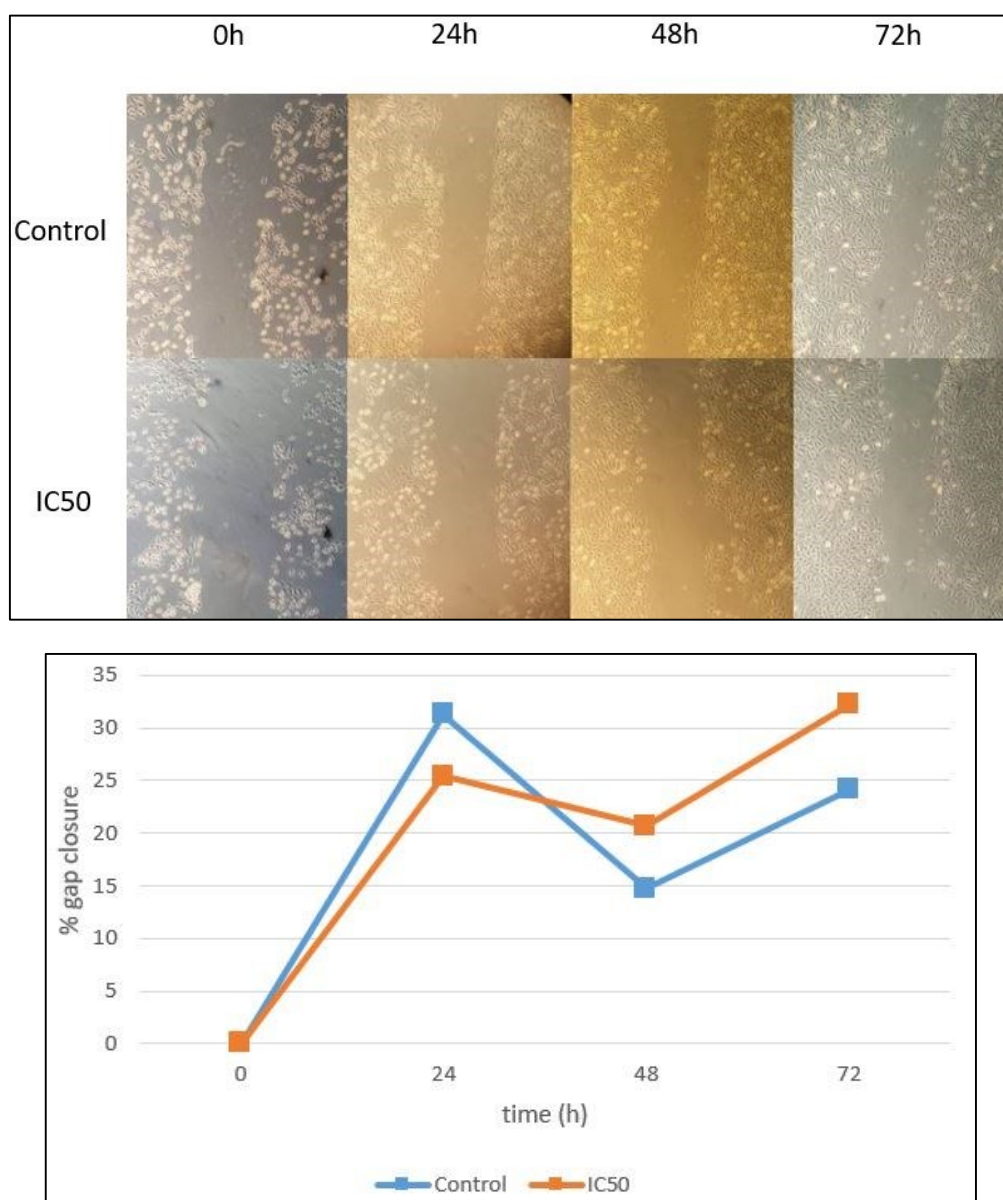


Εικόνα 12: Επάνω: Αντιπροσωπευτική ανάλυση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου έπειτα από επίδραση συγκεντρώσεων κνικίνης 0, 19, 38 και 57 μM για την κυτταρική σειρά T98G. Κάτω: Η ποσοστιαία κατανομή των κυττάρων ανά φάση, σε συγκεντρώσεις κνικίνης 0, 19, 38 και 57 μM για την κυτταρική σειρά T98G. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα από τρία διαφορετικά πειράματα με $*p < 0,05$.

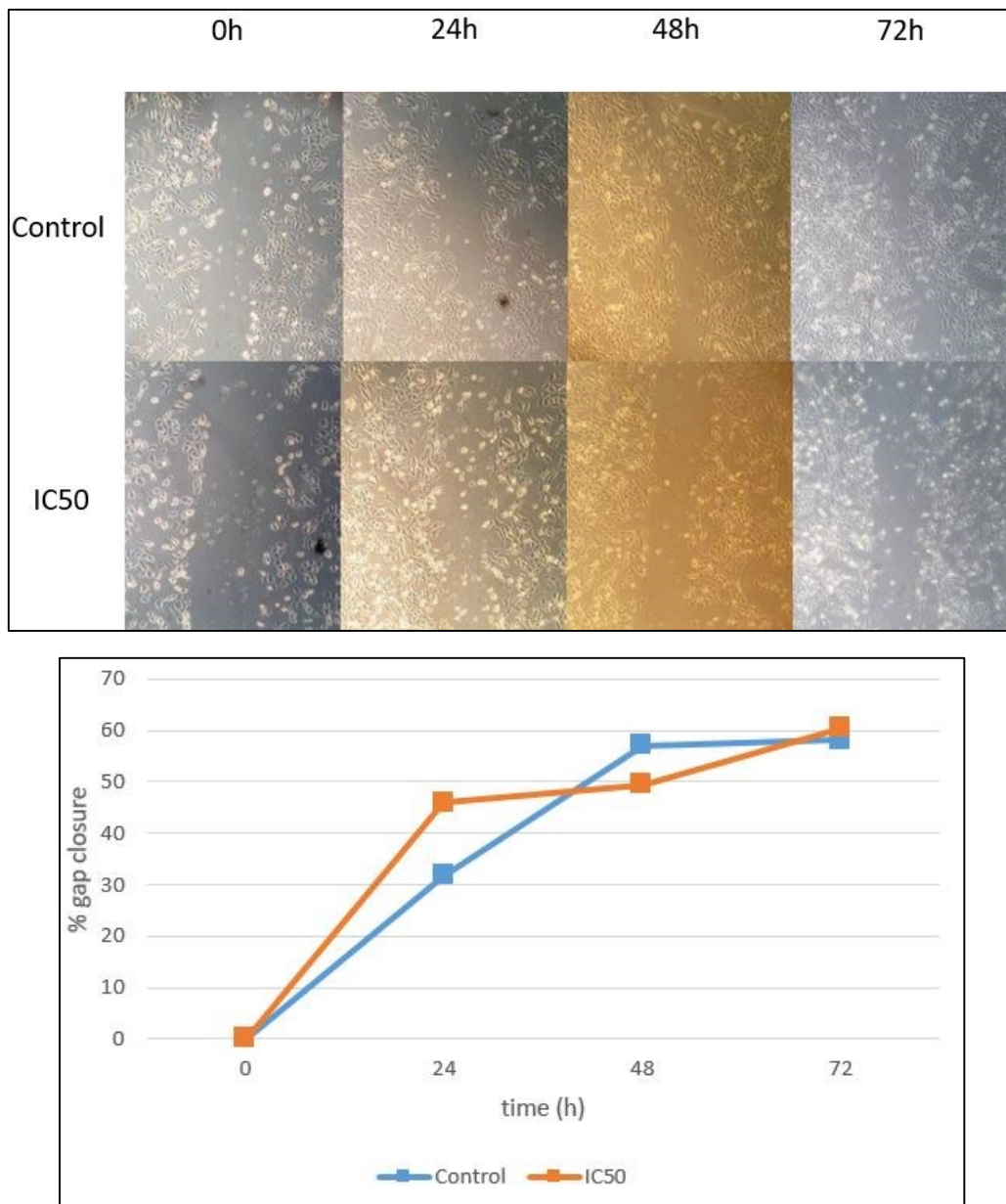
3.3 Αξιολόγηση της επίδρασης της κνικίνης στη μετανάστευση των κυττάρων (Scratch Wound Healing Assay)

Η προσομοίωση τραύματος δια αμυχής (Scratch wound healing assay), χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να διερευνηθούν οι πιθανές αντιμεταναστευτικές ιδιότητες της κνικίνης. Για το σκοπό αυτό, τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 ώρες με παράγοντα starving προς αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ώστε το αποτέλεσμα της πληγής να οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στην επίδραση της ουσίας στην κυτταρική μετανάστευση. Κατά την πειραματική αυτή διαδικασία, το κέντρο του τρυβλίου χαράχθηκε κατακόρυφα και παρατηρήθηκε ο χρόνος επούλωσης της <<πληγής>> έως και 72 ώρες αργότερα. Σε τρυβλίο U87 προστέθηκαν 19 μM κνικίνης ενώ σε τρυβλίο T98G προστέθηκαν 38 μM κνικίνης ενώ για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκε και μάρτυρας. Συγκεκριμένα ελήφθησαν φωτογραφίες τη στιγμή που δημιουργήθηκε η πληγή και προστέθηκε η ουσία ($t=0\text{h}$) και έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το ίδιο τρόπο και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Η προσομοίωση αυτή έδειξε ασήμαντη στατιστική διαφορά στο

κλείσιμο της πληγής με χρήση κνικίνης, τόσο για τα κύτταρα U87 όσο και για τα κύτταρα T98G. Το ποσοστό επούλωσης για την κυτταρική σειρά U87 με προσθήκη 19 μ M κνικίνης βρέθηκε 25.4 , 20.7 και 32.22 % για $t=24h$, 48h και 72h. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τον μάρτυρα βρέθηκαν 31.3 , 14.7 και 24.14 %. Παρόμοια ήταν και τα ποιοτικά αποτελέσματα για την κυτταρική σειρά T98G, όπου ο μάρτυρας επουλώθηκε σε βαθμό 58.1 % έπειτα από 72 ώρες, ενώ η πληγή της κνικίνης με συγκέντρωση 38 μ M επουλώθηκε σε ποσοστό 60.4 %.



Εικόνα 13: Α) Εικόνες από το μικροσκόπιο με μεγέθυνση 10x κατά τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος δι' αμυχής σε κύτταρα U87. Β) Η επί τις 100 ποσοστιαία επούλωση της πληγής στα κύτταρα U87 σε συνάρτηση με το χρόνο για κάθε συγκέντρωση.



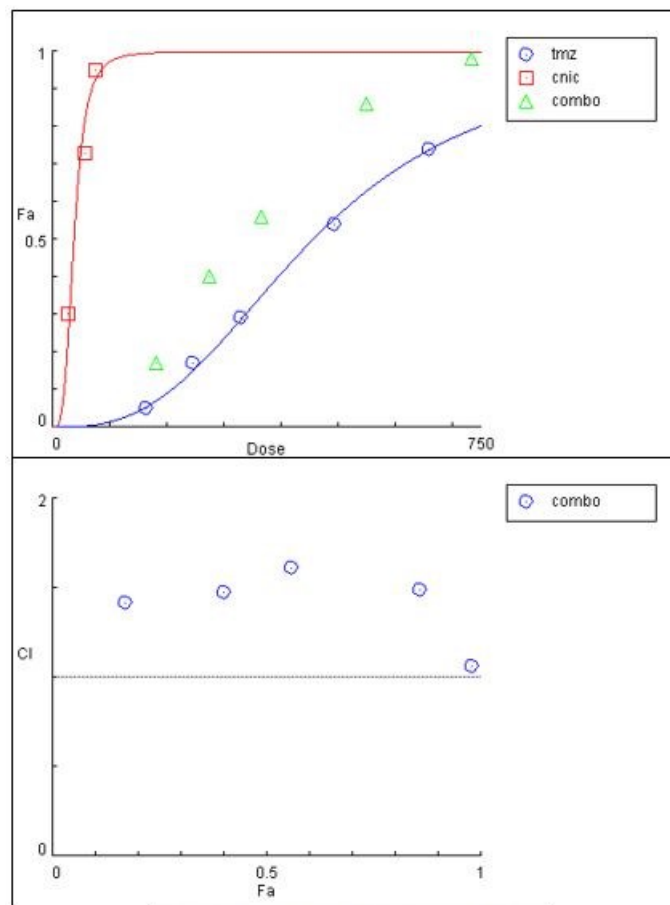
Εικόνα 14: Α) Εικόνες από το μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x κατά τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος δι' αμυχής σε κύτταρα T98G. Β) Η ποσοστιαία επί τις 100 επούλωση του τραύματος κυττάρων T98G συναρτήσει με το χρόνο για κάθε συγκέντρωση.

3.4 Μελέτη της συνδυαστικής δράσης κνικίνης και τεμοζολομίδης σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος T98G

Όπως προαναφέρθηκε ασθενείς με νεοδιαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα λαμβάνουν θεραπεία με τεμοζολομίδα. Η κνικίνη συνδυάστηκε με την ουσία αυτή για τη μελέτη της συνδυαστικής τους δράσης, σε κύτταρα T98G με σκοπό να ερευνηθεί η πιθανή συνεργιστική ή ανταγωνιστική τους δράση. Για τον προσδιορισμό αυτό, διαφορετικές συγκεντρώσεις κνικίνης και τεμοζολομίδης -συνδυαστικά και μεμονωμένα- χορηγήθηκαν στα παραπάνω κύτταρα και υπολογίστηκε ο συνδυαστικός δείκτης CI (Combination Index) για κάθε συνδυασμό (διάγραμμα 2). Ο δείκτης υπολογίστηκε με βάση το πρόγραμμα φαρμάκων CompuSyn. Αναλυτικότερα, η τιμή αυτού του δείκτη αποκαλύπτει εάν δρουν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά με τις τιμές μικρότερες του 1 να δηλώνουν συνέργεια, τιμές μεγαλύτερες του 1 ανταγωνιστικότητα και τιμές ίσες του 1 δηλώνουν αθροιστική δράση.

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλάσια και υποπολλαπλάσια του IC₅₀ για κάθε παράγοντα. Αρχικά, η τεμοζολομίδα με IC₅₀ 330 μM προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 165, 247.5, 330, 495 και 660 μM. Αντίστοιχα, η κνικίνη με IC₅₀ 38 μM χορηγήθηκε με δόσεις των 19, 28.5, 38, 57 και 76 μM. Συνδυαστικά χορηγήθηκαν με ταυτόχρονα υποπολλαπλάσια και πολλαπλάσια του IC₅₀ τους για αυτή την κυτταρική σειρά. Για κάθε συνδυασμό τεμοζολομίδης και κνικίνης, ο δείκτης υπέδειξε ανταγωνιστική δράση με τον συνδυασμό 2IC₅₀ να υποδεικνύει ασθενή ανταγωνισμό. Οι καμπύλες δόσης-ανταπόκρισης και η διαγραμματική απεικόνιση των τιμών του συνδυαστικού δείκτη για κάθε ζεύγος συνδυασμού κνικίνης και τεμοζολομίδης απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

Διάγραμμα 2: Επάνω: Καμπύλη δόσης- ανταπόκρισης για κάθε παράγοντα χωριστά, και για το συνδυασμό τους (combo) σε κύτταρα T98G. Κάτω: Διάγραμμα αποτύπωσης συνδυαστικών δεικτών για κάθε συνδυασμό παραγόντων σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος T98G.



Δόση tmz	Δόση cnic	Επίδραση	CI
165.0	19.0	0.17	1.41835
247.5	28.5	0.4	1.47562
330.0	38.0	0.56	1.61163
495.0	57.0	0.86	1.49154
660.0	76.0	0.98	1.05799

Συζήτηση/Συμπεράσματα

Το γλοιοβλάστωμα είναι ο πιο συχνός πρωτοπαθής όγκος του εγκεφάλου. Είναι υπεύθυνο για 2500 θανάτους ετησίως στο ηνωμένο βασίλειο [11] και αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 50% όλων των πρωτογενών εγκεφαλικών όγκων στις ηνωμένες πολιτείες με ετήσια εμφάνιση περίπου τους 3 ανά 100.000 ανθρώπους. [12] Μάλιστα αντικατοπτρίζει την πλειονότητα των περίπου 200.000 θανάτων παγκοσμίως που σχετίζονται με όγκους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος κάθε χρόνο. [10,11]

Η ετερογένεια και η πολυμορφία αυτών των κακοηθειών είναι τόσο πολύπλοκη που έχει οδηγήσει την επιστήμη στην έρευνα νέων πιο αποδοτικών μεθόδων για τη θεραπευτική αντιμετώπισή τους, ακόμα και την ανακούφιση των συμπτωμάτων. Η προοδευτική προσθήκη των φυτικών ουσιών σε διάφορους καρκίνους έχει κεντρίσει το βλέμμα των επιστημόνων και έχει φέρει διάφορες φυτικές ουσίες στο επίκεντρο. Χαρακτηριστικό αυτών των ουσιών είναι ότι λόγω της φύσης τους, δεν είναι καθόλου τοξικές για τον ανθρώπινο οργανισμό και η παραγωγή τους χρησιμοποιώντας χημικά μέσα είναι ακριβή και χρονοβόρα. Επιπλέον, έχοντας μικρό μοριακό βάρος διασχίζουν με σχετική ευκολία τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ενώ παράλληλα πολλές από αυτές τις ουσίες έχουν ιδιότητες ακτινοευαισθητοποίησης και χημειοευαισθητοποίησης όταν συνδυάζονται με ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία αντίστοιχα.

Η κνικίνη, μια σεσκιτερπενική λακτόνη, έχει μεταξύ άλλων κυτταροτοξική δράση σε διάφορες κατηγορίες καρκινικών κυττάρων. Όσον αφορά τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, δοκιμάστηκε πρώτη φορά στο τρέχον εργαστήριο και έδειξε αξιόλογη επίδραση σε δυο κυτταρικές σειρές, στη σειρά U87 και τη T98G, με IC₅₀ 19 μ M ή 7.2 μ g/mL και 38 μ M ή 14.38 μ g/mL αντίστοιχα. Η αναστολή του μισού κυτταρικού πληθυσμού πραγματοποιήθηκε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και τα αποτελέσματα ελήφθησαν 72 ώρες μετά τη χορήγησή της στα κύτταρα. Αν και το IC₅₀ της κυτταρικής σειράς U87 είναι σημαντικά μικρότερο σε σχέση με αυτό της σειράς T98G, καμία από τις δύο σειρές δεν έδειξε IC₅₀ μεγαλύτερο ή σχετικά κοντινό του αντίστοιχου IC₅₀ της τεμοζολομίδης (για τα κύτταρα U87, T98G). Ωστόσο, καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές δεν εμφάνισε IC₅₀ μικρότερο των 4 μ g/mL, μέγιστο σημείο αναφοράς για τη χρήση μιας ουσίας σαν πιθανή αντικαρκινική θεραπεία, σύμφωνα με το Αμερικανικό Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (National Cancer Institute- NCI). [22] Η πρόταση αυτή, υπογραμμίζει την κνικίνη σαν οριακά ακατάλληλη θεραπεία για το γλοιοβλάστωμα, με άλλες φυσικοχημικές και βιολογικές παραμέτρους να αναμένεται να ερευνηθούν σε βάθος.

Για την υποστήριξη του παραπάνω εγχειρήματος, η δράση της κνικίνης μελετήθηκε εξονυχιστικά. Η κυτταρομετρία ροής με χρωστική ιωδιούχο προπάνιο έδειξε στάση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις S και G₂/M για κάθε κυτταρική σειρά. Επιπλέον παρατηρήθηκε αυξημένη απόπτωση (subG₀/G₁) σε κάθε κυτταρική σειρά, με τη U87 να είναι εντονότερη. Το στοιχείο αυτό υποδεικνύει ότι μάλλον η κνικίνη επάγει αποπτωτικά φαινόμενα. Από προηγούμενες μελέτες η κνικίνη αποδείχθηκε ότι αναστέλλει το μεταγραφικό παράγοντα NF- κ B και την επαγωγή της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου iNOS. Δεδομένου ότι αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας είναι κεντρικός μεσολαβητής της απόπτωσης και της ανοσολογική απόκρισης, πιστεύεται ότι η κνικίνη μπορεί να προστατεύει τα ενεργοποιημένα μακροφάγα από την απόπτωση μέσω του μονοπατιού αυτού. Η αναστολή του NF- κ B, μειώνει την αντοχή στη χημειοθεραπεία και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Από την άλλη, η κνικίνη έδειξε αναστολή της δραστηριότητας της επαγωγίσιμης συνθάσης του μονοξειδίου το αζώτου iNOS σε μακροφάγα επαγόμενα από

LPS . Σε μελέτες της αντιοξειδωτικής δράσης, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην επαγόμενη από PMA ενδοκυτταρική παραγωγή ROS σε καρκινικά κύτταρα HL-60. Η δράση της κνικίνης θα μπορούσε να μεσολαβείται από την αναστολή των δραστηριοτήτων NF-κβ και iNOS. Η αναστολή της δραστηριότητας iNOS δείχνει επίσης να σχετίζεται με την τοξικότητα που παρατηρήθηκε προς τα μακροφάγα. [20,39] Στη φάση G0/G1 δεν παρατηρήθηκε στάση του κυτταρικού κύκλου.

Όσον αφορά τη μεταναστευτική ικανότητα κάθε κυτταρικής σειράς, μελετήθηκε η επίδραση της κνικίνης 24, 48 και 72 ώρες μετά την προσθήκη της ουσίας και σε σύγκριση πάντα με τον μάρτυρα. Από τα πειράματα επιβεβαιώθηκε ότι η κνικίνη δεν προκαλεί αναστολή της μετανάστευσης τόσο για τη σειρά T98G όσο και για την U87, και καθιστά την κνικίνη αδύνατη να καταπολεμήσει την έντονη διηθητική συμπεριφορά του γλοιοβλαστώματος. [38] Όσον αφορά τα T98G κύτταρα, εμφάνισαν ανταγωνιστική δράση συνδυασμένα με τεμοζολομίδη, σχεδόν σε κάθε συγκέντρωση, και έτσι η αθροιστική τους σημασία σαν θεραπευτική προσέγγιση φαντάζει σε αυτό το επίπεδο τουλάχιστον, αδύνατη.

Σύνοψη

Αν και η κνικίνη δεν έχει δοκιμαστεί ακόμα για το αν διαπερνά με επιτυχία τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, έχει τα χαρακτηριστικά που συνοδεύουν αυτή τη διαπερατότητα. Μελλοντικά, ενώ η κνικίνη έχει υποδείξει κάποιες θεραπευτικές ιδιότητες απαιτείται να διερευνηθεί σε βάθος τόσο σε μη μεταλλαγμένα κύτταρα όσο και σε άλλες σειρές γλοιοβλαστώματος πέραν της U87 και T98G. Έπειτα από την εργαστηριακή μελέτη αυτή, πρέπει να πραγματοποιηθούν κλινικές δοκιμές σε άλλα μοντέλα χρησιμοποιώντας την κνικίνη συνδυαστικά με άλλα φάρμακα ή όχι, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί εκ των υστέρων για πιθανή θεραπεία του γλοιοβλαστώματος. Η κατανόηση του πλήρους φαρμακοκινητικού της προφίλ κρίνεται φυσικά απαραίτητη για μελλοντικά βήματα. Παρά τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ο ακριβής μηχανισμός που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων πρέπει να διερευνηθεί σε βάθος.

Περίληψη

Το γλοιοβλάστωμα είναι μια από τις πιο απαιτητικές μορφές καρκίνου και λόγω της σπανιότητάς του, καθώς και του υψηλού ποσοστού θνησιμότητας, η σύγχρονη επιστήμη οδηγήθηκε στην ανακάλυψη νέων ουσιών που αναστέλλουν τη δράση του. Η κνικίνη, μια σεσκιτερπενική λακτόνη που προέρχεται κυρίως από τα φυτά του γένους *centaurea*, επιδεικνύει κυτταροτοξική δράση σε πολλές μορφές καρκίνου. Η παρούσα μελέτη συζητά την επίδρασή του στις κακοήθεις κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος U87 και T98G. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εξετάστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία αποκλεισμού με μπλε του τρυπανίου, και το IC50 βρέθηκε 19 μ M για τα κύτταρα U87, και 38 μ M για τα κύτταρα T98G. Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου δοκιμάστηκε με κυτταρομετρία ροής, και αποδείχθηκε στάση στις φάσεις S και G2/M για κάθε κυτταρική σειρά. Σε μεταγενέστερα πειράματα, αποδείχθηκε η ανταγωνιστική δράση της κνικίνης με την τεμοζολομίδη χρησιμοποιώντας το λογισμικό CompuSyn, καθώς επίσης και η ελλιπής αναστολή της κνικίνης στην κυτταρική μετανάστευση. Συνολικά, η κνικίνη δείχνει να έχει

σχετικά καλή αντικαρκινική επίδραση στο γλοιοβλάστωμα, ενώ οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην εύρεση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων της κνικίνης, καθώς και στο συνδυασμό της με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες ή ακτινοβολία, για να διερευνήσουν τα αθροιστικά αποτελέσματα για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος.

Abstract

Glioblastoma is one of the most challenging forms of cancer, and due to its rarity and high mortality rate, modern science led to the discovery of new substances that inhibit its action. Cnicin, a sesquiterpene lactone derived mostly from plants of the genus *Centaurea*, demonstrate cytotoxic activity in many forms of cancer. This paper discusses its effect on malignant U87 and T98G glioblastoma cell lines. Cell viability was examined using the trypan blue exclusion assay, showing IC₅₀ 19 μ M for U87 cells and 38 μ M for T98G cells. The cell cycle distribution was tested with flow cytometry, which showed arrest in S and G2/M phase for both cancer cell lines. In subsequent experiments, the antagonistic action of cnicin and temozolomide was confirmed using the CompuSyn software, and also proved that cnicin wasn't able to inhibit cell migration. Overall, cnicin appears to have some good anti-cancer effects in glioblastoma, and future scientists should focus on determining its pharmacokinetic properties of cnicin. Combining it with other anti-cancer agents or radiation, is also necessary to explore the cumulative effects for the treatment of glioblastoma.

Βιβλιογραφία

1. Cancer. Ανακτήθηκε από <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Krieghoff-Henning, E., Folkerts, J., Penzkofer, A., & Weg-Remers, S. (2017). Cancer—an overview. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, 40(2), 48-54.
3. Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., ... & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England journal of medicine*, 352(10), 987-996.
4. Cnicin. Ανακτήθηκε από https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/search/cnicin?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=cnicin&type=product_name .
5. Fernandes, C., Costa, A., Osório, L., Lago, R. C., Linhares, P., Carvalho, B., & Caeiro, C. (2017). Current standards of care in glioblastoma therapy. *Exon Publications*, 197-241.
6. Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119, 37-53.
7. Wei, D. C., & Morrison, E. H. (2019). Histology, Astrocytes.
8. Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(10), 1861-1867.
9. Soomro, S. H., Ting, L. R., Qing, Y. Y., & Ren, M. (2017). Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. *JPM. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(9), 1410-1414.
10. Birkó, Z., Nagy, B., Klekner, Á., & Virga, J. (2020). Novel molecular markers in glioblastoma—Benefits of liquid biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7522.
11. Rominiyi, O., Vanderlinden, A., Clenton, S. J., Bridgewater, C., Al-Tamimi, Y., & Collis, S. J. (2021). Tumour treating fields therapy for glioblastoma: Current advances and future directions. *British journal of cancer*, 124(4), 697-709.
12. Yuan, B., Wang, G., Tang, X., Tong, A., & Zhou, L. (2022). Immunotherapy of glioblastoma: recent advances and future prospects. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 18(5), 2055417.
13. Lah, T. T., Novak, M., & Breznik, B. (2020, February). Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 60, pp. 262-273). Academic Press.
14. Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncology*, 1(1), 44-51.
15. Lombardi, M. Y., & Assem, M. (2017). Glioblastoma genomics: a very complicated story. *Exon Publications*, 3-25.

16. Gilard, V., Tebani, A., Dabaj, I., Laquerrière, A., Fontanilles, M., Derrey, S., ... & Bekri, S. (2021). Diagnosis and management of glioblastoma: A comprehensive perspective. *Journal of Personalized Medicine*, 11(4), 258.
17. Glioblastoma Multiforme (GBM). Ανακτήθηκε από <https://www.pennmedicine.org/for-patients-and-visitors/patient-information/conditions-treated-a-to-z/glioblastoma-multiforme>.
18. D'Alessio, A., Proietti, G., Sica, G., & Scicchitano, B. M. (2019). Pathological and molecular features of glioblastoma and its peritumoral tissue. *Cancers*, 11(4), 469.
19. Yin, S. Y., Wei, W. C., Jian, F. Y., & Yang, N. S. (2013). Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
20. Erel, S. B., Karaalp, C., Bedir, E., Kaehlig, H., Glasl, S., Khan, S., & Krenn, L. (2011). Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharmaceutical biology*, 49(8), 840-849.
21. Locken, L. J. (1985). Cnicin concentrations in spotted knapweed (*Centaurea maculosa* Lam.) and associated soils.
22. Sen, A., Ozbas Turan, S., & Bitis, L. (2017). Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 541-546.
23. Cnicin. Ανακτήθηκε από <https://www.carlroth.com/de/en/more-reference-substances/cnicin/p/4560.1>.
24. Kurita, M., Tanigawa, M., Narita, S., & Usuki, T. (2016). Synthetic study of cnicin: Synthesis of the side chain and its esterification. *Tetrahedron Letters*, 57(52), 5899-5901.
25. Liu, A., Hou, C., Chen, H., Zong, X., & Zong, P. (2016). Genetics and epigenetics of glioblastoma: applications and overall incidence of IDH1 mutation. *Frontiers in oncology*, 6, 16.
26. Steponaitis, G., & Tamasauskas, A. (2021). Mesenchymal and proneural subtypes of glioblastoma disclose branching based on GSC associated signature. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4964.
27. Trogrlić, I., Trogrlić, D., Trogrlić, D., & Trogrlić, A. K. (2018). Treatment of glioblastoma with herbal medicines. *World Journal of Surgical Oncology*, 16(1), 1-14.
28. Fisher, J. P., & Adamson, D. C. (2021). Current FDA-approved therapies for high-grade malignant gliomas. *Biomedicines*, 9(3), 324.
29. Vengoji, R., Macha, M. A., Batra, S. K., & Shonka, N. A. (2018). Natural products: A hope for glioblastoma patients. *Oncotarget*, 9(31), 22194.
30. Glioblastoma molecular subtypes. Ανακτήθηκε από https://operativeneurosurgery.com/doku.php?id=glioblastoma_molecular_subtypes.
31. Csapi, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Berényi, Á., Forgo, P., Szabó, P., & Hohmann, J. (2010). Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy research*, 24(11), 1664-1669.
32. Cnicin. Ανακτήθηκε από https://lotus.naturalproducts.net/compound/lotus_id/LTS0240427.
33. Schmidt, T. J. (2006). Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. *Studies in natural products chemistry*, 33, 309-392.

34. Rotondo, R., Oliva, M. A., & Arcella, A. (2022). The sesquiterpene lactone cynaropicrin manifests strong cytotoxicity in glioblastoma cells U-87 MG by induction of oxidative stress. *Biomedicines*, 10(7), 1583.
35. Youn, U. J., Miklossy, G., Chai, X., Wongwiwatthanakit, S., Toyama, O., Songsak, T., ... & Chang, L. C. (2014). Bioactive sesquiterpene lactones and other compounds isolated from *Vernonia cinerea*. *Fitoterapia*, 93, 194-200.
36. Baichwal, V. R., & Baeuerle, P. A. (1997). Apoptosis: activate NF-κB or die? . *Current Biology*, 7(2), R94-R96.
37. Kim, W., Yoo, H., Shin, S. H., Gwak, H. S., & Lee, S. H. (2014). Extraneural metastases of glioblastoma without simultaneous central nervous system recurrence. *Brain Tumor Research and Treatment*, 2(2), 124-127.
38. Hatoum, A., Mohammed, R., & Zakieh, O. (2019). The unique invasiveness of glioblastoma and possible drug targets on extracellular matrix. *Cancer management and research*, 1843-1855.
39. Paço, A., Brás, T., Santos, J. O., Sampaio, P., Gomes, A. C., & Duarte, M. F. (2022). Anti-inflammatory and immunoregulatory action of sesquiterpene lactones. *Molecules*, 27(3), 1142.
40. Aguilera-Márquez, J., de Dios-Figueroa, G. T., Reza-Saldivar, E. E., Camacho-Villegas, T. A., Canales-Aguirre, A. A., & Lugo-Fabres, P. H. (2022). Biomaterials: Emerging systems for study and treatment of glioblastoma. *Neurology Perspectives*, 2, S31-S42.
41. Moujir, L., Callies, O., Sousa, P. M., Sharopov, F., & Seca, A. M. (2020). Applications of sesquiterpene lactones: a review of some potential success cases. *Applied Sciences*, 10(9), 3001.
42. Centaurea cyanus. Ανακτήθηκε από <https://antropocene.it/en/2023/01/30/centaurea-cyanus-2/>.
43. Centaurea stoebe – spotted knapweed. Ανακτήθηκε από <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/centaurea/stoebe/>.
44. Alhadrami, H. A., Sayed, A. M., Hassan, H. M., Youssif, K. A., Gaber, Y., Moatasim, Y., ... & Gamaleldin, N. M. (2021). Cnicin as an anti-SARS-CoV-2: an integrated in silico and in vitro approach for the rapid identification of potential COVID-19 therapeutics. *Antibiotics*, 10(5), 542.
45. Çelikezen, F. Ç., Hayta, Ş., Özdemir, Ö., & Türkez, H. (2019). Cytotoxic and antioxidant properties of essential oil of *Centaurea behen* L. in vitro. *Cytotechnology*, 71, 345-350.
46. Ratliff, M., Kim, H., Qi, H., Kim, M., Ku, B., Azorin, D. D., ... & Kwon, Y. J. (2022). Patient-derived tumor organoids for guidance of personalized drug therapies in recurrent glioblastoma. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6572.
47. Yalamarty, S. S. K., Filipczak, N., Li, X., Subhan, M. A., Parveen, F., Ataide, J. A., ... & Torchilin, V. P. (2023). Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). *Cancers*, 15(7), 2116.
48. Jöhrer, K., & Çiçek, S. S. (2021). Multiple myeloma inhibitory activity of plant natural products. *Cancers*, 13(11), 2678.
49. Kollis, P. M., Ebert, L. M., Toubia, J., Bastow, C. R., Ormsby, R. J., Poonnoose, S. I., ... & Gargett, T. (2022). Characterising distinct migratory profiles of infiltrating T-cell subsets in human glioblastoma. *Frontiers in immunology*, 13, 850226.
50. Khasraw, M., Fujita, Y., Lee-Chang, C., Balyasnikova, I. V., Najem, H., & Heimberger, A. B. (2022). New approaches to glioblastoma. *Annual review of medicine*, 73, 279-292.

51. Thakur, A., Faujdar, C., Sharma, R., Sharma, S., Malik, B., Nepali, K., & Liou, J. P. (2022). Glioblastoma: Current status, emerging targets, and recent advances. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(13), 8596-8685.
52. Όγκοι Εγκεφάλου | Γλοιώματα. Ανακτήθηκε από <https://www.nomikosp.gr/ogkoi-egkefalou-gloiomata>
53. Overview of types of glioma. Ανακτήθηκε από <https://www.aaroncohen-gadol.com/en/patients/glioma/types/overview>
54. Wen, P. Y., Weller, M., Lee, E. Q., Alexander, B. M., Barnholtz-Sloan, J. S., Barthel, F. P., ... & Van Den Bent, M. J. (2020). Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-oncology*, 22(8), 1073-1113.
55. Simpson, J. E., & Gammoh, N. (2020). The impact of autophagy during the development and survival of glioblastoma. *Open Biology*, 10(9), 200184.
56. Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J., & Kanmogne, G. D. (2006). Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1, 223-236.