



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

**ΑΝΤΩΝΙΑ Δ. ΜΟΥΡΤΖΙΚΟΥ**

Σχετ : Βεβαίωση Γραμματείας Ιατρικής Σχολής Αθηνών με Α.Π.: 6466/5-4-2012

**ΑΘΗΝΑ 2017**



# **ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

## **ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Γεώργιος Αθανασάς, Αν. Καθηγητής Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Πέτρος Καρακίτσος, Καθηγητής Κυτταρολογίας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Βασίλειος Σμυρنيώτης, Καθηγητής Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Παρασκευή Μουτσάτσου-Λαδικού, Καθηγήτρια Κλινικής Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Κλεάνθη Δήμα, Αναπλ. Καθηγήτρια Κλινικής Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Νικόλαος Δανιάς, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Πάυλος Μαραγκουδάκης, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Στη μοναδική και ανιδιοτελή αγάπη μου  
τη Γεωργία

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτογενή όγκο σε απομακρυσμένα όργανα και η ανάπτυξη δευτερογενών εστιών (μετάσταση) αποτελεί την πιο επικίνδυνη πλευρά του καρκίνου. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) μπορεί να βοηθήσει στην πρόγνωση της πορείας των ασθενών με καρκίνο, στον σχεδιασμό και εφαρμογή νέων θεραπευτικών φαρμάκων, στην εξατομίκευση των φαρμάκων ανά ασθενή, στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία και τέλος στην κατανόηση της βιολογίας της μετάστασης.

Οι μέθοδοι για την ανίχνευση των CTCs μπορούν να διαχωριστούν σε κυτταρομετρικές που βασίζονται στην ανίχνευση ολόκληρου του κυττάρου με τη χρήση δεικτών ειδικών για τον όγκο και στις τεχνικές που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων. Και τα δύο είδη τεχνικών περιλαμβάνουν ένα στάδιο απομόνωσης και ένα στάδιο ανίχνευσης. Τα CTCs αποτελούν σπάνια συμβάντα και ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα σε συγκεντρώσεις του ενός κυττάρου ανά  $10^6$ - $10^7$  λευκοκύτταρα, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός τους προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου στα απαιτούμενα όρια. Πλήθος μοριακών δεικτών για τα CTCs έχουν μελετηθεί με σκοπό να αξιολογηθούν και να συσχετιστούν με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο, καθώς και με την κλινική τους έκβαση.

Ένας ιδανικός δείκτης θα πρέπει να είναι ειδικός για τα καρκινικά κύτταρα και όχι για τα φυσιολογικά κύτταρα, να είναι ειδικός για τον ιστό από τον οποίο προέρχονται τα συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα, να μην εμφανίζεται σε οποιοδήποτε άλλο κυτταρικό τύπο του φυσιολογικού ιστού στον οποίο ανιχνεύονται τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και να ανιχνεύεται εύκολα με μικρή διασπορά και κλινική συσχέτιση.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρήθηκε η συγκριτική μελέτη μεθόδων ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκινώματα παχέος εντέρου, η συσχέτιση τους ως προς την ευαισθησία και ειδικότητα τους, το όριο ανίχνευσης (traceability) τους, και τέλος η συμβολή μας στις προτεινόμενες βιβλιογραφικά πολυκεντρικές μελέτες για τον καθορισμό cutoff values και την επιλογή των κατάλληλων “Tumor specific” δεικτών, από την πληθώρα των επί του παρόντος χρησιμοποιούμενων. Συνολικά συλλέχθηκαν 84 δείγματα από 41 ασθενείς με καρκινώματα παχέος εντέρου και 16 δείγματα εθελοντών αιμοδοτών χωρίς

ένδειξη για ύπαρξη καρκίνου. Οι αναπτυχθείσες μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν στα ανωτέρω δείγματα.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Δ΄ Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού ΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ», επιβλέποντος του κ. Γεωργίου Αθανασά Αν. Καθηγητή Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, τον οποίο οφείλω να Ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη του, αλλά και την απλόχερα άμεση ανταπόκριση του στην έκκληση μου να είναι επιβλέπων σ' αυτή μου την προσπάθεια.

Ευχαριστώ ειλικρινά από καρδιάς και ευγνωμονώ τον κ. Πέτρο Καρακίτσο Καθηγητή Κυτταρολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και Διευθυντή του Εργαστηρίου Διαγνωστικής Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού ΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ», ο οποίος με εγκαρδιότητα με έκανε δεκτή να αποτελέσω μέλος του Εργαστηρίου του από τον Ιούνιο του 2010 έως σήμερα, τιμώντας με ιδιαίτερα με αυτήν του την απόφαση, παρέχοντας μου την ευκαιρία και τη δυνατότητα να εργάζομαι σε ένα «επιστημονικά υψηλού επιπέδου περιβάλλον» [state of the art], «στολίδι» και «ευσεβή πόθο» για κάθε επιστήμονα, ενώ με την ευγενική του εμπιστοσύνη στο άτομο μου απετέλεσε μέλος της τριμελούς μου επιτροπής και μου παρήξε όλες εκείνες τις ικανές και αναγκαίες συνθήκες ώστε να εκπονηθεί και να ολοκληρωθεί εργαστηριακά η διατριβή μου, στηρίζοντάς με πάντα με το ενδιαφέρον του, συμβάλλοντας συγχρόνως με τις γνώσεις του.

Ευχαριστώ βαθύτατα τον κ. Βασίλειο Σμυρνιώτη Καθηγητή Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και Διευθυντή της Δ΄ Πανεπιστημιακής Χειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού ΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ», μέλους της τριμελούς μου επιτροπής, ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του.

Ένα μεγάλο Ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής μου.

Αποτελεί τιμή για μένα να Ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ Άρη Σπάθη Βιολόγο, Επιστημονικό συνεργάτη του Εργαστηρίου Διαγνωστικής Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού ΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ» και υπεύθυνο του τμήματος Κυτταρομετρίας και Μοριακών Τεχνικών που συνετέλεσε καθοριστικά με την συμβολή, εποπτεία, καθοδήγηση, βοήθεια, τις πολύτιμες παρατηρήσεις και επισημάνσεις του, το ενδιαφέρον, αλλά και την αμέριστη και αξιόλογα υπολογίσιμη συνεισφορά του στη διεκπεραίωση και ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Ιδιαίτερες Ευχαριστίες εκφράζω στον κ. Αναστάσιο Μαχαίρα, Καθηγητή Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και Διευθυντή της Γ΄ Πανεπιστημιακής Χειρουργικής

Κλινικής του Πανεπιστημιακού ΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ», που μου έδωσε την άδεια να συνεργαστώ με ειδικευόμενους ιατρούς της κλινικής του κατά την συλλογή των δειγμάτων.

Επίσης, θα επιθυμούσα να Ευχαριστήσω εξαιρετικά τον κ. Σπυρίδωνα Χριστοδούλου, Δρ Χειρουργό, με τον οποίο συνεργαστήκαμε άψογα και με μεθοδικότητα στη συλλογή των δειγμάτων ασθενών της Δ΄ Πανεπιστημιακής Χειρουργικής Κλινικής στην οποία ήταν ειδικευόμενος κατά το διάστημα της εκπόνησης της διατριβής μου, η παρουσία του οποίου ήταν καθοριστικής σημασίας, ομοίως και τον κ. Αναστάσιο Καλλία ειδικευόμενο ιατρό της Γ΄ Πανεπιστημιακής Χειρουργικής με τον οποίο επίσης είχαμε αгаστή συνεργασία.

Δεν παραλείπω να Ευχαριστήσω θερμά όλους τους συναδέλφους Βιολόγους, Διδάκτορες και υποψήφιους Διδάκτορες του Εργαστηρίου Διαγνωστικής Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού ΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ» για την συνεργασία μας και την στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και όλα τα άτομα που στελεχώνουν το Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού ΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ» Ιατρούς, Τεχνολόγους, Παρασκευαστές, Διοικητικούς και Επιστημονικούς συνεργάτες. Τους εκτιμώ ιδιαίτερα. Ενα μεγάλο Ευχαριστώ χρωστώ σε όλους εκείνους που με βοήθησαν καθ' οιαδήποτε τρόπο, μου συμπαραστάθηκαν, με στήριξαν ηθικά και πίστεψαν σ' αυτή μου την προσπάθεια.

Τέλος, δεν παραλείπω να Ευχαριστήσω τους ασθενείς και τους εθελοντές αιμοδότες που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.





## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Σύντμηση	Αγγλικός όρος	Ελληνικός όρος
Ab	Antibody	Αντίσωμα
APC	Allophycocyanin	Αλλοφυκοκυανίνη
BM	Bone Marrow	Μυελός των Οστών
BSA	Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη Βοείου Ορού
Cath-D	Cathepsin D	Καθεψίνη D
CD	Cluster of Differentiation	Συστάδα Διαφοροποίησης
CK	Cytokeratin	Κυτταροκερατίνη
cDNA	Complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
CEA	Carcinoembryonic Antigen	Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο
CepCs	Circulating epithelial Cells	Κυκλοφορούντα επιθηλιακά Κύτταρα
CLSM	Confocal Laser Scanning	Ομοεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ
CTCs	Circulating Tumor Cells	Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα
CSC	Cancer Stem Cell	Καρκινικό Βλαστικό Κύτταρο
Cq	Green Fluorescent Protein	Πράσινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη
CV	Coefficient of Variation	Συντελεστής μεταβλητότητας
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindole	4,6-διαμίδινο-2-φαινυλινδόλη
DEPC	Diethylpyrocarbonate	Διεθύλοπυροανθρακικό οξύ
dNTP	Deoxynucleoside Triphosphate	Τριφωσφορικός νουκλεοζίτης
DTC	Disseminated Tumor Cell	Διεσπαρμένο Καρκινικό Κύτταρο
DFI	Disease Free Interval	Ελεύθερο νόσου διάστημα
ECD	R-PhycoerythrinTexas Red	R-Φυκοερυθρίνη Τέξας
ECM	Extra Cellular Matrix	Εξωκυττάρια μήτρα
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό Οξύ
EGFR	Epidermal Growth Factor	Υποδοχέας του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	Επιθήλιο-Μεσεγχυματική Μετάβαση
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule	Μόριο Προσκόλλησης Επιθηλιακών Κυττάρων

EPCs	Endothelial Progenitor Cells	Πρόγονα ενδοθηλιακά κύτταρα
EPISPOT	Epithelial ImmunoSPOT	Επιθηλιακές ΑνοσοΚΗΛΙΔΕΣ
ESA	Epithelial Specific Antigen	Ειδικό Επιθηλιακό Αντιγόνο
EtBr	Ethidium Bromide	Βρωμιούχο αιθίδιο
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting	Σύστημα Φθορισμομετρικής Ενεργοποίησης Κυτταρικής Ταξινόμησης
FAST	Fiber-optic Array Scanning	Τεχνολογία Σάρωσης Συστοιχιών από Οπτικές Ύνες
FC	Flow Cytometry	Κυτταρομετρία Ροής
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization	Φθορίζων In Situ Υβριδισμός
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	Ισοκυανιούχος Φλουορεσκεΐνη
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	Φαινόμενο Μεταφοράς Ενέργειας με Φθορισμό
FSC	Forward Scatter	Πρόσθια Σκέδαση
HGF	Hepatocyte Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων
HEA	Human Epithelial Antigen	Ανθρώπινο Επιθηλιακό Αντιγόνο
HLA	Human Leukocyte Antigen	Ανθρώπινο Λευκοκυτταρικό Αντιγόνο
IHC	Immuno Histo Chemistry	Ανοσοϊστοχημεία
ISH	In situ Hybridization	In situ Υβριδισμός
ISET	Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells	Απομόνωση βάση Μεγέθους των Επιθηλιακών Καρκινικών Κυττάρων
LSC	Laser Scanning Cytometry	Κυτταρομετρία Σάρωσης με Λείζερ
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting	Σύστημα Μαγνητικής Ενεργοποίησης Κυτταρικής Ταξινόμησης
MAGE	Melanoma Antigen	Αντιγόνο Μελανώματος
MCS	Migratory Cancer Stem cell	Μεταναστευτικό Καρκινικό Βλαστικό Κύτταρο
mRNA	messengerRibonucleic Acid	αγγελιοφόρο Ριβονουκλεϊκό Οξύ
MUC1	Mucine 1	Μουκίνη 1

NK	Natural Killer cells	Κύτταρα φυσικοί φονιάδες
NSCLC	Non-Small-cell Lung Cancer	Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα
OS	Overall Survival	Ολική επιβίωση
PB	Peripheral Blood	Περιφερικό Αίμα
PDGF	Platelet Derived Growth Factor	Αυξητικός Παράγοντας Αιμοπεταλίων
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Μονοπύρρηνα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος
PBS	Phosphate-Buffered Saline	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών Αλάτων
PC5	Phycoerythrin Cyanin 5	Φυκοερυθρίνη Κυανίνη 5
PC7	Phycoerythrin Cyanin 7	Φυκοερυθρίνη Κυανίνη 7
PE	Phycoerythrin	Φυκοερυθρίνη
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein	Περιδινούχος χλωροφύλλη-A-πρωτεΐνη
PFA	Paraformaldehyde	Παραφορμαλδεϋδη
PFC	Polyparametric Flow Cytometry	Πολυπαραμετρική Κυτταρομετρία Ροής
PI	Propidium Iodide	Ιωδίδιο του Προπιδίου
PSA	Prostate Specific Antigen	Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο
QDs	Quantum Dots	Κβαντικές Τελείες
RARE	Rosette Applied imaging Rare Event	Εφαρμοσμένη Απεικόνιση Σπάνιου Γεγονότος με Ροζέτες
RBC	Red Blood Cells	Ερυθρά Αιμοσφαίρια
Real time RT-PCR	Real time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction	Πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Αντίστροφης Μεταγραφής Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
SCS	Stationary Cancer Stem Cell	Στατικό Καρκινικό Βλαστικό Κύτταρο
SSC	Side Scatter	Πλάγια Σκέδαση
TG	Thyroglobulin	Θυρεοσφαιρίνη

TKIs	Tyrosine Kinase Inhibitors	Αναστολείς της Κινάσης της Τυροσίνης
TMEM	Tumor Micro Enviroment of Metastasis	Μικροπεριβάλλον του όγκου της μετάστασης
UK-NEQAS	United Kingdom National External Quality Assessment Service	Εθνική Υπηρεσία Εξωτερικής Διασφάλισης Ποιότητας του Ηνωμένου Βασιλείου
uPAR	Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor	Υποδοχέας του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	II
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	IV
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	VII
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	XI
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ .....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ .....	5
2.1 Εισαγωγή.....	5
2.2 Επιδημιολογία καρκινωμάτων παχέος εντέρου.....	6
2.3 Πολυπαραγοντική αιτιολογία καρκινωμάτων παχέος εντέρου .....	9
2.4 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στην εκδήλωση και στην εξέλιξη καρκινωμάτων παχέος εντέρου .....	15
2.5 Παράγοντες κινδύνου .....	16
2.6 Διάγνωση με εξετάσεις ρουτίνας.....	18
2.7 Πρόληψη .....	19
2.7.1. Οδηγίες Δευτερογενούς Πρόληψης (Προ-συμπτωματικός Έλεγχος) .....	19
2.7.2. Οδηγίες για Πρώιμη Ανίχνευση.....	20
2.8 Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	20
2.9 Τύποι Καρκίνου του Παχέος Εντέρου.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	29
3.1 Εισαγωγή.....	29
3.2 Μοριακή βάση στην καρκινογένεση των αδενοκαρκινωμάτων παχέος εντέρου .....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ .....	35
4.1 Εισαγωγή.....	35
4.2 Οι σχέσεις καρκινικού όγκου και στρώματος στον πρωτογενή όγκο .....	38
4.2.1 Μικροπεριβάλλον και Καρκινικά κύτταρα .....	39
4.2.2 Ενεργοποίηση ινοβλαστών και αγγειογένεση .....	42
4.2.3 Χρόνια φλεγμονή και η συμμετοχή της στην προώθηση του καρκίνου .....	43
4.2.4 Μεταναστευτικά καρκινικά βλαστικά κύτταρα (MCS-Migratory Cancer Stem cell) .....	45
4.3 Ενδοαγγείωση (intravasation) .....	48
4.4 Εξαγγείωση (extravasation).....	49
4.5 Αποικισμός των μεταστατικών κυττάρων (colonization).....	49
4.6 Βλαστικά κύτταρα και μικρομεταστατικό περιβάλλον .....	50
4.6.1 Ιδιότητες και χαρακτηριστικά της «φωλεάς» (niche).....	51
4.7 Εμπλεκόμενα γονίδια στη μεταστατική διαδικασία .....	52

4.8 Καρκινική αδράνεια (cancer dormancy) .....	53
4.9 Παράλληλη εξέλιξη του όγκου και της μετάστασης .....	54
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ</b> .....	58
5.1 Εισαγωγή .....	58
5.2 Μοριακός χαρακτηρισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων .....	60
5.2.1 Μελέτη του μοριακού προφίλ των CTCs με ανοσοκυτταροχημεία και RT-PCR .....	62
5.2.2 Μελέτη του προφίλ γονιδιακής έκφρασης των CTCs με μικροσυστοιχίες .....	63
5.2.3 Μελέτη του γονιδιώματος με FISH και CGH .....	64
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (CTCs)</b> .....	65
6.1 Εισαγωγή .....	65
6.2 Μέθοδοι ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων .....	65
6.2.1 Ανοσοκυτταρομετρικές μέθοδοι.....	68
6.2.2 Μοριακές μέθοδοι .....	70
<b>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	72
Σκοπός της εργασίας .....	73
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	74
7.1 Υλικό της μελέτης .....	74
7.1.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ .....	74
7.2 Μέθοδοι.....	74
7.2.1 Κυτταρομετρία ροής.....	74
7.2.2 Μοριακές τεχνικές.....	77
7.3 Πειραματική πορεία κυτταρομετρίας.....	80
Αντισώματα και υλικό.....	80
7.3.1 Έκφραση υπο-μελέτη δεικτών στην κυτταρική σειρά HT29 .....	81
7.3.2 Επίδραση λυτικού.....	81
7.3.3 Απομόνωση κυττάρων με Ficoll.....	82
7.3.4 Απομόνωση κυττάρων με μαγνητικά σφαιρίδια (Cellection) .....	82
7.3.5 Όριο ανίχνευσης με κυτταρομετρία (LOD-Limit Of Detection).....	83
7.3.6 Πρωτόκολλο Κυτταρομετρίας Ροής:.....	83
7.4 Πειραματική πορεία μοριακής ανάλυσης.....	84
Μοριακές Τεχνικές (PCR, Nested PCR, RT-PCR) .....	84
7.4.1 Απομόνωση CTCs' mRNA .....	85
7.4.2 Αντίστροφη μεταγραφή (RT) .....	86
7.4.3 PCR .....	87
7.5 Ηθικά θέματα .....	89
7.6 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία δεδομένων.....	89

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	90
ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	90
Κυτταροκερατίνες .....	92
EGFR.....	95
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ .....	100
Επίδραση λυτικού.....	100
Εντόπιση επιθηλιακών κυττάρων κατά την απομόνωση με Ficoll.....	100
Επιλογή αντισωμάτων για την ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων .....	100
Όριο ανίχνευσης με κυτταρομετρία (LOD- Limit of Detection).....	101
Αποτελέσματα κλινικών δειγμάτων .....	108
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	111
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	118
ABSTRACT.....	121
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	124

#### **Περιεχόμενα γραφημάτων αποτελεσμάτων**

Γράφημα 1: RT-PCR γονιδίου ελέγχου B2MG.....	92
Γράφημα 2: RT-PCR CK19 και CK20 .....	94
Γράφημα 3: RT-PCR CK20 HT29 .....	94
Γράφημα 4: RT-PCR CK19 HT29 .....	95
Γράφημα 5: nested RT-PCR CK19 HT29.....	95
Γράφημα 6: RT-PCR EGFR.....	96
Γράφημα 7: nested RT-PCR EGFR.....	96
Γράφημα 8: Δοκιμασία απομόνωσης σε Ficoll HT29.....	102
Γράφημα 9: Δοκιμασία αντισωμάτων για ανίχνευση HT29 κυττάρων.....	103
Γράφημα 10: Άμεσο πρωτόκολλο κυτταρομετρίας.....	105
Γράφημα 11: Ενδοκυττάριο πρωτόκολλο κυτταρομετρίας.....	107

#### **Περιεχόμενα πινάκων αποτελεσμάτων**

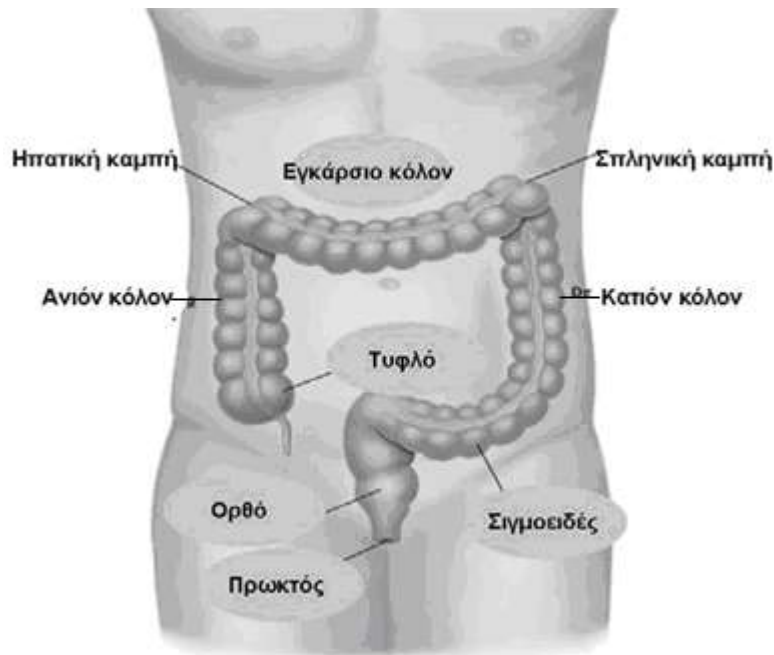
Πίνακας 1: Ιστολογικά αποτελέσματα ασθενών. ....	90
Πίνακας 2: Αποτελέσματα ενίσχυσης mRNA κυτταροκερατινών.....	93
Πίνακας 3: Αποτελέσματα ενίσχυσης mRNA EGFR.....	97
Πίνακας 4: Συνοπτική παράθεση του μοριακού προφίλ των ασθενών. ....	97
Πίνακας 5: Συνοπτική παράθεση δημογραφικών στοιχείων των ασθενών.....	100
Πίνακας 6: Αποτελέσματα λευκοκυτταρικών πληθυσμών .....	108
Πίνακας 7: Αποτελέσματα επιθηλιακών πληθυσμών.....	108



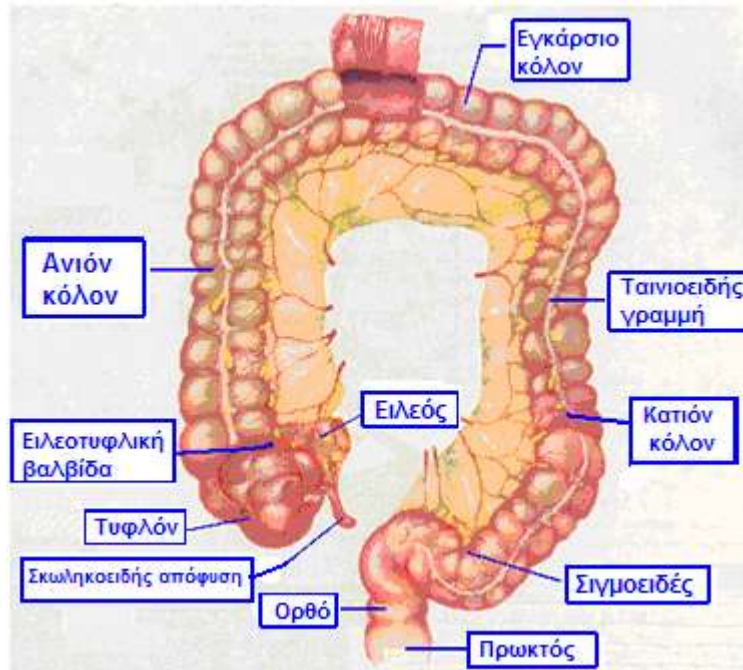
## **A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Το παχύ έντερο βρίσκεται στο κύτος της κοιλίας και αποτελεί το τελικό τμήμα του πεπτικού συστήματος. Υποδιαιρείται σε τυφλό, ανιόν κόλον, εγκάρσιο κόλον, κατιόν κόλον, σιγμοειδές, ορθό και πρωκτό (Σχήμα1), (Εικόνα1). Η αιμάτωση του παχέος εντέρου γίνεται από την άνω και κάτω μεσεντέρια αρτηρία. Οι φλέβες ακολουθούν τις αρτηρίες και καταλήγουν στην άνω μεσεντέρια φλέβα, ενώ η λέμφος αποχετεύεται στους άνω μεσεντέριους λεμφαδένες.



***Σχήμα 1.** Σχηματική παράσταση των τμημάτων του παχέος εντέρου*



**Εικόνα 1.** Ανατομία παχέος εντέρου

Το τοίχωμα του παχέος εντέρου αποτελείται από: το βλεννογόνο χιτώνα, τον υποβλεννογόνο χιτώνα και το μυϊκό χιτώνα. Τα περισσότερα τμήματα του εντέρου καλύπτονται στην εξωτερική επιφάνεια τους από το περιτόναιο ή το λίπος του μεσόκολου. Τα υπόλοιπα τμήματα περιβάλλονται από το περικολικό, μη περιβαλλόμενο από περιτόναιο, λίπος.

Ο βλεννογόνος του παχέος εντέρου αποτελείται από ένα μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο, το οποίο καλύπτει την επιφάνεια του αυλού και των κρυπτών, το χόριο που παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυπτών και τη βλεννογόνα μυϊκή στιβάδα που αφορίζει το όριο με τον υποβλεννογόνο χιτώνα.

Το εντερικό επιθήλιο περιλαμβάνει διάφορες κατηγορίες κυττάρων με συγκεκριμένες λειτουργίες. Τα απορροφητικά κύτταρα είναι επιφορτισμένα με την απορρόφηση ιόντων και νερού. Τα καλυκοειδή κύτταρα (goblet) συνθέτουν, αποθηκεύουν και εκκρίνουν βλέννη. Οι δύο αυτοί τύποι κυττάρων απαρτίζουν το καλυπτικό επιθήλιο.

Στο επιθήλιο των κρυπτών εκτός από απορροφητικά και λαγνοειδή κύτταρα, αναγνωρίζονται και διάφορα άλλα είδη κυττάρων, όπως κύτταρα Paneth τα οποία αφθονούν στο λεπτό έντερο, ενδοκρινή κύτταρα, καθώς και ανώριμες μορφές των πιο πάνω κυττάρων και εντερικά βλαστικά κύτταρα (colon stem cells, CSCs).

Το **χόριο** περιβάλλει τις κρύπτες και παρέχει υποστηρικτικό μικροπεριβάλλον για το επιθήλιο. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία του επιθηλίου και διαμορφώνει το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων που αποκαλείται ‘φωλεά’ (**stem cell niche**) [1].

Η **βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα** χωρίζει το βλεννογόνο από τον υποβλεννογόνο χιτώνα και συνδέεται με το περικρυπτικό δίκτυο των μυοϊνοβλαστών.

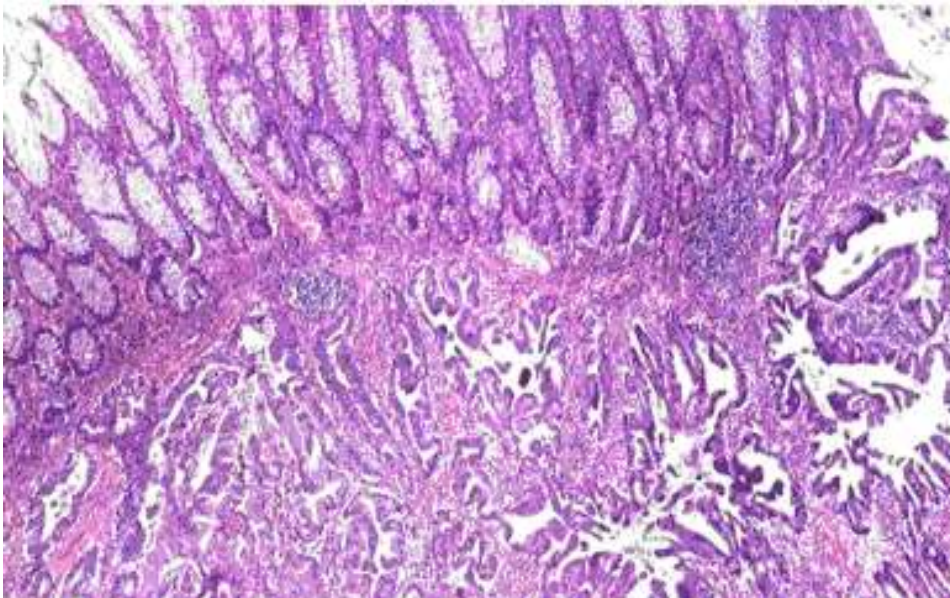
Ο **υποβλεννογόνιος χιτώνας** αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό και περιέχει ινοβλάστες, κολλαγόνο, λιποκύτταρα, φλεγμονώδη κύτταρα, νεύρα και αγγεία. Εδώ συναντούνται δύο νευρικά πλέγματα: το υποβλεννογόνο πλέγμα του Meissner που εντοπίζεται αμέσως κάτω από τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα και το εν τω βάθει υποβλεννογόνο πλέγμα (πλέγμα του Henle). Τα αγγεία του υποβλεννογόνιου χιτώνα περιλαμβάνουν αρτηρίδια, φλεβίδια και λεμφαγγεία.

Ο **μυϊκός χιτώνας** του παχέος εντέρου αποτελείται από μια έσω κυκλοτερή στιβάδα και μια έξω επιμήκη στιβάδα. Μεταξύ των δύο βρίσκεται το μυεντερικό πλέγμα του Auerbach. Η έξω μυϊκή στιβάδα παχύνεται και σχηματίζει τις κολικές ταινίες. Εξωτερικά ο μυϊκός χιτώνας καλύπτεται από λίπος, το οποίο ανάλογα με την εντόπιση περιβάλλεται ή όχι από περιτόναιο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

### 2.1 Εισαγωγή

Το καρκίνωμα παχέος εντέρου, ορίζεται από τον ΠΟΥ, ως το **επιθηλιακό νεόπλασμα του παχέος εντέρου, το οποίο διηθεί τη βλεννογόνια μυϊκή στοιβάδα** (Εικόνα 2.1). Αποτελείται κυρίως από αδενικούς σχηματισμούς διαφόρου μεγέθους και σχήματος που καλύπτονται από μια ή περισσότερες σειρές κυττάρων, με ή χωρίς παραγωγή βλέννης. Ο τύπος και το ποσοστό των αδενικών σχηματισμών, καθώς και η ατυπία των κυττάρων που τους επενδύουν, καθορίζουν το βαθμό διαφοροποίησης [2].

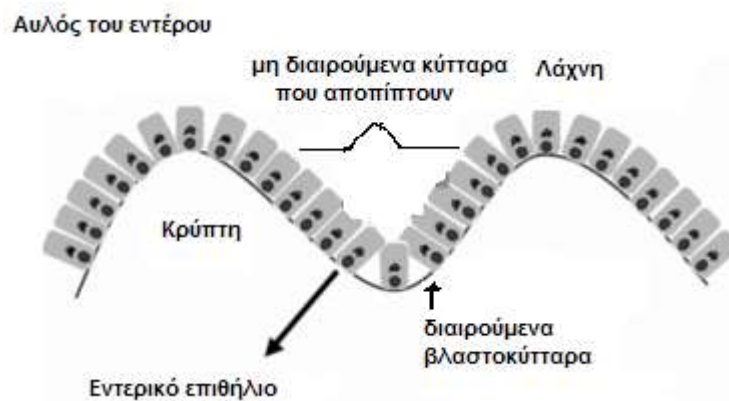


*Εικόνα 2.1* Αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου [HEX 100]

Η παρουσία διασκορπισμένων Paneth κυττάρων ή νευροενδροκρινικών κυττάρων ή κυττάρων με πλακώδη διαφοροποίηση εντός των κρυπτών είναι συμβατή με διάγνωση αδενοκαρκινώματος.

Η εμφάνιση καρκινωμάτων στο παχύ έντερο αφορά κυρίως τα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν εσωτερικά τον αυλό του. Το παχύ έντερο εμφανίζει εσωτερικά πλήθος εγκολπώσεων, τους *σωληνοειδείς αδένες*, που βοηθούν στην αύξηση της

απορροφητικής του επιφάνειας. Το επιθήλιο που καλύπτει τους σωληνοειδείς αδένες αποτελείται από μια μονόστιβη σειρά κυβοειδών επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία έχουν απορροφητικό ρόλο (απορροφητικά κύτταρα) ή εκκρίνουν βλέννη (καλυκοειδή κύτταρα), ενώ σε μικρότερο αριθμό εμφανίζονται και τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα. Τα επιθηλιακά κύτταρα των λαχνών του εντέρου αποπίπτουν κάθε 3-6 ημέρες, ανανεώνονται από κύτταρα που διαιρούνται στις βάσεις των κρυπτών [διαιρούμενα βλαστικά κύτταρα-colon stem cells (CSCs)] και διαφοροποιούνται σε απορροφητικά ή καλυκοειδή, (Εικόνα 2.2).



**Εικόνα 2.2.** Σχηματική απεικόνιση τμήματος του επιθηλίου του παχέος εντέρου.

## 2.2 Επιδημιολογία καρκινωμάτων παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) αποτελεί παγκοσμίως τον τρίτο πιο συχνό καρκίνο στους άντρες και το δεύτερο στις γυναίκες, με πάνω από 1.2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 608.700 θανάτους ετησίως (ΚΕΕΛΠΙΝΟ 2012), (GLOBOCAN 2008) και αντιπροσωπεύει το 13% όλων των καρκίνων, Σχήμα 2.1

Η συχνότητα του ΚΠΕ ποικίλλει, με τη μεγαλύτερη να απαντάται σε Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, Ευρώπη και Βόρεια Αμερική και τη μικρότερη στην κεντρική Ασία και Αφρική. Η συχνότητα της νόσου αυξάνει σημαντικά μετά την ηλικία των 40-50 ετών.

Τα τελευταία χρόνια η θνησιμότητα από ΚΠΕ ελαττώνεται προοδευτικά. Αυτό οφείλεται πιθανόν στην πρόιμη διάγνωση μέσω του πληθυσμιακού ελέγχου

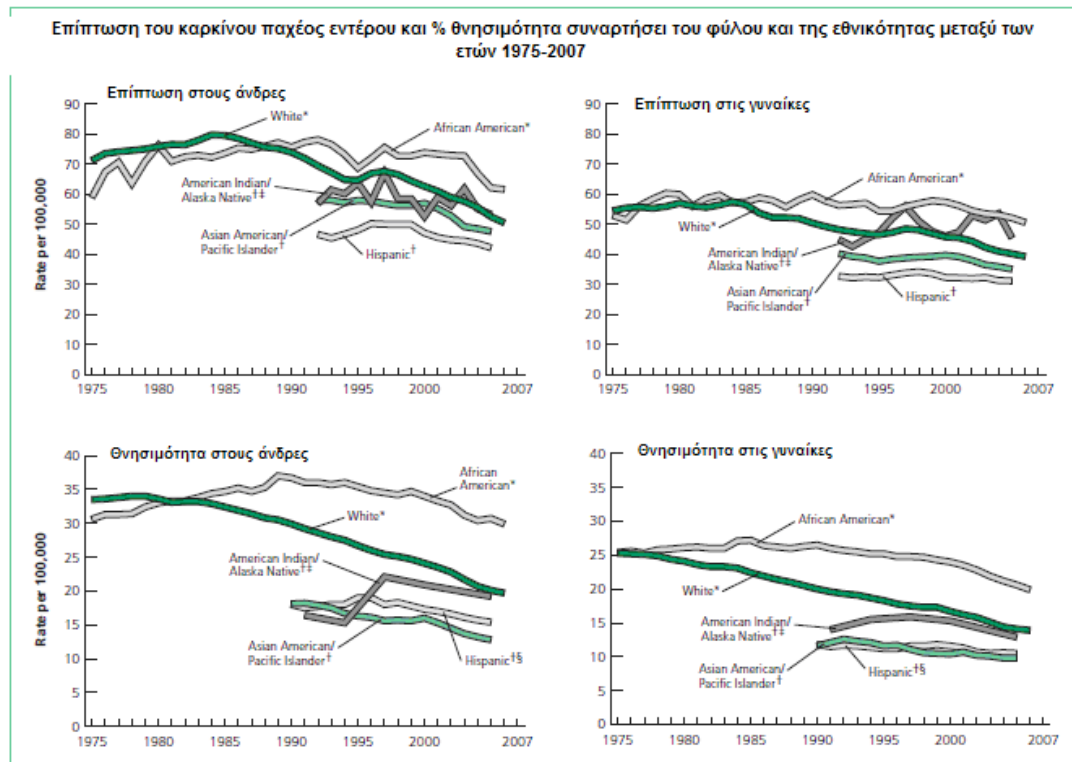
(screening), καθώς και στη βελτίωση της θεραπευτικής αντιμετώπισης (χειρουργική, ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία).

Κάθε χρόνο ο καρκίνος του παχέος εντέρου διαγιγνώσκεται παγκοσμίως σε μισό εκατομμύριο ανθρώπους. Στην Ευρώπη, η υψηλότερη θνησιμότητα παρατηρείται σε άνδρες και γυναίκες των ανατολικών και βορειοδυτικών χωρών. Χαμηλότερη είναι η θνησιμότητα στις χώρες της νότιας Ευρώπης [3].

Στην Ευρώπη, κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται 213.000 νέα περιστατικά και 110.000 θάνατοι από καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ στις ΗΠΑ το αντίστοιχο ποσοστό των θανάτων ανέρχεται στις 56.000, Σχήμα 2.2

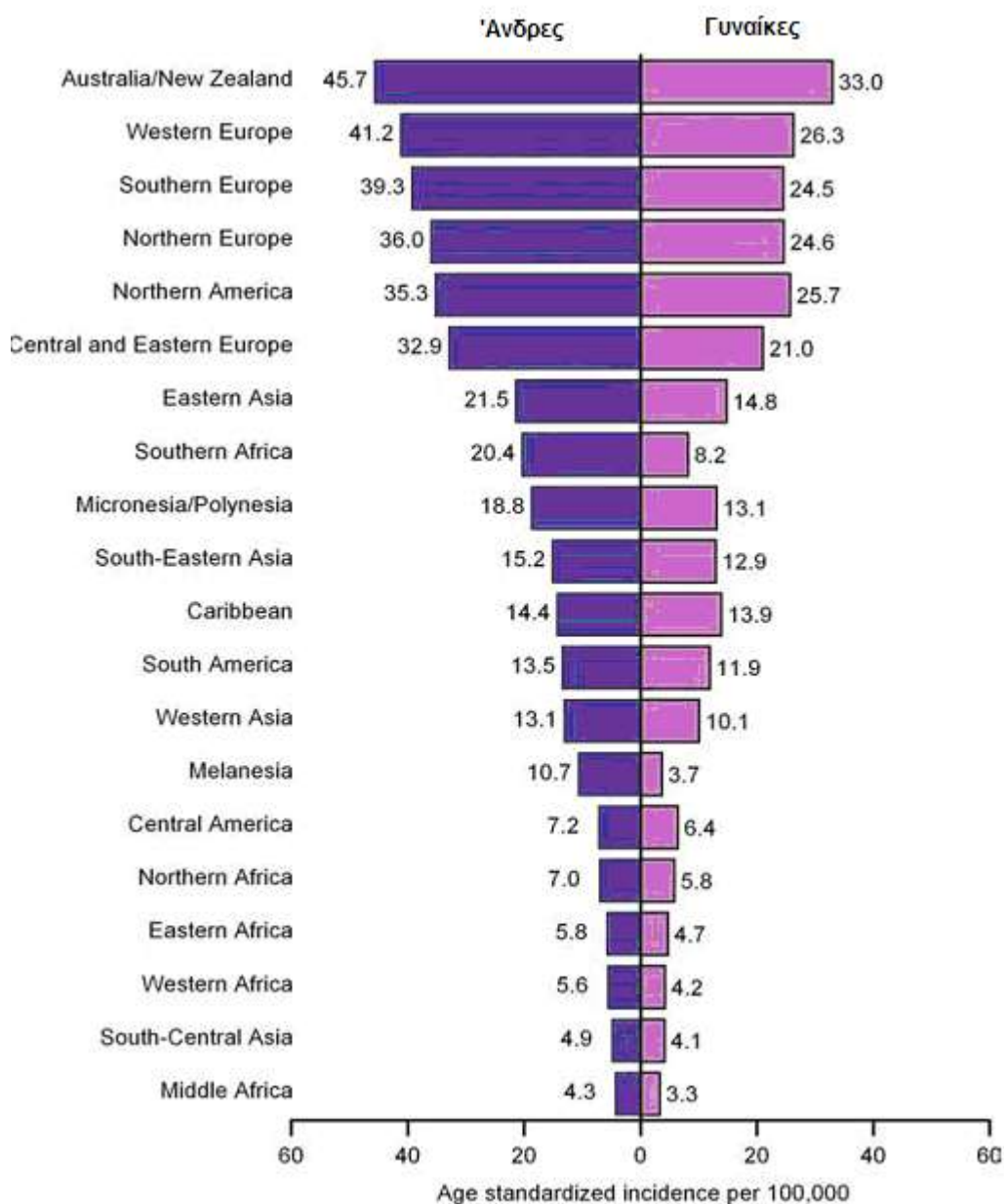
Παρά το ότι η Ελλάδα καταλαμβάνει τη χαμηλότερη θέση ανάμεσα στις χώρες της Ε.Ε, ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι σημαντική αιτία θανάτου (8,7 θάνατοι ανά 100.000 πληθυσμού) και αποτελεί την τρίτη κατά σειρά αιτία θανάτου από κακοήγη νεοπλασμάτα. Η συχνότητα στα δύο φύλα είναι παρόμοια, με τη διαφορά ότι στους άνδρες είναι αυξημένη η συχνότητα του καρκίνου του ορθού. Η πιθανότητα ενός ατόμου χωρίς συμπτώματα να αναπτύξει στη διάρκεια της ζωής του τη νόσο πλησιάζει το 6% και για τα δύο φύλα, ενώ περίπου οι μισοί από αυτούς θα πεθάνουν από τη νόσο.

Τη στιγμή της διάγνωσης, περίπου το 20% των ασθενών έχουν μεταστατική νόσο (που έχει επεκταθεί πέραν του παχέος εντέρου), ενώ ποσοστό 50% των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου αναπτύσσουν μεταστάσεις και τελικά καταλήγουν, λόγω της νόσου. Σήμερα είμαστε πλέον σε θέση να γνωρίζουμε ότι περίπου ένα στα δεκαπέντε περιστατικά καρκίνου του παχέος εντέρου προκαλείται από άμεσα κληρονομούμενες γενετικές ανωμαλίες. Επίσης, γνωρίζουμε ότι ένας στους πέντε από τους ασθενείς που εμφανίζουν καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν τουλάχιστον δύο κοντινούς συγγενείς που έπασχαν ή πάσχουν από καρκίνο.



**Σχήμα 2.1** Επίπτωση, Θνησιμότητα στον Καρκίνο Παχέος Εντέρου: Incidence - Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program; Mortality - National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention, as provided by the SEER Program, National Cancer Institute. **Πηγή:** American Cancer Society 2007.





**Σχήμα 2.2** Παγκόσμια επίπτωση καρκίνου παχέος εντέρου-ορθού **Πηγή:** GLOBOCAN 2008.

### 2.3 Πολυπαραγοντική αιτιολογία καρκινωμάτων παχέος εντέρου

Τα αίτια του καρκίνου του παχέος εντέρου παραμένουν άγνωστα. Πιστεύεται ότι στη δημιουργία του συμμετέχουν γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες [4-6].

Οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να καθορίσουν ποιά άτομα έχουν την προδιάθεση να αναπτύξουν τη νόσο, ενώ οι διατροφικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να

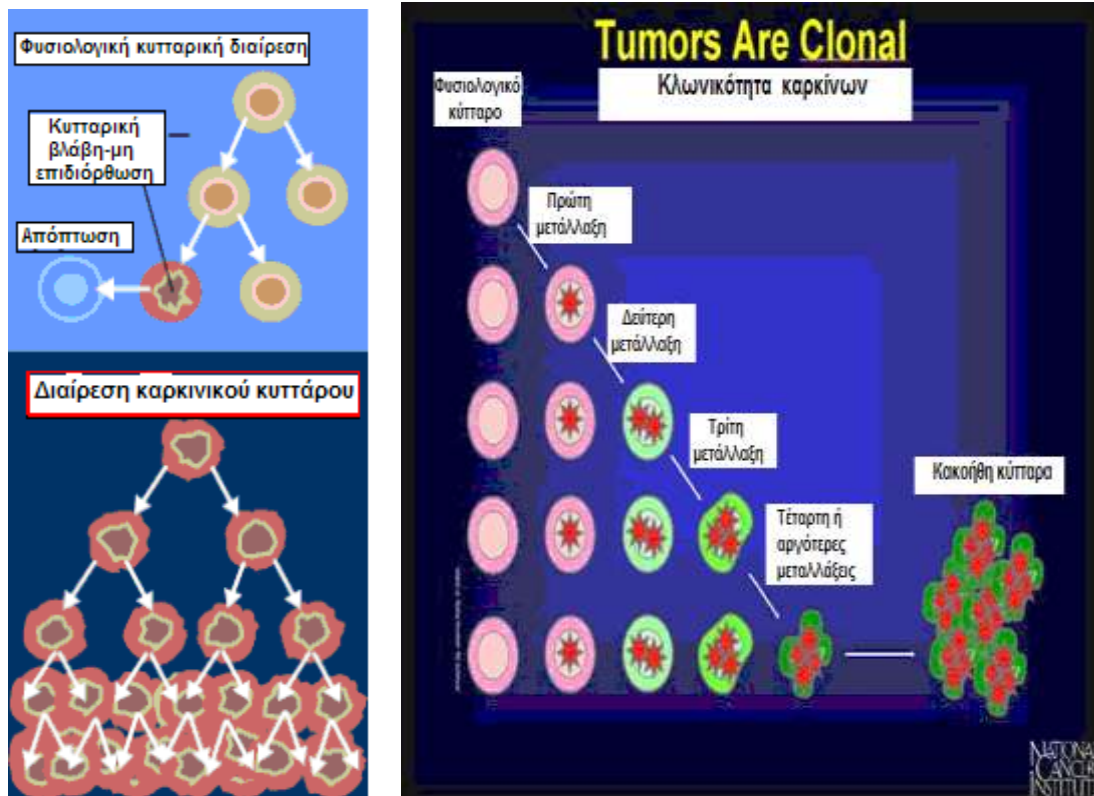
καθορίσουν ποιά από τα παραπάνω άτομα σε κίνδυνο τελικά θα εμφανίσουν τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Σε κυτταρικό επίπεδο ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια [7]. Κάθε ανθρώπινο κύτταρο φέρει ένα πολύπλοκο και αυστηρά ρυθμιζόμενο γενετικό πρόγραμμα που ελέγχει τη φυσιολογική κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Ο καρκίνος οφείλεται σε μια διαταραχή αυτού του φυσιολογικού ρυθμιστικού προτύπου, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, γεγονότα που χαρακτηρίζουν έναν κακοήγη όγκο [8].

Το γεγονός που ισχυροποιεί την άποψη για τη γενετική βάση του καρκίνου σε κυτταρικό επίπεδο είναι η παρατήρηση ότι σχεδόν όλοι οι καρκίνοι είναι μονοκλωνικής προέλευσης, που σημαίνει ότι όλα τα καρκινικά κύτταρα ενός ασθενούς μπορεί να προέρχονται από ένα και μόνο αρχικό προγονικό κύτταρο, Εικόνα 2.3, [9-13].

Οι αλλαγές που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο όταν γίνεται ογκογόνο συνοψίζονται σε:

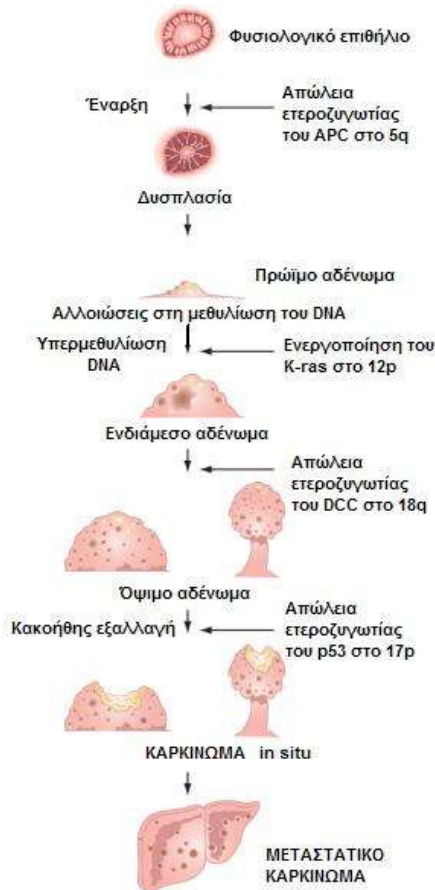
- Αθανατοποίηση του κυττάρου να αναπτύσσεται επ'άοριστον (immortalization),
- Μετασχηματισμό ώστε να μπορεί να διαφεύγει από τον έλεγχο των φυσιολογικών ρυθμιστικών περιοριστικών μηχανισμών της ανάπτυξης (transformation),
- Αποφυγή απόπτωσης (evading apoptosis),
- Αναισθητοποίηση σε αντιαυξητικά σήματα (insensitivity to antigrowth factors),
- Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα (self-sufficiency in growth factors),
- Ανάπτυξη ικανότητας αγγειογένεσης (sustained angiogenesis).



**Εικόνα 2.3.** Ο καρκίνος ξεκινά με την εξαλλαγή ενός σωματικού κυττάρου σε καρκινικό και τη συνεπακόλουθη αρρυθμιστή κυτταρική διαίρεση του, με αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκου, τα κύτταρα του οποίου είναι όλα απόγονοι του ίδιου αρχικού κυττάρου (κλωνικότητα) [10, 13].

Η πλήρης ανάπτυξη ενός καρκινικού όγκου απαιτεί κατά κανόνα την άθροιση πολλαπλών διαδοχικών γενετικών μεταλλάξεων μέσα σε ένα συγκεκριμένο σωματικό κύτταρο, Εικόνα 2.4, [14, 15].

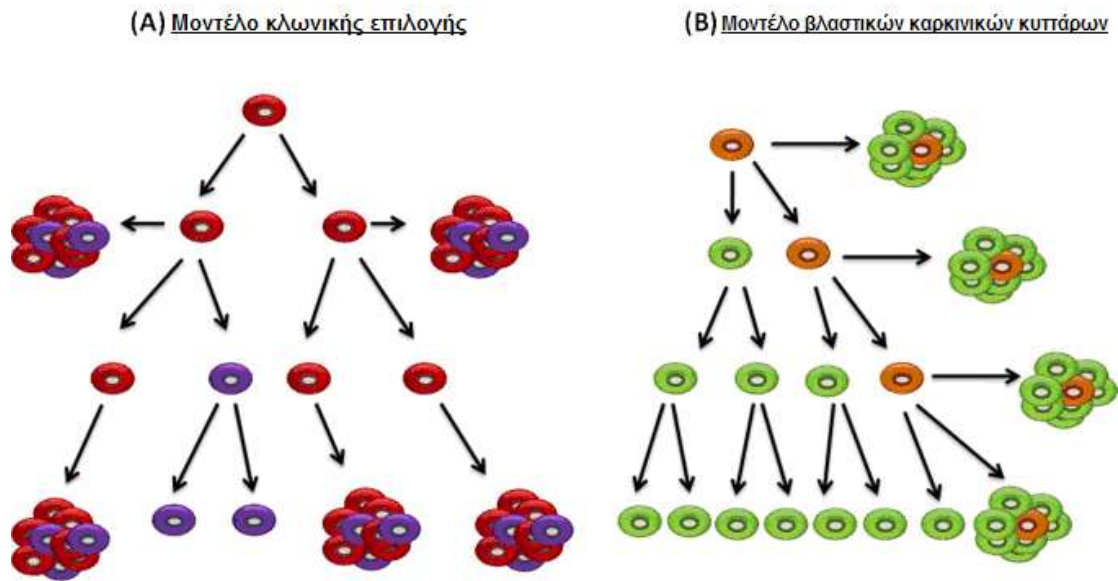
Το κλασικό αυτό μοντέλο της καρκινογένεσης έχει δεχτεί πληθώρα κριτικών, ενώ συγχρόνως έχει ανακύψει ένα πιο σύγχρονο μοντέλο καρκινογένεσης. Σύμφωνα με το σύγχρονο μοντέλο, η καρκινογένεση προέρχεται από τη διαφυγή των βλαστικών κυττάρων ή και προγονικών κυττάρων των οργάνων από τους φυσιολογικούς ενδογενείς και εξωγενείς (φωλεά) ρυθμιστικούς παράγοντες, Εικόνα 2.5α και 2.5β, [16-18].



**Εικόνα 2.4.** Η καρκινογένεση στο παχύ έντερο γίνεται μέσω γενετικών αλλοιώσεων όπου εμπλέκονται: ογκογονίδια (*ras* και κυρίως στο *K-ras*) και ογκοκατασταλτικά γονίδια (κυρίως αυτά των χρωμοσωμάτων 5q, 17p, 18q, π.χ *SMAD-4* και *p53*). [15]

Η κρύπτη του παχέος εντέρου αποτελεί την κοιτίδα της πλειοψηφίας των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, τα οποία εντοπίζονται σε μια κόγχη στη βάση της κρύπτης, η οποία ελέγχει τη συμπεριφορά τους και διατηρεί την ομοιόσταση των βλαστικών κυττάρων μέσω ποικίλων οδών σηματοδότησης και αλληλεπιδράσεων. Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει για να καθοριστούν δείκτες που να δίνουν τη δυνατότητα να προσδιοριστούν βλαστικά κύτταρα παχέος εντέρου, τα πιο χρήσιμα από τα οποία είναι ο *Lgr5* του *Wnt* γονιδίου στόχου. Μολονότι η βάση της κρύπτης περιέχει αρκετά βλαστικά κύτταρα, κάθε κολονική κρύπτη αποτελείται από ένα μόνο κλώνο κυττάρων. Οι ερευνητές έχουν προσπαθήσει να συμβιβάσουν αυτές τις φαινομενικά αντιφατικές παρατηρήσεις με τη διεξαγωγή έρευνας σε φάσεις διαίρεσης βλαστικών κυττάρων. Η διασπορά των μεταλλαγμένων βλαστικών κυττάρων που παρήχθησαν μέσα σε μια κρύπτη, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός monocryptal αδενώματος το οποίο εξελίσσεται σε μικροαδένωμα. Κάποια πρώιμα

αδενώματα έχουν γίνει πολυκλωνικά μέσω ενός ακόμη άγνωστου μηχανισμού. Η παρουσία του υποπληθυσμού των καρκινικών κυττάρων τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν όγκους όταν εμφυτεύονται σε ποντικούς, έχει ανανεώσει το ενδιαφέρον για τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, ειδικά σε ότι αφορά την σχέση τους συναρτήσεως των επιπτώσεων κατά τη χημειοθεραπεία. Διάφοροι πιθανοί δείκτες των καρκινικών βλαστικών κυττάρων εντέρου έχουν μελετηθεί στον καρκίνο παχέος εντέρου, ιδιαίτερα ο CD133 [18].

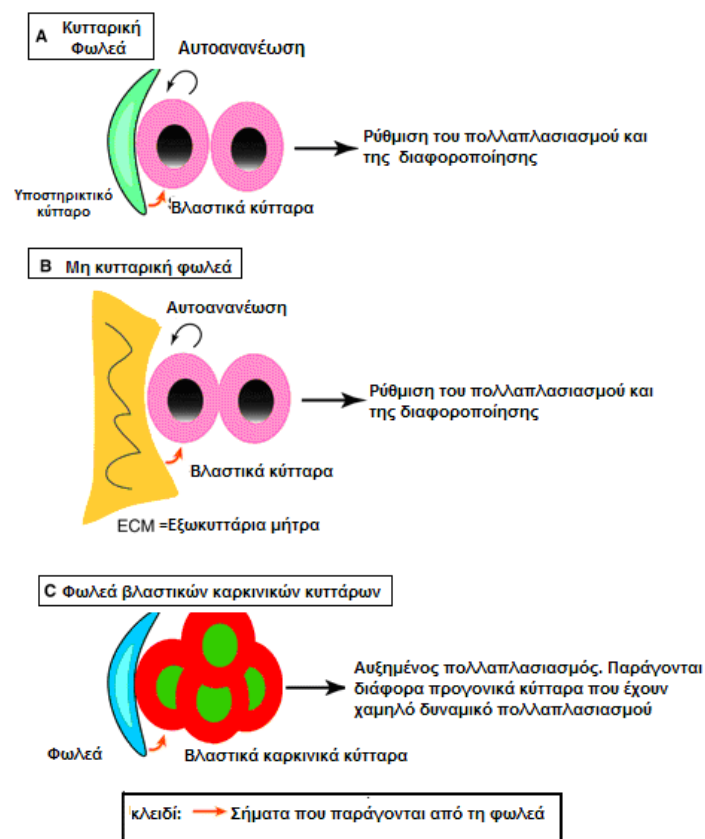


**Εικόνα 2.5α.**

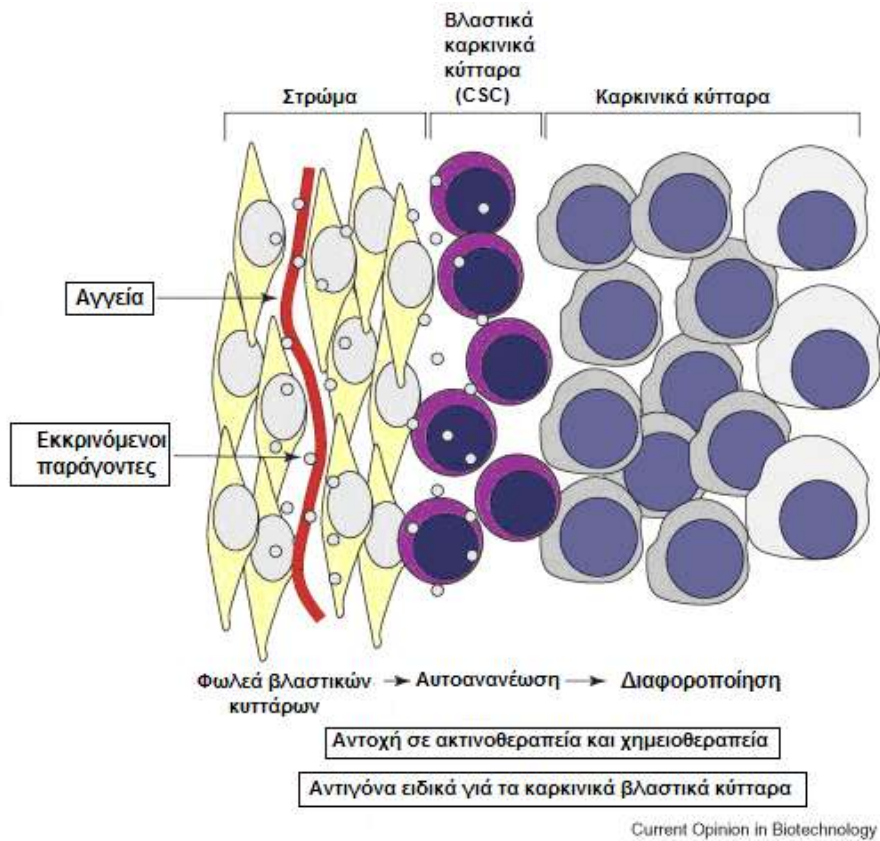
**Εικόνα 2.5β.**

**Μοντέλα κυτταρικής ετερογένειας σε συμπαγείς όγκους.** (A) Το μοντέλο της κλωνικής επιλογής στηρίζεται στην άποψη ότι κάθε κύτταρο του όγκου εν δυνάμει μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός νέου όγκου, μέσα από νέες μεταλλάξεις οι οποίες του προσδίδουν πλεονέκτημα ανάπτυξης και επιβίωσης. Αυτά τα κύτταρα (κόκκινο) επικρατούν σε σχέση με τα άλλα καρκινικά κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από μικρότερη ικανότητα πολλαπλασιασμού (μωβ). (B) Το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων αποδέχεται ότι συγκεκριμένο είδος των βλαστικών κυττάρων ή και των προγονικών κυττάρων των οργάνων ευθύνεται για την έναρξη του όγκου, την εξέλιξη του και τελικά τη μετάσταση. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs) (πορτοκαλί) και έχουν την ικανότητα της αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε άλλου είδους κύτταρα, τα οποία αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων του όγκου (πράσινο) [19].

Η απορρύθμιση του πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων (ή των προγονικών κυττάρων, στα οποία έχει επανενεργοποιηθεί το πρόγραμμα αυτοανανέωσης) οδηγεί σε ανάπτυξη μονοκλωνικού πληθυσμού κυττάρων. Όταν καρκινικά κύτταρα της νεοπλασματικής μάζας βρεθούν σε καινούργιο περιβάλλον (π.χ. μετά από πειραματική εμφύτευση σε πειραματόζωα ή στις περιπτώσεις μεταστάσεων), ένας μικρός μόνο αριθμός από αυτά διατηρούν την ικανότητα να δημιουργήσουν νέα νεοπλασματική μάζα ίδια με την αρχική. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται καρκινικά βλαστικά κύτταρα (cancer stem cells), Εικόνες 2.6 και 2.7. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα έχουν επίσης ιδιότητες αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης. Με την αυτοανανέωση έχουν την ικανότητα να προκαλούν υποτροπές και μεταστάσεις, ενώ με την ιδιότητα της διαφοροποίησης παράγουν την καρκινική μάζα που αποτελείται από έναν ετερογενή πληθυσμό καρκινικών κυττάρων [17].



**Εικόνα 2.6** Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs) εξαρτώνται από το μικροπεριβάλλον τους για την ανάπτυξη της καρκινικής μάζας [16]. Σύγκριση της φωλεάς σε φυσιολογικές καταστάσεις και σε καρκινώματα [20].



**Εικόνα 2.7** Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs) περιβάλλονται από τη φωλεά (niche) που συμβάλλει στη διατήρηση της αυτοανανέωσης τους. Η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων παράγει μη αυτοανανεούμενα κύτταρα που σχηματίζουν τη μάζα του όγκου [17].

## 2.4 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στην εκδήλωση και στην εξέλιξη καρκινωμάτων παχέος εντέρου

Η διατροφή θεωρείται σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας. Οι μελέτες όμως των διαιτητικών συνηθειών είναι δύσκολο να αξιολογηθούν, γιατί στη φυσική διατροφή περιέχονται πολλές καρκινογόνες ουσίες, αλλά και ανταγωνιστές τους. Μεγάλης κλίμακας μελέτες διαιτητικών συνηθειών σε πληθυσμούς με καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν καταδείξει ότι ορισμένες τροφές, όπως το λίπος και το κόκκινο κρέας, όταν καταναλώνονται σε αυξημένες ποσότητες, παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Πληθυσμοί που καταναλώνουν αυξημένες ποσότητες φυτικών ινών, όπως λαχανικά και φρούτα

(πλούσια σε βιταμίνη C), παρουσιάζουν μειωμένη συχνότητα αναπτύξεως καρκίνου του παχέος εντέρου.

Παραμένει ωστόσο αδιευκρίνιστο αν συγκεκριμένα στοιχεία της τροφής, ο τρόπος μαγειρέματος ή κάποια φυτοχημική παρέμβαση ευθύνονται γι' αυτήν την σχέση [21]. Τα πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα έλαια (ιχθυέλαια) και το ελαιόλαδο, που περιέχει κυρίως μονοακόρεστα λίπη, πιστεύεται ότι ασκούν προστατευτική δράση στην εμφάνιση της νόσου. Άλλα συμπληρώματα της διατροφής, όπως οι βιταμίνες A, C και E, η β-καροτίνη και το σελήνιο, που δρουν ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες, καθώς και η βιταμίνη D έχουν μελετηθεί χωρίς όμως να τεκμηριώνεται η αποτελεσματικότητά τους. Η λήψη ασβεστίου φαίνεται αρκετά αποτελεσματική, ενώ υπάρχουν ενδείξεις από προοπτικές μελέτες για τη χρησιμότητα του φυλλικού οξέος. Κλινικές μελέτες και επιδημιολογικές παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τον προστατευτικό ρόλο της ασπιρίνης και των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ). Η απουσία άσκησης και η παχυσαρκία έχουν επίσης σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου [6].

Οι καπνιστές έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου και κυρίως καρκίνου του ορθού (του τελικού τμήματος του παχέος εντέρου). Ο κίνδυνος αυτός συνδέεται με τη διάρκεια και την ποσότητα του καπνίσματος, ενισχύεται στη μακροχρόνια χρήση, ενώ ελαττώνεται με τη διακοπή του καπνίσματος. Μελέτες υποστηρίζουν ότι το κάπνισμα μπορεί να λειτουργεί ως παράγοντας έναρξης της νεοπλασματικής εκτροπής στον καρκίνο του παχέος εντέρου [22].

## 2.5 Παράγοντες κινδύνου

Η ηλικία αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Όλα τα άτομα, ανεξαρτήτως φύλου και χωρίς κάποιο ιστορικό, κινδυνεύουν να εμφανίσουν καρκίνο του παχέος εντέρου μετά την ηλικία των 50 ετών. Αν και ο κίνδυνος αυτός υπάρχει και πριν τα 50 έτη, οι περισσότεροι από το 90% των ανθρώπων που εμφανίζουν καρκίνο του παχέος εντέρου είναι άνω των 50 ετών. Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο είναι:

- η παρουσία ενός ή περισσότερων συγγενών α' βαθμού με καρκίνο ή πολύποδες του παχέος εντέρου



- η παρουσία αδενωματωδών πολυπόδων ή καρκίνου του παχέος εντέρου στο παρελθόν
- το ιστορικό μακροχρόνιας και εκτεταμένης Ιδιοπαθούς Φλεγμονώδους νόσου του παχέος εντέρου (Ελκώδης κολίτιδα, νόσος του Crohn).

Σήμερα διαχωρίζονται δύο βασικές κατηγορίες κινδύνου:

- η ομάδα μέσου κινδύνου και
- η ομάδα υψηλού κινδύνου.

**Ομάδα μέσου κινδύνου:** Τα άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών θεωρούνται μέσου κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου. Μετά την ηλικία αυτή η συχνότητα της νόσου διπλασιάζεται για κάθε δεκαετία ζωής. Σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες, τα άτομα που δεν έχουν κανένα σύμπτωμα, αλλά ανήκουν στην ομάδα μέσου κινδύνου, δηλαδή όταν η ηλικία τους είναι μεγαλύτερη από τα 50 έτη, πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμασία ανίχνευσης αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα κάθε χρόνο και σε εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση κάθε 3 με 5 χρόνια ή σε ολική κολonosκόπηση ανά 10ετία, αν δεν υπάρξουν ευρήματα. Όταν δεν είναι δυνατή η ολική κολonosκόπηση, πρέπει να γίνεται βαριούχος υποκλυσμός με διπλή αντίθεση (DCBE).

**Ομάδα υψηλού κινδύνου:** Σε αυτήν την ομάδα ανήκουν:

- τα άτομα με ατομικό ιστορικό πολυπόδων ή καρκίνου του παχέος εντέρου
- τα άτομα με οικογενειακό ιστορικό πολυπόδων ή καρκίνου του παχέος εντέρου
- οι ασθενείς με μακροχρόνια Ελκώδη κολίτιδα ή νόσο του Crohn.

Το οικογενειακό ιστορικό μπορεί να μας βοηθήσει να ξεχωρίσουμε τις οικογένειες που έχουν βλάβες στα γονίδια τους που κληρονομούνται και προδιαθέτουν στην εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ορισμένα άτομα που ανήκουν σε αυτές τις οικογένειες μπορεί να εμφανίσουν καρκίνο σε ποσοστό που φτάνει το 100%. Τα άτομα που ανήκουν στην ομάδα αυτή, μπορεί να εμφανίσουν καρκίνο σε μικρότερη ηλικία. Τα άτομα που ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου πρέπει να υποβάλλονται περιοδικά σε κολonosκόπηση, ανάλογα με το ιστορικό τους και ανεξάρτητα από την ηλικία τους. Ειδικότερα, όσοι έχουν έναν ή περισσότερους

συγγενείς α' βαθμού με καρκίνο ή πολύποδες του παχέος εντέρου διαγνωσθέντων σε ηλικία μικρότερη των 60 ετών, πρέπει να ελέγχονται από την ηλικία των 40 ετών. Επίσης, όσοι έχουν ιστορικό αδενωματωδών πολυπόδων ή καρκίνου του παχέος εντέρου κατά το παρελθόν, ιστορικό Οικογενούς Πολυποδίασης του παχέος εντέρου ή συνδρόμου μη Πολυποδιασικού καρκίνου του παχέος εντέρου στην οικογένεια ή ιστορικό μακροχρόνιας και εκτεταμένης Ιδιοπαθούς Φλεγμονώδους νόσου του παχέος εντέρου (Ελκώδης κολίτιδα, νόσος του Crohn) πρέπει να ελέγχονται πιο τακτικά, στα διαστήματα που ορίζονται από τον ιατρό τους.

## 2.6 Διάγνωση με εξετάσεις ρουτίνας

Στις περισσότερες κακοήθειες ο προληπτικός έλεγχος θεωρείται "δευτερογενής πρόληψη" γιατί ανιχνεύει καρκίνους σε πρώιμα στάδια, αλλά δεν προλαμβάνει τη νόσο. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ο προληπτικός έλεγχος μπορεί να θεωρηθεί και "πρωτογενής πρόληψη", καθώς μπορεί να ανιχνεύσει προκαρκινικούς πολύποδες και να σταματήσει τη εξέλιξη της νόσου. Άτομα με τους παράγοντες κινδύνου που προαναφέρθηκαν, θα πρέπει να συμβουλευθούν ειδικό ιατρό για το πότε θα πρέπει να ξεκινήσουν προληπτικούς ελέγχους. Ο ειδικός ιατρός θα συστήσει μια ή περισσότερες από τις παρακάτω εξετάσεις, ανάλογα με την ηλικία, τους επιβαρυντικούς παράγοντες και τυχόν σημεία ή συμπτώματα.

- **Εξέταση κοπράνων για ίχνη αίματος (FOBT)**, που δεν φαίνονται δια γυμνού οφθαλμού.
- **Δακτυλική εξέταση από ιατρό**, ο οποίος μπορεί να αισθανθεί τυχόν ανώμαλους σχηματισμούς, ή να δει αίμα που κρύβονταν εσωτερικά.
- **Σιγμοειδοσκόπηση ή κολonosκόπηση**, όπου με εύκαμπτο μακρύ όργανο με οπτικές ίνες ελέγχεται όλο ή μέρος του παχέος εντέρου.
- **Βαριούχος υποκλυσμός διπλής αντίθεσης (DCBE)**, δηλαδή ακτινογραφίες του παχέος εντέρου με χρήση σκιαγραφικού υγρού.

Η περαιτέρω διερεύνηση ύποπτων αποτελεσμάτων μπορεί να απαιτήσει και άλλες εξετάσεις, όπως αξονική και μαγνητική τομογραφία, σπινθηρογράφημα κ.ά. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και η ανάγκη για επιπρόσθετες εξετάσεις αποτελούν διαδικασία που γίνεται από τον ειδικό ιατρό και εξατομικεύεται για κάθε περίπτωση.

## 2.7 Πρόληψη

Ο καρκίνος του εντέρου προσφέρεται ιδιαίτερα για πρόληψη γιατί:

- συνήθως ξεκινάει σαν καλοήθης πολύποδας (προκαρκινική κατάσταση)
- απαιτείται αρκετό διάστημα πριν εξελιχθεί σε καρκίνο
- η πολυπεκτομή διακόπτει την εξέλιξη σε καρκίνο
- ακόμα και αν έχουμε καρκίνο, σε αρχικό στάδιο θεραπεύεται πλήρως με εγχείρηση.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου μπορεί να προληφθεί. Η κολonosκόπηση αποτελεί τον καλύτερο τρόπο διάγνωσης των πολυπόδων (πρόληψη) και έχει την ανάλογη αξία του test Παπανικολάου που γίνεται στις γυναίκες για την πρόληψη του καρκίνου της μήτρας. Η εξέταση των κοπράνων για παρουσία αίματος, ως μέθοδος πρόληψης δεν έχει δώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα, γιατί συχνά η εξέταση είναι ψευδώς θετική ή αρνητική για αίμα. Σύμφωνα με τις οδηγίες της Αμερικανικής Γαστρεντερολογικής Εταιρείας, όλα τα άτομα (άνδρες και γυναίκες) ηλικίας άνω των 50 ετών, που δεν πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα και δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του παχέος εντέρου ανήκουν στην ομάδα χαμηλού κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα άτομα αυτά πρέπει να υποβάλλονται σε κολonosκόπηση κάθε δέκα χρόνια από την ηλικία των 50 ετών, ώστε να προφυλαχθούν από τη νόσο. Οι ασθενείς που παρουσιάζουν θετικό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του παχέος εντέρου πρέπει να υποβάλλονται περιοδικά σε κολonosκόπηση, μετά την ηλικία των 40 ετών ώστε να διαγνωσθεί έγκαιρα η νόσος ή να αφαιρεθούν τυχόν υπάρχοντες αδενωματώδεις πολύποδες. Επίσης, ασθενείς που έχουν ήδη χειρουργηθεί για καρκίνο παχέος εντέρου ή για πολύποδες του παχέος εντέρου, πρέπει να υποβάλλονται σε περιοδικό έλεγχο (1-3 χρόνια) για την αφαίρεση νέων πολυπόδων και την πρόληψη ανάπτυξης νέου καρκίνου.

### 2.7.1. Οδηγίες Δευτερογενούς Πρόληψης (Προ-συμπτωματικός Έλεγχος)

Ο προσυμπτωματικός έλεγχος που συνιστάται για τη δευτερογενή πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου αποτελείται από:

- ❑ Αιματολογική εξέταση κοπράνων μετά το 40ο έτος της ηλικίας ανά 2ετία και μετά το 50ο έτος της ηλικίας κάθε χρόνο.
- ❑ Κολonosκόπηση μετά το 50ο έτος της ηλικίας ανά 5ετία και σε άτομα υψηλού κινδύνου μετά το 40ο έτος της ηλικίας κάθε χρόνο.

### 2.7.2. Οδηγίες για Πρώιμη ανίχνευση

Σήμερα αναπτύσσονται δυο νέες μέθοδοι ελέγχου του παχέος εντέρου:

- ❖ η εικονική κολonosκόπηση και
- ❖ η κολonosκόπηση με βιντεοκάψουλα παχέος εντέρου.

Η εικονική κολonosκόπηση συνίσταται στην απεικόνιση του παχέος εντέρου με αξονική ή μαγνητική τομογραφία και η ανασύνθεση και ανάλυση των εικόνων με ειδικά προγράμματα λογισμικού. Η ανάλυση των δημοσιευμένων μελετών σε σύγκριση με την κολonosκόπηση ως μεθόδου αναφοράς, έχει δείξει ότι ανιχνεύονται 75% των πολύποδων, με καλύτερη ευαισθησία για πολύποδες μεγαλύτερους από ένα εκατοστό. Η εξέταση αυτή εκτελείται σήμερα σε αρκετά ακτινολογικά εργαστήρια στην Ελλάδα.

Στην κολonosκόπηση παχέος εντέρου με βιντεοκάψουλα, ο ασθενής καταπίνει την βιντεοκάψουλα η οποία εκπέμπει συνεχώς εικόνες σε δέκτη-καταγραφέα που ο ασθενής φορά στη ζώνη του. Οι εικόνες αναλύονται με ειδικό πρόγραμμα λογισμικού. Η εξέταση αυτή βρίσκεται σε φάση κλινικών μελετών στην Ευρώπη, στις οποίες μετέχει και το Γαστρεντερολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν».

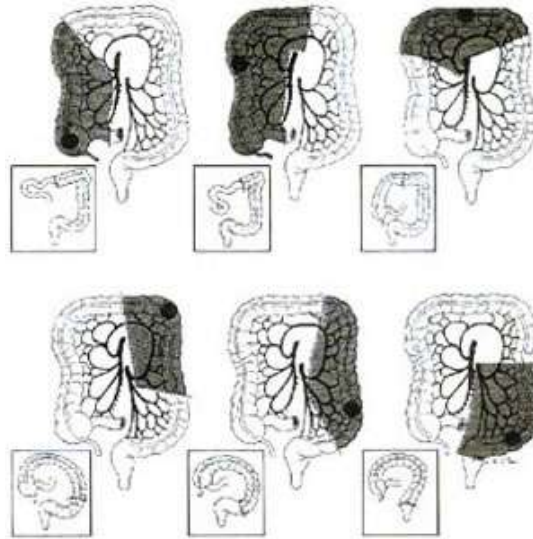
### 2.8 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Οι περισσότεροι πολύποδες μπορούν συνήθως να αφαιρεθούν κατά τη διάρκεια της κολonosκόπησης, χωρίς να χρειαστεί εγχείρηση. Η επέμβαση αυτή είναι ανώδυνη και γίνεται μέσα από το κολonosκόπιο. Ο πολύποδας που αφαιρείται στέλνεται για ιστολογική εξέταση. Συνήθως οι πολύποδες είναι καλοήθεις και η αφαίρεση τους θεωρείται θεραπευτική. Εάν όμως βρεθεί μια εστία καρκίνου μέσα στον πολύποδα, αλλά περιορίζεται μόνο στον πολύποδα, τότε η αφαίρεση θεωρείται πλήρης και δεν χρειάζεται άλλου είδους παρέμβαση. Εάν η εξέταση στο μικροσκόπιο δείχνει ότι πιθανά δεν έχουν αφαιρεθεί όλα τα καρκινικά κύτταρα μαζί με τον πολύποδα τότε

μπορεί να χρειαστεί μια δεύτερη κολonosκόπηση ή χειρουργική αφαίρεση του τμήματος του εντέρου, όπου υπήρχε αυτός ο πολύποδας. Η ανεύρεση καρκίνου που έχει καταλάβει όλο τον πολύποδα ή έχει προχωρήσει στο τοίχωμα του εντέρου χρειάζεται χειρουργική αφαίρεση. Το είδος της χειρουργικής επέμβασης ποικίλλει και εξαρτάται από τη θέση του καρκίνου στο παχύ έντερο. Σε μερικές περιπτώσεις, που σήμερα όμως είναι σπάνιες, αν ο όγκος είναι πολύ κοντά στην έξοδο του εντέρου, μπορεί να χρειαστεί να δημιουργηθεί ένα άνοιγμα του εντέρου στο τοίχωμα της κοιλίας, από όπου θα αφοδεύει ο ασθενής. Το άνοιγμα αυτό ονομάζεται κολοστομία και είναι έτσι φτιαγμένο ώστε να προσαρμόζεται σ' αυτό ένα σακουλάκι, που θα μαζεύει τα κόπρανα και θα αλλάζεται συχνά από τον ασθενή. Όσοι έχουν εμφανίσει στο παρελθόν πολύποδα(ες) μπορεί να εμφανίσουν και άλλους αργότερα. Επίσης, οι ασθενείς που είχαν καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν αυξημένο κίνδυνο να ξαναεμφανίσουν στο μέλλον καρκίνο ή πολύποδες. Γι' αυτό το λόγο συνιστάται περιοδική παρακολούθηση των ασθενών αυτών με κολonosκόπηση. Παρά τις βελτιώσεις των χημειοθεραπειών, οι διαθέσιμες επιλογές παραμένουν μη ικανοποιητικές για τους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου – ορθού. Η ενδοφλέβια χορήγηση φθοριοπυριμιδινών αποτελεί τη βάση της θεραπείας του καρκίνου του παχέος εντέρου – ορθού για πάνω από 40 χρόνια. Υπάρχει όμως ανάγκη να αναπτυχθούν νέες θεραπείες που θα προσφέρουν βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και θα καταστήσουν τη χημειοθεραπευτική αγωγή πιο ανεκτή και εύκολη. Πράγματι, δύο πρόσφατες μελέτες που ερεύνησαν τις προτιμήσεις των ασθενών απέναντι στις διάφορες θεραπείες, βρήκαν ότι οι ασθενείς σε συντριπτικό ποσοστό (84% και 92% αντίστοιχα) προτιμούν τις νεότερες θεραπείες από το στόμα, αντί της καθιερωμένης ενδοφλέβιας αγωγής. Η ευκολία, η χορήγηση του φαρμάκου στο σπίτι και τα προβλήματα της ενδοφλέβιας χορήγησης, αναφέρθηκαν και στις δύο μελέτες ως οι κύριοι λόγοι αυτής της προτίμησης. Η αντιμετώπιση εξαρτάται από το μέγεθος, την εντόπιση και την έκταση του όγκου, από τις τυχόν επιπλοκές που έχει προκαλέσει και από τη γενική κατάσταση του ασθενούς. Απαιτείται η συνεργασία ομάδας ιατρών όπως χειρουργού, γαστρεντερολόγου, ογκολόγου και ακτινοθεραπευτή, ώστε να ακολουθηθεί μια ή συνδυασμός περισσοτέρων θεραπευτικών επιλογών.

✓ **Χειρουργική θεραπεία** είναι η πιο συχνή αντιμετώπιση για καρκίνο παχέος εντέρου. Ο χειρουργός αφαιρεί τον όγκο και τμήμα του κοντινού υγιούς εντέρου

καθώς και τους γειτονικούς λεμφαδένες. Συνήθως υπάρχει η δυνατότητα να ξαναενώσει τα τμήματα του εντέρου, αλλιώς πρέπει να δημιουργηθεί παρά φύσει έδρα (περίπου 15% των καρκίνων), Εικόνα 2.8.



**Εικόνα 2.8** Απεικόνιση της χειρουργικής εκτομής που πραγματοποιείται ανάλογα με την εντόπιση του όγκου, καθώς και η αναστόμωση του εντέρου [23].

- ✓ **Ακτινοθεραπεία** ονομάζεται η αγωγή με ακτινοβολία υψηλής δόσης με στόχο την τοπική καταστροφή καρκινικών κυττάρων στην περιοχή που εφαρμόζεται
- ✓ **Χημειοθεραπεία** είναι η χρήση φαρμάκων που εξολοθρεύουν τα καρκινικά κύτταρα όπου και αν βρίσκονται στον οργανισμό. Γίνεται συνήθως μετά το χειρουργείο, αλλά και πριν ή και ανεξάρτητα από αυτό. Τα φάρμακα δίνονται από τη φλεβική οδό, ή από του στόματος
- ✓ **Βιολογική θεραπεία** π.χ. η γονιδιακή θεραπεία και η θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν στην εξουδετέρωση ειδικών αυξητικών παραγόντων που προάγουν την εξάπλωση του όγκου, τη διασπορά του και την ανάπτυξη μεταστάσεων. Με τον όρο γονιδιακή θεραπεία εννοούμε την εισαγωγή στον οργανισμό του ασθενούς «κομματιών» γενετικού υλικού [DNA ή RNA] με διάφορους φορείς-vectors (π.χ. ιούς, λιπιδώματα). Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να είναι σωματική ή γαμετική, διακρίνεται δε σε διορθωτική, κυτταροτοξική και ανοσορρυθμιστική. Όλες οι μορφές αντιμετώπισης έχουν ανεπιθύμητες και τοξικές παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτές εξαρτώνται από τη μορφή και την

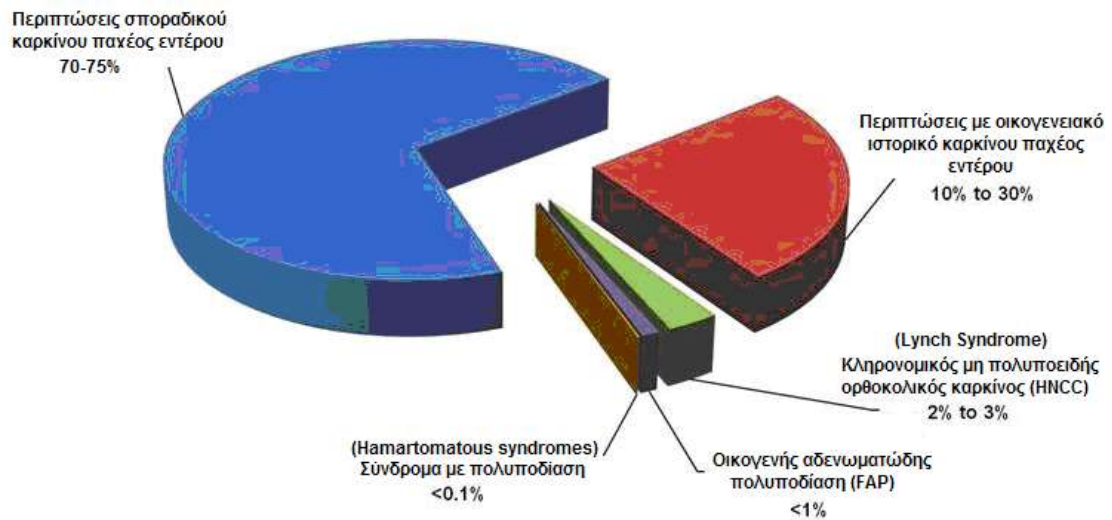
ένταση της αγωγής καθώς και από την κατάσταση του ίδιου του οργανισμού. Για το λόγο αυτό θα πρέπει, πάντα σε συνεννόηση με τον θεράποντα ιατρό, να εκτιμώνται τα δυνητικά οφέλη σε σχέση με το βιολογικό κόστος κάθε θεραπευτικής αντιμετώπισης, ώστε ότι εφαρμόζεται να έχει ουσιαστικό αποτέλεσμα. Τέλος, ιδιαίτερα σημαντική είναι η συνεχής παρακολούθηση μετά την αγωγή για τυχόν υποτροπές ή μεταστάσεις.

## 2.9 Τύποι Καρκίνου του Παχέος Εντέρου

Διακρίνονται δύο κύριες μορφές Καρκίνου του Παχέος Εντέρου: ο **σποραδικός** και ο **κληρονομικός**, (Σχήμα 2.4).

Ο **σποραδικός καρκίνος** του παχέος εντέρου εκδηλώνεται σε άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό ή με χωρίς σημαντική εκδήλωση στην οικογένεια. Παρά το γεγονός ότι μερικές φορές υπάρχει κάποιο κληρονομικό ή οικογενές στοιχείο στο ιστορικό των ασθενών, εν τούτοις δεν είναι συνήθης ο τύπος αυτός καρκίνου. Το 70%-75% περίπου του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου (ΚΠΕ) είναι σποραδικός. Ο σποραδικός Καρκίνος του Παχέος Εντέρου είναι μια νόσος της προχωρημένης ηλικίας και το ποσοστό των ανθρώπων το οποίο φτάνει σε γήρας διαρκώς αυξάνει. Η μέση ηλικία διάγνωσης του ΚΠΕ είναι μετά το εβδομικοστό έτος. Περίπου το 25% των περιπτώσεων συμβαίνουν σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό ΚΠΕ. Σ' αυτές τις περιπτώσεις περιλαμβάνεται και το 5% των περιπτώσεων με οικογενειακό ιστορικό **οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης**. Οι πλείστοι από αυτούς τους ασθενείς αναπτύσσουν αδενωματώδεις πολύποδες που εκφύονται από τον εντερικό βλεννογόνο. Τα άτομα με αυτούς τους πολύποδες υφίστανται πολυπεκτομή και τίθενται υπό ενδοσκοπική επαγρύπνιση [24].

Ο κληρονομικός ΚΠΕ περιλαμβάνει τον **οικογενή** και τον **κληρονομούμενο**. Ο οικογενής και ο κληρονομούμενος καρκίνος παρατηρούνται σε άτομα οικογενειών με λανθασμένο γονίδιο, κληρονομούμενο από τον πατέρα ή τη μητέρα. Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση και ο κληρονομικός μη πολυποειδής ορθοκολικός καρκίνος είναι οι δύο μορφές του κληρονομικού ΚΠΕ [25].

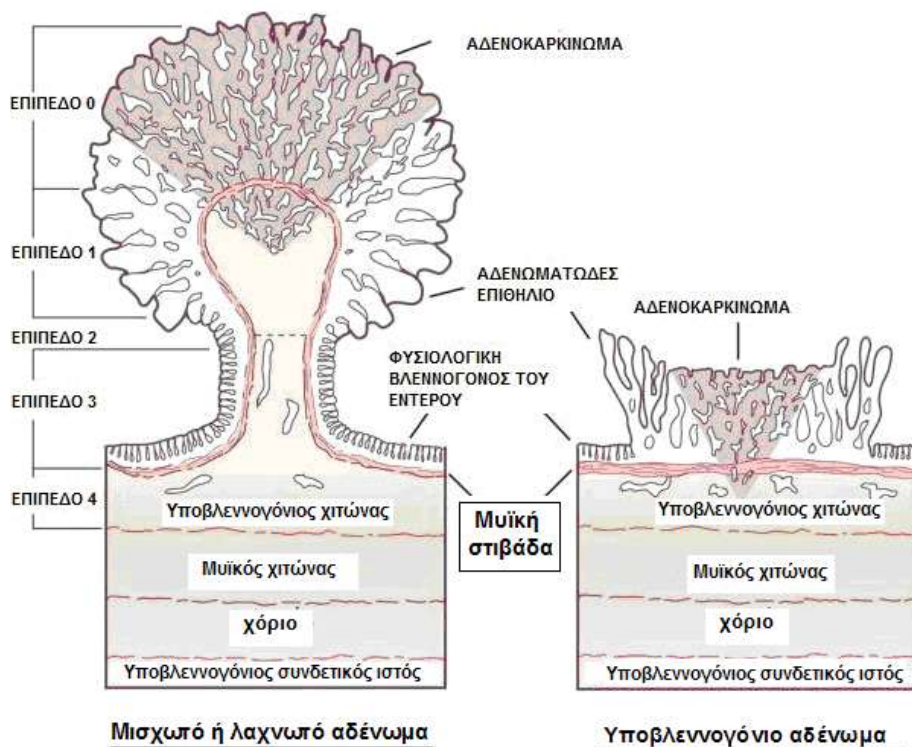


**Σχήμα 2.4** Κατανομή του καρκίνου παχέος εντέρου στον οικογενή και κληρονομούμενο καρκίνο [26]

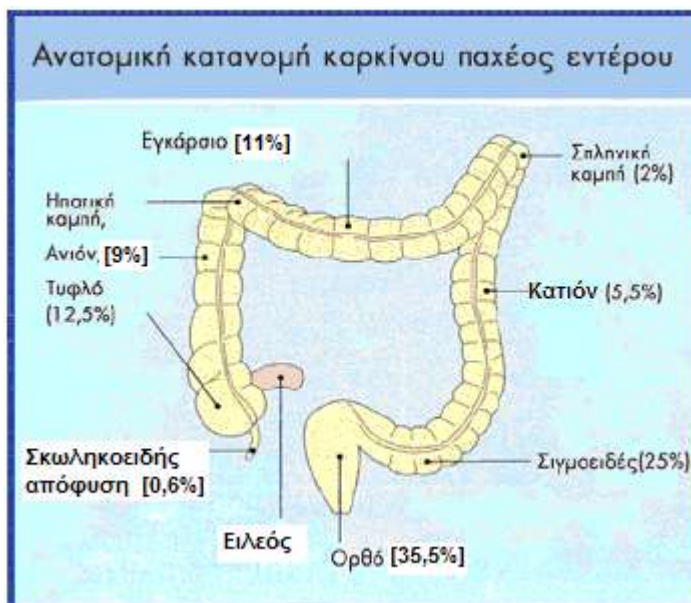
## 2.10 Κατάταξη και Σταδιοποίηση της νόσου

Μετά τη χειρουργική αφαίρεση και την ιστολογική διάγνωση του καρκίνου, γίνεται η σταδιοποίηση της νόσου, ώστε να γνωρίζεται η έκταση της, Εικόνα 2.9 και οι πιθανές επεκτάσεις της εκτός της πρωτοπαθούς εστίας. Το ποσοστό επί τοις % που κατανέμεται ανατομικά ο καρκίνος στο παχύ έντερο, ποικίλει, Εικόνα 2.10.





Εικόνα 2.9. Τα διάφορα στάδια της νόσου [27]



Εικόνα 2.10. Εκατοστιαία κατανομή του ΚΠΕ στα επιμέρους τμήματα του παχέος εντέρου και του ορθού [6].

Η νόσος κατατάσσεται σ' ένα από τα ακόλουθα στάδια:

- **Στάδιο 0:** Ο καρκίνος είναι πρώιμος και εντοπίζεται μόνο στο εσωτερικό του επιθηλίου του εντέρου
- **Στάδιο I:** Ο καρκίνος περιλαμβάνει περισσότερα στρώματα του επιθηλίου του εντέρου
- **Στάδιο II:** Ο καρκίνος έχει επεκταθεί έξω από το τοίχωμα του εντέρου, αλλά δεν έχει προσβάλλει λεμφαδένες
- **Στάδιο III:** Έχουν προσβληθεί λεμφαδένες, αλλά όχι άλλες απομακρυσμένες εστίες
- **Στάδιο IV:** Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Η σταδιοποίηση κατά Dukes, ορίζει ως:

- ✓ Dukes A- Ο όγκος εντοπίζεται μόνο στο εσωτερικό τοίχωμα του παχέος εντέρου
- ✓ Dukes B- Ο Όγκος έχει εισχωρήσει από το εσωτερικό τοίχωμα προς τον μυ χωρίς να προσβάλει τους λεμφαδένες της περιοχής
- ✓ Dukes C- Ο Όγκος έχει επεκταθεί και σε ένα ή περισσότερους λεμφαδένες της περιοχής. Οι λεμφαδένες είναι μέρος του λεμφικού συστήματος και αποτελούν την φυσιολογική άμυνα του οργανισμού εναντίον των μολύνσεων
- ✓ Dukes D- Τα καρκινικά κύτταρα του όγκου έχουν διασκορπιστεί και σε άλλα όργανα του σώματος και έχουν δημιουργήσει δευτεροπαθείς όγκους (μεταστάσεις).

Κατά UICC (International Union for Cancer Control), η κατάταξη TNM (Tumor Lymphnode Metastasis) δίνεται σε σχέση με τα στάδια [28, 29] ως εξής: Εικόνες 2.11α και 2.11β

ΣΤΑΔΙΟ	TNM ΚΑΤΑΤΑΞΗ	Κατά Dukes	Κατά Astler-Coller (1954)
I	T1-2,N0,M0	A	A, B1
IIA	T3,N0,M0	B	B2
IIB	T4,N0,M0	B	B3
IIIA	T1-2,N1,M0	C	C1
IIIB	T3-4,N1,M0	C	C2/C3
IIIC	T(οποιοδήποτε),N2,M0	C	C1/C2/C3
IV	T(οποιοδήποτε),N(οποιοδήποτε),M1	—	D

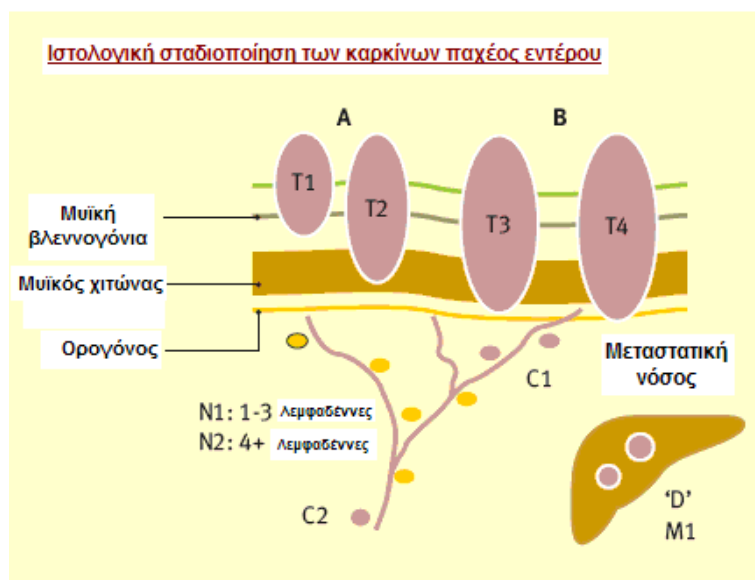
T1: όγκος 2 cm, T2: όγκος ~2 cm -5 cm ,T3:όγκος >5 cm, T4: ο όγκος διηθεί τα παρακείμενα όργανα

N0: όχι μετάσταση σε λεμφαδένες, M0: όχι απομακρυσμένη μετάσταση

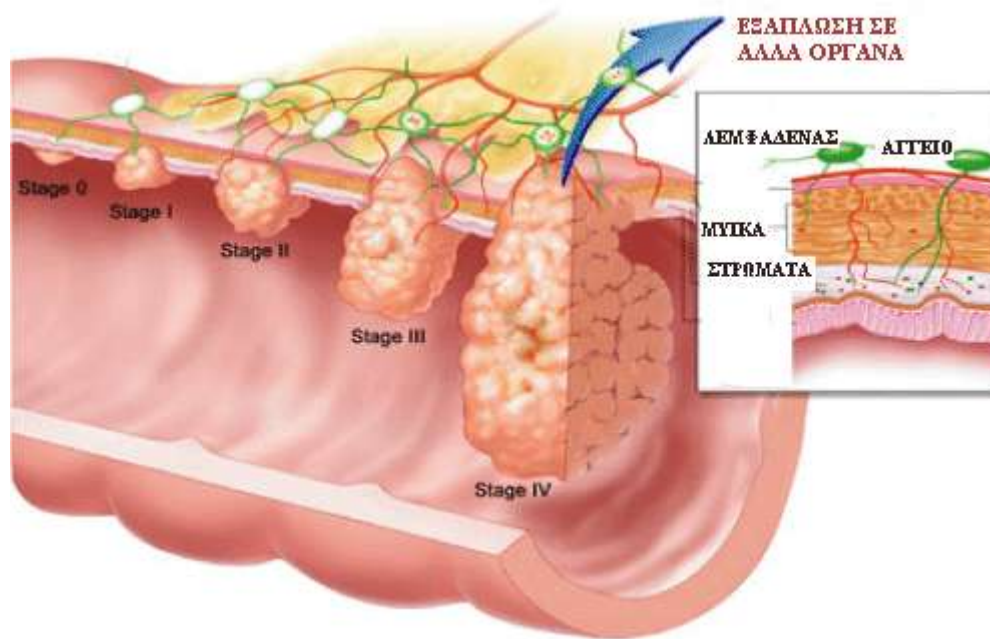
N1: μετάσταση σε 1-3 λεμφαδένες

N2: μετάσταση σε 4 και πλέον λεμφαδένες

M1: απομακρυσμένη μετάσταση



**Εικόνα 2.11α.** Ιστολογική κατάταξη κατά UICC σε σχέση με τα στάδια της νόσου [23].

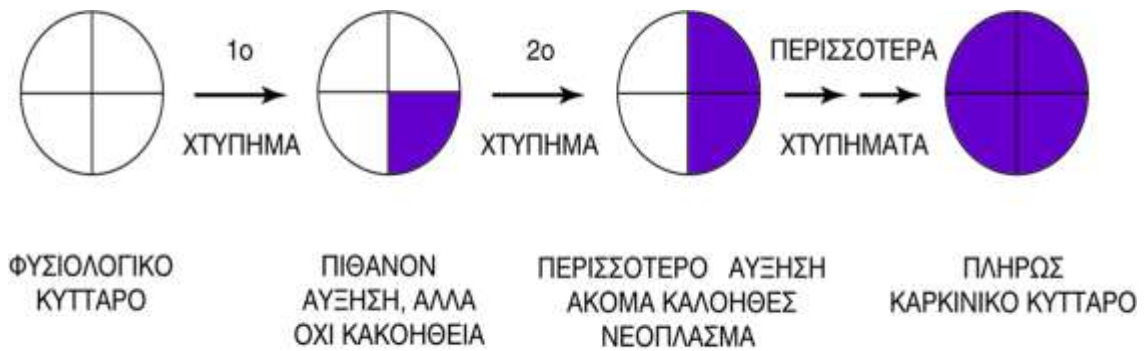


**Εικόνα 2.11β.** Σχηματική απεικόνιση της κατάταξης κατά UICC σε σχέση με τα στάδια της νόσου [30].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

### 3.1 Εισαγωγή

Η καρκινογένεση αποτελεί μακροχρόνια πολυσταδιακή διαδικασία, όπου η άθροιση πολυάριθμων γενετικών μεταβολών οδηγεί στη διαταραχή κυτταρικών λειτουργιών, όπως του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της μεταγωγής σημάτων, με αποτέλεσμα τη γέννηση παθολογικών κυτταρικών κλώνων, οι οποίοι επικρατούν και στη συνέχεια αποκτούν την ικανότητα να διηθούν και να μεθίστανται. Θεωρείται ότι η καρκινογενετική πορεία διαρκεί περί τα είκοσι χρόνια. Αυτό το δεδομένο στηρίζει την άποψη για την ανάγκη συσσώρευσης περίπου επτά γενετικών αλλοιώσεων, «χτυπημάτων», στο γενετικό υλικό των κυττάρων που μετασχηματίζονται σε καρκινικά [31], Σχήμα 3.1. Κατά τη διαδικασία αυτή, παρατηρούνται μορφολογικές μεταβολές στους πάσχοντες ιστούς, που ονομάζονται προκαρκινικές αλλοιώσεις. Η αναγνώριση και η επιτήρηση των προκαρκινικών αλλοιώσεων αποτελεί σημαντικό στάδιο στην πρόληψη του καρκίνου [6, 32].

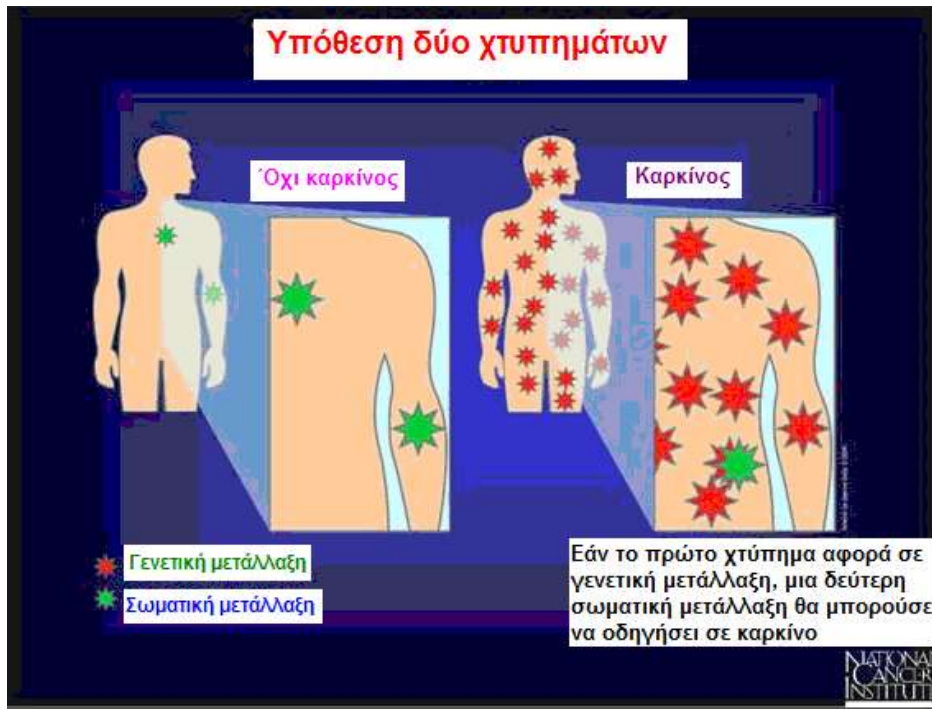


**Σχήμα 3.1** Υπόθεση Knudson<sup>1</sup>, έναρξη της καρκινογένεσης [33]

Τα στάδια που κατά κανόνα ακολουθούνται στην καρκινογένεση [34] είναι:

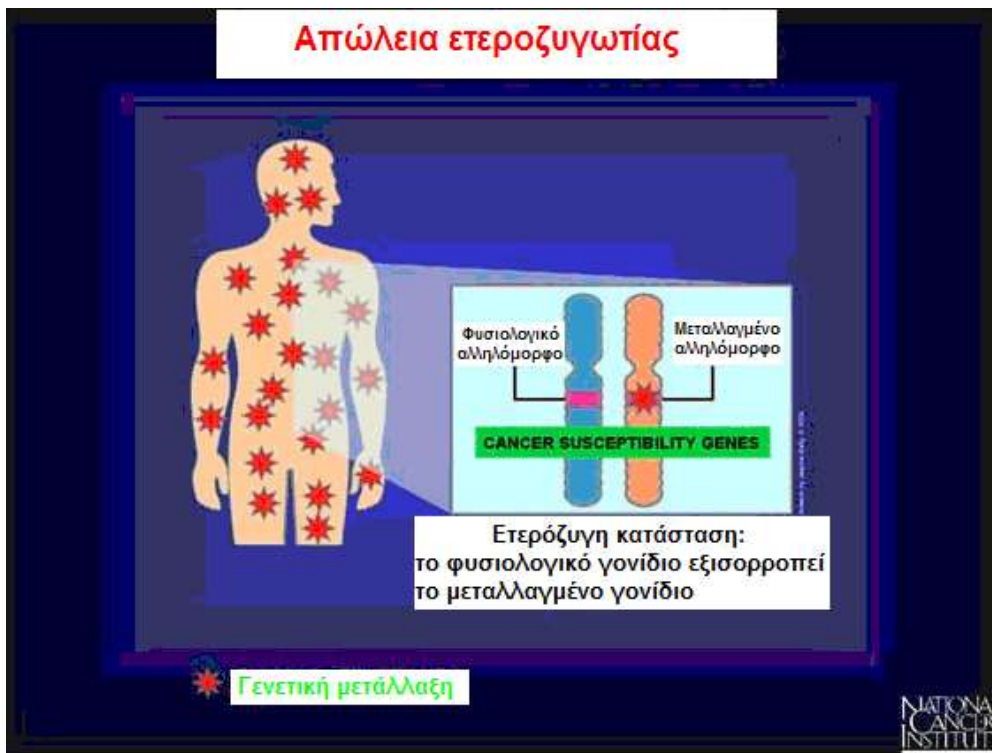
- **1<sup>ο</sup> στάδιο**- ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων
- **2<sup>ο</sup> στάδιο**- αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η οποία απαιτεί δύο χτυπήματα (2<sup>nd</sup> hit), Εικόνα 3.1α και 3.1.β.
- **3<sup>ο</sup> στάδιο**- μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA και «γενικευμένη γενετική αστάθεια». Αδρανοποιητικές μεταλλάξεις στα MMR γονίδια επιταχύνουν τη μετάβαση από τα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης στα όψιμα, καθώς επιτρέπουν τη συσσώρευση μεταλλάξεων και προάγουν τη γονιδιακή αστάθεια [35].

<sup>1</sup> Ο Alfred G. Knudson ανέπτυξε την υπόθεση των «διπλών χτυπημάτων» (2nd hit), φαινόμενο γνωστό ως «απώλεια της ετεροζυγωτίας» (LOH), που αφορούν στην έναρξη της καρκινογένεσης, κατά την οποία είναι απαραίτητο να μεταλλαχθούν ή να απενεργοποιηθούν και τα δυο αλληλόμορφα ογκοκατασταλτικά γονίδια.



A)

B)



**Εικόνα 3.1A και 3.1B** Υπόθεση Knudson[20], [«διπλά χτυπήματα», απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH)].

Κατά την ογκογένεση, υπάρχει διαταραχή της σχέσης απόπτωσης-ανανέωσης-διαφοροποίησης στον πληθυσμό των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου. Όταν το ποσοστό των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται χωρίς να διαφοροποιούνται και να αποπίπτουν αυξάνει, δημιουργείται μία μάζα κυττάρων με μιτωτικό δυναμικό, που συσσωρεύονται στην περιοχή, δημιουργώντας μια **υπερπλασία**. Οι υπερπλασίες αυτές είναι καλοήθειες, ωστόσο τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από διαταραγμένη αύξηση και αλλαγές στο σχήμα και στο μέγεθος τους ή στην συμπύκνωση της χρωματίνης τους. Οι αρχικές αυτές υπερπλασίες των λίγων κυττάρων ονομάζονται «**εστίες εκτροπής**» (aberrant crypt foci) και είναι η πρωϊμότερη ιστολογική βλάβη που μπορεί να εντοπιστεί. Τα κύτταρα στις εστίες εκτροπής είναι δυνατόν, συσσωρεύοντας και μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων, να δημιουργήσουν σταδιακά ένα καλόηθες **αδένωμα**, που εν δυνάμει μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνωμα *in situ* ή σε μεταστατικό **καρκίνωμα**. Η πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής των αδενωμάτων συσχετίζεται με το μέγεθος τους, το βαθμό δυσπλασίας και τον ιστολογικό τύπο. Ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης ΚΠΕ αυξάνει με το βαθμό της επιθηλιακής δυσπλασίας [6, 36].

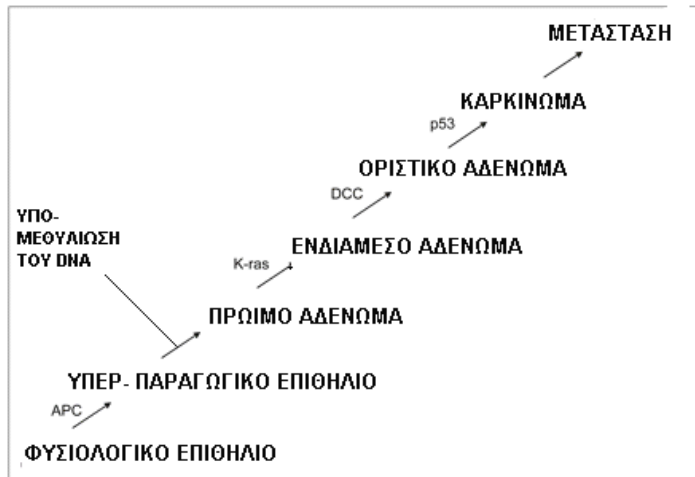
Τα **αδενώματα** είναι ο πιο συχνός τύπος πολυπόδων του παχέος εντέρου, τα οποία είναι καλοήθειες όγκοι, αλλά μπορούν να αποτελέσουν προκαρκινωματώδη κατάσταση. Πολλοί ερευνητές πιστεύουν, ότι όλοι οι καρκίνοι του παχέος εντέρου προέρχονται από πολύ μικρά αδενώματα.

### 3.2 Μοριακή βάση στην καρκινογένεση των αδενοκαρκινωμάτων παχέος εντέρου

Η μετάβαση από το φυσιολογικό επιθήλιο σε αδένωμα και καρκίνωμα είναι αποτέλεσμα συσσωρευμένων μοριακών γεγονότων [37-39].

Το μοντέλο της εξέλιξης του όγκου τεκμαίρεται συγκρίνοντας τις γενετικές μεταβολές που παρουσιάζονται στο φυσιολογικό επιθήλιο, τα αδενώματα με προδευτικά αυξανόμενο μέγεθος, με αυτές των κακοηθειών, Σχήμα 3.2 [40-42].





**Σχήμα 3.2** Σχηματική παράσταση του μοντέλου της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο [15].

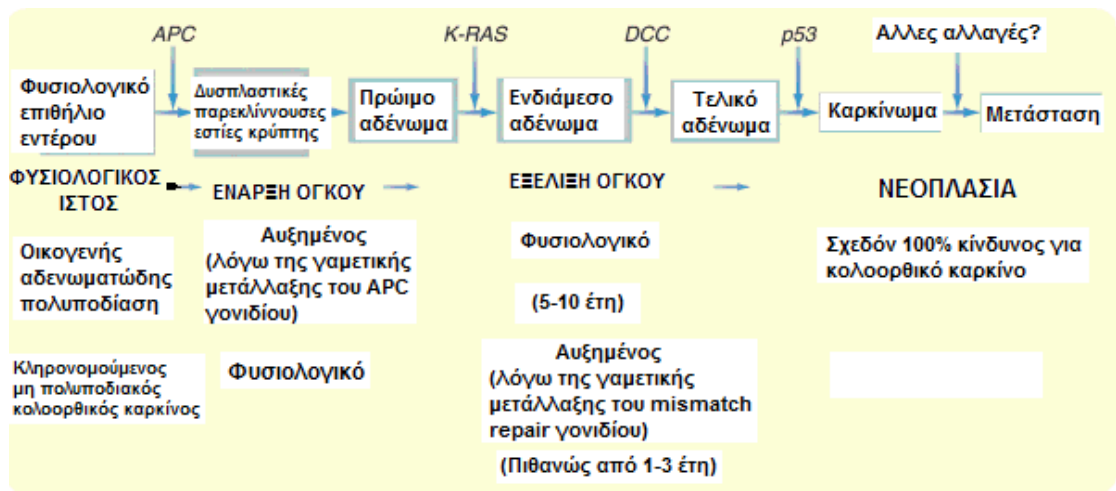
Τουλάχιστον πέντε έως επτά κατά κανόνα συσσωρεύσεις γενετικών αλλοιώσεων απαιτούνται για τη μετατροπή ενός φυσιολογικού επιθηλίου σε κλωνικό κύτταρο που οδηγεί σε καρκίνωμα.

Υπάρχουν δύο μονοπάτια μέσω των οποίων τα ανωτέρω μοριακά συμβάντα μπορούν εξελιχθούν σε ΚΠΕ. Η πλειοψηφία των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου οφείλονται σε χρωμοσωμική αστάθεια [chromosomal instability (CIN)]. Το 20% έως 30% των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου εμφανίζουν υπερμεθυλίωση γονιδίου, φαινοτυπική μεθυλίωση των CpG νησίδων, εκ των οποίων ένα ποσοστό παρουσιάζει μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability) και αποτελεί το 15% των ΚΠΕ [39, 43-48].

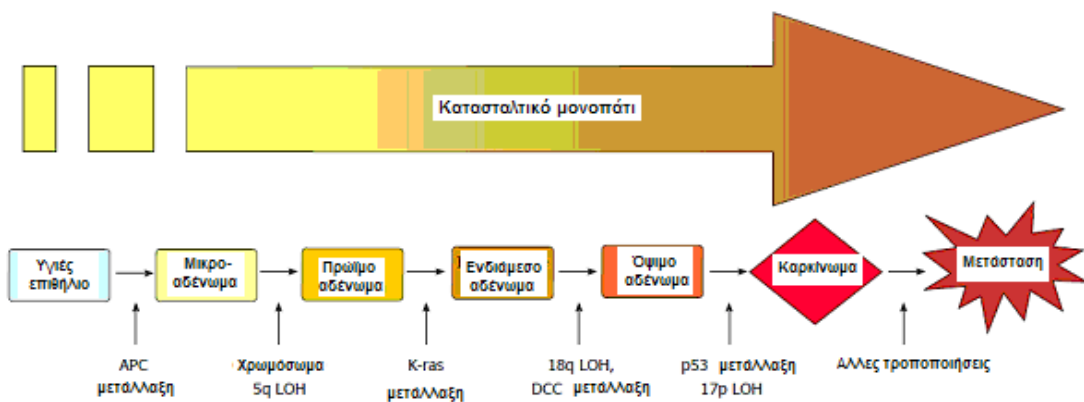
Επιπλέον, στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου που οφείλονται σε χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) παρατηρείται ανευπλοειδία και συχνά ανιχνεύσιμες απώλειες στο μοριακό επίπεδο των τμημάτων των χρωμοσωμάτων 5q, 18q και 17p, αλλά και μετάλλαξη του **KRAS** ογκογονιδίου. Τα γονίδια που βρίσκονται στα αναφερόμενα χρωμοσώματα (5q, 18q και 17p) είναι το **APC** (5q), τα **DCC/MADH2/MADH4** (18q) και το **TP53** (17p) [37-39].

Γενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο **APC**, καθώς επίσης και οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις στα MMR (γονίδια που συμβάλλουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, ονομαζόμενα MMR -mismatch repair- γονίδια) προδιαθέτουν για ΚΠΕ [49]. Τα γονίδια που συνήθως αλλιοώνονται στα κύτταρα του παχέος εντέρου είναι: τα ογκοκατασταλτικά για τις πρωτεΐνες **APC**, **P53**, **SMAD4** (DCC), τα ογκοκατασταλτικά γονίδια του συστήματος MMR (**MLH1, MSH2, MSH3, MSH6**) και

το πρωτο-ογκογονίδιο για την **K-RAS** καθώς και τα **neu, myc, myb** σε μικρότερο ποσοστό, Εικόνα 3.2, Σχήμα 3.3



**Εικόνα 3.2.** Διαδικασία καρκινογένεσης στον ΚΠΕ βάση των εμπλεκόμενων γονιδίων [33]



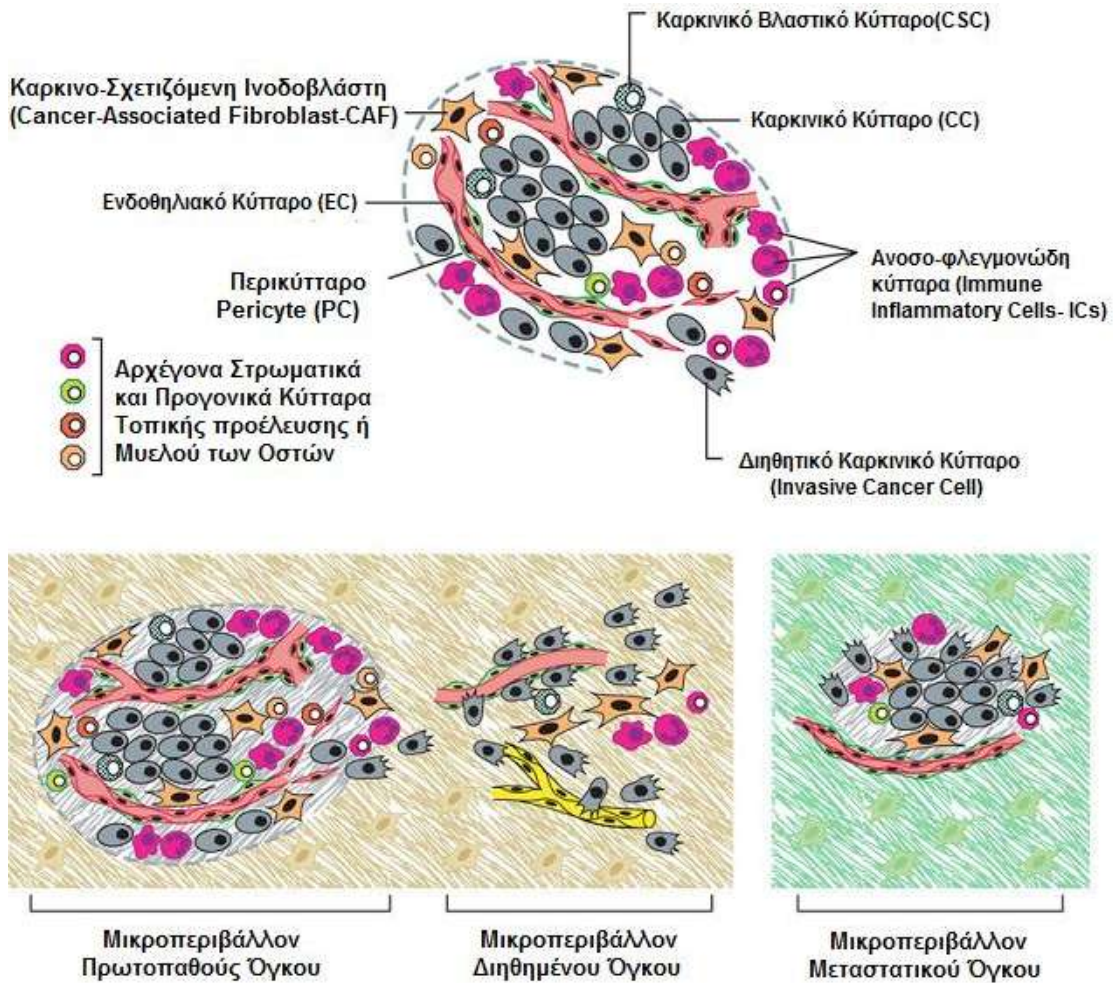
**Σχήμα 3.3** Μοριακές μεταβολές στο μονοπάτι της ογκοκαταστολής που οδηγούν σε καρκίνωμα και προδεντικά σε μετάσταση [42].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

### 4.1 Εισαγωγή

Η κατανόηση της παθογένειας του καρκίνου και της διαδικασίας της μετάστασης έχει απασχολήσει σημαντικά την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία 30 χρόνια και αυτό γιατί οι θάνατοι από καρκίνο οφείλονται κατά 90% στη μετάσταση του πρωτοπαθούς όγκου [50].

Πρώτος ο Paget το 1889 διατύπωσε τη θεωρία «σπόρου-εδάφους» (seed and soil hypothesis) στο πρώτο τεύχος του Lancet, με σκοπό να ερμηνεύσει την όχι τυχαία εμφάνιση της μετάστασης [51]. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, θα πρέπει να υπάρχει ειδική συγγένεια μεταξύ συγκεκριμένων καρκινικών κυττάρων (σπόρος) η οποία σε συνάρτηση με το μικροπεριβάλλον συγκεκριμένων οργάνων (έδαφος) αποτελούν την ικανή και αναγκαία συνθήκη για τη δημιουργία της μετάστασης, Σχήμα 4.1 [52].



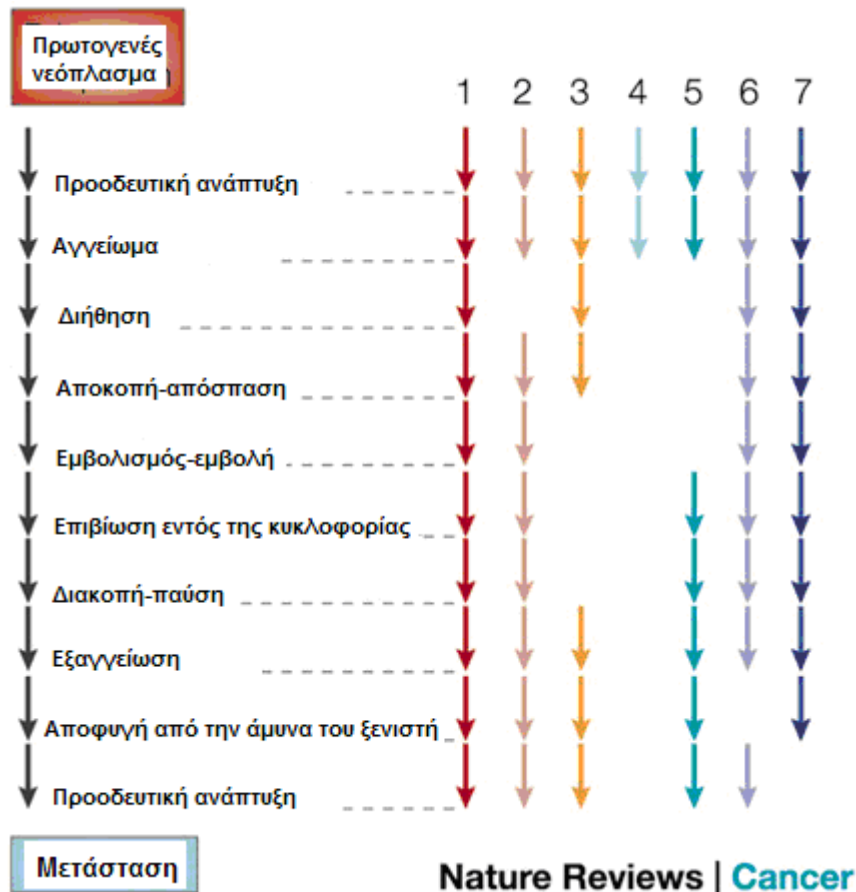
**Σχήμα 4.1** Τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (Επάνω): Οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι αποτελούνται από συνάθροιση διακριτών κυτταρικών τύπων. Το παρέγχυμα και το στρώμα των όγκων περιλαμβάνουν κυτταρικούς τύπους και υποτύπους οι οποίοι επιτρέπουν την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Σημειωτέον, τα φλεγμονώδη κύτταρα που βρίσκονται στους όγκους μπορεί να συμπεριλαμβάνουν είτε υποτύπους που να προάγουν, είτε υποτύπους που να ογκοκαταστέλλουν. **Το μικροπεριβάλλον του όγκου (Κάτω):** Οι πολλαπλοί κυτταρικοί τύποι του στρώματος δημιουργούν διαδοχικά μικροπεριβάλλοντα, τα οποία στη συνέχεια αλλάζουν καθώς ο όγκος διηθεί το φυσιολογικό ιστό και περαιτέρω εγκαθίσταται και αποικίζει απομακρυσμένους ιστούς [52].

Η σύγχρονη προσέγγιση της θεωρίας του Paget αποτελείται από τρεις αρχές:

- 1) Τα πρωτογενή νεοπλάσματα (primary tumors) και οι μεταστάσεις αποτελούνται αφενός από καρκινικά κύτταρα και αφ'ετέρου από κύτταρα ξενιστές. Τα νεοπλάσματα χαρακτηρίζονται από βιολογική ετερογένεια

και περιλαμβάνουν γονοτυπικά και φαινοτυπικά διάφορους υποπληθυσμούς καρκινικών κυττάρων, καθένας εκ των οποίων μπορεί να ολοκληρώσει μόνο κάποια στάδια της μεταστατικής διαδικασίας [53].

- 2) Η μεταστατική διαδικασία (metastatic cascade), είναι μια επιλεκτική διαδικασία για τα κύτταρα εκείνα που είναι ικανά να διηθήσουν, να κάνουν εμβολή, να επιβιώσουν στην κυκλοφορία, να σταματήσουν σε ένα απομακρυσμένο αγγείο, να εξαγγειωθούν μέσα σε αυτό και τελικά να πολλαπλασιαστούν μέσα στο παρέγχυμα κάποιου οργάνου. Η παρατήρηση ότι σχεδόν όλοι οι καρκίνοι είναι **μονοκλωνικής** προέλευσης ισχυροποιείται από το γεγονός αυτό [54].
- 3) Η μετάσταση μπορεί να αναπτυχθεί μόνο σε συγκεκριμένα όργανα και εξαρτάται από τις πολλαπλές αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των μεταστατικών κυττάρων και των διαφόρων ομοιοστατικών μηχανισμών οι οποίοι διευκολύνουν τόσο την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, όσο και την επιβίωση τους, αλλά επίσης προάγουν την νεοαγγειογένεση, τη διήθηση και τελικά τη μετάσταση, Σχήμα 4.2 [55]. Στις περιπτώσεις εκείνες κατά τις οποίες τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται σε ένα μη ευνοϊκό περιβάλλον, μεταπίπτουν σε λανθάνουσα κατάσταση (dormancy). Μετά από άγνωστο χρονικό διάστημα τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν των μη ευνοϊκών επιδράσεων του μικροπεριβάλλοντος και δημιουργούν υποτροπές ή μεταστάσεις [56].



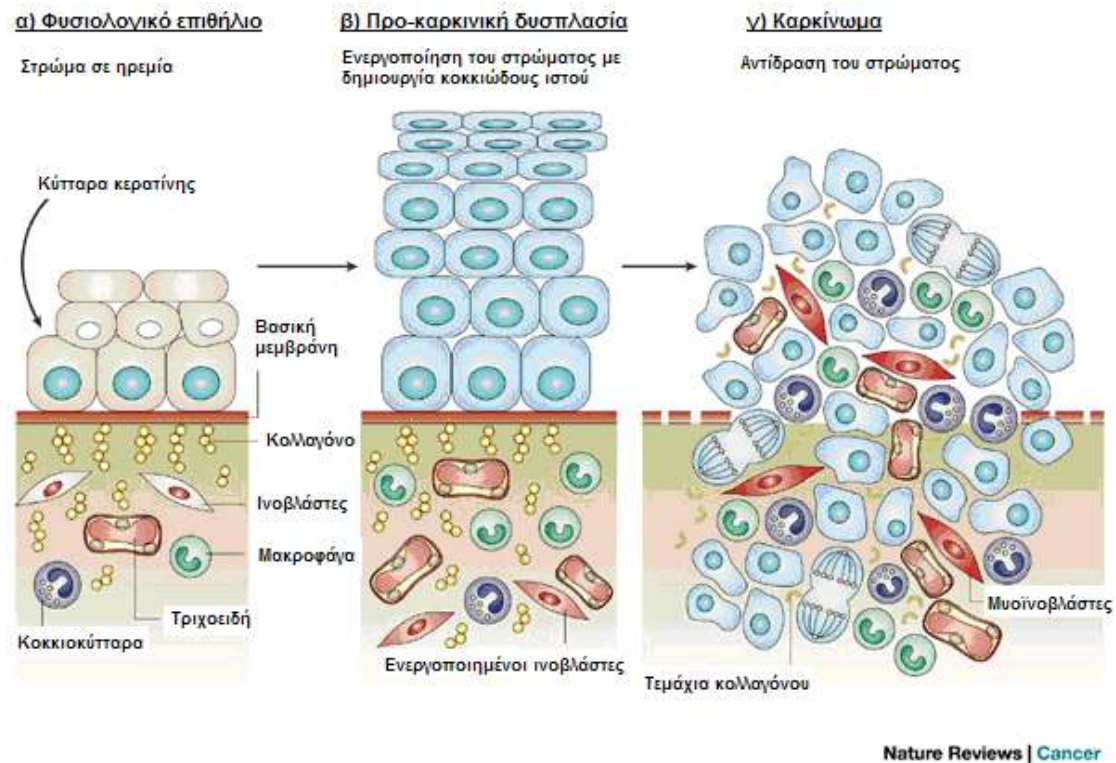
**Σχήμα 4.2** Τα διαδοχικά βήματα στην παθογένεση της καρκινικής μετάστασης [55].

## 4.2 Οι σχέσεις καρκινικού όγκου και στρώματος στον πρωτογενή όγκο

Ο καρκίνος έχει γίνει αποδεκτό ότι είναι αποτέλεσμα αλληλοεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου με το στρώμα ή και τον περιβάλλοντα ιστό [57].

Ως **στρώμα** ορίζεται το μικροπεριβάλλον ενός κακοήθους νεοπλασματος, ενώ το στάδιο του όγκου εξαρτάται από την ενεργοποίηση του. Το στρώμα αποτελείται από ενεργοποιημένους ινοβλάστες (μυοϊνοβλάστες), αγγεία, φλεγμονώδη κύτταρα, κύτταρα του συστήματος ανοσίας, λιποκύτταρα και από τη μη διαλυτή εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (EMC) [58, 59].

Τα δυσπλαστικά κύτταρα ενεργοποιούν το υποκείμενο στρώμα με ενεργοποίηση των ινοβλαστών, συστράτευση φλεγμονωδών κυττάρων και αύξηση των αγγείων, δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη διήθησης, Σχήμα 4.3 [60].

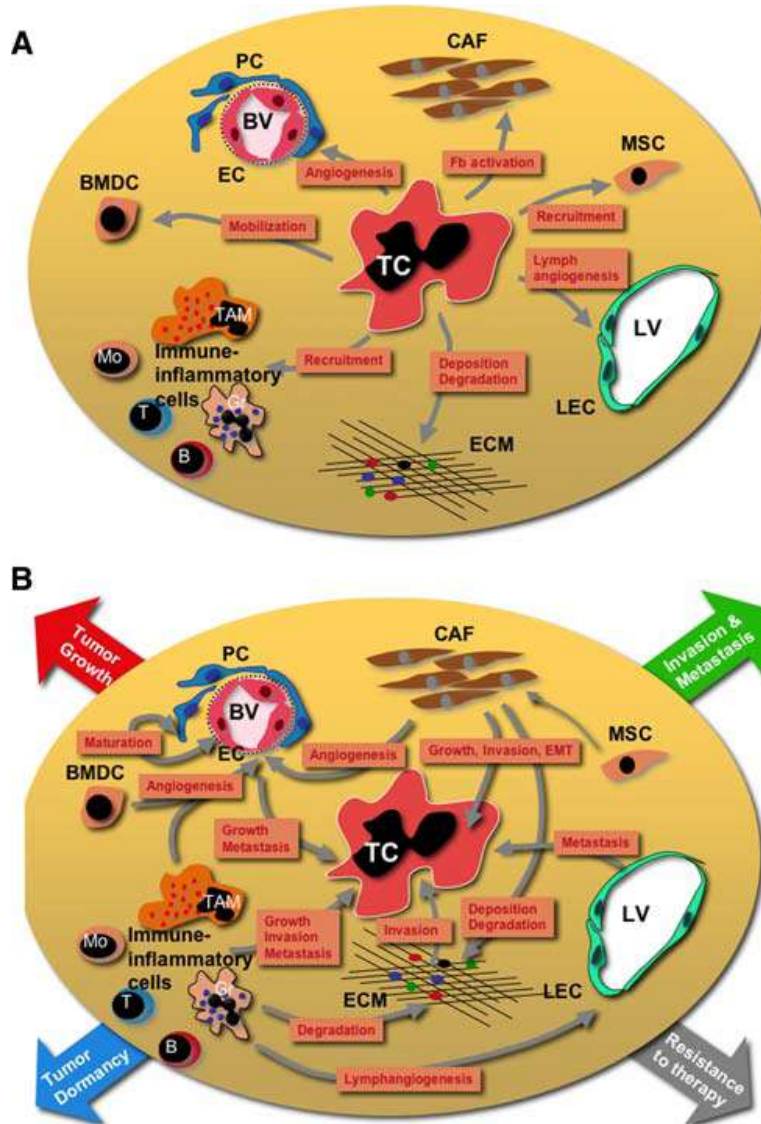


**Σχήμα 4.3** Το στάδιο του όγκου εξαρτάται από την ενεργοποίηση του στρώματος. Η φυσιολογική λειτουργία των οργάνων και η ανάπτυξη διηθητικών καρκινωμάτων χαρακτηρίζεται από αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιθηλιακών και στρωματικών κυττάρων [40].

#### 4.2.1 Μικροπεριβάλλον και Καρκινικά κύτταρα

Το μικροπεριβάλλον της πρωτοπαθούς εστίας παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των μεταστάσεων, ενώ στη συνέχεια το μικροπεριβάλλον των μεταστατικών εστιών παίζει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο των μικρομεταστάσεων και στην εξέλιξη αυτών [61]. Πολλαπλά σήματα που προέρχονται από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος επηρεάζουν το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, Σχήμα 4.4. Τα μακροφάγα και οι μυοϊνοβλάστες του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος υποβοηθούν ποικιλοτρόπως τη μεταστατική διεργασία αναδιαμορφώνοντας την εξωκυττάρια

θεμέλια ουσία, προάγοντας την αγγειογένεση, ενισχύοντας την ικανότητα μετακίνησης των καρκινικών κυττάρων και καταστέλλοντας την ανοσολογική απόκριση και την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, Σχήμα 4.5 [62].

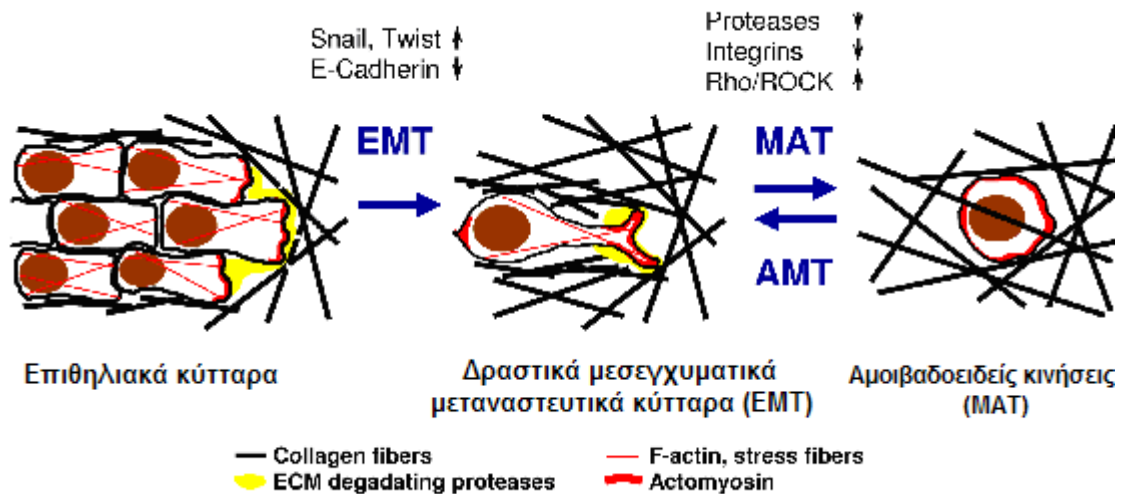


Σχήμα 4.4 Το μικροπεριβάλλον του όγκου και η σχέση του κατά την εξέλιξη της νόσου και στη μετάσταση. Οι πολλαπλές κυτταρικές αλληλεπιδράσεις στο καρκινικό μικροπεριβάλλον:

A Τα κύτταρα του όγκου οργανώνονται είτε άμεσα (π.χ με την έκκριση λυτικών παραγόντων), είτε έμμεσα (π.χ με επαγωγή της κυτταρικής υποξίας ή νέκρωσης) B Στη συνέχεια, γεγονότα στο μικροπεριβάλλον του όγκου προωθούν την εξέλιξή του ενεργοποιώντας την ανάπτυξη και επιβίωσή του, διευκολύνοντας έτσι τη διαδικασία της διήθησης και τη μετάσταση. Συντμήσεις: B Β-λεμφοκύτταρο, BMDC Κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών, BV Αιμοφόρο αγγείο, CAF Καρκινώματα σχετιζόμενα με ινοβλάστες, EC Ενδοθηλιακό κύτταρο, ECM



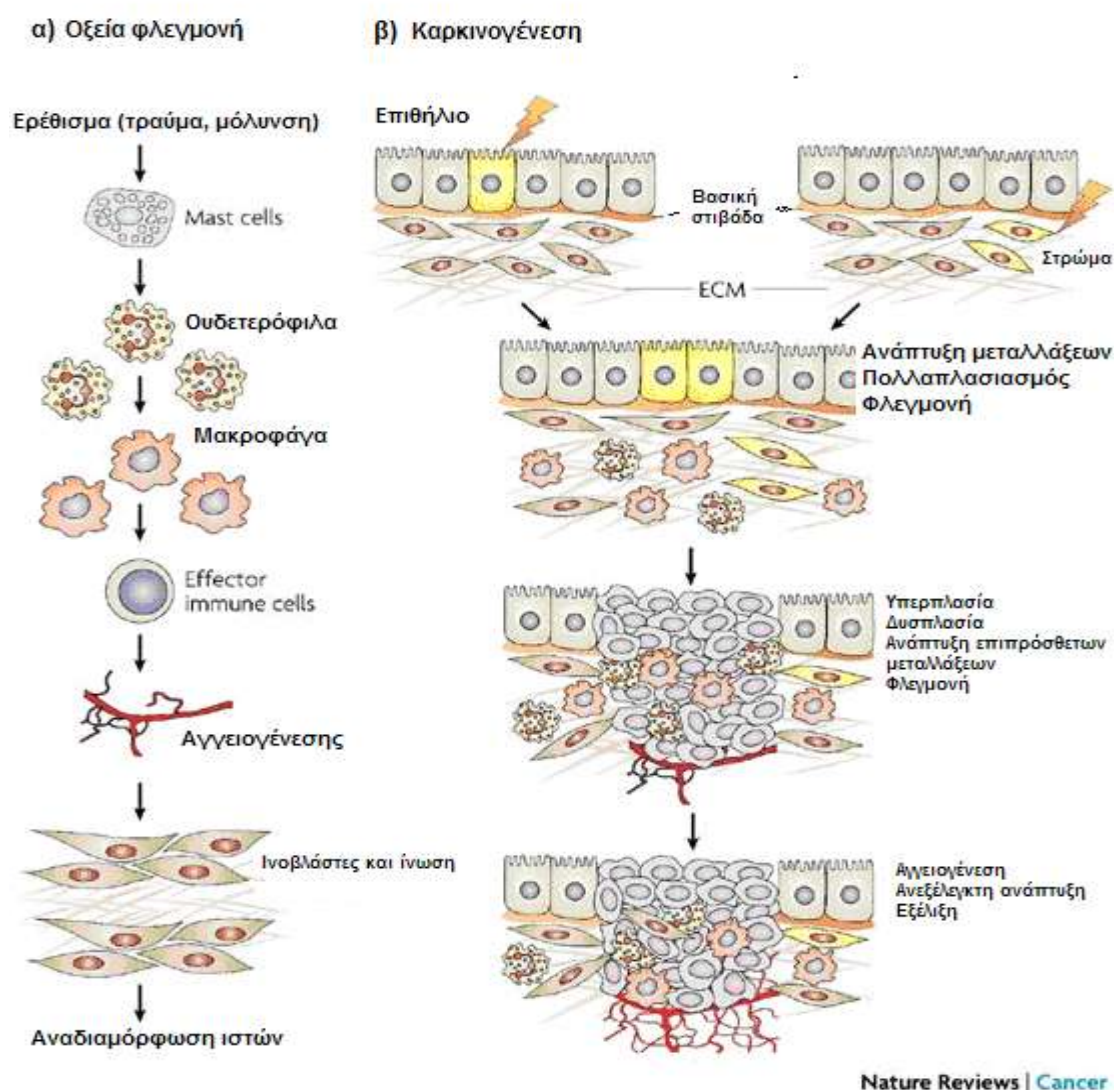
Εξωκυττάριο υπόστρωμα, EMT Επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση, Gr Κοκκιωκύτταρα, LEC Λεμφικό ενδοθηλιακό κύτταρο, LV Λεμφαγγείο, Mo Μονοκύτταρο, MSC Μεσεγχυματικό βλαστικό κύτταρο, PC Περικύτταρο, T T-λεμφοκύτταρο, TAM Κύτταρο σχετιζόμενο με τον όγκο-μακροφάγο, TC Καρκινικά κύτταρα [41].



**Σχήμα 4.5 Μετακίνηση καρκινικών κυττάρων:** Η μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων σε δραστικά μεσεγχυματικά μεταναστευτικά κύτταρα (EMT) επάγεται από την αναστολή των μεταγραφικών ρυθμιστών όπως Snail ή Twist, η οποία οδηγεί σε καταστολή της E-καντερίνης και συνεπώς στην απώλεια ενδοκυτταρικών συνδέσμων. Η εισβολή μεμονωμένων μεσεγχυματικών κυττάρων εξαρτάται από την πρωτεολυτική αποδόμηση της περιβάλλουσας εξωκυττάριας ουσίας (ECM). Οι διαδικασίες αποδόμησης εντοπίζονται στην πρόσθια πλευρά του κυττάρου και τελικά δημιουργούν ένα μονοπάτι –δίοδο για την εισβολή. Όταν η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης ή η δραστικότητα της εξωκυτταρικής πρωτεάσης μειωθεί στα μεσεγχυματικά κύτταρα, ή όταν η σηματοδότηση του Rho/ROCK υπερεκφραστεί, τότε λαμβάνει χώρα η μετάβαση προς τις αμοιβαδοειδείς κινήσεις (MAT). Αντιστρόφως, η αναστολή της σηματοδότησης Rho/ROCK μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αμοιβαδοειδή μεσεγχυματική μετάβαση (AMT). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εμφανίζουν επιμηκυμένη μορφολογία σε τρισδιάστατο περιβάλλον, με τις μονάδες συστολής της ακτομυοσίνης να είναι τοποθετημένες στο πρόσθιο και οπίσθιο μέρος του κυττάρου, ενώ τα αμοιβαδοειδή κύτταρα τυπικά εμφανίζουν κυκλικό σχήμα σε τρισδιάστατο περιβάλλον, με μια πιο φλοιώδη κατανομή των ινιδίων ακτομυοσίνης [62].

## 4.2.2 Ενεργοποίηση ινοβλαστών και αγγειογένεση

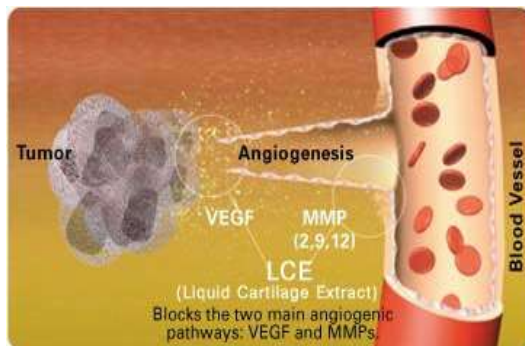
Το μικροπεριβάλλον των καρκινωμάτων εμφανίζει πολλές ομοιότητες με τον κοκκιώδη ιστό που αναπτύσσεται σε τραύματα. Κυρίαρχο κύτταρο και στις δύο περιπτώσεις είναι οι τροποποιημένοι ινοβλάστες (μυοϊνοβλάστες), ενώ τόσο τα καρκινώματα όσο και οι περιοχές επούλωσης τραυμάτων χαρακτηρίζονται από υπερπλασία των αγγείων, αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας και συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων, Σχήμα 4.6 [58, 60, 63].



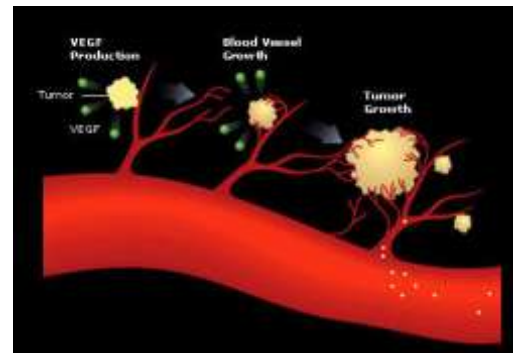
**Σχήμα 4.6** Ομοιότητες μεταξύ οξείας φλεγμονής/αποκατάστασης και καρκινογένεσης [40].

Η νεοαγγειογένεση παρέχει στον όγκο, με τον σχηματισμό νέων αγγείων αίματος, θρεπτικές ουσίες που τον συντηρούν ζωντανό. Οι έρευνες έχουν αποδώσει μια νέα κατανόηση του τρόπου με τον οποίο αναπτύσσονται και εξελίσσονται οι όγκοι και πως αυτή η ανάπτυξη μπορεί να επιβραδυνθεί με αναστολείς της αγγειογένεσης που εξαλείφουν την παροχή αίματος στους όγκους. Στους αναστολείς αγγειογένεσης συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων οι: αγγειοτενσίνη, ενδοστατίνη, κανστατίνη, κομβρεταστατίνη, θρομβοσπονδίνη, ιντερφερόνη α, το bevacizumab που είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), οι TKIs (Tyrosine Kinase Inhibitors) που αναστέλλουν τη λειτουργία του VEGF-R δηλαδή την κινάση τυροσίνης, καθώς και άλλων υποδοχέων όπως του υποδοχέα του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα PDGF-R, η θαλιδομίδη, οι αναστολείς ιστικών μεταλλοπρωτεϊνών και οι αναστολείς ιντεγκρινών, Σχήμα 4.6α.

Ενεργοποιητές της αγγειογένεσης μπορεί να είναι είτε πρωτεΐνες, όπως: AFGF, bFGF, PGF, VEGF, TNFα, GCSF, IL-8, Scatter factor, Angiogenin, είτε μικρά μόρια όπως: Adenosine, 1-Butyryl glycerol, Nicotinamide, Prostaglandins E1,E2 κλπ. Σχήμα 4.6β.



**Σχήμα 4.6α** Αναστολείς αγγειογένεσης



**Σχήμα 4.6β** Ενεργοποιητές της αγγειογένεσης

(Πηγή: American Journal of Pathology)

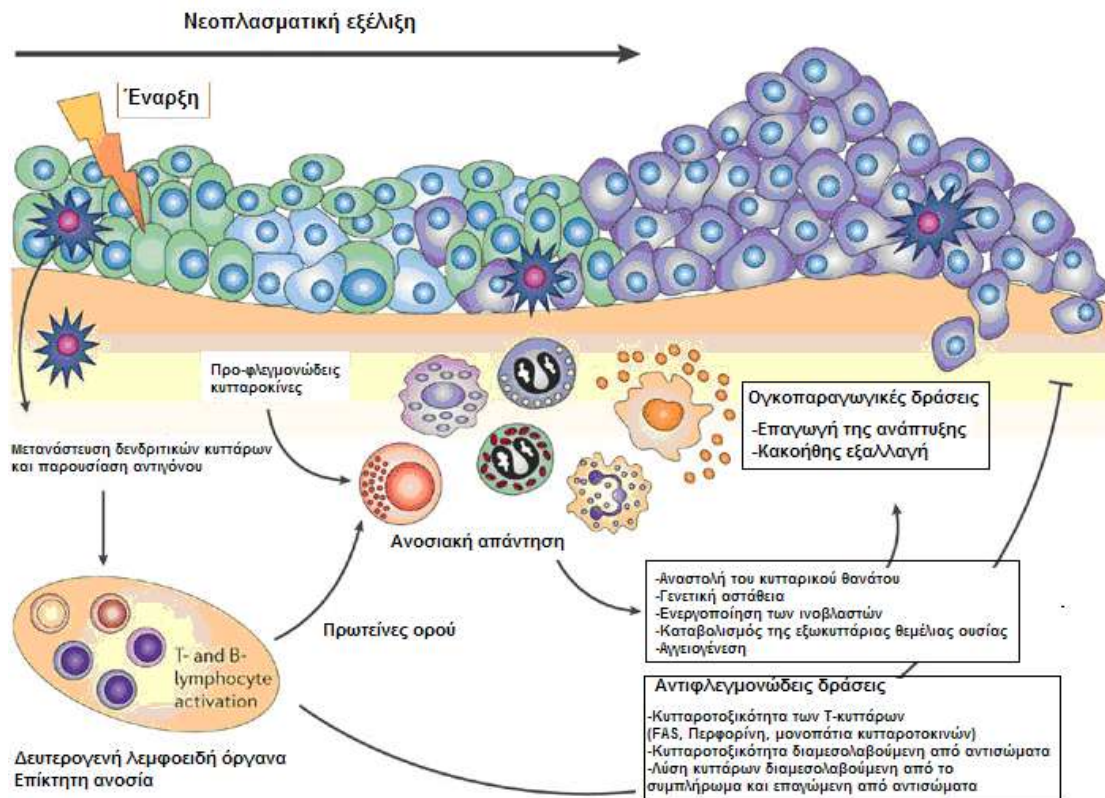
### 4.2.3 Χρόνια φλεγμονή και η συμμετοχή της στην προώθηση του καρκίνου

Η αρχική άποψη κατά την οποία ο ρόλος των λευκοκυττάρων στους όγκους εθεωρείτο ότι ήταν συνέπεια αποτυχημένης προσπάθειας καταστροφής των καρκινικών κυττάρων έχει εν μέρει αποδυναμωθεί, δεδομένου ότι οι όγκοι δεν είναι

μόνο αποτελεσματικοί στο να μπορούν να ξεφεύγουν από την ανοσοαπόρριψη, αλλά πολύ σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι μπορούν να τροποποιούν κάποιους φλεγμονώδεις κυτταρικούς τύπους και να τους καθιστούν ικανούς να προωθούν τον καρκίνο και όχι να τον καταστέλλουν.

Στις χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις έχει καταδειχτεί ότι όχι μόνο η αρχική φλεγμονώδης ανταπόκριση δεν επιλύεται, αλλά αντιθέτως δημιουργούνται συστηματικές συνθήκες που προωθούν συνεχόμενη στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων [64]. Με βάση αυτή την τεκμηρίωση, καταδεικνύεται το γεγονός ότι πολλά από τα διεισδυτικά ανοσο-κύτταρα μπορεί να σχετίζονται με τη διάρρηξη του ιστού, η οποία προκαλείται από φλεγμονώδεις παράγοντες ή την ανταπόκριση στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Τα κύτταρα του στρώματος εμφανίζουν συχνά ογκοκατασταλτικές δράσεις. Οι κύριοι μεσολαβητές της ογκοκατασταλτικής δράσης στο μικροπεριβάλλον είναι τα T-λεμφοκύτταρα, Σχήμα 4.7 [65]. Στα καρκινώματα του παχέος εντέρου έχει βρεθεί ότι η αυξημένη *in situ* διήθηση από T-λεμφοκύτταρα σχετίζεται με καταστολή της διήθησης και ανάπτυξης μεταστάσεων των νεοπλασμάτων, αλλά και με καλύτερη πρόγνωση των ασθενών [66-69].



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Cancer

**Σχήμα 4.7** Φλεγμονώδης αντίδραση στο μικροπεριβάλλον κατά την εξέλιξη των καρκινωμάτων [65].

#### 4.2.4 Μεταναστευτικά καρκινικά βλαστικά κύτταρα (MCS-Migratory Cancer Stem cell)

Σύμπλοκα μορίων και μονοπάτια έχουν αναγνωρισθεί προσφάτως ότι ρυθμίζουν τόσο την κυτταρική μετανάστευση βλαστικών καρκινικών κυττάρων, όσο και ότι προάγουν τη μεταστατική διαδικασία.

Η μοντέρνα και πρόσφατα προταθείσα υπόθεση του μεταναστευτικού μοντέλου βάσει των MCS, έρχεται να δώσει εξηγήσεις τόσο στην άποψη για το πώς οι μεταστάσεις επανακτούν την ετερογένεια τους στη διαφοροποίηση και τη μορφολογία του

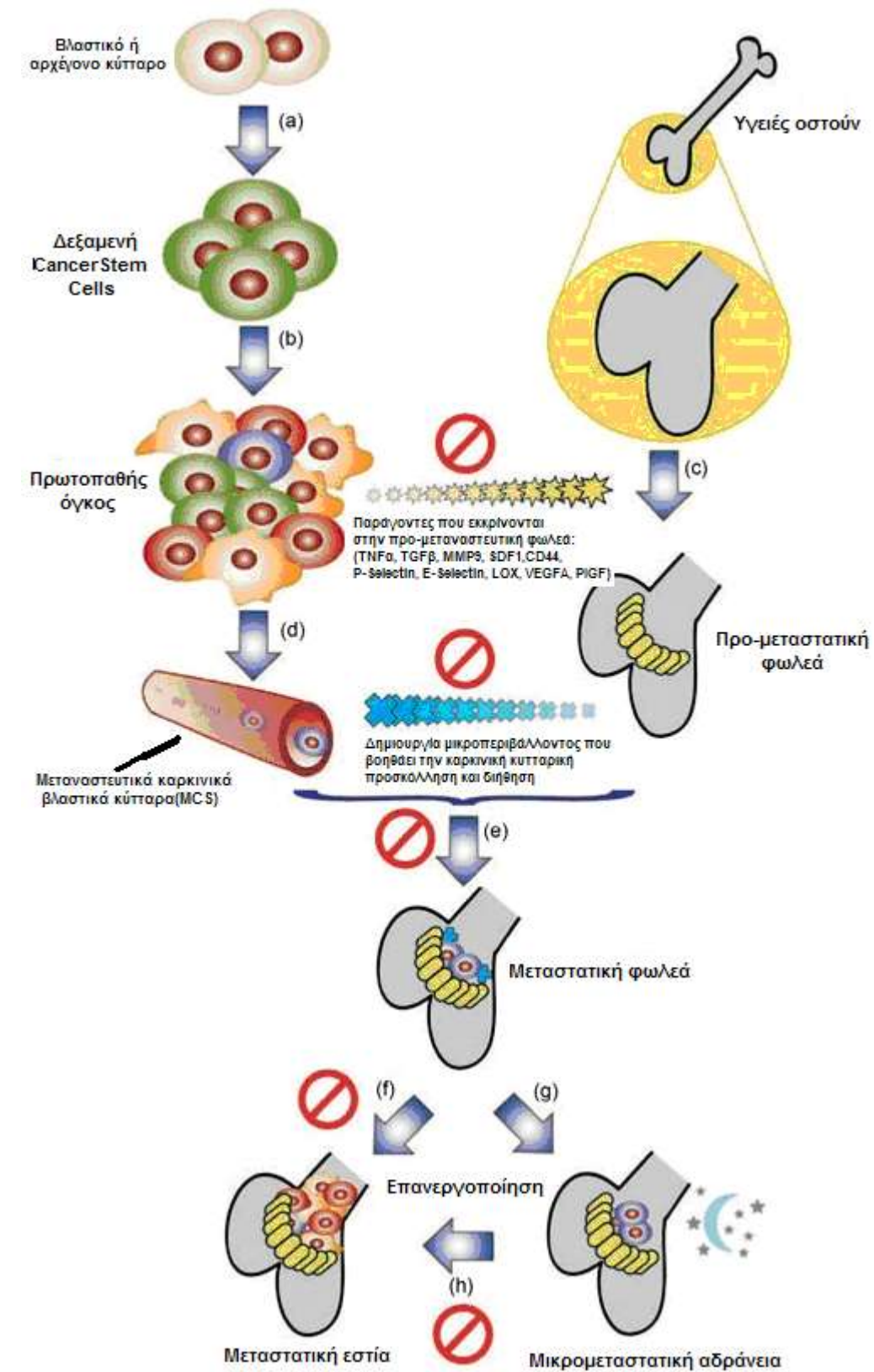
πρωτοπαθούς όγκου, όσο και για την λανθάνουσα κατάσταση των καρκινικών κυττάρων (cell dormancy), Σχήμα 4.8 [70].

Η περίπτωση της μεταναστευτικής ετερογένειας δικαιολογείται από το γεγονός ότι μεγάλα τμήματα της πρωτογενούς καρκινικής μάζας και της μετάστασης προέρχονται από την ίδια δεξαμενή των MCS, οπότε η κύρια διαφορά μεταξύ πρωτογενούς όγκου και της μετάστασης θα είναι η απόσταση και ο τρόπος της μετανάστευσης. Δηλαδή, μικρές αποστάσεις ωθούν στην ανάπτυξη πρωτοπαθούς όγκου, ενώ μακρινές αποστάσεις οδηγούν στη μετάσταση.

Η λανθάνουσα κατάσταση των καρκινικών κυττάρων (cell dormancy) εξηγείται από το γεγονός της απουσίας περιβαλλοντικών σημάτων, η ύπαρξη των οποίων σηματοδοτεί τη διαφοροποίηση των διασκορπισμένων MCS ή επί παρουσίας σημάτων προκαλείται αναστολή του καρκινικού κύκλου [71].

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχουν χαρακτηριστεί πιθανά MCS τα οποία είναι κύτταρα που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα πυρηνικής β-κατενίνης.

Η καλύτερη κατανόηση των MCS ως θεμελιώδους συνιστώσας στον καταρράκτη της μετάστασης, θα οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές στρατηγικές κατά του μεταστατικού καρκίνου.

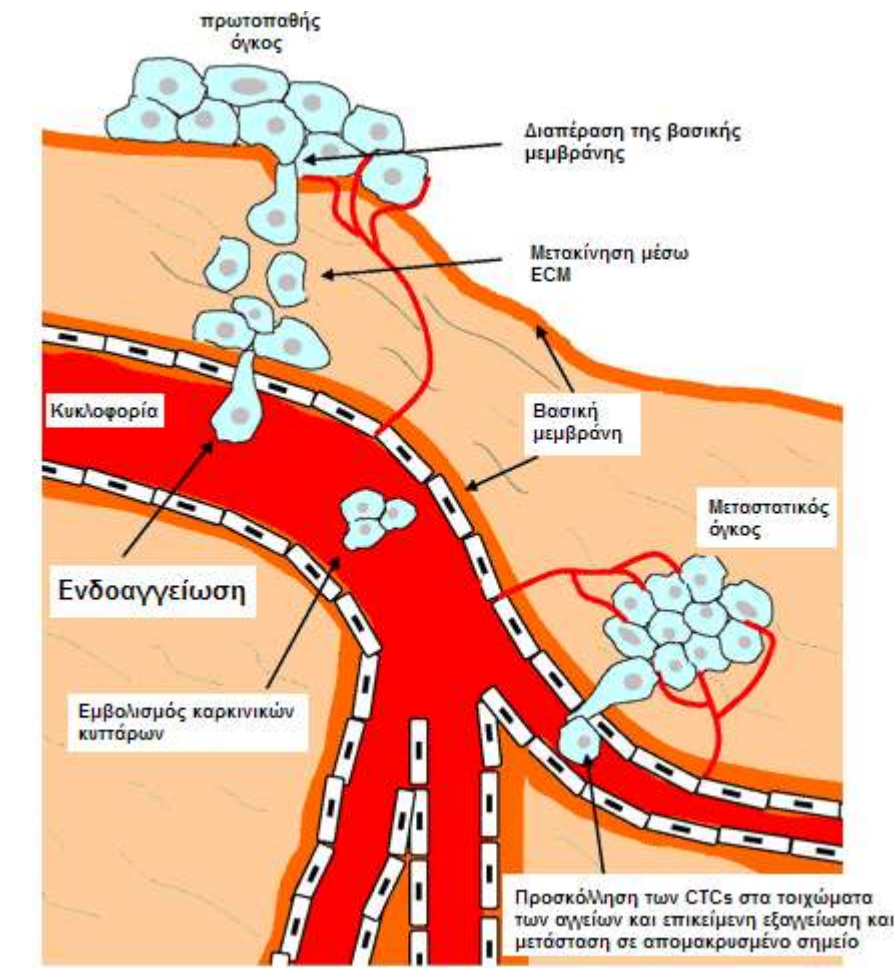


**Σχήμα 4.8** Η υπόθεση του μεταναστευτικού καρκινικού βλαστικού κυττάρου (MCS) [70].

### 4.3 Ενδοαγγείωση (intravasation)

Με την ενδοαγγείωση επιτυγχάνεται η μεταφορά των καρκινικών κυττάρων στη γενική κυκλοφορία είτε μέσω των αιμοφόρων αγγείων, είτε μέσω των λεμφαγγείων, προκειμένου στη συνέχεια να εξαπλωθούν σε απομακρυσμένους ιστούς και να δημιουργήσουν μεταστάσεις, Σχήμα 4.9 [72, 73].

Από τα χιλιάδες καρκινικά κύτταρα που θα μπουν στην κυκλοφορία ένα ποσοστό της τάξεως του 0,01% θα επιβιώσει και θα παράξει μεταστάσεις, πολλές φορές χρησιμοποιώντας τα αιμοπετάλια ως προστατευτικό προπέτασμα, σε αντίθεση με τον οργανισμό ο οποίος διαθέτοντας τα NK κύτταρα δημιουργεί ένα ιδιαίτερα εχθρικό περιβάλλον για τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα.

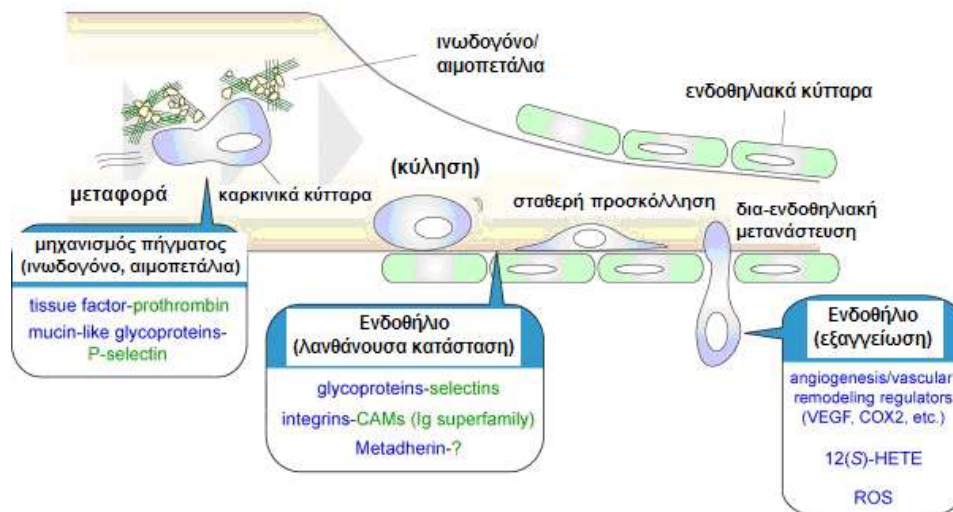


**Σχήμα 4.9** Ενδοαγγείωση: Σχηματικό διάγραμμα των ακολουθούμενων βημάτων στη μεταστατική πορεία [74].



#### 4.4 Εξαγγείωση (extravasation)

Η μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων από τα αιμοφόρα αγγεία στα οποία έχουν ήδη εγκατασταθεί και η μετεγκατάστασή τους στους παρακείμενους ιστούς πραγματοποιείται με την εξαγγείωση. Κατά τη διαδικασία αυτή συμβαίνουν πολύπλοκες αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των τοιχωμάτων των αγγείων, εντός των οποίων βρίσκονται, Σχήμα 4.10. Η εξαγγείωση λαμβάνει χώρα μερικές ώρες μετά την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στα τοιχώματα των αγγείων. Εκεί, λόγω των υφιστάμενων συνθηκών, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) με επιρρέπεια στο stress συνάφειας, αποκόπτονται και δεν οδηγούν σε μετάσταση [75].



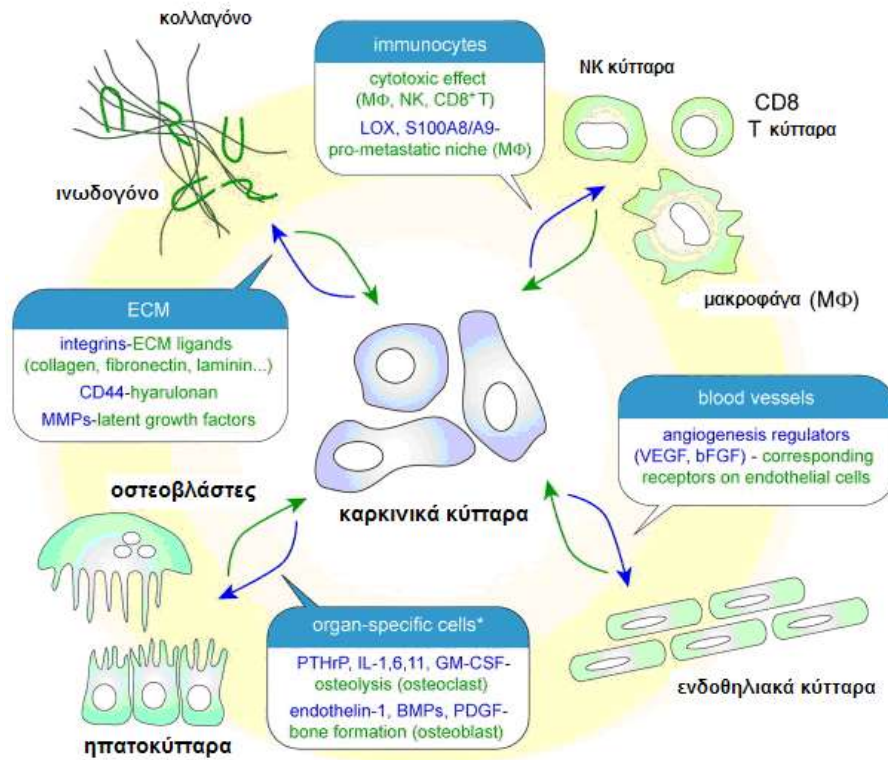
**Σχήμα 4.10** Διαδικασία της εξαγγείωσης [55].

#### 4.5 Αποικισμός των μεταστατικών κυττάρων (colonization)

Αποικισμός ονομάζεται η φάση εκείνη κατά την οποία τα μεταναστευτικά καρκινικά κύτταρα αφού εγκατασταθούν στο παρέγχυμα του προσβληθέντος από αυτά ιστού ξεκινούν να διαμορφώνουν την καρκινική μάζα.

Το περιβάλλον του ιστού δεν παρέχει στα καρκινικά κύτταρα τους αναγκαίους για την επιβίωση και εξέλιξή τους αυξητικούς παράγοντες, με συνέπεια πολλά από αυτά

είτε να πεθάνουν αμέσως, είτε να επιβιώσουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα υπό τη μορφή μονήρων κυττάρων ή μικρών συμπλεγμάτων κυττάρων, οπότε και τα ονομάζουμε μικρομεταστάσεις, Σχήμα 4.11 [76].



**Σχήμα 4.11** Αποικισμός των μεταστατικών κυττάρων [76].

## 4.6 Βλαστικά κύτταρα και μικρομεταστατικό περιβάλλον

Οι βασικές ιδιότητες των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων είναι η αυτοανανέωση και η διαφοροποίηση. Τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν κύτταρα παρόμοια με τον εαυτό τους, αλλά και να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Βλαστικά κύτταρα υπάρχουν σε όλους τους ιστούς. Αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων του κάθε οργάνου και συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης. Οι πολύπλοκοι ενδοκυτταριό μηχανισμοί και οι αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον στρώμα (φωλεά, «stem cell niche») ελέγχουν την

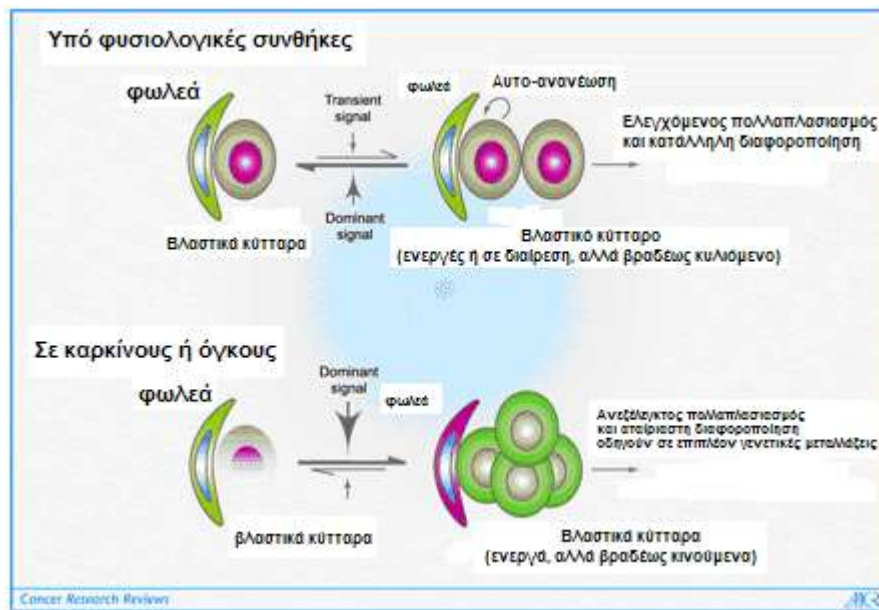
λειτουργία των βλαστικών κυττάρων και την ισορροπία μεταξύ αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού [17, 77, 78].

#### 4.6.1 Ιδιότητες και χαρακτηριστικά της «φωλεάς» (niche)

Η «φωλεά» στην κυτταρική βιολογία των βλαστικών κυττάρων περιγράφει το ειδικό εκείνο μικροπεριβάλλον που υποστηρίζει τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων και ενεργά ρυθμίζει την κυτταρική λειτουργία και τον πολλαπλασιασμό τους. Η αλληλεπίδραση των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων με τα κύτταρα της «φωλεάς» εξασφαλίζει τη φυσιολογική λειτουργία των οργάνων [16, 20].

Η φωλεά δημιουργείται από μια ομάδα κυττάρων, τα οποία συνδέονται με τα βλαστικά κύτταρα, μέσω μορίων προσκόλλησης. Η φωλεά, υπό φυσιολογικές συνθήκες ασκεί κατασταλτικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων και ευνοεί τη διαφοροποίησή τους. Η πρωτεΐνη μορφογένεσης των οστών [bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)] ανήκει στην υπεροικογένεια του TGF- $\beta$ , εκφράζεται στα μεσεγχυματικά κύτταρα της φωλεάς των βλαστικών κυττάρων του εντέρου και έχει κατασταλτική δράση στα βλαστικά κύτταρα. Αντίθετα, ο ανταγωνιστής της BMP-4 (Noggin) εκφράζεται παροδικά στα βλαστικά κύτταρα και προκαλεί την ενεργοποίησή τους.

Έχει επιβεβαιωθεί, ότι η απώλεια της κατασταλτικής δράσης της φωλεάς σχετίζεται με μη ελεγχόμενη αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων και ανώμαλη διαφοροποίησή τους, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κακοήθειας. Εναλλακτικά, τα βλαστικά κύτταρα λόγω μεταλλάξεων δεν ανταποκρίνονται στον έλεγχο της φωλεάς και πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, δημιουργώντας την καρκινική μάζα. Συνήθως, ο συνδυασμός της διαταραχής της φωλεάς και των βλαστικών κυττάρων οδηγεί στην ανάπτυξη κακοήθειας, Σχήμα 4.12 [20, 70].



**Σχήμα 4.12** Σύγκριση φωλεών σε φυσιολογικές και καρκινικές συνθήκες. Τα βλαστικά κύτταρα της φωλεάς σε φυσιολογικές συνθήκες προσφέρουν ένα περιβάλλον το οποίο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Στην περίπτωση του καρκίνου/όγκου, είτε λόγω ενδογενών μεταλλάξεων, τα βλαστικά καρκινικά κύτταρα γίνονται αυτόαρκα και προάγουν ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, είτε λόγω αλλαγών στα σήματα της φωλεάς που επίσης ευνοούν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό [20].

#### 4.7 Εμπλεκόμενα γονίδια στη μεταστατική διαδικασία

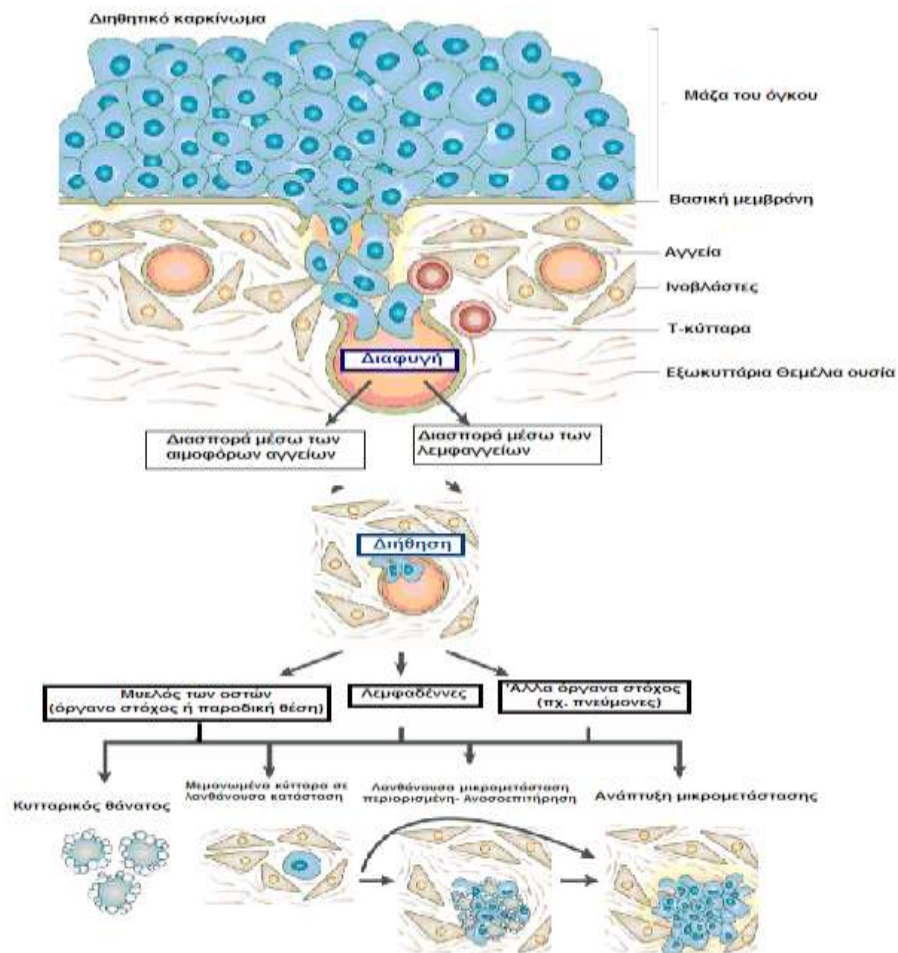
Η πορεία προς τη μετάσταση είναι μία εξαιρετικά δυναμική διαδικασία (καταρράκτης μετάστασης-metastatic cascade), από καταγισμό γεγονότων στα οποία εμπλέκονται 3 τάξεις γονιδίων [79].

Τα γονίδια αυτά κατατάσσονται με βάση το ρόλο της εμπλοκής τους στα διάφορα στάδια της μεταστατικής πορείας.

- Τα γονίδια έναρξης της μετάστασης (metastasis initiation)
- Τα γονίδια εξέλιξης της μετάστασης (metastasis progression)
- Τα μεταστατικά τοξικά γονίδια (metastasis virulence genes)

## 4.8 Καρκινική αδράνεια (cancer dormancy)

Η διατήρηση των καρκινικών κυττάρων σε λανθάνουσα κατάσταση (dormancy) επιτυγχάνεται με την ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών και αντιαγγειακών παραγόντων, αλλά και με την ανοσοεπιτήρηση. Διαταραχή της ισορροπίας υπέρ της αγγειογένεσης και διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα συντελεί στην εξέλιξη των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων και στην εξέλιξη της μικρομεταστατικής διαδικασίας, Σχήμα 4.13 [56].



**Σχήμα 4.13** Η αλληλεπίδραση κακοήθων κυττάρων-στρώματος στην πρωτοπαθή εστία και τις μεταστάσεις. Τα κύτταρα του στρώματος μπορούν να κρατήσουν τα καρκινικά κύτταρα σε λανθάνουσα κατάσταση (dormancy) στις μικρομεταστατικές εστίες [56].

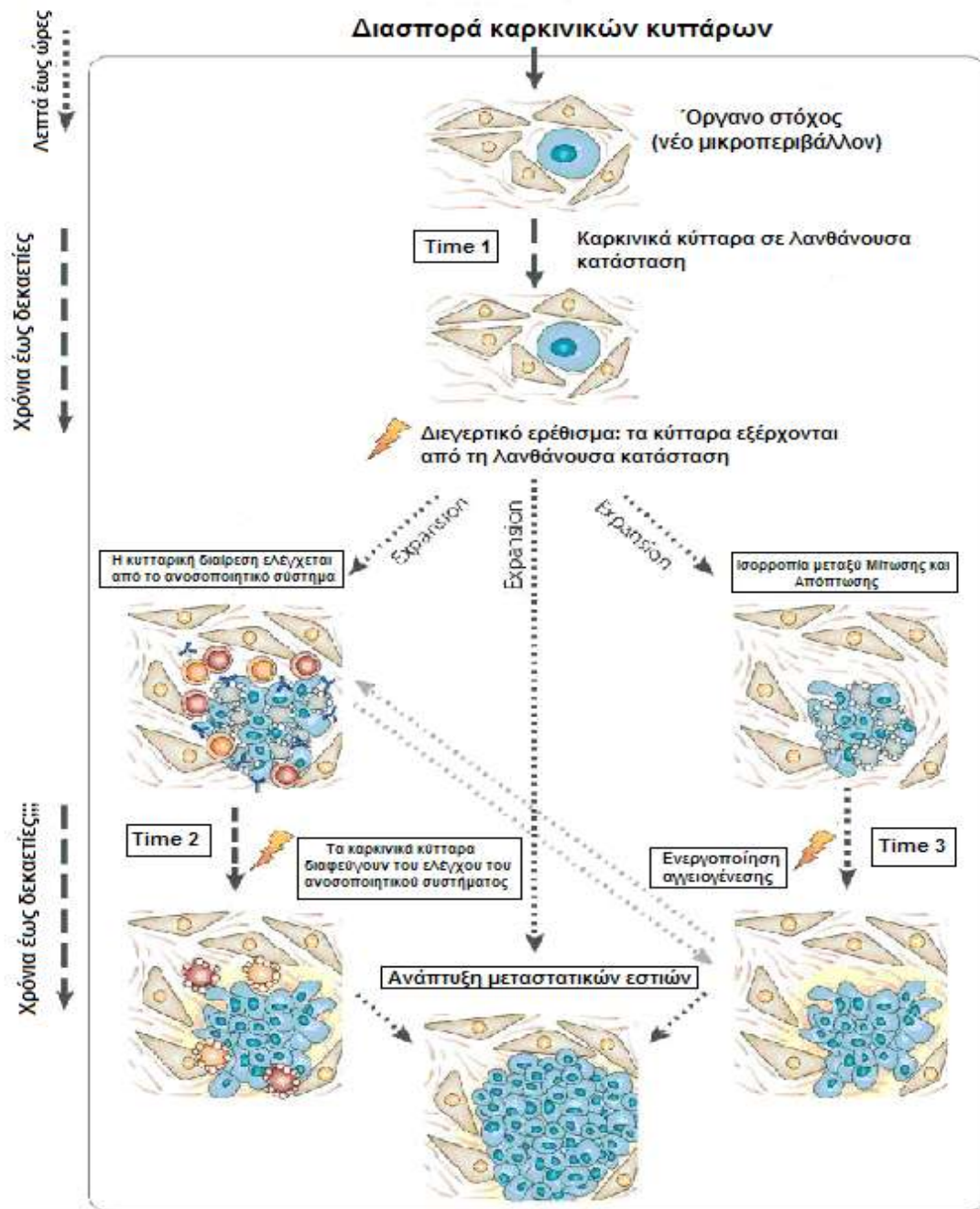
## 4.9 Παράλληλη εξέλιξη του όγκου και της μετάστασης

Για την κατανόηση των μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που συντελούνται μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος ως προς την εξέλιξη του πρωτοπαθούς όγκου και την μετάσταση, έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα, Σχήμα 4.14 [56, 80].

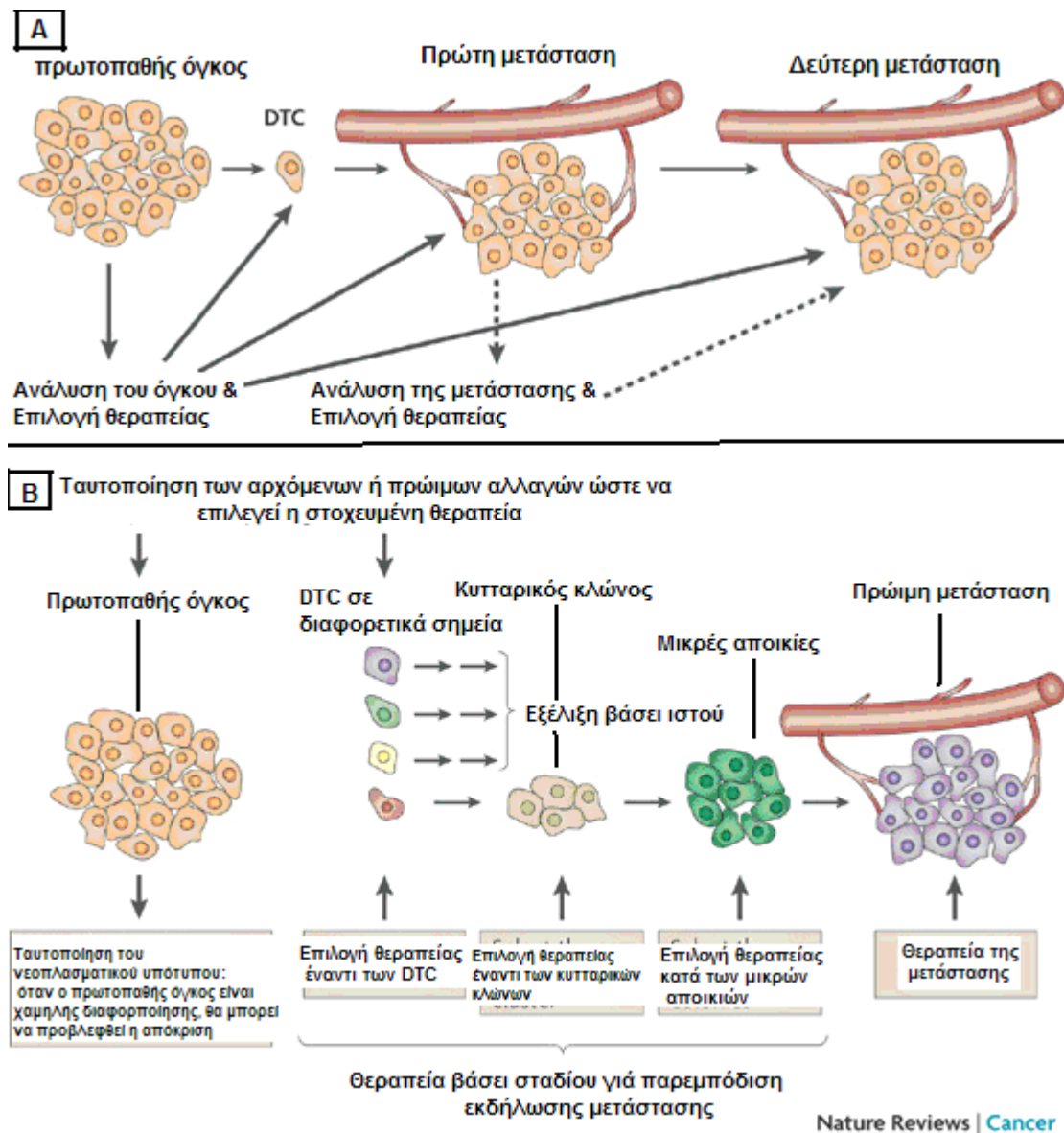
Τα επικρατέστερα μοντέλα είναι το γραμμικό (linear model) και το παράλληλο (progression model), Σχήμα 4.15 [80]

Το γραμμικό μοντέλο ορίζει ότι η εξέλιξη του πρωτοπαθούς όγκου γίνεται μέσα στο μικροπεριβάλλον του, όπου τα κύτταρά του υπόκεινται σε γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, αυτόνομα πολλαπλασιάζονται δημιουργώντας κλώνους, οι οποίοι με τη σειρά τους μεθίστανται ταυτόχρονα σε γειτονικά όργανα και σε διάστημα 6-12 ετών. Κομβικό σημείο στο γραμμικό μοντέλο αποτελεί το μέγεθος του όγκου ( $1 \text{ cm}^3$ ).

Το παράλληλο μοντέλο δέχεται ότι τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν του πρωτοπαθούς όγκου χωρίς να έχουν αποκτήσει ακόμα τα πλήρη κακοήθη φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Στην περίπτωση αυτή, τα διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα (DTCs) μπορεί να εξαπλωθούν πριν τη διάγνωση και συγχρόνως να αποικίσουν διαφορετικά όργανα σε διαφορετικό χρόνο.



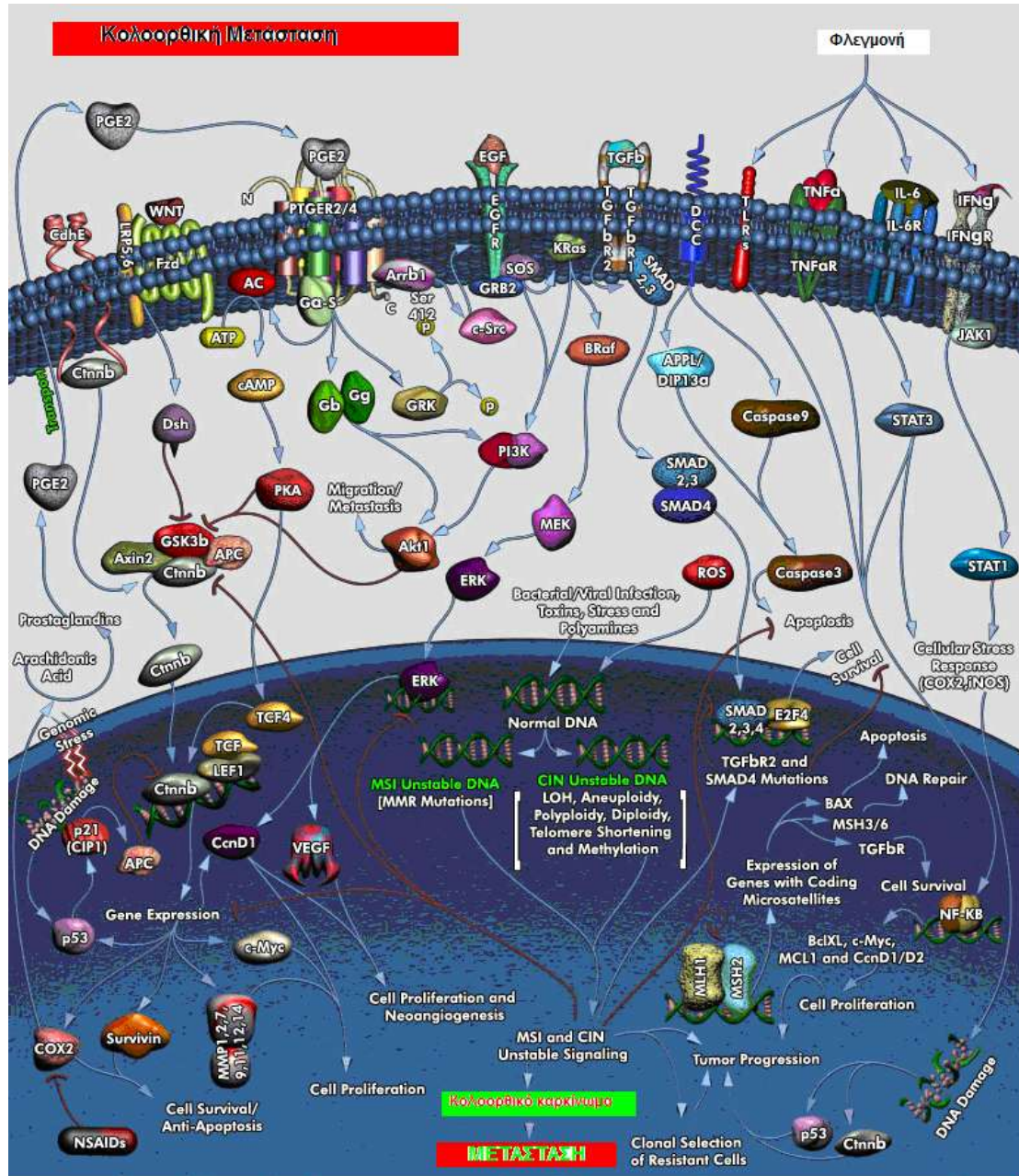
**Σχήμα 4.14** Διαφυγή από τη λανθάνουσα κατάσταση με ρύθμιση της δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος και της αγγειογένεσης οδηγεί στην εξέλιξη κλινικά μη εμφανών μεταστατικών εναποθέσεων και σε ανάπτυξη κλινικά εμφανών μεταστατικών εστιών, αρκετά χρόνια μετά την αρχική θεραπεία του όγκου [56].



**Σχήμα 4.15** Παράλληλη εξέλιξη του όγκου και της μετάστασης: A) Το γραμμικό (linear model) και B) Το παράλληλο (progression model) μοντέλο: A) Η επιθετικότητα των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων (DTCs) βασίζεται στην προέλευσή τους από τους πιο επιθετικούς κλώνους των καρκινικών κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου. Στο μοντέλο αυτό τα γενετικά χαρακτηριστικά του όγκου δίνουν δυνατότητα επιλογής της θεραπείας. B) Το παράλληλο μοντέλο δυσχεραίνει την επιλογή θεραπείας, δεδομένου ότι απαιτείται η απευθείας ανάλυση της συστηματικής νόσου. Επιπλέον, οι γενετικές πληροφορίες που φέρουν τα DTCs διαφέρουν μεταξύ τους από όργανο σε όργανο και εξελίσσονται ανεξάρτητα [80].



Ο καταρράκτης και τα μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στη μεταστατική διαδικασία του κολορθικού καρκίνου.



Πηγή: QIAGEN® Sample & Assay Technologies

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

### 5.1 Εισαγωγή

Ο Thomas Ashworth, Αυστραλός παθολογοανατόμος, το 1869 [81] κάνει την πρώτη αναφορά στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), παρατηρώντας στο μικροσκόπιο κύτταρα στο αίμα ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο, πανομοιότυπα με εκείνα του αρχικού όγκου στη βιοψία. Στα χρόνια που μεσολαβούν από τότε μέχρι σήμερα, η έρευνα του καρκίνου έχει αποδείξει την σπουδαιότητα του ρόλου των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στη μεταστατική διαδικασία και εξέλιξη [82, 83].

Το 1955 ο Engell χρησιμοποιεί τεχνική έγκλισης σε κύβους παραφίνης κυτταρολογικού υλικού (cell block) για να απομονώσει τα CTCs, οπότε και ξεκινάει ένα ενθουσιώδες ρεύμα στις κυτταρολογικές τεχνικές [84, 85].

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα θεωρούνται «σπάνια γεγονότα» (rare events) και ανιχνεύονται στο αίμα ασθενών με καρκίνους επιθηλιακής προέλευσης, σε συγκέντρωση 1 καρκινικό κύτταρο ανά  $10^6$ - $10^7$  λευκοκύτταρα, Πίνακας 5.1 [86-88].

Αριθμός Κυττάρων	Τύπος Κυττάρων
$10^6$ $\mu$ l	Erythrocytes
$10^5$ $\mu$ l	Platelets
$10^4$ $\mu$ l	Reticulocytes
$10^3$ $\mu$ l	Neutrophils
$10^2$ $\mu$ l	Lymphocytes
$10^1$ $\mu$ l	Monocytes
$10^0$ $\mu$ l	Eosinophils
$10^{-1}$ $\mu$ l	Basophils
$10^3$ ml	CD34+ Cells
$10^2$ ml	nRBC
$10^1$ ml	CECs
$10^0$ ml	CD34+CD38- Cells
$10^{-1}$ ml	EPCs
$10^3$ L	CTCs
$10^2$ L	

**Πίνακας 5.1** Ο αριθμός των CTCs σε σχέση με τον αριθμό των διαφόρων κυττάρων του αίματος

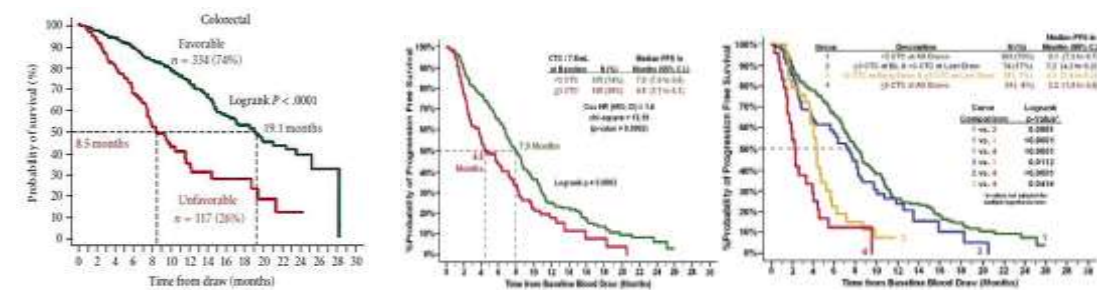
Η χρησιμότητα της ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων αποτελεί ισχυρό όπλο στη φαρέτρα των κλινικών ιατρών, αφού η σημασία τους είναι καθοριστική σε ότι αφορά την έγκαιρη διάγνωση, στην εφαρμογή στοχευμένης

θεραπείας, στην ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία, αλλά και στην πρόγνωση της πορείας του ασθενούς, Σχήμα 5.1[89-91].



**Σχήμα 5.1** Η χρησιμότητα των CTCs στη διαχείριση ασθενών με καρκίνο

Επιπλέον, αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη σε σχέση με το ελεύθερο νόσου διάστημα (DFI-disease free interval) και την ολική επιβίωση (OS-overall survival), καθώς και η μείωση τους <3 CTCs μετά την αρχή της θεραπείας προβλέπει επιμήκυνση του ελεύθερου νόσου διαστήματος στο μεταστατικό ΚΠΕ [82, 92, 93] Σχήμα 5.2



**Σχήμα 5.2** Κλινική σημασία των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων: (αριστερά) Η Karlan Meier Ανάλυση της ολικής επιβίωσης (OS) πριν την αρχή νέας γραμμής θεραπείας για τους ασθενείς με ΚΠΕ. Οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε αυτούς με Favorable and Unfavorable CTC (Unfavorable: >3 CTC/7.5mL for colon) [82], (μέση) Η Karlan Meier Ανάλυση του ελεύθερου νόσου διαστήματος (Progression-free survival), (δεξιά) Η Karlan Meier Ανάλυση της επιμήκυνσης του ελεύθερου νόσου διαστήματος στους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου σε σχέση με τη μείωση των CTCs (<3 CTC/7.5mL) μετά την έναρξη της θεραπείας (Used with permission. © Veridex, LLC 2010).

Ειδικότερα, η παρακολούθηση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων κατά τη διάρκεια και μετά την συστηματική adjuvant θεραπεία (π.χ χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία, θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα) θα μπορούσε να αποδειχθεί μοναδική πληροφορία για τη διαχείριση εκάστου ενός ασθενούς με καρκίνο και να επιτρέψει την αλλαγή θεραπείας, πολλά χρόνια πριν την εμφάνιση μεταστάσεων. Η ανάγκη για ανάδειξη βιοδεικτών «πραγματικού χρόνου» οι οποίοι θα είναι σε θέση να πιστοποιούν την αποτελεσματικότητα της συστηματικής εξατομικευμένης θεραπείας στους ασθενείς, είναι άμεσης σημασίας. Για το λόγο αυτό, οι πρώιμες αλλαγές στον αριθμό των CTCs πιθανά να αντιπροσωπεύει την επιτυχία ή αποτυχία της εφαρμοζόμενης εξατομικευμένης θεραπείας ή τον καθορισμό υποομάδων ασθενών που χρήζουν πιο επιθετικής συστηματικής χημειοθεραπείας [94-96].

Η μοριακή ανάλυση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων που απομονώνονται από το περιφερικό αίμα, χαρακτηρίζεται σαν «υγρή βιοψία» αφού φέρουν χαρακτηριστικά των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων [97, 98].

Τα CTCs συμπεριλαμβάνονται ήδη σε περισσότερες από 400 κλινικές μελέτες ως βιοδείκτες, ενώ ανοίγει ο δρόμος για πρόιμη ανίχνευση, εν τω βάθει κατανόηση και ριζική καταπολέμιση της μεταστατικής διασποράς των καρκινικών κυττάρων, ενώ συγχρόνως αναμένονται θεαματικά καινοτόμες θεραπευτικές εφαρμογές στο άμεσο μέλλον [99-101].

## **5.2 Μοριακός χαρακτηρισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων**

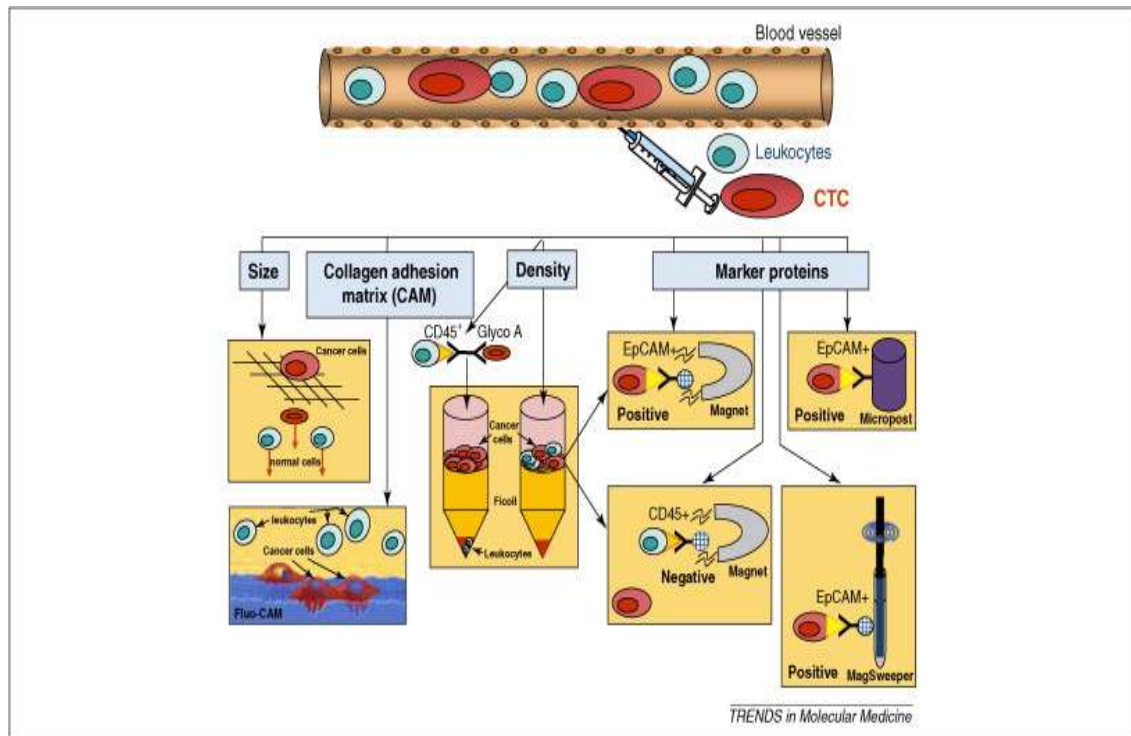
Με το μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs είμαστε σε θέση να αντλήσουμε πολύτιμη πληροφορία που αφορά στη βιολογική φύση τους, όπως την έκφραση των EMT δεικτών, την παρουσία σημαντικών μεταλλάξεων, την επιγενετική αποσιώπιση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων του όγκου, την κατάσταση των υποδοχέων (ορμονικών, επιδερμικών και υποδοχέων άλλων αυξητικών παραγόντων) [102, 103].

Η ανάλυση του μοριακού προφίλ των CTCs, όσον αφορά τα γενετικά, αλλά και τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους, συμβάλλει στον καθορισμό της προέλευσης τους από τον πρωτοπαθή ή μη όγκο [51], καθώς και στον καθορισμό του ποσοστού τους [104-106].

Συνήθως χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές για τις πειραματικές μελέτες που αφορούν στην ανάλυση του μοριακού προφίλ των CTCs, με τον κίνδυνο τα χαρακτηριστικά των κυττάρων σε αυτές τις καλλιέργειες να υφίστανται σημαντικές αλλοιώσεις λόγω των επαναλαμβανόμενων ανακαλλιιεργειών και τελικά να αποκλίνουν από τον αρχικό πληθυσμό [107, 108].

Πολλές ευαίσθητες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί ώστε να καταστεί δυνατή η ανίχνευση των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών, αλλά και διασπαρμένων καρκινικών κυττάρων (DTCs) στο μυελό των οστών σε επίπεδο ενός κυττάρου [109, 110]. Τόσο τα CTCs, όσο και τα DTCs μπορούν να διαχωριστούν από τα λευκοκύτταρα είτε βάσει των φυσικών τους χαρακτηριστικών (π.χ πυκνότητα ή μέγεθος), είτε βάσει των βιολογικών τους χαρακτηριστικών (π.χ έκφραση επιθηλιακών πρωτεϊνών, όπως EpCAM ή κερατινών) Σχήμα 5.3 [111, 112].

Για την ανίχνευση τους συνήθως χρησιμοποιείται η ανοσοχρώση (immunostaining) ή τεχνικές RT-PCR και άκρως τελευταία η τεχνική EPISPOT η οποία μετράει τον αριθμό των κυττάρων που απελευθερώνουν-εκλύουν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τον όγκο. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ανίχνευση των κυτταρικά ελεύθερων νουκλεϊνικών οξέων που εκλύονται από τον όγκο στο αίμα, θα μπορούσε να αποτελέσει έναν έμμεσο τρόπο πρόβλεψης της μικρομεταστατικής νόσου στο άμεσο μέλλον.



**Σχήμα 5.3** Σχηματική παράσταση των χρησιμοποιούμενων τεχνικών εμπλουτισμού των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Ο εμπλουτισμός των CTCs από το περιφερικό αίμα ασθενών βασίζεται σε 4 αρχές: μέγεθος (*membrane filter devices*), πυκνότητα (*Ficoll centrifugation*), έκφραση επιφανειακών δεικτών (*EpCAM* για θετική και *CD45* για αρνητική επιλογή; αντι-*EpCAM* ή αντι-*CD45* αντισώματα δεσμευμένα με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό των CTCs σε ένα μαγνητικό περιβάλλον) και *invasive capacity* (*adherence and invasion of fluorescent matrix*) [112].

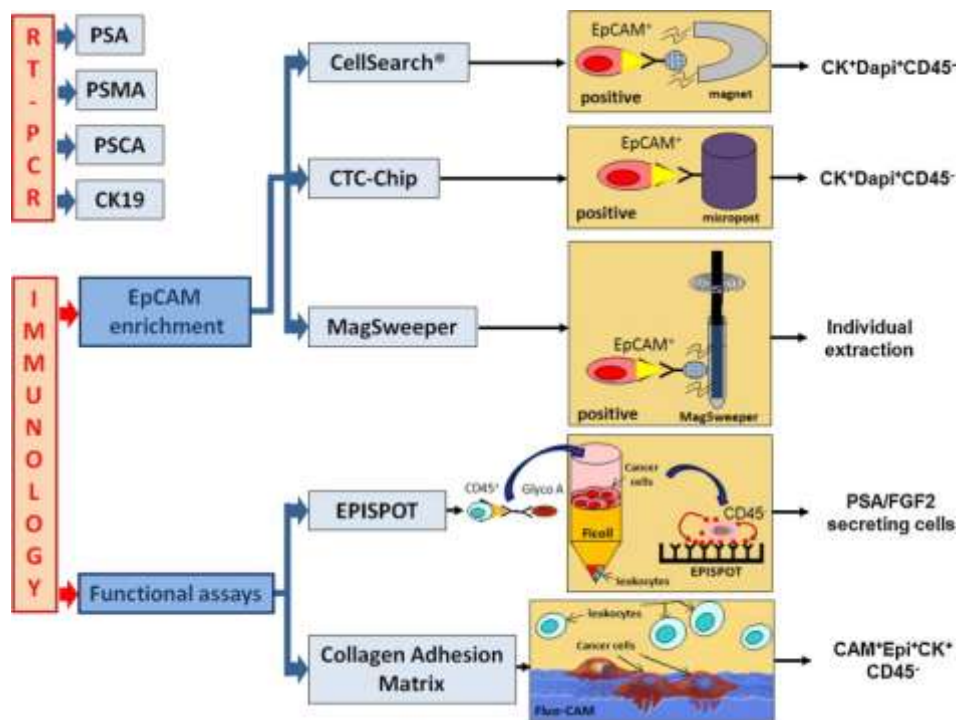
### 5.2.1 Μελέτη του μοριακού προφίλ των CTCs με ανοσοκυτταροχημεία και RT-PCR

Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των ιστικών πρωτεϊνών σε συνδυασμό με άλλα αντισώματα έναντι άλλων καρκινοσχετιζόμενων αντιγόνων και μορικές τεχνικές με PCR είναι οι δύο κατά βάση τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του μοριακού προφίλ των CTCs, Σχήμα 5.4 [87, 113].

Μελέτες επίσης έχουν γίνει και σε κυτταρικές σειρές με ανοσοκυτταροχημεία και RT-PCR και έχουν αναγνωρισθεί επιθηλιακοί δείκτες (*E-cadherin*, *EpCAM*, *cytokeratins*), αλλά και μεσεγχυματικοί δείκτες (*vimentin*). Ο φαινότυπος αυτών των

κυττάρων χαρακτηρίστηκε και από την έκφραση σχετικών με τη μετάσταση μορίων προσκόλλησης, όπως οι υπομονάδες της ιντεγκρίνης (integrine) ( $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$ ), μέλη της οικογένειας MAGE και ο υποδοχέας της λαμινίνης [108].

Οι μοριακές τεχνικές είναι πιο ευαίσθητες, ενώ οι ανοσοκυτταροχημικές έχουν το πλεονέκτημα ότι διατηρούν τα μορφολογικά στοιχεία στα χρωσμένα κύτταρα [87]. Πάντως και οι δύο τεχνικές έχουν το κοινό πρόβλημα ότι χρήζουν πρωτυποποίησης και επικύρωσης.



**Σχήμα 5.4** Σχηματική παράσταση των χρησιμοποιούμενων τεχνικών εμπλουτισμού και χαρακτηρισμού του μοριακού προφίλ των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, RT-PCR και Ανοσοκυτταροχημικές.

### 5.2.2 Μελέτη του προφίλ γονιδιακής έκφρασης των CTCs με μικροσυστοιχίες

Οι μελέτες των Smiron D. et al και O'Hara M. et al [114, 115] αναφέρονται στη μελέτη του προφίλ γονιδιακής έκφρασης των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, προστάτη, μαστού, χρησιμοποιώντας ανοσοσφαιρίδια έναντι του επιθηλιακού μορίου κυτταρικής προσκόλλησης (EpCAM-Epithelial Cell Adhesion Molecule) και εν συνεχεία έκαναν ανάλυση της γονιδιακής τους έκφρασης

με χρήση μικροσυστοιχιών. Έγινε επιλογή γονιδίων από κάθε τύπο καρκίνου με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η πιθανή καταλληλότητα τους ως δείκτες μικρομετάστασης. Οι μικροσυστοιχιές έχουν σαφές προβάδισμα έναντι άλλων τεχνικών αφού παρέχουν τη δυνατότητα ανακάλυψης νέων γονιδίων στόχων που συμβάλλουν στη διάγνωση και θεραπεία της μικρομεταστατικής νόσου.

### 5.2.3 Μελέτη του γονιδιώματος με FISH και CGH

Ο συνδυασμός ανοσοκυτταροχημείας και *in situ* υβριδισμού φθορισμού (FISH), καθώς και η τεχνική ενίσχυσης ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome amplification) με ακόλουθο συγκριτικό γενωμικό υβριδισμό (CGH-comparative genomic hybridization) σε μεμονωμένα κύτταρα που έχουν επιλεγεί με ανοσοκυτταροχημεία, έδωσαν πολύτιμες πληροφορίες όσον αφορά την προέλευση αυτών των κυττάρων σε σχέση με τον πρωτογενή όγκο από τον οποίο διαφεύγουν. Επιπλέον, με την τεχνική FISH έχει καταδειχτεί ότι υπάρχουν ταιριαστά πρότυπα ανευπλοειδίας μεταξύ των CTCs και του πρωτογενούς όγκου, επικυρώνοντας την κλωνική σχέση που φαίνεται να υπάρχει μεταξύ των κυττάρων του πρωτογενούς όγκου και των κυττάρων της μετάστασής του [114].



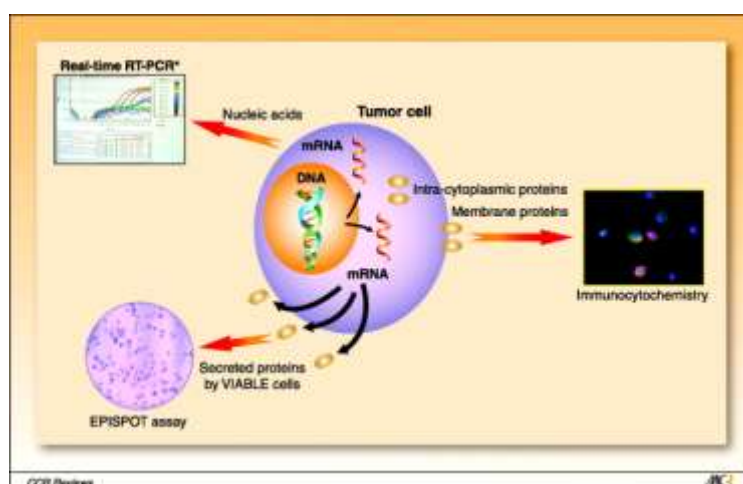
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (CTCs)

### 6.1 Εισαγωγή

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων είναι μια δύσκολη, ακόμα και σήμερα υπόθεση, αφού τα CTCs αποτελούν σπάνια συμβάντα (1 καρκινικό κύτταρο ανά  $10^6$ - $10^7$  λευκοκύτταρα), γεγονός που γίνεται ακόμα δυσκολότερο δεδομένου ότι δεν υπάρχει ένα ειδικό χαρακτηριστικό που να ξεχωρίζει τα CTCs από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος με καθολικό τρόπο. Απαιτούν αναλυτικές μεθόδους με ιδιαίτερη ευαισθησία και ειδικότητα, δεδομένου του γεγονότος ότι στην πραγματικότητα διαφορετικοί ιστολογικοί και μοριακοί τύποι καρκίνου εκφράζουν διαφορετικές ομάδες δεικτών και η ετερογένεια αυτή μπορεί να υφίσταται ακόμα και στον ίδιο ιστολογικά καρκινικό τύπο [116, 117].

### 6.2 Μέθοδοι ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων

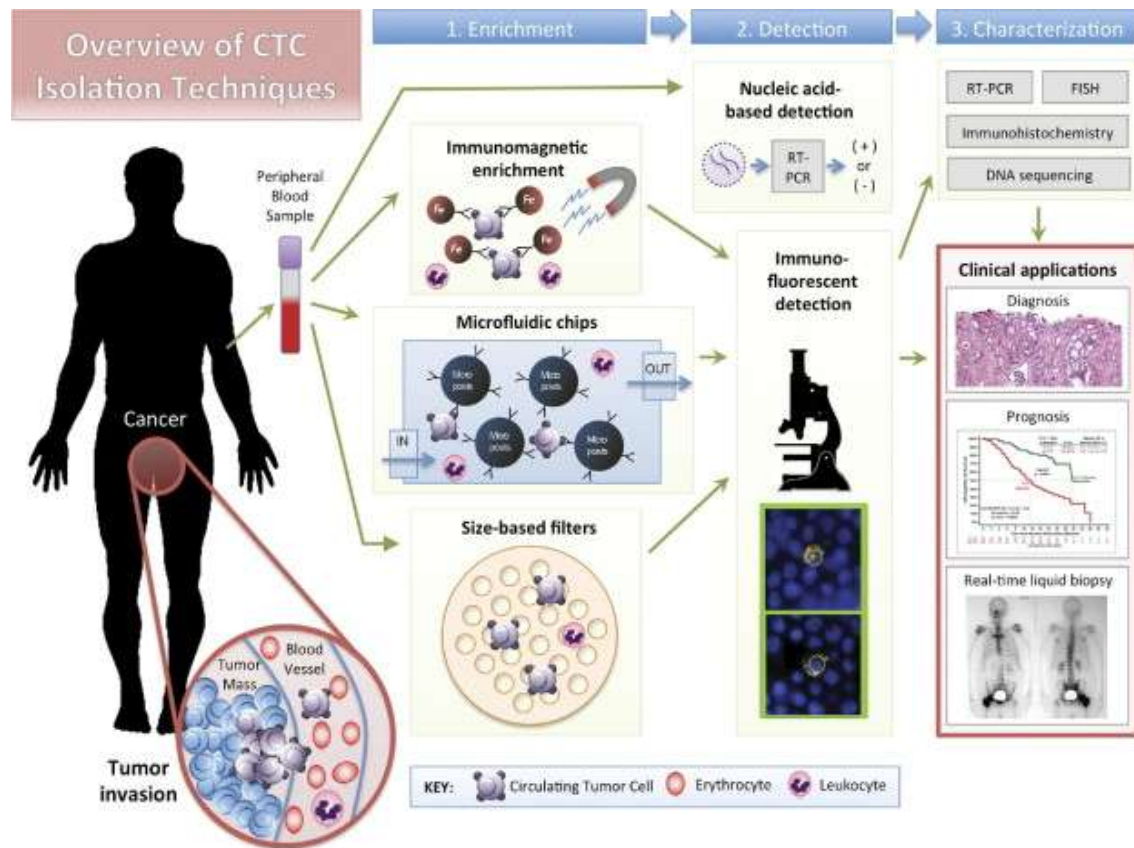
Οι μέθοδοι ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων ταξινομούνται σε κυτταρομετρικές και μοριακές, Σχήμα 6.1, Σχήμα 6.2, Σχήμα 6.3, Σχήμα 6.4 και Πίνακας 6.1 [109, 118-121].



**Σχήμα 6.1** Σχηματική παράθεση των κυτταρομετρικών και μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση των CTCs [109].

Μέθοδος ανίχνευσης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<b><u>Ανοσοκυτταρομετρικές</u></b>		
<b>Cell Search</b>	Μορφολογική ανάλυση των CTC Ημιαυτόματη τεχνική Οπτική επιβεβαίωση των CTCs με ανοσοφθορισμό Απευθείας αρίθμηση των CTCs Απομόνωση των CTC για περαιτέρω πιθανή ανάλυση	Υποκειμενική ανάλυση των CTCs
<b>EPISPOT assay</b>	Υψηλή ευαισθησία Ανίχνευση των ζωντανών CTCs	Δεν είναι δυνατή η μορφολογική ανάλυση Οι πρωτεΐνες πρέπει να εκκριθούν ή να διαχυθούν ενεργά από τα CTCs
<b>CTC chip</b>	Οπτική επιβεβαίωση των CTCs	Υποκειμενική ανάλυση των CTCs
<b>FAST</b>	Δεν χρειάζεται εμπλουτισμός	Υποκειμενική ανάλυση των CTCs
<b>LSC</b>	Δεν χρειάζεται εμπλουτισμός Οπτική επιβεβαίωση των CTCs	Υποκειμενική ανάλυση των CTCs Χαμηλή ειδικότητα λόγω των περιορισμών των δεικτών
<b><u>Μοριακές μέθοδοι</u></b>		
<b>RT-PCR</b>	Υψηλή ευαισθησία Αντικειμενικός προσδιορισμός του σήματος	Χαμηλή ειδικότητα Αστάθεια του RNA
<b>qRT-PCR</b>	Καλύτερη ειδικότητα από τη συμβατική PCR Πολύ υψηλή ευαισθησία Αντικειμενικός προσδιορισμός του σήματος	Αστάθεια του RNA Δεν είναι δυνατή η μορφολογική ανάλυση

**Πίνακας 6.1** Συνοπτική παράθεση των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων των τεχνικών ανίχνευσης των CTCs [109].



**Σχήμα 6.2** Σχηματική παράθεση των τεχνικών απομόνωσης των CTCs βάση των σταδίων: 1.Εμπλουτισμός, 2.Ανίχνευση, 3.Χαρακτηρισμός των CTCs, σε σχέση με την κλινική τους εφαρμογή [122].

Οι κυτταρομετρικές μέθοδοι εφαρμόζονται για να ανιχνευτούν τα CTCs μέσω έκφρασης ογκοειδικών δεικτών, ενώ οι μοριακές βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων και περιλαμβάνουν προηγουμένως στάδιο εμπλουτισμού πριν την ανίχνευση, με σκοπό να αυξηθεί η ευαισθησία τους. Ο εμπλουτισμός των CTCs μπορεί να γίνει στη βάση μορφολογικών κριτηρίων, όπως είναι το μέγεθος (size filtration) και η πυκνότητα των κυττάρων (Ficoll-Hypaque separation), είτε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων καρκινικών δεικτών των κυττάρων στόχων (ανοσομαγνητικός διαχωρισμός), Πίνακας 6.2 [92, 109, 123].

Πίνακας 6.2

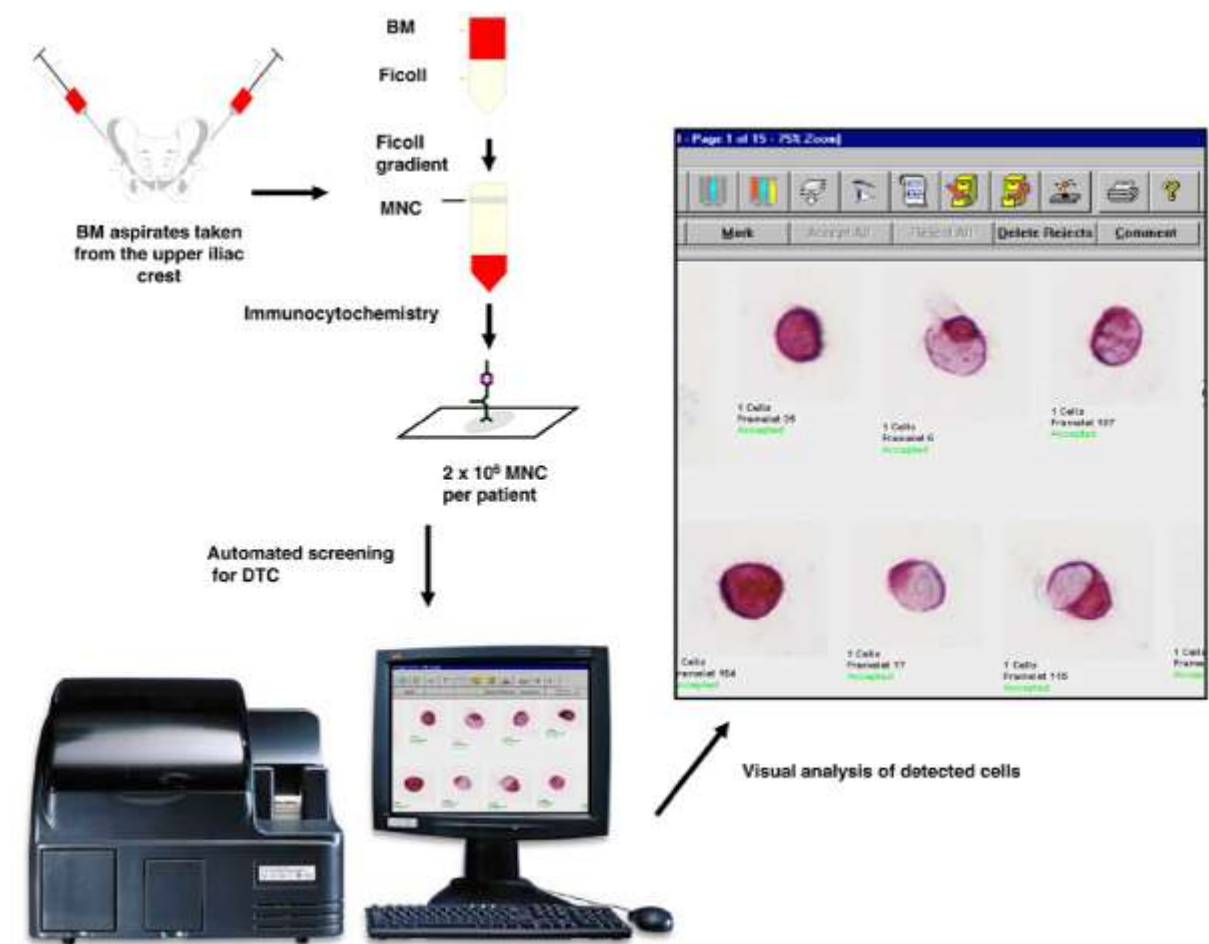
Σύγκριση μεταξύ των χρησιμοποιούμενων τεχνικών εμπλουτισμού των CTCs

Τεχνικές εμπλουτισμού	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<p>Πυκνότητα κυττάρου</p> <p>Ficoll Hyraque ή κάτι αντίστοιχο</p>	<p>Εύκολη τεχνική, χαμηλό κόστος, εφαρμόζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, συγκρατούνται τα EpCAM+ και EpCAM- κύτταρα</p>	<p>Χαμηλή ειδικότητα, χαμηλή ανάκτηση των CTC, περιορισμένα δεδομένα για κλινική χρήση</p>
<p>OncoQuick®</p>	<p>Εύκολη τεχνική, το πορώδες φράγμα διαχωρίζει τη διαβάθμιση πυκνότητας από το ολικό αίμα</p>	<p>Χαμηλή ανάκτηση των CTC, περιορισμένα δεδομένα για κλινική χρήση</p>
<p>Μέγεθος κυττάρου</p> <p>ISET®</p>	<p>Εύκολη τεχνική, εφαρμόζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων</p>	<p>Χαμηλή ειδικότητα, πολλά λευκοκύτταρα δεν αποκλείονται</p>

### 6.2.1 Ανοσοκυτταρομετρικές μέθοδοι

Η χρήση της ανοσοκυτταροχημείας αποτελεί βασική προσέγγιση στην ταυτοποίηση των CTCs, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα έναντι επιθηλιακών ή σχετιζόμενων με τον όγκο αντιγόνων, Σχήμα 6.3. Οι κυτταροκερατίνες είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενοι *πρωτεϊνικοί* δείκτες για την ανίχνευση επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων σε μεσεγχυματικούς ιστούς όπως ο μυελός των οστών, το αίμα, οι λεμφαδένες [109, 124-127], αλλά υπάρχουν προβλήματα στις περιπτώσεις εκείνες που τα καρκινικά κύτταρα έχουν χάσει την έκφραση των κυτταροκερατινών ή στην περίπτωση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων σαν αποτέλεσμα του χρησιμοποιούμενου αντισώματος, το οποίο πιθανά να μην αναγνωρίζει το φάσμα των κυτταροκερατινικών πρωτεϊνών, ή και λόγω της διαφορετικής ευαισθησίας της χρησιμοποιούμενης ανοσοτεχνικής χρώσης. Για το λόγο αυτό, έχει τεθεί το ζήτημα από διάφορους παγκόσμιους οργανισμούς να γίνει προτυποποίηση των ανοσοκυτταρομετρικών μεθόδων [109, 124, 128-131].

Η χρήση των αυτοματοποιημένων μηχανημάτων λύνει πολλά προβλήματα, αφού αυξάνει την ταχύτητα και την αναπαραγωγικότητα των αναλύσεων, Σχήμα 6.3.



**Σχήμα 6.3.** Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων (DTCs) στο μυελό των οστών ασθενών με επιθηλιακούς όγκους. Η διαδικασία της ανίχνευσης ξεκινάει με βαθμίδωση φικόλης για την απομόνωση των μονοπύρηνων (MNC) και τη χρήση αντισωμάτων έναντι κερατίνης (CK). Η ανίχνευση των χρωσμένων DTCs μπορεί να γίνει αυτοματοποιημένα [123].

Στα εμπορικά διαθέσιμα ημιαυτοματοποιημένα μηχανήματα ανήκει το **CellSearch** σύστημα το οποίο επιτρέπει και τον εμπλουτισμό με EpCAM και την ανοσοχρώση με κυτταροκερατίνες στα δείγματα αίματος. Το CellSearch έχει πάρει FDA έγκριση για την παρακολούθηση στο αίμα μεταστατικών ασθενών μαστού και κολορρθικού καρκίνου.

Η πιο καινούργια τεχνική “**CTC-chip**” αποτελείται από 78.000 μικροστήλες οι οποίες είναι συνδεδεμένες με αντίσωμα έναντι του EpCAM. Τα EpCAM θετικά CTCs δεσμεύονται στις μικροκολώνες, υπό τον έλεγχο συνεχούς ροής και ανιχνεύονται από μια κάμερα βάση της μορφολογίας τους, της ζωτικότητας τους και των καρκινικών δεικτών. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί CKs και DAPI για τη θετική επιλογή των CTCs μαζί με το CD45 για την αρνητική επιλογή των λευκοκυττάρων.

Το **Laser Scanning Cytometer (LSC)** συνδυάζει την ταχύτητα του κυτταρομετρητή ροής με τη δυνατότητα να αναλύει κάθε θετικό μονήρες κύτταρο από τις μορφολογικές του ιδιότητες. Το LSC μπορεί να αναλύει έως 50.000 κύτταρα σε μισή ώρα. Η τεχνική συνδυάζει την λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) και την EpCAM- ανοσοχρώση και το κυτταρόμετρο αναλύει το φθορισμό.

Η τεχνική **EPISPOT** ανιχνεύει ζωντανά καρκινικά κύτταρα και εκμεταλλεύεται την ικανότητα αυτών των κυττάρων να εκκρίνουν πρωτεΐνες μετά από καλλιέργεια 24 ωρών, βασισμένη στην ανοσομαγνητική έκπλυση των CD45+ κυττάρων και στον εμπλουτισμό τους.

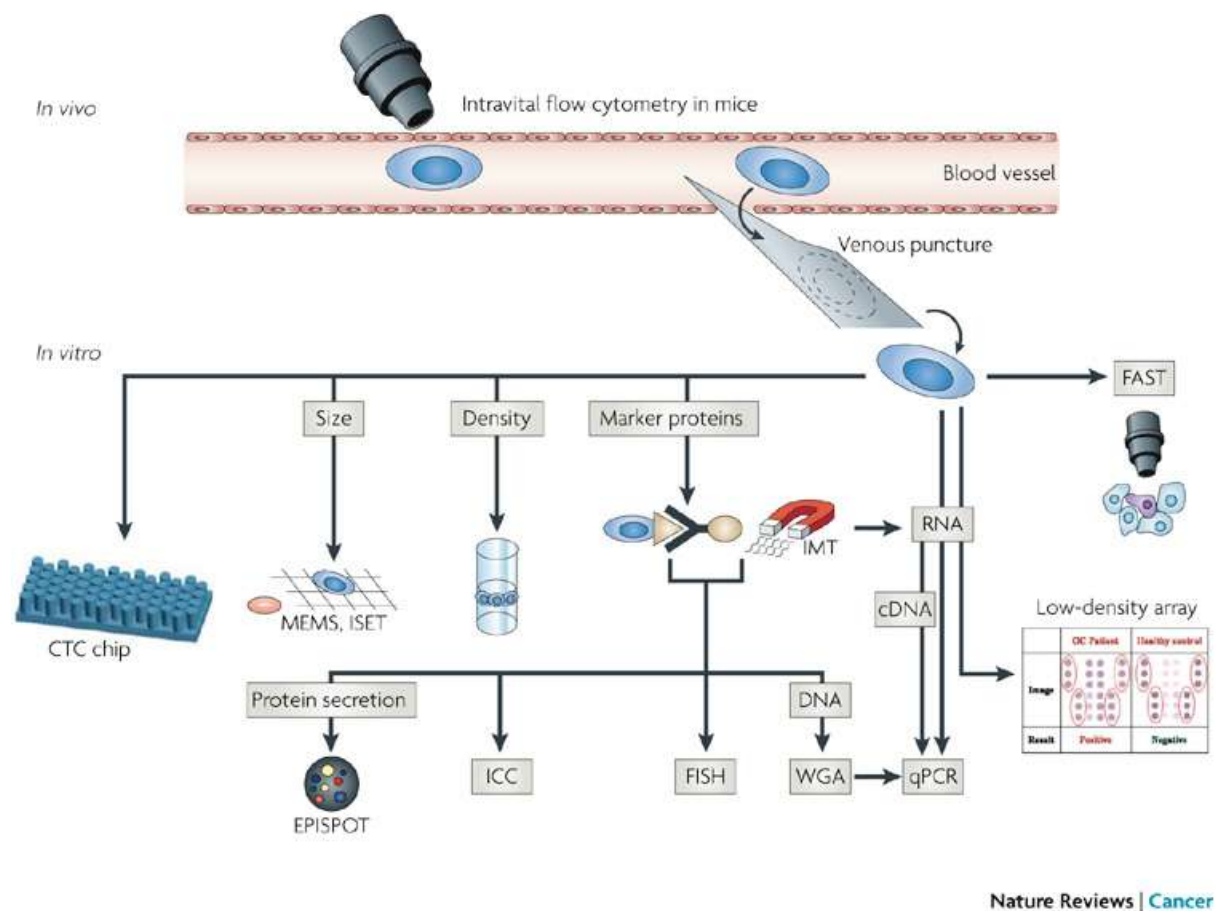
Με την **Fiber-optic Array Scanning Technology, FAST** (Τεχνολογία Σάρωσης Συστοιχιών από οπτικές ίνες) τοποθετούνται ανοσοφθορίζοντα επισημασμένα κύτταρα πάνω σε γυάλινα υποστρώματα με ταχύτητα 500 φορές υψηλότερη από την συμβατική αυτόματη ψηφιακή μικροσκοπία, αλλά με αντίστοιχη ευαισθησία και βελτιωμένη ειδικότητα, ενώ ο χρόνος έκθεσης μειώνεται με τη χρήση Laser.

## 6.2.2 Μοριακές μέθοδοι

Αν και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ελεύθερου DNA, τα τελευταία χρόνια η RT-PCR αποτελεί «gold standard» για την αναγνώριση των CTCs μέσω της ανίχνευσης καρκινοσχετιζόμενων μεταγράφων mRNA που υπερεκφράζονται στον καρκίνο[132]. Επειδή το RNA εξαφανίζεται γρήγορα στα κλινικά δείγματα μετά τον κυτταρικό θάνατο, η ανίχνευση του στο περιφερικό αίμα υποδηλώνει παρουσία ζωντανών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων [133]. Με την RT-PCR γίνεται σύνθεση cDNA και το γονίδιο(-ια) στόχος ενισχύεται με ειδικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή[134-138]. Με την RT-PCR επιτυγχάνουμε υψηλότερη ευαισθησία, σε σύγκριση με την ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, όμως προκύπτει το πρόβλημα των

ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων είτε λόγω της επιμόλυνσης του δείγματος, είτε λόγω παράτυπης μεταγραφής καρκινικών mRNA (illegitimate expression) από υγιή κύτταρα, είτε λόγω ψευδογονιδίων.

Με τη χρήση της real-time PCR έχουμε τη δυνατότητα να ποσοτικοποιήσουμε το καρκινικό φορτίο στο κλινικό δείγμα και να βελτιώσουμε την ειδικότητα, ενώ με την ποσοτική RT-PCR (qRT-PCR) μπορούμε να πετύχουμε ποσοτικό προσδιορισμό του χαμηλού ή υψηλού επιπέδου έκφρασης ενός συγκεκριμένου δείκτη ο οποίος διαφοροποιείται μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων.



**Σχήμα 6.4** Συνοπτική παρουσίαση των χρησιμοποιούμενων μεθόδων για ανίχνευση των CTCs [121].

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## Σκοπός της εργασίας

Η σημασία της ανίχνευσης των CTCs, σε σχέση με την επιβίωση των ασθενών, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη δημιουργία εξατομικευμένης θεραπείας, έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες. Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα είναι κυρίως μοριακές μέθοδοι (real time RT-PCR), ενώ στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με Laser Scanning Cytometry και το εγκεκριμένο σύστημα CellSearch. Λίγες έως τώρα ομάδες έχουν αποπειραθεί να ανιχνεύσουν CTCs χρησιμοποιώντας Κυτταρομετρία Ροής. Παρότι οι μοριακές τεχνικές χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, η κυτταρομετρία ροής πλεονεκτεί από άποψη ταχύτητας και ευκολίας. Επιπλέον, δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα (πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής), καθώς και της ανάλυσης ολόκληρου του κυττάρου, αφού δεν καταστρέφεται κατά την προετοιμασία του δείγματος.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η συγκριτική μελέτη μεθόδων ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκινώματα παχέος εντέρου, η συσχέτιση τους ως προς την ευαισθησία και ειδικότητα τους, το όριο ανίχνευσης (traceability) τους και τέλος η συμβολή μας στις προτεινόμενες βιβλιογραφικά πολυκεντρικές μελέτες για τον καθορισμό cutoff values και την επιλογή των κατάλληλων “Tumor specific” δεικτών, από την πληθώρα των επί του παρόντος χρησιμοποιούμενων.

Οι στόχοι ήταν να πραγματοποιηθούν λήψεις περιφερικού αίματος από τους ασθενείς κατά τις φάσεις: 1) προ χειρουργείου και πριν την εφαρμογή αναισθησίας, και 2) την επόμενη της χειρουργικής επέμβασης.

Προεγχειρητικά: η ανίχνευση των CTCs μπορεί να αποτελέσει έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και για τους λόγους αυτούς χρειάζονται ακόμα μελέτες με μεθόδους αυξημένης ευαισθησίας και ειδικότητας,

Μετεγχειρητικά: η ανίχνευση των CTCs ενδεχόμενα να έχει μεγαλύτερη προγνωστική αξία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 7.1 Υλικό της μελέτης

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της διδακτορικής διατριβής, το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 84 δείγματα από λήψεις περιφερικού αίματος ασθενών κατά τις φάσεις: 1) προ χειρουργείου και πριν την εφαρμογή αναισθησίας, και 2) την επόμενη της χειρουργικής επέμβασης, ενώ την ομάδα ελέγχου απετέλεσαν 16 ασθενείς χωρίς ένδειξη για ύπαρξη καρκινώματος παχέος εντέρου.

#### 7.1.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Συνολικά συλλέχθηκαν 84 δείγματα από 41 ασθενείς με ένδειξη καρκινώματος παχέος εντέρου και 16 δείγματα εθελοντών αιμοδοτών χωρίς ένδειξη για ύπαρξη καρκίνου. Στο σύνολο των δειγμάτων 37 ήταν γυναίκες και 47 άνδρες, αναλογία ανδρών/γυναικών ~1:1, ηλικίας 51 έως 87 ετών (μέσος όρος ηλικίας τα 69 έτη-mean 69), Α) προ χειρουργείου και Β) την επομένη του χειρουργείου, σύμφωνα με το Πρωτόκολλο της διδακτορικής διατριβής. Όταν το περιφερικό αίμα δεν ήταν αρκετό εκτελέστηκε μόνο η μια εκ των δύο μεθόδων.

### 7.2 Μέθοδοι

#### 7.2.1 Κυτταρομετρία ροής

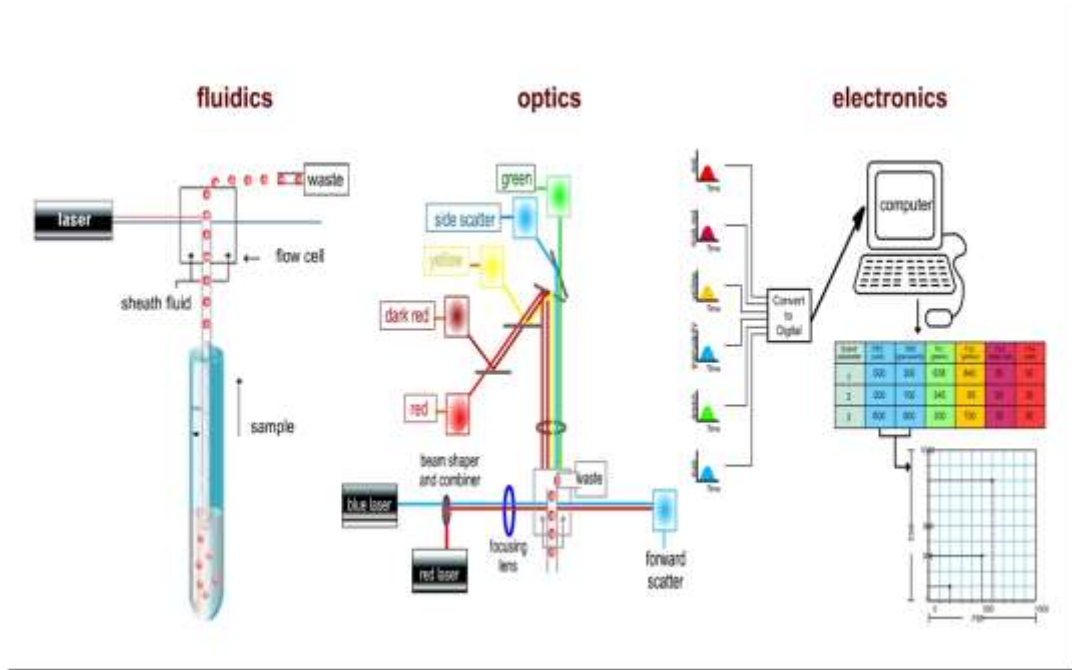
Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) αποτελεί μια ποσοτική, γρήγορη, πολυπαραμετρική, αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων και σωματιδίων, με βάση την σκέδαση και το φθορισμό, με την προϋπόθεση ότι το υπό ανάλυση δείγμα βρίσκεται σε κατάσταση εναιωρήματος. Το κάθε κύτταρο αναλύεται χωριστά. Σχεδιάστηκε για να ενισχύσει τη μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων, με τη χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών και αποτελεί πλέον αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο στα κλινικά εργαστήρια. Κατά την ανάλυση των κυττάρων, οι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη είναι η σκέδαση της

προσπίπτουσας ακτινοβολίας στα κύτταρα και η παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία καθώς τα κύτταρα διέρχονται από την κυψελίδα ροής με τη βοήθεια της υδροδυναμικής εστίασης.

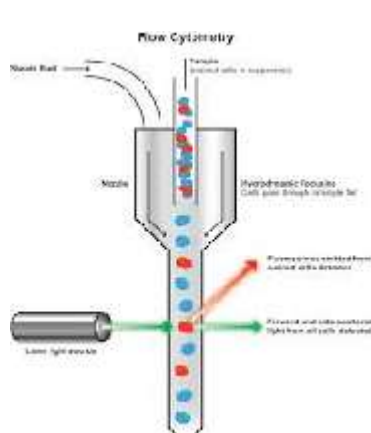
Η κυτταρομετρία ροής χαρακτηρίζεται ως ένας επιτυχής συνδυασμός αιματολογικού αναλυτή και φθορίζοντος μικροσκοπίου. Ο κυτταροδιαχωριστής ροής (κυτταρόμετρο) εκτός της ανάλυσης των κυττάρων, επιτρέπει επιπλέον την απομόνωση των κυττάρων χωρίς σχετική απώλεια της βιωσιμότητάς τους [139].

Η κυτταρομετρία ροής μετράει τα οπτικά και φθορίζοντα χαρακτηριστικά ενός κυττάρου. Το μέγεθος του κυττάρου το οποίο σχετίζεται με τον πρόσθιο σκεδασμό και η πολυπλοκότητα του που σχετίζεται με τον πλάγιο σκεδασμό, μπορούν να διαχωρίσουν διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που είναι επισημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές συνδέονται με πρωτεΐνες που βρίσκονται στις μεμβράνες ή στο εσωτερικό των κυττάρων. Οι ουσίες αυτές, καθώς τα κύτταρα διέρχονται από την πηγή φωτός διεγείρονται σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση και όταν επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση εκπέμπουν φωτεινή ενέργεια σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από την αρχική ακτίνα. Η χρήση πολλαπλών φθορίζουσών ουσιών οι οποίες διεγείρονται από το ίδιο ή περισσότερα laser, αλλά έχουν διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής, επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών ιδιοτήτων των κυττάρων [140, 141].

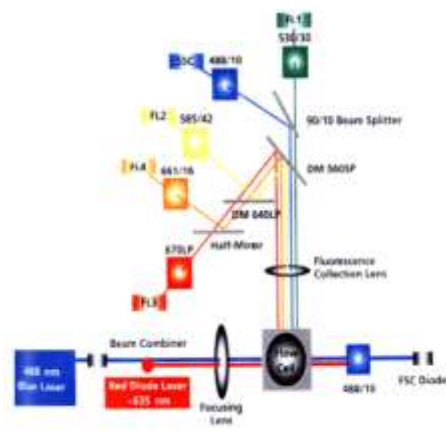
Ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία βασικά συστήματα: 1) το υδροδυναμικό σύστημα ροής, 2) το οπτικό σύστημα και 3) το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων, Σχήματα 7.1 και 7.2



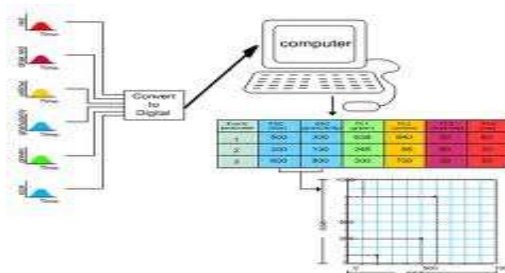
Σχήμα 7.1 Σχηματική παράσταση ενός κυτταρομετρητή ροής



Υδροδυναμικό σύστημα κυτταρομετρητή ροής



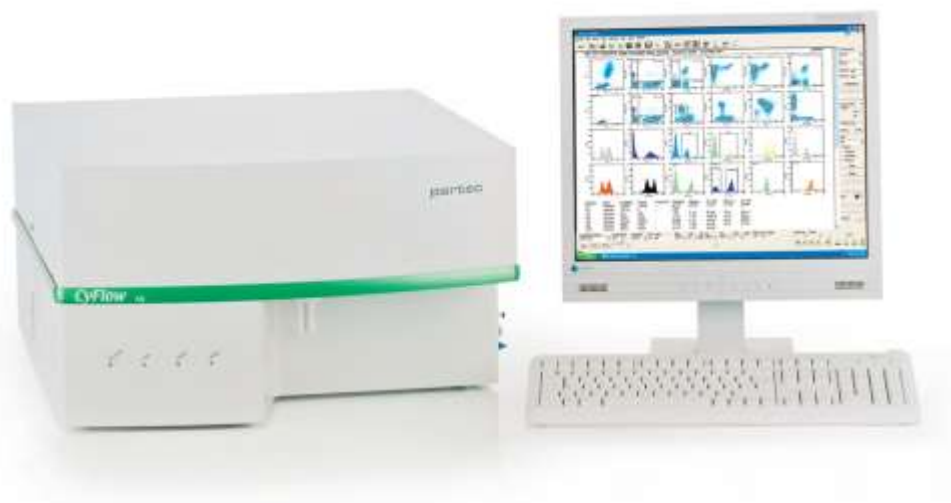
Οπτικό σύστημα κυτταρομετρητή ροής



Ηλεκτρονικό σύστημα κυτταρομετρητή ροής

Σχήμα 7.2 Τα τρία βασικά συστήματα ενός κυτταρομετρητή ροής

Ο κυτταρομετρητής ροής στον οποίο έγιναν οι αναλύσεις-μετρήσεις των δειγμάτων είναι ο Cyflow Space (Partec, Munster, Germany), Σχήμα 7.3



**Σχήμα 7.3** *Cyflow Space (Partec, Munster, Germany)*

### 7.2.2 Μοριακές τεχνικές

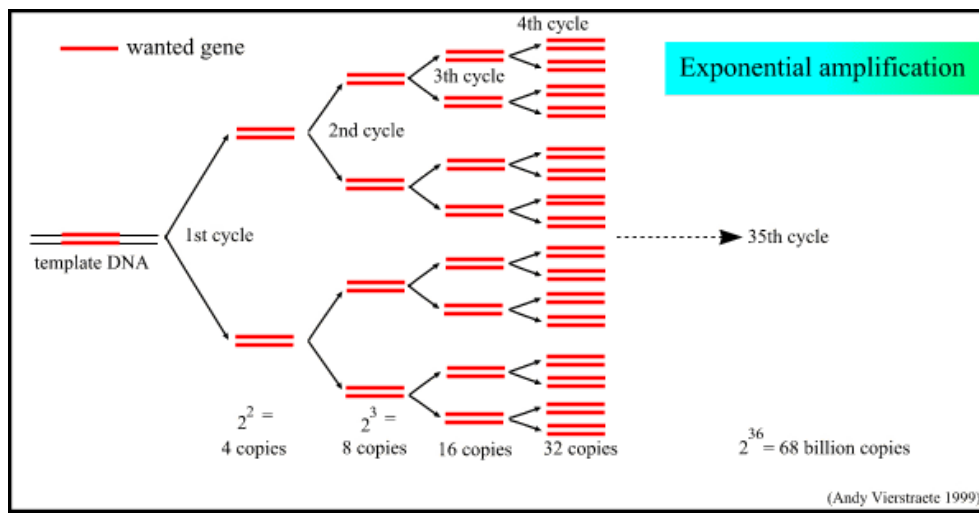
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μία μέθοδος αποτελεσματική για τη γρήγορη ανάλυση συγκεκριμένων περιοχών DNA. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι:

- Δύο συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές (~20 νουκλεοτίδια ο καθένας), συμπληρωματικοί περιοχών σε αντίθετες πλευρές των δύο αλυσίδων, έτσι ώστε να περιέχεται μεταξύ τους η DNA ακολουθία. Οι εκκινητές αυτοί μετά τον υβριδισμό με το DNA-στόχο έχουν τα 3'-OH άκρα αντικρυστά μεταξύ τους.
- Μία αλληλουχία στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών και μπορεί να έχουν μήκος 100-3500 bp.
- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ώστε να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για να βρουν οι εκκινητές τις συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του DNA.

- Τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).

Η PCR χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλιωνα μόρια του DNA, όταν θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου εναρκτηρίου μορίου (εκκινητή- primer), που συνδέεται με τη μήτρα σ' αυτό ακριβώς το σημείο. Έτσι, με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε τη DNA πολυμεράση ώστε να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA.

Μία κλασσική PCR περιέχει έναν αριθμό επαναλαμβανόμενων κυκλικών διαδικασιών για τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου, Σχήμα 7.4



**Σχήμα 7.4** Η εκθετική ενίσχυση γονιδίου με την τεχνική της PCR.

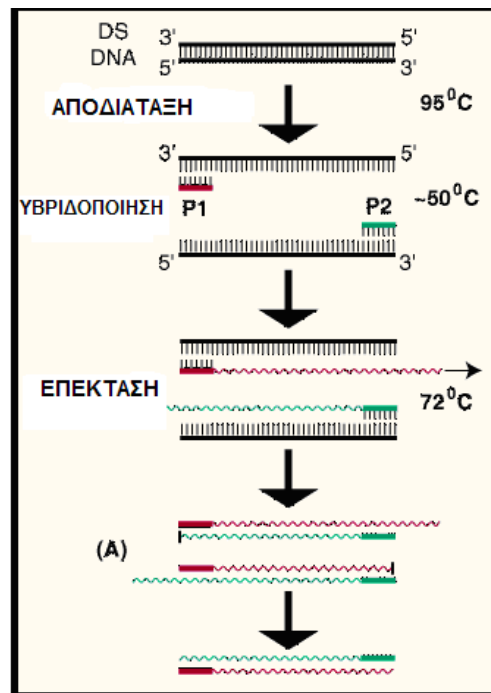
Κάθε κύκλος περιέχει τρία βήματα, Σχήματα 7.5 και 7.6:

1<sup>ο</sup> βήμα: **Αποδιάταξη (DENATURATION)**. Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας στόχου, που επιτυγχάνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία στο δοχείο αντίδρασης στους 95 °C. Στο στάδιο αυτό στο δοχείο αντίδρασης περιέχονται: τα dNTPs, η θερμοανθεκτική πολυμεράση και το ζεύγος των εκκινητών σε περίσσεια. Η διάρκεια είναι ένα περίπου λεπτό.

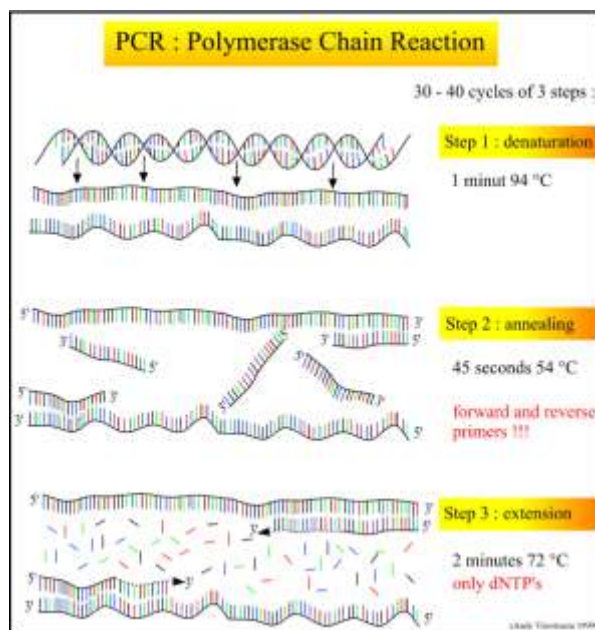
2<sup>ο</sup> βήμα: **Υβριδοποίηση (ANNEALING)**. Στο δεύτερο στάδιο, της υβριδοποίησης, η θερμοκρασία του μίγματος σταδιακά ελαττώνεται περίπου στους 55°C. Η θερμοκρασία αυτή ποικίλει ανάλογα με τις ακολουθίες. Κατά τη διάρκεια αυτού του

σταδίου οι εκκινητές σχηματίζουν ζεύγη βάσεων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου.

3<sup>ο</sup> βήμα: **Επέκταση (EXTENSION)**. Στο τρίτο στάδιο, η θερμοκρασία αυξάνεται περίπου στους 72 °C, όπου είναι και η βέλτιστη θερμοκρασία για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης. Ο χρόνος επώασης ποικίλει αναλογα με το μήκος του τμήματος στόχου. Η σύνθεση του DNA αρχίζει στο 3' -OH άκρο κάθε εκκινητή.



Σχήμα 7.5 Σχηματική παράσταση της PCR ([www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html](http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html)).



**Σχήμα 7.6** Τα διάφορα βήματα της PCR ([www.pcr.html](http://www.pcr.html)).

Η πολλαπλή PCR (Multiplex PCR) είναι μία τεχνική πολλαπλασιασμού ταυτόχρονα 2-3 διαφορετικών αλληλουχιών γονιδιώματος, συγχρόνως στην ίδια αντίδραση με διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών.

### 7.3 Πειραματική πορεία κυτταρομετρίας

#### Αντισώματα και υλικό

Αντίσωμα	Εταιρεία	Κλώνος
CD45 PeCy5	Cytognos	IMMU19.2
EPCAM-Alexa488	Biolegend	9C4
EPCAM-APC	Biolegend	9C4
EPCAM-PE	Santa Cruz	KS1/4
CK8/18	Novocastra	5D3
CK19	Biogenex	RCK108
EGFR-PE	Biolegend	AY13
Goat anti-mouse IgG-APC	Biolegend	Polyclonal
Ισοτυπικοί μάρτυρες (IgG1-PeCy5, IgG2a-PE , IgG2b-Alexa 488, IgG2b-APC)	Biolegend	Polyclonal



### 7.3.1 Έκφραση υπο-μελέτη δεικτών στην κυτταρική σειρά HT29

Τα πειράματα αφορούσαν σε βελτιστοποίηση της κυτταρομετρίας στην κυτταρική σειρά **HT29** και τα αντισώματα, την κυτταρική σειρά **HT29** με περιφερικό αίμα εμβολιασμό (spiking) σε διαφορετικές αραιώσεις, συνθήκες φθοριοχρώματα αντισωμάτων, με απώτερο σκοπό την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς και του καθορισμού του cut off value αλλά και του LOD (limit of detection).

Η κυτταρική σειρά HT29 (Cell Line Services, Γερμανία) έχει προκύψει από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου και χρησιμοποιείται ευρέως ως θετικός μάρτυρας. Σε όλα τα πειράματα τα αντισώματα έχουν προστεθεί μετά από κάλυψη των μη-εδικών θέσεων δέσμευσης με χρήση αντιορού (FcBlocker, Biolegend). Τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT-29 δεν εμφάνισαν θετικότητα στο CD45, ενώ σε πειράματα με χρήση 2γενούς αντισώματος με φθοριόχρωμα ή και με ενδοκυττάρια αντιγόνα βρέθηκε ισχυρή θετικότητα για CK8/18, CKPan, CK19, CK7, και EMA (κλώνοι BerEP4 και MOC31).

Όπως αναμενόταν, το EpCAM-Alexa488 (9C4) εκφράζεται σε άνω του 90% των ζωντανών κυττάρων της κυτταρικής σειράς HT29. Αντιθέτως, το EpCAM-APC 9C4 δεν είχε αντίστοιχα αποτελέσματα καθώς χάθηκε η έκφραση στο 80% των HT29 κυττάρων. Μετά από επισκευή του κόκκινου laser, με το οποίο ανιχνεύεται το φθοριόχρωμα, ελήφθησαν αντίστοιχα καλά αποτελέσματα. Αντιθέτως, ο δεύτερος κλώνος του EpCAM (EpCAM-PE, κλώνος KS1/4) που δοκιμάστηκε, ενώ είχε ισχυρή έκφραση στην κυτταρική σειρά, παρουσίασε ψευδή θετικότητα σε δείγμα ολικού αίματος που ελήφθη από εθελοντή. Μετά από λύση των ερυθρών και έκπλυση των κυττάρων μειώθηκε σημαντικά ο αριθμός των ψευδώς θετικών γεγονότων στο αίμα αλλά αποφασίστηκε η αντικατάσταση του από το EGFR.

### 7.3.2 Επίδραση λυτικού

Σε δείγμα από ολικό αίμα εθελοντή προστέθηκε αντίσωμα CD45 ενώ στην κυτταρική σειρά EpCAM. Προστέθηκε λυτικό διάλυμα ερυθρών και μετρήθηκαν οι αριθμοί των κυττάρων με σύστημα απόλυτης μέτρησης. Στο ολικό αίμα παρατηρήσαμε μείωση κατά 56% των κυττάρων προ και μετά λύσης, ενώ στα κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29 παρατηρήσαμε μείωση μόνο 3,7%. Ως αποτέλεσμα, η λύση δεν

επιδρούσε αρνητικά στα επιθηλιακού τύπου κύτταρα και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί.

### 7.3.3 Απομόνωση κυττάρων με Ficoll

Ο πιο συνήθης τρόπος εμπλουτισμού των εμπύρηνων κυττάρων και απομάκρυνσης των ερυθρών αποτελεί η φυγοκέντρηση παρουσία υδρόφιλου πολυσακχαρίτη (Ficoll), ο οποίος προκαλεί συγκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται μετά τη φυγοκέντρηση ολικού αίματος σε αντιπηκτικό EDTA 4 στοιβάδες: η κατώτερη που περιέχει τα ερυθρά, η επόμενη που περιέχει κοκκιοκύτταρα και μέρος του πολυσακχαρίτη, η επόμενη που περιέχει τα PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear cells) και η ανώτερη που αποτελεί το πλάσμα.

Δοκιμάστηκε σε ποιο από τα κλάσματα απομονώνονται τα επιθηλιακά κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29. Περίπου 800.000 κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29 προστέθηκαν σε 3ml αίματος υγιούς εθελοντή. Αφού διαχωρίστηκαν τα κλάσματα, τα κύτταρα επώαστηκαν με αντισώματα έναντι των CD45 και EpCAM. Ο ολικός αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε στο κυτταρόμετρο. Το 90,2% των κυττάρων της κυτταρικής σειράς HT29 βρέθηκε στο κλάσμα των PBMCs, 7,4% στο κλάσμα των κοκκιοκυττάρων και τα υπόλοιπα στο κλάσμα των ερυθρών.

### 7.3.4 Απομόνωση κυττάρων με μαγνητικά σφαιρίδια (Cellection)

Δεύτερος κοινός τρόπος εμπλουτισμού αποτελεί η απομόνωση των επιθυμητών κυττάρων με χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων. Τεχνητά παραμαγνητικά σφαιρίδια διαμέτρου 4-6μm έχουν καλυφθεί με αντίσωμα έναντι του πληθυσμού στόχου. Πραγματοποιείται επώαση, κατακράτηση του σημασμένου πληθυσμού με επώαση των κυττάρων πλησίον μαγνήτη και απομάκρυνση των υπολοίπων κυττάρων. Ο επιθυμητός πληθυσμός μπορεί να διαχωριστεί από τα σφαιρίδια και να μελετηθεί περαιτέρω. Επιλέχθηκε το προτυπωμένο σύνολο αντιδραστηρίων CELLection (Invitrogen), το οποίο περιέχει σφαιρίδια καλυμμένα με EpCAM.

Έπειτα από δοκιμές φάνηκε πως υπήρχε σημαντική απώλεια κυττάρων μετά τον εμπλουτισμό. Τροποποιήθηκαν οι κάτωθι συνθήκες: α) χειρισμός με πλατύ ρύγχος, β) επιλογή τρόπου ανακίνησης των κυττάρων και αναλογίας σφαιριδίων.

### 7.3.5 Όριο ανίχνευσης με κυτταρομετρία (LOD-Limit Of Detection)

#### 7.3.5.1 Άμεσο πρωτόκολλο

Σε ολικό αίμα με αντιπηκτικό πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού των λευκοκυττάρων με πρωτόκολλο χωρίς λύση. Το αίμα επώαστηκε με αντίσωμα έναντι του CD45 και αναλύθηκε σε κυτταρόμετρο με δυνατότητα απόλυτης μέτρησης. Η ανωτέρω διαδικασία επιτρέπει την μέτρηση του απόλυτου αριθμού. Αντίστοιχο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε στην κυτταρική σειρά HT29, όπου μετρήθηκαν τα κύτταρα έπειτα από επώαση με EpCAM. Δημιουργήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων της κυτταρικής σειράς HT29 σε διαφορετικά εύρη και αναλύθηκαν έπειτα από προσθήκη λυτικού και έκπλυση.

#### 7.3.5.2 Ενδοκυττάριο πρωτόκολλο

Δημιουργήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων της κυτταρικής σειράς HT29 σε εύρος 20.000 έως 20 που προστέθηκαν σε 3 ml αίματος. Διαχωρίστηκε ο πληθυσμός των PBMCs με Histopaque και μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων με χρήση τετραχρωμίας και αναλύθηκαν έπειτα από προσθήκη λυτικού και έκπλυση.

Το τελικό πρωτόκολλο που θα χρησιμοποιηθεί στους ασθενείς παρατίθεται ακολούθως.

### 7.3.6 Πρωτόκολλο Κυτταρομετρίας Ροής:

1. Συλλογή 15ml ολικού αίματος σε αντιπηκτικό EDTA. Μέτρηση του απόλυτου αριθμού (Partec EasyCount CD4-CD45) των λευκοκυττάρων και των ποσοστών των λευκοκυττάρων με πρωτόκολλο χωρίς λύση των κυττάρων.
2. Επίστρωση 7,5 ml ολικού αίματος ασθενούς επάνω από 7,5 ml ficoll (Lymphoprep™ STEMCELL TECHNOLOGIES Lot No 12GCS14) σε σωληνάριο των 15ml
3. Φυγοκέντρηση 30 min σε 2200 rpm (830g)
4. Μεταφορά της στοιβάδας των PBMCs σε νέο σωληνάριο και δύο διαδοχικές πλύσεις με PBS-EDTA 4mM. Η έκπλυση πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση για 10 min σε 1700 rpm (500g), απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη 15 mL με PBS-EDTA

5. Ανασύσταση των κυττάρων με 1 ml PBS-EDTA. Μέτρηση του απόλυτου αριθμού των PBMCs (Partec EasyCount CD4-CD45) και των ποσοστών των λευκοκυττάρων με πρωτόκολλο χωρίς λύση των κυττάρων. Τα αναμενόμενα αποτελέσματα έχουν λιγότερο από 10% πολυμορφοπύρηννα μετά την απομόνωση.
6. Κάλυψη μη-ειδικών θέσεων δέσμησης με 5μl/10<sup>6</sup> λευκοκύτταρα FcBlocker (Biolegend) και επώαση 20 min σε RT<sup>0</sup>.
7. Προσθήκη 5μl EpCAM-Alexa488, 5μl 7'AAD, 5μl EGFR-PE και 5μl/10<sup>6</sup> λευκοκύτταρα CD45-PerCy5 με ακόλουθη επώαση 30 min στους 4<sup>0</sup>C.
8. Από το ανωτέρω εναιώρημα, αφαιρούνται 100 ml, αραιώνονται με 1400 ml λυτικού (Quicklysis, Cytognos) και μετρούνται στο κυτταρόμετρο για να προκύψει το αποτέλεσμα του πρωτοκόλλου απευθείας μέτρησης.
9. Το υπόλοιπο εναιώρημα φυγοκεντρείται, αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 0,5ml/10<sup>6</sup> κύτταρα Fixation buffer (Biolegend). Πραγματοποιείται επώαση 20 min σε σκοτάδι.
10. Το μονιμοποιητικό απομακρύνεται με προσθήκη 10 ml PBS, φυγοκέντρηση, και 2 διαδοχικά πλυσίματα με 5 ml Perm/wash buffer 1x (Biolegend).
11. Μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου προστίθενται σε 100 ml Perm/wash buffer 1x τα πρωτογενή ενδοκυττάρια αντισώματα (CK19, CK8/18 1:30) και πραγματοποιείται επώαση 20 min σε σκοτάδι.
12. Γίνονται 2 εκπλύσεις με 5ml Perm/wash buffer 1x και προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα σε 100 ml Perm/wash buffer (Goat anti-mouse IgG-APC, 1:30). Επώαση 20 min σε σκοτάδι.
13. Ακολουθούν 2 διαδοχικά πλυσίματα με 5 ml Perm/wash buffer 1x, τελική ανασύσταση του ιζήματος των κυττάρων σε 1.500 ml PBS και μέτρηση στο κυτταρόμετρο.

## 7.4 Πειραματική πορεία μοριακής ανάλυσης

### Μοριακές Τεχνικές (PCR, Nested PCR, RT-PCR)

Για την ανίχνευση των μεταγράφων στόχων χρησιμοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή. Επιλέχθηκαν γονίδια που δεν μεταγράφονται σε κύτταρα που φυσιολογικά απαντώνται στο αίμα. Επιλέχθηκαν τα

*CK20*, *CK19*, *CEA*, και *EGFR*, ενώ ως εσωτερικός μάρτυρας επιλέχθηκε το γονίδιο *B2MG* που μεταγράφεται και στα λευκοκύτταρα. Για τα γονίδια *CK19* και *EGFR* πραγματοποιήθηκε 2<sup>η</sup> PCR με εσωτερικούς εκκινήτες (Nested-PCR). Το *CEA* εγκαταλείφθηκε, αφού τα αποτελέσματα ήταν μη επαναλήψιμα και μη αναπαραγώγιμα.

Βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες για την RT-PCR *CK19*-outer με χρήση της Platinum polymerase, ενώ έγιναν και αντίστοιχα πειράματα με την Promega GoTag polymerase για να διαπιστωθεί εάν μπορούμε να απαλλαγούμε από τα unspecific products που λαμβάναμε από την Platinum polymerase.

#### 7.4.1 Απομόνωση CTCs' mRNA

1. Συλλογή 15ml ολικού αίματος σε αντιπηκτικό EDTA. Μέτρηση του απόλυτου αριθμού (Partec EasyCount CD4-CD45) των λευκοκυττάρων και των ποσοστών των λευκοκυττάρων με πρωτόκολλο χωρίς λύση των κυττάρων.
2. Επίστρωση 7.5 ml ολικού αίματος ασθενούς επάνω από 7.5 ml ficoll (Lymphoprep<sup>TM</sup> STEMCELL TECHNOLOGIES Lot No 12GCS14) σε σωληνάριο των 15ml.
3. Φυγοκέντρηση 30 min σε 2200 rpm (830g).
4. Μεταφορά της στοιβάδας των PBMCs σε νέο σωληνάριο και δύο διαδοχικές πλύσεις με PBS-EDTA 4mM. Η έκπλυση πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση για 10 min σε 1700 rpm (500g), απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη 15 ml με PBS-EDTA.
5. Ανασύσταση των κυττάρων με 1 ml PBS-EDTA. Μέτρηση του απόλυτου αριθμού των PBMCs (Partec EasyCount CD4-CD45) και των ποσοστών των λευκοκυττάρων με πρωτόκολλο χωρίς λύση των κυττάρων. Τα αναμενόμενα αποτελέσματα έχουν λιγότερο από 10% πολυμορφοπύρηννα μετά την απομόνωση.
6. Εμπλουτισμός των επιθηλιακών κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια Epithelial enrichment με immunomagnetic beads (Invitrogen<sup>TM</sup> DYNAL<sup>R</sup> Cat.No 162.03) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
7. Απομόνωση mRNA με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια προσδεδεμένα με oligodT<sub>25</sub> collection mRNA με immunomagnetic oligodT<sub>25</sub> (Invitrogen<sup>TM</sup> DYNAL<sup>R</sup> Cat.No 610.11/610.12) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

8. Φύλαξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για περαιτέρω μοριακή ανάλυση.

#### 7.4.2 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Προετοιμάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα

##### Mix A:

0,1λ primers (hexamers) (300μgr ή 3μgr/μL) x αριθμό δειγμάτων

1λ dNTPs (10mM) x αριθμό δειγμάτων

0,9 λ DEPC H<sub>2</sub>O x αριθμό δειγμάτων

##### Mix B:

4λ buffer first strand x αριθμό δειγμάτων

2λ DTT (0,1M) x αριθμό δειγμάτων

1λ RNAout (40U/μL) x αριθμό δειγμάτων

Σε κάθε δείγμα από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  που περιέχει 10λ απομονωμένο mRNA με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια προσδεδεμένα σε oligodT<sub>25</sub> (βήμα 5.2.1.7 και 5.2.1.8), προστέθηκαν 2λ από το mixA και επωάστηκαν σε PCR στο ακόλουθο πρόγραμμα:

65 <sup>0</sup> C για 5´
HOLD 4 <sup>0</sup> C enter
Προσθήκη 7λ σε κάθε δείγμα από το mixB
50 <sup>0</sup> C για 5´
HOLD 25 <sup>0</sup> C
Προσθήκη 1λ SS Transcriptase σε κάθε δείγμα
42 <sup>0</sup> C για 60´
70 <sup>0</sup> C για 15´
HOLD 4 <sup>0</sup> C enter

Μετά το τέλος του προγράμματος πραγματοποιήθηκε είτε αποθήκευση των cDNAs των δειγμάτων στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ή ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση των μεταγράφων στόχων των επιλεγθέντων γονιδίων που δεν μεταγράφονται σε κύτταρα που φυσιολογικά απαντώνται στο αίμα, ήτοι τα *CK20*, *CK19*, *CEA*, και *EGFR*. Για τον έλεγχο της απομόνωσης και του RT επιλέχθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας τα μετάγραφα του γονιδίου B2MG, το οποίο μεταγράφεται και στα λευκοκύτταρα.

### 7.4.3 PCR

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του cDNA (2λ) χρησιμοποιώντας μείγμα τύπου mastermix ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι διακυμάνσεις. Το cDNA από τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29Blank χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, ενώ ως αρνητικός το cDNA από εθελοντή και ddH<sub>2</sub>O ως δείγμα για τον έλεγχο επιμολύσεων.

#### 7.4.3.1 CK19, CK20, B2MG

PCR ddH <sub>2</sub> O	13,25λ x ανά δείγμα
PCR buffer (5x)	5λ x ανά δείγμα
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3λ x ανά δείγμα
Primer Forward 10μM	0,5λ x ανά δείγμα
Primer Reverse 10μM	0,5λ x ανά δείγμα
dNTPs 10mM	0,5λ x ανά δείγμα
GoTaq Polymerase (5U/μl)	0,25λ x ανά δείγμα
Σύνολο	23λ ανά δείγμα
cDNA	2λ ανά δείγμα

94° 2'	} 40x
94° 30''	
58° 30''	
72° 30''	
72° 5'	
HOLD 4°C	

#### 7.4.3.2 EGFR

PCR ddH <sub>2</sub> O	14,25λ x ανά δείγμα
PCR buffer (5x)	5λ x ανά δείγμα
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2λ x ανά δείγμα
Primer Forward 10μM	0,5λ x ανά δείγμα
Primer Reverse 10μM	0,5λ x ανά δείγμα
dNTPs 10mM	0,5λ x ανά δείγμα
GoTaq Polymerase (5U/μl)	0,25λ x ανά δείγμα
Σύνολο	23λ ανά δείγμα
cDNA	2λ ανά δείγμα

94° 2'	
94° 30''	} 5x
60° 30''	
72° 30''	
94° 30''	} 30x
55° 30''	
72° 30''	
72° 5'	
HOLD 4°C	

### 7.4.3.3 CK19 Nested PCR

PCR ddH <sub>2</sub> O	13,25λ x ανά δείγμα
PCR buffer (5x)	5λ x ανά δείγμα
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3λ x ανά δείγμα
Primer Forward 10μM	0,5λ x ανά δείγμα
Primer Reverse 10μM	0,5λ x ανά δείγμα
dNTPs 10mM	0,5λ x ανά δείγμα
GoTaq Polymerase (5U/μl)	0,25λ x ανά δείγμα
Σύνολο	23λ ανά δείγμα
cDNA	2λ ανά δείγμα

94° 2'	
94° 30''	} 30x
61° 30''	
72° 30''	
72° 5'	
HOLD 4°C	

### 7.4.3.4 Nested EGFR

PCR ddH <sub>2</sub> O	14,25λ x ανά δείγμα
PCR buffer (5x)	5λ x ανά δείγμα
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2λ x ανά δείγμα
Primer Forward 10μM	0,5λ x ανά δείγμα
Primer Reverse 10μM	0,5λ x ανά δείγμα
dNTPs 10mM	0,5λ x ανά δείγμα
GoTaq Polymerase (5U/μl)	0,25λ x ανά δείγμα
Σύνολο	23λ ανά δείγμα
cDNA	2λ ανά δείγμα



94 <sup>0</sup> 2'	
94 <sup>0</sup> 30''	} 5x
60 <sup>0</sup> 30''	
72 <sup>0</sup> 30''	
94 <sup>0</sup> 30''	} 25x
55 <sup>0</sup> 30''	
72 <sup>0</sup> 30''	
72 <sup>0</sup> 5'	
HOLD 4 <sup>0</sup> C	

Τα προϊόντα των PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% με TBE buffer 1x.

## 7.5 Ηθικά θέματα

Το πρωτόκολλο της μελέτης εμπίπτει στις ερευνητικές εργασίες του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ». Επίσης, η μελέτη εμπίπτει στα πλαίσια δικαιοδοσίας της Επιτροπής Δεοντολογίας και Ηθικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ», από όπου και έχει παρθεί η σχετική έγκριση.

## 7.6 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία δεδομένων

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS statistics for Windows Version: 20.0. Για ανεξάρτητα δείγματα έγινε ο στατιστικός έλεγχος t-test που αφορούσε την σύγκριση της μέσης τιμής συνεχών παραμέτρων (ηλικία, αριθμός κυττάρων) στις κατηγορίες ασθενών-υγιών μαρτύρων (ποιοτικές μεταβλητές) και για κατηγορικές μεταβλητές το Fisher's exact test. Για την συσχέτιση δύο μεταβλητών εφαρμόστηκε ο στατιστικός έλεγχος Spearman correlation (rho). Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν διαφορές με  $p < 0.05$ .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Για τη μοριακή ανάλυση των μεταγράφων στόχων χρησιμοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) μετά από αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR). Επιλέχθηκαν γονίδια που δεν μεταγράφονται σε κύτταρα που φυσιολογικά απαντώνται στο αίμα. Τα γονίδια αυτά ήταν τα *CK19*, *CK20* και ο *EGFR*, ενώ ως εσωτερικός μάρτυρας επιλέχθηκε το γονίδιο *B2MG* που μεταγράφεται και στα λευκοκύτταρα. Στη μοριακή ανάλυση συμπεριελήφθησαν 68 δείγματα ασθενών και 16 φυσιολογικών, εκ των οποίων 37 ήταν γυναίκες και 47 άνδρες, αναλογία ανδρών/γυναικών ~1:1, ηλικίας 51 έως 87 ετών (μέσος όρος ηλικίας τα 69 έτη-mean 69), Α) προ χειρουργείου και Β) την επομένη του χειρουργείου.

Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των όγκων παρατίθενται κάτωθι (Πίνακας 1).

*Πίνακας 1: Ιστολογικά αποτελέσματα ασθενών με δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως παθολογικά. LN (%) ποσοστό λεμφαδένων με διήθηση από το καρκίνωμα.*

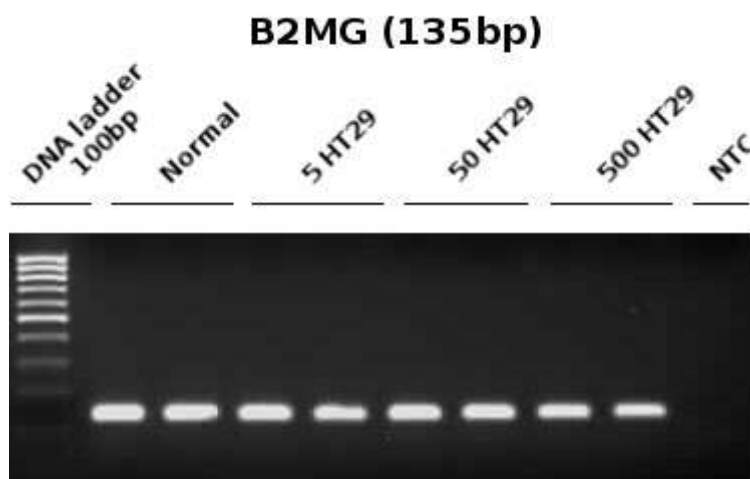
A/A	Ιστολογική	Εντόπιση	TNM T	TNM N	TNM M	STAGE	GRADE	LN (%)
1	Αδενοκαρκίνωμα	Ορθό	2	0	X	1	2	0,0%
2	Αδενοκαρκίνωμα	Τυφλό	4a	0	X	2b	1	0,0%
3	Αδενοκαρκίνωμα	Ανιόν κόλον	3	1	1	3b	2	21,4%
4	Αδενοκαρκίνωμα	Σιγμοειδές	3	2a	1	3b	2	30,8%
5	Καρκίνωμα με παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων δίκην σφραγιστήρος	Ανιόν κόλον	3	2b	1	3c	3	52,4%
6	Αδενοκαρκίνωμα	Ορθοσιγμοειδές	3	0	X	2a	2	0,0%
7	Αδενοκαρκίνωμα	Ορθοσιγμοειδές	3	0	X	2a	2	0,0%
8	Αδενοκαρκίνωμα	Τυφλό	2	0	X	2a	2	0,0%
9	Αδενοκαρκίνωμα	Τυφλό			X			
10	Αδενοκαρκίνωμα	Τυφλό	Tis	0	X	0		0,0%
11	Αδενοκαρκίνωμα	Ορθό	3	0	X	2a	2	0,0%
12	Αδενοκαρκίνωμα	Σιγμοειδές	3	0	X	2a	2	0,0%
13	Αδενοκαρκίνωμα	Κατιόν κόλον	1	0	X	1	2	0,0%

14	Αδενοκαρκίνωμα	Σιγμοειδές	3	0	X	2a	2	0,0%
15	Αδενοκαρκίνωμα	Ορθοσιγμοειδές	3	1b	1	3b	2	8,0%
16	Αδενοκαρκίνωμα	Τυφλό	3	0	X	2a		0,0%
17	Αδενοκαρκίνωμα	Τυφλό	3	0	X	2a	2	0,0%
18	Αδενοκαρκίνωμα	Χωρίς παρασκεύασμα					2	
19	Αδενοκαρκίνωμα	Τυφλό	Tis	0	X	0		0,0%
20	Αδενοκαρκίνωμα	Σιγμοειδές	4a	0	X	2b	2	0,0%
21	Αδενοκαρκίνωμα	Στομάχου	3	0	X	2a	2	0,0%
22	Αδενοκαρκίνωμα	Σιγμοειδές	3	1a	1	3a	2	7,1%
23	Αδενοκαρκίνωμα	Σιγμοειδές	3	0	X	2a	2	0,0%
24	Αδενοκαρκίνωμα	Σιγμοειδές	3	0	X	2a	2	0,0%
25	Αδενοκαρκίνωμα	Ορθό	3	1b	1	3b	2	14,3%
26	Αδενοκαρκίνωμα	Τυφλό	3	0	X	2a	2	0,0%
27	Αδενοκαρκίνωμα	Ορθοσιγμοειδές	3	1c	1	3c	2	12,5%
28	Αδενοκαρκίνωμα	Κατιόν κόλον	4a	1c	X	3b	2	33,3%
29	Αδενοκαρκίνωμα	Σιγμοειδές	3	2a	1	3b	2	22,7%
30	Αδενοκαρκίνωμα	Ορθό	Tis	0	1	C2	2	3,6%
31	Αδενοκαρκίνωμα	Χωρίς παρασκεύασμα						
32	Αδενοκαρκίνωμα	Κατιόν κόλον	3	0	X	2a	2	0,0%
33	Αδενοκαρκίνωμα	Ανιόν κόλον	4a	0	X	2b	2	0,0%
34	Αδενοκαρκίνωμα	Χωρίς παρασκεύασμα						
35	Αδενοκαρκίνωμα	Χωρίς παρασκεύασμα						
36	Αδενοκαρκίνωμα	Τυφλό	4b	1a	1	3c	2	1,6%
37	Αδενοκαρκίνωμα	Ανιόν κόλον	3	0	X	2a	2	0,0%
38	Αδενοκαρκίνωμα	Ανιόν κόλον	3	1a	1	3b	2	3,6%
39	Αδενοκαρκίνωμα	Σπληνική καμπή	2	0	X	1	1	0,0%
40	Αδενοκαρκίνωμα	Ορθό	3	0	X	2a	2	0,0%

### Γονίδιο ελέγχου

Ενίσχυση του μεταγράφου mRNA του γονιδίου ελέγχου *B2MG* πραγματοποιήθηκε τόσο για τα δείγματα από τους ασθενείς, όσο και για τα δείγματα φυσιολογικών εθελοντών. Επιτυχής ενίσχυση για τα μετάγραφα mRNA της *B2MG* κατέστη εφικτή

για το σύνολο των δειγμάτων (n=84). Ενδεικτικά παρατίθενται αποτελέσματα από πήκτωμα αγαρόζης των πειραμάτων προτύπωσης της τεχνικής ανίχνευσης στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1: Σε 7.5ml περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης HT29 κυττάρων και πραγματοποιήθηκε απομόνωση των PBMCs, απομόνωση των EpCAM+ κυττάρων με μαγνητικά σφαιρίδια και απομόνωση mRNA με μαγνητικά σφαιρίδια προσδεσμένα με oligo-dT. Πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση με PCR. Ανιχνεύθηκαν μετάγραφα του γονιδίου ελέγχου B2MG σε όλα τα δείγματα.

### Κυτταροκερατίνες

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση για ανίχνευση mRNA μεταγράφων των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυτταροκερατίνες CK19 και CK20. Ενδεικτικά αποτελέσματα πηκτώματος αγαρόζης για τα πειράματα προτύπωσης παρατίθενται στα παρακάτω γραφήματα (Γράφημα 2, Γράφημα 3, Γράφημα 4, Γράφημα 5).

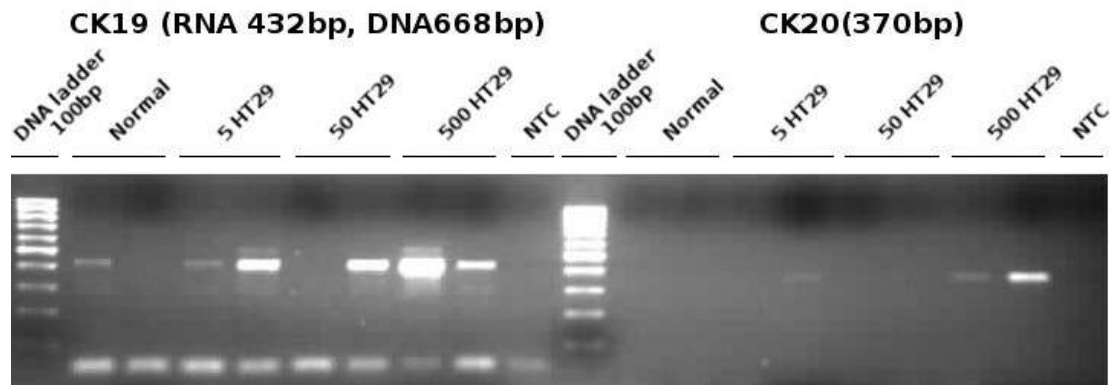
Αρχικά, για την CK19 το κατώτατο όριο ανίχνευσης ήταν τα 50 κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29 ανά 7.5 mL περιφερικού αίματος (Γράφημα 3). Με τη χρήση ενός δεύτερου σταδίου ενίσχυσης (nested PCR, Γράφημα 5) το κατώτατο όριο ήταν τα 5 κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29 ανά 7.5 mL. Στα δείγματα μαρτύρων αναγνωρίστηκε ενίσχυση της CK19 σε 9/13 (69%), (Πίνακας 2, Γράφημα 2).

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ενίσχυσης mRNA κυτταροκερατινών.

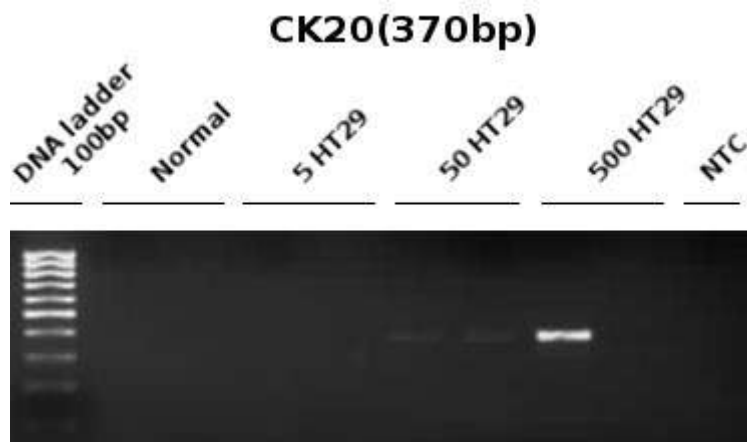
<b>CK19</b>	<b>Θετικά</b>	<b>+/-</b>	<b>Αρνητικά</b>	<b>Σύνολο</b>
A. Προ χειρουργείου n=38	7 (18.5%)	6 (15.8%)	25 (65.8%)	100%
B. Μετά χειρουργείου n=26	3 (11.1%)	4 (15.4%)	19 (73.1%)	100%
Υγιείς Μάρτυρες n=16	2 (12.5%)	2 (12.5%)	12 (75%)	100%
<b>CK19 nested</b>	<b>Θετικά</b>	<b>+/-</b>	<b>Αρνητικά</b>	<b>Σύνολο</b>
A. Προ χειρουργείου n=38	21 (55.3%)	8 (21.1%)	9 (23.7%)	100%
B. Μετά χειρουργείου n=26	10 (38.5%)	6 (23.1%)	10 (38.5%)	100%
Υγιείς Μάρτυρες n=16	5 (31.3%)	1 (6.2%)	10 (62.5%)	100%
<b>CK20</b>	<b>Θετικά</b>	<b>+/-</b>	<b>Αρνητικά</b>	<b>Σύνολο</b>
A. Προ χειρουργείου n=38	1 (2.6%)	0 (0%)	37 (97.4%)	100%
B. Μετά χειρουργείου n=26	1 (3.8%)	0 (0%)	25 (96.2%)	100%
Υγιείς Μάρτυρες n=16	0 (0%)	0 (0%)	16 (100%)	100%

Όπως φαίνεται με χρήση 2ης διαδοχικής PCR (nested) για την έκφραση του *CK19* γονιδίου, αυξήθηκε η ευαισθησία της έκφρασης του. Παρατηρήθηκε ωστόσο έκφραση του *CK19* γονιδίου και στους υγιείς μάρτυρες. Το ποσοστό των υγιών-μαρτύρων στην έκφραση του *CK20* γονιδίου ήταν αρνητικό σε ποσοστό 100%, ενώ στους ασθενείς αναγνωρίστηκε έκφραση μόνο σε έναν ασθενή στα δείγματα προ και μετά χειρουργείου. Στατιστικά σημαντική αύξηση στα παθολογικά δείγματα αναγνωρίστηκε μόνο με την ανίχνευση των *CK19* μεταγράφων ( $p=0.024$ ) με την nested μέθοδο, με ασθενή συσχέτιση με το στάδιο του όγκου (Grade,  $p=0.012$ ).

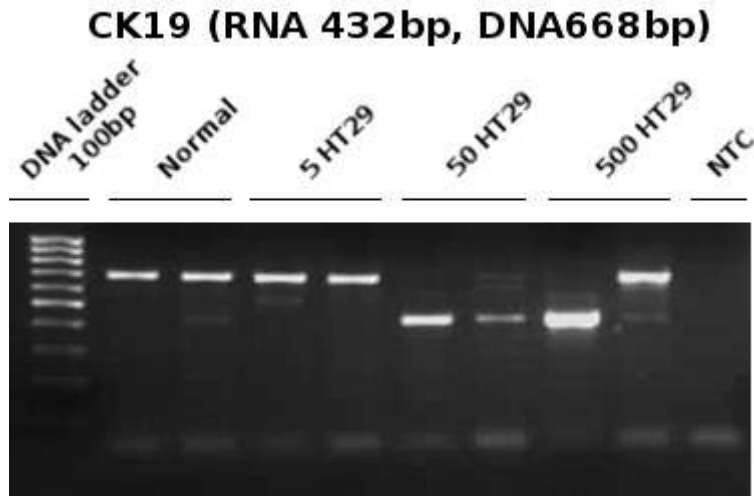
Μεγαλύτερη ευαισθησία (SN) παρουσίασε η *CK19* nested (67.6%) με ειδικότητα (SP) 66.2%. Για τις *CK20* και την απλή PCR για την *CK19* τα ποσοστά ήταν αρκετά χαμηλότερα (SN: 2.9%, 30.9%, SP: 100%, 75%).



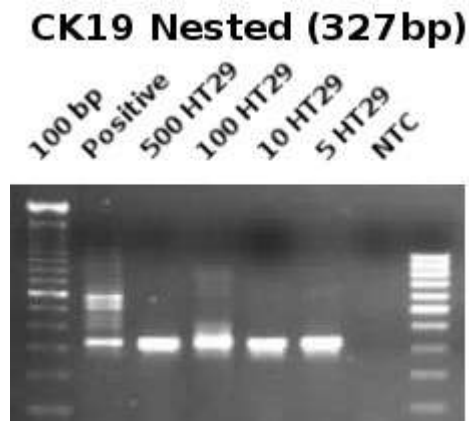
Γράφημα 2: Με την ανωτέρω μεθοδολογία πραγματοποιήθηκε ενίσχυση γονιδίων που εκφράζονται σε επιθηλιακά κύτταρα. Ανιχνεύθηκαν μετάγραφα των CK19 και CK20 χωρίς να υπάρχει ομοιόμορφη έκφραση τους, ενώ ανιχνεύθηκε και μικρή ποσότητα CK19 στο δείγμα από δείγμα φυσιολογικού εθελοντή.



Γράφημα 3: Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών απομόνωσης και της PCR η έκφραση του CK20 κατέστη εφικτό να ανιχνευθεί όταν υπήρχαν τουλάχιστον 50 HT29 κύτταρα σε 7.5ml περιφερικού αίματος.



Γράφημα 4: Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών απομόνωσης και της PCR η έκφραση του CK19 κατέστη εφικτό να ανιχνευθεί όταν υπήρχαν τουλάχιστον 50 HT29 κύτταρα σε 7.5ml. περιφερικού αίματος.

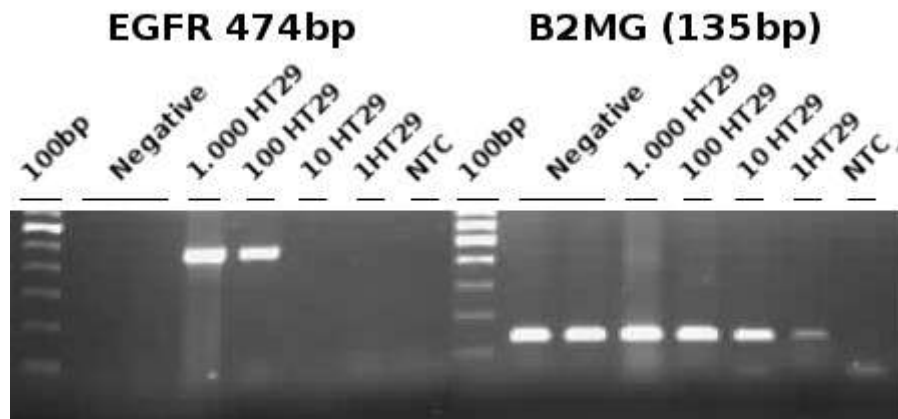


Γράφημα 5: Με χρήση 2ής διαδοχικής PCR (nested) η έκφραση του CK19 κατέστη εφικτό να ανιχνευθεί όταν υπήρχαν τουλάχιστον 5 HT29 κύτταρα σε 7.5ml. περιφερικού αίματος.

## EGFR

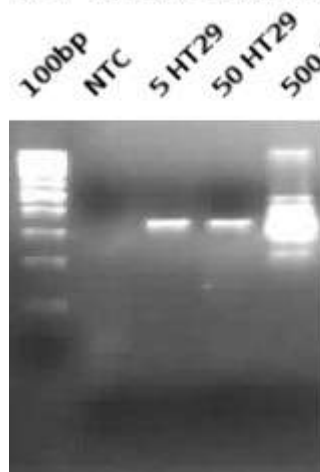
Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση για ανίχνευση μεταγράφων του *EGFR* γονιδίου. Ενδεικτικά αποτελέσματα πηκτώματος αгарόζης για τα πειράματα προτύπωσης παρατίθενται στα παρακάτω γραφήματα (Γράφημα 2, Γράφημα 3). Για τον EGFR το κατώτατο όριο ανίχνευσης ήταν τα 100 κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29 σε 7.5

mL περιφερικού αίματος. Με τη χρήση ενός δεύτερου σταδίου ενίσχυσης (nested PCR, Γράφημα 5) το κατώτατο όριο ήταν τα 5 κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29 ανά 7.5 mL. Στα δείγματα μαρτύρων αναγνωρίστηκε ενίσχυση του *EGFR* μόνο με την nested PCR σε 3/16 (18.8%) (Πίνακας 3, Γράφημα 7).



Γράφημα 6: Με την ανωτέρω μεθοδολογία πραγματοποιήθηκε ενίσχυση *EGFR*. Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών απομόνωσης και της PCR η έκφραση του κατέστη εφικτό να ανιχνευθεί όταν υπήρχαν τουλάχιστον 100 HT29 κύτταρα σε 7.5ml περιφερικού αίματος.

### EGFR Nested (322bp)



Γράφημα 7: Με χρήση 2ής διαδοχικής PCR (nested) η έκφραση του *EGFR* κατέστη εφικτό να ανιχνευθεί όταν υπήρχαν τουλάχιστον 5 HT29 κύτταρα σε 7.5ml. περιφερικού αίματος.



Όπως φαίνεται στον πίνακα 2 το ποσοστό των υγιών-μαρτύρων στην έκφραση του *EGFR* γονιδίου ήταν αρνητικό σε ποσοστό 100%, ομοίως 100% ασθενών προ και μετά χειρουργείου. Ωστόσο, όπως φαίνεται (Πίνακας 3) με χρήση 2ης διαδοχικής PCR (nested) για την έκφραση του *EGFR* γονιδίου, αυξήθηκε η ευαισθησία της έκφρασης του. Παρατηρήθηκε έκφραση του *EGFR* γονιδίου και στους υγιείς μάρτυρες. Η ανίχνευση *EGFR* nested παρουσίασε SN: 22.1%, SP: 71.2%.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ενίσχυσης mRNA *EGFR*

<i>EGFR</i>	Θετικά	+/-	Αρνητικά	Σύνολο
A. Προ χειρουργείου n=38	0 (0%)	0 (0%)	38 (100%)	100%
B. Μετά χειρουργείου n=26	0 (0%)	0 (0%)	26 (100%)	100%
Υγιείς Μάρτυρες n=16	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	100%
<i>EGFR</i> nested	Θετικά	+/-	Αρνητικά	Σύνολο
A. Προ χειρουργείου n=38	3 (7.9%)	5 (13.2%)	30 (78.9%)	100%
B. Μετά χειρουργείου n=26	1 (3.8%)	6 (23.1%)	19 (73.1%)	100%
Υγιείς Μάρτυρες n=16	3 (18.8%)	0%	13 (81.2%)	100%

Πίνακας 4: Συνοπτική παράθεση του μοριακού προφίλ των γονιδίων *CK 19*, *CK 20*, *EGFR*, *B2MG* ανά α/α ασθενών A) προ χειρουργείου, B) μετά χειρουργείο και της διάγνωσης.

α/α	<i>CK 19</i>	Nested	<i>CK 20</i>	<i>EGFR</i>	Nested	<i>B2MG</i>	ΔΙΑΓΝΩΣΗ
1A	-	(dim+)	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
1B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
2A	-	(dim+)	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
2B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
3A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
3B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
4A	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
5A	+	+	-	-	-	+	Καρκίνωμα με παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων δίκην σφραγιστήρος
6A	+	+	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
7A	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
8A	+	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα

9A	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
10A	+	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
10B	+	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
11A	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
11B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
12A	+	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
12B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
13A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
13B	-	+	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
14A	+	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
14B	+/-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
15A	+/-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
15B	+	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
16A	+/-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
16B	+/-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
17A	+	+	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
17B	+/-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
18A	+/-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
18B	+/-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
19A	+/-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
19B	+/-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
20A	+/-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
20B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
21A	+/-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
21B	-	(dim+)	-	-	+/-	+	Αδενοκαρκίνωμα
22A	-	(dim+)	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
22B	-	-	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
23A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
23B	-	(dim+)	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
24A	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
24B	-	(dim+)	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
25A	-	(dim+)	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
25B	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
26A	-	(dim+)	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
26B	-	(dim+)	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
27A	-	(dim+)	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
27B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
28A	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
28B	-	+	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα

29A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
29B	-	-	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
30A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
30B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
31A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
31B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
32A	-	-	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
32B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
33A	-	+	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
33B	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
34A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
35A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
36A	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
36B	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
37A	-	+	+	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
37B	-	-	+	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα
38A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
38B	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
40A	-	-	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
40B	-	+	-	-	-	+	Αδενοκαρκίνωμα
41A	-	+	-	-	+	+	Αδενοκαρκίνωμα

## ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Στην ανάλυση με κυτταρομετρία ροής συμπεριελήφθησαν 78 δείγματα, εκ των οποίων 33 ήταν γυναίκες και 45 άνδρες, αναλογία ανδρών/γυναικών ~1:1, ηλικίας 51 έως 87 ετών (μέσος όρος ηλικίας τα 69 έτη-mean 69), Α) προ χειρουργείου και Β) την επομένη του χειρουργείου, στα οποία περιλαμβάνονταν και 12 δείγματα υγιών μαρτύρων, σύμφωνα με το Πρωτόκολλο της διδακτορικής διατριβής (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Συνοπτική παράθεση δημογραφικών στοιχείων των ασθενών

Ηλικία (μέση)	66,75
Μέγιστη	87
Ελάχιστη	20
SD	16,27
Φύλο	
Άνδρες	45
Γυναίκες	33
Σύνολο	78

### Επίδραση λυτικού

Σε δείγμα από ολικό αίμα εθελοντή προστέθηκε αντίσωμα CD45, ενώ στην κυτταρική σειρά ErCAM. Προστέθηκε λυτικό διάλυμα ερυθρών και μετρήθηκαν οι αριθμοί των κυττάρων με σύστημα απόλυτης μέτρησης. Στο ολικό αίμα παρατηρήσαμε μείωση κατά 56% των κυττάρων προ και μετά λύσης, ενώ στα HT29 μείωση μόνο 3,7%. Ως αποτέλεσμα, η λύση δεν επιδρούσε αρνητικά στα επιθηλιακού τύπου κύτταρα και μπορούσε να χρησιμοποιηθεί.

### Εντόπιση επιθηλιακών κυττάρων κατά την απομόνωση με Ficoll

Δοκιμάστηκε σε ποιο από τα κλάσματα απομονώνονται τα επιθηλιακά κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29. Περίπου 25.000 κύτταρα από την κυτταρική σειρά HT29 προστέθηκαν σε 3ml αίματος υγιούς εθελοντή. Αφού διαχωρίστηκαν τα κλάσματα, τα κύτταρα επώαστηκαν με αντισώματα έναντι των CD45 και ErCAM. Ο ολικός αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε στο κυτταρόμετρο. Το 80% των κυττάρων από την κυτταρική σειρά HT29 βρέθηκε στο κλάσμα των PBMCs, 18% στο κλάσμα των κοκκιοκυττάρων και τα υπόλοιπα στο κλάσμα των ερυθρών (Γράφημα 8).

### Επιλογή αντισωμάτων για την ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν στη βελτιστοποίηση της κυτταρομετρίας στην κυτταρική σειρά HT29 σε περιφερικό αίμα εμβολιασμός

(spiking) σε διαφορετικές αραιώσεις, συνθήκες, και φθοριοχρώματα αντισωμάτων. Τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29 δεν εμφάνισαν θετικότητα στο CD45, ενώ σε πειράματα με χρήση 2γενούς αντισώματος με φθοριόχρωμα ή και με ενδοκυττάρια αντιγόνα βρέθηκε ισχυρή θετικότητα για CK8/18, CKPan, CK19, CK7, και EMA (Γράφημα 9). Ο βέλτιστος συνδυασμός αντισωμάτων για CKs ήταν η χρήση των CK8/18 και CK19 (Γράφημα 9). Όπως αναμενόταν, το EpCAM-Alexa488 (9C4) εκφράζεται σε άνω του 90% των άθικτων (ζώντων) κυττάρων της κυτταρικής σειράς HT29, (Γράφημα 8). Ο δεύτερος κλώνος του EpCAM (EpCAM-PE, κλώνος KS1/4) που δοκιμάστηκε, ενώ είχε ισχυρή έκφραση στα κύτταρα της κυτταρικής σειράς HT29, παρουσίασε ψευδή θετικότητα σε δείγμα ολικού αίματος που ελήφθη από εθελοντή. Μετά από λύση των ερυθρών και έκπλυση των κυττάρων μειώθηκε σημαντικά ο αριθμός των ψευδώς θετικών γεγονότων στο αίμα, αλλά αποφασίστηκε η αντικατάσταση του από τον EGFR που ανήκει στις μεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται σε υψηλό βαθμό στα καρκινώματα του παχέος εντέρου (Γράφημα 10, Γράφημα 11).

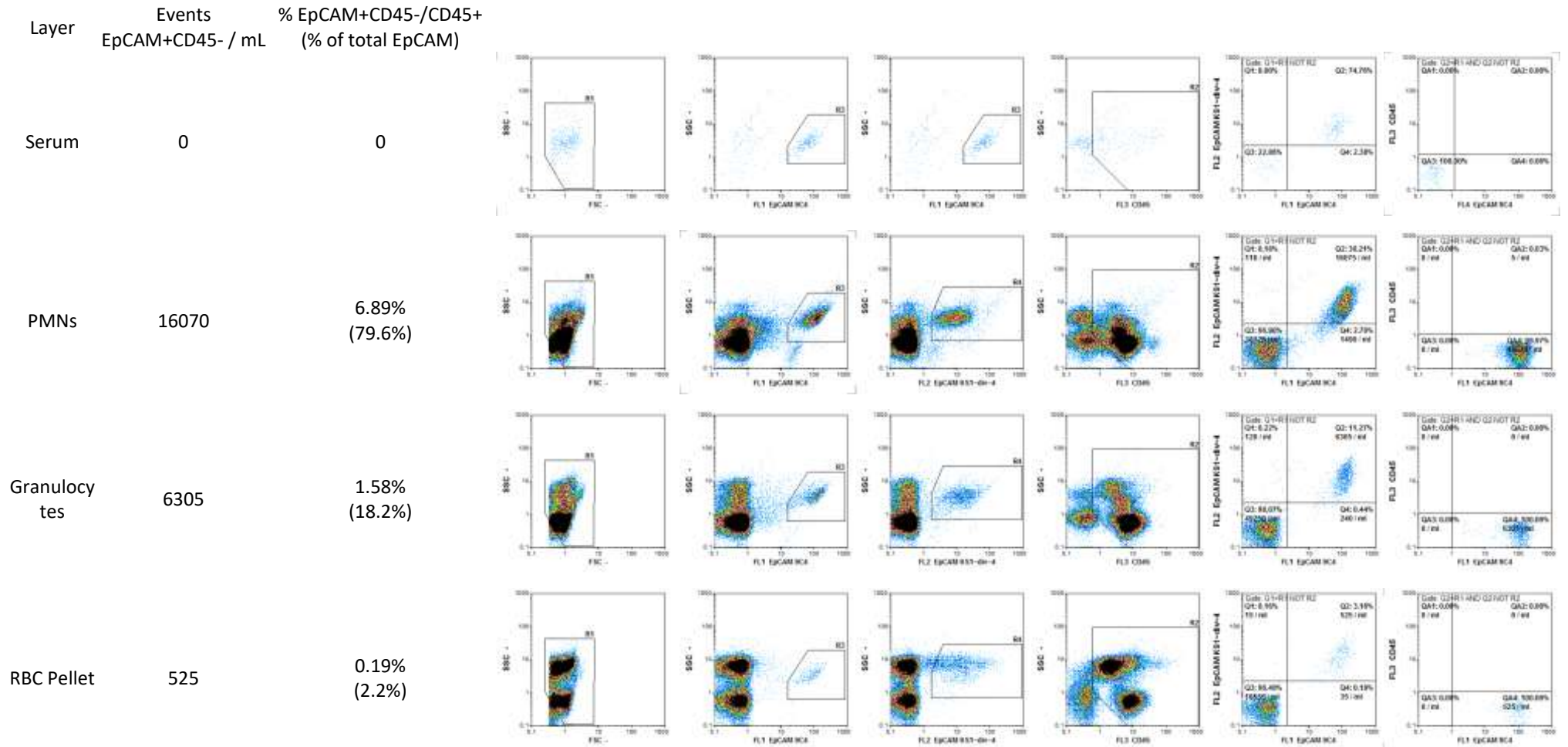
### **Όριο ανίχνευσης με κυτταρομετρία (LOD- Limit of Detection)**

#### **Άμεσο πρωτόκολλο**

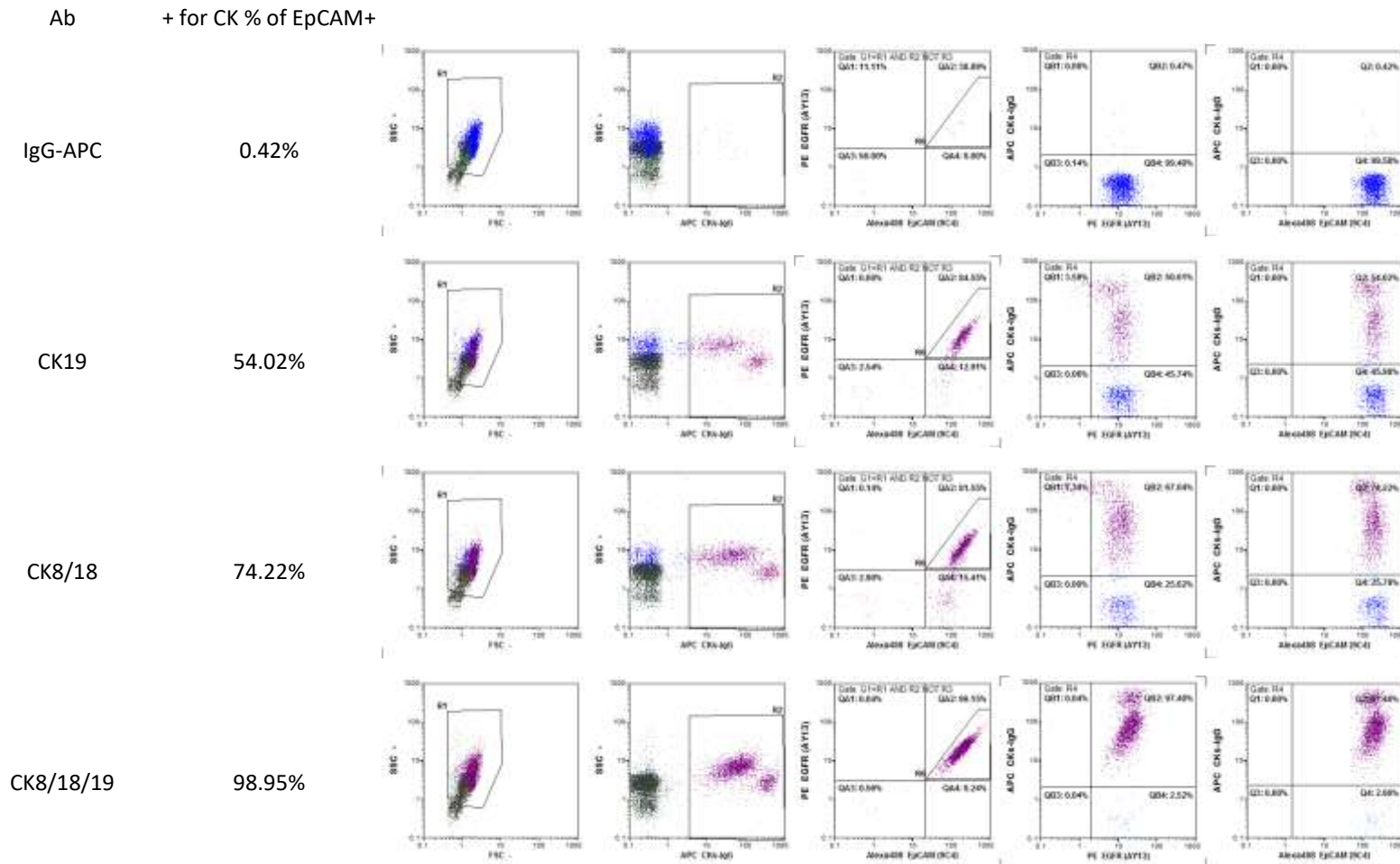
Δημιουργήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων της κυτταρικής σειράς HT29 σε εύρος 20.000 έως 20 κύτταρα που προστέθηκαν σε 3 ml αίματος. Διαχωρίστηκε ο πληθυσμός των PBMCs με Histopaque και μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων με χρήση τριχρωμίας έναντι EpCAM, EGFR και CD45 + 7AAD. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη κυττάρων της κυτταρικής σειράς HT29 σε γνωστή συγκέντρωση και μέτρηση του αριθμού τους από το 1/10 των PBMCs που απομονώθηκαν. Το 1/3 των αναμενόμενων κυττάρων αναγνωρίστηκε μέχρι και το όριο των 20 αναμενόμενων κυττάρων ανά mL ( LOD 20 cells/mL), (Γράφημα 10).

#### **Ενδοκυττάριο πρωτόκολλο**

Δημιουργήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων της κυτταρικής σειράς HT29 σε εύρος 10.000 έως 5 κύτταρα ανά 1 ml αίματος και με χρήση τετραχρωμίας έναντι EpCAM, EGFR και CD45 + 7AAD CKs. Το 1/10 των αναμενόμενων κυττάρων αναγνωρίστηκε μέχρι και το όριο των 20 αναμενόμενων κυττάρων ανά mL ( LOD 20 cells/mL), (Γράφημα 11).



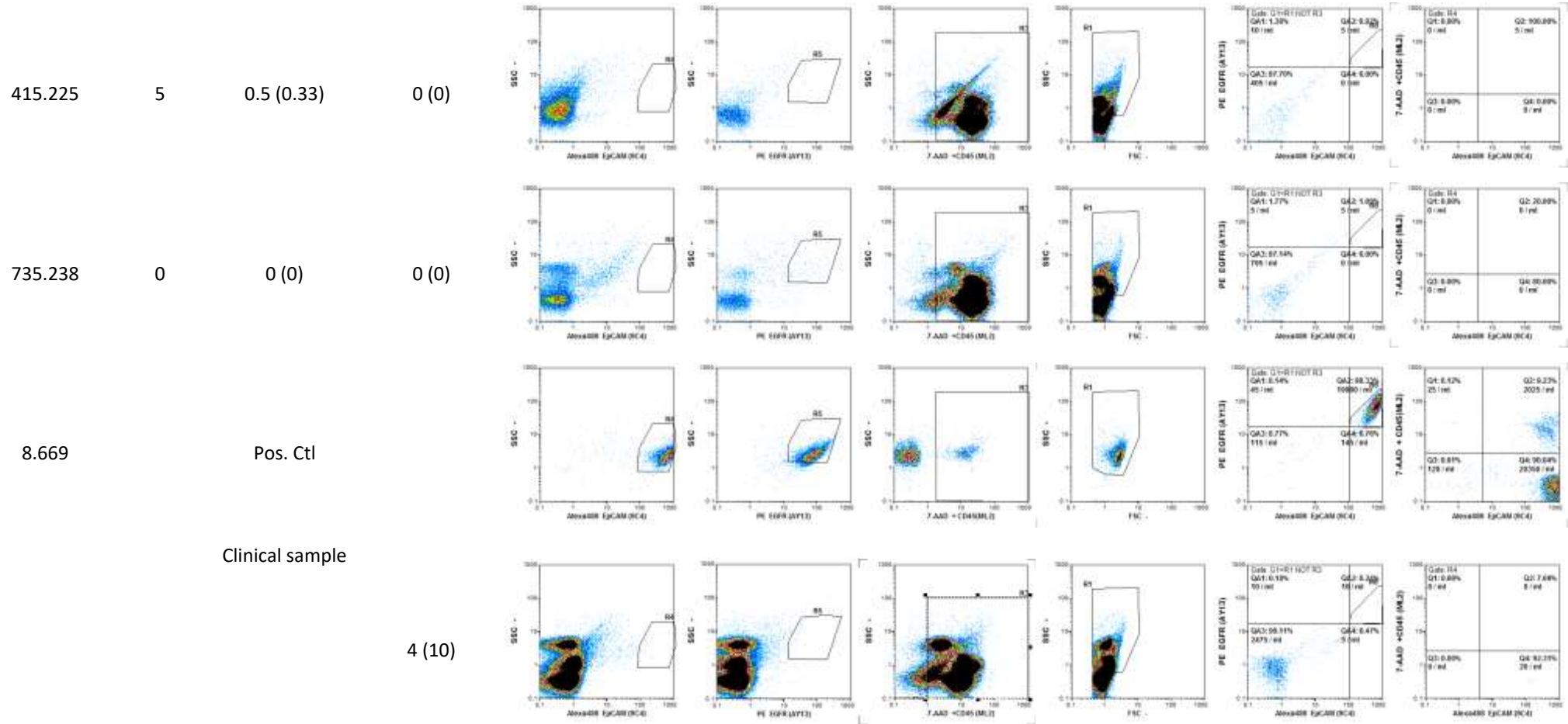
Γράφημα 8: Σε 3ml περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης HT29 κυττάρων (25.000) και πραγματοποιήθηκε απομόνωση των PBMCs. Παρατηρήθηκε πως ελάχιστα HT (<5%) βρίσκονται στη στοιβάδα του ορού ή στο ίζημα των ερυθρών. Αντιθέτως, σημαντικό ποσοστό αναγνωρίστηκε στο κάτω τμήμα της στοιβάδας των PMNs (buffy coat layer) και ακολούθως συμπεριλήφθηκε και αυτή στη διαδικασία της απομόνωσης. Το σημαντικότερο μέρος των HT29 απομονώνεται στα PMNs.



Γράφημα 9: Συνδυασμός αντισωμάτων έναντι CK8/18 και CK19 απέφερε την ανάδειξη θετικότητας σε σχεδόν όλο τον πληθυσμό των EpCAM+ HT29 κυττάρων.

Events	HT29 spiked 7mL	Expected HT29 (per/mL)	HT29 identified (per/mL)	Flow Cytometry Plots
1.092.559	1.000	100 (66.6)	35 (30)	
485.630	500	50 (33.3)	16 (10)	
695.622	100	10 (6.6)	4 (5)	
644.284	50	5 (3.3)	1(1)	
617.902	20	2 (1.3)	1 (1)	

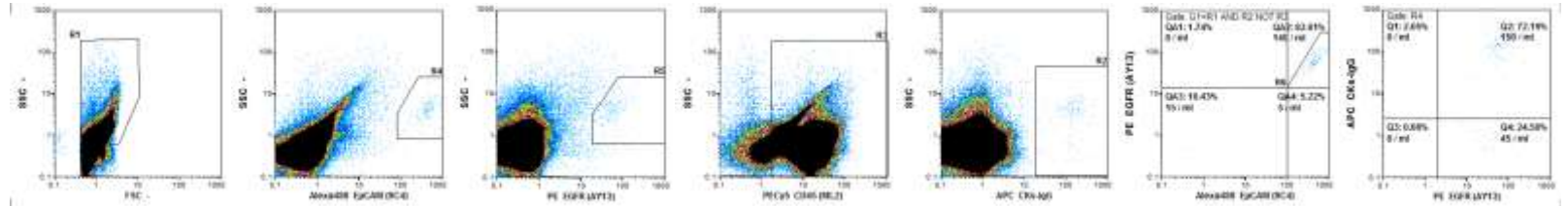




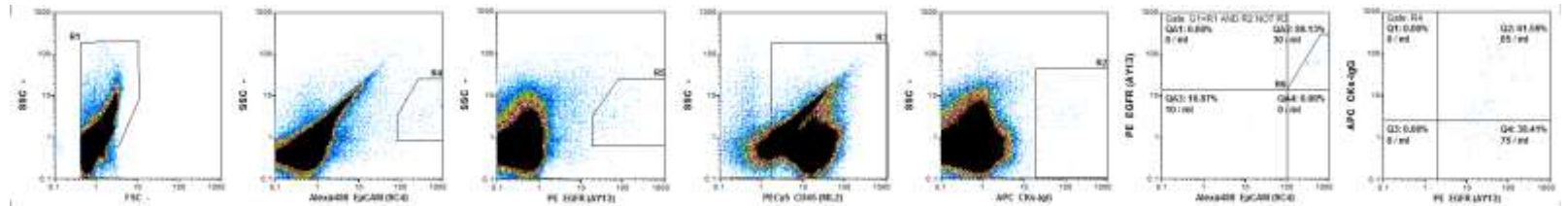
Γράφημα 10: Μέθοδος ανάλυσης με άμεσο πρωτόκολλο χρώσης έναντι EpCAM, EGFR και CD45 + 7AAD. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη HT29 κυττάρων σε γνωστή συγκέντρωση και μέτρηση του αριθμού τους από το 1/10 των PBMCs που απομονώθηκαν. Το 1/3 των αναμενόμενων κυττάρων αναγνωρίστηκε μέχρι και το όριο των 20 αναμενόμενων κυττάρων ανά mL.

Events      Expected HT29  
(per/mL)      HT29  
identified  
(per/mL)

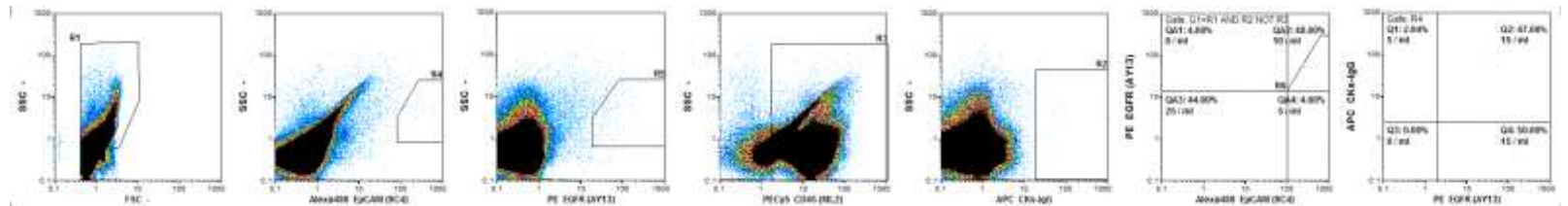
4.401.818      900 (600)      95 (140)



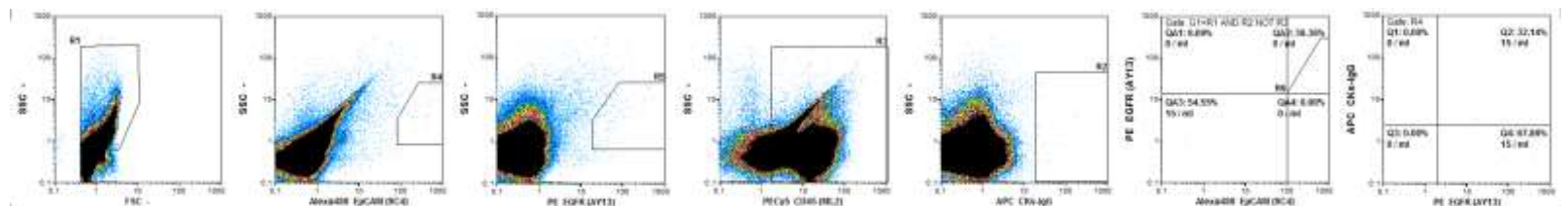
2.800.930      450 (300)      34 (30)

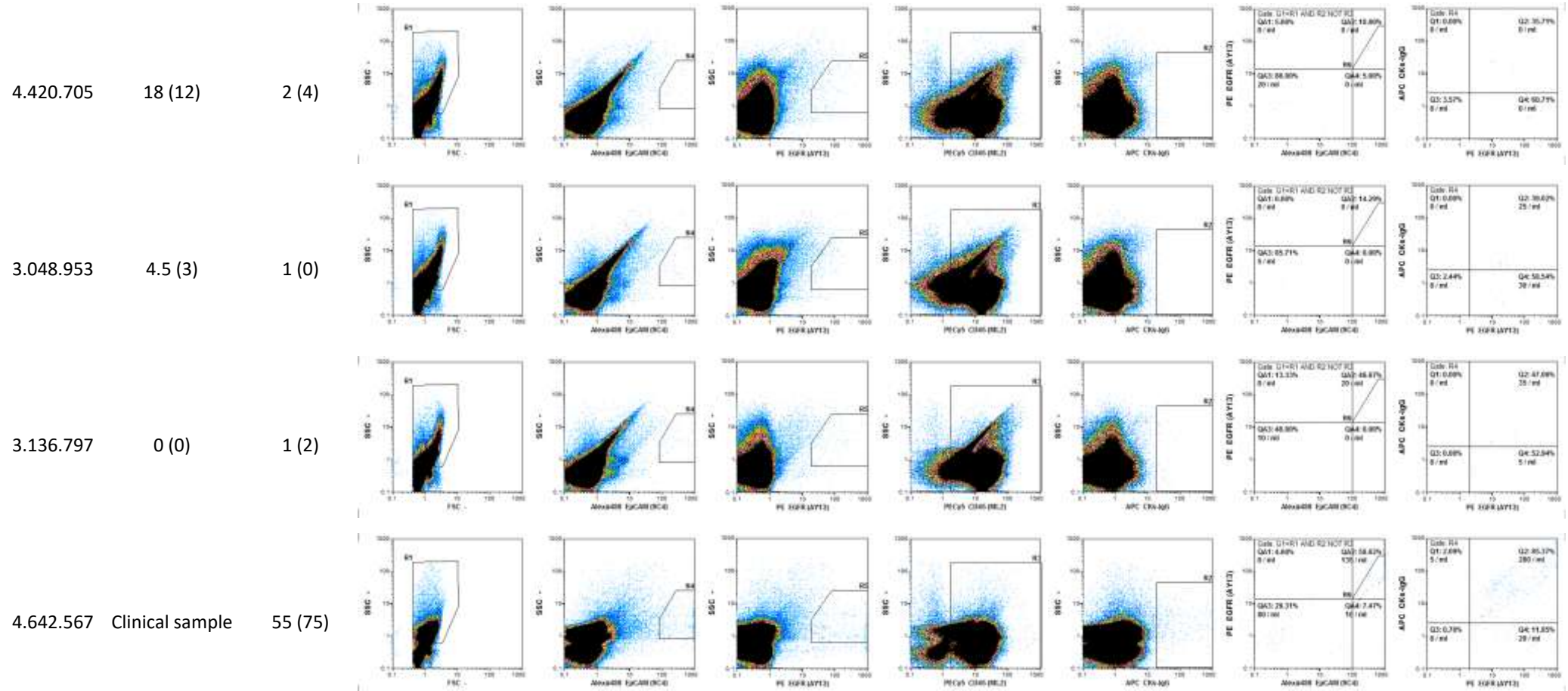


3.972.206      90 (60)      10 (11)



3.661.314      45 (30)      4 (5)





Γράφημα 11: Μέθοδος ανάλυσης με ενδοκυττάριο πρωτόκολλο. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη HT29 κυττάρων σε γνωστή συγκέντρωση και μέτρηση του αριθμού τους από τα υπόλοιπα 9/10 των PBMCs που απομονώθηκαν. Το 1/10 των αναμενόμενων κυττάρων αναγνωρίστηκε μέχρι και το όριο των 20 αναμενόμενων κυττάρων ανά mL.

### Αποτελέσματα κλινικών δειγμάτων

Οι παράμετροι που μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής ήταν ο απόλυτος αριθμός λευκοκυττάρων (blood count leucocytes/ml)\*, το ποσοστό των κοκκιοκυττάρων (blood granulocytes%)\*, ο αριθμός των PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear cells)\* (PBMCs count/ml)\*, το ποσοστό των κοκκιοκυττάρων στα PBMCs (PBMCs granulo%)\* (Πίνακας 6). Για την ανίχνευση των επιθηλιακών κυττάρων μετρήθηκε ο αριθμός των EpCAM+EGFR+CD45- και ο αριθμός των EpCAM+EGFR+CK+CD45- χρησιμοποιώντας δύο μεθόδους οριοθέτησης.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα λευκοκυτταρικών πληθυσμών \*Βλ. επεξήγηση στο κείμενο άνω

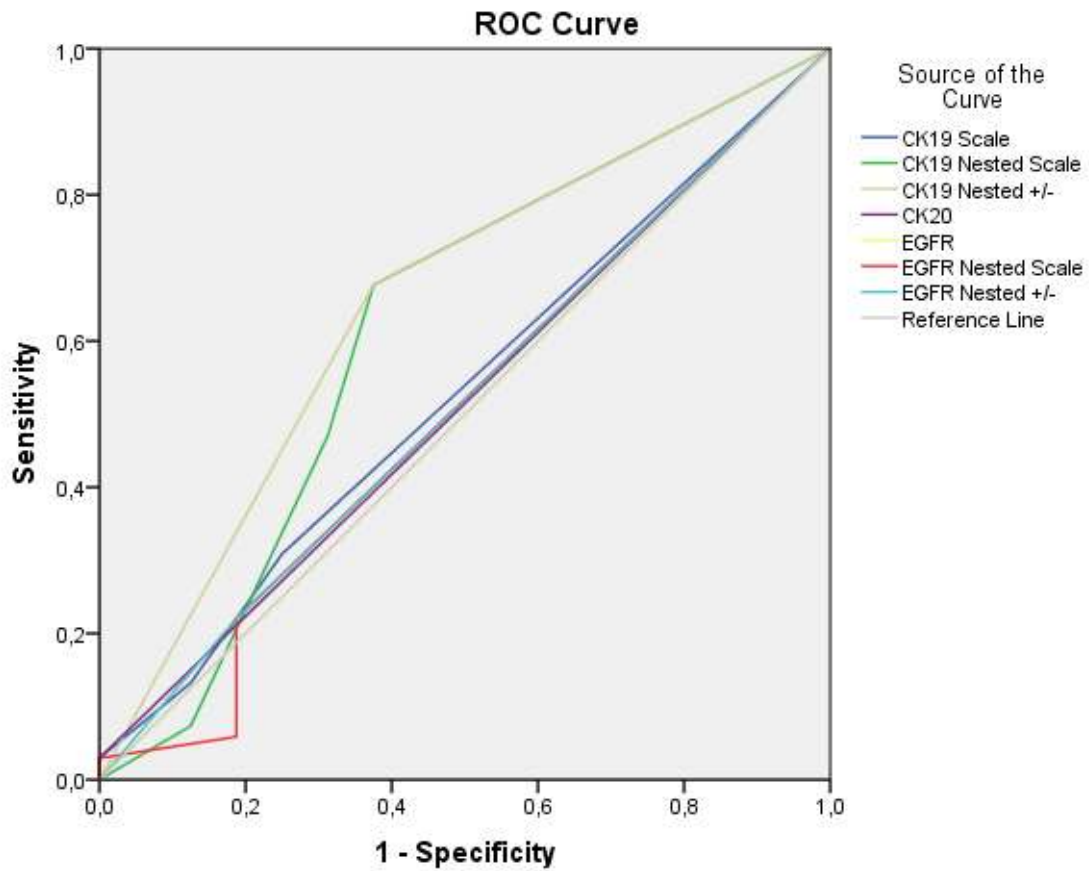
	Blood Count Leukocytes / ml*	Blood Granulo %*	PBMCs Count / ml*	PBMCs Granulo %*
Max	12,958,470	88.1%	56545440	75.76%
Min	1,056,720	22.5%	185430	0.50%
Mean	5,182,776	64.8%	9994266	16.60%
SD	2,324,481	13.9%	8690688	18.85%

Πίνακας 7: Αποτελέσματα επιθηλιακών πληθυσμών. \*SEM: standard error of mean

	Control n=12		Patients n=61		P	ProSurg	AfterSurg	p
	Mean	SEM*	n=61	SEM*		n=37	n=24	
Άμεσο n=73								
Quadrant EpCAM+EGFR+CD45-	5.66	1.43	36.24	12.34	0.017	37.26	35.00	0.132
Quadrant Count/ml	7.91	1.29	38.60	12.13	0.014	45.79	30.62	0.236
Polygonal EpCAM+EGFR+CD45-	1.41	0.49	17.60	8.30	0.056	15.49	22.58	0.522
Polygonal Count/ml	2.08	0.74	17.82	6.80	0.025	18.12	19.62	0.329
	Control n=12		Patients N=49		P	ProSurg	AfterSurg	p
Ενδοκυττάριο n=61	Mean	SEM*	Mean	SEM*		n=29	n=20	
Quadrant EpCAM+EGFR+CK+CD45-	2.50	1.04	7.86	2.33	0.041	5.28	11.10	0.393
Quadrant Count/ml	2.60	1.40	11.52	2.95	0.008	8.72	14.75	0.455
Polygonal EpCAM+EGFR+CK+CD45-	1.00	0.42	5.78	1.70	0.009	3.41	8.50	1.000
Polygonal Count/ml	1.50	0.76	8.17	2.16	0.005	5.41	11.00	0.885

Οι σημαντικότερες συσχετίσεις που αναγνωρίστηκαν ήταν για την έκφραση CK με τα καρκινώματα (0.256,  $p=0.044$ ), με ύπαρξη διήθησης λεμφαδένων (0.380  $p=0.008$ ) και το στάδιο της νόσου (0.391,  $p=0.003$ ). Για το άμεσο πρωτόκολλο βρέθηκε σημαντική συσχέτιση με τα δείγματα από το δεξί κόλον (0.369,  $p=0.002$ ) και με τη θετικότητα για nested CK19 (0.241,  $p=0.042$ ).

Η ανίχνευση με το άμεσο πρωτόκολλο παρουσίασε με όριο τα 3 κύτταρα/mL (cut off value) SN: 49.2% με SP: 58.3%, ενώ το ένδοκυττάριο με όριο το 1 κύτταρο/mL (cut off value) SN: 62.7% με SP: 70%.

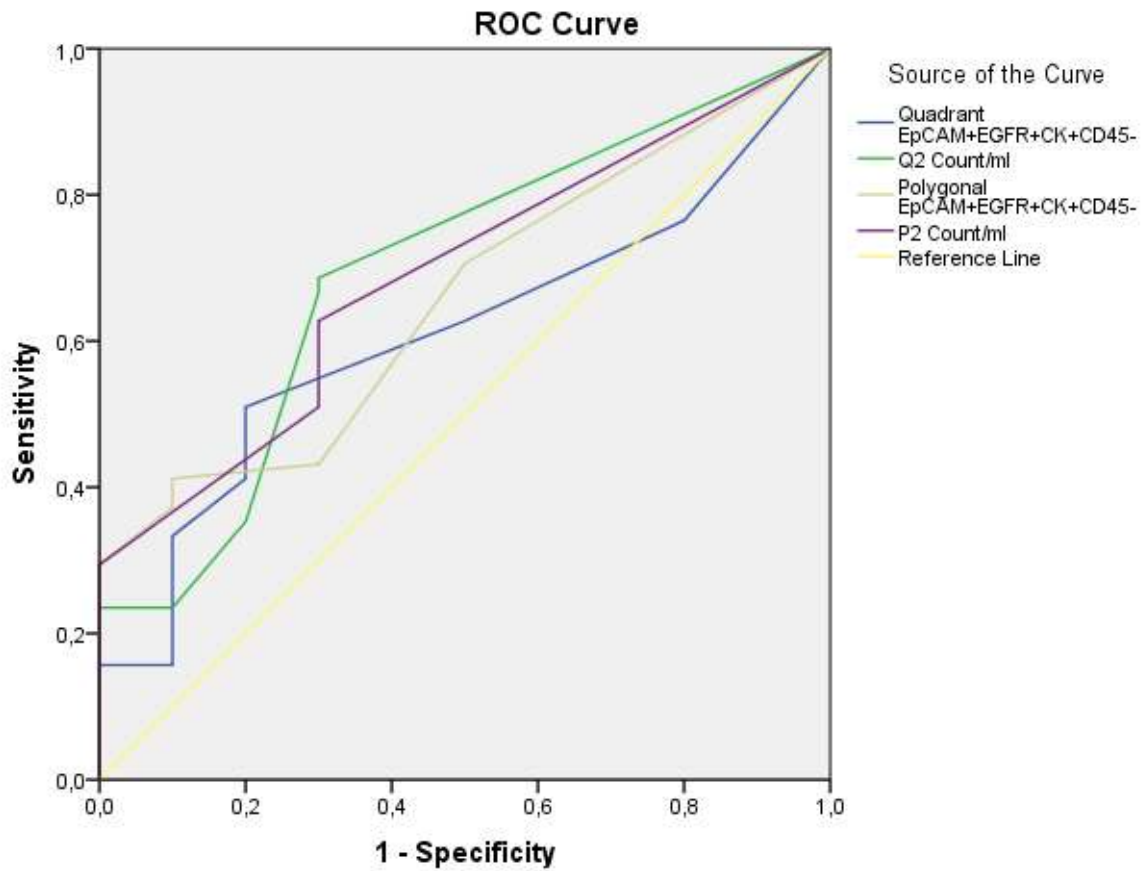
**Area Under the Curve**

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error <sup>a</sup>	Asymptotic Sig. <sup>b</sup>	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
				CK19 Scale	,528
CK19 Nested Scale	,615	,086	,153	,447	,784
CK19 Nested +/-	,651	,078	,062	,498	,803
CK20	,515	,079	,855	,359	,670
EGFR	,500	,081	1,000	,342	,658
EGFR Nested Scale	,504	,083	,959	,342	,666
EGFR Nested +/-	,517	,080	,838	,360	,673

The test result variable(s): CK19 Scale, CK19 Nested Scale, CK19 Nested +/-, CK20, EGFR, EGFR Nested Scale, EGFR Nested +/- has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

**Area Under the Curve**

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error <sup>a</sup>	Asymptotic Sig. <sup>b</sup>	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Quadrant	,609	,084	,280	,444	,773
EpCAM+EGFR+CK+CD45-Q2 Count/ml	,694	,089	,054	,520	,868
Polygonal	,658	,083	,117	,496	,820
EpCAM+EGFR+CK+CD45-P2 Count/ml	,690	,080	,059	,533	,848

The test result variable(s): Quadrant EpCAM+EGFR+CK+CD45-, Q2 Count/ml, Polygonal

EpCAM+EGFR+CK+CD45-, P2 Count/ml has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αναλυτική μεθοδολογία για την απομόνωση και ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) χαρακτηρίζεται από πληθώρα τεχνικών και μεθόδων, οι οποίες στις περισσότερες των περιπτώσεων χρησιμοποιούν συνδυασμό δύο σταδίων: το στάδιο της απομόνωσης με ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό και το στάδιο της ανίχνευσης [142]. Όμως, το κοινό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι περισσότερες από τις υφιστάμενες μεθόδους είναι ότι δεν έχουν επαρκώς προτυποποιηθεί και επικυρωθεί ανάμεσα στα εργαστήρια και αυτό το γεγονός αποτελεί την αιτία που σε διάφορες μελέτες έχουν αναφερθεί διαφορετικές ειδικότητες και ευαισθησίες στην ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) [142]. Αναδύεται εύλογα η επιτακτική ανάγκη προς την κατεύθυνση της αυτοματοποίησης, προτυποποίησης, ποιοτικού ελέγχου και διαπίστευσης των αναλυτικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και το μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs, πλην όμως ο δρόμος φαίνεται ακόμα μακρύς [87, 142, 143]. Σε λίγες μελέτες έχει επιχειρηθεί να συγκριθούν απευθείας διαφορετικές μέθοδοι ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των CTCs στο ίδιο δείγμα περιφερικού αίματος ασθενούς, ενώ τα παρατιθέμενα αποτελέσματα τους δείχνουν σημαντική διακύμανση στα όρια ανίχνευσης [87, 144-146]. Οι ανωτέρω λόγοι καθιστούν επί του παρόντος αδύνατη την εκτέλεση της μέτρησης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στην καθημέρα κλινική ρουτίνα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε μέθοδος προσδιορισμού των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε περιφερικό αίμα ασθενών με καρκινώματα του παχέος εντέρου με Κυτταρομετρία ροής και συγχρόνως με Μοριακές μεθόδους (PCR και RT-PCR), ενώ συγκρίθηκαν μεταξύ τους οι δύο μεθοδολογίες ως προς την ευαισθησία και ειδικότητα τους.

Ειδικότερα, σε ότι αφορά τα μοριακά αποτελέσματα για την έκφραση του *CK 19* γονιδίου (κυτταροκερατίνη 19) στην ομάδα ασθενών, κατέδειξαν ότι με τη χρήση μιας δεύτερης PCR (Nested PCR) αυξήθηκε η ευαισθησία της έκφρασης του *CK 19* γονιδίου και το ποσοστό των θετικών δειγμάτων προ χειρουργείου ήταν 76,4% (55,3% ισχυρά, 21,1% ασθενώς), ενώ μετά χειρουργείου 61,6% (38,5% ισχυρά, 23,1% ασθενώς), γεγονός που θα μπορούσε να συνδέεται με την αφαίρεση του όγκου. Παρατηρήθηκε ωστόσο έκφραση του *CK 19* γονιδίου και σε 5 υγιείς μάρτυρες. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στους περιορισμούς της μελέτης, δεδομένου

ότι την ομάδα φυσιολογικών μαρτύρων απετέλεσαν εθελοντές αιμοδότες, των οποίων το οικογενειακό ή και ατομικό ιστορικό δεν γνωρίζουμε. Επιπλέον, με τη χρήση μιας δεύτερης PCR (Nested PCR) αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου, αλλά συγχρόνως αυξάνεται και η επιμόλυνση λόγω της 2<sup>ης</sup> PCR και θα μπορούσε και αυτό το γεγονός πιθανά να εμπλέκεται στη θετικότητα των ευρημάτων μας στην ομάδα ελέγχου υγιών-μαρτύρων. Τα ευρήματα θετικότητας μας είναι υψηλότερα από τα αποτελέσματα της μελέτης του Zieglschmid, V., et al. 2005 που ανίχνευσαν *CK 19* mRNA στους υγιείς αιμοδότες σε ποσοστό 3,7% (n=54) και του Wang, J., et al. 2006 σε 2 από τους 30 υγιείς της ομάδας ελέγχου, ποσοστό 6,7% (n=30). Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι ψευδώς θετικά αποτελέσματα για την έκφραση του *CK 19* γονιδίου στην ομάδα μαρτύρων θα μπορούσαν να προκύψουν είτε λόγω επιμόλυνσης από γενωμικό DNA κατά τη διάρκεια της εξαγωγής του RNA, είτε λόγω παράτυπης έκφρασης του σε φυσιολογικά λευκοκύτταρα, είτε τέλος στην παρουσία ψευδογονιδίων του *CK 19*, [87, 102, 137, 147-152].

Αναφορικά με την έκφραση του *CK 20* γονιδίου (Κυτταροκερατίνη 20) τα αποτελέσματα μας στην ομάδα ελέγχου των υγιών- μαρτύρων βρέθηκαν σε ποσοστό 100% αρνητικά. Θετικό αποτέλεσμα έκφρασης του *CK 20* γονιδίου βρέθηκε σε 1 ασθενή προ χειρουργείου (2,6%) και σε 1 ασθενή μετά χειρουργείου (3,8%). Οι Koch M., et al. 2001 ομοίως στη μελέτη τους που συμπεριελάμβανε 18 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου, οι λήψεις περιφερικού αίματος, αλλά και από την μεσεντέρια φλέβα, κατά τα χρονικά διαστήματα προ, κατά τη διάρκεια και μετά το χειρουργείο, αναφέρουν ότι η έκφραση του *CK 20* γονιδίου βρέθηκε αρνητική [153]. Θεωρούν ότι το γεγονός των αρνητικών μοριακών ευρημάτων τους πιθανά να σχετίζεται είτε με μη είσοδο επιθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν την *CK 20* στην κυκλοφορία του αίματος, είτε πιθανά τα κύτταρα που εισήλθαν στην κυκλοφορία γρήγορα να πέρασαν σε φάση απόπτωσης χάνοντας την ικανότητα προσκόλλησης τους [154]. Σε πολλές μελέτες αναφέρεται ότι η θετικότητα του *CK 20* γονιδίου στα αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου συσχετίζεται με το στάδιο της νόσου, το βαθμό διαφοροποίησης, το ποσοστό (%) διήθησης λεμφαδένων, την ύπαρξη μεταστάσεων, αλλά και στον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των δειγμάτων με ειδικό anti-cytokeratin (CK) 20 αντίσωμα (gastrointestinal-specific anti-cytokeratin (CK) 20 antibody) αντί του ευρέως χρησιμοποιούμενου γενικού επιθηλιακού αντιγόνου BerEP4 που εμείς χρησιμοποιήσαμε, [155, 156]. Ο Schuster R., et al. 2004 συμπεραίνει ότι καθίσταται μη ικανοποιητική η ανίχνευση της



έκφρασης του *CK 20* γονιδίου είτε λόγω μη ειδικής προέλευσης από κύτταρα του όγκου, είτε λόγω κυττάρων που εκφράζουν παράτυπα μετάγραφα (illegimate transcription) σε κύτταρα του αίματος και πιθανολογεί ότι ο δείκτης *CK 20* δεν είναι ο καταλληλότερος για την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου [137, 157-160]. Ο Denis MG., et al. 1997 στη μελέτη που πραγματοποίησαν σε κυτταρικές σειρές, αλλά και σε ασθενείς με αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου, συμπεραίνουν επίσης ότι η έκφραση του *CK 20* γονιδίου είναι χαμηλή [161] και άλλοι εγείρουν ερωτήματα που αφορούν στην ειδικότητα του ως δείκτη [162-164]. Οι Tsavellas G., et al. 2002 στη μελέτη τους που αφορούσε σύγκριση μεταξύ των μεθόδων RT-PCR και κυτταρομετρίας με στόχο την ανίχνευση των μεταγράφων του *CK 20* γονιδίου (*CK 20 mRNA*) και του *CEA* γονιδίου (*CEA mRNA*) σε ασθενείς με αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου και υγιείς μάρτυρες, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αν και βρέθηκε συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων, εν τούτοις υπήρχε χαμηλή ευαισθησία και παρατηρήθηκε αβεβαιότητα στην αντιγονική έκφραση σε φυσιολογικά κύτταρα του αίματος, ενώ κατέδειξαν ότι θα πρέπει να λυθεί το ζήτημα που αφορά στο φαινότυπο των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων πριν οποιαδήποτε οριστικοποίηση της ανίχνευσης τους στην κυκλοφορία του αίματος [165]. Ωστόσο, βασική παράμετρος αναδεικνύεται η επιλογή τόσο της μεθόδου για τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, όσο και του πρωτοκόλλου συλλογής κυττάρων (πχ. Ficoll- gradient isolation), αλλά και η επιλογή των καταλληλότερων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του επιθηλιακού μορίου προσκόλλησης (Epithelial Cell Adhesion Molecule-EpCAM), ειδικότερα δε του EpCAM κλώνου (πχ. BerEP4 ή KS1/4), δεδομένης αφενός της ετερογενούς έκφρασης του EpCAM μορίου στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα των ασθενών με κολοορθικό καρκίνο και αφετέρου της ασάφειας που αναδεικνύεται στο εάν όλα τα αντι- EpCAM αντισώματα δύνανται να ανιχνεύσουν και να δεσμεύσουν τον ίδιο αριθμό κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων και εάν έχουν την ίδια προγνωστική και κλινική σημασία, [164, 166-168]. Ο Antolovic D., et al. 2010 βρήκαν ανάλογα με την σταδιοποίηση της νόσου (UICC stage) διαφορετικά ποσοστά (%) έκφρασης του γονιδίου *CK20* (stage II 0%, stage III 17% και stage IV 7%). Επιπλέον, ο Wong SC., et al. 2009 αναφέρουν θετικότητα σε ποσοστό 6% (n=50) σε ασθενείς με κολοορθικό αδενοκαρκίνωμα και 0% θετικότητα σε καλοήγη νόσο του παχέος εντέρου. Ο Koyanagi K., et al. 2008 στη μελέτη τους αναφέρουν ότι χρησιμοποιώντας τη μέθοδο

ποσοτικής PCR (qPCR) μπόρεσαν να ανιχνεύσουν σε ποσοστό 6% την έκφραση του CK20 σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου.

Ο τύπος I υποδοχέας της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα έχει αναγνωριστεί ως καθοριστικής σημασίας στην παθογένεση του καρκίνου. Στην οικογένεια αυτή συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων ο υποδοχέας του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR) και ο c-erbB-2 γνωστός και ως HER-2. Και οι δύο αυτοί παράγοντες εμφανίζουν ανωμαλίες στην έκφραση τους σε πολλούς και διαφορετικούς όγκους [169]. Στον κολορθικό καρκίνο η υπερέκφραση του EGFR έχει καταδειχθεί σε ποσοστό 50-70% [170]. Η ειδικότητα της RT-PCR για την ανίχνευση των μεταγράφων του *EGFR* γονιδίου (*EGFR* mRNA) ως δείκτη που εκφράζουν τα διαφυγόντα καρκινικά κύτταρα από τον όγκο και έχουν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος έχει αποτελέσει σημείο εκτεταμένων συζητήσεων με αντιφατικά ευρήματα, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε η θετικότητα του και στην ομάδα ελέγχου υγιών μαρτύρων σε ποσοστό 9% [137, 171].

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας για την έκφραση των μεταγράφων του *EGFR* γονιδίου με χρήση  $2^{\text{H5}}$  διαδοχικής PCR κατά την οποία αυξήθηκε η ευαισθησία της μεθόδου, κατέδειξαν 21,2% θετικότητα (8% ισχυρής, 13,2% ασθενούς) στους ασθενείς προ χειρουργείου, ενώ η θετικότητα ήταν 27,1% (4% ισχυρής, 23,1% ασθενούς) στους ασθενείς μετά χειρουργείο, στη δε ομάδα μαρτύρων παρατηρήθηκε σε 3 ασθενείς θετικότητα των μεταγραφών του *EGFR*, συμφωνώντας και με άλλες αντίστοιχες μελέτες [134, 137, 171, 172]. Ο De Luca A., et al. 2000 σε μελέτη τους με ασθενείς που έχουν αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου τα μετάγραφα του *EGFR* γονιδίου βρέθηκαν θετικά σε ποσοστό 59%, αλλά και στην ομάδα των υγιών μαρτύρων η θετικότητα του ήταν σε ποσοστό 10,5% [173], αποδίδοντας τα ευρήματα τους στη νόμιμη μεταγραφή του στα λευκοκύτταρα (illigimate transcription in leucocytes), ενώ οι Tsouma A., et al. 2010 βρήκαν θετικότητα για τα μετάγραφα του *EGFR* γονιδίου στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου σε ποσοστό 19,2%, συσχετίζοντας τα με το στάδιο κατά Astler-Coller της νόσου και την ολική επιβίωση [134]. Ο Zieglschmid, V., et al. 2005 αναφέρουν στη μελέτη τους ποσοστό 12,5% (n=11) θετικότητα για τα μετάγραφα του *EGFR* γονιδίου στα διαφυγόντα καρκινικά κύτταρα σε ασθενείς με κολορθικό καρκίνωμα και 9% θετικότητα στην ομάδα ελέγχου [137].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής, ειδικότερα δε όσον αφορά στο άμεσο πρωτόκολλο στο οποίο χρησιμοποιήθηκε

όγκος ολικού αίματος 3 ml, φάνηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα απομονώνονται στην στιβάδα των PBMCs (μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος) και με τη χρήση τριχρωμίας έναντι EpCAM, EGFR και CD45 + 7AAD το όριο ανίχνευσης ήταν 20 κύτταρα ανά mL (LOD 20 cells/mL), (Γράφημα 10, 5<sup>η</sup> στήλη εικόνων).

Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα από το ενδοκυττάριο πρωτόκολλο στο οποίο χρησιμοποιήθηκε όγκος ολικού αίματος 3 ml, φάνηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα απομονώνονται στην στιβάδα των PBMCs και με τη χρήση τετραχρωμίας έναντι EpCAM, EGFR και CD45 + 7AAD+ CKs το όριο ανίχνευσης ήταν 20 κύτταρα ανά mL (LOD 20 cells/mL), (Γράφημα 11, 5<sup>η</sup> στήλη εικόνων). Το ενδοκυττάριο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε επειδή οι κυτταροκερατίνες είναι ενδοκυττάρια αντιγόνα και ως εκ τούτου χρειάζεται ένα στάδιο ειδικής κατεργασίας των PBMCs ώστε να γίνει διαπερατή η μεμβράνη των κυττάρων (permeabilization-fixation). Με το άμεσο πρωτόκολλο το cut off value ήταν τα 3 καρκινικά κύτταρα/ mL και η ευαισθησία βρέθηκε 49,2%, ενώ η ειδικότητα 58,3%. Αντίστοιχα, με το ενδοκυττάριο πρωτόκολλο το cut off value ήταν το 1 καρκινικό κύτταρο/ mL, με ευαισθησία 62,7% και ειδικότητα 70%.

Ο Tsavellas G, et al., 2002 στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν 14 mL ολικού αίματος και το όριο ανίχνευσης ήταν 50 HT29 κύτταρα/14 mL [165]. Αν και τα αποτελέσματα σύγκρισης της RT-PCR με την κυτταρομετρία είχαν συσχέτιση στα πειράματα με εμβολιασμό (spiking), στους ασθενείς δεν παρουσίασαν συσχέτιση, γεγονός παρόμοιο με τα αποτελέσματα μας. Δυστυχώς δεν αναφέρουν την ευαισθησία της μεθόδου τους στους ασθενείς. Η Tsvetana Hristozova et al., 2012 [174], χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη ποσότητα ολικού αίματος από εμάς (7.5 mL) και χωρίς απόμόνωση PBMCs, παρουσίασε μεγαλύτερη ειδικότητα (90%) αλλά χαμηλότερη ευαισθησία (43%) σε προχωρημένου σταδίου καρκινώματα κεφαλής – τραχήλου, και το όριο ανίχνευσης ήταν 20 κύτταρα ανά mL (LOD 20 cells/mL). Επίσης, οι Garrigós et al., 2010 [175] στη δημοσιευμένη μελέτη τους χρησιμοποίησαν 20 mL ολικού αίματος για να ανιχνεύσουν σε εύρος 1 έως 10.000 καρκινικά κύτταρα με cut-off τα 120 κύτταρα και ευαισθησία 56%, σε καρκινώματα παχέος εντέρου σταδίου 3 και άνω. Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα μας, η κυτταρομετρία αναδείχθηκε ως καλύτερη μέθοδος από την RT-PCR για την αναγνώριση υποτροπών. Τέλος, σε καρκίνο μαστού [176] οι συγγραφείς με μικρότερο όριο ανίχνευσης ( $10^{-5}$  αντί του  $10^{-6}$  που είχαμε εμείς με το ενδοκυττάριο πρωτόκολλο), παρουσίασαν αντίστοιχο

ποσοστό ευαισθησίας με το άμεσο πρωτόκολλο (43%) και κατέδειξαν την κλινική συσχέτιση της ανίχνευσης CTCs με νωρίτερη υποτροπή και μειωμένη επιβίωση.

Σε κάθε περίπτωση, το γεγονός που αναδεικνύεται μετά από ενδελεχή έρευνα της βιβλιογραφίας στο PubMedNCBI, google scholar, EMBASE με τα αρκτικόλεξα CTCs, colon cancer, flow cytometry, studies είναι ότι μέχρι σήμερα υπάρχουν ελάχιστες δημοσιευμένες μελέτες με κυτταρομετρία ροής για ανίχνευση και μέτρηση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε διάφορους τύπους καρκίνων, οι περισσότερες των οποίων δεν συμπεριελάμβαναν δείγματα ασθενών [177-179].

Κατά τούτο θα μπορούσαμε να τονίσουμε ότι στο κομμάτι που αφορά την κυτταρομετρία ροής η μελέτη μας είναι πρωτότυπη και ως προς τον σχεδιασμό, αλλά και την εφαρμογή της. Τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να δώσουν έναυσμα για μελλοντικές μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας, αλλά και παρακολούθησης (follow up) των ασθενών που εντάχθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Η σύγκριση μεταξύ των δύο τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μοριακών (PCR, Nested PCR και RT-PCR) και κυτταρομετρίας ροής, κατέδειξε τη δυναμική υπεροχή της κυτταρομετρίας ροής, χωρίς ωστόσο να μειώνεται η αξία των μοριακών τεχνικών και ειδικότερα η εισαγωγή και χρήση πλέον σήμερα στα σύγχρονα εργαστήρια της ποσοτικής PCR (qPCR) και της πραγματικού χρόνου ποσοτικής PCR [Real-Time Quantitative PCR (qPCR)].

Συμπερασματικά, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) μπορούν να αναγνωριστούν με μοριακές τεχνικές μέσω της ανίχνευσης του mRNA αντιγράφων γονιδίων που υπερεκφράζονται στον καρκίνο, αλλά και με μεθόδους κυτταρομετρίας που ανιχνεύουν αυτούσια κύτταρα. Στην RT-PCR μετά την σύνθεση του cDNA, το μετάγραφο του γονιδίου που μας ενδιαφέρει (στόχος) ενισχύεται με έναν ειδικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή. Η ευαισθησία της RT-PCR χαρακτηρίζεται ως υψηλή, ωστόσο ως μοριακή μέθοδος είναι επιρρεπής σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, λόγω επιμόλυνσης του δείγματος, της έκφρασης των γονιδίων στόχων και στα φυσιολογικά κύτταρα, καθώς και της ύπαρξης ψευδογονιδίων (γονίδια που πιθανώς μεταγράφονται χωρίς να μπορούν να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες).

Η κυτταρομετρία ροής παρουσιάζει ευκολία και ταχύτητα και επιπλέον δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα (πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής) καθώς και της ανάλυσης ολόκληρου του κυττάρου, αφού δεν καταστρέφεται κατά την προετοιμασία του δείγματος, ενώ ως τεχνική έχει και το πλεονεκτικό στοιχείο του κόστους – αποτελεσματικότητας.

Και για τις δύο μεθόδους (μοριακές και κυτταρομετρία ροής) η έλλειψη ενός δείκτη πραγματικά ειδικού για τον ιστό από τον οποίο προέρχεται το καρκινικό κύτταρο αποτελεί πρόβλημα σε ότι αφορά την ειδικότητα τους. Επιπρόσθετα, και οι δύο μέθοδοι χρήζουν πρωτυποποίησης και επικύρωσης [142].

Επί τη βάση των ανωτέρω, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν επιπρόσθετο προγνωστικό δείκτη για την εξέλιξη της νόσου σε νεοδιαγνωσθέντες με καρκίνο ασθενείς και χαρακτηρίζονται ως «πραγματικού χρόνου υγρή βιοψία» (“real-time liquid biopsy”) [89].

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων θα μπορούσε να αναδείξει θεραπευτικούς στόχους (π.χ HER2 ή EGFR), ειδικότερα δε όσον αφορά στην εξατομικευμένη θεραπεία μέσω της δράσης βιολογικών θεραπειών με μονοκλωνικά αντισώματα, (π.χ Herceptin ή Erbitux) [180]. Για τον λόγο αυτό, η ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα θα μπορούσε να είναι ένας άριστος μη επεμβατικός προγνωστικός καρκινικός βιοδείκτης, αλλά και να συμβάλλει τόσο στην κατάταξη όσο και στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας [55, 104, 181].

Τέλος, είναι πλήρως αποδεκτό σήμερα ότι η ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με καρκινώματα του παχέος εντέρου έχει μεγάλη κλινική σημασία, καθώς η ανίχνευση τους σχετίζεται με μειωμένο ελεύθερο νόσου διάστημα και μικρότερη ολική επιβίωση, ενώ θα μπορούσαν να αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη για την ανταπόκριση στη θεραπεία πολύ νωρίτερα από τον απεικονιστικό έλεγχο (μαγνητική και αξονική τομογραφία) [142].

## «Τεχνικές ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε καρκινώματα παχέος εντέρου»

Αντωνία Μουρτζίκου, Βιοχημικός MSc, EurSpecLabMed

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα, 2017

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) είναι κύτταρα που έχουν διαφύγει από τον πρωτοπαθή όγκο και έχουν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος. Οι μεταστάσεις είναι η κύρια αιτία θανάτου των ασθενών με συμπαγείς επιθηλιακούς κακοήθεις όγκους, που είναι ανθεκτικές στις συμβατικές θεραπείες (π.χ. Ca μαστού, παχέος εντέρου, προστάτου). Η αιματογενής διασπορά των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο είναι το καθοριστικό βήμα για τη δημιουργία μεταστάσεων και επιδρά σημαντικά στην πρόγνωση των ασθενών. Τα καρκινικά κύτταρα μεθίστανται και εγκαθίστανται σε διάφορα όργανα κάνοντας αδύνατη την εξάλειψη της νόσου με το χειρουργείο, τις ακτινοβολίες, τη χημειοθεραπεία ή τις βιολογικές θεραπείες. Η ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων θεωρείται ότι συμβάλλει στην πρόωπη διάγνωση, στην παρακολούθηση των ασθενών, ειδικά στους ασθενείς με μετάσταση, στην ανταπόκριση στις θεραπείες, αλλά και στην επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος και την εξατομικευμένη θεραπεία.

Οι τεχνικές ανίχνευσης των CTCs μπορούν να διαχωριστούν αδρά σε κυτταρομετρικές που εξετάζουν το κύτταρο σαν ολότητα και στην κατηγορία αυτή ανήκουν η ανοσοϊστοχημεία, η κυτταρομετρία σάρωσης με laser, το σύστημα CellSearch και η κυτταρομετρία ροής και σε μοριακές τεχνικές οι οποίες βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων με την RT-PCR.

Με δεδομένο ότι τα CTCs αποτελούν σπάνια συμβάντα (1 καρκινικό κύτταρο σε  $10^6$ - $10^7$  λευκοκύτταρα) καθίσταται αναγκαίο ένα στάδιο διαχωρισμού από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος, που προηγείται της ανίχνευσης. Ο διαχωρισμός των κυττάρων μπορεί να γίνει α) βάσει των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους, όπως πχ. το μέγεθος και την πυκνότητα του κυττάρου χρησιμοποιώντας τη βαθμίδωση

πυκνότητας (ficoll gradient) ή φίλτρα και β) με τη χρήση ειδικών δεικτών για τα καρκινικά κύτταρα (ανοσοαπομόνωση) χρησιμοποιώντας ανοσομαγνητικά σφαιρίδια. Επιπλέον, η επιλογή των κυττάρων μπορεί να είναι αρνητική (μειώνοντας τα λευκοκύτταρα) οπότε χρησιμοποιείται το CD45, θετική με τη χρήση αντισωμάτων για κάποιο αντιγόνο κοινό για πολλαπλών τύπων καρκινικά κύτταρα (ErCAM) ή ειδικό για ένα συγκεκριμένο είδος όγκου.

Οι μοριακές τεχνικές αποτελούν το gold standard στην ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων καθώς χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Λίγες έως τώρα μελέτες έχουν γίνει με κυτταρομετρία ροής (KP), όμως αυτό που χαρακτηρίζει την KP είναι ότι πλεονεκτεί σε ταχύτητα και απλότητα.

Σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής ήταν η συγκριτική μελέτη μεθόδων ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκινώματα παχέος εντέρου, η συσχέτιση τους ως προς την ευαισθησία και ειδικότητα τους, το όριο ανίχνευσης (traceability) τους και τέλος η συμβολή μας στις προτεινόμενες βιβλιογραφικά πολυκεντρικές μελέτες για τον καθορισμό cutoff values και την επιλογή των κατάλληλων “Tumor specific” δεικτών, από την πληθώρα των επί του παρόντος χρησιμοποιούμενων.

Το υλικό της μελέτης απετέλεσαν 84 δείγματα από λήψεις περιφερικού αίματος ασθενών κατά τις φάσεις: 1) προ χειρουργείου και πριν την εφαρμογή αναισθησίας, και 2) την επόμενη της χειρουργικής επέμβασης, ενώ την ομάδα ελέγχου απετέλεσαν 16 ασθενείς χωρίς ένδειξη για ύπαρξη καρκινώματος παχέος εντέρου.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μοριακές τεχνικές (PCR, Nested PCR και RT-PCR) καθώς και κυτταρομετρία ροής (KP).

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γ.Ν «ΑΤΤΙΚΟΝ», στο Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας, σε συνεργασία με την Δ' Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική.

Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ», από όπου και έχει παρθεί η σχετική έγκριση.

Η στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS statistics for Windows Version: 20.0. Για ανεξάρτητα δείγματα έγινε ο στατιστικός έλεγχος t-test που αφορούσε την σύγκριση της μέσης τιμής συνεχών παραμέτρων (ηλικία, αριθμός κυττάρων) στις κατηγορίες ασθενών-υγιών μαρτύρων

(ποιοτικές μεταβλητές) και για κατηγορικές μεταβλητές το Fisher's exact test. Για την συσχέτιση δύο μεταβλητών εφαρμόστηκε ο στατιστικός έλεγχος Spearman correlation ( $\rho$ ). Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν διαφορές με  $p < 0.05$ .

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη συνοψίζονται ως εξής:

#### Μοριακές τεχνικές

Στατιστικά σημαντική αύξηση στα παθολογικά δείγματα αναγνωρίστηκε μόνο με την ανίχνευση των CK19 μεταγράφων ( $p=0.024$ ) με την nested μέθοδο, με ασθενή συσχέτιση με το στάδιο του όγκου (Grade,  $p=0.012$ ).

Μεγαλύτερη ευαισθησία (SN) παρουσίασε η CK19 nested (67.6%) με ειδικότητα (SP) 66.2%. Για τις CK20 και την απλή PCR για την CK19 τα ποσοστά ήταν αρκετά χαμηλότερα (SN: 2.9%, 30.9%, SP: 100%, 75%).

Η ανίχνευση EGFR nested παρουσίασε SN: 22.1%, SP: 71.2%.

#### Κυτταρομετρία ροής (KP)

Οι σημαντικότερες συσχετίσεις που αναγνωρίστηκαν ήταν για την έκφραση CK με τα καρκινώματα (0.256,  $p=0.044$ ), με ύπαρξη διήθησης λεμφαδένων (0.380  $p=0.008$ ) και το στάδιο της νόσου (0.391,  $p=0.003$ ). Για το άμεσο πρωτόκολλο βρέθηκε σημαντική συσχέτιση με τα δείγματα από το δεξί κόλον (0.369,  $p=0.002$ ) και με την θετικότητα για nested CK19 (0.241,  $p=0.042$ ).

Η ανίχνευση με το άμεσο πρωτόκολλο παρουσίασε με όριο τα 3 κύτταρα/mL (cut off value) SN: 49.2% με SP: 58.3%, ενώ το ένδοκυττάριο με όριο το 1 κύτταρο/mL (cut off value) SN: 62.7% με SP: 70%.

Συμπερασματικά η σύγκριση μεταξύ των δύο τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μοριακών (PCR, Nested PCR και RT-PCR) και κυτταρομετρίας ροής (KP), κατέδειξε τη δυναμική υπεροχή της κυτταρομετρίας ροής, χωρίς ωστόσο να μειώνεται η αξία των μοριακών τεχνικών και ειδικότερα η εισαγωγή και χρήση πλέον σήμερα στα σύγχρονα εργαστήρια της ποσοτικής PCR (qPCR) και της πραγματικού χρόνου ποσοτικής PCR [Real-Time Quantitative PCR (qPCR)].

Τέλος θα πρέπει να τονιστεί ότι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν επιπρόσθετο προγνωστικό δείκτη για την εξέλιξη της νόσου σε νεοδιαγνωσθέντες με καρκίνο ασθενείς και χαρακτηρίζονται ως «πραγματικού χρόνου υγρή βιοψία» (“real-time liquid biopsy”).



## “Detection Methods of Circulating Tumor Cells (CTCs) in Colorectal Cancer”

**Antonia Mourtzikou, Biochemist MSc, EurSpecLabMed**

**PhD Thesis**

**Athens, 2017**

### ABSTRACT

Circulating Tumor Cells (CTCs) are detected in peripheral blood of patients with epithelial origin cancers in concentrations of 1 cancer cell per  $10^6$ - $10^7$  leukocytes. They represent an important biological link in the prevalence of cancer, between primary tumor and metastatic disease. The clinical significance of their detection has been studied by several groups and it has been proven that they represent an independent prognostic factor for Disease Free and Overall Survival. They are promising markers for the evaluation of response to therapy and they could be investigated as new therapeutic targets.

The so far used techniques for CTCs detection can be generally divided in cytometric techniques looking at the entire cell and the molecular techniques. Nucleic acid based techniques are mostly represented by RT-PCR whereas immunocytochemistry, Laser Scanning Cytometry, CellSearch system and Flow Cytometry are cytometric techniques.

The CTCs are very rare events, thus an isolation step should be performed before their detection. The isolation can be based on the structural characteristics of the cells (cell size and density) or by using specific tumor markers. Immunomagnetic separation can be divided into negative selection (depletion of leukocytes) using CD45 antibody and positive selection using antibodies common to all tumor cells (EpCAM) or tumor specific antibodies.

Molecular techniques are considered as a gold standard for CTCs detection, because they are characterized by high sensitivity and specificity as well. Few reports have been published on the CTCs detection using Flow Cytometry.

The aim of the present PhD thesis was the comparison of two methods (i.e molecular and flow cytometry) for detection and enumeration of CTCs in peripheral blood of colon cancer patients. Furthermore, to investigate any correlation between the two techniques according to their sensitivity and specificity, their LOD, and finally, the determination of cut off values and the choice of the appropriate “Tumor specific” markers.

The material of the study consisted of 84 samples from peripheral blood draws from colon cancer patients: a) before the surgery and b) the day after the surgery. The control group consisted of 16 healthy blood donors.

The methods used were molecular techniques (PCR, Nested PCR and RT-PCR), along with flow cytometry.

The study was conducted at the laboratory of Diagnostic Cytopathology, in the University General Hospital “Attikon”, in cooperation with the 4<sup>th</sup> Department of the University Surgery Clinic. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University General Hospital “Attikon”.

All statistical analyses were performed using statistical package SPSS statistics for Windows Version: 20.0. For independent variables the t-test was performed and for categorical variables the Fisher’s exact test. Between-group comparison was undertaken using Mann-Whitney test. Linear correlation between two variables was evaluated using Spearman correlation ( $\rho$ ).  $P < 0.05$  were considered to be statistically significant.

The results are given below:

#### Molecular techniques

A statistically significant increase in the pathological samples was identified only in the detection of *CK19* transcripts (with  $p=0.024$ ) using the nested method, while the correlation with the stage of tumor was weak (Grade,  $p=0.012$ ).

A larger sensitivity (SN) was exhibited by the *CK19* nested (67.6%) with specificity (SP) 66.2%. For the *CK20* and the traditional PCR for *CK19* the corresponding percentages were considerably lower (SN: 2.9%, 30.9%, SP: 100%, 75%). The detection of *EGFR* nested exhibited SN: 22.1%, SP: 71.2%.

#### Flow Cytometry

The most significant correlation identified was for the expression of CK with carcinomas (0.256,  $p=0.044$ ), with the existence of lymph node infiltration (0.380  $p=0.008$ ) and with the stage of the disease (0.391,  $p=0.003$ ). For the direct protocol,

considerable correlation was found with the samples of the right colon (0.369,  $p=0.002$ ) and with the positivity for nested *CK19* (0.241,  $p=0.042$ ).

The detection with the direct protocol exhibited, with threshold 3 cells/mL (cut off value), SN: 49.2% with SP: 58.3%, while the intracellular, with threshold 1 cell/mL (cut off value) SN: 62.7% with SP: 70%.

To conclude, the comparison of the two techniques employed in the present doctoral thesis, namely molecular (PCR, Nested PCR and RT-PCR) and flow cytometry, demonstrated the advantage of flow cytometry, without undermining the value of molecular techniques and particularly of the currently introduced and used in modern laboratories techniques of the quantitative PCR (qPCR) and of the real-time quantitative PCR [Real-Time Quantitative PCR (qPCR)].

Summarazing, CTCs can be used as an additional predictor for disease progression in newly diagnosed patients with malignant cancers and therefore are characterized as “real-time liquid biopsy”. The molecular profile of CTCs could also identify therapeutic targets such as the HER2 or EGFR for individualized therapy through the action of biological therapies with monoclonal antibodies such as Herceptin or Erbitux. Therefore, detection of CTCs in the peripheral blood could become not only an excellent non-invasive prognostic tumor marker but also an assistant in the classification of the disease and choice of therapeutic intervention.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### References

1. Yen, T. & Wright, N.A.: **The gastrointestinal tract stem cell niche.** *Stem Cell Rev* 2006,**2**:203-212.
2. Hamilton SR: **Carcinoma of Colon and rectum.** *WHO Classification of Tumours of the Digestive System* 2010,:132-146.
3. Huerta, S.: **Recent advances in the molecular diagnosis and prognosis of colorectal cancer.** *Expert Rev Mol Diagn* 2008,**8**:277-288.
4. Conen, A.M., Winawer, S. J., Friedman, M.A. Gunderson, L.L': **Cancer of the colon, rectum and anus.** . *Mc Graw-Hill Inc.* 1995,:371-375,743-745.
5. **Cecil Παθολογία . Εκδόσεις Λίτσας** 1996,**2**:482-485.
6. [http://www.hopkinscoloncancer.org/subspecialties/heredicolor\\_cancer/diagnosis/diagno.htm#col](http://www.hopkinscoloncancer.org/subspecialties/heredicolor_cancer/diagnosis/diagno.htm#col)
7. Pulverer, B.: **Trio united by division as cell cycle clinches centenary Nobel.** *Nature* 2001,**413**:553.
8. Ponder, B.A.: **Cancer genetics.** *Nature* 2001,**411**:336-341.
9. Woodruff, M.F., Ansell, J.D., Forbes, G.M., Gordon, J.C., Burton, D.I. & Micklem, H.S.: **Clonal interaction in tumours.** *Nature* 1982,**299**:822-824.
10. Mاتيoli, G.: **Cancer clonality and field theory.** *Med Hypotheses* 1988,**27**:149-151.
11. Gelehrker, T., Collins, F. & Ginsburg, D.: *Αρχές Ιατρικής Γενετικής*, vol edn . Edited by . εκδόσεις Πασχαλίδη; 2003.
12. Leedham, S.J. & Wright, N.A.: **Human tumour clonality assessment--flawed but necessary.** *J Pathol* 2008,**215**:351-354.
13. Greaves, M. & Maley, C.C.: **Clonal evolution in cancer.** *Nature* 2012,**481**:306-313.
14. Parsyan, A., Hernández, G. & Meterissian, S.: **Translation initiation in colorectal cancer.** *Cancer Metastasis Rev* 2012,**31**:387-395.
15. Raj, G.V., Moreno, J.G. & Gomella, L.G.: **Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors.** *Cancer* 1998,**82**:1419-1442.
16. Xie, T. & Li, L.: **Stem cells and their niche: an inseparable relationship.** *Development* 2007,**134**:2001-2006.

17. Ailles, L.E. & Weissman, I.L.: **Cancer stem cells in solid tumors.** *Curr Opin Biotechnol* 2007,**18**:460-466.
18. Zeki, S.S., Graham, T.A. & Wright, N.A.: **Stem cells and their implications for colorectal cancer.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011,**8**:90-100.
19. Vera-Ramirez, L., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, M.C., Ramirez-Tortosa, C.L., Granados-Principal, S., Lorente, J.A. & Quiles, J.L.: **Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2011,**80**:347-368.
20. Li, L. & Neaves, W.B.: **Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters.** *Cancer Res* 2006,**66**:4553-4557.
21. **Οδηγίες για την πρόληψη και την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου .** *Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρία* 1998,:10-19.
22. **Οδηγίες για την πρόληψη και την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου.** *Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρία* 1998,:10-19.
23. Τριανταφυλλίδης, Ι.: *Καρκίνος Παχέος Εντέρου και Ορθού*, vol edn . Edited by . Εκδόσεις Δικτύονα; 2009.
24. Cooper, K., Squires, H., Carroll, C., Papaioannou, D., Booth, A., Logan, R.F., Maguire, C., Hind, D. & Tappenden, P.: **Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation.** *Health Technol Assess* 2010,**14**:1-206.
25. Lynch, H.T. & de la Chapelle, A.: **Hereditary colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2003,**348**:919-932.
26. Burt, R.W.: **Colon cancer screening.** *Gastroenterology* 2000,**119**:837-853.
27. Haggitt, R.C., Glotzbach, R.E., Soffer, E.E. & Wruble, L.D.: **Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy.** *Gastroenterology* 1985,**89**:328-336.
28. Ferri: **Clinical advisor.** ,2009:.
29. Wittekind, C. & et al.: **TNM-Atlas .** *Springer, 5th ed* 2004,.
30. Chevlen Eric M.: **“Treating Colorectal Cancer in the Elderly Population”.** 2007.
31. Αγγελούπουλου Κ., Δ.Κ.: **Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια: Μοριακή προσέγγιση για έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου .** *Γενετική του ανθρώπου* 2000,**2**:53-62.

32. Williams G, Quirke P, Shepherd N: **Dataset for Colorectal Cancer** . *The Royal College of Pathologists 2nd Ed* 2007.
33. Knudson, A.G.J.: **Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes.** *Cancer Res* 1985,**45**:1437-1443.
34. Gelehrter T.D., Collins F.S., Ginsburg D.: **Principles of Medical Genetics.** *Williams & Wilkins 2nd Ed* 1998.
35. : **Βιολογία του καρκίνου, 2η έκδοση, εκδ. Π.Χ. Πασχαλίδη.** 2006,:
36. Williams G, Quirke P, Shepherd N: **Dataset for Colorectal Cancer** . *The Royal College of Pathologists (2nd Ed)* 2007.
37. Fearon, E.R. & Vogelstein, B.: **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** *Cell* 1990,**61**:759-767.
38. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W.: **The multistep nature of cancer.** *Trends Genet* 1993,**9**:138-141.
39. Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B.: **Genetic instabilities in human cancers.** *Nature* 1998,**396**:643-649.
40. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M. & Bos, J.L.: **Genetic alterations during colorectal-tumor development.** *N Engl J Med* 1988,**319**:525-532.
41. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y. & White, R.: **Allelotype of colorectal carcinomas.** *Science* 1989,**244**:207-211.
42. Morán, A., Ortega, P., de Juan, C., Fernández-Marcelo, T., Frías, C., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A.J., Díaz-Rubio, E., Iniesta, P. & Benito, M.: **Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance.** *World J Gastrointest Oncol* 2010,**2**:151-158.
43. Kinzler, K.W. & Vogelstein, B.: **Landscaping the cancer terrain.** *Science* 1998,**280**:1036-1037.
44. Boland, C.R., Shin, S.K. & Goel, A.: **Promoter methylation in the genesis of gastrointestinal cancer.** *Yonsei Med J* 2009,**50**:309-321.
45. Lindblom, A.: **Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers.** *Curr Opin Oncol* 2001,**13**:63-69.
46. Leggett, B. & Whitehall, V.: **Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis.** *Gastroenterology* 2010,**138**:2088-2100.

47. Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D. et al.: **CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer.** *Nat Genet* 2006,**38**:787-793.
48. Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N. et al.: **The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers.** *Science* 2006,**314**:268-274.
49. Kinzler KW, V.B.: **Colorectal tumors** . *The Genetic Basis of Human Cancer 2nd ed* 2002,:583-612.
50. Peinado, H., Rafii, S. & Lyden, D.: **Inflammation joins the "niche".** *Cancer Cell* 2008,**14**:347-349.
51. Paget, S.: **The distribution of secondary growths in cancer of the breast.** *Lancet* 1889,**1**:571-573.
52. Hanahan, D. & Weinberg, R.A.: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011,**144**:646-674.
53. Fidler, I.J.: **The organ microenvironment and cancer metastasis.** *Differentiation* 2002,**70**:498-505.
54. Fidler, I.J.: **Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture.** *Cancer Res* 1990,**50**:6130-6138.
55. Fidler, I.J.: **The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.** *Nat Rev Cancer* 2003,**3**:453-458.
56. Aguirre-Ghiso, J.A.: **Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy.** *Nat Rev Cancer* 2007,**7**:834-846.
57. Liotta, L.A. & Kohn, E.C.: **The microenvironment of the tumour-host interface.** *Nature* 2001,**411**:375-379.
58. Radisky, E.S. & Radisky, D.C.: **Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion.** *Rev Endocr Metab Disord* 2007,**8**:279-287.
59. De Wever, O., Nguyen, Q., Van Hoorde, L., Bracke, M., Bruyneel, E., Gespach, C. & Mareel, M.: **Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac.** *FASEB J* 2004,**18**:1016-1018.

60. Mueller, M.M. & Fusenig, N.E.: **Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2004,**4**:839-849.
61. Lorusso, G. & Rüegg, C.: **The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis.** *Histochem Cell Biol* 2008,**130**:1091-1103.
62. Kopfstein, L. & Christofori, G.: **Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment.** *Cell Mol Life Sci* 2006,**63**:449-468.
63. Albini, A. & Sporn, M.B.: **The tumour microenvironment as a target for chemoprevention.** *Nat Rev Cancer* 2007,**7**:139-147.
64. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F.: **Cancer-related inflammation.** *Nature* 2008,**454**:436-444.
65. de Visser, K.E., Eichten, A. & Coussens, L.M.: **Paradoxical roles of the immune system during cancer development.** *Nat Rev Cancer* 2006,**6**:24-37.
66. Tsujino, T., Seshimo, I., Yamamoto, H., Ngan, C.Y., Ezumi, K., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N. & Monden, M.: **Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer.** *Clin Cancer Res* 2007,**13**:2082-2090.
67. Galon, J., Fridman, W. & Pagès, F.: **The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective.** *Cancer Res* 2007,**67**:1883-1886.
68. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P. et al.: **Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.** *Science* 2006,**313**:1960-1964.
69. Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D. et al.: **Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2005,**353**:2654-2666.
70. Li, F., Tiede, B., Massagué, J. & Kang, Y.: **Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis.** *Cell Res* 2007,**17**:3-14.
71. Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F. & Kirchner, T.: **Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2005,**5**:744-749.



72. Scott, J., Kuhn, P. & Anderson, A.R.A.: **Unifying metastasis--integrating intravasation, circulation and end-organ colonization.** *Nat Rev Cancer* 2012,**12**:445-446.
73. Zijlstra, A., Lewis, J., Degryse, B., Stuhlmann, H. & Quigley, J.P.: **The inhibition of tumor cell intravasation and subsequent metastasis via regulation of in vivo tumor cell motility by the tetraspanin CD151.** *Cancer Cell* 2008,**13**:221-234.
74. Lee, G.Y.H. & Lim, C.T.: **Biomechanics approaches to studying human diseases.** *Trends Biotechnol* 2007,**25**:111-118.
75. Miles, F.L., Pruitt, F.L., van Golen, K.L. & Cooper, C.R.: **Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis.** *Clin Exp Metastasis* 2008,**25**:305-324.
76. Shibue, T. & Weinberg, R.A.: **Metastatic colonization: settlement, adaptation and propagation of tumor cells in a foreign tissue environment.** *Semin Cancer Biol* 2011,**21**:99-106.
77. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L.: **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** *Nature* 2001,**414**:105-111.
78. Wicha, M.S., Liu, S. & Dontu, G.: **Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift.** *Cancer Res* 2006,**66**:1883-90; discussion 1895-6.
79. Nguyen, D.X. & Massagué, J.: **Genetic determinants of cancer metastasis.** *Nat Rev Genet* 2007,**8**:341-352.
80. Klein, C.A.: **Parallel progression of primary tumours and metastases.** *Nat Rev Cancer* 2009,**9**:302-312.
81. Ashworth TR: . *Aust. Med. J.* 1869,**14**:146.
82. Miller, M.C., Doyle, G.V. & Terstappen, L.W.M.M.: **Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer.** *J Oncol* 2010,**2010**:617421.
83. Lianidou, E.S.: **Circulating tumor cells--new challenges ahead.** *Clin Chem* 2012,**58**:805-807.
84. ENGELL, H.C.: **Cancer cells in the blood; a five to nine year follow up study.** *Ann Surg* 1959,**149**:457-461.
85. ENGELL, H.C.: **Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation.** *Acta Chir Scand Suppl* 1955,**201**:1-70.

86. Thorsteinsson, M., Söletormos, G. & Jess, P.: **Low number of detectable circulating tumor cells in non-metastatic colon cancer.** *Anticancer Res* 2011,**31**:613-617.
87. Mavroudis, D.: **Circulating cancer cells.** *Ann Oncol* 2010,**21 Suppl 7**:vii95-100.
88. Li, Q.: **Circulating tumor cells: determining its number and what it means.** *Cytometry A* 2010,**77**:211-212.
89. Lianidou, E.S., Mavroudis, D., Sotiropoulou, G., Agelaki, S. & Pantel, K.: **What's new on circulating tumor cells? A meeting report.** *Breast Cancer Res* 2010,**12**:307.
90. Diamandis, E.P., Pantel, K., Scher, H.I., Terstappen, L. & Lianidou, E.: **Circulating cancer cells and their clinical applications.** *Clin Chem* 2011,**57**:1478-1484.
91. Markou, A., Liang, Y. & Lianidou, E.: **Prognostic, therapeutic and diagnostic potential of microRNAs in non-small cell lung cancer.** *Clin Chem Lab Med* 2011,**49**:1591-1603.
92. Pantel, K. & Riethdorf, S.: **Pathology: are circulating tumor cells predictive of overall survival?.** *Nat Rev Clin Oncol* 2009,**6**:190-191.
93. Tralhão, J.G., Hoti, E., Serôdio, M., Laranjeiro, P., Paiva, A., Abrantes, A.M., Pais, M.L., Botelho, M.F. & Castro Sousa, F.: **Perioperative tumor cell dissemination in patients with primary or metastatic colorectal cancer.** *Eur J Surg Oncol* 2010,**36**:125-129.
94. Dotan, E., Cohen, S.J., Alpaugh, K.R. & Meropol, N.J.: **Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges.** *Oncologist* 2009,**14**:1070-1082.
95. Wang, J., Wu, C., Lu, C., Hsieh, J., Wu, D., Huang, S. & Lin, S.: **Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis.** *World J Surg* 2006,**30**:1007-1013.
96. Takeuchi, H. & Kitagawa, Y.: **Circulating tumor cells in gastrointestinal cancer.** *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2010,**17**:577-582.
97. Alix-Panabières, C. & Pantel, K.: **Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer.** *Clin Chem* 2012,:

98. Coumans, F.A.W., Ligthart, S.T., Uhr, J.W. & Terstappen, L.W.M.M.: **Challenges in the Enumeration and Phenotyping of CTC.** *Clin Cancer Res* 2012,**18**:5711-5718.
99. Bonmassar, L., Fossile, E., Scoppola, A., Graziani, G., Prete, S.P., Formica, V., Cappelletti, D., De Vecchis, L., Cardillo, A., Concolino, F. et al.: **Detection of circulating tumor cells is improved by drug-induced antigen up-regulation: preclinical and clinical studies.** *Anticancer Res* 2010,**30**:4721-4730.
100. Papavasiliou, P., Fisher, T., Kuhn, J., Nemunaitis, J. & Lamont, J.: **Circulating tumor cells in patients undergoing surgery for hepatic metastases from colorectal cancer.** *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2010,**23**:11-14.
101. Pilati, P., Mocellin, S., Bertazza, L., Galdi, F., Briarava, M., Mammano, E., Tessari, E., Zavagno, G. & Nitti, D.: **Prognostic value of putative circulating cancer stem cells in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis.** *Ann Surg Oncol* 2012,**19**:402-408.
102. Strati, A., Markou, A., Parisi, C., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulas, V. & Lianidou, E.: **Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR.** *BMC Cancer* 2011,**11**:422.
103. Chimonidou, M., Strati, A., Tzitzira, A., Sotiropoulou, G., Malamos, N., Georgoulas, V. & Lianidou, E.S.: **DNA methylation of tumor suppressor and metastasis suppressor genes in circulating tumor cells.** *Clin Chem* 2011,**57**:1169-1177.
104. Hayes, D.F. & Smerage, J.B.: **Circulating tumor cells.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010,**95**:95-112.
105. Gervasoni, A., Monasterio Muñoz, R.M., Wengler, G.S., Rizzi, A., Zaniboni, A. & Parolini, O.: **Molecular signature detection of circulating CTC tumor cells using a panel of selected genes.** *Cancer Lett* 2008,**263**:267-279.
106. Katsumata, K., Sumi, T., Mori, Y., Hisada, M., Tsuchida, A. & Aoki, T.: **Detection and evaluation of epithelial cells in the blood of colon cancer patients using RT-PCR.** *Int J Clin Oncol* 2006,**11**:385-389.
107. Kraus, J., Pantel, K., Pinkel, D., Albertson, D.G. & Speicher, M.R.: **High-resolution genomic profiling of occult micrometastatic tumor cells.** *Genes Chromosomes Cancer* 2003,**36**:159-166.
108. Putz, E., Witter, K., Offner, S., Stosiek, P., Zippelius, A., Johnson, J., Zahn, R., Riethmüller, G. & Pantel, K.: **Phenotypic characteristics of cell lines derived**

**from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases.** *Cancer Res* 1999,**59**:241-248.

109. Alix-Panabières, C., Riethdorf, S. & Pantel, K.: **Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis.** *Clin Cancer Res* 2008,**14**:5013-5021.

110. Parisi, C., Markou, A. & Lianidou, E.S.: **Development of a multiplexed PCR-coupled liquid bead array assay for vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants.** *Clin Biochem* 2012,**45**:475-482.

111. Gerhard, M., Juhl, H., Kalthoff, H., Schreiber, H.W., Wagener, C. & Neumaier, M.: **Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction.** *J Clin Oncol* 1994,**12**:725-729.

112. Pantel, K. & Alix-Panabières, C.: **Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives.** *Trends Mol Med* 2010,**16**:398-406.

113. Pantel, K. & Brakenhoff, R.H.: **Dissecting the metastatic cascade.** *Nat Rev Cancer* 2004,**4**:448-456.

114. Smirnov, D.A., Zweitzig, D.R., Foulk, B.W., Miller, M.C., Doyle, G.V., Pienta, K.J., Meropol, N.J., Weiner, L.M., Cohen, S.J., Moreno, J.G. et al.: **Global gene expression profiling of circulating tumor cells.** *Cancer Res* 2005,**65**:4993-4997.

115. O'Hara, S.M., Moreno, J.G., Zweitzig, D.R., Gross, S., Gomella, L.G. & Terstappen, L.W.M.M.: **Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormone-refractory prostate cancer.** *Clin Chem* 2004,**50**:826-835.

116. Mostert, B., Sleijfer, S., Foekens, J.A. & Gratama, J.W.: **Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer.** *Cancer Treat Rev* 2009,**35**:463-474.

117. Paterlini-Bréchet, P.: **Organ-specific markers in circulating tumor cell screening: an early indicator of metastasis-capable malignancy.** *Future Oncol* 2011,**7**:849-871.

118. Alunni-Fabbroni, M. & Sandri, M.T.: **Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization.** *Methods* 2010,**50**:289-297.

119. Paterlini-Brechot, P. & Benali, N.L.: **Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions.** *Cancer Lett* 2007,**253**:180-204.
120. Stebbing, J. & Jiao, L.R.: **Circulating tumour cells as more than prognostic markers.** *Lancet Oncol* 2009,**10**:1138-1139.
121. Pantel, K., Brakenhoff, R.H. & Brandt, B.: **Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells.** *Nat Rev Cancer* 2008,**8**:329-340.
122. Small, A.C., Gong, Y., Oh, W.K., Hall, S.J., van Rijn, C.J.M. & Galsky, M.D.: **The emerging role of circulating tumor cell detection in genitourinary cancer.** *J Urol* 2012,**188**:21-26.
123. Fehm, T., Müller, V., Alix-Panabières, C. & Pantel, K.: **Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance.** *Breast Cancer Res* 2008,**10 Suppl 1**:S1.
124. Fehm, T., Braun, S., Müller, V., Janni, W., Gebauer, G., Marth, C., Schindlbeck, C., Wallwiener, D., Borgen, E., Naume, B. et al.: **A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation.** *Cancer* 2006,**107**:885-892.
125. Braun, S., Vogl, F.D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M.P., Coombes, R.C., Schlimok, G., Diel, I.J., Gerber, B., Gebauer, G. et al.: **A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer.** *N Engl J Med* 2005,**353**:793-802.
126. Pantel, K., Felber, E. & Schlimok, G.: **Detection and characterization of residual disease in breast cancer.** *J Hematother* 1994,**3**:315-322.
127. Braun, S., Pantel, K., Müller, P., Janni, W., Hepp, F., Kantenich, C.R., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G. et al.: **Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.** *N Engl J Med* 2000,**342**:525-533.
128. Borgen, E., Beiske, K., Trachsel, S., Nesland, J.M., Kvalheim, G., Herstad, T.K., Schlichting, E., Qvist, H. & Naume, B.: **Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase.** *J Pathol* 1998,**185**:427-434.
129. Willipinski-Stapelfeldt, B., Riethdorf, S., Assmann, V., Woelfle, U., Rau, T., Sauter, G., Heukeshoven, J. & Pantel, K.: **Changes in cytoskeletal protein**

**composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells.** *Clin Cancer Res* 2005,**11**:8006-8014.

130. Braun, S. & Pantel, K.: **Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance.** *Med Oncol* 1999,**16**:154-165.

131. Borgen, E., Naume, B., Nesland, J.M., Kvalheim, G., Beiske, K., Fodstad, O., Diel, I., Solomayer, E.F., Theocharous, P., Coombes, R.C. et al.: **Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells.** *Cytotherapy* 1999,**1**:377-388.

132. Lianidou, E.S. & Markou, A.: **Molecular assays for the detection and characterization of CTCs.** *Recent Results Cancer Res* 2012,**195**:111-123.

133. Ludwig, J.A. & Weinstein, J.N.: **Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection.** *Nat Rev Cancer* 2005,**5**:845-856.

134. Tsouma, A., Aggeli, C., Lembessis, P., Zografos, G., Korkolis, D., Pectasides, D., Skondra, M., Pissimissis, N., Tzonou, A. & Koutsilieris, M.: **Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients.** *World J Gastroenterol* 2010,**16**:5965-5974.

135. Allen, J.E. & El-Deiry, W.S.: **Circulating Tumor Cells and Colorectal Cancer.** *Curr Colorectal Cancer Rep* 2010,**6**:212-220.

136. Lloyd, J.M., McIver, C.M., Stephenson, S., Hewett, P.J., Rieger, N. & Hardingham, J.E.: **Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells.** *Clin Cancer Res* 2006,**12**:417-423.

137. Zieglschmid, V., Hollmann, C. & Böcher, O.: **Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005,**42**:155-196.

138. Galamb, O., Sipos, F., Solymosi, N., Spisák, S., Krenács, T., Tóth, K., Tulassay, Z. & Molnár, B.: **Diagnostic mRNA expression patterns of inflamed, benign, and malignant colorectal biopsy specimen and their correlation with peripheral blood results.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008,**17**:2835-2845.

139. Marti, G.E., Stetler-Stevenson, M., Bleasing, J.J. & Fleisher, T.A.: **Introduction to flow cytometry.** *Semin Hematol* 2001,**38**:93-99.

140. Recktenwald, D.J.: **Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration.** *J Hematother* 1993,**2**:387-394.

141. Brown, M. & Wittwer, C.: **Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology.** *Clin Chem* 2000,**46**:1221-1229.
142. Mourtzikou, A., Kroupis, C., Poupouridou, N., Christodoulou, S., Skondra, M., Kastania, A., Athanasas, G., Pectasides, D. & Dimas, K.: **Molecular Detection of Circulating Tumor Cells in peripheral blood of colon cancer patients.** *Journal of GHR* 2012,**1**:74-79.
143. Lianidou, E.S. & Markou, A.: **Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer.** *Clin Chem Lab Med* 2011,**49**:1579-1590.
144. Van der Auwera, I., Peeters, D., Benoy, I.H., Elst, H.J., Van Laere, S.J., Prové, A., Maes, H., Huget, P., van Dam, P., Vermeulen, P.B. et al.: **Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer.** *Br J Cancer* 2010,**102**:276-284.
145. Pinzani, P., Salvadori, B., Simi, L., Bianchi, S., Distanti, V., Cataliotti, L., Pazzagli, M. & Orlando, C.: **Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection.** *Hum Pathol* 2006,**37**:711-718.
146. Ring, A.E., Zabaglo, L., Ormerod, M.G., Smith, I.E. & Dowsett, M.: **Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques.** *Br J Cancer* 2005,**92**:906-912.
147. Zippelius, A., Kufer, P., Honold, G., Köllermann, M., Oberneder, R., Schlimok, G., Riethmüller, G. & Pantel, K.: **Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow.** *J Clin Oncol* 1997,**15**:2701-2708.
148. Kowalewska, M., Chechlińska, M., Markowicz, S., Kober, P. & Nowak, R.: **The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes.** *Eur J Cancer* 2006,**42**:2671-2674.
149. Gradilone, A., Gazzaniga, P., Silvestri, I., Gandini, O., Trasatti, L., Lauro, S., Frati, L. & Aglianò, A.: **Detection of CK19, CK20 and EGFR mRNAs in peripheral blood of carcinoma patients: correlation with clinical stage of disease.** *Oncol Rep* 2003,**10**:217-222.

150. Ruud, P., Fodstad, O. & Hovig, E.: **Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells.** *Int J Cancer* 1999,**80**:119-125.
151. Novaes, M., Bendit, I., Garicochea, B. & del Giglio, A.: **Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of cytokeratin 19 expression in the peripheral blood mononuclear cells of normal female blood donors.** *Mol Pathol* 1997,**50**:209-211.
152. Jung, R., Krüger, W., Hosch, S., Holweg, M., Kröger, N., Gutensohn, K., Wagener, C., Neumaier, M. & Zander, A.: **Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro.** *Br J Cancer* 1998,**78**:1194-1198.
153. Koch, M., Weitz, J., Kienle, P., Benner, A., Willeke, F., Lehnert, T., Herfarth, C. & von Knebel Doeberitz, M.: **Comparative analysis of tumor cell dissemination in mesenteric, central, and peripheral venous blood in patients with colorectal cancer.** *Arch Surg* 2001,**136**:85-89.
154. Sträter, J., Wedding, U., Barth, T., Koretz, K., Elsing, C. & Möller, P.: **Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells.** *Gastroenterology* 1996,**110**:1776-1784.
155. Wong, S., Chan, C., Ma, B., Hui, E., Ng, S., Lai, P., Cheung, M., Lo, E., Chan, A., Lam, M. et al.: **Clinical significance of cytokeratin 20-positive circulating tumor cells detected by a refined immunomagnetic enrichment assay in colorectal cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2009,**15**:1005-1012.
156. Bustin, S., Siddiqi, S., Ahmed, S., Hands, R. & Dorudi, S.: **Quantification of cytokeratin 20, carcinoembryonic antigen and guanylyl cyclase C mRNA levels in lymph nodes may not predict treatment failure in colorectal cancer patients.** *Int J Cancer* 2004,**108**:412-417.
157. Schuster, R., Max, N., Mann, B., Heufelder, K., Thilo, F., Gröne, J., Rokos, F., Buhr, H., Thiel, E. & Keilholz, U.: **Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers.** *Int J Cancer* 2004,**108**:219-227.



158. Moll, R., Löwe, A., Laufer, J. & Franke, W.: **Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies.** *Am J Pathol* 1992,**140**:427-447.
159. Moll, R., Zimbelmann, R., Goldschmidt, M., Keith, M., Laufer, J., Kasper, M., Koch, P. & Franke, W.: **The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas.** *Differentiation* 1993,**53**:75-93.
160. Miettinen, M.: **Keratin 20: immunohistochemical marker for gastrointestinal, urothelial, and Merkel cell carcinomas.** *Mod Pathol* 1995,**8**:384-388.
161. Denis, M., Lipart, C., Leborgne, J., LeHur, P., Galmiche, J., Denis, M., Ruud, E., Truchaud, A. & Lustenberger, P.: **Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients.** *Int J Cancer* 1997,**74**:540-544.
162. Bustin, S., Gyselman, V., Williams, N. & Dorudi, S.: **Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients.** *Br J Cancer* 1999,**79**:1813-1820.
163. Champelovier, P., Mongelard, F. & Seigneurin, D.: **CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells.** *Anticancer Res* 1999,**19**:2073-2078.
164. Jung, R., Petersen, K., Krüger, W., Wolf, M., Wagener, C., Zander, A. & Neumaier, M.: **Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes.** *Br J Cancer* 1999,**81**:870-873.
165. Tsavellas, G., Huang, A., McCullough, T., Patel, H., Araia, R. & Allen-Mersh, T.: **Flow cytometry correlates with RT-PCR for detection of spiked but not circulating colorectal cancer cells .** *Clin Exp Metastasis* 2002,**19**:495-502.
166. Antolovic, D., Galindo, L., Carstens, A., Rahbari, N., Büchler, M., Weitz, J. & Koch, M.: **Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies.** *BMC Biotechnol* 2010,**10**:35.
167. Vlems, F., Soong, R., Diepstra, H., Punt, C., Wobbles, T., Tabiti, K. & van Muijen, G.: **Effect of blood sample handling and reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay sensitivity on detection of CK20 expression in healthy donor blood.** *Diagn Mol Pathol* 2002,**11**:90-97.

168. Koyanagi, K., Bilchik, A., Saha, S., Turner, R., Wiese, D., McCarter, M., Shen, P., Deacon, L., Elashoff, D. & Hoon, D.: **Prognostic relevance of occult nodal micrometastases and circulating tumor cells in colorectal cancer in a prospective multicenter trial.** *Clin Cancer Res* 2008,**14**:7391-7396.
169. Prigent, S. & Lemoine, N.: **The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands.** *Prog Growth Factor Res* 1992,**4**:1-24.
170. Salomon, D., Brandt, R., Ciardiello, F. & Normanno, N.: **Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.** *Crit Rev Oncol Hematol* 1995,**19**:183-232.
171. Vlems, F., Diepstra, J., Cornelissen, I., Ligtenberg, M., Wobbes, T., Punt, C., van Krieken, J., Ruers, T. & van Muijen, G.: **Investigations for a multi-marker RT-PCR to improve sensitivity of disseminated tumor cell detection.** *Anticancer Res* 2003,**23**:179-186.
172. De Luca, A., Pignata, S., Casamassimi, A., D'Antonio, A., Gridelli, C., Rossi, A., Cremona, F., Parisi, V., De Matteis, A. & Normanno, N.: **Investigations for a multi-marker RT-PCR to improve sensitivity of disseminated tumor cell detection.** *Clin Cancer Res* 2000,**6**:1439-1444.
173. De Luca, A., Pignata, S., Casamassimi, A., D'Antonio, A., Gridelli, C., Rossi, A., Cremona, F., Parisi, V., De Matteis, A. & Normanno, N.: **Detection of circulating tumor cells in carcinoma patients by a novel epidermal growth factor receptor reverse transcription-PCR assay.** *Clin Cancer Res* 2000,**6**:1439-1444.
174. Hristozova, T., Korschak, R., Budach, V. & Tinhofer, I.: **A Simple Multicolor Flow Cytometry Protocol for Detection and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells in Epithelial Cancers.** *Cytometry Part A* 2012,**81A**:489-495.
175. Garrigós, N., Gallego, J., Guillén-Ponce, C., Guaraz, P., García-Bautista, M., Castillejo, A., Gómez-Martínez, A., Carrato, A., Rodríguez-Lescure, A. & Soto, J.: **Circulating tumour cell analysis as an early marker for relapse in stage II and III colorectal cancer patients: a pilot study .** *Clin Transl Oncol* 2010,**12**:142-147.
176. Hu, Y.: **Detection of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Utilizing Multiparameter Flow Cytometry and Assessment of the Prognosis of Patients in Different CTCs Levels.** *Cytometry Part A* 2010,**77A**:213-219.
177. Watanabe, M., Uehara, Y., Yamashita, N., Fujimura, Y., Nishio, K., Sawada, T., Takeda, K., Koizumi, F. & Koh, Y.: **Multicolor Detection of Rare Tumor Cells**

**in Blood Using a Novel Flow Cytometry-Based System.** *Cytometry Part A* 2014,**85A**:206-213.

178. Sawada, T., Watanabe, M., Fujimura, Y., Yagishita, S., Shimoyama, T., Maeda, Y., Kanda, S., Yunokawa, M., Tamura, K., Tamura, T. et al.: **Sensitive cytometry based system for enumeration, capture and analysis of gene mutations of circulating tumor cells.** *Cancer Sci* 2016,**107**:307-314.

179. Takao, M. & Takeda, K.: **Enumeration, Characterization, and Collection of Intact Circulating Tumor Cells by Cross Contamination-Free Flow Cytometry.** *Cytometry Part A* 2011,**79A**:107-117.

180. Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M. et al.: **Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** *N Engl J Med* 2001,**344**:783-792.

181. Zhang, L., Wu, G. & Pantel, K.: **Detection of circulating tumor cells by RT-PCR significantly associated with poor prognosis in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2011,**130**:359-364.