



---

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ  
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HepG2, IN VITRO**

---



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**Δ.Π.Μ.Σ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**



---

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ  
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HepG2, IN VITRO**

---

**ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΛΩΛΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Επιβλέπων Καθηγητής: ΤΣΕΛΕΠΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024**



## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

### **Επιβλέπων:**

Τσελέπης Αλέξανδρος, Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας,  
Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

### **Μέλη επιτροπής:**

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήματος Χημείας,  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τέλλης Κωνσταντίνος, Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (ΕΔΙΠ),  
Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων



## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών/ Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης, στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του ΔΠΜΣ «Ιατρική Χημεία», κατά την περίοδο 2022-2023.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ.Αλέξανδρο Τσελέπη, ομότιμο καθηγητή Βιοχημείας- Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ανάθεση της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής αλλά και για την συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης των πειραμάτων, την συμπαράσταση και ενθάρρυνση αλλά και τις ουσιώδεις συμβουλές.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ευγενική τους αποδοχή ώστε να αποτελέσουν μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, στον Δρ. κ. Τέλλη Κωνσταντίνο, Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (ΕΔΙΠ), Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθώς και στον κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνο, Καθηγητή Οργανικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα επιθυμούσα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Αικατερίνη Τσούκα και τον υποψήφιο διδάκτωρ Ιωάννη Κουτσαλιάρη για την καθοδήγηση κατά την διάρκεια των πειραμάτων αλλά και το ευχάριστο κλίμα σε όλο το χρονικό διάστημα της εκπόνησης της μεταπτυχιακής διατριβής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην υποψήφια διδάκτωρ του Τμήματος, Λουίζα Πεχλιβάνη για την πολύτιμη βοήθεια και συμπαράσταση της κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων στα εργαστήρια.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, που μου παρείχε στήριξη σε όλο το διάστημα των σπουδών μου, χωρίς την οποία τίποτα από όσα έχω καταφέρει μέχρι σήμερα δεν θα ήταν πραγματικότητα αλλά και στους φίλους μου για την ηθική υποστήριξη, την υπομονή αλλά και την βοήθεια που μου παρείχαν.





# Περιεχόμενα

Σκοπός .....	11
1. Εισαγωγή .....	12
2. Μορφολογία και Φυσιολογία Αιμοπεταλίων .....	13
3. Αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων και καρκινικών κυττάρων.....	17
3.1 Αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων και καρκινικών κυττάρων .....	17
3.2 Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια .....	18
3.3 Η επιβίωση και η σύλληψη των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων από τα αιμοπετάλια.....	21
4. Τα αιμοπετάλια στην εξέλιξη και μετάσταση του όγκου.....	23
4.1 Επίδραση των αιμοπεταλίων στην ανάπτυξη του όγκου.....	23
4.2 Αιμοπετάλια, φλεγμονή και καρκίνος .....	23
4.3 Αιμοπετάλια και Σχηματισμός NETs στον Καρκίνο .....	25
4.4 Απόδραση από την ανοσολογική επιτήρηση .....	28
4.5 Μεσολάβηση αιμοπεταλίων στην εξαγγείωση καρκινικών κυττάρων .....	29
4.6 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων και των υποδοχέων τους στη μετάσταση του καρκίνου .....	30
4.7 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στη μετάσταση του καρκίνου- Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων .....	31
4.8 Συμβολή των αιμοπεταλίων στην ανάπτυξη και αγγειογένεση του όγκου .....	33
5. Τα αιμοπετάλια ως στόχοι για την θεραπεία του καρκίνου .....	35
5.1 CLEC-2 και η αλληλεπίδραση με την ποδοπλανίνη.....	35
5.2 CLEC-2 και ποδοπλανίνη ως στόχοι φαρμάκων.....	38
6. Ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2.....	40
7. Εργαστηριακή Διερεύνηση (Μέθοδοι και Υλικά).....	43
7.1 Πειραματική πορεία καλλιέργειας κυττάρων HepG2: .....	43
7.2 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας ( Light Transmitted Aggregometry, ...	51
LTA).....	51
7.3 Επίδραση αιμοπεταλίων στα κύτταρα HepG2 .....	59
7.4 Κυτταρομετρία Ροής.....	60
8. Αποτελέσματα .....	68
9. Συμπεράσματα- Συζήτηση .....	83
Βιβλιογραφία .....	91



## Σκοπός

Είναι ευρέως γνωστό, ότι τα αιμοπετάλια είναι κύτταρα τα οποία αλληλεπιδρούν με όλα τα συστατικά του κυκλοφορικού συστήματος. Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, εστιάστηκε στην μελέτη της επίδρασης των αιμοπεταλίων σε καλλιέργεια ανθρώπινων ηπατικών καρκινικών κυττάρων, HepG2. Μελετήθηκε η επίδραση των αιμοπεταλίων στα κύτταρα HepG2 σε διαφορετικούς χρόνους, για 48 αλλά και 72 ώρες αντίστοιχα και διερευνήθηκε μέσω της κυτταρομετρίας ροής κατά πόσο επηρεάστηκε η κυτταρική ανάπτυξη τους, μετά την επίδραση των αιμοπεταλίων σε αυτά.

# 1. Εισαγωγή

Τα αιμοπετάλια παρόλο που έχουν αναγνωρισθεί ως οι κύριοι παράγοντες της αιμόστασης και της θρόμβωσης, αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως κύτταρα πολλαπλών χρήσεων. Πράγματι, τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν ένα ευρύ φάσμα φαινομενικά άσχετων παθοφυσιολογικών συμβάντων.

Πέρα από τον παραδοσιακό τους ρόλο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, η συμμετοχή των αιμοπεταλίων στην αλληλεπίδραση μεταξύ αιμόστασης, θρόμβωσης, φλεγμονής και καρκίνου είναι πιθανότατα πολύπλοκη, αλλά εξαιρετικά σημαντική. Σήμερα, πολλά κλινικά και πειραματικά στοιχεία υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα αιμοπετάλια παίζουν αρκετούς ρόλους στην εξέλιξη κακοηθειών και σε θρόμβωση που σχετίζεται με τον καρκίνο.

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορεί να ρυθμίζουν την μετανάστευση αιμοποιητικών και ανοσοποιητικών κυττάρων προς την θέση του όγκου, συμβάλλοντας στη φλεγμονή που σχετίζεται με τον καρκίνο. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από καρκινικά κύτταρα μπορεί επίσης να συμβάλει στη μετάσταση και την εξέλιξη του καρκίνου, διεγείροντας την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και τον σχηματισμό εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων (NETs) που περιβάλλουν καρκινικά κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην αγγειογένεση.<sup>1</sup>

Η αμοιβαία αλληλεπίδραση μεταξύ καρκίνου και αιμοπεταλίων έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές σε πολλά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων. Γίνεται σαφές ότι η ανάλυση αυτών των χαρακτηριστικών των αιμοπεταλίων θα μπορούσε να προσφέρει μια νέα στρατηγική στην αναζήτηση βιοδεικτών καρκίνου. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, εξετάζεται η συνάφεια των αιμοπεταλίων στη βιολογία του καρκίνου, εστιάζοντας στα χαρακτηριστικά του καρκίνου και στους τρόπους με τους οποίους τα αιμοπετάλια μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του. Συγκεκριμένα, η μελέτη βασίστηκε σε καλλιέργεια ανθρώπινων ηπατικών καρκινικών κυττάρων, HepG2.

## 2. Μορφολογία και Φυσιολογία Αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια, λειτουργούν κυρίως ως ρυθμιστές της αιμόστασης, αλλά παίζουν επίσης δευτερεύοντα ρόλο στην αγγειογένεση και την έμφυτη ανοσία. Είναι αναμφισβήτητα από τα πιο σημαντικά κύτταρα στο ανθρώπινο σώμα, καθώς έχουν μια εξαιρετική ικανότητα για μορφολογική αλλαγή και ισχυρές ιδιότητες έκκρισης<sup>1</sup>. Ως μικρά, δισκοειδή κύτταρα είναι τα μικρότερα στην κυκλοφορία του αίματος, με διάμετρο 2–5 μm και πάχος 0,5 μm<sup>1</sup>. Τα αιμοπετάλια προέρχονται από μεγάλα κύτταρα με ακανόνιστο πυρήνα, που ονομάζονται μεγακαρυοκύτταρα, τα οποία βρίσκονται κυρίως στο μυελό των οστών και αποτελούν μέρος της αιμοποιητικής κυτταρικής σειράς<sup>2</sup>. Τα αιμοπετάλια έχουν μέση διάρκεια ζωής 5-7 ημέρες στην κυκλοφορία του αίματος, όπου αντέχουν τόσο σκληρές συνθήκες που όσο μεγαλώνουν μειώνονται σε μέγεθος<sup>1,3</sup>. Ο μέσος υγιής άνθρωπος έχει 150.000–400.000 αιμοπετάλια ανά μικρολίτρο (αιμοπετάλια/μl) σε κυκλοφορία ανά πάσα στιγμή και οι αλλαγές στον συνολικό αριθμό αιμοπεταλίων και στο μέσο όγκο αιμοπεταλίων συχνά σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις και χρησιμοποιούνται ως δείκτης οξείας φλεγμονής.<sup>1,4,5</sup>

Η μεμβράνη των αιμοπεταλίων περιέχει διάφορες γλυκοπρωτεΐνες όπως GPIbIX-V, GPVI και GPαIIbβIII, οι οποίες είναι απαραίτητες για την πλήρη συσσώρευση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Η μεμβράνη τους, έχει επίσης υποδοχείς ενεργοποιημένους από πρωτεάση: PAR-1, PAR-4 και τους υποδοχείς της οικογένειας P2Ys, που μεσολαβούν στην ενεργοποίηση και την συσσωμάτωση<sup>6</sup>. Τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης τρία διαφορετικά είδη εκκριτικών κοκκίων: α-κοκκία, πυκνά κοκκία και λυσοσωμικά κοκκία.<sup>7,8</sup>

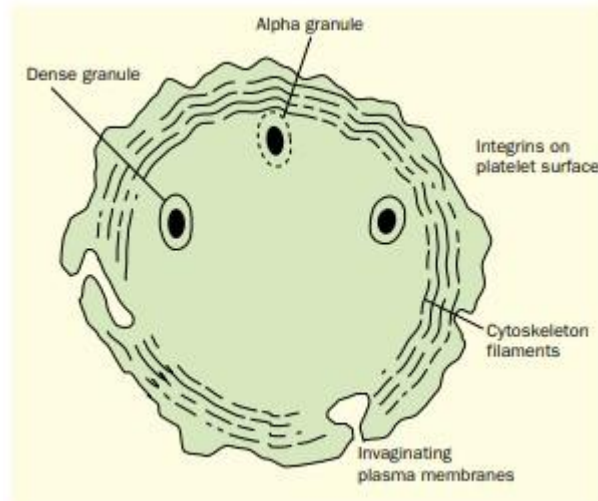
Τα α-κοκκία, περιέχουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη και διαλυτές πρωτεΐνες που εκφράζονται στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων, όταν αυτή ενεργοποιείται. Αυτοί οι δείκτες μεμβράνης εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής προσκόλλησης, της πήξης, της φλεγμονής, της κυτταρικής ανάπτυξης και της άμυνας του ξενιστή<sup>1,8</sup>. Περιλαμβάνουν P-σελεκτίνη, ινωδογόνο, παράγοντα vonWillenbrand, επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, αυξητικό παράγοντα αγγειακού ενδοθηλίου, αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια και πρόδρομες ουσίες του συμπληρώματος C3 και C4<sup>5,9</sup>.

Τα πυκνά κοκκία, από την άλλη πλευρά, είναι ελαφρώς πιο σπάνια. Περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις νουκλεοτιδίων αδενίνης, συγκεκριμένα ADP και ATP, μαζί με τη σεροτονίνη και την ισταμίνη, οι οποίες απελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Η τρίτη ομάδα κοκκίων, τα λυσοσώματα, είναι η λιγότερο κοινή με μόνο 1-2 ανά κύτταρο. Περιέχουν ένζυμα αποικοδόμησης πρωτεϊνών όπως καθεψίνες, ελαστάσες, κολλαγονάσες και γλυκοσιδάσες καθώς και LAMP-1, LAMP-2 και CD63.

8,9,10

Η παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1), παρουσιάζει την δομή των αιμοπεταλίων, τα οποία φαίνεται να αποτελούνται από τα α-κοκκία καθώς και τα πυκνά κοκκία τα οποία είναι μικρότερα σε μέγεθος. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια, όπως και άλλα κύτταρα, περιέχουν έναν κυτταροσκελετό, ένα δίκτυο πρωτεϊνικών νημάτων που παρέχουν δομική υποστήριξη, επιτρέπουν την κίνηση των κυττάρων και βοηθούν στην κυτταρική διαίρεση. Αυτά τα κυτταροσκελετικά νήματα, συνεργάζονται για να επιτρέψουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, συμπεριλαμβανομένης της προσκόλλησης, της συσσώρευσης και της συστολής του θρόμβου. Παρέχουν το απαραίτητο δομικό πλαίσιο ώστε τα αιμοπετάλια να ανταποκρίνονται γρήγορα στον αγγειακό τραυματισμό και να συμμετέχουν στην αιμόσταση. Επίσης, τα αιμοπετάλια φαίνεται να περιέχουν ιντεγκρίνες στην επιφάνειά τους, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον συντονισμό των πολύπλοκων διεργασιών που εμπλέκονται στην αιμόσταση και τη θρόμβωση. Στα αιμοπετάλια, οι ιντεγκρίνες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη μεσολάβηση των αλληλεπιδράσεων με συστατικά του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων, όπως το κολλαγόνο και ο παράγοντας von Willebrand. Τέλος, τα αιμοπετάλια έχουν μια πλασματική μεμβράνη, η οποία είναι το εξωτερικό όριο του κυττάρου και είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ακεραιότητας του κυττάρου, τη ρύθμιση της διέλευσης των μορίων μέσα και έξω από το κύτταρο και τη διευκόλυνση των αλληλεπιδράσεων κυττάρου-κυττάρου.



Εικόνα 1: Δομή αιμοπεταλίων. <sup>2</sup>

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μπορεί να συμβεί μέσω επαφής με διαφορετικούς αγωνιστές, με τους πιο επικρατέστερους να είναι: θρομβίνη, ADP, παράγοντας von Willenbrand και κολλαγόνο<sup>11</sup>. Η θρομβίνη είναι ο πιο ισχυρός αγωνιστής των αιμοπεταλίων. Δρα στους υποδοχείς GPIIb-IX-V και PARs. Οι υποδοχείς PARs, έχουν 4 υποομάδες: τον PAR2, ο οποίος δεν υπάρχει στα αιμοπετάλια και τον PAR3, ο οποίος λειτουργεί μόνο ως συμπαράγοντας στην ενεργοποίηση του PAR4. Ο PAR1, είναι ο πιο ισχυρός υποδοχέας για την επαγόμενη από τη θρομβίνη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καθώς είναι πιο ευαίσθητος σε χαμηλότερα επίπεδα θρομβίνης από τον PAR4. <sup>11,12</sup>

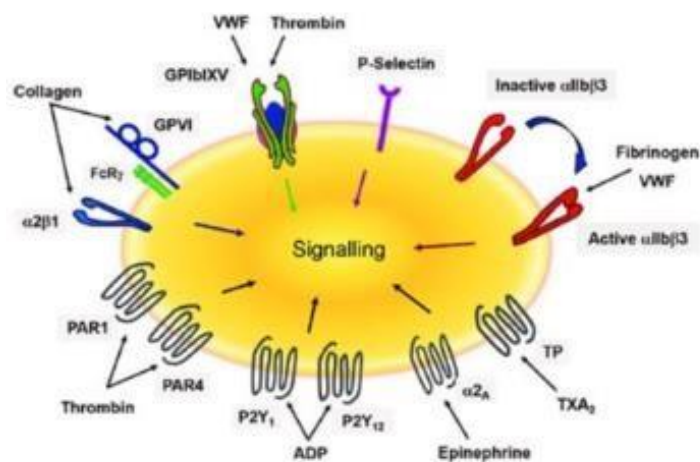
Ένας άλλος ισχυρός ενεργοποιητής αιμοπεταλίων είναι η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP). Μπορεί να είναι εξωγενής ή να απελευθερώνεται από τα πυκνά κοκκία των ίδιων των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, αποτελώντας έναν βρόχο ενεργοποίησης μεταξύ συγκλίνων αιμοπεταλίων. <sup>5,13</sup> Οι υποδοχείς ADP στα αιμοπετάλια είναι η οικογένεια πρωτεϊνών P2Ys. Ο υποδοχέας P2Y1, εκκινεί την συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP και είναι υπεύθυνος για την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και επίσης ενισχύει και σταθεροποιεί την απόκριση συσσωμάτωσης <sup>13</sup>. Καθώς τα α-κοκκία, περιέχουν ADP, αυτό μπορεί να αποτελέσει έναν βρόχο ενεργοποίησης μεταξύ των αιμοπεταλίων που ενισχύει τη συσσώρευσή τους. <sup>13</sup>

Ο παράγοντας Von Willenbrand (vWF), είναι μια μεγάλου μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από ενδοθηλιακά κύτταρα Weibel-Palade και από μεγακαρυοκύτταρα. Υπάρχει στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και στον υποενδοθηλιακό συνδετικό ιστό. Παίζει ουσιαστικό ρόλο στην πρωτοπαθή και δευτεροπαθή αιμόσταση ως μεσολαβητής της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και ως φορέας για τον παράγοντα πήξης FVIII. Ο vWF εκτίθεται σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα όπου αλληλεπιδρά με την GPIIb των αιμοπεταλίων και υποστηρίζει την μετατόπιση των αιμοπεταλίων στο υποενδοθήλιο. Η ιντεγκρίνη  $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$  των αιμοπεταλίων, αλληλεπιδρά επίσης με τον vWF, προκαλώντας διασταυρούμενη σύνδεση των αιμοπεταλίων που επιτρέπει την συσσώρευση τους.<sup>14</sup>

Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, εκθέτουν αρνητικά φορτισμένη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) στη μεμβράνη τους. Αυτό λειτουργεί ως άγκυρα για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου προθρομβινάσης που μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συμβάλλουν επίσης στην εγγενή οδό της πήξης εκκρίνοντας Poly-P στα πυκνά κοκκία τους που ενεργοποιεί τον FXII. Εν τω μεταξύ, η πήξη από μόνη της θα ενεργοποιήσει επίσης τα αιμοπετάλια, καθώς η θρομβίνη θα ενεργοποιήσει τους υποδοχείς PARs στα αιμοπετάλια, δημιουργώντας έτσι έναν βρόχο θετικής ανάδρασης που ενισχύει σημαντικά τη διαδικασία αιμόστασης/πήξης.<sup>15</sup>

Παρακάτω, απεικονίζονται οι οδοί ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Εικόνα 2). Οι οδοί ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι σύνθετοι καταρράκτες σηματοδότησης που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, όπως αγγειακό τραυματισμό ή βιοχημικά σήματα στο αίμα. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι ένα κρίσιμο βήμα στο σχηματισμό θρόμβων αίματος (αιμόσταση) για την πρόληψη της υπερβολικής αιμορραγίας. Αυτές οι οδοί λειτουργούν συνεργιστικά για να ενισχύσουν τα σήματα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, οδηγώντας σε αλλαγή σχήματος, έκκριση κοκκίων, ενεργοποίηση ιντεγκρίνης και, τελικά, συσσώρευση αιμοπεταλίων και σχηματισμό θρόμβου στο σημείο της αγγειακής βλάβης. Η απορρύθμιση των οδών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μπορεί να οδηγήσει σε θρομβωτικές διαταραχές ή αιμορραγικές διαταραχές, υπογραμμίζοντας τη σημασία της διατήρησης μιας λεπτής ισορροπίας στη λειτουργία των αιμοπεταλίων.





Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των οδών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.<sup>15</sup>

### 3. Αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων και καρκινικών κυττάρων

#### 3.1 Αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων και καρκινικών κυττάρων

Υπάρχει μια πραγματική αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων και καρκίνου. Πράγματι, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικούς και ποικίλους ρόλους στην εξέλιξη του καρκίνου, μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με καρκινικά κύτταρα και με μακροχρόνιες έμμεσες αλληλεπιδράσεις, όπου μεσολαβούν οι απελευθερώσεις αιμοπεταλίων. Τα μικροκυστίδια (MVs, που αναφέρονται επίσης ως μικροσωματίδια) που απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια έχουν αναδειχθεί ως κύριοι συνεισφέροντες στον σύνδεσμο αιμοπεταλίων-καρκίνου. Οι αλληλεπιδράσεις των μικροκυστιδίων που προέρχονται από αιμοπετάλια (PMVs) με καρκινικά κύτταρα, μπορούν να προάγουν την εξέλιξη της νόσου μέσω πολλαπλών μηχανισμών, αλλά τα PMVs διαθέτουν επίσης αντικαρκινικές λειτουργίες. Αυτή η πολύπλοκη σχέση προέρχεται από τη δέσμευση των PMVs τόσο με καρκινικά κύτταρα όσο και με μη μετασχηματισμένα κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου και τη μεταφορά περιεχομένου που προέρχεται από αιμοπετάλια στο κύτταρο στόχο, καθένα από τα οποία μπορεί να έχει διεγερτικά ή ρυθμιστικά αποτελέσματα.

Τα μικροκυστίδια, είναι εξωκυτταρικά κυστίδια ετερογενούς μεγέθους, με διάμετρο από 100 nm έως 1 μm, που αποβάλλονται από τα ζωντανά κύτταρα κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης της πλασματικής μεμβράνης προς τα έξω, παγιδεύοντας

τοπικά κυτταροπλασματικά περιεχόμενα με φαινομενικά στοχαστικό τρόπο. Ως εκ τούτου, τα PMVs ενθυλακώνονται από μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων που φιλοξενεί επιφανειακές πρωτεΐνες και λιπίδια που αντικατοπτρίζουν το εξωτερικό των αιμοπεταλίων, με εσωτερικά συστατικά που περιλαμβάνουν ώριμα αγγελιοφόρα RNA που προέρχονται από αιμοπετάλια, προ-mRNA, microRNAs και άλλα μη κωδικοποιητικά RNA, πρωτεΐνες, δεύτερους αγγελιοφόρους και μιτοχόνδρια. Καθένα από αυτά τα στοιχεία εμπλέκεται σε καθιερωμένες και υποτιθέμενες λειτουργίες PMVs στον καρκίνο. Επιπλέον, τα PMVs συμβάλλουν στις συννοσηρότητες του καρκίνου λόγω του ρόλου τους στην πήξη και τη θρόμβωση και μέσω των αλληλεπιδράσεων με τα φλεγμονώδη κύτταρα. Ωστόσο, ο διαχωρισμός των επιδράσεων των παραπάνω από αυτές των αιμοπεταλίων σε περιβάλλοντα καρκίνου, εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό εμπόδιο.<sup>16</sup>

### **3.2 Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια**

Η συσχέτιση μεταξύ καρκίνου και θρόμβωσης είναι γνωστή από το 1865 όταν ο Armand Trousseau περιέγραψε για πρώτη φορά ότι οι εντοπισμένοι καρκίνοι μπορούν να προκαλέσουν σχηματισμό φλεβικού θρόμβου σε απομακρυσμένες τοποθεσίες.<sup>17</sup> Αυτή η κακοήθης θρόμβωση, είναι μια από τις πιο συχνές κλινικές εκδηλώσεις σε ασθενείς με καρκίνο και σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση και επιβίωση. Ο κύριος λόγος για τον υψηλό θρομβωτικό κίνδυνο σε ασθενείς με καρκίνο είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια και να διεγείρουν τη συσσώρευση μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών. Η επαγόμενη από κύτταρα όγκου συσσώρευση αιμοπεταλίων (TCIPA) έχει αποδειχθεί σε διάφορες κυτταρικές σειρές όπως του παγκρέατος, του παχέος εντέρου και των νεφρών.<sup>18</sup> Επιπλέον, η επαγόμενη από κύτταρα όγκου συσσώρευση αιμοπεταλίων, έχει συσχετιστεί με υψηλό μεταστατικό δυναμικό. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και στην επαγόμενη από κύτταρα όγκου συσσώρευση αιμοπεταλίων.<sup>14,15</sup>

Ένας σημαντικός μηχανισμός της επαγόμενης από κύτταρα όγκου συσσώρευσης αιμοπεταλίων, είναι η έκκριση θρομβίνης από καρκινικά κύτταρα. Η θρομβίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης που μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες, αλλά

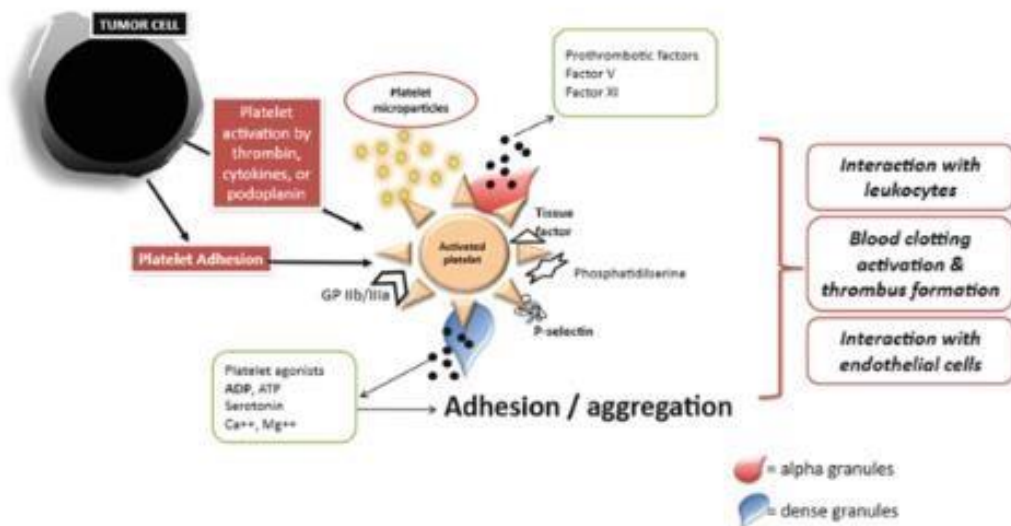
επίσης ενεργοποιεί τους παράγοντες πήξης V, VIII, XI και XIII και τους υποδοχείς PAR στα ίδια τα αιμοπετάλια.<sup>14</sup> Τα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος και του πνεύμονα συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια μέσω της έκκρισης θρομβίνης καθώς και της έκκρισης θρομβοξάνης A2. Τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν επίσης ADP, η οποία ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια μέσω των υποδοχέων P2Y1 και P2Y12, κάνοντας τα αιμοπετάλια να απελευθερώνουν περισσότερο ADP από τα πυκνά κοκκία τους και έτσι να ενεργοποιούν άλλα κοντινά αιμοπετάλια. Τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, του προστάτη και του μαστού μπορούν να δεσμεύσουν τον υποδοχέα FcγRIIa των αιμοπεταλίων και να προκαλέσουν πυκνή έκκριση κοκκίων στα αιμοπετάλια.<sup>6</sup> Διαφορετικοί τύποι καρκίνου όπως ο πλακώδης και ο βλαστικός έχουν επίσης αποδειχθεί ότι εκφράζουν την ποδοπλανίνη, η οποία συνδέεται με το εκφραζόμενο σε αιμοπετάλια CLEC-2 και προκαλεί ενεργοποίηση αιμοπεταλίων.<sup>19</sup>

Ο ιστικός παράγοντας (TF) είναι αναμφισβήτητα ο κύριος ενεργοποιητής του καταρράκτη πήξης, μόλις έρθει σε επαφή με τον ενεργοποιημένο παράγοντα VIIa στην κυκλοφορία του αίματος. Ο ιστικός παράγοντας εκφράζεται συχνά σε καρκινικά κύτταρα και σε μικροσωματίδια που προέρχονται από καρκίνο. Αυξημένα επίπεδα TF στον ορό έχουν αποδειχθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου και σε θρόμβωση που προκαλείται από χημειοθεραπεία. Τα αιμοπετάλια καθώς και τα μικροσωματίδια που προέρχονται από τον καρκίνο έχει επίσης περιγραφεί πως εκφράζουν ιστικούς παράγοντες στη μεμβράνη τους και έτσι συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και στη θρόμβωση που σχετίζεται με τον καρκίνο.<sup>20</sup>

Υπάρχουν και άλλοι έμμεσοι μηχανισμοί ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από τα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, οι βλεννίνες που εκφράζονται από καρκινικά κύτταρα μπορούν να αναγκάσουν τα αιμοπετάλια και τα κοκκιοκύτταρα να αλληλοεπιδράσουν. Στη συνέχεια, υπάρχει αμφίδρομη σηματοδότηση και απελευθέρωση καθεψίνης G από τα κοκκιοκύτταρα, η οποία διασπά τον ενεργοποιημένο υποδοχέα πρωτεάσης αιμοπεταλίων-4 (PAR4) και ενεργοποιώντας τις πρωτεΐνες G (Gq και G12/13) προκαλεί αλλαγή σχήματος και ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Υπάρχουν επίσης ελλείψεις που συνδέονται με κακοήθεια της πρωτεάσης διάσπασης vWF: ADAM13. Η έλλειψή της προκαλεί την κυκλοφορία μεγάλων πολυμερών vWF, τα οποία μπορούν με τη σειρά τους να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια.<sup>21</sup>

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τα καρκινικά κύτταρα έχει μια μυριάδα προκαρκινικών επιδράσεων όπως η τόνωση της ανάπτυξης του όγκου, η προετοιμασία της μεταστατικής θέσης και η βοήθεια των μεταστατικών κυττάρων να επιβιώσουν στην κυκλοφορία. Η επαγωγή μιας παρακρινούς σηματοδότησης με τη μεσολάβηση της κυκλοοξυγονάσης 2 (COX-2), μεταξύ των στρωματικών και επιθηλιακών κυττάρων στο αδένωμα που προκαλείται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορεί να δώσει στα επακόλουθα καρκινικά κύτταρα έναν πιο επιθετικό φαινότυπο. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η χαμηλή δόση ασπιρίνης μπορεί να έχει αντιμεταστατική δράση αναστέλλοντας την COX-1. Αυτή η αναστολή θα μείωνε την προκαλούμενη από τον καρκίνο ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων, έχοντας αντιμεταστατική δράση στα καρκινικά κύτταρα.<sup>22</sup>

Παρακάτω (Εικόνα 3), παρουσιάζεται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια μέσω πολλών μηχανισμών, οδηγώντας σε προσκόλληση και συσσώρευση αιμοπεταλίων. Ένας κοινός μηχανισμός περιλαμβάνει τα καρκινικά κύτταρα που απελευθερώνουν διάφορους παράγοντες όπως ο παράγοντας ιστού, η διφωσφορική αδενοσίνη και η θρομβίνη, οι οποίοι ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια κατά την επαφή. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να εκφράζουν επιφανειακά μόρια που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς των αιμοπεταλίων, προάγοντας την προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να προκαλέσει αλληλεπιδράσεις με λευκοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και ενεργοποίηση οδών πήξης του αίματος, οδηγώντας σε φλεγμονή, αγγειογένεση και σχηματισμό θρόμβων, τα οποία συμβάλλουν στην εξέλιξη και τη μετάσταση του όγκου. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ καρκινικών κυττάρων και αιμοπεταλίων διευκολύνει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση.



Εικόνα 3: Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τα καρκινικά κύτταρα.<sup>22</sup>

### 3.3 Η επιβίωση και η σύλληψη των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων από τα αιμοπετάλια

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι ο αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων ενισχύει τη μεταστατική δύναμη του καρκίνου, ενώ η θρομβοπενία (χαμηλός αριθμός αιμοπεταλίων) μπορεί να εμποδίσει τη διαδικασία. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα αιμοπετάλια έχουν πολλά μόρια προσκόλλησης, συμπεριλαμβανομένων των ιντεγκρινών (αIIbβ3), σελεκτινών (P-selectin), γλυκοπρωτεϊνών πλούσιων σε λευκίνη (P-selectin glycoprotein ligand -PSGL-1 και GPIIb/V/IX) και πρωτεϊνών υπεροικογένειας ανοσοσφαιρίνης (μόριο προσκόλλησης αιμοπεταλίων-ενδοθηλίου PECAM-1). Αυτά τα μόρια, τους επιτρέπουν να σχηματίζουν συσσωματώματα με καρκινικά κύτταρα για να τα προστατεύουν από τις δυνάμεις διάτμησης που διαφορετικά θα κατέστρεφαν τις μεμβράνες τους. Αυτά τα συσσωματώματα χρησιμεύουν επίσης για τη σταθεροποίηση της ανακοπής των καρκινικών κυττάρων στο ενδοθηλιακό τοίχωμα.<sup>24</sup>

Η επαγόμενη από κύτταρα όγκου συσσώρευση αιμοπεταλίων, έχει ως αποτέλεσμα τα αιμοπετάλια να επικαλύπτουν το καρκινικό κύτταρο και έτσι να το προστατεύουν από τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK) στην κυκλοφορία του αίματος.

Μπορούν επίσης να βλάψουν την κυτταρολυτική/ογκολυτική δραστηριότητα που προκαλείται από τα φυσικά φονικά κύτταρα, εκκρίνοντας TGF-β αιμοπεταλίων. Ο TGF-β βλάπτει την κινητοποίηση των φονικών κυττάρων και την έκκριση ιντερφερόνης-γ με μείωση της ρύθμισης του ανοσοϋποδοχέα NKG2D.<sup>25</sup>

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο τα αιμοπετάλια βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα, είναι με τη μεταφορά πρωτεΐνης μεμβράνης. Στη μέση του συσσωματώματος των αιμοπεταλίων, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να συνεκφράζουν δείκτες αιμοπεταλίων καθώς και κύρια μόρια ιστοσυμβατότητας (MHC) για να καμουφλάρονται περαιτέρω.<sup>26</sup> Τα αιμοπετάλια υποστηρίζουν την ανακοπή των καρκινικών κυττάρων με τον ίδιο τρόπο που συμβάλλουν στην ανακοπή των λευκοκυττάρων: με σύνδεση που εξαρτάται από σελεκτίνη (P-selectin) και προσκόλληση εξαρτώμενη από ιντεγκρίνη (αIIbβ3, GP-Iba και vWF, όλα συμβάλλουν στη σταθερή προσκόλληση).<sup>17</sup> Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί, ότι πολλά καρκινικά κύτταρα, εκφράζουν «υποδοχείς αιμοπεταλίων» όπως αIIbβ3, αVβ3 ή GP-Iba.<sup>26</sup> Αυτοί οι υποδοχείς όχι μόνο βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να ξεφύγουν από την ανοσολογική απόκριση, αλλά επίσης μεσολαβούν σε άμεσες αλληλεπιδράσεις καρκίνου-ενδοθηλίου και καρκίνου-λευκοκυττάρου που προάγουν την εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων και τα προετοιμάζουν για τον αποικισμό του ιστού στόχου.<sup>27</sup>

Μια άλλη σημαντική επίδραση της επαγόμενης από κύτταρα όγκου συσσώρευσης αιμοπεταλίων στην ενδοθηλιακή μετανάστευση του καρκίνου, είναι η απελευθέρωση ADP από τα πυκνά κοκκία των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Η διφωσφορική αδενοσύνη, αλληλεπιδρά με τον ενδοθηλιακό υποδοχέα PY2 (P2Y1R), προκαλώντας χαλαρότερες συνδέσεις ενδοθηλιακών κυττάρων και επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να περάσουν πιο εύκολα. Η σεροτονίνη περιέχεται επίσης στα πυκνά κοκκία και πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι με τον αποκλεισμό του υποδοχέα της, αναστέλλεται η μεταστατική εξάπλωση. Οι ασθενείς με καρκίνο που τείνουν να έχουν υψηλότερα από τα μέσα επίπεδα σεροτονίνης στο αίμα, έχουν χειρότερη πρόγνωση και επιβίωση.<sup>28</sup>

## **4. Τα αιμοπετάλια στην εξέλιξη και μετάσταση του όγκου**

### **4.1 Επίδραση των αιμοπεταλίων στην ανάπτυξη του όγκου**

Τα αιμοπετάλια έχουν μυριάδες αυξητικούς παράγοντες αποθηκευμένους στα α-κοκκία τους.<sup>1,8</sup> Είναι παρόντα στο μικροπεριβάλλον του όγκου έξω από τα αγγεία, όπου μπορούν να έρθουν σε άμεση επαφή με τα κακοήθη κύτταρα. Όταν ενεργοποιούνται, εκκρίνουν μετασχηματιστικό αυξητικό παράγοντα βήτα (TGF-β), αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF). Αυτοί οι παράγοντες όχι μόνο επάγουν την ανάπτυξη του όγκου, αλλά προάγουν επίσης την αγγειογένεση και τη νεοαγγείωση του όγκου.

Είναι σημαντικό επίσης να ληφθεί υπόψη, ότι τα αιμοπετάλια έχουν επίσης αντικαρκινική δράση. Πρόσφατα, το microRNA που προέρχεται από αιμοπετάλια έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός ρυθμιστής της ανάπτυξης όγκου. Τα μικροσωματίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια μεταφέρουν το miR-24 σε καρκινικά κύτταρα που στοχεύουν τα mt-Nd2 και Snora75, ενεργοποιώντας τη ρύθμιση των μιτοχονδρίων και αναστέλλοντας την ανάπτυξη του όγκου. Αυτό δείχνει ότι η λειτουργία των αιμοπεταλίων και οι επιπτώσεις στην εξέλιξη του καρκίνου μπορεί να εξαρτώνται από το στάδιο και το πλαίσιο.<sup>23</sup>

### **4.2 Αιμοπετάλια, φλεγμονή και καρκίνος**

Οι κακοήθεις όγκοι έχουν συχνά περιγραφεί ως πληγές που δεν επουλώνονται. Μερικά από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του όγκου είναι η συστατική του αγγειογένεση και η πολυετής φλεγμονή καθώς και η διήθηση ινοβλαστών και η συνεχής αναγέννηση του στρώματος. Το αγγειακό σύστημα στους όγκους είναι συχνά διαφραγμένο, διευκολύνοντας την δια-ενδοθηλιακή μεταφορά και εκθέτοντας υποενδοθηλιακούς παράγοντες όπως το κολλαγόνο και τον TF.<sup>10</sup> Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια μέσω των διαφόρων μηχανισμών επαγόμενης από κύτταρα όγκου συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Με την πρόσθετη επίδραση των εκτεθειμένων υποενδοθηλιακών

προπηκτικών παραγόντων, υπάρχει ένας συνεχής βρόχος ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους που ρυθμίζει το μικροπεριβάλλον του όγκου, συμπεριλαμβανομένων των προφλεγμονωδών κυτοκινών.<sup>29</sup>

Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια είναι ισχυροί στρατολογήτες και ενεργοποιητές των λευκοκυττάρων. Αυτά τα μόρια περιλαμβάνουν CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL7, CXCL12 και ιντερλευκίνη-8 (IL8). Η χημειοκίνη CXCL12 προσελκύει αιμοποιητικά κύτταρα στη θέση του όγκου, διεγείροντας την ανάπτυξη του όγκου και την αγγειογένεση. Τα μακροφάγα είναι επίσης CXCR4 θετικά κύτταρα που στρατολογούνται στη θέση του όγκου από το εκφραζόμενο σε αιμοπετάλια CXCL12. Από την άλλη πλευρά, η έκκριση αιμοπεταλίων CXCL5 και CXCL7 σε απομακρυσμένες θέσεις προς τον πρωτοπαθή όγκο προσλαμβάνουν κοκκιοκύτταρα για να προετοιμάσουν την προμεταστατική θέση.

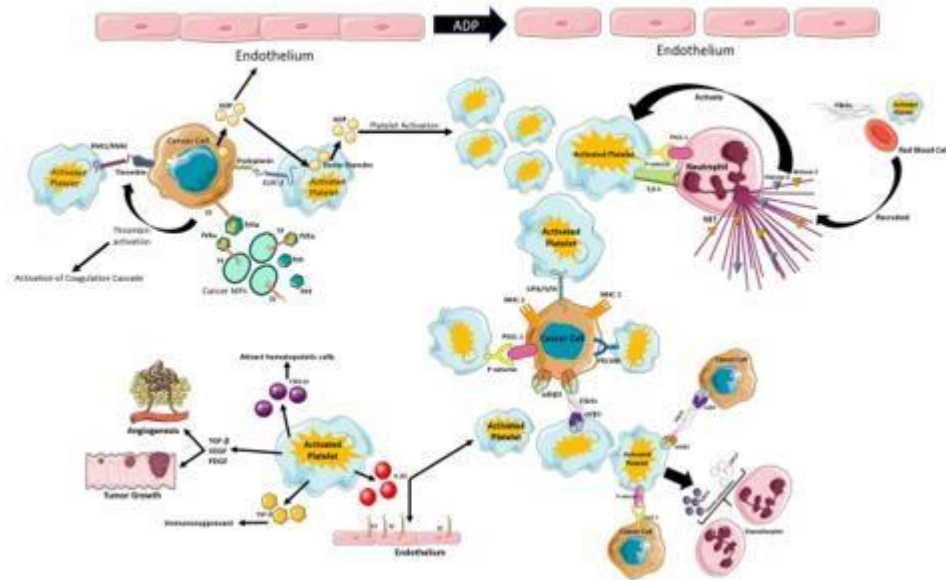
Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκφράζουν επίσης την IL-1β (συντίθεται στο αιμοπετάλιο από το pre-mRNA). Η IL-1β επάγει την έκφραση του TF σε ενδοθηλιακά κύτταρα και διεγείρει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ενδοθηλίουλευκοκυττάρου. Η IL-1β προάγει επίσης την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με αυτοκρινή τρόπο μέσω του υποδοχέα IL-1.<sup>29</sup>

Ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β) που εκφράζεται και εκκρίνεται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχει ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και βοηθά στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την αναγνώριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο TGF-β, είναι επίσης εν μέρει υπεύθυνος για τον μετασχηματισμό των ουδετερόφιλων προς έναν προ-ογκογόνο φαινότυπο<sup>29</sup>.

Όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 4), η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στον καρκίνο μπορεί να οδηγήσει σε θρομβοφλεγμονή μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως άμεση ενεργοποίηση από καρκινικά κύτταρα, αλληλεπίδραση με λευκοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, ενεργοποίηση της πήξης του αίματος, απελευθέρωση παραγόντων που προέρχονται από αιμοπετάλια (αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες και χημειοκίνες, οι οποίες προάγουν περαιτέρω τη φλεγμονή, την αγγειογένεση και την εξέλιξη του όγκου ενώ συμβάλλουν στον σχηματισμό θρόμβων). Συνολικά, αυτοί οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων συμβάλλουν στη θρομβο-φλεγμονή στον



καρκίνο, ενισχύοντας ένα μικροπεριβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξη του όγκου, τη μετάσταση και τις θρομβωτικές επιπλοκές.



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών μηχανισμών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων που μπορούν να οδηγήσουν σε θρομβο-φλεγμονή στον καρκίνο.<sup>29</sup>

### 4.3 Αιμοπετάλια και Σχηματισμός NETs στον Καρκίνο

Τα ουδετερόφιλα είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού και παραδοσιακά χαρακτηρίζονται από δύο τρόπους δράσης: την εμφύσηση παθογόνων και την έκκριση αντιμικροβιακής ουσίας. Τα τελευταία χρόνια έχει εντοπιστεί μια νέα λειτουργία: εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων (NETs). Οι εξωκυτταρικές αυτές παγίδες ουδετερόφιλων, είναι το αποτέλεσμα της αποβολής της χρωματίνης και του κοκκώδους περιεχομένου των ουδετερόφιλων από τον πυρήνα για να σχηματίσουν μια δομή που μοιάζει με ιστό. Αυτή η δομή μπορεί φυσικά να παγιδεύσει και να σκοτώσει παθογόνα.<sup>29</sup> Υπάρχουν πρόσφατες μελέτες που υποδηλώνουν ότι τα NETs μπορεί επίσης να εμπλέκονται στην εξέλιξη του όγκου, στην μετάσταση και στη θρόμβωση που σχετίζεται με τον καρκίνο.<sup>30</sup>

Το αιμοπεταλιακό TLR4 (Toll-like receptor 4) μπορεί να προκαλέσει NETosis σε ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και οι ιστόνες 3 και 4 που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μπορούν με τη σειρά τους να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια σε έναν συνεχή βρόχο. Το εξωκυτταρικό DNA, είναι ικανό να δεσμεύει

και να ενεργοποιεί τον παράγοντα πήξης XII καθώς και να ενεργοποιεί απευθείας τα αιμοπετάλια. Επιπλέον, η ενεργοποιημένη P-σελεκτίνη αιμοπεταλίων, μπορεί να ενεργοποιήσει τα ουδετερόφιλα μέσω της ενεργοποίησης του συνδέτη-1 της γλυκοπρωτεΐνης P-σελεκτίνης (PSGL-1) και να πυροδοτήσει τον σχηματισμό εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων.<sup>31</sup> Αυτές οι οδοί ενεργοποίησης, υποδηλώνουν ότι τα NETs είναι πράγματι ένας προπηκτικός παράγοντας καθώς παρέχουν ένα ισχυρό ερέθισμα καθώς και ένα ικρίωμα για τον σχηματισμό θρόμβων. Επίσης, προάγουν την εναπόθεση ινώδους, στρατολογούν ερυθρά αιμοσφαίρια και ενισχύουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και με τη σειρά της, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προάγει το σχηματισμό των εξωκυτταρικών αυτών παγίδων ουδετερόφιλων.<sup>31</sup>

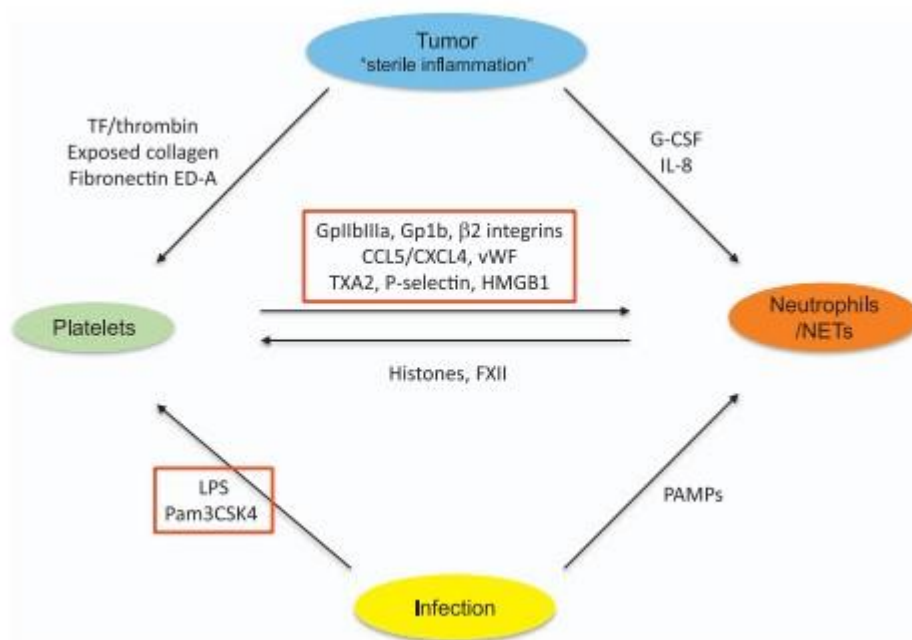
Πράγματι, η σύνδεση μεταξύ του σχηματισμού των εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων και της φλεβικής θρομβοεμβολής έχει αποδειχθεί από καιρό. Σε ένα μοντέλο λαγόνιας θρόμβωσης που προκαλείται από απόφραξη σε μπαμπούνους, οι ερευνητές κατέδειξαν αύξηση στην κυκλοφορία των NETs μετά από 48 ώρες, η οποία διατηρήθηκε για 6 διαδοχικές ημέρες, μαζί με την παρουσία δεικτών DNA στον θρόμβο. Μια άλλη ομάδα έδειξε ότι το DNA του πλάσματος είναι αυξημένο σε ασθενείς με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση έναντι υγιών ασθενών.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί, ότι τα ουδετερόφιλα που προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο, είναι πιο επιρρεπή σε NETosis όταν εκτίθενται σε παραμεθοξυαμφοταμίνη (PMA) σε σχέση με εκείνα από υγιείς ασθενείς. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τις ιδιότητες ενεργοποίησης των εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων, του παράγοντα διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων (G-CSF) και της IL-8, που εκκρίνονται τοπικά από καρκινικά κύτταρα.

Έχει αναφερθεί ότι τα αιμοπετάλια που έχουν μορφωθεί με όγκο μπορεί να ασκούν μια επίδραση προ-NETosis στα ουδετερόφιλα του μικροπεριβάλλοντος όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα NETs για να προστατευθούν από το διατμητικό στρες στην κυκλοφορία και από το ανοσοποιητικό σύστημα κατά τη διάρκεια της μεταστατικής διαδικασίας.<sup>29</sup> Η επαγόμενη από τις εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου, ενισχύοντας την επαγόμενη από κύτταρα όγκου συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την προθρομβωτική κατάσταση.

Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα και πληροφορίες για να ρίξει φως στη συμβολή των αιμοπεταλίων στη δημιουργία NETs και τη συμμετοχή τους στην εξέλιξη του καρκίνου.

Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 5), φαίνεται ότι τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του σχηματισμού εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων τόσο άμεσα μέσω αλληλεπιδράσεων με ουδετερόφιλα όσο και έμμεσα απελευθερώνοντας διαλυτούς παράγοντες που ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα. Όταν τα παθογόνα εισβάλλουν στο σώμα, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με το παθογόνο (PAMPs) και της απελευθέρωσης διαλυτών μεσολαβητών. Έτσι, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν παράγοντες που διεγείρουν τα ουδετερόφιλα, οδηγώντας στο σχηματισμό NETs, τα οποία παγιδεύουν και σκοτώνουν παθογόνα, ενισχύοντας έτσι την ανοσοαπόκριση του ξενιστή έναντι της μόλυνσης. Τα αιμοπετάλια λοιπόν, διεγείρουν τα ουδετερόφιλα ώστε να απελευθερώσουν εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων στο μικροπεριβάλλον του όγκου.



Εικόνα 5: Εξαρτώμενη από τα αιμοπετάλια ρύθμιση του σχηματισμού εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων.<sup>49</sup>

#### 4.4 Απόδραση από την ανοσολογική επιτήρηση

Οι ετερογενείς μανδύες των αιμοπεταλίων και των καρκινικών κυττάρων προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα από υψηλές δυνάμεις διάτμησης στην κυκλοφορία του αίματος καθώς και από επίθεση από λευκοκύτταρα. Τα αιμοπετάλια και το ινωδογόνο, προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα στο αγγείο από την κάθαρση από τα φυσικά φονικά κύτταρα. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός που επάγεται από τα αιμοπετάλια για την προστασία των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση, είναι διαφορούμενος. Ο μανδύας των αιμοπεταλίων και των καρκινικών κυττάρων εμφανίζει ενεργό φαινότυπο, εκκρίνοντας μια πληθώρα παραγόντων που προέρχονται από αιμοπετάλια, όπως η ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ή ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). Ο TGF- $\beta 1$  προκαλεί μια μείωση της ρύθμισης των υποδοχέων NKG2D που μοιάζουν με λεκτίνη τύπου C, η οποία προκαλεί μειωμένη αντικαρκινική δραστηριότητα στα φυσικά φονικά κύτταρα.

Επιπλέον, ύστερα από έρευνες, φάνηκε ότι τα αιμοπετάλια προσδίδουν μόρια μείζοντος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I στις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων με σχηματισμό άμεσης επαφής, που οδηγεί σε ανακούφιση της αντιδραστικότητας των φυσικών φονικών κυττάρων και της κυτταροτοξικότητας προς τα καρκινικά κύτταρα.<sup>32</sup>

Αυτός ο μηχανισμός μοριακής μίμησης που προσαρμόζει έναν ψευδοφυσιολογικό φαινότυπο, επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να μειώνουν την ρύθμιση των μορίων MHC κατηγορίας I για να ξεφύγουν από την ανοσολογική επιτήρηση των κυτταροτοξικών T κυττάρων. Στην κυκλοφορία του αίματος, η μεταφορά ανοσορυθμιστικών πρωτεϊνών τελικά οδηγεί σε MHC κατηγορίας I θετικό φαινότυπο χωρίς επαγωγή δραστηριότητας των φυσικών φονικών κυττάρων. Επιπλέον, λόγω της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με τη μεσολάβηση των κυττάρων όγκου, ο συνδέτης που σχετίζεται με τον παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF, (GITRL) που προκαλείται από γλυκοκορτικοειδές μέλος της οικογένειας TNF που βρίσκεται σε ακοκκία, συνεκφράζεται με την P-σελεκτίνη στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Ο GITRL δεν έδειξε καμία επίδραση στην ενεργοποίηση ή τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, ενώ η κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων και η απελευθέρωση IFN $\gamma$  μειώνονται εκπληκτικά. Ο συνδέτης αυτός, που προέρχεται από αιμοπετάλια φαίνεται να ενεργοποιεί τον GATR σε φυσικά φονικά κύτταρα και να υποκινεί έναν φαινότυπο

κυττάρων όγκου με μετριασμένη ανοσογονικότητα.<sup>33</sup> Ο αποκλεισμός του GITR στα φυσικά φονικά κύτταρα αντισταθμίζει εν μέρει τη μειωμένη κυτταροτοξικότητα τους, η οποία προκαλείται από κύτταρα όγκου που καλύπτονται από αιμοπετάλια. Δίπλα στα φυσικά αυτά φονικά κύτταρα, τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης να παρεμβαίνουν στα δενδριτικά κύτταρα, στα ουδετερόφιλα, στα μακροφάγα και στα λεμφοκύτταρα και να ρυθμίζουν την ανοσολογική τους λειτουργία.

Ωστόσο, η επίδραση των αιμοπεταλίων στην προσαρμοστική ανοσία είναι διφορούμενη. Πρόσφατα, ο Rachidi ανακάλυψε ότι τα αιμοπετάλια είναι η κύρια πηγή του TGF-β στο μικροπεριβάλλον του όγκου μέσω της έκφρασης του TGF-βπροσαρτημένου υποδοχέα γλυκοπρωτεΐνης Α (GARP). Η λειτουργία του GARP, είναι να ενεργοποιεί τον λανθάνοντα TGF-β σε κοντινή απόσταση από τα αιμοπετάλια. Το σύμπλεγμα GARP-TGFβ μαζί με το γαλακτικό που εκκρίνεται από αιμοπετάλια ανέστειλε την ανοσία των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων έναντι τόσο του μελανώματος όσο και του καρκίνου του παχέος εντέρου.<sup>34</sup> Αυτά τα δεδομένα τεκμηριώνουν την ιδέα ότι τα αιμοπετάλια παρεμβαίνουν στο έμφυτο καθώς και στο προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα για την αντιμετώπιση των καρκινικών κυττάρων.

#### **4.5 Μεσολάβηση αιμοπεταλίων στην εξαγγείωση καρκινικών κυττάρων**

Εκτός από την προστασία από την ανοσολογική επιτήρηση, τα αιμοπετάλια και οι υποδοχείς προσκόλλησης αιμοπεταλίων παρουσιάζουν περαιτέρω ευεργετικά αποτελέσματα για την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων και την εξαγγείωση σε μακρινά όργανα. Οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων είναι προικισμένες με ένα πλήθος μορίων προσκόλλησης, όπως έξι διαφορετικές ιντεγκρίνες (αIIbβIII, α2β1, α5β1, α6β1, αLβ2, ανβ3), GPIb-IX-V, GPVI, CLEC-2 και P-σελεκτίνη. Τα περισσότερα δεδομένα που αφορούν τον ρόλο των υποδοχέων προσκόλλησης στον μεταστατικό καταρράκτη, είναι διαθέσιμα για την ιντεγκρίνη αIIbβIII, GPIb-IX-V και P-σελεκτίνη. Αντίστοιχα, η προμεταστατική τους δράση προφανώς συσχετίζεται είτε με την έκφρασή τους στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, είτε με τους ρόλους τους ως μόρια-στόχους στη θρόμβωση και την πήξη. Η οικογένεια των υποδοχέων προσκόλλησης σελεκτίνης αποτελείται από 3 λεκτίνες τύπου C, ενώ η P-σελεκτίνη εκφράζεται κυρίως στα αιμοπετάλια καθώς και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατά την ενεργοποίηση των

αιμοπεταλίων, η P-σελεκτίνη από α-κοκκία μετατοπίζεται σε επιφάνειες αιμοπεταλίων και μεσολαβεί στη δέσμευση αιμοπεταλίων σε λευκοκύτταρα ή ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αναστολή της P-σελεκτίνης, μπορεί να εμποδίσει τη συσσώρευση λευκοκυττάρων σε έναν αναπτυσσόμενο θρόμβο, καθώς και την εναπόθεση ινώδους που εμφανίζει τον κρίσιμο ρόλο των P-σελεκτινών στην πήξη και τη στρατολόγηση λευκοκυττάρων. Σε διαφορετικές μελέτες, ένας αποκλεισμός ή ανεπάρκεια P-σελεκτίνης, οδήγησε σε τεράστια μείωση στις μεταστατικές εστίες των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου στους πνεύμονες των ποντικών και σε μετριασμό της δέσμευσης των αιμοπεταλίων με τα κύτταρα όγκου.<sup>35</sup>

#### **4.6 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων και των υποδοχέων τους στη μετάσταση του καρκίνου**

Εκτός από τον κρίσιμο ρόλο τους στην πήξη και στη διατήρηση της αιμόστασης μετά από τραυματισμό των αγγείων, τα αιμοπετάλια περιέχουν μια πληθώρα βιοενεργών μορίων στα κοκκία τους και εκφράζουν διαφορετικούς υποδοχείς στις επιφάνειές τους που συμβάλλουν επίσης στη φλεγμονή, την εξέλιξη του καρκίνου και τη μετάσταση. Στα αρχικά λεπτά, όταν τα καρκινικά κύτταρα αποσπώνται από τον πρωτοπαθή όγκο και έχουν πρόσβαση στο αίμα, τα αιμοπετάλια είναι τα πρώτα κύτταρα-ξενιστές που συναντούν. Ο σχηματισμός συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων κυττάρων όγκου παρατηρήθηκε σε πειραματικά μοντέλα μεταστάσεων σε ποντίκια και αρουραίους. Ο ενισχυμένος σχηματισμός μεταστάσεων στους πνεύμονες συνοδεύτηκε από θρομβοπενία. Μετά από αυτές τις πρώιμες παρατηρήσεις ετεροτυπικών και προογκογονικών συσσωματωμάτων καρκινικών κυττάρων και αιμοπεταλίων, τις τελευταίες δεκαετίες, η γνώση για το πώς τα καρκινικά κύτταρα εκμεταλλεύονται τα αιμοπετάλια για επιβίωση, σύλληψη και τελικά εξαγγείωση από τα αιμοφόρα αγγεία σε μακρινά όργανα έχει αυξηθεί τρομερά.

Έτσι, διάφορες εξαιρετικές ανασκοπήσεις έχουν αφιερωθεί στον ρόλο των αιμοπεταλίων στη μετάσταση καρκίνου τα τελευταία χρόνια, συζητώντας τη συμβολή των υποδοχέων προσκόλλησης, όπως η P-σελεκτίνη ή η ιντεγκρίνη αIIbβIII, υποδοχέων που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια όπως ο P2Y<sub>12</sub> ή ο ενεργοποιημένος από πρωτεάση υποδοχέας-1 (PAR-1), ή και αυξητικών παραγόντων και χημειοκινών που προέρχονται από αιμοπετάλια.<sup>36</sup>

#### 4.7 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στη μετάσταση του καρκίνου- Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων

Τα καρκινικά κύτταρα που εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος πρέπει να αντιμετωπίσουν τους υψηλούς ρυθμούς διάτμησης και την ανοσολογική επιτήρηση, π.χ. την επίθεση των φυσικών φονικών κυττάρων. Τα αιμοπετάλια προστατεύουν τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), εγκλωβίζοντας τα καρκινικά κύτταρα σε έναν θρόμβο, προστατεύοντάς τα από την κυτταρόλυση από τα φυσικά κύτταρα φονείς. Για μια σταθερή προσκόλληση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των καρκινικών κυττάρων, τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια με διακριτούς μηχανισμούς, οι οποίοι είναι επίσης ο λόγος για την υπερπηκτικότητα και τον αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης σε ασθενείς με καρκίνο. Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν διαλυτούς μεσολαβητές όπως ADP, θρομβοξάνη A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) ή ομάδα υψηλής κινητικότητας (HMGB1), που συνδέεται με τον TLR4 (Toll Like Receptor) που μοιάζει με «διόδιο» για να υποκινήσει τοπική ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Πρόσφατα, ο Ward et al αποκάλυψε ότι η προσκόλληση που εκφράζεται από καρκινικά κύτταρα υποδοχέα συζευγμένου με πρωτεΐνη πρόσφυσης G (GPCR) CD97, προκάλεσε ενεργοποίηση αιμοπεταλίων που οδηγεί σε απελευθέρωση λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA) από τα αιμοπετάλια. Το λυσοφωσφατιδικό οξύ με τη σειρά του, ενισχύει τη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων και την αγγειακή διαπερατότητα για την προώθηση της διαενδοθηλιακής μετανάστευσης. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν τον TF στις κυτταρικές τους μεμβράνες, ο οποίος ενεργοποιεί τον καταρράκτη της πήξης και τελικά παράγει θρομβίνη, η οποία με τη σειρά της επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Εκτός από την ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης και των αιμοπεταλίων, η θρομβίνη είναι βασικής σημασίας για σχεδόν κάθε βήμα του μεταστατικού καταρράκτη. Η θρομβίνη ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη του όγκου, π.χ. με την ενεργοποίηση του PAR1 και του ινωδογόνου.

Στο μικροπεριβάλλον του όγκου, οι ινοβλάστες και τα μακροφάγα που διεγείρονται από τη θρομβίνη εκκρίνουν χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων που ευνοεί την εισβολή των προογκογονικών μυελοειδών κυττάρων. Η θρομβίνη έχει επίσης αρκετές επιδράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα που υποστηρίζουν την αγγειογένεση, για παράδειγμα με την ενίσχυση της μιτογόνου δραστηριότητας του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, η θρομβίνη αναστέλλει την απόπτωση και

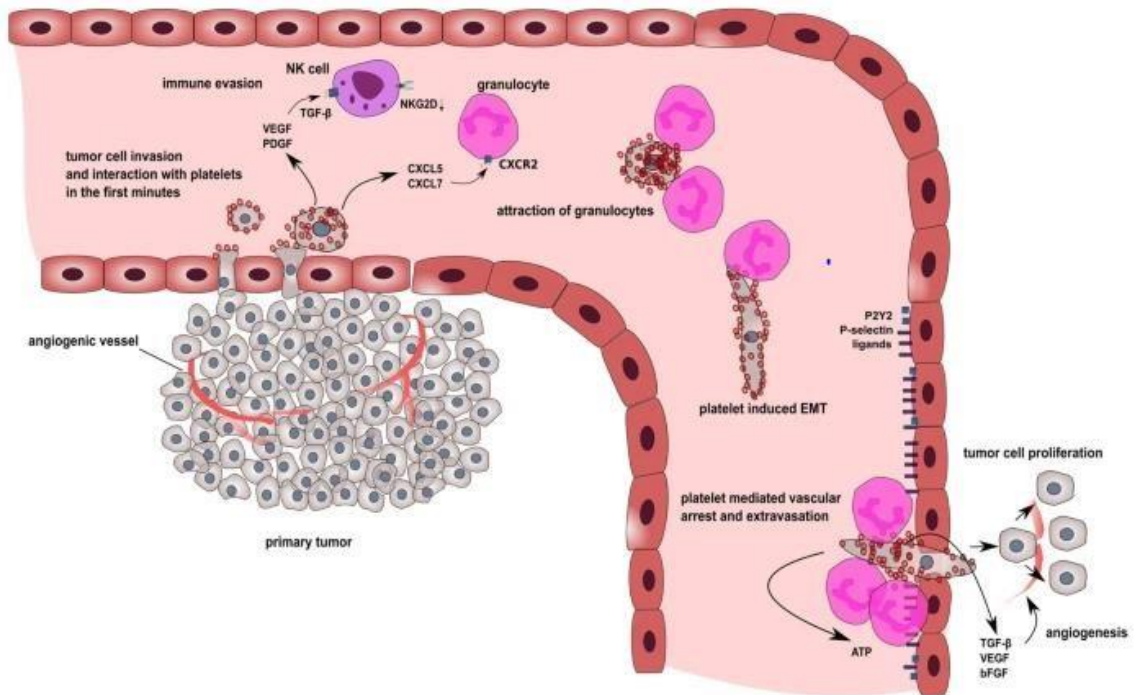
επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αγγειακών προγονικών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που διεγείρονται από τη θρομβίνη αποκαλύπτουν μια στρογγυλεμένη μορφολογία, που διευκολύνει τη διαενδοθηλιακή μετανάστευση των κυττάρων όγκου.<sup>37</sup>

Εκτός από τη θρομβίνη, αποσαφηνίστηκαν αρκετοί άλλοι μηχανισμοί που ασκούν επαγόμενη από καρκινικά κύτταρα ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Πρόσφατα, ο Shao αποκαλύψε, ότι οι βλεννίνες του καρκινώματος ξεκινούν έναν μηχανισμό αμοιβαίας ενεργοποίησης σε ουδετερόφιλα και αιμοπετάλια. Οι βλεννίνες, συνδέονται με την P-σελεκτίνη στα αιμοπετάλια και την L-σελεκτίνη στα ουδετερόφιλα φέρνοντας και τα δύο κύτταρα σε κοντινή απόσταση. Μια άμεση αλληλεπίδραση της P-σελεκτίνης των αιμοπεταλίων και της PSGL-1 στα ουδετερόφιλα επάγει την απελευθέρωση της καθεσπίνης G από τα ουδετερόφιλα, προκαλώντας την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.<sup>37</sup> Επιπλέον, ορισμένοι ασθενείς με όγκο που πάσχουν από διάφορα είδη καρκίνου έχουν ανεπάρκεια σε ένζυμα που διασπούν τον παράγοντα von Willebrand, που θα μπορούσε τελικά να οδηγήσει σε ενεργοποίηση αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία και σε αυξημένο αριθμό μεταστάσεων. Αργότερα, ο TF αναγνωρίστηκε σε κυστίδια που προέρχονται από όγκο ως ο λόγος για την προπηκτική δραστηριότητα. Επιπλέον, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας που προέρχονται από κύτταρα όγκου (MMPs), μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων με τη σειρά του μπορεί να προκαλέσει αυξημένη έκφραση MMPs στα κύτταρα μελανώματος.<sup>38</sup> Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν πολλές διαφορετικές επιλογές για να προκαλέσουν την πήξη και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε κοντινή απόσταση. Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τα καρκινικά κύτταρα και τα αιμοπετάλια σχηματίζουν συσσωματώματα χρησιμοποιώντας διάφορους υποδοχείς προσκόλλησης.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη μεταστατική διαδικασία προάγοντας την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, την προσκόλληση, την εξαγγείωση, την αγγειογένεση (απελευθερώνουν προ-αγγειογενείς παράγοντες όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αυτά (PDGF), οι οποίοι προάγουν το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων στη μεταστατική θέση), την ανοσορύθμιση (μπορούν να αλληλεπιδράσουν με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως T



κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα και φυσικά κύτταρα φονείς, αναστέλλοντας τις αντικαρκινικές δραστηριότητές τους και προάγοντας την ανοσολογική διαφυγή από τα καρκινικά κύτταρα) αλλά και τη θρόμβωση.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των αιμοπεταλίων στην μετάσταση καρκινικών κυττάρων.<sup>36</sup>

#### 4.8 Συμβολή των αιμοπεταλίων στην ανάπτυξη και αγγειογένεση του όγκου

Κατά τη διακοπή της εμβολής των καρκινικών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα λόγω της μεσολάβησης των αιμοπεταλίων, τα πυκνά κοκκία στα αιμοπετάλια εκκρίνουν ATP, που με την σειρά του συνδέεται και ενεργοποιεί τους ενδοθηλιακούς υποδοχείς P2Y2. Στη συνέχεια, ο ενδοθηλιακός φραγμός ανοίγει και διευκολύνεται η μετανάστευση και η εξαγγείωση των κυττάρων όγκου για να σχηματιστούν μεταστατικές εστίες. Δίπλα στο ATP, το έκκριμα των αιμοπεταλίων αποτελείται από μια πληθώρα περισσότερων από 300 βιοδραστικών μορίων που απομονώνονται στο τοπικό μικροπεριβάλλον μετά την ενεργοποίηση. Μερικά από αυτά τα μόρια είναι προικισμένα με την ικανότητα να ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη του όγκου. Σε ένα μοντέλο ορθοτοπικού όγκου παγκρέατος ποντικού, η καθημερινή χορήγηση του αναστολέα P2Y12 (Κλοπιδογρέλη) μείωσε σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης του όγκου και τον αριθμό των μεταστατικών εστιών.

Ο αποκλεισμός της ιντεγκρίνης  $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ , οδήγησε σε μειωμένη μετανάστευση, εισβολή και πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και επίσης ο μέσος όγκος όγκου των υποδορίως εγχυόμενων κυττάρων μελανώματος σε γυμνά ποντίκια και αρουραίους μετριάστηκε βαθιά.<sup>39</sup>

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αγγειογένεση έχει αναγνωριστεί από καιρό σε αρκετές *in vitro* και *in vivo* μελέτες που εφαρμόζουν ποικίλες αγγειογενετικές δοκιμασίες. Πολλά μόρια, αποθηκευμένα στα  $\alpha$ -κοκκία των αιμοπεταλίων, παρουσιάζουν προαγγειογενετικές ιδιότητες όπως ο VEGF, ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF), ο bFGF ή ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) αλλά και τα μόρια που παρουσιάζουν αντιαγγειογενετικά αποτελέσματα, π.χ. ενδοστατίνη, αγγειοστατίνη, PF4 ή θρομβοσπονδίνη μεταξύ άλλων εντοπίζονται στα αιμοπετάλια. Τα επίπεδα VEGF στον ορό ασθενών που πάσχουν από διάφορους καρκίνους είναι συχνά αυξημένα, γεγονός που συσχετίζεται με προχωρημένη νόσο και κακή πρόγνωση.<sup>40</sup> Οι αυξημένες συγκεντρώσεις VEGF θα μπορούσαν δυνητικά να συμβάλουν στο σχηματισμό αγγείων όγκου, αλλά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα στους ιστούς του όγκου έχουν την ικανότητα να συλλαμβάνουν αιμοπετάλια με αυξημένη έκφραση TF. Έτσι, ο TF παράγει τελικά θρομβίνη και ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια μέσω του PAR-1, το οποίο κορυφώνεται με τοπική καθίζηση αιμοπεταλίων και απελευθέρωση αυξητικού παράγοντα. Κατά την ενεργοποίηση, τα αιμοπετάλια εκφράζουν το CD154, γνωστό και ως συνδέτη CD40, το οποίο είναι επίσης ικανό να επιταχύνει την αγγειογένεση.<sup>41</sup> Τα ποντίκια με ανεπάρκεια CD40 εμφανίζουν μειωμένη ανάπτυξη όγκου και ατροφία αγγείων όγκου στους μαστικούς αδένες.

Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν με την εφαρμογή της κλοπιδογρέλης σε ποντίκια, η οποία παρείχε στοιχεία ότι τα αιμοπετάλια εξέφραζαν το CD40L και στη συνέχεια μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων και του ιστού του όγκου ευθύνεται για τη νεοαγγείωση. Όπως προαναφέρθηκε, τα αιμοπετάλια περιέχουν προ- και αντιαγγειογενείς παράγοντες, οι οποίοι αποθηκεύονται σε διαφορετικά  $\alpha$ -κοκκία και οι οποίοι απελευθερώνονται από διαφορετικά ερεθίσματα. Στο πλαίσιο της επαγόμενης από κύτταρα όγκου ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και του σχηματισμού ενός επιτρεπόμενου μεταστατικού μικροπεριβάλλοντος, ο ρόλος των διαφορετικών οδών ενεργοποίησης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η διέγερση του PAR-1, του GPVI

ή του P2Y<sub>12</sub> προκάλεσε απελευθέρωση VEGF ενώ η ενεργοποίηση του PAR-4 ή της TXA<sub>2</sub> προκάλεσε αυξημένη απελευθέρωση ενδοστατίνης από α-κοκκία.<sup>42</sup>

Λόγω του γεγονότος ότι τα αιμοπετάλια περιέχουν διαφορετικά microRNAs, τα οποία απελευθερώνονται σε μικροκυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης (PMPs) κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, είναι δελεαστικό να υποθέσουμε ότι τα microRNAs συμβάλλουν στη νεοαγγείωση και σε αναπτυσσόμενους όγκους. Τα μικροκυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης από ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου για παράδειγμα, μεσολάβησαν στη μεταφορά του microRNA σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Έτσι, τα microRNAs που προέρχονται από PMPs είναι ικανά να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάσουν τη νεοαγγείωση.<sup>43</sup>

Τα αιμοπετάλια διευκολύνουν την αγγειογένεση με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, αλλά οι ακριβείς μηχανισμοί έκκρισης κοκκίων αιμοπεταλίων διαφορετικών προαγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων έχουν αποσαφηνιστεί μόνο εν μέρει. Μια βαθύτερη εικόνα για τα μονοπάτια σηματοδότησης των αιμοπεταλίων, τους εμπλεκόμενους υποδοχείς και την οργάνωση των κοκκίων, θα προσφέρει νέες θεραπευτικές ευκαιρίες για χειρισμό στην υποστήριξη της αγγειογένεσης με τη μεσολάβηση των αιμοπεταλίων.

## **5. Τα αιμοπετάλια ως στόχοι για την θεραπεία του καρκίνου**

### **5.1 CLEC-2 και η αλληλεπίδραση με την ποδοπλανίνη**

Διάφορα είδη καρκινικών κυττάρων προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων και διευκολύνουν την ανάπτυξη και μετάσταση του καρκίνου. Τα αιμοπετάλια συσσωματώνουν τα γύρω καρκινικά κύτταρα για να τα προστατεύσουν από το διατμητικό στρες και/ή τα φυσικά κύτταρα φονείς στο αίμα και να τους παρέχουν σκαλωσιά για προσκόλληση στο αγγειακό τοίχωμα. Επιπλέον, οι αγγειογενείς και οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια

διευκολύνουν την ανάπτυξη και την αγγειογένεση του καρκίνου. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα διεγείρουν τα αιμοπετάλια μέσω της έκφρασης μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης, της ποδοπλανίνης. Η ποδοπλανίνη εκφράζεται σε ορισμένα είδη καρκινικών κυττάρων και η έκφρασή της φαίνεται να σχετίζεται με μετάσταση καρκίνου ή κακοήθη εξέλιξη. Το 2007, εντοπίστηκε η πρωτεΐνη CLEC-2 ως υποδοχέας για την ποδοπλανίνη. Έκτοτε, αποκαλύφθηκε ότι η συσχέτιση μεταξύ CLEC-2 και της ποδοπλανίνης διαδραματίζουν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και παθολογικών ρόλων.

Η πρωτεΐνη CLEC-2 εκφράζεται σε υψηλό βαθμό και σχεδόν ειδικά σε αιμοπετάλια και μεγακαρυοκύτταρα στον άνθρωπο. Η πρωτεΐνη αυτή, μεσολαβεί σε σήματα ενεργοποίησης ανάλογα με την πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης. Έχει ένα μοτίβο σηματοδότησης που ονομάζεται «ημι-ITAM» (μοτίβο ενεργοποίησης με βάση την τυροσίνη ανοσοϋποδοχέα) στην κυτταροπλασματική της περιοχή, το οποίο έχει ένα μοναδικό μοτίβο YXXL. Η ομαδοποίηση της πρωτεΐνης CLEC-2 οδηγεί σε φωσφορυλίωση τυροσίνης του ημι-ITAM από τις κινάσες Src και τη δέσμευση της κινάσης τυροσίνης Syk στο ημι-ITAM που έχει φωσφορυλιωθεί με τυροσίνη. Η ενεργοποίηση του Syk επάγει συμβάντα σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης τυροσίνης του SLP-76 και του Syk και της ενεργοποίησης της κινάσης τυροσίνης και της φωσφολιπάσης Cγ2 (PLCγ2), τα οποία καταλήγουν στη συσσώρευση αιμοπεταλίων.<sup>44</sup>

Η ποδοπλανίνη είναι μια μονόμορφη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από μια βραχεία κυτταροπλασματική περιοχή και μια εξωκυτταρική περιοχή με άφθονα υπολείμματα Ser/Thr ως πιθανές θέσεις Ο-γλυκοζυλίωσης. Εκφράζεται στην επιφάνεια ενός ευρέος φάσματος καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των καρκινωμάτων πλακωδών κυττάρων, των σεμινωμάτων, του οστεοσαρκώματος και του γλοιοβλαστώματος. Η ποδοπλανίνη εκφράζεται επίσης σε διάφορα είδη φυσιολογικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ποδοκυττάρων στο νεφρό, των κυψελιδικών κυττάρων τύπου I στους πνεύμονες, των ινοβλαστικών δικτυωτών κυττάρων (FRCs) στους λεμφαδένες, των αρθρικών κυττάρων στην άρθρωση και των λεμφικών ενδοθηλιακών κυττάρων (LECs), αλλά όχι των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων που επαναλαμβάνονται διαδοχικά και διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό. Μεταξύ αυτών, οι περιοχές PLAG3 και PLAG4, οι οποίες και οι δύο περιέχουν διπλό Glu-Asp και Ο-γλυκοζυλιωμένο Thr, απαιτούνται για τη σύνδεση με την CLEC-2 και την εξαρτώμενη από την ποδοπλανίνη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων.<sup>45</sup> Η

ποδοπλανίνη στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων επάγει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, η οποία διευκολύνει την αιματογενή μετάσταση του καρκίνου.

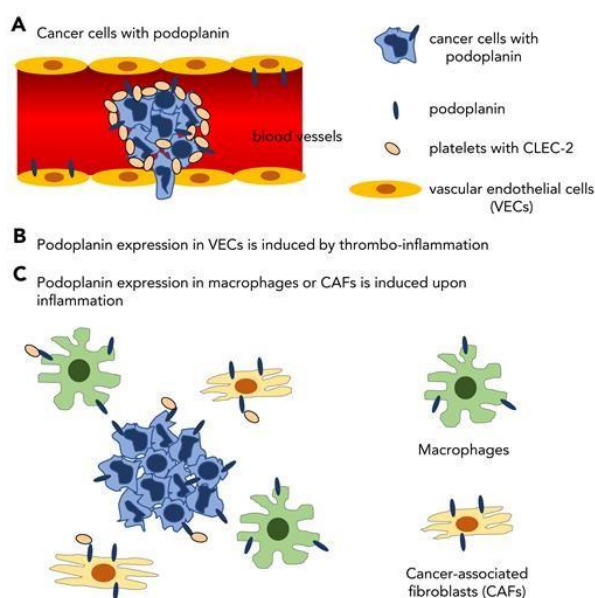
Η αλληλεπίδραση μεταξύ CLEC-2 και ποδοπλανίνης βοηθά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα καρκινικά κύτταρα, αυξάνοντας έτσι την επιβίωσή των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό συμβαίνει, διότι η ποδοπλανίνη που εκφράζεται σε κυκλοφορούντα κύτταρα γλοιώματος ή μικροκυστίδια που προέρχονται από γλοιώμα στην κυκλοφορία του αίματος ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια δεσμεύοντας την CLEC-2. Η ποδοπλανίνη διεγείρει τα αιμοπετάλια και τον επακόλουθο σχηματισμό θρόμβων μέσω της αλληλεπίδρασης CLEC-2 ποδοπλανίνης. Ωστόσο, η ποδοπλανίνη, η οποία προκαλεί θρόμβωση που σχετίζεται με τον καρκίνο, μπορεί να μην περιορίζεται στην ποδοπλανίνη στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Η ποδοπλανίνη, όπως προαναφέρθηκε, εκφράζεται επίσης σε φυσιολογικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των νεφρικών ποδοκυττάρων, των κυψελιδικών κυττάρων του πνεύμονα τύπου I, των FRC στους λεμφαδένες και των LEC, αλλά όχι στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ποδοπλανίνη σε αυτά τα κύτταρα δεν μπορεί να έχει πρόσβαση στην CLEC-2 των αιμοπεταλίων.

Σε παθολογική κατάσταση, προκαλείται η έκτοπη έκφραση της ποδοπλανίνης. Έχει αναφερθεί ότι η έκφραση της αυξάνεται στο τοίχωμα του αγγείου κατά τη διάρκεια της φλεβικής θρόμβωσης, η οποία μπορεί να προκληθεί από θρομβοφλεγμονή.<sup>46</sup>

Επιπλέον, η έκφραση της ποδοπλανίνης επάγεται σε μακροφάγα ή κύτταρα στο ήπαρ. Αυτά τα κύτταρα που εκφράζουν την ποδοπλανίνη μεταναστεύουν στην περιοχή των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και αλληλεπιδρούν με τα αιμοπετάλια που διαρρέουν από υπερδιαπερατά αγγεία, γεγονός που διευκολύνει το σχηματισμό θρόμβων στο ήπαρ. Επίσης, οι σχετιζόμενοι με τον καρκίνο ινοβλάστες αναφέρεται ότι εκφράζουν την ποδοπλανίνη, η οποία συσχετίζεται με κακοήθεια καρκίνου και κακή πρόγνωση σε καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού, του παγκρέατος και του ήπατος.

Οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η ποδοπλανίνη προκαλεί θρόμβωση που σχετίζεται με τον καρκίνο φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 7). Η διαμεμβρανική αυτή γλυκοπρωτεΐνη (ποδοπλανίνη), που εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη σχετιζόμενη με τον καρκίνο θρόμβωση αλληλεπιδρώντας άμεσα με τα αιμοπετάλια, προκαλώντας έκφραση TF, προάγοντας

της αγγειογένεση και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και δυνητικά συμβάλλοντας στη θρομβοφλεγμονή στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επιπλέον, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7, σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα, η έκφραση της ποδοπλανίνης σε μακροφάγα ή ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (CAFs) μπορεί να μην προκληθεί κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Αυτή η αναστολή της έκφρασης της ποδοπλανίνης σε αυτά τα κύτταρα μπορεί να αποτρέψει την άμεση εμπλοκή τους στη θρομβοφλεγμονή, αν και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διαλευκανθούν οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται.



**Εικόνα 7:** Μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η ποδοπλανίνη προκαλεί θρόμβωση που σχετίζεται με τον καρκίνο.<sup>45</sup>

## 5.2 CLEC-2 και ποδοπλανίνη ως στόχοι φαρμάκων

Η κύρια αιτία θανάτου σε ασθενείς με καρκίνο είναι η εξέλιξη του όγκου (καρκινική καχεξία και απομακρυσμένη μετάσταση) και η δεύτερη κύρια αιτία είναι η σχετιζόμενη με τον καρκίνο θρόμβωση. Ως εκ τούτου, τα φάρμακα που εμποδίζουν τη συσχέτιση μεταξύ CLEC-2 και ποδοπλανίνης είναι καλοί υποψήφιοι ενάντια των καρκινικών μεταστάσεων και θεραπειών θρόμβωσης που σχετίζονται με τον καρκίνο. Επειδή η ποδοπλανίνη εκφράζεται επίσης σε φυσιολογικούς ιστούς, θα πρέπει να σημειωθεί η πιθανότητα ανεπιθύμητων ενεργειών του φαρμάκου. Για την επίλυση του

προβλήματος, έχει αναφερθεί η σειρά μονοκλωνικών αντισωμάτων LpMab, η οποία αναγνωρίζει ειδικά ανώμαλα γλυκοζυλιωμένη ποδοπλανίνη σε καρκινικά κύτταρα.<sup>47</sup> Αν και αυτό το αντίσωμα είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την αποφυγή παρενεργειών, μπορεί να μην αναγνωρίζει την ποδοπλανίνη που αυξάνεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και/ή μονοκύτταρα κατά τη διάρκεια χρόνιας φλεγμονής, τα οποία θα συμμετείχαν σε θρόμβωση που σχετίζεται με τον καρκίνο.

Η στόχευση της CLEC-2 μπορεί να έχει πλεονεκτήματα, επειδή τα φάρμακα anti-CLEC-2 θα αναστέλλουν τη σχετιζόμενη με τον καρκίνο θρόμβωση εμποδίζοντας τη σύνδεση μεταξύ CLEC-2 και ποδοπλανίνης, τόσο σε καρκινικά κύτταρα όσο και σε διάφορα φυσιολογικά κύτταρα, όπου η έκφραση της ποδοπλανίνης προκαλείται παθολογικά. Επιπλέον, η έκφραση CLEC-2 περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στα αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα.

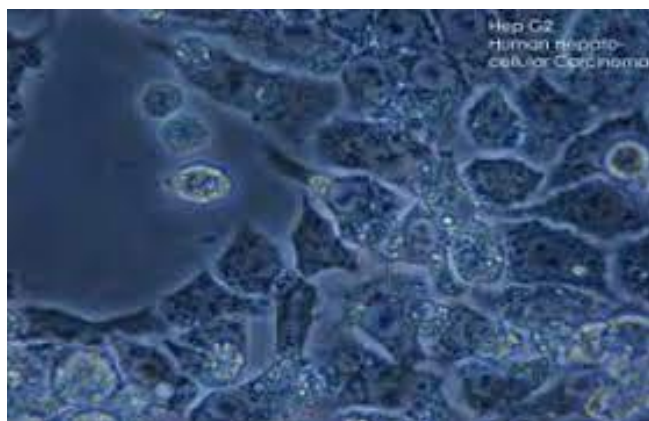
Η πιο πιθανή παρενέργεια των anti-CLEC-2 φαρμάκων είναι η αυξημένη αιμορραγική τάση. Ωστόσο, σε έρευνες που διεξήχθησαν, τα ποντίκια που είχαν εξαντληθεί γενετικά και φαρμακολογικά από CLEC-2 δεν παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στην αιμορραγική τάση, πιθανώς επειδή η έκφραση της ποδοπλανίνης δεν παρατηρείται στα φυσιολογικά τοιχώματα των αγγείων και παίζει ελάχιστο ρόλο στη φυσιολογική αιμόσταση. Με βάση τα δεδομένα που προέρχονται από πειράματα σε ποντίκια, εικάστηκε ότι τα φάρμακα anti-CLEC-2 θα προκαλούσαν λιγότερη αιμορραγική τάση από αυτή που σημειώθηκε με τα αντιαιμοπεταλιακά/αντιπηκτικά φάρμακα.

Μέχρι σήμερα, τα αντισώματα anti-CLEC-2, είναι ένα μικρό μόριο που δεσμεύει CLEC-2 και μεταλλαγμένη ανασυνδυασμένη ροδοκυτίνη. Τα αντισώματα αυτά, έχουν αναφερθεί ως αντιδραστήρια που συνδέονται με την CLEC-2 και αποκλείουν τη σύνδεση της ποδοπλανίνης. Βέβαια, απαιτείται περαιτέρω μελέτη πριν από την κλινική εφαρμογή.<sup>48</sup>

## 6. Ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2

Η κυτταρική σειρά HepG2 αποτελείται από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος, τα οποία προέρχονται από ιστό ήπατος ενός 15χρονου λευκού άνδρα, ο οποίος έπασχε από καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, αποτελεί την 5<sup>η</sup> πιο συχνή μορφή καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα κύτταρα αυτά έχουν την μορφή επιθηλιακών κυττάρων, με μέγεθος 18 microns και μπορούν να καλλιεργηθούν με μεγάλη επιτυχία σε ευρεία κλίμακα.

Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος HepG2, προσκολλώνται στην επιφάνεια καλλιέργειας και αναπτύσσονται με την μορφή μικρών συσσωματωμάτων. Επίσης, εκκρίνουν σημαντικές πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως πλασμινογόνο, ινωδογόνο, τρανσφερίνη αλλά και αλβουμίνη. Αν και εφόσον καλλιεργηθούν σωστά, διαφοροποιούνται και μέσω αυτής της διαφοροποίησης μας δίδεται η δυνατότητα να μελετήσουμε την δυσλειτουργία του ήπατος αλλά και την ενδοκυτταρική μεταφορά μορίων μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων του ήπατος. Η δυσλειτουργία του ήπατος μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες. Τα κύτταρα HepG2, χρησιμοποιούνται ως μοντέλα ώστε να μελετηθεί ο μεταβολισμός του ήπατος, η ογκογένεση αλλά και η τοξικότητα ξενοβιοτών. Επιπλέον, σημαντικό γεγονός αποτελεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμασίες που περιλαμβάνουν συσκευές τεχνητού ήπατος.<sup>50</sup>



Εικόνα 8: HepG2 κύτταρα.<sup>51</sup>



Ο κυτταρικός κύκλος είναι μια σειρά από φάσεις που υφίσταται ένα κύτταρο καθώς μεγαλώνει και διαιρείται. Ενώ τα κύτταρα HepG2, μια ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά ήπατος, ακολουθούν γενικά τις ίδιες φάσεις του κυτταρικού κύκλου με άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα ειδικά χαρακτηριστικά τους ενδέχεται να διαφέρουν ελαφρώς λόγω της καρκινικής φύσης τους. Ο κυτταρικός κύκλος συνήθως χωρίζεται σε τέσσερις κύριες φάσεις: G1, S, G2 και M. Ωστόσο, επειδή για την ανάλυση των πειραμάτων της διατριβής αυτής χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής η οποία θα αναλυθεί παρακάτω, θα επικεντρωθούμε στην ανάλυση της φάσης M και των υποφάσεων της (M1, M2, M3). Όταν χρησιμοποιείται κυτταρομετρία ροής για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, ιδιαίτερα με καρκινικά κύτταρα όπως τα HepG2, η ορολογία M1, M2 και M3 αναφέρεται συχνά σε διαφορετικούς πληθυσμούς ή φάσεις εντός του ιστογράμματος του περιεχομένου του DNA, παρά στις παραδοσιακές φάσεις του κυτταρικού κύκλου της μίτωσης (φάση M). Στο πλαίσιο της κυτταρομετρίας ροής, αυτές οι φάσεις (M1, M2, M3) είναι αυθαίρετες πύλες που ορίζονται από τον ερευνητή με βάση την κατανομή των κυττάρων σε διαφορετικά επίπεδα περιεχομένου DNA, τα οποία αντικατοπτρίζουν διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά την M1 (Φάση G0/G1), ο πληθυσμός αυτός αντιπροσωπεύει κύτταρα με περιεχόμενο διπλοειδούς DNA (2n), υποδεικνύοντας ότι βρίσκονται στη φάση G0 ή G1 του κυτταρικού κύκλου. Αυτά τα κύτταρα δεν έχουν ακόμη ξεκινήσει τη σύνθεση DNA. Στα ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής, αυτός ο πληθυσμός είναι τυπικά η πρώτη σημαντική κορυφή. Η M2 (Φάση S), περιλαμβάνει κύτταρα που συνθέτουν ενεργά DNA και επομένως έχουν περιεκτικότητα σε DNA μεταξύ 2n και 4n. Σε ένα ιστόγραμμα κυτταρομετρίας ροής, αυτά τα κύτταρα πέφτουν μεταξύ των κορυφών G1 και G2/M, δημιουργώντας ένα συνεχές αντί για μια ξεχωριστή κορυφή, επειδή το περιεχόμενο DNA ποικίλλει συνεχώς κατά τη φάση S καθώς προχωρά η αντιγραφή του DNA. Τέλος, η M3 (Φάση G2/M), αφορά τον πληθυσμό που χαρακτηρίζεται από τετραπλοειδές περιεχόμενο DNA (4n), που δείχνει ότι τα κύτταρα έχουν ολοκληρώσει τη σύνθεση του DNA και βρίσκονται στη φάση G2 ή έχουν εισέλθει σε μίτωση (φάση M). Στα ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής, αυτή είναι συνήθως η δεύτερη σημαντική κορυφή.

Η έμφαση σε αυτές τις φάσεις "M" σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής με κύτταρα HepG2, ή οποιαδήποτε κύτταρα, οφείλεται στη φύση της ανάλυσης. Η κυτταρομετρία ροής μετρά την ένταση φθορισμού των χρωστικών που δεσμεύουν το

DNA, η οποία συσχετίζεται με την περιεκτικότητα σε DNA μεμονωμένων κυττάρων. Αυτό επιτρέπει στους ερευνητές να διακρίνουν κύτταρα σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου με βάση την περιεκτικότητά τους σε DNA, αλλά δεν μετρά άμεσα άλλα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου, όπως η παρουσία ειδικών κυκλινών ή η δραστηριότητα των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών, που είναι κρίσιμες για τις μεταβάσεις φάσης στον κυτταρικό κύκλο.

Συνοπτικά, όταν χρησιμοποιείται κυτταρομετρία ροής για την ανάλυση κυτταρικών κύκλων, οι όροι M1, M2 και M3 αναφέρονται σε πληθυσμούς μέσα σε ένα ιστόγραμμα που αντιστοιχούν σε διαφορετικά στάδια κυτταρικού κύκλου με βάση το περιεχόμενο του DNA και όχι σε μιτωτικές υποφάσεις. Αυτή η μέθοδος παρέχει έναν γρήγορο και ποσοτικό τρόπο αξιολόγησης της κατανομής των κυττάρων σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου, ο οποίος είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, των επιδράσεων των φαρμάκων στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και των χαρακτηριστικών καρκινικών κυττάρων όπως τα HepG2.<sup>51</sup>

## 7. Εργαστηριακή Διερεύνηση (Μέθοδοι και Υλικά)

### 7.1 Πειραματική πορεία καλλιέργειας κυττάρων HepG2:

#### Θρεπτικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια

##### **Θρεπτικό υλικό / RPMI-1640 Medium**

Χρησιμοποιήθηκε για όλες τις καλλιέργειες και η σύστασή του είναι η εξής:

- 2mM L-Γλουταμίνη
- 1 mM Πυροσταφιλικό οξύ
- 4500 mg/L Γλυκόζη
- 1500 mg/L Διττανθρακικό νάτριο

Το πλήρες θρεπτικό υλικό εμπλουτίζεται με 10% όγκο κατ'όγκον FBS (εμβρυϊκό βόειο ορό) αλλά και με 1% όγκο κατ'όγκον αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη). Διατηρείται στο ψυγείο και πριν από την χρήση του προθερμαίνεται σε υδατόλουτρο με 37<sup>0</sup>C.

**FBS (Fetal Bovine Serum, εμβρυϊκός βόιος ορός):** Προστίθεται στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, καθώς παρέχει στα κύτταρα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και τους παράγοντες που χρειάζονται για να αναπτυχθούν, να πολλαπλασιαστούν και να διαιρεθούν.

**Διάλυμα αντιβιοτικών στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης:** Τα αντιβιοτικά αυτά χρησιμοποιούνται με σκοπό την πρόληψη των κυττάρων από πιθανές βακτηριακές μολύνσεις.

**PBS (Phosphate Buffered Saline, 1X):** Είναι ισοτονικό και μη τοξικό για τα κύτταρα. Διατηρεί την ζωτικότητα των κυττάρων της καλλιέργειας, κρατώντας το PH και την οσμωμοριακότητα σε φυσιολογικά επίπεδα. Χρησιμοποιείται, για την έκπλυση της φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας, για την απομάκρυνση τυχόν υπολλειμάτων, αλλά και πριν από την επώαση με την θρυψίνη καθώς η παρουσία του ορού λειτουργεί ανασταλτικά στην δράση της θρυψίνης.

**Διάλυμα θρυψίνης (0,5% trypsin-EDTA):** Η θρυψίνη, προμηθεύεται ως συγκεντρωμένο διάλυμα 10X και αραιώνεται σε διάλυμα PBS σε τελική συγκέντρωση 1X. Στη συνέχεια, δημιουργούνται κλάσματα τα οποία διατηρούνται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Η θρυψίνη, είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο επιτυγχάνει με την ενζυμική του δράση να διασπά τους δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων και του υποστρώματος επιτυγχάνοντας έτσι την αποκόλληση τους από το υπόστρωμα αλλά και την διάσπαση των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Ειδικότερα, με την χρήση της θρυψίνης πραγματοποιείται η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας.

**DMSO (Διμεθυλοσουλφοξείδιο-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub> SO):** Χρησιμοποιείται για την ψύξη των κυττάρων, στο διάλυμα του παγώματος. Αποτελεί μια κρυοπροστατευτική ουσία που χρησιμοποιείται για την αποφυγή του σχηματισμού των κρυστάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων. Σε περίπτωση που σχηματιστούν κρύσταλλοι στο εσωτερικό τους, μπορεί να προκληθούν βλάβες στις μεμβράνες των κυττάρων, γεγονός το οποίο δεν επιθυμούμε να συμβεί.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, ο οποιοσδήποτε χειρισμός γίνεται στα κύτταρα είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται κάτω από άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής για να αποφευχθούν επιμολύνσεις. Επιπλέον, κατά την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων, για μεγαλύτερη ασφάλεια στους χειρισμούς ο πάγκος εργασίας, όλα τα υλικά καθώς και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, ψεκάζονταν με διάλυμα αιθανόλης 70%.

### Απόψυξη κυττάρων

- Επώαση φιαλών κυτταρικής καλλιέργειας μικρού μεγέθους με 3,5 mL κολλαγόνο 50 µg/mL για 20 min στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).
- Θέρμανση θρεπτικού υλικού RPMI 1640-Medium, με προσθήκη 10% v/v FBS ( Fetal Bovine Serum) και 1% v/v πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη, σε υδατόλουτρο με 37°C για 20min.
- Μετά το πέρας των 20 min, πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις της κάθε φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας με 1mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS (1X), προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ακαθαρσίες.
- Παγόλυση κυττάρων τα οποία διατηρούνταν σε υγρό άζωτο και επίστρωση αυτών στις φιάλες καλλιέργειας, όπου κάθε μια περιέχει 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού (RPMI 640 με προσθήκη 10% v/v FBS και 1% v/v πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη). Η απόψυξη των κυττάρων πρέπει να γίνεται γρήγορα ώστε να διασφαλιστεί η μεγαλύτερη επιβίωση τους. Τα κύτταρα μεταφέρονται από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C και ανακινούνται με γρήγορες κινήσεις για 1 με 2 λεπτά μέχρις ότου ξεπαγώσουν πλήρως. Ύστερα μεταφέρονται στην φιάλη με το θρεπτικό υλικό.
- Μεταφορά των φιαλών κυτταρικής καλλιέργειας στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) και επώαση των κυττάρων για 3 ημέρες, ώστε να προσκολληθούν και να αναπτυχθούν.

### Αλλαγή θρεπτικού μέσου

- Κάθε 3 ημέρες, πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού μέσου μέχρις ότου παρατηρηθεί πλήρης κάλυψη (70-90%) της επιφάνειας κάθε φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας.

- Αρχικά, απομακρύνονται τα μη προσκολλημένα κύτταρα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού με αποστειρωμένη γυάλινη πιπέτα Pasteur η οποία είναι συνδεδεμένη με αντλία κενού.
- Έπειτα, γίνονται 2 εκπλύσεις της κάθε φιάλης με 1mL PBS (1X) με σκοπό την απομάκρυνση νεκρών κυττάρων αλλά και ακαθαρσιών από το περιεχόμενό τους.
- Τέλος, προστίθενται 10mL πλήρους θρεπτικού μέσου στην κάθε φιάλη και ύστερα οι φιάλες καλλιέργειας διατηρούνται στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub> για 3 ημέρες.

### **Ανακαλλιέργεια (1<sup>η</sup>)**

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, με σκοπό την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς και την απόκτηση ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων προκειμένου να επιτευχθεί η διεξαγωγή των πειραμάτων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πλήρως αποστειρωμένες φιάλες κυτταρικής καλλιέργειας 25mm<sup>2</sup> (μικρού μεγέθους) και 75mm<sup>2</sup> (μεγάλου μεγέθους).

Η μικροσκοπική παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο, των κυττάρων που αναπτύσσονται στην φιάλη κυτταρικής καλλιέργειας, φανερώνει το πότε πρέπει να γίνει η ανακαλλιέργεια τους. Τα κύτταρα HepG2 κατά την ανάπτυξή τους, προσκολλώνται στην επιφάνεια της φιάλης και όσο οι ημέρες περνούν και καταναλώνοντας το θρεπτικό μέσο, συσσωρεύονται, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται ο περαιτέρω πολλαπλασιασμός τους.

Η ανακαλλιέργεια, λαμβάνει χώρα όταν το 70-90% της φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας έχει καλυφθεί με τα κύτταρα. Αυτό συμβαίνει διότι τότε τα κύτταρα δεν διαθέτουν χώρο ώστε να μεγαλώσουν περισσότερο και η επαφή μεταξύ τους αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
- Έκπλυση κάθε φιάλης με 2 x 1mL PBS (1X).
- Επώαση κυττάρων με 1mL διαλύματος θρυψίνης/ EDTA για 5min στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C), με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων.
- Προσθήκη 1mL πλήρους θρεπτικού μέσου, ώστε ο ορός που περιέχεται σε αυτό να αναστείλει την περαιτέρω δράση της θρυψίνης.
- Συλλογή κυττάρων σε σωληνάριο falcon χωρητικότητας 15mL.
- Φυγοκέντρηση κυττάρων στις 2500 στροφές (RPM) για 7min.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 1mL πλήρους θρεπτικού μέσου.
- Επώαση 2 φιαλών κυτταρικής καλλιέργειας μεγάλου μεγέθους με 5mL 50μg/mL κολλαγόνο για 20 min, στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).
- Έκπλυση φιαλών με 2 x 2 mL PBS (1X).
- Προσθήκη 20 mL πλήρους θρεπτικού μέσου στην κάθε φιάλη, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων.
- Επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο(5% CO<sub>2</sub>, 37°C) για 3 ημέρες.
- Πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού μέσου κάθε 3 ημέρες μέχρι να παρατηρηθεί πλήρης κάλυψη (70-90%) της επιφάνειας της κάθε φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας, ώστε να γίνει η 2<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι το χρονικό διάστημα ανάπτυξης των κυττάρων μέχρις ότου παρατηρηθεί πλήρης κάλυψη της επιφάνειας κάθε φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας, διαφέρει κάθε φορά ανάλογα με την κατάσταση του δείγματος των κυττάρων.

### Ανακαλλιέργεια (2<sup>η</sup>)

- Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
- Έκπλυση κάθε φιάλης με 2 x 2mL PBS (1X).
- Επώαση κυττάρων με 2mL διαλύματος θρυψίνης/ EDTA για 5min στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C), με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων.
- Προσθήκη 2mL πλήρους θρεπτικού μέσου ώστε ο ορός που περιέχεται σε αυτό να αναστείλει την περαιτέρω δράση της θρυψίνης.
- Συλλογή κυττάρων σε σωληνάριο falcon χωρητικότητας 15mL.
- Φυγοκέντρηση κυττάρων στις 2500 στροφές (RPM) για 7min.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 1 mL πλήρους θρεπτικού μέσου.
- Επώαση 4 φιαλών κυτταρικής καλλιέργειας μεγάλου μεγέθους με 5mL 50μg/mL κολλαγόνο για 20 min, στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).
- Έκπλυση φιαλών με 2 x 2mL PBS (1X).
- Προσθήκη 20 mL πλήρους θρεπτικού μέσου στην κάθε φιάλη, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων.
- Επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) για 3 ημέρες.



- Πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού μέσου κάθε 3 ημέρες μέχρι να παρατηρηθεί πλήρης κάλυψη (70-90%) της επιφάνειας της κάθε φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας, ώστε να πραγματοποιηθεί το 1<sup>ο</sup> σκέλος του πειράματος (επίστρωση κυττάρων ώστε να γίνει σε αυτά επίδραση αιμοπεταλίων).

### **Επίστρωση κυττάρων, προετοιμασία για επίδραση αιμοπεταλίων**

- Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων
- Έκπλυση κάθε φιάλης με 2 x 2mL PBS (1X).
- Επώαση κυττάρων με 2mL διαλύματος θρυψίνης/ EDTA για 5min στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C), με σκοπό να αποκολληθούν τα κύτταρα.
- Προσθήκη 2mL πλήρους θρεπτικού μέσου ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη.
- Συλλογή κυττάρων σε σωληνάρια falcon χωρητικότητας 15mL.
- Φυγοκέντρηση κυττάρων στις 2500 στροφές (RPM) για 7min.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 1 mL πλήρους θρεπτικού μέσου.
- Τοποθέτηση σε σωληνάριο τύπου Eppendorf, 45μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS, 45 μL χρωστικής trypan blue και 10μL κυττάρων.
- Συλλογή 10μL του περιεχομένου του σωληναρίου τύπου Eppendorf προς μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.

- Μέτρηση των κυττάρων. Τοποθετούνται από 10μL του παραπάνω εναιωρήματος σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer.

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = \left[ \left( \frac{\text{Συνολικός αρ. κυττάρων στα 4 τετράγωνα}}{4} \right) \times 10^5 \times V \right]$$

- Επώαση πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας 6 θέσεων με 500μL 50μg/mL κολλαγόνο για 20 min στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).
- Έκπλυση του πλακιδίου με 2 x 500μL PBS (1X) ανα θέση.
- Προσθήκη 2mL πλήρους θρεπτικού μέσου σε κάθε θέση του πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας.
- Προσθήκη του κυτταρικού εναιωρήματος (10<sup>5</sup> κύτταρα) ανά θέση.
- Επώαση κυττάρων στον κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) για 24 ώρες.
- Ακολουθεί ψύξη όσων κυττάρων απέμειναν.

### Ψύξη κυττάρων

- Η ψύξη των κυττάρων, μπορεί να πραγματοποιηθεί όταν καλυφθεί το 70-90% της επιφάνειας της φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας.
- Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων. Αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου από την φιάλη κυτταρικής καλλιέργειας με γυάλινη πιπέτα Pasteur που είναι συνδεδεμένη με αντλία κενού.
- Έκπλυση φιάλης κυτταρικής καλλιέργειας με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X). (2 x 1mL για μικρές φιάλες, 2 x 2mL για μεγάλες φιάλες).

- Επώαση κυττάρων με διάλυμα θρυψίνης/ EDTA για 5min στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Χρήση 1mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA για τις μικρού μεγέθους φιάλες, 2mL για τις μεγάλες. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων.
- Προσθήκη (1mL για μικρές φιάλες ή 2mL για μεγάλες φιάλες) πλήρους θρεπτικού μέσου ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη.
- Συλλογή κυττάρων σε σωληνάρια falcon χωρητικότητας 15mL.
- Φυγοκέντρηση κυττάρων στις 2500 στροφές (RPM) για 7min.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 1 mL πλήρους θρεπτικού μέσου.
- Αποθήκευση σε κρυοφιαλίδιο (cryovial) 1mL, που περιέχει 950 μL εναιωρήματος κυττάρων και 50μL DMSO, για 2-3 ημέρες στους -80°C και ύστερα στο υγρό N<sub>2</sub> για μεγαλύτερα διαστήματα (σταδιακή ψύξη κυττάρων).

## **7.2 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας ( Light Transmitted Aggregometry, LTA)**

### Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων καθώς και η επίδραση τους στα κύτταρα HepG2. Ως συσσώρευση, καλούμε την διαδικασία μέσω της οποίας περιγράφεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vivo*, πραγματοποιείται μετά από τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος, συμβάλλοντας στην πρωτογενή αιμόσταση. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vitro*, σε PRP ή σε πλυμένα αιμοπετάλια, προκαλείται με την χρήση εξωγενώς προστιθέμενων αγωνιστών.

Η συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (LTA), αποτελεί μια μέθοδο εκλογής (gold standard method) για την μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και εκτελείται είτε σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, είτε σπανιότερα σε πλήρες αίμα (πλυμένα αιμοπετάλια WPs) όπως προαναφέρθηκε. Έχει χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες μελέτες αξιολόγησης της ανταπόκρισης στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή.

Η προκαλούμενη από τον εξωγενώς προστιθέμενο αγωνιστή συσσώρευση των αιμοπεταλίων, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του εναιωρήματός τους, η οποία μετράται με ένα ειδικό νεφελόμετρο, που ονομάζεται συσσωρευόμετρο. Το συσσωρευόμετρο, αποτελεί ένα φασματόμετρο σταθερού μήκους κύματος, με μια ή τέσσερις θέσεις δειγμάτων, ώστε να επιτρέπεται η ταυτόχρονη μέτρηση της διαπερατότητας ακόμη και σε τέσσερα διαφορετικά δείγματα, το οποίο ανιχνεύει την διαφορά της οπτικής διαπερατότητας, μετά την προσθήκη ενός αιμοπεταλιακού αγωνιστή είτε στο PRP, είτε στα πλυμένα αιμοπετάλια. Τα δείγματα, κατά την διάρκεια της τεχνικής αυτής, βρίσκονται σε θερμοκρασία 37°C, προς μίμηση των *in vivo* συνθηκών. Αναδεύονται με ειδικό μαγνητάκι στις 1200 rpm, για την παραγωγή διατμητικών δυνάμεων αλλά και την ανάδευση των αιμοπεταλίων.

Έπειτα, μέσα από κυψελίδες, οι οποίες περιέχουν PRP και PPP (πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια), περνά μια ακτίνα υπέρυθρου φωτός. Το φως το οποίο περνά από την κυψελίδα με το PRP, πριν την προσθήκη αγωνιστή, θεωρείται 0% διαπερατότητα ή συσσώρευση ενώ το φως που περνά από την κυψελίδα με το PPP, θεωρείται 100% διαπερατότητα ή συσσώρευση. Η ανίχνευση του φωτός, πραγματοποιείται από φωτοδιόδους σιλικόνης. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, εκτιμάται μετά από την έκθεση στους φυσιολογικούς διεγέρτες, καταγράφοντας με την μορφή καμπύλης τις αλλαγές στην μετάδοση του φωτός μέσω του εξεταζόμενου δείγματος. Τα αιμοπετάλια, ανταποκρινόμενα στην προσθήκη του αγωνιστή, υφίστανται αλλαγή του σχήματός τους (αύξηση του μεγέθους τους) γεγονός το οποίο οδηγεί στο να περνά λιγότερο φως από την κυψελίδα, άρα και σε καταγραφή μικρότερης διαπερατότητας. Ύστερα, παρατηρείται προσκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους, σχηματισμός συσσωματωμάτων, με αποτέλεσμα να περνά περισσότερο φως από την κυψελίδα και έτσι να καταγράφεται ως μεγαλύτερη διαπερατότητα.

Η καταγραφή της *in vitro* συσσώρευσης πραγματοποιείται για 4-5 min και χαρακτηρίζεται από την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, την μέγιστη αύξηση στη

διαπερατότητα του φωτός που προκαλείται από τον αγωνιστή (% συσσώρευση) , τον ρυθμό συσσώρευσης (% μεταβολή συσσώρευσης/ min), την πρωτογενή αλλά και την δευτερογενή συσσώρευση.

### Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer)
- Οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (Olympus, CX41)
- Συσσωρευόμετρο 700-4DR (Chrono-Log)
- Λογισμικό Aggrolink8 (Chrono-Log)
- Ηλεκτρονικός Υπολογιστής, με λογισμικό Cell Quest (Becton Dickinson)
- Μαγνητάκια (Chrono-Log)
- Γυάλινες Κυψελίδες (Chrono-Log)
- Αυτόματες πιπέτες
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Στατώ
- Πλαστικά σωληνάκια προπυλενίου

### Χημικά Αντιδραστήρια

- Κιτρικό νάτριο ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ , 294,10g/mol, Merck)
- D (+) Γλυκόζη ( $C_6H_{12}O_6$ , 180,16g/mol, Fluka)
- Οξαλικό αμμώνιο ( $(NH_4)_2C_2O_4$ , 142,11g/mol, Mallinckrodt)
- Κιτρικό οξύ ( $C_6H_8O_7$ , 192,13g/mol, Merck)
- Πεπτίδιο-ενεργοποιητή του υποδοχέα της θρομβίνης 6 [TRAP-6 ( $C_{34}H_{56}N_{10}O_9$ , 748,87g/mol, Bachem)]

- Διμεθυλοσουλφοξείδιο [DMSO (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, 78,13g/mol, Carloerba)]
- Αραχιδονικό οξύ [ AA (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(CH=CHCH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H,304,47g/mol
- Διφωσφορική αδενοσίνη [ADP (C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>, 427,201g/mol, Chrono-Log)]

#### Διαλύματα εργασίας

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD):** Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζης. Συγκεκριμένα, 0,8 g κιτρικού οξέος, 2,2 g κιτρικού νατρίου και 2,5 g D(+) γλυκόζης διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου ύδατος (d.H<sub>2</sub>O). Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για 1 μήνα. Το κιτρικό οξύ δεσμεύει χηλικά τα Ca<sup>2+</sup>, τα οποία με την δράση ενζύμων μετατρέπουν το ινωδογόνο σε αδιάλυτο ινώδες συμβάλλοντας στην δημιουργία του θρόμβου. Η γλυκόζη αποτελεί απαραίτητη πηγή μεταβολικής ενέργειας για τα κύτταρα του αίματος. Η αναλογία αντιπηκτικού: αίματος είναι 1:9 v/v.
- **Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου (1% w/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>):** Το οξαλικό αμμώνιο διαλύεται σε απεσταγμένο νερό (d.H<sub>2</sub>O) και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C. Το οξαλικό αμμώνιο διαδραματίζει διττό ρόλο, καθώς συνεισφέρει στη λύση, τυχόν, υπαρχόντων ερυθροκυττάρων, αλλά και στη διαδικασία μέτρησης των αιμοπεταλίων.
- **Διάλυμα χλωριούχου νατρίου (0,9% w/v NaCl):** Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

## Πειραματική πορεία

### Παρασκευή PRP

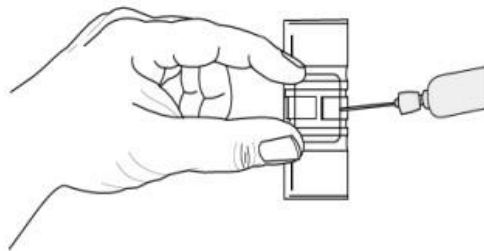
- Αρχικά, πραγματοποιείται αιμοληψία και γίνεται συλλογή 20mL περιφερικού φλεβικού αίματος σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου, τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD, σε αναλογία 1:9.
- Έπειτα, τα δείγματα υπόκεινται σε φυγοκέντρηση, με κατάλληλη ρύθμιση των παραμέτρων: 126×g, για 15mins, σε θερμοκρασία δωματίου.



**Εικόνα 9:** Οι τρεις στιβάδες του αίματος μετά την φυγοκέντρηση στα 126 x g.

- Εν συνεχεία, λαμβάνονται τα 2/3 του υπερκειμένου, το οποίο αποτελεί το PRP, και μεταφέρονται προσεκτικά σε άλλο σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Το συγκεκριμένο βήμα χρήζει προσοχής, καθώς δεν πρέπει να γίνει ανάμιξη του PRP, με τις στρώσεις των λευκών ή ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- Κατόπιν, μετράται κατά προσέγγιση ο όγκος του PRP.
- Ακολουθεί μια ακόμα φυγοκέντρηση των υπόλοιπων δειγμάτων στα 1500×g για 20min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Πραγματοποιείται συλλογή του εναπομείναντος υπερκείμενου (το υπόλοιπο 1/3), το οποίο αποτελεί το PRP, το οποίο και μεταφέρεται προσεκτικά, επίσης, σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Στο, εν λόγω βήμα, επιστάται και πάλι προσοχή κατά την μεταφορά, προς μη ανάμιξη των στρώσεων λευκών κι ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- Μετράται, κατά προσέγγιση, ο όγκος του PRP.
- Έπεται μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων, η οποία ακολουθεί τα επόμενα βήματα:
- Γίνεται αραιώση, 1:20 του PRP σε 1% w/v  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ . Έτσι, σε ένα eppendorf προστίθενται 190  $\mu\text{L}$   $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  και 10 $\mu\text{L}$  PRP, τα οποία και αναδεύονται ελαφρά, με απαλές κινήσεις το χέρι, μέχρι καλής διάλυσης του PRP στο  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ .
- Τοποθετούνται από 10  $\mu\text{L}$  του παραπάνω εναιωρήματος σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer (Εικόνα 10 ), προσέχοντας η λήψη τους να λαμβάνει χώρα είτε από το κέντρο του εναιωρήματος και όχι από την επιφάνεια ή τον πυθμένα.



**Εικόνα 10:** Προσθήκη εναιωρήματος κυττάρων στην πλάκα Neubauer.

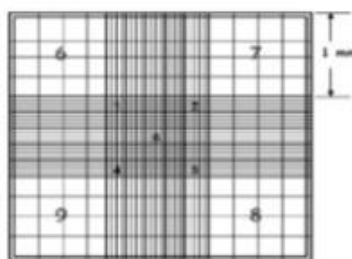




**Εικόνα 11:** Απεικόνιση της πλάκας Neubauer- αιμοκυτταρόμετρου.

- Γίνεται επώαση της πλάκας Neubauer (Εικόνα 11) σε τρυβλίο Petri, για 15 mins. Είναι σημαντικό η επώαση να πραγματοποιηθεί σε υγρό περιβάλλον, το οποίο επιτυγχάνεται με ένα μικρό κομμάτι βαμβάκι που βρέχεται και τοποθετείται στο τρυβλίο.
- Πραγματοποιείται μέτρηση των αιμοπεταλίων στην πλάκα Neubauer σε οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου στην μεγέθυνση 40X. Συγκεκριμένα, μετρούνται τα αιμοπετάλια σε 5 μεσαίου μεγέθους τετράγωνα της πλάκας Neubauer (στα 4 γωνιακά τετράγωνα και στο μεσαίο τετράγωνο). Ο αριθμός των αιμοπεταλίων υπολογίζεται μέσω της σχέσης:

$$C_{\text{plts}} = \text{άθροισμα αιμοπεταλίων στα 5 μεσαία τετράγωνα} * 1000 \text{ plts/ul}$$



**Εικόνα 12:** Περιοχή των γραμμώσεων της πλάκας Neubauer.

- Βάσει του αριθμού των αιμοπεταλίων που βρέθηκε, υπολογίζεται η ποσότητα του PRP, με την οποία πρέπει να αραιωθεί το PRP, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων να είναι 250.000/μL. Ο υπολογισμός γίνεται, αξιοποιώντας την παρακάτω σχέση:

$$C_{αρχ.} * V_{PRP} = C_{τελ.} * (V_{PRP} + V_{PPP})$$

- Άνοιγμα συσσωρευόμετρου 30min πριν τις μετρήσεις ώστε να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους 37°C.
- Σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης τοποθετούνται 500μL PPP και ύστερα αυτή τοποθετείται στην θέση «PPP» του οργάνου. Το συγκεκριμένο δείγμα δεν φέρει μαγνητάκι και παραμένει στην θέση αυτή εως ότου το πείραμα φτάσει στο τέλος του.
- Χρησιμοποιούνται γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης που περιέχουν μαγνητάκια. Σε μια κυψελίδα προστίθεται PRP (495μL). Γίνεται επώαση για 5min. Αφού περάσουν τα 5min, προστίθεται ο αγωνιστής (Πίνακας ) και γίνεται μια ακόμη επώαση για 7min. Ο τελικός όγκος σε κάθε κυψελίδα ισούται με 500μL.
- Τέλος, καταγράφονται οι καμπύλες συσσώρευσης των δειγμάτων (συσσώρευση αιμοπεταλίων).

Αγωνιστές	Συγκεντρώσεις αγωνιστών στις κυψελίδες	Αρχικά stocks αγωνιστών
<b>ADP</b>	10 μM	10 mM
<b>TRAP-6</b>	10 μM	5 mM
<b>AA</b>	0,5 mM	167 mM

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις αγωνιστών.

Αξίζει να σημειωθεί, πως στην εν λόγω μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα, πριν την υλοποίηση του βασικού πειράματος, με την τεχνική της συσσωρευομετρίας οπτικής διαπερατότητας (LTA), προκειμένου να διαπιστωθεί ποιος από τους τρεις αγωνιστές προκαλεί μεγαλύτερη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Έγινε συλλογή περιφερικού φλεβικού αίματος από διαφορετικούς υγιείς δότες και εξετάστηκε με βάση τα παραπάνω βήματα η δράση και

των τριών αυτών αγωνιστών. Διαπιστώθηκε ότι ο αγωνιστής που έδινε μεγαλύτερη συσσώρευση στους περισσότερους δότες είναι η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και αυτή είναι που επιλέχθηκε ώστε να χρησιμοποιηθεί στο τελικό πείραμα για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

### 7.3 Επίδραση αιμοπεταλίων στα κύτταρα HepG2

- Μετά το πέρας των 24 ωρών της επώασης των κυττάρων HepG2, λαμβάνει χώρα η επίδραση των αιμοπεταλίων σε αυτά.
- Ακολουθήθηκαν όλα τα παραπάνω βήματα της συσσωρευομετρίας οπτικής διαπερατότητας (LTA), προκειμένου να γίνει η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.
- Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
- Έκπλυση του πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας 6 θέσεων με 2 x 500μL PBS (1X) ανα θέση.
- Αλλαγή θρεπτικού μέσου, και προσθήκη 2mL serum free θρεπτικού μέσου (serum free και 0,4 mL πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) σε κάθε θέση του πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας.
- Επίδραση:

Οι πειραματικές συνθήκες ανα θέση του πλακιδίου είναι οι εξής:

1. Κύτταρα HepG2 (κύτταρα ελέγχου).
2. Κύτταρα HepG2 και PPP (φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα).

3. Κύτταρα HepG2 και PRP (πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα).
  4. Κύτταρα HepG2 και ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια (activated) .
  5. Κύτταρα HepG2 και αγωνιστής ADP.
  6. Κύτταρα HepG2 και PPP και ADP.
- Η αναλογία κυττάρων/αιμοπεταλίων θα πρέπει να είναι 1/10 επομένως ύστερα από υπολογισμούς βρέθηκε ότι στις πειραματικές συνθήκες 2,3,4,6 προστίθενται συνολικά 20μL ανά θέση ενώ στην 5<sup>η</sup> συνθήκη προστίθενται 2μL ADP.
  - Επώαση κυττάρων στον κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) για 48 και για 72 ώρες προκειμένου να ακολουθήσει η κυτταρομετρική ανάλυση.

## 7.4 Κυτταρομετρία Ροής

### Αρχή μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry), αποτελεί μια τεχνική ποσοτική αλλά και γρήγορη μέσω της οποίας δίνεται η δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης και ανάλυσης μιας πληθώρας φυσικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Για την μέτρηση και την ανάλυση είναι απαραίτητη η ροή των κυττάρων μέσω μιας συσκευής οπτικής ανίχνευσης, ενώ με την χρήση φθορίζουσων χρωστικών πραγματοποιείται ενίσχυση της μικροσκοπικής ανάλυσής τους.

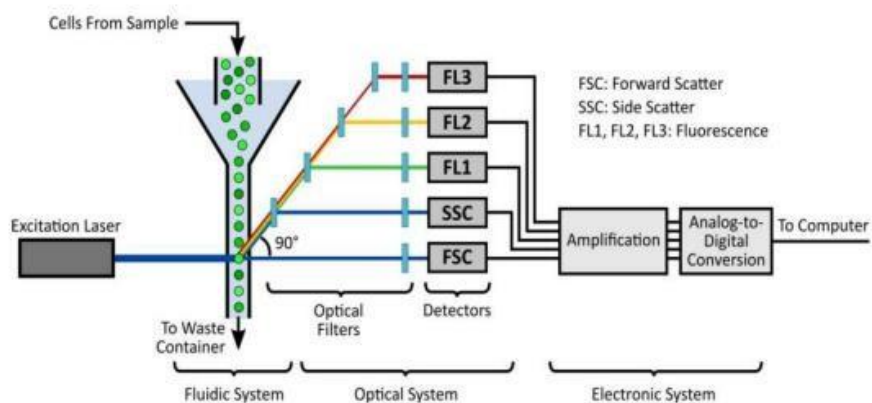
Το κυτταρόμετρο ροής, είναι το όργανο που μετράει και ανιχνεύει το ποσό της φθορίζουσας χρώσης επι των κυττάρων. Αποτελείται από μια ή περισσότερες δέσμες φωτός που παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια διέγερσης αλλά και από μια σειρά ανιχνευτών φθορισμού. Δυο επιπλέον ανιχνευτές αναλύουν δυο ανεξάρτητες από τον

φθορισμό φυσικές κυτταρικές παραμέτρους: την πρόσθια σκέδαση, που είναι ανάλογη του μεγέθους και την πλάγια σκέδαση που είναι ανάλογη της κοκκίωσης.

Τα συστήματα τα οποία απαρτίζουν ένα κυτταρόμετρο ροής είναι τρία: ένα ρευστό, ένα οπτικό και ένα ηλεκτρονικό (Εικόνα 13). Το σύστημα των ρευστών, είναι αυτό το οποίο μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα, ώστε να περνούν ένα ένα από την δέσμη φωτός. Το οπτικό σύστημα με την σειρά του, αποτελείται από δέσμες φωτός που πραγματοποιούν πρόσπτωση στα κύτταρα και παράγουν οπτικά σήματα αλλά και από οπτικά φίλτρα, μέσω των οποίων κατευθύνονται τα σήματα φωτός στους κατάλληλους ανιχνευτές. Τέλος, το ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει σήματα πλάγιας και πρόσθιας σκέδασης και σήματα φθορισμού σε ηλεκτρικά σήματα, που μπορούν να επεξεργαστούν από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

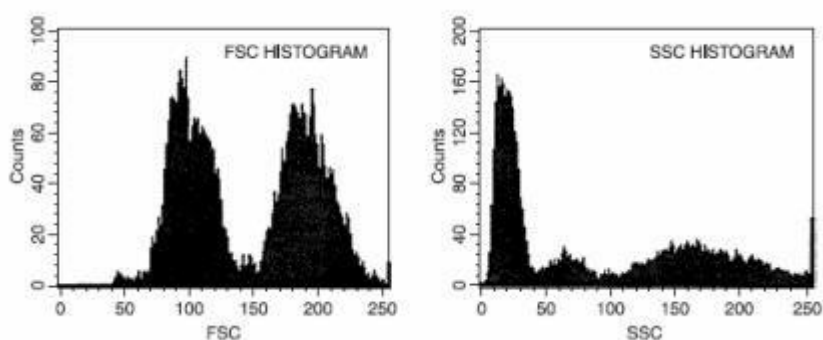
Προκειμένου να μπορέσει να διεξαχθεί σωστά η κυτταρομετρία ροής, θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν τα παρακάτω: Τα δείγματα πρέπει να βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος, τα προς ανάλυση κύτταρα, θα πρέπει να έχουν μέγεθος μεταξύ 0,2150μm αλλά και να επισημαίνονται με αντισώματα που έχουν σημειωθεί με τις κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές. Τα προς μέτρηση κύτταρα, μπορούν να μαρκαριστούν με ένα ή περισσότερα αντισώματα, συγκεκριμένα μονοκλωνικά, τα οποία προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα αντισώματα αυτά έχουν επισημανθεί με κατάλληλες φθορίζουσες ουσίες, προκειμένου να προσδεθούν στα αντίστοιχα αντιγόνα στην επιφάνεια των κυττάρων.

Η ένταση φθορισμού, καθώς και οι δείκτες σκέδασης καταγράφονται για κάθε κύτταρο και οι πληροφορίες αναλύονται με πρόγραμμα υπολογιστή. Οι φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται και διεγείρονται από laser 488 nm, είναι η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη [Fluorescein Isothiocyanate (FITC)], η φυκοερυθρίνη [Phycocerythrin (PE) και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο peritlimin-χλωροφύλλης [Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP)], οι οποίες εκπέμπουν σε μήκη κύματος 530 nm, 585 nm και 650 nm αντίστοιχα.

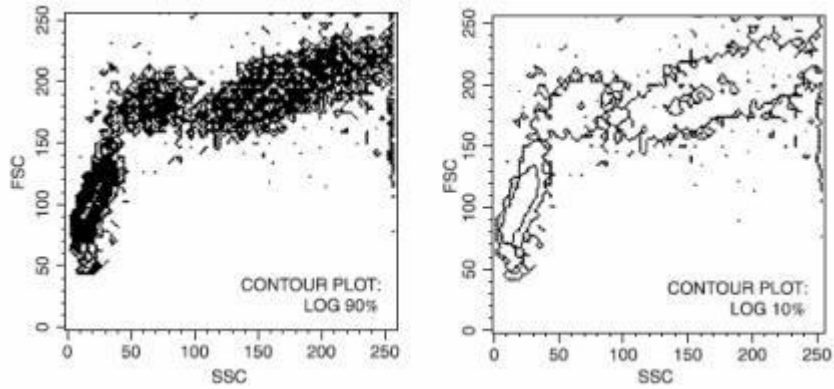


Εικόνα 13: Αρχή λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής.

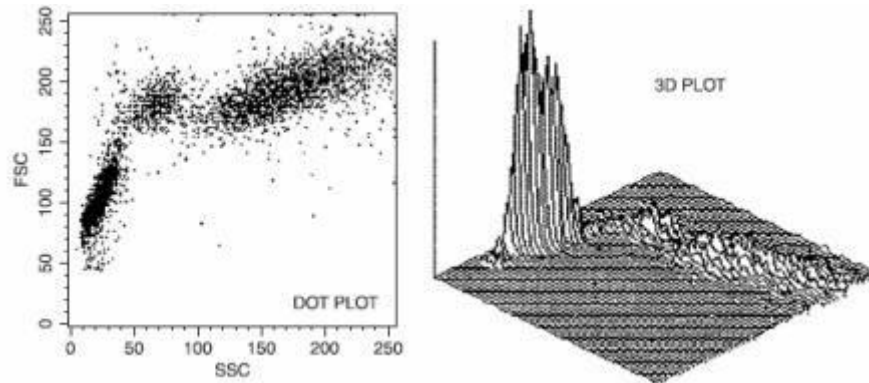
Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ανάλυσης των δεδομένων στην κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 14). Τα αποτελέσματα μπορούν να αναπαρασταθούν με ιστόγραμμα (α) καθώς και με contour plot (β), όπου SSC (Side Scattering, είναι η σκέδαση κάθετα στην δέσμη laser) και FSC (Forward Scattering, είναι η σκέδαση παράλληλα με την δέσμη laser). Επίσης, η αναπαράσταση των αποτελεσμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί και με δισδιάστατο γράφημα [(γ), dot plot, αριστερά] αλλά και με τρισδιάστατη γραφική παράσταση [(γ), (3D plot, δεξιά)].



Εικόνα 14: (α)



Εικόνα 14: (β)



Εικόνα 14: (γ)

### Όργανα

- Κυτταρόμετρο ροής (FACSCalibur, Becton Dickinson, BD Biosciences; San Jose, CA)
- Σωληνάκια κυτταρομέτρου ροής (Becton Dickinson)
- Στατώ
- Αυτόματες πιπέτες
- Πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 6 θέσεων (Corning)
- Κωνικά βαθμονομημένα σωληνάρια των 15 και 50 mL (Corning)

- Αποστειρωμένα σιφόνια 5mL (Starstedt)
- Αποστειρωμένα σιφόνια 10 mL (Starstedt)
- Αποστειρωμένα σιφόνια 25 mL (Starstedt)
- Φυγόκεντρος πάγκου Rotofix 32 (Hettich)
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Ανάστροφο μικροσκόπιο
- Επωαστικός κλίβανος (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)

#### Χημικά αντιδραστήρια

- FACS Flow Sheath Fluid (BD Biosciences)
- FACS Rinse Solution (BD Biosciences)
- FACS Clean Solution (BD Biosciences)
- Water for injection (WFI)
- Θρεπτικό μέσο RPMI 1640- Medium (Sigma)
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Biochrom)
- Αντιβιοτικά πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη [10.000 U/mL/10.000 kg/mL (100X) ]
- Ιωδιούχο προπίδιο ( Propium Iodide, PI)



### Διαλύματα εργασίας

**Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X):** Ποσότητα διαλύματος DPBS (10X) αραιώνεται 1:10 σε WFI ούτως ώστε να παρασκευαστεί το διάλυμα PBS (1X). Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

**Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640-Medium:** Κατάλληλος όγκος FBS και αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη διαλύθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 με σκοπό να φτιαχτεί το διάλυμα περιεκτικότητας 10% FBS/ 1% Pen/Str/RPMI 1640. Το διάλυμα αυτό, αποθηκεύεται για 1 μήνα στους 4°C.

### Πειραματική πορεία

Μετά το πέρας των 48 και των 72 ωρών επώασης των κυττάρων HepG2 στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με αιμοπετάλια αντίστοιχα, ακολουθείται η παρακάτω πειραματική πορεία.

- Αρχικά, τίθεται σε λειτουργία το κυτταρόμετρο ροής, καθώς χρειάζονται 20min μέχρι να είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί προ των μετρήσεων.
- Απομάκρυνση των μη προσκολλημένων κυττάρων από κάθε θέση του 6 θέσεων πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X) 2x500μL ανά θέση του πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας.
- Επώαση κυττάρων με 500μL διαλύματος θρυψίνης/ EDTA ανά θέση του πλακιδίου, για 5 min στον επωαστικό κλίβανο (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).
- Προσθήκη 500μL πλήρους θρεπτικού μέσου ανά θέση.
- Συλλογή του εναιωρήματος κάθε θέσης, σε 6 διαφορετικά κωνικά βαθμονομημένα σωληνάρια για κάθε συνθήκη.

- Τοποθέτηση 6 σωληνακίων κυτταρομέτρου ροής σε στατώ.
- Προσθήκη σε κάθε ένα από τα 6 σωληνάκια, 500μL ιωδιούχου προπιδίου (PI) και 500mL του εναιωρήματος των κυττάρων.
- Ακολουθεί αποθήκευσή τους σε σκοτεινό μέρος για 3min πριν την κυτταρομετρία ροής.

#### Μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής

Σημειώνεται πως η ανάλυση κάθε δείγματος πραγματοποιείται με 10.000 γεγονότα (events), δηλαδή 10.000 κύτταρα που θα επεξεργαστεί το όργανο.

- Λαμβάνει χώρα έκπλυση του οργάνου με WFI, για 5min.
- Εισαγωγή ρυθμίσεων του αντίστοιχου πρωτοκόλλου (HepG2 protocol).
- Μέτρηση των δειγμάτων για κάθε συνθήκη ξεχωριστά. Πραγματοποιήθηκαν δηλαδή 6 μετρήσεις σε κάθε ένα από τα πειράματα.
- Μετά το πέρας των μετρήσεων, γίνεται έκπλυση του οργάνου με FACS Rinse Solution για 10min.
- Ύστερα, ακολουθεί έκπλυση με FACS Clean Solution για 10min αντίστοιχα.
- Μετά τις δυο παραπάνω εκπλύσεις, πραγματοποιείται έκπλυση του κυτταρομέτρου με WFI επίσης για 10min.
- Δεν παραλείπεται η διαδικασία απόχυσης του περιεχομένου του δοχείου αποβλήτων.

- Τέλος, γίνεται πλήρωση του δοχείου με FACS Flow Sheath Fluid.
- Συλλέγονται τα αποτελέσματα του εκάστοτε πειράματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και λαμβάνει χώρα η επεξεργασία τους αντιστοίχως.

## 8. Αποτελέσματα

### Μελέτη της επίδρασης των αιμοπεταλίων στην ανάπτυξη ηπατικών καρκινικών κυττάρων

Μελετήθηκε η δράση των εξής στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2: PPP (φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα), PRP (πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα), ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) καθώς και ADP μαζί με PPP. Όλες οι ενώσεις εξετάστηκαν στην συγκέντρωση των 20μM. Μελετήθηκε η δράση τους στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 σε δυο διαφορετικά χρονικά πλαίσια, αρχικά στις 48 ώρες και έπειτα στις 72 ώρες.

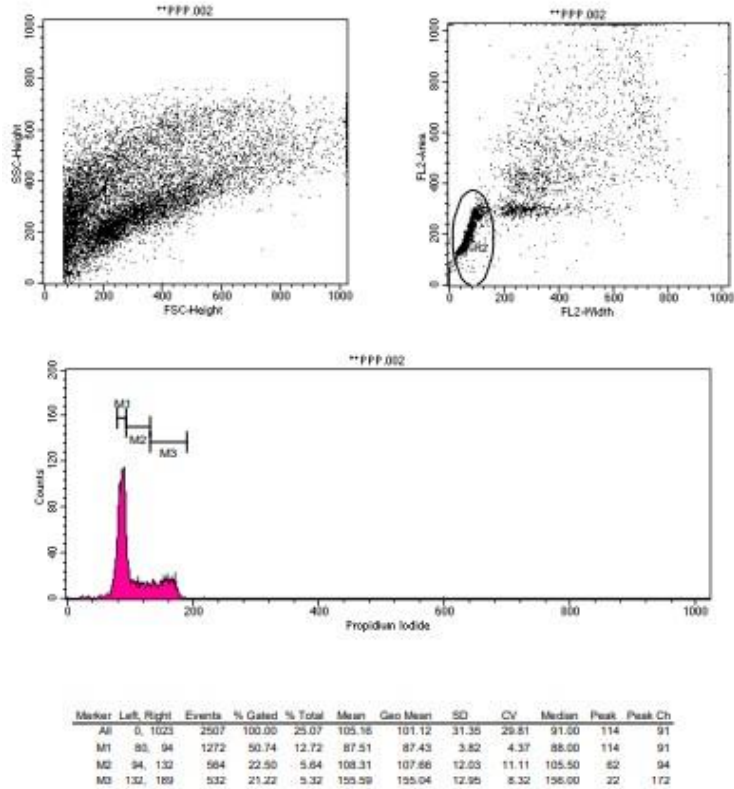
Το σκεπτικό των πειραματικών συνθηκών στις οποίες βασίστηκε η συγκεκριμένη διατριβή, αφορά αρχικά την δημιουργία μιας συνθήκης, η οποία αποτελεί την ομάδα ελέγχου (control). Η συμπερίληψη μιας ομάδας ελέγχου, είναι μια τυπική πρακτική στον πειραματικό σχεδιασμό. Αυτή η ομάδα δημιουργεί μια βασική γραμμή για την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 χωρίς εξωτερικές επιρροές. Επιτρέπει, να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των πειραματικών συνθηκών με το φυσικό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων HepG2.

Στην συνέχεια, εστίασαμε στην σύγκριση του φτωχού σε αιμοπετάλια πλάσματος (PPP) , έναντι πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP). Η σύγκριση μεταξύ PPP και PRP, στοχεύει στη διερεύνηση του ρόλου των παραγόντων που προέρχονται από αιμοπετάλια στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Το PRP είναι πλούσιο σε αυξητικούς παράγοντες και το πείραμα μπορεί να προσπαθήσει να κατανοήσει εάν αυτοί οι παράγοντες προάγουν ή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων αυτών. Το PPP, με λιγότερους παράγοντες που προέρχονται από αιμοπετάλια, χρησιμεύει ως έλεγχος για την απομόνωση της επίδρασης των αιμοπεταλιακών παραγόντων. Η ενεργοποίηση του PRP (ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, activated) πραγματοποιείται, έτσι ώστε να αξιολογηθεί εάν η ενεργοποιημένη μορφή PRP έχει διαφορετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 σε σύγκριση με το μη ενεργοποιημένο PRP, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τη συνάφεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στον επηρεασμό της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων.

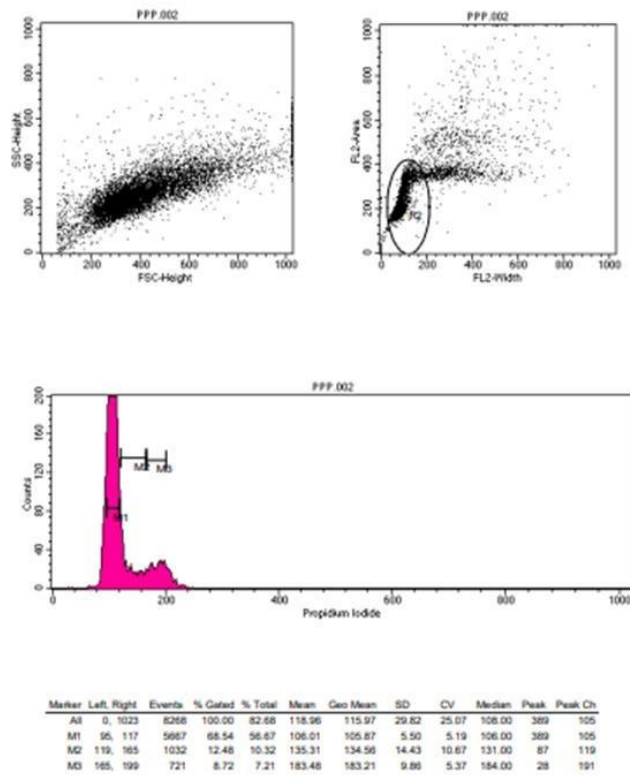
Επιπρόσθετα, η χρήση του ADP ως πειραματική συνθήκη, έγινε στοχεύοντας στην κατανόηση του πώς το ADP επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, αποκαλύπτοντας πιθανώς τη σηματοδότηση και τον μεταβολικό αντίκτυπό του στα καρκινικά κύτταρα. Η συμπερίληψη της διφωσφορικής αδενοσίνης, οφείλεται στο ρόλο της ως νουκλεοτιδίου, το οποίο εμπλέκεται στον μεταβολισμό και τη σηματοδότηση της κυτταρικής ενέργειας. Η διφωσφορική αδενοσίνη, μπορεί να ενεργοποιήσει πουρινεργικούς υποδοχείς και να επηρεάσει διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Η συνδυαστική πειραματική συνθήκη (ADP & PPP), έχει ως στόχο την διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων ή συνεργιστικών επιδράσεων μεταξύ διαφορετικών παραγόντων. Αυτό θα μπορούσε να βοηθήσει στο να κατανοήσουμε πώς πολλά συστατικά, το καθένα με τη δική του επίδραση, αλληλεπιδρούν επηρεάζοντας την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Ο συνδυασμός ADP με PPP μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με το εάν το ADP μπορεί να ρυθμίσει τις ανασταλτικές επιδράσεις του PPP.

Όλες οι παραπάνω συνθήκες λοιπόν, επιλέγονται για να διερευνήσουν τις περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των συστατικών και των καρκινικών κυττάρων, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.

Προκειμένου να ληφθούν τα παρακάτω γραφήματα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής όπως προαναφέρθηκε, ώστε να συλλεχθούν τα απαραίτητα πειραματικά αποτελέσματα. Παρατίθενται λοιπόν, οι αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής, για τα πειράματα που έλαβαν χώρα στις 48 ώρες επίδρασης και έπειτα στις 72 ώρες επίδρασης στα καρκινικά κύτταρα HepG2.



Εικόνα 15: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής του 2ου πειράματος 48ωρης επίδρασης, για την επίδραση του PPP στα καρκινικά κύτταρα HerG2.



Εικόνα 16: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής του 2ου πειράματος επίδρασης 72 ωρών του PPP στα καρκινικά κύτταρα HerG2.

Στις παραπάνω εικόνες (Εικόνες 15,16), φαίνονται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής από την 48ωρη και αντίστοιχα την 72ωρών επίδραση του φτωχού σε αιμοπετάλια πλάσματος στα καρκινικά κύτταρα HepG2. Και στις δύο αυτές εικόνες (Εικόνες 15,16), στην πάνω αριστερά γραφική παράσταση περιγράμματος (counter plot), ο άξονας  $\chi$ , που αντιπροσωπεύει το FSC-Height, υποδεικνύει το μέγεθος των κυττάρων. Τα μεγαλύτερα κύτταρα παράγουν υψηλότερα σήματα FSC και έτσι εμφανίζονται πιο δεξιά στο γράφημα, ενώ τα μικρότερα κύτταρα έχουν χαμηλότερα σήματα FSC και εμφανίζονται στα αριστερά. Ο άξονας  $\psi$ , ο οποίος αντιπροσωπεύει το SSC-Height, αντανακλά την εσωτερική πολυπλοκότητα ή την κοκκοποίηση των κυττάρων. Κυψέλες με μεγαλύτερη εσωτερική πολυπλοκότητα (π.χ. κύτταρα με θραύσματα) παράγουν υψηλότερα σήματα SSC και εμφανίζονται ψηλότερα στο γράφημα, ενώ τα κύτταρα με μικρότερη εσωτερική πολυπλοκότητα (απλούστερες εσωτερικές δομές) παράγουν χαμηλότερα σήματα SSC και εμφανίζονται χαμηλότερα. Ο όρος εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων HepG2, αναφέρεται στο γεγονός ότι ενώ τα κύτταρα στον πληθυσμό αυτό μοιράζονται μια κοινή προέλευση, η εγγενής ετερογένεια και διάφορες εξωτερικές επιρροές μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορές στην εσωτερική δομή μεταξύ των μεμονωμένων κυττάρων. Επομένως, η γραφική παράσταση FSC-Height έναντι SSC-Height στην κυτταρομετρία ροής παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για το μέγεθος και την εσωτερική πολυπλοκότητα των καρκινικών κυττάρων HepG2, βοηθώντας μας στον χαρακτηρισμό και την κατανόηση αυτών των κυττάρων με μεγαλύτερη λεπτομέρεια.

Στην κυτταρομετρία ροής, το FL2 τυπικά αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο κανάλι φθορισμού που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου φθοροφόρου ή φθορίζοντος χρώματος. Στην πάνω δεξιά γραφική παράσταση περιγράμματος (counter plot) των εικόνων αυτών (Εικόνες 15,16), ο άξονας  $\chi$ , που αντιπροσωπεύει το FL2-Width, παρέχει πληροφορίες σχετικά με το πλάτος του σήματος φθορισμού που εκπέμπεται από τα κύτταρα στο κανάλι FL2. Αυτή η παράμετρος μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως το μέγεθος και η κοκκοποίηση των κυττάρων, καθώς και τα χαρακτηριστικά του φθοροφόρου και του πρωτοκόλλου χρώσης που χρησιμοποιείται. Η κοκκοποίηση, στο πλαίσιο της κυτταρομετρίας ροής, αναφέρεται συνήθως στην παρουσία κοκκίων ή ενδοκυτταρικών δομών μέσα στα κύτταρα που διασκορπίζουν φως όταν τα κύτταρα αναλύονται σε ένα κυτταρόμετρο ροής. Όσον αφορά τον άξονα  $\psi$ , που αντιπροσωπεύει την FL2-Area, υποδεικνύει την

περιοχή του παλμού σήματος που ανιχνεύεται στο όργανο. Αυτή η παράμετρος συσχετίζεται με την ένταση ή την ποσότητα του φθορισμού που εκπέμπεται από τα κύτταρα στο κανάλι FL2. Τα κύτταρα με υψηλότερη ένταση φθορισμού παράγουν σήματα μεγαλύτερης περιοχής και εμφανίζονται ψηλότερα στο γράφημα, ενώ τα κύτταρα με χαμηλότερη ένταση φθορισμού παράγουν σήματα μικρότερης περιοχής και φαίνονται χαμηλότερα. Συνολικά, η γραφική παράσταση FL2-Width, FL2-Area στην κυτταρομετρία ροής παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά φθορισμού των καρκινικών κυττάρων HepG2, βοηθώντας στην ανάλυση και τον χαρακτηρισμό αυτών των κυττάρων με βάση τις ιδιότητες φθορισμού τους.

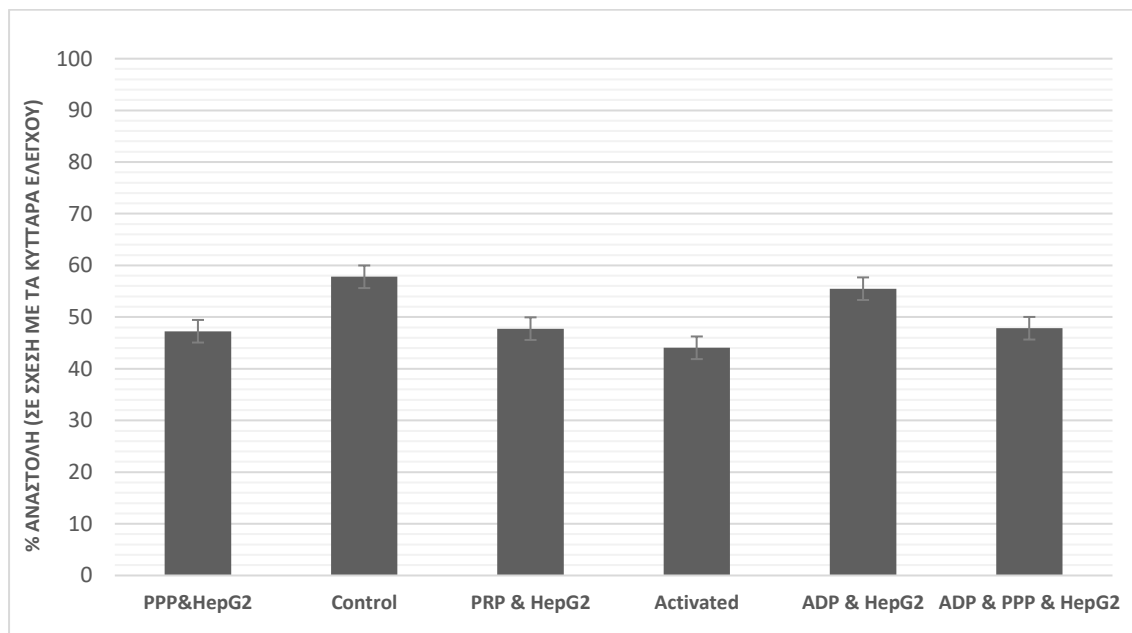
Το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium iodide, PI) είναι μια φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται στην κυτταρομετρία ροής για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων και της περιεκτικότητας σε DNA. Όταν το ιωδιούχο προπίδιο συνδέεται με το DNA, εκπέμπει φθορισμό κατά τη διέγερση από ένα λέιζερ, επιτρέποντας μας την διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων και την ανάλυση της κατανομής του κυτταρικού κύκλου με βάση το περιεχόμενο DNA. Στο ιστόγραμμα στο κέντρο των Εικόνων (15,16), στον άξονα  $\chi$ , που αφορά την ένταση φθορισμού ιωδιούχου προπιδίου, η ένταση αυτή συσχετίζεται με την ποσότητα του DNA που υπάρχει σε κάθε κύτταρο. Κύτταρα χρωματισμένα με ιωδιούχο προπίδιο με άθικτες μεμβράνες (ζωντανά κύτταρα) έχουν γενικά χαμηλό φθορισμό PI λόγω περιορισμένης διείσδυσης χρωστικής μέσα στο κύτταρο. Ωστόσο, κύτταρα με κατεστραμμένες μεμβράνες (νεκρά κύτταρα) ή κύτταρα σε μεταγενέστερα στάδια απόπτωσης παρουσιάζουν αυξημένο φθορισμό PI καθώς η χρωστική δεσμεύεται στο DNA. Επομένως, ο άξονας  $\chi$ , που αντιπροσωπεύει την ένταση του ιωδιούχου προπιδίου, παρέχει πληροφορίες σχετικά με το περιεχόμενο DNA και τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ο άξονας  $\psi$  (Counts), αντιπροσωπεύει τον αριθμό των γεγονότων ή των μετρήσεων που ανιχνεύονται σε κάθε επίπεδο έντασης ιωδιούχου προπιδίου. Κάθε συμβάν τυπικά αντιστοιχεί σε ένα μεμονωμένο κύτταρο που διέρχεται από το κυτταρόμετρο ροής. Η μέτρηση υποδεικνύει τη συχνότητα των κυττάρων με συγκεκριμένη ένταση ιωδιούχου προπιδίου εντός του αναλυθέντος δείγματος.

Αναλύοντας λοιπόν την κατανομή της έντασης του ιωδιούχου προπιδίου, το οποίο επιτρέπει τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε DNA, είναι δυνατή η διάκριση των κυττάρων HepG2 σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου και ο προσδιορισμός της αναλογίας τους στις διαφορετικές αυτές φάσεις του κυτταρικού κύκλου



(M1,M2,M3). Όταν εξετάζουμε ένα ιστόγραμμα που δημιουργείται από δεδομένα κυτταρομετρίας ροής, κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει μια ξεχωριστή φάση του κυτταρικού κύκλου. Όσον αφορά την επίδραση των 48 ωρών του PPP στα καρκινικά κύτταρα HepG2 σε σύγκριση με αυτή των 72 ωρών, όπως φαίνεται στα ιστογράμματα των Εικόνων (15,16), η παράταση της επίδρασης σε 72 ώρες επιτρέπει περισσότερο χρόνο για να ασκήσει τα αποτελέσματά της στα κύτταρα. Αυτή η εκτεταμένη διάρκεια μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω αλλαγές στην κατανομή του κυτταρικού κύκλου σε σύγκριση με το χρονικό διάστημα της επίδρασης των 48 ωρών. Όπως φαίνεται, η επίδραση που διήρκησε 72 ώρες, προκάλεσε πιο έντονα αποτελέσματα, οδηγώντας σε πιο σημαντικές αλλαγές στο προφίλ του κυτταρικού κύκλου. Συγκρίνοντας τα ιστογράμματα που λαμβάνονται από την κυτταρομετρία ροής και στα δύο χρονικά σημεία της επίδρασης του PPP στα κύτταρα HepG2 (48, 72 ώρες), παρατηρούνται μετατοπίσεις στις κορυφές που αντιστοιχούν σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου, αλλαγές στην αναλογία των κυττάρων σε κάθε φάση, καθώς ακόμα και η εμφάνιση υποπληθυσμών που υποδεικνύουν συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις.

Ειδικότερα, για την επίδραση των 48 ωρών λήφθηκαν τα εξής αποτελέσματα βάση των παρακάτω γραφημάτων. Η συνθήκη στην οποία εμπεριέχονται τα κύτταρα HepG2 και μόνον, αποτελεί τα κύτταρα ελέγχου (control).

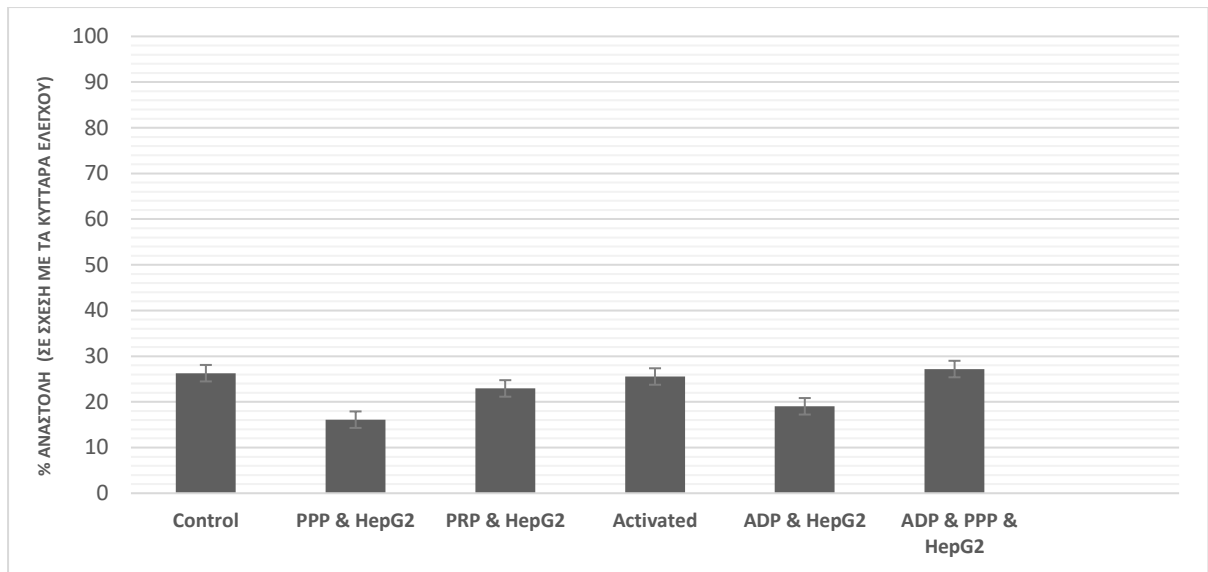


**Εικόνα 17:** Επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control) στην 48ωρη επίδραση διαφορετικών ουσιών στα καρκινικά κύτταρα HepG2, για την φάση M1.

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα (Εικόνα 17), που αφορά την επίδραση 48 ωρών στα καρκινικά κύτταρα HepG2 και απεικονίζει το ποσοστό ανάπτυξης τους υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και συγκεκριμένα για την φάση M1 του κύκλου ανάπτυξης των κυττάρων, φαίνεται ότι:

Όσον αφορά τα κύτταρα ελέγχου (control), αντιπροσωπεύουν την αρχική ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, υπό κανονικές συνθήκες, χωρίς καμία παρέμβαση. Η επίδραση του φτωχού σε αιμοπετάλια πλάσματος στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (PPP & HepG2), παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη ανάπτυξη των κυττάρων σε σχέση με το control, υποδεικνύοντας ότι το PPP μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 και η μεταβολή αυτή που προκαλεί στην ανάπτυξή τους είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ). Σχετικά με την επίδραση του PRP στα κύτταρα HepG2 (PRP & HepG2), είναι φανερό ότι το ποσοστό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων είναι ελαφρώς χαμηλότερο από το control, υποδηλώνοντας ότι το PRP έχει μικρή ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, αν και το αποτέλεσμα είναι λιγότερο έντονο από ότι με το PPP. Αναφορικά με την επίδραση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (activated) στα καρκινικά κύτταρα HepG2, φαίνεται ότι η ράβδος αυτή είναι αρκετά παρόμοια με αυτή της πειραματικής συνθήκης PRP & HepG2, επομένως, έχει παρόμοια μικρή ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2.

Στην περίπτωση της επίδρασης ADP στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (ADP & HepG2), ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων, είναι υψηλότερος σε σχέση με τις συνθήκες PRP & HepG2 αλλά και activated, εξακολουθεί όμως να είναι ελαφρώς χαμηλότερος από το control, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η διφωσφορική αδενοσίνη μεταβάλλει ελάχιστα την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Τέλος, ο συνδυασμός ADP και PPP με κύτταρα HepG2 (ADP & PPP & HepG2), οδηγεί σε ρυθμό ανάπτυξης παρόμοιο με την επίδραση του ADP στα κύτταρα HepG2, φανερώνοντας ότι η παρουσία PPP δεν μεταβάλλει σημαντικά την επίδραση του ADP στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2.

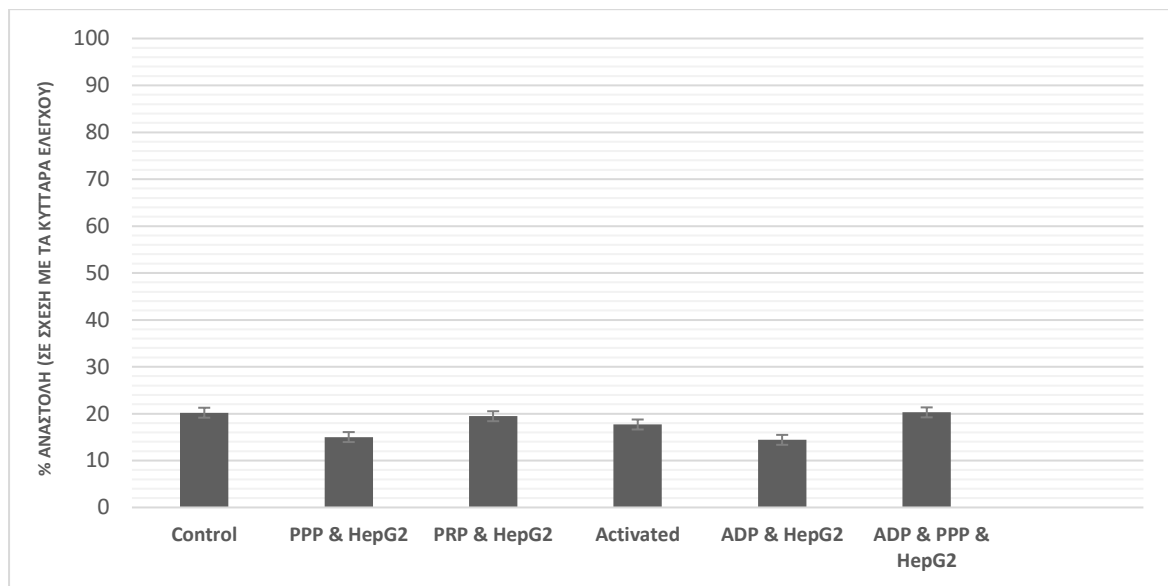


**Εικόνα 18:** Επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control) στην 48ωρη επίδραση διαφορετικών ουσιών στα καρκινικά κύτταρα HepG2, για την φάση M2.

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα (Εικόνα 18), που αφορά την επίδραση 48 ωρών στα καρκινικά κύτταρα HepG2 και απεικονίζει το ποσοστό ανάπτυξης τους υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και συγκεκριμένα για την φάση M2 του κύκλου ανάπτυξης των κυττάρων, φαίνεται ότι:

Τα κύτταρα ελέγχου (control), αντιπροσωπεύουν την αρχική ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, υπό κανονικές συνθήκες. Για την επίδραση του φτωχού σε αιμοπετάλια πλάσματος στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (PPP & HepG2), παρουσιάζεται σημαντική μείωση στην κυτταρική ανάπτυξη σε σχέση με το control, δηλώνοντας έτσι ότι το PPP έχει ισχυρή και στατιστικά σημαντική ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 ( $p < 0,05$ ). Σχετικά με την επίδραση του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος στα κύτταρα HepG2 (PRP & HepG2), η ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 είναι μειωμένη σε σχέση με το control, αλλά είναι υψηλότερη από ότι στην περίπτωση του PPP & HepG2, υποδεικνύοντας ότι το PRP έχει επίσης ανασταλτική δράση, αν και μικρότερη από αυτή του PPP. Αναφορικά με την επίδραση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (activated) στα κύτταρα HepG2, φαίνεται να οδηγεί σε ρυθμό ανάπτυξης κυττάρων παρόμοιο με της περίπτωσης της επίδρασης του PRP στα κύτταρα HepG2, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι δεν διαφέρει σημαντικά ως προς την επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη σε σύγκριση με το PRP.

Όσον αφορά την επίδραση της διφωσφορικής αδενοσίνης στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (ADP & HepG2), δείχνει χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης κυττάρων από το control, υποδηλώνοντας ότι η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) έχει στατιστικά σημαντική ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 ( $p < 0,05$ ). Από την άλλη πλευρά, ο συνδυασμός ADP και PPP μαζί με κύτταρα HepG2 έχει ως αποτέλεσμα μια ελαφρά αύξηση σε σχέση με την επίδραση μόνον του ADP στα κύτταρα HepG2, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να φανερώνει ότι το PPP μπορεί να μετριάξει ελαφρώς την ανασταλτική επίδραση της διφωσφορικής αδενοσίνης.



**Εικόνα 19:** Επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control) στην 48ωρη επίδραση διαφορετικών ουσιών στα καρκινικά κύτταρα HepG2, για την φάση M3.

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα (Εικόνα 19), που αφορά την επίδραση 48 ωρών στα καρκινικά κύτταρα HepG2 και απεικονίζει το ποσοστό ανάπτυξης τους υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και συγκεκριμένα για την φάση M3 του κύκλου ανάπτυξης των κυττάρων, φαίνεται ότι:

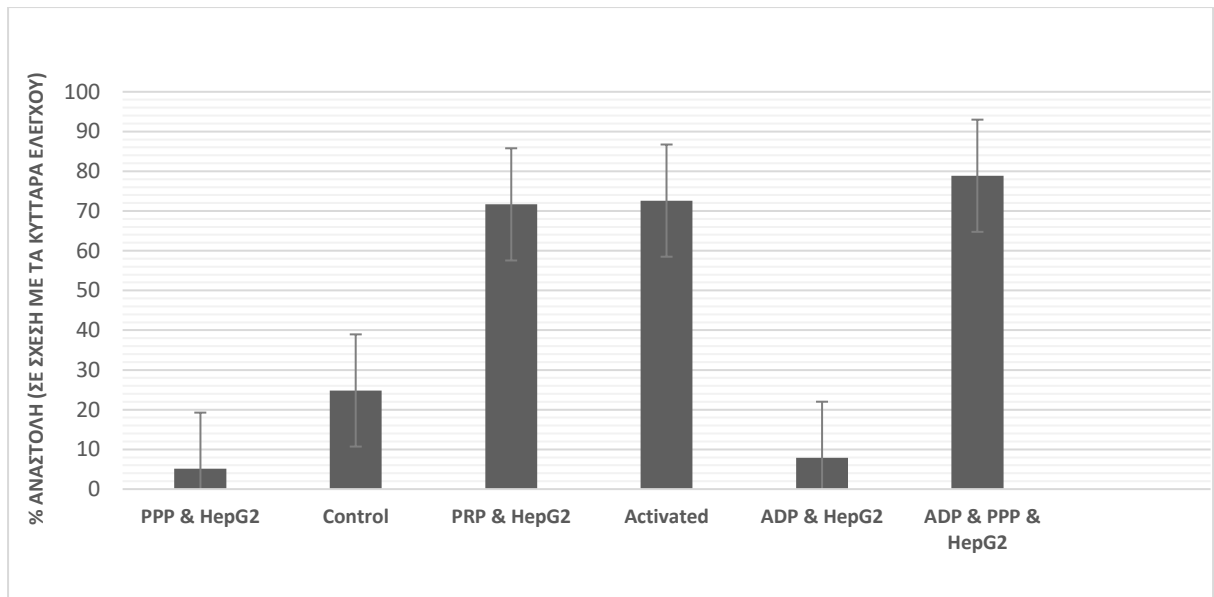
Τα κύτταρα ελέγχου (control), αντιπροσωπεύουν την αρχική ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, υπό κανονικές συνθήκες. Για την επίδραση του PPP στα κύτταρα HepG2 (PPP & HepG2), βάση του παραπάνω γραφήματος, το ύψος της ράβδου, δείχνει ότι τα κύτταρα έχουν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με το control, σημειώνοντας έτσι μια ανασταλτική επίδραση του PPP στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ( $p < 0,05$ ). Στην περίπτωση της επίδρασης του PRP στα κύτταρα HepG2 (PRP & HepG2)

φαίνεται να υπάρχει μια μικρή ανασταλτική επίδραση του PRP στην κυτταρική ανάπτυξη σε σχέση με το control. Αναφορικά με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (activated) και την επίδρασή τους στα κύτταρα HepG2, δείχνει έναν ρυθμό ανάπτυξης κυττάρων που είναι επίσης ελαφρώς χαμηλότερος από το control, παρόμοιο με του PRP & HepG2, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων δεν μεταβάλλει σημαντικά την επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη.

Με την επίδραση της διφωσφορικής αδενοσίνης στα κύτταρα HepG2 (ADP & HepG2), τα κύτταρα εμφανίζουν ρυθμό ανάπτυξης που είναι και πάλι ελαφρώς χαμηλότερος από το control, αλλά φαίνεται να είναι περίπου ο ίδιος ή λίγο μικρότερος από τις ράβδους PRP & HepG2 και Activated, φανερώνοντας έτσι παρόμοια ή ελάχιστα αυξημένη ανασταλτική επίδραση του ADP στην κυτταρική ανάπτυξη. Ο συνδυασμός ADP και PPP μαζί με κύτταρα HepG2 στην περίπτωση αυτή, δείχνει ότι η συνδυασμένη επίδρασή τους στην κυτταρική ανάπτυξη δεν διαφέρει σημαντικά από την επίδραση του ADP μόνο.

Συνολικά, για την 48ωρη επίδραση των διαφορετικών αυτών ουσιών στα καρκινικά κύτταρα HepG2 και για τις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων HepG2 (M1, M2, M3), τα πειράματα που απεικονίζονται στα διαγράμματα ράβδων υποδεικνύουν ότι όλες οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν, τείνουν να αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, σε διαφορετικούς βαθμούς, με το PPP να δείχνει το στατιστικά σημαντικότερο ( $p < 0,05$ ) και σταθερό ανασταλτικό αποτέλεσμα. Οι πειραματικές συνθήκες που αντιπροσωπεύονται από το control, δείχνουν σταθερά τον υψηλότερο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Αντιστοίχως, λήφθηκαν τα παρακάτω γραφήματα για τα πειράματα που έλαβαν χώρα για τις 72 ώρες επίδρασης στα καρκινικά κύτταρα HepG2.



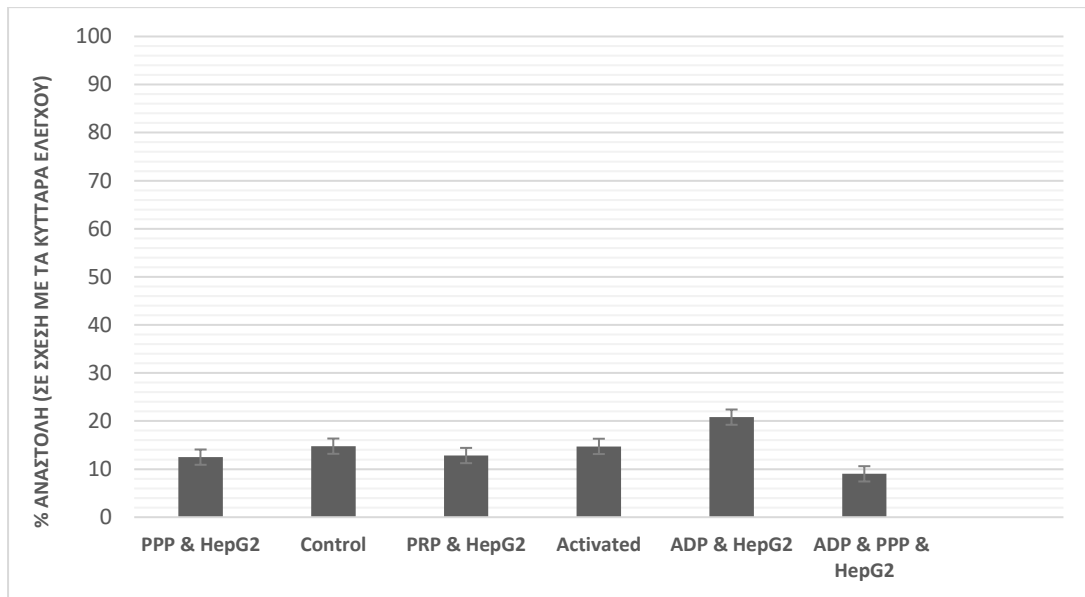
**Εικόνα 20:** Επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control) στην 72 ωρών επίδραση διαφορετικών ουσιών στα καρκινικά κύτταρα HepG2, για την φάση M1.

Βάση του παραπάνω γραφήματος (Εικόνα 20), που αφορά την επίδραση 72 ωρών στα καρκινικά κύτταρα HepG2 και απεικονίζει το ποσοστό ανάπτυξης τους υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και συγκεκριμένα για την φάση M1 του κύκλου ανάπτυξης των κυττάρων, φαίνεται ότι:

Τα κύτταρα ελέγχου (control), είναι αυτά τα οποία αντιπροσωπεύουν την βασική-αναμενόμενη κυτταρική ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, χωρίς καμία παρέμβαση. Στην περίπτωση της επίδρασης του PPP στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (PPP & HepG2), φαίνεται να έχουμε το χαμηλότερο παρατηρούμενο ποσοστό ανάπτυξης, γεγονός το οποίο παρουσιάζει ισχυρή και στατιστικά σημαντική ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 ( $p < 0,05$ ). Το ποσοστό ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 στην επίδραση του PRP σε αυτά (PRP & HepG2), είναι μεγαλύτερο σε σχέση με το control και έτσι καταλαβαίνουμε ότι το PRP προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 σε αυτή την πειραματική διάταξη. Αναφορικά με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (activated), στο γράφημα αυτό, παρατηρούμε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων σε αυτή την περίπτωση είναι παρόμοιος με το control, υποδεικνύοντας ότι η πειραματική αυτή συνθήκη δεν έχει ουσιαστικό αντίκτυπο στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης ( $p > 0,05$ ).

Όσον αφορά την επίδραση της διφωσφορικής αδενοσίνης στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (ADP & HepG2), δείχνει να έχει στατιστικά σημαντική ανασταλτική

επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη ( $p < 0,05$ ), με τον πήχη να είναι επίσης χαμηλότερος σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Επίσης, είναι αρκετά ενδιαφέρον, ότι ο συνδυασμός ADP με PPP στην 72 ωρών επίδραση τους στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (ADP & PPP & HepG2), οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με κάθε άλλη περίπτωση. Αυτό, φανερώνει μια πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ ADP και PPP η οποία μετριάξει τα επιθυμητά ανασταλτικά αποτελέσματα.



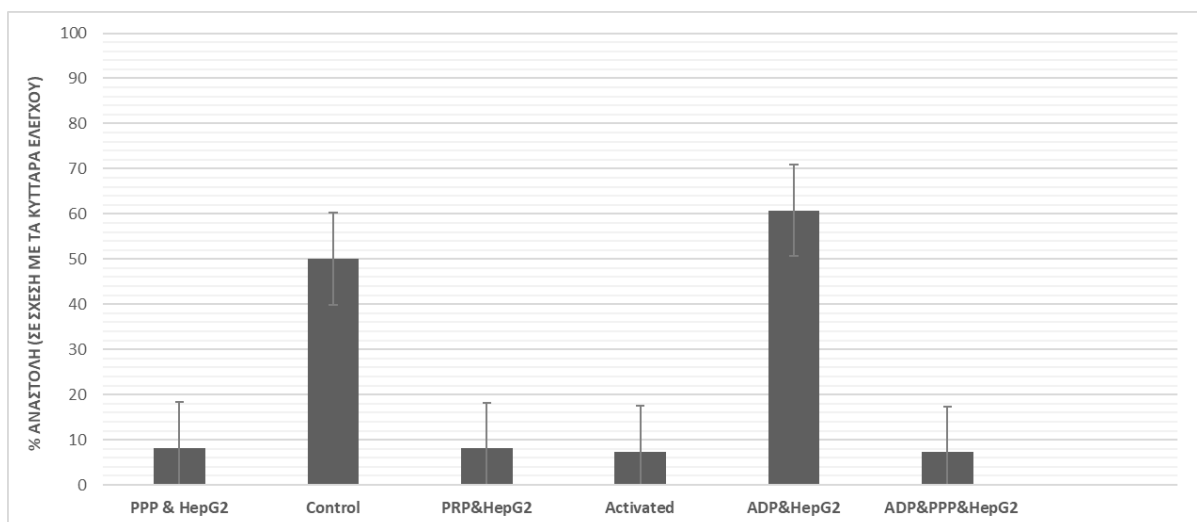
**Εικόνα 21:** Επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control) στην 72 ωρών επίδραση διαφορετικών ουσιών στα καρκινικά κύτταρα HepG2, για την φάση M2.

Βάση του παραπάνω γραφήματος (Εικόνα 21), που αφορά την επίδραση 72 ωρών στα καρκινικά κύτταρα HepG2 και απεικονίζει το ποσοστό ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και συγκεκριμένα για την φάση M2 του κύκλου ανάπτυξης των κυττάρων, φαίνεται ότι:

Τα κύτταρα ελέγχου (control), είναι αυτά που αντιπροσωπεύουν τον τυπικό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων HepG2, χωρίς οποιαδήποτε παρέμβαση. Σχετικά με την επίδραση του PPP στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (PPP & HepG2), φαίνεται να παρουσιάζει μειωμένο ποσοστό ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, δείχνοντας έτσι ότι το PPP παρουσιάζει ανασταλτική και στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ) επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Για την περίπτωση της επίδρασης του PRP στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (PRP & HepG2), φαίνεται να οδηγεί

σε παρόμοιο επίπεδο ανάπτυξης με τα κύτταρα ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι έχει μικρή έως καθόλου άρα και στατιστικά μη σημαντική ( $p > 0,05$ ) επίδραση στην ανάπτυξή τους. Σχετικά με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (activated), το ποσοστό κυτταρικής ανάπτυξης κάτω από αυτή την πειραματική συνθήκη, είναι συγκρίσιμο με αυτό του PRP, κάτι το οποίο δείχνει ότι αυτή η επίδραση επίσης δεν επηρεάζει σημαντικά την κυτταρική ανάπτυξη.

Όσον αφορά την επίδραση της διφωσφορικής αδενοσίνης στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (ADP & HepG2), παρατηρούμε ότι υπάρχει μια αξιοσημείωτη αύξηση στο ποσοστό ανάπτυξης για τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε επίδραση με ADP για 72 ώρες, υποδηλώνοντας ότι το ADP μπορεί να ενίσχυσε την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 σε σχέση με το control, επομένως η ανασταλτική της δράση στην ανάπτυξη των κυττάρων είναι στατιστικά μη σημαντική ( $p > 0,05$ ). Η συνδυασμένη επίδραση της διφωσφορικής αδενοσίνης και του πλάσματος φτωχού σε αιμοπετάλια στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (ADP & PPP & HepG2), δείχνει μείωση στο ποσοστό ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, μάλιστα φαίνεται να είναι μικρότερη και από την ανάπτυξη που παρατηρείται μόνο με το PPP, οδηγώντας έτσι στην διαπίστωση μιας μετριαστικής επίδρασης του PPP στην ενισχυτική δράση του ADP στην ανάπτυξη των κυττάρων.



**Εικόνα 22:** Επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control) στην 72 ωρών επίδραση διαφορετικών ουσιών στα καρκινικά κύτταρα HepG2, για την φάση M3.



Βάση του παραπάνω γραφήματος (Εικόνα 22), που αφορά την επίδραση 72 ωρών στα καρκινικά κύτταρα HepG2 και απεικονίζει το ποσοστό ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και συγκεκριμένα για την φάση M3 του κύκλου ανάπτυξης των κυττάρων, φαίνεται ότι:

Τα κύτταρα ελέγχου (control), αντιπροσωπεύουν τον τυπικό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων HepG2, χωρίς οποιαδήποτε παρέμβαση και συγκρίνονται με αυτό όλες οι υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες. Αναφορικά με την επίδραση του PPP στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (PPP & HepG2), είναι αυτό που παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη ανάπτυξη σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, υποδηλώνοντας μια ισχυρή ανασταλτική επίδραση του PPP, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2, η οποία είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ). Η ανάπτυξη που παρατηρείται στα κύτταρα HepG2 που έχουν υποστεί επίδραση με PRP (PRP & HepG2), είναι πολύ χαμηλότερη από ότι στα κύτταρα ελέγχου, γεγονός το οποίο μας οδηγεί στην διαπίστωση ότι υπάρχει ανασταλτική δράση αλλά όχι τόσο ισχυρή όσο του PPP. Σχετικά με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (activated) και την επίδρασή τους στα καρκινικά κύτταρα HepG2, από ότι φαίνεται βάση του γραφήματος αυτού, οδηγεί επίσης σε χαμηλότερη κυτταρική ανάπτυξη σε σχέση με το control, παρόμοια με αυτή του PRP & HepG2, κάτι το οποίο φανερώνει την ανασταλτική και στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ) επίδραση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2.

Αναφορικά με την επίδραση της διφωσφορικής αδενοσίνης στα καρκινικά κύτταρα HepG2, (ADP & HepG2), παρατηρούμε μια σημαντική αύξηση στην κυτταρική ανάπτυξη σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, κατανοώντας ότι η διφωσφορική αδενοσίνη προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2, επομένως η ανασταλτική δράση της στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HepG2, είναι στατιστικά μη σημαντική ( $p > 0,05$ ). Όταν η διφωσφορική αδενοσίνη συνδυάστηκε με το φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα και επίδρασαν στα καρκινικά κύτταρα HepG2 (ADP & PPP & HepG2), παρατηρήθηκε ότι η κυτταρική ανάπτυξη ήταν πολύ χαμηλότερη από ότι με την επίδραση της ADP. Επομένως, φαίνεται η μετριαστική επίδραση του PPP στην ενισχυτική δράση της διφωσφορικής αδενοσίνης.

Συνολικά, για την επίδραση των 72 ωρών, των διαφορετικών αυτών ουσιών στα καρκινικά κύτταρα και για τις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων HepG2 (M1, M2, M3), τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από αυτά τα πειράματα υποδηλώνουν ότι το PPP είναι ένας ισχυρός και ο στατιστικά σημαντικότερος

αναστολέας της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2, το PRP και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια έχουν μέτρια ανασταλτική δράση και το ADP γενικά προάγει την κυτταρική ανάπτυξη. Όταν το ADP συνδυάζεται με το PPP τότε η αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων από το PPP εξουδετερώνεται εν μέρη, με αποτέλεσμα μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

## 9. Συμπεράσματα- Συζήτηση

Τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάζονται με τη μορφή διαγραμμάτων ράβδων, υποδεικνύουν ότι το φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα (PPP) ασκεί σταθερά ισχυρή ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2. Η ερμηνεία ότι το φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα έχει ισχυρή ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, θα πρέπει να υποστηριχθεί από μια βαθύτερη κατανόηση των βιολογικών αλληλεπιδράσεων και μηχανισμών που παίζουν ρόλο. Ενώ τα διαγράμματα υποδηλώνουν οπτικά ότι το PPP αναστέλλει σταθερά την κυτταρική ανάπτυξη περισσότερο από τις άλλες περιπτώσεις, οι βαθύτεροι λόγοι για αυτήν την παρατήρηση μπορεί να είναι πολύπλευροι και πολύπλοκοι. Μερικές πιθανές εξηγήσεις στο γιατί το PPP μπορεί να παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 έναντι όλων των άλλων συνθηκών επίδρασης είναι οι εξής:

- 1. Έλλειψη αυξητικών παραγόντων:** Το φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη συγκέντρωση αιμοπεταλίων και κατά συνέπεια χαμηλότερο επίπεδο αυξητικών παραγόντων, που βρίσκονται συνήθως στα αιμοπετάλια. Οι αυξητικοί αυτοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι γνωστό ότι προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Η απουσία ή τα μειωμένα επίπεδα αυτών των παραγόντων στο PPP θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
- 2. Παρουσία ανασταλτικών ουσιών:** Το PPP, μπορεί να περιέχει υψηλότερα επίπεδα ανασταλτικών κυτοκινών ή άλλων συστατικών του πλάσματος που μπορούν να ρυθμίσουν αρνητικά την κυτταρική ανάπτυξη. Οι ουσίες αυτές, θα μπορούσαν να δράσουν απευθείας στα κύτταρα HepG2 ή να αλλάξουν το κυτταρικό μικροπεριβάλλον με τρόπο που δεν ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
- 3. Εξάντληση θρεπτικών συστατικών:** Η διαδικασία παρασκευής του PPP, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών που απαιτούνται για την ανάπτυξη των κυττάρων. Αν λοιπόν το PPP στερείται θρεπτικών

συστατικών ή της ισορροπίας των θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό και την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, αυτό μπορεί να οδηγεί στον μειωμένο πολλαπλασιασμό τους.

4. **Αλλαγές στην κυτταρική σηματοδότηση:** Τα συστατικά του PRP, μπορεί να αλληλοεπιδράσουν με υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας ή με μονοπάτια σηματοδότησης εντός των κυττάρων HepG2, που οδηγούν στην ενεργοποίηση των ανασταλτικών οδών ανάπτυξης ή στην καταστολή των οδών που προάγουν την ανάπτυξη.
5. **Επαγωγή απόπτωσης:** Το φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα, μπορεί να περιέχει παράγοντες που προκαλούν απόπτωση, γνωστή και ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, στα κύτταρα HepG2. Αυτό, θα μπορούσε να οδηγήσει σε καθαρή μείωση του αριθμού των κυττάρων, δίνοντας την εμφάνιση αναστολής της ανάπτυξης.
6. **Επίδραση στον κυτταρικό κύκλο:** Τα συστατικά εντός του PRP, θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων HepG2, οδηγώντας πιθανώς στην διακοπή του. Αυτό, θα μπορούσε να συμβεί μέσω της ρύθμισης των κυκλινών, των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών (CDK) και των αναστολέων CDK, οι οποίοι είναι ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο της προόδου των κυττάρων μέσω του κυτταρικού κύκλου.

Αντίθετα, το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP) και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εμφανίζουν μέτρια ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Ο βαθμός αναστολής είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν που παρατηρείται με το PRP, γεγονός που υποδηλώνει ότι, το PRP και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (activated) είναι γνωστό ότι έχουν υψηλές συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών που συνήθως εμπλέκονται στις διαδικασίες επούλωσης και αναγέννησης ιστών. Ωστόσο, τα αποτελέσματά τους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ιδιαίτερα στα καρκινικά κύτταρα όπως τα HepG2 (μια κυτταρική σειρά καρκίνου του ήπατος όπως προαναφέρθηκε), μπορεί να είναι πολύπλοκα και να εξαρτώνται από την

ισορροπία και την αλληλεπίδραση διαφόρων παραγόντων. Ακολουθούν ορισμένοι λόγοι για τους οποίους το PRP και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορεί να έχουν μέτρια ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2:

- 1. Ισορροπία αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών:** Το PRP περιέχει ένα πλήθος αυξητικών παραγόντων, όπως PDGF, TGF-β, VEGF και άλλοι. Ενώ αυτοί οι παράγοντες μπορούν να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων, οι επιδράσεις τους στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να ποικίλλουν. Ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες μπορεί να έχουν ανασταλτικές επιδράσεις στα κύτταρα HepG2 λόγω ειδικών εκφράσεων υποδοχέα ή ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης που μεταβάλλονται στα καρκινικά κύτταρα.
- 2. Αλλαγές οδού κυτταρικής σηματοδότησης:** Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τυπικά περιλαμβάνει την απελευθέρωση αυτών των αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Εάν τα μονοπάτια σηματοδότησης στα κύτταρα HepG2 μεταβληθούν λόγω της καρκινικής φύσης τους, η απόκριση σε αυτούς τους αυξητικούς παράγοντες μπορεί να είναι διαφορετική από εκείνη των φυσιολογικών κυττάρων, οδηγώντας δυνητικά σε αναστολή της ανάπτυξης ή ακόμα και σε απόπτωση.
- 3. Ανοσολογική Διαμόρφωση:** Το PRP περιέχει όχι μόνο αυξητικούς παράγοντες αλλά και διάφορες κυτοκίνες και κύτταρα του ανοσοποιητικού που θα μπορούσαν να ρυθμίσουν την ανοσολογική απόκριση. Αυτή η ανοσορύθμιση μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, δυνητικά αναστέλλοντάς την εάν τα ανοσολογικά συστατικά ενεργοποιηθούν με τρόπο που στοχεύει τα κύτταρα HepG2.
- 4. Συγκέντρωση ενεργών συστατικών:** Η συγκέντρωση των ενεργών συστατικών στο PRP και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορεί να επηρεάσει τις κυτταρικές αποκρίσεις. Μπορεί να υπάρχει ένα βέλτιστο εύρος για την προώθηση της ανάπτυξης και μια περίσσεια μπορεί να οδηγήσει σε ανασταλτικό αποτέλεσμα. Η διαδικασία ενεργοποίησης μπορεί επίσης να αλλάξει τη συγκέντρωση ή τη δραστηριότητα αυτών των συστατικών.

5. **Ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά:** In vitro, η προσθήκη PRP στο μέσο καλλιέργειας μπορεί να αλλάξει τη δυναμική της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών. Υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων και αυξητικών παραγόντων μπορεί να ανταγωνίζονται για περιορισμένα θρεπτικά συστατικά στο μέσο, οδηγώντας σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης.
6. **Επαγωγή γήρανσης:** Ορισμένοι παράγοντες εντός του PRP μπορεί να προκαλέσουν μια κατάσταση γήρανσης στα κύτταρα HepG2. Η γήρανση είναι μια κατάσταση αναστολής ανάπτυξης στην οποία τα κύτταρα μπορούν να εισέλθουν ως απόκριση σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του ογκογόνου στρες.

Η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), ένα άλλο συστατικό που εξετάστηκε, φαίνεται να έχει μια προαγωγική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 σε ορισμένες πειραματικές ρυθμίσεις. Είναι προϊόν αποφωσφορυλίωσης ATP και παίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταφορά ενέργειας μέσα στα κύτταρα. Συμμετέχει επίσης στη συσσώρευση αιμοπεταλίων και μπορεί να έχει διάφορους ρόλους σηματοδότησης ανάλογα με το πλαίσιο. Όταν εξετάζουμε τις επιδράσεις της στα κύτταρα HepG2, διάφοροι μηχανισμοί θα μπορούσαν να εξηγήσουν γιατί μπορεί να προάγει την κυτταρική ανάπτυξη:

1. **Ενεργειακός μεταβολισμός:** Το ADP είναι αναπόσπαστο μέρος του κυτταρικού ενεργειακού μεταβολισμού. Στα καρκινικά κύτταρα, τα οποία συχνά έχουν υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις λόγω ταχείας ανάπτυξης, η παρουσία ADP μπορεί να σηματοδοτεί την ανάγκη για αυξημένη παραγωγή ATP, διεγείροντας έτσι μονοπάτια που οδηγούν σε ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων.
2. **Πουρινεργική σηματοδότηση:** Τα κύτταρα έχουν πουρινεργικούς υποδοχείς που ενεργοποιούνται από νουκλεοτίδια όπως το ADP. Η δέσμευση του ADP σε αυτούς τους υποδοχείς μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια σηματοδότησης που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στα κύτταρα HepG2, αυτές οι οδοί μπορεί να

ρυθμιστούν προς τα πάνω ή να τροποποιηθούν με τρόπο που τα καθιστά ιδιαίτερα ανταποκρινόμενα στην ADP.

3. **ADP ως μόριο σηματοδότησης:** Το ADP χρησιμεύει ως μόριο σηματοδότησης που μπορεί να επηρεάσει την ενεργοποίηση διαφόρων ενδοκυτταρικών καταρράξεων σηματοδότησης. Αυτοί οι καταρράκτες μπορεί να περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση κινασών όπως οι Akt και MAPK, οι οποίες είναι γνωστό ότι προάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.
4. **Επίδραση στον κυτταρικό κύκλο:** Το ADP μπορεί να επηρεάσει τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επηρεάζοντας τη δραστηριότητα των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, η ADP θα μπορούσε να ενθαρρύνει την εξέλιξη των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S, όπου λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA, οδηγώντας σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
5. **Αλλαγή ευαισθησίας ADP σε καρκινικά κύτταρα:** Τα καρκινικά κύτταρα συχνά παρουσιάζουν αλλοιωμένη ευαισθησία στα σήματα ανάπτυξης. Τα κύτταρα HepG2 μπορεί να έχουν αυξημένη ευαισθησία στην ADP λόγω αλλαγών στην έκφραση των υποδοχέων ή στις οδούς μεταγωγής σήματος που είναι τυπικές στα καρκινικά κύτταρα.
6. **Ρόλος στην αυτοκρινή και παρακρινή σηματοδότηση:** Η ADP μπορεί να δράσει με αυτοκρινή ή παρακρινό τρόπο, επηρεάζοντας όχι μόνο τα κύτταρα που την απελευθερώνουν αλλά και τα γειτονικά κύτταρα. Αυτό μπορεί να δημιουργήσει ένα τοπικό περιβάλλον που ευνοεί την κυτταρική ανάπτυξη, ειδικά εάν τα ίδια τα κύτταρα HepG2 απελευθερώνουν παράγοντες που ανταποκρίνονται θετικά στην ADP.
7. **Έμμεσες Επιδράσεις:** Το ADP θα μπορούσε να έχει έμμεσες επιδράσεις στην κυτταρική ανάπτυξη, για παράδειγμα, ρυθμίζοντας το μικροπεριβάλλον του όγκου, αλλάζοντας τη συμπεριφορά των στρωματικών κυττάρων ή επηρεάζοντας την

αγγειογένεση, όπου όλα θα μπορούσαν να υποστηρίξουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Επιπλέον, όταν η διφωσφορική αδενοσίνη συνδυάζεται με φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα, υπάρχει μερική εξουδετέρωση της ανασταλτικής δράσης του PPP και αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του PPP και του ADP. Ακολουθούν ορισμένοι πιθανοί λόγοι για αυτό το παρατηρούμενο αποτέλεσμα:

- 1. Σηματοδότηση με τη μεσολάβηση ADP:** Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το ADP μπορεί να συνδεθεί με πουρινεργικούς υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια και να ενεργοποιήσει μονοπάτια σηματοδότησης που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Εάν το PPP περιέχει παράγοντες που αναστέλλουν αυτές τις οδούς, η προσθήκη ADP μπορεί να βοηθήσει στην αποκατάσταση της ισορροπίας σηματοδότησης προς την προώθηση της ανάπτυξης.
- 2. Αλλοιωμένες κυτταρικές αποκρίσεις:** Τα καρκινικά κύτταρα συχνά έχουν απορυθμισμένες οδούς σηματοδότησης που μπορούν να ανταποκριθούν απρόβλεπτα σε εξωτερικά ερεθίσματα. Το ADP μπορεί να τροποποιήσει το κυτταρικό περιβάλλον ή τη σηματοδότηση με τρόπο που αλλάζει τον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα ανταποκρίνονται στους ανασταλτικούς παράγοντες του PPP.
- 3. Διαμόρφωση ανασταλτικών παραγόντων:** Η διφωσφορική αδενοσίνη, θα μπορούσε να ρυθμίσει τη δραστηριότητα ή τη συγκέντρωση των ανασταλτικών παραγόντων που υπάρχουν στο PPP. Για παράδειγμα, μπορεί να προκαλέσει την έκφραση ενζύμων που υποβαθμίζουν αυτούς τους παράγοντες ή μπορεί να αλλάξει τη διαμόρφωση των ανασταλτικών πρωτεϊνών, καθιστώντας τις λιγότερο αποτελεσματικές.
- 4. Συνεργικές επιδράσεις:** Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ADP και των συστατικών του PPP μπορεί να οδηγήσει σε μια συνεργιστική επίδραση όπου το ADP ενισχύει



τη δραστηριότητα ορισμένων παραγόντων που προάγουν την ανάπτυξη στο PPP που δεν αναστέλλονται πλήρως από τα άλλα συστατικά, οδηγώντας σε καθαρή αύξηση της κυτταρικής ανάπτυξης.

5. **Ανταγωνιστική Δέσμευση:** Εάν το PPP περιέχει μόρια που συνδέονται με τους ίδιους υποδοχείς με το ADP αλλά έχουν ανασταλτική δράση, το ADP μπορεί να ανταγωνίζεται αυτά τα μόρια για δέσμευση υποδοχέα. Συναγωνίζοντας τους αναστολείς, το ADP θα μπορούσε να επιτρέψει τη συνέχιση των σημάτων ανάπτυξης.
6. **Αλλαγή στο μικροπεριβάλλον:** Η παρουσία ADP μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του όγκου που είναι ευνοϊκές για την κυτταρική ανάπτυξη, όπως η προώθηση της αγγειογένεσης ή η αλλαγή της συμπεριφοράς των στρωματικών κυττάρων, τα οποία μπορούν έμμεσα να υποστηρίξουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.
7. **Ενεργειακή Ομοιόσταση:** Το ADP είναι ένας δείκτης της κυτταρικής ενεργειακής κατάστασης. Όταν προστίθεται στο περιβάλλον με PPP, μπορεί να υποδεικνύει στο κύτταρο ότι η ενέργεια είναι διαθέσιμη, διεγείροντας έτσι μονοπάτια που οδηγούν σε αύξηση της παραγωγής ενέργειας και της χρήσης για ανάπτυξη.
8. **Μετριασμός των αποπτωτικών σημάτων:** Το PPP μπορεί να περιέχει παράγοντες που επάγουν απόπτωση, η οποία εξουδετερώνεται από την ADP μέσω της ενεργοποίησης των οδών επιβίωσης, οδηγώντας σε μείωση του κυτταρικού θανάτου και προφανή αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.
9. **Διέγερση Μηχανισμών Επιδιόρθωσης:** Το ADP θα μπορούσε να διεγείρει μηχανισμούς κυτταρικής επιδιόρθωσης που διαφορετικά αναστέλλονται από το PPP. Αυτό θα μπορούσε να περιλαμβάνει την ανοδική ρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση του DNA.

Συμπερασματικά καταλήγουμε ότι, τα πειράματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 ρυθμίζεται λεπτομερώς από μια ισορροπία παραγόντων που υπάρχουν στο περιβάλλον τους. Οι αποκρίσεις ανάπτυξης των κυττάρων είναι ευαίσθητες στη σύνθεση του περιβάλλοντος μέσου, απεικονίζοντας τη σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ ουσιών που προωθούν την ανάπτυξη και αναστολή και των οδών σηματοδότησης εντός των καρκινικών κυττάρων. Θα χρειαστούν περαιτέρω μελέτες για να διαλευκανθούν οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που βρίσκονται κάτω από αυτές τις παρατηρήσεις.

Η συνολική επίδραση των αιμοπεταλίων στα κύτταρα HepG2, όπως διαπιστώνεται από τα πειράματα που έλαβαν χώρα, δεν είναι ευθέως προωθητική, όπως μπορεί να είναι στο πλαίσιο της επούλωσης τραυμάτων και της αναγέννησης των ιστών. Αντίθετα, τα συστατικά των αιμοπεταλίων μπορεί να έχουν ουδέτερη ή ακόμα και ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη σύνθετη φύση των κυτταρικών αποκρίσεων σε εξωτερικούς παράγοντες και υπογραμμίζουν ότι οι επιδράσεις που παρατηρούνται στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να είναι σημαντικά διαφορετικές από αυτές στα φυσιολογικά κύτταρα λόγω των αλλοιωμένων φυσιολογικών και μοριακών τοπίων των καρκινικών κυττάρων.

## Βιβλιογραφία

1. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev.* (2017) 36:195–8.
2. Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: from megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol.* (2013) 201:785–96.
3. Thompson CB, Jakubowski JA, Quinn PG, Deykin D, Valeri CR. Platelet size and age determine platelet function independently. *Blood.* (1984) 63:1372–5.
4. Sayit AT, Gunbey PH, Terzi Y. Is the mean platelet volume in patients with acute cholecystitis an inflammatory marker? *J Clin Diagn Res.* (2015) 9:TC05–7
5. 10. Menter DG, Kopetz S, Hawk E, Sood AK, Loree JM, Gresele P, et al.. Platelet “first responders” in wound response, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* (2017) 36:199–213.
6. Bambace NM, Holmes CE. The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost.* (2011) 9:237–49.
7. Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol.* (2012) 210:3–22.
8. Pagel O, Walter E, Jurk K, Zahedi RP. Taking the stock of granule cargo: platelet releasate proteomics. *Platelets.* (2017) 28:119–28.
9. Gremmel T, Frelinger A, Michelson A. Platelet physiology. *Semin Thromb Hemost.* (2016) 42:191–204.
10. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Hempel D, Tucker SC, Honn KV. Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer Metastasis Rev.* (2017) 36:249–62.
11. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thromb Res.* (2012) 129:250–6.
12. Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, Ameriso SF, Dalby AJ, Fish MP, et al.. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* (2012) 366:1404–13.

13. Randi AM, Laffan MA. Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. *J Thromb Haemost.* (2017) 15:13–20.
14. Xu XR, Zhang D, Oswald BE, Carrim N, Wang X, Hou Y, et al.. Platelets are versatile cells: new discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. *Crit Rev Clin Lab Sci.* (2016) 53:409–30.
15. Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *J Hematol Oncol.* (2018) 11:125.
16. Lazar S, Goldfinger E.L. Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer. *Blood.* (2021) 10:137(23):3192–3200.
17. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood.* (2007) 110:1723–9.
18. Ferroni P, Martini F, Portarena I, Grenga I, Riondino S, La Farina F, et al.. An activated protein C-dependent thrombin generation assay predicts chemotherapy-associated venous thromboembolism in cancer patients. *Thromb Haemost.* (2011) 105:931–2.
19. Li N. Platelets in cancer metastasis: To help the “villain” to do evil. *Int J Cancer.* (2016) 138:2078–87.
20. Thomas GM, Brill A, Mezouar S, Crescence L, Gallant M, Dubois C, et al.. Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* (2015) 13:1310–9.
21. Faraday N, Schunke K, Saleem S, Fu J, Wang B, Zhang J, et al.. Cathepsin G-dependent modulation of platelet thrombus formation *in vivo* by blood neutrophils. *PLoS ONE.* (2013) 8:e71447.
22. Patrignani P, Patrono C. Aspirin, platelet inhibition, and cancer prevention. *Platelets.* (2018) 29:779–85.
23. Michael JV, Wurtzel JGT, Mao GF, Rao AK, Kolpakov MA, Sabri A, et al.. Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. *Blood.* (2017) 130:567–80.

24. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2014) 111:E3053–61.
25. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res*. (1999) 59:1295–300.
26. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, et al.. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res*. (2012) 72:440–8.
27. Steeg PS. New insights into the tumor metastatic process revealed by gene expression profiling. *Am J Pathol*. (2005) 166:1291–4.
28. Leoncik V, Wu H, Ward LT, Kierzek AM, Plant NJ. Generation of 2,000 breast cancer metabolic landscapes reveals a poor prognosis group with active serotonin production. *Sci Rep*. (2016) 6:19771.
29. Olsson AK, Cedervall J. The pro-inflammatory role of platelets in cancer. *Platelets*. (2018) 29:569–73.
30. Cools-Lartigue J, Spicer J, Najmeh S, Ferri L. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell Mol Life Sci*. (2014) 71:4179–94.
31. Cedervall J, Hamidi A, Olsson A-K. Platelets, NETs, and cancer. *Thromb Res*. (2018) 164:148–52.
32. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee H-G, Kopp H-G, et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res*. (2012) 72:440–8.
33. Placke T, Salih HR, Kopp H-G. GITR ligand provided by thrombopoietic cells inhibits NK cell antitumor activity. *J Immunol*. (2012) 189:154–60.
34. Metelli A, Salem M, Wallace CH, Wu BX, Li A, Li X, et al. Immunoregulatory functions and the therapeutic implications of GARP-TGF- $\beta$  in inflammation and cancer. *J Hematol Oncol*. (2018) 11:24.

35. Läubli H, Borsig L. Selectins as mediators of lung metastasis. *Cancer Microenviron Off J Int Cancer Microenviron Soc.* (2010) 3:97–105.
36. Li N. Platelets in cancer metastasis: to help the “villain” to do evil. *Int J Cancer.* (2016) 138:2078–87.
37. Shao B, Wahrenbrock MG, Yao L, David T, Coughlin SR, Xia L, et al. Carcinoma mucins trigger reciprocal activation of platelets and neutrophils in a murine model of trousseau syndrome. *Blood.* (2011) 118:4015–23.
38. Alonso-Escolano D, Strongin AY, Chung AW, Deryugina EI, Radomski MW. Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoproteins. *Br J Pharmacol.* (2004) 141:241–52.
39. Trikha M, Zhou Z, Timar J, Raso E, Kennel M, Emmell E, et al. Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and alphavbeta3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* (2002) 62:2824–33.
40. Karayiannakis AJ, Bolanaki H, Syrigos KN, Asimakopoulos B, Polychronidis A, Anagnostoulis S, et al. Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. *Cancer Lett.* (2003) 194:119–24.
41. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* (2011) 11:264–74.
42. Bambace NM, Levis JE, Holmes CE. The effect of P2Y-mediated platelet activation on the release of VEGF and endostatin from platelets. *Platelets.* (2010) 21:85–93.
43. Gidlöf O, van der Brug M, Ohman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C, et al. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood.* (2013) 121:3908–17 S1–26.
44. Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, et al. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem.* (2007) 282(36): 25993-26001.

45. Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, et al. Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci.* (2008) 99(1):54-61.
46. Suzuki-Inoue K. CLEC-2/ podoplanin and thromboinflammation. *Blood.* (2017) 129(14):1896-1898.
47. Kato Y, Kaneko MK. A cancer-specific monoclonal antibody recognizes the aberrantly glycosylated podoplanin. *Sci Rep.* (2014) 4:5924.
48. Tsukiji N, Osada M, Sasaki T, et al. Cobalt hematoporphyrin inhibits CLEC-2/podoplanin interaction, tumor metastasis, and arterial/venous thrombosis in mice. *Blood Adv.* (2018) 2 (17):2214-2225.
49. Cedervall, J., Hamidi, A., Olsson A.K., Platelets NETs and cancer. *Thrombosis Research* (2018) 164, S148-S152.
50. Dolores Lopez, Sau Wai, Milton J. Finegold, Barbara B., doi:10.16/jhumpath.(2009).07.03.
51. Tomasetti, C., Vogelstein, B., & Parmigiani, G. (2013). Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), 1999-2004.

