



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ DNA (cell free DNA) ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»

ΠΛΑΛΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΑΡΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ DNA (cell free DNA) ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»

ΠΙΛΛΑΛΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΑΡΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ DNA (cell free DNA) ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»

ΠΙΛΑΛΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΑΡΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ:

Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
- Διαμάντης Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
- Μαργαρίτης Αυγέρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.).

Στο σημείο αυτό έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους τόσο αξιόλογους ανθρώπους που γνώρισα και συνεργάστηκα, καθώς έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α και επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, Δρ. Ανδρέα Σκορίλα για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου για την ανάθεση της εν λόγω εργασίας, καθώς και την επιστημονική του καθοδήγηση καθ' όλη την πορεία διεξαγωγής της παρούσας εργασίας.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α., Δρ. Μαργαρίτη Αυγέρη, για την ουσιαστικά εποικοδομητική συνεργασία μας. Οι συμβουλές, η υπομονή και η βοήθειά του, ήταν καταλυτικές για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να παραθέσω ευχαριστήρια μνεία στον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών του Τμήματος Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α., Δρ. Διαμάντη Σίδερη για την συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική μου επιτροπή.

Στο σημείο αυτό δε θα μπορούσα να παραλείψω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα στις υποψήφιες Διδάκτορες Παπαδημητρίου Μαρία-Αλεξάνδρα και Πανουτσοπούλου Κωνσταντίνα για τις καταλυτικές συμβουλές τους, την ουσιαστική τους υποστήριξη και την συνεργασία υπό ένα κλίμα εξαιρετικής συναδελφικότητας, αλληλοσεβασμού και αλληλοεκτίμησης.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους ανθρώπους που με πλαισιώνουν, οι οποίοι είναι αναπόσπαστο έρεισμα στην ζωή μου, δίνοντάς μου δύναμη και έμπνευση να διεκδικώ αυτά που ονειρεύομαι.

Περίληψη

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως (Bladder Cancer, BlCa) αποτελεί την 10^η πιο συχνή μορφή καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο και τη 2^η πιο κοινή μορφή κακοήθειας του ουρογεννητικού συστήματος του αντρικού πληθυσμού - μετά τον καρκίνο του προστάτη - στις χώρες με υψηλό δείκτη ανάπτυξης (Human Development Index, HDI). Ο επιπολασμός της νόσου είναι υψηλότερος στους άνδρες και η συχνότητα διάγνωσης αυξάνει με το πέρας της ηλικίας. Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό ετερογένειας σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, καθώς άτομα με όμοια κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά εμφανίζουν διαφορές ως προς την πρόγνωση της νόσου και την απόκριση τους στα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Ανακύπτει, επομένως, η ανάγκη ακριβούς πρόγνωσης για την εφαρμογή εξατομικευμένων πρωτοκόλλων αποτελεσματικής θεραπείας και μεταθεραπευτικής παρακολούθησης (follow-up) των ασθενών. Ωστόσο, οι προγνωστικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη αδυνατούν να προσδιορίσουν με ακρίβεια την πορεία έκβασης της νόσου, με αποτέλεσμα οι πλειοψηφία των ασθενών να υποβάλλεται σε επεμβατική θεραπεία καθώς και μακροπρόθεσμες μετεγχειρητικές παρακολουθήσεις, μέσω κυστεοσκοπήσεων, κυτταρολογικής εξέτασης ούρων και CT-MRI απεικονιστικών μεθόδων. Η συνθήκη αυτή έχει ως επακόλουθο την υποβάθμιση της ποιότητας ζωής των ασθενών, καθώς και την αύξηση του κόστους διαχείρισης του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, καθιστώντας την συγκεκριμένη κακοήθεια ως την πιο κοστοβόρα ανά ασθενή, επιβαρύνοντας σημαντικά τα συστήματα υγείας. Ως εκ τούτου, η μελέτη και ταυτοποίηση νέων μοριακών βιοδεικτών, οι οποίοι θα συνεισφέρουν στην βελτίωση της διάγνωσης, της πρόγνωσης των ασθενών ουροθηλιακού καρκίνου και θα μπορούν να εφαρμοσθούν στις πρακτικές της κλινικής ρουτίνας, χαρακτηρίζεται από έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Οι τεχνικές της υγρής βιοψίας και ιδιαίτερα η ανάλυση του ελεύθερου κυττάρων DNA (cell-free DNA, cfDNA), αποτελούν ένα πεδίο έντονης ερευνητικής μελέτης. Η ανάλυση του cfDNA στην σύγχρονη μοριακή διαγνωστική πλεονεκτεί λόγω της μειωμένης επίδρασης της ετερογένειας των όγκων (tumor heterogeneity), καθώς και ο μη επεμβατικός της χαρακτήρας της λήψης των δειγμάτων, αποφεύγοντας την εκδήλωση πιθανών επιπλοκών και περιορίζοντας το υψηλό κόστος παρακολούθησης των ασθενών. Το cfDNA απελευθερώνεται στην κυκλοφορία μέσω μηχανισμών κυτταρικού θανάτου και ιδιαίτερα της απόπτωσης και έχει μικρό χρόνο ημιζωής, συνιστώντας ένα μοριακό στιγμιότυπο του οργανισμού. Επίσης, τα βιολογικά υγρά εμπλουτίζονται με cfDNA από όλα τα κύτταρα του οργανισμού (φυσιολογικά κύτταρα, καρκινικά κύτταρα, κύτταρα από το μικροπεριβάλλον του όγκου). Επομένως, κλάσμα του cfDNA αποτελεί το cfDNA των όγκων (circulating tumor DNA, ctDNA), βάσει του οποίου μπορούν να ανιχνεύονται μεταλλάξεις ειδικές για διάφορους

τύπους καρκίνου που έχουν κλινική αξία στην πρόγνωση της νόσου και την πρόβλεψη ανταπόκρισης στην θεραπεία. Οι μεταλλαγές αυτές μπορεί να αφορούν σημειακές μεταλλάξεις, απαλοιφές ή πολλαπλασιασμούς γενετικών τόπων, δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, καθώς και μη φυσιολογικές επιγενετικές τροποποιήσεις. Μέχρι σήμερα, έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των Η.Π.Α. (Food and Drug Administration, FDA) δύο εφαρμογές του cfDNA στην σύγχρονη μοριακή διαγνωστική των ανθρωπίνων κακοηθειών (EGFR Mutation Test v2 , Epi proColon).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών ανάλυσης του cfDNA σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και η κλινική αξιολόγησή του για την πρόγνωση και εξέλιξη της νόσου.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, αξιοποιήθηκαν στο σύνολο 170 ιστοτεμάχια όγκων και 100 δείγματα ορού περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης. Αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης του cfDNA από τον ορό, ποσοτικοποίησής του, καθώς και εκτίμησης της ποιότητας του. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθοδολογιών ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time qPCR), με τη χρήση της χημείας SYBR Green και της μεθόδου σχετικής ποσοτικοποίησης $2^{-\Delta\Delta CT}$ για τον προσδιορισμό της ακεραιότητας του cfDNA και του αριθμού των αντιγράφων των αλληλομόρφων τριών γονιδίων στόχων, *CDKN2A*, *MDM2* και *CCND1*, τόσο σε δείγματα ορού όσο και σε δείγματα ιστού ασθενών με καρκίνο στην ουροδόχο κύστη. Στην συνέχεια έγινε κλινική αξιολόγηση, μέσω εκτενούς βιοστατιστικής ανάλυσης, της ποσότητας και της ακεραιότητας του cfDNA, καθώς και του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων (copy number variation, CNV) των τριών γονιδίων στόχων (*CDKN2A*, *CCND1*, *MDM2*).

Στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας, βελτιστοποιήθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης του cfDNA από ορό περιφερικού αίματος, καθώς και real-time qPCR πρωτόκολλα ανάλυσης του αριθμού των αντιγράφων (CNVs) των *CDKN2A*, *CCND1*, *MDM2* στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Από τα αποτελέσματα της κλινικής αξιολόγησης, φαίνεται ότι στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, η αύξηση του σταδίου της νόσου οδηγεί σε ενίσχυση των μονοπατιών του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου έναντι της νέκρωσης. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι το *CDKN2A* γονίδιο έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στους ασθενείς με μη μυοδιηθητική νόσο, καθώς ασθενείς με ομόζυγη ή ετερόζυγη απαλοιφή του συγκεκριμένου γενετικού τόπου εμφανίζουν καλύτερη επιβίωση. Το *MDM2* γονίδιο έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στους ασθενείς με μυοδιηθητική νόσο, καθώς ασθενείς με πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου γενετικού τόπου εμφανίζουν δυσμενέστερη επιβίωση. Τα επίπεδα εμφάνισης των *CDKN2A* και *MDM2* γονιδίων στον ορό των ασθενών με επιφανειακό και υψηλής διαφοροποίησης καρκίνο είναι σημαντικά χαμηλότερα συγκριτικά με τους ασθενείς

προχωρημένου σταδίου και υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνου. Οι μη μυοδιηθητικοί, χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκοι έχουν καλύτερη πρόγνωση, οι προαναφερθέντες ενδείξεις ίσως να αποτελούν έναν καλό προγνωστικό δείκτη, κάτι που χρήζει βέβαια περαιτέρω επιβεβαίωσης με ανάλυση επιβίωσης σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ορού. Συμπερασματικά, το cfDNA φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο βιομόριο στην βελτίωση της διαχείρισης του καρκίνου, καθώς μέσω της ανάλυσής του καθίσταται εφικτός ο προσδιορισμός του συνολικού μοριακού προφίλ των όγκων μη επεμβατικά. Παρ' όλα αυτά, είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη του, για την διασαφήνιση πτυχών της βιολογίας του και των τρόπων αξιοποίησής του στην ιατρική ακριβείας.

Abstract

Bladder cancer (BlCa) constitutes the 10th most common form of cancer worldwide and the 2nd most common form of urogenital malignancy in the male population -after prostate cancer - in countries with a high Human Development Index (HDI). The prevalence of the disease is higher in men and the incidence of its diagnosis increases with aging. Bladder cancer is characterized by a high rate of heterogeneity, at cellular and molecular level, since individuals with similar clinicopathological features present differences in the prognosis of the disease and their response to treatment protocols. Therefore, there is the need for accurate prognosis for the implementation of personalized effective treatment and post-treatment monitoring protocols (follow-up) of patients. However, the prognostic markers that are used in clinical practice, are unable to define accurately the disease passing and consequently the majority of patients undergo invasive treatment as well as long-term postoperative follow-up, through cystoscopy, urinary cytology and CT-MRI imaging methods. This condition has as repercussion the deterioration of patients' quality of life and the cost augmentation of managing bladder cancer, making this malignancy the most costly per patient, burdening the health systems significantly. Hence, the study and identification of new molecular biomarkers, which would contribute to improving the diagnosis, the prognosis of patients with urothelial cancer and can be applied to clinical practice, are of great research interest.

Liquid biopsy methods, and in particular the analysis of cell-free DNA (cfDNA), are under of intense research interest. The analysis of cfDNA in modern molecular diagnostics is favored because of the trivial effect of tumor heterogeneity and its non-invasive nature allows of sequential sampling, avoiding the occurrence of possible complications and reducing the high cost of monitoring patients. Cell-free DNA is released into the circulation through mechanisms of cell death and especially apoptosis, having a short half-life, constituting a molecular snapshot of the organism. Furthermore, biological fluids are enriched with cfDNA from all cells of the organism (normal cells, cancer cells, cells from the tumor microenvironment). Therefore, a portion of cfDNA is the tumor cfDNA (circulating tumor DNA, ctDNA), on the basis of which analysis, specific mutations to various types of cancer can be detected, having clinical value in prognosis of disease and prediction response to treatment. The range of mutations may involve point mutations, deletions or gains of genetic locus, structural chromosomal abnormalities, and abnormal epigenetic modification. To date, two applications of cfDNA in the modern molecular diagnostics (EGFR Mutation Test v2, Epi proColon), have been approved by the US Food and Drug Administration (FDA).

The aim of the present study is the development of new technologies for cfDNA analysis in bladder cancer patients and its subsequent clinical evaluation prognosis and progression of the disease.

In the present study a total of 170 cancer tissue samples and 100 serum samples of peripheral blood from patients with bladder cancer were utilized. A protocol for isolating cfDNA from serum, quantifying it, and evaluating its quality was developed and optimized. Thereafter, real-time qPCR protocols were developed and optimized, using SYBR Green chemistry and the relative quantification 2-DDCT method, in order to determine the cfDNA integrity and the copy number of the three target genes, *CDKN2A*, *CCND1*, *MDM2*, in both serum and tissue samples of patients with bladder cancer. Clinical evaluation was then performed, via extensive biostatistical analysis, about the amount and integrity index of cfDNA, as well as the detection of copy number variations of the target genes (*CDKN2A*, *CCND1*, *MDM2*).

Based on the results of clinical evaluation, it appears that in bladder cancer with the increase of the disease stage, the pathways of programmed cell death against necrosis are enhanced. In addition, the *CDKN2A* gene has a greater impact on patients with non-muscle invasive disease, as patients with homozygous or heterozygous deletion of this genetic locus show off better survival possibilities. The *MDM2* gene has a greater impact on patients with muscle invasive disease, since patients with amplification of this genetic locus show off having poor survival rates. Levels of *CDKN2A* and *MDM2* copies in serum of patients with superficial and highly differentiated cancer are significantly lower than in patients with advanced and high-grade cancer. Non-muscle invasive, low grade tumors have good prognosis, so the above indications may constitute a good prognostic marker, which needs to be further confirmed by survival analysis in a larger number of serum samples. In conclusion, cfDNA seems to be an immense promising biomolecule in improving cancer management, as its analysis makes it possible to determine the overall molecular profile of tumors in a non-invasive way. Nevertheless, further study is needed to clarify aspects of its biology and how they can be reclaimed in precision medicine.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Ουροποιητικό Σύστημα	1
1.1.1 Φυσιολογία και Ανατομία	1
1.1.2 Εμβρυολογία του ουροποιητικού συστήματος.....	2
1.2 Ουροδόχος Κύστη	4
1.2.1 Ανατομία και Θέση της ουροδόχου κύστεως.....	4
1.2.2 Ιστολογία της ουροδόχου κύστεως	5
1.3 Καρκίνος ουροδόχου κύστεως	7
1.3.1 Επιδημιολογία καρκίνου ουροδόχου κύστεως	7
1.3.2 Παράγοντες Επικινδυνότητας.....	10
1.3.3 Παθολογία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	13
1.3.4 Διάγνωση, Πρόγνωση και μέθοδοι Θεραπείας του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	24
1.3.5 Μοριακή παθολογία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	26
1.4 Υγρή Βιοψία	30
1.4.1 Υγρή Βιοψία-Γενικές Πληροφορίες	30
1.4.2 Πλεονεκτήματα της υγρής βιοψίας έναντι της κλασικής βιοψίας ιστού	31
1.4.3 Περιορισμοί της υγρής βιοψίας	32
1.4.4 Εγκεκριμένες εφαρμογές της υγρής βιοψίας στην κλινική ογκολογία	33
1.5 Ελεύθερο κυττάρων DNA (cell free DNA,cfDNA).....	34
1.5.1 Ιστορική αναδρομή του cfDNA.....	34
1.5.3 Σύγχρονες τεχνολογικές μέθοδοι για την ανάλυση του cfDNA.....	47
1.5.4 Κλινική εφαρμογή του ctDNA στην ογκολογία.....	48
1.5.5 Τρέχουσες κλινικές δοκιμές.....	50
1.5.6 Μελλοντικές κατευθύνσεις	52
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	53
2. Υλικά και μέθοδοι	55
2.1 Βιολογικό υλικό	55
2.2 Ομάδες Επικύρωσης-Validation Cohorts.....	56
2.3 Ομογενοποίηση ιστολογικών δειγμάτων ουροδόχου κύστεως	57
2.4 Απομόνωση ολικού DNA από ιστολογικά δείγματα καρκίνου ουροδόχου κύστης	58

2.5 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού DNA.....	59
2.6 Απομόνωση DNA από δείγματα ορού (cell-free DNA, cfDNA)	60
2.7 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA.....	60
2.8 Αξιολόγηση του μεγέθους των τμημάτων του DNA μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης	61
2.9 Αρχή μεθόδου Ποσοτικής real time PCR	62
2.10 Αντίδραση qPCR για τα γονίδια <i>CCND1</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>MDM2</i> και <i>LEP</i>	66
2.11 Σχεδιασμός και σύνθεση εκκινητών	67
2.12 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης	68
2.13 Ανίχνευση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	69
2.14 Βιοστατιστική ανάλυση	70
3. Αποτελέσματα	71
3.1 Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης cfDNA-Έλεγχος ποσότητας, ποιότητας και ακεραιότητας.....	71
3.2 Επιλογή γονιδίου αναφοράς, ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθοδολογίας ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την εκτίμηση ποσότητας και ακεραιότητας του cfDNA.....	73
3.3 Κλινική αξιολόγηση ποσότητας και ακεραιότητας cfDNA.....	77
3.4 Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων-στόχων για εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων τους.....	78
3.5 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθοδολογίας ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων των γονιδίων στόχων	81
3.5.1 Εκτίμηση του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων σε γενωμικό DNA από ιστό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως-Προσδιορισμός της συχνότητάς τους.....	81
3.5.2 Εκτίμηση του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων σε cfDNA που απομονώθηκε από ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως.....	85
3.5.3 Δημιουργία καμπυλών αναφοράς.....	87
3.6 Κλινική αξιολόγηση του αριθμού των αλληλομόρφων των γονιδίων στόχων σε ιστό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως.....	89
3.7 Κλινική αξιολόγηση του αριθμού των αλληλομόρφων των γονιδίων στόχων σε ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως.....	91
4. Συζήτηση	94
Βιβλιογραφία.....	108

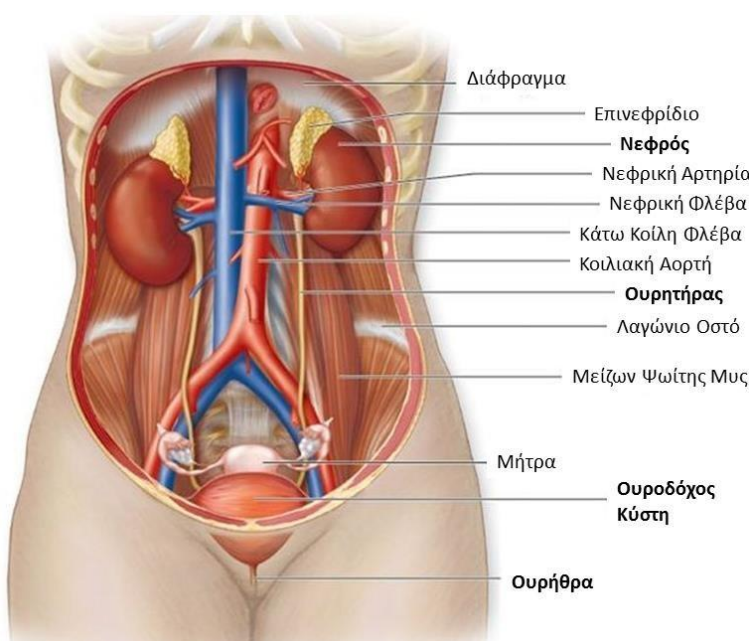
1. Εισαγωγή

1.1 Ουροποιητικό Σύστημα

1.1.1 Φυσιολογία και Ανατομία

Το ουροποιητικό σύστημα των θηλαστικών είναι συνέχεια ενός συστήματος κοίλων οργάνων, όπου η πρωταρχική του λειτουργία είναι η συλλογή, η μεταφορά, η φύλαξη και η αποβολή των ούρων περιοδικά, με μια εξαιρετικά συντονισμένη σειρά διαδικασιών[1]. Κατ' αυτό τον τρόπο ρυθμίζει τη χημική σύνθεση και τον όγκο του αίματος (οξεοβασική ισορροπία) και εξασφαλίζει την απομάκρυνση των μεταβολικών και τοξικών προϊόντων που προκύπτουν μέσω της λειτουργίας των νεφρών. Η διαδικασία της συνεχούς ροής των ούρων στο ανώτερο και η διακοπτόμενη αποβολή τους από το κατώτερο ουροποιητικό σύστημα συμβάλλει ουσιαστικά στο κομμάτι του καθαρισμού της ουροποιητικής οδού, απαλλάσσοντάς την από την παρουσία μικροβίων που πιθανά να την έχουν προσβάλλει [2]. Το ουροποιητικό σύστημα απαρτίζεται από τους νεφρούς, τους νεφρικούς κάλυκες και τη νεφρική πύελο κάθε νεφρού, τους ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη και την ουρήθρα. Καθένα από τα όργανα αυτά έχει διακριτά ανατομικά χαρακτηριστικά και πραγματοποιεί σημαντικές λειτουργίες για την ομοιόσταση του οργανισμού[3].

Τα ουροποιητικό σύστημα πέρα από ανώτερο (νεφροί και ουρητήρες) και κατώτερο (ουροδόχος κύστη και ουρήθρα), διακρίνεται και σε δύο μοίρες. Οι νεφροί παράγουν τα ούρα, αποτελώντας την εκκριτική μοίρα του ουροποιητικού συστήματος. Οι νεφρικοί κάλυκες, η νεφρική πύελος, οι ουρητήρες, η ουροδόχος κύστη και η ουρήθρα αποτελούν την αποχετευτική μοίρα του συστήματος, δηλαδή τη μοίρα μέσω της οποίας διέρχονται και αποβάλλονται τα ούρα[3].



Εικόνα 1.1: Ουροποιητικό σύστημα
θήλυ ατόμου (<https://byhealth.com/>)

1.1.2 Εμβρυολογία του ουροποιητικού συστήματος

Ο σχηματισμός του ουροποιητικού συστήματος ξεκινά στον άνθρωπο κατά την 4^η εβδομάδα της κύησης και είναι στενά συνδεδεμένος με την ανάπτυξη του γεννητικού συστήματος, λόγω της κοινής τους εμβρυϊκής προέλευσης. Προέρχεται από το διάμεσο μεσόδερμα και συνδέει τους σωμίτες (παραξονικό μεσόδερμα) με το πλάγιο πέταλο του μεσοδέρματος (σωματικό και σπλαχνικό). Με το πέρας της τέταρτης εβδομάδας έχει σχηματισθεί η νεφρογόνος χορδή, η οποία δίνει την γένεση των τριών εμβρυϊκών νεφρικών συστημάτων [4] :

- Τον πρόνεφρο
- Τον μεσόνεφρο
- Τον μετάνεφρο

Ο πρόνεφρος αποτελείται από 7-10 αρχέγονα προνεφρικά σωληνάκια, είναι μεν μη λειτουργικός σχηματισμός, αλλά απαραίτητος δε για την ανάπτυξη άλλων ιστών και κυτταρικών τύπων, που περιλαμβάνονται στον μεσόνεφρο. Εκφυλίζεται στο τέλος της 4^{ης} εβδομάδας της κύησης[5]. Ο μεσόνεφρος, ως συνέχεια του ουραίου τμήματος του πρόνεφρου, λειτουργεί ως εμβρυϊκός νεφρός στην οσφυϊκή περιοχή μεταξύ της 4^{ης} και 8^{ης} εβδομάδας κύησης. Αυτή του η λειτουργία παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του αμνιακού υγρού, που είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη άλλων οργάνων, όπως των πνευμόνων[5, 6]. Ο μεσόνεφρος, εν τέλει, εκφυλίζεται και τα υπολείμματά του συμμετέχουν στον σχηματισμό αρκετών δομικών χαρακτηριστικών του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως του μεσονεφρικού πόρου ή πόρο του Wolff. Συνεπώς, το ουραίο τμήμα του μεσόνεφρου σχηματίζει τον πόρο του Wolff και συνεχίζει να επεκτείνεται, δημιουργώντας ένα επιθηλιακό, σωληνοειδές εκκόλπωμα, την ουρητηρική καταβολή (ureteric bud), που εισδύει στο παρακείμενο μεσέγχυμα. Η διείσδυση αυτή σηματοδοτεί και την έναρξη του σχηματισμού του μόνιμου νεφρού, του μετάνεφρου[7]. Η ουρητηρική καταβολή επάγει το μεσέγχυμα να διαφοροποιηθεί σε δύο διαφορετικά στοιχεία: α) το μετανεφρογόνο μεσέγχυμα (metanephric or metanephrogenic mesenchyme) ή μετανεφρογόνο βλάστημα (metanephric or metanephrogenic blastema) και β) το στρωματικό μεσέγχυμα ή στρώμα (stromal mesenchyme or stroma). Το μετανεφρογόνο βλάστημα, το στρώμα και η ουρητηρική καταβολή, με πολύπλοκες και αμοιβαίες επιδράσεις μεταξύ τους μέσω αυξητικών και άλλων παραγόντων, σχηματίζουν τελικά τον μετάνεφρο[5, 7]. Ο μετάνεφρος, εμφανίζεται κατά την 5^η εβδομάδα, στην ιερή περιοχή, γίνεται λειτουργικός ήδη από την 11^η εβδομάδα, αλλά η πλήρης διαμόρφωσή του ολοκληρώνεται την 32^η εβδομάδα κύησης στον άνθρωπο[4]. Το μεσεγχυματικό μετανεφρογόνο βλάστημα με διαδοχικές διαφοροποιήσεις θα σχηματίσει τελικά τις εκκριτικές μονάδες, δηλαδή τους νεφρώνες (κάψα του Bowman, εγγύς και άπω εσπειραμένο σωληνάριο, αγκύλη του Henle), ενώ η επιθηλιακή ουρητηρική

καταβολή με διαδοχικές διακλαδώσεις θα σχηματίσει το αποχετευτικό, σύστημα, δηλαδή τα αθροιστικά σωληνάκια, τους μείζονες και ελάσσονες κάλυκες, τη νεφρική πύελο και τον ουρητήρα. Από την ουρητηρική καταβολή προέρχεται, επίσης, και το κυστικό τρίγωνο[7, 8]. Ο πόρος του Wolff στη συνέχεια κάμπτεται προς τη μέση γραμμή και εκβάλλει στην αμάρα. Η ουρητηρική καταβολή προσδευτικά επιμηκύνεται και διεισδύει μέσα στο μετανεφρογόνο βλάστημα με κατεύθυνση προσθοπίσθια και κρανιακά. Η διάπλαση του μετάνεφρου εξαρτάται από τις αμοιβαίες επαγωγικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μετανεφρογόνου βλαστήματος και της ουρητηρικής καταβολής. Σήματα από το μετανεφρογόνο βλάστημα επάγουν την επιμήκυνση, τη διείσδυση και τη διακλάδωση της ουρητηρικής καταβολής[7].

Η κλοάκη ή αμάρα είναι κοινό στοιχείο του ορθοπρωκτικού και ουρογεννητικού συστήματος κατά την 5^η εβδομάδα και διαχωρίζεται στις δύο διαφορετικές οδούς κατά την 6^η και 7^η εβδομάδα της κύησης[9]. Η αμάρα χωρίζεται πρόσθια (κοιλιακά) στον αρχέγονο ουρογεννητικό κόλπο και οπίσθια (νωτιαία) στον ορθοπρωκτικό σωλήνα, μέσω του ουροορθικού διαφράγματος που σχηματίζει το περίνεο[10]. Ο αρχέγονος ουρογεννητικός κόλπος διακρίνεται σε ανώτερο τμήμα απ' όπου θα προκύψει η ουροδόχος κύστη, σε πυελικό τμήμα από όπου θα σχηματισθούν ο προστάτης και τα υμενώδη τμήματα της ουρήθρας στους άντρες και η ουρήθρα στις γυναίκες. Από τον οριστικό ουρογεννητικό κόλπο ή αλλιώς το φαλλικό τμήμα δημιουργούνται η πεϊκή ουρήθρα στους άντρες και ο πρόδρομος του κολεού στις γυναίκες[4]. Η ανάπτυξη της ουροδόχου κύστης λαμβάνει χώρα μεταξύ της 4^{ης} και 7^{ης} εβδομάδας κύησης. Αρχικά η ουροδόχος κύστη είναι σε συνέχεια με την αλλαντοΐδα και όταν ο αυλός αποφραχθεί μια παχιά ινώδης χορδή, ο ουραχός, συνδέει την κορυφή της ουροδόχου κύστης με τον ομφαλό[11]. Με την αύξηση του μεγέθους της ουροδόχου κύστης τα κατώτερα άκρα των μεσонеφρικών πόρων και οι εκβολές των ουρητηρικών καταβολών ενσωματώνονται στο οπίσθιο τοίχωμά της. Το τμήμα αυτό του οπίσθιου τοιχώματος της κύστης, που οριοθετείται από τα τέσσερα στόμια, αποτελεί το αρχέγονο κυστικό τρίγωνο και έχει μεσοδερμική προέλευση, ενώ το υπόλοιπο τμήμα της ουροδόχου κύστης προέρχεται από τον ουρογεννητικό κόλπο και έχει ενδοδερμική προέλευση. Έπειτα, το μεσόδερμα του κυστικού τριγώνου αντικαθίσταται σταδιακά από το ενδοδερμικό επιθήλιο. Οι λείοι μύες της ουροδόχου κύστεως προέρχονται από το σπλαχνικό εμβρυϊκό μεσόδερμα[12].

Και στα δύο φύλα, η ουροδόχος κύστη αναπτύσσεται αρχικά ως ενδοκοιλιακό όργανο και καταλαμβάνει την τελική, πυελική της θέση, αργότερα, μετά τη γέννηση.[13] Η ουρήθρα έχει διπλή προέλευση. Τα ανώτερα τμήματά της και στα δύο φύλα, προέρχονται από τους μεσонеφρικούς πόρους του Wolff (μεσόδερμα), ενώ τα κατώτερα από τον ουρογεννητικό κόλπο (ενδόδερμα). Διαφέρει μόνο το τελικό τμήμα της πεϊκής ουρήθρας, που προέρχεται από εξώδερμα[12].

1.2 Ουροδόχος Κύστη

1.2.1 Ανατομία και Θέση της ουροδόχου κύστεως

Η ουροδόχος κύστη είναι ένα κοίλο και μυώδες όργανο μεταβλητών διαστάσεων, που βρίσκεται μέσα στη μικρή πύελο, πίσω από την ηβική σύμφυση. Συγκεντρώνει τα ούρα, που έρχονται από τους δύο ουρητήρες, συγκρατεί μια ποσότητα και στη συνέχεια τα αποβάλλει δια της ουρήθρας κατά την ούρηση. Τυπικά μπορεί να συγκρατήσει περίπου 300-500mL ούρων έως ότου διεγερθούν οι αντίστοιχοι τασεοϋποδοχείς και δημιουργηθεί η ανάγκη κένωσής της. Το μέγεθός της εξαρτάται από την ηλικία, το φύλο και την ετερογένεια μεταξύ των ατόμων[14]. Η ουροδόχος κύστη, όταν είναι γεμάτη, έχει περίπου κωνικό σχήμα και το άνω της μέρος εξέχει πάνω από την ηβική σύμφυση, ενώ όταν είναι άδεια βρίσκεται εξ ολοκλήρου εντός της πυέλου[3].

Ανατομικά είναι σε συνέχεια άνωθεν με τους ουρητήρες και κοιλιακά με την ουρήθρα. Η ουροδόχος κύστη διακρίνεται σε τρία βασικά μέρη. Η βάση ή πυθμένας, που βρίσκεται προς τα κάτω, το σώμα, που χωρίζεται από τη βάση από τις εκβολές των ουρητήρων και η κορυφή, που έρχεται προς τα άνω και μπροστά και συνδέεται μέσω του μεσαίου ομφαλικού συνδέσμου με τον ομφαλό. Από τη βάση αρχίζει και η ουρήθρα. Η βάση στον άντρα στηρίζεται πάνω στον προστάτη, ενώ στη γυναίκα πάνω στο έδαφος της πυέλου. Όταν κοιτάξουμε το εσωτερικό της κύστεως θα δούμε ότι είναι πτυχωτό, εκτός από μια τριγωνική περιοχή στη βάση, που λέγεται κυστικό τρίγωνο και είναι λεία. Στις τρεις γωνίες του κυστικού τριγώνου, του οποίου η κορυφή στρέφεται προς τα κάτω και μπροστά, υπάρχουν ισάριθμες οπές. Οι δύο άνω οπές, δεξιά και αριστερά, είναι τα στόμια των δύο ουρητήρων, ενώ η κάτω οπή είναι το στόμιο που αρχίζει η ουρήθρα. Στη βάση του τριγώνου υπάρχει μία προεξοχή του βλεννογόνου, το ουρητηρικό όγκωμα, όπου πέριξ του στομίου της ουρήθρας, ο βλεννογόνος σχηματίζει μία κυκλική προεξοχή, τον ουρηθραίο δακτύλιο, που σχηματίζει με τη σειρά του τον έσω σφιγκτήρα της ουρήθρας. Κάθε ουρητήρας σχηματίζει την άνω πλευρική γωνία της τριγωνικής βάσης, ενώ ο έσω ουρηθρικός σφιγκτήρας σχηματίζει τη κατώτερη γωνία (αυχένας της ουροδόχου). Αυτό το τρίγωνο, μέσα στη βάση της ουροδόχου κύστης μπορεί να παρατηρηθεί κατά την κυστεοσκόπηση[15].

Η ουροδόχος κύστη αιματώνεται κυρίως από την άνω και κάτω κυστική αρτηρία (κλάδοι της έσω λαγόνιου αρτηρίας). Νευρώνεται από ένα δίκτυο συμπαθητικών και παρασυμπαθητικών νευρικών ινών. Οι κλάδοι του συμπαθητικού εκβάλλουν από τα κάτω θωρακικά και άνω οσφυϊκά μέρη του νωτιαίου μυελού (T10-L2) και σχηματίζουν τα άνω και κάτω υπογάστρια νεύρα. Οι κλάδοι του παρασυμπαθητικού προέρχονται από τα ιερά νωτιαία νεύρα (S2-S4) που συνενώνονται για να σχηματίσουν τα πυελικά σπλαχνικά νεύρα. Τα νεύρα του αιδοίου (S2-S4), είναι κλάδος του ιερού

πλέγματος και παρέχουν επικουρικό σωματικό έλεγχο στους ραβδωτούς μύες του εξωτερικού σφιγκτήρα της ουρήθρας[1].

Οι υποδοχείς μηχανικής πίεσης που βρίσκονται στο τοίχωμα της ουροδόχου κύστεως αποκρίνονται στην αύξηση της πίεσης μέσω αύξησης της πλήρωσης της κύστεως με διάταση του μυϊκού της τοιχώματος. Οι υποδοχείς αυτοί μεταφέρουν αυτή την πληροφορία στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω σπλαχνικών προσαγωγών ινών των υπογάστριων και πυελικών σπλαχνικών νεύρων. Εάν η αισθητηριακή πληροφορία προέρχεται από υποδοχείς του ανώτερου μέρους της κύστεως τότε διεγείρεται ο συμπαθητικός κλάδος και εάν προέρχεται από τους υποδοχείς του κατώτερου τμήματος διεγείρεται ο παρασυμπαθητικός κλάδος[1]. Σε γενικές γραμμές, η ενεργοποίηση του παρασυμπαθητικού επάγει την κένωση και του συμπαθητικού την πλήρωση της κύστεως[1].

1.2.2 Ιστολογία της ουροδόχου κύστεως

Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστεως διακρίνεται σε τέσσερις βασικούς χιτώνες από μέσα προς τα έξω:

- Βλεννογόνο στρώμα (Urothelium - lamina propria)
- Υποβλεννογόνιος (Submucosa)
- Μυϊκός που με τη σειρά του διαχωρίζεται σε 3 στοιβάδες: την έξω επιμήκη στοιβάδα, τη μέση κυκλωτή και την έσω επιμήκη (Muscularis propria)
- Ορογόνο και Ινώδης (Serosa/adventitia)

Έχει πάχος $3.3\text{mm} \pm 1.1\text{mm}$ στους άντρες και $3.0\text{mm} \pm 1.0\text{mm}$ στις γυναίκες. Το πάχος του τοιχώματος είναι σχετικά ομοιόμορφο κατά τα διάφορα μέρη του οργάνου, εκτός από το κυστικό τρίγωνο, το οποίο διαφέρει και ως προς τη νεύρωση, τη μυϊκή διαμόρφωση και την εμβρυϊκή προέλευση[16].

Ο βλεννογόνος της ουροδόχου κύστης αποτελείται από το ουροθήλιο, μια βασική μεμβράνη και το χόριο του βλεννογόνου. Το ουροθήλιο είναι ένα χαρακτηριστικό μεταβατικό επιθήλιο με πολλούς στοίχους κυττάρων που από αδενικού τύπου στην εν τω βάθει στιβάδα γίνονται πλακώδη κύτταρα στην επιπολής. Επενδύει τη νεφρική πύελο, τους ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη, την ανώτερη ουρήθρα και τους προστατικούς αδένες[17]. Λειτουργεί, λόγω της θέσης του, σαν ένας φυσικός φραγμός, με αποτέλεσμα να είναι επιρρεπές σε τραυματισμούς, λοιμώξεις και φλεγμονές, απαιτώντας συνεχή συντήρηση. Επιπλέον, από το ουροθήλιο απελευθερώνονται αγγειοφόρα μόρια και νευροδιαβιβαστές, συμπεριλαμβανομένων της αδενοσίνης και της ακετυλοχολίνης, γεγονός που επιτρέπει την μεταφορά πληροφοριών για την κατάσταση του αυλού της κύστης και του

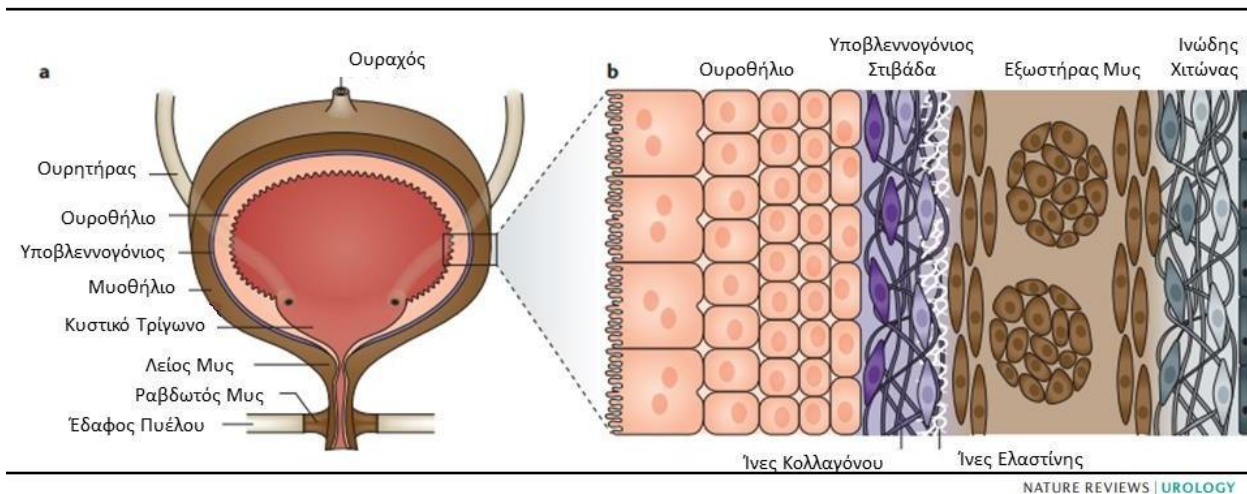
βλεννογόνου στρώματος στους υποκείμενους ιστούς, εμπλέκοντας το νευρικό και το μυϊκό σύστημα[17]. Περιλαμβάνει τρεις κυτταρικές στιβάδες. Τη στιβάδα των βασικών κυττάρων, των ενδιάμεσων κυττάρων και των κυττάρων «ομπρέλα». Η στιβάδα των βασικών κυττάρων περιέχει αρχέγονα αδιαφοροποίητα κύτταρα που έχουν κρίσιμο ρόλο στην αναγέννηση του ουροθηλίου. Η ενδιάμεση στιβάδα δημιουργεί και αντικαθιστά γρήγορα τον ουροθηλιακό ιστό σε περιπτώσεις φλεγμονής ή τραυματισμού[18]. Η στιβάδα των κυττάρων «ομπρέλα» έρχεται σε άμεση επαφή με τα ούρα, καθώς επενδύει τον αυλό του οργάνου και λειτουργεί σαν φραγμός μεταξύ αίματος και ούρων, χάριν στη σύνθεσή του με βλέννη και γλυκοζαμινογλυκάνη και των ισχυρών στενών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά μπορεί να έχουν έναν ή και περισσότερους πυρήνες, είναι πολυεδρικά και η μορφολογία και το σχήμα τους εξαρτώνται από τον βαθμό πλήρωσης της κύστης. Σε κενή κύστη τα κύτταρα «ομπρέλα» είναι κυβοειδή, ενώ σε γεμάτη κύστη αποκτούν την μορφή πλακωδών κυττάρων[19]. Το βλεννογόνο στρώμα της ουροδόχου κύστεως εμφανίζεται με πολλές πτυχώσεις έτσι ώστε να μπορεί να υποβάλλεται σε διαδοχικούς κύκλους πληρώσεων και κενώσεων, διατηρώντας παράλληλα και τον ρόλο του ως λειτουργικός φραγμός κατά τη διάρκεια όλων αυτών των αυξομειώσεων στο μέγεθος του οργάνου[20].

Η υποβλεννογόνια στιβάδα αποτελείται από ίνες ή και δεσμίδες κολλαγόνου (τύπου I και τύπου III) καθώς επίσης από ένα δίκτυο ινών ελαστίνης. Η στιβάδα αυτή περιέχει ένα πυκνό τριχοειδικό πλέγμα (συνδέει τον ιστό με τα αιμοφόρα αγγεία και το νευρικό ιστό), το οποίο διατηρεί την αγγείωση του ουροθηλίου. Η υψηλή ελαστικότητα του αγγειακού πλέγματος διασφαλίζει ότι η πλήρωση της κύστεως δεν αυξάνει την αγγειακή αντίσταση[21]. Έχει επίσης και πλούσιο λεμφικό δίκτυο, το οποίο συμβάλλει στην ανοσολογική άμυνα ενάντια στα παθογόνα που εισβάλλουν στην ουροποιητική οδό[20].

Η μυϊκή στιβάδα του τοιχώματος της ουροδόχου κύστεως, απαρτίζεται από λείες μυϊκές ίνες, νευρώνεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα και συνιστά το 60-70% του τοιχώματος στους υγιείς. Δέσμες μυϊκών ινών, γνωστές και ως δεμάτια, συνθέτουν την πλειοψηφία της μυϊκής στιβάδας και τα δεμάτια περιβάλλονται και διασυνδέονται μεταξύ τους με συνδετικό ιστό πλούσιο σε κολλαγόνο. Αυτά τα επιμήκη και ατρακτοειδή κύτταρα προσδίδουν την λειτουργικότητα στην κύστη κατά την διάρκεια της πλήρωσής της μέσω της ικανότητάς τους να χαλαρώνουν και να επιμηκύνονται και κατά τη διάρκεια της κένωσής της να βραχύνονται μέσω γρήγορων και συγχρονισμένων συσπάσεων. Το μυϊκό τοίχωμα του συγκεκριμένου οργάνου καλείται και εξωστήρας μυς (detrusor muscle) και αποτελείται από εσωτερικές, ενδιάμεσες και εξωτερικές μυϊκές στιβάδες. Τα μυϊκά κύτταρα της εσωτερικής και εξωτερικής στιβάδας παρατίθενται κατά μήκος του οργάνου, τα μυϊκά κύτταρα της ενδιάμεσης στιβάδας προσανατολίζονται κυκλοτερώς[22, 23]. Διακριτές στιβάδες μυϊκών ινών

παρατηρούνται μόνο στην περιοχή του έσω ουρηθρικού σφιγκτήρα, ενώ παρατηρείται ότι στον αυχένα της κύστης και σε ανώτερες μοίρες της ουροδόχου οι μυϊκές δέσμες είναι πιο ομοιόμορφες και στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Συνεπώς η διαδικασία της ούρησης είναι αποτέλεσμα συνδυασμού σύσπασης του συγκεκριμένου μυ και της χαλάρωσης του ουρηθρικού σφιγκτήρα. Ο ουρητήρας διέρχεται λοξά του μυϊκού τοιχώματος, αποτρέποντας έτσι την παλινδρόμηση των ούρων προς τους νεφρούς καθώς η κύστη γεμίζει[24].

Τέλος, ο ορογόνος χιτώνας συνίσταται από συνδετικό ιστό, βρίθκει αιμοφόρων αγγείων και καλύπτει τον θόλο της ουροδόχου κύστεως. Είναι σε συνέχεια με το περιτόναιο του κοιλιακού τοιχώματος. Ο ινώδης χιτώνας, αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό και επενδύει εξωτερικά την κύστη, οριοθετώντας την όπου δεν υπάρχει ο ορογόνος χιτώνας[25].



Εικόνα 1.2: α) Ανατομία και β) Ιστολογία της ουροδόχου κύστεως [20]

1.3 Καρκίνος ουροδόχου κύστεως

1.3.1 Επιδημιολογία καρκίνου ουροδόχου κύστεως

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως (Bladder Cancer, BC) είναι η 10^η πιο συχνή μορφή καρκίνου παγκοσμίως και η 2^η συχνότερη του ουρογεννητικού συστήματος στον ανδρικό πληθυσμό, μετά τον καρκίνο του προστάτη, στις ανεπτυγμένες χώρες.[26] Ο επιπολασμός του φαίνεται να αυξάνεται με σταθερό ρυθμό σε παγκόσμια κλίμακα[27, 28].

Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (GLOBOCAN 2018) εκτιμάται ότι 550.000 νέες περιπτώσεις διαγνώστηκαν παγκοσμίως με καρκίνο ουροδόχου κύστεως,

ενώ σημειώθηκαν 200.000 θάνατοι για το 2018. Τα υψηλότερα ποσοστά του συγκεκριμένου καρκίνου σημειώνονται στη νότια και δυτική Ευρώπη καθώς επίσης και στην βόρεια Αμερική. Το 2019 διαγνώσθηκαν 80.500 περιπτώσεις καρκίνου ουροδόχου κύστεως στις Η.Π.Α., καθιστώντας τον συγκεκριμένο καρκίνο τον 6^ο πιο κοινό στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η Ελλάδα έχει τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως όσον αφορά τον ανδρικό πληθυσμό, ενώ αντίστοιχα ο Λίβανος για τον γυναικείο πληθυσμό. Οι περιοχές με τη μικρότερη συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου καρκίνου είναι η Αφρική και η κεντρική Αμερική, που αποτελούνται σε μεγάλο βαθμό από χώρες με δείκτη ανάπτυξης κάτω του μέσου όρου (Human Development Index, HDI), πιθανά λόγω της μειωμένης έκθεσης σε χημικές ενώσεις της βιομηχανίας και της πρόσβασης στον καπνό[27].

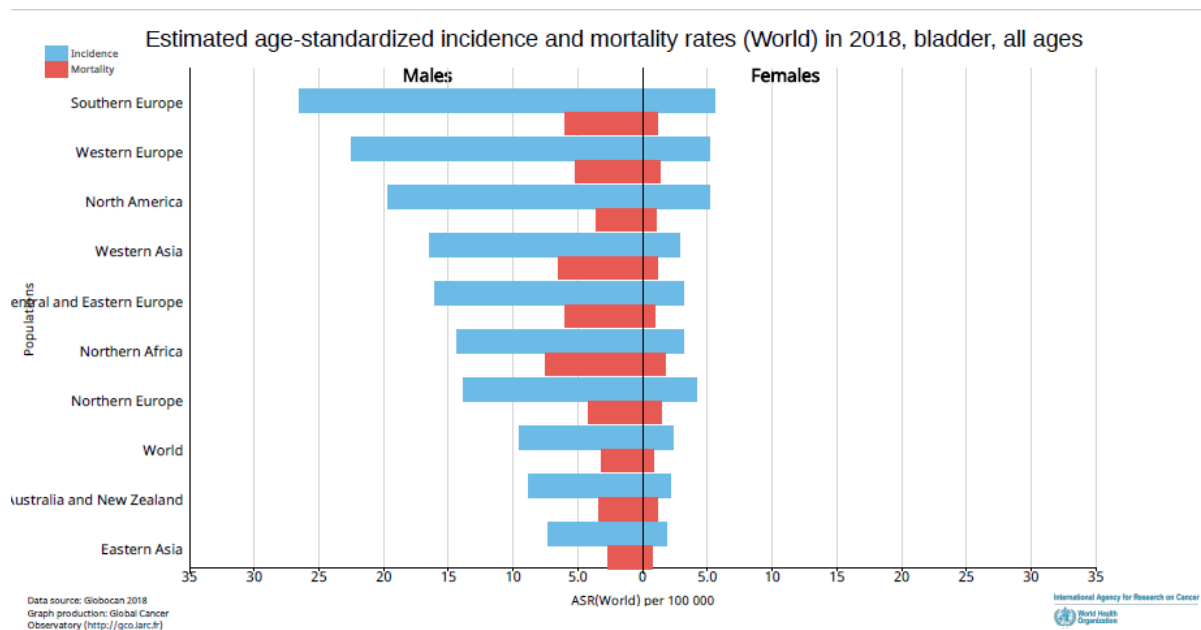
Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως είναι περίπου τέσσερις φορές συχνότερος στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες, γεγονός που καταδεικνύεται από την παγκόσμια επίπτωσή του (9,6/100.000 για τους άντρες και 2,4/100.000 για τις γυναίκες). Στους άνδρες είναι ο 6^{ος} πιο κοινός καρκίνος και η 9^η αιτία θανάτου λόγω κακοήθειας.[27] Αυτή η φυλετική διαφοροποίηση αποδίδεται στην πιθανή διαφορετική συμπεριφορά των δύο φύλων ως προς το κάπνισμα, κάτι που εξηγεί τα αυξανόμενα ποσοστά του καρκίνου στις γυναίκες των ανεπτυγμένων χωρών. Σε γενικές γραμμές, όπως θα αναλυθεί και στο αντίστοιχο χωρίο, το κάπνισμα είναι ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως[29]. Εντούτοις τις τελευταίες δεκαετίες οι διαφορές στα ποσοστά μεταξύ των δυο φύλων έχουν αρχίσει να μειώνονται σημαντικά. Ωστόσο, οι γυναίκες με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι πιθανότερο να εμφανίσουν όγκους προχωρημένου σταδίου τοπικά, ενώ παράλληλα σχετίζονται με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής της νόσου και αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας κατόπιν συγκεκριμένης θεραπευτικής αγωγής[30].

Ο επιπολασμός της συγκεκριμένης νόσου, καθώς και η πιθανότητα υποτροπής της και η επικείμενη θνησιμότητα αυξάνονται με την ηλικία. Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως εμφανίζεται σε ένα μεγάλο εύρος ηλικιών, ωστόσο η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου είναι τα 69 έτη στους άνδρες και τα 71 στις γυναίκες[31]. Σπάνιες είναι οι περιπτώσεις εμφάνισης του σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες (<40 ετών), όπου θα πρόκειται συνήθως για καλής διαφοροποίησης, μη διηθητικές κακοήθειες[32]. Έχουν καλύτερη πρόγνωση, αλλά όπως αποτυπώνεται τον ίδιο κίνδυνο προόδου της νόσου, για όλους τους βαθμούς διαφοροποίησης, με τους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας[33]. Στους ηλικιωμένους ασθενείς τα ποσοστά θνησιμότητας είναι υψηλότερα, κυρίως λόγω ανάπτυξης πιο επιθετικών μορφών καρκίνου που συνήθως αποδίδονται σε μη έγκαιρη διάγνωση και σε αδυναμία εφαρμογής πιο «επιθετικής» θεραπείας[33].

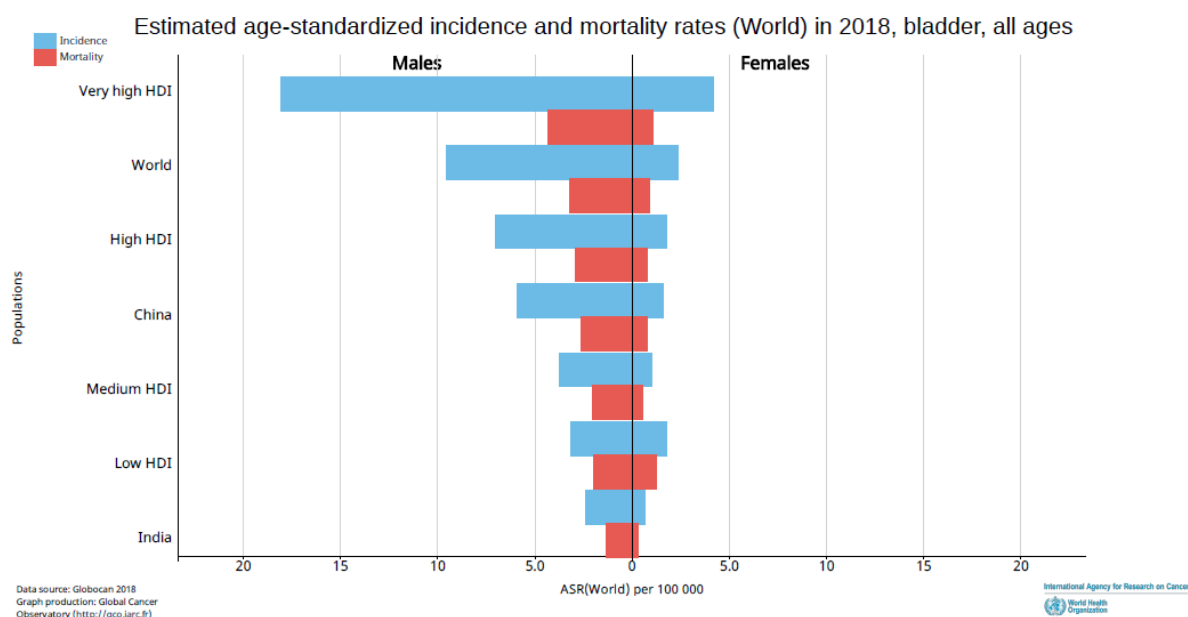
Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως θεωρείται 13^η αιτία θανάτου λόγω κακοήθειας σε παγκόσμια κλίμακα. Τα ποσοστά θνησιμότητας αντανακλούν την φυλετική διαφοροποίηση που αποτυπώνεται στην επίπτωση του συγκεκριμένου καρκίνου. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα θνησιμότητας στους άντρες ανέρχονται στους 3,2/100.000 θανάτους που είναι περίπου τέσσερις φορές υψηλότερα από τα επίπεδα θνησιμότητας των γυναικών (0,9/100.000 θανάτους). Τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας εμφανίζονται στη βόρεια και ανατολική Αφρική και στη Μέση Ανατολή, με μέγιστα στην Αίγυπτο (6,6/100.000)[27].

Στις Η.Π.Α. το 2019 σημειώθηκαν 17.600 θάνατοι από τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Παρ' όλο που η επίπτωση του συγκεκριμένου καρκίνου έχει μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες στις Η.Π.Α., η θνησιμότητά του έχει παραμείνει σταθερή, στους 4,4/100.000 θανάτους, από το 1987, παρόλη την βελτίωση στην έγκαιρη διάγνωση, στην κυστεκτομή και τη θεραπεία.[34] Αποτελεί την 8^η αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες, κακοήθους αιτιολογίας[35].

Βέβαια, σε παγκόσμια κλίμακα, παρά την αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, έχουν μειωθεί τα ποσοστά της αντίστοιχης θνησιμότητας, με εξαίρεση την Ισλανδία, το Εκουαδόρ και τις Φιλιππίνες[36].



Εικόνα 1.3: Τα επίπεδα επίπτωσης και θνησιμότητας λόγω του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, σε παγκόσμια διασπορά και για τα δύο φύλα. Έως Δεκέμβριος 2020. (<https://gco.iarc.fr/>)



Εικόνα 1.4: Τα επίπεδα επίπτωσης και θνησιμότητας λόγω του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, ως προς τον δείκτη ανάπτυξης (HDI) και για τα δύο φύλα. Έως Δεκέμβριος 2020.

(<https://gco.iarc.fr/>)

1.3.2 Παράγοντες Επικινδυνότητας

Ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου που αφορά τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι το κάπνισμα, το οποίο εκτιμάται να εμπλέκεται στο 66% νέων περιστατικών στους άντρες και στο 30% στις γυναίκες στις βιομηχανικές περιοχές[37, 38]. Οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν τον συγκεκριμένο καρκίνο έχουν προσδιορίσει την ύπαρξη αντίστοιχου κινδύνου από 3 έως 4 φορές στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Ο σχετικός κίνδυνος θνησιμότητας κακοήθους αιτιολογίας λόγω καπνίσματος που αφορά τον καρκίνο ουροδόχου κύστεως ανέρχεται δεύτερος μετά τον αντίστοιχο για τον καρκίνο του πνεύμονα[39, 40].

Το κάπνισμα φαίνεται να επηρεάζει το ίδιο άντρες και γυναίκες, καθώς και άτομα διαφορετικών εθνοτήτων. Έχει παρατηρηθεί μια άμεση μείωση κινδύνου, της τάξης του 40%, για την εκδήλωση του συγκεκριμένου καρκίνου στα άτομα που σταμάτησαν την κατανάλωση καπνού μέχρι τα τέσσερα πρώτα έτη και ολοκληρωτική απαλοιφή κινδύνου λόγω καπνίσματος μέχρι τα 20 έτη από τη διακοπή του. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της επίπτωσης του καρκίνου και της διάρκειας έκθεσης του ατόμου στον καπνό[41]. Τέλος, έχει προσδιοριστεί ότι η παθητική έκθεση στον καπνό των μη καπνιζόντων ατόμων αυξάνει τον κίνδυνο επίπτωσης της νόσου κατά 22%, σε σχέση με τους μη καπνίζοντες που δεν έχουν εκτεθεί στον καπνό[42].

Στον καπνό εμπεριέχονται διάφορα γνωστά καρκινογόνα συστατικά, όπως πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, βενζιδίνη, 4-αμινοδιφαινύλιο, β-ναφθυλαμίνη και 4-χλωρο-ο-τολουιδίνη, τα

οποία σχετίζονται με την αύξηση κινδύνου επίπτωσης λόγω του καπνίσματος[43]. Οι ενώσεις αυτές, βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα ούρα, επάγουν την ανάπτυξη φλεγμονής και ο μεταβολισμός τους τον σχηματισμό «προσθέτων» με το DNA (DNA-adducts) ουσιών και εν τέλει μόνιμες γενετικές μεταλλάξεις. Τέτοιες μεταλλάξεις μπορούν να ενεργοποιήσουν ογκογονίδια ή να απενεργοποιήσουν ογκοκατασταλτικά γονίδια, προωθώντας την καρκινογένεση. Συγκεκριμένοι γονότυποι που έχουν να κάνουν με τη μη φυσιολογική λειτουργία αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι πιο επιρρεπείς στην ανάπτυξη κακοήθειας μεταξύ των ατόμων που καπνίζουν[44].

Ο δεύτερος ισχυρότερος και τεκμηριωμένος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο ουροδόχου κύστεως είναι η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες λόγω κυρίως φύσης επαγγέλματος, συμπεριλαμβανομένων των αρωματικών αμινών, των αρωματικών πολυκυκλικών υδρογονανθράκων και των χλωριωμένων υδρογονανθράκων[45]. Τα συστατικά αυτά βρίσκονται ευρέως σε βιομηχανικά προϊόντα, όπως βαφές, μέταλλα, προϊόντα καουτσούκ και προϊόντα πετρελαίου[41]. Πέραν των εργαζομένων που εκτίθενται στα παράγωγα αυτά κατά την παραγωγή των προϊόντων, άλλα επαγγέλματα αυξημένης έκθεσης είναι οι πυροσβέστες, οι κομμωτές και οι γεωργοί, οι οποίοι χρησιμοποιούν μυκητοκτόνα. Συνολικά, η έκθεση σε τέτοιου τύπου χημικά παράγωγα εκτιμάται να ευθύνεται για το 18% των νέων συμβάντων καρκίνου ουροδόχου κύστεως. Φαινομενικά, η έκθεση για δύο χρόνια σε αυτούς τους παράγοντες είναι αρκετή για την αύξηση κινδύνου, η νόσος, ωστόσο, συχνά δεν αναπτύσσεται παρά με το πέραν δεκαετιών έκθεσης, όπως συμβαίνει και με το κάπνισμα.[46] Τα τελευταία χρόνια βέβαια η έκθεση των εργαζομένων σε αυτούς τους παράγοντες έχει μειωθεί στις βιομηχανίες, καθώς λαμβάνονται πιο εντατικά μέτρα ατομικής προστασίας[41].

Ένας ακόμη παράγοντας που σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ουροδόχου κύστεως είναι κατανάλωση υγρών και συγκεκριμένα η κατανάλωση νερού με ποσότητες αρσενικού [47] και παραπροϊόντων χλωρίωσης[48]. Κατά την χλωρίωση του πόσιμου νερού παράγονται τριαλογονομεθάνια, τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί ως καρκινογόνες ουσίες[41]. Σε μικρότερο βαθμό έχουν ενοχοποιηθεί η ακτινοθεραπεία και η κατανάλωση αναλγητικών και φαρμακευτικών παραγόντων, όπως η κυκλοφωσφαμίδη –αλκυλιωτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται στις λευχαιμίες και τα λεμφώματα- και η πιογλιταζόνη –ένα αντιδιαβητικό φάρμακο[41]. Τέλος η παχυσαρκία,[49] οι χρόνιες ουρολοιμώξεις και οι κυστίτιδες καθώς και η σχιστοσωμίαση επιδρούν με τον τρόπο τους στην αύξηση του κινδύνου επίπτωσης για τον συγκεκριμένο καρκίνο[26].

Πιο αναλυτικά το πρωτόζωο *Schistosoma haematobium*, το οποίο μολύνει ~240 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, προκαλεί την σχιστοσωμίαση, η οποία έχει ενοχοποιηθεί ισχυρά για την εμφάνιση καρκίνου ουροδόχου κύστεως[50]. Τα καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου της

ουροδόχου κύστης (Squamous Cell Carcinoma, SCC) είναι η δεύτερη πιο κοινή μορφή καρκίνου στις περιοχές της Μέσης Ανατολής και της Αφρικής, όπου η σχιστοσωμίαση είναι ενδημική ασθένεια[51]. Στις περιοχές αυτές, η μέση ηλικία διάγνωσης του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι τα 40-49 έτη. Η λοίμωξη της ουροδόχου κύστεως από το πρωτόζωο αυτό προκαλεί επακόλουθες βακτηριακές λοιμώξεις, φλεγμονώδη αντίδραση, ενδογενή σύνθεση N-νιτροζαμινών και δραστικές ρίζες οξυγόνου που επάγουν φθορές στο DNA[52]. Η συγκεκριμένη ασθένεια φαίνεται να έχει ταχύτερο αντίκτυπο στην επίπτωση του καρκίνου συγκριτικά με το κάπνισμα και την έκθεση σε χημικούς παράγοντες και μπορεί να αποφευχθεί με την λήψη κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής[50].

Πέραν από τους επίκτητους παράγοντες κινδύνου υπάρχουν και οι γενετικοί, οι οποίοι ευθύνονται για τις οικογενείς μορφές του καρκίνου. Οι μορφές αυτές είναι πιο σπάνιες, αλλά εάν ένα άτομο έχει συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο στην ουροδόχο κύστη τότε παρουσιάζει 50-100% αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξει κα εκείνο, συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό[53]. Ο σχετικός κίνδυνος αυξάνεται εάν γίνεται και παράλληλη κατανάλωση καπνού[54]. Μέσω της διεξαγωγής μελετών συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies - GWAS) έχουν προσδιοριστεί διάφοροι γενετικοί τόποι που έχουν βρεθεί να αυξάνουν την επιρρέπεια στην εμφάνιση του συγκεκριμένου καρκίνου[55]. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται το MYC (πρωτεΐνη του πρωτο-ογκογονιδίου MYC) , ένας μεταγραφικός παράγοντας με συχνή ογκογονική δράση,[56, 57] το NAT2 (N-ακετυλοτρανσφεράση 2), ένας παράγοντας ακετυλίωσης που εξουδετερώνει τις αρωματικές αμίνες [58] και το GSTM1 (γλουταθειόνη S τρανσφεράση M1), ένα ένζυμο που συμμετέχει στην αποτοξίνωση των περιβαλλοντικών καρκινογόνων[59, 60]. Τα NAT2 και GSTM1 φαίνεται να έχουν συνεργική αλληλεπίδραση στην εξέλιξη της καρκινογένεσης με κύριο παράγοντα κινδύνου το κάπνισμα[61].

Ενώ ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως δεν είναι συνήθως κληρονομικός, ορισμένα σύνδρομα καθίστανται ικανά μέσω της μοριακής τους βάσης να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου. Για παράδειγμα, χαρακτηριστικό του συνδρόμου Cowden είναι μια κληρονομική μετάλλαξη στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN*, η οποία προδιαθέτει για ένα εύρος νεοπλασμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκινώματος εκ πλακώδους επιθηλίου[62]. Ένα ακόμη παράδειγμα είναι το σύνδρομο Lynch, όπου μεταλλαγές στο *MSH2* γονίδιο, το οποίο συμμετέχει σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, σχετίζονται με τον κληρονομικό μη πολυποδιακό ορθοκολικό καρκίνο και με την αύξηση κινδύνου εμφάνισης καρκίνου ουροδόχου κύστεως[63].

1.3.3 Παθολογία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

1.3.3.1 Ιστολογική Ταξινόμηση

Βάσει του Εθνικού Ινστιτούτου για τον Καρκίνο, (<https://www.cancer.gov>) ως νεόπλασμα θεωρείται μία ανώμαλη μάζα ιστού που σχηματίζεται λόγω του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή της απώλειας της ιδιότητας του κυτταρικού θανάτου. Τα νεοπλάσματα διακρίνονται σε καλοήγη και κακοήγη.

Τα καλοήγη νεοπλάσματα είναι καλά διαφοροποιημένα και αναπτύσσονται τοπικά. Εάν η μάζα συνεχίσει να αναπτύσσεται και να αυξάνει σε μέγεθος έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πιεστικών προβλημάτων στη γύρω περιοχή. Δεν διηθούν γειτονικούς ιστούς και δεν διασπείρονται σε νέες ανατομικές θέσης στο υπόλοιπο σώμα, συνεπώς δεν κάνουν μεταστάσεις και υποτροπές και είναι συνήθως ιάσιμα. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι είναι οριοθετημένα και περιγεγραμμένα από μια κάψα και τα νεοπλασματικά κύτταρα μοιάζουν με το μητρικό ιστό[64]. Τα νεοπλάσματα αυτά έχουν συνήθως την κατάληξη -ωμα, όπως για παράδειγμα το αδένωμα, το ινοδοαδένωμα, το λειομύωμα και το λίπωμα[65].

Στα κακοήγη νεοπλάσματα, τα οποία καλούνται και καρκινικοί όγκοι, οι αλλαγές στην κυτταρική προσκόλληση, την «κινητικότητα» και την παραγωγή πρωτεασών επιτρέπουν στα κύτταρα του πρωτογενούς όγκου να αποκολλώνται και να διηθούν τους γύρω ιστούς, με αποτέλεσμα να περνούν εν τέλει στην αιματική ή τη λεμφική κυκλοφορία και να δημιουργούν μεταστάσεις, δηλαδή εστίες δευτερογενούς όγκου. Όντας επιθετικά είναι δύσκολο να θεραπευτούν, υποτροπιάζουν συχνά και πολλές φορές είναι και θανατηφόρα. Δεν είναι καλά διαφοροποιημένα, δεν περιβάλλονται από κάψα και έχουν απωλέσει την ομοιότητά τους με το μητρικό ιστό. Ο ρυθμός ανάπτυξής του κακοήθους όγκου είναι κατά κόρον αυξημένος. Επίσης, δεν ανταποκρίνεται στα σήματα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και έχει την ικανότητα επαγωγής της αγγείωσής του[64]. Τα κακοήγη νεοπλάσματα συνήθως έχουν την κατάληξη -καρκίνωμα (π.χ. αδenoκαρκίνωμα) ή -σάρκωμα (π.χ. λειομυοσάρκωμα)[65].

Όσον αφορά τα νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστεως εμπλέκεται πλειοψηφικά το ουροθήλιο, δηλαδή το χαρακτηριστικό μεταβατικό επιθήλιο που επενδύει εσωτερικά το βλεννογόνο στρώμα του οργάνου. Συνοπτικά, απαρτίζεται από 3-7 στίχους κυττάρων και στην κατώτερη στιβάδα του είναι τα βασικά κύτταρα. Σε επαφή με τα ούρα έρχονται τα κύτταρα «ομπρέλα». Τα κύτταρα του ουροθηλίου έχουν διακριτή πολικότητα, μιας και οι πυρήνες των κυττάρων του διευθετούνται κάθετα στη βασική μεμβράνη. Ιστολογικά έχουν παρατηρηθεί διάφορες αλλοιώσεις του επιθηλίου. Κάποιες χαρακτηρίζονται από μορφή θηλωμάτων, ενώ κάποιες άλλες όχι, κάποιες διηθούν το μυϊκό χιτώνα,

ενώ κάποιες άλλες όχι. Κάποιες επίπεδες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις είναι η υπερπλασία, η ατυπία, η δυσπλασία και η μετάπλαση του μεταβατικού επιθηλίου[66].

Ιστορικά, ο όρος υπερπλασία έχει εξισωθεί με το μέτρημα των κυτταρικών στίχων του ουροθηλίου, το οποίο θεωρείται υπερπλαστικό εάν οι κυτταρικές στιβάδες ξεπερνούν τις επτά. Πλέον υπερπλαστικό, θεωρείται το ουροθήλιο που παρουσιάζει πυκνά διευθετημένο βλεννογόνο χωρίς όμως ατυπία. Η υπερπλασία μπορεί να έχει ψευδείς θηλώδεις δομές, ενώ συμμετέχει στην διαδικασία απόκρισης στη φλεγμονή[67]. Στην ατυπία το επιθήλιο μπορεί να εμφανίζεται πυκνότερο ή και όχι. Οι πυρήνες των κυττάρων είναι διογκωμένοι και έχουν συνήθως κεντρικά εμφανή πυρηνοειδή. Μικροσκοπικά παρατηρούνται συχνά κύτταρα σε μίτωση, τα οποία ανήκουν στα κατώτερα στρώματα του επιθηλίου. Η φλεγμονώδης αντίδραση είναι σχεδόν πάντα ορατή[67]. Στη δυσπλασία τα κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους και οι πυρήνες τους είναι ακανόνιστα μεγεθυμένοι, έντονα ηλεκτρονιόπυκνοι και πλειομορφικοί. Ιστολογικά θυμίζει μια ενδιάμεση εικόνα μεταξύ φυσιολογικού επιθηλίου και καρκινώματος *in situ*[67]. Τέλος, με τον όρο μετάπλαση γίνεται αναφορά στην κατά τόπους αλλαγή του ουροθηλίου από μεταβατικό σε πλακώδες (πλακώδης μετάπλαση) ή αδενικό (αδενική μετάπλαση)[66].

Διευκρινιστικά, τα θηλώματα που αναφέρθηκαν είναι επιφανειακοί όγκοι της ουροδόχου κύστεως και μοιάζουν με μικρά δέντρα ή πολύποδες. Επεκτείνονται τόσο προς τον αυλό όσο και προς τα βαθύτερα στρώματα, καθώς συνδέεται με το ουροθήλιο μέσω ενός αγγειοσυνδετικού άξονα. Οι μορφές αυτές παρατηρούνται συχνότερα σε υπερπλαστικές και μεταπλαστικές αλλοιώσεις του ουροθηλίου[68].

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως μπορεί να διακριθεί και βάσει της διήθησης ή μη της μυϊκής στιβάδας του οργάνου, δηλαδή σε διηθητικό (Muscle Invasive Bladder Cancer – MIBC) και σε μη διηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (Non Muscle Invasive Bladder Cancer – NMIBC) αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, στους ασθενείς με μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως ο όγκος είναι περιορισμένος στο επιφανειακό στρώμα του οργάνου και τις περισσότερες φορές θεραπεύεται. Αντιθέτως, στο διηθητικό τύπου καρκίνο, επειδή ο όγκος εισχωρεί στη μυϊκή στιβάδα του οργάνου, θεωρείται πιο επιθετικός και ικανός να κάνει πιθανή μετάσταση στους λεμφαδένες ή σε άλλα όργανα. Περίπου το 75% των νεοδιαγεγνωσμένων ασθενών με τον συγκεκριμένο καρκίνο, πρόκειται για NMIBC, ενώ το υπόλοιπο 20-25% έχει MIBC ή μεταστατικό καρκίνο, συνεπώς η πλειοψηφία των όγκων είναι επιθηλιακής προέλευσης[41]. Υπάρχει, ακόμη, ένα ποσοστό της τάξης του 5-10% που αφορά επίπεδες αλλοιώσεις, χαμηλής διαφοροποίησης στο βλεννογόνο στρώμα της κύστης, οι οποίες χαρακτηρίζονται και ως καρκίνωμα *in situ*[69]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) και το Εθνικό Γενικό Αντικαρκινικό Δίκτυο των

ΗΠΑ (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) συνίσταται η διάκριση των όγκων της ουροδόχου κύστεως σε τέσσερεις βασικούς ιστολογικούς τύπους [70] :

1. Καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου (Transitional Cell Carcinoma /TCC)
2. Καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου (Squamous Cell Carcinoma /SCC)
3. Αδενοκαρκίνωμα (Adenocarcinoma)
4. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα (Small cell carcinoma)

Καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου: ονομάζεται και ουροθηλιακό καρκίνωμα και αποτελεί περίπου το 90% των όγκων της ουροδόχου κύστεως στις δυτικές χώρες[71]. Απεικονιστικά εμφανίζονται είτε ως περιοχές πάχυνσης του τοιχώματος της κύστης τοπικά είτε ως μάζες που εκτείνονται προς τον αυλό του οργάνου ή σε πιο προχωρημένα στάδια προς τους παρακείμενους ιστούς. Στο μικροσκόπιο χαρακτηριστική είναι η παρουσία μεγαλύτερου -από το φυσιολογικό- αριθμού κυτταρικών στίχων του επιθηλίου και θηλωδών πτυχώσεων του βλεννογόνου στρώματος. Επίσης, διακρίνεται η απώλεια της κυτταρικής πολικότητας, η μη φυσιολογική ωρίμανση των κυττάρων από τη βασική προς την κορυφαία στιβάδα, ο αυξημένος λόγος του πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα, η παρουσία πυρηνίσκου, η συμπύκνωση της χρωματίνης και ο αυξημένος αριθμός κυττάρων στη φάση της μίτωσης[72]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας οι ουροθηλιακοί καρκίνοι ταξινομούνται σε 13 διαφορετικές ιστολογικές παραλλαγές με διαφορετική πρόγνωση η καθεμία[73]. Ωστόσο, με βάση το μοτίβο ανάπτυξης του όγκου, τα καρκινώματα αυτά μπορούν να διακριθούν σε ενδοεπιθηλιακά (in situ), επιφανειακά θηλώδη και διηθητικά καρκινώματα[74].

Τα ενδοεπιθηλιακά καρκινώματα (CIS) είναι επίπεδα, μη μυοδιηθητικά νεοπλάσματα με υψηλή τάση εξέλιξης. Τα φυσιολογικά κύτταρα του επιθηλίου αντικαθίστανται από καρκινικά κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από πυρηνικό πλειομορφισμό, χρωματίνη υψηλής συμπύκνωσης, πυρηνίσκους και αυξημένο αριθμό φυσιολογικών και μη μιτώσεων. Εντοπίζονται στο στρώμα του βλεννογόνου και κάποιες φορές με περισσότερες από μία εστίες. Τα CIS μπορεί να αποτελούν πρωτογενείς ή και δευτερογενείς αλλοιώσεις του επιθηλίου, αλλά και να εμφανιστούν παράλληλα με κάποια άλλη μορφή ουροθηλιακής κακοήθειας. Εάν δεν ληφθεί η κατάλληλη θεραπεία, τα καρκινώματα αυτά μπορεί να εξελιχθούν σε μυοδιηθητικά στο 50% των ασθενών εντός του χρονικού πλαισίου των 5 ετών και να υποτροπιάσει η νόσος στο 90% των ασθενών. Ενέχει, επομένως, τον κίνδυνο δημιουργίας μεταστάσεων[75].

Τα επιφανειακά θηλώδη καρκινώματα είναι όγκοι που περιορίζονται στο ουροθήλιο. Έχουν ένα εξωφυτικό μέρος που εκβάλλει στον αυλό της κύστης, έχοντας θηλωματώδη διάταξη. Συνήθως

περιορίζεται μέχρι τη βασική μεμβράνη του βλεννογόνου, αλλά μπορεί να επεκταθεί και στην υποβλεννογόνο στιβάδα. Παρ' όλα αυτά δεν διηθεί το μυϊκό χιτώνα του οργάνου[76].

Τα διηθητικά καρκινώματα διηθούν τον εξωστήρα μυ της ουροδόχου κύστεως και μπορεί να εκτείνονται και πέρα από αυτόν. Οι όγκοι αυτοί είναι συχνά χαμηλής διαφοροποίησης και έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τα μη μυοδιηθητικά νεοπλάσματα, καθώς είναι πιθανότερο να κάνουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες ή σε άλλα όργανα[77].

Καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου: δεν αποτελεί συνήθη τύπο καρκίνου της ουροδόχου κύστεως στο δυτικό κόσμο, καθώς αντιπροσωπεύει περίπου το 3% των περιπτώσεων[78]. Ωστόσο, στις περιοχές όπου η σχιστοσωμίαση είναι ενδημική αποτελεί την πιο κοινή μορφή του συγκεκριμένου καρκίνου. Το εν λόγω καρκίνωμα είναι περισσότερο επιθετικό από το ουροθηλιακό[79]. Έχει εξωφυτική μορφή, μπορεί να ποικίλει ως προς τον βαθμό διαφοροποίησης και ο μυϊκός ιστός σχεδόν πάντα είναι διηθημένος τη στιγμή της διάγνωσης. Χαρακτηριστικό του είναι η αυξημένη παρουσία κερατίνης στα πλακώδη κύτταρα και τις διακυτταρικές γέφυρες, ενδείξεις που συνεπάγονται με την κακή πρόγνωση. Τα κύτταρα επίσης έχουν πολυγωνική μορφή και πλούσιο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα[80].

Αδενοκαρκίνωμα: είναι μία σπάνια μορφή του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, καθώς αντιπροσωπεύει το 0,5-2% των περιπτώσεων στις Η.Π.Α. και παρουσιάζεται συνήθως σε ασθενείς μικρότερης ηλικίας[81]. Σχεδόν όλα τα αδενοκαρκινώματα είναι διηθητικά τη στιγμή της διάγνωσης τους. Ο όγκος μπορεί να είναι πρωτογενής ή πιθανότερα δευτερογενής[82]. Τα πρωτοπαθή προέρχονται από το ουροθήλιο, αλλά έχουν ξεκάθαρο αδενικό φαινότυπο, ενώ τα δευτερογενή προκύπτουν συνήθως λόγω μετάστασης από άλλη εστία –συνήθως από το παχύ έντερο, τον προστάτη, το ενδομήτριο, το μαστό και τον πνεύμονα[82]. Στα πρωτοπαθή, το 1/3 του συνόλου αναπτύσσεται από τον ουραχό και τα υπόλοιπα 2/3 από το ουροθήλιο. Στο μικροσκόπιο διακρίνονται διάφορα μορφολογικά μοτίβα, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» (signet ring cell), τα οποία διηθούν το τοίχωμα του οργάνου[83].

Μικροκυτταρικό καρκίνωμα: πρόκειται για μία σπάνια μορφή κακοήθειας, καθώς αντιπροσωπεύει το 1% των ασθενών που έχουν υποβληθεί σε κυστεκτομή και περίπου το 0,5% όλων των περιστατικών καρκίνου ουροδόχου κύστεως[78, 84]. Θεωρείται ένα επιθετικό, χαμηλής διαφοροποίησης νευρο-ενδοκρινικό νεόπλασμα με κακή πρόγνωση. Προέρχεται από το βλεννογόνο και συνήθως διηθεί το τοίχωμα της κύστης μέχρι τα πιο βαθιά στρώματα. Τα κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλό βαθμό συνεκτικότητας, έχουν στρογγυλό ή οβάλ σχήμα και στερούνται ποσότητας

κυτταροπλάσματος. Παρατηρούνται επίσης, η εκτεταμένη θραυσματοποίηση της χρωματίνης, η αλληλοεπικάλυψη πυρήνων (molding) και η σύνθλιψη των κυττάρων (crush artifact)[85].

1.3.3.2 Σταδιοποίηση-Διαφοροποίηση

Όπως και στη διαχείριση κάθε κακοήθους νεοπλάσματος, έτσι και στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως ο προσδιορισμός του παθολογικού σταδίου, μέσω ενός συστήματος ταξινόμησης, είναι αδήριτη προϋπόθεση για την εκτίμηση της πρόγνωσης των διαφόρων ασθενών και της επιλογής της κατάλληλης θεραπευτικής στρατηγικής. Οι κυρίαρχες μεταβλητές που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της εξέλιξης και της υποτροπής της νόσου αλλά και της επιβίωσης των ασθενών είναι ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (Grade) και ο βαθμός διήθησης του όγκου (TNM σύστημα)[86].

Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (Grade): Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 40 χρόνων, έχουν προταθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησης του παθολογικού σταδίου στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Ένα από τα περισσότερο αποδεκτά είναι το σύστημα που προτάθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 1973 (WHO 1973). Σύμφωνα με το σύστημα αυτό, οι όγκοι διαφοροποιούνται βάσει του βαθμού κυτταρικής και αρχιτεκτονικής ατυπίας σε Grade I, II και III[87].

- Grade I: Πρόκειται για καρκινώματα θηλωματώδους μορφής, όπου τα κύτταρα του ουροθηλίου είναι καλά διευθετημένα και μοιάζουν με τα φυσιολογικά. Εμφανίζουν ισχνά θηλώματα με ελάχιστο βαθμό ανωμαλίας. Οι εικόνες μιτώσεων και νέκρωσης κυττάρων σχεδόν απουσιάζουν, όπως και ο πυρηνικός πλειομορφισμός. Η χρωματίνη εμφανίζεται ακέραια, με φυσιολογικό βαθμό συμπύκνωσης. Μπορεί να παρατηρηθεί μικρή αύξηση του αριθμού των κυτταρικών στοιχείων του μεταβατικού επιθηλίου[86].
- Grade II: Στην ομάδα αυτή συγκαταλέγονται διάφοροι τύποι μη μυοδιηθητικών όγκων. Η αρχιτεκτονική και η κυτταρική ατυπία καλύπτει ένα ευρύ φάσμα αλλοιώσεων μεταξύ εκείνων που παρατηρούνται στους βαθμούς Grade I και III. Τα θηλώματα είναι παχύτερα από αυτά του προηγούμενου σταδίου, μειώνεται ο βαθμός διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων και σημειώνεται συμπύκνωση της χρωματίνης. Η ποικιλία στην πολικότητα των κυττάρων και τα χαρακτηριστικά του πυρήνα αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την επιλογή κατάλληλης θεραπείας. Για τον λόγο αυτό, κάποιοι συγγραφείς πρότειναν την διάκριση των Grade II όγκων σε Grade IIa και Grade IIb υποκατηγορίες, βάσει του πυρηνικού πλειομορφισμού και του αριθμού των μιτώσεων[88, 89].
- Grade III: Στους όγκους αυτής της ομαδοποίησης μπορεί να διηθούνται όλα τα τοιχώματα του οργάνου. Η αρχιτεκτονική και κυτταρική ετερογένεια είναι τυπικά ευρήματα. Διακρίνονται κύτταρα στη φάση της μίτωσης σε όλο το ουροθήλιο, ακόμη και στα κορυφαία στρώματα, όπως

επίσης και νεκρωτικά κύτταρα. Παρατηρείται αύξηση του αριθμού των διάφορων κυτταρικών τύπων, αλληλοεπικάλυψη πυρήνων και απώλεια του βαθμού διαφοροποίησης. Η πυρηνική μεμβράνη εμφανίζεται με ακανόνιστο σχήμα, ενώ συχνά εντοπίζονται και νεοπλασματικά γιγαντοκύτταρα. Η χρωματίνη παρουσιάζει υψηλό βαθμό θραυσματοποίησης και είναι συχνή η εμφάνιση ευδιάκριτου πυρηνίσκου[86].

Το 1998 ο WHO με την Διεθνή Εταιρεία Ουρολογικής Παθολογίας (International Society of Urological Pathology, ISUP) διέκρινε τα ουροθηλιακά νεοπλάσματα σε θηλωματώδη (papillary) και σε θηλωματώδη νεοπλάσματα χαμηλού δυναμικού κακοήθειας (papillary urothelial neoplasms of low malignant potential, PUNLMP)[68]. Επακολούθως, το PUNLMP συμπεριλήφθηκε στο ταξινομικό σύστημα του WHO το 2004, το οποίο συμπεριέλαβε και τις κατηγορίες καρκινωμάτων χαμηλού (low-grade, LG) και υψηλού (high-grade, HG) βαθμού κακοήθειας, ομάδες που διατηρήθηκαν και στο αντίστοιχο σύστημα του WHO το 2016[70].

Το WHO/ISUP 1998 σύστημα ταξινόμησης εισήγαγε, επίσης, την περιγραφή και το διαχωρισμό της υπερπλασίας και των επίπεδων αλλοιώσεων στην ουροδόχο κύστη. Το WHO 2016 σύστημα είναι βασισμένο στα κριτήρια των WHO/ISUP 1998 και WHO 2004 συστημάτων. Σύμφωνα με αυτό οι μη μυοδιαθητικοί όγκοι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε χαμηλό και υψηλό βαθμό κακοήθειας, ενώ οι όγκοι που διηθούν τον εξωστήρα μυ της κύστης αντιμετωπίζονται όλοι ως όγκοι υψηλού βαθμού κακοήθειας[86].

Το PUNLMP νεόπλασμα εμφανίζεται κυρίως σε νεαρούς ασθενείς. Το εξωφυτικό του μέρος είναι λεπτό, ενώ η κυτταρική ατυπία απουσιάζει ή εμφανίζεται σε ελάχιστο βαθμό. Η πολικότητα των κυττάρων διατηρείται, το μέγεθος του πυρήνα μπορεί να είναι αυξημένο και κύτταρα στη φάση της μίτωσης εντοπίζονται μόνο προς τα βασικά στρώματα του βλεννογόνου. Έχει καλή πρόγνωση, υπάρχει ο κίνδυνος υποτροπής, αλλά ο κίνδυνος εξέλιξης είναι χαμηλός και ως εκ τούτου δεν θεωρούνται αμιγώς καλοήθεις αλλοιώσεις, όπως τα θηλώματα[86].

Τα μη μυοδιαθητικά, χαμηλού βαθμού κακοήθειας καρκινώματα χαρακτηρίζονται από ευδιάκριτα θηλώματα και μερική διαταραχή στην κυτταρική συνοχή. Η μίτωση είναι σπάνιο εύρημα, τα κύτταρα του ουροθηλίου μπορεί να παρουσιάζουν ποικιλία στην πολικότητα και ευμεγέθεις πυρήνες. Από την άλλη, μερικά μη μυοδιαθητικά καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας μπορεί να χαρακτηρίζονται από πλήρη αρχιτεκτονική αποδιοργάνωση. Σημαντική ένδειξη είναι η πυρηνική ατυπία, όπου ο πυρήνας έχει έναν ευδιάκριτο πυρηνίσκο, είναι πλειομορφικός και βρίσκεται συχνά στη φάση της μίτωσης. Το πάχος του ουροθηλίου δεν είναι ομοιόμορφο και ποικίλει σημαντικά, ενώ οι θηλές είναι συντηγμένες και παρουσιάζουν άναρχη ανάπτυξη[86].

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση WHO 2004/2016 [90, 91]

Επίπεδες αλλοιώσεις	Θηλωματώδεις αλλοιώσεις
Υπερπλασία	Ουροθηλιακό θήλωμα
Αντιδραστική ατυπία	Θηλωματώδεις νεόπλασμα χαμηλού δυναμικού κακοήθειας (PUNLMP)
Ατυπία άγνωστης σημαντικότητας	Καρκίνωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (Low-grade)
Δυσπλασία ουροθηλίου	Καρκίνωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας (High-grade)
Ουροθηλιακό καρκίνωμα in situ	

1998, 2004, 2016 WHO/ISUP	PUNLMP	Low grade	High grade
1973 WHO		Grade 1	Grade 2 Grade 3
1999 WHO	PUNLMP	Grade 1	Grade 2 Grade 3

Εικόνα 1.5: Συστήματα ταξινόμησης του WHO ως προς τον βαθμό διαφοροποίησης των ουροθηλιακών όγκων [92].

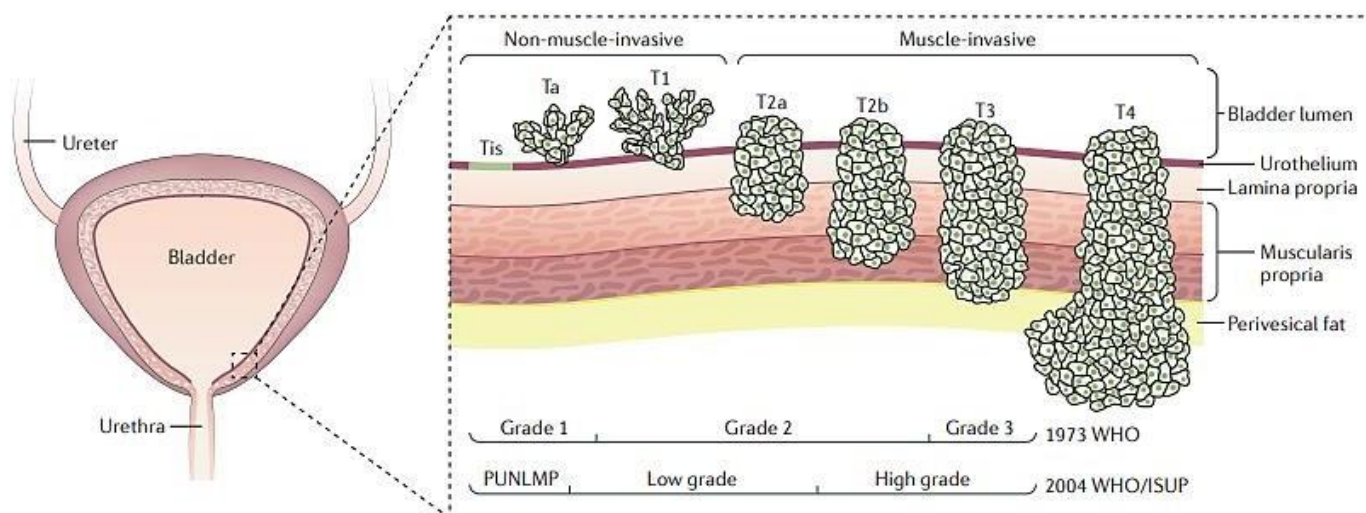
Βαθμός διήθησης του όγκου: Το σύστημα που εξετάζει το βαθμό διήθησης του όγκου (Tumor, Nodes, Metastases- TNM) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα ταξινόμησης διεθνώς και έχει δημιουργηθεί από τη Διεθνή Ένωση Εναντίον του Καρκίνου (International Union Against Cancer, UICC). Τα αρχικά της συντομογραφίας του πραγματεύονται τα εξής:

- T: αναφέρεται στο μέγεθος και την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου
- N: αναφέρεται στη διασπορά ή όχι του όγκου στους λεμφαδένες
- M: αναφέρεται στην ύπαρξη ή όχι μεταστατικής εστίας

Καθένα από τα τρία γράμματα, έπειτα από την εξέταση του όγκου, προσδιορίζεται με κάποιο νούμερο ή άλλο χαρακτήρα. Όσον αφορά την ταξινόμηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως έχει προκύψει ο εξής πίνακας:

Πίνακας 1.2: Σύστημα σταδιοποίησης TMN [93]

Κύριος όγκος	
TX	Ο κύριος όγκος δεν μπορεί να αξιολογηθεί.
T0	Δεν βρέθηκε πρωτογενής όγκος στην κύστη.
Ta	Μη διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα.
Tis	Καρκίνωμα in situ.
T1	Ο όγκος εισδύει υποεπιθηλιακά, στο συνδετικό ιστό.
T2	Ο όγκος διεισδύει στο μυϊκό χιτώνα της κύστης.
pT2a	Ο όγκος εισβάλλει την επιφανειακή μυϊκή στιβάδα (στο εσωτερικό μισό).
pT2b	Ο όγκος έχει εξαπλωθεί εις βάθος της μυϊκής στιβάδας.
T3	Ο όγκος διηθεί τον λιπώδη περικυστικό ιστό.
pT3a	Ορατό μικροσκοπικά.
pT3b	Ορατό μακροσκοπικά (εξωκυστική μάζα).
T4	Ο όγκος διηθεί οποιοδήποτε από τα: προστατικό στρώμα, σπερματικά κυστίδια, μήτρα, κολεό, πυελικό τοίχωμα, κοιλιακό τοίχωμα.
pT4a	Ο όγκος έχει εξαπλωθεί στο προστατικό στρώμα, τη μήτρα ή τον κολεό.
pT4b	Ο όγκος έχει εξαπλωθεί στο πυελικό ή το κοιλιακό τοίχωμα.
Επιχώριοι Λεμφαδένες	
NX	Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν.
N0	Ο όγκος δεν έχει εξαπλωθεί στους επιχώριους λεμφαδένες.
N1	Μετάσταση σε έναν μόνο πυελικό λεμφαδένα (έσω και έξω λαγόνιος, του θυρεοειδούς ή τον προ-ιερό λεμφαδένα).
N2	Μετάσταση σε πολλαπλούς πυελικούς λεμφαδένες (έσω και έξω λαγόνιους, θυρεοειδείς και προΐερούς)
N3	Μετάσταση σε έναν ή περισσότερους κοινούς λαγόνιους λεμφαδένες.
Απομακρυσμένες Μεταστάσεις	
M0	Απουσία μεταστατικής εστίας.
M1	Μακρινή μετάσταση.



Εικόνα 1.6: Σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης σύμφωνα με TNM σύστημα. Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (grade) σύμφωνα με το σύστημα WHO 1973 και WHO/ISUP 2004 [94].

1.3.3.3 Κίνδυνος υποτροπής και Εξέλιξης της νόσου

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, το 75% των νέων περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστεως ανήκει στα μη μυοδιηθητικά καρκινώματα (Non-Muscle Invasive Bladder Cancer, NMIBC), δηλαδή είναι όγκοι σταδίου Ta, T1 και Tis και αποτελούν το 70%, το 20% και το 10% των NMIBC αντίστοιχα[41, 95]. Συνοπτικά, οι όγκοι Ta σταδίου είναι όγκοι θηλώδους μορφής που περιορίζονται στο βλεννογόνο στρώμα της κύστης, οι T1 εισχωρούν στην υποβλεννογόνιο στιβάδα αλλά όχι στο μυϊκό χιτώνα, ενώ οι Tis είναι επίπεδοι όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης στο ουροθήλιο. Το 60-70% των NMIBC τείνει να υποτροπιάσει μετά τη διουρηθρική κυστεκτομή, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις με υψηλό κίνδυνο εξέλιξης της νόσου σε μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (Muscle-Invasive Bladder Cancer, MIBC)[96]. Τα στοιχεία αυτά αντανακλούν ότι οι NMIBC είναι μια ετερογενής ομάδα όγκων, με διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες, δυσχεραίνοντας έτσι την ακριβή εκτίμηση κινδύνου υποτροπής και εξέλιξης της νόσου. Για τον λόγο αυτό έχει γίνει προσπάθεια σε παγκόσμια κλίμακα για τη δημιουργία αλγορίθμων, οι οποίοι θα χαρακτηρίζουν την επιθετικότητα του νεοπλασματος βάσει των παθολογοανατομικών και μοριακών του χαρακτηριστικών, υποδεικνύοντας την εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας στους διάφορους ασθενείς.

Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Έρευνας και Θεραπείας του Καρκίνου (European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC) κατασκεύασε, λοιπόν, τους πίνακες κινδύνου υποτροπής και εξέλιξης –στον 1^ο και 5^ο χρόνο- για ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστεως σταδίου Ta και T1. Από τους πίνακες αυτούς προκύπτει ένα score, το οποίο βασίζεται στην εκτίμηση των έξι

σημαντικότερων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών του συγκεκριμένου καρκίνου, δηλαδή τον αριθμό των καρκινικών εστιών, το μέγεθος του όγκου, αν υπάρχει προγενέστερο συμβάν υποτροπής, το στάδιο του όγκου, εάν συνυπάρχει καρκίνωμα in situ και το βαθμό διαφοροποίησης (grade)[97].

Πίνακας 1.3: Πίνακας EORTC για τον υπολογισμό της υποτροπής και της εξέλιξης του καρκίνου [91]

Παράγοντας	Υποτροπή	Εξέλιξη
Αριθμός καρκινικών εστιών		
1	0	0
2-7	3	3
≥8	6	3
Διάμετρος όγκου (cm)		
<3	0	0
≥3	3	3
Ποσοστό υποτροπής		
Αρχικό	0	0
≤1 επανεμφάνιση/έτος	2	2
>1 επανεμφάνιση/έτος	4	2
Κατηγορία		
Ta	0	0
T1	1	4
Ταυτόχρονη παρουσία Tis		
Όχι	0	0
Ναι	1	6
Βαθμός κακοήθειας (Grade)		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
Τελικό score	0-17	0-23

Πίνακας 1.4: Πιθανότητα υποτροπής και εξέλιξης της νόσου σύμφωνα με το συνολικό score [91]

Score	Πιθανότητα υποτροπής στον 1 ^ο		Πιθανότητα υποτροπής στα 5	
Υποτροπής	χρόνο		χρόνια	
	%	(95% CI)	%	(95% CI)
0	15	(10-19)	31	(24-37)
1-4	24	(21-26)	46	(42-49)
5-9	38	(35-41)	62	(58-65)
10-17	61	(55-67)	78	(73-84)
Score	Πιθανότητα εξέλιξης στον 1 ^ο χρόνο		Πιθανότητα εξέλιξης στα 5 χρόνια	
Εξέλιξης	%	(95% CI)	%	(95% CI)
0	0,2	(0-0,7)	0,8	(0-1,7)
2-6	1	(0,4-1,6)	6	(5-8)
7-13	5	(4-7)	17	(14-20)
14-23	17	(10-24)	45	(35-55)

Με βάση τους πίνακες κινδύνου της EORTC για την πιθανότητα υποτροπής και εξέλιξης, οι κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας (European Association of Urology, EAU) συνιστούν την περαιτέρω ταξινόμηση των ασθενών με NMIBC, όπως αποτυπώνεται στον Πίνακα 1.5:

Πίνακας 1.5: Πίνακας EORTC για τον υπολογισμό της υποτροπής και της εξέλιξης των ασθενών με μη μυοδιηθητικό καρκίνο [91]

Ομάδα κινδύνου	Χαρακτηριστικά
Χαμηλού κινδύνου	Πρωτογενείς όγκοι, TaG1, <3cm, δεν συνυπάρχουν με CIS.
Μεσαίου κινδύνου	Όγκοι μεταξύ χαμηλού και υψηλού κινδύνου.
Υψηλού κινδύνου	T1 όγκοι, όγκοι G3, συνύπαρξη με CIS, TaG1G2 όγκοι με διάμετρο >3cm και πολλαπλές υποτροπές.

1.3.4 Διάγνωση, Πρόγνωση και μέθοδοι Θεραπείας του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

Το πιο κοινό κλινικό σύμπτωμα του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι αιματουρία, η οποία γίνεται συνήθως μακροσκοπικά ορατή σε όγκους πιο προχωρημένου σταδίου[98]. Η αιματουρία ανιχνεύεται εργαστηριακά μικροσκοπικά στη γενική εξέταση ούρων ή και με τη χρήση ειδικής χρωματογραφικής ταινίας ούρων (dipstick)[99]. Το καρκίνωμα *in situ* μπορεί να υποπτευθεί σε ασθενείς με συμπτώματα στο κατώτερο ουροποιητικό, ειδικά όταν υπάρχει ερεθισμός κατά την κένωση. Στους μυοδιηθητικούς όγκους μπορεί να περιλαμβάνονται στα κλινικά συμπτώματα η συχνουρία/επιτακτική ούρηση, η επώδυνη ούρηση και σε πιο προχωρημένους όγκους ο πόνος στην πυελική χώρα και σημάδια απόφραξης του ουροποιητικού συστήματος[100]. Ο μικρός βαθμός επίπτωσης του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως στον γενικό πληθυσμό αποτελεί έναν κύριο ανασταλτικό παράγοντα για την δυνατότητα εφαρμογής, εντός ενός οικονομικά συμφέροντος κόστους, δοκιμών ελέγχου (screening) με σκοπό την ανίχνευση της νόσου σε πρώιμο στάδιο[101, 102]. Έχουν, ωστόσο, πραγματοποιηθεί μελέτες όπου εάν η ειδική ταινία χρωματογραφίας ήταν θετική για την αιματουρία, οι ασθενείς εξετάζονταν για την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο του *FGFR3* και της *NMP22* πρωτεΐνης στα ούρα[102, 103]. Παρ' όλα αυτά, δεν συνίσταται ο έλεγχος των ατόμων σε συνθήκες ρουτίνας για τον συγκεκριμένο καρκίνο[91].

Η διάγνωση του καρκίνου σε ασθενείς με υποψία γίνεται με την κυστεοσκόπηση. Το κυστεοσκόπιο είναι ένα ενδοσκοπικό εργαλείο που διέρχεται από την ουρήθρα και επιτρέπει στον ουρολόγο να εκτιμήσει το εσωτερικό της κύστης. Είναι λεπτό και εύκαμπτο και φέρει ένα προσοφθάλμιο, μέσω του οποίου διακρίνεται ο αυλός της κύστης. Μπορεί να συνδεθεί, επίσης, κάμερα για την καταγραφή της διαδικασίας. Κατά τη διάρκεια της κυστεοσκόπησης ο ασθενής υφίσταται τοπική αναισθησία[104]. Εάν παρατηρηθεί κάποια αλλοίωση, τότε αφαιρείται η συγκεκριμένη περιοχή μέσω διουρηθρικής εκτομής του όγκου της ουροδόχου κύστης (Transurethral Resection of Bladder Tumour, TURBT). Το βιοπτικό υλικό χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τον προσδιορισμό των παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών, όπως η θέση του όγκου, ο βαθμός διαφοροποίησης (grade), το βάθος της διήθησης του όγκου, την παρουσία CIS και αν ο εξωστήρας μυς υπάρχει στο δείγμα. Ελέγχεται επίσης η παρουσία λεμφοαγγειακής διήθησης ή κάποιας άλλης ασυνήθιστης (παραλλαγμένης) ιστολογίας[91].

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της EAU, απαραίτητη για την τελική διάγνωση είναι η κυστεοσκόπηση, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί επικουρικά και η κυτταρολογική εξέταση στα ούρα, για την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων. Η τελευταία παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία σε χαμηλής διαφοροποίησης (high-grade) όγκους, όπως το καρκίνωμα *in situ*. Το θετικό αποτέλεσμα στην κυτταρολογική εξέταση μπορεί να υποδηλώνει κακοήθεια σε οποιοδήποτε σημείο του

ουροποιητικού συστήματος, ενώ το αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει την παρουσία της. Πραγματοποιούνται, συμπληρωματικά, μια αξονική τομογραφία άνω και κάτω κοιλίας και μια ενδοφλέβια πυελογραφία (ουρογραφία) για την καλύτερη εκτίμηση της νόσου [91, 100].

Από την παθολογοανατομική έκθεση που θα προκύψει, μέσω της αξιολόγησης του κυστικού ιστοτεμαχίου κατά τη TURBT, λαμβάνονται σημαντικές πληροφορίες που μπορούν να αξιοποιηθούν για την εκτίμηση της πρόγνωσης. Για παράδειγμα, ο βαθμός διαφοροποίησης (Grade) και διήθησης του όγκου (TNM σύστημα) σε συνδυασμό με τη χρήση των Πινάκων κινδύνου υποτροπής και εξέλιξης της EORTC συνεισφέρουν σημαντικά στην ταξινόμηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου και στην επιλογή κατάλληλης θεραπευτικής στρατηγικής για κάθε μια από τις ομάδες αυτές [91, 100].

Σε γενικές γραμμές, η διαχείριση των NMIBC τύπων μπορεί να περιοριστεί στη TURBT και την ενδοκυστική θεραπεία, ανάλογα με τον βαθμό κινδύνου που προκύπτει από την ταξινόμηση βάσει των EORTC πινάκων. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένου ότι υπάρχει σοβαρός κίνδυνος υποτροπής ή/και προόδου όγκων μετά από τη TURBT, συνίσταται ενδοκυστική θεραπεία για όλα τα στάδια (Ta, T1 και CIS). Η άμεση μεμονωμένη μετεγχειρητική ενδοκυστική έγχυση χημειοθεραπείας εντός έξι ωρών από τη TURBT μπορεί να μειώσει το ποσοστό υποτροπής σε ασθενείς με χαμηλού κινδύνου και επιλεγμένους όγκους ενδιάμεσου κινδύνου. Οι περαιτέρω ενδοκυστικές εγχύσεις χημειοθεραπείας μπορούν να βελτιώσουν την ελεύθερη υποτροπής επιβίωση σε ενδιάμεσου κινδύνου όγκους, αλλά δεν αποτρέπουν την πρόοδο. Αυτές οι εγχύσεις σχετίζονται με ήπιες ανεπιθύμητες ενέργειες. Η ενδοκυστική ανοσοθεραπεία με Bacillus Calmette-Guérin (BCG) είναι ανώτερη από την ενδοκυστική χημειοθεραπεία στη μείωση των υποτροπών και στην πρόληψη ή καθυστέρηση της εξέλιξης στον μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Ωστόσο, το ενδοκυστικό BCG είναι πιο τοξικό. Σε ασθενείς που διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο εξέλιξης, πρέπει να εξεταστεί η ριζική κυστεκτομή [91].

Εν αντιθέσει, οι MIBC τύποι χρήζουν πιο επιθετικές μεθόδους αντιμετώπισης, όπως η ριζική κυστεκτομή, πολλές φορές παράλληλα με την εφαρμογή χημειοθεραπείας. Πέρα από τη χειρουργική αφαίρεση της κύστης, περιλαμβάνονται και η προστατεκτομή στους άντρες και η υστερεκτομή και η εκτομή μέρους του κολεού και της ουρήθρας στις γυναίκες. Ακολουθεί αναπόσπαστα και η εκτομή των λεμφαδένων, καθώς βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση. Φυσικό επακόλουθο είναι η εκτροπή των ούρων σε απομονωμένες έλικες λεπτού ή παχέος εντέρου. Προεγχειρητική ακτινοθεραπεία δεν πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε εκτροπή ούρων. Μετά τη κυστεκτομή δεν ενδείκνυται άμεση επικουρική χημειοθεραπεία. Ωστόσο, η ριζική κυστεκτομή στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης T4b δεν είναι θεραπευτική επιλογή. Εάν υπάρχουν συμπτώματα, η ριζική κυστεκτομή μπορεί να είναι μια θεραπευτική /παρηγορητική επιλογή [100].

Το υψηλό ποσοστό υποτροπής και εξέλιξης της νόσου στους NMIBC τύπους αναδεικνύει την ανάγκη παρακολούθησης (monitoring) των ασθενών αυτών. Οι κατευθυντήριες οδηγίες της EAU συνιστούν την πραγματοποίηση κυστεοσκόπησης μετά από 3 μήνες από τη TURBT, τα αποτελέσματα της οποίας αποτελούν ισχυρό προγνωστικό δείκτη. Εάν, επίσης, οι κυτταρολογικές εξετάσεις δίνουν θετικό αποτέλεσμα, αλλά δεν είναι ορατή κάποια ιστολογική αλλοίωση στην κύστη συνίσταται η λήψη βιοψίας από εξωκυτικές περιοχές[91]. Για την παρακολούθηση των ασθενών που έχουν υποστεί ριζική κυστεκτομή το Εθνικό Γενικό Αντικαρκινικό Δίκτυο των ΗΠΑ (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) προτείνει την κυτταρολογική εξέταση των ούρων, εξετάσεις που αντιπροσωπεύουν την ηπατική λειτουργία, τον προσδιορισμό της κρεατινίνης και των ηλεκτρολυτών κάθε 3-6 μήνες για τα επόμενα 2 έτη. Ακόμη, την απεικόνιση της θωρακικής κοιλότητας, της άνω και κάτω κοιλίας και του άνω ουροποιητικού συστήματος κάθε 3-6 μήνες για τα επόμενα 2 έτη. Τέλος, παρακολουθούνται ετησίως τα επίπεδα της βιταμίνη B12, λόγω της εκτροπής των ούρων [105].

1.3.5 Μοριακή παθολογία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως είναι μια νόσος μεγάλης ετερογένειας τόσο σε μοριακό όσο και σε κλινικοπαθολογικό επίπεδο[106]. Οι δύο μεγάλες κατηγορίες, NMIBC και MIBC, του συγκεκριμένου καρκίνου διαφέρουν ευκρινώς ως προς τα μοριακά τους χαρακτηριστικά. Όσον αφορά τους NMIBC τύπους, ο καρυότυπός τους είναι ή τουλάχιστον προσεγγίζει τον διπλοειδή, σε αντίθεση με τους MIBC όπου τα φαινόμενα ανευπλοειδίας είναι συχνά, καθώς και πολλά άλλα είδη αλλαγών, όπως η χρωμοθρυψία[107]. Το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων τους ουροδόχου, όπως συμβαίνει και σε πολλούς άλλους συμπαγείς όγκους, χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια, συμπεριλαμβανομένων των δομικών και αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών[108, 109]. Η δημιουργία δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών θεωρείται ότι προκύπτει από βλάβες στο DNA, οι οποίες επάγονται από ενδογενείς ή εξωγενείς μεταλλαξογόνους παράγοντες, που δεν έχουν επιδιορθωθεί ή έχουν επιδιορθωθεί εσφαλμένα. Η αύξηση στις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις θα μπορούσε να είναι γενετικής ή και επίκτητης αιτιολογίας, και η ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώνουν τις βλάβες του DNA έχει καθοριστικό ρόλο στον σχηματισμό των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων [110].

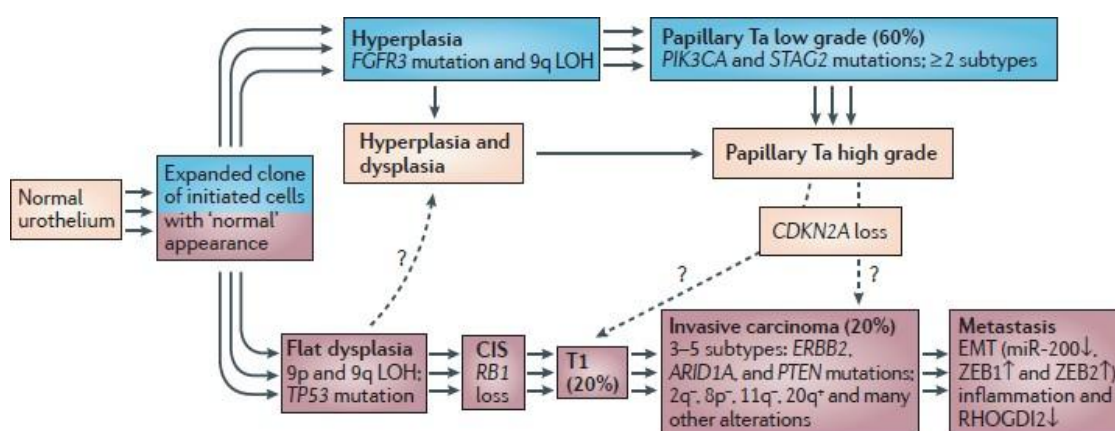
Σε γενικές γραμμές, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως βρίσκεται από χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως απαλοιφές και πολλαπλασιασμοί γενετικών τόπων, συμμετέχοντας σχεδόν όλα τα χρωμοσώματα[111, 112]. Οι απαλοιφές γενετικών τόπων ή και ολόκληρου του χρωμοσώματος 9 είναι συχνές τόσο στους NMIBC όσο και τους MIBC. Δύο γονίδια που επηρεάζονται από τις απαλοιφές του χρωμοσώματος 9 είναι οι αναστολείς της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, *CDKN2A*) και της 2B(cyclin-dependent kinase inhibitor 2B, *CDKN2B*). Από τον

CDKN2A γενετικό τόπο κωδικοποιούνται τα p16 και p14^{ARF} πρωτεϊνικά μόρια, ενώ από τον *CDKN2B* το p15[113, 114]. Η απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss of heterozygosity, LOH) του χρωμοσώματος 9, η ομόζυγη απαλοιφή του *CDKN2A* και η απώλεια της έκφρασης του p16 στους NMIBC αποτελούν προγνωστικούς δείκτες για την μείωση του χρονικού διαστήματος ελεύθερου υποτροπής[115-117]. Άλλες αλλαγές στον αριθμό και συγκεκριμένα στην απαλοιφή αλληλομόρφων έχουν ταυτοποιηθεί στους χρωμοσωμικούς βραχίονες 8p, 2q και 5q, όπου σχετίζονται με περισσότερο επιθετικό φαινότυπο της νόσου[118-120]. Έχει, επίσης, ταυτοποιηθεί και γονιδιακός πολλαπλασιασμός σε γενετικούς τόπους που εμπεριέχουν ογκογονίδια, μερικοί εκ των οποίων βρίσκονται στους χρωμοσωμικούς βραχίονες 6p, 8p, 11q και 12q [120-122]. Στους MIBC έχει ταυτοποιηθεί και σύντηξη γονιδίων και μάλιστα μεταξύ των *FGFR3-TACC3* [123, 124].

Εκτός από τις διαφορές στην αρχιτεκτονική του γονιδιώματος, οι NMIBC και MIBC διαφέρουν και ως προς το φορτίο των μεταλλαγών. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αλληλούχηση του συνόλου των εξονίων σε δείγματα καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, εκτιμάται η ύπαρξη κατά μέσο όρο 169-195 μεταλλαγών ανά δείγμα NMIBC [125, 126] και περίπου 300 ανά δείγμα MIBC[123]. Αυτή η συχνότητα των μεταλλαγών στους MIBC ξεπερνιέται μόνο στον καρκίνο του πνεύμονα και το μελάνωμα. Εντύπωση δημιουργεί η απουσία C:G→A:T μεταστροφών, οι οποίες δημιουργούνται από την επίδραση των πολυκυκλικών υδρογονανθράκων στο DNA, μιας και το κάπνισμα είναι ο ισχυρότερος περιβαλλοντικός παράγοντας κινδύνου. Αντιθέτως, βρέθηκαν C:G→T:A μεταθέσεις, οι οποίες δημιουργούνται από απαμινάσεις της κυτιδίνης [127]. Οι περισσότερες περιπτώσεις NMIBC χαρακτηρίζονται από ενεργοποιητικές σημειακές αλλαγές του *FGFR3* και του *PIK3CA* γονιδίου και σε κάποιες περιπτώσεις στην οικογένεια των *RAS* γονιδίων[128-130]. Έχουν, επιπλέον, αναφερθεί και απενεργοποιητικές μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των *TSC1* [130] και *STAG2* [131, 132] και σε γονίδια, των προϊόντα των οποίων τροποποιούν τη χρωματίνη, συμπεριλαμβανομένων των *KDM6A*, *CREBBP*, *EP300* και *ARID1A*[123, 125, 126, 133]. Οι MIBC τύποι μοιράζονται πολλά μοριακά χαρακτηριστικά με άλλους συμπαγείς όγκους, ιδιαίτερα αυτό της απώλειας λειτουργίας ογκοκατασταλτικών μορίων, επιτρέποντας έτσι τη διαφυγή από τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και την απορρύθμιση των βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα γονίδια *TP53* και *RB1* είναι συχνά μεταλλαγμένα, όπως και οι ρυθμιστές των μονοπατιών που εμπλέκονται[123]. Συχνές μεταλλαγές παρατηρούνται και στα γονίδια, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στο PI3K μονοπάτι [134].

Κλινικοπαθολογικά και μοριακά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα ουροθηλιακά καρκινώματα αναπτύσσονται μέσω δύο διακριτών μονοπατιών, τα οποία αποτυπώνονται και στην Εικόνα 1.7. Οι όγκοι υψηλής διαφοροποίησης, θηλωματώδους μορφής μπορεί να προκύψουν μέσω απλής

υπερπλασίας και μικρής δυσπλασίας και σε μοριακό επίπεδο χαρακτηρίζονται από απώλεια ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 9, ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα *FGFR3*, *TERT* και *PIK3CA* και απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο *STAG2* γονίδιο. Αυτοί οι όγκοι δεν είναι διηθητικοί, υποτροπιάζουν συχνά, αλλά είναι γενετικά σταθεροί. Τα μυοδιηθητικά καρκινώματα θεωρείται ότι προκύπτουν μέσω επιπέδων δυσπλασιών και των καρκινωμάτων *in situ*, τα οποία φέρουν συνήθως μεταλλάξεις στο *TP53* γονίδιο, απώλεια ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 9 και λιγότερο συχνά μεταλλάξεις στο *FGFR3*. Είναι γενετικά ασταθή και συσσωρεύουν ποικίλες γονιδιωματικές αλλοιώσεις. Οι υψηλής διαφοροποίησης NMIBC μπορούν να εξελιχθούν σε MIBC μέσω της απαλοιφής του *CDKN2A* γενετικού τόπου [135].



Εικόνα 1.7: Πιθανά μονοπάτια για την παθογένεση των ουροθηλιακών καρκίνων [135]

1.3.6 Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες μπορεί να προσδιοριστούν από διάφορα βιολογικά υλικά, όπως τα ούρα, το αίμα ή τους ιστούς, προσφέροντας τη δυνατότητα εντοπισμού της νόσου νωρίτερα, ταξινόμησης των ασθενών σε ομάδες κινδύνου, βελτίωσης στην πρόγνωση και την πρόβλεψη για την επιλογή κατάλληλης θεραπείας. Παρ' όλο που στη βιβλιογραφία παρατίθενται συνεχώς το θέμα και η έγκριση βιοδεικτών, ιδιαίτερα στα ούρα, κανένας δεν εκπληρώνει τις απαιτήσεις για την εφαρμογή τους στην κλινική ρουτίνα [136].

Καθώς η κυτταρολογική εξέταση στα ούρα των NMIBC υστερεί ευαισθησίας, η ανάλυση των μεταλλάξεων στο γονίδιο του *FGFR3* σε συνδυασμό με την εξέταση άλλων DNA δεικτών αποτελεί μια χρήσιμη εναλλακτική για την παρακολούθηση της ασθένειας [137-139]. Σε πολλές μελέτες γίνεται αναφορά για την ανίχνευση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως μέσω της ανάλυσης μεθυλίωσης δεικτών στα ούρα. Υπάρχουν παραδείγματα που περιλαμβάνουν αντίστοιχα ολόκληρα πάνελ εν δυνάμει βιοδεικτών, τα οποία αξιολογούνται μόνα τους [140-143] ή σε συνδυασμό με τις μεταλλάξεις

στο *FGFR3*[144]. Το πιο σύνηθες συμβάν που περιγράφεται στον συγκεκριμένο καρκίνο είναι η σημειακή μεταλλαγή στον υποκινητή του γονιδίου της τελομεράσης (*TERT*), ανεξαρτήτου σταδίου και βαθμού διαφοροποίησης. Οι πιο συχνές αλλαγές εντοπίζονται στις θέσεις -124 bp και -146 bp σε σχέση με το σημείο έναρξης της μεταγραφής, επιτρέποντας την δημιουργία ειδικών δοκιμών, κατάλληλων για την εφαρμογή σε ούρα[145, 146]. Το *TP53* είναι το πιο κοινό ογκοκατασταλτικό γονίδιο που μεταλλάσσεται σε όλους τους καρκίνους στον άνθρωπο και σχετίζεται με χαρακτηριστικά επιθετικότητας του όγκου[147, 148]. Όσον αφορά την πρόγνωση και την πρόβλεψη των NMIBC, έχουν παρουσιάσει κάποια αξία πρωτεϊνικά μόρια σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτά της οικογένειας των ErbB και FGFR, οι δείκτες αγγειογένεσης (VEGF, MVD, HIF-1α) και διήθησης (E-cadherin και N-cadherin) [149, 150].

Στους MIBC η εκτίμηση των απενεργοποιητικών μεταλλαγών στο *RB* γονίδιο σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη ιστοχημική αξιολόγηση των p53, p21, Rb, p27 και της κυκλίνης E1 έχει δειχθεί ότι έχει προβλεπτική ακρίβεια υψηλότερη από την χρήση οποιουδήποτε βιοδείκτη μεμονωμένα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ριζική κυστεκτομή, βελτιώνοντας συνάμα και την ταξινόμηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου[151-153]. Στους μυοδιηθητικούς όγκους οι δείκτες πολλαπλασιασμού (Ki-67) και αγγειογένεσης (VEGF) σχετίζονται με υψηλότερα παθολογικά στάδια, υποτροπή της νόσου και διήθηση και μετάσταση στους λεμφαδένες.[154-157] Η τροποποιημένη έκφραση στα *FGFR3*, *GATA3*, *FOXA1*, *ERBB2* συνεισφέρουν στην ενίσχυση της πρόγνωσης στους MIBC και της απόκρισής τους στη θεραπεία [136].

Η πρόβλεψη της απόκρισης στην χημειοθεραπεία είναι αρωγός στην επιλογή του τύπου και του χρονικού διαστήματος της συστηματικής ή της τοπικής θεραπείας. Ως εν δυνάμει προβλεπτικοί βιοδείκτες μελετώνται μόρια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως η κυκλίνη D1 και το Ki-67 αντίστοιχα. Επίσης, μόρια που έχουν κομβικό ρόλο στην διαδικασία της απόπτωσης όπως τα p53 και Bcl-2[136]. Πολλοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες επάγουν βλάβες στο DNA. Για τον λόγο αυτό μελετώνται πιο επισταμένα πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αναγνώριση και την επιδιόρθωση των βλαβών αυτών. Για παράδειγμα, μεταλλαγές στο *ERCC2* σχετίζονται με την απόκριση στη χημειοθεραπεία που βασίζεται στην σισπλατίνη [158].

Πέρα από τη συμμετοχή των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στην κατανόηση και κατ' επέκταση την καλύτερη διαχείριση κάθε καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, σημαντικό ρόλο παίζουν τα μη κωδικά RNA μόρια (non coding RNAs) που αποτελούν ρυθμιστικά μόρια της γονιδιακής έκφρασης. Μέσω των δεδομένων του Γονιδιακού Άτλαντα του Καρκίνου (The Cancer Genome Atlas, TCGA) και των μελετών συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Study , GWAS) έχουν ταυτοποιηθεί κάποια μικρά μη

κωδικά RNAs (miRNAs), τα οποία παρέχουν πληροφορίες για την κίνδυνο υποτροπής της νόσου και την επιβίωση των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως [159].

1.4 Υγρή Βιοψία

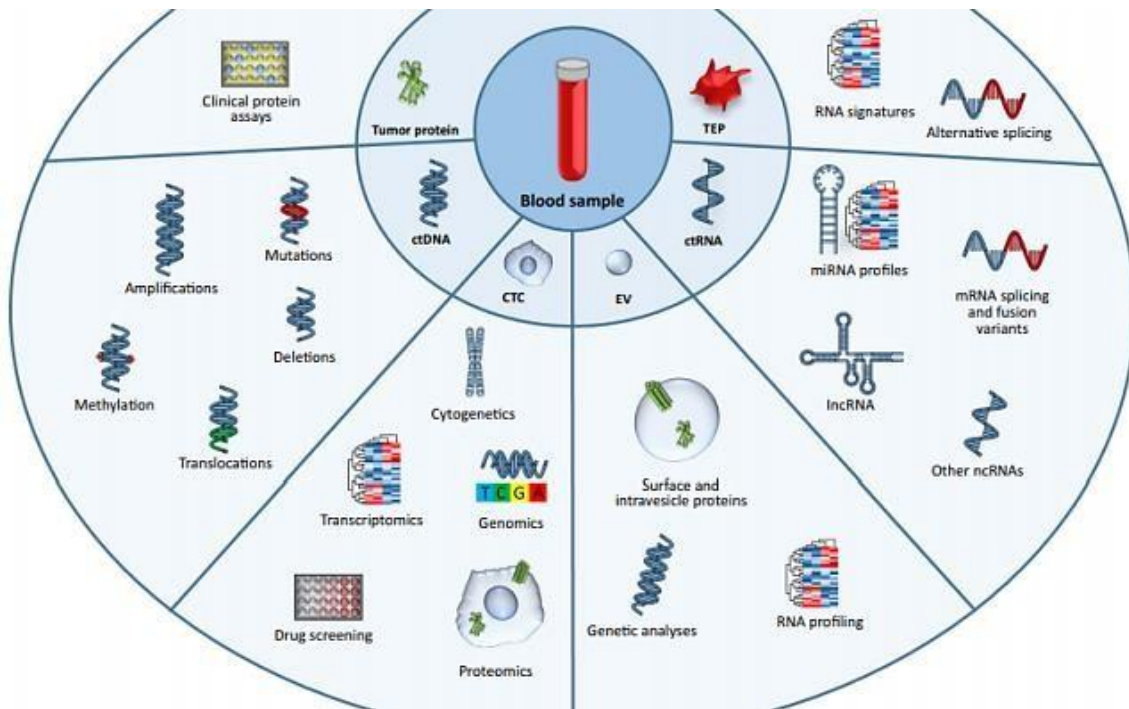
1.4.1 Υγρή Βιοψία-Γενικές Πληροφορίες

Πρώτη η Αξιολόγηση των Γονιδιωματικών Εφαρμογών στην Πράξη και την Πρόληψη (The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention, EGAPP) έθεσε τα τρία κριτήρια που απαιτούνται για την υιοθέτηση ενός καρκινικού βιοδείκτη στην κλινική πράξη: [160] την αναλυτική εγκυρότητα - η οποία μετρά την ακρίβεια, την αξιοπιστία και την επαναληψιμότητα της κλινικής δοκιμής-, την κλινική εγκυρότητα –η οποία αξιολογεί την ικανότητα της δοκιμής να διαχωρίσει έναν πληθυσμό σε ομάδες με σημαντικά διαφορετική κλινική εικόνα- και τη κλινική χρησιμότητα –η οποία εκτιμά εάν τα αποτελέσματα ωφελούν τους ασθενείς που πραγματοποίησαν το τεστ συγκριτικά με εκείνους που δεν πραγματοποιήθηκε [160, 161].

Όσον αφορά την ιατρική ακριβείας, ειδικότερα στην ογκολογία, ο βασικός της στόχος έγκειται στην βελτίωση του χρόνου διάγνωσης και της θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου[162]. Υπό αυτό το πρίσμα, μπορεί να εφαρμοσθεί μία ποικιλία γονιδιωματικών και μοριακών αναλύσεων σε υλικό του όγκου για την ταυτοποίηση γνωστών προβλεπτικών δεικτών που συνεισφέρουν στην επιλογή κατάλληλης θεραπείας, την ταξινόμηση του όγκου σε μοριακό υπότυπο που αξιοποιείται στην εκτίμηση της πρόγνωσης, τον χαρακτηρισμό σωματικών μεταλλάξεων που εμπλέκονται στην εξέλιξη της κακοήθειας, την ανίχνευση μη φυσιολογικών αλλαγών στα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια και τον εντοπισμό διακριτών μοριακών υπογραφών που υποδηλώνουν μεταστατική νόσο[163]. Ωστόσο, η λήψη καρκινικού υλικού για τη δημιουργία των μοριακών προφίλ εξαρτάται κατά κόρον από επεμβατικές διαδικασίες, οι οποίες δεν είναι πάντα εφικτές και δεν προσφέρονται για τη διαδοχική παρακολούθηση των καρκινικών γονοτύπων [164].

Επακολούθως, η ιατρική ακριβείας εστιάζει όλο και περισσότερο στην υγρή βιοψία, λόγω του μη επεμβατικού της χαρακτήρα και της εφικτής επανάληψής της σε πολλαπλά χρονικά σημεία, όπου και διευκολύνεται η παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Στην ογκολογία ο όρος της υγρής βιοψίας αναφέρεται στην δειγματοληψία και την ανάλυση των προς προσδιορισμό ουσιών στα διάφορα βιολογικά υγρά, με κυρίαρχο το αίμα αλλά και σε άλλα εξίσου εύκολα προσβάσιμα με αυτό όπως τα ούρα, ο ασκίτης και το πλευριτικό υγρό[165, 166]. Στους αναλύτες του περιφερικού αίματος συμπεριλαμβάνονται καρκινικά κύτταρα (CTCs), ελεύθερο κυττάρων DNA (cfDNA), το οποίο στους

ασθενείς με καρκίνο εμπεριέχει και το ελεύθερο κυττάρων καρκινικό DNA (ctDNA), ελεύθερο κυττάρων RNA (cfRNA), το οποίο συνίσταται κυρίως από μικρά μη κωδικά RNAs αλλά και mRNAs, εξωκυττάρια κυστίδια, όπως τα εξωσώματα, αιμοπετάλια που έχουν αλληλεπιδράσει με τα κύτταρα του όγκου και έχουν διαφοροποιήσει τη λειτουργία τους (tumour-educated platelets, TEPs), πρωτεΐνες και μεταβολίτες [167].



Εικόνα 1.8: Οι αναλύτες της υγρής βιοψίας και οι πληροφορίες που αποκομίζονται από τον κάθε έναν [167].

Σαν σύνολο, όλοι οι παραπάνω αναλύτες έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά πρωτογενών όγκων ή μεταστάσεων, για την ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονιδίωμα ή για αλλαγές στον φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων των αλληλομόρφων, που λαμβάνονται κυρίως από τα CTCs ή το ctDNA.[165] Οι τεχνικές της υγρής βιοψίας χρησιμοποιούνται με όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον για την άντληση πληροφοριών που αφορούν το μεταγράφημα, το επιγονιδίωμα, το πρωτέωμα και τη μεταβολωμική[167].

1.4.2 Πλεονεκτήματα της υγρής βιοψίας έναντι της κλασικής βιοψίας ιστού

Η αξιολόγηση των αναλυτών της υγρής βιοψίας παρέχει πιο συνολικές πληροφορίες για την δυναμική ετερογένεια του καρκίνου τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Για παράδειγμα, μπορεί να παρέχει πληροφορίες για καρκινοειδικές μεταλλάξεις από πολλαπλά σημεία του σώματος με ιστοειδικό χαρακτήρα, ακόμη και αν δεν είναι ανιχνεύσιμες απεικονιστικά πρωτοπαθείς ή μεταστατικές εστίες.

Αυτό συνδράμει στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου, αλλά και στην ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου ή και υποτροπής μετά την χειρουργική αφαίρεση του όγκου [168, 169].

Ο μη επεμβατικός χαρακτήρας της υγρής βιοψίας επιτρέπει την πραγματοποίηση διαδοχικών δειγματοληψιών, καθώς πρόκειται συνήθως για μια απλή αιμοληψία, αντανακλώντας την απόκριση των ασθενών στην θεραπεία. Επίσης, αποτρέπει την εκδήλωση των πιθανών επιπλοκών και περιορίζει το υψηλό κόστος που διέπει τη διαδικασία λήψης βιοψιών από ιστούς. Συνοπτικά, κάποιες πιθανές επιπλοκές της ιστικής βιοψίας αποτελούν ο πνευμοθώρακας, η αιμορραγία, η διάτρηση του εντέρου και οι επικείμενες λοιμώξεις. Συγκεκριμένα, για τον μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, τα υψηλά ποσοστά υποτροπής και πιθανότητας εξέλιξης της νόσου απαιτούν τη συχνή παρακολούθηση των ασθενών με κυστεοσκόπησης (κάθε 3-6 μήνες για 5 έτη) και κυτταρολογικές εξετάσεις στα ούρα, καθιστώντας τη διαχείριση των NMIBC την πιο κοστοβόρα σε σχέση με αυτή άλλων κακοηθειών για τα εθνικά συστήματα υγείας των αναπτυγμένων χωρών. Πέραν του υψηλού κόστους, η ανάγκη για την συχνή εφαρμογή επεμβατικών μεθόδων, όπως στην προκειμένη περίπτωση η κυστεοσκόπηση, αυξάνει την πιθανότητα εκδήλωσης κάποιας επιπλοκής [170].

Παρ' όλο, λοιπόν, που η κυστεοσκόπηση αποτελεί τη «gold-standard» μέθοδο στην κλινική πράξη για την διάγνωση και την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο στην ουροδόχο κύστη, η ευαισθησία της προσεγγίζει 65-70% για την ανίχνευση του *in situ* καρκινώματος (χαμηλής διαφοροποίησης, επιθετικού χαρακτήρα καρκίνωμα), γεγονός που σημαίνει ότι πολλές περιπτώσεις τα CIS δεν διαγιγνώσκονται[170]. Επιπλέον, ουροθηλιακές δυσπλασίες, η πολυεστιακή ανάπτυξη και οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις μπορεί να παραβλεφθούν ή να αφαιρεθούν ανεπαρκώς μέσω της κυστεοσκόπησης[171]. Παράλληλα, καθώς πρόκειται για απεικονιστική μέθοδο του αυλού της κύστης, δεν ανακύπτουν πληροφορίες σχετικές με τον βαθμό διήθησης του τοιχώματος του οργάνου από τον όγκο[172]. Όλα αυτά συνηγορούν στο ότι ενέχεται κίνδυνος για την υποεκτίμηση του σταδίου και του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου, κάτι που ξεπερνιέται με την υγρή βιοψία [170].

1.4.3 Περιορισμοί της υγρής βιοψίας

Ο κύριος περιοριστικός παράγοντας των εφαρμογών της υγρής βιοψίας είναι τα όρια ανίχνευσης των τεχνικών που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις στο ctDNA εμφανίζονται σε μικρές συγκεντρώσεις (<0.01%) και οι σπάνιες μεταλλάξεις μπορεί να μην βρεθούν, ανάλογα και το βάθος που γίνεται η αλληλούχηση. Οι δοκιμές πρέπει να μπορούν να εκτιμήσουν την ετερογένεια του όγκου, ωστόσο δεν απελευθερώνουν ποσοτικά το ίδιο όλες οι καρκινικές εστίες DNA στην κυκλοφορία -μερικοί τύποι καρκίνου μπορεί να απελευθερώνουν μικρές συγκεντρώσεις ή και καθόλου ctDNA ανάλογα την ανατομική τους θέση, π.χ. το γλοίωμα[173]. Επομένως, οι τεχνικές της

υγρής βιοψίας χρήζουν αύξηση της ευαισθησίας τους (να ανιχνεύουν τις μικρές ποσότητες των αναλυτών της στην κυκλοφορία) και της ειδικότητάς τους (να ταυτοποιούν και να διαχωρίζουν ορθά τα καρκινικά από τα μη καρκινικά συστατικά)[168].

Ακόμη, πρέπει να επικυρωθούν και να τυποποιηθούν οι προ-αναλυτικές (συλλογή, διατήρηση και αποθήκευση των δειγμάτων), οι αναλυτικές (απομόνωση, ποσοτικοποίηση και ανάλυση των δειγμάτων) και οι μετα-αναλυτικές (συλλογή και παρουσίαση δεδομένων) συνθήκες και φάσεις επεξεργασίας, καθώς στην κλινική ρουτίνα τα εργαστήρια πρέπει να εργάζονται σε μια κοινή βάση[168].

Η ανάπτυξη μεθοδολογιών υγρής βιοψίας περιορίζεται μέχρι στιγμής κυρίως στα CTCs και το ctDNA. Οι μέχρι τώρα δοκιμές των δύο αυτών αναλυτών που έχουν αναπτυχθεί απαιτούν την ανάπτυξη τυποποιημένων πρωτοκόλλων, όπου Διεθνείς κοινοπραξίες, όπως η Ευρωπαϊκή Κοινότητα Υγρής Βιοψίας (European Liquid Biopsy Society, ELBS, www.elbs.eu) μπορούν να παίξουν καθοριστικό ρόλο σε αυτή την προσπάθεια.[174] Ακόμη, νέοι αναλύτες της υγρής βιοψίας, όπως τα εξωκυττάρια κυστίδια,[175] τα αλληλεπιδρώντα με τα καρκινικά κύτταρα αιμοπετάλια [176] και τα κυκλοφορικά miRNAs,[177] βρίσκονται υπό εντονότερη ερευνητική μελέτη, αναμένοντας την πιθανή συνεισφορά τους στην κλινική πράξη. Τα μέχρι τώρα σύνθετα πάνελ βιοδεικτών που έχουν κατασκευαστεί χρειάζεται να ελεγχθούν σε κλινικές μελέτες με καλά καθορισμένα τελικά σημεία για την απόδειξη της κλινικής εγκυρότητας και χρησιμότητάς τους, οι οποίες είναι και απαραίτητες προϋποθέσεις για την εισαγωγή τους στην κλινική ρουτίνα[178].

1.4.4 Εγκεκριμένες εφαρμογές της υγρής βιοψίας στην κλινική ογκολογία

Το CellSearch σύστημα (Menarini Silicon Biosystems)[179] είναι ένας ανιχνευτής CTCs, εγκεκριμένος από το FDA για ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, προστάτη ή παχέος εντέρου. Ενισχύει την ανίχνευση των κυττάρων που εκφράζουν μόρια επιθηλιακής κυτταρικής προσκόλλησης (EpCAMs), αλλά στερούνται του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45. Η αναλυτική και κλινική εγκυρότητα της ποσοτικοποίησης των CTCs για την πρόγνωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, προστάτη ή παχέος εντέρου καθώς επίσης και ασθενών με μη μεταστατικό καρκίνο μαστού που έχουν λάβει ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία, έχουν επαληθευτεί σε μελέτες και/ή σε κοινές μετα-αναλύσεις, στις οποίες έχουν συμμετάσχει χιλιάδες ασθενείς[180-182]. Παρ' όλα αυτά, η καταμέτρηση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μέσω του CellSearch System δεν έχει υιοθετηθεί σε ευρεία κλίμακα για κανέναν από αυτούς τους καρκίνους, κυρίως επειδή δεν έχει αποδειχθεί να έχει κλινική χρησιμότητα. Για παράδειγμα, από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το εάν οι ασθενείς με αυξημένο αριθμό CTCs μπορούν να επωφεληθούν από την πρόωρη μετάβαση σε άλλο

θεραπευτικό σχήμα δεν προέκυψε κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα[183]. Ως εκ τούτου, η καταμέτρηση CTCs αντιπροσωπεύει έναν καθιερωμένο προγνωστικό, αλλά όχι προβλεπτικό βιοδείκτη[164].

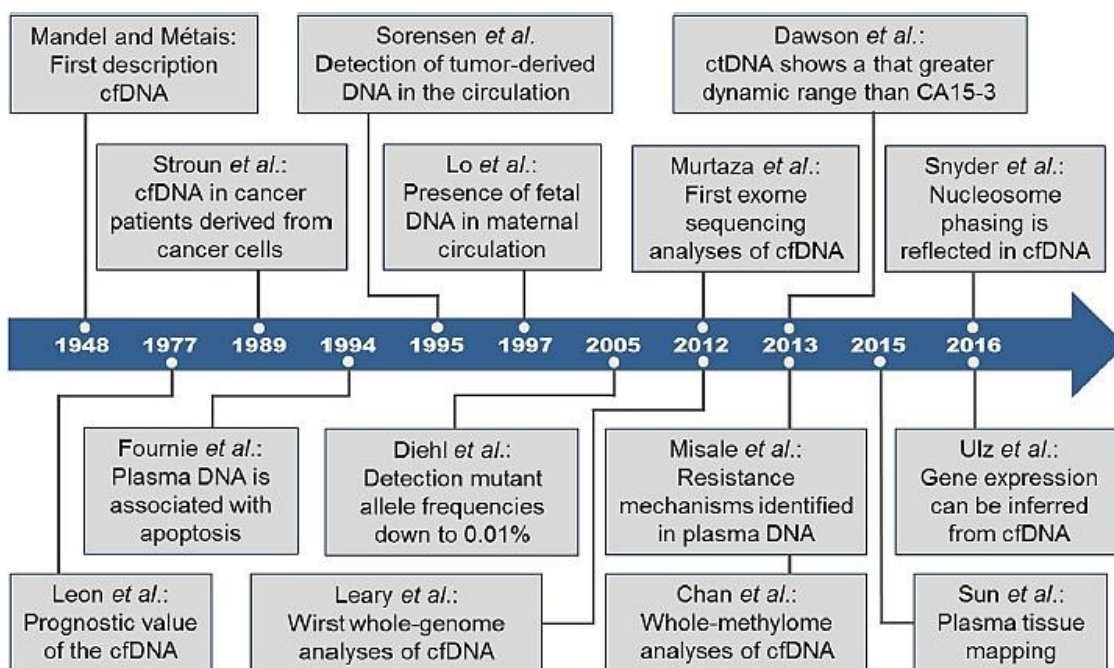
Εν αντιθέσει με παραπάνω, δύο δοκιμές, βασισμένες στο cfDNA και εγκεκριμένες από το FDA έχει αποδειχθεί ότι έχουν κλινική χρησιμότητα. Η πρώτη αφορά το cobas EGFR Mutation Test v2 (Roche Molecular Diagnostics), όπου ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο *EGFR* γονίδιο [184] στο cfDNA που απομονώνεται από πλάσμα ασθενών με καρκίνο στους πνεύμονες[185]. Το δεύτερο τεστ είναι το Epi proColon (Epigenomics AG), το οποίο χαρακτηρίζει την κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του *SEPT9* γονιδίου στο cfDNA που απομονώθηκε από πλάσμα ασθενών που εξετάζονται για καρκίνο του παχέος εντέρου[186]. Η υπερμεθυλίωση του υποδοχέα έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου. Η κλινική χρησιμότητα του Epi proColon έχει εκτιμηθεί σε πολλές μελέτες που περιλαμβάνουν αρκετές χιλιάδες κλινικά δείγματα και σε πρόσφατες μετα-αναλύσεις που περιγράφουν το τεστ ως έναν αποτελεσματικό δείκτη για την ανίχνευση ορθοκολικού καρκίνου αξιοποιώντας το αίμα των ασθενών, αν και με χαμηλή ευαισθησία στο πρώιμο στάδιο I του συγκεκριμένου καρκίνου[187, 188]. Στους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο στους πνεύμονες (NSCLC), το cobas EGFR Mutation Test v2 ανιχνεύει ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *EGFR* που έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία στους αναστολείς τυροσινικών κινασών (TKIs). Αυτές οι μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην απαλοιφή του εξωνίου 19 και της L858R αντικατάστασης στο εξώνιο 21, είναι ισχυροί προβλεπτικοί παράγοντες για την αυξημένη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς που έλαβαν στοχευμένες για τον EGFR θεραπείες, όπως το φάρμακο πρώτης γενιάς erlotinib (Tarceva)[189]. Το τεστ μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της T790M μεταλλαγής στο *EGFR* σε ασθενείς, των οποίων ο καρκίνος εξελίχθηκε μετά από θεραπεία με TKIs. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη οδηγεί σε ανθεκτικότητα στην θεραπεία και η ανίχνευσή της υποδηλώνει την μετάβαση από την χορήγηση του erlotinib στο osimertinib –ένα φάρμακο τρίτης γενιάς. Η προβλεπτική αξία του συγκεκριμένου τεστ, έχει οδηγήσει αρκετές επαγγελματικές εταιρίες να συνιστούν την χρήση του cfDNA για την ταυτοποίηση μεταλλαγών του *EGFR* σε ασθενείς με NSCLC[190]. Συμπερασματικά, η κλινική χρησιμότητα των cobas EGFR Mutation Test v2 και Epi proColon αναδεικνύουν τις δυνατότητες του ctDNA ως βιοδείκτη[167].

1.5 Ελεύθερο κυττάρων DNA (cell-free DNA, cfDNA)

1.5.1 Ιστορική αναδρομή του cfDNA

Παρ' όλο που η δομή του DNA περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Watson και Crick το 1953,[191] η παρουσία του DNA στο πλάσμα υγιών και ασθενών ατόμων είχε περιγραφεί ήδη από το 1948 από

τους Mandel και Métais[192]. Ωστόσο, η ανακάλυψη αυτή δεν κέντρισε το επιστημονικό ενδιαφέρον στην αρχή και πέρασαν περίπου 30 χρόνια για να επανέλθει δυναμικά πλέον στην ερευνητική ατζέντα. Έπειτα, λοιπόν, από μία μακριά περίοδο ερευνητικής αδράνειας επί του συγκεκριμένου ευρήματος, οι Tan *et al.*, ανέφεραν την παρουσία υψηλών επιπέδων DNA στην κυκλοφορία ασθενών με συστηματικό ερυθρωματώδη λύκο (SLE), χρησιμοποιώντας τόσο τη αντίδραση διφαινυλαμίνης όσο και τη μέθοδο διάχυσης σε πήκτωμα[193]. Η παρατήρηση αυτή, τελικά, προσέλκυσε το ενδιαφέρον για το ελεύθερο κυττάρων κυκλοφορικό DNA (cell-free DNA ή cfDNA) στον ορό και το πλάσμα. Επιπλέον, σε μία καινοτόμο τότε εργασία, οι Stroun και Anker παρουσίασαν την αυθόρμητη απελευθέρωση νουκλεϊκών οξέων από τα κύτταρα των κόλπων της καρδιάς ζωντανών βατράχων, κάτι που ενίσχυσε την περαιτέρω προώθηση του ενδιαφέροντος στο συγκεκριμένο πεδίο[194]. Εν συνεχεία, οι Koffler *et al.*, κατέδειξαν την παρουσίαση αυξημένων επιπέδων cfDNA σε ασθενείς με συστηματικό ερυθρωματώδη λύκο ή με ρευματοειδή αρθρίτιδα[195]. Ο Steinman αμφισβήτησε στην αρχή τα αποτελέσματα αυτά, καθώς δεν μπορούσε να απομονώσει μόρια DNA στο πλάσμα υγιών ατόμων[196]. Υπέθεσε, λοιπόν, ότι η παρουσία cfDNA στην κυκλοφορία ήταν μια παθολογική κατάσταση και πρότεινε να γίνονται μετρήσεις μόνο στο πλάσμα[196]. Παρόμοια αποτελέσματα ανέφεραν και οι Davis και Davis, οι οποίοι δήλωσαν ότι ο ορός δεν είναι κατάλληλο υλικό για την ανάλυση του cfDNA, αφού το γενωμικό DNA (gDNA) απελευθερώνεται περιοδικά στον ορό κατά τη διαδικασία της πήξης[197]. Το 1977, οι Leon *et al.*, παρουσίασαν πρώτοι την προγνωστική αξία του cfDNA σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα[198]. Υψηλά επίπεδα cfDNA βρίσκονταν συχνά σε ασθενείς με περισσότερα σοβαρά συμπτώματα, οι οποίοι είχαν ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα για λιγότερο από 10 χρόνια, ενώ οι ασθενείς με μεγαλύτερης διάρκειας ενεργή νόσο παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα του αναλύτη[199]. Στον αντίποδα, κάνοντας χρήση υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας ραδιο-δοκιμών, οι Cox και Gokcen, βρήκαν το DNA ως φυσικό περιεχόμενο τόσο στον ορό όσο και το πλάσμα[200]. Την ίδια χρονιά, οι Anker *et al.*, ισχυρίστηκαν ότι τα λευκοκύτταρα στο ανθρώπινο αίμα απελευθερώνουν αυθόρμητα DNA όταν γίνεται *in vitro* επώαση[201]. Στις αρχές του 1980, ερευνήθηκε η διαγνωστική αξία του cfDNA στην πνευμονική εμβολή και στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, αλλά από τις μελέτες αυτές δεν προέκυψαν σύμφωνα αποτελέσματα[202].



Εικόνα 1.9: Χρονικό διάγραμμα των ιστορικών και πρόσφατων εξελίξεων στην ανάλυση του cfDNA [202]

Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 1.9, το 1977 προτάθηκε για πρώτη φορά η χρήση του cfDNA ως εν δυνάμει καρκινικό βιοδείκτη, όταν οι Leon *et al.* ανέφεραν αυξημένα επίπεδα του cfDNA σε ασθενείς με καρκίνο. Σε ορισμένους ασθενείς, παρατηρήθηκε ακόμη και μείωση των επιπέδων του cfDNA έπειτα από επιτυχή αντικαρκινική θεραπεία[199]. Χρησιμοποιώντας ραδιοανοσοχημικές μεθόδους για ποσοτικοποίηση, προσδιορίστηκε η απόλυτη ποσότητα cfDNA σε ορό 173 ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου και σε 55 υγιείς. Οι συγγραφείς βρήκαν σημαντικά υψηλότερα τα επίπεδα του DNA στον ορό ασθενών με μεταστατική νόσο, παρ' όλο που δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του DNA και το μέγεθος ή την θέση του πρωτογενή όγκου. Ωστόσο, οι ασθενείς με μειωμένα επίπεδα του cfDNA υπό θεραπευτική αγωγή, εμφάνισαν συρρίκνωση του όγκου και ελάττωση του πόνου. Από την άλλη, όταν τα επίπεδα του cfDNA αυξάνονται ή παραμένουν σταθερά, παρατηρείται ελλιπής απόκριση στην θεραπευτική αγωγή[199]. Μερικά χρόνια αργότερα, οι Stroun *et al.*, έδειξαν για πρώτη φορά ότι το DNA που απομονώνεται από την κυκλοφορία ασθενών με καρκίνο προέρχεται από τα καρκινικά κύτταρα, χρησιμοποιώντας μία μέθοδο που βασίζεται στην μείωση της σταθερότητας του δίκλωνου καρκινικού DNA[203]. Σε συνέπεια με τις μελέτες των Leon *et al.*, οι συγγραφείς ανέφεραν αυξημένα επίπεδα του cfDNA σε ασθενείς με καρκίνο συγκριτικά με υγιή άτομα, όμως υπόδειξαν ότι η παρουσία υψηλών επιπέδων cfDNA δεν αποτελεί από μόνη της ισχυρό διαγνωστικό δείκτη[203]. Σύντομα έγινε εμφανές ότι η ανίχνευση ειδικών καρκινικών αλλαγών θα μπορούσε να καταστεί επιτυχής εφαρμογή του cfDNA ως

κλινικό βιοδείκτη. Ο πρώτος άμεσος προσδιορισμός του προερχόμενου από καρκινικά κύτταρα DNA στην κυκλοφορία επετεύχθη από τους Sorensen *et al.* το 1994[204]. Πραγματοποιώντας ενίσχυση ειδικών αλληλομόρφων και αλληλουχίζοντας απευθείας τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, οι συγγραφείς ταυτοποίησαν την παρουσία μεταλλαγών στο KRAS γονίδιο στο πλάσμα ασθενών με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Λίαν συντόμως, αποδείχθηκε ότι το DNA του πλάσματος σχετίζεται με την κυτταρική απόπτωση και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης κυτταρικού θανάτου, καθώς εντοπίζεται στην κυκλοφορία κυρίως με τη μορφή μονονουκλεοσωμάτων[205].

Όλες αυτές οι μελέτες αποτελούν «ακρογωνιαίο λίθο» για την κλινική αξιοποίηση του cfDNA στην ανίχνευση κακοήθειας, την εκτίμηση της απόκρισης στο θεραπευτικό σχήμα που έχει επιλεχθεί και τον προσδιορισμό της υποτροπής της νόσου. Παρ' όλα αυτά, η σημαντική ανακάλυψη της ανάλυσης του καρκινικού cfDNA, καθυστέρησε σε σχέση με τις εφαρμογές που βασίζονται στο εμβρυϊκό κυκλοφορούν DNA (cell-free fetal DNA, cffDNA). Πολλές ερευνητικές ομάδες μπόρεσαν και ανίχνευσαν διάφορες και καρκινοειδικές αλλαγές, όπως για παράδειγμα τη μικροδορυφορική αστάθεια, την απώλεια ετεροζυγωτίας, σημειακές μεταλλαγές και τη μη φυσιολογική μεθυλίωση στο πλάσμα, προτείνοντας σε λογική συνέχεια ότι τα επίπεδα του ειδικού καρκινικού DNA αντανakλούν το καρκινικό φορτίο [206-213]. Αυτό αποτέλεσε και το πρώτο στοιχείο για την παρουσία εμβρυϊκού DNA στην κυκλοφορία εγκύων στο πέρας της κύησης[214]. Με την ανακάλυψη αυτή, ακολούθησαν πολλές επιστημονικές μελέτες, όπου εν τέλει δημιουργήθηκαν δοκιμές για τον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου, [214] του παράγοντα Rhesus [215] και γενετικών διαταραχών που ευθύνονται για ασθένειες όπως η β-θαλασσαιμία [216] και οι τρισωμίες[217]. Όλες αυτές οι καινοτόμες εργασίες συνέδραμαν στην ανάπτυξη γενετικών δοκιμών προγεννητικού ελέγχου, λαμβάνοντας το εμβρυϊκό γενετικό υλικό, χωρίς την εφαρμογή κάποιας επεμβατικής μεθόδου, όπως είναι η αμνιοπαρακέντηση. Επί του παρόντος, διατίθενται στο εμπόριο μια ποικιλία μη επεμβατικών προγεννητικών δοκιμών και εκατομμύρια έγκυες έχουν πραγματοποιήσει και πραγματοποιούν τις δοκιμές αυτές[202].

1.5.2.1 Βιολογικά χαρακτηριστικά της δεξαμενής του cfDNA

Ο όρος εξωκυττάριο DNA αναφέρεται τόσο στο πυρηνικό όσο και στο μιτοχονδριακό DNA που απελευθερώνεται από τα κύτταρα στο εξωκυττάριο μέσο με διάφορους μηχανισμούς. Τα μόρια αυτά έχουν βρεθεί στα βιολογικά υγρά, όπως στο αίμα, τη λέμφο, τη χολή, το γάλα, τα ούρα, το σάλιο, στη βλέννη, στο νωτιαίο και το αμνιακό υγρό και έχουν απομονωθεί σε ανθρώπους αλλά και σε ζώα και φυτά. Επιπλέον, εξωκυττάρια μόρια DNA έχουν εντοπιστεί και στο υπερκείμενο

κυτταροκαλλιέργειών *in vitro* είτε από κυτταρικές σειρές, από πρωτογενή κύτταρα, από οργανοειδή ή από καλλιέργειες εμβρύων[218].

Όσον αφορά το εξωκυττάριο κυκλοφορικό DNA (cell-free DNA, cfDNA) χαρακτηρίζεται από δίκλωνα μόρια DNA ή μόρια DNA σε συνάφεια με μακρομοριακά σύμπλοκα ή εσωτερικευμένα σε κυστίδια και εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος[219]. Αντιπροσωπεύεται από τμήματα DNA συγκεκριμένου μήκους που κυμαίνονται κατά κόρον από 60-1000 bp και μπορούν να προσδιοριστούν και να μετρηθούν με τεχνικές της υγρής βιοψίας[165, 220]. Από μελέτες ανάλυσης μεθυσίωσης έχει βρεθεί ότι η απελευθέρωση του cfDNA στο πλάσμα γίνεται πλειοψηφικά από τα αιμοποιητικά κύτταρα στα υγιή άτομα[219]. Διεξήχθησαν ακόμη μελέτες για τον προσδιορισμό της δεξαμενής του cfDNA μετά από τη μεταμόσχευση οργάνου και μυελού των οστών, όπου οι ομάδες των Lo και Snyder αντίστοιχα,[221, 222] ανέδειξαν την παρουσία μορίων DNA του δότη στην κυκλοφορία του δέκτη του μοσχεύματος, υποδεικνύοντας ότι το cfDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της γενετικής υπογραφής του εκάστοτε οργάνου.

Στα βιολογικά υγρά το cfDNA μπορεί να εντοπίζεται με διαφορετικές δομικές διαμορφώσεις, οι οποίες αντανakλούν και το μηχανισμό μέσω του οποίου απελευθερώθηκε. Επομένως, το DNA μπορεί να εμφανίζεται με τη μορφή νουκλεοσωμάτων, όπου το δίκλωνο DNA περιελίσσεται γύρω από ένα οκταμερές ιστονών και η δομή αυτή σταθεροποιείται με τη συμμετοχή της ιστόνης H1. Κάθε νουκλεόσωμα συνδέεται με το γειτονικό του, μέσω της περιοχής σύνδεσης, η οποία συνίσταται από δίκλωνο DNA[219]. Το cfDNA έχει απομονωθεί από την κυκλοφορία και υπό τη μορφή των «virtosome». Τα «virtosome» είναι σύμπλοκα λιποπρωτεϊνών με νουκλεϊκά οξέα και θεωρούνται διακυτταρικοί αγγελιαφόροι[223]. Σε *in vitro* μελέτες φαίνεται ότι το συγκεκριμένο σύμπλοκο απελευθερώνεται με ένα ενεργειακά εξαρτώμενο βήμα,[224] από ζωντανά κύτταρα,[224, 225] με ρυθμιζόμενο τρόπο[201, 219]. Επιπρόσθετα, το DNA ως ισχυρά ηλεκτροστατικό μόριο συνδέεται και με πρωτεΐνες της κυκλοφορίας, όπως με την αλβουμίνη, τις ανοσοσφαιρίνες, τη φιβρονεκτίνη και το C1q συστατικό του συμπληρώματος, σχηματίζοντας νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα, αλλά και με κυτταρικές επιφάνειες[226]. Έχουν βρεθεί DNA μόρια στην επιφάνεια τόσο των λευκοκυττάρων όσο και των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αίμα[227]. Στην επιφάνεια των κυττάρων υπάρχουν υποδοχείς, ικανοί να προσδέσουν DNA μόρια, αλλά και να επάγουν την ενδοκυττάρωσή τους[228]. Άλλη μία διαμόρφωση του εν λόγω βιομορίου περιλαμβάνει τα μόρια DNA που σχετίζονται με εξωκυττάρια μικροκυστίδια, όπως τα εξωσώματα, τα εκτοσώματα και τα αποπτωτικά σωμάτια[219]. Οι δομές αυτές προστατεύουν το μόριο από τη δράση των νουκλεασών της κυκλοφορίας και ελαττώνουν την αναγνώρισή τους ως σήματα κινδύνου από το ανοσοποιητικό σύστημα[229]. Τέλος, πέραν του πυρηνικού DNA, το cfDNA εμπλουτίζεται και από το μιτοχονδριακό (mtDNA). Παρ' όλο που η δομή

του mtDNA της κυκλοφορίας (cf-mtDNA) δεν είναι ακόμη καλά χαρακτηρισμένη, μπορεί να εντοπιστεί είτε σε γυμνή μορφή είτε σε συνάφεια με θραύσματα της εσωτερικής και της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης[230].

Κλάσμα του cfDNA είναι και το καρκινικό DNA της κυκλοφορίας (circulating tumor DNA, ctDNA), το οποίο προέρχεται από τα καρκινικά κύτταρα. Στο ctDNA ανιχνεύονται καρκινοειδικές και μη μεταλλάξεις που έχουν να κάνουν με σημειακές μεταλλάξεις, δομικές και χρωμοσωμικές ανωμαλίες, παραλλαγές στον αριθμό των αλληλομόρφων καθώς και μη φυσιολογικές επιγενετικές τροποποιήσεις. Στους ασθενείς με καρκίνο το cfDNA δεν τροφοδοτείται μόνο από τα κύτταρα του όγκου, αλλά και από κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου καθώς και από άλλα μη καρκινικά κύτταρα -όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος- από διάφορα μέρη του σώματος[219]. Συνεπώς, τα στρωματικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα τροφοδοτούν εξίσου την κυκλοφορία με DNA που σχετίζεται με την εξέλιξη της κακοήθειας[231].

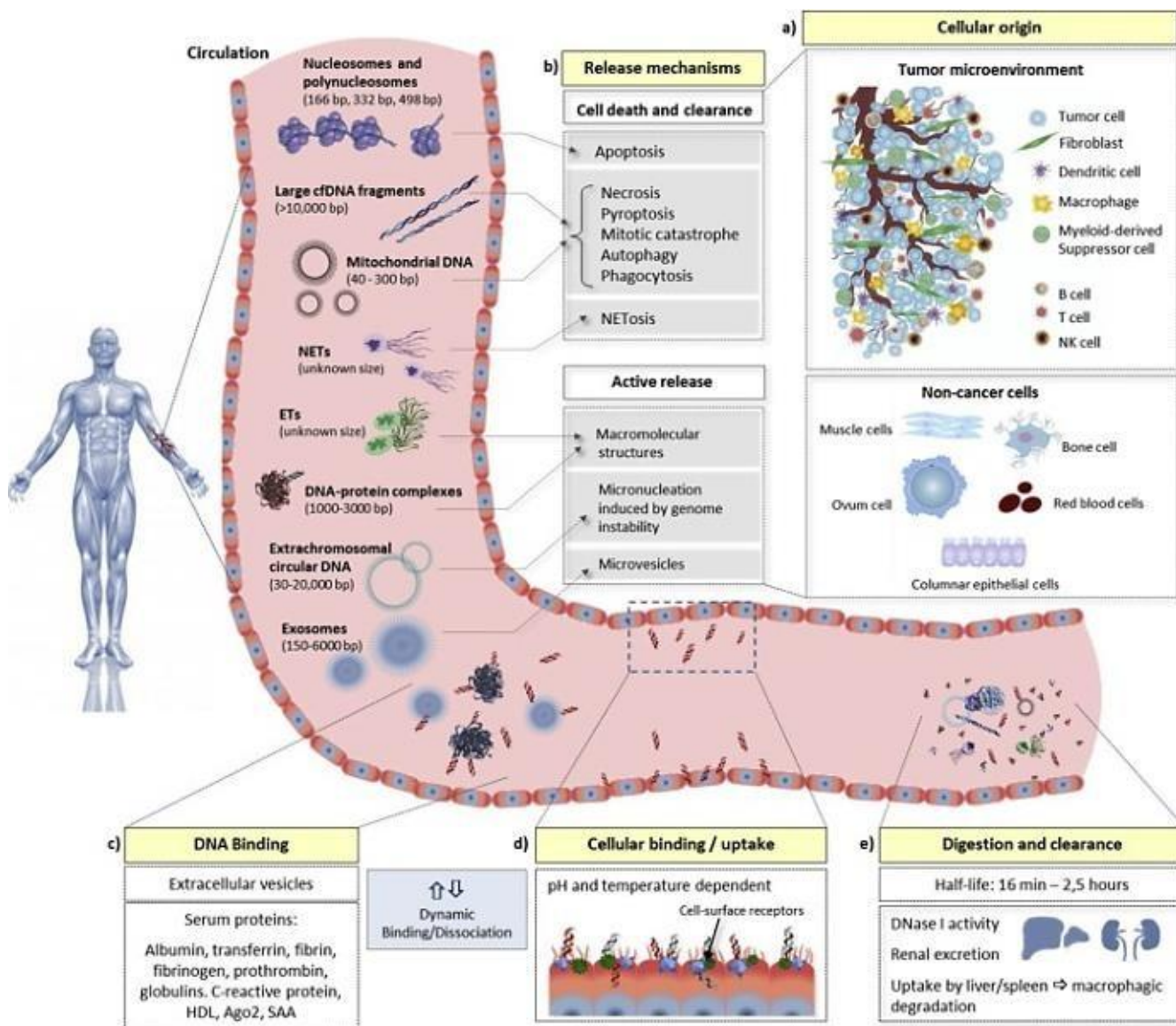
Όλες αυτές οι συνθήκες οδηγούν στην μεγάλη ποικιλομορφία τόσο της απόλυτης ποσότητας του κυκλοφορικού DNA, όσο και του μήκους των τμημάτων καρκινικού DNA που διανέμονται στην κυκλοφορία. Οι συγκεντρώσεις του cfDNA στο πλάσμα μπορεί να κυμαίνονται από <1-100 ng/mL [232] στα υγιή άτομα και περισσότερο και από 1000 ng/mL σε ασθενείς με καρκίνο, γεγονός που εξαρτάται από το στάδιο και το φορτίο της νόσου[199, 233]. Σε γενικές γραμμές οι ασθενείς με νόσο πιο προχωρημένου ή μεταστατικού σταδίου έχουν περισσότερο ανιχνεύσιμα επίπεδα ctDNA από τους ασθενείς με εντοπισμένη νόσο. Για παράδειγμα, σε μία μελέτη που συγκρίνονταν τα επίπεδα του ctDNA σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους, το ctDNA ανιχνεύθηκε σε >75% των ασθενών με προχωρημένο καρκίνο, ενώ σε <50% των ασθενών με πρωτογενή, εντοπισμένο καρκίνο[173].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το cfDNA αποικοδομείται από τη δράση δεοξυριβονουκλεασών (DNAασών) στο περιφερικό αίμα, οδηγώντας έτσι σε σχετικά χαμηλά επίπεδα cfDNA στους υγιείς. Το γεγονός ότι στους ασθενείς με καρκίνο τα επίπεδα cfDNA είναι αυξημένα μπορεί να αποδοθεί σε χαμηλότερης λειτουργικότητας DNAάσες στο πλάσμα των ασθενών αυτών,[234, 235] καθώς έχει αναφερθεί ότι η μέση συγκέντρωση της DNAάσης I είναι χαμηλότερη σε ασθενείς με καρκίνο συγκριτικά με τους υγιείς[234]. Ακόμη, το DNA στους ασθενείς με καρκίνο μπορεί να είναι ανθεκτικό στη δράση της DNAάσης, όπως φαίνεται έπειτα από πέψη με βακτηριακής προέλευσης DNAάση in vitro[236, 237]. Πιστεύεται, επιπροσθέτως, ότι καθώς ο καρκίνος εξελίσσεται και αυξάνεται σε μέγεθος, αυξάνεται και η απόπτωση και η νέκρωση των κυττάρων. Αυτή η συνθήκη μπορεί να επάγει τη μαζική απελευθέρωση DNA στην κυκλοφορία από τον καρκινικό αλλά και τον παρακείμενο υγιή ιστό, διαταράσσοντας την ισορροπία μεταξύ της διασποράς και της απομάκρυνσης του DNA από την κυκλοφορία. Το μήκος των τμημάτων του καρκινικού DNA που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία

ποικίλει από <1% μέχρι και >90%, αναλόγως το μέγεθος του όγκου, τον αριθμό των καρκινικών εστιών, τον βαθμό διαφοροποίησης και αγγειογένεσης του όγκου καθώς και την υποβολή ή όχι σε θεραπευτική αγωγή ,[173, 238] καθιστώντας κατ' αυτόν τον τρόπο το ctDNA έναν «απαιτητικό» αναλύτη.

1.5.2.2 Βιολογικά χαρακτηριστικά-Μηχανισμοί απελευθέρωσης

Το όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον για το cfDNA ως αναλύτη της υγρής βιοψίας, καθώς και οι πρόσφατες παρατηρήσεις σχετικά με τα διαφορετικά μοτίβα θραυσματοποίησης που μπορεί να προκύπτουν, δημιουργούν την ανάγκη για την περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών απελευθέρωσης του βιομορίου στα σωματικά υγρά. Οι κυρίαρχοι μηχανισμοί που τροφοδοτούν την κυκλοφορία με cfDNA είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και η νέκρωση των κυττάρων, καθώς και η ενεργός κυτταρική απέκκριση του βιομορίου στα σωματικά υγρά. Άλλοι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου που εμπλέκονται στην διαδικασία της απελευθέρωσης του cfDNA είναι η πυρόπτωση, η αυτοφαγία, η μιτοφαγία, η φαγοκύτωση, η μιτωτική καταστροφή και η NETosis. Η συνδρομή τόσων μηχανισμών στην απελευθέρωση του cfDNA στην κυκλοφορία, δημιουργεί μια ποικιλία DNA τμημάτων διαφορετικού μήκους (bp)[239].



Εικόνα 1.10: Τα χαρακτηριστικά του cfDNA στο ανθρώπινο σώμα. α) Κυτταρική προέλευση του ctDNA. β) Μηχανισμοί απελευθέρωσης στην κυκλοφορία. γ) Δυναμική αλληλεπίδραση με τα εξωκυτάρια κυστίδια και με πολλές πρωτεΐνες του ορού. δ) Πρόσδεση στην κυτταρική επιφάνεια. ε) Πέψη και απομάκρυνση από την κυκλοφορία [239]

Η απόπτωση θεωρείται η κινητήριος δύναμη απελευθέρωσης του DNA στην κυκλοφορία[240]. Επιπλέον δεδομένα που τεκμηριώνουν ενισχυτικά την αποπτωτική διαδικασία ως την κύρια πηγή προέλευσης του cfDNA, προέκυψαν από την πραγματοποίηση πειραμάτων σε ποντίκια, τα οποία και έδειξαν ότι η πλειοψηφία των τμημάτων DNA στο πλάσμα των αλλομοσχευματικών ζωικών μοντέλων ήταν μονονουκλεοσωμικής μορφής[241].

Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπ' όψιν την αποπτωτική -πλειοψηφικά- προέλευση του cfDNA, το μοτίβο θραυσματοποίησής του θα είναι εξαρτώμενο από την δράση των κασπασών. Οι κασπάσες είναι οι

κύριοι τελεστές των μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών της απόπτωσης και μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω της εξωγενούς (μέσω ενεργοποίησης υποδοχέα θανάτου) ή της ενδογενούς οδού (μέσω μιτοχονδρίων) κατά τη διάρκεια της απόπτωσης[242]. Πιο αναλυτικά, η ενεργοποιημένη από κασπάση δεοξυριβονουκλεάση (caspase-activated Dnase, CAD), είναι μία ενδονουκλεάση ειδική ως προς το δίκλωνο DNA και επάγει σχάσεις στη δίκλωνη δομή του[243]. Εφόσον η CAD στερείται δράση εξωνουκλεάσης, μπορεί να τέμνει μόνο περιοχές σύνδεσης μεταξύ των νουκλεοσωμάτων[244]. Αυτή η πέψη μεταξύ των περιοχών σύνδεσης των νουκλεοσωμάτων, δημιουργεί ένα μοτίβο θραυσματοποίησης με τμήματα cfDNA τυπικού μήκους 167 bp, τα οποία αντιστοιχούν κατά προσέγγιση στο τμήμα του DNA που είναι τυλιγμένο γύρω από το νουκλεόσωμα (~147 bp) και το τμήμα DNA που συνδέει δύο νουκλεοσώματα (~20 bp)[240]. Ωστόσο, ανάλογα με τη δράση των νουκλεασών κατά την αποπτωτική διαδικασία, μπορεί προκύψουν και τμήματα DNA μεγαλύτερα των 167 bp, που αντιπροσωπεύουν δι-, τρι- και πολυ-νουκλεοσώματα[239].

Χρησιμοποιώντας διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις μεταξύ τους, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την αυξημένη παρουσία μικρότερων τμημάτων cfDNA (~90 bp) κακοήθους προέλευσης, συγκριτικά με τα τμήματα cfDNA φυσιολογικού τύπου[239]. Παρόμοια ευρήματα έχουν παρατηρηθεί ήδη από το 2011, όταν η ομάδα του Thierry έδειξε την μεγαλύτερη παρουσία τμημάτων cfDNA <100 bp, ιδιαίτερα σε καρκινικά δείγματα[245]. Η αιτία παραγωγής μικρότερων θραυσμάτων δεν είναι πλήρως αποκρυσταλλωμένη, αλλά στις πιθανές εξηγήσεις συμπεριλαμβάνονται οι διαφορές στην περιέλιξη των νουκλεοσωμάτων ή η δράση των νουκλεασών μεταξύ των διαφορετικών τύπων ιστών, οι διαφορετικοί τρόποι απομόνωσης του cfDNA ή η εισαγωγή μεροληπτικών στοιχείων κατά τη διάρκεια προετοιμασίας βιβλιοθήκης από μονόκλωνο DNA[239].

Επιπρόσθετα, τμήματα cfDNA που υπερβαίνουν τα 10.000 bp παρατηρούνται επίσης συχνά σε ασθενείς με καρκίνο, αντανakλώντας ότι η προέλευσή τους οφείλεται στην κυτταρική νέκρωση[239]. Η νέκρωση χαρακτηρίζεται ως τυχαία και παθητική διαδικασία, προσδιορίζεται και ως μορφή μη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και επάγεται ως απόκριση σε ισχυρές χημικές και μηχανικές πιέσεις. Στα τυπικά επακόλουθα της διαδικασίας αυτής περιλαμβάνονται η διόγκωση και η ρήξη των νεκρωτικών κυττάρων, χωρίς όμως να αποδιοργανώνεται ο πυρήνας και η χρωματίνη θραυσματοποιείται με έναν πιο άναρχο τρόπο, οδηγώντας στην απελευθέρωση τμημάτων DNA έως και >50 kbp[219].

Όσον αφορά το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) που όπως προαναφέρεται είναι δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA, μεγέθους 16.000 bp, απελευθερώνεται στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια των διαδικασιών κυτταρικού θανάτου και ειδικά μέσω της μιτοφαγίας[246]. Έχει απομονωθεί από το αίμα υγιών αλλά και ασθενών ατόμων, συμπεριλαμβανομένου και των ασθενών με καρκίνο[247]. Σε αντιδιαστολή με

το τυπικό μοτίβο θραυσματοποίησης του πυρηνικού cfDNA που προέρχεται κυρίως από την αποπτωτική διαδικασία, το cf-mtDNA είναι περισσότερο τμηματοποιημένο και τυπικά κυμαίνεται μεταξύ 40 και 300 bp[239]. Αυτό το εύρος στο μέγεθος των τμημάτων μπορεί να αποδοθεί στην απουσία των ιστονών, η οποία αφήνει εκτεθειμένο το «γυμνό» cf-mtDNA στην δράση των ενζύμων. Μολοταύτα, η ανάλυση του cf-mtDNA παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς σε πολυάριθμες μελέτες φαίνεται να έχει εφαρμογή στη διάγνωση ποικίλων νόσων (π.χ. στο σακχαρώδη διαβήτη, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, την αθηρογένεση, την κοκκιοματώδη πολυαγγειίτιδα), παθοφυσιολογικών συνθηκών (π.χ. σε τραυματισμό) ή σε φυσιολογικές καταστάσεις (π.χ. στην έντονη άσκηση)[219]. Στον τομέα της ογκολογίας έχουν παρατηρηθεί κάποια ξεκάθαρα και ουσιαστικά ευρήματα που άπτονται στην θεραπεία, την πρόγνωση ή την επαναληπτική εξέταση (follow-up) των ασθενών, αλλά αρκετές δημοσιεύσεις συγκλίνουν στην ύπαρξη της ανάγκης για ανάπτυξη δοκιμών που να συσχετίζουν το cf-mtDNA είτε με επίπεδα φλεγμονής [219] είτε με φαινόμενα εξωκυττάρων «παγίδων» DNA,[248] στα οποία πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ο ρόλος τους στην καρκινογένεση και τη μετάσταση[249, 250]. Εξαιτίας των πολλαπλών αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA (από κάποιες δεκάδες μέχρι και χιλιάδες ανά κύτταρο), φαίνεται συνετό το ενδιαφέρον για την ανίχνευση cf-mtDNA, καθώς εμφανίζεται ως σημαντική πηγή του ευρύτερου cfDNA. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί σημαντικά επίπεδα σωματικών μεταλλάξεων και παραλλαγών του αριθμού των αλληλομόρφων στο μιτοχονδριακό DNA που εμπλέκονται σε διάφορους καρκίνους [251-253] και μπορούν να αναλυθούν μέσω του cf-mtDNA.

Πέραν του προγραμματισμένου ή μη κυτταρικού θανάτου, υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν ότι ένα σημαντικό κλάσμα του cfDNA προέρχεται και από την ενεργό κυτταρική έκκριση.[254, 255] Έχει παρατηρηθεί σε *in vitro* μελέτες κυτταροκαλλιέργειών η παρουσία cfDNA τμημάτων στο θρεπτικό υλικό που κυμαίνονται από 1000 έως 3000 bp, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο την υπόθεση της ενεργούς έκκρισης του cfDNA[239]. Ενώ ο ακριβής μηχανισμός που εμπλέκεται στην ενεργητική απελευθέρωση του cfDNA από τα κύτταρα παραμένει ασαφής, είναι πιθανό το cfDNA να απελευθερώνεται ως αποτέλεσμα της γενετικής αστάθειας[256]. Παράλληλα, αναφέρεται για πρώτη φορά σε μία πρόσφατη ερευνητική εργασία, η παρουσία εξωχρωμοσωμικού κυκλικού DNA στο ανθρώπινο αίμα[257]. Αυτά τα DNA μόρια απομακρύνονται από τον πυρήνα ως κυκλικά κομμάτια DNA χωρίς κεντρομερή, τα οποία προκύπτουν ως αποτέλεσμα χρωμοσωμικής αστάθειας κατά την αντιγραφή του DNA [258] και κυμαίνονται από 30 έως 20.000 bp, στο ανθρώπινο αίμα[259].

Μία άλλη μορφή ενεργητικής ή ρυθμιζόμενης έκκρισης περιλαμβάνει τα DNA τμήματα που σχετίζονται με εξωκυττάρια κυστίδια. Μάλιστα, στο αίμα ασθενών με καρκίνο έχει προσδιοριστεί ένας αφύσικα μεγάλος αριθμός μικροκυστιδίων, καθώς εκκρίνονται με αυξημένη συχνότητα από τα

καρκινικά κύτταρα διάφοροι τύποι τέτοιων σχηματισμών, όπως είναι τα εξωσώματα, τα εκτοσώματα και τα αποπτωτικά σωμάτια[219]. Τα εξωσώματα έχουν μέγεθος μεταξύ 30 και 100 nm, εκκρίνονται φυσιολογικά από τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και απαρτίζονται από πρωτεΐνες, συγκεκριμένα λιπίδια, mRNA και microRNA καθώς επίσης και από μόρια DNA μεγέθους 150-6000 bp. Τα μόρια του DNA στα εξωσώματα φαίνεται να έχουν δύο μορφές. Μία δίκλωνη μορφή που είναι προσδεσμένη με την εξωτερική μεμβράνη του μικροκυστιδίου, μεγέθους >2.5 kbp. Η δεύτερη μορφή χαρακτηρίζεται από δίκλινα μόρια DNA που βρίσκονται στο εσωτερικό του εξωσώματος και έχουν μέγεθος που κυμαίνεται από 100bp έως και 2.5 kbp[219].

1.5.2.3 Χρόνος ημιζωής και Απομάκρυνση του cfDNA από την κυκλοφορία

Υπάρχει αναμφισβήτως μεγάλη έλλειψη γνώσης γύρω από την προέλευση και τις μοριακές ιδιότητες του cfDNA. Όπως περιγράφεται και παραπάνω ένα μεγάλο κλάσμα του cfDNA προέρχεται από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ενώ στον εμπλουτισμό της κυκλοφορίας με το συγκεκριμένο βιομόριο είναι πλέον ξεκάθαρο ότι συνεισφέρουν και άλλοι μηχανισμοί. Επιπλέον, καθένας από αυτούς τους μηχανισμούς ρυθμίζεται από ένα μεγάλο εύρος βιολογικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (πολλοί από τους οποίους συνδέονται άρρηκτα με μια πολύπλοκη διάδραση κυτταρικών και φυσιολογικών αλληλεπιδράσεων) που είναι σχεδόν μοναδικοί για το εκάστοτε άτομο. Στις μεταβλητές μπορεί να περιλαμβάνονται η ηλικία, το φύλο, η φυλή, ο δείκτης μάζας σώματος, η φυσιολογική λειτουργία των οργάνων, το κάπνισμα, η φυσική άσκηση, η διατροφή, τα επίπεδα γλυκόζης, το οξειδωτικό stress, οι λοιμώξεις, η έμμηνος ρύση και η κύηση. Εκτός από τους μηχανισμούς απελευθέρωσης, τα χαρακτηριστικά του cfDNA επηρεάζονται σημαντικά και από το ρυθμό απομάκρυνσής του από την κυκλοφορία. Διάφορες επιστημονικές μελέτες έχουν εκτιμήσει τον χρόνο ημιζωής του συγκεκριμένου βιομορίου στην κυκλοφορία από 16 min έως και 2,5 h, αλλά είναι κάτι που απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση για τις διάφορες συνθήκες που ανακύπτουν (π.χ. σε υγιείς και ασθενείς, πριν και μετά το χειρουργείο, στην ηρεμία και μετά την άσκηση) [219].

Όσον αφορά τους μηχανισμούς με τους οποίους απομακρύνεται το cfDNA από την κυκλοφορία, εμπλέκονται η νεφρική απέκκριση του cfDNA στα ούρα,[260] η επεξεργασία του με τη δεοξυριβονουκλεάση I [234] και η πρόσληψή του από το ήπαρ και τον σπλήνα,[261] η οποία ακολουθείται από την αποικοδόμηση του cfDNA μέσω της φαγοκυττάρωσης. Η απομάκρυνση του cfDNA μέσω αυτών των μηχανισμών επηρεάζεται με τη σειρά της από την αλληλεπίδραση του cfDNA με τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και τα εξωκυττάρια κυστίδια και από τη σύνδεση τμημάτων του cfDNA με αρκετές πρωτεΐνες του ορού (π.χ. αλβουμίνη, τρανσφερίνη, ινωδογόνο, προθρομβίνη, σφαιρίνες, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη κ.ά.)[219]. Επιπρόσθετα, το cfDNA μπορεί να αναγνωριστεί από ποικίλες πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων και να ενδοκυτταρωθεί ως σύμπλοκο για την πιθανή

επικείμενη αποικοδόμησή του σε νουκλεοτίδια ή για την μεταφορά του στον πυρήνα. Η πρόσδεση του cfDNA στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας εξαρτάται στο pH και τη θερμοκρασία και μπορεί να ανασταλεί από διάφορα υποστρώματα[226]. Επομένως, ο ρυθμός πρόσληψης του cfDNA από τους διάφορους κυτταρικούς τύπους επηρεάζει και τον ρυθμό απομάκρυνσης του μορίου από την κυκλοφορία.

1.5.2.4 Βιολογική λειτουργία

Βάσει των δεδομένων που αφορούν τη βιολογία του cfDNA, αναδείχθηκε και ο λειτουργικός του ρόλος, ο οποίος έγκειται στην ιδιότητά του ως διακυτταρικός αγγελιαφόρος και στην συμμετοχή του στο φαινόμενο της γενομετάστασης. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να περιγράφεται και το αντίκτυπό του στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις, μέσω της αλληλεπίδρασής του με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος[219].

Διακυτταρικός αγγελιαφόρος: Τα «virtosomes», όπως ήδη έχει περιγραφεί, είναι λιποπρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιέχουν DNA, RNA και DNA-εξαρτώμενες DNA και RNA πολυμεράσες[223]. Αυτά τα σύμπλοκα λειτουργούν ως μέσα επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων και απελευθερώνονται από τα κύτταρα με ενεργητικό και ρυθμιζόμενο τρόπο, κάτι που επιβεβαιώθηκε από το υπερκείμενο κυτταροκαλλιεργειών[201, 262].

Ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο ότι μόνο τα «virtosome» έχουν το ρόλο του διακυτταρικού μηνύτορα. Δεδομένης της απουσίας μεμβράνης οριοθέτησης και του μεγέθους τους, το οποίο είναι αντίστοιχο των μικρών λιποσωμάτων,[263] είναι εξίσου πιθανό και τα μικροκυτίδια να εμπλέκονται στην μεταφορά γενετικής πληροφορίας από ένα κύτταρο σε ένα άλλο. Σύμπλοκα μοριακών οχημάτων με συνθετικά μόρια DNA, τα οποία σχηματίζονται για τη μεταφορά είτε μικρών DNA αλληλουχιών (π.χ. antisense μόρια DNA) είτε μεγαλύτερων (π.χ. πλασμιδιακό DNA) που αποσκοπούν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης in vitro και in vivo, ενισχύουν την παραπάνω θέση[263].

Γενομετάσταση: Από τις αρχικές κιάλας μελέτες για το συγκεκριμένο βιομόριο προέκυψε ότι τα τμήματα του cfDNA μπορούν να εισέρχονται σε γειτονικά ή και πιο απομακρυσμένα κύτταρα [264, 265] καταδεικνύοντας την ικανότητα του cfDNA να μεταβάλλει την βιολογία του κυττάρου δέκτη. Αν και δεν είναι προς το παρόν πλήρως κατανοητό το πως ακριβώς το cfDNA επάγει αυτά τα αποτελέσματα, υπάρχουν κάποιες ενδιαφέρουσες ενδείξεις που αξίζει να αναφερθούν. Αρχικά, φαίνεται ότι το ctDNA συμμετέχει στην καρκινογένεση και την ανάπτυξη μεταστάσεων, μέσω της εισαγωγής του σε κύτταρα με μια διαδικασία που θυμίζει την in vitro διαμόλυνση και καλείται «γενομετάσταση», [219, 266] επάγοντας την υπερέκφραση αρκετών προ-μεταστατικών γονιδίων, μέσω του ανεξάρτητου μονοπατιού TLR9/MYD88[239]. Έπειτα, έχει δειχθεί ότι η πλειοψηφία του

cfDNA που απελευθερώνεται από ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος (143B) σε κυτταροκαλλιέργεια, απαρτίζεται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, στις οποίες έχουν συχνή παρουσία ειδικά τρανσποζόνια –για παράδειγμα τα LINE-1-, τα οποία με τη σειρά τους είναι ενεργά στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Λαμβάνοντας υπ’ όψιν την εγγενή τους κινητικότητα, η πλευρική μεταφορά και η εισαγωγή των μεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα του εκάστοτε ξενιστή μπορεί να διαταράξει κωδικές περιοχές, περιοχές συρραφής και να ενεργοποιήσει ογκογονίδια. Για παράδειγμα, η εισαγωγή ενός και μόνο μεταθετού στοιχείου L1 στην περιοχή ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου μπορεί να σηματοδοτήσει την καρκινική εξαλλαγή[267].

Η πλευρική μεταφορά του cfDNA συμμετέχει και στην αύξηση της αντοχής των καρκινικών κυττάρων έναντι στην ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία[268]. Κατά την ακτινοθεραπεία, οι βάσεις του DNA οξειδώνονται. Το οξειδωμένο cfDNA απελευθερώνεται και αφομοιώνεται από γειτονικά κύτταρα, επάγοντας θραύσεις στο DNA, διεγείροντας την βιογένεση δραστικών ριζών οξυγόνου και ενεργοποιώντας τα μονοπάτια απόκρισης στις βλάβες του DNA. Συμπληρωματικά σε αυτό, έχει πρόσφαταδειχθεί ότι το cfDNA που προέρχεται από νέκρωση καρκινικών κυττάρων, μεταφέρεται πλευρικά τόσο στα κοντινά όσο και σε κύτταρα απομακρυσμένων οργάνων, συνεπάγοντας ενσωμάτωση στο γονιδίωμα, βλάβες στο DNA και δημιουργία φλεγμονής[269]. Αυτό προκαλεί βλάβες στην σταθερότητα του γονιδιώματος και υπονομεύει την ομοιοστατική ικανότητα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, το οποίο αποτελεί εν δυνάμει ερέθισμα για τον ογκογονικό μετασχηματισμό. Παρ’ όλο που δεν υπάρχει επί του παρόντος σαφής απάντηση για το πώς το cfDNA ενσωματώνεται στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ερευνητικές ομάδες προτείνουν ότι μπορεί να επιτυγχάνεται μέσω του μη ομόλογου ανασυνδυασμού[270-272].

Προ-φλεγμονώδεις και Ανοσολογικές επιδράσεις: Το DNA είναι ένα μακρομόριο που ενεργοποιεί την ανοσολογική απάντηση. Η δομή της διπλής έλικας, τα μοτίβα συγκεκριμένων αλληλουχιών και οι μοριακές αλληλεπιδράσεις είναι οι τρεις κύριοι παράγοντες που επάγουν την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος[273]. Η έκθεση του δίκλωνου DNA στα κύτταρα της φυσικής ανοσίας του οργανισμού, και η σύνδεσή του σε ανάλογους των Toll υποδοχείς (Toll-like receptors, TLRs), επάγει την ενεργοποίηση των NFκB/AP1 μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των κυτταροκινών της φλεγμονής, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor, TNFα), η ιντερλευκίνη -1 και -6 (IL-1, IL-6)[219].

Το DNA μπορεί τόσο από μόνο του όσο και σε συνάφεια με άλλα μακρομόρια να ενεργοποιήσει το ανοσολογικό σύστημα και να προκαλέσει την δημιουργία φλεγμονώδους φαινοτύπου [231, 273, 274]. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η παρουσία δεοξυριβονουκλεασών στην κυκλοφορία, συμβάλλει στην αποικοδόμηση των DNA μορίων, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση αυτή. Μάλιστα, σε πειράματα

με ποντίκια, τα άτομα με μη λειτουργικές δεοξυριβονουκλεάσες στην κυκλοφορία ήταν επιρρεπή στην εμφάνιση αυτοάνοσων ασθενειών[275].

1.5.3 Σύγχρονες τεχνολογικές μέθοδοι για την ανάλυση του cfDNA

Στα δείγματα της υγρής βιοψίας σημαντικό ρόλο έχουν οι προ-αναλυτικοί παράγοντες (το φιαλίδιο συλλογής δείγματος, ο χρόνος μεταξύ της συλλογής του αίματος και της μετατροπής του σε ορό ή πλάσμα, οι συνθήκες φύλαξης του ορού ή του πλάσματος, η μέθοδος απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων), καθώς επηρεάζουν άμεσα της ποιότητα των προς ανάλυση δειγμάτων. Συνεπώς, απαιτείται η επεξεργασία των δειγμάτων εντός 2-6 ωρών προς αποφυγή της κυτταρικής λύσης[276]. Πρόσφατες μελέτες εστιάζουν στην ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλάξεων χρησιμοποιώντας hotspot PCR πρωτόκολλα για διαγνωστικούς και/ή προγνωστικούς σκοπούς[277].

Για την ανάλυση του ctDNA οι κλασικές προσεγγίσεις, όπως η αλληλούχηση κατά Sanger, δεν επαρκούν για την ανίχνευση μεταλλαγών στο ctDNA του πλάσματος. Η ανάλυση των προς μελέτη γονιδίων γίνεται με διάφορες παραλλαγές της PCR και με αλληλούχηση νέας γενιάς, καθώς οι τεχνικές αυτές έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα[165].

Τόσο η ποσοτική όσο και η ψηφιακή PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση των προς μελέτη γονιδίων[278]. Παρ' όλο που και οι δύο τεχνικές είναι ποσοτικές, διαφέρουν στον τρόπο με τον οποίο μετρείται το δείγμα- στην qPCR τα δείγματα ποσοτικοποιούνται με καμπύλη αναφοράς, ενώ στην dPCR γίνεται άμεσα απόλυτη ποσοτικοποίηση. Χρησιμοποιούνται πολλές παραλλαγές της ποσοτικής PCR (qPCR), συμπεριλαμβανομένων της PNA-clamp PCR (Peptide Nucleic Acids-clamp PCR),[279] της PNA-LNA PCR (Peptide Nucleic Acid-Locked Nucleic Acid PCR),[280] του PCR-ARMS συστήματος (Amplification Refractory Mutation System PCR)[281] και της COLD-PCR (Coamplification at a Lower Denaturation Temperature PCR) τεχνολογίας[282]. Οι ψηφιακές PCR διαδικασίες που περιλαμβάνουν σφαιρίδια, γαλακτώματα, ενίσχυση και μαγνήτες (beads, emulsion, amplification, magnetics, BEAMing) [283] και η ψηφιακή PCR σταγόνες (droplet digital PCR, ddPCR) [284, 285] είναι περισσότερο ευαίσθητες από την ποσοτική PCR.[165, 286] Η εφαρμογή τόσο της qPCR όσο και της ddPCR είναι γρήγορη, οικονομικά συμφέρουσα, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και κατάλληλη για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλλαγών, όπως για τον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων. Ωστόσο, η εφαρμογή τους είναι περιορισμένη επειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για την παρακολούθηση γνωστών γενετικών αλλαγών[165].

Η αλληλούχηση νέας γενιάς, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του ctDNA. Η τεχνολογία του NGS περιλαμβάνει την αλληλούχηση γονιδίων στόχων καθώς επίσης και την αλληλούχηση του συνόλου του γονιδιώματος (WGS) και την αλληλούχηση του συνόλου των εξωνίων

(WES), όπου γίνεται μη στοχευόμενα η αλληλούχηση[287]. Καμία από τις τεχνικές του NGS δεν απαιτεί προηγούμενη γνώση για την ύπαρξη ή μη μεταλλαγών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ενθέσεων, απαλοιφών, ανακατατάξεων καθώς και δύσκολων στον εντοπισμό αλλαγών, όπως αλλαγές στον αριθμό γενετικών τόπων και συντήξεις γονιδίων[165]. Οι τεχνικές αυτές είναι περισσότερο κοστοβόρες, η διεξαγωγή και η ανάλυσή τους απαιτεί περισσότερο χρόνο και απαιτούν ισχυρότερη βιοπληροφορική υποστήριξη[165]. Επιπλέον, η αξιοποίηση των NGS τεχνικών μπορεί να περιοριστεί από τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από σφάλματα στην αλληλούχηση[288].

1.5.4 Κλινική εφαρμογή του ctDNA στην ογκολογία

Οι παρούσες κλινικές εφαρμογές του ctDNA στην ογκολογία διατείνονται από την σάρωση ασθενών με καρκίνο και την έγκαιρη ανίχνευση υποτροπής έως την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και την παρακολούθηση της απόκρισης σε αυτήν. Βέβαια, η χρησιμότητα του ctDNA ποικίλλει μεταξύ των διάφορων τύπων καρκίνου[289].

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης μπορεί να διακριθεί σε μη μυοδιηθητικό (NMIBC) και σε μυοδιηθητικό (MIBC) καρκίνο. Ανεξάρτητα από τη θεραπεία που θα εφαρμοστεί, η πλειοψηφία των NMIBC όγκων υποτροπιάζει εντός πέντε ετών και στο 15% των ασθενών θα εξελιχθεί σε διηθητική ή μεταστατική νόσο. Ως εκ τούτου, η έγκαιρη διάγνωση όπως και η πρώιμη ανίχνευση της υποτροπής ή της εξέλιξης είναι ζωτικής σημασίας[290].

Σε μία μελέτη ανασκόπησης, λοιπόν, φαίνεται ότι το ctDNA μπορεί να ανιχνευθεί εγκαίρως (προτού η εξέλιξη ή η υποτροπή της νόσου γίνει κλινικά εμφανής) σε ασθενείς με NMIBC ή MIBC[291]. Έχουν αναπτυχθεί προσωποποιημένες δοκιμές, εφαρμόζοντας ddPCR, βάσει συχνών μεταλλαγών που έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα ιστών από ασθενείς με πρωτογενή κακοήθεια στο ουροθήλιο. Εν συνεχεία, οι δοκιμές αυτές εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια του follow-up των ασθενών, όπου παρακολουθείται η ανίχνευση σωματικών παραλλαγών στο DNA σε δείγματα καρκινικού ιστού, πλάσματος και ούρων. Ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών αυτών είχαν ανιχνεύσιμο καρκινικό DNA στο πλάσμα (83%) και στα ούρα (76%). Οι ασθενείς διακρίνονται μετέπειτα σε δύο ομάδες σύμφωνα με το κλινικό αποτέλεσμα: εκείνους με επανεμφάνιση και εκείνους με εξέλιξη της νόσου. Κατά μέσο όρο, τα επίπεδα του καρκινικού DNA στο πλάσμα και τα ούρα ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με εξέλιξη σε σχέση με αυτούς με επανεμφάνιση της νόσου. Επιπλέον, το 67% και 83% των ασθενών με εξελισσόμενη νόσο είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα ctDNA στο πλάσμα και τα ούρα αντίστοιχα, αρκετούς μήνες πριν την κλινική εκδήλωση της εξέλιξης. Τα δεδομένα αυτά επισημαίνουν την εφικτή χρήση των αναλυτών της υγρής βιοψίας για την έγκαιρη διάγνωση και την

παρακολούθηση υποτροπής των ασθενών με καρκίνο του ουροποιητικού συστήματος καθώς και την αξιοποίησή της ως προγνωστικό εργαλείο για την ομαδοποίηση των ασθενών[287].

Σε μια μεταγενέστερη εργασία της ίδιας ερευνητικής ομάδας βρέθηκε ότι τα επίπεδα του ctDNA στο πλάσμα των ασθενών προτού την χειρουργική επέμβαση συσχετίζονται σημαντικά με την ολική και την ελεύθερη συμβάντος επιβίωση. Συνολικά, το 89% των ασθενών με ανιχνεύσιμα επίπεδα ctDNA επανεμφάνισε τη νόσο, συγκριτικά με το 33% των ασθενών που δεν είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα ctDNA[292]. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα του ctDNA σύντομα μετά το χειρουργείο αναδείχθηκαν υψηλότερα στους ασθενείς που εμφάνισαν εν τέλει επικείμενη υποτροπή σε σχέση με αυτούς που δεν εμφάνισαν[293].

Συλλήβδην, οι μελέτες αυτές αναδεικνύουν την εφικτή εφαρμογή των μεθοδολογιών που εξετάζουν το ctDNA για την έγκαιρη διάγνωση και την παρακολούθηση της απόκρισης στην θεραπεία των ασθενών στον εντοπισμένο καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Εάν τα ευρήματα αυτά επικυρωθούν σε επικείμενες κλινικές δοκιμές, οι τεχνικές αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διαχείριση των ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης. Ωστόσο, οι περιορισμοί του ctDNA στο σενάριο αυτό πρέπει να αναγνωριστούν και να διευθετηθούν. Για παράδειγμα, υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα τα οποία αντιτίθενται μεταξύ τους, καθώς σε άλλες μελέτες δεν έχει κατορθωθεί η ανίχνευση ctDNA σε ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστης[294].

Οι γενετικές αλλαγές, που ανιχνεύονται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης είναι ποικίλες και γι' αυτό είναι αναγκαίος ένας προβλεπτικός βιοδείκτης που να κατευθύνει τις θεραπευτικές προσεγγίσεις. Αναφορές που έχουν βασιστεί σε ιστοτεμάχια ως δείγματα μελέτης αναδεικνύουν την συσχέτιση των μεταλλαγών στα *NF2* και *TSC1* γονίδια με αυξημένο κλινικό όφελος από την θεραπεία με το everolimus[295]. Επιπρόσθετα, σε μία αντίστοιχη μελέτη βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των αλλαγών στα *HER2* ή *ERBB3* γονίδια με την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (progression-free survival, PFS) για τρεις μήνες με τη λήψη του afatinib[296]. Έχουν βρεθεί αυξημένα ποσοστά πλήρους απόκρισης έπειτα από ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία με βάση τη cisplatin σε ασθενείς με μία ή περισσότερες μεταλλαγές στα μέλη της ομάδας των γονιδίων που αποκαθιστούν και διορθώνουν βλάβες στο DNA (DNA damage repair, DDR), όπως τα *ATM*, *RB1* ή *FANCC* [297]. Επιπλέον, μεταλλαγές στο *ERCC2*, ένα γονίδιο υπεύθυνο για την εκτομή και αποκατάσταση νουκλεοτιδίων, έχουν επίσης συσχετισθεί με ευαισθησία στην θεραπεία που βασίζεται στην πλατίνα[158]. Παρ' όλο που οι μελέτες αυτές βασίζονται στην αξιολόγηση δειγμάτων ιστών, συνολικά υποδεικνύουν ότι η ανίχνευση μεταλλαγών στο γενωμικό υλικό θα πρέπει να βρίσκεται στην πρώτη γραμμή για την ανάπτυξη προβλεπτικών βιοδεικτών στον καρκίνο του ουροθηλίου, συνεισφέροντας στον σχεδιασμό μελλοντικών κλινικών δοκιμών. Τέτοιου τύπου δοκιμές βρίσκονται ήδη σε εξέλιξη και μία εκ των

οποίων -η PURE-01- δημοσιεύθηκε το 2018[298]. Η PURE-01 μελέτη βρίσκεται στην φάση II των κλινικών δοκιμών, στην οποία διερευνάται η χρήση τριών κύκλων χορήγησης του ανοσοενισχυτικού pembrolizumab πριν την πραγματοποίηση κυστεκτομής σε ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο του ουροθηλίου. Στους νέους βιοδείκτες που διερευνώνται, περιλαμβάνεται ο συνδυασμός θετικού score στο PD-L1, το φορτίο μεταλλαγών ενός όγκου (Tumor Mutational Burden, TMB) και η παρουσία μεταλλαγών στα γονίδια της οικογένειας DDR (*CHEK2*, *MRE11A*, *XRCC3*, *MSH2*, *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *FANCA*, *ATR* και *RAD51B*). Στους ασθενείς όπου η παρουσία των δεικτών αυτών είναι αυξημένη, το ποσοστό της πλήρους παθολογικής απόκρισης φτάνει στο 90%, συγκριτικά με το 39.5% του υπό θεραπείας πληθυσμού.[298] Οι μεταλλαγές αυτές έχουν, επίσης, ανιχνευτεί στο ctDNA σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο ουροδόχου κύστης[299]. Ως εκ τούτου, μελλοντικά, το ctDNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, αντικαθιστώντας τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν τη λήψη ιστοτεμαχίων, για την καλύτερη επιλογή θεραπευτικής προσέγγισης στον εκάστοτε ασθενή[287].

Όπως και στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, έτσι και στον καρκίνο ουροδόχου κύστης το φορτίο μεταλλαγών ενός όγκου (Tumor Mutational Burden, TMB) μπορεί να προβλέψει την απόκριση και το θεραπευτικό όφελος στην χορήγηση αναστολέων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος[300, 301]. Στην φάση II των κλινικών δοκιμών του atezolizumab σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο ουροδόχου κύστης έπειτα από μη απόκριση σε θεραπεία βασισμένη στη cisplatin, το αυξημένο TMB αποτέλεσε ανεξάρτητο προβλεπτικό δείκτη στην απόκριση στο atezolizumab[302]. Επιπλέον, εντοπίστηκε να συσχετίζονται ο αριθμός των γενωμικών αλλαγών στο ctDNA και το κλινικό όφελος (ποσοστό ελέγχου της νόσου, επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου, ολική επιβίωση) υπό τη θεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος[303].

1.5.5 Τρέχουσες κλινικές δοκιμές

Σε πολλές εν εξελίξει κλινικές δοκιμές γίνεται η αξιολόγηση για την αξιοποίηση του ctDNA ως βιοδείκτη. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες έχουν ως στόχο να ταυτοποιηθούν γενετικές αλλαγές στο ctDNA που να έχουν προβλεπτική ή προγνωστική αξία για την κλινική πράξη[287].

Υπάρχει μία ανοιχτή, τυχαιοποιημένη, πολυκεντρική μελέτη -*BISCAY (NCT02546661)*- στη φάση Ib με ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο ουροδόχου κύστης, στους οποίους έχει χορηγηθεί θεραπεία πρώτης γραμμής και εστιάζει στην ανάδειξη βιοδεικτών αξιοποιώντας το ctDNA. (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02546661>) Τα τελικά σημεία της μελέτης είναι η ασφάλεια, η ανεκτικότητα, η φαρμακοκινητική και η αντικαρκινική δράση πολλαπλών φαρμακευτικών παραγόντων ως μονοθεραπεία και ως συνδυασμοί. Η μελέτη αυτή αποτελείται από περισσότερες

υπομελέτες, καθεμία από αυτές αξιολογεί την ασφάλεια και την ανεκτικότητα ενός συγκεκριμένου - ή σε συνδυασμό με περισσότερους- παράγοντα, σε ασθενείς που έχουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Η κατανομή των ασθενών για τους συγκεκριμένους φαρμακευτικούς παράγοντες εξαρτάται από την παρουσία συγκεκριμένων γενωμικών αλλαγών που έχουν ταυτοποιηθεί στα ιστοτεμάχια των ασθενών και η αξιολόγηση θα γίνει σε δείγματα πλάσματος και ορού για την ανάλυση του ctDNA. Όπως και σε άλλους καρκίνους, η ανακάλυψη των μοριακών αλλαγών, που μπορούν να προβλέψουν το θεραπευτικό όφελος για συγκεκριμένους φαρμακευτικούς παράγοντες, συμπεριλαμβάνοντας στοχευμένες θεραπείες και ανοσοθεραπεία, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, οι αλλαγές στο *FGFR* γονίδιο φαίνεται ότι είναι ένα σημαντικό μοριακό συμβάν και το erdafitinib (αναστολέας του FGFR) έχει ήδη εγκριθεί από τον FDA για τους ασθενείς αυτούς[304].

Μία δεύτερη μελέτη που βρίσκεται στην φάση II των κλινικών δοκιμών -*RESPONDER (NCT03263039)*- περιλαμβάνει ασθενείς με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα, οι οποίοι λαμβάνουν pembrolizumab ως δεύτερη γραμμή θεραπείας. (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03263039>) Συλλέγονται κλινικά δεδομένα, αίμα και δεδομένα αλληλούχησης των καρκινικών ιστοτεμαχίων (μετά από έξι βδομάδες θεραπείας) των ασθενών με σκοπό την αξιολόγηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, των κυτοκινών, την συγκέντρωση χημειοτακτικών παραγόντων και του ctDNA. Ο στόχος της μελέτης είναι να ταυτοποιηθούν οι ανοσολογικοί μηχανισμοί διαφυγής σε συνδυασμό με τον χαρακτηρισμό του μοριακού προφίλ των ασθενών, καθώς επίσης και την ταυτοποίηση προβλεπτικών βιοδεικτών σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνωμα, οι οποίοι λαμβάνουν ανοσοθεραπεία[287].

Τέλος, υπάρχει μια «πανκαρκινική» μελέτη -*The Circulating Cell- free Genome Atlas study (NCT02889978)*- που περιλαμβάνει ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου και υγιή άτομα. (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02889978>) Συλλέγονται ιστοτεμάχια και πλάσμα από ασθενείς με καρκίνο καθώς και κλινικές πληροφορίες που μπορεί να αξιοποιηθούν στη μετ' έπειτα ανάλυση. Τα πρώτα αποτελέσματα της μελέτης περιλαμβάνουν δεδομένα αλληλούχησης του cfDNA για τον χαρακτηρισμό της ετερογένειας του πληθυσμού με και χωρίς καρκίνο. Επιπλέον στόχοι της μελέτης είναι η ανάπτυξη και η αξιολόγηση μοντέλων για τη διάκριση της κακοήθειας από την καλοήθεια, να προσδιοριστεί η ιστική προέλευση, καθώς και να αξιολογηθεί η συμφωνία των παραλλαγών που ταυτοποιήθηκαν μεταξύ καρκινικού ιστού και cfDNA. Η έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου είναι υψίστης σημασίας, διότι αυξάνει τις πιθανότητες απόκρισης στη θεραπεία. Σε αυτό το πλαίσιο η ανάπτυξη δοκιμών ικανών να ανιχνεύσουν καρκινοειδικές γενετικές αλλαγές προτού εκδηλωθεί κλινικά η ασθένεια, συνεισφέρουν σημαντικά στη διάγνωση, την πρόγνωση και την

πρόβλεψη του καρκίνου. Ωστόσο, οι προσεγγίσεις αυτές πρέπει, εν τέλει, να οδηγούν σε μείωση της θνησιμότητας από τον καρκίνο, προκειμένου να μπορέσουν να εισέλθουν και στην κλινική ρουτίνα[287].

1.5.6 Μελλοντικές κατευθύνσεις

Στο εγγύς μέλλον αναμένεται να αλλάξει ριζικά η παροχή υγειονομικής περίθαλψης στους ασθενείς. Με την περαιτέρω ανάπτυξη των μεθοδολογιών της υγρής βιοψίας -ιδίως της ανάλυσης του cfDNA- η γονιδιωματική του καρκίνου θα γίνει ευρέως διαθέσιμη, προσβάσιμη και εύκολα πραγματοποιήσιμη και πιθανώς να χρησιμοποιηθεί επικουρικά στον έλεγχο του καρκίνου. Για τον σκοπό αυτό, μεγάλες, ευρείας κλίμακας κλινικές μελέτες, όπως η *NCT02889978*, θα διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον χαρακτηρισμό και τη χαρτογράφηση των γενωμικών αλλαγών που σχετίζονται με τον καρκίνο, λειτουργώντας ως πηγή αναφοράς για τη μεγιστοποίηση της χρησιμότητας της υγρής βιοψίας[305]. Ακόμη, οι ευρέως διαθέσιμες γονιδιωματικές πληροφορίες που παρέχονται από τέτοιες μελέτες μπορεί να οδηγήσουν στην υλοποίηση περισσότερων κλινικών δοκιμών για την αναζήτηση και ανακάλυψη νέων αξιοποιήσιμων βιοδεικτών. Οι βιοδείκτες είναι ουσιαστικής σημασίας για την βελτίωση της υγειονομικής περίθαλψης των ασθενών, βελτιστοποιώντας την επιλογή κατάλληλης θεραπείας για τους ασθενείς που εν δυνάμει θα ανταποκριθούν και αποφεύγοντας τις δυσάρεστες παρενέργειες, όπως η φαρμακευτική τοξικότητα, στους ασθενείς που δεν θα ανταποκρίνονταν. Όμοια, η ταυτοποίηση προγνωστικών βιοδεικτών θα μπορούσε να διευκολύνει τις στρατηγικές ομαδοποίησης των ασθενών, επιλέγοντας για παράδειγμα τους ασθενείς υψηλού κινδύνου για τη συμμετοχή τους σε κλινικές δοκιμές με ανοσοενισχυτική θεραπεία. Ωστόσο, σε όλες αυτές οι εφαρμογές, η απόδειξη βελτιωμένων κλινικών αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη για την εξέλιξη και την προώθηση της υγρής βιοψίας[287].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως αποτελεί την 4^η πιο συχνή κακοήθεια του ανδρικού πληθυσμού των ανεπτυγμένων χωρών και τον 2^ο κατά σειρά εμφάνισης καρκίνο του ανδρικού ουρογεννητικού συστήματος. Ο ουροθηλιακός καρκίνος μπορεί να διαχωριστεί ιστολογικά σε δύο βασικές κατηγορίες: τον επιφανειακό ή μη-μυοδιηθητικό καρκίνο της κύστεως (Non Muscle Invasive Bladder Cancer, NMIBC) και τον μυοδιηθητικό καρκίνο της κύστης (Muscle Invasive Bladder Cancer, MIBC). Οι δύο κατηγορίες διαφέρουν μεταξύ τους αισθητά ως προς την μακροπρόθεσμη έκβαση της ασθένειας καθώς οι επιφανειακοί όγκοι χαρακτηρίζονται από συχνές υποτροπές, σπανιότερη εξέλιξη σε διηθητική νόσο και καλή πενταετή επιβίωση, ενώ αντιθέτως, οι μυοδιηθητικοί όγκοι έχουν υψηλά ποσοστά μετάστασης και δυσμενή πρόγνωση πενταετούς επιβίωσης.

Χαρακτηριστικό του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι η έντονη κλινική ετερογένεια ως προς την πρόγνωση της υποτροπής και της εξέλιξης της νόσου, την επιβίωση των ασθενών αλλά και την ανταπόκριση τους στην θεραπεία. Η ακριβής πρόγνωση της νόσου είναι απαραίτητη για τη θέσπιση εξατομικευμένων θεραπευτικών αποφάσεων και πρωτοκόλλων μεταθεραπευτικής παρακολούθησης (follow-up) των ασθενών. Ωστόσο, οι προγνωστικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα αδυνατούν να προβλέψουν με βεβαιότητα την έκβαση του ουροθηλιακού καρκίνου, με συνέπεια να απαιτείται η μακροπρόθεσμη και διαρκής μεταθεραπευτική παρακολούθηση των ασθενών μέσω επεμβατικών κυστεοσκοπήσεων, κυτταρολογική εξέταση ούρων και CT/MRI. Ως συνέπεια, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως αποτελεί τον καρκίνο με το μεγαλύτερο κόστος θεραπείας-ανά-ασθενή για τα συστήματα υγείας των ανεπτυγμένων χωρών. Η κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων που συμμετέχουν στη νόσο αλλά και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους, αποτελεί ένα πεδίο με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον που έχει ως σκοπό την εύρεση βιοδεικτών για την εξατομικευμένη πρόγνωση των ασθενών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση του cfDNA από τον ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως και η μετ' έπειτα κλινική του αξιολόγηση. Αξιοποιήθηκαν, επομένως, στο σύνολο 170 δείγματα καρκινικού ιστού και 100 δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης. Αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης του cfDNA από τον ορό, ποσοτικοποίησής του, καθώς και εκτίμησης της ποιότητάς του. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθοδολογιών ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time qPCR), με τη χρήση της χημείας SYBR Green και της μεθόδου σχετικής ποσοτικοποίησης $2^{-\Delta\Delta CT}$ για τον προσδιορισμό της ακεραιότητας του cfDNA και του αριθμού των αντιγράφων των αλληλομόρφων τριών γονιδίων στόχων που επιλέχθηκαν έπειτα από βιβλιογραφική και βιοπληροφορική αναζήτηση, τόσο σε δείγματα ορού όσο και σε δείγματα ιστού ασθενών με καρκίνο στην ουροδόχο κύστη. Έπειτα

έγινε κλινική αξιολόγηση, μέσω εκτενούς βιοστατιστικής ανάλυσης, της ποσότητας και της ακεραιότητας του cfDNA, καθώς και της ανίχνευσης διαφοροποιήσεων, από την διπλοειδική κατάσταση, του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων τριών γονιδίων στόχων (*CDKN2A*, *CCND1*, *MDM2*).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, αξιοποιήθηκαν συνολικά 140 δείγματα DNA από καρκινικούς ιστούς ουροδόχου κύστης, ενώ απομονώθηκε DNA από 30 νέους ιστούς. Επιπλέον απομονώθηκε cfDNA από 100 δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην Α' Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό» υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κων/νου Στραβοδήμου. Οι ασθενείς με μη- μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (Ta, T1) υποβλήθηκαν σε διουρηθρική κυστεκτομή, ενώ το σύνολο των ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο υπέστη ριζική κυστεκτομή. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν μέχρι την επεξεργασία τους στους -80°C.

Για τον διαχωρισμό των ομάδων κινδύνου ασθενών με μη διηθητικό και διηθητικό τύπο καρκίνου, ακολουθήθηκαν οι επίσημες οδηγίες του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Έρευνας και Θεραπείας του Καρκίνου (EORTC). Η παρακολούθηση των ασθενών με μη διηθητικό τύπο καρκίνου περιελάμβανε κυστεοσκόπηση ουροδόχου κύστης και κυτταρολογική εξέταση σύμφωνα με τις οδηγίες της EAU (European Association of Urology). Η κατασκευή λεπτομερούς βάσης καταγραφής των κλινικοπαθολογικών δεδομένων των ασθενών καθώς και της μετεγχειρητικής πορείας τους (follow-up) πραγματοποιήθηκαν στο Νοσοκομείο «Λαϊκό» υπό τον Καθηγητή Κων/νο Στραβοδήμου και τον ιατρό Δρ. Θεόδωρο Τόκα. Οι ασθενείς με MIBC παρακολούθηθηκαν με υπερηχογράφημα νεφρού κάθε 3 μήνες και CT / MRI θώρακος κάθε 6 μήνες. Η μελέτη εγκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο/επιτροπή βιοηθικής του ίδιου Νοσοκομείου.

Όσον αφορά τα δείγματα των ιστών, το 60,6% των ασθενών διαγνώστηκε με πρωτογενή NMIBC (TaT1), ενώ το 39,4% με MIBC (T2-T4). Σύμφωνα με WHO 2004, το 35,9% των όγκων κατατάχθηκε ως low grade ενώ το με 64,1% ως high grade. Στην κατάταξη κινδύνου υποτροπής/εξέλιξης των NMIBC ασθενών σύμφωνα με την ταξινόμηση EORTC, 44 ασθενείς με NMIBC ταξινομήθηκαν ως χαμηλού/ενδιάμεσου και 58 ως υψηλού κινδύνου. Στην ανάλυση επιβίωσης συμπεριλήφθησαν όλοι οι ασθενείς κάθε τύπου βιολογικού δείγματος.

Αντίστοιχα στα δείγματα ορού, το 57% των ασθενών διαγνώστηκε με πρωτογενή NMIBC (TaT1), ενώ το 43% με MIBC (T2-T4). Σύμφωνα με WHO 2004, το 32% των όγκων κατατάχθηκε ως low grade ενώ το με 68% ως high grade. Στην κατάταξη κινδύνου υποτροπής/εξέλιξης των NMIBC ασθενών σύμφωνα με την ταξινόμηση EORTC, 25 ασθενείς με NMIBC ταξινομήθηκαν ως χαμηλού/ενδιάμεσου και 32 ως υψηλού κινδύνου.

Πίνακας 2.1: Σύνοψη χαρακτηριστικών βιολογικού υλικού

Μεταβλητή	Δείγματα ιστών n=170	Δείγματα ορού n=100
Διήθηση του μυοθηλίου		
Μη μυοδιηθητικός όγκος (NMIBC/Ta, T1)	103 (60,6%)	57 (57%)
Μυοδιηθητικός όγκος (MIBC/T2-T4)	67 (39,4%)	43 (43%)
Παθολογοανατομικό στάδιο όγκου		
pTa	51 (30%)	28 (28%)
pT1	52 (30,6%)	29 (29%)
pT2	30 (17,6%)	19 (19%)
pT3-4	37 (21,8%)	24 (24%)
Grade (WHO 2004)		
Low Grade	61 (35,9%)	32 (32%)
High Grade	109 (64,1%)	68 (68%)
Μη μυοδιηθητικός όγκος (NMIBC; TaT1)		
Κατάταξη κινδύνου υποτροπής/εξέλιξης NMIBC ασθενών με ταξινόμηση κατά EORTC		
Low/Intermediate risk	44 (43,1%)	25 (43,9%)
High Risk	58 (56,9%)	32 (56,1%)
Παρακολούθηση καρκίνου		
Ασθενείς με Follow-up	91	51
Υποτροπή / Εξέλιξη	38 (41,8%) / 20 (22%)	25 (49%) / 15 (29,4%)
Επιβίωση ελεύθερης Υποτροπής / Εξέλιξης	53 (58,2%) / 71 (78%)	26 (51%) / 36 (70,6%)
Εκτός follow-up	12	7
Μυοδιηθητική νόσος (MIBC; T2-T4)		
Παρακολούθηση καρκίνου		
Ασθενείς με Follow-up	56	40
Υποτροπή / Θάνατος	35 (62,5%) / 32 (57,1%)	26 (65%) / 25 (62,5%)
Επιβίωση ελεύθερης Υποτροπής / Επιβίωση	21 (37,5%) / 24 (42,9%)	14 (35%) / 15 (37,5%)
Εκτός follow-up	11	4

2.2 Ομάδες Επικύρωσης-Validation Cohorts

Με σκοπό την περεταίρω ενίσχυση και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της εν λόγω εργασίας, αξιοποιήθηκαν δύο τύποι ομάδων ασθενών επικύρωσης (validation cohorts), το σύνολο των Pietzak

et al. 2017 (n=105) [306] και το σύνολο του TCGA (The Cancer Genome Atlas, Bladder Cancer, Cell) 2017 (n=413) [307] για τους NMIBC και MIBC αντίστοιχα. Τα σύνολα αυτά αναλύθηκαν παράλληλα με το σύνολο των ασθενών της εν λόγω εργασίας (screening cohort) με βάση των αριθμό των αντιγράφων των γονιδίων *CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2* σε συσχέτιση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την επιβίωση των ασθενών. Το σύνολο των Pietzak *et al.* 2017 (n=105) αποτελείται από 105 ασθενείς με NMIBC (Ta: 55, T1: 38 και CIS: 12) όπου αναλύθηκαν ταυτόχρονα εκατομμύρια τμήματα DNA μέσω μαζικής, παράλληλης και στοχευμένης αλληλούχησης. Αντίστοιχα το σύνολο TCGA (n=413) περιλαμβάνει 412 ασθενείς με MIBC (T2-T4) και οι αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων προσδιορίστηκαν μέσω Affymetrix SNP6.0. Τα κανονικοποιημένα δεδομένα των διαφοροποιήσεων στον αριθμό των αντιγράφων είναι διαθέσιμα δημοσίως στο διαδίκτυο. Συγκεκριμένα, για το σύνολο των Pietzak *et al.* 2017 στο European Urology Volume 72 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>) και για το σύνολο του TCGA στο cbiportal (<https://www.cbiportal.org/>).

2.3 Ομογενοποίηση ιστολογικών δειγμάτων ουροδόχου κύστεως

Τα υλικά που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι:

- Υγρό άζωτο
- TRI Reagent (Molecular Center Research inc)
- Ομογενοποιητής

Με τη διαδικασία της ομογενοποίησης επιτυγχάνεται η λύση της συνοχής του ιστού και ως εκ τούτου της κυτταρικής μεμβράνης και η απελευθέρωση των προς απομόνωση βιομορίων (DNA, RNA και πρωτεΐνες). Για την ομογενοποίηση χρησιμοποιείται το TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc), το οποίο συνδυάζει ισοθειοκυανική γουανιδίνη (30% v/v) και φαινόλη (50% v/v) σε ένα μονοφασικό διάλυμα, που προκαλεί άμεση αναστολή των ριβονουκλεασών του κυττάρου, συμβάλλοντας έτσι στη λύση του. Αρχικά, τα δείγματα ιστού της ουροδόχου κύστεως μεταφέρονται από τους -80°C, ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό και με τη βοήθεια νυστεριού τέμνονται για την επιλογή ιστοτεμαχίου 50-100mg. Ο ομογενοποιητής και το τεμάχιο του ιστού μεταφέρονται σε δοχείο με υγρό άζωτο. Το παγωμένο τεμάχιο τοποθετείται στον παγωμένο ομογενοποιητή και συνθλίβεται μέχρι να κονιορτοποιηθεί. Στη συνέχεια, η προκύπτουσα σκόνη μεταφέρεται σε φιαλίδια τύπου Eppendorf 2,0 mL, όπου και προστίθενται 1,0 mL αντιδραστηρίου TRI. Ακολουθεί σχολαστική και προσεκτική ανάδευση με τη χρήση πιπέτας, με σκοπό την περεταίρω ομογενοποίηση του δείγματος, διαλύοντας τα εναπομείναντα μέρη του ιστού. Όταν επιτευχθεί η πλήρης ομογενοποίηση, το δείγμα επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 5-7 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα

νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα χωρίζονται στα επιμέρους συστατικά τους. Στο σημείο αυτό, το ομογενοποίημα μπορεί να αποθηκευτεί προσωρινά στους -80°C , μέχρι την επακόλουθη απομόνωση των βιομορίων του.

2.4 Απομόνωση ολικού DNA από ιστολογικά δείγματα καρκίνου ουροδόχου κύστης

Τα διαλύματα που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου:

- Wash Solution: 0,1M κιτρικό νάτριο ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_2\text{O}_7$) σε διάλυμα αιθανόλης 10% v/v
- Διάλυμα αιθανόλης 75% v/v
- Διάλυμα NaOH 8mM
- Διάλυμα HEPES 0,1M

Τα ομογενοποιημένα δείγματα αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ύστερα από τη φύλαξή τους στους -80°C . Γίνεται προσθήκη στη συνέχεια 200μL χλωροφορμίου. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση για 15sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 min. Το χλωροφόρμιο μαζί με το αντιδραστήριο TRI, βοηθά στην αποδιάταξη των στερεοδομών των πρωτεϊνών, και αναστέλλει την αποικοδόμηση του RNA και του DNA από τις ριβονουκλεάσες και τις δεοξυριβονουκλεάσες αντίστοιχα. Μετά το τέλος της επώασης τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε $12.000 \times g$, για 15 min, στους 4°C . Κατ' αυτόν τον τρόπο το ομογενοποίημα διαχωρίζεται σε τρεις διακριτές φάσεις: στην υδατική φάση, τη μεσόφαση και την οργανική φάση, οι οποίες περιέχουν το RNA, το DNA και τις πρωτεΐνες αντίστοιχα. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέα φιαλίδια τύπου Eppendorf για την επικείμενη απομόνωση του ολικού RNA. Επομένως, στο αρχικό φιαλίδιο έχουν απομείνει η μεσόφαση και η οργανική φάση. Προστίθενται 300μL αιθανόλης 100% v/v και γίνεται ανακίνηση με παλινδρομική αναστροφή του φιαλιδίου. Ακολουθούν επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min και φυγοκέντρηση σε $2.000 \times g$, για 5 min, στους 4°C . Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες της οργανικής φάσης, απομακρύνεται και το ίζημα, το οποίο περιέχει το ολικό DNA, ξεπλένεται με προσθήκη 1,0mL Wash Solution. Επώαση σε τράπεζα ανάδευσης σε 750 rpm, για 50 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπεται φυγοκέντρηση σε $2.000 \times g$, για 5 min, στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Όμοια, ακολουθεί και δεύτερη πλύση του ιζήματος με την προσθήκη 1,0mL Wash Solution, επώαση στην τράπεζα ανάδευσης σε 750 rpm, για 50 min, σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση σε $2.000 \times g$, για 5 min, στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Γίνεται στη συνέχεια προσθήκη 1,5mL αιθανόλης 75% v/v, επώαση στην τράπεζα ανάδευσης σε 750 rpm, για 60 min, σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση σε $2.000 \times g$, για 5 min, στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Τα φιαλίδια μένουν ανοιχτά για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της αιθανόλης, καθώς αποτελεί έναν πτητικό οργανικό

διαλύτη. Πραγματοποιείται διαλυτοποίηση του ιζήματος με την προσθήκη 300-600μL καυστικού νατρίου (NaOH 8mM), εμπειρικά ανάλογα με το μακροσκοπικό μέγεθος του ιζήματος. Γίνεται σχολαστική μηχανική ανάδευση με τη χρήση πιπέτας και τα δείγματα επωάζονται στην τράπεζα ανάδευσης σε 750 rpm, για 90 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε 12.000 x g, για 10 min, στους 4°C, για να καταβυθιστούν τα πιθανά αδιάλυτα κυτταρικά συστατικά που μπορεί να έχουν απομείνει, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα φιαλίδια τύπου Eppendorf 1,5mL και προστίθενται 86μL HEPES 0,1M για την προσαρμογή του pH στο 8,4. Το απομονωμένο DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C.

2.5 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού DNA

Η συγκέντρωση του ολικού DNA προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά και βασίζεται στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν στο υπεριώδες, με μέγιστο απορρόφησης στα 260nm. Η φασματοφωτομέτρηση διεξήχθη σε νανοφωτόμετρο BioSpec-nano (Shimadzu Corporation, Kyoto, Ιαπωνία) με την εισαγωγή 1μL ολικού DNA που απομονώθηκε από δείγμα ιστού ουροδόχου κύστης. Σε ένα φωτόμετρο με λάμπα διφθερίου, φωτομετρούνται τα δείγματα αρχικά σε μήκος κύματος 260nm, αφού προηγουμένως γίνεται μηδενισμός του φωτόμετρου χρησιμοποιώντας NaOH 8mM, με το οποίο έγινε και η διαλυτοποίηση των δειγμάτων. Ακολουθεί ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA, χρησιμοποιώντας την εξής παραδοχή:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \text{ ng}/\mu\text{L DNA}$$

Η συγκέντρωση του DNA στα δείγματα υπολογίζεται με βάση την απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και το αντίστροφο της αραιώσης, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$C_{\text{DNA}}(\text{ng}/\mu\text{L}) = 0,05 \times 200 \times A_{260\text{nm}}$$

Στη συνέχεια τα δείγματα φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 280nm. Στο συγκεκριμένο μήκος κύματος απορροφούν μέγιστα τα αμινοξέα που έχουν αρωματικό δακτύλιο στη δομή τους, δηλαδή η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη. Έτσι, προσδιορίζεται η παρουσία πρωτεϊνών στα απομονωμένα δείγματα.

Για την ποιότητα του DNA των δειγμάτων, υπολογίζεται ο λόγος $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, ο οποίος αντιπροσωπεύει την καθαρότητα του δείγματος από πρωτεΐνες και άλλες οργανικές ενώσεις. Αποδεκτές τιμές του συγκεκριμένου λόγου, οι οποίες υποδεικνύουν την αποδεκτή καθαρότητα και ποιότητα του δείγματος, κυμαίνονται από 1,8 έως 2,2.

2.6 Απομόνωση DNA από δείγματα ορού (cell-free DNA, cfDNA)

Τα υλικά που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι:

- NucleoSpin cfDNA XS-Macherey Nagel

Τα δείγματα του ορού, τα οποία φυλάσσονται στους -80°C , αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε δείγμα χρειάζονται δύο φιαλίδια τύπου Eppendorf 1,5mL. Στο κάθε ένα από αυτά μεταφέρονται 240μL δείγματος. Ακολουθεί η φυγοκέντρησή τους σε $12.000 \times g$, για 3 min, στους 25°C , ώστε να καταβυθιστούν αδιάλυτα υλικά, όπως εναπομείναντα κύτταρα, υπολείμματα κυτταρικών θραυσμάτων και αιωρούμενα σωματίδια, που μπορεί να εμπεριέχει ο ορός. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα φιαλίδια τύπου Eppendorf 1,5mL. Σε κάθε φιαλίδιο γίνεται η προσθήκη 20μL πρωτεϊνάσης K, γίνεται ανάδευση με τη χρήση πιπέτας και επώαση για 10 min, στους 37°C . Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη στο ένα από τα δύο φιαλίδια κάθε δείγματος 360μL Binding Buffer. Το φιαλίδιο αυτό αναστρέφεται 3 φορές, υφίσταται vortex για 3 sec και φυγοκεντρείται σύντομα και απότομα ώστε όλο το περιεχόμενό του να βρίσκεται στο κάτω μέρος του φιαλιδίου (spin-down). Μεταφέρεται στη συνέχεια το περιεχόμενο του φιαλιδίου (620μL) σε μία κολόνα NucleoSpin cfDNA XS, η οποία είναι τοποθετημένη με τη σειρά της σε ένα φιαλίδιο συλλογής τύπου Eppendorf 2mL, όπου θα καταλήγει το περιεχόμενο που θα διέρχεται από το φίλτρο της κολόνας κατά τις φυγοκεντρήσεις. Γίνεται, λοιπόν, φυγοκέντρηση σε $2.000 \times g$ για 30 sec, στους 25°C και διαδοχικά μια φυγοκέντρηση σε $11.000 \times g$, για 5 sec, στους 25°C . Ακολουθείται η ίδια διαδικασία για το φιαλίδιο που περιέχει τα υπόλοιπα 240μL του δείγματος, το περιεχόμενο του οποίου μεταφέρεται στην ίδια κολόνα με το προηγούμενό του. Αφού, λοιπόν, ολοκληρωθεί και η τελευταία φυγοκέντρηση σε $11.000 \times g$, για 5 sec, στους 25°C , η κολόνα μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο συλλογής. Γίνεται προσθήκη 500μL Wash Buffer στην κολόνα και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε $11.000 \times g$, για 30 sec, στους 25°C . Η κολόνα μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο συλλογής, γίνεται προσθήκη 250μL Wash Buffer και φυγοκέντρηση σε $11.000 \times g$, για 3 min, στους 25°C . Η κολόνα μεταφέρεται σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf 1,5mL, προστίθενται 20μL Elution Buffer και γίνεται φυγοκέντρηση σε $11.000 \times g$, για 5 sec, στους 25°C . Στην ίδια κολόνα προστίθενται ακόμη 10μL Elution Buffer και γίνεται φυγοκέντρηση σε $11.000 \times g$, για 5 sec, στους 25°C . Τα φιαλίδια αφήνονται ανοιχτά για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου για να απομακρυνθεί η περίσσεια της αιθανόλης, η οποία αποτελεί αναστολέα στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που θα ακολουθήσει. Το περιεχόμενο μεταφέρεται σε φιαλίδια τύπου Eppendorf 0,2mL και φυλάσσεται στους -20°C .

2.7 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA

Τα υλικά που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι:

- Qubit dsDNA HS Assay Kit- Invitrogen
- Qubit Fluorometer- Invitrogen

Η πορεία που θα περιγραφεί προϋποθέτει την βαθμονόμηση του Qubit Fluorometer, βάσει των προτύπων που περιέχει.

Τα Qubit dsDNA HS Reagent και Qubit dsDNA HS Buffer αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 min καθώς η διαφορά στην θερμοκρασία μεταξύ των δύο αντιδραστηρίων μπορεί να επηρεάσει στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Το διάλυμα εργασίας προκύπτει με τη διαλυτοποίηση του Qubit dsDNA HS Reagent στο dsDNA HS Buffer σε αναλογία 1:200. Για κάθε δείγμα μεταφέρονται σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf 0,5mL, 199μL του διαλύματος εργασίας και 1μL δείγματος. Τα φιαλίδια αυτά είναι ειδικά καθώς η κατασκευή του τοιχώματος τους επηρεάζει στο ελάχιστο δυνατό τη μέτρηση του φθορισμού. Πραγματοποιείται ήπιο vortex για 2-3 sec και επώαση για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 2 min, το φιαλίδιο τοποθετείται στο Qubit Fluorometer, όπου προσδιορίζεται αυτόματα η συγκέντρωση του δίκλωνου DNA σε ng/mL.

$$C_{DNA}(ng/mL) = QF_{value} \times (200/\chi)$$

QF_{value}: το σήμα του φθορισμού

χ: ο αριθμός των mL που διαλυτοποιήθηκαν στο διάλυμα εργασίας

2.8 Αξιολόγηση του μεγέθους των τμημάτων του DNA μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

Τα υλικά που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι:

- Agilent High Sensitivity DNA Kit
- Agilent 2100 Bioanalyzer
- Chip priming station
- IKA vortex mixer

Αρχικά, όλα τα αντιδραστήρια αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.

Πρώτα πρέπει να γίνει η προετοιμασία του Gel-Dye Mix. Το High Sensitivity DNA Dye Concentrate υφίσταται vortex 10 sec και spin-down, μεταφέρονται 15μL του στο High Sensitivity DNA gel matrix φιαλίδιο. Ακολουθεί ανάδευση με τη χρήση πιπέτας, vortex για 10 sec και spin-down. Το περιεχόμενο μεταφέρεται σε ένα φιαλίδιο που εμπεριέχει μία κολόνα με φίλτρο και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 2.240 x g, για 10 min, στους 25°C. Απομακρύνεται η κολόνα με το φίλτρο και το περιεχόμενο που απομένει αποτελεί το Gel-Dye Mix, το οποίο πρέπει να εκτίθεται όσο το δυνατό λιγότερο στο φως.

Έπειτα τοποθετείται το High Sensitivity DNA chip στη διαμόρφωση που ονομάζεται chip priming station. Στο chip priming station το έμβολο της σύριγγας είναι στο 1,0mL, η βάση του σταθμού εργασίας είναι ρυθμισμένη στη θέση C και ο μοχλός που συγκρατεί το έμβολο της σύριγγας βρίσκεται στην χαμηλότερη θέση. Μεταφέρονται 9μL του Gel-Dye Mix στο βοθρίο που σημαίνεται με **G**. Η διαμόρφωση του chip priming station κλείνει και το έμβολο της σύριγγας πιέζεται μέχρι να συγκρατηθεί από τον μοχλό. Αναμονή για ακριβώς 60 sec και απελευθέρωση του εμβόλου από το μοχλό συγκράτησης. Αφήνεται το έμβολο για 5 sec να επανέλθει κοντά στο 1mL και μετά αργά και σταθερά τοποθετείται πάλι στη θέση 1,0mL της σύριγγας. Το chip priming station ανοίγεται και μεταφέρονται 9μL Gel-Dye Mix σε κάθε ένα από τα τρία βοθρία που μαρκάρονται με **G**. Στη συνέχεια, γίνεται μεταφορά 5μL High Sensitivity DNA marker σε κάθε βοθρίο των τριών πρώτων στηλών του chip. Ακολουθεί η μεταφορά 1μL του High Sensitivity DNA ladder στο βοθρίο που σημαίνεται με το σύμβολο **H**. Σε κάθε ένα από τα υπόλοιπα 11 βοθρία, μεταφέρεται 1μL των προς μελέτη δειγμάτων. Το chip τοποθετείται στο IKA vortex mixer και αφήνεται να αναδευτεί σε 2.200 rpm, για 60 sec.

Εντός 5 min το chip θα πρέπει να έχει τοποθετηθεί στο Agilent 2100 Bioanalyzer, όπου εκτελείται η ηλεκτροφόρηση, ενώ παράλληλα μέσω του αντίστοιχου λογισμικού αποτυπώνονται τα μεγέθη των τμημάτων του δίκλωνου DNA που υπάρχουν σε κάθε δείγμα.

Τα ηλεκτρόδια του Agilent 2100 Bioanalyzer πλένονται πριν και μετά τη χρήση του με υπερκάρθαρο νερό.

2.9 Αρχή μεθόδου Ποσοτικής real time PCR

Η συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός επιθυμητού τμήματος DNA. Το προϊόν της μπορεί να υποβληθεί σε αλληλούχηση, σε κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς, σε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης ή ακρυλαμίδης, ή σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και επακόλουθη ηλεκτροφόρηση. Σε όλες τις περιπτώσεις ηλεκτροφόρησης το αποτέλεσμα είναι ποιοτικό, δηλαδή της μορφής «ναι ή όχι». Δεν παρέχει, ως εκ τούτου, πληροφορίες για την αρχική ποσότητα του DNA στο δείγμα.

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) αποτελεί πλέον μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA και cDNA, μεγέθους 100-600 bp. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που «διαβάζουν» τον φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως ο ποσοτικός προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης, η ανάλυση miRNAs, η γονοτύπηση, η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, η

ταυτοποίηση SNPs και η αποτελεσματικότητα μιας θεραπευτικής αγωγής, καθώς η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της ενίσχυσης ενός στοχευόμενου μορίου DNA σε πραγματικό χρόνο.

Στη Real Time PCR η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος γίνεται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης μέσω της παρακολούθησης της εκπομπής του φθορισμού. Η εκπομπή του φθορισμού μετريέται στο πέρας κάθε κύκλου της εν λόγω PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει η καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Να σημειωθεί ότι το σήμα του φθορισμού είναι ανάλογο της ποσότητας του αρχικού υποστρώματος. Στον θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου τα δείγματα υφίστανται διαδοχικά διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, με σκοπό την αξιοποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των νουκλεϊκών οξέων και του ενζύμου (DNA πολυμεράση). Ουσιαστικά, η Real Time PCR συνίσταται από μια σειρά θερμοκρασιακών κύκλους που επαναλαμβάνονται 25-50 φορές. Οι κύκλοι αυτοί αποτελούνται από δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο γίνεται ο διαχωρισμός του δίκλωνου DNA συνήθως στους 95°C, ενώ στο δεύτερο στάδιο γίνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο και η ενίσχυση του υποστρώματος από την DNA πολυμεράση, περίπου στους 60°C.

Όσον αφορά την καμπύλη ενίσχυσης, διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις: την φάση υποβάθρου, την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού (πλατώ). Η φάση του υποβάθρου καταλαμβάνει τους πρώτους 10-15 κύκλους, όπου η εκπομπή του ειδικού σήματος φθορισμού δεν μπορεί να ξεπεράσει τον φθορισμό του υποβάθρου. Στην εκθετική φάση, υπάρχει περίσσεια των συστατικών της αντίδρασης και πραγματοποιείται διπλασιασμός του προϊόντος με το πέρας κάθε κύκλου. Καθώς εξελίσσεται η αντίδραση, στην γραμμική φάση, τα αντιδραστήριά της μειώνονται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται ανασταλτικοί παράγοντες και συνεπώς η απόδοση της αντίδρασης ελαττώνεται. Η ενίσχυση σταματάει όταν η αντίδραση υπεισέρχεται στην φάση του κορεσμού. Το σημείο του κορεσμού μπορεί να διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από την κινητική της αντίδρασής τους.

Για την ποσοτικοποίηση, λαμβάνεται υπ' όψιν η εκθετική φάση της αντίδρασης καθώς από αυτή μπορεί να προσδιοριστεί η τιμή Ct (threshold cycle). Το Ct αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης που χρειάστηκαν ώστε το ειδικό σήμα φθορισμού του προς ενίσχυση προϊόντος να ξεπεράσει το μη ειδικό σήμα του υποβάθρου. Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος. Η εξαγωγή των τιμών Ct πραγματοποιείται μέσω του ειδικού SDS 1.2.3. (Sequence Detection Systems 1.2.3.) λογισμικού της Applied Biosystems. Μέσω αυτού του λογισμικού δύναται η επιλογή εφαρμογής ενός κατωφλίου (threshold) στις καμπύλες ενίσχυσης. Το κατώφλι τοποθετείται στην αρχή της εκθετικής φάσης και μπορεί να είναι ξεχωριστό μεταξύ μιας

σειράς αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε διαφορετική χρονική στιγμή. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ένα κοινό δείγμα (βαθμονομητής ή πρότυπο δείγμα) μεταξύ των διαφορετικών σειρών αντιδράσεων, με σκοπό τη διόρθωση των διακυμάνσεων των τιμών Ct που αναμένονται, καθώς η διαφορά του Ct του δείγματος από το Ct του προτύπου παραμένει σταθερή και αμετάβλητη. Συνεπώς, στην ανάλυση των αποτελεσμάτων αξιοποιείται η προκύπτουσα κανονικοποιημένη τιμή.

Τα αντιδραστήρια της ποσοτικής PCR είναι παρόμοια με αυτά της συμβατικής και στα οποία συμπεριλαμβάνονται το αρχικό DNA υπόστρωμα, ειδικοί εκκινητές, ρυθμιστικό διάλυμα με ιόντα Mg^{2+} , τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), η Taq DNA πολυμεράση. Επιπλέον, απαραίτητη είναι η χρήση φθορίζουσών ουσιών που προσδένονται είτε ειδικά είτε μη ειδικά στο προϊόν που ενισχύεται.

Όπως γίνεται μνεία και παραπάνω υπάρχουν δύο τύποι χημικών αντιδράσεων που αξιοποιούνται για την ανίχνευση της αλληλουχίας που ενισχύεται στην Real Time PCR. Υπάρχουν, λοιπόν, τα μη ειδικά συστήματα (SYBR-Green) όπου ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια DNA που ενισχύονται. Στα ειδικά συστήματα (TaqMan) γίνεται εκπομπή φθορισμού μόνο από την επιθυμητή αλληλουχία που ενισχύεται, μέσω της ειδικής πρόσδεσης μορίων ανιχνευτών.

Στα μη ειδικά συστήματα χρησιμοποιείται συνήθως μία φθορίζουσα χρωστική, η οποία ενσωματώνεται στο δίκλινο DNA (dsDNA). Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική τέτοιου τύπου είναι η SYBR Green I, η οποία διεγείρεται μέγιστα με ακτινοβολία μήκους κύματος 494nm και εκπέμπει σε μήκος κύματος 521nm. Πρόκειται για μια ασύμμετρη κυανίνη που εμφανίζει 100 φορές μεγαλύτερη συγγένεια ως προς το dsDNA συγκριτικά με το βρωμιούχο αιθίδιο. Η σύνδεσή της SYBR Green I στο dsDNA γίνεται κατά την σύνθεση της ενισχυόμενης αλληλουχίας, με αποτέλεσμα το σήμα του φθορισμού να αυξάνει με το πέρας των κύκλων καθώς αυξάνει η συγκέντρωση του δίκλινου προϊόντος. Σημειώνεται ότι η SYBR Green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα.

Παρ' όλα αυτά, είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη παρουσία και μιας χρωστικής αναφοράς με σκοπό την κανονικοποίηση του εκπεμπόμενου φθορισμού. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιείται κατά κόρον είναι η ROX (passive reference dye). Η ROX εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος από τη SYBR Green I, διατηρώντας αμετάβλητο το σήμα φθορισμού της κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, συμβάλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο στη διόρθωση του φθορισμού που παράγεται από τα ενισχυόμενα προϊόντα.

Το κύριο πλεονέκτημα της SYBR Green είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών και για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας στόχου, γεγονός που την καθιστά οικονομική επιλογή σε σχέση με τη χρήση ενός ειδικού ανιχνευτή (probe). Επίσης, κατά τη σύνθεση

του dsDNA προϊόντος ενσωματώνονται χιλιάδες μόρια χρωστικής, γεγονός που συνεπάγεται ότι το σήμα του φθορισμού μπορεί να πολλαπλασιαστεί έως και 1000 φορές, γεγονός που την καθιστά ευαίσθητο δείκτη για την ποσότητα του dsDNA. Ωστόσο, η μεγάλη της συγγένεια ως προς το dsDNA υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη χρωστική προσδένεται σε όλα τα dsDNA μόρια που συντίθεται κατά τη φάση ενίσχυσης της αντίδρασης. Στα μόρια αυτά, πέρα από την αλληλουχία στόχο, συγκαταλέγονται τα πιθανά διμερή εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που μπορεί να προκύψουν, τα οποία εκπέμπουν φθορισμό και κατά συνέπεια αλλοιώνουν τον προσδιορισμό της πραγματικής ποσότητας του αρχικού υποστρώματος. Για την αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών, κρίνεται απαραίτητη η υλοποίηση καμπύλης αποδιάταξης (Melting Curve Analysis) μετά την ολοκλήρωση της ενίσχυσης και της φάση κορεσμού. Η μελέτη καμπυλών αποδιάταξης συνεισφέρει στη διάκριση του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου από τον φθορισμό που παράχθηκε από διμερή εκκινητών ή από μη ειδικά προϊόντα. Η θερμοκρασία τήξης αντιπροσωπεύει τη θερμοκρασία στην οποία το 50% των dsDNA προϊόντων έχει αποδιαταχθεί και εξαρτάται από το μήκος του dsDNA τμήματος και από το ποσοστό γουανίνης/κυτοσίνης (G/C) που συνίσταται. Βάσει αυτού, θεωρείται ότι τα διμερή των εκκινητών έχουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης από το προϊόν της αντίδρασης και κατ' αυτόν τον τρόπο επιτελείται και ο διαχωρισμός τους. Πιο αναλυτικά, από το διάγραμμα των καμπυλών τήξης προκύπτουν κάποιες κορυφές. Η κάθε κορυφή πρεσβεύει την θερμοκρασία τήξης κάποιου dsDNA μορίου. Η θερμοκρασία τήξης για τα προϊόντα της αντίδρασης πρέπει να εμφανίζεται γραφικά ως μοναδική κορυφή. Εάν, λοιπόν, στο διάγραμμα εμφανισθούν περισσότερες της μιας κορυφές αυτό σημαίνει την παρουσία και άλλων - πέραν του επιθυμητού- προϊόντων. Για την κατασκευή της καμπύλης εφαρμόζεται μετά το πέρας της ενίσχυσης, θερμοκρασία 60°C, η οποία αυξάνεται σταδιακά μέχρι τους 95°C.

Το αποτέλεσμα, γενικά της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αρχική ποσότητα του υποστρώματος και την ποιότητά του. Οπότε, για την αποφυγή λαθών κατά την επεξεργασία και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων κρίνεται αναγκαία η διαδικασία κανονικοποίησης. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την μελέτη ενός γονιδίου, το οποίο παρουσιάζει σταθερή έκφραση στην κατάσταση που μελετάται, παράλληλα με την μελέτη του γονιδίου-στόχου. Η παρουσία του γονιδίου αυτού παραμένει σταθερή από δείγμα σε δείγμα. Για τη μελέτη του αριθμού των αντιγράφων των αλληλομόρφων χρησιμοποιούνται γονίδια αναφοράς τα οποία παρουσιάζουν σταθερή παρουσία στο γονιδίωμα στην εκάστοτε συνθήκη που μελετάται. Στο καρκίνο της ουροδόχου κύστεως ως γονίδια αναφοράς –κυρίως όταν μελετάται η γονιδιακή έκφραση- χρησιμοποιούνται συνήθως το *ACTB* (beta-actin), το *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), το *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), το *TBP* (TATA-Box Binding Protein), το *B2M* (beta-2-microglobulin) και το *18SrRNA* (18S rRNA). Για την ανάλυση του αριθμού

των αλληλικών αντιγράφων, συγκεκριμένα σε δείγματα ορού ή πλάσματος, έχουν χρησιμοποιηθεί βιβλιογραφικά το *RPPH1* (Ribonuclease P RNA Component H1), το *GAPDH* (llyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), το *LEP* (Leptin), το *APP* (Amyloid Beta Precursor Protein) και το *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase). Στην παρούσα εργασία ως γονίδιο αναφοράς σε δείγματα ιστού και ορού ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως για την εκτίμηση του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων των γονιδίων *CCND1* (Cyclin D1), *CDKN2A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) και *MDM2* (MDM2 Proto-Oncogene) χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της λεπτίνης-*LEP*.

2.10 Αντίδραση qPCR για τα γονίδια *CCND1*, *CDKN2A*, *MDM2* και *LEP*.

Στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκε ένα πρωτόκολλο qPCR για την ενίσχυση των γονιδίων *CCND1*, *CDKN2A*, *MDM2* και *LEP*. Η ανίχνευση των προϊόντων έγινε με τη χρήση του συστήματος της SYBR Green I στο 7500 Real Time PCR κυκλοποιητή (Applied Biosystems, CA, USA). Τα γονίδια *CCND1*, *CDKN2A* και *MDM2* μελετώνται ως προς τον αριθμό των αντιγράφων τους στο γονιδίωμα ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως και το *LEP* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Για την ενίσχυση καθενός από τα προαναφερθέντα γονίδια χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη ειδικών πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών, τα οποία σχεδιάστηκαν βάσει της αλληλουχίας των γονιδίων αυτών. Η βελτιστοποιημένη αντίδραση τελικού όγκου 10 μ L περιλαμβάνει:

- 5 μ L KAPA™ SYBR® FAST qPCR 2x mix (Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, USA)
- 1 μ L από τον ειδικό πρόσθιο εκκινητή
- 1 μ L από τον ειδικό ανάστροφο εκκινητή
- 1 μ L υπερκάθαρο νερό
- 2 μ L DNA υπόστρωμα (<1200 ng/mL)

Όπως έχει αναφερθεί, ο αριθμός των αντιγράφων των τριών αυτών γονιδίων μελετήθηκε τόσο σε δείγματα ιστών όσο και σε δείγματα ορού. Στα δείγματα των ιστών οι ειδικοί πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές για τα *CDKN2A*, *MDM2* και *LEP* γονίδια ήταν σε συγκέντρωση 200nM, ενώ για το *CCND1* σε συγκέντρωση 100nM. Όσον αφορά τα δείγματα του ορού, οι ειδικοί πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές για τα *CDKN2A*, *MDM2* και *LEP* γονίδια ήταν σε συγκέντρωση 300nM, ενώ για το *CCND1* σε συγκέντρωση 100nM.

Το θερμικό πρωτόκολλο της qPCR ήταν κοινό για όλες τις αντιδράσεις. Εφαρμόζονται αρχικά 95°C για 10 min, ώστε να ενεργοποιηθεί η πολυμεράση (αποδεσμεύεται από το μόριο του αντισώματος που είναι συνδεδεμένη) και να αποδιαταχθεί το dsDNA. Έπονται 40 κύκλοι, οι οποίοι απαρτίζονται την διαδοχική εφαρμογή 95°C για 30sec για την αποδιάταξη του dsDNA και 60°C για 1min για την υβριδοποίηση των εκκινητών και την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου. Με το πέρας της αντίδρασης,

ακολουθεί η δημιουργία της καμπύλης αποδιάταξης, όπου εφαρμόζονται 95°C για 15sec και 60°C για 1min, και η θερμοκρασία αυξάνει σταδιακά -με συνεχή μέτρηση του φθορισμού- μέχρι να φτάσει τους 95°C. Η καμπύλη αποδιάταξης εκφράζεται ως ο αρνητικός λογάριθμος του φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν μοναδιαία για κάθε δείγμα και κάθε γονίδιο στόχο, και σε κάθε σειρά αντιδράσεων προστέθηκαν εκτός από τα άγνωστα δείγματα, η κυτταρική σειρά HeLa, ως βαθμονομητής (calibrator) καθώς τα γονίδια στόχοι εμφανίζουν διπλοειδία σε αυτή και δείγμα αρνητικού ελέγχου (Negative control).

2.11 Σχεδιασμός και σύνθεση εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για τις αντιδράσεις PCR αποτελεί κομβικό σημείο για την απόδοση και την επιτυχία της PCR και των παραλλαγών της. Υπάρχουν, βέβαια, ορισμένοι βασικοί κανόνες που πρέπει να ακολουθούνται κατά την σύνθεση ενός ζεύγους εκκινητών.

Κατ' αρχάς, το μέγεθος του εκάστοτε εκκινητή θα πρέπει να κυμαίνεται από 18 έως 25 νουκλεοτίδια. Για την μέγιστη απόδοση της PCR αντίδρασης οι προς ενίσχυση αλληλουχίες στόχοι δεν θα πρέπει να ξεπερνούν τα 300 bp. Επίσης, τόσο ο πρόσθιος όσο και ο ανάστροφος θα πρέπει να έχουν παρόμοιο ποσοστό σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) και ιδανικά περίπου στο 50-60%. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) του εκάστοτε εκκινητή πρέπει να αντιστοιχεί περίπου στους 50-65°C και η διαφορά του T_m του πρόσθιου εκκινητή από το T_m του ανάστροφου να μην ξεπερνά τους 2°C. Γενικά, καλό θα ήταν να αποφεύγονται οι μεγάλες επαναλήψεις νουκλεοτιδίων, ειδικά των Gs και Cs. Πρέπει να λαμβάνεται ακόμη υπ' όψιν η ανάγκη για αποφυγή σχηματισμού διμερών εκκινητών και άλλων δευτεροταγών δομών που επηρεάζουν αρνητικά την αντίδραση της PCR. Για τον λόγο αυτό, δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην είναι συμπληρωματικά τα 3' άκρα μεταξύ των εκκινητών. Τέλος, γίνεται η αξιολόγηση των θερμοδυναμικών τους χαρακτηριστικών με βιοπληροφορικά εργαλεία και αλγόριθμους. Το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), για παράδειγμα, είναι διαθέσιμο στο διαδίκτυο και μπορεί να αξιοποιηθεί για την εκτίμηση της ειδικότητας της προς ενίσχυση αλληλουχίας μέσω της υβριδοποίησης του αντίστοιχου ζεύγους ειδικών εκκινητών.

Στη συγκεκριμένη εργασία, οι εκκινητές για την ενίσχυση της DNA αλληλουχίας που αντιστοιχεί στα γονίδια *APP* (NC_000021.9), *TBP* (NC_000006.12), *LEP* (NC_000007.14), *CCND1* (NC_000011.10), *CDKN2A* (NC_000009.12) και *MDM2* (NC_000012.12) σχεδιάστηκαν με βάση τις δημοσιευμένες DNA αλληλουχίες των γονιδίων αυτών στη βάση δεδομένων του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των ΗΠΑ (NCBI Reference Sequence Database).

Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της qPCR στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' ➔ 3')	Μήκος (bp)	%GC	Tm	PCR προϊόν (bp)
CCND1 F	CCGTGAAAAAGAGCCGCCTG	20	60.0	62.19	121
CCND1 R	CGGATGGAGTTGTCTGGTGTAG	21	57.14	60.47	
CDKN2A gF	ATGCCTGCTTCTACAAACCCAC	22	50.0	61.14	119
CDKN2A R	GGAGCCCATACGCAACGAGAT	21	57.14	62.56	
MDM2 F	TCCCCCTTTACACTCACTTACTC	23	47.83	59.16	121
MDM2 R	TCGCCCTATTTCCTTCAATCAGA	23	43.48	59.55	
LEP F	CTCCACCCCATCCTGACCTTA	21	57.14	60.63	237
LEP R237	CACCTCTGTGGAGTAGCCTGAA	22	54.55	61.41	
LEP R116	AGGTTCTCCAGGTCGTTGGAT	21	52.38	60.83	
TBP F	CAGGAAGACGACGTAATGGCTC	22	54.55	54.55	255
TBP R255	AGATAGCAGCACGGTATGAGCA	22	50.0	61.6	
TBP R121	CATCCATCTTCTCACAACACCACC	24	50.0	61.63	
APP F225	ACTCAGCTCTCCTCTTGTTTTTCAG	25	44.0	60.97	225
APP R225	CGGGTTTGTCTTCTCCACATT	22	45.45	59.64	
APP F115	ACACCGATGGGTAGTGAAGCA	21	52.38	61.44	115
APP R115	GAACGGCTACGAAAATCCAACCT	23	47.83	61.42	

Σημείωση: ο πρόσθιος εκκινητής στο γονίδιο *LEP* είναι κοινός για τα δύο προϊόντα που προκύπτουν και οι δύο διαφορετικοί ανάστροφοι εκκινητές καθορίζουν το μέγεθος της αλληλουχίας που θα ενισχυθεί. Η ίδια συνθήκη ισχύει και για το *TBP* γονίδιο. Η λογική σχεδιασμού των διπλών ζευγών εκκινητών για ένα γονίδιο, όπου το μικρότερο προϊόν εμπεριέχεται στο μεγαλύτερο έγκειται στον προσδιορισμό της ακεραιότητας του cfDNA του ορού των ασθενών.

2.12 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της qPCR, η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης. Στην παρούσα εργασία εφαρμόσθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης και συγκεκριμένα η $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Comperative Ct method) μεθοδολογία. Στη μεθοδολογία αυτή, οι αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων των γονιδίων-στόχων υπολογίζονται σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό ενός παράλληλα ενισχυόμενου γονιδίου αναφοράς. Πραγματοποιείται, λοιπόν, σύγκριση των Ct των προς ανάλυση δειγμάτων με το Ct ενός πρότυπου δείγματος αναφοράς. Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε DNA από την HeLa κυτταρική σειρά, όπου τα γονίδια-στόχοι

και το γονίδιο αναφοράς εμφανίζονται σε διπλοειδία. Γίνεται, επομένως, κανονικοποίηση ως προς ένα ενδογενές γονίδιο, με σκοπό τη διόρθωση των πιθανών και αναμενόμενων διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες είναι πιθανόν να οφείλονται στην διαφορετική ποσότητα αρχικού υποστρώματος DNA ή και στην διαφορετική απόδοση της αντίδρασης στις διαφορετικές χρονικές στιγμές διεξαγωγής του πειράματος.

Όπως είναι έκδηλο, η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης στηρίζεται στη μαθηματική εξίσωση $2^{-\Delta\Delta Ct}$, όπου:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{δείγματος}} - \Delta Ct_{\text{αναφοράς}}$$

$\Delta Ct_{\text{δείγματος}}$: αντιστοιχεί στην κανονικοποιημένη τιμή Ct κάθε δείγματος, ως προς το ενδογενές γονίδιο.

$\Delta Ct_{\text{αναφοράς}}$: αντιστοιχεί στην κανονικοποιημένη τιμή Ct για το γονίδιο αναφοράς.

Για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι το $\Delta\Delta Ct$ ισούται με μηδέν, καθώς η διαφορά στην αριθμό των αλληλικών αντιγράφων του γονιδίου-στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με των εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα προς ανάλυση δείγματα αντικατοπτρίζουν το πόσες φορές μικρότερη ή μεγαλύτερη είναι η παρουσία των αντιγράφων των γονιδίων-στόχων σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

2.13 Ανίχνευση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα υλικά που απαιτούνται για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι:

- Αγαρόζη (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1X) που περιέχει: 0.089 M Tris (Applichem), 0.089 M βορικό οξύ (Merck), MEDTA (Applichem)
- DNA loading dye solution 6X (Fermentas International Ltd.)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού βάσει την μετακίνηση φορτισμένων σωματιδίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Πιο συγκεκριμένα, οι χημικές ενώσεις που φέρουν φορτίο λόγω ιοντισμού μετακινούνται, ανάλογα με το είδος του φορτίου, προς την άνοδο (θετικός πόλος) ή την κάθοδο (αρνητικός πόλος). Οι εφαρμογές της τεχνικής αυτή αφορούν το διαχωρισμό μακρομορίων όπως DNA, RNA, πρωτεϊνών, τον έλεγχο της καθαρότητας του δείγματος καθώς και τον ποσοτικό-ποιοτικό έλεγχο και τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των υπό εξέταση ενώσεων. Η

ανίχνευση και ο ημιποσοτικός προσδιορισμός προϊόντων PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της ηλεκτροφόρησης τους σε πήκτωμα αγαρόζης, με την επιπλέον προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο προσδένεται σε δίκλωνες δομές, και δίνει φθορισμό υπό την υπεριώδη ακτινοβολία, μετά την ηλεκτροφόρηση. Η κινητικότητα των προϊόντων εξαρτάται από το μέγεθος τους. Τα αρνητικά φορτισμένα PCR προϊόντα κινούνται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη με τον δεκαδικό λογάριθμο του μοριακού τους βάρους προς τον θετικό πόλο, με συνέπεια να δημιουργούν διακριτές ζώνες που αντιστοιχούν σε αντίστοιχα συγκεκριμένα μοριακά βάρη.

Αρχικά γίνεται η παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 2,5% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X και 0,01% w/v βρωμιούχο αιθίδιο. Αφού το πήκτωμα έχει πήξει πλήρως μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Έπειτα γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων προς φόρτωση στο πήκτωμα, με την προσθήκη κατάλληλου όγκου loading dye solution. Συγκεκριμένα 10μL προϊόντος PCR αναμειγνύεται με 2μL loading dye solution (6x). Πραγματοποιείται η φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα και μαζί με τον κατάλληλο ladder, ο οποίος αποτελεί μάρτυρα με γνωστά μεγέθη τμημάτων DNA και βοηθά στην διάκριση των μοριακών βαρών. Στην εν λόγω εργασία, βάσει των μήκων των γονιδιακών προϊόντων που ενισχύθηκαν, χρησιμοποιήθηκε 50 bp ladder. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης αρχίζει με τη ρύθμιση στη συσκευή της τάσης και των λεπτών, στα οποία θα «τρέξουν» τα δείγματα στο πήκτωμα. Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε σταθερή τάση 120V, για 40min, σε θερμοκρασία δωματίου.

2.14 Βιοστατιστική ανάλυση

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με σκοπό την αξιολόγηση της κλινικής αξίας της ποσότητας και της ακεραιότητας του cfDNA και του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων επιλεγμένων γονιδίων στόχων στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.17.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Για την ανάλυση κατανομής των επιπέδων παρουσίας του εκάστοτε γονιδίου στις διαφορετικές ομάδες ασθενών με βάση αποκλειστικά τη διήθηση του ουροθηλίου (NMIBC και MIBC), το παθολογικό στάδιο του όγκου (tumor stage) και το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου (Grade) έγινε χρήση των μη παραμετρικών δοκιμασιών Mann-Whitney U test. Η ανάλυση επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή καμπυλών επιβίωσης κατά Kaplan-Meier, όπου ελέγχθηκαν η ολική επιβίωση, η επιβίωση ελεύθερας νόσου και η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου.

3. Αποτελέσματα

3.1 Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης cfDNA-Έλεγχος ποσότητας, ποιότητας και ακεραιότητας

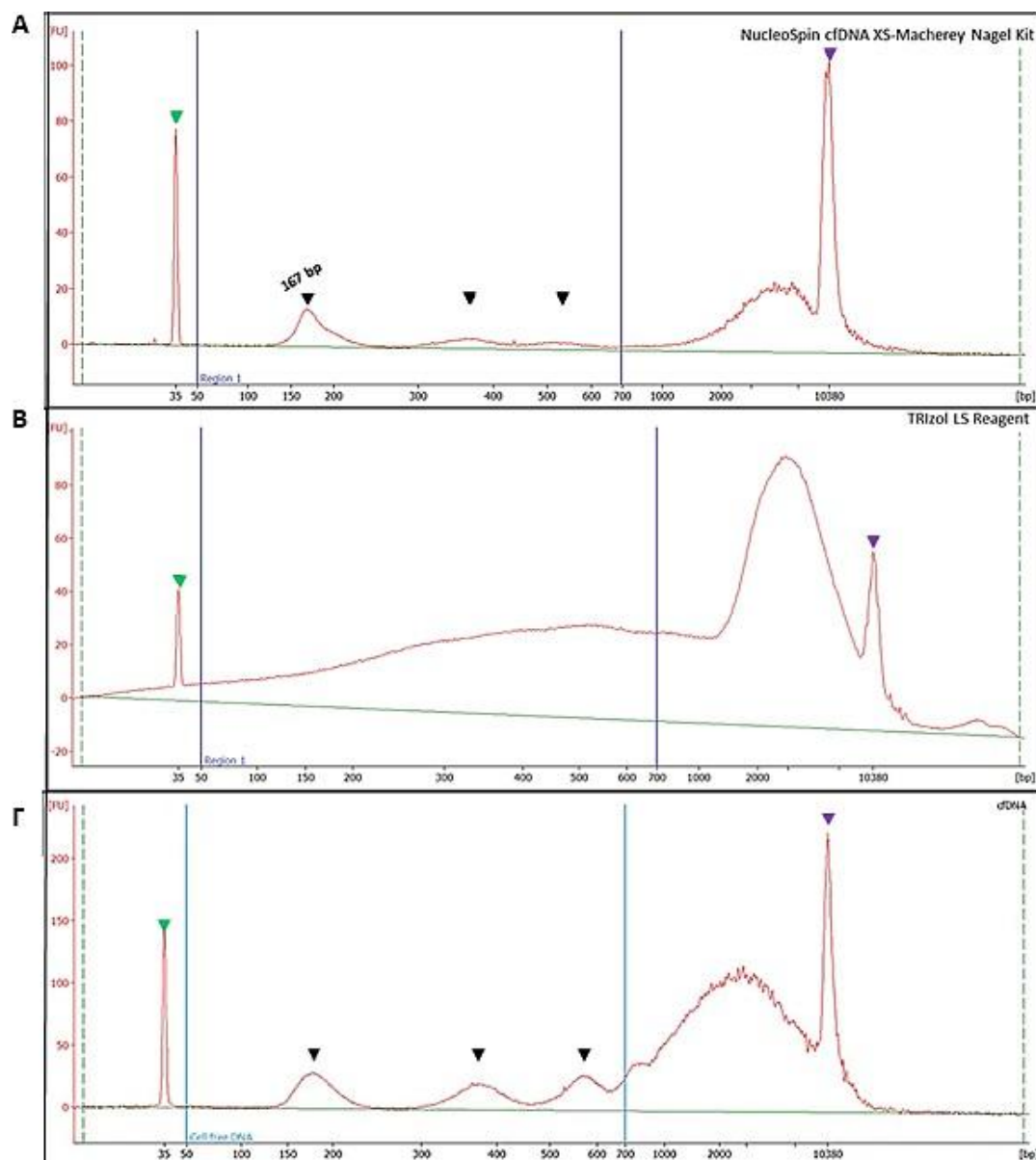
Η απομόνωση του cfDNA από τον ορό των ασθενών πραγματοποιήθηκε μέσω του NucleoSpin cfDNA XS-Macherey Nagel Kit και η ποσότητα του προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά με τη χρήση του Qubit dsDNA HS Assay Kit. Η συγκέντρωση του DNA (ng/mL) στα δείγματα του ορού κυμάνθηκε από <100 έως και >1000 ng/mL. Οι τιμές αυτές συνάδουν με τις πληροφορίες που αποκομίζονται από τη βιβλιογραφία για τη συγκέντρωση του cfDNA στον ορό ή το πλάσμα ασθενών με καρκίνο, [219] ενώ η συντριπτική τους πλειοψηφία ξεπερνούσαν τα 100 ng/mL. Η συνθήκη αυτή αποτελεί μία πρώτη καλή ένδειξη για την ικανοποιητική ποιότητα του cfDNA που απομονώθηκε.

Στη συνέχεια, όπως γίνεται σαφές από τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο κύριος μηχανισμός που τροφοδοτεί την κυκλοφορία με cfDNA είναι αυτός του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Όπως έχει περιγραφεί εκτενώς στην εισαγωγή, το γεγονός αυτό καθιστά την παρουσία στην κυκλοφορία τμημάτων cfDNA κυρίως 167bp και ακέραιων πολλαπλάσιων αυτών.[240] Για την εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων dsDNA που απομονώθηκαν από τον ορό των ασθενών διεξήχθη η μέθοδος της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το Agilent High Sensitivity DNA Kit.

Με τον όρο ακεραιότητα, όμως, γίνεται αναφορά στον λόγο των μεγαλύτερων τμημάτων dsDNA που υποδηλώνουν των μη προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (νέκρωση) προς τα μικρότερα τμήματα dsDNA που αντανakλούν την αποπτωτική τους προέλευση. Σε ασθενείς με καρκίνο, έχει βρεθεί αυξημένη η παρουσία μεγαλύτερων τμημάτων cfDNA σε σχέση με τα υγιή άτομα. Μάλιστα, όσο πιο προχωρημένος είναι ένας καρκίνος, τόσο εντονότερη παρατηρείται να είναι η νέκρωση των καρκινικών και μη κυττάρων και συνεπώς μεγαλώνει και η παρουσία μεγάλων τμημάτων dsDNA στην κυκλοφορία [240].

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.1A, είναι έκδηλη η μεγαλύτερη παρουσία τμημάτων DNA εντός του διαστήματος 160-180 bp, σε ένα ενδεικτικό δείγμα dsDNA που απομονώθηκε από ορό ασθενούς μέσω του NucleoSpin cfDNA XS-Macherey Nagel Kit. Παρατηρείται, ωστόσο, αυξημένη και η παρουσία μεγαλύτερων τμημάτων DNA (>700 bp), τα οποία υποδηλώνουν dsDNA μη αποπτωτικής προέλευσης. Τέλος, οι δύο δείκτες υπερκαλύπτουν την παρουσία των υπόλοιπων dsDNA τμημάτων και η γραμμή βάσης (baseline) είναι οριζόντια με μηδενική κλίση. Στην εικόνα 3.1B αντιπροσωπεύεται η απεικόνιση της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης dsDNA που απομονώθηκε από ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως μέσω της μεθόδου φαινόλης-χλωροφορμίου (TRIzol LS

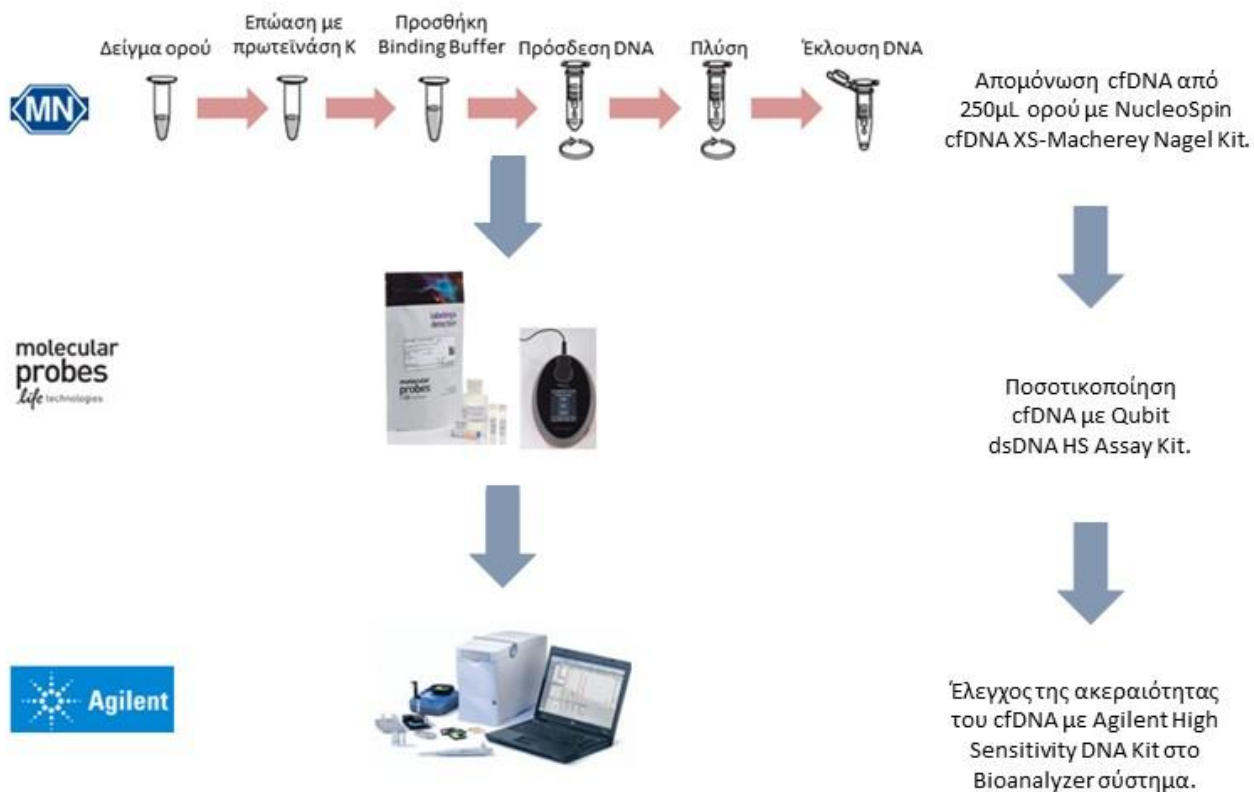
Reagent). Στο ηλεκτροφόρημα αυτό τα dsDNA τμήματα μεγάλου μήκους υπερκαλύπτουν τους δείκτες, ενώ η γραμμή βάσης είναι κατηφορικής κλίσης. Η εικόνα 3.1Γ, χρησιμοποιείται ως πρότυπη εικόνα αναφοράς για την σύγκριση μεταξύ των ηλεκτροφορημάτων 3.1Α και 3.1Β, καθώς είναι αυτή που προτείνεται από την επίσημη ιστοσελίδα της Agilent (<https://www.agilent.com/>) και αξιοποιείται για την μετ' έπειτα στοιχειοθέτηση της επιλογής της πιο κατάλληλης μεθόδου για την απομόνωση του cfDNA από τον ορό των ασθενών.



Εικόνα 3.1: Α) Ενδεικτικό ηλεκτροφόρημα dsDNA που απομονώθηκε από ορό ασθενούς με καρκίνο ουροδόχου κύστεως μέσω NucleoSpin cfDNA XS-Macherey Nagel Kit. Β) Ενδεικτικό ηλεκτροφόρημα dsDNA που απομονώθηκε από ορό ασθενούς με καρκίνο ουροδόχου κύστεως μέσω της μεθόδου φαινόλης-χλωροφορμίου (TRIZOL LS). Γ) Εικόνα από την επίσημη σελίδα της Agilent και απεικονίζει δείγμα cfDNA που αναλύθηκε με το Bioanalyzer σύστημα. Σημειώνεται ότι οι μαύρες αιχμές

υποδεικνύουν την παρουσία μονο-, δι- και τρι- νουκλεοσωμάτων, όπου αναμένονται εντός της περιοχής που οριοθετείται από τις κάθετες μπλε γραμμές. Η πράσινη αιχμή αντιστοιχεί στον δείκτη τμήματος μικρού μήκους (35 bp), ενώ η μωβ στον δείκτη τμήματος μεγάλου μήκους (10380 bp). Η πράσινη γραμμή του οριζόντιου άξονα συνιστά τη γραμμή βάσης (baseline).

Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης, ποσοτικοποίησης και ελέγχου ακεραιότητας του cfDNA



Εικόνα 3.2: Το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε για την απομόνωση, την ποσοτικοποίηση και του ελέγχου ποιότητας του cfDNA. Η απομόνωση του cfDNA διεξήχθη μέσω του NucleoSpin cfDNA XS-Macherey Nagel Kit, η ποσοτικοποίηση του μέσω του Qubit dsDNA HS Assay Kit και ο έλεγχος της ακεραιότητάς του μέσω της ανάλυσής του με τη High Sensitivity DNA δοκιμή στο Bioanalyzer σύστημα.

3.2 Επιλογή γονιδίου αναφοράς, ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθοδολογίας ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την εκτίμηση ποσότητας και ακεραιότητας του cfDNA

Όπως έχει επαναδιατυπωθεί ένα γονίδιο αναφοράς πρέπει να έχει σταθερό αριθμό αντιγράφων στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες και χρησιμοποιείται για να εξομαλύνει στις διαφορές που αναμένονται μεταξύ των δειγμάτων, λόγω διαφοράς στην απόδοσης της αντίδρασης ως προς την

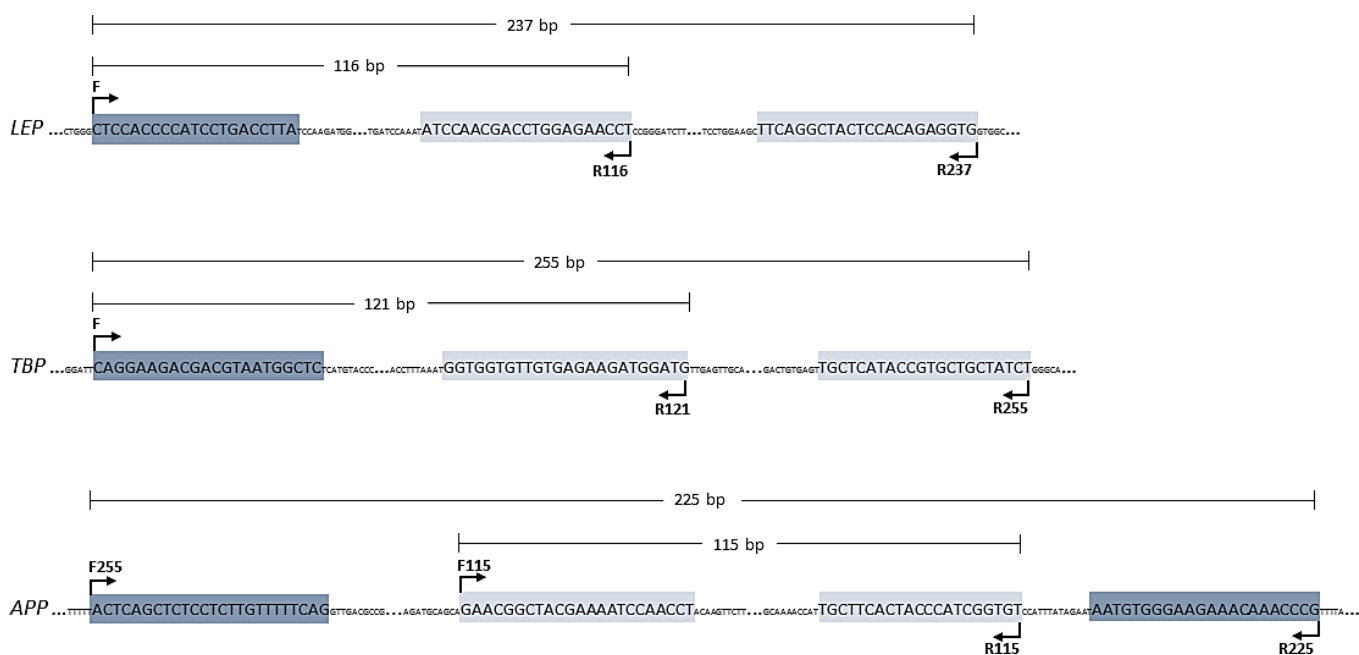
ενίσχυση του εκάστοτε προϊόντος. Ακόμη, στην εν λόγω εργασία δημιουργήθηκε η ανάγκη της σχετικής ποσοτικοποίησης του αρχικού υποστρώματος DNA που εισήχθη στην αντίδραση και αυτό επετεύχθη με την ποσοτικοποίηση του γονιδίου αναφοράς ως προς έναν ενδογενή μάρτυρα, γνωστής συγκέντρωσης ($\text{HeLa}_{\text{DNA}} = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$). Επίσης, πέραν του ζητήματος της ποσοτικοποίησης αναδείχθηκε και το ζήτημα προσδιορισμού της ακεραιότητας του cfDNA, καθώς βιβλιογραφικά φαίνεται να έχει κλινική αξία.[308] Με τον όρο ακεραιότητα γίνεται αναφορά στον λόγο της παρουσίας μεγάλων προς μικρότερων τμημάτων dsDNA, αντικατοπτρίζοντας κατά προσέγγιση τον λόγο της νεκρωτικής προς την αποπτωτική δραστηριότητα.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω εξετάστηκαν κάποια γονίδια ως εν δυνάμει γονίδια αναφοράς και συγκεκριμένα τα γονίδια *LEP*, *APP* και *TBP*. Για κάθε γονίδιο σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές ώστε να προκύπτουν δύο προϊόντα ενίσχυσης. Ένα μικρότερο προϊόν (<167 bp) που να αντιστοιχεί στο αποπτωτικής προέλευσης DNA και εμπεριέχεται σε ένα μεγαλύτερου μήκους προϊόν (>200 bp), το οποίο αντιπροσωπεύει το νεκρωτικής προέλευσης DNA.

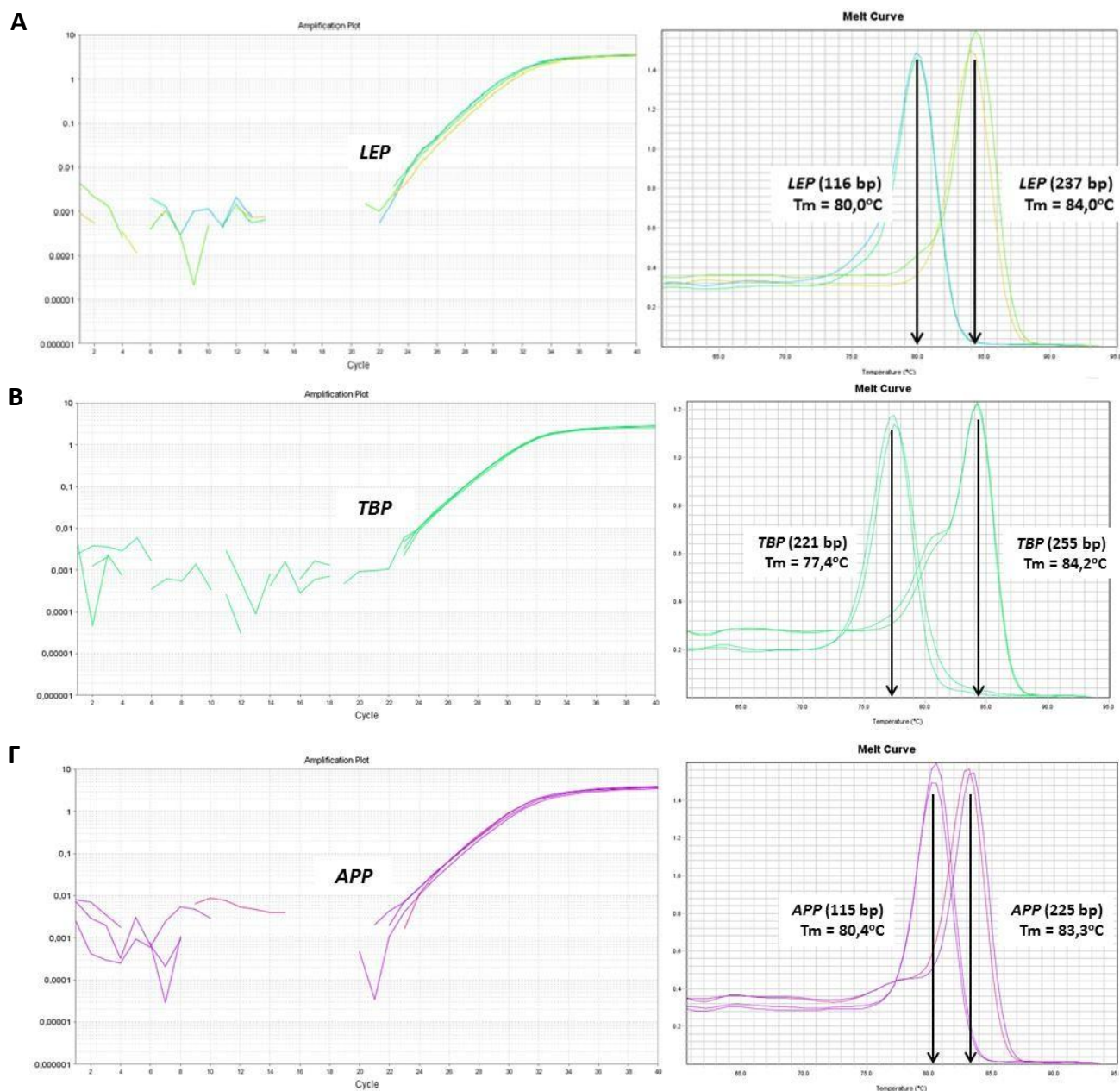
Ως εκ τούτου η επιλογή για την εξέταση των τριών αυτών γονιδίων, ως υποψήφια γονίδια αναφοράς, στηρίχθηκε στο γεγονός ότι το *TBP* [309, 310] είναι ένα συχνά χρησιμοποιούμενο γονίδιο αναφοράς στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, ενώ τα *LEP* [311, 312] και *APP* [313, 314] γονίδια έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ανάλυσης του cfDNA τόσο ως προς τον ποσοτικό προσδιορισμό του όσο και ως προς τον προσδιορισμό της ακεραιότητας του cfDNA. Παράλληλα, επειδή στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως λαμβάνουν χώρα πολλά γενωμικά συμβάντα, συμπεριλαμβανομένων των χρωμοσωμικών αριθμητικών και δομικών ανωμαλιών, εξετάστηκε ότι οι γενετικοί τόποι και των τριών αυτών γονιδίων (*LEP*: 7q32.1, *APP*: 21q21.3, *TBP*: 6q27) βρίσκονται σε χρωμοσωμικές περιοχές με χαμηλή συχνότητα αλλαγών στον συγκεκριμένο καρκίνο[118, 121, 315]. Σημειώνεται στο σημείο αυτό ότι αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση η αναλογία των δύο προϊόντων, του διαφορετικού μεγέθους που προκύπτουν για κάθε υποψήφιο γονίδιο αναφοράς, να είναι ή να προσεγγίζει σημαντικά το 1:1. Κατ' αυτόν τον τρόπο, εξασφαλίζεται ότι οι διαφορές που παρατηρούνται στην παρουσία των δύο προϊόντων που ενισχύθηκαν με αρχικό υπόστρωμα το cfDNA που απομονώθηκε από τον ορό των ασθενών, είναι πραγματικές. Αυτή η συνθήκη ελέγχθηκε στην συγκεκριμένη εργασία στην HeLa καρκινική σειρά, όπου με βάση δεδομένα αλληλούχησης και τα τρία υποψήφια γονίδια αναφοράς είναι σε διπλοειδία, καθώς επίσης και σε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από ιστό φυσιολογικού ουροθηλίου.

Για την επιλογή γονιδίου αναφοράς, που θα αξιοποιηθεί στον μετ' έπειτα προσδιορισμό της ποσότητας και της ακεραιότητας του cfDNA, καθώς και του αριθμού των αντιγράφων των γονιδίων στόχων, ελέγχθηκαν τα *LEP*, *APP* και *TBP* γονίδια με real-time qPCR. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε

ως θετικός μάρτυρας η HeLa καρκινική σειρά, όπου και τα τρία αυτά γονίδια βρίσκονται σε διπλοειδία, ενώ ελέγχθηκαν δείγματα τόσο ιστών όσο και ορού από ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστεως. Επιπλέον, σε κάθε δείγμα έγινε η ενίσχυση και του μικρού και του μεγάλου τμήματος για το εκάστοτε γονίδιο. Υπενθυμίζεται ότι το μικρό τμήμα του κάθε γονιδίου εμπεριέχεται στο μεγαλύτερο και η διάταξη αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ακεραιότητας του cfDNA στον ορό των ασθενών, καθώς βιβλιογραφικά φαίνεται να έχει κλινική αξία. Ενδεικτικά, στην Εικόνα 3.4 παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης των real-time qPCR αντιδράσεων για τα *LEP*, *APP* και *TBP* γονίδια σε HeLa κυτταρική σειρά.

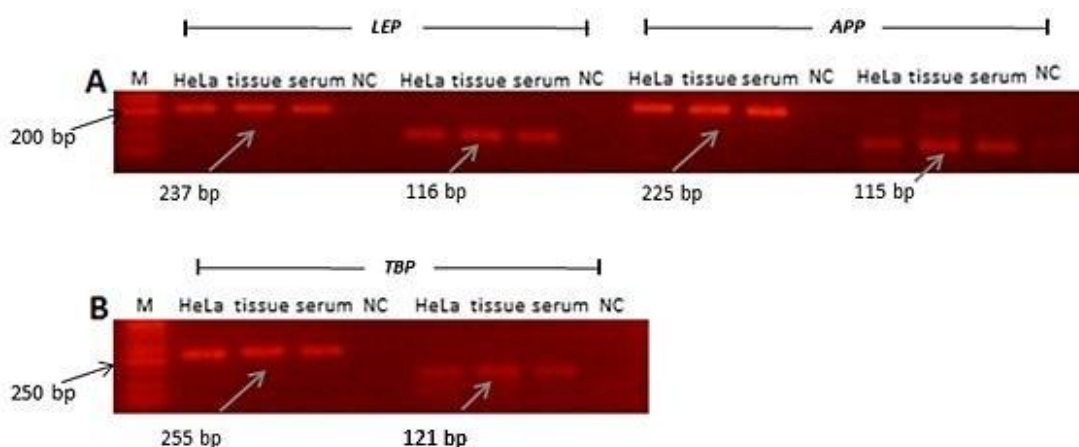


Εικόνα 3.3: Απεικόνιση των διαφορετικών μεγέθους προϊόντων που προκύπτουν έπειτα από την ενίσχυση υποστρώματος με τα ειδικά ζεύγη εκκινητών που έχουν σχεδιαστεί για τα τρία υποψήφια γονίδια αναφοράς. Με F επισημαίνεται ο ειδικός πρόσθιος εκκινητής, ενώ με R ο ειδικός ανάστροφος. Εάν υπάρχει αριθμητικός δείκτης που έπεται του F ή του R, αυτός προσδιορίζει το μέγεθος που προκύπτωντος προϊόντος, διαφορετικά υποδηλώνει κοινό εκκινητή για τα δύο προϊόντα.



Εικόνα 3.4: Καμπύλες ενίσχυσης και τήξης των τριών υποψήφιων γονιδίων αναφοράς. Α) *LEP*, Β) *TBP*, Γ) *APP*.

Για την περαιτέρω τεκμηρίωση περί μοναδικότητας των προϊόντων στην εκάστοτε αντίδραση, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης (2,5% w/v).

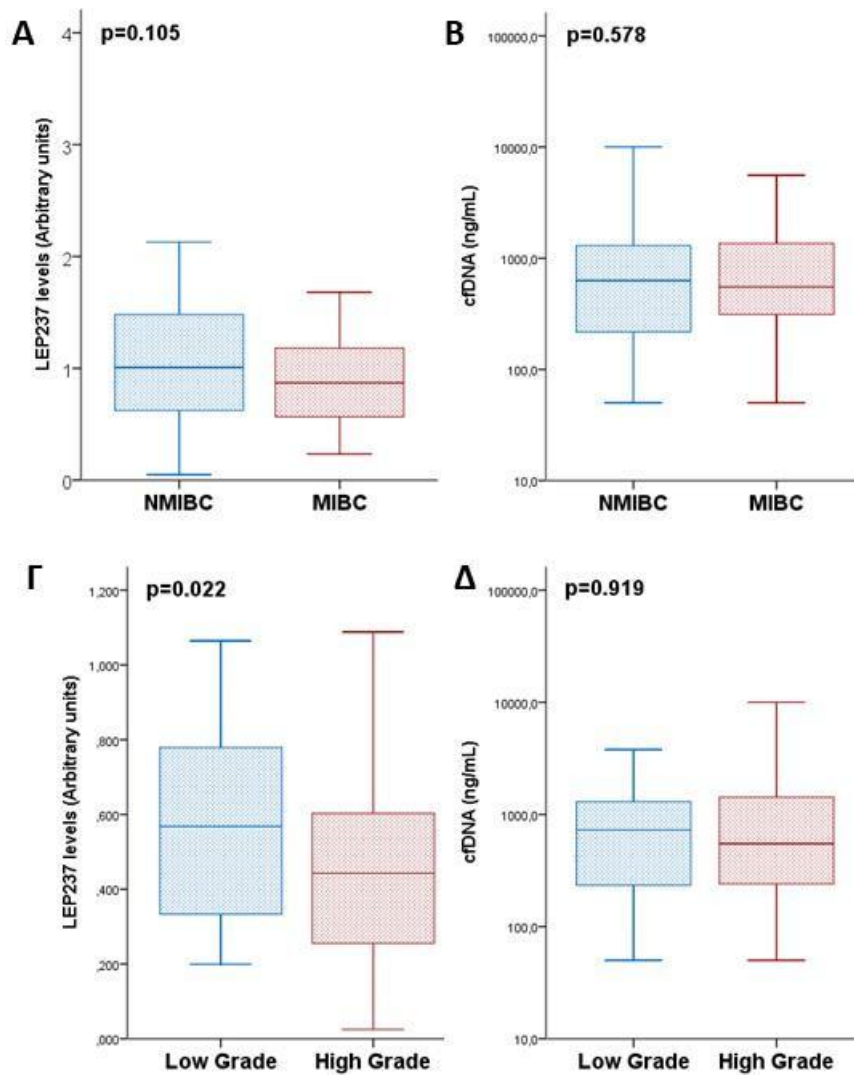


Εικόνα 3.5: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2,5% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των τριών υποψήφιων γονιδίων αναφοράς. Α) τα προϊόντα 237 bp και 116 bp αντιστοιχούν στο γονίδιο της *LEP*, ενώ τα 225 bp και 115 bp στο γονίδιο του *APP*. Β) τα προϊόντα 255 bp και 221 bp αντιστοιχούν στο γονίδιο του *TBP*. Ακόμη, M: πρότυπα μεγέθη DNA (DNA ladder 50 bp), HeLa: θετικός μάρτυρας, tissue: δείγμα καρκινικού ιστού, serum: δείγμα ορού ασθενούς, NC: αρνητικός μάρτυρας.

Λαμβάνοντας, εν τέλει, υπ' όψιν την ικανοποιητική παρουσία στα δείγματα των ασθενών, την απόδοση της αντίδρασης της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, καθώς και την εικόνα ηλεκτροφόρησης επιλέχθηκε το *LEP* γονίδιο ως γονίδιο αναφοράς.

3.3 Κλινική αξιολόγηση ποσότητας και ακεραιότητας cfDNA

Όσον αφορά τα επίπεδα παρουσίας του μη αποπτωτικής προέλευσης ενισχυμένου προϊόντος (237 bp) για το γονίδιο της *LEP*, είναι αυξημένα στους όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας σε σχέση με αυτούς με υψηλό βαθμό κακοήθειας (Εικόνα 3.6Γ) και μάλιστα με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.022$), ενώ παρουσιάζουν αντίστοιχη τάση στους μη μυοδιηθητικούς σε σχέση με τους μυοδιηθητικούς όγκους (Εικόνα 3.6Α). Στις Εικόνες 3.Β και 3.Δ αυτό που παρατηρείται είναι ότι η συγκέντρωση (ng/mL) του cfDNA που απομονώθηκε από τον ορό των ασθενών είναι παρόμοια μεταξύ των NMIBC και MIBC, καθώς επίσης και των χαμηλού και υψηλού βαθμού κακοήθειας.

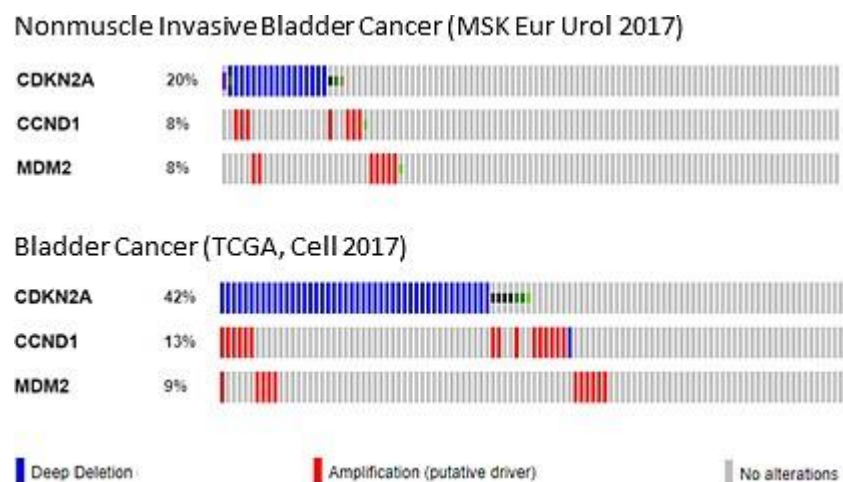


Εικόνα 3.6: Α & Γ) Τα επίπεδα παρουσίας του μη αποπτωτικής προέλευσης ενισχυμένου προϊόντος (237 bp) για το γονίδιο της *LEP*, ως προς την διήθηση του ουροθηλίου και ως προς τον βαθμό κακοήθειας. Β & Δ) Η συγκέντρωση (ng/mL) του cfDNA ως προς την διήθηση του ουροθηλίου και ως προς τον βαθμό κακοήθειας του όγκου των ασθενών. Η τιμή p (p-value) υπολογίστηκε μέσω Mann-Whitney U test.

3.4 Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων-στόχων για εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων τους

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς και στην εισαγωγή, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως χαρακτηρίζεται από υψηλό φορτίο μεταλλαγών, όπου περιλαμβάνονται σημειακές μεταλλάξεις, αριθμητικές αλλοιώσεις έως και απώλειες ολόκληρων χρωμοσωμικών βραχιόνων. Οι απαλοιφές και οι πολλαπλασιασμοί διάφορων γενετικών τόπων είναι ένα σύνηθες φαινόμενο στον συγκεκριμένο καρκίνο και όπως έχει δειχθεί οι αλλαγές στον αριθμό κάποιων γενετικών τόπων σχετίζονται την εξέλιξη και την υποτροπή της νόσου.[135]

Τα γονίδια που επιλέχθηκαν στην εν λόγω εργασία για τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων τους σε δείγματα ιστού και ορού ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως είναι τα *CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2*. Η επιλογή αυτή προέκυψε έπειτα από βιοπληροφορική αναζήτηση στην πλατφόρμα του cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>), όπου πραγματοποιήθηκε σύγκριση στις συχνότητες εμφάνισης αλλαγών στον αριθμό των αλληλομόρφων 84 γονιδίων σε 105 ασθενείς με μη μυοδιηθητικό και 1.637 γονιδίων σε 413 ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο ουροδόχου κύστεως. Τα γονίδια στόχοι, *CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2*, είχαν από τις μεγαλύτερες συχνότητες εμφάνισης αριθμητικών αλλαγών στα αλληλόμορφα τους και στις δύο κοορτές.



Εικόνα 3.7: Εικόνα που ανακτήθηκε από την πλατφόρμα του cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>), καταδεικνύοντας τις συχνότητες εμφάνισης απαλοιφών και πολλαπλασιασμών των γενετικών τόπων των τριών γονιδίων στόχων σε ασθενείς με NMIBC και MIBC.

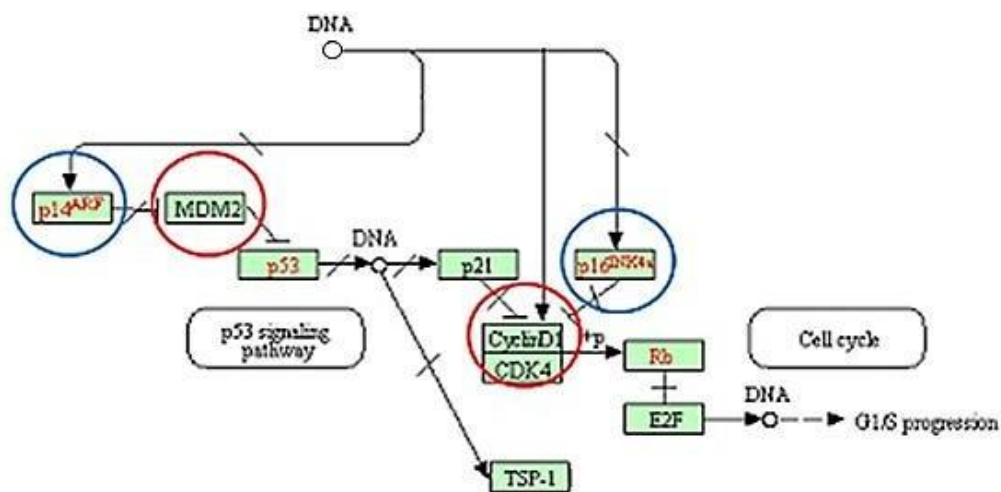
Πιο αναλυτικά, το γονίδιο *CDKN2A* βρίσκεται στην 9p21 χρωμοσωμική περιοχή, θεωρείται γονίδιο με ογκοκατασταλτική λειτουργία και συμμετέχει στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου μέσω της συμμετοχής του στο μονοπάτι του p53. Όπως αναφέρεται βιβλιογραφικά η απώλεια ετεροζυγωτίας ή και η απαλοιφή ολόκληρου του συγκεκριμένου γενετικού τόπου είναι ένα εξαιρετικά συχνό συμβάν και συνήθως πρώιμο στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως[135]. Σύμφωνα με τις ομάδες επικύρωσης, απαλοιφή τουλάχιστον ενός αντιγράφου του *CDKN2A* γονιδίου βρέθηκε σε 16% και 33% των ασθενών με NMIBC και MIBC αντίστοιχα.

Το *CCND1* γονίδιο εντοπίζεται στη 11q13 χρωμοσωμική περιοχή, χαρακτηρίζεται ογκογονίδιο και συμμετέχει στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου μέσω του RB1 μονοπατιού. Ο γενετικός τύπος του συγκεκριμένου γονιδίου φαίνεται ότι συχνά πολλαπλασιάζεται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Η αύξηση των αντιγράφων του *CCND1* σχετίζεται με την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς απενεργοποιείται το σημείο ελέγχου στην G1 φάση της μεσόφασης[135].

Σύμφωνα με τις ομάδες επικύρωσης, παρατηρείται πολλαπλασιασμός του *CCND1* γονιδίου στο 7% και 12% των ασθενών με NMIBC και MIBC αντίστοιχα.

Το *MDM2* γονίδιο βρίσκεται στην 12q14-q15 χρωμοσωμική περιοχή, χαρακτηρίζεται ως ογκογονίδιο και συμμετέχει στον κυτταρικό κύκλο καταστέλλοντας τη δράση της p53 πρωτεΐνης μέσω της σήμανσής της με ουβικουιλίνη για την αποικοδόμησή της στο πρωτεάσωμα. Ο γενετικός τόπος του συγκεκριμένου γονιδίου φαίνεται ότι συχνά πολλαπλασιάζεται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως[135]. Η αύξηση των αντιγράφων του *MDM2* συνεπάγεται καταστολή της λειτουργίας της p53 και συνεπώς βλάβη στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού. Σύμφωνα με τις ομάδες επικύρωσης, παρατηρείται πολλαπλασιασμός του *MDM2* γονιδίου στο 7% και 9% των ασθενών με NMIBC και MIBC αντίστοιχα.

Παράλληλα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.8, η οποία προέρχεται από την Εγκυκλοπαίδεια του Κιότο για τα γονίδια και τα γονιδιώματα (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG), τα τρία αυτά γονίδια όχι μόνο εμπλέκονται στην έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, αλλά σε μοριακό επίπεδο αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό ενίσχυσε ακόμη περισσότερο την επιλογή των συγκεκριμένων γονιδίων, καθώς πέρα από τη μεμονωμένη πιθανή κλινική αξία που φαίνεται να έχουν, ίσως συνδυαστικά να συνδράμουν στη δημιουργία μιας πιο πολυπρισματικής εικόνας που να ευνοεί την πιο αντιπροσωπευτική εκτίμηση της πρόγνωση των ασθενών.

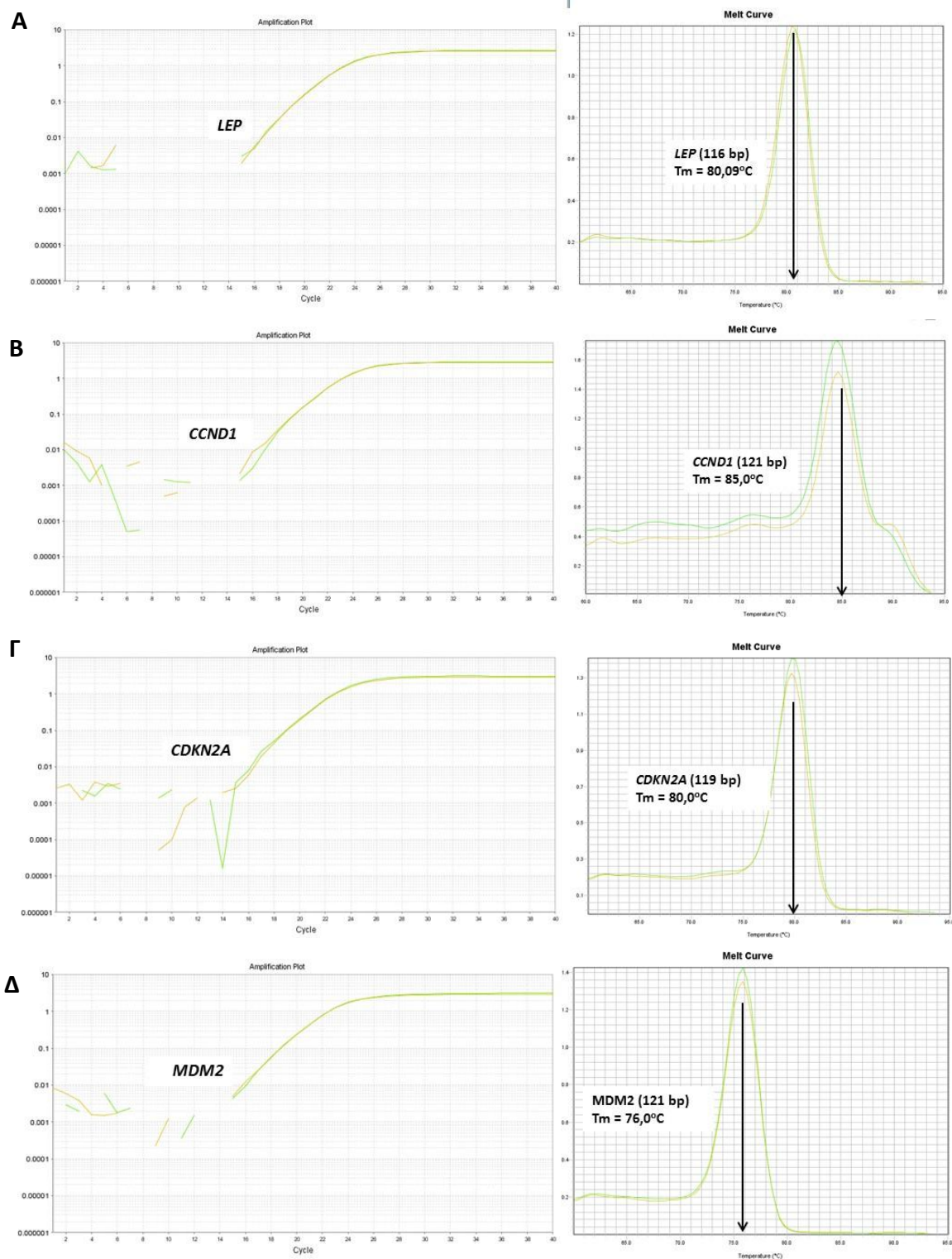


Εικόνα 3.8 : Σχηματικά το πως εμπλέκονται μεταξύ τους τα τρία γονίδια-στόχοι στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, μέσω της συμμετοχής τους στα μονοπάτια του p53 και του RB1. Με μπλε κύκλο περιγράφονται τα γονίδια, των οποίων ο γενετικός τόπος απαλείφεται, ενώ με κόκκινο τα γονίδια, των οποίων ο γενετικός τόπος πολλαπλασιάζεται. Διευκρινίζεται ότι τα p14^{ARF} και p16^{INK4} κωδικοποιούνται από τον *CDKN2A* γενετικό τόπο. (<https://www.genome.jp/kegg>)

3.5 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθοδολογίας ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων των γονιδίων στόχων

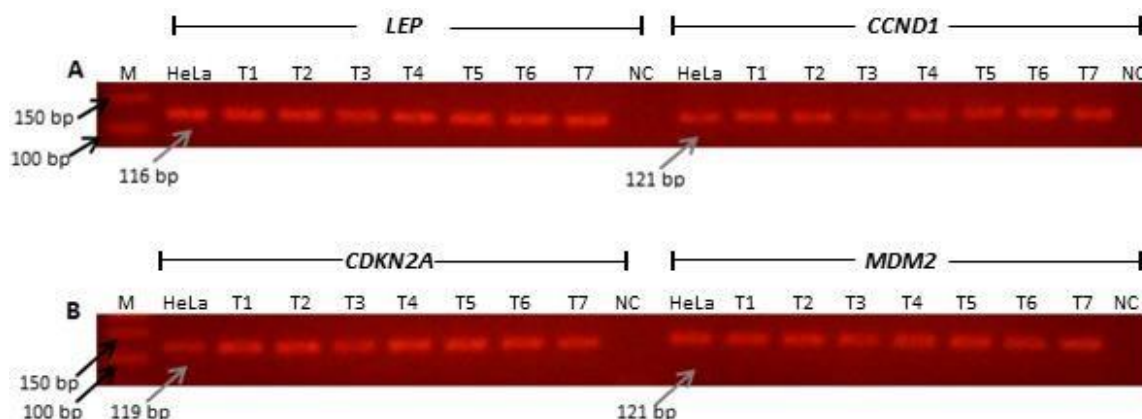
3.5.1 Εκτίμηση του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων σε γενωμικό DNA από ιστό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως-Προσδιορισμός της συχνότητάς τους

Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων των τριών γονιδίων στόχων -*CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2*- που επιλέχθηκαν έπειτα από βιοπληροφορική αναζήτηση σε δείγματα DNA που απομονώθηκε από καρκινικά ιστοτεμάχια ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *LEP* γονίδιο, βάση του οποίου επιτελέστηκε και η σχετική ποσοτικοποίηση των γονιδίων στόχων, ενώ η HeLa καρκινική κυτταρική σειρά αξιοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Σημειώνεται ότι η αναλογία του αριθμού των αλληλομόρφων του γονιδίου της *LEP* προς τον αντίστοιχο των γονιδίων στόχων προσεγγίζει το 1:1, τόσο στην HeLa καρκινική σειρά, όπου βάση των δεδομένων αλληλούχησης τα γονίδια *LEP*, *CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2* είναι σε διπλοειδία, όσο και στο γενωμικό DNA που απομονώθηκε από φυσιολογικό ουροθήλιο. Ενδεικτικά στην Εικόνα 3.9 παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης των Real Time qPCR αντιδράσεων αντίστοιχα για τα *CCND1*, *CDKN2A* και *MDM2* γονίδια καθώς και του *LEP* γονιδίου αναφοράς σε HeLa κυτταρική σειρά.



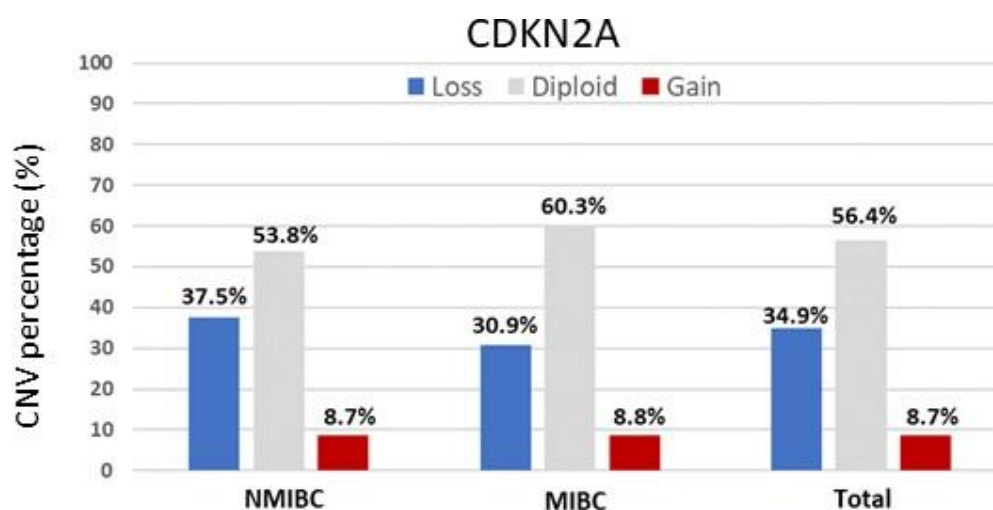
Εικόνα 3.9: Καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης real-time qPCR αντίδρασης του γονιδίου αναφοράς και των γονιδίων στόχων σε δείγματα DNA που απομονώθηκαν από ιστό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως. Α) *LEP*, Β) *CCND1*, Γ) *CDKN2A*, Δ) *MDM2*

Για την περαιτέρω τεκμηρίωση της μοναδικότητας των ενισχυόμενων προϊόντων της εκάστοτε αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης (2,5% w/v).

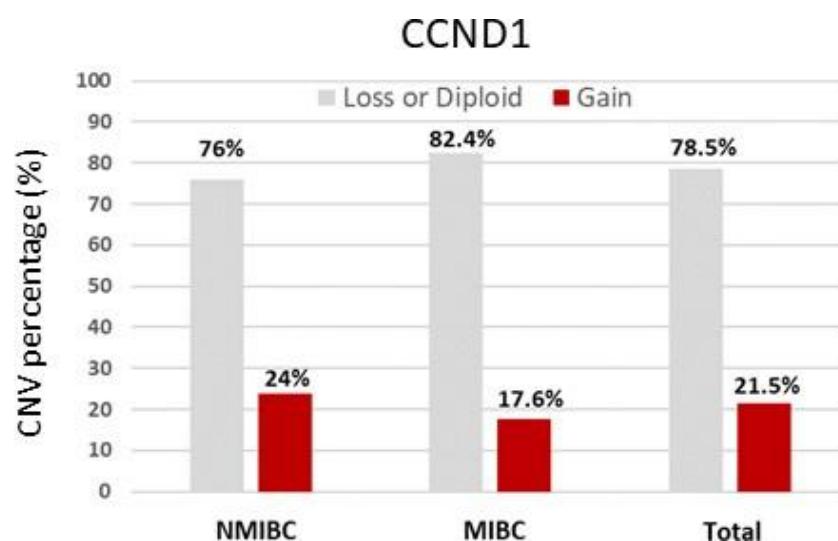


Εικόνα 3.10: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2,5% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των τριών γονιδίων στόχων και του γονιδίου αναφοράς. Α) τα προϊόντα 116 bp και 121 bp αντιστοιχούν στα *LEP* και *CCND1* γονίδια, ενώ Β) τα προϊόντα 119 bp και 121 bp αντιστοιχούν στα *CDKN2A* και *MDM2* γονίδια. Ακόμη, M: πρότυπα μεγέθη DNA (DNA ladder 50 bp), HeLa: θετικός μάρτυρας, T1-T7 (tissue): δείγματα καρκινικού ιστού, NC: αρνητικός μάρτυρας.

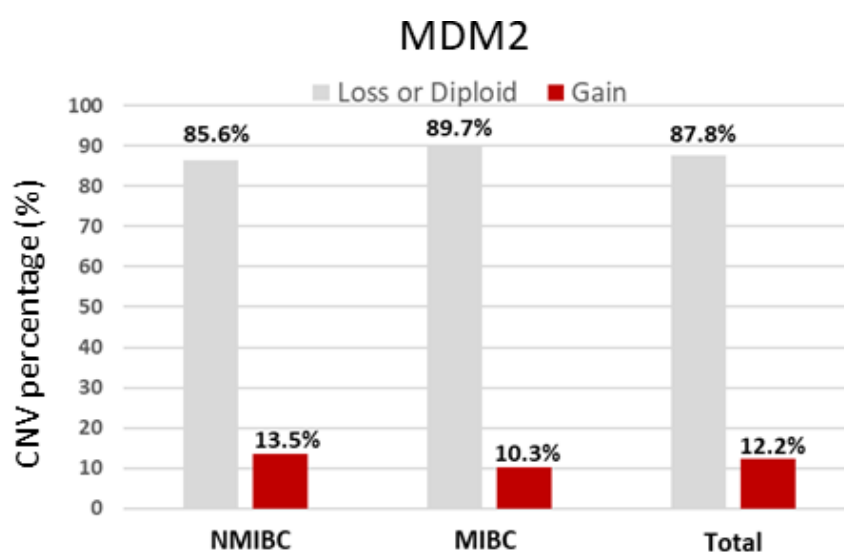
Όσον αφορά την ομάδα ασθενών που μελετήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, τα ποσοστά εμφάνισης αριθμητικών αλληλικών παρεκκλίσεων από τη διπλοειδική κατάσταση των *CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2* γονιδίων, συνοψίζονται αντίστοιχα στις Εικόνες 3.11-3.13.



Εικόνα 3.11: Συχνότητες εμφάνισης αλλαγών στον αριθμό των αλληλομόρφων του *CDKN2A*.



Εικόνα 3.12: Συχνότητες εμφάνισης αλλαγών στον αριθμό των αλληλομόρφων του *CCND1*.



Εικόνα 3.13: Συχνότητες εμφάνισης αλλαγών στον αριθμό των αλληλομόρφων του *MDM2*.

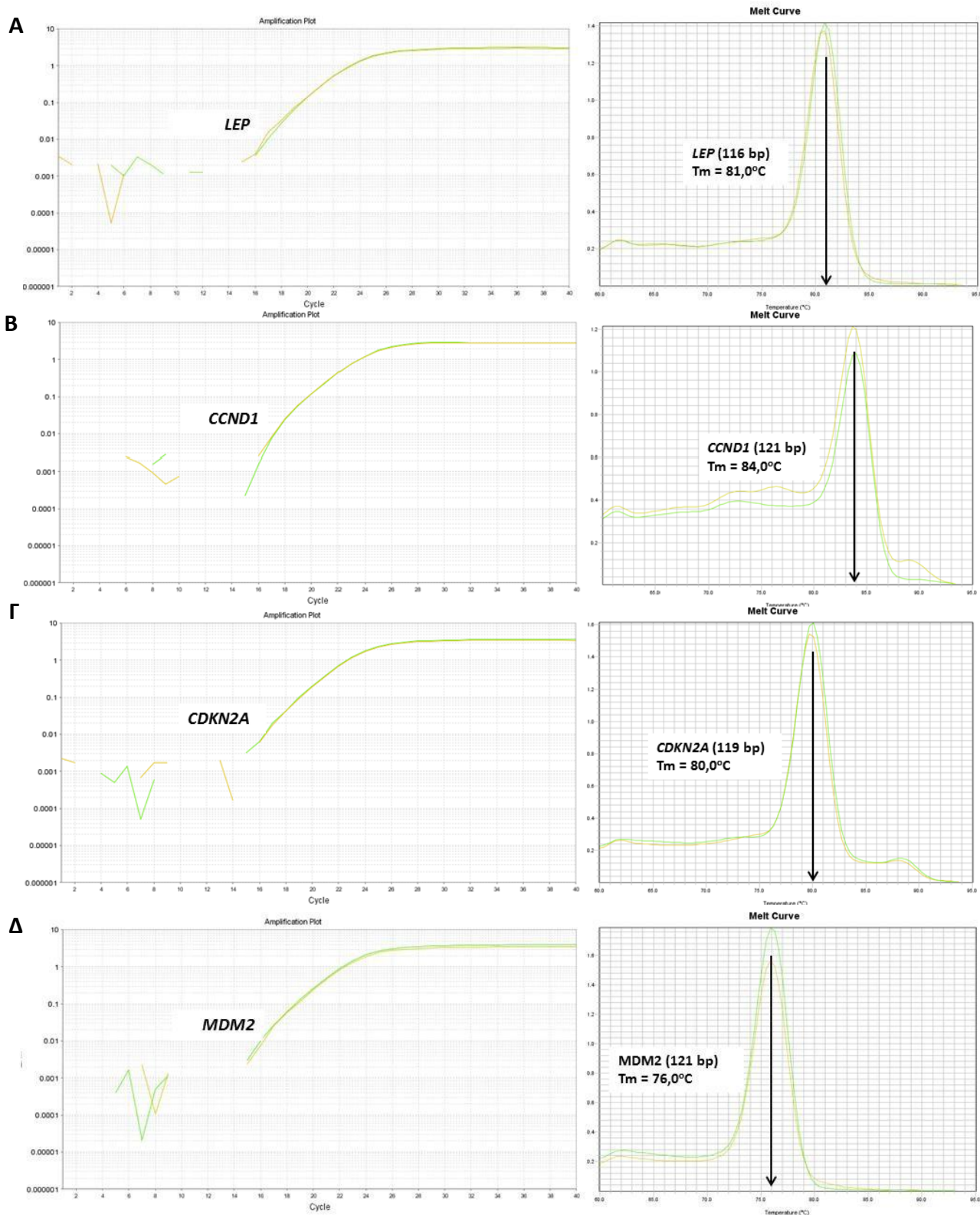
Στον Πίνακα 3.1 συνοψίζονται οι συχνότητες εμφάνισης της αλλαγής στον αριθμό των αλληλομόρφων των τριών γονιδίων στόχων, τόσο στην ομάδα ασθενών του βιολογικού υλικού όσο και στις ομάδες επικύρωσης.

Πίνακας 3.1: Η συχνότητα εμφάνισης των αριθμητικών παρεκκλίσεων από τη διπλοειδία των γονιδίων στόχων.

Κατάσταση	Γονίδιο	TCGA(%)	MSK Eur Urol (%)	Κοορτή βιολογικού υλικού		
				NMIBC (%)	MIBC (%)	Συνολικά (%)
Απαλοιφή	<i>CDKN2A</i>	33,3	16,2	37,5	30,9	34,9
Πολ/μός	<i>CCND1</i>	11,5	6,7	24	17,6	21,5
Πολ/μός	<i>MDM2</i>	8,8	6,7	13,5	10,3	12,2

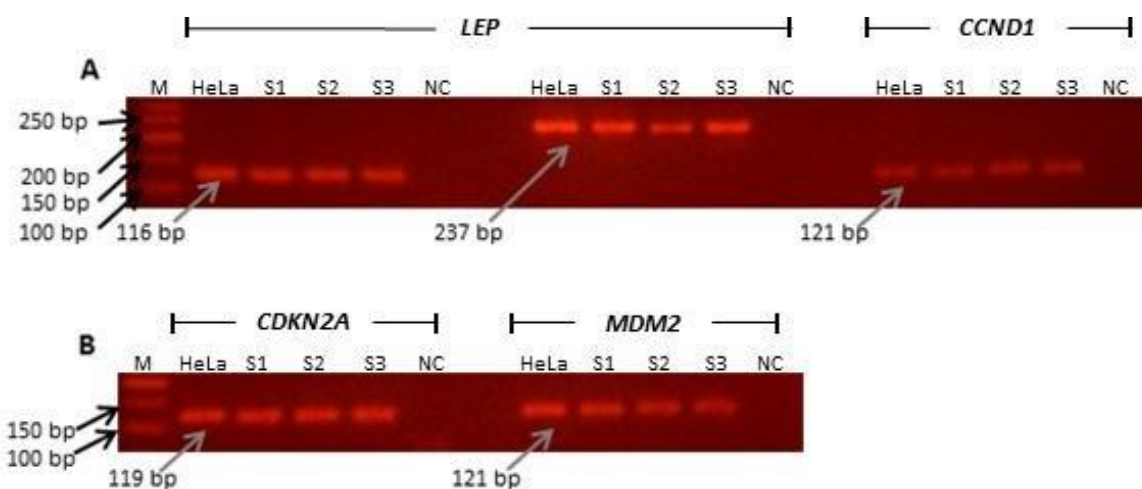
3.5.2 Εκτίμηση του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων σε cfDNA που απομονώθηκε από ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως

Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων των τριών γονιδίων στόχων -*CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2*- σε δείγματα cfDNA που απομονώθηκε από τον ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *LEP* γονίδιο. Όμοια με παραπάνω, η HeLa καρκινική κυτταρική σειρά αξιοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Ενδεικτικά στην Εικόνα 3.14 παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης των Real Time qPCR αντιδράσεων αντίστοιχα για τα *CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2* γονίδια καθώς και του *LEP* γονιδίου αναφοράς σε HeLa κυτταρική σειρά.



Εικόνα 3.14: Καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης real-time qPCR αντίδρασης του γονιδίου αναφοράς και των γονιδίων στόχων σε δείγματα DNA που απομονώθηκαν από ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως. Α) *LEP*, Β) *CCND1*, Γ) *CDKN2A*, Δ) *MDM2*

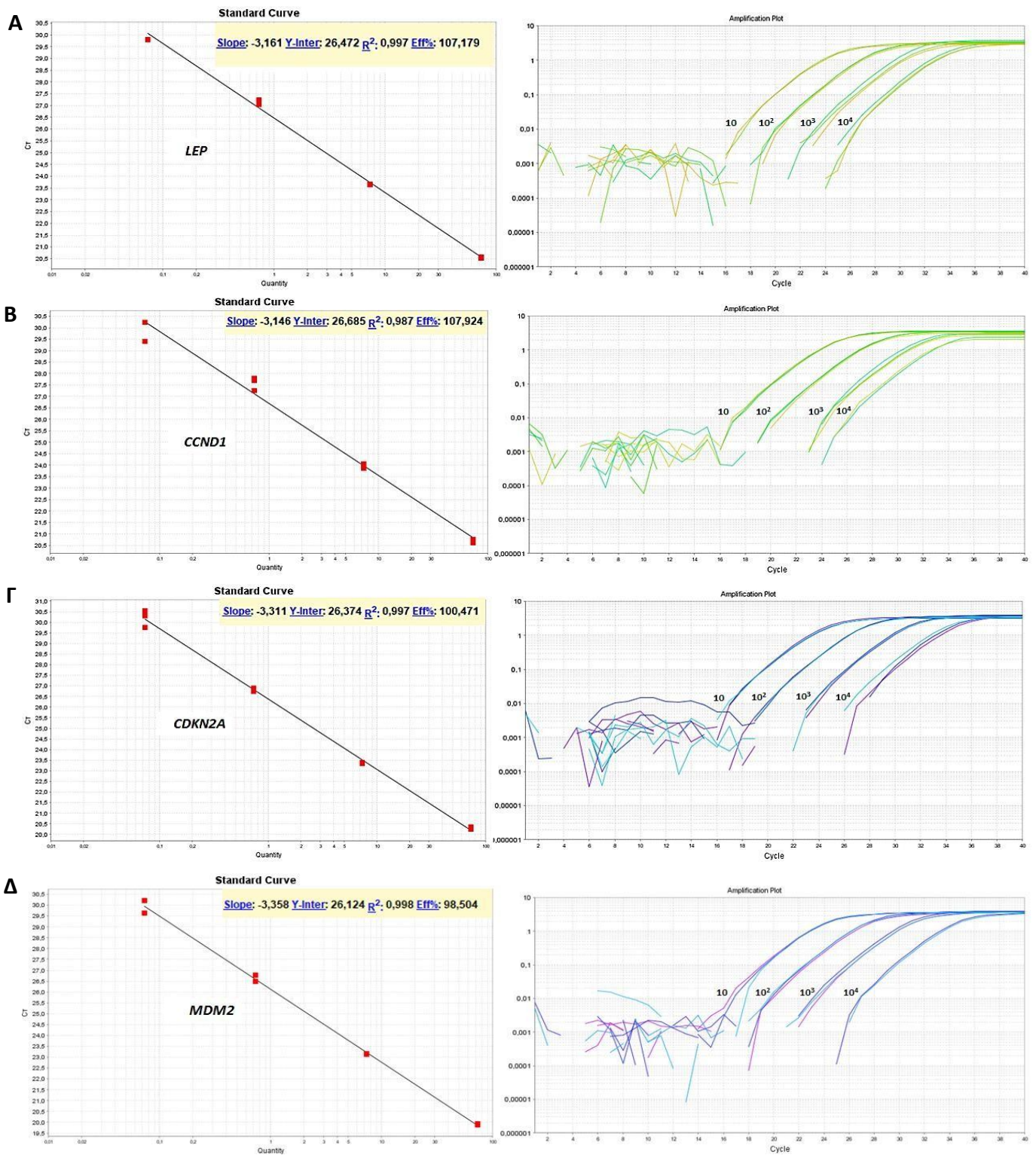
Για την περαιτέρω τεκμηρίωση της μοναδικότητας των ενισχυόμενων προϊόντων της εκάστοτε αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης (2,5% w/v).



Εικόνα 3.15: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2,5% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των τριών γονιδίων στόχων και του γονιδίου αναφοράς. Α) τα προϊόντα 116 bp και 237 bp αντιστοιχούν στο *LEP* γονίδιο, ενώ το προϊόν 121 bp στο *CCND1* γονίδιο. Β) τα προϊόντα 119 bp και 121 bp αντιστοιχούν στα *CDKN2A* και *MDM2* γονίδια. Ακόμη, M: πρότυπα μεγέθη DNA (DNA ladder 50 bp), HeLa: θετικός μάρτυρας, S1-S3 (serum): δείγματα ορού, NC: αρνητικός μάρτυρας.

3.5.3 Δημιουργία καμπυλών αναφοράς

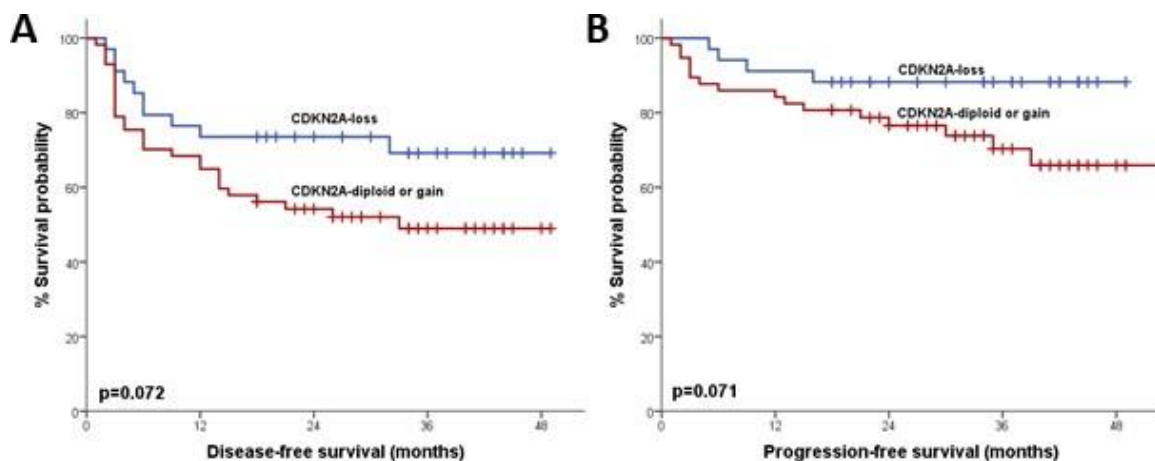
Το πρωτόκολλο της Real Time qPCR που αναπτύχθηκε για την εκτίμηση του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων των τριών γονιδίων στόχων έχει κατώτερο όριο ανίχνευσης 7,3 ng/mL dsDNA υποστρώματος. Σύμφωνα με τις καμπύλες αναφοράς, οι οποίες κατασκευάστηκαν μέσω διαδοχικών αραιώσεων δείγματος dsDNA γνωστής συγκέντρωσης ($\text{DNA}_{\text{HeLa}} = 365 \text{ ng}/\mu\text{L}$), το πρωτόκολλο αυτό είναι καλά καθορισμένα, καθώς τόσο η απόδοση (%) της αντίδρασης ενίσχυσης όσο και ο συντελεστής συνάφειας R^2 , προσεγγίζουν το 100% και το 1 αντίστοιχα. Οι καμπύλες αυτές αντιπροσωπεύουν γραφικές παραστάσεις του δεκαδικού λογαρίθμου της συγκέντρωσης του dsDNA υποστρώματος σε σχέση με το C_t (ο αριθμός των κύκλων της PCR αντίδρασης, όπου η τιμή του φθορισμού ξεπερνάει το κατώφλι του θορύβου). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαδοχικές αραιώσεις –εις τριπλούν– με δείκτη αραιώσης 1:10 για τα τρία γονίδια στόχους και το γονίδιο αναφοράς.



Εικόνα 3.16: Αξιολόγηση της ευαισθησίας της μεθόδου μέσω διαδοχικών αραιώσεων dsDNA γνωστής συγκέντρωσης. Στις καμπύλες αναφοράς τα σημεία κατά αυξανόμενη συγκέντρωση αντιστοιχούν σε 7,3 ng/mL, 73 ng/mL, 730 ng/mL και 7300 ng/mL. Οι δυνάμεις του 10 που αποτυπώνονται στις καμπύλες ενίσχυσης αντιστοιχούν στις φορές της αραιώσης του αρχικού υποστρώματος. . A) *LEP*, B) *CCND1*, Γ) *CDKN2A*, Δ) *MDM2*

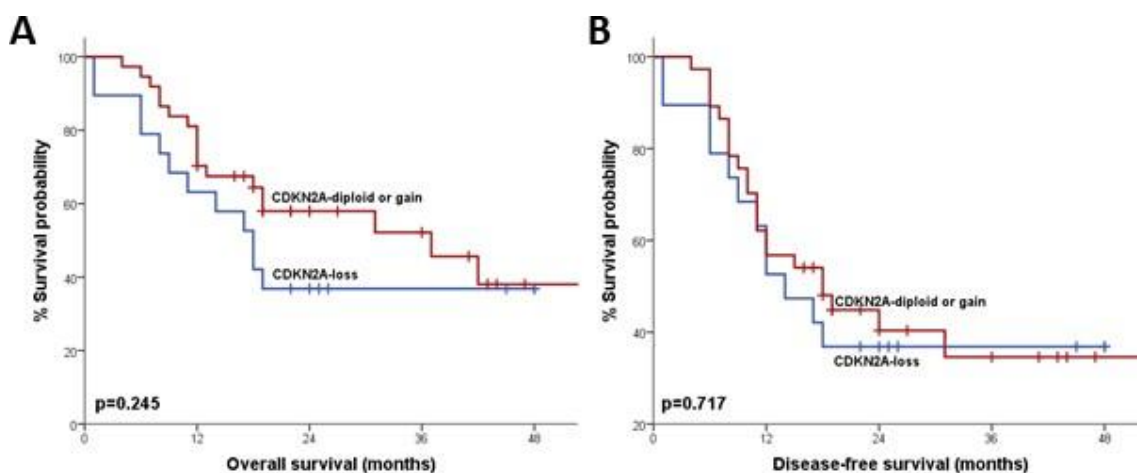
3.6 Κλινική αξιολόγηση του αριθμού των αλληλομόρφων των γονιδίων στόχων σε ιστό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης επιβίωσης των ασθενών με μη μυοδιηθητικό τύπο καρκίνου (NMIBC: n=103) μελετήθηκε η επιβίωση ελεύθερας νόσου (Disease Free Survival, DFS), που προσδιορίστηκε από την υποτροπή της νόσου των ασθενών. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε μελέτη για την επιβίωση των ασθενών ελεύθερας εξέλιξης της ασθένειας (Progression Free Survival, PFS), η οποία προσδιορίστηκε από την υποτροπή και την μετάπτωση της νόσου των ασθενών σε πλέον προχωρημένο παθολογοανατομικό στάδιο του όγκου. Οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Εικόνα 3.17) απεικονίζουν την τάση που έχουν οι ασθενείς με απαλοϊφή του *CDKN2A* για καλύτερη έκβαση διαστήματος ελεύθερας νόσου (DFS) και επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS).



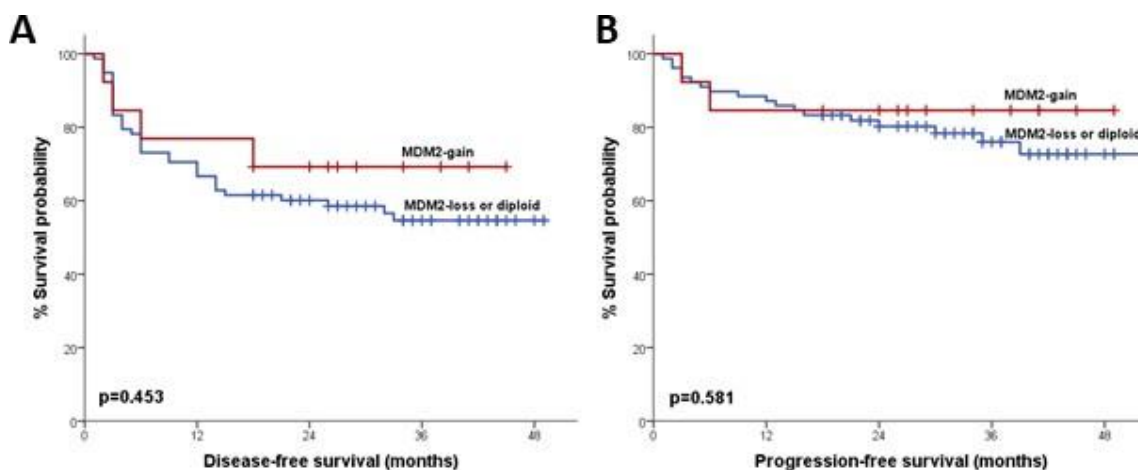
Εικόνα 3.17: Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης σε ασθενείς με NMIBC όγκο. Α) Το διάστημα ελεύθερας νόσου (Disease-free Survival - DFS) και Β) το διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (Progression-free survival - PFS) σε ασθενείς με απαλοϊφή του *CDKN2A* και σε ασθενείς όπου ο γενετικός τύπος του *CDKN2A* βρίσκεται σε διπλοειδία ή πολλαπλασιασμό. Η τιμή p (p-value) υπολογίστηκε μέσω του log-rank test.

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης επιβίωσης των ασθενών με μυοδιηθητικό τύπο καρκίνου (MIBC: n=67) μελετήθηκε η ολική επιβίωση (Overall survival, OS) και η επιβίωση ελεύθερας νόσου (Disease Free Survival, DFS), η οποία προσδιορίστηκε από την ύπαρξη μετάστασης της νόσου ή θανάτου των ασθενών. Οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Εικόνα 3.18) απεικονίζουν την τάση που έχουν οι ασθενείς με απαλοϊφή του *CDKN2A* για βραχύτερο προσδόκιμο επιβίωσης.



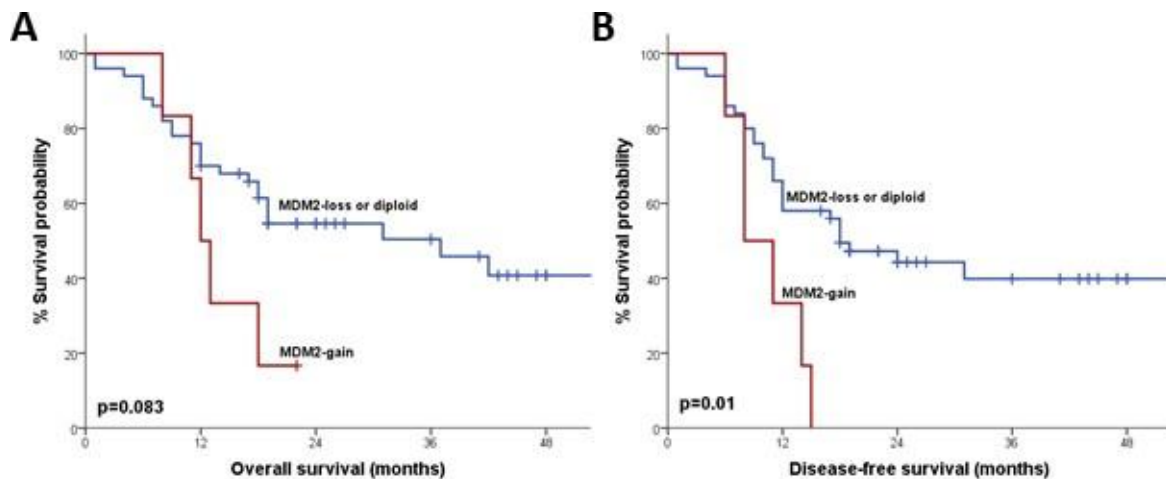
Εικόνα 3.18: Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης σε ασθενείς με MIBC όγκο. Α) Το ολικής επιβίωσης (Overall survival - OS) και Β) Το διάστημα ελευθέρου νόσου (Disease-free Survival - DFS) σε ασθενείς με απαιολιφή του *CDKN2A* και σε ασθενείς όπου ο γενετικός τύπος του *CDKN2A* βρίσκεται σε διπλοειδία ή πολλαπλασιασμό. Η τιμή p (p -value) υπολογίστηκε μέσω του log-rank test.

Όσον αφορά τις μελέτες επιβίωσης ως προς τον αριθμό των αντιγράφων του *MDM2* γονιδίου σε NMIBC ασθενείς, φαίνεται να υπάρχει μια τάση καλύτερης επιβίωσης ως προς το διάστημα ελευθέρως νόσου και το διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου στους ασθενείς με πολλαπλασιασμό του *MDM2*, αλλά χωρίς κάποια στατιστική σημαντικότητα.



Εικόνα 3.19: Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης σε ασθενείς με NMIBC όγκο. Α) Το διάστημα ελευθέρως νόσου (Disease-free Survival - DFS) και Β) το διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (Progression-free survival - PFS) σε ασθενείς με πολλαπλασιασμό του *MDM2* και σε ασθενείς όπου ο γενετικός τύπος του *MDM2* βρίσκεται σε διπλοειδία ή απαιολιφή. Η τιμή p (p -value) υπολογίστηκε μέσω του log-rank test.

Όσον αφορά τις μελέτες επιβίωσης ως προς τον αριθμό των αντιγράφων του *MDM2* γονιδίου σε MIBC ασθενείς, φαίνεται να υπάρχει μια τάση μειωμένης επιβίωσης στους ασθενείς με πολλαπλασιασμό του *MDM2*. Επίσης παρουσιάζουν σαφώς βραχύτερο διάστημα ελευθέρου νόσου, με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.01$).

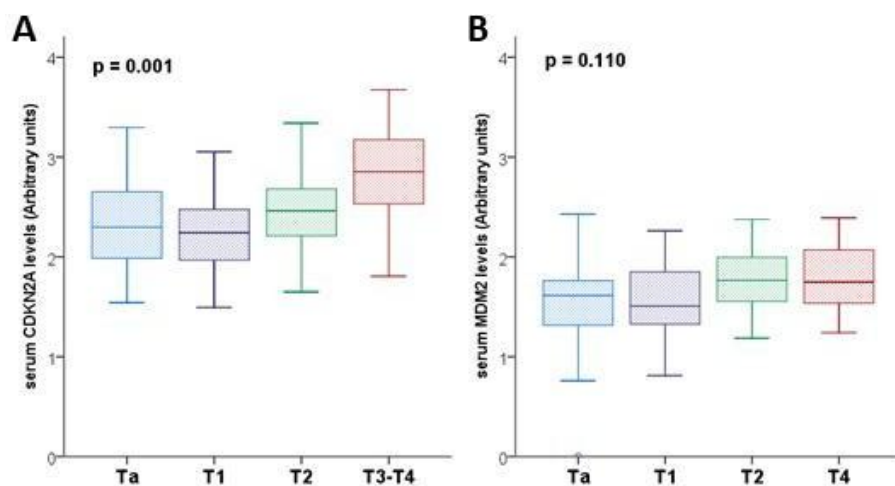


Εικόνα 3.20: Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης σε ασθενείς με MIBC όγκο. Α) Το ολικής επιβίωσης (Overall survival - OS) και Β) Το διάστημα ελευθέρου νόσου (Disease-free Survival - DFS) σε ασθενείς με πολλαπλασιασμό του *MDM2* και σε ασθενείς όπου ο γενετικός τύπος του *MDM2* βρίσκεται σε διπλοειδία ή απαλοιφή. Η τιμή p (p -value) υπολογίστηκε μέσω του log-rank test.

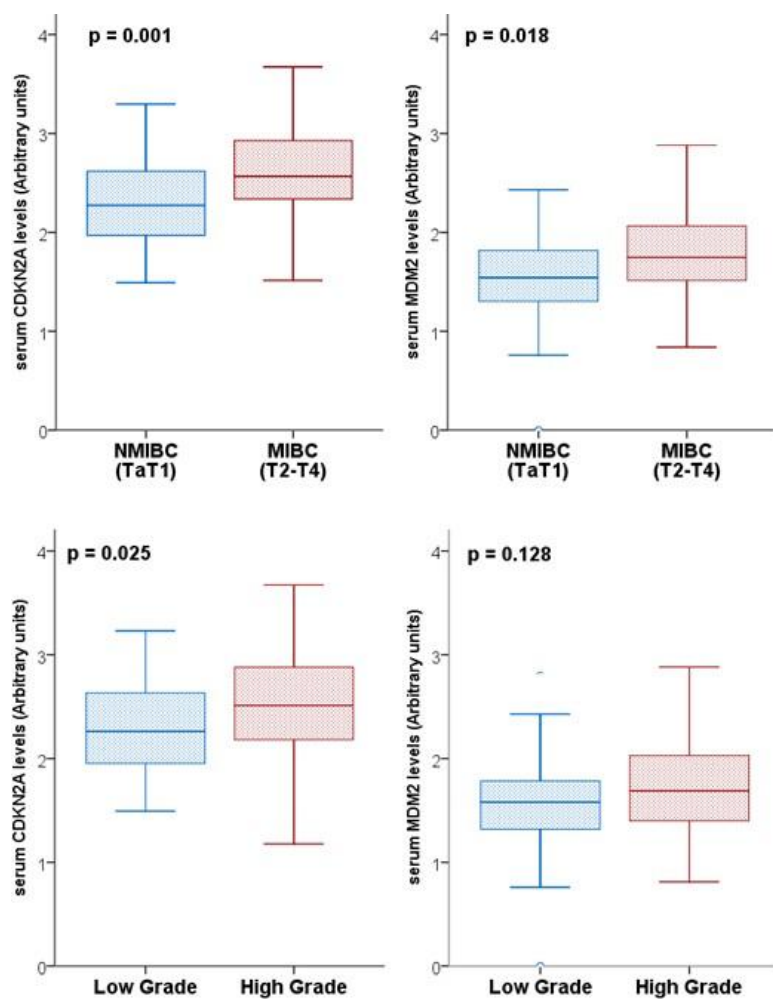
3.7 Κλινική αξιολόγηση του αριθμού των αλληλομόρφων των γονιδίων στόχων σε ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως

Για την πραγματοποίηση εκτίμησης του αριθμού αλληλικών αντιγράφων των γονιδίων στόχων, απομονώθηκε cfDNA από ορό 100 ασθενών (Ta:n=28, T1:n=29, T2:n=19, T3-T4:n=24) με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.

Σύμφωνα με τα θηκογράμματα της Εικόνα 3.21 παρατηρείται μια σαφής αύξηση των αλληλικών αντιγράφων του *CDKN2A* σε ασθενείς με καρκίνο μεγαλύτερου σταδίου και μάλιστα με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.001$). Παρόμοια τάση φαίνεται να ισχύει και για το *MDM2*.



Εικόνα 3.21: Στο συγκεκριμένο θηκόγραμμα απεικονίζεται η παρουσία των αλληλικών αντιγράφων των *CDKN2A* και *MDM2* γονιδίων, στο cfDNA που απομονώθηκε από τον ορό ασθενών, ως προς το στάδιο της νόσου. Η τιμή p (p -value) υπολογίστηκε μέσω Mann-Whitney U test.



Εικόνα 3.22: Στα εν λόγω θηκογράμματα, απεικονίζεται η παρουσία των αλληλικών αντιγράφων των *CDKN2A* και *MDM2* γονιδίων, στο cfDNA που απομονώθηκε από τον ορό, ως προς τον μη μυοδιηθητικό και μυοδιηθητικό χαρακτήρα και τον βαθμό κακοήθειας του καρκίνου. Η τιμή p (p -value) υπολογίστηκε μέσω Mann-Whitney U test.

Σύμφωνα με τα θηκογράμματα Α και Β της Εικόνα 3.22 παρατηρείται μια σαφής αύξηση των αλληλικών αντιγράφων του *CDKN2A* και του *MDM2* στον ορό των ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο και μάλιστα με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.001$ και $p=0.018$ αντίστοιχα). Παρόμοια τάση φαίνεται να ισχύει και για το *MDM2*. Όμοια, παρατηρείται μια σαφής αύξηση των αλληλικών αντιγράφων του *CDKN2A* στον ορό των ασθενών με υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνου, με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.025$). Παρόμοια τάση φαίνεται να ισχύει και για το *MDM2*.

4. Συζήτηση

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγκειται στην κλινική αξιολόγηση του ελεύθερου κυττάρων DNA (cell-free DNA, cfDNA), που απομονώθηκε από τον ορό ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Παρ' όλο που τα τελευταία χρόνια σημειώνεται ραγδαία αύξηση του ερευνητικού ενδιαφέροντος για την υγρή βιοψία και τους αναλύτες της, το cfDNA βρίθεται περαιτέρω πληροφοριακού εμπλουτισμού ως προς την βιολογία του και κατ' επέκταση την αξιοποίησή του στην ογκολογία. Συνάμα, οι μελέτες που πραγματεύονται το cfDNA στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι λίγες και ακόμη λιγότερα είναι τα αξιοποιήσιμα κλινικά τους αποτελέσματα, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη του βιομορίου στον συγκεκριμένο καρκίνο, καθώς συνιστά έναν εν δυνάμει βιοδείκτη που μπορεί και προσδιορίζεται μη επεμβατικά. Η παρούσα μελέτη διεξήχθη με στατιστικά σημαντικό αριθμό ασθενών. Στόχος, λοιπόν, της παρούσας μελέτης είναι να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο απομόνωσης, ποσοτικοποίησης και ελέγχου ποιότητας και ακεραιότητας του cfDNA, καθώς επίσης να γίνει και κλινική αξιολόγηση του μορίου ως προς την συγκέντρωσή του στον ορό των ασθενών, την ακεραιότητά του και την παρουσία αριθμητικών αλλαγών κάποιων γονιδίων στόχων που βιβλιογραφικά φαίνεται να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Η ταυτοποίηση κάποιας από τις προαναφερθέντες ιδιότητες με κλινική αξία θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω ως νέος μοριακός δείκτης που βελτιώνει πρόγνωση της υποτροπής και της εξέλιξης της νόσου, της επιβίωσης των ασθενών καθώς και της ανταπόκρισής τους στην επιλεγμένη θεραπεία.

Για την υλοποίηση του παραπάνω στόχου, αξιοποιήθηκε ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων καρκινικού ιστού (n=170) και ορού (n=100) ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως. Απομονώθηκε cfDNA από τα δείγματα ορού των ασθενών, ενώ αξιοποιήθηκε γενωμικό DNA καρκινικού ουροθηλίου. Στο DNA που απομονώθηκε και από τα δύο βιολογικά υλικά προσδιορίστηκε σε πρώτο βαθμό η συγκέντρωσή του και η ποιότητά του. Επίσης, στο cfDNA έγινε και η εκτίμηση της ακεραιότητάς του, της παρουσίας δηλαδή των διαφορετικών σε μήκος dsDNA τμημάτων. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε πρωτόκολλο ποσοτικής Real-Time PCR αντίδρασης, για την επιλογή κατάλληλου γονιδίου αναφοράς, καθώς επίσης και αντίστοιχο πρωτόκολλο Real-Time PCR αντίδρασης για την εκτίμηση του αριθμού των αλληλικών αντιγράφων των γονιδίων στόχων (*CDKN2A*, *CCND1*, *MDM2*) τόσο στα δείγματα ιστών όσο και στα δείγματα ορού των ασθενών. Στα πρωτόκολλα των Real-Time PCR αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της SYBR Green I χημείας και η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης. Τέλος τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης του cfDNA στον ορό, της ακεραιότητάς του, καθώς επίσης και της ανίχνευσης παρεκκλίσεων από τη διπλοειδία των γονιδίων στόχων υφίσταντο εκτεταμένη βιοστατιστική ανάλυση για την κλινική τους αξιολόγηση.

Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα του GLOBOCAN το 2018, ο εν λόγω καρκίνος αποτελεί τον δέκατο (10^ο) πιο κοινό τύπο καρκίνου και τη δέκατη Τρίτη (13^η) αιτία θανάτου κακοήθους χαρακτήρα σε παγκόσμιο επίπεδο και για τα δύο φύλα[27]. Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως (BICa) αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή κακοήθεια της ανδρικής ουρογεννητικής οδού, μετά τον καρκίνο του προστάτη και τον τέταρτο πιο συχνά διαγνωσμένο καρκίνο στον άρρεν πληθυσμό στις ανεπτυγμένες χώρες[316, 317]. Εμφανίζεται συχνότερα στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, όπου τα ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητάς του στον ανδρικό πληθυσμό είναι περίπου τετραπλάσια συγκριτικά με τα αντίστοιχα των γυναικών.[27] Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου φαίνεται να αυξάνεται με την ηλικία, ενώ η μέση ηλικία διάγνωσης προσεγγίζει τα 70 έτη[316]. Αυτό που χρήζει επισήμανσης είναι το γεγονός ότι στην Ελλάδα καταγράφεται ο υψηλότερος βαθμός επίπτωσης του καρκίνου της κύστεως στον ανδρικό πληθυσμό παγκοσμίως[27].

Η πλειοψηφία (90%) των όγκων της ουροδόχου κύστεως είναι ουροθηλιακής προέλευσης, όπου το ουροθήλιο είναι μεταβατικό επιθήλιο που επενδύει εσωτερικά την κύστη. Οι όγκοι αυτοί είναι γνωστοί και ως ουροθηλιακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστεως (Urothelial Bladder Cancer, UBC). Το υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων αφορά καρκινώματα εκ πλακώδους επιθηλίου και αδενοκαρκινώματα της ουροδόχου κύστεως[94]. Δεδομένου ότι το ουροθηλιακό καρκίνωμα είναι μια ετερογενείς νόσος,[318] τόσο σε κλινικό όσο και σε μοριακό επίπεδο, επακολούθησε η αποδοχή του μοντέλου των δύο μονοπατιών -two-pathway model- όσον αφορά την παθογένεση του.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι χαρακτηρίζεται από διαφορετικής κυτταρικής προέλευσης και μοριακής αιτιολογίας συμβάντα, αναδεικνύονται δύο διακριτά μονοπάτια που οδηγούν στην ανάπτυξη είτε του μη μυοδιηθητικού (Non Muscle Invasive Bladder Cancer, NMIBC) είτε του μυοδιηθητικού (Muscle Invasive Bladder Cancer, MIBC) καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Περίπου το 70-80% των ασθενών εμφανίζει όγκους μη μυοδιηθητικής μορφής (Ta, Tis και T1 όγκοι), ενώ το υπόλοιπο 20-30% όγκους που διηθούν τη μυϊκή στιβάδα του οργάνου (T2-T4)[135, 319, 320]. Στην περίπτωση των NMIBC το 70% είναι Ta, το 20% T1 και το 10% είναι CIS-Tis σταδίου[321, 322]. Σε γενικές γραμμές οι NMIBC δεν θεωρούνται απειλητικοί για τη ζωή, καθώς έχουν καλή πενταετή επιβίωση, αλλά επανεμφανίζονται συχνά (~50-70%). Ακόμη, το 10-20% των NMIBC περιπτώσεων -κατά κόρον T1 όγκοι υψηλού βαθμού κακοήθειας (Grade)- θα εξελιχθεί σε MIBC.[321, 323, 324] Η κύρια θεραπευτική αντιμετώπιση των NMIBC όγκων είναι η εφαρμογή της διουρηθρικής εκτομής του όγκου από την κύστη (TURBT) και η μετεγχειρητική ανοσοθεραπεία με το Bacillus Calmette-Guerin (BCG). Όσον αφορά τους MIBC όγκους, χαρακτηρίζονται από ισχυρό μεταστατικό δυναμικό και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας [321, 323, 324] και αντιμετωπίζονται με ριζική κυστεοεκτομή (RC), εκτεταμένη εκτομή των λεμφαδένων της πυέλου, χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία[323, 325].

Παρ' όλο που έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στη διάγνωση και τη θεραπεία της συγκεκριμένης νόσου, λόγω της τεχνολογικής εξέλιξης στις απεικονιστικές μεθόδους, της εισαγωγή νέων διαγνωστικών μέσων, των καρκινικών δεικτών στα ούρα και της βελτίωσης στις χειρουργικές τεχνικές, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως παραμένει μείζον κλινικό πρόβλημα. Η κυστεοσκόπηση, με τη λήψη βιοπτικού υλικού από το τοίχωμα του οργάνου και η κυτταρολογική εξέταση ούρων αποτελούν, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, τα κύρια εργαλεία τον εντοπισμό και την μετεγχειρητική παρακολούθηση των όγκων της ουροδόχου κύστεως. Ωστόσο, και οι δύο μεθοδολογίες παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα[91, 100]. Η κυστεοσκόπηση, ως μια επεμβατική διαγνωστική μέθοδος, χαρακτηρίζεται από σπάνιες αλλά σημαντικές επιπλοκές, οι οποίες επηρεάζουν δυσμενώς την ποιότητα ζωής των ασθενών. Επιπλέον, η TURBT δεν είναι πάντοτε ακριβής στην σταδιοποίηση του όγκου, καθώς η κλινική υποεκτίμηση εμφανίζεται έως και στο 50% των περιπτώσεων[326]. Η κυτταρολογική εξέταση στα ούρα, ενώ έχει ικανοποιητικά επίπεδα ειδικότητας και ευαισθησίας, δεν δύναται να εντοπίσει όγκους χαμηλής κακοήθειας[327]. Παράλληλα, η ετερογένεια της νόσου, τόσο σε κυτταρικό όσο και σε μοριακό επίπεδο, καθιστά την εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών ένα ουσιαστικό κλινικό ζήτημα για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου και της πρόβλεψης στην ανταπόκρισης στην θεραπεία, ακόμη και σε ασθενείς που κατατάσσονται στην ίδια ομάδα κινδύνου και μοιράζονται κοινά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά[94, 135]. Για την αξιολόγηση της πρόγνωσης των ασθενών εκτιμώνται το στάδιο και ο βαθμός κακοήθειας του όγκου, η ύπαρξη πολλαπλών καρκινικών εστιών, το μέγεθος του όγκου και η ταυτόχρονη παρουσία ή όχι του *in situ* καρκινώματος[321]. Υπό αυτό το πρίσμα, ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Έρευνας και Θεραπείας του Καρκίνου (EORTC), μέσω της δημιουργίας των πινάκων υπολογισμού κινδύνου, εισάγει τα πλέον κλινικά καθιερωμένα εργαλεία για την ταξινόμηση και την εκτίμηση πρόγνωσης των NMIBC. Ωστόσο, επειδή η ταξινόμηση κατά EORTC βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιστού, φέρει επακολούθως σημαντικούς περιορισμούς[91, 100, 321].

Η ποιότητα ζωής των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως επηρεάζεται σημαντικά από το σημείο της διάγνωσής του και έπειτα. Αρχικά, τα υψηλά ποσοστά επανεμφάνισης και εξέλιξης των NMIBC, καθώς επίσης και του μεταστατικού δυναμικού των MIBC όγκων συνεπάγονται τη δια βίου παρακολούθηση των ασθενών, με συχνές κυστεοσκοπήσεις. Το γεγονός αυτό καθιστά τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης στον ακριβότερο καρκίνο ανά ασθενή για θεραπεία, ενώ η επανάληψη εφαρμογής επεμβατικών μεθόδων έχει δυσμενή αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής των ασθενών.[328] Συμπληρωματικά, η ριζική κυστεοεκτομή, καθώς και οι παρενέργειες της χημειοθεραπείας, ανοσοθεραπείας και ακτινοθεραπείας συμμετέχουν στην υποβάθμιση της ποιότητας ζωής των ασθενών. Βάση μελετών, λοιπόν, που έχουν διεξαχθεί φαίνεται ότι επηρεάζονται αρνητικά διάφορες

πτυχές της ζωής των ασθενών, όπως η εκδήλωση πόνου, η δυσλειτουργία στις διαδικασίες της ούρησης και της αναπαραγωγής και η επανένταξη στις δραστηριότητες του κοινωνικού ιστού[329].

Παρά, λοιπόν, την αύξηση της ερευνητικής δραστηριότητας για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, οι οποίοι μπορούν να αξιοποιηθούν πρωταρχικά σαν επικουρικά εργαλεία στα ήδη υπάρχοντα και εν δυνάμει να αντικαταστήσουν την κυστεοσκόπηση και την κυτταρολογική εξέταση ούρων στην διάγνωση και την παρακολούθηση των ασθενών, έως τώρα δεν έχει βρεθεί κάποιος δείκτης που να μπορεί να αξιοποιηθεί στην καθημερινή κλινική πράξη[330]. Ανακύπτει, επομένως, η αδήριτη ανάγκη για την ταυτοποίηση νέων καρκινικών δεικτών, ικανών να υποστηρίξουν εξατομικευμένη πρόγνωση, βελτιώνοντας τη διαχείριση της νόσου και φέροντας μια ισορροπία στην αποτελεσματικότητά του συστήματος υγείας συναρτήσει του κόστους, της διάγνωσης, της πρόγνωσης και της θεραπείας, ωφελώντας την συνολική ποιότητα ζωής των ασθενών.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες έκφρασης και αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος που ταυτοποιούν γονίδια και μονοπάτια με ρόλο κλειδί στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, αποκαλύπτοντας μια πιο περίπλοκη εικόνα με πολλαπλές μοριακές υποκατηγορίες που διέπουν τις συμβατικές έως τώρα ομαδοποιήσεις που βασίζονται στο στάδιο και το βαθμό κακοήθειας του όγκου. Το γεγονός αυτό συμβάλλει στην διασαφήνιση των μοριακών χαρακτηριστικών, της παθογένειας και της ετερογένειας της συγκεκριμένης νόσου. Πιο συγκεκριμένα, στους NMIBC όγκους ένα συχνό και πρώιμο συμβάν είναι αυτό της απώλειας ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 9 και μάλιστα των γενετικών τόπων που κωδικοποιούν τα ογκοκατασταλτικής λειτουργίας γονίδια *CDKN2A*, *CDKN2B* και *TSC1*. Τα δύο πρώτα είναι αρνητικοί ρυθμιστές στα μονοπάτια του p53 και RB-1, ενώ το *TSC1* εμπλέκεται στο mTOR μονοπάτι. Επιπλέον, οι περισσότερες περιπτώσεις των NMIBC όγκων χαρακτηρίζονται από ενεργοποιητικές σημειακές μεταλλάξεις στα *FGFR3* και *PIK3CA* γονίδια και σε γονίδια της οικογένειας RAS. Στους MIBC όγκους, είναι κοινές οι μεταλλάξεις στα *TP53* και *RB1* γονίδια και στους ρυθμιστές αυτών (π.χ. πολλαπλασιασμός των *MDM2* και *E2F3* γονιδίων και ομόζυγη απάλειψη του *CDKN2A*). Σημειώνονται, επίσης, συχνά απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN*. Συγκεντρωτικά, η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στα *FGFR3* και *PIK3CA* γονίδια είναι υψηλότερη στους NMIBC συγκριτικά με τους MIBC, ενώ ισχύει το αντίστροφο για το *TP53* γονίδιο. Ενδεικτικά, μεταλλάξεις ενεργοποίησης του ογκογονιδίου *FGFR3* εμφανίζονται στο 80% των Ta όγκων, ενώ μόλις στο 10% των διηθητικών όγκων (T2-T4) και μεταλλάξεις ενεργοποίησης του ογκογονιδίου *PI3KCA* εμφανίζονται στο 25% των TaT1 όγκων και στο 9-20% των T2-T4 όγκων. Αντίστοιχα, απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο *TP53* εμφανίζονται στο 76% των T2-T4 όγκων και στο 14% των Ta όγκων[94, 135]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το μονοπάτι Notch εμφανίζει έναν νέο ογκοκατασταλτικό ρόλο στον καρκίνο της

ουροδόχου κύστης, καθώς απενεργοποίηση της σηματοδότησης του οδηγεί στην φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση των *ERK1* και *ERK2*, και κατ' επέκταση σε καρκινογένεση[331]. Άλλοι μοριακοί βιοδείκτες που έχουν εμφανίσει σημαντική διαφοροδιαγνωστική αξία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης ανήκουν στην ομάδα των ncRNAs. Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση των miR-143/145 καθώς και των miR-221/222 στην πλειοψηφία των όγκων σε σχέση με παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, ενώ παράλληλα, δύο μόρια της κατηγορίας των lncRNAs, το GAS5 και το UCA1, έχουν αποδειχθεί ως ανεξάρτητοι μοριακοί καρκινικοί βιοδείκτες για την βραχυπρόθεσμη υποτροπή και εξέλιξη ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης[332-334]. Ωστόσο, όπως αναφέρεται και παραπάνω, προς το παρόν, κανείς δείκτης δεν έχει επικυρωθεί ως μοριακός προγνωστικός δείκτης που να μπορεί να αξιοποιηθεί στην κλινική πράξη για τη διαχείριση της νόσου.

Το cell-free DNA (cfDNA) συνίσταται από DNA θραύσματα που απομονώνονται από το περιφερικό αίμα και τα βιολογικά υγρά (ούρα, λέμφο, σάλιο, χολή, βλέννη, νωτιαίο και αμνιακό υγρό) του κάθε ανθρώπου. Στα υγιή άτομα η πλειοψηφία του cfDNA προέρχεται από το αιμοποιητικό σύστημα ενώ υπό ειδικές φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις αυτό αλλάζει. Επομένως, το cfDNA αποτελεί ένα σημαντικό αναλύτη της υγρής βιοψίας. Γενικά, στην υγρή βιοψία αναλύονται μη στερεά βιολογικά υλικά και αποκτώνται παρόμοιες πληροφορίες με αυτές της βιοψίας του ιστού όχι όμως επεμβατικά, ενώ η εφαρμογή της σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης και της ογκολογίας, λαμβάνει όλο και μεγαλύτερο χώρο. Επιπλέον, πέραν της αποφυγής των επιπλοκών, με την υγρή βιοψία λαμβάνονται πληροφορίες, όπως η ετερογένεια του όγκου ή η ανάδυση νέων υποκλώνων κατά τη εξέλιξη του καρκίνου που συνήθως χάνονται με την κλασσική βιοψία του ιστού λόγω περιορισμένης πρόσβασης στην εστία του όγκου. Με τις τεχνικές της υγρής βιοψίας διευκολύνεται η τακτική παρακολούθηση (follow-up) των ασθενών καθώς είναι εφικτή η πολλαπλή επανάληψη των δοκιμών της σε διάφορα χρονικά διαστήματα, κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό στους ασθενείς με καρκίνο στην ουροδόχο κύστη, καθώς υφίστανται τακτικές επεμβατικές κυστεοσκοπήσεις. Τέλος, πέφτει κατακόρυφα και το οικονομικό κόστος, που επιβαρύνει σημαντικά τα συστήματα υγείας[287, 335]. Συνοπτικά, εκτός του cfDNA, στους αναλύτες της υγρής βιοψίας συγκαταλέγονται και τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), τα εξωκυττάρια κυστίδια (π.χ. εξωσώματα), ποικίλες γλυκοπρωτεΐνες και αντιγόνα (π.χ. PSA, CEA, CA 125, CA19-9, βHCG, αFP), καθώς και λοιπά κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα (π.χ. mRNA, miRNA) και αιμοπετάλια που έχουν αλληλεπιδράσει με τα κύτταρα του όγκου και έχουν διαφοροποιήσει τη λειτουργία τους (tumour-educated platelets, TEPs) [167, 336].

Η δεξαμενή του cfDNA στα βιολογικά υγρά συνίσταται από διάφορες δομικές διαμορφώσεις και ειδικότερα έχει ανιχνευθεί με τη μορφή του μονο- και πολυ-νουκλεοσωμάτων, των εξωκυττάρων

μικροκυστιδίων (εξωσώματα, εκτοσώματα, αποπτωτικά σωμάτια) και των μακρομοριακών συμπλόκων («virtosome», ουδετεροφιλικές εξωκυττάρειες ινώδεις παγίδες-NETs, σύμπλοκα με πρωτεΐνες του ορού ή με υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων)[219]. Το DNA απελευθερώνεται από τα κύτταρα στα βιολογικά υγρά μέσω διάφορων μηχανισμών, με κυρίαρχο τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Άλλοι μηχανισμοί που συμβάλλουν στον εμπλουτισμό της κυκλοφορίας με cfDNA είναι η νέκρωση και η ενεργός κυτταρική έκκριση, καθώς και άλλοι λιγότερο μελετημένοι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου όπως η πυρόπτωση, η φαγοκυττάρωση, η αυτοφαγία, η μιτοφαγία και η NETosis[239]. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει ότι το cfDNA δεν είναι μια ομοιόμορφη δεξαμενή, αλλά αποτελείται από θραύσματα DNA, τα χαρακτηριστικά των οποίων σχετίζονται με τον μηχανισμό απελευθέρωσής τους στα βιολογικά υγρά. Ειδικότερα, η απόπτωση επάγει την θραυσματοποίηση του χρωμοσωμικού DNA σε πολλαπλάσια τμήματα των 160-180 bp, συνεπάγοντας την παρουσία στην κυκλοφορία μονο-νουκλεοσωμάτων (~166 bp) και πολυνουκλεοσωμάτων (332 bp, 498 bp). Η νέκρωση οδηγεί σε πύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα και σε μη ειδική πέψη αυτής, παράγοντας DNA τμήματα μεγαλύτερα των 10.000 bp, ενώ το cfDNA που προέρχεται από την ενεργό κυτταρική έκκριση κυμαίνεται μεταξύ 1000 και 3000 bp. Το μιτοχονδριακό DNA μπορεί εξίσου να απελευθερωθεί μέσω των μηχανισμών αυτών, εμπλουτίζοντας τα βιολογικά υγρά με DNA τμήματα που κυμαίνονται μεταξύ 40 και 300 bp. Τα εξωσώματα, τα οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία με ρυθμιζόμενο τρόπο, φέρουν DNA τμήματα 150-6.000 bp. Επομένως, τα επίπεδα του cfDNA στα βιολογικά υγρά εξαρτάται σγμαντικά από το βαθμό και ρυθμό απελευθέρωσής του από τα κύτταρα. Ωστόσο, με την είσοδό του στην κυκλοφορία, τα επίπεδα του cfDNA επηρεάζονται προσθετικά από την ικανότητα πρόσδεσης του βιομορίου με εξωκυττάρια κυστίδια και πρωτεΐνες του ορού, το ποσοστό πρόσδεσης, αποσύνδεσης και εσωτερίκευσής του από κύτταρα, το οποίο εξαρτάται με τη σειρά του από το pH, τη θερμοκρασία και την παρουσία ηπαρίνης και τέλος από το βαθμό πέψης και απομάκρυνσης του cfDNA από την κυκλοφορία μέσω της δραστηριότητας της DNase I, την αποβολή του στα ούρα μέσω της νεφρικής λειτουργίας και με την δεύσμευσή του μέσω ενδοκύττωσής του από τα κύτταρα του σπλήνα και του ήπατος. Επακόλουθα, ο χρόνος ημιζωής του cfDNA στην κυκλοφορία κυμαίνεται μεταξύ των 16 min και 2,5 h [239].

Όσον αφορά τους ασθενείς με καρκίνο, το cfDNA προέρχεται από πολλαπλές πηγές, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων, των κυττάρων από το μικροπεριβάλλον του όγκου και από μη καρκινικά κύτταρα από άλλες περιοχές του σώματος. Εν αντιθέσει, το καρκινικό κυκλοφορούν DNA (ctDNA) είναι κλάσμα της συνολικής δεξαμενής του cfDNA και φέρει καρκινοειδικές αλλαγές στο DNA[232]. Είναι γνωστό, λοιπόν, ότι τα ολικά επίπεδα του cfDNA στην κυκλοφορία είναι υψηλότερα στους ασθενείς με καρκίνο σε σχέση με τα υγιή άτομα[337]. Η συγκέντρωση του cfDNA στο αίμα ποικίλλει σημαντικά, καθώς στους ασθενείς με καρκίνο έχει βρεθεί

να κυμαίνεται μεταξύ των 0-5 και >1000 ng/mL και στα υγιή άτομα μεταξύ 0 και 100 ng/mL[219]. Υπάρχει, επίσης, παρατηρείται μια σημαντική διαφορά στα επίπεδα του καρκινικού κυκλοφορούντος DNA (ctDNA) στο αίμα μεταξύ των ασθενών με διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση του ctDNA σε ασθενείς με μελάνωμα ή με καρκίνο του μαστού είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη των ασθενών με γλοιοβλάστωμα και αυτό έχει να κάνει με την θέση της εστίας του όγκου και της αγγείωσης του εκάστοτε οργάνου[336]. Ακόμη, διαφορές στη συγκέντρωση του cfDNA σημειώνονται ανάλογα και το στάδιο του καρκίνου. Για παράδειγμα, οι ασθενείς με καλοήθεις εξωφυτικές βλάβες ή με καρκίνο αρχικού σταδίου παρουσιάζουν μικρότερη συγκέντρωση του συγκεκριμένου αναλύτη στο αίμα σε σχέση με τους ασθενείς με καρκίνο προχωρημένου σταδίου. Συνεπώς τα επίπεδα του cfDNA στην κυκλοφορία αντανακλούν το φορτίο του όγκου κάθε ασθενούς[338].

Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, στους ασθενείς με καρκίνο ο μη προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (νέκρωση) λαμβάνει χώρα συχνότερα συγκριτικά με τα υγιή άτομα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό των βιολογικών υγρών με μεγάλα τμήματα DNA (>200 bp). Μάλιστα, όσο πιο προχωρημένος είναι ένας καρκίνος τόσο εντείνεται η διαδικασία της νέκρωσης και άρα αυξάνονται τα μεγάλα τμήματα DNA στην κυκλοφορία. Η συνθήκη αυτή φαίνεται να έχει κλινική αξία και μετράται με την αξιολόγηση της ακεραιότητας του cfDNA[339, 340]. Η ακεραιότητα, συνεπώς, εκφράζεται ως ο λόγος των τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους προς τα τμήματα DNA 160-180 bp, αντιπροσωπεύει τον λόγο της νεκρωτικής προς την αποπτωτική δραστηριότητα και έχει μελετηθεί για την κλινική της αξία στη διάγνωση και την πρόγνωση διαφόρων καρκίνων. Ο λόγος της ακεραιότητας έχει βρεθεί αυξημένος σε ασθενείς με καρκίνο και ιδιαίτερα με μεταστατικό καρκίνο συγκριτικά με μη μεταστατικές περιπτώσεις[339, 341].

Με την απομόνωση του ctDNA από τα βιολογικά υγρά των ασθενών, μπορεί να αξιολογηθεί η παρουσία ειδικών γενετικών αλλαγών, χαρακτηριστικών για τον εκάστοτε καρκίνο, οι οποίες μπορεί να είναι της μορφής σημειακών μεταλλάξεων, δομικών και αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, όπως πολλαπλασιασμοί και απαλοιφές γενετικών τόπων, μετατοπίσεις χρωμοσωμικών βραχιόνων και επιγενετικών τροποποιήσεων. Η ανίχνευση τέτοιων αλλαγών μπορεί να συνεισφέρει στη σταδιοποίηση και πρόγνωση του καρκίνου, τον προσδιορισμό της θέσης της καρκινικής εστίας, την επιλογή κατάλληλου θεραπευτικού πρωτοκόλλου, την παρακολούθηση της απόκρισης σε τοπικές ή συστηματικές θεραπείες, την παρακολούθηση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου και επανεμφάνισης έπειτα από την ολοκλήρωση της θεραπείας και στην ταυτοποίηση μηχανισμών επίκτητης αντοχής σε φάρμακα[239]. Λόγω της τεχνολογικής προόδου, η αναλυτική ευαισθησία στην ανίχνευση του ctDNA έχει βελτιωθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια και οι νέες τεχνολογικές εφαρμογές, όπως το

«σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση» (amplification refractory mutation system, PCR-ARMS), η BEAMing ψηφιακή PCR (beads, emulsion, amplification, magnetics) και της ψηφιακής PCR (digital PCR, dPCR) επιτρέπουν την ταυτοποίηση μεταλλαγμένων αλληλομόρφων με συχνότητα εμφάνισης πολύ μικρότερης του 1%. Επίσης, οι τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) έχουν μεγάλο αντίκτυπο στην ανάλυση του cfDNA. Δύναται, λοιπόν, η αλληλούχηση γονιδίων στόχων καθώς επίσης και η αλληλούχηση του συνόλου του γονιδιώματος (WGS) και του συνόλου των εξωνίων (WES) στο cfDNA[202].

Πράγματι, υπάρχουν εν εξελίξει κλινικές δοκιμές που αξιολογούν το cfDNA για την αξιοποίησή του ως πιθανό βιοδείκτη. Κυρίως διερευνάται η ικανοποιητική ανίχνευση καρκινοειδικών μεταλλάξεων στο ctDNA που θα βελτιώσουν την πρόγνωση και την πρόβλεψη των ασθενών και θα μπορέσει να εφαρμοσθεί στην κλινική ρουτίνα[287]. Ωστόσο, εκτός των τρεχόντων κλινικών δοκιμών έχουν εγκριθεί από το FDA ήδη δύο δοκιμές, οι οποίες χρησιμοποιούν το cfDNA για την ανίχνευση καρκινοειδικών μεταλλάξεων στο *EGFR* γονίδιο για ασθενείς με καρκίνο των πνευμόνων και για την εκτίμηση του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή του *SEPT9* γονιδίου σε ασθενείς με καρκίνο στο παχύ έντερο, αναδεικνύοντας την ρεαλιστική αξία του cfDNA ως πολλά υποσχόμενου βιοδείκτη στην διαχείριση των ασθενών με καρκίνο[185, 186].

Όπως αναφέρεται ένας από τους βασικούς στόχους της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση απομόνωσης, ποσοτικοποίησης και εκτίμησης ποιότητας και ακεραιότητας του cfDNA. Βιβλιογραφικά περιγράφονται διάφορες μέθοδοι απομόνωσης του cfDNA από τον ορό ή το πλάσμα, όπως της φαινόλης-χλωροφορμίου, των διαφόρων εμπορικών Kit (με χρήση κολονών ή με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων), ακόμη και της απομόνωσης με χρήση ιωδιούχου νατρίου[342]. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, προσπάθεια απομόνωσης του cfDNA από ορό μέσω της μεθόδου φαινόλης-χλωροφορμίου και ενός εμπορικού Kit. Πιο συγκεκριμένα, έγινε απομόνωση DNA από ορό με τα TRIzol™ LS Reagent και TRI Reagent BD σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που συνιστά η εταιρεία. Έπειτα έγιναν προσπάθειες βελτιστοποίησης της συγκεκριμένης μεθόδου απομόνωσης με επώαση των δειγμάτων με πρωτεΐνάση K, ακόμη και με πρόωρη κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με υπερκορεσμένο διάλυμα νατρίου (6M) ως μια προσπάθεια μείωσης της παρουσίας των οργανικών ενώσεων. Παρ' όλες όμως τις προσπάθειες, όπως διακρίνεται καθαρά στην Εικόνα 3.1B το DNA που απομονώνεται είναι χαμηλής ποιότητας, με υψηλής παρουσίας δηλαδή οργανικών προσμίξεων, καθιστώντας το μη διαχειρίσιμο για την περαιτέρω αξιοποίησή του σε αντιδράσεις Real-Time qPCR. Σύμφωνα, λοιπόν, με σύγκριση βιβλιογραφικά των διαφόρων Kit απομόνωσης,[343] αλλά και της μικρής απαίτησης σε ποσότητα ορού (έως 240 μL ορού), επιλέχθηκε το NucleoSpin cfDNA XS-Macherey Nagel Kit. Η εικόνα που προέκυψε έπειτα από την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση του DNA που

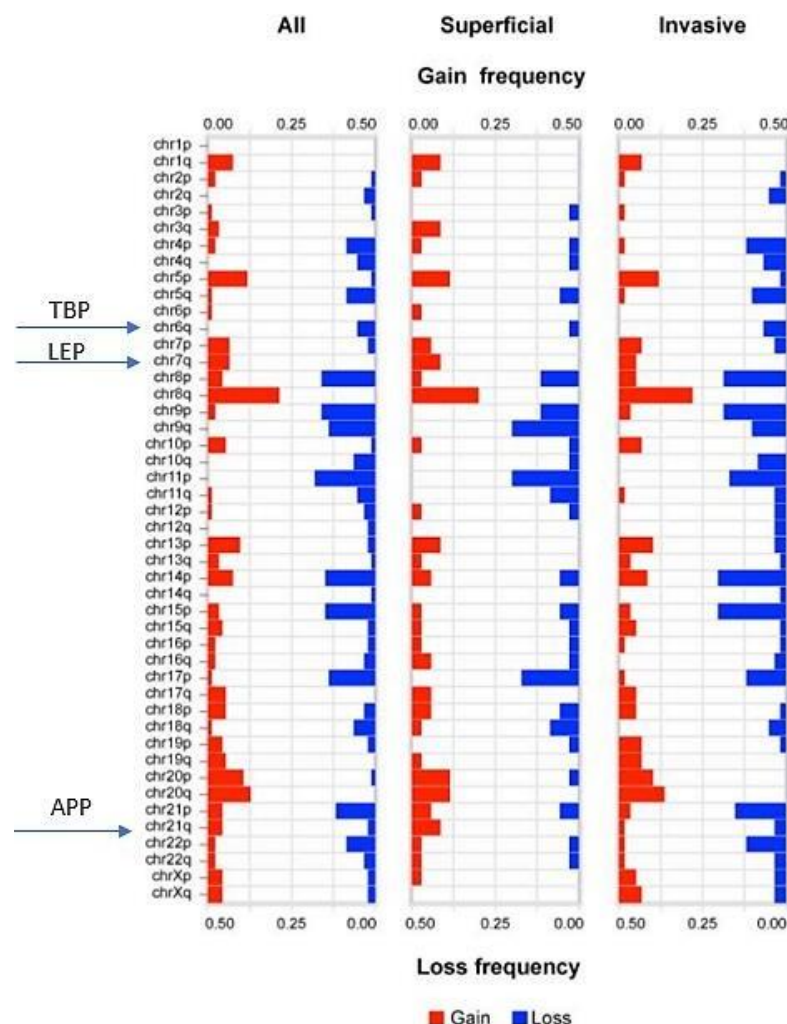
απομονώθηκε από τον ορό με την χρήση του συγκεκριμένου Kit (Εικόνα 3.1Α) συνάδει με την εικόνα που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση του cfDNA, σύμφωνα με την Agilent εταιρεία. Διακρίνεται καθαρά μια μεγάλη κορυφή στα 160-180 bp που αντιπροσωπεύει τα τμήματα DNA αποπτωτικής προέλευσης, ενώ αφήνεται και μια υπόνοια για την διάκριση δι- και τρι- νουκλεοσωμάτων. Επιπλέον η γραμμή βάσης της ηλεκτροφόρησης (baseline) είναι οριζόντια με μηδενική κλίση, υποδεικνύοντας την απουσία χημικών παρεμποδίσεων και την καλή ποιότητα του cfDNA. Κάτι που απεικονίζεται επίσης είναι και DNA μεγάλου μοριακού βάρους, το οποίο μπορεί να αντιστοιχεί σε τμήματα DNA που απελευθερώθηκαν στην κυκλοφορία μέσω της κυτταρικής νέκρωσης ή και σε τμήματα DNA που απελευθερώθηκαν από τη λύση λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια σχηματισμού του ορού. Άλλωστε για τον λόγο αυτό επισημαίνεται σαφώς στη βιβλιογραφία η προτυποποίηση των προ-ανλυτικών συνθηκών (ειδικά φυαλίδια συλλογής αίματος, πρωτόκολλα φυγοκεντρήσεων, θερμοκρασίες φύλαξης και αποθήκευσης των δειγμάτων) για την βέλτιστη απομόνωση του cfDNA[202].

Παράλληλα, προέκυψε και η ανάγκη της ακριβούς ποσοτικοποίησης του απομονωμένου cfDNA, καθώς όπως έχει αναφερθεί πολλάκις φαίνεται να έχει κλινικό ενδιαφέρον στην ογκολογία. Επιλέχθηκε επομένως να γίνει απόλυτη ποσοτικοποίηση των δειγμάτων φθορισμομετρικά με το Qubit dsDNA HS Assay Kit, η αναλυτική ευαισθησία του οποίου επαρκεί για τη μέτρηση των δειγμάτων cfDNA[344].

Όσον αφορά το γενωμικό DNA που αξιοποιήθηκε, έχει απομονωθεί από ιστοτεμάχια όγκου ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως με τη μέθοδο της φαινόλης-χλωροφορμίου. Προσδιορίστηκε, ποσοτικά και ποιοτικά φασματοφωτομετρικά σε μήκη κύματος 260nm και 280nm με νανοφωτόμετρο BioSpec-nano. Τα δείγματα των ιστών που αξιοποιήθηκαν στην ανάλυση της συγκεκριμένης εργασίας είχαν λόγο A260/A280 εντός του διαστήματος 1,8-2,2, γεγονός που τα καθιστά δείγματα καλής ποιότητας, λόγω της καθαρότητάς τους από οργανικές ενώσεις.

Έπειτα, μετά την ποσοτικοποίηση και την ποιοτική αξιολόγηση του cfDNA έπεται ο προσδιορισμός της ακεραιότητάς του. Με τον όρο ακεραιότητα ορίζεται ο λόγος της παρουσία τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους προς την παρουσία μικρότερων τμημάτων DNA (160-180 bp), αντιπροσωπεύοντας την νεκρωτική προς την αποπτωτική δραστηριότητα του οργανισμού. Για τον σκοπό αυτό έπρεπε αρχικά να γίνει επιλογή ενός γονιδίου αναφοράς, όπου βάσει ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών ενισχύονται δύο προϊόντα του γονιδίου αυτού. Οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι ώστε το μικρότερο προϊόν που προκύπτει να εμπεριέχεται στο μεγαλύτερο. Ο λόγος της ακεραιότητας, λοιπόν, αντιστοιχεί στα επίπεδα παρουσίας του μεγάλου προϊόντος προς το μικρότερο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση, για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συχνά τα ALU στοιχεία[345]. Ωστόσο, οι αλληλουχίες αυτές δεν μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την σχετική

ποσοτικοποίηση του αριθμού των αλληλομόρφων γονιδίων που υφίστανται συχνά πολλαπλασιασμό ή απαλοιφή στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, καθώς από τη φύσης τους δεν είναι στο γονιδίωμα σε αναλογία 1:1. Για τον λόγο αυτό διερευνήθηκε η επιλογή ενός γονιδίου αναφοράς, καθώς και η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου της Real Time qPCR αντίδρασης, το οποίο θα αξιοποιείται τόσο στην σχετική ποσοτικοποίηση των τμημάτων DNA μη αποπτωτικής προέλευσης όσο και στην σχετική ποσοτικοποίηση των αλληλικών αντιγράφων των γονιδίων στόχων. Τα υποψήφια γονίδια αναφοράς, επιλέχθηκαν έπειτα από βιβλιογραφική αναζήτηση και ήταν είτε συχνά χρησιμοποιούμενα γονίδια αναφοράς στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είτε είχαν χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση της ακεραιότητας του cfDNA σε μελέτες. Όπως απεικονίζεται στη Εικόνα 4.1, και τα τρία υποψήφια γονίδια αναφοράς βρίσκονται σε γενετικούς τόπους, όπου σπάνια λαμβάνουν χώρα γενωμικά συμβάντα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.



Εικόνα 4.1: Συχνότητες απώλειας ή πολλαπλασιασμού χρωμοσωμικών βραχιόνων σε ασθενείς με επιφανειακό και με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Σημειώνεται ο χρωμοσωμικός βραχίονας που εντοπίζεται το κάθε υποψήφιο γονίδιο αναφοράς [346].

Επιλέχθηκε, επομένως, το γονίδιο της λεπτίνης (*LEP*) ως γονίδιο αναφοράς, από την ενίσχυση του οποίου προκύπτει ένα προϊόν 116 bp. Η επιλογή του συγκεκριμένου γονιδίου βασίζεται στην ικανοποιητική παρουσία του γονιδίου στα δείγματα των ασθενών, καθώς και στην καλή απόδοση της Real Time qPCR αντίδρασης. Επίσης η αναλογία των δύο προϊόντων, του διαφορετικού μεγέθους που προκύπτουν προσεγγίζει σημαντικά το 1:1, σε HeLa κυτταρική σειρά και γενωμικό DNA φυσιολογικού ουροθελίου, όπου το γονίδιο βρίσκεται φυσιολογικά σε διπλοειδία. Τα αποτελέσματα διέπονται από καλή επαναληψιμότητα. Τέλος, τόσο από τις καμπύλες τήξης όσο και από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ενισχύονται μοναδικά προϊόντα. Ειδικότερα βάση της εικόνας ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 3.5) η ποσότητα των τελικών προϊόντων είναι οπτικά ίδια, κάτι που δεν συμβαίνει για τα άλλα δύο υποψήφια γονίδια αναφοράς.

Με το πέρας της στατιστικής ανάλυσης φαίνεται η συγκέντρωση του cfDNA (ng/mL) στον ορό να μη διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ασθενών με μη μυοδιηθητικό (NMIBC) και με μυοδιηθητικό (MIBC) καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, ούτε και μεταξύ των ασθενών με όγκο χαμηλού (Low Grade) και υψηλού (High Grade) βαθμού κακοήθειας. Παρ' όλα αυτά, το προϊόν της *LEP* που υποδεικνύει μη αποπτωτική προέλευση (237 bp) έχει μεγαλύτερη παρουσία στον ορό των ασθενών όγκο χαμηλού βαθμού κακοήθειας σε σχέση με τους ασθενείς με όγκο μικρής διαφοροποίησης και μάλιστα με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.022$). Η ίδια τάση, αλλά όχι στατιστικώς σημαντική ίσως λόγω του αριθμού των δειγμάτων, φαίνεται να ισχύει στους μη μυοδιηθητικούς συγκριτικά με τους μυοδιηθητικούς όγκους. Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν σαφή και απόλυτα αποτελέσματα ότι η παρουσία τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με το στάδιο της νόσου ή τον βαθμό κακοήθειας. Μάλιστα σημειώνονται αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ των διαφορετικών καρκίνων που μελετώνται[339]. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να σημαίνουν ότι στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως όσο αυξάνεται το στάδιο και ο βαθμός κακοήθειας του όγκου ενισχύεται περισσότερο το μονοπάτι του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε σχέση με τη νέκρωση των κυττάρων, κάτι που έχει παρατηρηθεί και στον καρκίνο του παχέος εντέρου[347].

Στη συνέχεια διεξήχθη βιοπληροφορική ανάλυση για την επιλογή γονιδίων, των οποίων ο αριθμός των αλληλομόρφων τους θα μελετηθεί σε ιστό και ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως. Έπειτα, λοιπόν, από αναζήτηση στην πλατφόρμα του cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>), επιλέχθηκαν τα *CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2* γονίδια. Η συχνότητα εμφάνισης αλλαγών (απαλοιφής ή πολλαπλασιασμού) στον αριθμό των αλληλομόρφων των συγκεκριμένων γονιδίων ήταν από τις υψηλότερες τόσο στους ασθενείς με μη μυοδιηθητικό όσο και στους ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Παράλληλα, και τα τρία γονίδια αυτά εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, μέσα από την καίρια συμμετοχή τους στα μονοπάτια του p53 και του RB1.

Επιπρόσθετα, αλληλεπιδρούν και μεταξύ τους συμμετέχοντας σε μια μοριακή σκυταλοδρομία αναστολής και αρνητικής ανάδρασης. Το *CDKN2A* θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο και συχνά απαλείφεται από τα πρώτα στάδια του συγκεκριμένου καρκίνου. Τα *CCND1* και *MDM2* θεωρούνται ογκογονίδια και παρατηρείται συνήθως ο πολλαπλασιασμός του γενετικού τους τύπου και κυρίως στους όγκους που διηθούν τη μυϊκή στιβάδα της κύστης.

Αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε σε πρώτη φάση το πρωτόκολλο ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων των *CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2* γονιδίων σε γενωμικό DNA καρκινικού ουροθηλίου. Φαίνεται για μια ακόμη φορά προς το γονίδιο αναφοράς (*LEP*) προς τα γονίδια στόχους εμφανίζεται με αναλογία 1:1 στην HeLa κυτταρική σειρά, όπου από δεδομένα αλληλούχησης και τα τέσσερα αυτά γονίδια βρίσκονται σε διπλοειδία. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα της συχνότητας εμφάνισης των αριθμητικών παρεκκλίσεων από τη διπλοειδία των τριών γονιδίων στόχων τόσο στην ομάδα ασθενών που αποτελεί το βιολογικό υλικό της εν λόγω εργασίας, όσο και στις ομάδες επικύρωσης συγκεντρώθηκαν και συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1. Σύμφωνα, λοιπόν, με τον πίνακα αυτό παρατηρείται μια μερική συμφωνία μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών, αποτελώντας θετικό δείγμα για την θεμιτή λειτουργία του βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου που αναπτύχθηκε.

Πραγματοποιήθηκε, ακολούθως, ανάλυση επιβίωσης των ασθενών με μη μυοδιηθητικό τύπο καρκίνου ως προς την επιβίωση ελευθέρως νόσου (Disease Free Survival, DFS), που σηματοδοτείται από την υποτροπή της νόσου και την επιβίωση ελευθέρως εξέλιξης της ασθένειας (Progression Free Survival, PFS), η οποία προσδιορίστηκε από την υποτροπή και την μετάπτωση της νόσου των ασθενών σε πλέον προχωρημένο παθολογοανατομικό στάδιο του όγκου. Δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, ωστόσο απεικονίζεται μια τάση σύμφωνα με την οποία οι ασθενείς με μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και με απαλοιφή του *CDKN2A* γονιδίου έχουν καλύτερη επιβίωση ελευθέρως νόσου και ελευθέρως εξέλιξης της ασθένειας. Για την περαιτέρω διερεύνηση της κλινικής σημαντικότητας πιθανώς να χρειάζεται αύξηση των αναλυόμενων δειγμάτων.

Εν αντιθέσει, στους ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έγινε ανάλυση επιβίωσης με συνισταμένες την ολική επιβίωση των ασθενών (Overall survival - OS) και του διαστήματος ελευθέρως νόσου. Δεν προκύπτει, εν προκειμένω, κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, υποδεικνύεται μόνο μια τάση οι ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και με απαλοιφή του *CDKN2A* γονιδίου να έχουν δυσμενέστερη ολική επιβίωση. Συνεπώς, φαίνεται ότι η απαλοιφή του *CDKN2A* γονιδίου έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στους μη μυοδιηθητικούς καρκίνους.

Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης των ασθενών με μη μυοδιηθητικό τύπο καρκίνου ως προς την επιβίωση ελευθέρως νόσου και την επιβίωση ελευθέρως εξέλιξης της ασθένειας για το *MDM2* γονίδιο. Δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, υποδεικνύεται μόνο μια τάση οι ασθενείς με μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και πολλαπλασιασμό του *MDM2* γονιδίου να έχουν καλύτερη επιβίωση ελευθέρως νόσου.

Στους ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έγινε ανάλυση επιβίωσης ως προς την ολική επιβίωση των ασθενών και του διαστήματος ελευθέρως νόσου για το *MDM2* γονίδιο. Στις συγκεκριμένες καμπύλες επιβίωσης φαίνεται με σαφήνεια και στατιστική σημαντικότητα ότι οι ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και πολλαπλασιασμό του *MDM2* γονιδίου έχουν χειρότερη επιβίωση ελευθέρως νόσου, όπου στο συγκεκριμένο στάδιο του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως αυτό σημαίνει θάνατος ή μετάσταση. Επίσης, απεικονίζεται μια αντίστοιχη τάση, μη στατιστικώς σημαντική, για την μείωση της ολικής επιβίωσης στους συγκεκριμένους ασθενείς. Όσον αφορά, συνεπώς, τον πολλαπλασιασμό του *MDM2* γονιδίου, φαίνεται να έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στους ασθενείς προχωρημένου σταδίου.

Έπειτα, αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε το πρωτόκολλο ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων των *CDKN2A*, *CCND1* και *MDM2* γονιδίων σε cfDNA που απομονώθηκε από ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως. Σημειώνεται στο σημείο αυτό ότι κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς με διαδοχικές αραιώσεις της HeLa κυτταρικής σειράς, γνωστής συγκέντρωσης, τόσο για το γονίδιο αναφοράς όσο και των τριών γονιδίων στόχων και προσδιορίστηκε ότι η μεθοδολογία που έχει αναπτυχθεί, δύναται να ανιχνεύσει έως και 7,3 ng/mL. Επομένως, η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου επαρκεί για τη μελέτη του cfDNA και την εκτίμηση του αριθμού των γονιδιακών αλληλικών αντιγράφων.

Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, στατιστική ανάλυση όπως και παραπάνω για την εκτίμηση της κλινικής αξίας των προκύπτοντων αποτελεσμάτων. Προκύπτει, επομένως, με ισχυρή στατιστική σημαντικότητα ότι στους όγκους προχωρημένου σταδίου (T3-T4) τα επίπεδα παρουσίας του *CDKN2A* γονιδίου είναι αυξημένα στον ορό συγκριτικά με τους όγκους αρχικών σταδίων (Ta,T1). Παρόμοια τάση εμφανίζουν και τα επίπεδα παρουσίας του *MDM2*, ως προς το στάδιο του όγκου.

Ακόμη, τα επίπεδα εμφάνισης και του *CDKN2A* και του *MDM2* γονιδίου είναι αυξημένα στους ασθενείς με μυοδιηθητικό (T2-T4) σε σχέση με τους ασθενείς με μη μυοδιηθητικό (Ta,T1) καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και μάλιστα με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.001$ και 0.018 αντίστοιχα). Όμοια, τα επίπεδα εμφάνισης και του *CDKN2A* είναι αυξημένα, με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.025$) στους ασθενείς με όγκο υψηλού βαθμού κακοήθειας. Αντίστοιχη τάση παρατηρείται, χωρίς

να είναι στατιστικώς σημαντική, για το *MDM2* γονίδιο, όπου για την περαιτέρω διερεύνηση της κλινικής σημαντικότητάς του πιθανώς να χρειάζεται αύξηση του αριθμού των αναλυόμενων δειγμάτων.

Εν κατακλείδι, στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης του cfDNA από ορό ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως, καθώς επίσης και ποσοτικοποίησης και ελέγχου ποιότητας και ακεραιότητάς του. Ακόμη, έχει επιλεγθεί ένα γονίδιο αναφοράς, το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο στον προσδιορισμό της ακεραιότητας του cfDNA, όσο και στον προσδιορισμό του αριθμού των αλληλομόρφων σε επιλεγμένα γονίδια που υφίσταντο απαλοιφές και πολλαπλασιασμούς στον συγκεκριμένο καρκίνο, ενώ έχουν βελτιστοποιηθεί οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν για την εκτίμησή τους. Βάσει της στατιστικής ανάλυσης, φαίνεται ότι στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως με την αύξηση του σταδίου της νόσου, ενισχύονται τα μονοπάτια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου έναντι της νέκρωσης. Επιπλέον, υποδεικνύεται ότι το *CDKN2A* γονίδιο έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στους ασθενείς με μη μυοδιηθητική νόσο, ενώ το *MDM2* γονίδιο στους ασθενείς με μυοδιηθητική νόσο. Τα χαμηλά επίπεδα εμφάνισης, ωστόσο, των *CDKN2A* και *MDM2* γονιδίων στον ορό των ασθενών με επιφανειακό και υψηλής διαφοροποίησης καρκίνου ίσως αποτελούν έναν καλό προγνωστικό δείκτη, κάτι που θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με ανάλυση επιβίωσης σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Γίνεται, επομένως, σαφές ότι το cfDNA σαν βιομόριο προσφέρει πολλές συνθήκες που μπορούν να μελετηθούν και να αξιολογηθούν κλινικά για την πρόγνωση, την πρόβλεψη και εν γένει για την βελτίωση της διαχείρισης των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.

Βιβλιογραφία

1. Fowler, C.J., D. Griffiths, and W.C. de Groat, The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci*, 2008. **9**(6): p. 453-66.
2. O'Grady, F. and W.R. Cattell, Kinetics of urinary tract infection. II. The bladder. *Br J Urol*, 1966. **38**(2): p. 156-62.
3. Ε.Δ. Κατρίτση, Δ.Α.Κ., Η.Δ. Κούβελα, Στοιχεία Ανατομίας-Στοιχεία Φυσιολογίας. ΙΔΡΥΜΑ ΕΥΓΕΝΙΔΟΥ, 2013: p. 249.
4. Libretti S, A.N., Embryology, Genitourinary. StatPearls, 2020.
5. Merkel, C.E., C.M. Karner, and T.J. Carroll, Molecular regulation of kidney development: is the answer blowing in the Wnt? *Pediatr Nephrol*, 2007. **22**(11): p. 1825-38.
6. Duenhoelter, J.H. and J.A. Pritchard, Fetal respiration. A review. *Am J Obstet Gynecol*, 1977. **129**(3): p. 326-38.
7. Yosypiv, I.V. and S.S. El-Dahr, Role of the renin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. *Pediatr Nephrol*, 2005. **20**(9): p. 1219-29.
8. Woolf, A.S., & Pitera, J. E., Embryology. *Pediatric Nephrology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009.
9. Kruepunga, N., et al., The development of the cloaca in the human embryo. *J Anat*, 2018. **233**(6): p. 724-739.
10. Gredler, M.L., et al., Evolution of external genitalia: insights from reptilian development. *Sex Dev*, 2014. **8**(5): p. 311-26.
11. Parada Villavicencio, C., et al., Imaging of the Urachus: Anomalies, Complications, and Mimics. *Radiographics*, 2016. **36**(7): p. 2049-2063.
12. Ε., Φ.-Κ., Εμβρυολογία του ουροποιογεννητικού συστήματος. . *Παιδιατρική Ουρολογία*. , 1993: p. 1-21
13. Carpenter JR, P.J., Rowe T. , Management of the high-risk fetus : prenatal diagnosis and therapy. . *Pediatric Urology Practice*, 1999: p. 91-118
14. Shermadou ES, R.S., Leslie SW., Anatomy, Abdomen and Pelvis, Bladder. StatPearls [Internet]. 2020.
15. Standring, S., Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice. Elsevier, 2016. **41st edition**: p. 1576.
16. Hakenberg, O.W., et al., Bladder wall thickness in normal adults and men with mild lower urinary tract symptoms and benign prostatic enlargement. *Neurourol Urodyn*, 2000. **19**(5): p. 585-93.
17. Khandelwal, P., S.N. Abraham, and G. Apodaca, Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **297**(6): p. F1477-501.
18. Chan, Y.Y., et al., The Current Use of Stem Cells in Bladder Tissue Regeneration and Bioengineering. *Biomedicines*, 2017. **5**(1).
19. Truschel, S.T., et al., Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(3): p. 830-46.
20. Ajalloueian, F., et al., Bladder biomechanics and the use of scaffolds for regenerative medicine in the urinary bladder. *Nat Rev Urol*, 2018. **15**(3): p. 155-174.
21. Abrams, P., Urodynamics. Springer-Verlag, London, 2006: p. 7-16.
22. Andersson, K.E. and A. Arner, Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2004. **84**(3): p. 935-86.
23. DeLancey, J.O.e.a., INCONTINENCE. Health Publication, Plymouth, UK, 2002: p. 17-82
24. Sam P, N.A., LaGrange CA., Anatomy, Abdomen and Pelvis, Bladder Detrusor Muscle. StatPearls [Internet]. 2020.
25. Bolla SR, O.N., Jetli R., Histology, Bladder. StatPearls [Internet]. 2020.
26. Saginala, K., et al., Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci (Basel)*, 2020. **8**(1).

27. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
28. Ferlay J., E.M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A., Soerjomataram I., Bray F., Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. 2018.
29. Silverman D.T., K.S., Figueroa J.D., Prokunina-Olsson L., Rothman N., *Cancer Epidemiology and Prevention-Bladder cancer*. Oxford University Press, 2017.
30. Dobruch, J., et al., Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol*, 2016. **69**(2): p. 300-10.
31. Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
32. Khan, R., et al., Bladder cancer in a young patient: Undiscovered risk factors. *Oncol Lett*, 2016. **11**(5): p. 3202-3204.
33. Wan, J. and H.B. Grossman, Bladder carcinoma in patients age 40 years or younger. *Cancer*, 1989. **64**(1): p. 178-81.
34. Noone A.M., H.N., Krapcho M., Miller D., Brest A., Yu M., Ruhl J., Tatalovich Z., Mariotto A., Lewis D.R., et al, SEER Cancer Statistics Review 1975–2015. . National Cancer Institute, USA: 2018.
35. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 2019. **69**(1): p. 7-34.
36. Wong, M.C.S., et al., The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1129.
37. Brennan, P., et al., Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*, 2000. **86**(2): p. 289-94.
38. Brennan, P., et al., The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data). *Cancer Causes Control*, 2001. **12**(5): p. 411-7.
39. Freedman, N.D., et al., Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*, 2011. **306**(7): p. 737-45.
40. Group, I.W., IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2004. **84**(Tobacco Smoke and Involuntary Smoking).
41. Burger, M., et al., Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, 2013. **63**(2): p. 234-41.
42. Yan, H., et al., Secondhand smoking increases bladder cancer risk in nonsmoking population: a meta-analysis. *Cancer Manag Res*, 2018. **10**: p. 3781-3791.
43. Scelo, G. and P. Brennan, The epidemiology of bladder and kidney cancer. *Nat Clin Pract Urol*, 2007. **4**(4): p. 205-17.
44. (US)., C.f.D.C.a.P.U.N.C.f.C.D.P.a.H.P.U.O.o.S.a.H., How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US), 2010.
45. Zeegers, M.P., et al., Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occup Environ Med*, 2001. **58**(9): p. 590-6.
46. Chen, H.I., et al., Bladder cancer screening and monitoring of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) exposure among workers in Taiwan. *Urology*, 2005. **66**(2): p. 305-10.
47. Marshall, G., et al., Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J Natl Cancer Inst*, 2007. **99**(12): p. 920-8.
48. Villanueva, C.M., et al., Total and specific fluid consumption as determinants of bladder cancer risk. *Int J Cancer*, 2006. **118**(8): p. 2040-7.
49. Sun, J.W., et al., Obesity and risk of bladder cancer: a dose-response meta-analysis of 15 cohort studies. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119313.

50. Inobaya, M.T., et al., Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. *Res Rep Trop Med*, 2014. **2014**(5): p. 65-75.
51. Mostafa, M.H., S.A. Sheweita, and P.J. O'Connor, Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev*, 1999. **12**(1): p. 97-111.
52. Zaghloul, M.S., Bladder cancer and schistosomiasis. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2012. **24**(4): p. 151-9.
53. Pelucchi, C., et al., Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*, 2006. **3**(6): p. 327-40.
54. Lin, J., et al., Bladder cancer risk as modified by family history and smoking. *Cancer*, 2006. **107**(4): p. 705-11.
55. Gu, J. and X. Wu, Genetic susceptibility to bladder cancer risk and outcome. *Per Med*, 2011. **8**(3): p. 365-374.
56. Kiemeny, L.A., et al., Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet*, 2008. **40**(11): p. 1307-12.
57. Wu, X., M.A. Hildebrandt, and D.W. Chang, Genome-wide association studies of bladder cancer risk: a field synopsis of progress and potential applications. *Cancer Metastasis Rev*, 2009. **28**(3-4): p. 269-80.
58. Hein, D.W., Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res*, 2002. **506-507**: p. 65-77.
59. Garcia-Closas, M., et al., NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*, 2005. **366**(9486): p. 649-59.
60. Gu, J., et al., Effects of N-acetyl transferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians. *Mutat Res*, 2005. **581**(1-2): p. 97-104.
61. Rothman, N., et al., A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci. *Nat Genet*, 2010. **42**(11): p. 978-84.
62. Riegert-Johnson, D.L., et al., Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hered Cancer Clin Pract*, 2010. **8**(1): p. 6.
63. van der Post, R.S., et al., Risk of urothelial bladder cancer in Lynch syndrome is increased, in particular among MSH2 mutation carriers. *J Med Genet*, 2010. **47**(7): p. 464-70.
64. Newkirk, K.M., Brannick, E. M., & Kusewitt, D. F. , Chapter 6 – Neoplasia and Tumor Biology. *Pathologic Basis of Veterinary Disease (Sixth Edition)*, 2017: p. 286-321.e1.
65. Walter L. Kemp, D.K.B., Travis G. Brown, *Pathology: The Big Picture-Chapter 4. Neoplasia*. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2008.
66. Liang Cheng, A.L.-B., Gregory T. MacLennan, Rodolfo Montironi and David G. Bostwick, *Urologic Surgical Pathology 2nd Edition-Neoplasms of the urinary bladder*. Elsevier Health Sciences, 2008: p. 1026.
67. Grignon, D.J., The current classification of urothelial neoplasms. *Mod Pathol*, 2009. **22 Suppl 2**: p. S60-9.
68. Epstein, J.I., Amin, M. B., Reuter, V. R., Mostofi, F. K., Algaba, F., Allsbrook, W. C., Ayala, A. G., Becich, M. J., Beltrán, A. L., Boccon-Gibód, L., Bostwick, D. G., Busch, C., Davis, C. J., Eble, J. N., Foster, C. S., Furusato, M., Grignon, D. J., Humphrey, P. A., Ishak, E. A., ... Young, R. H., The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *American Journal of Surgical Pathology*, 1998. **22**: p. 1435-1448.
69. Pasin E, J.D., Mitra AP, Cote RJ, Stein JP. , Superficial Bladder Cancer: An Update on Etiology, Molecular Development, Classification, and Natural History. *Rev Urol.* , 2008: p. 31-43.
70. Moch H, H.P., Ulbright TM, et al. , *WHO Classification of Tumours of the Urinary Stem and Male Genital Organs*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2016.
71. Johansson, S.L. and S.M. Cohen, Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Semin Surg Oncol*, 1997. **13**(5): p. 291-8.

72. Walton, T., Bladder tumours. British Association of Urological Surgeons, 2011.
73. Chalasani, V., Chin, J. L., & Izawa, J. I., Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer. *Canadian Urological Association Journal.*, 2009: p. S193-S198.
74. Boustead, G.B., et al., Stage, grade and pathological characteristics of bladder cancer in the UK: British Association of Urological Surgeons (BAUS) urological tumour registry. *BJU Int*, 2014. **113**(6): p. 924-30.
75. Akhtar, M., et al., Urothelial Carcinoma In Situ (CIS): New Insights. *Adv Anat Pathol*, 2019. **26**(5): p. 313-319.
76. Migaldi, M., et al., Superficial papillary urothelial carcinomas in young and elderly patients: a comparative study. *BJU Int*, 2004. **94**(3): p. 311-6.
77. (UK)., N.C.C.f.C., Bladder Cancer: Diagnosis and Management. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK). Managing muscle-invasive bladder cancer., 2015.
78. Rogers, C.G., et al., Clinical outcomes following radical cystectomy for primary nontransitional cell carcinoma of the bladder compared to transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 2006. **175**(6): p. 2048-53; discussion 2053.
79. Scosyrev, E., J. Yao, and E. Messing, Urothelial carcinoma versus squamous cell carcinoma of bladder: is survival different with stage adjustment? *Urology*, 2009. **73**(4): p. 822-7.
80. Muhammad T Idrees, M., Pathology of Urinary Bladder Squamous Cell Carcinoma Overview of Squamous Cell Bladder Carcinoma. Medscape, 2019.
81. Thomas, D.G., A.M. Ward, and J.L. Williams, A study of 52 cases of adenocarcinoma of the bladder. *Br J Urol*, 1971. **43**(1): p. 4-15.
82. Bates, A.W. and S.I. Baithun, Secondary neoplasms of the bladder are histological mimics of nontransitional cell primary tumours: clinicopathological and histological features of 282 cases. *Histopathology*, 2000. **36**(1): p. 32-40.
83. Dadhania, V., B. Czerniak, and C.C. Guo, Adenocarcinoma of the urinary bladder. *Am J Clin Exp Urol*, 2015. **3**(2): p. 51-63.
84. Blomjous, C.E., et al., Small cell carcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic, morphometric, immunohistochemical, and ultrastructural study of 18 cases. *Cancer*, 1989. **64**(6): p. 1347-57.
85. Ghervan, L., et al., Small-cell carcinoma of the urinary bladder: where do we stand? *Clujul Med*, 2017. **90**(1): p. 13-17.
86. Comperat, E.M., et al., Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016". *Eur Urol Focus*, 2019. **5**(3): p. 457-466.
87. Mostofi, F.K., Sobin, Leslie H, Torloni, Humberto & World Health Organization., Histological typing of urinary bladder tumours / F. K. Mostofi, in collaboration with L. H. Sobin, H. Torloni and pathologists in fourteen countries. World Health Organization., 1973.
88. Malmstrom, P.U., C. Busch, and B.J. Norlen, Recurrence, progression and survival in bladder cancer. A retrospective analysis of 232 patients with greater than or equal to 5-year follow-up. *Scand J Urol Nephrol*, 1987. **21**(3): p. 185-95.
89. Pauwels, R.P., et al., Grading in superficial bladder cancer. (1). Morphological criteria. *Br J Urol*, 1988. **61**(2): p. 129-34.
90. Humphrey, P.A., et al., The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, 2016. **70**(1): p. 106-119.
91. M. Babjuk (Chair), M.B.V.-c., E. Compérat, P. Gontero, A.H. Mostafid, J. Palou, B.W.G. van Rhijn, M. Rouprêt, S.F. Shariat, R. Sylvester, R. Zigeuner Guidelines Associates: O. Capoun, D. Cohen, J.L. Dominguez Escrig, B. Peyronnet, T. Seisen, V. Soukup, EAU Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and CIS). European Association of Urology 2020.
92. Fojecki, G., et al., Consultation on UTUC, Stockholm 2018 aspects of diagnosis of upper tract urothelial carcinoma. *World J Urol*, 2019. **37**(11): p. 2271-2278.

93. Magers, M.J., et al., Staging of bladder cancer. *Histopathology*, 2019. **74**(1): p. 112-134.
94. Sanli, O., et al., Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 17022.
95. Lopez-Beltran, A., et al., Handling and pathology reporting of specimens with carcinoma of the urinary bladder, ureter, and renal pelvis. *Eur Urol*, 2004. **45**(3): p. 257-66.
96. Amling, C.L., Diagnosis and management of superficial bladder cancer. *Curr Probl Cancer*, 2001. **25**(4): p. 219-78.
97. Soukup, V., et al., Risk Stratification Tools and Prognostic Models in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Critical Assessment from the European Association of Urology Non-muscle-invasive Bladder Cancer Guidelines Panel. *Eur Urol Focus*, 2020. **6**(3): p. 479-489.
98. Ramirez, D., et al., Microscopic haematuria at time of diagnosis is associated with lower disease stage in patients with newly diagnosed bladder cancer. *BJU Int*, 2016. **117**(5): p. 783-6.
99. Bolenz, C., et al., The Investigation of Hematuria. *Dtsch Arztebl Int*, 2018. **115**(48): p. 801-807.
100. J.A. Witjes (Chair), H.M.B., R. Cathomas, E. Comp  rat, N.C. Cowan, G. Gakis, V. Hernández, A. Lorch, M.J. Ribal (Vice-chair), G.N. Thalmann, A.G. van der Heijden, E. Veskim  e Guidelines Associates: E. Linares Espin  s, M. Rouanne, Y. Neuzillet, EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. European Association of Urology 2020.
101. Grossman, H.B., et al., Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA*, 2005. **293**(7): p. 810-6.
102. Roobol, M.J., et al., Feasibility study of screening for bladder cancer with urinary molecular markers (the BLU-P project). *Urol Oncol*, 2010. **28**(6): p. 686-90.
103. Starke, N., et al., Long-term outcomes in a high-risk bladder cancer screening cohort. *BJU Int*, 2016. **117**(4): p. 611-7.
104. Barnes, R.W., Bergman, R. T., & Hadley, H. L., The cystoscopic procedure. *Endoscopy*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1959. **6**: p. 34-50.
105. Network., N.C.C., NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Bladder Cancer. NCCN.org., 2020.
106. Inamura, K., Bladder Cancer: New Insights into Its Molecular Pathology. *Cancers (Basel)*, 2018. **10**(4).
107. Morrison, C.D., et al., Whole-genome sequencing identifies genomic heterogeneity at a nucleotide and chromosomal level in bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(6): p. E672-81.
108. Knowles, M.A., Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*, 2006. **27**(3): p. 361-73.
109. Schulz, W.A., Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. *Int J Cancer*, 2006. **119**(7): p. 1513-8.
110. Natarajan, A.T. and F. Palitti, DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat Res*, 2008. **657**(1): p. 3-7.
111. Sandberg, A.A., Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer: a personal view. *Am J Med Genet*, 2002. **115**(3): p. 173-82.
112. Wu, X.R., Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(9): p. 713-25.
113. Cairns, P., et al., Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science*, 1994. **265**(5170): p. 415-7.
114. Williamson, M.P., et al., p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Genet*, 1995. **4**(9): p. 1569-77.
115. Kruger, S., et al., P16 immunoreactivity is an independent predictor of tumor progression in minimally invasive urothelial bladder carcinoma. *Eur Urol*, 2005. **47**(4): p. 463-7.
116. Bartoletti, R., et al., Loss of P16 expression and chromosome 9p21 LOH in predicting outcome of patients affected by superficial bladder cancer. *J Surg Res*, 2007. **143**(2): p. 422-7.

117. Ploussard, G., et al., Prognostic value of loss of heterozygosity at chromosome 9p in non-muscle-invasive bladder cancer. *Urology*, 2010. **76**(2): p. 513 e13-8.
118. Lindgren, D., et al., Integrated genomic and gene expression profiling identifies two major genomic circuits in urothelial carcinoma. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38863.
119. Nishiyama, N., et al., Copy number alterations in urothelial carcinomas: their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(4): p. 462-9.
120. Hurst, C.D., et al., Novel tumor subgroups of urothelial carcinoma of the bladder defined by integrated genomic analysis. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(21): p. 5865-5877.
121. Nord, H., et al., Focal amplifications are associated with high grade and recurrences in stage Ta bladder carcinoma. *Int J Cancer*, 2010. **126**(6): p. 1390-402.
122. Eriksson, P., et al., Detailed Analysis of Focal Chromosome Arm 1q and 6p Amplifications in Urothelial Carcinoma Reveals Complex Genomic Events on 1q, and SOX4 as a Possible Auxiliary Target on 6p. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e67222.
123. Cancer Genome Atlas Research, N., Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 2014. **507**(7492): p. 315-22.
124. Williams, S.V., C.D. Hurst, and M.A. Knowles, Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet*, 2013. **22**(4): p. 795-803.
125. Nordentoft, I., et al., Mutational context and diverse clonal development in early and late bladder cancer. *Cell Rep*, 2014. **7**(5): p. 1649-1663.
126. Balbas-Martinez, C., et al., Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nat Genet*, 2013. **45**(12): p. 1464-9.
127. Lawrence, M.S., et al., Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 2013. **499**(7457): p. 214-218.
128. Billerey, C., et al., Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol*, 2001. **158**(6): p. 1955-9.
129. Jebar, A.H., et al., FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*, 2005. **24**(33): p. 5218-25.
130. Platt, F.M., et al., Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(19): p. 6008-17.
131. Solomon, D.A., et al., Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer. *Nat Genet*, 2013. **45**(12): p. 1428-30.
132. Taylor, C.F., et al., Frequent inactivating mutations of STAG2 in bladder cancer are associated with low tumour grade and stage and inversely related to chromosomal copy number changes. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(8): p. 1964-74.
133. Gui, Y., et al., Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet*, 2011. **43**(9): p. 875-8.
134. Askham, J.M., et al., AKT1 mutations in bladder cancer: identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K. *Oncogene*, 2010. **29**(1): p. 150-5.
135. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*, 2015. **15**(1): p. 25-41.
136. Soria, F., et al., Molecular markers in bladder cancer. *World J Urol*, 2019. **37**(1): p. 31-40.
137. Wild, P.J., et al., Detection of urothelial bladder cancer cells in voided urine can be improved by a combination of cytology and standardized microsatellite analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(6): p. 1798-806.
138. Zuiverloon, T.C., et al., Combinations of urinary biomarkers for surveillance of patients with incident nonmuscle invasive bladder cancer: the European FP7 UROMOL project. *J Urol*, 2013. **189**(5): p. 1945-51.
139. Zuiverloon, T.C., et al., Optimization of nonmuscle invasive bladder cancer recurrence detection using a urine based FGFR3 mutation assay. *J Urol*, 2011. **186**(2): p. 707-12.

140. Reinert, T., et al., Comprehensive genome methylation analysis in bladder cancer: identification and validation of novel methylated genes and application of these as urinary tumor markers. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(17): p. 5582-92.
141. Chung, W., et al., Detection of bladder cancer using novel DNA methylation biomarkers in urine sediments. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011. **20**(7): p. 1483-91.
142. Zuiverloon, T.C., et al., A methylation assay for the detection of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine. *BJU Int*, 2012. **109**(6): p. 941-8.
143. Renard, I., et al., Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *Eur Urol*, 2010. **58**(1): p. 96-104.
144. Kandimalla, R., et al., A 3-plex methylation assay combined with the FGFR3 mutation assay sensitively detects recurrent bladder cancer in voided urine. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(17): p. 4760-9.
145. Allory, Y., et al., Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur Urol*, 2014. **65**(2): p. 360-6.
146. Hurst, C.D., F.M. Platt, and M.A. Knowles, Comprehensive mutation analysis of the TERT promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine. *Eur Urol*, 2014. **65**(2): p. 367-9.
147. Shariat, S.F., et al., Cooperative effect of cell-cycle regulators expression on bladder cancer development and biologic aggressiveness. *Mod Pathol*, 2007. **20**(4): p. 445-59.
148. Fritsche, H.M., et al., Characteristics and outcomes of patients with clinical T1 grade 3 urothelial carcinoma treated with radical cystectomy: results from an international cohort. *Eur Urol*, 2010. **57**(2): p. 300-9.
149. Byrne, R.R., et al., E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term followup. *J Urol*, 2001. **165**(5): p. 1473-9.
150. Xylinas, E., et al., Blood- and tissue-based biomarkers for prediction of outcomes in urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol*, 2014. **32**(3): p. 230-42.
151. Shariat, S.F., et al., Multiple biomarkers improve prediction of bladder cancer recurrence and mortality in patients undergoing cystectomy. *Cancer*, 2008. **112**(2): p. 315-25.
152. Shariat, S.F., et al., Risk stratification of organ confined bladder cancer after radical cystectomy using cell cycle related biomarkers. *J Urol*, 2012. **187**(2): p. 457-62.
153. Shariat, S.F., et al., Correlation of cyclin D1 and E1 expression with bladder cancer presence, invasion, progression, and metastasis. *Hum Pathol*, 2006. **37**(12): p. 1568-76.
154. Zu, X., et al., Vascular endothelial growth factor-C expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis. *BJU Int*, 2006. **98**(5): p. 1090-3.
155. Herrmann, E., et al., VEGF-C, VEGF-D and Flt-4 in transitional bladder cancer: relationships to clinicopathological parameters and long-term survival. *Anticancer Res*, 2007. **27**(5A): p. 3127-33.
156. Margulis, V., et al., Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(2): p. 114-9.
157. Margulis, V., et al., Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(24): p. 7369-73.
158. Van Allen, E.M., et al., Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer Discov*, 2014. **4**(10): p. 1140-53.
159. Oneyama, C., et al., MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene*, 2011. **30**(32): p. 3489-501.
160. Teutsch, S.M., et al., The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med*, 2009. **11**(1): p. 3-14.

161. Hayes, D.F., Biomarker validation and testing. *Mol Oncol*, 2015. **9**(5): p. 960-6.
162. Ashley, E.A., Towards precision medicine. *Nat Rev Genet*, 2016. **17**(9): p. 507-22.
163. Moscow, J.A., T. Fojo, and R.L. Schilsky, The evidence framework for precision cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018. **15**(3): p. 183-192.
164. Heitzer, E., et al., Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet*, 2019. **20**(2): p. 71-88.
165. Siravegna, G., et al., Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(9): p. 531-548.
166. Wan, J.C.M., et al., Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(4): p. 223-238.
167. De Rubis, G., S. Rajeev Krishnan, and M. Bebawy, Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci*, 2019. **40**(3): p. 172-186.
168. Raimondi, L., et al., Circulating biomarkers in osteosarcoma: new translational tools for diagnosis and treatment. *Oncotarget*, 2017. **8**(59): p. 100831-100851.
169. Lim, M., et al., Liquid Biopsy in Lung Cancer: Clinical Applications of Circulating Biomarkers (CTCs and ctDNA). *Micromachines (Basel)*, 2018. **9**(3).
170. Lodewijk, I., et al., Liquid Biopsy Biomarkers in Bladder Cancer: A Current Need for Patient Diagnosis and Monitoring. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(9).
171. Burger, M., et al., Photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer with hexaminolevulinate cystoscopy: a meta-analysis of detection and recurrence based on raw data. *Eur Urol*, 2013. **64**(5): p. 846-54.
172. Mark E. Brezinski MD, P., Optical Coherence Tomography-17.4. *BLADDER CANCER*. Elsevier Inc., 2006: p. 493-545.
173. Bettgowda, C., et al., Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(224): p. 224ra24.
174. Lampignano, R., et al., Multicenter Evaluation of Circulating Cell-Free DNA Extraction and Downstream Analyses for the Development of Standardized (Pre)analytical Work Flows. *Clin Chem*, 2020. **66**(1): p. 149-160.
175. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020. **367**(6478).
176. Best, M.G., P. Wesseling, and T. Wurdinger, Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression Monitoring. *Cancer Res*, 2018. **78**(13): p. 3407-3412.
177. Anfossi, S., et al., Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018. **15**(9): p. 541-563.
178. Heidrich, I., et al., Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int J Cancer*, 2020.
179. Riethdorf, S., et al., Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 920-8.
180. Antonarakis, E.S., et al., Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(19): p. 2149-2156.
181. Heller, G., et al., Circulating Tumor Cell Number as a Response Measure of Prolonged Survival for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Comparison With Prostate-Specific Antigen Across Five Randomized Phase III Clinical Trials. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(6): p. 572-580.
182. Huang, X., et al., Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 202.
183. Riethdorf, S., et al., Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018. **125**: p. 102-121.

184. Sacher, A.G., et al., Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol*, 2016. **2**(8): p. 1014-22.
185. Leighl, N.B., et al., Molecular testing for selection of patients with lung cancer for epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the study of lung cancer/association for molecular pathology guideline. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(32): p. 3673-9.
186. Warren, J.D., et al., Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med*, 2011. **9**: p. 133.
187. Song, L., et al., The performance of the SEPT9 gene methylation assay and a comparison with other CRC screening tests: A meta-analysis. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 3032.
188. Nian, J., et al., Diagnostic Accuracy of Methylated SEPT9 for Blood-based Colorectal Cancer Detection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Transl Gastroenterol*, 2017. **8**(1): p. e216.
189. Wu, Y.L., et al., First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol*, 2015. **26**(9): p. 1883-1889.
190. Lindeman, N.I., et al., Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*, 2018. **142**(3): p. 321-346.
191. Watson, J.D. and F.H. Crick, The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1953. **18**: p. 123-31.
192. MANDEL P, M.P., Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. . *C R Seances Soc Biol Fil.*, 1948: p. 241-3.
193. Tan, E.M., et al., Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 1966. **45**(11): p. 1732-40.
194. Stroun, M. and P. Anker, Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles. *Biochem J*, 1972. **128**(3): p. 100P-101P.
195. Koffler, D., et al., The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest*, 1973. **52**(1): p. 198-204.
196. Steinman, C.R., Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest*, 1975. **56**(2): p. 512-5.
197. Davis, G.L., Jr. and J.S.t. Davis, Detection of circulating DNA by counterimmunoelectrophoresis (CIE). *Arthritis Rheum*, 1973. **16**(1): p. 52-8.
198. Leon, S.A., et al., Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol*, 1977. **4**(2): p. 139-43.
199. Leon, S.A., et al., Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, 1977. **37**(3): p. 646-50.
200. Cox, R.A. and M. Gokcen, DNA concentrations in serum and plasma. *Clin Chem*, 1977. **23**(2 PT. 1): p. 297.
201. Anker, P., M. Stroun, and P.A. Maurice, Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res*, 1975. **35**(9): p. 2375-82.
202. Perakis, S., et al., Advances in Circulating Tumor DNA Analysis. *Adv Clin Chem*, 2017. **80**: p. 73-153.
203. Stroun, M., et al., Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 1989. **46**(5): p. 318-22.
204. Sorenson, G.D., et al., Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994. **3**(1): p. 67-71.

205. Fournie, G.J., et al., Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett*, 1995. **91**(2): p. 221-7.
206. Chen, X.Q., et al., Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med*, 1996. **2**(9): p. 1033-5.
207. de Kok, J.B., et al., Detection of tumour DNA in serum of colorectal cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest*, 1997. **57**(7): p. 601-4.
208. Kopreski, M.S., et al., Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*, 1997. **76**(10): p. 1293-9.
209. Yamada, T., et al., Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(6): p. 1527-32.
210. Castells, A., et al., K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(2): p. 578-84.
211. Chen, X., et al., Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(9): p. 2297-303.
212. Esteller, M., et al., Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res*, 1999. **59**(1): p. 67-70.
213. Vasioukhin, V., et al., Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*, 1994. **86**(4): p. 774-9.
214. Lo, Y.M., et al., Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997. **350**(9076): p. 485-7.
215. Lo, Y.M., Fetal RhD genotyping from maternal plasma. *Ann Med*, 1999. **31**(5): p. 308-12.
216. Li, Y., et al., Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA*, 2005. **293**(7): p. 843-9.
217. Chiu, R.W., et al., Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*, 2011. **342**: p. c7401.
218. Fleischhacker, M. and B. Schmidt, Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1775**(1): p. 181-232.
219. Thierry, A.R., et al., Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*, 2016. **35**(3): p. 347-76.
220. Nagata, S., et al., Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(1): p. 108-16.
221. Snyder, T.M., et al., Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(15): p. 6229-34.
222. Lo, Y.M., et al., Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet*, 1998. **351**(9112): p. 1329-30.
223. Gahan, P.B. and M. Stroun, The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem Funct*, 2010. **28**(7): p. 529-38.
224. Adams, D.H. and P.B. Gahan, The DNA extruded by rat spleen cells in culture. *Int J Biochem*, 1983. **15**(4): p. 547-52.
225. Adams, D.H. and A.A. McIntosh, Studies on the cytosolic DNA of chick embryo fibroblasts and its uptake by recipient cultured cells. *Int J Biochem*, 1985. **17**(10): p. 1041-51.
226. Chelobanov, B.P., P.P. Laktionov, and V.V. Vlasov, Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids. *Biochemistry (Mosc)*, 2006. **71**(6): p. 583-96.
227. Bryzgunova, O.E., et al., Redistribution of Free- and Cell-Surface-Bound DNA in Blood of Benign and Malignant Prostate Tumor Patients. *Acta Naturae*, 2015. **7**(2): p. 115-8.

228. Gahan, P.B. and R. Swaminathan, Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1137**: p. 1-6.
229. Mittra, I., N.K. Nair, and P.K. Mishra, Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *J Biosci*, 2012. **37**(2): p. 301-12.
230. Chiu, R.W., et al., Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem*, 2003. **49**(5): p. 719-26.
231. Mouliere, F. and A.R. Thierry, The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opin Biol Ther*, 2012. **12 Suppl 1**: p. S209-15.
232. Schwarzenbach, H., D.S. Hoon, and K. Pantel, Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(6): p. 426-37.
233. Jahr, S., et al., DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 2001. **61**(4): p. 1659-65.
234. Tamkovich, S.N., et al., Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1075**: p. 191-6.
235. Hawes, M.C., F. Wen, and E. Elquza, Extracellular DNA: A Bridge to Cancer. *Cancer Res*, 2015. **75**(20): p. 4260-4.
236. Cox, R.A. and M. Gokcen, Comparison of serum DNA, native DNA-binding and deoxyribonuclease levels in ten animal species and man. *Life Sci*, 1976. **19**(10): p. 1609-14.
237. Reitz, M., et al., Secretion of neutral and acid DNases in cultivated human lymphocytes after incubation with DNA; possible consequences for inhalation anesthesia. *Z Naturforsch C J Biosci*, 1995. **50**(5-6): p. 419-24.
238. Heitzer, E., P. Ulz, and J.B. Geigl, Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*, 2015. **61**(1): p. 112-23.
239. Bronkhorst, A.J., V. Ungerer, and S. Holdenrieder, The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*, 2019. **17**: p. 100087.
240. Heitzer, E., L. Auinger, and M.R. Speicher, Cell-Free DNA and Apoptosis: How Dead Cells Inform About the Living. *Trends Mol Med*, 2020. **26**(5): p. 519-528.
241. Thierry, A.R., et al., Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(18): p. 6159-75.
242. Green, D.R., The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. *Cell*, 2019. **177**(5): p. 1094-1107.
243. Enari, M., et al., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
244. Kitazumi, I. and M. Tsukahara, Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J*, 2011. **278**(3): p. 427-41.
245. Mouliere, F., et al., High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e23418.
246. Ding, W.X. and X.M. Yin, Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*, 2012. **393**(7): p. 547-64.
247. Yu, M., Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges. *Mitochondrial DNA*, 2012. **23**(5): p. 329-32.
248. Itagaki, K., et al., Mitochondrial DNA released by trauma induces neutrophil extracellular traps. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0120549.
249. Cools-Lartigue, J., et al., Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*, 2013.
250. Tohme, S., et al., Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res*, 2016. **76**(6): p. 1367-80.
251. Yu, M., Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci*, 2011. **89**(3-4): p. 65-71.

252. Yu, M., Somatic mitochondrial DNA mutations in human cancers. *Adv Clin Chem*, 2012. **57**: p. 99-138.
253. Chatterjee, A., E. Mambo, and D. Sidransky, Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 2006. **25**(34): p. 4663-74.
254. Stroun, M., et al., About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*, 2001. **313**(1-2): p. 139-42.
255. Stroun, M., et al., Presence of RNA in the nucleoprotein complex spontaneously released by human lymphocytes and frog auricles in culture. *Cancer Res*, 1978. **38**(10): p. 3546-54.
256. Bronkhorst, A.J., et al., Sequence analysis of cell-free DNA derived from cultured human bone osteosarcoma (143B) cells. *Tumour Biol*, 2018. **40**(9): p. 1010428318801190.
257. Kumar, P., et al., Normal and Cancerous Tissues Release Extrachromosomal Circular DNA (eccDNA) into the Circulation. *Mol Cancer Res*, 2017. **15**(9): p. 1197-1205.
258. Fenech, M., et al., Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 2011. **26**(1): p. 125-32.
259. Zhu, J., et al., Molecular characterization of cell-free eccDNAs in human plasma. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 10968.
260. Reckamp, K.L., et al., A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *J Thorac Oncol*, 2016. **11**(10): p. 1690-700.
261. Lo, Y.M., et al., Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*, 1999. **64**(1): p. 218-24.
262. Stroun, M., et al., Circulating nucleic acids in higher organisms. *Int Rev Cytol*, 1977. **51**: p. 1-48.
263. Thierry, A.R. and A. Ditschilo, Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(21): p. 5691-8.
264. Borenfreund, E. and A. Bendich, A Study of the Penetration of Mammalian Cells by Deoxyribonucleic Acids. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961. **9**(1): p. 81-91.
265. Gartler, S.M., Cellular uptake of deoxyribonucleic acid by human tissue culture cells. *Nature*, 1959. **184**(Suppl 19): p. 1505-6.
266. Bendich, A., T. Wilczok, and E. Borenfreund, Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis. *Science*, 1965. **148**(3668): p. 374-6.
267. Scott, E.C., et al., A hot L1 retrotransposon evades somatic repression and initiates human colorectal cancer. *Genome Res*, 2016. **26**(6): p. 745-55.
268. Glebova, K., et al., Oxidized extracellular DNA as a stress signal that may modify response to anticancer therapy. *Cancer Lett*, 2015. **356**(1): p. 22-33.
269. Mittra, I., et al., Cell-free chromatin from dying cancer cells integrate into genomes of bystander healthy cells to induce DNA damage and inflammation. *Cell Death Discov*, 2017. **3**: p. 17015.
270. Furi, I., et al., Cell Free DNA of Tumor Origin Induces a 'Metastatic' Expression Profile in HT-29 Cancer Cell Line. *PLoS One*, 2015. **10**(7): p. e0131699.
271. Ju, Y.S., et al., Frequent somatic transfer of mitochondrial DNA into the nuclear genome of human cancer cells. *Genome Res*, 2015. **25**(6): p. 814-24.
272. Dvorakova, M., et al., DNA released by leukemic cells contributes to the disruption of the bone marrow microenvironment. *Oncogene*, 2013. **32**(44): p. 5201-9.
273. Pisetsky, D.S., The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clin Immunol*, 2012. **144**(1): p. 32-40.
274. Kawasaki, T., T. Kawai, and S. Akira, Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol Rev*, 2011. **243**(1): p. 61-73.
275. Napirei, M., et al., Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet*, 2000. **25**(2): p. 177-81.

276. El Messaoudi, S., et al., Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*, 2013. **424**: p. 222-30.
277. Diehl, F., et al., Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(45): p. 16368-73.
278. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(16): p. 9236-41.
279. Oh, J.E., et al., Detection of low-level KRAS mutations using PNA-mediated asymmetric PCR clamping and melting curve analysis with unlabeled probes. *J Mol Diagn*, 2010. **12**(4): p. 418-24.
280. Watanabe, K., et al., EGFR Mutation Analysis of Circulating Tumor DNA Using an Improved PNA-LNA PCR Clamp Method. *Can Respir J*, 2016. **2016**: p. 5297329.
281. Spindler, K.L., et al., Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(4): p. 1177-85.
282. Milbury, C.A., et al., Multiplex amplification coupled with COLD-PCR and high resolution melting enables identification of low-abundance mutations in cancer samples with low DNA content. *J Mol Diagn*, 2011. **13**(2): p. 220-32.
283. Diehl, F., et al., BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods*, 2006. **3**(7): p. 551-9.
284. Sanmamed, M.F., et al., Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem*, 2015. **61**(1): p. 297-304.
285. Hindson, B.J., et al., High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*, 2011. **83**(22): p. 8604-10.
286. Han, X., J. Wang, and Y. Sun, Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017. **15**(2): p. 59-72.
287. Maia, M.C., M. Salgia, and S.K. Pal, Harnessing cell-free DNA: plasma circulating tumour DNA for liquid biopsy in genitourinary cancers. *Nat Rev Urol*, 2020. **17**(5): p. 271-291.
288. Oxnard, G.R., C.P. Paweletz, and L.M. Sholl, Genomic Analysis of Plasma Cell-Free DNA in Patients With Cancer. *JAMA Oncol*, 2017. **3**(6): p. 740-741.
289. Phallen, J., et al., Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*, 2017. **9**(403).
290. Babjuk, M., et al., EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*, 2017. **71**(3): p. 447-461.
291. Birkenkamp-Demtroder, K., et al., Genomic Alterations in Liquid Biopsies from Patients with Bladder Cancer. *Eur Urol*, 2016. **70**(1): p. 75-82.
292. Christensen, E., et al., Liquid Biopsy Analysis of FGFR3 and PIK3CA Hotspot Mutations for Disease Surveillance in Bladder Cancer. *Eur Urol*, 2017. **71**(6): p. 961-969.
293. Birkenkamp-Demtroder, K., et al., Monitoring Treatment Response and Metastatic Relapse in Advanced Bladder Cancer by Liquid Biopsy Analysis. *Eur Urol*, 2018. **73**(4): p. 535-540.
294. Todenhöfer T., V.G., Struss W., Annala M., Beja K., Eigl B., Mischinger J., Stenzl A., Black P., Wyatt A., Using liquid biopsy to assess the genomic landscape of metastatic urothelial carcinoma. *European Urology Supplements*, 2017. **16**(3): p. e677-e678.
295. Iyer, G., et al., Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. *Science*, 2012. **338**(6104): p. 221.
296. Choudhury, N.J., et al., Afatinib Activity in Platinum-Refractory Metastatic Urothelial Carcinoma in Patients With ERBB Alterations. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(18): p. 2165-71.
297. Plimack, E.R., et al., Defects in DNA Repair Genes Predict Response to Neoadjuvant Cisplatin-based Chemotherapy in Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*, 2015. **68**(6): p. 959-67.
298. Necchi, A., et al., Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(34): p. 3353-3360.

299. Agarwal, N., et al., Characterization of metastatic urothelial carcinoma via comprehensive genomic profiling of circulating tumor DNA. *Cancer*, 2018. **124**(10): p. 2115-2124.
300. Rizvi, N.A., et al., Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 124-8.
301. Snyder, A., et al., Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*, 2014. **371**(23): p. 2189-2199.
302. Rosenberg, J.E., et al., Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*, 2016. **387**(10031): p. 1909-20.
303. Khagi, Y., et al., Hypermutated Circulating Tumor DNA: Correlation with Response to Checkpoint Inhibitor-Based Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(19): p. 5729-5736.
304. Loriot, Y., et al., Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 2019. **381**(4): p. 338-348.
305. Liu, M.C.e.a., Plasma cell-free DNA (cfDNA) assays for early multi-cancer detection: the circulating cell-free genome atlas (CCGA) study. *Ann. Oncol. ,* 2018. **29 (Suppl. 8)**, : p.viii14.
306. Pietzak, E.J., et al., Next-generation Sequencing of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Reveals Potential Biomarkers and Rational Therapeutic Targets. *Eur Urol*, 2017. **72**(6): p. 952-959.
307. Robertson, A.G., et al., Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 2017. **171**(3): p. 540-556 e25.
308. Hauser, S., et al., Cell-free serum DNA in patients with bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *Anticancer Res*, 2012. **32**(8): p. 3119-24.
309. Ohl, F., et al., Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. *J Urol*, 2006. **175**(5): p. 1915-20.
310. Duenas, M., et al., Gene Expression Analyses in Non Muscle Invasive Bladder Cancer Reveals a Role for Alternative Splicing and Tp53 Status. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 10362.
311. Chan, K.C., et al., Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(13): p. 4141-5.
312. Boddy, J.L., et al., The role of cell-free DNA size distribution in the management of prostate cancer. *Oncol Res*, 2006. **16**(1): p. 35-41.
313. Salvianti, F., et al., Integrity and Quantity of Total Cell-Free DNA in the Diagnosis of Thyroid Cancer: Correlation with Cytological Classification. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(7).
314. Cheng, J., et al., Cell-Free Circulating DNA Integrity Based on Peripheral Blood as a Biomarker for Diagnosis of Cancer: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017. **26**(11): p. 1595-1602.
315. Heidenblad, M., et al., Tiling resolution array CGH and high density expression profiling of urothelial carcinomas delineate genomic amplicons and candidate target genes specific for advanced tumors. *BMC Med Genomics*, 2008. **1**: p. 3.
316. Antoni, S., et al., Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*, 2017. **71**(1): p. 96-108.
317. Torre, L.A., et al., Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
318. Warrick, J.I., et al., Intratumoral Heterogeneity of Bladder Cancer by Molecular Subtypes and Histologic Variants. *Eur Urol*, 2019. **75**(1): p. 18-22.
319. Castillo-Martin, M., et al., Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol*, 2010. **28**(4): p. 401-8.
320. Kamat, A.M., et al., Bladder cancer. *Lancet*, 2016. **388**(10061): p. 2796-2810.
321. Sylvester, R.J., et al., Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 2006. **49**(3): p. 466-5; discussion 475-7.

322. Fernandez-Gomez, J., et al., Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol*, 2009. **182**(5): p. 2195-203.
323. Prasad, S.M., et al., Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts. *Nat Rev Urol*, 2011. **8**(11): p. 631-42.
324. van Rhijn, B.W., et al., Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol*, 2009. **56**(3): p. 430-42.
325. DeSantis, C.E., et al., Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 2014. **64**(4): p. 252-71.
326. Svatek, R.S., et al., Discrepancy between clinical and pathological stage: external validation of the impact on prognosis in an international radical cystectomy cohort. *BJU Int*, 2011. **107**(6): p. 898-904.
327. Lotan, Y. and C.G. Roehrborn, Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology*, 2003. **61**(1): p. 109-18; discussion 118.
328. Svatek, R.S., et al., The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. *Eur Urol*, 2014. **66**(2): p. 253-62.
329. Truta, A., et al., Health Related Quality of life in bladder cancer. Current approach and future perspectives. *Clujul Med*, 2017. **90**(3): p. 262-267.
330. Tokas, T., et al., Downregulated KLK13 expression in bladder cancer highlights tumor aggressiveness and unfavorable patients' prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017. **143**(3): p. 521-532.
331. Rampias, T., et al., A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. *Nat Med*, 2014. **20**(10): p. 1199-205.
332. Avgeris, M., et al., Uncovering the clinical utility of miR-143, miR-145 and miR-224 for predicting the survival of bladder cancer patients following treatment. *Carcinogenesis*, 2015. **36**(5): p. 528-37.
333. Avgeris, M., et al., Loss of GAS5 tumour suppressor lncRNA: an independent molecular cancer biomarker for short-term relapse and progression in bladder cancer patients. *Br J Cancer*, 2018. **119**(12): p. 1477-1486.
334. Tsikrika, F.D., et al., miR-221/222 cluster expression improves clinical stratification of non-muscle invasive bladder cancer (TaT1) patients' risk for short-term relapse and progression. *Genes Chromosomes Cancer*, 2018. **57**(3): p. 150-161.
335. Pantel, K. and C. Alix-Panabieres, Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*, 2010. **16**(9): p. 398-406.
336. Kustanovich, A., et al., Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther*, 2019. **20**(8): p. 1057-1067.
337. Zhu, Y.J., et al., Quantitative cell-free circulating EGFR mutation concentration is correlated with tumor burden in advanced NSCLC patients. *Lung Cancer*, 2017. **109**: p. 124-127.
338. Valpione, S., et al., Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients. *Eur J Cancer*, 2018. **88**: p. 1-9.
339. Arko-Boham, B., et al., Circulating cell-free DNA integrity as a diagnostic and prognostic marker for breast and prostate cancers. *Cancer Genet*, 2019. **235-236**: p. 65-71.
340. Casadio, V., et al., Urine cell-free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: preliminary data. *Urol Oncol*, 2013. **31**(8): p. 1744-50.
341. Holdenrieder, S., et al., DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1137**: p. 162-70.
342. Urosevic N, I.T., Grasko J and Lim EM, Evaluation of Clinical Laboratory Methods for Plasma Cell-Free DNA Analysis in Suspected Septicaemia. *J Med Diagn Meth*, 2013. **2**(3).

- 343. Bronkhorst, A.J., V. Ungerer, and S. Holdenrieder, Comparison of methods for the isolation of cell-free DNA from cell culture supernatant. *Tumour Biol*, 2020. **42**(4): p. 1010428320916314.
- 344. Bronkhorst, A.J., V. Ungerer, and S. Holdenrieder, Comparison of methods for the quantification of cell-free DNA isolated from cell culture supernatant. *Tumour Biol*, 2019. **41**(8): p. 1010428319866369.
- 345. Hussein, N.A., S.N. Mohamed, and M.A. Ahmed, Plasma ALU-247, ALU-115, and cfDNA Integrity as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Breast Cancer. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019. **187**(3): p. 1028-1045.
- 346. Guo, G., et al., Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet*, 2013. **45**(12): p. 1459-63.
- 347. Bedin, C., et al., Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Int J Cancer*, 2017. **140**(8): p. 1888-1898.