



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ
ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ 1 (MCT1) ΣΕ
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΩΙΜΟ
ΜΗ- ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΖΑΦΕΙΡΙΑΔΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ
ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ 1 (MCT1) ΣΕ
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΩΙΜΟ
ΜΗ- ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΖΑΦΕΙΡΙΑΔΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ
ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ 1 (MCT1) ΣΕ
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΩΙΜΟ
ΜΗ- ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΖΑΦΕΙΡΙΑΔΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Αθηνά Μάρκου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα
Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Αθηνά Μάρκου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ
- Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ
- Γαλάτεια Καλλέργη, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΑΘΗΝΑ 2021

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Κλινική Βιοχημεία- Μοριακή Διαγνωστική», υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Κας Α. Μάρκου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Κα Μάρκου για την ανάθεση του πολύ ενδιαφέροντος ερευνητικού θέματος, αλλά κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε, τόσο σε πειραματικό επίπεδο με την άψογη κατάρτισή της και τις γνώσεις της, όσο και σε προσωπικό επίπεδο για την ψυχολογική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια Κα Ε. Λιανίδου και για τη δυνατότητα εκπόνησης της εργασίας μου στο εργαστήριό της, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις πολύτιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια της κατάρτισής μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Κα Γ. Καλλέργη για το χρόνο και τις σημαντικές της παρατηρήσεις ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Ευχαριστώ τους υπεύθυνους ιατρούς Β. Γεωργούλια, Λ. Τουφεκτζιάν, Κ. Πόταρη, Ε. Σεψά για τη διάθεση των βιολογικών δειγμάτων των ασθενών με ΜΜΚΠ από τα νοσοκομεία Metropolitan General και Γ.Ν.Ν.Θ.Α. <<Η ΣΩΤΗΡΙΑ>>.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις μεταδιδάκτορες Δρ. Αρετή Στρατή και Δρ. Μάρθα Ζαβρίδου για τις συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους καθ' όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής μου πορείας. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Θεοδώρα Λόντρα για τη βοήθειά της σε πειραματικό αλλά και προσωπικό επίπεδο, πάντα δίπλα μου με την καλή της διάθεση. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Αλίκη Ντζιφά, Δήμητρα Στεργιοπούλου, Σταυρούλα Σμίλκου και Βικτώρια Τσερπέλη για τη βοήθειά τους και το ευχάριστο εργαστηριακό κλίμα, καθώς και τους μεταπτυχιακούς μου συναδέλφους Ιωάννη Κόλλια και Ελπίδα Παπαδοπούλου για όλες τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με στηρίζουν διαρκώς σε κάθε μου βήμα όλα αυτά τα χρόνια.

ΑΘΗΝΑ 2021

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦ.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Μεταστατική διαδικασία.....	3
1.3 Μη- Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα.....	7
1.3.1 Εισαγωγή.....	7
1.3.2 Διάγνωση	8
1.3.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις	9
2. ΚΕΦ. 2 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ WARBURG ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ.....	11
2.1 Εισαγωγή	11
2.2 Φαινόμενο Warburg	13
2.2.1 Εισαγωγή.....	13
2.2.2 Φαινόμενο Warburg και μεταστάσεις	17
2.3 Μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς	18
2.3.1 Εισαγωγή.....	18
2.3.2 Έκφραση μονοκαρβοξυλικών μεταφορέων.....	21
2.3.3 Μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς στον καρκίνο.....	22
2.3.4 Μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς στο «Αντίστροφο Φαινόμενο Warburg» 24	
2.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις	25
3. ΚΕΦ. 3 ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ.....	27
3.1 Εισαγωγή	27
3.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα	29
3.2.1 Εισαγωγή.....	29

3.2.2	Αναλυτικές τεχνικές για την απομόνωση, καταμέτρηση και ανίχνευση των CTCs	29
3.3	CTCs στον Καρκίνο του Πνεύμονα.....	36
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....		38
4.	ΚΕΦ. 4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
4.1	Υλικά.....	39
4.1.1	Συλλογή κλινικών δειγμάτων	39
4.1.2	Κυτταρικές σειρές	40
4.2	Απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με το σύστημα Parsortix (ANGLE plc, UK)	40
4.2.1	Αρχή μεθόδου	40
4.2.2	Αντιδραστήρια και πειραματική πορεία	42
4.3	Απομόνωση ολικού RNA με το αντιδραστήριο TRIzol- LS (Thermo Fisher Scientific,USA)	43
4.3.1	Αρχή μεθόδου	43
4.3.2	Αντιδραστήρια και πειραματική πορεία	44
4.4	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	46
4.4.1	Αρχή μεθόδου	46
4.4.2	Αντιδραστήρια και πειραματική πορεία	46
4.5	Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης.....	48
4.5.1	Αρχή μεθόδου	48
4.5.2	Αντιδραστήρια και πειραματική πορεία	51
4.6	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	53
4.6.1	Αρχή μεθόδου	53
4.6.2	Αντιδραστήρια	56
4.6.3	Οργανολογία.....	57

4.6.4	<i>In silico</i> σχεδιασμός εκκινητών	59
5.	ΚΕΦ. 5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ 1 (MCT1) ΣΕ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	61
5.1	Πειραματική πορεία	61
5.1.1	Συνθήκες αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς <i>B2M</i> ..	62
5.1.2	Συνθήκες αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου <i>MCT1</i>	64
5.1.3	Συνθήκες αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου <i>MCT4</i>	65
5.2	Κλινικά δείγματα	67
5.3	Κανονικοποίηση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των <i>MCT1</i> και <i>MCT4</i> στα CTCs	67
5.4	Στατιστική επεξεργασία	68
5.5	Πειραματικά αποτελέσματα	68
5.5.1	Ανίχνευση μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς <i>B2M</i>	68
5.5.2	Ανίχνευση μεταγράφων του <i>MCT1</i> σε CTCs υγιών ατόμων και ασθενών με πρώιμο MMKP	70
5.5.3	Ανίχνευση μεταγράφων του <i>MCT4</i> σε CTCs υγιών ατόμων και ασθενών με πρώιμο MMKP	72
5.5.4	Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης μεταξύ των γονιδίων <i>MCT1</i> και <i>MCT4</i> σε ασθενείς με πρώιμο MMKP	75
5.5.5	Κλινική αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων <i>MCT1</i> και <i>MCT4</i> στα CTCs ασθενών με MMKP	75
5.5.6	Συσχέτιση της υπερέκφρασης του <i>MCT1</i> με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πρώιμο MMKP στα χρονικά διαστήματα πριν και ένα μήνα μετά το χειρουργείο	77
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	80
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	83

6. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	87
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	101
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	104
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	105
ABSTRACT	107

ΚΕΦ.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1 Εισαγωγή

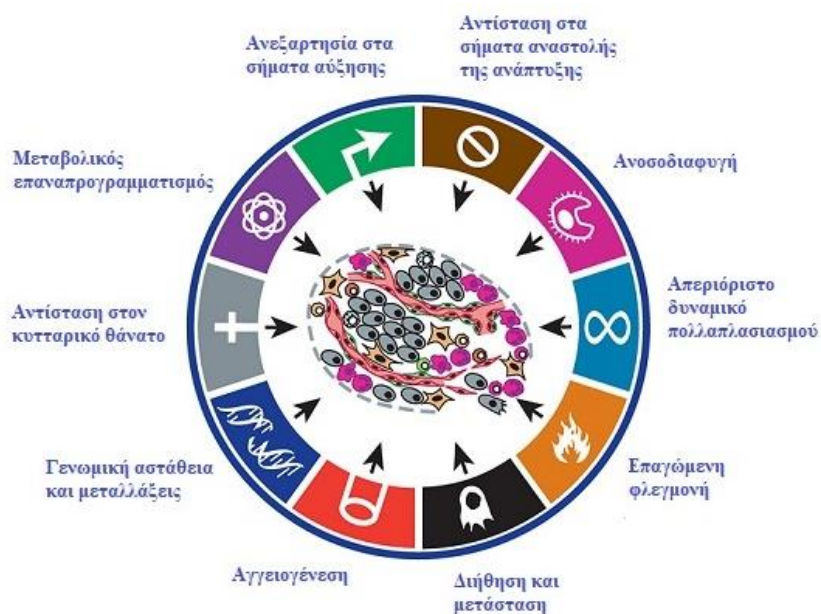
Οι ρίζες της λέξης “καρκίνος” αποδίδονται στον Ιπποκράτη (460-370 π.Χ.), ο οποίος θεωρείται ο “Πατέρας της Ιατρικής”. Ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε τις λέξεις “καρκίνος” και “καρκίνωμα” για να περιγράψει μη ελκώδεις ή ελκώδεις μορφοποιήσεις όγκων. Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από την ανώμαλη ανάπτυξη των κυττάρων του οργανισμού, που έχουν την τάση να πολλαπλασιάζονται μη ελεγχόμενα και σε μερικές περιπτώσεις να δημιουργούν μεταστάσεις. Τα καρκινικά κύτταρα παύουν να ανταποκρίνονται κατάλληλα στα σήματα που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την υπερβολική ανάπτυξη και διαίρεσή τους, διεισδύοντας έτσι στους φυσιολογικούς ιστούς και όργανα. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός δύναται να συμβεί σε οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο, γεγονός που εξηγεί τα διαφορετικά είδη καρκίνου και τη διαφορετική συμπεριφορά και ανταπόκριση σε θεραπείες (1).

Ο καρκίνος αποτελεί μια γενετική ασθένεια και προκαλείται από γενετικές τροποποιήσεις γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη σωστή λειτουργία, ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων. Οι γενετικές αλλαγές είναι δυνατόν να εμφανιστούν στον οργανισμό λόγω κληρονομικότητας, λόγω λαθών που μπορούν να συμβούν κατά τη διαίρεση ή εξαιτίας επιβλαβών παραγόντων του περιβάλλοντος (χημικά και ακτινοβολίες). Τα γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις οδηγούν στην ανάπτυξη του όγκου χωρίζονται κυρίως σε τρεις κατηγορίες: τα ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Τα **ογκογονίδια** προκύπτουν από μεταλλάξεις σε πρωτο- ογκογονίδια. Ενώ τα τελευταία εμπλέκονται στη φυσιολογική ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων, όταν μεταλλάσσονται και ενεργοποιούνται σε υψηλότερο βαθμό από το φυσιολογικό μετατρέπονται στα ογκογονίδια. Τα ογκογονίδια είναι υπεύθυνα για την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων και την επιβίωσή τους έπειτα από αποφυγή των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Τα **ογκοκατασταλτικά** γονίδια έχουν την ικανότητα να σταματούν την κυτταρική διαίρεση όταν δεν ακολουθεί τους περιορισμούς του κυττάρου, επομένως οποιαδήποτε μεταλλαγή που οδηγεί σε σίγαση των γονιδίων αυτών έχει ως αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Τέλος, τα **γονίδια επιδιόρθωσης του DNA** είναι κρίσιμα σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου,

επομένως μεταλλάξεις σε αυτά οδηγούν συχνά σε ανάπτυξη μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια, καθώς και σε αλλαγές στα χρωμοσώματά τους (διπλασιασμοί, ελλείψεις). Όλα αυτά τα γεγονότα σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες έχουν ως συνέπεια την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (2).

Τις τελευταίες δεκαετίες το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς το μικροπεριβάλλον του όγκου, καθώς φαίνεται να αποτελεί ένα συμπαράγοντα για την έναρξη, την εξέλιξη, την ανοσοδιαφυγή του όγκου αλλά και την αντίσταση στις θεραπείες. Σύμφωνα με την ανανεωμένη έκδοση του “Hallmarks of Cancer”, τα δέκα χαρακτηριστικά του καρκίνου είναι τα εξής (Σχήμα 1.1) (3):

1. Ανεξάρτητη, από τα σήματα αύξησης, ανάπτυξη του όγκου
2. Αντίσταση στα σήματα αναστολής της ανάπτυξης
3. Ανοσοδιαφυγή
4. Απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού
5. Επαγόμενη από τον όγκο φλεγμονή
6. Διήθηση στους ιστούς και μετάσταση
7. Επαγόμενη από τον όγκο αγγειογένεση
8. Γενομική αστάθεια και μεταλλάξεις
9. Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο
10. Επαναπρογραμματισμός του κυτταρικού μεταβολισμού

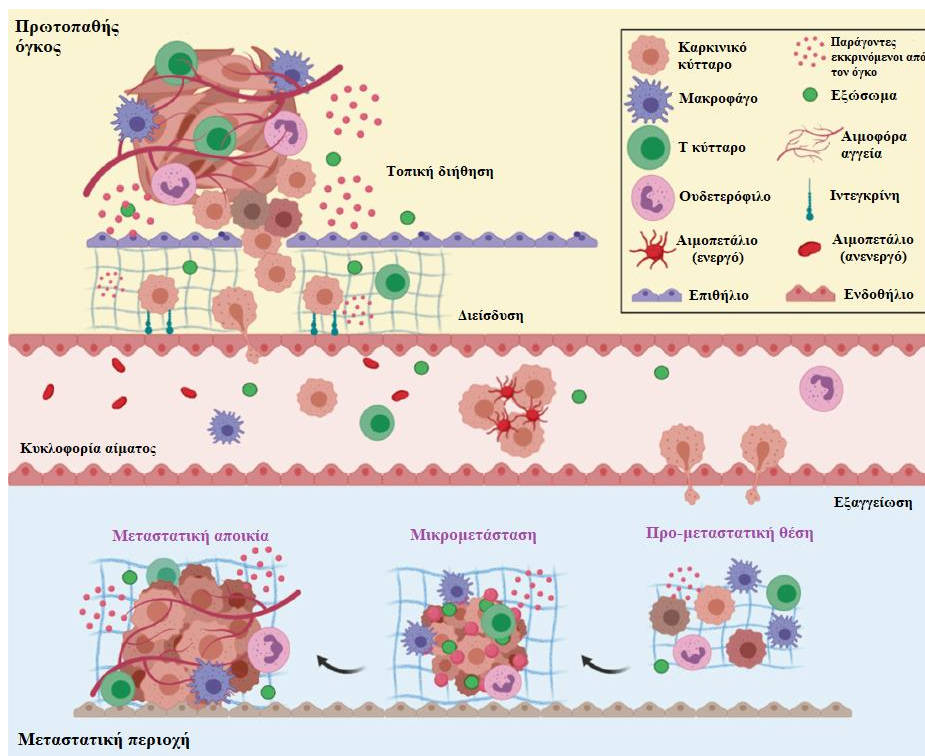


Σχήμα 1.1. Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (3)

1.2 Μεταστατική διαδικασία

Οι μεταστάσεις είναι η μεγαλύτερη αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο και παρ' όλες τις εξελίξεις που έχουν σημειωθεί η περίπλοκη διαδικασία της μετάστασης παραμένει μέχρι και σήμερα ελάχιστα κατανοητή. Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο σε απομακρυσμένες περιοχές και η εγκαθίδρυση νέων αποικιών στα απομακρυσμένα όργανα, αποτελούν την περίπλοκη και πολλών σταδίων διαδικασία της μετάστασης (4). Ήδη από το 1889 ο Stephen Pagen περιέγραψε την «Υπόθεση Σπόρων και Εδάφους» (“The seed and soil hypothesis”) που υποστήριζε ότι η μετάσταση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων (the seeds) με συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον άλλων οργάνων (the soil), που επανεξετάστηκε πολλά χρόνια μετά από τον Fidler (4). Η αλληλουχία γεγονότων που θα οδηγήσει εν τέλει σε μεταστάσεις αποτελείται από τα εξής διαδοχικά στάδια (**Σχήμα 1.2**):

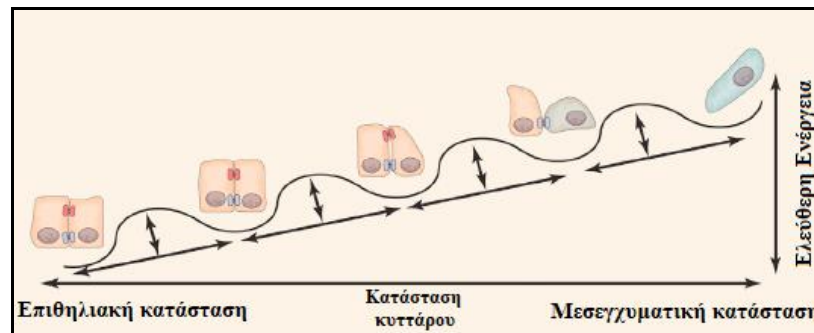
1. **Τοπική διήθηση** των κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου στον περιβάλλον ιστό
2. **Διείσδυσή** τους στην κυκλοφορία του αίματος και επιβίωση στις δύσκολες συνθήκες της αιματογενούς διασποράς
3. **Εξαγγείωση** μέσω των αγγειακών τοιχωμάτων στο παρέγχυμα των απομακρυσμένων ιστών
4. Πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων και μετατροπή των μικρών αποικιών σε κλινικά ανιχνεύσιμες **μεταστατικές εστίες (αποικισμός)**



Σχήμα 1.2. Η μεταστατική διαδικασία. Τα πέντε κύρια βήματα που περιλαμβάνουν την τοπική διήθηση, διείσδυση, μεταφορά μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, εξαγγείωση και αποικισμό. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (5)

Το βιολογικό υπόβαθρο που ευθύνεται για την ανάπτυξη και εγκαθίδρυση μεταστάσεων είναι ελάχιστα κατανοητό, παρ' όλα αυτά υπάρχουν κάποιες βασικές βιολογικές πορείες που φαίνεται πως διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διασπορά των καρκινικών κυττάρων (6). Μια βασική διαδικασία που φαίνεται πως συνεισφέρει σημαντικά στα πρώτα στάδια της μετάστασης, είναι η **Επιθηλιακή- Μεσεγχυματική Μετάβαση** (Epithelial-Mesenchymal Transition- EMT). Η EMT προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα χαρακτηριστικά που είναι αναγκαία για τη διήθησή τους και την ανάπτυξη μεταστάσεων, όπως αυτά της διασποράς, της αυξημένης κινητικότητας, της διείσδυσης, καθώς και την ικανότητα να αποικοδομούν συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (7). Η μετάβαση από την επιθηλιακή στη μεσεγχυματική κατάσταση απαιτεί τη διάλυση των ισχυρών ενώσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και την απώλεια της πολικότητάς τους, με αποτέλεσμα τη μετατροπή από μια συστάδα επιθηλιακών κυττάρων σε ξεχωριστά κύτταρα με μεσεγχυματικές ιδιότητες, όπως η αυξημένη ικανότητα διείσδυσης και διαφοροποίησης (8). Σήμερα είναι γνωστό ότι η EMT δεν αποτελεί απλά μια επιλογή είτε επιθηλιακής ή μεσεγχυματικής κατάστασης, παρά μια **δυναμική διαδικασία** με ένα ευρύ φάσμα σταδίων μετατροπής, όπου τα καρκινικά

κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα μπορούν και διατηρούν ορισμένα επιθηλιακά χαρακτηριστικά (**Σχήμα 1.3**). Η μετάβαση από τη μια κατάσταση στην άλλη επάγεται από ένα πλήθος αυξητικών παραγόντων και σηματοδοτικών μονοπατιών (5). Τα καρκινικά κύτταρα που χαρακτηρίζονται από το συνδυασμό επιθηλιακών και μεσεγχυματικών ιδιοτήτων είναι πιο ανθεκτικά στις δύσκολες συνθήκες της κυκλοφορίας του αίματος και τείνουν να έχουν καλύτερες πιθανότητες στην ανάπτυξη μεταστάσεων (9). Παρ' όλα αυτά, στην εξέλιξη του όγκου και την έναρξη της μεταστατικής διαδικασίας, φαίνεται πως εκτός από την EMT κρίσιμο ρόλο διαδραματίζουν και κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος. Έρευνες υποδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο της παρουσίας των ινοβλαστών που σχετίζονται με το καρκίνο (Cancer- associated Fibroblasts- CAFs) ως τα κυρίαρχα κύτταρα στη διαδικασία διήθησης των καρκινωμάτων (10).



Σχήμα 1.3. Η διαδικασία EMT. Τα ενδιάμεσα στάδια μετάβασης του κυττάρου από την επιθηλιακή στη μεσεγχυματική κατάσταση. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (6)

Τα καρκινικά κύτταρα αργά ή γρήγορα θα καταφέρουν να διεισδύσουν στα αγγεία των γειτονικών ιστών ή στα νέα αγγεία που έχουν προκύψει λόγω της καρκινογένεσης και θα εισέλθουν στην κυκλοφορία ως **κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα** (Circulating Tumor Cells- CTCs) (Κεφάλαιο 3) είτε με τη μορφή μονήρων κυττάρων είτε ως συμπλέγματα (CTC clusters) (6). Ο χρόνος μεταφοράς των καρκινικών κυττάρων στο αίμα είναι μόλις μερικά λεπτά και τα CTCs αναγκάζονται να ξεπεράσουν πολλά εμπόδια προκειμένου να καταφέρουν να αποικίσουν σε άλλα όργανα. Οι δυσκολίες αυτές αφορούν τις φυσικές πιέσεις που υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος, όπως την υδροδυναμική πίεση και διατμητικές τάσεις, ενώ καλούνται να ανταπεξέλθουν και στην αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος και κυρίως των φυσικών φονικών κυττάρων (11). Εκτός από το δυσμενές περιβάλλον του κυκλοφορικού συστήματος, τα CTCs απειλούνται επιπλέον και από τα σημεία ελέγχου

των ίδιων των κυττάρων, με πιο σημαντικό το θάνατο “apoptosis”. Ο προγραμματισμένος αυτός θάνατος αποτελεί την επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα όταν αυτά παύουν να προσκολλώνται στην εξωκυττάρια μήτρα και σε γειτονικά κύτταρα (12), καθιστώντας έτσι τα CTCs ευάλωτα σε αυτή τη διαδικασία. Για την προσπέλαση αυτού του σημείου ελέγχου παρατηρείται σε πολλά καρκινικά κύτταρα η αύξηση της έκφρασης του HIF-1 λόγω υποξίας, που παρέχει μια προστασία έναντι του “apoptosis”. Ο μηχανισμός αυτός εξαρτάται από τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό που υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα (Κεφάλαιο 2). Στην επιβίωσή τους συνεισφέρουν επιπλέον αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος, όπως αιμοπετάλια, ουδερετόφιλα, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα, που προσφέρουν σημαντική βοήθεια στην εξαγγείωση των CTCs και την εισαγωγή τους στο παρέγχυμα απομακρυσμένων ιστών (6). Τελικό βήμα στην ανάπτυξη ανιχνεύσιμων μεταστατικών εστιών αποτελεί η ικανότητα πολλαπλασιασμού των **διασπαρμένων καρκινικών κυττάρων** (Disseminated Tumor Cells- DTCs). Τα DTCs έπειτα από την εξαγγείωση βρίσκονται σε ένα επίσης μη ευνοϊκό περιβάλλον του νέου ιστού, με διαφορετικά στρωματικά κύτταρα, αυξητικούς παράγοντες και ουσίες της εξωκυττάριας μήτρας. Σε αυτό το καινούριο περιβάλλον ακολουθούν δύο πορείες: είτε παραμένουν στην αδράνεια, αποτέλεσμα που αντικατοπτρίζει την αποτυχία των DTCs να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες, είτε κατορθώνουν να πολλαπλασιαστούν και να δημιουργήσουν νέους κλώνους καρκινικών κυττάρων. Στην τελευταία περίπτωση, φαίνεται πως κρίσιμο ρόλο διαδραματίζει η **Μεσεγγυματική- Επιθηλιακή Μετάβαση** (Mesenchymal-to-Epithelial Transition, MET), που επιτρέπει στα DTCs την επαναφορά ορισμένων επιθηλιακών χαρακτηριστικών και της κυτταρικής οργάνωσης που χαρακτήριζε τον πρωτοπαθή όγκο (13). Η MET συμβαίνει σε πολλά κύτταρα κατά τον αποικισμό σε άλλα όργανα και φαίνεται να είναι αναγκαία για την εγκαθίδρυση μεταστάσεων (14).

Μέχρι σήμερα έχουν γίνει πολυάριθμες έρευνες στον τομέα του καρκίνου και όλες οι προσπάθειες έχουν οδηγήσει ένα βήμα πιο κοντά στην κατανόηση των πρώιμων σταδίων, παρ’ όλα αυτά το υπόβαθρο και οι μηχανισμοί της μετάστασης παραμένουν κατά ένα μεγάλο βαθμό άλυτα μυστήρια. Για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπειών κρίνεται αναγκαία η διαλεύκανση τόσο των αλληλεπιδράσεων και της επικοινωνίας μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, όσο και του ακριβούς τρόπου

συνεισφοράς των υπολοίπων κυττάρων και παραγόντων που φαίνεται πως είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την εξέλιξη του όγκου.

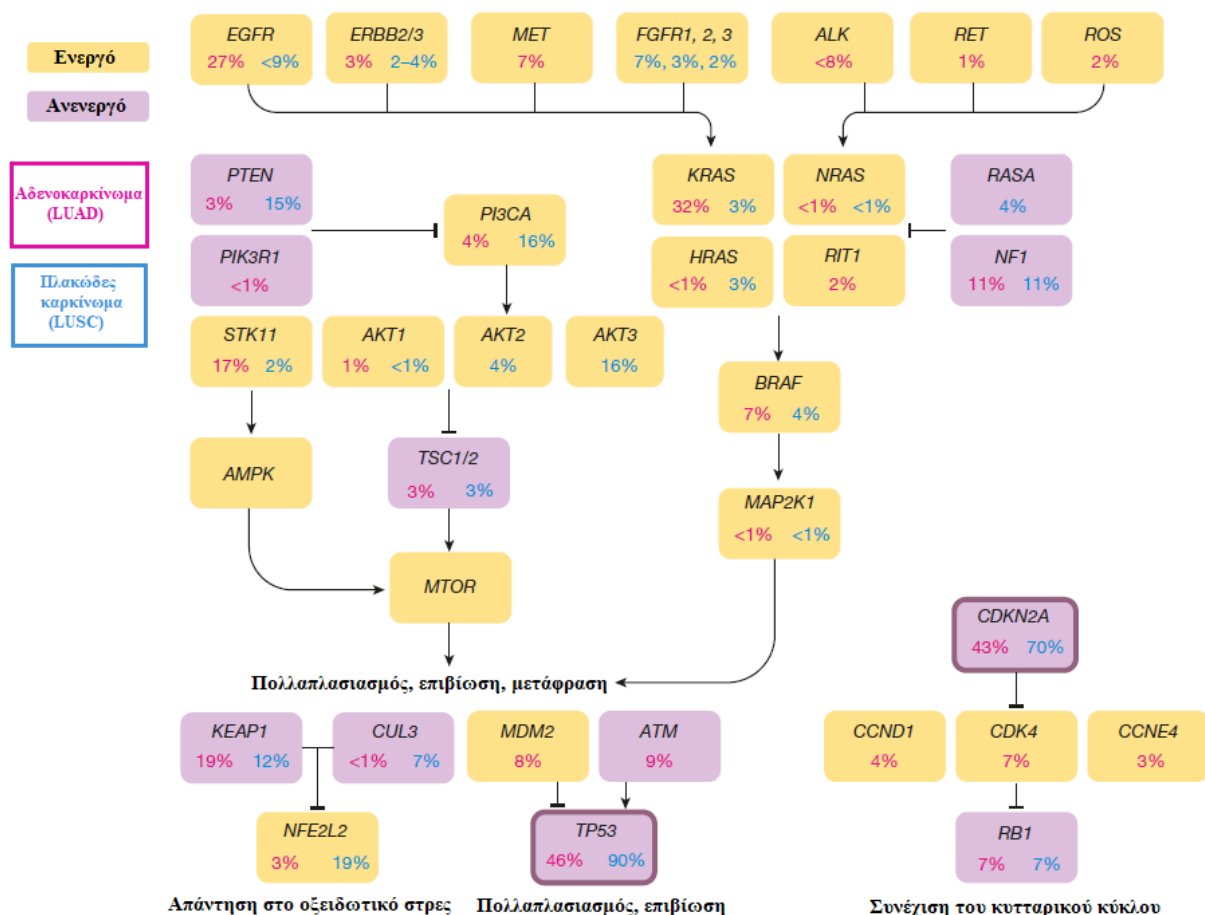
1.3 Μη- Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα

1.3.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο συχνή αιτία θανάτου παγκοσμίως, με τα τελευταία δεδομένα να δείχνουν ότι το 2020 σημειώθηκαν εξαιτίας αυτού περίπου 1.8 εκατομμύρια θάνατοι (15). Αποτελεί μια μοριακά ετερογενή ασθένεια, γι' αυτό καθίσταται κρίσιμη η κατανόηση της βιολογίας του για την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών. Η πιο γνωστή αιτιολογία εμφάνισης της νόσου είναι το κάπνισμα, με το ποσοστό να υπερβαίνει το 80% των περιπτώσεων στην Αμερική και σε άλλες χώρες στις οποίες συνηθίζεται το κάπνισμα. Αντίθετα, στους μη καπνιστές η νόσος συναντάται κυρίως σε γυναίκες και στην Ανατολική Ασία και φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση με περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το παθητικό κάπνισμα και η μόλυνση με καρκινογόνα, καθώς και με την κληρονομική προδιάθεση (16).

Υπάρχουν δύο κύρια είδη στον καρκίνο του πνεύμονα, ο **Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα (ΜΚΠ)** και ο **Μη- Μικροκυτταρικός καρκίνος του Πνεύμονα (ΜΜΚΠ)**. Το 80- 85% των περιπτώσεων είναι του τύπου ΜΜΚΠ. Ο ΜΜΚΠ χωρίζεται σε τρία επιμέρους είδη, το Αδενοκαρκίνωμα, το Πλακώδες Καρκίνωμα και το Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα. Ενώ οι υπότυποι αυτοί ξεκινούν από διαφορετικούς τύπους κυττάρων του πνεύμονα, κατηγοριοποιούνται μαζί ως ΜΜΚΠ καθώς η θεραπεία και η πρόγνωσή τους είναι παρόμοια. Αντίθετα, ο ΜΚΠ απαρτίζει τις 10-15% των περιπτώσεων και συνήθως αναπτύσσεται και εξαπλώνεται γρηγορότερα από τον ΜΜΚΠ, έτσι τείνει να ανταποκρίνεται καλύτερα στις χημειοθεραπείες και στη θεραπεία με ακτινοβολία (17).

Όπως και σε άλλες κακοήθειες, έτσι και στον καρκίνο του πνεύμονα υπάρχουν υποπληθυσμοί κυττάρων και κλώνων με διαφορετικά μοριακά χαρακτηριστικά που οδηγούν στην εμφάνιση ετερογένειας εντός του όγκου, γι' αυτό είναι αναγκαία η ταυτοποίηση των κλωνικών γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν νωρίς και κατά την εξέλιξη του όγκου, ούτως ώστε να αναπτυχθούν νέες και πιο στοχευμένες θεραπείες. Οι πιο συνηθισμένες γενετικές αλλαγές στο Αδενοκαρκίνωμα και το Πλακώδες Καρκίνωμα παρατίθενται στο παρακάτω **Σχήμα 1.4**.



Σχήμα 1.4. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στο Αδενοκαρκίνωμα και στο Πλακώδες Καρκίνωμα. Η συχνότητα των αλλαγών βασίζεται στο σύνολο σωματικών μεταλλάξεων, ομόζυγων ελλείψεων, ενισχύσεων και υπερέκφραση ή υποέκφραση γονιδίων. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (18)

Σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS και EGFR συνήθως υφίστανται στους ιδρυτικούς κλώνους, καταδεικνύοντας έτσι το σημαντικό τους ρόλο στην εμφάνιση του όγκου. Οι μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη p53 παρατηρείται συχνότερα σε προχωρημένο στάδιο, γεγονός που υποδεικνύει τη συνεισφορά του στην εξέλιξη του όγκου (18). Στο παραπάνω σχήμα παρουσιάζονται τα ποσοστά εμφάνισης και των υπολοίπων μεταλλάξεων.

1.3.2 Διάγνωση

Στους περισσότερους ασθενείς με υποψία καρκίνου του πνεύμονα είναι αναγκαία η βιοψία ιστού ώστε να γίνει επιβεβαίωση της διάγνωσης και να βρεθεί ο τύπος καρκίνου (Αδενοκαρκίνωμα ή Πλακώδες Καρκίνωμα), ενώ με τη βιοψία αποκτώνται πληροφορίες και για το μοριακό χαρακτηρισμό του όγκου. Απεικονιστικές μέθοδοι

όπως η CT απεικόνιση ή η Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων (PET) είναι πολύ βοηθητικές και δίνουν μια κατεύθυνση ως προς το σημείο από το οποίο είναι αναγκαίο να γίνει λήψη δείγματος ιστού. Σε περίπτωση που οι μεταστατικές περιοχές είναι προσβάσιμες, τότε πραγματοποιείται λήψη δείγματος ιστού που παρέχει πληροφορίες για τη σταδιοποίηση και τη διάγνωση. Μεσοθωρακοσκόπηση της τραχείας, θωρακοσκόπηση και ανάλογες μέθοδοι επιτρέπουν τη βιοψία λεμφαδένων ή ύποπτων ιστών της περιοχής. Οι δύο αυτές μέθοδοι έχουν το μειονέκτημα ότι απαιτούν γενική αναισθησία, όμως παρέχουν μεγάλη ποσότητα δείγματος και μειώνουν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα κάτω από 10%, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου διάγνωσης που χρησιμοποιείται (19).

1.3.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Την τελευταία εικοσαετία η θεραπεία για τον καρκίνο του πνεύμονα έχει εξελιχθεί και από τις κυτταροτοξικές θεραπείες που βασίζονταν αποκλειστικά στη γνώμη του εκάστοτε ιατρού, πλέον το ενδιαφέρον έχει στραφεί στις εξατομικευμένες θεραπείες. Λαμβάνονται υπόψη οι γενετικές αλλαγές καθώς και η κατάσταση του PD-L1 (Programmed Death- Ligand 1) δείκτη του κάθε ατόμου, που προσφέρουν το πλεονέκτημα θεραπειών με στόχευση συγκεκριμένων μορίων ή την αναστολή των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, αντίστοιχα. Οι θεραπείες που στοχεύουν συγκεκριμένους μόρια στον MMKP άρχισαν να εφαρμόζονται ήδη από τη δεκαετία του 1990, ξεκινώντας από τον αναστολέα του EGFR μορίου, τον Gefitinib (18). Σε αυτή την κατηγορία ανήκει ο αναστολέας Erlotinib που έχει συσχετισθεί με μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου που υποτροπίασαν έπειτα από άλλα θεραπευτικά σχήματα (20). Τα θετικά αποτελέσματα των δύο αυτών αναστολέων οδήγησαν ακολούθως στην ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών με στόχευση των ALK ανακατατάξεων, των ROS1 συντήξεων και BRAF μεταλλάξεων που κατέχουν σημαντικό ποσοστό στους κλώνους του MMKP (21). Ο Crizotinib, συγκεκριμένα, αποτελεί έναν ανταγωνιστικό ATP αναστολέα των ALK, MET και ROS1 τυροσινικών κινασών με αποτελεσματικότητα έναντι των τύπων του MMKP που χαρακτηρίζονται από την ανακατάταξη ALK (22). Ο Crizotinib έχει συσχετισθεί με βελτιωμένη ολική ανταπόκριση και Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής (PFS) σε σχέση με κυτταροτοξικές θεραπείες σε ασθενείς που είχαν λάβει προηγούμενες θεραπείες (23).

Τέλος, το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την ανοσοθεραπεία και στην περίπτωση με χρήση κυρίως μονοκλωνικών αντισωμάτων για στόχευση του CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen- 4) και έναντι των PD-1 (Programmed Cell Death Protein- 1) και του προσδέτη του PD-L1. Κατά την καρκινογένεση, η σύνδεση των PD-1 και PD-L1 απενεργοποιεί τα T- λεμφοκύτταρα με αποτέλεσμα την καταστολή της ανοσιακής απόκρισης και την εξέλιξη του όγκου και μεταστάσεων (24). Έτσι, αναστολείς που εμποδίζουν τη σύνδεσή τους δίνουν την ευκαιρία ενεργοποίησης εκ νέου των T- λεμφοκυττάρων και επιτρέπουν ξανά τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των καρκινικών κυττάρων (25). Συνδυασμός μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των PD-1/PD-L1 και CTLA-4 πιθανόν να οδηγήσει σε υψηλότερη και μεγαλύτερης διάρκειας απόκριση του ανοσοποιητικού στον ΜΜΚΠ, όπως φάνηκε σε πειραματικά μοντέλα (26).

ΚΕΦ. 2 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ WARBURG ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ

2.1 Εισαγωγή

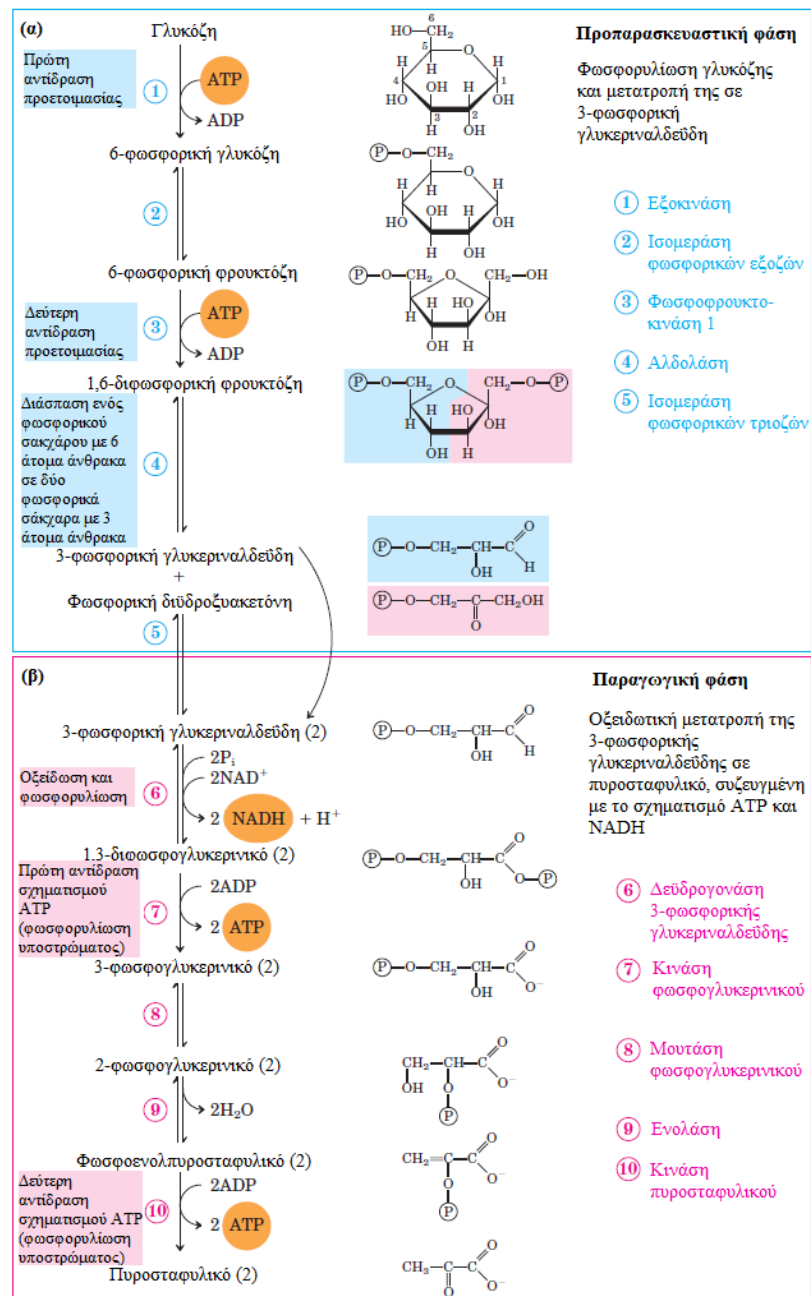
Όλα τα κύτταρα χρειάζονται μια πηγή ενέργειας για την επιβίωση και τη διατήρηση της ομοιόστασής τους. Μια κύρια πηγή ενέργειας στο κύτταρο είναι η γλυκόζη, η οποία καταλαμβάνει κεντρική θέση στο μεταβολισμό των φυτών, των ζώων και πολλών μικροοργανισμών. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης επιτρέπει την αξιοποίηση της ενέργειας υπό μορφή ATP μέσω της οξείδωσης των δεσμών άνθρακα που υπάρχουν στο μόριό της. Η γλυκόζη μεταβολίζεται μέσω της διαδικασίας της **γλυκόλυσης** (glycolysis: “lysis of glucose”) που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και αποτελείται από δέκα, καταλυόμενες από ένζυμα, αντιδράσεις όπου γίνεται μετατροπή της σε πυροσταφυλικό οξύ, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή των υψηλά ενεργειακών μορίων ATP και NADH (**Σχήμα 2.1**) (27). Στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα αποτελεί μια αναερόβια διαδικασία και φυσιολογικά αναστέλλεται υπό την παρουσία οξυγόνου (28).

Το ενεργειακό κέρδος της γλυκόλυσης είναι δύο μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης, ενώ η ενέργεια διατηρείται με το σχηματισμό δύο μορίων NADH ανά μόριο γλυκόζης (29). Επιπλέον, το πυροσταφυλικό οξύ μεταβολίζεται περαιτέρω, ακολουθώντας μια από τρεις πιθανές καταβολικές οδούς:

1. Πρώτη οδός: Οξείδωση σε ακετυλο- συνένζυμο A, το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στον κύκλο του Krebs (TCA cycle) και οξειδώνεται πλήρως σε CO₂. Τα ηλεκτρόνια από αυτές τις οξειδώσεις μεταφέρονται στο οξυγόνο προς σχηματισμό H₂O. Έτσι, η ενέργεια που προκύπτει από τις αντιδράσεις οξείδωσης οδηγεί σε σύνθεση του ATP στο μιτοχόνδριο μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αποδίδοντας περίπου 36 μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης (30).
2. Δεύτερη οδός: Αναγωγή του σε γαλακτικό οξύ. Διαδικασία που συμβαίνει φυσιολογικά στους γραμμωτούς μύες που συστέλλονται έντονα και χαρακτηρίζονται από περιορισμένη παροχή οξυγόνου (**υποξία**). Λόγω της έλλειψης οξυγόνου που αποτελεί δέκτη ηλεκτρονίων, το NADH δεν μπορεί να επανοξειδωθεί σε NAD⁺. Έτσι, το πυροσταφυλικό προσλαμβάνει τα διαθέσιμα

ηλεκτρόνια του NADH και ανάγεται σε γαλακτικό, ενώ το παραγόμενο NAD^+ επιτρέπει τη συνέχεια της γλυκόλυσης (31).

3. Τρίτη οδός: Μετατροπή σε αιθανόλη και CO_2 υπό αναερόβιες ή υποξικές συνθήκες, μια διαδικασία που ονομάζεται αλκοολική ζύμωση (alcohol fermentation) και συμβαίνει σε μερικούς φυτικούς ιστούς και σε ορισμένα ασπόνδυλα, πρώτιστα και μικροοργανισμούς, όπως η μαγιά των ζυθοποιών.



Σχήμα 2.1. Στάδια της γλυκόλυσης. (α) Προπαρασκευαστική φάση και (β) παραγωγική φάση.

Προσαρμογή στα ελληνικά από την πηγή (29)

2.2 Φαινόμενο Warburg

2.2.1 Εισαγωγή

Η γλυκόλυση υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο έτσι ώστε τα επίπεδα του ATP να διατηρούνται σχεδόν σταθερά και να εξασφαλίζονται επαρκείς ποσότητες των ενδιάμεσων της γλυκόλυσης. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς τα περισσότερα κύτταρα εκτίθενται συνεχώς σε υψηλές ποσότητες θρεπτικών συστατικών, έτσι είναι απαραίτητη η ύπαρξη συστημάτων ελέγχου ώστε να γίνεται πρόσληψη μόνο των απαραίτητων συστατικών για την επιβίωση και τον ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό τους. Έτσι, η πρόσληψη των ουσιών γίνεται μόνο έπειτα από την ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων όταν χρειάζεται, παρεμποδίζοντας έτσι τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Αντιθέτως, τα **καρκινικά κύτταρα**, ξεπερνούν αυτά τα σημεία ελέγχου λόγω μεταλλάξεων και άλλων τροποποιήσεων και χαρακτηρίζονται από αυτόνομη έναρξη των σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι ογκογονικές μεταλλάξεις οδηγούν στην αυξημένη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, σε επίπεδο που υπερβαίνει τις βιοενεργητικές ανάγκες του κυττάρου για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του (30).

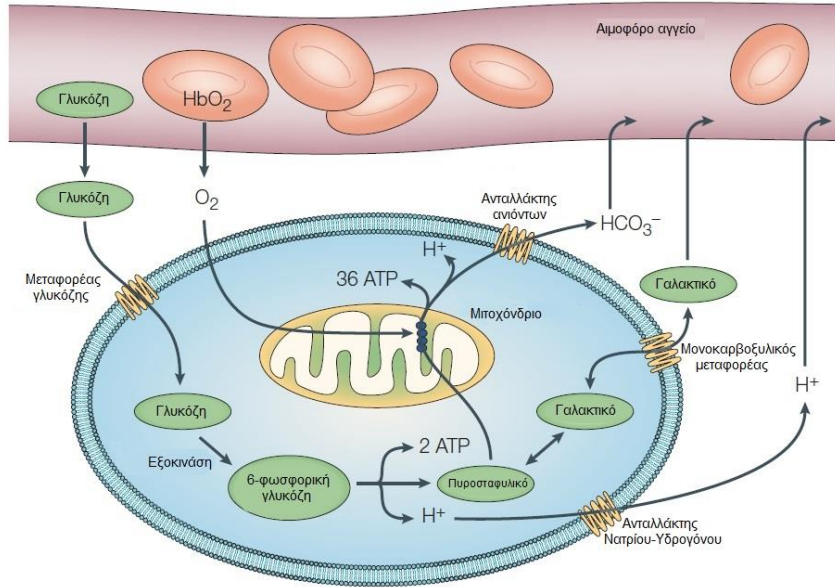
Τη δεκαετία του 1920, ο **Otto Warburg** έδειξε ότι σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς, οι καρκινικοί ιστοί εμφανίζουν υψηλά επίπεδα πρόσληψης γλυκόζης και έκκρισης γαλακτικού οξέος, ακόμη και υπό την παρουσία ικανοποιητικών επιπέδων οξυγόνου, ικανών να υποστηρίξουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως «**αερόβια γλυκόλυση**» ή αλλιώς «**Φαινόμενο Warburg**» (32,33). Τρεις είναι οι κύριες μεταβολικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν το «Φαινόμενο Warburg» (34):

- Πρόσληψη γλυκόζης
- Έκκριση γαλακτικού οξέος
- Διαθεσιμότητα οξυγόνου

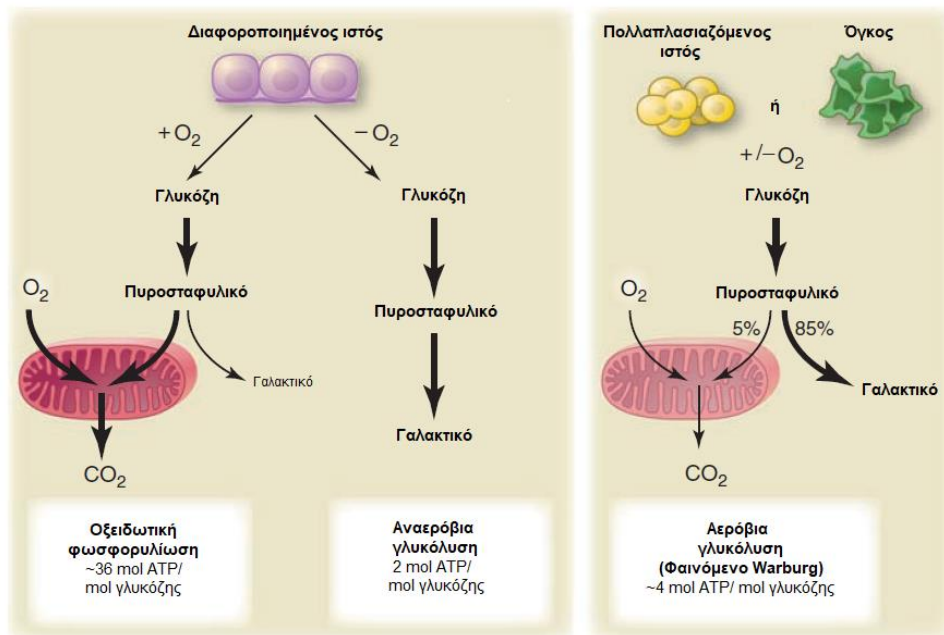
Η ευρεία κλινική εφαρμογή της Τομογραφίας Εκπομπής Ποζιτρονίων- PET (Positron Emission Tomography) οδήγησε στην αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος για το μεταβολισμό των όγκων. Η FdG- PET με χρήση του ιχνηθέτη ^{18}F -φθοροδεοξυγλυκόζης (^{18}F -fluorodeoxyglucose/ ^{18}F -FdG), οδηγεί στην ταυτοποίηση περιοχών με υψηλή πρόσληψη και μεταβολισμό της γλυκόζης στον οργανισμό. Η ^{18}F -FdG εισέρχεται στα κύτταρα μέσω υποδοχέων γλυκόζης (GLUTs) και φωσφορυλιώνεται

από την εξοκινάση II σε ^{18}F -FdG-6-φωσφορικό (^{18}F -FdG-6-P), το οποίο δεν μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω και λόγω της υψηλής πολικότητάς του παγιδεύεται στο κύτταρο. Η τεχνική αυτή βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ταυτοποίηση όγκων αλλά και ιστών που είναι μεταβολικά πολύ ενεργοί, όπως ο εγκέφαλος και η καρδιά, ενώ χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας σε θεραπείες. Πιθανολογείται ότι η **υψηλή πρόσληψη γλυκόζης** οφείλεται στην υπερέκφραση των υποδοχέων GLUT1 και GLUT3) και των εξοκινασών I και II **και ότι σχετίζεται με το «Φαινόμενο Warburg»** (35). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ασθενείς που εμφάνισαν στις απεικονίσεις τους αυξημένα επίπεδα γλυκόζης χαρακτηρίζονταν από πιο επιθετικούς καρκίνους και γενικότερα κακή πρόγνωση (36,37).

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις του O. Warburg, τα καρκινικά κύτταρα μεταβολίζουν με διαφορετικό τρόπο τη γλυκόζη σε σχέση με τους υγιείς ιστούς και λόγω του αυξημένου βαθμού πολλαπλασιασμού αυξάνουν την πρόσληψη της γλυκόζης και το ρυθμό της γλυκολυτικής ροής. Έτσι, ενώ η αερόβια γλυκόλυση εμφανίζει γενικά μικρότερη απόδοση σε ATP, μόλις 2 μόρια ATP/ μόριο γλυκόζης, φαίνεται πως η παραγωγή του ATP γίνεται πολύ πιο ραγδαία σε σχέση με τη μιτοχονδριακή αναπνοή. Στα **Σχήματα 2.2 και 2.3** παρατίθεται ο μεταβολισμός της γλυκόζης στα κύτταρα των θηλαστικών και η ενεργειακή διαφορά μεταξύ οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αναερόβιας και αερόβιας γλυκόλυσης, αντίστοιχα. Έχει υπολογιστεί ότι κατά το «Φαινόμενο Warburg» η γλυκολυτική ροή ενισχύεται τόσο στα καρκινικά κύτταρα ώστε τη στιγμή που 1 μόριο ATP παράγεται κατά την αναπνοή, την ίδια στιγμή η αερόβια γλυκόλυση παράγει 24 μόρια ATP (38). Παρ' όλα αυτά ακόμη και υπό την επαρκή παρουσία οξυγόνου η υψηλότερη απόδοση σε πυροσταφυλικό δε συνεπάγεται και αυξημένη οξείδωσή του στα μιτοχόνδρια. Αντιθέτως, το περισσότερο μέρος του μετατρέπεται σε γαλακτικό από τη γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH), το οποίο ακολούθως εκκρίνεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επομένως, φαίνεται πως η γλυκόλυση και ο κύκλος του Krebs στον καρκίνο δεν είναι το ίδιο συνδεδεμένες σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (39).



Σχήμα 2.2. Μεταβολισμός γλυκόζης στα κύτταρα των θηλαστικών. Η γλυκόζη προσλαμβάνεται από ειδικούς μεταφορείς και μεταβολίζεται στο κύτταρο προς παραγωγή ενέργειας. Στο σχήμα φαίνονται οι δυο πιθανές πορείες του πυροσταφυλικού ανάλογα με τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (40).



Σχήμα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μεταξύ της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της αναερόβιας και της αερόβιας γλυκόλυσης («Φαινόμενο Warburg»). Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (30)

Η αρχική υπόθεση του Warburg ήταν ότι η στροφή προς την αερόβια γλυκόλυση οφειλόταν σε ελαττωματικά μιτοχόνδρια, κάτι το οποίο στη συνέχεια απορρίφθηκε αφού έγινε γνωστό ότι παρ' όλο που η μιτοχονδριακή αναπνοή συνέβαινε σε μικρότερο ποσοστό απ' τη γλυκόλυση, δεν είχε καταστραφεί εντελώς. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο της αναπνοής στην ανάπτυξη του όγκου, καθώς επιτρέπει την παραγωγή των ενδιάμεσων προϊόντων του Κύκλου του Krebs που είναι αναγκαία στις αναβολικές διαδικασίες και συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό. Η μιτοχονδριακή αναπνοή είναι συζευγμένη με τον Κύκλο του Krebs, καθώς οι μεταφορείς ηλεκτρονίων που ανάγονται κατά τη διαδικασία του Κύκλου οξειδώνονται εκ νέου από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (οξειδωτική φωσφορυλίωση) (34). Παρ' όλο που στους ανθρώπινους καρκίνους επικρατεί το «Φαινόμενο Warburg», υπάρχει ένα ευρύ φάσμα μεταβολικών προφίλ, που ποικίλλει από αυστηρώς γλυκολυτικά καρκινικά κύτταρα μέχρι και αυστηρά οξειδωτικά κύτταρα (39).

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από μεταβολική ετερογένεια που επάγεται από τις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος, όπως η τοποθεσία των κυττάρων σε σχέση με τα αιμοφόρα αγγεία και η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, τα θρεπτικά συστατικά, το pH και τα σηματοδοτικά μόρια (39). Στις προκαρκινικές αλλοιώσεις, όπως στον πολύποδα ή στο *in situ* καρκίνωμα, τα υπερπλαστικά επιθηλιακά κύτταρα διαχωρίζονται από τα αιμοφόρα αγγεία μέσω μιας βασικής μεμβράνης, επομένως η αρχή της καρκινογένεσης και η εξέλιξη του κακοήθους φαινοτύπου συμβαίνει σε ένα περιβάλλον με έλλειψη των αιμοφόρων αγγείων. Ήδη από το 1919 ο Krogh έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου μειώνονταν όσο αυξανόταν η απόσταση από τα τριχοειδή αγγεία (41). Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός οδηγεί σε πάχυνση της επιθηλιακής στοιβάδας και ωθεί τα καρκινικά κύτταρα στο κέντρο του όγκου και μακριά από τα αιμοφόρα αγγεία, επομένως η γλυκόζη και το οξυγόνο δεν μπορούν να προσεγγίσουν όλα τα καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη υποξικών περιοχών. Αυτό το μικροπεριβάλλον ευνοεί τους φαινοτύπους που είναι ανθεκτικοί στην υποξία και στην οξίνιση που προκύπτει από τα προϊόντα των ίδιων των καρκινικών κυττάρων. Οι ανθεκτικοί φαινότυποι ανταγωνίζονται για τη γλυκόζη και το οξυγόνο που βρίσκονται σε έλλειψη, έχοντας το πλεονέκτημα της επιβίωσης στις δύσκολες συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος (42).

Η αερόβια γλυκόλυση φαίνεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ικανοποίηση των αναβολικών αναγκών του κυττάρου, καθώς η αυξημένη κατανάλωση

γλυκόζης παράγει πολυάριθμα ενδιάμεσα γλυκολυτικά προϊόντα, τα οποία εμπλέκονται εν συνεχεία σε διάφορα βιοσυνθετικά μονοπάτια παρά στην παραγωγή πυροσταφυλικού. Επομένως, τα γλυκολυτικά ενδιάμεσα παρέχουν σημαντικούς δομικούς λίθους για τη σύνθεση αμινοξέων, νουκλεοτιδίων και λιπιδίων, απαραίτητων για την ανάπτυξη και διαίρεση των καρκινικών κυττάρων. Εκτός από τα καρκινικά κύτταρα, φαίνεται πως ορισμένοι κυτταρικοί τύποι, όπως τα κύτταρα αμφιβληστροειδούς και τα εμβρυϊκά κύτταρα στρέφονται επίσης ως ένα βαθμό προς την αερόβια γλυκόλυση (43). Τα T- λεμφοκύτταρα και τα αιμοποιητικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα φαίνεται πως επιλέγουν την αερόβια γλυκόλυση κατά τη διάρκεια του έντονου πολλαπλασιασμού τους (34). Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν ότι η επιλογή της αερόβιας γλυκόλυσης είναι σημαντική όχι μόνο σε κακοήθειες, αλλά και σε φυσιολογικές συνθήκες.

Μέχρι και σήμερα η επιλογή της αερόβιας γλυκόλυσης από τα κύτταρα του όγκου αφήνει αναπάντητα ερωτήματα και οι λόγοι δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι. Ερευνητές προσπαθούν να δώσουν πιθανές εξηγήσεις ως προς το γιατί ένας φαινομενικά λιγότερο αποτελεσματικός φαινότυπος επιλέγεται από τα καρκινικά κύτταρα. Οι Gatenby et al. σε σχετική δημοσιευμένη ανασκόπησή τους (40) πρότειναν ότι τα αυξημένα ποσοστά γλυκόλυσης δεν είναι τυχαία, αντιθέτως αποτελούν αναγκαίο παράγοντα του κακοήθους φαινοτύπου και είναι ένα από τα χαρακτηριστικά των διεισδυτικών καρκίνων (3). Υποστηρίζεται ότι αποτελεί μια λύση προσαρμογής στους περιορισμούς του μικροπεριβάλλοντος που προκύπτουν από τη μείωση θρεπτικών στοιχείων κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης.

2.2.2 Φαινόμενο Warburg και μεταστάσεις

Το «Φαινόμενο Warburg» προωθεί τη διαδικασία της μετάστασης και βοηθάει στην επιλογή πιο επιθετικών φαινοτύπων καρκίνου. Κατά τη διαδικασία της μετάστασης τα καρκινικά κύτταρα καλούνται να ξεπεράσουν πιέσεις από το περιβάλλον όπως το στρες, αλλά και να καλύψουν ουσιώδεις ενεργειακές απαιτήσεις. Τα κύτταρα στη διαδικασία της μετάστασης χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες (44), ενώ μόνο μερικά από αυτά θα καταφέρουν να επιβιώσουν των δύσκολων συνθηκών και να μεταναστεύσουν σε ένα μακρινό όργανο δημιουργώντας μεταστάσεις. Σε αυτή τη διαδικασία θα ευνοηθούν καρκινικά κύτταρα που

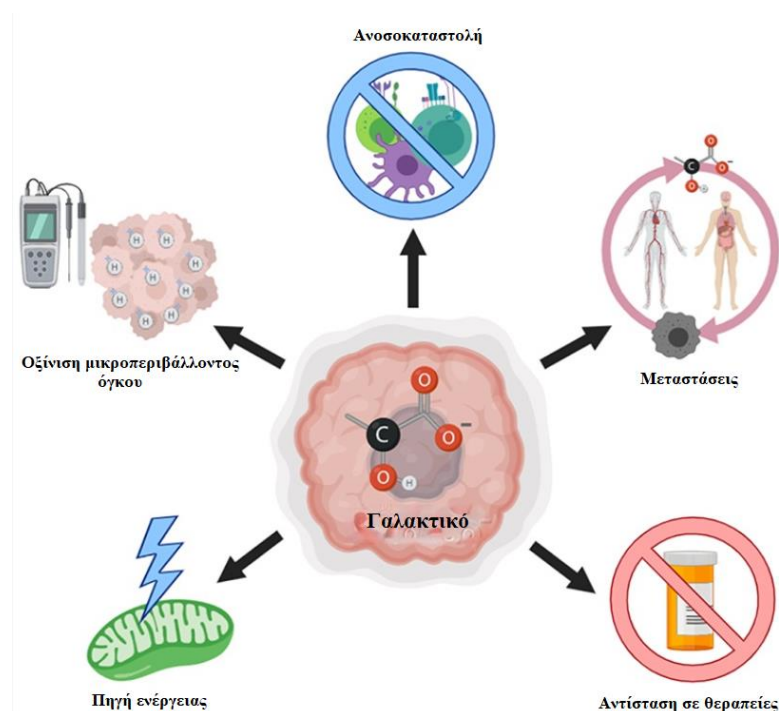
ακολουθούν έναν γλυκολυτικό φαινότυπο και είναι ανθεκτικά στην υποξία και στο όξινο μικροπεριβάλλον. Ένα σημαντικό εμπόδιο που χρειάζεται να ξεπεραστεί επιπλέον κατά τη μετανάστευση των κυττάρων είναι ο προγραμματισμένος θάνατος “anoikis”, που προκαλείται από πολύ αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών παραγόντων ROS (“Reactive Oxygen Species”), όταν τα κύτταρα αποκολλώνται από την εξωκυτταρική μήτρα. Τα επίπεδα των ROS είναι κρίσιμα, καθώς μέτρια αύξηση των επιπέδων τους ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που ευνοούν την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση, ενώ αντίθετα υπερβολική συσσώρευση των ROS οδηγεί σε ανεπανόρθωτη βλάβη του κυττάρου και προκαλεί κυτταρικό θάνατο (45). Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ROS, επομένως για την επιβίωσή τους είναι αναγκαία η ανάπτυξη μιας αντιοξειδωτικής ιδιότητας έτσι ώστε τα επίπεδα ROS να διατηρούνται σε επιθυμητά επίπεδα που δε θα είναι κυτταροτοξικά. Εφόσον η κύρια πηγή παραγωγής των ROS είναι ο οξειδωτικός μεταβολισμός των μιτοχονδρίων, πιθανολογείται ότι αυτός είναι άλλος ένας λόγος που τα καρκινικά κύτταρα στρέφονται προς την αερόβια γλυκόλυση, η οποία τους εξασφαλίζει μειωμένα επίπεδα ROS κατά την αποκόλλησή τους από την εξωκυττάρια μήτρα και διαφυγή από τον “anoikis”.

2.3 Μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς

2.3.1 Εισαγωγή

Το «Φαινόμενο Warburg» εμπλέκεται στην αλλαγή μεταβολικών ενζύμων, όπως της εξοκινάσης 2 (HK2), της κινάσης του πυροσταφυλικού τύπου M2 (PKM2), τον μεταφορέα γλυκόζης 1 (GLUT1), τη γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH) και τους **μονοκαρβοξυλικούς μεταφορείς (MCTs)**. Επιπλέον, ο φαινότυπος Warburg φαίνεται να σχετίζεται όχι μόνο με την αυξημένη πρόσληψη ενέργειας, αλλά και με την ενεργοποίηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων, όπως του c-Myc, NF-kB και του HIF-1a, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των μεταβολικών ενζύμων με αποτέλεσμα τη μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό (46). Η αυξημένη έκκριση του γαλακτικού οξέος στον εξωκυττάριο χώρο επηρεάζει αρκετούς κυτταρικούς τύπους όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (CAFs), τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και τα μη-καρκινικά στρωματικά κύτταρα (47). Σήμερα είναι γνωστή η σημασία του γαλακτικού ως ένας ογκομεταβολίτης με

σηματοδοτικές ιδιότητες που ενσωματώνεται στον κύκλο του Krebs και αποτελεί πηγή ενέργειας, ενώ αυξημένα επίπεδά του οδηγούν σε μεταστάσεις και σχετίζονται με επιθετικούς όγκους (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4. Ο ρόλος του γαλακτικού οξέος στον καρκίνο. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (46)

Το γαλακτικό οξύ υφίσταται στον ανθρώπινο οργανισμό ως δύο ισομερή, το D-γαλακτικό και το L-γαλακτικό, με το τελευταίο να αποτελεί το κυρίαρχο φυσιολογικό εναντιομερές του γαλακτικού. Η pKa του γαλακτικού ανιόντος/ γαλακτικού οξέος είναι 3.8 σε φυσιολογικό pH και το γαλακτικό οξύ μετατρέπεται απευθείας στο γαλακτικό του ανιόν και σε κατιόντα υδρογόνου (H^+). Υπό φυσιολογικές συνθήκες το γαλακτικό αποτελεί πηγή ενέργειας για την καρδιά, τον εγκέφαλο και τους σκελετικούς μύες. Η φυσιολογική του συγκέντρωση στο αίμα και στους υγιείς ιστούς είναι 1.5-3 mM, ενώ στους **καρκινικούς ιστούς** φτάνει τα 10-30 mM (46). Δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες γλυκόζης κι έτσι τα επίπεδά της μειώνονται σημαντικά στο μικροπεριβάλλον του όγκου, τα καρκινικά κύτταρα καταφεύγουν πολλές φορές στην πρόσληψη του γαλακτικού οξέος για την παραγωγή της απαραίτητης ενέργειας (48).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα κρίνεται αναγκαία η έκκριση του γαλακτικού και των H^+ στον εξωκυττάριο χώρο, αφενός για την αποφυγή της ενδοκυτταρικής οξίνισης και

αφετέρου για τη διατήρηση του ρυθμού της γλυκόλυσης, καθώς συσσώρευση του γαλακτικού ενδοκυτταρικά οδηγεί σε μείωση του γλυκολυτικού ρυθμού (46). Η μεταφορά του γαλακτικού εκτός των κυττάρων πραγματοποιείται μέσω ενός ειδικού μηχανισμού μεταφοράς που περιλαμβάνει την οικογένεια των μονοκαρβοξυλικών μεταφορέων **MCTs (Monocarboxylate Transporters)**.

Οι MCTs αποτελούν μέλη της οικογένειας μεταφορέων διαλυμένων ουσιών 16 (**SLC16**— Solute Carrier 16) που είναι αναγκαίοι για τη μεταφορά μικρής αλυσίδας μονοκαρβοξυλικών οξέων, ορμονών, θρεπτικών στοιχείων και αμινοξέων (49). Η πρώτη δημοσιευμένη έρευνα για τους MCT μεταφορείς έγινε από τους ερευνητές Halestrap και Denton το 1974 (50). Το ευρύ φάσμα της ειδικότητας των υποστρωμάτων καταδεικνύει τον ζωτικής σημασίας ρόλο τους στην ομοιόσταση και στη λειτουργία των κυκλοφορούντων ενδογενών μορίων. Συνολικά υπάρχουν 14 ισομορφές της MCT οικογένειας (MCTs 1-14, SLC16A1- 14) και δύο μέλη εξαρτώμενα από το νάτριο για τη λειτουργία τους (SMCTs 1/2, SLC5A8/12). Μεταξύ των 14 μελών, οι MCT1/ SLC16A1, MCT2/ SLC16A7, MCT3/ SLC16A8 και MCT4/ SLC16A3 μεταφέρουν μονοκαρβοξυλικά ιόντα μαζί με πρωτόνια και είναι καλά χαρακτηρισμένοι λόγω του κρίσιμου ρόλου τους στη μεταφορά προϊόντων της γλυκόλυσης και των κετονοσωμάτων. Αποτελούν παθητικούς μεταφορείς, καθώς μεταφέρουν τα υποστρώματα με βάση τις συγκεντρώσεις τους εκατέρωθεν της πλασματικής μεμβράνης, πάνω στην οποία είναι η θέση τους (51). Οι MCTs 5- 14 έχουν μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό, αν και πρόσφατες έρευνες παρέχουν κάποιες πληροφορίες για την ειδικότητα των υποστρωμάτων τους (49).

Οι MCTs μεταφέρουν κοινά υποστρώματα, όπως το πυροσταφυλικό, το L-γαλακτικό, κετονοσώματα (ακετοξικό, β- υδροξυβουτυρικό) και λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (προπιονικό, βουτυρικό), με διαφορετική όμως σχετική συγγένεια (**Πίνακας 2.1**). Ο MCT2 είναι ο μεταφορέας με την υψηλότερη συγγένεια ως προς τα μονοκαρβοξυλικά οξέα, με $K_m = 0.1- 1.2 \text{ mM}$ αναλόγως το υπόστρωμα και $K_m = 0.5- 0.75 \text{ mM}$ συγκεκριμένα για το γαλακτικό. Ακολουθεί ο MCT1 με $K_m = 1- 12.5 \text{ mM}$ αναλόγως το υπόστρωμα και $K_m = 3.5-10 \text{ mM}$ για το γαλακτικό. Ο MCT3 έχει συγγένεια ως προς το γαλακτικό συγκρίσιμη με του MCT1 ($K_m = 5-6 \text{ mM}$), ενώ ο MCT4 χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγγένεια για το γαλακτικό ($K_m = 22-28 \text{ mM}$) και το πυροσταφυλικό ($K_m = 153 \text{ mM}$). Το γαλακτικό παρ' όλο που δεν είναι το μόνο

υπόστρωμα των MCTs, αποτελεί το πιο καλά χαρακτηρισμένο και το πιο άφθονο in vivo, ειδικά στους όγκους που μπορεί να φτάσει συγκεντρώσεις μέχρι τα 40 mM (52).

Πίνακας 2.1. Ρυθμιστές έκφρασης και σταθερότητας των MCTs, καθώς και η σχετική συγγένεια με το γαλακτικό των πιο καλά χαρακτηρισμένων MCT. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (52)

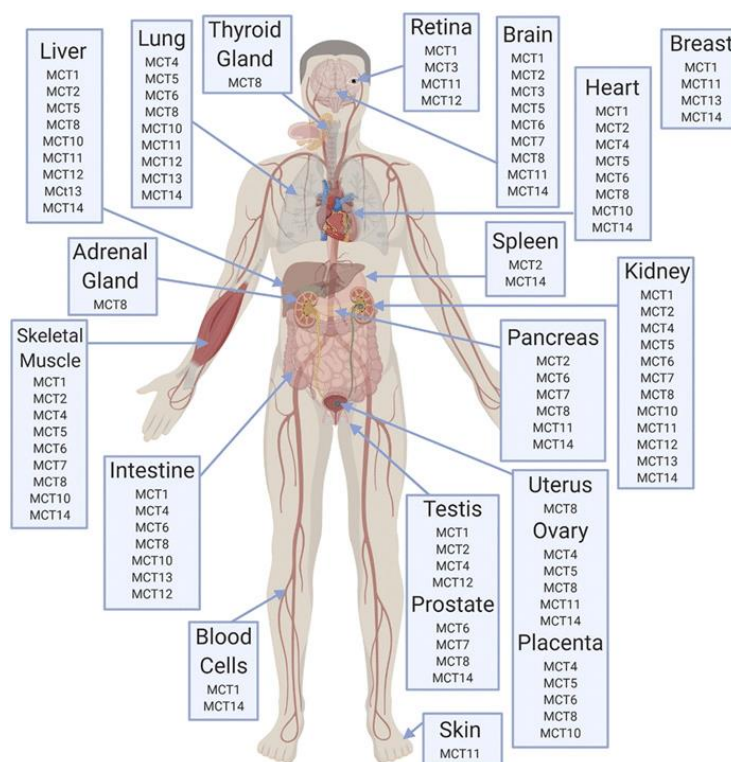
	K _m Γαλακτικού	Μεταγραφική ρύθμιση	Μετα-μεταγραφική ρύθμιση	Μεταφραστική ρύθμιση	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	Πρωτεΐνες σαπερόνες
MCT1/SLC16A1	3.5-10 mM	Promoter methylation (-) c-Myc (+) NF-κB (+)* Wnt (+) NFAT (+)* MACC1 (+) HIF-2 (+)* GPR81 signaling (+) AMPK-PGC-1α pathway (+ or -)* PGC-1α-ERRα pathway (+)	miR-29a (-) miR-29b (-) miR-124 (-) miR-219 (+)# miR-342-3p (-) miR-495 (-)		S-nitrosation (-) Dimerization (+) cAMP (-)	CD147/basigin (+) CD44 (+)# Gp70/embigin (+)#
MCT2/SLC16A7	0.5-0.75 mM	c-Myc (+)		PI3K-Akt-mTOR (+)		Gp70/embigin (+) CD147/basigin (+)#
MCT3/SLC16A8	5-6 mM					CD147/basigin (+)
MCT4/SLC16A3	22-28 mM	Promoter methylation (-) HIF-1 (+) GPR81 (+)	miR-1 (-)			CD147/basigin (+) CD44 (+)#

Μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει ανάλυση της δομής των MCTs με κρυσταλλογραφία ακτινών x, αλλά έχει προταθεί ένα πιθανό μοντέλο με βάση τη δομή του μεταφορέα της 3- φωσφογλυκερόλης (GlpT) από το βακτήριο E.coli και από πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (53,54). Όλοι οι MCTs διαθέτουν συντηρημένες αλληλουχίες αμινοξέων και προβλέπεται ότι απαρτίζονται από 12 διαμεμβρανικές περιοχές (TM), ενδοκυττάρια N- τελικά και C- τελικά άκρα και από έναν μεγάλο ενδοκυττάριο βρόγχο μεταξύ των διαμεμβρανικών περιοχών TM6- TM7. Οι διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία αντικατοπτρίζουν την εξελικτική απόκλιση σχετικά με τη λειτουργία τους, καθώς οι MCT1-4 που μεταφέρουν μονοκαρβοξυλικά οξέα μαζί με πρωτόνια φαίνεται να βρίσκονται στο ίδιο σύμπλεγμα γονιδίων. Το σύμπλεγμα υποδιαιρείται περαιτέρω σε δύο μικρότερα κλαδιά που αποτελούν τους MCT1-2 και MCT3-4, τα οποία σχετίζονται με την ειδικότητα των υποστρωμάτων και τη συγγένεια που έχουν βρεθεί στις MCT ισομορφές στα θηλαστικά (55).

2.3.2 Έκφραση μονοκαρβοξυλικών μεταφορέων

Οι μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς ακολουθούν διαφορετικά μοτίβα έκφρασης ανάλογα με τις διαφορετικές λειτουργίες των φυσιολογικών ιστών. Τα διαφορετικά μοτίβα έκφρασης οφείλονται στο γεγονός ότι οι MCTs υπόκεινται σε μεταγραφική, μετα- μεταγραφική, μεταφραστική και μετα- μεταφραστική ρύθμιση, όπως φάνηκε

συνοπτικά στον **Πίνακα 2.1**. Κανένας μονοκαρβοξυλικός μεταφορέας δεν έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα β- κύτταρα των νησίδων Langerhans του παγκρέατος, διότι το γαλακτικό μέσω διαδοχικών αντιδράσεων θα οδηγούσε σε παραγωγή ATP και έκκριση της ινσουλίνης κατά τη διάρκεια της σωματικής άσκησης, με αποτέλεσμα την υπογλυκαιμία (51). Στο **Σχήμα 2.5** παρατίθενται οι ιστοί έκφρασης των διαφόρων μεταφορέων, με έμφαση στον MCT1 που εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού.



Σχήμα 2.5. Πρωτεϊνική έκφραση των ισομορφών MCT στους ανθρώπινους ιστούς (49)

2.3.3 Μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς στον καρκίνο

Στους καρκίνους του ανθρώπινου οργανισμού συχνά παρατηρείται μια αυξημένη έκφραση των MCTs. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί η υπερέκφραση των MCT1 και MCT4 σε πολλά είδη καρκίνου όπως του μαστού, των οστών, του παχέος εντέρου και των νεφρών. Η υπερέκφρασή τους φαίνεται να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση όπως σε περιπτώσεις καρκίνου της ουροδόχου κύστεως και προστάτη (56), καθώς και με διήθηση λεμφαδένων και μεταστάσεις στο μελάνωμα και στο αδενοκαρκίνωμα

(57,58). Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν το σημαντικό ρόλο τους στην ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου και πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην αναστολή των δύο αυτών μονοκαρβοξυλικών υποδοχέων ως μια καινοτόμα θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου (59). Η αυξημένη έκφραση μπορεί να είναι συνέπεια πολλών και διαφορετικών μηχανισμών (52). Η υποξία αποτελεί έναν μηχανισμό επαγωγής της έκφρασης του MCT4 απευθείας μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα HIF-1 (60), ενώ οδηγεί με έμμεσο τρόπο σε αυξημένη έκφραση των MCT1 και MCT2 (61). Λανθασμένη ενεργοποίηση του Myc μπορεί να ενεργοποιήσει τους MCT1 και MCT2 είτε απευθείας είτε μέσω των καταστολέων μετάφρασης miR- 29a και miR- 29c (62). Η σηματοδότηση μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB καθώς και η απώλεια λειτουργίας του p53 επάγει τη μεταγραφή του MCT1 (63). Η εξωκυτταρική οξίνιση μπορεί να ενεργοποιήσει τα HIF-1 και Myc, τα οποία ακολούθως διεγείρουν τη μεταγραφή του MCT1 (64). Αντιθέτως, υπάρχουν μηχανισμοί όπως η μεθυλίωση των εκκινητών γονιδίων που οδηγούν σε μειωμένη έκφραση των MCTs, με αποτέλεσμα έτσι τη σίγαση του MCT1 στον καρκίνο του μαστού (65) και του MCT4 στον καρκίνο του παχέος εντέρου (66).

Το μικροπεριβάλλον του όγκου ασκεί φυσικές πιέσεις στα καρκινικά κύτταρα, που εξαναγκάζονται να προσαρμοστούν μέσω του μεταβολισμού τους στο οξειδωτικό στρες, την έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, την ανοσοεπιτήρηση και σε ένα υποξικό και όξινο περιβάλλον. Η προσαρμογή του μεταβολισμού τα καθιστά περισσότερο ανθεκτικά, ενώ ένα μικροπεριβάλλον με pH= 6- 6.5 σχετίζεται με μεταστάσεις, αγγειογένεση και αντίσταση σε θεραπείες, χαρακτηριστικά πιο επιθετικών όγκων (67). Για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων που χαρακτηρίζονται από υψηλό γλυκολυτικό ρυθμό είναι απαραίτητη η έκκριση του γαλακτικού και των πρωτονίων από τα κύτταρα, μέσω των MCTs. Οι MCT1 και MCT4 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση και στη συμβίωση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του όγκου.

Η θεωρία της μεταφοράς του γαλακτικού οξέος μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων έχειδειχθεί ότι συμβαίνει και στα καρκινικά κύτταρα, υπό τον όρο της «**μεταβολικής συμβίωσης**» (52). Μεταξύ των όγκων αλλά και μέσα στον ίδιο όγκο υπάρχουν ετερογενείς περιοχές που ρυθμίζονται από τις ειδικές συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος, όπως η υποξία στο κέντρο του όγκου και η καλύτερη οξυγόνωση

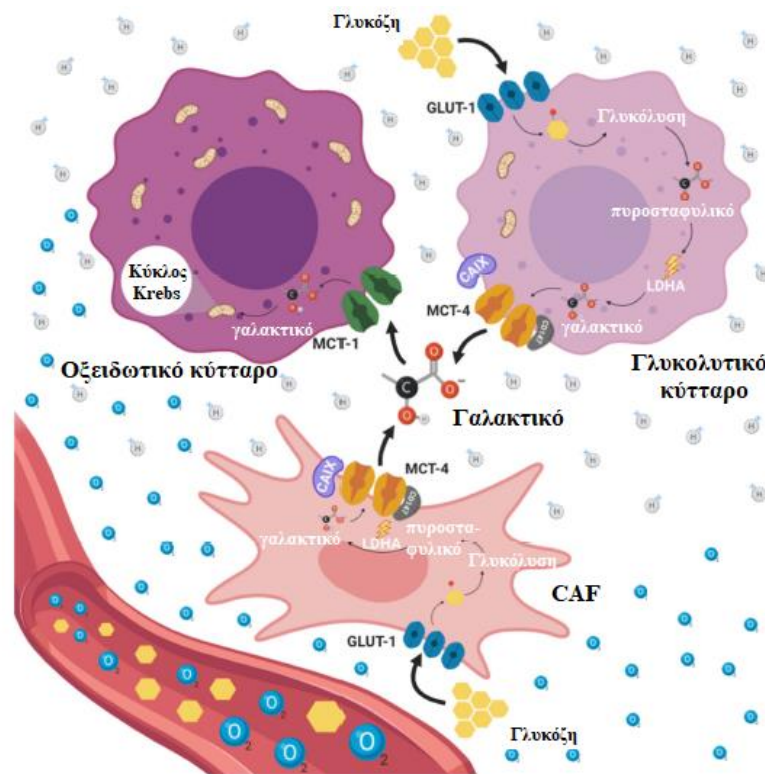
στην περιφέρεια (68). Τα καρκινικά κύτταρα κοντά στα αιμοφόρα αγγεία βρίσκονται σε ευνοϊκή θέση λόγω της διαθεσιμότητας του οξυγόνου και των θρεπτικών στοιχείων και παρατηρείται μια κατάσταση μεταβολικής συμβίωσης με τα υποξικά κύτταρα, προσδίδοντας πλεονεκτήματα στον ραγδαία αναπτυσσόμενο όγκο που χαρακτηρίζεται από υποξικές περιοχές. Στη μεταβολική συμβίωση συνεισφέρουν η διαφορετική έκφραση και λειτουργία μεταξύ των MCT1 και MCT4. Ο MCT4 υπερεκφράζεται στον γλυκολυτικό ιστό λόγω της υποξίας και εκκρίνει το γαλακτικό που παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, ενώ τα καρκινικά κύτταρα κοντά στα αιμοφόρα αγγεία υπερεκφράζουν τον MCT1 και ακολούθως προσλαμβάνουν το γαλακτικό που βρίσκεται στο μικροπεριβάλλον (69). Εφόσον τα οξειδωτικά καρκινικά κύτταρα προτιμούν το γαλακτικό σε σχέση με τη γλυκόζη, η τελευταία είναι διαθέσιμη για την πρόσληψη από τα γλυκολυτικά κύτταρα με σκοπό την επιβίωσή τους.

2.3.4 Μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς στο «Αντίστροφο Φαινόμενο Warburg»

Στο πλαίσιο επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων υπό συνθήκες έλλειψης των θρεπτικών συστατικών, παρατηρείται επιπλέον μια αλληλεπίδραση μεταξύ των στρωματικών κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος και των κυττάρων του όγκου. Η διαδικασία αυτή έχει χαρακτηριστεί ως «**Αντίστροφο Φαινόμενο Warburg**» κατά το οποίο ινοβλάστες συσχετιζόμενοι με τον όγκο (CAFs) στρέφονται προς την αερόβια γλυκόλυση με τελικό στόχο τη μεταφορά των γλυκολυτικών μεταβολιτών, κυρίως του γαλακτικού, στα καρκινικά κύτταρα (70). Οι CAFs αποτελούν τον πιο άφθονο κυτταρικό πληθυσμό στους όγκους και σχετίζονται με την εξέλιξη του όγκου και τις μεταστάσεις (71). Κατέχουν ένα μεταβολικό φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από αυξημένη γλυκόλυση και μειωμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση, έτσι στα αρχικά στάδια του καρκίνου τα νεοπλασματικά κύτταρα μέσω των παραγόντων ROS στρατολογούν τους CAFs στην περιοχή του όγκου.

Οι CAFs χαρακτηρίζονται από έντονη γλυκόλυση που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή του γαλακτικού. Επειδή υπερεκφράζουν τον MCT4 το παραγόμενο γαλακτικό εκκρίνεται στο μικροπεριβάλλον και προσλαμβάνεται μέσω του MCT1 από τα γειτονικά καρκινικά κύτταρα. Στη συνέχεια, μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό μέσω της LDH1, με ταυτόχρονη αναγωγή του NAD^+ σε NADH και H^+ , με αποτέλεσμα το πυροσταφυλικό και το NADH να εισέρχονται στον κύκλο του Krebs και να συμβάλλουν στην παραγωγή της απαραίτητης ενέργειας (69). Με αυτό τον τρόπο οι

CAFs ανταλλάσσουν το γαλακτικό με τα οξειδωτικά καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιούν το γαλακτικό ως πηγή ενέργειας μέσω του Κύκλου του Krebs (46). Σε ένα μοντέλο Καρκίνου του Πνεύμονα παρατηρήθηκε αυξημένη αερόβια γλυκόλυση στους CAFs και προαγωγή της EMT και μετανάστευση του Μη- Μικροκυτταρικού Καρκίνου του Πνεύμονα, ενώ αντίθετα τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονταν από αυξημένη οξειδωτική φωσφορυλίωση και αυξημένα επίπεδα του ATP, έπειτα από την ενεργοποίηση των PI3K/Akt και MAPK/ ERK μονοπατιών (72). Σύμφωνα με το **Σχήμα 2.6** στο οποίο φαίνεται η μεταβολική συμβίωση μεταξύ των κυττάρων, τονίζεται άλλη μια φορά ο κρίσιμος ρόλος των MCT1 και MCT4 στην ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου.



Σχήμα 2.6. «Αντίστροφο Φαινόμενο Warburg». Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος με τελικό στόχο την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (46)

2.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Οι μηχανισμοί που προωθούν την εξέλιξη του καρκίνου είναι εξαιρετικά πολύπλοκοι και οι γενετικές αλλαγές είναι ετερογενείς ακόμη και στον ίδιο όγκο, επομένως η στόχευση ενός μεμονωμένου γονιδίου είναι αρκετά δύσκολη και πολλές

φορές αναποτελεσματική. Λόγω της ευελιξίας στο μεταβολισμό που παρατηρείται σχεδόν σε κάθε τύπο καρκίνου, οι έρευνες έχουν στραφεί προς τη στόχευση των καρκινικών κυττάρων με αναστολή της αερόβιας γλυκόλυσης. Σήμερα γίνονται προσπάθειες για την αναστολή των MCTs, με το ενδιαφέρον στραμμένο κυρίως προς τους MCT1 και MCT4. Ο MCT1 που υπερεκφράζεται στα οξειδωτικά καρκινικά κύτταρα και οδηγεί σε πρόσληψη του γαλακτικού, έχει ως συνέπεια τα υποξικά κύτταρα να προσλαμβάνουν τη διαθέσιμη γλυκόζη, άρα αναστολή του MCT1 οδηγεί έμμεσα σε θάνατο των υποξικών καρκινικών κυττάρων. Σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές ενώσεις ως αναστολείς των MCTs, όπως η φλορετίνη και το α-κυανο-4-υδροξυκινναμικό (CHC), κλασικοί αναστολείς των MCT1 και MCT4 (59). Πολύ σημαντικοί αναστολείς αποτελούν οι AR- C155858 και AZD3965, με πιθανές ανοσορυθμιστικές και χημειοθεραπευτικές ιδιότητες.

Περισσότερη έμφαση έχει δοθεί στον AZD3965, αναστολέα του MCT1 με πιθανή δράση και έναντι του MCT2. Ο AZD3965 ολοκληρώνει τη Φάση I των κλινικών δοκιμών (NCT01791595) και έδειξε πολλά υποσχόμενα σημάδια αποτελεσματικότητας σε ασθενείς με Διάχυτο Μεγάλο B- Κυτταρικό Λέμφωμα (DLBCL) (73). Καθώς η αναστολή των MCT1/4 ενδεχομένως οδηγεί σε στροφή των καρκινικών κυττάρων προς την οξειδωτική φωσφορυλίωση, εξετάζεται το ενδεχόμενο ταυτόχρονης αναστολής της γλυκόλυσης και του μιτοχονδριακού μεταβολισμού, όπως με τον αναστολέα μετοφομίνη (47). Τέλος, μια ακόμη στρατηγική που διερευνάται είναι οι πιθανοί αναστολείς της σαπερόνης CD147, με στόχο τη διάσπαση της αλληλεπίδρασης MCT1/4 και CD147 (74). Αυτές οι παρατηρήσεις καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ταυτόχρονη χρήση των MCT αναστολέων και άλλων θεραπευτικών παραγόντων για την αναχαίτιση της ανάπτυξης του όγκου, ίσως αποτελεί το κλειδί για πιο αποτελεσματικές μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις (47).

ΚΕΦ. 3 ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

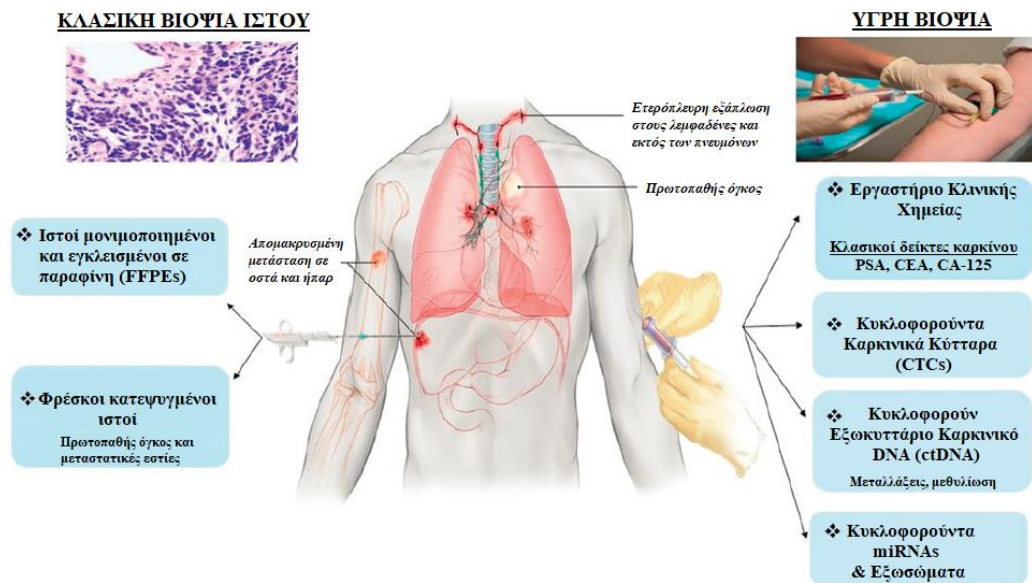
3.1 Εισαγωγή

Η υψηλή ετερογένεια και η ταχεία εξέλιξη των όγκων έχουν ως αποτέλεσμα την αποτυχία θεραπειών, που παρατηρείται σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με καρκίνο. Ο καρκίνος αναπτύσσεται λόγω της συσσώρευσης μεταλλαγών σε γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική επιβίωση, την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του όγκου. Στις αλλαγές αυτές που συμβαίνουν καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου οφείλεται η ανάπτυξη ετερογενών κλώνων τόσο στις πρωτοπαθείς όσο και στις μεταστατικές περιοχές. Πριν την επιλογή της θεραπείας, λοιπόν, κρίνεται αναγκαίος ο μοριακός χαρακτηρισμός του όγκου ούτως ώστε να γίνει στόχευση συγκεκριμένων μορίων και μεταλλάξεων. Ωστόσο, ακόμη και μετά την έναρξη της κατάλληλης θεραπείας, είναι πιθανό λόγω των πιέσεων που ασκούνται στα καρκινικά κύτταρα να δημιουργηθούν νέες αλλαγές στο γενετικό υπόβαθρο και στο μικροπεριβάλλον, με αποτέλεσμα την επιβίωση και την αντίσταση σε θεραπείες. Προκύπτει, επομένως, μια αναγκαιότητα για σειριακές λήψεις δειγμάτων προκειμένου να γίνει εκ νέου χαρακτηρισμός των νέων κλώνων και εφαρμογή αποτελεσματικότερων θεραπειών.

Μέχρι στιγμής, ο μοριακός χαρακτηρισμός του όγκου και η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας βασίζεται στην κλασική βιοψία ιστού από τον πρωτοπαθή όγκο ή τις μεταστατικές περιοχές. Η κλασική βιοψία είναι μια επεμβατική μέθοδος που δεν επιτρέπει τις συχνές σειριακές λήψεις δειγμάτων, δεν δύναται να διεξαχθεί σε όλα τα όργανα λόγω περιορισμένης πρόσβασης, ενώ οι πληροφορίες που δίνει αφορούν ένα στιγμιότυπο του όγκου και δεν αντικατοπτρίζει την ετερογένεια σε όλη την έκτασή της. Αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι στο αίμα των ασθενών υπάρχουν παράγοντες που αντιπροσωπεύουν το υπόβαθρο του καρκινικού ιστού, οι οποίοι μπορούν να μελετηθούν σε πραγματικό χρόνο και να δώσουν συμπληρωματικά με την κλασική βιοψία, μια πιο σωστή εκτίμηση του όγκου του ασθενούς μέσω της υγρής βιοψίας (75).

Η **υγρή βιοψία** είναι μια ελάχιστα επεμβατική τεχνική που βασίζεται στην ανάλυση αίματος, αποτελώντας έτσι ένα ισχυρό και αξιόπιστο εργαλείο για την ταυτοποίηση του μοριακού προφίλ των ασθενών σε πραγματικό χρόνο και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας (76). Η υγρή βιοψία προσφέρει τη δυνατότητα σειριακών

λήψεων των δειγμάτων αίματος από τους ασθενείς, καθιστώντας έτσι ικανή τη συλλογή πληροφοριών καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου (**Σχήμα 3.1**) Οι γενετικές πληροφορίες προέρχονται κυρίως από τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells- CTCs), το κυκλοφορούν εξωκυττάριο καρκινικό DNA (Circulating Tumor DNA- ctDNA), τα κυκλοφορούντα miRNA, τα εξωσώματα και τα Αιμοπετάλια- εκπαιδευόμενα από τον όγκο TEPs (Tumor Educated Platelets).



Σχήμα 3.1. Σύγκριση κλασικής βιοψίας με την υγρή βιοψία. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (77)

Σήμερα η ανάλυση των CTCs αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για ασθενείς με πρώιμο και προχωρημένο καρκίνο και ο μοριακός χαρακτηρισμός τους προσφέρει επιπλέον τη δυνατότητα κατανόησης της βιολογίας των μεταστάσεων και της αντίστασης στις κοινές θεραπείες. Παράλληλα, η ανάλυση του ctDNA στο πλάσμα δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης των γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν συνεχώς σε έναν αναπτυσσόμενο και ετερογενή όγκο, ενώ κερδίζει έδαφος στην παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση της υποτροπής έπειτα από χειρουργείο (78). Οι περισσότερες έρευνες στο κομμάτι της υγρής βιοψίας αφορούν τα CTCs και το ctDNA με πολυάριθμες δημοσιεύσεις και πάνω από 600 κλινικές δοκιμές για τους δύο αυτούς βιοδείκτες (79). Υπάρχουν ισχυρά δεδομένα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, του προστάτη, του πνεύμονα και του παχέος

εντέρου (80). Πρόσφατα παρουσιάστηκε ότι η υγρή βιοψία ενδεχομένως να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έγκαιρη διάγνωση και το screening (81), παρ' όλα αυτά φαίνεται πως η εφαρμογή της στο πλαίσιο της έγκαιρης διάγνωσης του καρκίνου ανήκει ακόμη στο μακρινό μέλλον (82).

3.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα

3.2.1 Εισαγωγή

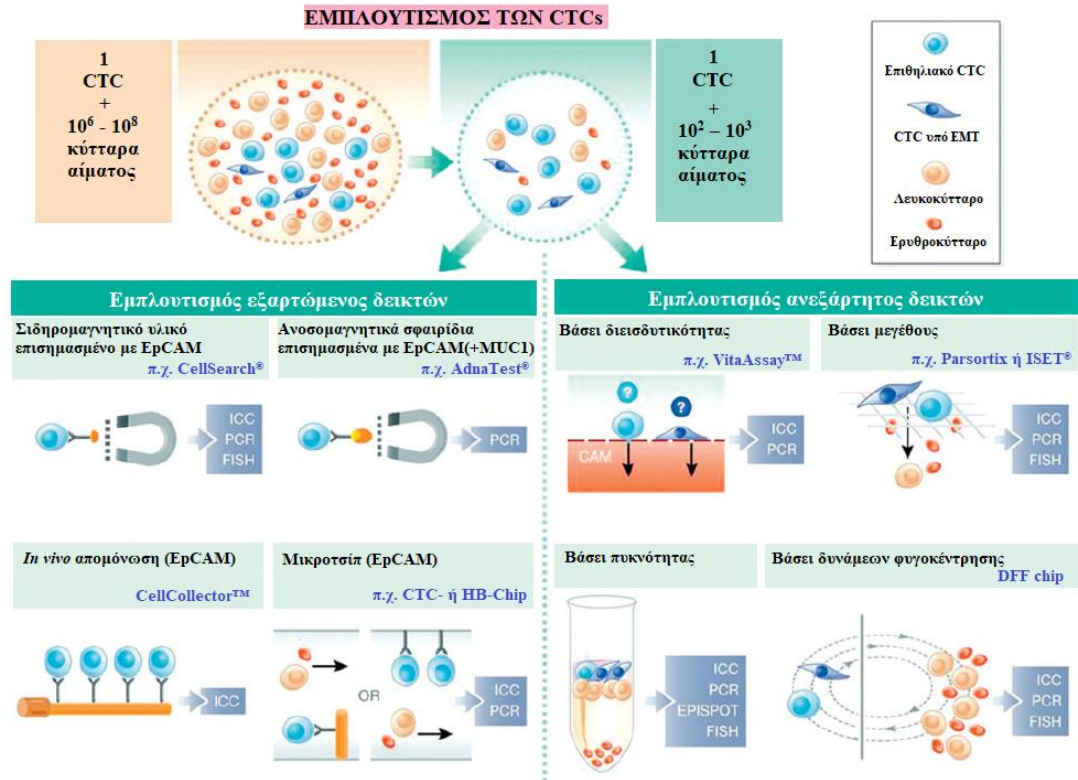
Η παρουσία των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Thomas Ashworth το 1869, όταν ο ίδιος παρατήρησε ότι στο αίμα ασθενών έπειτα από θάνατο βρέθηκαν κύτταρα όμοια με αυτά του όγκου (83). Το 1889 ο Stephen Pagen ανέπτυξε την υπόθεση “the seed and soil hypothesis” που επανεξετάστηκε αρκετά χρόνια αργότερα από τους Langley και Fidler, υποστηρίζοντας ότι τα καρκινικά κύτταρα (the seeds) έχουν την προτίμηση να μεταναστεύουν σε ένα συγκεκριμένο όργανο (the soil) με σκοπό την εύρεση ευνοϊκότερων συνθηκών για την ανάπτυξη και την εξέλιξή τους (84). Το 2005 έγινε γνωστή η κλινική σημασία των διασπειρόμενων καρκινικών κυττάρων (Disseminated Tumor Cells- DTCs) στο μυελό των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού (85). Η ανάλυσή τους από το μυελό των οστών είναι εξαιρετικά επεμβατική με την επιπλέον δύσκολη εφαρμογή σειριακών αναλύσεων, γι' αυτό και το ενδιαφέρον στρέφεται προς τις τεχνικές της υγρής βιοψίας και την ανίχνευση των CTCs (77). Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα είναι σπάνια κι έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, ενώ ένα μικρό ποσοστό κατορθώνει να ξεπεράσει τις δύσκολες συνθήκες και να κάνει μεταστάσεις. Οι μεταστάσεις είναι ο κύριος λόγος θανάτου στους ασθενείς με καρκίνο και η διασπορά των καρκινικών κυττάρων μέσω της κυκλοφορίας του αίματος φαίνεται πως είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα για την μεταβολή από τοπική σε συστηματική ασθένεια (Κεφάλαιο 1).

3.2.2 Αναλυτικές τεχνικές για την απομόνωση, καταμέτρηση και ανίχνευση των CTCs

Η απομόνωση και η ανάλυση των CTCs αποτελεί πρόκληση λόγω της σπανιότητάς τους στο περιφερικό αίμα (86), ενώ δεν είναι δυνατή η καθαρή απομόνωσή τους. Η

συναπομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs) είναι αναπόφευκτη με τις μέχρι τώρα μεθοδολογίες, καθώς βρίσκονται σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις. Τα CTCs μέσω της EMT αρχίζουν να αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγγυματικών κυττάρων, όπως αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης και διείσδυσης της βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας μήτρας. Εκτός από τον αναγκαίο ρόλο της στη μεταστατική διαδικασία, η EMT αποτελεί πολύ σημαντικό εμπόδιο στην ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, καθώς τα περισσότερα αναλυτικά συστήματα ανιχνεύουν τα CTCs μέσω των επιθηλιακών δεικτών EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) που εκφράζονται στην επιφάνειά τους. Έτσι, υποπληθυσμοί των CTCs που εκφράζουν μεσεγγυματικούς δείκτες όπως TWIST και ALDH1 είναι εφικτό να ανιχνευθούν μόνο εάν χρησιμοποιούνται δείκτες ειδικοί προς αυτά για την ανίχνευσή τους (76). Η ανίχνευση των CTCs με μεσεγγυματικά χαρακτηριστικά είναι πολύ σημαντική, καθώς έχουν συσχετισθεί με την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, ενώ η αντίστροφη διαδικασία MET ευνοεί τα κύτταρα στο να μεταναστεύσουν και να ολοκληρώσουν επιτυχώς τη διαδικασία της μετάστασης (87).

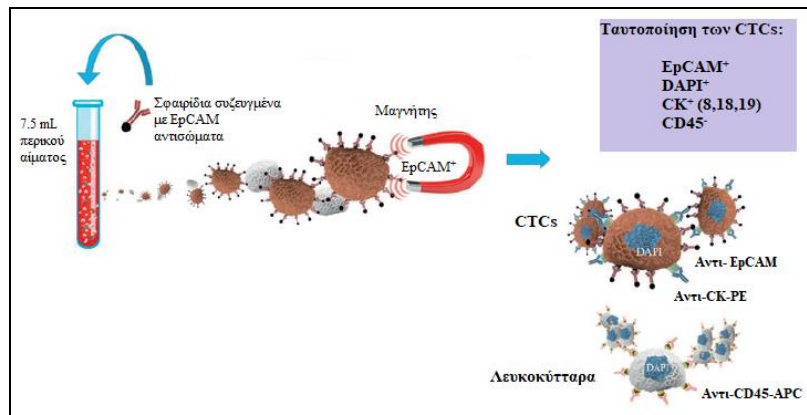
Η ανάλυση των CTCs περιλαμβάνει τα στάδια της **απομόνωσης/ εμπλουτισμού, ανίχνευσης, καταμέτρησης και μοριακού χαρακτηρισμού**. Οι στρατηγικές που ακολουθούνται αφορούν διαχωρισμό με βάση τις φυσικές ιδιότητές τους (μέγεθος, πυκνότητα), ιχνηθέτηση με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια ειδικά για πρωτεΐνες της επιφάνειά τους, ενώ αναπτύσσονται συνεχώς συσκευές μικρορευστονικής και φιλτραρίσματος, ακόμη και μεθοδολογίες *in vivo* απομόνωσης CTCs από το περιφερικό αίμα. Πλήθος ερευνών διεξάγονται και δημοσιεύονται συνεχώς με τελικό στόχο την ανάπτυξη όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστων και αποτελεσματικών μεθόδων για κάθε στάδιο ανάλυσης των CTCs (88–90). Στο **Σχήμα 3.2** παρατίθενται συνοπτικά οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των CTCs, ενώ παρακάτω αναλύονται τα κύρια αναλυτικά συστήματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση/ εμπλουτισμό, ανίχνευση, καταμέτρηση και μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs (77). Για την καθιέρωση των διαγνωστικών μεθόδων που βασίζονται στην ανάλυση των CTCs στην κλινική πράξη, είναι αναγκαία η ανάπτυξη και η επιλογή αξιόπιστων και επικυρωμένων τεχνικών απομόνωσης.



Σχήμα 3.2. Κυριότερα συστήματα εμπλουτισμού και απομόνωσης των CTCs στην υγρή βιοψία.

Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (77)

Το Σύστημα CellSearch® (Janssen Diagnostics, Raritan, N.J.) είναι μέχρι σήμερα το μόνο εγκεκριμένο από τον FDA σύστημα για την πρόγνωση και παρακολούθηση μεταστατικού καρκίνου μαστού (2004), προστάτη (2008) και παχέος εντέρου (2008) με στόχο τον **εμπλουτισμό και την καταμέτρηση των CTCs** (91). Είναι ένα ημι-αυτοματοποιημένο σύστημα με υψηλή επαναληψιμότητα, ενώ η αναλυτική ακρίβεια, γραμμικότητα και διαγνωστική ειδικότητά του επικυρώθηκαν για πρώτη φορά το 2004 (92). Βασίζεται σε ένα συνδυασμό θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού των CTCs βάσει ειδικών δεικτών επιφανείας (EpCAM, κυτταροκερατίνες 8,18,19) και αυτοματοποιημένης ψηφιακής μικροσκοπίας. Λόγω των συντηρητικών που χρησιμοποιούνται δεν είναι δυνατή η γονιδιακή έκφραση των απομονωμένων CTCs, έτσι το ενδιαφέρον στρέφεται συνεχώς προς τις τεχνικές μοριακού χαρακτηρισμού (76). Το σύστημα προσφέρει επιπλέον τη δυνατότητα ανίχνευσης ενός τέταρτου δείκτη που επιλέγεται ανάλογα με τους στόχους της εκάστοτε έρευνας. Στο **Σχήμα 3.3** παρατίθεται η αρχή εμπλουτισμού των CTCs με το σύστημα CellSearch®.



Σχήμα 3.3. Εμπλουτισμός και ανίχνευση των CTCs στο σύστημα CellSearch®. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (77)

ο **Συστήματα απομόνωσης/ εμπλουτισμού των CTCs**

Τα CTCs είναι εξαιρετικά σπάνια, με αναλογία περίπου ενός CTC ανάμεσα σε 10^6 - 10^8 κυττάρων περιφερικού αίματος. Η σπανιότητα και η ετερογένεια καθιστά την απομόνωση και τον εμπλουτισμό τους μια δύσκολη και απαιτητική διαδικασία, καθιστώντας αναγκαία την ανάπτυξη τυποποιημένων και αξιόπιστων πρωτοκόλλων απομόνωσης με δυνατότητα περαιτέρω ανάλυσης και μοριακού χαρακτηρισμού. Οι αναλυτικές τεχνικές απομόνωσης/ εμπλουτισμού χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με την ιδιότητα στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός των CTCs από τα υπόλοιπα κύτταρα του περιφερικού αίματος:

- I. Συστήματα εξαρτώμενα από την **ιχνηθέτηση δεικτών με βάση τις βιολογικές ιδιότητες** των CTCs, όπως ειδικές πρωτεΐνες έκφρασης στην επιφάνειά τους, όπου ο διαχωρισμός γίνεται με χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων με θετική ή αρνητική επιλογή
- II. Συστήματα **ανεξάρτητα ιχνηθέτησης**, που βασίζονται στις **φυσικές ιδιότητες** των CTCs, όπως το μέγεθος, η πυκνότητα, η συμπεριφορά υπό επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και η παραμορφωσιμότητά τους (συστήματα μικρορευστονικής)

Παρακάτω παρατίθενται τα βασικότερα συστήματα απομόνωσης, με την κάθε τεχνολογία να είναι συμπληρωματική των άλλων λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων που στοχεύει και την κάθε μία να προσδιορίζει διαφορετικούς υποπληθυσμούς CTCs.

Στα συστήματα που βασίζονται στην ιχνηθέτηση ακολουθείται κυρίως η μέθοδος της **θετικής επιλογής**. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται στην αιχμαλώτιση των CTCs μέσω ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι επιθηλιακών δεικτών που εκφράζονται στην επιφάνειά τους και απουσιάζουν από τα λευκοκύτταρα, όπως και στο σύστημα CellSearch. Χρησιμοποιούνται μικροσφαιρίδια συζευγμένα με αντισώματα έναντι ειδικών αντιγόνων επιφανείας ή ενδοκυτταρικών αντιγόνων (κυτταροκερατίνες). Ο ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης επιφανείας είναι ο EpCAM, που παρουσιάζει το μειονέκτημα απομόνωσης και ανίχνευσης μόνο των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων, άρα είναι αναγκαία η χρήση συμπληρωματικών αντισωμάτων κατά τη σύζευξη με τα μικροσφαιρίδια, όπως ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι βιμεντίνης, πρωτεΐνης που ανιχνεύεται σε καρκινικά κύτταρα κατά τη διαδικασία EMT.

Η απομόνωση των CTCs εναλλακτικά πραγματοποιείται με τη διαδικασία της **αρνητικής επιλογής**. Η προσέγγιση αυτή δεν σχετίζεται με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των CTCs διότι βασίζεται στην αφαίρεση των μη καρκινικών κυττάρων του περιφερικού αίματος από το δείγμα των ασθενών. Επιτυγχάνεται με τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με ειδικά αντιδραστήρια και την επακόλουθη μαγνητική απομόνωση των λευκών αιμοσφαιρίων με βάση ειδικών δεικτών, όπως το CD45 και CD61 (93). Σε αυτή τη μεθοδολογία βασίζεται το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα RosetteSep (StemCell technologies, Canada), το οποίο με χρήση μίγματος αντισωμάτων που ενώνουν τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια μεταξύ τους, οδηγούν την πλειονότητα των μη καρκινικών κυττάρων του περιφερικού αίματος σε απομάκρυνση, με αποτέλεσμα τον αρνητικό εμπλουτισμό του δείγματος με τα καρκινικά κύτταρα. Πλεονέκτημα της αρνητικής επιλογής είναι η ανεξαρτησία της μεθόδου από την έκφραση EpCAM και η καλύτερη ανάκτηση των CTCs από τα λευκοκύτταρα του αίματος, σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο που βασίζεται στο διαχωρισμό με βάση την πυκνότητα (94).

Εναλλακτικό τρόπο εμπλουτισμού αποτελούν οι μεθοδολογίες που βασίζονται στις φυσικές ιδιότητες των CTCs: πυκνότητα, μέγεθος και ηλεκτρικό φορτίο. Η **φυγοκέντρωση βαθμιαίας πυκνότητας** πραγματοποιείται με χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων, με το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο να αποτελεί το Ficoll (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburg, Penn.). Ο διαχωρισμός βασίζεται στη χαμηλότερη πυκνότητα των μονοπύρηνων κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των

CTCs, από τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (95). Όσον αφορά την απομόνωση με βάση το **μέγεθος**, έχουν αναπτυχθεί συστήματα με μεμβρανικά φίλτρα, τσιπ μικρορευστονικής καθώς και υδροδυναμικές μέθοδοι (96,97). Χαρακτηριστικό σύστημα μικροροής αποτελεί το Parsortix (ANGLE plc, UK) που βασίζεται στην απομόνωση των CTCs με βάση το μέγεθος και το σχήμα τους, το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 4.2. Ένα εμπορικά διαθέσιμο σύστημα φίλτρων για την απομόνωση των CTCs αποτελεί το ISET (RareCell, France), το οποίο έχει δείχθει ότι δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης ακόμη και των CTCs με υβριδικό φαινότυπο λόγω της EMT, σε Μη- Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα (98).

Η μέθοδος απομόνωσης των CTCs μπορεί να βασίζεται επίσης στη **μορφολογία και τις διηλεκτρικές** τους ιδιότητες. Οι διηλεκτρικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων εξαρτώνται από τη διάμετρο, την περιοχή μεμβράνης, την πυκνότητα, την αγωγιμότητα και τον όγκο. Λόγω του φαινοτύπου και της μορφολογίας τους, το κάθε κύτταρο παρουσιάζει διαφορετικές διηλεκτρικές ιδιότητες, το οποίο εκμεταλλεύεται η ηλεκτρο- κινητική απομόνωση των CTCs (99). Με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η απομόνωση μονήρων κυττάρων. Μια τέτοια μεθοδολογία αποτελεί η DEPArray (Silicon Biosystems, Menarini Group, IT). Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί **in vivo μέθοδοι απομόνωσης**, όπως η λευκαφαίρεση και το σύστημα CellCollector (Gilupi GmbH, Germany), που ενδεχομένως να αποτελέσουν σωτήρια λύση στον περιορισμό του μικρού όγκου των δειγμάτων αίματος που χρησιμοποιείται στις υπόλοιπες μεθόδους. Το σύστημα GILUPI αποτελεί ένα καινοτόμο σύστημα που απομονώνει τα CTCs μέσω ενός νανοανιχνευτή που εισέρχεται στη φλέβα του ασθενούς μέσω μιας μικροβελόνας. Αντισώματα έναντι EpCAM έχουν προσδεθεί ομοιοπολικά στη λειτουργική επιφάνεια του CellCollector, ούτως ώστε κατά την επαφή της βελόνας με το αίμα του ασθενούς να προσκολλώνται στον νανοανιχνευτή τα EpCAM θετικά κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα. Η επιφάνεια είναι κατασκευασμένη έτσι ώστε να μην επιτυγχάνεται η πρόσδεση μη ειδικών κυττάρων του αίματος (100,101).

ο **Ανίχνευση και μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs**

Η ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός επιτυγχάνεται με διάφορες μεθοδολογίες: ανοσοφθορισμός, μοριακή ανάλυση νουκλεϊκών οξέων και ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από τα CTCs.

Απεικονιστικές προσεγγίσεις

Η απεικόνιση των επιθηλιακών CTCs με αντισώματα έναντι κυτταροκερατινών αποτελεί μια επικυρωμένη και τυποποιημένη μέθοδο που εξασφαλίζει την μορφολογική ερμηνεία των θετικών συμβάντων. Επιπλέον πλεονεκτήματα προσφέρει η χρήση πολλαπλών αντισωμάτων στην ανίχνευση των CTCs, όπως αντισώματα έναντι κυτταροκερατινών, του HER-2 και έναντι αντιγόνων των βλαστικών κυττάρων (ALDH1, CD44, CD24) τα οποία σημαίνονται με διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες (DyLight Technology, ThermoFischer) για το διαχωρισμό των διαφορετικών εκπομπών (102). Εκτός από τις κλασικές τεχνικές ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιούνται επίσης αυτοματοποιημένα συστήματα με σκοπό την απεικόνιση υψηλότερης ανάλυσης CTCs, όπως το σύστημα Ariol (Leica Biosystems, Germany), το οποίο έχει εκτιμηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του προστάτη (103).

Μοριακές προσεγγίσεις

Οι μοριακές τεχνικές χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα και προσφέρουν το πλεονέκτημα ανίχνευσης και χαρακτηρισμού των CTCs σε επίπεδο DNA και RNA. Μπορούν να σχεδιαστούν *in silico* με σκοπό τη μέγιστη δυνατή ειδικότητα προς τους επιθυμητούς στόχους και επιτρέπουν τον εσωτερικό και εξωτερικό έλεγχο (104,105), ενώ επιτρέπουν την αυτοματοποίηση των συστημάτων κυρίως στο στάδιο της απομόνωσης και της μετέπειτα ανάλυσης του DNA και RNA. Υπάρχει η δυνατότητα ποσοτικοποίησης και άλλο ένα πλεονέκτημα είναι ότι χρειάζονται μικρή ποσότητα δείγματος, ενώ η τεχνική της πολλαπλής PCR προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολλών στόχων στο ίδιο δείγμα. Μεγάλο μειονέκτημα αποτελεί η έλλειψη τυποποιημένων προαναλυτικών διαδικασιών και κυρίως στην περίπτωση της απομόνωσης των CTCs που πρωταρχικό ρόλο παίζει η ακεραιότητα του δείγματος. Επιπλέον, για τη σωστή διεξαγωγή των πειραμάτων είναι απαραίτητη η χρήση διαφορετικών χώρων στο εργαστήριο προς αποφυγή επιμολύνσεων, οι οποίες είναι πολύ εύκολο να συμβούν και να οδηγήσουν σε παραπλανητικά αποτελέσματα. Οι μοριακές τεχνικές περιλαμβάνουν την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR), πολλαπλή PCR (multiplex PCR), ειδική για μεθυλίωση PCR που χρησιμοποιείται κυρίως για τη διερεύνηση της μεθυλίωσης των υποκινητών (methyl-specific PCR), αλληλοειδική PCR (allele-specific PCR) που χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις ανίχνευσης μεταλλάξεων. Επιπλέον χρησιμοποιούνται αρκετά και η

τεχνική FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) και τεχνικές μικροσυστοιχιών σε chip.

Προσεγγίσεις βασισμένες σε πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τα CTCs (EPISPOT Assay)

Η δοκιμασία EPISPOT (Epithelial ImmunoSPOT) βασίζεται στην ανίχνευση πρωτεϊνών που απελευθερώνονται ειδικά από τα επιθηλιακά CTCs. Τα κύτταρα καλλιεργούνται για σύντομο χρονικό διάστημα πάνω σε μεμβράνη επικαλυπτόμενη με αντισώματα έναντι των ειδικών πρωτεϊνών, τα οποία ακολούθως ανιχνεύονται με ένα δεύτερο αντίσωμα που είναι σημασμένο με φθορίζουσες ουσίες. Η δοκιμασία αυτή έχει εφαρμοσθεί σε διαφόρους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου (106).

3.3 CTCs στον Καρκίνο του Πνεύμονα

Οι κλασικές βιοψίες στον Καρκίνο του Πνεύμονα είναι πολύ δύσκολο να διεξαχθούν, έτσι η υγρή βιοψία αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στο χαρακτηρισμό του όγκου μέσω της ανάλυσης των CTCs. Αν και τα CTCs που απελευθερώνονται από τους καρκινικούς ιστούς του πνεύμονα έχουν σπάνια επιθηλιακά χαρακτηριστικά και είναι δύσκολο να ανιχνευθούν με τις τεχνικές που βασίζονται στους επιθηλιακούς δείκτες, έρευνες έχουν δείξει την προγνωστική σημασία της καταμέτρησης των CTCs, καθώς και τη σημασία τους στην ανταπόκριση θεραπειών με τη σύγκριση του αριθμού τους πριν και μετά τη χορήγηση της θεραπείας. Η παρουσία EpCAM⁺CTCs σε ασθενείς με MMKP πριν και μετά το χειρουργείο σχετίζεται με χειρότερη ολική επιβίωση και μικρότερο «Διάστημα Ελεύθερο Νόσου» (107,108).

Σε μια πιλοτική μελέτη του 2016, οι Crosbie et al έπειτα από καταμέτρηση των CTCs (CellSearch[®]) που ελήφθησαν από την πνευμονική φλέβα ασθενών με πρώιμο MMKP κατά τη διάρκεια του χειρουργείου, έδειξαν ότι ασθενείς με CTCs στην πνευμονική φλέβα είχαν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου (109). Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής ενδέχεται να εκτιμηθούν εκ νέου στην TRACERx μελέτη που βρίσκεται υπό εξέλιξη, με στόχο την εύρεση νέων θεραπευτικών στόχων και την πρόβλεψη του κινδύνου υποτροπής από την καταμέτρηση των CTCs από την πνευμονική φλέβα και εκτίμηση άλλων αναλυτών του αίματος (110).

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs στον ΜΜΚΠ είναι πολύ σημαντικός στην ανίχνευση μεταλλάξεων, καθώς μεταλλάξεις που ευθύνονται για την ετερογένεια του όγκου και την αντίσταση σε θεραπείες είναι δυνατόν να βρεθούν στα CTCs, τη στιγμή που η κλασική βιοψία προσφέρει απλά ένα στιγμιότυπο του όγκου και πολλές μεταλλάξεις μένουν μη ανιχνεύσιμες. Οι μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά στα CTCs ασθενών με ΜΜΚΠ το 2008 (111). Σε αυτή τη μελέτη, ασθενείς με ΜΜΚΠ στο αίμα των οποίων ανιχνεύθηκαν $ErCAM^+$ CTCs με EGFR μεταλλάξεις, εμφάνισαν γρηγορότερα εξέλιξη της νόσου, σε σχέση με τους ασθενείς με έλλειψη της μετάλλαξης αυτής στα CTCs. Σε μια άλλη μελέτη των Pailler et al. έγινε εκτίμηση της κατάστασης των CTCs ως προς τις ανακατατάξεις του γονιδίου ALK σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που ακολούθησαν τη θεραπεία με Crizotinib. Ενώ το συνοδό διαγνωστικό τεστ για τις ανακατατάξεις του ALK σε αυτή την κατηγορία ασθενών πραγματοποιείται με βιοψία ιστού, οι ερευνητές έδειξαν ότι ανίχνευση της ανακατάταξης ALK σε CTCs των ασθενών καθιστούν ικανή τη διάγνωση αλλά και την παρακολούθηση της ασθένειας με Crizotinib (112). Είναι αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση της ανίχνευσης, του μοριακού χαρακτηρισμού της κλινικής σημασίας των CTCs, ειδικά σε ένα τύπο καρκίνου τόσο θανατηφόρο, που είναι δύσκολες οι σειριακές βιοψίες για την εκτίμηση της πορείας της νόσου.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το εργαστήριό μας σε προηγούμενη μελέτη έδειξε την υπερέκφραση του μονοκαρβοξυλικού μεταφορέα 4 (*MCT4*) σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ασθενών με πρώιμο ΜΜΚΠ και την προγνωστική του σημασία (113). Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η εκτίμηση της έκφρασης και της προγνωστικής σημασίας του μονοκαρβοξυλικού μεταφορέα 1 (*MCT1*), καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό μεταφορέα του γαλακτικού οξέος και έχει δειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Η μελέτη έγινε σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν με βάση το μέγεθός τους σε ασθενείς με πρώιμο ΜΜΚΠ σε διαφορετικά χρονικά σημεία της νόσου. Πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και επικύρωση μιας ευαίσθητης και ειδικής RT-qPCR μεθόδου για την ανίχνευση των μεταγράφων και την εκτίμηση της έκφρασης του *MCT1*. Επιπλέον, μελετήθηκε η διαφορά των επιπέδων έκφρασης και έγινε εκτίμηση της συσχέτισης των δύο μονοκαρβοξυλικών μεταφορέων, ενώ παράλληλα εξετάστηκε η προγνωστική τους σημασία με καμπύλες επιβίωσης.

ΚΕΦ. 4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Υλικά

4.1.1 Σύλλογή κλινικών δειγμάτων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συλλέχθηκαν 119 δείγματα περιφερικού αίματος από 59 ασθενείς με πρώιμο Μη- Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα (ΜΜΚΠ) και 19 δείγματα από υγιείς δότες, που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Τα κέντρα που συμμετείχαν στη μελέτη είναι τα εξής:

- Metropolitan General (Υπεύθυνος Ιατρός: Β. Γεωργούλιας)
- Γ.Ν.Ν.Θ.Α. «Η ΣΩΤΗΡΙΑ», Ογκολογική μονάδα Γ' ΠΠ Κλινικής
- Γ.Ν.Ν.Θ.Α. «Η ΣΩΤΗΡΙΑ», 2^η Πνευμονολογική Κλινική
- Γ.Ν.Ν.Θ.Α. «Η ΣΩΤΗΡΙΑ», 7^η Πνευμονολογική Κλινική
- Γ.Ν.Ν.Θ.Α. «Η ΣΩΤΗΡΙΑ», Θωρακοχειρουργική Κλινική
- Γ.Ν.Ν.Θ.Α. «Η ΣΩΤΗΡΙΑ», Παθολογοανατομικό Τμήμα

(Υπεύθυνοι Ιατροί: Λ. Τουφεκτζιάν, Κ. Πόταρης, Ε. Σεψάς)

Τα δείγματα της μελέτης επιλέχθηκαν με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

Κριτήρια ένταξης

- Ιστολογικά επιβεβαιωμένος ΜΜΚΠ: Αδενοκαρκίνωμα και Καρκίνωμα Πλακωδών Κυττάρων
- Ηλικία ≥ 18 ετών
- Εγχειρήσιμη νόσος (Στάδια I-IIIa) ΜΜΚΠ
- Ασθενείς οι οποίοι υπέγραψαν τη συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή τους στη μελέτη, όπως αυτή εγκρίθηκε από την Εθνική και Επιστημονική Επιτροπή του Γενικού Νοσοκομείου Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών «Η ΣΩΤΗΡΙΑ»

Κριτήρια αποκλεισμού

- Ηλικία <18 ετών
- Μη εγχειρήσιμη νόσος ΜΜΚΠ, ασχέτως σταδίου
- Ασθενείς με οποιαδήποτε τρέχουσα ή προγενέστερη ιατρική κατάσταση, που σύμφωνα με τη γνώμη του Ερευνητή, θα μπορούσε να παρεμποδίσει τη διεξαγωγή της δοκιμής ή να επηρεάσει την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της

4.1.2 Κυτταρικές σειρές

Για τον έλεγχο της σωστής διεξαγωγής και καλής απόδοσης της αντίδρασης RT-qPCR, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω κυτταρικές σειρές ως θετικοί μάρτυρες:

- 100 ng/ μ L MCF-7 κύτταρα, η οποία αποτελεί κυτταρική σειρά Καρκίνου Μαστού
- 100 ng/ μ L SKBR- 3 κύτταρα, επίσης κυτταρική σειρά Καρκίνου Μαστού

4.2 Απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με το σύστημα Parsortix (ANGLE plc, UK)

Κατά την αιμοληψία, για να αποφευχθεί η επιμόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων του δέρματος, απορρίφθηκαν τα πρώτα 5mL και το σωληνάριο συλλογής αίματος αποσυνδέθηκε πριν την απόσυρση της βελόνας. Το περιφερικό αίμα (20mL σε EDTA) από υγιείς δότες και ασθενείς συλλέχθηκε και υπέστη επεξεργασία με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Αρχικά, έγινε φυγοκέντρηση του ολικού αίματος στα 500g για 10 λεπτά και διαχωρίστηκε το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά. Το πλάσμα ακολούθως φυγοκεντρήθηκε στα 2000g για δέκα λεπτά και τα 8mL πλάσματος που διαχωρίστηκαν αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρις ότου γίνει η επεξεργασία τους. Στα έμμορφα συστατικά του ολικού αίματος προστέθηκε ποσότητα διαλύματος PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7.3) μέχρι την ποσότητα των 20mL και στη συνέχεια ακολούθησε η απομόνωση/ εμπλουτισμός των CTCs με το σύστημα Parsortix.

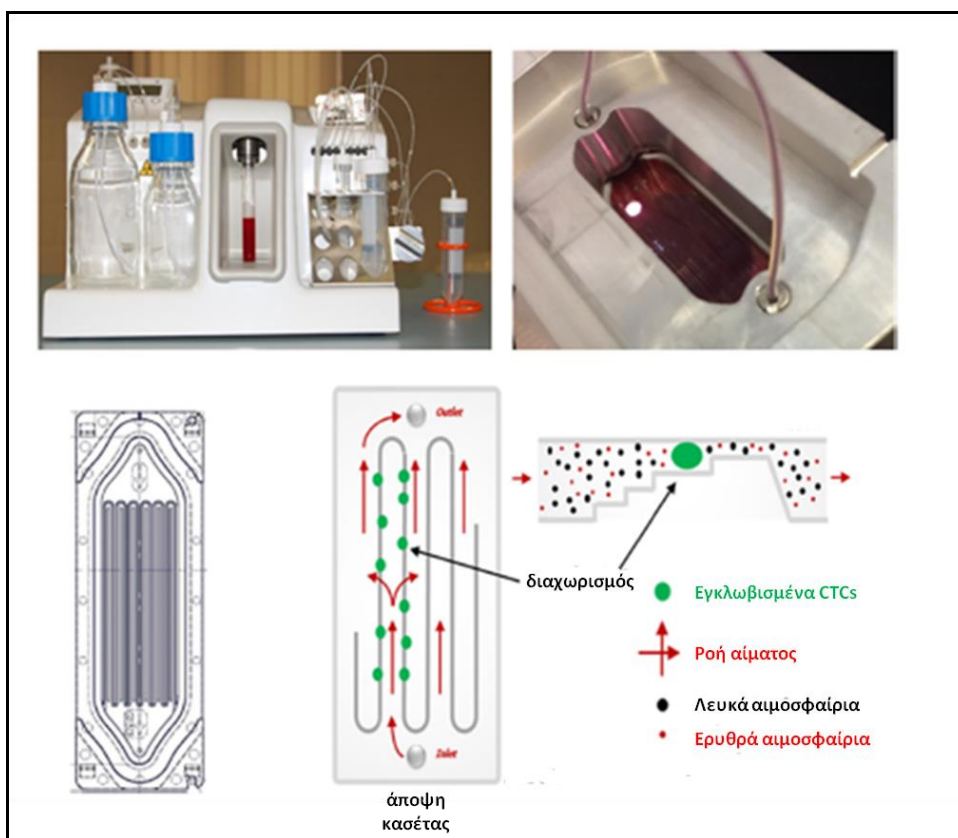
4.2.1 Αρχή μεθόδου

Ο εμπλουτισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με το σύστημα Parsortix βασίζεται στις φυσικές ιδιότητές τους (σχήμα, μέγεθος) που τα διακρίνει από τα φυσιολογικά μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs- Peripheral Blood Mononuclear Cells). Η πλατφόρμα Parsortix βασίζεται σε ένα σύστημα μικροροής (microfluidics) που απομονώνει τα CTCs με βάση το μέγεθός τους, ενώ στη συνέχεια μπορεί να γίνει ο χαρακτηρισμός τους με ανοσοφθορισμό ή και περαιτέρω μελέτη τους με μοριακές τεχνικές. Η πλατφόρμα φέρει την CE- IVD σήμανση και προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα:

- Εφαρμογή σε όλους τους τύπους καρκίνου λόγω του ότι βασίζεται αποκλειστικά στον διαχωρισμό των καρκινικών κυττάρων με βάση το μέγεθός τους
- Μείωση προαναλυτικών σφαλμάτων λόγω της αυτοματοποίησης του συστήματος
- Διαχωρισμός των CTCs από τα υπόλοιπα κύτταρα του περιφερικού αίματος, ανεξάρτητα από την έκφραση ή μη της πρωτεΐνης EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων

Το βασικότερο πλεονέκτημα της πλατφόρμας αποτελεί ο εμπλουτισμός των CTCs ανεξάρτητα από την έκφραση του δείκτη EpCAM, καθώς κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου και ιδιαίτερα της μεταστατικής διαδικασίας, ένα ποσοστό των καρκινικών κυττάρων βρίσκεται στην Επιθηλιο- Μεσεγχυματική κατάσταση όπου παρατηρείται μειωμένη έκφραση των επιθηλιακών δεικτών. Αρκετά συστήματα εμπλουτισμού των CTCs που βασίζονται στην έκφραση επιθηλιακών δεικτών έχουν ως αποτέλεσμα να χάνουν κάποια καρκινικά κύτταρα τα οποία χαρακτηρίζονται από μεσεγχυματικούς δείκτες. Ο περιορισμός αυτός εξαλείφεται με την απομόνωση καρκινικών κυττάρων με μεθοδολογίες που βασίζονται στις φυσικές ιδιότητές τους, όπως το μέγεθος και η πυκνότητα, κάτι που επιτυγχάνεται με το σύστημα Parsortix.

Η βασική αρχή απομόνωσης των CTCs με την πλατφόρμα Parsortix φαίνεται στο **Σχήμα 4.1**. Η κασέτα που χρησιμοποιείται για την απομόνωση έχει μια δομή διαχωρισμού με πολλαπλά κανάλια, μέσω των οποίων τα κύτταρα ωθούνται να διέλθουν και να οδηγηθούν σε μια τερματική διχάλα διαμέτρου 6,5μm. Λόγω του μικρότερου μεγέθους τους, τα περισσότερα κύτταρα του περιφερικού αίματος διέρχονται από αυτή την τερματική διχάλα, σε αντίθεση με τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα τα οποία λόγω μεγάλου μεγέθους και ακαμψίας παγιδεύονται στην κασέτα και δεν μπορούν να διαφύγουν μέσω της διχάλας των 6,5μm.



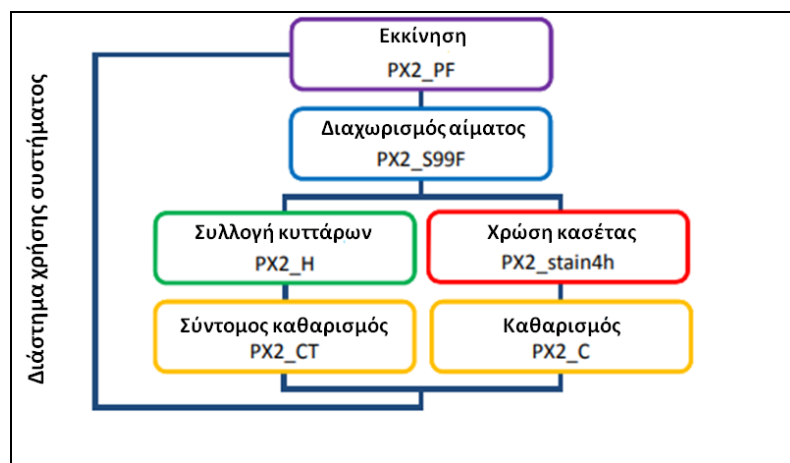
Σχήμα 4.1. Βασική αρχή εμπλουτισμού των CTCs με το σύστημα Parsortix.

4.2.2 Αντιδραστήρια και πειραματική πορεία

- Διάλυμα έκπλυσης PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7.3)
- Διάλυμα NaClO (10%)
- Διάλυμα έκπλυσης Decon Decomatic (10%)
- Απόλυτη αιθανόλη (100% v/v)
- Κασέτα διαχωρισμού

Κατά τον εμπλουτισμό των δειγμάτων περιφερικού αίματος σε CTCs ακολουθούνται τα βήματα του προγράμματος που αναγράφονται στην οθόνη του οργάνου, σύμφωνα με τον κατασκευαστή. Πραγματοποιείται η διέλευση 20mL δείγματος (ολικό περιφερικό και PBS) μέσα από την κασέτα διαχωρισμού (“separation cassette”) με μια επακόλουθη έκπλυση. Μετά την ολοκλήρωση του εμπλουτισμού, ακολουθεί το στάδιο συλλογής των CTCs (Harvest) που επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της ανάστροφης ροής, και τα κύτταρα αραιωμένα με 200μL διαλύματος PBS, συλλέγονται σε

σωληνάριο τύπου Eppendorf. Το πρόγραμμα συλλογής περιλαμβάνει την εφαρμογή 21 σύντομων παλμών, ώστε να απεγκλωβίσει τα δεσμευμένα- στην κασέτα- κύτταρα. Στο **Σχήμα 4.2** φαίνεται η πειραματική πορεία των προγραμμάτων του συστήματος Parsortix.



Σχήμα 4.2. Πειραματική πορεία εμπλουτισμού των CTCs με το σύστημα Parsortix.

Μετά τη συλλογή των CTCs, τα απομονωμένα κύτταρα διαλύονται σε 1mL διαλύματος TRIzol-LS (Invitrogen, USA) και αποθηκεύονται στους -80°C μέχρις ότου πραγματοποιηθεί απομόνωση RNA και DNA.

4.3 Απομόνωση ολικού RNA με το αντιδραστήριο TRIzol- LS (Thermo Fisher Scientific, USA)

4.3.1 Αρχή μεθόδου

Το αντιδραστήριο TRIzol-Ls χρησιμοποιείται για την απομόνωση υψηλής ποιότητας ολικού RNA από δείγματα κυττάρων ή ιστών. Πρόκειται για ένα μονοφασικό διάλυμα που αποτελείται κυρίως από φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη, με αποτέλεσμα την απομόνωση των διαφόρων ειδών RNA οποιουδήποτε μοριακού βάρους. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται μέσω της ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, που αποτελεί έναν αποδιατακτικό παράγοντα που απομακρύνει τις πρωτεΐνες που είναι προσδεδεμένες στο RNA, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει τη δράση των RNασών που απελευθερώνονται από τα διάφορα οργάνδια των κυττάρων. Με τη

μέθοδο του TRIzol-LS επιτυγχάνεται η απομόνωση μη αποικοδομημένου RNA. Έπειτα από τη λύση των κυττάρων ακολουθεί προσθήκη χλωροφορμίου και διαχωρισμός του διαλύματος σε τρεις διακριτές φάσεις:

- υπερκείμενη υδατική φάση που περιέχει το RNA
- κατώτερη έγχρωμη οργανική φάση που περιέχει τις περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά τμήματα DNA (50b- 10kb)
- ενδιάμεση φάση που περιέχει μεγαλύτερα τμήματα DNA και κάποιες από τις πρωτεΐνες

Το RNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη ισοπροπανόλης στην υδατική φάση.

4.3.2 Αντιδραστήρια και πειραματική πορεία

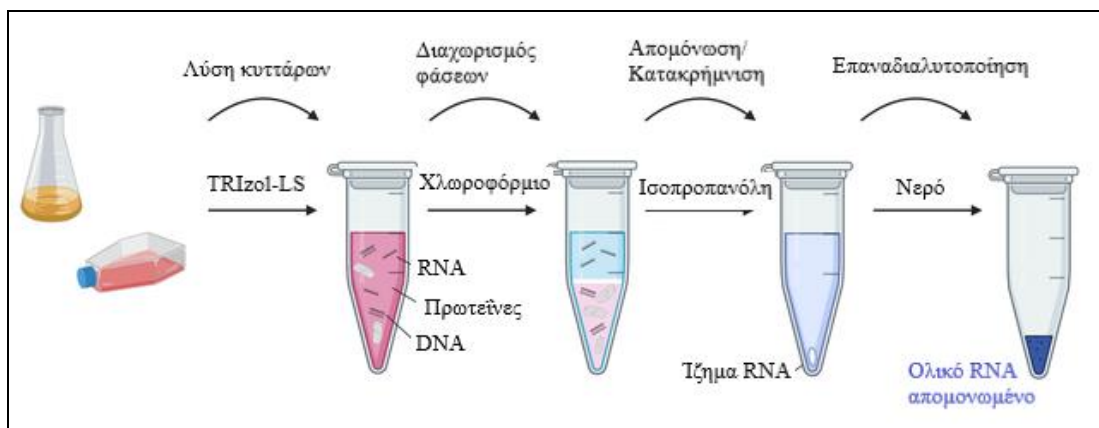
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ RNA
TRIzol-LS
Χλωροφόρμιο
Ισοπροπανόλη
75% v/v αιθανόλη
Καθαρό νερό

Μετά τον εμπλουτισμό του δείγματος σε CTCs και το διαχωρισμό από τα PBMCs, ακολουθεί η απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα με το αντιδραστήριο TRIzol- LS (Σχήμα 4.3)

1. Προσθήκη 1 mL του αντιδραστηρίου TRIzol-LS στο δείγμα και επώαση στους 15-30°C για 5 λεπτά, έτσι ώστε να γίνει λύση των κυττάρων, απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το RNA και αναστολή των RNAσών που απελευθερώνονται.
2. Προσθήκη 200μL χλωροφορμίου (για κάθε 1mL TRIzol-LS), έντονη ανάδευση με το χέρι για περίπου 15 δευτερόλεπτα και επώαση για 2-3 λεπτά στους 15-30°C. Το χλωροφόρμιο χωρίζει σε τρεις φάσεις το διάλυμα διατηρώντας το

ολικό RNA στην επάνω διαυγή, υδατική στιβάδα. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000g για 15 λεπτά (4 °C) που βοηθά στο διαχωρισμό των στιβάδων.

3. Προσεκτική μεταφορά της υδατικής στιβάδας σε καθαρό σωληνάριο τύπου Eppendorf κι έπειτα προσθήκη 500μL ισοπροπανόλης (για κάθε 1mL TRIzol-LS) και ήπια ανάδευση. Σε αυτό το στάδιο το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στους -20 °C μέχρι την επόμενη μέρα.
4. Επώαση για 10 λεπτά στους 15-30 °C και φυγοκέντρηση στα 12000g για 30 λεπτά (4 °C).
5. Απόχυση του υπερκειμένου διαλύματος, με αποτέλεσμα να παραμείνει στο Eppendorf το ίζημα που αποτελεί το ολικό RNA.
6. Προσθήκη 1mL 75% αιθανόλης αραιωμένης με H₂O (για κάθε 1mL TRIzol-LS) για την έκπλυση του ιζήματος, ανάδευση του διαλύματος και φυγοκέντρηση στα 12000g για 10 λεπτά (4 °C). Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται εις διπλούν.
7. Απόχυση του υπερκειμένου υγρού και φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα, προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα ίχνη της αιθανόλης. Η απομάκρυνση της αιθανόλης είναι απαραίτητο βήμα, καθώς δρα παρεμποδιστικά σε μεταγενέστερες αναλύσεις, ιδίως στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.
8. Το ίζημα αφήνεται σε πάγο ή σε κενό αέρα για 5- 10 λεπτά με σκοπό την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης και στη συνέχεια γίνεται επαναδιαλυτοποίηση σε 11μL καθαρού νερού. Τέλος, 1μL του διαλύματος χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA σε φασματοφωτόμετρο, ενώ το υπόλοιπο διάλυμα φυλάσσεται στους -70 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.



Σχήμα 4.3. Πειραματικά στάδια απομόνωσης ολικού DNA με τη χρήση αντιδραστηρίου TRIzol-LS.

4.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

4.4.1 Αρχή μεθόδου

Η αντίστροφη μεταγραφή αποτελεί τη διαδικασία σύνθεσης ενός συμπληρωματικού μορίου DNA (complementary DNA- cDNA) από ολικόRNA που προκύπτει έπειτα από απομόνωση. Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο κιτ αντιδραστηρίων “High- Capacity RNA-to-cDNATMkit” (Catalog Number: 4387406, Applied Biosystems), με τα εξής χαρακτηριστικά:

- ο Γρήγορο: με σύντομο χρόνο αντίδρασης, συνήθως 30-60 λεπτά
- ο Βολικό: με απλή ροή εργασίας και λίγα στάδια πιπετταρίσματος
- ο Αξιόπιστο: αντίστροφη μεταγραφή άφθονων, αλλά και περιορισμένων στόχων
- ο Ευέλικτο: με βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο δύο σταδίων, το οποίο δίνει τη δυνατότητα πολλαπλών PCR αντιδράσεων από μία μόνο αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η αντίδραση καταλύεται το ένζυμο M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) που υπάρχει στον ιό λευχαιμίας των ποντικών και είναι ικανό να συνθέσει μία συμπληρωματική αλυσίδα DNA με μήτρα RNA (σύνθεση cDNA) ή μονόκλωνο DNA. Η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου επιτυγχάνεται μέσω μείγματος oligo-dTs και τυχαίων οκταμερών ολιγονουκλεοτιδίων.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με επώαση για 1h στους 37°C καθώς αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου ενώ για τον τερματισμό της απαιτείται αύξηση της θερμοκρασίας στους 95°C για 5min ώστε να γίνει η απενεργοποίηση-μετουσίωση του ενζύμου.

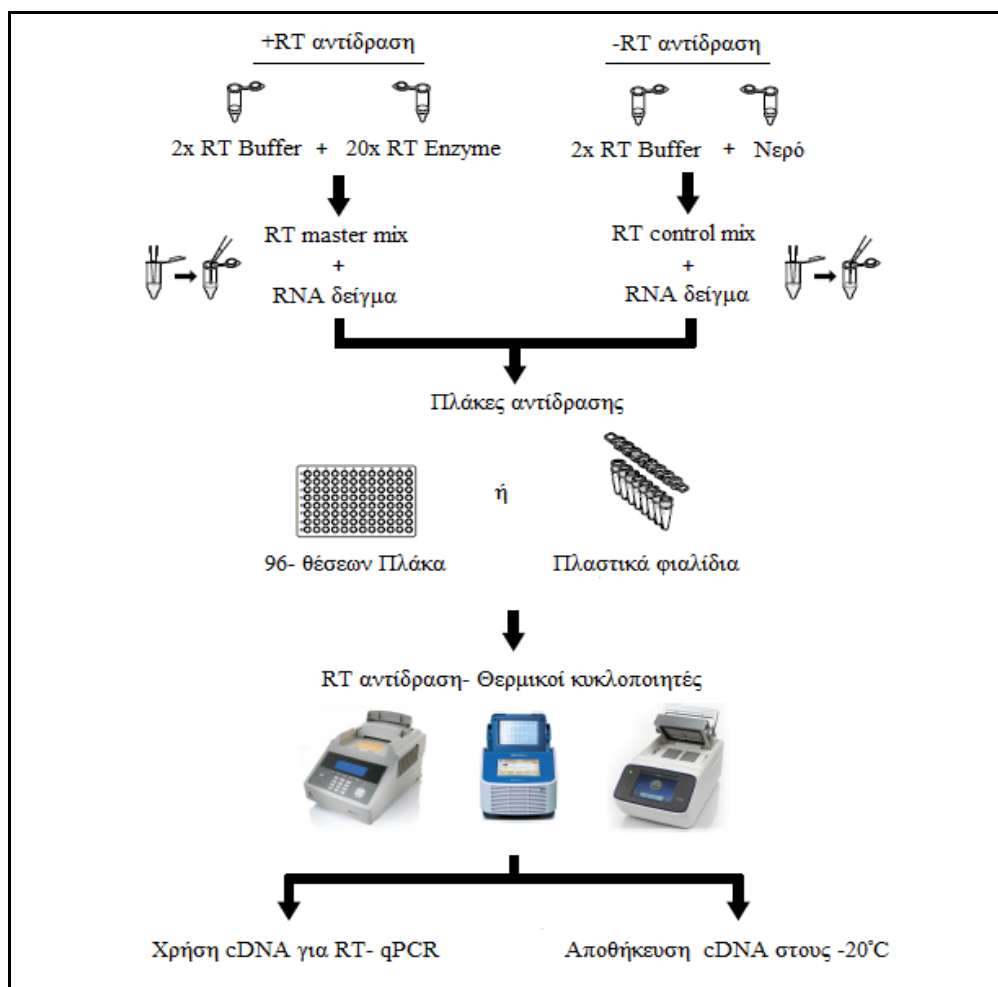
4.4.2 Αντιδραστήρια και πειραματική πορεία

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτούνται τα παρακάτω συστατικά στις αναλογίες που περιγράφονται στον **Πίνακα 4.1**, ενώ στο **Σχήμα 4.4** παρατίθεται η πειραματική πορεία σύνθεσης του συμπληρωματικού DNA.

Πίνακας 4.1. Συστατικά της αντίδρασης σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΟΓΚΟΣ (ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ)	
	+RT Αντίδραση	-RT Αντίδραση
2X RT Buffer Mix	10 μ l	10 μ l
20X RT Enzyme Mix	1 μ l	-
RNA δείγμα	μέχρι 9 μ l	μέχρι και 9 μ l
Nuclease- free H ₂ O	έως και 20 μ l	έως και 20 μ l
Τελικός όγκος/ αντίδραση	20 μ l	20 μ l

Σε κάθε πειραματική σειρά προστίθεται επιπλέον ένα δείγμα θετικού ελέγχου από μία κυτταρική σειρά (π.χ. MCF-7) ως γονίδιο αναφοράς, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής έγινε με επιτυχία, κι ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου που αντί για το δείγμα RNA περιέχει ddH₂O, έτσι ώστε να γίνει αντιληπτή οποιαδήποτε επιμόλυνση από ανεπιθύμητο γενωμικό DNA που θα δώσει λανθασμένο σήμα.



Σχήμα 4.4. Πειραματική πορεία αντίστροφης μεταγραφής προς σύνθεση συμπληρωματικού DNA με χρήση του “High- Capacity RNA-to-cDNA™ kit”.

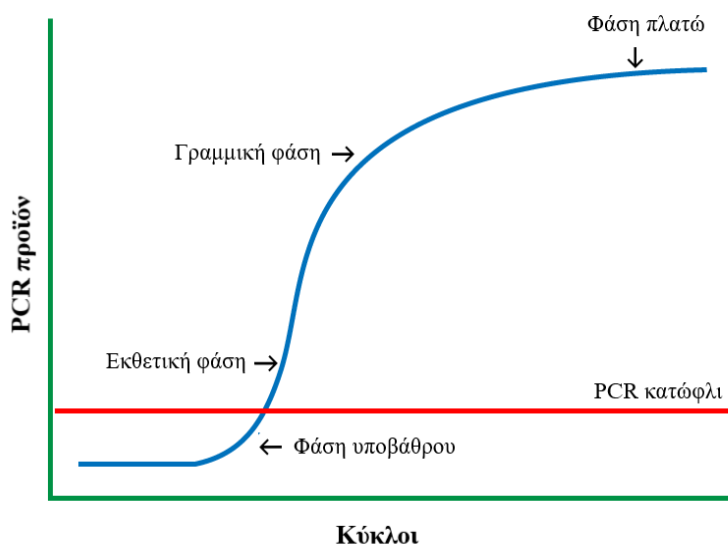
4.5 Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης

4.5.1 Αρχή μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR) είναι μια τεχνική in vitro πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA που αναπτύχθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Kary Mullis. Βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου DNA πολυμεράση να συνθέτει αντίγραφα DNA με κατεύθυνση 5'→3' εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) στο 3' άκρο ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών (primers), συμπληρωματικά ως προς την αλυσίδα που υπόκειται στην αντιγραφή. . Οι εκκινητές προσδένονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας- στόχου, με τον πρόσθιο εκκινητή να προσδένεται συμπληρωματικά στην αντινοσηματική αλυσίδα (3'-5') και τον ανάστροφο εκκινητή στη νοσηματική αλυσίδα (5'-3'). Στη συνέχεια, η DNA

πολυμεράση επεκτείνει τα 3' άκρα των εκκινητών προσθέτοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια συμπληρωματικά ως προς την αλυσίδα που αντιγράφεται. Κατά τους πρώτους κύκλους της αντίδρασης δημιουργείται ένα ενδιάμεσο προϊόν, με μήκος μεγαλύτερο του επιθυμητού, με την πάροδο όμως των κύκλων αρχίζουν να δημιουργούνται πολλά αντίγραφα του DNA- στόχου. Η PCR χαρακτηρίζεται από τις εξής τέσσερις φάσεις, όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 4.5**:

- **Φάση υποβάθρου:** Δε λαμβάνεται σήμα φθορισμού λόγω έλλειψης του προϊόντος.
- **Εκθετική φάση:** Στη φάση αυτή έχουν αρχίσει να δημιουργούνται αντίγραφα της αλληλουχίας- στόχου. Σε κάθε κύκλο, θεωρητικά, έχουμε διπλασιασμό των μορίων DNA άρα και εκθετική αύξηση του DNA στόχου.
- **Γραμμική φάση:** Μειωμένη παραγωγή των αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων.
- **Φάση πλατώ (κορεσμού):** Σταματά η παραγωγή νέων αντιγράφων λόγω εξάντλησης ενός ή περισσοτέρων αντιδραστηρίων.

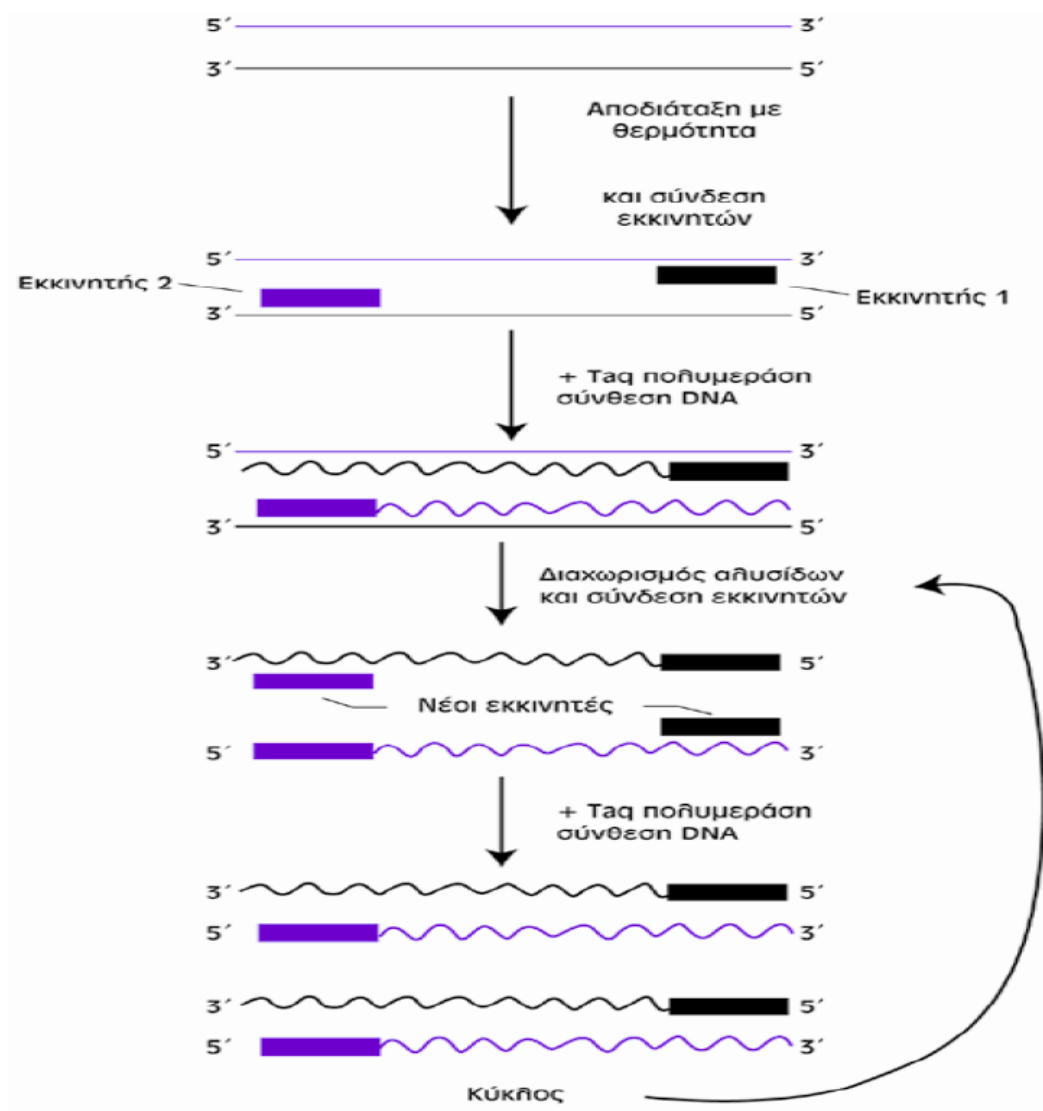


Σχήμα 4.5. Φάσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Τα στάδια του κάθε κύκλου των PCR αντιδράσεων είναι τα εξής:

1. **Αποδιάταξη του DNA (denaturation) στους 95°C.** Λόγω υψηλής θέρμανσης σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA, η διπλή έλικα ανοίγει και δημιουργούνται οι δύο μονόκλωνες αλυσίδες
2. **Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing) στους 50-60°C.** Οι εκκινητές προσδένονται συμπληρωματικά στο εκμαγείο DNA που επιθυμούμε να αντιγράψουμε. Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις G και C, όπου θεωρητικά για έναν εκκινητή μήκους <25 βάσεων δίνεται από τον τύπο: $T_m = (A+T) \cdot 2^\circ C + (G+C) \cdot 4^\circ C$
3. **Επέκταση εκκινητών (extension) στους 72°C.** Η θερμοκρασία αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Το ένζυμο θα επεκτείνει τους εκκινητές χρησιμοποιώντας τα δεοξυριβονουκλεοτίδια που υπάρχουν στο μίγμα της αντιδρασης κι έτσι θα αρχίσει να συντίθεται η συμπληρωματική αλυσίδα.

Στο **Σχήμα 4.6** φαίνεται η αρχή μεθόδου της PCR και τα στάδια του κάθε κύκλου.



Σχήμα 4.6. Αρχή της μεθόδου PCR.

4.5.2 Αντιδραστήρια και πειραματική πορεία

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ
Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer (20x)
MgCl ₂ (25mM)
dNTPs (10mM)

Πρόσθιος εκκινητής- Forward primer (10μM)
Ανάστροφος εκκινητής- Reverse primer (10μM)
Taq DNA πολυμεράση (10U/uL))
BSA (10μg/ μl)
Καθαρό νερό

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικούς κυκλοποιητές, οι οποίοι είναι προγραμματισμένοι να ακολουθούν προκαθορισμένες θερμοκρασίες και χρόνους ανάλογα με τον κύκλο. Ένα κλασικό πρωτόκολλο PCR αποτελείται από τις εξής συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνων:

- 1. Αποδιάταξη** στους 95°C για 15 λεπτά αρχικά και στη συνέχεια για 30 δευτερόλεπτα σε κάθε νέο κύκλο
- 2. Υβριδοποίηση** στους 50-60 °C για περίπου 30 δευτερόλεπτα, ανάλογα με την θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών
- 3. Επιμήκυνση** στους 72 °C για περίπου 30 δευτερόλεπτα

Με το πέρας 25-40 κύκλων αναλόγως το πρωτόκολλο, η PCR θα περάσει στη φάση πλατώ.

Με την πάροδο των χρόνων έχουν δημιουργηθεί αρκετές παραλλαγές της κλασικής PCR, ανάλογα με την απαιτούμενη ειδικότητα, απόδοση, χρόνο αλλά και τη διαθέσιμη ποσότητα δείγματος. Κάποιες από τις σημαντικές και πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές στα εργαστήρια είναι η “PCR Αντίστροφης Μεταγραφής” (Reverse Transcription PCR) σε πειράματα όπου το ζητούμενο είναι να ελεγχθεί η έκφραση ενός γονιδίου, η “Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου” (quantitative Real Time PCR) με την οποία μπορούμε να παρακολουθούμε σε πραγματικό χρόνο την αντίδραση με τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης της ποσότητας DNA που υπάρχει στο δείγμα, η “Hot Start PCR” κατά την οποία επιτυγχάνεται αυξημένη ειδικότητα λόγω τροποποίησης της DNA πολυμεράσης που δεν της επιτρέπει να δρα σε θερμοκρασία

δωματίου παρά μόνο στη βέλτιστη θερμοκρασία. Άλλες δύο πολύ σημαντικές παραλλαγές αποτελούν η “Nested PCR” όπου χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών (εξωτερικό και εσωτερικό ζεύγος) με σκοπό την αύξηση της ειδικότητας του προϊόντος και η “Multiplex PCR”, κατά την οποία ενισχύονται ταυτόχρονα πολλαπλές αλληλουχίες DNA από ένα μόνο δείγμα, που πλεονεκτεί ως προς τη μικρή ποσότητα δείγματος που απαιτεί και τον μικρότερο χρόνο που χρειάζεται για να ελέγξουμε πολλές αλληλουχίες σε ένα μόνο πείραμα. Αναλόγως με την αναγκαιότητα του κάθε πειράματος ως προς την ειδικότητα, την απόδοση και άλλους παράγοντες, επιλέγεται και η κατάλληλη παραλλαγή PCR.

4.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η συμβατική PCR έχει το μειονέκτημα ότι γίνεται εκτίμηση των προϊόντων στη φάση κορεσμού (πλατώ) και μας στερεί τη δυνατότητα να παρακολουθήσουμε την εξέλιξη της αντίδρασης κατά τα διάφορα στάδια. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ευρέως μία παραλλαγή της PCR, η PCR πραγματικού χρόνου, η οποία καθιστά ικανή τόσο την ποιοτική αλλά όσο και την ποσοτική εκτίμηση των αντιγράφων της αλληλουχίας- στόχου.

4.6.1 Αρχή μεθόδου

Η PCR πραγματικού χρόνου βασίζεται στην προσθήκη φθορίζοντων μορίων στο μίγμα της αντίδρασης, τα οποία ιχνηθετούν τα προϊόντα που συντίθενται κατά την πορεία της PCR, κι έτσι δίνεται η δυνατότητα μέτρησης του σήματος φθορισμού που εκπέμπεται από τα μόρια αυτά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να εκτιμήσουμε είτε ποιοτικά είτε ποσοτικά το δείγμα μας, ανάλογα με την ένταση του φθορισμού η οποία είναι ανάλογη προς τον αριθμό των αντιγράφων που προκύπτουν με το πέρας των κύκλων της αντίδρασης.

Οι φθορίζουσες ουσίες διακρίνονται σε ειδικές και μη ειδικές ως προς τη συγκεκριμένη αλληλουχία που επιθυμούμε την ενίσχυσή της,.

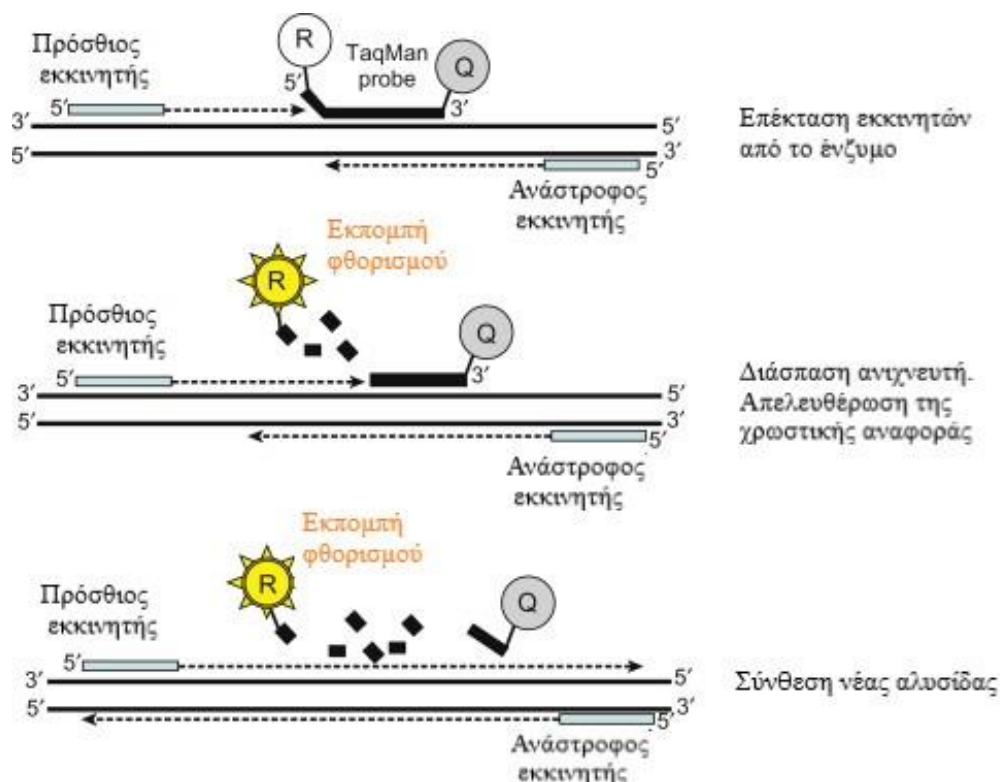
- ο **Μη ειδικές:** ευρέως χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες ουσίες αυτού του τύπου είναι οι SYBR Green ή LC Green. Πρόκειται για χρωστικές οι οποίες έχουν την ικανότητα να προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA, με αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης φθορισμού έως και 1000 φορές. Επομένως κατά τη

διάρκεια της Real Time PCR και καθώς αυξάνονται τα δίκλωνα προϊόντα, οι χρωστικές προσδένονται στα προϊόντα και φθορίζουν σε μία ένταση ανάλογη της ποσότητας των αντιγράφων που έχουν δημιουργηθεί στην αντίδραση.

- ο **Ειδικές:** πρόκειται για φθορίζοντα μόρια τα οποία είναι ειδικά ως προς ένα σημείο της αλληλουχίας που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Έτσι, προσδένονται σε ένα σημείο μεταξύ των εκκινητών και φέρουν φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν φθορισμό ανάλογα με το είδους του κάθε ειδικού ανιχνευτή. Παραδείγματα τέτοιων εκκινητών αποτελούν οι ιχνηθέτες υδρόλυσης (Hydrolysis probes), οι «μοριακοί φάροι» (Molecular beacons), οι «σκορπιοί» (Scorpions) και οι ιχνηθέτες υβριδισμού (Hybridization probes).

Ανεξάρτητα από το σύστημα ανίχνευσης που χρησιμοποιείται σε κάθε διαφορετικό πρωτόκολλο, το κοινό χαρακτηριστικό των συστημάτων αυτών είναι η αντιστοιχία της ενίσχυσης του DNA με την ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται. Έτσι, κατά την πορεία της αντίδρασης, όσο αυξάνεται η αλληλουχία του DNA που ενισχύουμε, τόσο αυξάνεται και ο φθορισμός. Για την ποσοτικοποίηση του προϊόντος μας ενδιαφέρει ο όρος “Threshold Cycle” (Ct) ή “Quantification Cycle” (Cq), ο οποίος αποτελεί τον κύκλο στον οποίο το σήμα φθορισμού διαχωρίζεται από τον φθορισμό λόγω υποβάθρου, δηλαδή αποτελεί το σημείο στο οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώτερο όριο ανίχνευσης της αντίδρασης (κατώφλι). Με βάση τον κύκλο Cq μπορούμε να αξιολογήσουμε ποιοτικά το δείγμα μας αλλά και σε σχέση με άλλα δείγματα, καθώς ένα δείγμα με χαμηλό Cq (νωρίτερη εμφάνιση) δείχνει ότι υπάρχει μεγαλύτερη αφθονία της αλληλουχίας αυτής σε σχέση με ένα άλλο δείγμα στο οποίο χρειάστηκαν περισσότεροι κύκλοι, άρα εμφανίζεται σε υψηλότερο Cq, για να έχουμε σήμα φθορισμού. Επιπλέον, η καμπύλη ποσοτικοποίησης γνωστών δειγμάτων στα οποία έγιναν διαδοχικές αραιώσεις και μετρήθηκε ο φθορισμός και το σημείο Cq, μας δίνει τη δυνατότητα να ποσοτικοποιήσουμε απόλυτα των αριθμό αντιγράφων που έχει το δείγμα μας με βάση την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο **ανιχνευτής τύπου Taqman**, που αποτελεί έναν ιχνηθέτη υδρόλυσης. Ο ανιχνευτής Taqman αυξάνει την ειδικότητα της αντίδρασης, καθώς προσδένεται συμπληρωματικά με την αλληλουχία στόχο και εκπέμπει σήμα φθορισμού μόνο όταν ενισχύεται το επιθυμητό προϊόν στην αντίδραση. Στο **Σχήμα 4.7** φαίνεται η αρχή λειτουργίας του ανιχνευτή τύπου Taqman.



Σχήμα 4.7. Αρχή λειτουργίας του ιχνηθέτη τύπου Taqman.

Ο ανιχνευτής Taqman βασίζεται στην ενεργότητα $5' \rightarrow 3'$ εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, καθώς και σε διπλά σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια- ιχνηθέτες που εκπέμπουν φθορισμό μόνο όταν βρίσκονται σε μακρινή απόσταση μεταξύ τους. Η ιχνηθέτηση αυτή στηρίζεται στην αρχή μεταφοράς ενέργειας συντονισμού με φθορισμό (Fluorescence Resonance Energy Transfer- FRET), κατά την οποία η περιοχή μήκους κύματος στην οποία εκπέμπει μία φθορίζουσα ουσία αποτελεί την περιοχή απορρόφησης της δεύτερης ουσίας (επικαλυπτόμενα φάσματα). Ο ανιχνευτής σχεδιάζεται έτσι ώστε να φέρει στο $5'$ άκρο του μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (reporter fluorescent dye), ενώ στο $3'$ άκρο του έχει συνδεδεμένη μια χρωστική-αποσβέστη (quencher dye) η οποία όταν βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με τη χρωστική αναφοράς εμποδίζει την εκπομπή φθορισμού, με αποτέλεσμα την έλλειψη σήματος. Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε ως χρωστική αναφοράς η 6-FAM (6-carboxyfluorescein) η οποία απορροφά στα 495nm και εκπέμπει στα 520nm, ενώ ως χρωστική αποσβέστης χρησιμοποιήθηκε η BHQ_1 (Black Hole Quencher 1). Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης όπου αρχίζει να συντίθεται ο DNA στόχος, ο ανιχνευτής Taqman προσδένεται συμπληρωματικά στην αλληλουχία- στόχο και στη συνέχεια η Taq πολυμεράση κατά την επέκταση των εκκινήτων διασπά τον ανιχνευτή

εξαιτίας της δράσης της ως 5'→3' εξωνουκλεάση. Έτσι η χρωστική αναφοράς απελευθερώνεται και δεν βρίσκεται πλέον σε κοντινή απόσταση με τη χρωστική αποσβέστη, με αποτέλεσμα την εκπομπή σήματος φθορισμού, γεγονός που μας επιβεβαιώνει την παρουσία του επιθυμητού DNA στόχου στο δείγμα. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται με την πρόοδο της αντίδρασης, καθώς συσσωρεύονται όλο και περισσότερα αντίγραφα της ακολουθίας- στόχου.

Η συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας πορεύτηκε με βάση τα “**MIQE guidelines**” (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) κατά την ανάπτυξη του πρωτοκόλλου της Real- Time PCR (114).

4.6.2 Αντιδραστήρια

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ
Ρυθμιστικό διάλυμα- Buffer (5x)
MgCl ₂ (25mM)
dNTPs (10mM)
Πρόσθιος εκκινητής- Forward primer (10μM)
Ανάστροφος εκκινητής- Reverse primer (10μM)
Ιχνηθέτης- Taqman Probe (3μM)
Taq DNA πολυμεράση (10u/ul)
BSA (10μg/ μl)
Καθαρό νερό

Οι συνθήκες θερμοκρασίας είναι οι ίδιες με τη συμβατική PCR και η ακριβής θερμοκρασία ορίζεται με βάση το εκάστοτε πρωτόκολλο έπειτα από βελτιστοποίηση.

4.6.3 Οργανολογία

Σύστημα Cobas® 4800 (Roche Diagnostics)

Για τις αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Cobas®4800 (**Σχήμα 4.8**), που αποτελείται από τον αναλυτή Cobas z480 και το λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης LightCycler® 480. Αποτελεί έναν κυκλοποιητή ταχέως θερμικού μπλοκ που δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ενίσχυσης και ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων- στόχων σε πραγματικό χρόνο.

Η ανίχνευση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί:

1. Μέσω χρωστικών που προστέθηκαν στο μίγμα της αντίδρασης PCR (π.χ. LC Green), οι οποίες χαρακτηρίζονται από αύξηση σήματος φθορισμού όταν προσδένονται σε δίκλιωνα μόρια DNA.
2. Μέσω συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων- ανιχνευτών σημασμένων με φθορίζουσες ουσίες (π.χ. Taqman Probe) που προσδένονται ειδικά στην αλληλουχία- στόχο και εξαιτίας της πρόσδεσης αυτής εκπέμπουν φθορισμό.

Και στις δύο προσεγγίσεις γίνεται αντιστοιχία της έντασης του σήματος φθορισμού με τον αριθμό αντιγράφων DNA, επομένως το Cobas z 480 δίνει τη δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης της αλληλουχίας- στόχου κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης (ποσοτική Real- Time PCR). Επιπλέον, η ταυτόχρονη ανίχνευση τεσσάρων καναλιών- ανιχνευτών επιτρέπει την ανάλυση σημάτων από διαφορετικές χρωστικές σε πολλαπλές δοκιμασίες PCR (multiplex PCR).

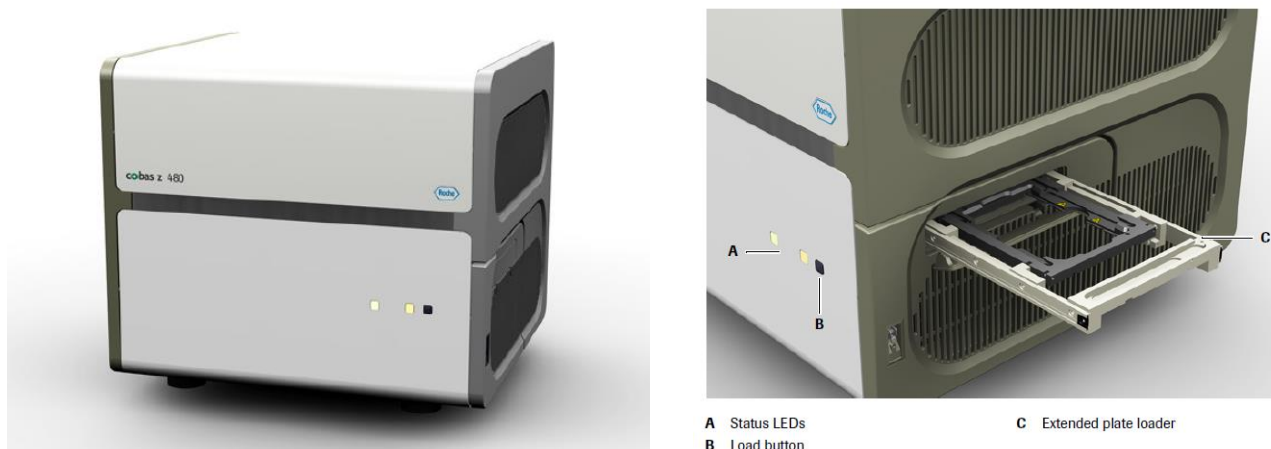
Οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε πλαστικά σωληνάρια με τελικό όγκο αντίδρασης 10μl, τα οποία φυγοκεντρώνονται για λίγα δευτερόλεπτα και στη συνέχεια προστίθενται σε κατάλληλη πλατφόρμα 96- θέσεων (96-well plate). Στο εσωτερικό του οργάνου υπάρχουν τα εξής **κύρια δομικά στοιχεία**:

- ο Θερμικό μπλοκ με κάλυμμα κυλίνδρου μπλοκ, εξαεριστήρας, φορτωτής πλατφόρμας πολλαπλών θέσεων και barcode scanner των θέσεων στην πλατφόρμα αυτή. Ο θερμικός κυκλοποιητής ψύχει και θερμαίνει ομοιόμορφα

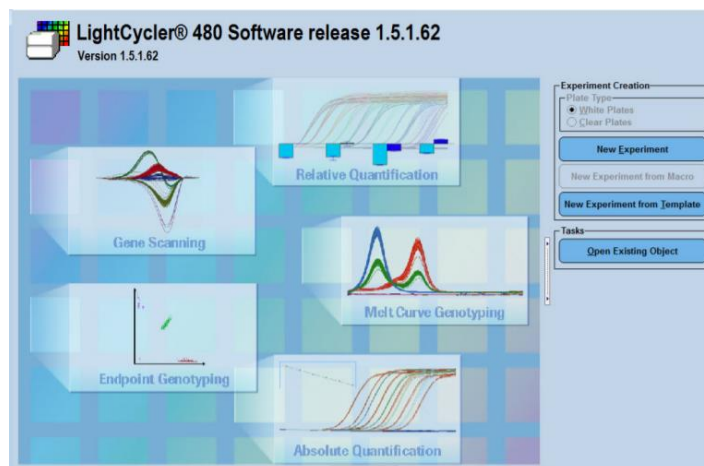
την πλατφόρμα 96-θέσεων κατά τις διάφορες μεταβολές θερμοκρασίας, με χρήση θερμοηλεκτρικών στοιχείων Peltier.

- Πηγή διέγερσης
- Μπλε δίοδος με φάσμα εκπομπής στα 390- 710nm
- Φίλτρα εκπομπής σε πέντε μήκη κύματος: 480nm, 465nm, 498nm, 533nm και 618nm

Το σύστημα Cobas z 480 είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή, στον οποίο γίνεται η παρακολούθηση της αντίδρασης και η ανίχνευση των προϊόντων μέσω του λογισμικού LightCycler®480 (**Σχήμα 4.8**). Η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται σε έξι μήκη κύματος: 488nm, 510nm, 610nm, 640nm και 660nm. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται ο αναλυτής Cobas, η θύρα στην οποία προστίθεται η πλατφόρμα των 96-θέσεων και το λογισμικό LightCycler.



Σχήμα 4.8. Όργανο Cobas z 480 (Roche Diagnostics). Στα αριστερά αντικατοπτρίζεται η μπροστινή όψη του οργάνου και στα δεξιά η πλαϊνή όψη στην οποία γίνεται φόρτωση των δειγμάτων στην πλατφόρμα 96-θέσεων.



Σχήμα 4.9. Πρόγραμμα LightCycler® 480 με το οποίο γίνεται η παρακολούθηση της αντίδρασης και η συλλογή αποτελεσμάτων.

4.6.4 *In silico* σχεδιασμός εκκινητών

Ως *in silico* μελέτη χαρακτηρίζεται η υπολογιστική μελέτη μέσω της οποίας επιλέγονται οι βέλτιστες αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων- εκκινητών, με σκοπό την υψηλή εξειδίκευση της αντίδρασης PCR. Για το σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, USA)

Τα κριτήρια που πρέπει να πληροί ένα ζεύγος εκκινητών είναι τα εξής:

- Το μέγεθός τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 18- 25bp
- Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (Primer Melting Temperature, T_m) ή θερμοκρασία υβριδισμού (Annealing Temperature) πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 52- 60°C, και εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση σε βάσεις G και C των εκκινητών. Η διαφορά της θερμοκρασίας τήξης μεταξύ των δύο εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην ίδια αντίδραση PCR πρέπει να είναι το πολύ 2°C
- Η περιεκτικότητά τους σε βάσεις GC πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40-60%, ενώ στο 3' των εκκινητών συνίσταται να αποφεύγεται η επανάληψη των βάσεων G και C
- Η πιο σημαντική περιοχή στην οποία πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή κατά το σχεδιασμό είναι το 3' άκρο των εκκινητών, διότι από αυτή την περιοχή ξεκινάει η ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος. Έτσι, είναι αναγκαίο να μη σχηματίζονται δευτεροταγείς και παλινδρομικές δομές και να μην

περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Επιπλέον, οι αλληλουχίες των εκκινητών δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, κυρίως στο 3' άκρο, προς αποφυγή διμερών

- ο Πολύ σημαντικό είναι οι εκκινητές να παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση με την επιθυμητή αλληλουχία, και να αποφεύγεται οποιαδήποτε ομολογία με ανεπιθύμητες περιοχές

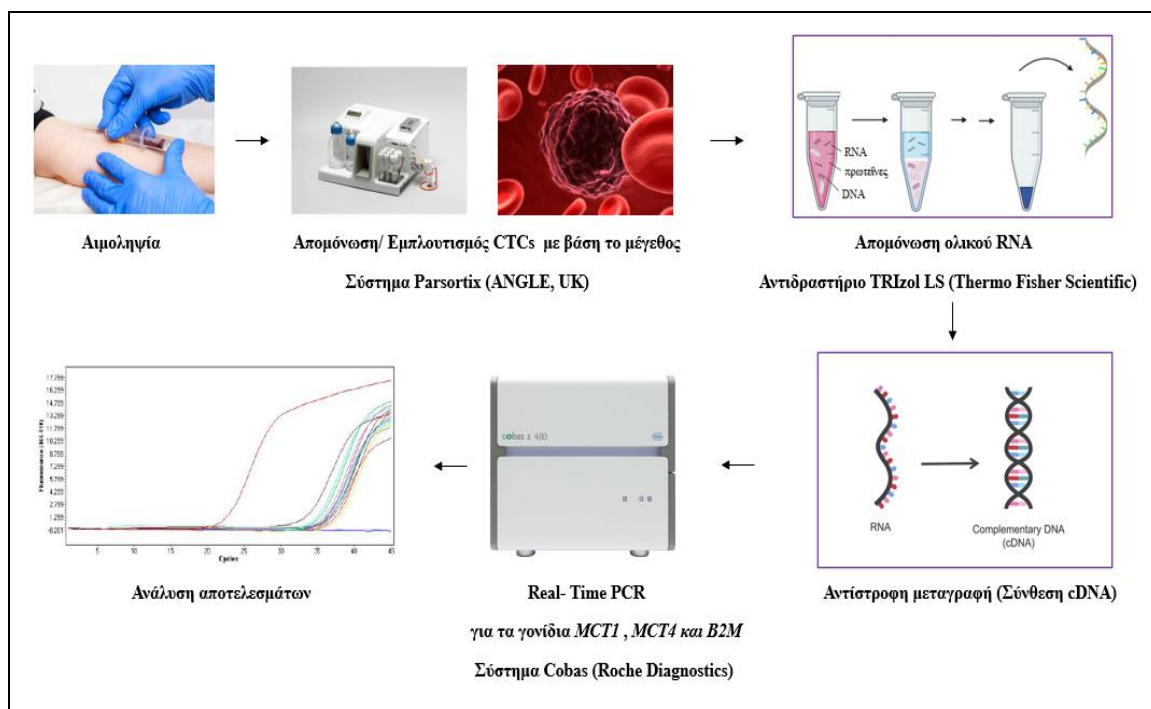
Για την ενίσχυση τόσο του γονιδίου αναφοράς (*B2M*) όσο και των μεταγράφων των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές (primers) και ειδικοί ιχνηθέτες Taqman (Hydrolysis Taqman Probe), που σχεδιάστηκαν *in silico* με το πρόγραμμα **Primer Premier 5.0**. Για να εξασφαλιστεί η ειδικότητα της αλληλουχίας όλων των εκκινητών και ιχνηθετών, διεξήχθη έλεγχος BLAST (NCBI, nucleotide BLAST), όπου ελέγχθηκαν πιθανές ομολογίες των εκκινητών ως προς ανεπιθύμητες αλληλουχίες. Επιπλέον, οι εκκινητές και ιχνηθέτες σχεδιάστηκαν με προσοχή ούτως ώστε να αποφευχθούν εντελώς ο σχηματισμός διμερών μεταξύ των εκκινητών και σταθερών δομών φουρκέτας, τα ψευδή σημεία εκκίνησης και η υβριδοποίηση σε γενωμικό DNA.

ΚΕΦ. 5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ 1 (*MCT1*) ΣΕ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

5.1 Πειραματική πορεία

Οι διαδικασίες απομόνωσης των CTCs απ' το περιφερικό αίμα, απομόνωσης του ολικού RNA από τα CTCs και σύνθεσης του cDNA περιγράφηκαν αναλυτικά στις **παραγράφους 4.2, 4.3 και 4.4** αντίστοιχα και ήταν οι ίδιες για όλα τα δείγματα. Το διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας παρουσιάζεται στο **Σχήμα 5.1**. Η ποιότητα όλων των δειγμάτων cDNA ελέγχθηκε με τη μελέτη του γονιδίου αναφοράς *B2M* (β2-μικροσφαιρίνη) με RT- qPCR. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταγράφων *MCT1*, *MCT4* και *B2M* ακολουθήθηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα RT-qPCR ανάλογα με το γονίδιο που μελετήθηκε, τα οποία παρατίθενται παρακάτω.

Σε κάθε στάδιο της πειραματικής πορείας συμπεριλήφθηκε, εκτός των δειγμάτων, ένας αρνητικός μάρτυρας για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης κι ένας θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της καλής απόδοσης των διαδικασιών απομόνωσης, αντίστροφης μεταγραφής και της Real- Time PCR. Προς αποφυγή επιμολύνσεων στην PCR, κάθε διαδικασία έγινε σε ξεχωριστούς χώρους, με διαφορετικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Η απομόνωση του RNA, η αντίστροφη μεταγραφή και η προετοιμασία των αντιδράσεων της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε σε ειδικούς θαλάμους νηματικής ροής (Laminar- flow hoods).



Σχήμα 5.1. Πειραματική πορεία για τη μελέτη μεταγράφων των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* σε ασθενείς με NSCLC.

Ακολουθούν οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες των αντιδράσεων Real- Time PCR για το κάθε γονίδιο.

5.1.1 Συνθήκες αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς *B2M*

Πίνακας 5.1. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη Taqman για το γονίδιο *B2M*

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία 5'→3'	Μέγεθος (bp)	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>B2M</i>	Πρόσθιος	GCCTGCCGTGTGAACCATGT	20	63.7	99
	Ανάστροφος	AAATGCGGCATCTTCAAACCTC	22	63.2	
	Ιχνηθέτης TaqMan	FAM-CATGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCCAC-BBQ	30	73.4	

Πίνακας 5.2. Συστατικά αντίδρασης της RT- qPCR για την ενίσχυση του γονιδίου B2M.

Αντιδραστήρια Mix	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Buffer Mix (5x)	1	0,5x
MgCl₂ (25mM)	1,2	3mM
dNTPs (10mM)	0,15	0,15mM
BSA (10 μg/μL)	0,3	0,3 μg/μL
Forward Primer B2M (10μM)	0,25	0,25μM
Reverse Primer B2M (10μM)	0,25	0,25 μM
TaqMan probe (3μM)	0,83	0,25 μM
Go Taq® G2 Hot Start Polymerase	0,1	0,05 U/μL
ddH₂O	4,92	-
cDNA	1	-
Τελικός όγκος/ αντίδραση	10	-

Πίνακας 5.3. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αντίδρασης RT- qPCR για το γονίδιο B2M.

Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
Αποδιάταξη	2 min	95°C	1
Ενίσχυση	10 s	95°C	45
	20s	58°C	
	20s	72°C	
Ψύξη	30s	40°C	1

5.1.2 Συνθήκες αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου *MCT1*

Πίνακας 5.4. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη Taqman για το γονίδιο MCT1.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία 5'→3'	Μέγεθος (bp)	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>MCT1</i>	Πρόσθιος	CATGATTGTTGGTGGCTGC	19	54.9	115
	Ανάστροφος	GAAGGCAAGCCCAAGACC	18	56.5	
	Ιχνηθέτης TaqMan	FAM-TCAGGCTGTGGCTTGATTGCA-BHQ	21	59.8	

Πίνακας 5.5. Συστατικά αντίδρασης της RT- qPCR για την ενίσχυση του γονιδίου MCT1.

Αντιδραστήρια Mix	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Buffer Mix (5x)	2	1x
MgCl₂ (25mM)	1	2,5mM
dNTPs (10mM)	0,2	0,2mM
BSA (10 μg/μL)	0,5	0,5 μg/μL
Forward Primer <i>MCT1</i> (10μM)	0,3	0,3μM
Reverse Primer <i>MCT1</i> (10μM)	0,3	0,3 μM
TaqMan probe (3μM)	1	0,3 μM
Go Taq® G2 Hot Start Polymerase	0,1	0,05 U/μL
ddH₂O	3,6	-
cDNA	1	-

Τελικός όγκος/ αντίδραση	10	-
--------------------------	----	---

Πίνακας 5.6. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αντίδρασης RT- qPCR για το γονίδιο MCT1.

Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
Αποδιάταξη	2 min	93°C	1
Ενίσχυση	10 s	93°C	45
	15s	59°C	
	15s	72°C	
Ψύξη	10s	40°C	1

5.1.3 Συνθήκες αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου *MCT4*

Πίνακας 5.7. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη Taqman για το γονίδιο MCT4.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία 5'→3'	Μέγεθος (bp)	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>MCT4</i>	Πρόσθιος	CCCTTCGGGAGGCAAACCT	18	59.7	133
	Ανάστροφος	TTTGGGCTTCTTCCTAATGCA	21	60.2	
	Ιχνηθέτης TaqMan	FAM-TGTGCGTGAACCGCTTTGGCTG-BHQ	22	70.8	

Πίνακας 5.8. Συνστατικά αντίδρασης της RT- qPCR για την ενίσχυση του γονιδίου MCT4.

Αντιδραστήρια Mix	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Buffer Mix (5x)	2	1x
MgCl₂ (25mM)	1	2,5mM
dNTPs (10mM)	0,2	0,2mM
BSA (10 μg/μL)	0,5	0,5 μg/μL
Forward Primer MCT4(10μM)	0,2	0,2μM
Reverse Primer MCT4 (10μM)	0,2	0,2 μM
TaqMan probe (3μM)	0,6	0,18 μM
Go Taq® G2 Hot Start Polymerase	0,1	0,05 U/μL
ddH₂O	4,2	-
Cdna	1	-
Τελικός όγκος/ αντίδραση	10	-

Πίνακας 5.9. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αντίδρασης RT- qPCR για το γονίδιο MCT4.

Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
Αποδιάταξη	3 min	95°C	1
Ενίσχυση	10 s	95°C	45
	15s	58°C	
	15s	72°C	
Ψύξη	10s	40°C	1

5.2 Κλινικά δείγματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 119 δείγματα περιφερικού αίματος από 59 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο Μη- Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα (ΜΜΚΠ) πρώιμου σταδίου (I-IIIΑ). Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν α) 59 δείγματα πριν τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, β) 49 δείγματα των ίδιων ασθενών ένα μήνα μετά την αφαίρεση και γ) 11 δείγματα κατά τη φάση της υποτροπής. Επιπλέον, ως δείγματα ελέγχου (controls) συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από 19 υγιείς δότες, τα οποία αναλύθηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με τα παθολογικά δείγματα. Όλοι οι υγιείς δότες δεν είχαν κάποια γνωστή ασθένεια ή πυρετό τη στιγμή της αιμοληψίας, ούτε ιστορικό κάποιας κακοήθειας.

5.3 Κανονικοποίηση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των *MCT1* και *MCT4* στα CTCs

Η κανονικοποίηση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των *MCT1* και *MCT4* στα CTCs πραγματοποιείται σύμφωνα με την έκφραση του *B2M* ως γονίδιο αναφοράς και χρησιμοποιώντας τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_q}$ από τους Livak και Schmittgen (115).

Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* εκτιμάται ως μια σχετική αναλογία ως προς την έκφραση του *B2M* τόσο στο κλάσμα CTCs των ασθενών, όσο και στο αντίστοιχο κλάσμα μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) της ομάδας των υγιών δοτών (βαθμονομητής) που απομονώθηκε και αναλύθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως τα κλινικά δείγματα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_q}$, αξιολογήθηκε η υπερέκφραση των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* στο κλάσμα CTCs των δειγμάτων.

Στα CTCs, ένα δείγμα χαρακτηρίστηκε ως θετικό στην υπερέκφραση των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* με βάση την αλλαγή της έκφρασής τους σε σχέση με την ομάδα των 19 υγιών δοτών που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Η τιμή του ορίου λήψης (cut off) (μέση τιμή $\pm 2SD$), υπολογίστηκε σύμφωνα με την έκφραση των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* στο κλάσμα PBMCs του υγιούς πληθυσμού, καθώς γνωρίζουμε πως στα δείγματα των υγιών δεν υπάρχουν CTCs, άρα με την ίδια μέθοδο απομονώνονται μόνο τα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Πιο αναλυτικά, γι' αυτά τα 19 δείγματα ελέγχου, μετρήθηκε η διαφορά της τιμής του C_q ($\Delta C_{q\text{control}}$) για τα *MCT1* και *MCT4* από την αντίστοιχη τιμή C_q για το *B2M* (πχ. $C_{qMCT1} - C_{qB2M}$) και υπολογίστηκε η μέση

τιμή τους. Ακολούθησε υπολογισμός του $\Delta\Delta C_q$ (ΔC_q - μέση τιμή) για κάθε δείγμα ελέγχου και στη συνέχεια υπολογίστηκε το $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Η μέση τιμή των 19 τιμών $2^{-\Delta\Delta C_q}$ των υγιών δοτών $\pm 2SD$ αποτελεί το cut off για την υπερέκφραση των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* στα CTCs ασθενών με MMKΠ.

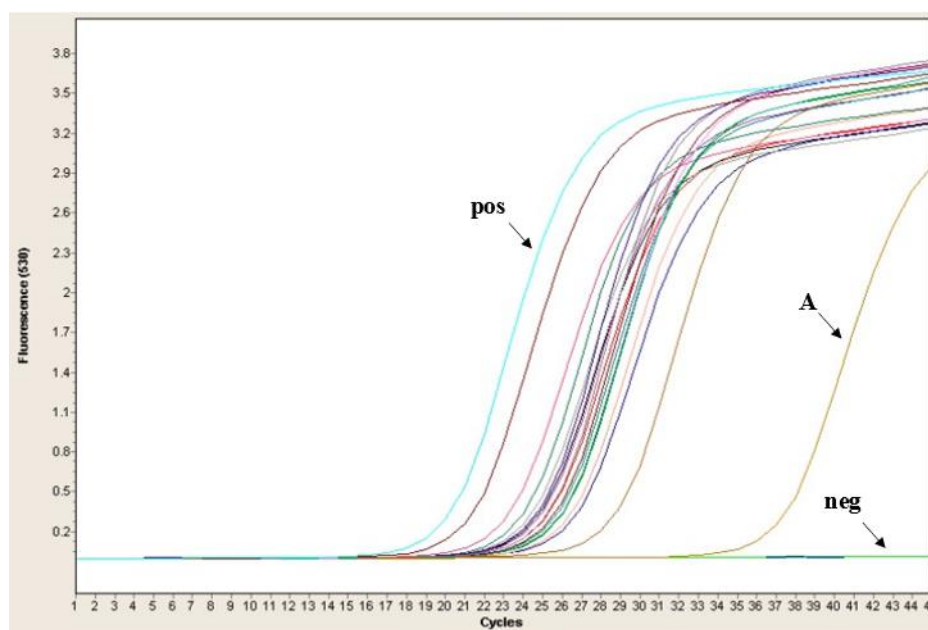
5.4 Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS (SPSS Statistics 25.0, company, Armonk, NY, United States). Για την εκτίμηση συσχέτισης της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων (υγιών δοτών και ασθενών στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα) χρησιμοποιήθηκε το Kruskal- Wallis τεστ. Για τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* χρησιμοποιήθηκε το χ^2 τεστ, ενώ για τη συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου *MCT1* και των διαφόρων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών εφαρμόσθηκε το Mann- Whitney τεστ. Τέλος, για την εκτίμηση της προγνωστικής σημασίας των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* εφαρμόσθηκε Kaplan- Meier ανάλυση. Όλες οι p τιμές ήταν two- sided. Ως στατιστικώς σημαντική τιμή ορίζεται η $p_{value} > 0.05$.

5.5 Πειραματικά αποτελέσματα

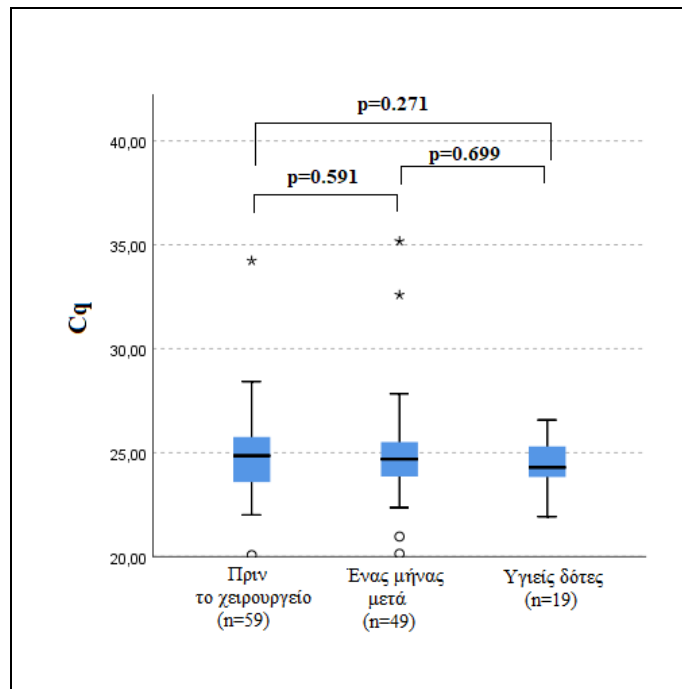
5.5.1 Ανίχνευση μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς *B2M*

Η *B2M* χρησιμοποιείται ευρέως ως γονίδιο αναφοράς. Δεδομένου ότι εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα αναμένουμε θετικό σήμα φθορισμού σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα, εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα. Στο **Σχήμα 5.2** παρατίθεται ένα χαρακτηριστικό γράφημα κλινικών δειγμάτων για το γονίδιο *B2M*.



Σχήμα 5.2. Χαρακτηριστικό γράφημα κλινικών δειγμάτων για το γονίδιο *B2M*. (*pos*: θετικός μάρτυρας
neg: αρνητικός μάρτυρας *A*: δείγμα υγιών που εξαιρέθηκε)

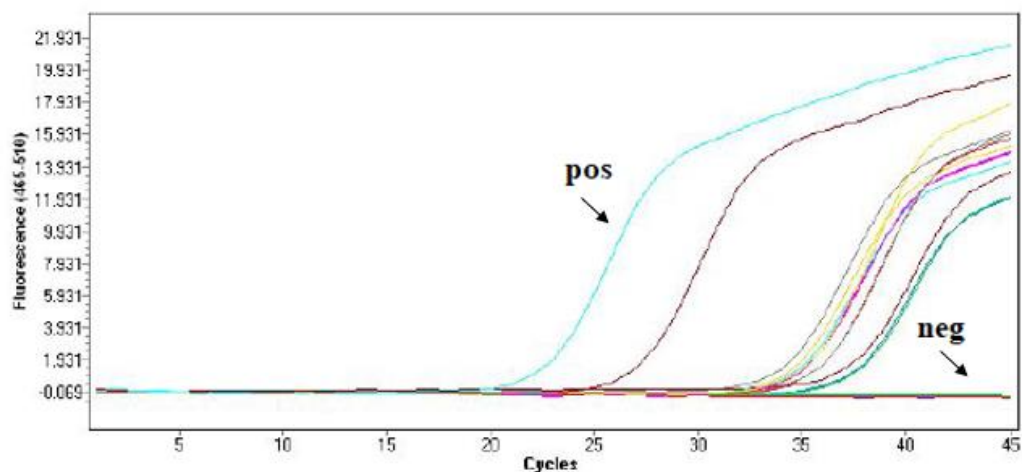
Παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο *B2M* εκφράζεται σε όλα τα δείγματα, υγιών και ασθενών. Ωστόσο, ένα δείγμα από τους υγιείς δότες εξαιρέθηκε από τη μελέτη (δείγμα *A* Σχήματος 5.2), καθώς η *B2M* εκφραζόταν σε ασυνήθιστα χαμηλά επίπεδα. Με βάση τους κύκλους *Cq* που ελήφθησαν, φάνηκε ότι η έκφραση του *B2M* δε διαφοροποιείται στατιστικά σημαντικά ούτε μεταξύ των υγιών και των ασθενών, αλλά ούτε και ανάμεσα στα δείγματα των ασθενών πριν και μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου ($p > 0.05$) (Σχήμα 5.3). Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο καθώς το γονίδιο *B2M* ως γονίδιο αναφοράς εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και η έκφρασή του παραμένει σταθερή και δεν διαφοροποιείται μεταξύ των ομάδων.



Σχήμα 5.3. Διαγραμματική απεικόνιση των Cq των μεταγράφων του γονιδίου B2M σε δείγματα υγιών δοτών και ασθενών με πρόιμο MMKΠ πριν και μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου.

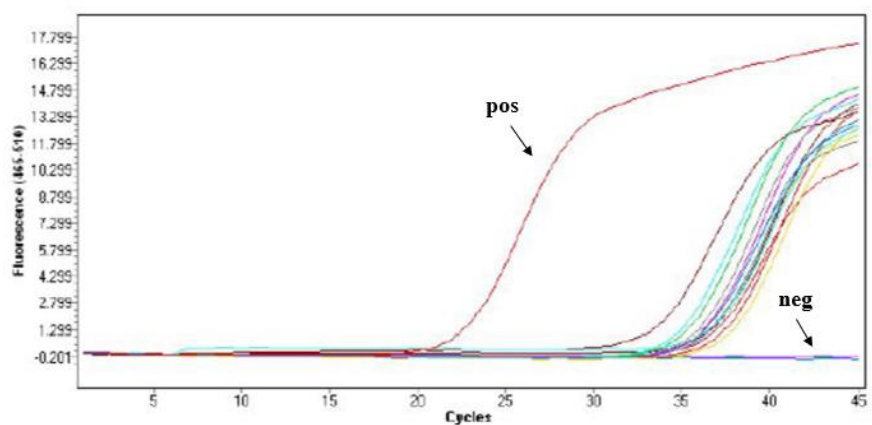
5.5.2 Ανίχνευση μεταγράφων του MCT1 σε CTCs υγιών ατόμων και ασθενών με πρόιμο MMKΠ

Μετάγραφα του MCT1 ανιχνεύθηκαν σε όλους τους υγιείς δότες, αναμενόμενο αποτέλεσμα δεδομένου ότι γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι ο MCT1 εκφράζεται φυσιολογικά σχεδόν σε όλους τους ιστούς (Κεφάλαιο 2). Το όριο λήψης απόφασης (cut off) ορίστηκε στο **2.16 για το MCT1**, με βάση τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο 5.3. Στο **Σχήμα 5.4** παρατίθεται ένα χαρακτηριστικό γράφημα δειγμάτων των υγιών δοτών για το γονίδιο MCT1.



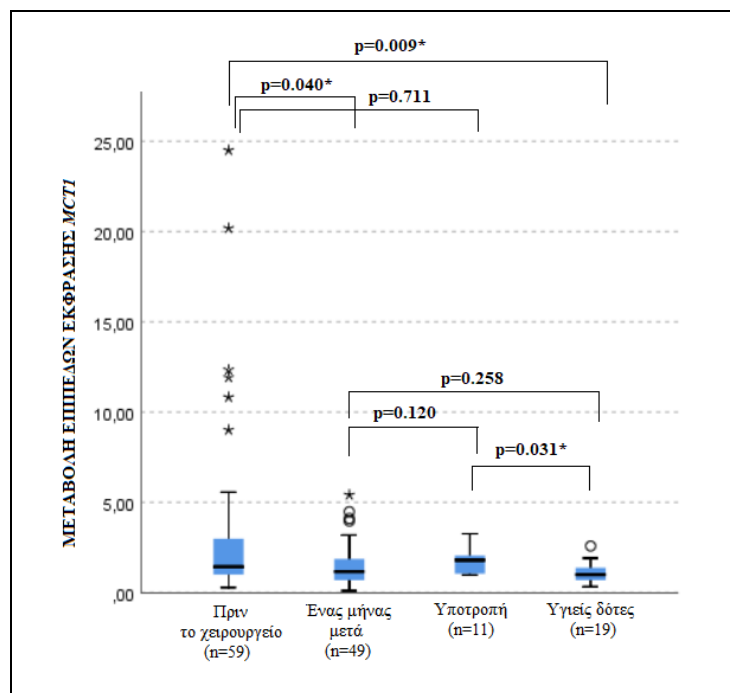
Σχήμα 5.4. Χαρακτηριστικό γράφημα κλινικών δειγμάτων των μεταγράφων *MCT1* των υγιών δοτών (*pos*: θετικός μάρτυρας, *neg*: αρνητικός μάρτυρας).

Σύμφωνα με το cut off που ορίστηκε, βρέθηκε ότι το γονίδιο *MCT1* υπερεκφράζεται σε 20/59 (33.9%) ασθενείς πριν τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ένα μήνα μετά το χειρουργείο και κατά τη φάση της υποτροπής είναι 9/49 (18.4%) και 2/11 (18.2%), αντίστοιχα. Στο **Σχήμα 5.5** παρατίθεται ένα χαρακτηριστικό γράφημα μεταγράφων του *MCT1* στα κλινικά δείγματα ασθενών με ΜΜΚΠ.



Σχήμα 5.5. Χαρακτηριστικό γράφημα μεταγράφων του γονιδίου *MCT1* ασθενών με ΜΜΚΠ ένα μήνα μετά το χειρουργείο (*pos*: θετικός μάρτυρας, *neg*: αρνητικός μάρτυρας).

Επιπλέον, μελετήθηκε η μεταβολή επιπέδων έκφρασης στα διάφορα χρονικά διαστήματα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.6**.



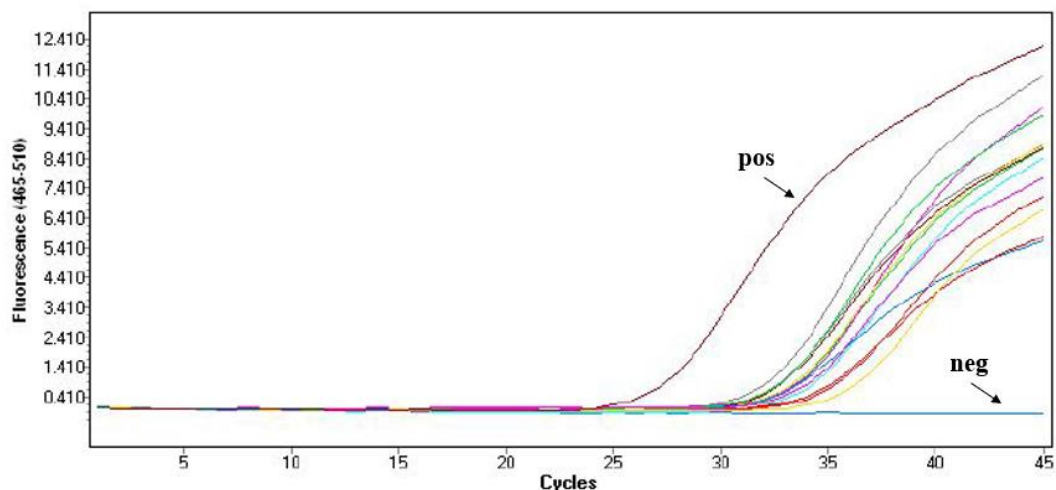
Σχήμα 5.6. Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του *MCT1* μεταξύ των υγιών δοτών και των δειγμάτων ασθενών με ΜΜΚΠ σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (με * σημαίνονται τα στατιστικά σημαντικά δεδομένα).

Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *MCT1* παρατηρήθηκαν πριν τη χειρουργική αφαίρεση, γεγονός που δείχνει ότι έχουμε αυξημένη έκφραση του *MCT1* όταν το καρκινικό φορτίο είναι μεγάλο, ειδικά πριν την εφαρμογή θεραπείας. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των υγιών δοτών και ασθενών πριν το χειρουργείο ($p = 0.009$) και κατά τη φάση της υποτροπής ($p = 0.031$). Ανάλογη διαφοροποίηση δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στους υγιείς δότες και στα δείγματα ασθενών ένα μήνα μετά το χειρουργείο.

5.5.3 Ανίχνευση μεταγράφων του *MCT4* σε CTCs υγιών ατόμων και ασθενών με πρώιμο ΜΜΚΠ

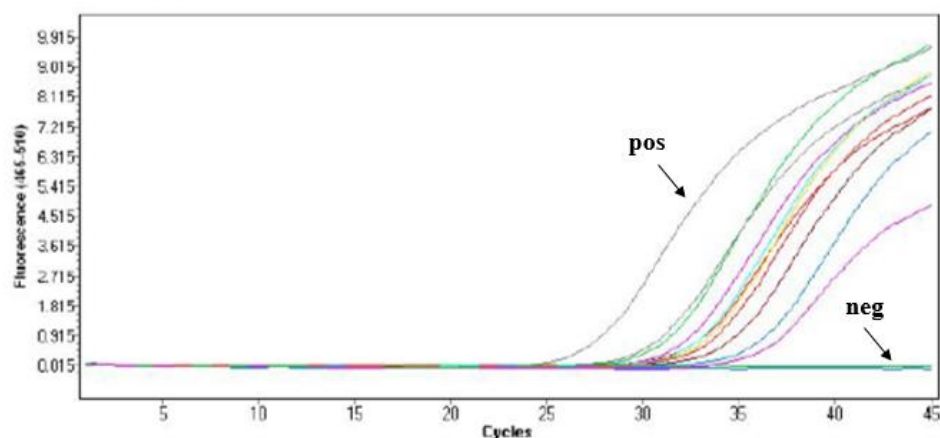
Μετάγραφα του *MCT4* ανιχνεύθηκαν σε όλους τους υγιείς δότες, αναμενόμενο αποτέλεσμα με βάση τη βιβλιογραφία (Κεφάλαιο 2). Το όριο λήψης απόφασης (cut off) ορίστηκε στο **2.08 για το *MCT4***, με βάση τη μέθοδο που περιγράφηκε στην

παράγραφο 5.3. Στο **Σχήμα 5.7** παρατίθεται ένα χαρακτηριστικό γράφημα δειγμάτων των υγιών δοτών για το γονίδιο *MCT4*.



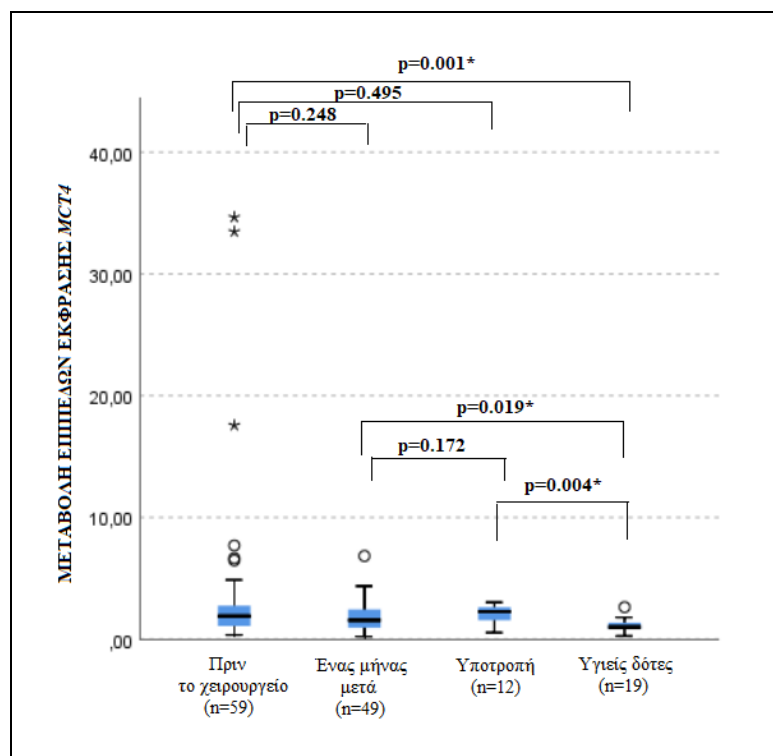
Σχήμα 5.7. Χαρακτηριστικό γράφημα κλινικών δειγμάτων των μεταγράφων *MCT4* των υγιών δοτών (*pos*: θετικός μάρτυρας, *neg*: αρνητικός μάρτυρας).

Σύμφωνα το cut off που ορίστηκε, βρέθηκε ότι το γονίδιο *MCT4* υπερεκφράζεται σε 24/59 (40.7%) ασθενείς πριν τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ένα μήνα μετά το χειρουργείο και κατά τη φάση της υποτροπής είναι 14/49 (28.6%) και 8/12 (66.7%), αντίστοιχα. Στο **Σχήμα 5.8** παρατίθεται ένα χαρακτηριστικό γράφημα μεταγράφων του *MCT4* στα κλινικά δείγματα ασθενών με ΜΜΚΠ.



Σχήμα 5.8. Χαρακτηριστικό γράφημα μεταγράφων του γονιδίου *MCT4* ασθενών με ΜΜΚΠ ένα μήνα μετά το χειρουργείο (*pos*: θετικός μάρτυρας, *neg*: αρνητικός μάρτυρας).

Επιπλέον, μελετήθηκε η μεταβολή επιπέδων έκφρασης στα διάφορα χρονικά διαστήματα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.9**.



Σχήμα 5.9. Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του *MCT4* μεταξύ των υγιών δοτών και των δειγμάτων ασθενών με ΜΜΚΠ σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (με * σημαίνονται τα στατιστικώς σημαντικά δεδομένα).

Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *MCT4* παρατηρήθηκαν κατά τη φάση της υποτροπής και πριν τη χειρουργική αφαίρεση, γεγονός που δείχνει ότι έχουμε αυξημένη έκφραση των επιπέδων του *MCT4* όταν το καρκινικό φορτίο είναι μεγάλο. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των υγιών δοτών και των ασθενών πριν το χειρουργείο ($p=0.001$), ένα μήνα μετά το χειρουργείο ($p=0.019$) και στη φάση της υποτροπής ($p=0.004$).

5.5.4 Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης μεταξύ των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* σε ασθενείς με πρώιμο MMKP

Για τη μελέτη συσχέτισης της έκφρασης των δύο μονοκαρβοξυλικών μεταφορέων *MCT1* και *MCT4* αξιολογήθηκαν 119 δείγματα σε διάφορα χρονικά σημεία και πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 5.10.

*Πίνακας 5.10. Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης μεταξύ των *MCT1* και *MCT4* σε ασθενείς με MMKP*

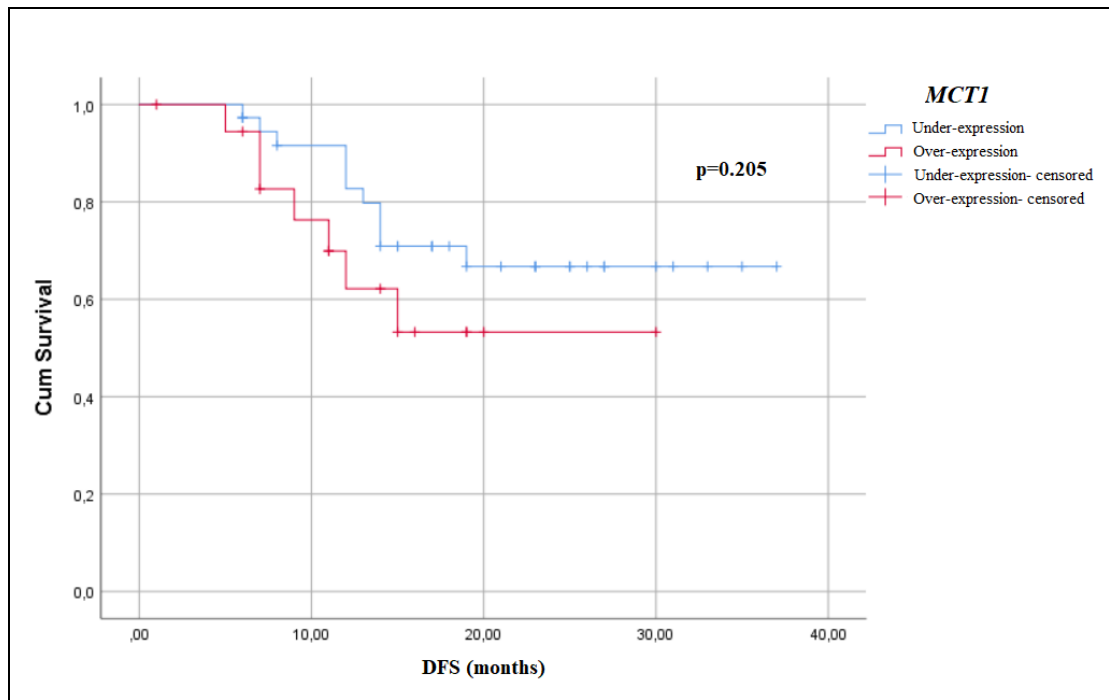
		<i>MCT4</i>		
		Υποέκφραση	Υπερέκφραση	ΣΥΝΟΛΟ
<i>MCT1</i>	Υποέκφραση	60	28	88
	Υπερέκφραση	14	17	31
	ΣΥΝΟΛΟ	74	45	119
Συσχέτιση (Concordance): (77/119) 64.7%		K- Cohen= 0.201		
(p= 0.021, chi-square test)				

Συνολικά παρατηρήθηκε συμφωνία στο **64.7%** (77/119) των δειγμάτων και σε συνδυασμό με το συντελεστή **k-cohen= 0.201** προκύπτει το συμπέρασμα ότι έχουμε μια **μέτρια συσχέτιση** των δύο γονιδίων στα δείγματα ασθενών με MMKP.

5.5.5 Κλινική αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* στα CTCs ασθενών με MMKP

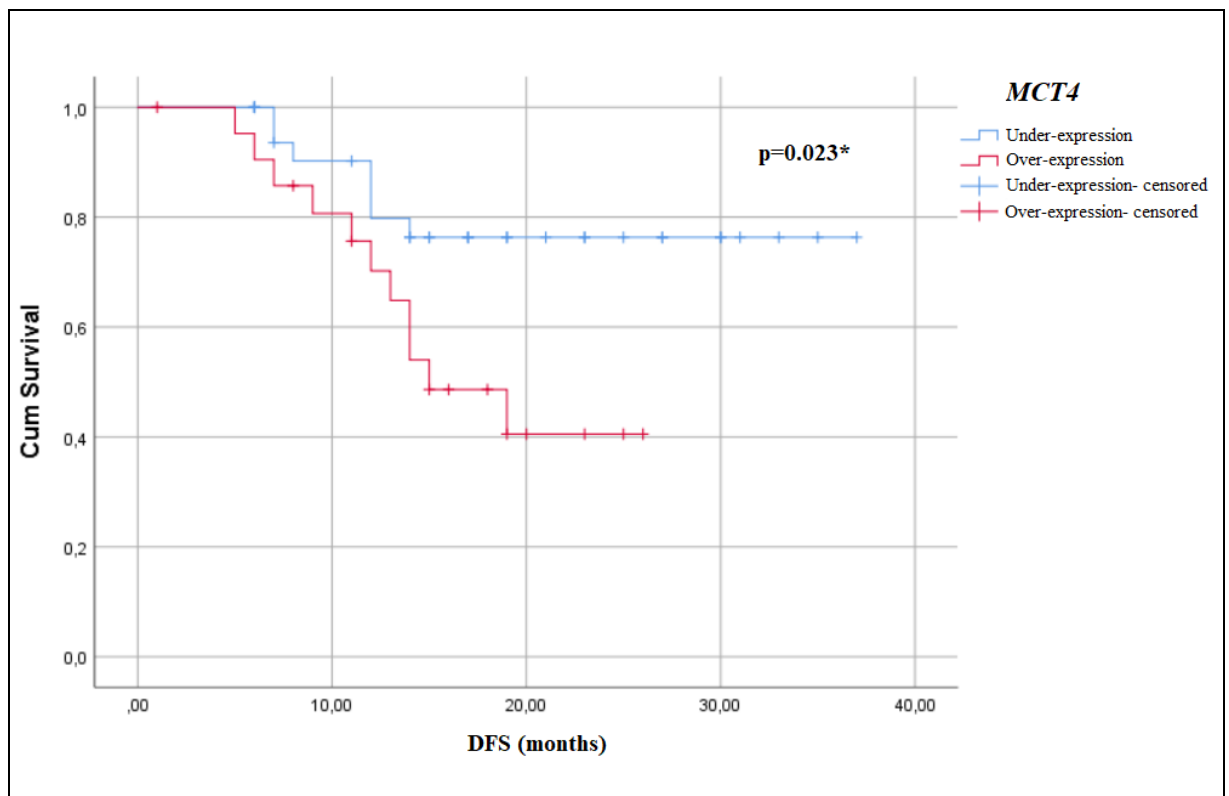
Η κλινική αξιολόγηση των γονιδίων *MCT1* και *MCT4* πραγματοποιήθηκε για 59 ασθενείς με πρώιμο MMKP για τους οποίους υπήρχαν πληροφορίες για την κλινική έκβαση της νόσου. Η αξιολόγηση στηρίχθηκε σε καμπύλες επιβίωσης Kaplan Meier για το χρονικό «**Διάστημα Επιβίωσης Ελεύθερο Ασθένειας**» (**Disease Free**

Survival- DFS) των ασθενών αυτών. Η καμπύλη επιβίωσης για την έκφραση του *MCT1* δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το DFS ($p= 0.205$) όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.10**.



Σχήμα 5.10. Kaplan- Meier ανάλυση για την εκτίμηση της προγνωστικής σημασίας του *MCT1* σε σχέση με το DFS ασθενών με MMΚΠ.

Αντιθέτως, η καμπύλη επιβίωσης για το γονίδιο *MCT4* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το DFS ($p= 0.023$), όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.11**. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του *MCT4* στα CTCs συνδέεται με μειωμένο DFS στους ασθενείς με πρώιμο MMΚΠ.



Σχήμα 5.11. Kaplan- Meier ανάλυση για την εκτίμηση της προγνωστικής σημασίας του *MCT4* σε σχέση με το DFS ασθενών με ΜΜΚΠ.

5.5.6 Συσχέτιση της υπερέκφρασης του *MCT1* με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πρώιμο ΜΜΚΠ στα χρονικά διαστήματα πριν και ένα μήνα μετά το χειρουργείο

Η ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της υπερέκφρασης του *MCT1* και των διαφόρων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών παρατίθεται στον **Πίνακα 5.11**. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται ο αριθμός των ασθενών κάθε κατηγορίας που υπερέκφρασαν το γονίδιο *MCT1* στα χρονικά διαστήματα πριν τη χειρουργική αφαίρεση.

Πίνακας 5.11. Συσχέτιση υπερέκφρασης του γονιδίου *MCT1* με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με πρώιμο ΜΜΚΠ πριν τη χειρουργική αφαίρεση.

Κλινικοπαθολογικά Χαρακτηριστικά	Αριθμός ασθενών	<i>MCT1</i> Υπερέκφραση (πριν το χειρουργείο)	p value
Φύλο			0.086
Άνδρας	32	9	
Γυναίκα	21	10	
Ηλικία			0.098
≥65	35	7	
<65	22	11	
Ιστορικό καπνίσματος			0.122
Ναι	27	12	
Όχι	2	0	
Πρώην	21	3	
Ιστολογική			0.289
Αδενοκαρκίνωμα	27	9	
Καρκίνωμα Πλακωδών Κυττάρων (SCC)	29	10	
Άλλο	2	0	

Παθολογικό στάδιο καρκίνου			0.136
IA	19	6	
IIA	2	2	
IIIA	12	3	
IB	11	4	
IIB	12	3	
IIIB	2	1	
Μέγεθος όγκου (cm)			0.06
≤ 2 cm	9	3	
$2 < x \leq 3$ cm	15	4	
$3 < x \leq 5$ cm	20	9	
$5 < x \leq 7$ cm	8	1	
> 7 cm	7	3	

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η υπερέκφραση του *MCT1* δε σχετίζεται με κανένα από τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά στην πληθυσμιακή ομάδα που μελετήθηκε.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υγρή βιοψία αποτελεί μια μη επεμβατική και πολύτιμη μέθοδο που παρέχει πληροφορίες αναφορικά με την πρόγνωση και την παρακολούθηση της εξέλιξης και της θεραπείας της νόσου σε πραγματικό χρόνο, τη στιγμή που η κλασική βιοψία αναπαριστά ένα μόνο στιγμιότυπο του όγκου και δεν παρέχει ευρύ φάσμα πληροφοριών για όλους τους υποκλώνους που συνήθως υπάρχουν σε έναν όγκο. Η απομόνωση των CTCs και ο ακόλουθος μοριακός χαρακτηρισμός σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεϊνών παρέχει πολλές πληροφορίες για την ετερογένεια του όγκου και αποτελούν σημαντικές αναλύσεις στην προσέγγιση της υγρής βιοψίας. Παρ' όλα τα πολλά πλεονεκτήματα, η υγρή βιοψία δεν έχει καθιερωθεί ακόμη στην κλινική πράξη λόγω των προαναλυτικών και αναλυτικών περιορισμών και υπάρχουν λίγοι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικά τεστ συμπληρωματικά με την κύρια διάγνωση. Οι κλινικές μελέτες και δημοσιεύσεις συνεχώς αυξάνονται με σκοπό την όσο το δυνατόν πιο γρήγορη εφαρμογή της στην κλινική πράξη.

Ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά του καρκίνου με βάση τη δημοσίευση των Hanahan και Weinberg "Hallmarks of Cancer: The Next Generation" είναι ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός των καρκινικών κυττάρων, με σκοπό την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις δύσκολες συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος. Τα καρκινικά κύτταρα για να ανταπεξέλθουν στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου, στρέφονται προς την αερόβια γλυκόλυση, προσλαμβάνοντας μεγάλες ποσότητες γλυκόζης και παράγοντας ακολούθως υψηλά ποσοστά γαλακτικού οξέος, το οποίο ως τοξική ουσία είναι αναγκαίο να εκκρίνεται από τα κύτταρα. Το «Φαινόμενο Warburg» μελετάται εδώ και χρόνια από ερευνητές που προσπαθούν να δώσουν απάντηση στο γιατί τα καρκινικά κύτταρα ακολουθούν ένα φαινομενικά επικίνδυνο για την επιβίωσή τους φαινότυπο που τους προσδίδει χαμηλότερα ποσοστά ενέργειας. Φαίνεται πως οι περισσότερες υποθέσεις καταλήγουν στο γεγονός ότι προσδίδει πλεονεκτήματα στα κύτταρα με σκοπό την επιβίωση στο δυσμενές μικροπεριβάλλον και την υιοθέτηση πιο επιθετικών χαρακτηριστικών που επιτρέπουν τη μετάσταση.

Οι μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο «Φαινόμενο Warburg», καθώς αναλαμβάνουν την παθητική μεταφορά του γαλακτικού οξέος διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης, επηρεάζοντας έτσι τα ποσοστά του εντός και

εκτός των κυττάρων. Πολλές έρευνες έχουν δείξει την ανάμειξή τους σε διαφόρους τύπους καρκίνου και την πιθανή χρήση τους ως βιοδείκτες. Το εργαστήριό μας έδειξε σε προηγούμενη μελέτη την υπερέκφραση του *MCT4* σε υψηλή συχνότητα στα CTCs ασθενών με πρώιμο MMKP και παρατηρήθηκε ότι αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη, καθώς ασθενείς με υπερέκφραση του *MCT4* στα CTCs τους παρουσίαζαν μειωμένο DFI [114]. Επιπλέον, εξετάζεται η πιθανή χρήση τους ως νέοι θεραπευτικοί στόχοι έναντι του καρκίνου. Ήδη ο αναστολέας AZD3965 έναντι του *MCT1* βρίσκεται σε κλινικές μελέτες, ενώ έχουν προταθεί και άλλες ουσίες ως πιθανοί αναστολείς των *MCT1* και *MCT4*. Επιπλέον, έχει γίνει ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας δοκιμασίας ανοσοφθορισμού των δεικτών *MCT1* και *MCT4* στα CTCs ασθενών με MMKP μέσω του -εγκεκριμένου από τον FDA- Συστήματος Veridex™ CellSearch, με στόχο την πρόγνωση και πρόβλεψη των ασθενών που συμμετέχουν στις κλινικές δοκιμές του AZD3965 αναστολέα (116).

Για τους λόγους αυτούς κρίθηκε σκόπιμη η εκτίμηση της έκφρασης και της προγνωστικής σημασίας του *MCT1* σε απομονωμένα με βάση το μέγεθος CTCs ασθενών με πρώιμο MMKP και η ανάπτυξη και επικύρωση μιας ευαίσθητης και ειδικής RT-qPCR μεθόδου για την ανίχνευση μεταγράφων του. Παράλληλα, στόχοι της εργασίας ήταν η εκτίμηση της διαφοράς στα επίπεδα έκφρασης των *MCT1* και *MCT4* σε διάφορα χρονικά σημεία της νόσου και της προγνωστικής τους σημασίας μέσω καμπυλών επιβίωσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ανιχνεύθηκαν μετάγραφα του *MCT1* και *MCT4* σε όλα τα δείγματα ασθενών και των υγιών δοτών, όπως ήταν αναμενόμενο καθώς γνωρίζουμε πως οι μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς εκφράζονται φυσιολογικά στον οργανισμό. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το γονίδιο *MCT1* υπερεκφράζεται σε 20/59 (33.9%) ασθενείς πριν τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ένα μήνα μετά το χειρουργείο και κατά τη φάση της υποτροπής είναι 9/49 (18.4%) και 2/11 (18.2%), αντίστοιχα. Τα επίπεδα έκφρασης διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) και στους δύο MCTs, μεταξύ των υγιών δοτών και των ασθενών τη χρονική στιγμή πριν το χειρουργείο. Γνωρίζουμε πως τα καρκινικά κύτταρα, σε σχέση με τα υγιή, επιλέγουν σε έναν μεγάλο βαθμό την οδό της γλυκόλυσης για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους («Φαινόμενο Warburg»), έτσι παρατηρείται υπερέκφραση των MCTs ώστε να επιτελείται η έξοδος του γαλακτικού από τα καρκινικά κύτταρα, ιδιαίτερα πριν το χειρουργείο όπου το καρκινικό φορτίο είναι

μεγάλο. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p=0.04$) των επιπέδων έκφρασης του *MCT1* στους ασθενείς πριν το χειρουργείο και ένα μήνα μετά, γεγονός που υποδεικνύει ότι κατά τη μείωση του καρκινικού φορτίου μειώνονται τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Επιπλέον, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση ($p=0.031$) των επιπέδων έκφρασης κατά τη φάση της υποτροπής σε σχέση με τους υγιείς δότες, λόγω αύξησης του καρκινικού φορτίου στους ασθενείς που υποτροπίασαν.

Παρατηρήθηκε μέτρια συσχέτιση μεταξύ των δύο MCTs, καθώς βρέθηκε συμφωνία σε 77/119 (64.7%) δείγματα στα CTCs των ασθενών. Μέχρι στιγμής είναι γνωστό ότι και οι δύο MCTs διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στα φυσιολογικά κύτταρα όσο και στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, όμως δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα στη βιβλιογραφία για να εξηγηθεί πως συσχετίζονται τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ τους. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητο να διεξαχθούν για να διερευνηθεί η μεταξύ τους συσχέτιση. Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώθηκε για ακόμη μια φορά ότι ο *MCT4* αποτελεί έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για τους ασθενείς, καθώς ασθενείς που το υπερέκφραζαν πριν το χειρουργείο είχαν μειωμένο DFS. Ανάλογα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν για το *MCT1*. Τέλος, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο *MCT1* δε συσχετίζεται με κανένα από τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών στην πληθυσμιακή ομάδα που μελετήθηκε.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως είναι αναγκαίο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες για τους *MCT1* και *MCT4* μεταφορείς σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ούτως ώστε να γίνει εκτίμησή τους ως βιοδείκτες στον ΜΜΚΠ. Σε συνδυασμό με τις πολύτιμες πληροφορίες που προσφέρει η ανάλυση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs, είναι ανάγκη να γίνει καθιέρωση της υγρής βιοψίας στην κλινική πράξη, με σκοπό τη χρήση μη επεμβατικών δεικτών για την πρόγνωση και την παρακολούθηση των θεραπειών αλλά και της πορείας της νόσου.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΟΡΟΛΟΓΙΑ
^{18}F -FdG	^{18}F fluorodeoxyglucose
ALDH1	Aldehyde Dehydrogenase 1
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
ATP	Adenosine Triphosphate
B2M	Beta-2-microglobulin
BHQ-1	Black Hole Quencher 1
BSA	Bovine Serum Albumin
CAFs	Cancer-associated fibroblasts
CD147	Cluster of differentiation 147
CD24	Cluster of differentiation 24
CD44	Cluster of differentiation 44
CD45	Cluster of differentiation 45
CD61	Cluster of differentiation 61
cDNA	Complementary DNA
CHC	alpha-Cyano-4-hydroxycinnamate
CTCs	Circulating Tumor Cells
ctDNA	Circulating tumor DNA
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte- associated antigen 4

DFI	Disease Free Interval
DFS	Disease Free Survival
DLBCL	Diffuse Large B-cell Lymphoma
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DTCs	Disseminated Tumor Cells
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
EpCAM	Epithelial Cell-Adhesion Molecule
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAM	Fluorescein amidites
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence In situ Hybridization
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GlpT	Glycerol-3-phosphate transporter
GLUT1	Glucose Transporter 1
GLUT3	Glucose Transporter 3
HER-2	Human Epidermal Growth Factor receptor 2
HIF-1a	Hypoxia-inducible Factor 1-alpha
HK2	Hexokinase 2

KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LDH	Lactate Dehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 cell line
MCT1	Monocarboxylate Transporter 1
MCT2	Monocarboxylate Transporter 2
MCT3	Monocarboxylate Transporter 3
MCT4	Monocarboxylate Transporter 4
MCTs	Monocarboxylate Transporters
MET	Mesenchymal-to-Epithelial Transition
MgCl ₂	Magnesium Chloride
miRNA	Micro RNA
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NAClO	Sodium Hypochlorite
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NF- κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
p53	Tumor protein p53
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

PD-1	Programmed cell Death protein 1
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PET	Positron Emission Tomography
PFS	Progression Free Survival
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKM2	Pyruvate Kinase M2
ROS	Reactive Oxygen Species
RT- qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
SKBR-3	Sloan-Kettering Breast adenocarcinoma 3
SLC16	Solute Carrier family 14
TCA cycle	Tricarboxylic Acid cycle
TEPs	Tumor-educated Platelets
TM	Transmembrane domain
ΜΚΠ	Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα
ΜΜΚΠ	Μη- Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. The Development and Causes of Cancer - The Cell - NCBI Bookshelf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/> (τελευταία επίσκεψη: Οκτώβριος 2021).
2. What Is Cancer? - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#cell-differences> (τελευταία επίσκεψη: Οκτώβριος 2021).
3. Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011, Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, **144**, 646–74.
4. Fidler, I.J., 2003, The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, **3**, 453–8.
5. Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe H.H., Salhab H.A. and Fares,Y. 2020, Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther*, **5**, 28
6. Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R. and Weinberg, R.A., 2017, Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, **168**, 670–91.
7. Kalluri, R. and Weinberg R.A., 2009, The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.*, **119**, 1420–8.
8. Thiery, J.P., 2002. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, **2**,442–54.
9. Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., De Clercq, S., Minguijón, E., Balsat, C., Sokolow, Y., Dubois, C., De Cock, F., Scozzaro, S., Sopena, F., Lanas, A., D' Haene, N., Salmon, I., Marine, J.C., Voet, T., Sotiropoulou, P.A. and Blanpain, C., 2018, Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, **556**, 463-468.
10. Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K. and Sahai, E., 2007, Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*, **9**, 1392–400.

11. Headley, M.B., Bins, A., Nip, A., Roberts, E.W., Looney, M.R., Gerard, A. and Krummel, M.F., 2016, Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature*, **531**, 513–7.
12. Majidpoor, J. and Mortezaee, K., 2021, Steps in metastasis: an updated review. *Med Oncol*, **38**, 1–17.
13. Brabletz, T., 2012, To differentiate or not — routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer*, **12**, 425–36.
14. del Pozo Martin, Y., Park, D., Ramachandran, A., Ombrato, L., Calvo, F., Chakravarty, P., Spencer-Dene, B., Derzsi, S., Hill, C.S., Sahai, E. and Malanchi, I., 2015, Mesenchymal Cancer Cell-Stroma Crosstalk Promotes Niche Activation, Epithelial Reversion, and Metastatic Colonization. *Cell Rep*, **13**, 2456–69.
15. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F., 2021, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.*, **71**, 209-249.
16. Alberg, A.J., Brock, M.V., Ford, J.G., Samet J.M. and Spivack, S.D., 2013, Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.*, **143** (5 Suppl), e1S-e29S.
17. Types of lung cancer | Cancer Research UK n.d. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/stages-types-grades/types> (τελευταία επίσκεψη: Οκτώβριος 2021).
18. Herbst, R.S., Morgensztern, D. and Boshoff, C., 2018, The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, **553**, 446–54.
19. Dietel, M., Bubendorf, L., Dingemans, A.M.C., Doooms, C., Elmberger, G., García, R.C., Kerr, K.M., Lim, E., López-Ríos, F., Thunnissen, E., Van Schil, P.E., and von Laffert, M., 2016, Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): Recommendations of the European Expert Group. *Thorax*, **71**, 177–84.
20. Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V.,

- Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., van Kooten, M., Dediu, M., Findlay, B., Tu, D., Johnston, D., Bezjak, A., Clark, G., Santabárbara, P. and Seymour, L., 2005, Erlotinib in Previously Treated Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, **353**, 123– 32.
21. Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., Hu, Y., Tan, Z., Stokes, M., Sullivan, L., Mitchell, J., Wetzel, R., Macneill, J., Ren, J.M., Yuan, J., Bakalarski, C.E., Villen, J., Kornhauser, J.M., Smith, B., Li, D., Zhou, X., Gygi, S.P., Gu, T.L., Polakiewicz, R.D., Rush, J. and Comb, M.J., 2007, Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*, **131**, 1190–203.
 22. Kwak, E.L., Bang, Y-J., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Solomon, B., Maki, R.G., Ou, S.H., Dezube, B.J., Jänne, P.A., Costa, D.B., Varella-Garcia, M., Kim, W.H., Lynch, T.J., Fidias, P., Stubbs, H., Engelman, J.A., Sequist, L.V., Tan, W., Gandhi, L., Mino-Kenudson, M., Wei, G.C., Shreeve, S.M., Ratain, M.J., Settleman, J., Christensen, J.G., Haber, D.A., Wilner, K., Salgia, R., Shapiro, G.I., Clark, J.W., Iafrate, A.J., 2010, Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. **363**, 1693–703.
 23. Shaw, A.T., Kim, D-W., Nakagawa, K., Seto, T., Crinó, L., Ahn, M-J., De Pas, T., Besse, B., Solomon, B.J., Blackhall, F., Wu, Y.L., Thomas, M., O'Byrne, K.J., Moro-Sibilot, D., Camidge, D.R., Mok, T., Hirsh, V., Riely, G.J., Iyer, S., Tassell, V., Polli, A., Wilner, K.D. and Jänne, P.A., 2013, Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*, **368**, 2385–94.
 24. Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E. and Chen, L., 2002, Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.*, **8**, 793–800.
 25. Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A.S., Eder, J.P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.J., Felip, E., Lee, J.S., Hellmann, M.D., Hamid, O., Goldman, J.W., Soria, J.C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R.Z., Zhang, J., Lunceford, J.K., Rangwala, R.,

- Lubiniecki, G.M., Roach, C., Emancipator, K. and Gandhi, L., 2015, Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.*, **372**, 2018-28.
26. Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H. and Allison J.P., 2010, PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **107**, 4275–80.
 27. Koppenol, W.H., Bounds, P.L. and Dang, C.V., 2011, Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*, **11**, 325-37.
 28. Racker, E., 1974, History of the Pasteur Effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem*, **5**, 17–23.
 29. Nelson, D.L. and Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry.*, 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York, 2005, 1216 pp.
 30. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. and Thompson, C.B., 2009, Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, **324**, 1029–33.
 31. Liberti, M.V. and Locasale, J.W., 2016, The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 211–8.
 32. Warburg, O., Wind, F. and Negelein, E., 1927, The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*, **8**, 519–30.
 33. Warburg, O., 1956, On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, 309–14.
 34. DeBerardinis, R.J. and Chandel, N.S., 2020, We need to talk about the Warburg effect. *Nat Metab*, **2**, 127–9.
 35. Potter, M., Newport, E. and Morten, K.J., 2016, The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*, **44**, 1499–505.
 36. Kunkel, M., Reichert, T.E., Benz, P., Lehr, H.A., Jeong, J.H., Wieand, S., Bartenstein, P., Wagner, W. and Whiteside, T.L., 2003, Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, **97**, 1015–24.

37. Mochiki, E., Kuwano, H., Katoh, H., Asao, T., Oriuchi, N. and Endo, K., 2004, Evaluation of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose Positron Emission Tomography for Gastric Cancer. *World J Surg.*, **28**, 247–53.
38. Pascale, R.M., Calvisi, D.F., Simile, M.M., Feo, C.F. and Feo, F., 2020, The warburg effect 97 years after its discovery. *Cancers*, **12**, 1–33.
39. Lu, J., 2019, The Warburg metabolism fuels tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, **38**, 157–64.
40. Gatenby, R.A. and Gillies, R.J., 2004, Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, **4**, 891–9.
41. Krogh, A., 1919, The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol*, **52**, 409–15.
42. Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W. and Giaccia, A.J., 1996, Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, **379**, 88–91.
43. Rajala, R.V.S., 2020, Aerobic Glycolysis in the Retina: Functional Roles of Pyruvate Kinase Isoforms. *Front. Cell Dev. Biol*, **8**, 266.
44. Piskounova, E., Agathocleous, M., Murphy, M.M., Hu, Z., Huddlestun, S.E., Zhao, Z., Leitch, A.M., Johnson, T.M., DeBerardinis, R.J., Morrison, S.J., 2015, Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*, **527**, 186–91.
45. Gorrini, C., Harris, I.S. and Mak, T.W., 2013, Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.*, **12**, 931–47.
46. de la Cruz-López, K.G., Castro-Muñoz, L.J., Reyes-Hernández, D.O., García-Carrancá, A. and Manzo-Merino, J., 2019, Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol*, **9**, 1143.
47. Sun, X., Wang, M., Wang, M., Yao, L., Li, X., Dong, H., Li, M., Sun, T., Liu, X., Liu, Y. and Xu, Y., 2020, Role of Proton-Coupled Monocarboxylate Transporters in Cancer: From Metabolic Crosstalk to Therapeutic Potential. *Front Cell Dev Biol*, **8**, 651.

48. Hui, S., Ghergurovich, J.M., Morscher, R.J., Jang, C., Teng, X., Lu, W., Esparza, L.A., Reya, T., Le Zhan, Yanxiang Guo, J., White, E. and Rabinowitz, J.D., 2017, Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*, **551**, 115–8.
49. Felmler, M.A., Jones, R.S., Rodriguez-Cruz, V., Follman, K.E. and Morris, M.E., 2020, Monocarboxylate transporters (SLC16): Function, regulation, and role in health and disease. *Pharmacol Rev.*, **72**, 466–85.
50. Halestrap, A.P. and Denton, R.M., 1974, Specific Inhibition of Pyruvate Transport in Rat Liver Mitochondria and Human Erythrocytes by α -Cyano-4-hydroxycinnamate. *Biochem J.*, **138**, 313–6.
51. Halestrap, A.P. and Wilson, M.C., 2012, The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life*, **64**, 109–19.
52. Payen, V.L., Mina, E., Van Hée, V.F., Porporato, P.E. and Sonveaux, P., 2020, Monocarboxylate transporters in cancer. *Mol Metab*, **33**, 48–66.
53. Manoharan, C., Wilson, M.C., Sessions, R.B. and Halestrap, A.P., 2006, The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity. *Mol Membr Biol*, **23**, 486.
54. Wilson, M.C., Meredith, D., Bunnun, C., Sessions, R.B. and Halestrap, A.P., 2009, Studies on the DIDS-binding site of monocarboxylate transporter 1 suggest a homology model of the open conformation and a plausible translocation cycle. *J Biol Chem*, **284**, 20011–21.
55. Pinheiro, C. and Longatto-Filho, A., 2012, Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr.*, **44**, 127–39.
56. Park, S.J., Smith, C.P., Wilbur, R.R., Cain, C.P., Kallu, S.R., Valasapalli, S., Sahoo, A., Guda, M.R., Tsung, A.J. and Velpula, K.K., 2018, An overview of MCT1 and MCT4 in GBM: small molecule transporters with large implications. *Am J Cancer Res.*, **8**, 1967-76.
57. Pinheiro, C., Miranda-Gonçalves, V., Longatto-Filho, A., Vicente, A. L., Berardinelli, G. N., Scapulatempo-Neto, C., Costa, R. F., Viana, C. R., Reis, R.

- M., Baltazar, F. and Vazquez, V. L., 2016, The metabolic microenvironment of melanomas: Prognostic value of MCT1 and MCT4. *Cell cycle*, **15**, 1462–1470.
58. Payen, V. L., Hsu, M. Y., Räddecke, K. S., Wyart, E., Vazeille, T., Bouzin, C., Porporato, P. E., and Sonveaux, P., 2017, Monocarboxylate Transporter MCT1 Promotes Tumor Metastasis Independently of Its Activity as a Lactate Transporter. *Cancer Res.*, **77**, 5591–601.
 59. Kobayashi, M., Narumi, K., Furugen, A. and Iseki, K., 2021, Pharmacology & Therapeutics Transport function , regulation , and biology of human monocarboxylate transporter 1 (hMCT1) and 4 (hMCT4). *Pharmacol Ther.*, **226**, 107862.
 60. Ullah, M.S., Davies, A.J. and Halestrap, A.P., 2006, The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **281**, 9030–7.
 61. Miranda-Gonçalves V., Granja S., Martinho O., Honavar M., Pojo M., Costa B.M., Pires M. M., Pinheiro C., Cordeiro M., Bebiano G., Costa P., Reis R. M. and Baltazar F., 2016, Hypoxia-mediated upregulation of MCT1 expression supports the glycolytic phenotype of glioblastomas. *Oncotarget*, **7**, 46335–53.
 62. Gan, L., Xiu, R., Ren, P., Yue, M., Su, H., Guo, G., Xiao, D., Yu, J., Jiang, H., Liu, H., Hu, G., and Qing, G., 2016, Metabolic targeting of oncogene MYC by selective activation of the proton-coupled monocarboxylate family of transporters. *Oncogene*, **35**, 3037–48.
 63. Boidot, R., Végran, F., Meulle, A., Le Breton, A., Dessy, C., Sonveaux, P., Lizard-Nacol, S., and Feron, O., 2012, Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res.*, **72**, 939–948.
 64. Corbet, A.P., Pinto, A., Martherus, R., Santiago de Jesus, J.P., Polet, F. and Feron, O., 2016, Acidosis Drives the Reprogramming of Fatty Acid Metabolism in Cancer Cells through Changes in Mitochondrial and Histone Acetylation. *Cell Metab.*, **24**, 311–23.
 65. Asada, K., Miyamoto, K., Fukutomi, T., Tsuda, H., Yagi, Y., Wakazono, K.,

- Oishi, S., Fukui, H., Sugimura, T. and Ushijima, T., 2003, Reduced Expression of GNA11 and Silencing of MCT1 in Human Breast Cancers. *Oncology*, **64**, 380–8.
66. Viswanath, P., Najac, C., Izquierdo-Garcia, J. L., Pankov, A., Hong, C., Eriksson, P., Costello, J. F., Pieper, R. O., and Ronen, S. M., 2016, Mutant IDH1 expression is associated with down-regulation of monocarboxylate transporters. *Oncotarget*, **7**, 34942–55.
 67. García-Canaveras, J.C., Chen, L., Rabinowitz, J.D., 2019, The tumor metabolic microenvironment: Lessons from lactate. *Cancer Res.*, **79**, 3155–62.
 68. Hensley, C. T., Faubert, B., Yuan, Q., Lev-Cohain, N., Jin, E., Kim, J., Jiang, L., Ko, B., Skelton, R., Loudat, L., Wodzak, M., Klimko, C., McMillan, E., Butt, Y., Ni, M., Oliver, D., Torrealba, J., Malloy, C. R., Kernstine, K., Lenkinski, R. E. and DeBerardinis, R. J., 2016, Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell*, **164**, 681–94.
 69. Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., De Saedeleer, C. J., Kennedy, K. M., Diepart, C., Jordan, B. F., Kelley, M. J., Gallez, B., Wahl, M. L., Feron, O. and Dewhirst, M. W., 2008, .Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest.*, **118**, 3930–42.
 70. Bonuccelli, G., Tsigirgos, A., Whitaker-Menezes, D., Pavlides, S., Pestell, R. G., Chiavarina, B., Frank, P. G., Flomenberg, N., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F. and Lisanti, M. P., 2010, Cell Cycle Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle*, **9**, 3506–14.
 71. Shan, T., Chen, S., Chen, X., Lin, W. R., Li, W., Ma, J., Wu, T., Cui, X., Ji, H., Li, Y. and Kang, Y., 2017, Cancer-associated fibroblasts enhance pancreatic cancer cell invasion by remodeling the metabolic conversion mechanism. *Oncol Rep.*, **37**, 1971–9.
 72. Luo, M., Luo, Y., Mao, N., Huang, G., Teng, C., Wang, H., Wu, J., Liao, X. and Yang, J., 2018, Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Malignant Progression of Non-Small Cell Lung Cancer via Connexin 43-Formed Unidirectional Gap Junctional Intercellular Communication. *Cell Physiol*

- Biochem., **51**, 315–36.
73. A Phase I Trial of AZD3965 in Patients With Advanced Cancer - Full Text View-ClinicalTrials.gov n.d.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01791595?term=AZD3965&draw=2&rank=1> (τελευταία επίσκεψη: Οκτώβριος 2021).
 74. Spinello, I., Saulle, E., Quaranta, M. T., Pasquini, L., Pelosi, E., Castelli, G., Ottone, T., Voso, M. T., Testa, U. and Labbaye, C., 2019, The small-molecule compound AC-73 targeting CD147 inhibits leukemic cell proliferation, induces autophagy and increases the chemotherapeutic sensitivity of acute myeloid leukemia cells. *Haematologica*, **104**, 973–85.
 75. Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S. and Bardelli, A., 2017, Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, **14**, 531–48.
 76. Lianidou, E. and Pantel, K., 2019, Liquid biopsies. *Genes Chromosomes Cancer*, **58**, 219–32.
 77. Lianidou, E. and Hoon, D. in *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, eds Rifai, N., Horvath, A.R. and Wittwer, C.T., 6th ed., Elsevier, St. Louis, 2017, ch. 52, pp. 1111-44
 78. Pantel, K. and Alix-Panabières, C., 2019, Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol*, **16**, 409–24.
 79. ClinicalTrials.gov n.d. <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> (τελευταία επίσκεψη: Οκτώβριος 2021).
 80. Alix-Panabières, C. and Pantel, K., 2021, Liquid biopsy: From discovery to clinical application. *Cancer Discov.*, **11**, 858–73.
 81. Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., Douville, C., Javed, A. A., Wong, F., Mattox, A., Hruban, R. H., Wolfgang, C. L., Goggins, M. G., Dal Molin, M., Wang, T. L., Roden, R., Klein, A. P., Ptak, J., Dobbryn, L., Schaefer, J. Silliman, N., Popoli, M., Vogelstein, J.T., Browne, J.D., Schoen, R.E., Brand, R.E., Tie, J., Gibbs, P., Wong, H.L., Mansfield, A.S., Jen, J., Hanash, S.M., Falconi, M., Allen, P.J., Zhou, S., Bettgowda, C., Diaz, L.A. Jr, Tomasetti, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Lennon, A.M. and

- Papadopoulos N., 2018, Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*, **359**, 926–30.
82. Santarpia, M., Liguori, A., D'Aveni, A., Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Daffinà, M. G., Lazzari, C., Altavilla, G. and Rosell, R., 2018, Liquid biopsy: still early days for early detection. *Lancet*, **391**, 2593–4.
 83. Ashworth, T.R., 1869, A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. *Med J Aust*, **14**, 146-147.
 84. Langley, R.R., Fidler, I.J., 2011, The seed and soil hypothesis revisited - the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int. J. Cancer Res.*, **128**, 2527.
 85. Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C., Schlimok, G., Diel, I. J., Gerber, B., Gebauer, G., Pierga, J. Y., Marth, C., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E. F., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G. Y., Bliss, J., Vincent-Salomon, A. and Pantel, K., 2005, A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. *N Engl J Med.*, **353**, 793-802.
 86. Tibbe, A. G., Miller, M. C., and Terstappen, L.W., 2007, Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry A.*, **71**, 154–62.
 87. Alix-Panabières, C., Mader, S. and Pantel, K., 2017, Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J Mol Med (Berl)*, **95**, 133–42.
 88. Lin, Z., Luo, G., Du, W., Kong, T., Liu, C. and Liu, Z., 2015, Recent Advances in Microfluidic Platforms Applied in Cancer Metastasis: Circulating Tumor Cells' (CTCs) Isolation and Tumor-On-A-Chip. *Small*, **16**, 133- 142.
 89. Giannopoulou, L., Kasimir-Bauer, S. and Lianidou, E.S., 2018, Liquid biopsy in ovarian cancer: recent advances on circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Clin Chem Lab Med*, **56**, 186–97.
 90. Zou, D. and Cui, D., 2018, Advances in isolation and detection of circulating tumor cells based on microfluidics. *Cancer Biol Med*, **15**, 335.
 91. Riethdorf, S., O' Flaherty, L., Hille, C. and Pantel, K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev.*, **125**, 102–21.

92. Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., Tibbe, A. G., Uhr, J. W. and Terstappen, L. W., 2004, Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*, **10**, 6897–904.
93. Liu, Z., Fusi, A., Klopocki, E., Schmittl, A., Tinhofer, I., Nonnenmacher, A. and Keilholz, U., 2011, Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med.*, **9**, 1–8.
94. Naume, B., Borgen, E., Tøssvik, S., Pavlak, N., Oates, D. and Nesland, J.M., 2004, Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy*, **6**, 244–52.
95. Mostert, B., Sleijfer, S., Foekens, J.A., Gratama, J.W., 2009, Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev*, **35**, 463–74.
96. Mohamed, H., Murray, M., Turner, J.N. and Caggana, M., 2009, Isolation of tumor cells using size and deformation. *Journal of Chromatogr A*, **1216**, 8289–95.
97. Tan, S.J., Lakshmi, R.L., Chen, P., Lim, W.T., Yobas, L. and Lim, C.T., 2010, Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients. *Biosens Bioelectron.*, **26**, 1701–5.
98. Faugeron, V., Paillet, E., Auger, N., Taylor, M. and Farace, F., 2014, Clinical Utility of Circulating Tumor Cells in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol*, **4**, 281.
99. Broche, L.M., Bhadal, N., Lewis, M.P., Porter, S., Hughes, M.P. and Labeed, F.H., 2007, Early detection of oral cancer - Is dielectrophoresis the answer? *Oral Oncol.*, **43**, 199–203.
100. Theil, G., Fischer, K., Weber, E., Medek, R., Hoda, R., Lücke, K. and Fornara, P., 2016, The Use of a New CellCollector to Isolate Circulating Tumor Cells from the Blood of Patients with Different Stages of Prostate Cancer and Clinical Outcomes- A Proof-of-Concept Study. *PloS One*, **11**, e0158354
101. Gorges, T. M., Penkalla, N., Schalk, T., Joosse, S. A., Riethdorf, S., Tucholski,

- J., Lücke, K., Wikman, H., Jackson, S., Brychta, N., von Ahsen, O., Schumann, C., Krahn, T. and Pantel, K., 2016, Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clin Cancer Res.*, **22**, 2197–206.
102. Balic, M., Rapp, N., Stanzer, S., Lin, H., Strutz, J., Szkandera, J., Daidone, M. G., Samonigg, H., Cote, R. J. and Dandachi, N., 2011, Novel immunofluorescence protocol for multimarker assessment of putative disseminating breast cancer stem cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, **19**, 33–40.
 103. Wendel, M., Bazhenova, L., Boshuizen, R., Kolatkar, A., Honnatti, M., Cho, E. H., Marrinucci, D., Sandhu, A., Perricone, A., Thistlethwaite, P., Bethel, K., Nieva, J., Heuvel, M. V. and Kuhn, P., 2012, 2012, Fluid biopsy for circulating tumor cell identification in patients with early-and late-stage non-small cell lung cancer: a glimpse into lung cancer biology. *Phys Biol.*, **9**, 016005.
 104. Lianidou, E.S. and Markou, A., 2011, Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem*, **57**, 1242–55.
 105. Sieuwerts, A. M., Mostert, B., Bolt-de Vries, J., Peeters, D., de Jongh, F. E., Stouthard, J. M., Dirix, L. Y., van Dam, P. A., Van Galen, A., de Weerd, V., Kraan, J., van der Spoel, P., Ramírez-Moreno, R., van Deurzen, C. H., Smid, M., Yu, J. X., Jiang, J., Wang, Y., Gratama, J. W., Sleijfer, S., Foekens, J.A. and Martens, J. W., 2011, mRNA and microRNA expression profiles in circulating tumor cells and primary tumors of metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res.*, **17**, 3600–18.
 106. Broche, L.M., Bhadal, N., Lewis, M.P., Porter, S., Hughes, M.P. and Labeed, F.H., 2007, Early detection of oral cancer- Is dielectrophoresis the answer? *Oral Oncol.*, **43**, 199–203.
 107. Zhu, W. F., Li, J., Yu, L. C., Wu, Y., Tang, X. P., Hu, Y. M. and Chen, Y. C., 2014, Prognostic value of EpCAM/MUC1 mRNA-positive cells in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol.*, **35**, 1211–9.
 108. Yang, D., Yang, X., Li, Y., Zhao, P., Fu, R., Ren, T., Hu, P., Wu, Y., Yang, H.

- and Guo, N., 2020, Clinical significance of circulating tumor cells and metabolic signatures in lung cancer after surgical removal. *J Transl Med.*, **18**, 1–13.
109. Crosbie, P. A., Shah, R., Krysiak, P., Zhou, C., Morris, K., Tugwood, J., Booton, R., Blackhall, F. and Dive, C., 2016, Circulating tumor cells detected in the tumor-draining pulmonary vein are associated with disease recurrence after surgical resection of NSCLC. *J Thor Oncol.*, **11**, 1793–7.
 110. TRACKing Non-small Cell Lung Cancer Evolution Through Therapy (Rx) - Tabular View - ClinicalTrials.gov n.d.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01888601> (τελευταία επίσκεψη: Οκτώβριος 2021).
 111. Maheswaran, S., Sequist, L. V., Nagrath, S., Ulkus, L., Brannigan, B., Collura, C. V., Inserra, E., Diederichs, S., Iafrate, A. J., Bell, D. W., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Irimia, D., Settleman, J., Tompkins, R. G., Lynch, T. J., Toner, M. and Haber, D. A., 2008, Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells. *N Engl J Med.*, **359**, 366–77.
 112. Pailler, E., Adam, J., Barthélémy, A., Oulhen, M., Auger, N., Valent, A., Borget, I., Planchard, D., Taylor, M., André, F., Soria, J. C., Vielh, P., Besse, B. and Farace, F., 2013, Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.*, **31**, 2273–81.
 113. Markou, A., Tzanikou, E., Kallergi, G., Pantazaka, E., Georgoulas, V., Kotsakis, A. and Lianidou E., 2021, Evaluation of Monocarboxylate Transporter 4 (MCT4) Expression and Its Prognostic Significance in Circulating Tumor Cells From Patients With Early Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Cell Dev Biol*, **9**, 1–9.
 114. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. and Wittwer, C. T., 2009, The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–22.
 115. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression

- data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**, 402–8.
116. Kershaw, S., Cummings, J., Morris, K., Tugwood, J. and Dive, C., 2015, Optimisation of immunofluorescence methods to determine MCT1 and MCT4 expression in circulating tumour cells. *BMC Cancer*, **15**, 1–10.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<i>Σχήμα 1.1. Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (3).....</i>	<i>2</i>
<i>Σχήμα 1.2. Η μεταστατική διαδικασία. Τα πέντε κύρια βήματα που περιλαμβάνουν την τοπική διήθηση, διείσδυση, μεταφορά μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, εξαγγείωση και αποικισμό. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (5)</i>	<i>4</i>
<i>Σχήμα 1.3. Η διαδικασία EMT. Τα ενδιάμεσα στάδια μετάβασης του κυττάρου από την επιθηλιακή στη μεσεγχυματική κατάσταση. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (6).....</i>	<i>5</i>
<i>Σχήμα 1.4. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στο Αδενοκαρκίνωμα και στο Πλακώδες Καρκίνωμα. Η συχνότητα των αλλαγών βασίζεται στο σύνολο σωματικών μεταλλάξεων, ομόζυγων ελλείψεων, ενισχύσεων και υπερέκφραση ή υποέκφραση γονιδίων. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (18).....</i>	<i>8</i>
<i>Σχήμα 2.1. Στάδια της γλυκόλυσης. (α) Προπαρασκευαστική φάση και (β) παραγωγική φάση. Προσαρμογή στα ελληνικά από την πηγή (29)</i>	<i>12</i>
<i>Σχήμα 2.2. Μεταβολισμός γλυκόζης στα κύτταρα των θηλαστικών. Η γλυκόζη προσλαμβάνεται από ειδικούς μεταφορείς και μεταβολίζεται στο κύτταρο προς παραγωγή ενέργειας.. Στο σχήμα φαίνονται οι δυο πιθανές πορείες του πυροσταφυλικού ανάλογα με τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (40).</i>	<i>15</i>
<i>Σχήμα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μεταξύ της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της αναερόβιας και της αερόβιας γλυκόλυσης («Φαινόμενο Warburg»). Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (30)</i>	<i>15</i>
<i>Σχήμα 2.4. Ο ρόλος του γαλακτικού οξέος στον καρκίνο. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (46)</i>	<i>19</i>
<i>Σχήμα 2.5. Πρωτεϊνική έκφραση των ισομορφών MCT στους ανθρώπινους ιστούς (49)</i>	<i>22</i>
<i>Σχήμα 2.6. «Αντίστροφο Φαινόμενο Warburg». Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος με τελικό στόχο την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (46)</i>	<i>25</i>

Σχήμα 3.1. Σύγκριση κλασικής βιοψίας με την υγρή βιοψία. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (77)	28
Σχήμα 3.2. Κυριότερα συστήματα εμπλουτισμού και απομόνωσης των CTCs στην υγρή βιοψία. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (77)	31
Σχήμα 3.3. Εμπλουτισμός και ανίχνευση των CTCs στο σύστημα CellSearch®. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (77)	32
Σχήμα 4.1. Βασική αρχή εμπλουτισμού των CTCs με το σύστημα Parsortix.	42
Σχήμα 4.2. Πειραματική πορεία εμπλουτισμού των CTCs με το σύστημα Parsortix. ..	43
Σχήμα 4.3. Πειραματικά στάδια απομόνωσης ολικού DNA με τη χρήση αντιδραστηρίου TRIzol-LS.	45
Σχήμα 4.4. Πειραματική πορεία αντίστροφης μεταγραφής προς σύνθεση συμπληρωματικού DNA με χρήση του “High- Capacity RNA-to-cDNA™ kit”	48
Σχήμα 4.5. Φάσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.	49
Σχήμα 4.6. Αρχή της μεθόδου PCR.....	51
Σχήμα 4.7. Αρχή λειτουργίας του ιχνηθέτη τύπου Taqman.	55
Σχήμα 4.8. Όργανο Cobas z 480 (Roche Diagnostics). Στα αριστερά αντικατοπτρίζεται η μπροστινή όψη του οργάνου και στα δεξιά η πλαϊνή όψη στην οποία γίνεται φόρτωση των δειγμάτων στην πλατφόρμα 96- θέσεων.	58
Σχήμα 4.9. Πρόγραμμα LightCycler® 480 με το οποίο γίνεται η παρακολούθηση της αντίδρασης και η συλλογή αποτελεσμάτων.....	59
Σχήμα 5.1. Πειραματική πορεία για τη μελέτη μεταγράφων των γονιδίων MCT1 και MCT4 σε ασθενείς με NSCLC.....	62
Σχήμα 5.2. Χαρακτηριστικό γράφημα κλινικών δειγμάτων για το γονίδιο B2M. (pos: θετικός μάρτυρας neg: αρνητικός μάρτυρας A: δείγμα υγιών που εξαιρέθηκε).....	69
Σχήμα 5.3. Διαγραμματική απεικόνιση των Cq των μεταγράφων του γονιδίου B2M σε δείγματα υγιών δοτών και ασθενών με πρόωμο MMKΠ πριν και μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου.....	70
Σχήμα 5.4. Χαρακτηριστικό γράφημα κλινικών δειγμάτων των μεταγράφων MCT1 των υγιών δοτών (pos: θετικός μάρτυρας, neg: αρνητικός μάρτυρας).....	71

<i>Σχήμα 5.5. Χαρακτηριστικό γράφημα μεταγράφων του γονιδίου MCT1 ασθενών με MMKΠ ένα μήνα μετά το χειρουργείο (pos: θετικός μάρτυρας, neg: αρνητικός μάρτυρας).</i>	71
<i>Σχήμα 5.6. Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του MCT1 μεταξύ των υγιών δοτών και των δειγμάτων ασθενών με MMKΠ σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (με * σημαίνονται τα στατιστικώς σημαντικά δεδομένα).</i>	72
<i>Σχήμα 5.7. Χαρακτηριστικό γράφημα κλινικών δειγμάτων των μεταγράφων MCT4 των υγιών δοτών (pos: θετικός μάρτυρας, neg: αρνητικός μάρτυρας).</i>	73
<i>Σχήμα 5.8. Χαρακτηριστικό γράφημα μεταγράφων του γονιδίου MCT4 ασθενών με MMKΠ ένα μήνα μετά το χειρουργείο (pos: θετικός μάρτυρας, neg: αρνητικός μάρτυρας).</i>	73
<i>Σχήμα 5.9. Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του MCT4 μεταξύ των υγιών δοτών και των δειγμάτων ασθενών με MMKΠ σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (με * σημαίνονται τα στατιστικώς σημαντικά δεδομένα).</i>	74
<i>Σχήμα 5.10. Kaplan- Meier ανάλυση για την εκτίμηση της προγνωστικής σημασίας του MCT1 σε σχέση με το DFS ασθενών με MMKΠ.</i>	76
<i>Σχήμα 5.11. Kaplan- Meier ανάλυση για την εκτίμηση της προγνωστικής σημασίας του MCT4 σε σχέση με το DFS ασθενών με MMKΠ.</i>	77

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 2.1. Ρυθμιστές έκφρασης και σταθερότητας των MCTs, καθώς και η σχετική συγγένεια με το γαλακτικό των πιο καλά χαρακτηρισμένων MCT. Προσαρμοσμένο στα ελληνικά από την πηγή (52)</i>	<i>21</i>
<i>Πίνακας 4.1. Συστατικά της αντίδρασης σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA). .</i>	<i>47</i>
<i>Πίνακας 5.1. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη Taqman για το γονίδιο B2M</i>	<i>62</i>
<i>Πίνακας 5.2. Συστατικά αντίδρασης της RT- qPCR για την ενίσχυση του γονιδίου B2M.</i>	<i>63</i>
<i>Πίνακας 5.3. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αντίδρασης RT- qPCR για το γονίδιο B2M.</i>	<i>63</i>
<i>Πίνακας 5.4. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη Taqman για το γονίδιο MCT1.</i>	<i>64</i>
<i>Πίνακας 5.5. Συστατικά αντίδρασης της RT- qPCR για την ενίσχυση του γονιδίου MCT1.....</i>	<i>64</i>
<i>Πίνακας 5.6. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αντίδρασης RT- qPCR για το γονίδιο MCT1.....</i>	<i>65</i>
<i>Πίνακας 5.7. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη Taqman για το γονίδιο MCT4.</i>	<i>65</i>
<i>Πίνακας 5.8. Συστατικά αντίδρασης της RT- qPCR για την ενίσχυση του γονιδίου MCT4.....</i>	<i>66</i>
<i>Πίνακας 5.9. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αντίδρασης RT- qPCR για το γονίδιο MCT4.....</i>	<i>66</i>
<i>Πίνακας 5.10. Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης μεταξύ των MCT1 και MCT4 σε ασθενείς με MMKP.....</i>	<i>75</i>
<i>Πίνακας 5.11. Συσχέτιση υπερέκφρασης του γονιδίου MCT1 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με πρώιμο MMKP πριν τη χειρουργική αφαίρεση.</i>	<i>78</i>

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ
ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ 1 (MCT1) ΣΕ
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΩΙΜΟ
ΜΗ- ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΖΑΦΕΙΡΙΑΔΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα καρκινικά κύτταρα προσλαμβάνουν υψηλά ποσοστά γλυκόζης και παράγουν μεγάλη ποσότητα γαλακτικού οξέος ακόμη και υπό την παρουσία οξυγόνου («**Φαινόμενο Warburg**»). Το γαλακτικό είναι τοξικό για τα κύτταρα και είναι αναγκαία η έκκρισή του μέσω μονοκαρβοξυλικών μεταφορέων. Έχει βρεθεί ότι ο μονοκαρβοξυλικός μεταφορέας 1 (**MCT1**) υπερεκφράζεται σε αρκετούς τύπους καρκίνου και αναστολείς του, ως νέοι θεραπευτικοί στόχοι, έχουν εισαχθεί σε κλινικές δοκιμές. Πρόσφατα παρατηρήθηκε η υπερέκφραση του μονοκαρβοξυλικού μεταφορέα 4 (**MCT4**) στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) ασθενών με πρώιμο Μη- Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα (ΜΜΚΠ), καθιστώντας για ακόμη μια φορά την **υγρή βιοψία** ως ένα ισχυρό εργαλείο για την παρακολούθηση εξέλιξης της νόσου σε πραγματικό χρόνο.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μιας ευαίσθητης και ειδικής RT- qPCR μεθόδου για την εκτίμηση της έκφρασης του **MCT1** σε απομονωμένα με βάση το μέγεθος CTCs ασθενών με πρώιμο ΜΜΚΠ, ενώ ταυτόχρονα έγινε εκτίμηση της διαφοράς των επιπέδων έκφρασης των **MCT1** και **MCT4** στα ίδια δείγματα σε διάφορα χρονικά σημεία της νόσου. Τέλος, εξετάστηκε η προγνωστική τους σημασία.

Έγινε συλλογή περιφερικού αίματος από 59 ασθενείς και συγκεκριμένα α) 59 δειγμάτων πριν και β) 49 δειγμάτων ένα μήνα μετά το χειρουργείο, γ) 11 δειγμάτων στη φάση της υποτροπής, καθώς και 19 δειγμάτων από υγιείς δότες που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου.

Τα επίπεδα έκφρασης του **MCT1** και **MCT4** στα CTCs διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των υγιών δοτών και των ασθενών τόσο στη φάση της υποτροπής

όσο και στην αρχική φάση πριν το χειρουργείο. Παρατηρήθηκε ότι ο *MCT1* υπερεκφράζεται σε 20/59 (33.9%) ασθενείς πριν το χειρουργείο, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ένα μήνα μετά και στη φάση της υποτροπής ήταν 9/49 (18.4%) και 2/11 (18.2%), αντίστοιχα. Η ανάλυση Kaplan Meier έδειξε ότι ο *MCT4* αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη στους ασθενείς με ΜΜΚΠ, καθώς όσοι τον υπερέκφραζαν είχαν μειωμένο DFS ($p=0.023$). Κάτι ανάλογο δεν παρατηρήθηκε για τον *MCT1*. Είναι ανάγκη να διεξαχθούν περαιτέρω έρευνες στα CTCs σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ώστε να εκτιμηθούν και οι δύο MCTs ως βιοδείκτες στον ΜΜΚΠ.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Υγρή βιοψία, «Φαινόμενο Warburg», ΜΜΚΠ

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: CTCs, *MCT1*, *MCT4*

EVALUATION OF MONOCARBOXYLATE TRANSPORTER 1 (*MCT1*) EXPRESSION AND ITS PROGNOSTIC SIGNIFICANCE IN CIRCULATING TUMOR CELLS FROM EARLY STAGE NON- SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

ANASTASIA ZAFEIRIADOU

ABSTRACT

Cancer cells uptake large amounts of glucose, producing high levels of lactate even in the presence of oxygen (“**Warburg Effect**”). Lactate is toxic for the cells and needs to be excreted through monocarboxylate transporters. Monocarboxylate transporter 1 (*MCT1*) is overexpressed in various types of cancers and inhibitors of *MCT1* have entered clinical trials as new therapeutic targets. Recently, it was shown that monocarboxylate transporter 4 (*MCT4*) is overexpressed in circulating tumor cells (CTCs) of early stage Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) patients, indicating one more time the importance of **liquid biopsy** in disease monitoring in real time.

The aim of the present study was to develop and validate a sensitive and specific RT- qPCR method for the evaluation of *MCT1* mRNA expression in size- based CTCs from early stage NSCLC patients among different timepoints. Furthermore, we aimed to evaluate the differences in the expression of *MCT1* and *MCT4* and their prognostic significance.

Peripheral blood of 59 NSCLC patients was collected at different timepoints: a) 59 samples at baseline (pre- surgery), b) 49 samples one month after surgery and c) 11 samples at the time of relapse. Additionally, 19 peripheral blood samples were collected from healthy donor (control group).

Overexpression of both MCTs in CTCs differed significantly between healthy donors and patients at the baseline and at the time of relapse. *MCT1* was overexpressed in 20/59 (33.9%) patients at the baseline and in 9/49 (18.4%) and 2/11 (18.2%) patients one month after surgery and at the time of relapse, respectively.

Kaplan Meier analysis showed that patients with *MCT4* overexpression in CTCs had a significantly shorter DFS ($p=0.023$), but no correlation was found for *MCT1*. Future studies should be conducted in a larger number of samples in order to better evaluate both MCTs as possible biomarkers in NSCLC.

SUBJECT AREA: Liquid Biopsy, “Warburg Effect”, NSCLC

KEYWORDS: CTCs, *MCT1*, *MCT4*