



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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (CTCs) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΣΠΟΡΑΔΙΚΟ ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ (Medullary Thyroid Carcinoma-MTC)**

**ΕΛΕΝΗ ΛΑΓΟΠΟΔΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2023



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (CTCs) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΣΠΟΡΑΔΙΚΟ ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ (Medullary Thyroid Carcinoma-MTC)**

ΕΛΕΝΗ ΛΑΓΟΠΟΛΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ
A.M.: 7113062100012

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής και Κλινικής Χημείας, Τμήμα
Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής και Κλινικής Χημείας, Τμήμα
Χημείας, ΕΚΠΑ

Αθηνά Μάρκου, Επίκουρη Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας,
Ευανθία Κασσή, Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

***Στους γονείς μου
Γιάννη & Ελένη***

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, στο Τμήμα Χημείας, του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε. Λιανίδου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσά μου, Καθηγήτρια κα Ε. Λιανίδου, αρχικά, για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος και στη συνέχεια, για τη διαρκή υποστήριξη, την άπογη συνεργασία και την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου. Θα ήθελα, επίσης, να την ευχαριστήσω για την ηθική συμπαράστασή της, την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε. δίνοντας μου την ευκαιρία ενασχόλησης με το τόσο σημαντικό και ενδιαφέρον πεδίο της Υγρής Βιοψίας και της αντιμετώπισης του καρκίνου, καθώς και για όλη τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, επιπλέον, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Α. Μάρκου, για την συμβολή και τις υποδείξεις της, τόσο στο εργαστηριακό κομμάτι της εργασίας, όσο και στο θεωρητικό υπόβαθρο και φυσικά για τον χρόνο της και τις πολύτιμες παρατηρήσεις της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Ενδοκρινολόγο, Επιμελητή Ενδοκρινολογικού Τμήματος - Επιστημονικά Υπεύθυνου Ιατρείου Νεοπλασιών Θυρεοειδούς, 401 ΓΣΝΑ, κ. Γεώργιο Σημαιάκη για τη διάθεση των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, για την ανάπτυξη και σχεδιασμό της μελέτης και για την άπογη συνεργασία, καθώς και την Καθηγήτρια κα. Ε. Κασσή, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Επιπλέον, η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής δεν θα ήταν η ίδια, χωρίς τη στήριξη, την αγάπη και τη βοήθεια των μελών του εργαστηρίου μας. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, λοιπόν, οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Θεοδώρα Λόντρα για την καθοριστική και ανιδιοτελή βοήθειά της και στήριξή της στις αρχές της ερευνητικής μου εργασίας και στη Δρ. Α. Στρατή και Δρ. Α. Ντζιφά για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Παράλληλα, ευχαριστώ ιδιαίτερος τις υποψήφιες διδάκτορες Σταυρούλα Σμίλκου, Βικτώρια Τσερπέλη και Αναστασία Ζαφειριάδου κάθε μία για

λόγους ξεχωριστούς αλλά κυρίως για την προθυμία τους να μου προσφέρουν τη βοήθεια τους και τις γνώσεις τους αδιάκοπα, καθώς και την συνάδελφο Έλενα Θάνου, για την άψογη συνεργασία, το όμορφο κλίμα και τις στιγμές που μοιραστήκαμε στο εργαστήριο. Ο καθένας συνέβαλε με τον τρόπο του στην πορεία της εργασίας μου και τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο χωρίς αυτά τα άτομα. Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους γονείς μου και στους φίλους μου, για την αγάπη τους, καθώς και την ψυχολογική στήριξη που μου παρέχουν σε κάθε νέο μου βήμα. Χωρίς εκείνους, τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (CTCs) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΠΟΡΑΔΙΚΟ ΜΤC

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Μυελοειδές Καρκίνωμα του Θυρεοειδούς (Medullary Thyroid Carcinoma-**MTC**) είναι ένας νευροενδοκρινής όγκος προερχόμενος από τα παραθυλακικά κύτταρα C του θυρεοειδούς αδένος και αποτελεί τον τρίτο πιο συχνό υπότυπο καρκίνου του θυρεοειδούς. Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις (Distant metastases-DM) και/ή η βιοχημική ανοχή (Biochemical Persistent Disease-BPD) της νόσου επηρεάζουν αρνητικά την πρόγνωση των ασθενών και ο χρόνος ημιδιπλασιασμού της καλσιτονίνης είναι ο κύριος προγνωστικός δείκτης για την εξέλιξη του ΜΤC. Η Υγρή Βιοψία (Liquid Biopsy-**LB**) αποτελεί, σήμερα, ένα πολλά υποσχόμενο, ελάχιστα επεμβατικό εργαλείο που παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία του όγκου και τη μοριακή ταυτότητά του. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο μοριακός χαρακτηρισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells-**CTCs**) σε ασθενείς με σποραδικό ΜΤC με απομακρυσμένες μεταστάσεις και/ή βιοχημική ανοχή της νόσου χρησιμοποιώντας επιθηλιακούς, μεσεγχυματικούς καθώς και ειδικούς για το ΜΤC δείκτες.

Στη παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν δεκατρείς ασθενείς (n=13) με σποραδικό ΜΤC που έφεραν σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια *RET* (n=10) και *HRAS* (n=2), ενώ σε έναν ασθενή το προφίλ των μεταλλάξεων είναι άγνωστο. Για κάθε ασθενή, πραγματοποιήθηκε λήψη περιφερικού αίματος σε EDTA, σε διάφορα χρονικά σημεία μετά από χειρουργική αφαίρεση του θυρεοειδούς αδένος. Χρησιμοποιώντας πανομοιότυπες αιμοληψίες για όλα τα δείγματα περιφερικού αίματος, η απομόνωση των CTCs έγινε με θετικό EpCAM ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό και ακολούθησε, παράλληλα, άμεση σύγκριση με το σύστημα μικρορευστονικής Parsortix (ANGLE-plc, Guildford, UK), το οποίο απομονώνει τα CTCs με βάση το μέγεθος και την πλαστικότητα τους. Ο EpCAM θετικός ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός φαίνεται να υπερέχει από άποψη ευαισθησίας, αφού ένα σημαντικά υψηλότερο ποσοστό πανομοιότυπων δειγμάτων περιφερικού αίματος βρέθηκε θετικό σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Η ανάλυση έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών *CK-8*, *CK-18* και *CK-19*, του μεσεγχυματικού δείκτη

VIMENTIN-(VIM), του υποδοχέα χημειοκινών *CXCR4* και του MTC-ειδικού δείκτη την καλσιτονίνη (Calcitonin-CALCA) σε CTCs πραγματοποιήθηκε με RT-qPCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, όλα τα δείγματα βρέθηκαν αρνητικά, ως προς την έκφραση της *CK-19*, ενώ αντίθετα, 4 δείγματα βρέθηκαν θετικά, ως προς την έκφραση της *CK-8* και σε 2, ως προς την έκφραση της *CK-18*. Βρέθηκε υπερέκφραση του *CXCR4* σε μόνο 3 δείγματα τα οποία αντιστοιχούν στα πρώτα χρονικά σημεία του ίδιου ασθενή, ενώ στο τελικό χρονικό σημείο, όπου τεκμηριώθηκε η σταθεροποίηση της νόσου (βιοχημική και δομική), δεν βρέθηκε υπερέκφραση του *CXCR4*, μετά την αλλαγή της συστηματικής θεραπείας. Η υπερέκφραση της *VIMENTIN* βρέθηκε στα περισσότερα δείγματα συνηγορώντας υπέρ μιας διαδικασίας μετάβασης από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό χαρακτήρα (Epithelial to Mesenchymal Transition-EMT) που πιθανώς συμβαίνει σε προχωρημένο MTC. Τέλος, υπερέκφραση καλσιτονίνης ανιχνεύθηκε σε ένα μόνο δείγμα, σε ένα καθορισμένο χρονικό σημείο, 60 ημέρες πριν από την έντονη αύξηση της καλσιτονίνης ορού. Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι ο θετικός EpCAM ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός αποτελεί μια καλύτερη προσέγγιση για την απομόνωση CTCs σε ασθενείς με MTC.

Η έκφραση των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών της *CK-8*, *CK-18* και *CK-19*, του μεσεγχυματικού δείκτη *VIMENTIN*, του υποδοχέα χημειοκινών *CXCR4* και της καλσιτονίνης (*CALCA*) σε CTCs θα πρέπει να μελετηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και για μεγαλύτερες περιόδους παρακολούθησης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ: Υγρή Βιοψία, Medullary Thyroid Cancer

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα, Επιθηλιακοί δείκτες Μεσεγχυματικοί δείκτες, Καλσιτονίνη, CTCs

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN PATIENTS WITH spMTC

ABSTRACT

Medullary Thyroid Carcinoma (**MTC**) is a neuroendocrine tumor originating from the parafollicular C cells of the thyroid gland and is the third most common subtype of thyroid neoplasia. Distant metastases (DM) and/or biochemical persistent disease (BPD) in MTC, adversely affect disease prognosis. Calcitonin doubling-times (DTs) is the main prognostic indicators for disease progression. Liquid biopsy (**LB**) based on CTCs enrichment and characterization seems to be an intriguing non-invasive tool providing information about tumor biology and molecular identity. The aim of this study was the molecular characterization of CTCs in sporadic MTC (spMTC) patients with DM and/or BPD using epithelial, mesenchymal as well as MTC-specific markers

Thirteen spMTC patients carrying somatic mutations in *RET* (n=10), *HRAS* (n=2) and one patient with unknown mutation status were included. Peripheral blood (PB) in EDTA was obtained from every patient at different time points after surgical removal of the thyroid gland. Using identical blood draws for all samples, a direct comparison study between CTC-enrichment was directly compared by EpCAM-based positive immunomagnetic CTC enrichment and the size-based Parsortix microfluidics system (ANGLE-plc, Guildford, UK) was performed. The EpCAM-based positive immunomagnetic CTC enrichment seems superior in terms of sensitivity since a significantly higher percentage of identical PB-samples was found positive at the gene expression level. Expression analysis at mRNA level of the epithelial markers *CK-8*, *CK-18*, and *CK-19*, the mesenchymal marker *VIMENTIN*, the chemokine receptor *CXCR4*, and the MTC-specific marker calcitonin (*CALCA*) in CTCs was performed using RT-qPCR. The results showed that all samples were negative for *CK-19* expression, while, on the contrary, 4 samples were positive for *CK-8* expression and 2 for *CK-18* expression. Overexpression of *CXCR4* was found in only 3 samples corresponding to the initial time points of the same patient, whereas at the final time point, where disease stabilization (biochemical and structural) was documented, *CXCR4* overexpression was absent, after changing the systemic therapy. *VIMENTIN* overexpression was observed in most of the samples, indicating Epithelial to

Mesenchymal Transition (EMT) process possibly occurring in progressive MTC. Finally, calcitonin overexpression was detected in only one sample at a specific time point, 60 days before the marked serum calcitonin increase. Our results indicate that positive EpCAM immunomagnetic enrichment constitutes a better approach for isolating CTCs in patients with MTC.

In conclusion, gene expression of epithelial markers *CK-8*, *CK-18* and *CK-19*, mesenchymal marker *VIMENTIN*, chemokine receptor *CXCR4* and calcitonin (*CALCA*) in CTCs should be studied in a larger number of patients and for longer follow-up periods

SUBJECT AREA: Liquid Biopsy, Medullary Thyroid Cancer

KEYWORDS: CTCs, Epithelial markers, Mesenchymal markers, Calcitonin

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ-ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ13

1.1 Εισαγωγή.....	17
1.1.1 Γονίδια και καρκινογένεση.....	17
1.1.2 Ταξινόμηση όγκου	18
1.2 Καρκίνος και Μετάσταση.....	21
1.2.1 Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική Μετάβαση (Epithelial–Mesenchymal Transition-EMT).....	22
1.2.2 CTCs Clusters.....	23
1.3 Μυελοειδές Καρκίνωμα του Θυρεοειδούς (Medullary Thyroid Carcinoma-MTC)22	
1.3.1. Εισαγωγή	25
1.3.2 Μηχανισμοί Παθογένειας MTC	27
1.3.3 Καλσιτονίνη.....	31
1.3.4 Θεραπεία.....	32
1.3.5 Μετάσταση	33

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ.....34

2.1 Εισαγωγή.....	37
2.2 Εγκεκριμένα τεστ Υγρής Βιοψίας από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration -FDA).....	41
2.3 Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα (Circulating Tumor Cells-CTCs).....	43
2.3.1 Τεχνικές για την απομόνωση των CTCs	45
2.3.1.1 Απομόνωση βάσει Επιφανειακών Δεικτών	45
2.3.1.2 Απομόνωση βάσει Φυσικών Ιδιοτήτων.....	48
2.3.2 Αναλυτικές Τεχνικές για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs	50
2.4. Εξωκυττάριο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (Circulating Tumor DNA-ctDNA)54	
2.4.1 Ιστορική Αναδρομή και βιολογική προέλευση	54

2.4.2. Κλινική Σημασία του ctDNA	55
2.5 Σύγκριση CTCs και cfDNA.....	57
2.6 Υγρή Βιοψία στο MTC)	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
3.1 Κλινικά Δείγματα	63
3.1.1 Ασθενείς με MTC	63
3.1.2 Υγιείς Αιμοδότες.....	63
3.2 Συλλογή Περιφερικού Αίματος.....	63
3.3 Κατεργασία και Ανάλυση των δειγμάτων	64
3.3.1 Εφαρμογή διαδικασιών στο προ-αναλυτικό και στο αναλυτικό στάδιο	64
3.3.2 Απομόνωση πλάσματος από περιφερικό αίμα.....	65
3.3.3 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα με τη χρήση διαλύματος λύσης ερυθρών κυττάρων.....	66
3.3.3.1 Αρχή μεθόδου	66
3.3.3.2 Πειραματική πορεία	66
3.3.4 Απομόνωση των CTCs με χρήση EpCAM-θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού	67
3.3.4.1 Αρχή μεθόδου	67
3.3.4.2 Πειραματική Πορεία	68
3.3.5 Απομόνωση CTCs με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK)	70
3.3.5.1 Αρχή μεθόδου	70
3.3.5.2 Πειραματική Πορεία	72
3.3.6 Απομόνωση ολικού RNA από το κλάσμα των CTCs με χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol™ LS (Invitrogen, USA)	73
3.3.6.1 Πειραματική πορεία	74
3.3.7 Σύνθεση cDNA	75
3.3.7.1 Αρχή μεθόδου	75

3.3.7.2 Πειραματική Πορεία	77
3.3.8 Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR).....	78
3.3.8.1 Αρχή Μεθόδου.....	78
3.3.8.2 Ποσοτικοποίηση	79
3.3.8.3 Στάδια PCR.....	81
3.3.8.4 Συστήματα ανίχνευσης.....	82
3.3.8.5 Οργανολογία	85
3.3.9 In silico σχεδιασμός εκκινητών	88
3.3.9.1 Γενικά	88
3.3.9.2 In silico σχεδιασμός εκκινητών για την καλσιτονίνη (CALCA).....	89
3.3.10 Πρωτόκολλα real-time PCR	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ CTCs -	
ΜΕΛΕΤΗ ΈΚΦΡΑΣΗΣ, CK-8, CK-18, CK-19, VIMENTIN, CXCR4 ΚΑΙ	
ΚΑΛΣΙΤΟΝΙΝΗΣ (CALCA).....	101
4.1. Εισαγωγή.....	101
4.2. Πειραματική Πορεία.....	101
4.2.1 Κλινικά Δείγματα.....	102
4.3 Αποτελέσματα.....	103
4.3.1 Απομόνωση CTCs με τη χρήση EpCAM θετικού ανομαγνητικού	
εμπλουτισμού	103
4.3.1.1 Έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων cDNA μέσω της έκφρασης του	
γονιδίου αναφοράς B2M.....	103
4.3.1.2 Αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης των επιθηλιακών δεικτών σε	
επίπεδο mRNA	105
4.3.1.3 Αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών σε	
επίπεδο mRNA	108
4.3.1.4 Μελέτη ειδικότητας των εκκινητών της καλσιτονίνης (CALCA).....	111
4.3.1.5 Μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (CALCA) σε επίπεδο mRNA...	117

4.3.1.6 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα.....	118
4.3.2 Απομόνωση CTCs με το σύστημα μικροροών Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK).	119
4.3.2.1 Έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς B2M.....	119
4.3.2.2 Μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (CALCA) σε επίπεδο mRNA..	120
4.3.2.3 Αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης των επιθηλιακών δεικτών σε επίπεδο mRNA	120
4.3.3.4 Αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών σε επίπεδο έκφρασης mRNA	122
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ.....	131
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	135
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	139
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	141

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΚΙΝΟΣ-ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

1.1 Εισαγωγή

Η ανάπτυξη του καρκίνου οφείλεται στη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών στους μηχανισμούς ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης και, κυρίως, στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, με αποτέλεσμα τον μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό του κυττάρου και τελικά τη δημιουργία όγκου. Σε κυτταρικό επίπεδο, η ανάπτυξη του καρκίνου αποτελεί μία πολυπαραγοντική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει τη συσσώρευση μεταλλάξεων και την δημιουργία κυττάρων με εκθετική αυξητική ικανότητα πολλαπλασιασμού, διήθησης και μετάστασης. Ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός έχει, στη συνέχεια, ως αντίκτυπο την ανάπτυξη ενός πληθυσμού από, κλωνικά, προερχόμενα καρκινικά κύτταρα. Η ανάπτυξη του όγκου είναι το επόμενο στάδιο, κατά το οποίο, επιπλέον μεταλλάξεις εντός του κυττάρου λαμβάνουν χώρα και προσδίδουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στο κύτταρο, όπως γρήγορη ανάπτυξη, οδηγώντας σε ένα κυρίαρχο υποπληθυσμό. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κλωνική επέκταση και συνεχίζεται, κατά τη διαδικασία ανάπτυξης του όγκου, καθιστώντας τους ολοένα και πιο επιθετικούς. Γενικότερα, η καρκινογένεση μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε ιστό και όργανο, οδηγώντας σε πολλούς διακριτούς τύπους καρκίνου με διαφορετική συμπεριφορά και ανταπόκριση στις θεραπείες(1,2)

1.1.1 Γονίδια και καρκινογένεση

Τα γονίδια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση είναι τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά. Τα ογκογονίδια προέρχονται από μεταλλάξεις σε πρώτο-ογκογονίδια, τα οποία φυσιολογικά προωθούν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Η μετατροπή τους σε ογκογονίδια οδηγεί στην ενίσχυσή τους και συνεπώς, στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους και τελικά, την εμφάνιση καρκίνου. Στην δεύτερη κατηγορία, ανήκουν γονίδια που φυσιολογικά αναγνωρίζουν τυχόν βλάβες στο DNA και τη μη φυσιολογική ανάπτυξη του κυττάρου, αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο και οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Γονίδια διαμεμβρανικών υποδοχέων κινασών τυροσίνης, όπως ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor,

EGFR), αλλά και γονίδια, όπως τα *PIK3CA*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* και άλλα, αποτελούν παραδείγματα ογκογονιδίων που συχνά εμφανίζουν μεταλλάξεις σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Στον αντίποδα, το γονίδιο *p53* και το γονίδιο της ομόλογης της τενσίνης φωσφατάσης (Phosphatase and Tensin homolog, *PTEN*), η οποία ρυθμίζει, ανασταλτικά, το μονοπάτι της 3-κινάσης της φωσφατίδουλο-ινοσιτόλης (PhosphoInositide 3-Kinase, *PI3K*) είναι αντιπροσωπευτικά γονίδια της κατηγορίας των ογκοκατασταλτικών. Άλλα σημαντικά γονίδια τα οποία παρουσιάζουν μεταλλάξεις που σχετίζονται με τον καρκίνο είναι τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, γονίδια ενζύμων που εμπλέκονται στη διαμόρφωση των ιστών, μη-κωδικά RNAs και άλλα (3).

Οι παραπάνω κατηγορίες γονιδίων, στο σύνολό, τους συμμετέχουν σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου και οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε αυτά τροποποιούν τη φυσιολογική σηματοδότηση και επηρεάζουν τον μεταβολισμό των κυττάρων, μεταρρυθμίζοντας βασικές λειτουργίες του, ενισχύοντας την επιβίωση και την ανάπτυξη του όγκου. Τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση είναι το μονοπάτι *PI3K*, καθώς και το μονοπάτι της κινάσης–ενεργοποιημένης από μιτογόνο πρωτεΐνη (Mitogen-Activated Protein Kinase, *MAPK*). Επιπλέον, το μικροπεριβάλλον του όγκου επηρεάζει εξίσου τον μεταβολικό φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων και κατ’ επέκταση στην πρόοδό τους και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Αυτές οι μεταβολικές τροποποιήσεις έχουν στόχο την αύξηση παραγωγής ενέργειας, την αυξημένη σύνθεση μακρομορίων και τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (1,3,4).

1.1.2 Ταξινόμηση όγκου

Ένας καλοήθης όγκος περιορίζεται στην αρχική του θέση εμφάνισης, χωρίς διήθηση σε διπλανούς ιστούς και χωρίς την παρουσία μετάστασης με τη θεραπεία να αρκείται σε χειρουργική αφαίρεση. Στον αντίποδα, ένας κακοήθης όγκος, ο οποίος είναι και ο μοναδικός που αναφέρεται ως καρκίνος, έχει την ικανότητα να διεισδύει στους περιβάλλοντες ιστούς και να εξαπλώνεται, μέσω του λεμφικού ή του κυκλοφορικού συστήματος, σε ολόκληρο τον οργανισμό, δημιουργώντας μεταστάσεις. Ο κακοήθης όγκος διακρίνεται σε τρεις βασικές κατηγορίες: στα καρκινώματα, τα οποία είναι

κακοήθειες των επιθηλιακών κυττάρων, στα σαρκώματα, των οποίων η εμφάνισή είναι σπάνια και αφορά συμπαγείς όγκους στους συνδετικούς και ινώδεις ιστούς και τέλος, στα λεμφώματα, τα οποία σχηματίζονται από τα αδιαφοροποίητα κύτταρα του αίματος του ανοσολογικού συστήματος. Επίσης, οι όγκοι ταξινομούνται με βάση τον ιστό από τον οποίο προέρχονται και το είδος κυττάρων τα οποία εμπλέκονται. Όσο νωρίτερα γίνει η διάγνωση της νόσου, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα επιβίωσης του ασθενή και αποτελεσματικότερη η ανταπόκριση στην όποια θεραπεία. Το κατά πόσο περιορισμένος τοπικά ή εκτεταμένος είναι ο καρκίνος, περιγράφεται από το σύστημα **TNM** (Tumour, Node, Metastasis) κλινικής σταδιοποίησης, που περιλαμβάνει τα εξής στάδια (5):

Στάδιο 0 – Καρκίνος in situ.

Στάδιο 1 – Τοπικός/ Εντοπισμένος Καρκίνος.

Στάδιο 2 – Τοπική Επέκταση Καρκίνου, πρώιμα στάδια.

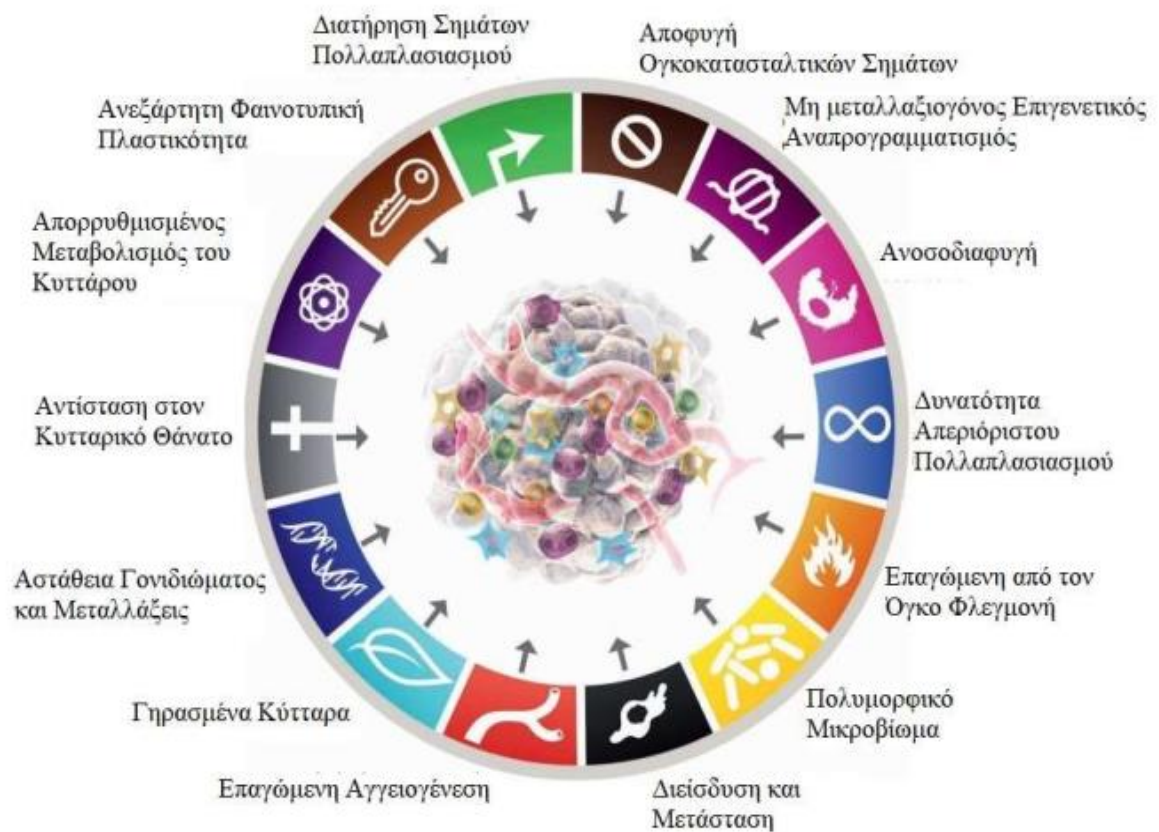
Στάδιο 3 – Τοπική Διήθηση Καρκίνου, προχωρημένο στάδιο.

Στάδιο 4 – Μεταστατικός Καρκίνος

1.1.3 Τα αίτια του καρκίνου

Η ανάπτυξη του όγκου είναι μία πολυσύνθετη διαδικασία. Τα σύγχρονα δεδομένα δείχνουν ότι, αποτελεί αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πολλών παραγόντων εξού και η διακριτή συμπεριφορά ανάμεσα στους διάφορους τύπους καρκίνου, ενώ ακόμα και στον ίδιο όγκο, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια μεταξύ τους. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν γενετικά, περιβαλλοντικά ή/και ατομικά χαρακτηριστικά. Συνεπώς, η εμφάνιση του καρκίνου καθορίζεται, τόσο από ενδογενείς, όσο και από εξωγενείς παράγοντες. Έτσι, οι γενετικές αλλαγές μπορεί να οφείλονται σε οικογενειακό ιστορικό και κληρονομικότητα ή να είναι σποραδικές, δηλαδή απόρροια του τρόπου ζωής και υιοθέτησης επιβλαβών συνηθειών, μερικές από τις οποίες είναι το κάπνισμα, η πλούσια σε λιπαρά διατροφή και η έκθεση σε χημικές ουσίες. Οι παραπάνω παράμετροι προκαλούν αλλαγές σε επίπεδο DNA, οι οποίες περιλαμβάνουν μεταλλάξεις, ελλείψεις ή προσθήκες τμημάτων DNA, αναδιατάξεις, ενίσχυση ή μείωση του αριθμού γονιδίων, επιγενετικές αλλαγές σε επίπεδο δομής χρωματίνης, έκφρασης, καθώς και μεθυλίωσης γονιδίων (6).

Μια πιο ολοκληρωμένη άποψη για τα γενικά χαρακτηριστικά του καρκίνου είναι σημαντική για την βαθύτερη κατανόηση και αποσαφήνιση της πολυπλοκότητας της ανάπτυξής του, ώστε η γνώση αυτών να εφαρμοστεί σε νέα και πιο αποτελεσματικά θεραπευτικά πρωτόκολλα αντιμετώπισής του. Προς την κατεύθυνση αυτή, η σειρά των βιβλιογραφικών ανασκοπήσεων των B. Weinberg και D. Hanahan διαδραμάτισε μείζονα ρόλο. Σε αυτά τα σημαντικά άρθρα περιέγραψαν τα κύρια χαρακτηριστικά του καρκίνου με θέμα “Hallmarks of Cancer”. Σημειώνεται ότι, η λίστα των χαρακτηριστικών του καρκίνου ανανεώνεται σε κάθε έκδοση μαρτυρώντας την πρόοδο στη μελέτη και κατανόησή τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά, 14 σύμφωνα με την τελευταία έκδοση (2022), φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (**Σχήμα 1.1**) (6):



Σχήμα1.1 Hallmarks of Cancer (6)

1.2 Καρκίνος και Μετάσταση

Η δημιουργία δευτεροπαθών όγκων, οι οποίοι εντοπίζονται μακριά από την πρωτοπαθή εστία του καρκίνου, είναι γνωστή με τον όρο «μετάσταση». Η μετάσταση αποτελεί την κύρια αιτία αποτυχίας της θεραπείας και θανάτου των ασθενών με καρκίνο και συνιστά μια περίπλοκη διαδικασία, στην οποία εμπλέκονται πληθώρα μηχανισμών και αλληλεπιδράσεων, οι οποίοι παραμένουν ως ένα μεγάλο βαθμό αχαρτογράφητοι. Η δημιουργία και η ανάπτυξη μεταστατικών εστιών απαιτεί τη διαφυγή κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο και την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος, όπου αφού ξεπεράσουν εμπόδια όπως η πίεση του αίματος και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, εγκαθίστανται σε νέο περιβάλλον υγιών κυττάρων δημιουργώντας μετάσταση. Τα κύτταρα αυτά που επάγουν τη μετάσταση δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον που διευκολύνει την αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό και οδηγεί μακροσκοπικά σε ανάπτυξη κακοήθων δευτεροπαθών όγκων. Οι D.Hanahan και B.Weinberg τονίζουν ότι, η ενεργή εισχώρηση και η μετάσταση είναι κύριο χαρακτηριστικό της κακοήθειας. Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων και ο επικείμενος σχηματισμός νέων αποικιών σε απομακρυσμένους ιστούς συνιστά ένα καταρράκτη γεγονότων (4,7,8).

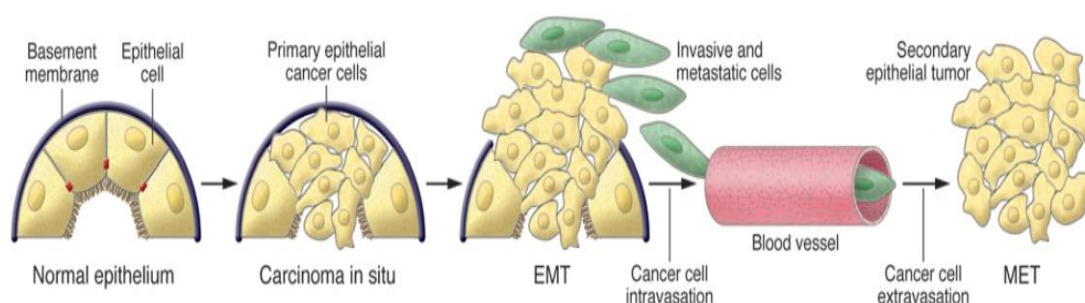
Η αλληλουχία των γεγονότων της μετάστασης περιλαμβάνει αρχικά την προσκόλληση στα τοιχώματα των αγγείων και εξαγγείωση στο παρέγχυμα απομακρυσμένων ιστών, ενώ ακολουθεί ο σχηματισμός μικρομεταστατικών εστιών στο παρέγχυμα και τέλος, ο πολλαπλασιασμός τους, σε εμφανώς, κλινικά ανιχνεύσιμες μεταστάσεις. Αυτό που πυροδοτεί τη μετάσταση είναι η χρωμοσωμική αστάθεια η οποία προκύπτει από λάθη κατά τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και τη δημιουργία αριθμητικών και δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, λόγω αντιγραφικού στρες. Το αποτέλεσμα είναι τα θυγατρικά κύτταρα να έχουν άνισο περιεχόμενο DNA με ικανότητα διαρροής από τον κυτταρικό πυρήνα, σχηματίζοντας πυρηνίσκους στο κυτοσόλιο του κυττάρου, οι οποίοι ωστόσο, τείνουν να σπάνε. Τα καρκινικά κύτταρα αντιλαμβάνονται το DNA που απελευθερώνεται ως μολυσματικό και μέσω πολύπλοκων μηχανισμών διαφεύγουν από τον αρχικό όγκο και εισέρχονται στην κυκλοφορία, ικανά να σχηματίσουν νέες εστίες. (9).

1.2.1 Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική Μετάβαση (Epithelial–Mesenchymal Transition-EMT)

Η διασπορά γίνεται μέσω της κυκλοφορίας συσσωματωμάτων καρκινικών κυττάρων, γεγονός που φέρνει στο προσκήνιο το φαινόμενο Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική Μετάβαση EMT (epithelial–mesenchymal transition- **EMT**). Η EMT είναι μία διαδικασία η οποία διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη δημιουργία της μετάστασης και κατά την οποία, τα καρκινικά κύτταρα χάνουν τον επιθηλιακό τους φαινότυπο και αποκτούν μεσεγχυματικό, διευκολύνοντας τη μετακίνησή τους και συνεπώς, τη δημιουργία μετάστασης (8,10). Ωστόσο, η EMT, φυσιολογικά, ενεργοποιείται κατά την εμβρυογένεση, στο πλαίσιο της ανάπτυξης των οργάνων, στην τελική ιστοειδική διαφοροποίηση των κυττάρων, αλλά και κατά την ενήλικη ζωή, με στόχο την επούλωση πληγών και την ανάπλαση του επιθηλιακού ιστού. Η EMT είναι μια βιολογική διαδικασία επαναδιαφοροποίησης, μέσω της οποίας τα επιθηλιακά κύτταρα αναπτύσσουν την ικανότητα διασποράς, διήθησης και αντίστασης σε αποπτωτικούς μηχανισμούς. Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν μία πολικότητα και είναι στενά συνδεδεμένα, τόσο μεταξύ τους, όσο και με τη θεμέλια εξωκυττάρια ουσία. Κατά το διηθητικό στάδιο του καρκίνου, τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους και μέσω της EMT ενισχύεται η παραγωγή ενζύμων, οδηγώντας στη σταδιακή αποικοδόμηση της επιθηλιακής στοιβάδας και στην απομάκρυνση των κυττάρων από αυτήν. Επομένως, η EMT επάγει αντιστρεπτές βιοχημικές τροποποιήσεις, που επιτρέπουν στα επιθηλιακά κύτταρα να αποκτήσουν ένα μεσεγχυματικό χαρακτήρα, δημιουργώντας μία πλαστικότητα ως προς τον φαινότυπό τους που είναι κρίσιμη για τη δημιουργία μετάστασης (6).

Η πληθώρα γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων στις οποίες υπόκεινται τα καρκινικά κύτταρα κατά την δημιουργία του πρωτοπαθούς όγκου αποδίδονται στα ετερόκλητα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγει το φαινόμενο EMT στην εξωκυττάρια μήτρα. Η EMT επάγεται μέσω διάφορων μοριακών – σηματοδοτικών διεργασιών, οι οποίες περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, την έκφραση συγκεκριμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, αναδιοργάνωση των κυτταροοσκελετικών πρωτεϊνών, παραγωγή ενζύμων αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας και αλλαγές στην έκφραση συγκεκριμένων miRNAs. Ο αυξητικός παράγοντας **TGF-β** (transforming growth factor-β) αποτελεί ισχυρό

επαγωγή της EMT, ο οποίος σε πρώιμα στάδια μπορεί να καταστείλει την καρκινική ανάπτυξη, ενώ αντίθετα σε όψιμα, παραγόμενος από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, επάγει την EMT. Επιπλέον, στη διαδικασία εμπλέκονται και πολλά μόρια προσκόλλησης, όπως οι ιντεγκρίνες $\alpha 6$, $\alpha 3$ και $\beta 1$, αυξητικοί παράγοντες, όπως **TGF- β** , **EGF**, **FGF** και η β -κατενίνη (11). Τέλος, συμμετέχουν και διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως είναι οι SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB1 και FOXC2, οι οποίοι εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια όπως MAPK, ERK, PI3K. Κυτταρικές επιφανειακές πρωτεΐνες, όπως **α -SMA**, **FSP1**, VIMENTIN, δεσμίνη και διάφορες ιντεγκρίνες ($\beta 4$, $\alpha 5 \beta 1$, κ.α.), συχνά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεσεγχυματικοί βιοδείκτες (10).



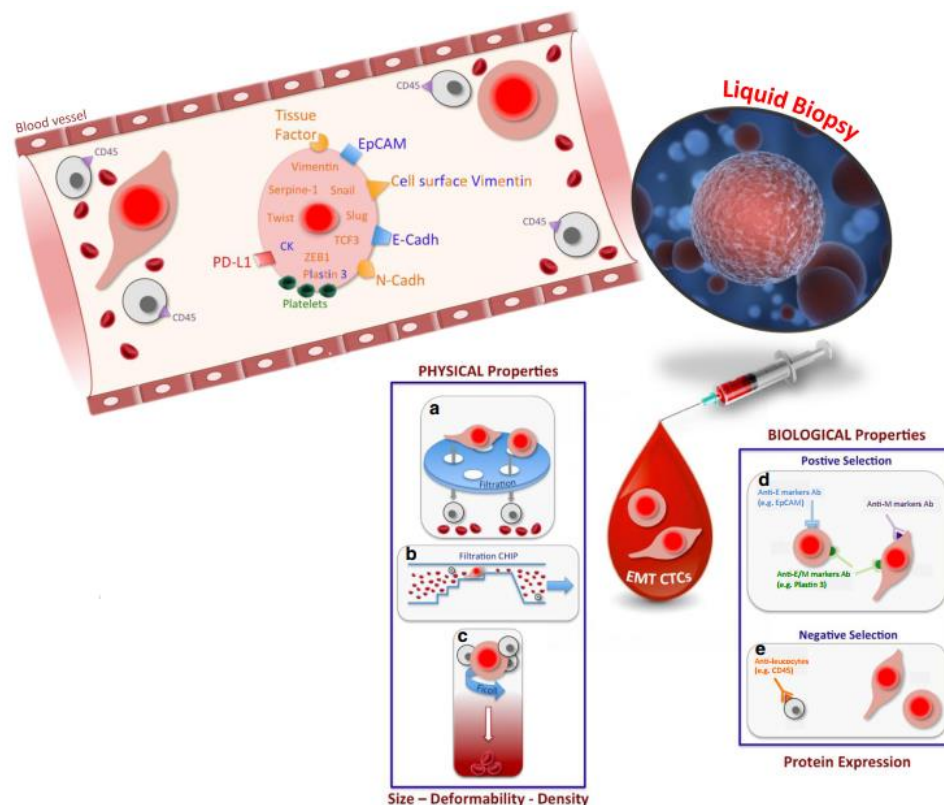
Σχήμα 1.2 Η συνεισφορά της EMT στην μεταστατική διαδικασία (10)

Ωστόσο, η «εξάλειψη» των επιθηλιακών δεικτών δεν είναι προαπαιτούμενο για τη δημιουργία μετάστασης, καθώς η αντίθετη διαδικασία – MET (mesenchymal-epithelial transition) παίζει σημαντικό ρόλο στην εξαγγείωση των CTCs και την ανάπτυξη μεταστατικής εστίας (10,11).

1.2.2 CTCs Clusters

Τα καρκινικά κύτταρα που διαφεύγουν από τον πρωτοπαθή όγκο και εισέρχονται στην κυκλοφορία, πλέον, αναφέρονται με τον όρο Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα (Circulating Tumor Cells-CTCs) τα οποία, όπως αναλύεται, εκτενώς, σε επόμενο κεφάλαιο, διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην Υγρή Βιοψία. Τα CTCs διέρχονται στην κυκλοφορία, είτε ως μονήρη κύτταρα, είτε ως συσσωματώματα κυττάρων, τα επονομαζόμενα **CTCs Clusters**. Τα μονήρη CTCs δεν εμφανίζουν τόσο μεγάλη δυναμική επαγωγή μετάστασης, συγκριτικά με τα CTCs Clusters, τα οποία θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ένας ιδιαίτερα επιθετικός παράγοντας

μετάστασης. Μεγάλο μέρος αυτού του γεγονότος αποδίδεται στη σύσταση των συσσωματωμάτων. Στο εξωτερικό τμήμα βρίσκεται μια ομάδα κυττάρων που λειτουργούν ως οδηγοί (leading cells) με ιδιαίτερα έντονο μεσεγγυματικό χαρακτήρα και έντονη ικανότητα διήθησης. Επίσης, μέσω της έκκρισης πρωτεασών καταφέρνουν να εισέρθουν στο επιθήλιο του ιστού, που θα αποτελέσει τη νέα μεταστατική εστία, συμπαρασέρνοντας και τα υπόλοιπα καρκινικά κύτταρα. Αντίθετα, στο εσωτερικό τμήμα του συμπλέγματος τα CTCs εμφανίζουν επιθηλιακό φαινότυπο και εκφράζουν στην επιφάνειά τους την E-καντχερίνη, η οποία διατηρεί τις διακυτταρικές συνδέσεις ισχυρές και συνεπώς, τα κύτταρα παραμένουν προσκολλημένα και το πλέγμα συμπαγές. Εκτός από τα CTCs, τα συσσωματώματα αυτά εμπεριέχουν στρωματικά κύτταρα, που συμβάλουν στην διείσδυση, καθώς και κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος από το μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα και μαρκοφάγα, προκειμένου να διαφεύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης. Συνεπώς, η ετερογένεια των CTCs είναι υψίστης σημασίας για την εξέλιξη του όγκου και όσο μεγαλύτερη είναι τόσο μεγαλύτερης έκτασης είναι η ανάπτυξή του (7,8,12).

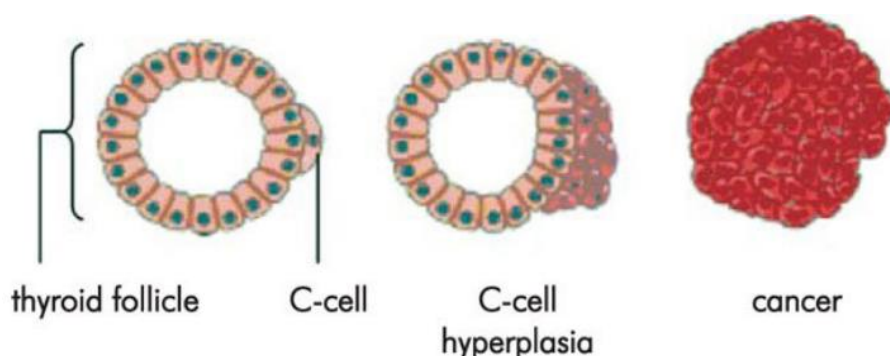


Σχήμα 1.1 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα με Επιθηλιακό και Μεσεγγυματικό φαινότυπο (11)

1.3 Μυελοειδές Καρκίνωμα του Θυρεοειδούς (Medullary Thyroid Carcinoma-MTC)

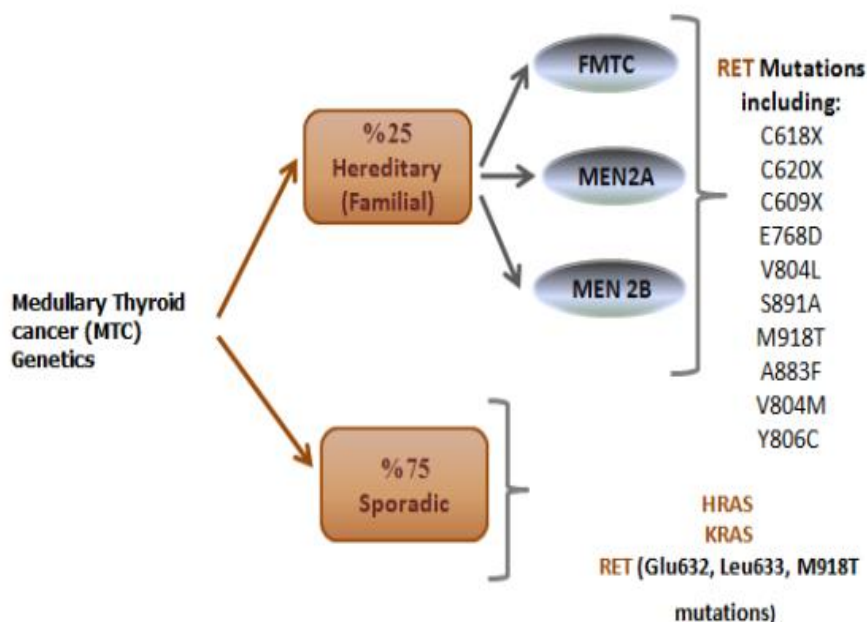
1.3.1. Εισαγωγή

Το Μυελοειδές Καρκίνωμα του Θυρεοειδούς (Medullary Thyroid Carcinoma-MTC) είναι ένας νευροενδοκρινής όγκος προερχόμενος από τα παραθυλακικά κύτταρα C του θυρεοειδούς αδένος και αφορά το περίπου 5% κακοήθων νεοπλασιών του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Περιεγράφηκε, για πρώτη φορά το 1959, από τον Hazard, ο οποίος διέκρινε τον συγκεκριμένο τύπο επιθετικού καρκινώματος του θυρεοειδούς από άλλους ελάχιστα διαφοροποιημένους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς (13). Το MTC διακρίνεται σε σποραδικό το οποίο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μονήρους όζου με ή χωρίς ψηλαφητούς τραχηλικούς λεμφαδένες και κληρονομούμενο, το οποίο εμφανίζεται αμφοτερόπλευρα των δύο λοβών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, εμφανίζεται ως σποραδικό και σε ένα ποσοστό περίπου 30% ως κληρονομούμενο, το οποίο εμφανίζεται σε συσχέτιση με το αυτοσωμικά επικρατές Σύνδρομο Πολλαπλής Ενδοκρινούς Νεοπλασίας τύπου 2 (Multiple Endocrine Neoplasia type 2-MEN2) που αποτελεί την πιο συχνή μορφή κληρονομούμενου MTC. Στους ασθενείς με MTC αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό η υπερπαραγωγή καλσιτονίνης από τα κύτταρα C, καθιστώντας το πεπτίδιο αυτό ένα σημαντικό εργαλείο για τη διάγνωση και τη διαχείριση της νόσου. Η υπερπλασία των κυττάρων C, που περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Wolfe το 1973, χαρακτηρίζεται από πολυκεντρικές αθροίσεις των κυττάρων αυτών στο παρέγχυμα του θυρεοειδούς και αποτελεί την ιστολογική διαταραχή που εμφανίζεται πριν από την ανάπτυξη του MTC (14).



Σχήμα 1.4 Ανάπτυξη υπερπλασίας των κυττάρων C του θυρεοειδούς αδένος (15)

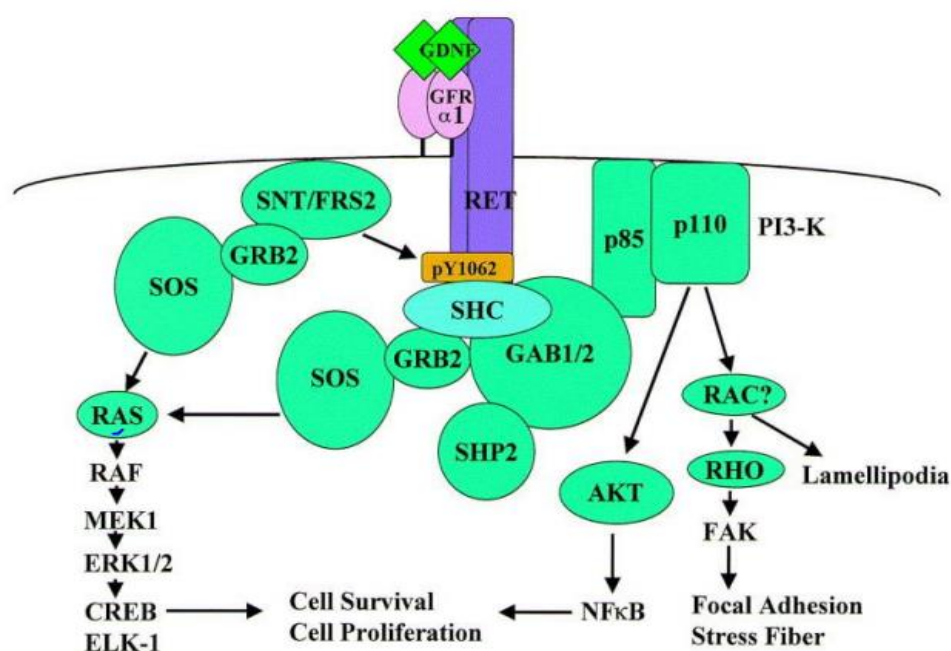
Η νόσος αναπτύσσεται στα παραθυλακικά κύτταρα C τα οποία προέρχονται από την νευρική ακρολοφία και ανευρίσκονται στο άνω και μέσο τμήμα του θυρεοειδούς αδένος. Ο όγκος έχει χονδροειδή εμφάνιση λευκών ή σκουρόχρωμων οζιδίων με αδρά υφή και περιοχές που εμφανίζουν αιμορραγία, νέκρωση, ίνωση ή ασβεστοποίηση. Ιστολογικά, αποτελείται από ομοιόμορφα πολυγωνικά ή ατρακτοειδή κύτταρα σε ένα μεταβλητό ινώδες στρώμα. Σε ασθενείς με κληρονομούμενο MTC παρατηρείται υπερπλασία των κυττάρων C και η νόσος εμφανίζεται ηλικιακά νωρίτερα, με το ποσοστό μετάστασης να είναι μεγαλύτερο σε σχέση με εκείνους με σποραδικό MTC. Η διάγνωση πραγματοποιείται με βιοψία αναρρόφησης με λεπτή βελόνα που καταδεικνύει την παρουσία αμυλοειδούς και θετικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης για την καλσιτονίνη (Calcitonine-CT), το καρκινικό εμβρυϊκό αντιγόνο (Cancer Embryonic Antigen-CEA) και την χρωμογρανίνη Α κυττάρων (14). Στις περιπτώσεις σποραδικού MTC, οι μισοί από τους ασθενείς που παρουσιάζουν ψηλαφητό όζο του θυρεοειδούς έχουν κλινικά ανιχνεύσιμη αυχενική λεμφαδενοπάθεια και περίπου το 5% των ασθενών παρουσιάζουν απομακρυσμένη μεταστατική νόσο. Μόλις γίνει η διάγνωση του MTC, θα πρέπει να γίνονται δοκιμές για να αξιολογηθεί η έκταση της νόσου. Αυτές οι δοκιμασίες περιλαμβάνουν όχι μόνο απεικονιστικές μελέτες, αλλά και μέτρηση της καλσιτονίνης του CEA στον ορό (13,14).



Σχήμα 1.5 Γονίδια που εμπλέκονται στο MTC (16)

1.3.2 Μηχανισμοί Παθογένειας MTC

Τα τελευταία χρόνια, ο χαρακτηρισμός των γενετικών τροποποιήσεων και των σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία εμπλέκονται και επάγουν τελικά την εμφάνιση του MTC, έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης στα πλαίσια πολλών ερευνών, σε μια προσπάθεια κατανόησής τους και ανεύρεσης σημαντικών βιοδεικτών για διάγνωση, πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία. Μεταλλάξεις, που επάγουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα προς το μονοπάτι της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης, έχουν ταυτοποιηθεί στο 90% των περιπτώσεων του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Η μοριακή παθογένεια στην πλειοψηφία των περιπτώσεων περιλαμβάνει διατάραξη της ρύθμισης της **MAPK**, που είναι υπεύθυνη για τις μιτογόνες δράσεις του κυττάρου, και εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι **(PI3K)/AKT**, το οποίο ελέγχει ενδοκυτταρικές λειτουργίες, όπως η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός. Για την εκδήλωση του μεγαλύτερου ποσοστού των περιπτώσεων MTC, υπεύθυνες είναι οι μεταλλάξεις στο πρωτο-ογκογονίδιο **RET** (Rearranged during transfection), οι οποίες μπορεί να είναι είτε σποραδικές, είτε κληρονομούμενες και να αφορούν το σύνδρομο **MEN** τύπου 2A και 2B. Ωστόσο, υπάρχει και ένα ποσοστό σποραδικού MTC που οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια **HRAS**, **KRAS** και **NRAS** (13).

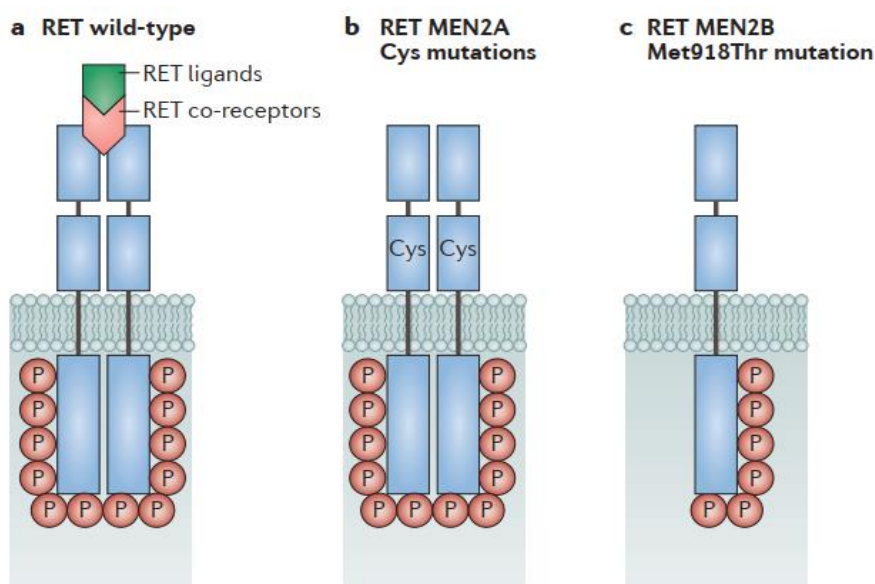


Σχήμα 1.6 Ενδοκυττάριο Σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον υποδοχέα RET (16)

Το 1989 χαρτογραφήθηκε στο γονιδίωμα, για πρώτη φορά, το πρωτο-ογκογονίδιο *RET* στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10 (10q11.2) και αποτέλεσε ορόσημο, καταδεικνύοντάς το ως, ενδεχομένως, υπεύθυνο γονίδιο για την εκδήλωση του συνδρόμου **MEN** (17). Την ίδια χρονιά, επίσης, αποδείχθηκε ότι το γονίδιο *RET* κωδικοποιεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα με ενδογενή δραστικότητα τυροσινικής κινάσης (Transmembrane Receptor with Tyrosine Kinase activity-**RTK**) (16), οποίος εμπλέκεται σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία διαδραματίζουν ρόλο κλειδί για την ανάπτυξη των παραθυρεοειδικών αδένων, των ουρογενετικών συστημάτων και της νευρικής ακρολοφίας, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, των πάρα- και συμπαθητικών γαγγλίων, του μυελού των επινεφριδίων, των εντερικών γαγγλίων και των παραθυλακικών κυττάρων C, τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη του MTC (16). Ο προσδέτης του υποδοχέα είναι ένας νευροτροφικός παράγοντας (glial cell derived neurotropic factor-**GDNF**) και όταν προσδένεται στον υποδοχέα *RET* προκαλεί διμερισμό και το ενδοκυττάριο τμήμα του αποκτά ιδιότητες τυροσινικής κινάσης, αυτοφωσφορυλιώνεται και στη συνέχεια ενεργοποιείται η κυτταρική σηματοδότηση. Τα μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται επάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων (18). Μέχρι σήμερα περισσότερες από 100 gain-of-function μεταλλάξεις του *RET* έχουν βρεθεί σε ασθενείς με κληρονομούμενο ή σποραδικό MTC (19). Το γονίδιο *RET* στις περιπτώσεις τόσο κληρονομούμενου, όσο και σποραδικού καρκίνου φέρει, συνήθως, σημειακές μεταλλάξεις, ενώ οι προσθήκες και οι ελλείψεις αποτελούν πιο σπάνιο φαινόμενο. Οι σημειακές μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν τόσο το εξωκυττάριο, όσο και το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα επιφέροντας διαφορετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις που αφορούν το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα επάγουν συστηματικό διμερισμό, ανεξάρτητα από τη σύνδεση του προσδέτη, ενεργοποιώντας τον υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης, ενώ μεταλλάξεις που αφορούν εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα επάγουν την ενεργοποίησή του, όχι μόνο ανεξάρτητα από τη σύνδεση του προσδέτη, αλλά και ανεξάρτητα από τον διμερισμό του (20).

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος της κυστεΐνης στις θέσεις 609, 611, 618, 620, 630 και 634 οι οποίες στον υποδοχέα αγρίου τύπου είναι συνδεδεμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι εν λόγω μεταλλάξεις οδηγούν στον σχηματισμό εκτρεπόμενων διαμοριακών δεσμών που επάγουν τον αυτόνομο διμερισμό και αυτοφωσφορυλίωση

του ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα χωρίς την ανάγκη σύνδεσης του προσδέτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της δεύτερης κατηγορίας είναι η μετάλλαξη **M918T** στο εξόνιο 16 και αφορά την αντικατάσταση της μεθειονίνης με θρεονίνη στο ενεργό κέντρο των κινασών του υποδοχέα. Η συγκεκριμένη αντικατάσταση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του δεσμευόμενου **ATP** και συνεπώς, την αύξηση της ενεργότητάς της κινάσης, επάγοντας την αυτοφωσφορυλίωση ανεξαρτήτως του διμερισμού του υποδοχέα. Η εν λόγω μετάλλαξη είναι συνδεδεμένη με κακή πρόγνωση της νόσου και σχετίζεται με πολύπλοκα λειτουργικά αποτελέσματα, όπως αλλαγές στο υπόστρωμα και στην ειδικότητα του ενζύμου των κινασών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποδοχέα και από ενδογενείς προσδέτες και ως εκ τούτου, την αδυναμία αυτόματης αναστολής της σηματοδότησης. Λιγότερο συχνές είναι οι μεταλλάξεις στα γονίδια **HRAS**, **KRAS** και **NRAS** τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια **GTP-binding Proteins** που δρουν, επίσης, στα σηματοδοτικά μονοπάτια **MAPK** και **PI3K-AKT-mTOR** και είναι υπεύθυνες για πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και αρκετών υποτύπων καρκίνου του θυρεοειδούς με το MTC να αφορά το μικρότερο ποσοστό (18,21,22).



Σχήμα 1.7 Διαφορετικοί τρόποι ενεργοποίησης του υποδοχέα RET. α) Φυσιολογική ενεργοποίηση εξαρτώμενη από τον προσδέτη ή τον διμερισμό (άγριου τύπου). β) Ανεξάρτητη από τον προσδέτη ή τον διμερισμό ενεργοποίηση, λόγω της παρουσίας μιας μετάλλαξης στην εξωκυττάρια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη. γ) Ανεξάρτητη από προσδέτη ενεργοποίηση ως μονομερές, λόγω της παρουσίας μιας μετάλλαξης στην ενδοκυτταρική περιοχή κινάσης τυροσίνης (20)

Οι ενεργές σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια *RAS* (*H*-, *K*- και *NRAS*) έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με σποραδικό MTC, οι οποίοι ήταν αρνητικοί για τις μεταλλάξεις του *RET*, με μεταβλητό ποσοστό, ανάλογα με τις τεχνικές ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκαν (23,24). Οι μεταλλάξεις στο MTC που αφορούν το γονίδιο *RAS* εμφανίζονται κυρίως στο *H*- και στο *KRAS* και συνήθως, αλληλοαποκλείονται με τις μεταλλάξεις του *RET*. Σε μελέτη, διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις *HRAS*, έδειξαν καλύτερη πρόγνωση από όσους έφεραν μεταλλάξεις στο *RET* (25,26). Το γονίδιο *RAS* αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο σηματοδότησης από διαφόρους υποδοχείς στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου και ανευρίσκεται μεταλλαγμένο σε πολλούς τύπου καρκίνου. Στους ανθρώπους, τα τρία γονίδια *RAS*, που εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, κωδικοποιούν τρεις διακριτές, αλλά εξαιρετικά ομόλογες πρωτεΐνες 21 kDa γνωστές ως p21: *HRAS*, *NRAS*, *KRAS*, οι οποίες ανακυκλώνονται μέσω της ενεργούς μορφής GTP και της ανενεργού μορφής GDP. Οι πιο κοινές μεταλλάξεις στους όγκους έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας υδρόλυσης GTP. Συνεπώς, η πρωτεΐνη *RAS* παραμένει στην ανοιχτή θέση και συνεχίζει να διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ακόμα και απουσία ενός συνεχόμενου σήματος (22,24).

Το γενετικό προφίλ του σποραδικού MTC είναι πιο ετερογενές από αυτό του κληρονομούμενου. Το γενετικό υπόβαθρο 208 περιπτώσεων με σποραδικό MTC ταυτοποιήθηκε με αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing-NGS) και το ποσοστό των ασθενών που βρέθηκαν αρνητικοί στις *RET*, *HRAS*, *KRAS* και *NRAS* μεταλλάξεις ήταν χαμηλό (13,27). Σύμφωνα με τα δεδομένα της έρευνας, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *RET* παραμένουν αυτές με την υψηλότερη συχνότητα και ακολουθούν εκείνες του *RAS*. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα ότι οι ασθενείς, οι οποίοι ήταν θετικοί σε μεταλλάξεις του *RET*, παρουσιάζουν χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης από αυτούς που ήταν θετικοί σε μεταλλάξεις στο *HRAS* και ότι η συχνότητα παραλλαγής των αλληλομόρφων αντιπροσωπεύει έναν επιπλέον προγνωστικό δείκτη για τους θετικούς στη μετάλλαξη *RET* ασθενείς (26). Σημαντικός είναι, επίσης, ο ρόλος του *RET* ως βιοδείκτη στη διάγνωση και συγκεκριμένα, στον προληπτικό έλεγχο των ασθενών με οικογενειακό ιστορικό MTC για ταυτοποίηση των ασθενών με γαμετική μετάλλαξη, πριν την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων εκδήλωσης της νόσου καθώς, και προγνωστικά στη περίπτωση ασθενών με

σποραδικό MTC που παρουσιάζουν γαμετική μετάλλαξη στο *RET* και οι οποίοι εμφανίζουν κακή πρόγνωση (19).

1.3.3 Καλσιτονίνη

Τα παραθυλακικά κύτταρα ή αλλιώς κύτταρα C είναι νευροενδοκρινή κύτταρα που αντιπροσωπεύουν ένα ποσοστό μικρότερο από το 1% των συνολικών κυττάρων του θυρεοειδούς αδένος. Τα κύτταρα C μεταναστεύουν από τη νευρική ακρολοφία στον θυρεοειδή αδένα, κατά την ανάπτυξη, στην τελική τους χαρακτηριστική θέση εκατέρωθεν των δύο λοβών. Τα κύτταρα C εκκρίνουν πολλά πεπτίδια και ουσίες, συμπεριλαμβανόμενης της καλσιτονίνης και του CEA (14). Η καλσιτονίνη αποτελεί μία ιστοειδική πρωτεΐνη 32 αμινοξέων και βάρους 3.5-kDa η οποία εκκρίνεται, κυρίως, από τα κύτταρα C, με αποτέλεσμα η χειρουργική αφαίρεση του θυρεοειδούς αδένος να οδηγεί σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα καλσιτονίνης στο πλάσμα των ασθενών. Προεγχειρητικά, τα αυξημένα επίπεδα καλσιτονίνης συνδέονται με τη βαρύτητα και την έκταση του όγκου, καθώς και με την εξάπλωσή του τοπικά. Η ύπαρξη υπολειμματικής νόσου μετά το χειρουργείο, η εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων και ο θάνατος είναι πιθανότερο να συμβούν σε ασθενείς στους οποίους προεγχειρητικά τα επίπεδα της καλσιτονίνης ήταν υψηλότερα από 10000 pg/ml. Η ανίχνευση καλσιτονίνης στο αίμα ασθενών με MTC οι οποίοι έχουν υποστεί θυρεοειδοεκτομή αποτελεί ένδειξη υπολειμματικής νόσου και η συστηματική μέτρηση των επιπέδων της καλσιτονίνης αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την παρακολούθηση της εξέλιξης και της έκτασης της νόσου. Σύμφωνα με τη θεώρηση ότι οι κακοήθεις όγκοι αναπτύσσονται εκθετικά, ο ρυθμός ανάπτυξής τους περιγράφεται από τον χρόνο διπλασιασμού του όγκου και επομένως καλύτερος προγνωστικός δείκτης στην περίπτωση του MTC είναι ο χρόνος διπλασιασμού της καλσιτονίνης (28).

Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του όγκου, η οποία επηρεάζει το βαθμό επιβίωσης, καθορίζεται από την αρχική και την υπολειμματική έκτασή του, πριν και μετά τη θυρεοειδεκτομή, αντίστοιχα, και το χρόνο διπλασιασμού του όγκου. Η βαρύτητα της υπολειμματικής νόσου μπορεί να προκύψει από τα επίπεδα της καλσιτονίνης στον ορό και τη μέτρηση του χρόνου διπλασιασμού αυτών, ώστε να αξιολογηθεί ο χρόνος

επιβίωσης μετά το χειρουργείο (13). Το CEA αποτελεί έναν, επίσης, σημαντικό βιοδείκτη για τη διαχείριση του MTC, αν και λιγότερο ειδικό από την καλσιτονίνη, καθώς παράγεται επίσης και στο ήπαρ. Ωστόσο, η συγκέντρωσή του στο πλάσμα είναι λιγότερο μεταβλητή από την καλσιτονίνη. Η παρακολούθηση των επιπέδων του CEA είναι πιο χρήσιμη σε περιπτώσεις μεταστατικής νόσου όταν το MTC γίνεται ελάχιστα διαφοροποιημένο και τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα παραγωγής καλσιτονίνης αλλά διατηρούν την ικανότητα παραγωγής CEA. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μία προοδευτική αύξηση των επιπέδων του CEA με σταθερά επίπεδα καλσιτονίνης υποδεικνύει κακή πρόγνωση (14).

1.3.4 Θεραπεία

Η γνώση της βιολογίας του όγκου είναι υψίστης σημασίας για την επιλογή κατάλληλης θεραπείας. Παρόλο που η ολική θυρεοειδοεκτομή μαζί με αφαίρεση των τραχηλικών λεμφαδένων αποτελεί τη θεραπεία επιλογής για τους ασθενείς με MTC, περίπου το 80% των ασθενών εμφανίζουν, ήδη, απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά τη διάγνωση, με αποτέλεσμα η χειρουργική επέμβαση να μην επαρκεί και να απαιτείται επιπρόσθετη θεραπεία. Δεδομένου του γεγονότος ότι, στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με MTC υπεύθυνες είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *RET*, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς τυροσινικής κινάσης (Tyrosine Kinase Inhibitors-**TKIs**), καθότι τα αποτελέσματα των ερευνών είναι ενθαρρυντικά, παρουσιάζοντας αύξηση του ελεύθερου νόσου διαστήματος (Progression Free Survival-**PFS**). Συνεπώς, φαρμακευτικές ουσίες, οι οποίες αποτελούν TKIs, όπως vandetanib και cabozantinib, έχουν λάβει έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration-**FDA**) και από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency-**EMA**) για τη θεραπεία του MTC (20). Η αποτελεσματικότητα αυτών των φαρμάκων οφείλεται στην ικανότητά τους να στοχεύουν πολλαπλές κινάσες, ωστόσο παρουσιάζουν αρκετές παρενέργειες, η πιο σημαντική από τις οποίες αφορά το vandetanib και είναι η επιμήκυνση του διαστήματος QT (διάστημα καμπυλών καρδιογραφήματος, αντιπροσωπευτικό της διάρκειας του ηλεκτρικού σήματος της καρδιακής λειτουργίας) με σπάνια περιστατικά πολύμορφης καρδιακής ταχυκαρδίας και αιφνίδιου θανάτου, ενώ για το cabozantinib σημαντικότερες, αλλά

και σπανιότερες, στη συχνότητα εμφάνισής τους, είναι ο σχηματισμός συριγγίου, η γαστρεντερική διάτρηση και η αιμορραγία. Παρόλα αυτά, οι TKIs προσφέρουν σημαντικό πλεονέκτημα στη θεραπεία του MTC, αν και στο μέλλον διαφαίνεται ότι θα αποτελούν μέρος συνδυαστικής θεραπείας (19).

Ένα ερώτημα που παραμένει ανοιχτό είναι η φαρμακογονιδιωματική προσέγγιση και το ποσοστό που οι μεταλλάξεις του *RET* και του *HRAS* επηρεάζουν την ανταπόκριση του όγκου στη θεραπεία. Παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι, ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη M918T στο *RET* παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα ευαισθησίας στη θεραπεία, ενώ ασθενείς με άλλες μεταλλάξεις του *RET* ανθίστανται, ειδικότερα στη χορήγηση του vandetanib. Ασθενείς με MTC οι οποίοι εμφανίζουν σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *RET* εμφανίζουν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με TKIs. Μολονότι, τα αποτελέσματα δεν διαφοροποιούνταν σημαντικά από εκείνους που δεν παρουσίαζαν μεταλλάξεις στο *RET* ή από εκείνους για τους οποίους το γενετικό τους προφίλ, ως προς το *RET*, ήταν άγνωστο (20). Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός, ότι οι αναστολείς των τυροσινικών κινασών δεν ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις όταν γίνεται λόγος για εκτεταμένη μετάσταση, γεγονός που επιβεβαιώνεται από το ότι η 10ετής επιβίωση ανέρχεται σε ποσοστό μόλις 21%, σύμφωνα με τον Αμερικανικό Οργανισμό Κατευθυντήριων Γραμμών Διαχείρισης του Θυρεοειδούς (American Thyroid Association Guidelines Task Force-ATA) (29).

1.3.5 Μετάσταση

Η μετάσταση στους λεμφαδένες ανιχνεύεται κυρίως κατά τη διάγνωση, ενώ απομακρυσμένες μετάστασεις είναι εμφανείς στο 20% ασθενών με MTC. Η προχωρημένη μετάσταση σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα καλσιτονίνης στον ορό (30). Η πρόγνωση εξαρτάται από την αρχική κλινική σταδιοποίηση, το μέγεθος και τη διήθηση του όγκου, το φύλο και την ηλικία. Η αρχική κλινική σταδιοποίηση είναι σημαντική γιατί, ενώ ασθενείς που έχουν περιφερική λεμφαδενοπάθεια έχουν πιθανότητας 5ετούς επιβίωσης σε ποσοστό 94%, οι ασθενείς που έχουν νόσο σταδίου IV έχουν πιθανότητα 5ετούς επιβίωσης σε ποσοστό 41%. Η μεταστατική διαδικασία είναι αιματογενής και ασθενείς που έχουν πιο προχωρημένη νόσο μπορεί να εμφανίσουν απομακρυσμένες, διάχυτες, πολυεστιακές μεταστάσεις στους πνεύμονες,

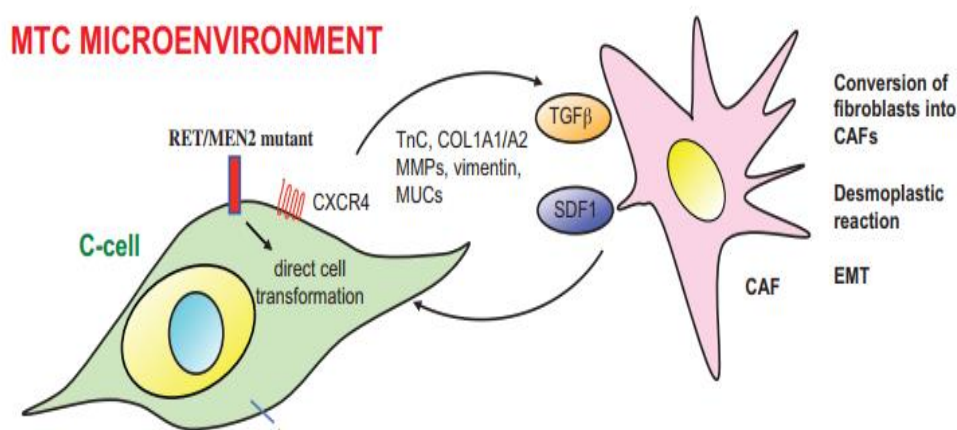
στο ήπαρ και στα οστά, καθώς επίσης και στους κοιλιακούς λεμφαδένες, αλλά και στον εγκέφαλο σε μικρότερα ποσοστά. Η εξέλιξη της μεταστατικής νόσου είναι βραδεία, επιτρέποντας σε ασθενείς που έχουν εκτεταμένη νόσο να έχουν μακρά επιβίωση (14).

Όπως αναφέρεται σε προηγούμενο υποκεφάλαιο, οι μεταλλάξεις στο *RET* και στο *HRAS* αποτελούν κυρίαρχο χαρακτηριστικό στο γονοτυπικό προφίλ της νόσου είτε γίνεται λόγος για σποραδικό, είτε για κληρονομούμενο MTC και εμπλέκονται στη διαδικασία της διήθησης του όγκου και μετάστασης, μέσω αλλαγών που επάγουν στο μικροπεριβάλλον και σχετίζονται με κακή πρόγνωση (31,32). Ο όγκος δεν πρέπει να θεωρείται ως απλή μάζα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, αλλά πολύπλοκων ιστών στους οποίους ένα συνολικό διασπαστικό περιβάλλον κυτταρικών και μη κυτταρικών συστατικών αποτελούν το λεγόμενο μικροπεριβάλλον όγκου (Tumor MicroEnvironment-TME). Το TME αποτελείται από την εξωκυττάρια μήτρα (Extracellular Matrix-ECM), τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα ανοσοφλεγμονώδη κύτταρα και τα αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία (33,34). Τα καρκινικά κύτταρα είναι σε στενή επαφή με το TME και η αλληλεπίδρασή τους προάγει την έναρξη ανάπτυξης, την εξέλιξη του όγκου και τη μεταστατική διαδικασία. Κακοήθη κύτταρα συμβάλλουν ενεργά στην αναδιαμόρφωση του προϋπάρχοντος στρώματος δημιουργώντας ένα νέο μικροπεριβάλλον που μπορεί να έχει φλεγμονώδη ή δεσμοπλαστικά χαρακτηριστικά. Η δράση του δεσμοπλαστικού στρώματος στο MTC σχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου και τη δημιουργία μετάστασης στους λεμφαδένες. Το δεσμοπλαστικό στρώμα είναι νεοσυντιθέμενος ιστός ο οποίος αποτελείται από ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (Cancer-Associated Fibroblasts-CAFs) και μυοβλάστες. Ο ρόλος των CAFs είναι κρίσιμος για την καρκινογένεση καθώς προκαλούν την τροποποίηση της εξωκυττάριας μήτρας επάγοντας την έκφραση παρακρινών αυξητικών παραγόντων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Επίσης, το δεσμοπλαστικό στρώμα επηρεάζει και τη δράση πολλών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, καθώς αποτελεί φραγμό για την είσοδο και δράσης τους στο εσωτερικό του όγκου (35,36).

Η διέγερση της δραστηριότητας του υποδοχέα *RET* οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. **SLUG**, **SNAIL**, **ZEB**, **TWIST**), πρωτεϊνών προσκόλλησης (π.χ. E-καντχερίνη, N-καντχερίνη, βιμεντίνη) και πρωτεϊνών

αναδιαμόρφωσης μήτρας (π.χ. μεταλλοπρωτεάσες μήτρας) που μπορεί να προκαλέσουν την μετατροπή των καρκινικών κυττάρων σε περισσότερους μεσεγχυματικούς φαινότυπους επάγοντας το φαινόμενο EMT (36).

Επιπροσθέτως, το *RET* εμπλέκεται στην προώθηση μηχανισμών που σχετίζονται με την έκκριση φλεγμονωδών ουσιών και τη διείσδυση κυττάρων του ανοσοποιητικού στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Στο πλαίσιο αυτό, η υπερδιέγερση του RET οφειλόμενη σε μεταλλάξεις έχει αποδειχθεί να συμβάλει σε αυτή τη διαδικασία, προκαλώντας έκφραση προφλεγμονωδών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των κυτταροκινών, των χημειοκινών και των υποδοχέων τους. Όταν απελευθερωθούν αυτά τα μόρια, μπορούν να δράσουν απευθείας στο καρκινικό κύτταρο του όγκου, οδηγώντας είτε στην ενίσχυση της ανάπτυξής και της κινητικότητάς του, είτε προάγουν αλλαγές στον μικροπεριβάλλον του όγκου, ενεργώντας ως χημειοελκτικά για πρωτογενή κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία εν συνεχεία διεισδύουν στον αναπτυσσόμενο όγκο, και συμβάλλουν στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας, στην αγγειογένεση και στην αύξηση της φλεγμονής.

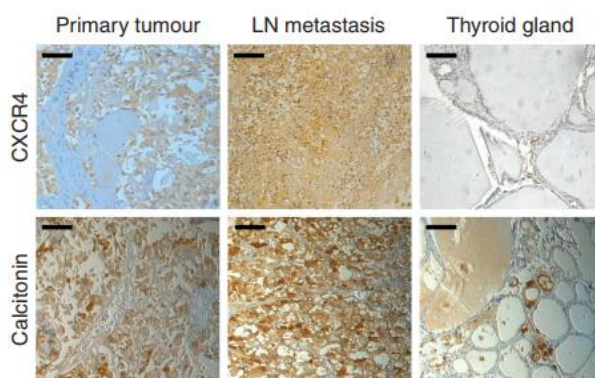


Σχήμα 1.8 Επίδραση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου στο MTC (35)

Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι η διέγερση του υποδοχέα χημειοκινών (Chemokine Receptor 4-**CXCR4**), πυροδοτώντας αποκρίσεις με τις κυκλοφορούσες χημειοκίνες που απελευθερώνονται από τα CAFs ή τον ίδιο τον όγκο, επάγοντας την αγγειογένεση εν προκειμένω να διατηρηθεί η ανάπτυξη της μάζας του όγκου (36). Ο υποδοχέας χημειοκίνης CXCR4 εκφράζεται φυσιολογικά σε ένα ευρύ φάσμα ιστών κατά την εμβρυογένεση, συμπεριλαμβανομένου του ανοσοποιητικού και του κεντρικού νευρικού συστήματος και παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της

αγγειογένεση. Ενώ, ως επί τω πλείστω, ο CXCR4 απουσιάζει υπό φυσιολογικές καταστάσεις, σε πολλούς από τους ιστούς στους ενήλικες, ωστόσο, υπερεκφράζεται σε μία ποικιλία ανθρωπίνων καρκινωμάτων συμπεριλαμβανομένου και του MTC. Φαινόμενο που προκαλεί αυτήν την υπερέκφραση είναι η περιφερική υποξία στη μάζα του όγκου η οποία προκαλεί την απελευθέρωση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1 (Hypoxia Inducible Factor 1-**HIF-1**) στο μικροπεριβάλλον του, ο οποίος με τη σειρά του διευκολύνει την ανοδική ρύθμιση της έκφρασης του CXCR4, προτρέποντας την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω μεταστατικής εξάπλωσης (37).

Ο **SDF1a** (stromal cell-derived factor 1 alpha) είναι μια χημειοκίνη ευρέως εκφρασμένη, η οποία λειτουργεί ως ένα ισχυρό χημειοελκτικό για κύτταρα που εκφράζουν CXCR4. Ο SDF1a εκφράζεται στα πιο κοινά μεταστατικά όργανα, όπως λεμφαδένες, ήπαρ, πνεύμονες και οστά. Διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει ότι, τα θετικά στο CXCR4 κύτταρα μετακινούνται, εκλεκτικά, προς τους ιστούς που εκφράζουν τον SDF1a για να σχηματίσουν απομακρυσμένες μεταστάσεις. Εκτός από τη χημειοταξία, η δέσμευση του SDF1a στο CXCR4 προκαλεί την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μονοπατιών, τα οποία σχετίζονται με την EMT, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Τέλος, η αυξανόμενη έκκριση χημειοκινών αυξάνει τα επίπεδα της έκφρασης του προσδέτη **GFL** (Glial cell line-derived neurotrophic Family Ligands) από κύτταρα της εξωκυττάριας μήτρας με επικείμενη περαιτέρω διέγερση του *RET* και τη συνέχιση ενός φαύλου κύκλου αυτών των βιολογικών διεργασιών που επάγουν τελικά τη μετάσταση (31,35,36).



Σχήμα 1.9 Έκφραση του CXCR4 στο MTC. Αντιπροσωπευτικά δείγματα με ανοσοϊστοχημική στρώση για CXCR4 και καλσιτονίνη αντίστοιχα σε ιστικά δείγματα MTC (αριστερά), μετάστασης σε λεμφαδένες (κέντρο) και μη νεοπλαστικού θυρεοειδούς αδένος (32)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ

2.1 Εισαγωγή

Η **Υγρή Βιοψία (Liquid Biopsy-LB)** αποτελεί μια ελάχιστα επεμβατική διαδικασία παρακολούθησης του όγκου σε πραγματικό χρόνο. Η Υγρή Βιοψία, σήμερα, δεν περιορίζεται μόνο στον κλάδο της ογκολογίας, αλλά βρίσκει, επίσης, εφαρμογή στον προγεννητικό έλεγχο, στις καρδιολογικές παθήσεις και στην αθηροσκλήρωση. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στον τομέα της ογκολογίας καθώς, παρέχει καινοτόμες προσεγγίσεις για την πρόιμη διάγνωση, την επιλογή και την παρακολούθηση της θεραπείας αλλά και την πρόιμη ανίχνευση υποτροπής της νόσου.

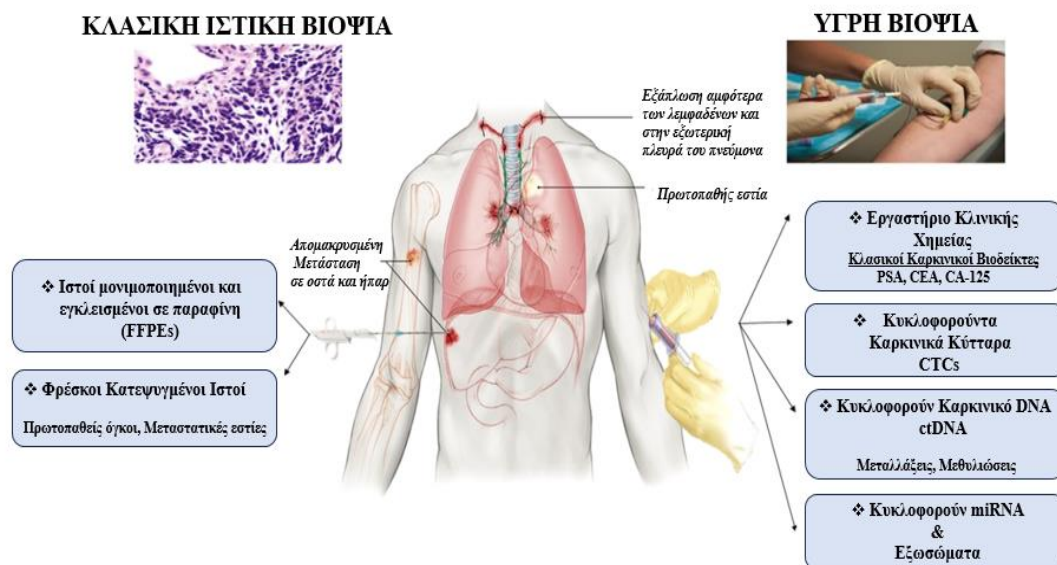
Η Υγρή Βιοψία αποτελεί μια συμπληρωματική προσέγγιση στην κλασική ιστική βιοψία, καθώς δεν φέρει πολλούς από τους περιορισμούς των κλασικών μεθόδων. Δεν υποκαθιστά την αξία της παραδοσιακής ιστικής βιοψίας, που συνεχίζει να αποτελεί την εξέταση επιλογής για τη διάγνωση του καρκίνου, αλλά παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για το γενετικό προφίλ του (38). Στις ιστικές βιοψίες συνήθως παραλαμβάνεται τμήμα του πρωτοπαθούς όγκου στο οποίο αντανakλάται η μοριακή του σύσταση τη χρονική στιγμή λήψης του δείγματος η οποία μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτική του συνολικού μοριακού προφίλ του. Δεδομένου ότι οι όγκοι εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια ελλοχεύει ο κίνδυνος μερικά από αυτά τα ετερόκλητα χαρακτηριστικά και ενδεχομένως οι πιο επιθετικοί υποπληθυσμοί κυττάρων να παραμένουν μη ανιχνεύσιμοι, γεγονός που υποδηλώνει ότι σημαντικές πληροφορίες χάνονται (39,40).

Το χάσμα αυτό έρχεται να γεφυρώσει η Υγρή Βιοψία, όπου με μια απλή αιμοληψία καλύπτεται ένα ευρύ φάσμα των ιδιοτήτων της κακοήθειας, συμπεριλαμβανομένων και των πιθανών μεταστάσεων και βιοχημικών αλλαγών που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της διασποράς αιματογενώς, οι οποίες δεν είναι εμφανείς στον πρωτοπαθή όγκο. Επομένως, η ετερογένεια του όγκου μεταξύ των ασθενών μπορεί να αποτυπωθεί από την ανάλυση ενός και μόνο δείγματος αίματος του ασθενούς. Επιπροσθέτως, είναι εφικτή η ανίχνευση και η ταυτοποίηση

μοριακών, γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων δευτερογενών εστιών και κατ' επέκταση η καταπολέμηση αυτών πριν την παρουσία εμφανούς μετάστασης (41).

Αδιαμφισβήτητο είναι το γεγονός ότι, οι περισσότεροι ασθενείς με καρκίνο λαμβάνουν θεραπεία σύμφωνα με τα μοριακά χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου, όπως και ότι τα χαρακτηριστικά αυτά υπόκεινται σε αλλαγές κατά τη εξέλιξη της νόσου και κατά τη δημιουργία μεταστάσεων. Γίνεται λόγος, λοιπόν, όχι μόνο για ετερογένεια του όγκου αλλά και των διαφόρων μεταστατικών εστιών, αν αυτές υπάρχουν,. Επιπροσθέτως, μερικές φορές η τοπολογία του όγκου τον καθιστά δύσκολα προσβάσιμο, εξαιτίας του γεγονότος ότι, εντοπίζεται σε απομακρυσμένες περιοχές, όμως, χάριν στην ελάχιστη επεμβατική και χαμηλού κινδύνου μέθοδο της υγρής βιοψίας, είναι εφικτή η λήψη δειγμάτων σε τακτά χρονικά διαστήματα για τη παρακολούθηση δυναμικών αλλαγών στο μοριακό υπόβαθρο της νόσου, οι οποίες προκύπτουν από τη θεραπευτική πίεση καθώς είναι γνωστό ότι το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων δεν είναι στατικό, αλλά δυναμικό και μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας (42). Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υποκλώνων που ανθίστανται στο ισχύον θεραπευτικό σχήμα καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη αλλαγής του. Μέσω της υγρής βιοψίας, επομένως, μπορεί να γίνει ταυτοποίηση όλων των υποκλώνων που υπάρχουν τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας και επιτρέπει την συστηματική παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου. Συνεπώς, είναι σημαντικός ο ρόλος της υγρής βιοψίας στην ταυτοποίηση βιοδεικτών στο περιφερικό αίμα οι οποίοι θα καθιστούν δυνατή την παρακολούθηση ανταπόκρισης στην θεραπεία σε πραγματικό χρόνο, δίνοντας τεράστιες δυνατότητες στη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο (41,43).

Η Υγρή Βιοψία περιλαμβάνει την ανάλυση **CTCs**, κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (Circulating Tumor DNA, **ctDNA**) και microRNAs (Circulating Tumor miRNA-**ctmiRNA**), που αποτελούν μέρος των κυκλοφορούντων εξωκυττάρων DNA και RNA (Cell Free DNA & RNA, **cfDNA – cfRNA**), αντίστοιχα, και των εξωκυττάρων κυστιδίων (Extracellular Vesicles, **EVs**), όπως τα εξωσώματα (exosomes) (41), ενώ τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί και στα αιμοπετάλια-“εκπαιδευμένα από τον όγκο” (Tumor-Educated Platelets, **TEPs**), τα οποία αλληλοεπιδρούν με τα καρκινικά κύτταρα και φέρουν σημαντικές πληροφορίες για την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση, σε επίπεδο RNA (44) και τέλος πρωτεΐνες και μεταβολίτες καθώς ανευρίσκονται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών υγρών (45).



Σχήμα 2.2 Σύγκριση Κλασσικής Ιστοικής Βιοψίας – Υγρής Βιοψίας (46)

Στα αρχικά στάδια σχηματισμού και ανάπτυξης του όγκου, κύτταρα αποσπώνται και διαφεύγουν στην κυκλοφορία του αίματος. Τα CTCs μπορούν να εμπλουτιστούν και να ανιχνευτούν μέσω διαφορετικών τεχνολογιών που εκμεταλλεύονται τα φυσικά και τα βιολογικά χαρακτηριστικά τους και αποτελούν ένα δυναμικό πεδίο έρευνας στην Υγρή Βιοψία. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τα CTCs και το ctDNA είναι διαφορετικές και συμπληρωματικές για την κατανόηση του μοριακού προφίλ του όγκου (47). Συγκεκριμένα, ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs προσφέρει μία μοναδική προοπτική στην κατανόηση της βιολογίας της μετάστασης και της αντίστασης σε καθιερωμένες θεραπείες. Παράλληλα, η ανάλυση ctDNA στο πλάσμα των ασθενών δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης ενεργών γενετικών μεταλλάξεων και επιγενετικών τροποποιήσεων, παρακολούθηση ανταπόκρισης στην θεραπεία και τέλος, τον εντοπισμό προόδου νόσου πριν την κλινική επιβεβαίωση (51). Η παραπάνω προσέγγιση συνεισφέρει σημαντικά στην έγκαιρη ανίχνευση της **ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (minimal residual disease, MRD)**, αφού παρέχει στους κλινικούς γιατρούς τη δυνατότητα να προβλέψουν τον κίνδυνο υποτροπής σε ασθενείς πρώιμου σταδίου νόσου, όπου έχει προηγηθεί χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Ωστόσο, ο πιο εντυπωσιακός στόχος στην κλινική εφαρμογή της Υγρής βιοψίας είναι η πρόωμη διάγνωση του καρκίνου με μία απλή δοκιμασία αίματος, κάτι που από πολλούς έχει χαρακτηριστεί ως το «άγιο δισκοπότηρο» στο πεδίο έρευνας του καρκίνου (46).

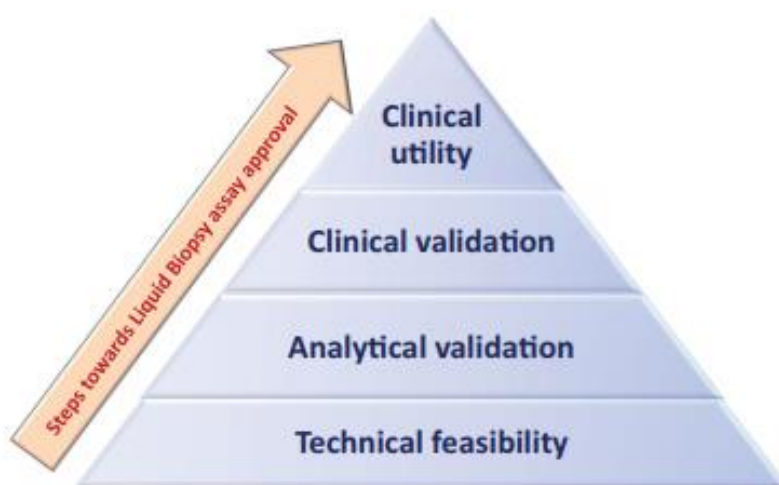
Παρόλο που η υγρή βιοψία παρουσιάζει ιδιαίτερης σημασίας κλινικό ενδιαφέρον και σημαντικά πλεονεκτήματα στη χρήση των CTCs και του ctDNA ως πηγές καρκινικών βιοδεικτών για τον καρκίνο, η πλήρης ενσωμάτωση των αναλύσεων υγρής βιοψίας στην κλινική πρακτική βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση. Κάποιες από τις παραμέτρους που αποτελούν πιθανή εξήγηση για τη δυσκολία της κλινικής επικύρωσης μιας μεθοδολογίας της υγρής βιοψίας, είναι οι εξής: (I) υπάρχει πληθώρα διαθέσιμων τεχνικών για την ανίχνευση κυκλοφορούντων βιοδεικτών, αλλά καμία αναλυτική ένδειξη για την ιδανική τεχνική προσέγγιση, (II) υπάρχει συνεχώς αυξανόμενος αριθμός πιθανών βιοδεικτών για την αξιολόγηση σε CTCs και ctDNA, (III) απαιτούνται καλά σχεδιασμένες μελέτες σύγκρισης μεταξύ CTCs και ctDNA στα ίδια κλινικά δείγματα, (IV) υπάρχει δυσκολία στον έλεγχο της προ-αναλυτικής φάσης για τη λήψη ισχυρών και αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων και (V) το υψηλό κόστος των διαθέσιμων μέχρι σήμερα τεχνικών, οι οποίες περιορίζουν την προσβασιμότητά της (46).

Η ανίχνευση των CTCs και του ctDNA δεν είναι εφικτή στο ίδιο επίπεδο σε όλους τους τύπους καρκίνου. Επίσης, τα cfDNA και ctRNA, υποσύνολα των οποίων, όπως αναφέρεται, αποτελούν τα ctDNA και cfDNA που απομονώνονται, προέρχονται, ως επί το πλείστον, από φυσιολογικά αποπτωτικά κύτταρα και ένα μικρό, μόλις, ποσοστό των μορίων αυτών έχουν προέλευση από καρκινικά κύτταρα. Ακόμα, τα CTCs, ειδικά στα αρχικά στάδια της νόσου, βρίσκονται συνήθως σε χαμηλά επίπεδα στο αίμα των ασθενών. Επομένως, η ανίχνευση, απομόνωση και ανάλυση των προαναφερθέντων συστατικών στα πλαίσια της υγρής βιοψίας χρήζει εκτενούς μελέτης για την ανάπτυξη, τυποποίηση και επικύρωση μεθόδων και διαδικασιών, τόσο σε προ-αναλυτικό όσο και σε αναλυτικό επίπεδο, ώστε αυτές να μπορέσουν να εφαρμοστούν στο κλινικό εργαστήριο με αποτελεσματικότητα και να παρέχουν χρήσιμα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Το προ-αναλυτικό στάδιο περιλαμβάνει παράγοντες όπως η επιλογή κατάλληλων σωληναρίων συλλογής αίματος, ο χρόνος και οι διαδικασίες που μεσολαβούν από την αιμοληψία μέχρι την επεξεργασία του πλάσματος, καθώς και η απομόνωση των επιθυμητών συστατικών. Στο στάδιο της ανάλυσης, η προσοχή στρέφεται μεταξύ άλλων στο χαρακτηρισμό, την ποσοτικοποίηση και τη μέγιστη διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα των βιοδεικτών. Τέλος, η συμπληρωματικότητα των πληροφοριών που δίνουν οι διαφορετικοί βιοδείκτες της

υγρής βιοψίας ή η πιθανή προέλευσή τους από διαφορετικούς πληθυσμούς καρκινικών κυττάρων, είναι κάτι που πρέπει να ληφθεί υπόψιν (48,49).

2.2 Εγκεκριμένα τεστ Υγρής Βιοψίας από τον Αμερικάνικο Οργανισμό τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration -FDA)

Η υγρή βιοψία έχει πλέον μία δυναμική παρουσία στην ογκολογία, όπως διαφαίνεται από τα πολυάριθμα τεστ υγρής βιοψίας που έχουν εγκριθεί από τον FDA (**Πίνακας 2.1**). Σύμφωνα με την πρωτοβουλία του οργανισμού Αξιολόγησης Γονιδιωματικών Εφαρμογών στην Πράξη και στην Πρόληψη (Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention-**EGAPP**), τα βήματα για να εγκριθεί μία δοκιμασία υγρής βιοψίας από το FDA και τελικώς να εισαχθεί στην κλινική πράξη είναι τα ακόλουθα τρία: α) η αξιολόγηση της μεθοδολογίας, εφόσον αυτή αναπτυχθεί, στα πλαίσια αναλυτικής ειδικότητας και ευαισθησίας, που θα αποδεικνύουν την αναλυτική της αξιοπιστία β) η αξιολόγηση της κλινικής αξιοπιστίας, η οποία περιλαμβάνει την αξιολόγηση της κλινικής ειδικότητας και ευαισθησίας, καθώς και τον καθορισμό της θετικής και αρνητικής προβλεπτικής αξίας και γ) η απόδειξη της κλινικής χρησιμότητάς της δοκιμασίας μέσω μελετών μεγάλης κλίμακας επί ομάδων πληθυσμού (**Σχήμα 2.2**). Μία κρίσιμη πτυχή που βρίσκεται στη βάση της πυραμίδας για την ανάπτυξη της δοκιμασίας είναι η τεχνική σκοπιμότητας που περιλαμβάνει όλα τα προ- και μετα-αναλυτικά στάδια που ίσως επηρεάσουν την όλη διαδικασία (49).



Σχήμα 2.3 Σημαντικά βήματα προς την έγκριση μιας ανάλυσης της υγρής βιοψίας (49)

Ωστόσο, η ανάπτυξη δοκιμασιών υγρής βιοψίας και η πολυπλοκότητα της διαδικασίας μέχρι την έγκρισή της από τον FDA δεν υπόσχονται πάντα αξιόπιστα αποτελέσματα. Ένα σημαντικό πρόβλημα που εμποδίζει την υγρή βιοψία από την ενσωμάτωσή της στην κλινική πράξη είναι η έλλειψη προτυποποίησης. Η εγκαθίδρυση τυποποιημένων διαδικασιών (Standard Operating Procedures-SOPs) στις δοκιμασίες υγρής βιοψίας που θα επιτρέπουν τα διαγνωστικά εργαστήρια να τις εκτελούν με ενιαία ροή εργασίας είναι επιτακτική ανάγκη. Τροχοπέδη στην ανάγκη αυτή αποτελούν οι διάφορες τεχνικές προκλήσεις που περιπλέκουν την εγκαθίδρυση κοινών SOPs και για αυτό απαιτείται η διενέργεια πολλών πολυκεντρικών μελετών. Πρόβλημα αποτελεί, επίσης, και η ετερογένεια του όγκου και των διαφορών που είναι δυνατόν να παρατηρηθούν είτε ανάμεσα σε κύτταρα διαφορετικών ασθενών είτε μεταξύ κυττάρων του ίδιου του ασθενούς. Επιπροσθέτως, σημαντικός είναι ο έλεγχος ποιότητας κατά τη διάρκεια της όλης διαδικασίας, εξασφαλίζοντας ότι οι κλινικοί βασίζονται σε αξιόπιστα αποτελέσματα για την επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού πρωτοκόλλου. Για την αποφυγή ετερογενών αποτελεσμάτων, μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και την εξάλειψη διακυμάνσεων οι οποίες παρατηρούνται ανεξάρτητα από τη διαδικασία της δοκιμασίας σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η κανονικοποίηση της μεθόδου.

Ο καλύτερος τρόπος για να ξεπεραστούν τα παραπάνω είναι μέσω της Διαπίστευσης Εργαστηρίων που εκτελούν δοκιμασίες υγρής βιοψίας με βάση το πρότυπο **ISO15189** στην Ευρώπη και την Τροποποίηση Βελτίωσης Κλινικού Εργαστηρίου (Clinical Laboratory Improvement Amendment-**CLIA**) ή διαπιστεύσεις εργαστηρίων από το Κολλέγιο Αμερικανών Παθολόγων (College of America Pathologists -**CAP**) στις ΗΠΑ, οι οποίες έχουν καθιερωθεί στα Κλινικά Χημικά Εργαστήρια διεθνώς για πολλές δεκαετίες (49).

Πίνακας 2.1 Τεστ υγρής βιοψίας που εγκρίθηκαν από το FDA (έως τον Μάρτιο του 2023) (49)

CTC enumeration CellSearch*	Menarini Silicon Biosystems	Metastatic Breast Metastatic Colorectal Metastatic Prostate Metastatic NSCLC	CTC detection (CK*/DAPI/ CD45*)	Prognostic significance	Ep-CAM based CTC enrichment & CTC detection with IF	2004 2007 2008 2016	Whole blood Plasma
cobas® EGFR Mutation Test v2	Roche		EGFR exon 19 deletions or exon 21 L858R	CDx for erlotinib (TARCEVA, Genentech) and osimertinib (TAGRISSO, AstraZeneca)	Real-time PCR		
Epi proColon*	Epigenomics AG	Colorectal cancer	Septin9 gene DNA methylation	Screening test	Bisulfite conversion & Real-time PCR	2016	Plasma
cobas® EGFR Mutation Test v2	Roche	Metastatic NSCLC	EGFR exon 19 deletions or exon 21 L858R	CDx for gefitinib (IRESSA, AstraZeneca)	Real-time PCR	2018	Plasma
therascreen® PIK3CA RGQ PCR Kit	Qiagen	Advanced or Metastatic Breast Cancer	PIK3CA mutations	CDx for alpelisib (PIQRAY, Novartis)	Real-time PCR	2019	Plasma
Guardant360® CDx assay	Guardant Health	Metastatic NSCLC	EGFR exon 19 deletions, L858R and T790M	CDx for osimertinib (TAGRISSO, AstraZeneca Pharmaceuticals LP)	NGS	2020	Plasma
Guardant360® CDx assay	Guardant Health	All Solid Cancers	SNVs, Indels, amplifications and fusions in 55 genes	Comprehensive genomic profiling (CGP)	NGS	2020	Plasma
FoundationOne® Liquid CDx	FoundationOne	Metastatic Castration Resistance Prostate Cancer (mCRPC)	BRCA1 and/ or BRCA2 mutations	CDx for rucaparib (RUBRACA, Clovis Oncology, Inc.)	NGS	2020	Plasma
FoundationOne® Liquid CDx	FoundationOne	Advanced or Metastatic Breast Cancer	PIK3CA mutations	CDx for alpelisib (PIQRAY, Novartis)	NGS	2020	Plasma
FoundationOne® Liquid CDx	FoundationOne	Metastatic NSCLC	ALK rearrangements	CDx for alectinib (ALECENSA, Genentech USA, Inc.)	NGS	2020	Plasma
FoundationOne® Liquid CDx	FoundationOne	Advanced Ovarian cancer	BRCA1 and/ or BRCA2 mutations	CDx for rucaparib (RUBRACA, Clovis Oncology, Inc.)	NGS	2020	Plasma
cobas® EGFR Mutation Test v2	Roche	Metastatic NSCLC	EGFR exon 19 deletions or exon 21 L858R	CDx for expanded EGFR TKIs: osimertinib (TAGRISSO, AstraZeneca), erlotinib (TARCEVA, Genentech), gefitinib (IRESSA, AstraZeneca), afatinib (GILOTRIF, Boehringer Ingelheim), and dacomitinib (VIZIMPRO, Pfizer)	Real-time PCR	2020	Plasma
FoundationOne® Liquid CDx	FoundationOne	Metastatic Castration Resistance Prostate Cancer (mCRPC)	BRCA1, BRCA2 and ATM mutations	CDx for olaparib (LYNPARZA, AstraZeneca Pharmaceuticals LP)	NGS	2020	Plasma
Guardant360® CDx assay	Guardant Health	Locally Advanced or Metastatic NSCLC	EGFR Exon 20 Insertion Mutations	CDx for amivantamab-vmjw (RYBREVANT, Janssen)	NGS	2021	Plasma
Guardant360® CDx assay	Guardant Health	Locally Advanced or Metastatic NSCLC	KRAS G12C mutation	CDx for sotorasib (LUMAKRAS, Amgen Inc.)	NGS	2021	Plasma
FoundationOne® Liquid CDx	FoundationOne	Metastatic NSCLC	MET exon 14 skipping	CDx for capmatinib (TABRECTA, Novartis)	NGS	2021	Plasma
FoundationOne® Liquid CDx	FoundationOne	Metastatic NSCLC	EGFR exon 19 deletions or exon 21 L858R substitutions	CDx for erlotinib (TARCEVA, Genentech), osimertinib (TAGRISSO), and gefitinib (IRESSA)	NGS	2022	Plasma
therascreen®KRAS RGQ PCR kit	Qiagen	NSCLC	KRAS G12C mutation	CDx for adagrasib (KRAZATI, Mirati Therapeutics)	Real-time PCR	2022	Plasma
CTC Isolation / enrichment	ANGLE	Metastatic Breast Cancer	Different biomarkers	CTC isolation	Size-based enrichment microfluidics	2022	Whole blood
FoundationOne® Liquid CDx	FoundationOne	Metastatic NSCLC	ROS1 mutations or NTRK fusions	CDx for entrectinib (ROZLYTREK, Roche)	NGS	2023	Plasma
Guardant360® CDx assay	Guardant Health	Advanced or Metastatic Breast Cancer	ESR1 mutations	CDx for elacestrant (ORSERDU, Menarini)	NGS	2023	Plasma

2.3 Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα (Circulating Tumor Cells-CTCs)

Η γνώση ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας σε απομακρυσμένα όργανα και να δημιουργούν μεταστατικές εστίες χρονολογείται από το 1874, ενώ η παρουσία τους αξιώθηκε για πρώτη φορά το 1869 από τον Thomas Ashworth ο οποίος περιέγραψε κύτταρα στο αίμα ασθενών που απεβίωσαν τα οποία ομοιάζαν με εκείνα του πρωτοπαθούς όγκου (50). Εδώ και είκοσι χρόνια, τα CTCs έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς μελέτης για τη διαλεύκανση των μηχανισμών της μετάστασης και για το ρόλο τους στη διαδικασία αυτή. Όπως περιέγραψε το 1889 ο Stephen Paget στην υπόθεση ‘seed and soil’, η δυνατότητα ενός καρκινικού κυττάρου να δημιουργήσει μετάσταση εξαρτάται από τις αλληλοεπιδράσεις του με διάφορους παράγοντες της ομοίωσης του οργανισμού, που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την αγγειογένεση και τη διεισδυτικότητα του κυττάρου καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι ορισμένα μόνο

καρκινικά κύτταρα προωθούν τη μετάσταση, δημιουργώντας μεταστατικές εστίες με μη-τυχαίο τρόπο σε συγκεκριμένα όργανα που παρουσιάζουν ευνοϊκές συνθήκες για το μικροπεριβάλλον τους (51).

Η ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs συνιστά ένα σημαντικό σύνολο μοριακών αναλύσεων στον τομέα της υγρής βιοψίας. Η παρουσία των CTCs στην κυκλοφορία του αίματος έχει συνδεθεί με χειρότερη πρόγνωση και υποτροπή της νόσου σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (52), ενώ πλήθος πολυκεντρικών μελετών έχουν δείξει ότι σχετίζονται με μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου και μειωμένη ολική επιβίωση και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως παχέος εντέρου και προστάτη, αναδεικνύοντας έτσι την κλινική σημασία της ανάλυσής τους (53,54). Ήδη από το 2002, η ερευνητική μας ομάδα, παρουσίασε πρώτη στη διεθνή βιβλιογραφία την προγνωστική σημασία της ανίχνευσης του mRNA της κυτταροκερατίνης-19 (Cytokeratin 19- CK-19) στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού (55–57). Λίγα χρόνια μετά, βασιζόμενο στον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζουν τα CTCs στην μεταστατική εξάπλωση του όγκου, το FDA εξέδωσε την έγκριση του συστήματος CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems, Italy) για την ανίχνευση και καταμέτρηση ασθενών με καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη (46). Επιπλέον, η ανάλυση των CTCs λειτουργεί σαν οδηγός στην επιλογή της θεραπείας και παρέχει τη δυνατότητα πρόβλεψης δράσης φαρμακευτικών ουσιών σε μεμονωμένους ασθενείς, ανάλογα με το μοριακό αποτύπωμα της νόσου που εμφανίζουν, καθώς διέπονται από μία δυναμική επικράτηση, είτε του επιθηλιακού, είτε του μεσεγχυματικού χαρακτήρα σε περιόδους θεραπείας ή προόδου της νόσου (57). Συγκεκριμένα, έρευνα έδειξε, μετά από ανάλυση των CTCs σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, ότι η έκφραση του μεταγράφου V7 του υποδοχέα των ανδρογόνων (Androgen receptor V7-AR-V7) έχει ως αποτέλεσμα την αντίσταση στη θεραπεία με enzalutamide (58).

Για λόγους επιστημονικού ενδιαφέροντος, η σε βάθος ανάλυση των χαρακτηριστικών των CTCs σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεϊνών δίνει τη δυνατότητα κατανόησης της βιολογίας της μεταστατικής διαδικασίας και των μηχανισμών αντίστασης στη θεραπεία (48).

2.3.1 Τεχνικές για την απομόνωση των CTCs

Το γεγονός ότι τα CTCs είναι πολύ σπάνια και η ποσότητα του διαθέσιμου, προς ανάλυση, δείγματος είναι πολύ περιορισμένη, παραμένει μια τεράστια αναλυτική και τεχνική πρόκληση. Το εξαιρετικά χαμηλό όριο ανίχνευσης, στην περίπτωση των CTCs, επηρεάζεται μόνο από την ποσότητα αίματος του δείγματος που εξετάζεται στην εκάστοτε περίπτωση και στις περισσότερες περιπτώσεις, ένας πληθυσμός CTCs απομονώνεται μαζί με μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, **PBMCs**). Αυτός ο περιορισμός θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν πριν την οποιαδήποτε ανάλυση και ως εκ τούτου, η ανάπτυξη μεθοδολογιών με μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία για την απομόνωση των CTCs και τον όσο δυνατόν καλύτερο διαχωρισμό τους από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος κρίνεται αναγκαία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μέθοδος περιλαμβάνει δύο στάδια: αυτό του εμπλουτισμού-απομόνωσης και αυτό της ανίχνευσης. Ο εμπλουτισμός των CTCs διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με την προσέγγιση απομόνωσης που χρησιμοποιεί η εκάστοτε μέθοδος: α) απομόνωση με βάση τις βιολογικές ιδιότητες των CTCs, β) με βάση τις φυσικές ιδιότητες των CTCs (59).

2.3.1.1 Απομόνωση βάσει Επιφανειακών Δεικτών

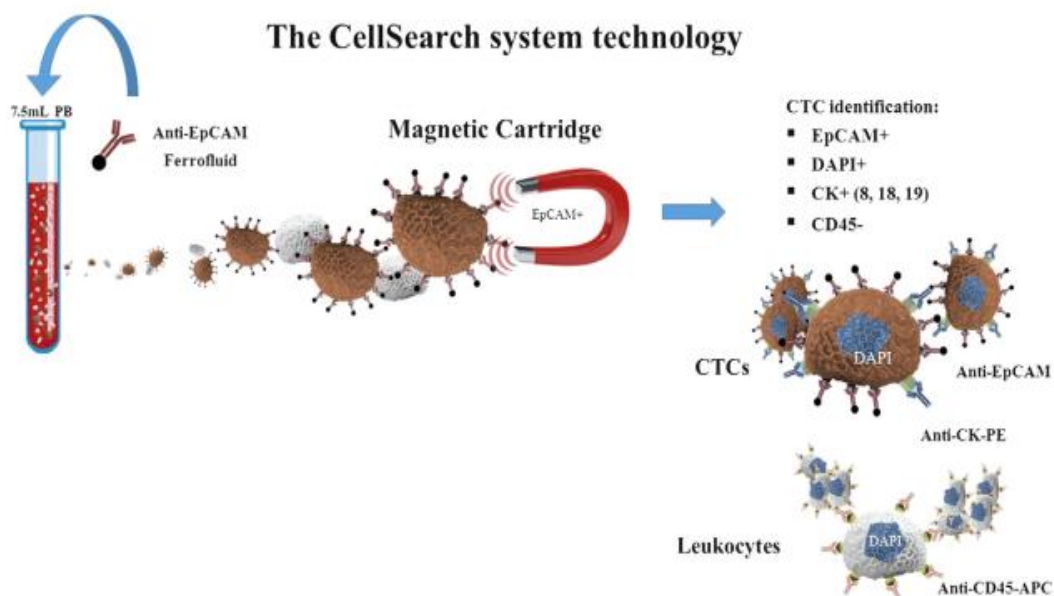
Η θετική επιλογή είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα εμπλουτισμού των CTCs και βασίζεται στη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι ειδικών δεικτών που εκφράζονται μόνο στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών, ενώ απουσιάζουν από την επιφάνεια των λευκοκυττάρων. Μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα σε μαγνητικά σωματίδια ή ακινητοποιημένα σε τοιχώματα/μεμβράνες ειδικών τσιπς μικροροών, δεσμεύουν εκλεκτικά τα CTCs από το αίμα, με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του δείγματος σε CTCs μέσω θετικής επιλογής.

Το μόριο προσκόλλησης των επιθηλιακών κυττάρων, EpCAM, είναι ο πιο συνηθισμένος επιθηλιακός δείκτης των CTCs και χρησιμοποιείται από πολλά συστήματα. Η συγκεκριμένη προσέγγιση του EpCAM είναι ήδη καθιερωμένη και έχει αποδειχθεί η κλινική της σημασία στην απομόνωση των CTCs. Ωστόσο, κύριο μειονέκτημα της συγκεκριμένης προσέγγισης είναι η αδυναμία απομόνωσης κυττάρων που εμφανίζουν ένα πιο μεσεγχυματικό φαινότυπο. Επίσης, όπως

αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο του κεφαλαίου, τα CTCs παρουσιάζουν τεράστια ετερογένεια και μια προσέγγιση που επιτρέπει την υπερπήδηση του εμποδίου αυτού είναι η ταυτόχρονη χρήση πολλαπλών αντισωμάτων έναντι διαφορετικών δεικτών. Στο πλαίσιο αυτό, έχει προταθεί η χρήση κι άλλων ειδικών για τον όγκο δεικτών, όπως οι **CEA, EGFR, PSA, HER-2, MUC-1, EphB4, IGF-1R, cadherin-11** και **TAG-72**. Αντίθετα, η αρνητική επιλογή επιτυγχάνει τον εμπλουτισμό των CTCs, ανεξάρτητα από την έκφραση του EpCAM, και βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι δεικτών που εκφράζονται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων, όπως το CD45 (π.χ. σύστημα **RosetteSep**). Αποτελέσματα ερευνών υποδεικνύουν ότι, η συνδυαστική χρήση αντισωμάτων έναντι του CD-146 και του EpCAM βελτιώνει την απομόνωση των CTCs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, ενώ σε διαφορετική μελέτη υποδεικνύεται ότι τα επίπεδα ανίχνευσης αυξήθηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι του CD-176. Η αξιολόγηση των CTCs ως δείκτη πρόγνωσης πρέπει να περιλαμβάνει τόσο τα EpCAM θετικά κύτταρα, όσο και τους αρνητικούς υποκλώνους (59,60).

Στην κατηγορία απομόνωσης των CTCs με βάσει επιφανειακούς δείκτες ανήκει το σύστημα **CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems, Italy)** το οποίο θεωρείται gold standard για την ανίχνευση και καταμέτρηση των CTCs στην κλινική εφαρμογή καθώς συσχετίζει την απαρίθμησή τους με την πρόγνωση και παρουσιάζει υψηλή επαναληψιμότητα, αναλυτική ακρίβεια και διαγνωστική ειδικότητα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια συνδεδεμένα με αντισώματα antiEpCAM, τα οποία δεσμεύουν τα CTCs και ακολουθεί χρώση των κυττάρων με ανοσοφθορισμό, με χρήση αντισωμάτων έναντι των κυτταροκερατινών CK-8, CK-18 ή CK-19 (επιθηλιακοί δείκτες για επιβεβαίωση των CTCs) και έναντι του δείκτη CD45 (για τον αποκλεισμό των λευκοκυττάρων), ενώ παράλληλα πραγματοποιείται και χρώση του πυρήνα με 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (**DAPI**). Το σύστημα βασίζεται στον συνδυασμό θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού των CTCs και αυτοματοποιημένης απεικονιστικής μεθόδου ψηφιακής μικροσκοπίας. Τα στάδια καταμέτρησης των CTCs είναι: 1) ιχνηθέτηση με μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με αντίσωμα έναντι του EpCAM, 2) ανοσομαγνητικός διαχωρισμός των CTCs, 3) χρώση των CTCs με φυκοερυθρίνη ιχνηθετημένη με anti-CK αντίσωμα (CK-PE), χρώση του πυρήνα με DAPI και χρώση των λευκοκυττάρων με αλλοφυκοκυανίνη ιχνηθετημένη με anti-CD45 αντίσωμα (CD45-APC) και μονιμοποίηση των κυττάρων

και τέλος 4) ανάλυση με μικροσκόπιο φθορισμού, ώστε να διαχωριστούν τα CTCs από τα λευκοκύτταρα. Για τον χαρακτηρισμό ενός κυττάρου ως CTC, θα πρέπει αυτό να παρουσιάζει CK(+), CD45(-), DAPI(+) και η πλασματική μεμβράνη να είναι συνεχής, διαμέτρου τουλάχιστον 4μm. Το σύστημα παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης και τέταρτου δείκτη, μέσω ενός επιπλέον καναλιού φθορισμού, ανάλογα με τη μελέτη που πραγματοποιείται. Ένα μειονέκτημα του συστήματος CellSearch® είναι ότι βασίζεται εξολοκλήρου στην έκφραση του επιθηλιακού δείκτη EpCAM. Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορούν να ανιχνευθούν υποπληθυσμοί CTCs που βρίσκονται, απόλυτα, σε κατάσταση EMT και άρα δεν εκφράζουν το EpCAM. Ένα άλλο μειονέκτημα, είναι ότι δεν επιτρέπονται οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης σε CTCs που απομονώνονται με το σύστημα αυτό, καθώς το συντηρητικό των κυττάρων που χρησιμοποιείται κατά την αιμοληψία αποτελεί αναστολέα για την περαιτέρω μοριακή ανάλυση σε επίπεδο RNA (46).



Σχήμα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση της αρχής μεθόδου εμπλουτισμού και ανίχνευσης των CTCs μέσω του συστήματος CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems, Italy) (46)

Υπάρχουν διάφορα παρόμοια συστήματα που εμφανίζουν μικροδιαφορές στη μεθοδολογία τους, όπως το είναι το **AdnaTest** (Qiagen), που επίσης στηρίζεται στον θετικό εμπλουτισμό CTCs με τη χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων και ακολουθεί μοριακή ανάλυσή τους με πολλαπλή RT-PCR για την ανίχνευση διάφορων γονιδίων, ή συστήματα που συνδυάζουν άλλες τεχνικές, όπως η *in vivo* τεχνολογία

CellCollector (Gilupi GmbH, Germany) που αποτελεί ένα, επίσης, καινοτόμο σύστημα απομόνωσης CTCs και βασίζεται στη χρήση ενός νανοκαθετήρα, επικαλυμμένου στην άκρη του με νανοσφαιρίδια χρυσού, πάνω στα οποία δεσμεύονται ομοιοπολικά τα χημικά αντισώματα έναντι του EpCAM (60–62).

2.3.1.2 Απομόνωση βάσει Φυσικών Ιδιοτήτων

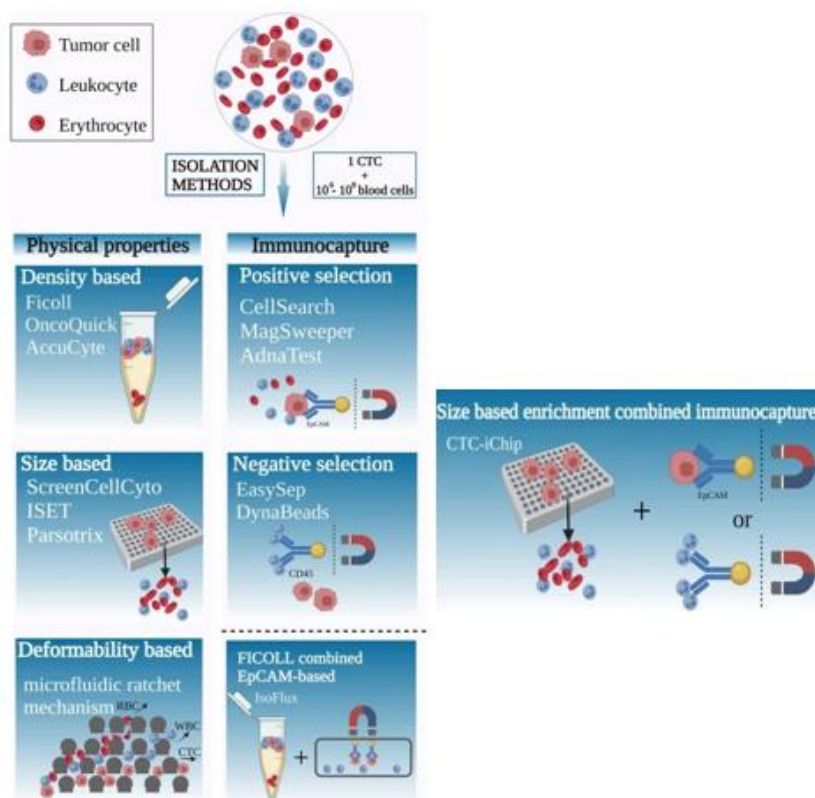
Τα CTCs όπως έχει αναφερθεί, ουκ ολίγες φορές, παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και λόγω του φαινομένου EMT δεν εκφράζουν όλα στην επιφάνειά τους επιθηλιακούς δείκτες, με αποτέλεσμα η χρήση των παραπάνω τεχνικών ανίχνευσης να καθίσταται ανεπαρκής σε πολλούς τύπους καρκίνου. Τα φυσικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τα CTCs από τα υπόλοιπα κύτταρα, μεταξύ άλλων, είναι το μέγεθος, η πυκνότητα, η πλαστικότητα και οι ηλεκτρικές ιδιότητές τους. Τεχνικές που βασίζουν τον εμπλουτισμό των κυττάρων αυτών στις παραπάνω ιδιότητες παρουσιάζουν μια πληρέστερη εικόνα του μοριακού προφίλ του όγκου (53).

Αναφορικά, η τεχνική **ISSET (Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells, RareCell Diagnostics France)**, η οποία βασίζεται στο μέγεθος πραγματοποιεί την απομόνωση των CTCs μέσω διήθησης του δείγματος σε φίλτρο πορώδους μεμβράνης, πάνω στην οποία συγκρατούνται μόνο τα CTCs, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους συγκριτικά με τα λευκοκύτταρα του αίματος. Στην κατηγορία αυτή εμπίπτει, επίσης, και το σύστημα **ScreenCell**, το οποίο μέσω της χρήσης φίλτρων επιτρέπει την απομόνωση ζώντων CTCs ή μονιμοποιημένων σε φορμαλδεΰδη (46).

Επιπλέον χαρακτηριστικό της κατηγορίας αυτής είναι το σύστημα **Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK)**, το οποίο αποτελεί την πρώτη εγκεκριμένη από τον FDA συσκευή για τον εμπλουτισμό των CTCs στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού και αποτελεί ένα σύστημα διαχωρισμού βασιζόμενο στο μέγεθος επιτυγχάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο αποτελεσματικότερη απομόνωση των CTCs αφού δεν χάνεται ο αρνητικός EpCAM πληθυσμός (63). Έρευνα ανέδειξε την ετερογένεια που παρουσιάζουν στις μεταλλάξεις του *PIK3CA* γονιδίου σε EpCAM(+) και EpCAM(-) CTCs που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix (ANGLE-plc, Guildford, UK), από το αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (64). Κατά τη σύγκριση

μεθόδων απομόνωσης CTCs με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE-plc, Guildford, UK) και με ανοσομαγνητική θετική επιλογή βάσει EpCAM σε ασθενείς με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι το πρώτο παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην απομόνωση CTCs για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (65). Επίσης, το εν λόγω σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση CTCs με στόχο την ανάλυση μεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων (66), καθώς και για την αξιολόγηση της έκφρασης του MCT4 (Monocarboxylate Transporter 4) ασθενών με πρώιμο NSCLC (67).

Άλλη μέθοδος, που βασίζεται στις ηλεκτρικές ιδιότητες των CTCs είναι το σύστημα **DEPArray (Silicon Biosystems, Menarini group, IT)** και επιτυγχάνει τον διαχωρισμό μέσω διηλεκτρικής σταθεράς. Με βάση την πυκνότητα, η πιο διαδεδομένη μέθοδος απομόνωσης είναι η φυγοκέντρωση διαβαθμισμένης πυκνότητας με τη χρήση του αντιδραστηρίου φικόλης (**Ficoll**) (46). Οι τεχνικές απομόνωσης παρουσιάζονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2.4 Απεικόνιση ορισμένων βασικών Τεχνικών Απομόνωσης-Εμπλουτισμού CTCs (59)

2.3.2 Αναλυτικές Τεχνικές για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs

Το επόμενο βήμα, μετά τον εμπλουτισμό των CTCs είναι η ανίχνευσή τους και ο μοριακός χαρακτηρισμός τους. Τεχνολογικές πρόοδοι στο πεδίο αυτό περιλαμβάνουν: α) Απεικονιστικές μεθόδους ανοσοφθορισμού και κυτταρομετρίας ροής με τη χρήση laser, β) Μοριακές τεχνικές οι οποίες βασίζονται στην ανάλυση νουκλεϊκών οξέων των CTCs με υψηλή ευαισθησία ή τον συνδυασμό μοριακών και απεικονιστικών μεθόδων και γ) τεχνικές βασισμένες στην έκκριση ειδικών πρωτεϊνών από τα CTCs. Κάθε μία από αυτές τις τεχνικές αλληλοσυμπληρώνονται, καθώς δίνουν διαφορετικές πληροφορίες για τα CTCs (68). Οι απεικονιστικές μέθοδοι, συνήθως, αφορούν ιχνηθετημένα αντισώματα έναντι επιθηλιακών δεικτών στην επιφάνεια των CTCs, όπως η CK-19, και ταυτόχρονα προσφέρουν μία ερμηνεία της μορφολογίας τους. Στη τρίτη κατηγορία χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η τεχνολογία EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT), όπου η παρουσία ή όχι κυττάρων αξιολογείται με βάση την ανίχνευση πρωτεϊνών που απορρίπτουν ή εκκρίνουν επιθηλιακά κύτταρα (45).

Οι μοριακές τεχνικές αδυνατούν να προσδιορίσουν με ακρίβεια τον αριθμό των CTCs που είναι παρόντα σε ένα δείγμα. Ωστόσο, μια πληθώρα βιοδεικτών μπορούν να ανιχνευτούν και να ποσοτικοποιηθούν, καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση και τον μοριακό τους χαρακτηρισμό σε επίπεδο DNA και RNA. Μέσω των μοριακών αναλύσεων μπορούν να ληφθούν ποιοτικές πληροφορίες για τη γονιδιακή έκφραση, τη μεθυλίωση του DNA, την ανίχνευση μεταλλάξεων και miRNAs, ενώ είναι δυνατή και η ποσοτικοποίησή τους με την τεχνική της ποσοτικής PCR (quantitative-PCR, **qPCR**). Οι μοριακές τεχνικές εκμεταλλεύονται την εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα της **PCR** (69). Επιπλέον, είναι εύκολες στον χειρισμό και απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος για την ανάλυση και, ειδικά, όταν εφαρμόζεται πολλαπλή PCR είναι δυνατή η ανάλυση περισσότερων του ενός στόχου στο ίδιο δείγμα, επιτρέποντας μια πολυπαραμετρική προσέγγιση. Σε αντίθεση με τις απεικονιστικές μεθόδους, οι αναλύσεις μέσω μοριακών μεθόδων είναι αντικειμενικές, ποσοτικές και δεν υπόκεινται σε προσωπικές εκτιμήσεις. Επιπροσθέτως, παρουσιάζουν σχετικά χαμηλό κόστος ανάλυσης, υψηλή απόδοση και επιδέχονται ευκολότερα συστήματα ελέγχου ποιότητας και αυτοματοποίησης γεγονός που τις καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλες για αναλύσεις ρουτίνας σε εργαστήρια μοριακής διαγνωστικής. Τα κύρια μειονεκτήματα

των μοριακών ποσοτικών προσδιορισμών αφορούν στα προ-αναλυτικά στάδια και σχετίζονται με τη σταθερότητα των CTCs, και του γενετικού υλικού. Ως εκ τούτου, αναγκαία κρίνεται η ύπαρξη ξεχωριστών εργαστηριακών χώρων για τα στάδια προετοιμασίας δείγματος, ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση τελικού προϊόντος. Πρόβλημα αποτελεί, επίσης, η μεταφορά και η αποθήκευση των δειγμάτων και τέλος, σημαντικό ζήτημα αποτελεί το γεγονός ότι, οι πληροφορίες λαμβάνονται σε επίπεδο συνολικού αριθμού μεταγράφων, χωρίς να υπάρχει διαχωρισμός για το αν προέρχονται από το ίδιο κύτταρο ή διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (70). Οι κυριότερες μοριακές τεχνικές ανίχνευσης και ανάλυσης των CTCs είναι: RT-qPCR, ddPCR, Multiplex RT-qPCR, ειδική για μεθυλίωση PCR (MSP), ARMS-PCR, FISH, NGS και MPS (46,71). Στη συνέχεια αναλύονται τα χαρακτηριστικότερα παραδείγματα από αυτές.

RT-qPCR (Reverse Transcription-qPCR, ποσοτική PCR-αντίστροφης μεταγραφής) είναι μία μέθοδος, κατά την οποία μελετάται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μετάσταση, μέσω ποσοτικής PCR σε δείγματα cDNA τα οποία έχουν συντεθεί, έπειτα από τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής από mRNA που απομονώνεται από το δείγμα. Μία εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική RT-qPCR πραγματικού χρόνου έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης της CK-19 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (72). Πολλές και διαφορετικές μοριακές δοκιμασίες βασισμένες σε RT-qPCR έχουν αναπτυχθεί για διάφορα μετάγραφα γονιδίων των CTCs, όπως του *PD-L1* (73). Σε πρόσφατη δημοσίευση, έχει πραγματοποιηθεί μελέτη της προγνωστικής σημασίας της έκφρασης δεικτών, όπως *CD24*, *CD44*, *ALDH1*, *TWIST1*, *ESR1*, *PGR*, *HER2*, *EGFR* και *CK-19* με τη χρήση RT-qPCR σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (57).

Στην ίδια μεθοδολογία βασίζεται και η **Multiplex RT-qPCR**, η οποία δίνει το πλεονέκτημα εξοικονόμησης δείγματος, λαμβάνοντας υπόψιν την σπανιότητα των CTCs, καθώς πραγματοποιείται ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών γονιδίων-στόχων. Multiplex RT-qPCR έχει αναπτυχθεί για την πολλαπλή στόχευση των υποδοχέων των ανδρογόνων AR-V5 και AR-567, με σκοπό τη μελέτη του προφίλ έκφρασής τους στα CTCs σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα στα EVs προερχόμενα από το πλάσμα σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη (74).

Άλλες προσεγγίσεις για την ανίχνευση μεταλλάξεων περιλαμβάνουν την τεχνολογία **Droplet Digital PCR (ddPCR)**, της οποίας η βασική μεθοδολογία άπτεται στο γεγονός ότι το δείγμα κλασματοποιείται σε μικρότερα μέρη ίσου όγκου πριν την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR, ώστε να περιέχουν, είτε ένα μόριο της αλληλουχίας στόχου, είτε κανένα. Σε κάθε ένα από τα κλάσματα που προκύπτουν λαμβάνει χώρα μία αντίδραση PCR προσφέροντας τη δυνατότητα του απόλυτου ποσοτικού προσδιορισμού των αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εντός του δείγματος. Επίσης, η αύξηση του αριθμού των κύκλων βελτιώνει την ακρίβεια, ενώ ο διαχωρισμός του δείγματος σε μέρη καθιστά δυνατή την ανίχνευση μεταλλάξεων σε ένα μεγάλο υπόβαθρο αλληλουχιών αγρίου τύπου, μειώνοντας το όριο ανίχνευσης και καθιστώντας την τεχνική εξαιρετικά ευαίσθητη, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση πολυμορφισμών αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variations, **CNVs**) (75). Εξαιρετικό ενδιαφέρον αποτελεί η ανάπτυξη δοκιμασίας κατά την οποία μελετήθηκε η έκφραση του *PD-L1*, σημαντικός βιοδείκτης για την παρακολούθηση ασθενών με ανοσοθεραπεία, με RT-ddPCR σε CTCs ασθενών με μεταστατικό πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου, η οποία και αποδείχθηκε ότι παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία (76)

Επιπλέον, αναφέρεται η Liquid Bead Array (Υγρή Συστοιχία Σφαιριδίων), μία τεχνική της οποίας τα τελικά προϊόντα της πολλαπλής PCR είναι βιοτινυλωμένα. Στον αντίποδα, ειδικοί ανιχνευτές ολιγονουκλεοτίδια πάνω σε μικροσφαιρίδια ιχνηθετημένα με φυκοερυθρίνη επωάζονται με στρεπταβιδίνη και, στη συνέχεια, υβριδοποιούνται με τα μόρια στόχους. Τα δεσμευμένα επισημασμένα προϊόντα της RT-PCR αναλύονται και ποσοτικοποιούνται με βάση τα σφαιρίδια, μέσω της τεχνολογίας κυτταρομετρίας ροής του Luminex. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτόχρονη ανίχνευση έκφρασης 14 γονιδίων (*CK19*, *HER2*, *hMAM*, *MAGEA3*, *SNAIL*, *TWIST*, *VIM*, *CD24*, *CD44*, *ALDH1*, *PTEN*, *PDCD4*, *GA733-2* και *MUC-1*) σε CTCs με σκοπό τον μοριακό χαρακτηρισμό τους σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (77).

Άλλη μία μοριακή τεχνική είναι η **ARMS-PCR (Amplification-Refractory Mutation System – PCR)**, η οποία στηρίζεται στη χρήση δύο ζευγών εκκινητών, εκ των οποίων το ένα υβριδοποιείται στην μεταλλαγμένη αλληλουχία, ενώ το άλλο στην αλληλουχία αγρίου τύπου. Με τον τρόπο αυτό, αυξάνεται η ειδικότητα και η

ευαισθησία, καθώς η ύπαρξη μίας και μόνο βάσης στο 3' άκρο, η οποία δεν είναι σε αντιστοιχία με το μεταλλαγμένο γονίδιο, οδηγεί στην μη παραγωγή προϊόντος. Επίσης, αυξάνεται η ταχύτητα της αντίδρασης, καθώς ταυτόχρονα με την υβριδοποίηση των εκκινητών γίνεται αντιληπτή η παρουσία ή όχι μεταλλάξεων. Ωστόσο, βασικό μειονέκτημα είναι το ενδεχόμενο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, λόγω μη ειδικής σύνδεσης με την αλληλουχία αγρίου τύπου το οποίο συχνά αποκλείει την χαμηλή ορίων ανίχνευση μεταλλάξεων. Μία νέα τεχνολογία που ονομάζεται **NAPA:NAMEPrO-assisted ARMS** μπορεί να άρει τον περιορισμό αυτό, βελτιώνοντας την απόδοση της ARMS-PCR με την προσθήκη ενός επιπλέον βήματος ενζυματικής προσθήκης, το οποίο μειώνει τις αλληλουχίες αγρίου τύπου πριν την πραγματοποίηση της ανάλυσης. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση δύο hot spot μεταλλάξεων του *PIK3CA* (E545 K και H1047R) τόσο σε CTCs όσο και σε cfDNA και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αποτελεί μία μέθοδο που συνδυάζει ταχύτητα και ακρίβεια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη ρουτίνα των διαγνωστικών εργαστηρίων (78). Σε πρόσφατη έρευνα, αναπτύχθηκε η ίδια μέθοδος για την ανίχνευση 4 μεταλλάξεων του γονιδίου *ESR1* σε δείγματα ζευγών CTCs και ctDNA από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και τα αποτελέσματα κατέδειξαν συνάφεια 90% με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των ίδιων μεταλλάξεων με τη χρήση drop-off ddPCR, παρουσιάζοντας μία μέθοδο υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας για την ανίχνευση του μοριακού προφίλ των μεταλλάξεων του γονιδίου *ESR1* (79).

Τα CTCs είναι σπάνια γεγονότα και ακολουθούν την κατανομή Poisson, γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διαδικασία της ανίχνευσης. Επομένως, ο όγκος του περιφερικού αίματος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση είναι κρίσιμος, ειδικότερα σε περιπτώσεις πρώιμων σταδίων του καρκίνου. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο σύνολό τους προϋποθέτουν την αξιολόγησή τους σε μεγάλες κλινικές μελέτες, την έγκριση και την τυποποίησή τους για την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη. Συνεπώς, η καθιέρωση διεθνών προτύπων για την καταμέτρηση και τον χαρακτηρισμό των CTCs είναι καθοριστική για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων και τη χρήση τους στην κλινική πρακτική. Στο πλαίσιο αυτό σημαντικά είναι τα εξής ζητήματα: α) η τυποποίηση του προ-αναλυτικού σταδίου, όπως ο όγκος του δείγματος, η αποφυγή επιμόλυνσης από επιθηλιακά κύτταρα του

δέρματος κατά την αιμοληψία, σε περίπτωση ανάλυση επιθηλιακών δεικτών και η μεταφορά του δείγματος, διασφαλίζοντας την σταθερότητα των CTCs κάτω από διαφορετικές συνθήκες, β) η τυποποίηση των μεθόδων απομόνωσης με τη διεργασία πειραμάτων spiking για μελέτη της ανάκτησης, γ) η προτυποποίηση των τεχνικών ανίχνευσης με χρήση εσωτερικών και εξωτερικών προτύπων ελέγχου και δ) η σύγκριση μεθόδων ενδο-εργαστηριακά και δια-εργαστηριακά στο ίδιο δείγμα. Τέλος, η ανάπτυξη διεθνών προτύπων για την καταμέτρηση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs είναι εξαιρετικά σημαντική στις απεικονιστικές μεθόδους ανίχνευσης, οι οποίες υπόκεινται σε προσωπικές εκτιμήσεις (53).

2.4. Εξωκυττάριο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (Circulating Tumor DNA-ctDNA)

2.4.1 Ιστορική Αναδρομή και βιολογική προέλευση

Το εξωκυττάριο κυκλοφορούν DNA (cell free DNA-cfDNA) αναφέρθηκε πρώτη φορά από τους Mandel και Metais το 1948 οι οποίοι εντόπισαν νουκλεϊκά οξέα να κυκλοφορούν ελεύθερα στο ανθρώπινο πλάσμα (80).

Το cfDNA εισέρχεται στη κυκλοφορία, κυρίως, μέσω των διαδικασιών της απόπτωσης και της νέκρωσης των κυττάρων. Η διαδικασία της απόπτωσης παράγει θραύσματα DNA, μήκους περίπου 180 bp, ως τελικό προϊόν μίας προγραμματισμένης φυσιολογικής πέψης του γενωμικού DNA. Το ctDNA αποτελεί ένα εξαιρετικά μικρό κλάσμα του cfDNA. Το ctDNA σε παθολογία συμπαγούς όγκου ή κατά την ύπαρξη μεταστατικών εστιών προέρχεται από διαδικασίες, όπως η νέκρωση, η αυτοφαγία, ή/και άλλους μηχανισμούς, που επάγονται από το στρες της εξωκυττάριας μήτρας του όγκου και τα χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση αποτελεί μία παθολογική διαδικασία, κατά την οποία παράγονται μεγαλύτερα τμήματα DNA εξαιτίας της ατελούς και τυχαίας πέψης του γενετικού υλικού. Συνεπώς, το μήκος και η ακεραιότητα του cfDNA αποτελεί ενδεικτικό χαρακτηριστικό διάκρισης της προέλευσής τους και κατ'έκταση αν είναι αποτέλεσμα μιας φυσιολογικής διαδικασίας ή μιας παθολογικής κατάστασης (81). Τέλος, βιολογική προέλευση του ctDNA μπορεί να αποτελούν τα CTCs που αποσυντίθενται στην κυκλοφορία. Κατά την εξέλιξη της νόσου, το καρκινικό

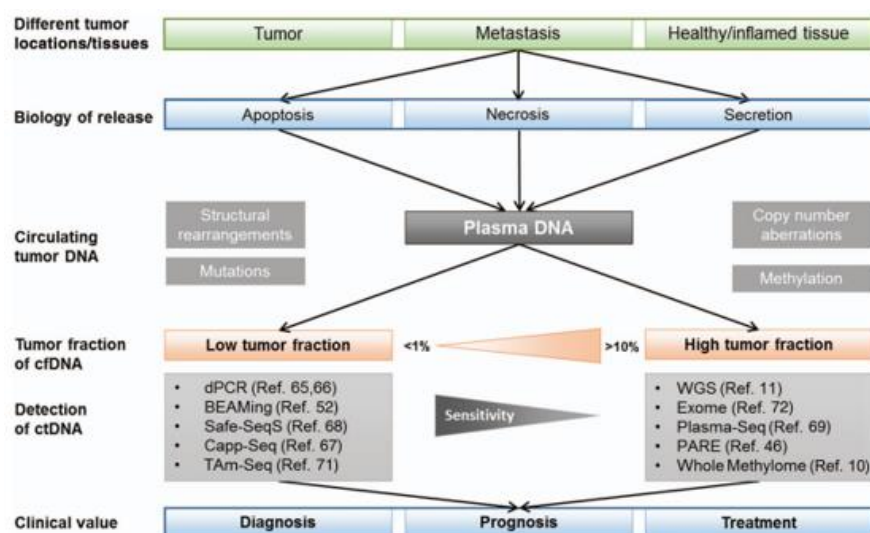
«φορτίο» αυξάνεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση του ρυθμού του κυτταρικού θανάτου και της συγκέντρωσης του ctDNA στην κυκλοφορία (46).

2.4.2. Κλινική Σημασία του ctDNA

Οι αναλύσεις στο ctDNA έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια στα πλαίσια της υγρής βιοψίας για τη διάγνωση, την πρόγνωση, την εκτίμηση της εξέλιξης του όγκου, την παρακολούθηση της θεραπείας ή την μελέτη βιοδεικτών που σχετίζονται με αντίσταση σε συγκεκριμένες θεραπείες, αλλά και την εκτίμηση κινδύνου υποτροπής, μετάστασης καθώς και ανίχνευσης ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD). Η προσέγγιση αυτή παρέχει ένα ευρύ και περιγραφικό φάσμα γενετικών και επιγενετικών πληροφοριών με την, πλέον ελάχιστα, επεμβατική προσέγγιση, προσφέροντας στην πληθώρα των αναλύσεων, οι οποίες μπορούν να γίνουν στο ctDNA, μια μεγάλη δυναμική κλινικής χρησιμότητας (81).

Το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην ποιοτική ανάλυση του ctDNA, η οποία αφορά την μελέτη της ακεραιότητας του DNA, την ανίχνευση μεταλλάξεων, τις μεταβολές σε επίπεδα αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variations, CNVs), την ενίσχυση γονιδίων, τη μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI), την απώλεια της ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity, LOH) και την μελέτη του επιγενετικού προφίλ, μέσω μεθυλίωσης σημαντικών για τον κυτταρικό κύκλο γονιδίων (42). Το ctDNA φέρει συγκεκριμένες μεταλλάξεις που αφορούν, είτε τον πρωτοπαθή όγκο, είτε τις μεταστατικές εστίες. Κάποιες από αυτές τις μεταλλάξεις σχετίζονται με την ανάπτυξη συγκεκριμένων κλώνων, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στην θεραπεία. Συνεπώς, η ποιοτική ανάλυση του ctDNA, σε τακτά χρονικά διαστήματα αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της ανταπόκρισης στη θεραπεία, καθώς αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα του προφίλ των μεταλλάξεων και της ετερογένειας του όγκου τη δεδομένη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας. Μια άλλη θεωρία είναι ότι, μέσω της μεταφοράς ογκογονιδίων σε υγιή κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική διαφοροποίησή τους και εν τέλει, στην καρκινογένεση (43,82).

Δεδομένου του υψηλού βαθμού θραυσματοποίησης του ctDNA και της χαμηλής συγκέντρωσής του αποτελεί μεγάλη πρόκληση για την απομόνωσή του. Επομένως το πλάσμα έχει δειχθεί ότι υπερτερεί ως δείγμα για την απομόνωση, συγκριτικά με τον ορό. Ένα από τα πλεονεκτήματα της ανάλυσης του ctDNA που του προσδίδει ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον είναι η ευκολία συλλογής και ανάλυσης του πλάσματος χωρίς να απαιτείται το στάδιο του εμπλουτισμού για την απομόνωση σπάνιων κυτταρικών πληθυσμών όπως στην περίπτωση των CTCs. Ωστόσο, ο χρόνος ημιζωής του ctDNA είναι μικρός και αποβάλλεται από τον οργανισμό μέσω του ήπατος και των νεφρών. Για αυτό απαιτείται ειδικός χειρισμός του δείγματος και άμεση διακομιδή στο εργαστήριο. Επίσης, το κλάσμα του ctDNA είναι μικρό και το υπόβαθρο του cfDNA εξαιρετικά υψηλό, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του στο αίμα να είναι χαμηλή. Άρα, η ανίχνευση και ανάλυση του ctDNA απαιτεί την ανάπτυξη ιδιαίτερα ευαίσθητων και ειδικών μεθοδολογιών (47,49).



Σχήμα 2.5 Σχηματική απεικόνιση της κλινικής σημασίας του ctDNA στην Υγρή Βιοψία, των τεχνικών ανίχνευσής του στο πλάσμα και των γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων του καρκίνου που μπορούν να μελετηθούν (42)

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next-Generation Sequencing, NGS), η αλληλούχηση όλων των εξονίων του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing, WES) και η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS), καθώς και τεχνικές ποσοτικής qPCR, αποτελούν μεθόδους αναφοράς για την ανίχνευση μεταλλάξεων (83). Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνολογίες υψηλής ευαισθησίας όπως η ddPCR, η οποία παρουσιάζει εξαιρετικά

χαμηλό όριο ανίχνευσης δίνοντας τη δυνατότητα απόλυτης ποσοτικοποίησης, όπως αναφέρεται σε προηγούμενο υποκεφάλαιο. Στον αντίποδα, οι τεχνικές ανίχνευσης της μεθυλίωσης περιλαμβάνουν την ειδική για μεθυλίωση PCR (Methylation-specific PCR, MSP) (46).

Η κλινική εφαρμογή της ανάλυσης του ctDNA και η ενσωμάτωση της υγρής βιοψίας στην κλινική πράξη παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες ως προς την προτυποποίηση σε προ-αναλυτικό και αναλυτικό επίπεδο για την παροχή αξιόπιστων και επαναλήψιμων αποτελεσμάτων. Στο πλαίσιο αυτό, κινούνται φορείς, όπως η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Υγρής Βιοψίας (European Liquid Biopsy Society, **ELBS**) και η Διεθνής Ένωση Προτυποποίησης στην Υγρή Βιοψία (International Liquid Biopsy Standardization Alliance, **ILSA**) (84-87).

2.5 Σύγκριση CTCs και cfDNA

Τόσο η ανάλυση των CTCs, όσο και η ανάλυση του cfDNA αποτελούν τους δύο βασικούς πυλώνες της υγρής βιοψίας και ως εκ τούτου, η κλινική εφαρμογή τους έχει παρουσιάσει σημαντική πρόοδο τα τελευταία χρόνια. Επί του πρακτέος, οι αναλύσεις του cfDNA απαιτούν μικρότερη ποσότητα αίματος και είναι πιο εύκολη η ποσοτικοποίησή σε σχέση με τα CTCs. Επίσης, η απομόνωση των CTCs είναι αρκετά πιο περίπλοκη λόγω της σπανιότητάς τους, ενώ για την απομόνωση του cfDNA δεν υφίσταται κάποια πρότυπη μέθοδος. Ωστόσο, η ανάλυση των CTCs επιτρέπει την ανάλυση ακόμα και σε επίπεδο μονήρων κυττάρων, καθιστώντας εφικτή την μελέτη που μοριακού προφίλ τους σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεϊνών, παρέχοντας την ευκαιρία λειτουργικής μελέτης επιλογής εξατομικευμένης θεραπείας. Ποσοτικά, αυξημένα επίπεδα CTCs είναι ένας δείκτης ενεργούς μετάστασης, ενώ αύξηση στα επίπεδα του cfDNA υποδηλώνει την παρουσία του όγκου χωρίς τη δυνατότητα διεξαγωγής συμπερασμάτων για το αν υφίσταται μετάσταση. Η αξιολόγηση του αριθμού των CTCs στην κυκλοφορία, πριν και μετά τη θεραπεία, μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία μετάστασης, ενώ η αξιολόγηση της συγκέντρωσης του cfDNA μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για προληπτικό έλεγχο ή πρόωμη διάγνωση και συνιστά μια πληρέστερη εικόνα της ετερογένειας του όγκου και του προφίλ των μεταλλάξεων. Η μελέτη των CTCs και του cfDNA είναι

συμπληρωματικές και απαραίτητες για έναν πιο ολοκληρωμένο μοριακό χαρακτηρισμό του καρκίνου και την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή του (46).

2.6 Υγρή Βιοψία στο MTC

Τα τελευταία χρόνια, ένα όλο και αυξανόμενο φορτίο πληροφοριών συσσωρεύεται για τη χρήση της υγρής βιοψίας σε ασθενείς με MTC για διάγνωση, πρόγνωση, εκτίμηση του όγκου και παρακολούθηση της θεραπείας. Πράγματι, η υγρή βιοψία μπορεί να αποδειχθεί ένα εργαλείο ζωτικής σημασίας στη συμβατική ως τώρα διαχείριση κακοηθειών του θυρεοειδούς (88).

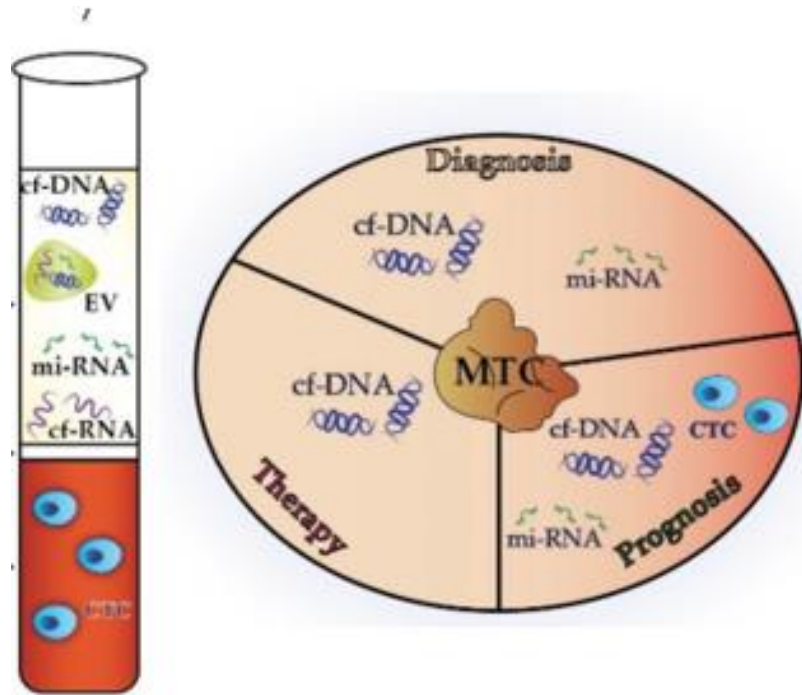
Σε έρευνα που διεξήχθη, η ανάλυση των CTCs απέδειξε το ρόλο τους στην πρόγνωση σε ένα σύνολο ασθενών με MTC και σε πρόσφατη δημοσίευση, CTCs τα οποία βρέθηκαν θετικά στην καλσιτονίνη τακτοποιήθηκαν στο αίμα 15 ασθενών, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αφαίρεση του θυρεοειδούς αδένος 12 χρόνια μετά την αρχική διάγνωση. Σημειώνεται ότι, σε 3 ασθενείς παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα CTCs στην κυκλοφορία τους, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα καλσιτονίνης στο αίμα τους παρέμεναν χαμηλά υποδηλώνοντας μία ενδεχόμενη κακή πρόγνωση (89). Παλαιότερες έρευνες υποδηλώνουν ότι, η έκφραση της κυτταροκερατίνης CK-20 και της GRP (Growth-Regulated Protein) μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση των CTCs που προέρχονται από MTC με καλή ευαισθησία και ειδικότητα (90). Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί η καταμέτρηση CTCs με το σύστημα CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems, Italy), η οποία παρέχει τη δυνατότητα πρόβλεψης του συνολικού χρόνου επιβίωσης ασθενών σε προχωρημένο στάδιο της νόσου (91,92), ενώ η ταυτοποίηση περισσότερων των 5 CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο MTC συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση (93).

Ο ρόλος του cfDNA είναι εξίσου σημαντικός για την πρόγνωση, διάγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία ασθενών με MTC. Το γεγονός αυτό υποστηρίζουν αποτελέσματα έρευνας, κατά τα οποία, η παρουσία μεταλλάξεων του *RET* και τα επίπεδα της καλσιτονίνης στον ορό 58 ασθενών με MTC παρουσίασαν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα cfDNA τα οποία ανιχνεύτηκαν. Επομένως, το cfDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάγνωση MTC τη στιγμή που οι συμβατικές

παράμετροι, όπως η καλσιτονίνη και οι μεταλλάξεις του *RET* είναι αρνητικές (94). Ομοίως, η ανίχνευση της μετάλλαξης *RET*-M918T στο cfDNA φαίνεται να έχει προγνωστική σημασία σε μεγαλύτερο βαθμό από την μέτρηση του χρόνου διπλασιασμού της καλσιτονίνης και να σχετίζεται με μικρότερο συνολικό διάστημα επιβίωσης (95). Επίσης, ύστερα από ανάλυση στο cfDNA, βρέθηκε ότι οι μεταλλάξεις του *RET* ήταν πιο συχνές σε ασθενείς με MTC, οι οποίοι παρουσίαζαν μετάσταση, υψηλότερο φορτίο νόσου και προόδου νόσου και συνεπώς, χειρότερη πρόγνωση (96). Πρόσφατα, μεταλλάξεις του *RET* ανιχνεύτηκαν σε επίπεδο ανάλυσης cfDNA σε ασθενείς που εμφάνισαν πρόοδο νόσου, ενώ στην αρχή παρουσίασαν θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με selpercaptinib. Στην εν λόγω μελέτη, η μετάλλαξη *RET*-V804M ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς πριν την έναρξη της θεραπείας. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας τα επίπεδα της μειώθηκαν και στη συνέχεια επανεμφάνισαν αύξηση μαζί με την εμφάνιση νέας μετάλλαξης, της *RET*-G810 στην αρχή της προόδου νόσου. Η εμφάνιση αυτών των μεταλλάξεων συσχετίστηκε με την εμφάνιση αντίστασης στη θεραπεία με selpercaptinib. Στο πλαίσιο αυτό το ctDNA μπορεί να διευκολύνει την παρακολούθηση της θεραπείας και την πρόωπη ταυτοποίηση ασθενών που παρουσιάζουν αντίσταση στην θεραπεία και χρήζουν αλλαγής της (97).

Τέλος, τα miRNAs μπορούν ευκόλως να απομονωθούν και να μελετηθούν σε ασθενείς με MTC και τα επίπεδά τους σχετίζονται με τα κλινοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά και την πρόγνωση. Σε έρευνα κατά την οποία μελετήθηκε η έκφραση mi-RNAs στον ορό 15 ασθενών με επιθετικό MTC, βρέθηκε ότι το κυκλοφορούν mi-RNA-222-3p και το mi-RNA-17-5p ήταν σημαντικά αυξημένα και διακρίνουν τους ασθενείς με MTC από εκείνους με καλοήθεια θυρεοειδούς (98). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση 51 miRNAs, τα οποία διαφοροποιούνται στην έκφραση μεταξύ ασθενών σε προχωρημένο στάδιο και σε ασθενείς που παρουσιάζουν μετάσταση. Μεταξύ αυτών των miRNAs, τα επίπεδα έκφρασης του mi-RNA-375 ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με ενεργή νόσο, σε σχέση με εκείνους που ήταν θεραπευμένοι. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του συσχετίστηκε με την παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης και μειωμένο χρόνο συνολικής επιβίωσης, αλλά όχι με την ανταπόκριση στη θεραπεία με vandetanib (99). Άλλη μελέτη αξιολόγησε τα επίπεδα του mi-RNA-144 και του mi-RNA-34a στο πλάσμα σε 25 ασθενών που παρουσίαζαν μετάλλαξη στο γονίδιο *RET* και 25

ασθενών που δεν παρουσίαζαν μετάλλαξη στο *RET*, και στη συνέχεια, τα ευρήματα σχετίστηκαν με δείγματα υγιών δοτών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα επίπεδα των mi-RNA-144 και mi-RNA-34a στο αίμα ήταν υψηλότερα στους ασθενείς και ειδικότερα, σε αυτούς που εμφάνιζαν τη μετάλλαξη, σε σχέση με τους υγιείς. Ωστόσο, τα δεδομένα αυτά δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, ώστε να συσχετιστούν με την πρόγνωση ασθενών με MTC (100).



Σχήμα 2.6 Εφαρμογές της υγρής βιοψίας στο MTC (88).

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs στο σποραδικό Μυελοειδές Καρκίνωμα του Θυρεοειδούς (Medullary Thyroid Cancer-MTC) σε ασθενείς που παρουσίαζαν απομακρυσμένες μεταστάσεις ή/και βιοχημική ανοχή νόσου. Η απομόνωση των CTCs πραγματοποιήθηκε μέσω του EpCAM θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού και εν συνεχεία, συγκρίθηκε με το σύστημα μικροροών ParsortixTM (ANGLE pI, Guildford, UK), κατά το οποίο ο εμπλουτισμός των CTCs πραγματοποιείται με βάση το μέγεθος και την πλαστικότητα τους. Μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών *CK-8*, *CK-18* και *CK-19*, καθώς σε προηγούμενες μελέτες, γίνεται λόγος για μεικτούς φαινοτύπους των CTCs σε ασθενείς με σποραδικό MTC. Επιπροσθέτως, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το φαινόμενο EMT είναι έντονο σε μεταστατικό MTC και για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου του μεσεγχυματικού δείκτη *VIMENTIN* και του γονιδίου του υποδοχέα των χημειοκινών *CXCR4*, εφόσον φαίνεται να εμπλέκεται στην EMT. Τέλος, μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου της καλσιτονίνης (*CALCA*), καθώς αποτελεί μία ιστοειδική πρωτεΐνη και τον βασικό βιοδείκτη στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Η μελέτη της έκφρασης των παραπάνω δεικτών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική RT-qPCR. Οι αναλύσεις στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά από χειρουργική αφαίρεση του θυρεοειδούς αδένα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κλινικά Δείγματα

3.1.1 Ασθενείς με MTC

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα ασθενών με σποραδικό MTC, οι οποίοι συμμετείχαν στα πλαίσια Κλινικής Μελέτης με κύριο ερευνητή τον Ενδοκρινολόγο Ιατρό κ. Γεώργιο Σημιαϊκή (Επιμελητής Ενδοκρινολογικού Τμήματος - Επιστημονικά Υπεύθυνος Ιατρείου Νεοπλασιών Θυρεοειδούς, 401 ΓΣΝΑ). Ο αριθμός των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν 13, με επιβεβαιωμένο, ιστολογικά και κυτταρολογικά, MTC. Όλοι οι ασθενείς έδωσαν ενυπόγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους στην κλινική μελέτη.

3.1.2 Υγιείς Αιμοδότες

Κατά τη διεξαγωγή της κλινικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από 17 υγιείς εθελοντές αιμοδότες, ως δείγματα ελέγχου για όλες τις πειραματικές διαδικασίες που διεξήχθησαν, κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και τα οποία αναλύθηκαν κατά τρόπο πανομοιότυπο με τα δείγματα των ασθενών.

3.2 Συλλογή Περιφερικού Αίματος

Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν στο Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών 401-ΓΣΝΑ (Λεωφ. Παναγιώτη Κανελλόπουλου, Αθήνα 115 25) και στο Διαγνωστικό Κέντρο ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ (Ιλίσίων 3-5, Αθήνα 115 28)

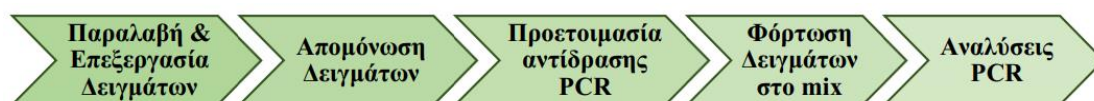
Κατά την αιμοληψία τόσο στους ασθενείς, όσο και στους υγιείς δότες, τα πρώτα 5mL περιφερικού αίματος απορρίφθηκαν, με σκοπό την αποφυγή επιμόλυνσης του δείγματος από επιδερμικά επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία ενδεχομένως θα επηρέαζαν τα αποτελέσματα των αναλύσεων. Έπειτα συλλέχθηκαν 20mL περιφερικού αίματος από κάθε ασθενή και 10mL από κάθε υγιή αιμοδότη, σε σωληνάρια με αντιπηκτικό K₂EDTA. Τα δείγματα μετά την αιμοληψία μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο

Ανάλυσης Κυκλοφορούντων Καρκινικών Κυττάρων (ACTC Lab) του Τομέα Αναλυτικής Χημείας, στο Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α, άμεσα και υπό συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος, μέσω πιστοποιημένων εταιρειών μεταφοράς βιολογικών δειγμάτων, ενώ κατά την άφιξη και παραλαβή τους από το εργαστήριο, πραγματοποιήθηκε, άμεσα, κατεργασία για την ανάλυσή τους. Έτσι, έγινε ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων με σκοπό την ελαχιστοποίηση πιθανών προ-αναλυτικών σφαλμάτων.

3.3 Κατεργασία και Ανάλυση των δειγμάτων

3.3.1 Εφαρμογή διαδικασιών από το προ-αναλυτικό έως και το αναλυτικό στάδιο

Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών, από την παραλαβή και επεξεργασία των δειγμάτων έως και την ανάλυσή τους, ακολουθούνται αυστηρά πρωτόκολλα και οδηγίες εργασίας για τη διασφάλιση της ποιότητας των αναλύσεων και των ορθών αποτελεσμάτων, όπως ακριβώς ορίζει το πρότυπο ISO 15189:2012 για το οποίο είναι διαπιστευμένο το Εργαστήριο. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι σε όλα τα προ-αναλυτικά στάδια ακολουθούνται οι απαραίτητες διαδικασίες για την αποφυγή επιμολύνσεων, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά τα τελικά αποτελέσματα. Για αυτόν το λόγο, το Εργαστήριο διαθέτει ξεχωριστούς χώρους προετοιμασίας για κάθε στάδιο (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1 Τα διαδοχικά στάδια της κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων που πραγματοποιούνται σε ξεχωριστούς εργαστηριακούς χώρους

Οι διαδικασίες απομόνωσης ολικού RNA, η προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης PCR, καθώς και η φόρτωση των δειγμάτων στα σωληνάρια με το μίγμα της αντίδρασης, πραγματοποιούνται η κάθε μία εντός ξεχωριστών ειδικών θαλάμων (PCR hood) (Σχήμα 3.2). Πριν από κάθε διαδικασία, οι θάλαμοι και τα απαραίτητα αναλώσιμα, αποστειρώνονται με διάλυμα χλωρίνης ~10% και ακτινοβολούνται με UV ακτινοβολία για επαρκή χρόνο. Για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης, χρησιμοποιείται ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control) σε κάθε πειραματικό

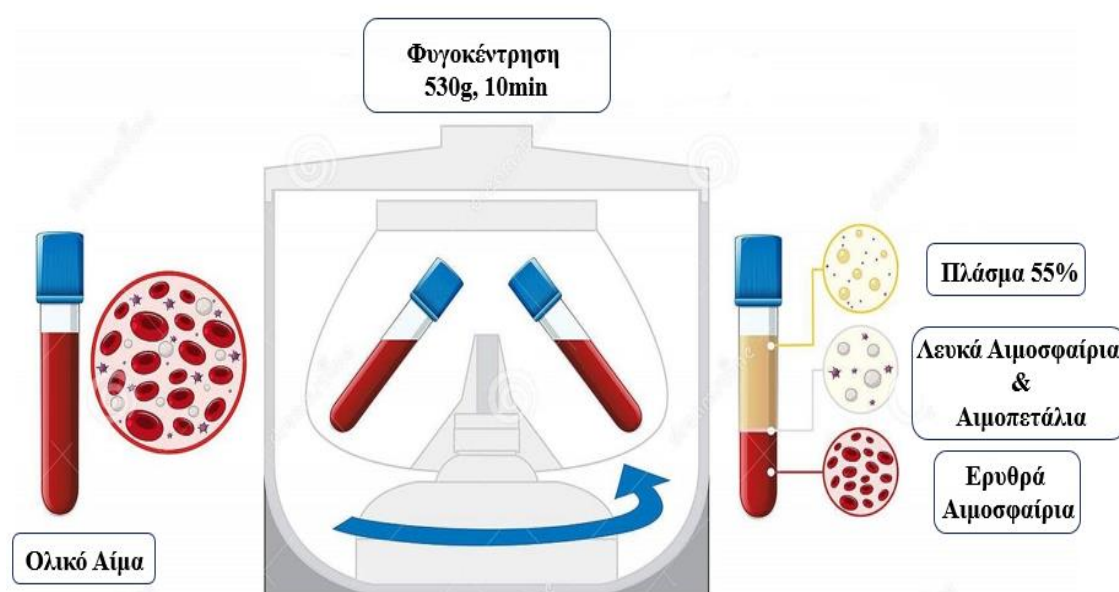
στάδιο, το οποίο περιλαμβάνει μόνο ποσότητα του μίγματος της αντίδρασης, απουσία γενετικού υλικού από τα δείγματα.



Σχήμα 3.2 Θάλαμος Προετοιμασίας αντίδρασης PCR (PCR-hood)

3.3.2 Απομόνωση πλάσματος από περιφερικό αίμα

Αμέσως μετά την παραλαβή των δειγμάτων, το αίμα μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Falcon και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $500\times g$ για 10min. Το υπερκείμενο πλάσμα απομονώνεται και μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο (Falcon 15mL), όπου πραγματοποιείται και δεύτερη φυγοκέντρηση στα $2000 \times g$ για 10min. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο καθαρό σωληνάριο (Eppendorf) και φυλάσσεται στους -70°C για μετέπειτα αναλύσεις στο πλάσμα.



Σχήμα 3.3 Σχηματική απεικόνιση απομόνωσης πλάσματος

3.3.3 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα με τη χρήση διαλύματος λύσης ερυθρών κυττάρων

3.3.3.1 Αρχή μεθόδου

Μετά την απομάκρυνση του πλάσματος, παραλαμβάνουμε το κλάσμα των έμμορφων συστατικών του αίματος. Με την προσθήκη διαλύματος λύσης των ερυθρών κυττάρων και, γενικότερα, των απύρηνων κύτταρων, παραλαμβάνουμε το κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων. Το διάλυμα λύσης των ερυθρών κυττάρων είναι ένα υπερτονικό διάλυμά, σε σχέση με το ενδοκυττάριο περιβάλλον των κυττάρων αυτών και ως εκ τούτου, μέσω ωσμωτικής πίεσης λύεται η κυτταρική μεμβράνη και το κύτταρο καταστρέφεται.

Αντιδραστήρια/υλικά

Red Cell Lysis (RCL), pH 7,3

- 775mmol/dL NH_4Cl
- 50 mmol/dL KHCO_3
- 0,5 mmol/dL EDTA

Πριν την έναρξη της πειραματικής πορείας της διαδικασίας απομόνωσης πραγματοποιείται πεχαμέτρηση του διαλύματος RCL (pH=7,3)

3.3.3.2 Πειραματική πορεία

- Μετά την φυγοκέντρηση και την απομάκρυνση του πλάσματος, στα κύτταρα που έχουν καθιζάνει προτίθεται, μέχρι την ένδειξη των 45 mL, διάλυμα RCL, ακολουθεί περιοδική ανακίνηση και επώαση για 20min.
- Φυγοκέντρηση στα $530 \times g$ για 20min και απόχυση του υπερκειμένου με φορά αντίθετη από εκείνη που έχουν καθιζάνει τα κύτταρα.
- Προσθήκη στην πελέτα 1mL διαλύματος RCL, διαλυτοποίηση με τη χρήση πιπέτας και συμπλήρωση μέχρι την ένδειξη των 30mL.
- Επώαση για 10min και φυγοκέντρηση στα $530 \times g$ για 10min.

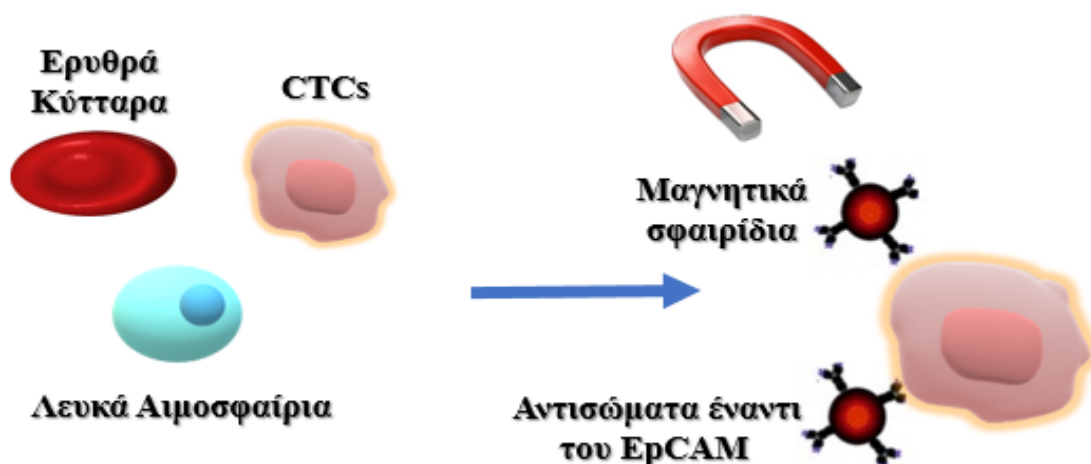
- Απόχυση κατά τον ίδιο τρόπο και προσθήκη 1mL διαλύματος RCL για διαλυτοποίηση.
- Συμπλήρωση με RCL μέχρι την ένδειξη των 10mL και επώαση για 10min.
- Φυγοκέντρωση στα $530 \times g$ για 10min.
- Απόχυση του υπερκειμένου κατά τον ίδιο τρόπο και προσθήκη 4mL διαλύματος έκπλυσης και διαλυτοποίηση της πελέτα.

3.3.4 Απομόνωση των CTCs με χρήση EpCAM-θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού

3.3.4.1 Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στο διαχωρισμό των θετικών σε EpCAM κυττάρων από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος με τη χρήση παραμαγνητικών ανοσοσφαιριδίων επικαλυμμένων με anti-EpCAM αντισώματα Dynabeads Epithelial Enrich (Dyna, Oslo, Norway). Τα σφαιρίδια Dynabeads Epithelial Enrich είναι ομοιόμορφα, παραμαγνητικά σφαιρίδια από πολυστυρένιο (4.5 μm σε διάμετρο) καλυμμένα με ένα IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (mAb Ber-EP4) ειδικό για δύο γλυκοπολυπεπτιδικά μεμβρανικά αντιγόνα (34 και 39 kDa) του επιθηλιακού δείκτη EpCAM, τα οποία εκφράζονται στους περισσότερους φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ανθρώπινους επιθηλιακούς ιστούς. Το mAb Ber-EP4 είναι τοποθετημένο πάνω σε ένα δευτερογενές αντίσωμα για βέλτιστο προσανατολισμό του Ber-EP4 πάνω στα σφαιρίδια. Αυτό το προϊόν είναι ειδικά σχεδιασμένο για τον εμπλουτισμό κυκλοφορούντων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων από ανθρώπινο περιφερικό αίμα. Το εναιώρημα των κυττάρων του αίματος επωάζεται με τα παραμαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads με αποτέλεσμα τα επιθηλιακά κύτταρα να προσδένονται στα αντισώματα που υπάρχουν πάνω σε αυτά και, ακολούθως, αυτά να απομονώνονται και να εκπλένονται με τη χρήση μαγνήτη, ενώ με εκπλύσεις τα μη προσδεδεμένα, στα σφαιρίδια, κύτταρα απομακρύνονται. Τα εμπλουτισμένα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε διάφορες ερευνητικές εφαρμογές, όπως απομόνωση γενωμικού DNA, ολικού RNA και ακολούθως να πραγματοποιείται

ενίσχυση με PCR. Σημειώνεται ότι, τα σφαιρίδια είναι αδρανή και δεν παρεμβαίνουν σε τέτοιες ακόλουθες διαδικασίες.



Σχήμα 3.4 Εμπλουτισμός κυκλοφορούντων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων από ανθρώπινο περιφερικό αίμα με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό

Αντιδραστήρια/υλικά

- Σφαιρίδια Dynabeads Epithelial Enrich (Dyna, Norway) σε μορφή εναιωρήματος με συγκέντρωση 4×10^8 σφαιρίδια /mL PBS (pH 7,4) το οποίο περιέχει επίσης 0,1% BSA, και 0,02% νατραζίδιο (NaN_3) ως συντηρητικό.
- Διάλυμα έκπλυσης (PBS, το οποίο περιέχει επίσης 1% FBS, και 0,6% κιτρικό νάτριο).
- Μαγνητική συσκευή διαχωρισμού Dynal MPC.

3.3.4.2 Πειραματική Πορεία

Προετοιμασία των σφαιριδίων Dynabeads Epithelial Enrich

- Κατά τη διάρκεια της τελευταίας φυγοκέντρωσης κατά τη διαδικασία απομόνωσης μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα, μεταφέρω 25,0μL (1×10^7 σφαιρίδια) από το εναιώρημα των σφαιριδίων για κάθε 1,00mL κυτταρικού εναιωρήματος σε καθαρό tube Eppendorf και ακολουθεί έκπλυσή τους με 1mL διαλύματος έκπλυσης με τη χρήση μαγνήτη Dynal MPC.

- Προσθήκη από 1 mL δείγματος σε κάθε tube, απομάκρυνση από τον μαγνήτη και ανάδευση με πιπέτα.
- Τοποθέτηση περιστροφικό αναδευτήρα (Dyna) στους 4 °C για 30 min, ώστε να λάβει χώρα η πρόσδεση των καρκινικών κυττάρων στα σφαιρίδια.
- Τοποθέτηση των σωληναρίων στο μαγνήτη για 3 min στους 4 °C, ώστε τα μαγνητικά σφαιρίδια, στα οποία έχουν προσδεθεί τα κύτταρα, να μετακινηθούν προς το τοίχωμα του σωληναρίου στο οποίο βρίσκονται.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου διαλύματος, προσεκτικά, με τη χρήση πιπέτας, ώστε να μην διαταραχθεί το αδιάλυτο των σφαιριδίων. Στο υπερκείμενο περιέχονται όλα τα φυσιολογικά περιφερειακά κύτταρα του αίματος και αποτελούν το κλάσμα των PBMCs του δείγματος.
- Προστίθενται 1mL διαλύματος έκλυσης (4°C), αφαιρούνται τα σωληνάρια από το μαγνήτη και αναδιαλύονται τα σύμπλοκα κυττάρων–σφαιριδίων, προσεκτικά, με τη χρήση πιπέτας. Επανατοποθέτηση στο μαγνήτη για άλλα 3min.
- Μετά το πέρας των 3min απορρίπτουμε το υπερκείμενο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται, συνολικά, 3 φορές.
- Αφού έχουμε απορρίψει το υπερκείμενο από την τελευταία έκπλυση, πραγματοποιείται προσθήκη 1mL TRIZOL LS (Invitrogen, USA) και ακολουθεί αναδιαλυτοποίηση με την πιπέτα, ώστε να επιτευχθεί πλήρης λύση των κυττάρων. Ακολουθεί μεταφορά όλης της ποσότητας στο επόμενο σωληνάριο.
- Συλλογή όλης της ποσότητας στο τελευταίο σωληνάριο και επώαση για 1min εκτός μαγνήτη.
- Επανατοποθέτηση του σωληναρίου στο μαγνήτη και επώαση για 3min.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου διαλύματος προσεκτικά με τη χρήση πιπέτας ώστε να μην διαταραχθεί το αδιάλυτο των σφαιριδίων και απόχυση σε νέο σωληνάριο, τύπου Eppendorf. Στο υπερκείμενο περιέχονται τα κύτταρα μετά από λύση, που ήταν προσδεμένα στα μαγνητικά σφαιρίδια.

- Αποθήκευση του δείγματος στους -70°C προς μελλοντική απομόνωση του RNA και DNA.

Για το PBMC κλάσμα: Μετά την απομάκρυνση των σωληνάρων από τον περιστροφικό αναδευτήρα και τοποθέτηση τους στο μαγνήτη για 3 min, συλλέγεται το υπερκείμενο από ένα σωληνάριο. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 530 × g για 10 min, απόχυση του εναιωρήματος και επαναδιαλυτοποίηση της κυτταρικής πελέτας σε 1mL διαλύματος TRIzol LS (Invitrogen, USA). Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στα ακόλουθα σημεία:

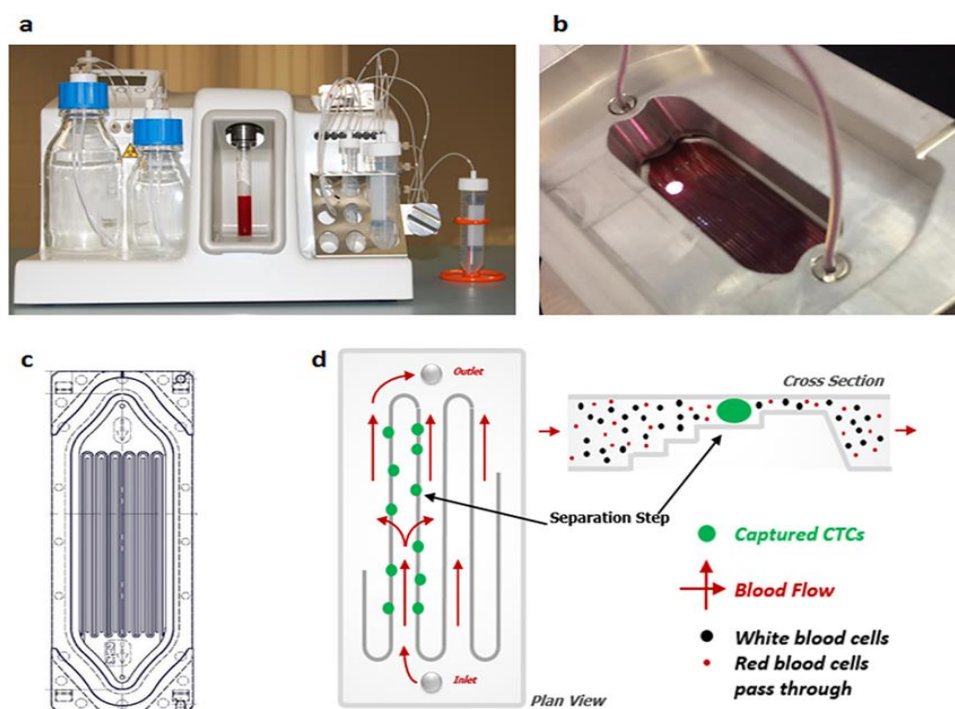
- Κατά τη διάρκεια των διαδικασιών επώασης και έκλυσης, είναι πολύ σημαντικό να διατηρείται κρύο το εναιώρημα των κυττάρων σε χαμηλή θερμοκρασία (2-8°C) αλλά και το διάλυμα έκλυσης, ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη μη ειδική σύνδεση φαγοκυττάρων – που φέρουν Fc υποδοχείς – στα μονοκλωνικά αντισώματα που φέρουν τα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Ο χειρισμός των προσδεδεμένων κυττάρων στα σφαιρίδια πρέπει να γίνεται με πάρα πολλή προσοχή και έτσι το περιττό πιετάρισμα πρέπει να αποφεύγεται.

3.3.5 Απομόνωση CTCs με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK)

3.3.5.1 Αρχή μεθόδου

Το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) είναι η πρώτη εγκεκριμένη από τον FDA συσκευή για τον εμπλουτισμό των CTCs στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού και αποτελεί ένα σύστημα διαχωρισμού των κυττάρων ανεξάρτητα από την έκφραση επιθηλιακών δεικτών στην κυτταρική τους μεμβράνη. Αντιθέτως, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση τις φυσικές ιδιότητες των κυττάρων και όχι τα χημικά/βιολογικά τους χαρακτηριστικά, προσφέροντάς ένα εξαιρετικό πλεονέκτημα, εξέχουσας σημασίας, καθώς το φαινόμενο EMT διαδραματίζει βασικό ρόλο στη διαδικασία της μετάστασης. Κύτταρα που διαφεύγουν από τον πρωτοπαθή όγκο και διέρχονται στην κυκλοφορία έχουν χάσει μέρος του επιθηλιακού τους χαρακτήρα και μεταβαίνουν στην μεσεγχυματική τους κατάσταση εκφράζοντας μεσεγχυματικούς

δείκτες. Σε ορισμένους τύπους καρκίνου, το φαινόμενο EMT είναι αρκετά έντονο και επομένως η απομόνωση των CTCs με ανοσομαγνητικές τεχνικές καθίσταται ακατάλληλη αφού ο EpCAM αρνητικός υποπληθυσμός διαφεύγει. Το σύστημα Parsortix χρησιμοποιεί την τεχνολογία μικροροής με τη χρήση κασέτας για την απομόνωση και στη συνέχεια, τον εμπλουτισμό των CTCs, τα οποία παγιδεύονται στην κασέτα εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους τους και της δυσμορφίας τους, συγκριτικά με τα υπόλοιπους πληθυσμούς κύτταρων του αίματος. Η κασέτα χαρακτηρίζεται από μία δομή διαχωρισμού που αποτελείται από πολλαπλά κανάλια. Τα κύτταρα διέρχονται από τα κανάλια αυτά και καταλήγουν σε μια τερματική διχάλα διαμέτρου 6,5μm, από την οποία το μεγαλύτερο ποσοστό των περιφερειακών κυττάρων του αίματος εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους (δεδομένου ότι η μέση διάμετρος ενός καρκινικού κυττάρου είναι 8μm) διέρχονται χωρίς να παγιδεύονται. Αντιθέτως, κύτταρα, των οποίων το μέγεθος και η ακαμψία είναι απαγορευτικά για τη διάμετρο των 6,5μm, συγκρατούνται στην κασέτα. Στο τέλος, με αντιστροφή της ροής (harvest), τα CTCs συλλέγονται σε ρυθμιστικό διάλυμα (63).



Σχήμα 3.5 Διάταξη Συσκευής Parsortix™ (ANGLE-plc, Guildford, UK) α) κασέτα διαχωρισμού, β) εξάρτημα τοποθέτησης κασέτας, γ) ροή αίματος μέσω της κασέτας, δ) εσωτερική διάταξη της κασέτας και αναπαράσταση της ροής των κυττάρων του αίματος εντός της κασέτας, στ) αναπαράσταση των παγιδευμένων κυττάρων εντός της κασέτας (63)

Αντιδραστήρια/υλικά

- Διάλυμα έκπλυσης (PBS, το οποίο περιέχει επίσης 1% FBS, και 0,6% κιτρικό νάτριο)
- Διάλυμα NaClO (10%)
- Διάλυμα έκπλυσης Decon Decomatic 10% (περιέχει ανιοντικούς και μη ανιοντικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες, σταθεροποιητικούς παράγοντες, μη φωσφορούχα απορρυπαντικά, αλκάλια και παράγοντες απομόνωσης)
- Απόλυτη αιθανόλη (100% v/v)
- Κασέτα διαχωρισμού
- Κασέτα έκπλυσης
- Σωληνάρια τύπου Falcon των 50mL
- Σωληνάρια Συλλογής τύπου Eppendorf των 2,0mL

3.3.5.2 Πειραματική Πορεία

Μετά την απομόνωση του πλάσματος από το περιφερικό αίμα, όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 3.3.2, πραγματοποιείται προσθήκη στο εναπομείναν κλάσμα του αίματος ποσότητας διαλύματος PBS, ίση σε όγκο, με την ποσότητα του πλάσματος που απομακρύνθηκε και ακολουθεί απλή ανάδευση με τη χρήση πιπέτας.

Έκπλυση

- Έλεγχος της στάθμης των αντιδραστηρίων στη συσκευή πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.
- Έκπλυση της κασέτας διαχωρισμού με απόλυτη αιθανόλη (Priming).
- Τοποθέτηση του δείγματος στην ειδική θέση στη συσκευή και επιλογή του κατάλληλου προγράμματος (S99F), ώστε να ξεκινήσει η διέλευση του αίματος από την κασέτα και να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των κυττάρων.
- Μετά το πέρας του διαχωρισμού (2h) και τη διέλευση ολόκληρης της ποσότητας του δείγματος, απομακρύνουμε την κασέτα διαχωρισμού και τοποθετούμε την κασέτα καθαρισμού, επιλέγοντας το αντίστοιχο πρόγραμμα

έκπλυσης (CT2) του συστήματος. Το στάδιο της έκπλυσης πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος Decon Decomatic.

- Επανατοποθέτηση της κασέτας διαχωρισμού και εφαρμογή ανάστροφης ροής (harvest).
- Συλλογή CTCs σε 200 μ L εναιωρήματος PBS σε σωληνάριο συλλογής τύπου Eppendorf των 2,0 mL.
- Έκπλυση του συστήματος με χρήση της κασέτας καθαρισμού, ώστε να χρησιμοποιηθεί εκ νέου η συσκευή.
- Προσθήκη 1mL TRIzol LS (Invitrogen, USA) και ακολουθεί αναδιαλυτοποίηση με την πιπέτα, ώστε να επιτευχθεί πλήρης λύση των κυττάρων.

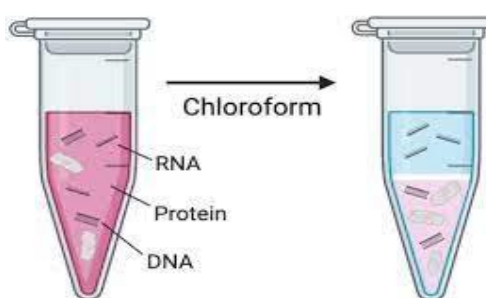
3.3.6 Απομόνωση ολικού RNA από το κλάσμα των CTCs με χρήση του αντιδραστήριου TRIzol™ LS (Invitrogen, USA)

Το αντιδραστήριο TRIzol™ LS (Invitrogen, USA) χρησιμοποιείται για την απομόνωση ολικού RNA από τα CTCs που απομονώθηκαν, τόσο με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, όσο και με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK). Πρόκειται για ένα μονοφασικό διάλυμα το οποίο αποτελείται από φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη. Κατά τη διάρκεια της λύσης, διατηρεί την ακεραιότητα του RNA, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί λύση των κυττάρων και διαλυτοποίηση των συστατικών του. Συγκεκριμένα, η ισοθειοκυανική γουανιδίνη, η οποία είναι ένας ισχυρός χαοτροπικός παράγοντας, συμβάλλει στη λύση των κυττάρων, απομακρύνει τις πρωτεΐνες από τα σύμπλοκά τους με το RNA και ταυτόχρονα αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες (RNases) που απελευθερώνονται από οργανίδια, όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα, επιτρέποντας την απομόνωση μη αποικοδομημένου RNA. Ακολουθεί προσθήκη χλωροφορμίου, και κατόπιν φυγοκέντρησης, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός της υδατικής από την οργανική φάση. Το DNA παραμένει στην οργανική φάση (ισοθειοκυανική γουανιδίνη), ενώ το RNA στην υδατική (χλωροφόρμιο-φαινόλη), ως πιο πολικό μόριο, καθότι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των ελεύθερων φωσφορικών ομάδων. Στη συνέχεια, κατακρημνίζεται με την προσθήκη ισοπροπανόλης και μετά από εκπλύσεις, όπου

απομακρύνονται οι προσμίξεις, το RNA επαναδιαλυτοποιείται με την προσθήκη νερού ελεύθερου ριβονουκλεασών (RNAase-free water) και φυλάσσεται για διάστημα, όχι μεγαλύτερο της μίας εβδομάδας, στους -80°C , ώστε να χρησιμοποιηθεί για downstream ανάλυση.

Αντιδραστήρια και Υλικά

- Αντιδραστήριο TRIzol™ LS (Invitrogen, USA)
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπυλική αλκοόλη
- 75% v/v αιθανόλη
- Διάλυμα φύλαξης RNA (κιτρικό νάτριο, pH 6,4) (ThermoFisher Scientific, USA)



***Σχήμα 3.6** Διαχωρισμός φάσεων μετά την προσθήκη χλωροφορμίου κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA*

3.3.6.1 Πειραματική πορεία

*Η πειραματική πορεία για την απομόνωση του RNA γίνεται σε δύο μέρες, καθώς περιλαμβάνει ένα στάδιο επώασης overnight.

*Η διαδικασία λαμβάνει χώρα εντός ειδικού θαλάμου PCR-hood, η οποία χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την απομόνωση του RNA, ώστε να αποφεύγονται τυχόν επιμολύνσεις από γενωμικό DNA.

Μετά την προσθήκη 1,00 mL TRIzol LS και τη λύση των κυττάρων, κατά το πέρας των διαδικασιών απομόνωσης, ακολουθεί η παρακάτω πειραματική πορεία:

- Προσθήκη 200μL χλωροφορμίου, ισχυρή ανάδευση με το χέρι για 15sec και επώαση του μίγματος για 2-3min σε θερμοκρασία δωματίου ($15-30^{\circ}\text{C}$).

- Φυγοκέντρωση του δείγματος σε 12.000×g για 15 min στους 4°C, κατά την οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των φάσεων.
- Μεταφορά της υδατικής φάσης, στην οποία περιέχεται το RNA, προσεκτικά, σε ένα καθαρό σωληνάριο τύπου Eppendorf και προσθήκη 500μL ισοπροπανόλης.
- Ήπια ανάδευση και παραμονή στους -20 °C μέχρι την επόμενη ημέρα.
- Επώαση στους 15-30°C για 10min και φυγοκέντρωση σε 12.000×g για 30min στους 4°C.
- Απόχυση του υπερκείμενου και παραλαβή του ιζήματος το οποίο αποτελεί το RNA.
- Έκπλυση του ιζήματος με 1,00mL 75% v/v αιθανόλης, ανάδευση του διαλύματος και φυγοκέντρωση στα 12.000×g για 10min στους 4°C. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται.
- Απόχυση του υπερκείμενου και φυγοκέντρωση για 30sec. Απομάκρυνση προσεκτικά με πιπέτα όλων των ιχνών αιθανόλης που έχουν παραμείνει και εξάτμιση της για 15min σε κενό αέρος.
- Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 11μL διάλυματος φύλαξης RNA (κυτρικό νάτριο, pH 6,4) (ThermoFisher Scientific, USA).

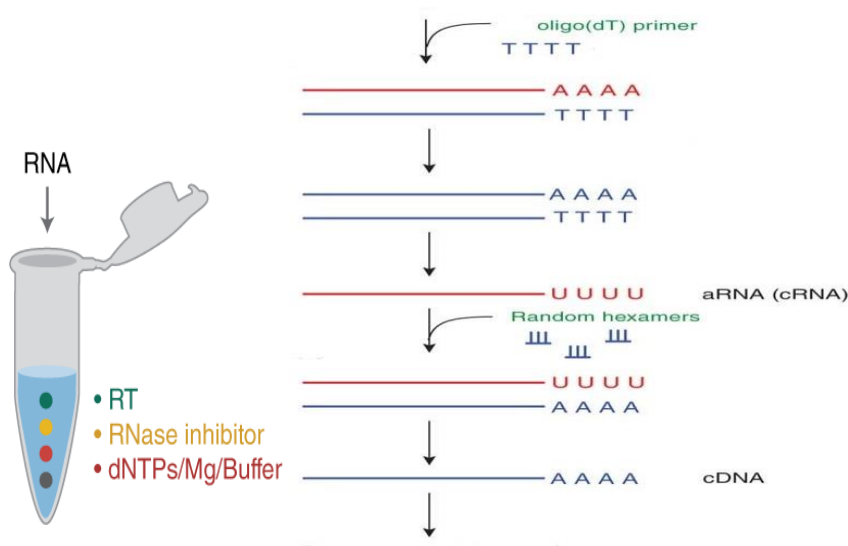
3.3.7 Σύνθεση cDNA

Το ένζυμο για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιεί ως εκμαγείο το μονόκλωνο μόριο του ώριμου αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA-mRNA) και καταλύεται από το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase-RTase).

3.3.7.1 Αρχή μεθόδου

Η σύνθεση του cDNA περιλαμβάνει την προσθήκη ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών, (oligo(dT)), οι οποίοι υβριδοποιούνται με την polyA ουρά στο 3' άκρο του μορίου mRNA, εκτίθοντας κατά αυτόν τον τρόπο, το υδρόξυ-τελικό άκρο, ώστε να δράσει η RT και να αρχίσει η σύνθεση του cDNA. Το ένζυμο προσθέτει ένα-ένα τα

νουκλεοτίδια στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA. Κάθε νουκλεοτίδιο που προστίθενται είναι συμπληρωματικό προς το αντίστοιχο νουκλεοτίδιο στην αλληλουχία του mRNA, που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο, ακριβώς, όπως κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA, με τη διαφορά ότι το RNA περιέχει ουρακίλη (U) αντί για θυμίνη (T). Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός υβριδικού δίκλωνου μορίου που αποτελείται από μία αλυσίδα RNA και μια αλυσίδα DNA. Στη συνέχεια, δρουν ριβονουκλεάσες, οι οποίες αποικοδομούν, μερικώς, την αλυσίδα RNA. Σειρά έχει η πολυμεράση, η οποία θα συνθέσει το συμπληρωματικό κλώνο DNA, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά ως εκμαγείο την μονόκλωνη αλυσίδα DNA και ως εκκινητές τα μικρά τμήματα RNA που δεν αποικοδομήθηκαν. Τέλος, η λιγάση θα συνδέσει τα τμήματα μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς και το τελικό προϊόν είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA.



Σχήμα 3.7 Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης cDNA

Αντιδραστήρια-Υλικά-Συσκευές

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (ThermoFisher Scientific, USA)

- RT Buffer Mix
- RT Enzyme mix
- Θερμικός κυκλοποιητής (Mastercycler® pro, Eppendorf)

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιείται θερμικός κυκλοποιητής (Mastercycler® pro, Eppendorf). Η μονάδα αυτή διαθέτει υποδοχείς για σωληνάρια

των 0,2mL (μέγιστος αριθμός σωληναρίων 96) και μπορεί να υποβάλλει τα δείγματα σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας σε ένα εύρος μεταξύ των +4°C και 99°C. Ο ρυθμός ψύξης και θέρμανσης ποικίλλει και προσδιορίζεται, είτε σε °C, είτε σε Fahrenheit ανά λεπτό. Το συγκεκριμένο μοντέλο διαθέτει θερμαινόμενο κάλυμμα, ώστε να αποφεύγεται η ενδεχόμενη εξάτμιση των δειγμάτων στις υψηλές θερμοκρασίες.



Σχήμα 3.8 Θερμικός κυκλοποιητής (Mastercycler® pro, Eppendorf)

3.3.7.2 Πειραματική Πορεία

Η προετοιμασία της μετατροπής του RNA σε cDNA λαμβάνει χώρα σε ειδικό χώρο (PCR hood), όπου αποστειρώνονται τα μικροσιφόνια (πιπέτες), τα σωληνάρια PCR των 200μL και τα ρύγχη πιπετών (filter tips) μέσω UV ακτινοβολίας.

Προετοιμασία των αντιδραστηρίων της αντίδρασης

- Σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 0,2mL προστίθενται:
 - 10,00μL RT Buffer Mix για κάθε μία αντίδραση μετατροπής δείγματος RNA σε cDNA
 - 1,00μL RT για κάθε μία αντίδραση μετατροπής δείγματος RNA σε cDNA
- Αναδευση του μείγματος με Vortex και spin down
- Προσθήκη από 11μL μείγματος σε σωληνάρια PCR των 0,1mL
- Προθήκη όλης της ποσότητας του δείγματος RNA

- Τα σωληνάρια μεταφέρονται στον θερμικό κυκλοποιητή (Mastercycler® pro, Eppendorf) όπου πραγματοποιείται η αντίδραση κάτω από τις εξής συνθήκες:

37 °C για 60 min (Βέλτιστη λειτουργία του ενζύμου)

4 °C για 5 min (Αδρανοποίηση του ενζύμου)

4 °C (Συντήρηση)

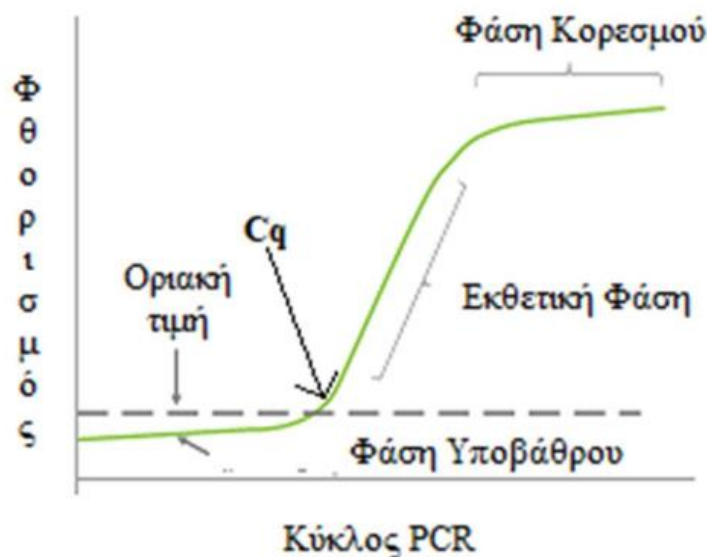
- Τα δείγματα φυλάσσονται στους 4 °C για να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων με τη χρήση RT-qPCR.

3.3.8 Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

3.3.8.1 Αρχή Μεθόδου

Η real-time PCR ή ποσοτική PCR (quantitative, **qPCR**) στηρίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και τη μέτρηση της έντασης του παραγόμενου φθορισμού, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ο φθορισμός που εκπέμπεται, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, αποτελεί δείκτη των παραγόμενων αντιγράφων DNA σε κάθε κύκλο της PCR. Το σήμα αυξάνει ευθέως ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος και δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, πλεονεκτώντας έτσι έναντι των συμβατικών μεθόδων PCR που πραγματοποιούν ανάλυση «τελικού σημείου». Ο φθορισμός μετράται στο τέλος κάθε κύκλου και η έντασή του αντανακλά την εκάστοτε ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος τη δεδομένη χρονική στιγμή. Στους αρχικούς κύκλους, το σήμα του φθορισμού είναι αρκετά χαμηλό, ώστε να ξεχωρίσει από το σήμα υποβάθρου, και συνεπώς μη ανιχνεύσιμο. Η φάση αυτή ονομάζεται **φάση θορύβου ή υποβάθρου** (background). Το σημείο, κατά το οποίο η ένταση του φθορισμού αυξάνεται και, πλέον, αρχίζει να διακρίνεται από το όριο ανίχνευσης, αντιστοιχεί αναλογικά στην ποσότητα των προϊόντων στο δείγμα. Η φάση αυτή ονομάζεται **λογαριθμική φάση** (exponential/ log phase) και το σήμα του φθορισμού αυξάνεται, εκθετικά, καθώς έχω τη μεγαλύτερη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Ο κύκλος, κατά τον οποίο το σήμα της έντασης του φθορισμού αρχίζει να ξεχωρίζει από το σήμα υποβάθρου, στην αρχή της εκθετικής φάσης, ονομάζεται **κύκλος ποσοτικοποίησης (Cq-quantification**

Cycle). Η τιμή C_q σχετίζεται με την αρχική ποσότητα του DNA-στόχου, αντιστρόφως ανάλογα, προσφέροντας τη δυνατότητα ποσοτικής ανάλυσης, μέσω μιας καμπύλης αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων διαδοχικών αραιώσεων των οποίων η συγκέντρωση των αντιγράφων DNA είναι γνωστή. Σταδιακά, το σήμα φτάνει στα μέγιστα επίπεδα, ενώ η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται δραματικά και η φάση αυτή ονομάζεται **φάση κορεσμού** (plateau) .



Σχήμα 3.9 Τυπικό διάγραμμα αντίδρασης qPCR, όπου φαίνεται η ένταση του μετρούμενου φθορισμού σε συνάρτηση με τον κύκλο της PCR. Υποδεικνύονται οι 3 φάσεις της αντίδρασης, καθώς και η τιμή C_q .

3.3.8.2 Ποσοτικοποίηση

Η PCR είναι μία εκθετική διαδικασία, κατά την οποία ο αριθμός των μορίων DNA διπλασιάζεται, μετά από κάθε κύκλο, δεδομένου ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι 100%. Συγκεκριμένα, η αντίδραση της ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου ακολουθεί την παρακάτω μαθηματική εξίσωση:

$$N_n = N_0 \times (1 + E)^n \quad (1) \quad \text{όπου,}$$

- N_n αριθμός αντιγράφων DNA μετά από n κύκλους
- N_0 αρχικός αριθμός αλληλουχιών στόχων στο δείγμα
- E απόδοση της αντίδρασης PCR (0–100%)
- N αριθμός κύκλων

Με την προϋπόθεση της ύπαρξης ενός αντιγράφου στο αρχικό δείγμα και ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι 100%, η παραπάνω εξίσωση απλοποιείται στην εξής μορφή:

$$Nn = 2^n \quad (2)$$

Με βάση μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς από διαδοχικές αραιώσεις 10 τάξεων μεγέθους, τότε για κάθε 10 τάξεις μεγέθους που ανεβαίνουμε, η διαφορά δύο διαδοχικών κύκλων δίνεται από την εξής σχέση:

$$10 = 2^n \quad (3)$$

Από την οποία προκύπτει ότι: $n=3.322$ και άρα $E=1$

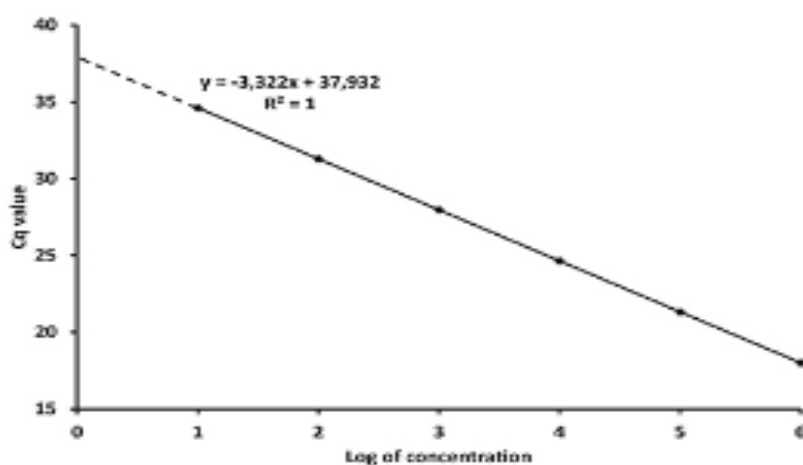
Εύλογα, αρά, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αξιοπιστία της καμπύλης αναφοράς στην ποσοτικοποίηση καθορίζεται από την απόσταση των τιμών Cq δύο διαδοχικών αραιώσεων. Αν σχεδιαστεί διάγραμμα του λογαρίθμου της συγκέντρωσης με την τιμή Cq , τότε η απόδοση E μπορεί να προκύψει από την εξίσωση παλινδρόμησης όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

$$y = k + c \quad (5) \text{ όπου,}$$

x συγκέντρωσης αλληλουχιών στόχων

y Cq

τότε το k , είναι ο συντελεστής παλινδρόμησης ή κλίση της ευθείας



Σχήμα 3.10 Διάγραμμα του λογαρίθμου της συγκέντρωσης με την τιμή Cq

Από την εξίσωση (1) προκύπτει ότι η κλίση είναι ίση με -3,322 και κατ' επέκταση $E=100\%$ σύμφωνα με τη εξίσωση (4). Η συγκέντρωση ή η ποσότητα των αλληλουχιών στόχων στο άγνωστο δείγμα υπολογίζονται σύμφωνα με την τιμή του C_q μέσω της εξίσωσης (5).

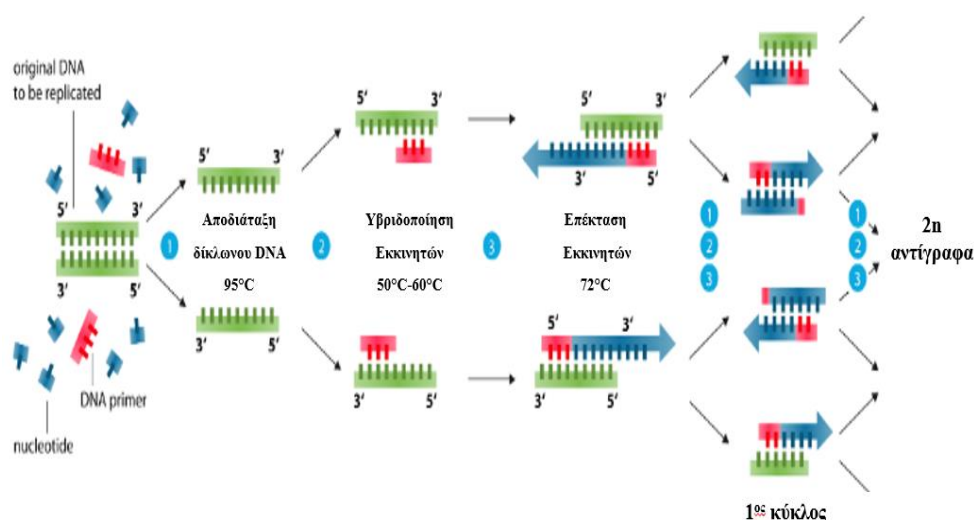
3.3.8.3 Στάδια PCR

Κάθε κύκλος της αντίδρασης PCR αποτελείται από 3 στάδια (Σχήμα 3.11):

1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C. Η υψηλή θερμοκρασία προκαλεί τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη της διπλής έλικας, δηλαδή τον πλήρη διαχωρισμό των δύο αλυσίδων του DNA, ώστε να προκύψουν μονόκλωνα μόρια

2) Υβριδοποίηση των Εκκινητών στους ~50°C-60°C. Με την πτώση της θερμοκρασίας και λόγω συμπληρωματικότητας των εκκινητών, αυτοί προσδένονται ειδικά στο DNA-στόχο. Η επιλογή κατάλληλης θερμοκρασίας γίνεται με βάση τη σύσταση και το μήκος των εκκινητών (συνήθως <25 βάσεις) και υπολογίζεται από τον τύπο $T_m = [2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)] ^\circ C$.

3) Επέκταση Εκκινητών στους ~72°C. Η επέκταση πραγματοποιείται στη θερμοκρασία, όπου παρουσιάζει τη βέλτιστη απόδοση το ένζυμο, ώστε να δράσει και να αρχίσει να προσθέτει δεσοξυριβονουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς την μητρική αλυσίδα, επεκτίνοντας την νεοσυντιθέμενη συμπληρωματική αλυσίδα και τη σύνθεση νέων δίκλωνων μορίων DNA.

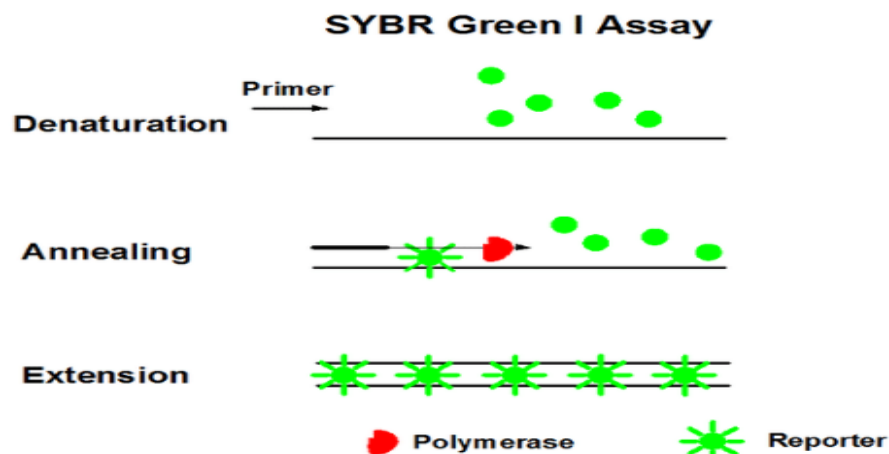


Σχήμα 3.11 Αρχή Μεθόδου – Στάδια αντίδρασης PCR

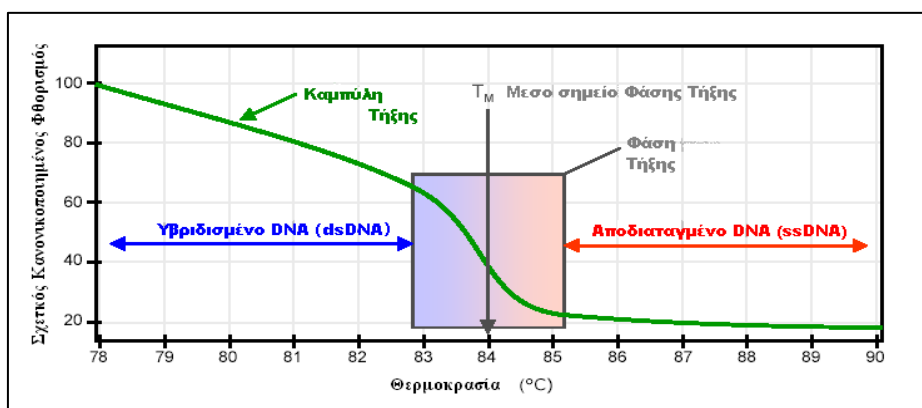
3.3.8.4 Συστήματα ανίχνευσης

SYBR-Green (LC Green)

Η **SYBR Green** είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική για την ανίχνευση του προϊόντος στην PCR και έχει την ικανότητα να προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου μορίου του DNA. Ωστόσο, η πρόσδεση είναι ανεξάρτητη από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, γεγονός που αποτελεί μείζον μειονέκτημα! Η SYBR Green παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 480-510nm, ενώ το φάσμα εκπομπής είναι παρόμοιο με αυτό της φλουορεσκεΐνης με μέγιστη εκπομπή στα 510-540nm. Τα επίπεδα του φθορισμού είναι κατά 1000 φορές υψηλότερα, όταν η χρωστική είναι συνδεδεμένη με το δίκλωνο μόριο DNA, από εκείνα της ελεύθερης χρωστικής, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του σήματος φθορισμού. Όταν γίνεται παρακολούθηση του σήματος σε πραγματικό χρόνο, τότε παρατηρείται μια αύξηση του φθορισμού, κατά το στάδιο της επέκτασης, ακολουθούμενο από μία σημαντική μείωση αυτού, όταν το δίκλωνο μόριο DNA αποδιατάσσεται, αφού τα φθορίζοντα μόρια αποδεσμεύονται (**Σχήμα 3.12**). Συνεπώς, η μέτρηση του φθορισμού είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται μετά το τέλος της επιμήκυνσης κάθε κύκλου της PCR. Κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι παρακάμπτει την χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών, των οποίων το κόστος είναι αρκετά υψηλό. Αντίθετα, όπως αναφέρεται και παραπάνω, υπάρχει έλλειψη ειδικότητας κατά τη δέσμευση των χρωστικών αυτών στο δίκλωνο DNA. Την άρση αυτού του μειονεκτήματος έρχεται να δώσει η ανάλυση καμπυλών τήξης. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) είναι χαρακτηριστική για κάθε δίκλωνο μόριο DNA και ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA γίνεται μονόκλωνο. Τα μηχανήματα της real-time PCR διαθέτουν λογισμικό, όπου πραγματοποιείται αυτόματα ο υπολογισμός της πρώτης παραγώγου $-dF/dT$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή γραφήματος κορυφών, κάθε μία από τις οποίες αντιστοιχεί στο T_m του εκάστοτε προϊόντος της PCR (**Σχήμα 3.13**).



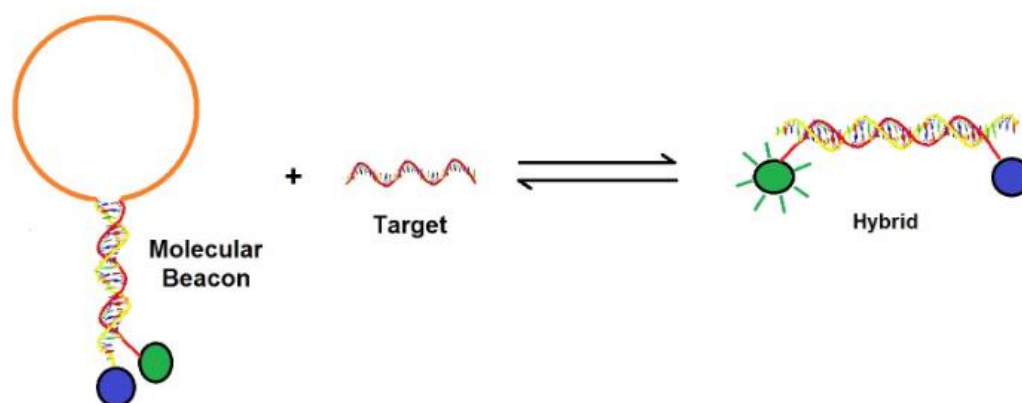
Σχήμα 3.12 Σχηματική απεικόνιση δράσης της SYBR-Green



Ζεύγος ανιχνευτών υβριδισμού

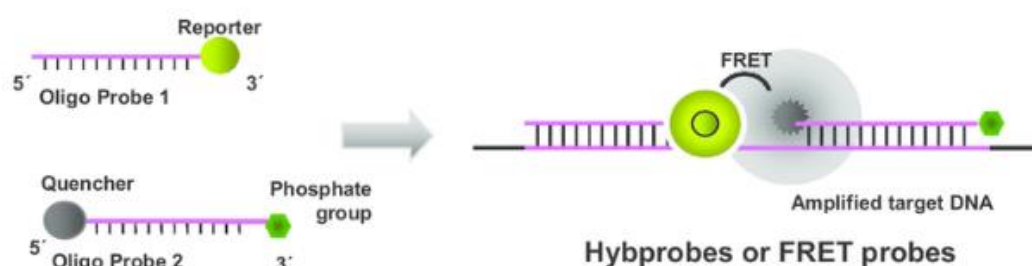
Οι πιο χαρακτηριστικοί ανιχνευτές υβριδισμού είναι αυτοί που περιέχουν δομές φουρκέτας (Μοριακοί Φάροι) και εκείνοι που βασίζονται στο φαινόμενο **FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)**. Επισημαίνεται ότι, όταν γίνεται λόγος για ανιχνευτές, αναφερόμαστε σε ολιγονουκλεοτίδια. Οι Μοριακοί Φάροι σχηματίζουν δομή φουρκέτας, γιατί τα δύο τους άκρα, τα οποία είναι επισημασμένα με ένα φθορισμογόνο και έναν αποσβέστη αντίστοιχα, είναι συμπληρωματικά. Το τμήμα της θηλιάς είναι συμπληρωματικό προς την αλληλουχία στόχο και επομένως, όσο παραμένει η δομή φουρκέτας δεν παράγεται σήμα φθορισμού. Αντίθετα, παρουσία της αλληλουχίας στόχου και με αύξηση της θερμοκρασίας, η δομή φουρκέτας αποδιατάσσεται και ο ανιχνευτής υβριδοποιείται, λόγω

συμπληρωματικότητας, με αποτέλεσμα το φθορισμογόνο να απομακρύνεται από τον αποσβέστη και να παράγεται φθορισμός (Σχήμα 3.14).



Σχήμα 3.14 Σχηματική απεικόνιση δράσης ανιχνευτών υβριδισμού (Μοριακοί Φάροι)

Από την άλλη, οι ανιχνευτές υβριδισμού που βασίζονται στο φαινόμενο FRET αφορούν δύο εκκινητές και δύο ανιχνευτές. Ο ένας ανιχνευτής είναι επισημασμένος με έναν δότη ενέργειας στο 3' άκρο, ενώ ο άλλος με έναν δέκτη στο 5' άκρο. Το φάσμα εκπομπής του δότη επικαλύπτει το φάσμα διέγερσης του δέκτη. Όταν οι δύο ανιχνευτές υβριδοποιούνται στην αλληλουχία στόχο, τότε οι δύο χρωστικές έρχονται κοντά και μέσω του φαινομένου FRET, η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από τον δότη στον δέκτη, με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού (Σχήμα 3.15).

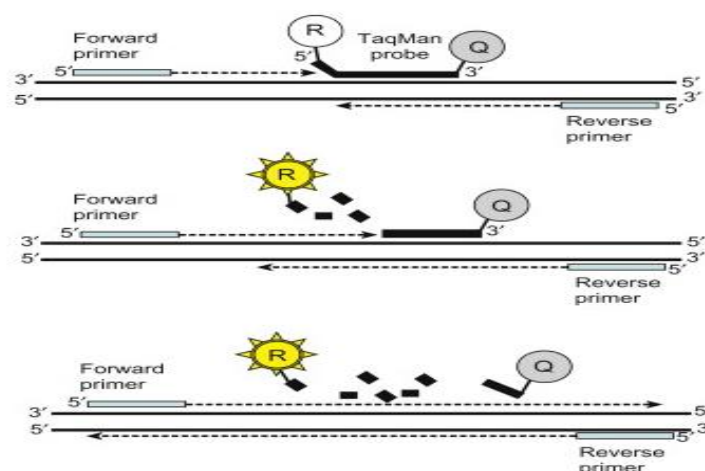


Σχήμα 3.15 Σχηματική απεικόνιση δράσης ανιχνευτών υβριδισμού που βασίζονται στο φαινόμενο FRET

Ανιχνευτές υδρόλυσης (TaqMan)

Οι πιο διαδεδομένοι ανιχνευτές υδρόλυσης είναι οι TaqMan Probes. Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια διπλά ιχνηθετημένα με ένα φθορισμογόνο στο 5' άκρο και έναν αποσβέστη στο 3' άκρο. Οι εκκινητές πρέπει με κάποιο τρόπο να είναι προστατευμένοι στο 3' άκρο, ώστε να αποφευχθεί η επιμήκυνση κατά το στάδιο της

υβριδοποίησης. Όταν το σωστό απλικόνιο ενισχύεται, τότε ο ανιχνευτής υβριδοποιείται στην αλληλουχία στόχο μετά το στάδιο της αποδιάταξης και παραμένει στην κατάσταση αυτή μέχρι η πολυμεράση να εκτοπίσει το 5' άκρο. Στη συνέχεια, το ένζυμο διασπά τον ανιχνευτή, με αποτέλεσμα το φθορισμογόνο να απομακρύνεται από τον αποσβέστη και να εκπέμπεται φθορισμός. Η πολυμεράση θα διασπάσει τον ανιχνευτή, μόνο όταν αυτός είναι υβριδοποιημένος στην αλληλουχία στόχο και για το λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντική η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας (Σχήμα 3.16).



Σχήμα 3.16 Σχηματική απεικόνιση της δράσης ανιχνευτών υδρόλυσης (TaqMan)

3.3.8.5 Οργανολογία

Οι αναλύσεις real-time PCR της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν, κυρίως, στον θερμικό κυκλοποιητή Mic Real-Time PCR System (Bio Molecular Systems). Ωστόσο, κατά περιπτώσεις, έγινε, επίσης, χρήση του κυκλοποιητή LightCycler® (Roche Diagnostics, Switzerland) και του Συστήματος cobas® 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland), τα χαρακτηριστικά των παραπάνω αναλύονται εκτενώς παρακάτω.

Αναλυτής Mic Real-Time PCR System (Bio Molecular Systems)

Ο θερμικός κυκλοποιητής Mic Real-Time PCR System (Σχήμα 3.17) εφαρμόζει μαγνητική επαγωγή για την ταχεία θέρμανση των δειγμάτων και εξαναγκασμένη ροή αέρα για ψύξη. Ως εκ τούτου, με τη χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογία, οι χρόνοι

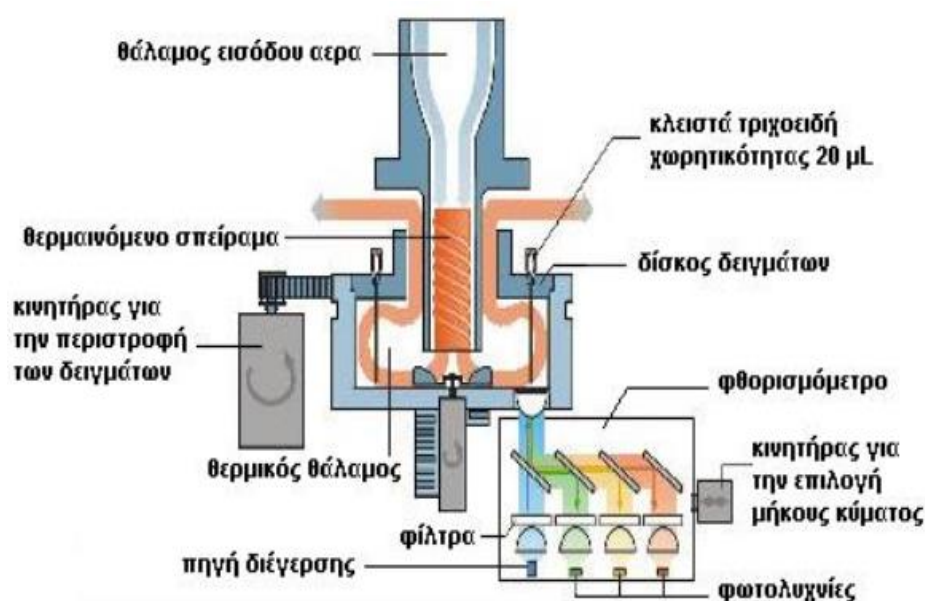
της αντίδρασης μειώνονται σημαντικά, καθώς επιτυγχάνει μικρούς χρόνους θέρμανσης και ψύξης. Συγκεκριμένα, έχει την ικανότητα ολοκλήρωσης 35 κύκλων σε 25min και είναι εφικτή η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης 48 δειγμάτων. Τα ειδικά σωληνάρια που χρησιμοποιούνται για την τοποθέτηση του δείγματος είναι επικαλυμμένα με έλαιο σιλικόνης ώστε να αποφεύγεται η εξάτμιση και η συμπύκνωση του δείγματος, βελτιώνοντας, κατά αυτόν τον τρόπο, την εκτέλεση της αντίδρασης και καθιστώντας περιττή την ανάγκη χρήσης θερμαινόμενου πώματος. Το επιτρεπόμενο εύρος όγκου της συνολικής αντίδρασης κυμαίνεται από 10 έως 25μL. Διαθέτει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών στόχων κατά τη διεξαγωγή της ίδιας αντίδρασης PCR και χρησιμοποιεί 4 κανάλια διέγερσης και 4 φίλτρα εκπομπής, τα οποία καλύπτουν όλο το φάσμα των χρωστικών ή των ειδικών μορίων ιχνηθετών (probes), που συνήθως χρησιμοποιούνται στην qPCR. Το σύστημα, επίσης, διαθέτει ξεχωριστά για κάθε κανάλι, μια πηγή διέγερσης LED (Light Emission Diode) υψηλής ενέργειας και μία φωτοδίοδο ανιχνευτή και ο χρόνος ανάκτησης σήματός είναι 1s. Σημαντικό πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα υψηλής ανάλυσης καμπυλών τήξης (High Resolution Melting, **HRM**), καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ποιοτικός έλεγχος στην ανάλυση των κύκλων για την διερεύνηση μη ειδικών προϊόντων. Το σύστημα έχει την ικανότητα να ανιχνεύει διαφορές στο σήμα του φθορισμού έως και 5pg ανά 2 πρότυπα δείγματα, με $C_q \pm 0,2$ μεταξύ διαφορετικών και με $CV=3\%$, προσδίδοντας έτσι υψηλή ακρίβεια, επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα, αντίστοιχα. Ο προγραμματισμός της αντίδρασης και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται σε υπολογιστή που συνδέεται με το Mic, μέσω του λογισμικού Mic qPCR Cycler Software.



Σχήμα 3.17 Ο αναλυτής Mic Real-Time PCR System. Απεικονίζονται το όργανο, τα σωληνάρια, καθώς και οι 48 θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων στον περιστροφέα του οργάνου

LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Switzerland)

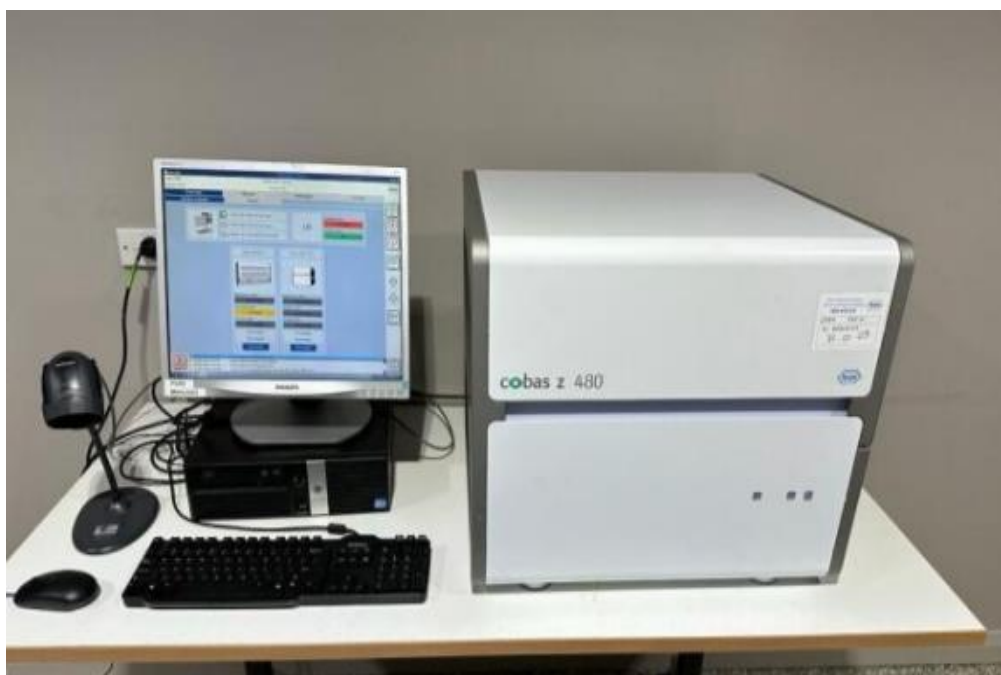
Ο κυκλοποιητής LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Switzerland) (Σχήμα 3.18), του οποίου η θέρμανση και η ψύξη επιτυγχάνεται μέσω ροής αέρα, διαθέτει μια μπλε δίοδος LED, με μέγιστη εκπομπή στα 470 nm, που λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για τη διέγερση των δειγμάτων, ενώ έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης του φθορισμού σε έξι διαφορετικά μήκη κύματος (530, 555, 610, 640, 670, 705 nm). Τα δείγματα τοποθετούνται σε υάλινα τριχοειδή, τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται σε περιστροφικό δίσκο, κατά τρόπο τέτοιο ώστε, το άκρο κάθε τριχοειδούς να τοποθετείται ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής κατά την περιστροφή από τον ειδικό κινητήρα. Συγκεκριμένα, η μπλε δίοδος εκπέμπει ενέργεια η οποία εστιάζεται στο άκρο του τριχοειδούς και διεγείρει τη χρωστική. Με τη βοήθεια ενός διχρωμικού καθρέφτη, ο φθορισμός που εκπέμπεται αντανακλάται στο φθορισμόμετρο και κατανέμεται ανεξαρτήτως μήκους κύματος στους 6 ανιχνευτές, μέσω ενός ηλεκτρικού αγωγού. Ένας σφαιρικός φακός ευθυγραμμίζει το σήμα το οποίο μετράται από ένα ειδικό οπτικό σύστημα φίλτρων. Το σήμα μεταφέρεται από κάθε ανιχνευτή σε ένα φωτοϋβρίδιο το οποίο θα στείλει την τελική αποτίμηση στο όργανο. Ο συνδυασμός φθορισμόμετρου και κυκλοποιητή αυξάνει κατά πολύ την ευαισθησία.



Σχήμα 3.18 Σχηματική απεικόνιση της αρχής μεθόδου λειτουργίας του LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Switzerland)

Σύστημα cobas[®] 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland)

Το Σύστημα cobas[®] 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland) (Σχήμα 3.19) αποτελείται από το cobas z480 αναλυτή και το LightCycler λογισμικό. Παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης 96 δειγμάτων και επιτυγχάνει την ταχεία και ακριβή αυξομείωση της θερμοκρασίας μέσω μπλοκ θερμικού κυκλοποιητή και τη χρήση θερμοηλεκτρικών στοιχείων Peltier. Διαθέτει μία μπλε δίοδο LED υψηλής ενέργειας με 5 φίλτρα εκπομπής και 6 φίλτρα ανίχνευσης. Επιπλέον, επιτρέπει την απόλυτη και τη σχετική ποσοτικοποίηση καμπυλών τήξης.



Σχήμα 3.19 Σύστημα cobas[®] 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland)

3.3.9 In silico σχεδιασμός εκκινητών

3.3.9.1 Γενικά

Ο όρος “in silico” αναφέρεται στην υπολογιστική μελέτη κατά την επιλογή των, πλέον, κατάλληλων αλληλουχιών ολιγονουκλεοτιδίων για τα οποία γίνεται ο σχεδιασμός των εκκινητών (primers), ώστε να έχουμε ειδικό προϊόν στην PCR. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, USA). Γενικότερα, τα κριτήρια που πρέπει να πληροί ένα ζεύγος εκκινητών συνοψίζονται παρακάτω:

- Η πιο σημαντική περιοχή για ειδική ενίσχυση είναι η 3' περιοχή του εκκινήτη, λόγω του ότι η ενίσχυση ξεκινά από την περιοχή αυτή. Γενικά, αυτά τα άκρα πρέπει να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλινδρομικές δομές, να μην περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες και εκφυλισμένες αλληλουχίες.
- Οι αλληλουχίες των δύο εκκινήτων δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ιδιαίτερα στο 3' άκρο τους, έτσι ώστε να μη σχηματίζονται διμερή εκκινήτων.
- Συνιστάται οι δύο εκκινήτες να χαρακτηρίζονται από ανάλογη περιεκτικότητα σε βάσεις GC και με Tm σε παρόμοιες θερμοκρασίες.
- Η περιεκτικότητα των εκκινήτων σε βάσεις GC πρέπει να κυμαίνεται σε ποσοστό μεταξύ 40% και 70%.
- Οι εκκινήτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι πάντοτε υψηλής καθαρότητας.
- Η αλληλουχία-στόχος είναι προτιμότερο να είναι μια «ισορροπημένη» περιοχή, δηλαδή να περιλαμβάνει ίσες αναλογίες των τεσσάρων βάσεων A, T, G, C και να μην είναι συμπληρωματική με τον εαυτό της, μονότονη ή επαναλαμβανόμενη.

3.3.9.2 In silico σχεδιασμός εκκινήτων για την καλσιτονίνη (CALCA)

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, και τηρώντας όλα τα παραπάνω κριτήρια έγινε in silico σχεδιασμός εκκινήτων, μέσω του προγράμματος Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, USA), για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της καλσιτονίνης (CALCA).

Δεδομένου ότι πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης γονιδίου, είναι σημαντικό οι εκκινήτες να σχεδιάζονται σε περιοχή συρραφής των εξωνίων, ώστε να αποφεύγεται η μη ειδική ενίσχυση γενωμικού DNA. Επίσης, σημαντική είναι η επιλογή του κατάλληλου μεταγράφου (στην προκειμένη περίπτωση επιλέχθηκε το μετάγραφο 5, ως το πλέον καταλληλότερο), το οποίο in vivo μεταφράζεται στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, πάνω στο οποίο θα σχεδιαστεί το ζεύγος των εκκινήτων. Από την

GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001378949.1), λαμβάνουμε την αντίστοιχη αλληλουχία του συγκεκριμένου μεταγράφου και απεικονίζουμε πάνω σε αυτήν τις περιοχές συρραφής των εξωνίων, οι οποίες αποτελούν εστίες ενδιαφέροντος για τον σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική υβριδοποίηση σε γενωμικό DNA. Πριν την επιλογή της κατάλληλης περιοχής σχεδιασμού πάνω στην αλληλουχία του μεταγράφου επιλογής, εφαρμόζουμε το πρόγραμμα BLAST®, ώστε να δούμε ποιες περιοχές του εν λόγω μεταγράφου αλληλεπικαλύπτονται με περιοχές άλλων διαφορετικών γονιδίων. Περιοχές που εμφανίζουν έντονη αλληλοεπικάλυψη αποκλείονται για τον σχεδιασμό εκκινητών, προς αποφυγή μη ειδικού προϊόντος. Αφού γίνει η επιλογή των εκκινητών, τους εφαρμόζουμε στο πρόγραμμα PrimerPremier για να αξιολογήσουμε τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους και, συνεπώς, την καταλληλότητα τους σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια.

Αλληλουχία Μεταγράφου

Homo sapiens calcitonin related polypeptide alpha (**CALCA**), transcript variant 5, mRNA (NCBI Reference Sequence: NM_001378949.1)

```

1   atcagagaca ctgccagacc caagtgtcgc cgccgcttcc acagggctct ggctggacgc
61   cgccgcccgc gctgccaccg cctctgatcc aagccacctc ccgccagggt ggatcggaca
121  gtctcaatcc ccgggtcgcg tcttctctgt cggctgcgga ctccagtctt actctctcgc
181  actgcacaca ggcttaggcc agtctcggga cactcaggct cccaggggac cgcgcacaga
241  gcctgagaga ggtgtcatgg gcttccaaaa gttctcccc ttcctggctc tcagcatctt
301  ggtcctgttg caggcaggca gcctccatgc agcaccattc aggtctgccc tggagagcag
361  ccagcagac ccggccacgc tcagttagga cgaagcgcgc ctccctgctgg ctgcactggt
421  gcaggactat gtgcagatga aggccagtga gctggagcag gagcaagaga gagagggctc
481  cagcctggac agccccagat ctaagcggtg cggtaatctg agtacttgca tgctgggcac
541  atacacgcag gacttcaaca agtttcacac gttcccccaa actgcaattg gggttggagc
601  acctggaag aaaagggata tgtccagcga cttggagaga gaccatcgcc ctcatgttag
661  catgccccag aatgccaaact aaactcctcc ctttcttcc taatttccct tcttgcatcc
721  ttcctataac ttgatgcatg tggtttggtt cctctctggt ggctctttgg gctggatttg
781  gtggctttcc ttgtggcaga ggatgtctca aacttcagat gggaggaaa agagcaggac
841  tcacagggtg gaagagaatc acctgggaaa ataccagaaa atgagggccg ctttgagtc
901  ccagagatg tcatcagagc tcctctgtcc tgcttctgaa tgtgctgatc atttgaggaa
961  taaaattatt tttccccaaa

```

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, σχεδιάσθηκαν εκκινητές για το μετάγραφο 5 του γονιδίου της καλσιτονίνης (**CALCA**) και αφού αξιολογήθηκε η καταλληλότητα με

την τήρηση των παραπάνω κριτηρίων, καταλήξαμε στο παρακάτω ζεύγος αλληλουχιών, οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

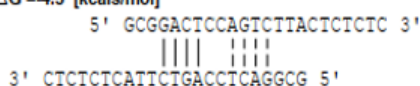
Πίνακας 3.1 Αλληλουχίες εκκινητών καλσιτονίνης (CALCA)

Γονίδιο		Αλληλουχίες 5'-3'	Μέγεθος (bp)	Tm (°C)	GC%
CALCA	Πρόσθιος	5'-GCGGACTCCAGTCTTACTCTCTC-3'	21	59,2	56,5
	Οπίσθιος	5'-GGAAGCCCATGACACCTCTCT-3'	23	60,4	57,1

Τα διμερή τα οποία ανιχνεύτηκαν με βάση το λογισμικό πρόγραμμα Primer Premier διαφαίνονται στα παρακάτω σχήματα

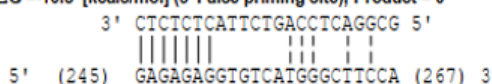
1. Most stable dimer:

$\Delta G = -4.5$ [kcal/mol]

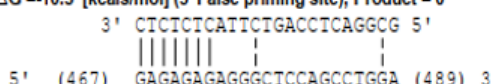


1. Most stable false priming site:

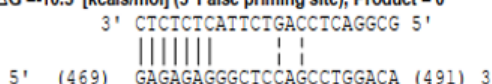
$\Delta G = -10.5$ [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 0



2. $\Delta G = -10.5$ [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 0



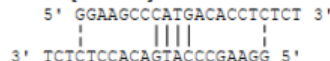
3. $\Delta G = -10.5$ [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 0



Σχήμα 3.20 Διμερή πρόσθιου εκκινητή του CALCA

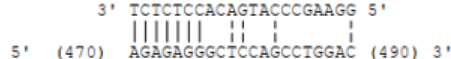
1. Most stable dimer:

$\Delta G = -5.4$ [kcal/mol]

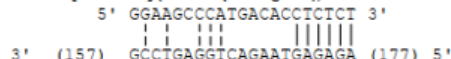


1. Most stable false priming site:

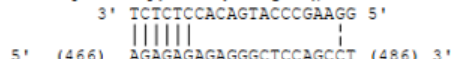
$\Delta G = -12.0$ [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 335



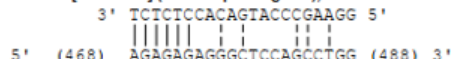
2. $\Delta G = -8.9$ [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 0



3. $\Delta G = -8.9$ [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 331



4. $\Delta G = -8.9$ [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 333



Σχήμα 3.21 Διμερή οπίσθιου εκκινητή του CALCA

Αναφορικά με τη έκφραση των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών CK-8, CK-18, CK-19, του μεσεγχυματικού δείκτη VIMENTIN, του υποδοχέα χημειοκινών CXCR4 αλλά και για τον έλεγχο ποιότητας των δειγμάτων μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς β2-μικροσφαιρίνης (b2-Microglobulin, B2M), χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές και ανιχνευτές από πρωτόκολλα που έχουν ήδη αναπτυχθεί και διαπιστευθεί από το εργαστήριο.

3.3.10 Πρωτόκολλα real-time PCR

Πειραματική Πορεία

Αρχικά, υπολογίζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που θα χρειαστούν, ανάλογα τον αριθμό των δειγμάτων, για την παρασκευή του μίγματος (**mix**) της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται το άθροισμα των δειγμάτων + 1 αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control, **NC**) + 1 θετικό δείγμα ελέγχου (**PC**) + το 10% του συνολικού αριθμού αντιδράσεων. Ακολουθεί καλή ανάμιξη (Vortex) και σύντομη φυγοκέντρωση (spin down) και μοιράζονται 9μL από το μίγμα σε κάθε σωληνάριο. Στη συνέχεια, αφού πρώτα σφραγιστεί το σωληνάριο του αρνητικού δείγματος (NC), προστίθεται 1μL σε κάθε σωληνάριο από το αντίστοιχο δείγμα και σφραγίζονται και αυτά. Τέλος, αφού έχουν σφραγιστεί όλα τα σωληνάρια των δειγμάτων, προστίθεται και 1μL στο σωληνάριο του PC. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης σε κάθε σωληνάριο είναι 10μL (9μL mix + 1μL δείγματος). Τα σωληνάρια τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου πραγματοποιείται qPCR , με βάση το πρωτόκολλο του εκάστοτε γονιδίου, του οποίου η έκφραση μελετάται.

Το H₂O που χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων (αραιώσεις, αναλύσεις, προετοιμασία mix, κλπ) πρόκειται για απιονισμένο, κατεργασμένο με πυροανθρακικό-διδυθυλεστέρα (diethylpyrocarbonate, **DEPC) και απαλλαγμένο από νουκλεάσες (nuclease-free DEPC-treated water).*

Πρωτόκολλο B2M

Πίνακας 3.2 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τον έλεγχο ποιότητας με το γονίδιο αναφοράς B2M

Αντιδραστήριο	Όγκος, V (μL) ×δείγμα
H ₂ O	2,7
Buffer (5x)	2
MgCl ₂ (25mM)	1
dNTPS (10mM)	0,2
BSA (10ng/μL)	0,5
F primer (10μM)	0,5
R primer (10μM)	0,5
Probe (10μM)	0,5
Taq	0,1

Πίνακας 3.3 Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για τον έλεγχο ποιότητας με το γονίδιο αναφοράς B2M

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	10s
Αποδιάταξη	52 °C	20s
Υβριδοποίηση	72 °C	20s

Πρωτόκολλο CALCA

Πίνακας 3.4 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (CALCA)

Αντιδραστήριο	Όγκος, V (μL) ×δείγμα
H ₂ O	4,15
Buffer (5x)	2
MgCl ₂ (25mM)	0,8
dNTPS (10mM)	0,2
BSA (10ng/μL)	0,15
F primer (10μM)	0,3
R primer (10μM)	0,3
Probe (10μM)	1
Taq	0,1

Πίνακας 3.5 Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (CALCA)

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	10s
Αποδιάταξη	65°C	20s
Υβριδοποίηση	72°C	20s

Πρωτόκολλο CK-19

Πίνακας 3.6 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της CK-19

Αντιδραστήριο	Όγκος, V (μL) × δείγμα
H ₂ O	3,75
Buffer (5x)	2
MgCl ₂ (25mM)	1
dNTPS (10mM)	0,2
BSA (10ng/μL)	0,15
F primer (10μM)	0,4
R primer (10μM)	0,4
Probe (10μM)	0,3
Taq	0,3

Πίνακας 3.7 Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της CK-19

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	10s
Αποδιάταξη	65°C	20s
Υβριδοποίηση	72°C	20s

Πρωτόκολλο CK-18

Πίνακας 3.8 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της CK-18

Αντιδραστήριο	Όγκος, V (μL) ×δείγμα
H ₂ O	5,89
Buffer (5x)	2
MgCl ₂ (25mM)	0,8
dNTPS (10mM)	0,15
BSA (10ng/μL)	0,1
F primer (10μM)	0,1
R primer (10μM)	0,83
Probe (10μM)	0,83
Taq	0,1

Πίνακας 3.9 Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της CK-18

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	10s
Αποδιάταξη	65°C	20s
Υβριδοποίηση	72°C	20s

Πρωτόκολλο CK-8

Πίνακας 3.10 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της CK-8

Αντιδραστήριο	Όγκος, V (μL) ×δείγμα
H ₂ O	5,2
Buffer (5x)	2
MgCl ₂ (25mM)	0,4
dNTPS (10mM)	0,1
BSA (10ng/μL)	0,1
F primer (10μM)	0,1
R primer (10μM)	0,5
Probe (10μM)	0,5
Taq	0,1

Πίνακας 3.11 Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της CK-8

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	10s
Αποδιάταξη	65°C	20s
Υβριδοποίηση	72°C	20s

Πρωτόκολλο VIMENTIN

Πίνακας 3.12 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης VIMENTIN

Αντιδραστήριο	Όγκος, V (μL) ×δείγμα
H ₂ O	5,89
Buffer (5x)	2
MgCl ₂ (25mM)	0,8
dNTPS (10mM)	0,15
BSA (10ng/μL)	0,1
F primer (10μM)	0,1
R primer (10μM)	0,83
Probe (10μM)	0,83
Taq	0,1

Πίνακας 3.13 Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της VIMENTIN

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	10s
Αποδιάταξη	65°C	20s
Υβριδοποίηση	72°C	20s

Πρωτόκολλο CXCR4

Πίνακας 3.14 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης του CXCR4

Αντιδραστήριο	Όγκος, V (μL) ×δείγμα
H ₂ O	5,89
Buffer (5x)	2
MgCl ₂ (25mM)	0,8
dNTPS (10mM)	0,15
BSA (10ng/μL)	0,1
F primer (10μM)	0,1
R primer (10μM)	0,83
Probe (10μM)	0,83
Taq	0,1

Πίνακας 3.15 Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης του CXCR4

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	10s
Αποδιάταξη	65°C	20s
Υβριδοποίηση	72°C	20s

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ CTCs -

ΜΕΛΕΤΗ ΈΚΦΡΑΣΗΣ, *CK-8*, *CK-18*, *CK-19*, *VIMENTIN*, *CXCR4* ΚΑΙ ΚΑΛΣΙΤΟΝΙΝΗΣ (*CALCA*)

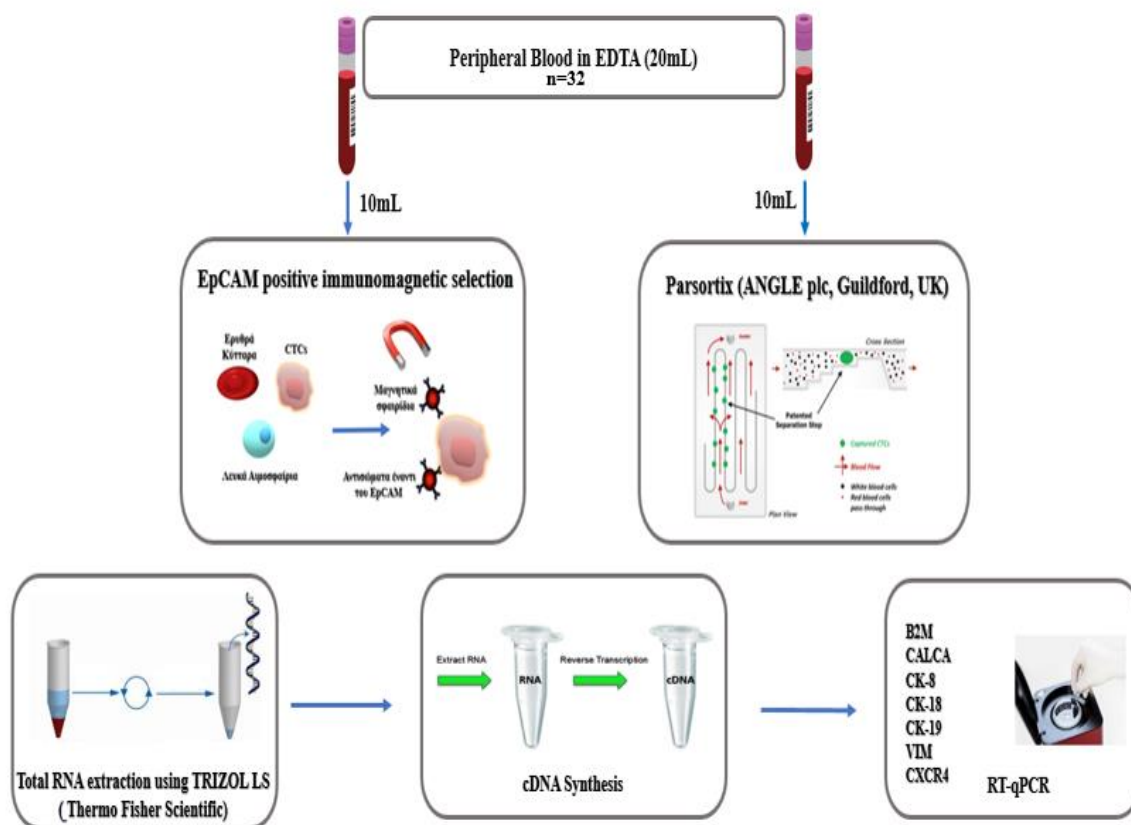
4.1. Εισαγωγή

Όπως αναφέρεται στο υποκεφάλαιο 1.3.1, η πλειοψηφία ασθενών με MTC που παρουσιάζουν μετάσταση, εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *RET*, ενώ υπάρχει και ένα σημαντικό ποσοστό, κυρίως σποραδικού MTC, που εμφανίζουν μεταλλάξεις στο *HRAS*. Έρευνες έχουν δείξει ότι, οι περιπτώσεις μεταστατικού MTC εμφανίζουν πιο έντονα μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά και εκφράζουν μεσεγχυματικούς δείκτες, όπως η *VIMENTIN*, χωρίς ωστόσο, να αποκλείονται και περιπτώσεις μεικτών φαινοτύπων με ταυτόχρονη έκφραση επιθηλιακών παραγόντων, όπως οι κυτταροκίνες *CK-8*, *CK-18* και *CK-19*. Τελευταία, η επαγωγή της έκφραση του υποδοχέα χημειοκινών *CXCR4*, που φαίνεται να συσχετίζεται με μεταλλάξεις στο *RET* και στο *HRAS*, έχει αποτελέσει μονοπώλιο αρκετών ερευνών, καθώς είναι συχνή σε μεταστατικό MTC και ενδεχομένως, να επηρεάζει την ανταπόκριση στη θεραπεία με TKIs. Είναι, συνεπώς, προφανές ότι το MTC παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 1.3.5, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη μετάστασης, στην πρόγνωση και στην ανταπόκριση στη θεραπεία. Η Υγρή Βιοψία μέσω του μοριακού χαρακτηρισμού των CTCs και τη μελέτη έκφρασης των παραπάνω δεικτών παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως η γρήγορη, χαμηλού κόστους, μη επεμβατική φύση συλλογής δειγμάτων και η δυνατότητα παρακολούθησης της ενδοκαρκινικής και διαμεταστατικής γενετικής ετερογένειας σε πραγματικό χρόνο, όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 2.5, όπου αναφέρονται οι εφαρμογές της υγρής βιοψίας στο MTC.

4.2. Πειραματική Πορεία

Η απομόνωση των CTCs από το ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο μεθόδων: τον EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό και το σύστημα μικρορευστονικής ParsortixTM (ANGLE plc, Guildford, UK). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση γενωμικού RNA από τα CTCs με το αντιδραστήριο

TRIzol LS και ακολούθησε η μετατροπή του σε cDNA με το High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποιότητας με το γονίδιο αναφοράς *B2M* όλων των κλινικών δειγμάτων cDNA ασθενών και υγιών, με τη χρήση RT-qPCR. Κατόπιν, ακολούθησε η ανάλυση έκφρασης των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών *CK-8*, *CK-18* και *CK-19*, του μεσεγχυματικού δείκτη *VIMENTIN*, του υποδοχέα χημειοκινών *CXCR4* και της καλσιτονίνης (*CALCA*), αντίστοιχα, επίσης με RT-qPCR. Οι πειραματικές διαδικασίες, τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται, εκτενώς, στο κεφάλαιο 3. Η γενική πειραματική πορεία της εργασίας, παρουσιάζεται με τη μορφή σχεδιαγράμματος ροής εργασίας στο **Σχήμα 4.1**.



Σχήμα 4.1 Πειραματική πορεία για τον εμπλουτισμό και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs

4.2.1 Κλινικά Δείγματα

Από τους 13 ασθενείς με σποραδικό MTC, στα πλαίσια της κλινικής μελέτης, συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος σε διάφορα χρονικά σημεία, μετά από χειρουργική αφαίρεση του θυρεοειδούς αδένος, με το σύνολο των δειγμάτων να ανέρχεται σε 33. Ωστόσο, λόγω μη επαρκούς ποσότητας σε ένα δείγμα, ο τελικός

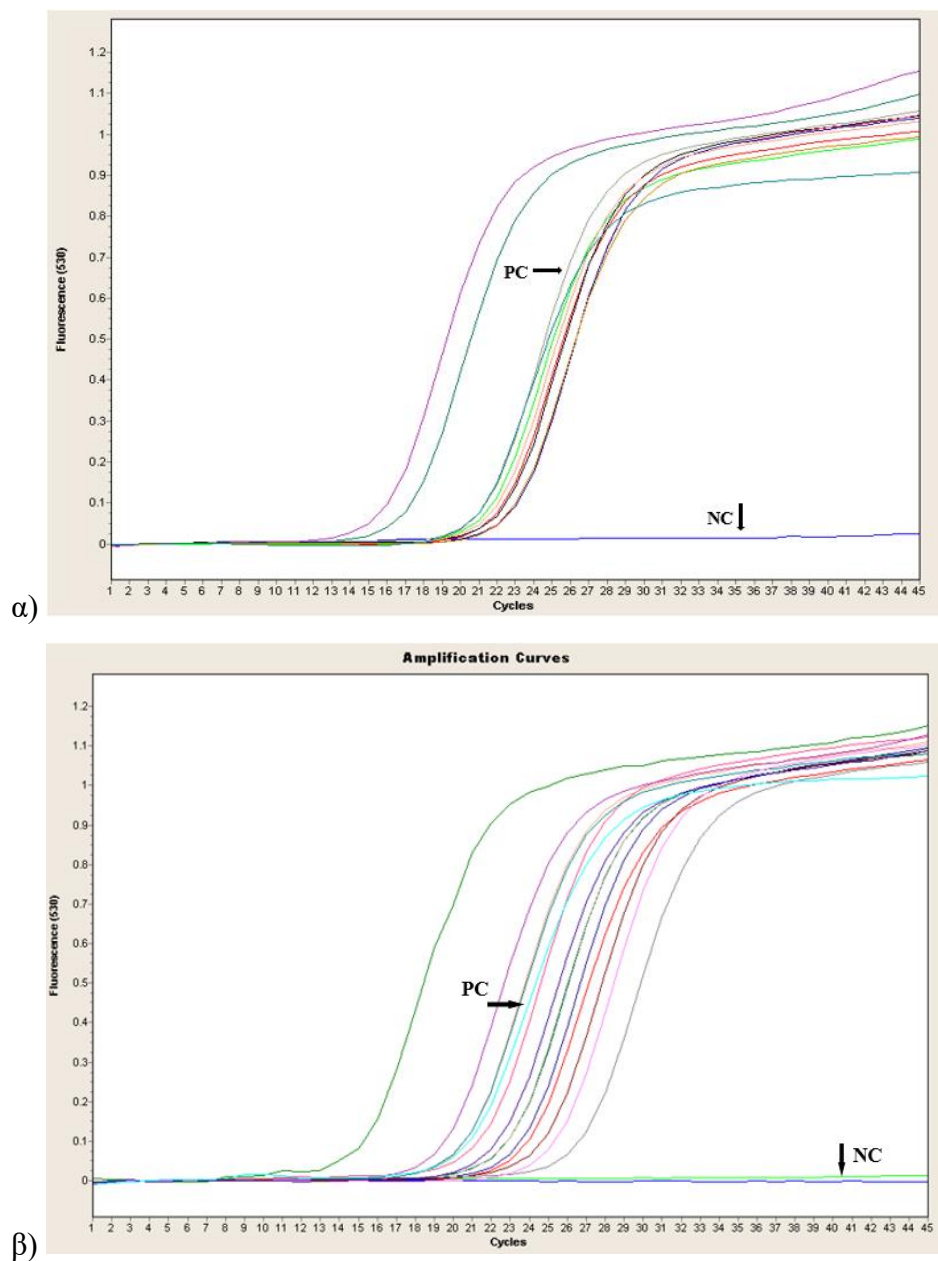
αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν 32. Ο συνολικός όγκος των 18 από τα 32 δείγματα, ήταν 20 mL, ο οποίος διαχωρίστηκε σε 10 mL, και ακολούθησε απομόνωση των CTCs με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό και με το σύστημα Parsortix (ANGLE plc, Guildford UK), ταυτοχρόνως, στα πλαίσια σύγκρισης των μεθόδων αυτών. Στα υπόλοιπα 14 δείγματα, ο συνολικός όγκος ήταν εξαρχής 10 mL και η απομόνωση των CTCs πραγματοποιήθηκε μόνο μέσω EpCAM θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού (Συνολικά: n=32 με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, n=18 με το σύστημα Parsortix). Η μελέτη έκφρασης των προαναφερθέντων δεικτών πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα. Οι 13 ασθενείς βρέθηκαν θετικοί στις σωματικές μεταλλάξεις *RET* (n=10) και *HRAS* (n=2), με τη μέθοδο NGS στο πλάσμα, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού-Τομέας Θυρεοειδικής Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πίζας, Ιταλία, ως επι τω πλείστω, αλλά και στο Διαγνωστικό κέντρο GENOTYΠΟΣ (Ιλισίων 3-5, Αθήνα 115 28). Σημειώνεται ότι, για έναν ασθενή το προφίλ των μεταλλάξεων παραμένει άγνωστο. Τέλος, τα δείγματα των υγριών αιμοδοτών (n=17), επεξεργάστηκαν με τον ίδιο τρόπο για τη χρήση τους ως φυσιολογικά δείγματα ελέγχου στις αντίστοιχες αναλύσεις. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, τηρήθηκαν οι διαδικασίες που αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 3.2.1, για τη διασφάλιση της ποιότητας των αναλύσεων και της αποφυγής επιμολύνσεων.

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Απομόνωση CTCs με τη χρήση EpCAM θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού

4.3.1.1 Έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων cDNA μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς B2M

Αρχικά, πριν την ανάλυση για την μελέτη έκφρασης των προαναφερθέντων δεικτών, προηγήθηκε έλεγχος ποιότητας όλων των δειγμάτων cDNA, τόσο των υγιών (n=17), όσο και των ασθενών (n=32), μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M*, με τη χρήση RT-qCR. Ακολουθούν ενδεικτικά γραφήματα με τα αποτελέσματα μίας αντίδρασης (Σχήμα 4.2):



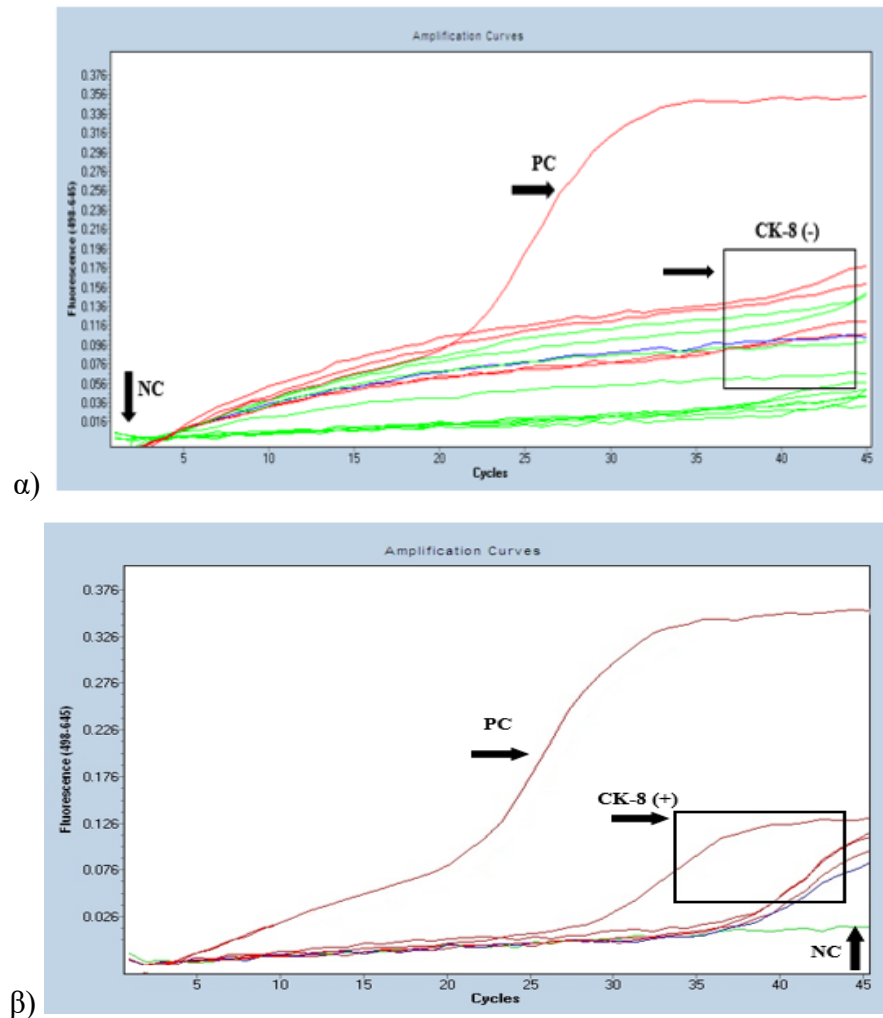
Σχήμα 4.2 Χαρακτηριστικό γράφημα ελέγχου ποιότητας δειγμάτων cDNA, μέσω της μελέτης έκφρασης του γονιδίου αναφοράς B2M, από CTCs τα οποία έχουν απομονωθεί με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό α) υγιών δοτών (n=17) και β) ασθενών με σποραδικό MTC (n=32)

Αφού λήφθηκαν θετικά αποτελέσματα για την ποιότητα του cDNA όλων των δειγμάτων, με την ανίχνευση του γονιδίου αναφοράς B2M και βεβαιώθηκε η αποφυγή επιμόλυνσης, με την μη-ανίχνευση προϊόντος της αντίδρασης RT-qPCR στα αρνητικά δείγματα ελέγχου, ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων για τη μελέτη έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων.

4.3.1.2 Αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης των επιθηλιακών δεικτών σε επίπεδο mRNA

Μελέτη έκφρασης της CK-8

Συνολικά, βρέθηκαν 4/32 (12,5%) θετικά δείγματα, ως προς την έκφραση της CK-8. Ακολουθούν χαρακτηριστικά γραφήματα της ανάλυσης (Σχήμα 4.3).



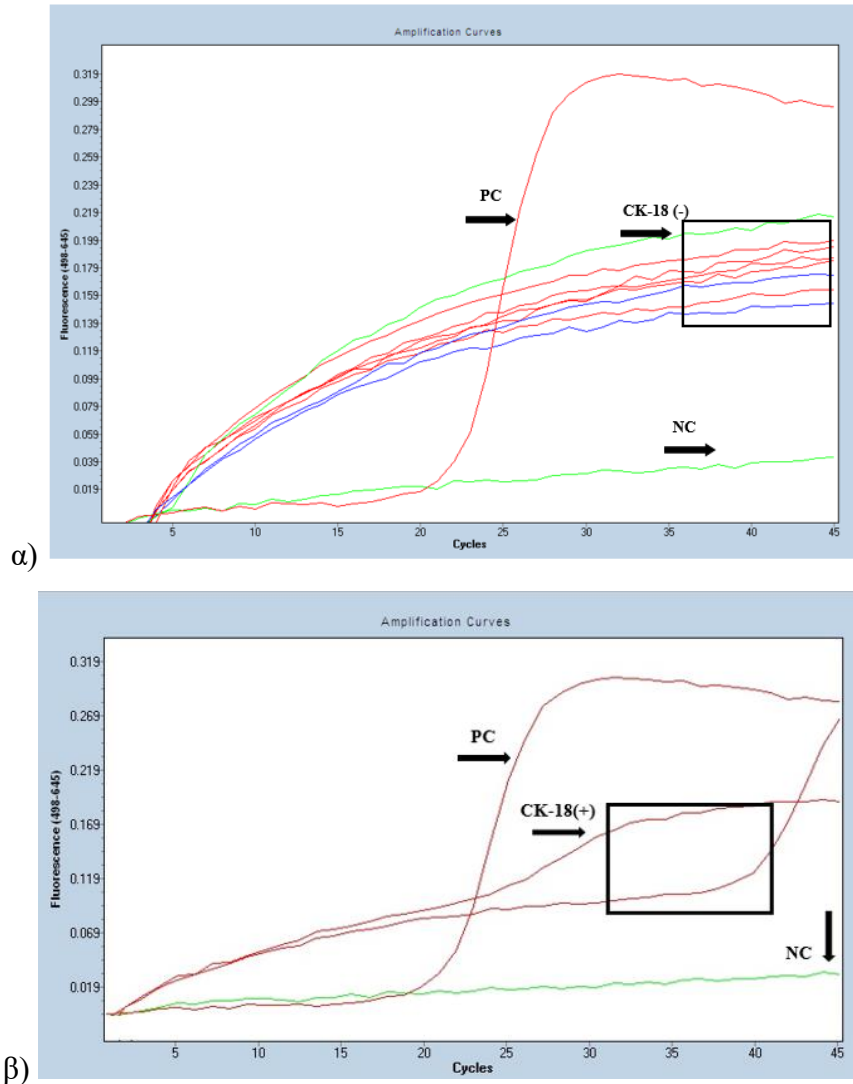
Σχήμα 4.3 Χαρακτηριστικό γράφημα της μελέτης έκφρασης της CK-8 σε δείγματα cDNA από CTCs, που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ασθενών με σποραδικό MTC α) δειγμάτων τα οποία βρέθηκαν αρνητικά και β) δειγμάτων τα οποία βρέθηκαν θετικά ως προς την έκφραση της CK-8

*Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Σύστημα cobas[®] 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland)

*Οι probes είναι ζεύγος ανιχνευτών υβριδισμού που βασίζονται στο φαινόμενο FRET

Μελέτη έκφρασης της CK-18

Συνολικά, βρέθηκαν 2/32 (6,25%) θετικά δείγματα, ως προς την έκφραση της CK-18. Ακολουθούν χαρακτηριστικά γραφήματα της ανάλυσης (**Σχήμα 4.4**).



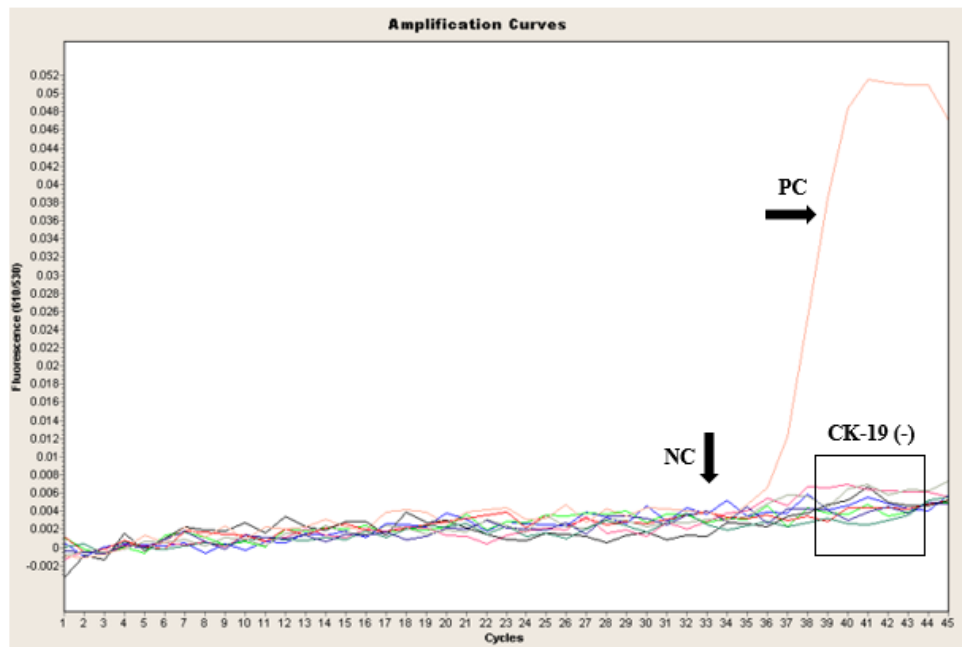
Σχήμα 4.4 Χαρακτηριστικό γράφημα για την μελέτη έκφρασης της CK-18 σε δείγματα cDNA από CTCs, που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ασθενών με σποραδικό MTC α)δειγμάτων τα οποία βρέθηκαν αρνητικά και β) δειγμάτων τα οποία βρέθηκαν θετικά, ως προς την έκφραση της CK-8

* Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Σύστημα cobas[®] 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland)

*Οι probes είναι ανιχνευτές υδρόλυσης

Μελέτη έκφρασης της CK-19

Δεν βρέθηκαν θετικά δείγματα, ως προς την έκφραση της CK-19. Ακολουθεί χαρακτηριστικό γράφημα της ανάλυσης (Σχήμα 4.5).



Σχήμα 4.5 Μελέτη έκφραση της CK-19 στα δείγματα cDNA από CTCs, που απομονώθηκαν μέσω ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ασθενών με σποραδικό MTC. Όλα βρέθηκαν αρνητικά, ως προς την έκφραση της CK-19

** Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Switzerland)*

**Οι probes είναι ανιχνευτές υδρόλυσης*

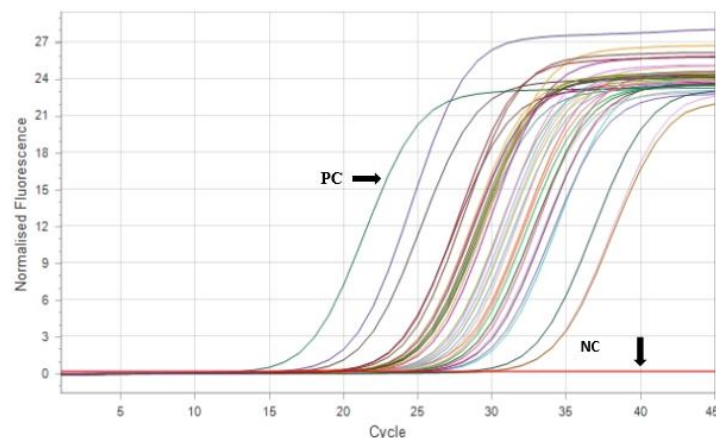
Για τον χαρακτηρισμό ενός δείγματος θετικό, ως προς την έκφραση των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών, CK-8, CK-18 και CK-19, κατά την ανάλυση με RT-qPCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής προϋποθέσεις:

- Ανίχνευση προϊόντος στην RT-qPCR εντός των κύκλων του προγράμματος που έχουμε ορίσει, στα κλινικά δείγματα και στο θετικό δείγμα ελέγχου (PC).
- Μη ανίχνευση προϊόντος στα αρνητικά δείγματα ελέγχου (NC), για την εξασφάλιση απουσίας επιμόλυνσης.
- Εμφάνιση καμπύλης ενίσχυσης του σήματος φθορισμού

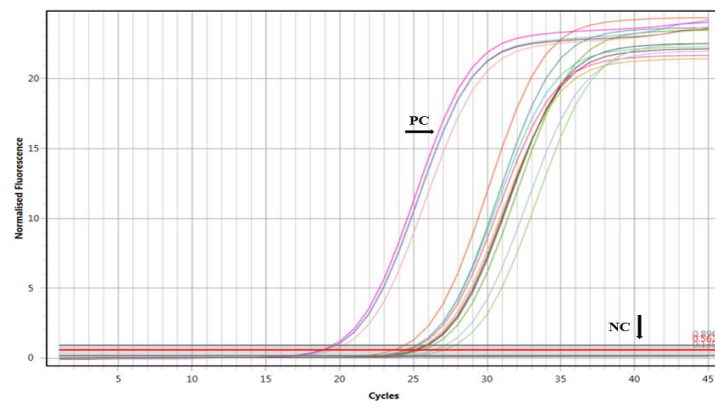
4.3.1.3 Αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών σε επίπεδο mRNA

Μελέτη έκφρασης της VIMENTIN

Συνολικά, σε 22/32 (75,9%) δείγματα βρέθηκε υπερέκφραση της VIMENTIN. Ακολουθούν χαρακτηριστικά γραφήματα της ανάλυσης (**Σχήμα 4.6**), καθώς και τα κριτήρια που εφαρμόστηκαν για τον καθορισμό της υπερέκφρασης, ως προς την VIMENTIN.



α)



β)

Σχήμα 4.6 Χαρακτηριστικό γράφημα της μελέτης έκφρασης της VIMENTIN σε δείγματα cDNA από CTCs, που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό α) ασθενών με σποραδικό MTC και β) υγιών δοτών

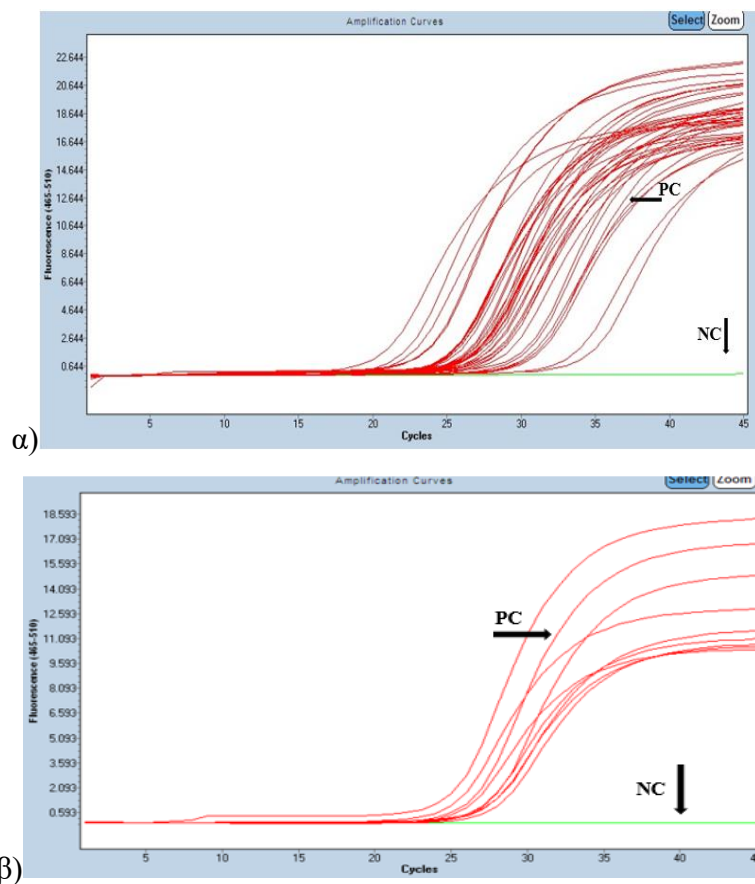
*Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή Mic Real-Time PCR System (Bio Molecular Systems)

*Η ανίχνευση του προϊόντος έγινε με τη χρήση της χρωστικής LC Green

- Ανίχνευση προϊόντος στην qPCR εντός των κύκλων του προγράμματος που έχουμε ορίσει, στα κλινικά δείγματα και στο θετικό δείγμα ελέγχου (PC).
- Ταυτόχρονη μη ανίχνευση προϊόντος στα αρνητικά δείγματα ελέγχου (NC), για την εξασφάλιση της απουσίας επιμόλυνσης.
- Συλλέχθηκαν δείγματα από 17 υγιείς δότες, τα οποία λειτούργησαν ως πληθυσμός αναφοράς και καθόρισαν την υπερέκφραση. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης της *VIMENTIN* των δειγμάτων ενδιαφέροντος με αντίστοιχα δείγματα υγιών, από την οποία υπολογίστηκε, με τη μέθοδο υπολογισμού $\Delta\Delta C_q$, ένα cutoff ίσο με 5,08.

Μελέτη έκφρασης του CXCR4

Συνολικά, σε 3/32 (9,38%) δείγματα βρέθηκε υπερέκφραση του CXCR4. Ακολουθεί χαρακτηριστικό γράφημα της ανάλυσης (**Σχήμα 4.7**), καθώς και τα κριτήρια που εφαρμόστηκαν για τον καθορισμό της υπερέκφρασης, ως προς το CXCR4.



Σχήμα 4.7 Ενδεικτικό διάγραμμα της μελέτης έκφρασης του CXCR4 σε δείγματα που απομονώθηκαν μέσω ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό α) ασθενών με σποραδικό MTC και β) σε δείγματα υγιών δοτών

* Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Σύστημα cobas[®] 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland)

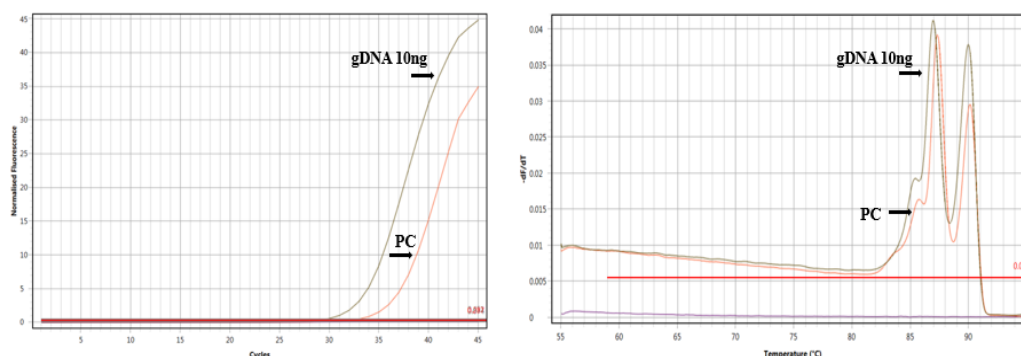
*Οι probes είναι ανιχνευτές υδρόλυσης

- Ανίχνευση προϊόντος στην RT-qPCR εντός των κύκλων του προγράμματος που έχουμε ορίσει, στα κλινικά δείγματα και στο θετικό δείγμα ελέγχου (PC).
- Ταυτόχρονη μη ανίχνευση προϊόντος στα αρνητικά δείγματα ελέγχου (NC), για την εξασφάλιση της απουσίας επιμόλυνσης.
- Συλλέχθηκαν δείγματα από 17 υγιείς δότες, τα οποία λειτούργησαν ως πληθυσμός αναφοράς, και καθόρισαν την υπερέκφραση. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης του *CXCR4* των δειγμάτων ενδιαφέροντος με αντίστοιχα δείγματα υγιών, από την οποία υπολογίστηκε, με τη μέθοδο υπολογισμού $\Delta\Delta C_q$, ένα cutoff ίσο με 2,41.

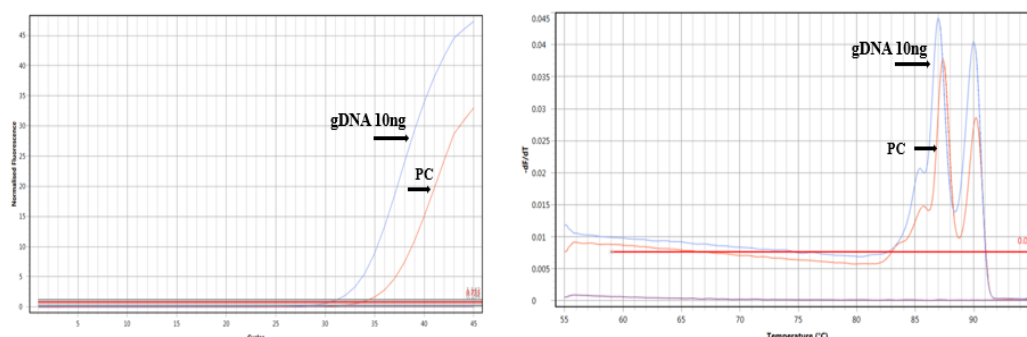
4.3.1.4 Μελέτη ειδικότητας των εκκινητών της καλσιτονίνης (CALCA)

Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου

Οι πειραματικές συνθήκες της RT-qPCR βελτιστοποιήθηκαν, αναφορικά με τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών της καλσιτονίνης (CALCA). Η αντίδραση RT-qPCR έλαβε χώρα σε συνθήκες με θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών $T=60^{\circ}\text{C}$ και $T=65^{\circ}\text{C}$ και ελέγχθηκε η ειδικότητα των εκκινητών, χρησιμοποιώντας δείγμα genomic DNA (gDNA). Ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα καμπύλων ενίσχυσης και τήξης.



Σχήμα 4.8 Γράφημα βελτιστοποίησης θερμοκρασιακού προγράμματος υβριδοποίησης εκκινητών καλσιτονίνης (CALCA) $T=60^{\circ}\text{C}$ καμπύλων ενίσχυσης (αριστερά) και καμπύλων τήξεως (δεξιά)

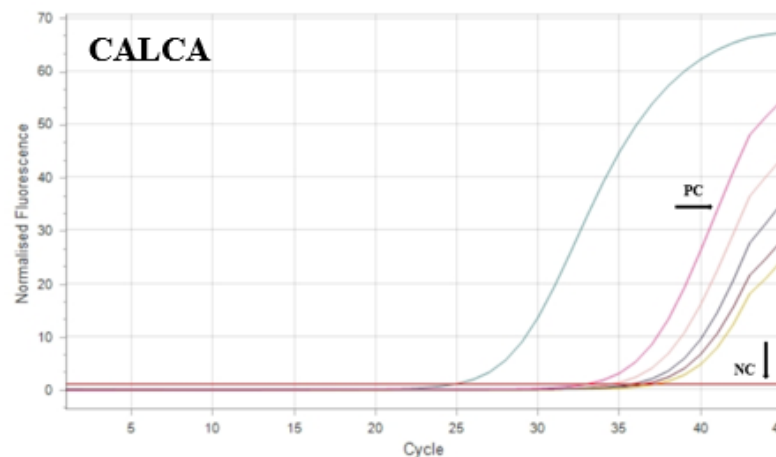
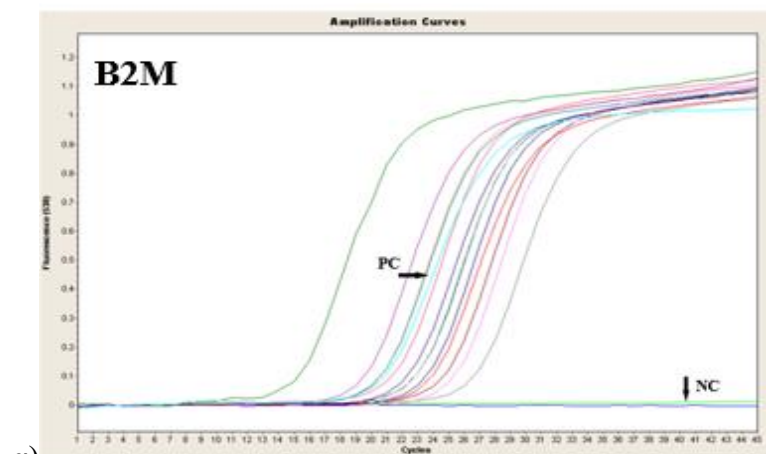


Σχήμα 4.9 Γράφημα βελτιστοποίησης θερμοκρασιακού προγράμματος υβριδοποίησης εκκινητών καλσιτονίνης (CALCA) $T=65^{\circ}\text{C}$ καμπύλων ενίσχυσης (αριστερά) και καμπύλων τήξεως (δεξιά)

Παρατηρήσαμε ότι, η αύξηση της θερμοκρασίας δεν αύξησε την ειδικότητα των εκκινητών, καθώς δεν είχαμε πλήρη απαλοιφή του gDNA. Ωστόσο, επειδή η συγκέντρωση σε ένα δείγμα gDNA είναι και πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση στα, προς μελέτη, δείγματα, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ειδικότητας των εκκινητών σε κλάσμα CTCs ασθενών ($n=10$) που απομονώθηκαν, μέσω ErCAM θετικού ανοσομαγνητικού εμπλουτισμού και σε αντίστοιχο κλάσμα, όπως τα άλλα CTCs, υγιών ($n=10$) που απομονώθηκαν με την ίδια μέθοδο.

Δείγματα Ασθενών με σποραδικό MTC (n=10) για τη μελέτη της ειδικότητας των εκκινητών της καλσιτονίνης(CALCA)

Ακολουθούν χαρακτηριστικά γραφήματα για τον έλεγχο ποιότητας δειγμάτων cDNA (n=10) από CTCs, τα οποία απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ασθενών με σποραδικό MTC, μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M* και για την έκφραση της καλσιτονίνης (*CALCA*) (Σχήμα 4.10), καθώς και πίνακας με τις αντίστοιχες τιμές C_q (Πίνακας 4.1).



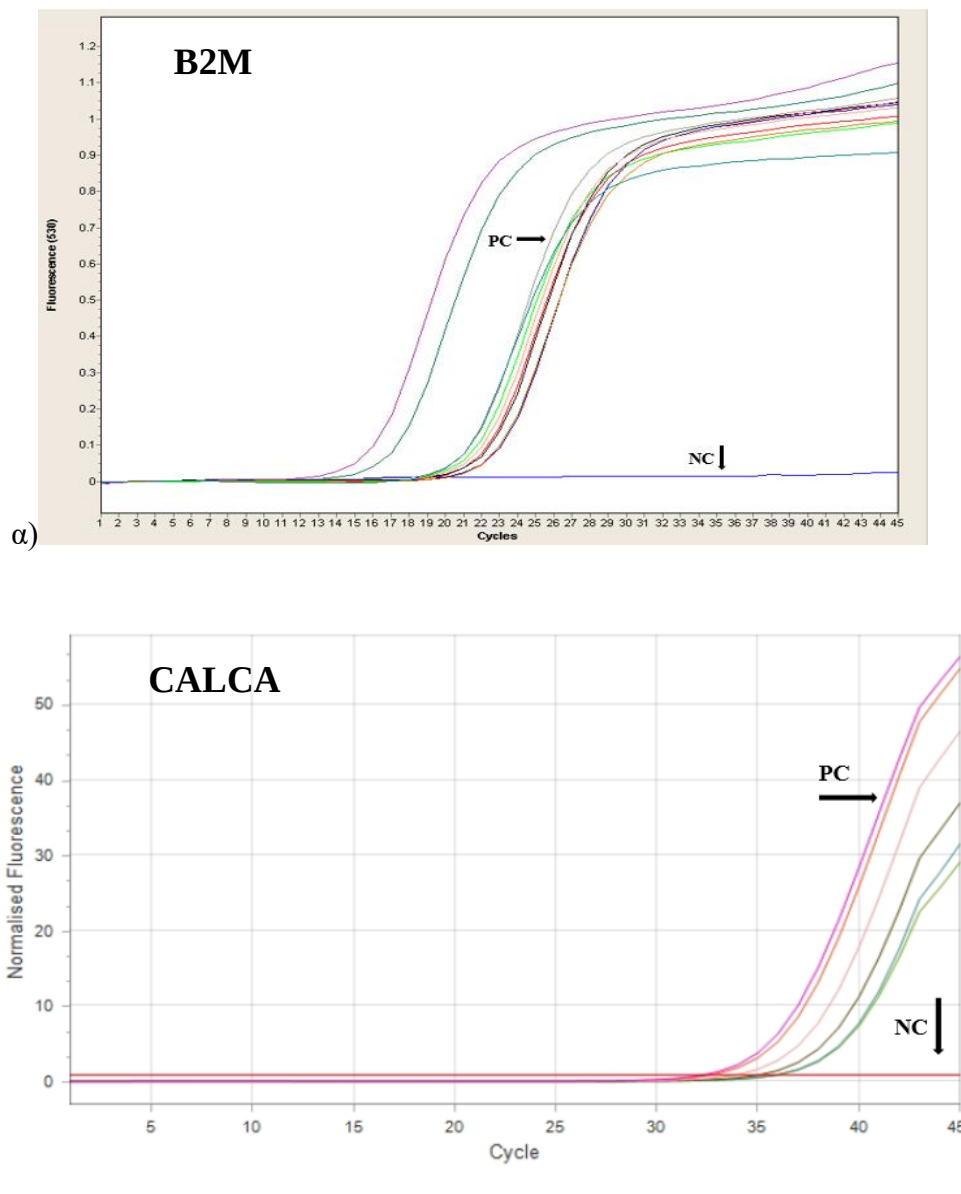
Σχήμα 4.10 Χαρακτηριστικό γράφημα μελέτης ειδικότητας των εκκινητών σε δείγματα cDNA (n=10) από CTCs που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό ασθενών με σποραδικό MTC α) για τον έλεγχο ποιότητας μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M*
β) για την έκφραση της καλσιτονίνης (*CALCA*)

Πίνακας 4.1 Cq των δειγμάτων cDNA (n=10) από CTCs που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό ασθενών με σποραδικό MTC για τον έλεγχο ποιότητας μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς B2M και για την καλσιτονίνη (CALCA)

Δείγματα CTCs MTC	B2M (Cq)	CALCA (Cq)	ΔCq
MTC17	23,91	24,9	0,99
MTC20	23,1	34,48	11,38
MTC29	21,07	37,18	16,11
MTC22	26,13	36,98	10,85
MTC27	23,21	32,33	9,12
MTC24	22,69	36,42	13,73
MTC30	22,38	35,74	13,36
MTC34	20,85	34,21	13,36
MTC07	19,46	36,79	17,33
MTC13	24,09	38,04	13,95
AVERAGE	22,69	34,71	12,02
SD	1,89	3,84	4,56

Υγιείς Δότες (n=10) για τη μελέτη της ειδικότητας των εκκινήτων της καλσιτονίνης(CALCA)

Ακολουθούν χαρακτηριστικά γραφήματα για τον έλεγχο ποιότητας δειγμάτων cDNA (n=10) από κλάσμα CTCs, όπως των ασθενών, τα οποία απομονώθηκαν επίσης με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, υγιών δοτών, μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M* και για την έκφραση της καλσιτονίνης (*CALCA*) (Σχήμα 4.11), καθώς και πίνακας με τις αντίστοιχες τιμές Cq (Πίνακας 4.2).



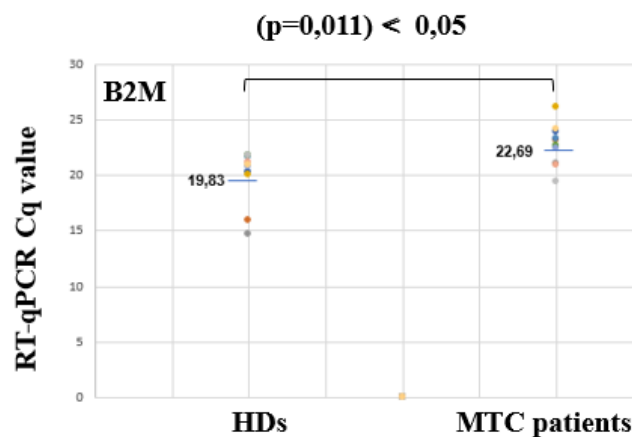
Σχήμα 4.11 Χαρακτηριστικό γράφημα μελέτης ειδικότητας των εκκινήτων σε δείγματα cDNA (n=10) από CTCs που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, υγιών δοτών α) για τον έλεγχο ποιότητας cDNA μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M* β) για την έκφραση της καλσιτονίνης (*CALCA*)

Πίνακας 4.2 Cq των δειγμάτων cDNA (n=10) από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, υγιών δοτών, για τον έλεγχο ποιότητας μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς B2M και για την καλσιτονίνη (CALCA)

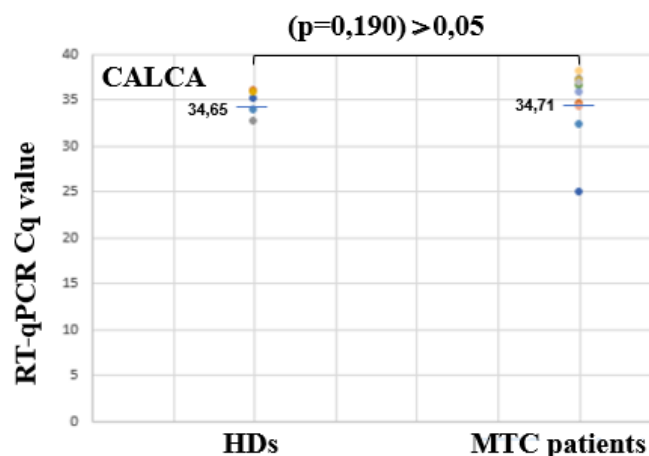
Δείγματα κλάσμα CTCs υγιών	B2M (Cq)	CALCA (Cq)	Δ(Cq)
HD-EpCAM 1	20,3	35,05	14,75
HD-EpCAM 2	15,94	35,94	20
HD-EpCAM 3	14,74	-	-
HD-EpCAM 4	20,05	-	-
HD-EpCAM 5	21,61	-	-
HD-EpCAM 6	21,76	32,6	10,84
HD-EpCAM 7	20,72	-	-
HD-EpCAM 8	21,15	35,85	14,7
HD-EpCAM 9	21,73	-	-
HD-EpCAM 10	20,93	33,83	12,9
AVERAGE	19,83	34,65	14,64
SD	2,49	1,43	3,4

Στατιστική Επεξεργασία

Χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney U Test ελέγχου δύο ανεξαρτήτων δειγμάτων, για να ερευνηθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών αιμοδοτών και ασθενών, ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *B2M* και του *CALCA*. Από τα αποτελέσματα, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την έκφραση της *B2M* ($p=0,011<0,05$) (Σχήμα 4.12), ενώ ως προς την έκφραση του *CALCA*, η διαφορά που προέκυψε δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,190>0,05$) (Σχήμα 4.13). Επισημαίνεται ότι, ο αριθμός των δειγμάτων ήταν πολύ μικρός και άρα, με αύξηση του αριθμού τους, θα είχαμε καλύτερο διαχωρισμό. Επίσης, σε 5/10 από τα δείγματα των φυσιολογικών δοτών η καλσιτονίνη δεν εκφράστηκε.



Σχήμα 4.12 Διάγραμμα για την σύγκριση των δειγμάτων *cDNA* από CTCs που απομονώθηκαν με *ErCAM* θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *B2M* σε υγιείς δοτών (Healthy Donors-HDs) ($n=10$) και σε ασθενείς με σποραδικό MTC (MTC patients ($n=10$))

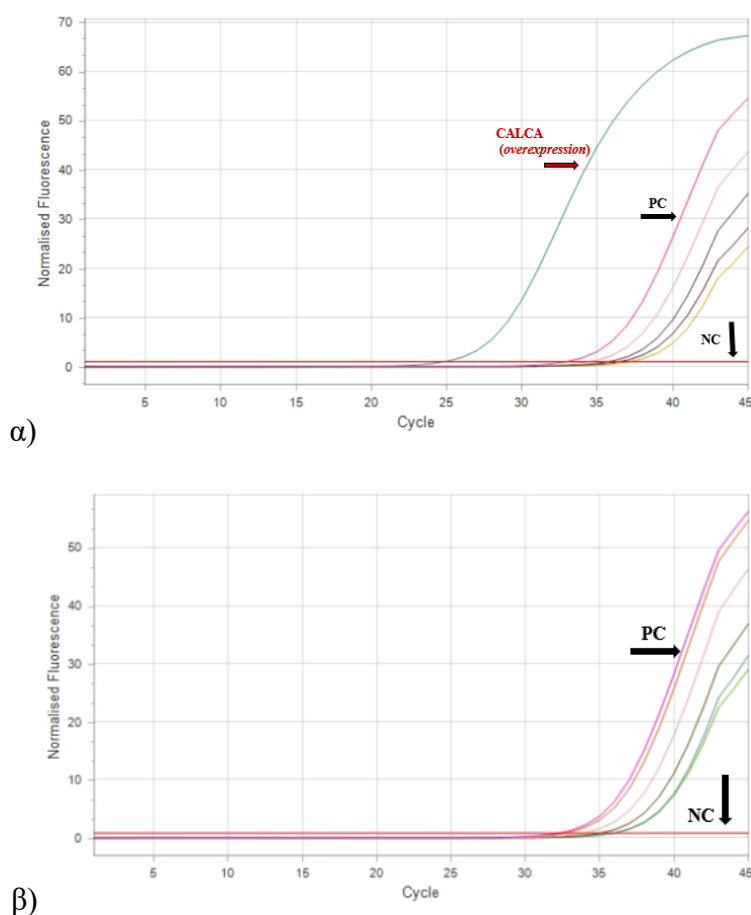


Σχήμα 3.13 Διάγραμμα για την σύγκριση των δειγμάτων *cDNA* από CTCs που απομονώθηκαν με *ErCAM* θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ως προς την έκφραση της καλσιτονίνης (*CALCA*) σε υγιείς δότες (Healthy Donors-HDs) ($n=10$) και σε ασθενείς με σποραδικό MTC (MTC patents) ($n=10$)

Αφού ελέγχθηκε η ειδικότητα των εκκινητών του *CALCA* προχωρήσαμε σε ανάλυση των δειγμάτων μας

4.3.1.5 Μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (*CALCA*) σε επίπεδο mRNA

Συνολικά, σε 1/32 (3,13%) δείγμα βρέθηκε υπερέκφραση της καλσιτονίνης (*CALCA*). Ακολουθούν χαρακτηριστικά γραφήματα της ανάλυσης, καθώς και τα κριτήρια που εφαρμόστηκαν για τον καθορισμό της υπερέκφρασης, ως προς την καλσιτονίνη (*CALCA*) (Σχήμα 4.16):



Σχήμα 4.14 Χαρακτηριστικό γράφημα της μελέτης έκφρασης της καλσιτονίνης (*CALCA*) σε δείγματα *cDNA* από CTCs, που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό α) ασθενών με σποραδικό MTC και β) υγιών δοτών

- Ανίχνευση προϊόντος στην RT-qPCR εντός των κύκλων του προγράμματος που έχουμε ορίσει, στα κλινικά δείγματα και στο θετικό δείγμα ελέγχου (PC).
- Ταυτόχρονη μη ανίχνευση προϊόντος στα αρνητικά δείγματα ελέγχου (NC), για την εξασφάλιση της απουσίας επιμόλυνσης.

- Συλλέχθηκαν δείγματα από 17 υγιείς δότες τα οποία λειτούργησαν ως πληθυσμός αναφοράς και καθόρισαν την υπερέκφραση. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης της καλσιτονίνης (CALCA) των δειγμάτων ενδιαφέροντος με αντίστοιχα δείγματα υγιών, από την οποία υπολογίστηκε, με βάση τη μέθοδο υπολογισμού $\Delta\Delta C_q$, ένα cutoff ίσο με 7,32.

4.3.1.6 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων cDNA από CTCs, που απομονώθηκαν με ErCAM θετικής ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ασθενών με σποραδικό MTC και υγιών δοτών, για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων της καλσιτονίνης (CALCA), των επιθηλιακών δεικτών CK-8, CK-18 και CK-19, του μεσεγχυματικού δείκτη VIMENTIN, του υποδοχέα χημειοκινών CXCR4, αντίστοιχα, καθώς και του γονιδίου αναφοράς B2M παρουσιάζονται, συνοπτικά, στο παρακάτω heatmap (Σχήμα 4.15).

ΑΣΘΕΝΕΙΣ													ΥΓΙΕΙΣ																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	1			2			3			4			5			6			7			8			9		10		11		12		13		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Μεταλλάξεις	HRAS			RET			RET			RET			RET			RET			RET			HRAS			RET		RET		RET		RET																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							

Σχήμα 4.15 Παρουσίαση συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων με τη μορφή Heatmap για τα δείγματα (n=32) ασθενών με σποραδικό MTC και υγιών δοτών (n=17). (Κόκκινο: υπερέκφραση, Πράσινο φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης)

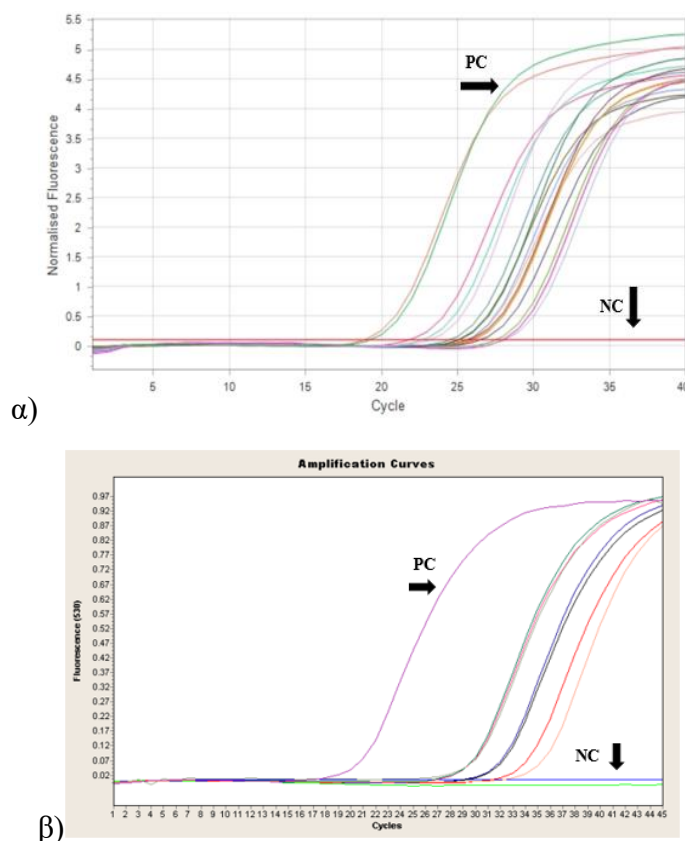
Σύμφωνα με τα δεδομένα του heatmap, παρατηρούμε ότι σε ένα μόνο δείγμα, το οποίο αντιστοιχεί στο δεύτερο time point ασθενή με μετάσταση έχουμε υπερέκφραση της καλσιτονίνης (CALCA). Επιπλέον, στον ίδιο ασθενή βρέθηκε υπερέκφραση του CXCR4 σε όλα τα time points εκτός από το τελευταίο, κατόπιν αλλαγής της θεραπείας. Σημειώνεται ότι, ο συγκεκριμένος ασθενής φέρει μεταλλάξεις στο HRAS γονίδιο. Σχετικά με την έκφραση της καλσιτονίνης (CALCA) και του CXCR4 στα άλλα δείγματα δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές. Η VIMENTIN υπερεκφράζεται στην πλειοψηφία των δειγμάτων. Αναφορικά με τους επιθηλιακούς δείκτες, βρέθηκαν

τέσσερα δείγματα θετικά, ως προς την έκφραση *CK-8* και δύο, ως προς την έκφραση της *CK-18*, ενώ είχαμε απουσία έκφρασης της *CK-19* σε όλα τα δείγματα.

4.3.2 Απομόνωση CTCs με το σύστημα μικροροών Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK).

4.3.2.1 Έλεγχος ποιότητας των δειγμάτων μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M*

Αρχικά, πριν την ανάλυση των δειγμάτων, τα οποία απομονώθηκαν μέσω του συστήματος μικροροών Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK), για την μελέτη των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών *CK-8*, *CK-18* και *CK-19*, του μεσεγχυματικού δείκτη *VIMENTIN*, του υποδοχέα χημειοκινών *CXCR4* και τέλος του γονιδίου της καλσιτονίνης (*CALCA*), προηγήθηκε RT-qPCR για τον έλεγχο ποιότητας του cDNA, μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M*, σε όλα τα δείγματα, τόσο των ασθενών (n=18), όσο και των υγιών. Ακολουθούν χαρακτηριστικά γραφήματα της ανάλυσης (Σχήμα 4.16):

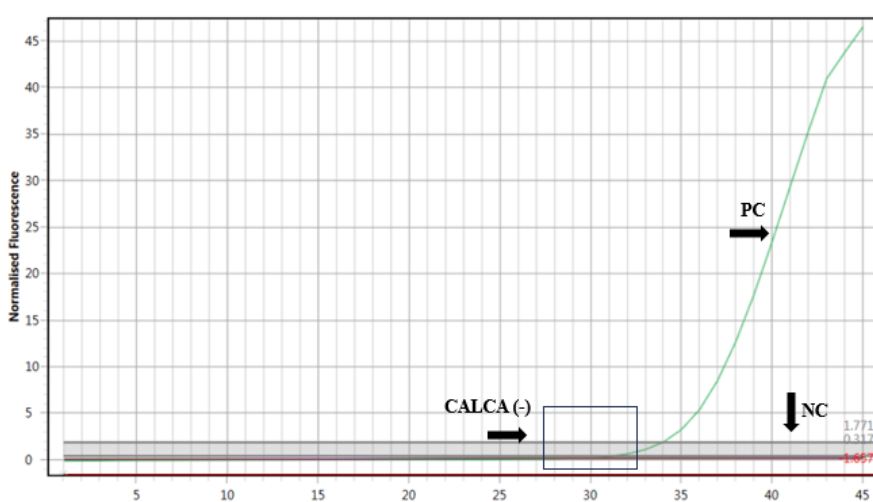


Σχήμα 4.16 Χαρακτηριστικό γράφημα του ελέγχου ποιότητας μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M* δειγμάτων cDNA από CTCs, τα οποία έχουν απομονωθεί με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) α) υγιών δοτών (n=17) και β) ασθενών με σποραδικό MTC (n=18)

Αφού λήφθηκαν θετικά αποτελέσματα για την ποιότητα του cDNA όλων των δειγμάτων, με την ανίχνευση του γονιδίου αναφοράς της *B2M* και βεβαιώθηκε η αποφυγή επιμόλυνσης με την μη-ανίχνευση προϊόντος της αντίδρασης RT-qPCR στα αρνητικά δείγματα ελέγχου, ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων για τη μελέτη έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων.

4.3.2.2 Μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (*CALCA*) σε επίπεδο mRNA

Δεν ανιχνευτήκαν θετικά, ως προς την έκφραση της καλσιτονίνης (*CALCA*) δείγματα. Ακολουθεί χαρακτηριστικό γράφημα της ανάλυσης (Σχήμα 4.17).

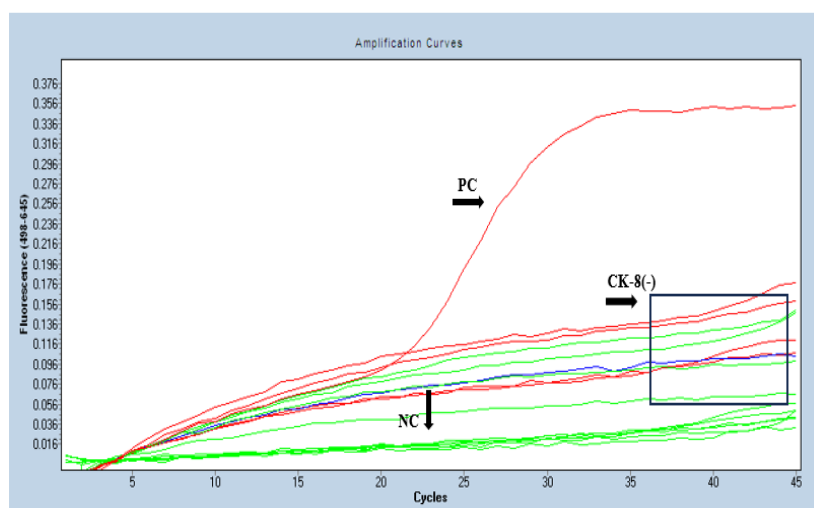


Σχήμα 4.17 Μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (*CALCA*) σε δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC

4.3.2.3 Αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης των επιθηλιακών δεικτών σε επίπεδο mRNA

Μελέτη έκφρασης της CK-8

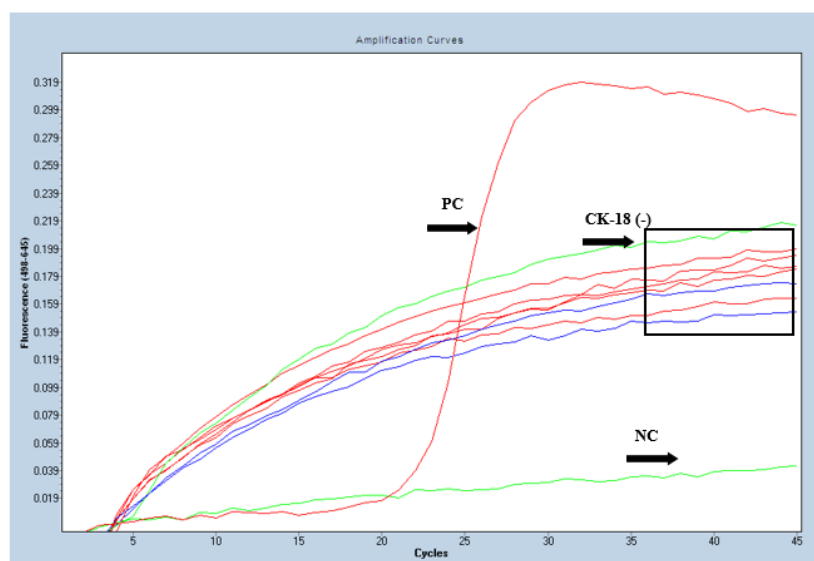
Δεν ανιχνεύτηκαν θετικά δείγματα, ως προς την έκφραση της CK-8. Ακολουθεί χαρακτηριστικό γράφημα της ανάλυσης (Σχήμα 4.18).



Σχήμα 4.18 Μελέτη έκφρασης της CK-8 στα δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC

Μελέτη έκφρασης της CK-18

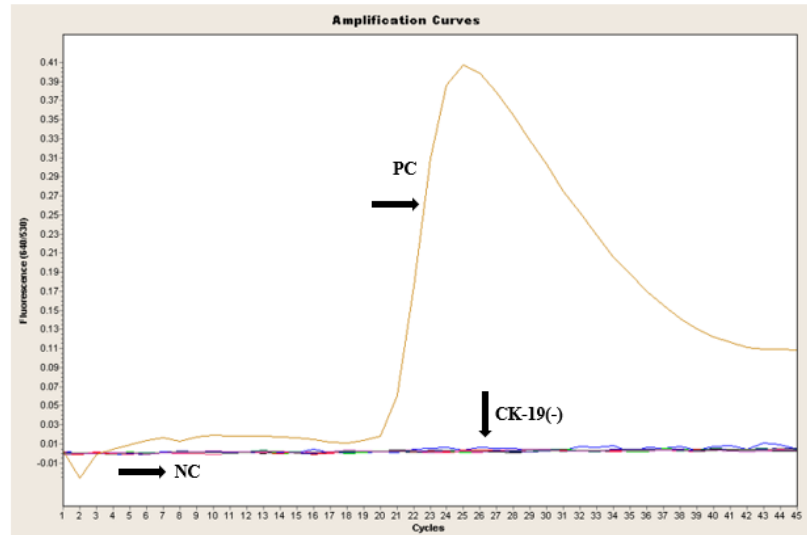
Δεν ανιχνεύθηκαν θετικά δείγματα, ως προς την έκφραση της CK-18. Ακολουθεί χαρακτηριστικό γράφημα της ανάλυσης (Σχήμα 4.19).



Σχήμα 4.19 Μελέτη έκφρασης της CK-18 στα δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC

Μελέτη έκφρασης της CK-19

Δεν ανιχνεύτηκαν θετικά δείγματα ως προς την έκφραση της CK-19. Ακολουθεί χαρακτηριστικό γράφημα της ανάλυσης (Σχήμα 4.20).

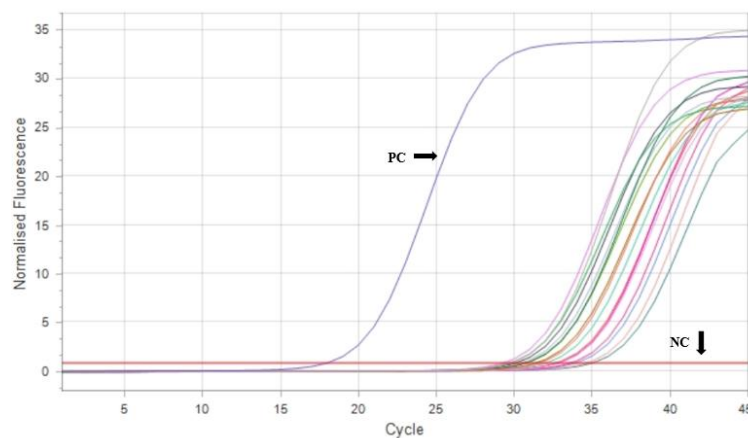


Σχήμα 4.20 Μελέτη έκφρασης της CK-19 στα δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC

4.3.3.4 Αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών σε επίπεδο έκφρασης mRNA

Μελέτη έκφρασης της VIMENTIN

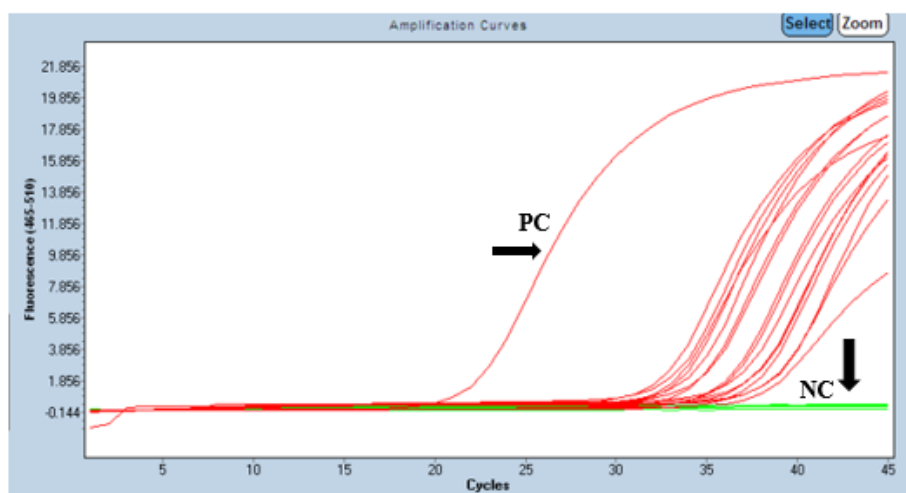
Ακολουθεί χαρακτηριστικό γράφημα της ανάλυσης (Σχήμα 4.21)



Σχήμα 4.21 Μελέτη έκφρασης της VIMENTIN σε δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC

Μελέτη έκφρασης του CXCR4

Ακολουθεί χαρακτηριστικό γράφημα της ανάλυσης (Σχήμα 4.22)



Σχήμα 4.22 Μελέτη έκφρασης του CXCR4 σε δείγματα cDNA από δείγματα cDNA που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης έκφρασης στα CTCs ασθενών με σποραδικό MTC, τα οποία απομονώθηκαν με το σύστημα μικροροών Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK), δεν παρατηρήθηκε έκφραση της καλσιτονίνης καθώς όλα τα δείγματα είχαν μηδενικό Cq, μολονότι ο B2M έλεγχος ήταν θετικός. Κατά τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών CK-8, CK-18 και CK-19, όλα τα δείγματα βρέθηκαν επίσης αρνητικά. Αντιθέτως, κατά την μελέτη του γονιδίου του μεσεγχυματικού δείκτη VIMENTIN και του υποδοχέα χημειοκίνης CXCR4, παρατηρήθηκε εμφάνιση καμπυλών ενίσχυσης σήματος φθορισμού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης, έχει πραγματοποιηθεί ως τώρα με τη χρήση ανοσοϊστοχημικής χρώσης για την επιβεβαίωση των CTCs που προέρχονται από MTC (89). Δεδομένου, όμως, ότι στα εν λόγω δείγματα δεν ανιχνεύτηκε καλσιτονίνη, εκτιμούμε ότι το σήμα που ανιχνεύσαμε, κατά τη μελέτη έκφρασης της VIMENTIN και του CXCR4, οφείλεται σε φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία παγιδεύτηκαν στην κασέτα διαχωρισμού και τα οποία δεν αποτελούν CTCs. Γνωρίζουμε ότι, τόσο το CXCR4 όσο και η VIMENTIN εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα και σε υγιείς (101,102). Συγκεκριμένα, η κασέτα διαχωρισμού που χρησιμοποιείται στο σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK), όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 3, αποτελείται από πολλαπλά κανάλια, μέσω των οποίων τα κύτταρα διέρχονται καταλήγοντας σε μια τερματική διχάλα διαμέτρου

6,5μm. Υποθέτουμε ότι τα CTCs τα οποία προέρχονται από ασθενείς με MTC διαθέτουν διάμετρο μικρότερη των 6,5μm και επομένως διέρχονται χωρίς να παγιδεύονται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Υγρή Βιοψία αποτελεί μια ελάχιστα επεμβατική προσέγγιση, η οποία συνιστά ένα σύνολο μοριακών αναλύσεων στο αίμα ασθενών με καρκίνο και δυνατότητα εφαρμογής στην κλινική πράξη, με στόχο την ανίχνευση υποτροπής και της ελάχιστα υπολειπόμενης νόσου, ακόμα και στα πρώιμα στάδια, μετά την χειρουργική αφαίρεση καθώς και τη μελέτη δεικτών που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία. Σε σχέση με την κλασική ιστική βιοψία μας δίνει το πλεονέκτημα παρακολούθησης των ασθενών σε διάφορα χρονικά διαστήματα ακόμα και όταν ο πρωτοπαθής όγκος έχει αφαιρεθεί χειρουργικά, αλλά και σε περιπτώσεις μεταστατικού καρκίνου, όπου η υγρή βιοψία δεν είναι εφικτή. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs παρέχει μια πιο αντιπροσωπευτική εικόνα του μοριακού προφίλ του όγκου σε ασθενείς με MTC, με σκοπό την εκτίμηση της πρόγνωσης του και την παρακολούθηση υποτροπής και ανταπόκρισης στη θεραπείας (46,48). Πράγματι, η υγρή βιοψία μπορεί να είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την υπέρβαση των ορίων της συμβατικής αντιμετώπισης των κακοηθειών του θυρεοειδούς (88).

Τα τελευταία χρόνια, η προσπάθεια ανεύρεσης νέων βιοδεικτών για την πρόιμη διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση της θεραπείας ασθενών με σποραδικό MTC έχει λάβει σημαντικές διαστάσεις (88). Οι μεταλλάξεις που οφείλονται για την εμφάνιση της νόσου αφορούν κυρίως τα γονίδια *RET* και *HRAS*, που δρουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK και PI3K-AKT, τα οποία ελέγχουν την διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (19). Εκτός από την επαγωγή της καρκινογένεσης, μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια επιφέρουν και δευτερογενείς τροποποιήσεις, που αφορούν την αλληλεπίδραση του όγκου με το μικροπεριβάλλον του. Τέτοιες τροποποιήσεις ενδέχεται να αλλάζουν τόσο τον μοριακό χαρακτήρα των κυττάρων μέσω της EMT, όσο και το προφίλ έκφρασης χημειοκινών. Το σύνολο των γεγονότων αυτών οδηγεί στη δημιουργία μεταστάσεων (103). Εύλογα προκύπτει το συμπέρασμα ότι, το MTC εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και συνεπώς η ανάλυση του μοριακού προφίλ του όγκου κρίνεται αναγκαία.

Η διέγερση της δραστηριότητας του *RET* και του *HRAS* οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων, πρωτεϊνών προσκόλλησης, όπως η *VIMENTIN* και πρωτεϊνών αναδιαμόρφωσης της εξωκυττάριας μήτρας που μπορεί να προκαλέσουν την μετατροπή των καρκινικών κυττάρων σε πιο μεσεγχυματικούς φαινότυπους (24,36,104). Αποτελέσματα έρευνας, στα πλαίσια του μοριακού χαρακτηρισμού CTCs ασθενών με MTC, έδειξε ότι τα κύτταρα στην πλειοψηφία τους ήταν μεσεγχυματικά (105). Τα αποτελέσματα συνάδουν με αυτά της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς παρατηρήθηκε ότι η *VIMENTIN* υπερεκφράζεται στα περισσότερα δείγματα.

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1, η αλληλεπίδραση του δεσμοπλαστικού στρώματος στο φαινόμενο EMT σε ασθενείς με MTC είναι σημαντική. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι, στο στρώμα του όγκου ασθενών με MTC, τρεις δείκτες ενεργοποίησης ινοβλαστών (η πρωτεΐνη ενεργοποίησης ινοβλαστών α , (FAP α), η Τενασκίνη C (Tn-C) και α -ακτίνη λείων μυών (α -SMA)) εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε σύγκριση με τον φυσιολογικό θυρεοειδή αδένα και συσχετίζονται με τον βαθμό δεσμοπλασίας (106). Τέλος, έκφραση Tn-C παρατηρήθηκε στο στρώμα του όγκου τόσο σε περιπτώσεις κληρονομούμενου, όσο και σε σποραδικού MTC (107,108).

Έχει προταθεί, πρόσφατα, ότι καταστάσεις υποξίας στο μικροπεριβάλλον του όγκου θα μπορούσαν να προκαλέσουν την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας και να οδηγήσουν σε αύξηση της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να εισβάλλουν στο λεμφικά αγγεία (109). Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, τα οποία έχει προταθεί ότι ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη μετανάστευσή τους (110). Είναι ενδιαφέρον ότι σε καρκίνους του θυρεοειδούς με μεταλλάξεις στο μονοπάτι RET-RAS-BRAF παρουσιάζεται υψηλή έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με CAFs (111). Δεδομένου ότι το MTC εμφανίζει επίσης μεταλλάξεις στα ίδια ογκογονίδια, η ανάπτυξη δεσμοπλαστικού στρώματος στο MTC θα μπορούσε να σχετιστεί με την ενεργοποίηση αυτού του καταρράκτη σηματοδότησης και παραγωγής CAFs, οι οποίοι αλληλοεπιδρούν με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, επάγοντας έναν πιο μεσεγχυματικό φαινότυπο.

Όσον αφορά την ανάλυση έκφρασης της του γονιδίου του υποδοχέα χημειοκινών *CXCR4*, που διεξήχθη στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τα

αποτελέσματα έδειξαν υπερέκφραση σε έναν μόνο ασθενή, ο οποίος ήταν θετικός σε μετάλλαξη στο *HRAS*. Η υπερέκφραση βρέθηκε στα 3 πρώτα χρονικά σημεία, ενώ απουσίαζε στο τελευταίο time point, μετά από αλλαγή της θεραπείας. Τα συγκεκριμένα ευρήματα φαίνεται να συνάδουν με τη βιβλιογραφία, καθώς μεταλλάξεις στο *HRAS* εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/PTEN/AKT/mTOR. Το συγκεκριμένο βιολογικό μονοπάτι είναι υπεύθυνο για τη μεταγωγή σήματος που ρυθμίζει την έκφραση του *HIF-α* (22,112). Σύμφωνα με έρευνες σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ), μεταλλάξεις στο *HRAS* έχουν συνδεθεί με υπερέκφραση του *CXCR4* (113,114). Ο σχηματισμός μεταστάσεων είναι μια συντονισμένη διαδικασία, η οποία παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με αυτή της διακίνησης λευκοκυττάρων, μια διαδικασία, η οποία ελέγχεται στενά από τις χημειοκίνες και τους αντίστοιχους υποδοχείς τους (115).

Από αυτή την άποψη, C-X-C υποδοχείς χημειοκίνης τύπου 4 και 7 (*CXCR4*, *CXCR7*), καθώς και του προσδέτη τους, *SDF1a*, επίσης γνωστός ως *CXCL12*, έχουν εμπλακεί σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων (116). Ο συζευγμένος με πρωτεΐνη G υποδοχέας χημειοκίνης *CXCR4* εκφράζεται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών κατά την εμβρυογένεση, συμπεριλαμβανομένου του ανοσοποιητικού και του κεντρικού νευρικού συστήματος και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την αγγειογένεση (31). Η έκφραση του *CXCR4*, ως επί τω πλείστω, απουσιάζει υπό φυσιολογικές συνθήκες σε πολλούς από τους ιστούς των ενηλίκων, ενώ φαίνεται να υπερεκφράζεται σε ποικιλία ανθρώπινων καρκινωμάτων (117,118). Το *SDF1a* (stromal cell-derived factor 1 alpha) είναι μια χημειοκίνη ευρέως εκφρασμένη, η οποία λειτουργεί ως ένα ισχυρό χημειοελκτικό για κύτταρα που εκφράζουν *CXCR4*. Ο *SDF1a* εκφράζεται στα πιο κοινά μεταστατικά όργανα, όπως οι λεμφαδένες, το ήπαρ, οι πνεύμονες και τα οστά (119–121). Διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει ότι, τα θετικά στο *CXCR4* κύτταρα ακολουθούν ή αλλιώς μετακινούνται προς τους ιστούς που εκφράζουν τον *SDF1a* για να σχηματίσουν απομακρυσμένες μεταστάσεις. Εκτός από τη χημειοταξία, η δέσμευση του *SDF1a* στο *CXCR4* προκαλεί την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μονοπατιών, τα οποία σχετίζονται με EMT, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση.

Τέλος, η αυξανόμενη έκκριση χημειοκινών αυξάνει τα επίπεδα της έκφρασης του προσδέτη GFL από κύτταρα της εξωκυττάριας μήτρας με περαιτέρω διέγερση του

RET και τη συνέχιση ενός φαύλου κύκλου αυτών των βιολογικών διεργασιών που επάγουν τη μετάσταση (31,35,36). Αποτελέσματα έρευνας σε ασθενείς με MTC, έδειξαν ότι η έκφραση του *CXCR4* σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο της νόσου και μεταστατικό φαινότυπο. Επίσης, επώαση κυτταροκαλλιέργειων TT, που εκφράζουν *CXCR4*, με τον SDF-1a είχε ως αποτέλεσμα, αύξηση της διηθητικής ικανότητας των κυττάρων. Παράλληλα, μελέτη της έκφρασης του mRNA στα κύτταρα αυτά έδειξε αύξηση της έκφρασης ως προς την *VIMENTIN*, αποτελώντας ένδειξη για τον μεσεγχυματικό φαινότυπο των κυττάρων αυτών. Το *CXCR4* μπορεί να θεωρηθεί ως ένας νέος θεραπευτικός στόχος σε περιπτώσεις προχωρημένου MTC (31). Το γεγονός ότι μετά την αλλαγή της θεραπείας, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης του *CXCR4*, ενδεχομένως, να εξηγείται λόγω του δεσμοπλαστικού στρώματος που επηρεάζει και τη δράση πολλών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, καθώς αποτελεί φραγμό για την είσοδο και δράσης τους στο εσωτερικό του όγκου (111,115,122).

Στα πλαίσια των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τα οποία αφορούν την ανάλυση έκφρασης των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών *CK-8*, *CK-18* και *CK-19*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε ένα μικρό ποσοστό βρέθηκαν θετικά, ως προς την έκφραση του *CK-8* και του *CK-18*, ενώ αντίθετα όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά, ως προς την έκφραση της *CK-19*. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα, η καταμέτρηση των CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του θυρεοειδούς με το σύστημα CellSearch, το οποίο βασίζεται στην καταμέτρηση βάσει των επιθηλιακών δεικτών *CK-8*, *CK-18* και *CK-19*, έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα (93). Με βάση τη βιβλιογραφία, κατά τον μοριακό χαρακτηρισμό CTCs σε ασθενείς με MTC, με τη χρήση μεθόδων CanPatrol™ και RNA-ISH (RNA in situ hybridization) υπεδείχθησαν μεικτοί φαινότυποι με σαφή υπεροχή του μεσεγχυματικού έναντι του επιθηλιακού (105).

Η καλσιτονίνη αποτελεί έναν σημαντικό καρκινικό δείκτη του MTC με τεράστια κλινική σημασία και αφορά κυρίως στη μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών που έχουν υποβληθεί σε θυρεοειδεκτομή και στους οποίους η μέτρηση των επιπέδων καλσιτονίνης του ορού, έπειτα από πρόκληση αποτελεί πολύτιμο και αξιόπιστο δείκτη για την παρουσία υπολειπόμενης ή υποτροπιάζουσας νόσου. Παρόλα αυτά, υπάρχουν περιπτώσεις προχωρημένων σταδίων και παρουσίας μεταστάσεων, στις οποίες η παραγωγή και η έκκριση καλσιτονίνης είναι μειωμένη

στο πλάσμα (123). Σε έρευνα που διεξήχθη, η ανάλυση των CTCs απέδειξε το ρόλο τους στην πρόγνωση σε ένα σύνολο ασθενών με MTC και σε πρόσφατη δημοσίευση, CTCs θετικά στην καλσιτονίνη τακτοποιήθηκαν στο αίμα 15 ασθενών, οι οποίοι είχαν υποστεί αφαίρεση του θυρεοειδούς αδένος, 12 χρόνια μετά την αρχική διάγνωση. Σημειώνεται ότι σε 3 ασθενείς παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα CTCs στην κυκλοφορία τους, ενώ τα επίπεδα καλσιτονίνης στο αίμα τους παρέμεναν χαμηλά υποδηλώνοντας μία ενδεχόμενη κακή πρόγνωση (89). Στα αντίστοιχα δείγματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της καλσιτονίνης (*CALCA*), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές, έκτος από ένα στο οποίο παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της καλσιτονίνης στα CTCs, 60 ημέρες πριν την αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων της καλσιτονίνης στον ορό.

Τέλος, φάνηκε ότι ο θετικός EpCAM ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός, ενδεχομένως, να αποτελεί καλύτερη μέθοδο απομόνωσης των CTCs ασθενών με σποραδικό MTC συγκριτικά με το σύστημα μικροροών Parsortix™ (ANGLE-plc, Guildford, UK), γεγονός που αναμένεται να επιβεβαιωθεί με πειράματα spiking.

Εν κατακλείδι, ο αριθμός των δειγμάτων της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι σχετικά μικρός. Επομένως, από τα αποτελέσματα παίρνουμε μόνο κάποιες ενδείξεις και για το λόγο αυτό η έκφραση των γονιδίων των επιθηλιακών δεικτών *CK-8*, *CK-18* και *CK-19*, του μεσεγχυματικού δείκτη *VIMENTIN*, του υποδοχέα χημειοκινών *CXCR4* και της καλσιτονίνης (*CALCA*) σε CTCs ασθενών με σποραδικό MTC θα πρέπει να μελετηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και για μεγαλύτερες περιόδους παρακολούθησης.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΟΡΟΛΟΓΙΑ
CTCs	Circulating Tumor Cells
ctDNA	Circulating Tumor DNA
cfDNA	Cell Free DNA
MTC	Medullary Thyroid Cancer
DM	Distance Metastasis
BPD	Biochemical Persistent Disease
MRD	Minimal residual Disease
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
PD	Progression of Disease
TNM	Tumor Node Metastasis
CNA	Circulating Nucleid Acid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
NRAS	Neuroblastoma Ras viral oncogene homolog
BRAF	b-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
DNA	DeoxyriboNucleid Acid
p53	TP53, Tumor Protein 53
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit a
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
RNA	RiboNucleid Acid
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
MET	Mesenchymal-Epithelial Transition
miRNA	Micro-RNA
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FOXC2	Forkhead box protein C2
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
PD-L1	Programmed Death Ligand-1
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
FDA	Food and Drug Administration
ATP	Adenosine TriPhosphate
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
BMP-2	Bone Morphogenetic protein-2
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
ALDH1	Aldehyde dehydrogenase 1 family
AKT	Protein Kinase B
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
VIM	VIMENTINE
CT	Calcitonine

CEA	Cancer Embryonic Antigen
CXCR4	Chemokine Receptor 4
MEN2	Multiple Endocrine Neoplasia type 2
TGF- β	Transforming growth factor- β
LB	Liquid Biopsy
EVs	Extracellular Vesicles
TEPs	Tumor-Educated Platelets
PCR	Polymerase Chain Reaction
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissue
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
WBC	White Blood Cells
RBC	Red Blood Cells
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
CD45	Cluster of Differentiation 45
CK	CytoKeratin
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhenylIndole
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
ISSET	Isolation by Size of Epithelial Tumor cells
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
EPISPOT	Epithelial ImmunoSPOT assay
qPCR	(real time) Quantitive PCR
RT-qPCR	Reverse Transcriptase quantitive PCR
MSP	Methylation Specific PCR
ARMS-PCR	Amplification-Refractory Mutation System PCR
CNA	Copy Number Aberrations
NGS	Next Generation Sequencing
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
BEAMing	Bead, Emulsion, Amplification, Magnetics
dPCR	Digital PCR
ELBS	European Liquid Biopsy Society
ILSA	International Liquid Biopsy Standardization Alliance
mPCR	Multiplex PCR
WGA	Whole Genome Amplification
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
MIC	Magnetic Induction Cycler
HRM	High Resolution Melting
bms	Bio Molecular Systems
PC	Positive Control
NC	Negative Control
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphate mix
BSA	Bovine Serum Albumin
F primer	Forward primer
R primer	Reverse primer
ISO	International Organization for Standardization

ESMO	European Society for Medical Oncology
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
TME	Tumor MicroEnvironment
CAFs	Cancer-associated Fibroblasts
ECM	Extra Cellular Matrix
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor 1
SDF1a	Stromal cell-derived factor 1 alpha
EGAPP	Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention
SOPs	Standard Operating Procedures
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendment
CAP	College of America Pathologists
AR-V7	Androgen Receptor V7
PSA	Prostatic Antigen
MUC-1	Mucin 1
EphB4	Ephrin type-B receptor 4
TAG-72	Tumor associated glycoprotein-72
ddPCR	Droplet Digital PCR
PGR	Progesteron Receptor
MAGEA3	Melanoma-associated antigen 3
SNAIL	Zinc finger protein
PDCD4	Programmed Cell Death 4
NAPA	NaMEPrO-assisted ARMS
LOH	Loss of Heterozygosity,
ACTC Lab	Analysis of Circulating Tumor Cells Laboratory
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Hallmarks of Cancer.....	20
Σχήμα 1.2 Η συνεισφορά του EMT στην μεταστατική διαδικασία.....	23
Σχήμα 1.4 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα με Επιθηλιακό και Μεσεγχυματικό φαινότυπο.....	24
Σχήμα 4.4 Ανάπτυξη υπερπλασίας των κυττάρων C του θυρεοειδούς αδένος.....	25
Σχήμα 1.5 Γονίδια που εμπλέκονται στο MTC.....	26
Σχήμα 1.6 Σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον υποδοχέα <i>RET</i>	27
Σχήμα 1.7 Διαφορετικοί τρόποι ενεργοποίησης του υποδοχέα <i>RET</i>	29
Σχήμα 1.8 Επίδραση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου στο MTC.....	35
Σχήμα 1.9 Έκφραση του <i>CXCR4</i> στο MTC.....	36
Σχήμα 2.5 Σύγκριση Κλασσικής Βιοψίας – Υγρής Βιοψίας	39
Σχήμα 2.6 Σημαντικά βήματα προς την έγκριση μιας ανάλυσης της υγρής βιοψίας..	41
Σχήμα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση αρχής μεθόδου εμπλουτισμού και ανίχνευσης των CTCs μέσω του συστήματος CellSearch.....	47
Σχήμα 2.4 Απεικόνιση ορισμένων βασικών Τεχνικών Απομόνωσης-Εμπλουτισμού CTCs.....	49
Σχήμα 2.5 Σχηματική απεικόνιση της κλινικής σημασίας του ctDNA ως βιοδείκτη στην Υγρή Βιοψία και των τεχνικών ανίχνευσής του στο πλάσμα και των γενετικών μεταλλαγών του καρκίνου που μπορούν να μελετηθούν.....	56
Σχήμα 2.6 Εφαρμογές της υγρής βιοψίας στο MTC.....	60
Σχήμα 3.1 Διαδοχικά στάδια κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων που πραγματοποιούνται σε ξεχωριστούς εργαστηριακούς χώρους.....	64
Σχήμα 3.2 Ενδεικτικός Θάλαμος Προετοιμασίας αντίδρασης PCR – hood.....	65
Σχήμα 3.3 Σχηματική απεικόνιση απομόνωσης πλάσματος.....	65
Σχήμα 3.4 Εμπλουτισμός κυκλοφορούντων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων από περιφερικό αίμα με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό.....	68
Σχήμα 3.5 Διάταξη Συσκευής Parsortix™ (ANGLE-plc, Guildford UK).....	71
Σχήμα 3.6 Διαχωρισμός φάσεων με την προσθήκη χλωροφορμίου κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA.....	74
Σχήμα 3.7 Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης cDNA.....	76
Σχήμα 3.8 Θερμικός κυκλοποιητής (Mastercycler® pro, Eppendorf).....	77

Σχήμα 3.9 Τυπικό διάγραμμα αντίδρασης qPCR, όπου φαίνεται η ένταση του μετρούμενου φθορισμού.....	79
Σχήμα 3.10 Διάγραμμα του λογάριθμου της συγκέντρωσης με την τιμή C _q	80
Σχήμα 3.11 Αρχή Μεθόδου – Στάδια αντίδρασης PCR.....	81
Σχήμα 3.12 Σχηματική απεικόνιση δράσης της SYBR-Green.....	83
Σχήμα 3.13 Γράφημα υπολογισμού καμπυλών τήξης.....	83
Σχήμα 3.14 Σχηματική απεικόνιση δράσης ανιχνευτών υβριδισμού (Μοριακοί Φάροι).....	84
Σχήμα 3.15 Σχηματική απεικόνιση δράσης ανιχνευτών υβριδισμού βασιζόμενοι στο φαινόμενο FRET.....	84
Σχήμα 3.16 Σχηματική απεικόνιση της δράσης ανιχνευτών υδρόλυσης.....	85
Σχήμα 3.17 Ο αναλυτής Mic Real-Time PCR System.....	86
Σχήμα 3.18 Σχηματική απεικόνιση της αρχής μεθόδου λειτουργίας του LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Switzerland).....	87
Σχήμα 3.19 Σύστημα cobas® 4800 (Roche Diagnostics, Switzerland).....	88
Σχήμα 3.20 Διμερή πρόσθιου εκκινητή της καλσιτονίνης (CALCA).....	91
Σχήμα 3.21 Διμερή οπίσθιου εκκινητή της καλσιτονίνης (CALCA).....	91
Σχήμα 4.1 Πειραματική πορεία για τον εμπλουτισμό και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs.....	102
Σχήμα 4.2 Χαρακτηριστικό γράφημα ελέγχου ποιότητας, μέσω του γονιδίου B2M, δειγμάτων cDNA από CTCs, τα οποία έχουν απομονωθεί με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό α) υγιών δοτών και β) ασθενών με σποραδικό MTC.....	105
Σχήμα 4.3 Χαρακτηριστικό γράφημα μελέτης έκφρασης της CK-8 σε δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό ασθενών με σποραδικό MTC α) δειγμάτων που βρέθηκαν αρνητικά και β) δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά ως προς την έκφραση της CK-8.....	105
Σχήμα 4.4 Χαρακτηριστικό γράφημα μελέτης έκφρασης της CK-18 σε δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό ασθενών με σποραδικό MTC α) δειγμάτων τα οποία βρέθηκαν αρνητικά και β) δειγμάτων τα οποία βρέθηκαν θετικά ως προς την έκφραση της CK-8.....	106

Σχήμα 4.5 Μελέτη έκφραση της <i>CK-19</i> στα δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό.....	107
Σχήμα 4.6 Χαρακτηριστικό γράφημα μελέτης έκφρασης της <i>VIMENTIN</i> σε δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό α) ασθενών με σποραδικό MTC και β) υγιών δοτών.....	108
Σχήμα 4.7 Χαρακτηριστικό διάγραμμα της μελέτης έκφρασης του <i>CXCR4</i> σε δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό α) ασθενών με σποραδικό MTC και β) σε δείγματα υγιών δοτών.....	109
Σχήμα 4.8 Γράφημα βελτιστοποίησης θερμοκρασιακού προγράμματος υβριδοποίησης εκκινητών καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>) T=60°C καμπυλών ενίσχυσης (αριστερά) και καμπυλών τήξεως (δεξιά).....	111
Σχήμα 4.9 Γράφημα βελτιστοποίησης θερμοκρασιακού προγράμματος υβριδοποίησης εκκινητών καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>) T=65°C καμπυλών ενίσχυσης (αριστερά) και καμπυλών τήξεως (δεξιά).....	111
Σχήμα 4.10 Χαρακτηριστικό γράφημα μελέτης ειδικότητας των εκκινητών σε δείγματα cDNA (n=10) από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό ασθενών με σποραδικό MTC α) για τον έλεγχο ποιότητας μέσω του γονιδίου αναφοράς B2M β) για την έκφραση της καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>).....	112
Σχήμα 4.11 Χαρακτηριστικό γράφημα μελέτης ειδικότητας των εκκινητών σε δείγματα cDNA (n=10) από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, υγιών δοτών α) για τον έλεγχο ποιότητας μέσω του γονιδίου αναφοράς B2M β) για την έκφραση της καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>).....	114
Σχήμα 4.12 Διάγραμμα σύγκρισης Cq των δειγμάτων cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς B2M σε υγιείς δοτών (Healthy Donors-HDs) και σε ασθενείς με σποραδικό MTC (MTC Patients).....	116
Σχήμα 5.13 Διάγραμμα σύγκρισης Cq των δειγμάτων cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με EpCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό, ως προς την έκφραση της καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>) σε υγιείς δοτών (Healthy Donors-HDs) και σε ασθενείς με σποραδικό MTC (MTC Patients).....	116

Σχήμα 4.14 Χαρακτηριστικό γράφημα της μελέτης έκφρασης της καλσιτονίνης (CALCA) σε δείγματα cDNA από CTCs που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό α) ασθενών με σποραδικό MTC και β) υγιών δοτών.....	117
Σχήμα 4.15 Παρουσίαση συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων με τη μορφή Heatmap για τα δείγματα α) ασθενών με σποραδικό MTC και β) υγιών δοτών. (Κόκκινο: υπερέκφραση, Πράσινο φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης).....	118
Σχήμα 4.16 Χαρακτηριστικό γράφημα του ελέγχου ποιότητας B2M δειγμάτων cDNA τα οποία έχουν απομονωθεί με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) α) υγιών δοτών και β) ασθενών με σποραδικό MTC.....	119
Σχήμα 4.17 Μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (CALCA) σε δείγματα που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC.....	120
Σχήμα 4.18 Μελέτη έκφρασης της CK-8 στα δείγματα που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC.....	121
Σχήμα 4.19 Μελέτη έκφρασης της CK-18 στα δείγματα που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC.....	121
Σχήμα 4.20 Μελέτη έκφρασης της CK-19 στα δείγματα που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC.....	122
Σχήμα 4.21 Μελέτη έκφρασης της VIMENTIN σε δείγματα που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™ (ANGLE plc, Guildford, UK) ασθενών με σποραδικό MTC.....	122
Σχήμα 4.24 Μελέτης έκφρασης του CXCR4 σε δείγματα που απομονώθηκαν με το σύστημα Parsortix™.....	123

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Τεστ υγρής βιοψίας που εγκρίθηκαν από το FDA.....	43
Πίνακας 3.1 Αλληλουχίες εκκινητών καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>).....	91
Πίνακας 3.2 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τον έλεγχο ποιότητας με το γονίδιο αναφοράς <i>B2M</i>	93
Πίνακας 3.3 Συνθήκες της αντίδρασης PCR για τον έλεγχο ποιότητας με το γονίδιο αναφοράς <i>B2M</i>	93
Πίνακας 3.4 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>).....	94
Πίνακας 3.5 Συνθήκες της αντίδρασης PCR για τη μελέτη έκφρασης της καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>).....	94
Πίνακας 3.6 Μίγμα αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της <i>CK-19</i>	95
Πίνακας 3.7 Συνθήκες της αντίδρασης PCR για τη μελέτη έκφρασης της <i>CK-19</i>	95
Πίνακας 3.8 Μίγμα της αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της <i>CK-18</i>	96
Πίνακας 3.9 Συνθήκες της αντίδρασης PCR για τη μελέτη έκφρασης της <i>CK-18</i>	96
Πίνακας 3.10 Μίγμα αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης της <i>CK-8</i>	97
Πίνακας 3.11 Συνθήκες της αντίδρασης PCR για τη μελέτη έκφρασης της <i>CK-8</i>	97
Πίνακας 3.12 Μίγμα αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης <i>VIMENTIN</i> ...	98
Πίνακας 3.13 Συνθήκες της αντίδρασης για τη μελέτη έκφρασης της <i>VIMENTIN</i> ...	98
Πίνακας 3.14 Μίγμα αντίδρασης RT-qPCR για τη μελέτη έκφρασης του <i>CXCR4</i> ...	99
Πίνακας 3.15 Συνθήκες της αντίδρασης για τη μελέτη έκφρασης του <i>CXCR4</i>	99
Πίνακας 4.1 Cq των δειγμάτων cDNA (n=10) από CTCs που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό ασθενών με σποραδικό MTC για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς <i>B2M</i> και της καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>).....	113
Πίνακας 4.2 Cq των δειγμάτων cDNA (n=10) από CTCs που απομονώθηκαν με ErCAM θετικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό ασθενών με σποραδικό MTC για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς <i>B2M</i> και της καλσιτονίνης (<i>CALCA</i>).....	115

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009. page 719–24.
2. Cooper GM, The Development and Causes of Cancer - The Cell - NCBI Bookshelf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963> (τελευταία επίσκεψη Νοέμβριος 2023).
3. Lee E, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010 2:a003236.
4. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer*. 2011;11(2):85-95.
5. Rosen D.; Sapra A., TNM Classification. StatPearls [Internet]. NCBI Bookshelf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187>(τελευταία επίσκεψη: Νοέμβριος 2023).
6. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
7. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020;5(1):28.
8. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. 2017;168(4):670-691.
9. Bakhoum SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*. 2018;553(7689):467-472.
10. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009;120(5):1420–8.
11. Alix-Panabières C, Mader S, Pantel K. Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J. Mol. Med.* 2017; 95(2):133-142.
12. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(1-2):43-73.
13. Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front. Endocrinol.* 2020;11:102.
14. Hoff A, Hoff P. Medullary Thyroid Carcinoma. *Hematol. Oncol. Clin.*

- 2007;21(3):475-88 .
15. De Groot J, Links TP, Hofstra R, Plukker J. An introduction to managing medullary thyroid cancer. *Hered Cancer Clin Pract.* 2006;4:115–25.
 16. Khatami F, Tavangar SM. Genetic and epigenetic of medullary thyroid cancer. *Iran. Biomed. J.* 2018 ;22(3):142-50.
 17. Takahashi M. Oncogenic activation of the ret protooncogene in thyroid cancer. *Crit Rev Oncog* 1995;6:35–46.
 18. Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikholeslami S, Afsari F. Diversity of mutations in the RET proto-oncogene and its oncogenic mechanism in medullary thyroid cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2016;53(4):217-27
 19. Accardo G, Conzo G, Esposito D, Gambardella C, Mazzella M, Castaldo F, et al. Genetics of medullary thyroid cancer: An overview. *Int. J. Surg.* 2017;41(1):S2-S6.
 20. Romei C, Ciampi R, Elisei R. A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016;12(4):192-202.
 21. Salvatore D, Santoro M, Schlumberger M. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2021;17(5):296-306.
 22. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* 2011;36(6):320-8
 23. Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Leary R, Bettegowda C, Roberts NJ, et al. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E364-9.
 24. Moura MM, Cavaco BM, Leite V. RAS proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer.* 2015;22(5):R235-52.
 25. Ciampi R, Mian C, Fugazzola L, Cosci B, Romei C, Barollo S, et al. Evidence of a low prevalence of ras mutations in a large medullary thyroid cancer series. *Thyroid.* 2013;23(1):50–7.
 26. Ciampi R, Romei C, Ramone T, Prete A, Tacito A, Cappagli V, et al. Genetic Landscape of Somatic Mutations in a Large Cohort of Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas Studied by Next-Generation Targeted Sequencing. *iScience.* 2019;20:324–36.

27. Persani L, De Filippis T, Colombo C, Gentilini D. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Genetic diagnosis of endocrine diseases by NGS: novel scenarios and unpredictable results and risks. *Eur J Endocrinol* 2018;179(3):R111-R123.
28. Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The diagnosis and management of thyroid nodules a review. *JAMA* 2018;319(9):914-924.
29. Bible KC, Kebebew E, Brierley J, Brito JP, Cabanillas ME, Clark TJ, et al. 2021 American Thyroid Association Guidelines for Management of Patients with Anaplastic Thyroid Cancer: American Thyroid Association Anaplastic Thyroid Cancer Guidelines Task Force. *Thyroid* 2021;31:337.
30. Angelousi A, Hayes AR, Chatzellis E, Kaltsas GA, Grossman AB. Metastatic medullary thyroid carcinoma: a new way forward. *Endocr Relat Cancer*. 2022;29:R85–103.
31. Werner TA, Forster CM, Dizdar L, Verde PE, Raba K, Schott M, et al. CXCR4/CXCR7/CXCL12 axis promotes an invasive phenotype in medullary thyroid carcinoma. *Br J Cancer*. 2017;117:1837–45.
32. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer*. 2004;4(7):540-50.
33. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell*. 2010;18(6):884-901.
34. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309-22.
35. Castellone MD, Melillo RM. RET-mediated modulation of tumor microenvironment and immune response in multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2). *Endocr. Relat. Cancer*. 2018 ;25(2):T105-T119.
36. Mulligan LM. GDNF and the RET receptor in cancer: New insights and therapeutic potential. *Front. Physiol*. 2019;9:1873.
37. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(4):709-22.
38. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol* 2022;15(1): 1–14.
39. Proietto M, Crippa M, Damiani C, Pasquale V, Sacco E, Vanoni M, et al.

- Tumor heterogeneity: preclinical models, emerging technologies, and future applications. *Front Oncol.* 2023;13:1164535.
40. Keller L, Pantel K. Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2019;19(10):553-567.
 41. Lianidou E, Pantel K. Liquid biopsies. *Genes Chromosom. Cancer.* 2019;58(4):219-232.
 42. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin. Chem.* 2015;61(1):112-23.
 43. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov* 2021;11(4):858-873.
 44. Joosse SA, Pantel K. Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients. *Cancer Cell.* 2015;28(5):552-554.
 45. Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic — implementation issues and future challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2021;18(5):297-312.
 46. Lianidou, E. and Hoon, D. in *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, 2018, ch. 52.page 235–81.
 47. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov.* 2016;6(5):479-91.
 48. Mader S, Pantel K. Liquid biopsy: Current status and future perspectives. *Oncol Res Treat.* 2017;40(7-8):404-408.
 49. Ntzifa A, Lianidou E. Pre-analytical conditions and implementation of quality control steps in liquid biopsy analysis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2023;60(8):573-594.
 50. Ashworth TR. A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. *Med J Aust.* 1869;14:146-147.
 51. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer.* 2011;128(11):2527-35.
 52. Lianidou ES, Mavroudis D, Georgoulas V. Clinical challenges in the molecular characterization of circulating tumour cells in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2013;108(12):2426-32.
 53. Diamandis EP, Pantel K, Scher HI, Terstappen L, Lianidou E. Circulating Cancer Cells and Their Clinical Applications *Clin. Chem.* 2011;57(11):1478-84

54. Cortés-Hernández LE, Eslami ZS, Pantel K, Alix-Panabières C. Molecular and Functional Characterization of Circulating Tumor Cells: From Discovery to Clinical Application. *Clin Chem* 2020;66(1):97-104.
55. Markou A, Strati A, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem*. 2011;57(3):421-30.
56. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res* 2003;9(14). 2003;5145–51.
57. Strati A, Nikolaou M, Georgoulas V, Lianidou ES. RNA-Based CTC Analysis Provides Prognostic Information in Metastatic Breast Cancer. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(3):513.
58. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1028-38.
59. Ju S, Chen C, Zhang J, Xu L, Zhang X, Li Z, et al. Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomark Res* 2022;10(1):1-25.
60. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: Detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin. Chem*. 2011;57(9):1242-55.
61. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. *Clin. Chem*. 2013;59(1):110-8.
62. Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells - Biology and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2014;11(3):129-44.
63. Miller MC, Robinson PS, Wagner C, O'Shannessy DJ. The Parsortix™ Cell Separation System—A versatile liquid biopsy platform. *Cytom Part A*. 2018;93(12):1234-1239.
64. Lampignano R, Yang L, Neumann MHD, Franken A, Fehm T, Niederacher D, et al. A novel workflow to enrich and isolate patient-matched EpCAM^{high} and EpCAM^{low}/negative CTCs enables the comparative characterization of the PIK3CA status in metastatic breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1885–5.
65. Zavridou M, Mastoraki S, Strati A, Koutsodontis G, Klinakis A, Psyrri A, et al.

- Direct comparison of size-dependent versus EpCAM-dependent CTC enrichment at the gene expression and DNA methylation level in head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 2020;10(1):655.
66. Markou, Londra D, Tserpeli V, Kollias, Tsaroucha E, Vamvakaris I, et al. DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in liquid biopsy components of early stage NSCLC: a promising tool for early detection. *Clin Epigenetics* 2022;14(1):61.
 67. Markou A, Tzanikou E, Kallergi G, Pantazaka E, Georgoulas V, Kotsakis A, et al. 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* 2021;9:641978.
 68. Marzese DM, Hirose H, Hoon DSB. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2013;13(8):827-44.
 69. Strati A, Markou A, Kyriakopoulou E, Lianidou E. Detection and Molecular Characterization of Circulating Tumour Cells: Challenges for the Clinical Setting. *Cancers (Basel)* 2023;15(7):2185.
 70. Lawrence R, Watters M, Davies CR, Pantel K, Lu YJ. Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2023;20(7):487–500.
 71. Stergiopoulou D, Markou A, Giannopoulou L, Buderath P, Balgkouranidou I, Xenidis N, et al. Detection of ESR1 Mutations in Primary Tumors and Plasma Cell-Free DNA in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Patients. *Cancers (Basel)*. 2022;14(15):3790.
 72. Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMC Cancer*. 2011;11:422.
 73. Strati A, Economopoulou P, Lianidou E, Psyrri A. Clinical Significance of PD-L1 Status in Circulating Tumor Cells for Cancer Management during Immunotherapy. *Biomedicines*. 2023;11(6):1768.
 74. Strati A, Zavridou M, Bournakis E, Mastoraki S, Lianidou E. Expression pattern of androgen receptors, AR-V7 and AR-567es, in circulating tumor cells and paired plasma-derived extracellular vesicles in metastatic castration resistant prostate cancer. *Analyst* 2019;144(22):6671–80.

75. Olmedillas-López S, Olivera-Salazar R, García-Arranz M, García-Olmo D. Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology: An Updated Review. *Mol Diagn Ther* 2022;26(1):61–87.
76. Strati A, Zavridou M, Economopoulou P, Gkolfinopoulos S, Psyrri A, Lianidou E. Development and Analytical Validation of a Reverse Transcription Droplet Digital PCR (RT-ddPCR) Assay for PD-L1 Transcripts in Circulating Tumor Cells. *Clin Chem*. 2021;67(4):642–52.
77. Parisi C, Markou A, Strati A, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES. Development and Validation of Multiplex Liquid Bead Array Assay for the Simultaneous Expression of 14 Genes in Circulating Tumor Cells. *Anal Chem* 2019;91(5):3443–51.
78. Markou A, Tzanikou E, Ladas I, Makrigiorgos GM, Lianidou E. Nuclease-Assisted Minor Allele Enrichment Using Overlapping Probes-Assisted Amplification-Refractory Mutation System: An Approach for the Improvement of Amplification-Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction Specificity in Liquid Biopsies. *Anal Chem*. 2019;91(20):13105–11.
79. Stergiopoulou D, Markou A, Tzanikou E, Ladas I, Mike Makrigiorgos G, Georgoulas V, et al. ESR1 napa assay: Development and analytical validation of a highly sensitive and specific blood-based assay for the detection of ESR1 mutations in liquid biopsies. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3):1–18.
80. Mandel P MP. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l’homme. *C R Seances Soc Biol Ses Fil Vol142*. 1948;142(3-4):241–3.
81. Hassan S, Shehzad A, Khan SA, Miran W, Khan S, Lee YS. Diagnostic and Therapeutic Potential of Circulating-Free DNA and Cell-Free RNA in Cancer Management. *Biomedicines* 2022;10(8):2047.
82. Heidrich I, Abdalla T, Reeh M, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy Marker in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13(18):4500.
83. Keller L, Belloum Y, Wikman H, Pantel K. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. *Br J Cancer* 2021;124(2):345–58.
84. Van der Leest P, Boonstra PA, Elst A Ter, van Kempen LC, Tibbesma M, Koopmans J, et al. Comparison of circulating cell-free dna extraction methods for downstream analysis in cancer patients. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1222.

85. Weber S, Spiegl B, Perakis SO, Ulz CM, Abuja PM, Kashofer K, et al. Technical evaluation of commercial mutation analysis platforms and reference materials for liquid biopsy profiling. *Cancers (Basel)*.2020;12(6):1–16.
86. Lampignano R, Neumann MHD, Weber S, Kloten V, Herdean A, Voss T, et al. Multicenter evaluation of circulating cell-free DNA extraction and downstream analyses for the development of standardized (Pre)analytical work flows. *Clin Chem*. 2020;66(1):149–60.
87. Connors D, Allen J, Alvarez JD, Boyle J, Cristofanilli M, Hiller C, et al. International liquid biopsy standardization alliance white paper. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2020;156:103112.
88. Romano C, Martorana F, Pennisi MS, Stella S, Massimino M, Tirrò E, et al. Opportunities and challenges of liquid biopsy in thyroid cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(14):7707.
89. Sriramareddy SN, Hamoir E, Chavez M, Louis R, Beckers A, Willems L. Tumor cells may circulate in medullary thyroid cancer patients independently of serum calcitonin *Endocrine-Related Cancer*. 2018; 2:ERC-18-0180.
90. Weber T, Lacroix J, Wörner S, Weckauf H, Winkler S, Hinz U, et al. Detection of hematogenic and lymphogenic tumor cell dissemination in patients with medullary thyroid carcinoma by cytokeratin 20 and preprogastrin-releasing peptide RT-PCR. *Int J Cancer*. 2003;103(1):126–31.
91. Rao CG, Chianese D, Doyle G V, Miller MC, Russell T, Sanders RA, et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int. J. Oncol*. 2005;27(1):49-57.
92. Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*. 2007;96(3):417-23.
93. Xu JY, Handy B, Michaelis CL, Waguespack SG, Hu MI, Busaidy N, et al. Detection and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):4461–7.
94. Zane M, Agostini M, Enzo MV, Casal Ide E, Del Bianco P, Torresan F, et al. Circulating cell-free DNA, SLC5A8 and SLC26A4 hypermethylation, BRAFV600E: A non-invasive tool panel for early detection of thyroid cancer. *Biomed Pharmacother*. 2013;67(8):723–30.
95. Cote GJ, Evers C, Hu MI, Grubbs EG, Williams MD, Hai T, et al. Prognostic

- significance of circulating RET M918T mutated tumor DNA in patients with advanced medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(9):3591–9.
96. Allin DM, Shaikh R, Carter P, Thway K, Sharabiani MTA, Gonzales-de-Castro D, et al. Circulating tumour DNA is a potential biomarker for disease progression and response to targeted therapy in advanced thyroid cancer. *Eur J Cancer.* 2018;103:165–75.
 97. Solomon BJ, Tan L, Lin JJ, Wong SQ, Hollizeck S, Ebata K, et al. RET solvent front mutations mediate acquired resistance to selective RET inhibition in RET-driven malignancies. *J Thorac Oncol.* 2020;15(4):541–9.
 98. Zhang A, Wang C, Lu H, Chen X, Ba Y, Zhang C, et al. Altered serum MicroRNA profile may serve as an auxiliary tool for discriminating aggressive thyroid carcinoma from nonaggressive thyroid cancer and benign thyroid nodules. *Dis Markers* 2019;2019:3717683.
 99. Romeo P, Colombo C, Granata R, Calareso G, Gualeni AV, Dugo M, et al. Circulating miR-375 as a novel prognostic marker for metastatic medullary thyroid cancer patients. *Endocr Relat Cancer.* 2018;25(3):217–31.
 100. Shabani N, Sheikholeslami S, Paryan M, Zarif Yeganeh M, Tavangar SM, Azizi F, et al. An investigation on the expression of miRNAs including miR-144 and miR-34a in plasma samples of RET -positive and RET -negative medullar thyroid carcinoma patients. *J Cell Physiol* 2020;235(2):1366–73.
 101. Majka M, Ratajczak MZ. Biological role of the CXCR4-SDF-1 axis in normal human hematopoietic cells. *Methods Mol Biol.* 2006;332:103–14.
 102. Ridge KM, Eriksson JE, Pekny M, Goldman RD. Roles of vimentin in health and disease. *Genes Dev* 2022;36(7-8):391–407.
 103. Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature.* 2018;556(7702):463-468.
 104. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, et al. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest.* 2005;126(4):1068–81.
 105. Li D, Li N, Ding Y. Epithelial-to-mesenchymal transition of circulating tumor cells and CD133 expression on predicting prognosis of thyroid cancer patients.

- Mol Clin Oncol 2022;17(3):141.
106. Aubert S, Berdelou A, Gnemmi V, Behal H, Caiazzo R, D'herbomez M, et al. Large sporadic thyroid medullary carcinomas: predictive factors for lymph node involvement. *Virchows Arch* 201;472(3):461–8.
 107. Koperek O, Prinz A, Scheuba C, Niederle B, Kaserer K. Tenascin C in medullary thyroid microcarcinoma and C-cell hyperplasia. *Virchows Arch*. 2009;455(1):43–8.
 108. Steiner F, Hauser-Kronberger C, Rendl G, Rodrigues M, Pirich C. Expression of tenascin C, EGFR, E-Cadherin, and TTF-1 in medullary thyroid carcinoma and the correlation with RET mutation status. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1093.
 109. Koperek O, Bergner O, Pichlhöfer B, Oberndorfer F, Hainfellner JA, Kaserer K, et al. Expression of hypoxia-associated proteins in sporadic medullary thyroid cancer is associated with desmoplastic stroma reaction and lymph node metastasis and may indicate somatic mutations in the VHL gene. *J Pathol*. 2011;225(1):63–72.
 110. Laatikainen LE, Castellone MD, Hebrant A, Hoste C, Cantisani MC, Laurila JP, et al. Extracellular superoxide dismutase is a thyroid differentiation marker down-regulated in cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(3):785–96.
 111. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432(7015):332–7.
 112. Moore AR, Rosenberg SC, McCormick F, Malek S. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nat. Rev. Drug Discov*. 2020 Aug;19(8):533-552
 113. Tsaouli G, Ferretti E, Bellavia D, Vacca A, Felli MP. Notch/CXCR4 Partnership in Acute Lymphoblastic Leukemia Progression. *J Immunol Res* 2019;2019:5601396.
 114. Ladikou EE, Chevassut T, Pepper CJ, Pepper AGS. Dissecting the role of the CXCL12/CXCR4 axis in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2020;189(5):815–25.
 115. Liu H, Yang Z, Lu W, Chen Z, Chen L, Han S, et al. Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy. *Cancer Med* 2020;9(11):3786–99.
 116. Korbecki J, Kojder K, Kapczuk P, Kupnicka P, Gawrońska-Szklarz B, Gutowska I, et al. The Effect of Hypoxia on the Expression of CXC Chemokines and CXC Chemokine Receptors-A Review of Literature. *Int J Mol*

- Sc 2021;22(2):1–30.
117. Gowhari Shabgah A, Haleem Al-qaim Z, Markov A, Valerievich Yumashev A, Ezzatifar F, Ahmadi M, et al. Chemokine CXCL14; a double-edged sword in cancer development. *Int Immunopharmacol* 2021;97:107681.
 118. Pozzobon T, Goldoni G, Viola A, Molon B. CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol. Lett.* 2016 Sep;177:6-15.
 119. Shi A, Wang T, Jia M, Dong L, Shi H. Effects of SDF-1/CXCR7 on the Migration, Invasion and Epithelial-Mesenchymal Transition of Gastric Cancer Cells. *Front Genet* 2021;12:760048.
 120. Kawaguchi N, Zhang TT, Nakanishi T. Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. *Cells* 2019;8(2):185.
 121. Raza S, Rajak S, Tewari A, Gupta P, Chattopadhyay N, Sinha RA, et al. Multifaceted role of chemokines in solid tumors: From biology to therapy. *Semin Cancer Biol* 2022;86(Pt3):1105–21.
 122. Coperchini F, Croce L, Marinò M, Chiovato L, Rotondi M. Role of chemokine receptors in thyroid cancer and immunotherapy. *Endocr Relat Cancer* 2019;26(8):R465–78.
 123. Maia AL, Wajner SM, Ferreira Vargas CV. Advances and controversies in the management of medullary thyroid carcinoma. *Curr. Opin. Oncol.* Lippincott; 2017;29(1):25-32.