



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

*ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ*

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ  
ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΤΡΑΤΗ  
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2020



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

*ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ*

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ  
ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΤΡΑΤΗ  
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2020



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

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ**  
**ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΤΡΑΤΗ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:** Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:** Ψαρρά Κατερίνα, Χημικός MSc PhD Γ.Ν.Α. “Ο Ευαγγελισμός”

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Λιανίδου Ευρυκλεία, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Κρούπης Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστήμιο Αθηνών

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός», στα πλαίσια του Διετούς Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «Κλινικής Βιοχημείας – Μοριακής Διαγνωστικής» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Υπεύθυνη επιβλέπουσα για την εργασία αυτή ήταν η κ. Αικατερίνη Ψαρρά, Δρ. Χημικός, του Τμήματος Κυτταρομετρίας Ροής Γ.Ν.Α. « Ο Ευαγγελισμός» και η κ. Ευρύκλεια Λιανίδου Καθ. Αναλυτικής Χημείας στο Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθ. Αναλυτικής Χημείας κ.Ε.Λιανίδου, για την συνεπίβλεψη και καθοδήγηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς επίσης και τα μέλη του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας Δρ.Μ. Ζαβρίδου και Δρ.Α. Στρατή για τη βοήθεια που μου παρείχαν καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την Δρ.Α. Ψαρρά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και με έκανε δεκτή να αποτελέσω μέλος του Εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. « Ο Ευαγγελισμός», από τον Σεπτέμβριο του 2019 έως σήμερα. Την ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και επίβλεψη των πειραμάτων, καθώς και για όλες τις γνώσεις της που μου πρόσφερε απλόχερα καθόλη τη διάρκεια. Είμαι ευγνώμων για τη συνεργασία μας, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω μία Επιστήμονα υπομονετική, με κατανόηση, η οποία δεν δίσταζε να προσφέρει τη βοήθειά της σε οτιδήποτε και αν χρειαζόμουν.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός», την Αιματολόγο κ. Ε. Γρηγορίου για την προσφορά των επιστημονικών της γνώσεων και τις πολύτιμες συμβουλές της, τις Τεχνολόγους κ. Γ.Παπαγιαννοπούλου κ. Ρ. Κατσαβριά, κ. Σ. Ψυρρή,κ. Μ. Ζαφείρη.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω θερμά την κ. Ε. Ελεμινιάδου για τη σημαντική συμβολή και βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Επίσης την Α. Παπαδημητροπούλου και τον ιατρό Ν. Αλεβιζόπουλο για την άριστη συνεργασία.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	3
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	3
1.1.1 Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης .....	3
1.1.2 Τύποι Καρκίνου και επιπολασμός.....	5
1.1.3 Στατιστικά καρκίνου.....	6
1.1.4 Μεταστατικός καρκίνος .....	8
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	10
1.2.1 Ανατομία του μαστού .....	10
1.2.2 Επίπτωση και θνησιμότητα.....	10
1.3 ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΟΨΙΑ ΙΣΤΟΥ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ.....	12
1.3.1 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) .....	13
1.3.2 Κλινική σημασία ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων .....	15
1.3.3 Χαρακτηριστικά κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.....	17
1.4 ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT) .....	18
1.4.1 Στάδια επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης .....	20
1.5 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ CTCs.....	22
1.5.1 Μέθοδοι ανοσοσυγγένειας .....	24
1.5.2 Ανοσομαγνητικές μέθοδοι .....	25
1.5.3 Εμπλουτισμός CTCs με αρνητική επιλογή .....	27
1.5.4 Εμπλουτισμός CTCs βασισμένος σε βιοφυσικές ιδιότητες.....	27
1.5.5 Διαχωρισμός με βάση το μέγεθος.....	27
1.5.6 Διαχωρισμός με βάση την πυκνότητα .....	27
1.5.7 Διαχωρισμός με βάση το ηλεκτρικό φορτίο .....	28
1.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ CTCs.....	29
1.7 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ .....	31
1.7.1 Ιστορική Αναδρομή.....	32
1.7.2 Αρχή Λειτουργίας.....	32
1.7.3 Υδροδυναμικό σύστημα ροής (FLUIDICS).....	33
1.7.4 Οπτικό σύστημα.....	33
1.7.5 Σκέδαση φωτός.....	35
1.7.6 Ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων .....	36
1.7.7 Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής .....	38

1.8 ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	40
1.8.1 Επιλογή φθορίζουσων ουσιών .....	43
1.9 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....	43
1.10 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ.....	46
1.11 ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ .....	48
1.12 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	50
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
2.1 Καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7.....	51
2.2 Επιλογή μονοκλωνικών Αντισωμάτων .....	52
2.3 Σύνδεση των μονοκλωνικών Αντισωμάτων στα καρκινικά κύτταρα .....	53
2.4 Κυτταρόμετρο Navios Ex.....	53
2.5 Αντιδραστήρια-Εξοπλισμός.....	54
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	56
4. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	89
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>Ab</b>	Antibody	Αντίσωμα
<b>AR</b>	Androgen receptor	Υποδοχέας ανδρογόνων
<b>APC</b>	Allophycocyanin	Αλλοφυκοκυανίνη
<b>BP</b>	Band pass	Διέλευση ζωνών
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη Βοείου Ορού
<b>CA125</b>	cancer antigen 125	Καρκινικό Αντιγόνο 125
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation	Συστάδα Διαφοροποίησης
<b>CK</b>	Cytokeratin	Κυτταροκερατίνη
<b>cDNA</b>	Complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
<b>CTCs</b>	Circulating Tumor Cells	Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα
<b>ctDNA</b>	circulating tumor DNA	Κυκλοφορούν καρκινικό DNA
<b>CSC</b>	Cancer Stem Cell	Καρκινικό Βλαστικό Κύτταρο
<b>DEP</b>	Dielectrophoresis	Διηλεκτροφόρηση
<b>DTC</b>	Disseminated Tumor Cell	Διεσπαρμένο Καρκινικό Κύτταρο
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Αιθυλεν διαμινοτετραοξικό Οξύ
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor	Υποδοχέας επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα
<b>EMT</b>	Epithelial-Mesenchymal Transition	Επιθήλιο-Μεσεγχυματική Μετάβαση
<b>EpCAM</b>	Epithelial Cell Adhesion Molecule	Μόριο Προσκόλλησης Επιθηλιακών κυττάρων
<b>EPISPOT</b>	Epithelial ImmunoSPOT	Επιθηλιακές ΑνοσοΚΗΛΙΔΕΣ
<b>FAD</b>	Flavin Adenine Dinucleotide	Φλαβινο-Αδενινο Δινουκλεοτίδιο
<b>FAST</b>	Fiber-optic Array Scanning	Τεχνολογία Σάρωσης Συστοιχιών από Οπτικές Ίνες
<b>FC</b>	Flow Cytometry	Κυτταρομετρία Ροής
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
<b>FISH</b>	Fluorescent In Situ Hybridization	Φθορίζων In Situ Υβριδισμός
<b>FITC</b>	Fluorescein Isothiocyanate	Ισοκυανιούχος Φλουορεσκεΐνη
<b>FMO</b>	Fluorescence Minus One	Φθορισμού Μείον Ένα
<b>FSC</b>	Forward Scatter	Πρόσθια Σκέδαση
<b>HER2</b>	human epidermal growth factor receptor 2	Υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα Τύπου 2



<b>ISET</b>	Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells	Απομόνωση βάση Με έθους των Επιθηλιακών Καρκινικών Κυττάρων
<b>LP</b>	long pass	Μακράς διόδου
<b>MET</b>	Mesenchymal - Epithelial Transition	Μεσεγχυματική-Επιθηλιακή Μετάβαση
<b>MRD</b>	Minimal residual disease or Measurable residual disease	Ελάχιστη υπολειμματική νόσος
<b>MUC1</b>	Mucin 1	Μουκίνη 1
<b>NAD(P)H</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Νικοτιδαμινο-Αδενινο (φωσφορικό) Δινουκλεοτίδιο
<b>NSCLC</b>	Non-Small-cell Lung Cancer	Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα
<b>PBMCs</b> <b>Αίματος</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Μονοπύρηννα Κύτταρα Περιφερικού
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered Saline	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών Αλάτων
<b>PC7</b>	Phycoerythrin Cyanin 7	Φυκοερυθρίνη Κυανίνη 7
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
<b>PE</b>	Phycoerythrin	Φυκοερυθρίνη
<b>PFA</b>	Paraformaldehyde	Παραφορμαλδεΐδη
<b>PMTs</b>	photomultiplier tubes	φωτοπολλαπλασιαστές
<b>PSA</b>	Prostate Specific Antigen	Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο
<b>PSMA</b>	Prostate-specific membrane antigen	Ειδικό προστατικό αντιγόνο της μεμβράνης
<b>RCL</b>	Red cell lysis	Διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων
<b>RT-QPCR</b>	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Αντίστροφης Μεταγραφής Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
<b>SMA</b>	Smooth muscle alpha-actin	Ακτίνη των λείων μυών
<b>SP</b>	Short pass	Βραχείας διόδου
<b>SSC</b>	Side Scatter	Πλάγια Σκέδαση
<b>UKNEAS</b>	United Kingdom National External Quality Assessment Service	Εθνική Υπηρεσία Εξωτερικής Διασφάλισης Ποιότητας του Ηνωμένου Βασιλείου
<b>7AAD</b>	7-Aminoactinomycin	7-Αμινοακτινομυκίνη

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

Ο καρκίνος, όπως ορίζεται από τον ΠΟΥ (Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας), είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που μπορεί να προσβάλει κάθε ιστό και όργανο του σώματος. Χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη δυνατότητα τους να εισβάλουν σε άλλους ιστούς (1).

Κάθε ανθρώπινο κύτταρο ελέγχεται και ρυθμίζεται αυστηρά από το γενετικό του υλικό. Ο καρκίνος είναι μία ασθένεια που οφείλεται σε μεταλλάξεις σε γονίδια κλειδιά οι οποίες συσσωρεύονται στο κύτταρο και οδηγούν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου σε βάρος των υπόλοιπων κυττάρων και τέλος στην καταστροφή ολόκληρου του οργανισμού (1).

Πολύ συχνά, οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τις κυτταρικές διαιρέσεις καταστρέφονται ή δυσλειτουργούν και έτσι ένα κύτταρο αρχίζει να αυξάνεται και να διαιρείται. Όταν οι απόγονοι του κυττάρου αυτού κληρονομήσουν την τάση να μην υπακούουν στις εντολές ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης, τότε τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται συνεχώς. Η μάζα των ανεπιθύμητων αυτών κυττάρων ονομάζεται όγκος (2).

#### **1.1.1 Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης**

Η ανάπτυξη του όγκου απαιτεί κατά κανόνα άθροιση πολλαπλών διαδοχικών γενετικών μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο (εικόνα 1.1). Σύμφωνα με το μοντέλο της καρκινογένεσης, στο πρώτο στάδιο γίνεται μετάλλαξη σε ένα μόνο κύτταρο, σε γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του κυττάρου και έτσι γίνεται γένεση σε ένα κύτταρο το οποίο έχει ικανότητα αυτοανανέωσης. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων κυττάρων με τη βοήθεια παραγόντων που προάγουν τη μίτωση (υπερπλασία). Έτσι το κύτταρο συνεχίζει να διαιρείται και ξεπερνά των

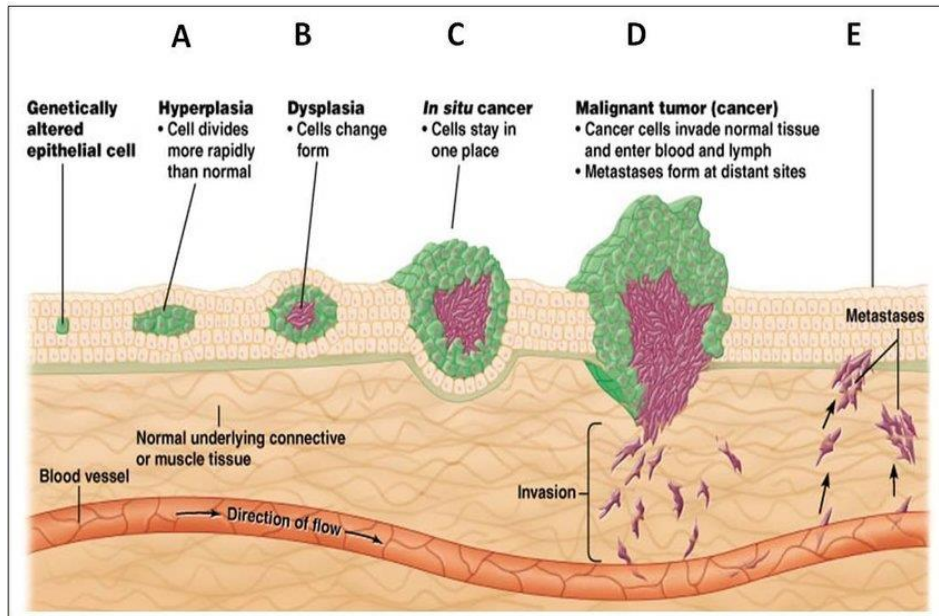
αριθμό διαιρέσεων που θα πραγματοποιούσε ένα μη καρκινικό κύτταρο με αποτέλεσμα το DNA να είναι επιρρεπές σε λάθη λόγω γενωμικής αστάθειας με συνέπεια να συσσωρεύονται επιπλέον μεταλλάξεις και να αλλάζει η μορφή του κυττάρου (δυσπλασία).

Επιπλέον μεταλλάξεις θα οδηγήσουν στον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των κυττάρων καλύπτοντας μεγαλύτερη περιοχή στο συγκεκριμένο ιστό. Τα κύτταρα αυτά χάνουν την ταυτότητα τους και αναπτύσσονται χωρίς καμία ρύθμιση αλλά παραμένουν στην ίδια περιοχή (insitu καρκίνος) (2).

Σε επόμενο στάδιο τα κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να εισβάλλουν σε άλλες περιοχές με θραύση της βασικής μεμβράνης (κακοήθης καρκίνος) και τέλος η μετάστασή τους συμβαίνει όταν τα καρκινικά κύτταρα φθάσουν σε απομακρυσμένους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας του αίματος είτε μέσω του λεμφικού συστήματος (Εικόνα 1.1). Ο μεταστατικός καρκίνος είναι η πιο επικίνδυνη μορφή καρκίνου και αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο ποσοστό θανάτων από καρκίνο (3,4).

Από τη διαδικασία αυτή φαίνεται ότι μια και μόνο διαταραχή αδυνατεί να αποδιοργανώσει το κύτταρο, αλλά απαιτούνται πολλά στάδια μέχρι το κύτταρο να γίνει καρκινικό. Η πολυπλοκότητα της καρκινογένεσης φαίνεται να είναι η αιτία για τη δυσκολία ανεύρεσης της κατάλληλης θεραπείας και για την αντιμετώπιση της νόσου.

Είναι πλέον αποδεκτό ότι απαιτούνται τεχνολογίες οι οποίες να μπορούν να ανιχνεύσουν τα καρκινικά κύτταρα και να χαρακτηρίσουν τον όγκο έτσι ώστε να δοθούν οι απαραίτητες πληροφορίες για την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών.



Εικόνα 1. 1 Τα στάδια μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Για τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό απαιτούνται πολλά στάδια. Αρχικά το κύτταρο αποκτά μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη συνέχεια τα κύτταρα συσσωρεύουν μεταλλάξεις με αποτέλεσμα την αλλαγή της μορφολογίας τους. Τα κύτταρα είναι πλέον ασταθή, χάνουν την ταυτότητα τους και πολλαπλασιάζονται χωρίς περιορισμό. Τέλος τα κύτταρα αποκτούν την ικανότητα διείσδυσης και εγκατάστασης σε άλλους ιστούς[4]

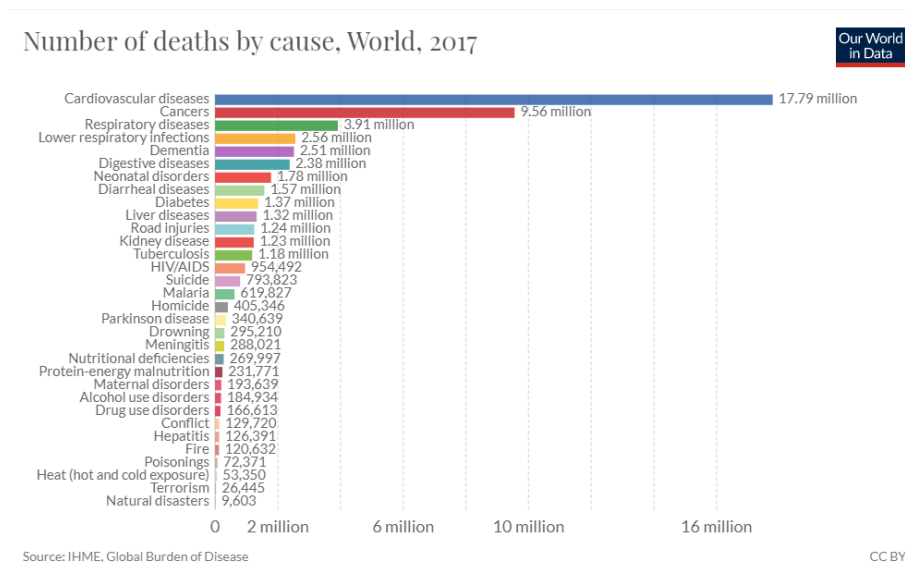
### 1.1.2 Τύποι Καρκίνου και επιπολασμός

Ο καρκίνος ταξινομείται με βάση τον τύπο του ιστού από τον οποίο προέρχεται. Στον άνθρωπο παρατηρήθηκαν περισσότεροι από 200 διαφορετικοί τύποι καρκίνου οι οποίοι διαχωρίζονται στις εξής 4 κύριες κατηγορίες:

- α) τα καρκινώματα: καρκίνοι των επιθηλιακών ιστών που καλύπτουν την επιφάνεια του σώματος και τις εσωτερικές κοιλότητες
- β) τα σαρκώματα: καρκίνοι οι οποίοι ξεκινούν σε συνδετικούς ιστούς όπως στα οστά και τους μύς
- γ) τις λευχαιμίες: καρκίνοι του αίματος
- δ) τα λεμφώματα: καρκίνοι του λεμφικού ιστού(5)

### 1.1.3 Στατιστικά καρκίνου

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ευθύνεται για 9,6 εκατομμύρια θανάτους το 2018 (Εικόνα 1.2). Σε παγκόσμιο επίπεδο περίπου 1 στους 6 θανάτους οφείλεται σε καρκίνο.



Εικόνα 1. 2 Αριθμός θανάτων ανά ασθένεια. Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά. Το 2018 παρατηρήθηκαν 17,8εκ. θάνατοι από καρδιαγγειακά και 9,6εκ. θάνατοι από καρκίνο (6).

Οι πιο συχνές μορφές καρκίνου είναι ο καρκίνος του πνεύμονα με 2,09 εκατομμύρια περιπτώσεις, ο καρκίνος του μαστού με 2,09 εκατομμύρια περιπτώσεις, ο καρκίνος του παχέος εντέρου (1,80 εκατομμύρια περιπτώσεις), ο καρκίνος του προστάτη (1,28 εκατομμύρια περιπτώσεις), καρκίνος του δέρματος (1,04 εκατομμύρια περιπτώσεις) και ο καρκίνος του στομάχου (1,03 εκατομμύρια περιπτώσεις) (Πίνακας 1.1) (6).

Πίνακας 1. 1 Καταγραφή περιστατικών καρκίνου το έτος 2018. Ο συχνότερος τύπος καρκίνου είναι ο καρκίνος του πνεύμονα και ακολούθως ο καρκίνος του μαστού. Globocan2018

Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancers, both sexes, all ages

Cancer	Cases
Lung	2 093 876
Breast	2 088 849
Colorectum	1 849 518
Prostate	1 276 106
Stomach	1 033 701
Liver	841 080
Oesophagus	572 034
Other cancers	8 323 793

Cancer Today - IARC, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon CEDEX 08, France - Tel: +33 (0)4 72 73 84 85 - powered by GLOBOCAN 2018

Η θνησιμότητα των διάφορων τύπων καρκίνου ποικίλλει. Δεδομένα υποδεικνύουν ότι όσοι έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού ή του προστάτη έχουν καλύτερη επιβίωση από εκείνους που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του πνεύμονα ή του στομάχου. Το στάδιο το οποίο μπορεί να γίνει η διάγνωση της νόσου αλλά και οι θεραπείες, που αναπτύχθηκαν, επηρεάζουν την πρόγνωση των διαφόρων τύπων καρκίνου.

Οι πιο συχνές αιτίες θανάτου από καρκίνο είναι ο καρκίνος του πνεύμονα (1,76 εκατομμύρια θάνατοι) ο καρκίνος του παχέος εντέρου (862.000 θάνατοι), ο καρκίνος του στομάχου (783.000 θάνατοι), του ήπατος (782.000 θάνατοι) και ο καρκίνος του μαστού (627 000 θάνατοι)(7).

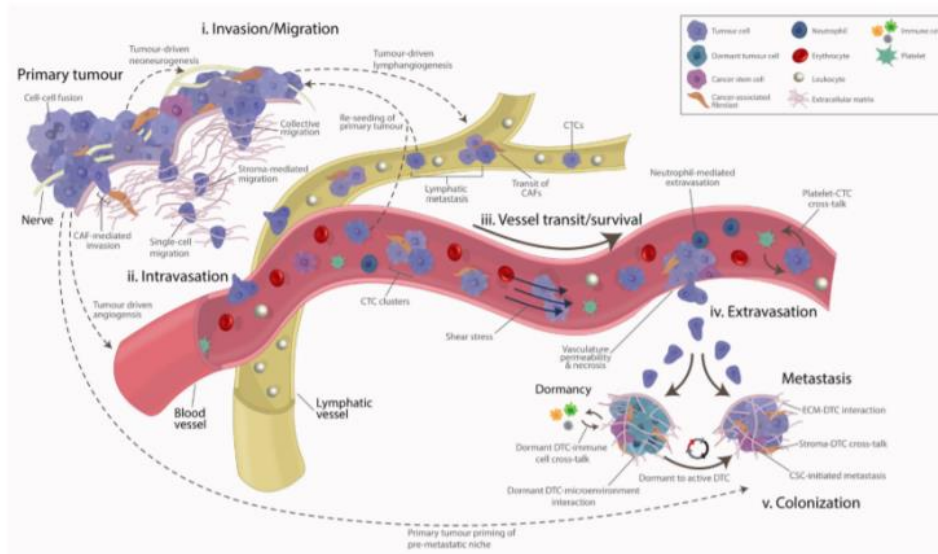
Ο καρκίνος μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε μέρος του σώματος. Χαρακτηριστικό του καρκίνου είναι η ταχεία δημιουργία μη φυσιολογικών κυττάρων, που ξεπερνούν τα συνήθη όριά τους και τα οποία μπορούν στη συνέχεια να εισβάλουν σε παρακείμενα τμήματα του σώματος και να εξαπλωθούν σε άλλα όργανα. Η τελευταία διαδικασία αναφέρεται ως μετάσταση. Οι μεταστάσεις αποτελούν τη σημαντικότερη αιτία θανάτου από τον καρκίνο.

#### 1.1.4 Μεταστατικός καρκίνος

Τα κύτταρα του όγκου (καρκινικά κύτταρα) έχουν τη δυνατότητα να διασπείρονται σε άλλα σημεία του σώματος, να εγκαθίστανται εκεί και να αναπτύσσονται. Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων ονομάζεται μετάσταση. Σημειώνεται ότι η διαδικασία μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό και η απόκτηση της ικανότητας μετάστασης και διήθησης σε παρακείμενους ιστούς είναι αποτέλεσμα πολλαπλών σταδιακών αλλαγών (8)(9).

Η μετάσταση είναι γενικός όρος, που χρησιμοποιείται για την περιγραφή της εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων από τον αρχικό όγκο στους περιβάλλοντες ιστούς και στα απομακρυσμένα όργανα και αποτελεί την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας του καρκίνου. Εκτιμάται ότι η μετάσταση είναι υπεύθυνη για το 90% των θανάτων από καρκίνο. Η μετάσταση περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικών και αλληλένδετων βημάτων. Τα καρκινικά κύτταρα αποσπώνται από τον πρωτογενή όγκο, διοχετεύονται στο κυκλοφορικό και λεμφικό σύστημα, και εισβάλλουν και πολλαπλασιάζονται σε απομακρυσμένα όργανα. Τα μεταστατικά κύτταρα δημιουργούν μικροπεριβάλλον, που διευκολύνει την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δευτερογενούς όγκου. Το γεγονός ότι περίπου 1.500 άνθρωποι πεθαίνουν καθημερινά από καρκίνο επιβεβαιώνει τη δυσκολία διαχείρισης της νόσου από τη στιγμή που θα γίνει μετάσταση [8][9].

Τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται στο σώμα μέσω μιας σειράς βημάτων τα οποία περιλαμβάνουν την εισβολή των κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος και στο λεμφικό σύστημα, την μετακίνηση στα τοιχώματα των κοντινών λεμφαδένων ή των αιμοφόρων αγγείων και τέλος την εξαγγείωση των κυττάρων και την εγκατάστασή τους σε καινούργιο ιστό (Εικόνα 1.3) (10).



Εικόνα 1.1 Στάδια μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα από τον πρωτοπαθή όγκο εισβάλλουν στη κυκλοφορία του αίματος και στο λεμφικό σύστημα και μεταναστεύουν σε απομακρυσμένα σημεία. Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά με τα οποία εξαγγειώνονται και εγκαθίστανται σε άλλους ιστούς. Εκεί πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν καινούργιο όγκο(9)

Έχει επίσης προταθεί ότι σε ορισμένους τύπους καρκίνου τα κύτταρα μπορούν να εγκαταλείψουν τον πρωτογενή όγκο από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης. Για να αποκοπούν από τον πρωτογενή όγκο, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγγυματικών κυττάρων και επιθετική συμπεριφορά που τους δίνει τη δυνατότητα να εισέλθουν στα αγγεία. Η μετάβαση αυτή είναι γνωστή ως επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάβαση (EMT). Για την προσκόλληση τους στον ιστό στόχο μετατρέπονται πάλι σε επιθηλιακά, διαιρούνται ανεξέλεγκτα και σχηματίζουν καινούργιο όγκο (11).



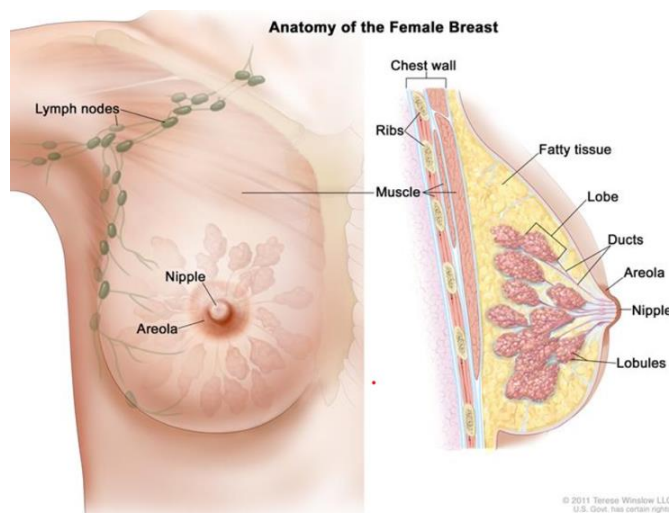
## 1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

### 1.2.1 Ανατομία του μαστού

Ο μαστός είναι ένας αδένας ο οποίος βρίσκεται αναρτημένος στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα, εκτεινόμενος από τη 2<sup>η</sup> μέχρι την 6<sup>η</sup> πλευρά και από το έξω στερνικό χείλος μέχρι την πρόσθια μασχαλιαία γραμμή.

Ο μαστός αποτελείται από 15-20 λοβούς που ακτινοβολούν από τη θηλή. Κάθε λοβός αποτελείται από σωληνόμερφους σχηματισμούς οι οποίοι ονομάζονται λοβία και περιβάλλονται από λίπος και ινώδη συνδετικό ιστό. Τα λοβία είναι η βασική δομική μονάδα του μαστού και αποτελούνται από επιθηλιακά κύτταρα. Κάθε λοβίο υποδιαιρείται σε 10 έως 100 κυψελίδες. Μικροί πόροι συνδέουν αδένες με λοβία και λοβούς και μεταφέρουν το γάλα από τους λοβούς στη θηλή (Εικόνα 1.4) .

Γύρω στο 90% του συνόλου των καρκίνων του μαστού ξεκινά από τους πόρους ή από τους λοβούς.

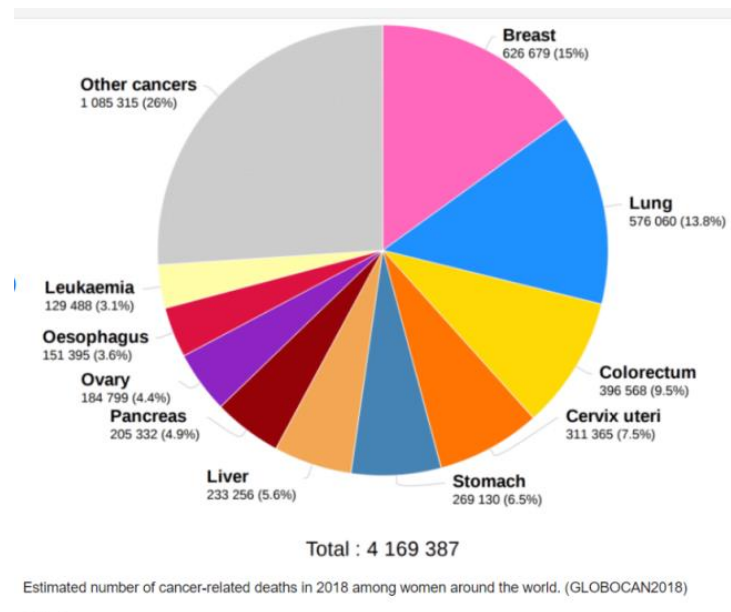


Εικόνα 1. 2 Ανατομία του μαστού(77) .

### 1.2.2 Επίπτωση και θνησιμότητα

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συνηθέστερο τύπο καρκίνου στις γυναίκες και επηρεάζει κάθε χρόνο περίπου 2,1 εκατομμύρια γυναίκες. Εκτιμάται ότι 1 στις 8

γυναίκες θα αναπτύξει καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής της. Το 2018, 627.000 γυναίκες πέθαναν από καρκίνο του μαστού, δηλαδή περίπου το 15% όλων των θανάτων από καρκίνο στις γυναίκες (12). Τα τελευταία 50 χρόνια παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των περιστατικών καρκίνου του μαστού παγκοσμίως. Παρόλο που η συχνότητά εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνεται σταθερά, το ποσοστό θνησιμότητας μειώνεται λόγω της έγκαιρης διάγνωσης και της ανάπτυξης αποτελεσματικότερων θεραπειών (Εικόνα 1. 5) (13).



Εικόνα 1.3 Παρουσίαση των περιστατικών θανάτου από διάφορους τύπους καρκίνου[7]

Όπως έχει αναφερθεί ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο κοινή κακοήθεια στις γυναίκες. Η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται συχνά από έλλειψη πρώιμων συμπτωμάτων, γεγονός, που οδηγεί σε καθυστερημένη ανίχνευση της νόσου.

Παρά τις προόδους, που επιτεύχθηκαν τα τελευταία 30 χρόνια στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, η ανάπτυξη μεταστατικής νόσου εξακολουθεί να αποτελεί σημαντική αιτία θανάτου για τις γυναίκες, που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού.

Η καθυστέρηση στην ανίχνευση του καρκίνου οδηγεί σε δυσκολία ανεύρεσης θεραπείας και αυξημένη θνησιμότητα. Ως εκ τούτου είναι σημαντική η ανεύρεση

τεχνολογιών οι οποίες θα βοηθούν στην πρόωμη ανίχνευση και συνεχή παρακολούθηση των περιστατικών καρκίνου του μαστού (14).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνολογίες που έχουν επιτρέψει την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων τα οποία βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος και αναφέρονται ως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells - CTCs) και των καρκινικών κυττάρων, που εισέβαλαν σε άλλα όργανα και ονομάζονται διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα (Disseminated Tumor Cells - DTC)(15).

Η ανίχνευση των κυττάρων του όγκου στην κυκλοφορία του αίματος δίνει τη δυνατότητα έγκαιρης διάγνωσης της νόσου, παρακολούθησης της εξέλιξής της καθώς και έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.

### **1.3 ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΟΨΙΑ ΙΣΤΟΥ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ**

Ο παραδοσιακός τρόπος διάγνωσης του καρκίνου πραγματοποιείται με την κύτταρο-ιστοπαθολογική ανάλυση. Η ανίχνευση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων όπως η διαφορά στην αναλογία πυρηνικών / κυτταροπλασματικών περιοχών, ο πυρηνικός δυσμορφισμός και η αποδιοργανωμένη αρχιτεκτονική του ιστού (π.χ. δυσπλασία) αποτελούν στοιχεία για τη διάγνωση κακοηθειών (16).

Η βιοψία ιστού επιτρέπει την ιστολογική διάγνωση και σταδιοποίηση του όγκου. Παρόλα αυτά είναι μια δύσκολη και επεμβατική διαδικασία, στην οποία οι επαναλήψεις της δειγματοληψίας δεν είναι πάντα εφικτές. Επίσης με τη μέθοδο αυτή δεν αντιπροσωπεύεται πλήρως η ποικιλομορφία του όγκου (16).

Οι παραδοσιακές επεμβατικές διαδικασίες είναι επικίνδυνες και επώδυνες για την ασθενή, για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια γίνονται έρευνες για ανακάλυψη μη επεμβατικών μεθόδων με την μελέτη περιφερικού αίματος γνωστό και ως «υγρή βιοψία» (17).

Η υγρή βιοψία είναι μια επαναστατική μέθοδος ανίχνευσης και απομόνωσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs), ctDNA του όγκου και εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs), τα οποία απελευθερώνονται από τον όγκο στην κυκλοφορία του αίματος. Η μελέτη των χαρακτηριστικών του όγκου αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την εύρεση ευαισθησίας ή αντοχής σε αντικαρκινικούς παράγοντες με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων και εξατομικευμένων θεραπειών. Οι εξατομικευμένες θεραπείες αναφέρονται σε συγκεκριμένες θεραπείες για κάθε ασθενή ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της ασθένειας του και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να προσφέρουν καλύτερα αποτελέσματα για τον ασθενή (17)(18),(19).

Η υγρή βιοψία είναι μια μη επεμβατική μέθοδος η οποία έχει το πλεονέκτημα της δυνατότητας επανάληψης της δειγματοληψίας με αποτέλεσμα να μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την παρακολούθηση της νόσου σε πραγματικό χρόνο, εύρεση κατάλληλης θεραπείας και έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας (17). Επίσης αποτελεί ένα πολύ καλό δείκτη παρακολούθησης της πρόγνωσης του ασθενή με καρκίνο ελέγχοντας την παρουσία ή την απουσία μετάστασης κατά τη διάρκειά θεραπειών (20).

Λόγω της πολυπλοκότητας του καρκίνου και των παραγόντων, που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της νόσου είναι επιτακτική ανάγκη η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου, η παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου αλλά και ο χαρακτηρισμός του όγκου έτσι ώστε να δίνεται η κατάλληλη θεραπεία για την αντιμετώπιση της νόσου. Μελέτες δείχνουν ότι με την έγκαιρη διάγνωση το ποσοστό θνησιμότητας έχει μειωθεί σημαντικά (17)(21).

### **1.3.1 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)**

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumors Cells - CTCs) είναι κύτταρα τα οποία αποκόπτονται από τον πρωτοπαθή όγκο, εισέρχονται στην κυκλοφορία και έχουν την ικανότητα μετάστασης και εγκατάστασης σε άλλα μέρη του σώματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία του όγκου. Τα κύτταρα αυτά θεωρούνται ως η αιτία μετάστασης του όγκου και εξέλιξης της ασθένειας (22).

Η παρουσία καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος σε ασθενή με μεταστατικό καρκίνο αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1869 από τον Thomas Ashworth. Το 1955, ο Engell παρατήρησε μεγαλύτερη συχνότητα καρκινικών κυττάρων στην αποστράγγιση της φλέβας του όγκου σε σύγκριση με το περιφερικό αίμα. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970, η εισαγωγή ευαίσθητων και ειδικών ανοσοιστοχημικών τεχνικών επανάφεραν το ενδιαφέρον για την ανίχνευση CTCs και την πιθανή σύνδεσή τους με πρόωρες μεταστάσεις (23).

Το 1990, βρέθηκαν CTCs σε ασθενείς με νευροβλάστωμα, με καρκίνο του παχέος εντέρου, καρκίνο του μαστού και του μικροκυτταρικού και μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Οι μελέτες αυτές κατέδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ανιχνευθούν με παραδοσιακές τεχνικές ανοσοχημείας (17)(23).

Ένας τυπικός πρωτογενής όγκος περιέχει εκατομμύρια κύτταρα τα οποία συσσωρεύουν μεταλλάξεις που τα οδηγούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και ικανότητα να εισχωρούν σε παρακείμενους ιστούς. Τα κύτταρα αυτά παρασύρονται από την κυκλοφορία του αίματος ή το λεμφικό σύστημα και μπορούν να παραμείνουν στην κυκλοφορία, να δημιουργήσουν συστάδες (cluster) καθώς κυκλοφορούν, ή να εγκατασταθούν σε άλλους ιστούς, δημιουργώντας μεταστάσεις (17).

Η μετάσταση του όγκου είναι γνωστό ότι προκαλείται από κύτταρα που έχουν χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων, τα οποία δεν υπακούουν σε σήματα απόπτωσης και έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης.

Κάποια από τα κύτταρα προσκολλώνται στο τοίχωμα των τριχοειδών αγγείων και εισέρχονται σε καινούργιους ιστούς.

Τα CTCs αποτελούν σπάνια συμβάντα, υπολογίζεται ότι στην κυκλοφορία του αίματος υπάρχει 1 CTC ανά  $10^6/10^7$  λευκοκύτταρα. Επίσης τα κύτταρα αυτά έχουν μικρό χρόνο ημιζωής (1-2.4 ώρες), από τη στιγμή που θα απελευθερωθούν στην κυκλοφορία και το μέγεθος τους κυμαίνεται στα 9-30 $\mu$ m (24).

Ο μικρός αριθμός των κυττάρων αυτών αλλά και ο περιορισμένος χρόνος ημιζωής τους καθιστούν την ταυτοποίηση των CTCs πολύ δύσκολη, οπότε απαιτούνται

τεχνολογίες και εφαρμογές οι οποίες να έχουν την ικανότητα να απομονώσουν 1 CTC ανά 1 mL αίματος και ικανότητα ταυτοποίησης με αποτελεσματικότητα των διαφόρων τύπων CTCs (25).

### **1.3.2 Κλινική σημασία ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων**

Η υγρή βιοψία έχει ανοίξει καινούργιους δρόμους για τη διάγνωση και παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου. Είναι άγνωστο όμως μέχρι ποιο βαθμό μπορεί η μελέτη των CTCs να αποτελέσει εναλλακτική λύση στην επεμβατική βιοψία.

Έρευνες των τελευταίων χρόνων δίνουν υποσχόμενα αποτελέσματα ειδικά για πρωτοδιάγνωση σε καρκίνους στους οποίους είναι δύσκολη η επεμβατική βιοψία αλλά και για έλεγχο της μετάστασης του καρκίνου.

Παρόλα τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα και το ενδιαφέρον πολλών εταιρειών, η πρόωρη διάγνωση του καρκίνου αντιμετωπίζει μεγάλες προκλήσεις όσον αφορά την ευαισθησία και ειδικότητα.

Τα CTCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου σε πολλούς διαφορετικούς καρκίνους όπως τον καρκίνο του προστάτη, του μαστού, του παχέος εντέρου και του πνεύμονα(26).

Μελέτες κατέδειξαν ότι η ύπαρξη 5 ή περισσότερων CTCs ανά 7,5 mL αίματος αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη για τη συνολική επιβίωση (27). Η τιμή cut-off για τη διάκριση των ασθενών με καρκίνο του μαστού και προστάτη, αποφασίστηκε σε  $\geq 5$  CTCs / 7,5 mL . Σύμφωνα με μελέτες, η χειρότερη πρόγνωση παρατηρήθηκε σε ασθενείς με  $\geq 5$  CTCs / 7.5 mL. Η καταμέτρηση των CTCs μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου κατά τη διάρκεια της θεραπείας (11).

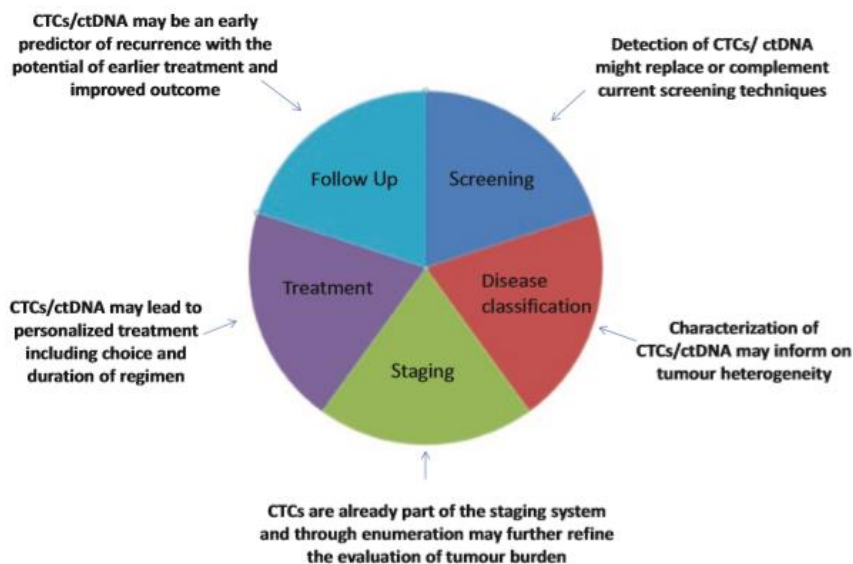
Τυπικά μια αύξηση των CTCs κατά τη διάρκεια θεραπείας του καρκίνου υποδηλώνει την εξέλιξη της νόσου. Αντιθέτως ασθενείς με μικρότερο αριθμό CTCs επιβιώνουν περισσότερο σε σχέση με ασθενείς που έχουν περισσότερα CTCs. Ο

τύπος και η ποσότητα των κυττάρων αυτών εκ πρώτης όψης μπορούν να ορίσουν τον τύπο του καρκίνου και το στάδιο της νόσου (27).

Έρευνες αποδεικνύουν ότι η μελέτη των CTCs όσον αφορά το στάδιο της μετάστασης και για παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου βρίσκεται κοντά στην κλινική εφαρμογή (Εικόνα 1.6).

Επίσης η ανάλυση των CTCs παρέχει πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (28).

Μελέτες αποδεικνύουν ότι ο αριθμός των CTCs σχετίζεται με το μέγεθος και το στάδιο του όγκου. Επομένως η καταμέτρηση των κυττάρων αποτελεί πολύ καλό δείκτη της εξέλιξης της νόσου και της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Όσο πιο γρήγορα γίνει η ανίχνευσή τους τόσο πιο αποτελεσματική και γρήγορη θα είναι η θεραπεία (29). Επιπλέον οι ασθενείς προστατεύονται από τις παρενέργειες αναποτελεσματικών θεραπειών. Συνεπώς η μείωση των CTCs υποδεικνύει την αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής αγωγής. Σήμερα, υπάρχουν πολλές προσεγγίσεις για την απομόνωση και ανίχνευση των CTCs (16).



Εικόνα 1.4 Κλινική σημασία ανίχνευσης των CTCs (78)

Προς το παρόν ο ρόλος της μελέτης των CTCs περιορίζεται κυρίως σε προγνωστικούς σκοπούς, αλλά υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων τεχνικών για το μοριακό χαρακτηρισμό τους και τον έλεγχο της ετερογένειας

του όγκου. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των καρκινικών κυττάρων μπορεί να δώσει πληροφορίες για την παρουσία του όγκου, το στάδιο ανάπτυξης και για μεταλλάξεις που υπάρχουν στον όγκο. Οι πληροφορίες αυτές είναι πολύ σημαντικές για την ανακάλυψη καινούργιων θεραπευτικών στόχων και την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών.

Οι μελέτες των CTCs και του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA από τον όγκο οδηγούν σε ένα καινοτόμο μοντέλο υγρής βιοψίας αφήνοντας πίσω τις συμβατικές επεμβατικές βιοψίες (30), (31).

### **1.3.3 Χαρακτηριστικά κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων**

Τα φυσικά χαρακτηριστικά των CTCs δίνουν τη δυνατότητα διαχωρισμού τους από τα υπόλοιπα κύτταρα της κυκλοφορίας. Τα κύτταρα αυτά είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος (9-30μm) από τα κύτταρα του αίματος και με διαφορετική μορφολογία. Επίσης λόγω της πυκνότητάς τους διαχωρίζονται με διαφορεική φυγοκέντρωση σε φικόλη στη στοιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων (32).

Τα CTCs εκφράζουν στην επιφάνειά τους αλλά και στο κυτταρόπλασμά τους συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες τα βοηθούν στο να μεταναστεύουν και να ενσωματώνονται σε συγκεκριμένους ιστούς. Τα χαρακτηριστικά μόρια, που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα είναι το EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) και οι κυτταροκερατίνες τα οποία περιγράφονται ως επιθηλιακά χαρακτηριστικά και προσδίδουν στα κύτταρα την ικανότητα προσκόλλησης στη βασική μεμβράνη. Επίσης τα CTCs είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως λευκοκυτταρικός δείκτης (33).

Το EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία λειτουργεί ως μόριο προσκόλλησης μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων, το οποίο συμμετέχει στην κυτταρική σηματοδότηση, στη μετανάστευση, καθώς επίσης και στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επίσης έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την έκφραση ογκογονιδίων όπως c-myc. Το EpCAM φαίνεται να παίζει ρόλο στην ογκογένεση και τη μετάσταση των



καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον έχει την ικανότητα να καταστέλλει την E-cadherin και προάγει την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (epithelial-mesenchymal transition – EMT) και τη μετάσταση του όγκου. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως δείκτης ανίχνευσης των CTCs.

Οι κυτταροκερατίνες είναι δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στον κυτταροσκελετό των επιθηλιακών κυττάρων. Ο ρόλος τους είναι να επιτρέπουν στα κύτταρα να έχουν αντοχή στο μηχανικό στρες. Οι κυτταροκερατίνες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των CTCs σε συνδυασμό με το EpCAM. Μελέτες δείχνουν ότι τα CTCs είναι διπλά θετικά στην έκφραση EpCAM+/ CK+.

Το CD45 είναι αντιγόνο που εκφράζεται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων και είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση διάφορων κυτταρικών λειτουργιών, όπως την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση των κυττάρων και τον ογκογονικό μετασχηματισμό. Τα CTCs δεν εκφράζουν CD45 έτσι ο δείκτης αυτός χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CD45-) από τα λευκοκύτταρα (CD45+).

Κατά τη διαδικασία της μετάστασης τα επιθηλιακά κύτταρα μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά και χάνουν την έκφραση των κυτταροκερατινών και του EpCAM και αποκτούν την έκφραση δεικτών όπως η βιμεντίνη - Vimentin και N-καδερίνη - cadherin (34).

Οι χημειοκίνες και οι καδερίνες είναι μόρια απαραίτητα για την εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων.

Η βιμεντίνη είναι το κύριο συστατικό του κυτταροσκελετού των μεσεγχυματικών κυττάρων και εκφράζεται στα μεσεγχυματικά κύτταρα. Συχνά χρησιμοποιείται ως δείκτης κυττάρων που μεταπίπτουν σε μεσεγχυματικά κατά τη διαδικασία της EMT η οποία συμβαίνει κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης αλλά και κατά τη διάρκεια της μετάστασης.

#### **1.4 ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT)**

Στους επιθηλιακούς όγκους, τα κύτταρα για να είναι σε θέση να αποχωριστούν τον πρωταρχικό όγκο, να εισέλθουν στην κυκλοφορία και να μεταναστεύσουν σε άλλους ιστούς, πρέπει να υποστούν σημαντικές αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών αλλά και στη μορφολογία τους. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα κύτταρα χάνουν τα επιθηλιακά τους χαρακτηριστικά και αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών κυττάρων. Η μετάβαση αυτή ονομάζεται επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) (35).

Πειραματικές και κλινικές μελέτες κατέδειξαν ότι η EMT είναι φαινόμενο, το οποίο συμβάλλει στην πρόοδο του καρκίνου και στη μετάσταση (36)(37)(38). Σε αυτή τη διαδικασία τα επιθηλιακά κύτταρα του πρωτογενούς όγκου υφίστανται μια σειρά φαινοτυπικών αλλαγών. Η απώλεια επιθηλιακών δεικτών και η απόκτηση μεσεγχυματικού φαινοτύπου προσδίδει στα κύτταρα μείωση της προσκόλλησης, αύξηση της κυτταρικής κινητικότητας και της διεισδυτικότητας των κυττάρων (39).

Είναι πλέον αποδεκτό ότι τα κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο μεταξύ επιθηλιακής και μεσεγχυματικής μετάβασης παρουσιάζουν μεγάλη πλαστικότητα. Έχει επίσης περιγραφεί η στενή σύνδεση μεταξύ των EMT και των κυκλοφορούντων βλαστικών κυττάρων (Circulating Stem Cells - CSC) (29).

Πολλές μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη CTCs με EMT και CSC δείκτες στην κυκλοφορία του αίματος σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού(29).

Τα CSC ίσως να μην είναι μια ξεχωριστή κατηγορία κυττάρων αλλά μια μεταβατική κατάσταση, που μπορεί να ενεργοποιείται και να απενεργοποιείται και να είναι στενά συνδεδεμένη με το EMT.

Τα CSCs έχουν δυνατότητα αυτοανανέωσης, που μοιάζει με αυτή των βλαστοκυττάρων και θεωρούνται ως πηγή της μετάστασης και εξάπλωσης του καρκίνου. Επίσης παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις χημειοθεραπείες και κατά συνέπεια η μελέτη τους θα βοηθήσει στην επιλογή των θεραπειών(29).

Δεδομένου ότι τα CTCs εκφράζουν δείκτες μεσεγχυματικών κυττάρων αλλά και δείκτες βλαστικών κυττάρων, υποδεικνύει ότι το φαινόμενο EMT διαδραματίζει βασικό ρόλο στη διαδικασία μετάστασης των κυττάρων όγκου. Κατά συνέπεια, τα καρκινικά κύτταρα που υποβάλλονται σε EMT μπορούν να μεταναστεύσουν σε

περιφερικό αίμα ως CTCs. Λόγω των μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών τους, αυτά τα κύτταρα μπορεί να είναι σε θέση να φθάσουν σε μακρινές θέσεις του σώματος και να προκαλέσουν μεταστάσεις(35).

Μελέτες έδειξαν ότι στον καρκίνο του μαστού τα κύτταρα χαρακτηρίζονται θετικά στην έκφραση CD44 και αρνητικά στην έκφραση CD24 (CD44+/CD24-). Το CD44 είναι γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων, στην προσκόλληση και στην μετανάστευση των κυττάρων. Αποτελεί ένα από τους πλέον μελετημένους επιφανειακούς δείκτες των καρκινικών βλαστοκυττάρων σε καρκίνους όπως του μαστού και του προστάτη και εκφράζεται σχεδόν από κάθε κύτταρο του όγκου.

Το CD24, είναι ένα αντιγόνο σταθερό στη θερμότητα, το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων σε πολλούς τύπους καρκίνου (40).

Αυτοί οι πληθυσμοί παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα και είναι επιρρεπείς στη μετάσταση (34).

Όπως έχει αναφερθεί τα κύτταρα κατά την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση αποκτούν χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων. Οι δείκτες CD44 και CD24 χρησιμεύουν στην ανίχνευση των κυττάρων που έχασαν τα επιθηλιακά τους χαρακτηριστικά.

#### **1.4.1 Στάδια επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης**

Όπως έχει αναφερθεί κατά την Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική Μετάβαση παρατηρούνται αλλαγές στην έκφραση των μορίων οι οποίες οδηγούν στην απόκτηση κινητικότητας και διεισδυτικότητας των κυττάρων.

Τα επιθηλιακά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους μέσω στενών συνδέσμων, χασματικών συνδέσμων ημιδεσμοσωμάτων, δεσμοσωμάτων και συνδέσμων προσκόλλησης, παρουσιάζοντας πολικότητα και σύνδεση στη βασική μεμβράνη (βασικό υμένα). Επίσης παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης E-καδερίνης, EpcAM και κυτταροκερατινών και ιντεγκρινών.

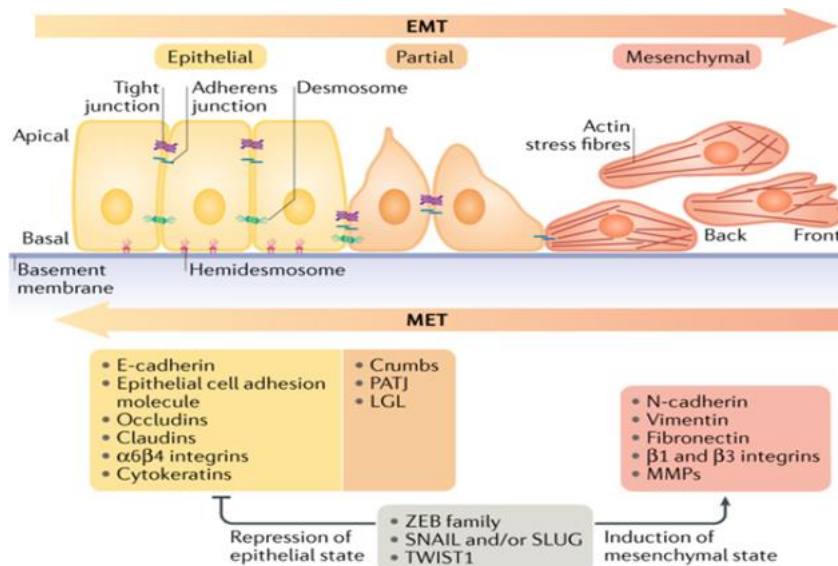
Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας EMT τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τις ιδιότητές τους και αποκτούν σταδιακά χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εμφανίζουν απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων με αποτέλεσμα τη χαλαρή οργάνωση, απώλεια της πολικότητάς τους αλλά και τροποποίηση του σχήματός τους. Επίσης παρουσιάζουν προοδευτική απώλεια επιθηλιακών δεικτών και έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών, όπως η N-καδερίνη, ινονεκτίνη και βιμεντίνη (Εικόνα 1.7) (41), (42).

Η απώλεια της E-καδερίνης και υπερέκφραση της N-καδερίνης καθώς και κυτταροσκελετικές μεταβολές (π.χ. έκφραση της βιμεντίνης) είναι φαινοτυπικές και δομικές αλλαγές, που προσδίδουν μεγάλη επιθετικότητα στα καρκινικά κύτταρα (35)(43).

Η διαδικασία EMT έχει ως αποτέλεσμα την απόκτηση μεταναστευτικών και διεισδυτικών ιδιοτήτων, διευκολύνοντας τα καρκινικά κύτταρα να εισέλθουν στην κυκλοφορία και να εξέλθουν σε κάποια απομακρυσμένη θέση, να εγκατασταθούν σε άλλους ιστούς και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους με επιθηλιακό φαινότυπο. Τα μεταστατικά κύτταρα ενίοτε υπόκεινται και στην αντίθετη διαδικασία τη μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση (MET), αποκτώντας πάλι επιθηλιακό φαινότυπο.

Μελέτες που έγιναν όσον αφορά την έκφραση του EpCAM έδειξαν ότι τα CTCs που εισέρχονται στην κυκλοφορία αλλάζουν μορφολογία και μειώνουν την έκφραση EpCAM μέσα σε 30 min από τη στιγμή της έγχυσης των κυττάρων στην κυκλοφορία. Ωστόσο ορισμένα κύτταρα, παρουσίασαν μοτίβα έκφρασης, που ήταν ανάμεικτα. Η ανάλυση των CTCs σε ασθενείς έδειξε μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των κυττάρων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ρύθμιση των φαινοτυπικών αλλαγών στα καρκινικά κύτταρα είναι μια δυναμική διαδικασία (44).



Εικόνα 1.5 Στάδια μετάβασης των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT). Τα επιθηλιακά κύτταρα κατά τη μετατροπή τους σε μεσεγχυματικά χάνουν κάποιους από τους συνδέσμους, τροποποιείται η έκφραση επιθηλιακών πρωτεϊνών και διαφοροποιείται το σχήμα τους (41)

Όπως και ο πρωτογενής όγκος έτσι και τα CTCs είναι εξαιρετικά ετερογενή και αποτελούνται από υποπληθυσμούς που διαφέρουν φαινοτυπικά και γενετικά. Εντούτοις, μόνο ένας μικρός αριθμός CTCs είναι σε θέση να επιβιώσουν στην κυκλοφορία του αίματος και να σχηματίζουν μεταστάσεις. Η αναγνώριση των CTCs που είναι ικανά για μετάσταση είναι σημαντικό για την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών κατά της μεταστατικής νόσου (45).

## 1.5 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ CTCs

Η ετερογένεια του όγκου αποτελεί μεγάλο πρόβλημα στην επιλογή αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Συνέπεια των μη αποτελεσματικών θεραπειών είναι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η διάχυσή τους σε παρακείμενους ιστούς και κατ' επέκταση η δημιουργία μεταστάσεων (46).

Τα CTCs που βρίσκονται στο αίμα κατά τη διάρκεια των θεραπειών ίσως αποτελούν εκπροσώπους των ανθεκτικών υποπληθυσμών, επομένως η καταμέτρηση των CTCs και ο χαρακτηρισμός των κυττάρων αυτών είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών.

Έχουν αναπτυχθεί τεχνολογίες όπως το CellSearch το οποίο μελετά την έκφραση του επιθηλιακού μορίου προσκόλλησης κυττάρων (EpcAM) και των κυτταροκερατινών CK8, 18 και 19. Το σύστημα αυτό έχει τη δυνατότητα να χαρακτηρίζει τα CTCs, τα οποία δεν έχουν μετατραπεί σε μεσεγχυματικά (47).

Άλλες τεχνολογίες όπως το AdnaTest (QIAGEN, HannoverGmbH, Γερμανία) πέραν από το δείκτη EpcAM, μελετά την έκφραση και άλλων δεικτών όπως το Mucin 1 (MUC-1) , HER2 και τον υποδοχέα επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (EGFR)(48).

Υπολογίζονται ότι  $10^6$  καρκινικά κύτταρα ανά γραμμάριο όγκου εισέρχονται καθημερινά στην κυκλοφορία του αίματος και 1ml αίματος περιέχει περίπου 1 CTC σε  $10^5$ - $10^7$  λευκοκύτταρα και  $10^9$  ερυθροκύτταρα. Λόγω της σπανιότητας των CTCs είναι απαραίτητη η χρήση μεθόδων ανίχνευσης με αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα (49), (50).

Για την επίλυση των δυσκολιών ανίχνευσης των CTCs, οι μέθοδοι ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται συνδυάζονται και με στρατηγικές εμπλουτισμού. Οι τεχνικές εμπλουτισμού βασίζονται σε δύο στρατηγικές επιλογής: η επιλογή των κυττάρων γίνεται σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά (μέγεθος, πυκνότητα, ηλεκτρικά φορτία, παραμόρφωση) είτε σύμφωνα με τα μόρια που εκφράζουν (έκφραση πρωτεϊνών στην επιφάνεια ή κυτταροπλασματικά) (Εικόνα 1.8).

Επίσης είναι απαραίτητο τα CTCs να διαχωρίζονται από τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος (λευκοκύτταρα και ερυθρά). Η ανίχνευση των CTCs μπορεί να γίνει μέσω κυτταρομετρικών μεθόδων (ανοσοκυτταροχημεία) ή μέσω μοριακών τεχνικών (PCR, RT-PCR) (30)(16).

### 1.5.1 Μέθοδοι ανοσοσυγγένειας

Οι μέθοδοι ανοσοσυγγένειας χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των CTCs με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, στοχεύοντας τα επιφανειακά αντιγόνα των καρκινικών κυττάρων τα οποία δεν εκφράζονται στα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος. Τα αντισώματα που επιλέγονται είναι προσδεμένα πάνω στην επιφάνεια της συσκευής ή σε μαγνητικά σφαιρίδια (ανοσομαγνητικές μέθοδοι). Η απομόνωση των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν αντιγόνα στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων ονομάζεται θετικός εμπλουτισμός. Ο αρνητικός εμπλουτισμός, βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων τα οποία συνδέονται με αντιγόνα τα οποία δεν εκφράζονται στα CTCs αλλά εκφράζονται στα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος (30).

Ωστόσο, η ετερογένεια των αντιγόνων που υπάρχουν στην επιφάνεια των CTCs αποτελούν την μεγαλύτερη πρόκληση για το διαχωρισμό των κυττάρων (16)

Για το θετικό εμπλουτισμό χρησιμοποιείται ο επιθηλιακός επιφανειακός δείκτης (EpCAM), ενώ για τον αρνητικό εμπλουτισμό, χρησιμοποιείται το αντίσωμα CD45 το οποίο στοχεύει στα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος. Οι μέθοδοι αρνητικού εμπλουτισμού έχουν συνήθως χαμηλότερη καθαρότητα από τις μεθόδους θετικού εμπλουτισμού. Ωστόσο, το πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι γίνεται η απομόνωση των CTCs χωρίς σήμανση, ανεξάρτητα από την ειδική έκφραση των αντιγόνων τους.

Ο συνδυασμός των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται για την κάθε εξέταση επιλέγεται βάση των αντιγόνων που βρίσκονται στην επιφάνεια η στο κυτταρόπλασμα του υπό εξέταση κυτταρικού πληθυσμού ή βάση των αντιγόνων που βρίσκονται σε κυτταρικούς πληθυσμούς προς αποκλεισμό (51).

Τα αποτελέσματα των μεθόδων που βασίζονται στην ανοσοσυγγένεια είναι πολύ ενθαρρυντικά όμως, το γεγονός ότι απαιτούν φυγοκέντρηση του αίματος ή λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελεί μειονέκτημα λόγω απώλειας αριθμού των CTCs (16) (52).

Επίσης υπάρχει ο κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω ύπαρξης μη κακοηθών κυττάρων του όγκου τα οποία έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Για τον λόγο αυτό είναι πολύ σημαντικό να εξετάζετε η μετάπτωση επιθηλιακών-μεσεγγχυματικών κυττάρων (EMT) αλλά και δείκτες βλαστικών κυττάρων. Μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύσουν δείκτες βλαστικών κυττάρων και μεσεγγχυματικούς δείκτες είναι το CD24/CD44 N-καδερίνη και βιμεντίνη(34).

Δύο από τα κύρια μειονεκτήματα στη χρήση μεθόδων που βασίζονται στην ανοσοσυγγένεια για την απομόνωση των CTCs είναι η ετερογένεια των CTCs, η οποία μπορεί να προκαλέσει απώλεια υποπληθυσμών CTCs κατά τον εμπλουτισμό και η σύνδεση των CTCs πάνω στην επιφάνεια μιας συσκευής η οποία μπορεί να προκαλέσει δυσκολίες στην ανάκτηση των κυττάρων (30)

### **1.5.2 Ανοσομαγνητικές μέθοδοι**

Οι ανοσομαγνητικές μέθοδοι έχουν ως πλεονέκτημα τη δυνατότητα να ξεπεράσουν ένα από τα προβλήματα που προκαλούνται από τις μεθόδους ανοσοσυγγένειας. Όπως έχει αναφερθεί στις μεθόδους ανοσοσυγγένειας τα κύτταρα συγκρατούνται πάνω σε επιφάνεια συσκευής και απαιτείται η χρήση θρυψίνης μετά τον εμπλουτισμό, η οποία πιθανόν να διασπά τα επιφανειακά αντιγόνα.

Στις ανοσομαγνητικές μεθόδους επιλέγονται αντισώματα τα οποία προσδένονται πάνω σε σφαιρίδια και αναγνωρίζουν μόρια της επιφάνειας των καρκινικών κυττάρων όπως για παράδειγμα το EpCAM(30).

**CellSearch®** είναι η μόνη τεχνολογία που είναι εγκεκριμένη από το FDA για ανίχνευση και απομόνωση των CTCs σε καρκίνο του μαστού, προστάτη και παχέος εντέρου.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί το αντίσωμα EpCAM όσο και τα αντισώματα των κυτταροπλασματικών επιθηλιακών κυτταροκερατινών (8,18 και 19) και επιτρέπει το μαγνητικό διαχωρισμό των EpCAM-θετικών και CK-θετικών κυττάρων από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος μετά από φυγοκέντρηση 7.5 mL αίματος (17).



Με την τεχνική αυτή απομονώνονται μόνο τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν τον συγκεκριμένο παράγοντα EpCAM στην επιφάνεια τους και απομακρύνονται τα υπόλοιπα. Επίσης η πλήρης αυτοματοποίηση των μεθόδων αυτών αποτελεί ένα επιπλέον πλεονέκτημα (18)(53)

Οι πρώτες κλινικές μελέτες που διεξήχθησαν με το σύστημα CellSearch έδειξαν ότι η παρουσία των CTCs συνδέεται με κακή πρόγνωση στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και τον καρκίνο του προστάτη. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν το ίδιο για μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), για καρκίνο της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος, της κεφαλής, των ωοθηκών, και για ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Το σύστημα CellSearch αποδείχθηκε ότι είναι σε θέση να ανιχνεύσει CTCs πριν και μετά από χειρουργική επέμβαση για μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού, καρκίνο του παχέος εντέρου και καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Εκτεταμένες μελέτες που έγιναν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή αποδεικνύουν ότι η παρουσία των CTCs στην κυκλοφορία του αίματος είναι ένας πολύ καλός προγνωστικός δείκτης για την αξιολόγηση της ολικής επιβίωσης σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, εντέρου και προστάτη (17) (54).

**To AdnaTest®** (Qiagen, Germany) είναι μέθοδος που συνδυάζει τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό των CTCs και τη multiplex RT-PCR. Για τον εμπλουτισμό των CTCs χρησιμοποιούνται διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία είναι προσδεμένα σε μαγνητικά σφαιρίδια και αναγνωρίζουν τα καρκινικά κύτταρα με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Για καρκίνο του μαστού χρησιμοποιούνται τα EpCAM, MUC-1 και HER2, για καρκίνο του προστάτη PSMA, PSA, EGFR και AR και για καρκίνο των ωοθηκών τα EpCAM, MUC-1, CA125 και ERCC1. Από τα κύτταρα που έχουν εμπλουτιστεί, απομονώνεται το mRNA, το οποίο μεταγράφεται σε cDNA με τη χρήση της RT-qPCR για τη μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων (17).

### **1.5.3 Εμπλουτισμός CTCs με αρνητική επιλογή (Τεχνικές ανεξάρτητης σήμανσης)**

Οι τεχνολογίες αρνητικής επιλογής αφαιρούν τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος με τη χρήση αντισωμάτων, που στοχεύουν σε πρωτεΐνες, που δεν εκφράζονται από τα CTCs, όπως για παράδειγμα τον λευκοκυτταρικό δείκτη CD45.

Ωστόσο, η μέθοδος αρνητικού εμπλουτισμού των CTCs συνήθως αποδίδει κύτταρα χαμηλότερης καθαρότητας σε σύγκριση με τις μεθόδους θετικού εμπλουτισμού(30).

### **1.5.4 Εμπλουτισμός CTCs βασισμένος σε βιοφυσικές ιδιότητες (Τεχνικές ανεξάρτητης σήμανσης)**

Οι τεχνολογίες εμπλουτισμού των CTCs βασίζονται στις διαφορετικές βιοφυσικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων (μορφολογικά χαρακτηριστικά είτε σύμφωνα με τα μόρια που εκφράζουν) σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος.

### **1.5.5 Διαχωρισμός με βάση το μέγεθος**

Για το διαχωρισμό με βάση το μέγεθος χρησιμοποιείται το σύστημα μικροδιήθησης, το οποίο εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι τα CTCs έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από ό,τι τα λευκά αιμοσφαίρια. Το σύστημα μικροδιήθησης έχει ως μειονέκτημα τα χαμηλά επίπεδα καθαρότητας (<10%), αλλά και την ευαισθησία στο φράξιμο. Επίσης λόγω της δυνατότητας παραμόρφωσης των κυττάρων είναι δυνατόν τα κύτταρα να διαπερνούν τους πόρους της μεμβράνης και να επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου.

Τα κύτταρα τα οποία είναι πλέον προσκολλημένα στην επιφάνεια μπορούν να καταμετρηθούν ή να αναλυθούν με μοριακές μεθόδους όπως με qPCR ή αλληλούχιση για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τους - ISET (isolation by size of epithelial tumor cells), ScreenCell®, Parsortix® (55).

### **1.5.6 Διαχωρισμός με βάση την πυκνότητα**

Για τον διαχωρισμό με βάση την πυκνότητα χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια όπως Ficoll-Paque® (GE Healthcare Life Sciences, USA) και Lymphoprep™, τα οποία έχουν την ικανότητα να διαχωρίζουν τα κύτταρα του αίματος με βάση την πυκνότητα έπειτα από φυγοκέντρηση του ολικού αίματος.

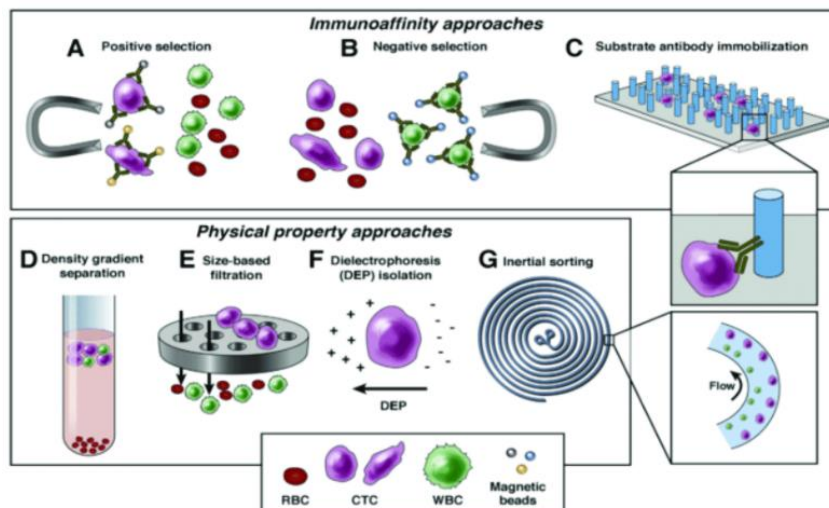
Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ως αρχικό στάδιο εμπλουτισμού των CTCs. Με την φυγοκέντρηση ολικού αίματος επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μονοπύρηνων κυττάρων (PBMCs- Peripheral Blood Mononuclear Cells) από ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας προϊόντα όπως Ficoll-Paque® (GEHealthcareLifeSciences, USA) και Lymphoprep™.

Η φικόλη είναι ένα συνθετικό πολυμερές σακχαρόζης υψηλού μοριακού βάρους που έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από εκείνη των λεμφοκυττάρων, αλλά μικρότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων. Μετά τη φυγοκέντρηση τα ερυθροκύτταρα και το πολυμορφοπύρηννα διέρχονται διαμέσου της φικόλης και σχηματίζουν ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου ενώ τα λεμφοκύτταρα και τα μονοπύρηννα παραμένουν πάνω από το στρώμα της φικόλης.

Η φυγοκέντρηση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό στιβάδων που περιέχουν διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Στην κάτω στιβάδα απομονώνονται τα ερυθροκύτταρα και κοκκιοκύτταρα, τα οποία έχουν τη μεγαλύτερη πυκνότητα, πάνω από τα ερυθροκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα υπάρχει η στιβάδα από Ficoll-Paque και στην επιφάνεια μεταξύ του πλάσματος και του στρώματος Ficoll-Paque, βρίσκονται τα μονοπύρηννα τα οποία έχουν χαμηλότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα. Στη στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων απομονώνονται και τα CTCs (55)(56).

#### **1.5.7 Διαχωρισμός με βάση το ηλεκτρικό φορτίο**

Η διηλεκτροφόρηση (DEP) είναι μια ηλεκτροκινητική μέθοδος που εκμεταλλεύεται τις ενδογενείς διηλεκτρικές ιδιότητες των αιωρούμενων κυττάρων για διάκριση και διαχωρισμό. Έχει αναδειχθεί ως μια πολύ υποσχόμενη μέθοδος για την απομόνωση των CTCs από το αίμα. Η DEP-απομόνωση των CTCs είναι ανεξάρτητη από τους δείκτες κυτταρικής επιφάνειας(57).



Εικόνα 1.6 Ταξινόμηση μεθόδων βάσει των βιολογικών και φυσικών ιδιοτήτων των CTC (55)

## 1.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ CTCs

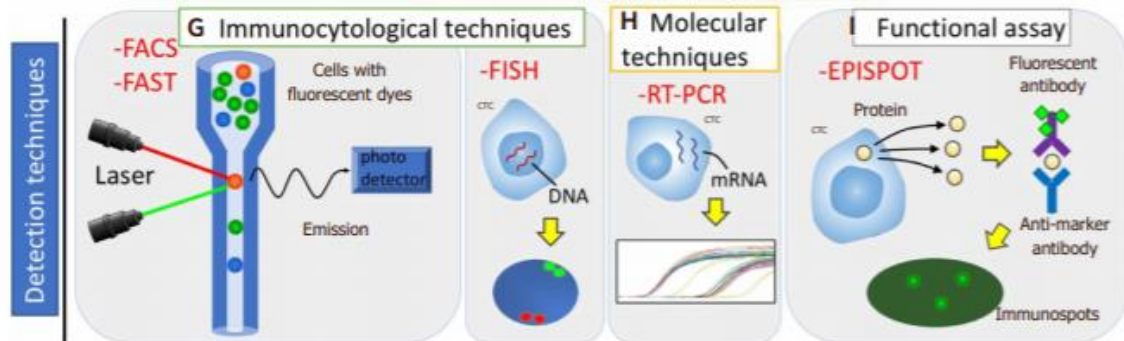
Μετά τον εμπλουτισμό των CTCs, απαιτείται η ανίχνευσή για καταμέτρηση ή/και χαρακτηρισμό των κυττάρων.

Οι τεχνολογίες ανίχνευσης χρησιμοποιούνται οι ανοσοκυτταρολογικές μέθοδοι όπως είναι η κυτταρομετρία ροής, FAST, FISH, τεχνολογίες που βασίζονται στο νουκλεϊνικό οξύ (PCR, RT-PCR) είτε με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού είτε οι τεχνολογίες ελέγχου λειτουργικότητας (Εικόνα 1.9) (58) (59).

Για τη μέθοδο RT-qPCR απαιτείται η απομόνωση γενετικού υλικού από τα καρκινικά κύτταρα (mRNA), η αντίστροφη μεταγραφή του σε cDNA και η χρήση εκκινητών (μικρά μονόκλιωνα τμήματα DNA) για την πραγματοποίηση της αντίδρασης της πολυμεράσης. Ακολούθως γίνεται έλεγχος της έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα (58), (59).

Η τεχνική EPISPOT ανιχνεύει πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μια μεμβράνη επικαλυμμένη με

αντισώματα που συνδέονται στις πρωτεΐνες. Για την ανίχνευσης των αντισωμάτων αυτών απαιτείται δεύτερο αντίσωμα επισημασμένο με φθορίζουσα ουσία (59).



Εικόνα 1.7 Μέθοδοι ανίχνευσης των CTCs (59)

Η κάθε μέθοδος χρησιμοποιεί διαφορετικούς δείκτες για την απομόνωση των CTCs. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωση διαφορετικών πληθυσμών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων λόγω της ετερογένειας που τα χαρακτηρίζει.

Για παράδειγμα με τη χρήση επιθηλιακών δεικτών, όπως του EpCAM και συγκεκριμένων κυτταροκερατινών, απομονώνονται μόνο τα κυκλοφορούντα κύτταρα τα οποία έχουν επιθηλιακά χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα την απώλεια ανίχνευσης των CTCs που έχουν μεταβεί στη μεσεγχυματική κατάσταση (EMT) και έχουν χάσει εν μέρει ή πλήρως τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά τους. Είναι σημαντικό να γίνεται σωστή επιλογή των μονοκλωνικών αντισωμάτων για να απομονώνονται όσο περισσότεροι υποπληθυσμοί καρκινικών κυττάρων (17), αλλά και ορθή επιλογή των μεθόδων ανίχνευσης ώστε να υπάρχει η κατάλληλη ευαισθησία και ειδικότητα (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1. 1 Τεχνολογίες εμπλουτισμού και ανίχνευσης των CTCs(59)

Method	System	Principle	Limitations
Enrichment technologies			
Biological	CellSearch	EpCAM antibodies coated with ferrofluid beads	Dependent on EpCAM
	AdnaTest	Immunomagnetic detection of EpCAM	High rate of false positive
	CTC-chip	EpCAM antibodies coated with microposts	Dependent on EpCAM
	MACS	Immunomagnetic beads coated with EpCAM antibodies	Dependent on EpCAM
Physical	MagSweeper	Immunomagnetic beads coated with EpCAM antibodies	Dependent on EpCAM
	ISET	Size	Variations in cell size
	OncoQuik	Density	Loss of CTCs
	RosetteSep	Density, negative selection	Loss of CTCs
Detection technologies			
Immunocytological	FACS	Antigen expression optical	Limited throughput
	FAST	Antigen expression optical	Loss of CTCs
	FISH	Detects chromosomal DNA sequence	Loss of viability
Molecular	RT-PCR	Measures nucleic acid	High rate of false positive
Functional assay	EPISPOT	Antigen expression	Enzymatic activity varies

## 1.7 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιημένη και αυτοματοποιημένη μέθοδο η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των μεμονωμένων κυττάρων. Ο έλεγχος των χαρακτηριστικών των κυττάρων γίνεται μέσω ανάλυσης της σκέδασης του φωτός καθώς και της εκπομπής φθορισμού από τα κύτταρα. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι το δείγμα να βρίσκεται σε μορφή εναιωρήματος (60)

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιεί τεχνολογία βασισμένη σε λέιζερ για την καταμέτρηση και ταξινόμηση των κυττάρων σε ένα ετερογενές ρευστό μίγμα. Ο κυτταρομετρητής αποτελεί ένα συνδυασμό αιματολογικού αναλυτή και μικροσκοπίου φθορισμού στον οποίο γίνεται ο διαχωρισμός των κυττάρων χωρίς απώλεια της βιωσιμότητας και της δομής τους(60)

Τα κύτταρα περνούν μέσω μιας ακτίνας φωτός λέιζερ και στη συνέχεια προσδιορίζονται οι εντάσεις φωτός και φθορισμού από τη συσκευή ανίχνευσης. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η επώαση του δείγματος με μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες, τα οποία να προσδένονται σε αντιγόνα του προς μελέτη κυτταρικού πληθυσμού.

Με βάση την ένταση φθορισμού προσδιορίζεται και το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο υπό μελέτη αντιγόνο.

Η κυτταρομετρία ροής είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση των CTCs λόγω της δυνατότητας της για ταυτόχρονη πολυπαραμετρική ανάλυση χιλιάδων κυττάρων ανά δευτερόλεπτο. Αυτό την καθιστά μια γρήγορη και απλή μέθοδο για την ανάλυση των κυττάρων σε εναιώρημα.

### **1.7.1 Ιστορική Αναδρομή**

Η κατασκευή του πρώτου αυτοματοποιημένου αναλυτή των έμμορφων στοιχείων του αίματος έγινε το 1956 από τον Coulter χρησιμοποιώντας τις αρχές λειτουργίας μιας συσκευής που περιγράφηκε το 1947 από τον Gucker, η οποία είχε τη δυνατότητα να ανιχνεύει βακτηρίδια στον αέρα κατά τη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> Παγκοσμίου Πολέμου.

Το 1960 κατασκευάστηκε ο πρώτος ολοκληρωμένος κυτταρομετρητής ροής από τον Louis Kametsky, ο οποίος είχε τη δυνατότητα ταυτόχρονης αναγνώρισης των κυτταρικών πληθυσμών και στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων. Στο ίδιο χρονικό διάστημα ο Mack Fulwyer παρουσίασε μια συσκευή που είχε τη δυνατότητα να διαχωρίζει τους κυτταρικούς πληθυσμούς με βάση το μέγεθός τους, ο Hulett και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν τις φθορίζουσες χρωστικές στην κυτταρομετρία, ο vanDilla και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν την πρώτη φωτεινή πηγή ακτίνων laser, οι Crosland και Taylor εφάρμοσαν τις αρχές της υδροδυναμικής εστίασης και οι Dittrich και Godhe εισήγαγαν την ιδέα των ιστογραμμάτων για να περιγράψουν τα πρώτα αποτελέσματα του DNA σε κύτταρα σηματοδοτημένα με βρωμιούχο αιθίδιο. Στη δεκαετία του 1970 άρχισε η κατασκευή των πρώτων εμπορευματοποιημένων κυτταρομέτρων (61)

### **1.7.2 Αρχή Λειτουργίας**

Κατά τη συνεχή ροή των σωματιδίων στο υδροδυναμικό σύστημα του κυτταρομετρητή, η φωτεινή δέσμη από το οπτικό σύστημα, προσπίπτει ευθέως στο εναιώρημα και ο σκεδασμός του φωτός μαζί με το φθορίζον σήμα για κάθε

σωματίδιο, καταγράφονται από ανιχνευτές τοποθετημένους παράλληλα και κάθετα ως προς τη φωτεινή δέσμη.

Η χρήση πολλαπλών φθορίζουσων ουσιών οι οποίες έχουν διαφορετικά φάσματα εκπομπής, επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών υποδοχέων των κυττάρων.

Όλα τα δεδομένα αναλύονται και παρουσιάζονται σε διαγράμματα, στα οποία φαίνονται οι μεταβολές του φθορισμού και τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο (61).

Ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από 3 βασικά συστήματα 1) το υδροδυναμικό σύστημα ροής 2) το οπτικό σύστημα και 3) το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων (Εικόνα 1.10).

### **1.7.3 Υδροδυναμικό σύστημα ροής (FLUIDICS)**

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του κυτταρομετρητή ροής, είναι η δυνατότητά του να προσδιορίζει τις ιδιότητες των κυττάρων που βρίσκονται σε μονήρη διάταξη. Με την εφαρμογή της θεωρίας της υδροδυναμικής εστίασης, επιτυγχάνεται η ροή των κυττάρων ένα προς ένα. Η ταχύτητα ροής των κυττάρων, μπορεί να ρυθμιστεί ελέγχοντας την πίεση μεταξύ του ρυθμιστικού διαλύματος και του κυτταρικού εναιωρήματος. Η σωστή ρύθμιση, επιτρέπει στα κύτταρα να διέρχονται ένα προς ένα, στο σημείο στο οποίο προσπίπτει κάθετα η ακτίνα laser του κυτταρομετρητή (Εικόνα 1.10).

Το Υδροδυναμικό σύστημα ροής αποτελείται από την κεντρική κυψελίδα, η οποία δρα ως κανάλι, μέσω της οποίας ρέει το εναιώρημα των κυττάρων περιβαλλόμενο από αδρανές ρυθμιστικό διάλυμα (62)

### **1.7.4 Οπτικό σύστημα**

Το οπτικό σύστημα αποτελείται από μια πηγή φωτός, συνήθως λέιζερ συγκεκριμένου μήκους κύματος και μια σειρά οπτικών φίλτρων και κατόπτρων, που κατευθύνουν συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός στον κατάλληλο ανιχνευτή (Εικόνα 1.10).



Η ακτίνα laser που χρησιμοποιείται συνήθως είναι αυτή του Αργού στα 488 nm(μπλε) και υπάρχει και η επιλογή της ακτίνας Ζαφειρείου, η οποία επίσης εκπέμπει στα 488 nm και έχει ως πλεονέκτημα το μεγαλύτερο χρόνο ζωής. Στους κυτταρομετρητές τελευταίας τεχνολογίας, μπορεί να εφαρμοστούν περισσότερες πηγές laser στα 635 nm(κόκκινο) όπως επίσης 405-407nm (μωβ) και 514nm (πράσινο).

Ο λόγος που χρησιμοποιείται το λέιζερ, έγκειται στο γεγονός ότι έχει την ικανότητα να παρέχει μονοχρωματικό φως υψηλής έντασης, που μπορεί να εστιάσει σε μια συγκεκριμένη κατεύθυνση, σχηματίζοντας στενές δέσμες. Τα κύτταρα λαμβάνουν φωτεινή ενέργεια κατά το σύντομο διάστημα παραμονής τους στη δέσμη φωτός και μπορούν και παράγουν φθορισμό ή σκέδαση φωτός ανιχνεύσιμης έντασης.

Στο προς ανάλυση δείγμα, προηγείται επεξεργασία με αντισώματα τα οποία είναι σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες. Καθώς προσπίπτει η ακτίνα λέιζερ πάνω στα κύτταρα προκαλείται διέγερση των φθορίζουσων ουσιών και εκπομπή σήματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος για κάθε φθορίζουσα ουσία. Η χρήση περισσότερων από μια πηγή λέιζερ, εξυπηρετεί την επιλογή πολλών διαφορετικών φθορίζουσων ουσιών, τα οποία θα μπορούν να διεγείρονται και να εκπέμπουν σήματα σε διαφορετικές συχνότητες. Επιπλέον στην κυτταρομετρία μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι χρωστικές tandem, οι οποίες είναι αποτέλεσμα ένωσης δύο χρωστικών. Η διέγερση της πρώτης χρωστικής, προκαλεί εκπομπή ενέργειας η οποία διεγείρει τη δεύτερη χρωστική. Το τελικό αποτέλεσμα είναι εκπομπή ενέργειας και φθορισμού σε μήκος κύματος μεγαλύτερο από ότι θα μπορούσε να επιτευχθεί με μία φθορίζουσα ουσία (62).

Το κυτταρόμετρο διαθέτει διάφορα φίλτρα και καθρέφτες, τα οποία χρησιμοποιούνται για να κατευθύνουν τα μήκη κύματος (διαχωρίζουν το φάσμα της ακτινοβολίας) στους ανιχνευτές-φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs) (συλλέγουν τα φωτεινά σήματα), έτσι ώστε ο κάθε ανιχνευτής να δέχεται τον φθορισμό μόνο από ένα καθορισμένο μήκος κύματος.

Στο κυτταρόμετρο χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι φίλτρων, όπως τα φίλτρα βραχείας διόδου (SP), τα οποία επιτρέπουν τη μετάδοση των φωτονίων κάτω από ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και τα φίλτρα μακράς διόδου (LP), τα οποία επιτρέπουν τη μετάδοση πάνω από ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Τα φίλτρα διέλευσης ζωνών (BP) επιτρέπουν τη μετάδοση φωτονίων που έχουν μήκη

κύματος εντός στενού εύρους. Τα σήματα φθορισμού κατευθύνονται στους φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs) και τέλος μετατρέπονται από το ηλεκτρονικό σύστημα, σε δεδομένα που μπορούν να απεικονιστούν και να ερμηνευθούν από το λογισμικό (62). Ο κάθε PMT ανιχνεύει επίσης οποιαδήποτε άλλα σήματα φθορισμού εκπέμπονται σε παρόμοιο μήκος κύματος με το μήκος κύματος που ανιχνεύει.

Η ταυτόχρονη μελέτη διαφορετικών παραμέτρων όπως της σκέδασης του φωτός και του φθορισμού (FS, SS, FL1- FL10), αυξάνει την ειδικότητα και την ευαισθησία της μεθόδου.

### **1.7.5 Σκέδαση φωτός**

Καθώς τα κύτταρα ρέουν στο υδροδυναμικό σύστημα, μια ακτίνα λέιζερ προσπίπτει πάνω σ'αυτά και προκαλείται σκεδασμός του φωτός, ανάλογα με το μέγεθος των κυττάρων (πρόσθιος σκεδασμός – forwardscatter- FS) και με την κοκκίωσή τους - εσωτερική πολυπλοκότητα (πλάγιος σκεδασμός – sidescatter- SS).

Ο πρόσθιος σκεδασμός, είναι το φως που σκεδάζεται από ένα κύτταρο προς τα εμπρός και συνεχίζει προς την ίδια κατεύθυνση που ήδη ταξίδευε το φως (συνήθως έως 20° από τον άξονα της ακτίνας λέιζερ). Αυτό το σήμα συλλέγεται από ένα PMT και χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων.

Ο πλάγιος σκεδασμός, είναι το φως που σκεδάζεται από τα κύτταρα και ταξιδεύει σε διαφορετική κατεύθυνση από την αρχική του διαδρομή και συλλέγεται από τους φακούς συλλογής στις 90 μοίρες σε σχέση με την ακτίνα του λέιζερ. Ο σκεδασμός αυτός παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κοκκίωση και την πολυπλοκότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα με χαμηλή κοκκίωση και πολυπλοκότητα παράγουν χαμηλότερο πλάγιο σκεδασμό, ενώ τα κύτταρα με υψηλό βαθμό εσωτερικής πολυπλοκότητας (όπως τα ουδετερόφιλα), οδηγούν σε μεγαλύτερο πλάγιο σκεδασμό. Τόσο ο πρόσθιος όσο και ο πλάγιος σκεδασμός είναι μοναδικά για κάθε είδος κυττάρου, γι' αυτό ο συνδυασμός τους χρησιμοποιείται συχνά στην

κλινική πράξη για διαχωρισμό των πληθυσμών των κυττάρων σε ετερογενή δείγματα.

Τα μεγαλύτερα και πιο κοκκιώδη κύτταρα παράγουν ένα μεγάλο πληθυσμό με υψηλά SS και FS. Τα μονοκύτταρα είναι μεγάλα κύτταρα, αλλά όχι τόσο κοκκιώδη, επομένως αυτά παράγουν ένα ξεχωριστό πληθυσμό με υψηλό FS αλλά χαμηλότερο SS. Τα μικρότερα λεμφοκύτταρα και οι λεμφοβλάστες παράγουν ξεχωριστό πληθυσμό με λιγότερα FS και χαμηλά SS. Επομένως, αυτά τα κύτταρα μπορούν να διαχωριστούν σε διαφορετικούς πληθυσμούς με βάση μόνο το FS και το SS τους.

Ο πρόσθιος και ο πλάγιος σκεδασμός, χρησιμοποιείται για τον αρχικό διαχωρισμό των κυτταρικών πληθυσμών που εμπεριέχονται στο εναιώρημα. Έτσι, με τη χρήση του πρόσθιου και του πλάγιου σκεδασμού, οι κυτταρικοί πληθυσμοί μπορούν συχνά να διακριθούν με βάση τις χαρακτηριστικές διαφορές στο μέγεθος των κυττάρων και την κοκκίωση. Για να συλλέξουμε όμως πιο λεπτομερείς πληροφορίες όπως την έκφραση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, χρησιμοποιούμε τεχνικές φθορισμού, για επισήμανση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει (62),(63).

#### **1.7.6 Ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων**

Το ηλεκτρονικό σύστημα αποτελείται από τους ανιχνευτές, τους ενισχυτές σήματος, τους επεξεργαστές σήματος και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή (Εικόνα 1.10).

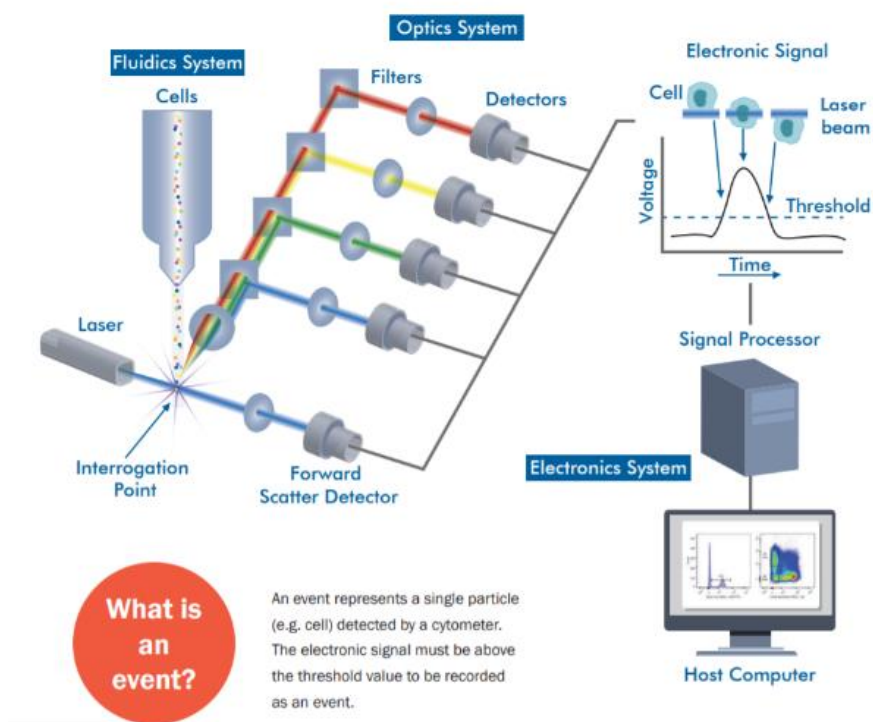
Όταν ένα κύτταρο ακτινοβολείται από μια ακτίνα λέιζερ, σκεδάζει το φως ή/και εκπέμπει φθορισμό.

Τα φωτεινά σήματα από τις φθορίζουσες χρωστικές συλλέγονται από φωτοανιχνευτές και φωτοπολλαπλασιαστές, οι οποίοι μετρούν την ένταση φθορισμού που εκπέμπεται από τα κύτταρα και τη διοχετεύουν στο ηλεκτρονικό σύστημα για κυτταρομετρική ανάλυση.

Αρχικά οι ανιχνευτές μετατρέπουν το φωτεινό σήμα σε ηλεκτρικό. Το ηλεκτρικό σήμα στη συνέχεια αυξάνεται από τους ενισχυτές. Οι επεξεργαστές σήματος μετατρέπουν το ενισχυμένο ηλεκτρικό σήμα σε ψηφιακό σήμα, που αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη αριθμητική τιμή και το στέλνουν στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έτσι, στον ηλεκτρονικό υπολογιστή αποθηκεύονται σε ψηφιακή μορφή οι

πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά του κάθε κύτταρου και μπορούν στην συνέχεια να επεξεργαστούν με διάφορους τρόπους. Συγκεκριμένα, ο ηλεκτρονικός υπολογιστής μπορεί να κάνει στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και να τα παρουσιάσει με μορφή διαφόρων διαγραμμάτων.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε διάφορα διαγράμματα, όπως τα ιστογράμματα κατανομής συχνοτήτων και τα στικτογράμματα (dotplots) (62).



Εικόνα 1.8 Το υδροδυναμικό σύστημα ροής στο οποίο επιτυγχάνεται η ροή των κυττάρων ένα προς ένα. Το οπτικό σύστημα το οποίο αποτελείται από λέιζερ ως πηγή φωτός για τη διέγερση των χρωστικών. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται από τους φωτοανιχνευτές και ακολουθεί ενίσχυση και επεξεργασία του σήματος για τη μετατροπή του από φωτεινό σε ηλεκτρικό. Τέλος η αναπαράσταση των αποτελεσμάτων σε μορφή διαγραμμάτων στον ηλεκτρονικό υπολογιστή (64).

### **1.7.7 Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής**

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των πληθυσμών των κυττάρων σε ένα ετερογενές δείγμα, τόσο σε κλινικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών τομέων όπως στην Αιματολογία, Ανοσολογία, Λοιμωξιολογία, Ογκολογία, Ουρολογία, Πνευμονολογία, Νευρολογία, Μαιευτική και Γυναικολογία, καθώς και στον τομέα των Μεταμοσχεύσεων. Επίσης στην Παθολογοανατομία και την Κυτταρολογία χρησιμοποιείται ως εργαλείο για διαφοροδιάγνωση πολλών νοσημάτων.

Οι πιο σημαντικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής είναι οι ακόλουθες:

#### Ανοσοφαινότυπος

Η πιο συνηθισμένη εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής είναι ο ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός. Αυτή η τεχνική αναγνωρίζει και ποσοτικοποιεί πληθυσμούς κυττάρων σε ένα ετερογενές δείγμα, συνήθως αίμα ή μυελό των οστών. Η καταμέτρηση των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη χρήση επισημασμένων με φθορίζουσες ουσίες αντισωμάτων ειδικών για τον υπό εξέταση πληθυσμό.

Στα κλινικά εργαστήρια, ο ανοσοφαινότυπος χρησιμοποιείται για τη διάγνωση αιματολογικών κακοηθειών όπως λεμφωμάτων και λευχαιμιών (63)(65).

#### Διαχωρισμός κυττάρων

Επιτυγχάνεται με εξειδικευμένο κυτταρομετρητή ροής που έχει την ικανότητα φυσικής απομόνωσης των κυττάρων ενδιαφέροντος σε ξεχωριστούς σωλήνες συλλογής. Ο κυτταρομετρητής διερευνά και χαρακτηρίζει κάθε κύτταρο καθώς περνά μέσα από το λέιζερ και απομονώνει τα κύτταρα ενδιαφέροντος σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα (63)(65).

#### Ανάλυση κυτταρικού κύκλου

Με τη χρήση φθορίζουσων ουσιών ο κυτταρομετρητής έχει τη δυνατότητα ανάλυσης της διαδικασίας της αντιγραφής και τη μελέτη των τεσσάρων διαφορετικών φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

Επίσης μπορεί να ανιχνευτεί και η κυτταρική ανευπλοειδία, που σχετίζεται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες(63)(65).

### Κυτταρικός Θάνατος

Η απόπτωση, ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μια φυσιολογική διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο κύκλο ζωής των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τα κύτταρα πεθαίνουν είτε με τη διαδικασία της νέκρωσης, που προκαλείται από εξωτερικές φυσικές και χημικές μεταβολές στο κύτταρο ή μέσω απόπτωσης, μια διαδικασία στην οποία τα κύτταρα ξεκινούν ένα πρόγραμμα "αυτοκτονίας" μέσω εσωτερικά ελεγχόμενων παραγόντων. Λόγω των διαφορών στη μορφολογία, αλλά και λόγω βιοχημικών και μοριακών μεταβολών που συμβαίνουν στα κύτταρα που πεθαίνουν, μπορεί να γίνει η διάκρισή τους μέσω της κυτταρομετρίας ροής (63)(65).

### Δοκιμασίες πολλαπλασιασμού κυττάρων

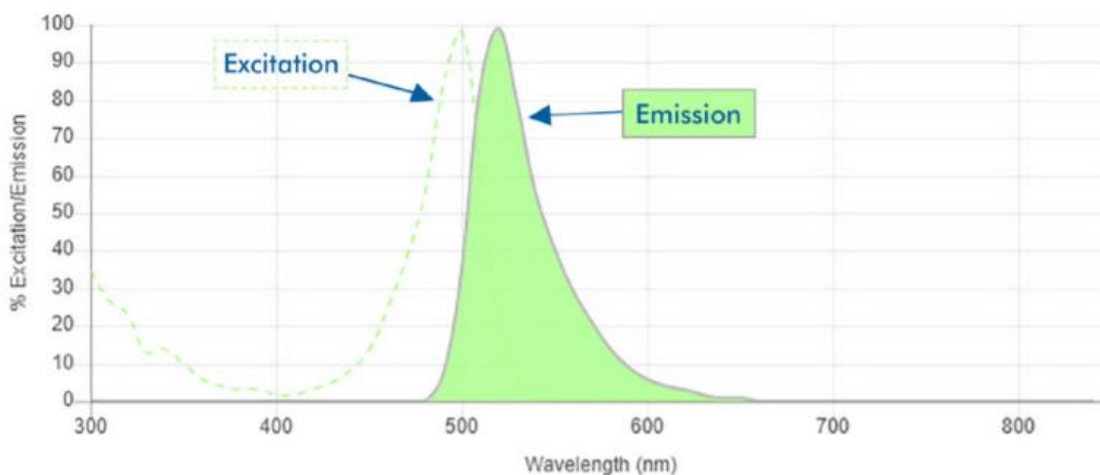
Οι δοκιμασίες πολλαπλασιασμού κυττάρων χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιολογία των κυττάρων για τη μέτρηση της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας ως απόκριση σε ερεθίσματα όπως οι αυξητικοί παράγοντες. Ο κυτταρομετρητής ροής μπορεί να μετρήσει τον πολλαπλασιασμό με επισήμανση των κυττάρων με φθορίζουσα χρωστική της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν ενεργοποιούνται τα κύτταρα, αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και υποβάλλονται σε μίτωση. Καθώς τα κύτταρα διαιρούνται, το μισό της αρχικής χρωστικής διαβιβάζεται σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Μετρώντας τη μείωση του σήματος φθορισμού, οι ερευνητές μπορούν να υπολογίσουν την κυτταρική ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό(63)(65).

### Ενδοκυτταρική ροή ασβεστίου

Τα κύτταρα αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και με το περιβάλλον τους μέσω των οδών μεταγωγής σήματος. Όταν ενεργοποιούνται αυτές οι οδοί, τα κανάλια ιόντων ασβεστίου που δεσμεύονται με τη μεμβράνη αντλούν ασβέστιο στο κύτταρο και αυξάνουν γρήγορα τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Τα υψηλότερα επίπεδα ασβεστίου παρέχουν ενέργεια στο κύτταρο και το βοηθούν να ανταποκρίνεται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Ο κυτταρομετρητής μπορεί να παρακολουθεί τη ροή του ασβεστίου στο κύτταρο και να μετρά την ανταπόκρισή τους στα διάφορα ερεθίσματα(63)(65).

## 1.8 ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Οι φθορίζουσες ουσίες είναι χρωστικές οι οποίες όταν δέχονται φωτεινή ενέργεια ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος (πχ από μια δέσμη Laser), διεγείρονται (απορροφούν ενέργεια) και κατά την αποδιέγερση τους εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Έτσι, στο φθορισμό, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία είναι χαμηλότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος από την απορροφούμενη ακτινοβολία (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.9 Παράδειγμα φθορίζουσας ουσίας η οποία διεγείρεται σε μήκος κύματος 480nm και κατά την αποδιέγερση της εκπέμπει ακτινοβολία μήκους κύματος 520 nm (64)

Στην κυτταρομετρία ροής οι φθορίζουσες ουσίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πρωτεϊνών στόχων. Επί της ουσίας, οι χρωστικές αυτές βρίσκονται συζευγμένες πάνω σε αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Το κύτταρο που είναι πλέον συνδεδεμένο με ένα φθορίζων αντίσωμα, περνά από το υδροδυναμικό σύστημα και αλληλεπιδρά με την ακτίνα λέιζερ, δημιουργεί έναν παλμό εκπομπής φωτονίων (κορυφή). Τα σήματα εκπομπής ανιχνεύονται και μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα τα οποία μέσω των επεξεργαστών μετατρέπονται σε ψηφιακά.

Ο κάθε παλμός ονομάζεται "event-συμβάν". Το συνολικό ύψος μετριέται και συσχετίζεται άμεσα με την ένταση φθορισμού για εκείνο το μεμονωμένο γεγονός. Όσο ψηλότερη είναι η ένταση φθορισμού, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των συμβάντων.

Η χρήση της κυτταρομετρίας ροής στη μελέτη πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα, απαιτεί την επιλογή κατάλληλων συνδυασμών φθορίζουσων ουσιών που να έχουν διακριτά φάσματα εκπομπής/απορρόφησης έτσι ώστε να μην αλληλεπικαλύπτονται.

Με τους σύγχρονους αναλυτές μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε συγχρόνως περισσότερες από διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές(51).

Υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές φθορίζουσες ουσίες όπως για παράδειγμα FITC, PerCP, APC, PE, Cy5.5, AlexaFluors, οι οποίες μπορούν να διεγερθούν από το ίδιο μήκος κύματος και να εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος (Πίνακας 1.3). Στην πραγματικότητα όμως, η χρήση πολλών φθορίζουσων ουσιών μπορεί να οδηγήσει σε αλληλοεπικάλυψη του σήματος εκπομπής, με αποτέλεσμα να απαιτείται μια διαδικασία διαχωρισμού και αφαίρεσης των κοινών τόπων μήκους κύματος μεταξύ των φθορίζουσων ουσιών (compensation).



Πίνακας 1.2 Ταξινόμηση των φθορίζουσων χρωστικών ανάλογα με το μήκος κύματος διέγερσης (64).

Conjugate	Laser & Excitation peak	Emission peak	Brightness		
DyLight 350	UV	354 nm	Blue	432 nm	Moderate
Alexa Fluor® 350	UV	346 nm	Blue	442 nm	Moderate
DyLight 405	Violet	400 nm	Blue	420 nm	Moderate
Alexa Fluor® 405	Violet	401 nm	Blue	421 nm	Moderate
DyLight 488	Blue	493 nm	Green	518 nm	Moderate
FITC	Blue	494 nm	Green	520 nm	Moderate
Alexa Fluor® 488	Blue	490 nm	Green	525 nm	Moderate
PE	Blue	496 nm, 565 nm	Yellow	578 nm	Bright
PE-Atto 594	Blue	496 nm, 565 nm	Red	632 nm	Bright
PerCP	Blue	482 nm	Red	678 nm	Dim
PE-Cy5.5	Blue	496 nm, 565 nm	Red	690 nm	Moderate
PE-Cy7	Blue	496 nm, 565 nm	Near Infrared (NIR)	782 nm	Moderate
Alexa Fluor® 532	Yellow-Green	532 nm	Yellow	554 nm	Moderate
Janelia Fluor® 549	Yellow-Green	549 nm	Yellow	571 nm	Bright
DyLight 550	Yellow-Green	562 nm	Yellow	576 nm	Bright
PE	Yellow-Green	496 nm, 565 nm	Yellow	578 nm	Bright
Alexa Fluor® 594	Yellow-Green	590 nm	Red	617 nm	Moderate
DyLight 594	Yellow-Green	593 nm	Red	618 nm	Moderate
PE-Atto 594	Yellow-Green	496 nm, 565 nm	Red	632 nm	Bright
PE-Cy5.5	Yellow-Green	496 nm, 565 nm	Red	690 nm	Moderate
PE-Cy7	Yellow-Green	496 nm, 565 nm	Near Infrared (NIR)	782 nm	Moderate
APC	Red	650 nm	Red	660 nm	Bright
Janelia Fluor® 646	Red	646 nm	Red	664 nm	Moderate
Alexa Fluor® 647	Red	650 nm	Red	665 nm	Moderate
DyLight 650	Red	652 nm	Red	672 nm	Bright
DyLight 680	Red	692 nm	Near Infrared (NIR)	712 nm	Bright
Alexa Fluor® 700	Red	695 nm	Near Infrared (NIR)	720 nm	Dim
APC-Cy7	Red	650 nm	Near Infrared (NIR)	767 nm	Moderate
Alexa Fluor® 750	Red	749 nm	Near Infrared (NIR)	775 nm	Moderate
DyLight 755	Red	754 nm	Near Infrared (NIR)	776 nm	Moderate

Ένα σημαντικό στοιχείο είναι ότι τα σήματα φθορισμού, μπορούν να προκύψουν από φυσικές ουσίες φθορισμού στο κύτταρο, όπως με τα νουκλεοτίδια πυριδίνης (NAD(P)H) και με οξειδωμένες φλεβίνες (FAD), και αυτό ονομάζεται "αυτοφθορισμός". Τα μεγαλύτερα και πιο κοκκώδη κύτταρα έχουν υψηλότερα επίπεδα αυτοφθορισμού λόγω της αυξημένης ποσότητας ενώσεων που φθορίζουν. Το επίπεδο του αυτοφθορισμού μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση του φθορισμού μείον ένα (FMO-Fluorescence Minus One) (66).

### 1.8.1 Επιλογή φθορίζουσων ουσιών

Οι φθορίζουσες ουσίες απορροφούν φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Η σύνδεση των φθορίζουσων ουσιών με αντισώματα επιτρέπει την ανάλυση μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Είναι λοιπόν σημαντικό να επιλεγεί η κατάλληλη φθορίζουσα ουσία, δεδομένου των χαρακτηριστικών της. Οι παράγοντες που πρέπει να λάβουμε υπόψη είναι:

- Το Μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης ( $\lambda_{exc}$ )
- Το Μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής ( $\lambda_{em}$ )
- Συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ( $\epsilon_{max}$ ). Η ικανότητα της φθορίζουσας ουσίας να απορροφήσει το φως σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος?
- Κβαντική Απόδοση Φθορισμού (Φφ) - Ο αριθμός των φωτονίων που εκπέμπονται ανά απορροφημένο φωτόνιο.
- Χρόνος αποσύνθεσης φθορισμού (τfl) - Το χρονικό διάστημα μετά το οποίο ο αριθμός των διεγερμένων φθορίζόντων μορίων μειώνεται στο  $1 / e$  (περίπου 37%) μέσω της απώλειας ενέργειας, συνήθως μετρείται σε νανοδευτερόλεπτα
- StokesShift - Η διαφορά μεταξύ του μέγιστου μήκους κύματος εκπομπών και του μέγιστου μήκους κύματος διέγερσης, που μετρείται σε νανόμετρα
- Γραμμή λέιζερ. Ποιες σειρές λέιζερ πρέπει να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής
- Τα φίλτρα. Το φίλτρο μικροσκοπίου που παράγει τα καλύτερα αποτελέσματα απεικόνισης
- Φωτοσταθερότητα - Πόσο ανθεκτική είναι μια ουσία στην έκθεση στο φως

### 1.9 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Το κάθε κύτταρο που περνά μέσα από το υδροδυναμικό και οπτικό σύστημα, ανιχνεύεται και υπολογίζεται ως ένα ξεχωριστό συμβάν (event). Τα δεδομένα αυτά μπορούν να αναπαριστούν με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Οι πιο κοινοί τύποι γραφημάτων που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής, περιλαμβάνουν τα ιστογράμματα και τα στικτογράμματα.

Τα γραφήματα ιστογράμματος, ελέγχουν μόνο μία παράμετρο. Συνήθως, ο άξονας Υ είναι ο αριθμός των συμβάντων (ο αριθμός των κυττάρων) που εμφανίζουν ένα δεδομένο φθορισμό και ο άξονας Χ είναι η σχετική ένταση φθορισμού που ανιχνεύεται σε ένα κανάλι. Ένας μεγάλος αριθμός συμβάντων που ανιχνεύονται σε μια συγκεκριμένη ένταση αναπαρίσταται ως κορυφή στο ιστόγραμμα. Ιδανικά, θα παραχθεί μόνο μία κορυφή και μπορεί να ερμηνευθεί ως το θετικό σύνολο δεδομένων (που αντιπροσωπεύει τα κύτταρα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενδιαφέροντος).

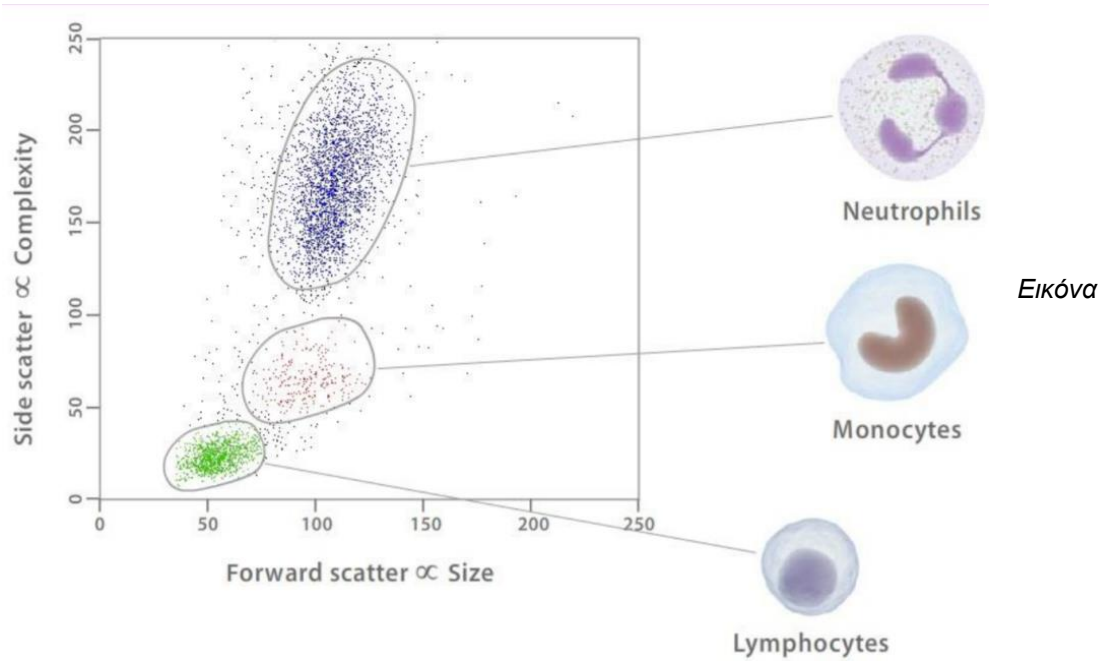
Σε περίπτωση που υπάρχουν πολλαπλές κορυφές στο ιστόγραμμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί αρνητικός μάρτυρας, έτσι ώστε να υπολογιστεί η μετατόπιση της έντασης φθορισμού μεταξύ του αρνητικού μάρτυρα και των θετικών δειγμάτων

Στο στικτόγραμμα τα συμβάντα παρουσιάζονται με τη μορφή κουκκίδων. Τα διαγράμματα αυτά χρησιμοποιούνται για τη ταυτόχρονη μελέτη δύο διαφορετικών δεικτών, επιτρέποντας τον εντοπισμό πιο σύνθετων φαινοτύπων και την απομόνωση σημαντικών πληθυσμών ενδιαφέροντος

Το Gating είναι μια σημαντική διαδικασία στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής, για την επιλογή των κυττάρων ενδιαφέροντος και την απομάκρυνση από την ανάλυση των ανεπιθύμητων συμβάντων, όπως τα νεκρά κύτταρα και τα θραύσματα κυττάρων (debris).

Στο στικτόγραμμα, οι πληθυσμοί κυττάρων σε ένα δείγμα περιφερικού αίματος, μπορούν να προσδιοριστούν με βάση τα σήματα από τον πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό (Εικόνα 1.12).

1.10



Απεικόνιση των υποπληθυσμών των κυττάρων σε ολικό αίμα(67)

θραύσματα κυττάρων (debris): πολύ μικρά στοιχεία (όπως νεκρά κύτταρα) με μικρό πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό

λεμφοκύτταρα/μονοκύτταρα: μικρά προς μεσαίου μεγέθους κύτταρα με χαμηλή εσωτερική κοκκίωση. Αυτά τα κύτταρα παράγουν μεσαίο πρόσθιο και χαμηλό πλάγιο σκεδασμό

κοκκιοκύτταρα-Granulocytes: μεγάλα κύτταρα με υψηλή εσωτερική κοκκίωση. Αυτά τα κύτταρα παράγουν υψηλές εντάσεις σήματος πρόσθιου και πλάγιου σκεδασμού.

Εντούτοις, μεταξύ των κοκκιοκυττάρων υπάρχουν τρεις διαφορετικές τάξεις (ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και ουδετερόφιλα) τα οποία είναι δύσκολο να διακριθούν χρησιμοποιώντας ιδιότητες σκέδασης φωτός μόνο και μόνο λόγω του ίδιου μεγέθους και δομής κυττάρων. Για να γίνει εφικτός ο διαχωρισμός των κυττάρων αυτών, απαιτείται η σήμανση των κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα συζευμένα με φθορίζουσες ουσίες, τα οποία στοχεύουν σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

## 1.10 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ CTCs ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Η εύρεση μεθόδων για ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε αίμα ασθενών με καρκίνο, αποτελούσε κίνητρο για πολλές ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο.

Η σπανιότητα των κυττάρων αυτών καθώς και ο μικρός χρόνος ημιζωής τους απαιτεί τεχνολογίες ανίχνευσης με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Πολλές ομάδες ανέπτυξαν τεχνολογίες με στάδια εμπλουτισμού των κυττάρων μέσω σφαιριδίων συνδεδεμένων με αντισώματα (ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός).

Η ερευνητική ομάδα του Shiang Huang το 2010 χρησιμοποίησε την κυτταρομετρία ροής ως μέθοδο ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Για τον έλεγχο της ευαισθησίας και ειδικότητας της μεθόδου χρησιμοποίησε την κυτταρική σειρά SKBR-3. Εμβολίασαν 1, 10, 50, 500 κύτταρα σε 7,5ml αίμα υγιών εθελοντών και προστέθηκαν τα αντισώματα CD45, EpCAM, Cytokeratin 8,18,19. Η ανίχνευση των κυττάρων έγινε με το FACS Calibur. Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε στο 0.001% που αντιστοιχεί στο 1 καρκινικό κύτταρο στα 100.000 κύτταρα (68).

Το 2012 η ερευνητική ομάδα του Ingeborg Tinhofer χρησιμοποίησε τα αντισώματα CD45, EpCam και Cytokeratin 7/8 για την ανίχνευση CTCs, με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Έθεσαν κάποια όρια όπως 10.000 για το σήμα φθορισμού του πρόσθιου σκεδασμού, 400 για το σήμα του EpCam και 300 για το σήμα των κυτταροκινών. Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές SW620 και UT-SCC-23 για εμβολιασμό 10, 20, 30 και 60 κυττάρων σε 5ml ολικό αίμα. Τα κύτταρα ανιχνεύτηκαν στο FACS Canto II. Από τα αποτελέσματά τους παρατηρήθηκε γραμμική σχέση όσον αφορά τον αριθμό των κυττάρων που εμβολιάστηκαν σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων που ανιχνεύτηκαν (69).

Το 2013 η ομάδα του Yasuhiro Koh χρησιμοποίησε καρκινικές κυτταρικές σειρές με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του EpCAM, οι οποίες εμβολιάστηκαν σε περιφερικό αίμα υγιών εθελοντών (0, 10, 100, 500, και 1.000 σε 1 mL ολικό αίμα).

Με τη χρήση anti-CD45 σφαιριδίων έκαναν αρνητικό εμπλουτισμό των καρκινικών κυττάρων, απομακρύνοντας τα λευκοκύτταρα και στη συνέχεια έγινε χρώση των κυττάρων με CD45-Alexa Fluor 700, EpCAM-phycoerythrin, κυτταροκερατίνη (CK)-fluorescein isothiocyanate και 7-AAD. Τα κύτταρα μετρήθηκαν με το σύστημα κυτταρομετρίας ροής FISHMAN-R. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατηρήθηκε γραμμικότητα όσον αφορά τον αριθμό των κυττάρων που εμβολιάστηκαν σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων που ανιχνεύθηκαν (70).

Το 2018 ο Neha Bhagwat και οι συνεργάτες του, ανέπτυξαν μια νέα κυτταρομετρική προσέγγιση για την απομόνωση των σπάνιων καρκινικών κυκλοφορούντων κυττάρων, από ολικό αίμα, με ανάλυση ολόκληρου του μεταγραφώματος (whole transcriptome analysis – WTA) και με μία νέα τεχνολογία BD Precise™ για ακριβή ποσοτικοποίηση των μεταγραφών RNA, με υψηλή απόδοση και χαμηλό κόστος. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό για την απομάκρυνση των λευκοκυττάρων και ερυθροκυττάρων, και στη συνέχεια το δείγμα περνάει σε ένα chip στο οποίο ενσωματώνονται υπέρηχοι, για το διαχωρισμό των σωματιδίων με βάση το μέγεθος και την πυκνότητα. Μετά την απομόνωση των CTCs πραγματοποιείται μοριακός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων (71).

Η ερευνητική ομάδα Bertucci F το 2019 δημοσιεύσε επιστημονικό άρθρο στο οποίο περιγράφεται η ανίχνευση των CTCs με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής και με στάδιο εμπλουτισμού με σφαιρίδια καλυμμένα με αντι-EpCAM.

Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας και ειδικότητας της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MDA-MB-231, από την οποία εμβολιάστηκαν 1, 5, 10 κύτταρα σε 1ml αίμα υγιών εθελοντών. Για την ανίχνευση τόσο σπάνιων συμβάντων επισημαίνουν ότι πρέπει να μετρηθούν εκατομμύρια συμβάντα, έτσι ώστε να μετρηθεί επαρκής αριθμός κυττάρων για στατιστικά σημαντική ανίχνευση. Για να αποφευχθεί ο κορεσμός του συστήματος από την μέτρηση πολυάριθμων κυττάρων εφάρμοσαν περιορισμό δύο ορίων. Αρχικά έθεσαν όριο τα 40.000 για το σήμα του πρόσθιου φθορισμού (για περιορισμό του σήματος των πολυμορφοπύρηνων, μακροφάγων, λεμφοκυττάρων) και στη συνέχεια έθεσαν το όριο των 300 για το σήμα του EpCAM (72).

## 1.11 ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ

Η διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων σε ένα εργαστήριο, δεν έγκειται μόνο στη διασφάλιση της ακρίβειας της αναλυτικής μεθόδου, αλλά επηρεάζεται άμεσα από όλα τα βήματα που ακολουθούνται για την διεκπεραίωση της εργαστηριακής ανάλυσης.

Για το λόγο αυτό εφαρμόζονται Προγράμματα Ελέγχου Ποιότητας, με τα οποία το εργαστήριο συμμετέχει σε Εσωτερικό και Εξωτερικό Έλεγχο Ποιότητας. Ο Εσωτερικός Έλεγχος ποιότητας γίνεται με τη χρήση πρότυπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης και παρέχει στο εργαστήριο συνεχή παρακολούθηση της διαδικασίας. Στον Εξωτερικό Έλεγχο ποιότητας, το εργαστήριο παραλαμβάνει δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης, των οποίων ο χειρισμός τους ακολουθεί τις ίδιες διαδικασίες με τα διαγνωστικά δείγματα και τα αποτελέσματα τους αποστέλλονται πίσω στην εταιρεία ελέγχου ποιότητας και γίνεται σύγκρισή τους με αποτελέσματα εργαστηρίων αναφοράς.

Ο Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας πραγματοποιείται επί καθημερινής βάσης και είναι σημαντικός για παρακολούθηση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας των κυτταρομετρικών αναλύσεων.

Ο ημερήσιος έλεγχος που πραγματοποιείται είναι το FLOWCHECK από την Beckman Coulter που είναι σφαιρίδια οπτικής ευθυγράμμισης τύπου I. Με τα σφαιρίδια αυτά ελέγχονται τα συστήματα του κυτταρόμετρου και επαληθεύεται η οπτική ευθυγράμμιση των lasers καθώς και η καθαρότητα της κυψελίδας ροής. Τα αποτελέσματα του ημερήσιου ελέγχου αποθηκεύονται στον κυτταρομετρητή σε διαγράμματα Levey-Jennings.

Ο εβδομαδιαίος έλεγχος γίνεται με το FLOWSET από την Beckman Coulter, που είναι σφαιρίδια αναφοράς καθορισμένου φθορισμού τύπου II. Στην ουσία, με τα σφαιρίδια αυτά ρυθμίζονται τα φίλτρα και οι φωτοπολλαπλασιαστές, έτσι ώστε τα δείγματα να αναλύονται στις ίδιες συνθήκες. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε διαγράμματα Levey-Jennings στον κυτταρομετρητή.

Εβδομαδιαία πραγματοποιείται και μέτρηση κυττάρων με έτοιμα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης (Immunotrol από την BeckmanCoulter) με τον οποίο γίνεται η καταμέτρηση των βασικών υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD3-CD16/56+), καθώς και ορισμένων υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων.

Ο εξαμηνιαίος ή ετήσιος έλεγχος RAINBOW γίνεται με τη χρήση σφαιριδίων βαθμονόμησης τύπου III, τα οποία ρυθμίζουν την ποσοτικοποίηση των σημάτων φθορισμού και υπολογίζουν την ευαισθησία και γραμμικότητα της ανταπόκρισης του κυτταρομετρητή.

Ο Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας πραγματοποιείται πολλές φορές σε ετήσια βάση με την παραλαβή δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Τα δείγματα αυτά μετρούνται στον κυτταρομετρητή με τις ίδιες συνθήκες των διαγνωστικών δειγμάτων (ίδιο εργαστηριακό προσωπικό, ίδιος κυτταρομετρητής κ.α). Το κάθε εργαστήριο που συμμετέχει στον Εξωτερικό Έλεγχο Ποιότητας στέλνει τα αποτελέσματά του στην Υπηρεσία Εξωτερικού Ελέγχου και δηλώνει τον κυτταρομετρητή που χρησιμοποιεί καθώς και τη μεθοδολογία.

Η Υπηρεσία αναλύει τα αποτελέσματα με στατιστικές μεθόδους και τα συγκρίνει με άλλα εργαστήρια αναφοράς, αξιολογώντας την κάθε τιμή ως αποδεκτή ή μη-αποδεκτή. Τέλος αποστέλλει έντυπο αξιολόγησης στο εργαστήριο αναφέροντας τον βαθμό αξιολόγησης για κάθε τιμή ξεχωριστά αλλά και με τον συνολικό βαθμό αξιολόγησης του εργαστηρίου.

Το Εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. « Ευαγγελισμός» στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, συμμετέχει στο Πρόγραμμα Εξωτερικού Ελέγχου Ποιότητας UKNEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service).

Ο Εσωτερικός και ο Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας είναι συμπληρωματικοί και απολύτως αναγκαίοι για τη σωστή λειτουργία κάθε κλινικού εργαστηρίου.



## **1.12 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε περιφερικό αίμα, με τη χρήση της πολυπαραμετρικής κυτταρομετρίας ροής, και η σύγκριση της κυτταρομετρίας ροής ως μέθοδος ανίχνευσης των καρκινικών κυττάρων με την RT-qPCR παρουσία και απουσία μαγνητικών σφαιριδίων.

Οι μεθοδολογίες θα εφαρμοστούν σε δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και σε υγιείς εθελοντές, ως αρχική ένδειξη κατά πόσο η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής, στο Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός». Για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας ανίχνευσης των CTCs χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 η οποία παραχωρήθηκε από το Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και από το Κέντρο Βασικής Έρευνας, Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου (IIBEAA). Για τον εμβολιασμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ολικό αίμα από υγιείς εθελοντές αιμοδότες του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός». Επιπρόσθετα έγινε σύγκριση της μεθόδου της Κυτταρομετρίας ροής με τη μέθοδο RT-qPCR από το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες από την εταιρεία BD Biosciences, για την επισήμανση των καρκινικών κυττάρων και σφαιρίδια Flow Count, για την αρχική καταμέτρηση των καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ο βασικός εξοπλισμός του εργαστηρίου καθώς και το κυτταρόμετρο Navios EX της εταιρείας Beckman Coulter. Τέλος οι μεθοδολογίες εμπλουτισμού και ανίχνευσης εφαρμόστηκαν και σε δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, τα οποία παραχωρήθηκαν από την ογκολογική κλινική του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός».

### **2.1 Καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7**

Οι κυτταρικές σειρές φαίνεται να αποτελούν βασικό στοιχείο στις μελέτες για ανίχνευση και μοριακή ανάλυση του καρκίνου του μαστού, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως σε πολλές πτυχές της εργαστηριακής έρευνας και ιδιαίτερα ως μοντέλα *in vitro* στην έρευνα για τον καρκίνο. Όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού, η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ευρέως για την έρευνα είναι η MCF-7 (73).

Τα κύτταρα MCF-7 είναι θετικά στους επιθηλιακούς δείκτες, όπως στην E-καδερίνη, στη β-κατενίνη, στην κυτοκερατίνη 18 (CK18), και στο EpCAM, επίσης είναι αρνητικά για τους μεσεγχυματικούς δείκτες, όπως η βιμεντίνη και η ακτίνη

των λείων μυών (SMA). Επιπλέον, τα κύτταρα MCF-7 έχουν ανεπαρκή έκφραση CD44 (73)

Τα κύτταρα από την καρκινική σειρά MCF-7 παραχωρήθηκαν από το Κέντρο Βασικής Έρευνας, Εργαστήριο βιολογίας του καρκίνου (ΙΒΕΑΑ).

## 2.2 Επιλογή μονοκλωνικών Αντισωμάτων

Για τον προσδιορισμό των CTCs χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος συνδυασμός μονοκλωνικών αντισωμάτων συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες της εταιρείας BD Biosciences.

**-EpcAM- FITC** (Fluorescein Isothiocyanate)

**-Vimentin- PE** (Phycoerythrin)

**-CD45-PerC7**

**-CD44-Pacific Blue**

**-CD24-A750**

**-CK 7/8/14/15/16/19- APC**

Το EpcAM είναι χαρακτηριστικό των μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων και χρησιμοποιείται για το θετικό εμπλουτισμό των CTCs. Μαζί με το EpcAM συνδιάζονται και οι κυτταροκερατίνες (CK 7/8/14/15/16/19) οι οποίες είναι χαρακτηριστικές πρωτεΐνες του ενδοκυτταροπλασματικού κυτταροσκελετού των επιθηλιακών κυττάρων. Επομένως τα CTCs είναι διπλά θετικά στους δείκτες EpcAM/CK.

Το CD45 χρησιμοποιείται για αρνητική επιλογή των CTCs. Μπορεί να διαχωρίσει τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα CD45- από τα λευκοκύτταρα CD45+.

Το CD44 και CD24 είναι χαρακτηριστικοί δείκτες των καρκινικών βλαστοκυττάρων. Θα χρησιμοποιηθούν σε δείγματα ασθενών για την ανίχνευση κυττάρων τα οποία βρίσκονται σε μεταβατικό στάδιο μετατροπής τους από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά. Τα κύτταρα αυτά είναι CD44+/CD24-.

Τέλος η βιμεντίνη είναι χαρακτηριστικό των μεσεγχυματικών κυττάρων και θα χρησιμοποιηθεί σε δείγματα ασθενών, για την ανίχνευση κυττάρων τα οποία έχουν μεταβεί στη μεσεγχυματική φάση.

Στην παρούσα εργασία, σε πρώτο στάδιο έγινε προσπάθεια ανίχνευσης καρκινικών κυττάρων με εμβολιασμό καρκινικών κυττάρων από την κυτταρική σειρά MCF-7 σε ολικό αίμα υγιών εθελοντών. Ο δείκτης CD45 χρησιμοποιήθηκε για τον αρχικό διαχωρισμό των καρκινικών κυττάρων από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος και το EpCAM και CK για την ανίχνευση των διπλά θετικών κυττάρων. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το 7AAD (7-aminoactinomycin D ) το οποίο είναι χρωστική που βάφει τα νεκρά κύτταρα για εκτίμηση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων.

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανίχνευσης CTCs σε δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού από την ογκολογική κλινική του Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός». Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον οι δείκτες CD44, CD24 και βιμεντίνη για την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων τα οποία έχουν υποστεί την διαδικασία EMT.

### **2.3 Σύνδεση των μονοκλωνικών Αντισωμάτων στα καρκινικά κύτταρα**

Η σύνδεση των μονοκλωνικών Αντισωμάτων επισημασμένων με φθορίζουσες ουσίες, στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, απαιτεί επώαση του δείγματος με τα μονοκλωνικά αντισώματα και μονιμοποίηση των κυττάρων με χρήση διαλύματος που περιέχει φορμαλδεΰδη. Για τη σύνδεση των κυτταροπλασματικών αντισωμάτων, χρειάζεται ειδική κατεργασία του δείγματος με διάλυμα που περιέχει σαπωνίνη. Με τη χρήση της σαπωνίνης δημιουργούνται οπές στην επιφάνεια των κυττάρων, με αποτέλεσμα τα αντισώματα να εισέρχονται στο κύτταρο και να συνδέονται με τα κυτταροπλασματικά αντιγόνα.

### **2.4 Κυτταρομετρητής Navios Ex**

Ο κυτταρομετρητής Navios Ex της εταιρείας Beckman Coulter έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης πρόσθιου και πλάγιου σκεδασμού καθώς και 10

διαφορετικών φθορίζουσων ουσιών. Διαθέτει τρία lasers 488nm (μπλε χρώματος), 638nm (κόκκινου χρώματος) και 405nm (μωβ χρώματος) και 10 φωτοπολλαπλασιαστές (Εικόνα 2.1). Όπως έχει ήδη αναφερθεί πριν από τη χρήση του κυτταρομετρητή πραγματοποιείται καθημερινά ο έλεγχος των συστημάτων του και η επαλήθευση της οπτικής ευθυγράμμισης των lasers με τη χρήση του flow check. Επίσης σε εβδομαδιαία βάση γίνεται έλεγχος των φωτοπολλαπλασιαστών με τη χρήση του flow set, για να διασφαλιστεί ότι τα δείγματα αναλύονται στις ίδιες συνθήκες φωτοπολλαπλασιαστών.

	Blue laser line				
Navios Detector	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5
Fluorochrome	FITC	PE	ECD (PE-Texas Red)	PC5.5 (PE-Cy5.5)	PC7 (PE-Cy7)
	Red laser line			Violet laser line	
Navios Detector	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
Fluorochrome	APC	APC-A700	APC-A750	Pacific Blue	Krome Orange

Εικόνα 2. 1 Το κυτταρόμετρο NAVIOS EX διαθέτει 10 φωτοπολλαπλασιαστές και τρία lasers (5+3+2) (74).

## 2.5 Αντιδραστήρια-Εξοπλισμός

- Μονοκλωνικά αντισώματα (Ab), συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες (BD Biosciences)
- PBS (Phosphate Buffer Saline), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
- PFA (Paraformaldehyde) Παραφορμαλδεΐδη
- Φυγόκεντρος
- vortex
- Πιπέτες Pasteur
- Κυτταρομετρο Navios Ex (Beckman Coulter)

- IntraPrep Reagent1 και IntraPrep Reagent 2
- Lymphoprep
- RCL buffer (NH<sub>4</sub>Cl 155mM, KHCO<sub>3</sub> 10mM, EDTA 0,1mM , pH=7,4)
- 50ml falcon tubes
- σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής

### **3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **Πείραμα 1: Καταμέτρηση κυττάρων καρκινικής σειράς**

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων της καρκινικής σειράς MCF-7, καθώς και ο έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε με την ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η συγκέντρωση των κυττάρων με την χρήση της πλάκας Neubauer ήταν  $2 \times 10^6$  στα 620μl.

Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική trypan blue η οποία βάφει μόνο τα νεκρά κύτταρα και αυτό γιατί δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων. Επίσης εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων έγινε και με το κυτταρόμετρο Navios EX της εταιρείας Beckman Coulter, με την χρήση των σφαιριδίων Flow Count. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων όλων των πειραμάτων έγινε με το πρόγραμμα KALUZA.

Για την καταμέτρηση των κυττάρων με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιήθηκαν 100μl από το εναιώρημα των κυττάρων στο οποίο προστέθηκαν 20μl της χρωστικής 7AAD, για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων και 100μl σφαιρίδια Flow Count τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του απόλυτου αριθμού των κυττάρων (αριθμός κυττάρων/μl), επίσης προστέθηκαν 500μl PBS. Τα κύτταρα μετρήθηκαν στο κυτταρόμετρο Navios Ex.

#### **Οριοθέτηση αρνητικού-θετικού πληθυσμού**

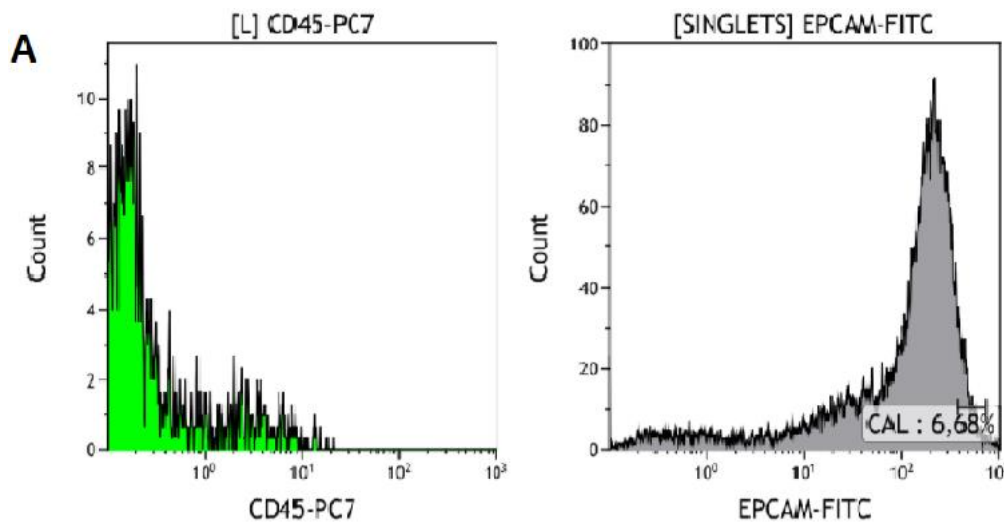
Η οριοθέτηση των πληθυσμών έγινε με τη χρήση του FMO (Φθορισμός Μείον Ένα). Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται όλα τα αντισώματα με τις φθορίζουσες ουσίες που προβλέπονται να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα πλην ένα κάθε φορά. Ο έλεγχος έγινε για τα τρία μονοκλωνικά αντισώματα EpCAM-FITC,

CD45-PerC7 και CK-APC. Στην πρώτη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα EPCAM-FITC, CD45-PerC7 χωρίς να προστεθεί το αντίσωμα CK-APC (FMO A). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα EPCAM-FITC CK-APC χωρίς να προστεθεί το CD45-PerC7 (FMO B) και τέλος χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα CD45-PerC7 και CK-APC χωρίς να προστεθεί το αντίσωμα EPCAM-FITC (FMO C), όπως φαίνεται και στον (Πίνακα 3.1)

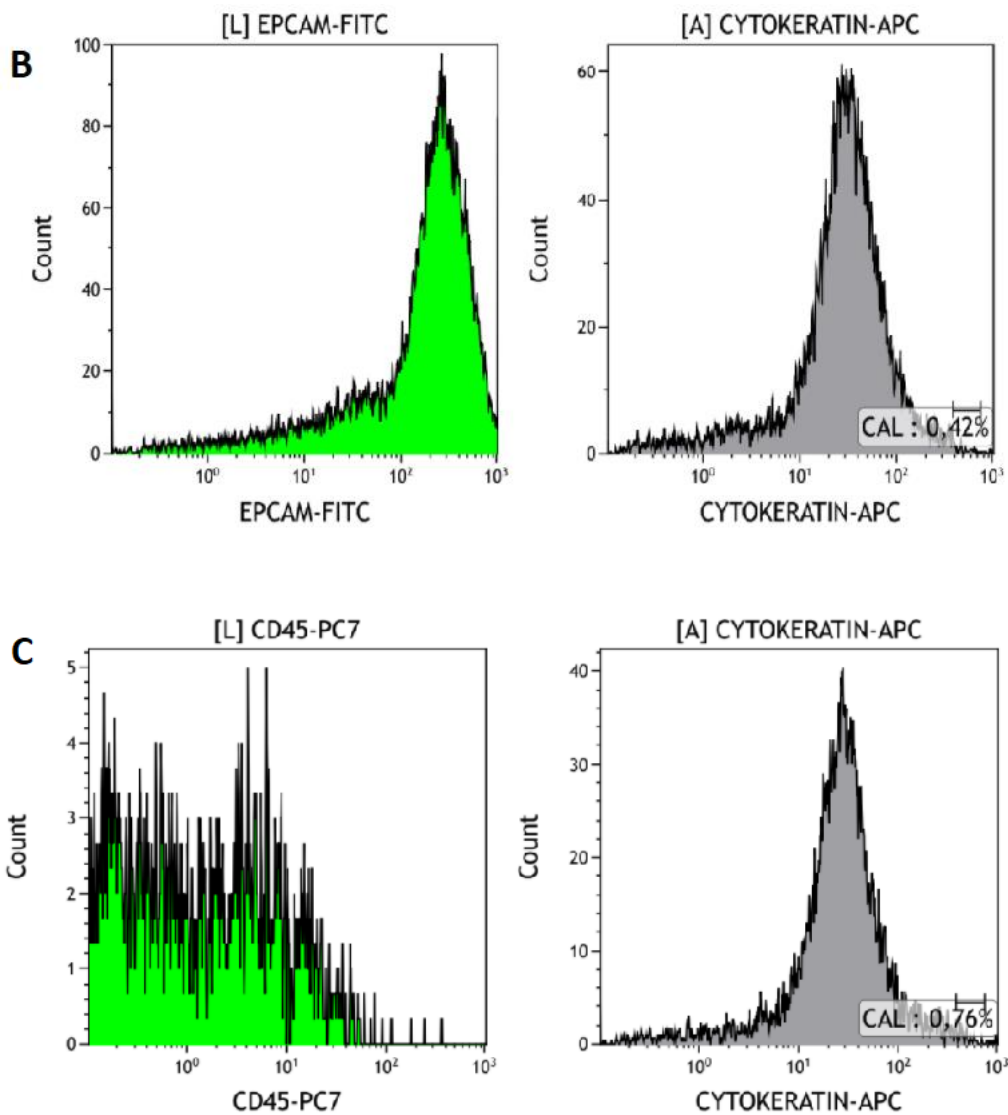
Πίνακας 3.1 Οριοθέτηση αρνητικού-θετικού πληθυσμού με τη χρήση του FMO

	FITC	PerC7	APC
<b>FMO-A</b>	EPCAM	CD45	---
<b>FMO-B</b>	EPCAM	---	CK
<b>FMO-C</b>	----	CD45	CK

Τα αποτελέσματα της χρήσης του FMO παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.1







Εικόνα 3. 1 Οριοθέτηση πληθυσμών με τη χρήση του FMO

## Πείραμα 2

### Ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7

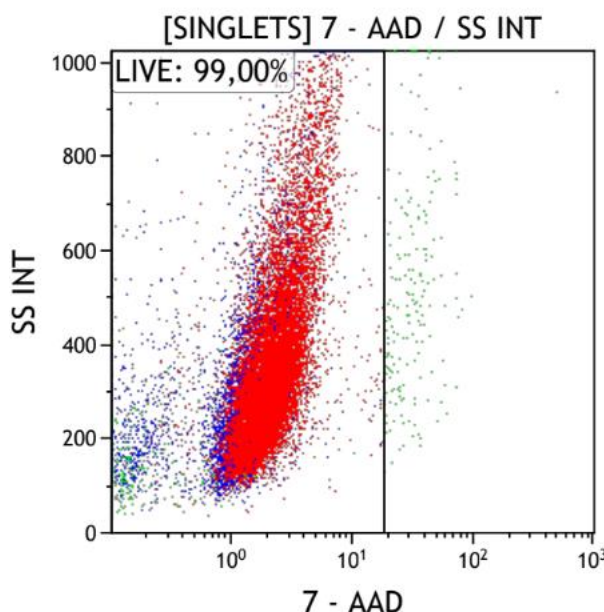
Για την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων και τον έλεγχο της σύνδεσης των αντισωμάτων με πρωτεΐνες στην επιφάνεια ή στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν 50μl δείγματος από την καρκινική σειρά MCF-7 στα οποία προστέθηκε η χρώση 7AAD (Εικόνα 13) καθώς και τα μονοκλωνικά αντισώματα EpCAM, CD45, CK (Εικόνα 14). Η μέτρηση των κυττάρων για όλα τα

πειράματα που ακολουθούν έγινε στο κυτταρόμετρο Navios EX της εταιρείας Beckman Coulter και η ανάλυση των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα KALUZA.

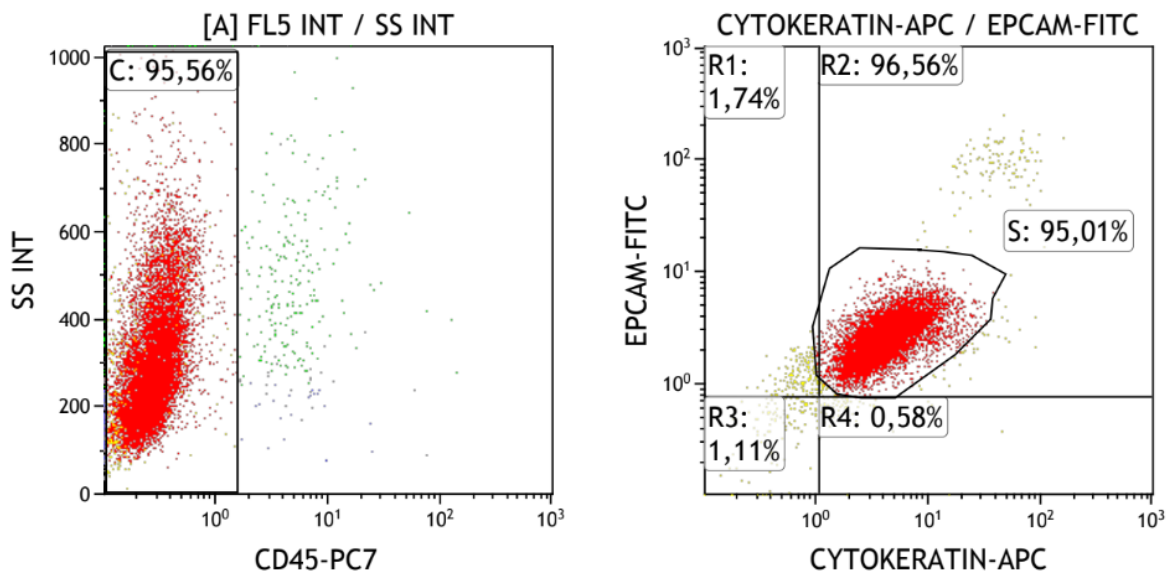
### Πρωτόκολλο προσθήκης μονοκλωνικών Αντισωμάτων

Το πρωτόκολλο προσθήκης των μονοκλωνικών Αντισωμάτων επιφανείας EpCAM, CD45 και της χρωστικής 7-AAD σε 50μl δείγματος της καρκινικής σειράς MCF-7 αρχίζει με την προσθήκη των αντισωμάτων επιφανείας, ανάδευση και επώαση για 10 min. Στη συνέχεια προστίθενται 100μl IntraPrep Reagent 1 για μονιμοποίηση των επιτόπων και επώαση για 15 min. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 2ml PBS και γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στα 300xg. Ακολουθεί η απομάκρυνση υπερκείμενου και η προσθήκη 100μl IntraPrep Reagent 2 για τη διάνοιξη της μεμβράνης των κυττάρων. Για την δράση του διαλύματος αυτού απαιτούνται 5 min επώασης. Αφού περάσει ο χρόνος επώασης προστίθενται τα κυτταροπλασματικά αντισώματα CK 7/8/14/15/16/19 και το δείγμα επώαζεται για 15 min. Στη συνέχεια προστίθενται 2ml PBS και γίνεται φυγοκέντρηση στα 300xg για 5 min. Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθενται 500μl PFA (Paraformaldehyde – Παραφορμαλδεΐδη), γίνεται ανάδευση του δείγματος και μέτρηση των κυττάρων στο κυτταρόμετρο Navios EX.

Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2 και Εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.2: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε στικτόγραμμα. Η χρωστική 7AAD χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων



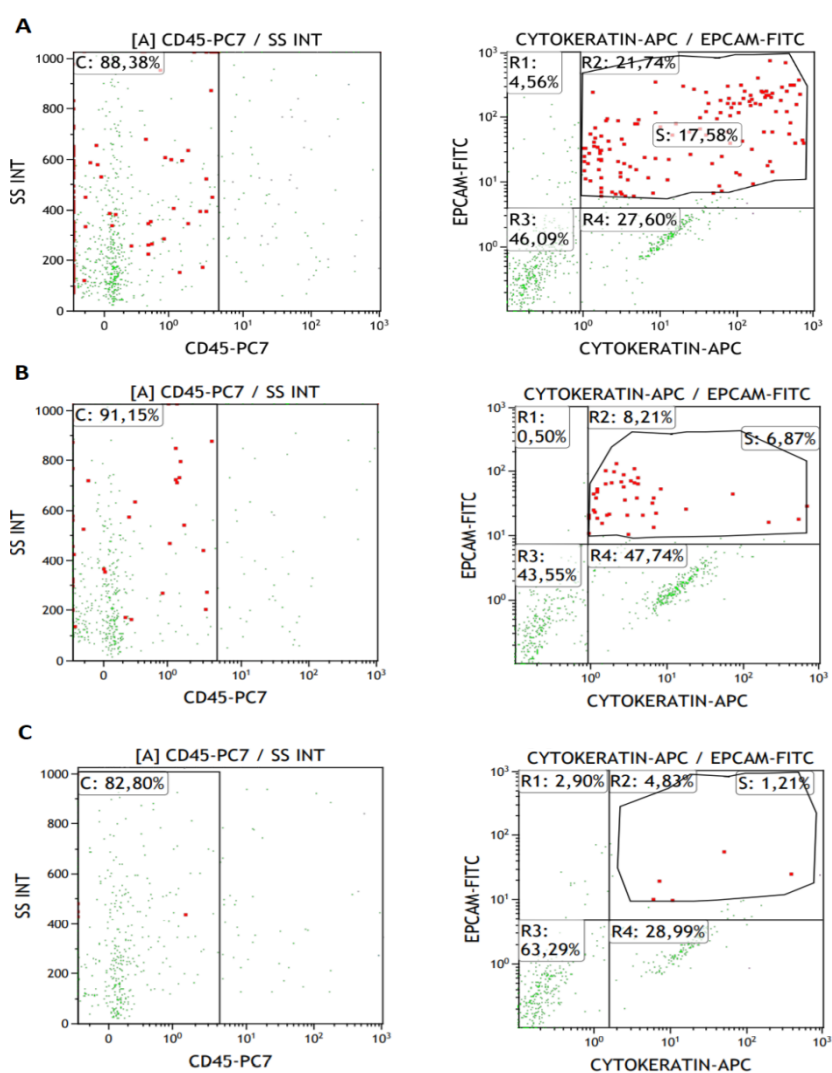
Εικόνα 3.3: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε στικτογράμματα. Αριστερά φαίνεται η αρνητική έκφραση των κυττάρων σε CD45 και δεξιά φαίνεται η θετική έκφραση των καρκινικών κυττάρων στους δείκτες EpcAM και CK.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε στικτογράμματα, φαίνεται ότι ένα μεγάλο ποσοστό της τάξης του 99% είναι αρνητικά στη χρώση 7AAD. Αυτό υποδηλώνει ότι τα κύτταρα της καρκινικής σειράς MCF-7 είναι ζωντανά αφού η χρώση αυτή είναι ανίκανη να περάσει την μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων. Το CD45 χρησιμοποιήθηκε για την αρχική οριοθέτηση των CTCs. Όπως έχει αναφερθεί τα CTCs είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45, οπότε επιλέγεται ο πληθυσμός που είναι αρνητικός στην έκφραση του CD45. Το ποσοστό των κυττάρων αυτών είναι 95,6%. Από αυτό τον πληθυσμό κυττάρων ένα ποσοστό της τάξης του 95% είναι διπλά θετικά στους δείκτες EpcAM και CK, φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που συμφωνούν με τα όσα αναφέρθηκαν για τα καρκινικά κύτταρα. Από το παραπάνω πείραμα, φαίνεται ότι τα κύτταρα της καρκινικής σειράς MCF-7 έχουν τον φαινότυπο που αναγράφεται στη βιβλιογραφία δίνοντας την επιλογή στη χρήση τους για την ανάπτυξη μεθοδολογιών για ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε δείγματα ασθενών.

### Πείραμα 3

Για τον έλεγχο καταλληλότητας της κυτταρομετρίας ως μέθοδος ανίχνευσης μικρών ποσοτήτων καρκινικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων της καρκινικής σειράς στα 1000, 100 και 10 κύτταρα χωρίς αυτά να εμβολιαστούν σε ολικό αίμα. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη των επισημασμένων με φθορίζουσες ουσίες μονοκλωνικών αντισωμάτων όπως περιγράφεται στο Πείραμα 1.

Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4



Εικόνα 3.4: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων ανίχνευσης A: 1000 κυττάρων, B: 100 κυττάρων και C: 10 κυττάρων

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα συμβάντα (events), που παρατηρήθηκαν στις αραιώσεις 1000, 100 και 10 κυττάρων.

Πίνακας 3.2: Αριθμός συμβάντων στις αραιώσεις 1000, 100 και 10 κυττάρων

Αριθμός κυττάρων	Αριθμός συμβάντων
1000	139
100	41
10	5

Ο αριθμός των συμβάντων που καταγράφηκαν στις αραιώσεις 1000, 100 και 10 κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 είναι 139, 41 και 5 αντίστοιχα. Από τον αριθμό των συμβάντων, παρατηρείται αδυναμία ανίχνευσης μεγάλου ποσοστού των κυττάρων τα οποία φαίνονται να μην εκφράζουν τους δείκτες ErCAM και CK. Αυτό ίσως οφείλεται στα συσσωματώματα που παρατηρήθηκαν στα κύτταρα, αλλά και το μεγάλο ποσοστό των κυττάρων που ήταν σε διαδικασία απόπτωσης κατά την μικροσκόπηση των κυττάρων. Παρ' όλα αυτά η κυτταρομετρία, φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει πολύ μικρό αριθμό κυττάρων, δεδομένου του αριθμού των συμβάντων που καταγράφηκαν στην ανάλυση των 10 κυττάρων.

#### Πείραμα 4

##### Εμβολιασμός καρκινικών κυττάρων της σειράς MCF-7 σε περιφερικό αίμα

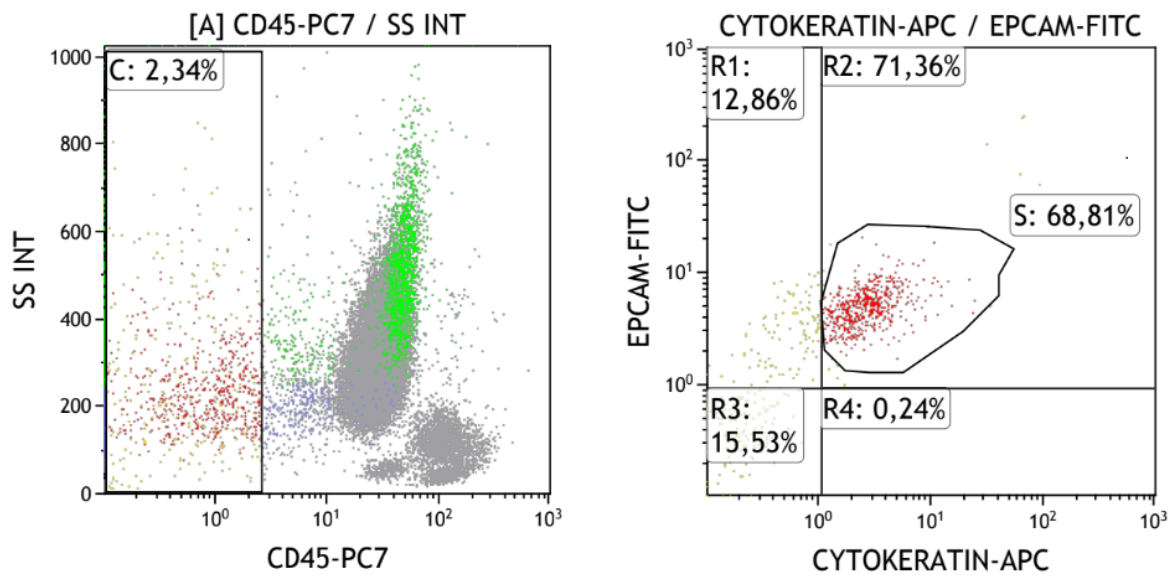
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα τα μονοκλωνικά αντισώματα CD45, ErCAM και CK χρησιμοποιήθηκαν και στα επόμενα πειράματα για ανίχνευση καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε ολικό αίμα υγιών εθελοντών αιμοδοτών.

Το ολικό αίμα που χρησιμοποιήθηκε στα ακόλουθα πειράματα εμβολιασμού καρκινικών κυττάρων σε περιφερικό αίμα, προέρχεται από εθελοντές αιμοδότες του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός». Η συλλογή του δείγματος έγινε σε σωληνάρια γενικής αίματος με αντιπηκτικό EDTA, για να αποφευχθεί η πήξη του δείγματος και να είναι εφικτή η μελέτη των έμμορφων συστατικών του αίματος.

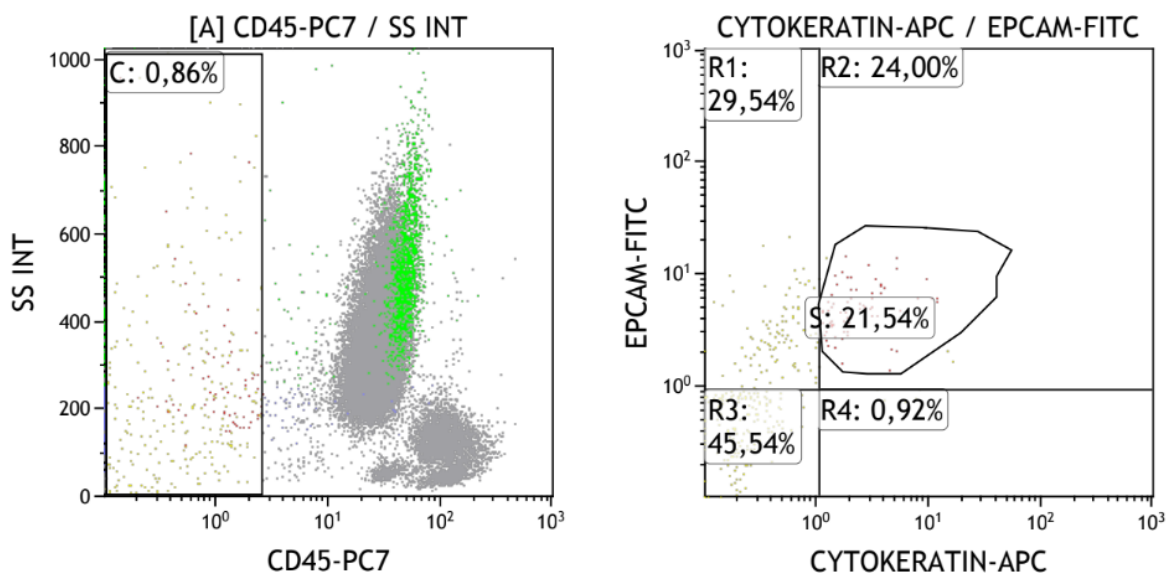
Για τον σχεδιασμό των πειραμάτων, αρχικά χρησιμοποιήθηκε μικρός όγκος δείγματος αίματος (50 μl) μέσα στον οποίο έγιναν διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων έτσι ώστε να δούμε πως επηρεάζεται η ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων παρουσία και των υπολοίπων κυττάρων του αίματος.

Αφού έχει υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων της καρκινικής σειράς MCF-7 σε PBS στα 100,1000 και 10.000 κύτταρα τα οποία εμβολιάστηκαν σε 50μl ολικού αίματος. Ακολούθησε η προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων επιφανείας (ErCAM, CD45) της χρωστικής 7-AAD και των κυτταροπλασματικών αντισωμάτων CK 7/8/14/15/16/19, όπως περιεγράφηκε στο Πείραμα 2. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας 50μl αίμα χωρίς να έχουν προστεθεί σε αυτό καρκινικά κύτταρα. Το δείγμα του αρνητικού μάρτυρα ακολούθησε όλες τις διαδικασίες που ακολούθησαν και τα δείγματα στα οποία είχαν προστεθεί καρκινικά κύτταρα.

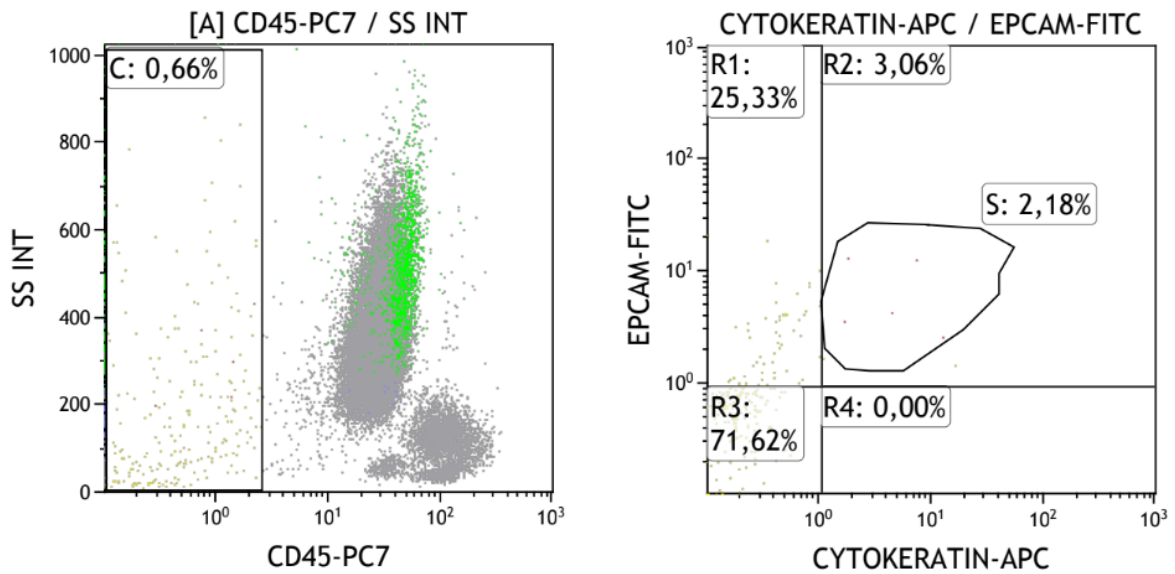
Τα αποτελέσματα του πειράματος προσθήκης 10.000, 1000 και 100 κυττάρων σε 50μl ολικού αίματος καθώς και του αρνητικού μάρτυρα παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 αντίστοιχα.



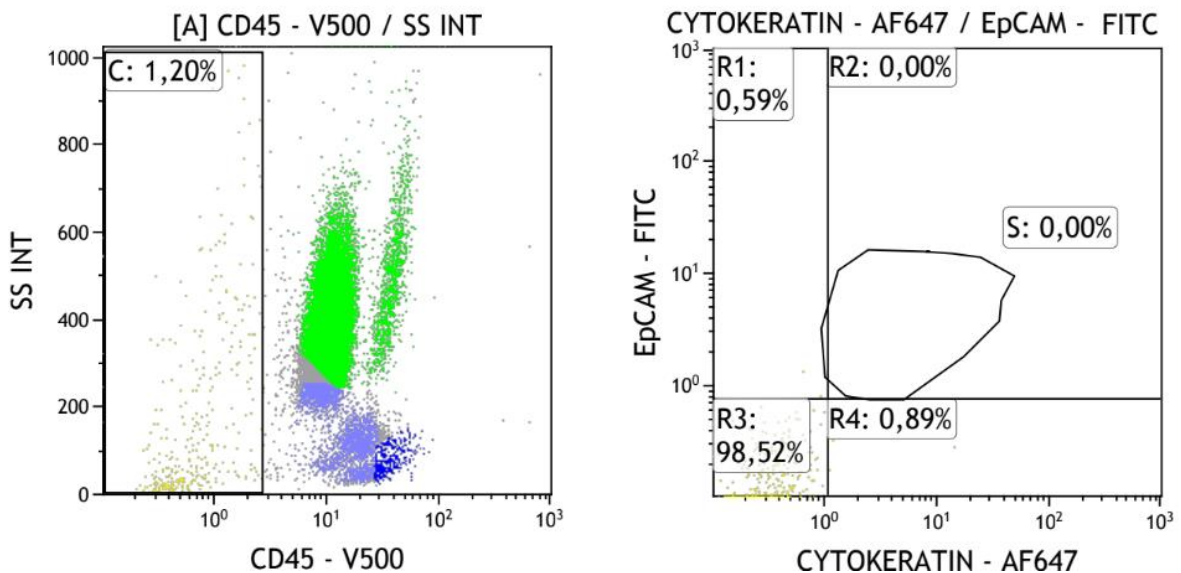
Εικόνα 3.5: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της προσθήκης 10.000 καρκινικών κυττάρων σε 50μl ολικό αίμα. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK.



Εικόνα 3.6: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της προσθήκης 1000 καρκινικών κυττάρων σε 50μl ολικό αίμα. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK.



Εικόνα 3.7: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της προσθήκης 100 καρκινικών κυττάρων σε 50μl ολικό αίμα. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK.



Εικόνα 3.8: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων του αρνητικού μάρτυρα. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK.



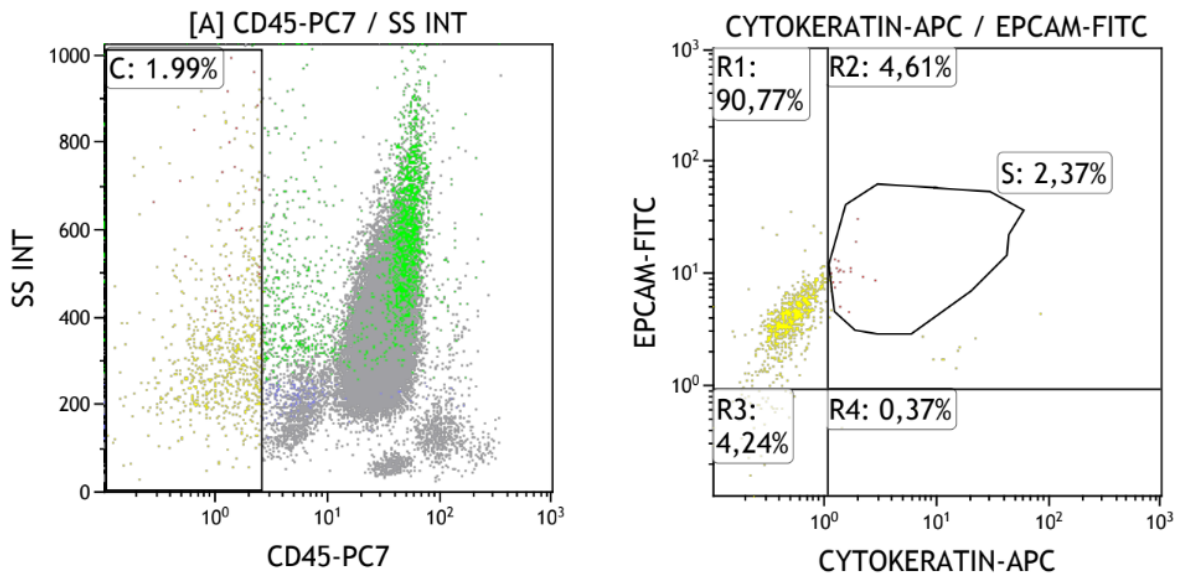
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι στην προσθήκη των 10.000 καρκινικών κυττάρων σε 50μl αίμα το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στο CD45 είναι 2,34%. Το υπόλοιπο ποσοστό των κυττάρων που είναι θετικά στο CD45 αντικατοπτρίζει τα λευκοκύτταρα του αίματος(λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα). Από τα κύτταρα που είναι αρνητικά στο CD45 το 68,8% είναι θετικά στο ErCAM και CK με αριθμό συμβάντων στα 584. Το ποσοστό αυτό μειώνεται στις αραιώσεις των 1000 και 100 κυττάρων σε 21,6% (αριθμός συμβάντων:70) και 2,18% (αριθμός συμβάντων:5) αντίστοιχα.

Στον αρνητικό μάρτυρα δεν υπάρχει κανένα διπλά θετικό συμβάν για το ErCAM και τις CK. Αυτό υποδηλώνει ότι όντως τα κύτταρα που είναι αρνητικά στο CD45 και θετικά στο ErCAM και CK είναι τα καρκινικά κύτταρα της κυτταρικής σειράς MCF-7.

Τα αποτελέσματα φαίνονται ενθαρρυντικά όσον αφορά τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής για την ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Η μείωση του ποσοστού των κυττάρων καθώς μειώνεται ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων που έχουν προστεθεί, δείχνει ότι όντως τα κύτταρα που ανιχνεύονται είναι τα καρκινικά κύτταρα.

Σε επόμενο στάδιο έγινε επανάληψη του πειράματος με μεγαλύτερη αραιώση των κυττάρων έτσι ώστε να προστεθούν μόνο 5 καρκινικά κύτταρα σε 50μl ολικό αίμα, για να αξιολογηθεί η ευαισθησία της μεθόδου στην ανίχνευση πολύ χαμηλού αριθμού κυττάρων.

Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.9.



Εικόνα 3.9: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της προσθήκης 5 καρκινικών κυττάρων σε 50μl ολικό αίμα. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, φαίνεται ότι το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στο CD45 και θετικά στο EpcAM και CK είναι 2,37% (αριθμός συμβάντων:19). Στο στικτόγραμμα που παρουσιάζει την έκφραση του CD45 φαίνεται ότι στα κύτταρα του αίματος υπάρχει ένας επιπλέον πληθυσμός κυττάρων ο οποίος ίσως να είναι κατεστραμμένα ερυθρά. Τα κύτταρα αυτά φαίνονται και στο στικτόγραμμα που παρουσιάζει την έκφραση του EpcAM και CK. Ίσως αυτός ο πληθυσμός να συγχέεται με τον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων στο πείραμα προσθήκης 5 κυττάρων στα 50μl αίματος, να μην μειώνεται σε σχέση με το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων στο πείραμα προσθήκης 100 κυττάρων στα 50μl αίματος. Επίσης φαίνεται η αδυναμία της συγκεκριμένης μεθοδολογίας στην ανίχνευση πολύ μικρού αριθμού καρκινικών κυττάρων και οπότε αδυναμία της να ανιχνεύσει 5 CTC στα 7.5ml ολικό αίμα, το οποίο θεωρείτε ως τιμή cut-off για την πρόγνωση των ασθενών.

Σε όγκο 7.5ml ολικού αίματος ο αριθμός των κυττάρων αίματος (ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα) είναι πολύ περισσότερος σε σχέση με τον αριθμό κυττάρων αίματος που υπήρχε στα πειράματα με 50μl αίμα. Για τον λόγο αυτό σε επόμενο

στάδιο δοκιμάζονται μεθοδολογίες οι οποίες είναι ικανές να απομακρύνουν το μεγαλύτερο μέρος των κυττάρων του αίματος και να εμπλουτίσουν με αυτό τον τρόπο τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα.

## **Πείραμα 5**

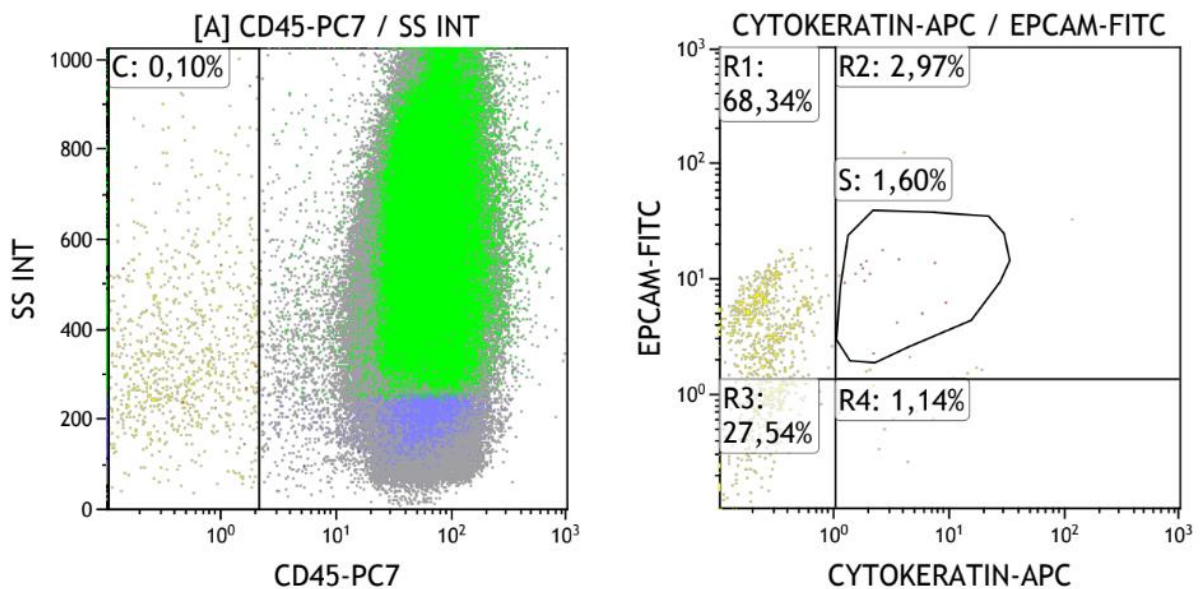
### **Εφαρμογή πρωτοκόλλου bulk lysis**

Ως πρώτη δοκιμή εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο bulk lysis. Το πρωτόκολλο bulk lysis εφαρμόζεται στο Εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής του Γ.Ν.Α. «Ευαγγελισμός» για την ανίχνευση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου MRD (Minimal residual disease or Measurable residual disease) σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα ή αμυλοείδωση. Μέσω της κυτταρομετρίας ροής ανιχνεύονται τα κακοήγη πλασματοκύτταρα, τα οποία ακόμα και μετά τη θεραπεία μπορεί να παραμείνουν στο μυελό των οστών και σε βάθος χρόνου ίσως αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται, οδηγώντας σε υποτροπή της νόσου. Τα πλασματοκύτταρα βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στην κυκλοφορία. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκε ως πρωτόκολλο ανίχνευσης CTCs και εφαρμόστηκε σε ολικό αίμα 7.5ml στο οποίο είχαν προστεθεί 8, 70 και 700 κύτταρα αντίστοιχα. Για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου χρειάστηκαν 25ml ολικό αίμα το οποίο χωρίστηκε σε τρία σωληνάρια (7,5ml ολικό αίμα το κάθε ένα). Στο κάθε σωληνάριο έγινε ο εμβολιασμός των 8, 70, 700 κυττάρων αντίστοιχα.

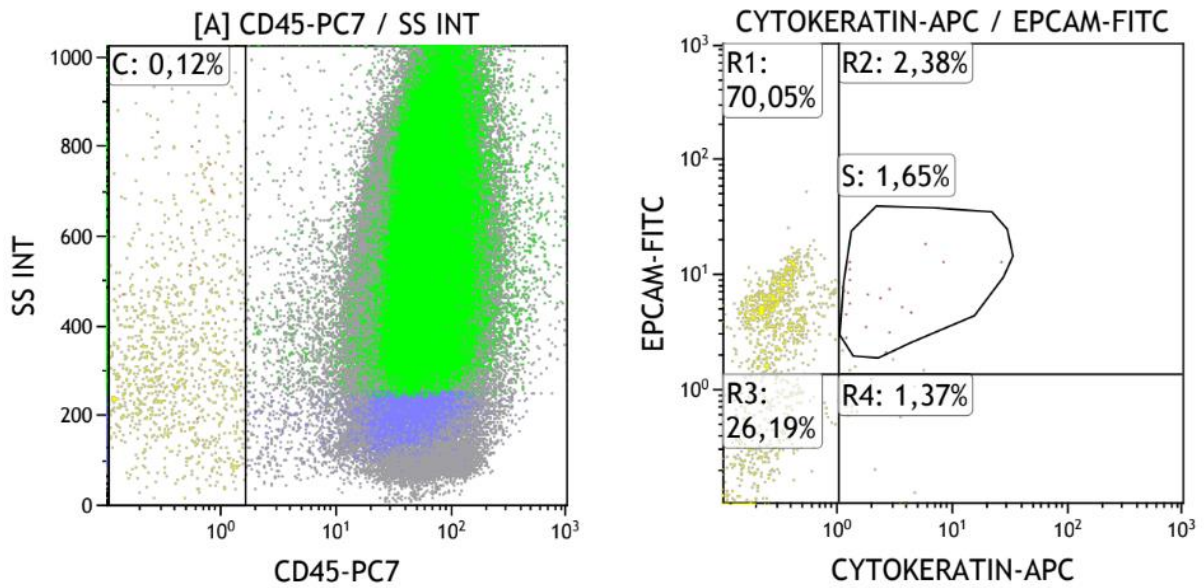
Στη συνέχεια το κάθε δείγμα χωρίστηκε σε τέσσερα falcon των 50ml που το καθένα περιείχε 2ml δείγματος. Στο κάθε falcon προστέθηκαν 48 ml αραιωμένο BulkLysis (1:10). Ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 10 min στα 800xg. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης έγινε απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (washing buffer). Ακολουθεί φυγοκέντρηση 5 min στα 800xg και έπειτα απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 2ml διαλύματος πλύσης. Πραγματοποιείται ανασύσταση του ιζήματος με το διάλυμα πλύσης και μεταφορά του σε καθαρό σωληνάριο κυτταρομετρίας ροής των 5ml. Τέλος γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στα 540xg, απόρριψη του υπερκείμενου και ανασύσταση το ιζήματος με 100μl PBS.

Στη συνέχεια, ακολουθείτε το πρωτόκολλο προσθήκης μονοκλωνικών Αντισωμάτων. Αρχικά γίνεται η προσθήκη των αντισωμάτων επιφανείας που είναι το EPCAM, CD45 και η χρωστική 7AAD. Ακολουθεί επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται 100μl PBS-BSA και προσθήκη 100μl διαλύματος A, έπειτα το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 2ml PBS-BSA και φυγοκέντρηση για 5 min στα 400xg, το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 100μl PBS-BSA και 100μl διαλύματος B, πραγματοποιείται ανάδευση και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη κυτταροπλασματικών αντισωμάτων CK 7/8/14/15/16/18/19 και το δείγμα επωάζεται για 15 min. Προστίθενται 2ml PBS-BSA και γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στα 400xg. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 500μl PBS-BSA. Τέλος το δείγμα αναδεύεται και μετρίεται στο κυτταρόμετρο Navios της Beckman Coulter.

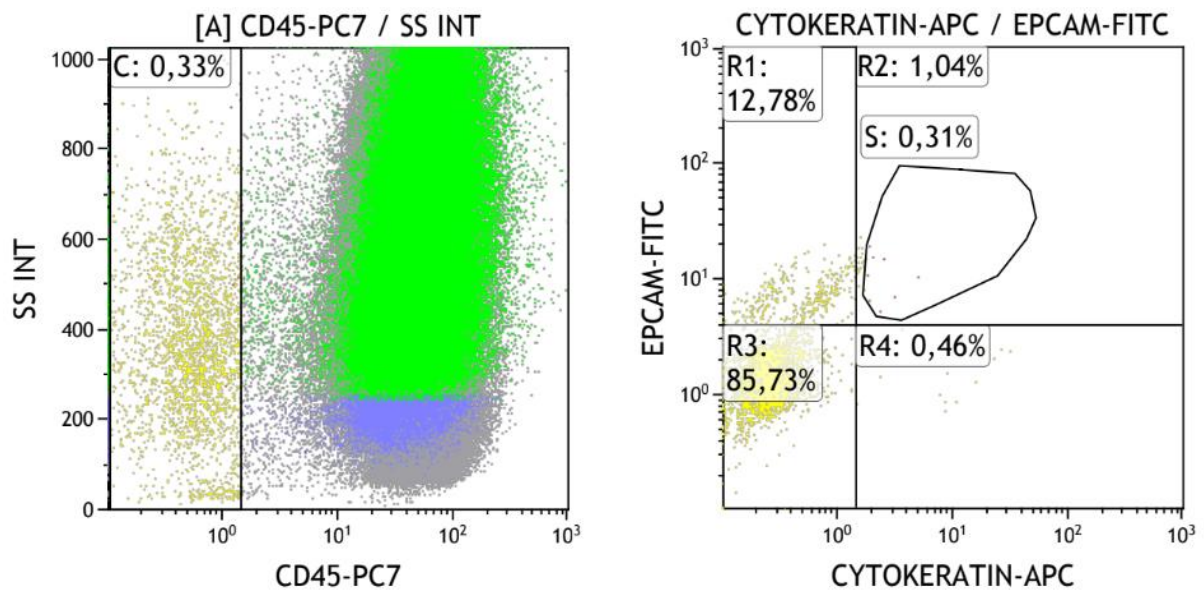
Τα αποτελέσματα από τα πειράματα προσθήκης 700, 70 και 8 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.10, 3.11, 3.12.



Εικόνα 3.10: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της προσθήκης 700 καρκινικών κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου bulk lysis. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EPCAM και CK.



Εικόνα 3.11: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της προσθήκης 70 καρκινικών κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου *bulk lysis*. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK.



Εικόνα 3.12: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της προσθήκης 8 καρκινικών κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου *bulk lysis*. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK.

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής του πρωτοκόλλου *bulk lysis* για την ανίχνευση μικρού αριθμού καρκινικών κυττάρων σε μεγάλο όγκο αίματος (7,5ml) δεν

φαίνονται να είναι ενθαρρυντικά. Όπως φαίνεται από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά στον αριθμό των καρκινικών κυττάρων που ανιχνεύονται στις αραιώσεις 8, 70 και 700 καρκινικών κυττάρων.

## **Πείραμα 6**

### **Εμπλουτισμός καρκινικών κυττάρων με τη χρήση της φικόλης**

Παρατηρώντας τα μειονεκτήματα του πρωτοκόλλου bulklysis και την αποτυχία του να απομονώσει τα καρκινικά κύτταρα, έγινε δοκιμή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με τη χρήση της φικόλης, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των κυττάρων βάση της πυκνότητάς τους. Με τη χρήση της φικόλης, γίνεται ο διαχωρισμός των κυττάρων χαμηλής πυκνότητας, όπως μονοκύτταρων και λεμφοκυττάρων από τα κύτταρα υψηλής πυκνότητας, όπως τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα τα οποία μεταφέρονται στην κάτω στιβάδα. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, λόγω της πυκνότητάς τους απομονώνονται στη στιβάδα των μονοκυττάρων.

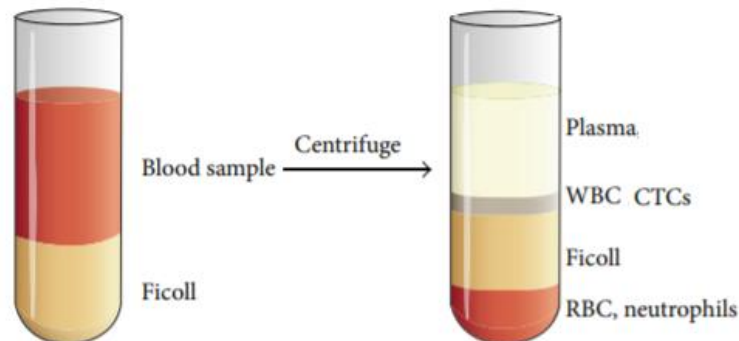
Για τον σχεδιασμό του πειράματος χρειάστηκαν 7ml ολικού αίματος, το οποίο είχε συλλεχθεί σε σωληνάρια γενικής αίματος με αντιπηκτικό EDTA, για να αποφευχθεί η πήξη του δείγματος και να είναι εφικτή η μελέτη των έμμορφων συστατικών του αίματος. Το ολικό αίμα χωρίστηκε σε 2 σωληνάρια από 3,5ml το καθένα.

Στη συνέχεια, στο ένα σωληνάριο προστέθηκαν 35 κύτταρα από την καρκινική σειρά MCF-7. Τα δείγματα και των δύο σωληναρίων αραιώθηκαν με ίσο όγκο αλατούχου διαλύματος.

Σε καθαρό σωληνάριο falcon των 15ml προστέθηκαν 3ml φικόλης και 4ml από το αραιωμένο ολικό αίμα, προσεκτικά χωρίς να γίνει ανάμειξη του αίματος με τη φικόλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 800xg για 30 min στους 18-20 βαθμούς.

Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται 3 στιβάδες. Η κάτω στιβάδα περιέχει ερυθροκύτταρα, τα οποία έχουν τη μεγαλύτερη πυκνότητα, πάνω από τα ερυθροκύτταρα σχηματίζεται η στιβάδα της φικόλης. Ακολουθεί η στιβάδα με τα μονοπύρηνα (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα) τα οποία έχουν χαμηλότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τελευταία (πάνω) στιβάδα είναι το πλάσμα

(Εικόνα 3.13). Τα CTCs λόγω της πυκνότητάς τους συγκεντρώνονται στη στιβάδα των μονοκυττάρων.



Εικόνα 3.13: Οι στιβάδες που σχηματίζονται αφού γίνει φυγοκέντρηση του δείγματος στο οποίο είχε προστεθεί η φικόλη (75).

Για την απομόνωση της στιβάδας των μονοκυττάρων και κατ' επέκταση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, αφαιρείται η πάνω στιβάδα που περιέχει το πλάσμα και μεταφέρεται η στιβάδα των μονοκυττάρων σε καθαρό σωληνάριο κυτταρομετρίας.

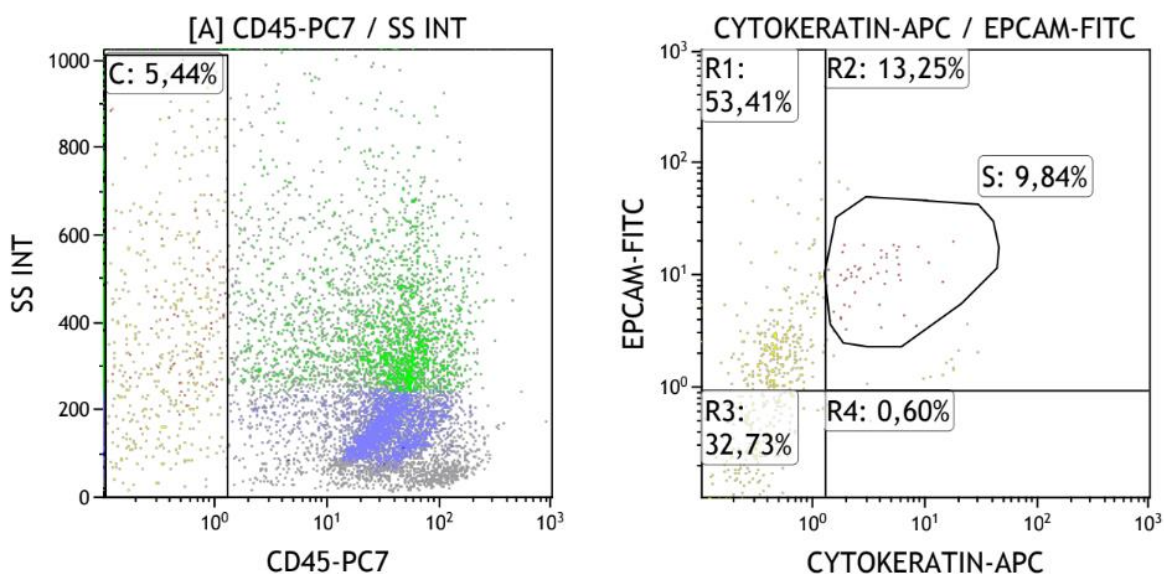
Στη συνέχεια, ακολουθεί ξέπλυμα των κυττάρων με τριπλάσιο όγκο αλατούχου διαλύματος, ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 400xg για 15 min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθείται το πρωτόκολλο προσθήκης μονοκλωνικών αντισωμάτων. Παράλληλα με το δείγμα στο οποίο προστέθηκαν τα καρκινικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν και 3.5ml ολικό αίμα χωρίς την προσθήκη καρκινικών κυττάρων. Τα στάδια του εμπλουτισμού με φικόλη, καθώς και της προσθήκης μονοκλωνικών αντισωμάτων ήταν κοινά και για τα δύο δείγματα.

Το πρωτόκολλο για την προσθήκη των μονοκλωνικών Αντισωμάτων στο δείγμα αίματος που περιέχει αραιωμένα κύτταρα από την καρκινική σειρά MCF-7, αρχίζει με την προσθήκη των αντισωμάτων επιφανείας EpCAM, CD45 και της χρωστικής 7AAD, γίνεται ανάδευση και επώαση για 10 min. Στη συνέχεια προστίθενται 100μl IntraPrep Reagent 1 για μονιμοποίηση των επιτόπων και επώαση για 15 min. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 2ml PBS και γίνεται φυγοκέντρηση για 5



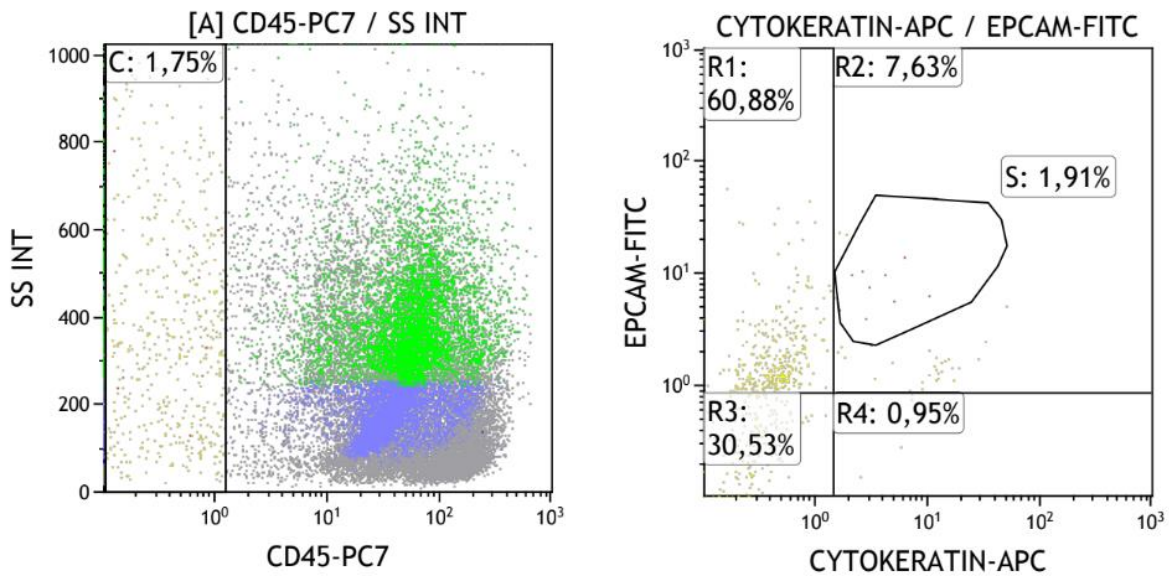
min στα 300xg. Ακολουθεί η απομάκρυνση υπερκείμενου και η προσθήκη 100μl IntraPrep Reagent 2, για λύση των ερυθρών και διάνοιξη της μεμβράνης των κυττάρων. Για την δράση του διαλύματος αυτού απαιτούνται 5 min επώασης. Αφού περάσει ο χρόνος επώασης, προστίθενται τα κυτταροπλασματικά αντισώματα CK 7/8/14/15/16/19 και το δείγμα επωάζεται για 15 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 2ml PBS και γίνεται φυγοκέντρηση στα 300xg για 5 min. Έπειτα, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500μl PFA, γίνεται ανάδευση του δείγματος και μέτρηση των κυττάρων στο κυτταρόμετρο Navios EX.

Τα αποτελέσματα προσθήκης 35 καρκινικών κυττάρων σε 3.5ml ολικό αίμα καθώς και του δείγματος στο οποίο δεν έχουν προστεθεί καρκινικά κύτταρα παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.14, 3.15.



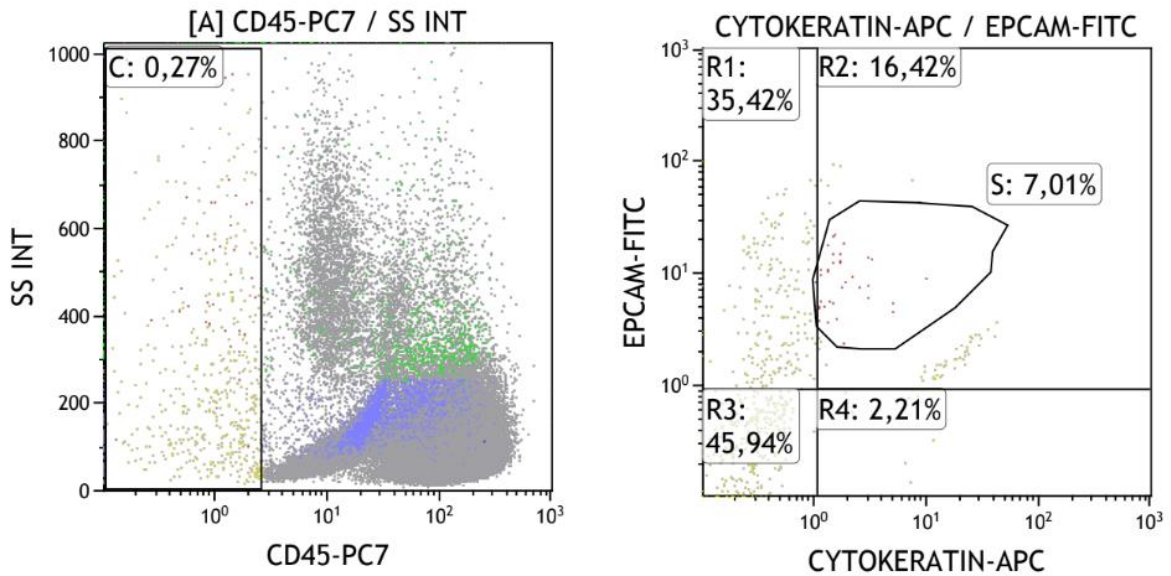
Εικόνα 3.14: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της προσθήκης 35 καρκινικών κυττάρων σε 3,5ml ολικό αίμα με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της φικόλης. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση Epcam και CK.



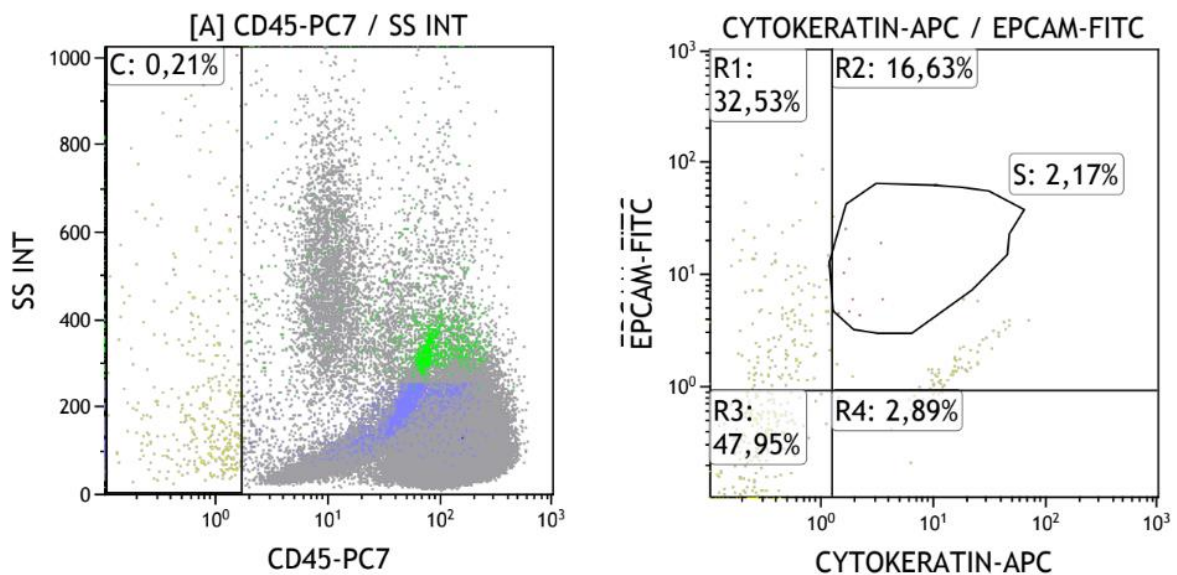


Εικόνα 3.15: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων χωρίς την προσθήκη καρκινικών κυττάρων σε ολικό αίμα με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου *bulk lysis*. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής του πρωτοκόλλου της φικόλης για την ανίχνευση μικρού αριθμού κυττάρων σε 3,5ml ολικό αίμα φαίνονται ενθαρρυντικά. Ο αριθμός των συμβάντων που καταγράφηκαν με την προσθήκη 35 καρκινικών κυττάρων σε 3,5ml ολικό αίμα και που είναι CD45 αρνητικά και EpcAM+/CK+ είναι 49, ενώ ο αριθμός των συμβάντων μειώνεται στα 5 στο δείγμα στο οποίο δεν έγινε προσθήκη καρκινικών κυττάρων. Ο μεγαλύτερος αριθμός των EpcAM+/CK+ συμβάντων σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων που προστέθηκαν μπορεί να οφείλεται σε μη ειδικές συνδέσεις των μονοκλωνικών αντισωμάτων σε κατεστραμμένα κύτταρα. Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε, έτσι ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα στην ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.16, 3.17.



Εικόνα 3.16: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της προσθήκης 35 καρκινικών κυττάρων σε 3,5ml ολικό αίμα με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της φικόλης. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK.



Εικόνα 3.17: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων χωρίς την προσθήκη καρκινικών κυττάρων σε ολικό αίμα με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου bulk lysis.. Αριστερά φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και δεξιά το ποσοστό των κυττάρων που είναι αρνητικά στην έκφραση του CD45 και θετικά στην έκφραση EpcAM και CK.

Ο αριθμός των συμβάντων που καταγράφηκαν με την προσθήκη 35 κυττάρων σε 3,5ml ολικό αίμα και είναι CD45 αρνητικά και EpCAM+/CK+ είναι 39, ενώ ο αριθμός των συμβάντων μειώνεται σε 9 στο δείγμα στο οποίο δεν έγινε προσθήκη καρκινικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού παραμένουν ενθαρρυντικά και συμφωνούν με τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος.

## **Πείραμα 7**

Στη συνέχεια γίνεται προσαρμογή του πρωτοκόλλου της φικόλης σε μεγαλύτερο όγκο αίματος έτσι ώστε να γίνει δοκιμή ανίχνευσης λιγότερων από 5 CTCs ανά 7,5ml αίματος, το οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι το όριο που έχει σημασία για την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Σε πρώτο στάδιο γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων με τη χρήση της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και της χρωστικής trypan blue. Στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε ο αριθμός των κυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής όπως περιγράφεται στο Πείραμα 1.

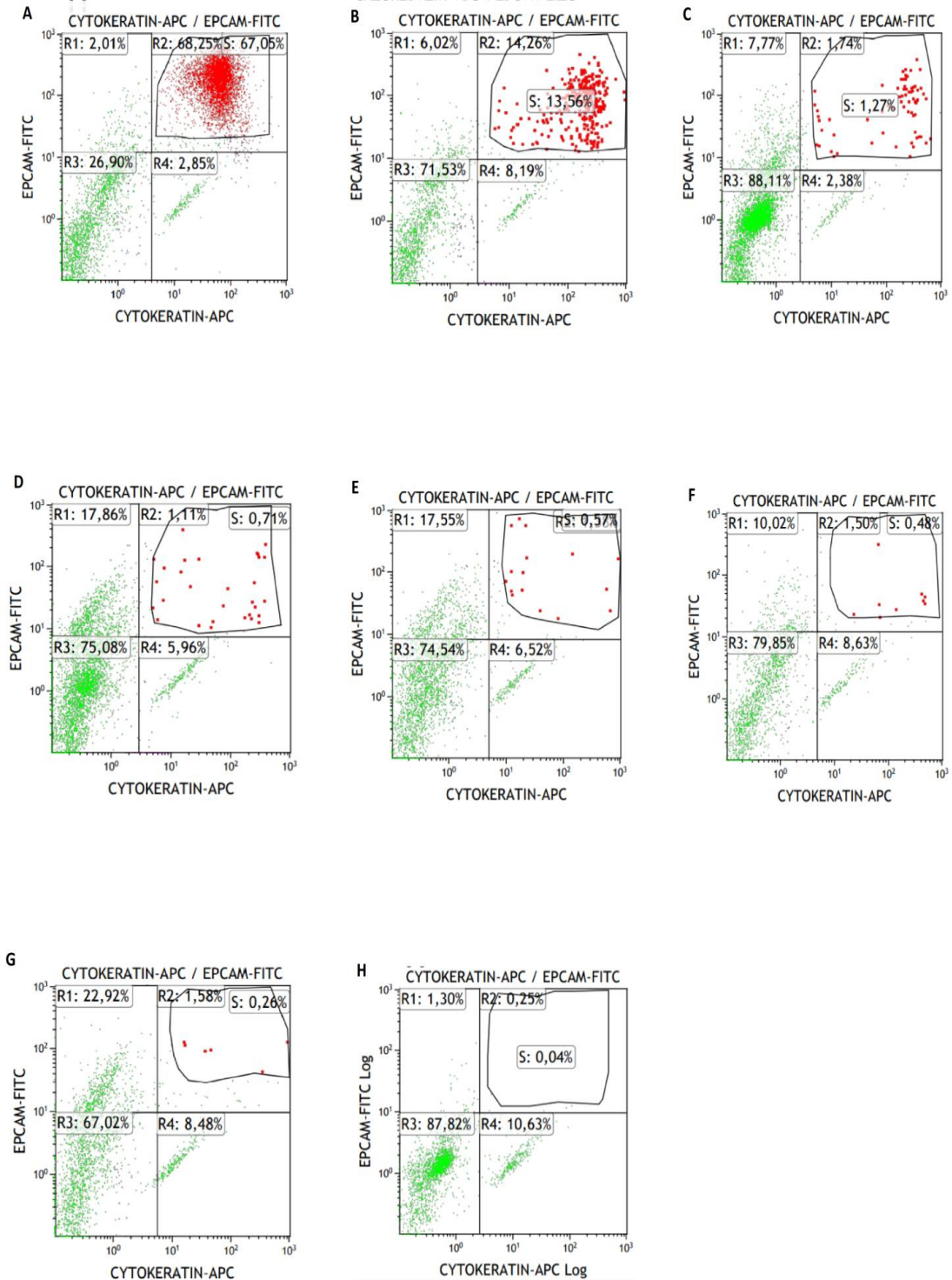
Στο ακόλουθο πείραμα έγιναν διαδοχικές αραιώσεις 5, 10, 100 και 1000, 5000, 10.000 και 150.000 κυττάρων της καρκινικής σειράς σε 7,5ml αίμα. Επίσης την ίδια διαδικασία ακολούθησε και δείγμα αίματος στο οποίο δεν προστέθηκαν καρκινικά κύτταρα (δείγμα control). Το κάθε δείγμα (7,5 ml) αραιώνεται σε 7,5ml PBS σε falcon των 50 ml. Σε καινούργιο σωληνάριο falcon (50 ml) προστίθενται 15ml φικόλης και 15 ml αιρωμένου δείγματος, προσεκτικά χωρίς να γίνει ανάμειξη του δείγματος με τη φικόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 800g για 30 min στους 18-20 βαθμούς. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης σχηματίζονται 3 στιβάδες.

Απομονώνεται σε καθαρό σωληνάριο κυτταρομετρίας η στιβάδα των μονοκυττάρων και κατ' επέκταση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, αφαιρώντας την πάνω στιβάδα που περιέχει το πλάσμα.

Στη συνέχεια ακολουθεί ξέπλυμα των κυττάρων με τριπλάσιο όγκο αλατούχου διαλύματος, ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 400xg για 15 min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθείται το πρωτόκολλο προσθήκης μονοκλωνικών αντισωμάτων όπως περιεγράφηκε στο Πείραμα 5. Παράλληλα με τα δείγματα στα

οποία προστέθηκαν τα καρκινικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν και 7,5ml ολικού αίματος χωρίς την προσθήκη καρκινικών κυττάρων. Τα στάδια του εμπλουτισμού με τη φικόλη καθώς και της προσθήκης μονοκλωνικών αντισωμάτων ήταν κοινά για όλα τα δείγματα.

Τα αποτελέσματα προσθήκης 5, 10, 100, 1000, 5000, 10.000 και 150.000 καρκινικών κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα καθώς και του δείγματος στο οποίο δεν έχουν προστεθεί καρκινικά κύτταρα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.18.



Εικόνα 3.18: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων προσθήκης A:150.000 κυττάρων, B:10.000 κυττάρων, C: 5.000 κυττάρων, D: 1.000 κυττάρων, E:100 κυττάρων, F:10 κυττάρων, G:5 κυττάρων και H: 0 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3) παρουσιάζονται τα συμβάντα (events) που παρατηρήθηκαν με την προσθήκη 150.000, 10.000, 5.000, 1000, 100, 10, 5 και 0 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα

Πίνακας 3.3: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων προσθήκης 150.000, 10.000, 5.000, 1000, 100, 10, 5 και 0 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα και αντιστοιχία των συμβάντων

Αριθμός κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα	CK+ EpCAM+
150.000 κύτταρα	5277
10.000 κύτταρα	293
5000 κύτταρα	73
1000 κύτταρα	36
100 κύτταρα	16
10 κύτταρα	9
5 κύτταρα	6
0 κύτταρα	0

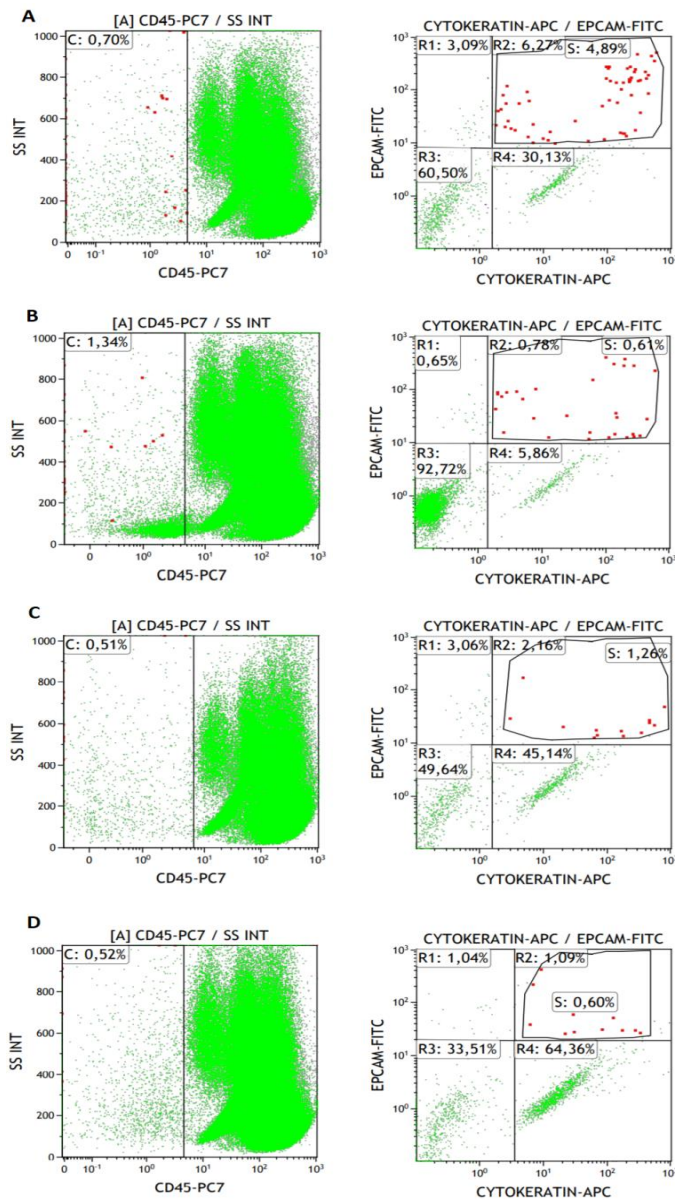
Με την προσθήκη 150.000, 10.000, 5.000, 1000, 100, 10, 5 και 0 κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7.5ml ολικό αίμα, την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με φικόλη και καταμέτρηση στο κυτταρόμετρο NAVIOS EX της Beckman Coulter καταγράφηκαν 5277, 293, 73, 36, 16, 9, 6, 0 συμβάντα αντίστοιχα. Ο αριθμός των συμβάντων μειώνεται όσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που προστέθηκαν.

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου εμπλουτισμού με χρήση της φικόλης έγινε επανάληψη του πειράματος 7, με εμβολιασμό 1000, 100, 10 και 0 καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7,5ml ολικό αίμα (Πείραμα 8). Τέλος εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο εμπλουτισμού με τη χρήση του διαλύματος RCL για τη λύση των ερυθροκυττάρων και συγκρίθηκε με το πρωτόκολλο εμπλουτισμού με χρήση της φικόλης (Πείραμα 9).



## Πείραμα 8

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου εμπλουτισμού με τη χρήση της φικόλης πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 1000, 100 και 10 καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7,5ml ολικό αίμα αντίστοιχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 7,5ml ολικού αίματος ως αρνητικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.19



Εικόνα 3.19: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων εμβολιασμού A: 1000, B:100, C:10 και D:0 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα και μέθοδο εμπλουτισμού με τη χρήση της φικόλης

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.4) παρουσιάζεται ο αριθμός των συμβάντων (events) που παρατηρήθηκαν με την προσθήκη 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα

Πίνακας 3.4: Αριθμός συμβάντων στις αραιώσεις 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα

Αριθμός κυττάρων που εμβολιάστηκαν	Αριθμός CK+ /ErCAM+ συμβάντων
1000	60
100	30
10	14
0	11

Με την προσθήκη 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7.5ml ολικό αίμα, την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με φικόλη και καταμέτρηση στο κυτταρόμετρο NAVIOS EX της Beckman Coulter καταγράφηκαν 60, 30, 14 και 11 συμβάντα αντίστοιχα. Η παρουσία των 11 διπλών θετικών συμβάντων CK+ /ErCAM+ υποδηλώνει ότι η ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων είναι μη-ειδική.

Παράλληλα με το Πείραμα 7 και Πείραμα 8 έγινε ο εμβολιασμός 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7.5ml ολικό αίμα για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με τη χρήση του διαλύματος RCL και την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Επίσης αντίστοιχα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με διάλυμα RCL και μαγνητικά σφαιρίδια και μέθοδο ανίχνευσης την RT-PCR, για έλεγχο των μεταγράφων B2M και CK19. Αντίστοιχο πείραμα έγινε και απουσία



μαγνητικών σφαιριδίων έτσι ώστε να γίνει σύγκριση της ανάκτησης των καρκινικών κυττάρων μεταξύ κυτταρομετρίας ροής και μοριακών μεθόδων.

### **Πείραμα 9**

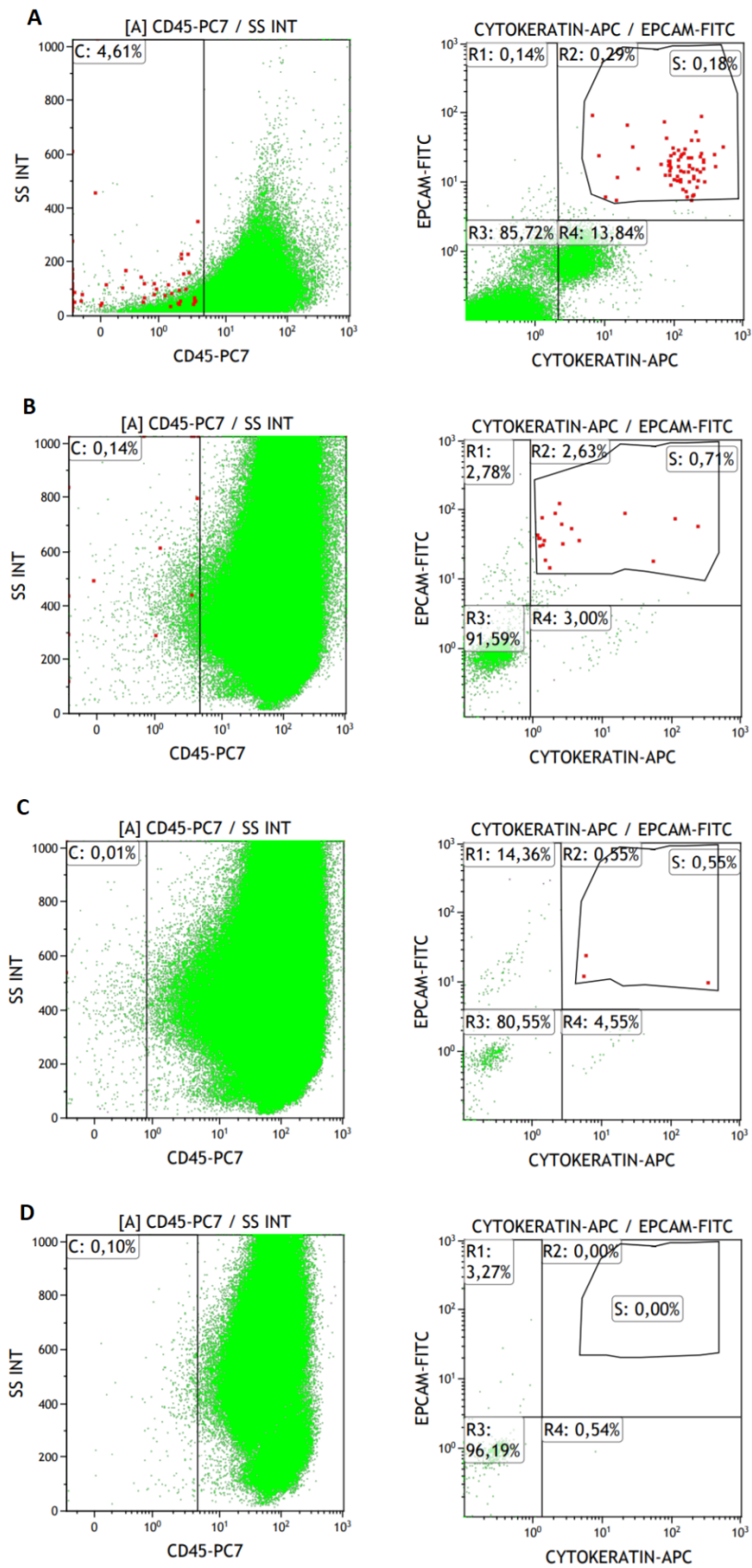
Στο πείραμα που ακολουθεί πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7.5ml ολικό αίμα, για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με τη χρήση του διαλύματος RCL και την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Το διάλυμα RCL έχει την ιδιότητα να καταστρέφει τα ερυθροκύτταρα, με αποτέλεσμα να εμπλουτίζονται τα λευκοκύτταρα και κατ' επέκταση και τα καρκινικά κύτταρα.

Η διαδικασία αρχίζει με την προσθήκη 40ml διαλύματος RCL σε 7.5ml ολικό αίμα στο οποίο είχε προηγηθεί ο εμβολιασμός των καρκινικών κυττάρων. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση τους στα 530g για 20 min. Στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η διαδικασία με προσθήκη 30ml και 10ml διαλύματος RCL με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 530g για 10 min αντίστοιχα.

Αφού απομακρυνθούν τα ερυθροκύτταρα ακολουθείται το πρωτόκολλο προσθήκης μονοκλωνικών αντισωμάτων επισημασμένων με φθορίζουσες ουσίες όπως περιγράφεται στο Πείραμα 2.

Τα αποτελέσματα του πειράματος προσθήκης 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7.5ml ολικό αίμα για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με τη χρήση του διαλύματος RCL και την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.20.



Εικόνα 3.20: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων εμβολιασμού A: 1000, B: 100, C: 10 και D: 0 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα και μέθοδο εμπλουτισμού με τη χρήση του διαλύματος RCL

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.5) παρουσιάζεται ο αριθμός των συμβάντων (events) που παρατηρήθηκαν με την προσθήκη 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα

*Πίνακας 3.5: Αριθμός συμβάντων στις αραιώσεις 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα με τη χρήση διαλύματος RCL*

Αριθμός κυττάρων που εμβολιάστηκαν	Αριθμός CK+ /ErCAM+ συμβάντων
1000	69
100	19
10	3
0	0

Τα αποτελέσματα προσθήκης 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7.5ml ολικό αίμα και την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με τη χρήση του διαλύματος RCL και καταμέτρηση στο κυτταρόμετρο NAVIOS EX της Beckman Coulter καταγράφηκαν 69, 19, 3 και 0 συμβάντα αντίστοιχα. Ο αριθμός των συμβάντων μειώνεται όσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που προστέθηκαν.

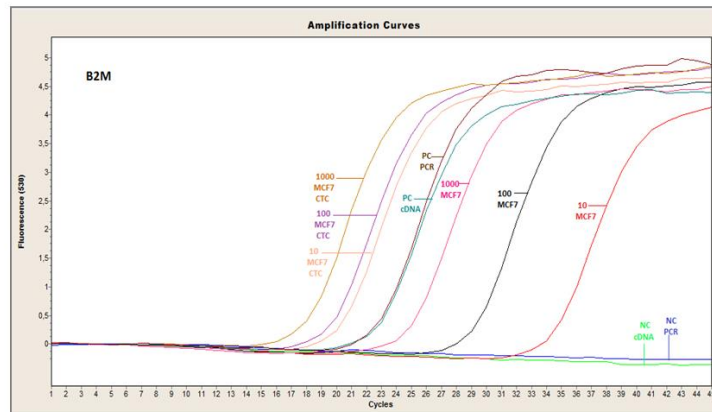
### **Πείραμα 10**

Για τον υλοποίηση του πειράματος εμβολιάστηκαν 1000, 100 και 10 κύτταρα της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7.5ml ολικό αίμα, για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με τη χρήση του διαλύματος RCL και μαγνητικών σφαιριδίων (Dynabeads Epithelial Enrich). Τα σφαιρίδια αυτά είναι ομοιόμορφα, παραμαγνητικά σφαιρίδια από πολυστυρένιο καλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για δύο γλυκοπεπτιδικά μεμβρανικά αντιγόνα του επιθηλιακού δείκτη ErCAM. Η μέθοδος ανίχνευσης των καρκινικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε είναι η RT-qPCR, για τον έλεγχο των μεταγράφων *B2M* και *CK19* (Εικόνα 3.21). Επίσης αντίστοιχα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν απουσία μαγνητικών σφαιριδίων (Εικόνα 3.22).

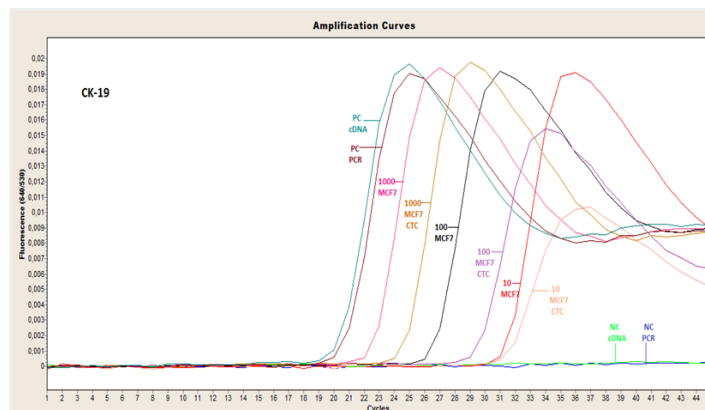
Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών από τη Δρ.Μαρθα Ζαβρίδου (Ερευνητική Ομάδα Καθ. Ε.Λιανίδου).

Το γονίδιο *B2M* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β2-μικροσφαιρίνη η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια όλων των κυττάρων και έχει σταθερή έκφραση. Το γονίδιο αυτό χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου. Το γονίδιο *CK-19* αποτελεί δείκτη επιθηλιακών κυττάρων, και κατ' επέκταση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (76).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.21, 3.22

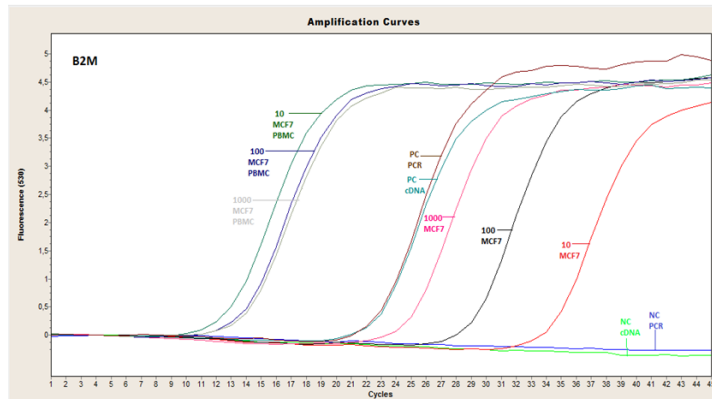


<i>B2M</i>	-	MCF7 spiked in 7.5mL PB
	Cq	Cq
10 cells MCF7	32.90	18.78
100 cells MCF7	27.68	18.17
1000 cells MCF7	23.53	16.58

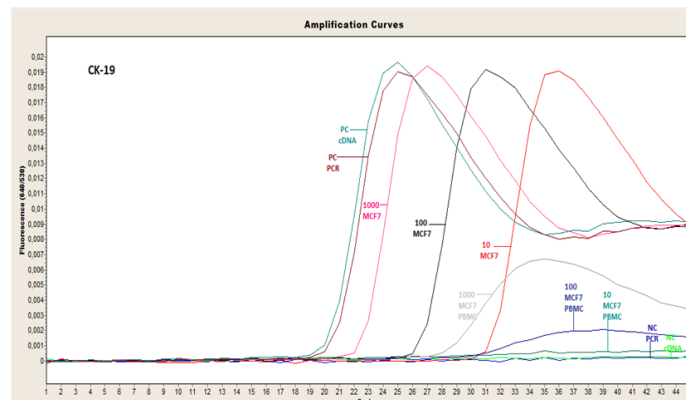


<i>CK-19</i>	-	MCF7 spiked in 7.5mL PB
	Cq	Cq
10 cells MCF7	29.22	29.48
100 cells MCF7	24.55	27.48
1000 cells MCF7	20.47	22.55

Εικόνα 3.21: Παρουσίαση αποτελεσμάτων έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *B2M* και του γονιδίου στόχου *CK-19* με τη χρήση διαλύματος RCL, μαγνητικών σφαιριδίων και μέθοδο ανίχνευσης τη RT-qPCR



	-	MCF7 spiked in 7.5mL PB
<b>B2M</b>	<b>Cq</b>	<b>Cq</b>
10 cells MCF7	32.90	11.47
100 cells MCF7	27.68	12.51
1000 cells MCF7	23.53	12.69



	-	MCF7 spiked in 7.5mL PB
<b>CK-19</b>	<b>Cq</b>	<b>Cq</b>
10 cells MCF7	29.22	-
100 cells MCF7	24.55	28.79
1000 cells MCF7	20.47	26.82

Εικόνα 3.22 Παρουσίαση αποτελεσμάτων έκφρασης του γονιδίου αναφοράς B2M και του γονιδίου στόχου CK-19 με τη χρήση διαλύματος RCL και μέθοδο ανίχνευσης τη RT-qPCR

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανίχνευσης των CTCs σε 10 δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, από την ογκολογική κλινική του Γ.Ν.Α «Ο Ευαγγελισμός». Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες 10 δείγματα από υγιείς εθελοντές του Γ.Ν.Α «Ο Ευαγγελισμός».

Για τον εμπλουτισμό των κυτάρων χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα RCL, για την απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων όπως περιγράφεται στο Πείραμα 9 και ως μέθοδος ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρίας ροής.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που προστέθηκαν στα δείγματα ασθενών είναι το EpCAM- FITC, Vimentin-PE, CD45-PerC7, CD44-Pacific Blue, CD24 -A750 και τα CK 7/8/14/15/16/19-APC. Το πρωτόκολλο προσθήκης μονοκλωνικών αντισωμάτων περιεγράφηκε στο Πείραμα 5.

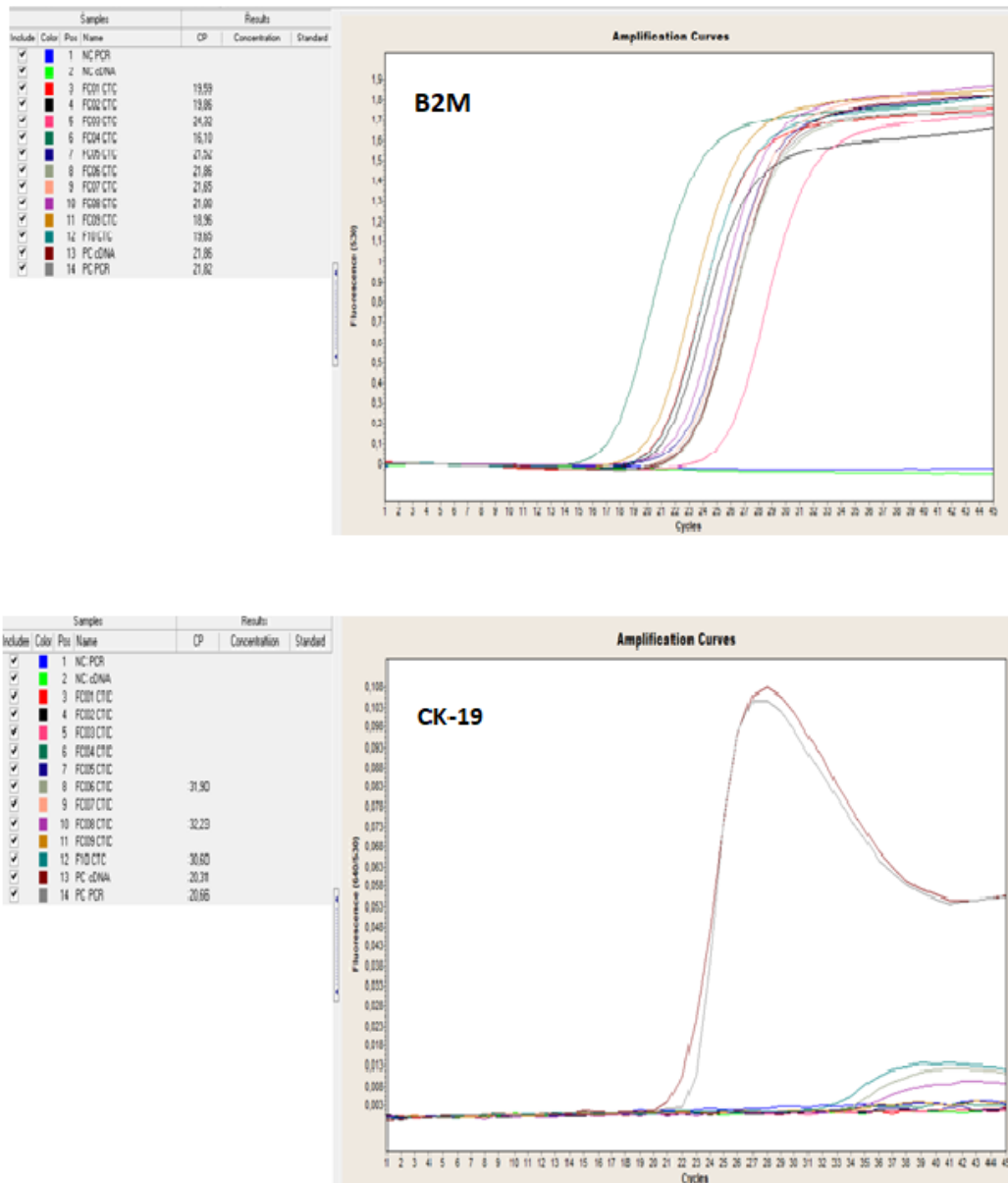
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων από 10 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και από 10 υγιείς εθελοντές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6

Πίνακας 3.6 Αποτελέσματα ανάλυσης 10 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και 10 υγιών εθελοντών

Patient's Name	Number of cells	EpCAM+/CK+ EVENTS	CD44+/CD24- EVENTS	EpCAM+ EVENTS	EPKAM+/CD44+ EVENTS	EPKAM+/CD44+CD24- EVENTS	CK-/CD44+CD24- EVENTS	Comments
SAMPLE 1	10,548,560	7	3	8	8	0	3	Γενικευμένο μεταστατικό/ οστικές, ηπατικές
SAMPLE 2	7,711,266	4	1	10	2	0	1	Γενικευμένο μεταστατικό/ πολλαπλές οστικές
SAMPLE 3	9,835,492	4	4	39	38	4	4	Γενικευμένο μεταστατικό/ οστικές, ηπατικές
SAMPLE 4	10,378,821	4	12	67	57	9	12	Γενικευμένο μεταστατικό/ οστικές
SAMPLE 5	5,476,417	1	0	1	0	0	0	Λεμφαδενικές μεταστάσεις/ πρώιμο στάδιο
SAMPLE 6	6,781,387	10	67	39	34	0	67	Γενικευμένο μεταστατικό/ δερματικές και φλεγμονώδης
SAMPLE 7	1,295,731	13	53	64	37	15	53	Γενικευμένο μεταστατικό/ οστικές
SAMPLE 8	6,411,128	11	23	219	155	4	23	Γενικευμένο μεταστατικό/ οστικές
SAMPLE 9	8,557,906	2	0	58	29	0	0	Γενικευμένο μεταστατικό/ οστικές, ηπατικές
SAMPLE 10	9,533,245	12	21	54	43	2	21	Γενικευμένο μεταστατικό/ηπατικές

Patient's Name	Number of cells	EpCAM+/CK+ EVENTS	CD44+/CD24- EVENTS	EpCAM+ EVENTS	EPKAM+/CD44+ EVENTS	EPKAM+/CD44+CD24- EVENTS	CK-/CD44+CD24- EVENTS	Comments
CONTROL 1	4.656.129	0	0	0	0	0	0	
CONTROL 2	5.715.373	1	0	1	0	0	0	
CONTROL 3	10.086.579	0	0	0	0	0	0	
CONTROL 4	8.898.162	0	0	0	0	0	0	
CONTROL 5	3.081.105	0	0	0	0	0	0	
CONTROL 6	9.267.840	1	0	8	5	0	0	
CONTROL 7	9.300.043	1	1	14	6	0	1	
CONTROL 8	8.350.820	2	0	21	17	0	0	
CONTROL 9	9.315.692	1	0	4	3	0	0	
CONTROL 10	8.398.358	2	2	22	9	1	2	

Παράλληλα τα ίδια δείγματα αναλύθηκαν και στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, από τη Δρ. Μ. Ζαβρίδου, με τη χρήση του διαλύματος RCL και μαγνητικών σφαιριδίων και με μέθοδο ανίχνευσης την RT-qPCR. Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.23



Εικόνα 3.23 Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων 10 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, με μέθοδο ανίχνευσης την RT-qPCR

#### 4. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ανάπτυξη μη επεμβατικών μεθόδων ανίχνευσης καρκινικών κυττάρων αποτελούν πλέον στόχο πολλών ερευνητικών ομάδων σε παγκόσμιο επίπεδο. Η ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης, για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου, την ανάπτυξη καινούργιων θεραπευτικών πρωτοκόλλων και τον έλεγχο καταλληλότητας της θεραπείας. Εκτιμάται ότι στην κυκλοφορία του αίματος ασθενών με καρκίνο υπάρχει 1 CTC ανά  $10^6/10^7$  μονοπύρνα κύτταρα. Η σπανιότητα των κυττάρων αυτών αλλά και ο περιορισμένος χρόνος ημιζωής τους καθιστούν την ταυτοποίηση των CTCs πολύ δύσκολη.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα της κυτταρικής σειράς MCF-7 τα οποία μετρήθηκαν με την ειδική πλάκα Neubauer και με το κυτταρόμετρο NAVIOS EX.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν πρωτόκολλα σύνδεσης των κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα επιφανείας αλλά και με κυτταροπλασματικά αντισώματα (Πείραμα 2). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού δείχνουν ότι το 95% των κυττάρων είναι CD45-. Επιλέγοντας αυτά τα κύτταρα το 95% τους είναι EpCAM+/CK+. Από τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού θεωρήσαμε κατάλληλα τα κύτταρα για τη συνέχεια των πειραμάτων, αφού φαινοτυπικά εκφράζουν τους δείκτες που αναγράφονται στη βιβλιογραφία για τα καρκινικά κύτταρα.

Για τον έλεγχο καταλληλότητας της κυτταρομετρίας ως μέθοδος ανίχνευσης μικρών ποσοτήτων καρκινικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων της καρκινικής σειράς MCF-7 στα 1000, 100 και 10 κύτταρα αντίστοιχα, χωρίς αυτά να εμβολιαστούν σε ολικό αίμα (Πείραμα 3). Από τα αποτελέσματα του πειράματος παρατηρείται ότι ο αριθμός των EpCAM+/CK+ συμβάντων αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων που αναλύθηκαν. Επίσης από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η κυτταρομετρία ροής έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει πολύ μικρό αριθμό κυττάρων, δεδομένου του αριθμού των συμβάντων (5 συμβάντα) που καταγράφηκαν κατά την ανάλυση των 10 καρκινικών κυττάρων.



Σε επόμενο πείραμα έγιναν διαδοχικές αραιώσεις των καρκινικών κυττάρων σε 10.000, 1000, 100 σε 50μl ολικό αίμα, έτσι ώστε να εκτιμηθεί το κατώτερο όριο ανίχνευσης των κυττάρων αυτών στον κυτταρομετρητή NAVIOS EX, παρουσία ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων (Πείραμα 4). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων συμπεραίνεται ότι η κυτταρομετρία ροής μπορεί να ανιχνεύσει τα 100 καρκινικά κύτταρα σε 50μl ολικού αίματος. Δεδομένου των πιο πάνω αποτελεσμάτων, έγινε μεγαλύτερη αραιώση των καρκινικών κυττάρων (σε 5 κύτταρα στα 50μl). Από τα αποτελέσματα αυτά δεν παρατηρήθηκε καμιά διαφορά στο ποσοστό ανίχνευσης μεταξύ 5 και 100 κυττάρων. Αυτό υποδηλώνει την αδυναμία της κυτταρομετρίας ροής να ανιχνεύσει πολύ μικρό αριθμό κυττάρων χωρίς να χρησιμοποιηθεί κάποια μέθοδος εμπλουτισμού των καρκινικών κυττάρων.

Το όριο στο οποίο πρέπει να φτάσει η ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων είναι λιγότερα από 5 CTCs ανά 7,5ml ολικό αίμα. Η τιμή αυτή χρησιμοποιείται για διάκριση των ασθενών. Οι ασθενείς με  $\geq 5$  CTCs /7.5 mL έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν μικρότερο αριθμό CTCs.

Λόγω της πολύ μικρής ποσότητας των καρκινικών κυττάρων που καλούμαστε να ανιχνεύσουμε μέσα σε πολύ μεγάλο όγκο αίματος (7.5ml), έγινε δοκιμή εφαρμογής πρωτοκόλλων εμπλουτισμού των καρκινικών κυττάρων. Η πρώτη δοκιμή έγινε με το πρωτόκολλο bulk lysis με το οποίο εμβολιάσαμε 700, 70 και 8 κύτταρα σε 7,5ml ολικό αίμα (Πείραμα 5). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού δεν ήταν καθόλου ενθαρρυντικά. Δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφορά στο ποσοστό ανίχνευσης των καρκινικών κυττάρων στις διάφορες αραιώσεις των κυττάρων. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω των πολλών σταδίων πλύσης που απαιτούσε το πρωτόκολλο αλλά και στη σύσταση των διαλυμάτων, με αποτέλεσμα να χαθεί μεγάλος αριθμός καρκινικών κυττάρων.

Στη συνέχεια έγινε δοκιμή με πρωτόκολλο εμπλουτισμού των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση της φικόλης (Πείραμα 6). Η δοκιμασία αυτή εκμεταλλεύεται τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων και διαχωρίζει τα κύτταρα με βάση την πυκνότητα. Με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της φικόλης απομακρύνεται ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων του αίματος (ερυθροκύτταρα, ουδετερόφιλα) με αποτέλεσμα να «εμπλουτίζονται» τα καρκινικά κύτταρα. Το πρωτόκολλο της

φικόλης εφαρμόστηκε αρχικά σε 3,5ml αίμα όπως καθορίζεται από τον παρασκευαστή. Στο αίμα αυτό προστέθηκαν 35 καρκινικά κύτταρα της κυτταρικής σειράς MCF-7. Τα αποτελέσματα του πειράματος με τη χρήση της φικόλης ήταν ενθαρρυντικά συγκρίνοντας το ποσοστό των κυττάρων που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα αίματος που έγινε ο εμβολιασμός των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με το ποσοστό των κυττάρων που ανιχνεύτηκαν στον αρνητικό μάρτυρα. Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε για να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Στη συνέχεια έγινε προσαρμογή του πρωτοκόλλου της φικόλης με εμβολιασμό καρκινικών κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα. Για τον σχεδιασμό του πειράματος έγιναν διαδοχικές αραιώσεις 5, 10, 100 και 1000, 5000, 10.000 και 150.000 κυττάρων της καρκινικής σειράς MCF-7 σε 7,5ml ολικού αίματος. Επίσης την ίδια διαδικασία ακολούθησε και δείγμα αίματος στο οποίο δεν προστέθηκαν καρκινικά κύτταρα (δείγμα control) (Πείραμα 7). Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζουν τα αποτελέσματα προσθήκης 1000, 100, 10, 5 και 0 κυττάρων (Πίνακας 3.3), τα οποία δείχνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης πολύ μικρού αριθμού καρκινικών κυττάρων σε 7,5ml ολικό αίμα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

Στη συνέχεια έγινε επανάληψη του Πειράματος 7 με προσθήκη 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7.5ml ολικό αίμα και την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με φικόλη (Πείραμα 8) για έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Ο αριθμός των συμβάντων EpCAM+/CK+ μειώνεται όσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που προστέθηκαν.

Όμως η παρουσία 11 EpCAM+/CK+ συμβάντων στον αρνητικό μάρτυρα, υποδηλώνει την μη ειδική ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων με την μέθοδο εμπλουτισμού της φικόλης και με μέθοδο ανίχνευσης την κυτταρομετρία ροής.

Στο Πείραμα 9 έγινε εμβολιασμός 1000, 100, 10 και 0 κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε 7.5ml ολικό αίμα, για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού με τη χρήση του διαλύματος RCL και την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Από τα αποτελέσματα του πειράματος παρατηρείται ότι ο αριθμός των συμβάντων μειώνεται όσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που προστέθηκαν. Τα μηδενικά συμβάντα στον αρνητικό μάρτυρα, υποδηλώνουν την ειδική ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων με την μέθοδο εμπλουτισμού του διαλύματος RCL και τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

Στα πειράματα ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων B2M και CK-19 (Πείραμα 10) με τη χρήση του διαλύματος RCL και μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με μονοκλωνικά αντισώματα ErCAM, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του γονιδίου B2M στα δείγματα ολικού αίματος στα οποία εμβολιάστηκαν καρκινικά κύτταρα, σε σχέση με τα δείγματα στα οποία τα καρκινικά κύτταρα δεν εμβολιάστηκαν σε ολικό αίμα. Επίσης παρατηρείται διαφορετική έκφραση στα δείγματα που έχουν 10, 100 και 1000 κύτταρα αντίστοιχα, με την έκφραση του B2M να μειώνεται όσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων. Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου CK-19 παρουσιάζονται παρόμοια επίπεδα έκφρασης στα δείγματα ολικού αίματος στα οποία εμβολιάστηκαν τα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα δείγματα των καρκινικών κυττάρων τα οποία δεν εμβολιάστηκαν σε ολικό αίμα. Αυτό υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης του CK-19 δεν επηρεάζονται από την παρουσία των υπόλοιπων κυττάρων του αίματος. Επίσης όσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται και η έκφραση του γονιδίου CK-19. Οπότε η μέθοδος εμπλουτισμού των καρκινικών κυττάρων με την χρήση του διαλύματος RCL και μαγνητικών σφαιριδίων και η ανίχνευση τους με τη χρήση της RT-qPCR, φαίνεται να είναι ειδική και ικανή να ανιχνεύσει πολύ μικρές συγκεντρώσεις καρκινικών κυττάρων (10 κύτταρα) σε 7,5ml ολικό αίμα.

Το αντίστοιχο πείραμα έγινε και απουσία μαγνητικών σφαιριδίων. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς (B2M) αυξάνονται όσο αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων που εμβολιάστηκαν και είναι αναμενόμενο ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αυτού είναι μεγαλύτερα στα δείγματα του ολικού αίματος στο οποίο είχαν εμβολιαστεί τα καρκινικά κύτταρα, σε σχέση με τα δείγματα των καρκινικών κυττάρων τα οποία δεν εμβολιάστηκαν σε ολικό αίμα. Επίσης συγκρίνοντας τις δύο τεχνικές, λόγω απουσίας μαγνητικών σφαιριδίων παραμένουν στο δείγμα περισσότερα κύτταρα αίματος με αποτέλεσμα τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς να είναι μεγαλύτερα σε αυτή την περίπτωση.

Όσον αφορά το γονίδιο στόχο η έκφραση του είναι μεγαλύτερη στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα δείγματα που εμβολιάστηκαν τα καρκινικά κύτταρα σε ολικό αίμα. Επίσης συγκρίνοντας τις δύο τεχνικές φαίνεται ότι η χρήση μαγνητικών σφαιριδίων βοηθά στην ανίχνευση μικρότερης ποσότητας καρκινικών κυττάρων και μπορεί να ανιχνεύσει 10 καρκινικά κύτταρα σε 7,5ml ολικό αίμα.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανίχνευσης καρκινικών κυττάρων που εμβολιάστηκαν σε 7,5ml ολικό αίμα με τη χρήση της RT-qPCR ως μέθοδο ανίχνευσης, συμφωνούν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανίχνευσης των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Δεδομένου αυτού, έγινε ανάλυση 10 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και 10 υγιών εθελοντών με μέθοδο ανίχνευσης την κυτταρομετρία ροής και την RT-qPCR για να γίνει σύγκριση μεταξύ των δύο μεθόδων.

Από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής παρατηρούμε ότι στους ασθενείς 6, 7, 8 και 10 ανιχνεύονται περισσότερα από 10 διπλά θετικά συμβάντα (ErCAM+/CK+) τα οποία αποτελούν επιθηλιακά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων (Πίνακας 3.6). Επίσης στους ίδιους ασθενείς ανιχνεύεται μεγάλος αριθμός κυττάρων που είναι θετικά στην έκφραση του CD44 και αρνητικά στην έκφραση του CD24 (CD44+/CD24-), χαρακτηριστικά των κυττάρων που βρίσκονται στην ενδιάμεση φάση κατά τη μετατροπή τους από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα CD44+/CD24- κύτταρα είναι αρνητικά στην έκφραση των κυτταροκερατινών, υποδηλώνοντας την απώλεια των επιθηλιακών χαρακτηριστικών κατά την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση. Όσον αφορά τους 10 υγιείς εθελοντές παρατηρούμε ότι είναι όλοι αρνητικοί στην έκφραση των δεικτών ErCAM+/CK+ και δεν υπάρχει σε κανένα υγιή εθελοντή η ύπαρξη CD44+/CD24- κυττάρων.

Από τα αποτελέσματα ανάλυσης των 10 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού με τη χρήση της RT-qPCR παρατηρείται η έκφραση του γονιδίου CK-19 (χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων) στους ασθενείς 6, 8 και 10. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής ως μέθοδο ανίχνευσης (Πίνακας 3.7).

Στην ασθενή 7 ανιχνεύονται ErCAM+/CK+ κύτταρα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, ενώ δεν ανιχνεύονται με την RT-qPCR. Αυτό ίσως να

οφείλεται στο γεγονός ότι με την κυτταρομετρία ροής έγινε έλεγχος έκφρασης περισσότερων κυτταροκερατινών (CK 7,8,14,15,18,19) σε σχέση με την RT-qPCR με την οποία έγινε έλεγχος της έκφρασης μόνο της CK-19.

Πίνακας 3.7 Σύγκριση των μεθόδων κυτταρομετρίας ροής και RT-qPCR.

		FlowCytometry * RealtimePCR Crosstabulation			
		RealtimePCR		Total	
		Negative	Positive		
FlowCytometry	Negative	Count	6	0	6
		% of Total	60,0%	0,0%	60,0%
	Positive	Count	1	3	4
		% of Total	10,0%	30,0%	40,0%
Total	Count	7	3	10	
	% of Total	70,0%	30,0%	100,0%	

Όπως έχει αναφερθεί οι μοριακές τεχνικές χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα έχοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης ενός καρκινικού κυττάρου σε  $10^6$  λευκοκύτταρα. Παρόλο που η κυτταρομετρία ροής έχει την ικανότητα να ανιχνεύσει μικρό αριθμό κυττάρων, μειονεκτεί σε σχέση με τις μοριακές τεχνικές στο γεγονός ότι για να θεωρηθεί ένας πληθυσμός «πραγματικός» θα πρέπει να αποτελείται από περισσότερα των 10 συμβάντων. Αυτό οδηγεί σε αδυναμία της μεθόδου να ανιχνεύσει λιγότερα από 10 καρκινικά κύτταρα, οπότε είναι αδύνατο να διαχωριστούν οι ασθενείς με βάση το όριο των 5 CTCs ανά 7.5ml αίμα που θεωρείται προγνωστικός δείκτης. Πλεονεκτεί όμως στο γεγονός ότι είναι μια απλή και γρήγορη μέθοδος με την οποία μπορούν να μελετηθούν και να διαχωριστούν ταυτόχρονα πολλοί πληθυσμοί κυττάρων ενδιαφέροντος, με τη χρήση περισσότερων από δέκα μονοκλωνικών αντισωμάτων, κάτι που αδυνατεί να γίνει με τις μοριακές τεχνικές.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cooper GM, Hausman RE. The Development and Causes of Cancer. Cell A Mol Approach. 2007;
2. Peate I. Understanding Cancer. Br J Healthc Assist. 2018;
3. Initiation C, Cells CS, Cells CS, Summary S. Cancer Initiation , Promotion , and Progression Stages of Tumor Development. 2018;
4. Kanwal S. Effect of O-GlcNAcylation on tamoxifen sensitivity in breast cancer derived MCF-7 cells. 2013;203.
5. Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. J Cancer Res Pract. 2017;4(4):127–9.
6. Ritchie H, Roser M. Causes of Death, Our World in Data. Our World in Data 2018.
7. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2020 Apr 27]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
8. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. Crit Rev Oncog. 2013;
9. Filipe EC, Lucas MC, Timpson P, Herrmann D, Chitty JL, Cox TR, et al. Recent advances in understanding the complexities of metastasis [ version 2 ; referees : 3 approved ] Referee Status : 2018;7:1–18.
10. What Is Cancer? - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2020 Apr 27]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
11. Simsek E. Determination of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood By Flow Cytometry. Niche. 2016;(January).
12. WHO | Breast cancer. WHO World Health Organization; 2018.
13. Becker S. A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. Int J Gynecol Obstet. 2015;
14. Wang L. Early diagnosis of breast cancer. Sensors (Switzerland). 2017;
15. Dasgupta A, Lim AR, Ghajar CM. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? Mol Oncol. 2017;11(1):40–61.
16. Salinas-Sánchez AS, Martínez-Sanchís C, Giménez-Bachs JM, García-Olmo DC. Liquid biopsy in cancer. Vol. 40, Actas Urológicas Españolas

- (English Edition). 2016. 1–2 p.
17. Lianidou E, Hoon D. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. In: Nader R, Horvath AR, Wittwer C, editors. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 6th Ed. St. Louis (MO): Elsevier; 2017. p. 1111–44.
  18. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2018.
  19. Lianidou E, Pantel K. Liquid biopsies. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2019.
  20. Lianidou ES, Markou A, Strati A. The role of ctcs as tumor biomarkers. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015.
  21. Burton R, Bell R. The Global Challenge of Reducing Breast Cancer Mortality. *Oncologist*. 2013;
  22. Ercan E, Simsek E, Guler OO, Canda AE, Atmaca AF, Carhan A. Determination of Circulating Tumor Cells by Flow Cytometry in the Bladder Cancer Patients. *Urol Androl – Open J*. 2018;2(1):25–30.
  23. Bünger S, Zimmermann M, Habermann JK. Diversity of assessing circulating tumor cells (CTCs) emphasizes need for standardization: a CTC Guide to design and report trials. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34(3):527–45.
  24. Kowalik A, Kowalewska M, Gózdź S. Current approaches for avoiding the limitations of circulating tumor cells detection methods—implications for diagnosis and treatment of patients with solid tumors. *Translational Research*. 2017.
  25. Alvarez Cubero MJ, Lorente JA, Robles-Fernandez I, Rodriguez-Martinez A, Puche JL, Serrano MJ. Circulating tumor cells: Markers and methodologies for enrichment and detection. In: *Methods in Molecular Biology*. 2017.
  26. Moussavi-Harami SF, Wisinski KB, Beebe DJ. Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: A Prognostic and Predictive Marker. *J Patient-Centered Res Rev*. 2014;1(2):85–92.
  27. Eroglu Z, Fielder O, Somlo G. Analysis of circulating tumor cells in breast cancer. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2013;11(8):977–85.
  28. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells

- and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discovery*. 2016.
29. Agnoletto C, Corrà F, Minotti L, Baldassari F, Crudele F, Cook WJJ, et al. Heterogeneity in circulating tumor cells: The relevance of the stem-cell subset. *Cancers (Basel)*. 2019;
  30. Bankó P, Lee SY, Nagygyörgy V, Zrínyi M, Chae CH, Cho DH, et al. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):1–20.
  31. Lianidou ES, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2014.
  32. Chen L, Bode AM, Dong Z. Circulating tumor cells: Moving biological insights into detection. *Theranostics*. 2017.
  33. Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*. 2019;
  34. Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Zoli W, Rigaud M. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: Characterization of cell subpopulations. *Annals of Translational Medicine*. 2014.
  35. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res*. 2012;
  36. Adams DL, Stefansson S, Haudenschild C, Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, et al. Cytometric characterization of Circulating Tumor Cells Captured by microfiltration and their correlation to the cellsearch® CTC test. *Cytom Part A*. 2015;
  37. Chen J, Cao SW, Cai Z, Zheng L, Wang Q. Epithelial-mesenchymal transition phenotypes of circulating tumor cells correlate with the clinical stages and cancer metastasis in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Biomarkers*. 2017;
  38. Qi LN, Xiang B De, Wu FX, Ye JZ, Zhong JH, Wang YY, et al. Circulating tumor cells undergoing emt provide a metric for diagnosis and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2018;
  39. Chen Y, Li S, Li W, Yang R, Zhang X, Ye Y, et al. Circulating tumor cells undergoing EMT are poorly correlated with clinical stages or predictive of



- recurrence in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2019;
40. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: An enduring ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012.
  41. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019.
  42. Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine*. 2018.
  43. Satelli A, Mitra A, Brownlee Z, Xia X, Bellister S, Overman MJ, et al. Epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells capture for detecting tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2015;
  44. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM- based detection due to epithelial-to- mesenchymal transition. 2012;
  45. Menyailo ME, Tretyakova MS, Denisov E V. Heterogeneity of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer : Identifying Metastatic Seeds. 2020;
  46. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*. 2013.
  47. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Molecular Oncology*. 2016.
  48. Aaltonen KE, Novosadová V, Bendahl P, Graffman C, Larsson A, Rydén L. Molecular characterization of circulating tumor cells from patients with metastatic breast cancer reflects evolutionary changes in gene expression under the pressure of systemic therapy Patient cohort. 2017;8(28):45544–65.
  49. Bailey P, Martin S. Insights on CTC Biology and Clinical Impact Emerging from Advances in Capture Technology. *Cells*. 2019;
  50. Christou N, Meyer J, Popeskou S, David V, Toso C, Buchs N, et al. Circulating Tumour Cells , Circulating Tumour DNA and Circulating Tumour miRNA in Blood Assays in the Different Steps of Colorectal Cancer Management , a Review of the Evidence in 2019. 2019;2019.
  51. Maecker H, Trotter J. Selecting reagents for multicolor flow cytometry with BD™ LSR II and BD FACSCanto™ systems. *Nat Methods*. 2008;

52. Zhang J, Chen K, Fan ZH. Circulating Tumor Cell Isolation and Analysis. In: *Advances in Clinical Chemistry*. 2016.
53. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. ScienceDirect Circulating tumor cell technologies 5. *Mol Oncol*. 2016;10(3):374–94.
54. Andree KC, Dalum G Van, Terstappen LWMM. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system ScienceDirect Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system 5. *Mol Oncol*. 2019;10(3):395–407.
55. Marrugo-Ramírez J, Mir M, Samitier J. Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):1–21.
56. Low WS, Wan Abas WAB. Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties. *BioMed Research International*. 2015.
57. Gascoyne PRC, Shim S. Isolation of Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis. 2014;(c):545–79.
58. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: Detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clinical Chemistry*. 2011.
59. Nakamura K, Iwatsuki M, Kurashige J, Ishimoto T, Baba Y. Circulating tumor cells in gastric cancer. 2018;
60. Mckinnon KM. *Flow Cytometry : An Overview*. 2019;1–16.
61. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012.
62. Biosciences B. *Introduction to Flow Cytometry - A Learning Guide*. Methods (San Diego, Calif.). 2000.
63. Bögli J. *The Basics of Flow Cytometry*. Biozentrum. 2018;(January).
64. Fluor A, Fluor A. *Flow Cytometry Handbook Available Fluorochrome Options by Laser Conjugate*.
65. O'Donnell EA, Ernst DN, Hingorani R. Multiparameter Flow Cytometry: Advances in High Resolution Analysis. *Immune Netw*. 2013;
66. Errante PR, Ebbing PCC, Rodrigues FSM, Ferraz RRN, Da Silva NP. Flow cytometry: a literature review. *Rev Ciências Médicas e Biológicas*. 2016;

67. Pelan-Mattocks LS, Pesch BA, Kehrli J. Flow cytometric analysis of intracellular complexity and CD45 expression for use in rapid differentiation of leukocytes in bovine blood samples. *Am J Vet Res.* 2001;
68. Hu Y, Fan L, Zheng J, Cui R, Liu W, He Y, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients utilizing multiparameter flow cytometry and assessment of the prognosis of patients in different CTCs levels. *Cytom Part A.* 2010;77(3):213–9.
69. Hristozova T, Konschak R, Budach V, Tinhofer I. A simple multicolor flow cytometry protocol for detection and molecular characterization of circulating tumor cells in epithelial cancers. *Cytom Part A.* 2012;
70. Watanabe M, Uehara Y, Yamashita N, Fujimura Y, Nishio K, Sawada T, et al. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system. *Cytom Part A.* 2014;
71. Bhagwat N, Dulmage K, Pletcher CH, Wang L, DeMuth W, Sen M, et al. An integrated flow cytometry-based platform for isolation and molecular characterization of circulating tumor single cells and clusters. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–14.
72. Lopresti A, Malergue F, Bertucci F, Liberatoscioli ML, Garnier S, DaCosta Q, et al. Sensitive and easy screening for circulating tumor cells by flow cytometry. *JCI Insight.* 2019;
73. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Research* 2015 p. 3147–54.
74. Sponsored and reviewed by ICCS Quality and Standards Committee Title : Compensation Tips for Beckman Coulter 10-Color Navios Platform Written by: Salima Janmohamed-Anastasakis Ph . D ., Applications Scientist , Beckman Coulter Life Sciences , Division of. 2018;1–13.
75. Low WS, Abu W, Wan B. Benchtop Technologies for Circulating Tumor Cells Separation Based on Biophysical Properties. 2015;2015.
76. Zavridou M, Mastoraki S, Strati A, Koutsodontis G, Klinakis A, Psyrris A, et al. Direct comparison of size-dependent versus EpCAM-dependent CTC enrichment at the gene expression and DNA methylation level in head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–9.
77. CDR415520-750.jpg (750x554) [Internet]. [cited 2020 Apr 27]. Available

from: <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR415520-750.jpg>

78. Cristofanilli M. Liquid Biopsies in Solid Tumors. 2017. 15–40 p.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μεταστατικός καρκίνος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Κατά τη διαδικασία της μετάστασης, αποκόπτονται κύτταρα από τον πρωτογενή όγκο και μέσω της κυκλοφορίας μεταφέρονται και εγκαθίστανται σε απομακρυσμένα όργανα. Η ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs), μπορεί να βοηθήσει στην πρόγνωση της πορείας των ασθενών με καρκίνο, στην ανάπτυξη καινούργιων θεραπευτικών φαρμάκων και στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία.

Τα CTCs αποτελούν σπάνια συμβάντα και ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα σε συγκεντρώσεις του ενός κυττάρου ανά  $10^6$  λευκοκύτταρα, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός τους προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου στα απαιτούμενα όρια.

Η απομόνωση των CTCs γίνεται με μεθόδους που βασίζονται είτε στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων (μέγεθος, πυκνότητα, ηλεκτρικά φορτία, παραμόρφωση) είτε σύμφωνα με τα μόρια που εκφράζουν στην επιφάνεια ή στο κυτταρόπλασμά τους.

Για την ανίχνευση των CTCs χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως η κυτταρομετρία ροής και η RT-qPCR. Η κυτταρομετρία ροής βασίζεται στην ανίχνευση ολόκληρου του κυττάρου με τη χρήση ειδικών δεικτών, που αναγνωρίζουν πρωτεΐνες της επιφάνειας ή κυτταροπλασματικές, ενώ η RT-QPCR βασίζεται στην ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων.

Στην παρούσα εργασία έγινε εμβολιασμός καρκινικών κυττάρων σε ολικό αίμα για σύγκριση διαφόρων μεθόδων απομόνωσης των CTCs χρησιμοποιώντας ως μέθοδο ανίχνευσης την κυτταρομετρία ροής. Τέλος η μέθοδος απομόνωσης με την μεγαλύτερη ειδικότητα εφαρμόστηκε σε δείγματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και σε δείγματα υγιών εθελοντών, για την ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Παράλληλα τα δείγματα αυτά μελετήθηκαν και με μοριακές μεθόδους.

## **ABSTRACT**

The development of metastatic disease is the major cause of death from cancer. During the process of metastases, cancer cells leave the primary site and via transportation from either blood, lymphatics or nerves they travel to distant sites where they create the metastasis. The detection of circulating tumour cells, (CTCs) might help in assessing prognosis from cancer, development of newer anticancer treatments, or in the follow up of the response to treatment.

CTCs are rare and they can be detected in the peripheral blood in concentrations of one cell over  $10^6$  leukocytes, therefore it is essential to enhance them in order to increase the sensitivity of the technique at the appropriated levels.

The detection of CTCs is done with methods that are either based on the morphological characteristics of the cells, (size, density, electrical current, dysformation), or based on the molecules that are expressed in the surface or their cytoplasm.

For the detection of the CTCs methods like flow cytometry. or RT-qPCR are used. Flow cytometry is based on the detection of the whole cancer cell with the help of specialized markers that recognize the surface or the cytoplasmic proteins. RT-qPCR detects nucleic acids.

In this study, whole blood was embolised with cancer cells in order to compare the different methods of isolation of CTCs using flow cytometry.

The isolation method with the bigger sensitivity was then used in samples from patients with metastatic breast cancer and in healthy volunteers, for the detection of circulating tumour cells. These samples were also studied with molecular methods.