



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ  
ΩΟΘΗΚΩΝ**

**ΛΥΔΙΑ ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2019**

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



**Ευρωπαϊκή Ένωση**  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα**  
**Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,**  
**Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Μελέτη δεικτών μεθυλίωσης στον καρκίνο των ωοθηκών

**ΛΥΔΙΑ ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ**

**A.M.: 001413**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:**

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

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:**

**Ευρύκλεια Λιανίδου**, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

**Ντία Γαλανοπούλου**, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

**Αικατερίνη Παυλάκη**, Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Ευρύκλεια Λιανίδου**, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

**Ντία Γαλανοπούλου**, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

**Αικατερίνη Παυλάκη**, Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**Χρίστος Παπαδημητρίου**, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**Νικόλαος Θωμάϊδης**, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

**Γεωργία Σωτηροπούλου**, Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

**Χρήστος Κρούπης**, Αναπλ. Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 13/12/2019**



Στους γονείς μου



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί τον τέταρτο συχνότερα εμφανιζόμενο γυναικολογικό καρκίνο και την πέμπτη αιτία θανάτου σχετιζόμενη με καρκίνο στις γυναίκες. Χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη ιστολογική και μοριακή ετερογένεια, με κυριότερο υπότυπο τον ορώδη καρκίνο ωοθηκών υψηλού βαθμού κακοήθειας (high grade serous ovarian carcinoma, HGSC), που μελετήθηκε στη διατριβή. Η παρούσα διατριβή έχει σκοπό τη μελέτη της μεθυλίωσης επιλεγμένων γονιδίων στον ορώδη καρκίνο ωοθηκών υψηλού βαθμού κακοήθειας. Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι δείγματα πρωτοπαθών όγκων, αντίστοιχα δείγματα παρακείμενων ιστών, καθώς και αντίστοιχα δείγματα κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) από τις ίδιες ασθενείς. Οι μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν συνιστούν την real-time MSP για την ανίχνευση της μεθυλίωσης σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και πλάσματος, καθώς και την MS-HRMA για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της μεθυλίωσης σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών.

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1A*, όπου πραγματοποιήθηκε μία συγκριτική μελέτη σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και ctDNA ασθενών με HGSC. Η μεθυλίωση του γονιδίου στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένη ολική επιβίωση (overall survival, OS) των ασθενών. Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης υπέδειξαν για πρώτη φορά την προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου στον HGSC.

Στη συνέχεια, ακολούθησε μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1*, όπου πραγματοποιήθηκε μελέτη σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και ctDNA ασθενών με HGSC. Η μεθυλίωση του γονιδίου στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένα OS και διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (progression free survival, PFS) των ασθενών. Η παρούσα μελέτη αποτέλεσε μία προσπάθεια αποσαφήνισης του ρόλου της μεθυλίωσης του γονιδίου στον HGSC.

Ακολούθησαν οι μελέτες μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται σε μοριακά μονοπάτια που διαταράσσονται στον HGSC, όπως τα γονίδια *BRCA1* και *MGMT* που συμμετέχουν σε διαφορετικές πορείες επιδιόρθωσης του DNA, το γονίδιο *NR2F1* που συμμετέχει ενεργά στην κυτταρική αδράνεια, τα γονίδια *RASSF10* που εμπλέκεται στην ανάπτυξη χημειοαντίστασης, καθώς και το γονίδιο *RKIP* που συμμετέχει στην EMT διαδικασία. Ύστερα από τη συνολική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων, με μειωμένο PFS. Επιπλέον, η μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* στο ctDNA συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένο PFS.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* σε δείγματα κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (circulating tumor cells, CTCs) ασθενών με HGSC, με την εφαρμογή RT-qPCR. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου με μειωμένη OS των ασθενών, υποδεικνύοντας μία πιθανή προγνωστική σημασία στον HGSC.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Μεθυλίωση του DNA

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Καρκίνος ωοθηκών, Μεθυλίωση του DNA, Υγρή Βιοψία, κυκλοφορούν καρκινικό DNA, Επιγενετική

## ABSTRACT

Ovarian cancer is the fourth most common gynecological malignancy and the fifth leading cause of cancer-related mortality in women. It is characterized by a remarkable histological and molecular heterogeneity, with the main subtype being high grade serous ovarian carcinoma (HGSC). This doctoral thesis is focused on DNA methylation of selected genes in clinical samples of patients with HGSC. For all methylation studies, we recruited FFPE samples of primary tumors, adjacent morphologically normal tissues, as well as corresponding plasma samples from the same patients. For the evaluation of methylation, we used two different methodologies, a real-time methylation specific PCR (real-time MSP) for the detection of methylation in tumor and adjacent FFPEs, as well as plasma circulating tumor DNA (ctDNA), and a methylation-sensitive high-resolution melting analysis (MS-HRMA) for the semi-quantitative estimation of methylation in tumor and adjacent FFPEs.

At first, in a comparison study, we investigated *RASSF1A* promoter methylation status in primary tumors, adjacent morphologically normal tissues and corresponding plasma samples of patients with HGSC. In primary tumors and adjacent tissues, *RASSF1A* promoter methylation was significantly correlated with worse patients' overall survival (OS). In this study, we reported for the first time that *RASSF1A* promoter methylation provides significant prognostic information in HGSC patients.

We next examined *ESR1* methylation in primary tumors and ctDNA of patients with HGSC. In primary tumors, *ESR1* methylation was significantly correlated with better patients' OS and progression free survival (PFS). In this study, we attempted to clarify the role of *ESR1* methylation in HGSC.

We next performed methylation studies of specific genes involved in molecular pathways which are frequently disrupted in HGSC, such as *BRCA1* and *MGMT* genes involved in different ways in DNA repair, the *NR2F1* gene that is actively involved in the establishment of a dormant phenotype, the *RASSF10* gene involved in the development of chemoresistance and the *RKIP* gene involved in the EMT process. After the statistical analysis of the results, we observed a significant correlation between *NR2F1* methylation in primary tumors with worse patients' PFS. Furthermore, *BRCA1* methylation in ctDNA was significantly correlated with better PFS.

Finally, we estimated *PD-L1* gene expression in circulating tumor cells (CTCs) of patients with HGSC, using RT-qPCR. Based on the results of the study, a statistically significant association between *PD-L1* gene expression and worse patients' OS was observed, indicating a possible prognostic significance in HGSC.

**SUBJECT AREA:** DNA methylation

**KEYWORDS:** Ovarian cancer, DNA methylation, Liquid Biopsy, circulating tumor DNA, Epigenetics



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.1.1 Ανατομία της ωοθήκης.....	2
1.2 Σταδιοποίηση των όγκων κατά FIGO.....	3
1.3 Ταξινόμηση του καρκίνου των ωοθηκών .....	4
1.3.1 Καρκινώματα τύπου I .....	5
1.3.1.1 LGSC.....	5
1.3.1.2 Ενδομητριοειδή και διαυγοκυτταρικά καρκινώματα .....	6
1.3.1.3 Οροβλεννώδη και βλεννώδη καρκινώματα .....	6
1.3.1.4 Όγκοι Brenner .....	7
1.3.2 Καρκινώματα τύπου II .....	7
1.3.2.1 HGSC.....	7
1.3.2.2 Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα και καρκινοσάρκωμα.....	8
1.4 Όγκοι χαμηλού κακοήθους δυναμικού .....	9
1.5 Προέλευση των κυριότερων ιστολογικών υποτύπων .....	9
1.5.1 Ορώδη καρκινώματα.....	10
1.5.2 Ενδομητριοειδή και διαυγοκυτταρικά καρκινώματα .....	11
1.5.3 Βλεννώδη καρκινώματα .....	11
1.6 Η μεταστατική διαδικασία στον καρκίνο των ωοθηκών .....	12
1.7 Πρωτεϊνικοί βιοδείκτες στον καρκίνο των ωοθηκών .....	15
1.7.1 CA-125 .....	16
1.7.2 HE4 .....	17
1.7.3. Ο αλγόριθμος ROMA και η εξέταση OV1™.....	18
1.8 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών .....	19
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....</b>	<b>21</b>
<b>ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....</b>	<b>21</b>

2.1 Εισαγωγή.....	21
2.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) στον καρκίνο των ωθηκών.....	24
2.3 Κυκλοφορούν εξωκυτταρικό DNA (cfDNA) στον καρκίνο των ωθηκών.....	33
2.3.1 Κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA) στον καρκίνο των ωθηκών .....	42
2.3.1.1 Σωματικές και γενετικές μεταλλάξεις .....	43
2.3.1.2 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες/LOH .....	48
2.3.1.3 Μεθυλίωση στο ctDNA.....	49
2.4 Κυκλοφορούντα εξωκυτταρικά και εξωσωμικά miRNAs .....	52
2.4.1 Κυκλοφορούντα εξωκυτταρικά miRNAs (cfmiRNAs) .....	57
2.4.1.1 Διάγνωση .....	57
2.4.1.2 Πρόγνωση.....	62
2.4.1.3 Ανταπόκριση στη θεραπεία .....	62
2.4.2 Κυκλοφορούντα εξωσωμικά miRNAs.....	63
2.4.2.1 Διάγνωση .....	63
2.4.2.2 Πρόγνωση.....	64
2.4.2.3 Ανταπόκριση στη θεραπεία .....	65
2.5 Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	65
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....</b>	<b>66</b>
<b>ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....</b>	<b>66</b>
3.1 Επιγενετική.....	66
3.2 Φυσιολογική μεθυλίωση .....	67
3.3 Μεθυλίωση και καρκίνος.....	70
3.3.1 Υπερμεθυλίωση και αποσιώπηση γονιδίων στον καρκίνο.....	71
3.3.2 Υπομεθυλίωση στον καρκίνο .....	72
3.4 Τεχνολογίες ανίχνευσης της μεθυλίωσης .....	74
3.4.1 Τεχνολογίες βασισόμενες στη χρήση περιοριστικού ενζύμου.....	75
3.4.2 Τεχνολογίες βασισόμενες στην κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο.....	75

3.4.2.1 NGS τεχνολογίες που βασίζονται στην κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο .....	76
3.4.2.2 Μικροσυστοιχίες μεθυλίωσης.....	77
3.4.2.3 PCR ειδική στη μεθυλίωση (MSP) και real-time MSP.....	78
3.4.2.4 MS-HRMA .....	78
3.4.3 Τεχνολογίες βασιζόμενες στον εμπλουτισμό .....	79
3.4.4 Τεχνολογίες βασιζόμενες στη μελέτη των 5-υδροξυμεθυλοκυτοσινών .....	80
3.5 Μεθυλίωση και καρκίνος των ωοθηκών.....	81
3.6 Επιγενετική θεραπεία στον καρκίνο των ωοθηκών.....	82
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....</b>	<b>83</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....</b>	<b>84</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>84</b>
4.1 Κλινικά δείγματα και καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	84
4.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από FFPEs .....	87
4.2.1 Αρχή μεθόδου .....	87
4.2.2 Αντιδραστήρια και υλικά .....	87
4.2.3 Πειραματική πορεία .....	87
4.3 Απομόνωση cfDNA από 2mL πλάσματος.....	90
4.3.1 Αρχή μεθόδου .....	90
4.3.2 Αντιδραστήρια και υλικά .....	90
4.3.3 Πειραματική πορεία .....	91
4.4 Φωτομετρικός προσδιορισμός του DNA .....	93
4.4.1 Πειραματική πορεία .....	94
4.5 Χημική μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (DNA conversion).....	94
4.5.1 Αρχή μεθόδου .....	94
4.5.2 Αντιδραστήρια και υλικά .....	95
4.5.3 Πειραματική πορεία .....	95
4.6 Αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR).....	97

4.6.1 Προετοιμασία της αντίδρασης - Οργανολογία .....	97
4.6.2 Έλεγχος ποιότητας του γενωμικού DNA με real-time PCR στο εξόνιο 20 του γονιδίου <i>PIK3CA</i> .....	99
4.6.3 Έλεγχος ποιότητας του converted DNA με real-time PCR για το γονίδιο αναφοράς <i>ACTB</i> .....	99
4.7 Real-time Methylation Specific PCR (real-time MSP) .....	100
4.7.1 Αρχή μεθόδου .....	100
4.8 Ανάλυση καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (Methylation-Sensitive High Resolution Melting Analysis, MS-HRMA) .....	103
4.8.1 Αρχή μεθόδου .....	103
4.9 Αντίδραση ποσοτικής PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR) .....	105
4.9.1 Αρχή μεθόδου .....	105
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....</b>	<b>107</b>
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>RASSF1A</i>: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΟΓΚΩΝ, ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΩΝ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ctDNA ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ HGSC .....</b>	<b>107</b>
5.1 Εισαγωγή.....	107
5.2 Κλινικά δείγματα .....	108
5.3 Πειραματική πορεία.....	108
5.4 Μέθοδοι ανίχνευσης της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> .....	109
5.5 Στατιστική ανάλυση.....	111
5.6 Πειραματικά αποτελέσματα .....	112
5.6.1 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> με real-time MSP .....	112
5.6.2 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> με MS-HRMA.....	112
5.6.3 Σύγκριση μεταξύ των δύο μεθοδολογιών real-time MSP και MS-HRMA.....	113
5.6.4 Σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και ctDNA .....	114
5.6.5 Προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> σε ασθενείς με HGSC .....	116
5.7 Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	123

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 .....</b>	<b>126</b>
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>ESR1</i> ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΝ ctDNA ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ HGSC.....</b>	<b>126</b>
6.1 Εισαγωγή.....	126
6.2 Κλινικά δείγματα .....	127
6.3 Πειραματική πορεία.....	127
6.4 Στατιστική ανάλυση.....	128
6.5 Πειραματικά αποτελέσματα .....	129
6.5.1 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>ESR1</i> στους πρωτοπαθείς όγκους.....	129
6.5.2 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>ESR1</i> στα αντίστοιχα ctDNA.....	129
6.5.3 Προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>ESR1</i> σε ασθενείς με HGSC.	130
6.5.4 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>ESR1</i> με MS-HRMA .....	131
6.6 Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	132
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 .....</b>	<b>135</b>
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>NR2F1</i>, <i>BRCA1</i>, <i>MGMT</i>, <i>RASSF10</i> ΚΑΙ <i>RKIP</i> ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΝ ctDNA ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ HGSC .....</b>	<b>135</b>
7.1 Εισαγωγή.....	135
7.2 Κλινικά δείγματα .....	136
7.3 Πειραματική πορεία.....	137
7.4 Στατιστική ανάλυση.....	138
7.5 Πειραματικά αποτελέσματα .....	138
7.5.1 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>NR2F1</i> .....	138
7.5.2 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>BRCA1</i> .....	142
7.5.3 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>MGMT</i> .....	145
7.5.4 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF10</i> .....	145
7.5.5 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RKIP</i> .....	146
7.5.6 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>SOX17</i> .....	147
7.5.7 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>CST6</i> .....	148
7.5.8 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μελετών μεθυλίωσης.....	149

7.6 Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	151
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 .....</b>	<b>155</b>
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>PD-L1</i> ΣΤΑ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ HGSC.....</b>	<b>155</b>
8.1 Εισαγωγή.....	155
8.2 Κλινικά δείγματα .....	155
8.3 Πειραματική πορεία.....	155
8.4 Στατιστική ανάλυση.....	156
8.5 Πειραματικά αποτελέσματα .....	156
8.6 Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	157
<b>ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>160</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>	<b>162</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>	<b>166</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1.1:</b> Εκτίμηση των α) νέων περιστατικών και β) θνησιμότητας, παγκοσμίως, για όλους τους τύπους καρκίνου, στις γυναίκες όλων των ηλικιών, το έτος 2018.....	1
<b>Σχήμα 1.2:</b> Ανατομία της ωοθήκης.....	2
<b>Σχήμα 1.3:</b> Οι περιοχές προέλευσης των διαφορετικών ιστολογικών υποτύπων.....	10
<b>Σχήμα 1.4:</b> Σύγκριση μεταξύ της γραμμικής και της παράλληλης κλωνικής επέκτασης στον καρκίνο των ωοθηκών.....	14
<b>Σχήμα 1.5:</b> Συμμετοχή των CSCs στην ανάπτυξη της υποτροπιάζουσας νόσου και στην επακόλουθη μεταστατική διαδικασία.....	15
<b>Σχήμα 1.6:</b> Σύγκριση των CA-125 και HE4 για τη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών, σε σχέση με άλλες γυναικολογικές παθήσεις, με τη χρήση καμπυλών ROC.....	18
<b>Σχήμα 2.1:</b> Οι κυριότερες εφαρμογές των αναλύσεων υγρής βιοψίας.....	23
<b>Σχήμα 3.1:</b> Οι δύο βασικές επιγενετικές τροποποιήσεις.....	66
<b>Σχήμα 3.2:</b> Αντίδραση μεθυλίωσης.....	68
<b>Σχήμα 3.3:</b> Φυσιολογική μεθυλίωση του DNA και ακόλουθη αποσιώπηση του γονιδίου.....	69
<b>Σχήμα 3.4:</b> Συνεργασία και αλληλεπίδραση των επιγενετικών τροποποιήσεων.....	69
<b>Σχήμα 3.5:</b> α) Οι μεθυλομάδες απομακρύνονται από τη μεθυλωμένη CpG νησίδα του υποκινητή του γονιδίου, το οποίο επανενεργοποιείται. β) Η μεθυλίωση της CpG νησίδας που βρίσκεται στον υποκινητή προκαλεί την καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου.....	70
<b>Σχήμα 3.6:</b> Σύγκριση καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων, με φανερές τις διαταραχές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA στα καρκινικά κύτταρα (E: εξώνιο).....	71
<b>Σχήμα 3.7:</b> Διαμόρφωση των ομοιοπολικών τροποποιήσεων στη χρωματίνη.....	74
<b>Σχήμα 3.8:</b> Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά το DNA conversion.....	76
<b>Σχήμα 3.9:</b> NGS τεχνολογίες που βασίζονται στην κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο.....	77
<b>Σχήμα 3.10:</b> Τεχνολογίες που βασίζονται στον εμπλουτισμό και στη μελέτη των 5hmC.....	80
<b>Σχήμα 4.1:</b> Απεικόνιση του πρωτοκόλλου απομόνωσης DNA από FFPEs.....	89
<b>Σχήμα 4.2:</b> Απεικόνιση του πρωτοκόλλου απομόνωσης cfDNA από δείγματα πλάσματος.....	93
<b>Σχήμα 4.3:</b> Φασματοφωτόμετρο Nanodrop-1000.....	93

<b>Σχήμα 4.4:</b> Τυπικό καταγράφημα φάσματος απορρόφησης DNA .....	94
<b>Σχήμα 4.5:</b> Ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler® epgradient.....	96
<b>Σχήμα 4.6:</b> Θάλαμος προετοιμασίας των αντιδράσεων PCR .....	97
<b>Σχήμα 4.7:</b> Όργανα α) LightCycler® 2.0 και β) LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostics) .....	98
<b>Σχήμα 4.8:</b> Όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics).....	98
<b>Σχήμα 4.9:</b> Όργανο HR1™ (Idaho Technology) .....	104
<b>Σχήμα 4.10:</b> Ενδεικτικά αποτελέσματα αντίδρασης ποσοτικής PCR.....	106
<b>Σχήμα 5.1:</b> Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> στον HGSC .....	108
<b>Σχήμα 5.2:</b> MS-HRMA: α) Κανονικοποιημένες καμπύλες τήξης του 0% και 100% μεθυλιωμένου προϊόντος, β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης του 0% και 100% μεθυλιωμένου προϊόντος .....	109
<b>Σχήμα 5.3:</b> Αναλυτική ειδικότητα της MS-HRMA: α) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης των 16 φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς (0%), β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης φυσιολογικών δειγμάτων πλάσματος (0%) .....	110
<b>Σχήμα 5.4:</b> Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας της real-time MSP μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών (0,1%, 1%, 10%, 30%, 50%).....	111
<b>Σχήμα 5.5:</b> Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας της MS-HRMA μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών (1%, 10%, 30%, 50%). α) Κανονικοποιημένες καμπύλες τήξης των προϊόντων, β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης .....	111
<b>Σχήμα 5.6:</b> Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης των 0%, 100% δειγμάτων ελέγχου και του πλακουντιακού DNA.....	112
<b>Σχήμα 5.7:</b> Σύγκριση των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> σε n=51 ζεύγη δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών της ομάδας B, με εφαρμογή της MS-HRMA μεθοδολογίας .....	113
<b>Σχήμα 5.8:</b> Συγκεντρωτικό διάγραμμα των αποτελεσμάτων της μελέτης μεθυλίωσης του <i>RASSF1A</i> και με τις δύο μεθόδους, στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και ctDNA της ομάδας B (n=53) .....	115



<b>Σχήμα 5.9:</b> Εκτίμηση της OS (2016) για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> , σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, με την εφαρμογή των α) real-time MSP και β) MS-HRMA.....	117
<b>Σχήμα 5.10:</b> Εκτίμηση της OS για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> , σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, με την εφαρμογή των α) real-time MSP και β) MS-HRMA.....	118
<b>Σχήμα 5.11:</b> Εκτίμηση της OS για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> , σε δείγματα παρακείμενων ιστών, με την εφαρμογή των α) real-time MSP και β) MS-HRMA.....	118
<b>Σχήμα 5.12:</b> Οι αλληλουχίες και οι θέσεις των εκκινήτων για τις μεθοδολογίες real-time MSP και MS-HRMA για τη μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> . Οι MSP εκκινήτες παρουσιάζονται με μπλε υπογράμμιση και οι MIP εκκινήτες με μαύρα πλαίσια .....	124
<b>Σχήμα 6.1:</b> Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου <i>ESR1</i> στον HGSC..	128
<b>Σχήμα 6.2:</b> Εκτίμηση των OS (α) και PFS (β) για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου <i>ESR1</i> , σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων .....	131
<b>Σχήμα 6.3:</b> α) Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας και ειδικότητας της MS-HRMA μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών. β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης των 15 φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς (0%). .	132
<b>Σχήμα 7.1:</b> Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης των επτά γονιδίων στον HGSC ..	137
<b>Σχήμα 7.2:</b> Εκτίμηση των OS (α) και PFS (β) για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου <i>NR2F1</i> , σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων.....	140
<b>Σχήμα 7.3:</b> α) Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας και ειδικότητας της MS-HRMA μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών. β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης των 16 φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς (0%). .	143
<b>Σχήμα 7.4:</b> Εκτίμηση των OS (α) και PFS (β) για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου <i>BRCA1</i> , σε δείγματα πλάσματος (ctDNA) .....	144
<b>Σχήμα 7.5:</b> Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας της real-time MSP μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών (0,1%, 0,5%, 1%, 10%, 30%, 50%).....	146
<b>Σχήμα 7.6:</b> Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας της real-time MSP μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών (0,1%, 1%, 10%).....	147

<b>Σχήμα 7.7:</b> Heatmap για τις μελέτες μεθυλίωσης εννέα γονιδίων με real-time MSP, στις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών και στο πλακουντιακό DNA (placental, PL).....	149
<b>Σχήμα 7.8:</b> Heatmap για τις μελέτες μεθυλίωσης οκτώ γονιδίων με real-time MSP, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων της ομάδας A.....	150
<b>Σχήμα 7.9:</b> Heatmap για τις μελέτες μεθυλίωσης οκτώ γονιδίων με real-time MSP, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχων ctDNA της ομάδας B.....	150
<b>Σχήμα 8.1:</b> Η πειραματική πορεία της μελέτης έκφρασης του γονιδίου <i>PD-L1</i> στον HGSC...	156
<b>Σχήμα 8.2:</b> Εκτίμηση της OS για τις ασθενείς της ομάδας 1 με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) έκφραση του γονιδίου <i>PD-L1</i> , σε δείγματα CTCs, με την εφαρμογή της RT-qPCR.....	157

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Σταδιοποίηση κατά FIGO των όγκων των ωοθηκών .....	3
Πίνακας 1.2: Ταξινόμηση του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών σε τύπους.....	5
Πίνακας 2.1: Κλινική σημασία των CTCs στον καρκίνο των ωοθηκών.....	25
Πίνακας 2.2: Κλινική σημασία του ctDNA στον καρκίνο των ωοθηκών.....	35
Πίνακας 2.3: Κλινική σημασία των κυκλοφορούντων εξωκυτταρικών και εξωσωμικών miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών.....	53
Πίνακας 4.1: Διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών .....	85
Πίνακας 4.2: Διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών .....	86
Πίνακας 4.3: Συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για το exon 20 wt του γονιδίου <i>PIK3CA</i> .....	99
Πίνακας 4.4: Συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για το γονίδιο <i>ACTB</i> .....	100
Πίνακας 4.5: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>RASSF1A</i> .....	100
Πίνακας 4.6: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>ESR1</i> .....	101
Πίνακας 4.7: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>NR2F1</i> .....	101
Πίνακας 4.8: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>BRCA1</i> .....	101
Πίνακας 4.9: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>MGMT</i> .....	102
Πίνακας 4.10: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>RASSF10</i> .....	102
Πίνακας 4.11: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>RKIP</i> .....	102
Πίνακας 4.12: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>SOX17</i> .....	103
Πίνακας 4.13: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο <i>CST6</i> .....	103
Πίνακας 4.14: Συνθήκες της αντίδρασης MS-HRMA για το γονίδιο <i>RASSF1A</i> .....	104
Πίνακας 4.15: Ανάλυση καμπυλών τήξης MS-HRMA για το γονίδιο <i>RASSF1A</i> .....	104
Πίνακας 4.16: Συνθήκες της αντίδρασης MS-HRMA για το γονίδιο <i>ESR1</i> .....	104
Πίνακας 4.17: Ανάλυση καμπυλών τήξης MS-HRMA για το γονίδιο <i>ESR1</i> .....	105
Πίνακας 4.18: Συνθήκες της αντίδρασης MS-HRMA για το γονίδιο <i>BRCA1</i> .....	105
Πίνακας 4.19: Ανάλυση καμπυλών τήξης MS-HRMA για το γονίδιο <i>BRCA1</i> .....	105

<b>Πίνακας 4.20:</b> Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>B2M</i> .....	106
<b>Πίνακας 4.21:</b> Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο <i>PD-L1</i> .....	106
<b>Πίνακας 5.1:</b> Σύγκριση των μεθόδων real-time MSP και MS-HRMA για τη μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> .....	114
<b>Πίνακας 5.2:</b> Τα αποτελέσματα της μελέτης μεθυλίωσης του <i>RASSF1A</i> στις υποομάδες της ομάδας B, με την εφαρμογή της real-time MSP .....	115
<b>Πίνακας 5.3:</b> Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ομάδα B).....	116
<b>Πίνακας 5.4:</b> Μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox μεταξύ των OS και PFS, της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> στους πρωτοπαθείς όγκους και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών (ομάδα B).....	119
<b>Πίνακας 5.5:</b> Μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox μεταξύ των OS και PFS, της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> στους πρωτοπαθείς όγκους και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών (ομάδα B).....	121
<b>Πίνακας 6.1:</b> Τα αποτελέσματα της μελέτης μεθυλίωσης του <i>ESR1</i> στις υποομάδες της ομάδας B .....	129
<b>Πίνακας 6.2:</b> Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>ESR1</i> των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ομάδα B).....	130
<b>Πίνακας 7.1:</b> Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>NR2F1</i> των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ομάδα B).....	139
<b>Πίνακας 7.2:</b> Μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox μεταξύ των OS και PFS, της μεθυλίωσης του γονιδίου <i>NR2F1</i> στους πρωτοπαθείς όγκους και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών (ομάδα B).....	140
<b>Πίνακας 7.3:</b> Τα αποτελέσματα της μελέτης μεθυλίωσης του <i>BRCA1</i> στις υποομάδες της ομάδας B, με την εφαρμογή της real-time MSP .....	143
<b>Πίνακας 7.4:</b> Σύγκριση των μεθόδων real-time MSP και MS-HRMA για τη μεθυλίωση του γονιδίου <i>BRCA1</i> .....	144

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Καθ. Ε. Λιανίδου. Το μεγαλύτερο μέρος της διατριβής (09/12/2016 - 08/12/2019) χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432, 1<sup>ος</sup> Κύκλος, του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» ΕΣΠΑ 2014-2020).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλλαν στη διεκπεραίωση αυτής της διατριβής, ξεκινώντας από την επιβλέπουσά μου, την Καθ. Ε. Λιανίδου, για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος με σημαντικές δυνατότητες περαιτέρω εξέλιξης. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την άριστη συνεργασία, τις συμβουλές και τη στήριξή της, κυρίως όμως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθ. Α. Παυλάκη και Καθ. Ν. Γαλανοπούλου, για τις σημαντικές υποδείξεις και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθ. Α. Παυλάκη για τη διάθεση μεγάλου μέρους των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθ. Χρ. Παπαδημητρίου, τον Καθ. Ν. Θωμαΐδη, την Καθ. Γ. Σωτηροπούλου και τον Αναπλ. Καθ. Χρ. Κρούπη για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Prof. Sabine Kasimir-Bauer, από το Πανεπιστήμιο του Essen, για τη διάθεση του μεγαλύτερου αριθμού των κλινικών δειγμάτων και των κυτταρικών σειρών καρκίνου ωοθηκών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς και σημαντικού μέρους των απαραίτητων αντιδραστηρίων.

Ευχαριστώ ακόμα όλα τα μέλη της ερευνητικής μας ομάδας, και ιδιαίτερα τις διδάκτορες Μάρθα Ζαβρίδου, Σοφία Μαστοράκη, Αρετή Στρατή, Κλειώ Παρίση, Αθηνά Μάρκου, Έλενα Τζανίκου, καθώς και τις υποψήφιες διδάκτορες Αλίκη Ντζιφά, Δήμητρα Στεργιοπούλου, Δώρα Λόντρα, Σοφία Μέλλιου, Βικτωρία Τσερπέλη, Σταυρούλα Σμίλκου, για το ευχάριστο κλίμα και το ειλικρινές πνεύμα συνεργασίας στο γραφείο και στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση, την κατανόηση και την υπομονή τους. Τους ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου δίνοντάς μου δύναμη και υποστήριξη, που πάντα με ενθαρρύνουν στις προσπάθειές μου και δε θα σταματήσουν ποτέ να στηρίζουν τις επιλογές μου.

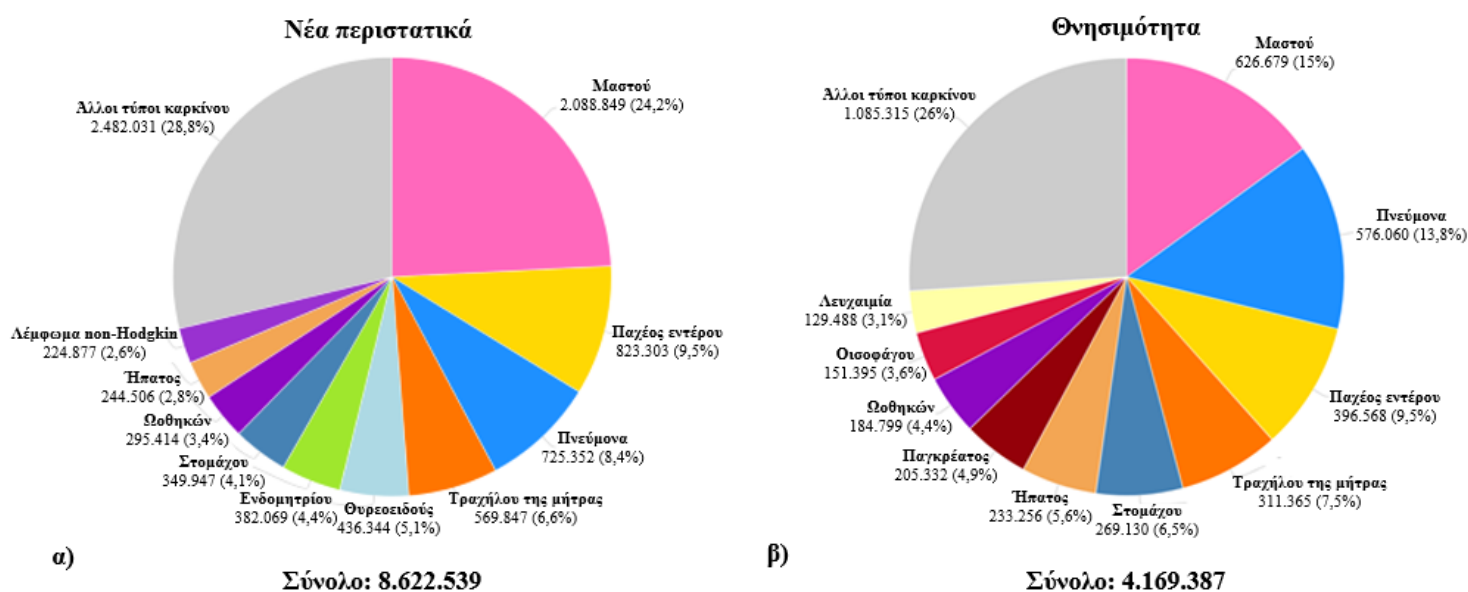


# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

### 1.1 Εισαγωγή

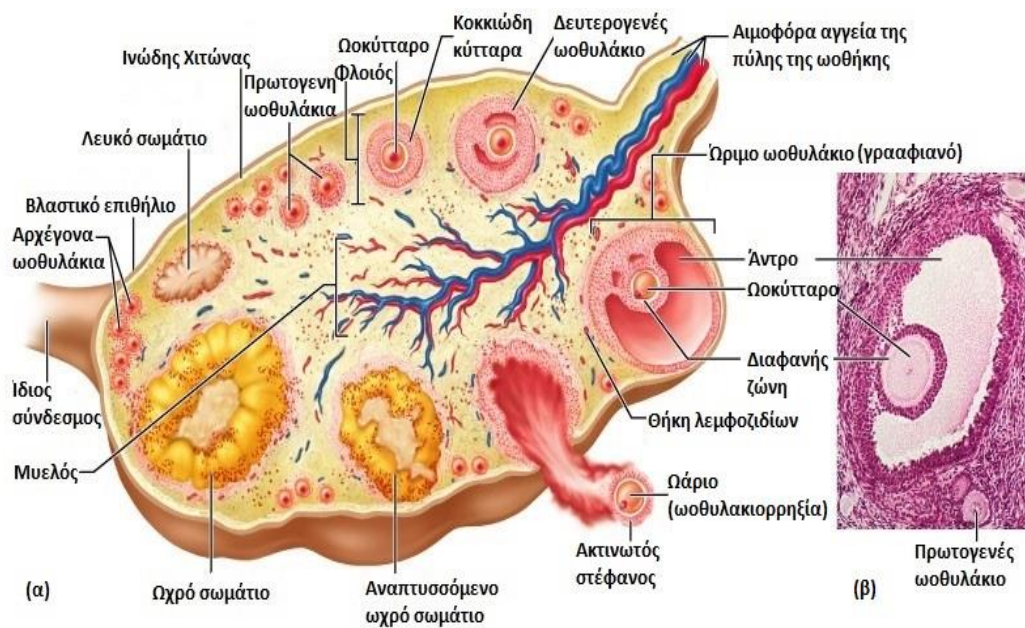
Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί τον τέταρτο συχνότερα εμφανιζόμενο γυναικολογικό καρκίνο μετά τον καρκίνο του μαστού, του τραχήλου της μήτρας και του ενδομητρίου. Είναι η πέμπτη αιτία θανάτου σχετιζόμενη με καρκίνο στις γυναίκες και κατέχει τα χειρότερα ποσοστά επιβίωσης συγκριτικά με τις υπόλοιπες γυναικολογικές κακοήθειες (1). Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης της νόσου είναι τα 60 έτη, ενώ η μέση γυναίκα διατρέχει κίνδυνο περίπου 1,5% να νοσήσει σε όλη τη διάρκεια της ζωής της. Ο καρκίνος των ωοθηκών μπορεί να είναι είτε σποραδικός είτε κληρονομικός, ωστόσο μόνο το 5% του συνόλου των περιστατικών σχετίζονται με ταυτοποιημένη γενετική προδιάθεση της ασθενούς, συγκεκριμένα με την εμφάνιση γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2*. Το οικογενειακό ιστορικό μπορεί να συνδυάζεται και με προδιάθεση για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού, χωρίς αυτό να είναι πάντοτε απαραίτητο. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις του σποραδικού καρκίνου ωοθηκών, δεν εμπλέκεται ο παράγοντας της κληρονομικότητας. Λόγω της έλλειψης διαγνωστικών μεθόδων για πρόωμη ανίχνευση της νόσου και της απουσίας χαρακτηριστικών και εμφανών συμπτωμάτων, περίπου το 85% των ασθενών διαγιγνώσκονται πρώτη φορά σε ήδη ανεπτυγμένο στάδιο της ασθένειας, συνήθως στο στάδιο ΙΙΙC. Στις περιπτώσεις αυτές τα ποσοστά επιβίωσης βρίσκονται μεταξύ 10% και 30%, ενώ σε περίπτωση που η νόσος διαγνωστεί σε πρώιμο στάδιο τα αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται σε τιμές μεταξύ 80% και 95% (2).



Σχήμα 1.1: Εκτίμηση των α) νέων περιστατικών και β) θνησιμότητας, παγκοσμίως, για όλους τους τύπους καρκίνου, στις γυναίκες όλων των ηλικιών, το έτος 2018 (Πηγή: GLOBOCAN 2018, <https://gco.iarc.fr>)

### 1.1.1 Ανατομία της ωοθήκης<sup>(3)</sup>

Η ωοθήκη αποτελεί τον γυναικείο γεννητικό αδέν, έχει σχήμα έλλειψης και διαστάσεις 3,5x2x1cm. Έχει δύο επιφάνειες, έσω και έξω, δύο χείλη, πρόσθιο και οπίσθιο και δύο πόλους, άνω και κάτω. Το χρώμα της είναι γκριζοκόκκινο και η επιφάνειά της υβώδης και ανώμαλη. Οι ωοθήκες είναι ένα ζεύγος οργάνων που βρίσκονται αναρτημένα μεταξύ της μήτρας και των πλάγιων τοιχωμάτων της ελάσσονος πυέλου. Η θέση της κάθε ωοθήκης είναι ο ωοθηκικός βόθρος, μία κατάδυση του περιτοναίου όπου στηρίζεται στο πρόσθιο χείλος της από μία πτυχή του, τον μεσοωοθηκίο σύνδεσμο. Επιπλέον στηρίζεται από τον κρεμαστήρα και τον ίδιο σύνδεσμο. Ο κρεμαστήρας σύνδεσμος καταφύεται στον άνω πόλο της ωοθήκης και περιέχει τα ωοθηκικά αγγεία και νεύρα που εισέρχονται μέσω της πύλης, ενώ ο ίδιος σύνδεσμος καταφύεται στον κάτω πόλο της ωοθήκης. Το οπίσθιο χείλος είναι ελεύθερο και έρχεται σε επαφή με τον κώδωνα του ωαγωγού, τον ουρητήρα και τη μητριάα αρτηρία. Η έξω επιφάνεια έρχεται σε επαφή με το περιτόναιο και η έσω επιφάνεια καλύπτεται από τον κώδωνα του ωαγωγού.



Σχήμα 1.2: Ανατομία της ωοθήκης (<http://apbrwww5.apsu.edu>)

Η ωοθήκη αποτελείται εξωτερικά από το βλαστικό επιθήλιο, που είναι μονόστιβο κυβικό. Το επιφανειακό αυτό επιθήλιο (**ovarian surface epithelium, OSE**) έχει μεσοθηλιακό και όχι μυλλερικό μορφολογικό φαινότυπο. Κάτω από το επιθήλιο υπάρχει μία υπεπιθηλιακή ινώδης στιβάδα, ο ινώδης χιτώνας. Το εσωτερικό της ωοθήκης συγκροτούν ο φλοιός και ο μυελός, που όμως δε διαχωρίζονται σαφώς μεταξύ τους. Ο φλοιός είναι η σπουδαιότερη μοίρα της ωοθήκης. Αποτελείται από συνδετικό ιστό (στρώμα), όπου βρίσκονται τα ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, τα ωχρά και τα λευκά σωμάτια. Τα ωοθυλάκια μπορεί να είναι αρχέγονα, πρωτογενή, δευτερογενή ή ώριμα (γρααφιανά). Γενικά το ωοθυλάκιο αποτελείται από ένα



ωάριο, το οποίο περιβάλλεται από στιβάδες κοκκιωδών κυττάρων και αυτές με τη σειρά τους, από στιβάδες κυττάρων της θήκης. Το φλοιώδες στρώμα αποτελείται από ινοβλαστικά κύτταρα και έχει ως βασικές λειτουργίες τη δομική στήριξη στα αναπτυσσόμενα ωάρια, την παροχή των κυττάρων της έσω και της έξω θήκης γύρω από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και την έκκριση στεροειδών ορμονών. Ο μυελός αποτελείται επίσης από συνδετικό ιστό και περιέχει τα αγγεία και τα νεύρα της ωοθήκης. Η ωοθηκική πύλη συνέχεται με το μυελό και αποτελεί την περιοχή από όπου εισέρχονται και εξέρχονται τα αγγεία του αίματος, τα λεμφικά αγγεία και τα νεύρα. Τα πυλαία κύτταρα μπορούν να συνθέσουν ανδρογόνα.

## 1.2 Σταδιοποίηση των όγκων κατά FIGO

Για την κατηγοριοποίηση του καρκίνου των ωοθηκών σε στάδια ισχύει μία διεθνής κατάταξη που φέρει το όνομα **FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics)**. Το σύστημα αυτό ταυτοποιεί τον όγκο τη στιγμή της διάγνωσης, που πραγματοποιείται με βεβαιότητα στη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης (4). Η τελευταία ανανέωση της σταδιοποίησης κατά FIGO πραγματοποιήθηκε το 2012 και οδήγησε στην αποδοχή νέων κριτηρίων για την κατηγοριοποίηση τριών γυναικολογικών κακοηθειών, του καρκίνου των ωοθηκών, του καρκίνου των ωαγωγών και του πρωτοπαθούς περιτοναϊκού καρκίνου (5). Ακολουθεί ο πίνακας 1.1 όπου παρουσιάζονται αναλυτικά τα στάδια κατά FIGO.

**Πίνακας 1.1: Σταδιοποίηση κατά FIGO των όγκων των ωοθηκών**

<b>Στάδιο I (T1-N0-M0)</b>	<b>Νόσος περιορισμένη στις ωοθήκες.</b>
<b>IA (T1a-N0-M0)</b>	Όγκος περιορισμένος στη μία ωοθήκη, απουσία ασκίτη με κακοήθη κύτταρα και άθικτη κάψα. Ο όγκος δε βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της ωοθήκης.
<b>IB (T1b-N0-M0)</b>	Όγκος περιορισμένος στις δύο ωοθήκες, απουσία ασκίτη με κακοήθη κύτταρα και άθικτη κάψα. Ο όγκος δε βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της ωοθήκης.
<b>IC (T1c-N0-M0)</b>	Όγκος περιορισμένος στη μία ή και στις δύο ωοθήκες, με ένα από τα ακόλουθα:
<b>IC1 (T1c1-N0-M0)</b>	Χειρουργική διαρροή.
<b>IC2 (T1c2-N0-M0)</b>	Σπασμένη κάψα πριν το χειρουργείο ή όγκος στην εξωτερική επιφάνεια της μίας ή και των δύο ωοθηκών.
<b>IC3 (T1c3-N0-M0)</b>	Παρουσία κακοήθων κυττάρων στον ασκίτη ή στα περιτοναϊκά εκπλύματα.
<b>Στάδιο II (T2-N0-M0)</b>	<b>Όγκος στη μία ή και στις δύο ωοθήκες με επέκταση στην πύελο.</b>

<b>IIA</b> <b>(T2a-N0-M0)</b>	Επέκταση ή/και μετάσταση στη μήτρα ή/και στους ωαγωγούς.
<b>IIB</b> <b>(T2b-N0-M0)</b>	Επέκταση σε άλλους πυελικούς ενδοπεριτοναϊκούς ιστούς.
<b>Στάδιο III</b> <b>(T1/T2-N1-M0)</b>	<b>Όγκος στη μία ή και στις δύο ωοθήκες, με κυτταρολογικά ή ιστολογικά επιβεβαιωμένες περιτοναϊκές εμφυτεύσεις στο περιτόναιο εκτός πυέλου ή/και θετικούς οπισθοπεριτοναϊκούς λεμφαδένες.</b>
<b>IIIA1</b> <b>(T1/2-N1-M0)</b>	Κυτταρολογικά ή ιστολογικά επιβεβαιωμένοι θετικοί οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες, μόνο. IIIA1(i): Μεταστάσεις με μέγιστη διάμετρο 10 mm. IIIA1(ii): Μεταστάσεις με μέγιστη διάμετρο >10 mm.
<b>IIIA2</b> <b>(T3a2-N0/N1-M0)</b>	Μικροσκοπική εξωπυελική περιτοναϊκή εμφύτευση με ή χωρίς θετικούς οπισθοπεριτοναϊκούς λεμφαδένες.
<b>IIB</b> <b>(T3b-N0/N1-M0)</b>	Μακροσκοπικές περιτοναϊκές μεταστάσεις εκτός της πυέλου με μέγιστη διάμετρο 2 cm, με ή χωρίς μεταστάσεις στους οπισθοπεριτοναϊκούς λεμφαδένες.
<b>IIIC</b> <b>(T3c-N0/N1-M0)</b>	Μακροσκοπικές περιτοναϊκές μεταστάσεις εκτός της πυέλου με μέγιστη διάμετρο 2 cm με ή χωρίς μεταστάσεις στους οπισθοπεριτοναϊκούς λεμφαδένες (περιλαμβάνει επέκταση του όγκου στην επιφάνεια του ήπατος και του σπλήνα, χωρίς παρεγχυματική διήθηση).
<b>Στάδιο IV</b> <b>(any-T-any N-M1)</b>	<b>Όγκος στη μία ή και στις δύο ωοθήκες, με μακρινές μεταστάσεις.</b>
<b>IVA</b> <b>(any-T-any N-M1a)</b>	Διάχυση πλευριτικού υγρού με θετική κυτταρολογική εξέταση.
<b>IVB</b> <b>(any-T-any N-M1b)</b>	Παρεγχυματικές μεταστάσεις και μεταστάσεις σε εξω-κοιλιακά όργανα (περιλαμβάνει τους βουβωνικούς λεμφαδένες και λεμφαδένες εκτός της κοιλιακής κοιλότητας).

### 1.3 Ταξινόμηση του καρκίνου των ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών εμφανίζει αξιοσημείωτη ετερογένεια σε κυτταρικό και σε μοριακό επίπεδο. Σχεδόν στο 95% των περιπτώσεων τα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονται στο OSE και αναπτύσσεται επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών (**epithelial ovarian cancer, EOC**), ενώ στο υπόλοιπο 5%, κύτταρα του στρώματος ή γεννητικά κύτταρα (ωάρια) εξελίσσονται σε καρκινικά (6). Οι μη επιθηλιακοί όγκοι αναπτύσσονται στα κύτταρα του στρώματος (2%) και στα ωοκύτταρα (3%). Οι όγκοι του στρώματος μπορεί να περιλαμβάνουν κοκκιώδη κύτταρα (κοκκιοκυτταρικοί), κύτταρα της θήκης (θηκώματα), όπως και κύτταρα υπεύθυνα για τη σύνθεση ανδρογόνων (όγκοι Sertoli-Leydig). Άλλη κατηγορία όγκων του στρώματος αποτελούν τα ινώματα (7). Τους όγκους των γεννητικών κυττάρων αποτελούν τα δυσγερμινώματα, οι όγκοι λεκιθικού σάκου και τα άωρα τερατώματα (7, 8).

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών ταξινομείται σε υποτύπους με ξεχωριστούς σε κάθε υπότυπο παράγοντες κινδύνου, διακριτές γενετικές ανωμαλίες, καθώς και διαφορετικά εμπλεκόμενα μοριακά μονοπάτια που καθορίζουν σε ένα βαθμό τη βιολογική συμπεριφορά, την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση. Οι κύριοι υπότυποι είναι τέσσερις: ο ορώδης (75%), ο ενδομητριοειδής (10%), ο διαυγοκυτταρικός (10%) και ο βλεννώδης (3%), ενώ σπανιότεροι είναι ο όγκος Brenner (μεταβατικού τύπου), οι οροβλεννώδεις (μικτοί), το καρκινοσάρκωμα και το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα. Τα ορώδη καρκινώματα ταξινομούνται σε όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας (**high grade serous carcinomas, HGSCs**) και σε χαμηλού βαθμού κακοήθειας (**low grade serous carcinomas, LGSCs**) (9, 10). Ένας επιπλέον τρόπος ταξινόμησης του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών διαχωρίζει τους υποτύπους στους τύπους I και II (πίνακας 1.2). Οι όγκοι τύπου I παρουσιάζουν ήπια κλινική εικόνα και γενετική σταθερότητα. Με εξαίρεση τον διαυγοκυτταρικό υπότυπο που χαρακτηρίζεται ως υψηλού βαθμού κακοήθειας, οι υπόλοιποι όγκοι τύπου I είναι χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Αντίθετα, οι τύπου II είναι επιθετικοί όγκοι υψηλού βαθμού κακοήθειας, αναπτύσσονται γρήγορα και διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο σε περισσότερα από 75% των νέων περιστατικών. Χαρακτηρίζονται επιπλέον από αξιοσημείωτη χρωμοσωμική αστάθεια (11).

Πίνακας 1.2: Ταξινόμηση του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών σε τύπους

<b>Τύπος I</b>	LGSCs, ενδομητριοειδείς, διαυγοκυτταρικοί, οροβλεννώδεις, βλεννώδεις, κακοήθεις όγκοι Brenner
<b>Τύπος II</b>	HGSCs, αδιαφοροποίητο καρκίνωμα, καρκινοσάρκωμα

### 1.3.1 Καρκινώματα τύπου I

#### 1.3.1.1 LGSC

Ο LGSC αντιπροσωπεύει περίπου το 5% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου των ωοθηκών και προσβάλλει κυρίως νεότερες γυναίκες. Διαφέρει σημαντικά από τον HGSC, με τα δύο είδη ορωδών καρκινωμάτων να εμφανίζουν ξεχωριστό μοριακό προφίλ, όπως και διαφορετικές περιοχές προέλευσης (12). Οι LGSC όγκοι μπορεί να είναι διεισδυτικοί ή μη-διεισδυτικοί (υποκεφάλαιο 1.4). Σε μοριακό επίπεδο, χαρακτηρίζονται από συχνές μεταλλάξεις των γονιδίων *BRAF* και *KRAS*, καθώς και από την αυξημένη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών *ERBB2* και *KRAS/BRAF/MEK*. Έχει παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο *BRAF* παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση από τις ασθενείς με μεταλλάξεις στο *KRAS* ή φυσιολογικά αλληλόμορφα και στα δύο γονίδια. Σε σπάνιες περιπτώσεις οι LGSC όγκοι μπορούν να εξελιχθούν σε HGSC (11).

### 1.3.1.2 Ενδομητριοειδή και διαυγοκυτταρικά καρκινώματα

Μετά τον ορώδη υπότυπο, ο ενδομητριοειδής και ο διαυγοκυτταρικός ευθύνονται για το 15% με 20% του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών. Μία σημαντική αναλογία ενδομητριοειδών και διαυγοκυτταρικών καρκίνων παρουσιάζει συσχέτιση με προϋπάρχουσα ενδομητρίωση στη γυναίκα. Συγκεκριμένα, πρόσφατες μοριακές μελέτες και μελέτες παθολογίας υπέδειξαν ότι η ενδομητρίωση αποτελεί πρόδρομο του σχετιζόμενου με την ενδομητρίωση καρκίνου των ωοθηκών (**endometriosis-associated ovarian cancer, EAO**C), όπου ως EAO C χαρακτηρίζονται οι ενδομητριοειδείς και οι διαυγοκυτταρικοί όγκοι (13). Σε σπάνιες περιπτώσεις, ενδομητριοειδές και διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα μπορεί να συνυπάρχουν σε έναν όγκο ωοθηκών. Τα ενδομητριοειδή καρκινώματα είναι καλά διαφοροποιημένοι όγκοι ευαίσθητοι στη θεραπεία, ωστόσο σε σπάνιες περιπτώσεις χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό διαφοροποίησης (11). Σε μοριακό επίπεδο, χαρακτηρίζονται από την αυξημένη συχνότητα σωματικών μεταλλάξεων στα γονίδια *CTN*NB1, *ARID*1A, *PIK*3CA και *P*TEN, καθώς και από τη μικρή συχνότητα μεταλλάξεων στο *T*P53 (14). Επιπλέον, συχνά παρατηρείται μικροδορυφορική αστάθεια (**microsatellite instability, MSI**) και αυξημένη ενεργοποίηση του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού (11).

Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα είναι επιθετικά νεοπλάσματα, με ιδιαίτερα συχνές τις περιπτώσεις επανεμφάνισης της νόσου ύστερα από τη χειρουργική εκτομή. Δεν ταξινομούνται ανάλογα με τον βαθμό διαφοροποίησης και όλες οι περιπτώσεις εκλαμβάνονται ως υψηλού βαθμού κακοήθειας (11). Σε μοριακό επίπεδο, τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα χαρακτηρίζονται από την αυξημένη συχνότητα σωματικών μεταλλάξεων στα γονίδια *ARID*1A, *PIK*3CA και *P*TEN, καθώς και από τη μικρή συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *T*P53 (14). Επιπλέον, συχνά παρατηρείται υπερμεθυλίωση γονιδίων που εμπλέκονται στο ERα μονοπάτι και απώλεια της μεθυλίωσης σε γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι HNF1, απενεργοποίηση του *P*TEN μονοπατιού και αυξημένη ενεργοποίηση του *PI*3K. Αντίθετα από τον ενδομητριοειδή υπότυπο, δεν παρατηρείται συχνά MSI (11).

### 1.3.1.3 Οροβλεννώδη και βλεννώδη καρκινώματα

Τα οροβλεννώδη καρκινώματα είναι ιδιαίτερα σπάνια, συνίστανται από μία μίξη επιθηλιακών κυττάρων, χαρακτηρίζονται από μυλλεριανό φαινότυπο και είναι μη-διεισδυτικά. Ωστόσο, βάσει των μορφολογικών, ανοσοϊστοχημικών και μοριακών γνωρισμάτων τους, καθώς και τη συχνή τους σχέση με την ενδομητρίωση, είναι σαφές ότι δεν έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τον

ορώδη ή τον βλεννώδη υπότυπο, αλλά με τον ΕΑΟC. Η ονομασία τους μπορεί να θεωρηθεί έως και παραπλανητική (15).

Τα βλεννώδη καρκινώματα είναι καλά διαφοροποιημένοι όγκοι, κυρίως κυσταδενώματα, παρουσιάζουν αρκετά σημαντική ετερογένεια και χαρακτηρίζονται από μη-μυλλεριανό φαινότυπο. Σε μοριακό επίπεδο, χαρακτηρίζονται από την παρουσία σωματικών μεταλλάξεων στα γονίδια *KRAS*, *BRAF* και/ή από την ενίσχυση του γονιδίου *ERBB2*, οπότε και από την αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού *ERBB2/KRAS/MEK*. Επιπλέον, συχνά παρατηρούνται μεταλλάξεις στο γονίδιο *RNF43* και στις μισές περίπου περιπτώσεις βλενωδών καρκινωμάτων, σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* (11).

#### 1.3.1.4 Όγκοι Brenner

Οι όγκοι Brenner συνίστανται από συγκεντρώσεις μεταβατικού επιθηλίου που περιβάλλονται από ινωματώδες στρώμα. Οι περισσότεροι όγκοι Brenner είναι καλοήθεις, σε σπάνιες όμως περιπτώσεις είναι κακοήθεις. Όπως θα αναφερθεί στο υποκεφάλαιο 1.5.3, σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελούν πρόδρομη περιοχή για μία υποκατηγορία βλενωδών καρκινωμάτων. Σε μοριακό επίπεδο, η απώλεια της έκφρασης του γονιδίου *CDKN2A* είναι πιθανό να εμπλέκεται στην εξέλιξη των καλοήθων όγκων Brenner σε κακοήθεις (11).

### 1.3.2 Καρκινώματα τύπου II

#### 1.3.2.1 HGSC

Ο HGSC αποτελεί τον συχνότερο υπότυπο του EOC και αντιπροσωπεύει το 75% των καρκινωμάτων των ωοθηκών. Οι περισσότεροι HGSCs διαγιγνώσκονται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο, με περίπου το 75% των ασθενών να έχουν ήδη μεταστάσεις στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Σχεδόν το 80% των ασθενών με HGSC αρχικά ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία, όμως στις περισσότερες περιπτώσεις ακολουθεί υποτροπή της νόσου. Ο ίδιος ο υπότυπος χαρακτηρίζεται από ιστολογική και μοριακή ετερογένεια. Ο HGSC μπορεί να διαχωριστεί σε δύο υποκατηγορίες, ανάλογα με τη μορφολογία του, στον συνήθη τύπο και στην επονομαζόμενη παραλλαγή SET (**solid, pseudoendometrioid, transitional, SET**). Η παραλλαγή SET διαφέρει στη μορφολογία των κυττάρων από τον συνήθη HGSC, χαρακτηρίζεται από την υψηλή παρουσία λεμφοκυττάρων διείσδυσης του όγκου (**tumor infiltrating lymphocytes, TILs**) και την αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα. Παρουσιάζεται συχνότερα σε νεότερες γυναίκες και έχει καλύτερη πρόγνωση, πιθανόν λόγω της αυξημένης

χημειοευαισθησίας των μεταβατικών κυττάρων τους. Σε μοριακό επίπεδο, η παραλλαγή SET χαρακτηρίζεται από τη συχνή παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRCA1* (11, 14).

Το 2011, δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα του **TCGA (The Cancer Genome Atlas, <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>)**, όπου σε έναν μεγάλο αριθμό ασθενών με HGSC (n=489) πραγματοποιήθηκαν μελέτες αλληλούχισης όλου του γονιδιώματος για την ανίχνευση μεταλλάξεων, μελέτες έκφρασης mRNA και πρωτεϊνών, μελέτες μεθυλίωσης, καθώς και αναλύσεις αριθμού αντιγράφων. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις (>96%) διαπιστώθηκε η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53* και ακολούθησαν σε πολύ μικρότερη συχνότητα (<5%) οι σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια *NF1*, *RBI*, *CDK12*, *PTEN* και οι γενετικές και σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Παρατηρήθηκε επιπλέον εκτεταμένη παρουσία αλλαγών αριθμού αντιγράφων, που υποδηλώνουν την προαναφερθείσα γενετική αστάθεια, με συχνότερη την ενίσχυση του γονιδίου *CCNE1*. Η συγκεκριμένη ενίσχυση του *CCNE1* προέκυψε αντιστρόφως ανάλογη της παρουσίας γενετικών αλλαγών στα γονίδια *BRCA1/2*. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης στο επίπεδο του mRNA, ο HGSC διαχωρίστηκε σε τέσσερις μοριακούς υποτύπους, που χαρακτηρίζονται από την έκφραση διαφορετικών ομάδων γονιδίων. Πρόκειται για τον ανοσοαντιδραστικό, τον διαφοροποιημένο, τον πολλαπλασιαστικό και τον μεσεγχυματικό υπότυπο. Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα των μελετών μεθυλίωσης ο HGSC διαχωρίστηκε σε τέσσερις υποτύπους και με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης των miRNAs σε τρεις. Τα αποτελέσματα αυτά τόνισαν περαιτέρω την μοριακή ετερογένεια του HGSC υποτύπου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε συνδυαστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων ώστε να μελετηθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του HGSC. Διαπιστώθηκε απανεργοποίηση του μονοπατιού του p53, απορρύθμιση του μονοπατιού του ομόλογου ανασυνδυασμού (**homologous recombination, HR**) σε περίπου 50% των περιπτώσεων, καθώς και εμπλοκή του Notch3 σηματοδοτικού μονοπατιού και του δικτύου μεταγραφικών παραγόντων FOXM1 στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου (14, 16).

### 1.3.2.2 Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα και καρκινοσάρκωμα

Τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα είναι σπάνιοι όγκοι των ωοθηκών από τους οποίους απουσιάζουν όλα τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των HGSCs και των ενδομητριοειδών όγκων υψηλού βαθμού κακοήθειας. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο εάν αποτελεί έναν ξεχωριστό υπότυπο και όχι παραλλαγές των χαμηλής διαφοροποίησης HGSCs ή ενδομητριοειδών υψηλού βαθμού κακοήθειας. Σε μοριακό επίπεδο, χαρακτηρίζονται από μεσεγχυματικό και όχι από επιθηλιακό φαινότυπο (11).

Ως καρκινοσάρκωμα ορίζεται ο διφασικός όγκος που αποτελείται τόσο από καρκίνωμα όσο και από σάρκωμα. Τα δύο αυτά συστατικά του είναι διακριτά, ωστόσο αναμειγμένα σε μεγάλο βαθμό. Σε μοριακό επίπεδο, χαρακτηρίζεται από μεσεγχυματικό και επιθηλιακό φαινότυπο, ενώ παράλληλα ανιχνεύονται μοριακές αλλαγές κοινές με τον HGSC, όπως οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* και η υπερέκφραση του γονιδίου *CDKN2A* (11).

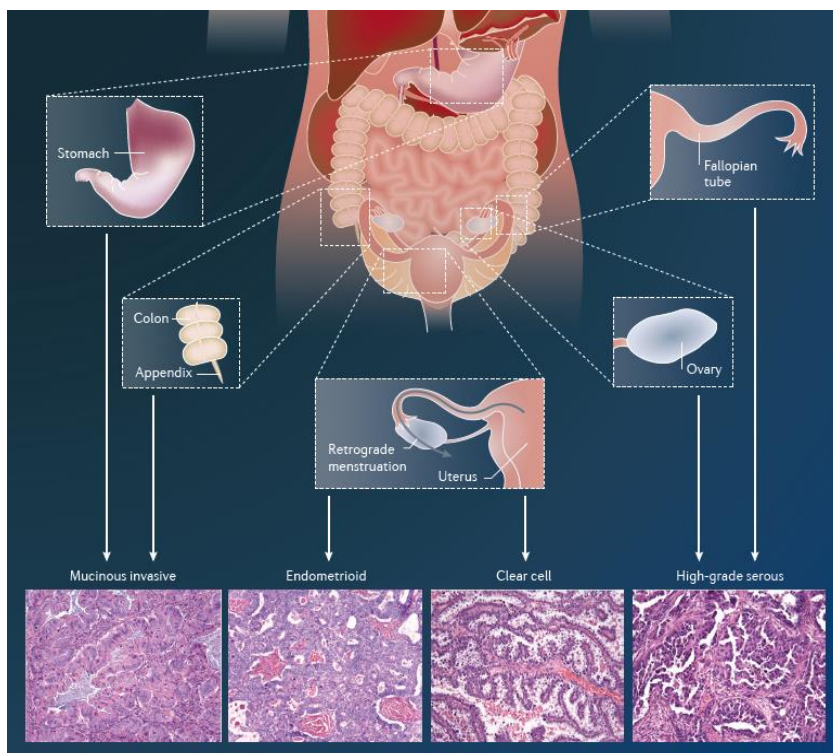
#### 1.4 Όγκοι χαμηλού κακοήθους δυναμικού

Οι όγκοι οριακής κακοήθειας (**serous borderline tumors, SBTs**) ή όγκοι χαμηλού κακοήθους δυναμικού (**low-malignant potential, LMP**) αποτελούν μία κατηγορία όγκων των ωοθηκών που τοποθετείται μεταξύ της καλοήθους και της κακοήθους νόσου. Οι περισσότεροι SBTs εντοπίζονται περιορισμένοι στην ωοθήκη κατά τη διάγνωση και παρουσιάζουν εξαιρετική πρόγνωση ύστερα από τη χειρουργική αντιμετώπισή τους. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης κυμαίνονται από 86% ως 92% για την προχωρημένη νόσο, ενώ για την πρώιμη νόσο φτάνουν μέχρι και το 98% (17, 18). Έως το 2014, οι SBTs διαχωρίζονταν σε δύο υποκατηγορίες, τους άτυπους πολλαπλασιαστικούς ορώδεις όγκους (**atypical proliferative serous tumors, APSTs**) και το μικροθηλωματώδες ορώδες καρκίνωμα (**micropapillary serous carcinoma, MPSC**) (12). Πλέον οι όροι SBTs και APSTs θεωρούνται συνώνυμοι, ενώ το MPSC περιγράφεται ως μη-διεισδυτικό LGSC (11).

#### 1.5 Προέλευση των κυριότερων ιστολογικών υποτύπων

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών χαρακτηρίζεται από μία αξιοσημείωτη ετερογένεια, που γίνεται ιδιαίτερα αντιληπτή με την μελέτη της προέλευσης των καρκινωμάτων τύπου I και II. Γενικά, τα καρκινώματα τύπου I προέρχονται από καλοήθεις πρόδρομες περιοχές, συχνά SBTs, ενώ όλα τα καρκινώματα τύπου II προέρχονται κατά κύριο λόγο από τα ορώδη σαλπγγικά ενδοεπιθηλιακά καρκινώματα (**serous tubal intraepithelial carcinomas, STICs**) (11).

Όπως απεικονίζεται αναλυτικά στο παρακάτω σχήμα, ο κάθε ένας από τους τέσσερις κυριότερους ιστολογικούς υποτύπους αναπτύσσεται με τη συμμετοχή διαφορετικών πρόδρομων περιοχών, που μπορεί να εδράζονται και εκτός του γεννητικού συστήματος (19).



Σχήμα 1.3: Οι περιοχές προέλευσης των διαφορετικών ιστολογικών υποτύπων (19)

### 1.5.1 Ορώδη καρκινώματα

Οι δύο ξεχωριστές υποκατηγορίες ορώδων όγκων έχουν διαφορετική προέλευση, γεγονός που υπογραμμίζει περαιτέρω την ετερογένεια της νόσου. Ωστόσο όλοι οι ορώδεις όγκοι χαρακτηρίζονται από μυλλερικό φαινότυπο. Οι HGSCs σχηματίζονται ύστερα από διασπορά συγκεκριμένων κυττάρων από τους κροσσούς του ωαγωγού που βρίσκεται δίπλα στην ωθήκη. Οι δομές αυτές καλούνται STICs και αποτελούν τις πρόδρομες περιοχές HGSC (12). Έχει βρεθεί ότι οι STICs και οι HGSCs έχουν σχεδόν κοινό γενετικό προφίλ, ενώ επιπλέον η γονιδιακή έκφραση στον HGSC είναι στενά σχετιζόμενη με αυτή του επιθηλίου του ωαγωγού, παρά με του αντίστοιχου της επιφάνειας της ωθήκης (20, 21). Οι HGSCs έχουν μυλλερικό μορφολογικό φαινότυπο όπως το επιθήλιο των ωαγωγών και όχι μεσοθηλιακό όπως το OSE, γεγονός που επιβεβαιώνει τη δευτερογενή εμπλοκή της ωθήκης σε αυτό τον τύπο καρκίνου. Ωστόσο δεν προέρχονται όλοι οι HGSCs από τους ωαγωγούς. Σε κάποιες περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα πιθανό να αναπτυχθεί ο όγκος από κάποια κύστη του φλοιού της ωθήκης (22). Κατά την ωοθυλακιορρηξία, οι κροσσοί του ωαγωγού πλησιάζουν την ωθήκη και υπάρχει η δυνατότητα να εμφυτευθούν επιθηλιακά κύτταρα από τον ωαγωγό στη διαρρηγμένη ωθηκική επιφάνεια, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας κύστης στο φλοιό της ωθήκης. Επιπλέον, η ωοθυλακιορρηξία εμπλέκεται στην πρόιμη καρκινογένεση με την απελευθέρωση υγρού που περιέχει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες είναι πιθανό να επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον του όγκου συμβάλλοντας στη δημιουργία φλεγμονής. Σχετικά με αυτή τη σχέση ωοθυλακιορρηξίας και



καρκίνου των ωοθηκών, υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα που παρουσιάζουν τον ελαττωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε γυναίκες με μειωμένο αριθμό ωοθυλακιορρηξιών, ως αποτέλεσμα πολλαπλών κυήσεων ή λήψης αντισυλληπτικών (23, 24).

Οι LGSCs έχουν διαφορετική προέλευση από τους HGSCs, αν και επίσης προέρχονται από το επιθήλιο των ωαγωγών. Συγκεκριμένα, οι πρόδρομοι των LGSCs είναι οι SBTs με τους οποίους έχουν σχεδόν κοινό φάσμα μεταλλάξεων και γενικότερα παρόμοια γενετικά και επιγενετικά γνωρίσματα. Οι SBTs σχηματίζονται εξαιτίας της χρόνιας φλεγμονής που μπορεί να προκύψει, με επακόλουθο τη θηλοειδή υπερπλασία του επιθηλίου του ωαγωγού και τελικά τη διασπορά, την εμφύτευση του επιθηλίου του ωαγωγού στην ωοθηκική επιφάνεια και το σχηματισμό του SBT. Περίπου το 5% των SBTs εξελίσσονται σε LGSC καρκινώματα (11).

### **1.5.2 Ενδομητριοειδή και διαυγοκυτταρικά καρκινώματα**

Έχει ήδη αναφερθεί στο υποκεφάλαιο 1.3 ότι οι ενδομητριοειδείς και οι διαυγοκυτταρικοί όγκοι (EAO) σχετίζονται με προϋπάρχουσα ενδομητρίωση στη γυναίκα. Και οι δύο υπότυποι χαρακτηρίζονται από μυλλεριανό φαινότυπο. Οι ενδομητριοειδείς όγκοι ήπιας κακοήθειας και οι διαυγοκυτταρικοί αναπτύσσονται από κύστεις ενδομητρίωσης, που ονομάζονται ενδομητρίωματα και αποτελούν τις πρόδρομες περιοχές τους. Η εμφάνιση καρκίνου των ωοθηκών σχετίζεται με τις περιπτώσεις ενδομητρίωσης όπου οι εστίες αναπτύσσονται οπουδήποτε στην πύελο και δεν εντοπίζονται αποκλειστικά στο ενδομήτριο. Αυτός ο έκτοπος ενδομήτριος ιστός έχει βρεθεί ότι χαρακτηρίζεται από μοριακές ανωμαλίες, που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση μονοπατιών που συνδέονται στενά με την ανάπτυξη καρκίνου. Κύριος παράγοντας που είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά κυττάρων από τα ενδομητρίωματα στην ωοθήκη είναι η παλίνδρομη ροή της εμμήνου ρύσεως, που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της ενδομητρίωσης. Οι ενδομητριοειδείς και οι διαυγοκυτταρικοί όγκοι αναπτύσσονται συνεπώς από ιστό του ενδομητρίου που εμφυτεύεται στην ωοθήκη, η οποία και εδώ εμπλέκεται δευτερογενώς στην καρκινογένεση. Επιπλέον, ο οροβλεννώδης υπότυπος έχει ως πρόδρομη περιοχή τις κύστεις ενδομητρίωσης (11, 13).

### **1.5.3 Βλεννώδη καρκινώματα**

Τα βλεννώδη καρκινώματα δε χαρακτηρίζονται από μυλλεριανό φαινότυπο, αντίθετα με τους άλλους τρεις βασικούς υποτύπους. Το βλεννώδες επιθήλιο που τους χαρακτηρίζει έχει ομοιότητες με τον βλεννογόνο του γαστρεντερικού συστήματος και συγκεκριμένα με αυτό του παχέος εντέρου, του τυφλού και του στομάχου. Οι βλεννώδεις όγκοι παρουσιάζουν αρκετά

σημαντική ετερογένεια και μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε δύο υποτύπους, ανάλογα με την προέλευσή τους. Στην πρώτη κατηγορία η πρόδρομη περιοχή είναι οι όγκοι Brenner, ενώ στη δεύτερη τα ώριμα τερατώματα. Οι βλεννώδεις όγκοι της πρώτης κατηγορίας, αναπτύσσονται στο μεταβατικού τύπου επιθήλιο που βρίσκεται στα σημεία σύνδεσης των ωαγωγών με τη μεμβράνη του περιτοναίου. Στη δεύτερη κατηγορία, η ωοθήκη εμπλέκεται πρωτογενώς στην καρκινογένεση, γεγονός που συμβαίνει μόνο στους μη επιθηλιακούς καρκίνους των ωοθηκών (11, 25).

## 1.6 Η μεταστατική διαδικασία στον καρκίνο των ωοθηκών

Στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών η μεταστατική διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει και να προχωρήσει μέσω τριών διαφορετικών πορειών, που είναι:

- η ενδοπεριτοναϊκή πορεία
- η διαδρομή μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας (αιματογενείς μεταστάσεις)
- η πορεία μέσω της λεμφικής οδού

Η ενδοπεριτοναϊκή μετάσταση αποτελεί τη συχνότερα εμφανιζόμενη περίπτωση, ενώ οι αιματογενείς μεταστάσεις δεν είναι σχεδόν ποτέ παρούσες κατά τη στιγμή της διάγνωσης της νόσου (26). Οι μακρινές μεταστάσεις, που προκαλούνται από τη διάδοση των καρκινικών κυττάρων μέσω της αιματογενούς και της λεμφικής οδού, λαμβάνουν χώρα περίπου στο ένα τρίτο των ασθενών. Πρόκειται για μεταγενέστερη εξέλιξη της νόσου, που δε συμβαίνει στα πρώιμα στάδια της (27).

Το πρώτο βήμα της μεταστατικής διαδικασίας στον επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών συνιστά η άμεση εξάπλωση στα γειτονικά όργανα του γεννητικού, του ουροποιητικού ή/και του γαστρεντερικού συστήματος. Είναι πιθανό να εισβάλουν καρκινικά κύτταρα μέχρι και στα πλευρικά τοιχώματα της περιτοναϊκής κοιλότητας. Στις περισσότερες περιπτώσεις ενδοπεριτοναϊκών μεταστάσεων είναι θετικοί οι λεμφαδένες της πυέλου και παρουσιάζεται ασκίτης (26). Ως ασκίτης χαρακτηρίζεται η συσσώρευση υγρού στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Στο ασκίτικο υγρό κακοήθους προέλευσης, είναι αυξημένη η παρουσία καρκινικών κυττάρων που έχουν διαφύγει από τον πρωτοπαθή όγκο (28). Επιπλέον, στον ασκίτη εμπεριέχονται εξωκυττάρια κυστίδια (**extracellular vesicles, EVs**) και ένας μεγάλος αριθμός T-κυττάρων, μακροφάγων σχετιζόμενων με τον όγκο (**tumor-associated macrophages, TAMs**), ινοβλαστών σχετιζόμενων με τον καρκίνο (**cancer-associated fibroblasts, CAFs**), κυτταροκινών και λιπιδίων. Όλα αυτά τα στοιχεία αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του οργανισμού υποβοηθώντας την εξέλιξη του όγκου και τη διαφυγή της ανοσοεπιτήρησης, και συνιστούν το μοναδικό

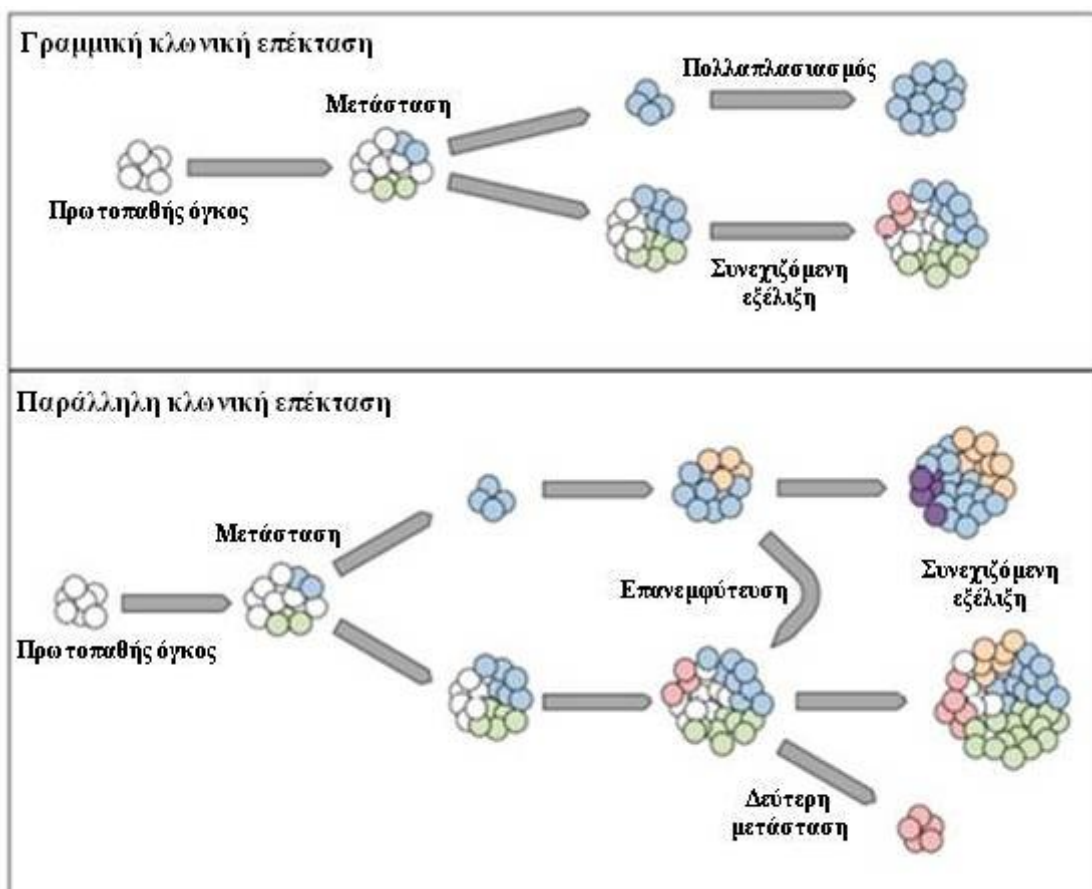
ανάμεσα σε όλες τις συμπαγείς κακοήθειες μικροπεριβάλλον του όγκου (**tumor microenvironment, TME**) στον καρκίνο των ωοθηκών. Η παρουσία κακοήθους ασκίτη παρατηρείται πολύ συχνά στον HGSC υπότυπο και γενικά στους όγκους τύπου II (29).

Η μεταστατική διαδικασία μέσω της ενδοπεριτοναϊκής πορείας, ξεκινά με την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (**epithelial-mesenchymal transition, EMT**) που υφίστανται αρχικά κάποια καρκινικά κύτταρα του όγκου. Η EMT είναι η διαδικασία με την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν βαθμιαία μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά, συνεπώς διευκολύνεται η μετανάστευσή τους διαμέσου της εξωκυτταρικής μήτρας και η εγκατάστασή τους στις πιθανές θέσεις μετάστασης. Η EMT επάγεται από πολλά διαφορετικά σήματα, που περιλαμβάνουν παράγοντες ανάπτυξης, ιντεγκρίνες, μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ συμμετέχουν και σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το Wnt/ $\beta$ -catenin σηματοδοτικό μονοπάτι, το Notch και το TGF- $\beta$  (30, 31). Στον καρκίνο των ωοθηκών έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που υποδεικνύουν ότι η EMT παίζει σημαντικό ρόλο στην ιδιαίτερη μεταστατική διαδικασία που χαρακτηρίζει τη νόσο, ωστόσο κάποια ερευνητικά αποτελέσματα στο πεδίο παρουσιάζουν μια διαφορετική εικόνα (32).

Στη συνέχεια της μεταστατικής διαδικασίας, τα κύτταρα που υφίστανται EMT αποσπώνται από τον όγκο και σχηματίζουν σφαιροειδείς δομές στο ασκίτικό υγρό, που στο μεταξύ έχει σωρευθεί στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Το τελικό βήμα της πορείας αποτελεί η εμφύτευσή τους στην επιφάνεια του περιτοναίου (26). Η προσκόλληση στο μεσοθήλιο, όπως ονομάζεται η εξωτερική στιβάδα του περιτοναίου, διευκολύνεται από πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, όπως το CD44, οι  $\beta$ -ιντεγκρίνες και η MUC16. Αυτές συνδέονται με τη μεσοθηλίνη και το υαλουρονικό οξύ, που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του μεσοθηλίου, οπότε πραγματοποιείται η προσκόλληση και μετέπειτα η εισβολή των καρκινικών κυττάρων στο περιτόναιο (28). Η προσκόλληση μπορεί να γίνει και εναλλακτικά, με τη σύνδεση των ανωτέρω πρωτεϊνών στη φμπρονεκτίνη, τη λαμνίνη και το κολλαγόνο τύπου IV, που βρίσκονται στην υποκείμενη εξωκυτταρική μήτρα (6). Γενικά η ενδοπεριτοναϊκή αυτή μετάσταση στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών είναι μοναδική μεταξύ των μεταστατικών διαδικασιών που μπορούν να συμβούν στους συμπαγείς όγκους (33).

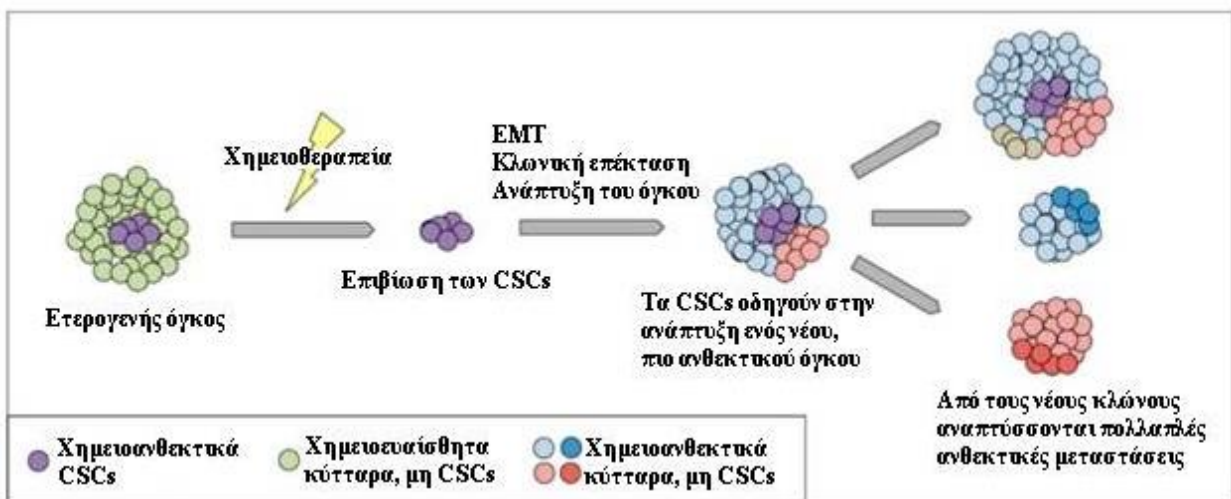
Εκτός από την ιστολογική και μοριακή ετερογένεια μεταξύ των διαφορετικών υποτύπων, ο καρκίνος των ωοθηκών χαρακτηρίζεται από **ετερογένεια του όγκου (tumor heterogeneity)**, που μπορεί να διαχωριστεί στην ετερογένεια μεταξύ των όγκων (inter-tumoral) όπου παρατηρούνται διαφορετικές γενετικές και φαινοτυπικές παραλλαγές μεταξύ πολλαπλών όγκων της ίδιας ασθενούς, για παράδειγμα μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των μεταστατικών εστιών ή μεταξύ διαφορετικών μεταστατικών εστιών, καθώς και στην ετερογένεια εντός του όγκου (intra-tumoral) όπου παρατηρούνται διακριτοί πληθυσμοί κυττάρων εντός του ίδιου

όγκου. Στον καρκίνο των ωοθηκών, η ετερογένεια εντός του όγκου κατέχει σημαντικό ρόλο στη μεταστατική διαδικασία και στην ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία, ενώ για την ανάπτυξή της έχουν προταθεί δύο θεωρίες: η κλωνική επέκταση (clonal expansion) και η εμπλοκή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (**cancer stem cells, CSCs**) (34). Η κλωνική επέκταση μπορεί να είναι γραμμική ή παράλληλη (35). Και οι δύο κατηγορίες έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, ενώ μπορεί και να συνυπάρχουν σε διαφορετικές μεταστατικές εστίες της ίδιας ασθενούς. Όταν λαμβάνει χώρα η γραμμική κλωνική επέκταση, οι μεταστατικοί όγκοι διακρίνονται από μεγάλο βαθμό ομοιογένειας, ενώ στην περίπτωση της παράλληλης κλωνικής επέκτασης, αναπτύσσονται διακριτοί υποπληθυσμοί κυττάρων με δυνατότητα ανεξάρτητης εμφύτευσης και ανάπτυξης διαφορετικών μεταστατικών εστιών, ακόμα και επανεμφύτευσης στη θέση του πρωτοπαθούς όγκου. Γενικά, στη γραμμική επέκταση ο πρωτοπαθής όγκος εξελίσσεται διαρκώς και αναπτύσσει νέους υποπληθυσμούς κυττάρων, ενώ στην παράλληλη επέκταση τόσο ο πρωτοπαθής όγκος όσο και οι μεταστατικές εστίες εξελίσσονται και αναπτύσσουν νέους υποπληθυσμούς κυττάρων. Οι δύο περιπτώσεις της κλωνικής επέκτασης απεικονίζονται λεπτομερώς στο σχήμα 1.4 (34).



Σχήμα 1.4: Σύγκριση μεταξύ της γραμμικής και της παράλληλης κλωνικής επέκτασης στον καρκίνο των ωοθηκών (34)

Εκτός από την κλωνική επέκταση, στη μεταστατική διαδικασία του καρκίνου των ωοθηκών συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό πληθυσμοί κυττάρων με βλαστικά χαρακτηριστικά, τα CSCs. Είναι εξαιρετικά πιθανό να ανθίστανται στη χημειοθεραπεία και να εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της υποτροπιάζουσας νόσου, με την απόκτηση γενετικών ή/και επιγενετικών αλλαγών και την ακόλουθη κλωνική επέκταση. Η εμπλοκή των CSCs στην ανάπτυξη αντίστασης στη χημειοθεραπεία και στην επακόλουθη μεταστατική διαδικασία απεικονίζεται λεπτομερώς στο σχήμα 1.5. Ο ανθεκτικός στη χημειοθεραπεία υποπληθυσμός των CSCs υφίσταται αρχικά EMT και στη συνέχεια κλωνική επέκταση και διαφοροποίηση, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός νέου όγκου, ανθεκτικού στη θεραπεία, που χαρακτηρίζεται ως υποτροπιάζουσα νόσος. Ο νέος όγκος οδηγεί γρήγορα στην ανάπτυξη πολλαπλών μεταστατικών εστιών, που σχηματίζονται από τους νέους χημειοανθεκτικούς κλώνους (34).



Σχήμα 1.5: Συμμετοχή των CSCs στην ανάπτυξη της υποτροπιάζουσας νόσου και στην επακόλουθη μεταστατική διαδικασία (34)

## 1.7 Πρωτεϊνικοί βιοδείκτες στον καρκίνο των ωοθηκών

Ως βιοδείκτες καλούνται εκείνα τα βιολογικά μόρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες στη διάγνωση, στην πρόγνωση και στη διαχείριση της θεραπείας μίας νόσου (36). Στην περίπτωση του καρκίνου, είναι πρόδηλο ότι ο προσδιορισμός ενός δείκτη καρκίνου και η εισαγωγή του στην καθημερινή κλινική πράξη απαιτεί πολυδιάστατες και πολυετείς ερευνητικές προσεγγίσεις (37). Στον καρκίνο των ωοθηκών δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα διαθέσιμοι κατάλληλοι βιοδείκτες για την πρώιμη διάγνωση της νόσου, με αποτέλεσμα το χαμηλό ποσοστό συνολικής επιβίωσης, το οποίο αγγίζει μόλις το 30% (2). Μόνο δύο βιοδείκτες έχουν λάβει την έγκριση του **FDA (Food and Drug Administration)** για την παρακολούθηση του καρκίνου των ωοθηκών και την ανίχνευση υποτροπής της νόσου ύστερα από την ολοκλήρωση της θεραπείας, το καρκινικό αντιγόνο CA-125 και η γλυκοπρωτεΐνη HE4 (38).

### 1.7.1 CA-125

Το καρκινικό αντιγόνο 125 (**cancer antigen 125, CA-125**), είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος βιοδείκτης για τον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, με τα επίπεδά του να μετρώνται κατά κύριο λόγο στον ορό. Η τιμή στον ορό αξιολογείται ως αυξημένη όταν ξεπεράσει το όριο των 35 U/mL (39). Ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1981 (40), έλαβε έγκριση από τον FDA το 1986 και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη για την παρακολούθηση της θεραπείας ήδη υπάρχουσας νόσου, για την επιβεβαίωση της διάγνωσης ή για τη διαπίστωση τυχόν υποτροπής (36). Πρόκειται για μία γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μεγέθους και υψηλού μοριακού βάρους που κωδικοποιείται από το γονίδιο *MUC16*, το οποίο υπερεκφράζεται από τα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα της ωοθήκης με επακόλουθο την έκκριση της πρωτεΐνης στη συστηματική κυκλοφορία των ασθενών. Ανήκει στα καρκινικά αντιγόνα επιφανείας, συγκεκριμένα πρόκειται για μία διαμεμβρανική βλεννώδη γλυκοπρωτεΐνη (36, 39).

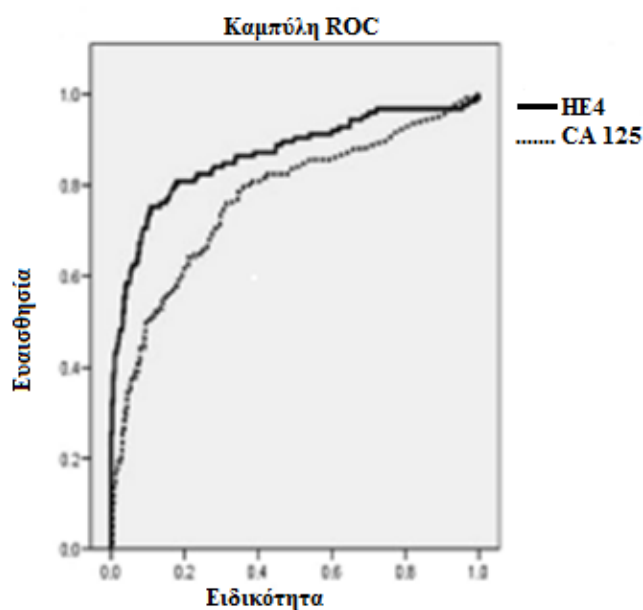
Κατά την παρακολούθηση της νόσου, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του CA-125 στον ορό συσχετίζονται με την πρόοδο ή την αναχαίτισή της (41). Από τις ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών, περίπου το 80% υπερεκφράζουν το CA-125, αντιθέτως, μόνο το 50% περίπου των ασθενών με νόσο σταδίου I παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα του CA-125, γεγονός που μειώνει δραματικά τη χρησιμότητά του ως διαγνωστικό δείκτη λόγω των πολλών ψευδώς αρνητικών τιμών που προκύπτουν. Κατά συνέπεια η διαγνωστική ευαισθησία του δείκτη είναι πολύ χαμηλή, περίπου 40% (36). Η διαγνωστική ειδικότητα του CA-125 είναι επίσης αρκετά μειωμένη, αφού ένας μεγάλος αριθμός καλοήθων παθήσεων μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων του, για παράδειγμα η ενδομητρίωση, η πυελική φλεγμονή και οι κύστει των ωοθηκών, ενώ κάποιες φορές παρατηρείται αύξησή του και κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης (42). Επιπλέον το CA-125 δεν είναι ειδικό καρκινικό αντιγόνο για τον καρκίνο των ωοθηκών, διότι αυξάνεται και σε περιπτώσεις καρκίνου σε άλλα όργανα όπως στον πνεύμονα και στο παχύ έντερο. Όλα αυτά υποδεικνύουν την ιδιαίτερα συχνή εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, οπότε και τη χαμηλή του ειδικότητα. Άλλος παράγοντας που επηρεάζει τα επίπεδα του CA-125 αποτελεί το προ- ή μετεμμηνοπαυσιακό στάδιο. Οι μέσες τιμές του ποικίλουν ανάλογα με την κατάσταση, με τις πιο υψηλές να παρατηρούνται σε προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς και τις χαμηλότερες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μεγάλης ηλικίας (36). Η μειωμένη ευαισθησία και ειδικότητα του CA-125 οδήγησαν συνεπώς στην έντονη προσπάθεια ανακάλυψης και άλλων πρωτεϊνικών βιοδεικτών με σκοπό τη συνδυασμένη μέτρησή τους για τη βελτίωση της ικανότητας πρόβλεψης της ύπαρξης κακοήθειας σε ασθενείς με μάζες στην περιοχή της πυέλου. Από όσους άλλους βιοδείκτες έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα, μόνο η HE4 έχει λάβει έγκριση από τον FDA, το 2009.

### 1.7.2 HE4

Η γλυκοπρωτεΐνη HE4 (**human epididymis protein 4, HE4**), αποτελείται από δύο πρωτεϊνικούς τομείς και έναν πυρήνα με τέσσερις δισουλφιδικές ομάδες (43). Πρόκειται για μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *WFDC2* (whey acidic protein four-disulfide core domain protein 2) και ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών με έναν τομέα που περιέχει γαλακτικό οξύ (44). Η τιμή της στον ορό αξιολογείται ως αυξημένη όταν ξεπεράσει το όριο των 150 pmol/L (45). Υπερεκφράζεται από τους επιθηλιακούς όγκους της ωοθήκης και εκκρίνεται σε μεγάλα επίπεδα στον ορό των ασθενών, όπως το CA-125, όμως παρουσιάζει αρκετά καλύτερη ευαισθησία (80%) και ειδικότητα, με λιγότερα ψευδώς αρνητικά και ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Σύμφωνα με μία πρόσφατη μετα-ανάλυση, η HE4 αποτελεί ικανοποιητικό δείκτη για τη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών (46). Συγκεκριμένα η πλειοψηφία των μη ωοθηκικών καρκινωμάτων δεν εκφράζει καθόλου την HE4, ενώ η μέτρησή της ανιχνεύει μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με νόσο σταδίου I. Γενικά η HE4 είναι λιγότερο πιθανό να αυξηθεί σε περιπτώσεις καλοήθων νόσων όπως είναι η ενδομητρίωση, όπου είναι χρήσιμη η μέτρηση των επιπέδων της για τη διαφοροποίηση της νόσου από τον καρκίνο των ωοθηκών, κυρίως σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (36). Επιπλέον, η HE4 μπορεί να ανιχνεύσει όγκους που ανήκουν στο βλεννώδη υπότυπο, σε μεγαλύτερο ποσοστό από το CA-125 (47).

Έχει βρεθεί ότι οι δύο δείκτες εμφανίζουν βελτιωμένη διαγνωστική ευαισθησία αν χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά, παρά ο κάθε ένας μόνος του, ιδίως στα στάδια I και II. Ωστόσο η συνολική διαγνωστική ειδικότητα είναι μειωμένη λόγω των αυξημένων ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων του CA-125 (47, 48).

Οι διαφορές στη διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα των βιοδεικτών διακρίνονται στις καμπύλες **ROC (receiver operating characteristic curves)**, όπου προσδιορίζεται η τιμή της περιοχής κάτω από την καμπύλη (**area under the curve, AUC**). Σε πολλές μελέτες των βιοδεικτών CA-125 και HE4 περιλαμβάνονται καμπύλες ROC. Ενδεικτικά παρατίθενται οι παρακάτω, από τη μελέτη των Escudero et al., όπου η HE4 παρουσίασε υψηλότερη διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα (AUC=0,903) συγκριτικά με το CA-125 (AUC=0,797) (47).



Σχήμα 1.6: Σύγκριση των CA-125 και HE4 για τη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών, σε σχέση με άλλες γυναικολογικές παθήσεις, με τη χρήση καμπυλών ROC (47)

### 1.7.3. Ο αλγόριθμος ROMA και η εξέταση OV1™

Εκτός από τους καρκινικούς βιοδείκτες CA-125 και HE4, έχουν λάβει έγκριση από τον FDA ο αλγόριθμος κινδύνου για κακοήθεια ωοθηκών (**risk of ovarian malignancy algorithm, ROMA**) το 2011 και η εξέταση **OV1™**. Ο αλγόριθμος ROMA συνδυάζει τα επίπεδα των CA-125 και HE4 με το προ- ή μετεμμηνοπαυσιακό στάδιο, ώστε να εξάγει μια βαθμολογία που υποδεικνύει την πιθανότητα κακοήθειας στις περιπτώσεις ασθενών που έχουν μια μάζα στην πύελο. Συγκεκριμένα, στις ασθενείς σε προεμμηνοπαυσιακό στάδιο η βαθμολογία  $ROMA \geq 1,31$  υποδεικνύει υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας και η βαθμολογία  $ROMA < 1,31$  υποδεικνύει χαμηλό κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας, ενώ στις ασθενείς σε μετεμμηνοπαυσιακό στάδιο η βαθμολογία  $ROMA \geq 2,77$  υποδεικνύει υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας και η βαθμολογία  $ROMA < 2,77$  υποδεικνύει χαμηλό κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας (39). Στην μελέτη των Moore et al. αναφέρθηκε για πρώτη φορά η συνδυαστική ερμηνεία των βιοδεικτών CA-125 και HE4 με την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, και διαπιστώθηκε ότι ο αλγόριθμος ROMA μπορεί να διαχωρίσει τον EOC από τους καλοήθεις όγκους των ωοθηκών και τους LMP όγκους με ευαισθησία 88,7% και ειδικότητα 74,7% (49).

Η εξέταση **OV1™** έχει εγκριθεί από την FDA για την εκτίμηση του κινδύνου παρουσίας καρκίνου των ωοθηκών σε γυναίκες που είχαν διαγνωστεί με μάζα στις ωοθήκες και είχαν ήδη προγραμματιστεί για χειρουργική επέμβαση. Συνιστά την ταυτόχρονη εκτίμηση πέντε πρωτεϊνικών βιοδεικτών στον ορό: του CA-125, της προαλβουμίνης, της απολιποπρωτεΐνης A1, της β2-μικροσφαιρίνης και της τρανσφερρίνης. Συνεκτιμάται επίσης το προ- ή



μετεμμηνοπαυσιακό στάδιο και εξάγεται μία βαθμολογία. Συγκεκριμένα, στις ασθενείς σε προεμμηνοπαυσιακό στάδιο η βαθμολογία  $OV1^{TM} \geq 5,0$  υποδεικνύει υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας και η βαθμολογία  $OV1^{TM} < 5,0$  υποδεικνύει χαμηλό κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας, ενώ στις ασθενείς σε μετεμμηνοπαυσιακό στάδιο η βαθμολογία  $OV1^{TM} \geq 4,4$  υποδεικνύει υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας και η βαθμολογία  $OV1^{TM} < 4,4$  υποδεικνύει χαμηλό κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας (39).

## 1.8 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών

Την καθιερωμένη θεραπεία για την πρωτοπαθή νόσο αποτελεί ένας συνδυασμός αρχικής ογκομειωτικής επέμβασης και χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής. Η μετεγχειρητική χημειοθεραπεία (**adjuvant chemotherapy**) βασίζεται στη χορήγηση δύο σχημάτων, ένα με βάση την πλατίνα (carboplatin ή cisplatin) και ένα με βάση την ταξάνη (paclitaxel και σε περιπτώσεις σοβαρών αντενδείξεων docetaxel) (50, 51). Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ασθενείς αρχικά ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής, ωστόσο σε παραπάνω από τις μισές αναπτύσσεται αντίσταση στα θεραπευτικά σχήματα και τελικά, υποτροπιάζουσα νόσος. Η υψηλή συχνότητα ανάπτυξης υποτροπιάζουσας νόσου οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αντίσταση στη χημειοθεραπεία, που μπορεί να είναι εγγενής ή επίκτητη, με τροποποιημένη έκφραση ορισμένων γονιδίων (52). Ως εκ τούτου, η ολική επιβίωση (**overall survival, OS**) και το διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (**progression free survival, PFS**) παραμένουν χαμηλά τις τελευταίες δεκαετίες, παρά τις μικρές βελτιώσεις και προσθήκες στα θεραπευτικά σχήματα (14, 16). Σε ορισμένες περιπτώσεις προχωρημένης νόσου όπου επιτεύχθηκε βέλτιστη ογκομείωση χορηγείται ενδοπεριτοναϊκή χημειοθεραπεία (cisplatin και paclitaxel), ενώ σε περιπτώσεις όπου δεν είναι εφικτή η βέλτιστη ογκομείωση χορηγείται εισαγωγική χημειοθεραπεία (**neoadjuvant chemotherapy, NACT**) (carboplatin και paclitaxel) και ενδιάμεση ογκομειωτική επέμβαση ([www.nncn.org](http://www.nncn.org)). Πρόσφατα έλαβαν έγκριση από τον FDA τρεις στοχευμένες θεραπείες για τον προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών, το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF **Bevacizumab**, που συγχορηγείται με τη θεραπεία πρώτης γραμμής ή τη θεραπεία που ακολουθεί την ενδιάμεση ογκομειωτική επέμβαση (FDA έγκριση, 06/2018) (53) και οι αναστολείς PARP (πολύ-ADP ριβοζο-πολυμεράσης) **Rucaparib** (FDA έγκριση, 04/2018) και **Olaparib** (FDA έγκριση, 12/2018) που χορηγούνται ως θεραπεία συντήρησης σε ασθενείς με γενετικές ή σωματικές *BRCA1/2* μεταλλάξεις (54, 55).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναδειχθεί τα οφέλη της ανοσοθεραπείας, που έχει αλλάξει ολοκληρωτικά την αντιμετώπιση συγκεκριμένων κακοηθειών όπως το μελάνωμα και τον καρκίνο του νεφρού. Στον καρκίνο των ωοθηκών είναι γνωστό ότι το ανοσοποιητικό σύστημα

συμμετέχει ενεργά στην προσπάθεια αντιμετώπισης της νόσου, η οποία χαρακτηρίζεται ως ανοσογονική, γεγονός που υποδεικνύεται με την υψηλή παρουσία CD3<sup>+</sup> TILs (56). Ειδικότερα ο HGSC, με βάση την έκφραση διαφορετικών γονιδίων διακρίνεται σε τέσσερις περαιτέρω μοριακούς υποτύπους, όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 1.3, ένας από τους οποίους είναι ο ανοσοαντιδραστικός, που χαρακτηρίζεται από την έκφραση των συνδετών χημειοκινών *CXCL11* και *CXCL10*, καθώς και του υποδοχέα *CXCR3* (14). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PD-L1* (programmed death ligand 1) και *PD-L2* (programmed death ligand 2) στον καρκίνο των ωοθηκών συσχετίζονται με σημαντικά μειωμένη OS, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι η σηματοδότηση μέσω του σημείου ελέγχου PD-1/PD-L1 αποτελεί μηχανισμό ανοσολογικής διαφυγής των όγκων αυτών (57). Η στόχευση του μονοπατιού PD-1/PD-L1 είναι ιδιαίτερα υποσχόμενη στο πεδίο της ανοσοθεραπείας του καρκίνου με τη χρησιμοποίηση αναστολέων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (58). Ωστόσο, η προγνωστική αξία των PD-L1 και PD-L2 στον καρκίνο των ωοθηκών είναι ακόμη υπό διερεύνηση, ενώ και ο ρόλος τους στο μικροπεριβάλλον του όγκου δεν έχει αποσαφηνιστεί (59). Επιπλέον, παρά τα ευρήματα που υποστηρίζουν έναν πιθανό ρόλο της ανοσοθεραπείας στην αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών, τα αποτελέσματα των πρώτων κλινικών μελετών με μονοθεραπεία αναστολέων του μονοπατιού PD-1/PD-L1 δεν είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά (60). Πολύ πρόσφατα, ανακοινώθηκαν τα αποτελέσματα μίας κλινικής μελέτης φάσης II (NCT02873962), όπου συμμετείχαν 38 ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών, από τις οποίες οι 18 ήταν πλατινοάντοχες και οι 20 πλατινοευαίσθητες. Στις ασθενείς αυτές δόθηκε ο συνδυασμός των στοχευμένων σχημάτων **Bevacizumab** και **Nivolumab**, που αποτελεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του PD-L1, και διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός αυτός έδειξε αποτελεσματικότητα στον υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών, περισσότερο στην υποομάδα των πλατινοευαίσθητων ασθενών (60).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

#### 2.1 Εισαγωγή

Η **υγρή βιοψία (liquid biopsy)** συνιστά ένα σύνολο αναλύσεων που πραγματοποιούνται στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο, με σκοπό τη διάγνωση της νόσου, την εκτίμηση της πρόγνωσης, καθώς και την πρόβλεψη ανταπόκρισης στη θεραπεία ή της ανάπτυξης αντίστασης σε κάποιο θεραπευτικό σχήμα. Πρόκειται για μη-επεμβατικές μεθόδους άντλησης πληροφοριών σχετικά με τη διάγνωση και την εξέλιξη της νόσου, με δυνατότητες εφαρμογής στην καθημερινή κλινική πράξη (61). Τις κύριες συνιστώσες του πεδίου της υγρής βιοψίας αντιπροσωπεύουν τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (**circulating tumor cells, CTCs**), το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (**circulating tumor DNA, ctDNA**), το κυκλοφορούν καρκινικό RNA (**circulating tumor RNA, ctRNA**) υποκατηγορία του οποίου αποτελούν τα κυκλοφορούντα εξωκυτταρικά miRNAs (**circulating cell-free microRNAs, cfmiRNAs**) και τα κυκλοφορούντα EVs, ειδικότερα τα εξωσώματα (62). Επιπλέον, πρόσφατα έχει βρεθεί ότι τα αιμοπετάλια που «εκπαιδεύονται» από τον όγκο (**tumor-educated platelets, TEPs**) μπορούν να μεταφέρουν νουκλεϊκά οξέα, κυρίως RNA, από τον όγκο σε μακρινά όργανα, με τη μελέτη τους να αποτελεί τη νεότερη προσθήκη στο πεδίο της υγρής βιοψίας (63).

Η μετάσταση στον καρκίνο των ωοθηκών πραγματοποιείται μέσω δύο κύριων πορειών χαρακτηριζόμενων από διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς: την παθητική διασπορά σφαιροειδών δομών προερχόμενων από τον όγκο στο περιτοναϊκό και το ασκитικό υγρό, και την αιματογενή μετάσταση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου της συστηματικής κυκλοφορίας, με τον επακόλουθο προτιμώμενο αποικισμό αυτών στο επίπλυν. Τα CTCs συνεισφέρουν στην αιματογενή μεταστατική πορεία και είναι εξαιρετικά σπάνια κύτταρα (26, 64). Το τελικό στάδιο και των δύο μεταστατικών πορειών αποτελεί ο αποικισμός καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από την ωοθήκη σε μακρινά όργανα, κυρίως το ήπαρ, τον σπλήνα και τους πνεύμονες (5).

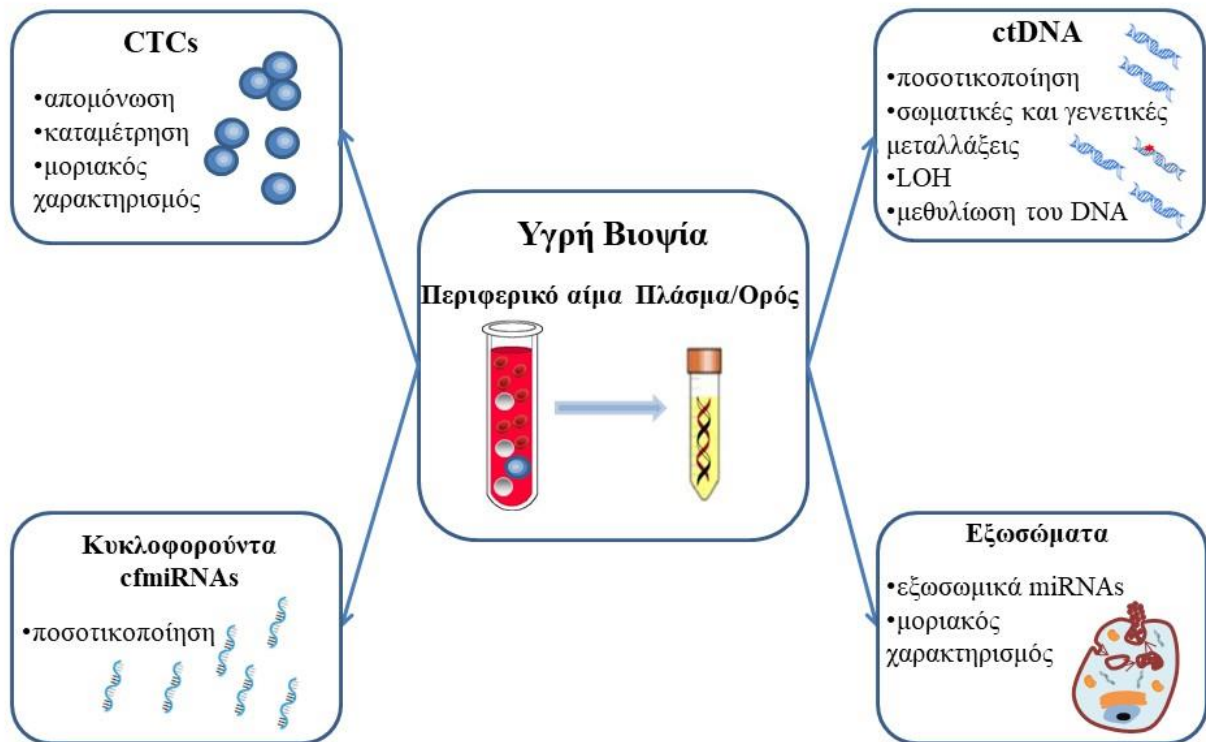
Το κυκλοφορούν εξωκυτταρικό DNA (**cell-free DNA, cfDNA**) κυκλοφορεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα των ασθενών με καρκίνο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μοριακών τροποποιήσεων που σχετίζονται με την ανάπτυξη της νόσου (65). Το ctDNA αποτελεί ένα μικρό ποσοστό του cfDNA που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία από τα καρκινικά κύτταρα και περιλαμβάνει όλες τις μοριακές αλλαγές που χαρακτηρίζουν το καρκινικό κύτταρο, όπως είναι οι μεταλλάξεις, η MSI, η απώλεια της ετεροζυγωτίας (**loss of heterozygosity, LOH**) και η μεθυλίωση του DNA (66). Το ctDNA μπορεί να χαρακτηριστεί ως

ένας μη επεμβατικός διαγνωστικός, προγνωστικός ή προβλεπτικός βιοδείκτης και μία εύκολα προσπελάσιμη πηγή DNA που προέρχεται από τον όγκο (67, 68).

Τα κυκλοφορούντα miRNAs αποτελούν μία υποομάδα των μη-κωδικοποιητικών RNAs που ανιχνεύονται σε σχεδόν όλα τα βιολογικά υγρά. Εμπλέκονται στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, ενώ κύριο ρόλο τους αποτελεί η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων τους. Η βιογένεση των miRNAs λαμβάνει χώρα αρχικά στον πυρήνα και στη συνέχεια στο κυτταρόπλασμα, με επακόλουθη απελευθέρωση των ώριμων miRNAs στην κυκλοφορία. Τα ώριμα miRNAs κυκλοφορούν είτε προσδεμένα σε ειδικές πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA (cfmiRNAs) ή εγκιβωτισμένα σε εξωσώματα (εξωσωμικά miRNAs) μαζί με πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα νουκλεϊκά οξέα (69-71). Τα εξωσώματα αποτελούν κύρια υποκατηγορία των EVs και εκκρίνονται από ζωντανά κύτταρα στον εξωκυττάριο χώρο ή στη συστηματική κυκλοφορία. Εξωσώματα εκκρίνονται και από καρκινικά κύτταρα, με διαρκώς αναγνωριζόμενο τον ρόλο τους στη μεταστατική διαδικασία (72-74). Στον καρκίνο των ωοθηκών, ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποδεικνύει έναν πιθανό ρόλο των εξωσωμάτων στην έγκαιρη διάγνωση και την εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών (74-76). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα εξωσώματα και το φορτίο τους, ειδικότερα τα εξωσωμικά miRNAs, εμπλέκονται σε μηχανισμούς ανάπτυξης αντίστασης στη χημειοθεραπεία, συνεπώς μπορούν να αποτελέσουν προβλεπτικούς δείκτες ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής (77).

Στον καρκίνο των ωοθηκών έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες στο πεδίο της υγρής βιοψίας, με τις περισσότερες να επικεντρώνονται στο ctDNA και στα cfmiRNAs (78). Πρόσφατα συνοψίσαμε τα αποτελέσματα των μελετών αυτών σε δύο άρθρα ανασκόπησης, όπου συζητήθηκε η δυνατότητα των CTCs, των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων και των εξωσωμάτων να χρησιμοποιηθούν ως καρκινικοί βιοδείκτες για την πρόγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (79, 80).

Οι κυριότερες εφαρμογές των αναλύσεων υγρής βιοψίας παρουσιάζονται αναλυτικά στο σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1: Οι κυριότερες εφαρμογές των αναλύσεων υγρής βιοψίας (80)

## 2.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) στον καρκίνο των ωοθηκών

Στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, έχει διαπιστωθεί ότι τα CTCs εμπλέκονται στην αιματογενή μεταστατική οδό (81, 82). Έως σήμερα, σε αρκετές μελέτες έχει γίνει προσπάθεια αξιολόγησης της κλινικής σημασίας των CTCs, ειδικότερα όσον αφορά στον πιθανό ρόλο τους ως προγνωστικοί ή/και προβλεπτικοί βιοδείκτες (83, 84). Για την απομόνωση, τον εμπλουτισμό και την ανίχνευση των CTCs στον καρκίνο των ωοθηκών, έχει χρησιμοποιηθεί ποικιλία διαφορετικών τεχνολογιών και μεθοδολογιών. Η απομόνωση και ο εμπλουτισμός των CTCs πραγματοποιούνται κυρίως με τη χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων ή βάσει του μεγέθους τους, ενώ η ανίχνευση των CTCs βασίζεται κυρίως σε μεθόδους που έχουν βάση την ανοσοκυτταροχημεία (**immunocytochemistry, ICC**), όπως η μικροσκοπική ανίχνευση ή το εγκεκριμένο από τον FDA σύστημα CellSearch<sup>®</sup> (Menarini Silicon Biosystems). Για τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs εφαρμόζονται κυρίως μεθοδολογίες ποσοτικής PCR αντίστροφης μεταγραφής (**reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR**) και RT-PCR (AdnaTest, QIAGEN, Hilden, Germany) (81, 84). Σε πρόσφατες μελέτες εφαρμόστηκαν νέες τεχνολογίες για την απομόνωση και τον εμπλουτισμό των CTCs με βάση τις φυσικές ιδιότητές τους, όπως οι συσκευές μικροροής για την απομόνωση και ανίχνευση των CTCs βάσει του μεγέθους τους (85, 86). Το σύστημα μικροροών Parsortix<sup>™</sup> (ANGLE plc) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση CTCs ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, με επακόλουθη RT-qPCR για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs (86).

Σε πρόσφατες μελέτες έγινε προσπάθεια εκτίμησης της προγνωστικής και της προβλεπτικής αξίας των CTCs ως καρκινικών βιοδεικτών σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, ενώ έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα τρεις μετα-αναλύσεις για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη εξαγωγή γενικότερων συμπερασμάτων (87-89).

Τα αποτελέσματα όλων των μελετών στα CTCs ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συνοψίζονται στον πίνακα 2.1. Όπως φαίνεται, η χρονική στιγμή λήψης του περιφερικού αίματος παρουσιάζει διαφορές, ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε πριν τη χειρουργική εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου.

Πίνακας 2.1: Κλινική σημασία των CTCs στον καρκίνο των ωοθηκών

Λήψη περιφερικού αίματος	Ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών	Υπότυπος καρκίνου ωοθηκών	Υγιείς δότες	Απομόνωση των CTCs	Ανίχνευση των CTCs	Αντιγόνο/γονίδιο στόχος	OS	PFS	Αναφορά	Έτος
Κατά τη διάγνωση	29	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	-	CellSearch®	CellSearch®	EpCAM, CK8,18,19	-	-	Lou et al. (90)	2019
Πριν το χειρουργείο	10	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	-	Ανοσομαγνητική μέθοδος CAM	Μικροσκοπία φθορισμού	EpCAM, ESA, CD24, CD44	-	-	Dong et al. (91)	2019
Πριν και μετά το χειρουργείο	30	ορώδης: 17, ενδομητριοειδής: 2, διαυγοκυτταρικός: 2, βλεννώδης: 5, άλλος: 4	-	Απομόνωση βάσει μεγέθους και παραμορφωσιμότητας	Ανοσοφθορισμός	EpCAM, CK	NS	NS	Kim et al. (92)	2019
Πριν και μετά το χειρουργείο, μετά τη χημειοθεραπεία	109	ορώδης: 91, βλεννώδης: 5, διαυγοκυτταρικός: 9, ενδομητριοειδής: 2, άλλος: 2	30	Ανοσομαγνητική (Dynabeads)	Πολλαπλή RT-PCR	<i>EpCAM, HER2, MUC1, WTI, P16, PAX8</i>	P=0,041 ( <i>EpCAM</i> <sup>+</sup> )	NS	Zhang et al. (93)	2018
Πριν το χειρουργείο	30	HGSC: 19, διαυγοκυτταρικός: 5, ενδομητριοειδής: 2, άλλος: 4	καλοήθης νόσος: 25	Σύστημα μικροροών	Ανοσοφθορισμός	EpCAM, panCK, CK7, Vimentin, HE4	-	-	Guo et al. (94)	2018
Πριν το χειρουργείο και/ή τη χημειοθεραπεία	20	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	12	Φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας και σύστημα μικροροών (Parsortix™)	RT-qPCR	29 γονίδια συμπεριλαμβανομένων: <i>SERPINE2, PPIA, TUSC3, EpCAM, CD45, B2M</i>	-	-	Obermayr et al. (86)	2017
Πριν το χειρουργείο και μετά τη χημειοθεραπεία	95	ορώδης: 81, βλεννώδης: 5, άλλος: 9	-	AdnaTest Ovarian CancerSelect / AdnaTest EMT-1Select	AdnaTest Ovarian CancerDetect/ RT-PCR	<i>EpCAM, MUC1, MUC16, PI3KA, AKT2, TWIST</i>	P=0,02 (BS, <i>PI3K</i> <sup>+</sup> ), P=0,002 (AC, EMT-like CTCs)	P=0,02 (AC, EMT-like CTCs)	Chebouti et al. (95)	2017
Κατά τη διάγνωση και 6	266	ορώδης: 229, άλλος: 37	-	Φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση	ICC/ FISH	EpCAM, CK7/18, CK5/8, CD45,	P=0,007 (AC)	P=0,008 (AC)	Obermayr et al. (96)	2017

μήνες μετά τη χημειοθεραπεία				πυκνότητας		EGFR, HER2, MUC1				
Πριν το χειρουργείο και μετά τη χημειοθεραπεία	54	ορώδης: 36, ενδομητριοειδής: 12, βλεννώδης: 4, διαυγοκυτταρικός: 2	-	Σύστημα μικροροών	ICC	EpCAM, TROP-2, EGFR, Vimentin, N-cadherin	NS	P=0,035 (BS)	Lee et al. (85)	2017
Πριν το χειρουργείο και μετά τη χημειοθεραπεία	65	ορώδης: 52, βλεννώδης: 9, άλλος: 4	-	AdnaTest Ovarian CancerSelect	AdnaTest Ovarian CancerDetect/ RT-PCR	<i>EpCAM, MUC1, MUC16, ERCC1</i>	P=0,0008 (AC)	P=0,0293 (AC)	Chebouti et al. (97)	2016
Πριν το χειρουργείο	10 (3: ανάλυση μονήρων κυττάρων)	ορώδης: 6, βλεννώδης: 2, άλλος: 2	-	AdnaTest Ovarian CancerSelect / AdnaTest EMT-1 / StemCellSelect	Πολλαπλή RT-PCR / AdnaTest Ovarian CancerDetect	3 ομάδες γονιδίων που σχετίζονται με την EMT και τη βλαστικότητα	-	-	Blassl et al. (98)	2016
Πριν το χειρουργείο και διαδοχικά	56	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	-	Βάσει μεγέθους (MetaCell®)	Κυτταρομορφολογική / qPCR	12 γονίδια συμπεριλαμβανομένων: <i>EpCAM, MUC1, MUC16, CK18,19, ERCC1</i>	-	-	Kolostova et al. (99)	2016
Πριν το χειρουργείο	118 (20: μελέτη γονιδιακής έκφρασης)	ορώδης: 85, ενδομητριοειδής: 1, διαυγοκυτταρικός: 3, βλεννώδης: 6, άλλος: 23	-	Βάσει μεγέθους (MetaCell®)	Κυτταρομορφολογική / qPCR	<i>EpCAM, MUC1, MUC16, CK18,19</i>	-	-	Kolostova et al. (82)	2015
Πριν το χειρουργείο, πριν τη χημειοθεραπεία και κατά τη διάρκεια 24 μηνών	123 (31: μελέτη στο διάστημα των 24 μηνών)	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	υγιείς δότες: 64, καλοήθης νόσος: 49	Ανοσομαγνητική μέθοδος CAM	ICC	EpCAM, ESA, CA125, DPP4	-	P<0,00001	Pearl et al. (100)	2015
Πριν το χειρουργείο	76	ορώδης: 61, ενδομητριοειδής: 2, διαυγοκυτταρικός: 6, άλλος: 7	48	Ανοσομαγνητική μέθοδος CAM	ICC	EpCAM, ESA, CA125, DPP4	P=0,0219	P=0,0024	Pearl et al. (101)	2014
Πριν το χειρουργείο	143	ορώδης: 109, άλλος: 34	-	AdnaTest Ovarian CancerSelect	RT-PCR (AdnaTest)	<i>EpCAM, MUC1, MUC16, ERCC1</i>	P=0,026	P=0,009	Kuhlmann et al. (102)	2014



Διαδοχικές μετρήσεις κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας	78	ορώδης: 59, ενδομητριοειδής: 7, διαυγοκυτταρικός: 3, άλλος: 9	-	CellSearch®	CellSearch®	EpCAM, CK8,18,19	NS	NS	Liu et al. (103)	2013
Πριν το χειρουργείο και μετά τη χημειοθεραπεία	216	ορώδης: 188, άλλος: 28	39	Φυγοκέντρωση σε βαθμίδωση πυκνότητας	RT-qPCR	12 γονίδια συμπεριλαμβανόμενων: <i>PPIC</i> , <i>EpCAM</i>	P=0,001 (AC)	P=0,001 (AC)	Obermayr et al. (104)	2013
Πριν και μετά τη λήψη temsirolimus	54	ορώδης: 39, ενδομητριοειδής: 4, διαυγοκυτταρικός: 3, άλλος: 8	-	CellSearch®	CellSearch®	EpCAM, CK8,18,19, M30	NS	NS	Behbakht et al. (105)	2011
Πριν το χειρουργείο και/ή μετά τη χημειοθεραπεία	122	ορώδης: 95, βλεννώδης: 8, άλλος: 19	-	AdnaTest	RT-PCR (AdnaTest)	<i>EpCAM</i> , <i>MUC1</i> , <i>HER2</i> , <i>CA125</i>	P=0,0054 (BS) P=0,047 (AC)	NS	Aktas et al. (106)	2011
Μετά τη χημειοθεραπεία	216	ορώδης: 153, άλλος: 63	-	CellSearch®	CellSearch®	EpCAM, CK8,18,19	P=0,0017	P=0,0024	Poveda et al. (107)	2011
Πριν το χειρουργείο	58	ορώδης: 44, ενδομητριοειδής: 2, διαυγοκυτταρικός: 6, άλλος: 6	-	Ανοσομαγνητική μέθοδος CAM	ICC	EpCAM, ESA, CK4,5,6,8,10,13,18	NS	P=0,042	Fan et al. (108)	2009
Πριν το χειρουργείο	53	ορώδης: 43, βλεννώδης: 3, διαυγοκυτταρικός: 3, ενδομητριοειδής: 3, άλλος: 1	-	Ανοσομαγνητικά σφαιρίδια	ICC	CK7,8,18,20, TFS-2, EGFR	NS	NS	Judson et al. (109)	2003
Μετά το χειρουργείο/Πριν τη χημειοθεραπεία	90	ορώδης: 60, βλεννώδης: 5, διαυγοκυτταρικός: 9, ενδομητριοειδής: 5, άλλος: 11	-	Ανοσομαγνητική (Dynabeads)	Ανοσομαγνητικά σφαιρίδια	MOC-31	NS	NS	Marth et al. (110)	2002

NS: όχι στατιστική σημασία (no significance), NR: δεν αναφέρεται (not reported), BS: πριν το χειρουργείο (before surgery), AC: μετά τη χημειοθεραπεία (after chemotherapy)

Στις πρώτες μελέτες στα CTCs ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ανοσοσφαιρίδια (110) και μία ICC μεθοδολογία (109). Οι Marth et al. ανίχνευσαν καρκινικά κύτταρα στο 12% των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (110), ενώ οι Judson et al. ανίχνευσαν CTCs στο 18,7% των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και παρατήρησαν ότι οι περισσότερες ασθενείς με ανιχνεύσιμα CTCs είχαν πρωτοπαθή όγκο σταδίου III (109). Και στις δύο αυτές μελέτες, δεν αναφέρθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των CTCs και της κλινικής έκβασης των ασθενών (109, 110).

Σε μία άλλη μελέτη, έγινε προσπάθεια εκτίμησης της προγνωστικής σημασίας των CTCs σε ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο ωοθηκών και αναφέρθηκε ότι τα CTCs που αποδόμησαν μία μήτρα ειδική στην προσκόλληση κυττάρων ήταν πιο διεισδυτικά, με την παρουσία τους να συσχετίζεται με σημαντικά μειωμένο PFS (108). Η ίδια ερευνητική ομάδα εφαρμόζοντας την ίδια μεθοδολογία για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των CTCs σε μία μεγαλύτερη ομάδα 129 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, πριν τη χειρουργική εκτομή, παρατήρησε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της παρουσίας των CTCs και μειωμένων διαστημάτων OS και PFS (101). Επιπρόσθετα, διερεύνησαν την προβλεπτική αξία των CTCs σε μία μικρή ομάδα 31 ασθενών που έλαβαν μετεγχειρητική χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής βασισμένη σε πλατίνα (carboplatin) και ταξάνη, όπου πραγματοποιήθηκαν λήψεις περιφερικού αίματος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, πριν και μετά το χειρουργείο, και έως 24 μήνες από την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας. Με τη χρήση της ίδιας μεθοδολογίας, διαπιστώθηκε η στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των CTCs και της προόδου νόσου (100). Σε μία πρόσφατη μελέτη, η ίδια ομάδα αξιολόγησε το μεταστατικό δυναμικό των διεισδυτικών CTCs σε μια μικρή ομάδα 10 ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, και πρότεινε τη δυνατότητα χρησιμοποίησης αυτού του υποπληθυσμού ως θεραπευτικού στόχου (91).

Η προγνωστική αξία των CTCs διερευνήθηκε με αρκετές μελέτες και από μία άλλη ερευνητική ομάδα. Οι Aktas et al. χρησιμοποίησαν το εμπορικά διαθέσιμο AdnaTest *BreastCancer* (QIAGEN, Hilden, Germany) για την απομόνωση και την ανίχνευση των CTCs σε μία μεγάλη ομάδα ασθενών, πριν το χειρουργείο και/ή μετά την χημειοθεραπεία με πλατίνα (106). Το AdnaTest *BreastCancer* βασίζεται στον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό με αντιγόνα-στόχους το EpCAM και την MUC1, και με επακόλουθη πολλαπλή RT-PCR για τα γονίδια *EpCAM*, *MUC1* και *HER2*. Επιπλέον, εφαρμόστηκε RT-PCR μεθοδολογία για την ανίχνευση της έκφρασης του *CA-125*. Στο 19% των ασθενών πριν το χειρουργείο και στο 27% μετά τη χημειοθεραπεία με πλατίνα ανιχνεύτηκαν CTCs, με την παρουσία αυτών να συσχετίζεται με σημαντικά μειωμένη OS, τόσο πριν το χειρουργείο όσο και μετά τη χημειοθεραπεία (106). Η ίδια ομάδα μελέτησε την προβλεπτική αξία του υποπληθυσμού των CTCs όπου παρατηρείται έκφραση του γονιδίου

*ERCCI* (*ERCCI*+CTC) (102). Για την απομόνωση και τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs σε μία μεγάλη ομάδα 143 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών χρησιμοποιήθηκε το AdnaTest *OvarianCancerSelect* (QIAGEN, Hilden, Germany), ενώ για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό τους το AdnaTest *OvarianCancerDetect* (QIAGEN, Hilden, Germany) όπου εφαρμόζεται πολλαπλή RT-PCR για τα γονίδια *EpCAM*, *MUC1*, *MUC16* (*CA-125*). Επιπλέον, εφαρμόστηκε RT-PCR μεθοδολογία για την ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου *ERCCI*. Στο 14% των ασθενών ανιχνεύθηκαν CTCs και η παρουσία τους συσχετίστηκε σημαντικά με μειωμένη OS. Ο υποπληθυσμός *ERCCI*+CTC ανιχνεύτηκε μόλις στο 8% των ασθενών, ωστόσο παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της παρουσίας του με μειωμένα διαστήματα OS και PFS. Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον συμπέρασμα της μελέτης αποτελεί η στατιστικά σημαντική συσχέτιση του υποπληθυσμού *ERCCI*+CTC με την ανάπτυξη αντίστασης στη χημειοθεραπεία με πλατίνα ( $P=0,010$ ), παρ'ότι δεν παρατηρήθηκε προγνωστική ή προβλεπτική σημασία της ICC έκφρασης της πρωτεΐνης *ERCC1* στον πρωτοπαθή όγκο (102). Σε επόμενη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι ο προσδιορισμός των μεταγράφων του γονιδίου *ERCCI* ενισχύει τη δυνατότητα ανίχνευσης CTCs στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, πριν το χειρουργείο και μετά τη χημειοθεραπεία. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ξανά ότι η παρουσία του υποπληθυσμού *ERCCI*+CTC αντικατοπτρίζει την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με πλατίνα, ενώ επιβεβαιώθηκε και η προγνωστική του σημασία, μεταθεραπευτικά (97). Σε άλλη μελέτη από την ίδια ομάδα, χαρακτηρίστηκαν τα CTCs όπου εμπλέκονται στην EMT διαδικασία (EMT-like CTCs), σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, πριν το χειρουργείο και μετά τη χημειοθεραπεία (95). Ως EMT-like CTCs περιγράφεται ο υποπληθυσμός των CTCs όπου ανιχνεύονται *PIK3CA*, *AKT-2* και *TWIST* μεταγράφα. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία *PI3K*+EMT-like CTCs σε συνδυασμό με την παρουσία CTCs με επιθηλιακό φαινότυπο, συσχετίστηκε σημαντικά με μειωμένη OS, όταν η λήψη περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε πριν το χειρουργείο. Επιπλέον, ο υποπληθυσμός των EMT-like CTCs ανιχνεύτηκε σε ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο σταδίων I-III, όπου διαπιστώθηκε υπολειπόμενη νόσος μετά το χειρουργείο. Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκε και η προγνωστική σημασία των CTCs, καθώς η παρουσία επιθηλιακών CTCs συσχετίστηκε με μειωμένα PFS και OS, και η παρουσία *PI3K*+ CTCs συσχετίστηκε με μειωμένη OS (95).

Έως σήμερα, το σύστημα CellSearch<sup>®</sup> (Menarini Silicon Biosystems) για την απομόνωση και καταμέτρηση των CTCs, έχει χρησιμοποιηθεί σε λίγες μελέτες στον καρκίνο των ωοθηκών. Η πρώτη μελέτη υπέδειξε προγνωστική σημασία στην καταμέτρηση των CTCs μετά από χημειοθεραπεία, καθώς αναφέρθηκε συσχέτιση του αριθμού των CTCs με μειωμένα OS και PFS, σε μια ομάδα 216 ασθενών με υποτροπιάζοντα καρκίνων ωοθηκών. Οι ασθενείς συμμετείχαν σε μία κλινική μελέτη φάσης III (NCT00113607) όπου έγινε σύγκριση της

θεραπευτικής αντιμετώπισης με pegylated λιποσωμική δοξορουμπικίνη (PLD), με τον συνδυασμό PLD και trabectedin (107). Σε μία άλλη κλινική μελέτη φάσης II (NCT00429793), εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα του mTOR αναστολέα temsirolimus σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών. Πραγματοποιήθηκε λήψη περιφερικού αίματος και καταμέτρηση των CTCs με το σύστημα CellSearch<sup>®</sup>, πριν και μετά τη θεραπεία με temsirolimus, όμως δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των CTCs και των διαστημάτων OS και PFS (105). Στην τρίτη μελέτη, το σύστημα CellSearch<sup>®</sup> χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με μόλις διαγνωσμένο και με υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές μετρήσεις κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας, όμως ο αριθμός των CTCs δεν συσχετίστηκε με μειωμένα διαστήματα OS και PFS (103). Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη, οι Lou et al. διεξήγαγαν μία προοπτική μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CellSearch<sup>®</sup> για την αξιολόγηση του ρόλου των CTCs στην ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία με πλατίνα, όμως δεν προέκυψε σημαντική συσχέτιση της παρουσίας τους κατά τη διάγνωση και της επακόλουθης ανάπτυξης αντίστασης (90).

Από την ερευνητική ομάδα του R.Zeillinger, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με στόχο την εκτίμηση της κλινικής σημασίας των CTCs στον καρκίνο των ωοθηκών. Στην πρώτη μελέτη, αξιολογήθηκε μία ομάδα έξι γονιδίων για τη μοριακή ανίχνευση των CTCs σε ασθενείς με γυναικολογικούς καρκίνους, συμπεριλαμβανόμενου του καρκίνου των ωοθηκών. Η έκφραση των γονιδίων προσδιορίστηκε με RT-qPCR και ταυτοποιήθηκε θετικό ως προς την παρουσία CTCs το 19% των 23 ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (111). Σε επόμενη μελέτη, προσδιορίστηκαν νέοι δείκτες για τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs στον καρκίνο των ωοθηκών συγκεκριμένα, με την εφαρμογή φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας για την απομόνωση των CTCs και RT-qPCR για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση επιλεγμένων μεταγράφων (104). Κατέληξαν σε μία ομάδα 11 γονιδίων και όρισαν ως CTC θετικά τα δείγματα όπου παρατηρήθηκε υπερέκφραση σε τουλάχιστον ένα από αυτά τα γονίδια. Ανιχνεύτηκαν CTCs σε 24,3% των δειγμάτων που ελήφθησαν κατά τη διάγνωση και σε 20,4% των δειγμάτων που αναλύθηκαν έξι μήνες μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας. Παρατηρήθηκε επίσης υπερέκφραση του γονιδίου *PPIC* στα δύο τρίτα των ασθενών, όμως λίγα μόνο δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως CTC θετικά με την υπερέκφραση του *ErCAM*. Μετά τη χημειοθεραπεία, ο υποπληθυσμός των *PPIC* θετικών CTCs ανιχνεύτηκε συχνότερα σε ασθενείς που παρουσίασαν αντίσταση στην πλατίνα, σε σχέση με τις πλατινοευαίσθητες, με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Επιπρόσθετα, η παρουσία των *PPIC* θετικών CTCs μετά τη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένα διαστήματα OS και PFS (104). Σε μία πρόσφατη μελέτη για τη εξέταση της σχέσης της παρουσίας των CTCs με την εμφάνιση

ελάχιστης υπολειμματικής νόσου, η μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε χειρότερη OS σε CTC θετικές ασθενείς, κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Η μελέτη αυτή υπέδειξε προγνωστική σημασία των CTCs σε μία μεγάλη ομάδα ασθενών κυρίως ορώδους καρκίνου ωοθηκών (96). Από την ίδια ερευνητική ομάδα πραγματοποιήθηκε πρόσφατα διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των CTCs και του ανοσοποιητικού συστήματος (112). Σε αντίστοιχα δείγματα πλάσματος ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, όπου είχαν αξιολογηθεί ως CTC θετικές σε προηγούμενη μελέτη, προσδιορίστηκε ο δείκτης ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος neopterin και ο λόγος kynurenine προς τρυπτοφάνη (104, 112). Παρατηρήθηκε ότι κατά τη διάγνωση και στο διάστημα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, τόσο ο δείκτης neopterin όσο και ο λόγος kynurenine προς τρυπτοφάνη ήταν σημαντικά αυξημένοι στο αντίστοιχο πλάσμα *PPIC* θετικών CTCs, συγκριτικά με τις τιμές που παρατηρούνται στο πλάσμα ασθενών με καλοήγη νόσο. Η μελέτη αυτή υποδηλώνει ότι οι ανοσολογικές αποκρίσεις εμφανίζονται όχι μόνο στον πρωτοπαθή όγκο αλλά και στη συστηματική κυκλοφορία (112).

Για την απομόνωση βάσει μεγέθους και τον εμπλουτισμό ζωντανών CTCs αναπτύχθηκε η πλατφόρμα MetaCell® (MetaCell s.r.o., Czech Republic), από τους Kolostova et al. (113). Μετά την απομόνωση των ζωντανών CTCs, ακολουθεί *in-vitro* καλλιέργειά τους, κυτταρομορφολογική ανάλυση και RT-qPCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων (113). Με την εφαρμογή της ανωτέρω μεθοδολογίας, απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν CTCs σε 77/118 (65,2%) ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών προχωρημένου σταδίου, πριν το χειρουργείο. Με βάση τα αποτελέσματα της κυτταρομορφολογικής ανάλυσης, επιλέχθηκαν 20 CTC θετικά δείγματα όπου μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων με RT-qPCR. Στην μελέτη αυτή προτάθηκε ένας νέος και ανεξάρτητος τρόπος σταδιοποίησης των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, βασιζόμενος στις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ της παρουσίας των CTCs και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών, ειδικότερα των επιπέδων του πρωτεϊνικού βιοδείκτη CA-125. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα του CA-125 υποδεικνύουν τη διασπορά των καρκινικών κυττάρων διαμέσου της λεμφικής κυκλοφορίας και προτάθηκε ότι τα CTCs αντιπροσωπεύουν την αιματογενή μεταστατική οδό (82). Σε επόμενη μελέτη, εφαρμόστηκε η ίδια πορεία για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των CTCs σε ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών. Ακολούθησε μελέτη έκφρασης γονιδίων με RT-qPCR στα θετικά δείγματα βάσει της κυτταρομορφολογικής ανάλυσης και διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου *EpCAM*, με τα επίπεδα να αυξάνονται ανάλογα με τον χρόνο της *in-vitro* καλλιέργειας. Τελικά προτάθηκε μία ομάδα επτά γονιδίων, συμπεριλαμβανόμενων των *EpCAM* και *MUC16*, για την ταυτοποίηση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών (99). Και στις δύο μελέτες δε

διερευνήθηκε η σχέση των CTCs με την πρόγνωση των ασθενών, αναφορικά με τα διαστήματα OS και PFS (82, 99).

Σε μία μόνο μελέτη έχει επιτευχθεί η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μονήρων CTCs στον καρκίνο των ωοθηκών, όπου απομονώθηκαν μονήρη CTCs από τρεις ασθενείς, πριν τη χειρουργική εκτομή. Ο μοριακός χαρακτηρισμός τους πραγματοποιήθηκε με πολλαπλή RT-PCR ακολουθούμενη από ηλεκτροφόρηση τριχοειδών. Με την πολλαπλή RT-PCR αξιολογήθηκε η έκφραση δύο ομάδων γονιδίων που αποτελούν δείκτες βλαστικότητας (*CD44*, *ALDH1A1*, *NANOG*, *OCT4*) και EMT (*NCAD*, *VIM*, *SNAIL2*, *CD117*, *CD146*) και παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη ετερογένεια μεταξύ των κυττάρων των διαφορετικών ασθενών, αλλά και μεταξύ των κυττάρων των ίδιων ασθενών. Παρατηρήθηκε επίσης η ταυτόχρονη έκφραση επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών, όπως και δεικτών βλαστικότητας στο ίδιο μονήρες CTC μίας ασθενούς (98).

Σε μία πρόσφατη μελέτη αξιολογήθηκε η δυνατότητα διάγνωσης του καρκίνου των ωοθηκών με την ανίχνευση συγκεκριμένων υποπληθυσμών CTCs. Τα CTCs απομονώθηκαν με την εφαρμογή μίας συσκευής μικροροών, ενώ για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό τους ακολούθησε ανοσοφθορισμός ως προς τα CD45, HE4, τη βιμεντίνη και τους δείκτες EMT, EpCAM και κυτταροκερατίνες (94). Η μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε μία ομάδα ασθενών με την παρουσία όγκου ωοθηκών, με τις μισές περίπου να διαγιγνώσκονται τελικά με καρκίνο ωοθηκών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του υποπληθυσμού DAPI<sup>+</sup>/E&M<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/HE4<sup>+</sup>CTC ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις περιπτώσεις καλοήθους νόσου (P=0,016). Ακολούθησε εκτίμηση της διαγνωστικής ευαισθησίας με τη χρήση καμπύλων ROC για την σύγκριση του ανωτέρω υποπληθυσμού με τον βιοδείκτη CA-125, όπου διαπιστώθηκε ότι η διαγνωστική ευαισθησία του υποπληθυσμού των CTCs (73,3%) υπερέφερε του CA-125 (56,7%). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι σε ασθενείς με υψηλό CA-125 ( $\geq 35$  U/mL), η ειδικότητα του υποπληθυσμού εξακολούθησε να είναι ικανοποιητική (86,7%) (94).

Σύγκριση μεταξύ των CTCs ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και του CA-125, πραγματοποιήθηκε και από μία άλλη πρόσφατη μελέτη, όπου για την απομόνωση των CTCs χρησιμοποιήθηκαν ανοσομαγνητικά σφαιρίδια και για τον μοριακό χαρακτηρισμό τους πολλαπλή RT-PCR. Είναι ενδιαφέρον ότι σε ασθενείς με όγκους σταδίου IA και IB διαπιστώθηκε ότι η ανίχνευση των CTCs (93%) υπερέφερε έναντι του CA-125 (64%). Παρατηρήθηκε επιπλέον ότι ο αριθμός των CTCs συσχετίστηκε σημαντικά με το στάδιο του πρωτοπαθούς όγκου (P=0,034), ενώ η έκφραση των γονιδίων *EpCAM* (P=0,003) και *HER2* (P=0,035) συσχετίστηκε με την ανάπτυξη

αντίστασης στη χημειοθεραπεία. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας *EpCAM*<sup>+</sup> CTCs πριν τη θεραπεία και μειωμένης OS (P=0,041) (93).

Σε μία άλλη πρόσφατη μελέτη, έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της προγνωστικής σημασίας των ανιχνεύσιμων CTCs μετά το χειρουργείο. Η απομόνωση των CTCs πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή μίας πλατφόρμας βάσει του μεγέθους και των διαφορών στην παραμορφωσιμότητα των κυττάρων αυτών σε σχέση με τα υπόλοιπα κυκλοφορούντα κύτταρα. Η παρουσία των CTCs μετεγχειρητικά συσχετίστηκε σημαντικά με την ανίχνευση λεμφαδενικής διήθησης (P=0,010), όμως δεν παρατηρήθηκε συσχέτισή της με μειωμένα διαστήματα PFS και OS (92).

### 2.3 Κυκλοφορούν εξωκυτταρικό DNA (cfDNA) στον καρκίνο των ωοθηκών

Για την εκτίμηση της κλινικής σημασίας του cfDNA στον καρκίνο των ωοθηκών, έχει πραγματοποιηθεί έως σήμερα ένας μεγάλος αριθμός μελετών, όπου αξιολογήθηκε ο ρόλος του cfDNA στη διάγνωση, την πρόγνωση της κλινικής έκβασης, την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία, ακόμα και τον ασυμπτωματικό έλεγχο του γενικού πληθυσμού (114, 115). Για τους σκοπούς αυτούς εφαρμόστηκε η ποσοτικοποίηση του ολικού cfDNA και/ή του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού μιτοχονδριακού DNA (**mitochondrial DNA, mtDNA**), ή η ανίχνευση και ταυτοποίηση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών στο ctDNA, όπως οι σωματικές και γενετικές μεταλλάξεις, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και ειδικότερα οι LOH, και η διαφορετική μεθυλίωση του DNA (116, 117). Επιπρόσθετα, σε μία case study ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το υβριδικό γονίδιο *FGFR2-FAM76A* στο ctDNA μίας ασθενούς με ορώδη καρκίνο ωοθηκών προχωρημένου σταδίου (118). Για μία χρονική περίοδο τεσσάρων ετών μετά την αρχική χειρουργική εκτομή και τη μετεγχειρητική χημειοθεραπεία, όπου η ασθενής παρουσίασε υποτροπές και άλλαξε αρκετά χημειοθεραπευτικά σχήματα, πραγματοποιήθηκαν 28 διαδοχικές λήψεις αίματος όπου διερευνήθηκε η παρουσία του γονιδίου *FGFR2-FAM76A* με PCR σε πραγματικό χρόνο (**real-time PCR**) και τα επίπεδα του CA-125. Παρατηρήθηκε ότι ενώ το υβριδικό γονίδιο ήταν ανιχνεύσιμο σε όλες τις μετρήσεις και στις υποτροπές της νόσου, το CA-125 παρουσίασε αύξηση μόνο τρεις φορές. Συνεπώς η παρουσία του υβριδικού γονιδίου στο ctDNA αξιολογήθηκε ως καλύτερος δείκτης ανίχνευσης υποτροπής της νόσου, συγκριτικά με το CA-125 (118).

Εκτός από το πυρηνικό cfDNA, που χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, έχει μήκος περίπου 150-170 bp και κυκλοφορεί περιελιγμένο σε νουκλεοσώματα (119), και το κυκλικό mtDNA, έχει ταυτοποιηθεί επιπλέον η παρουσία του κυκλικού εξτραχρωμοσωμικού DNA (**extrachromosomal circular DNA, eccDNA**) ή micro-DNA, που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μήκους 200-400 bp που έχουν αποκοπεί από τα

χρωμοσώματα, όπως το τελομερικό DNA. Το eccDNA μπορεί να αποτελείται και από μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που εντοπίζονται στις 5' αμετάφραστες περιοχές, τα εξώνια και τις CpG νησίδες (120, 121). Η παρουσία του eccDNA στην κυκλοφορία μελετήθηκε αρχικά σε ένα κατάλληλο μοντέλου ποντικού και στη συνέχεια διερευνήθηκε στον ορό και στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και καρκίνο ωοθηκών (n=11), πριν και μετά το χειρουργείο. Σε επτά από τις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών παρατηρήθηκε ότι το κυκλοφορούν eccDNA στο πλάσμα είχε σημαντικά μεγαλύτερο μήκος πριν το χειρουργείο, ενώ στις υπόλοιπες τέσσερις παρατηρήθηκε το αντίθετο. Λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα παρατηρήθηκε ότι συνολικά, η πλειοψηφία των ασθενών είχε κυκλοφορούν eccDNA σημαντικά μεγαλύτερου μήκος πριν το χειρουργείο (122).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις τα αποτελέσματα των μελετών στο cfDNA δεν παρουσιάζουν την αναμενόμενη συμφωνία. Οι ασυμφωνίες αυτές πιθανόν οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης του cfDNA, στις διαφορετικές προ-αναλυτικές συνθήκες, στη χρησιμοποίηση του ορού και όχι του πλάσματος, καθώς και στον διαφορετικό αρχικό όγκο πλάσματος/ορού από όπου πραγματοποιείται η απομόνωση του cfDNA. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη διαγνωστική αξία του cfDNA, ενώ για τον σκοπό αυτό έχουν διεκπεραιωθεί και δύο μετα-αναλύσεις (123, 124). Τα αποτελέσματα όλων των μελετών στο cfDNA και ειδικότερα στο ctDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συνοψίζονται στον πίνακα 2.2.



Πίνακας 2.2: Κλινική σημασία του ctDNA στον καρκίνο των ωοθηκών

ctDNA	Βιολογικό δείγμα	Ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών	Υπότυπος καρκίνου ωοθηκών	Υγιείς δότες	Γονίδιο στόχος	Ανίχνευση του ctDNA	Κλινική σημασία του ctDNA ως βιοδείκτη	Αναφορά	Έτος
Σωματικές και/ή γενετικές μεταλλάξεις	Πλάσμα	28	ορώδης: 15, ενδομητριοειδής: 5, βλεννώδης: 3, διαυγοκυτταρικός: 1, άλλος: 4	245	WGS	WGS	Διαγνωστικός, ελέγχου	Cristiano et al. (125)	2019
	Πλάσμα	4	HGSC: 2, ενδομητριοειδής: 1, βλεννώδης: 1	-	Ομάδα 44 γονιδίων συμπεριλαμβανόμενων: <i>TP53, BRCA1, APC, KRAS</i>	NGS: CAPP-Seq	Προβλεπτικός	Iwahashi et al. (126)	2019
	Πλάσμα	61	HGSC	-	<i>TP53</i>	ddPCR	Προβλεπτικός	Kim et al. (127)	2019
	Πλάσμα	112	HGSC: 108, ενδομητριοειδής: 2, μεικτός: 2	-	<i>BRCA1, BRCA2, TP53</i>	NGS: Illumina	Προβλεπτικός	Lin et al. (128)	2019
	Πλάσμα	210	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	-	16 γονίδια συμπεριλαμβανόμενων: <i>BRCA1, BRCA2</i>	NGS	Προβλεπτικός	Slavin et al. (129)	2018
	Πλάσμα	54	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	812	16 γονίδια συμπεριλαμβανόμενων: <i>TP53, NRAS, CTNNB1, PIK3CA, KRAS, APC, PTEN</i>	NGS: Illumina	Διαγνωστικός, ελέγχου	Cohen et al. (130)	2018
	Πλάσμα	83	ορώδης: 38, βλεννώδης: 13, ενδομητριοειδής: 10, διαυγοκυτταρικός: 13, άλλος: 9	714	18 γονίδια συμπεριλαμβανόμενων: <i>TP53, PTEN, PIK3CA, CTNNB1, PIK3R1</i>	NGS: Safe-SeqS	Διαγνωστικός, ελέγχου	Wang et al. (131)	2018
	Πλάσμα	14	HGSC	-	Ομάδα 50 γονιδίων	NGS: Ion Torrent	Προβλεπτικός	Arend et al. (132)	2018
	Πλάσμα	21	ορώδης: 12, άλλος: 9	-	<i>TP53, BRCA1, NOTCH2, DNMT3A, KRAS, FAT1, GATA6</i>	NGS: Illumina	Προβλεπτικός	Du et al. (133)	2018
	Πλάσμα	4	ορώδης	-	<i>TP53</i>	dPCR	Διαγνωστικός (βελτιστοποίηση μεθόδου)	Park et al. (134)	2018

	Πλάσμα	42	ΕΟΚ, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	44	Ομάδα 58 γονιδίων	NGS: TEC-Seq	Διαγνωστικός	Phallen et al. (135)	2017
	Πλάσμα	121	ορώδης	-	<i>BRCA1, BRCA2</i>	NGS: Illumina	Διαγνωστικός	Ratajska et al. (136)	2017
	Πλάσμα	19	HGSC: 18, ενδομητριοειδής: 1	-	<i>BRCA1, BRCA2</i> , 141 επιπλέον γονίδια	NGS: Illumina	Προβλεπτικός	Weigelt et al. (137)	2017
	Πλάσμα	30	HGSC	-	<i>BRCA1, BRCA2</i>	NGS: παρόμοιο με το TAm-Seq	Προβλεπτικός	Christie et al. (138)	2017
	Πλάσμα	40	HGSC	-	<i>TP53</i>	dPCR μικροροών	Προβλεπτικός	Parkinson et al. (139)	2016
	Ορός	22	ορώδης: 21, μεικτός: 1	-	Ομάδες γονιδίων συμπεριλαμβανόμενων: <i>TP53, PIK3CA, MET, PTEN, KRAS, BRAF, FBXW7</i>	ddPCR	Προγνωστικός	Pereira et al. (140)	2015
	Πλάσμα	7	ΕΟΚ, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	-	Ομάδες γονιδίων συμπεριλαμβανόμενων: <i>TP53, PIK3CA, BRAF, EGFR</i>	dPCR	Διαγνωστικός	Bettegowda et al. (141)	2014
	Πλάσμα	3	ΕΟΚ, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	-	<i>RB1, ZEB2, MTOR, CES4A, BUB1, PARP8</i>	WES, dPCR, TAm-Seq	Προβλεπτικός	Murtaza et al. (142)	2013
	Πλάσμα	46	HGSC	2	<i>TP53, PTEN, EGFR, BRAF, KRAS, PIK3CA</i>	NGS: TAm-Seq, dPCR	Διαγνωστικός	Forshew et al. (143)	2012
	Πλάσμα	126	ορώδης: 64, βλενώδης: 18, ενδομητριοειδής: 26, διαυγοκυτταρικός: 10, άλλος: 8	-	<i>KRAS</i>	PCR-RFLP	Προγνωστικός	Dobrzycka et al. (144)	2011
	Πλάσμα/ Ορός	69	ΕΟΚ, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	-	<i>TP53</i>	Αλληλούχιση του DNA	Προγνωστικός	Swisher et al (145)	2005
	Πλάσμα	27	ορώδης: 14, βλενώδης: 4, ενδομητριοειδής: 3, διαυγοκυτταρικός: 3, άλλος: 3	-	<i>TP53</i>	F-SSCP	Διαγνωστικός	Otsuka et al. (146)	2004

Μεθυσίωση	Πλάσμα	50	HGSC	51	<i>ESR1</i>	real-time MSP	Προγνωστικός	Giannopoulou et al. (147)	2018
	Ορός	154	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	υγιείς δότες: 189 καλοήθης νόσος: 175	<i>COL23A1, C2CD4D, WNT6</i>	Στοχευμένο bisulfite sequencing υψηλής κάλυψης	Διαγνωστικός, Προβλεπτικός	Widschwendter et al. (148)	2017
	Πλάσμα	59	HGSC	51	<i>RASSF1A</i>	real-time MSP	Προγνωστικός	Giannopoulou et al. (149)	2017
	Ορός	71	ορώδης: 41, ενδομητριοειδής: 8, διαυγοκυτταρικός: 7, βλενώδης: 7, άλλος: 8	υγιείς δότες: 80 καλοήθης νόσος: 43	<i>RUNX3, TFPI2, OPCML</i>	Πολλαπλή nested MSP	Διαγνωστικός	Wang et al. (150)	2015
	Ορός	45	ορώδης, βλενώδης, ενδομητριοειδής, διαυγοκυτταρικός, αδιαφοροποίητος	20	<i>OPCML</i>	Bisulfite sequencing, MSRE-PCR	Διαγνωστικός	Zhou et al. (151)	2014
	Πλάσμα	47	ορώδης: 23, βλενώδης: 15, ενδομητριοειδής: 9	υγιείς δότες: 10 καλοήθης νόσος: 14	<i>RASSF2A</i>	MSP	Διαγνωστικός	Wu et al. (152)	2014
	Ορός	87	ορώδης: 50, βλενώδης: 9, ενδομητριοειδής: 10, διαυγοκυτταρικός: 9, mixed: 5 άλλος: 4	υγιείς δότες: 62 καλοήθης νόσος: 53	<i>APC, RASSF1A, CDH1, RUNX3, TFPI2, SFRP5, OPCML</i>	Πολλαπλή MSP	Διαγνωστικός	Zhang et al. (153)	2013
	Ορός	36	ορώδης: 18, βλενώδης: 12, ενδομητριοειδής: 6	25	<i>SLIT2</i>	MSP	Διαγνωστικός	Dong et al. (154)	2012
	Ορός	106	ορώδης	17	<i>RASSF1A</i>	qPCR (τροποποιημένη MethyLight)	Προβλεπτικός	BonDurant et al. (155)	2011
	Πλάσμα	30	ορώδης: 28, βλενώδης: 1, άλλος: 1	υγιείς δότες: 30 καλοήθης νόσος: 30	<i>RASSF1A, CALCA, EP300, PGR-PROX, BRCA1, CDKN1C</i>	Βασισόμενη σε μικροσυστοιχίες (MethDet test)	Διαγνωστικός	Liggett et al. (156)	2011

	Πλάσμα	33	ορώδης	33	<i>BRCA1, HIC1, PAX5, PGR-PROX, THBS1</i>	Βασιζόμενη σε μικροσυστοιχίες (MethDet test)	Διαγνωστικός	Melnikov et al. (157)	2009
	Πλάσμα/ Ορός	35	ορώδης: 21, βλεννώδης: 3, ενδομητριοειδής: 5, διαυγοκυτταρικός: 4, άλλος: 2	υγιείς δότες: 20 καλοήθης νόσος: 10	<i>BRCA1, RASSF1A</i>	MSP	Διαγνωστικός	Ibanez et al. (158)	2004
	Πλάσμα	138	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	-	<i>hMLH1</i>	MSP	Προγνωστικός	Gifford et al. (159)	2004
<b>Χρωμοσωμικές ανωμαλίες/LOH</b>	Πλάσμα	54	HGSC: 45, βλεννώδης: 2, άλλος: 7	υγιείς δότες: 44 καλοήθης νόσος: 11	-	NGS: εξωνίων, χαμηλής καλυψης	Διαγνωστικός	Vanderstichele et al. (160)	2017
	Πλάσμα	32	HGSC	καλοήθης νόσος: 32	-	NIPT πλατφόρμα	Διαγνωστικός	Cohen et al. (161)	2016
	Πλάσμα	10	ορώδης	-	-	qPCR	Διαγνωστικός	Harris et al. (162)	2016
	Ορός	63	ορώδης: 50, άλλος: 63	20	-	fluorescence- labeled PCR	Προγνωστικός	Kuhlmann et al. (163)	2012
<b>Ποσοτικοποίηση (cfDNA)</b>	Πλάσμα	24	ορώδης: 21, διαυγοκυτταρικός: 2, άλλος: 1	υγιείς δότες: 12 καλοήθης νόσος: 12	<i>ALU-219, ALU-115</i>	qPCR	Διαγνωστικός	Zhang et al. (164)	2018
	Ορός	36	ορώδης: 22, ενδομητριοειδής: 14	υγιείς δότες: 75 καλοήθης νόσος: 49	NR	Τεχνολογία bdDNA	Διαγνωστικός	Shao et al. (165)	2015
	Πλάσμα	144	ορώδης: 123, ενδομητριοειδής: 9, άλλος: 12	-	<i>Cyclophilin A</i>	qPCR	Προγνωστικός	Steffensen et al. (166)	2014
	Ορός	36	ορώδης: 21, άλλος: 15	καλοήθης νόσος: 16	<i>B2M, RAB25, CLDN4, ABCF2</i>	qPCR	Προγνωστικός	No et al. (167)	2012
	Ορός	62	ορώδης: 54, άλλος: 8	28	-	PicoGreen dsDNA kit	Προγνωστικός	Wimberger et al. (168)	2011
	Πλάσμα	164	ορώδης: 133, άλλος: 31	υγιείς δότες: 75 καλοήθης	<i>GADPH, ACTB</i>	qPCR	Προγνωστικός	Kamat et al. (169)	2010

				νόσος: 49					
	Πλάσμα	22	ορώδης	50	<i>hTERT</i>	qPCR	Προβλεπτικός	Capizzi et al. (170)	2008
	Πλάσμα	19	HGSC	12	<i>GADPH, ACTB, β-globin</i>	qPCR	Διαγνωστικός	Kamat et al. (171)	2006
<b>Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)</b>	Ορός	165	ορώδης: 115, ενδομητριοειδής: 19, άλλος: 14, άγνωστος: 17	60	Θραύσμα mtDNA 79bp, θραύσμα mtDNA 230bp, <i>GADPH, β-globin, 36B4</i> DNA	qPCR	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Meng et al. (172)	2019
	Πλάσμα	24	ορώδης	24	<i>ND1, ND5</i>	qPCR	Διαγνωστικός	Kaseru et al. (173)	2019
	Πλάσμα	67 (44 μετά τη θεραπεία)	ορώδης: 53, άλλος: 14	-	<i>β-globin, MTCYB</i>	qPCR	Προγνωστικός	Kalavska et al. (174)	2018
	Πλάσμα	100 (20 μετά τη θεραπεία)	ορώδης: 14, βλεννώδης: 6	-	<i>MTATP8</i>	qPCR	Προβλεπτικός	Choudhuri et al. (175)	2014
	Πλάσμα/ Ορός	21	ορώδης: 15, βλεννώδης: 6	υγιείς δότες: 36 καλοήθους νόσος: 24 ενδομητρί- ωση: 23	<i>MTATP8</i>	Πολλαπλή qPCR	Διαγνωστικός	Zachariah et al. (176)	2008

NR: δεν αναφέρεται (not reported), PCR-RFLP: PCR πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (PCR-restriction fragment length polymorphism), F-SSCP: φθορισμομετρία πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (fluorescent-based single-strand conformation polymorphism)

Στις πρώτες μελέτες στο cfDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του ολικού cfDNA ή ξεχωριστά του πυρηνικού και του mtDNA, σε δείγματα πλάσματος ή ορού. Για την ποσοτικοποίηση, σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκε real-time PCR για τρία γονίδια αναφοράς, όπου προσδιορίστηκε ο αριθμός των γενωμικών ισοδυνάμων (**genome equivalents, GE**) μέσω πρότυπης καμπύλης, και βρέθηκε ότι τα επίπεδα του cfDNA ασθενών με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών ήταν αυξημένα συγκριτικά με τα αντίστοιχα των υγιών δοτών (171). Σε μία άλλη μελέτη, για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε μία τεχνολογία διακλαδισμένου DNA (**branched DNA, bDNA**) και διαπιστώθηκε η στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του cfDNA ασθενών με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τα αντίστοιχα των ασθενών με πρόωμη νόσο ( $P < 0,01$ ). Επιπλέον, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του cfDNA στον ορό και της εμφάνισης καρκίνου ωοθηκών, με τη χρήση καμπύλων ROC (165).

Η προγνωστική σημασία του cfDNA στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών διερευνήθηκε πρώτα από τους Kamat et al. (169). Στη μελέτη αυτή, ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα του cfDNA στο πλάσμα 164 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, με την εφαρμογή μίας real-time PCR μεθοδολογίας. Ύστερα από τον προσδιορισμό του αριθμού των GE, παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του cfDNA  $> 22.000$  GE/mL και του μειωμένου διαστήματος PFS ( $P < 0,001$ ), και αυτή η συσχέτιση έδειξε ανεξάρτητη προγνωστική αξία ( $P = 0,02$ ) παρουσία των διαθέσιμων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών (169). Αντιθέτως, οι No et al. διερεύνησαν την προγνωστική αξία του cfDNA και δεν παρατήρησαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων του cfDNA 36 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και των επιπέδων των 16 ασθενών με καλοήγη νόσο. Για τη μέτρηση των επιπέδων του cfDNA χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια για τέσσερα γονίδια (167). Τα διαφορετικά αποτελέσματα των δύο μελετών μπορεί να οφείλονται στον μικρό αριθμό ασθενών που συμμετείχαν στη δεύτερη μελέτη, ενώ πιθανή εξήγηση αποτελεί η ανάλυση δειγμάτων ορού και όχι πλάσματος, από τους No et al. Ωστόσο, σε μία άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ορού 62 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων του cfDNA με μειωμένη OS ( $P = 0,010$ ) (168).

Σε επόμενη μελέτη όπου συμμετείχαν 144 ασθενείς με πολυανθεκτικό επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών που είχαν λάβει στοχευμένη θεραπεία με Bevacizumab, όταν μετρήθηκαν τα επίπεδα cfDNA του πλάσματος με χρήση real-time PCR για το γονίδιο *PPIC*, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων cfDNA και των δύο διαστημάτων PFS και OS, τόσο με μονοπαραγοντικές όσο και με πολυπαραγοντικές αναλύσεις επιβίωσης. Συνεπώς σε αυτή τη μελέτη, το cfDNA του πλάσματος αξιολογήθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας

στις πλατινοανθεκτικές ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών που έχουν λάβει θεραπεία με Bevacizumab (166).

Περισσότερο από δέκα χρόνια πριν, προτάθηκε η μέτρηση των επιπέδων του cfDNA για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία, με τη χρησιμοποίηση ενός κατάλληλου ορθοτροπικού μοντέλου ποντικού (177). Η προβλεπτική αξία του cfDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών διερευνήθηκε περαιτέρω σε μία προοπτική μη-τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων του cfDNA ασθενών και υγείων δοτών, καθώς και η συσχέτιση των συγκεντρώσεων του cfDNA με την ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής (170).

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού mtDNA και η χρησιμοποίησή τους για την εκτίμηση της κλινικής έκβασης των ασθενών έχει πραγματοποιηθεί από αρκετές μελέτες σε συμπαγείς κακοήθειες (178), όμως μόνο σε πέντε στον καρκίνο των ωοθηκών. Στην πρώτη μελέτη, ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα του πυρηνικού cfDNA και του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού mtDNA στον ορό και στο πλάσμα ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, ασθενών με καλοήγη νόσο και ενδομητρίωση, καθώς και υγείων δοτών, με την εφαρμογή πολλαπλής ποσοτικής PCR (176). Παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα του πυρηνικού cfDNA και του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού mtDNA των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, συγκριτικά με τα αντίστοιχα των ασθενών με καλοήγη νόσο και των υγείων δοτών. Επιπλέον, ενδιαφέρουσα ήταν η παρατήρηση μίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και των πασχόντων από ενδομητρίωση, για τα επίπεδα του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού mtDNA, όχι όμως και για του πυρηνικού cfDNA (176). Σε επόμενη μελέτη, οι Choudhuri et al. διερεύνησαν τη διαγνωστική και την προβλεπτική αξία των επιπέδων του πυρηνικού cfDNA και του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού mtDNA σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών, μέτρησαν τα επίπεδα των δύο νουκλεϊκών οξέων πριν και μετά τη θεραπεία, και παρατήρησαν μία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων του πυρηνικού cfDNA πριν και μετά τη θεραπεία. Ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν παρατηρήθηκε και στα επίπεδα του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού mtDNA (175). Πιο πρόσφατα, διερευνήθηκε η προγνωστική αξία των επιπέδων του πυρηνικού cfDNA και του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού mtDNA σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών, πριν και μετά από έξι κύκλους χημειοθεραπείας, με την εφαρμογή ποσοτικής PCR (174). Μετά τη χημειοθεραπεία, διαπιστώθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του πυρηνικού cfDNA όπως και του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού mtDNA, καθώς και μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση των υψηλότερων επιπέδων του πυρηνικού cfDNA με μειωμένο διάστημα PFS ( $P=0,04$ ), ενώ πριν τη χημειοθεραπεία παρατηρήθηκε ότι τα χαμηλά επίπεδα και

των δύο νουκλεϊκών οξέων συσχετίστηκαν σημαντικά με βελτιωμένα διαστήματα OS και PFS (174). Σε μία άλλη μελέτη, αξιολογήθηκε η διαγνωστική αξία του κυκλοφορούντος mtDNA στο ολικό αίμα, στο πλάσμα και στα εξωσώματα ασθενών με ορώδη καρκίνο ωοθηκών. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του κυκλοφορούντος mtDNA στο ολικό αίμα και στα εξωσώματα ήταν σημαντικά υψηλότερα στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα των υγιών δοτών, όμως η στατιστικά σημαντική αύξηση δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα του κυκλοφορούντος εξωκυτταρικού mtDNA που απομονώθηκε από το πλάσμα (173). Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη, οι Meng et al. αξιολόγησαν τη διαγνωστική και την προγνωστική σημασία του κυκλοφορούντος mtDNA στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών (172). Προσδιορίστηκε η ακεραιότητα του mtDNA που απομονώθηκε από τον ορό 165 ασθενών με τη μέτρηση του δείκτη δύο θραυσμάτων του mtDNA, του mtDNA230 και του mtDNA79, μήκους 230bp και 79bp αντίστοιχα. Η ανίχνευση των θραυσμάτων πραγματοποιήθηκε με ποσοτική PCR. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα και των δύο θραυσμάτων ήταν σημαντικά αυξημένα στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις υγιείς ( $P=0,0001$ ), ενώ ο δείκτης ακεραιότητας ήταν σημαντικά μειωμένος ( $P=0,0001$ ). Επιπλέον, με τη χρήση καμπύλων ROC, το θραύσμα mtDNA79 είχε διαγνωστική ευαισθησία 90,3%, διαγνωστική ειδικότητα 81,7% και  $AUC=0,900$ . Όσον αφορά στην προγνωστική αξία του mtDNA, παρατηρήθηκε ότι αυξημένα επίπεδα του mtDNA79 ( $P=0,003$ ,  $P=0,0001$ ) και του mtDNA230 ( $P=0,041$ ,  $P=0,0001$ ) συσχετίστηκαν με την παρουσία μετάστασης στους λεμφαδένες και με τις τιμές του δείκτη CA-125, αντίστοιχα. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα του mtDNA79 ( $P=0,0001$ ) και οριακά του mtDNA230 ( $P=0,048$ ) συσχετίστηκαν με μειωμένη OS των ασθενών (172).

Σε μία πρόσφατη μελέτη για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ALU, στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, ασθενών με καλοήγη νόσο και υγιών δοτών. Συγκεκριμένα, ύστερα από τη μέτρηση των επιπέδων των επαναλαμβανόμενων στοιχείων short ALU-115 και long ALU-219 με ποσοτική PCR και του επακόλουθου υπολογισμού του δείκτη ακεραιότητας ALU-219/ALU-115, παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα του στοιχείου ALU-219 και του δείκτη ALU-219/ALU-115 στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, συγκριτικά με τα αντίστοιχα των ασθενών με καλοήγη νόσο και των υγιών δοτών (164).

### **2.3.1 Κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA) στον καρκίνο των ωοθηκών**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ctDNA αποτελεί μία μικρή υποομάδα του ολικού cfDNA των ασθενών με καρκίνο (179). Ακολουθεί η συνοπτική περιγραφή των μελετών που αναφέρονται σε συγκεκριμένες γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις στο ctDNA ασθενών με καρκίνο



ωοθηκών. Οι μελέτες ταξινομούνται ανάλογα με την γενετική ή επιγενετική τροποποίηση που ανιχνεύεται στο ctDNA.

### 2.3.1.1 Σωματικές και γενετικές μεταλλάξεις

Η ανίχνευση ειδικών σωματικών και γενετικών μεταλλάξεων στο ctDNA συνιστά μία πολύ σημαντική εφαρμογή των αναλύσεων υγρής βιοψίας στον καρκίνο των ωοθηκών. Από όλες τις γενετικές αυτές τροποποιήσεις, οι πλέον μελετημένες είναι οι σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53*, που αποτελούν κύριο μοριακό χαρακτηριστικό του HGSC υποτύπου, καθώς και οι γενετικές και σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1/2*. Στις πρώτες μελέτες σωματικών μεταλλάξεων στο ctDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* (146) και αναφέρθηκε η προγνωστική αξία μίας συγκεκριμένης *TP53* μετάλλαξης, η παρουσία της οποίας συσχετίστηκε με μειωμένη OS των ασθενών ( $P=0,02$ ) (145). Σε δύο επόμενες μελέτες, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της ψηφιακής PCR (**digital PCR, dPCR**) για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων του γονιδίου *TP53* στο ctDNA ασθενών με ορώδη καρκίνο ωοθηκών (134, 139). Οι Parkinson et al. εξέτασαν διαδοχικά δείγματα ctDNA ασθενών με HGSC για την παρουσία μεταλλαγμένων αλληλομόρφων του *TP53*, μέτρησαν τις ίδιες χρονικές στιγμές τις τιμές του δείκτη CA-125 και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ανίχνευση των μεταλλάξεων του *TP53* αποτελεί καταλληλότερο δείκτη ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής (139). Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη, αξιολογήθηκε η προβλεπτική αξία των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων του γονιδίου *TP53* στο ctDNA 61 ασθενών με HGSC (127). Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων μεταλλάξεων του *TP53* χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της ψηφιακής PCR σταγόνας (**droplet digital PCR, ddPCR**), οπότε οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, την ομάδα με υψηλό ( $\geq 0,2$  αντίγραφα/ $\mu\text{L}$ ) και την ομάδα με χαμηλό ( $< 0,2$  αντίγραφα/ $\mu\text{L}$ ) αριθμό μεταλλαγμένων *TP53* αλληλομόρφων. Τρεις μήνες μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις δύο αυτές ομάδες ( $P=0,038$ ), με τις ασθενείς της ομάδας υψηλού αριθμού αντιγράφων να παρουσιάζουν νωρίτερα πρόοδο νόσου (127). Επιπλέον από τις μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53*, έχει διερευνηθεί η προγνωστική αξία συγκεκριμένων σωματικών μεταλλάξεων του γονιδίου *KRAS* στο ctDNA ασθενών με ορώδη καρκίνο ωοθηκών. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι η παρουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου *KRAS* στο ctDNA συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένη OS ( $P=0,022$ ) των ασθενών (144).

Η ανάπτυξη πολύ ευαίσθητων και ειδικών τεχνολογιών αλληλούχισης νέας γενιάς (**next-generation sequencing, NGS**) για την ανίχνευση του ctDNA, οδήγησε στην υπέρβαση της δυσκολίας που προκύπτει εξαιτίας των εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων του ctDNA σε

σχέση με το ολικό cfDNA. Με βάση αυτή την εξέλιξη, προτάθηκε μία διαφορετική προσέγγιση για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση ειδικών για τον καρκίνο μεταλλάξεων στο ctDNA, από τους Forsheo et al. (143). Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μίας εξαιρετικά ευαίσθητης και ειδικής μεθοδολογίας στοχευμένης «βαθιάς» αλληλούχισης (**targeted deep sequencing, TAm-Seq**) για την ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλής συχνότητας αλληλομόρφων (**allele frequencies, AF**). Με την εφαρμογή της μεθοδολογίας μετρήθηκαν οι AF, κυρίως του γονιδίου *TP53*, στο ctDNA 46 ασθενών με προχωρημένο HGSC. Αξιοσημείωτα, παρατηρήθηκε η ανίχνευση μίας μετάλλαξης του γονιδίου *EGFR* σε ένα δείγμα ctDNA, όμως όχι και στον αντίστοιχο πρωτοπαθή όγκο. Όλα τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαιώθηκαν με την εφαρμογή dPCR (143). Σε μία άλλη μελέτη, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση όλων των εξονίων του γονιδιώματος (**whole exome sequencing, WES**) στο ctDNA τριών ασθενών με καρκίνο ωοθηκών. Η μέτρηση και ποσοτικοποίηση των AF σε διαδοχικά δείγματα ctDNA οδήγησε στην ταυτοποίηση συγκεκριμένων σωματικών μεταλλάξεων που συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη επίκτητης αντίστασης στη χημειοθεραπεία. Τα γονίδια με τις σημαντικά αυξημένες συχνότητες μεταλλαγμένων αλληλομόρφων παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 2.2. Όλα τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με την εφαρμογή των μεθοδολογιών dPCR και TAm-Seq (142). Σε άλλη πρόσφατη μελέτη, αναπτύχθηκε μία νέα προσέγγιση μαζικής παράλληλης αλληλούχισης, η στοχευμένη αλληλούχιση διόρθωσης λάθους (**targeted error correction sequencing, TEC-Seq**), εφαρμόστηκε στο ctDNA ασθενών με πρώιμο καρκίνο, συμπεριλαμβανομένων ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, και οδήγησε στην ταυτοποίηση νέων γενετικών αλλαγών σχετιζόμενων με τον καρκίνο. Στο 68% των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών πρώιμου σταδίου ανιχνεύτηκαν σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια οδηγούς, ενώ σε όλους τους τύπους καρκίνου που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε υψηλή συμφωνία μεταξύ του μοριακού προφίλ του ctDNA και του πρωτοπαθούς όγκου (135).

Εκτός από την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των τεχνολογιών NGS, οι μεθοδολογίες dPCR και ddPCR έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση καρκίνο-ειδικών μεταλλαγμένων AF, στο ctDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (134, 139-141). Σε μία μελέτη όπου συμμετείχαν ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του προχωρημένου καρκίνου ωοθηκών, ταυτοποιήθηκαν ειδικές για τον καρκίνο μεταλλάξεις στο ctDNA, με την εφαρμογή dPCR μεθοδολογιών. Στις περισσότερους μεταστατικούς ασθενείς ανιχνεύτηκε ctDNA, ενώ στις ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών μετρήθηκε ένας υψηλός αριθμός μεταλλαγμένων AF (περίπου 10.000 ανά 5 mL πλάσματος) (141). Σε μία άλλη μελέτη, ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν ειδικές για τον καρκίνο μεταλλάξεις στο ctDNA ασθενών με γυναικολογικές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου ωοθηκών,

με την εφαρμογή WES, στοχευμένης αλληλούχισης και ddPCR. Η ανίχνευση του ctDNA μετά τη θεραπεία συσχετίστηκε σημαντικά με την επιβίωση για οκτώ ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο των διαδοχικών μετρήσεων του ctDNA στις προσεγγίσεις εξατομικευμένης θεραπείας (140).

Οι τεχνολογίες NGS έχουν οδηγήσει στην ανίχνευση και ταυτοποίηση ειδικών γενετικών και σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων *BRCA1/2* στο ctDNA από το πλάσμα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών. Σε μία πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε ότι όλες οι γενετικές *BRCA1/2* μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στο ctDNA ήταν παρούσες και στον πρωτοπαθή όγκο, όμως δε διαπιστώθηκε το ίδιο και για τις σωματικές *BRCA1/2* μεταλλάξεις, γεγονός που υπέδειξε την ετερογένεια της νόσου (136). Σε μία άλλη μελέτη για την ταυτοποίηση τυχαίων γενετικών μεταλλάξεων που προδιαθέτουν για την ανάπτυξη καρκίνου, συμμετείχαν 10.888 ασθενείς με περισσότερους από 50 τύπους προχωρημένου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου ωοθηκών (129). Με την εφαρμογή αλληλούχισης των εξωνίων στο ctDNA, χαρακτηρίστηκαν παραλλαγές 16 γονιδίων προδιάθεσης για την ανάπτυξη κληρονομικού καρκίνου και παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών είχαν τον υψηλότερο επιπολασμό γενετικών μεταλλάξεων (8,1%) συγκριτικά με τους ασθενείς των υπόλοιπων τύπων καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, γενετικές μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* ανιχνεύτηκαν σε 14 και σε τρεις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έρχονται σε συμφωνία με τα σχετικά υψηλά επίπεδα γενετικών μεταλλάξεων που παρατηρούνται σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών (129).

Σε ασθενείς με HGSC, η παρουσία των γενετικών *BRCA1/2* μεταλλάξεων έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς συσχετίζεται με καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με πλατίνα και στη στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς PARP, όπως το Olaparib. Ωστόσο, η παρουσία αναστροφής των γενετικών *BRCA1/2* μεταλλάξεων θεωρείται ως ένας μηχανισμός επίκτητης αντίστασης στη χημειοθεραπεία και δύναται να οδηγήσει στην ανάπτυξη υποτροπιάζουσας νόσου (16). Σε αρκετές μελέτες έχει ταυτοποιηθεί αναστροφή των *BRCA1/2* μεταλλάξεων στο ctDNA και έχει διερευνηθεί η προβλεπτική τους αξία αναφορικά με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με πλατίνα και/ή με αναστολείς PARP. Σε μία μελέτη ασθενών με υποτροπιάζοντα HGSC, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε στο ctDNA μία τεχνολογία στοχευμένης αλληλούχισης amplicons παρόμοια με την TAm-Seq, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση αναστροφών *BRCA1/2* μεταλλάξεων (138). Παρατηρήθηκε ότι οι ίδιες αναστροφές *BRCA1/2* μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν στο ctDNA ήταν παρούσες και στον αντίστοιχο πρωτοπαθή όγκο, ενώ όλες οι ασθενείς με αναστροφές *BRCA1/2* μεταλλάξεων στο ctDNA παρουσίασαν αντίσταση στη θεραπεία με πλατίνα και αναστολείς PARP (138). Σε μία μελέτη μίας ασθενούς με HGSC,

ταυτοποιήθηκε μία συγκεκριμένη αναστροφή *BRCA1* μετάλλαξης στο ctDNA, με την εφαρμογή μίας βασιζόμενης στο NGS μεθοδολογίας για την ταυτόχρονη ανίχνευση 62 γονιδίων (180). Μετά τον πρώτο κύκλο χημειοθεραπείας η αναστροφή αυτή δεν ανιχνεύτηκε, όμως ταυτοποιήθηκαν μία άλλη γενετική *BRCA1* μετάλλαξη και μία σωματική μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53*. Η αναστροφή της *BRCA1* μετάλλαξης ήταν επίκτητη και ανιχνεύτηκε στο ctDNA ύστερα από αρκετούς κύκλους χημειοθεραπείας με πλατίνα και επακόλουθης θεραπείας με Olaparib. Σε όλη τη διάρκεια της θεραπείας της ασθενούς πραγματοποιούνταν διαδοχικές μετρήσεις του δείκτη CA-125 και είναι αξιοσημείωτο ότι αμέσως μετά την ανίχνευση της αναστροφής της *BRCA1* μετάλλαξης, τα επίπεδα του CA-125 αυξήθηκαν εκθετικά (180). Σε μία άλλη μελέτη, ταυτοποιήθηκαν αναστροφές *BRCA1/2* μεταλλάξεων στο ctDNA ασθενών με ανθεκτικό στην πλατίνα καρκίνο ωοθηκών, με την εφαρμογή στοχευμένης μαζικής παράλληλης αλληλούχησης. Στο 21% των ασθενών ανιχνεύτηκαν αναστροφές σωματικών *BRCA1* ή *BRCA2* μεταλλάξεων, ή ενδογενείς διαγραφές, ενώ πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με την εφαρμογή ddPCR (137). Οι αναστροφές των *BRCA1/2* μεταλλάξεων αξιολογήθηκαν και σε μία πρόσφατη κλινική μελέτη φάσης II (NCT01891344) όπου συμμετείχαν 112 ασθενείς με HGSC, στις οποίες είχαν ανιχνευθεί *BRCA1/2* μεταλλάξεις (128). Πραγματοποιήθηκε NGS στο ctDNA των ασθενών πριν τη θεραπεία με τον αναστολέα PARP Rucaparib και μετά την πρόοδο νόσου. Πριν τη θεραπεία, οι ασθενείς χωρίς αναστροφή *BRCA1/2* μεταλλάξεων είχαν σημαντικά αυξημένο διάστημα PFS συγκριτικά με τις ασθενείς με παρουσία αναστροφής *BRCA1/2* μεταλλάξεων ( $P < 0,0001$ ). Επιπρόσθετα, σε δείγματα ctDNA πριν τη θεραπεία, η ανίχνευση αναστροφής *BRCA1/2* μεταλλάξεων ήταν σημαντικά αυξημένη στις ασθενείς με αντοχή και αντίσταση στην πλατίνα συγκριτικά με τις πλατινοευαίσθητες ασθενείς ( $P = 0,049$ ) (128).

Η κλινική χρησιμότητα του ctDNA στην παρακολούθηση της θεραπείας έχει διερευνηθεί και στις περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η χορήγηση εισαγωγικής χημειοθεραπείας (NACT). Σε μία πρόσφατη μελέτη, πραγματοποιήθηκε NGS για την ταυτόχρονη ανίχνευση 50 γονιδίων στο ctDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, πριν και μετά την εισαγωγική χημειοθεραπεία. Πριν τη θεραπεία ταυτοποιήθηκαν 59 γενετικές παραλλαγές 19 γονιδίων, όμως μόνο έξι από αυτές εξακολουθούσαν να είναι ανιχνεύσιμες μετά την ολοκλήρωση της εισαγωγικής χημειοθεραπείας (132). Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε το μοριακό προφίλ του ctDNA 16 ασθενών με γυναικολογικές κακοήθειες συμπεριλαμβανομένων τεσσάρων ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (126). Από αυτές, οι δύο έλαβαν εισαγωγική χημειοθεραπεία, μία ασθενής με HGSC και μία με βλεννώδη υπότυπο. Ύστερα από την εφαρμογή «βαθιάς» αλληλούχησης για τον προσδιορισμό του προφίλ του όγκου (**Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing, CAPP-Seq**), ταυτοποιήθηκαν 68 σωματικές μεταλλάξεις σε 44 γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των *TP53*,

*BRCA1*, *APC* και *KRAS*, για τις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών. Κάθε μία από τις τέσσερις ασθενείς είχε τουλάχιστον μία μετάλλαξη σε ένα από τα παραπάνω γονίδια. Επιπλέον, στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, το μοριακό προφίλ του ctDNA ήταν σε συμφωνία με του πρωτοπαθούς όγκου στο 75% των περιπτώσεων. Στις ασθενείς που έλαβαν εισαγωγική χημειοθεραπεία, πραγματοποιήθηκε CAPP-Seq στο ctDNA πριν και μετά τη θεραπεία και παρατηρήθηκε ότι οι γενετικές αλλαγές που ανιχνεύτηκαν είχαν σχέση με την ανταπόκριση στην εισαγωγική χημειοθεραπεία (126).

Η υγρή βιοψία που βασίζεται στην ανάλυση του ctDNA είναι επίσης ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου. Πρόσφατα πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και επικύρωση μίας εξέτασης στο ολικό αίμα, με την ονομασία CancerSEEK (130). Το CancerSEEK έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης εξέτασης των επιπέδων οκτώ πρωτεϊνών και της παρουσίας σωματικών μεταλλάξεων σε 2.001 γενετικούς τόπους, με την εφαρμογή NGS. Η εξέταση εφαρμόστηκε σε 1.005 ασθενείς που είχαν ήδη διαγνωσθεί με διαφορετικούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων 54 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, καθώς και σε 812 υγιείς δότες. Η διαγνωστική ευαισθησία ήταν διαφορετική ανάλογα με τον τύπο καρκίνου, με την υψηλότερη να παρατηρείται για τον καρκίνο των ωοθηκών (98%). Στις περιπτώσεις όπου ο πρωτοπαθής όγκος ήταν διαθέσιμος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του μοριακού προφίλ του με του αντίστοιχου ctDNA, με την υψηλότερη συμφωνία (100%) να παρατηρείται και πάλι στον καρκίνο των ωοθηκών. Βάσει του μοριακού προφίλ του ctDNA και των πρωτεϊνών που ανιχνεύονται στον ορό, το CancerSEEK έχει επιπλέον τη δυνατότητα προσδιορισμού της θέσης του πρωτοπαθούς όγκου. Στον καρκίνο των ωοθηκών, στο 79% των περιπτώσεων η πρόβλεψη ήταν ορθή, ενώ το ποσοστό έφτασε το 92% όταν συμπεριλήφθηκε και ο δεύτερος πιθανότερος τύπος καρκίνου (130). Από την ίδια ερευνητική ομάδα πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και επικύρωση άλλης μίας εξέτασης, με την ονομασία PapSEEK. Η εξέταση αυτή έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης των καρκίνων του ενδομητρίου και των ωοθηκών, ύστερα από γενετική ανάλυση των δειγμάτων από το Pap test, για σωματικές μεταλλάξεις σε 18 γονίδια με NGS και για μία ανευπλοειδία. Σε 245 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών η διαγνωστική ευαισθησία της εξέτασης ήταν 33%, όμως με την επακόλουθη ανάλυση 83 διαθέσιμων αντίστοιχων δειγμάτων ctDNA, το ποσοστό αυξήθηκε στο 63% (131).

Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη από τους Cristiano et al., πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (**whole genome sequencing, WGS**) σε 236 ασθενείς με επτά τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου των ωοθηκών και σε 245 υγιείς δότες (125). Ύστερα από την WGS χαμηλής κάλυψης, ακολούθησε ανάλυση της θραυσματοποίησης του ctDNA και χρήση μοντέλων machine learning για την κατηγοριοποίηση των εξεταζόμενων

ως πασχόντων από καρκίνο ή υγείων, και επιπλέον για την πρώτη περίπτωση, για τον προσδιορισμό του πρωτοπαθούς όγκου. Ο καρκίνος των ωοθηκών ανιχνεύτηκε στις 25 από τις 28 ασθενείς, με διαγνωστική ευαισθησία 89%, διαγνωστική ειδικότητα 98% και AUC=0,83, με τη χρήση καμπύλων ROC. Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε ονομάστηκε **DELFI (DNA evaluation of fragments for early interpretation)** (125).

### 2.3.1.2 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες/LOH

Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος των ωοθηκών και ειδικότερα ο HGSC υπότυπος χαρακτηρίζονται συχνά από την παρουσία χρωμοσωμικής αστάθειας (14). Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι ανιχνεύσιμες και στο ctDNA. Στον καρκίνο των ωοθηκών, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες στο ctDNA όπου ανιχνεύτηκαν συγκεκριμένες παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (**copy number variations, CNVs**) (161), LOH (163) ή ανώμαλες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (162). Οι Kuhlmann et al. πρώτοι εξέτασαν την παρουσία LOH στο ctDNA ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, πριν το χειρουργείο και μετά τη χημειοθεραπεία. Για τη μέτρηση της LOH σε δύο κλάσματα του ctDNA, τα υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους, εφαρμόστηκε μία βασισμένη στην PCR φθορισμομετρική ανάλυση των μικροδορυφόρων. Παρατηρήθηκε ότι στο χαμηλού μοριακού βάρους κλάσμα του ctDNA, η ανίχνευση LOH σε δύο δείκτες συσχετίζεται με τον βαθμό κακοήθειας ( $P=0,033$ ) και το στάδιο FIGO ( $P=0,004$ ), ενώ η ανίχνευση LOH σε έναν άλλο δείκτη συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένη OS ( $P=0,030$ ) και στα δύο κλάσματα του ctDNA (163).

Σε μία άλλη μελέτη με στόχο την ανάδειξη της προβλεπτικής αξίας του ctDNA, παρουσιάστηκε ένας αλγόριθμος για την ποσοτικοποίηση του ctDNA με την εφαρμογή ποσοτικής PCR. Πριν το χειρουργείο, ταυτοποιήθηκαν ανώμαλες χρωμοσωμικές συνδέσεις στους πρωτοπαθείς όγκους 10 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και στο ctDNA οκτώ ασθενών. Μετά το χειρουργείο, το ctDNA ήταν ανιχνεύσιμο σε τρεις περιπτώσεις, υποδεικνύοντας την παρουσία της νόσου, όμως στις υπόλοιπες πέντε το ctDNA ήταν μη ανιχνεύσιμο, υποδεικνύοντας την εξάλειψή της (162).

Η πρώτη μελέτη που αποσκοπούσε στον ασυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου των ωοθηκών με την ανίχνευση CNVs στο ctDNA, πραγματοποιήθηκε από τους Cohen et al. (161). Πριν το χειρουργείο, εφαρμόστηκε μία εμπορικά διαθέσιμη τεχνολογία μη-επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (**non-invasive prenatal testing, NIPT**) σε 16 ασθενείς με πρώιμο και σε ισάριθμες με προχωρημένο HGSC. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του ctDNA αναλύθηκαν για την παρουσία υποχρωμοσωμικών αλλαγών και τον προσδιορισμό ολικών χρωμοσωμικών προσθηκών ή απωλειών. Συνολικά ανιχνεύτηκε το 40,6% των περιστατικών με HGSC και πιο συγκεκριμένα το 38% των πρώιμων σταδίων, υποδεικνύοντας μία πιθανή χρησιμότητα του

NIPT στο ctDNA για τον ασυμπτωματικό έλεγχο του πρώιμου HGSC (161). Ωστόσο, πριν από την ευρύτερη εφαρμογή αυτής της προσέγγισης απαιτούνται περισσότερες μελέτες επικύρωσης, βελτίωση των προ-αναλυτικών συνθηκών και η ταυτόχρονη ανάλυση του DNA από τους αντίστοιχους πρωτοπαθείς όγκους (181).

Σε μία πρόσφατη μελέτη, αξιολογήθηκε η διαγνωστική αξία του ctDNA στον πρώιμο HGSC, με την ανίχνευση συγκεκριμένων μοτίβων χρωμοσωμικής αστάθειας. Στη μελέτη συμμετείχαν 57 ασθενείς με διεισδυτικό HGSC ή όγκο οριακής κακοήθειας, 11 με καλοήγη νόσο και 44 υγιείς δότες. Με τη εφαρμογή NGS, προσδιορίστηκαν συγκεκριμένα μοτίβα χρωμοσωμικής αστάθειας στο ctDNA όλων των ασθενών και παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό χρωμοσωμικής αστάθειας στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, συγκριτικά με τις περιπτώσεις των ασθενών με καλοήγη νόσο και των υγιών δοτών (160).

### 2.3.1.3 Μεθυλίωση στο ctDNA

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και στην πρόοδο της κακοήθους νόσου. Στα ανώμαλα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA, παρατηρείται συχνά υπερμεθυλίωση των υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των περισσότερων τύπων καρκίνου (182). Στον καρκίνο των ωοθηκών έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες μεθυλίωσης (183), ενώ είναι ιδιαίτερα σημαντική η παρατήρηση διαφορετικών μοτίβων μεθυλίωσης μεταξύ των διαφορετικών ιστολογικών υποτύπων, συμπεριλαμβανόμενου και του HGSC (184).

Εκτός από το ctDNA, έχει μελετηθεί η μεθυλίωση στο DNA απομονωμένο από ολικό αίμα και από λευκοκύτταρα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, με την εφαρμογή κατάλληλων μικροσυστοιχιών και bisulfite pyrosequencing. Στην πρώτη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι στο DNA από περιφερικό αίμα ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία ανιχνεύονται σημαντικά διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης, συγκριτικά με τα αντίστοιχα που ανιχνεύονται στους υγιείς δότες (185). Σε μία κλινική μελέτη φάσης III (NCT00003998), όπου συμμετείχαν 880 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, εξετάστηκε η μεθυλίωση στο λευκοκυτταρικό DNA με την εφαρμογή bisulfite pyrosequencing και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μέσης μεθυλίωσης του γονιδίου *SFN* και μειωμένου διαστήματος PFS ( $P=0,016$ ) (186). Η ίδια ερευνητική ομάδα προχώρησε στην μελέτη μεθυλίωσης του DNA που απομονώθηκε από ολικό αίμα, σε 247 από τις ασθενείς που συμμετείχαν στην προαναφερθείσα κλινική μελέτη. Μετά τη χημειοθεραπεία με πλατίνα, στην υποτροπή της νόσου παρατηρήθηκαν συγκεκριμένες

τροποποιήσεις στα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA από ολικό αίμα και μία ανεξάρτητη στατιστικά σημαντική συσχέτιση αυτών με μειωμένη OS ( $P=2,8 \times 10^{-4}$ ) (187).

Οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA μπορούν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρόωμη διάγνωση των γυναικολογικών κακοηθειών (188). Όσον αφορά στην προγνωστική τους αξία, η πρώτη μελέτη που υπέδειξε προγνωστική σημασία στη μεθυλίωση του ctDNA στον καρκίνο των ωοθηκών, πραγματοποιήθηκε από τους Gifford et al. πριν από δεκαπέντε χρόνια (159). Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *hMLH1* με την εφαρμογή PCR ειδικής στη μεθυλίωση (**methylation-specific PCR, MSP**) στο ctDNA 138 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών που συμμετείχαν στην κλινική μελέτη φάσης III (NCT00003998) που αναφέρθηκε προηγουμένως, πριν τη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής και στην υποτροπή της νόσου. Παρατηρήθηκε αύξηση της συχνότητας της μεθυλίωσης του γονιδίου *hMLH1* στην υποτροπή, ενώ στο 25% των ασθενών ανιχνεύτηκε μεθυλίωση στο ctDNA μετά τη θεραπεία όταν στις ίδιες ασθενείς η μεθυλίωση πριν τη θεραπεία ήταν μη ανιχνεύσιμη. Η παρουσία της επίκτητης αυτής μεθυλίωσης συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένη OS ( $P=0,007$ ) (159). Το ίδιο έτος, οι Ibanez et al. διερεύνησαν τη μεθυλίωση των γονιδίων *RASSF1A* και *BRCA1* στο ctDNA 50 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, με την εφαρμογή MSP μεθοδολογιών. Η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε και σε ασθενείς πρώιμου σταδίου, ενώ στο 82% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε συμφωνία μεταξύ της μεθυλίωσης του ctDNA και των αντίστοιχων πρωτοπαθών όγκων (158).

Μία μεθοδολογία για την ανίχνευση της μεθυλίωσης βασισμένη σε μικροσυστοιχίες (MethDet test) αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε σε 33 δείγματα DNA από πρωτοπαθείς όγκους και πλάσμα, οδηγώντας στον προσδιορισμό μίας ομάδας πέντε γονιδίων για την ανίχνευση του καρκίνου των ωοθηκών (157). Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόστηκε επιπλέον σε δύο ομάδες ασθενών με ορώδη καρκίνο ωοθηκών ( $n=28$ ) και καλοήγη νόσο ( $n=30$ ), καθώς και σε μία ομάδα υγείων δοτών ( $n=30$ ). Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκαν διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης στους υποκινητές έξι γονιδίων και για τις τρεις ομάδες δειγμάτων ctDNA που εξετάστηκαν (156).

Σε μία μεγαλύτερη μελέτη, ανιχνεύτηκε και ποσοτικοποιήθηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* στο ctDNA από τον ορό 106 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, με την εφαρμογή μίας ποσοτικής MSP μεθοδολογίας (155). Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου ανιχνεύτηκε στις μισές περίπου ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, ενώ για 20 ασθενείς όπου ήταν διαθέσιμα και τα δείγματα πρωτοπαθών όγκων, η συμφωνία μεταξύ των αντίστοιχων δειγμάτων ιστών και ctDNA ήταν καθολική. Επιπλέον, για εννέα ασθενείς μετρήθηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* στο ctDNA σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της θεραπείας και για τις οκτώ από αυτές παρατηρήθηκε συμφωνία μεταξύ των αλλαγών στη μεθυλίωση του ctDNA και της προόδου νόσου (155). Από τη δική μας ερευνητική ομάδα, και στο πλαίσιο της παρούσας



διατριβής, πραγματοποιήθηκαν δύο μελέτες μεθυλίωσης των γονιδίων *RASSF1A* (149) και *ESR1* (147) που αναλύονται εκτενέστερα στα κεφάλαια 5 και 6.

Για την ταυτόχρονη ανίχνευση της μεθυλίωσης περισσότερων του ενός γονιδίων μπορούν να εφαρμοστούν πολλαπλές MSP μεθοδολογίες. Μία πολλαπλή MSP μεθοδολογία για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της μεθυλίωσης επτά επιλεγμένων γονιδίων, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε στο ctDNA δειγμάτων ορού από 87 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών. Στη μελέτη αυτή, ένα δείγμα ctDNA χαρακτηριζόταν ως θετικό, εάν τουλάχιστον ένα γονίδιο ήταν μεθυλιωμένο (153). Σε άλλη μελέτη, αναπτύχθηκε μία πολλαπλή διπλή (nested) MSP μεθοδολογία για την ταυτόχρονη ανίχνευση της μεθυλίωσης τριών γονιδίων και εφαρμόστηκε στο ctDNA δειγμάτων ορού από 114 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, καθώς και σε δείγματα ασθενών με καλοήγη νόσο και υγείων δοτών, και παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη μεθυλίωση στο ctDNA των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (150).

Επιπλέον, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων *SLIT2* (154), *OPCML* (151) και *RASSF2A* (152) στο ctDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, έχει παρατηρηθεί υπερμεθυλίωση των γονιδίων αυτών και έχει προταθεί μία πιθανή εφαρμογή τους στην πρόωμη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών. Για την ανίχνευση της μεθυλίωσης του γονιδίου *OPCML* εφαρμόστηκε bisulfite sequencing, καθώς και μία μεθοδολογία ευαίσθητης στη μεθυλίωση PCR περιοριστικού ενζύμου (**methylation-sensitive restriction enzyme-PCR, MSRE-PCR**) (151).

Μέχρι σήμερα, μόνο μία πρόσφατη μελέτη είχε στόχο την αξιολόγηση της προβλεπτικής αξίας της μεθυλίωσης στο ctDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών. Η μεθυλίωση τριών επιλεγμένων γονιδίων (*COL23A1*, *C2CD4D* και *WNT6*) αξιολογήθηκε με την εφαρμογή στοχευμένου εξαιρετικά-υψηλής κάλυψης bisulfite sequencing και ο προσδιορισμός της οδήγησε στην επιτυχή διάκριση των ανταποκρινόμενων και των μη-ανταποκρινόμενων ασθενών στην εισαγωγική χημειοθεραπεία με πλατίνα. Στην ίδια μελέτη, ταυτοποιήθηκε επιπλέον μία ομάδα γονιδίων των οποίων η μεθυλίωση διαχωρίζει τις ασθενείς με HGSC από τις υγιείς και από τις ασθενείς με καλοήγη όγκο στην πύελο (148).

## 2.4 Κυκλοφορούντα εξωκυτταρικά και εξωσωμικά miRNAs

Σε αρκετές μελέτες έως σήμερα έχει γίνει προσπάθεια εκτίμησης και αξιολόγησης της κλινικής σημασίας των κυκλοφορούντων cfmiRNAs και των εξωσωμικών miRNAs στον ορό ή στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (189-191). Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρουσιάζουν πολλές φορές ασυμφωνίες ως προς τον ρόλο συγκεκριμένων miRNAs ή την κλινική τους σημασία. Συγκεκριμένα, μία πρόσφατη μετα-ανάλυση για την εκτίμηση της διαγνωστικής σημασίας των κυκλοφορούντων cfmiRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η διαγνωστική τους αξία είναι μέτρια, όμως πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μόνο δέκα μελετών (192). Αντίθετα, σε μία πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση για την αξιολόγηση της διαγνωστικής σημασίας των κυκλοφορούντων cfmiRNAs, όπου συμπεριλήφθηκαν 33 μελέτες, επισημάνθηκε η διαγνωστική αξία των κυκλοφορούντων cfmiRNAs, ειδικότερα της ταυτόχρονης ανάλυσης ομάδων επιλεγμένων miRNAs (193). Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί ο ρόλος ενός μη-κωδικοποιητικού RNA, του κυκλοφορούντος U2 μικρού πυρηνικού RNA (**small nuclear RNA, snRNA**), στη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών (194), ενώ σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ότι μία ομάδα 137 κυκλοφορούντων miRNAs στον ορό παρουσίαζε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στις γυναίκες με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ωοθηκών, σε σύγκριση με τις χαμηλού κινδύνου (195).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις τα αποτελέσματα των μελετών στα κυκλοφορούντα miRNAs δεν παρουσιάζουν την αναμενόμενη συμφωνία. Οι ασυμφωνίες αυτές πιθανόν οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης και ανίχνευσης των miRNAs, καθώς και στη χρησιμοποίηση διαφορετικών miRNAs αναφοράς για την κανονικοποίηση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη miRNAs. Επιπλέον, παρατηρούνται διαφορές και στις προ-αναλυτικές συνθήκες, στη χρησιμοποίηση του ορού ή του πλάσματος, καθώς και στον διαφορετικό αρχικό όγκο ορού/πλάσματος από όπου πραγματοποιείται η απομόνωση των κυκλοφορούντων miRNAs. Τα αποτελέσματα των μελετών και η κλινική αξιολόγηση των κυκλοφορούντων cfmiRNAs και εξωσωμικών miRNAs ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συνοψίζονται στον πίνακα 2.3. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μελέτες που περιλάμβαναν περισσότερες από 25 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών.

**Πίνακας 2.3: Κλινική σημασία των κυκλοφορούντων εξωκυτταρικών και εξωσωμικών miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών**

Υπερέκφραση miRNAs	Υπόεκφραση miRNAs	Βιολογικό δείγμα	Ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών	Υπότυπος καρκίνου ωοθηκών	Υγιείς δότες	Ανίχνευση των miRNAs	miRNA αναφοράς	Κλινική σημασία των miRNAs ως βιοδείκτη	Αναφορά	Έτος
miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-203a, miR-34b, miR-34a	-	Πλάσμα	28	ορώδης	υγιείς δότες: 60 καλοήθης νόσος: 12	RT-qPCR	miR-103	Διαγνωστικός	Márton et al. (196)	2019
miR-375, miR-1307	-	Ορός (εξωσώματα)	50	ορώδης	υγιείς δότες: 50 καλοήθης νόσος: 50	RT-qPCR	miR-39	Διαγνωστικός	Su et al. (197)	2019
-	Ομάδα miRNAs συμπεριλαμβανόμενων : miR-181a, miR-1908, miR-21, miR-486, miR-223, miR-1304	Πλάσμα	30	ορώδης: 30	-	NGS	synthetic 21 nt RNA	Προβλεπτικός	Kuhlmann et al. (198)	2019
Τρεις διαφορετικές ομάδες των δέκα, δέκα και εννέα miRNAs, αντίστοιχα		Ορός	320	ορώδης: 182, διαυγοκυτταρικός: 64, ενδομητριοειδής: 43, βλενώδης: 14, άλλος: 17, μη-EOC: 13	υγιείς δότες: 2759 καλοήθης νόσος: 29	Μικροστοιχίες και RT-qPCR	miR-149-3p, miR-2861, miR-4463	Διαγνωστικός	Yokoi et al. (199)	2018
miR-21, miR-100, miR-200b, miR-320	miR-16, miR-93, miR-126, miR-223	Πλάσμα (εξωσώματα)	106	ορώδης: 90, άλλος: 13, άγνωστος: 3	29	RT-qPCR	RNU6, miR-484, cel-miR-39	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Pan et al. (200)	2018
miR-1290	-	Ορός	70	HGSC: 30, διαυγοκυτταρικός: 18, ενδομητριοειδής: 12, βλενώδης: 10	13	RT-qPCR	cel-miR-39	Διαγνωστικός	Kobayashi et al. (201)	2018
miR-99a-5p	-	Ορός	62	ορώδης: 32, διαυγοκυτταρικός: 15, ενδομητριοειδής: 9, βλενώδης: 6	υγιείς δότες: 20 καλοήθης νόσος: 26	RT-qPCR	RNAU6B	Διαγνωστικός	Yoshimura et al. (202)	2018
-	miR-193a-5p	Ορός	45	ορώδης: 22,	υγιείς δότες: 40	RT-qPCR	U6 snRNA	Διαγνωστικός	Ren et al.	2018

				βλεννώδης: 15, ενδομητριοειδής: 8	καλοήθης νόσος: 30				(203)	
miR-21	-	Ορός	60	ορώδης: 31, βλεννώδης: 13, άλλος subtypes: 16	30	RT-qPCR	U6 snRNA	Διαγνωστικός	Mahmoud et al. (204)	2018
miR-375, miR-210, miR-150-5p, miR-181-5p	-	Ορός	56	HGSC	30	RT-qPCR	UniSp3 πρότυπο	Διαγνωστικός	Shah et al. (205)	2018
Διαφορική υπερέκφραση (νευρωνικό δίκτυο)	Διαφορική υποέκφραση (νευρωνικό δίκτυο)	Ορός	168	ορώδης: 100, ενδομητριοειδής και διαυγοκυτταρικός: 48, βλεννώδης: 10	υγιείς δότες: 123 καλοήθης νόσος: 29	RT-qPCR	miR-423- 3p, miR- 103a-3p	Διαγνωστικός	Elias et al. (206)	2017
miR-200b, miR-1274a, miR-141, miR-200c	-	Πλάσμα	207	ορώδης: 137, διαυγοκυτταρικός: 27, μεικτός: 21, άλλος: 22	-	RT-qPCR	miR-220, miR-19b, U6 snRNA, miR-320	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Halvorsen et al. (207)	2017
miR-142-3p, miR-26a-5p, let-7d-5p, miR-374a-5p, miR-766-3p, miR-200a-3p, miR-130b-3p, miR-328-3p	-	Ορός	155	ορώδης: 112, διαυγοκυτταρικός: 19, ενδομητριοειδής: 13, βλεννώδης: 11	υγιείς δότες: 63 καλοήθης νόσος: 43	RT-qPCR και NGS	miR-16	Διαγνωστικός	Yokoi et al. (208)	2017
miR-1246, miR-595, miR-2278	-	Ορός	168	HGSC	65	RT-qPCR	miR-15b	Διαγνωστικός	Todeschini et al. (209)	2017
miR-376a	-	Ορός	32	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	10	RT-qPCR	U6 snRNA	Διαγνωστικός	Yang et al. (210)	2017
miR-125b	-	Ορός	135	HGSC: 89, διαυγοκυτταρικός: 24, ενδομητριοειδής: 12, άλλος: 10	καλοήθης νόσος: 54	RT-qPCR	miR-16	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Zhu et al. (211)	2017
-	miR-148a	Πλάσμα	102	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	70	RT-qPCR	U6 snRNA	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Gong et al. (212)	2016
miR-373, miR-200a, miR-200b, miR-200c	-	Ορός	60	ορώδης: 43, άλλος: 2, άγνωστος: 15	υγιείς δότες: 32 καλοήθης νόσος: 20	RT-qPCR	miR-484	Διαγνωστικός	Meng et al. (213)	2016

miR-125b	-	Ορός	70	βλεννώδης: 36, ορώδης: 17, άλλος: 17	70	RT-qPCR	U6 snRNA	Διαγνωστικός	Zuberi et al. (214)	2016
-	miR-199a	Ορός	70	βλεννώδης: 36, ορώδης: 17, άλλος: 17	70	RT-qPCR	U6 snRNA	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Zuberi et al. (215)	2016
miR-373, miR-200a, miR-200b, miR-200c	-	Ορός (εξωσώ- ματα)	163	ορώδης: 120, άλλος: 15, άγνωστος: 28	υγιείς δότες: 32 καλοήθης νόσος: 20	RT-qPCR	miR-484	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Meng et al. (216)	2016
miR-7, miR-429	miR-25, miR-93	Ορός	180	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	66	RT-qPCR	miR-484	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Meng et al. (217)	2015
miR-200b	-	Πλάσμα	51	EOC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	υγιείς δότες: 25 καλοήθης νόσος: 25	RT-qPCR	miR-191	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Kapetanakis et al. (218)	2015
miR-200a, miR-200b, miR-200c	-	Ορός	70	βλεννώδης: 36, ορώδης: 17, άλλος: 17	70	RT-qPCR	U6 snRNA	Διαγνωστικός	Zuberi et al. (219)	2015
-	miR-145	Ορός	84	ενδομητριοειδής: 24, ορώδης: 18, διαυκοκυτταρικός: 17, βλεννώδης: 12, μεικτός: 13	υγιείς δότες: 135 καλοήθης νόσος: 51	RT-qPCR	U6 snRNA	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Liang et al. (220)	2015
miR-200c, miR-141	-	Ορός	74	ορώδης: 16, ενδομητριοειδής: 15, διαυκοκυτταρικός: 14, βλεννώδης: 12, αδιαφοροποίητος: 17	50	RT-qPCR	NR	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Gao et al. (221)	2015
-	let-7i-5p, miR-122, miR-152-5p, miR-25- 3p	Ορός	25	Ορώδης	καλοήθης νόσος: 20	RT-qPCR	has-miR- 103a-3p, miR-27b- 3p, miR- 30b-5p, miR-101- 3p	Διαγνωστικός	Langhe et al. (222)	2015
miR-26a	-	Πλάσμα	26	ορώδης: 15, άλλος: 11	19	RT-qPCR	cel-miR-39	Διαγνωστικός	Shen et al. (223)	2014

miR-22, miR-93, miR-451	miR-106b	Ορός	31	ΕΟC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	υγιείς δότες: 8 καλοήθης νόσος: 23	RT-qPCR and NGS	miR-16	Διαγνωστικός	Ji et al. (224)	2014
miR-625-3p, miR-720, miR-1274a	19 miRs συμπεριλαμβανόμενων : miR-19b, miR-223, miR-16, miR-150, miR-20a, miR-126, miR-1290	Πλάσμα	42	Ορώδης	υγιείς δότες: 23 καλοήθης νόσος: 36	RT-qPCR	miR-320, miR-720, miR-1274b, U6 snRNA	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Shapira et al. (225)	2014
miR-205	let-7f	Πλάσμα	360	ορώδης: 179, ενδομητριοειδής: 86, αδενοκαρκίνωμα: 47, βλεννώδης: 33, διαυγοκυτταρικός: 15	200	RT-qPCR	NR	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Zheng et al. (226)	2013
miR-21	-	Ορός	94	ορώδης: 68, άλλος: 26	40	RT-qPCR	U6 snRNA	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Xu et al. (227)	2013
miR-16, miR-21, miR-191, miR-4284	-	Πλάσμα	35	ΕΑOC	υγιείς δότες: 20 ενδομητρίωση: 33	RT-qPCR	miR-132	Διαγνωστικός	Suryawanshi et al. (228)	2013
miR-92	-	Ορός	50	ΕΟC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	50	RT-qPCR	cel-miR-54	Διαγνωστικός	Guo et al. (229)	2013
miR-221	-	Ορός	96	ορώδης: 70, άλλος: 26	35	RT-qPCR	mmu-miR-295	Διαγνωστικός, Προγνωστικός	Hong et al. (230)	2012
miR-200a, miR-200b, miR-200c	-	Ορός	28	HGSC	28	RT-qPCR	miR-103	Διαγνωστικός	Kan et al. (231)	2012
miR-21, miR-92, miR-93, miR-126, miR-29a	miR-155, miR-127, miR-99b	Ορός	28	ΕΟC, όχι συγκεκριμένος υπότυπος	15	RT-qPCR	miR-142-3p	Διαγνωστικός	Resnick et al. (232)	2009
miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-200b, miR-203, miR-205, miR-214	-	Ορός (εξωσώματα)	50	Ορώδης	υγιείς δότες: 10 καλοήθης νόσος: 10	Μικροσυστοιχίες με ανιχνευτές	NR	Διαγνωστικός	Taylor et al. (233)	2008

NR: δεν αναφέρεται (not reported)

## 2.4.1 Κυκλοφορούντα εξωκυτταρικά miRNAs (cfmiRNAs)

### 2.4.1.1 Διάγνωση

Η πρώτη μελέτη κυκλοφορούντων cfmiRNAs στον ορό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών βασίστηκε στην ποσοτικοποίηση της έκφρασής τους με RT-qPCR, με χρήση του miR-142-3p ως miRNA αναφοράς (232). Τα επίπεδα έκφρασης οκτώ κυκλοφορούντων cfmiRNAs διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και των υγείων δοτών, γεγονός που υπέδειξε μία πιθανή διαγνωστική τους αξία. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε υπερέκφραση πέντε miRNAs (miR-21, miR-92, miR-93, miR-126 και miR-29a) και υποέκφραση τριών (miR-155, miR-127 και miR-99b) (232). Σε επόμενη μελέτη, εξετάστηκαν δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών με την εφαρμογή ειδικών μικροσυστοιχιών και παρατηρήθηκε η αυξημένη έκφραση του miR-30c-1, καθώς και η μειωμένη έκφραση τριών κυκλοφορούντων cfmiRNAs (miR-342-3p, miR-181a και miR-450b-5p) (234). Σε μία άλλη μελέτη, με την εφαρμογή RT-qPCR και τη χρήση του miR-103 ως miRNA αναφοράς, παρατηρήθηκε η στατιστικά σημαντική υπερέκφραση τριών miRNAs (miR-200a, miR-200b και miR-200c) που ανήκουν στην οικογένεια miR-200, στα δείγματα ορού ασθενών με ορώδη καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα των υγείων δοτών. Εξετάστηκε επιπλέον η έκφραση του miR-182, όμως ενώ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπερέκφρασή του στις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών συγκριτικά με τις κυτταρικές σειρές φυσιολογικών κυττάρων, η υπερέκφραση αυτή δεν παρατηρήθηκε στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις υγιείς γυναίκες (231). Τα τρία αυτά miRNAs από την οικογένεια miR-200 βρέθηκαν αυξημένα και σε μία άλλη μελέτη, όπου επίσης χρησιμοποιήθηκε RT-qPCR, με την χρήση όμως του U6 snRNA για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης (219). Τα αυξημένα επίπεδα του κυκλοφορούντος miR-200b αναφέρθηκαν επιπλέον και σε μία μελέτη όπου συμμετείχαν 51 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών πριν και μετά τη θεραπεία (218). Στη μελέτη αυτή από τους Karpetanakis et al., διερευνήθηκαν επιπλέον πιθανές συμφωνίες των επιπέδων της έκφρασης του κυκλοφορούντος miR-200b με τα επίπεδα του βιοδείκτη CA-125 και του σταδίου FIGO, όμως δε διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις παρά μόνο μεταξύ των επιπέδων του CA-125 και του σταδίου FIGO. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι σε τρεις από τις τέσσερις ασθενείς με πρώιμο καρκίνο ωοθηκών, τα επίπεδα του CA-125 ήταν εξαιρετικά χαμηλά, ενώ του κυκλοφορούντος miR-200b υπερέβαιναν τον μέσο όρο (218). Σε μία άλλη μελέτη, σε δύο από τα μέλη της οικογένειας miR-200, τα κυκλοφορούντα miR-200c και miR-141, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών (221).

Επιπλέον, σε άλλες μελέτες διαπιστώθηκε η στατιστικά σημαντική υπερέκφραση των κυκλοφορούντων miR-221 (230), miR-92 (229) και miR-21 (204, 227) στα δείγματα ορού

ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τα αντίστοιχα των υγείων, υποδεικνύοντας μία πιθανή διαγνωστική τους σημασία. Επιπλέον, η υπερέκφραση του κυκλοφορούντος miR-26a αναφέρθηκε σε μία άλλη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και υγείων δοτών (223). Σε μία άλλη μελέτη όπου συμμετείχαν ασθενείς με ΕΑΟC και ορώδη καρκίνο ωοθηκών, παρατηρήθηκε σημαντικά διαφορετική έκφραση διακριτών miRNAs μεταξύ της κάθε ομάδας ασθενών και της ομάδας των υγείων δοτών (228). Πιο αναλυτικά, στον ΕΑΟC παρατηρήθηκε υπερέκφραση των miR-16, miR-191 και miR-21, ενώ στον ορώδη καρκίνο ωοθηκών παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα των miR-16, miR-191 και miR-4284. Η διαγνωστική αξία των δύο αυτών συνδυασμών επιβεβαιώθηκε με την κατασκευή καμπύλων ROC (228). Ο ρόλος δύο άλλων κυκλοφορούντων cfmiRNAs στη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών προσδιορίστηκε με την εφαρμογή RT-qPCR και χρήση του U6 snRNA για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης (214, 215). Τα επίπεδα του miR-199a βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις υγιείς γυναίκες (215). Αντιστρόφως, τα επίπεδα του miR-125b βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, με τα επίπεδα αυτά να συσχετίζονται σημαντικά με το στάδιο FIGO, την κατάσταση των λεμφαδένων και τις μακρινές μεταστάσεις (214). Τα επίπεδα του miR-125b βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα και σε μία άλλη μελέτη, όπου εξετάστηκαν δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και ασθενών με καλοήγη νόσο (211). Αυξημένα βρέθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης του miR-376a σε δείγματα ορού και ιστού από τον πρωτοπαθή όγκο μίας ομάδας ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, συγκριτικά με τα επίπεδα στον ορό υγείων γυναικών (210).

Η διαγνωστική αξία της υποέκφρασης του miR-145 εξετάστηκε από δύο μελέτες, όπου στην πρώτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από πρωτοπαθείς όγκους, αντίστοιχα δείγματα ορού και κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών (235), ενώ στη δεύτερη δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και υγείων δοτών, βάσει των οποίων κατασκευάστηκε καμπύλη ROC με AUC=0,82 (220). Σε μία άλλη μελέτη, προσδιορίστηκαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του κυκλοφορούντος miR-99a σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχων ορών ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, με την εφαρμογή RT-qPCR και χρήση του U6 snRNA για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης (236). Από μία άλλη ερευνητική ομάδα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υποέκφραση των κυκλοφορούντων let-7i-5p, miR-122, miR-152-5p και miR-25-3p σε μία ομάδα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με την ομάδα ασθενών που είχαν διαγνωστεί με καλοήγη ορώδες κυσταδένωμα (222), ενώ σε μία άλλη σχετικά πρόσφατη μελέτη, τα επίπεδα του κυκλοφορούντος miR-135a-3p ήταν σημαντικά χαμηλότερα στα δείγματα ορού των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τα αντίστοιχα



δείγματα των ασθενών με καλοήγη νόσο και των υγείων δοτών (237). Σε άλλη μελέτη, εξετάστηκε η έκφραση του miR-148a με RT-qPCR και διαπιστώθηκε η στατιστικά σημαντική υποέκφρασή του στις ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών, συγκριτικά με τις υγείες γυναίκες (212).

Η διαγνωστική αξία των κυκλοφορούντων miR-205 και let-7f αξιολογήθηκε σε μία ομάδα 360 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, με την εφαρμογή TaqMan συστοιχιών χαμηλής πυκνότητας (226). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση του miR-205 και υποέκφραση του let-7f, ενώ η συνδυαστική εκτίμηση των επιπέδων τους επέδειξε υψηλή διαγνωστική αξία (AUC=0,831) και βελτιωμένη διαγνωστική ευαισθησία συγκριτικά με τα επίπεδα του βιοδείκτη CA-125 (226). Σε μία άλλη μελέτη εξετάστηκε η έκφραση ενός μεγάλου αριθμού κυκλοφορούντων cfmiRNAs στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση και μείωση των επιπέδων έκφρασης για μία ομάδα οκτώ (miR-191-5p, miR-206, miR-548a-3p, miR-320a, miR-574-3p, miR-590-5p, miR-34c-5p και miR-106b-5p) και μία τεσσάρων (miR-150-5p, miR-645, miR-30a-5p και miR-19a-3p) miRNAs αντίστοιχα, συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασής τους στο πλάσμα των υγείων δοτών (238). Οι Shapira et al. διερεύνησαν την έκφραση των κυκλοφορούντων cfmiRNAs επίσης στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και παρατήρησαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης για 19 κυκλοφορούντα cfmiRNAs και αυξημένα επίπεδα έκφρασης για τρία miRNAs (miR-625-3p, miR-720 και miR-1274a) στην ομάδα των ασθενών συγκριτικά με την ομάδα των υγείων δοτών (225). Σε μία άλλη μελέτη, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης τριών miRNAs (miR-22, miR-93 και miR-451) και χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-106b, σε δείγματα ορού μίας ομάδας ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, συγκριτικά με των υγείων δοτών (224).

Ο προσδιορισμός της έκφρασης συγκεκριμένων miRNA που εμπλέκονται στην EMT, έλαβε χώρα αρχικά σε μία μελέτη των Meng et al. (217). Με την εφαρμογή RT-qPCR μεθοδολογιών με ειδικούς TaqMan ανιχνευτές και τη χρήση του miR-484 ως miRNA αναφοράς, αναφέρθηκε η υπερέκφραση δύο κυκλοφορούντων cfmiRNAs (miR-7 και miR-429) και η υποέκφραση άλλων δύο (miR-25 και miR-93) σε μία μεγάλη ομάδα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών. Τα δύο miRNAs όπου παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της EMT (217). Μέλη των οικογενειών miR-200 και miR-34 κατέχουν επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της EMT (196). Ως εκ τούτου, σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασής τους με RT-qPCR και παρατηρήθηκε σημαντική υπερέκφραση για όλα τα μέλη των δύο οικογενειών, εκτός του miR-34c, στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις υγείες. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα των miR-203a, miR-141, miR-200a και miR-429 ήταν σημαντικά υψηλότερα στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις ασθενείς με

καλοήθη νόσο (196). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη από τους Meng et al., εξετάστηκε η έκφραση επιλεγμένων κυκλοφορούντων cfmiRNAs σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, σε ασθενείς με καλοήθη νόσο, καθώς και σε υγιείς γυναίκες (213). Εφαρμόστηκαν RT-qPCR μεθοδολογίες με ειδικούς TaqMan ανιχνευτές και το miR-484 ως miRNA αναφοράς, και παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης για τέσσερα miRNAs (miR-373, miR-200a, miR-200b και miR-200c) στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών σε σύγκριση με τις υγιείς. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης για τα τρία από αυτά (miR-200a, miR-200b και miR-200c) στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις ασθενείς με καλοήθη νόσο. Αξιοσημείωτα, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του miR-373 ήταν αυξημένη αποκλειστικά σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών, ενώ για τα υπόλοιπα τρία miRNAs (miR-200a, miR-200b και miR-200c) αυξημένη έκφραση διαπιστώθηκε στις ασθενείς με προχωρημένη αλλά και με πρώιμη νόσο (213).

Σε μία πρόσφατη μελέτη όπου συμμετείχαν 168 ασθενείς με HGSC, αναφέρθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης τριών miRNAs (miR-1246, miR-595 και miR-2278) στα δείγματα ορού των ασθενών σε σύγκριση με των υγείων δοτών, ενώ ύστερα από κατασκευή των καμπύλων ROC διαπιστώθηκε ότι το miR-1246 ήταν ο καλύτερος διαγνωστικός βιοδείκτης (AUC=0,89) (209). Σε δύο άλλες πολύ πρόσφατες μελέτες, παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα των κυκλοφορούντων miR-1181 και miR-4314 (239) και σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-193a-5p (203) στα δείγματα ορού των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με των υγείων δοτών.

Από τους Elias et al. πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη ενός νευρωνικού δικτύου κυκλοφορούντων cfmiRNAs με στόχο την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών (206). Στη μελέτη όπου συμμετείχαν 168 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών διαφορετικών ιστολογικών υποτύπων και υγιείς δότες, ταυτοποιήθηκε ένα δίκτυο 14 cfmiRNAs με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ των ασθενών και των υγείων. Το προτεινόμενο νευρωνικό δίκτυο των 14 cfmiRNAs επέδειξε 100% διαγνωστική ειδικότητα και σημαντικά βελτιωμένη ειδικότητα και ευαισθησία συγκριτικά με τον βιοδείκτη CA-125 (206).

Η διαγνωστική αξία των κυκλοφορούντων cfmiRNAs συνδυαστικά με τα επίπεδα του CA-125, προσδιορίστηκε σε μία πρόσφατη μελέτη δύο ομάδων ασθενών με HGSC, με την εφαρμογή RT-qPCR (205). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση τεσσάρων miRNAs (miR-375, miR-210, miR-150-5p και miR-181-5p) στις δύο ομάδες των ασθενών συγκριτικά με την ομάδα των υγείων δοτών, ενώ η συνεκτίμηση των επιπέδων του κυκλοφορούντος miR-375 και του CA-125 επέδειξε σημαντικά βελτιωμένη διαγνωστική ειδικότητα και ευαισθησία (AUC=0,956) (205). Για τη διάγνωση του HGSC, διερευνήθηκε από μία άλλη ομάδα ο ρόλος του

κυκλοφορούντος miR-1290 και διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση των επιπέδων του στα δείγματα ορού των ασθενών με HGSC συγκριτικά με τα αντίστοιχα των υγείων. Σύμφωνα με τις καμπύλες ROC, η διαγνωστική αξία του miR-1290 ήταν σχετικά χαμηλή (AUC=0,71), όμως παρατηρήθηκε σημαντική αύξησή της (AUC=0,97) με τη συνεκτίμηση των επιπέδων του CA-125 (201).

Σε μία μελέτη των κυκλοφορούντων cfmiRNAs στον διαυγοκυτταρικό υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών, όπου χρησιμοποιήθηκε RT-qPCR, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα τεσσάρων miRNAs στα δείγματα ορού των ασθενών πριν το χειρουργείο, συγκριτικά με τα δείγματα που λήφθηκαν μετά το χειρουργείο. Αξιοσημείωτα, τα επίπεδα έκφρασης του κυκλοφορούντος miR-130a αυξήθηκαν σημαντικά στην έναρξη της υποτροπής της νόσου, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο του συγκεκριμένου miRNA στην εξέλιξη του διαυγοκυτταρικού καρκίνου ωοθηκών (240).

Σε μία πρόσφατη μελέτη, στην οποία διερευνήθηκε ο ρόλος του miR-590-3p στον EOC, αναφέρθηκε ένας πιθανός ρόλος του στην ανάπτυξη της νόσου, καθώς παρατηρήθηκε υπερέκφραση του miR-590-3p τόσο σε δείγματα ιστών από τους πρωτοπαθείς όγκους όσο και σε δείγματα πλάσματος ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα ασθενών με καλοήθεις γυναικολογικές παθήσεις (241). Ο ρόλος των κυκλοφορούντων cfmiRNAs στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου των ωοθηκών εξετάστηκε και από μία άλλη μελέτη, όπου προσδιορίστηκε η έκφραση του miR-99a-5p σε εξωσώματα που είχαν απομονωθεί από κύτταρα καρκίνου ωοθηκών, καθώς και σε δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, ασθενών με καλοήθη νόσο και υγείων δοτών (202). Παρατηρήθηκαν στατιστικά αυξημένα επίπεδα του κυκλοφορούντος miR-99a-5p στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις ασθενείς με καλοήθη νόσο (AUC=0,81), καθώς και με τις υγιείς (AUC=0,95), ενώ οι τιμές AUC βελτιώθηκαν με τη συνεκτίμηση των επιπέδων του βιοδείκτη CA-125 (202).

Από την ομάδα των Yokoi et al., πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη ενός μοντέλου για την πρόωμη διάγνωση των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, με την εφαρμογή μεθοδολογιών RT-qPCR και NGS (208). Στη μελέτη συμμετείχαν 155 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, ασθενείς με καλοήθη νόσο και υγιείς δότες, ενώ το διαγνωστικό μοντέλο απαρτίζεται από οκτώ κυκλοφορούντα cfmiRNAs που αναφέρονται αναλυτικά στον πίνακα 2.3 (208). Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη της ίδιας ομάδας, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και επικύρωση νέων μοντέλων για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών και τον ασυμπτωματικό έλεγχο στον γενικό πληθυσμό, με τη χρησιμοποίηση ειδικών μικροσυστοιχιών (199). Πιο συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε ένα μοντέλο για έλεγχο σε μία μεγάλη ομάδα 333 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών. Το μοντέλο αυτό περιλάμβανε δέκα miRNAs και επέδειξε εξαιρετική διαγνωστική απόδοση (AUC=1,00). Επιπλέον, αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν δύο μοντέλα με εννέα και δέκα

miRNAs αντίστοιχα, για τη διάκριση του καρκίνου των ωοθηκών από άλλους τύπους καρκίνου με συμπαγείς όγκους (AUC=0,87) και από τους καλοήθεις όγκους των ωοθηκών (AUC=0,86) (199).

#### **2.4.1.2 Πρόγνωση**

Σε έναν αρκετά μεγάλο αριθμό μελετών έχει διερευνηθεί η προγνωστική αξία των κυκλοφορούντων cfmiRNAs και έχει παρατηρηθεί ότι η υπερ- ή η υποέκφραση συγκεκριμένων κυκλοφορούντων cfmiRNAs συσχετίζεται με μειωμένα διαστήματα OS και PFS (πίνακας 2.3). Ειδικότερα, η υπερέκφραση των κυκλοφορούντων miR-21 (227), miR-221 (230), miR-141 (221) και miR-429 (217), και η υποέκφραση των κυκλοφορούντων miR-200c (221), miR-1290 (225), miR-145 (220), miR-199a (215) και miR-148a (212), συσχετίστηκαν σημαντικά με μειωμένη OS. Επιπρόσθετα, τα αυξημένα επίπεδα των κυκλοφορούντων miR-200b (218) και miR-125b (211), και τα μειωμένα επίπεδα των let-7f (226) και miR-135a-3p (237) συσχετίστηκαν σημαντικά με μειωμένο διάστημα PFS.

#### **2.4.1.3 Ανταπόκριση στη θεραπεία**

Ο ρόλος των κυκλοφορούντων cfmiRNAs στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία αξιολογήθηκε πρώτα από μία κλινική μελέτη φάσης II (NCT00477386), όπου συμμετείχαν ασθενείς με υποτροπιάζοντα και πλατινοανθεκτικό καρκίνο ωοθηκών που είχαν λάβει επιγενετική θεραπεία με decitabine ακολουθούμενη από carboplatin (242). Μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης 78 κυκλοφορούντων cfmiRNAs πριν και μετά τον πρώτο κύκλο της θεραπείας και παρατηρήθηκε ότι οι υποομάδες των ανταποκρινόμενων και των μη-ανταποκρινόμενων στη θεραπεία χαρακτηρίζονταν από διαφορετικό προφίλ cfmiRNAs. Επιπλέον, τρία κυκλοφορούντα cfmiRNAs (miR-616, miR-532-3p και miR-148b-5p) βρέθηκαν σημαντικά υπερεκφρασμένα στην υποομάδα των ανταποκρινόμενων στη θεραπεία, ενώ η υποέκφραση του miR-148b-5p συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένο διάστημα PFS (242).

Σε μία άλλη πρόσφατη μελέτη, αξιολογήθηκε η προσθήκη της στοχευμένης θεραπείας με Bevacizumab στη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής, σε μία μεγάλη ομάδα 207 ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (207). Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος για 754 miRNAs με TaqMan μικροσυστοιχίες χαμηλής πυκνότητας και ακολούθησε η μελέτη της έκφρασης επιλεγμένων miRNAs με την εφαρμογή RT-qPCR μεθοδολογιών. Το πιο σημαντικό συμπέρασμα της μελέτης αποτελεί η στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων έκφρασης του

κυκλοφορούντος miR-200c και του μειωμένου διαστήματος PFS (P=0,006) στην ομάδα των ασθενών που είχαν λάβει επιπρόσθετα Bevacizumab (207).

## **2.4.2 Κυκλοφορούντα εξωσωμικά miRNAs**

### **2.4.2.1 Διάγνωση**

Η πρώτη μελέτη των κυκλοφορούντων εξωσωμικών miRNAs στον καρκίνο ωοθηκών πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ορώδη υπότυπο, ασθενείς με καλοήγη νόσο και υγιείς δότες, με την εφαρμογή μικροσυστοιχιών με κατάλληλους ανιχνευτές (233). Με τη μεθοδολογία αυτή εξετάστηκε ένας μεγάλος αριθμός εξωσωμικών miRNAs όμως σε οκτώ (miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-200b, miR-203, miR-205 και miR-214) παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα δείγματα ορού και στους αντίστοιχους πρωτοπαθείς όγκους των ασθενών. Τα συγκεκριμένα miRNAs δεν ανιχνεύτηκαν στους υγιείς δότες, ενώ στις ασθενείς με καλοήγη νόσο παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασής τους συγκριτικά με την έκφραση στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, δεδομένα που υποδεικνύουν την κλινική σημασία της ομάδας των εξωσωμικών miRNAs στην πρόωμη διάγνωση της νόσου (233).

Σε μία άλλη μελέτη, προσδιορίστηκε η έκφραση επιλεγμένων κυκλοφορούντων εξωσωμικών miRNAs σε μία μεγάλη ομάδα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, σε μία ομάδα ασθενών με καλοήγη νόσο και σε υγιείς δότες (216). Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της έκφρασης των miRNAs εφαρμόστηκαν μεθοδολογίες RT-qPCR με κατάλληλους TaqMan ανιχνευτές, ενώ ως miRNA αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το miR-484. Σε μία ομάδα τεσσάρων miRNAs (miR-373, miR-200a, miR-200b και miR-200c) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις υγιείς, ενώ σε τρία από αυτά (miR-200a, miR-200b και miR-200c) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις ασθενείς με καλοήγη νόσο. Επιπλέον, τα συνολικά επίπεδα των εξωσωμάτων ήταν σημαντικά αυξημένα στην ομάδα των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες (216). Η ίδια ομάδα διερεύνησε πρόσφατα τη διαγνωστική αξία 48 επιλεγμένων κυκλοφορούντων εξωσωμικών miRNAs σε μία μεγάλη ομάδα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, κυρίως ορώδους υποτύπου, με την εφαρμογή RT-qPCR μεθοδολογιών. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση τεσσάρων (miR-21, miR-100, miR-200b και miR-320) και υποέκφραση επίσης τεσσάρων (miR-16, miR-93, miR-126 και miR-223) εξωσωμικών miRNAs στο πλάσμα των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με των υγιειών δοτών (200).

Η έκφραση του miR-222-3p σε μία μικρή ομάδα έξι ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, καθώς και στις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών SKOV3, A2780 και U937, εξετάστηκε από τους Ying et al. με την εφαρμογή RT-qPCR (243). Τα επίπεδα έκφρασης του miRNA προσδιορίστηκαν σε στα εξωσώματα απομονωμένα από τον ορό των ασθενών και έξι υγείων δοτών, και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση του miR-222-3p στα δείγματα ορού των ασθενών συγκριτικά με των υγείων. Η υπερέκφραση του miR-222-3p παρατηρήθηκε επιπλέον στα κύτταρα και στα μακροφάγα των κυτταρικών σειρών, ενώ επακόλουθα πειράματα οδήγησαν στην εκτίμηση ενός πιθανού ρόλου του miR-222-3p στην πώληση των μακροφάγων σχετιζόμενων με τον όγκο (243). Σε μία άλλη μελέτη, εξετάστηκε η έκφραση κυκλοφορούντων εξωσωμικών miRNAs σε δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο ωοθηκών και υγείων δοτών, με την εφαρμογή RT-qPCR και τη χρήση του U6 snRNA ως miRNA αναφοράς. Μόνο για το κυκλοφορούν εξωσωμικό miR-101 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υποέκφραση στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις υγιείς (244). Η διαγνωστική αξία των κυκλοφορούντων εξωσωμικών miR-375 και miR-1307 διερευνήθηκε από μία άλλη πρόσφατη μελέτη από τους Su et al. (197). Με την εφαρμογή RT-qPCR, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση των δύο miRNAs στα δείγματα ορού των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών σε σύγκριση με των υγείων δοτών και των ασθενών με καλοήγη νόσο. Ακολούθησε συνεκτίμηση των αποτελεσμάτων με τις τιμές των πρωτεϊνικών βιοδεικτών CA-125 και HE4, που οδήγησε στην ενίσχυση της διαγνωστικής αξίας τόσο για το CA-125 (AUC=0,977) όσο και για την HE4 (AUC=0,874) (197).

#### 2.4.2.2 Πρόγνωση

Έως σήμερα, μόνο μία ερευνητική ομάδα έχει αναδείξει την προγνωστική αξία των κυκλοφορούντων εξωσωμικών miRNAs στον καρκίνο των ωοθηκών. Στην πρώτη μελέτη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων έκφρασης των κυκλοφορούντων εξωσωμικών miR-373, miR-200b και miR-200c με μειωμένη OS (P=0,033, P=0,007 και P=0,017, αντίστοιχα), ενώ για το miR-200c παρατηρήθηκε επιπλέον στατιστικά σημαντική συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων έκφρασης με μειωμένο ελεύθερο νόσου διάστημα (**disease-free interval, DFI**) (P=0,019). Αξιοσημείωτα, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των miR-200b και miR-200c συσχετίστηκαν σημαντικά και με τις τιμές του δείκτη CA-125 (216). Στην πιο πρόσφατη μελέτη ενισχύθηκε η προγνωστική αξία του κυκλοφορούντος εξωσωμικού miR-200b, καθώς παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της υπερέκφρασής του με μειωμένη OS (P=0,019) (200).

### 2.4.2.3 Ανταπόκριση στη θεραπεία

Η πρώτη μελέτη των κυκλοφορούντων εξωσωμικών miRNAs αποκλειστικά σε ασθενείς με πλατινοανθεκτικό ορώδη καρκίνο ωοθηκών πραγματοποιήθηκε πρόσφατα από τους Kuhlmann et al. (198). Για τον σκοπό αυτό αναπτύχθηκε μία μεθοδολογία βασισμένη στο NGS, εφαρμόστηκε σε δείγματα πλάσματος ασθενών με πλατινοανθεκτικό και πλατινοευαίσθητο καρκίνο ωοθηκών και παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση μίας ομάδας ώριμων miRNAs μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών. Ειδικότερα, 12 εξωσωμικά miRNAs ανιχνεύτηκαν σε μειωμένα επίπεδα στο πλάσμα των ασθενών με πλατινοανθεκτική νόσο (miR-181a, miR-1908, miR-21, miR-486, miR-223, miR-1304, miR-548, miR-1185, miR-664, miR-345, miR-625 και miR-443), όμως η διαφορά στην έκφρασή τους μεταξύ των δύο ομάδων δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική (198).

## 2.5 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Οι υγρές βιοψίες είναι ελάχιστα επεμβατικές και επιτρέπουν τις ανεκτές διαδοχικές μετρήσεις κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Τα CTCs, το ctDNA, τα κυκλοφορούντα cfmiRNAs και τα κυκλοφορούντα εξωσώματα μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή καρκινικών βιοδεικτών με τη δυνατότητα παροχής πληροφοριών σχετικά με την έγκαιρη διάγνωση, την πρόγνωση, την ανταπόκριση στη θεραπεία και την ανάπτυξη αντίστασης στα θεραπευτικά σχήματα. Επιπρόσθετα, είναι ιδιαίτερα πιθανή η μελλοντική συμβολή τους στην ανάπτυξη και την καθιέρωση αποτελεσματικότερων εξατομικευμένων θεραπευτικών αλγορίθμων στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών.

Η κλινική σημασία των CTCs και του ctDNA έχει διερευνηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου των ωοθηκών (245). Επιπλέον, ένας αρκετά μεγάλος αριθμός πρόσφατων μελετών έχει οδηγήσει στην αποκάλυψη της διαγνωστικής και προγνωστικής αξίας ορισμένων κυκλοφορούντων cfmiRNAs και εξωσωμάτων, ενώ μικρότερος αριθμός μελετών επικεντρώθηκε στην εκτίμηση της προβλεπτικής τους αξίας.

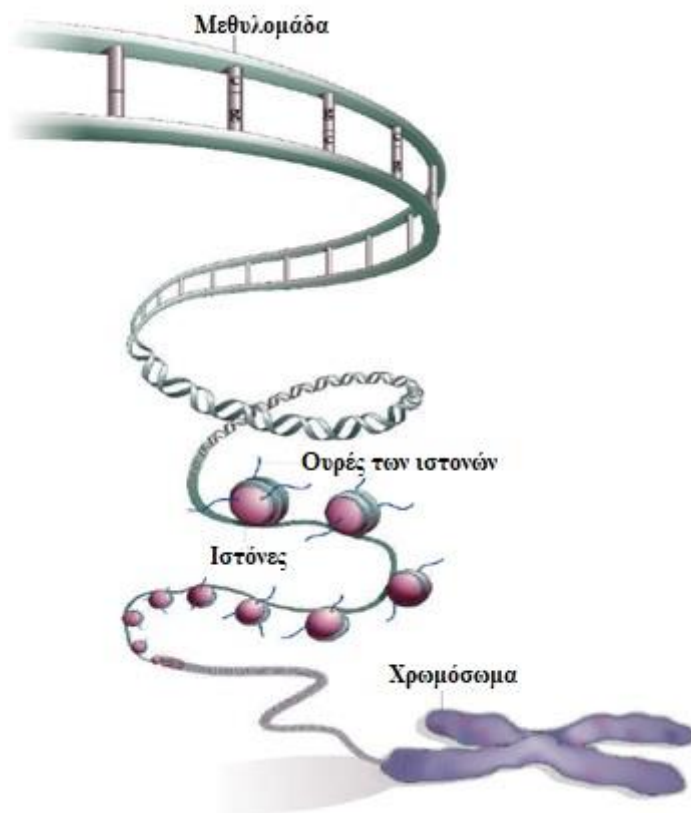
Τέλος, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι πριν την ευρύτερη εφαρμογή των δεικτών υγρής βιοψίας στην κλινική πράξη, είναι ύψιστης σημασίας η διενέργεια περαιτέρω μελετών για την καθιέρωση των κατάλληλων προ-αναλυτικών και μετα-αναλυτικών συνθηκών, ποιοτικού ελέγχου και επικύρωσης των προσδιορισμών που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση, την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό όλων των συστατικών υγρής βιοψίας (246, 247).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

#### 3.1 Επιγενετική

Οι επιγενετικές αλλαγές αναφέρονται σε τροποποιήσεις στο DNA, όπου όμως δε μεταβάλλεται η αλληλουχία των βάσεων όπως συμβαίνει στις γενετικές αλλαγές, για παράδειγμα στις μεταλλάξεις, απώλειες αλληλομόρφων, απαλοιφές, ενισχύσεις αλληλουχιών. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις διαφέρουν από τις γενετικές και στο γεγονός ότι οι πρώτες είναι δυνατό να διορθωθούν, οπότε θεωρούνται αντιστρεπτές αλλαγές (182). Τις κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις στον καρκίνο αποτελούν η μεθυλίωση συγκεκριμένων περιοχών του DNA και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών (σχήμα 3.1) (248). Επιπλέον, επιγενετικές τροποποιήσεις συνιστούν η αναδιάταξη της χρωματίνης, οι παραλλαγές των ιστονών, η τροποποίηση της έκφρασης μη κωδικοποιητικών RNAs και η απώλεια της αποτύπωσης σε εντυπωμένα γονίδια (**loss of imprinting, LOI**) (249). Η έννοια της αποτύπωσης αναφέρεται στην έκφραση του ενός μόνο αλληλομόρφου ενός γονιδίου, που οφείλεται στην καταστολή του πατρικού ή του μητρικού αλληλομόρφου (250). Η LOI αποτελεί μία πρόιμη επιγενετική τροποποίηση (251) και έναν μηχανισμό ενεργοποίησης γονιδίων σε ορισμένους τύπους καρκίνου (252).



Σχήμα 3.1: Οι δύο βασικές επιγενετικές τροποποιήσεις (248)

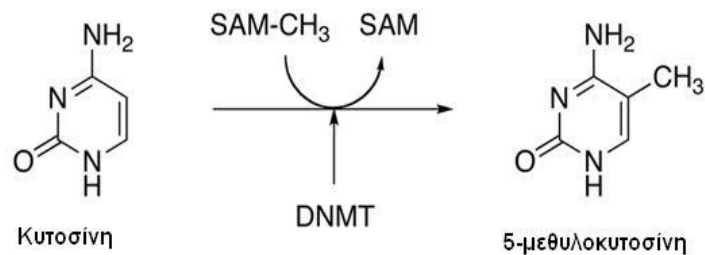


Οι τροποποιήσεις των ιστονών χαρακτηρίζονται από ομοιοπολικές τροποποιήσεις στις N-τελικές ουρές του πυρήνα των ιστονών (H2A, H2B, H3 και H4), που περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση, την ακετυλίωση, τη φωσφορυλίωση, τη βιοτινυλίωση και την ουβικιτινίωση (253). Από όλες αυτές τις τροποποιήσεις, η ακετυλίωση έχει μελετηθεί ιδιαίτερα στον καρκίνο. Είναι γνωστό ότι οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (**histone acetyltransferases, HATs**) είναι υπεύθυνες για την ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης των ιστονών H3 και H4, ενώ οι αποακετυλάσες των ιστονών (**histone deacetylases, HDACs**) είναι τα ένζυμα που απομακρύνουν τις ακετυλομάδες. Για τη μεθυλίωση, οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών (**histone methyltransferases, HMTs**) προσθέτουν μία μεθυλομάδα και οι απομεθυλάσες (**histone demethylases, HDMs**) είναι τα ένζυμα που αφαιρούν μεθυλομάδες από τις ιστόνες. Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των διεργασιών είναι η αλλαγή της διαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων και η συνολική αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης, που επηρεάζει τη ρύθμιση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων (254-257). Οι ιστόνες συνεπώς δε θεωρούνται μόνο ως οι απλές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο πακετάρισμα του DNA, αλλά και ως δυναμικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, που υφίστανται ποικίλες μετα-μεταφραστικές χημικές τροποποιήσεις (252).

### 3.2 Φυσιολογική μεθυλίωση

Σε κανονικές συνθήκες η μεθυλίωση είναι απαραίτητη διεργασία κατά την περίοδο της εμβρυογένεσης και της ανάπτυξης. Στα φυσιολογικά κύτταρα, συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος οδηγούνται σε σίγαση με μεθυλίωση, όπως τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία και συγκεκριμένα γονίδια που συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση (258, 259). Με μεθυλίωση παραμένουν ανενεργά τα εκάστοτε αλληλόμορφα των εντυπωμένων γονιδίων, ενώ η μεθυλίωση αποτελεί τον κύριο μηχανισμό απενεργοποίησης σχεδόν ολόκληρου του ενός X-χρωμοσώματος στις γυναίκες, μία φυσιολογική διαδικασία που καλείται αδρανοποίηση του X-χρωμοσώματος (260-262).

Η διαδικασία της μεθυλίωσης είναι μία χημική ομοιοπολική τροποποίηση που χαρακτηρίζεται από την προσθήκη μίας μεθυλομάδας από συγκεκριμένα ένζυμα, τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (**DNA methyltransferases, DNMTs**), στον 5' άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης, οδηγώντας στον σχηματισμό της 5-μεθυλοκυτοσίνης (**5-methylcytosine, 5mC**). Ο δότης της μεθυλομάδας είναι μία S-αδενοσυλομεθειονίνη (**S-adenosylmethionine, SAM**) (263, 264). Η αντίδραση της μεθυλίωσης παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα 3.2.



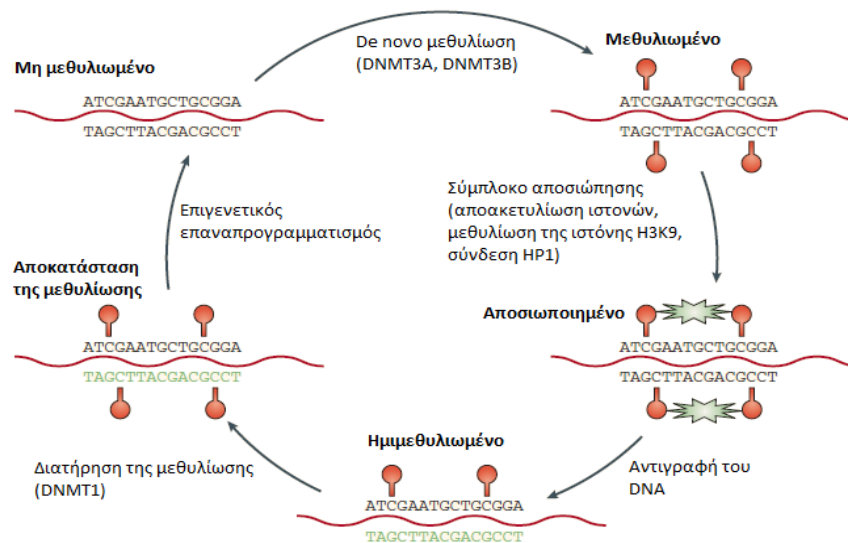
Σχήμα 3.2: Αντίδραση μεθυλίωσης

Σχηματίζεται με αυτό τον τρόπο η 5mC, σχεδόν πάντα στις περιπτώσεις όπου η κυτοσίνη προηγείται μίας γουανίνης στην αλληλουχία του DNA, δηλαδή στα CpGs (το p αναφέρεται στο φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ κυτοσίνης και γουανίνης) (265). Συνολικά στο ανθρώπινο γονιδίωμα εμπεριέχονται περίπου 28 εκατομμύρια CpGs, με το 60-80% αυτών να είναι μεθυλιωμένα στα φυσιολογικά κύτταρα (259), εκτός από μικρές μη-μεθυλιωμένες περιοχές που ονομάζονται CpG «νησίδες» (CpG islands) (182, 266). Οι CpG νησίδες είναι πλούσιες σε αλληλουχίες CpG, έχουν μήκος 0,5-4 kb και συνήθως καλύπτουν την 5' περιοχή πολλών γονιδίων, που περιλαμβάνει τον υποκινητή, την 5' αμετάφραστη περιοχή και το πρώτο εξώνιο. Βρίσκονται συνεπώς κοντά στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής (**transcription start sites, TSS**) και περιλαμβάνονται στους υποκινητές περίπου του 60% των γονιδίων (182).

Εκτός από τις CpG νησίδες, έχει βρεθεί ότι εκτεταμένες αλλαγές στο προφίλ μεθυλίωσης που πραγματοποιούνται κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων, συμβαίνουν και στις CpG «ακτές» (CpG shores). Οι περιοχές αυτές βρίσκονται έως 4 kb κοντά στις CpG νησίδες και χαρακτηρίζονται από μικρότερη πυκνότητα CpG αλληλουχιών (267). Άλλη περίπτωση μεθυλίωσης εκτός CpG νησίδων αποτελεί σχεδόν το ένα τέταρτο των μεθυλίωσεων που παρατηρούνται στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, που συμβαίνει σε μη-CpG περιοχές του γονιδιώματος (257).

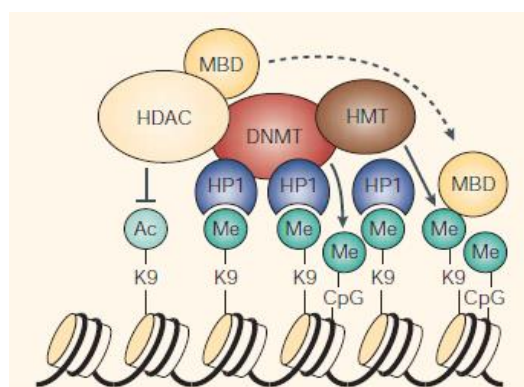
Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μεθυλίωση στο ανθρώπινο DNA πραγματοποιείται και διατηρείται από τρία ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των DNMTs. Πρόκειται για την DNMT1, και τις DNMT3a και DNMT3b. Η DNMT1 έχει ως λειτουργία τη διατήρηση της μεθυλίωσης, αφού στοχεύει στο ήδη ημιμεθυλιωμένο DNA. Μαζί με την UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1) είναι οι κύριες πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την αναπαραγωγή των προτύπων μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή του DNA. Αρχικά η UHRF1 προσδένεται στο ημι-μεθυλιωμένο DNA κατά την S-φάση του κυτταρικού κύκλου και στρατολογεί την DNMT1. Η DNMT1 εντοπίζεται στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής και αλληλεπιδρά με το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιασμού του κυττάρου (**proliferation cell nuclear antigen, PCNA**). Οι DNMT3a και DNMT3b είναι υπεύθυνες για την μεθυλίωση νέων

θέσεων στην αλληλουχία του DNA (de-novo μεθυλίωση) (263, 268). Η ρόλος των DNMTs στην φυσιολογική μεθυλίωση παρουσιάζεται λεπτομερώς στο ακόλουθο σχήμα (261).



Σχήμα 3.3: Φυσιολογική μεθυλίωση του DNA και ακόλουθη αποσιώπηση του γονιδίου (261)

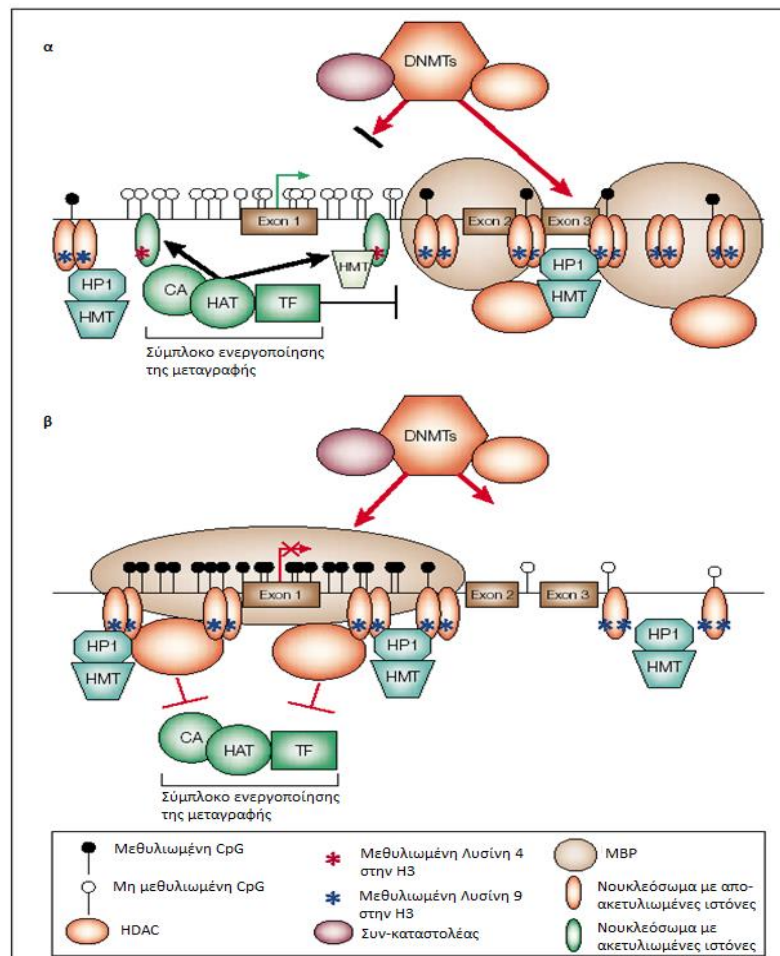
Αμέσως μετά τη δράση των DNMT3a και DNMT3b, συνδέονται στη μεθυλιωμένη περιοχή ειδικές πρωτεΐνες (**methylated binding domains, MBDs**) που ενεργοποιούν μία διαδοχική πορεία όπου στρατολογούνται ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες και άλλες πρωτεΐνες που δρουν ως καταστολείς της μεταγραφής, όπως η πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης 1 (**heterochromatin protein 1, HP1**), καθώς και οι HDAC και HMT, που αποακετυλιώνουν και μεθυλιώνουν τα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών κυρίως στις θέσεις 9 και 27. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η συμπυκνωμένη και αποσιωπημένη κατάσταση της χρωματίνης, λίγο πριν την αντιγραφή του DNA (σχήμα 3.4) (269).



Σχήμα 3.4: Συνεργασία και αλληλεπίδραση των επιγενετικών τροποποιήσεων (269)

Εκτός από τις τροποποιήσεις των ιστονών, για την τελική αποσιώπηση ενός γονιδίου πραγματοποιείται και αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων. Για το σκοπό αυτό συμμετέχουν παράγοντες αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων (**nucleosomal remodeling factors, NURFs**), που είναι οργανωμένοι σε σύμπλοκα. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις συνεπώς,

αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με τελικό σκοπό τη σίγαση ενός γονιδίου (249). Η αντιστρεπτή διαδικασία της απενεργοποίησης ενός γονιδίου με μεθυλίωση παρουσιάζεται στο σχήμα 3.5, όπου τονίζεται η συνεργιστική δράση των εμπλεκόμενων παραγόντων (268).

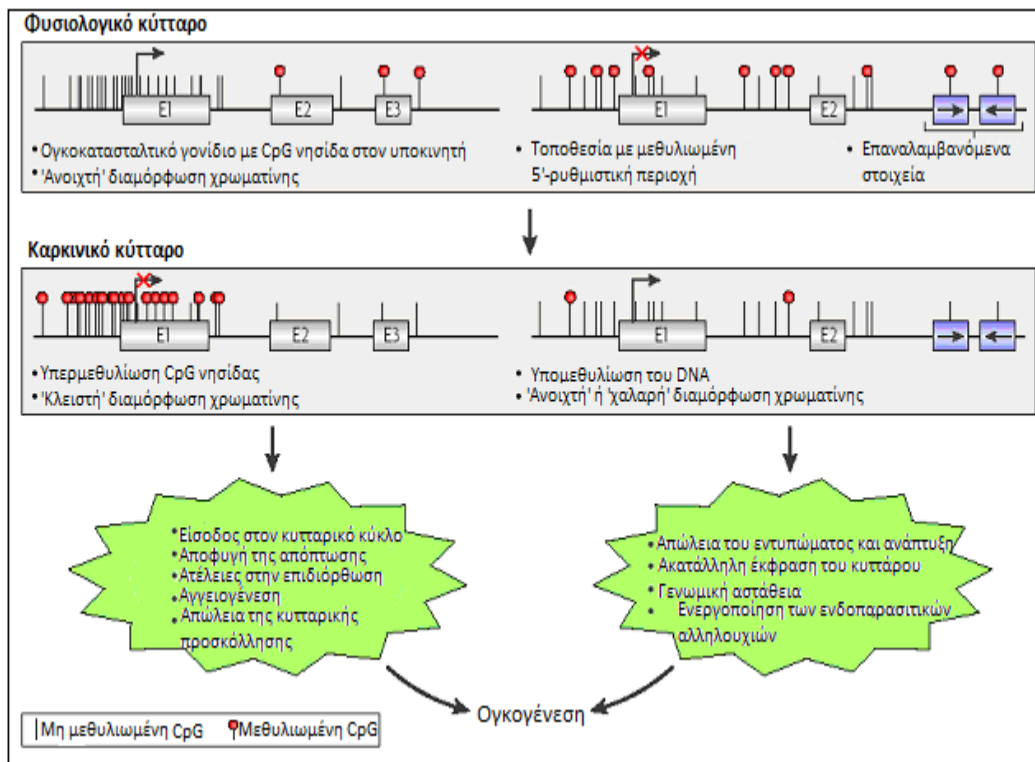


**Σχήμα 3.5:** α) Οι μεθυλομάδες απομακρύνονται από τη μεθυλιωμένη CpG νησίδα του υποκινητή του γονιδίου, το οποίο επανενεργοποιείται. β) Η μεθυλίωση της CpG νησίδας που βρίσκεται στον υποκινητή προκαλεί την καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου (268)

### 3.3 Μεθυλίωση και καρκίνος

Η μεθυλίωση αποτελεί τη συχνότερα εμφανιζόμενη επιγενετική τροποποίηση στα καρκινικά κύτταρα (270). Γενικά στον καρκίνο παρατηρείται ανώμαλη μεθυλίωση σε δύο διαφορετικές κατευθύνσεις, που παρουσιάζονται λεπτομερώς στο σχήμα 3.6 (252):

- συνολική υπομεθυλίωση στο γονιδίωμα, που οδηγεί σε γενετική αστάθεια
- υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων συγκεκριμένων γονιδίων, που οδηγεί στη μεταγραφική αποσιώπησή τους



Σχήμα 3.6: Σύγκριση καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων, με φανερές τις διαταραχές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA στα καρκινικά κύτταρα (E: εξόνιο) (252)

Οι συγκεκριμένες επιγενετικές αλλαγές πραγματοποιούνται στα πρώτα στάδια της νόσου και κατέχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νεοπλασίας. Η απενεργοποίηση ενός γονιδίου με μεθυλίωση μπορεί να συμβεί αν αποσιωπηθούν και τα δύο αλληλόμορφα ή αν αποσιωπηθεί το ένα από αυτά, στην περίπτωση που το άλλο έχει ήδη απενεργοποιηθεί με κάποια γενετική τροποποίηση (271). Η τελευταία περίπτωση συμφωνεί με την υπόθεση των πολλαπλών χτυπημάτων, που είχε προταθεί από τον Knudson το 1971 (272). Γενικά στον καρκίνο, η μεθυλίωση των κυτοσινών μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου και με άλλους μηχανισμούς εκτός της αποσιώπησης γονιδίων. Συγκεκριμένα, οι 5mC που σχηματίζονται με τη μεθυλίωση είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε μεταλλάξεις, ιδίως σε μετατροπές κυτοσίνης σε θυμίνη, με αυθόρμητη υδρολυτική απαμίνωση της μεθυλοκυτοσίνης. Στις μεθυλιωμένες CpG νησίδες είναι επίσης αρκετά πιθανή η μετατροπή της γουανίνης σε θυμίνη, μία μετάλλαξη που επάγεται και από καρκινογόνες ουσίες που ανιχνεύονται στον καπνό του τσιγάρου (261, 271).

### 3.3.1 Υπερμεθυλίωση και αποσιώπηση γονιδίων στον καρκίνο

Η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων στις αλληλουχίες των υποκινητών αλλά και των ενισχυτών (enhancers), μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορα στάδια της ογκογένεσης και της εξέλιξης της νεοπλασίας (263). Επηρεάζει γονίδια που εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες,

όπως ο κυτταρικός κύκλος, η επιδιόρθωση βλαβών στο DNA, ο μεταβολισμός των καρκινογόνων ουσιών, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, η απόπτωση και η αγγειογένεση. Όλες αυτές οι διαδικασίες συμμετέχουν στην ανάπτυξη του καρκίνου, ωστόσο ο αριθμός και το είδος των υπερμεθυλιωμένων γονιδίων, συσχετίζεται με τον τύπο της νεοπλασίας. Τα κύρια γονίδια που εντοπίζονται υπερμεθυλιωμένα στους περισσότερους τύπους καρκίνου συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA: *hMLH1*, *BRCA1*, *MGMT*, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου: *p16<sup>INK4a</sup>*, *CDKN2B*, ή δρουν ως ογκοκατασταλτικά: *RASSF1A*, *DAPK*, *APC*, *OPCML*, *GSTP1* (182, 249). Η συχνότητα υπερμεθυλίωσής τους όμως, διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στους διάφορους τύπους καρκίνου (273).

Σε ορισμένους τύπους καρκίνου είναι μεθυλιωμένες ολόκληρες ομάδες γονιδίων, οπότε λαμβάνουν χώρα εκτεταμένες μεθυλίωσεις CpG νησίδων σε όλο το γονιδίωμα. Ο φαινότυπος που χαρακτηρίζει αυτή την κατάσταση είναι ο **CIMP (CpG island methylator phenotype)** και οι καρκίνοι στους οποίους παρουσιάζεται περιγράφονται ως CIMP-καρκίνοι (274). Πολλές φορές συνυπάρχει και MSI, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις πολύ αυξημένης συχνότητας της μεθυλίωσης στο γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων. Οι CIMP-καρκίνοι παρατηρούνται συχνότερα σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας, κατά προτίμηση σε γυναίκες (261).

Ο CIMP φαινότυπος επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ έχει παρατηρηθεί ακόμη στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, του ενδομητρίου, του στομάχου, του ήπατος, του πνεύμονα, των ωοθηκών, του παγκρέατος, του προστάτη, του νεφρού, καθώς και στο γλοίωμα, στη λευχαιμία, στο μελάνωμα και στο νευροβλάστωμα. Ωστόσο, παρά την παρουσία CIMP φαινοτύπου σε πολλές μορφές καρκίνου προερχόμενες από διαφορετικούς ιστούς, δεν έχει καθιερωθεί ένας κοινός CIMP φαινότυπος, ενώ επιπλέον δεν έχουν ερμηνευτεί πλήρως οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην εμφάνισή του (274).

### 3.3.2 Υπομεθυλίωση στον καρκίνο

Αντίθετα από την υπερμεθυλίωση γονιδίων, στον καρκίνο μπορεί να συμβεί υπομεθυλίωση, ως και απομεθυλίωση αλληλουχιών του DNA που δεν αποτελούν υποκινητές, αλλά κωδικοποιούσες περιοχές και ιντρόνια (182, 252). Η υπομεθυλίωση μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που είχαν αποσιωπηθεί. Στα καρκινικά κύτταρα, με υπομεθυλίωση μπορούν να μετατραπούν τα πρωτοογκογονίδια σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια, με σημαντική συνεισφορά στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου (269). Η υπομεθυλίωση του DNA ήταν από τις πρώτες επιγενετικές τροποποιήσεις που μελετήθηκαν στον καρκίνο (182).

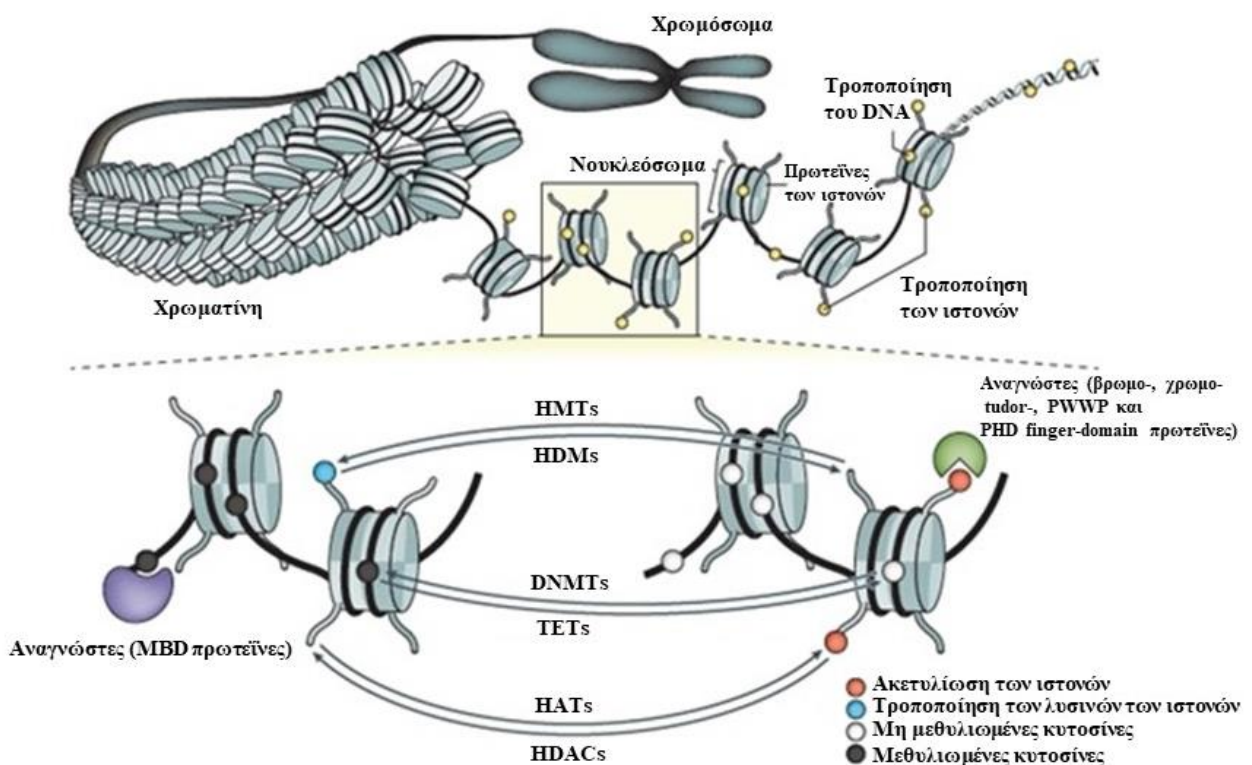
Όπως αναφέρθηκε στην αρχή του υποκεφαλαίου 3.3, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υπομεθυλίωση συνολικά στο γονιδιώμα τους συγκριτικά με τα φυσιολογικά, στους περισσότερους τύπους καρκίνου. Οι 5mC είναι μειωμένες κατά 20% με 60% στο γονιδίωμα ενός καρκινικού κυττάρου συγκριτικά με του φυσιολογικού. Η γενικευμένη υπομεθυλίωση στον καρκίνο ενισχύει τη γενικότερη γενωμική αστάθεια και συνδέεται με τη χρωμοσωμική αστάθεια που επίσης παρουσιάζεται στα καρκινικά κύτταρα. Η υπομεθυλίωση μπορεί να ευνοήσει το μιτωτικό ανασυνδυασμό οδηγώντας σε απαλοιφές και μετατοπίσεις, οπότε επάγει με αυτούς τους τρόπους την αναδιάταξη των χρωμοσωμάτων (182). Το φαινόμενο έχει ιδιαίτερα σοβαρή επίδραση, ιδίως όταν συμβαίνει στις αλληλουχίες-δορυφόρους που βρίσκονται στο κεντρομερίδιο των χρωμοσωμάτων (MSI), καθώς έχει βρεθεί ότι αρκετοί καρκίνοι χαρακτηρίζονται από μη ισορροπημένες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, με σημεία διακοπής στα κεντρομερίδια των δύο χρωμοσωμάτων που εμπλέκονται. Τελικά επάγεται LOH στα γονίδια που βρίσκονται στις επηρεαζόμενες περιοχές. Η υπομεθυλίωση με αυτές τις συνέπειες παρατηρείται συχνά στον καρκίνο των ωοθηκών (268, 271).

Άλλη περίπτωση γενικευμένης υπομεθυλίωσης σε διάφορους τύπους καρκίνου παρατηρείται στα επαναλαμβανόμενα στοιχεία, που αποτελούν το 20% με 30% του γονιδιώματος. Αυτά, σε αντίθεση με τις μη-μεθυλιωμένες CpG νησίδες στα φυσιολογικά κύτταρα, εμφανίζονται σε μεγάλο βαθμό μεθυλιωμένα. Η διατήρηση αυτής της μεθυλίωσης είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς συμβάλλει στην αποφυγή της χρωμοσωμικής αστάθειας, των μετατοπίσεων και της διαταραγμένης γονιδιακής έκφρασης. Αυτές οι θετικές συνέπειες για τη διατήρηση της χρωμοσωμικής ακεραιότητας εμποδίζονται από την επανενεργοποίηση των ενδοπαρασιτικών αλληλουχιών, που είναι το τελικό αποτέλεσμα της υπομεθυλίωσης. Οι ενδοπαρασιτικές αλληλουχίες είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που προέρχονται κατά κύριο λόγο από μεταθετά στοιχεία. Πρόκειται κυρίως για τα στοιχεία *ALU* και *LINE1* (252, 275). Οι αλληλουχίες αυτές έχουν την ικανότητα του πολλαπλασιασμού με τη συνεχή παρεμβολή νέων αντιγράφων τους σε τυχαίες θέσεις στο γονιδίωμα. Με την επανενεργοποίησή τους, αντιγράφονται και μετατοπίζονται σε νέες θέσεις, συμβάλλοντας έτσι στη γενικότερη γενωμική διαταραχή (182).

Επιπλέον, η υπομεθυλίωση συνεισφέρει και στην LOI. Το κύριο εντυπωμένο γονίδιο που υφίσταται LOI με εμπλοκή της υπομεθυλίωσης είναι το *IGF2*, σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στον καρκίνο των ωοθηκών (182).

Όσον αφορά στη σχέση της υπομεθυλίωσης με άλλες επιγενετικές αλλαγές, η στενή σύνδεση που παρατηρείται μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA και της ακετυλίωσης των ιστονών, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι και η εκτεταμένη υπομεθυλίωση θα επηρεάζει επίσης την ακετυλίωση,

στην αντίθετη κατεύθυνση (249). Επιπλέον, οι αλλαγές στη μεθυλίωση των ιστονών συχνά συσχετίζονται με αλλαγές στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA. Συγκεκριμένα, η τριμεθυλίωση της λυσίνης-4 της H3 (H3K4me3), που αποτελεί δείκτη ενεργοποίησης γονιδίων, συσχετίζεται με υπομεθυλίωση του DNA, ενώ η διμεθυλίωση της λυσίνης-9 της H3 (H3K9me2), που αποτελεί δείκτη καταστολής της γονιδιακής λειτουργίας, συχνά συνεντοπίζεται με υπερμεθυλίωση του DNA (275). Είναι φανερό συνεπώς ότι οι δυσλειτουργίες και οι απορρυθμίσεις σε ολόκληρο το πεδίο της επιγενετικής επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την κατάσταση της χρωματίνης και κατά συνέπεια τη γονιδιακή έκφραση (σχήμα 3.8) (276).



Σχήμα 3.7: Διαμόρφωση των ομοιοπολικών τροποποιήσεων στη χρωματίνη (276)

### 3.4 Τεχνολογίες ανίχνευσης της μεθυλίωσης

Η μελέτη της μεθυλίωσης του DNA μπορεί να οδηγήσει στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου, καθώς η μεθυλίωση συμμετέχει στην ογκογένεση αλλά και στην εξέλιξη της νόσου. Κατά συνέπεια, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνολογίες με στόχο την ανίχνευση της μεθυλίωσης στοχευμένα ή σε όλο το γονιδίωμα, με αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα (277-280). Οι τεχνολογίες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: στις βασιζόμενες στη χρήση περιοριστικού ενζύμου, στις βασιζόμενες στην κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (bisulfite treatment), στις βασιζόμενες στον εμπλουτισμό και σε όσες αποσκοπούν στη μελέτη των 5-υδροξυμεθυλοκυτοσινών (**5-hydroxymethylcytosines, 5hmC**) (279).



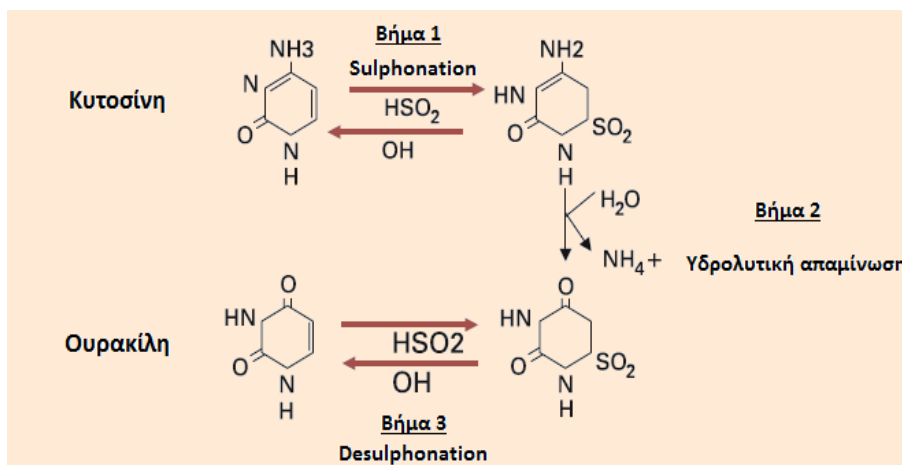
### 3.4.1 Τεχνολογίες βασιζόμενες στη χρήση περιοριστικού ενζύμου

Τα περιοριστικά ένζυμα ειδικά στη μεθυλίωση (**methylation restriction enzymes, MREs**) δρουν με την αποκοπή του DNA σε συγκεκριμένα νουκλεοτίδια (CCGG μοτίβα) και χρησιμοποιούνται συχνά στις μελέτες μεθυλίωσης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται δύο κύρια MREs, τα ευαίσθητα στη μεθυλίωση που αποκόπτουν αποκλειστικά το μη-μεθυλιωμένο DNA ενώ αφήνουν άθικτο το μεθυλιωμένο και τα μη-ευαίσθητα στη μεθυλίωση που αποκόπτουν το DNA ανεξάρτητα από το προφίλ μεθυλίωσης των αλληλουχιών αναγνώρισης. Τα MREs χρησιμοποιούνται συχνά σε μικροσυστοιχίες υβριδισμού που ανιχνεύουν 5mC, ενώ η πέψη με MREs με επακόλουθη αλληλούχιση αποτελεί την βάση της μεθοδολογίας MRE-αλληλούχισης (**MRE-seq**). Στην MRE-seq, μετά την πέψη με MREs, το θραυσματοποιημένο DNA επιλέγεται βάσει μεγέθους για την επακόλουθη προετοιμασία των βιβλιοθηκών χωρίς την κατεργασία με υπερήχους. Ωστόσο, λόγω του περιορισμένου αριθμού των θέσεων αναγνώρισης που περιλαμβάνουν CpGs, η MRE-seq αδυνατεί να καλύψει όλο το μεθυλιωμένο γονιδίωμα (methyloome). Επιπλέον, το ούτως ή άλλως κατακερματισμένο cfDNA, όπου μπορεί να έχουν αποδομηθεί και θέσεις αναγνώρισης, αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στην εφαρμογή της ανωτέρω μεθοδολογίας σε αναλύσεις υγρής βιοψίας (279).

Με την ανάπτυξη της dPCR μεθοδολογίας, έχει επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση της μεθυλίωσης του DNA με τον συνδυασμό πέψης με MREs και επακόλουθη εφαρμογή της (281). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται μη-ευαίσθητα στη μεθυλίωση MREs και ακολουθεί η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της μεθυλίωσης σε μία πλατφόρμα μικροροών, με την εφαρμογή της στατιστικής Poisson. Λόγω της υψηλής ευαισθησίας της ddPCR μεθοδολογίας, η τεχνολογία αυτή μπορεί να πραγματοποιήσει μελέτες μεθυλίωσης πολύ μικρών ποσοτήτων DNA, συνεπώς είναι κατάλληλη για αναλύσεις υγρής βιοψίας.

### 3.4.2 Τεχνολογίες βασιζόμενες στην κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο

Οι τεχνολογίες που έχουν ως βάση την κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο αποτελούν τις κυριότερα χρησιμοποιούμενες στις μελέτες μεθυλίωσης. Στην κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (DNA conversion), αρχικά αποδιατάσσεται το DNA, και στο αποδιατεταγμένο DNA όλες οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες και στη συνέχεια σε θυμίνες. Οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ως έχουν, χωρίς να επηρεάζονται καθόλου από τη διαδικασία. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά το DNA conversion παρατίθενται αναλυτικά στο σχήμα 3.8. Μειονέκτημα της χημικής τροποποίησης με όξινο θειώδες νάτριο αποτελεί η σε μεγάλο βαθμό αποικοδόμηση του DNA.



Σχήμα 3.8: Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά το DNA conversion

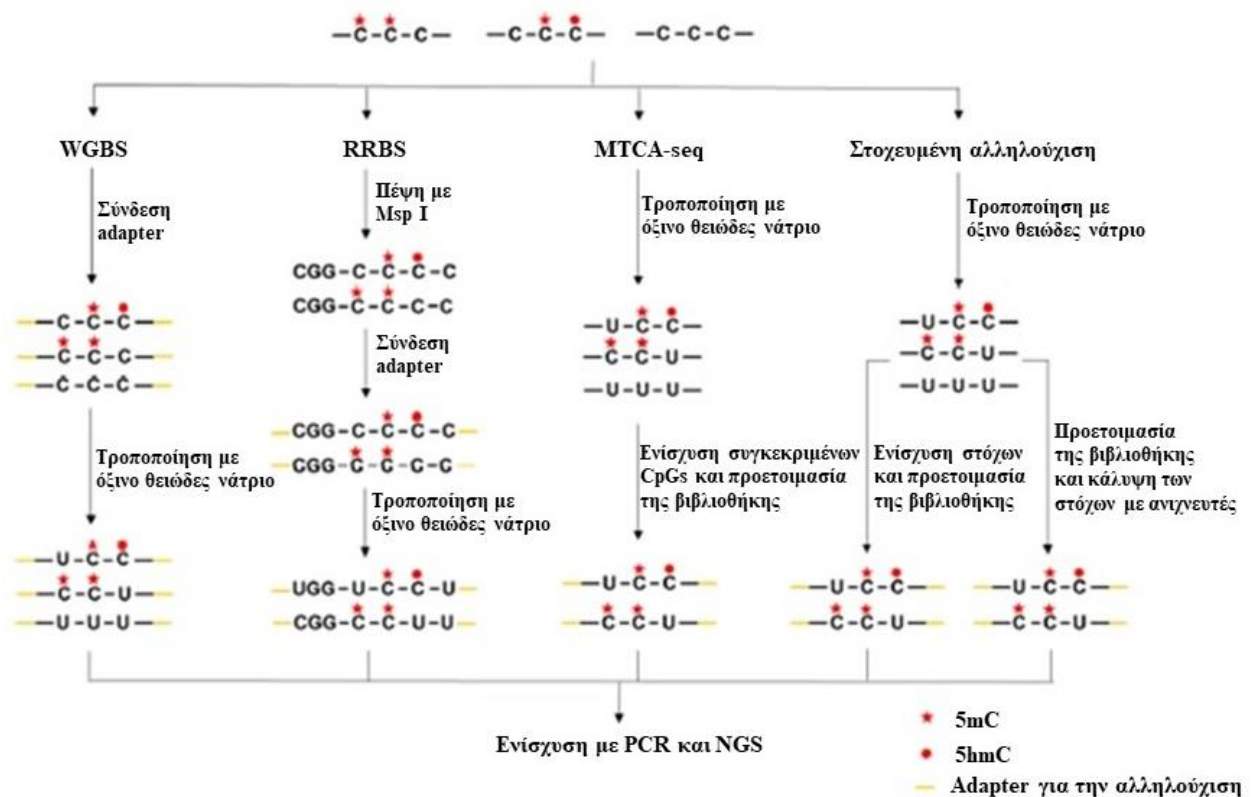
### 3.4.2.1 NGS τεχνολογίες που βασίζονται στην κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο

Τα προηγούμενα χρόνια, τη διαδικασία του DNA conversion ακολουθούσε η εφαρμογή της αλληλούχισης κατά Sanger, όμως πλέον εφαρμόζονται NGS μεθοδολογίες που παρέχουν τη δυνατότητα αλληλούχισης της μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (**whole-genome bisulfite sequencing, WGBS**), καθώς και της στοχευμένης αλληλούχισης (**targeted bisulfite sequencing**) που επιτρέπει την κάλυψη σε υψηλότερο βάθος. Ανάλογα με τον τρόπο ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου, η ενίσχυση στη στοχευμένη αλληλούχιση μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κατηγορίες: την ενίσχυση με την εφαρμογή PCR μεθοδολογιών και την ενίσχυση με την εφαρμογή ανιχνευτών υβριδοποίησης (279).

Εκτός της WGBS, έχουν αναπτυχθεί και άλλες NGS μεθοδολογίες για την ανίχνευση της μεθυλίωσης στο γονιδίωμα, όπως η αλληλούχιση της μεθυλίωσης μειωμένης αναπαράστασης (**reduced-representation bisulfite sequencing, RRBS**), που συνδυάζει την πέψη με MREs, την κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο και το NGS, για τη μελέτη της μεθυλίωσης περιοχών πλούσιων σε CpG νησίδες (279).

Μία άλλη εξαιρετικά ευαίσθητη NGS μεθοδολογία αποτελεί η ενίσχυση και αλληλούχιση μεθυλιωμένων CpGs, το ένα όπισθεν του άλλου (**methylated CpG tandems amplification and sequencing, MCTA-seq**). Στην MCTA-seq, μετά το DNA conversion χρησιμοποιείται ένας εκκινητής που περιλαμβάνει μία ημι-τυχαία αλληλουχία ταυτοποίησης και μία αλληλουχία άγκυρα για την ενίσχυση και επέκταση του τροποποιημένου DNA στο 3' άκρο. Λόγω της υψηλότερης πυκνότητας σε CpGs, οι μεθυλιωμένες CpG νησίδες αναμένεται να ενισχυθούν σε μεγαλύτερο βαθμό από τις μη-μεθυλιωμένες CpG νησίδες, καθώς και από τα θραύσματα που δεν αποτελούν CpG νησίδες. Στη συνέχεια, τα μεθυλιωμένα CpGs το ένα όπισθεν του άλλου (tandem) ενισχύονται επιλεκτικά με τη χρησιμοποίηση ενός άλλου εκκινητή που περιλαμβάνει της αλληλουχία CGCGCGG, οπότε τελικά θα ενισχυθούν περαιτέρω και θα αλληλουχηθούν

αποκλειστικά οι αλληλουχίες των μεθυλιωμένων CpG νησίδων. Η μεθοδολογία MCTA-seq παρέχει τη δυνατότητα ενίσχυσης πολύ μικρών τμημάτων DNA, έως 7,5 pg, συνεπώς είναι κατάλληλη για αναλύσεις υγρής βιοψίας (279).



Σχήμα 3.9: NGS τεχνολογίες που βασίζονται στην καταργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (279)

### 3.4.2.2 Μικροσυστοιχίες μεθυλίωσης

Οι ειδικές μικροσυστοιχίες για την ανίχνευση της μεθυλίωσης αποτελούσαν τη βασική τεχνολογία για τη μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδιώματος (methylome), πριν την επικράτηση των NGS τεχνολογιών για αυτόν τον σκοπό. Ωστόσο εξακολουθούν να εφαρμόζονται, με κύρια παραδείγματα την Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip που περιλαμβάνει ανιχνευτές για την ανίχνευση περισσότερων από 450.000 θέσεων μεθυλίωσης (96% των CpGs) και τη βελτιωμένη εκδοχή της, το Infinium MethylationEPIC BeadChip που περιλαμβάνει ανιχνευτές για την ανίχνευση περισσότερων από 850.000 θέσεων μεθυλίωσης, καλύπτοντας επιπλέον CpGs που ανήκουν στις περιοχές των ενισχυτών (enhancers). Οι μικροσυστοιχίες μεθυλίωσης έχουν εφαρμοσθεί και για την εξαγωγή δεδομένων του TCGA του HGSC (14). Γενικά οι μικροσυστοιχίες μεθυλίωσης χρησιμοποιούνται ευρέως για την επικύρωση νέων μεθοδολογιών, όμως έχουν ως μειονέκτημα τη μειωμένη κάλυψη όλων των θέσεων μεθυλίωσης του γονιδιώματος.

### 3.4.2.3 PCR ειδική στη μεθυλίωση (MSP) και real-time MSP

Η αντίδραση MSP αποτελεί μία παραλλαγή της PCR και βασίζεται στη χρησιμοποίηση δύο ζευγών εκκινητών, ένα για τη μεθυλιωμένη χημικά τροποποιημένη αλληλουχία-στόχο και ένα για την αντίστοιχη μη-μεθυλιωμένη αλληλουχία (282). Στην MSP μεθοδολογία, η διάκριση μεταξύ μεθυλιωμένου και μη μεθυλιωμένου DNA βασίζεται στο σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών που προσδένονται ειδικά σε χημικά τροποποιημένο και μεθυλιωμένο DNA, έτσι ώστε να μην ενισχύεται καθόλου γενωμικό DNA που δεν έχει μετατραπεί ή DNA μη μεθυλιωμένο ως προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει κάθε φορά. Συνεπώς, οι εκκινητές περιέχουν περισσότερα από τρία CpGs κοντά στο 3' άκρο τους, καθώς και ικανοποιητικό αριθμό βάσεων θυμίνης που έχουν προέλθει από χημικά τροποποιημένες κυτοσίνες (283).

Τη βελτιωμένη εκδοχή της αποτελεί η MSP σε πραγματικό χρόνο (**real-time MSP**), όπου χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών ειδικών για τη μεθυλιωμένη χημικά τροποποιημένη αλληλουχία-στόχο και μία φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Μία προσαρμογή της real-time MSP αποτελεί η **MethyLight**, όπου με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων ανιχνευτών υδρόλυσης τύπου TaqMan επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου-στόχου (284). Η real-time MSP μεθοδολογία χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της μεθυλίωσης σε αναλύσεις υγρής βιοψίας.

Η νεότερη εξέλιξη της MSP μεθοδολογίας, η ψηφιακή MSP σταγόνας (**droplet-digital MSP, ddMSP**), συνδυάζει την ειδικότητα της MSP με την εξαιρετική ευαισθησία της ddPCR και έχει εφαρμοστεί σε μελέτες μεθυλίωσης στο ctDNA ασθενών με καρκίνο του μαστού (285) και του παχέος εντέρου (286, 287).

### 3.4.2.4 MS-HRMA

Η ανάλυση καμπύλων τήξεως υψηλής διακριτικής ικανότητας (**methylation-sensitive high-resolution melting Analysis, MS-HRMA**) αποτελεί μία μεθοδολογία βασιζόμενη στην PCR για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της μεθυλίωσης. Αρχικά πραγματοποιείται μία αντίδραση real-time PCR για την ενίσχυση του χημικά τροποποιημένου DNA, με τη χρήση κατάλληλης φθορίζουσας ουσίας για την ανίχνευση του προϊόντος (288, 289). Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην real-time PCR έχουν σχεδιασθεί κατάλληλα ώστε να ενισχύουν εξίσου τη μεθυλιωμένη και τη μη-μεθυλιωμένη αλληλουχία του προς μελέτη γονιδίου και καλούνται ανεξάρτητοι της μεθυλίωσης εκκινητές (**methylation-independent primers, MIP**). Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα ή δύο CpGs κοντά στο 5' άκρο του (290). Μετά την

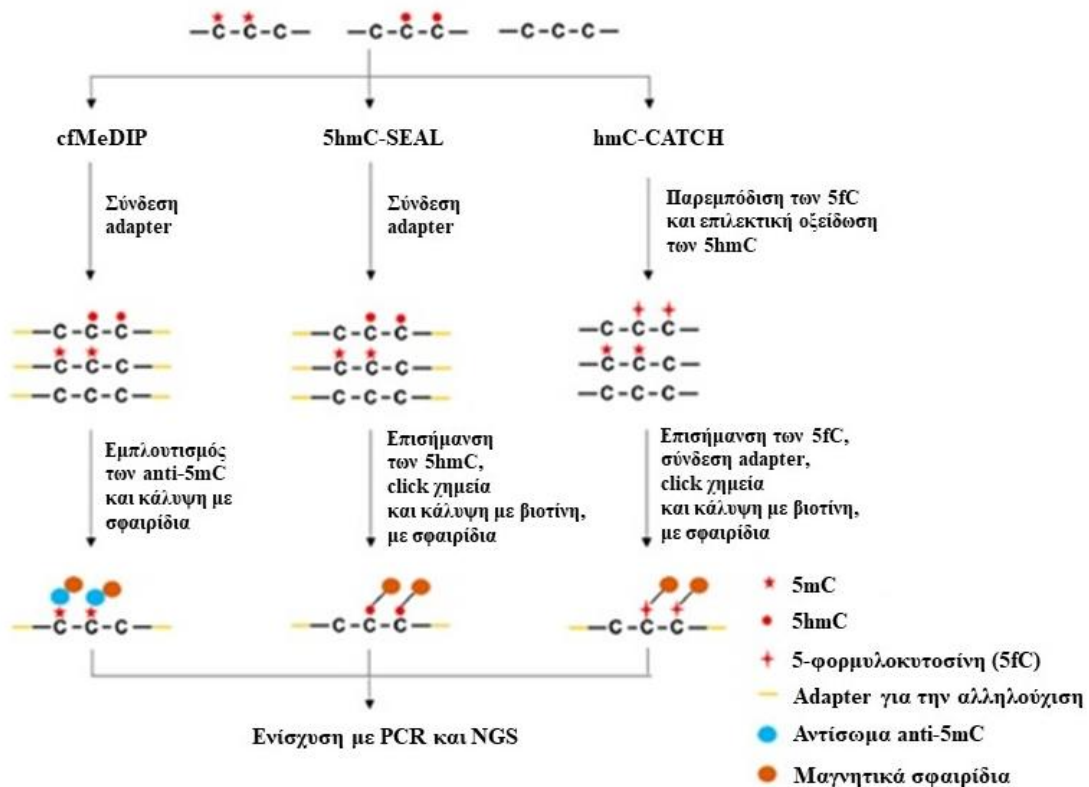
εφαρμογή της real-time PCR ακολουθεί ανάλυση καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας στο προϊόν της αντίδρασης. Οι καμπύλες τήξης του μεθυλιωμένου προϊόντος διαφέρουν από του μη-μεθυλιωμένου, καθώς κατά την τήξη τα δύο προϊόντα παρουσιάζουν διαφορετική θερμοδυναμική συμπεριφορά, που αντικατοπτρίζεται στη διαφορά των θερμοκρασιών τήξης (**melting temperature,  $T_m$** ) τους. Η  $T_m$  ορίζεται ως η θερμοκρασία όπου το δίκλωνο προϊόν της αντίδρασης PCR αποδιατάσσεται σε δύο κλώνους και παρατηρείται οξεία πτώση στον φθορισμό της φθορίζουσας ουσίας που χρησιμοποιείται στην PCR για την ανίχνευσή του. Συγκεκριμένα, το μεθυλιωμένο προϊόν έχει πάντα υψηλότερη  $T_m$  από το μη-μεθυλιωμένο. Οι καμπύλες τήξης του φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας κανονικοποιούνται και εξάγονται οι καμπύλες της πρώτης παραγώγου του φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας. Για κάθε δείγμα, οι τελικές καμπύλες της πρώτης παραγώγου του φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας συγκρίνονται με εκείνες του θετικού μάρτυρα (100% μεθυλιωμένο), του αρνητικού (0% μεθυλιωμένο) και των μεταξύ τους αναμίξεων, ώστε να εκτιμηθεί ημιοσοτικά η μεθυλίωση του δείγματος (288, 289).

### 3.4.3 Τεχνολογίες βασισμένες στον εμπλουτισμό

Στις τεχνολογίες που βασίζονται στον εμπλουτισμό χρησιμοποιούνται ειδικά αντισώματα έναντι των 5mC ή MBD πρωτεΐνες που προσδένονται στα CpGs, με στόχο την επιλογή των μεθυλιωμένων περιοχών για περαιτέρω ανάλυση και την απομάκρυνση των μη-μεθυλιωμένων περιοχών με έκπλυση. Την πρώτη κατηγορία συνιστά η αλληλούχιση ανοσοκαθίζησης του μεθυλιωμένου DNA (**methylated DNA immunoprecipitation sequencing, MeDIP-seq**), ενώ τη δεύτερη η αλληλούχιση του καλυμμένου DNA από ειδικές πρωτεΐνες πρόσδεσης (**methyl-CpG binding domain protein capture sequencing, MBD-seq**). Βασικά πλεονεκτήματα των τεχνολογιών αυτών αποτελούν η απουσία της χημικής κατεργασίας του DNA και η επιτυχής διάκριση μεταξύ 5mC και 5hmC λόγω της πρόσδεσης των κατάλληλων πρωτεϊνών, ενώ η ευαισθησία και η ειδικότητά τους είναι συγκρίσιμη με των WGBS μεθοδολογιών. Ωστόσο χαρακτηρίζονται από σχετικά χαμηλή ανάλυση της τάξεως των 100-300 bp, συνεπώς είναι πιθανό να παρουσιάσουν αδυναμία ανίχνευσης του ακριβούς ποσοστού της μεθυλίωσης σε έναν γενετικό τόπο. Επιπλέον, απαιτείται αρκετά υψηλή ποσότητα DNA για την παρασκευή των βιβλιοθηκών, που προηγείται της αλληλούχισης (279). Στις αναλύσεις υγρής βιοψίας, η χαμηλή ποσότητα του cfDNA αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την εφαρμογή των ανωτέρω μεθόδων, ωστόσο σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη παρουσιάστηκε η MeDIP-seq για το cfDNA (**cfMeDIP-seq**). Στην cfMeDIP-seq, με την προσθήκη ενός εξωγενούς λ DNA επετεύχθη η αύξηση της αρχικής ποσότητας του cfDNA πριν τον εμπλουτισμό (291).

### 3.4.4 Τεχνολογίες βασιζόμενες στη μελέτη των 5-υδροξυμεθυλοκυτοσινών

Η απομεθυλίωση του DNA είναι μία φυσιολογική διαδικασία που συντελείται από τα ένζυμα μετατόπισης ten-eleven (**ten-eleven translocation enzymes, TETs**). Τα TET ένζυμα (TET1, TET2, TET3) οξειδώνουν τις 5mC σε 5hmC, 5-φορμυλοκυτοσίνες και 5-καρβοξυκυτοσίνες, με τελικό αποτέλεσμα την απομεθυλίωση του DNA (292, 293). Οι 5hmC αποτελούν μία επιγενετική τροποποίηση με υψηλή σταθερότητα, που συσχετίζεται με την ογκογένεση και την εξέλιξη της νόσου, σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από συνολικά μειωμένα επίπεδα 5hmC και από αυξημένα επίπεδα 5mC σε ορισμένους γενετικούς τόπους (294). Σε σχέση με τα επίπεδα των 5mC, τα επίπεδα των 5hmC είναι πολύ χαμηλότερα, ενώ είναι γνωστό ότι η αλληλούχιση του DNA ύστερα από χημική τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο δεν δύναται να διαχωρίσει τις 5hmC από τις 5mC. Ως εκ τούτου, στις τεχνολογίες που βασίζονται στη μελέτη των 5hmC δεν εφαρμόζεται DNA conversion. Οι κυριότερες μεθοδολογίες είναι η **5hmC-Seal**, η **5hmC-CATCH**, η **hMeDIP-seq** που αποτελεί τροποποίηση της MeDIP-seq, και δύο μεθοδολογίες που βασίζονται στο οξειδωτικό DNA conversion, η αλληλούχιση ύστερα από οξειδωτικό DNA conversion (**oxidative bisulfite sequencing, OxBS-seq**) και η αλληλούχιση ύστερα από TET-βασισμένο DNA conversion (**TET-assisted bisulfite sequencing, TAB-seq**) (279).



Σχήμα 3.10: Τεχνολογίες που βασίζονται στον εμπλουτισμό και στη μελέτη των 5hmC (279)

### 3.5 Μεθυλίωση και καρκίνος των ωοθηκών

Όπως σε όλους τους τύπους καρκίνου, έτσι και στον καρκίνο των ωοθηκών είναι ιδιαίτερα σημαντικές οι επιγενετικές τροποποιήσεις για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου (295). Η σπουδαιότερη επιγενετική τροποποίηση είναι η αλλαγή του προφίλ μεθυλίωσης του DNA, με αποτέλεσμα τόσο την συνολική υπομεθυλίωση στο γονιδίωμα όσο και την υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων των υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων. Η μεθυλίωση του DNA ανιχνεύεται τόσο σε δείγματα ιστού από τον πρωτοπαθή όγκο ωοθηκών, όσο και στο ctDNA, όπως έχει ήδη αναφερθεί αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 2.3.1.3 (296). Επιπλέον μπορεί να ανιχνευθεί και στο ασκитικό υγρό (297). Μεταξύ των κύριων ιστολογικών υποτύπων του καρκίνου των ωοθηκών έχουν διαπιστωθεί σημαντικές διαφορές στο προφίλ μεθυλίωσης (184, 298), γεγονός που αναδεικνύει περαιτέρω την μοριακή ετερογένεια της νόσου (299). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη μεθυλίωσης και έκφρασης του γονιδίου *HNF1B*, όπου παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση και σίγαση του γονιδίου στον ορώδη καρκίνο των ωοθηκών, σε αντίθεση με το διανογκυτταρικό καρκίνωμα όπου παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου (298). Ο καρκίνος των ωοθηκών έχει χαρακτηριστεί πολλές φορές ως CIMP-καρκίνος, με το φαινότυπο CIMP να παρατηρείται κυρίως σε ορώδη και διανογκυτταρικά καρκινώματα (300). Στους CIMP-καρκίνους των ωοθηκών οι ασθενείς παρουσιάζουν συχνότερα αντίσταση στα θεραπευτικά σχήματα που τους χορηγούνται, με συνεπακόλουθο την κακή πρόγνωση και τα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης (297).

Οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA μπορούν να αποτελέσουν διαγνωστικούς, προγνωστικούς και προβλεπτικούς μοριακούς βιοδείκτες στον καρκίνο των ωοθηκών (301). Στις μελέτες ανίχνευσης υπερμεθυλίωσης, που αποτελούν την πλειοψηφία των μελετών σχετικά με τη μεθυλίωση, τις περισσότερες φορές αναλύονται σύνολα γονιδίων ταυτόχρονα και όχι ένα μοναδικό γονίδιο ως βιοδείκτης, με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας.

Στον καρκίνο των ωοθηκών, έχει χαρακτηριστεί ένας μεγάλος αριθμός ογκοκατασταλτικών γονιδίων που υφίστανται υπερμεθυλίωση των υποκινητών τους, με αποτέλεσμα την αποσιώπησή τους. Τα περισσότερα από τα κλασικά ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν βρεθεί υπερμεθυλωμένα, ενώ από τα αποτελέσματα πολλών μελετών, έχουν προκύψει αρκετά υπερμεθυλωμένα και αποσιωπημένα γονίδια, που είναι πιθανό να λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια σε αυτό τον τύπο καρκίνου. Επιπλέον, η υπερμεθυλίωση αποτελεί ένα επιβεβαιωμένο μέσο διαταραχής της πορείας σημαντικών μοριακών μονοπατιών, και προς τις δύο κατευθύνσεις (302, 303).

### 3.6 Επιγενετική θεραπεία στον καρκίνο των ωοθηκών

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις αποτελούν αντιστρεπτές αλλαγές, συνεπώς είναι δυνατή η στόχευσή τους με κατάλληλα θεραπευτικά σχήματα, συνδυαστικά ή ως μονοθεραπεία. Τα φάρμακα που παρουσιάζουν την αποτελεσματικότερη δράση είναι αυτά που οδηγούν στην υπομεθυλίωση των περιοχών του DNA που έχουν υπερμεθυλιωθεί, καθώς και οι αναστολείς της αποακετυλίωσης των ιστονών. Ως μονοθεραπεία σε αιματολογικές κακοήθειες, έχουν λάβει έγκριση από τον FDA έξι σχήματα επιγενετικής θεραπείας, τα δύο από τα οποία έχουν μηχανισμό δράσης την αντιστροφή της μεθυλίωσης ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)). Πρόκειται για την 5-azacytidine (**Azacitadine**) και την 5-aza-2'-deoxycytidine (**Decitabine**) (304). Για την αντιστροφή της μεθυλίωσης και συνεπώς την επανέκφραση των αποσιωπημένων γονιδίων, είναι απαραίτητη η αναστολή της δράσης των DNMTs. Οι αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών (**DNA methyltransferases inhibitors, DNMTIs**) διακρίνονται σε νουκλεοσιδικά και μη-νουκλεοσιδικά ανάλογα, με βάση τις χημικές δομές και τους μηχανισμούς δράσης. Οι νουκλεοσιδικοί DNMTIs ενσωματώνονται στην έλικα του DNA και αποτελούν ένα ομοιοπολικό συνδεδεμένο πρόσθετο του DNA. Η δράση τους έγκειται στην παγίδευση και την απενεργοποίηση των DNMTs. Η azacytidine όπως και η decitabine, είναι νουκλεοσιδικοί DNMTIs. Άλλο παράδειγμα νουκλεοσιδικού DNMTI αποτελεί η 5,6-dihydro-5-azacytidine (DHAC). Η δεύτερη κατηγορία των DNMTIs είναι οι μη-νουκλεοσιδικοί, που παρεμποδίζουν άμεσα την ενεργότητα των DNMTs, χωρίς ομοιοπολική σύνδεση με τα ένζυμα, με παράδειγμα την υδραλαζίνη. Έχουν ως πλεονέκτημα τη μειωμένη τοξικότητα συγκριτικά με τους νουκλεοσιδικούς αναστολείς (305).

Στον καρκίνο των ωοθηκών, έχει πραγματοποιηθεί κλινική μελέτη φάσης I όπου συμμετείχαν ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο ύστερα από θεραπεία με carboplatin, στις οποίες δόθηκε ο συνδυασμός carboplatin και decitabine σε χαμηλή δόση (306). Σε μία άλλη κλινική μελέτη φάσης II όπου εφαρμόστηκε ο ίδιος συνδυασμός, παρατηρήθηκε απομεθυλίωση των ανώμαλα υπερμεθυλιωμένων *hMLH1*, *RASSF1A*, *HOXA10* και *HOXA11*, που οδήγησε στην επαναφορά της ευαισθησίας στην carboplatin, σε αυξημένα ποσοστά ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία και σε αύξηση του PFS (307).

Όσον αφορά στη θεραπεία με υπομεθυλίωση και όχι με την εφαρμογή DNMTIs, τα αποτελέσματα μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί στον καρκίνο των ωοθηκών δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά, εξαιτίας των μη ειδικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν. Επιπλέον, σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε υπερέκφραση ογκογονιδίων (305).



## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διατριβή έχει σκοπό τη μελέτη της μεθυλίωσης επιλεγμένων γονιδίων στον καρκίνο των ωοθηκών και συγκεκριμένα, στον ορώδη καρκίνο ωοθηκών υψηλού βαθμού κακοήθειας (HGSC). Ο κύριος στόχος της διδακτορικής διατριβής είναι η εύρεση κατάλληλων δεικτών μεθυλίωσης που δίνουν στατιστικά σημαντική πληροφορία για την πρόγνωση των ασθενών.

Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι δείγματα πρωτοπαθών όγκων, αντίστοιχα δείγματα παρακείμενων ιστών, καθώς και αντίστοιχα δείγματα πλάσματος από τις ίδιες ασθενείς. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών.

Οι μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν βασίζονται στην PCR, και συνιστούν την ειδική για τη μεθυλίωση PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time MSP) για την ανίχνευση της μεθυλίωσης σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και πλάσματος, καθώς και την ανάλυση καμπύλων τήξεως υψηλής διακριτικής ικανότητας (MS-HRMA) για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της μεθυλίωσης σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών.

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1A*, όπου πραγματοποιήθηκε μία συγκριτική μελέτη σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και ctDNA ασθενών με HGSC. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, εκτιμήθηκε η προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου.

Στη συνέχεια, ακολούθησε μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1*, όπου πραγματοποιήθηκε μία μελέτη σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και ctDNA ασθενών με HGSC. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, εκτιμήθηκε η προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου και έγινε μία προσπάθεια αποσαφήνισης του ρόλου του στην εξέλιξη του HGSC.

Ακολούθησαν οι μελέτες μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται σε μοριακά μονοπάτια που διαταράσσονται στον HGSC, όπως τα γονίδια *BRCA1* και *MGMT* που συμμετέχουν σε διαφορετικές πορείες επιδιόρθωσης του DNA, το γονίδιο *NR2F1* που συμμετέχει ενεργά στην κυτταρική αδράνεια, τα γονίδια *RASSF10* που εμπλέκεται στην ανάπτυξη χημειοαντίστασης, καθώς και το γονίδιο *RKIP* που συμμετέχει στην EMT διαδικασία.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* σε δείγματα CTCs ασθενών με HGSC. Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος των ωοθηκών είναι ένας ιδιαίτερα ανοσογονικός καρκίνος, με πρόσφατες μελέτες να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η σηματοδότηση μέσω του σημείου ελέγχου PD-1/PD-L1 αποτελεί μηχανισμό ανοσολογικής διαφυγής. Δεν έχει μελετηθεί έως σήμερα η έκφραση του γονιδίου *PD-L1* στα CTCs ασθενών με καρκίνο ωοθηκών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 4.1 Κλινικά δείγματα και καρκινικές κυτταρικές σειρές

Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στις μελέτες μεθυσίωσης είναι η IGROV1, η OVCAR29 και η OAW42. Η καλλιέργειά τους, καθώς και η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκαν στην Κλινική Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου του Essen και ήταν ευγενική χορηγία της Prof. Sabine Kasimir Bauer, στα πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας.

Στις μελέτες μεθυσίωσης χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες δειγμάτων από ασθενείς με HGSC: η ομάδα A, που περιλαμβάνει n=66 δείγματα ιστοτεμαχίων μονιμοποιημένων σε φορμαλίνη και εγκιβωτισμένων σε παραφίνη (**formalin-fixed paraffin-embedded, FFPEs**) από πρωτοπαθείς όγκους και η ομάδα B, που αποτελείται από τρεις υποομάδες δειγμάτων: τα δείγματα FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους (n=61), τα διαθέσιμα αντίστοιχα δείγματα FFPEs από παρακείμενους ιστούς (n=58) και τα διαθέσιμα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος 2mL (n=59). Τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και για τις δύο ομάδες, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1. Για την απομόνωση του πλάσματος από το περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκαν 2x5mL EDTA σωληνάρια συλλογής αίματος, κατά τη διάγνωση, πριν τη χειρουργική επέμβαση και πριν την εφαρμογή θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του ολικού αίματος στα 1500g για 10min και αποθήκευση του πλάσματος στους -80°C. Όλες οι ασθενείς της ομάδας B έλαβαν μετεγχειρητικά τουλάχιστον 6 κύκλους χημειοθεραπείας με carboplatin AUC 5 και paclitaxel 175mg/m<sup>2</sup>. Οι πρωτοπαθείς όγκοι χαρακτηρίστηκαν ως πλατινοάντοχοι, εφόσον ανιχνεύτηκε υποτροπή της νόσου εντός 6 μηνών από την ολοκλήρωση της θεραπείας με πλατίνα. Η υπολειπόμενη νόσος (tumor rest), στις περισσότερες περιπτώσεις που ανιχνεύτηκε, είχε μέγεθος μικρότερο από 1cm. Όλα τα δείγματα της ομάδας B προήλθαν από την Κλινική Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Essen και ήταν ευγενική χορηγία της Prof. Sabine Kasimir-Bauer. Η απομόνωση των δειγμάτων πλάσματος από το περιφερικό αίμα, πραγματοποιήθηκε επίσης στην ίδια κλινική.

Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας των μεθοδολογιών χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες φυσιολογικών δειγμάτων, μία μικρή ομάδα FFPEs από ωαγωγούς υγείων γυναικών (n=16) και μία μεγαλύτερη ομάδα από δείγματα πλάσματος υγείων γυναικών (n=51). Τα δείγματα της ομάδας A καθώς και τα φυσιολογικά δείγματα ωαγωγών προήλθαν από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και ήταν ευγενική χορηγία της Καθ. Παθολογικής Ανατομικής Αικατερίνης Παυλάκη.

Πίνακας 4.1: Διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά	Ομάδα A (n=66) n%	Ομάδα B (σύνολο: n=64) n %
<b>Ιστολογικός υπότυπος</b>		
Ορώδης	66 (100)	64 (100)
<b>Βαθμός κακοήθειας (G)</b>		
G1	-	2 (3,1)
G2	-	26 (40,6)
G3	66 (100)	36 (56,3)
<b>Στάδιο FIGO</b>		
I	13 (19,7)	1 (1,6)
II	37 (56,1)	2 (3,1)
III	14 (21,2)	39 (60,9)
IV	-	8 (12,5)
Άγνωστο	2 (3,0)	14 (21,9)
<b>Ηλικία</b>	Διάμεση ηλικία=55	Διάμεση ηλικία=64
≥ διάμεση ηλικία	33 (50,0)	32 (50,0)
< διάμεση ηλικία	33 (50,0)	32 (50,0)
<b>Λεμφαδενική διήθηση (pN)</b>		
N0		18 (28,1)
N1		29 (45,3)
NX		4 (6,3)
Άγνωστο		13 (20,3)
<b>Πρωτοπαθής όγκος (pT)</b>		
T1		6 (9,4)
T2		6 (9,4)
T3		52 (81,2)
<b>Μακρινές μεταστάσεις (M)</b>		
M0		55 (85,9)
M1		8 (12,5)
Άγνωστο		1 (1,6)
<b>Αντίσταση στην πλατίνα</b>		
Θετική		10 (15,6)
Αρνητική		44 (68,8)
Άγνωστο		10 (15,6)
<b>Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)</b>		
Θετική		25 (39,0)
Αρνητική		38 (59,4)
Άγνωστο		1 (1,6)

Στη μελέτη έκφρασης του γονιδίου *PD-L1*, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα συμπληρωματικού DNA (**complementary DNA, cDNA**) από RNA που απομονώθηκε από CTCs ασθενών με HGSC, κατά τη διάγνωση. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες δειγμάτων: η ομάδα 1 (n=53) και η ομάδα 2 (n=25). Η απομόνωση των CTCs από το περιφερικό αίμα, η απομόνωση του RNA και η μετατροπή σε cDNA πραγματοποιήθηκαν στην Κλινική Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου του Essen και ήταν ευγενική χορηγία της Prof. Sabine Kasimir Bauer, στα

πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας. Για την απομόνωση και τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs και για τις δύο ομάδες ασθενών χρησιμοποιήθηκαν 2x5mL EDTA σωληνάρια συλλογής αίματος και εφαρμόστηκε το AdnaTest *OvarianCancerSelect* (QIAGEN, Hilden, Germany).

**Πίνακας 4.2: Διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών**

<b>Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά</b>	<b>Ομάδα 1 (n=41) n%</b>	<b>Ομάδα 2 (n=25) n %</b>
<b>Ιστολογικός υπότυπος</b>		
Ορώδης	41 (100)	25 (100)
<b>Βαθμός κακοήθειας (G)</b>		
G1	-	
G2	17 (41,5)	
G3	24 (58,5)	
<b>Στάδιο FIGO</b>		
I	3 (7,3)	
II	2 (4,9)	
III	30 (73,2)	
IV	6 (14,6)	
<b>Ηλικία</b>	Διάμεση ηλικία=60	Διάμεση ηλικία=59
≥ διάμεση ηλικία	21 (51,2)	14 (56,0)
< διάμεση ηλικία	20 (48,8)	11 (44,0)
<b>Λεμφαδενική διήθηση (pN)</b>		
N0	14 (34,1)	
N1	18 (43,9)	
NX	6 (14,6)	
Άγνωστο	3 (7,3)	
<b>Πρωτοπαθής όγκος (pT)</b>		
T1	4 (9,8)	
T2	4 (9,8)	
T3	32 (78,0)	
T4	1 (2,4)	
<b>Μακρινές μεταστάσεις (M)</b>		
M0	35 (85,4)	
M1	6 (14,6)	
<b>Αντίσταση στην πλατίνη</b>		
Θετική	3 (7,3)	
Αρνητική	27 (65,9)	
Άγνωστο	11 (26,8)	
<b>Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)</b>		
Θετική	13 (31,7)	
Αρνητική	26 (63,4)	
Άγνωστο	2 (4,9)	

## 4.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από FFPEs

### 4.2.1 Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση του DNA από FFPEs πραγματοποιήθηκε με το QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN®), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την απομόνωση του DNA από τομές ιστών FFPEs. Η πειραματική πορεία εφαρμόστηκε σε ειδικό χώρο που χρησιμοποιείται μόνο για την απομόνωση DNA, προς αποφυγή επιμολύνσεων.

Αρχικά η παραφίνη διαλυτοποιείται σε ξυλόλιο και απομακρύνεται από τις FFPEs. Ακολουθεί λύση του δείγματος με προσθήκη πρωτεϊνάσης K στις κατάλληλες συνθήκες αποδιάταξης και επώαση στους 90°C, ώστε να αντιστραφεί η σύνδεση της φορμαλίνης και να απομακρυνθεί η τελευταία. Στη συνέχεια το DNA προσδένεται σε μεμβράνη και διηθούνται τα συστατικά που αποτελούν επιμολυντές του. Το DNA εκπλύνεται προς απομάκρυνση όσων επιμολυντών έχουν παραμείνει και τελικά εκλύεται από τη μεμβράνη με το κατάλληλο διάλυμα έκλυσης.

### 4.2.2 Αντιδραστήρια και υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, από 15°C ως 25°C, εκτός από την πρωτεϊνάση K που απαιτεί θερμοκρασία 2°C ως 8°C σε περίπτωση που η θερμοκρασία περιβάλλοντος ξεπεράσει τους 25°C. Επιπλέον, στους 2-8°C διατηρούνται οι ειδικές στήλες έκλυσης και τα σωληνάρια συλλογής που περιλαμβάνονται στο kit. Στη συσκευασία περιέχονται τα εξής αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά:

- Πρωτεϊνάση K
- Διάλυμα ATL
- Διάλυμα AL
- Διάλυμα έκπλυσης AW1
- Διάλυμα έκπλυσης AW2
- Διάλυμα έκλυσης ATE
- Στήλες έκλυσης
- Σωληνάρια συλλογής

Τα αντιδραστήρια που απαιτούν προετοιμασία, κάθε φορά μόλις ανοιχτεί η συσκευασία του kit, είναι τα διαλύματα έκπλυσης AW1 και AW2 όπου προστίθενται 25 mL και 30 mL αιθανόλη (96-100%), αντίστοιχα. Πριν την προσθήκη της αιθανόλης αναμειγνύεται καλά το κάθε διάλυμα.

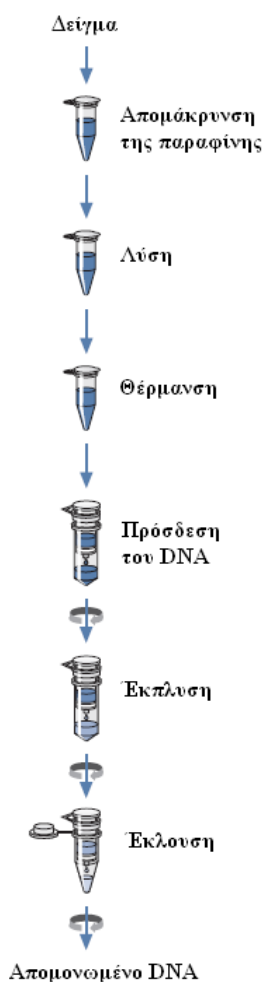
### 4.2.3 Πειραματική πορεία

Πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου, ελέγχεται η τυχόν ύπαρξη ιζημάτων στα διαλύματα AL και ATL. Σε περίπτωση που παρατηρηθούν, ακολουθεί διαλυτοποίησή τους με θέρμανση στους 70°C, με ήπια ανακίνηση. Τα στάδια του πειραματικού πρωτοκόλλου είναι τα παρακάτω:

1. Με τη χρήση νυστεριού, περικόπεται η περίσσεια της παραφίνης από το συσσωμάτωμα δείγματος-παραφίνης.
2. Κόβονται ως και 8 τομές πάχους 5-10  $\mu\text{m}$ , σε κάθε δείγμα. Αν η επιφάνεια του δείγματος έχει εκτεθεί στον αέρα, απορρίπτονται οι 2-3 πρώτες τομές.
3. Οι τομές τοποθετούνται αμέσως σε σωληνάρια των 1,5 mL και προστίθεται 1 mL ξυλόλιο σε κάθε σωληνάριο. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για 10 s.
4. Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 2 min.
5. Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο με πιπέτα.
6. Προστίθεται 1 mL αιθανόλη (96-100%) σε κάθε σωληνάριο και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση.
7. Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 2 min.
8. Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο με πιπέτα.
9. Τα σωληνάρια επώάζονται σε θερμοκρασία δωματίου, με ανοιχτά καπάκια, για 10 min ή όσο χρειαστεί για την πλήρη εξάτμιση της υπολειπόμενης αιθανόλης.
10. Επαναδιαλύεται το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου, με προσθήκη 180  $\mu\text{L}$  διαλύματος ATL. Ακολουθεί προσθήκη 20  $\mu\text{L}$  πρωτεΐνάσης K και ισχυρή ανάδευση.
11. Επώαση σε θερμοκρασία 56°C για 1 h.
12. Επώαση σε θερμοκρασία 90°C για 1 h.
13. Σύντομη φυγοκέντρωση, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείνασες σταγόνες στα καπάκια των σωληναρίων.
14. Προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος AL σε κάθε δείγμα και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  αιθανόλης (96-100%) και ακολουθεί πάλι ισχυρή ανάδευση.
15. Σύντομη φυγοκέντρωση, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείνασες σταγόνες στα καπάκια των σωληναρίων.
16. Ενώνονται οι στήλες έκλουσης με τα σωληνάρια συλλογής. Μεταφέρεται προσεκτικά στις στήλες το κυτταρόλυμα που βρίσκεται στα σωληνάρια των 1,5 mL, τα οποία απορρίπτονται. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 6000 g για 1 min. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής με το διήθημα και οι στήλες ενώνονται με νέα σωληνάρια. Αν το κυτταρόλυμα δεν πέρασε τελείως τη μεμβράνη, επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση.
17. Προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος AW1 σε κάθε στήλη, χωρίς να διαβραχεί το χείλος του σωληναρίου συλλογής. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 6000 g για 1 min. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής με το διήθημα και οι στήλες ενώνονται με νέα σωληνάρια.

18. Προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος AW2 σε κάθε στήλη, χωρίς να διαβραχεί το χείλος του σωληναρίου συλλογής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 6000 g για 1 min. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής με το διήθημα και οι στήλες ενώνονται με νέα σωληνάρια.
19. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 3 min, ώστε να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη της στήλης.
20. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής με το διήθημα και οι στήλες τοποθετούνται σε καθαρά σωληνάρια των 1,5 mL. Προστίθενται 20-100  $\mu\text{L}$  διαλύματος ATE στο κέντρο της μεμβράνης κάθε στήλης.
21. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 min, οπότε εκλύεται το DNA.

Τα δείγματα DNA φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



**Σχήμα 4.1: Απεικόνιση του πρωτοκόλλου απομόνωσης DNA από FFPEs**

### 4.3 Απομόνωση cfDNA από 2mL πλάσματος

#### 4.3.1 Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση του cfDNA από δείγματα πλάσματος πραγματοποιήθηκε με το QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN®), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιείται για την απομόνωση του cfDNA από πλάσμα και ούρα. Η πειραματική πορεία εφαρμόστηκε σε ειδικό χώρο που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την απομόνωση DNA, προς αποφυγή επιμολύνσεων.

Αρχικά πραγματοποιείται λύση με προσθήκη πρωτεΐνωσης K και επώαση στους 60°C. Στη συνέχεια το DNA προσδένεται σε μεμβράνη και διηθούνται τα συστατικά που αποτελούν επιμολυντές του. Το DNA εκπλύνεται προς απομάκρυνση όσων επιμολυντών έχουν παραμείνει και τελικά εκλούεται από τη μεμβράνη με το κατάλληλο διάλυμα έκλουσης.

#### 4.3.2 Αντιδραστήρια και υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, από 15°C ως 25°C, εκτός από την πρωτεΐνωση K που απαιτεί θερμοκρασία 2-8°C, και το carrier RNA διαλυμένο σε διάλυμα AVE που απαιτεί θερμοκρασία -15°C ως -30°C. Επιπλέον, στους 2-8°C διατηρούνται οι ειδικές στήλες έκλουσης και τα σωληνάρια συλλογής που περιλαμβάνονται στο kit. Στη συσκευασία περιέχονται τα εξής αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά:

- Πρωτεΐνωση K
- Διάλυμα ACL
- Διάλυμα ACB
- Διάλυμα έκπλυσης ACW1
- Διάλυμα έκπλυσης ACW2
- Διάλυμα έκπλυσης AVE
- Carrier RNA (λυοφιλοποιημένο)
- Tube extenders (20 mL)
- Στήλες έκλουσης
- Σωληνάρια συλλογής των 2 mL
- Σωληνάρια έκλουσης των 1,5 mL
- VacConnectors

Τα αντιδραστήρια που απαιτούν προετοιμασία, κάθε φορά μόλις ανοιχτεί η συσκευασία του kit, είναι τα διαλύματα έκπλυσης ACW1 και ACW2 όπου προστίθενται 25 mL και 30 mL αιθανόλη (96-100%), αντίστοιχα. Μετά την προσθήκη της αιθανόλης αναμειγνύεται καλά το κάθε διάλυμα. Επιπλέον, απαιτείται η προσθήκη 200 mL ισοπροπανόλης (100%) στο διάλυμα σύνδεσης ACB, με ακόλουθη καλή ανάμιξη.

Για την παρασκευή του διαλύματος carrier RNA σε διάλυμα AVE, προστίθενται στο σωληνάριο που ήδη περιέχει το λυοφιλοποιημένο carrier RNA (310 µg), 1550 µL διάλυμα AVE, ώστε να προκύψει διάλυμα με τελική συγκέντρωση 0,2 µg/µL. Ακολουθεί πολύ ισχυρή ανάμιξη, και



διαίρεση του τελικού διαλύματος σε κατάλληλες ποσότητες (aliquots), ώστε να μην ξεπαγώσουν περισσότερες από τρεις φορές. Οι ποσότητες φυλάσσονται σε θερμοκρασία  $-15^{\circ}\text{C}$  ως  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου:

1. Τα δείγματα πλάσματος των 2 mL, που είναι αποθηκευμένα στους  $-70^{\circ}\text{C}$ , ξεπαγώνουν ώστε να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Φυγοκέντρωση στα 2000 g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Απομάκρυνση υπερκείμενου και μεταφορά των δειγμάτων πλάσματος σε νέα σωληνάκια των 2 mL.
4. Αν κάποιο δείγμα περιέχει ποσότητα πλάσματος  $<2$  mL, προστίθεται διάλυμα phosphate-buffered saline (PBS), ως τα 2 mL.
5. Θερμαίνεται το υδρόλουτρο στους  $60^{\circ}\text{C}$  και το thermoblock στους  $56^{\circ}\text{C}$ .
6. Παρασκευάζεται το διάλυμα ACL (διάλυμα λύσης), σε carrier RNA/διάλυμα AVE, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν. Οι ποσότητες αναφέρονται παρακάτω (μέχρι και 10 δείγματα ταυτόχρονα, ωστόσο είναι εφικτή η απομόνωση DNA και από 24 δείγματα τη φορά):

<b>Αριθμός δειγμάτων</b>	<b>Διάλυμα ACL (mL)</b>	<b>Carrier RNA σε διάλυμα AVE (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
1	1,8	5,6
2	3,5	11,3
3	5,3	16,9
4	7,0	22,5
5	8,8	28,1
6	10,6	33,8
7	12,3	39,4
8	14,1	45,0
9	15,8	50,6
10	17,6	56,3

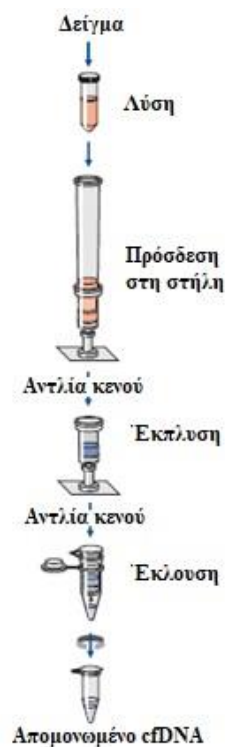
Ακολουθεί ήπια ανάδευση του διαλύματος, με 10 φορές αναστροφή του σωληναρίου που το περιέχει, και όχι έντονη ανάδευση, για να μην αφρίσει το διάλυμα.

#### **4.3.3 Πειραματική πορεία**

1. Προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  πρωτεϊνάσης K σε κάθε falcon.
2. Προστίθενται τα 2 mL πλάσματος σε κάθε falcon.

3. Προστίθενται 1,6 mL διαλύματος ACL, σε carrier RNA/διάλυμα AVE, σε κάθε falcon. Η ποσότητα αυτή περιέχει 1,0 µg carrier RNA. Ακολουθεί πολύ ισχυρή ανάδευση για 30 s.
4. Κατευθείαν τοποθετούνται τα falcon στο υδρόλουτρο, όπου παραμένουν για επώαση 30 min στους 60°C.
5. Προστίθενται 3,6 mL διαλύματος ACB. Ακολουθεί πολύ ισχυρή ανάδευση για 30 s.
6. Τα falcon τοποθετούνται σε παγόλουτρο για 5 min.
7. Προετοιμασία της αντλίας: τοποθετούνται ισάριθμα με τα δείγματα VacConnectors, στο QIAvac 24 plus. Στα VacConnectors εισάγονται οι στήλες έκλουσης και σε αυτές τα tube extenders.
8. Μεταφέρεται το περιεχόμενο των falcon στα αντίστοιχα tube extenders. Ανοίγει η αντλία και κλείνει μόλις όλο το περιεχόμενο περάσει από τις στήλες. Η πίεση απελευθερώνεται στα 0 mbar και απορρίπτονται τα tube extenders.
9. Προστίθενται 600 µL διαλύματος έκπλυσης ACW1 στις στήλες. Ανοίγει η αντλία και κλείνει μόλις όλο το περιεχόμενο περάσει από τις στήλες. Η πίεση απελευθερώνεται στα 0 mbar.
10. Προστίθενται 750 µL διαλύματος έκπλυσης ACW2 στις στήλες. Ανοίγει η αντλία και κλείνει μόλις όλο το περιεχόμενο περάσει από τις στήλες. Η πίεση απελευθερώνεται στα 0 mbar.
11. Προστίθενται 750 µL αιθανόλης (96-100%) στις στήλες. Ανοίγει η αντλία και κλείνει μόλις όλο το περιεχόμενο περάσει από τις στήλες. Η πίεση απελευθερώνεται στα 0 mbar.
12. Τοποθετούνται οι στήλες σε σωληνάρια συλλογής των 2 mL και απορρίπτονται τα VacConnectors.
13. Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 3 min, ώστε να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη της στήλης. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής των 2 mL. Τοποθετούνται οι στήλες σε νέα σωληνάρια συλλογής των 2 mL.
14. Επώαση στο thermoblock στους 56°C για 10 min, ώστε να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη της στήλης.
15. Απορρίπτονται τα σωληνάρια συλλογής των 2 mL. Οι στήλες τοποθετούνται σε σωληνάρια έκλουσης των 1,5 mL.
16. Προστίθενται 30 µL διαλύματος έκλουσης AVE στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης.
17. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min και φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 min, οπότε εκλύεται το cfDNA.

Τα δείγματα cfDNA φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



Σχήμα 4.2: Απεικόνιση του πρωτοκόλλου απομόνωσης cfDNA από δείγματα πλάσματος

#### 4.4 Φωτομετρικός προσδιορισμός του DNA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητάς του, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του οργάνου Nanodrop-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). Πρόκειται για ένα φασματοφωτόμετρο με ευρύ φάσμα μέτρησης της απορρόφησης (220-750 nm), που απαιτεί 1  $\mu$ L δείγματος για να μετρήσει με υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Είναι ειδικό για μέτρηση DNA και RNA χωρίς την ανάγκη αραιώσης των δειγμάτων, ακόμη και όταν οι συγκεντρώσεις τους είναι υψηλές (50 X μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι ένα κλασικό φασματοφωτόμετρο). Δε χρειάζεται κυψελίδες, αφού το δείγμα συγκρατείται στη θέση μέτρησης μεταξύ των άκρων δύο οπτικών ινών μέσω επιφανειακής τάσης. Η μέτρηση διαρκεί 10 s, το δείγμα μπορεί να επανακτηθεί, ενώ είναι γρήγορος και εύκολος ο καθαρισμός του οργάνου μεταξύ των μετρήσεων.

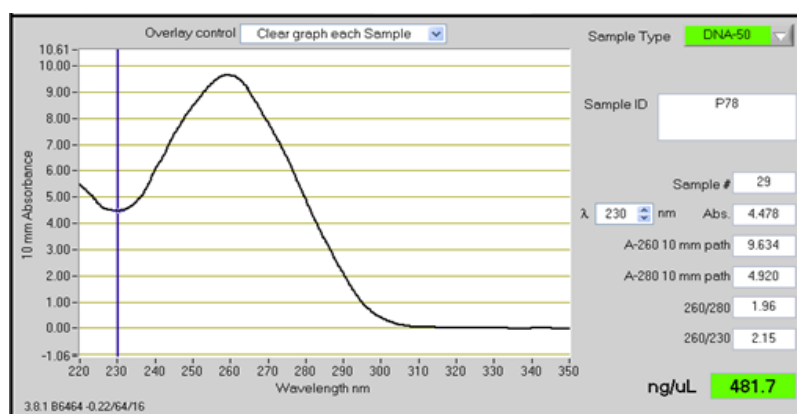


Σχήμα 4.3: Φασματοφωτόμετρο Nanodrop-1000

Η εκτίμηση της καθαρότητας του DNA γίνεται κυρίως με τη μέτρηση του λόγου των απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260 nm (όπου απορροφά το DNA) και στα 280 nm. Ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$  θα πρέπει να έχει τιμή 1,8-2,0 οπότε το δείγμα γίνεται αποδεκτό. Αν η αναλογία είναι μικρότερη, υποδεικνύεται πιθανή παρουσία πρωτεϊνών ή άλλων ουσιών που απορροφούν ισχυρά στα 280 nm. Δευτερευόντως για την εκτίμηση της καθαρότητας, υπολογίζεται και ο λόγος  $A_{260}/A_{230}$ , που πρέπει να έχει τιμή 2,0-2,2. Αν η αναλογία είναι μικρότερη, υποδεικνύεται πιθανή παρουσία φαινολών ή άλλων ουσιών που απορροφούν ισχυρά στα 230 nm. Το όριο ανίχνευσης του οργάνου, είναι 2 ng/μL.

#### 4.4.1 Πειραματική πορεία

Τοποθετείται 1 μL δείγματος στην κατάλληλη θέση του οργάνου. Λόγω της επιφανειακής τάσης που αναπτύσσεται μεταξύ της ειδικής θέσης και του βραχίονα του οργάνου, το δείγμα παραμένει στη θέση. Ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης και η ποσοτικοποίηση του δείγματος. Στη συνέχεια η θέση καθαρίζεται με απιονισμένο νερό και το όργανο είναι έτοιμο για την επόμενη μέτρηση. Ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα 4.4: Τυπικό καταγράφημα φάσματος απορρόφησης DNA

### 4.5 Χημική μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (DNA conversion)

#### 4.5.1 Αρχή μεθόδου

Η κατεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (DNA conversion) μετατρέπει όλες τις μη μεθυλωμένες κυτοσίνες σε ουρακίλες, με υδρολυτική απαμίνωση. Οι μεθυλωμένες κυτοσίνες παραμένουν ως έχουν, χωρίς να επηρεάζονται καθόλου από τη διαδικασία. Μετά τη χημική αυτή μετατροπή το DNA παύει να είναι δίκλωνο, γίνεται μονόκλωνο, με τους δύο κλώνους να μην είναι πλέον συμπληρωματικοί. Το τροποποιημένο DNA είναι πολύ πιο ευαίσθητο και ευπαθές σε σχέση με το μη τροποποιημένο, συνεπώς απαιτεί παραμονή σε εξαιρετικά χαμηλή θερμοκρασία (-70°C), μέχρι τη χρήση του.

Η τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο πραγματοποιήθηκε με το EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research Corp., USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλη η πειραματική πορεία εφαρμόστηκε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την προετοιμασία της αντίδρασης και για τα ακόλουθα στάδια της μεθόδου, προς αποφυγή επιμολύνσεων. Το αρνητικό δείγμα ελέγχου κάθε φορά ήταν το καθαρό νερό (H<sub>2</sub>O). Με τη χρήση του γίνεται ο έλεγχος της καθαρότητας των αντιδραστηρίων. Ως θετικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές IGROV1, OVCAR29, OAW42, καθώς και τα ακόλουθα 100% και 0% μεθυλιωμένα δείγματα ελέγχου:

- 100% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου: Methylated Human DNA Standard (Zymo Research Corp., USA)
- 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου: Πλακουντιακό (Placental) DNA (Sigma-Aldrich)

#### 4.5.2 Αντιδραστήρια και υλικά

Όλα τα απαιτούμενα αντιδραστήρια διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Περιλαμβάνονται στη συσκευασία του kit, μαζί με κάποια απαραίτητα αναλώσιμα υλικά. Πρόκειται για τα εξής:

- Αντιδραστήριο μετατροπής CT
- Διάλυμα desulphonation
- Διάλυμα αραίωσης
- Διάλυμα έκλουσης
- Διάλυμα διαλυτοποίησης
- Στήλες Zymo-Spin™ IC
- Διάλυμα σύνδεσης
- Σωληνάρια συλλογής
- Διάλυμα έκπλυσης

#### 4.5.3 Πειραματική πορεία

Αμέσως πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου είναι απαραίτητη η προετοιμασία του αντιδραστηρίου μετατροπής CT. Το αντιδραστήριο αυτό είναι φωτοευαίσθητο, οπότε λαμβάνονται οι απαιτούμενες προφυλάξεις. Στο σκουρόχρωμο σωληνάριο του αντιδραστηρίου προστίθενται 900 μL ύδατος, 300 μL διαλύματος αραίωσης και 50 μL διαλύματος διαλυτοποίησης. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το πειραματικό πρωτόκολλο είναι το παρακάτω:

1. Προστίθενται 130 μL αντιδραστηρίου μετατροπής CT και 20 μL δείγματος DNA σε κάθε σωληνάριο. Αν ο όγκος του δείγματος DNA είναι μικρότερος, η διαφορά καλύπτεται με H<sub>2</sub>O, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 150 μL. Αναμιγνύεται καλά το περιεχόμενο του σωληναρίου.

2. Όλα τα σωληνάρια τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή (Mastercycler<sup>®</sup> epgradient, Eppendorf, Germany). Το πρόγραμμα που ακολουθείται περιλαμβάνει τρία βήματα:
- 98°C για 10 min
  - 64°C για 2,5 h
  - 4°C για αποθήκευση, ως τις 20 h



Σχήμα 4.5: Ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler<sup>®</sup> epgradient

3. Προστίθενται 600  $\mu$ L διαλύματος σύνδεσης σε κάθε στήλη Zymo-Spin<sup>TM</sup> IC, που έχει τοποθετηθεί μέσα σε ένα σωληνάριο συλλογής.
4. Προστίθεται και το δείγμα στη στήλη. Με κλειστό καπάκι γίνεται περιστροφή του σωληναρίου αρκετές φορές, ώστε να αναμιχθεί καλά το περιεχόμενο.
5. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s. Απορρίπτεται το διήθημα.
6. Προστίθενται 100  $\mu$ L διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη.
7. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s.
8. Προστίθενται 200  $\mu$ L διαλύματος desulphonation στην κάθε στήλη.
9. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου (20-30°C) για 15-20 min. Μετά την επώαση, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s.
10. Προστίθενται 200  $\mu$ L διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη.
11. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s.
12. Προστίθενται 200  $\mu$ L διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη.
13. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s.
14. Η κάθε στήλη τοποθετείται μέσα σε νέο σωληνάριο των 1,5 mL. Προστίθενται 10  $\mu$ L διαλύματος έκπλυσης στην κάθε στήλη, πολύ κοντά στην επιφάνειά της.
15. Φυγοκέντρηση στα 10000 g για 30 s, οπότε εκλύεται το converted DNA.

Τα σωληνάρια περιέχουν το DNA που έχει μετατραπεί και φυλάσσονται σε θερμοκρασία -70°C, σε ειδικούς ψυκτικούς θαλάμους.

## 4.6 Αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)

### 4.6.1 Προετοιμασία της αντίδρασης - Οργανολογία

Η προετοιμασία της αντίδρασης πραγματοποιείται σε ξεχωριστό δωμάτιο όπου βρίσκονται ειδικοί θάλαμοι (hood), προς αποφυγή των επιμολύνσεων. Στους θαλάμους αυτούς ακτινοβολούνται με UV ακτινοβολία οι πιπέττες και όλα τα αναλώσιμα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν για την προετοιμασία της αντίδρασης PCR. Επιπλέον για τον έλεγχο της επιμόλυνσης, σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται αρνητικός μάρτυρας ελέγχου, που περιλαμβάνει μόνο ποσότητα από το διάλυμα των αντιδραστηρίων, χωρίς DNA-στόχο. Η προσθήκη του DNA-στόχου δεν πραγματοποιείται στο δωμάτιο προετοιμασίας της PCR, αλλά σε ξεχωριστό χώρο όπου οι πιπέττες και τα αναλώσιμα επίσης ακτινοβολούνται με UV. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται 1  $\mu$ L DNA-στόχου.



**Σχήμα 4.6: Θάλαμος προετοιμασίας των αντιδράσεων PCR**

Όλες οι αντιδράσεις real-time PCR πραγματοποιήθηκαν στα όργανα LightCycler<sup>®</sup> 1.5, LightCycler<sup>®</sup> 2.0 και cobas z480 (Roche Diagnostics). Στα LightCycler<sup>®</sup> 1.5 και 2.0, η κάθε αντίδραση real-time PCR λαμβάνει χώρα σε γυάλινο τριχοειδές κλειστό με πλαστικό πώμα, που είναι τοποθετημένο σε σταθερή θέση στον περιστρεφόμενο δίσκο δειγμάτων. Πριν την τοποθέτηση των τριχοειδών στο δίσκο, προηγείται φυγοκέντρηση διάρκειας λίγων δευτερολέπτων. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο και περιλαμβάνει το κατάλληλο λογισμικό. Στο εσωτερικό των οργάνων υπάρχει η πηγή διέγερσης, μία μπλε δίοδος με μέγιστη εκπομπή στα 470 nm. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται διεγείρει τις φθορίζουσες ουσίες που βρίσκονται εντός των γυάλινων τριχοειδών, εκπέμπεται φθορισμός, που ανακλάται και μετρείται από το φθορισμόμετρο που βρίσκεται μέσα στο όργανο. Στο LightCycler<sup>®</sup> 1.5, η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται σε τρία μήκη κύματος: 530 nm (πράσινο), 645 nm (κίτρινο) και 710 nm (ερυθρό), οπότε στο φθορισμόμετρο υπάρχουν τρία διαφορετικά φίλτρα και τρεις φωτολυχνίες. Στο LightCycler<sup>®</sup> 2.0, η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται σε έξι μήκη κύματος: 530 nm, 555 nm, 610 nm, 645 nm, 670 nm και 710 nm, οπότε στο φθορισμόμετρο υπάρχουν έξι διαφορετικά φίλτρα και έξι φωτολυχνίες. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, η θέρμανση και η ψύξη στο

θερμικό θάλαμο όπου βρίσκεται ο δίσκος με τα τριχοειδή, επιτυγχάνονται με τη βοήθεια ρεύματος αέρα.



**Σχήμα 4.7: Όργανα α) LightCycler® 2.0 και β) LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostics)**

Στο όργανο cobas z480 οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε κατάλληλες πλατφόρμες των 96 θέσεων (plates). Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης είναι και εδώ 10  $\mu$ L, ενώ επίσης πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του plate για λίγα δευτερόλεπτα πριν την τοποθέτησή του στο όργανο. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο και περιλαμβάνει το κατάλληλο λογισμικό (LightCycler® 480). Στο εσωτερικό των οργάνων υπάρχει η πηγή διέγερσης, μία μπλε δίοδος με φάσμα εκπομπής 390-710 nm και φίλτρα εκπομπής σε πέντε μήκη κύματος: 440 nm, 465 nm, 498 nm, 533 nm και 618nm. Η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται σε έξι μήκη κύματος: 488 nm, 510 nm, 580 nm, 610 nm, 640 nm και 660 nm. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, η θέρμανση και η ψύξη επιτυγχάνονται με τη βοήθεια ενός θερμικού κυκλοποιητή με χρήση θερμοηλεκτρικών στοιχείων Peltier, ο οποίος θερμαίνει ομοιόμορφα την πλατφόρμα των 96 θέσεων.



**Σχήμα 4.8: Όργανο Cobas z480 (Roche Diagnostics)**



#### 4.6.2 Έλεγχος ποιότητας του γενωμικού DNA με real-time PCR στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*

Για τον έλεγχο ποιότητας του DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα FFPEs και πλάσματος, πραγματοποιήθηκε real-time PCR στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*. Οι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές προσδένονται αποκλειστικά στο φυσιολογικό αλληλόμορφο του εξωνίου 20 (exon 20 wild type). Ο σχεδιασμός τους είχε επιτευχθεί από την ομάδα μας στο λογισμικό Primer Premier 5.0 (Primer Biosoft International).

Για την παρασκευή του μείγματος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια: GoTaq® Hot Start DNA πολυμεράση 5 U/μL (Promega), άχρωμο ρυθμιστικό διάλυμα 5X (Promega), διάλυμα MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega), μείγμα των τεσσάρων dNTPs 10 mM (Jena Bioscience), διάλυμα BSA (bovine serum albumin) 10 μg/μL (Sigma), καθώς και τα διαλύματα 10 μM των εκκινητών (Integrated DNA Technologies, IDT). Για την ανίχνευση του προϊόντος χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική LC Green® (Biofire Defence LLC, USA).

Πίνακας 4.3: Συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για το exon 20 wt του γονιδίου *PIK3CA*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	2 min		
Αποδιάταξη	94°C	10 s		60
Υβριδισμός	59°C	15 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ανάλυση καμπυλών τήξης (melting)	55°C	20 s		
	95°C	continuous		
	95°C	1 min		
Ψύξη	40°C	30 s		

#### 4.6.3 Έλεγχος ποιότητας του converted DNA με real-time PCR για το γονίδιο αναφοράς *ACTB*

Για την όσο δυνατόν μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας, τα δείγματα, ο θετικός καθώς και ο αρνητικός μάρτυρας του DNA conversion υπόκεινται σε έλεγχο με real-time PCR, ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι, του χημικά τροποποιημένου DNA. Είναι προφανές ότι στα δείγματα και στους θετικούς μάρτυρες επιδιώκαμε την ανίχνευση τροποποιημένου DNA ικανού να ενισχυθεί, ενώ οι αρνητικοί μάρτυρες έπρεπε να δώσουν μηδενικό σήμα. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με εκκινητές που αναγνωρίζουν επιλεγμένη περιοχή ανεξάρτητη της μεθυλίωσης, του γονιδίου αναφοράς *ACTB*. Απαραίτητες ιδιότητές τους είναι ο σχετικά μεγάλος αριθμός βάσεων θυμίνης που έχουν προέλθει από χημικά τροποποιημένες κυτοσίνες, καθώς και

η απουσία CrGs. Για την ανίχνευση του PCR προϊόντος έχει σχεδιασθεί από την ομάδα μας ένας ειδικός ανιχνευτής υδρόλυσης (probe) τύπου TaqMan® (Integrated DNA Technologies, IDT), που προσδένεται αποκλειστικά στο προϊόν, σε μία περιοχή μεταξύ του πρόσθιου και του ανάστροφου εκκινητή. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης τύπου TaqMan® έχει συνδεδεμένη τη φθορίζουσα ουσία φλουορεσκεΐνη (6-FAM<sup>TM</sup>) στο 5' άκρο του, που εκπέμπει φθορισμό σε μήκος κύματος 530 nm. Στο 3' άκρο του έχει συνδεδεμένη μία ουσία αποσβέστη (Black Hole Quencher®, BHQ), που δε φθορίζει και εμποδίζει την εκπομπή φθορισμού της φλουορεσκεΐνης, μέχρι να προσδεθεί ο ανιχνευτής στο PCR προϊόν.

**Πίνακας 4.4: Συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για το γονίδιο ACTB**

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		45
Αποδιάταξη	95°C	10 s		
Υβριδισμός	55°C	20 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ψύξη	40°C	30 s		

#### 4.7 Real-time Methylation Specific PCR (real-time MSP)

##### 4.7.1 Αρχή μεθόδου

Η αρχή μεθόδου της αντίδρασης real-time MSP περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 3.4.2.3. Ο σχεδιασμός των ζευγών εκκινητών για όλα τα πρωτόκολλα real-time MSP που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό Primer Premier 5.0 (Primer Biosoft International). Οι αντιδράσεις real-time MSP πραγματοποιήθηκαν στα όργανα LightCycler® 2.0, LightCycler® 1.5 και cobas z480 (Roche Diagnostics).

Ακολουθούν οι πίνακες με τις συνθήκες των αντιδράσεων real-time MSP, για τις μελέτες μεθυλίωσης των γονιδίων *RASSF1A*, *ESR1*, *NR2F1*, *BRCA1*, *MGMT*, *RASSF10*, *RKIP*, *SOX17* και *CST6*. Η ανίχνευση του μεθυλιωμένου προϊόντος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανιχνευτών υδρόλυσης τύπου TaqMan για τα γονίδια *NR2F1* και *CST6*, ενώ για όλα τα υπόλοιπα χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική LC Green®.

**Πίνακας 4.5: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο RASSF1A**

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		45
Αποδιάταξη	95°C	10 s		
Υβριδισμός	65°C	15 s		

Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ανάλυση καμπυλών τήξης (melting)	55°C	20 s		
	95°C	continuous		
	95°C	1 min		
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.6: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *ESR1*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		45
Υβριδισμός	63°C	20 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ανάλυση καμπυλών τήξης (melting)	55°C	20 s		
	95°C	continuous		
	95°C	1 min		
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.7: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *NR2F1*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		45
Υβριδισμός και επέκταση	62°C	45 s	√	
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.8: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *BRCA1*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		45
Υβριδισμός	65°C	20 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ανάλυση καμπυλών τήξης (melting)	55°C	20 s		
	95°C	continuous		
	95°C	1 min		
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.9: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *MGMT*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		45
Υβριδισμός	63°C	20 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ανάλυση καμπυλών τήξης (melting)	55°C	20 s		
	95°C	continuous		
	95°C	1 min		
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.10: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *RASSF10*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		45
Υβριδισμός	65°C	20 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ανάλυση καμπυλών τήξης (melting)	55°C	20 s		
	95°C	continuous		
	95°C	1 min		
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.11: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *RKIP*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		45
Υβριδισμός	63°C	20 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ανάλυση καμπυλών τήξης (melting)	55°C	20 s		
	95°C	continuous		
	95°C	1 min		
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.12: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *SOX17*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		45
Υβριδισμός	63°C	15 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ανάλυση καμπυλών τήξης (melting)	55°C	20 s		
	95°C	continuous		
	95°C	1 min		
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.13: Συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *CST6*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		45
Υβριδισμός	55°C	20 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ψύξη	40°C	30 s		

#### 4.8 Ανάλυση καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (Methylation-Sensitive High Resolution Melting Analysis, MS-HRMA)

##### 4.8.1 Αρχή μεθόδου

Η αρχή μεθόδου της MS-HRMA περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 3.4.2.4. Όλες οι αντιδράσεις real-time PCR για την ενίσχυση της μεθυλιωμένης και της μη-μεθυλιωμένης αλληλουχίας των γονιδίων *RASSF1A*, *ESR1* και *BRCA1* πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostics). Οι αναλύσεις των καμπύλων τήξεως με υψηλή διακριτική ικανότητα πραγματοποιήθηκαν στο όργανο High Resolution Melter 1 (HR1™) (Idaho Technology) και ακολούθησε η επεξεργασία τους με το κατάλληλο λογισμικό. Στην κατάλληλη υποδοχή του οργάνου, τοποθετείται κάθε φορά ένα γυάλινο τριχοειδές, ακολουθεί η τήξη του προϊόντος με συγκεκριμένο ρυθμό (rate) και η κατασκευή της καμπύλης τήξης. Ακολουθεί η εξαγωγή της καμπύλης της πρώτης παραγώγου του φθορισμού συναρτήσεως της θερμοκρασίας και η κανονικοποίηση της καμπύλης για την εκτίμηση της  $T_m$  του προϊόντος.



Σχήμα 4.9: Όργανο HR1™ (Idaho Technology)

Πίνακας 4.14: Συνθήκες της αντίδρασης MS-HRMA για το γονίδιο *RASSF1A*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		50
Υβριδισμός	63°C	15 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.15: Ανάλυση καμπυλών τήξης MS-HRMA για το γονίδιο *RASSF1A*

Παράμετροι	Συνθήκες
Rate	0,30
Αρχική θερμοκρασία	69°C
Τελική θερμοκρασία	95°C
Target	90%
LED	Auto
Κανονικοποίηση	2X Decrease resolution

Πίνακας 4.16: Συνθήκες της αντίδρασης MS-HRMA για το γονίδιο *ESR1*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		50
Υβριδισμός	61°C	15 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.17: Ανάλυση καμπυλών τήξης MS-HRMA για το γονίδιο *ESR1*

Παράμετροι	Συνθήκες
Rate	0,30
Αρχική θερμοκρασία	69°C
Τελική θερμοκρασία	95°C
Target	90%
LED	Auto
Κανονικοποίηση	2X Decrease resolution

Πίνακας 4.18: Συνθήκες της αντίδρασης MS-HRMA για το γονίδιο *BRCA1*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		
Αποδιάταξη	95°C	10 s		50
Υβριδισμός	63°C	15 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.19: Ανάλυση καμπυλών τήξης MS-HRMA για το γονίδιο *BRCA1*

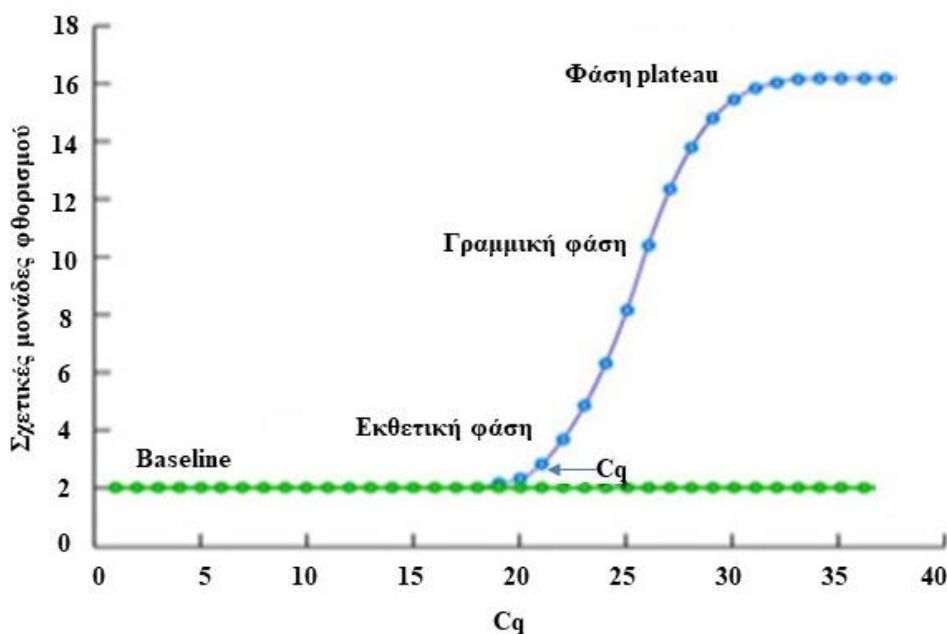
Παράμετροι	Συνθήκες
Rate	0,30
Αρχική θερμοκρασία	69°C
Τελική θερμοκρασία	90°C
Target	90%
LED	Auto
Κανονικοποίηση	2X Decrease resolution

## 4.9 Αντίδραση ποσοτικής PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR)

### 4.9.1 Αρχή μεθόδου

Στην αντίδραση RT-qPCR, ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το cDNA που έχει προκύψει από το RNA ύστερα από την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Το RNA μετατρέπεται σε cDNA, με τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή, ολιγοdT<sub>s</sub> ή ειδικοί εκκινητές συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία στόχο. Το cDNA που σχηματίζεται τελικά,

χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση. Πραγματοποιείται η αντίδραση ποσοτικής PCR και εξάγονται οι τιμές του κύκλου ποσοτικοποίησης (**cycle of quantification, Cq**) για κάθε δείγμα.



Σχήμα 4.10: Ενδεικτικά αποτελέσματα αντίδρασης ποσοτικής PCR

Ακολουθούν οι συνθήκες των αντιδράσεων RT-qPCR για τα γονίδια *B2M* και *PD-L1*. Όλες οι αντιδράσεις RT-qPCR πραγματοποιήθηκαν στο cobas z480 (Roche Diagnostics).

Πίνακας 4.20: Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *B2M*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		45
Αποδιάταξη	95°C	10 s		
Υβριδισμός	58°C	20 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ψύξη	40°C	30 s		

Πίνακας 4.21: Συνθήκες της αντίδρασης RT-qPCR για το γονίδιο *PD-L1*

Πρωτόκολλο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Σήμα φθορισμού	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min		45
Αποδιάταξη	95°C	10 s		
Υβριδισμός	58°C	20 s		
Επέκταση	72°C	20 s	√	
Ψύξη	40°C	30 s		



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *RASSF1A*: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΟΓΚΩΝ, ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΩΝ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ *ctDNA* ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ HGSC

#### 5.1 Εισαγωγή

Το γονίδιο *RASSF1* (Ras association domain family member 1) ανήκει στην Ras-association domain οικογένεια, που αριθμεί δέκα μέλη. Οι *RASSF* πρωτεΐνες συμμετέχουν στη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων και εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, τη μετανάστευση των κυττάρων και την κυτταρική προσκόλληση. Το *RASSF1* γονίδιο εδράζεται στη θέση 3p21.3 και περιέχει 8 εξόνια. Οι δύο υποκινητές του και το εναλλακτικό μάτισμα οδηγούν στη δημιουργία των 8 ισομορφών A-H. Οι ισομορφές *RASSF1A* και *RASSF1C* έχουν μελετηθεί περισσότερο ως τώρα, ειδικότερα η ισομορφή *RASSF1A* που έχει ογκοκατασταλτική δράση (308, 309). Το *RASSF1A* εμπλέκεται σε κύρια μοριακά μονοπάτια που διαταράσσονται στον καρκίνο, όπως τα Ras/PI3K/AKT, Ras/RAF/MEK/ERK, τα μονοπάτια Hippo και το σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης (309, 310). Το γονίδιο *RASSF1A* απενεργοποιείται συχνά με υπερμεθυλίωση του υποκινητή του στην πλειοψηφία των τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, του πνεύμονα, του γαστρεντερικού συστήματος, της ουροδόχου κύστεως, της κεφαλής και τραχήλου, καθώς και των γυναικολογικών κακοηθειών, του καρκίνου του ενδομητρίου και του τραχήλου της μήτρας (310, 311). Η ερευνητική μας ομάδα έχει δείξει την προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου στον πρώιμο καρκίνο του μαστού (312), όπως και την υψηλή συχνότητα της μεθυλίωσης στο *ctDNA* ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του στομάχου (313). Στον καρκίνο των ωοθηκών έχει ταυτοποιηθεί σε πολλές μελέτες η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RASSF1A* (314), χωρίς ωστόσο να έχει αναφερθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την κλινική εξέλιξη της νόσου και την επιβίωση των ασθενών.

**Στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η αξιολόγηση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RASSF1A* σε δείγματα FFPEs πρωτοπαθών όγκων, αντίστοιχων παρακεείμενων μορφολογικά φυσιολογικών ιστών, καθώς και σε αντίστοιχα δείγματα πλάσματος ασθενών με HGSC.** Για την ανίχνευση της μεθυλίωσης σε όλα τα δείγματα, εφαρμόστηκε μία εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη real-time MSP μεθοδολογία. Στα δείγματα FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους και παρακεείμενους ιστούς, εφαρμόστηκε επιπλέον μία μεθοδολογία MS-HRMA για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της μεθυλίωσης και ακολούθησε σύγκριση των δύο μεθοδολογιών. Πρόκειται για την πρώτη

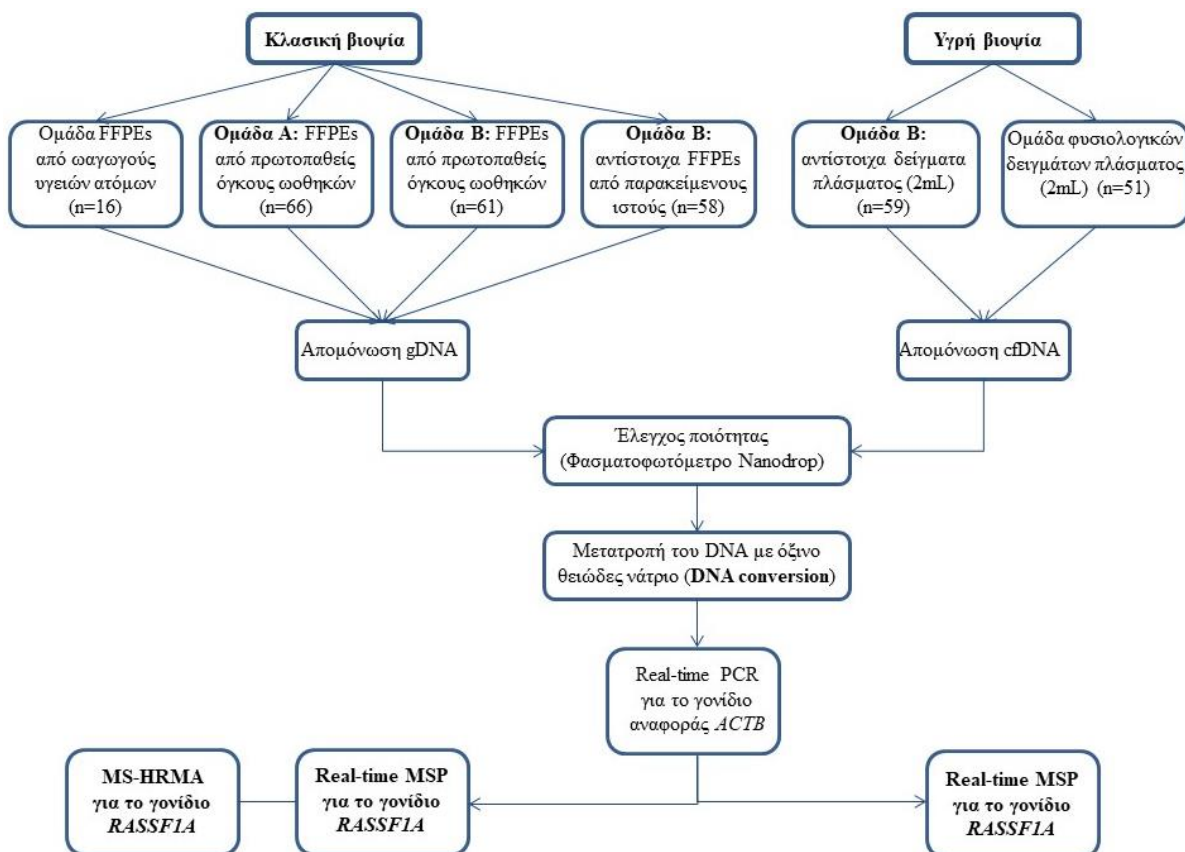
συγκριτική μελέτη εκτίμησης της μεθυλίωσης του *RASSF1A* στον HGSC, βασιζόμενη σε αντίστοιχα δείγματα πρωτοπαθούς όγκου, παρακείμενου ιστού και πλάσματος από τις ίδιες ασθενείς.

## 5.2 Κλινικά δείγματα

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι δύο ομάδες δειγμάτων από ασθενείς με HGSC καρκίνο ωοθηκών: η ομάδα Α, που περιλαμβάνει n=66 δείγματα FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους και η ομάδα Β, που αποτελείται από τρεις υποομάδες δειγμάτων: τα δείγματα FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους (n=61), τα διαθέσιμα αντίστοιχα δείγματα FFPEs από παρακείμενους ιστούς (n=58) και τα διαθέσιμα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος 2mL (n=59). Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας, χρησιμοποιήθηκαν οι δύο ομάδες φυσιολογικών δειγμάτων (υποκεφάλαιο 4.1).

## 5.3 Πειραματική πορεία

Ένα συγκεντρωτικό διάγραμμα της μελέτης παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα 5.1.

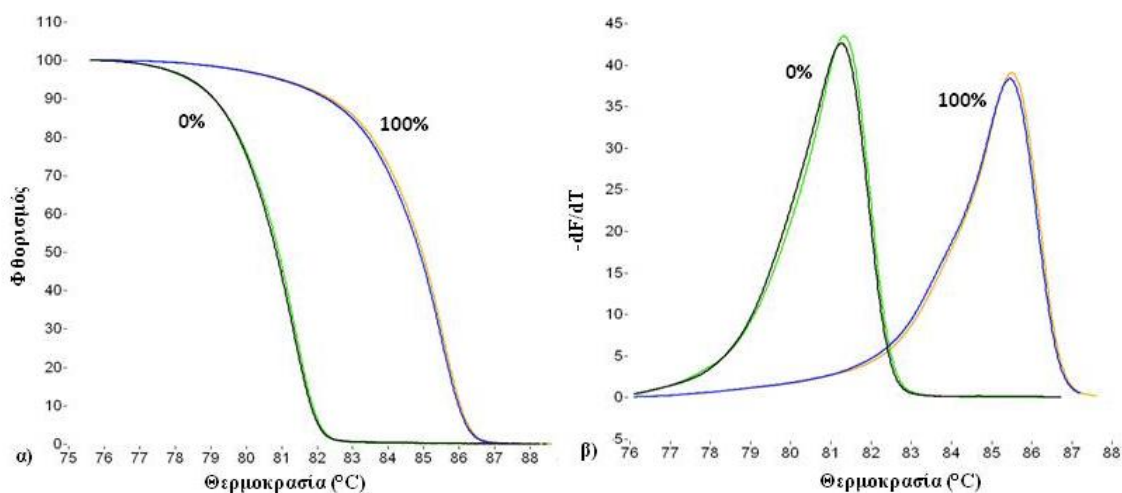


Σχήμα 5.1: Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στον HGSC (149)

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα ιστών FFPEs, η απομόνωση του cfDNA από τα δείγματα πλάσματος, ο έλεγχος ποιότητας με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop, καθώς και η χημική μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (DNA conversion), πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 4.

#### 5.4 Μέθοδοι ανίχνευσης της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A*

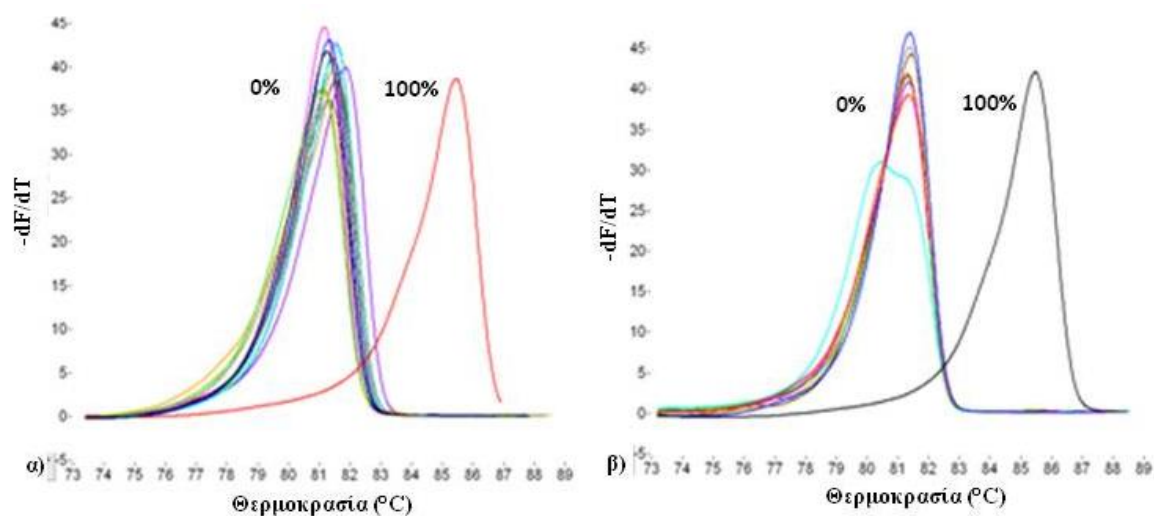
Για τη μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RASSF1A* χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μεθοδολογίες, μία εξαιρετικά ευαίσθητη real-time MSP και μία MS-HRMA μεθοδολογία για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της μεθυλίωσης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time MSP για την αποκλειστική ενίσχυση της μεθυλιωμένης αλληλουχίας του γονιδίου, καθώς και οι ανεξάρτητοι της μεθυλίωσης εκκινητές της MS-HRMA, που ενισχύουν εξίσου τη μεθυλιωμένη και τη μη-μεθυλιωμένη αλληλουχία του γονιδίου, σχεδιάστηκαν βάσει των μελετών των Fackler et al. (315) και Wojdacz et al. (290), αντίστοιχα. Οι συνθήκες των αντιδράσεων real-time MSP και MS-HRMA αναφέρονται λεπτομερώς στους πίνακες 4.5 και 4.14-15. Στην real-time MSP, με την ενίσχυση του γονιδίου-στόχου το δείγμα λαμβάνεται ως θετικό, μεθυλιωμένο στον υποκινητή του γονιδίου *RASSF1A*. Στην MS-HRMA, αρχικά πραγματοποιείται ενίσχυση του χημικά τροποποιημένου DNA του δείγματος, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι της μεθυλίωσης, και ακολουθεί ανάλυση καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας στο προϊόν της αντίδρασης. Οι καμπύλες της πρώτης παραγώγου του φθορισμού συναρτήσεως της θερμοκρασίας για κάθε δείγμα, συγκρίνονται με εκείνες των 0%, 100% και των μεταξύ τους αναμίξεων, ώστε να εκτιμηθεί ημιποσοτικά η μεθυλίωση. Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.2, η θερμοκρασία τήξης του 100% μεθυλιωμένου προϊόντος είναι  $T_m=86^\circ\text{C}$ , ενώ του 0% μεθυλιωμένου  $T_m=81^\circ\text{C}$ .



Σχήμα 5.2: MS-HRMA: α) Κανονικοποιημένες καμπύλες τήξης του 0% και 100% μεθυλιωμένου προϊόντος, β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης του 0% και 100% μεθυλιωμένου προϊόντος (149)

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν το 100% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου και οι καρκινικές κυτταρικές σειρές OVCAR29, IGROV1 και OAW42. Οι τρεις κυτταρικές σειρές βρέθηκαν μεθυλιωμένες και με τις δύο μεθοδολογίες, ενώ με την εφαρμογή της MS-HRMA, οι καμπύλες τήξης τους ταυτίστηκαν με την καμπύλη του 100% μεθυλιωμένου δείγματος ελέγχου. Στη συγκεκριμένη μελέτη δε χρησιμοποιήθηκε το πλακουντιακό DNA ως 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, καθώς είναι γνωστό ότι ανιχνεύεται μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *RASSF1A* (316), γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με τις δύο μεθοδολογίες real-time MSP και MS-HRMA. Συνεπώς, ως 0% μεθυλιωμένα δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά δείγματα FFPEs από ωαγωγούς, εφόσον μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μη-μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου οποιοδήποτε μη-μεθυλιωμένο δείγμα DNA στο γονίδιο-στόχο (289).

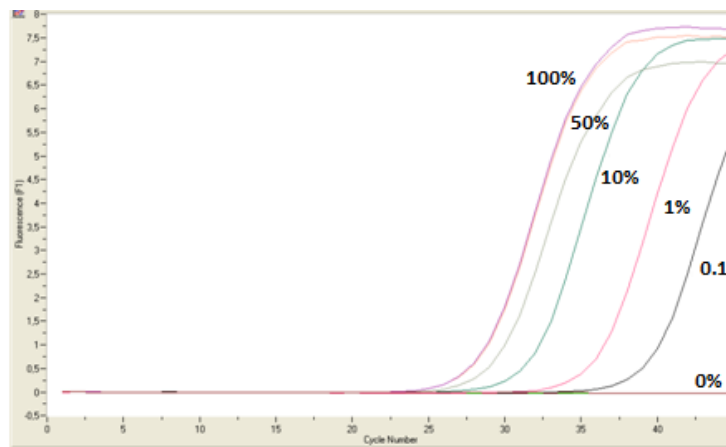
Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας των δύο μεθόδων, χρησιμοποιήθηκαν οι δύο ομάδες φυσιολογικών δειγμάτων ωαγωγών και πλάσματος. Δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* σε κανένα δείγμα, τόσο στην ομάδα φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς (0/16, 0%), όσο και στην ομάδα δειγμάτων πλάσματος από υγιείς δότες (0/51, 0%). Για την MS-HRMA, τα αποτελέσματα της μελέτης αναλυτικής ειδικότητας φαίνονται στο σχήμα 5.3.



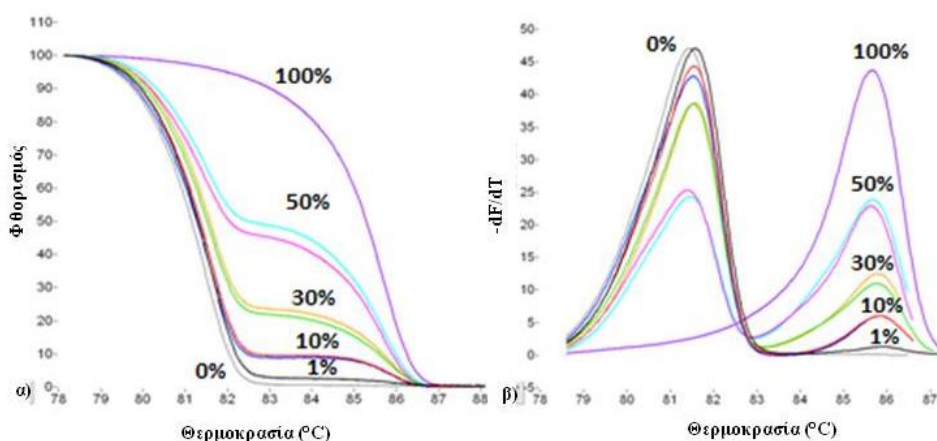
**Σχήμα 5.3: Αναλυτική ειδικότητα της MS-HRMA: α) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης των 16 φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς (0%), β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης φυσιολογικών δειγμάτων πλάσματος (0%) (149)**

Για την παρασκευή των απαραίτητων αναμιξέων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων δειγμάτων ελέγχου, ώστε να εξετασθεί η αναλυτική ευαισθησία των μεθοδολογιών real-time MSP και MS-HRMA, χρησιμοποιήθηκαν η 100% μεθυλιωμένη κυτταρική σειρά OVCAR29 και ένα 0% μεθυλιωμένο δείγμα ιστού. Παρασκευάστηκαν οι αναμιξείς 50%, 30%, 10%, 1% και 0,1%. Από τις μελέτες αναλυτικής ευαισθησίας προέκυψε ότι η real-time MSP μεθοδολογία ανιχνεύει έως και 0,1% μεθυλιωμένες αλληλουχίες παρουσία 99,9% μη μεθυλιωμένων (σχήμα 5.4), ενώ η MS-HRMA έως και 1% μεθυλιωμένες αλληλουχίες παρουσία 99% μη μεθυλιωμένων (σχήμα 5.5).

Στα δείγματα FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους και παρακείμενους ιστούς εφαρμόστηκαν και οι δύο μεθοδολογίες, ενώ στα δείγματα πλάσματος μόνο η real-time MSP, λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας της.



Σχήμα 5.4: Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας της real-time MSP μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλωμένων αλληλουχιών (0,1%, 1%, 10%, 30%, 50%) (149)



Σχήμα 5.5: Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας της MS-HRMA μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλωμένων αλληλουχιών (1%, 10%, 30%, 50%). α) Κανονικοποιημένες καμπύλες τήξης των προϊόντων, β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης (149)

## 5.5 Στατιστική ανάλυση

Για την εκτίμηση της συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθοδολογιών στις ομάδες δειγμάτων FFPEs, καθώς και για τη συσχέτιση της μεθύλωσης μεταξύ των υποομάδων της ομάδας B, υπολογίστηκαν τα Pearson  $\chi^2$  και Cohen's Kappa coefficient. Με P value < 0,05 η συμφωνία κρίθηκε ως στατιστικά σημαντική. Οι τιμές k ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με τις αντίστοιχες οδηγίες. Για την συσχέτιση της μεθύλωσης με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιήθηκαν τα Pearson  $\chi^2$  και Fisher's Exact test. Η ανάλυση Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση της μεθύλωσης με τα OS και PFS. Για τον υπολογισμό του P value εφαρμόστηκε το log-rank test. Επιπλέον, η ανάλυση παλινδρόμησης Cox εφαρμόστηκε

για την εκτίμηση του σχετικού στιγμιαίου κινδύνου (hazard ratio). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS version 25.0 (IBM® SPSS® Statistics).

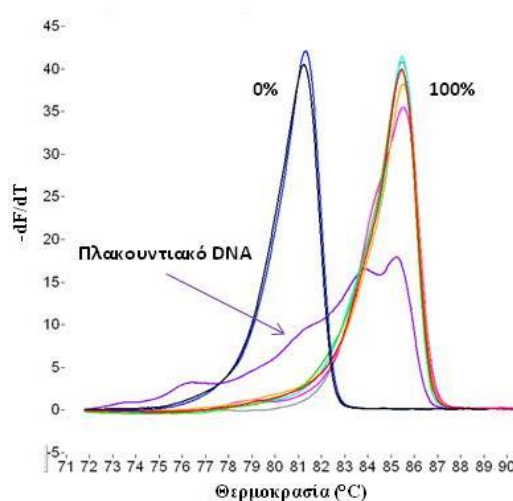
## 5.6 Πειραματικά αποτελέσματα

### 5.6.1 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* με real-time MSP

Αρχικά μελετήθηκε η μεθυλίωση του *RASSF1A* στα δείγματα FFPEs της ομάδας A, όπου ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε 26/66 (39,4%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων. Ακολούθησε η μελέτη της μεθυλίωσης με real-time MSP στις τρεις υποομάδες της ομάδας B. Παρατηρήθηκε μεθυλίωση του *RASSF1A* σε 25/61 (41,0%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων, σε 17/58 (29,3%) δείγματα παρακείμενων ιστών και σε 15/59 (25,4%) δείγματα πλάσματος.

### 5.6.2 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* με MS-HRMA

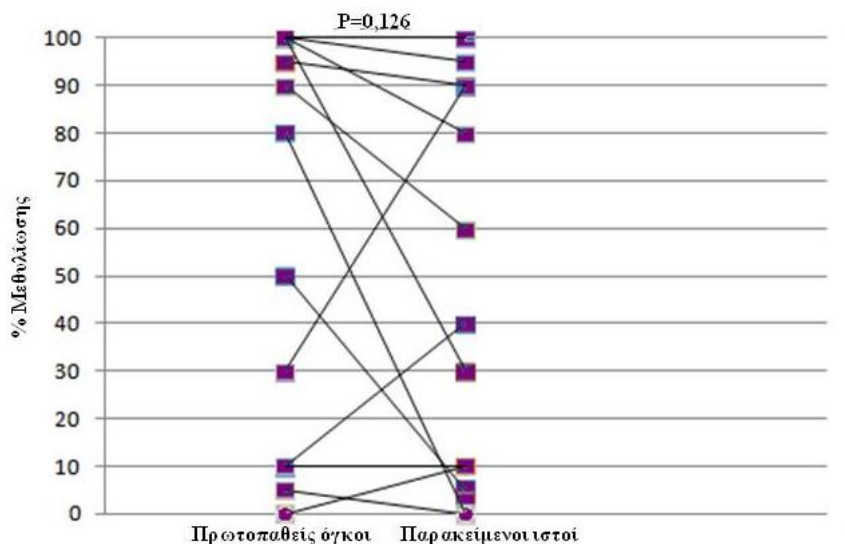
Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε το ποσοστό της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών, με εφαρμογή της ημιποσοτικής MS-HRMA μεθοδολογίας. Στην ομάδα A, η μεθυλίωση του γονιδίου ανιχνεύτηκε σε 26/66 (39,4%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων. Στην ομάδα B, ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε 28/61 (45,9%) δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων και σε 21/58 (36,2%) δειγμάτων παρακείμενων ιστών. Η MS-HRMA μεθοδολογία παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης και εκτίμησης της ετερογενούς μεθυλίωσης, σε αντίθεση με τη real-time MSP. Η πρώτη παράγωγος της καμπύλης τήξης δείγματος με ετερογενή μεθυλίωση έχει εικόνα αντίστοιχη με του σχήματος 5.6, όπου φαίνεται η ετερογενής μεθυλίωση του πλακουντιακού DNA στον υποκινητή του γονιδίου *RASSF1A*.



Σχήμα 5.6: Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης των 0%, 100% δειγμάτων ελέγχου και του πλακουντιακού DNA

Στην ομάδα A, παρατηρήθηκε ετερογενής μεθυλίωση σε 8/66 (12,1%) των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων, ενώ στην ομάδα B ετερογενής μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 7/61 (11,5%) των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων και σε 5/58 (8,6%) των παρακείμενων ιστών.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του ποσοστού μεθυλίωσης μεταξύ των πρωτοπαθών όγκων και των παρακείμενων ιστών της ομάδας B, σε n=51 περιπτώσεις όπου και τα δύο δείγματα ήταν διαθέσιμα. Σύμφωνα με την ημιποσοτική MS-HRMA μεθοδολογία, στις περισσότερες περιπτώσεις θετικών δειγμάτων, το ποσοστό της μεθυλίωσης ήταν χαμηλότερο στους παρακείμενους ιστούς συγκριτικά με τους πρωτοπαθείς όγκους. Ωστόσο, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.7, σε τρεις περιπτώσεις παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό μεθυλίωσης στους παρακείμενους ιστούς. Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών μεθυλίωσης των δύο υποομάδων (P=0,126, Mann-Whitney U test).



Σχήμα 5.7: Σύγκριση των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* σε n=51 ζεύγη δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών της ομάδας B, με εφαρμογή της MS-HRMA μεθοδολογίας (149)

### 5.6.3 Σύγκριση μεταξύ των δύο μεθοδολογιών real-time MSP και MS-HRMA

Ακολούθησε σύγκριση μεταξύ των δύο μεθόδων real-time MSP και MS-HRMA, στα δείγματα όπου εφαρμόστηκαν και οι δύο μεθοδολογίες (FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους και παρακείμενους ιστούς). Στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων και των δύο ομάδων, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του 2-sided Pearson  $\chi^2$  test και των τιμών k, η συμφωνία ήταν σχεδόν τέλεια. Πιο αναλυτικά, στην ομάδα A παρατηρήθηκε συμφωνία σε 62/66 (94%,  $P < 0,001$ ,  $k = 0,873$ ) περιπτώσεις, ενώ στην ομάδα B υπήρξε συμφωνία σε 58/61 (95%,  $P < 0,001$ ,  $k = 0,900$ ) δείγματα πρωτοπαθών όγκων. Στα δείγματα παρακείμενων ιστών, η συμφωνία μεταξύ των μεθόδων ήταν ικανοποιητική (50/58 (86%),  $P < 0,001$ ,  $k = 0,689$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 5.1.

**Πίνακας 5.1: Σύγκριση των μεθόδων real-time MSP και MS-HRMA για τη μεθυλίωση του γονιδίου RASSF1A**

<b>Πρωτοπαθείς όγκοι: μεθυλίωση του γονιδίου RASSF1A (ομάδα A, n=66)</b>			
<b>Real-time MSP</b>	<b>MS-HRMA</b>		
	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο	Σύνολο
Μη μεθυλιωμένο	38	2	40
Μεθυλιωμένο	2	24	26
Σύνολο	40	26	66
Συμφωνία (μεθόδων)	62/66 (94%), <b>P&lt;0,001</b> , Cohen's kappa=0,873		
<b>Πρωτοπαθείς όγκοι: μεθυλίωση του γονιδίου RASSF1A (ομάδα B, n=61)</b>			
<b>Real-time MSP</b>	<b>MS-HRMA</b>		
	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο	Σύνολο
Μη μεθυλιωμένο	33	3	36
Μεθυλιωμένο	0	25	25
Σύνολο	33	28	61
Συμφωνία (μεθόδων)	58/61 (95%), <b>P&lt;0,001</b> , Cohen's kappa=0,900		
<b>Παρακείμενοι ιστοί: μεθυλίωση του γονιδίου RASSF1A (ομάδα B, n=58)</b>			
<b>Real-time MSP</b>	<b>MS-HRMA</b>		
	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο	Σύνολο
Μη μεθυλιωμένο	35	6	41
Μεθυλιωμένο	2	15	17
Σύνολο	37	21	58
Συμφωνία (μεθόδων)	50/58 (86%), <b>P&lt;0,001</b> , Cohen's kappa=0,689		

#### **5.6.4 Σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης του γονιδίου RASSF1A στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και ctDNA**

Ακολούθησε σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης του γονιδίου RASSF1A σε 53 ασθενείς, όπου ήταν διαθέσιμα τα δείγματα FFPEs από τον πρωτοπαθή όγκο και τον παρακείμενο ιστό, καθώς και τα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος (τριπλέτες, n=53). Στον πίνακα 5.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης του προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ των πρωτοπαθών όγκων και των παρακείμενων ιστών, καθώς και μεταξύ των πρωτοπαθών όγκων και των δειγμάτων πλάσματος της ομάδας B. Στις περισσότερες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε συμφωνία μεταξύ των πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και πλάσματος. Σε 45/53 (85%) περιπτώσεις, προέκυψε στατιστικά σημαντική συμφωνία μεταξύ πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών ( $P<0,001$ , 2-sided Pearson  $\chi^2$ ,  $k=0,674$ ). Σύμφωνα με τις οδηγίες ερμηνείας των τιμών  $k$ , η συμφωνία μεταξύ των υποομάδων είναι ικανοποιητική. Επιπλέον, σε 33/53 (62%) παρατηρήθηκε μικρή συμφωνία μεταξύ των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων και των αντίστοιχων δειγμάτων πλάσματος ( $P=0,227$ , 2-sided Pearson  $\chi^2$ ,  $k=0,156$ ).

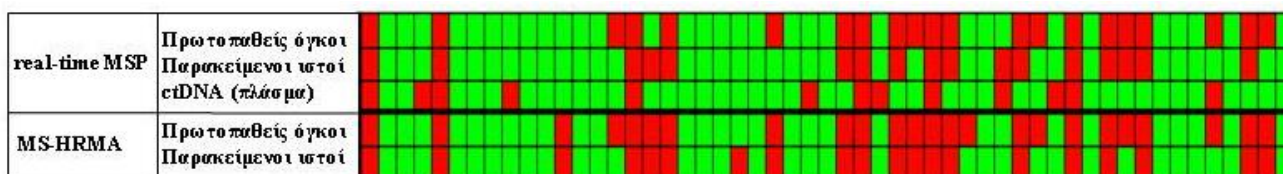


**Πίνακας 5.2: Τα αποτελέσματα της μελέτης μεθυλίωσης του *RASSF1A* στις υποομάδες της ομάδας Β, με την εφαρμογή της real-time MSP**

<b>Πρωτοπαθείς όγκοι vs παρακείμενοι ιστοί: μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (n=53)</b>			
<b>Πρωτοπαθής όγκος</b>	<b>Παρακείμενος ιστός</b>		<b>Σύνολο</b>
	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο	
Μη μεθυλιωμένο	30	2	32
Μεθυλιωμένο	6	15	21
Σύνολο	36	17	53
Συμφωνία	45/53 (85%), <b>P&lt;0,001</b> , k=0,674		
<b>Πρωτοπαθείς όγκοι vs αντίστοιχα δείγματα πλάσματος: μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (n=53)</b>			
<b>Πρωτοπαθής όγκος</b>	<b>Αντίστοιχο πλάσμα</b>		<b>Σύνολο</b>
	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο	
Μη μεθυλιωμένο	26	6	32
Μεθυλιωμένο	14	7	21
Σύνολο	40	13	53
Συμφωνία	33/53 (62%), <b>P=0,227</b> , k=0,156		

Στην ομάδα Β, χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον οι n=53 τριπλέτες για τη σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών, με εφαρμογή της MS-HRMA μεθοδολογίας. Η συμφωνία μεταξύ των δύο υποομάδων ήταν επίσης ικανοποιητική (47/53, 89%,  $P<0,001$ , 2-sided Pearson  $\chi^2$ , k=0,768).

Τα αποτελέσματα της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στις τριπλέτες της ομάδας Β, απεικονίζονται στο ακόλουθο διάγραμμα (σχήμα 5.8), όπου με κόκκινο χρώμα ορίζονται τα θετικά δείγματα (μεθυλιωμένα) και με πράσινο τα αρνητικά (μη-μεθυλιωμένα):



**Σχήμα 5.8: Συγκενρωτικό διάγραμμα των αποτελεσμάτων της μελέτης μεθυλίωσης του *RASSF1A* και με τις δύο μεθόδους, στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και ctDNA της ομάδας Β (n=53) (149)**

Σε έξι ασθενείς ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου στον πρωτοπαθή όγκο και στον παρακείμενο ιστό με τις δύο μεθοδολογίες, καθώς και στο αντίστοιχο ctDNA με την εφαρμογή της real-time MSP. Σε πέντε ασθενείς, ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του *RASSF1A* μόνο στα δείγματα πλάσματος, ενώ τα δείγματα πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών ήταν αρνητικά και με τις δύο μεθοδολογίες.

### 5.6.5 Προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* σε ασθενείς με HGSC

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην εκτίμηση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στις ασθενείς της ομάδας B, όπου ήταν διαθέσιμα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS. Ο συνολικός αριθμός των ασθενών είναι διαφορετικός, διότι σε κάποιες περιπτώσεις τα δεδομένα δεν ήταν διαθέσιμα. Επιπλέον, οι ασθενείς με OS≤4 μήνες και PFS≤6 μήνες εξαιρέθηκαν από τη μελέτη επιβίωσης. Η αρχική μελέτη πραγματοποιήθηκε με τα διαθέσιμα δεδομένα OS και PFS (03/2016), ενώ ακολούθησε και δεύτερη μελέτη επιβίωσης με νεότερα δεδομένα (04/2017). Στην πρώτη μελέτη επιβίωσης, η διάμεση OS ήταν 36 μήνες και η διάμεση PFS 12,5 μήνες, ενώ στη δεύτερη μελέτη επιβίωσης, η διάμεση OS ήταν 43 μήνες (εύρος 5-80 μήνες) και η διάμεση PFS 13 μήνες (εύρος: 0-13 μήνες). Η συσχέτιση του προφίλ μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στους πρωτοπαθείς όγκους με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά παρουσιάζεται στον πίνακα 5.3.

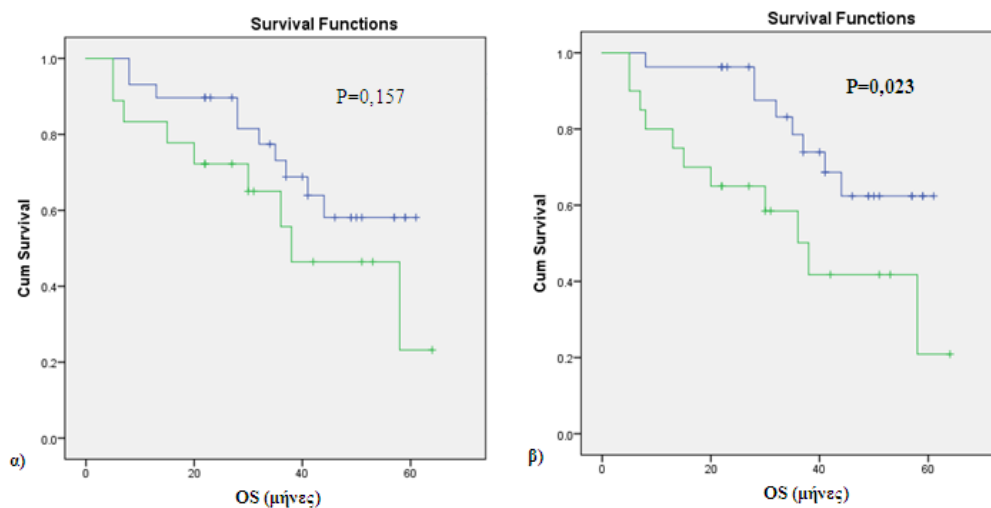
**Πίνακας 5.3:** Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ομάδα B)

Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά	Μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (πρωτοπαθείς όγκοι, n=47)				
		real-time MSP		MS-HRMA	
	n <sup>a</sup>	% μεθυλίωσης	P-value (χ <sup>2</sup> test)	% μεθυλίωσης	P-value (χ <sup>2</sup> test)
<b>Ηλικία</b>					
≥ 64	24	9 (37,5)	0,908	11 (45,8)	0,642
< 64	23	9 (39,1)		9 (39,1)	
<b>Βαθμός κακοήθειας (G)</b>					
G2	20	11 (55,0)	<b>0,043</b>	12 (60,0)	<b>0,037</b>
G3	27	7 (25,9)		8 (29,6)	
<b>Λεμφαδενική διήθηση (pN)</b>					
N0	15	7 (46,7)	0,062 <sup>b</sup>	8 (53,3)	<b>0,040</b>
N1	20	3 (15,0)		4 (20,0)	
<b>Μακρινές μεταστάσεις (M)</b>					
M0	41	16 (39,0)	1	18 (43,9)	1
M1	6	2 (33,3)		2 (33,3)	
<b>Αντίσταση στην πλατίνα</b>					
Θετική	8	2 (25,0)	0,697 <sup>b</sup>	4 (50,0)	0,454 <sup>b</sup>
Αρνητική	34	12 (35,3)		12 (35,3)	
<b>Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)</b>					
Θετική	17	8 (47,1)	0,352	9 (52,9)	0,278
Αρνητική	30	10 (33,3)		11 (36,7)	

<sup>a</sup>: σε περιπτώσεις όπου διαφέρει ο συνολικός αριθμός των ασθενών, λόγω μη διαθέσιμων πληροφοριών για τα κλινικά χαρακτηριστικά, <sup>b</sup>: Fisher's Exact Test

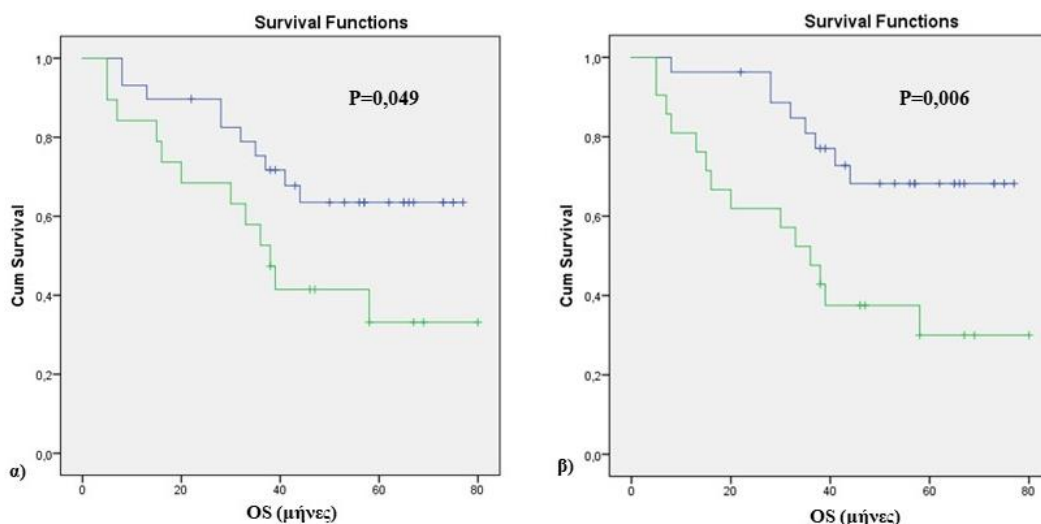
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* και του βαθμού κακοήθειας και με τις δύο μεθοδολογίες (real-time MSP:  $P=0,043$ , MS-HRMA:  $P=0,037$ ), ενώ σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης και του βαθμού λεμφαδενικής διήθησης (pN) παρατηρήθηκε με την εφαρμογή της MS-HRMA ( $P=0,040$ ). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στους παρακείμενους ιστούς και στο αντίστοιχο ctDNA, με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

Ακολούθησε η ανάλυση Kaplan-Meier όπου συσχετίστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* με τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS. Σύμφωνα με την αρχική μελέτη επιβίωσης, στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* συσχετίστηκε σημαντικά με την OS με την εφαρμογή της MS-HRMA ( $P=0,023$ ), όμως δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εφαρμογή της real-time MSP ( $P=0,157$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της OS και της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στους παρακείμενους ιστούς (real-time MSP:  $P=0,615$  και MS-HRMA:  $P=0,227$ ) και στα δείγματα πλάσματος ( $P=0,970$ ), καθώς και μεταξύ του PFS και της μεθυλίωσης του γονιδίου και στις τρεις υποομάδες (πρωτοπαθείς όγκοι: real-time MSP:  $P=0,940$  και MS-HRMA:  $P=0,665$ , παρακείμενοι ιστοί: real-time MSP:  $P=0,377$  και MS-HRMA:  $P=0,867$ , δείγματα πλάσματος:  $P=0,060$ ).



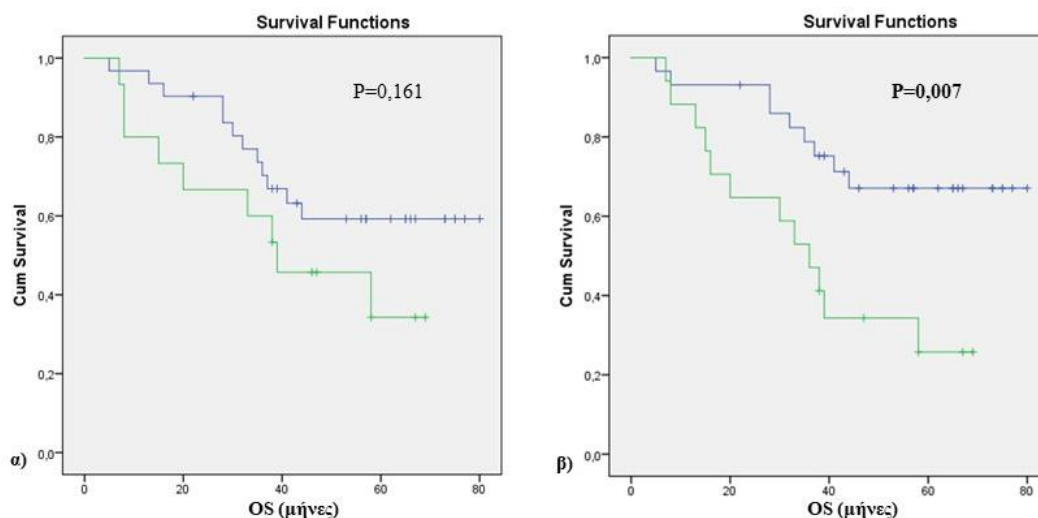
**Σχήμα 5.9:** Εκτίμηση της OS (2016) για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A*, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, με την εφαρμογή των α) real-time MSP και β) MS-HRMA (149)

Στη δεύτερη μελέτη επιβίωσης πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες αναλύσεις Kaplan-Meier με τα νέα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS. Στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων, η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* συσχετίστηκε σημαντικά με την OS με την εφαρμογή και των δύο μεθόδων (real-time MSP:  $P=0,049$  και MS-HRMA:  $P=0,006$ ).



**Σχήμα 5.10:** Εκτίμηση της OS για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A*, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, με την εφαρμογή των α) real-time MSP και β) MS-HRMA

Στα δείγματα παρακείμενων ιστών η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* συσχετίστηκε σημαντικά με την ολική επιβίωση με την εφαρμογή της MS-HRMA ( $P=0,007$ ), όμως δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εφαρμογή της real-time MSP ( $P=0,161$ ).



**Σχήμα 5.11:** Εκτίμηση της OS για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A*, σε δείγματα παρακείμενων ιστών, με την εφαρμογή των α) real-time MSP και β) MS-HRMA

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της OS και της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στα δείγματα πλάσματος ( $P=0,713$ ), καθώς και μεταξύ του PFS και της μεθυλίωσης του γονιδίου και στις τρεις υποομάδες (πρωτοπαθείς όγκοι: real-time MSP:  $P=0,701$  και MS-HRMA:  $P=0,473$ , παρακείμενοι ιστοί: real-time MSP:  $P=0,833$  και MS-HRMA:  $P=0,434$ , δείγματα πλάσματος:  $P=0,476$ ).

Τέλος, εξετάστηκε η συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στους πρωτοπαθείς όγκους με τα δεδομένα OS και PFS, παρουσία των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των

ασθενών της ομάδας Β. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μονοπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox για τη μεθυσίωση του γονιδίου εκτιμημένη και με τις δύο μεθόδους, καθώς και για κάθε κλινικοπαθολογικό χαρακτηριστικό, σε σχέση με τα διαστήματα OS και PFS. Σύμφωνα με την αρχική μελέτη επιβίωσης η μεθυσίωση του γονιδίου με την εφαρμογή της MS-HRMA και η παρουσία αντίστασης στην πλατίνα συσχετίστηκαν σημαντικά με μειωμένη OS (P=0,030 και P=0,019, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα των μονοπαραμετρικών αναλύσεων, όπως και της πολυπαραμετρικής ανάλυσης με παραμέτρους τη μεθυσίωση του γονιδίου και την αντίσταση στην πλατίνα, παρουσιάζονται στον πίνακα 5.4.

**Πίνακας 5.4: Μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox μεταξύ των OS και PFS, της μεθυσίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στους πρωτοπαθείς όγκους και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών (ομάδα Β)**

<b>Μονοπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: OS)</b>				
	<b>P-value</b>	<b>HR (hazard ratio)</b>	<b>95% CI για το HR</b>	
			<b>Κατώτερο</b>	<b>Ανώτερο</b>
<b>Μεθυσίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (real-time MSP)</b>	0,166	1,896	0,767	4,688
<b>Μεθυσίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (MS-HRMA)</b>	<b>0,030</b>	2,761	1,102	6,915
<b>Ηλικία</b>	0,844	0,913	0,370	2,254
<b>Βαθμός κακοήθειας (G)</b>	0,744	0,860	0,348	2,126
<b>Λεμφαδενική διήθηση (pN)</b>	0,432	0,640	0,210	1,948
<b>Μακρινές μεταστάσεις (M)</b>	0,784	1,189	0,345	4,096
<b>Αντίσταση στην πλατίνα</b>	<b>0,019</b>	3,752	1,245	11,306
<b>Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)</b>	0,758	0,859	0,326	2,263
<b>Πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: OS)</b>				
	<b>P-value</b>	<b>HR (hazard ratio)</b>	<b>95% CI για το HR</b>	
			<b>Κατώτερο</b>	<b>Ανώτερο</b>
<b>Μεθυσίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (MS-HRMA)</b>	0,253	1,818	0,653	5,064
<b>Αντίσταση στην πλατίνα</b>	<b>0,024</b>	3,588	1,185	10,863
<b>Μονοπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: PFS)</b>				
	<b>P-value</b>	<b>HR (hazard ratio)</b>	<b>95% CI για το HR</b>	
			<b>Κατώτερο</b>	<b>Ανώτερο</b>

<b>Μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (real-time MSP)</b>	0,943	1,029	0,468	2,264
<b>Μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (MS-HRMA)</b>	0,682	1,179	0,536	2,596
<b>Ηλικία</b>	0,827	1,093	0,494	2,416
<b>Βαθμός κακοήθειας (G)</b>	0,401	1,405	0,636	3,106
<b>Λεμφαδενική διήθηση (pN)</b>	0,599	0,773	0,296	2,018
<b>Μακρινές μεταστάσεις (M)</b>	0,797	0,851	0,249	2,909
<b>Αντίσταση στην πλατίνα</b>	0,403	-	-	-
<b>Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)</b>	0,597	1,244	0,554	2,792

Στην πολυπαραμετρική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή την OS, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης με τη μειωμένη OS, παρουσία της αντίστασης στην πλατίνα ( $P=0,253$ ). Στις μονοπαραμετρικές αναλύσεις με εξαρτημένη μεταβλητή το PFS, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου όπως και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών με το PFS.

Με τα νεότερα δεδομένα επιβίωσης (2017), η μεθυλίωση του γονιδίου με την εφαρμογή της MS-HRMA συσχετίστηκε σημαντικά με μειωμένη OS ( $P=0,009$ ), όμως δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της αντίστασης στην πλατίνα με μειωμένη OS. Στην πολυπαραμετρική ανάλυση, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* με real-time MSP ( $P=0,016$ ) και MS-HRMA ( $P=0,006$ ), της αντίστασης στην πλατίνα ( $P=0,020$ ) και της υπολειπόμενης νόσου ( $P=0,025$ ), με μειωμένη OS. Στις μονοπαραμετρικές αναλύσεις με εξαρτημένη μεταβλητή το PFS, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου με μειωμένο PFS, όμως παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αντίστασης στην πλατίνα και του PFS ( $P=0,001$ ). Στην πολυπαραμετρική ανάλυση, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* με real-time MSP ( $P=0,032$ ) και MS-HRMA ( $P=0,022$ ), της αντίστασης στην πλατίνα ( $P=0,001$ ) και της υπολειπόμενης νόσου ( $P=0,004$ ), με μειωμένο PFS. Τα αποτελέσματα των μονοπαραμετρικών και πολυπαραμετρικών αναλύσεων της μεθυλίωσης με τις δύο μεθοδολογίες παρουσία των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών, με εξαρτημένες μεταβλητές τα διαστήματα OS και PFS, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 5.5.

Πίνακας 5.5: Μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox μεταξύ των OS και PFS, της μεθυσίας του γονιδίου *RASSF1A* στους πρωτοπαθείς όγκους και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών (ομάδα Β)

Μονοπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: OS)				
	P-value	HR (hazard ratio)	95.0% CI για το HR	
			Κατώτερο	Ανώτερο
Μεθυσία του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (real-time MSP)	0,056	0,441	0,190	1,022
Μεθυσία του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (MS-HRMA)	<b>0,009</b>	3,172	1,326	7,585
Ηλικία	0,952	1,026	0,444	2,370
Βαθμός κακοήθειας (G)	0,973	1,015	0,432	2,381
Στάδιο FIGO	0,885	0,898	0,210	3,851
Λεμφαδενική διήθηση (pN)	0,963	0,975	0,338	2,813
Μακρινές μεταστάσεις (M)	0,762	1,207	0,356	4,092
Αντίσταση στην πλατίνα	0,099	2,393	0,849	6,786
Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)	0,805	1,116	0,467	2,667
Πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: OS)				
	P-value	HR (hazard ratio)	95% CI για το HR	
			Κατώτερο	Ανώτερο
Μεθυσία του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (real-time MSP)	<b>0,016</b>	89,344	2,272	3512,926
Μεθυσία του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (MS-HRMA)	<b>0,006</b>	0,008	0,000	0,251
Ηλικία	0,092	3,639	0,808	16,384
Βαθμός κακοήθειας (G)	0,713	0,780	0,207	2,938
Στάδιο FIGO	0,726	1,368	0,237	7,890
Λεμφαδενική διήθηση (pN)	0,952	1,054	0,192	5,788
Αντίσταση στην πλατίνα	<b>0,020</b>	0,139	0,026	0,735
Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)	<b>0,025</b>	16,038	1,406	182,911
Μονοπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: PFS)				
	P-value	HR (hazard ratio)	95% CI για το HR	
			Κατώτερο	Ανώτερο

Μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (real-time MSP)	0,713	0,868	0,409	1,844
Μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (MS-HRMA)	0,492	0,769	0,364	1,626
Ηλικία	0,645	0,839	0,399	1,766
Βαθμός κακοήθειας (G)	0,742	0,882	0,419	1,857
Στάδιο FIGO	0,750	0,720	0,096	5,394
Λεμφαδενική διήθηση (pN)	0,634	1,241	0,510	3,023
Μακρινές μεταστάσεις (M)	0,911	1,071	0,319	3,594
Αντίσταση στην πλατίνα	<b>0,001</b>	0,239	0,099	0,577
Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)	0,783	1,116	0,512	2,431
<b>Πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: PFS)</b>				
	<b>P-value</b>	<b>HR (hazard ratio)</b>	<b>95% CI για το HR</b>	
			<b>Κατώτερο</b>	<b>Ανώτερο</b>
Μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (real-time MSP)	<b>0,032</b>	254,388	1,589	40732,286
Μεθυλίωση του γονιδίου <i>RASSF1A</i> (MS-HRMA)	<b>0,022</b>	0,008	0,000	0,502
Ηλικία	0,125	4,881	0,642	37,085
Βαθμός κακοήθειας (G)	0,375	0,484	0,098	2,405
Στάδιο FIGO	0,457	0,377	0,029	4,920
Λεμφαδενική διήθηση (pN)	0,961	1,039	0,224	4,812
Αντίσταση στην πλατίνα	<b>0,001</b>	0,056	0,010	0,318
Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)	<b>0,004</b>	54,855	3,625	830,053



## 5.7 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RASSF1A* παρατηρείται συχνά στον καρκίνο των ωοθηκών (314). Ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων πριν από περίπου μία δεκαετία (317-319), ενώ εκτός από τους πρωτοπαθείς όγκους των ωοθηκών, η μεθυλίωση του γονιδίου έχει ανιχνευθεί επιπλέον σε καλοήγη κυσταδενώματα, καθώς και σε LMPs (320, 321). Σε αρκετές μελέτες έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών. Στην πρώτη από αυτές δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση της μεθυλίωσης με την κλινική έκβαση των ασθενών, όμως μία πιθανή εξήγηση αποτελεί η συνεκτίμηση των ασθενών με ορώδη καρκίνο ωοθηκών σε μία ομάδα, χωρίς να ληφθεί υπόψιν ο διαχωρισμός βάσει του βαθμού κακοήθειας (HGSC και LGSC) (321). Ωστόσο, είναι πλέον γνωστό ότι οι δύο αυτοί υπότυποι διαφέρουν σημαντικά τόσο στην περιοχή προέλευσής τους, όσο και στο μοριακό τους προφίλ (12). Η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* σε πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με HGSC ανιχνεύτηκε σε υψηλά ποσοστά από τους Montavon et al., όμως ο σχετικά μικρός αριθμός ασθενών με διαθέσιμα δεδομένα επιβίωσης (n=37) είναι μία πιθανή εξήγηση για την απουσία συσχέτισης της μεθυλίωσης με την OS (322). Ωστόσο, σε μία κλινική μελέτη φάσης II διαπιστώθηκε ότι η απομεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με αυξημένο PFS και πιθανή σχέση με την ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία με πλατίνα (307). Σε μία πρόσφατη μελέτη, επιβεβαιώθηκε το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης στους πρωτοπαθείς όγκους με την εφαρμογή bisulfite pyrosequencing, ενώ ενδιαφέρον αποτελεί η υψηλότερη συχνότητα της μεθυλίωσης του γονιδίου σε ασθενείς πρώιμου σταδίου, σε περιπτώσεις μη ορώδους υποτύπου, καθώς και σε ασθενείς με μη υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών (P<0,05) (323).

Στην υγρή βιοψία, η πρώτη μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* πραγματοποιήθηκε σε ctDNA από το πλάσμα, στο αντίστοιχο περιτοναϊκό υγρό και στους πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με καρκίνο ωοθηκών διαφορετικών ιστολογικών υποτύπων (158). Οι Ibanez et al. συμπέραναν ότι η μεθυλίωση του γονιδίου στο ctDNA αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου των ωοθηκών (158). Ακολούθησαν και άλλες μελέτες όπου επιβεβαιώθηκε η ανίχνευση της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* σε δείγματα πλάσματος (153, 155, 156). Σε μία από αυτές, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης σε 20 διαθέσιμα ζεύγη πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχου πλάσματος, και παρατηρήθηκε 100% συμφωνία. Διαπιστώθηκε επιπλέον ότι το προφίλ μεθυλίωσης μπορεί να αλλάξει κατά τη διάρκεια της θεραπείας των ασθενών (155). Σε καμία μελέτη μέχρι σήμερα δεν έχει εξεταστεί η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* σε CTCs ασθενών με καρκίνο ωοθηκών.

Η μεθυλίωση των παρακείμενων ιστών με φυσιολογική μορφολογία αντικατοπτρίζει τη διαδικασία της «καρκινοποίησης» του παρακείμενου καλοήθους επιθηλίου με τη συσσώρευση μοριακών αλλαγών (field effect). Στη περιγραφή field effect εμπίπτουν όλες οι γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες που ανιχνεύονται σε ιστούς με φυσιολογική μορφολογία, παρακείμενους του καρκινικού ιστού (324, 325). Σε δείγματα παρακείμενων ιστών, η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* έχει εξετασθεί σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (326, 327) και του ενδομητρίου (328). Στον καρκίνο του μαστού, σε μία σχετικά πρόσφατη μελέτη διερευνήθηκε το προφίλ μεθυλίωσης του γονιδίου σε μία μικρή ομάδα πρωτοπαθών όγκων και των αντίστοιχων παρακείμενων ιστών, με την εφαρμογή MS-HRMA μεθοδολογίας. Ανιχνεύτηκαν υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης και στις δύο ομάδες δειγμάτων, όμως δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχων παρακείμενων ιστών (326). Σε προηγούμενη μελέτη, είχε ανιχνευθεί μεθυλίωση στους παρακείμενους ιστούς 56 ασθενών, όμως και πάλι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συμφωνία του προφίλ μεθυλίωσης στους πρωτοπαθείς όγκους και στους παρακείμενους ιστούς (327). Στον καρκίνο των ωοθηκών, έχει διεξαχθεί μόνο μία ενδεικτική μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* σε παρακείμενους ιστούς, όμως οι ασθενείς ήταν μόνο τρεις, και τα δείγματα παρακείμενων ιστών βρέθηκαν μη-μεθυλιωμένα (319).

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση και κλινική αξιολόγηση της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και αντίστοιχου πλάσματος ασθενών με HGSC, με την εφαρμογή δύο μεθοδολογιών, real-time MSP και MS-HRMA. Οι δύο μεθοδολογίες παρουσίασαν σχεδόν τέλεια συμφωνία στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων των ομάδων A και B, και ικανοποιητική συμφωνία στα δείγματα παρακείμενων ιστών της ομάδας B. Δύο δείγματα πρωτοπαθών όγκων από την ομάδα A, τρία από την ομάδα B, όπως και 6 δείγματα παρακείμενων ιστών, βρέθηκαν μεθυλιωμένα με την MS-HRMA και μη-μεθυλιωμένα με την real-time MSP (πίνακας 5.1). Οι ασυμφωνίες αυτές οφείλονται πιθανόν στις μικρές διαφορές στις περιοχές που ενισχύουν τα δύο ζεύγη εκκινητών (σχήμα 5.12).

```
CGTTGTTTTGGTTGTTTTTTT CGTTTT CGTAGG CGCGCGGGGTTATTATTTA CGC
GCGTATTGTAGGTTTTTG CGTACGACGTTTTAGATGAAGT CGTTATAGAGGT CGTA
TTACGTGTGCGTGGCGGGTTTT CGCGGGTTGGAAGCGGTGGTTACCGTTAGGGGAT
TAGTTGT CGTGTGGGTTGTGTA CGCGGTGTTT CGCGCGATG CGTAG CGCGTTGGTA
CGTTTTAGT CGGGTGC CGGTTTTTTTTAG CGCGTTTAG CGGGTGTAGTTTTT CGTAG
TTAATGAGTTTAGGTTTTTT CGATATGGTT CGGTTGGGTT CGTGTTT CGTPTGGTTT
```

**Σχήμα 5.12:** Οι αλληλουχίες και οι θέσεις των εκκινητών για τις μεθοδολογίες real-time MSP και MS-HRMA για τη μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A*. Οι MSP εκκινητές παρουσιάζονται με μπλε υπογράμμιση και οι MIP εκκινητές με μαύρα πλαίσια (149)

Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.12, υπάρχει ένα επιπλέον CG στον πρόσθιο MIP εκκινητή. Σε περίπτωση που τα CGs των MSP εκκινητών είναι μη-μεθυλιωμένα, το δείγμα προκύπτει

αρνητικό με την εφαρμογή της real-time MSP. Εάν όμως το επιπλέον CG είναι μεθυλιωμένο, το δείγμα αυτό αναμένεται να προκύψει θετικό με την εφαρμογή της MS-HRMA. Επιπλέον, δύο δείγματα πρωτοπαθών όγκων από την ομάδα Α και δύο δείγματα παρακείμενων ιστών από την ομάδα Β βρέθηκαν μεθυλιωμένα με την real-time MSP, όχι όμως με την MS-HRMA (πίνακας 5.2). Η ασυμφωνίες αυτές οφείλονται πιθανότατα στην υψηλότερη ευαισθησία της real-time MSP μεθοδολογίας, σε σχέση με την MS-HRMA. Στα δείγματα πλάσματος εφαρμόστηκε μόνο η real-time MSP, λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας. Σε έξι δείγματα της ομάδας Β όπου ο πρωτοπαθής όγκος ήταν μη-μεθυλιωμένος, στο αντίστοιχο ctDNA ανιχνεύτηκε μεθυλίωση (πίνακας 5.2). Μία πιθανή εξήγηση αποτελεί η ύπαρξη της ετερογένειας στον καρκινικό ιστό, καθώς είναι πλέον σαφές ότι η κλασική βιοψία αντιπροσωπεύει ένα μικρό μέρος του συνολικού μοριακού προφίλ του όγκου, ενώ το ctDNA εμπεριέχει συνολικά γενετικά και επιγενετικά χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου. Ασφαλώς αυτό το συμπέρασμα δεν μπορεί να εξαχθεί από τη μελέτη μας, διότι απαιτείται η ανάλυση μονήρων κυττάρων του όγκου (single cell analysis).

Στα δείγματα παρακείμενων ιστών της ομάδας Β, η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* ανιχνεύτηκε σε σχετικά υψηλά ποσοστά και με τις δύο μεθόδους (πίνακας 5.1), γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία field effect. Επιπλέον, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.7, σε τρεις ασθενείς το ποσοστό της μεθυλίωσης στον παρακείμενο ιστό υπερβαίνει αυτό του πρωτοπαθούς όγκου, υποδεικνύοντας ισχυρό field effect.

Συμπερασματικά, πρόκειται για την πρώτη συγκριτική μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και αντίστοιχου πλάσματος, από τις ίδιες ασθενείς με HGSC. Στη μελέτη αυτή αναφέρεται για πρώτη φορά η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RASSF1A* σε παρακείμενους μορφολογικά φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με HGSC. Επιπλέον, επισημαίνεται η κλινική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου στους πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με HGSC, καθώς παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης με μειωμένη OS, τόσο με την real-time MSP ( $P=0,049$ ), όσο και με την MS-HRMA ( $P=0,006$ ). Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF1A* στον HGSC, ωστόσο θα πρέπει αυτά να επαληθευθούν με περισσότερες προοπτικές μελέτες. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το δείγμα ιστού από τον πρωτοπαθή όγκο είναι διαθέσιμο μόνο κατά τη διάγνωση, η μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου μπορεί να συνεχιστεί σε δείγματα ctDNA πριν, κατά τη διάρκεια, και μετά το τέλος της θεραπείας, σε περισσότερα δείγματα ασθενών, ώστε να εξεταστεί η πιθανή συμβολή της απενεργοποίησης του γονιδίου στην ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ESR1* ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΝ ctDNA ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ HGSC

#### 6.1 Εισαγωγή

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς (**estrogen receptors, ER**) αποτελούν μέλη μίας υπερικογενείας πυρηνικών υποδοχέων στεροϊδών και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες επαγόμενοι από τη σύνδεση υποδοχέα-συνδέτη. Υπάρχουν δύο ER ισομορφές, με ελαφρώς διαφορετική λειτουργία, η ισομορφή alpha (ERα) και η ισομορφή beta (ERβ), που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *ESR1* και *ESR2*, αντίστοιχα. Σε συγκεκριμένες γυναικολογικές κακοήθειες, όπως στον καρκίνο του μαστού και του ενδομητρίου, έχει διαπιστωθεί ότι η εκτεταμένη έκθεση σε οιστρογόνα και η επακόλουθη ενεργοποίηση της ERα κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των νεοπλασιών (329, 330). Η ισομορφή ERα είναι ο κύριος οιστρογονικός υποδοχέας στον μαζικό αδένα και στη μήτρα. Αντίθετα, στις ωοθήκες επικρατεί η ERβ ισομορφή. Στον ορώδη καρκίνο των ωοθηκών συχνά παρατηρείται υπερέκφραση της ERα, ενώ η έκφραση της ERβ είναι μειωμένη, με τη μείωση αυτή να συσχετίζεται σημαντικά με μεθυλίωση στον υποδοχέα του γονιδίου *ESR2* (329). Σε μία πολύ συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών με υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών, που χαρακτηρίζονται από όγκους ευαίσθητους στα οιστρογόνα, η έκφραση της ισομορφής ERα αποτελεί τον κύριο στόχο της ενδοκρινικής θεραπείας και συσχετίζεται με ευαισθησία στην ενδοκρινική θεραπεία (331). Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της ενδοκρινικής θεραπείας στον καρκίνο των ωοθηκών, έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές μελέτες φάσης II και III, για την εφαρμογή των αντιοιστρογονικών αναστολέων ταμοξιφαίνη και fulvestrant, καθώς και των αναστολέων αρωματάσης letrozole, anastrozole και exemestane. Συνολικά, οι ενδοκρινικές θεραπείες έδειξαν ένα μέτριο ποσοστό ανταπόκρισης της τάξης του 10-15%, σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών. Ωστόσο, δεν έχουν πραγματοποιηθεί τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες κλινικές μελέτες φάσης III της ενδοκρινικής θεραπείας έναντι του εικονικού φαρμάκου (placebo) στην υποτροπιάζουσα νόσο, ούτε για τη συντήρηση ή την μετεγχειρητική θεραπεία. Επιπλέον, παραμένει άγνωστη η επίδραση της ενδοκρινικής θεραπείας στην OS και στο PFS των ασθενών (332).

Σε μία πρόσφατη μελέτη από την ερευνητική μας ομάδα, εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, CTCs και ctDNA ασθενών με καρκίνο του μαστού (333). Στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αντίστροφη

συσχέτιση ( $P < 0,001$ ) μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του ER και της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1*. Τα τελικά αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι η μεθυλίωση του γονιδίου στα CTCs συσχετίστηκε σημαντικά με έλλειψη ανταπόκρισης στην ενδοκρινική θεραπεία με τους αναστολείς αρωματάσης everolimus/exemestane, συνεπώς η μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* μπορεί να αποτελέσει βιοδείκτη υγρής βιοψίας, για την πρόβλεψη ανταπόκρισης στην ενδοκρινική θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (333).

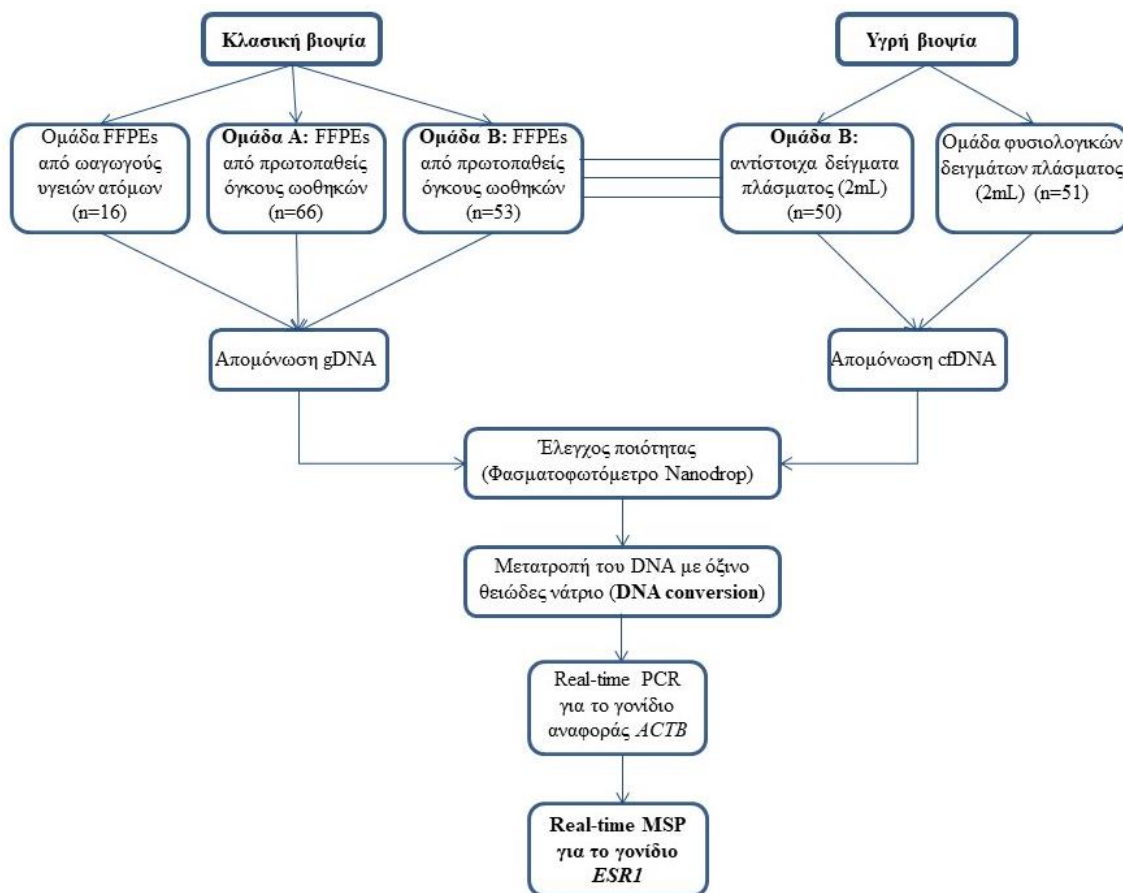
**Στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η εκτίμηση της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* σε δείγματα FFPEs πρωτοπαθών όγκων και σε αντίστοιχα δείγματα πλάσματος ασθενών με HGSC, καθώς και η αξιολόγηση της κλινικής της σημασίας.** Για την ανίχνευση της μεθυλίωσης σε όλα τα δείγματα, εφαρμόστηκε μία εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη real-time MSP μεθοδολογία, που έχει αναπτυχθεί πρόσφατα από την ερευνητική μας ομάδα (333). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ των δειγμάτων FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους και των αντίστοιχων ctDNA. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη μεθυλίωσης του *ESR1* στο ctDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, καθώς και για την πρώτη συγκριτική μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* στον HGSC, βασιζόμενη σε αντίστοιχα δείγματα πρωτοπαθούς όγκου και πλάσματος από τις ίδιες ασθενείς.

## 6.2 Κλινικά δείγματα

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι δύο ομάδες δειγμάτων από ασθενείς με HGSC καρκίνο ωοθηκών: η ομάδα A, που περιλαμβάνει  $n=66$  δείγματα FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους και από την ομάδα B: δείγματα FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους ( $n=53$ ) και τα διαθέσιμα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος 2mL ( $n=50$ ). Χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον οι δύο ομάδες φυσιολογικών δειγμάτων και οι τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών (υποκεφάλαιο 4.1). Στην ομάδα B, όλες οι ασθενείς με μακρινές μεταστάσεις (στάδιο FIGO IV,  $n=8$ , πίνακας 4.1) εξαιρέθηκαν από την μελέτη, καθώς έχουν εκ των πραγμάτων κακή πρόγνωση.

## 6.3 Πειραματική πορεία

Ένα συγκεντρωτικό σχηματικό διάγραμμα της μελέτης παρουσιάζεται στο σχήμα 6.1, όπου φαίνεται η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε. Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 4.6.



**Σχήμα 6.1: Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* στον HGSC (147)**

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα ιστών FFPEs, η απομόνωση του cfDNA από τα δείγματα πλάσματος, ο έλεγχος ποιότητας με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop, καθώς και η χημική μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (DNA conversion), πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 4.

#### 6.4 Στατιστική ανάλυση

Για την συσχέτιση της μεθυλίωσης μεταξύ των δειγμάτων FFPEs πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχων ctDNA της ομάδας Β, υπολογίστηκαν τα Pearson  $\chi^2$  και Cohen's Kappa coefficient. Με P value < 0,05 η συμφωνία κρίθηκε ως στατιστικά σημαντική. Οι τιμές k ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με τις αντίστοιχες οδηγίες. Για την συσχέτιση της μεθυλίωσης με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιήθηκαν τα Pearson  $\chi^2$  και Fisher's Exact test. Η ανάλυση Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση της μεθυλίωσης με τα OS και PFS. Για τον υπολογισμό του P value εφαρμόστηκε το log-rank test. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS version 25.0 (IBM® SPSS® Statistics).

## 6.5 Πειραματικά αποτελέσματα

### 6.5.1 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* στους πρωτοπαθείς όγκους

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* στην ομάδα φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς και στις τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, όπου ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε όλα σχεδόν τα δείγματα ωαγωγών 15/16 (93,8%), αλλά σε καμία από τις κυτταρικές σειρές OVCAR29, IGROV1 και OAW42. Ακολούθησε η εκτίμηση της μεθυλίωσης στις δύο ομάδες δειγμάτων FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους. Στην ομάδα A η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 31/66 (47,0%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων, ενώ στην ομάδα B σε 15/53 (28,3%), σε χαμηλότερο ποσοστό δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων.

### 6.5.2 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* στα αντίστοιχα ctDNA

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* στην ομάδα δειγμάτων πλάσματος υγείων γυναικών, όπου μόνο 1/51 (2,0%) βρέθηκε μεθυλιωμένο. Ακολούθησε η μελέτη της μεθυλίωσης στα αντίστοιχα ctDNA της ομάδας B, όπου η μεθυλίωση του γονιδίου ανιχνεύτηκε σε 19/50 (38,0%) δείγματα πλάσματος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* σε 48 ασθενείς, όπου ήταν διαθέσιμα τα δείγματα FFPEs από τον πρωτοπαθή όγκο και τα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* για 36/48 (75%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχου ctDNA ( $P=0,004$ , 2-sided Fisher's exact test,  $k=0,429$ ). Σύμφωνα με τις οδηγίες ερμηνείας των τιμών  $k$ , η συμφωνία μεταξύ των υποομάδων είναι μέτρια. Η σύγκριση της μεθυλίωσης μεταξύ των δύο υποομάδων παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1: Τα αποτελέσματα της μελέτης μεθυλίωσης του *ESR1* στις υποομάδες της ομάδας B

Πρωτοπαθείς όγκοι vs αντίστοιχα δείγματα πλάσματος: μεθυλίωση του γονιδίου <i>ESR1</i> (n=48)			
Πρωτοπαθής όγκος	Αντίστοιχο πλάσμα		Σύνολο
	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο	
Μη μεθυλιωμένο	27	9	36
Μεθυλιωμένο	3	9	12
Σύνολο	30	18	48
Συμφωνία	36/48 (75%), $P=0,004$ , $k=0,429$		

### 6.5.3 Προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* σε ασθενείς με HGSC

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην εκτίμηση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* σε 42 ασθενείς της ομάδας B, όπου ήταν διαθέσιμα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS (πίνακας 4.1). Οι ασθενείς με OS  $\leq$  4 μήνες και PFS  $\leq$  6 μήνες εξαιρέθηκαν από τη μελέτη επιβίωσης. Χρησιμοποιήθηκαν τα νεότερα δεδομένα OS και PFS (04/2017), με τη διάμεση OS να είναι 41 μήνες και τη διάμεση PFS 13 μήνες. Η συσχέτιση του προφίλ μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* στους πρωτοπαθείς όγκους με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά παρουσιάζεται στον πίνακα 6.2.

**Πίνακας 6.2:** Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ομάδα B)

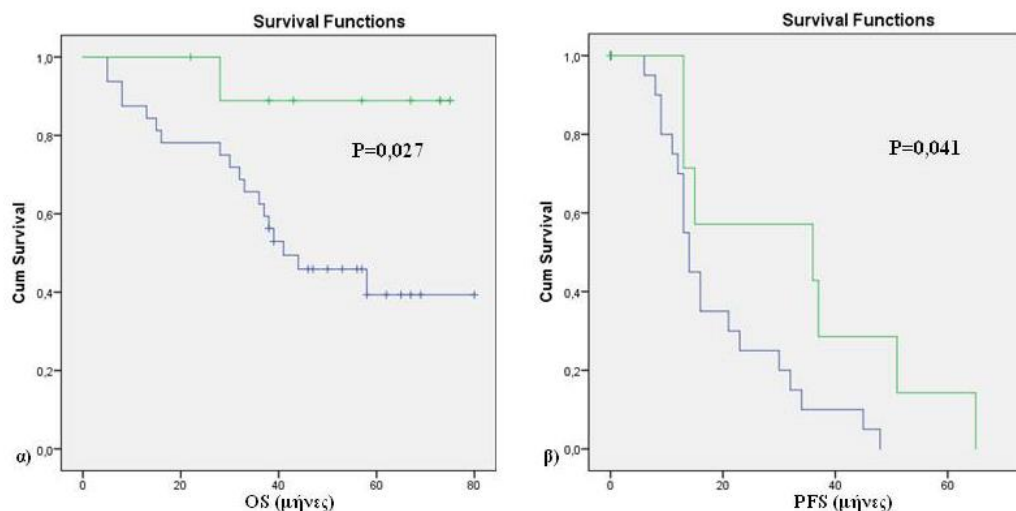
Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά	Μεθυλίωση του γονιδίου <i>ESR1</i> (πρωτοπαθείς όγκοι, n=53)		
	n <sup>a</sup>	% μεθυλίωσης	P-value ( $\chi^2$ test)
<b>Ηλικία</b>			
≥ 64	29	5 (17,2)	<b>0,049</b>
< 64	24	10 (41,7)	
<b>Βαθμός κακοήθειας (G)</b>			
G2	24	7 (29,2)	0,899
G3	29	8 (27,6)	
<b>Στάδιο FIGO</b>			
Πρώιμο (I+II)	7	1 (14,3)	0,658 <sup>b</sup>
Προχωρημένο (III)	46	14 (30,4)	
<b>Λεμφαδενική διήθηση (pN)</b>			
N0	18	3 (16,7)	0,291 <sup>b</sup>
N1	23	8 (34,8)	
<b>Αντίσταση στην πλατίνα</b>			
Θετική	9	2 (22,2)	0,704 <sup>b</sup>
Αρνητική	38	12 (31,6)	
<b>Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)</b>			
Θετική	20	10 (50,0)	<b>0,006</b>
Αρνητική	33	5 (15,2)	

<sup>a</sup>: σε περιπτώσεις όπου διαφέρει ο συνολικός αριθμός των ασθενών, λόγω μη διαθέσιμων πληροφοριών για τα κλινικά χαρακτηριστικά, <sup>b</sup>: Fisher's Exact Test

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* και της ηλικίας (P=0,049), καθώς και της παρουσίας υπολειπόμενης νόσου (P=0,006). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* στο αντίστοιχο ctDNA, με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.



Ακολούθησε η ανάλυση Kaplan-Meier όπου συσχετίστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* με τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS. Στους πρωτοπαθείς όγκους, η παρουσία της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένα διαστήματα OS ( $P=0,027$ ) και PFS ( $P=0,041$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου και των διαστημάτων OS ( $P=0,763$ ) και PFS ( $P=0,897$ ) στα δείγματα πλάσματος.

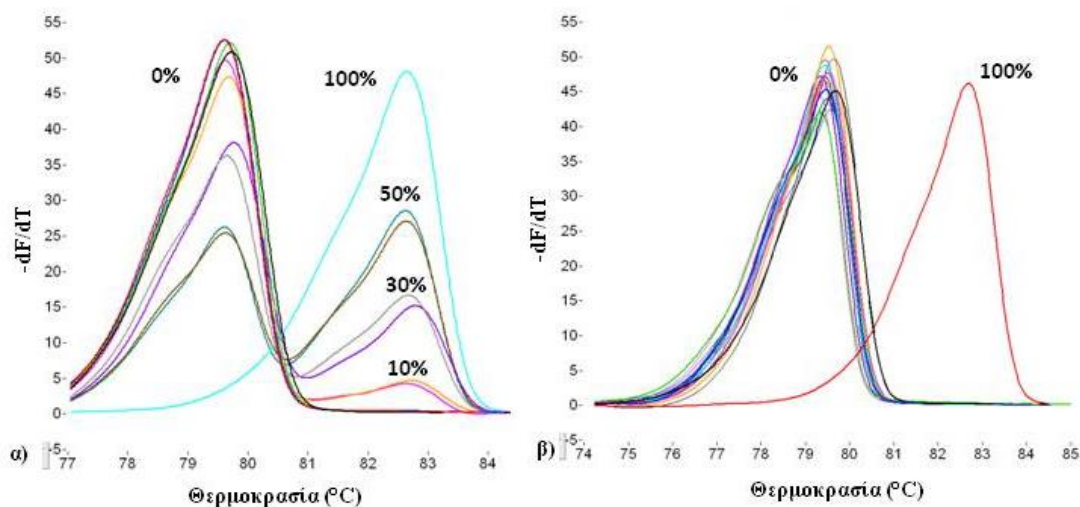


**Σχήμα 6.2:** Εκτίμηση των OS (α) και PFS (β) για τις ασθενείς της ομάδας B με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1*, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων (147)

#### 6.5.4 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* με MS-HRMA

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση μίας μεθοδολογίας MS-HRMA για την ημιποσοτική μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1*. Οι ανεξάρτητοι της μεθυλίωσης εκκινητές της MS-HRMA, που ενισχύουν εξίσου τη μεθυλιωμένη και τη μη-μεθυλιωμένη αλληλουχία του γονιδίου, σχεδιάστηκαν βάσει της μελέτης των Wojdacz et al. (290). Οι συνθήκες της αντίδρασης MS-HRMA αναφέρονται λεπτομερώς στους πίνακες 4.16-17. Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 3.4.2.4, οι καμπύλες της πρώτης παραγώγου του φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας για κάθε δείγμα, συγκρίνονται με εκείνες των 0%, 100% και των μεταξύ τους αναμίξεων, ώστε να εκτιμηθεί ημιποσοτικά η μεθυλίωση. Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.3, η θερμοκρασία τήξης του 100% μεθυλιωμένου προϊόντος είναι  $T_m=82,5^{\circ}\text{C}$ , ενώ του 0% μεθυλιωμένου  $T_m=79,5^{\circ}\text{C}$ . Για την παρασκευή των απαραίτητων αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων δειγμάτων ελέγχου, ώστε να εξετασθεί η αναλυτική ευαισθησία της μεθοδολογίας MS-HRMA, χρησιμοποιήθηκαν το 100% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου και το 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου (πλακουντιακό DNA). Παρασκευάστηκαν οι αναμίξεις 50%, 30%, 10% και 1%. Από τη μελέτη ευαισθησίας προέκυψε ότι η MS-HRMA ανιχνεύει έως και 10% μεθυλιωμένες αλληλουχίες παρουσία 90% μη μεθυλιωμένων (σχήμα 6.3). Η ανάμιξη 1% δεν ανιχνεύτηκε. Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε η ομάδα

φυσιολογικών δειγμάτων FFPEs από ωαγωγούς. Δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* σε κανένα διαθέσιμο δείγμα (0/15, 0%).



**Σχήμα 6.3:** α) Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας και ειδικότητας της MS-HRMA μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών. β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης των 15 φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς (0%).

Η μεθοδολογία εφαρμόστηκε στις τρεις κυτταρικές σειρές OVCAR29, IGROV1 και OAW42, όμως καμία από αυτές δε βρέθηκε μεθυλιωμένη, αποτέλεσμα που συμφωνεί με αυτό της real-time MSP μεθοδολογίας. Στη συνέχεια, η MS-HRMA εφαρμόστηκε σε επιλεγμένα δείγματα πρωτοπαθών όγκων της ομάδας B, θετικά με real-time MSP, όμως δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε κανένα δείγμα. Συνεπώς η μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* με MS-HRMA δε συνεχίστηκε στα υπόλοιπα δείγματα ιστών. Μία πιθανή εξήγηση της ασυμφωνίας αποτελεί το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες μεθοδολογίες real-time MSP και MS-HRMA για το γονίδιο *ESR1* στοχεύουν στη μελέτη μεθυλίωσης διαφορετικών CpGs, που βρίσκονται σε μη αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές.

## 6.6 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί λίγες μελέτες με στόχο την αποσαφήνιση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* στον καρκίνο των ωοθηκών. Στις πρώτες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, συμπεριλαμβανόμενης και της OAW42 (334, 335). Στην μελέτη των O'Doherty et al. η OAW42 βρέθηκε μεθυλιωμένη (335), αντίθετα με τα δικά μας αποτελέσματα. Η ασυμφωνία αυτή μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική θέση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή (335), σε σχέση με τη θέση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη δική μας μελέτη (333). Περίπου δέκα χρόνια πριν, οι Wiley et al. πρώτοι ανίχνευσαν μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* σε ασθενείς με καρκίνο

ωοθηκών διαφορετικής ιστολογίας, καθώς και σε ασθενείς με LMP όγκους ωοθηκών (336). Ακολούθησαν μελέτες μεθυλίωσης σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων διαφορετικής ιστολογίας, με τη συχνότητα ανίχνευσης της μεθυλίωσης να παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των μελετών αυτών (337-340). Οι διαφορές αυτές πιθανόν οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της μεθυλίωσης, καθώς και στον μη διαχωρισμό των ασθενών ανάλογα με την ιστολογικό υπότυπο του καρκίνου ωοθηκών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι δύο υπότυποι του ορώδους καρκίνου ωοθηκών (HGSC, LGSC) διαφέρουν τόσο στην περιοχή προέλευσής τους, όσο και στα μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου (11), συνεπώς είναι ιδιαίτερα σημαντικό να διαχωρίζονται επιπλέον οι ασθενείς με ορώδη υπότυπο. Στα πλαίσια μίας κλινικής μελέτης φάσης III (NCT00003998) εξετάστηκε η μεθυλίωση σε δύο περιοχές του γονιδίου *ESR1* που δεν αποτελούν CpG νησίδες με την εφαρμογή bisulfite pyrosequencing, σε λευκοκύτταρα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών. Για μία υποομάδα ασθενών, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων μεθυλίωσης στη μία περιοχή, με τα επίπεδα του CA-125 (186). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, οι Kirn et al. ανέπτυξαν μία real-time MSP μεθοδολογία για την ανίχνευση της μεθυλίωσης του γονιδίου και παρατήρησαν μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου και της μειωμένης OS των ασθενών με LGSC (341). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης και της OS στην ομάδα των 42 ασθενών με HGSC (341). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δεν συμπίπτουν με της δικής μας, όμως μία πολύ πιθανή εξήγηση μπορεί να αποτελέσει και πάλι η προσπέλαση διαφορετικών CpGs του γονιδίου από τους εκκινητές της μελέτης αυτής σε σχέση με τους δικούς μας (333).

Στον καρκίνο των ωοθηκών δεν αξιολογείται η έκφραση του ER με σκοπό τη λήψη αποφάσεων για τη θεραπεία των ασθενών, ενώ στις προσπάθειες αποσαφήνισης του ρόλου του ER, τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, ο ERα υπότυπος υπερεκφράζεται στον HGSC (342), με την υπερέκφρασή του να συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών (343). Επιπλέον, σε μία μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση του ERα με την επίδραση της ενδοκρινικής θεραπείας και της θεραπείας με πλατίνα, επάγει την ανάπτυξη των κυττάρων και δύναται να οδηγήσει σε αντίσταση στην πλατίνα (344). Σε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση, έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης της προγνωστικής σημασίας της έκφρασης του ER στον EOC (345). Συμπεριλήφθηκαν 35 μελέτες και ως γενικό συμπέρασμα προέκυψε η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του ERα με βελτιωμένη OS των ασθενών. Ωστόσο, ο θετικός ρόλος της έκφρασης του ERα περιορίστηκε σε ασθενείς με μη-ορώδη καρκίνο

ωοθηκών και το γενικό συμπέρασμα της μετα-ανάλυσης δεν επαληθεύτηκε όταν αξιολογήθηκαν αποκλειστικά ασθενείς με ορώδη υπότυπο, και πιο συγκεκριμένα με HGSC (345).

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχου πλάσματος ασθενών με HGSC, με την εφαρμογή μίας εξαιρετικά ειδικής και ευαίσθητης real-time MSP μεθοδολογίας (333). Η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε και στις δύο ομάδες δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων, καθώς και στα αντίστοιχα ctDNA της ομάδας B. Στην ομάδα B, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχου ctDNA. Σε εννέα δείγματα της ομάδας B όπου ο πρωτοπαθής όγκος ήταν μη-μεθυλιωμένος, στο αντίστοιχο ctDNA ανιχνεύτηκε μεθυλίωση (πίνακας 6.1). Μία πιθανή εξήγηση αποτελεί η ύπαρξη της ετερογένειας στον καρκινικό ιστό, καθώς είναι πλέον σαφές ότι η κλασική βιοψία αντιπροσωπεύει ένα μικρό μέρος του συνολικού μοριακού προφίλ του όγκου, ενώ το ctDNA εμπεριέχει συνολικά γενετικά και επιγενετικά χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* ανιχνεύτηκε σε όλα σχεδόν τα δείγματα FFPEs ωαγωγών, ενώ σημαντικά μικρότερα ποσοστά μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν στις δύο ομάδες δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων και μηδενική μεθυλίωση στις τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών. Στην ομάδα B, η παρουσία της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* στους πρωτοπαθείς όγκους συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένα διαστήματα OS και PFS. Σε προηγούμενη μελέτη από την ερευνητική μας ομάδα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του ER και της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1*, σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (333). Συνεπώς, διαπιστώθηκε ο σημαντικός ρόλος των συγκεκριμένων CpGs που εμπεριέχονται στους MSP εκκινητές στη ρύθμιση της έκφρασης του ER, οπότε συμπεραίνεται ότι η μεθυλίωση του γονιδίου εμπλέκεται σημαντικά στη σίγασή του. Η έκφραση του ER φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στην πρόγνωση των ασθενών με HGSC, συνεπώς η σίγαση του γονιδίου μέσω μεθυλίωσης μπορεί να επιδράσει θετικά στην κλινική έκβαση των ασθενών. Ο “προστατευτικός” αυτός ρόλος της μεθυλίωσης θα πρέπει να επαληθευτεί με περισσότερες μελέτες σε ασθενείς με HGSC. Συμπερασματικά, στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε για πρώτη φορά μεθυλίωση του γονιδίου *ESR1* στο ctDNA ασθενών με HGSC, με το προφίλ μεθυλίωσης του ctDNA να συσχετίζεται σημαντικά με αυτό των αντίστοιχων πρωτοπαθών όγκων. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου και της βελτιωμένης κλινικής έκβασης των ασθενών. Ωστόσο, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων μας, καθώς και για τη διερεύνηση μίας πιθανής θετικής επίδρασης της μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1* στην ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *NR2F1*, *BRCA1*, *MGMT*, *RASSF10* ΚΑΙ *RKIP* ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΝ ctDNA ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ HGSC

#### 7.1 Εισαγωγή

Η παρούσα εργασία έχει σκοπό τη μελέτη μεθυλίωσης πέντε γονιδίων, των *NR2F1*, *BRCA1*, *MGMT*, *RASSF10* και *RKIP*.

Το γονίδιο *NR2F1* (nuclear receptor subfamily 2 group F member 1) εμπλέκεται στην έναρξη και διατήρηση της κυτταρικής αδράνειας (dormancy). Συγκεκριμένα συμμετέχει στην p38-ρυθμιζόμενη αδράνεια περιορίζοντας τον επαναπρογραμματισμό των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων μέσω αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης και συσχετίζεται με έναν dormant φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από κατεσταλμένη χρωματίνη (346, 347). Η μεθυλίωση του δεν έχει μελετηθεί έως σήμερα στον καρκίνο των ωοθηκών.

Τα γονίδια *BRCA1* (BRCA1 DNA repair associated) και *MGMT* (O6-methylguanine-DNA methyl-transferase) εμπλέκονται σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Το γονίδιο *BRCA1* αποτελεί το πρώτο γονίδιο που συσχετίστηκε σε μεγάλο βαθμό με την προδιάθεση για κληρονομικό καρκίνο του μαστού και ωοθηκών, εντοπίζεται στη θέση 17q21.31 και διαθέτει υποκινητή διπλής κατεύθυνσης, τον οποίο μοιράζεται με το γειτονικό γονίδιο *NBR2* (348). Εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών στη διπλή έλικα του DNA, μέσω της πορείας του HR (349). Η μεθυλίωση του έχει μελετηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανόμενου και του καρκίνου των ωοθηκών (350), όμως η κλινική σημασία της μεθυλίωσής του στον μη-κληρονομικό καρκίνο ωοθηκών είναι υπό διερεύνηση. Το γονίδιο *MGMT* εντοπίζεται στη θέση 10q26 και έχει ως κύριο ρόλο την προστασία του κυττάρου από τη δράση των αλκυλιωτικών παραγόντων των χημειοθεραπευτικών σχημάτων, μέσω της εξάλειψης της αλκυλίωσης της O6 γουανίνης. Η μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT* έχει διερευνηθεί σε πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, όμως τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει είναι αντικρουόμενα (351).

Η μελέτη μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς αντίστασης στα θεραπευτικά σχήματα μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση και το χαρακτηρισμό νέων προβλεπτικών δεικτών. Στην κατεύθυνση αυτή επιλέχθηκε το γονίδιο *RASSF10* (Ras-association domain family 10), η μεθυλίωση του οποίου δεν έχει μελετηθεί έως σήμερα στον καρκίνο των ωοθηκών. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 5, η οικογένεια των *RASSF* γονιδίων αριθμεί δέκα μέλη, για αρκετά

από τα οποία έχει δειχθεί ότι έχουν ρόλο ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε πολλούς τύπους καρκίνου, με απώλεια της έκφρασής τους ύστερα από μεθυλίωση των υποκινητών τους (309). Η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF10* έχει μελετηθεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου και έχει χαρακτηριστεί δείκτης ανάπτυξης αντίστασης στη θεραπεία με ταξόλη στον καρκίνο του μαστού (352), στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (353) και στον καρκίνο του παχέος εντέρου (354).

Όπως αναφέρθηκε ήδη στο κεφάλαιο 1, η EMT κατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην μεταστατική διαδικασία του καρκίνου των ωθηκών, ενώ η μεθυλίωση των υποκινητών γονιδίων που εμπλέκονται στην EMT, μπορεί να οδηγήσει σε τροποποίηση της ρύθμισης της διαδικασίας (31). Ύστερα από βιβλιογραφική έρευνα στο πεδίο αυτό επιλέχθηκε το γονίδιο *RKIP* (Raf kinase inhibitory protein), η μεθυλίωση του οποίου δεν έχει μελετηθεί έως σήμερα στον καρκίνο των ωθηκών. Το γονίδιο *RKIP* αποτελεί καταστολέα της μετάστασης, που εμπλέκεται στην EMT αλλά και στο Wnt/ $\beta$ -catenin σηματοδοτικό μονοπάτι (355, 356). Η ρύθμιση του είναι σύνθετη, καθώς εκτός από τη μεθυλίωση, ειδικές πρωτεΐνες και miRNAs φαίνεται να εμπλέκονται στη μείωση της έκφρασης του στον καρκίνο. Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί σημαντικά το ενδιαφέρον για την αποσαφήνιση της ρύθμισης της έκφρασης του *RKIP* (357), με τη μεθυλίωση του να έχει μελετηθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου (358), στον καρκίνο του μαστού (359, 360), στο πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου (361, 362) και στον καρκίνο του στομάχου (363).

Η μεθυλίωση των γονιδίων *NR2F1*, *BRCA1*, *MGMT*, *RASSF10* και *RKIP* εξετάστηκε σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων ασθενών με HGSC, με την εφαρμογή εξαιρετικά ειδικών και ευαίσθητων real-time MSP μεθοδολογιών. Ειδικά για το γονίδιο *BRCA1*, η μεθυλίωση εξετάστηκε και με μία MS-HRMA μεθοδολογία. Για τα γονίδια *NR2F1* και *BRCA1*, ακολούθησε μελέτη μεθυλίωσης στα αντίστοιχα ctDNA των ασθενών. Επιπλέον, ολοκληρώθηκε η μελέτη μεθυλίωσης των γονιδίων *SOX17* (SRY-box transcription factor 17) και *CST6* (cystatin E/M), που είχε ξεκινήσει με τη διπλωματική μου εργασία. Το *SOX17* έχει ρόλο ογκοκατασταλτικού γονιδίου και αποτελεί αναστολέα του Wnt/ $\beta$ -catenin σηματοδοτικού μονοπατιού (364), ενώ το γονίδιο *CST6* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που δρα ως αναστολέας πρωτεασών κυστεΐνης (365).

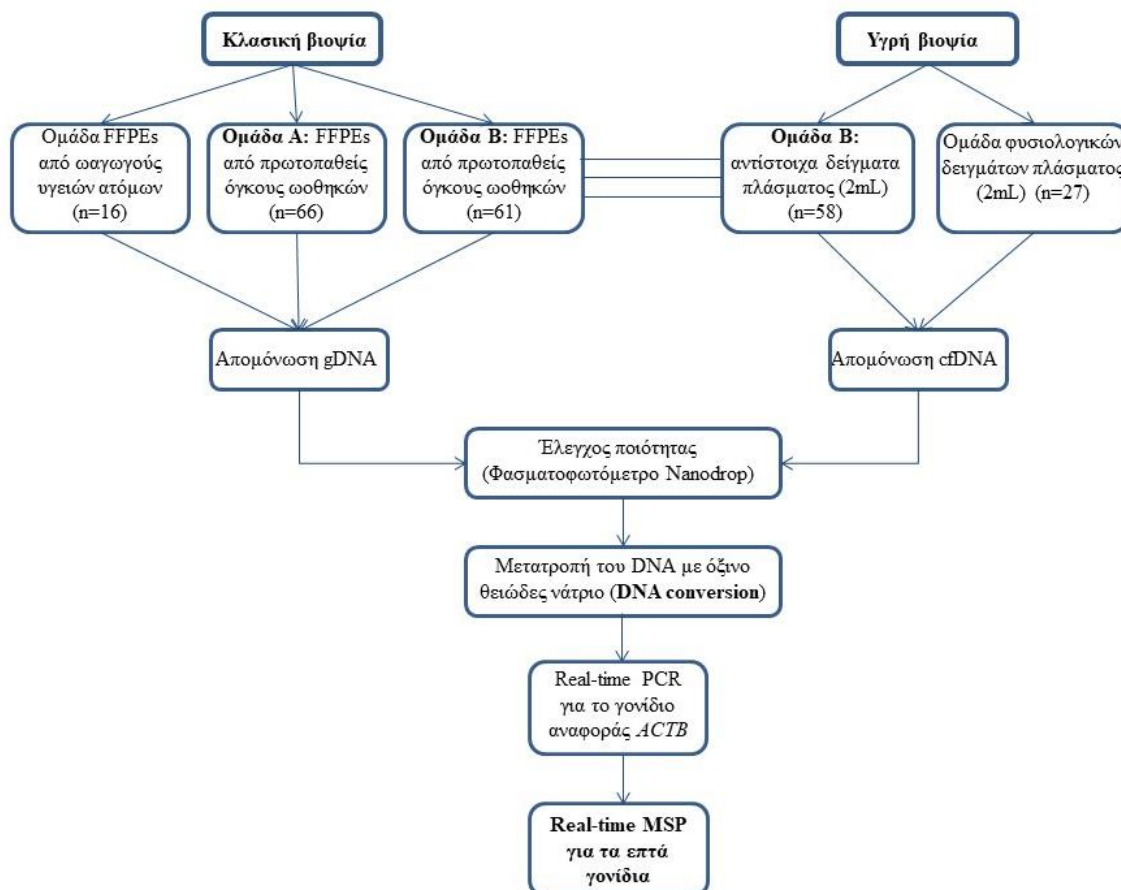
## 7.2 Κλινικά δείγματα

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι δύο ομάδες δειγμάτων από ασθενείς με HGSC καρκίνο ωθηκών: η ομάδα A, που περιλαμβάνει n=66 δείγματα FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους και από την ομάδα B: δείγματα FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους (n=61) και τα διαθέσιμα αντίστοιχα

δείγματα πλάσματος. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τις δύο ομάδες των φυσιολογικών δειγμάτων και οι τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών (υποκεφάλαιο 4.1).

### 7.3 Πειραματική πορεία

Ένα συγκεντρωτικό σχηματικό διάγραμμα της μελέτης παρουσιάζεται στο σχήμα 7.1, όπου φαίνεται η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε.



Σχήμα 7.1: Η πειραματική πορεία της μελέτης μεθυλίωσης των επτά γονιδίων στον HGSC

Οι συνθήκες όλων των αντιδράσεων real-time MSP, καθώς και της αντίδρασης MS-HRMA για το γονίδιο *BRCA1*, παρουσιάζονται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 4. Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα ιστών FFPEs, η απομόνωση του cfDNA από τα δείγματα πλάσματος, ο έλεγχος ποιότητας με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop, καθώς και η χημική μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (DNA conversion), πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 4.

## 7.4 Στατιστική ανάλυση

Για την εκτίμηση της συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθοδολογιών στις ομάδες δειγμάτων FFPEs, καθώς και για τη συσχέτιση της μεθυλίωσης μεταξύ των υποομάδων της ομάδας B, υπολογίστηκαν τα Pearson  $\chi^2$  και Cohen's Kappa coefficient. Με P value < 0,05 η συμφωνία κρίθηκε ως στατιστικά σημαντική. Οι τιμές k ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με τις αντίστοιχες οδηγίες. Για την συσχέτιση της μεθυλίωσης με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιήθηκαν τα Pearson  $\chi^2$  και Fisher's Exact test. Η ανάλυση Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση της μεθυλίωσης με τα OS και PFS. Για τον υπολογισμό του P value εφαρμόστηκε το log-rank test. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS version 25.0 (IBM® SPSS® Statistics).

## 7.5 Πειραματικά αποτελέσματα

### 7.5.1 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1*

Για την ανίχνευση της μεθυλίωσης εφαρμόστηκε μία εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη real-time MSP μεθοδολογία με ανιχνευτή υδρόλυσης TaqMan, που είχε ήδη αναπτυχθεί και βελτιστοποιηθεί από την ερευνητική μας ομάδα. Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 4.7. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη μεθυλίωσης δε χρησιμοποιήθηκε το πλακουντιακό DNA ως 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, καθώς σε αυτό ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1*.

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1* στην ομάδα των φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς και στα διαθέσιμα δείγματα πλάσματος υγείων γυναικών (n=27), όπου ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε ένα δείγμα ωαγωγών 1/16 (6,3%), όμως σε κανένα δείγμα πλάσματος (0/27, 0%). Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, όπου ανιχνεύτηκε μεθυλίωση στις OVCAR29 και IGROV1, όχι όμως στην OAW42. Ακολούθησε η εκτίμηση της μεθυλίωσης στις δύο ομάδες δειγμάτων FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους. Στην ομάδα A η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 14/66 (21,2%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων, ενώ στην ομάδα B σε 5/61 (8,2%), σε αρκετά χαμηλότερο ποσοστό δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων. Ακολούθησε η μελέτη μεθυλίωσης των αντίστοιχων ctDNA της ομάδας B, όπου η μεθυλίωση του γονιδίου ανιχνεύτηκε μόνο σε ένα δείγμα 1/57 (1,8%), συνεπώς δεν πραγματοποιήθηκε σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ των πρωτοπαθών όγκων και των αντίστοιχων ctDNA.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην εκτίμηση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* στις ασθενείς της ομάδας B, όπου ήταν διαθέσιμα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS (πίνακας 4.1). Οι ασθενείς με



OS  $\leq$  4 μήνες και PFS  $\leq$  6 μήνες εξαιρέθηκαν από τη μελέτη επιβίωσης. Χρησιμοποιήθηκαν τα νεότερα δεδομένα OS και PFS (04/2017), με τη διάμεση OS να είναι 41 μήνες και τη διάμεση PFS 13 μήνες. Η συσχέτιση του προφίλ μεθυσίας του γονιδίου *NR2F1* στους πρωτοπαθείς όγκους με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά παρουσιάζεται στον πίνακα 7.1, όπου παρατηρείται η απουσία στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων.

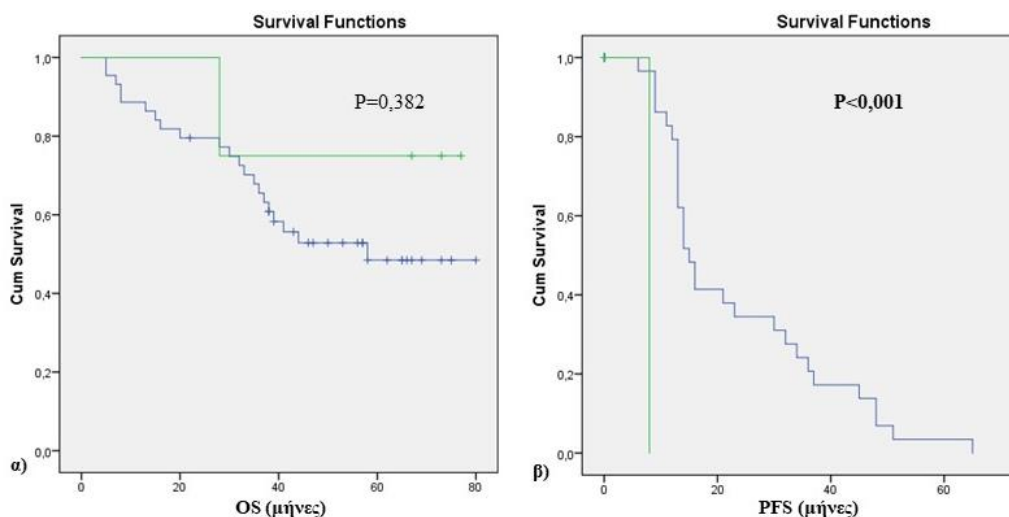
**Πίνακας 7.1:** Συσχέτιση της μεθυσίας του γονιδίου *NR2F1* των δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων με τα διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ομάδα B)

Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά	Μεθυσία του γονιδίου <i>NR2F1</i> (πρωτοπαθείς όγκοι, n=61)		
	n <sup>a</sup>	% μεθυσίας	P-value (Fisher's Exact Test)
<b>Ηλικία</b>			
≥ 64	31	2 (6,5)	0,671
< 64	30	3 (10,0)	
<b>Βαθμός κακοήθειας (G)</b>			
G2	26	2 (7,7)	1,000
G3	35	3 (8,6)	
<b>Στάδιο FIGO</b>			
Πρώιμο (I+II)	7	0	1,000
Προχωρημένο (III + IV)	54	5 (9,3)	
<b>Λεμφαδενική διήθηση (pN)</b>			
N0	18	0	0,264
N1	27	3 (11,1)	
<b>Μακρινές μεταστάσεις (M)</b>			
M0	53	4 (7,5)	0,518
M1	8	1 (12,5)	
<b>Αντίσταση στην πλατίνα</b>			
Θετική	10	1 (10,0)	1,000
Αρνητική	42	3 (7,1)	
<b>Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)</b>			
Θετική	26	3 (11,5)	0,642
Αρνητική	35	2 (5,7)	

<sup>a</sup>: σε περιπτώσεις όπου διαφέρει ο συνολικός αριθμός των ασθενών, λόγω μη διαθέσιμων πληροφοριών για τα κλινικά χαρακτηριστικά

Ακολούθησε η ανάλυση Kaplan-Meier όπου συσχέτιστηκε η μεθυσία του γονιδίου *NR2F1* στους πρωτοπαθείς όγκους, με τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS. Η παρουσία της μεθυσίας του γονιδίου *NR2F1* συσχέτιστηκε σημαντικά με μειωμένο διάστημα PFS ( $P < 0,001$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την OS ( $P = 0,382$ ) (σχήμα 7.2). Για την επιπλέον μελέτη της συσχέτισης της μεθυσίας του γονιδίου με το διάστημα PFS εφαρμόστηκε μονοπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox, όπου και πάλι η μεθυσία συσχέτιστηκε σημαντικά με μειωμένο διάστημα PFS ( $P = 0,018$ ). Ακολούθησε πολυπαραμετρική ανάλυση με

εξαρτημένη μεταβλητή το PFS, καθώς και μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή την OS. Στην πολυπαραμετρική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή το PFS, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της αντίστασης στην πλατίνα ( $P=0,001$ ) και της υπολειπόμενης νόσου ( $P=0,020$ ), με μειωμένο PFS. Στις μονοπαραμετρικές αναλύσεις με εξαρτημένη μεταβλητή την OS δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, ενώ στην πολυπαραμετρική ανάλυση παρατηρήθηκε συσχέτιση μόνο μεταξύ της αντίστασης στην πλατίνα ( $P=0,003$ ) με μειωμένη OS. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 7.2.



Σχήμα 7.2: Εκτίμηση των OS (α) και PFS (β) για τις ασθενείς της ομάδας Β με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1*, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων

Πίνακας 7.2: Μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox μεταξύ των OS και PFS, της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* στους πρωτοπαθείς όγκους και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών (ομάδα Β)

Μονοπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: OS)				
	P-value	HR (hazard ratio)	95.0% CI για το HR	
			Κατώτερο	Ανώτερο
Μεθυλίωση του γονιδίου <i>NR2F1</i>	0,399	2,377	0,319	17,729
Ηλικία	0,952	1,026	0,444	2,370
Βαθμός κακοήθειας (G)	0,973	1,015	0,432	2,381
Στάδιο FIGO	0,885	0,898	0,210	3,851
Λεμφαδενική διήθηση (pN)	0,963	0,975	0,338	2,813
Μακρινές μεταστάσεις (M)	0,762	1,207	0,356	4,092
Αντίσταση στην πλατίνα	0,099	2,393	0,849	6,786
Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)	0,805	1,116	0,467	2,667

Πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: OS)				
	P-value	HR (hazard ratio)	95% CI για το HR Κατώτερο      Ανώτερο	
Μεθυλίωση του γονιδίου <i>NR2F1</i>	0,642	1,776	0,157	20,035
Ηλικία	0,261	2,211	0,555	8,809
Βαθμός κακοήθειας (G)	0,832	0,863	0,222	3,359
Στάδιο FIGO	0,740	1,341	0,237	7,598
Λεμφαδενική διήθηση (pN)	0,849	1,165	0,242	5,609
Αντίσταση στην πλατίνα	<b>0,003</b>	0,115	0,028	0,469
Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)	0,054	10,992	0,963	125,518
Μονοπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: PFS)				
	P-value	HR (hazard ratio)	95% CI για το HR Κατώτερο      Ανώτερο	
Μεθυλίωση του γονιδίου <i>NR2F1</i>	<b>0,018</b>	0,035	0,002	0,561
Ηλικία	0,645	0,839	0,399	1,766
Βαθμός κακοήθειας (G)	0,742	0,882	0,419	1,857
Στάδιο FIGO	0,750	0,720	0,096	5,394
Λεμφαδενική διήθηση (pN)	0,634	1,241	0,510	3,023
Μακρινές μεταστάσεις (M)	0,911	1,071	0,319	3,594
Αντίσταση στην πλατίνα	<b>0,001</b>	0,239	0,099	0,577
Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)	0,783	1,116	0,512	2,431
Πολυπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox (Εξαρτημένη μεταβλητή: PFS)				
	P-value	HR (hazard ratio)	95% CI για το HR Κατώτερο      Ανώτερο	
Μεθυλίωση του γονιδίου <i>NR2F1</i>	0,343	4,549	0,199	103,943
Ηλικία	0,836	1,141	0,328	3,967
Βαθμός κακοήθειας (G)	0,672	0,737	0,179	3,034
Στάδιο FIGO	0,642	0,549	0,044	6,901
Λεμφαδενική διήθηση (pN)	0,854	1,144	0,271	4,832
Μακρινές μεταστάσεις (M)	0,465	2,070	0,294	14,565

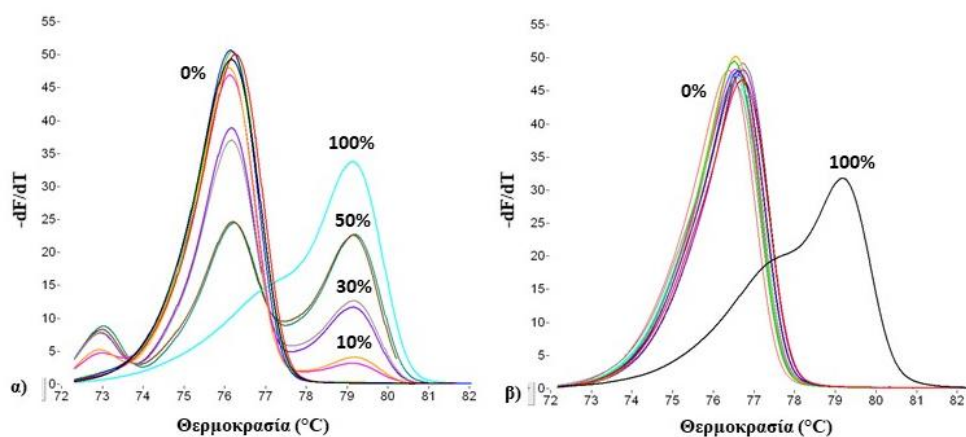
Αντίσταση στην πλατίνα	<b>0,001</b>	0,083	0,018	0,381
Υπολειπόμενη νόσος (tumor rest)	<b>0,020</b>	9,167	1,424	59,016

### 7.5.2 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *BRCA1*

Για τη μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *BRCA1* χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μεθοδολογίες, μία εξαιρετικά ευαίσθητη real-time MSP και μία MS-HRMA μεθοδολογία για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της μεθυλίωσης. Αρχικά βελτιστοποιήθηκε η real-time MSP μεθοδολογία, όπου για την αποκλειστική ενίσχυση της μεθυλιωμένης αλληλουχίας του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι MSP εκκινητές από την εργασία των Esteller et al. (366). Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP παρουσιάζονται στον πίνακα 4.8.

Για την ημιποσοτική μελέτη της μεθυλίωσης βελτιστοποιήθηκε μία MS-HRMA μεθοδολογία, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι ανεξάρτητοι της μεθυλίωσης εκκινητές από την εργασία των Snell et al. (367). Οι συνθήκες της αντίδρασης MS-HRMA παρουσιάζονται λεπτομερώς στους πίνακες 4.18-19. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη μεθυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το πλακουντιακό DNA ως 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, καθώς σε αυτό δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1*, με καμία από τις δύο μεθοδολογίες. Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 3.4.2.4, οι καμπύλες της πρώτης παραγώγου του φθορισμού συναρτήσεως της θερμοκρασίας για κάθε δείγμα, συγκρίνονται με εκείνες των 0%, 100% και των μεταξύ τους αναμιξεων, ώστε να εκτιμηθεί ημιποσοτικά η μεθυλίωση. Όπως φαίνεται στο σχήμα 7.3, η θερμοκρασία τήξης του 100% μεθυλιωμένου προϊόντος είναι  $T_m=79^{\circ}\text{C}$ , ενώ του 0% μεθυλιωμένου  $T_m=76^{\circ}\text{C}$ . Για την παρασκευή των απαραίτητων αναμιξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων δειγμάτων ελέγχου, ώστε να εξετασθεί η αναλυτική ευαισθησία της μεθοδολογίας MS-HRMA, χρησιμοποιήθηκαν το 100% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου και το 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου (πλακουντιακό DNA). Παρασκευάστηκαν οι αναμίξεις 50%, 30%, 10% και 1%. Από τη μελέτη ευαισθησίας προέκυψε ότι η MS-HRMA ανιχνεύει έως και 10% μεθυλιωμένες αλληλουχίες παρουσία 90% μη μεθυλιωμένων (σχήμα 7.3). Η ανάμιξη 1% δεν ανιχνεύτηκε.

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* στην ομάδα φυσιολογικών δειγμάτων FFPEs από ωαγωγούς στις τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών. Στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων FFPEs από ωαγωγούς, με την εφαρμογή της real-time MSP ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε 4/16 (25,0%) δείγματα, ενώ με την εφαρμογή της MS-HRMA, δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* σε κανένα δείγμα (0/16, 0%) (σχήμα 7.3). Επιπλέον, η μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* δεν ανιχνεύτηκε στις τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, με καμία από τις δύο μεθοδολογίες.



**Σχήμα 7.3:** α) Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας και ειδικότητας της MS-HRMA μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών. β) Πρώτη παράγωγος των καμπυλών τήξης των 16 φυσιολογικών FFPEs από αγωγούς (0%).

Η μεθυλίωση του γονιδίου με την εφαρμογή της real-time MSP εξετάστηκε επίσης σε n=9 διαθέσιμα δείγματα πλάσματος από υγιείς δότες, όπου σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου *BRCA1* στις δύο ομάδες δειγμάτων FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους, με real-time MSP. Στην ομάδα A η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 24/66 (36,4%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων, ενώ στην ομάδα B σε 10/61 (16,4%), σε χαμηλότερο ποσοστό δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων. Ακολούθησε η ημιποσοτική μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου με MS-HRMA, στα ίδια δείγματα. Στην ομάδα A η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 14/66 (21,2%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων, ενώ στην ομάδα B σε 4/61 (6,6%), σε χαμηλότερο ποσοστό δειγμάτων. Τέλος, εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* στα διαθέσιμα δείγματα πλάσματος της ομάδας B (n=55). Παρατηρήθηκε μεθυλίωση του γονιδίου σε 6/55 (10,9%) δείγματα πλάσματος. Ακολούθησε σύγκριση του προφίλ μεθυλίωσης του γονιδίου σε 53 ασθενείς, όπου ήταν διαθέσιμα τα δείγματα FFPEs από τον πρωτοπαθή όγκο και τα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος (πίνακας 7.3). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο υποομάδων, ενώ σύμφωνα με τις οδηγίες ερμηνείας των τιμών k, η συμφωνία είναι μικρή (P=0,574, Fisher's Exact Test, k=0,043).

**Πίνακας 7.3:** Τα αποτελέσματα της μελέτης μεθυλίωσης του *BRCA1* στις υποομάδες της ομάδας B, με την εφαρμογή της real-time MSP

<b>Πρωτοπαθείς όγκοι vs αντίστοιχα δείγματα πλάσματος: μεθυλίωση του γονιδίου <i>BRCA1</i> (n=53)</b>			
<b>Πρωτοπαθής όγκος</b>	<b>Αντίστοιχο πλάσμα</b>		<b>Σύνολο</b>
	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο	
Μη μεθυλιωμένο	41	4	45
Μεθυλιωμένο	7	1	8
Σύνολο	48	5	53
Συμφωνία	42/53 (79%), P=0,574, k=0,043		

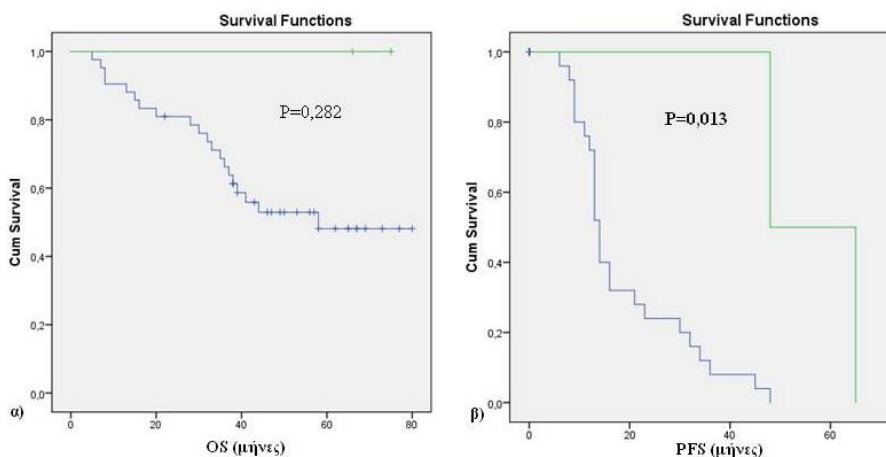
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των δύο μεθόδων real-time MSP και MS-HRMA. Στην ομάδα A παρατηρήθηκε συμφωνία σε 56/66 (85%, P<0,001, k=0,641)

περιπτώσεις, ενώ στην ομάδα Β υπήρξε συμφωνία σε 55/61 (90%,  $P < 0,001$ ,  $k = 0,527$ ) δείγματα πρωτοπαθών όγκων. Σύμφωνα με τις οδηγίες ερμηνείας των τιμών  $k$ , η συμφωνία μεταξύ των υποομάδων είναι ικανοποιητική για την ομάδα Α και μέτρια για την ομάδα Β.

**Πίνακας 7.4: Σύγκριση των μεθόδων real-time MSP και MS-HRMA για τη μεθυλίωση του γονιδίου BRCA1**

<b>Πρωτοπαθείς όγκοι: μεθυλίωση του γονιδίου BRCA1 (ομάδα Α, n=66)</b>			
<b>Real-time MSP</b>	<b>MS-HRMA</b>		
	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο	Σύνολο
Μη μεθυλιωμένο	42	0	42
Μεθυλιωμένο	10	14	24
Σύνολο	52	14	66
Συμφωνία (μεθόδων)	56/66 (85%), $P < 0,001$ , Cohen's kappa=0,641		
<b>Πρωτοπαθείς όγκοι: μεθυλίωση του γονιδίου BRCA1 (ομάδα Β, n=61)</b>			
<b>Real-time MSP</b>	<b>MS-HRMA</b>		
	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο	Σύνολο
Μη μεθυλιωμένο	51	0	51
Μεθυλιωμένο	6	4	10
Σύνολο	57	4	61
Συμφωνία (μεθόδων)	55/61 (90%), $P < 0,001$ , Cohen's kappa=0,527		

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην εκτίμηση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου BRCA1 στις ασθενείς της ομάδας Β, όπου ήταν διαθέσιμα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και τα δεδομένα OS και PFS. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ούτε με τα διαστήματα OS ( $P = 0,399$ ,  $P = 0,152$ ) και PFS ( $P = 0,187$ ,  $P = 0,071$ ), με την εφαρμογή των real-time MSP και MS-HRMA, αντίστοιχα. Ωστόσο, στα δείγματα πλάσματος η παρουσία της μεθυλίωσης του γονιδίου BRCA1 συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένο διάστημα PFS ( $P = 0,013$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την OS ( $P = 0,232$ ).



**Σχήμα 7.4: Εκτίμηση των OS (α) και PFS (β) για τις ασθενείς της ομάδας Β με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) μεθυλίωση του γονιδίου BRCA1, σε δείγματα πλάσματος (ctDNA)**

Επιπλέον, εφαρμόστηκε μονοπαραμετρική παλινδρόμηση κατά Cox, όπου και πάλι η μεθυλίωση συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένο διάστημα PFS ( $P=0,043$ ).

### **7.5.3 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *MGMT***

Για τη μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου *MGMT* βελτιστοποιήθηκε μία εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη real-time MSP μεθοδολογία. Για την αποκλειστική ενίσχυση της μεθυλιωμένης αλληλουχίας του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι MSP εκκινητές από την εργασία των Esteller et al. (368), που έχουν χρησιμοποιηθεί από την πλειοψηφία των μελετών μεθυλίωσης στον καρκίνο των ωοθηκών. Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 4.9. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη μεθυλίωσης δε χρησιμοποιήθηκε το πλακουντιακό DNA ως 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, καθώς σε αυτό ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT*.

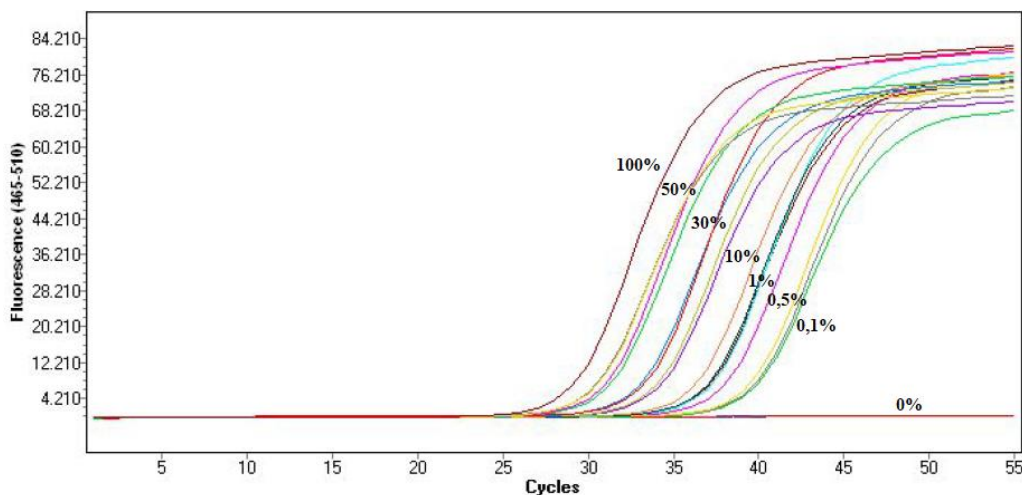
Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT* στην ομάδα φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς και στα διαθέσιμα δείγματα πλάσματος υγείων γυναικών ( $n=42$ ), όπου δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση, τόσο στην ομάδα των FFPEs ωαγωγών (0/16, 0%) όσο και στην ομάδα φυσιολογικών δειγμάτων πλάσματος (0/42, 0%). Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, όπου δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε καμία από τις OVCAR29, IGROV1 και OAW42. Ακολούθησε η εκτίμηση της μεθυλίωσης στις δύο ομάδες δειγμάτων FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους. Στην ομάδα A η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 7/66 (10,6%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων, ενώ στην ομάδα B σε 3/61 (4,9%), σε χαμηλότερο ποσοστό δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην εκτίμηση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου *MGMT* στις ασθενείς της ομάδας B, όπου ήταν διαθέσιμα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ούτε με τα διαστήματα OS ( $P=0,248$ ) και PFS (μη έγκυρο log-rank test).

### **7.5.4 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF10***

Για τη μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF10* αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μία εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη real-time MSP μεθοδολογία. Για την αποκλειστική ενίσχυση της μεθυλιωμένης αλληλουχίας του γονιδίου σχεδιάστηκαν κατάλληλοι MSP εκκινητές. Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 4.10. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη μεθυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το πλακουντιακό DNA ως

0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, καθώς σε αυτό δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF10*. Μεταξύ των 0% και 100% μεθυλιωμένων δειγμάτων ελέγχου, παρασκευάστηκαν οι αναμίξεις 50%, 30%, 10%, 1%, 0,5% και 0,1%. Από τη μελέτη αναλυτικής ευαισθησίας προέκυψε ότι η real-time MSP μεθοδολογία ανιχνεύει έως και 0,1% μεθυλιωμένες αλληλουχίες παρουσία 99,9% μη μεθυλιωμένων (σχήμα 7.5).



**Σχήμα 7.5:** Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας της real-time MSP μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμιξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών (0,1%, 0,5%, 1%, 10%, 30%, 50%).

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF10* στην ομάδα φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς, όπου δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε κανένα δείγμα (0/16, 0%). Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, όπου ανιχνεύτηκε μεθυλίωση στις OVCAR29 και IGROV1. Ακολούθησε η εκτίμηση της μεθυλίωσης στις δύο ομάδες δειγμάτων FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους. Στην ομάδα A η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 8/66 (12,1%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων, ενώ στην ομάδα B σε 6/61 (9,8%), σε ελαφρώς χαμηλότερο ποσοστό δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην εκτίμηση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF10* στις ασθενείς της ομάδας B, όπου ήταν διαθέσιμα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ούτε με τα διαστήματα OS ( $P=0,710$ ) και PFS ( $P=0,432$ ).

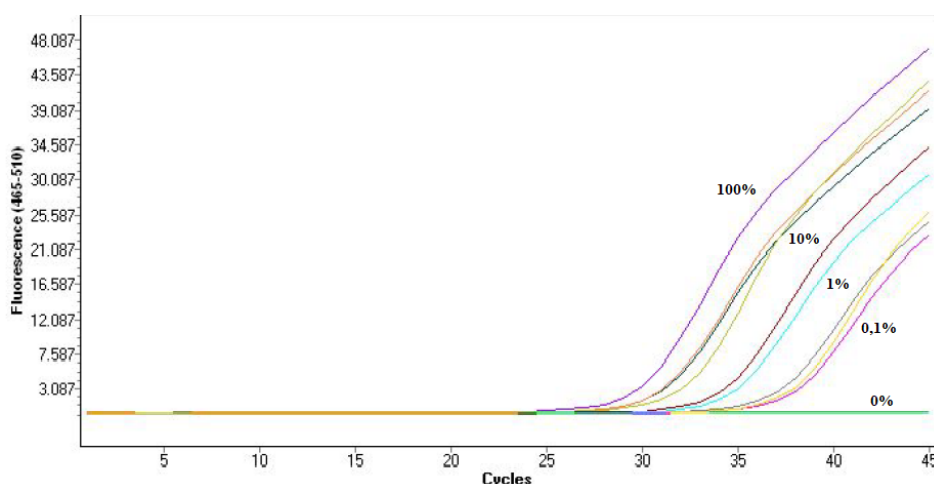
### 7.5.5 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *RKIP*

Για τη μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου *RKIP* βελτιστοποιήθηκε μία εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη real-time MSP μεθοδολογία. Για την αποκλειστική ενίσχυση της μεθυλιωμένης αλληλουχίας του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι MSP εκκινητές από την εργασία των Al-Mulla et al. (358), που έχουν χρησιμοποιηθεί σε όλες τις μελέτες μεθυλίωσης του γονιδίου *RKIP* έως



σήμερα. Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 4.11. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη μεθυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το πλακουντιακό DNA ως 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, καθώς σε αυτό δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *RKIP*. Μεταξύ των 0% και 100% μεθυλιωμένων δειγμάτων ελέγχου, παρασκευάστηκαν οι αναμίξεις 10%, 1% και 0,1%. Από τη μελέτη αναλυτικής ευαισθησίας προέκυψε ότι η real-time MSP μεθοδολογία ανιχνεύει έως και 0,1% μεθυλιωμένες αλληλουχίες παρουσία 99,9% μη μεθυλιωμένων (σχήμα 7.6).

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *RKIP* στα διαθέσιμα δείγματα φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς, όπου δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε κανένα δείγμα (0/13, 0%). Η μεθυλίωση του γονιδίου *RKIP* δεν ανιχνεύτηκε στις τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, ούτε όμως σε κάποιο από τα n=53 δείγματα πρωτοπαθών όγκων της ομάδας B, που εξετάστηκαν. Συνεπώς, δεν ακολούθησε η μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου στις υπόλοιπες ομάδες δειγμάτων.



Σχήμα 7.6: Προσδιορισμός αναλυτικής ευαισθησίας της real-time MSP μεθοδολογίας, με τη χρήση αναμίξεων μεταξύ 0% και 100% μεθυλιωμένων αλληλουχιών (0,1%, 1%, 10%).

### 7.5.6 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *SOX17*

Για την ανίχνευση της μεθυλίωσης του γονιδίου *SOX17* εφαρμόστηκε μία εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη real-time MSP μεθοδολογία που είχε ήδη αναπτυχθεί και βελτιστοποιηθεί από την ερευνητική μας ομάδα (369). Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *SOX17* παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 4.12. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη μεθυλίωσης δε χρησιμοποιήθηκε το πλακουντιακό DNA ως 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, καθώς σε αυτό ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *SOX17*.

Αρχικά εξετάστηκαν οι τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, όπου ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου στην κυτταρική σειρά IGROV1. Ακολούθησε η μελέτη της μεθυλίωσης

στις δύο ομάδες δειγμάτων FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους. Στην ομάδα A η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 51/66 (77,3%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων, ενώ στην ομάδα B σε 21/61 (34,4%), σε αρκετά χαμηλότερο ποσοστό δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην εκτίμηση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου *SOX17* στις ασθενείς της ομάδας B, όπου ήταν διαθέσιμα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ούτε με τα διαστήματα OS ( $P=0,051$ ) και PFS ( $P=0,289$ ).

### **7.5.7 Μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *CST6***

Για την ανίχνευση της μεθυλίωσης του γονιδίου *CST6* εφαρμόστηκε μία εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη real-time MSP μεθοδολογία με ανιχνευτή υδρόλυσης TaqMan, που είχε ήδη αναπτυχθεί και βελτιστοποιηθεί από την ερευνητική μας ομάδα (370). Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time MSP για το γονίδιο *CST6* παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 4.13. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη μεθυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το πλακουντιακό DNA ως 0% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου, καθώς σε αυτό δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *CST6*.

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *CST6* στην ομάδα φυσιολογικών FFPEs από ωαγωγούς όπου ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε ένα δείγμα ωαγωγών 1/16 (6,3%). Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, όπου ανιχνεύτηκε μεθυλίωση στις OVCAR29 και IGROV1. Ακολούθησε η εκτίμηση της μεθυλίωσης στις δύο ομάδες δειγμάτων FFPEs από πρωτοπαθείς όγκους. Στην ομάδα A η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε 13/66 (19,7%) δείγματα πρωτοπαθών όγκων, ενώ στην ομάδα B σε 4/61 (6,6%), σε χαμηλότερο ποσοστό δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην εκτίμηση της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του γονιδίου *CST6* στις ασθενείς της ομάδας B, όπου ήταν διαθέσιμα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και τα δεδομένα επιβίωσης OS και PFS. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ούτε με τα διαστήματα OS ( $P=0,483$ ) και PFS ( $P=0,660$ ).

### 7.5.8 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μελετών μεθυλίωσης

Ακολουθούν τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τις μελέτες μεθυλίωσης των ομάδων A και B με την εφαρμογή των real-time MSP μεθοδολογιών, σε μορφή Heatmap, στα σχήματα 7.8 και 7.9. Στα σχήματα αυτά έχουν ενσωματωθεί επιπλέον τα αποτελέσματα των μελετών μεθυλίωσης των γονιδίων *RASSF1A* και *ESR1* που αναλύθηκαν στα κεφάλαια 5 και 6. Επιπλέον, κατασκευάστηκε Heatmap με τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μελετών μεθυλίωσης στις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωθηκών και στο πλακουντιακό DNA (σχήμα 7.7). Σε όλα τα Heatmap, με κόκκινο απεικονίζονται τα δείγματα όπου βρέθηκε μεθυλιωμένο το εκάστοτε γονίδιο, με πράσινο τα μη-μεθυλιωμένα δείγματα, ενώ με γκρι οι περιπτώσεις όπου το δείγμα δεν ήταν διαθέσιμο.

Γονίδια	OVCAR29	IGROV1	OAW42	PL
<i>RASSF1A</i>				
<i>RASSF10</i>				
<i>BRCA1</i>				
<i>ESR1</i>				
<i>NR2F1</i>				
<i>MGMT</i>				
<i>RKIP</i>				
<i>CST6</i>				
<i>SOX17</i>				
<i>ACTB</i>				

Σχήμα 7.7: Heatmap για τις μελέτες μεθυλίωσης εννέα γονιδίων με real-time MSP, στις κυτταρικές σειρές καρκίνου ωθηκών και στο πλακουντιακό DNA (placental, PL)



## 7.6 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Σε έναν αρκετά μεγάλο αριθμό ασθενών με καρκίνο, υποκρύπτεται ένας ή περισσότεροι πληθυσμοί μη-πολλαπλασιαζόμενων υπολειπόμενων καρκινικών κυττάρων, με δυνατότητα ανάπτυξης τοπικών ή μακρινών μεταστάσεων. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται στην κατάσταση της αδράνειας, που μπορεί να είναι κυτταρική αδράνεια ή αδράνεια σχετιζόμενη με την ανοσοεπιτήρηση, που περιλαμβάνει την αγγειογενετική και την ανοσολογική αδράνεια. Η κυτταρική αδράνεια αποτελεί κύρια αιτία αποτυχίας της θεραπείας πρώτης γραμμής, της μετάστασης και της επακόλουθης ανάπτυξης της υποτροπιάζουσας νόσου (371, 372). Στον καρκίνο των ωθηκών δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα η κυτταρική αδράνεια, παρ'ότι είναι πιθανό να εμπλέκεται στη συχνά παρατηρούμενη αντίσταση στη θεραπεία και την ανάπτυξη υποτροπιάζουσας νόσου. Σε μία πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης MED12 με ανοσοϊστοχημεία, σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων ασθενών με καρκίνο ωθηκών, ενώ επιπλέον διερευνήθηκε ο ρόλος της MED12 στην κυτταρική αδράνεια και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί. Διαπιστώθηκε ότι η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MED12 επάγει την κυτταρική αδράνεια μέσω της απενεργοποίησης του EGFR μονοπατιού. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα έκφρασης της MED12 ήταν χαμηλότερα στις χημειοανθεκτικές ασθενείς συγκριτικά με τις χημειοευαίσθητες (373). Το γονίδιο *NR2F1*, όπως ήδη αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 7.1, έχει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και διατήρηση της κυτταρικής αδράνειας. Πρόσφατα πραγματοποιήθηκε μία μελέτη σε δείγματα μυελού των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού, από όπου απομονώθηκαν τα διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα (**disseminated tumor cells, DTCs**) και εξετάστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης NR2F1 με ανοσοφθορισμό. Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με υψηλή έκφραση της NR2F1 στα DTCs είχαν σημαντικά αυξημένο DFI συγκριτικά με τις ασθενείς όπου η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν χαμηλή (374). Στη δική μας μελέτη, η εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *NR2F1* στις δύο ομάδες δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων και στα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος της ομάδας Β. Στην ομάδα Β, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου με μειωμένο PFS. Ωστόσο, η μεθυλίωση ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στο ctDNA. Τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να επαληθευθούν με περισσότερα δείγματα πρωτοπαθών όγκων, κυρίως πρώιμου σταδίου, καθώς και ασθενών με υποτροπιάζουσα νόσο, ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της κυτταρικής αδράνειας στην εμφάνιση της υποτροπιάζουσας νόσου. Επιπλέον, είναι ενδιαφέρον να εξεταστεί η ταυτόχρονη έκφραση της πρωτεΐνης NR2F1 με ανοσοϊστοχημεία, ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση της έκφρασης με τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου.

Η μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* στον καρκίνο των ωοθηκών μελετήθηκε για πρώτη φορά το 2000, από τους Esteller et al., όπου χαρακτηρίστηκε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο (366). Έχουν ακολουθήσει μελέτες μεθυλίωσης του γονιδίου σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων (348), όμως δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της μεθυλίωσης του γονιδίου και των διαστημάτων OS και PFS (375-377). Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 2.3.1.3 και στον πίνακα 2.2, η μεθυλίωση του γονιδίου έχει διερευνηθεί και στο ctDNA ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, όμως σε καμία μελέτη δεν εξήχθησαν συμπεράσματα σχετικά με την πρόγνωση των ασθενών (156-158). Σε μία πρόσφατη μελέτη από τους Kondrashova et al., διερευνήθηκε ο ρόλος της μεθυλίωσης του γονιδίου *BRCA1* στην ανταπόκριση στη θεραπεία με Rucaparib, 21 πλατινοευθαισθητών ασθενών με υποτροπιάζοντα HGSC, όπου συμμετείχαν στην κλινική μελέτη φάσης II ARIEL2 Part 1 (NCT01891344) (378, 379). Για την ανίχνευση της μεθυλίωσης στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων που είχαν ληφθεί πριν τη θεραπεία, εφαρμόστηκε μία ποσοτική, ειδική για τη μεθυλίωση ddPCR. Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με ομόζυγη ή ημιμόζυγη μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* ανταποκρίθηκαν καλύτερα στη θεραπεία με Rucaparib (378). Παρατηρήθηκε επιπλέον ότι η μεθυλίωση του γονιδίου μπορεί να εξαλειφθεί κατά τη χημειοθεραπεία (378), ενώ είναι ήδη γνωστό ότι η απώλεια της μεθυλίωσης του γονιδίου *BRCA1* συσχετίζεται με την επίκτητη αντίσταση στη χημειοθεραπεία (16). Στη δική μας μελέτη, η μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* εξετάστηκε με την εφαρμογή δύο μεθοδολογιών, real-time MSP και MS-HRMA, στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων των δύο ομάδων, καθώς και στα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος της ομάδας B, με την εφαρμογή της real-time MSP. Οι δύο μεθοδολογίες παρουσίασαν ικανοποιητική συμφωνία για την ομάδα A και μέτρια για την ομάδα B. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα OS, PFS, όμως στα δείγματα ctDNA της ομάδας B, η παρουσία της μεθυλίωσης συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένο PFS. Η μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* μπορεί να οδηγήσει στην απενεργοποίηση του γονιδίου, σε ανεπάρκεια του μονοπατιού HR και τελικά σε ελαττωματική επιδιόρθωση των βλαβών στη διπλή έλικα του DNA. Κατά συνέπεια, τα καρκινικά κύτταρα των ασθενών που παρουσιάζουν μη ομαλή λειτουργία του γονιδίου *BRCA1*, δεν επιδιορθώνουν στον ίδιο βαθμό τις βλάβες που προκαλούνται από τη δράση των χημειοθεραπευτικών σχημάτων, οπότε οδηγούνται σε μεγαλύτερο βαθμό σε απόπτωση. Σε επόμενες μελέτες, είναι ενδιαφέρον να εξεταστεί η μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* σε δείγματα ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία με Olaparib, ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω η προγνωστική της αξία στον HGSC.

Η μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT* έχει διερευνηθεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου, καθώς και σε πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Ωστόσο, στον καρκίνο των ωοθηκών, τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει είναι συχνά αντικρουόμενα (351). Η πρώτη μελέτη

μεθυλίωσης στον καρκίνο των ωοθηκών πραγματοποιήθηκε από τους Esteller et al., όπου με την εφαρμογή MSP δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων από 23 ασθενείς (368). Με το αποτέλεσμα αυτό συμφώνησε και μία μεταγενέστερη μελέτη, όπου με την εφαρμογή real-time MSP, δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT* σε 126 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών (56 με HGSC) (380), ενώ και σε μία άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε real-time MSP, το ποσοστό της μεθυλίωσης του γονιδίου ήταν πολύ χαμηλό (3,3%) (337). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες έχει παρατηρηθεί αυξημένη μεθυλίωση του γονιδίου στον καρκίνο των ωοθηκών, με την εφαρμογή MSP, σε ποσοστά 38,9% (381) και 32,7% (382). Η αντίστροφη συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου *MGMT* με την έκφρασή του αναδείχθηκε σε μία μελέτη από τους Roh et al., όπου ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε ποσοστό 14,7% των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, σε όλες όμως τις περιπτώσεις, ο πρωτοπαθής όγκος ανήκε στον βλεννώδη και στον διαυγοκυτταρικό υπότυπο (383). Σε αντίστοιχα επίπεδα (15,9%) ανιχνεύτηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT* και από μία άλλη μελέτη (384). Η μεθυλίωση του γονιδίου έχει ανιχνευτεί και σε LMP όγκους ωοθηκών στη μελέτη των Shilpa et al., όπου με εφαρμογή MSP το 29,5% των πρωτοπαθών όγκων ωοθηκών και το 28,6% των LMP όγκων ωοθηκών βρέθηκαν μεθυλιωμένοι στο γονίδιο *MGMT* (385). Στη δική μας μελέτη, η μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT* ανιχνεύτηκε σε σχετικά χαμηλό ποσοστό στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων της ομάδας A και σε πολύ χαμηλό ποσοστό που άγγιξε μόλις το 5% στα δείγματα της ομάδας B. Καθώς η μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT* φαίνεται να σχετίζεται με την έναρξη του καρκίνου των ωοθηκών, είναι πιθανό το ιδιαίτερα χαμηλό ποσοστό που παρατηρήθηκε στην ομάδα B να οφείλεται στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των ασθενών της ομάδας διαγνώστηκαν σε προχωρημένο στάδιο της νόσου (πίνακας 4.1). Σε επόμενες μελέτες, είναι ενδιαφέρον να εξεταστεί η μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT* σε δείγματα πλάσματος ασθενών με πρώιμο HGSC, ώστε να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος της μεθυλίωσης στον HGSC, καθώς και η πιθανή προγνωστική της αξία.

Η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF10* έχει μελετηθεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου, όχι όμως στον καρκίνο των ωοθηκών. Έχει μελετηθεί στη λευχαιμία (386, 387), στον καρκίνο του θυρεοειδούς (388, 389), στο γλοίωμα (390), στον καρκίνο του προστάτη (391), στο μελάνωμα (392), στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (353, 393), στον καρκίνο του μαστού (352, 394), στο καρκίνωμα του οισοφάγου (395), στον καρκίνο του πνεύμονα (396, 397), στον καρκίνο του παχέος εντέρου (354), ενώ οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στον καρκίνο του στομάχου (398-403). Επιπλέον, έχει χαρακτηριστεί δείκτης ανάπτυξης αντίστασης στη θεραπεία με ταξόλη (docetaxel) στον καρκίνο του μαστού (352), στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (353) και στον καρκίνο του παχέος εντέρου (354). Σε μία μελέτη από τους Xue et al., μελετήθηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF10* σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και ορού ασθενών με

καρκίνο του στομάχου, με την εφαρμογή bisulfite sequencing. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης στους πρωτοπαθείς όγκους με τα αντίστοιχα δείγματα ορών, ενώ στους ασθενείς με μεθυλίωση του γονιδίου στον ορό παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα διαστήματα OS και DFS (403). Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη εξετάστηκε επίσης η κλινική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF10* στο ctDNA ασθενών με καρκίνο του στομάχου, με την εφαρμογή μίας MSP μεθοδολογίας. Και σε αυτή τη μελέτη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης στους πρωτοπαθείς όγκους με τα αντίστοιχα δείγματα ορών, ενώ στους ασθενείς με μεθυλίωση του γονιδίου στον ορό παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα διαστήματα OS και PFS (399). Στη δική μας μελέτη, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας real-time MSP μεθοδολογίας για την ανίχνευση της μεθυλίωσης του γονιδίου *RASSF10*. Με την εφαρμογή της, η μεθυλίωση του γονιδίου ανιχνεύτηκε σε ποσοστά κοντά στο 10% και στις δύο ομάδες δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων, όμως δεν παρατηρήθηκε προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης. Σε επόμενες μελέτες, είναι ενδιαφέρον να εξεταστεί η μεθυλίωση του γονιδίου σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και ctDNA, πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τη θεραπεία, ώστε να μελετηθεί εκτενέστερα ο ρόλος του γονιδίου στον HGSC.

Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 7.1, το γονίδιο *RKIP* αποτελεί καταστολέα της μετάστασης, με ενεργό ρόλο στην EMT και στο Wnt/ $\beta$ -catenin σηματοδοτικό μονοπάτι (355, 356). Στον καρκίνο των ωοθηκών δεν έχει μελετηθεί η μεθυλίωσή του, έχει πραγματοποιηθεί ωστόσο μία μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης *RKIP* σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών (404). Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της *RKIP* μειώνεται ανάλογα με τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, ενώ στην επιπλέον μελέτη σε κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών διαπιστώθηκε ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική προσκόλληση και η διείσδυση ήταν σημαντικά μειωμένα στα κύτταρα όπου η *RKIP* παρουσίασε υπερέκφραση, με τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα να παρατηρούνται στα κύτταρα όπου η *RKIP* είχε μειωμένη έκφραση. Συνολικά, στην μελέτη προτάθηκε ο ρόλος του γονιδίου *RKIP* ως καταστολέα της μετάστασης στον καρκίνο των ωοθηκών (404). Στη δική μας μελέτη, εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *RKIP* σε έναν αρκετά μεγάλο αριθμό δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων ασθενών με HGSC, ωστόσο σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση. Σε επόμενες μελέτες, είναι ενδιαφέρον να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και CTCs, με σκοπό την περαιτέρω αποσαφήνιση του ρόλου του γονιδίου *RKIP* στον HGSC.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

### ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *PD-L1* ΣΤΑ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ HGSC

#### 8.1 Εισαγωγή

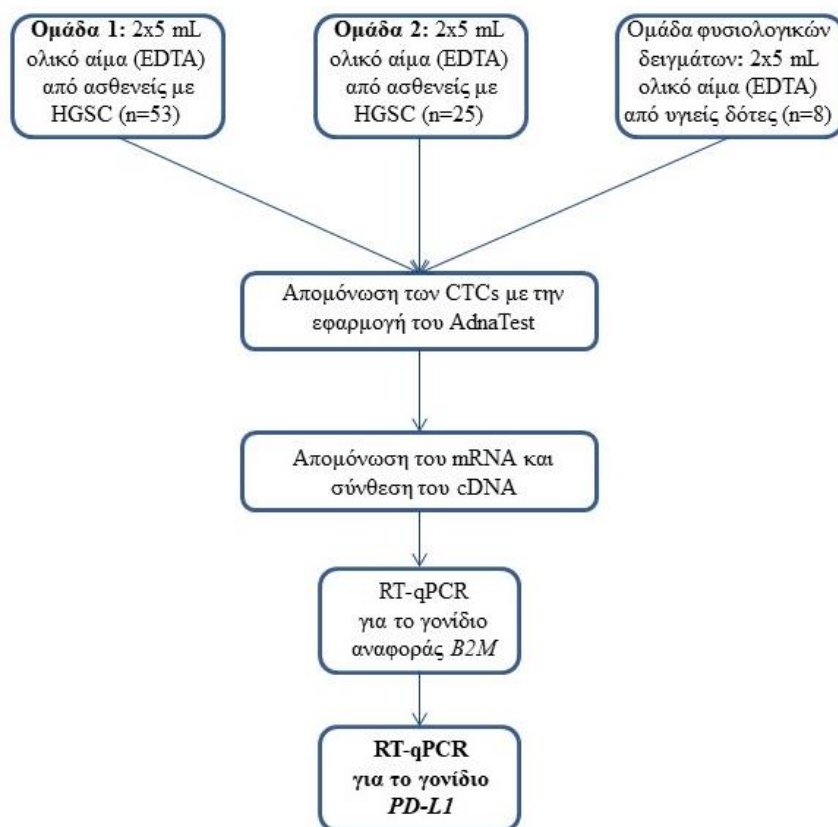
Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο υποκεφάλαιο 1.8, η στόχευση του μονοπατιού PD-1/PD-L1 είναι ιδιαίτερα υποσχόμενη στο πεδίο της ανοσοθεραπείας του καρκίνου με τη χρησιμοποίηση αναστολέων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος. **Στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η εκτίμηση της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* σε δείγματα CTCs ασθενών με HGSC, καθώς και η αξιολόγηση της κλινικής της σημασίας.** Για την μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1*, όπως και για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M*, εφαρμόστηκαν δύο εξαιρετικά ειδικές και ευαίσθητες RT-qPCR μεθοδολογίες που έχουν αναπτυχθεί και βελτιστοποιηθεί από την ερευνητική μας ομάδα (405).

#### 8.2 Κλινικά δείγματα

Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 4.1, για τη μελέτη έκφρασης του γονιδίου *PD-L1*, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα cDNA από RNA που απομονώθηκε από CTCs ασθενών με HGSC, κατά τη διάγνωση. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες δειγμάτων: η ομάδα 1 (n=53) και η ομάδα 2 (n=25). Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 4.2. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μία μικρή ομάδα δειγμάτων cDNA από υγιείς δότες (n=8). Η απομόνωση και ο εμπλουτισμός των δειγμάτων των υγιών δοτών πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με τα κλινικά δείγματα των δύο ομάδων ασθενών με HGSC. Ως θετικός μάρτυρας σε όλες τις αντιδράσεις RT-qPCR χρησιμοποιήθηκαν δείγματα cDNA από μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (**peripheral blood mononuclear cells, PBMCs**).

#### 8.3 Πειραματική πορεία

Ένα συγκεντρωτικό σχηματικό διάγραμμα της μελέτης παρουσιάζεται στο σχήμα 8.1, όπου φαίνεται η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε. Οι συνθήκες των αντιδράσεων RT-qPCR παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 4.20 για το γονίδιο αναφοράς *B2M* και στον πίνακα 4.21 για το γονίδιο *PD-L1*.



Σχήμα 8.1: Η πειραματική πορεία της μελέτης έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* στον HGSC

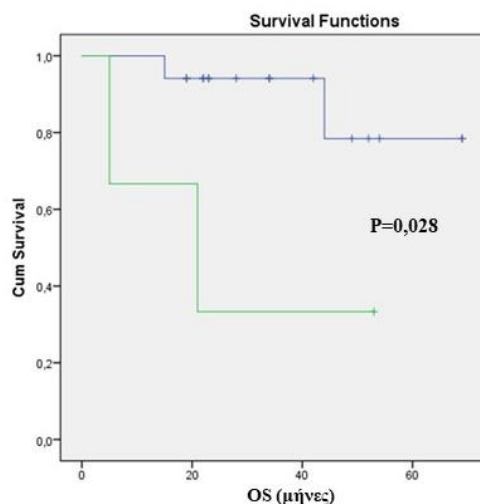
#### 8.4 Στατιστική ανάλυση

Για την συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιήθηκαν τα Pearson  $\chi^2$  και Fisher's Exact test. Η ανάλυση Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση της μεθυσίωσης με τα OS και DFI. Για τον υπολογισμό του P value εφαρμόστηκε το log-rank test. Με P value < 0,05 η συμφωνία κρίθηκε ως στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS version 25.0 (IBM® SPSS® Statistics).

#### 8.5 Πειραματικά αποτελέσματα

Τα δείγματα εξετάστηκαν πρώτα ως προς την ποιότητά τους με μία RT-qPCR μεθοδολογία για το γονίδιο αναφοράς *B2M*. Ύστερα από τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M*, έγιναν αποδεκτά 41 δείγματα από το σύνολο n=53. Αρχικά εξετάστηκε η έκφραση του γονιδίου *PD-L1* στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων, όπου σε κανένα από τα οκτώ δείγματα δεν ανιχνεύτηκε έκφραση του γονιδίου. Στη συνέχεια ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων cDNA της ομάδας 1. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* και ανιχνεύτηκε έκφραση του γονιδίου σε 5/41 (12,2%) δείγματα cDNA. Ακολούθησε

συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τα διαθέσιμα δεδομένα επιβίωσης και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* στα CTCs και της μειωμένης OS των ασθενών ( $P=0,028$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου και του διαστήματος DFI ( $P=0,495$ ).



**Σχήμα 8.2:** Εκτίμηση της OS για τις ασθενείς της ομάδας 1 με (πράσινο) ή χωρίς (μπλε) έκφραση του γονιδίου *PD-L1*, σε δείγματα CTCs, με την εφαρμογή της RT-qPCR

Στην ομάδα 2, τα δείγματα εξετάστηκαν αρχικά ως προς την ποιότητά τους με το γονίδιο αναφοράς *B2M* και στη συνέχεια ακολούθησε η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1*. Όλα τα δείγματα έγιναν αποδεκτά ( $n=25$ ), όμως δεν παρατηρήθηκε η έκφραση του γονιδίου *PD-L1* σε κανένα από αυτά.

## 8.6 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η έκφραση του γονιδίου *PD-L1* στον καρκίνο των ωοθηκών, έχει εξεταστεί από μελέτες σε δείγματα ιστού από τον πρωτοπαθή όγκο και το μικροπεριβάλλον του όγκου (406, 407), ενώ δεν έχει πραγματοποιηθεί έως σήμερα μελέτη έκφρασης του γονιδίου στα CTCs. Σε μία μελέτη όπου συμμετείχε μεγάλος αριθμός ασθενών (71 ασθενείς με EOC, 34 με καλοήγη νόσο, 10 με LMP όγκους, καθώς και 11 υγιείς δότες), εξετάστηκε η έκφραση του *PD-L1* σε δείγματα ιστού, στο ασκτικό υγρό και σε PBMCs απομονωμένα από το περιφερικό αίμα. Διαχωρίστηκαν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού από όλα τα δείγματα και μελετήθηκε η έκφραση του *PD-L1* με ανοσοϊστοχημεία και ειδικές μικροσυστοιχίες, στα κύτταρα-σχετιζόμενα με τη φλεγμονή. Παρατηρήθηκε διαφορετική έκφραση ανοσολογικών δεικτών που σχετίζονται με το μονοπάτι *PD1/PD-L1* στα δείγματα ασθενών με EOC συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα των ασθενών με καλοήγη νόσο και των υγείων δοτών. Επιπλέον, μετρήθηκε η διαλυτή μορφή (soluble) του

PD-L1 (sPD-L1) στο πλάσμα όλων των ασθενών και των υγριών δοτών και παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων του sPD-L1 στο πλάσμα των ασθενών με EOC συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα των ασθενών με καλοήγη νόσο και των υγριών δοτών (408). Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε η διαλυτή μορφή των PD-L1 και PD-L2 σε 83 δείγματα ορού ασθενών με EOC και σε 29 δείγματα ορού υγριών δοτών, με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια (409). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και εμπλουτισμός των αντίστοιχων CTCs με την εφαρμογή του AdnaTest *OvarianCancerSelect* (QIAGEN, Hilden, Germany), ενώ για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό τους χρησιμοποιήθηκε το AdnaTest *OvarianCancerDetect* (QIAGEN, Hilden, Germany). Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του sPD-L1 ήταν σημαντικά αυξημένα στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών συγκριτικά με τις υγιείς και συσχετίστηκαν με το μέγεθος του όγκου, ενώ αντιθέτως τα επίπεδα του sPD-L2 βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα και συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία με πλατίνα και την παρουσία *ERCC1*<sup>+</sup>CTCs. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα του sPD-L1 συσχετίστηκαν με σημαντικά μειωμένα διαστήματα OS (P=0,003) και PFS (P=0,019) (409).

Η έκφραση του γονιδίου *PD-L1* στα CTCs μελετήθηκε για πρώτη φορά σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού από τους Mazel et al., με τη χρησιμοποίηση του συστήματος CellSearch® (410). Από την ερευνητική μας ομάδα, εξετάστηκε η προγνωστική σημασία της υπερέκφρασης του γονιδίου *PD-L1* στα CTCs 113 ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου και διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του γονιδίου μετά το τέλος της θεραπείας με μειωμένα διαστήματα OS και PFS, ύστερα από την εφαρμογή πολυπαραμετρικής ανάλυσης, ενώ η απουσία της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* μετά τη θεραπεία, συσχετίστηκε ισχυρά με πλήρη ανταπόκριση (405). Επιπλέον, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* στα CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (411), καθώς και με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (412-415).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου *PD-L1* σε ένα μικρό ποσοστό των δειγμάτων CTCs της ομάδας 1, με την επακόλουθη στατιστική ανάλυση να υποδεικνύει πιθανή προγνωστική σημασία. Ωστόσο, υπάρχουν μερικά σημεία που θα πρέπει να τονιστούν. Κύριο μειονέκτημα της μελέτης αποτελεί ο αρκετά μικρός αρχικός όγκος περιφερικού αίματος (5 mL) από όπου πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των CTCs. Γενικά σε όλα τα δείγματά μας, φυσιολογικά και παθολογικά, η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *B2M* παρατηρήθηκε σε αρκετά υψηλότερα Cq από τα αναμενόμενα για ένα γονίδιο υψηλής έκφρασης όπως είναι το *B2M*. Το γονίδιο *PD-L1* εκφράζεται φυσιολογικά στα δείγματα υγριών δοτών και για την εκτίμηση της υπερέκφρασής του στα CTCs πραγματοποιείται κανονικοποίηση με την εφαρμογή της  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  μεθοδολογίας (405). Στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκε έκφραση

του γονιδίου *PD-L1* στα δείγματα των υγριών δοτών, οπότε δεν έγινε κανονικοποίηση και ελήφθησαν ως θετικά όλα τα δείγματα των ασθενών όπου ανιχνεύτηκε έκφραση του γονιδίου *PD-L1*. Η μη παρατηρούμενη έκφραση του γονιδίου *PD-L1* στους υγιείς δότες μπορεί να οφείλεται στον πολύ μικρό αριθμό των φυσιολογικών δειγμάτων, καθώς και στον μικρό αρχικό όγκο περιφερικού αίματος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωσή τους.

Με βάση τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* στον καρκίνο των ωοθηκών, παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου στα CTCs ασθενών με HGSC, καθώς και στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου με μειωμένη OS των ασθενών. Υποδεικνύεται συνεπώς, μία πιθανή προγνωστική σημασία της έκφρασης του *PD-L1* στα CTCs ασθενών με HGSC. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να επαληθευτούν με περισσότερες προοπτικές μελέτες, όπου θα συμμετέχει μεγαλύτερος αριθμός ασθενών με HGSC. Επιπλέον, θα είναι ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί η απομόνωση των CTCs από μεγαλύτερο αρχικό όγκο περιφερικού αίματος και να εφαρμοστούν διαφορετικές μεθοδολογίες για την απομόνωση και τον εμπλουτισμό τους.

## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε σκοπό τη μελέτη της μεθυλίωσης επιλεγμένων γονιδίων σε ασθενείς με HGSC. Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δείγματα πρωτοπαθών όγκων, αντίστοιχα δείγματα παρακείμενων ιστών, καθώς και αντίστοιχα δείγματα ctDNA από τις ίδιες ασθενείς. Οι μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν συνιστούν την real-time MSP για την ανίχνευση της μεθυλίωσης σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και ctDNA, καθώς και την MS-HRMA για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της μεθυλίωσης σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών.

Αρχικά εξετάστηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A*, όπου πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση και κλινική αξιολόγηση της μεθυλίωσης του γονιδίου σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων, παρακείμενων ιστών και αντίστοιχου πλάσματος ασθενών με HGSC, με την εφαρμογή δύο μεθοδολογιών, real-time MSP και MS-HRMA. Οι δύο μεθοδολογίες παρουσίασαν σχεδόν τέλεια συμφωνία στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων των ομάδων A και B, και ικανοποιητική συμφωνία στα δείγματα παρακείμενων ιστών της ομάδας B. Στα δείγματα παρακείμενων ιστών της ομάδας B, η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* ανιχνεύτηκε σε σχετικά υψηλά ποσοστά και με τις δύο μεθόδους, γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία field effect. Η μεθυλίωση του γονιδίου στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων και παρακείμενων ιστών συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένη OS των ασθενών. Συγκεκριμένα, η μεθυλίωση του γονιδίου *RASSF1A* συσχετίστηκε σημαντικά με την OS με την εφαρμογή και των δύο μεθόδων (real-time MSP:  $P=0,049$  και MS-HRMA:  $P=0,006$ ), ενώ στα δείγματα παρακείμενων ιστών η μεθυλίωση του γονιδίου συσχετίστηκε σημαντικά με την OS με την εφαρμογή της MS-HRMA ( $P=0,007$ ). Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης υπέδειξαν για πρώτη φορά την προγνωστική σημασία της μεθυλίωσης του γονιδίου στον HGSC.

Στη συνέχεια, ακολούθησε μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *ESR1*, όπου πραγματοποιήθηκε μελέτη σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και ctDNA ασθενών με HGSC. Η μεθυλίωση ανιχνεύτηκε και στις δύο ομάδες δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων, καθώς και στα αντίστοιχα ctDNA της ομάδας B. Στην ομάδα B, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχου ctDNA. Η μεθυλίωση του γονιδίου στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένα OS ( $P=0,027$ ) και PFS ( $P=0,041$ ) των ασθενών, με την εφαρμογή της real-time MSP. Με την παρούσα μελέτη, έγινε μία προσπάθεια αποσαφήνισης του ρόλου της μεθυλίωσης του γονιδίου στον HGSC.

Ακολούθησαν οι μελέτες μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται σε μοριακά μονοπάτια που διαταράσσονται στον HGSC, όπως τα γονίδια *BRCA1* και *MGMT* που συμμετέχουν σε διαφορετικές πορείες επιδιόρθωσης του DNA, το γονίδιο *NR2F1* που συμμετέχει ενεργά στην κυτταρική αδράνεια, τα γονίδια *RASSF10* που εμπλέκεται στην ανάπτυξη χημειοαντίστασης, καθώς και το γονίδιο *RKIP* που συμμετέχει στην EMT διαδικασία. Ύστερα από τη συνολική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου *NR2F1* στα δείγματα πρωτοπαθών όγκων με μειωμένο PFS ( $P < 0,001$ ) των ασθενών με HGSC, με την εφαρμογή της real-time MSP. Επιπλέον, η μεθυλίωση του γονιδίου *BRCA1* στο ctDNA συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένο PFS ( $P = 0,013$ ).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *PD-L1* σε δείγματα CTCs ασθενών με HGSC, με την εφαρμογή RT-qPCR. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου με μειωμένη OS των ασθενών ( $P = 0,028$ ), υποδεικνύοντας μία πιθανή προγνωστική σημασία στον HGSC.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Σύντμηση	Αγγλική Ορολογία	Ελληνική Ορολογία
<b>OSE</b>	ovarian surface epithelium	επιθήλιο της επιφάνειας της ωοθήκης
<b>FIGO</b>	International Federation of Gynecology and Obstetrics	-
<b>EOC</b>	epithelial ovarian cancer	επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών
<b>HGSCs</b>	high grade serous carcinomas	ορώδης καρκίνος ωοθηκών υψηλού βαθμού κακοήθειας
<b>LGSCs</b>	low grade serous carcinomas	ορώδης καρκίνος ωοθηκών χαμηλού βαθμού κακοήθειας
<b>EAOC</b>	endometriosis-associated ovarian cancer	σχετιζόμενος με την ενδομητρίωση καρκίνος των ωοθηκών
<b>MSI</b>	microsatellite instability	μικροδορυφορική αστάθεια
<b>SET</b>	solid, pseudoendometrioid, transitional	συμπαγής, ψευδοενδομητριοειδής, μεταβατικός
<b>TILs</b>	tumor infiltrating lymphocytes	λεμφοκύτταρα διείσδυσης του όγκου
<b>TCGA</b>	The Cancer Genome Atlas	-
<b>HR</b>	homologous recombination	ομόλογος ανασυνδυασμός
<b>SBTs</b>	serous borderline tumors	όγκοι οριακής κακοήθειας
<b>LMP</b>	low-malignant potential	όγκοι χαμηλού κακοήθους δυναμικού
<b>APSTs</b>	atypical proliferative serous tumors	άτυποι πολλαπλασιαστικοί ορώδεις όγκοι
<b>MPSC</b>	micropapillary serous carcinoma	μικροθηλωματώδες ορώδες καρκίνωμα
<b>STICs</b>	serous tubal intraepithelial carcinomas	ορώδη σαλπγγικά ενδοεπιθηλιακά καρκινώματα
<b>EVs</b>	extracellular vesicles	εξωκυττάρια κυστίδια
<b>TAMs</b>	tumor-associated macrophages	μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο
<b>CAFs</b>	cancer-associated fibroblasts	ινοβλάστες σχετιζόμενοι με τον καρκίνο
<b>TME</b>	tumor microenvironment	μικροπεριβάλλον του όγκου
<b>EMT</b>	epithelial-mesenchymal transition	επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση
<b>CSCs</b>	cancer stem cells	καρκινικά βλαστικά κύτταρα
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	-



<b>CA-125</b>	cancer antigen 125	καρκινικό αντιγόνο 125
<b>HE4</b>	human epididymis protein 4	-
<b>ROC</b>	receiver operating characteristic	καμπύλες ROC
<b>AUC</b>	area under the curve	περιοχή κάτω από την καμπύλη
<b>ROMA</b>	risk of ovarian malignancy algorithm	αλγόριθμος κινδύνου για κακοήθεια ωοθηκών
<b>OS</b>	overall survival	ολική επιβίωση
<b>PFS</b>	progression free survival	διάστημα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου
<b>NACT</b>	neoadjuvant chemotherapy	εισαγωγική χημειοθεραπεία
<b>CTCs</b>	circulating tumor cells	κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
<b>ctDNA</b>	circulating tumor DNA	κυκλοφορούν καρκινικό DNA
<b>ctRNA</b>	circulating tumor RNA	κυκλοφορούν καρκινικό RNA
<b>cfmiRNAs</b>	circulating cell-free microRNAs	κυκλοφορούντα εξωκυτταρικά miRNAs
<b>TEPs</b>	tumor-educated platelets	αιμοπετάλια που «εκπαιδεύονται» από τον όγκο
<b>cfDNA</b>	cell-free DNA	κυκλοφορούν εξωκυτταρικό DNA
<b>LOH</b>	loss of heterozygosity	απώλεια της ετεροζυγωτίας
<b>ICC</b>	immunocytochemistry	ανοσοκυτταροχημεία
<b>RT-qPCR</b>	reverse transcription quantitative PCR	ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής
<b>mtDNA</b>	mitochondrial DNA	μιτοχονδριακό DNA
<b>real-time PCR</b>	real-time PCR	αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο
<b>eccDNA</b>	extrachromosomal circular DNA	κυκλικό εξτραχρωμοσωμικό DNA
<b>GE</b>	genome equivalents	γενωμικά ισοδύναμα
<b>bDNA</b>	branched DNA	διακλαδισμένο DNA
<b>dPCR</b>	digital PCR	ψηφιακή PCR
<b>ddPCR</b>	droplet digital PCR	ψηφιακή PCR σταγόνας
<b>NGS</b>	next-generation sequencing	αλληλούχιση νέας γενιάς
<b>TAm-Seq</b>	targeted deep sequencing	στοχευμένη «βαθιά» αλληλούχιση
<b>AF</b>	allele frequencies	συχνότητα αλληλομόρφων
<b>WES</b>	whole exome sequencing	αλληλούχιση όλων των εξονίων του γονιδιώματος

<b>TEC-Seq</b>	targeted error correction sequencing	στοχευμένη αλληλούχιση διόρθωσης λάθους
<b>CAPP-Seq</b>	CAnker Personalized Profiling by deep Sequencing	«βαθιά» αλληλούχιση για τον προσδιορισμό του προφίλ του όγκου
<b>WGS</b>	whole genome sequencing	αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος
<b>DELFI</b>	DNA evaluation of fragments for early interpretation	αξιολόγηση των θραυσμάτων του DNA για την πρόιμη ερμηνεία
<b>CNVs</b>	copy number variations	παραλλαγές αριθμού αντιγράφων
<b>NIPT</b>	non-invasive prenatal testing	μη-επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος
<b>MSP</b>	methylation-specific PCR	PCR ειδική στη μεθυλίωση
<b>MSRE-PCR</b>	methylation-sensitive restriction enzyme-PCR	ευαίσθητη στη μεθυλίωση PCR περιοριστικού ενζύμου
<b>snRNA</b>	small nuclear RNA	μικρό πυρηνικό RNA
<b>DFI</b>	disease-free interval	ελεύθερο νόσου διάστημα
<b>LOI</b>	loss of imprinting	απώλεια της αποτύπωσης σε εντυπωμένα γονίδια
<b>HATs</b>	histone acetyltransferases	ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών
<b>HDACs</b>	histone deacetylases	αποακετυλάσες των ιστονών
<b>HMTs</b>	histone methyltransferases	μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών
<b>HDMs</b>	histone demethylases	απομεθυλάσες των ιστονών
<b>DNMTs</b>	DNA methyltransferases	DNA μεθυλοτρανσφεράσες
<b>5mC</b>	5-methylcytosine	5-μεθυλοκυτοσίνη
<b>SAM</b>	S-adenosylmethionine	S-αδενοσυλομεθειονίνη
<b>TSS</b>	transcription start sites	θέσεις έναρξης της μεταγραφής
<b>PCNA</b>	proliferation cell nuclear antigen	πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιασμού του κυττάρου
<b>MBDs</b>	methylated binding domains	πρωτεΐνες συνδεδεμένες με τη μεθυλιωμένη περιοχή
<b>HP1</b>	heterochromatin protein 1	πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης 1
<b>NURFs</b>	nucleosomal remodeling factors	παράγοντες αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων
<b>CIMP</b>	CpG island methylator phenotype	φαινότυπος CIMP
<b>5hmC</b>	5-hydroxymethylcytosine	5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη

<b>MREs</b>	methylation restriction enzymes	περιοριστικά ένζυμα ειδικά στη μεθυλίωση
<b>WGBS</b>	whole-genome bisulfite sequencing	αλληλούχιση της μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος
<b>RRBS</b>	reduced-representation bisulfite sequencing	αλληλούχιση της μεθυλίωσης μειωμένης αναπαράστασης
<b>MCTA-seq</b>	methyated CpG tandems amplification and sequencing	ενίσχυση και αλληλούχιση μεθυλιωμένων CpGs, το ένα όπισθεν του άλλου
<b>real-time MSP</b>	real-time MSP	MSP σε πραγματικό χρόνο
<b>ddMSP</b>	droplet-digital MSP	ψηφιακή MSP σταγόνας
<b>MS-HRMA</b>	Methylation-Sensitive High-Resolution Melting Analysis,	ανάλυση καμπύλων τήξεως υψηλής διακριτικής ικανότητας
<b>MIP</b>	methylation-independent primers	ανεξάρτητοι της μεθυλίωσης εκκινητές
<b>T<sub>m</sub></b>	melting temperature	θερμοκρασία τήξης
<b>MeDIP-seq</b>	methyated DNA immunoprecipitation sequencing	αλληλούχιση ανοσοκαθίζησης του μεθυλιωμένου DNA
<b>MBD-seq</b>	methyl-CpG binding domain protein capture sequencing	αλληλούχιση του καλυμμένου DNA από ειδικές πρωτεΐνες πρόσδεσης
<b>TETs</b>	ten-eleven translocation enzymes	ένζυμα μετατόπισης ten-eleven
<b>OxBS-seq</b>	oxidative bisulfite sequencing	αλληλούχιση ύστερα από οξειδωτικό DNA conversion
<b>TAB-seq</b>	TET-assisted bisulfite sequencing	αλληλούχιση ύστερα από TET-βασισμένο DNA conversion
<b>DNMTIs</b>	DNA methyltransferases inhibitors	αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών
<b>FFPEs</b>	formalin-fixed paraffin-embedded tissues	ιστοτεμάχια μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκιβωτισμένα σε παραφίνη
<b>cDNA</b>	complementary DNA	συμπληρωματικό DNA
<b>Cq</b>	cycle of quantification	κύκλος ποσοτικοποίησης
<b>ER</b>	estrogen receptors	οιστρογονικοί υποδοχείς
<b>PL DNA</b>	placental DNA	πλακουντιακό DNA
<b>DTCs</b>	disseminated tumor cells	διασπαρμένα καρκινικά κύτταρα
<b>PBMCs</b>	peripheral blood mononuclear cells	μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424
2. Cannistra SA. Cancer of the Ovary. *N Engl J Med* 2004;351:2519-29
3. Moore K. Κλινική Ανατομία. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2012
4. Odicino F, Pecorelli S, Zigliani L, Creasman WT. History of the FIGO cancer staging system. *Int J Gynaecol Obstet* 2008;101:205-10
5. Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet* 2014;124:1-5
6. Bast RC, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* 2009;9:415-28
7. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Cote TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 2003;97:2631-42
8. Kraggerud SM, Høe-Hansen CE, Alagaratnam S, Skotheim RI, Abeler VM, Rajpert-De Meyts E, et al. Molecular characteristics of malignant ovarian germ cell tumors and comparison with testicular counterparts: implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 2013;34:339-76
9. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet* 2014;384:1376-88
10. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T, et al. Histological classification of ovarian cancer. *Medical Electron Microscopy* 2003;36:9-17
11. Kurman RJ, Shih Ie M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol* 2016;186:733-47
12. Kurman RJ, Shih Ie M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol* 2011;42:918-31
13. Herreros-Villanueva M, Chen CC, Tsai EM, Er TK. Endometriosis-associated ovarian cancer: What have we learned so far? *Clin Chim Acta* 2019;493:63-72
14. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011;474:609-15
15. Kurman RJ, Shih Ie M. Seromucinous Tumors of the Ovary. What's in a Name? *Int J Gynecol Pathol* 2016;35:78-81
16. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 2015;521:489-94
17. Zeller C, Dai W, Curry E, Siddiq A, Walley A, Masrouf N, et al. The DNA Methylomes of Serous Borderline Tumors Reveal Subgroups With Malignant- or Benign-Like Profiles. *The American Journal of Pathology* 2013;182:668-77
18. Cadron I, Leunen K, Van Gorp T, Amant F, Neven P, Vergote I. Management of borderline ovarian neoplasms. *J Clin Oncol* 2007;25:2928-37
19. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Jr., Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 2011;11:719-25
20. Labidi-Galy SI, Papp E, Hallberg D, Niknafs N, Adleff V, Noe M, et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun* 2017;8:1093
21. McDaniel AS, Stall JN, Hovelson DH, Cani AK, Liu CJ, Tomlins SA, et al. Next-Generation Sequencing of Tubal Intraepithelial Carcinomas. *JAMA Oncol* 2015;1:1128-32
22. Bowtell DD, Bohm S, Ahmed AA, Aspuria PJ, Bast RC, Jr., Beral V, et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15:668-79
23. Saldanha SN, Tollefsbol TO. Pathway modulations and epigenetic alterations in ovarian tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2014;229:393-406
24. Yang-Hartwich Y, Gurrea-Soteras M, Sumi N, Joo WD, Holmberg JC, Craveiro V, et al. Ovulation and extra-ovarian origin of ovarian cancer. *Sci Rep* 2014;4:6116
25. Simons M, Simmer F, Bulten J, Ligtenberg MJ, Hollema H, van Vliet S, et al. Two types of primary mucinous ovarian tumors can be distinguished based on their origin. *Mod Pathol* 2019 Nov 6 [Epub ahead of print]
26. Tan DS, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:925-34

27. Cormio G, Rossi C, Cazzolla A, Resta L, Loverro G, Greco P, et al. Distant metastases in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:125-9
28. Kipps E, Tan DS, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer* 2013;13:273-82
29. Worzfeld T, Pogge von Strandmann E, Huber M, Adhikary T, Wagner U, Reinartz S, et al. The Unique Molecular and Cellular Microenvironment of Ovarian Cancer. *Front Oncol* 2017;7:24
30. Deng J, Wang L, Chen H, Hao J, Ni J, Chang L, et al. Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer. *Oncotarget* 2016;7:55771-55788
31. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT 2016. *Cell* 2016;166:21-45
32. Auer K, Bachmayr-Heyda A, Aust S, Sukhbaatar N, Reiner AT, Grimm C, et al. Peritoneal tumor spread in serous ovarian cancer-epithelial mesenchymal status and outcome. *Oncotarget* 2015;6:17261-75
33. Davidson B, Reich R, Trope CG, Wang TL, Shih Ie M. New determinates of disease progression and outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Histol Histopathol* 2010;25:1591-609
34. Roberts CM, Cardenas C, Tedja R. The Role of Intra-Tumoral Heterogeneity and Its Clinical Relevance in Epithelial Ovarian Cancer Recurrence and Metastasis. *Cancers (Basel)* 2019;11pii: cancers11081083
35. Klein CA. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* 2013;501:365-72
36. Moore RG, MacLaughlan S, Bast RC, Jr. Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010;116:240-5
37. Pavlou MP, Diamandis EP, Blasutig IM. The long journey of cancer biomarkers from the bench to the clinic. *Clin Chem* 2013;59:147-57
38. Bottoni P, Scatena R. The Role of CA 125 as Tumor Marker: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol* 2015;867:229-44
39. Leung F, Diamandis EP, Kulasingam V. Ovarian cancer biomarkers: current state and future implications from high-throughput technologies. *Adv Clin Chem* 2014;66:25-77
40. Bast RC, Jr., Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981;68:1331-7
41. Rustin GJ, Bast RC, Jr., Kelloff GJ, Barrett JC, Carter SK, Nisen PD, et al. Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:3919-26
42. Duffy MJ, Bonfrer JM, Kulpa J, Rustin GJ, Soletormos G, Torre GC, et al. CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:679-91
43. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005;65:2162-9
44. Yang Z, Luo Z, Zhao B, Zhang W, Zhang J, Li Z, et al. Diagnosis and preoperative predictive value of serum HE4 concentrations for optimal debulking in epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett* 2013;6:28-34
45. Molina R, Escudero JM, Auge JM, Filella X, Foj L, Torne A, et al. HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumour Biol* 2011;32:1087-95
46. Huang J, Chen J, Huang Q. Diagnostic value of HE4 in ovarian cancer: A meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018;231:35-42
47. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem* 2011;57:1534-44
48. Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, Yu Y, Lu KH, Diamandis EP, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005;99:267-77
49. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2009;112:40-6
50. Du Bois A, Pfisterer J. Future options for first-line therapy of advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15 Suppl 1:42-50

51. Matei D. Novel agents in ovarian cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2007;16:1227-39
52. Lloyd KL, Cree IA, Savage RS. Prediction of resistance to chemotherapy in ovarian cancer: a systematic review. *BMC Cancer* 2015;15:117
53. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011;365:2473-83
54. Balasubramaniam S, Beaver JA, Horton S, Fernandes LL, Tang S, Horne HN, et al. FDA Approval Summary: Rucaparib for the Treatment of Patients with Deleterious BRCA Mutation-Associated Advanced Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23:7165-7170
55. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:852-61
56. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203-13
57. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:3360-5
58. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* 2016;8:328rv4
59. Marinelli O, Annibali D, Aguzzi C, Tuyraerts S, Amant F, Morelli MB, et al. The Controversial Role of PD-1 and Its Ligands in Gynecological Malignancies. *Front Oncol* 2019;9:1073
60. Liu JF, Herold C, Gray KP, Penson RT, Horowitz N, Konstantinopoulos PA, et al. Assessment of Combined Nivolumab and Bevacizumab in Relapsed Ovarian Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2019 Oct 10 [Epub ahead of print]
61. Lianidou E, Hoon D. Circulating Tumor Cells and circulating Tumor DNA. In: Nader Rifai, Andea Rita Horvath and Carl Wittwer Editions. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Sixth Edition, Elsevier, 2017, p 1111-44
62. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci* 2019;40:172-186
63. Mader S, Pantel K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncol Res Treat* 2017;40:404-408
64. Yeung TL, Leung CS, Yip KP, Au Yeung CL, Wong ST, Mok SC. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;309:C444-56
65. Marzese DM, Hirose H, Hoon DS. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn* 2013;13:827-44
66. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426-37
67. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med* 2018;379:1754-1765
68. Otandault A, Anker P, Al Amir Dache Z, Guillaumon V, Meddeb R, Pastor B, et al. Recent advances in Circulating Nucleic Acids in oncology. *Ann Oncol* 2019;30:374-384
69. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, Calin GA. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15:541-563
70. Fabbri M. MicroRNAs and miRceptors: a new mechanism of action for intercellular communication. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018;373
71. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:145-56
72. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* 2016;126:1208-15
73. Keup C, Mach P, Aktas B, Tewes M, Kolberg HC, Hauch S, et al. RNA Profiles of Circulating Tumor Cells and Extracellular Vesicles for Therapy Stratification of Metastatic Breast Cancer Patients. *Clin Chem* 2018;64:1054-1062
74. Li X, Wang X. The emerging roles and therapeutic potential of exosomes in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer* 2017;16:92

75. Dorayappan KDP, Wallbillich JJ, Cohn DE, Selvendiran K. The biological significance and clinical applications of exosomes in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2016;142:199-205
76. Nawaz M, Fatima F, Nazarenko I, Ekstrom K, Murtaza I, Anees M, et al. Extracellular vesicles in ovarian cancer: applications to tumor biology, immunotherapy and biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* 2016;13:395-409
77. Chang L, Ni J, Zhu Y, Pang B, Graham P, Zhang H, et al. Liquid biopsy in ovarian cancer: recent advances in circulating extracellular vesicle detection for early diagnosis and monitoring progression. *Theranostics* 2019;9:4130-4140
78. Elias KM, Guo J, Bast RC, Jr. Early Detection of Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018;32:903-914
79. Giannopoulou L, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES. Liquid biopsy in ovarian cancer: recent advances on circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:186-197
80. Giannopoulou L, Zavridou M, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES. Liquid biopsy in ovarian cancer: the potential of circulating miRNAs and exosomes. *Transl Res* 2019;205:77-91
81. Gasparri ML, Savone D, Besharat RA, Farooqi AA, Bellati F, Ruscito I, et al. Circulating tumor cells as trigger to hematogenous spreads and potential biomarkers to predict the prognosis in ovarian cancer. *Tumour Biol* 2016;37:71-5
82. Kolostova K, Matkowski R, Jedryka M, Soter K, Cegan M, Pinkas M, et al. The added value of circulating tumor cells examination in ovarian cancer staging. *Am J Cancer Res* 2015;5:3363-75
83. Romero-Laorden N, Olmos D, Fehm T, Garcia-Donas J, Diaz-Padilla I. Circulating and disseminated tumor cells in ovarian cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol* 2014;133:632-9
84. Van Berckelaer C, Brouwers AJ, Peeters DJ, Tjalma W, Trinh XB, van Dam PA. Current and future role of circulating tumor cells in patients with epithelial ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol* 2016 pii: S0748-7983
85. Lee M, Kim EJ, Cho Y, Kim S, Chung HH, Park NH, et al. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) captured by microfluidic device in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2017;145:361-365
86. Obermayr E, Maritschnegg E, Agreiter C, Pecha N, Speiser P, Helmy-Bader S, et al. Efficient leukocyte depletion by a novel microfluidic platform enables the molecular detection and characterization of circulating tumor cells. *Oncotarget* 2017;9:812-823
87. Cui L, Kwong J, Wang CC. Prognostic value of circulating tumor cells and disseminated tumor cells in patients with ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Ovarian Res* 2015;8:38
88. Zeng L, Liang X, Liu Q, Yang Z. The Predictive Value of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer: A Meta Analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2015;27:1109-1117
89. Zhou Y, Bian B, Yuan X, Xie G, Ma Y, Shen L. Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2015;10:e0130873
90. Lou E, Vogel RI, Hoostal S, Wong P, Grad A, Monu M, et al. Analysis of Differentially Expressed MicroRNAs and Circulating Tumor Cells as Predictive Biomarkers of Platinum Chemoresistance in Primary Ovarian Carcinomas: A Prospective Study. *Oncologist* 2019;24:1422-e1013
91. Dong H, Tulley S, Zhao Q, Cho L, Chen D, Pearl ML, et al. The propensity of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in metastatic progression and therapeutic responsiveness. *Cancer Med* 2019;8:3864-3874
92. Kim M, Suh DH, Choi JY, Bu J, Kang YT, Kim K, et al. Post-debulking circulating tumor cell as a poor prognostic marker in advanced stage ovarian cancer: A prospective observational study. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e15354
93. Zhang X, Li H, Yu X, Li S, Lei Z, Li C, et al. Analysis of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer and Their Clinical Value as a Biomarker. *Cell Physiol Biochem* 2018;48:1983-1994
94. Guo YX, Neoh KH, Chang XH, Sun Y, Cheng HY, Ye X, et al. Diagnostic value of HE4+ circulating tumor cells in patients with suspicious ovarian cancer. *Oncotarget* 2018;9:7522-7533
95. Chebouti I, Kasimir-Bauer S, Buderath P, Wimberger P, Hauch S, Kimmig R, et al. EMT-like circulating tumor cells in ovarian cancer patients are enriched by platinum-based chemotherapy. *Oncotarget* 2017;8:48820-48831

96. Obermayr E, Bednarz-Knoll N, Orsetti B, Weier HU, Lambrechts S, Castillo-Tong DC, et al. Circulating tumor cells: potential markers of minimal residual disease in ovarian cancer? a study of the OVCAD consortium. *Oncotarget* 2017;8:106415-106428
97. Chebouti I KJ, Buderath P, Weber S, Wimberger P, Bokeloh Y, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. ERCC1-expressing circulating tumor cells as a potential diagnostic tool for monitoring response to platinum-based chemotherapy and for predicting post therapeutic outcome of ovarian cancer. *Oncotarget* 2017;8:24303-24313
98. Blassl C, Kuhlmann JD, Webers A, Wimberger P, Fehm T, Neubauer H. Gene expression profiling of single circulating tumor cells in ovarian cancer - Establishment of a multi-marker gene panel. *Mol Oncol* 2016;10:1030-42
99. Kolostova K, Pinkas M, Jakabova A, Pospisilova E, Svobodova P, Spicka J, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in ovarian cancer. *Am J Cancer Res* 2016;6:973-80
100. Pearl ML, Dong H, Tulley S, Zhao Q, Golightly M, Zucker S, et al. Treatment monitoring of patients with epithelial ovarian cancer using invasive circulating tumor cells (iCTCs). *Gynecol Oncol* 2015;137:229-38
101. Pearl ML, Zhao Q, Yang J, Dong H, Tulley S, Zhang Q, et al. Prognostic analysis of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2014;134:581-90
102. Kuhlmann JD, Wimberger P, Bankfalvi A, Keller T, Scholer S, Aktas B, et al. ERCC1-positive circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients as a predictive biomarker for platinum resistance. *Clin Chem* 2014;60:1282-9
103. Liu JF, Kindelberger D, Doyle C, Lowe A, Barry WT, Matulonis UA. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) in newly-diagnosed and recurrent ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2013;131:352-6
104. Obermayr E, Castillo-Tong DC, Pils D, Speiser P, Braicu I, Van Gorp T, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in patients with ovarian cancer improves their prognostic significance -- a study of the OVCAD consortium. *Gynecol Oncol* 2013;128:15-21
105. Behbakht K, Sill MW, Darcy KM, Rubin SC, Mannel RS, Waggoner S, et al. Phase II trial of the mTOR inhibitor, temsirolimus and evaluation of circulating tumor cells and tumor biomarkers in persistent and recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2011;123:19-26
106. Aktas B, Kasimir-Bauer S, Heubner M, Kimmig R, Wimberger P. Molecular profiling and prognostic relevance of circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients at primary diagnosis and after platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:822-30
107. Poveda A, Kaye SB, McCormack R, Wang S, Parekh T, Ricci D, et al. Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2011;122:567-72
108. Fan T, Zhao Q, Chen JJ, Chen WT, Pearl ML. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009;112:185-91
109. Judson PL, Geller MA, Bliss RL, Boente MP, Downs LS, Jr., Argenta PA, et al. Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognostic significance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003;91:389-94
110. Marth C, Kasic J, Kaern J, Trope C, Fodstad O. Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis. *Cancer* 2002;94:707-12
111. Obermayr E, Sanchez-Cabo F, Tea MK, Singer CF, Krainer M, Fischer MB, et al. Assessment of a six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients. *BMC Cancer* 2010;10:666
112. Gostner JM, Obermayr E, Braicu IE, Concin N, Mahner S, Vanderstichele A, et al. Immunobiochemical pathways of neopterin formation and tryptophan breakdown via indoleamine 2,3-dioxygenase correlate with circulating tumor cells in ovarian cancer patients- A study of the OVCAD consortium. *Gynecol Oncol* 2018;149:371-80
113. Kolostova K, Spicka J, Matkowski R, Bobek V. Isolation, primary culture, morphological and molecular characterization of circulating tumor cells in gynecological cancers. *Am J Transl Res* 2015;7:1203-13



114. Cheng X, Zhang L, Chen Y, Qing C. Circulating cell-free DNA and circulating tumor cells, the "liquid biopsies" in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2017;10:75
115. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 2018;36:1631-41
116. Barbosa A, Peixoto A, Pinto P, Pinheiro M, Teixeira MR. Potential clinical applications of circulating cell-free DNA in ovarian cancer patients. *Expert Rev Mol Med* 2018;20:e6
117. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, Colombo N, Gelao L, Fumagalli L, et al. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev* 2014;40:648-55
118. Martignetti JA, Camacho-Vanegas O, Priedigkeit N, Camacho C, Pereira E, Lin L, et al. Personalized ovarian cancer disease surveillance and detection of candidate therapeutic drug target in circulating tumor DNA. *Neoplasia* 2014;16:97-103
119. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* 2016;164:57-68
120. Paulsen T, Kumar P, Koseoglu MM, Dutta A. Discoveries of Extrachromosomal Circles of DNA in Normal and Tumor Cells. *Trends Genet* 2018;34:270-278
121. Shibata Y, Kumar P, Layer R, Willcox S, Gagan JR, Griffith JD, et al. Extrachromosomal microDNAs and chromosomal microdeletions in normal tissues. *Science* 2012;336:82-6
122. Kumar P, Dillon LW, Shibata Y, Jazaeri AA, Jones DR, Dutta A. Normal and Cancerous Tissues Release Extrachromosomal Circular DNA (eccDNA) into the Circulation. *Mol Cancer Res* 2017;15:1197-1205
123. Li B, Pu K, Ge L, Wu X. Diagnostic significance assessment of the circulating cell-free DNA in ovarian cancer: An updated meta-analysis. *Gene* 2019;714:143993
124. Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W, He Z, Zuo M, et al. Circulating Cell Free DNA as the Diagnostic Marker for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016;11:e0155495
125. Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature* 2019;570:385-389
126. Iwahashi N, Sakai K, Noguchi T, Yahata T, Matsukawa H, Toujima S, et al. Liquid biopsy-based comprehensive gene mutation profiling for gynecological cancer using CAnCER Personalized Profiling by deep Sequencing. *Sci Rep* 2019;9:10426
127. Kim YM, Lee SW, Lee YJ, Lee HY, Lee JE, Choi EK. Prospective study of the efficacy and utility of TP53 mutations in circulating tumor DNA as a non-invasive biomarker of treatment response monitoring in patients with high-grade serous ovarian carcinoma. *J Gynecol Oncol* 2019;30:e32
128. Lin KK, Harrell MI, Oza AM, Oaknin A, Ray-Coquard I, Tinker AV, et al. BRCA Reversion Mutations in Circulating Tumor DNA Predict Primary and Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma. *Cancer Discov* 2019;9:210-219
129. Slavin TP, Banks KC, Chudova D, Oxnard GR, Odegaard JI, Nagy RJ, et al. Identification of Incidental Germline Mutations in Patients With Advanced Solid Tumors Who Underwent Cell-Free Circulating Tumor DNA Sequencing. *J Clin Oncol* 2018;JCO1800328
130. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;359:926-930
131. Wang Y, Li L, Douville C, Cohen JD, Yen TT, Kinde I, et al. Evaluation of liquid from the Papanicolaou test and other liquid biopsies for the detection of endometrial and ovarian cancers. *Sci Transl Med* 2018;10 pii: 10/433/eaap8793
132. Arend RC, Londono AI, Montgomery AM, Smith HJ, Dobbin ZC, Katre AA, et al. Molecular Response to Neoadjuvant Chemotherapy in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Mol Cancer Res* 2018;16:813-824
133. Du ZH, Bi FF, Wang L, Yang Q. Next-generation sequencing unravels extensive genetic alteration in recurrent ovarian cancer and unique genetic changes in drug-resistant recurrent ovarian cancer. *Mol Genet Genomic Med* 2018 May 24 [Epub ahead of print]
134. Park YR, Kim YM, Lee SW, Lee HY, Lee GE, Lee JE, et al. Optimization to detect TP53 mutations in circulating cell-free tumor DNA from patients with serous epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol Sci* 2018;61:328-336

135. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017;9 pii: ean2415
136. Ratajska M, Koczkowska M, Zuk M, Gorczynski A, Kuzniacka A, Stukan M, et al. Detection of BRCA1/2 mutations in circulating tumor DNA from patients with ovarian cancer. *Oncotarget* 2017;8:101325-332
137. Weigelt B, Comino-Mendez I, de Bruijn I, Tian L, Meisel JL, Garcia-Murillas I, et al. Diverse BRCA1 and BRCA2 Reversion Mutations in Circulating Cell-Free DNA of Therapy-Resistant Breast or Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23:6708-20
138. Christie EL, Fereday S, Doig K, Pattnaik S, Dawson SJ, Bowtell DDL. Reversion of BRCA1/2 Germline Mutations Detected in Circulating Tumor DNA From Patients With High-Grade Serous Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 2017;35:1274-1280
139. Parkinson CA, Gale D, Piskorz AM, Biggs H, Hodgkin C, Addley H, et al. Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. *PLoS Med* 2016;13:e1002198
140. Pereira E, Camacho-Vanegas O, Anand S, Sebra R, Catalina Camacho S, Garnar-Wortzel L, et al. Personalized Circulating Tumor DNA Biomarkers Dynamically Predict Treatment Response and Survival In Gynecologic Cancers. *PLoS One* 2015;10:e0145754
141. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6:224ra24
142. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forsheew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497:108-12
143. Forsheew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DW, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012;4:136ra68
144. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Kinalski M, Kowalczyk O, Niklinska W, Chyczewski L. Circulating free DNA and p53 antibodies in plasma of patients with ovarian epithelial cancers. *Ann Oncol* 2011;22:1133-40
145. Swisher EM, Wollan M, Mahtani SM, Willner JB, Garcia R, Goff BA, et al. Tumor-specific p53 sequences in blood and peritoneal fluid of women with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:662-7
146. Otsuka J, Okuda T, Sekizawa A, Amemiya S, Saito H, Okai T, et al. Detection of p53 mutations in the plasma DNA of patients with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14:459-64
147. Giannopoulou L, Mastoraki S, Buderath P, Strati A, Pavlakis K, Kasimir-Bauer S, et al. ESR1 methylation in primary tumors and paired circulating tumor DNA of patients with high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2018;150:355-360
148. Widschwendter M, Zikan M, Wahl B, Lempiainen H, Paprotka T, Evans I, et al. The potential of circulating tumor DNA methylation analysis for the early detection and management of ovarian cancer. *Genome Med* 2017;9:116
149. Giannopoulou L, Chebouti I, Pavlakis K, Kasimir-Bauer S, Lianidou ES. RASSF1A promoter methylation in high-grade serous ovarian cancer: A direct comparison study in primary tumors, adjacent morphologically tumor cell-free tissues and paired circulating tumor DNA. *Oncotarget* 2017;8:21429-21443
150. Wang B, Yu L, Yang GZ, Luo X, Huang L. Application of multiplex nested methylated specific PCR in early diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:3003-7
151. Zhou F, Ma M, Tao G, Chen X, Xie W, Wang Y, et al. Detection of circulating methylated opioid binding protein/cell adhesion molecule-like gene as a biomarker for ovarian carcinoma. *Clin Lab* 2014;60:759-65
152. Wu Y, Zhang X, Lin L, Ma XP, Ma YC, Liu PS. Aberrant methylation of RASSF2A in tumors and plasma of patients with epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:1171-6

153. Zhang Q, Hu G, Yang Q, Dong R, Xie X, Ma D, et al. A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA. *Gynecol Oncol* 2013;130:132-9
154. Dong R, Yu J, Pu H, Zhang Z, Xu X. Frequent SLIT2 promoter methylation in the serum of patients with ovarian cancer. *J Int Med Res* 2012;40:681-6
155. Bondurant AE, Huang Z, Whitaker RS, Simel LR, Berchuck A, Murphy SK. Quantitative detection of RASSF1A DNA promoter methylation in tumors and serum of patients with serous epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2011;123:581-7
156. Liggett TE, Melnikov A, Yi Q, Replogle C, Hu W, Rotmensch J, et al. Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2011;120:113-20
157. Melnikov A, Scholtens D, Godwin A, Levenson V. Differential methylation profile of ovarian cancer in tissues and plasma. *J Mol Diagn* 2009;11:60-5
158. Ibanez de Caceres I, Battagli C, Esteller M, Herman JG, Dulaimi E, Edelson MI, et al. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res* 2004;64:6476-81
159. Gifford G, Paul J, Vasey PA, Kaye SB, Brown R. The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:4420-6
160. Vanderstichele A, Busschaert P, Smeets D, Landolfo C, Van Nieuwenhuysen E, Leunen K, et al. Chromosomal instability in cell-free DNA as a highly specific biomarker for detection of ovarian cancer in women with adnexal masses. *Clin Cancer Res* 2017;23:2223-2231
161. Cohen PA, Flowers N, Tong S, Hannan N, Pertile MD, Hui L. Abnormal plasma DNA profiles in early ovarian cancer using a non-invasive prenatal testing platform: implications for cancer screening. *BMC Med* 2016;14:126
162. Harris FR, Kovtun IV, Smadbeck J, Multinu F, Jatoi A, Kosari F, et al. Quantification of Somatic Chromosomal Rearrangements in Circulating Cell-Free DNA from Ovarian Cancers. *Sci Rep* 2016;6:29831
163. Kuhlmann JD, Schwarzenbach H, Wimberger P, Poetsch M, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. LOH at 6q and 10q in fractionated circulating DNA of ovarian cancer patients is predictive for tumor cell spread and overall survival. *BMC Cancer* 2012;12:325
164. Zhang R, Pu W, Zhang S, Chen L, Zhu W, Xiao L, et al. Clinical value of ALU concentration and integrity index for the early diagnosis of ovarian cancer: A retrospective cohort trial. *PLoS One* 2018;13:e0191756
165. Shao X, He Y, Ji M, Chen X, Qi J, Shi W, et al. Quantitative analysis of cell-free DNA in ovarian cancer. *Oncol Lett* 2015;10:3478-3482
166. Steffensen KD, Madsen CV, Andersen RF, Waldstrom M, Adimi P, Jakobsen A. Prognostic importance of cell-free DNA in chemotherapy resistant ovarian cancer treated with bevacizumab. *Eur J Cancer* 2014;50:2611-8
167. No JH, Kim K, Park KH, Kim YB. Cell-free DNA level as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* 2012;32:3467-71
168. Wimberger P, Roth C, Pantel K, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, Schwarzenbach H. Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2011;128:2572-80
169. Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, Dang D, Han LY, Godwin A, et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer* 2010;116:1918-25
170. Capizzi E, Gabusi E, Grigioni AD, De Iaco P, Rosati M, Zamagni C, et al. Quantification of free plasma DNA before and after chemotherapy in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Diagn Mol Pathol* 2008;17:34-8
171. Kamat AA, Sood AK, Dang D, Gershenson DM, Simpson JL, Bischoff FZ. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:230-4
172. Meng X, Schwarzenbach H, Yang Y, Muller V, Li N, Tian D, et al. Circulating Mitochondrial DNA is Linked to Progression and Prognosis of Epithelial Ovarian Cancer. *Transl Oncol* 2019;12:1213-1220

173. Keseru JS, Soltesz B, Lukacs J, Marton E, Szilagyi-Bonizs M, Penyige A, et al. Detection of cell-free, exosomal and whole blood mitochondrial DNA copy number in plasma or whole blood of patients with serous epithelial ovarian cancer. *J Biotechnol* 2019;298:76-81
174. Kalavaska K, Minarik T, Vlkova B, Manasova D, Kubickova M, Jurik A, et al. Prognostic value of various subtypes of extracellular DNA in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res* 2018;11:85
175. Choudhuri S, Sharma C, Banerjee A, Kumar S, Kumar L, Singh N. A repertoire of biomarkers helps in detection and assessment of therapeutic response in epithelial ovarian cancer. *Mol Cell Biochem* 2014;386:259-69
176. Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R, Holzgreve W, Zhong X. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 2008;112:843-50
177. Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D, Baldwin MF, Han LY, Lin YG, et al. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1369-74
178. Yu M. Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges. *Mitochondrial DNA* 2012;23:329-32
179. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014;32:579-86
180. Mayor P, Gay LM, Lele S, Elvin JA. BRCA1 reversion mutation acquired after treatment identified by liquid biopsy. *Gynecol Oncol Rep* 2017;21:57-60
181. Kulasingam V, Diamandis EP. Genomic profiling for copy number changes in plasma of ovarian cancer patients - a new era for cancer diagnostics? *BMC Med* 2016;14:186
182. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-59
183. Barton CA, Hacker NF, Clark SJ, O'Brien PM. DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol Oncol* 2008;109:129-39
184. Earp MA, Cunningham JM. DNA methylation changes in epithelial ovarian cancer histotypes. *Genomics* 2015;106:311-21
185. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Gayther SA, Apostolidou S, et al. An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. *PLoS One* 2009;4:e8274
186. Flanagan JM, Wilhelm-Benartzi CS, Metcalf M, Kaye SB, Brown R. Association of somatic DNA methylation variability with progression-free survival and toxicity in ovarian cancer patients. *Ann Oncol* 2013;24:2813-8
187. Flanagan JM, Wilson A, Koo C, Masrour N, Gallon J, Loomis E, et al. Platinum-based chemotherapy induces methylation changes in blood DNA associated with overall survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2017;23:2213-2222
188. Wittenberger T, Sleigh S, Reisel D, Zikan M, Wahl B, Alunni-Fabbroni M, et al. DNA methylation markers for early detection of women's cancer: promise and challenges. *Epigenomics* 2014;6:311-27
189. Nakamura K, Sawada K, Yoshimura A, Kinose Y, Nakatsuka E, Kimura T. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in ovarian cancer. *Mol Cancer* 2016;15:48
190. Zheng H, Liu JY, Song FJ, Chen KX. Advances in circulating microRNAs as diagnostic and prognostic markers for ovarian cancer. *Cancer Biol Med* 2013;10:123-30
191. Zhou Q, Zuo MZ, He Z, Li HR, Li W. Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for ovarian cancer: A pooled analysis of individual studies. *Int J Biol Markers* 2018;1724600818766500
192. Wang H, Wang T, Shi W, Liu Y, Chen L, Li Z. Comprehensive analysis on diagnostic value of circulating miRNAs for patients with ovarian cancer. *Oncotarget* 2017;8:66620-66628
193. Wang X, Kong D, Wang C, Ding X, Zhang L, Zhao M, et al. Circulating microRNAs as novel potential diagnostic biomarkers for ovarian cancer: a systematic review and updated meta-analysis. *J Ovarian Res* 2019;12:24
194. Kuhlmann JD, Baraniskin A, Hahn SA, Mosel F, Bredemeier M, Wimberger P, et al. Circulating U2 small nuclear RNA fragments as a novel diagnostic tool for patients with epithelial ovarian cancer. *Clin Chem* 2014;60:206-13

195. Pandey R, Woo HH, Varghese F, Zhou M, Chambers SK. Circulating miRNA Profiling of Women at High Risk for Ovarian Cancer. *Transl Oncol* 2019;12:714-725
196. Marton E, Lukacs J, Penyige A, Janka E, Hegedus L, Soltész B, et al. Circulating epithelial-mesenchymal transition-associated miRNAs are promising biomarkers in ovarian cancer. *J Biotechnol* 2019;297:58-65
197. Su YY, Sun L, Guo ZR, Li JC, Bai TT, Cai XX, et al. Upregulated expression of serum exosomal miR-375 and miR-1307 enhance the diagnostic power of CA125 for ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2019;12:6
198. Kuhlmann JD, Chebouti I, Kimmig R, Buderath P, Reuter M, Puppel SH, et al. Extracellular vesicle-associated miRNAs in ovarian cancer - design of an integrated NGS-based workflow for the identification of blood-based biomarkers for platinum-resistance. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:1053-1062
199. Yokoi A, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Yoneoka Y, Takahashi K, Shimizu H, et al. Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening. *Nat Commun* 2018;9:4319
200. Pan C, Stevic I, Muller V, Ni Q, Oliveira-Ferrer L, Pantel K, et al. Exosomal microRNAs as tumor markers in epithelial ovarian cancer. *Mol Oncol* 2018;12:1935-1948
201. Kobayashi M, Sawada K, Nakamura K, Yoshimura A, Miyamoto M, Shimizu A, et al. Exosomal miR-1290 is a potential biomarker of high-grade serous ovarian carcinoma and can discriminate patients from those with malignancies of other histological types. *J Ovarian Res* 2018;11:81
202. Yoshimura A, Sawada K, Nakamura K, Kinose Y, Nakatsuka E, Kobayashi M, et al. Exosomal miR-99a-5p is elevated in sera of ovarian cancer patients and promotes cancer cell invasion by increasing fibronectin and vitronectin expression in neighboring peritoneal mesothelial cells. *BMC Cancer* 2018;18:1065
203. Ren X, Zhang H, Cong H, Wang X, Ni H, Shen X, et al. Diagnostic Model of Serum miR-193a-5p, HE4 and CA125 Improves the Diagnostic Efficacy of Epithelium Ovarian Cancer. *Pathol Oncol Res* 2018;24:739-744
204. Mahmoud EH, Fawzy A, RA AE. Serum MicroRNA-21 Negatively Relates to Expression of Programmed Cell Death-4 in Patients with Epithelial Ovarian Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19:33-38
205. Shah JS, Gard GB, Yang J, Maidens J, Valmadre S, Soon PS, et al. Combining serum microRNA and CA-125 as prognostic indicators of preoperative surgical outcome in women with high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2018;148:181-188
206. Elias KM, Fendler W, Stawiski K, Fiascone SJ, Vitonis AF, Berkowitz RS, et al. Diagnostic potential for a serum miRNA neural network for detection of ovarian cancer. *Elife* 2017;6 pii: e28932
207. Halvorsen AR, Kristensen G, Embleton A, Adusei C, Barretina-Ginesta MP, Beale P, et al. Evaluation of Prognostic and Predictive Significance of Circulating MicroRNAs in Ovarian Cancer Patients. *Dis Markers* 2017;2017:3098542
208. Yokoi A, Yoshioka Y, Hirakawa A, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, et al. A combination of circulating miRNAs for the early detection of ovarian cancer. *Oncotarget* 2017;8:89811-89823
209. Todeschini P, Salviato E, Paracchini L, Ferracin M, Petrillo M, Zanotti L, et al. Circulating miRNA landscape identifies miR-1246 as promising diagnostic biomarker in high-grade serous ovarian carcinoma: A validation across two independent cohorts. *Cancer Lett* 2016;388:320-327
210. Yang L, Wei QM, Zhang XW, Sheng Q, Yan XT. MiR-376a promotion of proliferation and metastases in ovarian cancer: Potential role as a biomarker. *Life Sci* 2017;173:62-67
211. Zhu T, Gao W, Chen X, Zhang Y, Wu M, Zhang P, et al. A Pilot Study of Circulating MicroRNA-125b as a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Epithelial Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2017;27:3-10
212. Gong L, Wang C, Gao Y, Wang J. Decreased expression of microRNA-148a predicts poor prognosis in ovarian cancer and associates with tumor growth and metastasis. *Biomed Pharmacother* 2016;83:58-63

213. Meng X, Muller V, Milde-Langosch K, Trillsch F, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating Cell-Free miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in Patients with Epithelial Ovarian Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2016;924:3-8
214. Zuberi M, Khan I, Mir R, Gandhi G, Ray PC, Saxena A. Utility of Serum miR-125b as a Diagnostic and Prognostic Indicator and Its Alliance with a Panel of Tumor Suppressor Genes in Epithelial Ovarian Cancer. *PLoS One* 2016;11:e0153902
215. Zuberi M, Khan I, Gandhi G, Ray PC, Saxena A. The conglomeration of diagnostic, prognostic and therapeutic potential of serum miR-199a and its association with clinicopathological features in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol* 2016;37:11259-66
216. Meng X, Muller V, Milde-Langosch K, Trillsch F, Pantel K, Schwarzenbach H. Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2016;7:16923-35
217. Meng X, Joosse SA, Muller V, Trillsch F, Milde-Langosch K, Mahner S, et al. Diagnostic and prognostic potential of serum miR-7, miR-16, miR-25, miR-93, miR-182, miR-376a and miR-429 in ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 2015;113:1358-66
218. Kapetanakis NI, Uzan C, Jimenez-Pailhes AS, Gouy S, Bentivegna E, Morice P, et al. Plasma miR-200b in ovarian carcinoma patients: distinct pattern of pre/post-treatment variation compared to CA-125 and potential for prediction of progression-free survival. *Oncotarget* 2015;6:36815-24
219. Zuberi M, Mir R, Das J, Ahmad I, Javid J, Yadav P, et al. Expression of serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. *Clin Transl Oncol* 2015;17:779-87
220. Liang H, Jiang Z, Xie G, Lu Y. Serum microRNA-145 as a novel biomarker in human ovarian cancer. *Tumour Biol* 2015;36:5305-13
221. Gao YC, Wu J. MicroRNA-200c and microRNA-141 as potential diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *Tumour Biol* 2015;36:4843-50
222. Langhe R, Norris L, Saadeh FA, Blackshields G, Varley R, Harrison A, et al. A novel serum microRNA panel to discriminate benign from malignant ovarian disease. *Cancer Lett* 2015;356:628-36
223. Shen W, Song M, Liu J, Qiu G, Li T, Hu Y, et al. MiR-26a promotes ovarian cancer proliferation and tumorigenesis. *PLoS One* 2014;9:e86871
224. Ji T, Zheng ZG, Wang FM, Xu LJ, Li LF, Cheng QH, et al. Differential microRNA expression by Solexa sequencing in the sera of ovarian cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:1739-43
225. Shapira I, Oswald M, Lovecchio J, Khalili H, Menzin A, Whyte J, et al. Circulating biomarkers for detection of ovarian cancer and predicting cancer outcomes. *Br J Cancer* 2014;110:976-83
226. Zheng H, Zhang L, Zhao Y, Yang D, Song F, Wen Y, et al. Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *PLoS One* 2013;8:e77853
227. Xu YZ, Xi QH, Ge WL, Zhang XQ. Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:1057-60
228. Suryawanshi S, Vlad AM, Lin HM, Mantia-Smaldone G, Laskey R, Lee M, et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:1213-24
229. Guo F, Tian J, Lin Y, Jin Y, Wang L, Cui M. Serum microRNA-92 expression in patients with ovarian epithelial carcinoma. *J Int Med Res* 2013;41:1456-61
230. Hong F, Li Y, Xu Y, Zhu L. Prognostic significance of serum microRNA-221 expression in human epithelial ovarian cancer. *J Int Med Res* 2013;41:64-71
231. Kan CW, Hahn MA, Gard GB, Maidens J, Huh JY, Marsh DJ, et al. Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2012;12:627
232. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009;112:55-9
233. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110:13-21

234. Hausler SF, Keller A, Chandran PA, Ziegler K, Zipp K, Heuer S, et al. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer* 2010;103:693-700
235. Wu H, Xiao Z, Wang K, Liu W, Hao Q. MiR-145 is downregulated in human ovarian cancer and modulates cell growth and invasion by targeting p70S6K1 and MUC1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;441:693-700
236. Jiang H, Qu L, Wang Y, Cong J, Wang W, Yang X. miR-99a promotes proliferation targeting FGFR3 in human epithelial ovarian cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2014;68:163-9
237. Fukagawa S, Miyata K, Yotsumoto F, Kiyoshima C, Nam SO, Anan H, et al. MicroRNA-135a-3p as a promising biomarker and nucleic acid therapeutic agent for ovarian cancer. *Cancer Sci* 2017;108:886-896
238. Ayaz L, Cayan F, Balci S, Gorur A, Akbayir S, Yildirim Yaroglu H, et al. Circulating microRNA expression profiles in ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol* 2014;34:620-4
239. Ruan L, Xie Y, Liu F, Chen X. Serum miR-1181 and miR-4314 associated with ovarian cancer: MiRNA microarray data analysis for a pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018;222:31-38
240. Chao A, Lai CH, Chen HC, Lin CY, Tsai CL, Tang YH, et al. Serum microRNAs in clear cell carcinoma of the ovary. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2014;53:536-41
241. Salem M, O'Brien JA, Bernaudo S, Shawer H, Ye G, Brkic J, et al. miRNA-590-3p promotes ovarian cancer growth and metastasis via a novel FOXA2-versican pathway. *Cancer Res* 2018 May 10 pii: 0008-5472CAN-17-3014
242. Benson EA, Skaar TC, Liu Y, Nephew KP, Matei D. Carboplatin with Decitabine Therapy, in Recurrent Platinum Resistant Ovarian Cancer, Alters Circulating miRNAs Concentrations: A Pilot Study. *PLoS One* 2015;10:e0141279
243. Ying X, Wu Q, Wu X, Zhu Q, Wang X, Jiang L, et al. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget* 2016;7:43076-43087
244. Xu Y, Xu L, Zheng J, Geng L, Zhao S. MiR-101 inhibits ovarian carcinogenesis by repressing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Open Bio* 2017;7:1258-1266
245. Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res* 2015;21:4786-800
246. Klotten V, Neumann MHD, Di Pasquale F, Sprenger-Haussels M, Shaffer JM, Schlumpberger M, et al. Multicenter Evaluation of Circulating Plasma MicroRNA Extraction Technologies for the Development of Clinically Feasible Reverse Transcription Quantitative PCR and Next-Generation Sequencing Analytical Work Flows. *Clin Chem* 2019;65:1132-1140
247. Lampignano R, Neumann MHD, Weber S, Klotten V, Herdean A, Voss T, et al. Multicenter Evaluation of Circulating Cell-Free DNA Extraction and Downstream Analyses for the Development of Standardized (Pre)analytical Work Flows. *Clin Chem* 2019 Oct 18 [Epub ahead of print]
248. Qiu J. Epigenetics: unfinished symphony. *Nature* 2006;441:143-5
249. Jones PA, Baylin SB. The Epigenomics of Cancer. *Cell* 2007;128:683-92
250. Goovaerts T, Steyaert S, Vandenbussche CA, Galle J, Thas O, Van Criekinge W, et al. A comprehensive overview of genomic imprinting in breast and its deregulation in cancer. *Nat Commun* 2018;9:4120
251. Fedoriw A, Mugford J, Magnuson T. Genomic imprinting and epigenetic control of development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a008136
252. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286-98
253. Mastoraki S, Lianidou E. DNA and Histone Methylation in Lung Cancer. In: Kaneda A, Tsukada Y-i, editors. *DNA and Histone Methylation as Cancer Targets*. Cham: Springer International Publishing. p. 403-36
254. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003;22:6479-83
255. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21-33
256. Laird PW. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet* 2005;14 R65-76

257. Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011;17:330-9
258. Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20:590-607
259. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013;14:204-20
260. Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54
261. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:988-93
262. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett* 2009;583:1713-20
263. Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet* 2018;392:777-786
264. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003;3:253-66
265. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012;13:484-92
266. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008;9:465-76
267. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:50-5
268. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28
269. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004;4:143-53
270. Esteller M. Epigenetic changes in cancer. *F1000 biology reports*. 2011;3:9.
271. Feinberg AP, Koldobskiy MA, Gondor A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet* 2016;17:284-99
272. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 1971;68:820-3
273. Weinberg B. *The biology of cancer*. Editors Garland Science 2007
274. Miller BF, Sanchez-Vega F, Elnitski L. The Emergence of Pan-Cancer CIMP and Its Elusive Interpretation. *Biomolecules* 2016;6
275. Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 2010;19:698-711
276. Jones PA, Issa JP, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet* 2016;17:630-41
277. Barros-Silva D, Marques CJ, Henrique R, Jeronimo C. Profiling DNA Methylation Based on Next-Generation Sequencing Approaches: New Insights and Clinical Applications. *Genes (Basel)* 2018;9
278. Hernandez HG, Tse MY, Pang SC, Arboleda H, Forero DA. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *Biotechniques* 2013;55:181-97
279. Huang J, Wang L. Cell-Free DNA Methylation Profiling Analysis-Technologies and Bioinformatics. *Cancers (Basel)* 2019;11 pii: cancers11111741
280. Kristensen LS, Hansen LL. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin Chem* 2009;55:1471-83
281. Wu Z, Bai Y, Cheng Z, Liu F, Wang P, Yang D, et al. Absolute quantification of DNA methylation using microfluidic chip-based digital PCR. *Biosens Bioelectron* 2017;96:339-344
282. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:9821-6
283. Ku JL, Jeon YK, Park JG. Methylation-specific PCR. *Methods Mol Biol* 2011;791:23-32
284. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E32
285. Uehiro N, Sato F, Pu F, Tanaka S, Kawashima M, Kawaguchi K, et al. Circulating cell-free DNA-based epigenetic assay can detect early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2016;18:129
286. Barault L, Amatu A, Siravegna G, Ponzetti A, Moran S, Cassingena A, et al. Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. *Gut* 2018;67:1995-2005



287. Boeckx N, Op de Beeck K, Beyens M, Deschoolmeester V, Hermans C, De Clercq P, et al. Mutation and Methylation Analysis of Circulating Tumor DNA Can Be Used for Follow-up of Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Clin Colorectal Cancer* 2018;17:e369-e379
288. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 2007;35:e41
289. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* 2008;3:1903-8
290. Wojdacz TK, Borgbo T, Hansen LL. Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. *Epigenetics* 2009;4:231-4
291. Shen SY, Singhanian R, Fehring G, Chakravarthy A, Roehrl MHA, Chadwick D, et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature* 2018;563:579-583
292. Bachman M, Uribe-Lewis S, Yang X, Williams M, Murrell A, Balasubramanian S. 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nat Chem* 2014;6:1049-55
293. Koivunen P, Laukka T. The TET enzymes. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:1339-1348
294. Vasanthakumar A, Godley LA. 5-hydroxymethylcytosine in cancer: significance in diagnosis and therapy. *Cancer Genet* 2015;208:167-77
295. Balch C, Fang F, Matei DE, Huang TH, Nephew KP. Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer. *Endocrinology* 2009;150:4003-11
296. Natanzon Y, Goode EL, Cunningham JM. Epigenetics in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol* 2018;51:160-169
297. Asadollahi R, Hyde CA, Zhong XY. Epigenetics of ovarian cancer: from the lab to the clinic. *Gynecol Oncol* 2010;118:81-7
298. Shen H, Fridley BL, Song H, Lawrenson K, Cunningham JM, Ramus SJ, et al. Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat Commun* 2013;4:1628
299. Bodelon C, Killian JK, Sampson JN, Anderson WF, Matsuno R, Brinton LA, et al. Molecular classification of epithelial ovarian cancer based on methylation profiling: evidence for survival heterogeneity. *Clin Cancer Res* 2019;25:5937-5946
300. Kolbe DL, DeLoia JA, Porter-Gill P, Strange M, Petrykowska HM, Guirguis A, et al. Differential analysis of ovarian and endometrial cancers identifies a methylator phenotype. *PLoS One* 2012;7:e32941
301. Hentze JL, Hogdall CK, Hogdall EV. Methylation and ovarian cancer: Can DNA methylation be of diagnostic use? *Mol Clin Oncol* 2019;10:323-330
302. Feng LY, Chen CX, Li L. Hypermethylation of tumor suppressor genes is a risk factor for poor prognosis in ovarian cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e14588
303. Gloss BS, Samimi G. Epigenetic biomarkers in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett* 2014;342:257-63
304. Moufarrij S, Dandapani M, Arthofer E, Gomez S, Srivastava A, Lopez-Acevedo M, et al. Epigenetic therapy for ovarian cancer: promise and progress. *Clin Epigenetics* 2019;11:7
305. Nguyen HT, Tian G, Murph MM. Molecular Epigenetics in the Management of Ovarian Cancer: Are We Investigating a Rational Clinical Promise? *Front Oncol* 2014;4:71
306. Fang F, Balch C, Schilder J, Breen T, Zhang S, Shen C, et al. A phase 1 and pharmacodynamic study of decitabine in combination with carboplatin in patients with recurrent, platinum-resistant, epithelial ovarian cancer. *Cancer* 2010;116:4043-53
307. Matei D, Fang F, Shen C, Schilder J, Arnold A, Zeng Y, et al. Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer. *Cancer Res* 2012;72:2197-205
308. Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796:114-28
309. Volodko N, Gordon M, Salla M, Ghazaleh HA, Baksh S. RASSF tumor suppressor gene family: biological functions and regulation. *FEBS Lett* 2014;588:2671-84
310. Grawenda AM, O'Neill E. Clinical utility of RASSF1A methylation in human malignancies. *Br J Cancer* 2015;113:372-81
311. van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2007;1776:58-85

312. Kioulafa M, Kaklamanis L, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation in operable breast cancer. *Clin Biochem* 2009;42:970-5
313. Balgouranidou I, Matthaïos D, Karayiannakis A, Bolanaki H, Michailidis P, Xenidis N, et al. Prognostic role of APC and RASSF1A promoter methylation status in cell free circulating DNA of operable gastric cancer patients. *Mutat Res* 2015;778:46-51
314. Wang H, Cui M, Zhang S, He J, Song L, Chen Y. Relationship between RAS Association Domain Family Protein 1A Promoter Methylation and the Clinicopathological Characteristics in Patients with Ovarian Cancer: A Systematic Meta-Analysis. *Gynecol Obstet Invest* 2018;83:349-357
315. Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer* 2003;107:970-5
316. Chiu RW, Chim SS, Wong IH, Wong CS, Lee WS, To KF, et al. Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas. *Am J Pathol* 2007;170:941-50
317. Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene* 2001;20:1509-18
318. Rathi A, Virmani AK, Schorge JO, Elias KJ, Maruyama R, Minna JD, et al. Methylation profiles of sporadic ovarian tumors and nonmalignant ovaries from high-risk women. *Clin Cancer Res* 2002;8:3324-31
319. Yoon JH, Dammann R, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;94:212-7
320. Bhagat R, Chadaga S, Premalata CS, Ramesh G, Ramesh C, Pallavi VR, et al. Aberrant promoter methylation of the RASSF1A and APC genes in epithelial ovarian carcinoma development. *Cell Oncol (Dordr)* 2012;35:473-9
321. Choi YL, Kang SY, Shin YK, Choi JS, Kim SH, Lee SJ, et al. Aberrant hypermethylation of RASSF1A promoter in ovarian borderline tumors and carcinomas. *Virchows Arch* 2006;448:331-6
322. Montavon C, Gloss BS, Warton K, Barton CA, Statham AL, Scurry JP, et al. Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2012;124:582-8
323. Zhu X, Yang H, Lang J, Zhang Y. Ras association domain family protein 1a hypermethylation and PD-L1 expression in ovarian cancer: A retrospective study of 112 cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019;240:103-108
324. Chai H, Brown RE. Field effect in cancer-an update. *Ann Clin Lab Sci* 2009;39:331-7
325. Teschendorff AE, Gao Y, Jones A, Ruebner M, Beckmann MW, Wachter DL, et al. DNA methylation outliers in normal breast tissue identify field defects that are enriched in cancer. *Nat Commun* 2016;7:10478
326. Spitzwieser M, Holzweber E, Pfeiler G, Hacker S, Cichna-Markl M. Applicability of HIN-1, MGMT and RASSF1A promoter methylation as biomarkers for detecting field cancerization in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2015;17:125
327. Van der Auwera I, Bovie C, Svensson C, Trinh XB, Limame R, van Dam P, et al. Quantitative methylation profiling in tumor and matched morphologically normal tissues from breast cancer patients. *BMC Cancer* 2010;10:97
328. Arafa M, Kridelka F, Mathias V, Vanbellinthen JF, Renard I, Foidart JM, et al. High frequency of RASSF1A and RARb2 gene promoter methylation in morphologically normal endometrium adjacent to endometrioid adenocarcinoma. *Histopathology* 2008;53:525-32
329. Mungenast F, Thalhammer T. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:192
330. Voutsadakis IA. Hormone Receptors in Serous Ovarian Carcinoma: Prognosis, Pathogenesis, and Treatment Considerations. *Clin Med Insights Oncol* 2016;10:17-25
331. Paleari L, DeCensi A. Endocrine therapy in ovarian cancer: where do we stand? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2018;30:17-22
332. Langdon SP, Gourley C, Gabra H, Stanley B. Endocrine therapy in epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2017;17:109-117

333. Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, Chimonidou M, Politaki H, Voutsina A, et al. ESR1 methylation: a liquid biopsy-based epigenetic assay for the follow up of patients with metastatic breast cancer receiving endocrine treatment. *Clin Cancer Res* 2018;24:1500-1510
334. Imura M, Yamashita S, Cai LY, Furuta J, Wakabayashi M, Yasugi T, et al. Methylation and expression analysis of 15 genes and three normally-methylated genes in 13 Ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett* 2006;241:213-20
335. O'Doherty AM, Church SW, Russell SE, Nelson J, Hickey I. Methylation status of oestrogen receptor-alpha gene promoter sequences in human ovarian epithelial cell lines. *Br J Cancer* 2002;86:282-4
336. Wiley A, Katsaros D, Chen H, Rigault de la Longrais IA, Beeghly A, Puopolo M, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in malignant ovarian tumors and in ovarian tumors with low malignant potential. *Cancer* 2006;107:299-308
337. Brait M, Maldonado L, Noordhuis MG, Begum S, Loyo M, Poeta ML, et al. Association of promoter methylation of VGF and PGP9.5 with ovarian cancer progression. *PLoS One* 2013;8:e70878
338. Chmelarova M, Krepinska E, Spacek J, Laco J, Nekvindova J, Palicka V. Methylation analysis of tumour suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA. *Folia Biol (Praha)* 2012;58:246-50
339. Ozdemir F, Altinisik J, Karateke A, Coksuer H, Buyru N. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Exp Ther Med* 2012;4:1092-96
340. Vo LT, Thuan TB, Thu DM, Uyen NQ, Ha NT, To TV. Methylation profile of BRCA1, RASSF1A and ER in Vietnamese women with ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:7713-8
341. Kirn V, Shi R, Heublein S, Knabl J, Guenther-Biller M, Andergassen U, et al. Estrogen receptor promoter methylation predicts survival in low-grade ovarian carcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014;140:1681-7
342. Feng Z, Wen H, Ju X, Bi R, Chen X, Yang W, et al. Hormone receptor expression profiles differ between primary and recurrent high-grade serous ovarian cancers. *Oncotarget* 2017;8:32848-55
343. Matsuo K, Sheridan TB, Mabuchi S, Yoshino K, Hasegawa K, Studeman KD, et al. Estrogen receptor expression and increased risk of lymphovascular space invasion in high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2014;133:473-9
344. Matsumura S, Ohta T, Yamanouchi K, Liu Z, Sudo T, Kojimahara T, et al. Activation of estrogen receptor alpha by estradiol and cisplatin induces platinum-resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2017;18:730-739
345. Shen Z, Luo H, Li S, Sheng B, Zhao M, Zhu H, et al. Correlation between estrogen receptor expression and prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8:62400-62413
346. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 2014;14:611-22
347. Sosa MS, Parikh F, Maia AG, Estrada Y, Bosch A, Bragado P, et al. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RARBeta-driven quiescence programmes. *Nat Commun* 2015;6:6170
348. Senturk E, Cohen S, Dottino PR, Martignetti JA. A critical re-appraisal of BRCA1 methylation studies in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010;119:376-83
349. Papadimitriou M, Mountzios G, Papadimitriou CA. The role of PARP inhibition in triple-negative breast cancer: Unraveling the wide spectrum of synthetic lethality. *Cancer Treat Rev* 2018;67:34-44
350. Sun C, Li N, Ding D, Weng D, Meng L, Chen G, et al. The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e95285
351. Qiao B, Zhang Z, Li Y. Association of MGMT promoter methylation with tumorigenesis features in patients with ovarian cancer: A systematic meta-analysis. *Mol Genet Genomic Med* 2018;6:69-76
352. Dong T, Zhang M, Dong Y, Herman JG, van Engeland M, Zhong G, et al. Methylation of RASSF10 promotes cell proliferation and serves as a docetaxel resistant marker in human breast cancer. *Discov Med* 2015;20:261-71

353. Jin Y, Cao B, Zhang M, Zhan Q, Herman JG, Yu M, et al. RASSF10 suppresses hepatocellular carcinoma growth by activating P53 signaling and methylation of RASSF10 is a docetaxel resistant marker. *Genes Cancer* 2015;6:231-40
354. Guo J, Yang Y, Linghu E, Zhan Q, Brock MV, Herman JG, et al. RASSF10 suppresses colorectal cancer growth by activating P53 signaling and sensitizes colorectal cancer cell to docetaxel. *Oncotarget* 2015;6:4202-13
355. Liu W, Vivian CJ, Brinker AE, Hampton KR, Lianidou E, Welch DR. Microenvironmental Influences on Metastasis Suppressor Expression and Function during a Metastatic Cell's Journey. *Cancer Microenviron* 2014;7:117-31
356. Noh HS, Hah YS, Ha JH, Kang MY, Zada S, Rha SY, et al. Regulation of the epithelial to mesenchymal transition and metastasis by Raf kinase inhibitory protein-dependent Notch1 activity. *Oncotarget* 2016;7:4632-46
357. Farooqi AA, Li Y, Sarkar FH. The biological complexity of RKIP signaling in human cancers. *Exp Mol Med* 2015;47:e185
358. Al-Mulla F, Hagan S, Al-Ali W, Jacob SP, Behbehani AI, Bitar MS, et al. Raf kinase inhibitor protein: mechanism of loss of expression and association with genomic instability. *J Clin Pathol* 2008;61:524-9
359. Kim GE, Kim NI, Lee JS, Park MH, Yoon JH. Reduced RKIP Expression is Associated With Breast Neoplastic Progression and is Correlated With Poor Outcomes and Aberrant Methylation in Breast Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2017;25:467-474
360. Labbozzetta M, Poma P, Vivona N, Gulino A, D'Alessandro N, Notarbartolo M. Epigenetic changes and nuclear factor-kappaB activation, but not microRNA-224, downregulate Raf-1 kinase inhibitor protein in triple-negative breast cancer SUM 159 cells. *Oncol Lett* 2015;10:3807-3815
361. Guo W, Dong Z, Lin X, Zhang M, Kuang G, Zhu T. Decreased expression and aberrant methylation of Raf kinase inhibitory protein gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2012;30:703-11
362. Wei H, Liu Z, She H, Liu B, Gu J, Wei D, et al. Promoter methylation and expression of Raf kinase inhibitory protein in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2017;13:1866-1872
363. Li DX, Cai HY, Wang X, Feng YL, Cai SW. Promoter methylation of Raf kinase inhibitory protein: A significant prognostic indicator for patients with gastric adenocarcinoma. *Exp Ther Med* 2014;8:844-850.
364. Zhang W, Glockner SC, Guo M, Machida EO, Wang DH, Easwaran H, et al. Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist SRY-box containing gene 17 in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68:2764-72
365. Sotiropoulou G, Anisowicz A, Sager R. Identification, cloning, and characterization of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer. *J Biol Chem* 1997;272:903-10
366. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:564-9
367. Snell C, Krypuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2008;10:R12
368. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59:793-7
369. Chimonidou M, Strati A, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES. SOX17 promoter methylation in circulating tumor cells and matched cell-free DNA isolated from plasma of patients with breast cancer. *Clin Chem* 2013;59:270-9
370. Chimonidou M, Strati A, Malamos N, Kouneli S, Georgoulas V, Lianidou E. Direct comparison study of DNA methylation markers in EpCAM-positive circulating tumour cells, corresponding circulating tumour DNA, and paired primary tumours in breast cancer. *Oncotarget* 2017;8:72054-68
371. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:834-46

372. Yeh AC, Ramaswamy S. Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer? *Cancer Res* 2015;75:5014-22
373. Luo XL, Deng CC, Su XD, Wang F, Chen Z, Wu XP, et al. Loss of MED12 Induces Tumor Dormancy in Human Epithelial Ovarian Cancer via Downregulation of EGFR. *Cancer Res* 2018;78:3532-43
374. Borgen E, Rypdal MC, Sosa MS, Renolen A, Schlichting E, Lonning PE, et al. NR2F1 stratifies dormant disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2018;20:120
375. Bernards SS, Pennington KP, Harrell MI, Agnew KJ, Garcia RL, Norquist BM, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with BRCA1 or RAD51C methylated versus mutated ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2018;148:281-285
376. Pradjatmo H, Dasuki D, Anwar M, Mubarika S, Harijadi. Methylation status and immunohistochemistry of BRCA1 in epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:9479-85
377. Ruscito I, Dimitrova D, Vasconcelos I, Gellhaus K, Schwachula T, Bellati F, et al. BRCA1 gene promoter methylation status in high-grade serous ovarian cancer patients--a study of the tumour Bank ovarian cancer (TOC) and ovarian cancer diagnosis consortium (OVCAD). *Eur J Cancer* 2014;50:2090-8
378. Kondrashova O, Topp M, Nesic K, Lieschke E, Ho GY, Harrell MI, et al. Methylation of all BRCA1 copies predicts response to the PARP inhibitor rucaparib in ovarian carcinoma. *Nat Commun* 2018;9:3970
379. Swisher EM, Lin KK, Oza AM, Scott CL, Giordano H, Sun J, et al. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:75-87
380. Agostini A, Panagopoulos I, Davidson B, Trope CG, Heim S, Micci F. A novel truncated form of HMGA2 in tumors of the ovaries. *Oncol Lett* 2016;12:1559-1563
381. Furlan D, Carnevali I, Marcomini B, Cerutti R, Dainese E, Capella C, et al. The high frequency of de novo promoter methylation in synchronous primary endometrial and ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006;12:3329-36
382. An J, Wei Q, Liu Z, Lu KH, Cheng X, Mills GB, et al. Messenger RNA expression and methylation of candidate tumor-suppressor genes and risk of ovarian cancer-a case-control analysis. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2010;1:1-10
383. Roh HJ, Suh DS, Choi KU, Yoo HJ, Joo WD, Yoon MS. Inactivation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation: association of epithelial ovarian carcinogenesis in specific histological types. *J Obstet Gynaecol Res* 2011;37:851-60
384. Chmelarova M, Krepinska E, Spacek J, Laco J, Nekvindova J, Palicka V. Methylation analysis of tumour suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA. *Folia Biol (Praha)* 2012;58:246-50
385. Shilpa V, Bhagat R, Premalata CS, Pallavi VR, Ramesh G, Krishnamoorthy L. Relationship between promoter methylation & tissue expression of MGMT gene in ovarian cancer. *Indian J Med Res* 2014;140:616-23
386. Hesson LB, Dunwell TL, Cooper WN, Catchpoole D, Brini AT, Chiaramonte R, et al. The novel RASSF6 and RASSF10 candidate tumour suppressor genes are frequently epigenetically inactivated in childhood leukaemias. *Mol Cancer* 2009;8:42
387. Younesian S, Shahkarami S, Ghaffari P, Alizadeh S, Mehrasa R, Ghavamzadeh A, et al. DNA hypermethylation of tumor suppressor genes RASSF6 and RASSF10 as independent prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2017;61:33-38
388. Fan C, Wang W, Jin J, Yu Z, Xin X. RASSF10 is Epigenetically Inactivated and Suppresses Cell Proliferation and Induces Cell Apoptosis by Activating the p53 Signalling Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:1229-1239
389. Schagdarsurengin U, Richter AM, Wohler C, Dammann RH. Frequent epigenetic inactivation of RASSF10 in thyroid cancer. *Epigenetics* 2009;4:571-6
390. Hill VK, Underhill-Day N, Krex D, Robel K, Sangan CB, Summersgill HR, et al. Epigenetic inactivation of the RASSF10 candidate tumor suppressor gene is a frequent and an early event in gliomagenesis. *Oncogene* 2011;30:978-89

391. Dansranjavin T, Wagenlehner F, Gattenloehner S, Steger K, Weidner W, Dammann R, et al. Epigenetic down regulation of RASSF10 and its possible clinical implication in prostate carcinoma. *Prostate* 2012;72:1550-8
392. Helmbold P, Richter AM, Walesch S, Skorokhod A, Marsch W, Enk A, et al. RASSF10 promoter hypermethylation is frequent in malignant melanoma of the skin but uncommon in nevus cell nevi. *J Invest Dermatol* 2012;132:687-94
393. Wang F, Feng Y, Li P, Wang K, Feng L, Liu YF, et al. RASSF10 is an epigenetically inactivated tumor suppressor and independent prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016;7:4279-97
394. Richter AM, Walesch SK, Dammann RH. Aberrant Promoter Methylation of the Tumour Suppressor RASSF10 and Its Growth Inhibitory Function in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2016;8 pii: E26
395. Lu D, Ma J, Zhan Q, Li Y, Qin J, Guo M. Epigenetic silencing of RASSF10 promotes tumor growth in esophageal squamous cell carcinoma. *Discov Med* 2014;17:169-78
396. Richter AM, Walesch SK, Wurl P, Taubert H, Dammann RH. The tumor suppressor RASSF10 is upregulated upon contact inhibition and frequently epigenetically silenced in cancer. *Oncogenesis* 2012;1:e18
397. Wang Y, Ma T, Bi J, Song B, Zhou Y, Zhang C, et al. RASSF10 is epigenetically inactivated and induces apoptosis in lung cancer cell lines. *Biomed Pharmacother* 2014;68:321-6
398. Deng J, Liang H, Ying G, Li H, Xie X, Yu J, et al. Methylation of ras association domain protein 10 (RASSF10) promoter negative association with the survival of gastric cancer. *Am J Cancer Res* 2014;4:916-23 eCollection 2014
399. Hu Y, Ma P, Feng Y, Li P, Wang H, Guo Y, et al. Predictive value of the serum RASSF10 promoter methylation status in gastric cancer. *J Int Med Res* 2019;47:2890-2900
400. Li X, Liang Q, Liu W, Zhang N, Xu L, Zhang X, et al. Ras association domain family member 10 suppresses gastric cancer growth by cooperating with GSTP1 to regulate JNK/c-Jun/AP-1 pathway. *Oncogene* 2016;35:2453-64
401. Li Z, Chang X, Dai D, Deng P, Sun Q. RASSF10 is an epigenetically silenced tumor suppressor in gastric cancer. *Oncol Rep* 2014;31:1661-8
402. Wei Z, Chen X, Chen J, Wang W, Xu X, Cai Q. RASSF10 is epigenetically silenced and functions as a tumor suppressor in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432:632-7
403. Xue WJ, Feng Y, Wang F, Li P, Liu YF, Guo YB, et al. The value of serum RASSF10 hypermethylation as a diagnostic and prognostic tool for gastric cancer. *Tumour Biol* 2016;37:11249-57
404. Li HZ, Wang Y, Gao Y, Shao J, Zhao XL, Deng WM, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on metastasis and progression of human epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2008;6:917-28
405. Strati A, Koutsodontis G, Papaxoinis G, Angelidis I, Zavridou M, Economopoulou P, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2017;28:1923-1933
406. Qu QX, Xie F, Huang Q, Zhang XG. Membranous and Cytoplasmic Expression of PD-L1 in Ovarian Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* 2017;43:1893-1906
407. Webb JR, Milne K, Kroeger DR, Nelson BH. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2016;141:293-302
408. Chatterjee J, Dai W, Aziz NHA, Teo PY, Wahba J, Phelps DL, et al. Clinical Use of Programmed Cell Death-1 and Its Ligand Expression as Discriminatory and Predictive Markers in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23:3453-3460
409. Buderath P, Mairinger F, Mairinger E, Bohm K, Mach P, Schmid KW, et al. Prognostic significance of PD-1 and PD-L1 positive tumor-infiltrating immune cells in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2019;29:1389-1395
410. Mazel M, Jacot W, Pantel K, Bartkowiak K, Topart D, Cayrefourcq L, et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol Oncol* 2015;9:1773-82
411. Anantharaman A, Friedlander T, Lu D, Krupa R, Premasekharan G, Hough J, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *BMC Cancer* 2016;16:744

412. Guibert N, Delaunay M, Lusque A, Boubekeur N, Rouquette I, Clermont E, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer* 2018;120:108-112
413. Janning M, Kobus F, Babayan A, Wikman H, Velthaus JL, Bergmann S, et al. Determination of PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells of NSCLC Patients and Correlation with Response to PD-1/PD-L1 Inhibitors. *Cancers (Basel)* 2019;11pii: cancers11060835
414. Manjunath Y, Upparahalli SV, Avella DM, Deroche CB, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, et al. PD-L1 Expression with Epithelial Mesenchymal Transition of Circulating Tumor Cells Is Associated with Poor Survival in Curatively Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2019;11 pii: cancers11060806
415. Nicolazzo C, Raimondi C, Mancini M, Caponnetto S, Gradilone A, Gandini O, et al. Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab. *Sci Rep* 2016;6:31726