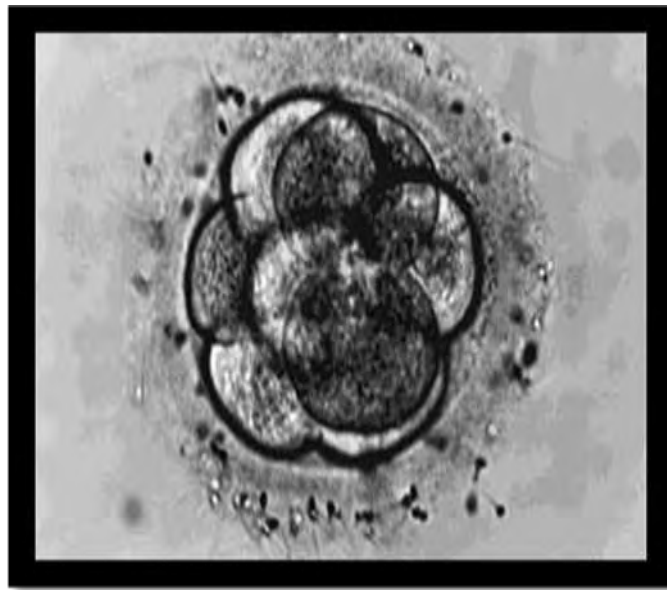


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΜΤΟΡ ΚΑΙ ΤΗΣ PARP ΣΤΟ
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ
ΜΑΣΤΟΥ***



ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΣΤΡΑΤΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

Κουρέτας Δημήτριος , Καθηγητής Τομέα Φυσιολογίας Ζώων, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Παπαζήσης Κωνσταντίνος, Επιμελητής Β' ΑΝΘ "Θεαγένειο"

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ
Κουρέτας Δημήτριος, καθηγητής φυσιολογίας Ζώων	
Μαρκουλάτος Παναγιώτης, καθηγητής εφαρμοσμένης μικροβιολογίας με έμφαση στην Βιοτεχνολογία	
Λιαδάκη Καλλιόπη, λέκτορας βιοχημικής φαρμακολογίας	

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1. Ο καρκίνος του μαστού	6
1.1.1. Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου	7
1.1.2. Φυσιολογική ανατομία του μαστού	8
1.1.3. Τύποι καρκίνων του μαστού	8
1.1.4. Μετάσταση καρκίνου του μαστού	9
1.1.5. Οι εξετάσεις που γίνονται στον καρκινικό ιστό	10
1.2. Βλαστικά κύτταρα (stem cells)	12
1.2.1. Εισαγωγή	12
1.2.2. Τα βλαστικά κύτταρα στην καρκινογένεση	15
1.2.3. Τα βλαστικά κύτταρα στη θεραπεία του καρκίνου	19
1.2.4. Ταυτοποίηση των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού	20
1.2.5. Το ένζυμο PARP και η αναστολή του στον καρκίνο του μαστού	25
1.2.6. Ο mTOR και η αναστολή του στον καρκίνο του μαστού	27
1.3 Κυτταρομετρία ροής	28
1.3.1. Βασικές αρχές	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.1. Προετοιμασία δειγμάτων	33
2.2. Εμπλουτισμός κυττάρων με την τεχνολογία MACS (Miltenyi Biotec)	37
2.3. Πρωτόκολλο διαδικασίας διαχωρισμού κυττάρων με τεχνολογία MACS	40
2.3.1 Μαγνητική επισήμανση κυττάρων με CD326 (θετική επιλογή)	40
2.3.2 Μαγνητικός διαχωρισμός με στήλη LS	40
2.3.3 Μαγνητική επισήμανση με CD45 (αρνητική επιλογή)	41
2.3.4 Μαγνητικός διαχωρισμός με στήλη LD	41
2.4. Καλλιέργεια των κυττάρων με αναστολείς του mTOR και της PARP	42
2.5 Πείραμα κυτταροτοξικότητας στα MDA-MB-231	44
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
3.1. Επίδραση αναστολέων της PARP στα MDA-MB-231	47

3.2.	Πειράματα αναστολέων PARP σε κύτταρα από πλευριτικά υγρά	49
3.3.	Επίδραση του αναστολέα του mTOR στα MDA-MB-231	53
3.4	Πειράματα αναστολέα mTOR σε κύτταρα από πλευριτικά υγρά	54
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60
	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ	61

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας ΠΘ, στο Συμεωνίδειο Ερευνητικό Κέντρο του Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο» και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Μοριακής Ογκολογίας και κυτταροκαλλιέργιων , κατά το χρονικό διάστημα Σεπτεμβρίου 2010- Φεβρουαρίου 2011.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κουρέτα Δημήτριο, Καθηγητή Τομέα Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ, για την συγκατάθεσή του να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω να απευθύνω στον Ιατρό - Ογκολόγο Κωνσταντίνο Παπαζήση για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου το συγκεκριμένο θέμα, τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διεξαγωγή της εργασίας, καθώς επίσης και για τις συμβουλές και την καθοδήγησή του.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Ιατρικής Τουπλικιώτη Παναγιώτα για την πολύπλευρη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε, καθώς και τις χρήσιμες επιστημονικές της επισημάνσεις.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Ιατρικής Ζιούτη Φανή για την καθοριστική συμβολή της στην επίλυση προβλημάτων κατά τη διάρκεια εκτέλεσης και συγγραφής των πειραμάτων, την ιδιαίτερη υπομονή της σε όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς επίσης και την διάθεσή της να μου λύσει όσο το δυνατόν περισσότερες απορίες.

Τέλος, θα ήταν μεγάλη μου παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου, Γιαννάκου Έφη (βιολόγος – κυτταρολόγος) για την βοήθειά της στην κυτταρομετρία ροής, Κοντοβίνη Μαρία - Κατερίνα (μεταπτυχιακή φοιτήτρια, απόφοιτος τμήματος Βιολογίας), Βαδέκα Χριστίνα (απόφοιτος Μοριακής Βιολογίας), Χονδρονάσιου Δάφνη (Τελειόφοιτος Βιολογίας) για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα οργανο/ιστο-ειδικά βλαστικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να διαφοροποιούνται και να παράγουν όλα τα λειτουργικά και δομικά τμήματα ενός ιστού ή οργάνου (πολυδύναμα - pluripotent ή ολοδύναμα - totipotent) και την ιδιότητα να ανανεώνονται διατηρώντας την πολυδυναμία τους και τον αριθμό τους. Τέτοια βλαστικά κύτταρα έχουν παρατηρηθεί και στο μαστό.

Σύμφωνα με τις νεότερες θεωρίες καρκινογένεσης, το κύτταρο που υφίσταται την κακοήγη εξαλλαγή δεν είναι ένα διαφοροποιημένο κύτταρο αλλά κάποιο προγονικό ή ακόμα και το ίδιο το βλαστικό κύτταρο (stem cell). Έτσι, η υπόθεση της συγκεκριμένης εργασίας δεν αντιπροσωπεύεται πια από το "στοχαστικό μοντέλο", σύμφωνα με το οποίο κάθε κύτταρο είναι ικανό να δημιουργήσει τον όγκο και κάθε καρκινικό να τον επαναποικίσει, αλλά από ένα ιεραρχικό μοντέλο της ογκογένεσης, όπου στην κορυφή της ιεραρχίας βρίσκονται τα βλαστικά κύτταρα του καρκίνου. Αυτά τα κύτταρα έχουν χαρακτηριστικά που τα κάνουν να ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα καρκινικά κύτταρα όπως ο χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού, η ανοχή σε χημειοθεραπευτικές ουσίες, η ικανότητα να "διαφοροποιούνται" προς όλες τις γραμμές του κυτταρικού πληθυσμού που συγκροτούν τον καρκίνο, η ικανότητα μετάστασης και η υιοθέτηση μονοπατιών μεταγωγής σήματος που παίζουν ρόλο στη βιολογία των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων.

Σύμφωνα με κάποιες μελέτες, έγινε ταυτοποίηση των δεικτών επιφανείας των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού. Έτσι, τα κύτταρα με φαινότυπο $CD44^{high}/CD24^{-low}/EpCAM^{+}$ έχουν την ιδιότητα να αναδημιουργούν όγκους. Παρατηρήθηκε ότι αυτά τα κύτταρα είναι ευαίσθητα σε αναστολείς της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης όπως αναστολείς του μονοπατιού του mTOR καθώς και αναστολείς επιδιόρθωσης του DNA, όπως αναστολείς της PARP.

Στη παρούσα ερευνητική εργασία έγινε προσπάθεια να αποδειχθεί ότι ο αναστολέας του μονοπατιού του mTOR και οι αναστολείς της PARP έχουν σημαντική αντινεοπλασματική δράση και πραγματοποιούμε μελέτες για να δούμε αν μπορούν να καταπολεμήσουν τα βλαστικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού (breast cancer stem cells). Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν και απομονώθηκαν κύτταρα από πλευριτική συλλογή ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Αφού τα επιθηλιακά κύτταρα καθαρίστηκαν από τα φλεγμονώδη και μεσοθηλιακά/ενδοθηλιακά κύτταρα με

μαγνητικά μικροσφαιρίδια σε στήλες MACS (Miltenyi Biotec), μελετήθηκε η επίδραση του αναστολέα του μονοπατιού mTOR, όπως και η επίδραση αναστολέων της PARP σε καλλιέργεια εναιώρησης και ελεύθερο από ορό θρεπτικό υλικό για το σχηματισμό σφαιριδίων (mammospheres). Ο αναστολέας του μονοπατιού του mTOR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Everolimus ενώ οι αναστολείς της PARP που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο 3-Aminobenzamide, ο 4-Hydroxyquinazoline και ο 1,5-Isoquinolinediol. Η καλλιέργεια κρατούσε μία εβδομάδα και στη συνέχεια τα κύτταρα αναλύονταν με κυτταρομετρία ροής για την έκφρασή τους στους δείκτες CD44, CD24 και EpCAM.

Σε κάποια δείγματα παρατηρήθηκε μείωση του υπό μελέτη κυτταρικού πληθυσμού, αλλά στην πλειοψηφία των πλευριτικών συλλογών δεν φάνηκε καμία επίδραση, αν και πρέπει να σημειώσουμε ότι απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός πλευριτικών υγρών ώστε να έχουμε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ο καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος των γυναικών στον Δυτικό κόσμο και η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνει σταθερά. Ο καρκίνος του μαστού χτυπά 1 γυναίκα στις 10 και αποτελεί το 25% του συνόλου των όγκων που πλήττουν αυτές. Είναι το πρώτο αίτιο θνησιμότητας από όγκο στο γυναικείο φύλλο με ποσοστά γύρω στο 17% στο σύνολο των θανάτων ογκολογικής φύσης. Η Αμερικανική Εταιρεία μελέτης Καρκίνου (ACS, American Cancer Society) υπολογίζει ότι στις ΗΠΑ ο καρκίνος του μαστού αποτελεί περίπου το 29% όλων των καρκίνων στις γυναίκες. Σε ολόκληρο τον κόσμο περισσότερες από 400.000 γυναίκες πεθαίνουν από καρκίνο του μαστού το χρόνο, ενώ εκτιμάται ότι ένα ποσοστό 8% με 9% των γυναικών θα αναπτύξουν καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Παγκοσμίως ο καρκίνος του μαστού είναι η πέμπτη κατά σειρά αιτία θανάτου από καρκίνο (μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, του στομάχου, του ήπατος και του ορθού). Το 2005, ο καρκίνος του μαστού προκάλεσε 502,000 θανάτους ανά τον κόσμο (7% των θανάτων λόγω καρκίνου, σχεδόν 1% του συνολικού ποσοστού θνησιμότητας).

Είναι ενδιαφέρον ότι, στην Ευρώπη, το 60% των κρουσμάτων καρκίνου του μαστού διαγιγνώσκεται σε πρώιμο στάδιο – ποσοστό που στην Ελλάδα φτάνει μόλις το 5%. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν πόσο ελλιπής είναι η σχετική ενημέρωση των Ελληνίδων, αν λάβουμε υπόψη τις δυνατότητες πλήρους ίασης που παρέχει μια έγκαιρη διάγνωση.

Αν και η έγκαιρη διάγνωση έχει σαν αποτέλεσμα υψηλά ποσοστά ίασης, ο καρκίνος του μαστού παραμένει η βασική αιτία θανάτου από καρκίνο στις ενήλικες γυναίκες κάτω των 54 ετών και η δεύτερη πιο συχνή αιτία για τις γυναίκες άνω των 54 ετών. Η νόσος αυτή προσβάλλει και τους άνδρες, αλλά σε ποσοστό μικρότερο από 1% επί του συνόλου όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού.

Στον καρκίνο του μαστού, επιθηλιακά κύτταρα του μαστού χάνουν τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να διηθήσουν τη βασική μεμβράνη και να διασπαρθούν στην υπόλοιπη δομή.

Υπολογίζεται πως μόλις το 5-10% των κρουσμάτων καρκίνου του μαστού σχετίζεται με παράγοντες κληρονομικότητας. Η πλειονότητα προκύπτει από βλάβες στο γενετικό υλικό των μαστικών κυττάρων, που προκαλούνται από διάφορους παράγοντες κατά τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου. Ωστόσο δύο γονίδια είναι γνωστά ως BRCA1 και

BRCA2 ,έχουν προσδιοριστεί ως παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού όταν έχουν υποστεί γενετική αλλοίωση.

1.1.1 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου

Υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Οι γυναίκες, για παράδειγμα, έχουν 100πλάσια πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τους άνδρες. Επίσης, η ηλικία αντιπροσωπεύει έναν από τους κύριους προδιαθεσικούς παράγοντες. Ο κίνδυνος να αναπτύξει μια γυναίκα καρκίνο στον μαστό αυξάνει με την ηλικία. Έτσι ενώ μέχρι την ηλικία των 39 ετών ο κίνδυνος είναι μόλις 0,5% στις ηλικίες 40-59 ετών ο κίνδυνος φτάνει το 4%(δηλαδή 1 στις 25 γυναίκες θα αναπτύξει καρκίνο στον μαστό). Από την ηλικία των 60 ετών και πάνω, ο κίνδυνος αυτός φτάνει το 7%(περίπου 1 στις 15 γυναίκες). Όμως εκτός από τα παραπάνω υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που οι επιστήμονες πιστεύουν ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και οι οποίοι μπορεί να αποφευχθούν, όπως η σωστή διατροφή, η άσκηση, η διακοπή του καπνίσματος κ.ά. Άλλοι παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού είναι:

Άλλοι παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού είναι:

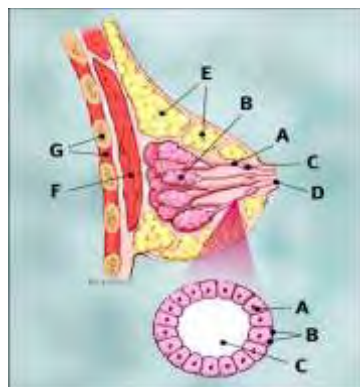
- Ακτινοβολήση θώρακα για άλλα νεοπλασμάτα (λεμφώματα). Πρόκειται για το μόνο παράγοντα με αποδεδειγμένη άμεση συσχέτιση με τον καρκίνο του μαστού.
- Κληρονομικότητα- Οι κόρες, οι αδερφές ή οι μητέρες γυναικών που ανέπτυξαν καρκίνο του μαστού και ιδιαιτέρως σε νεαρή ηλικία(<50 ετών), έχουν αυξημένο κίνδυνο να νοσήσουν και οι ίδιες.
- Η λευκή φυλή. Τα άτομα της λευκής φυλής προσβάλλονται συχνότερα από αυτά των άλλων φυλών.
- Εμμηναρχή (εμφάνιση πρώτης εμμηνορρυσίας) σε μικρή ηλικία, δηλαδή πριν από το 12ο έτος.
- Εμμηνόπαυση πριν από το 50ό έτος.
- Απουσία τεκνοποίησης ή τεκνοποίηση για πρώτη φορά μετά τα 30 χρόνια.
- Η μακροχρόνια χρήση - πάνω από δέκα έτη - θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης.
- Πιθανότατα η χρήση αντισυλληπτικών δισκίων.
- Η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αλκοόλ.

- Η ζωή σε βιομηχανικές περιοχές και ο σύγχρονος τρόπος ζωής και εργασίας, αν και οι ακριβείς παράγοντες παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Όλες οι γυναίκες κινδυνεύουν να εμφανίσουν τη νόσο, άσχετα με το αν έχουν αυτούς τους προδιαθεσικούς παράγοντες ή όχι. Στα δύο τρίτα των ασθενών από καρκίνο του μαστού δεν υπάρχει ιστορικό γνωστού προδιαθεσικού παράγοντα.

1.1.2 Φυσιολογική ανατομία του μαστού

Ο γυναικείος μαστός αποτελείται από το αδενικό τμήμα (τα λοβία, μέσα στα οποία γίνεται η παραγωγή του γάλακτος μετά τον τοκετό), το εκφορητικό κομμάτι (οι γαλακτοφόροι πόροι, μέσω των οποίων μεταφέρεται το γάλα στη θηλή) και τα υπόλοιπα τμήματά του είναι στοιχεία τα οποία συντελούν στη στήριξη του αδένα στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα (**Εικόνα 1**). Γύρω από τον μαστό υπάρχουν οι επιχώριοι λεμφαδένες, στους οποίους αποχετεύεται η λέμφος που παράγεται στον κάθε μαστό.



- A. Γαλακτοφόροι πόροι
 - B. Λοβία
 - C. Διευρύνσεις των πόρων που αποθηκεύεται το γάλα
 - D. Θηλή
 - E. Λίπος
 - F. Μείζων θωρακικός μυς
 - G. Θωρακικό τοίχωμα
-
- A. Φυσιολογικά κύτταρα των πόρων
 - B. Βασική μεμβράνη
 - C. Αυλός των γαλακτοφόρων πόρων

Εικόνα 1: Ανατομία του μαστού.

1.1.3 Τύποι καρκίνων του μαστού

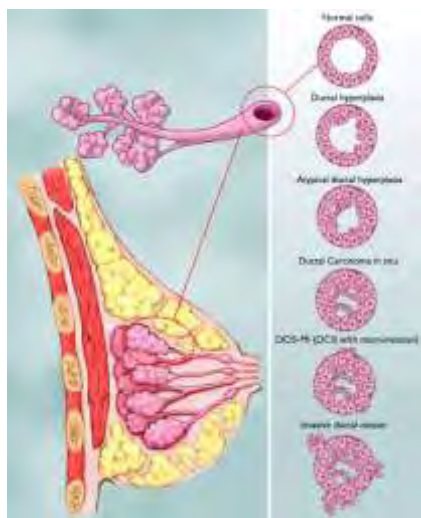
Πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS): Αποτελεί την πιο **πρώιμη μορφή** καρκίνου του μαστού, πολλές φορές αναφέρεται και σαν στάδιο 0 και δεν απειλεί την ζωή της ασθενούς εφόσον αντιμετωπιστεί εγκαίρως και σωστά.

Οι γυναίκες που αντιμετωπίστηκαν για **πορογενές καρκίνωμα in situ** στο παρελθόν, έχουν αυξημένο κίνδυνο (25-50%) να αναπτύξουν κάποια μορφή διηθητικού καρκίνου στο μέλλον, γι' αυτό βρίσκονται στην ομάδα επαγρύπνησης όπως λέμε, με τακτικό κλινικό και μαστογραφικό προληπτικό έλεγχο.

Κάποιες από αυτές πρέπει να λαμβάνουν **ορμονοθεραπεία**, η οποία υπό ορισμένες συνθήκες μειώνει αυτόν τον κίνδυνο.

Το καρκίνωμα των λοβιδίων in situ (CLIS): παρότι ούτε ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου αποτελεί ένδειξη υψηλού κινδύνου για τη δημιουργία όγκου και στα δύο στήθη.

Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (IDC): ονομάζεται έτσι όταν ξεπερνά το τοίχωμα του πόρου. Αντιπροσωπεύει το 70-80% όλων των μορφών καρκίνου του μαστού. Όταν τα καρκινικά κύτταρα διασπάσουν τη βασική μεμβράνη των γαλακτοφόρων πόρων, τότε προκύπτει το διθητικό πορογενές καρκίνωμα



- Φυσιολογικός πόρος
- Καλοήθης υπερπλασία πόρων
- Άτυπη υπερπλασία πόρων
- Μη διθητικό πορογενές καρκίνωμα
- Μικροδιθητικό πορογενές καρκίνωμα
- Διθητικό πορογενές καρκίνωμα

Εικόνα 2: Στάδια εξέλιξης προς διθητικό καρκίνωμα.

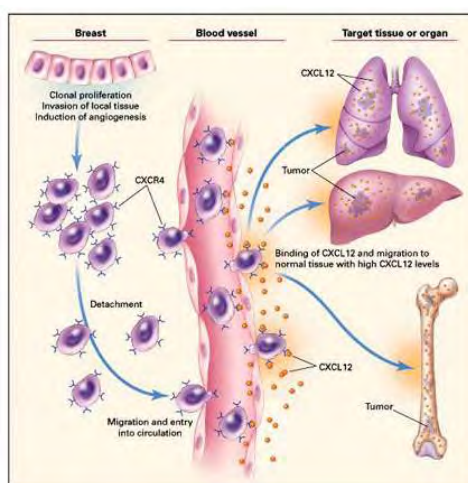
Διθητικό λοβιακό καρκίνωμα (ILC): ονομάζεται έτσι όταν ο όγκος ξεπερνά τα τοιχώματα του λοβιδίου. Όταν τα καρκινικά κύτταρα διασπάσουν τη βασική μεμβράνη των αδενίων, τότε έχουμε το διθητικό λοβιακό καρκίνωμα. Τα τελευταία χρόνια, για άγνωστους μέχρι στιγμής λόγους αυξάνει η συχνότητά του, κυρίως στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Αποτελεί το 10-15% όλων των καρκίνων του μαστού. Μπορεί να χτυπήσει ταυτόχρονα και τα δυο στήθη ή να εμφανιστεί σε περισσότερα σημεία στο ίδιο στήθος. Επειδή η ανάπτυξή του δεν είναι εστιακή, στα αρχικά στάδια δεν σχηματίζει ψηλαφητά ογκίδια, πράγμα που κάνει τη διάγνωσή του με ψηλάφηση ιδιαίτερα δύσκολη.

1.1.4 Μετάσταση καρκίνου του μαστού

Μετάσταση ονομάζεται η κατάσταση κατά την οποία κάποια καρκινικά κύτταρα του μαστού εξαπλώνονται σε άλλα μέρη του σώματος είτε μέσω του λεμφικού συστήματος είτε μέσω των αιμοφόρων αγγείων (**Εικόνα 3**).

Υπάρχουν δύο είδη μεταστατικού καρκίνου του μαστού. Όταν τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται από το μαστό στους μασχαλαίους λεμφαδένες, τότε ο καρκίνος

θεωρείται ότι βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο και είναι ακόμα θεραπεύσιμος με την κατάλληλη χειρουργική επέμβαση και θεραπεία (μικρομετάσταση). Όταν τα καρκινικά κύτταρα έχουν μεταναστεύσει σε άλλο μέρος του σώματος τότε η ασθενής θεωρείται ότι έχει μακρινή μετάσταση. Τα πιο συχνά μέρη στα οποία κάνει μετάσταση ο καρκίνος του μαστού είναι κυρίως τα οστά, το ήπαρ και οι πνεύμονες. Ο καρκίνος σε αυτές τις περιπτώσεις είναι δύσκολα θεραπεύσιμος και οι θεραπείες που εκτελούνται έχουν σαν κύριο στόχο την παρεμπόδιση της εξάπλωσης του καρκίνου σε άλλα σημεία, αλλά και την ελαχιστοποίηση των παρενεργειών από τη θεραπευτική αγωγή.



Εικόνα 3: Μετανάστευση καρκινικών κυττάρων του μαστού προς άλλα όργανα (πνεύμονες, ήπαρ, οστά) μέσω της κυκλοφορίας.

Πλευριτικό υγρό από καρκίνο του μαστού

Το πλευριτικό υγρό, που μερικές φορές αναφέρεται και σαν "νερό των πνευμόνων", είναι η συγκέντρωση παραπάνω υγρού ανάμεσα στη στιβάδα του υπεζωκότα, έξω από τους πνεύμονες. Ο υπεζωκότας είναι λεπτές μεμβράνες που καλύπτουν τους πνεύμονες και το εσωτερικό της θωρακικής κοιλότητας και διευκολύνουν την αναπνοή. Ένας από τους λόγους που μπορεί να προκληθεί υπερβολική συγκέντρωση πλευριτικού υγρού είναι ο μεταστατικός καρκίνος του μαστού. Όταν το πλευριτικό υγρό δυσκολεύει την αναπνοή ή προκαλεί θωρακικούς πόνους ή βήχα τότε αφαιρείται με την κατάλληλη επέμβαση (θωρακοκέντηση).

1.1.5 Οι εξετάσεις που γίνονται στον καρκινικό ιστό

Μετά την αρχική ιστολογική διάγνωση του καρκίνου του μαστού πραγματοποιούνται ανοσοϊστοχημικές ή μοριακές εξετάσεις που βοηθούν στη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων των ογκολόγων, ώστε να αποφασίσουν τη θεραπεία του

ασθενή. Οι πιο χρήσιμες από αυτές είναι οι εξετάσεις του HER-2/neu και των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης.

- **HER-2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2):** Είναι ένα ογκογονίδιο που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα για έναν συγκεκριμένο αυξητικό παράγοντα ο οποίος επάγει την ανάπτυξη των κυττάρων. Τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα περιέχουν δύο αντίγραφα του γονιδίου HER-2/neu και παράγουν χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης HER-2 στην επιφάνειά τους. Περίπου στο 20-30% των διηθητικών καρκίνων, το γονίδιο αυτό έχει ενισχυθεί και η πρωτεΐνη του έχει υπερεκφραστεί. Οι όγκοι αυτοί είναι κατάλληλοι για θεραπείες που δεσμεύουν ειδικά την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη. Η χημειοθεραπεία με Herceptin μπλοκάρει τους υποδοχείς αυτής της πρωτεΐνης αναστέλλοντας τον συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό και συνεπώς την ανάπτυξη του όγκου. Οι ασθενείς με ενισχυμένο το γονίδιο της HER-2/neu ανταποκρίνονται καλά στη θεραπεία με Herceptin και έχουν καλή πρόγνωση.
- **Υποδοχείς οιστρογόνων (ER-Estrogen Receptor) και προγεστερόνης (PR-Progesterone Receptor):** οι υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης είναι σημαντικοί προγνωστικοί δείκτες του καρκίνου του μαστού. Όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό των κυττάρων που είναι θετικά, καθώς και η ένταση της θετικότητας, τόσο καλύτερη είναι η πρόγνωση. Η θετικότητα στους υποδοχείς οιστρογόνων και /ή προγεστερόνης υποδηλώνει ευαισθησία στις ορμόνες. Οι ασθενείς μπορεί να ανταποκριθούν καλά στην ορμονοθεραπεία.

A. Χημειοθεραπεία-Ορμονοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία εφαρμόζεται σε ορισμένες ασθενείς που χειρουργήθηκαν για καρκίνο του μαστού, ανάλογα με τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης. Έχει σαν σκοπό να "αποστειρώσει" τον οργανισμό και να σκοτώσει καρκινικά κύτταρα που πιθανόν έχουν ξεφύγει και κυκλοφορούν στο υπόλοιπο σώμα, χωρίς να είναι εμφανή. Τα σύγχρονα χημειοθεραπευτικά φάρμακα είναι ασφαλή και αποτελεσματικά.

Η ορμονοθεραπεία αποτελεί μια άλλη μορφή θεραπείας που εφαρμόζεται σε συνδυασμό με τις άλλες μεθόδους. Μετά την εκτομή του ο όγκος ελέγχεται στο εργαστήριο για την παρουσία επάνω στα καρκινικά κύτταρα ορμονικών υποδοχέων. Εάν υπάρχουν τέτοιοι υποδοχείς τότε χρησιμοποιούμε συγκεκριμένα φάρμακα που τους μπλοκάρουν (ή μπλοκάρουν την παραγωγή οιστρογόνων) και σταματούν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

B. Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία είναι εξαιρετικά αποτελεσματική και στοχευμένη θεραπεία με την οποία καταστρέφονται υπολειπόμενα καρκινικά κύτταρα μετά το χειρουργείο. Με την ακτινοθεραπεία επιτυγχάνεται μείωση των υποτροπών της νόσου στον μαστό που έχει διατηρηθεί κατά 50-66%, όπου ανάλογα με την αρχική σταδιοποίηση της νόσου επιλέγονται και τα πεδία ακτινοβολίας. Η ακτινοθεραπεία κατά κανόνα δεν χρησιμεύει όταν γίνεται ολική μαστεκτομή, εκτός εξαιρέσεων. (Γλεντής Π.)

Γ. Νέες επιλογές θεραπείας

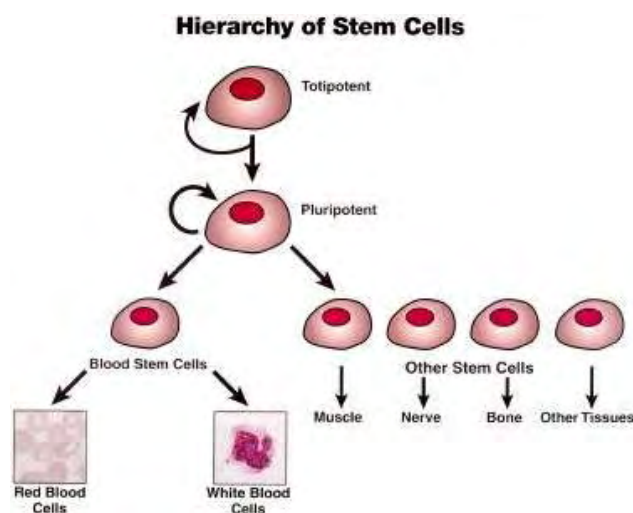
Για μεγάλο χρονικό διάστημα η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία ήταν τα κύρια όπλα που χρησιμοποιούσαν οι ασθενείς και οι γιατροί τους στη μάχη κατά του καρκίνου. Μπορεί όμως να έχουν ανεπιθύμητες επιδράσεις στο υπόλοιπο σώμα. Σήμερα υπάρχουν διαθέσιμες νέες θεραπείες που βασίζονται σε καινοτόμους μηχανισμούς δράσης. Οι νέες στοχευμένες θεραπείες δρουν έναντι συγκεκριμένων μορίων-στόχων που χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα. Ενδέχεται να προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα στους ασθενείς, γιατί απαλλάσσουν τον υπόλοιπο οργανισμό από τις παρενέργειες που προκαλούν οι καθιερωμένες αντικαρκινικές θεραπείες, οι οποίες μερικές φορές είναι δυσάρεστες.

1.2. Βλαστικά κύτταρα (stem cells)

1.2.1. Εισαγωγή

Τα βλαστικά κύτταρα είναι κύτταρα που βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι μπορούν να αυτο-ανανεωθούν μέσω της μιτωτικής κυτταρικής διαίρεσης, δηλαδή να διαιρεθούν σε κύτταρα που έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτά, αλλά και να μετατραπούν σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Υπάρχουν δύο είδη βλαστικών κυττάρων, τα εμβρυϊκά και αυτά των ενηλίκων. Τα εμβρυϊκά βρίσκονται στη βλαστοκύστη ενώ των ενηλίκων σε ιστούς και όργανα. Η κύρια διαφορά τους είναι στη δυναμικότητά τους (potency). Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα είναι ολοδύναμα ή πολυδύναμα και μπορούν να μετατραπούν σε οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο. Τα βλαστικά κύτταρα των ενηλίκων έχουν πιο περιορισμένη δυναμικότητα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κυτταρικούς τύπους του ιστού ή οργάνου από το οποίο προέρχονται. Ο όρος βλαστικά κύτταρα προτάθηκε από τον ιστολόγο A. Maksimov το 1908.

Οργανο-ειδικά ή ιστο-ειδικά βλαστικά κύτταρα ονομάζονται τα κύτταρα που έχουν δύο ικανότητες: 1) να διαφοροποιούνται και να παράγουν όλα τα λειτουργικά και δομικά τμήματα ενός ιστού ή οργάνου (πολυδύναμα - pluripotent ή ολοδύναμα - totipotent) και 2) να μπορούν να ανανεώνονται διατηρώντας την πολυδυναμία τους και τον αριθμό τους. Αυτές οι δύο λειτουργίες εξαρτώνται από την ικανότητα των βλαστικών κυττάρων να διαιρούνται με δύο τρόπους, την συμμετρική και την ασύμμετρη διαίρεση (**Εικόνα 4**). Στην πρώτη, ένα βλαστικό κύτταρο δίνει γένεση σε δύο όμοια κύτταρα που φέρουν τα χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων (άρα παραμένουν πολυδύναμα ή ολοδύναμα). Στη δεύτερη (ασύμμετρη διαίρεση) ένα βλαστικό κύτταρο δίνει γένεση σε δύο διαφορετικά μεταξύ τους κύτταρα: ένα βλαστικό και ένα πιο περιορισμένων δυνατοτήτων προγονικό κύτταρο (committed progenitor). (Weissman I.L., 2000)



Εικόνα 4: Απεικόνιση της ιεραρχίας των βλαστικών κυττάρων. Τα ολοδύναμα (totipotent) και τα πολυδύναμα (pluripotent) βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης, ενώ τα προγονικά κύτταρα έχουν πιο περιορισμένες δυνατότητες διαίρεσης. Από τα τελευταία προκύπτουν τα τελικά διαφοροποιημένα (ώριμα) κύτταρα των διάφορων κυτταρικών τύπων.

Τα βλαστικά κύτταρα ταυτοποιήθηκαν πρώτα στο αιμοποιητικό σύστημα. Μέχρι τώρα πάντως έχουν περιγραφεί οργανο-ειδικά βλαστικά κύτταρα σε πολλά όργανα, όπως και στον μαστό. Η δυσκολία όμως στην ταυτοποίηση με ειδικούς δείκτες τέτοιων κυττάρων και η απουσία κατάλληλων *in vitro* τεχνικών για την ανεύρεση των ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων, δηλαδή την αυτο-ανανέωση και τη δυνατότητά τους να δώσουν γένεση σε πιο διαφοροποιημένους προγόνους, εμπόδισε για πολλά χρόνια την ουσιαστική έρευνα σε αυτό το πεδίο.

Σε πειράματα που έγιναν από τους Kordon E.C. και Smith G.H.¹ (1998) σε επίμυες, αποδείχτηκε ότι ένας ολόκληρος λειτουργικός μαζικός αδένας ήταν δυνατό να αναπαραχθεί από ένα μόνο βλαστικό κύτταρο και ότι αυτή η διαδικασία μπορούσε να επαναληφθεί με διαδοχικές μεταμοσχεύσεις για αρκετές γενεές. Αυτό δείχνει ότι τα βλαστικά κύτταρα αυτο-ανανεώνονταν και ότι διατηρούσαν τη δυναμικότητά τους στο νεοσχηματισμένο όργανο. Η μεθοδολογία που χρησιμοποίησαν τότε για την επίτευξη των πειραμάτων τους, λόγω της έλλειψης ειδικών δεικτών των βλαστικών κυττάρων, ήταν η μόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού με τον MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus - ογκογόνος ιός του μαστού επίμυων). Ο ιός εισέρχεται στο γονιδίωμα των κυττάρων ξενιστών και αντιγράφει το γονιδιώμα του κατά την αντιγραφή αυτών των κυττάρων. Οι συγκεκριμένοι επίμυες δεν είχαν κάποια ομόλογη ακολουθία νουκλεϊκών οξέων με τον ιό, επομένως η εισαγωγή του ιού στα κύτταρα μπορούσε να εντοπιστεί με ανάλυση κατά Southern.

Πρόσφατα όμως παρατηρήθηκε σημαντική πρόοδος μετά τη δημοσίευση της μελέτης από τους G. Dontu και συν.² (2003), όπου έγινε δυνατή η καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων του μαστού (σε συνθήκες ελεύθερου από ορό εναιωρήματος, και με την προσθήκη ειδικών αυξητικών παραγόντων) σε σφαιρίδια (mammospheres). Τα επιθηλιακά κύτταρα παρέμεναν σε στάδιο μη διαφοροποίησης, αλλά διατηρούσαν την ικανότητα πολλαπλασιασμού σε συνθήκες μη προσκόλλησης σε επιφάνεια. Από αυτή την εργασία αποδείχτηκε ότι τα μη προσκολλημένα σφαιρίδια είναι εμπλουτισμένα σε βλαστικά κύτταρα ή αρχικά προγονικά κύτταρα, που είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε όλους τους επιθηλιακούς κυτταρικούς τύπους που παρουσιάζονται στο φυσιολογικό μαστό (μυοεπιθηλιακά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του πόρου και επιθηλιακά κύτταρα του αυλού που συνθέτουν τις πρωτεΐνες του γάλακτος). Επίσης τα κύτταρα αυτά μπορούν να αναγεννήσουν κλωνικά, πολύπλοκες λειτουργικές δομές σε τρισδιάστατα συστήματα καλλιέργειας (Matrigel).

Είχε παρατηρηθεί ότι όταν πρωταρχικές καλλιέργειες (primary cultures) επιθηλιακών κυττάρων μαστού ανθρώπου, που προέρχονται από πλαστικές επεμβάσεις μείωσης μαστού (reduction mammoplasties) ή τρωκτικών καλλιεργούνται σε στερεά υποστρώματα, τότε υφίστανται περιορισμένες διαιρέσεις και διαφοροποιούνται γρήγορα

¹ Kordon E.C., Smith G.H. (1998) An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development*, 125, 1921-1930

² Dontu G. et al. (2003) Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell proliferation*, 36 (Suppl. 1), 59-72

με μία διαδικασία που ρυθμίζεται από ορμονικούς παράγοντες, το εξωκυτταρικό στρώμα των κυττάρων (κολλαγόνο, κτλ.) και διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Η πρώτη πρόοδος στην καλλιέργεια ενός αδιαφοροποίητου πολυδύναμου πληθυσμού παρατηρήθηκε σε νευρικά κύτταρα όταν αυτά καλλιεργούνταν σε εναιώρημα και σχημάτιζαν σφαιρίδια (neurospheres). Το 4-20% αυτών των σφαιριδίων αποτελούνταν από βλαστικά κύτταρα ενώ ο υπόλοιπος πληθυσμός ήταν προγονικά κύτταρα σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης. Η ίδια στρατηγική, αλλά προσαρμοσμένη, χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια επιθηλιακών βλαστικών κυττάρων από μαστό. Στην καλλιέργεια προστίθενται αυξητικοί παράγοντες όπως EGF (Epidermal Growth Factor-επιδερμικός παράγοντας αύξησης) και bFGF (basic Fibroblast Growth Factor-βασικός παράγοντας αύξησης ινοβλαστών), αλλά και ινσουλίνη, υδροκορτιζόνη και B27 (διάφορες βιταμίνες).

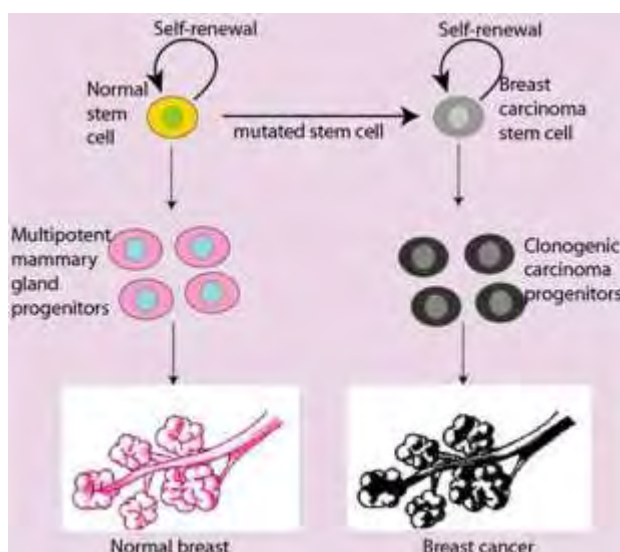
Ένα χαρακτηριστικό που διαθέτουν πολλά βλαστικά κύτταρα των ενηλίκων, συμπεριλαμβανομένων αυτών του αιμοποιητικού συστήματος και του νευρικού ιστού, και παρατηρήθηκε και στην καλλιέργεια σφαιριδίων είναι η ικανότητά τους να αποκλείουν χρωστικές από το κυτταρόπλασμά τους, όπως η Hoechst και η ροδαμίνη. Η ικανότητά τους αυτή οφείλεται στην έκφραση πρωτεϊνικών μεταφορέων, όπως της BCRP και P-γλυκοπρωτεϊνών. Η αυξημένη ενεργοποίηση μεταφορικών πρωτεϊνών μπορεί να επεκταθεί στον αποκλεισμό παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA σαν άμυνα των κυττάρων αυτών (Dontu G. et al., 2004)³.

1.2.2. Τα βλαστικά κύτταρα στην καρκινογένεση

Η καρκινογένεση είναι ένα φαινόμενο που απαιτεί χρόνο για να πραγματοποιηθεί και συχνά ξεκινά από ένα μόνο κύτταρο, στο οποίο συσσωρεύονται σταδιακά, κάποιες αλλοιώσεις στο γενετικό του υλικό, με συνέπεια την δημιουργία μεταλλάξεων. Συχνά απαιτείται η συσσώρευση τουλάχιστον πέντε αθροιστικών μεταλλάξεων, για να δημιουργηθεί το κακόηθες κύτταρο. Σήμερα ολοένα και περισσότερα δεδομένα επιβεβαιώνουν τη θεωρία ότι το κύτταρο-στόχος της ογκογένεσης δεν είναι το διαφοροποιημένο επιθηλιακό κύτταρο του μαστού αλλά μάλλον ένα πιο προγονικό ή και το ίδιο το βλαστικό κύτταρο (**Εικόνα 5**). Τα βλαστικά κύτταρα (σε αντίθεση με τα διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα) έχουν τέτοια διάρκεια ζωής που τους επιτρέπει

³ Dontu G. et al. (2004) Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. Breast Cancer Res, 6, R605-R615

να υφίστανται τις αλληπάλληλες βλάβες που προκαλεί στο DNA η μακρόχρονη έκθεση σε μεταλλαξιογόνους παράγοντες.



Εικόνα 5: Η δημιουργία καρκίνου του μαστού από μεταλλαγμένα βλαστικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης, όπως τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα.

Ένας όγκος μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα ανώμαλο όργανο που παράχθηκε από ένα καρκινικό κύτταρο, το οποίο είχε την ικανότητα να διαιρείται επ' άοριστον μέσω συσσωρευμένων μεταλλάξεων. Αν ένας όγκος θεωρηθεί σαν όργανο, τότε υπάρχουν πολλές αναλογίες ανάμεσα στα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα και στα καρκινικά κύτταρα που προκαλούν τον όγκο. Και τα δύο έχουν την δυνατότητα πολλαπλασιασμού και την ικανότητα να δίνουν γένεση σε νέους (φυσιολογικούς ή μη) ιστούς. Οι όγκοι, όπως και οι φυσιολογικοί ιστοί, αποτελούνται από ετερογενείς πληθυσμούς κυττάρων με διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και διαφορετική δυνατότητα πολλαπλασιασμού. Επειδή οι περισσότεροι όγκοι έχουν κλωνική προέλευση, τα ογκογόνα καρκινικά κύτταρα πρέπει να δίνουν γένεση σε φαινοτυπικά διαφορετικούς απογόνους, περιλαμβάνοντας καρκινικά κύτταρα με δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται επ' άοριστον, όπως επίσης καρκινικά κύτταρα με περιορισμένη ή καθόλου δυνατότητα πολλαπλασιασμού. Αυτό σημαίνει ότι τα ογκογόνα καρκινικά κύτταρα υφίστανται διαδικασίες ανάλογες με την αυτο-ανανέωση και τη διαφοροποίηση των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων.

Ένας άλλος λόγος της ετερογένειας των όγκων μπορεί να είναι η ανώμαλη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι πολλοί τύποι όγκων περιέχουν καρκινικά κύτταρα με ετερογενείς φαινοτύπους που αντικατοπτρίζουν όψεις της διαφοροποίησης που φυσιολογικά συμβαίνει στους ιστούς από τους οποίους

προκύπτουν οι όγκοι. Κάποια παραδείγματα αποτελούν η μεταβλητή έκφραση μυελοειδών δεικτών (markers) στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, η μεταβλητή έκφραση νευρωνικών δεικτών σε περιφερικούς νευροεκτοδερμικούς όγκους και η μεταβλητή έκφραση πρωτεϊνών του γάλακτος ή των υποδοχέων οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού (Reya T. et al., 2001)⁴.

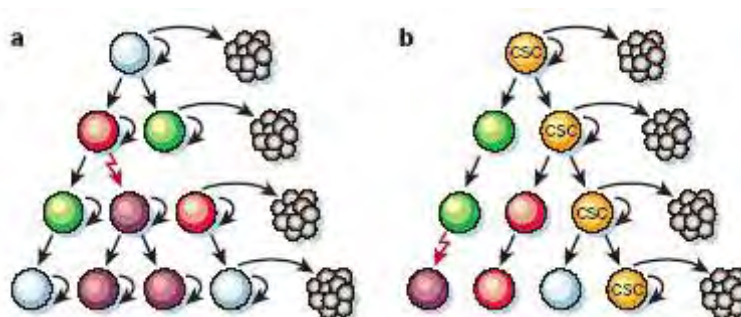
Έχει φανεί ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των καρκινικών κυττάρων είναι ικανά να δημιουργήσουν αποικίες όταν χρησιμοποιούνται κλωνογενείς μέθοδοι *in vitro* ή με τη μεταμόσχευση όγκων σε επίμυες με κατεστραμμένο ανοσιακό σύστημα. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την υπόθεση ότι ένα μικρό ποσοστό των καρκινικών κυττάρων, τα βλαστικά κύτταρα του καρκίνου (**Εικόνα 6**), έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιαστούν και να δημιουργήσουν τον όγκο (Chambers A.F. et al., 2000)⁵. Στην περίπτωση κάποιων τύπων λευχαιμιών υπάρχουν αξιοσημείωτες αποδείξεις ότι οι καρκίνοι αυτοί προκύπτουν από μεταλλάξεις που συσσωρεύονται στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα που είναι ικανά να προκαλέσουν οξεία μυελογενή λευχαιμία ανθρώπου σε NOD/SCID (Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency-μη παχείς διαβητικοί/με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια) επίμυες, δηλαδή επίμυες με κατεστραμμένο ανοσιακό σύστημα, έχουν φαινότυπο CD34⁺CD38⁻, δηλαδή ίδιο με τα φυσιολογικά αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Αντίθετα, λευχαιμικά κύτταρα με φαινότυπο CD34⁺CD38⁺ δεν μπορούν να μεταφέρουν την ασθένεια σε επίμυες στις περισσότερες περιπτώσεις, παρόλο που είναι καρκινικά. Αυτό υποδηλώνει ότι τα βλαστικά παρά τα πιο περιορισμένα προγονικά κύτταρα είναι ο στόχος για τη λευχαιμική εξαλλαγή (Bonnet D., Dick J.E., 1997)⁶. Παρόλα αυτά, στο αιμοποιητικό σύστημα υπάρχουν δύο διαφοροποιημένοι κυτταρικοί τύποι που έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης, τα B- και T-λεμφοκύτταρα και μπορούν να είναι επίσης στόχοι του λευχαιμικού μετασχηματισμού. Τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται κλωνικά όταν διεγείρονται να παράγουν λεμφοκύτταρα μνήμης. Τα λεμφοκύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται όταν αντιμετωπίζουν ένα αντιγόνο που έχει ξαναεισέλθει στον οργανισμό. Στις λεμφοειδείς λευχαιμίες μπορούν να ενεργοποιηθούν μιτογενή μονοπάτια με τη μεσολάβηση υποδοχέων και να προκληθεί η παραγωγή λευχαιμικών κυττάρων. Εκτός από τις λευχαιμίες έγινε εφικτό να αναγνωριστούν και να

⁴ Reya T. et al. (2001) Stem cells, cancer and cancer stem cells. Nature, 414, 105-111

⁵ Chambers A.F. et al. (2000) Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. Breast Cancer Res, 2, 400-407

⁶ Bonnet D., Dick J.E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, Nature Med, 3, 730-737

ταυτοποιηθούν βλαστικά κύτταρα στον καρκίνο του μαστού, του προστάτη και σε πλήθος άλλων κακοηθειών (Reya T. et al., 2001)⁷.



Εικόνα 6: Δύο γενικά μοντέλα της ετερογένειας των καρκινικών κυττάρων των όγκων. a) Τα καρκινικά κύτταρα είναι ετερογενή, αλλά τα περισσότερα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν εκτενώς και να δώσουν γένεση σε νέους όγκους. b) Τα καρκινικά κύτταρα είναι ετερογενή και μόνο ο υποπληθυσμός των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSC, κίτρινα) έχει την ικανότητα να πολλαπλασιαστεί εκτενώς και να σχηματίσει νέους όγκους.

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία δεν στηρίχθηκε στο στοχαστικό μοντέλο (όπου κάθε καρκινικό κύτταρο είναι ικανό να επανεποικίσει τον όγκο) αλλά σε ένα ιεραρχικό μοντέλο της ογκογένεσης, όπου στην κορυφή της ιεραρχίας βρίσκονται τα βλαστικά κύτταρα του καρκίνου. Αυτά τα κύτταρα έχουν χαρακτηριστικά που τα ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα καρκινικά κύτταρα:

1. Χαμηλό ρυθμό αλλά υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού.
2. Υψηλή έκφραση αντλιών στην κυτταρική μεμβράνη που αποκλείουν από το κυτταρόπλασμα βλαπτικές ουσίες, χημειοθεραπευτικά, κλπ.
3. Ικανότητα να "διαφοροποιούνται" προς όλες τις γραμμές του κυτταρικού πληθυσμού που συγκροτούν τον καρκίνο.
4. Ανοχή στη χημειοθεραπεία καθώς και στα περισσότερα από τα σύγχρονα "στοχευμένα" φάρμακα κατά της μεταγωγής σήματος.
5. Ικανότητα μετανάστευσης και τελικά μετάστασης σε σημεία όπου μπορεί να παραμείνουν για χρόνια ανενεργά μέχρι να λάβουν το κατάλληλο σήμα για ενεργοποίηση.
6. Υιοθέτηση δρόμων της μεταγωγής σήματος που παίζουν ρόλο στη βιολογία των βλαστικών κυττάρων μάλλον παρά του καρκίνου.

⁷ Reya T. et al. (2001) Stem cells, cancer and cancer stem cells. Nature, 414, 105-111

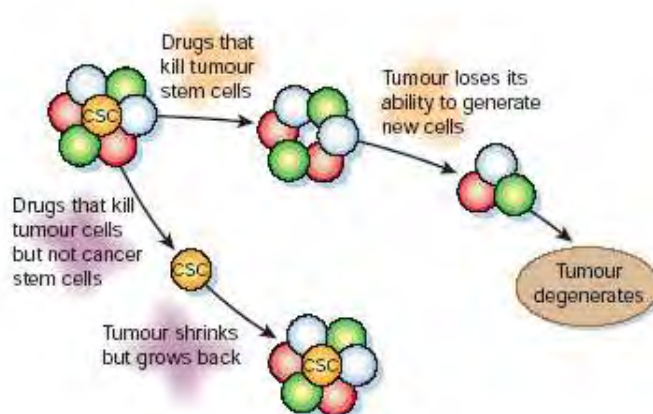
1.2.3. Τα βλαστικά κύτταρα στη θεραπεία του καρκίνου

Εάν η ανάπτυξη των καρκινικών όγκων εξαρτάται από τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, αυτό θα έχει σημαντικές συνέπειες για τη θεραπεία του καρκίνου. Μέχρι σήμερα, όλα τα φαινοτυπικά διαφορετικά καρκινικά κύτταρα μεταχειρίζονται σαν να έχουν απεριόριστη πολλαπλασιαστική ικανότητα και ότι μπορούν να αποκτήσουν την ικανότητα να μεθίστανται. Παρόλα αυτά, έχουν αναγνωριστεί διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα σε μακρινά σημεία από τους πρωταρχικούς όγκους σε ασθενείς που ποτέ δεν εμφάνισαν μετάσταση. Μία πιθανότητα είναι ότι το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή σκοτώνει τα διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα πριν αυτά προλάβουν να σχηματίσουν νέο όγκο. Μία άλλη πιθανότητα είναι τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα να μην μπορούν να σχηματίσουν νέο όγκο έτσι, ώστε μόνο τα σπάνια καρκινικά βλαστικά κύτταρα να μπορούν να οδηγήσουν σε μετάσταση. Αν συμβαίνει αυτό, τότε ο στόχος της θεραπείας πρέπει να είναι η αναγνώριση και η εξολόθρευση του καρκινικού βλαστικού πληθυσμού.

Εάν η ανάπτυξη των όγκων και η μετάσταση καθοδηγούνται από τον μικρό πληθυσμό των βλαστικών καρκινικών κυττάρων, αυτό μπορεί να εξηγήσει την αποτυχία δημιουργίας θεραπειών που είναι ικανές να απαλείψουν τον όγκο. Παρόλο που τα τωρινά διαθέσιμα φάρμακα μπορούν να συρρικνώσουν τους μεταστατικούς όγκους, αυτές οι συνέπειες είναι συνήθως προσωρινές και συχνά δεν παρατείνουν αρκετά το χρόνο ζωής των ασθενών. Μία πιθανότητα της αποτυχίας αυτών των θεραπευτικών αγωγών είναι η απόκτηση ανοχής στα φάρμακα των καρκινικών κυττάρων όπως αυτά εξελίσσονται. Μία άλλη πιθανότητα είναι ότι οι θεραπείες που υπάρχουν τώρα δεν μπορούν να σκοτώσουν τα βλαστικά καρκινικά κύτταρα αποτελεσματικά.

Οι υπάρχουσες θεραπείες έχουν σχεδιαστεί να κατευθύνονται εναντίον του μεγάλου πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων επειδή συχνά αναγνωρίζονται από την ιδιότητά τους να συρρικνώνουν όγκους. Επειδή τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα έχουν περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, μία ιδιότητα συρρίκνωσης του όγκου φαίνεται να επαρκεί για να σκοτώσει αυτά τα κύτταρα. Φαίνεται ότι τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα από διάφορους ιστούς είναι πιο ανθεκτικά στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα από τους ώριμους κυτταρικούς τύπους των ίδιων ιστών. Αυτό ίσως οφείλεται στα υψηλά επίπεδα έκφρασης αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ή ABC μεταφορέων. Εάν ισχύει το ίδιο για τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα τότε οι θεραπείες που υπάρχουν τώρα δεν επαρκούν για την εξάλειψη των κυττάρων αυτών (**Εικόνα 7**). Η χημειοθεραπεία τελικά μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη εξαφάνιση τον πληθυσμό των μη-βλαστικών

καρκινικών κυττάρων, κάτι που εκφράζεται ως "πλήρης κλινική ύφεση". Τα βλαστικά κύτταρα ωστόσο παραμένουν σχετικά αλώβητα και δίνουν γένεση ξανά σε κύτταρα απογόνους που οδηγούν στην κλινική υποτροπή (Reya T. et al., 2001)⁸. Μία υποτροπή που στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού μπορεί να επέλθει και δεκαετίες αργότερα, αφού τα βλαστικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού μπορούν να μείνουν σε κατάσταση "ύπνωσης" στον μυελό των οστών για μακρά χρονική περίοδο (Balic M. et al., 2006)⁹.



Εικόνα 7: Οι συνηθισμένες θεραπείες μπορεί να συρρικνώνουν τους όγκους σκοτώνοντας κυρίως τα κύτταρα με περιορισμένη δυνατότητα πολλαπλασιασμού. Αν τα θεωρούμενα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι λιγότερο ευαίσθητα σε αυτές τις θεραπείες, θα παραμείνουν ζωντανά μετά τη θεραπεία και θα αναβιώσουν τον όγκο. Αντίθετα, αν οι θεραπείες μπορούν να στοχεύσουν ενάντια στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, τότε μπορεί να τα σκοτώσουν πιο αποτελεσματικά κάνοντας τους όγκους ανίκανους να διατηρηθούν ή να αναπτυχθούν ξανά. Έτσι, ακόμα και αν οι θεραπείες που στοχεύουν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα δεν συρρικνώνουν τους όγκους αρχικά, μπορεί να οδηγήσουν τελικά στην εκφύλισή τους.

1.2.4. Ταυτοποίηση των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού

Σε μια σημαντική δημοσίευση από το εργαστήριο του M. Clarke ανακοινώθηκε η πρώτη επιτυχημένη ταυτοποίηση δεικτών (markers) επιφανείας που εκφράζονται συχνότερα από τα καρκινικά κύτταρα που έχουν ικανότητα να αναδημιουργήσουν τον όγκο, άρα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αποτελούν την ομάδα των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου. Έτσι, ο πληθυσμός των $CD44^{high}/CD24^{low/-}$ επιθηλιακών

⁸ Reya T. et al. (2001) Stem cells, cancer and cancer stem cells. Nature, 414, 105-111

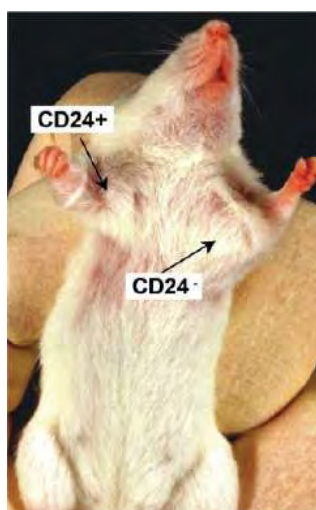
⁹ Balic M. et al. (2006) Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. Clin Cancer Res, 12, 5615-5621

κυττάρων (ErCAM⁺) από κύτταρα καρκίνου του μαστού που απομονώθηκαν από το πλευριτικό υγρό σε ασθενείς με κακοήγη πλευριτική συλλογή, φάνηκε ότι είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένος σε βλαστικά κύτταρα του καρκίνου, που μπορούν να μεταφυτεύσουν τον όγκο σε ανοσοκατεσταλμένους επίμυες. Αντίθετα, τα CD44^{low}/CD24^{high} κύτταρα δεν είχαν τέτοια δυνατότητα, ακόμα και όταν ενοφθαλμιζόταν μεγάλος αριθμός από αυτά.

Στο πείραμα του Al Hajj M. χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από εννέα ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, από τους οποίους τα οκτώ προήλθαν από πλευριτική συλλογή ενώ από έναν χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από τον πρωταρχικό όγκο. Στον τελευταίο τα κύτταρα διαχωρίστηκαν με χρήση ενζύμων (κολλαγενάση) αφού πρώτα ο όγκος χωρίστηκε σε μικρά κομμάτια. Τα κύτταρα στη συνέχεια ενέθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένους επίμυες και αναλύθηκαν οι πληθυσμοί των κυττάρων των όγκων που δημιουργήθηκαν. Όγκοι κατάφεραν να μεταφυτευτούν σε οκτώ από τους εννέα ασθενείς. Παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των κυττάρων που ήταν ικανός να δημιουργήσει όγκο στους επίμυες είχε το φαινότυπο CD44^{high}/CD24^{low/-}. Ακόμα και 100 κύτταρα με αυτόν τον φαινότυπο μπορούσαν να δημιουργήσουν όγκο στους επίμυες ενώ δεκάδες χιλιάδες κύτταρα με άλλο φαινότυπο αποτύγγαναν να δημιουργήσουν όγκο. Επίσης ο κυτταρικός υποπληθυσμός με αυτόν τον φαινότυπο μπορούσε να μεταβιβαστεί διαδοχικά σε άλλους επίμυες και να προκαλέσει όγκο με τον ίδιο κυτταρικό φαινότυπο, αλλά και τους φαινοτυπικά διαφορετικούς πληθυσμούς που υπήρχαν στον αρχικό όγκο. Ακόμα και μετά από τέσσερις μεταβιβάσεις των όγκων τα κύτταρα με το φαινότυπο CD44^{high}/CD24^{low/-} και ErCAM⁺ δεν έχαναν την ικανότητά τους να προκαλούν όγκους. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι κύτταρα με φαινότυπο CD44⁺/CD24⁺ που είχαν ενεθεί σε επίμυες, δεν προκάλεσαν τη δημιουργία ανιχνεύσιμου όγκου ακόμα και μετά από έξι μήνες (**Εικόνα 8**). Ο ογκογόνος κυτταρικός αυτός υποπληθυσμός έχει τη δυνατότητα να αυτο-ανανεώνεται και να δίνει γένεση σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους με μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, όπως τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα.

Η πιθανή ταυτοποίηση του ογκογόνου πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων θα επιτρέψει την ταυτοποίηση μορίων που εκφράζονται σε αυτά τα κύτταρα που θα μπορούσαν να στοχευθούν, ώστε να εξαφανίσουν τον κρίσιμο πληθυσμό των

καρκινικών κυττάρων και έτσι να οδηγήσουν σε πιο αποτελεσματικές θεραπείες κατά του καρκίνου (Al Hajj M. et al., 2003)¹⁰.



Εικόνα 8: Απεικόνιση ενός αντιπροσωπευτικού όγκου σε επίμω με φαινότυπο $CD44^+/CD24^-$ (δεξιά). Κύτταρα που ενέθηκαν με φαινότυπο $CD44^+/CD24^+$ δεν προκάλεσαν τη δημιουργία όγκου (αριστερά).

Περαιτέρω έρευνες επιβεβαίωσαν τα δεδομένα του πειράματος του Al Hajj για τον κυτταρικό πληθυσμό με φαινότυπο $CD44^+/CD24^{low/-}$. Επίσης, έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα του μαστού με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων μπορούν να πολλαπλασιαστούν *in vitro* σε συνθήκες μη προσκόλλησης σε επιφάνεια, σχηματίζοντας σφαιρίδια (mammospheres), μία ακόμα κοινή ιδιότητα με τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα. Αυτό το πειραματικό σύστημα μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα κατάλληλο *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη των κυττάρων με το συγκεκριμένο φαινότυπο, στο οποίο να καταπολεμείται αυτός ο πληθυσμός με στοχευμένους μοριακούς παράγοντες που έχουν σχέση με την επιβίωση και την αυτο-ανανέωσή του (Ponti D. et al., 2005)¹¹.

Σε μία έρευνα ελέγχθηκε η έκφραση των δεικτών CD44 και CD24 μετά από καλλιέργεια μεταστατικών κυττάρων καρκίνου του μαστού που προέρχονταν από πλευριτικά υγρά σε συνθήκες εναιώρησης με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για να σχηματιστούν σφαιρίδια (mammospheres). Στη συνέχεια τα κύτταρα που σχημάτιζαν σφαιρίδια ελέγχθηκαν για τη δυνατότητά τους να παράγουν όγκους. Η πλειοψηφία των πλευριτικών υγρών (20/27) περιείχε κύτταρα ικανά να σχηματίσουν σφαιρίδια σε διάφορα μεγέθη που μπορούσαν να μεταβιβαστούν. Μετά το διαχωρισμό αυτών των κυττάρων και την τοποθέτησή τους σε συνθήκες προσκόλλησης με ορό, τα κύτταρα

¹⁰ Al-Hajj M. et al. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA, 100, 3983-3988

¹¹ Ponti D. et al. (2005) Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. Cancer Res, 65 (13). 5506-5511

διαφοροποιούνταν λόγω της αυξημένης έκφρασης κυτοκερατινών. Επίσης, σε 21 από τα δείγματα, πριν καλλιεργηθούν έγινε ανάλυση για την έκφραση των δεικτών CD44 και CD24 που έδειξε ότι τα κύτταρα από κάποια δείγματα χωρίζονταν σε δύο πληθυσμούς και κάποια άλλα όχι. Το ποσοστό των κυττάρων με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{low/-} ήταν αρκετά μεταβλητό και δεν φαινόταν να σχετίζεται με την ικανότητα σχηματισμού των μεγαλύτερων σφαιριδίων. Από οκτώ από τα πλευριτικά υγρά που δημιουργούσαν σφαιρίδια, λήφθηκαν κύτταρα που ενέθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένους επίμυες. Από αυτά, τα τέσσερα ήταν ικανά να παράγουν όγκους όταν ενέθηκαν 5000 ή λιγότερα κύτταρα, ενώ ο ίδιος αριθμός κυττάρων που δεν είχαν καλλιεργηθεί δεν προκαλούσε όγκους. Η ικανότητα δημιουργίας όγκων φάνηκε να σχετίζεται με την ικανότητα παραγωγής μεγαλύτερων σφαιριδίων. Επίσης, δείχθηκε ότι μη καλλιεργημένα κύτταρα από ένα πολύ ογκογόνο δείγμα ήταν αρνητικά και για τους δύο δείκτες CD44 και CD24. Από αυτήν την έρευνα φαίνεται ότι η καλλιέργεια σφαιριδίων από πλευριτικά υγρά εμπλουτίζει τα δείγματα με κύτταρα που είναι ικανά να παράγουν όγκους σε ανοσοκατεσταλμένους επίμυες. Το πειραματικό αυτό μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της ευαισθησίας των ογκογόνων βλαστικών κυττάρων σε θεραπευτικούς παράγοντες και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του υποπληθυσμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού που προκαλεί όγκους (Grimshaw M. J. et al., 2008)¹².

Μία έρευνα έδειξε ότι ένας πληθυσμός καρκινικών βλαστικών κυττάρων με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{low/-} βρίσκεται και σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, όπως τα MDA-MB-231, MDA-MB-436, Hs578T, SUM1315 και τα HBL-100 κύτταρα. Τα κύτταρα με αυτόν τον φαινότυπο έχουν πιο επιθετικές ιδιότητες και αυξημένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην εισβολή (invasion). Επίσης, στη συγκεκριμένη έρευνα δείχθηκε ότι υπήρχε μία έλλειψη συσχέτισης ανάμεσα στα κύτταρα με φαινότυπο CD44⁺/CD24⁻ και την ικανότητα να εγκαθίστανται και να πολλαπλασιάζονται σε σημεία μετάστασης. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά έχουν χαρακτηριστικά μάλλον βασικού (basal-like) παρά ενδοαυλικού (lumen) τύπου, όπως και τα βλαστικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού. Οι ενδοαυτικοί τύποι (luminal) είναι θετικοί για τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER⁺) ενώ οι βασικού τύπου καρκίνοι είναι αρνητικοί (ER⁻), όπως είναι και η πλειοψηφία των καρκίνων που είναι θετικοί για τον υποδοχέα επιδερμικού παράγοντα αύξησης-2 (HER2⁺). Στις κυτταρικές αυτές σειρές τα κύτταρα με φαινότυπο CD44⁺/CD24⁻ είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης γονιδίων προ-

¹² Grimshaw M.J. et al. (2008) Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. Breast Cancer Res, 10: R52

εισβολής (proinvasive genes), όπως IL-1α, IL-6, IL-8 και UPA (Urokinase Plasminogen Activator-ενεργοποιητής ουροκινάσης πλασμινογόνου). Ειδικά τα κύτταρα MDA-MB-231 φαίνεται ότι έχουν την ιδιότητα να εκφράζουν αρκετά γονίδια που ευνοούν τη μετάσταση στα οστά και τους πνεύμονες (Sheridan C. et al., 2006)¹³.

Μία άλλη έρευνα έγινε στους διάφορους υποτύπους του καρκίνου του μαστού (luminal A και B, basal-like, HER2⁺ και normal-like), όπως επίσης και σε κληρονομικούς καρκίνους που είναι μεταλλαγμένοι για το γονίδιο BRCA1, σε σχέση με το φαινότυπο CD44⁺/CD24⁻ των κυττάρων που περιέχονται σε αυτούς. Παρατηρήθηκε ετερογένεια ως προς την έκφραση σε CD44 και CD24, τόσο ανάμεσα στους διαφορετικούς υποτύπους όσο και μέσα στον πληθυσμό των κυττάρων του ίδιου όγκου. Στο 35% των όγκων δεν υπήρχε έκφραση κανενός από τους δύο δείκτες, στο 13% υπήρχαν κύτταρα με περισσότερους από έναν φαινότυπους (CD44⁺/CD24⁻, CD44⁻/CD24⁺ και CD44⁺/CD24⁺) ενώ ο φαινότυπος CD44⁺/CD24⁻ παρατηρήθηκε στο 31% των όγκων. Ο τελευταίος φαινότυπος υπήρχε κυρίως στους βασικού τύπου καρκίνους (basal-like) που χαρακτηρίζονταν αρνητικοί και για τους τρεις δείκτες (ER⁻, PR⁻, HER2⁻ άρα triple negative), αλλά και στους μεταλλαγμένους για το γονίδιο BRCA1 καρκίνους, από τους οποίους το 94% περιείχε αυτόν τον φαινότυπο. Στους όγκους που ήταν HER2⁺ αυτός ο φαινότυπος ήταν σπάνιος αλλά υπήρχε υψηλή έκφραση CD24. Έτσι, δείχθηκε ότι όχι όλοι οι βασικού τύπου όγκοι και πολύ λίγοι HER2⁺ έχουν το φαινότυπο CD44⁺/CD24⁻, υποδηλώνοντας ότι οι ογκογόνες ιδιότητες μπορεί να μην περιορίζονται μόνο σε κύτταρα με αυτόν τον φαινότυπο και ότι και άλλοι δείκτες βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού πρέπει να ταυτοποιηθούν (Honeth G. et al., 2008)¹⁴.

Φαίνεται ότι τα βασικού τύπου καρκινώματα όπως και τα πιο βλαστικού τύπου κύτταρα έχουν ιδιαίτερη ευαισθησία σε φάρμακα που προκαλούν βλάβες στο DNA όπως η cisplatin. Η επιδιόρθωση τέτοιων βλαβών χρειάζεται τη δράση ενζύμων όπως η πολυ-ADP-ριβοζο πολυμεράση (PARP), αναστολείς της οποίας ήδη δοκιμάζονται σε προκλινικές και πρώιμες κλινικές μελέτες. Από την άλλη πλευρά, η εξάρτηση των βλαστικών κυττάρων από μονοπάτια όπως του mTOR, σημαίνει ότι οι αναστολείς της δράσης του mTOR μπορεί να έχουν επιλεκτική δράση κατά των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού, που φαίνονται να είναι ανθεκτικά στις ως τώρα θεραπείες.

¹³ Sheridan C. et al. (2006) CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. Breast Cancer Res, 8, R59

¹⁴ Honeth G. et al. (2008) The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. Breast Cancer Res, 10:R53

1.2.5. Το ένζυμο PARP και η αναστολή του στον καρκίνο του μαστού

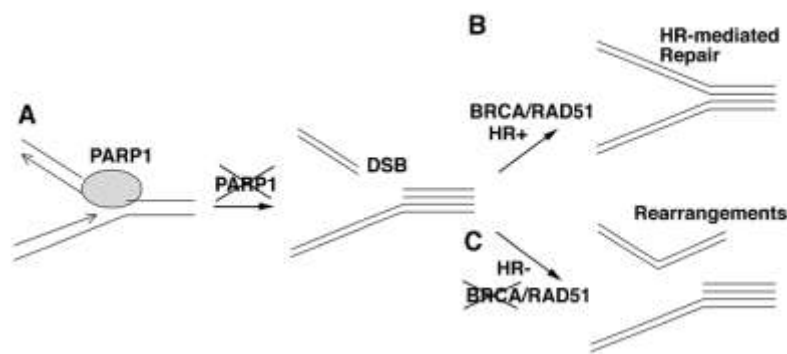
Οι πολυ-ADP-ριβοζο πολυμεράσες (PARP) είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της ADP-ριβόζης από το NAD^+ σε έναν αριθμό πρωτεϊνών δεκτών. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχει γίνει η αναγνώριση 18 μελών της οικογένειας PARP εκ των οποίων οι πρώτες πέντε είναι καλά χαρακτηρισμένες (PARP 1, 2, 3, 4 και 5). Η PARP1 αποτελεί το 85% της συνολικής κυτταρικής ενεργότητας της PARP.

Η PARP1 είναι ένα πυρηνικό ένζυμο 113 kDa που συμμετέχει στην αναγνώριση βλαβών του DNA και την επιδιόρθωσή του. Συγκεκριμένα είναι μοριακός αισθητήρας των μονών (single-strand breaks-SSBs) και διπλών (double-strand breaks-DSBs) σπασιμάτων του DNA και συνδέεται με αυτά. Η PARP1 επίσης συμμετέχει σε ένα πλήθος κυτταρικών λειτουργιών όπως στην ενίσχυση γονιδίων και τη μεταγραφική ρύθμιση, στην κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, όπως επίσης στην απόπτωση και τη χρωμοσωμική σταθερότητα. Η PARP1 ενεργοποιείται γρήγορα και συνδέεται στα σπασίματα του DNA, όπου χρησιμοποιεί το NAD^+ για να συνθέσει αλυσίδες της πολυ-ADP-ριβόζης είτε πάνω στο ίδιο το ένζυμο είτε σε διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες στόχους, όπως τοποϊσομεράσες, ιστόνες και p53. Αυτή η διαδικασία σύνδεσης και ενεργοποίησης βοηθάει στην ενίσχυση της διαδικασίας επιδιόρθωσης που είναι γνωστή ως επιδιόρθωση αποκοπής βάσεων (base excision repair-BER) κατά την οποία στοχεύονται τα SSBs. Τα SSBs παράγονται από την οξειδωτική καταστροφή του DNA που προέρχεται από τις μεταβολικές διαδικασίες των κυττάρων ή από εξωγενείς χημικούς παράγοντες ή από ιονίζουσες ακτινοβολίες (Menear K. A. et al., 2008)¹⁵.

Εφόσον η PARP1 συμμετέχει ενεργά στην επιδιόρθωση του DNA, η αναστολή της ενεργότητάς της μπορεί να προάγει τον κυτταρικό θάνατο είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA. Έτσι, οι αναστολείς της PARP1 μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ενδεχόμενοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που μπορεί να κάνουν πιο αποτελεσματικές άλλες κυτταροτοξικές θεραπείες. Η αναστολή της PARP προκαλεί συγκέντρωση μεγάλου αριθμού μη επιδιορθωμένων SSBs, οδηγώντας στην κατάρρευση των προυινίων αντιγραφής κατά τη φάση S και την επακόλουθη δημιουργία των DSBs. Επομένως, τα κύτταρα με ανεπαρκή επιδιόρθωση των DSBs είναι πιο ευαίσθητα σε αναστολείς της PARP. Αντίθετα, τα κύτταρα που μπορούν να επιδιορθώσουν τα DSBs δεν έχουν σχεδόν καθόλου ευαισθησία σε αναστολείς της PARP.

¹⁵ Menear K.A. et al. (2008) 4-[3-(4-Cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: A Novel Bioavailable Inhibitor of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1. Journal of Medicinal Chemistry, 51 (20), 6581-6591

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 στον καρκίνο του μαστού είναι υπεύθυνες για την πλειοψηφία των κληρονομικών αυτών καρκίνων. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που απαιτούνται στον ομόλογο ανασυνδυασμό, ένα μονοπάτι επιδιόρθωσης των DSBs. Η απώλεια της λειτουργίας αυτών των γονιδίων προκαλεί γονιδιωματική αστάθεια, που κάνει τα κύτταρα επιρρεπή σε επιπρόσθετες γενετικές βλάβες που μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο, όπως την ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων και την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα κύτταρα που έχουν ελαττωματικά BRCA1 και BRCA2 γονίδια είναι ευαίσθητα σε παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA και στη γ-ακτινοβολία, λόγω της έλλειψης μηχανισμών επιδιόρθωσης των DSBs. Οι αναστολείς της PARP προκαλούν θάνατο στα κύτταρα που έχουν αυτά τα ελαττωματικά γονίδια, λόγω των περισσότερων βλαβών του DNA που προκαλεί η αναστολή του ενζύμου (**Εικόνα 9**). Τα κύτταρα που είναι ετερόζυγα για αυτά τα γονίδια δεν επηρεάζονται από τους αναστολείς της PARP. Αν ληφθεί υπόψη ότι το μονοπάτι της PARP είναι απαραίτητο μόνο σε κύτταρα που δεν μπορούν να επιδιορθώσουν βλάβες μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού, μπορεί να αναπτυχθεί μία θεραπεία με υψηλή ειδικότητα για τα καρκινικά κύτταρα με ελαττωματικά BRCA γονίδια.



Εικόνα 9: A) Η PARP1 συνδέεται στα SSBs του DNA και τα επιδιορθώνει. Τα SSBs γίνονται DSBs όταν συναντούν τα πυρήνια αντιγραφής. B) Στην παρουσία των γονιδίων BRCA τα DSBs μπορούν να επιδιορθωθούν μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. C) Τα κύτταρα με μεταλλαγμένα γονίδια BRCA δεν μπορούν να επιδιορθώσουν τα DSBs με την αναστολή της PARP, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της αντιγραφής και τη δημιουργία περισσότερων βλαβών στο DNA.

Η χρήση αναστολέων της PARP σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά φάρμακα φαίνεται ελκυστική με την έννοια ότι ευαισθητοποιώντας τα καρκινικά κύτταρα με κυτταροτοξικούς παράγοντες, μπορεί να γίνει χρήση μικρότερης δόσης με την ίδια

αποτελεσματικότητα, ενώ παράλληλα θα μειωθούν οι παρενέργειες (Peralta-Leal A. et al., 2009)¹⁶.

Κάποιοι αναστολείς της PARP χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές και τα αρχικά αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, με απόκριση κυρίως των ασθενών που έχουν ελαττωματικά BRCA γονίδια. Οι συγκεκριμένοι αναστολείς δείχνουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα και χρησιμοποιούνται σε μικρές συγκεντρώσεις. Η προφυλακτική χρήση αυτών των αναστολέων σε γυναίκες που είναι ετερόζυγες για αυτά τα γονίδια και έχουν επομένως αυξημένες πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού, μπορεί να είναι αποτελεσματική.

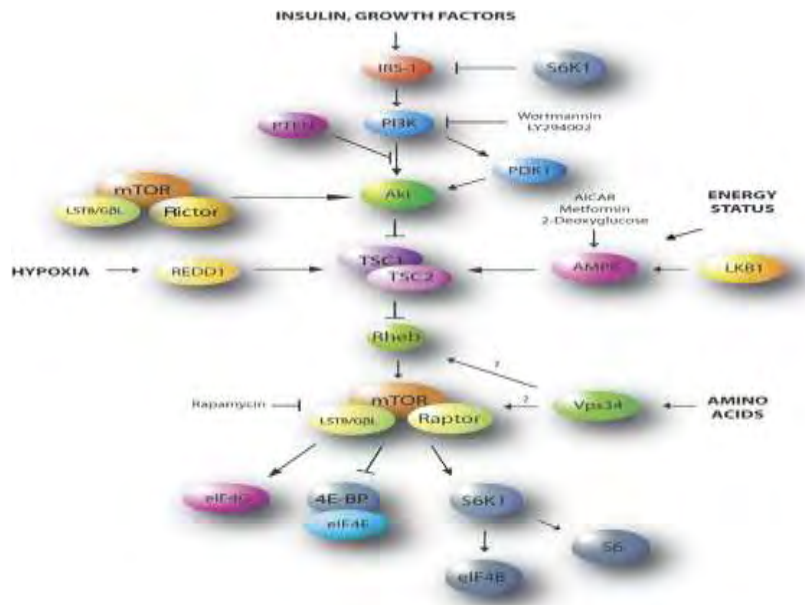
1.2.6.Ο mTOR και η αναστολή του στον καρκίνο του μαστού.

Ο mTOR, γνωστός και ως “στόχος” της ραπαμυκίνης, είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο FRAP1. Ο mTOR είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την κυτταρική κινητικότητα, την κυτταρική επιβίωση, την πρωτεϊνική σύνθεση και την μεταγραφή. Το μονοπάτι του mTOR σχετίζεται με την είσοδο στο κύτταρο της ινσουλίνης, αυξητικών παραγόντων ορμονών ρυθμίζοντας έτσι την έναρξη της μετάφρασης, ενεργοποιώντας τον καταρράκτη σηματοδότησης PI3K/Akt. Το μονοπάτι της PI3K/Akt ενεργοποιείται από υποδοχείς της οικογένειας HER και κυρίως τον HER-2, ο οποίος έχει 6 θέσεις δέσμευσης της PI3K. Κατά συνέπεια η παρουσία υποδοχέα HER υποδηλώνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξημένη κυτταρική μετάσταση. Η σειρά των γεγονότων ενεργοποίησης έχει ως εξής:

Η Akt φωσφορυλιώνεται από την PDK1 και ένα σύμπλεγμα mTOR/LST8-G8L και Rictor. Η Akt με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την TSC2 αποσταθεροποιώντας το συγκρότημα TSC1/2, προωθώντας έτσι την ενεργοποίηση του Mtor από την Rheb. Η REDD1, η οποία εμφανίζεται στην κατάσταση υποοξίας, δρα μέσω του συγκροτήματος TSC1/2 και αναστέλλει τον Mtor. Επίσης αμινοξέα μέσω του Vps34 (κατηγορία III της PI3K) ενδεχομένως προωθούν το σχηματισμό του συμπλέγματος Rheb/συγκρότημα mTOR (υπάρχουν όμως ερωτηματικά ακόμα σχετικά με αυτό το κομμάτι). Το συγκρότημα Mtor/LST8-G8L και Raptor μεσολαβούν στη φωσφορυλίωση της 4^E-BP1, S6K1 και eIF4G. Φωσφορυλιώνοντας η S6K1, ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει της

¹⁶ Peralta-Leal A. et al. (2009) PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. Free Radical Biology and Medicine

ριβωσωμικές πρωτεΐνες S6 και EIF4B. Το mTOR έχει σημαντικό πόλο στο συγκεκριμένο μονοπάτι και έχει αποδειχθεί ότι οι αναστολείς του αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και κατ'επέκταση του καρκίνου του μαστού.



Εικόνα10:Σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR για την έναρξη της μετάφρασης.

Ο πιο γνωστός αναστολέας του mTOR είναι η ραπαμυκίνη,όπως επίσης και το Everolimus που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα ερευνητική εργασία για την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του καρκίνου του μαστού.

1.3. Κυτταρομετρία ροής

Επειδή η κυτταρομετρία ροής ήταν ένα σημαντικό τμήμα της πειραματικής διαδικασίας, παρακάτω αναφέρονται κάποιες πληροφορίες όσον αφορά την τεχνική.

1.3.1. Βασικές αρχές

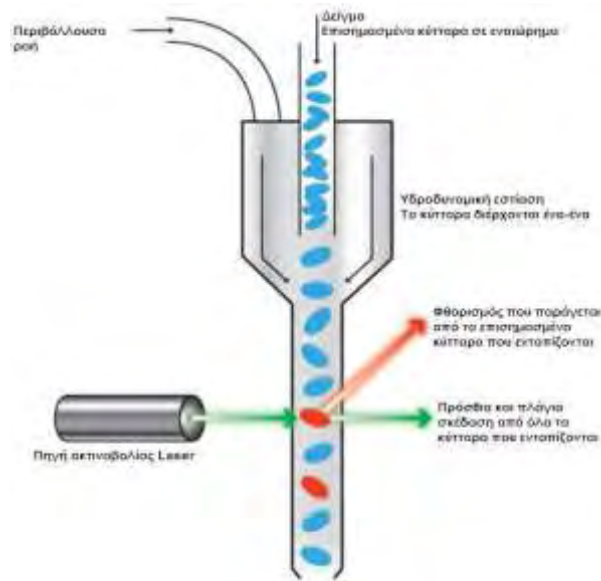
Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία γρήγορη τεχνική, ποσοτική, δυναμική και πολυπαραμετρική και βασίζεται στην ανάλυση του κάθε κυττάρου ξεχωριστά και όχι του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού. Σχεδιάστηκε για να ενισχύσει τη μικροσκοπική

ανάλυση των κυττάρων με χρήση φθοριζόντων ιχνηθετών και υποστρωμάτων. Αρχικά αναπτύχθηκε με κύριο σκοπό τον κυτταροδιαχωρισμό, στον οποίο οφείλει και το όνομα FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter). Σήμερα αποτελεί πλέον ένα διαγνωστικό εργαλείο στα κλινικά εργαστήρια αλλά και εξαιρετικά χρήσιμη τεχνική στα ερευνητικά εργαστήρια.

Η κυτταρομετρία ροής είναι τεχνική μέθοδος με την οποία επιτυγχάνεται η ανίχνευση, η μέτρηση, η αναγνώριση, η ταυτοποίηση και η διαλογή κυρίως κυττάρων, αλλά και άλλων σωματιδίων, όπως κυτταρικά οργανίδια (π.χ. πυρήνες κυττάρων, χρωματοσώματα), αιμοπετάλια, μικροσφαιρίδια, κ.ά. Η μέθοδος βασίζεται στις μετρήσεις των φωτεινών σημάτων σκέδασης και φθορισμού, που εκπέμπονται από τα κατάλληλα προπαρασκευασμένα κύτταρα ή σωματίδια, όταν εισάγονται για μέτρηση στον κυτταρομετρητή ροής, όπου δέχονται την ακτινοβολία της φωτεινής πηγής.

Ο πρώτος κυτταρομετρητής ροής σχεδιάστηκε το 1953, από τον Crosland Taylor, για την καταμέτρηση ερυθροκυττάρων και, στη συνέχεια, το 1965, ο Marc Fulwyler σχεδίασε τον πρώτο διαλογέα κυττάρων.

Η βασική αρχή της κυτταρομετρίας ροής είναι σε γενικές γραμμές η εξής: Τα κύτταρα ή τα σωματίδια επωάζονται με τα κατάλληλα, ανάλογα με τον σκοπό, μονοκλωνικά αντισώματα, με τα οποία συνδέονται. Το καθένα μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται είναι συζευγμένο με ένα συγκεκριμένο φθοριόχρωμα. Τα κύτταρα, σε μορφή εναιωρήματος, εισάγονται στον κυτταρομετρητή και προσάγονται, ένα-ένα, με λεπτή νηματική ροή, στο σημείο ανίχνευσης, όπου δέχονται την ακτινοβολία της φωτεινής πηγής (λυχνία laser). Τα κύτταρα, κατά το χρονικό διάστημα που δέχονται την προσπίπτουσα ακτινοβολία, εκπέμπουν φωτεινά σήματα, λόγω σκέδασης και φθορισμού, τα οποία, με κατάλληλο σύστημα φακών, διχροϊκών κατόπτρων και φίλτρων, διαχωρίζονται και κατευθύνονται στους ανιχνευτές (**Εικόνα 11**). Τα φωτεινά σήματα καθενός κυττάρου μετατρέπονται σε ηλεκτρικά, ενισχύονται, μετρώνται και οι ενδείξεις των μετρήσεων διοχετεύονται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Οι τιμές σκέδασης εξαρτώνται από το μέγεθος (ένταση πρόσθιας σκέδασης) και την κοκκίωση (ένταση κάθετης/πλάγιας σκέδασης) του κυττάρου, ενώ οι τιμές φθορισμού από τα αντιγονικά χαρακτηριστικά του. Η κυτταρομετρική ανάλυση, ολοκληρώνεται με την παρουσίαση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων καθενός κυττάρου, την ταξινόμηση των κυττάρων σε σύνολα και υποσύνολα (κυτταρικοί πληθυσμοί και υποπληθυσμοί) και με τη στατιστική επεξεργασία.



Εικόνα 11: Διάταξη κυψελίδας ροής σε κυτταρομετρητή ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας μετά από πρόσπτωση σε ένα κύτταρο.

Η σκέδαση, που παράγεται όταν ένα κύτταρο δέχεται την ακτινοβολία της πηγής, διακρίνεται στην πρόσθια σκέδαση (forward light scatter, FSC), η οποία εξαρτάται από το μέγεθος του κυττάρου και ανιχνεύεται κατά την προέκταση της προσπίπτουσας δέσμης, υπό γωνία 2° - 28° και στην κάθετη ή πλάγια σκέδαση (side scatter, SSC), η οποία εξαρτάται από την κοκκίωση (granularity) του κυττάρου και ανιχνεύεται σε διεύθυνση κάθετη (90°) με την προσπίπτουσα δέσμη (Ραπτοπούλου - Γιγή Μ., 2007)¹⁷.

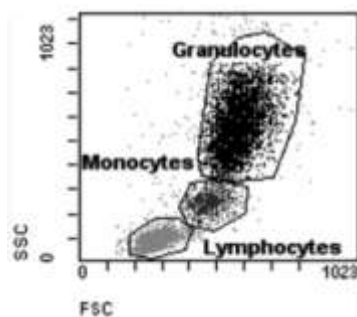
Ο φθορισμός παράγεται από τα φθοριοχρώματα, τα οποία είναι συζευγμένα στα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για τη σήμανση των επιθυμητών αντιγονικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Για να παρατηρηθεί το φαινόμενο του φθορισμού, οι φθορίζουσες ουσίες απαιτούν μία πηγή ενέργειας συγκεκριμένου μήκους κύματος, δηλαδή ακτινοβολία, η οποία προέρχεται από laser (συνήθως ιόντων αργού 488 nm) με πλεονέκτημα την παραγωγή μονοχρωματικής και σταθερής ακτινοβολίας. Οι φθορίζουσες χρωστικές, αφού διεγερθούν εκπέμπουν σε διάφορα μήκη κύματος, μεγαλύτερα της διέγερσης. Η εκπομπή αποτελεί ένα φάσμα ακτινοβολίας, για το λόγο αυτό πιθανό να υπάρχει και επικάλυψη φθοριοχρωμάτων, η οποία μπορεί να διορθωθεί μέσω του λογισμικού (compensation). Το πλεονέκτημα στους κυτταρομετρητές ροής είναι ότι από μία πηγή ενέργειας (ένα laser), μπορούμε να έχουμε ταυτόχρονη εκπομπή και προσδιορισμό 3-5 φθοριοχρωμάτων, ανάλογα με το σύστημα που διαθέτουμε. Αυτό

¹⁷ Ραπτοπούλου-Γιγή Μ. (2007) Κλινική Ανοσολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη

μεταφράζεται, στο ότι με την τεχνική αυτή μπορούν να προσδιοριστούν σε ένα σωληνάριο δείγματος από 3-5 αντιγόνα ταυτόχρονα στην κυτταρική μεμβράνη ενός κυττάρου καθώς και τυχόν συνέκφρασή τους. Η ταχύτητα ανάλυσης φτάνει έως και 3500 κύτταρα/sec. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια την ταυτόχρονη και γρήγορη συλλογή πολλών πληροφοριών κατά την τυποποίηση των κυτταρικών πληθυσμών. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται και διεγείρονται από laser 488 nm είναι συνήθως η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), η φυκοερυθρίνη (PE), η φυκοερυθρίνη-ερυθρό του Τέξας (ECD) και η φυκοερυθρίνη-κυανίνη (PC5) ή η Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) με κορυφές στο φάσμα εκπομπής στα 525 nm (πράσινο), 575 nm (κίτρινο), 620 nm (πορτοκαλί) και 670 nm (κόκκινο) αντίστοιχα.

Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής δέχεται τη ροή των δυαδικών αριθμών και έχει τη δυνατότητα παρουσίασης των αποτελεσμάτων και πραγματοποίησης πολύπλοκων αναλύσεων, συσχετίσεων και στατιστικής επεξεργασίας. Οι συνηθέστεροι τρόποι παρουσίασης είναι τα διαγράμματα κατανομής συχνοτήτων (ιστογράμματα) και τα διαγράμματα δύο παραμέτρων ή σημειακά διαγράμματα (dot plot), ή κυτταρογράμματα.

Τα προγράμματα ανάλυσης των δεδομένων, με τα οποία είναι εφοδιασμένα τα κυτταρόμετρα ροής, έχουν πολλές δυνατότητες. Μία από αυτές, πολύ σημαντική, είναι η δυνατότητα οριοθέτησης μιας περιοχής στο κυτταρόγραμμα, το λεγόμενο gating (**Εικόνα 12**), με σκοπό τον περιορισμό της ανάλυσης μόνο στα κύτταρα που εμπίπτουν στο gate, δηλαδή που παρουσιάζουν εντός των ορίων των τιμών του gate (Ραπτοπούλου-Γιγί Μ., 2007)¹⁸.



Εικόνα 12: Τυπικό στικτόγραμμα (dot plot) ολικού αίματος μετά από λύση ερυθρών. Διακρίνονται οι τρεις κυτταρικοί πληθυσμοί των λευκών αιμοσφαιρίων.

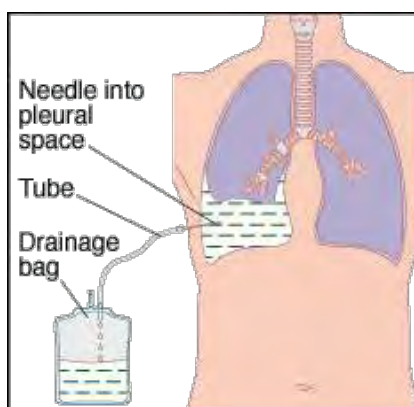
Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση σε διάφορους τομείς της ιατρικής. Η αιματολογία και η ογκολογία κατέχουν την κύρια θέση ως προς την αξιοποίηση της τεχνικής αυτής. Επειδή όμως αυτό που απαιτείται είναι το δείγμα να έχει

¹⁸ Ραπτοπούλου-Γιγί Μ. (2007) Κλινική Ανοσολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη

τη μορφή εναιωρήματος κυττάρων μπορεί να χρησιμεύσει ακόμα στη γενική παθολογία και στην παιδιατρική ως προς την ανοσολογική διαγνωστική πλευρά. Χρήσιμο βοήθημα μπορεί ακόμα να αποτελέσει στην κυτταρολογία αλλά και στη μελέτη των συμπαγών όγκων. Άλλα βιολογικά υγρά όπως βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, ΕΝΥ, υαλοειδές και υδατοειδές υγρό ή ούρα μπορούν επίσης να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής .

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το υλικό το οποίο επεξεργαζόμαστε είναι πλευριτικό υγρό από ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού στον πνεύμονα, που έχει επιβεβαιωθεί με θετική κυτταρολογική εξέταση. Το υγρό αυτό παραλαμβάνεται από το εργαστήριο σε ειδικό συλλέκτη. Η παρακέντηση γίνεται από τους αρμόδιους θωρακοχειρουργούς και το υγρό τοποθετείται στο κατάλληλο δοχείο.



Εικόνα 13: Παρακέντηση πλευριτικού υγρού από ασθενή.

2.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Μετά την άφιξη του πλευριτικού υγρού στο εργαστήριο ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Τοποθέτηση του πλευριτικού υγρού σε πλαστικά μπουκαλάκια φυγοκέντρου (falcon) των 175 ml (*Εικόνα 14*).
2. Φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 10 λεπτά.



Εικόνα 14: Falcon των 175ml



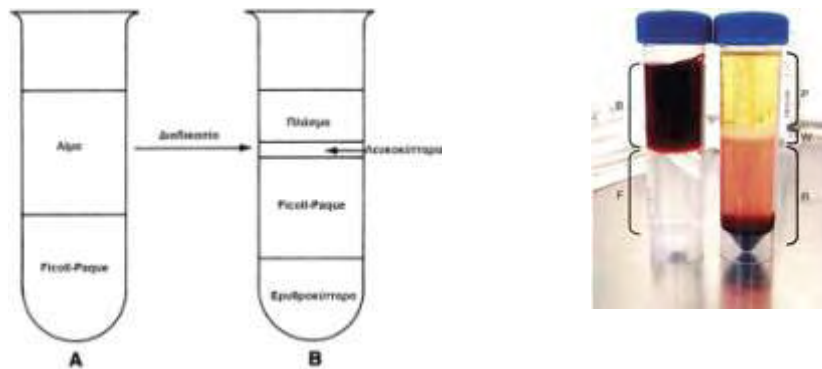
Εικόνα 15: Φυγόκεντρος

3. Απομάκρυνση υπερκειμένου και προσθήκη αποστειρωμένου PBS (Phosphate Buffered Saline).
4. Μεταφορά του υλικού σε δοχείο φυγοκέντρου (falcon) των 50 ml.
5. Φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 5 λεπτά.



Εικόνα 16: Falcon

6. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επιστοίβαξη σε Ficoll-Paque. Η επιστοίβαξη του πλευρικού υγρού γίνεται όπως και του αίματος.
7. Φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 15 λεπτά (χωρίς φρένο). Οι στιβάδες που προκύπτουν με τη σειρά από πάνω προς τα κάτω είναι: πλάσμα, στιβάδα λευκών αιμοσφαιρίων (μεσοστιβάδα), στιβάδα Ficoll-Paque και στιβάδα ερυθροκυττάρων και άλλων κοκκιωδών κυττάρων που εμφανίζεται ως ίζημα



(Εικόνα 17).

Εικόνα 17: (Αριστερά κάθε εικόνας) επιστοίβαξη αίματος σε Ficoll-Paque και (δεξιά κάθε εικόνας) οι στιβάδες που δημιουργούνται.

8. Λήψη της μεσοστιβάδας και μεταφορά σε δοχείο φυγοκέντρου των 50 ml με προσθήκη αποστειρωμένου PBS.
9. Φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 5 λεπτά.
10. Απομάκρυνση υπερκειμένου, μέτρηση κυττάρων με πλάκα Neubauer και:
 - α) προσθήκη 90% φιλτραρισμένου FBS (Fetal Bovine Serum) με 10% DMSO (2×10^6 κύτταρα/ml), μεταφορά σε cryovials (πλαστικά σωληνάκια των 2 ml) και τοποθέτηση στους -80°C ή
 - β) πείραμα.



Εικόνα 18: Cryovial

Το PBS είναι διάλυμα φωσφορικών αλάτων που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιολογική έρευνα. Περιέχει χλωριούχο νάτριο (NaCl), χλωριούχο κάλιο (KCl), φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) και φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) τα οποία διαλύονται σε αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα αυτό είναι ισοτονικό και μη τοξικό για τα κύτταρα και βοηθάει στη διατήρηση του pH (7,4). Το PBS πρέπει να φιλτράρεται πριν

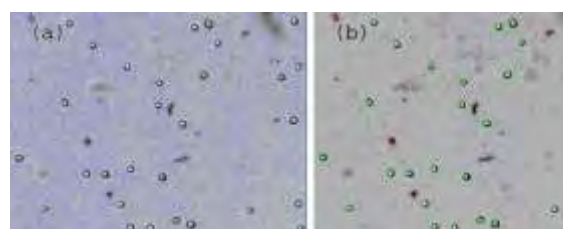
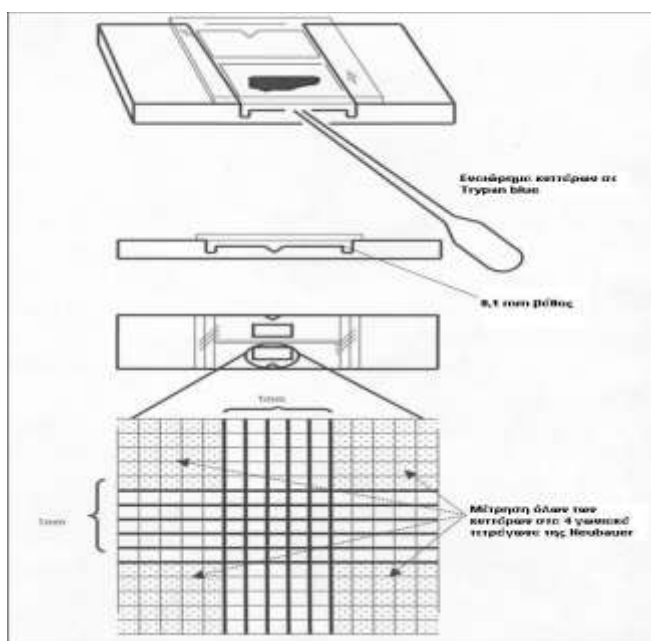
χρησιμοποιηθεί στα κύτταρα για να αποφεύγεται τυχόν επιμόλυνσή τους από διάφορους μικροβιακούς παράγοντες.

Το διάλυμα Ficoll-Paque περιέχει Ficoll, που είναι ένας ουδέτερος με πολλές διακλαδώσεις υδρόφιλος πολυσακχαρίτης, ο οποίος διαλύεται πολύ εύκολα σε υδατικά διαλύματα. Το Ficoll-Paque χρησιμοποιείται στα εργαστήρια για το διαχωρισμό του αίματος στα διάφορα συστατικά του. Πρώτα τοποθετείται σε ένα κωνικό σωλήνα (falcon) το Ficoll-Paque, στη συνέχεια επιστοιβάζεται σιγά-σιγά το αίμα και ακολουθεί η φυγοκέντρηση χωρίς φρένο. Από τις στιβάδες που προκύπτουν λαμβάνεται η μεσοστιβάδα.



Εικόνα :19
Eppendorf

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με πλάκα Neubauer. Γίνεται λήψη περίπου 20 μ l από το εναιώρημα των κυττάρων σε PBS. Το υλικό τοποθετείται σε ένα μικρό eppendorf (**Εικόνα 19**) και προστίθεται ίσος όγκος Trypan blue. Το διάλυμα αυτό εισέρχεται στα νεκρά κύτταρα και τα χρωματίζει μπλε, οπότε μπορεί να υπολογιστεί η ζωτικότητα των κυττάρων του εκάστοτε δείγματος (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 20: Πλάκα Neubauer και η εικόνα του σταυρού όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο (αριστερά). Για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων μετρώνται τα τέσσερα μεγάλα γωνιακά τετράγωνα. Υπολογίζεται ο μέσος όρος από τις μετρήσεις, πολλαπλασιάζεται επί 2 λόγω της αραιώσης του εναιωρήματος με ίσο όγκο trypan blue και επί 10^6 για αναγωγή του αριθμού των κυττάρων στο ml. (a) Εικόνα κυττάρων που έχουν βαφεί με trypan blue. Στη (b) τα ζωντανά κύτταρα σημαίνονται με πράσινο κύκλο ενώ τα νεκρά με κόκκινο (δεξιά).

Το FBS είναι ορός από έμβryo βοός που περιέχει πολλούς παράγοντες ανάπτυξης και πρωτεΐνες και είναι χαμηλός σε αντισώματα που βρίσκονται στο αίμα.

Χρησιμοποιείται ευρέως και μία από τις εφαρμογές του είναι στα θρεπτικά μέσα για την καλλιέργεια κυττάρων. Το DMSO (Dimethyl sulfoxide) με χημικό τύπο $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ έχει επίσης πολλές χρήσεις όπως διαλυτικό μέσο για διάφορες ουσίες αλλά και ως κρυοπροστατευτικό μέσο για τη διατήρηση κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C , σε συνδυασμό με το FBS. Το μίγμα που χρησιμοποιείται είναι 90% FBS και 10% DMSO, όπου το πρώτο έχει φιλτραριστεί για να αποφευχθούν διάφορες επιμολύνσεις. Το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα σε μεγάλες συγκεντρώσεις, αλλά σε μικρές προστατεύει τα κύτταρα και διατηρεί σε μεγάλο ποσοστό τη βιωσιμότητά τους.

Τα κύτταρα αφού τοποθετηθούν στα cryonials μεταφέρονται σε ένα ειδικό δοχείο (cryo freezing container), το οποίο βοηθάει στη σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας κατά $1^\circ\text{C}/\text{λεπτό}$ ώστε τα κύτταρα να μην υποστούν σοκ (*Εικόνα 21*). Μέσα σε 24 ώρες επιτυγχάνεται η επιθυμητή θερμοκρασία και τα cryonials με τα κύτταρα μπορούν να μεταφερθούν έξω από το ειδικό δοχείο και να διατηρηθούν στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το δοχείο αυτό στο οποίο προστίθεται ισοπροπανόλη, πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου πριν την τοποθέτησή του στους -80°C . Η ισοπροπανόλη πρέπει να ανανεώνεται όταν η διαδικασία τοποθέτησης στους -80°C και σε θερμοκρασία δωματίου επαναληφθεί πέντε φορές.



Εικόνα 21: Δοχείο σταδιακής μείωσης θερμοκρασίας

► Όλες οι εργασίες διεξάγονται στον απαγωγό (hood) για την επίτευξη άσηπτων συνθηκών.



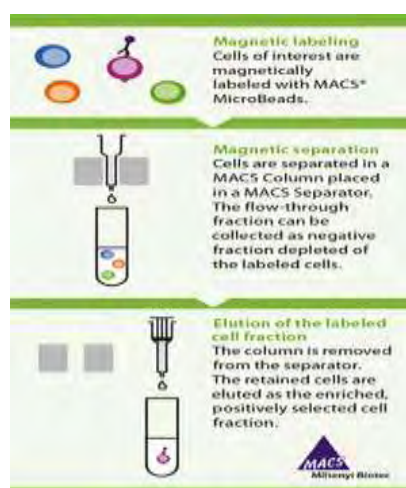
Εικόνα 22: Απεικόνιση απαγωγού.

Στην αρχή τα κύτταρα μετά την επεξεργασία τους τοποθετούνταν στους -80°C . Όταν στη συνέχεια υπήρχαν όλα τα κατάλληλα υλικά για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, τα κύτταρα επεξεργάζονταν την ίδια μέρα με την επόμενη διαδικασία που είναι η απομόνωση επιθηλιακών κυττάρων με τη μέθοδο MACS. Έτσι αποφευγόταν η

αναπόφευκτη μικρή μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας και του DMSO.

2.2. Εμπλουτισμός κυττάρων με την τεχνολογία MACS (Miltenyi Biotec)

Η τεχνολογία MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) βασίζεται στη χρήση μικροσφαιριδίων, στηλών και συσκευών διαχωρισμού. Η μεθοδολογία αποτελείται από τρία στάδια: τη μαγνητική επισήμανση, το μαγνητικό διαχωρισμό και τη συλλογή των επισημασμένων ή μη επισημασμένων κυττάρων (**Εικόνα 23**). Κατά το πρώτο στάδιο τα κύτταρα επισημαίνονται με τα μικροσφαιρίδια MACS σε ένα μικρό χρονικό διάστημα επώασης. Κατά το δεύτερο στάδιο τα κύτταρα διαχωρίζονται σε μία στήλη MACS που τοποθετείται στη συσκευή διαχωρισμού. Στο στάδιο αυτό μπορεί να γίνει η συλλογή των μη επισημασμένων κυττάρων που περνάνε από τη στήλη αν η επιλογή που γίνεται είναι αρνητική. Στο τρίτο στάδιο γίνεται απομάκρυνση της στήλης MACS από το μαγνητικό πεδίο και τα επισημασμένα κύτταρα που έχουν παραμείνει στη στήλη συλλέγονται ως θετικά επιλεγμένα κύτταρα με χρήση ενός εμβόλου.



Εικόνα 23: Στάδια μεθοδολογίας MACS.

Τα μικροσφαιρίδια χρησιμοποιούνται είτε για θετική επιλογή με το CD326 ή αλλιώς EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule - Μόριο Κυτταρικής Προσκόλλησης Επιθηλίων) ή HEA (Human Epithelial Antigen - Ανθρώπινο Επιθηλιακό Αντιγόνο), που εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα ή σε καρκινικά κύτταρα που έχουν επιθηλιακή προέλευση, είτε για αρνητική επιλογή με το CD45, που εκφράζεται από όλα τα κύτταρα του αίματος εκτός από τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Ο στόχος και με τις δύο επιλογές είναι το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων να είναι επιθηλιακής προέλευσης στο τελικό στάδιο. Η διαδικασία αυτή είναι εμπλουτισμός με τα επιθυμητά κύτταρα και όχι απομόνωσή τους. Η τελική καθαρότητα στα επιθυμητά κύτταρα, που

αναδεικνύει την ποιότητα του εμπλουτισμού, εξαρτάται από τις συνθήκες και τις τεχνικές που θα χρησιμοποιηθούν.

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι οι LS και οι LD (*Εικόνα 24*), όπου στο εσωτερικό τους περιέχονται σιδηρομαγνητικά σφαιρίδια. Συνηθίζεται οι πρώτες να χρησιμοποιούνται στη θετική και οι δεύτερες στην αρνητική επιλογή, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορεί να συμβεί και το αντίθετο. Οι στήλες και το περιεχόμενό τους είναι αποστειρωμένα. Η διαφορά τους είναι ο μέγιστος αριθμός κυττάρων που η κάθε μία μπορεί να δεχθεί (*Πίνακας 1*).



Εικόνα 24: Στήλες διαχωρισμού MACS.

Πίνακας 1: Χωρητικότητα στηλών σε κύτταρα.

Στήλη	Μέγιστος αριθμός επισημασμένων κυττάρων	Μέγιστος αριθμός συνολικών κυττάρων
LS	10^8	2×10^9
LD	10^8	5×10^8

Η συσκευή διαχωρισμού (*Εικόνα 24*) αποτελείται από έναν δυνατό μαγνήτη που παράγει υψηλού βαθμού μαγνητικό πεδίο στη στήλη, όταν η στήλη εισέλθει στη συσκευή. Η μαγνητική δύναμη είναι αρκετά δυνατή για να διατηρήσει τα επισημασμένα με το κατάλληλο αντίσωμα κύτταρα με πολύ μικρές ποσότητες μικροσφαιριδίων.



Εικόνα 25: Συσκευή διαχωρισμού MACS στην οποία μπορούν να επεξεργαστούν ταυτόχρονα μέχρι τέσσερα δείγματα (QuadroMACS, Miltenyi Biotec).

Κατά τη διαδικασία διαχωρισμού των κυττάρων χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα φίλτρα προ-διαχωρισμού

(*Εικόνα 26*) για τη συγκράτηση των συσσωματωμάτων των κυττάρων που τυχόν υπάρχουν στο εναιώρημά τους. Τα φίλτρα αυτά αποτελούνται από ένα νάιλον πλέγμα με διάμετρο 30 μm. Με αυτό επιτυγχάνεται η βελτίωση της διαδικασίας διαχωρισμού ειδικά όταν τα κύτταρα που διαχωρίζονται είναι σπάνια. Τα φίλτρα προ-διαχωρισμού τοποθετούνται πάνω από τη στήλη (LS ή LD) και είναι τα πρώτα συστατικά της τεχνικής με τα οποία έρχονται σε επαφή τα κύτταρα.



Εικόνα 26: Στήλη με φίλτρο προ-διαχωρισμού

Ένα άλλο συστατικό που απαιτείται για τη διαδικασία διαχωρισμού των κυττάρων είναι το ειδικό διάλυμα (buffer) το οποίο αποτελείται από PBS pH 7.2, 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin) και 2 mM EDTA. Με αυτό γίνεται η έκλουση των στηλών καθώς και η ανασύσταση των κυττάρων. Το buffer διατηρείται στους 4-8°C και πρέπει να είναι κρύο κατά τη διαδικασία της απομόνωσης. Η BSA είναι μία πρωτεΐνη που περιέχεται στον ορό του βοός και χρησιμεύει στην αύξηση της συγγένειας των αντισωμάτων για τα υποστρώματα επειδή συνδέεται μη ειδικά στα αντισώματα. Το EDTA (Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid) που περιέχεται στο buffer προσδένεται με το ασβέστιο των κυττάρων και βοηθάει ώστε να μην σχηματιστούν συσσωματώματα μεταξύ τους κατά τη φάση της ανασύστασης.

Πλεονεκτήματα της απομόνωσης κυττάρων με την τεχνολογία MACS

Όσον αφορά την τεχνική:

- Πολύ καλή καθαρότητα, ανάκαμψη και βιωσιμότητα των κυττάρων που διαχωρίζονται.
- Αποτελεσματικός διαχωρισμός κυττάρων που υπάρχουν σε πλειονότητα αλλά και σπάνιων κυττάρων.
- Ευέλικτες στρατηγικές διαχωρισμού: θετική ή αρνητική επιλογή αλλά και συνδυασμός των δύο.
- Όσον αφορά τις στήλες:
- Ήπια τεχνική με τα κύτταρα, δεν τα ταλαιπωρεί.
- Απλή διαδικασία έκπλυσης κυττάρων.
- Άνετη τεχνική για εργασία κάτω από άσηπτες συνθήκες.

Όσον αφορά τα μικροσφαιρίδια:

- Μικρά παραμαγνητικά συστατικά (50 nm).
- Συνδέονται με υψηλή ειδικότητα στα αντισώματα.
- Μικρά διαστήματα επώασης (15-30 λεπτά).
- Μη τοξικά και βιοδιασπώμενα.

- Δεν χρειάζεται διαχωρισμός των σφαιριδίων από τα κύτταρα. Τα επισημασμένα κύτταρα μπορούν αμέσως να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής, να καλλιεργηθούν ή να χρησιμοποιηθούν για οποιαδήποτε άλλη εφαρμογή.

2.3. Πρωτόκολλο διαδικασίας διαχωρισμού κυττάρων με τεχνολογία MACS

Πριν αρχίσει η διαδικασία έχει υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων. Όλη η διαδικασία πρέπει να γίνεται μέσα στον απαγωγό για την αποφυγή επιμολύνσεων των δειγμάτων αλλά και των συστατικών MACS (μικροσφαιρίδια, στήλες, κτλ.).

2.3.1. Μαγνητική επισημάνση κυττάρων με CD326 (θετική επιλογή)

- Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων σε PBS στα 300g για 10 λεπτά. Απομάκρυνση όλου του υπερκειμένου.
- Ανασύσταση του ιζήματος των κυττάρων σε 300 μl buffer για κάθε 5x10⁷ κύτταρα. Όταν τα κύτταρα είναι λιγότερα από 5x10⁷, χρησιμοποιούνται οι όγκοι που αναφέρονται. Σε περίπτωση περισσότερων κυττάρων υπολογίζονται οι αντίστοιχοι όγκοι που πρέπει να χρησιμοποιηθούν. Για παράδειγμα, για 108 κύτταρα χρησιμοποιείται διπλάσιος όγκος διαλύματος από αυτόν που θα αναφερθεί στο πρωτόκολλο.
- Προσθήκη 100 μl CD326 (ErCAM) μικροσφαιριδίων για κάθε 5x10⁷ κύτταρα.
- Καλή ανάμιξη του διαλύματος με πιπετάρισμα και επώαση για 30 λεπτά στους 4-8°C.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με την προσθήκη 5-10 ml buffer για κάθε 5x10⁷ κύτταρα και φυγοκέντρηση στα 300g για 10 λεπτά. Απομάκρυνση όλου του υπερκειμένου.
- Ανασύσταση μέχρι 108 κυττάρων σε 500 μl buffer.
- Ακολουθεί ο μαγνητικός διαχωρισμός.

2.3.2. Μαγνητικός διαχωρισμός με στήλη LS

Έχει προηγηθεί η τοποθέτηση της στήλης στη συσκευή διαχωρισμού.

- Προετοιμασία της στήλης και έκπλυσή της με 3 ml buffer.
- Προσθήκη του εναιωρήματος των κυττάρων στο φίλτρο προ-διαχωρισμού το οποίο βρίσκεται πάνω από τη στήλη.
- Συλλογή των μη επισημασμένων κυττάρων που περνάνε από τη στήλη σε ένα δοχείο φυγοκέντρου των 15 ml και έκπλυση της στήλης 3 φορές με 3 ml buffer.

Η προσθήκη κάθε νέας ποσότητας buffer πρέπει να γίνεται μόνο όταν η στήλη είναι άδεια.

- Απομάκρυνση της στήλης από τη συσκευή διαχωρισμού και τοποθέτησή της σε κατάλληλο σωλήνα διαλογής κυττάρων (δοχείο φυγοκέντρου των 15 ml). Επίσης αφαιρείται το φίλτρο προ-διαχωρισμού.
- Προσθήκη 5 ml buffer στη στήλη και γρήγορη έκπλυσή της με το κατάλληλο έμβολο που εφαρμόζεται σε αυτήν. Τα κύτταρα που περιέχονται σε αυτό το διάλυμα είναι αυτά που έχουν επισημανθεί με το CD326.

Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με πλάκα Neubauer.

2.3.3. Μαγνητική επισημάνση με CD45 (αρνητική επιλογή)

Πριν αρχίσει η διαδικασία έχει υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων.

- Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων σε PBS στα 300g για 10 λεπτά. Απομάκρυνση όλου του υπερκειμένου.
- Ανασύσταση του ιζήματος των κυττάρων σε 80 μl buffer για κάθε 107 κύτταρα.
- Προσθήκη 20 μl CD45 μικροσφαιριδίων για κάθε 107 κύτταρα.
- Καλή ανάμιξη του διαλύματος με πιπετάρισμα και επώαση για 15 λεπτά στους 2-8°C.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με την προσθήκη 1-2 ml buffer για κάθε 107 κύτταρα και φυγοκέντρηση στα 300g για 10 λεπτά. Απομάκρυνση όλου του υπερκειμένου.
- Ανασύσταση μέχρι $1,25 \times 10^8$ κυττάρων σε 500 μl buffer.

2.3.4. Μαγνητικός διαχωρισμός με στήλη LD

Έχει προηγηθεί η τοποθέτηση της στήλης στη συσκευή διαχωρισμού.

- Προετοιμασία της στήλης και έκπλυσή της με 2 ml buffer.
- Προσθήκη του εναιωρήματος των κυττάρων στο φίλτρο προ-διαχωρισμού το οποίο βρίσκεται πάνω από τη στήλη.
- Συλλογή των μη επισημασμένων κυττάρων που περνάνε από τη στήλη σε ένα δοχείο φυγοκέντρου των 15 ml και έκπλυση της στήλης 2 φορές με 1 ml buffer. Η προσθήκη κάθε καινούργιας ποσότητας buffer πρέπει να γίνεται μόνο όταν η στήλη είναι άδεια.

Τα επιθυμητά κύτταρα είναι αυτά που έχουν συλλεχθεί στο falcon με τις εκπλύσεις της στήλης. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με πλάκα Neubauer.

2.4. Καλλιέργεια των κυττάρων με αναστολείς του mTOR και της PARP

Τα επιθυμητά κύτταρα που βρίσκονται στο falcon φυγοκεντρούνται στις 1500 στροφές για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Ακολουθεί ένα ξέπλυμα των κυττάρων με 5-10 ml PBS και άλλη μία φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 5 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται ανασύσταση των κυττάρων σε ειδικό θρεπτικό υλικό (MEGM) και τοποθετείται η κατάλληλη ποσότητα κυττάρων σε πλάκες που αποτελούνται από έξι πηγαδάκια, για καλλιέργεια.



Εικόνα 27: Ειδικά πηγαδάκια μη προσκόλλησης

Τα πηγαδάκια έχουν ειδική επιφάνεια υδροτζέλ (hydrogel) με ομοιοπολικούς δεσμούς που είναι υδρόφιλη και με ουδέτερο φορτίο (**Εικόνα 27**). Η επιφάνεια αυτή ελαχιστοποιεί την προσκόλληση των κυττάρων, την πρωτεϊνική απορρόφηση και την ενζυμική ενεργοποίησή τους. Είναι μη τοξική για τα κύτταρα, βιολογικά αδρανής και μη διασπώμενη. Ο ρόλος που παίζουν αυτού του είδους τα πηγαδάκια είναι η διατήρηση των κυττάρων σε εναιώρημα και σε φάση μη προσκόλλησης. Επίσης εμποδίζουν τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων που εξαρτάται από την προσκόλλησή τους στην επιφάνεια των πηγαδιών, εμποδίζουν τα αρχέγονα κύτταρα να διαιρεθούν και μειώνουν τους δεσμούς προσκόλλησης και τις πρωτεΐνες του ορού στο υπόστρωμα.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι ειδικό για την καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων (MEGM-Mammary Epithelial Growth Medium, Lonza – **Εικόνα 28**) και γενικά κυττάρων που προέρχονται από ασθενείς (primary cultures). Επίσης δεν περιέχει ορό.



Εικόνα 28: MEGM

Το θρεπτικό υλικό όπως παρέχεται από το kit είναι το βασικό (500 ml), στο οποίο πρέπει να προστεθούν 2 ml BPE (Bovine Pituitary Extract, εκχύλισμα υπόφυσης βοός), 0,5 ml hEGF (human Epidermal Growth Factor, ανθρώπινος επιδερμικός παράγοντας ανάπτυξης), 0,5 ml υδροκορτιζόνη, 0,5 ml GA-1000 (αντιβιοτικά) και 0,5 ml ινσουλίνη, που επίσης παρέχονται από το kit ξεχωριστά. Οι επιπλέον αυξητικοί παράγοντες που προστίθενται χρησιμεύουν στην καλύτερη ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων που θα καλλιεργηθούν και στο σχηματισμό σφαιριδίων (mammospheres). Ο αριθμός των κυττάρων που προστίθεται σε κάθε

πηγαδάκι εξαρτάται κάθε φορά από το συνολικό αριθμό των κυττάρων και κυμαίνεται από 300000-1000000 κύτταρα/ml.

Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 4 ml θρεπτικού υλικού και κυττάρων με την κατάλληλη ποσότητα αναστολέα του mTOR και PARP. Ο αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Everolimus για τον mTOR καθώς και ο 3-Aminobenzamide, ο 4-Hydroxyquinazoline και ο 1,5-Isoquinolinediol (Biomol) για την PARP. Ο αναστολέας 3-Aminobenzamide αναστέλλει τις ενδογενείς πολύ-ADP-ριβοσυλ-τρανσφεράσες που παρουσιάζονται στις μεμβράνες. Αναστέλλει την απόπτωση που παράγεται από το νιτρικό οξείδιο αλλά όχι τη διαφοροποίηση στα κύτταρα HL-60. Προστατεύει τα κύτταρα από τις ρίζες οξυγόνου και την τοξικότητα του νιτρικού οξειδίου. Επίσης αναστέλλει την απόπτωση που παράγεται από το στρες. Η δράση του 4-Hydroxyquinazoline έγκειται στην εξασθένιση της ενεργοποίησης της ERK και της p38 MAP κινάσης που παράγεται από το LPS και δείχνει αρκετή επίδραση στο ενδοτοξικό σοκ που προκαλείται από το LPS. Ο 1,5-Isoquinolinediol αναστέλλει το νιτρικό οξείδιο (SIN-1) που παράγεται από την ενεργοποίηση της PARP στα ηπατοκύτταρα αρουραίου. Οι αναστολέας μετά τη διάλυσή τους φυλάσσονται στους -20°C.

Τα κύτταρα αφήνονται να καλλιεργηθούν για μία εβδομάδα σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C, σε ατμόσφαιρα που περιέχει 5% CO₂ και 100% σχετική υγρασία. Μετά την πάροδο μίας εβδομάδας το πείραμα σταματάει με τη συλλογή των κυττάρων με αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur και την τοποθέτησή τους σε δοχείο φυγοκέντρου των 15 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 5 λεπτά, απομάκρυνση υπερκειμένου, ανασύσταση με PBS και άλλη μία ίδια φυγοκέντρηση. Για τη διάσπαση τυχόν συσσωματωμάτων που μπορεί να έχουν δημιουργηθεί, μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου προστίθενται 3 ml διαλύματος τρυψίνης-βερσίνης. Στη συνέχεια τα κύτταρα περνάνε από μία σύριγγα ινσουλίνης απαλά 2-3 φορές και φυγοκεντρώνονται στις 1500 στροφές για 5 λεπτά. Ακολουθεί άλλο ένα ξέπλυμα με PBS και μία ίδια φυγοκέντρηση.



Εικόνα 29:
Καλλιέργεια
κυττάρων σε 6-well



Εικόνα 30: Κλίβανος για καλλιέργεια κυττάρων.

Το επόμενο στάδιο του πειράματος είναι η ανάλυση των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Τα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία προστίθενται είναι CD44-FITC, CD24-PE και EpCAM-PerCP-Cy5.5 (BD). Η ποσότητα που χρησιμοποιείται από το καθένα είναι 10 μ l. Τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν με τα αντισώματα σε θερμοκρασία δωματίου και σε χώρο που δεν υπάρχει φως για 15 λεπτά. Ακολουθεί η τοποθέτηση των κυττάρων σε κυτταρόμετρο και η ανάλυση του ανασοφαινοτύπου τους.

2.5. Πείραμα κυτταροτοξικότητας στα MDA-MB-231

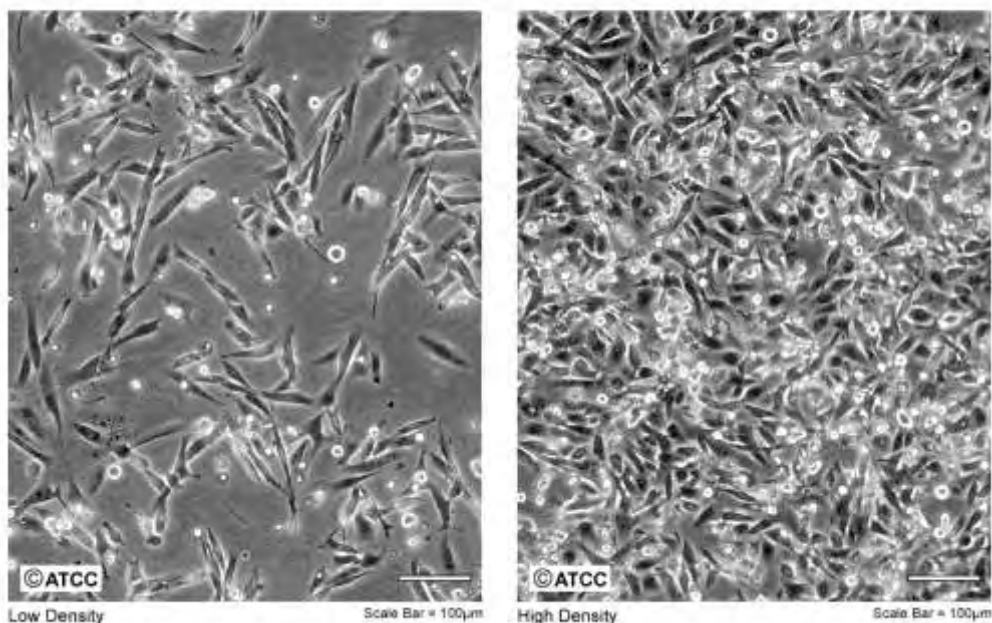
Η κυτταρική σειρά MDA-MB-231 (*Εικόνα 32*) προέρχεται από ανθρώπινο καρκίνο του μαστού που είναι αρνητική για τους τρεις υποδοχείς (HER2/neu, ER, PR) που εξετάζονται σε αυτού του είδους τους καρκίνους (triple negative). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ειδικές φλάσκες των 25 cm^2 (T-25) όταν



Εικόνα 31: Φλάσκα T-75

βγαίνουν από το υγρό άζωτο (-196°C), στο οποίο διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια σε φλάσκες των 75 cm^2 (T-75). Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των κυττάρων είναι DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) το οποίο είναι διάλυμα που περιέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται τα κύτταρα για την ανάπτυξή τους όπως αμινοξέα, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Επίσης στο DMEM προστίθεται FBS, δηλαδή ορός από έμβryo βοός σε ποσοστό 10%, που είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τέλος, προστίθεται μίγμα αντιβιοτικών και συγκεκριμένα πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε ποσοστό 1‰ για την αναστολή της ανάπτυξης των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων αντίστοιχα. Το θρεπτικό υλικό φιλτράρεται ώστε να συγκρατηθούν από το φίλτρο κάθε είδους μικροοργανισμοί που μπορεί να υπάρχουν στο θρεπτικό διάλυμα.

ATCC Number: **HTB-26**
Designation: **MDA-MB-231**



Εικόνα 32: Κυτταρική σειρά MDA-MB-231 σε καλλιέργεια. Αριστερά η καλλιέργεια είναι χαμηλής πυκνότητας, ενώ δεξιά υψηλής.

Όταν τα κύτταρα φτάσουν σε ικανοποιητικό ποσοστό που να καλύπτουν σχεδόν όλη τη φλάσκα γίνεται ανακαλλιέργεια. Αυτό επιτυγχάνεται με την αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα λόγω της προσθήκης 3-4 ml μίγματος τρυψίνης-βερσίνης σε αναλογία 0,025% : 0,02% και έκθεσής τους στους 37°C για περίπου 10-15 λεπτά. Η βερσίνη αποκολλά τα κύτταρα από τη φλάσκα ενώ η τρυψίνη τα διαχωρίζει μεταξύ τους. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml από το θρεπτικό διάλυμα για να σταματήσει η δράση της τρυψίνης και ακολουθεί πιπετάρισμα με πιπέττα των 5 ml 10-15 φορές για να διασπαστούν τα συσσωματώματα. Μετά γίνεται η κατάλληλη αραιώση ανάλογα με το πόσο γρήγορα αναπτύσσονται τα κύτταρα.

Τα κύτταρα μετρώνται με πλάκα Neubauer ώστε να τοποθετηθεί ο ίδιος αριθμός κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι στην πλάκα των 96 οπών (5000 κύτταρα ανά πηγαδάκι). Η εμφύτευση των κυττάρων γίνεται με πολυκάναλη πιπέττα ώστε να τοποθετηθεί κατά το δυνατόν ο ίδιος αριθμός κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι. Προστίθενται 100 µl κυττάρων και 200 µl θρεπτικού υλικού γύρω από τα πηγαδάκια που περιέχουν τα κύτταρα ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων. Τα κύτταρα αφήνονται έτσι στην πλάκα



Εικόνα 33: Τοποθέτηση κυττάρων σε πλάκα 96 οπών με πολυκάναλη πιπέττα

για μία μέρα ώστε να προσκολληθούν και επωάζονται σε κατάλληλες συνθήκες σε κλίβανο. Την επόμενη μέρα τοποθετούνται τα φάρμακα σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για καθέναν από τους αναστολείς της PARP στο πείραμα κυτταροτοξικότητας είναι μάρτυρας (control), 0,1 μM , 1 μM , 10 μM και 100 μM . Τα κύτταρα αφήνονται με την επίδραση των αναστολέων για 48 ώρες. Στη συνέχεια το πείραμα σταματάει με τη μονιμοποίηση των κυττάρων με την προσθήκη 50 μl 10% ψυχρού TCA (τριχλωροξικού οξέος) αφού πρώτα γίνει απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα αφήνονται στους 4°C για μισή ώρα και στη συνέχεια αφού απομακρυνθεί το TCA, πλένονται πέντε φορές με νερό βρύσης και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα για τουλάχιστον 24 ώρες. Την επόμενη μέρα προστίθενται 70 μl από τη χρωστική SRB (Sulforhodamine B) η οποία βάφει τα ζωντανά κύτταρα. Αφήνονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, η χρωστική απομακρύνεται, μετά πλένονται πέντε φορές με 1% οξικό οξύ και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl 10 mM μη ρυθμισμένου διαλύματος Tris-βάσεως ώστε να διαλυτοποιηθεί η χρωστική και για 10 λεπτά οι πλάκες με τα κύτταρα τοποθετούνται σε αναδευτήρα. Τέλος, η απορρόφηση μετράται σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών τύπου ELISA σε μήκος κύματος 492 nm αφαιρώντας τη μέτρηση υποβάθρου στα 620 nm (μήκος κύματος αναφοράς).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επίδραση αναστολέων της PARP στα MDA-MB-231:

Πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα κυτταροτοξικότητας με αναστολείς της PARP στα MDA-MB231 και παρακάτω ακολουθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων της απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (492 nm ref 620 nm), όπου αναγράφεται ο μέσος όρος (mean) από τις 6 ληφθείσες μετρήσεις για την κάθε συγκέντρωση καθώς επίσης και το sf που είναι το κλάσμα των ζωντανών κυττάρων, με το control να έχει τιμή 1 και όλες οι άλλες τιμές αναλογικά με το 1. Τα αποτελέσματα εξάγονται σε επίπεδο πρωτεΐνης και είναι ενδεικτικά κάθε φορά του πλήθους των κυττάρων.

Πίνακας 2: Επίδραση του αναστολέα 3-Aminobenzamide στα MDA-MB-231

	control	0,1μM	1μM	10μM	100μM
	0,128	0,124	0,127	0,126	0,126
	0,125	0,121	0,125	0,125	0,128
	0,133	0,126	0,137	0,141	0,134
	0,132	0,137	0,132	0,132	0,137
	0,136	0,135	0,132	0,134	0,133
	0,139	0,135	0,128	0,133	0,134
mean	0,132	0,129	0,130	0,131	0,132

Πίνακας 3: Επίδραση του αναστολέα 4-Hydroxyquinazoline στα MDA-MB-231

	control	0,1μM	1μM	10μM	100μM
	0,121	0,118	0,123	0,120	0,124
	0,129	0,131	0,121	0,120	0,122
	0,132	0,131	0,122	0,127	0,117
	0,124	0,130	0,121	0,122	0,108
	0,112	0,118	0,116	0,121	0,110
	0,126	0,120	0,108	0,114	0,105
mean	0,124	0,125	0,119	0,121	0,114

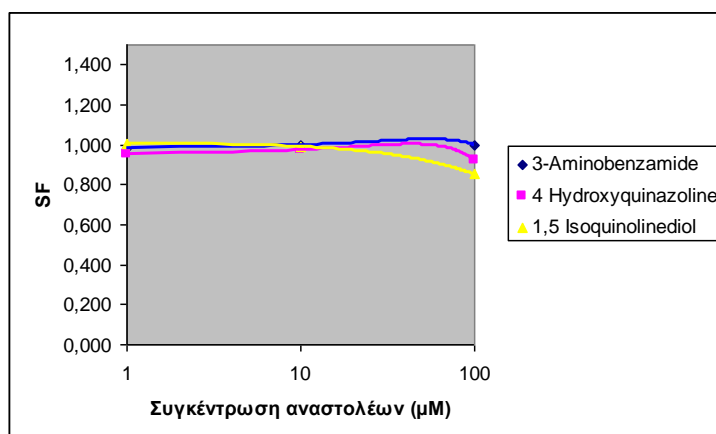
Πίνακας 4: Επίδραση του αναστολέα 1,5 Isoquinolinediol στα MDA-MB-231

	control	0,1μM	1μM	10μM	100μM
	0,113	0,120	0,121	0,121	0,100
	0,124	0,129	0,125	0,129	0,108
	0,117	0,125	0,129	0,116	0,107
	0,124	0,127	0,126	0,130	0,109
	0,132	0,123	0,121	0,120	0,103
	0,135	0,131	0,127	0,121	0,108
	0,113	0,120	0,121	0,121	0,100
mean	0,124	0,126	0,125	0,123	0,106

Πίνακας 5: Τιμές O.D.(μέσες τιμές) και SF των MDA-MB-231 μετά την επίδραση των τριών αναστολέων σε διάφορες συγκεντρώσεις για 48h.

Συγκέντρωση αναστολέα (μΜ)	3-Aminobenzamide		4-Hydroxyquinazoline		1,5-Isoquinolinediol	
	O.D.	SF	O.D.	SF	O.D.	SF
0	0,132	1	0,124	1	0,124	1
0,1	0,129	0,977	0,125	1,005	0,126	1,016
1	0,130	0,985	0,119	0,960	0,125	1,005
10	0,131	0,992	0,121	0,976	0,123	0,992
100	0,132	1	0,114	0,919	0,106	0,855

Με βάση τον παραπάνω πίνακα προκύπτει το διάγραμμα που ακολουθεί, όπου απεικονίζεται συγκριτικά η ευαισθησία των κυττάρων στις διάφορες συγκεντρώσεις των τριών αναστολέων.



Διάγραμμα 1: Επίδραση των τριών αναστολέων της PARP στα MDA-MB-231.

Στον άξονα των x του διαγράμματος βρίσκονται οι συγκεντρώσεις (μΜ) των αναστολέων της PARP σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα που δείχνουν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης εκφράζονται συγκριτικά ως προς την απορρόφηση (O.D.) του μάρτυρα (control), δηλαδή ως το κλάσμα των κυττάρων που παραμένει ανεπηρέαστο από τη δράση του φαρμάκου, δηλαδή το κλάσμα που έχει επιβιώσει (survival fraction-SF), και το οποίο προκύπτει από την ακόλουθη εξίσωση: $SF = OD_x / OD_c$, όπου OD_x και OD_c αντιπροσωπεύουν τις απορροφήσεις του δείγματος (υπό εξέταση αραιώση του φαρμάκου) και του μάρτυρα αντίστοιχα (*Διάγραμμα 1*). Οι τιμές SF βρίσκονται στον άξονα των y.

Από το πείραμα φαίνεται ότι η επιβίωση των κυττάρων δεν αλλάζει δραματικά ούτε στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (100 μΜ). Έτσι η συγκέντρωση των αναστολέων της PARP που τελικά χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα με τα κύτταρα από τα πλευριτικά υγρά ήταν η 100 μΜ. Αντίθετα, η συγκέντρωση για τον αναστολέα του Mtor, Everolimus που χρησιμοποιήθηκε ήταν 14 μΜ, λόγω της τοξικής του δράσης στα κύτταρα, όπως αποδείχτηκε, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Ο αριθμός των

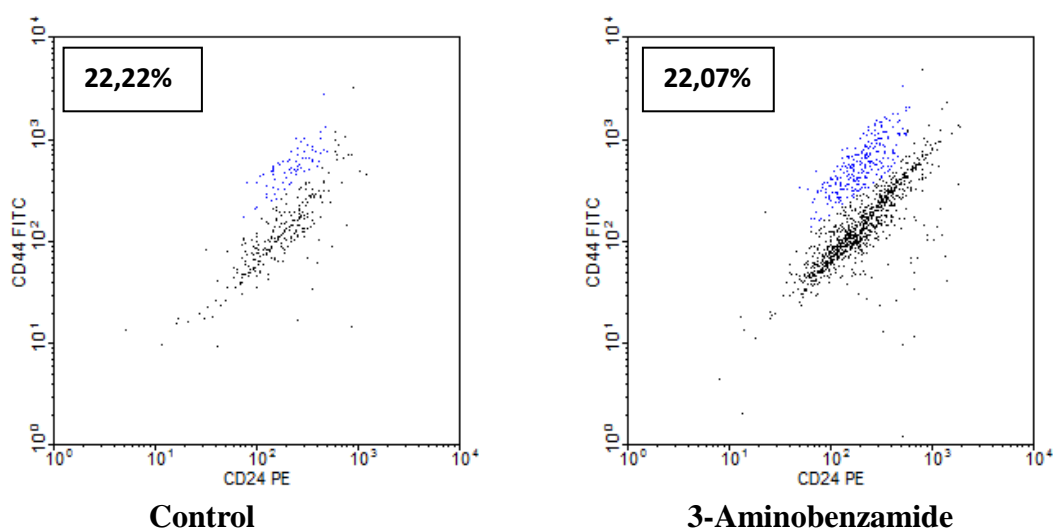
αναστολέων που χρησιμοποιούνται κάθε φορά εξαρτιόταν από τον αριθμό των κυττάρων που προέκυπταν μετά την απομόνωση με MACS.

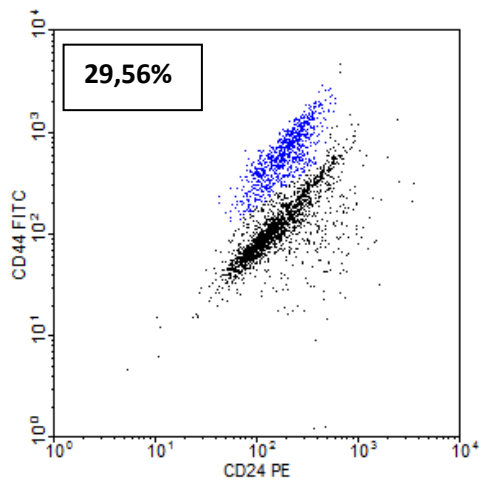
3.2. Πειράματα αναστολέων PARP σε κύτταρα από πλευριτικά υγρά

Η καλλιέργεια με τους αναστολείς κρατούσε μία εβδομάδα. Μετά τα κύτταρα επεξεργάζονταν με κυτταρομετρία ροής ως προς την έκφρασή τους σε CD44 και CD24. Το κυτταρόμετρο μετρούσε τα κύτταρα, τα οποία είχαν φαινότυπο CD44^{high}/CD24^{low} και υπολογιζόταν το ποσοστό αυτών(αναφέρεται στο πάνω αριστερά τμήμα κάθε διαγράμματος).

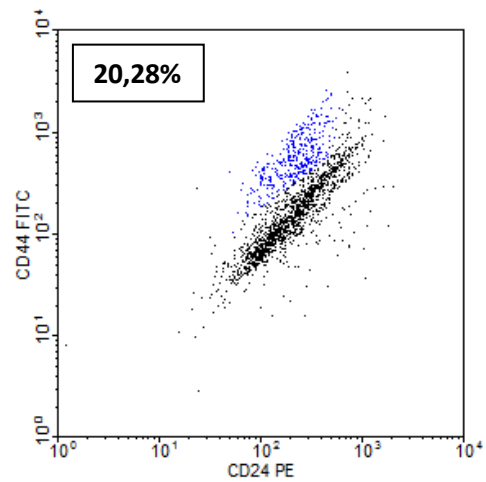
Παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα από κάθε πλευριτικό υγρό και τα ποσοστά των επιθυμητών κυττάρων μετά την επίδρασή τους με τους αναστολείς, καθώς και πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο απομόνωσής τους (θετική ή αρνητική επιλογή).

PE-1 : Αρνητική επιλογή





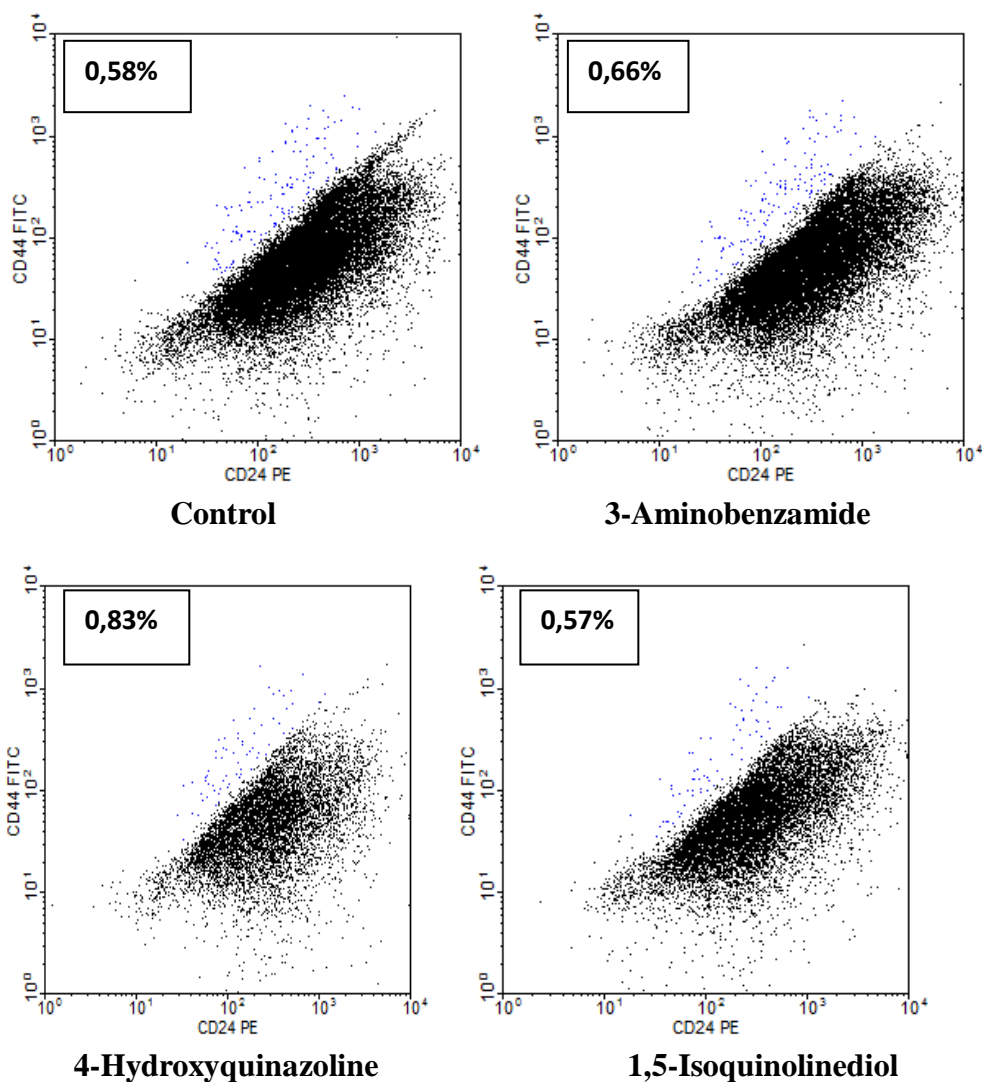
1,5-Isoquinolinediol



4-Hydroxyquinazoline

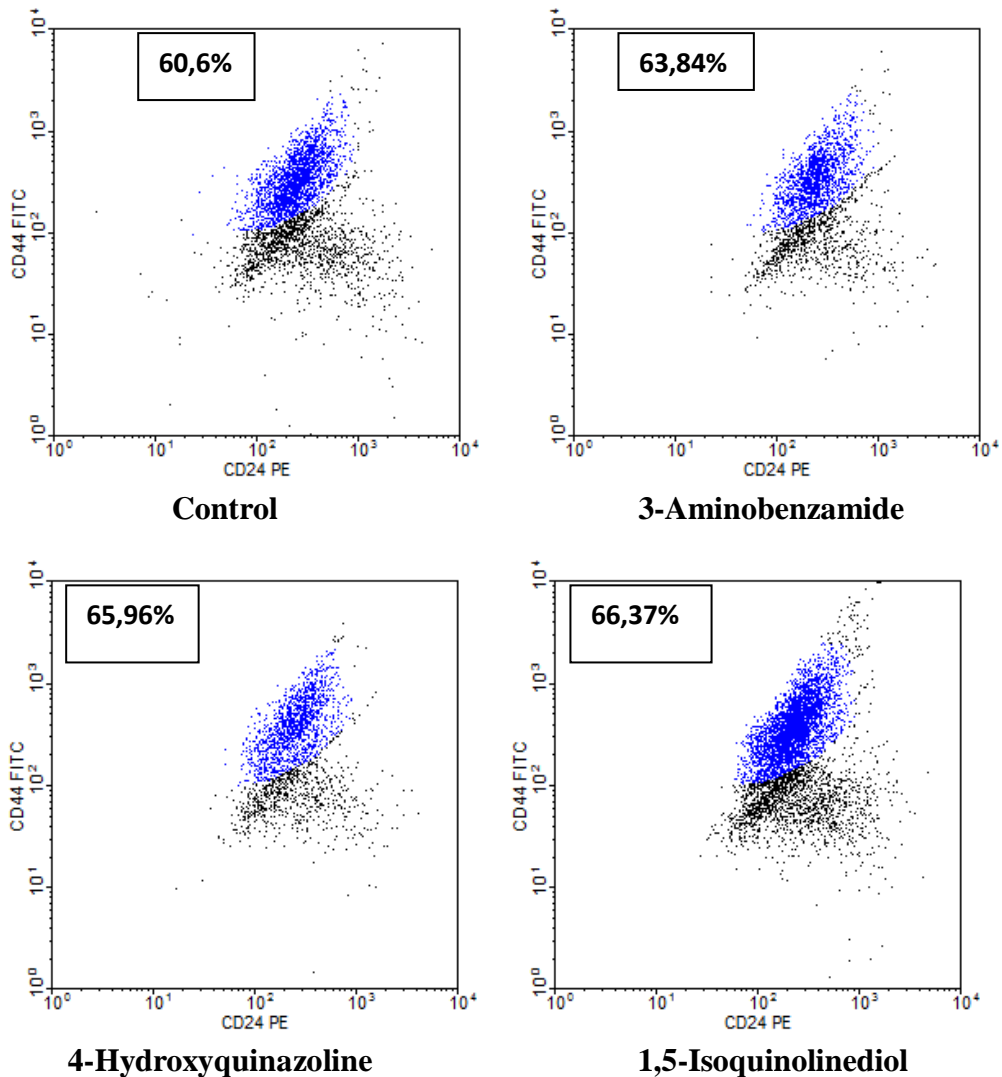
Διάγραμμα 2: Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται ο πληθυσμός με φαινότυπο $CD44^+/CD24^{low/-}$ που μας ενδιαφέρει, ο οποίος παρουσιάζεται με μπλε τελίτσες. Το ποσοστό επάνω αριστερά αναφέρεται στον πληθυσμό αυτόν. Από ότι παρατηρούμε δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στον πληθυσμό των κυττάρων αυτών μετά την προσθήκη των αναστολέων.

PE-2 : Θετική επιλογή



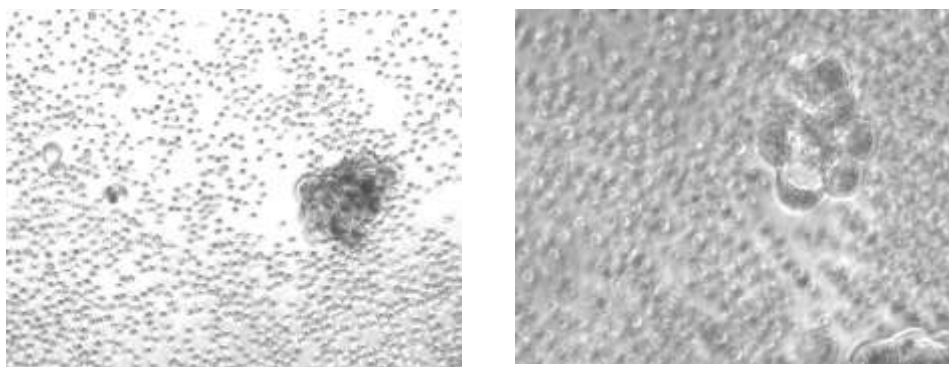
Διάγραμμα 3: Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται ο πληθυσμός κυττάρων με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{low/-} που μας ενδιαφέρει, ο οποίος όμως έχει απομονωθεί με θετική επιλογή και παρουσιάζεται με μπλε τελίτσες. Το ποσοστό επάνω αριστερά αναφέρεται στον πληθυσμό αυτόν. Παρατηρούμε και σε αυτήν την πλευριτική συλλογή ότι δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στον πληθυσμό των κυττάρων αυτών μετά την προσθήκη των αναστολέων.

PE-3 : Αρνητική επιλογή

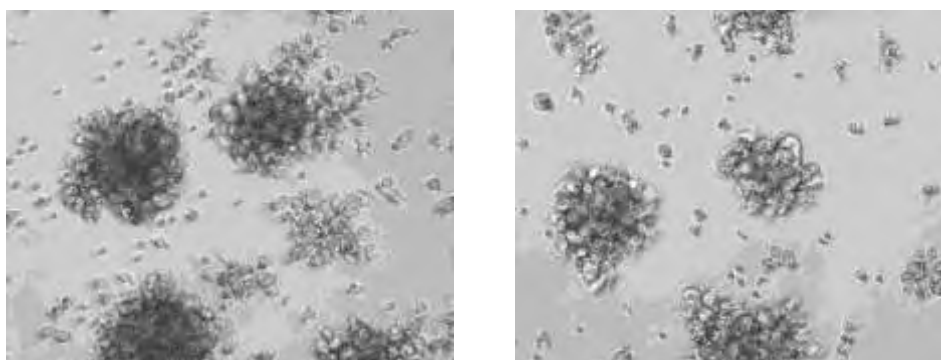


Διάγραμμα 4: Στο διάγραμμα αυτό απεικονίζεται ο πληθυσμός με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{low/-} που μας ενδιαφέρει, ο οποίος παρουσιάζεται με μπλε τελίτσες. Το ποσοστό επάνω αριστερά αναφέρεται στον πληθυσμό αυτόν. Από ότι παρατηρούμε δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στον πληθυσμό των κυττάρων αυτών μετά την προσθήκη των αναστολέων, ούτε και στον δεύτερο αναστολέα που στις άλλες πλευριτικές συλλογές είχαμε κάποιου είδους αύξηση, κάτι που μπορεί να σημαίνει ότι ο αναστολέας μας είχε ουδέτερα αποτελέσματα.

Κατά την καλλιέργεια των κυττάρων με τις συγκεκριμένες συνθήκες (μη προσκόλληση κυττάρων σε επιφάνεια, ειδικό θρεπτικό υλικό) παρατηρήθηκε ο σχηματισμός σφαιριδίων μεταξύ των κυττάρων (mammospheres). Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιες ενδεικτικές εικόνες από το 2^ο και το 3^ο πλευριτικό υγρό.



Εικόνα 34: Απεικόνιση mammospheres στο 3^ο πλευρικό υγρό.



Εικόνα 35: Απεικόνιση mammospheres στο 4^ο πλευρικό υγρό.

Στις παραπάνω εικόνες φαίνεται ο αρχικός σχηματισμός συσσωματωμάτων κυττάρων που θα καταλήξουν σε mammospheres. Εάν τα κύτταρα αφήνονταν να καλλιεργηθούν για παραπάνω από μία εβδομάδα (π.χ. ένα μήνα), θα σχηματίζονταν περισσότερα mammospheres τα οποία θα είχαν πιο ξεκάθαρο σχήμα.

3.3. Επίδραση του αναστολέα του mTOR στα MDA-MB-231

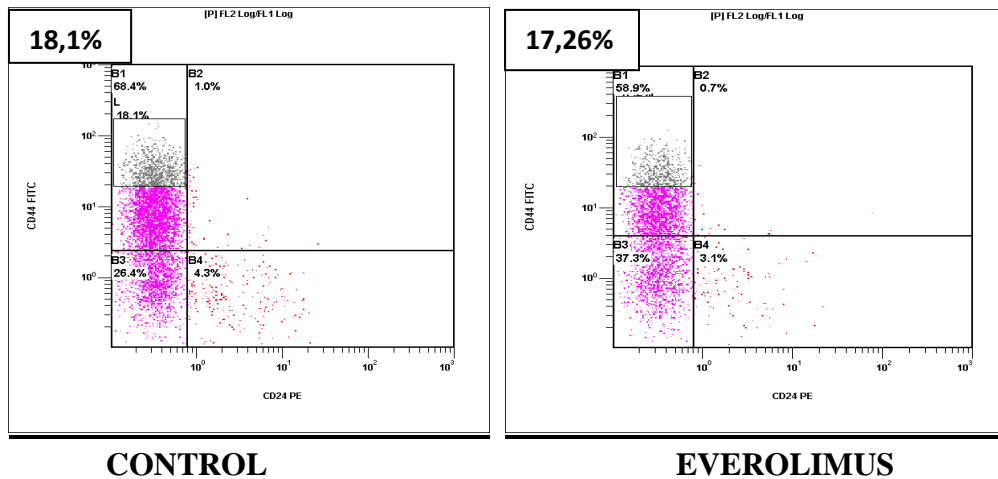
Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε και πάλι πείραμα κυτταροτοξικότητας με αναστολέα του mTOR στα MDA-MB-231 και παρακάτω ακολουθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων της απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (492 nm ref 620 nm), όπου αναγράφεται ο μέσος όρος (mean) από τις 4 ληφθείσες μετρήσεις για την κάθε συγκέντρωση καθώς επίσης και το sf που είναι το κλάσμα των ζωντανών κυττάρων, με το control να έχει τιμή 1 και όλες οι άλλες τιμές αναλογικά. Τα αποτελέσματα εξάγονται σε επίπεδο πρωτεΐνης και είναι ενδεικτικά κάθε φορά του πλήθους των κυττάρων.

Πίνακας 6: Επίδραση του αναστολέα Everolimus στα MDA-MB-231

	ctrl	5uM	10uM	15uM	20uM	30uM
	0,707	1,316	1,195	0,193	0,250	0,175
	0,701	1,476	1,105	0,207	0,199	0,183
	0,738	1,837	1,229	0,229	0,197	0,184
	0,694	1,370	1,114	0,185	0,179	0,206
mean	0,710	1,500	1,161	0,204	0,206	0,187
SF	0,998	2,109	1,632	0,286	0,290	0,263

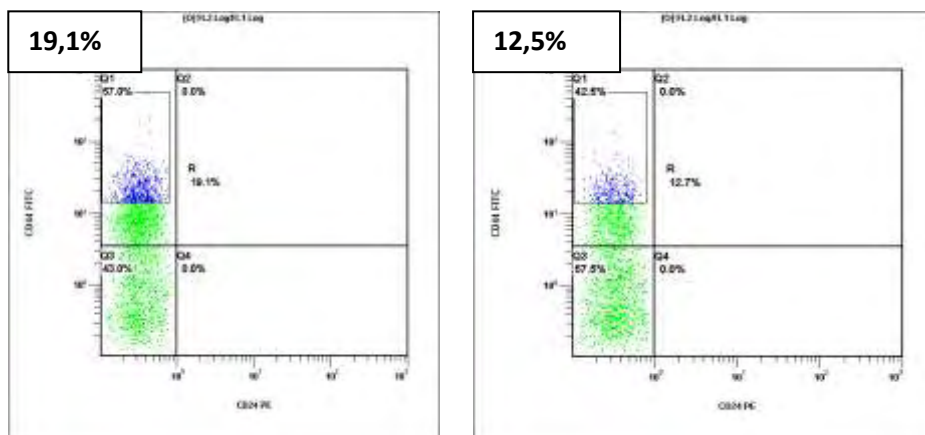
3.4. Πειράματα αναστολέα mTOR σε κύτταρα από πλευριτικά υγρά

PE-4 : Αρνητική επιλογή



Διάγραμμα 5: Παραπάνω απεικονίζεται ο πληθυσμός με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{low/-} που μας ενδιαφέρει μέσα σε ένα κουτάκι, το οποίο αποτελείται από γκρι τελίτσες. Το ποσοστό επάνω αριστερά αναφέρεται στον πληθυσμό αυτόν. Από ότι παρατηρούμε στη συγκεκριμένη πλευριτική συλλογή έχουμε μείωση του πληθυσμού που μελετάμε, κάτι που σημαίνει ότι ο αναστολέας μας είχε θετικά αποτελέσματα.

PE-5 : Αρνητική επιλογή

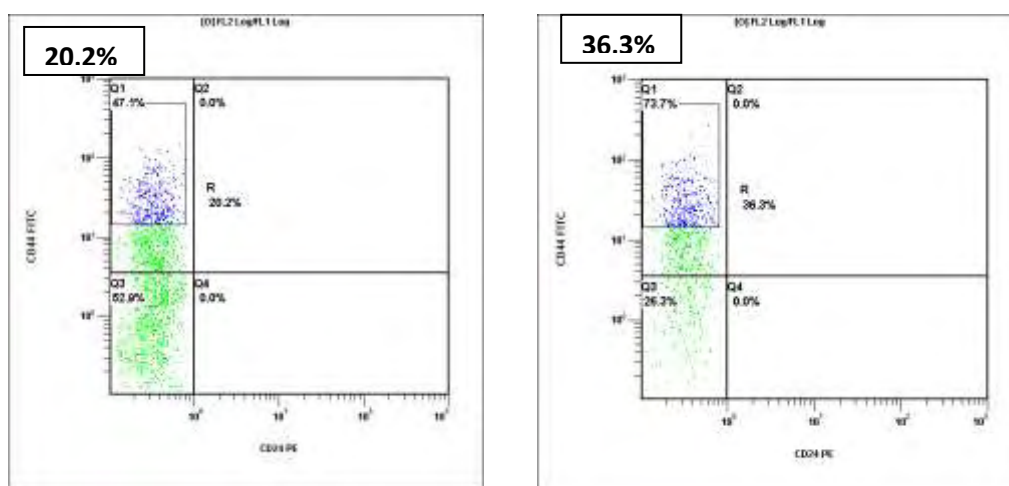


CONTROL

EVEROLIMUS

Διάγραμμα 6: Και στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται ο πληθυσμός με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{low/-} που μας ενδιαφέρει μέσα σε ένα κουτάκι, το οποίο σε αυτήν την περίπτωση αποτελείται από μπλε τελίτσες (ανάλογο του χρώματος που η κυτταρολόγος έδωσε στο συγκεκριμένο αντίσωμα). Το ποσοστό επάνω αριστερά αναφέρεται στον πληθυσμό αυτόν. Από ότι παρατηρούμε και στη συγκεκριμένη πλευρική συλλογή έχουμε μείωση του πληθυσμού που μελετάμε, κάτι που επίσης μπορεί να σημαίνει ότι ο αναστολέας μας είχε θετικά αποτελέσματα.

PE-6 : Αρνητική επιλογή

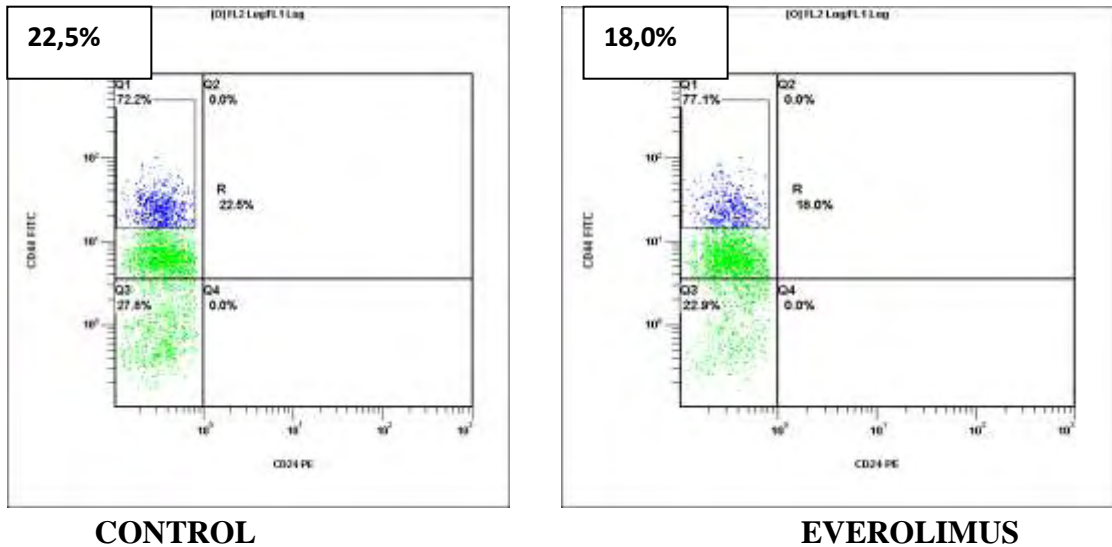


CONTROL

EVEROLIMUS

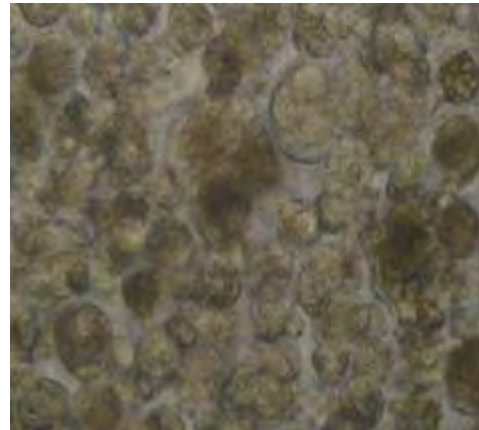
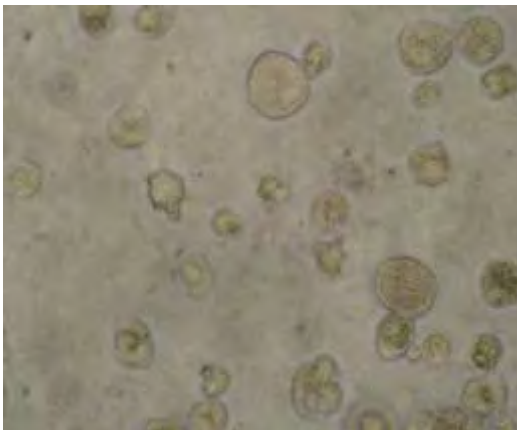
Διάγραμμα 7: Στο διάγραμμα απεικονίζεται ο πληθυσμός με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{low/-} που μας ενδιαφέρει μέσα σε ένα κουτάκι, το οποίο και αυτό αποτελείται από μπλε τελίτσες. Το ποσοστό επάνω αριστερά αναφέρεται στον πληθυσμό αυτόν. Από ότι παρατηρούμε στη συγκεκριμένη πλευρική συλλογή δεν έχουμε μείωση του πληθυσμού που μελετάμε, αντίθετα όμως παρατηρούμε μια αύξηση κάτι που ίσως σημαίνει ότι ο αναστολέας δεν επηρέασε τα κύτταρα αυτά.

PE-7 : Αρνητική επιλογή



Διάγραμμα 8: Σε αυτό το διάγραμμα βλέπουμε και πάλι τον πληθυσμό με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{low/-} που μας ενδιαφέρει μέσα σε ένα κουτάκι, το οποίο αποτελείται από μπλε τελίτσες. Το ποσοστό επάνω αριστερά αναφέρεται στον πληθυσμό αυτόν. Από ότι παρατηρούμε και στη συγκεκριμένη πλευριτική συλλογή έχουμε μείωση του πληθυσμού που μελετάμε, κάτι που επίσης μπορεί να σημαίνει ότι ο αναστολέας μας είχε θετικά αποτελέσματα.

Παρακάτω δίνονται φωτογραφίες των κυττάρων της 4 και 5 πλευριτικής συλλογής όπου μπορούν εύκολα να διακριθούν κάποια από τα mammospheres τα οποία όπως αναφέραμε και παραπάνω, αν η καλλιέργεια κρατούσε παραπάνω μέρες ίσως είχαμε περισσότερα και πιο ευδιάκριτα αποτελέσματα.



Εικόνα 35: Απεικόνιση mammospheres στο 4^ο πλευριτικό. **Εικόνα 36:** Απεικόνιση mammospheres στο 4^ο πλευριτικό

Μετά από κάποια πειράματα παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα είχαν καλύτερη βιωσιμότητα με την αρνητική επιλογή, ίσως λόγω της λιγότερης ταλαιπωρίας τους,

αφού με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα στο τέλος της διαδικασίας δεν χρειάζεται να εκπλυθούν από τη στήλη με το κατάλληλο έμβολο.

Μία άλλη παρατήρηση είναι ότι τα κύτταρα που απομονώνονταν την ίδια μέρα που το πλευριτικό υγρό κατέφθανε στο εργαστήριο είχαν καλύτερη βιωσιμότητα. Αυτό είναι φυσιολογικό αφού ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων πεθαίνουν λόγω του DMSO και του σοκ που υφίστανται εξαιτίας της μείωσης της θερμοκρασίας (-80°C) στην οποία διατηρούνται για μεγάλο διάστημα. Τα πλευριτικά υγρά των οποίων τα κύτταρα απομονώθηκαν αμέσως με στήλες MACS είναι το 1^ο, το 2^ο και το 3^ο, τα υπόλοιπα πλευριτικά υγρά χρησιμοποιήθηκαν, για την απομόνωση των κυττάρων τους σε άλλη χρονική στιγμή κάτι που ίσως να έπαιξε σημαντικό ρόλο στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων που απομονώθηκαν από πλευριτική συλλογή ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική ελάττωση στον πληθυσμό $\text{ErCAM}^+/\text{CD44}^{\text{high}}/\text{CD24}^{\text{low}}$ των κυττάρων μετά από επίδραση αναστολέων της PARP όπως επίσης και του αναστολέα του mTOR.

Συγκεκριμένα, η επίδραση με τους αναστολείς 3-Aminobenzamide και 4-Hydroxyquinazoline δεν άλλαξε καθόλου τον πληθυσμό των επιθυμητών κυττάρων ενώ με τον αναστολέα 1,5-Isoquinolinediol παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση που δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Επιπρόσθετα, η επίδραση με τον αναστολέα του mTOR Everolimus έδειξε μια μικρή μείωση του πληθυσμού που μας ενδιαφέρει χωρίς όμως και αυτή η μείωση να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική.

Η αποτυχία των αναστολέων να ασκήσουν την επίδρασή τους στον πληθυσμό $\text{ErCAM}^+/\text{CD44}^{\text{high}}/\text{CD24}^{\text{low}}$ των κυττάρων μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη αποδοτικότητάς τους κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων. Δηλαδή, μπορεί αν η καλλιέργεια βρισκόταν σε συνθήκες προσκόλλησης των κυττάρων σε επιφάνεια να ήταν πιο αποδοτικοί οι αναστολείς. Επίσης ένας άλλος λόγος είναι ότι τα κύτταρα με φαινότυπο βλαστοκυττάρων (stem-like) μπορεί να επηρεάζονται το ίδιο από αυτούς τους αναστολείς όπως τα υπόλοιπα κύτταρα που δεν έχουν αυτόν τον φαινότυπο, δηλαδή οι αναστολείς να μην έχουν ειδικότητα (specificity) για τα stem-like κύτταρα. Μια άλλη εξήγηση μπορεί να είναι ότι λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων δεν ήταν εφικτό να παρουσιαστεί ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα, όπως επίσης δεν μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι τα κύτταρα ήταν υγιή, λόγω της μεγάλης διάρκειας αποθήκευσής τους στους -80°C πριν από την απομόνωσή τους. Τέλος, οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι ήπιοι, δηλαδή δεν είναι πολύ τοξικοί, οπότε μπορεί να απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τους για μία μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση. Η συγκεντρώσεις 100 μM και 14 μM όμως είναι υψηλές και δεν θέλαμε να χρησιμοποιήσουμε υψηλότερες γιατί ακόμα και αν υπήρχε μείωση του ποσοστού του κυτταρικού πληθυσμού που θέλαμε, η συγκεντρώσεις θα ήταν τοξικές για κλινικές δοκιμές.

Η αναστολή της PARP είναι κυρίως δραστική και πιο αποτελεσματική σε ασθενείς που είναι μεταλλαγμένοι για τα γονίδια BRCA1 και BRCA2, που είναι υπεύθυνα για

την πλειοψηφία των κληρονομικών καρκίνων του μαστού, οι οποίοι αποτελούν το 5-10% της ασθένειας. Τα κύτταρα που έχουν μεταλλαγμένα BRCA γονίδια είναι πιο ευαίσθητα σε αναστολείς της PARP καθώς και σε παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA, όπως η ακτινοβολία-γ και τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Αντίθετα, τα κύτταρα που είναι φυσιολογικά δεν επηρεάζονται από τους αναστολείς της PARP. Ένας ακόμα λόγος που δεν ήταν αποτελεσματική η αναστολή της PARP είναι ότι οι ασθενείς από τις οποίες λήφθηκαν τα δείγματα να μην ήταν μεταλλαγμένες για τα γονίδια BRCA και συνεπώς να ήταν πιο ανθεκτικά στους αναστολείς του ενζύμου.

Μία επέκταση των πειραμάτων που εκτελέστηκαν και θα μπορούσαν να έχουν θετικότερα αποτελέσματα είναι: α) μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της έκθεσης των κυττάρων στους αναστολείς, δηλαδή παραπάνω από μία εβδομάδα, β) η ταυτόχρονη έκθεση της καλλιέργειας σε αναστολείς της PARP και mTOR και χημειοθεραπευτικά φάρμακα και γ) η εκτίμηση και άλλων δεικτών (markers) για τα βλαστοκύτταρα.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης με αναστολείς της PARP, είτε μόνοι τους είτε σε συνδυασμό με παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA, όπως δείχνουν διάφορες εργασίες σε μοντέλα με ποντίκια είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά (Rottenberga S. et al, 2008). Επίσης, η ύπαρξη HER υποδοχέων και κυρίως τον HER2 στις γυναίκες με καρκίνο του μαστού, βοηθάει ώστε να γίνει συνδυασμός φαρμάκου κατά του HER με φάρμακο που αναστέλλει το μονοπάτι της PI3K/Akt, όπως ο αναστολέας του mTOR. Οι αναστολείς αυτοί μπορεί να είναι κάποια από τα μελλοντικά όπλα ενάντια στην ασθένεια που κάθε χρόνο επιφέρει το θάνατο σε τόσες γυναίκες σε ολόκληρο τον κόσμο, τον καρκίνο του μαστού, και πρέπει να διεξαχθεί περισσότερη έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΑ

- Ραπτοπούλου-Γιγή Μ. (2007) Κλινική Ανοσολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Al-Hajj M. et al. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 3983-3988
- Balic M. et al. (2006) Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res*, 12, 5615-5621
- Bonnet D., Dick J.E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nature Med*, 3, 730-737
- Chambers A.F. et al. (2000) Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. *Breast Cancer Res*, 2, 400-407
- Dontu G. et al. (2003) Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell proliferation*, 36 (Suppl. 1), 59-72
- Dontu G. et al. (2004) Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res*, 6, R605-R615
- Grimshaw M.J. et al. (2008) Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 10: R52
- Honeth G. et al. (2008) The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res*, 10:R53
- Kordon E.C., Smith G.H. (1998) An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development*, 125, 1921-1930
- Menear K.A. et al. (2008) 4-[3-(4-Cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: A Novel Bioavailable Inhibitor of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (20), 6581-6591
- Peralta-Leal A. et al. (2009) PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radical Biology and Medicine*
- Ponti D. et al. (2005) Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 65 (13). 5506-5511
- Reya T. et al. (2001) Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-111
- Sheridan C. et al. (2006) CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 8, R59

- Weissman I.L. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell, 100, 157-168

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- <https://bcprd.lonza.com>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer_stem_cell
- [http:// en.wikipedia.org/wiki/Dimethyl_sulfoxide](http://en.wikipedia.org/wiki/Dimethyl_sulfoxide)
- <http:// en.wikipedia.org/wiki/EDTA>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Fetal_bovine_serum
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Ficoll>
- <http:// en.wikipedia.org/wiki/Metastasis>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate_buffered_saline
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin>
- <http://www.atcc.org/>
- <http://www.bdbiosciences.com>
- <http://www.biomol.com>
- <http://www.coleparmer.co.uk/>
- <http://www.miltenyibiotec.com/>
- <http://www.surgeon.gr/110/3342.aspx>
- http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Chapter_04/4_2_Cell_culture_procedures.htm