



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΒΛΑΣΤΙΚΟ
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΜΥΕΛΟ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΚΑΠΕ ΚΑΙ ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΚΑΙ ΕΚΒΑΣΗ

ΣΤΕΡΓΙΟΣ ΜΠΟΥΣΙΟΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΒΛΑΣΤΙΚΟ
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΜΥΕΛΟ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΚΑΠΕ ΚΑΙ ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΚΑΙ ΕΚΒΑΣΗ

ΣΤΕΡΓΙΟΣ ΜΠΟΥΣΙΟΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης του κ. Μπούσιου Στέργιου: 26-1-2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 711^α/3-5-2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Πενθερουδάκης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Παυλίδης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας –Ογκολογίας του του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαυρουδής Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-5-2011

«Μελέτη της ύπαρξης κυκλοφορούντων νεοπλασματικών κυττάρων και νεοπλασματικών κυττάρων με βλαστικό φαινότυπο και φαινότυπο επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετατροπής σε μυελό οστών και περιφερικό αίμα ασθενών με ΚΑΠΕ και συμπαγείς όγκους. Συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και έκβαση»»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 791^α/1-11-2016

Μαυρουδής Δημήτριος	Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης
Μπατσιστάτου Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παυλίδης Νικόλαος	τ. Καθηγητής Παθολογίας- Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γούσια Άννα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πενθερουδάκης Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσιάρα Σταυρούλα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαγκλάρα Αγγελική	Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 3-11-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Εκφράζω την ειλικρινή μου ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω αυτή την εργασία και ιδιαίτερω:

τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής,

Γεώργιο Πενθερουδάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή Ογκολογίας και δάσκαλό μου, για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση, τη συμπαράστασή του εντός και εκτός του πειραματικού χώρου που είχε για μένα ανεκτίμητη αξία, τις συζητήσεις μας πάνω σε όλα τα προβλήματα που έπρεπε να επιλυθούν κατά τη διάρκεια των μετρήσεων και την ανάλυση των δεδομένων, για τα κίνητρα που μου έδωσε ώστε να εντρυφήσω στην έρευνα και κυρίως για την ειλικρινή φιλία με την οποία συνδεθήκαμε στα χρόνια αυτά και η οποία θεμελιώθηκε σε βάθος χρόνου,

Δημήτριο Μαυρουδή, Καθηγητή Ογκολογίας για την ουσιαστική βοήθεια και συνεργασία, τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Βιολογίας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Κρήτης και για το βιοπτικό υλικό ασθενών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου με τα οποία μας συνέδραμε,

Νικόλαο Παυλίδη, Καθηγητή Ογκολογίας και ειδήμονα στο ΚΑΠΕ που εμπνεύστηκε αυτή την εργασία, για τις εποικοδομητικές του παρατηρήσεις, την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλλε από την στιγμή της ανάθεσης του θέματος και την εν γένει προετοιμασία που μου παρείχε ώστε να ενταχθώ στα κλινικά και ερευνητικά δρώμενα της Ογκολογίας με ηθικά και επιστημονικά εφόδια,

τον εκλεκτό επιστήμονα και θετικό άνθρωπο,

Γεώργιο Βαρθολομάτο, Βιοχημικό στο Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και υπεύθυνο της μονάδας Μοριακής Βιολογίας που με την τεράστια πειραματική εμπειρία του, υπήρξε η δεξαμενή γνώσεων στην οποία ανέτρεχα πάντοτε, για την αντιμετώπιση των ποικίλων πειραματικών δυσκολιών και προβλημάτων που συνόδευαν την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής στην οποία με μύησε διαθέτοντας άπλετο ελεύθερο χρόνο.

τους εκλεκτούς συνεργάτες και φίλους,

Γαλάτεια Καλλέργη και Στέλλα Αποστολάκη, Βιολόγους στο Εργαστήριο Βιολογίας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Κρήτης για την αμέριστη βοήθεια τους στη μεθοδολογική ανάπτυξη και την άψογη υποστήριξη αυτής της εργασίας με την εφαρμογή της μεθόδου του ανοσοφθορισμού, για τη θερμή τη φιλοξενία στο Εργαστήριο που εδράζονται και για την αγωνία τους να μας μεταλαμπαδεύσουν τις γνώσεις τους,

Έλλη Παπαγιαννοπούλου για την ενεργή συμμετοχή της σε όλες τις φάσεις της κατεργασίας των δειγμάτων φλεβικού αίματος για την απομόνωση περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων, την κυττοφυγοκέντρωση με Ficoll και την επίστρωση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες πριν τη διενέργεια του ανοσοφθορισμού καθώς επίσης, την ενεργή εμπλοκή της στην εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής, καθώς και για το ενδιαφέρον και τις παρατηρήσεις της κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της μελέτης,

*

Όλους τους επιστήμονες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία της διατριβής και των οποίων τις γνώσεις χρησιμοποίησα σ' αυτή τη μελέτη,

*

τους γονείς μου Βασίλη και Πηνελόπη για την πολύπλευρη συμπαράσταση, την ανοχή που επέδειξαν αδιαμαρτύρητα στα άγχη και στις αγωνίες μου και για όλα όσα μου πρόσφεραν αυτά τα χρόνια, καθώς και τον αγαπημένο μου αδερφό Σπύρο, του οποίου η συγκρότηση και μεθοδικότητα συνεχίζει να είναι πηγή έμπνευσης για μένα. Η στήριξη, η αγάπη και η ουσιαστική συμπαράστασή τους, ήταν πάντα το εφελτήριο για να επιδιώξω τους σημαντικότερους στόχους στη ζωή μου.

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

Στην οικογένειά μου,

στους ανώνυμους και ειλικρινείς εργατές της έρευνας του καρκίνου,

στους πολυάριθμους αρρώστους μας,

σ' εκείνους που στάθηκαν συμπαραστάτες μου σε δύσκολες στιγμές και που δε
δύναμαι να ονοματίσω.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ασθενείς με μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας (ΚΑΠΕ) αποτελούν ένα, όχι σπάνιο, πρόβλημα των κλινικών ογκολόγων, παρά τις επιτευχθείσες προόδους στην απεικονιστική τεχνολογία, τους ενδοσκοπικούς ελέγχους, την ανοσοϊστοχημεία και την αναγνώριση διαφόρων καρκινικών δεικτών. Κεντρικό πρόβλημα του κλινικού αυτού "συνδρόμου", όπως έχει αποκληθεί, αποτελεί η αμηχανία του κλινικού γιατρού μπροστά στη διαγνωστική προσέγγιση, καθώς επίσης και στο θεραπευτικό σχεδιασμό.

Το ΚΑΠΕ ως κλινική οντότητα χαρακτηριζόμενη από υποστροφή πρωτοπαθούς εστίας, πρόωμη μεταστατική διασπορά υψηλού φορτίου σε ασυνήθεις εντοπίσεις, αντίσταση στην θεραπεία αποτελεί ιδανικό μοντέλο για την μελέτη της μεταστατικής παθοφυσιολογίας. Η ύπαρξη και καταμέτρηση νεοπλασματικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα (Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα, ΚΚΚ) έχει παρατηρηθεί σε 20-40% αρρώστων με εντοπισμένους και μεταστατικούς συμπαγείς όγκους. Η προγνωστική και προβλεπτική σημασία των ΚΚΚ έχει τεκμηριωθεί σε αρκετές δημοσιεύσεις ασθενών με καρκίνο μαστού, παχέος εντέρου και προστάτη. Η παρουσία τους έχει μελετηθεί με διάφορες τεχνικές συμπεριλαμβανομένης της ανοσοκυτταροχημείας, του ανοσοφθορισμού, της ανίχνευσης mRNA με RT-PCR, μετά από κάποια διεργασία εμπλουτισμού των κυττάρων περιφερικού αίματος με Ficoll gradient φυγοκέντρωση ή με ανοσομαγνητικές μεθόδους και της κυτταρομετρίας ροής. Με τεχνικές ανοσοφθορισμού ή τεχνολογία Cellsearch, η ύπαρξη > 5 ΚΚΚ στο περιφερικό αίμα έχει προγνωστική σημασία για την έκβαση ασθενών με μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα μαστού, τόσο πριν όσο και μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής.

Η παρουσία ΚΚΚ στο ΚΑΠΕ δεν έχει μελετηθεί. Δεν έχει εξεταστεί επίσης η συσχέτιση τους με κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα της νόσου και η προγνωστική/προβλεπτική σημασία τους για την έκβαση του αρρώστου ή την απάντηση στην θεραπεία. Επιπρόσθετα, δεν έχει μελετηθεί ο στελεχιαίος (stem cell) φαινότυπος και ο φαινότυπος επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT, Epithelial Mesenchymal Transition), υπεύθυνος για την μεταμόρφωση ενός

επιθηλιακού κυττάρου σε μεσεγχυματογενές ικανό για μετάσταση, σε ΚΚΚ σε ασθενείς με ΚΑΠΕ. Εγγενή προβλήματα στις προσπάθειες αυτές είναι η προέλευση κυττάρων ΚΑΠΕ από ποικιλία ιστών και η ποικιλότητα stem cell φαινότυπου ανάλογα με το όργανο προέλευσης.

Προκλινικά δεδομένα από κυτταροκαλλιέργειες και πειράματα ξενομοσχευμάτων σε ποντίκια προτείνουν την ανάπτυξη κακοήθων νεοπλασματικών όγκων μόνον από μικρό ποσοστό κυττάρων με ικανότητες ασύμμετρης διαίρεσης, αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης προς ώριμους ιστούς, τα νεοπλασματικά στελεχιαία κύτταρα (Cancer Stem Cells). Το φαινόμενο EMT σε νεοπλασματικούς ιστούς σχετίζεται με την παροδική μεταλλαγή του νεοπλασματικού κυττάρου σε μεσεγχυματογενές, πλαστικό κύτταρο με δυνατότητα διήθησης-μετάστασης. Τελευταία δεδομένα συνδέουν την υιοθεσία EMT φαινότυπου εκ μέρους νεοπλασματικού κυττάρου με απόκτηση stem cell χαρακτηριστικών.

Η ταυτοποίηση του βιολογικού προφίλ αυτών των όγκων θα μπορούσε ενδεχόμενα να συνεισφέρει στη διάγνωση και σε μια πιο ορθολογική θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με ΚΑΠΕ.

Στόχος της μελέτης είναι η διαπίστωση πιθανής προγνωστικής σημασίας για την έκβαση και προβλεπτικής σημασίας για την ανταπόκριση στη θεραπεία της ύπαρξης, του αριθμού και της μεταβολής στον χρόνο των ΚΚΚ ασθενών με ΚΑΠΕ με εφαρμογή τεχνικών ανοσοφθορισμού και κυτταρομετρίας ροής. Έλεγχος, διενεργήθηκε και σε κυτταρικούς πληθυσμούς ασθενών με καρκίνο μαστού και παχέος εντέρου καθώς και φυσιολογικών μαρτύρων. Εξετάστηκε η διαφορά έκφρασης βλαστικών δεικτών μεταξύ αυτών των υποομάδων. Τέλος, η προγνωστική/προβλεπτική σημασία της ύπαρξης ΚΚΚ με stem cell ή EMT φαινότυπο και η συσχέτιση τους με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους αποτέλεσε επίσης αντικείμενο αυτής της μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	01
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	08
<hr/>	
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ, ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	09
1. ΚΑΠΕ	09
1.1. ΤΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΚΑΠΕ	09
1.1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	09
1.1.2. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	10
1.1.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	11
1.1.4. ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ	13
1.1.5. ΚΛΙΝΙΚΟ-ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΟΝΤΟΤΗΤΕΣ	15
1.1.6. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΠΕΛΑΣΗ	22
2. ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ (STEM ΚΥΤΤΑΡΑ)	27
2.1. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΔΙΕΠΟΥΝ ΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	29
2.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ STEM ΚΥΤΤΑΡΩΝ	32
2.3. ΑΥΤΟΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΩΝ STEM ΚΥΤΤΑΡΩΝ	32
2.4. ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΦΩΛΕΕΣ	34
2.5. ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ OCT4, SOX2 ΚΑΙ NANOG ΤΩΝ STEM ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ	35
2.5.1. OCT4	37
2.5.2. SOX2	38
2.5.3. ALDH1 (ΑΛΔΕΨΔΙΚΗ ΔΕΨΔΡΟΓΕΝΑΣΗ) – ΔΥΝΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STEM ΚΥΤΤΑΡΩΝ	39

2.6. ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	40
3. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (EMT)	43
3.1. ΓΕΝΙΚΑ - ΡΟΛΟΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	43
3.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΒΑΙΝΟΥΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ EMT	44
3.2.1. EMT ΚΑΙ ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΝΔΕΣΕΩΝ	45
3.2.2. EMT ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ	56
3.2.3. EMT ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ	61
3.2.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΗΣ EMT ΚΑΙ ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	63
3.2.5. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ EMT	65
3.2.6. EMT ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ	67
3.2.6.1. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ TGF-β	72
3.2.6.2. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ Wnt	79
3.2.6.3. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ	80
3.2.6.4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΜΕ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ (RTK'S)	89
4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ EMT ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	92
5. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ EMT ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	95
6. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (ΚΚΚ)	96
6.1. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΚΚΚ	96
6.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΚΚ	98
6.2.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΚΚ	98
6.2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΚΚ	100

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	104
<hr/>	
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	105
7. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟΥ ΚΑΙ ΟΠΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ	105
8. ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΕ ΚΚΚ	106
8.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΦΙΚΟΛΗΣ	106
8.2. ΑΝΟΣΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΚΚ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ	108
8.3. ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΟΥΣ ΠΛΑΚΕΣ	110
8.4. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	110
8.4.1. ΈΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΙΣΤΡΩΜΕΝΑ ΣΕ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΟΥΣ ΠΛΑΚΕΣ	112
8.4.2. ΆΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΣΩ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	115
8.5. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ	116
8.5.1. ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	116
8.5.2. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	117
8.5.3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΗΜΙ-ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΑΡΙΟΛ	117
8.6. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	119
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	121
<hr/>	
9. ΑΣΘΕΝΕΙΣ	122
10. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ	124

10.1.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΚΚ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	124
10.1.1.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΚΚ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	124
10.1.2.	ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΚΚ ΜΕ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	127
10.1.3.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΜΕ ΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ (PERFORMANCE STATUS)	130
10.1.4.	ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΑΠΟΥΣΙΑ ΚΚΚ	133
10.1.5.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΚΚ	136
10.1.6.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΚΚ	138
10.2.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΚΚΚ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	139
10.3.	ΚΚΚ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	140
10.3.1.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΚΚΚ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	143
10.4.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ	145
10.5.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ	148
11.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ STEM CELL ΚΑΙ EMT ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ	152
11.1.	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	152
11.2.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΚΚ ΜΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥΣ STEM CELL ΚΑΙ EMT ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ	153
11.3.	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΚΚ ΜΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥΣ STEM CELL ΚΑΙ EMT ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ	155

11.4. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΚΚ ΜΕ ΣΥΝΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ STEM CELL ΚΑΙ EMT ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ	155
--	-----

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	158
-----------------	------------

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	167
-----------------	------------

SUMMARY IN ENGLISH	174
---------------------------	------------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	180
---------------------	------------

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	222
--	------------

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	223
---------------------------	------------

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ, ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. ΚΑΠΕ

1.1 ΤΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΚΑΠΕ

1.1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας (ΚΑΠΕ¹) αποτελούν ένα ετερογενές σύνολο κακοηθών όγκων, οι οποίοι εκδηλώνονται με μεταστατική νόσο της οποίας η πρωτοπαθής εστία δεν είναι δυνατόν να καθορισθεί κατά το χρόνο της διάγνωσης, ανεξάρτητα από την έκταση της κλινικής και της εργαστηριακής διερεύνησης [1]. Οι όγκοι αυτοί αντιπροσωπεύουν μεταξύ των νεοπλασιών ένα κλινικό μοντέλο απόλυτου μεταστατικού δυναμικού και χαρακτηρίζονται στην πλειονότητά τους και ανεξάρτητα από τα κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά τους από ταυτόχρονη ενεργοποίηση υπερέκφραση πολλαπλών ογκογονιδίων, αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και σημαντικού βαθμού διαταραχή του αποπτωτικού μηχανισμού του κυττάρου [2, 3].

Μέχρι σήμερα, παρά την εξέλιξη προηγμένων και περίπλοκων διαγνωστικών μεθόδων και την ανίχνευση πλειάδας ανοσοϊστοχημικών και ορολογικών δεικτών, το ΚΑΠΕ συνεχίζει να θέτει σημαντικά καθημερινά διλήμματα στον κλινικό ογκολόγο.

¹ Άλλες ονομασίες με τις οποίες απαντάται η υπό μελέτη νοσολογική οντότητα στην Ελληνική βιβλιογραφία είναι: Μετάσταση ή Μεταστατικοί Όγκοι άγνωστης Πρωτοπαθούς Εστίας, και στην Αγγλική βιβλιογραφία CUP (Carcinoma of Undetermined Primary Origin) ή UPT (Unknown Primary Tumours) ή Occult Primary Malignancy

Διλήμματα που αφορούν τόσο τη διαγνωστική προσέγγιση, όσο και τη θεραπευτική αντιμετώπιση αυτών των ασθενών που αποτελούν, κατά προσέγγιση, το 3% των ασθενών με καρκίνο [4].

Ανέκαθεν ο ορισμός του συνδρόμου προσδιόριζε και τους ασθενείς που χαρακτηρίζονταν με τη διάγνωση του ΚΑΠΕ, αν και υπήρχε προβληματισμός όσον αφορά την έκταση αλλά και το επίπεδο του απαιτούμενου ελέγχου, προκειμένου να ταυτοποιηθεί ένας μεταστατικός όγκος ως καρκίνος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας [5]. Ιστορικά, ο απλούστερος ορισμός στη δεκαετία του '70 περιελάμβανε ασθενείς με ιστολογικά τεκμηριωμένο μεταστατικό καρκίνο, για τον οποίο το πλήρες ιστορικό, η ενδελεχής φυσική εξέταση, ο συνήθης αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος καθώς επίσης και η ακτινογραφία θώρακος αποτύγχαναν να προσδιορίσουν την πρωτοπαθή εστία [6]. Σήμερα ο απαιτούμενος έλεγχος για τη διάγνωση του ΚΑΠΕ είναι ευρύτερος και περιλαμβάνει εκτός από το βασικό αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο, έλεγχο ούρων και κοπράνων για αίμα, ιστοπαθολογική ανασκόπηση του βιοπτικού υλικού με ανοσοϊστοχημική μελέτη και απεικονιστικό έλεγχο με ακτινογραφία θώρακος και αξονική τομογραφία άνω και κάτω κοιλίας. Ενδοσκοπικός έλεγχος και λοιπές απεικονιστικές εξετάσεις πρέπει να διενεργούνται συναρτήσει των συμπτωμάτων και της τοπογραφίας των μεταστάσεων [7].

Ο όρος "άγνωστης πρωτοπαθούς" υποδηλώνει το κυρίαρχο κλινικό χαρακτηριστικό αυτών των νεοπλασιών που είναι η αδυναμία καθορισμού της πρωτοπαθούς εστίας. Η πρωτοπαθής εστία δεν εκδηλώνεται, είτε επειδή παρουσιάζει βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης, είτε επειδή ενδεχόμενα υποστρέφει ούτως ώστε ακόμη και νεκροτομικά να καθίσταται αδύνατο να διαγνωσθεί σε ποσοστό που ανέρχεται στο 15-25% των περιστατικών [8, 9]. Άλλα εξίσου ισχυρά χαρακτηριστικά των ΚΑΠΕ είναι η επιθετικότητα και το απρόβλεπτο μεταστατικό πρότυπο.

1.1.2 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα ΚΑΠΕ εΐθισται να κατηγοριοποιούνται βάσει παθολογοανατομικών, κυρίως, αλλά και κλινικών κριτηρίων. Πρόκειται για τα αδενοκαρκίνωματα καλής και μέσης διαφοροποίησης που απαντώνται κατά πλειοψηφία (50%), και έπονται σε συχνότητα

τα αδιαφοροποίητα ή πτωχής διαφοροποίησης καρκινώματα (30%), τα πλακώδη καρκινώματα (15%) και τα αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα (5%) που συμπεριλαμβάνουν νευροενδοκρινείς όγκους, λεμφώματα, όγκους από γεννητικά κύτταρα (germ-cell tumours), μελανώματα, σαρκώματα ή εμβρυικά καρκινώματα [10]. Τα αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα τείνουν να ελαχιστοποιηθούν σήμερα, καθώς με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας και των μικροσυστοιχιών γονιδίων καθορίζεται συνηθέστατα η ιστογενετική τους προέλευση ή φύση [11]. Σημειώνεται ωστόσο, ότι ο μοριακός έλεγχος και οι κυτταρογενετικές μέθοδοι στην καθ' ημέρα πράξη είναι σχετικά περιορισμένα κυρίως για οικονομικούς λόγους αλλά και λόγω αμφίβολης προσφοράς στην ολική επιβίωση των ασθενών. Το μεταστατικό μελάνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας και τα παιδιατρικά ΚΑΠΕ αποτελούν ιδιαίτερους τύπους καρκίνου άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας που συνήθως συζητούνται ξεχωριστά. Το μεταστατικό μελάνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς έχει παρόμοια κλινική συμπεριφορά και βιολογία με το μεταστατικό δερματικό μελάνωμα [12-15]. Στα παιδιά τα εμβρυικά καρκινώματα αποτελούν την πλειονότητα των νεοπλασμάτων άγνωστης πρωτοπαθούς [16].

1.1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Τα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας αποτελούν το 2.3–4.2% του συνόλου των κακοηθών νεοπλασιών, όπως προκύπτει από την καταγραφή της επίπτωσης τους στον πληθυσμό πέντε διαφορετικών χωρών [1, 17-23] (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Καταγραφείσα συχνότητα της επίπτωσης ΚΑΠΕ στο σύνολο των κακοηθών νεοπλασιών σε διάφορες χώρες

Χώρα	Συχνότητα (%)
Ελβετία [17]	2,3
ΗΠΑ [18]	2,3
Αυστραλία [19]	4,2
Ολλανδία [20]	4,0
Φινλανδία [21]	2,5
Ρωσία [22]	3,6
Ιαπωνία [23]	3,0

Η μέση ετήσια επίπτωση της νόσου βρέθηκε να είναι της τάξης των 7-12 περιστατικών ανά 100.000 πληθυσμού (Annual age-adjusted incidence rate) στις ΗΠΑ και 18-19 περιστατικών ανά 100.000 πληθυσμού στην Αυστραλία [18, 19]. Στην Ολλανδία, περίπου 2.500 ασθενείς με ΚΑΠΕ διαγιγνώσκονται ετησίως, με τη μέση ετήσια επίπτωση να προσεγγίζει τα 6,7 περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμού στους άνδρες και τα 5,3 στις γυναίκες αντίστοιχα [20]. Η παρατηρηθείσα ελαφρά μείωση του αριθμού των περιπτώσεων στο χρονικό διάστημα της 15ετίας 1972-1987 σχετίζεται ενδεχομένως με τη βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων. Συνολικά, παρά τις διαφορές ως προς τη διαγνωστική στρατηγική, καθώς και την έκτασή της στις διάφορες χώρες, δεν καταγράφεται ουσιώδης διαφορά στην επίπτωση των ΚΑΠΕ παγκοσμίως (Πίνακας 1). Είναι προφανές ότι η κλινική οντότητα των ΚΑΠΕ έχει ένα σταθερό πυρήνα αδιαμφισβήτητων περιπτώσεων, ενώ οι αναφερθείσες, σε διάφορες μελέτες, εξαιρετικά υψηλές ή χαμηλές συχνότητες (0.24-9.6%) φαίνεται ότι αντανακλούν τη συχνότητα παραπομπής σε ειδικά ογκολογικά κέντρα, που προφανώς σχετίζεται με την ειδικότητα του κέντρου, αλλά και την επιλογή ή το βαθμό διερεύνησης των ασθενών [24, 25].

Το ΚΑΠΕ φέρεται να είναι ο έβδομος έως όγδοος συνηθέστερος τύπος κακοήθειας και η τέταρτη, κατά σειρά συχνότητας, αιτία θανάτου από καρκίνο στις αναπτυγμένες χώρες. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι θεωρείται συνηθέστερο από το non-Hodgkin λέμφωμα. Από τα υπάρχοντα δεδομένα καταγραφής του καρκίνου διαπιστώνεται ότι τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών με ΚΑΠΕ καθρεπτίζουν εκείνα του γενικού

πληθυσμού με καρκίνο, με μέση ηλικία κατά τη διάγνωση τα 60 χρόνια (εύρος 20-89) και μία οριακά μεγαλύτερη συχνότητα στους άνδρες [4].

1.1.4 ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ

Ακριβής καταγραφή της φυσικής ιστορίας αυτής της ετερογενούς ομάδας νεοπλασμάτων, όπως είναι νοητό, δεν είναι δυνατή. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν ορισμένα κοινά βασικά χαρακτηριστικά τα οποία προσδιορίζουν την ιδιόμορφη κλινική οντότητα των ΚΑΠΕ.

Η φυσική ιστορία των ΚΑΠΕ διαφέρει χαρακτηριστικά από εκείνη των καρκίνων που εκδηλώνονται με συμπτωματολογία από τον πρωτοπαθή όγκο. Εξαρχής συστηματικές και άμεσα επιθετικές νεοπλασματικές νόσοι τα ΚΑΠΕ, έχουν βασική ειδοποιό διαφορά από τους άλλους όγκους το γεγονός ότι εκδηλώνονται κατ' αρχήν μόνο με τις μεταστάσεις. Οι μεταστάσεις σε ποσοστό > 50% των περιπτώσεων είναι ταυτόχρονα πολυεστιακές και η προεξάρχουσα μεταστατική εντόπιση αφορά τους λεμφαδένες [26]. Το χρονικό διάστημα, που μεσολαβεί από την έναρξη των συμπτωμάτων σ' αυτούς τους ασθενείς μέχρι τη διάγνωση, είναι αρκετά βραχύ, περίπου 12 εβδομάδες [5], γεγονός το οποίο υπογραμμίζει την ταχύτητα προόδου της κλινικής εξέλιξης αυτών των όγκων.

Ουσιαστικές όμως διαφορές έχουν διαπιστωθεί και στην παρατηρούμενη διαφορά των μεταστατικών εντοπίσεων στα διάφορα όργανα μεταξύ ασθενών οι οποίοι παρουσιάζονται με κλινικά έκδηλη την πρωτοπαθή εστία και ασθενών με ΚΑΠΕ, στους οποίους έγινε δυνατόν να διαγνωσθεί η λανθάνουσα πρωτοπαθής εστία της νεοπλασίας [27]. Ενδεικτικά, αναφέρεται η περίπτωση των οστικών μεταστάσεων γνωστής πρωτοπαθούς εστίας που συνήθως οφείλονται σε καρκίνο μαστού ή προστάτη ενώ στην περίπτωση που εκδηλώνονται σαν κλινική έκφραση του συνδρόμου άγνωστης πρωτοπαθούς, αποδίδονται, συνηθέστερα, σε κλινικά λανθάνοντα καρκίνο του πνεύμονος, ήπατος και νεφρού [28, 29]. Επίσης μεταστάσεις από καρκίνο του προστάτη που εκδηλώνεται κλινικά σαν ΚΑΠΕ, είναι πιο συχνές στο ήπαρ και τον πνεύμονα παρά στα οστά [30]. Γενικά, η μεταστατική συμπεριφορά των ΚΑΠΕ είναι μάλλον απρόβλεπτη και έχουν διαπιστωθεί άτυπες μεταστατικές εντοπίσεις σε σχετικά

υψηλά μάλιστα ποσοστά, όπως στα νεφρά, το μυοκάρδιο και το μυελό των οστών [31, 32]. Προφανώς το απρόβλεπτο της μεταστατικής εντόπισης στα ΚΑΠΕ περιπλέκει τη δυνατότητα εντόπισης της πρωτοπαθούς εστίας.

Η μέση ηλικία εκδήλωσης της νόσου και η συμπτωματολογία ποικίλουν στους διάφορους υπότυπους των ΚΑΠΕ και σχετίζονται τόσο με την ιστολογία, όσο και με τις εντοπίσεις και την έκταση των μεταστάσεων.

Τα αδenoκαρκινώματα παρουσιάζονται σε σχετικά μεγάλες ηλικίες (μέση ηλικία ≈ 58 έτη) και οι εντοπίσεις είναι συνήθως πολυσπλαχνικές. Οι κλινικές εκδηλώσεις τους χαρακτηρίζονται σε υψηλό ποσοστό ($\approx 80\%$) από γενικά συμπτώματα, όπως καταβολή και απώλεια βάρους καθώς και πλούσια κλινική σημειολογία. Με συνηθέστερες εντοπίσεις της μεταστατικής νόσου το ήπαρ, τους πνεύμονες, τον υπεζωκότα και τα οστά, οι προεξάρχουσες κλινικές εκδηλώσεις αφορούν κυρίως το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό σύστημα, ενώ συνήθη ευρήματα είναι η διόγκωση λεμφαδένων, η ηπατομεγαλία, ο ασκίτης και τα δερματικά οζία [33]. Τα πτωχής διαφοροποίησης καρκινώματα αφορούν μικρότερες ηλικίες (≈ 35 έτη), έχουν ταχύτερη πορεία ανάπτυξης και εκδηλώνονται συνήθως με μεταστάσεις στους μεσοθωρακικούς και οπισθοπεριτοναϊκούς λεμφαδένες και κατά δεύτερο λόγο στους πνεύμονες [34].

Η πρόιμη μεταστατική διασπορά αντανakλάται κλινικά στην απουσία συμπτωμάτων που σχετίζονται με τον πρωτοπαθή όγκο και ακόμη περισσότερο στην αδυναμία αναγνώρισης της πρωτοπαθούς εστίας ακόμη και νεκροτομικά. Διάφορες μελέτες αναφέρουν αδυναμία νεκροτομικής πιστοποίησης της πρωτοπαθούς σε 15-84% των περιπτώσεων ΚΑΠΕ [9, 27]. Ανάμεσα στις νεκροτομικά διαπιστωθείσες πρωτοπαθείς εστίες οι συχνότερες ήταν του πνεύμονος και του παγκρέατος. Αυτές αποτελούν σχεδόν τις μισές περιπτώσεις κλινικά λανθάνουσας πρωτοπαθούς εστίας που διαγνώστηκαν, ενώ ακολουθούν, σε μικρότερα ποσοστά, ο καρκίνος του νεφρού και του εντέρου, του ήπατος, των ωοθηκών και του στομάχου [6, 7, 9, 30, 35-38]. Τα δεδομένα αυτά ευρίσκονται σε αντίθεση με τα ποσοστά επίπτωσης των όγκων γνωστής πρωτοπαθούς εστίας, καθώς συνήθεις όγκοι, όπως του μαστού και του παχέος εντέρου, αποτελούν σπάνιες αιτίες του συνδρόμου ΚΑΠΕ.

1.1.5 ΚΛΙΝΙΚΟ-ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΟΝΤΟΤΗΤΕΣ

Τα ΚΑΠΕ κατηγοριοποιούνται σε δύο προγνωστικές ομάδες, στα ευνοϊκής και τα δυσμενούς πρόγνωσης που αντιπροσωπεύουν το 20% και 80% αντίστοιχα [10].

Στα ευνοϊκής πρόγνωσης ΚΑΠΕ συμπεριλαμβάνονται τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα κατανομής μέσης γραμμής, τα θηλώδη αδеноκαρκινώματα της περιτοναϊκής κοιλότητας, οι μονήρεις εστίες αδеноκαρκινώματος μασχαλιαίων λεμφαδένων, τα πλακώδη καρκινώματα λεμφαδένων περιοχής τραχήλου, τα χαμηλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινικά καρκινώματα, τα αδеноκαρκινώματα με ανοσοϊστοχημική έκφραση συμβατή με τα καρκινώματα εντέρου (CK20+, CK7-, CDX2+), τα αδеноκαρκινώματα σε άνδρες με αυξημένο PSA και οστικές μεταστάσεις με προεξάρχων το βλαστικό στοιχείο και η ελάχιστη νόσος με μονήρεις βουβωνικούς λεμφαδένες από πλακώδες καρκίνωμα ή μικρή δυνητικά εξαιρέσιμη βλάβη [10].

Δυσμενούς πρόγνωσης υπότυποι ΚΑΠΕ χαρακτηρίζονται τα μεταστατικά αδеноκαρκινώματα ήπατος, οι πολλαπλές σπλαγχνικές εντοπίσεις, η εκτεταμένη οστική μεταστατική νόσος ο κακοήθης ασκίτης και οι πολλαπλές εγκεφαλικές μεταστάσεις σε έδαφος αδеноκαρκινώματος ή πλακώδους καρκινώματος [10].

Ανάλογα με την περιοχή εντόπισης των μεταστάσεων διακρίνονται οι παρακάτω υποομάδες του ΚΑΠΕ όπως αναφέρονται στον πίνακα 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Υπο-ομάδες ΚΑΠΕ

ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗΣ	ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ
Κατεξοχήν ηπατικές μεταστάσεις ή/και μεταστάσεις σε άλλα όργανα	Αδενοκαρκίνωμα
Λεμφαδένες Λεμφαδενική νόσος μέσης κατανομής (μεσοθωρακικοί-οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες)	Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα ή χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα
Μασχαλιαίοι	Αδενοκαρκίνωμα μέτριας ή χαμηλής διαφοροποίησης
Τραχηλικοί	Πλακώδες καρκίνωμα
Βουβωνικοί	Αδιαφοροποίητο ή πλακώδες καρκίνωμα
Περιτοναϊκή κοιλότητα Αδενοκαρκινωμάτωση περιτοναίου	Ορώδες θηλώδες αδενοκαρκίνωμα
Μη ορώδες-θηλώδες αδενοκαρκίνωμα	Βλενοπαραγωγικό αδενοκαρκίνωμα με ή χωρίς την παρουσία κυττάρων δίκην σφραγστήρος δακτυλίου
Πνεύμονες Πνευμονικές μεταστάσεις	Αδενοκαρκίνωμα
Πλευριτική συλλογή	Αδενοκαρκίνωμα
Οστά	Αδενοκαρκίνωμα
Εγκεφαλικές μεταστάσεις	Αδενοκαρκίνωμα
Νευροενδοκρινικοί όγκοι	Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα με στοιχεία νευροενδοκρινικής προέλευσης
Κακοήθες μελάνωμα	Αδιαφοροποίητο νεόπλασμα με μελανωματικά χαρακτηριστικά

a) **Κατεξοχήν ηπατική μεταστατική νόσος**

Ασθενείς με κατεξοχήν ηπατική μεταστατική νόσο αποτελούν το 25% περίπου του συνόλου των διαγνωσμένων με ΚΑΠΕ. Πιο συχνοί ιστολογικοί τύποι είναι τα

αδενοκαρκινώματα. Η πρόγνωση αυτής της υποομάδας είναι πολύ πτωχή με διάμεση επιβίωση 3-7 μήνες. Ασθενείς με νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης ηπατικές μεταστάσεις άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και σχετικά μακρύτερη επιβίωση [26, 39, 40].

b) Μεταστατικό ΚΑΠΕ λεμφαδενικής εντόπισης

➤ Λεμφαδενική νόσος μέσης γραμμής

Σε αυτή την υποομάδα ασθενών, η νόσος εκδηλώνεται με μεταστάσεις σε λεμφαδένες κατανομής μέσης γραμμής (μεσοθωρακικά-οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες) και παραπέμπει σε εξωγοναδικούς όγκους. Η υποομάδα αυτή αναφέρθηκε αρχικά το 1979 [41] και τα χαρακτηριστικά της περιγράφηκαν στη συνέχεια από τους Greco και Syn [42]. Εμφανίζεται κυρίως σε άντρες μέσης ηλικίας κάτω των πενήντα ετών με λεμφαδενικές εντοπίσεις ή/και πνευμονικές μεταστάσεις.

Ιστοπαθολογικά, ταξινομούνται ως αδιαφοροποίητα καρκινώματα ή πτωχής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα [26, 42]. Οι όγκοι αυτοί, αν και είναι ταχέως εξελισσόμενοι, ανταποκρίνονται εντυπωσιακά στη χημειοθεραπεία και ικανό ποσοστό ασθενών (15%) κερδίζει μακροχρόνια επιβίωση. Από τον ορολογικό έλεγχο, η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (β-HCG) ή η α-εμβρυϊκή σφαιρίνη (AFP) είναι δυνατόν να βρεθούν αυξημένες σε μερικούς ασθενείς (<20%). Το σύνολο των στοιχείων αυτού του συνδρόμου απαντάται σε λίγους ασθενείς.

➤ Μεμονωμένη λεμφαδενική μετάσταση μασχάλης σε γυναίκες

Η υποομάδα αυτή χαρακτηρίζει κυρίως γυναίκες διάμεσης ηλικίας 52 ετών. Αν και η κλινική συνδρομή ανάγει τη διαφοροδιαγνωστική σκέψη σε καρκίνο του μαστού, σε μικρό ποσοστό των γυναικών αυτών (0,3%) διαγιγνώσκεται σε δεύτερο χρόνο πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού. Ιστολογικά πρόκειται συνήθως για αδενοκαρκίνωμα με υπερέκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων ή προγεστερόνης στο

20 έως 30% των περιπτώσεων [43]. Η μαστογραφία και το υπερηχογράφημα μαστού συστήνονται για τη διαγνωστική διερεύνηση αυτών των ασθενών ΚΑΠΕ αλλά αποτελούν απεικονιστικές μεθόδους με πτωχή ευαισθησία για τη συγκεκριμένη κατηγορία των ασθενών [44]. Η εξέταση μαγνητικού συντονισμού του μαστού (MRI) ενδεχόμενα πλεονεκτεί στη διαγνωστική ικανότητα προσδιορισμού της αρχικής εντόπισης σε μερικούς από αυτούς τους ασθενείς [44, 45]. Οι ασθενείς αυτής της υποομάδας αντιμετωπίζονται σύμφωνα με τις κατευθυντήριες θεραπευτικές οδηγίες για τον καρκίνο του μαστού σταδίου III με ικανοποιητικό ποσοστό επιβίωσης (5 έτη) [46]. Άντρες ασθενείς της ίδιας ομάδας έχουν χειρότερη πρόγνωση [47].

➤ **Λεμφαδενικές μεταστάσεις τραχήλου**

Λεμφαδενικές τραχηλικές μεταστάσεις από το κλινικά μη ανιχνεύσιμο αρχικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων αποτελούν το 1-2% των κακοηθειών της περιοχής της κεφαλής τραχήλου. Με την τοπικοπεριοχική θεραπεία, αυτοί οι ασθενείς, μπορούν να επιτύχουν μια ιδιαίτερα μακρά επιβίωση [48]. Οι ασθενείς με υπερκλείδια λεμφαδενόπαθεια ιστολογικά έχουν είτε πλακώδη είτε αδιαφοροποίητα καρκινώματα και παρουσιάζουν χειρότερη πρόγνωση. Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET), είναι χρήσιμη λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας της για τον εντοπισμό ενός αρχικού όγκου στην περιοχή της κεφαλής τραχήλου [49, 50].

➤ **Μεμονωμένη βουβωνική λεμφαδενική εντόπιση**

Ασθενείς με μεμονωμένη βουβωνική λεμφαδενική εντόπιση, αποτελούν μια λιγότερο συχνή υποομάδα, με πιο κοινό ιστολογικό τύπο αυτό του αδιαφοροποίητου καρκινώματος. Επίσης μπορούν να διαγνωστούν πλακώδη καρκινώματα ή μικτά αδενόπλακώδη καρκινώματα. Η κλινική εξέταση της ορθοπρωκτικής περιοχής, του πέους, λεπτομερής γυναικολογική εξέταση και πιθανώς κυστεοσκόπηση είναι απαραίτητες διαγνωστικές εξετάσεις για αυτούς τους ασθενείς. Τα λεμφώματα και τα μεταστατικά ή αμελανωτικά μελανώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας πρέπει επίσης να αποκλειστούν [51, 52].

c) Το μεταστατικό ΚΑΠΕ περιτοναϊκής κοιλότητας

Συνήθως πρόκειται για γυναίκες ασθενείς με διάμεση ηλικία τα 60 έτη, οι οποίες παρουσιάζονται με ασκίτη και περιτοναϊκές μάζες, χωρίς να διαπιστώνεται πρωτοπαθής όγκος στις ωοθήκες. Αυτό το σύνδρομο έχει ονομαστεί επίσης «πολυεστιακό εξωωθηκικό καρκίνωμα ή περιτοναϊκό ορώδες θηλώδες καρκίνωμα». Σήμερα πλέον αναγνωρίζεται ως ξεχωριστή κλινικοπαθολογοανατομική οντότητα και ονομάζεται πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα περιτοναίου [53].

Η διάγνωση απαιτεί ερευνητική λαπαροτομία ή λαπαροσκόπηση. Οι βιοψίες από τις περιτοναϊκές εμφυτεύσεις ταξινομούνται ιστολογικά ως ορώδες θηλώδες αδενοκαρκίνωμα, με ή χωρίς ψαμμώδη σωμάτια. Τα επίπεδα του αντίγονου Ca 125 στον ορό είναι συνήθως αυξημένα. Τα ποσοστά απάντησης στη χημειοθεραπεία και η επιβίωση είναι παρόμοια με αυτά του καρκίνου ωοθηκών σταδίου III κατά FIGO. Στη διαφορική διάγνωση περιλαμβάνονται το μεσοθηλίωμα του περιτοναίου, το ψευδομύξωμα του περιτοναίου και ο κακοήθης ασκίτης που αναπτύσσεται από όγκους του γαστρεντερικού σωλήνα ή άλλων οργάνων [54, 55].

➤ **Μη ορώδες θηλώδες αδενοκαρκίνωμα περιτοναίου**

Μερικοί ασθενείς διαγιγνώσκονται με μη ορώδεις-θηλώδεις όγκους κοιλίας και μπορεί να απαντηθούν και στα δύο φύλα. Στις περιπτώσεις που πρόκειται για βλεννοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα με παρουσία κυττάρων δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, πρέπει να διερευνάται η πιθανότητα προέλευσης από το γαστρεντερικό σύστημα. Οι όγκοι σε αυτούς τους ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία όπως τα ορώδη θηλώδη αδενοκαρκινώματα του περιτοναίου και η πρόγνωση είναι πολύ πτωχή [56].

d) Μεταστατικό ΚΑΠΕ στους πνεύμονες

➤ **Παρεγγυματικές πνευμονικές μεταστάσεις**

Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζονται με πολλαπλές αμφοτερόπλευρες πνευμονικές μεταστάσεις και την ιστολογική διάγνωση του αδενοκαρκινώματος οποιουδήποτε βαθμού διαφοροποίησης. Η πρόγνωση είναι πτωχή για τους περισσότερους ασθενείς. Οι νέοι άντρες ασθενείς με πιθανό εξωγοναδικό όγκο πρέπει να αποκλειστούν προσεκτικά από αυτή την ομάδα ασθενών [26, 39].

➤ **Μεμονωμένη κακοήθης πλευριτική συλλογή**

Σε μικρή ομάδα ασθενών μπορεί η κακοήθης πλευριτική συλλογή να αποτελεί τη μόνη διαπιστωμένη μεταστατική εστία. Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο κύριος ιστολογικός τύπος, ενώ οι πρωτοπαθείς εστίες από τον πνεύμονα, το μαστό ή την ωθήκη πρέπει να αποκλειστούν. Το μεσοθηλίωμα συμπεριλαμβάνεται επίσης στη διαφορική διάγνωση. Η πρόγνωση και αυτού του υποσυνόλου είναι πτωχή [26, 39].

e) **Μεταστατικό ΚΑΠΕ οστών**

Μικρό ποσοστό ασθενών με ΚΑΠΕ προσέρχονται με συμπτώματα από τις οστικές μεταστάσεις οι οποίες είναι συνήθως πολλαπλές. Το αδενοκαρκίνωμα είναι η συχνότερη ιστολογική διάγνωση. Ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος του μαστού πρέπει να αποκλειστούν σε άνδρες και γυναίκες ασθενείς αντίστοιχα [26, 57, 58].

f) **Το μεταστατικό ΚΑΠΕ κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ)**

Στο 15% του συνόλου των ασθενών που παρουσιάζονται με μεταστάσεις στο ΚΝΣ δεν θα προσδιορισθεί σαφής πρωτοπαθής εντόπιση παρά την ενδελεχή έρευνα. Στους ασθενείς αυτούς η νευρολογική σημειολογία προεξάρχει των συμπτωμάτων. Ιστολογικά κυριαρχούν τα μεταστατικά αδενοκαρκινώματα και τα πλακώδη

καρκινώματα. Οι ασθενείς με μονήρη μεταστατική εστία έχουν καλύτερη επιβίωση εφόσον αυτή είναι δυναμικά χειρουργικά εξαιρέσιμη [59, 60].

g) Τα μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες

Τα μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα νεοπλασιών. Τρεις διαφορετικές κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες νευροενδοκρινών όγκων έχουν περιγραφεί. Η πρώτη υποομάδα περιλαμβάνει τα χαμηλής κακοήθειας νευροενδοκρινικά καρκινώματα που προσβάλλουν συνήθως το ήπαρ και μερικές φορές συνδέονται με συμπτώματα από την έκκριση των αγγειοδραστικών πεπτιδίων. Η δεύτερη υποομάδα περιλαμβάνει το αναπλαστικό καρκίνωμα από μικρού μεγέθους κύτταρα, με μια ιστολογική εμφάνιση και μια κλινική συμπεριφορά που είναι παρόμοια με το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ή το εξωπνευμονικό μικροκυτταρικό καρκίνωμα. Η τρίτη υποομάδα αντιπροσωπεύει τα χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινείς χαρακτήρες που ανοσοϊστοχημικά προσδιορίζεται από την έκφραση χρωμογρανίνης, συναπτοφυσίνης και άλλων νευροενδοκρινικών δεικτών. Μερικοί από αυτούς τους ασθενείς μπορούν να παρουσιάζουν κλινική εικόνα που προσομοιάζει με εκείνη του εξωγοναδικού συνδρόμου [61, 62].

h) Κακόηθες μεταστατικό μελάνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας

Η διάγνωση του μεταστατικού μελανώματος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας, υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύει το 2-6% των περιπτώσεων μελανώματος. Το 10-15% από αυτές τις περιπτώσεις είναι αμελανωτικά μελάνωμα [63]. Παρά την έκφραση διαφορετικών απόψεων στη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η κλινική πορεία των ασθενών με μελάνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας είναι παρόμοια με αυτή των ασθενών με το πρωτοπαθές μελάνωμα δέρματος, όταν συγκρίνονται για το ίδιο κλινικό στάδιο της νόσου [64, 65].

1.1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΠΕΛΑΣΗ

Η ιστοπαθολογική ανασκόπηση αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της διαγνωστικής πρακτικής στην περίπτωση μεταστατικού καρκινώματος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας. Σε πρακτικό επίπεδο και πάνω σ'αυτή τη λογική θα πρέπει να λεχθεί ότι σε περίπτωση ανεπαρκούς ή ακαταλλήλου βιοπτικού υλικού η επανάληψη της βιοψίας είναι προτιμότερη από κάθε άλλη διαγνωστική διαδικασία.

Εξ ορισμού, η συμβατική απλή μικροσκόπηση με τις συνήθεις χρώσεις ρουτίνας δεν είναι σε θέση να προσδιορίσει την πρωτοπαθή εστία της νεοπλασίας στα ΚΑΠΕ [66] και πολύ περισσότερο, αδυνατεί να προσδιορίσει ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά πρόβλεψης πιθανής ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία [67]. Κάποια κυτταρομορφολογικά χαρακτηριστικά μπορούν μερικές φορές να κατευθύνουν τη διάγνωση, όπως π.χ. η θηλώδης διαμόρφωση προς καρκίνωμα των ωοθηκών, τα κύτταρα με διαμόρφωση σφραγιστήρος δακτυλίου προς καρκίνωμα του στομάχου, τα διαυγή κύτταρα προς καρκίνο του νεφρού και η παρουσία κολλοειδούς προς καρκίνο του θυρεοειδούς. Εντούτοις, τα παραπάνω μορφολογικά στοιχεία δεν έχουν αποδειχθεί επαρκή για την ασφαλή στήριξη της διάγνωσης της πρωτοπαθούς εστίας στην περίπτωση των ΚΑΠΕ. Εξάλλου έχει αποδειχθεί ότι ο προσδιορισμός ακόμη και γνωστής πρωτοπαθούς εστίας δεν είναι εφικτός με την συμβατική απλή μικροσκόπηση βιοπτικού υλικού από μεταστική εστία στις μισές περίπου των περιπτώσεων [68]. Επιπρόσθετα θα πρέπει να τονισθεί ότι η ιστοπαθολογική εικόνα της μετάστασης είναι δυνατόν να είναι διαφορετική από αυτήν της πρωτοπαθούς εστίας [69].

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί το βασικό διαφοροδιαγνωστικό εργαλείο ιδιαίτερα στις περιπτώσεις ΚΑΠΕ πτωχής διαφοροποίησης [70, 71]. Η εφαρμογή μεθόδων ανοσοϊστοχημείας γίνεται με τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντιωρών σε βιοπτικά υλικά μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη [72, 73]. Η ανίχνευση διαφόρων επιφανειακών ή κυτταροπλασματικών αντιγόνων επιτρέπει τη διαφορική διάγνωση των ΚΑΠΕ από άλλης ιστογενετικής προέλευσης

νεοπλάσματα αλλά και τον καθορισμό, σε ορισμένες περιπτώσεις, της πιθανής πρωτοπαθούς εστίας καρκινωμάτων (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες χρήσιμοι στη διαγνωστική προσέγγιση των ΚΑΠΕ

Ειδικότητα (Τύπος όγκου)	Αντιοροί
Καρκίνωμα	Κυτοκερατίνη, EMA
Λέμφωμα	CLA, EMA (±)
Σάρκωμα	Βιμεντίνη, Δεσμίνη, FVIII:RAg
Μελάνωμα	S-100, HMB-45, Βιμεντίνη, NSE
Νευροενδοκρινείς όγκοι	NSE, Χρωμογρανίνη, Συναπτοφυσίνη, Κυτοκερατίνη, EMA
Όγκοι από γεννητικά κύτταρα	Κυτοκερατίνη, EMA, HCG, AFP
Καρκίνωμα προστάτου	PSA, Κυτοκερατίνη, EMA
Καρκίνωμα θυρεοειδούς	Θυρεοσφαιρίνη, Κυτοκερατίνη, EMA, Καλσιτονίνη

Συντμ. AFP = α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη, CLA = Κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο, EMA = επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο, HCG = ανθρώπιος χορειακή γοναδοτροπίνη, NSE = ειδική νευρονική ενολάση, PSA = ειδικό προστατικό αντιγόνο, FVIII:RAg = Αντιγόνο σχετιζόμενο με τον παράγοντα VIII, S-100 = Πρωτεΐνη S-100

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της συνδυασμένης ανίχνευσης διαφόρων τύπων κυτταροκερατινών λόγω σχετικής ειδικότητάς τους σε επιμέρους καρκινώματα, όπως του CK20 σε όγκους του γαστρεντερικού, βλεννώδη καρκινώματα ωοθήκης και καρκινώματα από μεταβατικό επιθήλιο και του CK7 στον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονος. Μελέτες υποστηρίζουν ότι συγκεκριμένα πρότυπα συνδυασμένης έκφρασης διαφόρων κυτταροκερατινών παρουσιάζουν ευαισθησία κατάδειξης της πρωτοπαθούς εστίας της τάξης του 80% (Πίνακας 4) [74].

Πίνακας 4: Συνδυασμένη έκφραση διαφόρων κυτοκερατινών (ανοσοφαινότυποι) σε αδενοκαρκινώματα επιμέρους οργάνων

Όργανο	Κυτοκερατίνες
Έντερο	CK7-/CK20+
Στομάχι	CK7-/CK20+, CK7+/CK20+
Χοληφόρα	CK7+/CK20-, CK7+/CK20+
Πάγκρεας	CK7+/CK20-, CK7+/CK20+
Πνεύμονας	CK7+/CK20-
Ωοθήκες (μη βλεννώδη)	CK7+/CK20-
Ωοθήκες (βλεννώδη)	CK7-/CK20+, CK7+/CK20+
Μαστός	CK7+/CK20-
Ουροθήλιο	CK7+/CK20+
Ενδομήτριο	CK7+/CK20-
Προστάτης	CK7-/CK20-
Νεφρός	CK7-/CK20-
Ήπαρ	CK7-/CK20-

Ταυτοχρόνως, τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης (expression profile), με μικροσυστοιχίες DNA αποτελούν ένα επιπλέον ισχυρό εργαλείο στην κατεύθυνση της ταυτοποίησης της πρωτοπαθούς εστίας.

Μοριακές και κυτταρογενετικές μελέτες μπορούν σήμερα να προσφέρουν επιπρόσθετη διαγνωστική βοήθεια ταυτοποίησης όγκων, οι οποίοι μπορεί να εκδηλωθούν κλινικά ως αδιαφοροποίητα ΚΑΠΕ και για τους οποίους έχουν αναγνωρισθεί μοριακοί και κυτταρογενετικοί δείκτες [75-78]. Σε αντίθεση με τις αιματολογικές νόσους, οι τεκμηριωμένα σταθερές ειδικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε συμπαγείς όγκους είναι μάλλον περιορισμένες [79]. Τέτοιες είναι η αντιμετάθεση t(11,22) στους στρογγυλο-μικροκυτταρικούς όγκους Ewing/PNET [80, 81] και η ισοχρωμοσωμία i12p σε μεγάλο ποσοστό βλαστικοκυτταρικών γοναδικών όγκων [77, 82]. Ιδιαίτερα σημαντική είναι μάλιστα η προσφορά του *in situ* υβριδισμού για την ανίχνευση της ισοχρωμίας i(12p) στην περίπτωση των εξωγοναδικών όγκων από βλαστικά κύτταρα (germ cell), που εκδηλώνονται κλινικά σαν μεταστατικά καρκινώματα πτωχής διαφοροποίησης, επειδή ούτε ιστοπαθολογική τεχνική ικανή να

τα διαγνώσει προσφέρεται ούτε εκφράζουν αυξημένα επίπεδα των ειδικών ορολογικών καρκινικών δεικτών των γοναδικών όγκων AFP και hCG [83].

Η μοριακή-γενετική ανάλυση μπορεί επίσης να φανεί χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στην περίπτωση αδιαφοροποίητων στρογγυλοκυτταρικών όγκων, καθώς μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση ενός νευροεπιθηλιακού όγκου t(11,22), ραβδομυοσαρκώματος t(2,13), ορογονίου σαρκώματος t(x,18) και λεμφωμάτων t(8,14)-(14,18)-(11,14) [75]. Τέλος ανίχνευση του γενώματος EBV με τη μέθοδο της ανάστροφης τρανσκριπτάσης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR) υποστηρίζεται ότι μπορεί να βοηθήσει τη διαφοροδιάγνωση αδιαφοροποίητων καρκινωμάτων του ρινοφάρυγγος από αποδιαφοροποιημένους επιδερμοειδείς όγκους [84].

Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση μπορεί να βοηθήσει περαιτέρω τη διάγνωση σε 15% των περιπτώσεων ΚΑΠΕ πτωχής διαφοροποίησης, που δε μπορούν να ταυτοποιηθούν με τις συμβατικές παθολογοανατομικές τεχνικές, προσφέροντας διαγνωστική ακρίβεια στο 1/3 αυτών των περιπτώσεων [85]. Πιο ειδικά, αποτελεί ιδιαίτερα αξιόπιστη διαγνωστική μέθοδο για τη διάγνωση νευροενδοκρινών όγκων (νευροενδοκρινικά κοκκία πυκνού πυρήνα), μελανωμάτων (προμελανοσώματα) και αδιαφοροποίητων σαρκωμάτων [72]. Αντίθετα δε φαίνεται ότι μπορεί να προσφέρει σημαντικά στον καθορισμό της πρωτοπαθούς εστίας των αδενοκαρκινωμάτων και των επιδερμοειδών καρκινωμάτων παρότι μπορεί να τα διακρίνει ως ιστοπαθολογικούς τύπους, όταν εκδηλώνονται σαν αποδιαφοροποιημένα καρκινώματα [62, 86].

Ο έλεγχος διαλυτών καρκινικών δεικτών στον ορό των ασθενών με ΚΑΠΕ έχει περιορισμένη κλινική σημασία αναφορικά με τη διάγνωση της πρωτοπαθούς εστίας αλλά και την πρόγνωση της νόσου. Ποικίλοι παράγοντες φαίνεται ότι επηρεάζουν τη σχέση μεταξύ νεοπλασματικής μάζας και συγκέντρωσης του δείκτη στον ορό και κυρίως οι λειτουργίες της παραγωγής, έκκρισης και κάθαρσης [87, 88, 89], ενώ η συσχέτιση της έκφρασης διαφόρων καρκινικών δεικτών στον ιστό και τον ορό αίματος των ασθενών έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι πάντα ιδιαίτερα ισχυρή [90]. Θεραπευτικές ουσίες, όπως η ιντερφερόνη, κορτικοστεροειδή και κυτταροτοξικά φάρμακα, μπορούν να τροποποιήσουν το ρυθμό σύνθεσης και κυτταρικής απέκκρισης, ενώ ακόμη υποστηρίζεται ότι τα κυτταροτοξικά φάρμακα μπορούν περιπτώσιακά να προκαλέσουν

πρόσκαιρη αύξηση του δείκτη μέσω της προκαλούμενης ογκόλυσης [91]. Σε μελέτη αξιολόγησης έξι χρησιμοποιούμενων στην κλινική πράξη καρκινικών δεικτών (CEA, Ca 15-3, Ca 19-9, Ca 125, β-HCG και AFP) διαπιστώθηκε πολλαπλή μη ειδική έκφραση στην πλειονότητα των ασθενών, το 70% των οποίων είχαν άνω των τριών δεικτών με παθολογικά αυξημένες τιμές ενώ δε διαπιστώθηκε συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους [92]. Παρά την απουσία κλινικής σημασίας των καρκινικών δεικτών ορού σε ασθενείς με διαγνωσμένο ΚΑΠΕ, συνιστάται η εκτίμηση των PSA και β-HCG ορού στους άνδρες κατά την αρχική εργαστηριακή διερεύνηση προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα άτυπης κλινικής εκδήλωσης εξωγοναδικού όγκου που αποτελεί δυνητικά ιάσιμη νόσο και καρκίνου προστάτη που αντιμετωπίζεται με ορμονικούς χειρισμούς [93, 94].

Σήμερα υπό το φως των γνώσεων της μοριακής γενετικής του καρκίνου, η πολυσταδιακή πρόοδος του κακοήθους μετασχηματισμού των καρκινικών κυττάρων αποδίδεται σε παρεκτραπείσα σήμανση (aberrant signaling) των λειτουργιών πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και θανάτου των κυττάρων μέσω της ανώμαλης έκφρασης συνδυασμού ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων [95]. Έχει αναγνωρισθεί ποικιλία ογκογονιδίων τα οποία εκφράζουν συμπεριφορά αυξητικών παραγόντων και τα οποία λειτουργούν με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο. Από αυτά, άλλα κωδικοποιούν πολυπεπίδια (επιδερμικός, ινοβλαστικός και παραγόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγων), άλλα ολιγοπεπίδια (βομβεσίνη), και άλλα κωδικοποιούν ορμονοστεροειδικούς παράγοντες (οιστρογόνα, ανδρογόνα και ρετινοειδή) [96]. Οι αυξητικοί παράγοντες συνδέονται με ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς και πυροδοτούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι περισσότεροι από τους ογκογονιδιακούς υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ανήκουν σε μία από τις οκτώ κατηγορίες των διαμεμβρανικών υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης με κύρια ομάδα την οικογένεια c-erbB1 (cerbB-1/EGFR, c-erbB-2/HER-2 και c-erbB-3).

Για την εξέλιξη της μεταστατικής διαδικασίας η αγγειογένεση και η πρωτεόλυση αποτελούν δύο καθοριστικά βήματα. Η αγγειογένεση, ο σχηματισμός νέων αγγείων, είναι ουσιαστική διαδικασία για την αύξηση των περισσότερων όγκων τόσο κατά το αρχικό τους στάδιο, αλλά και κατά το στάδιο της ανάπτυξης των μεταστάσεων σε απομακρυσμένες περιοχές του οργανισμού. Η αγγειογένεση προκύπτει από διαταραχή της ισορροπίας προαγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων με υπεροχή

των πρώτων, ως απάντηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και του παρακείμενου στρώματος στα ερεθίσματα που προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα. Από τα πιο μελετημένα μόρια που εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης είναι και ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου (VEGF) και η θρομβοσποντίνη-1 (TSP-1), ενώ ποσοτικά η αγγειογένεση εκτιμάται με τη μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας [97].

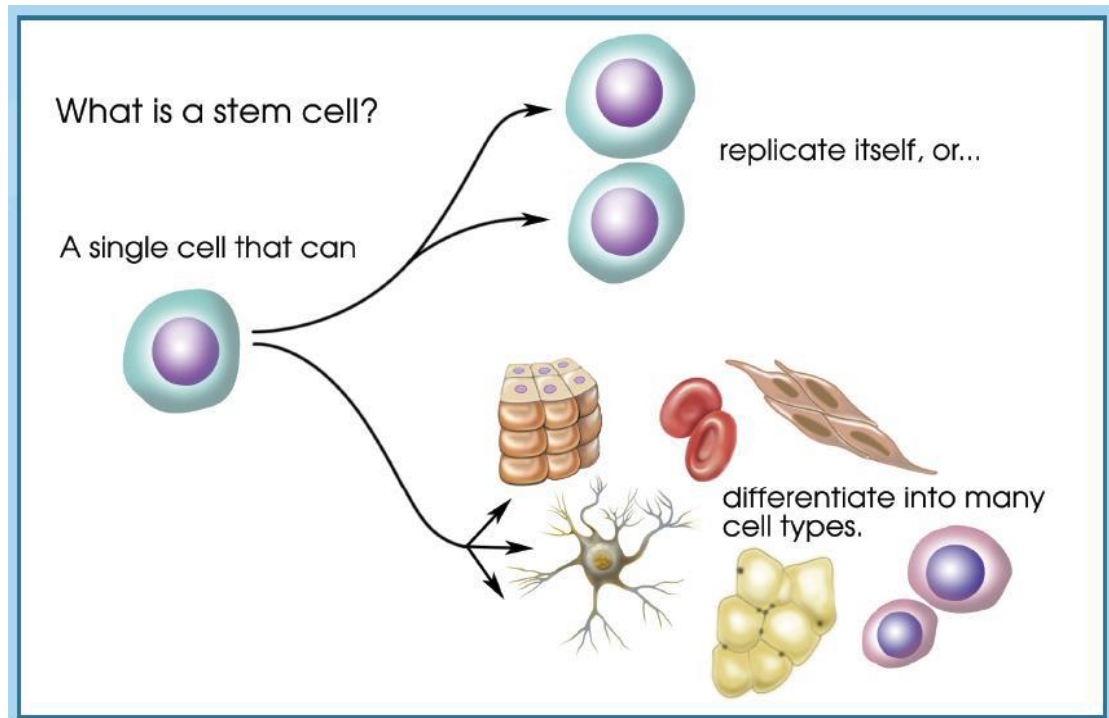
Η μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων εξαρτάται από τη δυνατότητά τους να διέρχονται από διαδοχικές βασικές μεμβράνες, οι οποίες διαδραματίζουν το ρόλο φραγμού. Κεντρικό ρόλο στη διάσπαση των μεμβρανών και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων κατέχουν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP), μια μεγάλη οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων [98, 99]. Από την άλλη οι αναστολείς των MMP, TIMP, φάνηκε να έχουν διπλό ρόλο στη μετάσταση των όγκων, τόσο αναστέλλοντας, όσο και προάγοντάς την, ανάλογα με τις συνθήκες του ιστικού μικροπεριβάλλοντος [100]. Οι διαδικασίες της αγγειογένεσης και της πρωτεόλυσης είναι συζευγμένες και εξαρτώνται από κοινούς ρυθμιστικούς παράγοντες [101].

Η συνέκφραση διαφόρων μελών της οικογένειας των MMP με τους αναστολείς τους φαίνεται να είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών καρκινωμάτων [72/100]. Η συνέκφραση των MMP-2 και 9 με τον TIMP-1, έχει παρατηρηθεί σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΚΑΠΕ [102]. Ωστόσο, δε διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των MMP με τον TIMP-1. Αυτό, ενδεχομένως ερμηνεύεται από το γεγονός ότι ο TIMP-1 είναι ένας μη ειδικός αναστολέας, αναστέλλοντας παράλληλα τη δράση πολλαπλών μελών της οικογένειας των MMP [103, 104]. Επιπλέον, υπάρχουν ισχυρά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι TIMP έχουν πολυπαραγοντική δράση, με ιδιότητες όχι μόνο ανασταλτικές αλλά και ευοδωτικές των μεταστατικών διεγέρσεων [105].

2. ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ (STEM ΚΥΤΤΑΡΑ)

Οι εξελίξεις στη βιολογία των βλαστοκυττάρων, συμβάλλουν στην κατανόηση των μηχανισμών οργανογένεσης, καρκινογένεσης, αλλά και στο σχεδιασμό βλαστικών κυττάρων ως θεραπευτικό μέσο για την επιτάχυνση της ιστικής επιδιόρθωσης.

Τα βλαστικά (stem) κύτταρα δύνανται να αυτοανανεώνονται και είναι πολυδύναμα (self-renewal), υπό την έννοια δυναμικής διαφοροποίησης που καταλήγει σε παραγωγή διαφορετικού τύπου απογόνων (pluripotent κύτταρα) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Τα stem κύτταρα χαρακτηρίζονται από ικανότητα απεριόριστης αυτοανανέωσης (self-renewal) και δυναμική για διαφοροποίηση προς διαφορετικούς τύπους κυττάρων.

Διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων, καλείται η διαδικασία κατά την οποία τα μη-εξειδικευμένα βλαστοκύτταρα, εξειδικεύονται σταδιακά. Η ρύθμισή της προϋποθέτει ένα σύνθετο ρυθμιστικό δίκτυο εσωτερικού προγραμματισμού, μέσω γονιδίων, αλλά και εξωτερική σηματοδότηση μέσω ουσιών που εκκρίνονται από άλλα κύτταρα, από τη φυσική επαφή με γειτονικά κύτταρα και από μόρια του μικροπεριβάλλοντος. Οι αλληλεπιδράσεις αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών, σηματοδοτούν την απόκτηση επιγενετικών δεικτών πάνω στο κυτταρικό DNA, που περιορίζουν την κυτταρική του έκφραση και δύνανται να μεταδοθούν και στην επόμενη γενιά [106].

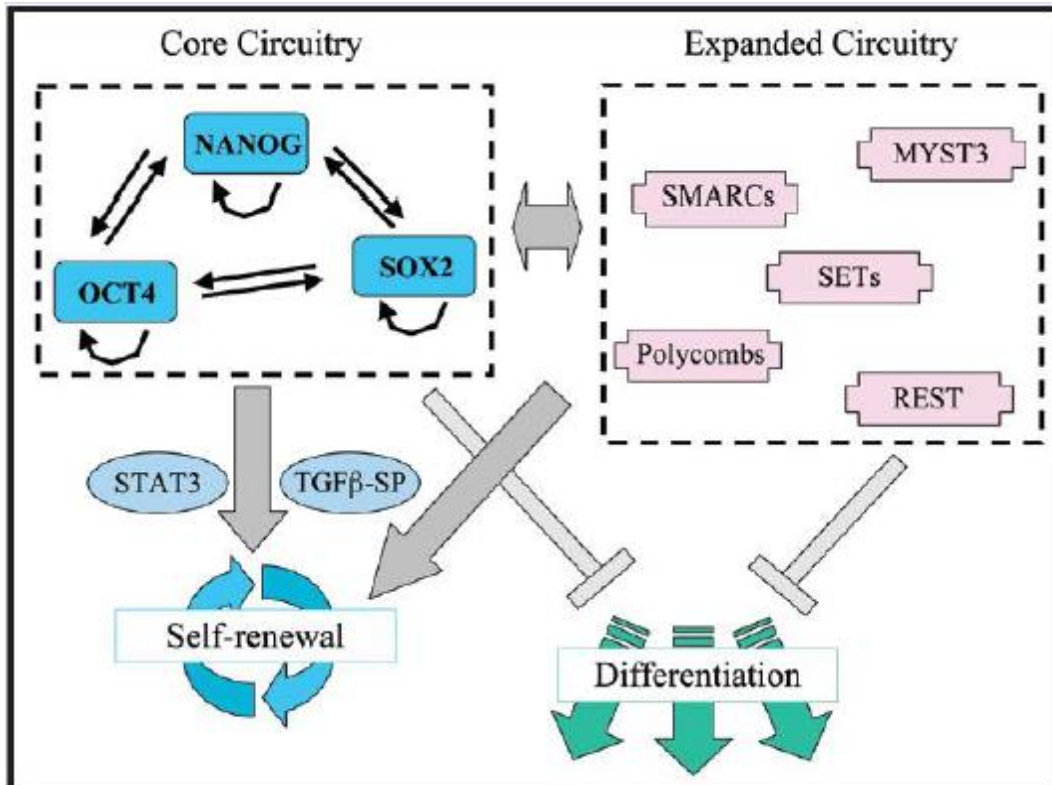
Κατά την οργανογένεση των θηλαστικών, από το γονιμοποιημένο ωάριο, δημιουργείται ένας σύνθετος οργανισμός με 200 διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Αυτό το αναπτυξιακό δυναμικό προέρχεται από την ικανότητα των πρώιμων

εμβρυικών stem κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε όλες τις κυτταρικές σειρές συμπεριλαμβανομένων και των germ σειρών [107].

Ως totipotency (ολοδυναμικότητα), ορίζεται η ικανότητα δημιουργίας ολόκληρου οργανισμού συμπεριλαμβανομένων και του εμβρυικού ιστού και του πλακούντα. Μόνο το γονιμοποιημένο ωάριο (ζυγωτό) και οι απόγονοι των δύο πρώτων διαιρέσεων είναι totipotent (παντοδύναμα), είναι δηλαδή ικανά να σχηματίσουν το έμβρυο καθώς και εξωεμβρυικούς ιστούς (τροφοβλάστη). Μετά από τέσσερις περίπου ημέρες τα totipotent κύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται σχηματίζοντας τη βλαστοκύστη και μια ομάδα κυττάρων που ονομάζεται εσωτερική μάζα κυττάρων ICM (Inner Cell Mass) από όπου και αναπτύσσεται το έμβρυο. Τα κύτταρα της εσωτερικής στοιβάδας, δεν είναι ολοδύναμα πλέον αλλά πολυδύναμα (pluripotent). Τα pluripotent βλαστοκύτταρα προέρχονται λοιπόν από τα totipotent μετά από πάροδο λίγων ημερών. Διαχωρίζονται στα εμβρυικά βλαστοκύτταρα και στα εμβρυικά γεννητικά (germ stem) κύτταρα. Με την πρόοδο της εμβρυικής ανάπτυξης μετατρέπονται σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο απολύνοντας το απεριόριστο δυναμικό διαφοροποίησής τους [108]. Τα βλαστοκύτταρα εδρεύουν σε διάφορους ιστούς και όργανα και συμμετέχουν στην ομοίωση αναγεννώντας ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη.

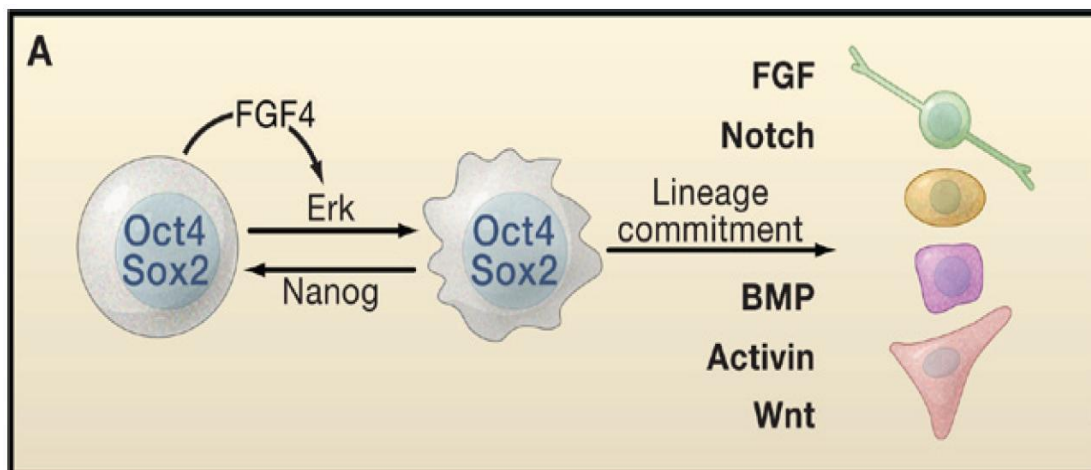
2.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΔΙΕΠΟΥΝ ΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα stem κύτταρα συνεχίζουν να αυτοανανεώνονται υπό την επίδραση ενός αυτορυθμιζόμενου δικτύου μεταγραφικών παραγόντων που εμποδίζει τη διαφοροποίηση και προάγει τον πολλαπλασιασμό καθώς και εξαιτίας επιγενετικών διαδικασιών που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του ίδιου δικτύου μεταγραφικών παραγόντων (Εικόνα 2) [109, 110].



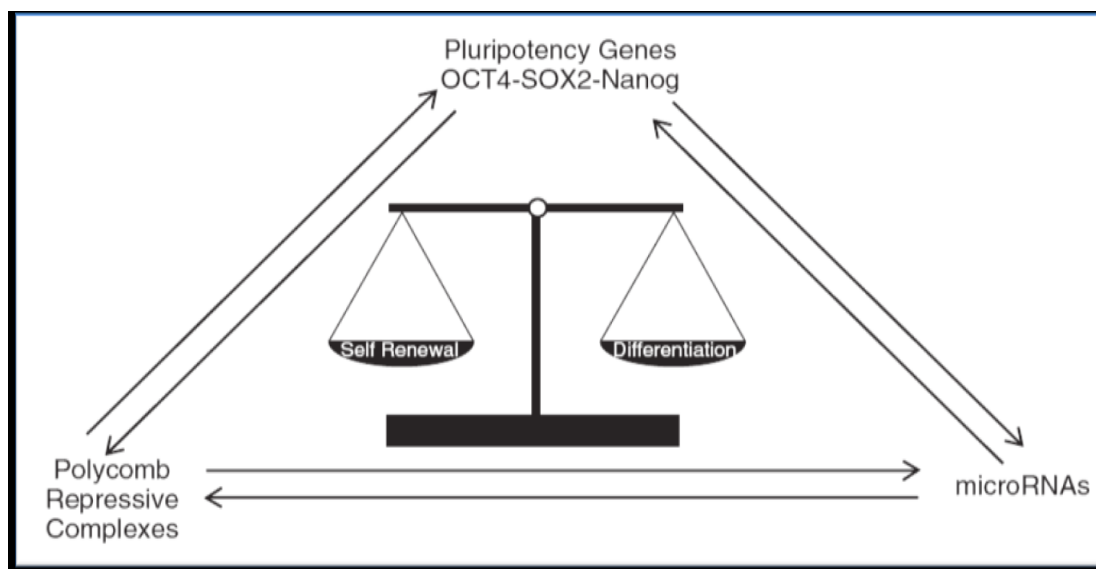
Εικόνα 2: Δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχει την αυτοανανέωση και διαφοροποίηση των εμβρυικών stem κυττάρων. Τα εμβρυικά stem κύτταρα συνεχίζουν να αυτοανανεώνονται υπό την επίδραση ενός αυτορυθμιζόμενου δικτύου μεταγραφικών παραγόντων, που εμποδίζει τη διαφοροποίηση και προάγει τον πολλαπλασιασμό καθώς, και εξαιτίας επιγενετικών διαδικασιών, που ενδεχομένως ελέγχονται από τους ίδιους μεταγραφικούς παραγόντες [109, 110].

Σημαντικές ενδείξεις εισηγούνται ότι η τριάδα των μεταγραφικών παραγόντων OCT4, SOX2, και Nanog διέπουν την πολυδυναμία των stem κυττάρων *in vivo* και *in vitro* (Εικόνα 3) [111].



Εικόνα 3: Η τριάδα των μεταγραφικών παραγόντων OCT4, SOX2, και Nanog διέπουν την πολυδυναμία των stem κυττάρων in vivo και in vitro.

Ρυθμιστή της αυτοανανέωσης των stem κυττάρων αποτελεί η Polycomb group protein οικογένεια (PcG) (Εικόνα 4) [112].



Εικόνα 4: Τα δίκτυα των ρυθμιστικών παραγόντων που διέπουν την πολυδυναμία και διαφοροποίηση των stem κυττάρων, περιλαμβάνουν την κυκλική ρυθμιστική σηματοδότηση των μεταγραφικών παραγόντων Nanog, OCT4 και SOX2, καθώς και της ομάδας polycomb που καταστέλει τη χρωματίνη, και τα microRNAs των stem κυττάρων [113].

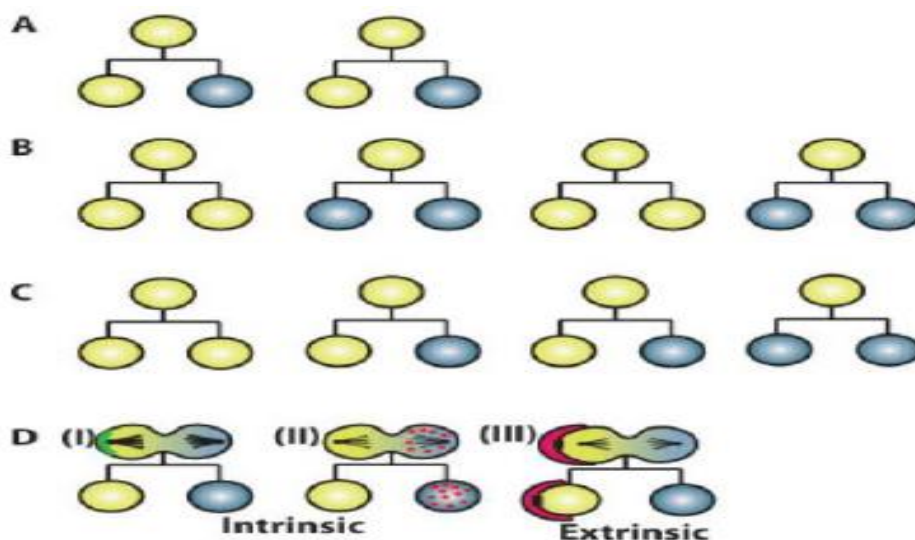
2.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ STEM ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Με βάση το βραδύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού πολλών stem κυττάρων συγκριτικά με τα υπόλοιπα κύτταρα, αναπτύχθηκε μια τεχνική ταυτοποίησής τους. Τα stem κύτταρα αναγνωρίζονται ως κύτταρα που κατακρατούν τη χρωστική tritiated thymidine ή bromodeoxyuridine (BrdU) και ονομάζονται Label – Retaining Cells (LRCs). Στα ταχύτερα πολλαπλασιαζόμενα TACs, η χρωστική αραιώνεται περισσότερο με τους διαδοχικούς κυτταρικούς κύκλους καθώς περνά στα θυγατρικά κύτταρα. Η τεχνική αυτή χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης καθώς έχουν αναγνωρισθεί και πληθυσμοί stem κυττάρων που δε διαιρούνται με βραδύ ρυθμό, όπως τα αιμοποιητικά stem κύτταρα (HSC).

2.3 ΑΥΤΟΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΩΝ STEM ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα stem κύτταρα διαιρούνται συνήθως ασύμμετρα, με αποτέλεσμα τη γένεση ενός θυγατρικού πανομοιότυπου με το αρχικό και ενός πιο δεσμευμένου, για συγκεκριμένη διαφοροποίηση, προγονικού κυττάρου. Το κύτταρο αυτό ονομάζεται Transit Amplifying Cell ή TAC. Τα Transit Amplifying κύτταρα τελικά καθίστανται ανίκανα για πολλαπλασιασμό και μετατρέπονται σε τελικώς διαφοροποιημένα (terminally differentiated TD) κύτταρα [108].

Η συμμετρική διαίρεση των stem κυττάρων παρέχει ένα μηχανισμό αύξησης του πληθυσμού των stem κυττάρων μετά την απώλειά τους. Μπορεί όμως δυνητικά να προκαλέσει και μια μη ελεγχόμενη κλιμάκωση του αριθμού των stem κυττάρων. Εναλλακτικά, η έλλειψη των κατάλληλων σημάτων δύναται να οδηγήσει σε εξάλειψη των stem κυττάρων (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μηχανισμοί διατήρησης του αριθμού των stem κυττάρων.

- A. Όλα τα stem κύτταρα μπορούν να διαιρεθούν ασύμμετρα.**
- B. Ίσοι αριθμοί συμμετρικών διαιρέσεων παράγουν είτε stem κύτταρα, είτε TACs.**
- C. Συνδυασμός συμμετρικών διαιρέσεων και ασύμμετρων διαιρέσεων.**
- D. Εξίσου ενδογενή και εξωγενή σήματα καθορίζουν την πορεία του κυττάρου.**

Stem κύτταρα – κίτρινα, TACs - μπλε [114].

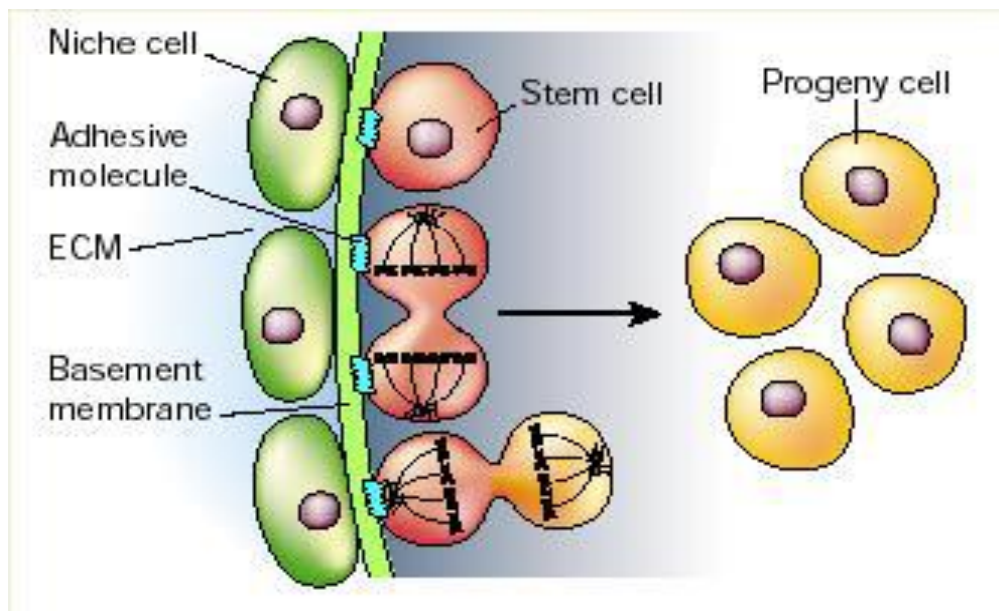
Δύο βασικοί μηχανισμοί διέπουν την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση. Πρόκειται για την ασύμμετρη κατανομή ενδοκυτταρικών σημάτων και τον ασύμμετρο προσανατολισμό και επαφή των θυγατρικών κυττάρων με στοιχεία της φωλεάς ή με εξωγενή σήματα. Σε καλλιέργειες stem κυττάρων η προσθήκη παραγόντων που επάγουν την EMT όπως TGF- β , Snail ή Twist, διατηρεί τα stem κύτταρα σε αδιαφοροποίητη κατάσταση [115].

Σύμφωνα με τη διεθνή κοινότητα κυτταρικής θεραπείας (ISCT – International Society of Cellular therapy), ως μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSC), ορίζονται μόνο όσα τηρούν συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Αυτές αφορούν στην πλαστικότητα και τη διαφοροποίηση, ενώ όταν διατηρούνται σε κυτταρικές καλλιέργειες, πρέπει να μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα και επίσης να

εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD105, CD73, CD90 και όχι τους CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19, HLA – DR [116, 117].

2.4 ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΦΩΛΕΕΣ

Τα σωματικά stem κύτταρα είναι απαραίτητα για την ομοιόσταση και στρατολογούνται μετά από βλάβη, συνεπικουρούμενα από το μικροπεριβάλλον που τα περιβάλλει [118], που παρέχει προστασία και ασκεί ρυθμιστική δράση. Αυτό το μικροπεριβάλλον καλείται φωλεά (stem cell niche), αφορά σε ανατομικά προσδιορισμένο χώρο που έχει αναγνωρισθεί σε πολλούς ιστούς [119] και ρυθμίζει τον αριθμό των stem κυττάρων, τη λειτουργία τους και την προσαρμογή των stem κυττάρων σε συνθήκες πίεσης ή αλλαγών (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Stem cell niche. Είναι απαραίτητη για τη συντήρηση της ταυτότητας του Stem κυττάρου και την αυτό-ανανεωτική του ικανότητα [120].

Φωλεές *in vivo*, έχουν περιγραφεί στη δροσόφιλα, το ωάριο, τον όρχι, το δέρμα των θηλαστικών, το μυελό των οστών και το γαστρεντερικό σύστημα, ενώ έχουν αναφερθεί

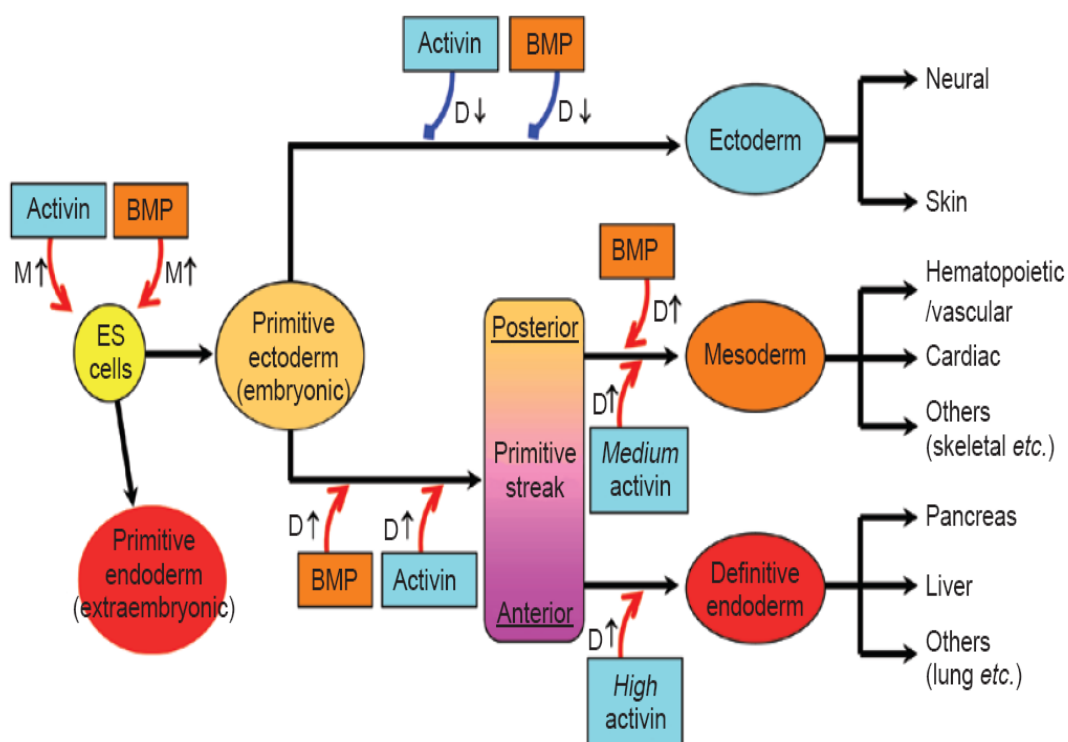
φωλεές και στον ενδοοστικό χώρο [121]. Η αναγνώριση και περιγραφή των φωλεών περιπλέκεται από το γεγονός ότι δεν υπάρχουν κατάλληλοι δείκτες για τη ταυτοποίηση stem κυττάρων.

Η ακριβής τοπογραφική οργάνωση και αρχιτεκτονική των stem κυττάρων σε μια φωλεά, σε συνάρτηση με τα περιβάλλοντα κύτταρα, διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της δεξαμενής των stem κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα αποτρέπει τη διαφοροποίησή τους.

Η πολωμένη προσκόλληση των stem κυττάρων στα υποστηρικτικά κύτταρα της φωλεάς ή στην εξωκυττάρια ουσία, αλλά και η ασύμμετρη ενδοκυττάρια κατανομή, παραγόντων με αναπτυξιακό δυναμικό, συμβάλλει στον προσανατολισμό της διαίρεσης των stem κυττάρων [122].

2.5 ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ OCT4, SOX2 ΚΑΙ NANOG ΤΩΝ STEM ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες εκφράζονται στα πολυδύναμα εμβρυικά stem κύτταρα. Ανωμαλίες στην έκφραση των OCT4 και Nanog οδηγούν σε απώλεια της πολυδυναμίας και εσφαλμένη διαφοροποίηση προς τροφοβλάστη και ενδόδερμα αντίστοιχα [123, 124]. Τα κύτταρα με έλλειψη Nanog, χαρακτηρίζονται από αυξημένη τάση προς διαφοροποίηση, ενώ ο SOX2 συμβάλλει μερικώς στην πολυδυναμία, ρυθμίζοντας τα επίπεδα του OCT4. Συνολικά, οι μεταγραφικοί παράγοντες OCT4, Nanog και SOX2 καθίστανται βασικοί ρυθμιστές του μεταγραφικού κυκλώματος που χαρακτηρίζει το stemness των εμβρυικών stem κυττάρων (Εικόνες 4 και 7) [125].



Εικόνα 7: Συμμετοχή μελών της TGF- β υπερ-οικογένειας στη διαφοροποίηση (κόκκινα βέλη) των εμβρυικών stem κυττάρων και των απογόνων τους και/ή στη διατήρηση μιας αδιαφοροποίητης κατάστασης (μπλε βέλη). Οι BMPs (bone morphogenetic proteins) και οι ακτιβίνες (μέλη της TGF- β υπερ-οικογένειας), επάγουν τη διαφοροποίηση των ιστών που προέρχονται από το μεσόδερμα και το ενδόδερμα, ενώ αναστέλλουν τη διαφοροποίηση του εκτοδέρματος προς νευρικό ιστό και δέρμα [126].

Με τον όρο stemness προσδιορίζεται η γονιδιακή έκφραση των εμβρυικών stem κυττάρων που ρυθμίζεται αυστηρά και περιλαμβάνει ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, ένζυμα τροποποίησης χρωματίνης, ρυθμιστικά RNA μόρια και σηματοδοτικά μονοπάτια. Ρυθμιστή της αυτοανανέωσης των stem κυττάρων αποτελεί η polycomb group protein οικογένεια (PcG) των καταστολέων της μεταγραφής μέσω της αποσιώπησης της χρωματίνης [125].

Ενώ έχει τεκμηριωθεί ότι τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα PcGs αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της διαφοροποίησης των εμβρυικών stem κυττάρων, παραμένουν

αδιευκρίνιστοι οι μηχανισμοί ελέγχου διαφοροποίησης των πολυδύναμων πρόδρομων κυττάρων στους αναπτυσσόμενους ιστούς.

Σημαντική εξέλιξη στο πεδίο των stem κυττάρων αποτέλεσε ο επαναπρογραμματισμός ώριμων ινοβλαστών δέρματος ανθρώπου σε πολυδύναμα Stem κύτταρα (Induced Pluripotent Stem cells – iPS), κατόπιν υπερέκφρασης του κουαρτέτου των μεταγραφικών παραγόντων Oct4, Sox2, Klf4 και c – myc [128]. Η EMT αποτελεί καταλυτικό εναρκτήριο γεγονός κατά την παραγωγή iPS, υποδεικνύοντας αξιοσημείωτες ομοιότητες μεταξύ κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, ανάπτυξης στο έμβρυο και καρκίνου [129].

2.5.1 OCT4

Ο OCT4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας του POU (Pit – Oct – Unc) – domain που εκφράζεται στα εμβρυικά βλαστοκύτταρα, στα πρωταρχικά γεννητικά κύτταρα και στις γονάδες των ενηλίκων. Έχει περιγραφεί στα βλαστοκύτταρα που απομονώθηκαν από τον ομφάλιο λώρο, το μυελό, το θύλακα των τριχών, τους μύες, το δέρμα, το πάγκρεας, το ήπαρ, το αμνιακό υγρό και τα νευρικά βλαστοκύτταρα. Η διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων σχετίζεται με μείωση της έκφρασης του OCT4 [130].

Το γονίδιο POU5F1, αποκωδικοποιεί δύο ισομορφές, το POU5F1_Ia (Oct4A) και το POU5F1_Ib (Oct4B). Τα Oct4A και Oct4B αποτελούνται από 360 και 265 αμινοξέα αντίστοιχα, εκ των οποίων τα 225 αμινοξέα του καρβοτελικού άκρου είναι κοινά. Ο Oct4B βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και ο ρόλος του δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος [131]. Ο Oct4A συναντάται στον πυρήνα και η έκφρασή του σχετίζεται με τη διατήρηση μιας αδιαφοροποίητης κατάστασης στα εμβρυικά κύτταρα. Επιπλέον, η έκφραση του Oct4A, έχει διαγνωστική σημασία σε κακοήθειες γεννητικών κυττάρων (germ cell tumors) [132]. Φυσιολογικά εκφράζεται κατά την εμβρυική ανάπτυξη, ενώ λίγες είναι οι μελέτες σε σωματικούς καρκίνους. Πυρηνική έκφραση απαντάται στον καρκίνο του νεφρού, πνεύμονα, μαστού, ουροδόχου κύστης, ρινοφάρυγγα, στο οστεοσάρκωμα, το ρετινοβλάστωμα και την κίρρωση του ήπατος. Επίσης, εκφράζεται κυτταροπλασματικά στον καρκίνο του προστάτου, στο

ηπατοκυτταρικό και στο καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου της στοματικής κοιλότητας [133, 131].

2.5.2 SOX2

Πρόκειται για σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα των stem κυττάρων που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 39 και κωδικοποιεί μέλη της HMG – domain DNA πρωτεϊνικής οικογένειας. Οι μεταγραφικοί παράγοντες SOX είναι απαραίτητοι για την εμβρυική ανάπτυξη και ενέχονται στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό.

Οι SOX πρωτεΐνες ενεργοποιούν ή καταστέλουν τη γονιδιακή μεταγραφή, μέσω διαντιδράσεων με κάποιο παράγοντα μεσολάβησης [134]. Κατηγοριοποιούνται σε υποομάδες με βάση την αλληλουχία τους. Η πρώτη κατηγορία B1 αποτελείται από τα SOX1, 2 και 3, που μοιράζονται το 90% των αμινοξέων [135]. Τα μέλη της B1 υποκατηγορίας είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές [134] και συνεκφράζονται στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) στην εμβρυική και ενήλικη ζωή.

Το SOX2 πιθανά ελέγχει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που συνδράμουν στην εμβρυική ανάπτυξη, όπως των Nanog, δ-crystalline, fibroblast growth factor 4 και του embryonal cell transcription factor 1. Επιπρόσθετα, σε συνδυασμό με την έκφραση του OCT4, συμμετέχει στη διατήρηση της ομοιόστασης, υπό την έννοια της αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης, των stem κυττάρων. Μελέτες γονιδιακής απενεργοποίησης, έχουν δείξει ότι SOX2 και OCT4, είναι απαραίτητοι παράγοντες για την εμβρυική ανάπτυξη. Η απενεργοποίησή τους οδηγεί στο θάνατο στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Έτσι, η συνεργασία τους έχει σαν αποτέλεσμα τη λειτουργία τους ως μοριακών «ροοστατών» των εμβρυικών stem κυττάρων. Η μειωμένη έκφραση του SOX2 σχετίζεται με μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού και της δυνατότητας αυτοανανέωσης, με ταυτόχρονη επαγωγή της διαφοροποίησης των stem κυττάρων. Επιπλέον, το SOX2, αποτελεί στόχο των Wnt, TGFβ, FGF, BMP και του NODAL σηματοδοτικών μονοπατιών κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Η έκφρασή του θεωρείται ογκογενετική καθώς εκφράζεται στο ρινοφαρυγγικό καρκίνο, στον καρκίνο

οισοφάγου, πνεύμονος, μαστού, παγκρέατος, παχέος εντέρου, προστάτου και με τα εμβρυικά καρκινώματα, κυρίως του εγκεφάλου [136, 137].

2.5.3 ALDH1 (ΑΛΔΕΥΔΙΚΗ ΔΕΥΔΡΟΓΕΝΑΣΗ) – ΔΥΝΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STEM ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ρετιναλδεΐδη, προέρχεται από οξείδωση της ρετινόλης (Βιταμίνη Α), ουσίας που προσλαμβάνεται από τις τροφές. Η οξείδωση της ρετινόλης είναι αντιστρεπτή και επιτυγχάνεται από ένζυμα της οικογένειας των αλκοολικών δεϋδρογονασών (ADH) και της οικογένειας των υδρογονασών/αναγωγασών, που εκφράζονται ευρέως στους ιστούς. Αντίθετα, το επόμενο βήμα στο μεταβολισμό της ρετινόλης είναι μη αντιστρεπτό και καταλύεται από τις αλδεϋδικές δεϋδρογενάσες (ALDHs), οι οποίες εμφανίζουν ειδική ιστική κατανομή. Θεωρούνται μάλιστα οι ιστικοί ρυθμιστές της παραγωγής ρετινοϊκού οξέος και επομένως της μεταβίβασης σήματος από το ρετινοϊκό οξύ [138]. Η ALDH1 καταλύει την παραγωγή και των δύο ισομορφών ρετινοϊκού οξέος, δηλαδή τη μετατροπή της all-trans-ρετιναλδεΐδης και της 9 cis-ρετιναλδεΐδης σε all-trans-ρετινοϊκό οξύ, αντιστοίχως [139].

Το ρετινοϊκό οξύ έχει πολλές δράσεις στο φυσιολογικό ιστό ενώ αποτελεί και σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα της λειτουργίας των βλαστοκυττάρων [140]. Η δράση του στα βλαστοκύτταρα εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης των αρχέγονων αυτών κυττάρων. Στα πολυδύναμα κύτταρα, ενισχύει την αυτοανανέωση, ενώ σε προγονικά πιο διαφοροποιημένα κύτταρα του μυελού των οστών, επάγει τη διαφοροποίησή τους [141]. Το ρετινοϊκό οξύ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την οργανογένεση του εγκεφάλου, της σπονδυλικής στήλης, του οφθαλμού, της καρδιάς, των νεφρών, του γαστρεντερικού και των άκρων [142, 143]. Επιπλέον, έχει αντινεοπλασματική δράση και θεωρείται αξιοσημείωτη χημειοπροφυλακτική προσέγγιση [144].

Η αλδεϋδική δεϋδρογενάση (aldehyde dehydrogenase, ALDH), ανήκει σε μια υπεροικογένεια κυτταροπλασματικών ενζύμων που σχετίζονται με την οξείδωση ενδοκυττάρων αλδεϋδών και έχουν ευρεία κατανομή, καθώς αναγνωρίζονται σε όλα

ζωντανά είδη, από τα αρχαιοβακτήρια έως τον άνθρωπο. Μερικά είδη βακτηρίων διαθέτουν περισσότερα γονίδια ALDH απ' ότι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, γεγονός που σχετίζεται με την επιβίωσή τους σε δυσμενείς συνθήκες, καθώς και με τη χρήση πληθώρας ουσιών στη διατροφή τους. Οι αλδεϋδικές δεϋδρογενάσες που δεν έχουν αναγνωρισθεί στους διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εμφανίζουν αρκετή ομολογία μεταξύ τους και διακρίνονται σε 20 οικογένειες. Καθεμιά περιλαμβάνει μέλη με τη μεγαλύτερη ομολογία (τουλάχιστο 60%) μεταξύ τους. Στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί 17 γονίδια ALDH.

Οι αλδεϋδικές δεϋδρογενάσες, οξειδώνουν ευρεία σειρά ενδογενών και εξωγενών αλδεϋδών και συμμετέχουν σε διαδικασίες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του οργανισμού. Κάθε μέλος της οικογένειας των ALDH εμφανίζει μεγαλύτερη ενεργότητα σε ορισμένα υποστρώματα αν και μπορεί να μεταβολίσει ένα ευρύ φάσμα αλδεϋδών με μικρότερη ωστόσο αποτελεσματικότητα [145].

Τα σημαντικότερα μέλη της οικογένειας είναι οι ALDH1 και ALDH2, που αποτελούν τετραμερή ένζυμα αποτελούμενα από υπομονάδες των 57 kDa. Εκφράζονται ευρέως στους ανθρώπινους ιστούς μολονότι τα επίπεδά τους διαφέρουν ανάλογα με την εντόπιση. Η ALDH1 εμπλέκεται στην ανάπτυξη καρκινωμάτων και αποτελεί δείκτη καρκινικών stem κυττάρων [146].

Βιβλιογραφικά, αναφέρεται η μελέτη της ALDH1 έκφρασης στα καρκινικά stem κύτταρα του καρκίνου του μαστού [147], του στομάχου, σε μεταστατικό καρκίνο κεφαλής-τραχήλου και του οισοφάγου (ALDH1 και 3), ενώ στον πνεύμονα εκφράζεται κυρίως η ALDH2 [148].

2.6 ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Σύμφωνα με το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (KBK), τα μόνα κύτταρα που έχουν την ικανότητα να επάγουν την αρχική δημιουργία του όγκου και να δίνουν γένεση σε όλους τους ετερογενείς υποπληθυσμούς κυττάρων που διαμορφώνουν τον όγκο, είναι εκείνα με ιδιότητες χαρακτηριστικές των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων, όπως είναι η ικανότητα αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης, τα οποία αποτελούν έναν ιδιαίτερα μικρό υποπληθυσμό κυττάρων του όγκου [149,

150]. Δεν έχει ωστόσο αποσαφηνιστεί εάν τα KBK προέρχονται από φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα έπειτα από διαδοχική και προοδευτική συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων ή από προγονικά κύτταρα στα οποία κατά την κακοήθη εξέλιξή τους ενεργοποιούνται μονοπάτια που εμπλέκονται στην αυτο-ανανέωση [151]. Εντούτοις, οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στο ότι τα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα μπορούν υπό συγκεκριμένες συνθήκες να αποδιαφοροποιηθούν και να αποκτήσουν βλαστικές ιδιότητες [152].

Η ταυτοποίηση των KBK περιγράφηκε πρώτη φορά το 1997 στο αιμοποιητικό σύστημα ασθενών με λευχαιμία [153]. Έκτοτε πληθώρα μελετών έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία τους σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, κόλου, προστάτη, πνεύμονα, ήπατος και εγκεφάλου [154-158]. Η ανίχνευση KBK σε συμπαγείς όγκους, πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά στον καρκίνο του μαστού το 2003, όπου ανάμεσα σε καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν από πλευριτικές συλλογές ασθενών, ανιχνεύτηκε ένας μικρός υποπληθυσμός κυττάρων με υψηλή έκφραση του μορίου CD44 και παράλληλα χαμηλή έως απύουσα έκφραση του CD24 (CD44^{high}CD24^{-/low}), τα οποία εμφάνιζαν ιδιότητες χαρακτηριστικές των βλαστικών κυττάρων, όπως η αυτο-ανανέωση και η ικανότητα διαφοροποίησης. Στη συνέχεια υποστηρίχθηκε ότι τα CD44⁺CD24^{-/low} κύτταρα που απομονώθηκαν από όγκους μαστού είχαν, υπό συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, την ικανότητα σχηματισμού σφαιρών, δηλαδή σφαιρικών συσσωματωμάτων κυττάρων, που είναι χαρακτηριστική των βλαστικών κυττάρων του μαστού [159, 160]. Στη συνέχεια αποκαλύφθηκε ότι, η ταυτοποίηση των KBK σε όγκους μαστού μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ανίχνευσης της υψηλής ενεργότητας του ενζύμου της ALDH [161, 162]. Προσφάτως διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός των φαινότυπων CD44⁺CD24^{low} και EpCAM^{high}CD49f⁺ μπορεί να χαρακτηρίσει ακόμη πιο αποτελεσματικά τον πληθυσμό των KBK στον καρκίνο του μαστού [163], ενώ μια σειρά από άλλους σημαντικούς δείκτες για KBK έχουν σήμερα περιγραφεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως είναι οι CD133, CD34, CD123, ESA, Oct4, Sox2, Nanog, c-kit και ABCG2 [164, 165].

Η βλαστικότητα των κυττάρων έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται μέσω μιας σειράς μορίων και μονοπατιών που εμπλέκονται επίσης στον καρκίνο του μαστού [166]. Μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η γένεση βλαστικών ιδιοτήτων σε φυσιολογικά και

καρκινικά κύτταρα μαστού μέσω υπερέκφρασης του υποδοχέα HER2, καθιστώντας τη στοχεύουσα θεραπεία έναντι του HER2 trastuzumab μία αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση έναντι των KBK [167, 168]. Η απώλεια της φωσφατάσης PTEN στον καρκίνο του μαστού έχει επίσης συσχετιστεί με την αυτο-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων [169]. Τέλος, η ρύθμιση της αυτο-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών με γνωστό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου, όπως είναι η σηματοδότηση Wnt μέσω ρύθμισης της β-κατενίνης [170], το μονοπάτι Notch [171] και το Hedgehog μέσω ρύθμισης του γονιδίου Bmi-1 [172]. Σημαντικός φαίνεται και εδώ ο ρόλος των microRNAs ως μετα-μεταγραφικών ρυθμιστών που καταστέλλουν τη βλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων [173].

Εξάλλου, η ρύθμιση της αυτο-ανανέωσης των KBK συνδέεται άμεσα με την EMT των κυττάρων και οι δύο αυτές διαδικασίες ενισχύουν σημαντικά τη μεταναστευτική τους ικανότητα [174]. Μελέτες σε πολλούς τύπους καρκίνου, επιβεβαίωσαν την ενεργό συμμετοχή KBK στην ανάπτυξη μεταστάσεων [175-178]. Ειδικότερα, τα καρκινικά κύτταρα μαστού με φαινότυπους CD44+/CD24low και υψηλής ενεργότητας και έκφρασης της ALDH εμφανίζονται ιδιαίτερα επιθετικά και ικανά να αναπτύσσουν μεταστάσεις [161, 179-181]. Η μετανάστευση των KBK φαίνεται να ενισχύεται περαιτέρω μέσω της αγγειογένεσης και λεμφαγγειογένεσης, διαδικασίες που επάγονται από τα ίδια τα κύτταρα σε συνθήκες υποξίας [182, 183].

Τα KBK εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και ακτινοθεραπεία [184]. Η ενεργοποίηση πρωτεϊνών που αναστέλλουν την απόπτωση αποτελεί γνωστό μηχανισμό αντίστασης των βλαστικών κυττάρων στην ακτινοθεραπεία [185, 186]. Αντίστοιχα, η χημειο-ανθεκτικότητα, αποδίδεται στη συμμετοχή της οικογένειας γονιδίων ABC (ATP-binding cassette), που καταλύουν τη μεταφορά των χημειοθεραπευτικών ουσιών έξω από το κύτταρο [187, 188]. Βάσει της συγκεκριμένης ιδιότητας των βλαστικών κυττάρων έχει αναπτυχθεί μέσω κυτταρομετρίας ροής ακόμη μία μέθοδος για την ταυτοποίηση των KBK σε συμπαγείς όγκους, γνωστή ως side population (SP) [189, 190]. Τα δεδομένα που αναφέρθηκαν, αναδεικνύουν την προγνωστική αξία της ανίχνευσης KBK στον πρωτοπαθή όγκο ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου. Ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού, η ταυτοποίηση των KBK με φαινότυπο CD44+/CD24-/low και υψηλή ενεργότητα ή έκφραση της ALDH, αποτελεί σημαντικό δείκτη έλλειψης ανταπόκρισης στις συνήθεις

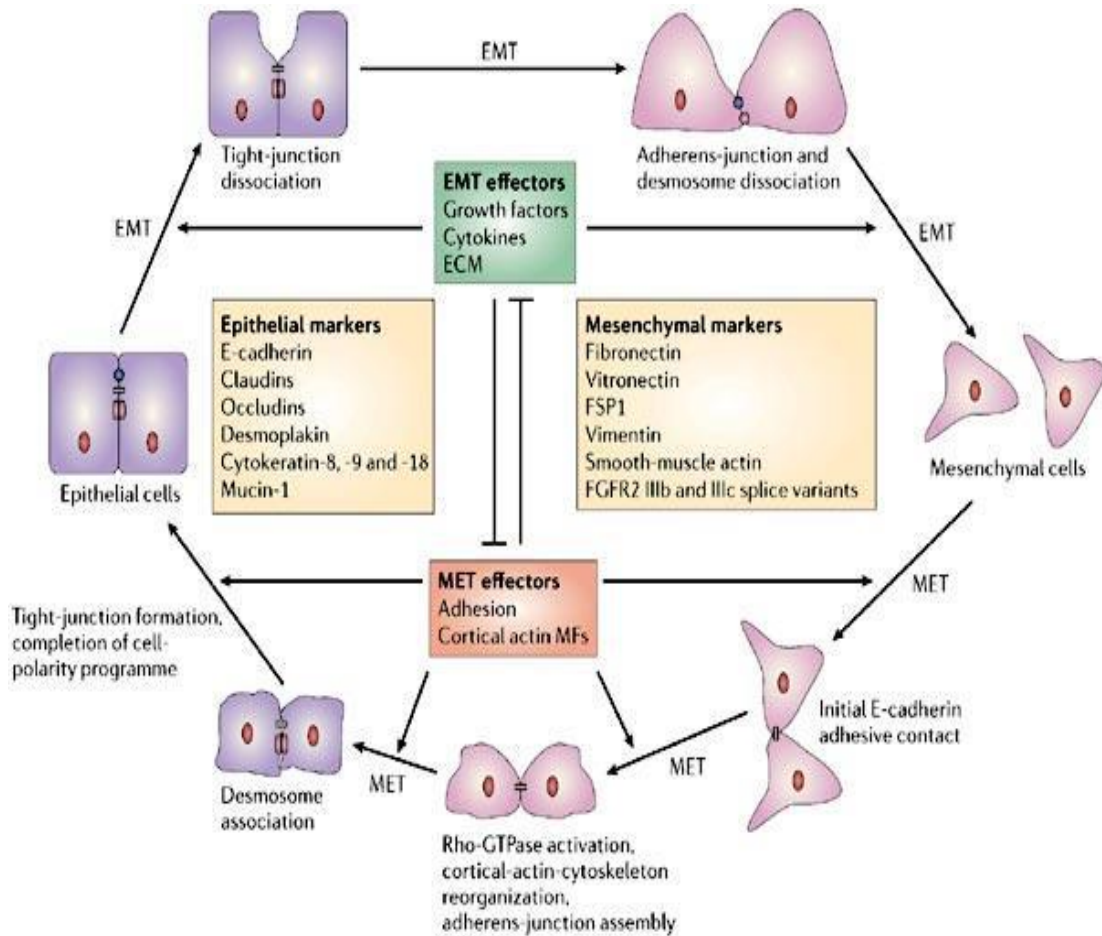
θεραπείες, αυξημένης πιθανότητας υποτροπής και μειωμένης συνολικής επιβίωσης των ασθενών [147, 161, 191, 192]. Συνεπώς, η στόχευση των ΚΒΚ αποτελεί μεγάλη πρόκληση στο σχεδιασμό στοχευουσών θεραπειών.

3. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (EMT)

3.1 ΓΕΝΙΚΑ - ΡΟΛΟΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Αν και από την διαρκώς εξελισσόμενη έρευνα προκύπτουν στοιχεία που ενισχύουν ή εγείρουν διχογνωμία πάνω στις θεωρίες της ανάπτυξης του καρκίνου, η πλέον προσφιλή θεωρία που αποκτά συνεχώς έδαφος είναι η EMT. Το φαινόμενο EMT είναι η διεργασία κατά την οποία ένα επιθηλιακό κύτταρο αποκτά φαινότυπο μεσεγχυματικού κυττάρου. Το επιθήλιο χάνει την πολικότητά του, τις ζώνες πρόσφυσης, τις στεγανές συνδέσεις, τα δεσμοσώματα και τα ενδιάμεσα νημάτια κερατίνης με σκοπό να επαναδιατάξει τις ίνες της F-actin και να δημιουργήσει φιλοπόδια και λαμelloπόδια (Εικόνα 8). Στο πλαίσιο αυτό, ο κυτταροσκελετός τροποποιείται με δομές που προσδίδουν δυνατότητα κίνησης, ενώ εμφανίζονται και νέες πρωτεΐνες με δομικό ρόλο όπως η βιμεντίνη και η N- καντχερίνη. Επίσης εκφράζονται μεταλλοπρωτεϊνάσες που συμμετέχουν στην αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας. Το τροποποιημένο κύτταρο παράγει επιπροσθέτως αγγειογενετικούς και λεμφαγγειογενετικούς παράγοντες [193, 194].

Τελικά, το κύτταρο υφίσταται απώλεια των δομών συνοχής που προκύπτει με αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής τους, με μεταγραφική ρύθμιση με φωσφορυλίωση ή ουβικουιτίνωση. Ένας άλλος μηχανισμός απώλειας των E-καντχερινών είναι μέσω αρνητικής ρύθμισης των σηματοδοτικών μονοπατιών και τέλος με ενεργό αποδόμησή τους από πρωτεολυτικά ένζυμα. Επίσης, χάνονται οι ζώνες πρόσφυσης και τα δεσμοσώματα. Χαρακτηριστικό κατά την EMT είναι η εμφάνιση της N-καντχερίνης παράλληλα με την απώλεια της E-καντχερίνης. Η N-καντχερίνη έχει σημαντικό ρόλο στη διεισδυτική δυναμική του κυττάρου [193-195].

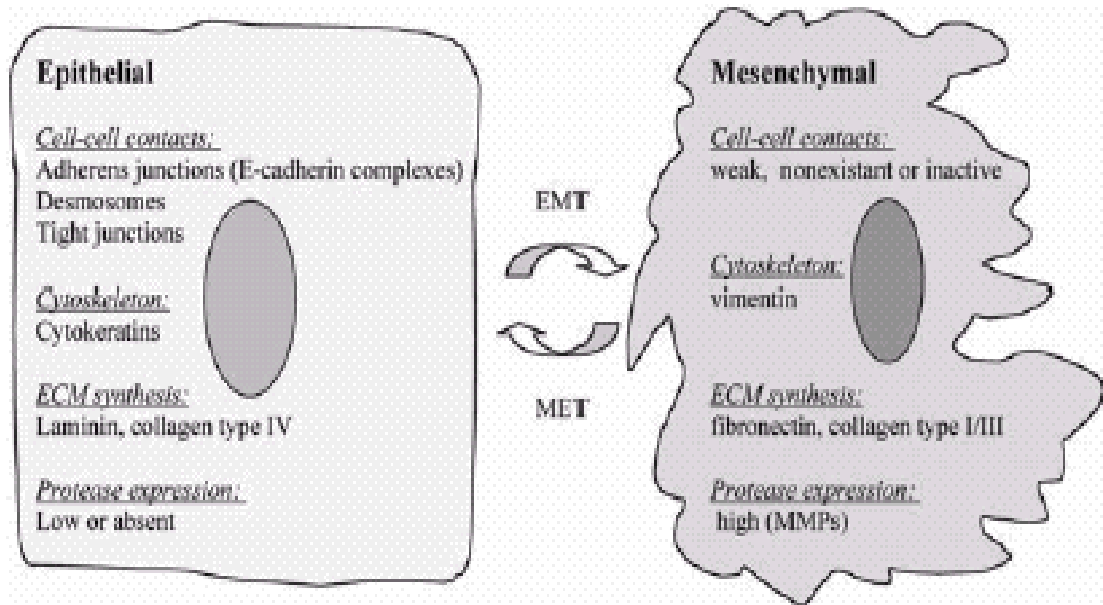


Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση EMT.

Η EMT συμμετέχει και σε φυσιολογικές πέραν των παθολογικών διεργασιών του οργανισμού. Έχει σημαντική θέση στην εμβρυογένεση καθώς και σε μια σειρά άλλων καταστάσεων όπως είναι η επούλωση τραύματος. Ταυτοχρόνως, εμπλέκεται και σε νόσους κατά τις οποίες όργανα καταστρέφονται στα πλαίσια ινωτικής διεργασίας, όπως μπορεί να συμβεί στο νεφρό, στον πνεύμονα, στο ήπαρ και στο περιτόναιο.

3.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΒΑΙΝΟΥΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ EMT

Η EMT είναι ένα μοριακό φαινόμενο που φαίνεται πως επιτελείται στα απώτερα στάδια της εξέλιξης ενός καρκίνου και μοντελοποιεί όλες εκείνες τις μοριακές διεργασίες της ιδιαίτερης ομοιοστασίας του καρκινικού κυττάρου που του προσδίδουν ένα επιθετικό μεταστατικό δυναμικό. Στο πλαίσιο μιας τέτοιας διεργασίας το επιθηλιακό καρκινικό κύτταρο υφίσταται συγκεκριμένες λειτουργικές και μορφολογικές μετατροπές (Εικόνα 9).



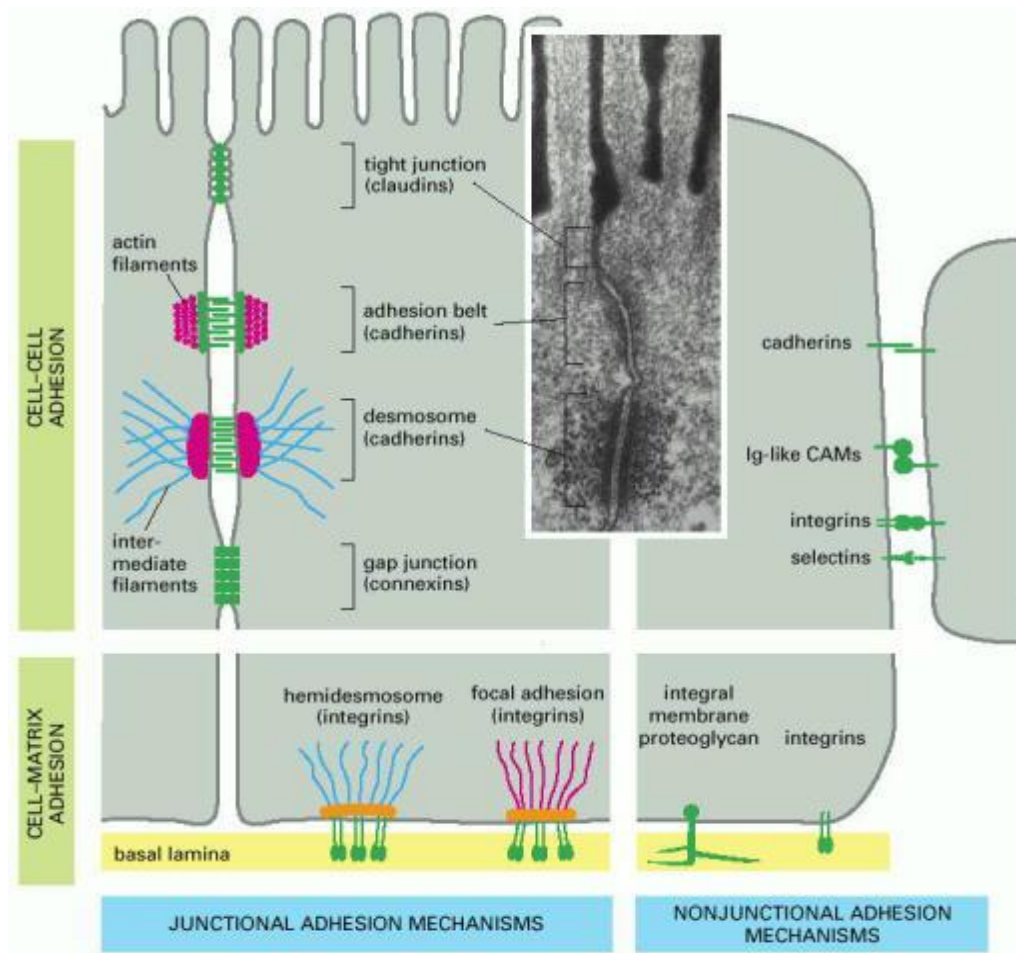
Εικόνα 9: Μορφολογικές και λειτουργικές μετατροπές στην EMT.

3.2.1 EMT ΚΑΙ ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΝΔΕΣΕΩΝ

Μια βασική τροποποίηση κατά την EMT είναι η απώλεια των κυτταρικών συνδέσεων που συγκρατούν το επιθηλιακό κύτταρο σε μία ενιαία μονάδα, τόσο δομικά όσο και λειτουργικά, με τα γειτονικά του επιθηλιακά κύτταρα [196].

Κάποιες από τις δομές αυτές ευθύνονται για τη σύνδεση των κυττάρων με την βασική τους μεμβράνη, όπως τα ημιδεσμοσώματα και οι focal adhesions, ενώ άλλες συνεισφέρουν στη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους όπως τα δεσμοσώματα, οι αποφρακτικές συνάψεις και οι ζώνες πρόσφυσης (Εικόνα 10). Η κατασκευή των ανωτέρω δομών βασίζεται σε μόρια που περιλαμβάνουν cadherins, ιντεγκρίνες,

syndecans, I-CAMs και σελεκτίνες. Οι τέσσερις διαθέσιμοι τύποι cadherins είναι οι E, P, N και δεσμοσωμική. Εξ αυτών, η E-cadherin χαρακτηρίζει τα επιθηλιακά κύτταρα και η N-cadherin τα μεσεγγυματικά αλλά και τα καρκινικά κύτταρα που έχουν υποστεί EMT.



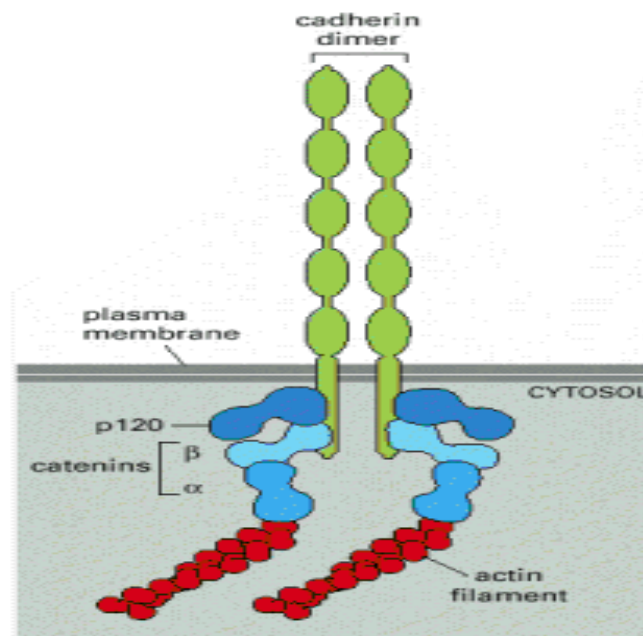
Εικόνα 10: Δομές συνοχής επιθηλιακών κυττάρων.

E-cadherin:

Η E-καντχερίνη ανήκει σε μια οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης εξαρτώμενα από το ασβέστιο. Το γονίδιο της E-καντχερίνης, που αποτελεί την κύρια καντχερίνη που εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16q23 και αποτελείται από 16 εξόνια. Κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που ανευρίσκεται ως υποδιμερές και

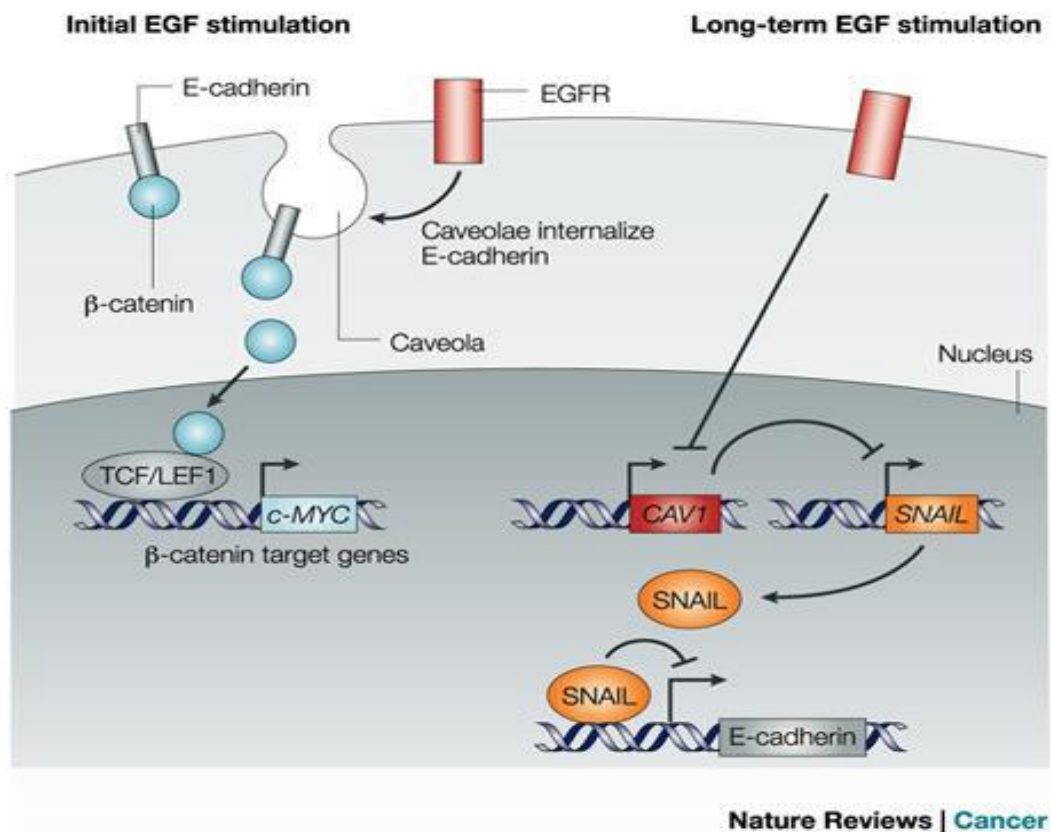
κατέχει κεντρική θέση στη δημιουργία και διατήρηση των ζωνών πρόσφυσης μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων.

Η διαμεσολαβούμενη από την E-καντχερίνη κυτταρική προσκόλληση ενέχεται στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ομοιόσταση των επιθηλιακών ιστών. Κατά την εμβρυογένεση, η δημιουργία μεσοκυττάρων συνδέσεων μέσω της E-καντχερίνης είναι απαραίτητη για τη δημιουργία επιθηλιακών κυττάρων από μεσεγχυματικά κύτταρα, ενώ οι τοπικές αλλαγές στην έκφραση της E-καντχερίνης επιτρέπουν την κυτταρική μετανάστευση και μορφογένεση. Κατά την επούλωση παρατηρείται μείωση της έκφρασης της E-καντχερίνης που επιτρέπει τη μετανάστευση των αναγεννώμενων επιθηλιακών κυττάρων [197, 198]. Η E-cadherin ενδοκυτταρίως ενώνεται με τα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού μέσω των α , β και p120 catenin (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σύμπλοκο E-cadherin με τις catenins και τα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού.

Η απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης αποτελεί καθοριστικό γεγονός στη διεργασία της EMT. Κατά τη διάρκεια της EMT μειώνεται η έκφραση γονιδίων όπως της E-καντχερίνης και αυξάνεται η έκφραση μεσεγχυματικών γονιδίων (Εικόνα 12) [199-202].

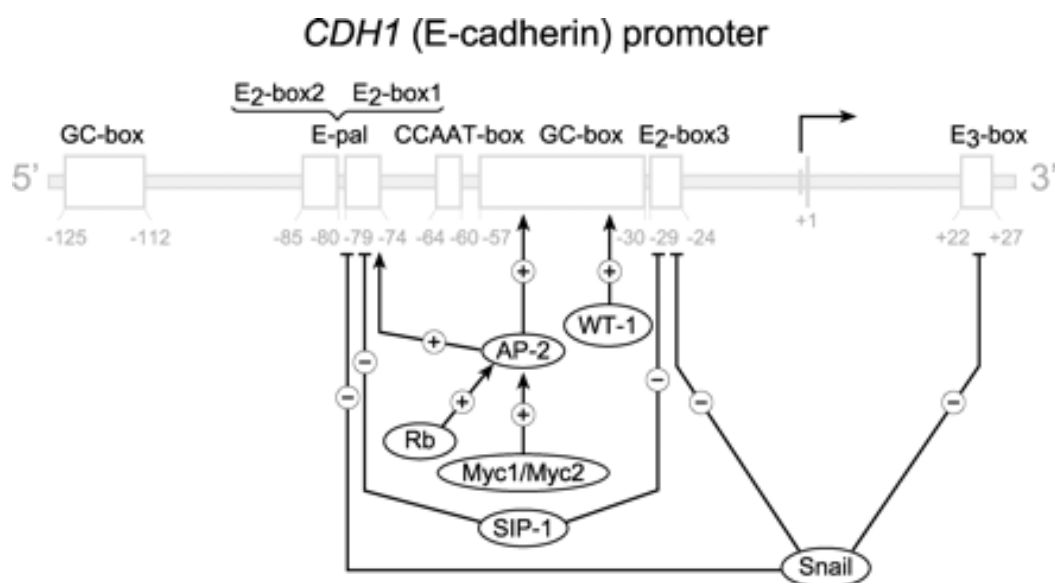


Εικόνα 12: Γονιδιακές διεργασίες κατά την EMT.

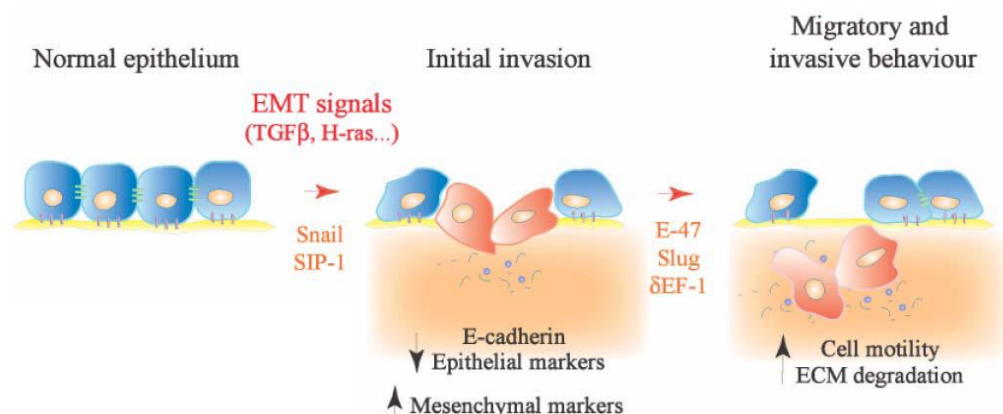
Τα αρχικά μεθυλιωμένα τμήματα του γονιδίου της E-καντχερίνης που οδηγούν σε μείωση της E-καντχερίνης και καρκινογένεση, προάγουν μεταστάσεις και έπεται μείωση της μεθυλίωσης και επανέκφραση της E-καντχερίνης με αποτέλεσμα την επιβίωση των καρκινικών πλέον κυττάρων.

Εξαφάνιση των E-cadherin από την μεμβράνη:

Πολλοί παράγοντες ρυθμίζουν τη μεταγραφή της E-καντχερίνης, καθώς προσδένονται στα E-κουτιά του εκκνητή του γονιδίου και καταστέλλουν την έκφρασή του προωθώντας την EMT (Εικόνα 13). Τέτοιοι καταστολείς της μεταγραφής είναι οι Snail, Slug, SIP1/ZEB2, δEF1/ZEB1 και mITF2 (Εικόνα 14).



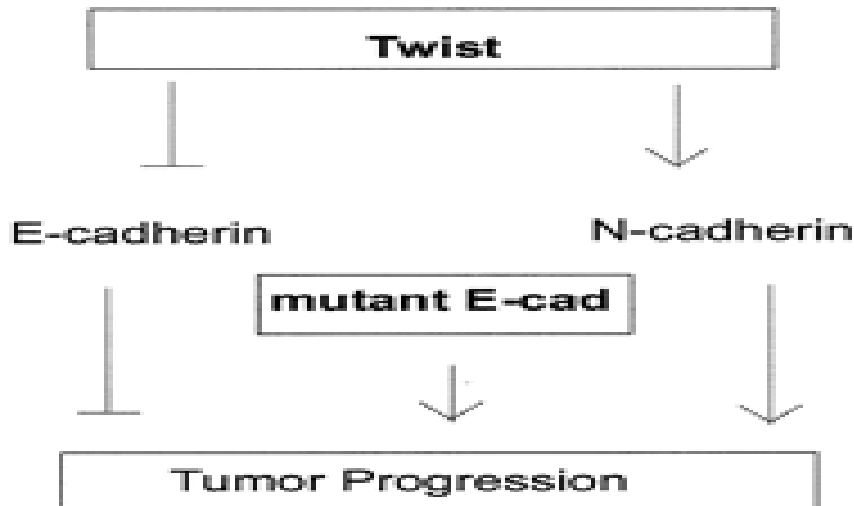
Εικόνα 13: Μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν την μεταγραφή της E-cadherin.



Εικόνα 14: Επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων στην E-καντηρίνη αποτελεί σημείο κλειδί στην εξέλιξη του EMT φαινομένου.

Το Snail φαίνεται ότι αποτελεί το σπουδαιότερο καταστολέα της μεταγραφής της E-καντηρίνης και συνεπώς εκ των σημαντικότερων παραγόντων που προάγουν την EMT. Επίσης, ο Twist ανήκει στους bHLH μεταγραφικούς παράγοντες και είναι σημαντικός τόσο στην εμβρυογένεση όσο και στην EMT. Η κύρια δράση του αφορά

στην πρόσδεση στα E-κουτιά του εκκινητή του γονιδίου της E-καντχερίνης με συνέπεια τη μείωση της μεταγραφής του (Εικόνα 15) [203].

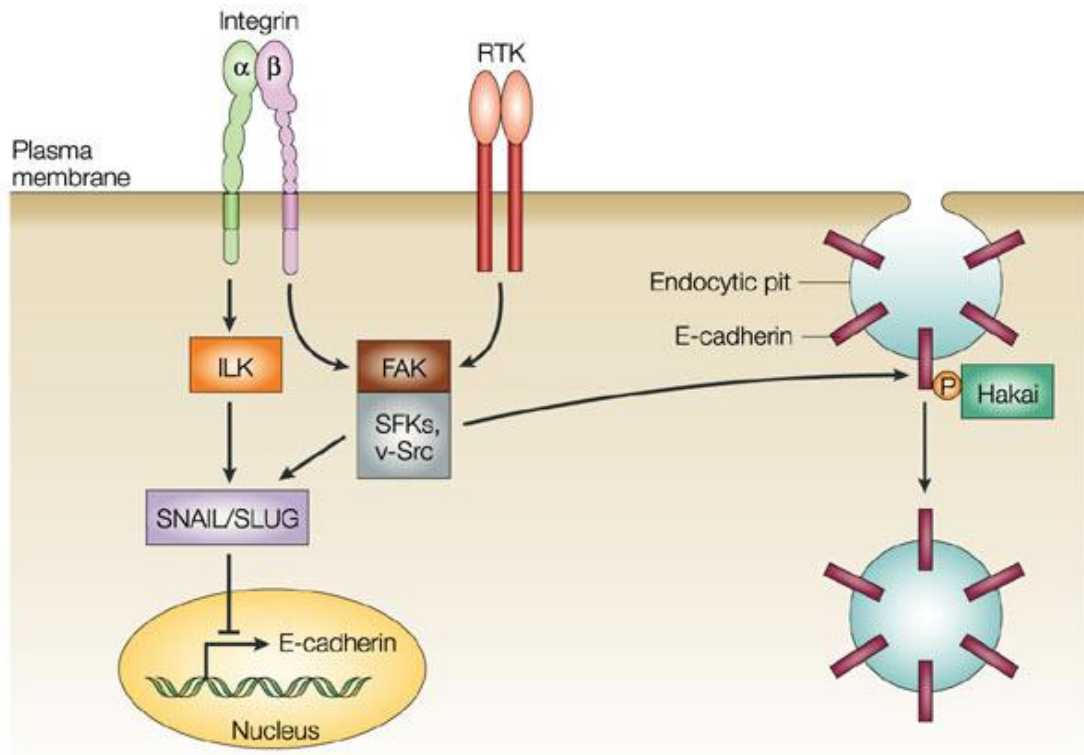


Εικόνα 15: Οι κύριες δράσεις του παράγοντα TWIST.

Παράλληλα, ο Twist εμπλέκεται και στην ενεργοποίηση της μεταγραφής κάποιων άλλων γονιδίων που χαρακτηρίζουν τη μεσεγχυματική κατάσταση των κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των βιμεντίνης, ινοσυνδετίνης και N-καντχερίνης.

Έχει διαπιστωθεί σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του Twist και στο διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα του μαστού [204], ενώ διατίθενται δεδομένα σχετικά με καταστολή του Twist στα πορογενή καρκινώματα του μαστού.

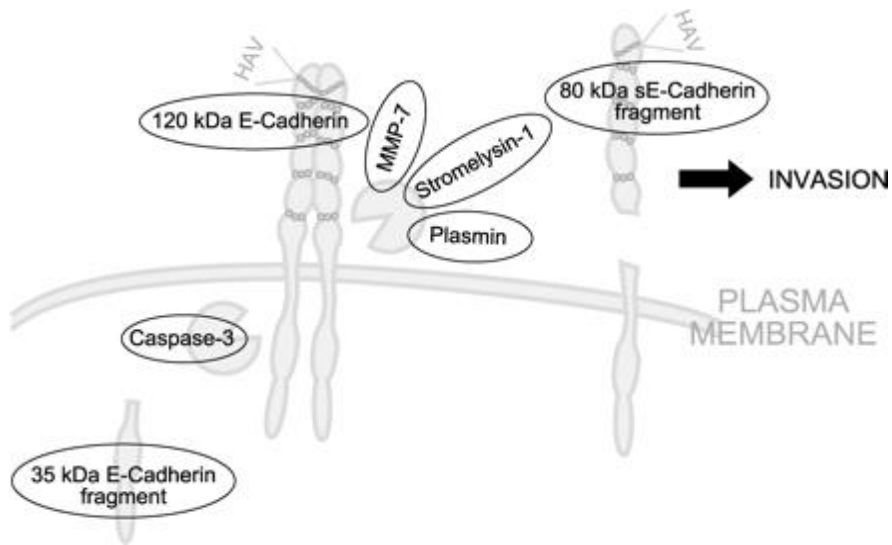
Ένας μηχανισμός απώλειας των E-cadherin από την κυτταρική μεμβράνη βασίζεται σε μεταμεταγραφική ρύθμιση του μορίου μέσω φωσφορυλίωσης ή ουμβικουϊτίνωσης που ελέγχεται από την δράση των μορίων FAK και Src. Τέτοιες μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις στην E-cadherin καταλήγουν σε ενδοκύττωση και αποδόμησή της μέσω του συστήματος ουμβικουϊτίνης-πρωτεασώματος [205, 206] (Εικόνα 16).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

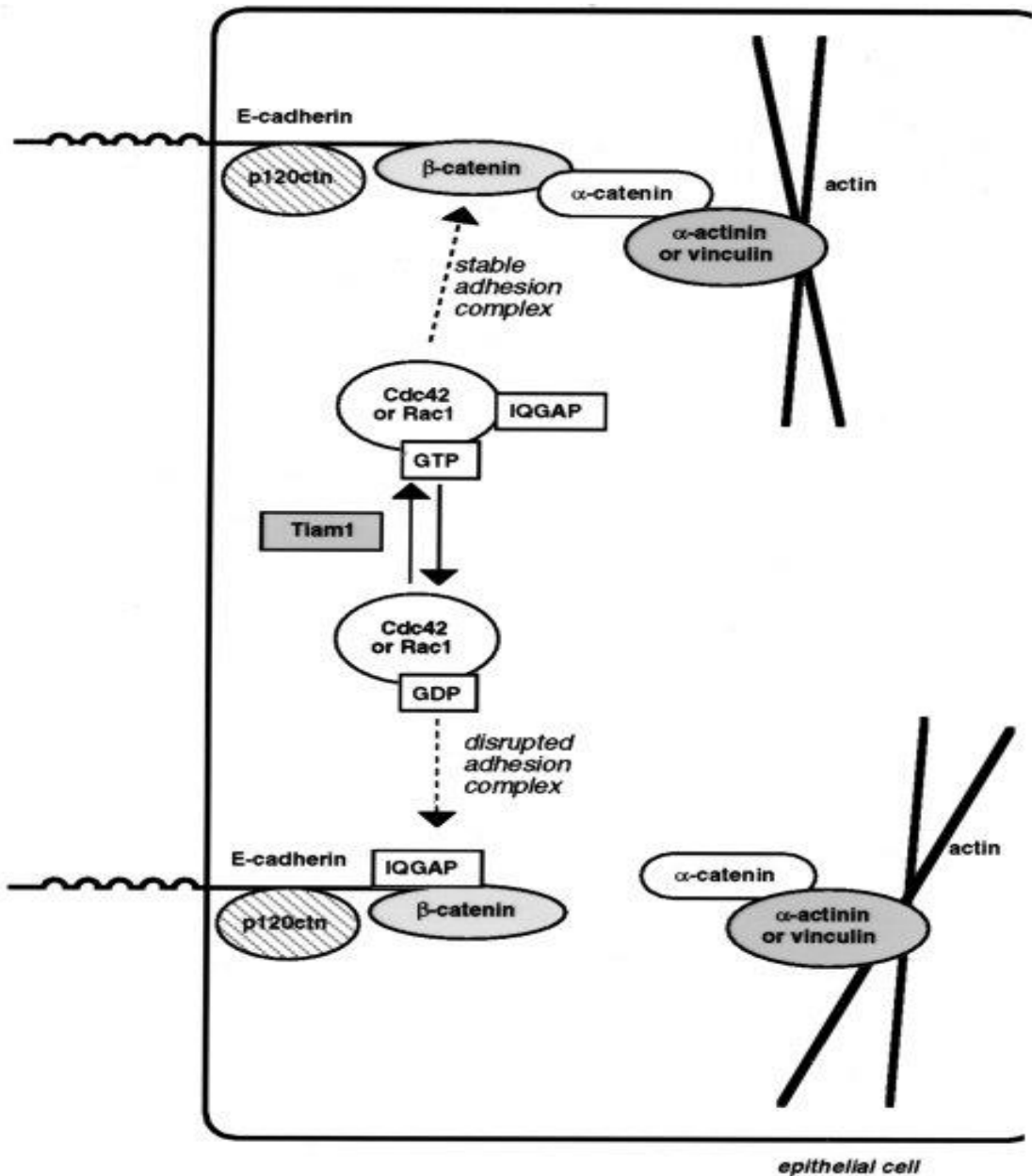
Εικόνα 16: Οδοί μεταγωγής σήματος που διαμεσολαβούν ενδοκύττωση της E-cadherin.

Αποδόμηση των E-cadherins χωρίς προηγηθείσα ενδοκύττωση μπορεί να συμβεί και από πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες [207] (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Αποδόμηση των E-cadherin από MMPs.

Φαίνεται επίσης πως η δομή συνοχής που σχηματίζουν οι E-cadherins ως σύμπλοκο με τις catenins μπορεί να διασπαστεί με την παρεμβολή μορίων που ενεργοποιούνται από μοριακά μονοπάτια και οδηγούν στην αποσταθεροποίηση του συμπλόκου [208] (Εικόνα 18).

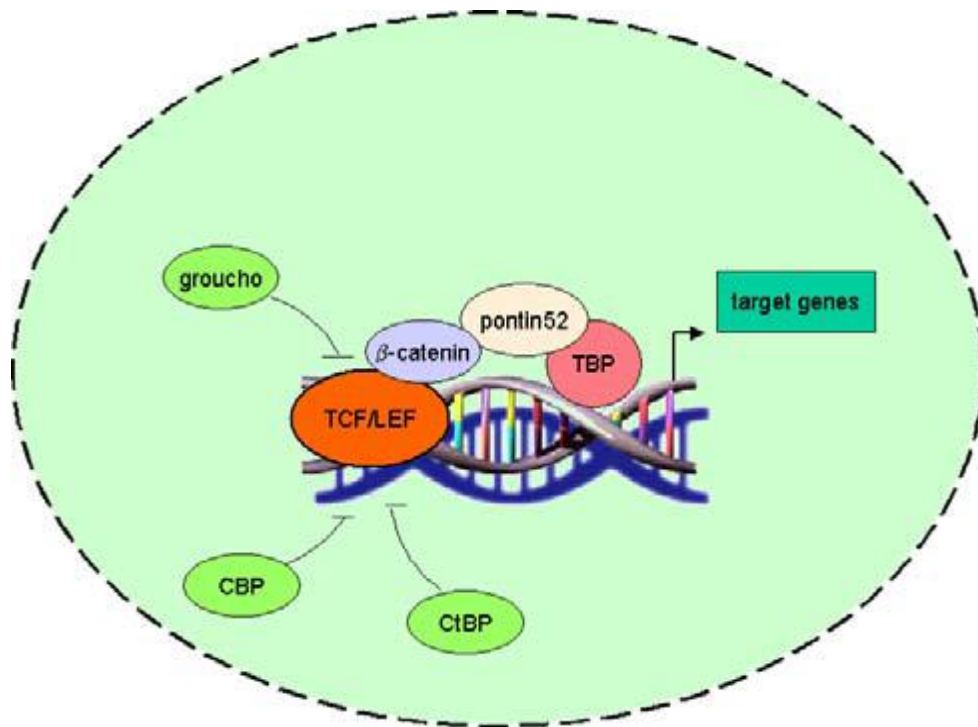


Εικόνα 18: Αποσταθεροποίηση των δομών συνοχής με παρεμβολή του IQGAP.

Τέλος ακόμα και η δράση των RhoGTPase μπορεί να εμπλέκεται στην απώλεια των δομών συνοχής που δημιουργούνται από E-cadherins [209].

Ρόλος απώλειας E-cadherin:

Η απώλεια των E-cadherins από το επιθηλιακό καρκινικό κύτταρο αποτελεί ένα φαινόμενο μεγίστης λειτουργικής σημασίας που διαμεσολαβεί έναν καταρράκτη από μοριακά φαινόμενα που οδηγούν το καρκινικό κύτταρο σε μεσεγχυματική μετατροπή. Πρακτικά, η απώλεια των E-cadherins οδηγεί σε απελευθέρωση β -catenins στο κυτταρόπλασμα που υπό προϋποθέσεις μπορούν να οδηγηθούν στον πυρήνα και να λειτουργήσουν ως συμπαραγόντες μεταγραφικών παραγόντων όπως ο TCF/LEF, με αποτέλεσμα την έκφραση σημαντικών μορίων για την εξέλιξη της EMT [210, 211] (Εικόνα 19).



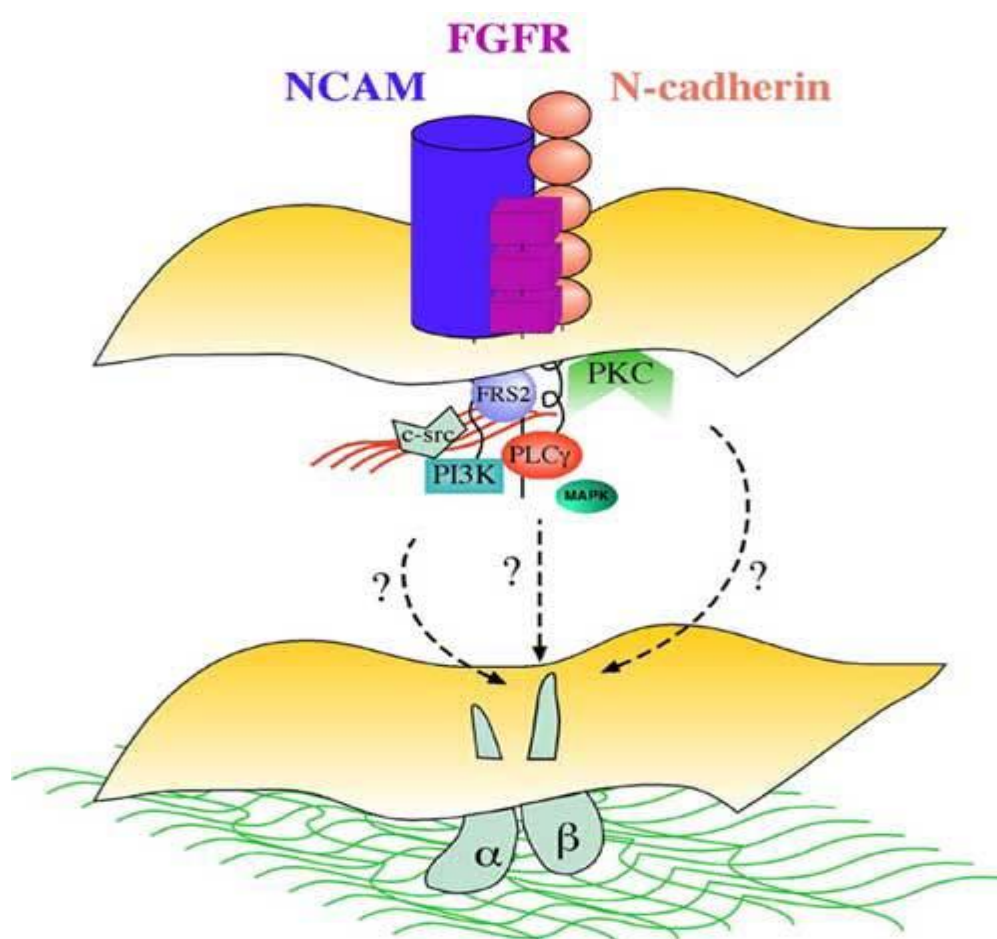
Εικόνα 19: Ο μεταγραφικός παράγοντας TCF/LEF με συμπάγοντα β -catenin.

Ρόλος N-cadherin:

Στο πλαίσιο της EMT, ανεξάρτητα της μείωσης της έκφρασης της E-καντχερίνης, αυξάνεται η έκφραση μιας σειράς άλλων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της N-καντχερίνης. Ο έλεγχος αυτού του γεγονότος γίνεται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες με το Snail να διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο. Η αυξημένη έκφραση της N-καντχερίνης έχει καθοριστικό ρόλο, καθώς προσδίδει στα κύτταρα αυξημένη

διεισδυτική ικανότητα, καθορίζοντας έτσι νεοπλάσματα αυξημένης επιθετικότητας [212, 213].

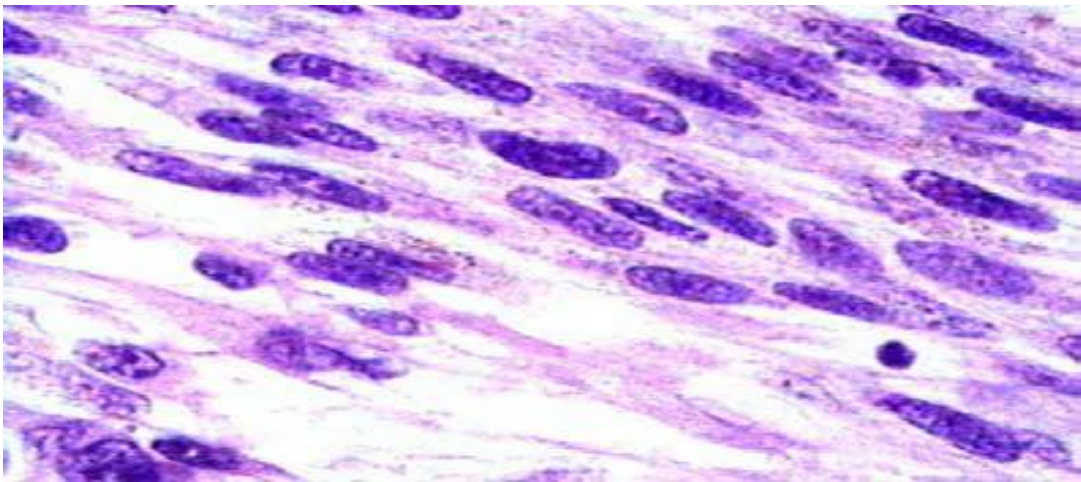
Η έκφραση της N-cadherin εξαρτάται επίσης και από τον μεταγραφικό παράγοντα Twist, του οποίου η έκφραση ευοδώνεται από τον παράγοντα NF-κB. Ο ρόλος της N-cadherin στο μεταστατικό καρκινικό κύτταρο είναι σημαντικός, αν και όχι πλήρως διευκρινισμένος [214]. Πιθανά ενεργοποιεί τον υποδοχέα του fibroblast growth factor (FGFR) χωρίς την παρουσία του αυξητικού παράγοντα (Εικόνα 20). Ταυτόχρονα, η N-cadherin μπορεί να αλληλεπιδρά με τους ινοβλάστες του στρώματος και να προάγει την προώθηση του κυττάρου. Τέλος συμμετέχει και στην ενεργοποίηση των RhoGTPases που έχουν ρόλο στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού κατά την EMT.



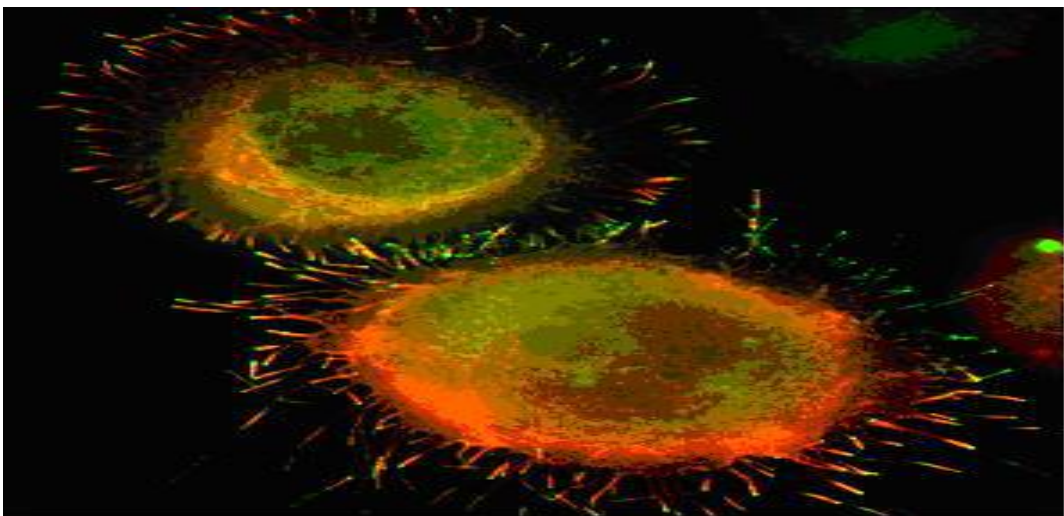
Εικόνα 20: Ενεργοποίηση του FGFR παρουσία της N-καντχερίνης.

3.2.2 ΕΜΤ ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ

Η ΕΜΤ επιφέρει μια χαρακτηριστική αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού του επιθηλιακού καρκινικού κυττάρου. Το σχήμα του κυττάρου αποκτά τη χαρακτηριστική ατρακτοκυτταρική (spindle cell) μορφολογία (Εικόνα 21) που χαρακτηρίζεται από επιμηκυσμένα κύτταρα με απώλεια της πολικότητάς του. Επιπλέον αποκτά και μετακινούμενες προσεκβολές, τα λαμελιπόδια (Εικόνα 22) και φιλοπόδια, που εξυπηρετούν την προώθηση του κυττάρου.



Εικόνα 21: Spindle cell κύτταρα.



Εικόνα 22: Λαμελιπόδια.

Κυτταροσκελετός και RhoGTPases:

Η κυτταροπλασματική μητρική ουσία περιέχει ένα πολύπλοκο δίκτυο που αποτελείται από μικροσωληνίσκους, μικρονημάτια και ενδιάμεσα νημάτια. Αυτές οι δομικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μορφολογία και στο σχήμα του κυττάρου, εμπλέκονται και στην κυτταροπλασματική και κυτταρική κίνηση. Τα οργανίδια αυτά στο σύνολό τους, είναι γνωστά και ως κυτταροσκελετός [215, 216].

Οι μικροσωληνίσκοι είναι ραβδοειδή ή σωληνοειδή οργανίδια, των οποίων η υπομονάδα αποτελείται από ένα ετεροδιμερές που συνίσταται από α και β μόρια τουμπουλίνης. Συμμετέχουν στην ανάπτυξη και διατήρηση του σχήματος του κυττάρου.

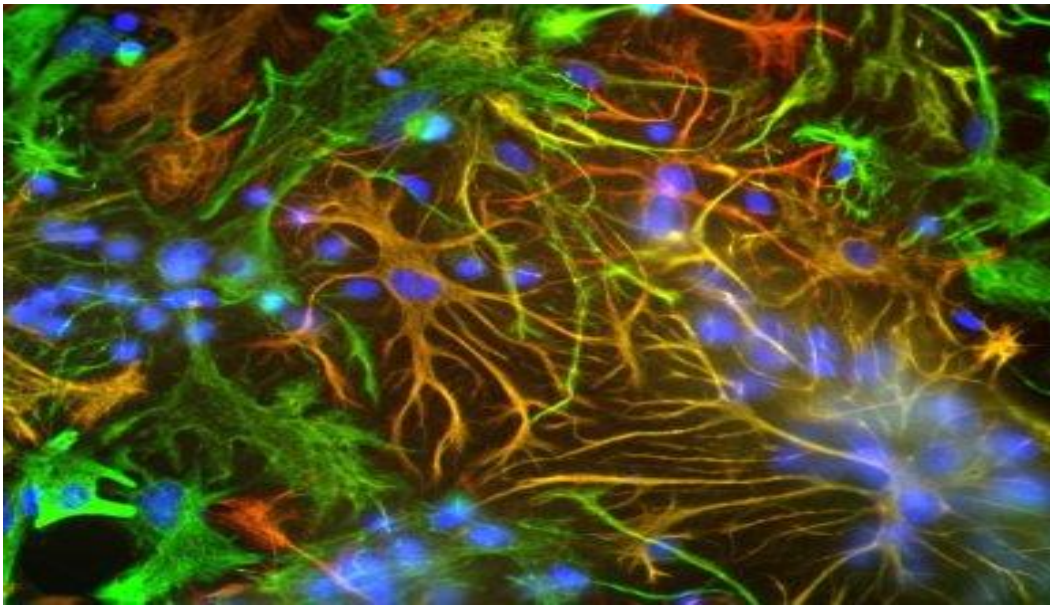
Τα ενδιάμεσα νημάτια είναι ενδιάμεσου μεγέθους συγκριτικά με τα νημάτια ακτίνης μυοσίνης. Οι πρωτεΐνες που αυτά σχηματίζουν είναι οι κυτταροκερατίνες, τα νημάτια βιμεντίνης που χαρακτηρίζουν κύτταρα μεσεγχυματικής καταγωγής, η δεσμίνη, τα νευρογλοιακά νημάτια και τα νευρονημάτια.

Τα μικρονημάτια ακτίνης αποτελούν δομικό συστατικό των μετακινούμενων προσεκβολών του κυττάρου, όπως τα ψευδοπόδια και φιλοπόδια [215-217].

Η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού συνεπεία της EMT, συμβαίνει υπό την επίδραση των RhoGTPases, σημαντικότερες εκ των οποίων είναι οι Cdc42, οι Rac και οι Rho [218]. Η ρύθμιση αυτών των μορίων επιτυγχάνεται από την ελεύθερη p120-catenin κατόπιν της απώλειας των E-cadherins που συμβαίνει κατά την EMT [219]. Ακόμα όμως και η ILK εμπλέκεται στις διεργασίες αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού δεδομένης της συμμετοχής της στην ενεργοποίηση της Rac-1 και Cdc4 [220]. Η δράση των RhoGTPase γίνεται επί του κυτταροσκελετού μέσω των επιτελεστικών μορίων Rock, LIMk, ERM με ρύθμιση της οργάνωσης των νηματίων ακτίνης. Παράλληλα, υφίστανται τροποποιήσεις και οι μικροσωληνίσκοι και τα ενδιάμεσα νημάτια, με αντικατάσταση των κυττοκερατινών από vimentin.

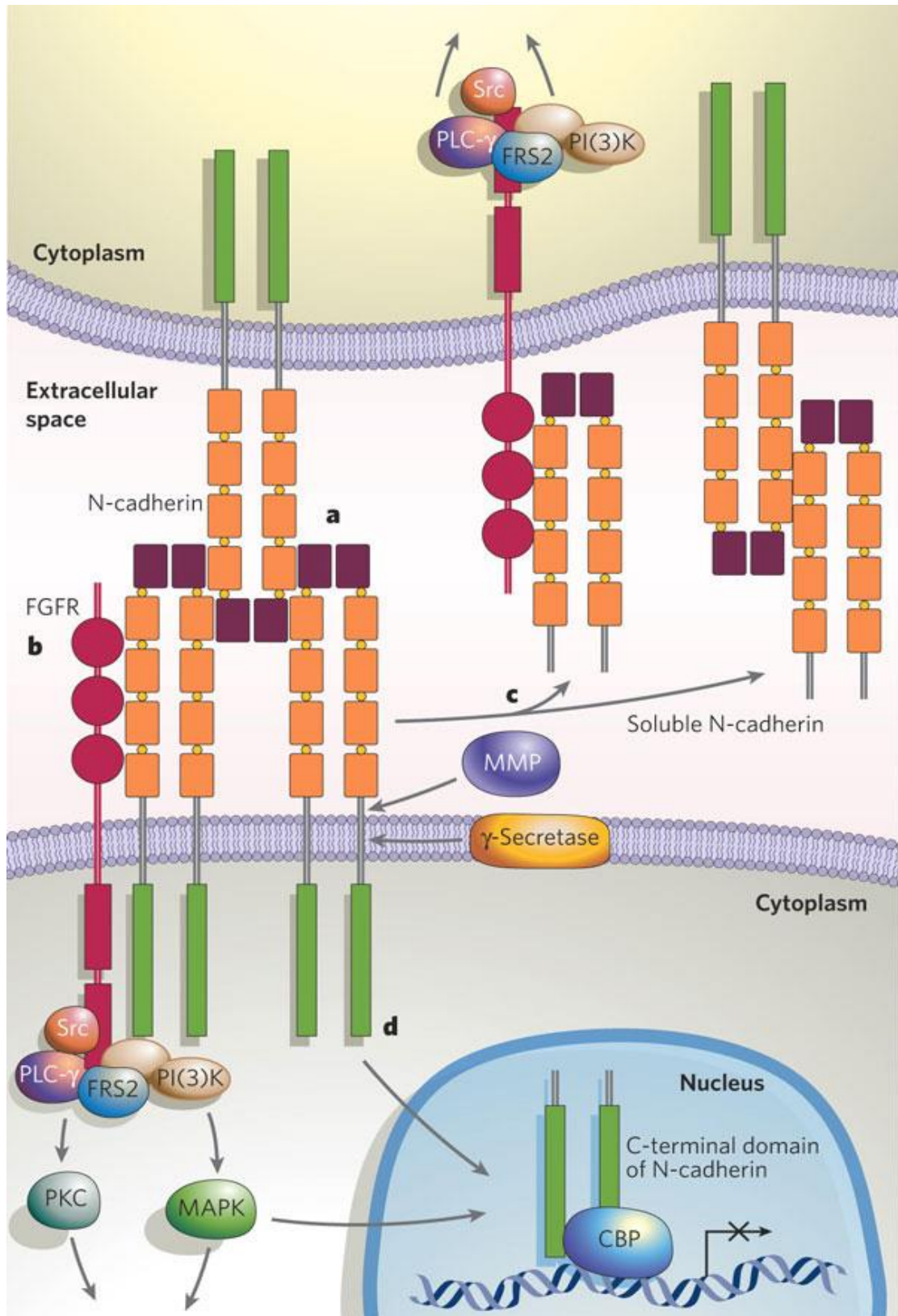
Vimentin:

Η vimentin είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών ενδιάμεσων νηματίων που αποτελούν σημαντικό δομικό υλικό κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης (Εικόνα 23). Έτσι η vimentin εμπλέκεται στη διατήρηση του σχήματος του κυττάρου, την ακεραιότητα του κυτταροπλάσματος και τη σταθεροποίηση του κυτταροσκελετού. Εκφράζεται σε ποικίλα μεσεγχυματικού τύπου κύτταρα, όπως ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και σε άλλα είδη κυττάρων που προέρχονται από το μεσόδερμα.



Εικόνα 23: Νημάτια vimentin.

Η έκφραση της vimentin φαίνεται να σχετίζεται με τη δραστηριότητα ενός σημαντικού για την EMT επιτελεστικού μορίου, της Src, υπό την επίδραση της οποίας επίσης καταστέλλεται η έκφραση της E-cadherin (Εικόνα 24) [221]. Η έκφραση της vimentin και η απώλεια των E-cadherin αποτελούν φαινόμενα που σε επίπεδο μεταγραφής βρίσκονται υπό τον κοινό έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα Snail [222]. Ρόλο στην έκφραση της vimentin διαδραματίζει και ο NF-kB άμεσα ή διά της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Twist [223].



Εικόνα 24: N-cadherin και οδοί μεταγωγής σήματος.

Κυτταροκερατίνες

Οι κυτταροκερατίνες σταδιακά εξαφανίζονται από τα κύτταρα κατά την EMT. Σε πρόσφατη μελέτη που έγινε σε μια μεγάλη σειρά περιστατικών καρκίνου του μαστού ανευρέθηκε σημαντική αύξηση της βιμεντίνης καθώς επίσης και σημαντική ελάττωση των κυτταροκερατινών 8, 18, και 19. Τα συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα στα οποία ανευρέθησαν αυτές οι κυτταροσκελετικές αλλαγές είχαν υποστεί το φαινόμενο της EMT και είχαν έντονη μεταστατική ικανότητα. Έτσι αποκαλύπτεται ο ρόλος των κυτταροκερατινών στην EMT.

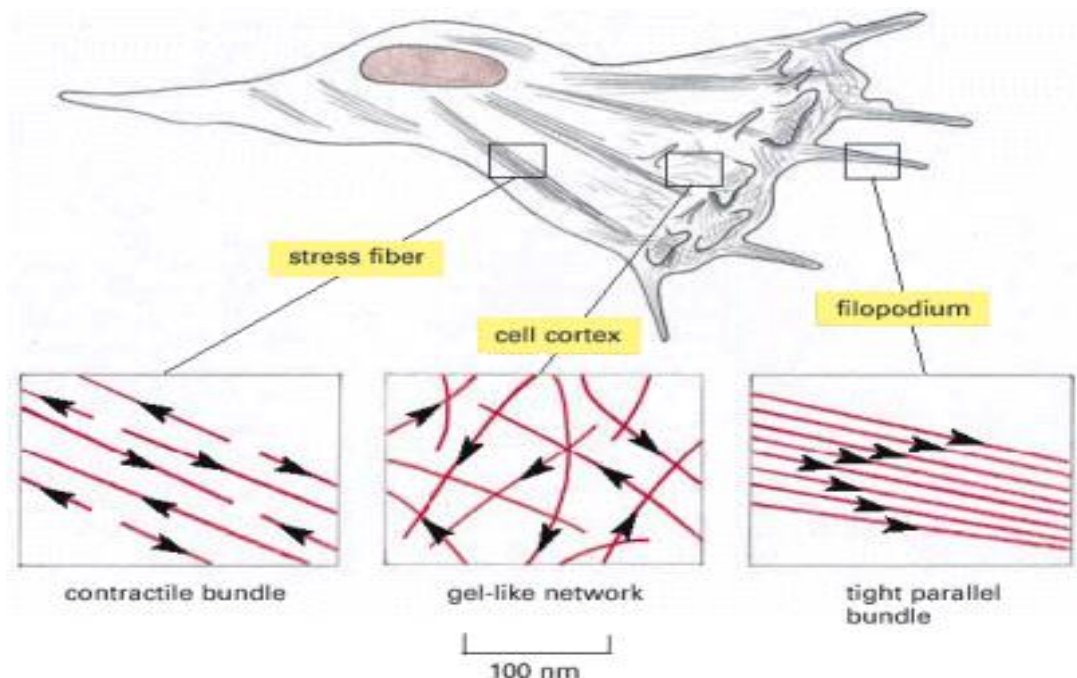
CD44:

Το μόριο CD44 συζευγμένο με τον κυτταροσκελετό και υπό την επίδραση των RhoGTPασών κατέχει σημαντική θέση στην κυτταρική κίνηση. Ταυτόχρονα όμως, συμμετέχει στο φαινόμενο EMT σε πολλαπλά επίπεδα [224]. Έχει υποστηριχθεί πως ο υποδοχέας του HGF, c-myc, χρήζει της συμβολής του CD44 για να ενεργοποιήσει τις MAPK. Υπογραμμίζεται παράλληλα η συμβολή του CD44 στην ενεργοποίηση του υποδοχέα της FGF. Αυτό επιτυγχάνεται με δέσμευση MMP-7 εξωκυτταρίως και πρωτεόλυση με αυτό του FGFR που έτσι ενεργοποιείται. Τέλος η ένωσή του με υαλουρονικό, ινδονεκτίνη και κολλαγόνο της θεμέλιας ουσίας καθώς και το γεγονός ότι φέρει MMP-9 συνεπικουρούν τη διείσδυση του καρκινικού κυττάρου.

Κυτταρική κίνηση:

Η απώλεια της πολικότητας του κυττάρου και η απόκτηση λαμελιποδίων προάγουν την κυτταρική κίνηση που είναι απαραίτητη για τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων και έχει τον χαρακτήρα της αμοιβαδοειδούς κίνησης (Εικόνα 25) [225, 226]. Η κατεύθυνση του κυττάρου καθορίζεται από τον τοπικό πολυμερισμό των ινών ακτίνης ώστε να δημιουργηθεί ένα δίκτυο που καταλήγει στην έκταση ενός λαμελιποδίου. Όταν το προέχον λαμελιπόδι εφάπτεται μορίων προσδετών της θεμέλιας ουσίας, υποδοχείς τύπου ιντεγκρίνης συναθροίζονται με αποτέλεσμα τη δημιουργία

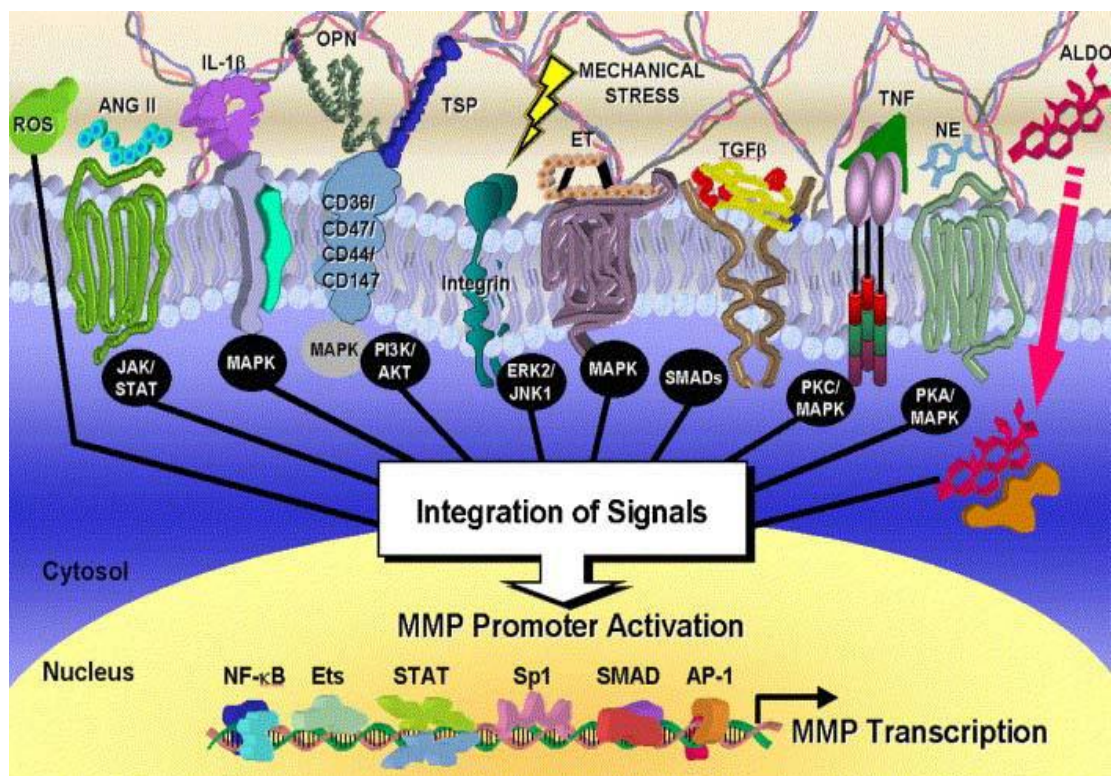
focal adhesions. Συγκεκριμένα, ενώνονται με τους προσδέτες της θεμέλιας ουσίας και ταυτόχρονα με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες με ρόλο είτε λειτουργικό (RhoGTRases) είτε δομικό για την ένωση με τα ινίδια ακτίνης.



Εικόνα 25: Αμοιβαδοειδής κυτταρική κίνηση.

3.2.3 ΕΜΤ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ

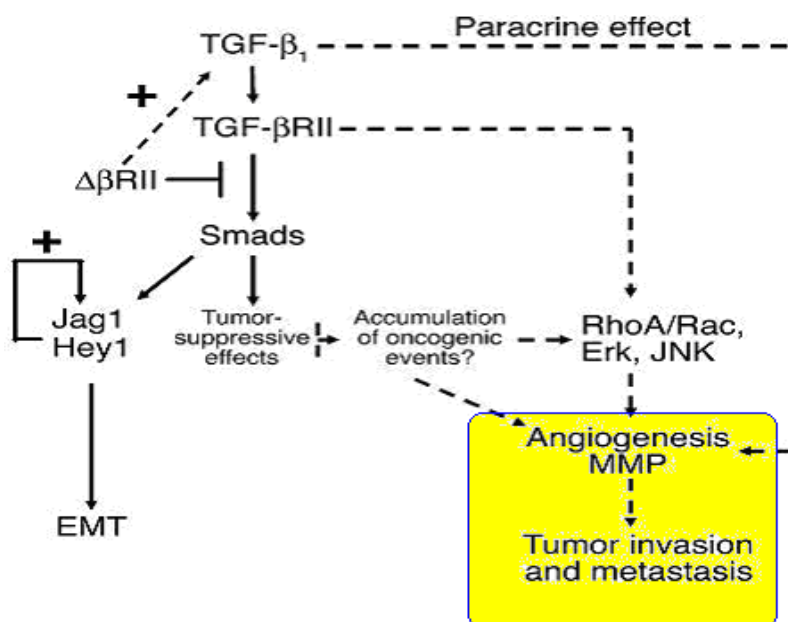
Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες είναι μια υπεροικογένεια ενδοπεπτιδασών, οι οποίες αποτελούνται από περίπου 22 μέλη και έχουν ρόλο τόσο σε φυσιολογικά φαινόμενα όσο και σε νεοπλασματικές διαδικασίες που εμφανίζονται σε επιμέρους κύτταρα. Παράγονται τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί εξαλλαγή (MMP-2 και MMP-9), όσο και στο στρώμα από τους ινοβλάστες (MMP-3,10,11). Οι MMP's έχουν την ιδιότητα να αποδομούν το βασικό υμένα και τη θεμέλια ουσία, ενώ παράλληλα συμμετέχουν στην κυτταρική κίνηση, στη λύση των κυτταρικών συνδέσεων, στην ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων και παρουσιάζουν αντιαποπτωτική δράση [227].



Εικόνα 26: Το σύνολο των σηματοδοτικών μονοπατιών οδηγούν, μέσω της παραγωγής μεταγραφικών παραγόντων, στην αύξηση της μεταγραφής των μεταλλοπρωτεϊνών.

Η σηματοδότηση για την αύξηση της παραγωγής των MMP's όπως κατά την καρκινογένεση γίνεται κυρίως μέσω δύο μονοπατιών (Εικόνα 26). Πρόκειται για το TGF-β που μέσα από ένα βιοχημικό καταρράκτη αυξάνει τον AP-1 μεταγραφικό παράγοντα, με συνέπεια την προαγωγή της μεταγραφής των MMP's και το Wnt μονοπάτι που μέσω της β-κατενίνης θα καταλήξει στην αύξηση του LEF μεταγραφικού παράγοντα που έχει ανάλογη δράση με τον AP-1. Στη ρύθμιση αυτών των σημαντικών πεπτιδασών, βασική θέση έχει μια οικογένεια πρωτεϊνών, οι TIMP's, με διττή επίδραση στις MMP's. Ο ακριβής μηχανισμός που αυτές δρουν φαίνεται πως εξαρτάται από το επιμέρους μόριο MMP στο οποίο δρουν.

Οι MMP's έχουν εξέχουσα σημασία στην EMT καθώς συμμετέχουν τόσο στην κατάργηση των κυτταρικών συνδέσεων, όσο και στην αναδιαμόρφωση των δομών του κυτταροσκελετού συμβάλλοντας στην αυξημένη κυτταρική κίνηση [227].



Εικόνα 27: Η έκφραση συγκεκριμένων μεταλλοπρωτεϊνών μετά την EMT οδηγεί σε διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

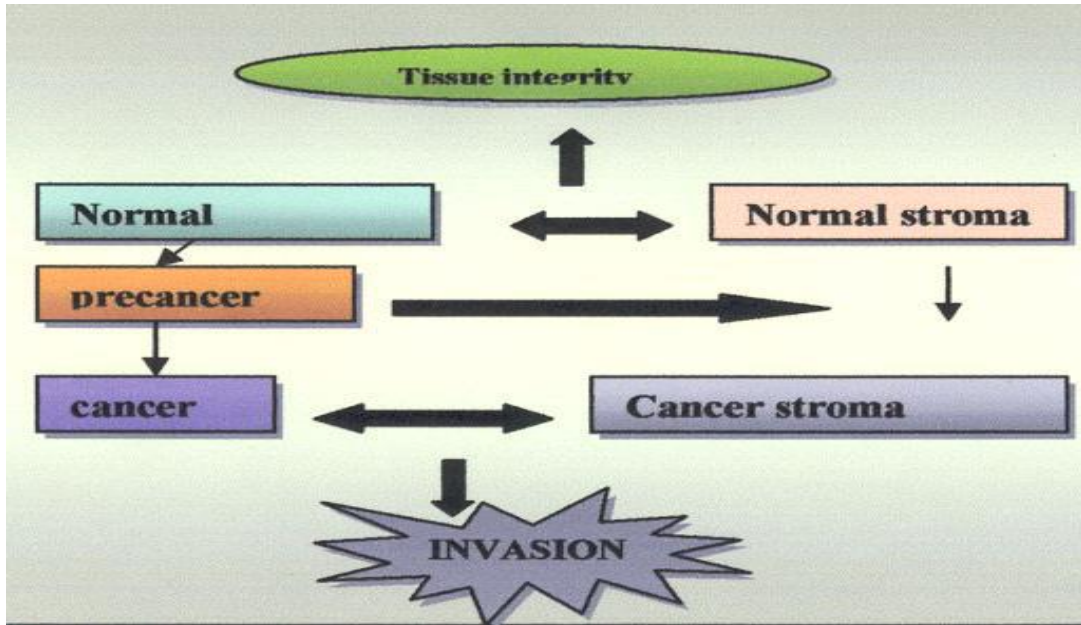
Η συμμετοχή των MMP's στην εξέλιξη του καρκίνου, βασίζεται στην πέψη των διαφόρων δομών της θεμέλιας ουσίας (κολλαγόνο, υαλουρονικό οξύ, πρωτεογλυκάνες) και τη δημιουργία μιας διόδου διαφυγής για τα καρκινικά κύτταρα από την αρχική τους θέση με αποτέλεσμα τη μετάσταση. Η αντιαποπτωτική δράση των MMP's αποδίδεται συγκεκριμένα στην πέψη του υποδοχέα FasL. Παράλληλα η πέψη του CD95 αντιγόνου επιφανείας αναστέλλει την αποπτωτική δράση των NK κυττάρων. Επιπλέον, οι MMP's ενεργοποιούν τους αυξητικούς παράγοντες FGF, EGF, TGF-β και TGF-α, γεγονός που εκλύει τη δράση των σηματοδοτικών μονοπατιών και κατά συνέπεια το φαινόμενο της EMT (Εικόνα 27).

3.2.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΗΣ EMT ΚΑΙ ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η νεοαγγειογένεση και η νεολεμφαγγειογένεση είναι θεμελιώδεις διαδικασίες στη βιολογία του καρκίνου [228, 229]. Εξασφαλίζουν τόσο τη συντήρηση των καρκινικών κυττάρων με μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στον αναπτυσσόμενο όγκο και απομάκρυνση των τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού όσο και τη δημιουργία οδών μετάστασης. Υπάρχουν κοινές σηματοδοτικές οδοί που ελέγχουν το EMT και την νεοαγγειογένεση οι σημαντικότερες των οποίων είναι τα μονοπάτια των RTKs-Ras-MAPKs, Wnt αλλά και Src-PI3K-Akt [230, 231]. Παράλληλα, η έκφραση MMP στα πλαίσια της EMT μπορεί να ενεργοποιήσει το βασικό παράγοντα της νεοαγγειογένεσης VEGF αλλά και της νεολεμφαγγειογένεσης (VEGF C & D). Τέλος η ILK έχει εμπλακεί και στις μοριακές διεργασίες της νεοαγγειογένεσης καθώς μέσω της οδού της Akt δύναται να ενεργοποιήσει τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF-1 που ευοδώνουν την έκφραση του VEGF.

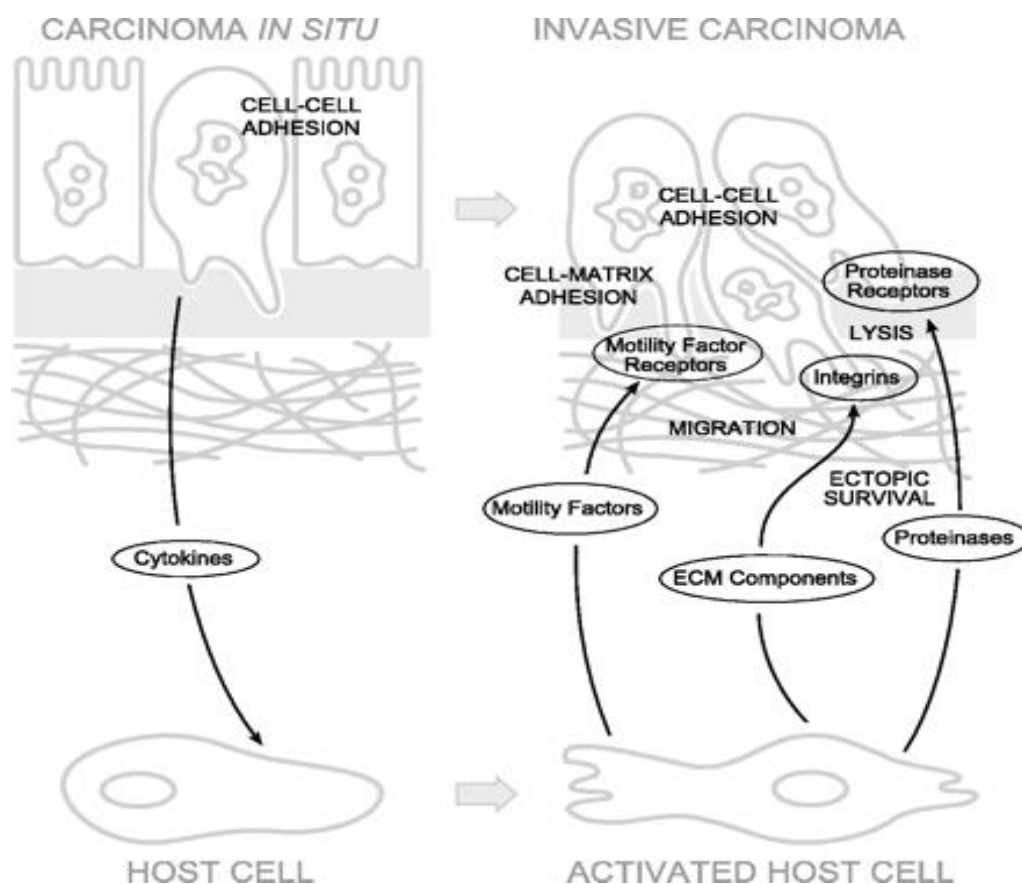
3.2.5 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ EMT

Ο καρκίνος προκαλεί μια φαινοτυπική μετατροπή στο στρώμα γύρω του καθώς το ενεργοποιεί. Το ενεργοποιημένο στρώμα με προέχον κύτταρο τον μυοϊνοβλάστη συμβάλλει στην μοριακή σηματοδότηση του EMT [232]. Τα επιθηλιακά κύτταρα και το στρώμα βρίσκονται σε ισορροπία που ελέγχεται από εκκρινόμενους αυξητικούς παράγοντες, κυττοκίνες, πρωτεΐνάσες και πρωτεϊνικά μόρια του στρώματος (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Σχέση καρκίνου-στρώματος.

Τα καρκινικά κύτταρα καταλύουν αυτή την ισορροπία καθώς τροποποιούν τους παράγοντες που τη διαμορφώνουν και δημιουργούν συνθήκες ενεργοποίησης του στρώματος (Εικόνα 29) [233-236].



Εικόνα 29: Αλληλεπίδραση καρκινικού κυττάρου με το μυοϊνοβλάστη.

Η ενεργοποίηση του καρκινικού στρώματος συνίσταται σε συγκεκριμένες διεργασίες και η παρουσία ενός νέου κυττάρου, του μυοϊνοβλάστη, έχει καθοριστική λειτουργική σημασία [237]. Επιπλέον στο ενεργοποιημένο στρώμα προσελκύονται κύτταρα φλεγμονής που εκκρίνουν διάφορους παράγοντες. Το ενεργοποιημένο καρκινικό στρώμα χαρακτηρίζεται από δομική αναδιοργάνωση και δημιουργία νεοαγγείων και νεολεμφαγγείων.

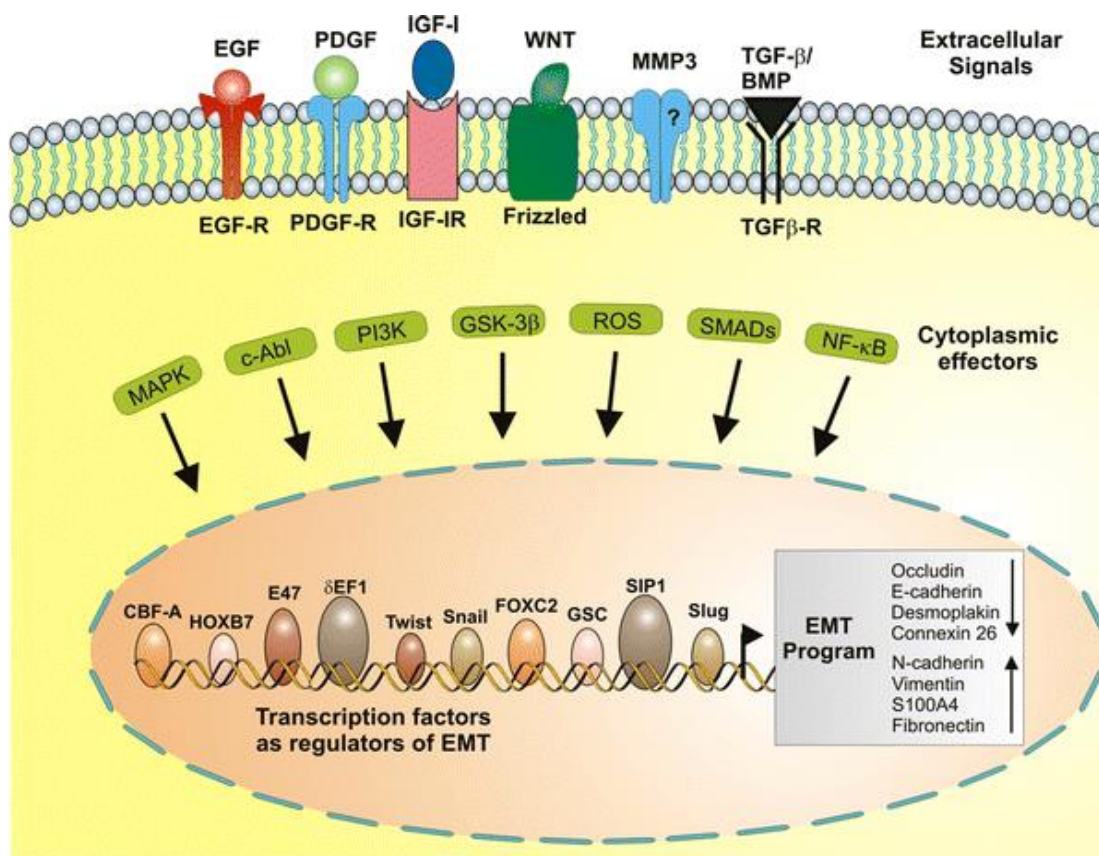
Οι μυοϊνοβλάστες είναι μεσεγγυματικά κύτταρα με χαρακτηριστικά λείων μυϊκών κυττάρων και ινοβλαστών. Διακρίνονται από το επίμηκες σχήμα τους, τον ανώμαλο πυρήνα, την παρουσία stress fibers και ανοσοϊστοχημικά από παρουσία δεικτών όπως α ακτίνη λείων μυϊκών κυττάρων (α -SMA), βιμεντίνη, προπυλ-4-υδροξυλάση και απουσία κυττοκερατινών. Οι παράγοντες που συντελούν στην δημιουργία τους είναι πρωτίστως ο TGF- β από τα καρκινικά κύτταρα και κύτταρα της φλεγμονής και δευτερευόντως ο PDGF. Πιθανολογείται ότι προέρχονται από τους

προϋπάρχοντες ινοβλάστες του στρώματος [238]. Ωστόσο, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο προέλευσης από λεία μυϊκά κύτταρα ή περικύτταρα της βασικής μεμβράνης των αγγείων, από αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα ή από επιθηλιακά κύτταρα.

Ο θεμελιώδης ρόλος των μυοϊνοβλαστών στην εξέλιξη της EMT των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων, αφορά στην παραγωγή σημαντικών μορίων στη σηματοδότηση της EMT όπως Wnt1, HGF, FGF και TGF- β . Επιπλέον όμως προάγουν την παραγωγή MMPs, που προσελκύουν τα κύτταρα φλεγμονής και αγγειογενετικούς παράγοντες.

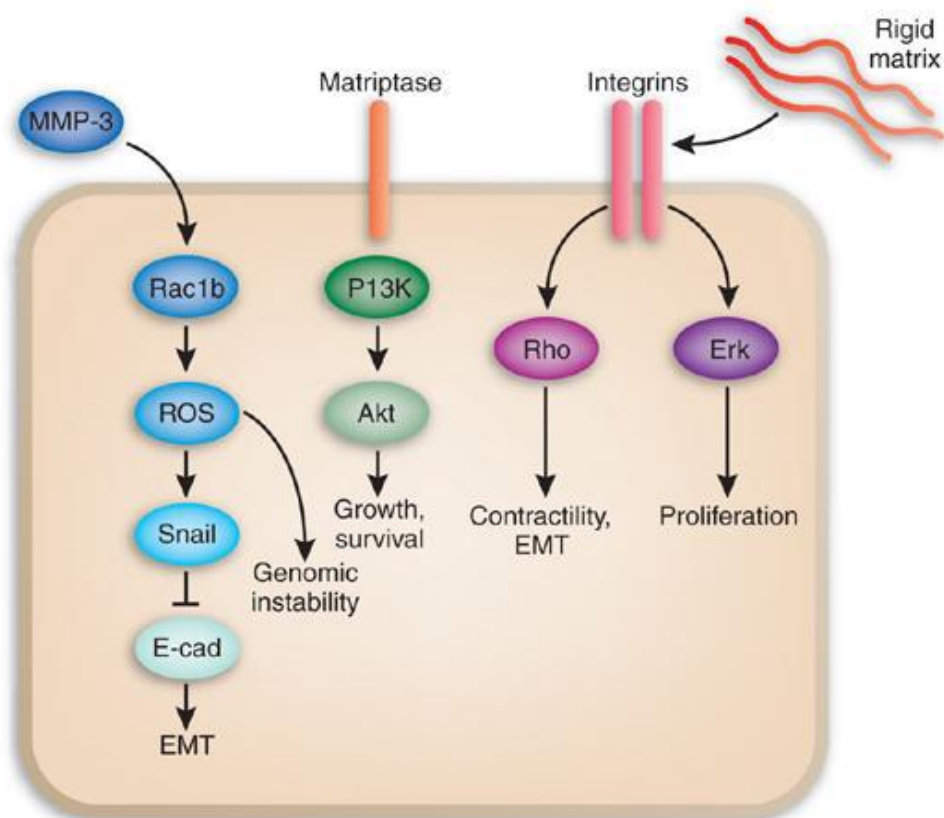
3.2.6 EMT ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Τα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που αποκτά το επιθηλιακό καρκινικό κύτταρο κατά την EMT του προσδίδουν μεταστατικό δυναμικό και αποτελούν προϊόν πολύπλοκων μοριακών διεργασιών. Η EMT διαμεσολαβείται από μόρια που συμμετέχουν σε μονοπάτια και οδηγούν είτε στη ρύθμιση της μεταγραφικής μηχανής, είτε σε ενεργοποίηση και απενεργοποίηση παραγόντων (Εικόνα 30 και 31) [239-242].



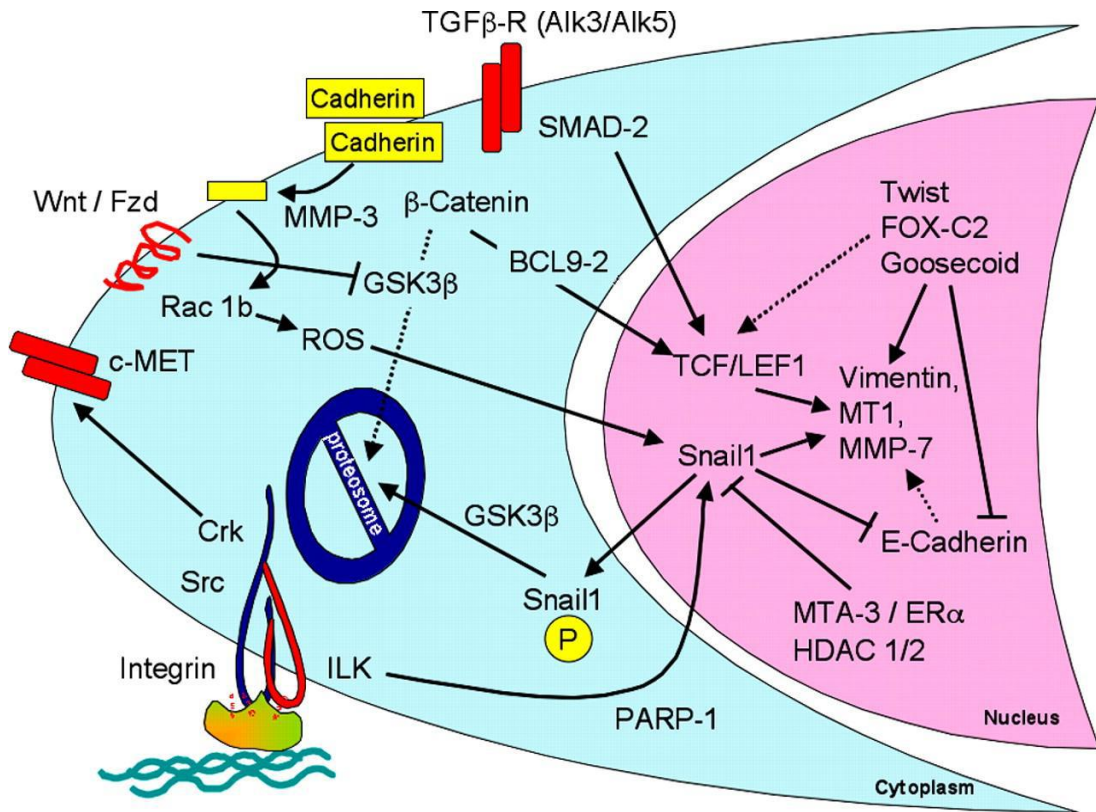
Εικόνα 30: Σηματοδοτικά μόρια και μεταγραφικοί παράγοντες της EMT.

Τα περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια καταλήγουν συνήθως στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 30 και 31). Έτσι, ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων με θετικό ή αρνητικό τρόπο με αποτέλεσμα το φαινότυπο της EMT. Μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με το φαινόμενο EMT, συμπεριλαμβάνονται τα Slug, Snail, WNT1, cFow-ER, β-κατενίνη/TCF, ZEB1, ZEB2, και Twist. Τα μόρια της οικογένειας Slug και Snail, αποτελούν ενεργοποιητές της μεταγραφής και αλληλεπιδρούν με το DNA με ένα μοτίβο γνωστό ως δάκτυλο ψευδαργύρου [197, 198, 243].



Εικόνα 31: Σηματοδοτικά μόρια και μεταγραφικοί παράγοντες της EMT.

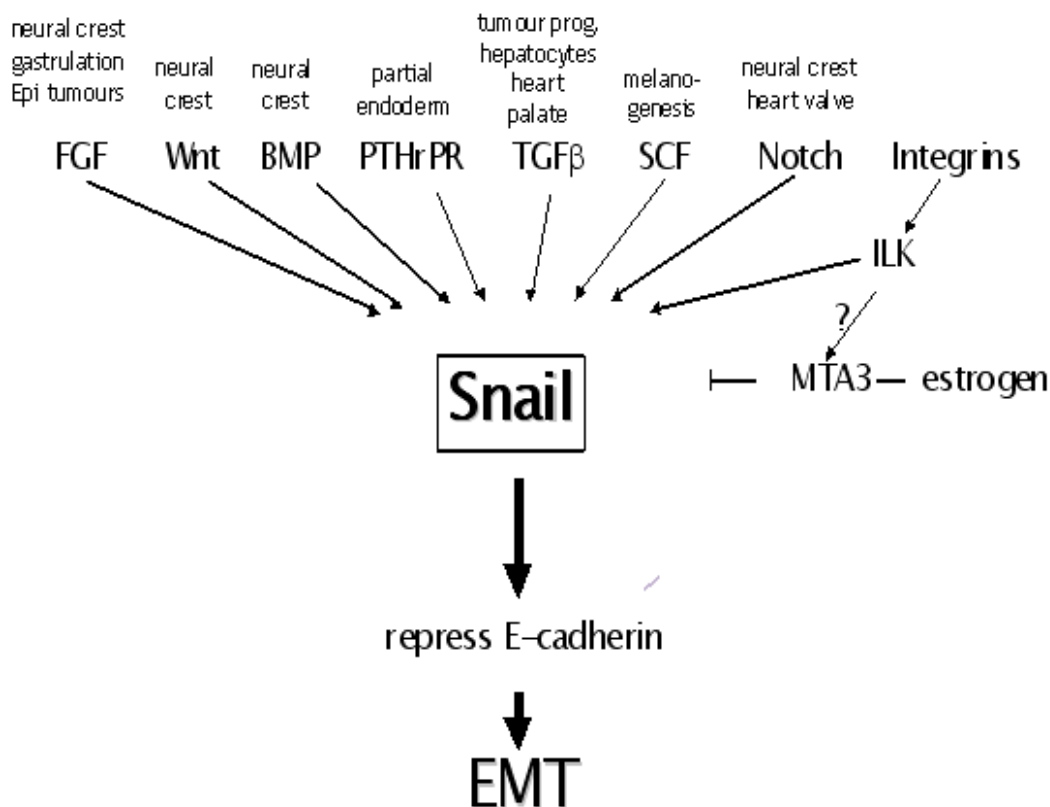
Πολλοί αυξητικοί παράγοντες έχουν τεκμηριωμένη συμμετοχή στη σηματοδότηση του EMT όπως ο EGF (epithelial growth factor), ο FGF (fibroblast growth factor), και κυρίως ο HGF/SF (hepatocyte growth factor ή scatter factor). Με δράση μέσω υποδοχών τυροσινικής κινάσης (RTKs) ξεκινούν τη μοριακή σηματοδότηση του EMT (Εικόνα 32). Ο αυξητικός παράγοντας TGF- β (transforming growth factor) είναι επιπρόσθετο μόριο που συμμετέχει στη σηματοδότηση του EMT, με ξεχωριστό ενδιαφέρον λόγω της διττής του φύσης στην ευόδωση και στην αποτροπή του καρκίνου.



Εικόνα 32: Αυξητικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη σηματοδότηση της EMT.

Φαίνεται πως η έκφραση Slug και Snail, αυξάνεται σε πρόκληση EMT με αρχικό σήμα EGF ή FGF μέσα από τα μονοπάτια του Ras/MAPK. Εξάλλου, οι Snail και Slug μπορεί να ενεργοποιηθούν και από σηματοδότηση του TGF-β ως αποτέλεσμα του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smads. Μέσω Snail δρα και ο παράγοντας ILK, ενώ στο Slug μπορεί να καταλήξει και το μονοπάτι της WNT σηματοδότησης.

Το Snail που βρίσκεται στον πυρήνα προκαλεί μείωση της έκφρασης του γονιδίου της E-καντχερίνης μέσω πρόσδεσης του Snail του εκκινητή γονιδίου (Εικόνα 33). Η μείωση της E-καντχερίνης είναι από τα σημαντικότερα γεγονότα στη διαδικασία της EMT και αναδεικνύει τη σημασία του Snail. Η καταστολή της έκφρασης της E-καντχερίνης από το Snail πραγματοποιείται μέσω δύο μονοπατιών.



Εικόνα 33: Καταστολή έκφρασης του γονιδίου της E-καντχερίνης από το Snail.

Το πρώτο εξαρτάται από τις τάξης I αποακετυλάσες της ιστόνης και το δεύτερο είναι ανεξάρτητο. Εκτός από τη δράση στην E-καντχερίνη ο Snail προκαλεί καταστολή της μεταγραφής και άλλων γονιδίων όπως της claudin, της occluding, cytokeratin 18, καθώς και ενεργοποίηση της μεταγραφής και άλλων γονιδίων όπως της βιμεντίνης και της ινοσυνδετίνης.

Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Slug αυξάνεται από την επίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών FGF, TGF-β, Wnt. Επίσης, ο Slug προκαλεί μείωση της έκφρασης του γονιδίου της E-καντχερίνης μέσω πρόσδεσης στα E-κουτιά του εκκινητή, κατ' αναλογία με το Snail.

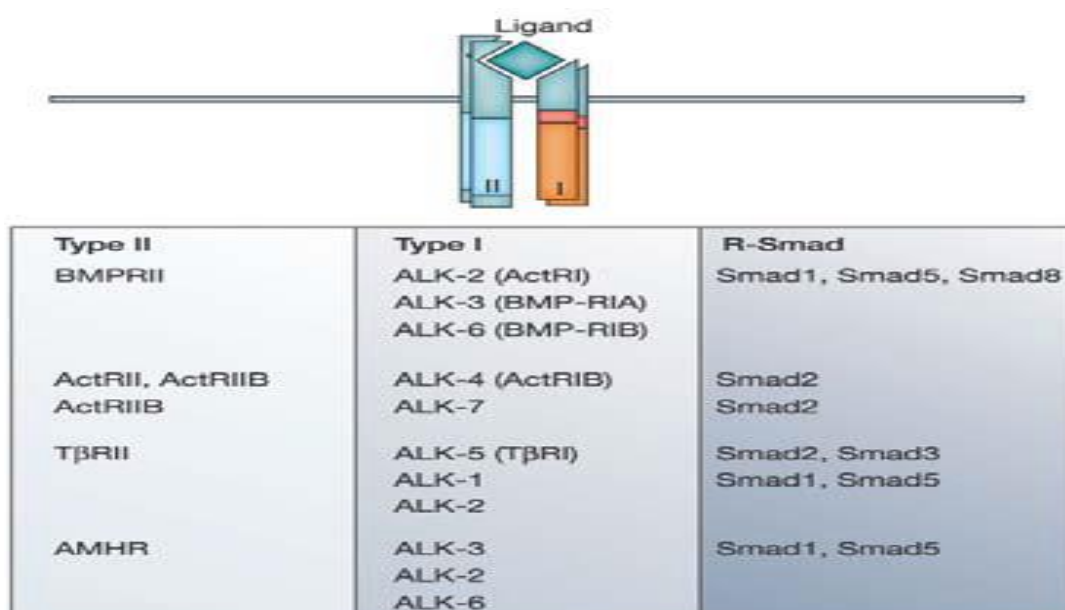
Το μονοπάτι NF-kβ συμμετέχει στην EMT και η απώλεια της δράσης του, καταργεί την προστασία των κυττάρων από την TGF-β επαγόμενη απόπτωση, και αναστέλλει την EMT. Αντίθετα, η ενεργοποίηση του NF-kβ επάγει την EMT και συνδράμει στη διατήρηση της μεσεγχυματικής κατάστασης του κυττάρου. Επιπλέον, τα γονίδια της

βιμεντίνης και της tenascin, που αποτελούν δείκτες περαίωσης της EMT, ρυθμίζονται από τον NF-κβ [197, 198, 243].

3.2.6.1 ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ TGF- B

I. Σηματοδότηση μέσω του TGF-β παράγοντα

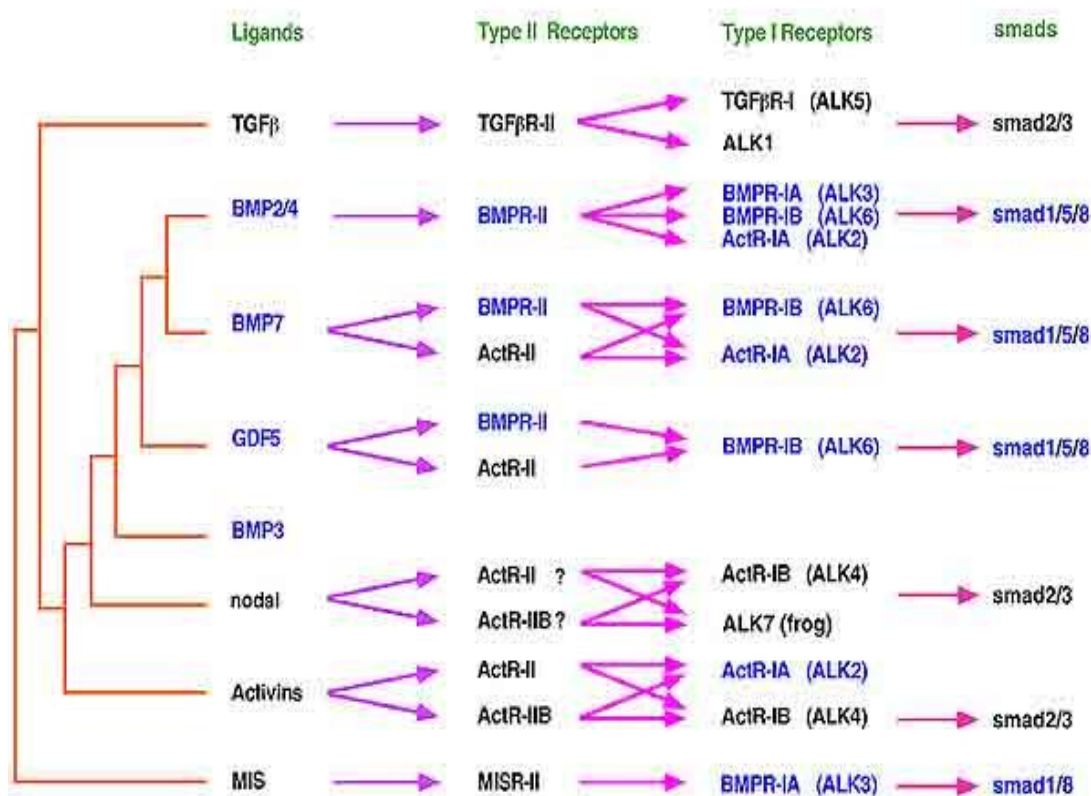
Το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του TGF-β παράγοντα είναι από τα σημαντικότερα στην ενεργοποίηση της EMT. Φυσιολογικά ο TGF-β και οι σχετιζόμενες κυτταροκίνες ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση [244]. Οι επιδράσεις των μορίων αυτής της υπεροικογένειας γίνονται μέσω ρύθμισης της έκφρασης ορισμένων γονιδίων που καθορίζουν τον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση καθώς και τα μόρια προσκόλλησης [244]. Οι δύο προσδέτες TGF-β, η BMP (Bone Marrow Protein) και η Activin, μεταδίδουν το σήμα τους μέσω ετεροτετραμερών συμπλεγμάτων, που αποτελούνται από δύο τύπους υποδοχέα κινάσης σερίνης/θρεονίνης, τον τύπο I και τον τύπο II (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Τύποι υποδοχέων TGFβ.

Μετά από την πρόσδεση του μορίου, ο υποδοχέας τύπου II ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει τον τύπου I υποδοχέα που με τη σειρά του ενεργοποιεί τα R-Smads (Receptor Regulated Smad). Οι μορφές του υποδοχέα είναι διαφορετικές για καθένα μόριο που δίνει το σήμα σε αυτό το μοριακό μονοπάτι και αυτές οι διαφορές αποδίδονται στα διαφορετικά είδη των υποδοχέων τύπου I και τύπου II (Εικόνα 35).

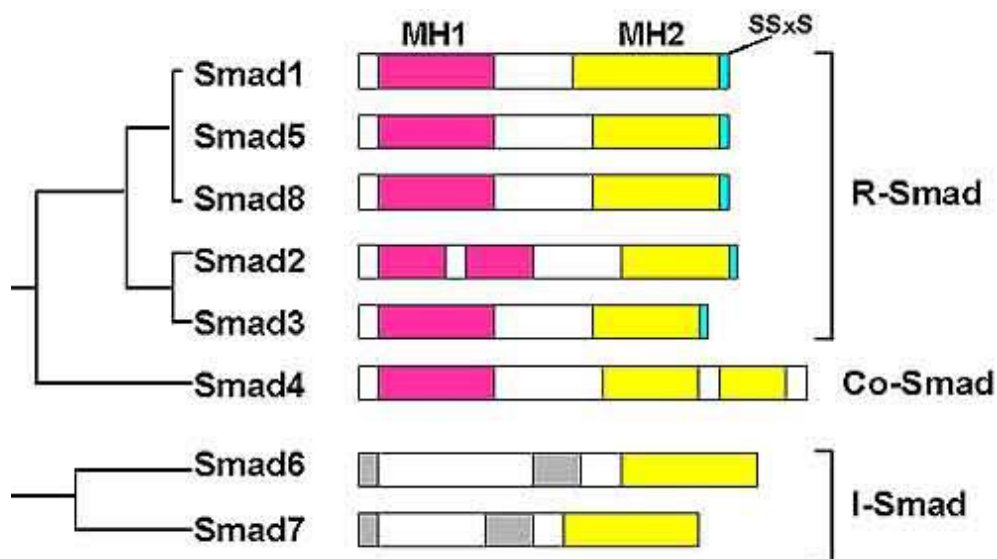
Binding Specificity of the TGF- β Superfamily Receptors



Εικόνα 35: Προσδέτες του TGF- β μονοπατιού και οι υπότυποι των υποδοχέων στους οποίους προσδένονται

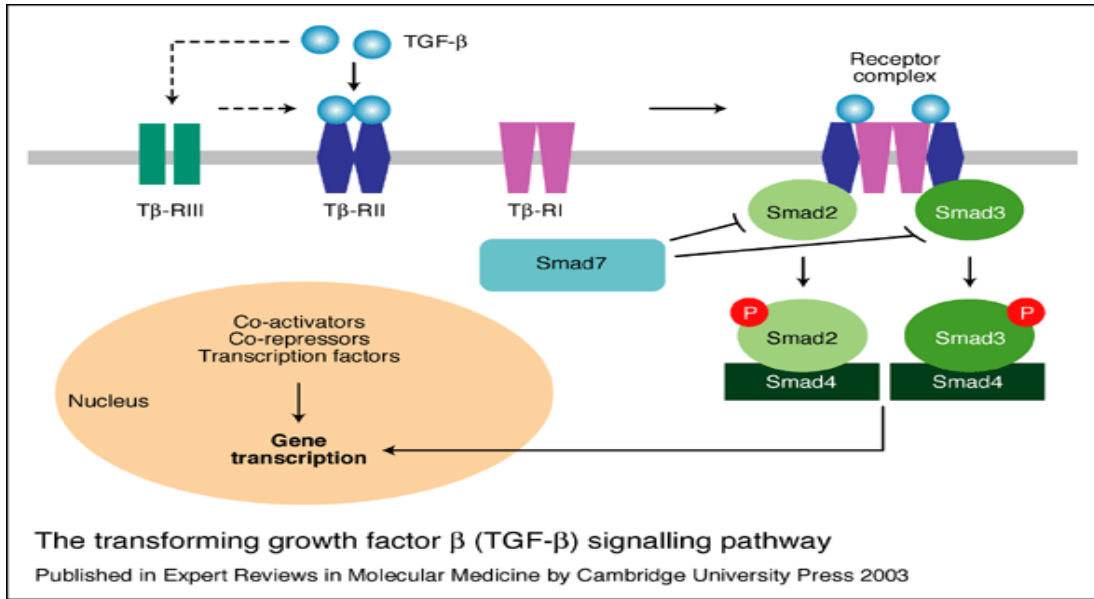
II. Smads: Τα βασικά επιτελεστικά μόρια στο μονοπάτι του TGF β

Υπάρχουν 8 διαφορετικές Smad πρωτεΐνες που επιμερίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες (Εικόνα 36). Στις Smad πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από τον υποδοχέα (R-Smad), το co-mediator Smad (co-Smad) και στις inhibiting smad πρωτεΐνες (I-Smad's).

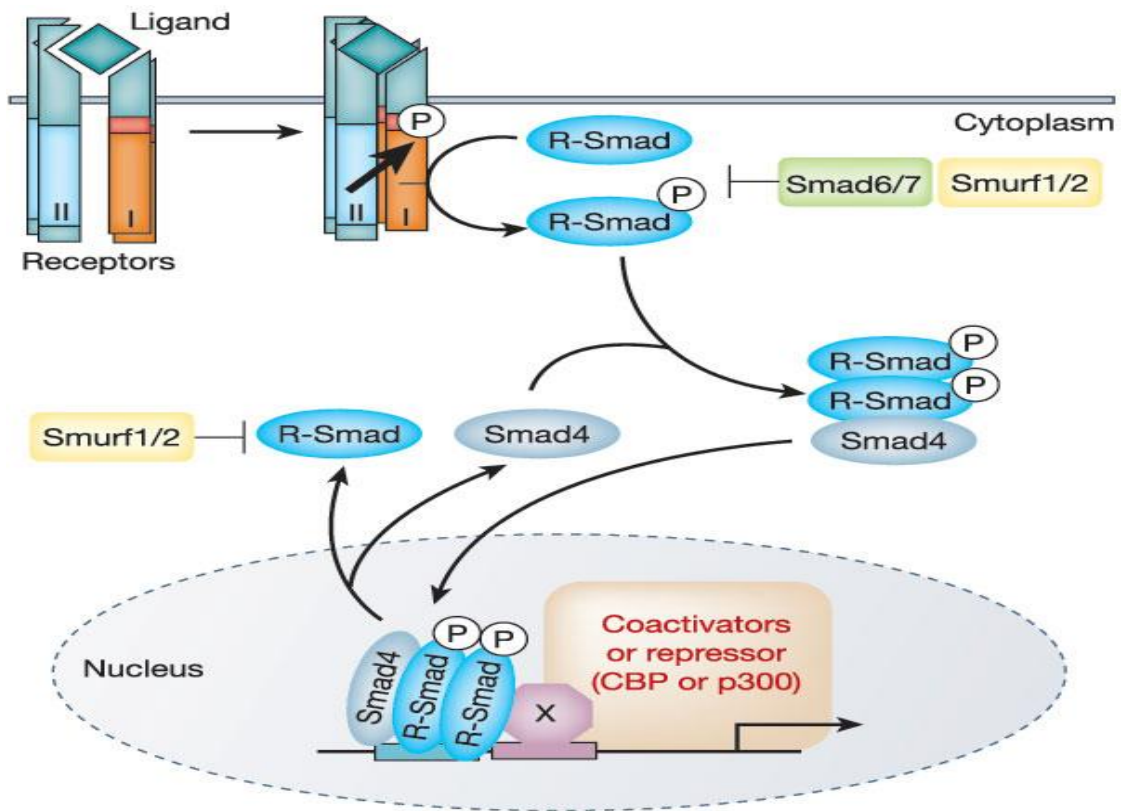


Εικόνα 36: Τα διάφορα είδη Smad πρωτεϊνών και οι κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται.

Η R-Smad κατηγορία περιλαμβάνει τα Smad 1,2,3,5 και 8 και είναι αυτά που φωσφορυλιώνονται απευθείας από τις τύπου I κινάσες του υποδοχέα. Το σύμπλεγμα Smad4 που προκύπτει, μεταναστεύει στον πυρήνα και σε συνεργασία με πυρηνικούς συμπράγοντες ρυθμίζουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων (Εικόνα 37) [245, 246]. Μετά την ενεργοποίηση, τα RSmads αποδεσμεύονται από το σύμπλοκο που προκύπτει, ενώνονται με το Smad 4 και μεταφέρονται στον πυρήνα (Εικόνα 38). Εκεί αλληλεπιδρούν με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμίζουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων [247].



Εικόνα 37: Αναπαράσταση της ενεργοποίησης των Smad 2 και 3 πρωτεϊνών και της επίδρασης αυτών στην μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων.



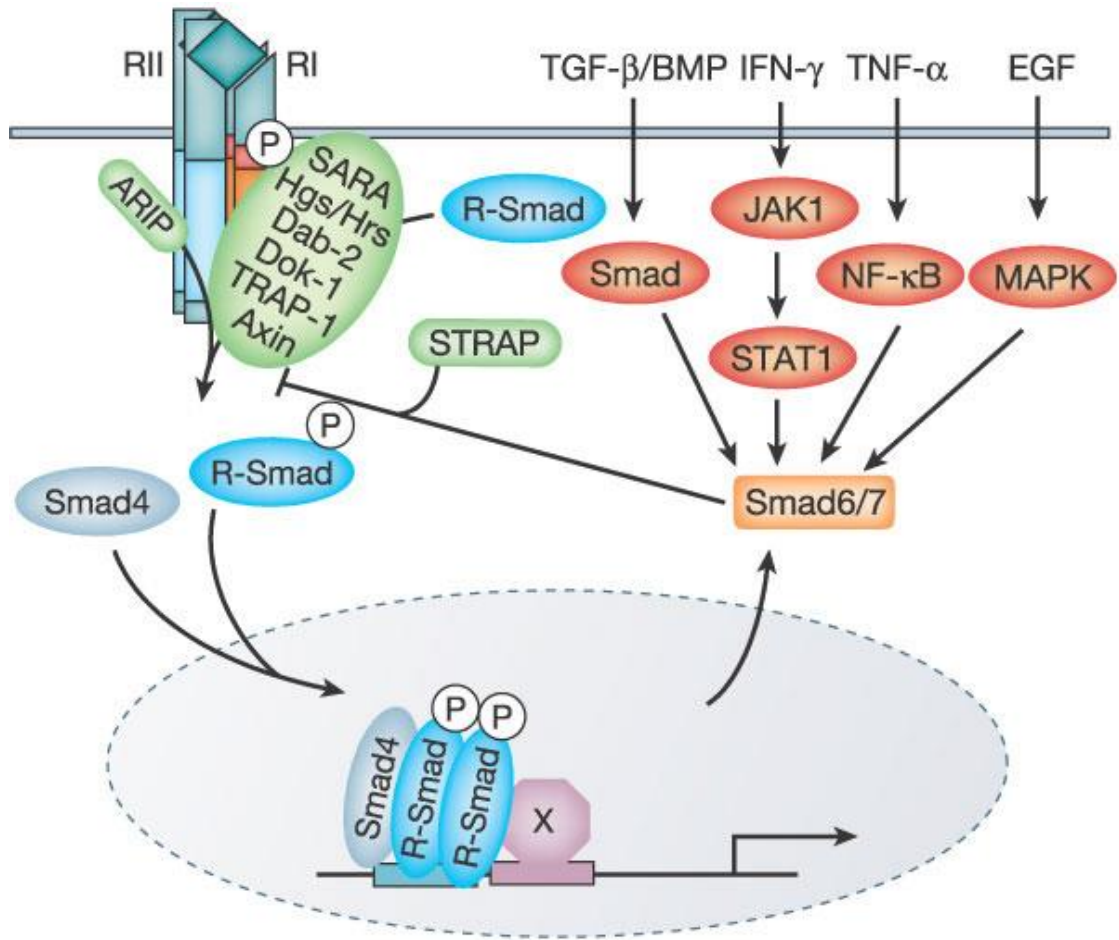
Εικόνα 38: Η οδός μεταγωγής σήματος μέσω smads.

Απο τα οκτώ Smads, το 6 και το 7 είναι τα μόνα ανασταλτικά του μονοπατιού. Καθώς συνδέονται στα τμήματα της υπομονάδας I που φυσιολογικά ενώνονται τα RSmads, παρεμποδίζεται η πρόσδεση των τελευταίων. Επιπλέον, το Smad 6 αναστέλλει την ένωση των RSmads με το Smad 4, ενώ ένας τρίτος μηχανισμός αναστολής του μονοπατιού είναι ο συνδυασμός των Smad 7 με παράγοντες όπως οι Smurf 1 και 2 που ενώνονται πάνω στην υπομονάδα I και την αποδομούν μέσω ουβικουϊτίνωσης. Τα Smad εκφράζονται μόνιμα στην πλειονότητα των κυτταρικών τύπων, εξαιρεθέντων των ανασταλτικών Smad 6 και 7 των οποίων τα επίπεδα ρυθμίζονται από εξωτερικά σήματα. Η ενεργοποίηση των RTKs, η σηματοδότηση από ιντερφερόνη γ μέσω STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) και η ενεργοποίηση του NF-kB από τον TNF-α προάγουν την ενεργοποίηση της έκφρασης των Smad 7 με συνέπεια την αναστολή του TGF-β σηματοδοτικού μονοπατιού.

Δεδομένου ότι η σηματοδότηση μέσω του TGF-β μονοπατιού αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, ευλόγως η απενεργοποίησή του οδηγεί σε ογκογένεση. Σε ποικίλα νεοπλάσματα έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις τόσο στους υποδοχείς του TGF-β όσο και στις Smad πρωτεΐνες. Μεταλλάξεις στον TGF-β τύπου II υποδοχέα διαπιστώθηκαν στην πλειοψηφία καρκίνων του ΓΕΣ, ενώ σε περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις παγκρεατικού καρκίνου παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στην Smad4 πρωτεΐνη.

III. Άλλες οδοί ενεργοποίησης των Smads:

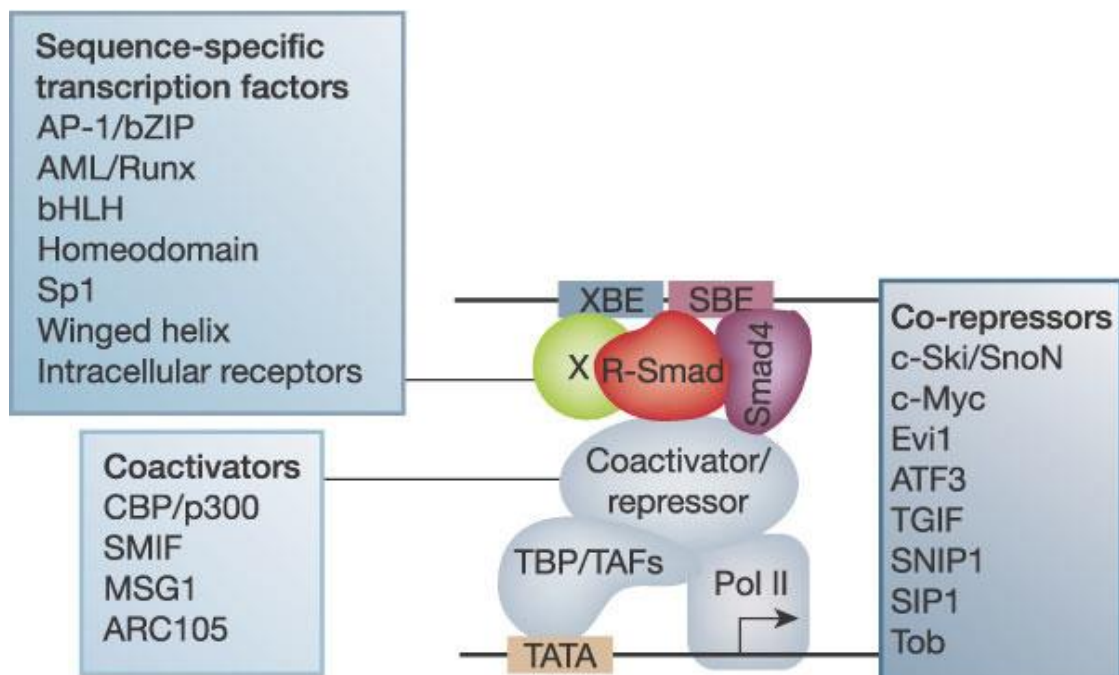
Η ενεργοποίηση των Smads διενεργείται πρωτίστως διαμέσω φωσφορυλίωσης από την υπομονάδα I του υποδοχέα του TGF β. Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ότι και το μονοπάτι των MAPK που ενεργοποιείται από τα RTKs ή \και το Ras, στοχεύει στα RSmads (Εικόνα 39). Το ενεργοποιημένο Ras μπορεί να παρεμποδίζει την μετανάστευση των RSmads στον πυρήνα γεγονός που δικαιολογεί την τροποποιημένη απάντηση TGF-β επίδρασης σε κύτταρα με υπερενεργοποιημένο το Ras.



Εικόνα 39: Άλλες οδοί μεταγωγής σήματος που δρύν πάνω στα smad.

IV. Smads και μεταγραφή:

Η επίδραση των Smads στην μεταγραφή είναι άμεση, καθώς διαντιδρούν με πλήθος μεταγραφικών παραγόντων ειδικών για συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: Συνενεργοποιητές και συνκαταστολείς των smad.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β δρα διττά καθώς υπάρχουν γονίδια που ενεργοποιούνται και άλλα που αναστέλλονται από αυτό. Έχει τεκμηριωθεί ότι, ο TGF- β μειώνει την έκφραση ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως του c-Myc, ενώ ενισχύει την έκφραση παραγόντων όπως το SIP1 το οποίο καταστέλλει τον υποκινητή του γονιδίου της E-καντχερίνης και παρακωλύει την έκφρασή της. Η ευοδωτική ή κατασταλτική δράση ένα γονιδίου από τα Smads καθορίζεται από τον υποκινητή του γονιδίου, τους μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετέχουν και την αλληλεπίδραση παραγόντων και σηματοδοτικών οδών σε δεδομένη στιγμή.

V. EMT μέσω σηματοδότησης του TGF- β μονοπατιού ανεξάρτητα από τα Smad's

Η υπεροικογένεια του TGF- β δύναται να οδηγήσει σε EMT ανεξαρτήτως των Smad's και μέσω εναλλακτικών οδών όπως είναι το μονοπάτι της MAPK.

Επιπλέον, η PI3K/AKT και το Rho-A μονοπάτι μπορούν να επάγουν την EMT αφού προηγουμένως ενεργοποιηθούν από το TGF- β μονοπάτι συμμετέχοντας με αυτόν τον

τρόπο στην καρκινογένεση. Εξάλλου, η TGF- β , επάγει την EMT και διαμέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras-Raf-MEK-ERK-AP1, το οποίο προκαλεί αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα Snai 1(Snail). Ο τελευταίος προάγει την έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών βιμεντίνης και ινοσυνδετίνης, και καταστέλλει τη μεταγραφή των επιθηλιακών δεικτών όπως της E-καντχερίνης.

3.2.6.2 ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ WNT

Ο ρόλος των WNT-πρωτεϊνών στο φαινόμενο EMT και στην καρκινογένεση είναι καταλυτικός. Οι WNT-πρωτεΐνες συνδέονται πάνω στους Frizzled υποδοχείς και στους LRP συνυποδοχείς που είναι two single span διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Η πρόσδεση των WNT-πρωτεϊνών στους Frizzled υποδοχείς, ακολουθείται από κινητοποίηση της κυτταροπλασματικής φωσφοπρωτεΐνης Dishevelled στην πλασματική μεμβράνη μέσω διαντίδρασης με φωσφολιπίδια. Ως αποτέλεσμα, η ενεργοποίηση του Dishevelled, τροποποιεί την αποδόμηση της κυτταροπλασματικής β -κατενίνης που σταθεροποιείται και καταλήγει στον πυρήνα [248-250]. Εκεί σχηματίζει συμπλέγματα με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο LEF/TCF. Το σύμπλεγμα αυτό προσδένεται στους υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων στόχων με τη συνδρομή συνενεργοποιητών όπως του SWI.

Η μετανάστευση της β -κατενίνης στον πυρήνα, γίνεται με την πρόσδεσή της πάνω σε συμπαράγοντες όπως ο bcl-9. Η β -κατενίνη αλληλεπιδρά με τις κυτταροπλασματικές περιοχές των καντχερινών, διαμορφώνοντας μια σύνδεση με τον ακτινικό κυτταροσκελετό μέσω της πρόσδεσής τους με την α -κατενίνη. Η αλληλεπίδραση της β -κατενίνης με την E-καντχερίνη και κατά συνέπεια η δομική και λειτουργική ακεραιότητα των ζωνών πρόσφυσης ρυθμίζεται δυναμικά από τη δραστηριότητα κινασών και φωσφατασών [249].

Εν τέλει, η ενεργοποίηση του WNT μονοπατιού με συνέπεια τη μετανάστευση της β -κατενίνης μέσα στον πυρήνα, αποφέρει ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων. Αυτοί, οδηγούν σε υπερέκφραση γονιδίων, όπως το Snail, που προκαλούν μείωση της έκφρασης του γονιδίου των E-καντχερινών [197, 200, 251].

Εξάλλου, το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt αλληλεπιδρά και με άλλες οδούς. Καταρχήν μπορεί να υφίσταται διαντίδραση μορίων διαφόρων οδών πριν το επίπεδο της μεταγραφής. Επί παραδείγματι η ILK (integrin linked kinase), μια σερίνη\θερονίνη κινάση σχετιζόμενη με τις υπομονάδες των ιντεγκρινών, ευοδώνει την μεταγραφική ενεργοποίηση από το β -catenin\LEF-1 σύμπλοκο και αυξάνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα LEF-1 [252].

Επιπλέον, το γονίδιο στόχος της Wnt σηματοδότησης μπορεί να φέρει στον υποκινητή του περιοχές που να αποτελούν στόχους για τα επιτελεστικά μόρια και άλλων οδών. Τέλος, δυο σήματα ανεξάρτητα τυχόν αλληλεπίδρασης, μπορούν να επιφέρουν ένα αθροιστικό αποτέλεσμα στο κύτταρο. Στο πλαίσιο αυτό, η επίδραση της οδού του Wnt και του P53 σε ένα κύτταρο του προσδίδουν επιθετική συμπεριφορά καθώς, πυροδοτείται ο πολλαπλασιασμός με ταυτόχρονη αδυναμία διόρθωσης των βλαβών του DNA.

3.2.6.3 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ

I. Ιντεγκρίνες

Η αλληλεπίδραση των κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία διαμεσολαβείται από τις ιντεγκρίνες, μία οικογένεια υποδοχέων κυτταρικής προσκόλλησης. Οι διαμεμβρανικές αυτές πρωτεΐνες, αποτελούνται από 18α και 8β υπομονάδες που διμερίζονται ώστε να προκύψουν τουλάχιστον 24 διαφορετικές ιντεγκρίνες με διακριτούς προσδέτες και σηματοδοτικές ιδιότητες.

Οι ιντεγκρίνες προσδέονται με το εξωκυττάριο τμήμα τους σε συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η λαμινίνη, η ινονεκτίνη και το κολλαγόνο. Το ενδοκυττάριο τμήμα τους, προσδέεται άμεσα ή έμμεσα στον κυτταροσκελετό ακτίνης και τον συνδέει με την εξωκυττάρια ουσία.

Εκτός από υποδοχείς κυτταρικής προσκόλλησης, οι ιντεγκρίνες έχουν και ρόλο υποδοχέων αμφίδρομης μεταγωγής σημάτων. Συμμετέχουν επίσης στην κυτταρική προσκόλληση, καθώς και στη ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών, τόσο φυσιολογικών, όπως η επούλωση και εμβρυϊκή ανάπτυξη, όσο και στην καρκινογένεση

και την κυτταρική μετανάστευση και πολλαπλασιασμό. Η πρόσδεση των ιντεγκρινών σε συγκεκριμένα συστατικά της θεμέλιας ουσίας αποφέρει ομαδοποίηση των υποδοχέων και σχηματισμό των τοπικών συνδέσεων [253, 254].

Τα μόρια πρόσδεσης ενώνουν τα κύτταρα μεταξύ τους και δρουν ως θέσεις αγκυροβολίας του κυτταροσκελετού κάθε κυττάρου. Έτσι οι κυτταροσκελετοί όλων των κυττάρων παραμένουν ενωμένοι σε μία μονήρη λειτουργική στοιβάδα.

Μέσα στο κύτταρο ένα πλήθος σηματοδοτικών μορίων των ιντεγκρινών, όπως ο FAK, Shc, Grb2, PI3K, Src και p130cas οδηγεί σε μια ακολουθία φωσφορυλιώσεων που καταλήγουν στην ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού.

II. Ενεργοποίηση της οδού των MAPK

Σε κύτταρα ενωμένα με το στρώμα, παράλληλα με την FAK ενεργοποιούνται οι MAPK όπως οι Erk1\2, JNK, p38 που κατευθύνουν το μονοπάτι σε έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας.

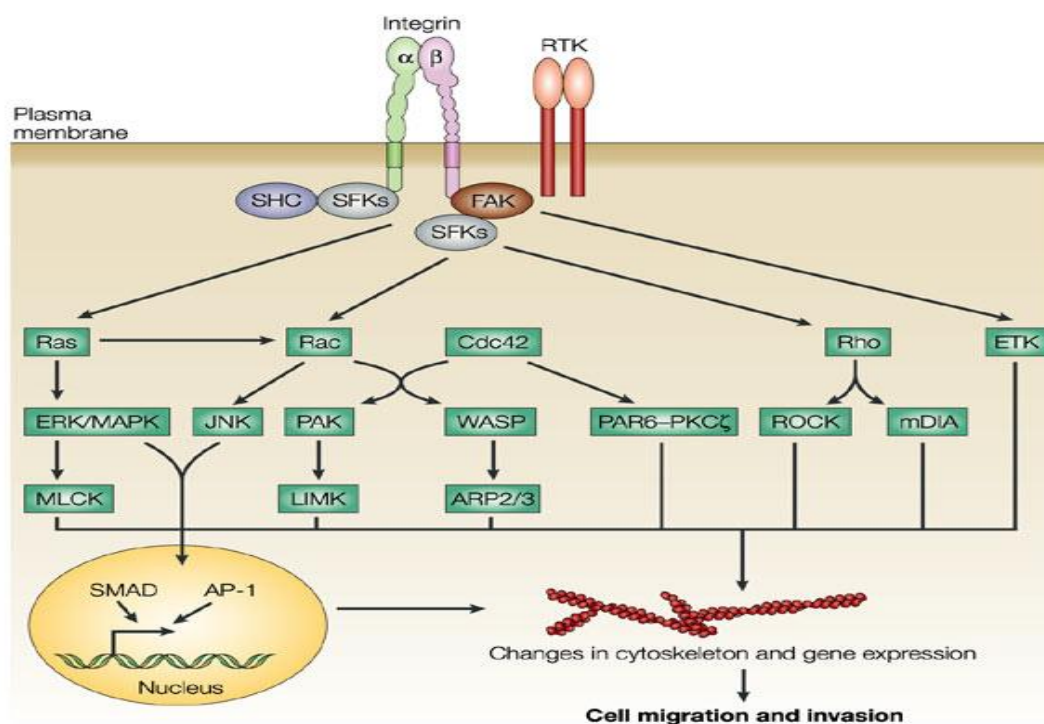
Οι MAPK ρυθμίζουν τα πρώιμα στάδια της κυτταρικής κίνησης και αλληλεπιδρούν με τις Rho kinases που αναλαμβάνουν να συντηρήσουν αυτή τη διεργασία. Το μονοπάτι των ERK κινασών εμπλέκεται στη λειτουργία της MLCK (myosin light-chain kinase) που φωσφορυλιώνει τις ελαφρές αλυσούς της μυοσίνης ώστε να αλληλεπιδρούν με τα ινίδια ακτίνης κατά την κυτταρική κίνηση.

Στο μονοπάτι των MAPK τέλος αποδίδεται και μια από τις οδούς που προάγουν την επιβίωση του καρκινικού κυττάρου από τη μοριακή διεργασία της απόπτωσης, μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης BAD.

III. Επίδραση ιντεγκρινών στην ρύθμιση των Rho GTPασων

Κατά την δέσμευση της θεμέλιας ουσίας με τις ιντεγκρίνες μεταδίδονται και σήματα που ενεργοποιούν τις Rho GTPασες των οποίων ο ρόλος συνίσταται στην επαναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού με τη δημιουργία δομών όπως φιλοπόδια. Οι

ιντεγκρίνες ενώνονται με ίνες του κυτταροσκελετού και συνδράμουν στην κυτταρική κίνηση. Παράλληλα όμως συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς ασκούν μεταγραφική ρύθμιση στα επίπεδα της κυκλίνης D (Εικόνα 41).



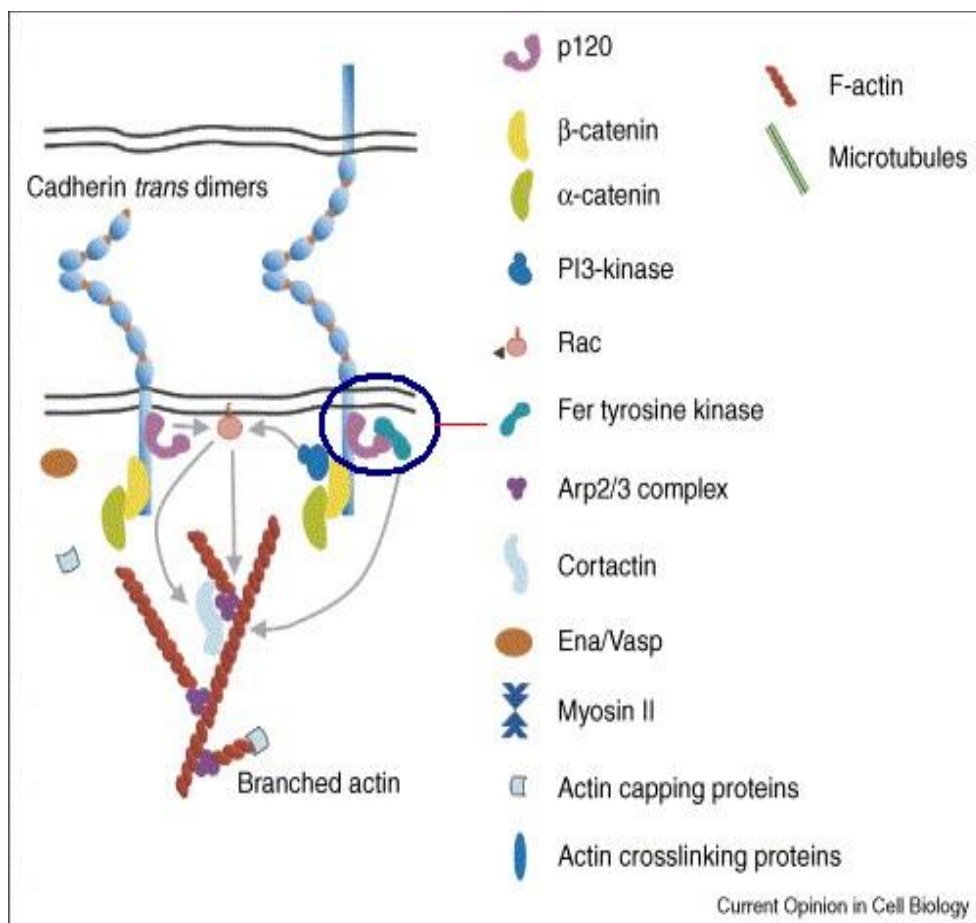
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικόνα 41: Ιντεγκρίνες και έλεγχος RhoGTRase.

IV. Μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ συμπλεγμάτων ιντεγκρινών και συμπλεγμάτων καντχερινών

Αυτές οι δομές βρίσκονται μεταξύ τους σε δυναμική ισορροπία και έχουν αναφερθεί σε αρκετά πειραματικά μοντέλα περιγραφής της EMT. Ελάττωση των δομών των ιντεγκρινών προκαλεί αύξηση των συμπλεγμάτων των καντχερινών. Έχει αναφερθεί ότι η πρόσδεση ανάμεσα σε καντχερίνες και στην ιντεγκρίνη α3β7 που διαδραματίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως κατά την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγεί στη μετανάστευση των πρώτων. Εξάλλου,

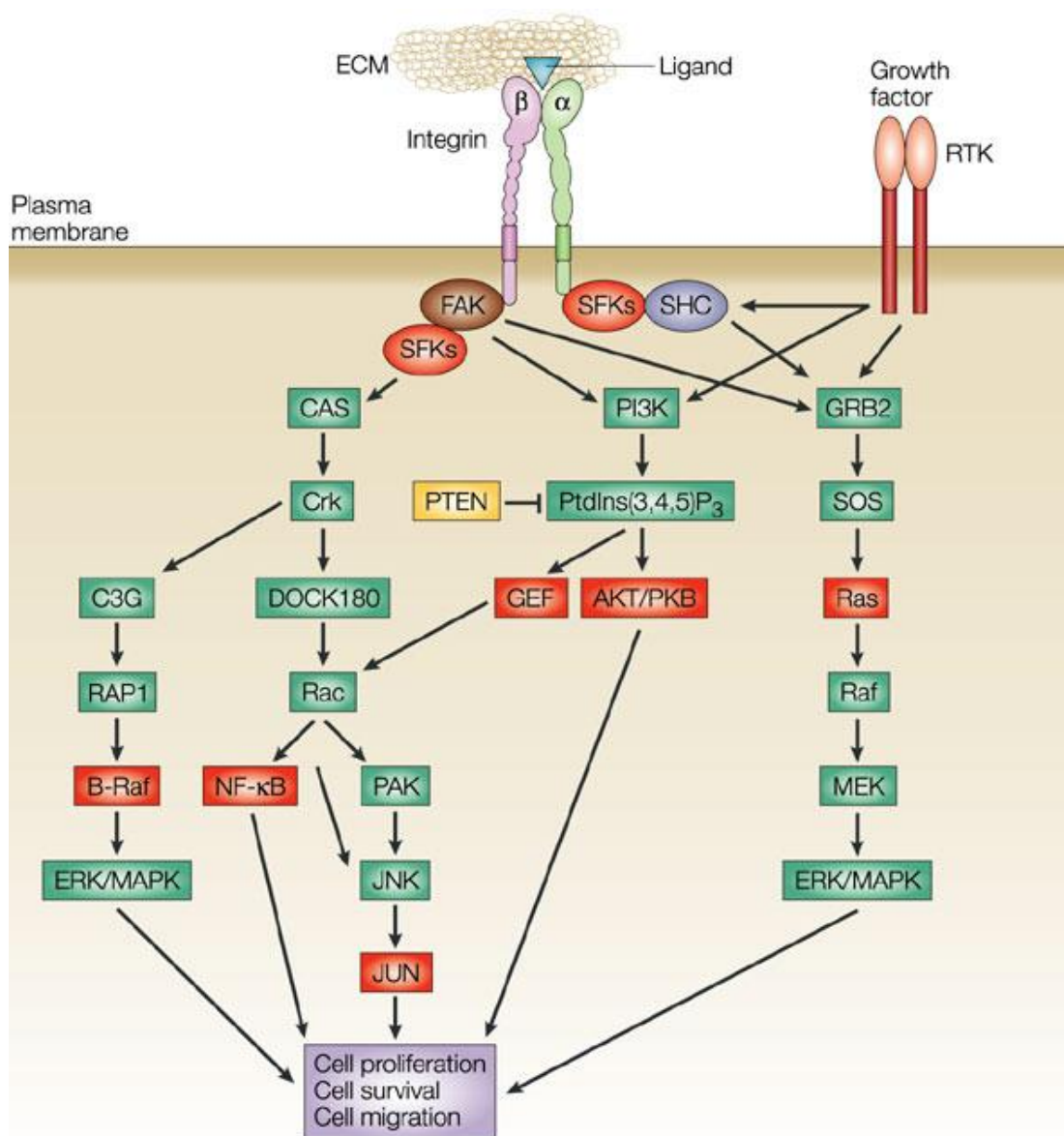
πιθανολογείται η ανταλλαγή ορισμένων πρωτεϊνών ανάμεσα στις κυτταροπλασματικές περιοχές των καντχερινών και των ιντεγκρινών, γεγονός που ρυθμίζει τη μεταξύ τους δράση. Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι η Fer, που αντιπροσωπεύει μια μη διαμεμβρανική τυροσινική κινάση, με ένα χαρακτηριστικό πρωτεϊνικό υπόστρωμα που δεσμεύεται στα ινίδια ακτίνης και λέγεται κοντρακτίνη (Εικόνα 42). Υπέρεκφραση του Fer στους ινοβλάστες επάγει την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα και ακολουθείται από το σχηματισμό ενός συμπλέγματος που περιλαμβάνει τη Fer, p120cas, α -κατενίνη και τη β -κατενίνη. Ελαττωμένα ποσά α - και β -κατενίνης ανοσοκατακρημνίζονται και τα δύο με E-καντχερίνη, που υπονοεί λύση των κυτταρικών προσκολλητικών δομών.



Εικόνα 42: Σχηματική απεικόνιση της εντόπισης της Fer πρωτεΐνης και της αλληλεπίδρασής της με τις καντχερίνες και τον κυτταροσκελετό.

V. Συνεργασία σηματοδοτικών μονοπατιών ιντεγκρινών και υποδοχέων αυξητικών παραγόντων

Η ανάπτυξη των κυττάρων προϋποθέτει εκτός από την ύπαρξη αυξητικών παραγόντων και την προσκόλληση στη θεμέλια ουσία. Η συνεργασία αυτή εδράζεται τόσο στο επίπεδο του υποδοχέα όσο και στην πορεία του καταρράκτη της σηματοδότησης [255]. Οι δύο διαφορετικές σηματοδοτικές οδοί που αποσκοπούν στο ίδιο αποτέλεσμα, συγκλίνουν στην πορεία τους σε κάποια μόρια κλειδιά συμπεριλαμβανομένων των SHC, Ras\Raf-1\MEK\Erk1\2, PI3K, Rho GTPases, JNK, RSK, FAK, paxillin, p130CAS (Εικόνα 43).



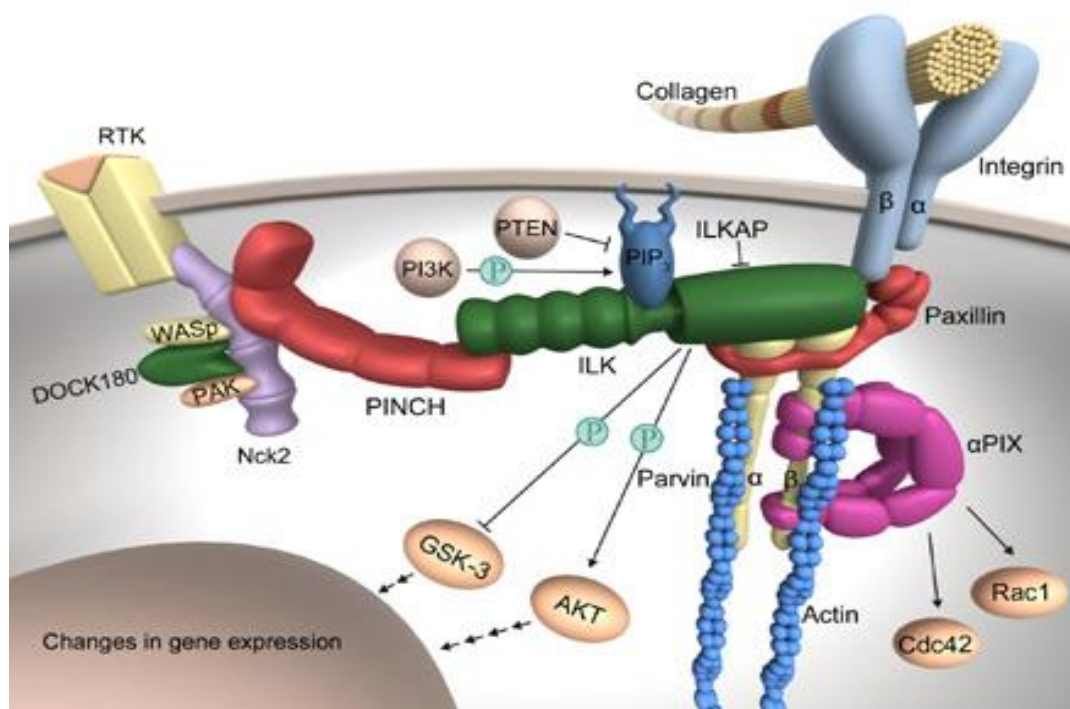
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικόνα 43: Συνεργασία ιντεγκρινών και αυξητικών παραγόντων.

VI. ILK (Integrin-Linked-Kinase)

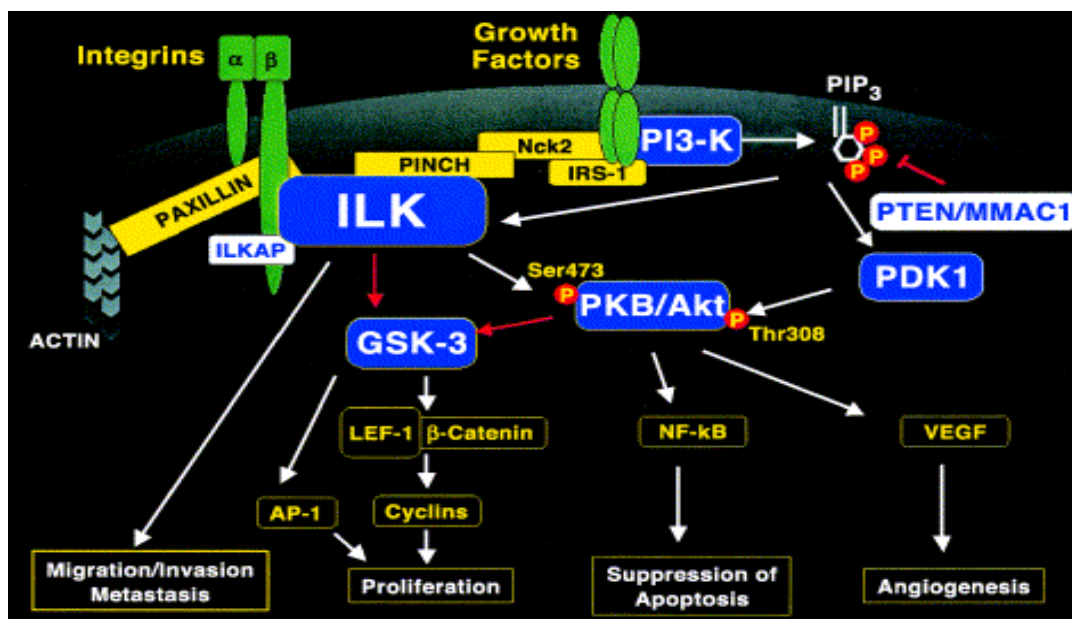
Η ILK είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που εντοπίζεται στις πλάκες εστιακής πρόσφυσης και εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση και στη ρύθμιση και σύγκλιση οδών μεταγωγής σημάτων από ιντεγκρίνες και αυξητικούς παράγοντες. Η ILK διαντιδρά με τις κυτταροπλασματικές υπομονάδες των β1 και β3 ιντεγκρινών, ενώ

ενεργοποιείται και από ποικίλους άλλους αυξητικούς παράγοντες μέσω της δράσης της PI3k καθώς και από τον TGF- β μέσω του Smad μονοπατιού. Η συσχέτιση της ILK με την ακτίνη και μυοσίνη την καθιστά κομβικό μόριο στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού που καθοδηγείται από σήματα του στρώματος που περιβάλλει το κύτταρο (Εικόνα 44) [256].



Εικόνα 44: ILK και το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του οποίου δρά.

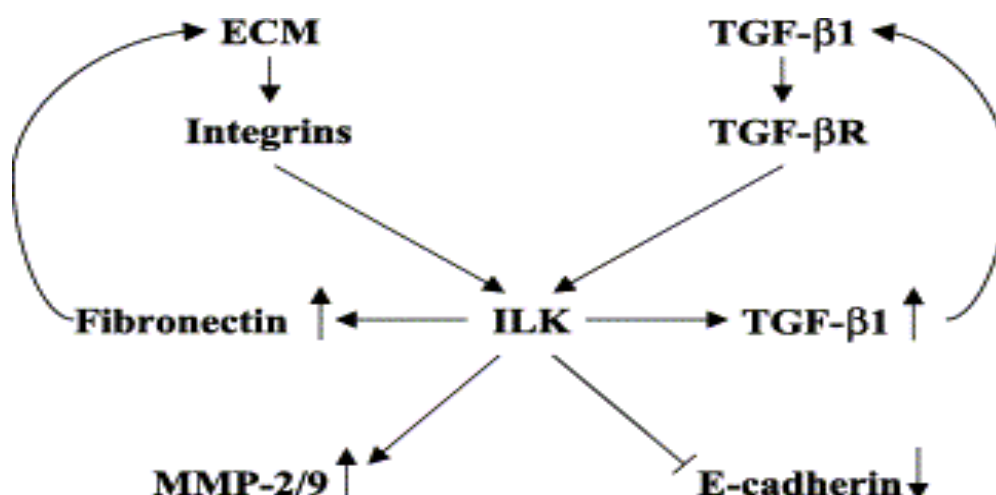
Η ILK δρα μέσω της φωσφορυλίωσης της PKB/AKT και του GSK-3 β και προάγει τόσο τη συσσώρευση μέσα στον πυρήνα της β -κατενίνης όσο και την ενεργοποίηση του β -κατενίνη/LEF μονοπατιού και του AP-1 μεταγραφικού παράγοντα. Επιπλέον η ILK επάγει τη μεταγραφή του Snail και του ZEB1. Η υπερέκφραση της ILK σε φυσιολογικά κύτταρα και η αναστολή της λειτουργίας της σε καρκινικά κύτταρα, την καθιστούν δυνητικό ογκογονίδιο (Εικόνα 45).



Εικόνα 45: Η θέση της ILK στη μετάσταση και τη διήθηση.

Η υπερέκφραση της ILK σε επιθηλιακά κύτταρα καταλήγει σε εξαλλαγή τους σε κύτταρα με αυξημένο δείκτη πολλαπλασιασμού, μεταναστευτική και διηθητική ικανότητα και χαρακτήρες μεσεγχυματικών κυττάρων [257, 258]. Το βασικό χαρακτηριστικό της δρομολογούμενης EMT είναι η απώλεια της E-καντχερίνης (Εικόνα 46).

Εξάλλου, τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την ILK εμφανίζουν και χαρακτηριστική απώλεια της β-κατενίνης από τις ζώνες πρόσφυσης και συσσώρευση της στον πυρήνα όπου, κατά τα γνωστά, ενεργοποιεί τον παράγοντα TCF. Η ενεργοποίηση της β-κατενίνης από την ILK είναι πανομοιότυπη με την ενεργοποίηση που προκαλείται από μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Wnt [259, 260]



Εικόνα 46: Στην εικόνα αυτή φαίνονται οι κυριότεροι τρόποι ενεργοποίησης της ILK καθώς και οι σημαντικότερες δράσεις της (μείωση E-καντχερίνης, αύξηση MMP2/9→EMT).

VII. GSK-3

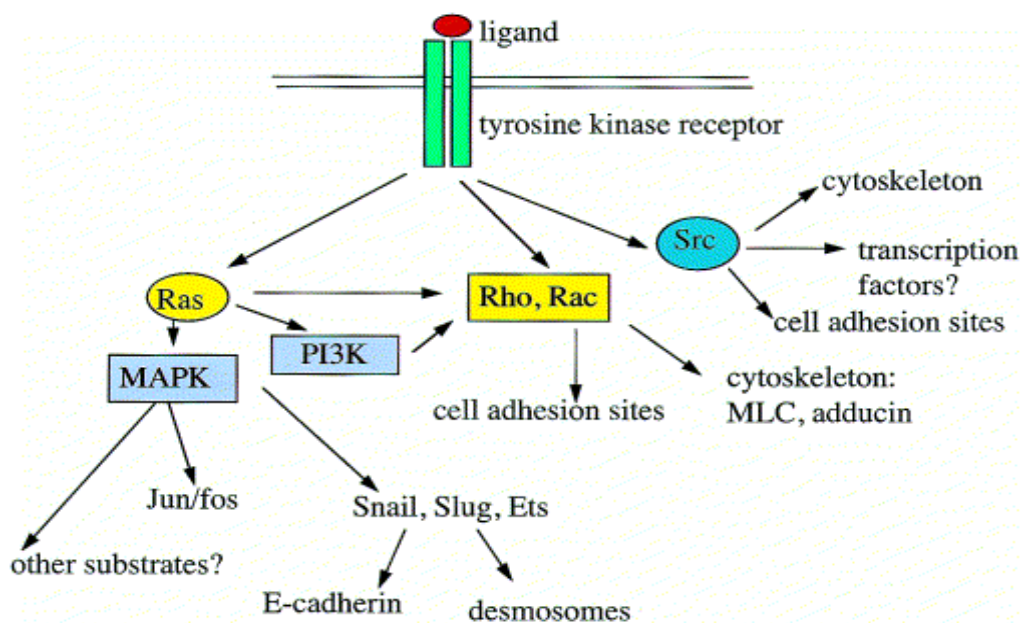
Το μόριο αυτό Glucogen Synthase Kinase-3 είναι μια πρωτεΐνη με δράση κινάσης της σερίνης. Η ενεργός κατάσταση αυτού του μορίου αποτελεί προϋπόθεση για τη διατήρηση φυσιολογικής δομής των επιθηλιακών κυττάρων δεδομένου ότι διατηρεί την έκφραση των E-καντχερινών και κατά συνέπεια αποτρέπει την EMT.

Η φυσιολογική δράση αυτού του μορίου έγκειται στη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης ώστε να καταστραφεί από το πρωτεολυτικό σύστημα του κυττάρου [261]. Το GSK3-β μειώνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Snail καθώς καταστέλλει τη μεταγραφή και καταστροφή του, μέσω του συστήματος ουβικουϊτίνης – πρωτεασώματος αφού προηγουμένως φωσφορυλιώνεται. Υπό την επίδραση διάφορων παραγόντων όπως Wnt και η PI3K, η GSK-3 απενεργοποιείται, με αποτέλεσμα τη μετανάστευση της β-κατενίνης στον πυρήνα όπου συνδέεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF και επάγει τη μεταγραφή του Snail [262]. Η διαδικασία αυτή, αναστέλλει τη μεταγραφή της E-καντχερίνης και οδηγεί στην EMT και στη μετάσταση.

3.2.6.4 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΜΕ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ (RTK'S)

I. Ενεργοποίηση των RTK's

Η δράση των RTKs ασκείται μέσω ενεργοποίησης ενός μεμβρανικού υποδοχέα RTK (receptor tyrosin kinase) που συνήθως αντιπροσωπεύει μια μονομερή πρωτεΐνη με ιδιότητα τυροσινικής κινάσης στο κυτταροπλασματικό της τμήμα. Εκ των σημαντικότερων μοριακών οδών που επάγουν το φαινόμενο της EMT είναι εκείνη που μεσολαβείται όταν ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες, με κυριότερους τους HGF, FGF, EGF, PDGF και IGF ενεργοποιήσουν τους RTK's (Εικόνα 47).

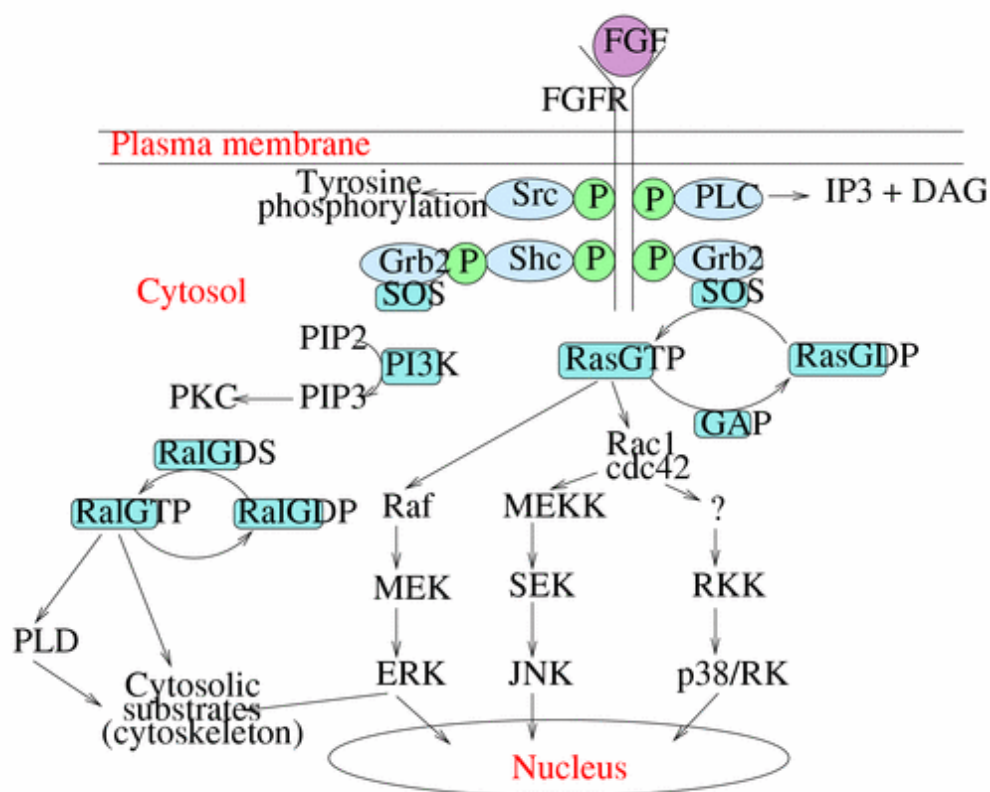


Εικόνα 47: Ενδοκυττάρια μονοπάτια που μπορούν να κινητοποιηθούν μετά την ενεργοποίηση των RTK υποδοχέων.

Η σύνδεση αυτών των προσδετών καταλύει την αυτοφωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης που βρίσκονται στους RTK's, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Έτσι, επάγεται το φαινόμενο της EMT ακολουθώντας διάφορες οδούς.

II. Υποδοχέας FGFR(1,2,3,4)

Οι FGF υποδοχείς διαφέρουν από τους υπόλοιπους υποδοχείς με ιδιότητα τυροσινικής κινάσης, καθώς η δράση τους προϋποθέτει την παρουσία πρωτεϊνών πρόσδεσης (Εικόνα 48).



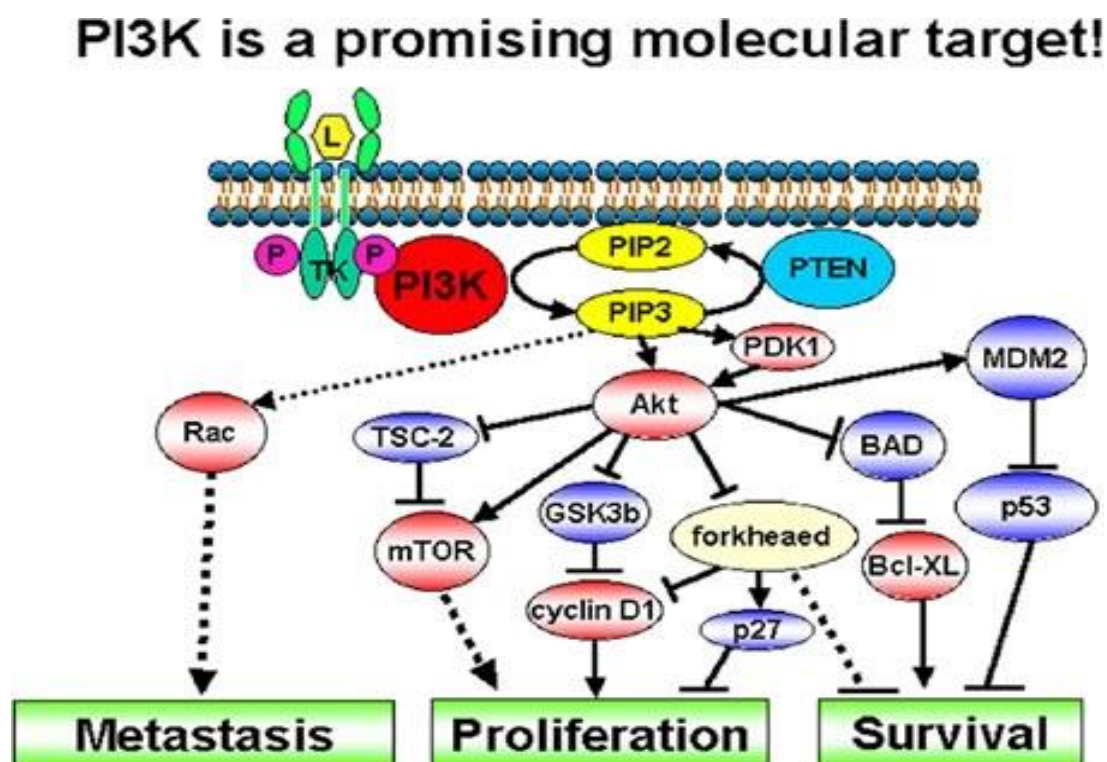
Εικόνα 48: Ενεργοποίηση του RTK υποδοχέα με την επίδραση του FGF.

Αυτές οι πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τη φωσφολιπάση Cγ την Shc, FRS2 και άλλες που κινητοποιούν το σχηματισμό του συμπλόκου Grb2/Sos. Εξάλλου, η ενεργοποίηση του FGFR εξασφαλίζει την πρόσδεση των θετικά ρυθμιστικών πρωτεϊνών Shp2 FRS2, απαραίτητων για την ενεργοποίηση της MAPKκινάσης.

Η τελευταία, ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες Jun/Fos και αναστέλλει τη συνοχή των κυττάρων. Επιπλέον ο P38, μέλος της ίδιας οικογένειας των MAPKκινάσων, επηρεάζει την κυτταρική κινητικότητα κατόπιν της επίδρασης του PDGF.

III. PI3K

Η PI3K (φωσφατιδυλοϊνοσιτολη-3-κινάση) αποτελεί ένζυμο με καταλυτικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση (Εικόνα 49).



Εικόνα 49: PI3K και κυτταρική σηματοδότηση.

Η ενεργοποίησή της γίνεται από υποδοχείς με δράση τυροσινικής κινάσης, όπως ο c-Met, από την ενεργό μορφή του Ras (Ras-GTP) καθώς και από υποδοχείς G-πρωτεϊνών. Αφού ενεργοποιηθεί αυτό το μόριο δρα στην κυτταρική μεμβράνη και προάγει τη δημιουργία ουσιών που ονομάζονται 3-φωσφοϊνοσιτίδια που ενώνονται με το AKT/PKB και το ενεργοποιούν. Αυτό με τη σειρά του φωσφορυλιώνει τον GSK-3β του οποίου η δράση αναστέλλεται [263]. Σημαντική είναι η επίδραση της PI3K και στην αναστολή της διαδικασίας απόπτωσης ενώ, μέσω διέγερσης των Rac1 και Cdc42,

συμμετέχει στο σχηματισμό των λαμελλιποδίων και φιλοποδίων και στη ρύθμιση της κυτταρικής κίνησης και μετανάστευσης.

IV. HGF\SF (hepatocyte growth factor\scatter factor)

Ο Hepatocyte growth factor θεωρείται πρότυπος αυξητικός παράγοντας που προάγει την ανάπτυξη και έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην EMT [220]. Πρόκειται για ετεροδιμερή γλυκοπρωτεΐνη με α και β αλυσίδα. Η σύνθεση και η έκκρισή της γίνεται από μεσεγχυματικά κύτταρα και ενεργοποιείται από ένζυμα έξω από τα κύτταρα. Δρα μέσω ενός διαμεμβρανικού υποδοχέα με ιδιότητα τυροσινικής κινάσης και κωδικοποιείται από το γονίδιο c-met. Ο υποδοχέας μπορεί να αναστέλλεται με φωσφορυλίωση από την PKC (protein kinase c). Εφόσον ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί έχει τη ιδιότητα να φωσφορυλιώνει μόρια με τμήμα SH2, μεταξύ των οποίων η PI3K, STAT3, GRB2, SHC, GAB1 και PLC-γ. Αυτά ενεργοποιούν μικρές GTP-binding πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των Ras, Rho και Rac, που οδηγούν στην ενεργοποίηση των MAP κινασών και των PI3 κινασών. Εξάλλου, είναι πιθανή και η ενεργοποίηση των Src, η δράση των οποίων σχετίζεται και με την αποδόμηση των μορίων συνοχής. Τα γονίδια των οποίων τελικά θα επηρεαστεί η μεταγραφή εκφράζουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε λειτουργίες του τύπου της ανάπτυξης, κινητικότητας και διεισδυτικότητας [207]. Το οριστικό φαινοτυπικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης εξαρτάται από τη διάρκειάς της, το περιβάλλον στο οποίο επιτελείται και την παράλληλη σηματοδότηση άλλων οδών. Τέλος, ο υποδοχέας cmyc του HGF, συνεργάζεται με άλλα διαμεμβρανικά μόρια και συμμετέχει στην προστασία του αποκολλημένου από το περιβάλλον του καρκινικού κυττάρου από την απόπτωση. Αυτό πραγματοποιείται κατόπιν σύνδεσης του υποδοχέα c-met με το Fas των NK κυττάρων.

4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ EMT ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Νεότερα δεδομένα συνδέουν την EMT με τα βλαστικά κύτταρα. Αφενός, πολλές από τις κυτταρικές διαδικασίες που επάγονται από την EMT κατά τη μεταστατική

διαδικασία, είναι ανάλογες εκείνων που ακολουθούν τα φυσιολογικά βλαστοκύτταρα κατά την ανοικοδόμηση των ιστών [264]. Αφετέρου, πολλά ρυθμιστικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην EMT των καρκινικών κυττάρων διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ικανότητα αυτο-ανανέωσης και επιβίωσης των KBK, όπως για παράδειγμα είναι η σηματοδότηση μέσω TGF- β , Notch, Hedgehog, Wnt και Ras, οι ιντεγκρίνες, καθώς και οι Rho GTPases [265-269]. Τα κοινά αυτά μόρια και μονοπάτια συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη αντίστασης των καρκινικών κυττάρων με χαρακτηριστές EMT και KBK, στην απόπτωση και τις συνήθειες αντικαρκινικές θεραπείες [270-273].

Ήδη, από το 2008, διαπιστώθηκε ότι η επαγωγή EMT μέσω έκτοπης έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων TWIST1, SNAIL1 και SLUG και ενεργοποίησης του TGF- β σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού, οδήγησε σε εμπλουτισμό των κυττάρων με φαινοτυπικό προφίλ CD44^{high}/CD24^{low}/⁻ και ανάπτυξη όγκων σε ποντικούς [274]. Παράλληλα, τόσο τα βλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από το φυσιολογικό μαστό ποντικών ή ανθρώπων, όσο και τα KBK από όγκους μαστού ασθενών, παρουσίαζαν μεσεγχυματικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και υψηλή έκφραση δεικτών EMT, του τύπου της βιμεντίνης και του μεταγραφικού παράγοντα TWIST. Έχει επίσης επιβεβαιωθεί ότι η επαγωγή EMT σε επιθηλιακά μη-βλαστικά κύτταρα μαστού είναι δυνατόν να επάγει τη γένεση KBK με φαινότυπο CD44⁺CD24⁻/low μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Ras/MAPK [275]. Εξάλλου, η επαγωγή της έκφρασης TWIST1 σε σειρές μαστού βρέθηκε ότι επάγει στα κύτταρα την έκφραση του φαινότυπου CD44^{high}CD24^{low} και αυξάνει την υψηλή ενεργότητα ALDH, με ενίσχυση της ικανότητας αυτο-ανανέωσης και του μεταστατικού τους δυναμικού [276].

Είναι φανερό ότι η EMT λειτουργεί ως μία διαδικασία αποδιαφοροποίησης των κυττάρων, μετατρέποντας τα διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα σε βλαστικά [277, 278]. Η επαγωγή EMT μέσω TWIST1 και SNAIL1 σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού επάγει την έκφραση μιας σειράς βλαστικών δεικτών και μετατρέπει τα κύτταρα σε πολυδύναμα και ικανά να διαφοροποιηθούν εκ νέου σε λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα ή οστεοβλάστες [279]. Η αποδιαφοροποίηση των κυττάρων έχει βρεθεί να επιτυγχάνεται ποικιλοτρόπως μέσω καλά μελετημένων επαγωγέων EMT. Στο πλαίσιο αυτό, ο ZEB1 ρυθμίζει έμμεσα την έκφραση του γονιδίου SOX2 σχετιζόμενου με το

βλαστικό φαινότυπο, μέσω καταστολής miRNA που αναστέλλει τη βλαστικότητα [280], ενώ ο SNAIL2 επάγει τη βλαστικότητα σε συνεργασία με το SOX9 [281].

Η βλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων είναι επίσης μία δυναμική διαδικασία που καταλήγει στην πλήρη αποδιαφοροποίηση και το μετασχηματισμό τους [174, 282, 283]. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα μη-βλαστικά καρκινικά κύτταρα μετατρέπονται σε KBK μέσω τροποποίησης της διάταξης χρωματίνης του υποκινητή του ZEB1, η οποία επιτυγχάνεται με άμεση ανταπόκριση σε αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος [284]. Ταυτόχρονα, έχει επιβεβαιωθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα με ενδιάμεσο φαινότυπο EMT ήταν πολύ πιθανότερο να αποκτήσουν βλαστικές ιδιότητες σε σχέση με εκείνα με αμιγώς επιθηλιακό ή μεσεγχυματικό φαινότυπο, πιθανότητα η οποία ρυθμίζεται άμεσα μέσω του παράγοντα NF-κΒ [285]. Τελικά, ο βλαστικός χαρακτήρας εμφανίζεται απαραίτητος στα αρχικά στάδια της EMT, ωστόσο μεταγενέστερα φαίνεται ότι δυσχεραίνει την πλήρη EMT του φαινότυπου των καρκινικών κυττάρων [286]. Πρόσφατα τεκμηριώθηκε στον καρκίνο του μαστού η σαφής διαφοροποίηση μεταξύ μεσεγχυματικών και επιθηλιακών KBK. Στην αντίστοιχη μελέτη, τα μεσεγχυματικά KBK με το φαινοτυπικό προφίλ CD44^{high}CD24⁻, ήταν περισσότερο αδρανή και ταυτοποιήθηκαν στα όρια του όγκου με το φυσιολογικό επιθήλιο, εκεί δηλαδή όπου ξεκινάει η διείδυση. Απεναντίας, τα επιθηλιακά KBK χαρακτηρίστηκαν από υψηλή ενεργότητα ALDH, ήταν εντατικότερα πολλαπλασιαζόμενα ενώ, ανιχνεύτηκαν στο πιο κεντρικό τμήμα του όγκου [287].

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου συνδέονται EMT και KBK εξακολουθεί να διερευνάται. Τα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι κύτταρα με ιδιότητες EMT και KBK εμφανίζουν αυξημένο μεταστατικό δυναμικό και ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και ακτινοθεραπεία [270, 288, 289]. Εξάλλου, τα καρκινικά κύτταρα που ταυτοποιούνται στο περιφερικό αίμα των ασθενών και συνεπώς συμμετέχουν στη μεταστατική διαδικασία, συχνά εκφράζουν παράλληλα δείκτες EMT και KBK [290]. Με το σκεπτικό αυτό, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα στοχεύουν ειδικά το συγκεκριμένο υποπληθυσμό κυττάρων.

5. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ EMT ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μία θεραπευτική πρόκληση αποτελούν οι στοχεύουσες θεραπείες έναντι μορίων που συμμετέχουν ενεργά στην EMT και παράλληλα εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης που ενέχονται στην αυτο-ανανέωση και την επιβίωση των KBK [291]. Μια σειρά από προκλινικά δεδομένα στον καρκίνο του μαστού υποστηρίζουν ότι υποπληθυσμός των KBK μπορεί να στοχευθεί αποτελεσματικά μέσω του αναστολέα του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR, everolimus, είτε ως μονοθεραπεία, είτε ως συνδυασμένη θεραπεία με άλλα κυτταροστατικά και βιολογικούς παράγοντες. Τεκμηριωμένο είναι και το όφελος του συνδυασμού με exemestane σε ασθενείς με ορμονοθετικό HER2-αρνητικό μεταστατικό καρκίνο μαστού [292-296]. Ομοίως, οι αναστολείς του μονοπατιού Notch στοχεύουν επίσης αποτελεσματικά τα KBK μέσω αναστολής της γ -secretase (MK-0752 και RO4929097) και το όφελός τους έχει επιβεβαιωθεί σε ασθενείς με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού με μελέτες φάσης I και II. Παράλληλα, διερευνάται και η αποτελεσματικότητά τους σε συνδυασμό με έναν ανταγωνιστή του μονοπατιού Hedgehog (vismodegib), ο οποίος φαίνεται να στοχεύει τα ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη καρκινικά κύτταρα [297-301]. Ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και η επίδραση της θεραπείας με αναστολείς της πρωτεΐνης GSK3, η οποία εμπλέκεται στα μονοπάτια σηματοδότησης Wnt και Hedgehog [302].

Άλλες θεραπείες που στοχεύουν αποτελεσματικά τα KBK στον καρκίνο του μαστού είναι ένας αναστολέας της πολυμεράσης PARP, το olaparib [303] και το οξύ ATRA (all-trans retinoic acid), μολονότι δεν έδειξε όφελος σε συνδυασμό με paclitaxel σε μελέτη φάσης II [304, 305]. Επιπροσθέτως, η σαλινομυκίνη, η μετφορμίνη και ένας αναστολέας ABC (ATP binding cassette) (MS-209), μπορούν να στοχεύσουν τα KBK σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά [306-309]. Μελέτες έχουν τεκμηριώσει τη δυνατότητα στόχευσης των KBK με αντισώματα έναντι των επιφανειακών μορίων CD44, CD123, CD33 και CD133 [310-313], ενώ τα τελευταία χρόνια διερευνάται η θεραπευτική χρήση των microRNAs, τα οποία αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές των KBK [314]. Τέλος, είναι επιβεβαιωμένη η άμεση συσχέτιση μεταξύ των KBK και του υποδοχέα HER2 και η αποτελεσματική στόχευση των KBK μέσω του trastuzumab που στοχεύει την εξωκυττάρια υπομονάδα του HER2. Η αντίσταση στο trastuzumab

αποδίδεται στην επαγωγή των KBK μέσω της ιντερλευκίνης 6 [167, 168, 315]. Επιπλέον, τόσο το lapatinib το οποίο στοχεύει ενδοκυττάρια τους υποδοχείς EGFR και HER2, όσο και αναστολείς των υποδοχέων CXCR1/2, δύνανται να στοχεύουν KBK μέσω αναστολής της δράσης της ιντερλευκίνης 8, η οποία επίσης ενέχεται στη ρύθμιση των KBK [316-318].

Η ανάπτυξη θεραπειών που στοχεύουν σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν την έκφραση μορίων με ενεργό συμμετοχή στην EMT, αποτελεί πρόσφατη εξέλιξη. Στο πλαίσιο αυτό, είναι δυνατή η αναστολή της φωσφορυλίωσης της STAT3 [319] και του μονοπατιού Ras/MAPK μέσω στόχευσης του uPA (sorafenib) [320], του μονοπατιού Hedgehog (cyclopamin) [321], των μονοπατιών Src, MEK1/2-ERK1/2 και Akt μέσω στόχευσης των FGFR4 και ILK [322, 323], καθώς επίσης και των μονοπατιών MAPK, PI3K/AKT μέσω στόχευσης του AXL RTK [324]. Επιπλέον, η στόχευση του TGF- β μπορεί να επιτευχθεί μέσω αναστολής της κινάσης ALK [270, 325], όσο και μέσω άμεσης μεταγραφικής καταστολής, η οποία είναι εφικτή για παράγοντες που συμμετέχουν ενεργά στην επαγωγή EMT, συμπεριλαμβανομένων των TWIST1, ZEB1, SLUG, SNAIL και MMP3/9 [326, 327]. Κατά συνέπεια, υπάρχουν θεραπείες που στοχεύουν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των καρκινικών κυττάρων σε EMT και των KBK. Ο συνδυασμός των κοινών θεραπειών με νέες θεραπείες που στοχεύουν το συγκεκριμένο υποπληθυσμό, πιθανά να αποτελέσουν στο μέλλον μία συνολικότερη θεραπευτική προσπέλαση της νόσου [291].

6. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (ΚΚΚ)

6.1 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΚΚΚ

Τα ΚΚΚ ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα των ασθενών με καρκίνο και συμπεριλαμβάνουν τον πληθυσμό των κυττάρων που ενέχεται στην ανάπτυξη της μετάστασης [328]. Η πρώτη αναφορά στην ύπαρξη των κυττάρων αυτών έγινε το 1869 από τον Thomas Ashworth [329] και έκτοτε δεδομένα μελετών σε διάφορους τύπους καρκίνου, ανέδειξαν την παρουσία και την κλινική σημασία της ανίχνευσής τους [330,

331]. Ωστόσο, το έλλειμμα ευαίσθητων και ειδικών μεθοδολογιών για την ανίχνευση ενός τόσο σπάνιου πληθυσμού κυττάρων, η συχνότητα του οποίου στο αίμα ανέρχεται περίπου σε 1 ΚΚΚ ανά 106 με 107 λευκά αιμοσφαίρια [332], μετατόπισαν το ενδιαφέρον αρχικά στην ταυτοποίηση των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων (ΔΚΚ) στο μυελό των οστών. Πρόκειται για το συνηθέστερο σημείο ανάπτυξης μικρομεταστάσεων [333] και το όργανο στο οποίο οδηγούνται τα ΚΚΚ που μεταναστεύουν μέσω της κυκλοφορίας προκειμένου να επιβιώνουν [334]. Συγκριτικές μελέτες αναφέρονται στην ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της παρουσίας ΚΚΚ και ΔΚΚ στο μυελό των οστών [335], ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι η συχνότητα των ΔΚΚ είναι μεγαλύτερη [336, 337]. Μολονότι η παρουσία ΔΚΚ στο μυελό των οστών σχετίζεται σημαντικά με χειρότερη κλινική έκβαση [338], η ανίχνευσή τους αποτελεί μία ιδιαίτερα επεμβατική μέθοδο, και κατά συνέπεια η δυνατότητα επανάληψης ανά τακτά χρονικά διαστήματα καθίσταται αμφίβολη. Αντιθέτως, η ταυτοποίηση των ΚΚΚ απαιτεί μία ανώδυνη αιμοληψία, με ρεαλιστική δυνατότητα τακτικών επαναλήψεων κατά τη διάρκεια της θεραπείας και της περαιτέρω παρακολούθησης των ασθενών. Έτσι, η ανίχνευση των ΚΚΚ επικράτησε στη συνέχεια και αποτελεί έως σήμερα ένα ιδιαίτερα σημαντικό εργαλείο στην κλινική πράξη.

Η ταυτοποίηση των ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών υποδηλώνει την παρουσία υπολειπόμενης νόσου και επομένως συμβάλλει στην κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Πέραν όμως της εκτίμησης της παρουσίας των ΚΚΚ, ο μοριακός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός τους αποτελεί σημαντική παράμετρο, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι δεν διαθέτουν όλα τα ΚΚΚ το ίδιο μεταστατικό δυναμικό [339]. Η αναζήτηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που σχετίζονται με επιθετική κλινική συμπεριφορά ή με αντίσταση στη θεραπεία, μπορεί να ταυτοποιήσει υποομάδες ασθενών με δυσμενή πρόγνωση, οι οποίοι πιθανά χρήζουν επιθετικότερης θεραπευτικής προσέγγισης. Αντιστοίχως, η ταυτοποίηση ΚΚΚ με ένα ευνοϊκότερο προφίλ θα μπορούσε να συμβάλλει στην αντιμετώπιση των ασθενών με ηπιότερα θεραπευτικά μέσα [340]. Συν τοις άλλοις, τα ΚΚΚ συχνά εμφανίζουν διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά από εκείνα του πρωτοπαθούς όγκου και η ανάλυσή τους προσομοιάζει με υγρή βιοψία πραγματικού χρόνου, που προσδιορίζει το φορτίο της νόσου και παρέχει σημαντική πληροφορία ως προς το μοριακό προφίλ του όγκου οποιαδήποτε χρονική στιγμή [332, 341]. Η πληροφορία που προκύπτει από το

φαινότυπο των ΚΚΚ μπορεί να δρομολογήσει θεραπείες με νέους στοχευτικούς παράγοντες, επιλεγμένων ακόμη και βάσει έκφρασης μορίων-στόχων στα ίδια τα ΚΚΚ [342]. Η στόχευση των ΚΚΚ θα μπορούσε να αποτρέψει τη δημιουργία μεταστάσεων και να βελτιστοποιήσει την κλινική έκβαση των ασθενών. Τέλος, η φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση των ΚΚΚ συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών της μετάστασης καθώς αναδεικνύει τα χαρακτηριστικά εκείνα που προάγουν τη μεταστατική διαδικασία [343].

6.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΚΚ

Ένας σημαντικός περιορισμός κατά την ανίχνευση των ΚΚΚ είναι η υψηλή ετερογένεια των κυττάρων αυτών ως προς την έκφραση των διαφόρων μορίων. Καθώς δε διατίθενται ειδικοί δείκτες για ΚΚΚ, η ταυτοποίησή τους πραγματοποιείται με την ανίχνευση μορίων που εκφράζονται στα κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης και όχι στα κύτταρα του αίματος. Ανάλογα λοιπόν με τον τύπο του καρκίνου χρησιμοποιούνται δείκτες επιθηλιακής προέλευσης, όπως οι κυτταροκερατίνες (cytokeratin, CK) και ο καρκίνο-σχετιζόμενος μεταγωγέας σήματος ασβεστίου EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), οι οποίοι όμως αναγνωρίζουν έναν υποπληθυσμό και όχι το σύνολο των ΚΚΚ [344, 345]. Ως γνωστόν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης διαφόρων μορίων μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και ΚΚΚ, ή ακόμη και μεταξύ μετάστασης και ΚΚΚ στον ίδιο ασθενή [346]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ετερογένεια του μοριακού προφίλ των ΚΚΚ σε έναν ή μεταξύ διαφορετικών ασθενών [347]. Τέλος, η συχνότητα των ΚΚΚ μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος είναι ιδιαίτερα μικρή. Εξαιτίας αυτών των περιοριστικών παραμέτρων και της επιβεβλημένης βελτιστοποίησης της ευαισθησίας των μεθόδων ανίχνευσης των ΚΚΚ, προηγείται ο εμπλουτισμός του δείγματος σε ΚΚΚ.

6.2.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΚΚ

Οι στρατηγικές εμπλουτισμού των ΚΚΚ βασίζονται τόσο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά που διαφέρουν μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, όπως είναι το μέγεθος, η πυκνότητα, το ηλεκτρικό φορτίο και η ικανότητα παραμόρφωσης,

όσο και σε βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η έκφραση ορισμένων μορίων [348]. Ο εμπλουτισμός των ΚΚΚ βάσει του αυξημένου τους μεγέθους είναι σήμερα δυνατός με συσκευές που εμπεριέχουν ειδικά φίλτρα μεμβράνης, όπως είναι οι τεχνολογίες ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells) [349], ScreenCell® [350], CellOptics® [351] και η μικροσυσκευή MEMS (micro electro-mechanical system) [352]. Μία άλλη μορφή εμπλουτισμού επιτυγχάνεται βάσει της διαφορετικής πυκνότητας των ΚΚΚ, όπως για παράδειγμα είναι η φυγοκέντρωση με διαβάθμιση πυκνότητας φικόλης [353] και η συσκευή OncoQuick™ [354]. Μια σειρά από συσκευές έχουν επίσης κατασκευαστεί για το διαχωρισμό των ΚΚΚ βάσει της ικανότητας παραμόρφωσης και του ηλεκτρικού τους φορτίου. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η φωτοακουστική κυτταρομετρία ροής [355], ένα καινοτόμο τσιπ τρισδιάστατης γεωμετρίας το οποίο βασίζεται στη διαφορετική ικανότητα παραμόρφωσης των κυττάρων [356] και συσκευές που χρησιμοποιούν την κλασματοποίηση μέσω πολλαπλών οπών (multiorifice flow fractionation, MOFF) ή τη διηλεκτροφόρηση (dielectrophoresis, DEP) [357, 358].

Ενδιαφέρουσα προσέγγιση εμπλουτισμού αποτελεί ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός των κυττάρων με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντισώματα και τη βοήθεια κατάλληλου μαγνήτη. Χαρακτηριστική είναι η θετική επιλογή των ΚΚΚ με τη χρήση σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντίσωμα έναντι του EpCAM, το οποίο εκφράζεται στην πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων διαφόρων όγκων [359, 360]. Στο ίδιο πλαίσιο εντάσσεται και η αρνητική επιλογή των ΚΚΚ, μέσω απομάκρυνσης των κυττάρων του αίματος έπειτα από χρήση σφαιριδίων με αντίσωμα έναντι του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45 [361]. Η κυριότερη μέθοδος ταυτοποίησης ΚΚΚ στο αίμα που βασίζεται στον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό βάσει έκφρασης EpCAM είναι η τεχνολογία CellSearch [362]. Άλλες μεθοδολογίες στις οποίες πραγματοποιείται ανοσομαγνητική απομόνωση βάσει έκφρασης EpCAM, είναι το MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) [363], το AdnaTest (επιπλέον χρήση σφαιριδίων με αντίσωμα έναντι του MUC1) [364], το CTC chip με ιδιαίτερα υψηλή απόδοση και καθαρότητα [365], καθώς επίσης και η τεχνική RARE™ (RosetteSep-Applied imaging Rare Event), που συνδυάζει το μαγνητικό διαχωρισμό των ΚΚΚ μέσω έκπλυσης των CD45-θετικών φυσιολογικών κυττάρων και επιπλέον βασίζεται στη διαφορετική πυκνότητα των κυττάρων [366]. Μία καινοτόμος τεχνική περιλαμβάνει

επίσης τη στόχευση των ΚΚΚ σε ολικό αίμα, χρησιμοποιώντας μαγνητική απομόνωση με σφαιρίδια, σε συνδυασμό με φασματοσκοπία και νανοσωματίδια surface-enhanced Raman scattering (SERS) συνδεδεμένα με αντίσωμα έναντι των EpCAM, HER2 ή EGFR [367, 368]. Ωστόσο, είναι γνωστή η αδυναμία των παραπάνω μεθόδων να απομονώσουν τον υποπληθυσμό των ΚΚΚ που δεν εκφράζουν το μόριο EpCAM, στα πλαίσια της EMT που συχνά υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα [369]. Μία καινοτόμο μέθοδο εμπλουτισμού ζωντανών ΚΚΚ αποτελεί η δοκιμή CAM, που βασίζεται στην υψηλή συγγένεια των επιθετικών ΚΚΚ προς τις πρωτεΐνες κυτταρικής προσκόλλησης CAM (cell adhesion matrix). Το αίμα τοποθετείται σε σωληνίσκους επικαλυμμένους με πρωτεΐνες CAM, ώστε τα επιθετικά ΚΚΚ να συνδέονται στα μόρια αυτά και να τα καταστρέφουν, μέσω ενός μηχανισμού που προσομοιάζει με εκείνο που χρησιμοποιούν κατά τη διείσδυση στο μεταστατικό ιστό [370]. Τέλος, υπάρχουν πλέον καινοτόμες μεθοδολογίες που συνδυάζουν φυσικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των ΚΚΚ, όπως είναι το CTC-iChip, το οποίο με μία τεχνολογία ελεγχόμενης μικρο-ροής πραγματοποιεί την απομόνωση των ΚΚΚ ανεξάρτητα από την παρουσία διαφόρων επιφανειακών αντιγόνων [371].

Η απόδοση των μεθόδων εμπλουτισμού των ΚΚΚ, είτε αυτές βασίζονται στον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό, είτε στις διαφορετικές φυσικές ιδιότητες των κυττάρων, πρέπει να καθορίζεται με πειράματα ανάκτησης και να συνεκτιμάται τόσο κατά την αξιολόγηση της μεθόδου όσο και του αποτελέσματος. Είναι προφανές ότι, καμία από τις διαθέσιμες μεθόδους δεν επιτρέπει την απόλυτη απομόνωση των ΚΚΚ χωρίς πρόσμιξη φυσιολογικών κυττάρων.

6.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΚΚ

Οι μέθοδοι ανίχνευσης ΚΚΚ κατηγοριοποιούνται σε κυτταρομετρικές και μοριακές, ανάλογα με την ανίχνευση πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων που εκφράζονται στα κύτταρα αντίστοιχα [348]. Και οι δύο κατηγορίες μεθόδων εδράζονται στην ανίχνευση των ΚΚΚ μέσω της χρήσης ειδικών δεικτών, ωστόσο οι κυτταρομετρικές μέθοδοι εμπεριέχουν πλέον έκδηλα τον παράγοντα της υποκειμενικής αξιολόγησης. Αυτό χαρακτηρίζει ακόμη και τις ημι-αυτοματοποιημένες κυτταρομετρικές μεθόδους, όπως είναι η πλατφόρμα CellSearch™, στην οποία κατόπιν μαγνητικού εμπλουτισμού των

ΚΚΚ βάσει έκφρασης EpCAM, ακολουθεί ημι-αυτοματοποιημένος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι των κυτταροκερατινών (CK) 8, 18 και 19, ως δείκτη επιθηλιακών κυττάρων, του CD45 ως δείκτη αιμοποιητικών κυττάρων και της χρωστικής dapi (4', 6-diamidino-2-phenylindole) για τον εντοπισμό του πυρήνα των κυττάρων. Έπεται σάρωση μέσω ημι-αυτοματοποιημένου αναλυτή μικροσκοπίας και απεικόνιση των κυττάρων που πληρούν τα κριτήρια της αρνητικότητας για CD45 και θετικότητας για CK και dapi. Η αξιολόγηση υπόκειται στον παρατηρητή, ενώ υπάρχει η δυνατότητα χρήσης ενός ακόμη αντισώματος επιλογής [372]. Μία άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των ΚΚΚ είναι η ανοσοκυτταροχημεία, κατά την οποία εμπλουτίζεται το δείγμα σε ΚΚΚ και ακολουθεί ανοσοφθορισμός με οποιοδήποτε επιθυμητό αντίσωμα έναντι μορίων επιθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων και παρατήρηση μέσω μικροσκοπίας φθορισμού. Το απλό μικροσκόπιο φθορισμού και η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των ΚΚΚ [373, 374]. Τα τελευταία χρόνια έχει κατασκευαστεί ένα ημι-αυτοματοποιημένο σύστημα μικροσκοπίας φθορισμού, το σύστημα ARIOL, το οποίο περιλαμβάνει εξειδικευμένο λογισμικό για την ανίχνευση των ΚΚΚ [375]. Η μεθοδολογία αυτή παρέχει τη δυνατότητα του πολλαπλού χαρακτηρισμού των ΚΚΚ έπειτα από ανοσοφθορισμό με διαφορετικά αντισώματα, την αυτόματη σάρωση μεγάλου αριθμού δειγμάτων και τον εντοπισμό των ΚΚΚ βάσει κριτηρίων που τίθενται από το χειριστή. Έτσι, επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση των ΚΚΚ βάσει της απουσίας έκφρασης αιμοποιητικών δεικτών και ανίχνευσης έκφρασης οποιουδήποτε επιθηλιακού δείκτη και η μέθοδος εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά θετικότητας σε ΚΚΚ συγκριτικά με το CellSearch [376]. Το σύστημα ARIOL επιτρέπει επίσης τον περαιτέρω φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των ΚΚΚ ως προς επιπλέον μόρια του ενδιαφέροντος, ανάλογα με τις ανάγκες κάθε μελέτης. Επιπλέον, καθίσταται εφικτή και η ποσοτικοποίηση της έντασης της έκφρασης κάθε μορίου ώστε να βελτιστοποιείται η αξιολόγηση των ΚΚΚ στη βάση της σημαντικής τους ετερογένειας. Τέλος, εξαιτίας της δυνατότητας παρατήρησης των υποψήφιων ΚΚΚ στην επιθυμητή εστίαση και μεγέθυνση, προσδιορίζεται ακριβέστερα το μέγεθος και η πυκνότητα του πυρήνα ή η αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και επομένως επιτυγχάνεται ασφαλέστερη αξιολόγηση από τον χειριστή. Ένα αντίστοιχο ημι-αυτοματοποιημένο σύστημα είναι η τεχνολογία FAST (fiber-optic array scanning technology), που

χαρακτηρίζεται από συλλογή του φάσματος φθορισμού με μία συστοιχία οπτικών ινών με αποτέλεσμα την ταχεία σάρωση του δείγματος [377]. Ομοίως, έχει αναπτυχθεί μία μέθοδος πολλαπλού χαρακτηρισμού των κυττάρων με τη χρήση χρωστικών της τεχνολογίας DyLight, η οποία περιλαμβάνει κβαντικά σημεία με μικρό φάσμα εκπομπής, οδηγώντας σε καλύτερη ένταση και απεικόνιση του σήματος σε σχέση με τις φθορίζουσες χρωστικές [378, 379]. Άλλες αυτοματοποιημένες συσκευές ανίχνευσης ΚΚΚ μέσω ανοσοφθορισμού, είναι τα κυτταρόμετρα σάρωσης με laser (Laser Scanning Cytometer, LSC), όπως είναι το Maintrac[®] [380], καθώς και το κυτταρόμετρο απεικόνισης CellTracks, το οποίο επιτρέπει παράλληλα την ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού και την αξιολόγηση μορφολογικών χαρακτηριστικών [381]. Τέλος, η ανίχνευση των ΚΚΚ επιτυγχάνεται και μέσω απλής κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση αντισωμάτων έναντι EpCAM, CK και CD45 [382].

Μία πρόσφατα αναπτυγμένη πρωτοποριακή μεθοδολογία είναι το CellCollectorTM, αποτελούμενο από ένα ειδικό σύρμα επικαλυμμένο με ανοσοσφαιρίδια EpCAM, που εισέρχεται μέσω ειδικού σωληνίσκου στη φλέβα του ασθενή, με αποτέλεσμα την in vivo ανίχνευση των ΚΚΚ στην κυκλοφορία. Η μέθοδος επιτρέπει την ανάλυση 1,5 λίτρου αίματος σε διάρκεια μισής ώρας, γεγονός που βελτιστοποιεί την ευαισθησία της [383]. Μία άλλη σύγχρονη μεθοδολογία είναι το CTC-chip, μία πλατφόρμα που επιτρέπει την απομόνωση των ΚΚΚ από ολικό αίμα, το οποίο ρέει μέσα σε κολώνες ανάμεσα σε μικροβοθρία επικαλυμμένα με αντίσωμα EpCAM υπό ελεγχόμενες συνθήκες ροής και την ανίχνευσή τους με αντισώματα έναντι των CK και CD45 [365, 384]. Αντίστοιχα τσιπ είναι το Ephesia chip [385], το IsoFlux system [386], το Herringbone-Chip [387] και η συσκευή JETTATM [388].

Οι μοριακές τεχνικές ανίχνευσης ΚΚΚ, θεωρούνται πιο ευαίσθητες και αντικειμενικές σε σχέση με τις κυτταρομετρικές μεθόδους. Ωστόσο δεν επιτρέπουν το μορφολογικό χαρακτηρισμό των κυττάρων και προϋποθέτουν καλύτερο εμπλουτισμό του δείγματος σε ΚΚΚ, καθώς η πρόσμιξη με τα φυσιολογικά κύτταρα περιορίζει την ειδικότητά τους [389, 390]. Η ανίχνευση του DNA των ΚΚΚ επιτυγχάνεται μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), μολονότι μειονεκτεί ως προς τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, εξαιτίας της ανίχνευσης και του ελεύθερου DNA που απελευθερώνεται στο αίμα από αποπτωτικά ΚΚΚ [391]. Έτσι, προκρίνεται η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης

μεταγραφής (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) για την ανίχνευση του mRNA, το οποίο προέρχεται κυρίως από ζωντανά ΚΚΚ εξαιτίας του μικρού χρόνου ζωής του [392]. Οι κυριότεροι περιορισμοί στις μοριακές μεθόδους είναι η ετερογένεια της έκφρασης των διαφόρων δεικτών, και η σημαντική πρόσμιξη των δειγμάτων με φυσιολογικά κύτταρα του αίματος, τα οποία είναι δυνατόν να εκφράζουν επιθηλιακούς ή καρκινικούς δείκτες [393, 394]. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται πλέον ευρέως η ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time RT-PCR), με δυνατότητα ποσοτικοποίησης του καρκινικού φορτίου [328, 395, 396]. Μία διαθέσιμη τεχνολογία μοριακής ανίχνευσης των ΚΚΚ είναι το AdnaTest, το οποίο μέσω μη-ποσοτικής RT-PCR ανιχνεύει γονίδια που σχετίζονται με EMT μετάβαση (PI3Ka, Akt-2, TWIST1) ή KBK (ALDH1). Προηγείται ανοσομαγνητικός διαχωρισμός των ΚΚΚ με σφαιρίδια επικαλυμμένα με MUC1, HER2 και EpCAM [364]. Μία νέα ημι-αυτοματοποιημένη τεχνολογία είναι το σύστημα CTCscope, το οποίο επιτρέπει την αποτελεσματική ποσοτικοποίηση των RNA μετάγραφων με *in situ* υβριδοποίηση [397]. Τέλος, η επιπλέον ενίσχυση του γονιδιώματος (whole genome amplification, WGA) είναι αναγκαία για τη μοριακή ανάλυση σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, έπειτα από την εφαρμογή μεθόδων που απομονώνουν μονήρη ΚΚΚ [398].

Συμπερασματικά, η ανάπτυξη μεθοδολογιών που αποσκοπούν στην αποτελεσματική απομόνωση και ανίχνευση των ΚΚΚ στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο είναι ραγδαία. Ωστόσο, οι αποκλίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων είναι εμφανείς [399, 400], γεγονός που δυσχεραίνει την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη. Επιπλέον, επιβάλλεται κατά την ανάπτυξη κλινικών μελετών να εφαρμόζονται μεθοδολογίες, τόσο με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, όσο και με σημαντική επαναληψιμότητα [391, 401].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟΥ ΚΑΙ ΟΠΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα

- Κύτταρα από καρκινικές σειρές, κύτταρα αίματος ασθενών ή υγιών εθελοντών
- Χρωστική Trypan Blue
- Αιματοκυτταρόμετρο Mallasez
- Οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο (OLYMPUS Bx40F)

Αναλυτική πορεία

Για την καταμέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται αρχικά διάλυσή τους σε όγκο κατάλληλου διαλύματος (PBS). Στη συνέχεια μεταφέρονται 10μl κυτταρικού διαλύματος σε σωληνάριο των 1,5ml, στο οποίο προστίθενται 90μl χρωστικής Trypan Blue, η οποία έχει την ιδιότητα να ενσωματώνεται στις μεμβράνες των νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων, χρωματίζοντάς τα μπλε. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μεταφορά 20μl από το διάλυμα σε αιματοκυτταρόμετρο (Mallasez) και με τη χρήση κατάλληλου οπτικού μικροσκοπίου πραγματοποιείται μέτρηση των ζωντανών κυττάρων, δηλαδή εκείνων που δεν εμφανίζουν χρώση. Το συγκεκριμένο αιματοκυτταρόμετρο αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα, καθένα από τα οποία επιμερίζεται σε 16. Όσο περισσότερα μεγάλα τετράγωνα μετρηθούν, τόσο πιο αντικειμενική είναι μία μέτρηση. Συνεπώς, συμπεριλαμβάνοντας τα 9 μεγάλα τετράγωνα, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται ως εξής:

Συνολικός αριθμός κυττάρων =

(Αριθμός μετρηθέντων κυττάρων/9_(α)) x 104_(β) x 10_(γ) x τελικός όγκος διαλύματος

α: αριθμός μετρηθέντων μεγάλων τετραγώνων

β: σταθερή τιμή αιματοκυτταρόμετρου, αντιστοιχεί στον όγκο διαλύματος που καλύπτεται από τα 16 τετράγωνα, ο οποίος ισούται με 0.1 mm³

γ: αραιώση 1:10 της χρωστικής Trypan Blue

8. ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΕ ΚΚΚ

Η συχνότητα των ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο δεν ξεπερνά συνήθως τη δεκάδα κυττάρων ανά ml ολικού αίματος, συγκριτικά με τα εκατομμύρια λευκών αιμοσφαιρίων και το δισεκατομμύριο ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η ελάχιστη συχνότητα των κυττάρων αυτών καθιστά την ανίχνευσή τους ιδιαίτερα απαιτητική, ώστε να προϋποθέτει τον εμπλουτισμό των δειγμάτων σε ΚΚΚ, καθώς παρατηρείται σημαντική πρόσμιξη με φυσιολογικά κύτταρα του αίματος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές εμπλουτισμού ΚΚΚ. Πρόκειται για την απομόνωση μονοπύρηνων κύτταρων περιφερικού αίματος μέσω φυγοκέντρωσης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης και την ανοσομαγνητική απομόνωση με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων.

8.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΦΙΚΟΛΗΣ

Η φυγοκέντρωση με διαβάθμιση πυκνότητας φικόλης αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού των κυττάρων βάσει της διαφορετικής τους πυκνότητας. Έτσι, επιτυγχάνεται η συλλογή των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος

(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs), στα οποία εμπεριέχονται και τα ΚΚΚ, με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του δείγματος σε ΚΚΚ.

Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα

- Φλεβικό αίμα ασθενή
- Σωληνάρια συλλογής αίματος
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid -EDTA)
- Φυσιολογικός ορός 0,9% (NaCl)
- Φικόλη πυκνότητας 1,077 gr/ml
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)

Αναλυτική πορεία

Πραγματοποιείται λήψη φλεβικού αίματος ασθενούς και τα πρώτα 5ml απορρίπτονται προκειμένου να αποφευχθεί η πρόσμιξη με τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος. Τα επόμενα 20ml αίματος που λαμβάνονται τοποθετούνται σε σωληνάρια τα οποία περιέχουν EDTA, μία ουσία με αντιπηκτική δράση. Στη συνέχεια το αίμα αραιώνεται με ίση ποσότητα ισότονου διαλύματος 0,9% NaCl, υπό στείρες συνθήκες και σε θερμοκρασία δωματίου. Σε δύο νέα σωληνάρια των 50ml τοποθετούνται από 20ml φικόλης, στην επιφάνεια της οποίας προστίθενται σταδιακά από 20ml αραιωμένου αίματος.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές χωρίς φρένο για 30 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία 25°C. Εξαιτίας της ειδικής πυκνότητας της φικόλης (1,077 gr/ml), μετά τη φυγοκέντρηση δημιουργείται ένας δακτύλιος ανάμεσα στο κλάσμα της φικόλης και το πλάσμα, ο οποίος περιέχει τα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος. Η λήψη του δακτύλιου γίνεται με χρήση πιπέτας των 5ml, αποφεύγοντας την αναρρόφηση φικόλης, η οποία έχει κυτταροτοξική δράση. Ακολουθεί η έκπλυση των κυττάρων, που μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο των 50ml, στο οποίο προστίθενται επιπλέον 30ml διαλύματος PBS. Έπεται ανάδευση των κυττάρων και φυγοκέντρηση

σε 1600 στροφές για 10 λεπτά της ώρας. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται λήψη του ιζήματος, στο οποίο εμπεριέχονται τα μονοπύρηνια κύτταρα και η έκπλυση επαναλαμβάνεται.

Εν τέλει, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml PBS και ακολουθεί η καταμέτρησή τους με τη βοήθεια της χρωστικής Trypan Blue, αιματοκυτταρόμετρου Mallasez και οπτικού μικροσκοπίου. Στην παρούσα μελέτη, τα απομονωμένα μονοπύρηνια κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ποικιλότροπα. Έτσι, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω εμπλουτισμός τους με τη χρήση ειδικών ανοσομαγνητικών σφαιριδίων, είτε επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες προκειμένου να ακολουθήσει ανοσοφθορισμός και παρατήρηση με μικροσκοπία, είτε διενεργήθηκε ανοσοφθορισμός και ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής.

8.2 ΑΝΟΣΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΚΚ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ

Πρόκειται για ανοσομαγνητική μέθοδο κατά την οποία τα κύτταρα απομονώνονται με χρήση μαγνητικών σφαιριδίων, τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους ειδικά αντισώματα έναντι αντιγόνων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Κατά τη θετική επιλογή των ΚΚΚ, γίνεται χρήση σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντισώματα έναντι αντιγόνων των επιθηλιακών κυττάρων, όπως το μόριο επιφανείας EpCAM. Αντιθέτως κατά την αρνητική επιλογή των ΚΚΚ, χρησιμοποιούνται σφαιρίδια που φέρουν στην επιφάνειά τους αντίσωμα έναντι του CD45, το οποίο είναι επιφανειακό των κυττάρων του αίματος. Συνεπώς, η συλλογή και απομάκρυνση των αιμοποιητικών κυττάρων, επιφέρει εμπλουτισμό του δείγματος σε ΚΚΚ. Στην παρούσα μελέτη η ανοσομαγνητική απομόνωση πραγματοποιήθηκε κατόπιν απομόνωσης των PBMCs μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης, καθώς ο εμπλουτισμός του δείγματος σε ΚΚΚ αυξάνεται περαιτέρω μέσω του συνδυασμού των δύο τεχνικών.

Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα

- Δείγματα απομονωμένων PBMCs του αίματος των ασθενών

- Μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με αντίσωμα anti-CD45
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)
- 100Mm αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediamino tetraacetic acid - EDTA)
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin - BSA)
- Μαγνητική συσκευή για σωληνάρια των 1,5 ml

Αναλυτική πορεία

Έπειτα από την απομόνωση των PBMCs από το αίμα των ασθενών μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης και την καταμέτρησή τους, ακολουθεί η επαναραίωσή τους σε διάλυμα PBS/BSA 0,1%, 2mM EDTA, σε όγκο τέτοιο ώστε να περιέχονται 10×10^6 κύτταρα ανά 1ml διαλύματος. Στη συνέχεια τα κύτταρα διανέμονται ανά 1ml, δηλαδή 10×10^6 κύτταρα, σε σωληνάρια των 1,5ml.

Πριν τη χρήση των μαγνητικών σφαιριδίων προηγείται η έκπλυσή τους. Με δεδομένο ότι απαιτείται ποσότητα 100μl σφαιριδίων ανά 10×10^6 κυττάρων, μεταφέρεται ο κατάλληλος όγκος σφαιριδίων σε σωληνάριο των 1,5ml. Έπειτα, το σωληνάριο τοποθετείται σε ειδική μαγνητική συσκευή για 2 λεπτά της ώρας κι ενώ βρίσκεται σε αυτήν, γίνεται απομάκρυνση της υγρής φάσης με πιπέτα των 1.000μl από την αντίθετη πλευρά, ώστε να μην έρθει καθόλου σε επαφή με τα σφαιρίδια που συγκρατούνται στην πλευρά του μαγνήτη. Ακολουθεί επαναδιάλυση των σφαιριδίων σε ίσο όγκο διαλύματος PBS/BSA 0,1%, 2mM EDTA και μεταφορά 100μl διαλυμένων σφαιριδίων σε καθένα σωληνάριο που περιέχει 10×10^6 κύτταρα. Στη συνέχεια και ενώ προηγείται καλή ανάδευση, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα (test-tube-rotator) σε θερμοκρασία 4°C για 30 λεπτά.

Κατόπιν, τα σωληνάρια τοποθετούνται στη μαγνητική συσκευή για 2 λεπτά της ώρας και τα σφαιρίδια που έχουν προσδέσει στην επιφάνειά τους τα κύτταρα του αίματος συγκρατούνται στον μαγνήτη. Συνεπώς, τα ΚΚΚ θα περιέχονται στο υπερκείμενο υγρό, το οποίο λαμβάνεται με 1.000μl πιπέτα και μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάριο. Έπειτα φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 λεπτά της ώρας στις

1.200 στροφές και η πελέτα διαλύεται σε διάλυμα PBS/FBS 2% προκειμένου να ακολουθήσει η επίστρωσή τους σε αντικειμενοφόρες πλάκες.

8.3 ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΟΥΣ ΠΛΑΚΕΣ

Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα

- Κύτταρα από καρκινικές σειρές, απομονωμένα PBMCs ασθενών ή υγιών αιμοδοτών
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)
- Εμβρυϊκός ορός βοός (Fetal Bovine Serum - FBS)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες

Αναλυτική πορεία

Μετά την καταμέτρηση του ακριβούς αριθμού των κυττάρων, προστίθεται ανάλογη ποσότητα διαλύματος PBS/FBS 2% προκειμένου σε κάθε 1ml να περιέχονται 500.000 κύτταρα. Κατόπιν μεταφέρονται 500μl κυτταρικού διαλύματος (250.000 κύτταρα) μέσα σε ειδικά σωληνάρια που εφαρμόζονται στην επιφάνεια κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας και έπεται φυγοκέντρωση για 2 λεπτά της ώρας στις 1.800 στροφές. Τέλος, οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται έως ότου στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα χρησιμοποιούνται άμεσα για ανοσοφθορισμό ή φυλάσσονται στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

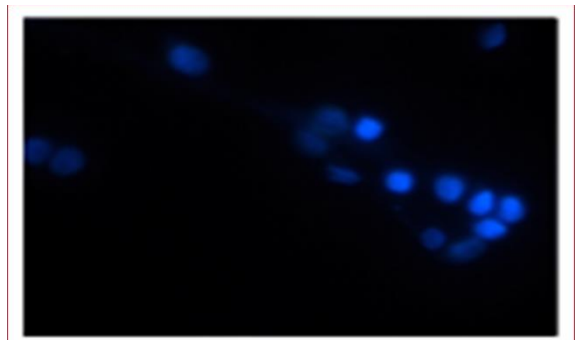
8.4 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια ανοσοχημική μέθοδος κατά την οποία ένα αντιγόνο γίνεται ορατό κατόπιν πρόσδεσής του σε αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με

φθορίζουσα ουσία. Οι τελευταίες, γνωστές και ως φθοριοχρώματα, είναι ειδικές χημικές ουσίες που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν, δηλαδή να εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν ακτινοβολούνται από φως μικρότερου μήκους κύματος. Συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοριοχρώματος μπορούν να διεγερθούν μέσω αόρατης υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και να απελευθερώσουν την ενέργεια με τη μορφή φωτονίων, παράγοντας ορατή ακτινοβολία. Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής ακτινοβολίας και ως εκ τούτου απελευθερώνει φθορίζον φως καθορισμένου μήκους κύματος.

Ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται στη μελέτη των ενδοκυττάρων και επιφανειακών αντιγόνων του κυττάρου, τόσο σε κυτταρικά εναιωρήματα, όσο και σε κυτταρικές επιστρώσεις σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου ή ιστολογικές τομές παραφίνης. Με τη μικροσκοπία φθορισμού ή την κυτταρομετρία ροής, ο ανοσοφθορισμός παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου των κυττάρων για την παρουσία συγκεκριμένων αντιγόνων, με χρήση ειδικών μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων. Κατά τον έμμεσο ανοσοφθορισμό, το αντίσωμα που χρησιμοποιείται για να αντιδράσει με το κυτταρικό αντιγόνο δεν είναι το ίδιο σημασμένο κι επομένως απαιτείται και δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φθορίζουσα ουσία που προσδένεται στο πρώτο. Κατά τον άμεσο ανοσοφθορισμό, το αντίσωμα που προσδένεται στο αντιγόνο είναι άμεσα σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Επιπλέον, υπάρχουν φθορίζουσες ουσίες οι οποίες προσδένονται άμεσα σε συγκεκριμένα συστατικά του κυττάρου, όπως είναι η DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) και η 7-AAD (7-aminoactinomycin D), που συνδέεται απευθείας στο DNA του πυρήνα.

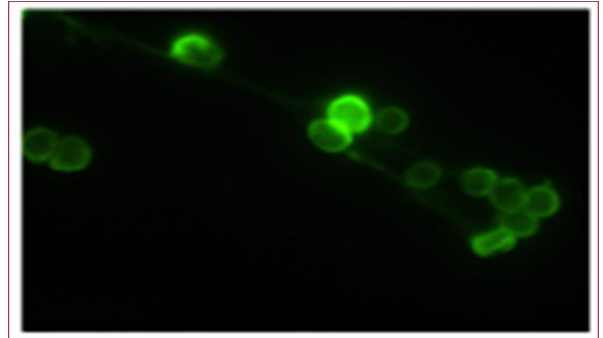
**Εικόνα 1: Μικρομεταστατικά κύτταρα
DAPI+**



Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε τόσο ο άμεσος όσο και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός που αναλύθηκαν με διαφορετικά συστήματα μικροσκοπίας και κυτταρομετρίας ροής. Ο εντοπισμός των ΚΚΚ στα PBMCs βασίστηκε στην ανίχνευση της έκφρασης των κυτταροκερατινών 8, 18 και 19, έναντι των οποίων προσδένεται

ειδικά το αντίσωμα A45-B/B3, είτε στην ανίχνευση του μορίου επιφανείας των επιθηλιακών κυττάρων EpCAM. Η απουσία έκφρασης του μορίου επιφανείας των αιμοποιητικών κυττάρων CD45 τεκμηριώνει ότι τα κύτταρα που ταυτοποιήθηκαν ήταν ΚΚΚ και όχι κύτταρα με έκτοπη έκφραση της κυτταροκερατίνης ή του EpCAM.

**Εικόνα 51: Μικρομεταστατικά κύτταρα
CK+**



8.4.1 ΈΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΙΣΤΡΩΜΕΝΑ ΣΕ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΟΥΣ ΠΛΑΚΕΣ

Υλικά - Αντιδραστήρια - Όργανα

- Αντικειμενοφόροι πλάκες με κύτταρα καρκινικών σειρών ή κύτταρα ασθενών
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin - BSA)
- Παραφορμαλδεύδη (Paraformaldehyde - PFA)
- NaOH 1M
- 0,5% TRITON 100-x
- Μονοκλωνικά αντισώματα: mouse anti-A45-B/B3, mouse anti-ALDH1A1, mouse anti-EpCAM
- Πολυκλωνικά αντισώματα: rabbit anti-CD45, rabbit anti-TWIST

- Φθορίζουσες χρωστικές Alexa Fluor®: Alexa 555 anti-rabbit, Alexa 633 anti-rabbit, Zenon® Alexa 488 anti-mouse
- Φθορίζουσα ουσία DAPI anti-fade (4,6-diamidino-2-phenylindole)

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, τα πλακίδια εκτίθενται για 15 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να αποψυχθούν από τους -80 °C που φυλάσσονται. Στη συνέχεια τοποθετούνται οριζόντια σε ειδική κασετίνα και επωάζονται με διάλυμα PBS/PFA 3% για 30 λεπτά της ώρας σε απαγωγό, ώστε να μονιμοποιηθούν τα κυττάρων στο υπόστρωμα (fixation). Ακολούθως, πραγματοποιούνται τρεις εκπλύσεις με διάλυμα PBS, διάρκειας 3 λεπτών της ώρας και έπεται επώαση με διάλυμα 0,5% TRITON x-100 για 10 λεπτά της ώρας, που αποσκοπεί σε αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης των κυττάρων στην είσοδο των αντισωμάτων (permeabilization). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις διάρκειας 3 λεπτών της ώρας με διάλυμα PBS/BSA 1% (blocking buffer), το οποίο προσδένεται στις μη-ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών και προκαλεί μείωση της μη-ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων. Κατά την τρίτη έκπλυση, το διάλυμα παραμένει στην επιφάνεια των πλακιδίων έως την επόμενη μέρα στη συντήρηση, μέσα σε κασετίνα με κορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη μείωση της μη-ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων.

Έπονται οι επωάσεις με τα αντισώματα και ανάλογα με τη χρώση επιλογής, προστίθενται τα αντίστοιχα αντισώματα που είναι προσδεδεμένα με κατάλληλα φθοριοχρώματα. Η αραίωση όλων των αντισωμάτων πραγματοποιείται σε διάλυμα PBS/BSA 1% και όλες οι επωάσεις διαρκούν μία ώρα. Η ποσότητα του αραιωμένου αντισώματος που προστίθεται ανά πλακίδιο είναι 100μl, προκειμένου να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πλακιδίου. Κατόπιν κάθε επώασης, ακολουθούν πάντοτε 3 εκπλύσεις με το ίδιο διάλυμα διάρκειας 3 λεπτών της ώρας, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του μη-δεσμευμένου αντισώματος.

Κατά το συνδυασμό αντισωμάτων του ίδιου είδους, μη συνδεδεμένων με φθορίζουσα χρωστική, εφαρμόζεται η τεχνολογία αντισωμάτων Zenon Alexa Fluor για τη σύζευξη του ενός εκ των δύο αντισωμάτων με την επιθυμητή φθορίζουσα ουσία. Το

αντίσωμα το οποίο σημαίνεται μέσω της συγκεκριμένης τεχνολογίας προστίθεται πάντοτε τελευταίο σε σειρά. Απαιτείται η προσθήκη 5μl χρωστικής Zenon (labeling reagent) και 5μl αντισώματος Zenon (blocking reagent) για κάθε 1μg αντισώματος που πρόκειται να σημανθεί. Προηγείται επώαση του αντισώματος με τη χρωστική Zenon για 5 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να συνδεθούν. Ακολουθεί προσθήκη του αντισώματος Zenon και δεύτερη επώαση για 5 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό να δεσμευθεί η περίσσεια της χρωστικής που δεν προσδέθηκε αποτελεσματικά. Έτσι, το αντίσωμα είναι έτοιμο για αραιώση στο διάλυμα PBS/BSA 1% και επώαση των δειγμάτων. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με εκ νέου μονιμοποίηση των κυττάρων με προσθήκη διαλύματος PBS/PFA 3% (post fixation), ακολουθούμενη από τρεις εκπλύσεις διάρκειας 5 λεπτών της ώρας με PBS.

Τελικά, σε κάθε πλακίδιο προστίθεται μία σταγόνα φθορίζουσας χρωστικής Dapi anti-fade, η οποία σημαίνει τον πυρήνα των κυττάρων, καθώς προσδέεται απευθείας στο DNA. Στην επιφάνεια κάθε πλακιδίου τοποθετείται καλυπτρίδα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα δείγματα φυλάσσονται σε καταψύκτη σταθερής θερμοκρασίας -20 °C και η παρατήρησή τους επιδιώκεται το συντομότερο, προς αποφυγή εξασθένησης της έντασης του φθορισμού.

Σε κάθε πειραματική διαδικασία συμπεριλαμβάνονται πλακίδια επιστρωμένα με κατάλληλες καρκινικές σειρές που λογίζονται ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, αναλόγως του αν εκφράζουν ή όχι το κάθε αντίσωμα. Ως επιπλέον αρνητικός μάρτυρας για κάθε αντίσωμα, συμπεριλαμβάνεται ένα πλακίδιο στο οποίο δεν προστίθεται το συγκεκριμένο αντίσωμα, αλλά το φθοριόχρωμα με το οποίο αυτό σημαίνεται, καθώς και τα υπόλοιπα αντισώματα και φθοριοχρώματα. Έτσι παρέχεται πληροφόρηση του θορύβου από όλα τα αντισώματα και φθοριοχρώματα της συγκεκριμένης χρώσης και επιτυγχάνεται καλύτερη ειδικότητα του σήματος που αξιολογείται στη συνέχεια ως θετική έκφραση. Στη συνέχεια παρατίθενται οι διαφορετικοί συνδυασμοί και αραιώσεις των αντισωμάτων και των φθορίζουσων χρωστικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

- mouse ALDH1A1 (1:100) - Alexa Fluor 555 anti-mouse (1:600) / rabbit TWIST (1:100) - Alexa Fluor 633 anti-rabbit (1:600) / mouse A45-B/B3 - Zenon Alexa 488 anti-mouse (1:75)

- rabbit CD45 (1:50) - Alexa Fluor 633 anti-rabbit (1:600) / mouse ALDH1A1 (1:100) - Alexa Fluor 555 anti-mouse (1:600) / mouse EpCAM - Zenon Alexa 488 anti-mouse (1:25)

8.4.2 ΑΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΣΩ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Υλικά - Αντιδραστήρια – Όργανα

- Κύτταρα καρκινικής σειράς, απομονωμένα PBMCs ασθενών ή υγιών αιμοδοτών
- Σωληνάρια ειδικά για χρήση σε κυτταρομετρία ροής (πολυστυρενίου των 5ml, με στρογγυλό πυθμένα, 12 x 75 mm)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline - PBS)
- Εμβρυϊκός ορός βοός (Fetal Bovine Serum - FBS)
- Αζίδιο του νατρίου (NaN₃)
- Μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές: mouse EpCAM/allorhycocyanin (APC), mouse CD45/phycoerythrin (PE)
- Φθορίζουσα ουσία 7-AAD (7-aminoactinomycin D)
- Κυτταρομετρητής FACScan

Αναλυτική πορεία

Τα κύτταρα καταμετρώνται και κατόπιν, αραιώνονται σε διάλυμα PBS/FBS1%/NaN₃0,01% και τοποθετούνται σε κατάλληλα σωληνάρια, ώστε καθένα να περιέχει 200μl διαλύματος με 2x10⁶ κύτταρα. Προστίθενται τα αντισώματα EpCAM και CD45 σε ποσότητες 30μl και 10μl αντίστοιχα και πραγματοποιείται επώαση για 30

λεπτά της ώρας στους 4°C σε σκοτάδι. Ακολουθεί προσθήκη 1ml του ίδιου διαλύματος και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά της ώρας στις 1.200 στροφές. Η έκπλυση επαναλαμβάνεται, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η περίσσεια αντισωμάτων. Τέλος, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 200μl του ίδιου διαλύματος, προστίθενται 10μl της χρωστικής 7-AAD, η οποία προσδένεται στο DNA των αποπτωτικών κυττάρων και έπεται επώαση επί 10 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα αναλύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής (Fluorescence-activated cell sorting, FACS), χωρίς να μεσολαβήσει έκπλυση της 7-AAD χρωστικής.

Η ανίχνευση του EpCAM γίνεται στο κανάλι FL4 (661/16) του κυτταρομετρητή FACScan μέσω του φθοριοχρώματος APC με το οποίο είναι προσδεδεμένο. Αντίστοιχα το CD45 και το 7-AAD ανιχνεύονται στο FL2 κανάλι (585/42) όπου εκπέμπει το PE και στο FL3 κανάλι (670LP) αντίστοιχα. Σε κάθε πειραματική διαδικασία δεσμεύεται ένα δείγμα 1×10^6 κυττάρων (NIL), στο οποίο εφαρμόζεται η ίδια διαδικασία χωρίς προσθήκη αντισωμάτων και που χρησιμεύει ως μάρτυρας ελέγχου για την έκφραση των υπό εξέταση μορίων.

8.5 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

8.5.1 ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Τα οπτικά μικροσκόπια χρησιμοποιούν το ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που κυμαίνεται μεταξύ 380 και 760nm. Ανάλογα με τη διάταξη των φακών και τον τρόπο παρατήρησης, τα οπτικά μικροσκόπια κατηγοριοποιούνται σε φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου και αντίθεσης φάσης. Στα πλέον ευρέως διαδεδομένα σύνθετα μικροσκόπια, το προς εξέταση αντικείμενο τοποθετείται εγγύτατα στον αντικειμενικό φακό, ο οποίος σχηματίζει ένα πραγματικό είδωλό του. Αυτό το είδωλο μεγεθύνεται από τον συγκλίνοντα ή προσοφθάλμιο φακό, ο οποίος σχηματίζει ένα φανταστικό είδωλο που παρατηρεί το μάτι. Η μεγέθυνση του προσοφθάλμιου φακού, πολλαπλασιάζεται με εκείνη του αντικειμενικού φακού και το γινόμενο αντιπροσωπεύει την τελική μεγέθυνση του αντικειμένου. Στην παρούσα μελέτη

χρησιμοποιήθηκε το οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο OLYMPUS Bx40F για την καταμέτρηση των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο.

8.5.2 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ένα κοινό μικροσκόπιο, στο οποίο το παρασκεύασμα μπορεί να φωτίζεται επιπλέον με υπεριώδη ακτινοβολία. Η μικροσκοπία φθορισμού βρίσκει εφαρμογή στην παρατήρηση ουσιών ή κυτταρικών δομών που φθορίζουν από τη φύση τους ή σημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές και κατά συνέπεια μπορούν να διεγερθούν και να φθορίσουν.

Στη μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου, το δείγμα διεγείρεται με φως προερχόμενο από λάμπα φθορισμού. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα διέρχεται από φίλτρα εκπομπής και ανιχνεύεται είτε άμεσα από τον παρατηρητή είτε έμμεσα από φωτογραφική ή ψηφιακή κάμερα. Οι δυνατότητες του μικροσκοπίου καθορίζουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών διαφορετικών συστατικών που είναι σημασμένα με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές με διακριτά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής.

Δεδομένου ότι η απαιτούμενη συγκέντρωση φθοριοχρώματος είναι πολύ μικρή, δεν προκύπτουν τεχνητές αλλοιώσεις και η ευαισθησία της μεθόδου είναι υψηλή. Η ειδικότητα και η αξιοπιστία της τεχνικής ενισχύονται, από τη χρήση εξειδικευμένων φθοριοχρωμάτων και φίλτρων, που καθιστούν την παρατήρηση των δειγμάτων εύκολη και γρήγορη.

8.5.3 ΣΥΣΤΗΜΑ ΗΜΙ-ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ARIOL

Το σύστημα ARIOL είναι ένα σύστημα οπτικής μικροσκοπίας και παράλληλα μικροσκοπίας φθορισμού, με δυνατότητα ημι-αυτοματοποιημένης αξιολόγησης πολλαπλών δειγμάτων, βάσει συγκεκριμένων παραμέτρων που καθορίζονται από το χρήστη. Στην περίπτωση του ανοσοφθορισμού, ρυθμίζονται διάφορες παράμετροι, μεταξύ των οποίων τα φθοριοχρώματα και το επίπεδο έντασης καθενός, καθώς και τα

αντισώματα. Οι ανάγκες των επιμέρους πειραμάτων, καθορίζουν τις εντολές του χρήστη και το σύστημα χρησιμοποιείται σε ποικίλες εφαρμογές.

Αρχικά πραγματοποιείται μία κωδικοποιημένη καταχώρηση των υπό μελέτη δειγμάτων, με την προσθήκη ειδικού κώδικα αναγνώσιμου από το σύστημα (barcode). Ακολουθεί η επιλογή της επιθυμητής περιοχής σάρωσης και το επίπεδο εστίασης καθενός παρασκευάσματος. Στη συνέχεια, ορίζεται από το χρήστη μια τιμή έντασης φθορισμού, συναρτήσει της οποίας επιλέγεται ένα κύτταρο ως θετικό για το κάθε φίλτρο φθορισμού. Έπεται μία αυτοματοποιημένη σάρωση της αντικειμενοφόρου πλάκας από το μηχάνημα, με δυνατότητα εναλλαγής μεταξύ διαφορετικών αντικειμενοφόρων πλακών και όριο τα 50 δείγματα ανά σάρωση. Το σύστημα αναγνωρίζει και φωτογραφίζει όλα τα υποψήφια θετικά κύτταρα κάθε δείγματος, συναρτήσει των εντολών που έχουν καταχωρηθεί από το χρήστη και αποθηκεύει την πληροφορία του συνόλου των θετικών κυττάρων ανά δείγμα.

Τελικά, ο χρήστης αξιολογεί καθένα κύτταρο χωριστά, ώστε να επιβεβαιώσει τη θετικότητά του. Το σύστημα παρέχει μία σειρά από επιπλέον χρήσιμες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων του μεγέθους του κυττάρου, της ποσοτικοποίησης της έντασης φθορισμού των διάφορων φθοριοχρωμάτων καθώς και του λόγου μεταξύ των διαφορετικών εντάσεων. Χρήσιμο χαρακτηριστικό του συστήματος είναι η μετακίνηση της αντικειμενοφόρου πλάκας στο οπτικό πεδίο εντόπισης του κάθε κυττάρου (relocation). Έτσι παρέχεται στο χρήστη η δυνατότητα επιβεβαίωσης της ύπαρξης αξιολογήσιμου κυττάρου με άθικτο πυρήνα και κυτταρική μεμβράνη και εν συνεχεία του περαιτέρω χαρακτηρισμού της έκφρασης των μορίων, όπως είναι η κατανομή και η υποκυττάρια εντόπισή τους.

Το σύστημα ARIOL διαθέτει ειδικά σχεδιασμένο λογισμικό για την ανίχνευση των ΚΚΚ ανάμεσα στα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος. Η ταυτοποίηση κυττάρων θετικών στην έκφραση επιθηλιακών δεικτών, όπως η κυτταροκερατίνη και το EpCAM και ταυτόχρονα αρνητικών στην έκφραση του CD45, διενεργείται με ακρίβεια και ευαισθησία από το σύστημα. Η περαιτέρω αξιολόγηση της έκφρασης περισσότερων δεικτών στα κύτταρα αυτά, ανάλογα με τη χρώση που έχει πραγματοποιηθεί, καθίσταται έτσι ευχερής.

8.6 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Πρόκειται για αυτοματοποιημένη μέθοδο κυτταρικής ανάλυσης, που επιτρέπει τη μέτρηση φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κύτταρων ή σωματιδίων, ευρισκόμενων σε μορφή εναιωρήματος εντός υγρού που ρέει σε νηματοειδή ροή και προσπίπτει σε δέσμη ακτίνας φωτός laser. Η σκεδαζόμενη από κάθε κύτταρο ακτινοβολία συλλέγεται από ειδικούς ανιχνευτές και αξιολογείται μέσω κατάλληλου λογισμικού. Η επεξεργασία των υπό μελέτη κυττάρων με ανιχνευτές που φθορίζουν, όπως μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες που συνδέονται με το DNA και RNA, παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης και δευτερογενούς από τον φθορισμό ακτινοβολίας εκτός από τη σκεδαζόμενη πρωτογενή.

Αρχικά, λοιπόν, τα κύτταρα ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο, μέσω υδροδυναμικού συστήματος ροής. Ακολούθως, δύο έως τέσσερις ακτίνες laser με επιμέρους μήκη κύματος που δύνανται να διεγείρουν διαφορετικά φθοριοχρώματα, προσπίπτουν στην κυτταρική διάταξη. Καθένα κύτταρο δέχεται την ακτινοβολία κάθετα προς την ροή του και μέρος αυτής απορροφάται ενώ το υπόλοιπο σκεδαζείται προς πάσα κατεύθυνση στο χώρο. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές μετρούν την ένταση του σκεδαζομένου φωτός. Εν συνεχεία λαμβάνονται τέσσερα κυρίως φωτεινά σήματα που περιλαμβάνουν το προσθίως σκεδαζόμενο φως (Forward Light Scatter, FSC), το πλαγίως σκεδαζόμενο φως (Side Scatter, SSC), τον παραγόμενο φθορισμό και την απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία μέσω ειδικών μετατροπών μετατρέπονται σε ψηφιακά. Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, διαμορφώνονται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και τελικά αναλύονται με τη χρήση ειδικού ηλεκτρονικού συστήματος. Έτσι μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων που υπερβαίνει τα 1.000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο σε πραγματικό χρόνο.

Η μέτρηση του προσθίως σκεδαζόμενου φωτός (FSC) αντιστοιχεί στο μέγεθος του κυττάρου και διαχωρίζει επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς, ενώ η μέτρηση του πλαγίως σκεδαζόμενου φωτός (SSC) παρέχει πληροφορίες σχετικά με την

κυτταροπλασματική κοκκίωση. Με βάση τις παραπάνω παραμέτρους σκέδασης του φωτός, διαχωρίζονται οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί και οριοθετείται ο υπό εξέταση υποπληθυσμός (gating). Τα δεδομένα του φθορισμού δύνανται να απομονωθούν, ώστε να αφορούν αποκλειστικά τον οριοθετημένο πληθυσμό, μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή. Ο συνηθέστερος τύπος ανάλυσης δεδομένων είναι το σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος (dot plot).

Με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής αναλύονται ταυτόχρονα πολλαπλά χαρακτηριστικά του κυττάρου με μεγάλη ταχύτητα. Οι πληροφορίες που παρέχονται αφορούν στο σχετικό μέγεθος, τον όγκο, την κοκκίωση, την πολυπλοκότητα δομής, την παρουσία επιφανειακών ή ενδοκυττάρων αντιγόνων, το περιεχόμενο DNA και την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού ταυτοχρόνως. Η πολλαπλή σήμανση με χρήση αντισωμάτων, καθίσταται εφικτή με την αύξηση του αριθμού των λέιζερ και των ανιχνευτών φθορισμού και παρέχει τη δυνατότητα αποτελεσματικότερου φαινοτυπικού χαρακτηρισμού των κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής FACScan, ο οποίος περιέχει ένα αερόψυκτο λέιζερ αργού (μπλε) και μία δίοδο κόκκινου λέιζερ, βελτιστοποιώντας την ανάλυση ακόμη και αντιγόνων χαμηλής πυκνότητας. Με τη χρήση του συγκεκριμένου κυτταρομετρητή επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός παράλληλα τεσσάρων διαφορετικών φθοριοχρωμάτων, στα τέσσερα διαφορετικά κανάλια FL1 (530/30), FL2 (585/42), FL3 (670LP) και FL4 (661/16).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη συμπεριελήφθησαν δύο ομάδες ασθενών με ΚΑΠΕ οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την καταμέτρηση των ΚΚΚ με δύο διαφορετικές τεχνικές, τον ανοσοφθορισμό και την κυτταρομετρία ροής. Στις δύο αυτές ομάδες οι ασθενείς διάθεταν όλα τα απαραίτητα στοιχεία τα οποία κρίνονται χρήσιμα για τη μετέπειτα ανάλυση.

Αναλυτικά, με ανοσοφθορισμό ελέγχθηκαν δείγματα 91 ασθενών διαγνωσμένων με ΚΑΠΕ, μέσης ηλικίας 67 ετών και εύρους από 34 έως 85 ετών. Από αυτούς το 54.5% διαγνώστηκε με ιστολογικό υπότυπο αδenoκαρκινώματος, το 22.7% με αδιαφοροποίητο καρκίνωμα, το 9.1% έφερε πλακώδες καρκίνωμα και αντίστοιχο ποσοστό ορώδες, ωοθηκικό ή περιτοναϊκό καρκίνωμα ενώ νευροενδοκρινικό καρκίνωμα παρουσίασε το 4.5% των ασθενών της μελέτης. Στον πίνακα 5 καταγράφονται τα δημογραφικά στοιχεία των συμμετεχόντων στη μελέτη, με τα αδenoκαρκινώματα να απαντώνται κατά πλειοψηφία και να έπονται σε συχνότητα τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα. Ιστολογικά, είναι κυρίως μέσης και χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης, ενώ η εντόπιση της νόσου είναι συνηθέστερα σπλαγγχνική. Η λειτουργική ικανότητα των ασθενών κατά τη διάγνωση ήταν ως επί το πλείστον 0 ή 1.

Πίνακας 5: Δημογραφικά ασθενών ΚΑΠΕ της μελέτης		
Ασθενείς		91 N (%)
Διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση (εύρος)		67 (34-85)
Ιστολογία	Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα	20 (22,7%)
	Αδενοκαρκίνωμα	48 (54,5%)
	Πλακώδες καρκίνωμα	8 (9,1%)
	Ορώδες / Ωοθηκικό / Περιτοναϊκό	8 (9,1%)
	Νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	4 (4,5%)
	Σύνολο καταγραφών	88
Βαθμός διαφοροποίησης	I	27 (29,7%)
	II και III	64 (70,3%)
	Σύνολο καταγραφών	91
Λειτουργική ικανότητα	0	44(48,3%)
	I	27 (29,7%)
	II	8 (8,8%)
	III	8 (8,8%)
	IV	4 (4,4%)
	Σύνολο καταγραφών	91
Εντόπιση νόσου	Σπλαγχνική	62 (68,1%)
	Περιτοναϊκή καρκινωμάτωση	18 (19,8%)
	Λεμφαδενική νόσος τραχήλου	6 (6,6%)
	Λεμφαδενική νόσος αλλαχού	5 (5,5%)
	Σύνολο καταγραφών	91
Ζώντες	Ναι	45(49,4%)
	Όχι	46 (50,6%)
	Σύνολο καταγραφών	91
Πρόοδος νόσου	Ναι	60 (66%)
	Όχι	31 (34%)
	Σύνολο καταγραφών	91

Οι συγκεκριμένοι ασθενείς, όπως θα αναλυθεί και κάτωθι, αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τις ανάγκες της στατιστικής ανάλυσης σε σχέση με επιμέρους κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους που συσχετίστηκαν με την παρουσία έναντι απουσίας ΚΚΚ καθώς και την ανίχνευση 5 ή περισσότερων ΚΚΚ έναντι λιγότερων των 5.

Για την ανίχνευση ΚΚΚ με κυτταρομετρία ροής μελετήθηκε δείγμα 35 ασθενών εκ των οποίων οι 25 διαγνωσμένοι με ΚΑΠΕ, οι 4 καρκίνο του εντέρου, οι 4 καρκίνο του μαστού ενώ υπήρχαν και 2 δείγματα αναφοράς. Το εύρος των ηλικιακών ομάδων δεν διάφερε σε σχέση με την ομάδα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη με ανοσοφθορισμό. Οι υποκατηγοριοποιήσεις που εφαρμόστηκαν συνέβαλαν στη στατιστική ανάλυση και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων με συσχέτιση της παρουσίας και του αριθμού των ΚΚΚ που καταμετρήθηκαν με όλες τις επιμέρους παραμέτρους.

10. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

10.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΚΚ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

10.1.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΚΚ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Αρχικά, έγινε προσπάθεια συσχέτισης της ηλικίας κατά τη διάγνωση της νόσου με την ανίχνευση ΚΚΚ σε αυτούς τους ασθενείς. Το εύρος των ηλικιών ήταν μεγάλο (34 έως 85 έτη). Για την ανάλυση της συσχέτισης της ηλικίας διάγνωσης με την ανίχνευση ΚΚΚ οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο υποομάδες με σημείο διαχωρισμού (cut-off point) την ηλικία των 65 ετών. Έτσι, στην πρώτη ομάδα συμπεριελήφθηκαν ασθενείς με ΚΑΠΕ, διαγνωσμένοι σε ηλικία μικρότερη ή ίση των 65 ετών και στη δεύτερη μεγαλύτερη των 65 ετών (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Αναλυτικά η ηλικία διάγνωσης των ασθενών με ΚΑΠΕ που συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση					
Ηλικία κατά τη διάγνωση					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	34	1	1,1	1,1	1,1
	40	1	1,1	1,1	2,2
	41	1	1,1	1,1	3,4
	42	1	1,1	1,1	4,5
	43	1	1,1	1,1	5,6
	44	1	1,1	1,1	6,7
	45	2	2,2	2,2	9,0
	46	1	1,1	1,1	10,1
	47	1	1,1	1,1	11,2
	48	1	1,1	1,1	12,4
	49	1	1,1	1,1	13,5
	50	2	2,2	2,2	15,7
	51	2	2,2	2,2	18,0
	52	2	2,2	2,2	20,2
	54	1	1,1	1,1	21,3
	55	2	2,2	2,2	23,6
	56	1	1,1	1,1	24,7
	57	2	2,2	2,2	27,0
	58	4	4,5	4,5	31,5
	59	1	1,1	1,1	32,6
	60	2	2,2	2,2	34,8
	61	3	3,4	3,4	38,2
	62	2	2,2	2,2	40,4
63	1	1,1	1,1	41,6	
64	3	3,4	3,4	44,9	
65	2	2,2	2,2	47,2	
66	2	2,2	2,2	49,4	
67	3	3,4	3,4	52,8	

68	5	5,6	5,6	58,4
69	2	2,2	2,2	60,7
70	5	5,6	5,6	66,3
71	3	3,4	3,4	69,7
72	1	1,1	1,1	70,8
73	3	3,4	3,4	74,2
74	5	5,6	5,6	79,8
75	3	3,4	3,4	83,1
76	4	4,5	4,5	87,6
77	3	3,4	3,4	91,0
78	1	1,1	1,1	92,1
79	2	2,2	2,2	94,4
81	2	2,2	2,2	96,6
83	2	2,2	2,2	98,9
85	1	1,1	1,1	100,0
Total	89	100,0	100,0	

Συνολικά, συμπεριλήφθησαν με επαρκή δεδομένα στην ανάλυση 89 ασθενείς, το 47,2% των οποίων διαγνώστηκαν σε ηλικία ίση ή μικρότερη των 65 ετών ενώ το υπόλοιπο 52,8 σε ηλικία μεγαλύτερη των 65, με διάμεση τιμή τα 67 έτη. Η στατιστική ανάλυση τόσο με συσχέτιση κατά Pearson όσο και με συσχέτιση κατά Spearman δεν ανέδειξε συσχέτιση της ηλικίας διάγνωσης της νόσου με τον εντοπισμό ΚΚΚ με την τεχνική του ανοσοφθορισμού ($p=0,902$ και $p=0,545$, αντίστοιχα) (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Συσχέτιση της ανίχνευσης ΚΚΚ με την ηλικία διάγνωσης			
Συσχετίσεις			
		Ηλικία κατά τη διάγνωση	Ανοσοφθορισμός ΚΚΚ
Ηλικία κατά τη διάγνωση	Pearson Correlation	1	,015
	Sig. (2-tailed)		,902
	N	89	71
Ανοσοφθορισμός ΚΚΚ	Pearson Correlation	,015	1
	Sig. (2-tailed)	,902	
	N	71	71

Επίσης, η ομαδοποίηση των ασθενών σε σχέση με την ανίχνευση 5 ή περισσότερων ΚΚΚ έναντι λιγότερων ανέδειξε δύο υποόμαδες με το 65,2% των ασθενών να εμφανίζει λιγότερα από 5 ΚΚΚ και το 14,6% 5 ή περισσότερα. Το 20,2% του συνόλου των ασθενών δεν προσμετρήθηκε στην παρούσα ανάλυση. Τα δεδομένα αυτά δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ηλικίας με την παρουσία 5 ή περισσότερων έναντι λιγότερων ΚΚΚ ($p > 0,05$) (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Κατηγοριοποίηση των ασθενών σύμφωνα με την ανίχνευση ≥ 5 ΚΚΚ					
ΚΚΚ ≥ 5					
	ΚΚΚ	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Όχι	58	65,2	81,7	81,7
	Ναι	13	14,6	18,3	100,0
	Σύνολο	71	79,8	100,0	
Missing	System	18	20,2		
Σύνολο		89	100,0		

10.1.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΚΚ ΜΕ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ίδια ομάδα των 89 ασθενών επιμερίστηκε σε κατηγορίες σύμφωνα με την εντόπιση της νόσου, με αποτέλεσμα τη σύσταση 4 υποομάδων. Στην πρώτη ομάδα συμπεριελήφθησαν ασθενείς με λεμφαδενική νόσο (Nodal, N), στη δεύτερη με σπλαγγχνική νόσο (Visceral, V), στην τρίτη με νόσο της κεφαλής και τραχήλου (Head & Neck, HN) και στην τέταρτη ασθενείς με περιτοναϊκή καρκινωμάτωση (Peritoneal Carcinomatosis, PC). Από τους 89 ασθενείς το 59,6% έφερε σπλαγγχνική εντόπιση, το 18% περιτοναϊκή καρκινωμάτωση, το 5,6% νόσο της κεφαλής και του τραχήλου και 4,5% λεμφαδενική εντόπιση. Εξάλλου, το 12,4% δεν εντάχθηκε στις εν λόγω υποκατηγορίες (Πίνακας 9).

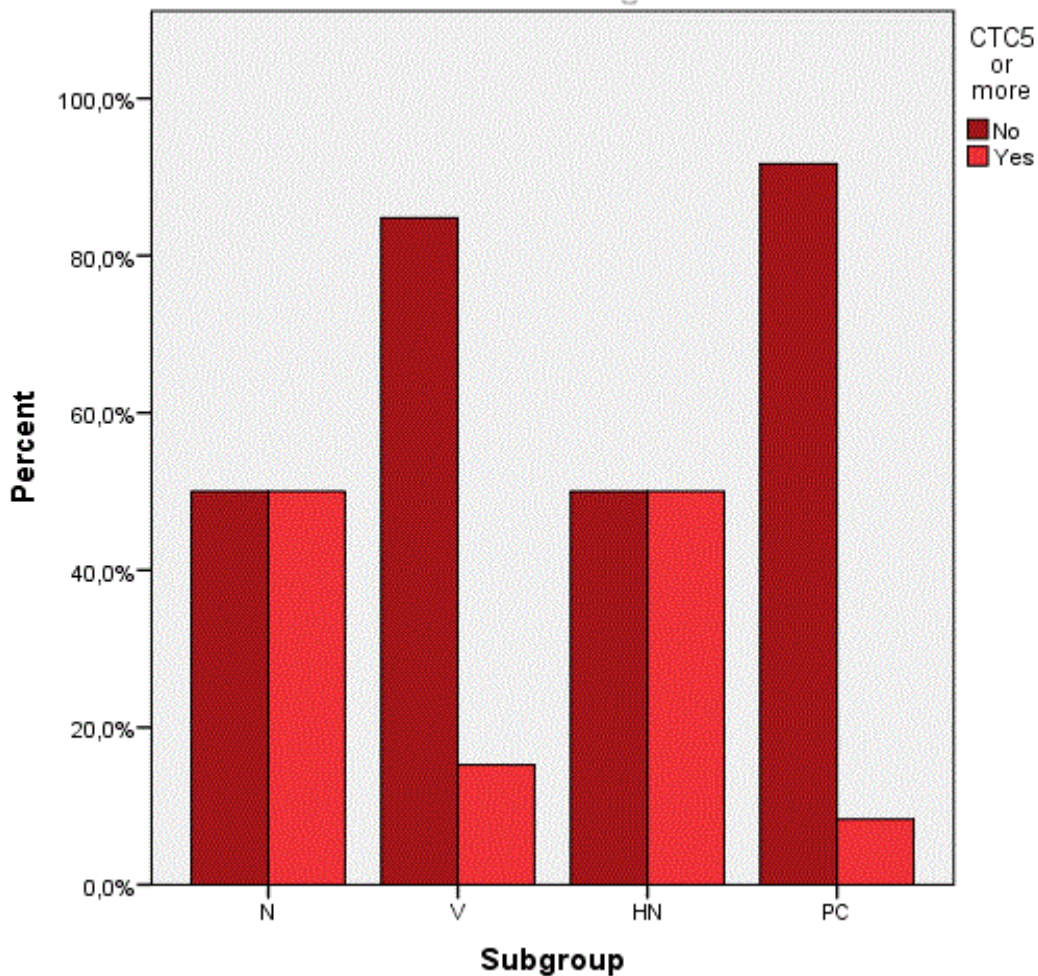
Πίνακας 9: Κατηγοριοποίηση των ασθενών σύμφωνα με την εντόπιση της νόσου					
Υποομάδες					
	Εντόπιση	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	N	4	4,5	5,1	5,1
	V	53	59,6	67,9	73,1
	HN	5	5,6	6,4	79,5
	PC	16	18,0	20,5	100,0
	Σύνολο	78	87,6	100,0	
Missing	System	11	12,4		
Σύνολο		89	100,0		

Κατά την ανάλυση που εφαρμόστηκε επισημάνθηκαν οι ασθενείς κάθε υποομάδας που έφεραν ΚΚΚ και διαχωρίστηκαν από αυτούς στους οποίους δεν ανιχνεύθηκαν ΚΚΚ (Πίνακας 10). Παρά το γεγονός ότι σε ορισμένες κατηγορίες ο αριθμός των ασθενών με ΚΑΠΕ με διαπιστωμένα ΚΚΚ ήταν μεγαλύτερος του αριθμού των μη φερόντων ΚΚΚ, η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε να υπάρχει καμία συσχέτιση της εντόπισης της νόσου με την παρουσία ΚΚΚ ($p > 0.05$).

Πίνακας 10: Ασθενείς των επιμέρους υποομάδων ανατομικής εντόπισης της νόσου στους οποίους ανιχνεύθηκαν ΚΚΚ						
ΚΚΚ (Ναι / Όχι) * Subgroup Crosstabulation						
		Υποομάδες				Σύνολο
		N	V	HN	PC	
ΚΚΚ (Ναι / Όχι)	Όχι	1	27	1	7	36
	Ναι	3	19	3	5	30
Σύνολο		4	46	4	12	66

Επιπροσθέτως, επιχειρήθηκε να συσχετιστεί η παρουσία 5 ή περισσότερων ΚΚΚ έναντι λιγότερων με την εντόπιση της νόσου. Από τους 66 ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση στο 81,8% ανιχνεύθηκαν λιγότερα από 5 ΚΚΚ ενώ στο 18,2% 5 ή περισσότερα. Μετά τη στατιστική ανάλυση το p-value υπολογίστηκε 0,060, γεγονός που τεκμηριώνει την ύπαρξη μη στατιστικώς σημαντικής συσχέτισης (Πίνακας 11 και ραβδόγραμμα 1).

Πίνακας 11: Ασθενείς των επιμέρους υποομάδων ανατομικής εντόπισης της νόσου στους οποίους ανιχνεύθηκαν ΚΚΚ ≥ 5 ή < 5						
ΚΚΚ ≥ 5 * Subgroup Crosstabulation						
		Υποομάδες				Σύνολο
		N	V	HN	PC	
ΚΚΚ ≥ 5	Όχι	2	39	2	11	54
	Ναι	2	7	2	1	12
Σύνολο		4	46	4	12	66



Ραβδόγραμμα 1: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης των ασθενών κάθε υποομάδας ανατομικής εντόπισης της νόσου με την παρουσία ≥ 5 ΚΚΚ έναντι <5

10.1.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΜΕ ΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ (PERFORMANCE STATUS)

Στην ιατρική και κυρίως στην ογκολογία επιχειρείται η ποσοτικοποίηση της γενικής κατάστασης και φυσικής δραστηριότητας των ασθενών. Η δυσαρμονία και το υποκειμενικό στοιχείο που είχε μια τέτοια κατηγοριοποίηση οδήγησε την επιστημονική κοινότητα σε ακριβή προσδιορισμό κανόνων αξιολόγησης των ασθενών με διάφορους τρόπους βαθμολόγησης να είναι διαθέσιμοι. Στην παρούσα εργασία, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν επί τη βάσει της λειτουργικής τους ικανότητας (Performance

Status, PS). Στην κατηγορία 0 συμπεριελήφθησαν όσοι είναι πλήρως ενεργοί και ασυμπτωματικοί, στην κατηγορία 1 ασθενείς που φέρουν συμπτώματα αλλά δεν είναι καθόλου κλινήρεις, στην κατηγορία 2 οι έχοντες συμπτώματα που περνούν λιγότερο από το 50% της ημέρας τους στο κρεβάτι, στην κατηγορία 3 οι συμπτωματικοί που περνούν περισσότερο από το 50% της ημέρας τους στο κρεβάτι και στην κατηγορία 4 οι κλινήρεις ασθενείς που δε μπορούν να ασκήσουν καμία δραστηριότητα αυτοεξυπηρέτησης.

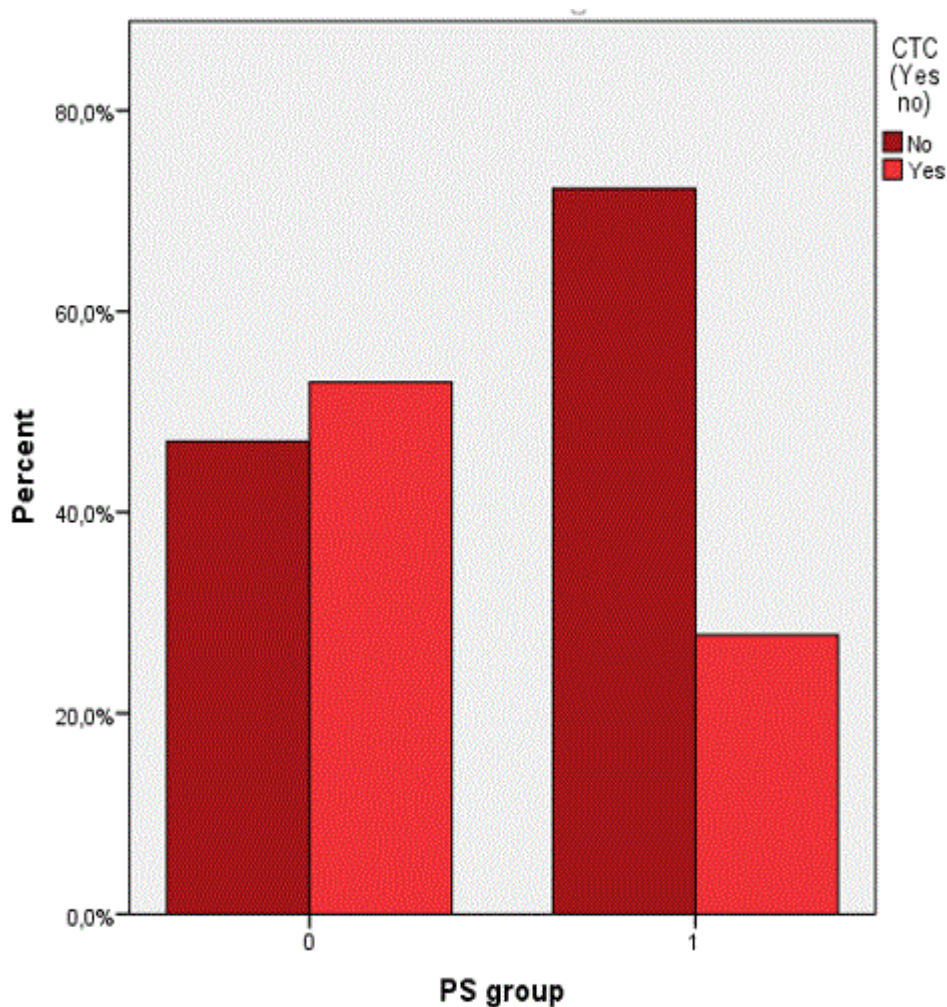
Στη παρούσα μελέτη, από το σύνολο των 91 ασθενών, κατηγοριοποιήθηκαν κατά τη διάγνωση του ΚΑΠΕ οι 77 ως προς τη λειτουργική τους ικανότητα. Από αυτούς, το 41,6% ήταν ασυμπτωματικοί, δηλαδή το PS ήταν 0, το 25,8% είχε PS 1, το 15,8% ήταν ισόποσα κατανεμημένο σε ασθενείς με PS 2 και 3, ενώ το 3,4% διαγνώσθηκε με PS 4 (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Τοποθέτηση των ασθενών σε διαφορετικές υποομάδες σύμφωνα με τη λειτουργική ικανότητα					
	PS	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	0	37	41,6	48,1	48,1
	1	23	25,8	29,9	77,9
	2	7	7,9	9,1	87,0
	3	7	7,9	9,1	96,1
	4	3	3,4	3,9	100,0
	Σύνολο	77	86,5	100,0	
Missing	System	12	13,5		
Σύνολο		89	100,0		

Στη συνέχεια για την εφαρμογή της στατιστικής ανάλυσης οι ασθενείς τοποθετήθηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε ασθενείς με PS 0 και 1 και η δεύτερη τους υπόλοιπους με PS 2, 3 και 4. Το τελικό αποτέλεσμα της δεύτερης αυτής κατηγοριοποίησης απέφερε 51 ασθενείς στην πρώτη και 18 στη δεύτερη ομάδα αντίστοιχα (Πίνακας 13) (Ραβδόγραμμα 2). Η στατιστική ανάλυση, δεν φάνηκε να συσχετίζει το PS με την ανίχνευση έναντι απουσίας των ΚΚΚ, αν και το αποτέλεσμα ήταν οριακά στατιστικώς σημαντικό ($p=0.066$).

Πίνακας 13: Διαχωρισμός των ασθενών με βάση το PS (PS 0 & 1= 0, PS 2, 3 & 4= 1)

ΚΚΚ (Ναι / Όχι) * PS group Crosstabulation				
		Ομάδα PS		Σύνολο
		0	1	
ΚΚΚ (Ναι / Όχι)	Όχι	24	13	37
	Ναι	27	5	32
Σύνολο		51	18	69



Ραβδόγραμμα 2: Σχηματική απεικόνιση του αριθμού των ασθενών με ή χωρίς ΚΚΚ σε κάθε υποκατηγορία σύμφωνα με το PS

Επιπρόσθετα, στις δύο αυτές ομάδες έγινε διαχωρισμός με βάση τη παρουσία 5 ή περισσότερων ΚΚΚ έναντι λιγότερων. Από τους 69 ασθενείς που αξιολογήθηκαν, στο 82,6% ανιχνεύθηκαν λιγότερα από 5 ΚΚΚ ενώ στο 17,4% 5 ή περισσότερα ΚΚΚ (Πίνακας 14). Η στατιστική ανάλυση που εφαρμόστηκε δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του PS με την παρουσία 5 ή περισσότερων έναντι λιγότερων ΚΚΚ ($p > 0,05$).

Πίνακας 14: Ασθενείς των επιμέρους υποομάδων PS στους οποίους ανιχνεύθηκαν ≥ 5 ή < 5 ΚΚΚ				
ΚΚΚ ≥ 5 * PS group Crosstabulation				
		Ομάδα PS		Σύνολο
		0	1	
ΚΚΚ ≥ 5	Όχι	40	17	57
	Ναι	11	1	12
Σύνολο		51	18	69

10.1.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ Ή ΑΠΟΥΣΙΑ ΚΚΚ

Μετά την ιστολογική εξέταση έγινε κατηγοριοποίηση των 89 ασθενών με ΚΑΠΕ σε 5 υποομάδες επί τη βάση ιστολογικών χαρακτηριστικών. Οι ασθενείς με αδιαφοροποίητο καρκίνωμα αντιπροσώπευαν το 22,5%, με αδenoκαρκίνωμα το 52,8%, με πλακώδες καρκίνωμα το 9% όσο και με ορώδες ή ωθηκικό ή περιτοναϊκό καρκίνωμα και με νευροενδοκρινικό καρκίνωμα το 5,6% (Πίνακας 15).

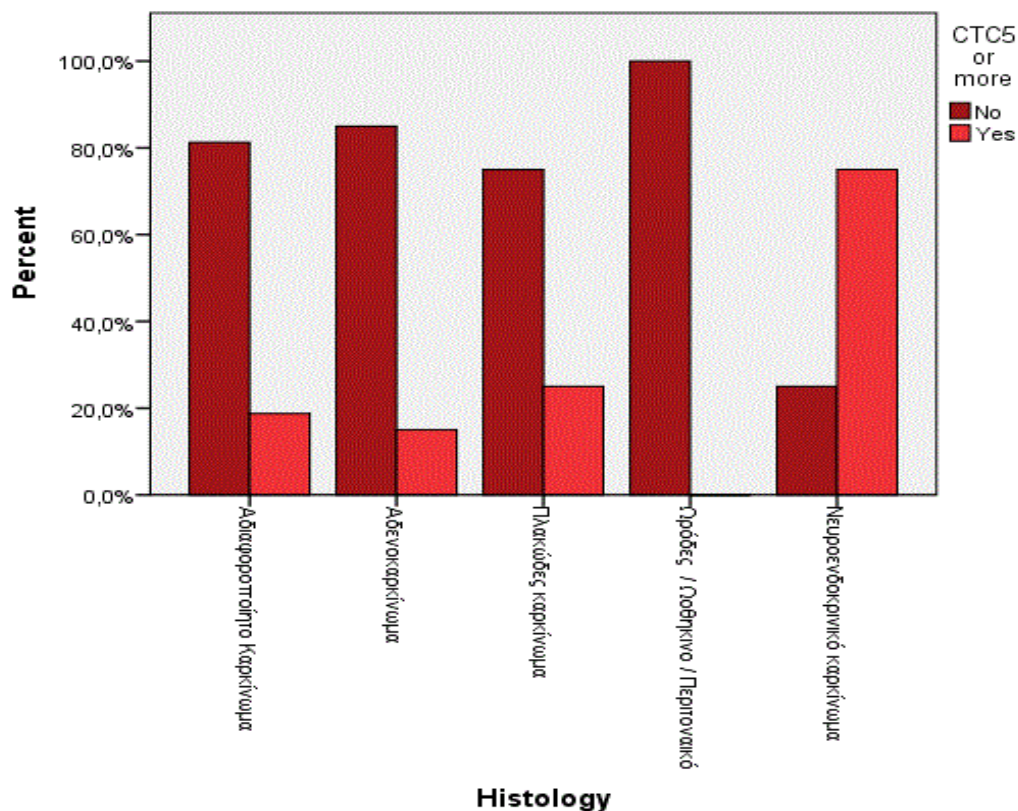
Πίνακας 15: Ιστολογική κατηγοριοποίηση των ασθενών με ΚΑΠΕ της μελέτης					
	Ιστολογία	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Αδιαφοροποίητο Καρκίνωμα	20	22,5	22,7	22,7
	Αδενοκαρκίνωμα	47	52,8	53,4	76,1
	Πλακώδες καρκίνωμα	8	9,0	9,1	85,2
	Ορώδες / Ωοθηκικό / Περιτοναϊκό	8	9,0	9,1	94,3
	Νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	5	5,6	5,7	100,0
	Total	88	98,9	100,0	
Missing	System	1	1,1		
Σύνολο		89	100,0		

Από τη στατιστική ανάλυση που εφαρμόστηκε φαίνεται πως η παρουσία έναντι απουσίας ΚΚΚ δεν σχετίζεται με τον ιστολογικό υπότυπο του ΚΑΠΕ καθώς δεν εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντική ($p > 0.05$) (Πίνακας 16).

Πίνακας 16: Αναλυτική παρουσίαση των ασθενών κατόπιν ιστολογικής κατηγοριοποίησής τους σε σχέση με την ανίχνευση ΚΚΚ							
ΚΚΚ (Ναι / Όχι) * Histology Crosstabulation							
		Ιστολογία					Σύνολο
		Αδιαφοροποίητο Καρκίνωμα	Αδενοκαρκίνωμα	Πλακώδες καρκίνωμα	Ορώδες/ Ωοθηκικό/ Περιτοναϊκό	Νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	
ΚΚΚ	Όχι	11	23	1	2	1	38
	Ναι	5	17	3	5	3	33
Σύνολο		16	40	4	7	4	71

Όπως και στις προηγούμενες αναλύσεις έτσι και εδώ οι ασθενείς κάθε ιστολογικού υπότυπου κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες με σημείο διαχωρισμού την ανίχνευση 5 ή περισσότερων ΚΚΚ. Από την υποκατηγοριοποίηση αυτή, προέκυψε ότι το 81,7% των ασθενών όλων των κατηγοριών εμφάνισε λιγότερα από 5 ΚΚΚ ενώ το 18,3% 5 ή περισσότερα. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε στατιστικώς οριακά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο ιστολογικό προφίλ και την ανίχνευση περισσότερων των 5 ΚΚΚ ($p= 0,032$). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παράδοξη τάση που επισημαίνεται σε ασθενείς με νευροενδοκρινικό καρκίνωμα, καθώς εμφανίζουν 5 ή περισσότερα ΚΚΚ σε ποσοστό 75%, μολονότι εμπίπτουν στην κατηγορία ευνοϊκής πρόγνωσης κατά τα ισχύοντα (Πίνακας 17, ραβδόγραμμα 3). Ωστόσο, τα μόλις 4 περιστατικά νευροενδοκρινικών καρκινωμάτων της μελέτης, προφανώς δεν είναι ασφαλές δείγμα για εξαγωγή συμπερασμάτων.

Πίνακας 17: Παρουσίαση των ασθενών κατόπιν ιστολογικής κατηγοριοποίησής τους σε σχέση με την ανίχνευση ≥ 5 ΚΚΚ έναντι <5							
ΚΚΚ ≥ 5 * Histology Crosstabulation							
		Ιστολογία					Σύνολο
		Αδιαφοροποίητο Καρκίνωμα	Αδενοκαρκίνωμα	Πλακώδες καρκίνωμα	Ορώδες / Ωοθηκικό / Περιτοναϊκό	Νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	
ΚΚΚ ≥ 5	Όχι	13	34	3	7	1	58
	Ναι	3	6	1	0	3	13
Σύνολο		16	40	4	7	4	71



Ραβδόγραμμα 3: Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού των ασθενών κάθε επιμέρους ιστολογικής υποομάδας σε σχέση με την παρουσία ≥ 5 ΚΚΚ έναντι < 5

10.1.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΚΚ

Τα δείγματα των ασθενών της μελέτης, κατηγοριοποιήθηκαν ιστοπαθολογικά με βάση το βαθμό διαφοροποίησης κατά WHO (World Health Organization).

Στην παρούσα μελέτη οι ασθενείς κατανεμήθηκαν σε δύο ομάδες για τις ανάγκες της στατιστικής ανάλυσης. Η πρώτη συμπεριέλαβε ασθενείς με ιστοπαθολογικό βαθμό διαφοροποίησης 1 και η δεύτερη εκείνους με ενδιάμεση και φτωχή διαφοροποίηση, βαθμού 2 και 3 αντίστοιχα. Τελικά, το 21,3% των ασθενών διαπιστώθηκε με καρκινώματα με βαθμό διαφοροποίησης 1 ενώ το 71,9% με 2 και 3. Το 6,7% των ασθενών δεν συμπεριελήφθη στην παρούσα συσχέτιση (Πίνακας 18).

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση των ασθενών της μελέτης με βάση το βαθμό διαφοροποίησης (Grade I έναντι Grade II και III)					
	GRADE group	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	19	21,3	22,9	22,9
	2	64	71,9	77,1	100,0
	Σύνολο	83	93,3	100,0	
Missing	System	6	6,7		
Σύνολο		89	100,0		

Η παρατήρηση και η στατιστική ανάλυση ανέδειξαν περίπου ισόποση κατανομή ως προς την ανίχνευση ΚΚΚ με ανοσοφθορισμό στις δύο ομάδες που δημιουργήθηκαν σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης. Η έλλειψη στατιστικώς σημαντικής συσχέτισης επιβεβαιώθηκε μετά την ολοκλήρωση της στατιστικής ανάλυσης ($p > 0,05$) (Πίνακας 19).

Πίνακας 19: Κατηγοριοποίηση των ασθενών των δύο επιμέρους υποομάδων ως προς το βαθμό διαφοροποίησης σε σχέση με την ανίχνευση ΚΚΚ				
ΚΚΚ (Ναι /Όχι) * GRADE group Crosstabulation				
		GRADE group		Σύνολο
		1	2	
ΚΚΚ (Ναι / Όχι)	Όχι	10	26	36
	Ναι	7	24	31
Σύνολο		17	50	67

Επιπρόσθετα, έγινε ανάλυση της συσχέτισης της παρουσίας 5 ή περισσότερων ΚΚΚ έναντι λιγότερων με το βαθμό διαφοροποίησης. Όπως προέκυψε, στο 82,4% των ασθενών με βαθμό διαφοροποίησης 1 και στο 82% εκείνων με βαθμό διαφοροποίησης 2 και 3 ανιχνεύθηκαν λιγότερα από 5 ΚΚΚ. Εν τέλει, από τη στατιστική ανάλυση δεν προκύπτει συσχέτιση του βαθμού διαφοροποίησης με την ανίχνευση των ΚΚΚ ($p > 0,05$) (Πίνακας 20).

Πίνακας 20: Κατηγοριοποίηση των ασθενών των δύο επιμέρους υποομάδων ως προς το βαθμό διαφοροποίησης σε σχέση με την ανίχνευση ≥ 5 ΚΚΚ έναντι <5				
ΚΚΚ ≥ 5 * GRADE group Crosstabulation				
		GRADE group		Σύνολο
		1	2	
ΚΚΚ ≥ 5	Όχι	14	41	55
	Ναι	3	9	12
Σύνολο		17	50	67

10.1.6 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΚΚ

Οι 61 από τους 91 ασθενείς με ΚΑΠΕ που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη επιμερίστηκαν σε δύο ομάδες σε σχέση με την εμφάνιση ή όχι λευκοκυττάρωσης. Παρατηρήθηκε ότι το 75,4% των ασθενών δεν εμφάνισε λευκοκυττάρωση ενώ το 24,6% όχι. Διαπιστώθηκε επίσης ότι, στο 58,7% των ασθενών χωρίς λευκοκυττάρωση δεν ανιχνεύθηκαν ούτε και ΚΚΚ ενώ εκείνοι με λευκοκυττάρωση ήταν σχεδόν ισόποσα κατανομημένοι αναφορικά με την παρουσία ΚΚΚ καθώς στο 46,7% δεν ανιχνεύθηκαν ΚΚΚ (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Ανίχνευση ΚΚΚ σε ασθενείς με ή χωρίς λευκοκυττάρωση				
ΚΚΚ (Ναι / Όχι) * Leukocytosis Crosstabulation				
		Λευκοκυττάρωση		Σύνολο
		Όχι	Ναι	
ΚΚΚ (Ναι / Όχι)	Όχι	27	7	34
	Ναι	19	8	27
Σύνολο		46	15	61

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση ($p > 0,05$) ανάμεσα στη λευκοκυττάρωση και την ανίχνευση των ΚΚΚ με ανοσοφθορισμό. Επιπλέον, μετά την ομαδοποίηση με σημείο αναφοράς την παρουσία 5 ή περισσότερων ΚΚΚ έναντι λιγότερων, προέκυψε ότι το 87% των ασθενών χωρίς λευκοκυττάρωση και το 82% με λευκοκυττάρωση παρουσίασαν λιγότερα από 5 ΚΚΚ στον ανοσοφθορισμό. Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε κάποια σύνδεση της ανίχνευσης περισσότερων από 5 ΚΚΚ με την παρουσία λευκοκυττάρωσης ($p > 0.05$) (Πίνακας 22).

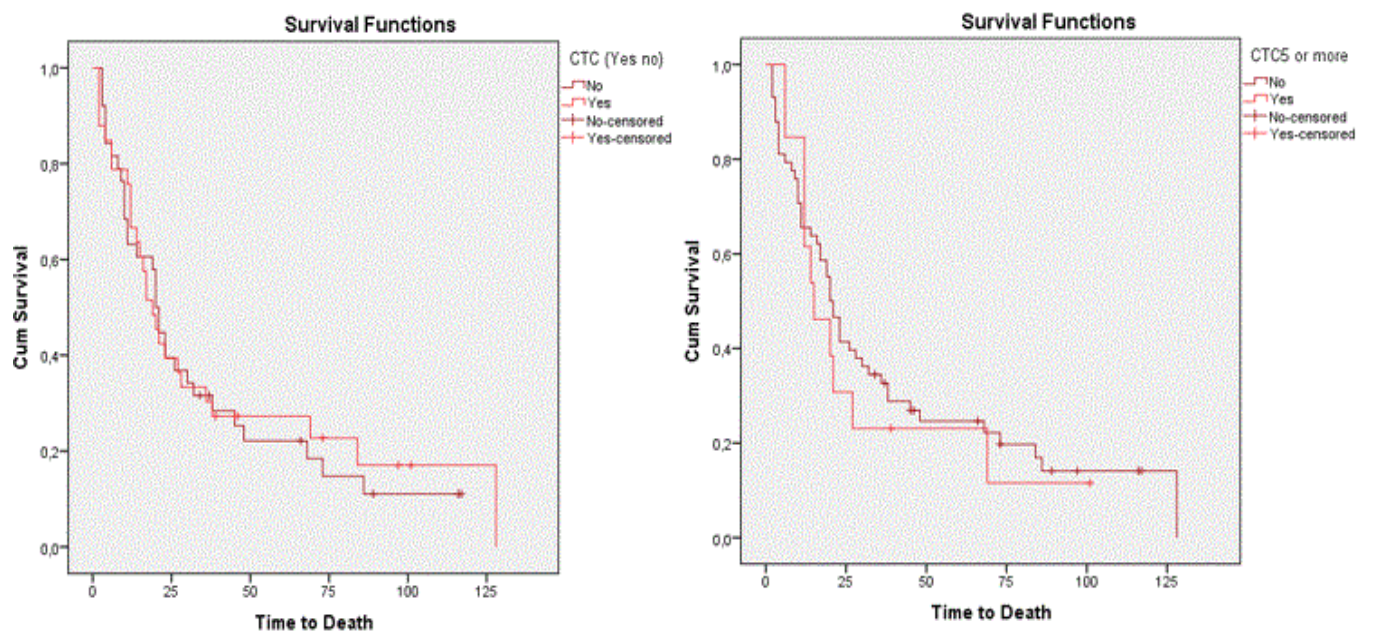
Πίνακας 22: Συσχέτιση της παρουσίας λευκοκυττάρωσης με την ανίχνευση ≥ 5 ΚΚΚ έναντι < 5				
ΚΚΚ ≥ 5 * Leukocytosis Crosstabulation				
		Λευκοκυττάρωση		Σύνολο
		Όχι	Ναι	
ΚΚΚ ≥ 5	Όχι	40	12	52
	Ναι	6	3	9
Σύνολο		46	15	61

10.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΚΚΚ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Ένα από τα κρισιμότερα σημεία της παρούσας εργασίας, αποτελεί η εξακρίβωση πιθανής συσχέτισης των ΚΚΚ με την επιβίωση των ασθενών με ΚΑΠΕ. Πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο αυτό μελέτη ανίχνευσης ΚΚΚ με ανοσοφθορισμό και επιχειρήθηκε συσχέτιση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών τόσο σε σχέση με την

ανίχνευση ή όχι ΚΚΚ όσο και ως προς την παρουσία 5 ή περισσότερων ΚΚΚ έναντι λιγότερων.

Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση τόσο της παρουσίας ΚΚΚ όσο και του απόλυτου αριθμού τους (5 ή περισσότερων έναντι λιγότερων) με την επιβίωση των ασθενών ($p > 0,05$) (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα επιβίωσης σε σχέση με την παρουσία των ΚΚΚ και τον αριθμό τους (≥ 5 έναντι < 5) με ανοσοφθορισμό

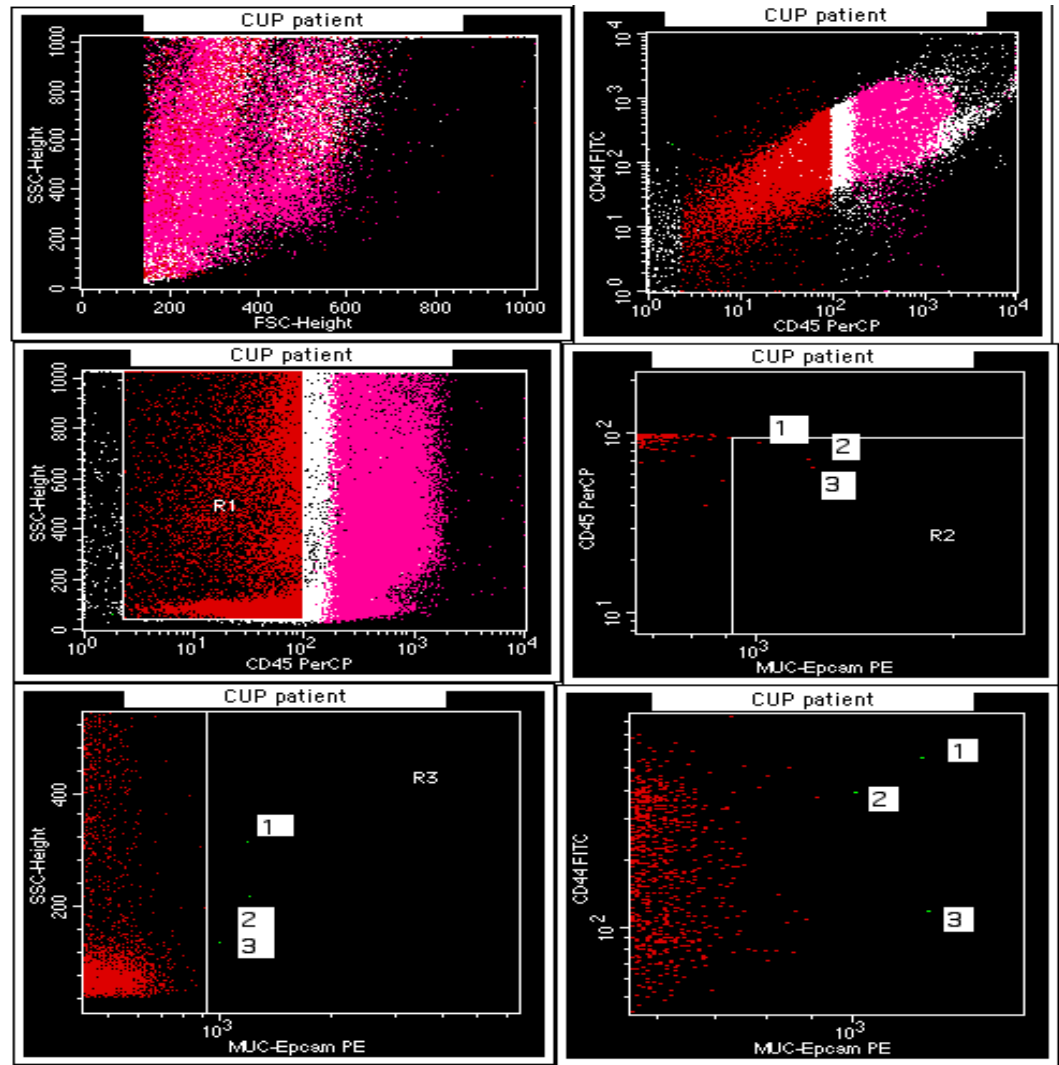
10.3 ΚΚΚ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Πέραν της ανίχνευσης με την τεχνική του ανοσοφθορισμού έγινε καταμέτρηση του απόλυτου αριθμού ΚΚΚ και με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Στην συγκεκριμένη διαδικασία συμπεριλήφθησαν 25 ασθενείς με ΚΑΠΕ, από 4 με αδενοκαρκινώματα μαστού και παχέος εντέρου, καθώς και 2 μάρτυρες.

Από τους ασθενείς με ΚΑΠΕ που αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ροής, βρέθηκε ότι στο 64% ταυτοποιήθηκαν ΚΚΚ και στο υπόλοιπο 36% απουσίαζαν. Σημειώνεται επίσης ότι στο 28% (7 από τους 25 ασθενείς), τα καταμετρηθέντα ΚΚΚ υπερέβαιναν τα 50 κατά περίπτωση (Πίνακας 23). Υπενθυμίζεται ότι στην καταμέτρηση με

ανοσοφθορισμό, μόλις στο 14,6% των ασθενών αναγνωρίστηκαν 5 ή περισσότερα ΚΚΚ. Ωστόσο ο πληθυσμός των ασθενών με ΚΑΠΕ που εκτιμήθηκε με τις 2 τεχνικές δεν ήταν κοινός.

Πίνακας 23: ΚΚΚ με κυτταρομετρία ροής σε 25 αξιολογημένους ασθενείς με ΚΑΠΕ		
ΚΚΚ (Απόλυτος αριθμός)	Συχνότητα	%
0	9	36
13	1	4
15	1	4
20	1	4
23	1	4
25	1	4
30	1	4
33	1	4
37	1	4
38	1	4
50	1	4
110	1	4
140	1	4
180	1	4
200	1	4
280	1	4
330	1	4
1-49	9	36
>= 50	7	28



Εικόνα 52: Ταυτοποίηση του υποπληθυσμού των καρκινικών κυττάρων μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος μέσω κυτταρομετρίας ροής σε ασθενή με ΚΑΠΕ της μελέτης

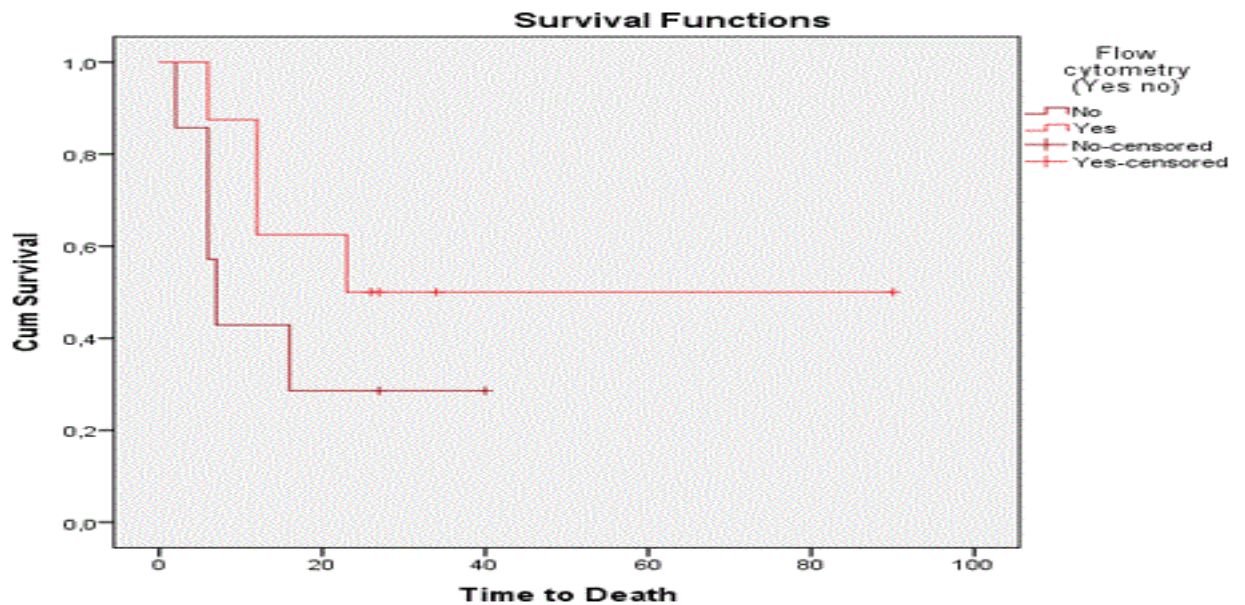
Αντιστοίχως, σε κανέναν από τους υγιείς μάρτυρες δεν έγινε ανίχνευση ΚΚΚ με την κυτταρομετρία ροής. Τα ΚΚΚ απουσίαζαν επίσης στο 50% των ασθενών με αδενοκαρκινώματα μαστού και παχέος εντέρου που μελετήθηκαν με την ίδια τεχνική (Πίνακας 24).

Πίνακας 24: Έλεγχος παρουσίας ΚΚΚ με κυτταρομετρία ροής σε φυσιολογικούς μάρτυρες και ασθενείς με καρκίνο μαστού και παχέος εντέρου

		Αριθμός ασθενών	Αριθμός ΚΚΚ					Ομαδοποίηση (%)			
			0	20	25	36	150	0	≤ 25	≤ 50	>50
Υποομάδες ασθενών	Μάρτυρες	2	2					2 (100%)			
	Ca μαστού	4	2	1			1	2 (50%)	1 (25%)		1 (25%)
	Ca εντέρου	4	2		1	1		2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)	
Σύνολο		10									

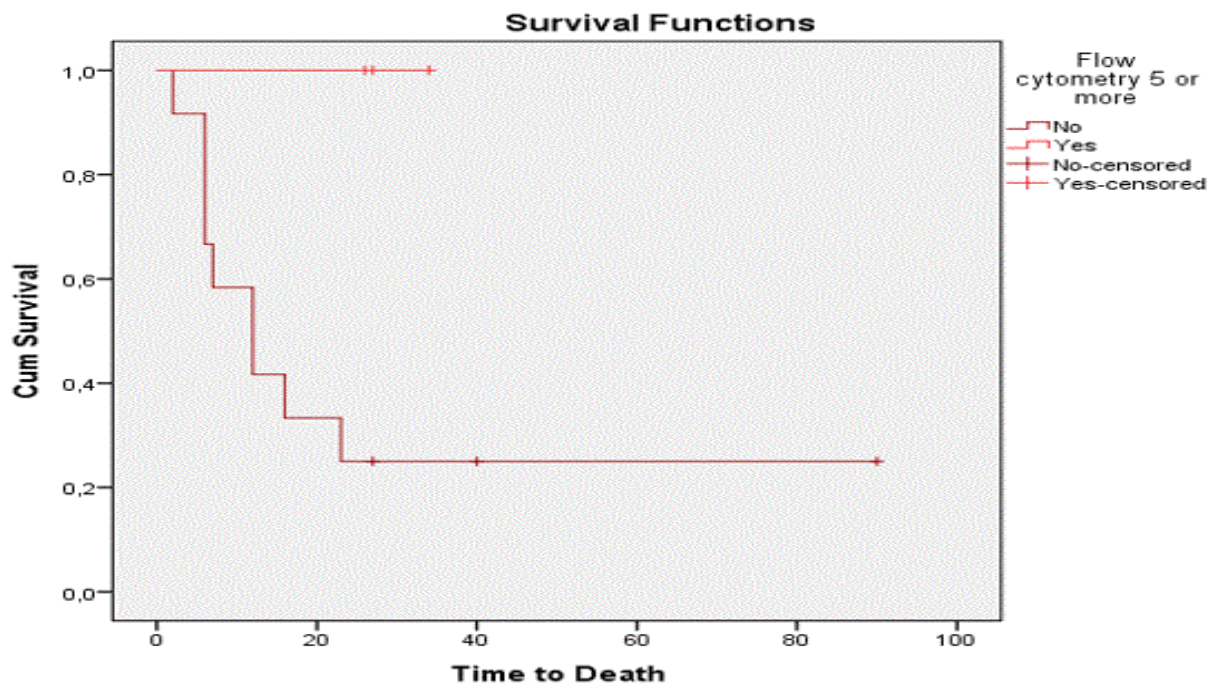
10.3.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΚΚΚ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Κατά τρόπο ανάλογο με τον ανοσοφθορισμό, επιχειρήθηκε ταυτοποίηση ΚΚΚ με κυτταρομετρία ροής σε ασθενείς με ΚΑΠΕ και συσχέτισή τους με τη συνολική επιβίωση. Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης δε διαπιστώθηκε τέτοιου είδους συσχέτιση που να κρίνεται στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$) (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα συνολικής επιβίωσης των ασθενών σε σχέση με την παρουσία ΚΚΚ με κυτταρομετρία ροής

Η ομαδοποίηση των ασθενών σε σχέση με την ανίχνευση ≥ 5 ΚΚΚ έναντι λιγότερων, ανέδειξε μία οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση αυτής της παραμέτρου με τη συνολική επιβίωση ($p= 0.049$). Η εξαγωγή του συγκεκριμένου



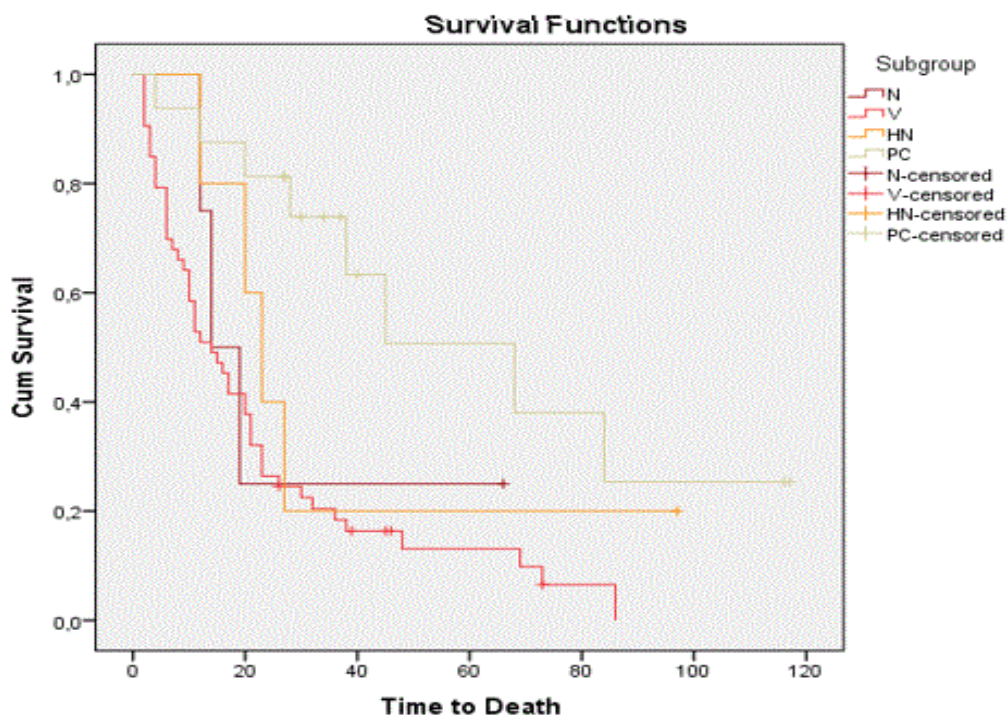
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα επιβίωσης των ασθενών που φέρουν ≥ 5 ΚΚΚ έναντι <5 με κυτταρομετρία ροής

αποτελέσματος αποτελεί μία πρώιμη απόδειξη ότι τα ΚΚΚ δεν αποτελούν προγνωστικό δείκτη στο ΚΑΠΕ (Διάγραμμα 3).

10.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

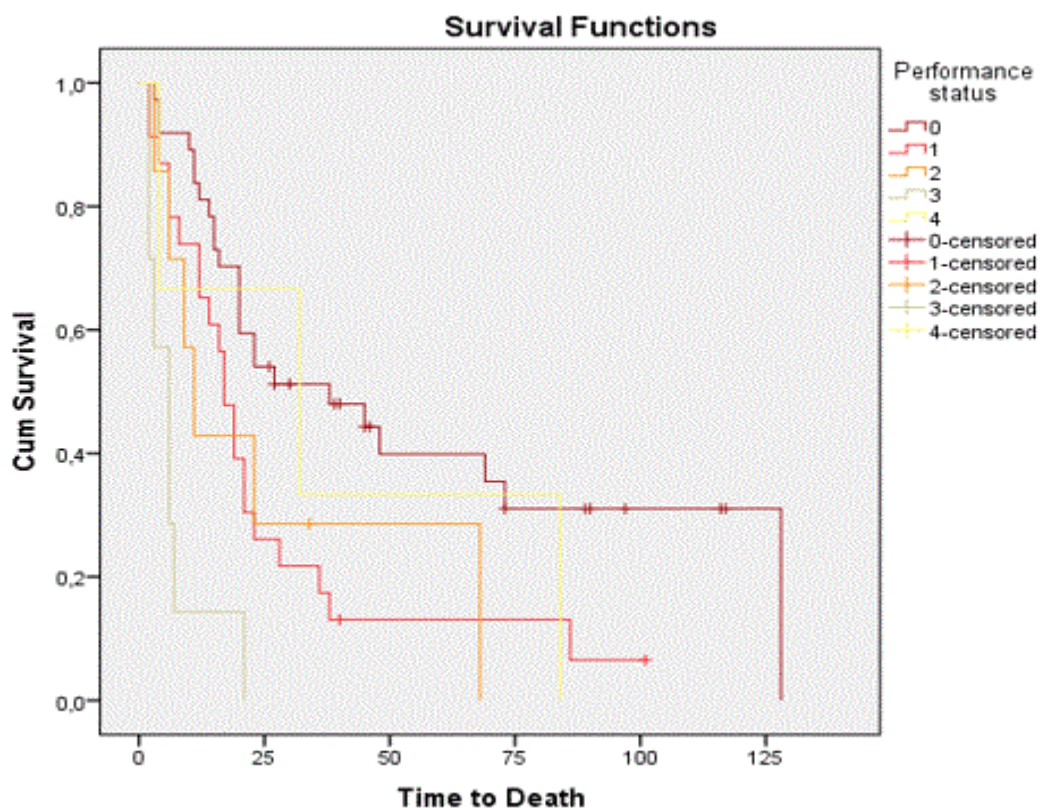
Η παρούσα μελέτη με τη συλλογή όλων των προαναφερθέντων κλινικοπαθολογοανατομικών δεδομένων προσφέρει τη δυνατότητα τόσο της συσχέτισής τους με την παρουσία ΚΚΚ, όσο και με τη διαμέση επιβίωση των ασθενών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε οι ασθενείς με ΚΑΠΕ κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την εντόπιση της νόσου σε 4 επιμέρους υποομάδες. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε ισχυρή συσχέτιση της εντόπισης της νόσου με τη συνολική επιβίωση των ασθενών ($p= 0.04$). Όπως υποδεικνύεται και στο γράφημα η επιβίωση των ασθενών με περιτοναϊκή καρκινωμάτωση είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των ασθενών με σπλαγγική και εντόπιση κεφαλής και τραχήλου. Εξάλλου, η ομάδα ασθενών με λεμφαδενική εντόπιση της νόσου εμφανίζει τη μικρότερη συνολική επιβίωση (Διάγραμμα 4).



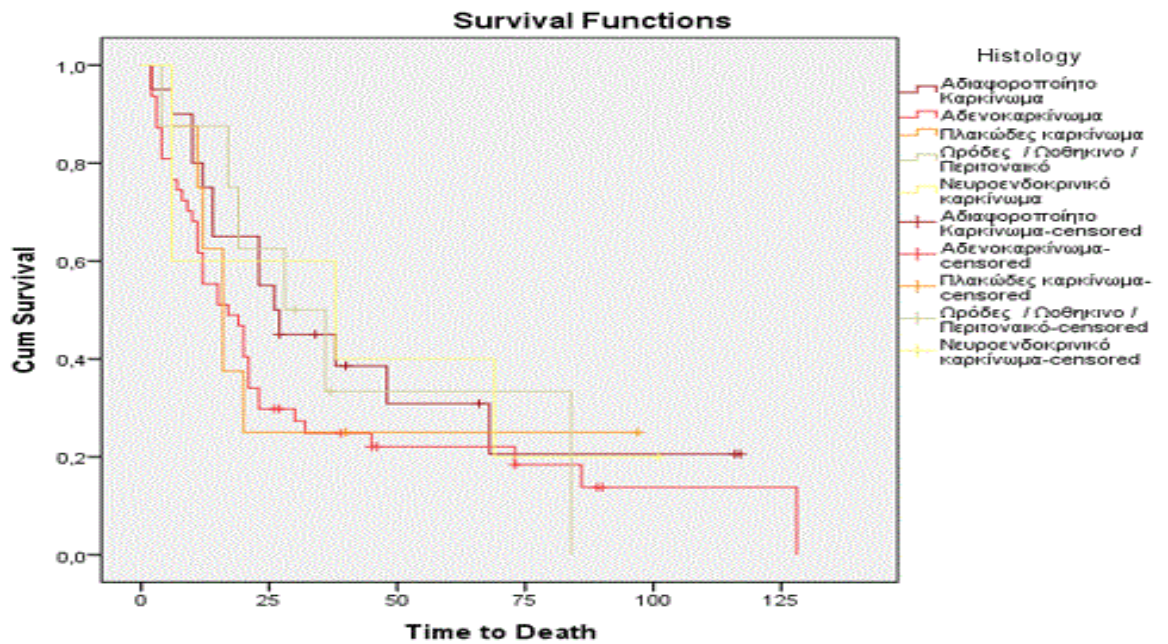
Διάγραμμα 5: Γράφημα συνολικής επιβίωσης με βάση την εντόπιση της νόσου

Στατιστικώς σημαντική προκύπτει πως είναι και η συσχέτιση του PS με τη συνολική επιβίωση των ασθενών. Όσοι χαρακτηρίστηκαν από PS 0 και 1 εμφάνισαν την πλέον παρατεταμένη συνολική επιβίωση ($p < 0,05$) (Διάγραμμα 5).



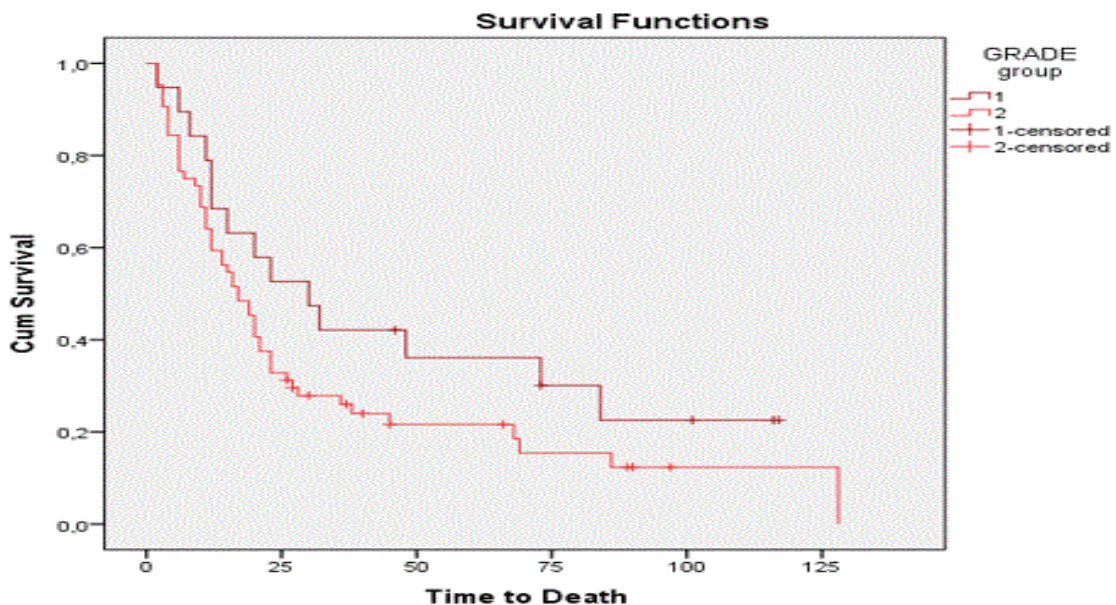
Διάγραμμα 6: Διάγραμμα συνολικής επιβίωσης ασθενών με βάση το PS

Αντιθέτως, φάνηκε πως ο ιστοπαθολογικός υπότυπος των ΚΑΠΕ δε συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την συνολική επιβίωση των ασθενών. Όπως αναπαριστάται και στο γράφημα, κανένας από τους υφιστάμενους ιστολογικούς υπότυπους δε συνδυάζεται από δραματική επιβάρυνση, είτε ευνοϊκή πρόγνωση της επιβίωσης των ασθενών με ΚΑΠΕ ($p > 0,05$) (Διάγραμμα 6).



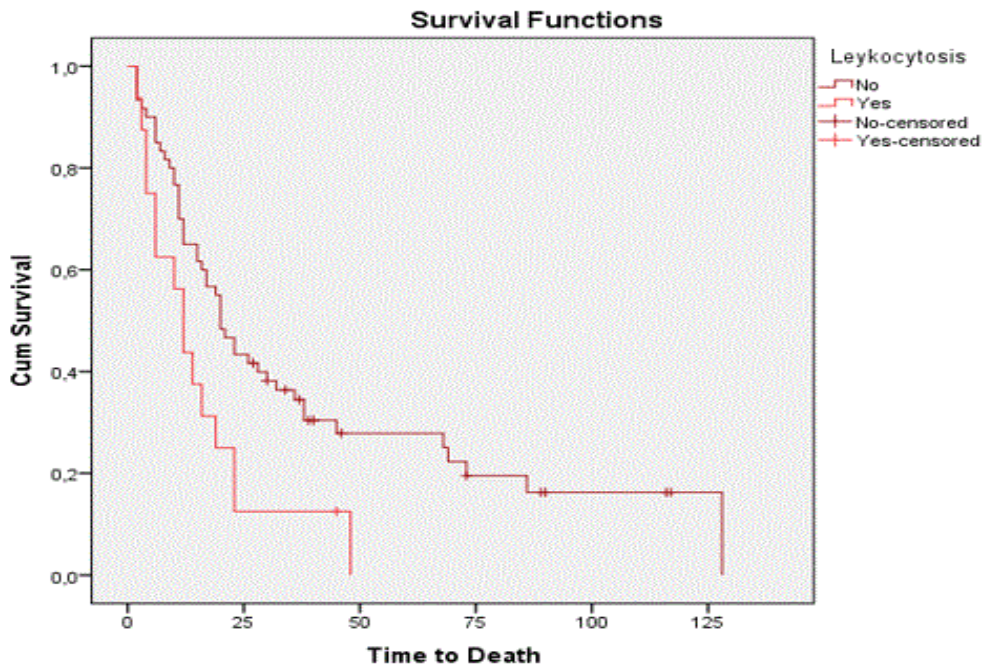
Διάγραμμα 6: Διάγραμμα συνολικής επιβίωσης ασθενών με βάση τον ιστοπαθολογικό υπότυπο

Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα της συσχέτισης της συνολικής επιβίωσης με τις δύο διαμορφωθείσες ομάδες με βάση το βαθμό διαφοροποίησης. Οι ασθενείς της πρώτης ομάδας με καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα βαθμού διαφοροποίησης 1 (Grade 1) δε διαφέρουν από εκείνους της δεύτερης με βαθμούς διαφοροποίησης 2 και 3 (Grade 2, 3) ως προς τη συνολική τους επιβίωση κάτι που επιβεβαιώνεται και από τη στατιστική ανάλυση καθώς το p value είναι μεγαλύτερο του 0,05 (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα συνολικής επιβίωσης ασθενών με βάση το βαθμό διαφοροποίησης

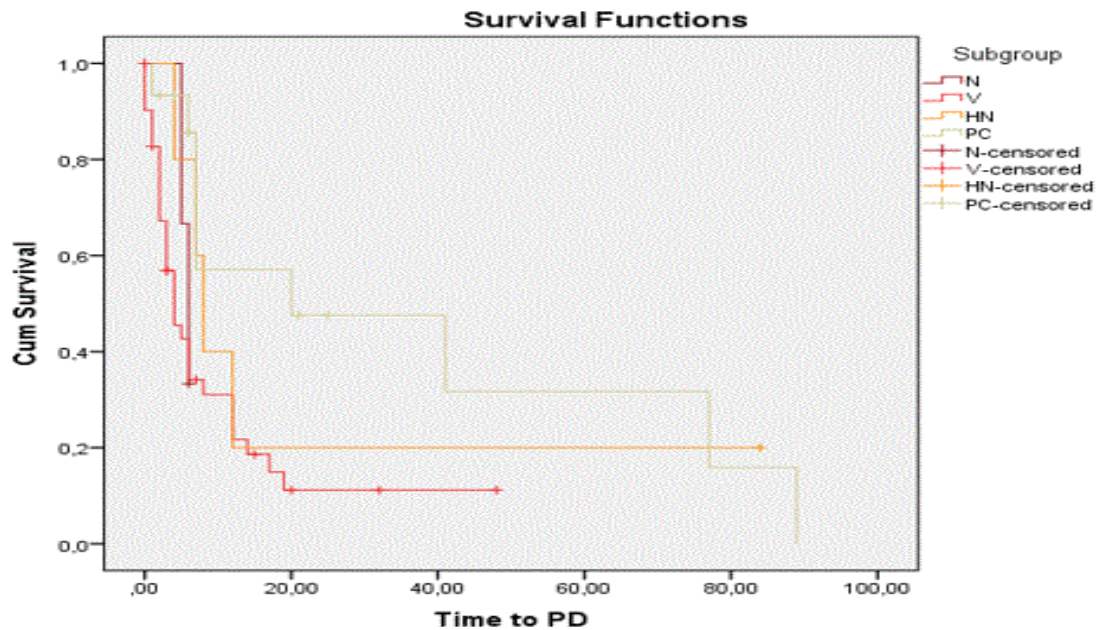
Η αξιολόγηση των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών ολοκληρώθηκε με την εκτίμηση της λευκοκυττάρωσης, που φάνηκε να έχει δυσμενή αντίκτυπο στη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΚΑΠΕ. Η συγκεκριμένη διαπίστωση επιβεβαιώθηκε πως είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,016$) (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα συνολικής επιβίωση ασθενών με βάση την παρουσία έναντι απουσίας λευκοκυττάρωσης

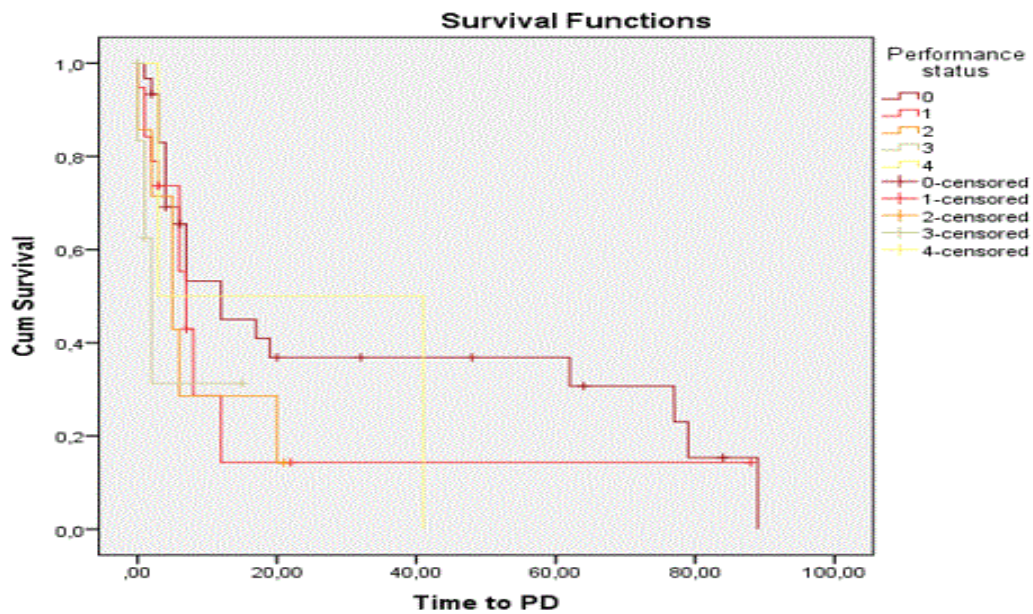
10.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Οι αξιολογηθείσες κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι συσχετίστηκαν επιπροσθέτως και με το διάστημα ελεύθερο νόσου με σκοπό την ανίχνευση στατιστικής σημαντικότητας. Όπως προαναφέρθηκε, η εντόπιση της νόσου σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με τη συνολική επιβίωση των ασθενών ($p=0,04$). Ανάλογη διαπίστωση τεκμηριώνεται και για τη σχέση της εντόπισης της νόσου και του διαστήματος ελεύθερου νόσου. Φαίνεται πως η περιτοναϊκή καρκινωμάτωση αναδεικνύεται σε ευνοϊκό προγνωστικό δείκτη στο ΚΑΠΕ, καθώς η συγκεκριμένη υποομάδα ασθενών επιτυγχάνει την πλέον μακρά, ελεύθερη νόσου επιβίωση, με στατιστική σημαντικότητα ($p=0,041$) (Διάγραμμα 9).



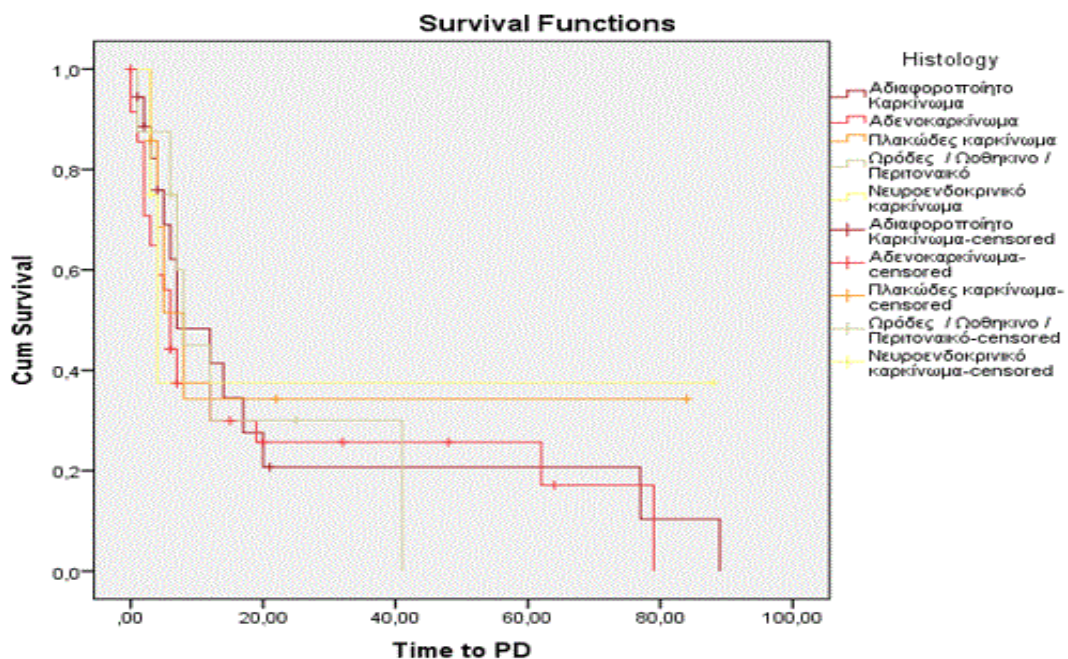
Διάγραμμα 9: Διάγραμμα διαστήματος ελεύθερου νόσου με βάση την εντόπιση της νόσου

Αντιθέτως, ενώ η συνολική επιβίωση συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με το PS, το διάστημα ελεύθερο νόσου δεν επηρεάζεται ευνοϊκά από την καλή λειτουργική ικανότητα, δεδομένου ότι η μεταξύ τους σχέση δεν εμφανίζει στατιστική σημαντικότητα ($p > 0,050$). Παρά ταύτα, οι ασθενείς με PS 0 εμφανίζουν το πλέον παρατεταμένο διάστημα ελεύθερο νόσου (Διάγραμμα 10).



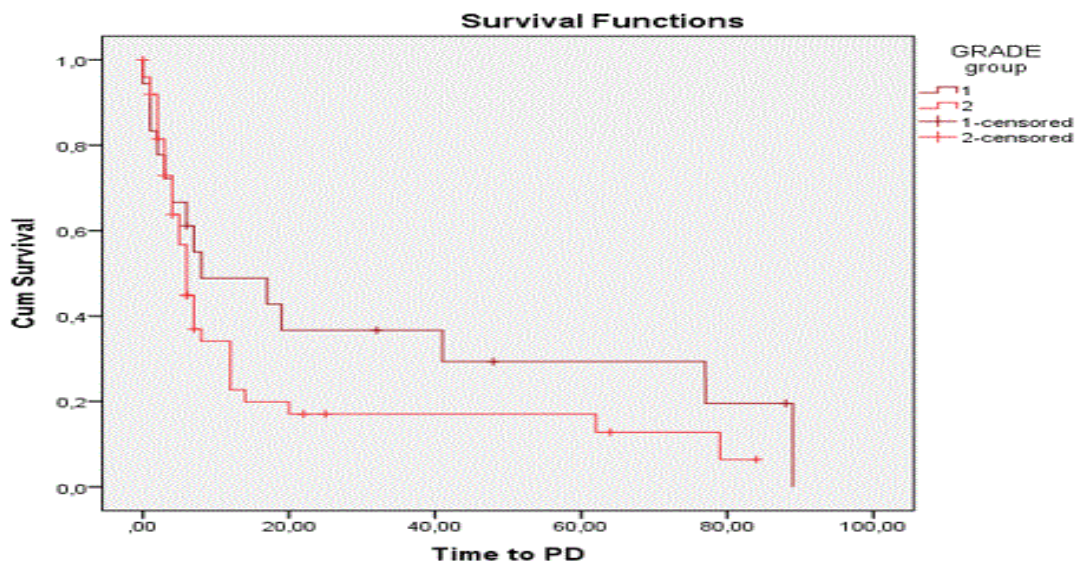
Διάγραμμα 10: Διάγραμμα διαστήματος ελεύθερου νόσου με βάση το PS

Ο ιστοπαθολογικός υπότυπος των ασθενών με ΚΑΠΕ δεν έδειξε να συσχετίζεται με το διάστημα ελεύθερο νόσου, όπως ακριβώς συνέβη και με την συνολική επιβίωση. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε p value μεγαλύτερο του 0,05 (Διάγραμμα 11).



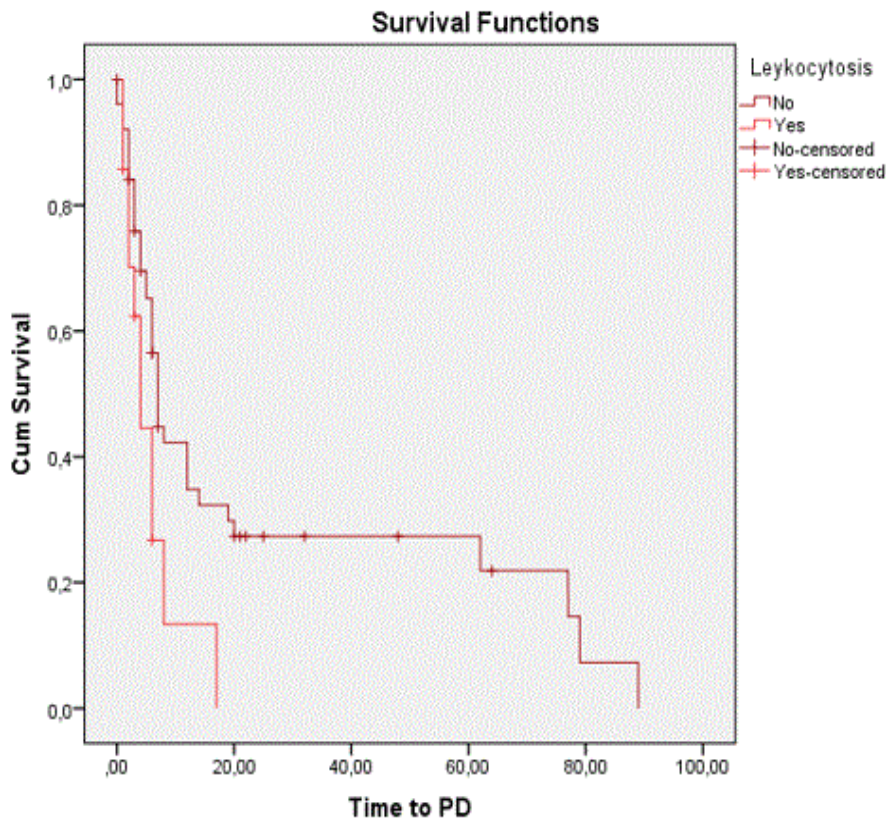
Διάγραμμα 8: Διάγραμμα διαστήματος ελεύθερου νόσου με βάση τον ιστοπαθολογικό υπότυπο

Εξάλλου, δεν προέκυψε συσχέτιση του βαθμού διαφοροποίησης με το διάστημα ελεύθερου νόσου που να εμπίπτει στα όρια στατιστικής σημαντικότητας. Αν και οι ασθενείς με ιστοπαθολογικό βαθμό διαφοροποίησης 1 εμφανίζουν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου συγκριτικά με τους διαγνωσμένους με καρκινώματα ενδιάμεσου και φτωχής διαφοροποίησης, δε φαίνεται αυτή η τάση να επιβεβαιώνεται στατιστικά ($p > 0,05$, Διάγραμμα 12). Η διαπίστωση αυτή ευθυγραμμίζεται απόλυτα με την αντίστοιχη συσχέτιση βαθμού διαφοροποίησης και συνολικής επιβίωσης.



Διάγραμμα 9: Διάγραμμα διαστήματος ελεύθερου νόσου με βάση το βαθμό διαφοροποίησης

Τέλος, η παρουσία λευκοκυττάρωσης φαίνεται πως εκτός από τη συνολική επιβίωση σχετίζεται και με το διάστημα ελεύθερου νόσου. Αυτό επιβεβαιώνεται από την ισχυρή συσχέτιση που έδειξε η στατιστική ανάλυση ($p = 0,028$) (Διάγραμμα 13), κατ' αντιστοιχία με τη συνολική επιβίωση.



Διάγραμμα 10: Διάγραμμα διαστήματος ελεύθερου νόσου με βάση την παρουσία έναντι απουσίας λευκοκυττάρωσης

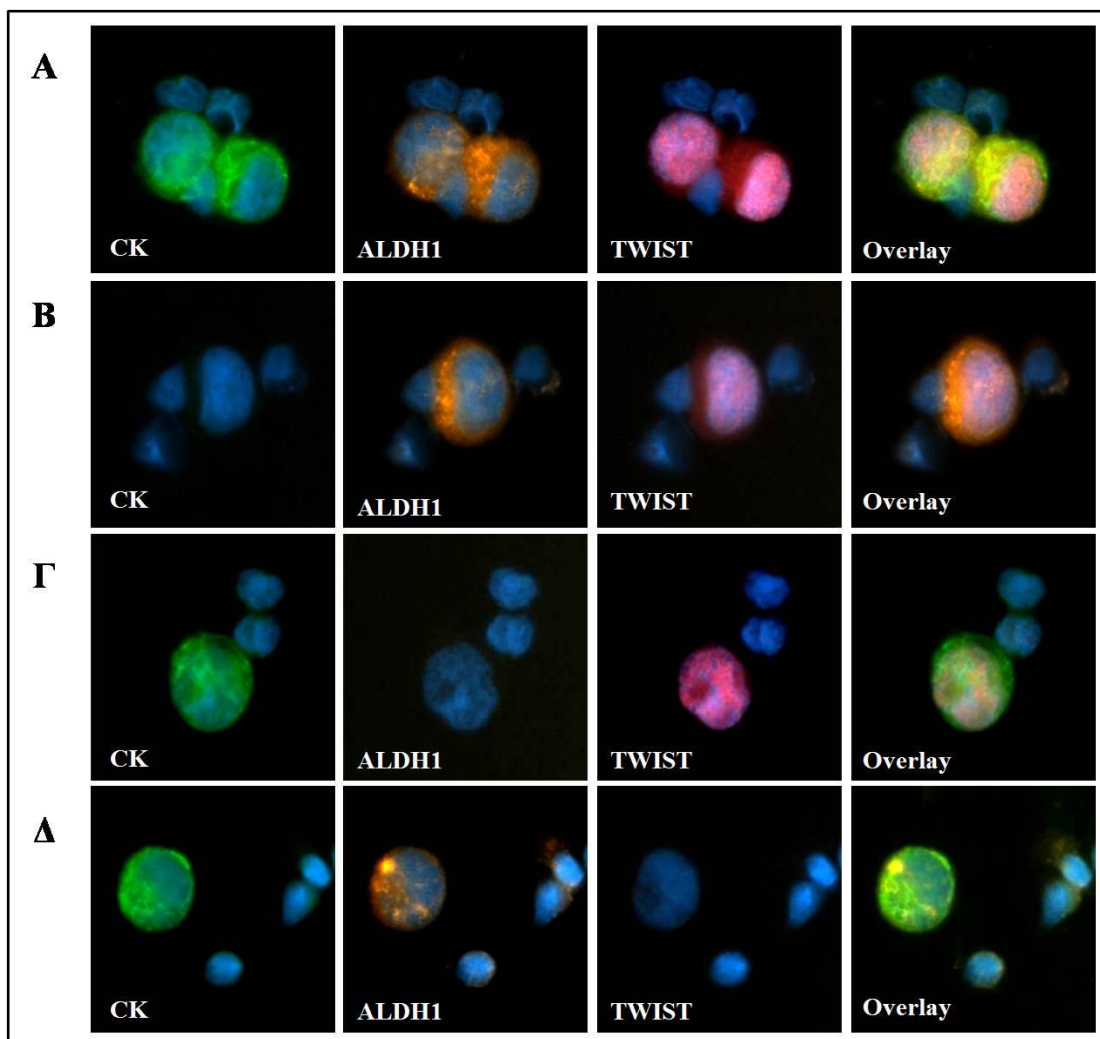
11. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΚΚ ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ STEM CELL ΚΑΙ EMT ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ

11.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Από το σύνολο των 91 ασθενών με ΚΑΠΕ της παρούσας μελέτης, στους 70 με διαθεσιμότητα δείγματος απομονωμένων μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος κατά τους 3 πρώτους κύκλους συμπληρωματικής ή παρηγορητικής θεραπείας, επιχειρήθηκε εκτίμηση της συνέκφρασης των μορίων CK, ALDH1 και TWIST. Έτσι, ταυτοποιήθηκαν ΚΚΚ με φαινότυπους stem cell, EMT, καθώς και ορισμένα που έφεραν συγχρόνως τους δύο φαινότυπους.

11.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΚΚ ΜΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥΣ STEM CELL ΚΑΙ EMT ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ

Η ανάπτυξη της μεθόδου εκτίμησης της συνέκφρασης της ALDH1 και του TWIST στα ΚΚΚ των ασθενών, πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων τριπλού ανοσοφθορισμού για CK/ALDH1/TWIST. Η ειδικότητα των αντισωμάτων ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες για την έκφραση του κάθε μορίου χωριστά, οι οποίοι εκτιμήθηκαν μέσω του συστήματος ARIOL (Εικόνα 53). Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η ειδικότητα της μεθόδου μέσω τριπλού ανοσοφθορισμού για CK/ALDH1/TWIST σε δείγμα απομονωμένων μονοπύρηνων κυττάρων από 10 υγιείς αιμοδοτές, όπου διαπιστώθηκε ότι η ALDH1 και το TWIST εκφράζονται στην πλειοψηφία των κυττάρων, όμως σε κανένα δείγμα δεν ταυτοποιήθηκαν κύτταρα θετικά στην έκφραση CK.



Εικόνα 53: Πειράματα ελέγχου για τη συνέκφραση των μορίων CK, ALDH1 και TWIST σε αναμεμιγμένα κύτταρα ελέγχου HepG2 με PBMcs φυσιολογικών αιμοδοτών, ARIOL, 200X. Η σήμανση της CK πραγματοποιήθηκε μέσω της φθορίζουσας χρωστικής Zenon Alexa 488 (πράσινο), της ALDH1 μέσω της χρωστικής Alexa 555 (πορτοκαλί) και του TWIST μέσω της χρωστικής Alexa 633 (ροζ), έπειτα από τριπλό ανοσοφθορισμό. Σε όλες τις εικόνες εμφανίζεται συγχρόνως η σήμανση των κυτταρικών πυρήνων μέσω της χρωστικής Dapi (μπλε). Στους αρνητικούς μάρτυρες πραγματοποιήθηκε επώαση με όλα τα πρωτογενή αντισώματα και τα αντίστοιχα συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές δευτερογενή αντισώματα, παραλείποντας αποκλειστικά το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του αντίστοιχου μορίου.

A) Επώαση με όλα τα αντισώματα,

B) αρνητικός μάρτυρας για CK,

Γ) αρνητικός μάρτυρας για ALDH1,

Δ) αρνητικός μάρτυρας για TWIST.

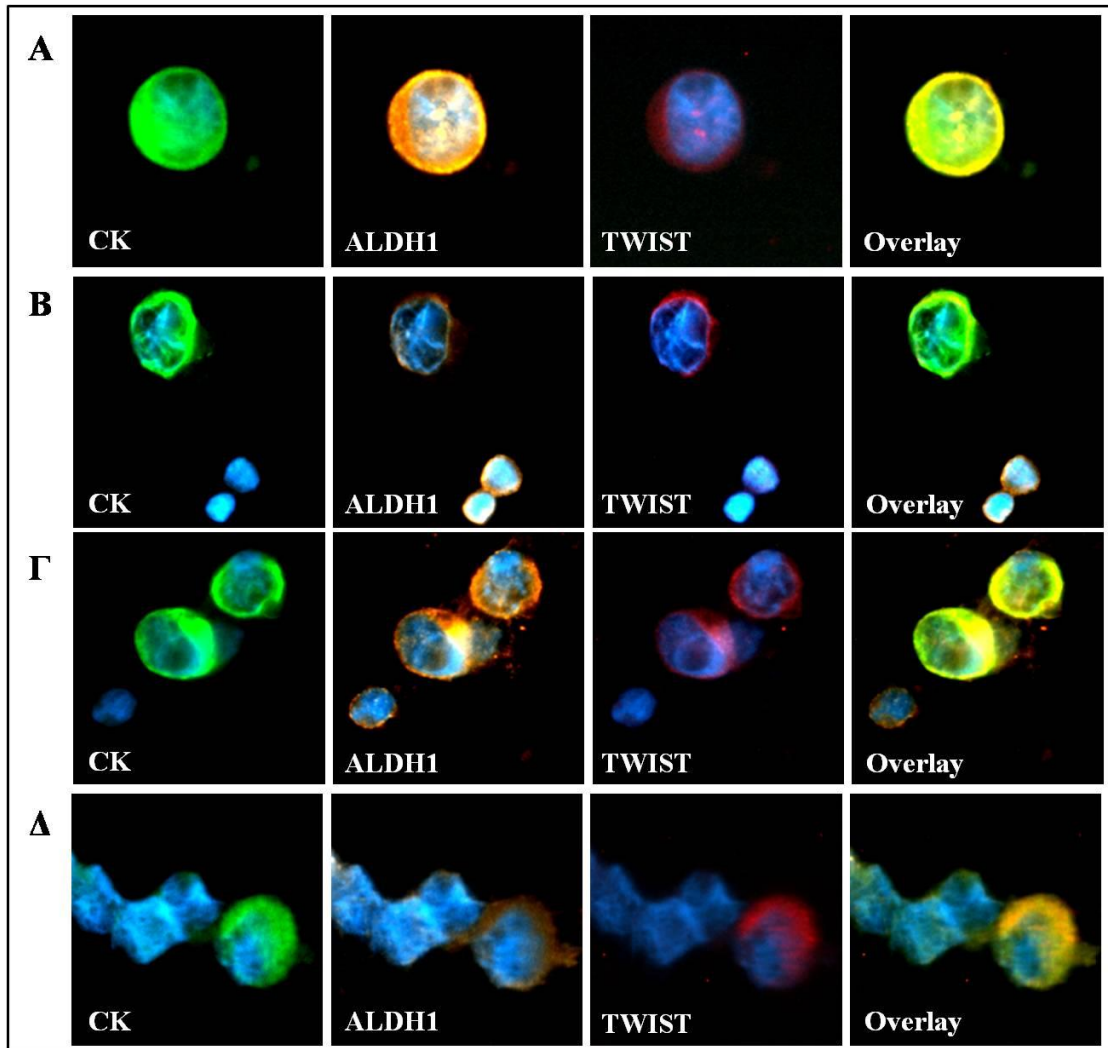
11.3 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΚΚ ΜΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥΣ STEM CELL ΚΑΙ EMT ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ

Η παρουσία ΚΚΚ διερευνήθηκε σε δείγμα μονοπύρηνων κυττάρων 70 ασθενών με ΚΑΠΕ, προκειμένου να ακολουθήσει περαιτέρω χαρακτηρισμός τους για την έκφραση της ALDH1 και του TWIST. ΚΚΚ ανιχνεύτηκαν στους 39 ασθενείς (56%), με ένα συνολικό αριθμό 192 ΚΚΚ (εύρος: 1-20). Αρχικά εκτιμήθηκε η έκφραση της ALDH1 και ταυτοποιήθηκαν σε 2 ασθενείς (5%) ALDH1-θετικά ΚΚΚ. Επρόκειτο για αδενοκαρκινώματα με σπλαγγική εντόπιση της νόσου (Πίνακας 25).

11.4 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΚΚ ΜΕ ΣΥΝΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ STEM CELL ΚΑΙ EMT ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ

Ακολούθησε εκτίμηση του προφίλ παράλληλης έκφρασης της ALDH1 και του TWIST στο ίδιο κύτταρο, που ανέδειξε την ταυτοποίηση τεσσάρων διαφορετικών φαινότυπων (CK+ALDH+Twist+ / CK+ALDH-Twist+ / CK+ALDH+Twist- / CK+ALDH-Twist-). Επικρατέστερος προκύπτει πως ήταν ο CK+ALDH+Twist+ (Εικόνα 54A), ο οποίος ταυτοποιήθηκε στους 7 από το σύνολο των 39 ασθενών στους οποίους ανιχνεύτηκαν ΚΚΚ (18%) (Πίνακας 25).

Στον πίνακα 25, παρουσιάζεται η κατανομή των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ταυτοποιημένων με ανοσοφθορισμό. Με δεδομένη την υψηλή ετερογένεια του φαινοτυπικού προφίλ των ΚΚΚ, όσο και το περιορισμένο δείγμα της μελέτης, η προγνωστική σημασία της ανίχνευσής δε δύναται να τεκμηριωθεί. Ως εκ τούτου, η εκπόνηση μεταφραστικών μελετών σε μεγάλες και καλά καθορισμένες ομάδες ασθενών, εξακολουθεί να αποτελεί αναγκαιότητα.



Εικόνα 54: Αντιπροσωπευτικές μικρογραφίες των φαινοτυπικά διαφορετικών ΚΚΚ ανάμεσα σε φυσιολογικά κύτταρα των ασθενών με ΚΑΠΕ, ARIOL, 400X. Η σήμανση της CK πραγματοποιήθηκε μέσω της φθορίζουσας χρωστικής Zenon Alexa 488 (πράσινο), της ALDH1 μέσω της Alexa 555 (πορτοκαλί) και του TWIST μέσω της Alexa 633 (ροζ), έπειτα από τριπλό ανοσοφθορισμό. Σε όλες τις εικόνες εμφανίζεται συγχρόνως η σήμανση των κυτταρικών πυρήνων μέσω της χρωστικής Dapi (μπλε).

A) CK+ALDH+Twist+,

B) CK+ALDH-Twist-,

Γ) CK+ALDH+Twist-,

Δ) CK+ALDH-Twist+

Πίνακας 25: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός ΚΚΚ ασθενών με ΚΑΠΕ						
	ΚΚΚ ανά δείγμα ασθενή (10⁶ PBMCs)					
Ασθενείς	ALDH+Twist+	ALDH+Twist-	ALDH-Twist+	ALDH-Twist-	Αριθμός ΚΚΚ	Συνολική επιβίωση
1	2	0	0	0	2	84
2	1	0	0	0	1	28
3	1	0	0	7	8	21
4	2	0	0	1	3	19
5	1	0	0	0	1	20
6	2	0	0	0	2	25
7	1	0	0	14	15	15
8	0	1	0	3	4	128
9	0	1	0	5	6	39

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ΚΑΠΕ, αν και αποτελούν σπάνιες κακοήθεις νεοπλασίες και ταυτόχρονα ένα καλό κλινικό πρότυπο μελέτης της μεταστατικής νόσου στον άνθρωπο, δεν έχουν μελετηθεί ικανοποιητικά αναφορικά με τη βιολογία του καρκινικού κυττάρου, το οποίο ευθύνεται για την ιδιότυπη αυτή κλινική συμπεριφορά. Η μεγάλη ετερογένεια τόσο των κλινικών εκδηλώσεων όσο και των παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών αυτών των όγκων είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της αναγνώρισης τους ως ενιαίας κλινικής οντότητας και την περιορισμένη σε έκταση και βάθος έρευνα αυτού του αντικείμενου.

Ένα σημαντικό ερώτημα που αποτελεί καίριο κλινικό δίλημμα και αφορά στην αντιμετώπιση των ασθενών με ΚΑΠΕ, είναι το σχετιζόμενο με την κατεύθυνση και την έκταση της διαγνωστικής προσέγγισης αυτών των ασθενών που θα μπορούσε να έχει απότοκες θεραπευτικές προεκτάσεις. Ο λεπτομερής απεικονιστικός, ενδοσκοπικός ή και χειρουργικός έλεγχος για αναζήτηση της πρωτοπαθούς εστίας έχει αποδειχθεί ότι δε μπορεί να συνεισφέρει ουσιαστικά στην ιασιμότητα και την επιβίωση αυτών των ασθενών. Έτσι η διερεύνηση των ΚΑΠΕ σε επίπεδο μοριακής βιολογίας και κυτταρικής βιοχημείας προβάλλει ως ο μόνος ουσιαστικός και επιστημονικά ορθός δρόμος έρευνας για την κατανόηση αυτού του συνδρόμου, πάνω στον οποίο θα ήταν δυνατόν να στηριχθεί μια ορθολογικότερη αντιμετώπιση των ασθενών που σήμερα έχουν δυσμενή πρόγνωση. Στο ίδιο πλαίσιο, η ανάπτυξη προγνωστικών μεθόδων είναι επιβεβλημένη.

Τα πλέον δόκιμα σήμερα θεραπευτικά σχήματα, στα οποία χρησιμοποιούνται συνδυασμοί χημειοθεραπευτικών φαρμάκων όπου κυριαρχεί η πλατίνη, έχουν ενισχύσει το θεραπευτικό όφελος σε κάποιες υποομάδες των ΚΑΠΕ. Για την πλειονότητα όμως των ασθενών που πάσχουν από μεταστατικά αδενοκαρκινώματα και κυρίως με ηπατική εντόπιση, η επιτευχθείσα πρόοδος με τα δοκιμασθέντα εμπειρικά σχήματα χημειοθεραπείας, σε καμιά περίπτωση δεν μπορεί να θεωρείται ουσιαστική. Επιπλέον πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι υπερ-ενεργοποίηση ογκογονιδίων δυνατόν να ενισχύει τη χημειοανθεκτικότητα. Έχει υποστηριχθεί ότι υπερέκφραση του ογκογονιδίου *ras* μπορεί να μειώσει την κυτταροτοξική δράση αλκυλιούντων παραγόντων σε όγκους που το υπερεκφράζουν μέσω παρέμβασης καταστολής του αποπτωτικού μηχανισμού των καρκινικών κυττάρων.

Με δεδομένη τη διαπιστωθείσα πολυδυναμική βιολογική ταυτότητα των ΚΑΠΕ, η θεωρητικά πλέον ενδεδειγμένη και ορθολογική προσέγγιση οφείλει να είναι πολυπαραγοντική. Νέα δεδομένα και παράγοντες προκύπτουν σήμερα όλο και πιο συχνά από το πεδίο της βασικής και προκλινικής έρευνας και τα οποία αφορούν στις πολλαπλές πτυχές της βιολογικής έκφρασης των ΚΑΠΕ.

Πριν από ένα αιώνα έγινε η πρώτη αναφορά στην ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών [329]. Από τότε ήταν φανερό πως η παρουσία ΚΚΚ είναι ιδιαίτερης κλινικής σημασίας. Η πλήρης βέβαια εκμετάλλευση των ΚΚΚ απαιτεί την ανάπτυξη διαγνωστικών μεθόδων οι οποίες έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τα εξαιρετικά σπάνια ΚΚΚ. Σήμερα η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησης ΚΚΚ με μεγάλη ακρίβεια. Ωστόσο, δε διατίθεται ακόμη το απαραίτητο υπόβαθρο ώστε να τεκμηριωθεί η προγνωστική και προβλεπτική τους σημασία. Τις τελευταίες δεκαετίες υποστηρίζεται ότι οι απομακρυσμένες μεταστάσεις αναπτύσσονται από τους πληθυσμούς των καρκινικών κυττάρων που ανιχνεύονται στο μυελό των οστών και στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών [328]. Πληθώρα μελετών έχουν δείξει ότι, η ανίχνευση των κυτταρικών αυτών πληθυσμών αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και μειωμένη επιβίωση των ασθενών [330, 335, 338, 404-406]. Στην κλινική πράξη έχει επικρατήσει η μελέτη των ΚΚΚ, καθώς η συλλογή περιφερικού αίματος αποτελεί μία πιο απλή και λιγότερο επεμβατική μέθοδο, συγκριτικά με τη λήψη δείγματος μυελού. Πέραν της προγνωστικής σημασίας της ταυτοποίησης των ΚΚΚ ως προς την επιβίωση, σε πολλές μελέτες έχει φανεί ότι η παρουσία τους αποτελεί σημαντικό δείκτη έλλειψης ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία [407, 408], με αποτέλεσμα να βρίσκονται σε εξέλιξη μεγάλες κλινικές μελέτες που διερευνούν το πιθανό όφελος από αλλαγή της θεραπείας στις περιπτώσεις που τα ΚΚΚ εμφανίζουν αντοχή στα χορηγούμενα κυτταροστατικά [409]. Παρόλα αυτά, το προφίλ και η συμπεριφορά των ΚΚΚ παρουσιάζει αξιοσημείωτη ετερογένεια, καθώς έχει βρεθεί ότι συχνά φέρουν χαρακτηριστικά διαφορετικά από εκείνα του πρωτοπαθούς όγκου και της μετάστασης [346]. Η ετερογένεια αυτή, συχνά ανακύπτει και μεταξύ των ΚΚΚ που ανιχνεύονται στον ίδιο ασθενή [347]. Επομένως, ο περαιτέρω χαρακτηρισμός των κυττάρων αυτών θα μπορούσε να αναδείξει εκείνα που φέρουν χαρακτηριστικά επιθετικότητας και αντίστασης στη θεραπεία, συμβάλλοντας στην

ακριβέστερη εκτίμηση της νόσου [340]. Μία επίσης σημαντική εφαρμογή της μελέτης των ΚΚΚ είναι ο χαρακτηρισμός τους ως προς την έκφραση μορίων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχους θεραπείας. Στο πλαίσιο αυτό, έχει πράγματι δειχθεί ότι είναι δυνατή η στόχευση των ΚΚΚ με θεραπείες έναντι μορίων που φέρουν τα ίδια τα ΚΚΚ, ανεξάρτητα από το μοριακό προφίλ του πρωτοπαθούς όγκου [342, 410]. Η αποτελεσματική στόχευση του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική αντιμετώπισης της ανάπτυξης μεταστάσεων, η οποία θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικό όφελος στην επιβίωση των ασθενών. Επομένως, τα ΚΚΚ θεωρούνται ως μια «υγρή βιοψία πραγματικού χρόνου», η οποία είναι δυνατόν να προσδιορίσει τον αριθμό και το προφίλ των ΚΚΚ οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή της μετέπειτα παρακολούθησης των ασθενών, συμβάλλοντας σε αποτελεσματικότερες στρατηγικές αντιμετώπισης της νόσου τους [341, 411].

Για τους παραπάνω λόγους, μία σειρά από μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί και ολοένα αναπτύσσονται καινούριες τα τελευταία χρόνια, με στόχο την ανίχνευση και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των ΚΚΚ [412]. Η υψηλή ετερογένεια αυτών των κυττάρων, καθώς και η ιδιαίτερα μικρή συχνότητά τους μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος, αποτελούν δύο πολύ σημαντικούς περιορισμούς για την αποτελεσματική ανίχνευσή τους με ευαισθησία και ειδικότητα. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι εμπλουτισμού των δειγμάτων σε ΚΚΚ, οι οποίες εφαρμόζονται πριν την ταυτοποίησή τους, καθώς επίσης και μέθοδοι ανίχνευσης που βασίζονται σε μία σειρά από χαρακτηριστικά και ιδιότητες που διαφέρουν μεταξύ των ΚΚΚ και των αιμοποιητικών κυττάρων. Γενικά, οι μέθοδοι εμπλουτισμού βασίζονται είτε σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι το μέγεθος, η πυκνότητα, το ηλεκτρικό φορτίο και η ικανότητα παραμόρφωσης των ΚΚΚ, είτε σε βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η έκφραση ορισμένων μορίων, ενώ αντίστοιχα οι μέθοδοι ανίχνευσης κατηγοριοποιούνται ως κυτταρομετρικές ή μοριακές, ανάλογα με το αν ανιχνεύουν τα ίδια τα κύτταρα ή νουκλεϊκά οξέα τους [348]. Η ασυμφωνία μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων είναι μεγάλη, καθώς η κάθε μία εμφανίζει διαφορετικούς περιορισμούς [399, 413]. Πολλές ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο στοχεύουν στην ανάπτυξη μεθόδων για την ανίχνευση και απομόνωση των ΚΚΚ με υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, καθαρότητα και απόδοση και παράλληλα με κόστος που να επιτρέπει την κλινική εφαρμογή τους σε επίπεδο ρουτίνας [391, 401].

Ο εμπλουτισμός των ΚΚΚ στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης, ενώ η ταυτοποίηση των ΚΚΚ με έλεγχο έκφρασης των CK 8, 18 και 19, τα οποία χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω ως προς την έκφραση του δείκτη ALDH1A1 και του δείκτη TWIST, μέσω πειραμάτων τριπλού ανοσοφθορισμού. Η επιλογή των συγκεκριμένων δεικτών έγινε κυρίως βάσει της υψηλής ειδικότητας με την οποία έχει βρεθεί ότι χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα με χαρακτήρα stem cell και EMT [147, 414]. Καθώς τα ΚΚΚ αποτελούν έναν εξαιρετικά σπάνιο πληθυσμό κυττάρων μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος, ένας μικρός αριθμός ΚΚΚ είναι τελικά διαθέσιμος προς περαιτέρω φαινοτυπική ανάλυση με τις συνήθεις διαθέσιμες τεχνικές. Επιπλέον έχει πολλές φορές δειχθεί η ιδιαίτερα υψηλή ετερογένειά τους ακόμη και σε επίπεδο του ίδιου ασθενή [347]. Για τους λόγους αυτούς, όλο και περισσότερες μελέτες τα τελευταία χρόνια προτείνουν ότι κατά τη μελέτη των ΚΚΚ δεν αρκεί απλώς η ανίχνευση της έκφρασης των διαφόρων μορίων, αλλά απαιτείται μία εκτενέστερη ποιοτική και ποσοτική φαινοτυπική μελέτη της έκφρασής τους [341, 415]. Σε επίπεδο πρωτοπαθούς όγκου επίσης είναι γνωστό ότι η ποσότητα μίας πρωτεΐνης μπορεί να διαφέρει μεταξύ των κυττάρων και ότι η διαφοροποίηση αυτή πιθανόν μεταφράζεται σε διαφορετική κλινική σημασία [416]. Επιπλέον, η δράση μίας πρωτεΐνης είναι δυνατόν να επηρεάζεται ανάλογα με την υποκυττάρια εντόπισή της, όπως για παράδειγμα έχει δειχθεί ο ρόλος των μορίων PTEN και β-catenin κατά την ανίχνευσή τους στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων [417, 418], ενώ υπάρχουν μόρια στα οποία παίζει σημαντικό ρόλο τόσο η κυτταρική τους εντόπιση, όσο και τα επίπεδα της έκφρασής τους, όπως ισχύει για τον υποδοχέα ER [419, 420]. Το γεγονός ότι το διαφορετικό προφίλ έκφρασης πολλών μορίων στους όγκους παρουσιάζει διαφορετική σημασία ως προς την κλινική έκβαση των ασθενών, ενισχύει ακόμη περισσότερο την ανάγκη του εκτενούς φαινοτυπικού χαρακτηρισμού των διαφόρων δεικτών στα ΚΚΚ. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε μία προσπάθεια προσδιορισμού των διαφορετικών προφίλ έκφρασης της ALDH1 και του TWIST στα ΚΚΚ των ασθενών. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε ημι-αυτοματοποιημένη μικροσκοπία ARIOL, ενώ η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των ΚΚΚ πραγματοποιήθηκε μέσω του συστήματος ARIOL.

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η ανάδειξη πιθανής προγνωστική αξίας των ΚΚΚ στους ασθενείς με ΚΑΠΕ. Αρκετές μελέτες έχουν υποστηρίξει την προγνωστική αξία της ανίχνευσης των ΚΚΚ σε άλλες νεοπλασματικές νόσους όπως στα καρκινώματα μαστού, παχέος εντέρου και προστάτη. Η έλλειψη συσχέτισης τους με τα ΚΑΠΕ από προηγούμενες μελέτες καθιστά την παρούσα ιδιαίτερης βαρύτητας. Επιπροσθέτως, η μελέτη του στελεχιαίου φαινοτύπου καθώς και του φαινοτύπου EMT σε ΚΚΚ που έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με ΚΑΠΕ αποτελεί ένα ακόμη πεδίο με βιβλιογραφικό έλλειμμα.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ακρίβεια της ανίχνευσης των ΚΚΚ στους ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δύο σύγχρονες και εξαιρετικής ευαισθησίας τεχνικές με σκοπό να περιοριστεί ει δυνατόν στο ελάχιστο, η πιθανότητα εξαγωγής ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων. Επιπλέον, με τον ανοσοφθορισμό και τη συνεστιακή μικροσκοπία παρασχέθηκε η δυνατότητα παρατήρησης της μορφολογίας των κυττάρων, ενώ η επιλογή μεγάλου αριθμού ασθενών υποστηρίζει με υψηλή στατιστική σημαντικότητα τα αποτελέσματα της μελέτης. Από την άλλη με την κυτταρομετρία ροής ελέγχθηκε πληθυσμός ασθενών με ΚΑΠΕ και συγκρίθηκε με πάσχοντες με καρκίνο μαστού και παχέος εντέρου καθώς και με δείγματα από μη νοσούντες.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και η στατιστική τους ανάλυση έδειξε πως η παρουσία ή όχι ΚΚΚ ασθενών με ΚΑΠΕ, δε σχετίζεται με την ηλικία διάγνωσης της νόσου. Ανάλογα με τη φύση και την εντόπισή τους οι διάφοροι υπότυποι των ΚΑΠΕ εμφανίζουν διαφορετική ηλικία εκδήλωσης [33]. Ενδεχομένως, η μη συσχέτιση της παραμέτρου της ηλικίας με τα ΚΚΚ να οφείλεται στη μεγάλη ετερογένεια που χαρακτηρίζει το δείγμα της μελέτης.

Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε συσχέτιση της παρουσίας ΚΚΚ ούτε και με την εντόπιση της νόσου. Αυτό πιθανολογούμε πως αποτελεί μία ένδειξη της συνολικότερης σημασίας των ΚΚΚ που δεν αποτελούν μεμονωμένη εκδήλωση επιμέρους υποομάδων αλλά είναι παρόντα στο πλαίσιο της μεταστατικής διαδικασίας και άσχετα με την εντόπιση της νόσου. Αντίστοιχα, η καθολικότητα της θέσης των ΚΚΚ δικαιολογεί και τη μη συσχέτισή τους με το PS των ασθενών, που δεν είναι κατ' ανάγκη επιβαρυνμένο στη μεταστατική εξέλιξη του ΚΑΠΕ.

Απεναντίας, διαπιστώθηκε ότι τα ΚΚΚ συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά με τον ιστολογικό υπότυπο των ΚΑΠΕ. Η έντονη παρουσία περισσότερων από 5 ΚΚΚ στο 75% των ασθενών με νευροενδοκρινικό καρκίνωμα, επιβάλλει έκπτυξη του δείγματος για ασφαλέστερα συμπεράσματα, δεδομένου ότι αντιπροσωπεύουν ευνοϊκής πρόγνωσης υποομάδα.

Η ομαδοποίηση ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης δεν έδειξε ότι τα ΚΚΚ μπορούν να σχετίζονται προγνωστικά με αυτό το δείκτη. Οι ασθενείς με βαθμό διαφοροποίησης 1 που δεν εμφανίζουν ΚΚΚ ανέρχονται στο 58,8%, ενώ σε εκείνους με βαθμούς διαφοροποίησης 2 και 3, τα ΚΚΚ απουσιάζουν στο 52%. Ενδεχομένως, αυτή η πτωτική τάση των ασθενών στους οποίους δεν ανιχνεύονται ΚΚΚ να είναι μία ένδειξη η οποία όμως στην παρούσα μελέτη δεν μπορεί να υποστηρίξει ένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα.

Η αδυναμία συσχέτισης των ΚΚΚ με την παρουσία λευκοκυττάρωσης πιστοποιεί το μη χαρακτηρισμό τους ως προγνωστικών δεικτών. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από το γεγονός πως δεν φάνηκε μία ξεκάθαρη τάση που να συσχετίζει τη συνολική επιβίωση των ασθενών με την ανίχνευση ΚΚΚ.

Ανάλογη ανάλυση πραγματοποιήθηκε και στο δείγμα των ασθενών με ΚΑΠΕ, αλλά και αδενοκαρκινώματα μαστού και παχέος εντέρου στους οποίους η ανίχνευση ΚΚΚ έγινε με εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής. Τόσο η ανίχνευση όσο και η παρουσία 5 ή περισσότερων έναντι λιγότερων ΚΚΚ με κυτταρομετρία ροής, δεν αποτελεί προγνωστικό δείκτη της συνολικής επιβίωσης των ασθενών. Το αποτέλεσμα αυτό εδραιώνεται καθώς αναπαράγεται και με τις 2 τεχνικές ανοσοφθορισμού και κυτταρομετρίας ροής καθώς επίσης και σε διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών με ΚΑΠΕ. Επομένως, με την παρούσα μελέτη υποστηρίζεται απερίφραστα πως οι δύο τεχνικές ανοσοφθορισμού και κυτταρομετρίας ροής, μπορούν να αποφέρουν αποτελέσματα σχετικά με την ανίχνευση και την προγνωστική σημασία των ΚΚΚ με αξιοπιστία και επαναληψιμότητα. Επίσης, με την κυτταρομετρία ροής επιβεβαιώθηκε ο παθολογικός χαρακτήρας των ΚΚΚ καθώς δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα αναφοράς.

Εξάλλου, η παρούσα μελέτη εκτίμησε την επίδραση επιμέρους κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών στην πρόγνωση των ασθενών με

ΚΑΠΕ. Η περιτοναϊκή καρκινωμάτωση συνδυάζεται με την καλύτερη συνολική επιβίωση συγκριτικά με τις υπόλοιπες εντοπίσεις της νόσου. Οι υπόλοιπες υποομάδες παρουσιάζουν βραχύτερη επιβίωση χωρίς σημαντική μεταξύ τους διαφοροποίηση.

Στο PS των ασθενών με ΚΑΠΕ αποδίδεται αξία προγνωστικού δείκτη σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης. Παρόμοιο συμπέρασμα, προκύπτει και για το βαθμό διαφοροποίησης. Οι ασθενείς με καλά διαφοροποιημένα ΚΑΠΕ επιτυγχάνουν καλύτερη επιβίωση από εκείνους με φτωχά διαφοροποιημένους όγκους.

Αντίθετα με τα παραπάνω, δεν αποδίδεται προγνωστική σημασία στον ιστολογικό υπότυπο των ΚΑΠΕ που δε φαίνεται να συσχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών.

Αξιοπρόσεκτη είναι η συσχέτιση της λευκοκυττάρωσης με τη συνολική επιβίωση, καθώς ασθενείς με ΚΑΠΕ και λευκοκυττάρωση κατά τη διάγνωση, παρουσιάζουν καταφανέστατα βραχύτερη επιβίωση συγκριτικά με εκείνους με φυσιολογικά επίπεδα λευκών. Η εμφάνιση λευκοκυττάρωσης αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη και συνοδεύεται σε πολλές μελέτες από αυξημένη θνησιμότητα ασθενών συνηθέστερα με καρκίνο πνεύμονα. Μια πιθανή ερμηνεία, αποτελεί το γεγονός ότι η λευκοκυττάρωση επιβεβαιώνει εξελισσόμενη νόσο καθώς το ανοσοποιητικό είναι πλήρως ευαισθητοποιημένο προκειμένου να την αντιμετωπίσει [401, 402].

Τέλος, η συσχέτιση διάφορων κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων με το διάστημα ελεύθερο νόσου ευθυγραμμίζεται με τις αντίστοιχες συσχετίσεις τους με τη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΚΑΠΕ. Η περιτοναϊκή καρκινωμάτωση αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό δείκτη και συνοδεύεται τόσο από μεγαλύτερη περίοδο ελεύθερη νόσου όσο και από συνολική επιβίωση. Το εύρημα αυτό δεν αποτελεί τάση αλλά όπως και στη συνολική επιβίωση παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα.

Αντιθέτως, δεν επιβεβαιώνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση του PS με το διάστημα ελεύθερο νόσου όπως είχε συμβεί με τη συνολική επιβίωση, μολονότι ασθενείς σε καλή λειτουργική κατάσταση εμφανίζουν το πλέον παρατεταμένο διάστημα ελεύθερο νόσου. Εξάλλου, δεν αποδίδεται προγνωστική σημασία ούτε και στον ιστολογικό υπότυπο, αφού δε συσχετίζεται σημαντικά τόσο με το διάστημα ελεύθερο νόσου όσο και με τη συνολική επιβίωση. Τέλος, στατιστικά αξιολογήσιμη είναι η σχέση της λευκοκυττάρωσης με το διάστημα ελεύθερο νόσου, κατ' αντιστοιχία

με τη συνολική επιβίωση. Η αντίδραση του ανοσοποιητικού φαίνεται πως δικαιολογεί τη διαπίστωση αυτή.

Συμπερασματικά λοιπόν, η παρούσα μελέτη πρόσφερε τη δυνατότητα ταυτοποίησης ΚΚΚ μία δύο μεθοδολογίες σε ασθενείς με ΚΑΠΕ και επιπλέον πρόσθεσε σημαντική πληροφορία σχετικά με τη συμπεριφορά και το ρόλο αυτών των κυττάρων στη μεταστατική εξέλιξη της νόσου. Αν και δεν πιστοποιήθηκε προγνωστική αξία των ΚΚΚ στα ΚΑΠΕ, περαιτέρω μελέτες στην κατεύθυνση αυτή είναι επιβεβλημένες ώστε να προκύψουν πιο ώριμα δεδομένα. Επιπλέον, τυχόν ανάδειξη προβλεπτικής σημασίας των ΚΚΚ σε ασθενείς με ΚΑΠΕ μπορεί να προάγει το σχεδιασμό θεραπευτικών πρωτοκόλλων και καινοτόμων φαρμάκων για την αντιμετώπιση της νόσου. Πιθανή στόχευση των ΚΚΚ σε αυτούς τους ασθενείς αποτελεί θεραπευτική και ερευνητική πρόκληση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύουν κατά προσέγγιση το 3% όλων των κακοηθειών του ανθρώπου. Οι ασθενείς με ΚΑΠΕ εκδηλώνονται με μεταστατική νόσο για την οποία δεν είναι δυνατόν να καθορισθεί η πρωτοπαθής εντόπιση κατά τον χρόνο της διάγνωσης μετά από ενδελεχή κλινική-εργαστηριακή διερεύνηση. Μέχρι σήμερα, προηγμένες και περίπλοκες διαγνωστικές μέθοδοι ή και επεμβατικές διαδικασίες απέτυχαν να αυξήσουν τη διαφοροδιαγνωστική ακρίβεια σ' αυτούς τους όγκους όσο και να συνεισφέρουν στο θεραπευτικό όφελος. Ως εκ τούτου έχει γίνει αποδεκτό σήμερα ότι μια περιορισμένη διαφοροδιαγνωστική διαδικασία αρκεί για τη διάγνωση των ΚΑΠΕ. Σ' αυτή συμπεριλαμβάνονται πέραν του λεπτομερούς ιστορικού και της ενδελεχούς φυσικής εξέτασης, βασικός αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος, απεικονιστικές εξετάσεις στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ακτινογραφία θώρακος και αξονικές υπολογιστικές τομογραφίες και ενδοσκοπήσεις. Βασική κρίνεται η ανασκόπηση του βιοπτικού υλικού με εκτεταμένη ανοσοϊστοχημική μελέτη. Η τελευταία παρέχει την δυνατότητα ταυτοποίησης χημειοευαίσθητων καρκινωμάτων.

Η γνώση της υποκείμενης βιολογίας των ΚΑΠΕ είναι ελλιπής. Από τις υπάρχουσες κλινικές μελέτες είναι γνωστό ότι πρόκειται για μεταστατικούς όγκους ετερογενούς αρχής, οι οποίοι εκδηλώνουν κοινά κλινικά χαρακτηριστικά και προφανώς κοινή βιολογική ταυτότητα. Η σε βάθος γνώση της βιολογίας τους εκτιμάται ότι θα μπορούσε να συνεισφέρει σε ορθολογικότερο σχεδιασμό κλινικών θεραπευτικών σχεδιασμών.

Πληθώρα δεδομένων που προκύπτουν από μελέτες με καρκινικές σειρές και μοντέλα ζώων, καθώς και από ασθενείς με καρκίνο, υποδεικνύουν ότι η δημιουργία μεταστάσεων είναι μία πολυσύνθετη διαδικασία. Τα κύρια στάδια του μεταστατικού μηχανισμού είναι αρχικά ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων στην πρωτοπαθή εστία, η διείσδυσή τους στο μεσοκυττάριο χώρο που περιβάλλει τον πρωτοπαθή όγκο και η είσοδός τους στη συστηματική κυκλοφορία (ενδαγγείωση), όπου μετακινούνται είτε ως μεμονωμένα κύτταρα, είτε ως συσσωματώματα κυττάρων. Ακολουθεί η μετανάστευσή τους σε απομακρυσμένα σημεία, η έξοδος από την κυκλοφορία (εξαγγείωση) και η διείσδυση σε νέους ιστούς προκειμένου να σχηματίσουν μικρομεταστάσεις. Τέλος, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους στα δευτερεύοντα όργανα που έχουν προσβληθεί οδηγεί στην ανάπτυξη μακροσκοπικά ορατών μεταστάσεων. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που ανιχνεύονται είτε ως ΔΚΚ σε

δευτεροπαθείς εστίες, είτε ως ΚΚΚ στο περιφερικό αίμα των ασθενών, αποτελούν τα μικρομεταστατικά κύτταρα.

Έως σήμερα, απουσιάζουν μελέτες σχετιζόμενες με ανίχνευση ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών με ΚΑΠΕ. Απεναντίας, σε διαγνωσμένες ασθενείς με καρκίνο μαστού, η παρουσία ΚΚΚ αποτελεί ανεξάρτητο και ισχυρό δείκτη αυξημένης πιθανότητας υποτροπής και μειωμένης ολικής επιβίωσης, τόσο στην πρώιμη όσο και τη μεταστατική νόσο. Επιπλέον, η παρουσία ΚΚΚ σε ασθενείς με καρκίνο μαστού έχει συσχετιστεί με μειωμένη ανταπόκριση στα συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα. Πέραν όμως της εκτίμησης της παρουσίας των ΚΚΚ, ο μοριακός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός τους αποτελεί κεντρικό θέμα σημαντικής ερευνητικής προσπάθειας από πολλές ομάδες, καθώς δεν διαθέτουν όλα τα ΚΚΚ το ίδιο μεταστατικό δυναμικό. Η περαιτέρω μοριακή ανάλυσή τους θα μπορούσε να αναδείξει τα χαρακτηριστικά εκείνα που ευοδώνουν τη μεταστατική διαδικασία, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της μετάστασης. Επιπλέον, η μελέτη των ΚΚΚ παρέχει τη δυνατότητα του προσδιορισμού του μοριακού προφίλ του όγκου ανά πάσα χρονική στιγμή και επομένως θεωρείται ως μια υγρή βιοψία «πραγματικού χρόνου». Η ανίχνευση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με επιθετική κλινική συμπεριφορά ή με αντίσταση στη θεραπεία στα ΚΚΚ είναι δυνατόν να ταυτοποιήσει υποομάδες ασθενών με φτωχή πρόγνωση. Οι ασθενείς αυτοί πιθανόν είναι υποψήφιοι για πιο επιθετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις ή για θεραπεία με νέους στοχεύοντες παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούσαν να επιλεγούν ακόμη και με βάση την έκφραση μορίων-στόχων στα ίδια τα ΚΚΚ. Για τους παραπάνω λόγους, τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται ολοένα και περισσότερες τεχνικές για την ανίχνευση και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των ΚΚΚ στο αίμα των ασθενών με κακοήθειες.

Μία σημαντική διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την ανάπτυξη μεταστάσεων είναι η EMT των καρκινικών κυττάρων, δηλαδή η σταδιακή μετατροπή του επιθηλιακού τους φαινότυπου σε φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων. Ο μεσεγχυματικός φαινότυπος που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα διευκολύνει όχι μόνον την αρχική τους διείσδυση μέσω του πρωτοπαθούς όγκου, αλλά και την ενδαγγείωση και μετακίνησή τους μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας, καθώς επίσης και την εξαγγείωση και τελικά τη διείσδυσή τους στο νέο όργανο. Μία από τις κύριες αλλαγές που παρατηρούνται κατά την EMT αφορά στο πρότυπο έκφρασης των

ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροσκελετού, όπου παρατηρείται γενικά σημαντική μείωση στην έκφραση της κυτταροκερατίνης, με παράλληλη αύξηση στην έκφραση της βιμεντίνης, η οποία αποτελεί έναν ισχυρό δείκτη EMT και εμφανίζεται απαραίτητη για τη διείσδυση και ενδαγγείωση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, σημαντική αλλαγή παρατηρείται στην έκφραση των μορίων που ενέχονται στις διακυτταρικές επαφές, η οποία έχει βρεθεί ότι επάγεται μέσω μιας σειράς μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι οι TWIST, SNAIL και SLUG. Ο μεταγραφικός παράγοντας TWIST αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό δείκτη EMT, ο οποίος ενέχεται σε διάφορα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας, όπως η αρχική διείσδυση και η ενδαγγείωση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία χαρακτηριστικών συμβατών με EMT στον πρωτοπαθή όγκο των ασθενών με αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και μειωμένη επιβίωση.

Όπως υποδεικνύεται από πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια, η EMT σχετίζεται άμεσα με τη γένεση KBK. Τα KBK έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, ως ένας μικρός υποπληθυσμός κυττάρων με ιδιότητες χαρακτηριστικές των βλαστικών κυττάρων. Σύμφωνα με το μοντέλο των KBK, τα κύτταρα αυτά θεωρούνται ως τα μόνα ικανά να «αυτο-ανανεώνονται», να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα και να διαφοροποιούνται, επάγοντας το σχηματισμό όλων των κυτταρικών υποπληθυσμών που απαρτίζουν τον πρωτοπαθή όγκο. Επιπλέον είναι γνωστό ότι τα KBK συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη μεταστάσεων, καθώς ευθύνονται για τη διασπορά του πρωτοπαθούς όγκου, δίνοντας γένεση σε όλους τους υποπληθυσμούς του.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η EMT και η προτεινόμενη θεωρία των KBK πιστεύεται ότι κατέχουν σημαντική θέση στην βιολογία των ΚΚΚ. Η παρουσία δεικτών KBK ή EMT στα ΚΚΚ πιθανόν ταυτοποιεί έναν κυτταρικό υποπληθυσμό με αυξημένη ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία και ενισχυμένη ικανότητα να δημιουργεί μεταστάσεις. Όλο και περισσότερες μελέτες τα τελευταία χρόνια διερευνούν με διάφορες μεθοδολογίες την παρουσία δεικτών για EMT και KBK στα ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού, εντούτοις δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να περιγράφουν το φαινόμενο σε καλά καθορισμένες ομάδες με μεγάλους αριθμούς ασθενών. Επιπλέον, δεν έχει δειχθεί έως σήμερα η σύγχρονη έκφραση δεικτών KBK και EMT στα ΚΚΚ σε

επίπεδο μονήρων κυττάρων. Με βάση τα παραπάνω, σχεδιάστηκε η παρούσα μελέτη για τη διερεύνηση της παρουσίας ΚΚΚ που φέρουν παράλληλα φαινότυπους ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMT σε ασθενείς με καρκίνο μαστού. Στόχος ήταν η διερεύνηση της συχνότητάς τους σε ασθενείς με πρώιμη και μεταστατική νόσο, η εκτίμηση της πιθανής αντίστασής τους στη χημειοθεραπεία, καθώς επίσης της προγνωστικής τους αξίας.

Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκε μία νέα μεθοδολογία τριπλού ανοσοφθορισμού σε απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών, μέσω της οποίας ελέγχθηκε η έκφραση των κυτταροκερατινών 8, 18 και 19 για τον εντοπισμό των ΚΚΚ, ενώ ως δείκτες ΚΒΚ και EMT χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα η ALDH1 και το TWIST. Η συνέκφραση των παραπάνω μορίων αξιολογήθηκε σε επίπεδο μονήρων κυττάρων μέσω του ημι-αυτοματοποιημένου συστήματος μικροσκοπίας φθορισμού ARIOL. Επιπλέον, μέσω μίας σειράς πειραμάτων ελέγχου με τη χρήση των παραπάνω καρκινικών σειρών, καθώς επίσης και δείγματος φυσιολογικών αιμοδοτών, επιβεβαιώθηκε η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου ανίχνευσης των δύο δεικτών στα ΚΚΚ.

Η παρούσα μελέτη προσέφερε μία νέα, ευαίσθητη και ειδική μεθοδολογία για το χαρακτηρισμό των ΚΚΚ ως προς τη συνέκφραση δύο πολύ σημαντικών δεικτών ΚΒΚ και EMT. Τέλος, διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η συνέκφραση δύο σημαντικών δεικτών ΚΒΚ και EMT σε επίπεδο μονήρων ΚΚΚ, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο τη μεταξύ τους συσχέτιση.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε εάν τα ΚΚΚ που εμφανίζουν το φαινότυπο ΚΒΚ όπως ορίστηκε βάσει της υψηλής έκφρασης του ισοένζυμου ALDH1A1, φέρουν και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ΚΒΚ. Ως δείκτης λειτουργικότητας ΚΒΚ χρησιμοποιήθηκε η ενζυμική ενεργότητα της ALDH, ο έλεγχος της οποίας πραγματοποιήθηκε μέσω κατάλληλης μεθοδολογίας, γνωστής ως δοκιμή ALDEFLUOR με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Η μέθοδος ανίχνευσης της ενεργότητας ALDH στα ΚΚΚ αναπτύχθηκε μέσω μίας σειράς πειραμάτων σε διαδοχικές αραιώσεις των καρκινικών κυττάρων της κάθε σειράς σε απομονωμένα μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος φυσιολογικών αιμοδοτών (αραιώσεις των 10 , 10^2 , 10^3 και 10^4 κυττάρων ανά 10^6 αιμοποιητικών κυττάρων). Η ταυτοποίηση των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω της ανίχνευσης της έκφρασης των μορίων της

επιφάνειας EpCAM και CD45, έναντι της κυτταροκερατίνης, καθώς η δοκιμή ALDEFLUOR δεν επιτρέπει τη σύγχρονη ταυτοποίηση ενδοκυττάρων μορίων. Σε συμφωνία με άλλες μελέτες ανίχνευσης KKK μέσω κυτταρομετρίας ροής, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η μέθοδος εμφανίζει υψηλή ευαισθησία, ωστόσο στις μεγάλες αραιώσεις των 10 και 100 καρκινικών κυττάρων παρατηρήθηκε υπερεκτίμηση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η ανίχνευση της ενεργότητας της ALDH πραγματοποιήθηκε με μεγάλη ευαισθησία στο σύνολο των αραιώσεων, ωστόσο και εδώ παρατηρήθηκε μείωση της ποσοστιαίας ενεργότητας με την αυξανόμενη αραιώση των καρκινικών κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε ενδείκνυται για ασθενείς με υψηλό φορτίο KKK.

Τέλος, μέσω της κυτταρομετρίας ροής ήταν δυνατή η εκτίμηση της ενεργότητας της ALDH στο σύνολο CD45-αρνητικών κυττάρων ανεξάρτητα από την έκφραση του EpCAM, στα οποία συμπεριλαμβάνεται μεταξύ άλλων ο υποπληθυσμός των KKK με πλήρη απώλεια έκφρασης επιθηλιακών δεικτών στα πλαίσια της ολοκληρωμένης EMT. Όπως διαπιστώθηκε, η ενεργότητα της ALDH στο συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων ήταν αυξημένη συγκριτικά με τον πληθυσμό των EpCAM-θετικών/CD45-αρνητικών κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι η παραπάνω προσέγγιση επιτρέπει την ανίχνευση του πληθυσμού των KKK με πλήρη EMT και παράλληλα λειτουργικό χαρακτήρα KBK.

Λιγότερα των 5 KKK ταυτοποιήθηκαν στο 65,2% του πληθυσμού των ασθενών με ΚΑΠΕ της μελέτης, ενώ στο 14,6% ανευρέθηκαν ≥ 5 KKK με ανοσοφθορισμό. Επιπροσθέτως του ανοσοφθορισμού, εφαρμόστηκε και κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση KKK. Η διενεργηθείσα ανάλυση σε ανεξάρτητο πληθυσμό ασθενών με ΚΑΠΕ συγκριτικά με τον ανοσοφθορισμό, αποκάλυψε την παρουσία KKK στο 64% των περιπτώσεων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση ότι στο 28% του συγκεκριμένου πληθυσμού, βρέθηκαν περισσότερα των 50 KKK κατά περίπτωση. Αναφορικά με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, δεν ανιχνεύτηκε συσχέτιση μεταξύ των KKK και της ηλικίας κατά τη διάγνωση της νόσου, της εντόπισής της, της λειτουργικής κατάστασης των ασθενών ή της λευκοκυττάρωσης ($P > 0.05$). Επίσης καθορίστηκε η συσχέτιση της παρουσίας KKK με την επιβίωση. Η διαφορά στη συνολική επιβίωση μεταξύ των δύο υποομάδων ασθενών με KKK ≥ 5 έναντι < 5 όπως αυτά ανιχνεύτηκαν με τον ανοσοφθορισμό, δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, ενώ ασθενής συσχέτιση προέκυψε από την κυτταρομετρία ροής ($P = 0.049$).

Επιπλέον, στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με ΚΑΠΕ. Η περιτοναϊκή καρκινωμάτωση, τα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα και η ικανοποιητική λειτουργική κατάσταση των ασθενών συνδέονται με βελτιωμένη επιβίωση.

Συνοψίζοντας, αυτή η μελέτη υποδεικνύει ότι η παρουσία ΚΚΚ σε ασθενείς με ΚΑΠΕ, δε συνοδεύεται από φτωχή επιβίωση ενώ καμία συσχέτισή τους δεν αναγνωρίστηκε με μια σειρά κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων. Επομένως, τα ΚΚΚ δεν αποτελούν προγνωστικό παράγοντα των ΚΑΠΕ. Καλά σχεδιασμένες κλινικές δοκιμές σε ικανό αριθμό ασθενών με ΚΑΠΕ επιβάλλεται να πραγματοποιηθούν στο μέλλον, προκειμένου να επικυρωθεί η διαπίστωση αυτή. Επιπλέον, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε μία φαινοτυπική ανάλυση των ΚΚΚ ασθενών με ΚΑΠΕ, ως προς την παρουσία χαρακτηριστικών ΚΒΚ και ενδιάμεσης EMT. Η παρούσα μελέτη προσέφερε μία νέα μεθοδολογία για την ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση της συνέκφρασης δύο σημαντικών δεικτών ΚΒΚ και EMT στα ΚΚΚ σε επίπεδο κυττάρου. Επίσης περιγράφηκε για πρώτη φορά η σύγχρονη έκφραση δεικτών ΚΒΚ και EMT στο ίδιο κύτταρο, επιβεβαιώνοντας τη συσχέτιση μεταξύ των δύο χαρακτηριστικών στα ΚΚΚ. Η προγνωστική αξία της ανίχνευσης ΚΚΚ ως προς την επιβίωση των ασθενών μένει να διερευνηθεί περαιτέρω. Με την παρούσα μελέτη αναδεικνύεται αφενός η σημασία της εκτενούς φαινοτυπικής μελέτης των ΚΚΚ για την αποσαφήνιση του ρόλου τους στη μεταστατική διαδικασία και αφετέρου η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών θεραπειών που θα στοχεύουν σε μόρια που σχετίζονται άμεσα με τα χαρακτηριστικά ΚΒΚ και EMT. Μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να συμβάλλει σημαντικά στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των ασθενών με ΚΑΠΕ.

SUMMARY IN ENGLISH

About 3% of all cancer patients suffer from Cancer of Unknown Primary Origin (CUP). These patients present with metastatic disease for which a primary site can not be detected at the time of diagnosis. Sophisticated diagnostic technics and operational procedures have failed to improve the diagnostic efficacy in this group of patients. Consequently, it has been adopted today that a policy of a limited diagnostic procedure with basic laboratory tests and imaging studies is sufficient for the diagnosis of this syndrome, while the use of immunohistochemistry as well as serum tumor markers of high specificity may help to identify other tumors.

What is still missing today is the knowledge of the underling molecular biology of these highly metastatic malignancies that are characterized by early aquisition of a metastatic phenotype.

Since the exact mechanism of metastases formation has not yet been elucidated, there is a great need for a more extensive study of the metastatic process. Numerous studies in cancer cell lines and animal models have demonstrated the complexity of the metastatic process. The main stages of metastasis development include the proliferation of cancer cells in the primary site, invasion in surrounding tissues and intravasation into the circulation, where they can migrate either as single cells or clusters. Afterwards, cancer cells can extravasate at distant sites and invade new organs to form micrometastases, where their subsequent proliferation leads to the formation of overt metastases. These cells, identified either as disseminated tumor cells (DTCs) in secondary sites or as circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of patients, consist the population of micrometastatic cells.

Several studies have shown that the detection of CTCs in peripheral blood of patients with CUP is a strong and independent marker for increased risk of relapse and reduced overall survival. Moreover, the presence of CTCs in breast cancer has been strongly correlated with lower response rates to conventional chemotherapies. However, CTCs are a highly heterogeneous population exhibiting differential metastatic potential, therefore their further molecular and phenotypic characterization is of outmost importance. This could highlight those characteristics that prosper metastatic process, contributing to a better understanding of the mechanism of metastasis. Moreover, CTCs are considered as a real time liquid biopsy, which allows

the molecular characterization of the tumor at different time points. The identification of CTCs bearing characteristics associated with aggressive behavior or resistance to conventional treatment might also help to identify subgroups of patients with poor prognosis. These patients could be offered more aggressive therapeutic approaches and/or targeted therapies against molecules selected according to their expression on CTCs. Thus, during the last years, a growing number of techniques are being developed for the detection and characterization of CTCs.

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells is a process holding an important role in metastasis formation, during which the epithelial phenotype dynamically converts to a mesenchymal one. These mesenchymal characteristics enable the initial invasion and intravasation of cancer cells, their migration through the systemic circulation and the subsequent extravasation and invasion at distant sites. One of the major changes during EMT is related to the expression pattern of the cytoskeleton intermediate filaments. Specifically, a significant reduction of cytokeratin expression along with a simultaneous increase in vimentin expression is usually observed. Moreover, the expression of molecules involved in cell to cell contacts, induced by a series of transcription factors, such as TWIST, SNAIL and SLUG is also modulated. The expression of the putative EMT markers, Vimentin and TWIST is considered essential for the invasion and intravasation of cancer cells in the circulation. In addition, numerous studies have shown that characteristics suggestive of the presence of EMT in primary tumors, are strongly associated with resistance to chemotherapy, high risk of relapse and decreased survival.

A growing body of evidence suggests a correlation between the EMT process and the generation of cancer stem cells (CSCs). CSCs have been identified as a small subpopulation in several types of cancers, including breast cancer, and are considered to bear properties of normal stem cells. The CSC model proposes that these cells only, are capable of self-renewal, unlimited proliferation and differentiation, whereas they have also been shown to participate in the metastatic process, giving rise to all the subpopulations that constitute the primary tumor.

Based on the above, the detection of putative EMT and CSC markers on CTCs could distinguish a subpopulation of CTCs demonstrating chemoresistance and

enhanced metastatic potential. Several studies during the last years have also reported the presence of EMT and CSC characteristics on CTCs by the use of different techniques, however there are no clinical studies including well defined groups with large number of patients. Moreover, the co-expression of CSC and EMT markers at the single CTC level has not yet been reported. On this basis, we investigated whether CTCs of patients with breast cancer, co-express putative stem cell and intermediate EMT phenotypes. Furthermore, we interrogated the frequency of these CTC subpopulations among patients with early and metastatic disease, evaluated their potential prognostic value.

For this purpose, a novel triple immunofluorescence methodology was developed on isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients, for the detection of cytokeratins 8, 18 and 19 as a CTC marker, along with ALDH1 and TWIST, as putative CSC and EMT markers, respectively. The co-expression of these molecules was evaluated at the single cell level by the use of the semi-automated fluorescence microscopy system ARIOL.

This study has provided a new, sensitive and specific method for the characterization of CTCs according to the co-expression of two putative CSC and EMT markers. This study showed for the first time that two putative CSC and EMT markers are frequently co-expressed on single CTCs, reinforcing their association.

We further investigated whether CTCs bearing the stem cell phenotype, as defined by the high expression of the isoenzyme ALDH1A1, also acquire functional stem cell characteristics. The enzymatic activity of ALDH was used as a functional marker of CSCs, which was evaluated by ALDEFLUOR assay and the use of flow cytometry. The methodology for the detection of ALDH activity on CTCs was developed through a series of experiments using serial dilutions of tumor cells from each cell line into isolated PBMCs from normal blood donors (dilutions of 10, 100, 1.000 and 10.000 cells per 10^6 PBMCs). Tumor cells were detected by the expression of EpCAM and CD45 surface molecules instead of cytokeratin, since the evaluation of intracellular proteins cannot be combined with the ALDEFLUOR assay. CTCs could be identified in all the above dilutions, however an overestimation of cell counts was observed in low concentrations of 10 and 100 tumor cells per 10^6 PBMCs. ALDH activity could also be

detected in all dilutions, however the recovery rate was reduced in low cell concentrations, suggesting that the developed methodology is appropriate for patients bearing high CTC counts only.

Finally, ALDH enzymatic activity was evaluated on CD45-negative cells, which include the subpopulation of CTCs that have completely lost the expression of epithelial markers in the context of full EMT. It was shown that ALDH activity in these cells was increased, compared to the population of EpCAM-positive/CD45-negative cells, suggesting that the current approach allows the detection of CTCs bearing a fully EMT phenotype and also functional characteristics of CSCs.

Less than 5 CTCs were detected in the blood of 65.2% of a CUP population of patients, whereas 14.6% were found with 5 or more CTCs by immunofluorescence. In addition to immunofluorescence, flow cytometry was used to determine CTCs. The analysis of a separate cohort of patients with CUP, revealed the presence of CTCs in 64% of cases. Interestingly enough, in the 28% this population more than 50 CTCs were identified per sample. With respect to clinicopathological features, there was also no detectable relation between CTCs and age at diagnosis, localization of the disease, patients' performance status, or leukocytosis in CUP ($P > 0.05$). It was also determined the association between CTCs' detection and survival. The difference in overall survival between CTCs < 5 and CTCs ≥ 5 groups detected by immunofluorescence was not statistically significant, whereas, there was just a weak correlation by flow cytometry ($P = 0.049$).

In addition, a statistically significant association was observed between clinicopathological parameters and overall survival in CUP patients. Peritoneal carcinomatosis, well differentiated carcinomas and favorable performance status were associated with improved survival.

To summarize, this study indicated that CTCs were not related to the poor survival in CUP patients and no correlation exists between CTCs and other common clinicopathological parameters. Therefore, CTCs might not be a significantly progress and prognostic indicator for CUP patients. Well-designed clinical studies with large cases of CUP should be performed in the future to validate the relationship between CTCs and prognosis of CUP patients. Furthermore, we performed a phenotypic analysis

of CTCs from CUP patients, regarding the presence of stem cell and partial EMT characteristics. The present study provides a new methodology that allows the sensitive and specific detection of CSC and EMT markers and their co-expression at the single CTC level. It was also described for the first time that CSC and EMT markers are frequently co-expressed on the same CTC, further confirming the correlation between the two states in CTCs. Their prognostic value for patients' survival remains to be further investigated. The present study highlights the significance of the extensive phenotypic analysis of CTCs for the determination of their role in the metastatic process, as well as the need for alternative targeted therapies against molecules associated with stem cell and EMT features. This approach could contribute to a more effective management of CUP patients.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pavlidis N, Briasoulis E, Hainsworth J, et al. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1990-2005.
2. Briasoulis E, Tsokos M, Fountzilas G, et al. Bcl2 and p53 protein expression in metastatic carcinoma of unknown primary origin: biological and clinical implications. A Hellenic Cooperative Oncology Group study. *Anticancer Res.* 1998, 18:1907-1914.
3. Pavlidis N, Briassoulis E, Bai M, et al. Overexpression of C-myc, Ras and C-erbB-2 oncoproteins in carcinoma of unknown primary origin. *Anticancer Res.* 1995, 15:2563-2567.
4. Pavlidis N, Fizazi K. Cancer of unknown primary. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 69(7): 271-280.
5. Leonard RJ, Nystrom JS. Diagnostic evaluation of patients with carcinoma of unknown primary tumor site. *Semin Oncol* 1993; 20: 244-250.
6. Stewart JF, Tattersall MH, Woods RL, et al. Unknown primary adenocarcinoma: incidence of overinvestigation and natural history. *Br Med* 1979; 1: 1530-1533.
7. Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Lenzi R, et al. Analysis of a Diagnostic Strategy for Patients With Suspected Tumours of Unknown Origin. *J Clin Oncol* 1995; 13(8): 2094-2103.
8. NeumannXH, Nystrom.J.S. Metastatic cancer of unknown origin: nonsquamous cell type. *Semin Oncol* 1982; 9(4): 427-434.
9. Le Chevalier T, Cvitkovic E, Caille P, et al. Early metastatic cancer of unknown primary origin at presentation, a clinical study of 302 consecutive autopsied patients. *Arch Intern Med* 1988; 148: 2035-2039.

10. Pavlidis N. Optimal therapeutic management of patients with distinct clinicopathological cancer of unknown primary subsets. *Ann Oncol.* 2012; 23(10): x282-5.
11. Pentheroudakis G, Golfopoulos V, Pavlidis N. Switching benchmarks in cancer of unknown primary: from autopsy to microarray. *Eur J Cancer* 2007; 43(14): 2026-2036.
12. Van der Ploeg AP, Haydu LE, Spillane AJ, et al. Melanoma Patients with an Unknown Primary Tumor Site Have a Better Outcome than Those with a Known Primary Following Therapeutic Lymph Node Dissection for Macroscopic (Clinically Palpable) Nodal Disease. *Ann Surg Oncol.* 2014 May 7. [Epub ahead of print].
13. Egberts F, Krüger S, Behrens HM, et al. Melanomas of unknown primary frequently harbor TERT-promoter mutations. *Melanoma Res.* 2014 Apr; 24(2): 131-6.
14. Egberts F, Bergner I, Krüger S, et al. Metastatic melanoma of unknown primary resembles the genotype of cutaneous melanomas. *Ann Oncol.* 2014 Jan; 25(1): 246-50.
15. Dutton-Regester K, Kakavand H, Aoude LG, et al. Melanomas of unknown primary have a mutation profile consistent with cutaneous sun-exposed melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013 Nov; 26(6): 852-60.
16. Kuttesch JF Jr, Parham DM, Kaste SC, et al. Embryonal malignancies of unknown primary origin in children. *Cancer.* 1995 Jan 1; 75(1): 115-21.
17. Levi F, Te VC, Erler G, et al. Epidemiology of unknown primary tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1810–2.
18. Muir C. Cancer of unknown primary site. *Cancer* 1995; 75(1 Suppl): 353-356.
19. Coates M, Armstrong B. NSW Central Cancer Registry. *Cancer in New South Wales. Incidence and Mortality.* NSW, Cancer Council, 1995.

20. Visser O, Coebergh JWW, Schouten LJ. Incidence of Cancer in the Netherlands 1993. Utrecht, The Netherlands Cancer Registry, 1993.
21. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, et al. Cancer Incidence in Five Continents, Vol VI. IARC Scientific Publication No. 120. Lyon, IARC, 1992.
22. Komov DV, Komarov IG, Podruguliskii KR, et al. Cancer metastases from an unestablished primary tumor (clinical aspects, diagnosis, treatment). *Sov Med Rev F Oncology* 1991, 4, 1–33.
23. Parkin DM, Whelan S, Ferlay J, et al. Cancer incidence in five continents, vol. VII. Lyon: IARC; 1991 [No. 143].
24. Altman E, Cadman E. An analysis of 1539 patients with cancer of unknown primary site. *Cancer* 1986; 57: 120-124.
25. Brewster DH, Lang J, Bhatti LA, et al. Descriptive epidemiology of cancer of unknown primary site in Scotland, 1961-2010. *Cancer Epidemiol.* 2014; 38(3): 227-34.
26. Briasoulis E, Pavlidis N. Cancer of unknown primary origin. *Oncologist* 1997; 2(3): 142–152.
27. Mayordomo JI, Guerra JM, Guijarro C, et al. Neoplasms of unknown primary site: a clinicopathological study of autopsied patients. *Tumori* 1993; 79: 321-324.
28. Simon MA, Kneisl JS. A prospective diagnostic strategy for the evaluation of skeletal metastases of unknown origin (meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1991; 10: A27.
29. Shih LY, Chen TH, Lo WH. Skeletal metastasis from occult carcinoma. *J Surg Oncol* 1992; 51: 109-113.
30. Nystrom JS, Weiner JM, Wolf Meshnik R, et al. Identifying the Primary Site in Metastatic Cancer of Unknown Origin. Inadequacy of Roentgenographic Procedures. *JAMA* 1979; 241(4): 381-383.

31. Le Chevalier T, Caille P, Spielmann M, et al. Carcinoma of unknown primary, a study of 302 consecutive autopsied patients (meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1985; 4: 8-8.
32. Ringenberg QS, Doll DC, Yarbrow JW, et al. Tumors of unknown origin in the bone marrow. *Arch Intern Med* 1986; 146: 2027-2028.
33. Le Chevalier T, Cvitkovic E, Caille P et al. Early metastatic cancer of unknown primary origin at presentation: a clinical study of 302 consecutive autopsied patients. *Arch Intern Med* 1988; 148: 2035–2039.
34. Hainsworth JD, Dial TW, Greco FA. Curative combination chemotherapy for patients with advanced poorly differentiated carcinoma of unknown primary site. *Am J Clin Oncol* 1988; 11: 138-145.
35. Hamilton CS, Langlands AO. Acups (adenocarcinoma of unknown primary site): a clinical and cost benefit analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13: 1497-1503.
36. Kirsten F, Chi CH, Leary JA, et al. Metastatic adeno or undifferentiated carcinoma from an unknown primary site - natural history and guidelines for identification of treatable subsets. *Q J Med* 1987; 62: 143-161.
37. Moertel CG, Reitemeier RJ, Schutt AJ, et al. Treatment of the patient with adenocarcinoma of unknown origin. *Cancer* 1972; 30: 1469-1472.
38. Osteen RT, Kopf G, Wilson RE. In pursuit of the unknown primary. *Am J Surg* 1978; 135: 494-498.
39. Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Hess KR, et al. Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients. *J Clin Oncol*. 1994; 12(6): 1272-80.
40. Ayoub JP, Hess KR, Abbruzzese MC, et al. Unknown primary tumors metastatic to liver. *J Clin Oncol*. 1998 Jun;16(6):2105-12.
41. Fox RM, Woods RL, Tattersall MH, et al. Undifferentiated carcinoma in young men: the atypical teratoma syndrome. *Lancet*. 1979; 1(8130): 1316-8.

42. Greco FA, Vaughn WK, Hainsworth JD. Advanced poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: recognition of a treatable syndrome. *Ann Intern Med.* 1986; 104(4): 547-53.
43. Jackson B, Scott-Conner C, Moulder J. Axillary metastasis from occult breast carcinoma: diagnosis and management. *Am Surg.* 1995; 61(5): 431-4.
44. Leibman AJ, Kossoff MB. Mammography in women with axillary lymphadenopathy and normal breasts on physical examination: value in detecting occult breast carcinoma. *AJR Am J Roentgenol.* 1992; 159(3): 493-5.
45. Schorn C, Fischer U, Luftner-Nagel S, et al. MRI of the breast in patients with metastatic disease of unknown primary. *Eur Radiol.* 1999; 9(3): 470-3.
46. Ellerbroek N, Holmes F, Singletary E, et al. Treatment of patients with isolated axillary nodal metastases from an occult primary carcinoma consistent with breast origin. *Cancer.* 1990; 66(7): 1461-7.
47. Matsuoka K, Ohsumi S, Takashima S, et al. Occult breast carcinoma presenting with axillary lymph node metastases: follow-up of eleven patients. *Breast Cancer.* 2003;10(4):330-4.
48. Koivunen P, Laranne J, Virtaniemi J, et al. Cervical metastasis of unknown origin: a series of 72 patients. *Acta Otolaryngol.* 2002; 122(5): 569-74.
49. Califano J, Westra WH, Koch W, et al. Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(7): 599-604.
50. Jereczek-Fossa BA, Jassem J, Orecchia R. Cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma from an unknown primary. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30(2): 153-64.
51. Zaren HA, Copeland EM 3rd. Inguinal node metastases. *Cancer.* 1978; 41(3): 919-23.

52. Guarischi A, Keane TJ, Elhakim T. Metastatic inguinal nodes from an unknown primary neoplasm. A review of 56 cases. *Cancer*. 1987; 59(3): 572-7.
53. van de Wouw AJ, Jansen RL, Griffioen AW, et al. Clinical and immunohistochemical analysis of patients with unknown primary tumour. A search for prognostic factors in UPT. *Anticancer Res*. 2004; 24(1): 297-301.
54. Zang RY, Zhang ZY, Cai SM, et al. Epithelial ovarian cancer presenting initially with extraabdominal or intrahepatic metastases: a preliminary report of 25 cases and literature review. *Am J Clin Oncol*. 2000; 23(4): 416-9.
55. Strnad CM, Grosh WW, Baxter J, et al. Peritoneal carcinomatosis of unknown primary site in women. A distinctive subset of adenocarcinoma. *Ann Intern Med*. 1989; 111(3): 213-7.
56. Ringenberg QS, Doll DC, Loy TS, et al. Malignant ascites of unknown origin. *Cancer*. 1989; 64(3): 753-5.
57. Katagiri H, Takahashi M, Inagaki J, et al. Determining the site of the primary cancer in patients with skeletal metastasis of unknown origin: a retrospective study. *Cancer*. 1999; 86(3): 533-7.
58. Gentile PS, Carloss HW, Huang TY, et al. Disseminated prostatic carcinoma simulating primary lung cancer. Indications for immunodiagnostic studies. *Cancer*. 1988; 62(4): 711-5.
59. Maesawa S, Kondziolka D, Thompson TP, et al. Brain metastases in patients with no known primary tumor. *Cancer*. 2000; 89(5): 1095-101.
60. Le Chevalier T, Smith FP, Caille P, et al. Sites of primary malignancies in patients presenting with cerebral metastases. A review of 120 cases. *Cancer*. 1985; 56(4): 880-2.
61. Garrow GC, Greco FA, Hainsworth JD. Poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of unknown primary tumor site. *Semin Oncol*. 1993; 20(3): 287-91.

62. Hainsworth JD, Johnson DH, Greco FA. Poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of unknown primary site. A newly recognized clinicopathologic entity. *Ann Intern Med.* 1988; 109(5): 364-71.
63. Laveau F, Picot MC, Dereure O, et al. [Metastatic melanoma of unknown primary site]. [Article in French]. *Ann Dermatol Venereol.* 2001; 128(8-9): 893-8.
64. Schlagenhauff B, Stroebel W, Ellwanger U, et al. Metastatic melanoma of unknown primary origin shows prognostic similarities to regional metastatic melanoma: recommendations for initial staging examinations. *Cancer.* 1997; 80(1): 60-5.
65. Anbari KK, Schuchter LM, Bucky LP, et al. Melanoma of unknown primary site: presentation, treatment, and prognosis--a single institution study. University of Pennsylvania Pigmented Lesion Study Group. *Cancer.* 1997; 79(9): 1816-21.
66. Mackey B, Ordonez NG. Pathological evaluation of neoplasm with unknown primary tumor site. *Semin Oncol* 1993; 20: 206-228.
67. Hainsworth JD, Wright EP, Gray GFJ, et al. Poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: correlation of light microscopic findings with response to cisplatin-based combination chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1987; 5(8): 1275-80.
68. Sheahan K, O'Keane JC, Abramowitz A, et al. Metastatic adenocarcinoma of an unknown primary site: a comparison of the relative contributions of morphology, minimal essential clinical data and CEA immunostaining status. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 729-735.
69. Eckert F, Baricevic B, Landthaler M, et al. Metastatic signet-ring cell melanoma in a patient with an unknown primary tumor: histologic, immunohistochemical, and ultrastructural findings. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 870-875.

70. van der GA, Verwij J, Planting AS, et al. The value of immunohistochemistry in patients with poorly differentiated adenocarcinomas and undifferentiated carcinomas of unknown primary. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996; 122: 181-185.
71. Matthews P, Ellis IO. Use of immunocytochemistry in the diagnosis of metastatic carcinoma. *Ann Med* 1996; 28(4): 297-300.
72. Greco FA, Hainsworth JD. Cancer of unknown primary site. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*, vol. 56, 8th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co.; 2008. p. 2363–83.
73. Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2002; 38: 758–763.
74. Dennis JL, Hvidsten TR, Wit EC, et al. Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: development of a diagnostic algorithm. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3766–72.
75. Ilson DH, Motzer RJ, Rodriguez E, et al. Genetic analysis in the diagnosis of neoplasm of unknown primary tumor site. *Semin Oncol* 1993, 20, 229–237.
76. Motzer RJ, Rodriguez E, Reuter VE, et al. Molecular and cytogenetic studies in the diagnosis of patients with poorly differentiated carcinomas of unknown primary site. *J Clin Oncol* 1995, 13, 274–282.
77. Atkin NB, Baker MC. Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumors. *Lancet* 1982; (2): 1349-1356.
78. Mathew S, Murty VV, Bosl GJ, et al. Loss of heterozygosity identifies multiple sites of allelic deletions on chromosome 1 in human male germ cell tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 6265-6269.
79. Atkin NB. Solid tumor cytogenetics: Progress since 1979. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 40: 3-12.
80. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, et al. Chromosomal translocation in Ewing's sarcoma. *N Engl J Med* 1983; 309: 497-498.

81. Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T, et al. Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma. *N Engl J Med* 1984; 311: 584-585.
82. Bosl GJ, Dmitrofsky E, Reuter V, et al. i(12p): A specific karyotypic abnormality in Germ cell tumors. [Abstract] *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1989;8:131
83. Hainsworth JD, Greco FA. Poorly differentiated carcinoma and germ cell tumors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1991, 5:1223-1231.
84. Feinmesser R, Miyazaki I, Cheung R, et al. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine needle aspiration. *N Engl J Med* 1992; 326: 17-21.
85. Horn T, Andersen CB, Nerstrom H. Electron microscopy of need biopsies from cancer patients with unknown tumours. *Ugeskr Laeger* 1995; 155: 1120-1129.
86. Hammar S, Bockus D, Remington F. Metastatic tumors of unknown origin: an ultrastructural analysis of 265 cases. *Ultrastruct Pathol* 1987; 11: 209-250.
87. Stieber P, Fateh Moghadam A. Tumor markers and their sensible use. *Klin Labor* 1993; 39: 291-306.
88. Fritsche HA. Serum tumor markers for patient monitoring: a case-oriented approach illustrated with carcinoembryonic antigen. *Clin Chem* 1993; 39: 2431-2434.
89. Carl J, Trykker H, Schott P. A simple mathematical model applied to describing tumour marker data. *Cancer Detect Prev* 1989; 13: 293-299.
90. Diez M, Pollan M, Maestro ML, et al. Concordance between serum and cytosolic levels of CEA, CA125 and SCC antigens in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1995; 15(6B): 2811-2817.
91. Bagshawe KD. Edward Arnold, editor.: *Choriocarcinoma: the clinical biology of the trophoblast and its tumours.* 1969;

92. Pavlidis N, Kalef-Ezra J, Briassoulis E, et al. Evaluation of six tumor markers in patients with carcinoma of unknown primary. *Med Pediatr Oncol.* 1994; 22(3): 162-7.
93. Kirsten F, Chi CH, Leary JA, et al. Metastatic adeno or undifferentiated carcinoma from an unknown primary site--natural history and guidelines for identification of treatable subsets. *Q J Med.* 1987 Feb; 62(238): 143-61.
94. Briassoulis E, Tolis C, Bergh J, et al; ESMO Guidelines Task Force. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of cancers of unknown primary site (CUP). *Ann Oncol.* 2005; 16 Suppl 1: i75-6.
95. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 1989; 49(14): 3713-21.
96. Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science.* 1991; 254(5035): 1146-53.
97. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004 Aug; 25(4): 581-611.
98. Remele AG, Noël A, Duggan C, et al. Assay of matrix metalloproteinases types 1, 2, 3 and 9 in breast cancer. *Br J Cancer.* 1998 Mar; 77(6): 926-31.
99. Rha SY, Yang WI, Kim JH, et al. Different expression patterns of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer. *Oncol Rep.* 1998 Jul-Aug; 5(4): 875-9.
100. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene.* 2002 Mar 28; 21(14): 2245-52.
101. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Oct; 33(10): 960-70.
102. Karavasilis V, Malamou-Mitsi V, Briassoulis E, et al. Matrix metalloproteinases in carcinoma of unknown primary. *Cancer* 2005; 104: 2282-7.
103. Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, et al. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res.* 1995; 1(8): 899-906.

104. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(17): 1260-70.
105. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, et al. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2000; 18(5): 1135-49.
106. Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(8): 526-37.
107. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev.* 2005; 85(2): 635-78.
108. Xie T, Li L. Stem cells and their niche: an inseparable relationship. *Development.* 2007; 134(11): 2001-6.
109. Schulz WA, Hoffmann MJ. Transcription factor networks in embryonic stem cells and testicular cancer and the definition of epigenetics. *Epigenetics.* 2007; 2(1): 37-42.
110. Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development.* 2007; 134(4): 635-46.
111. Silva J, Smith A. Capturing pluripotency. *Cell.* 2008; 132(4): 532-6.
112. Spivakov M, Fisher AG. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet.* 2007; 8(4):263-71.
113. Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, et al. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(7): 1093-108.
114. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 2009; 217(2): 144-60.
115. Roberts A, Mishra L. Role of TGF- β in stem cells and cancer. *Oncogene.* 2005; 24: 5667.

116. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
117. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
118. Greco SJ, Rameshwar P. Microenvironmental considerations in the application of human mesenchymal stem cells in regenerative therapies. *Biologics*. 2008; 2(4): 699-705.
119. Kosinski C, Li VS, Chan AS, et al. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(39): 15418-23.
120. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001; 414(6859): 98-104.
121. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(1): 11-21.
122. Yamashita Y. Asymmetric stem cell division and pathology: insights from *Drosophila* stem cell systems. *J Pathol*. 2009; 217(2): 181-5.
123. Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*. 2004; 23(43): 7150-60.
124. Chambers I, Silva J, Colby D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*. 2007; 450(7173): 1230-4.
125. Glinsky GV. "Stemness" genomics law governs clinical behavior of human cancer: implications for decision making in disease management. *J Clin Oncol*. 2008; 26(17): 2846-53.
126. Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res*. 2009; 19(1): 103-15.

127. Tysnes BB. Tumor-initiating and -propagating cells: cells that we would like to identify and control. *Neoplasia*. 2010; 12(7): 506-15.
128. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4): 663-76.
129. Li R, Liang J, Ni S, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(1): 51-63.
130. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*. 2005; 121(3): 465-77.
131. Sotomayor P, Godoy A, Smith GJ, et al. Oct4A is expressed by a subpopulation of prostate neuroendocrine cells. *Prostate*. 2009; 69(4): 401-10.
132. Trosko JE. From adult stem cells to cancer stem cells: Oct-4 Gene, cell-cell communication, and hormones during tumor promotion. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1089: 36-58.
133. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, et al. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer*. 2007; 120(7): 1598-602.
134. Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet*. 2000; 16(4): 182-7.
135. Pevny L, Placzek M. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol*. 2005; 15(1): 7-13.
136. Phi JH, Park SH, Kim SK, et al. Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32(1): 103-12.
137. Schmitz M, Temme A, Senner V, et al. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer*. 2007; 96(8): 1293-301.

138. Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact.* 2003; 143-144: 201-10.
139. Brodeur H, Parisotto M, Chagnon S, et al. Isomer-specific retinoic acid biosynthesis in HeLa cells expressing recombinant class I aldehyde dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770(11): 1548-56.
140. Evans T. Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling. *Exp Hematol.* 2005; 33(9): 1055-61.
141. Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ. All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood.* 2000; 95(2): 470-7.
142. Mic FA, Haselbeck RJ, Cuenca AE, et al. Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of *Raldh2* null mutant mice. *Development.* 2002; 129(9): 2271-82.
143. Nadauld LD, Sandoval IT, Chidester S, et al. Adenomatous polyposis coli control of retinoic acid biosynthesis is critical for zebrafish intestinal development and differentiation. *J Biol Chem.* 2004; 279(49): 51581-9.
144. Decensi A, Costa A. Recent advances in cancer chemoprevention, with emphasis on breast and colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2000; 36(6): 694-709.
145. Sládek NE. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003; 17(1): 7-23.
146. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 385(3): 307-13.
147. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(5): 555-67.

148. Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, et al. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc.* 2004; 63(1): 49-63.
149. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(12): 895-902.
150. Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, et al. Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ.* 2008; 15(6): 947-58.
151. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(10): 755-68.
152. Li Y, Lathera J. Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer Res.* 2012; 72(3): 576-80.
153. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3(7): 730-7.
154. Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005; 65(23): 10946-51.
155. Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008; 15(3): 504-14.
156. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007; 445(7123): 106-10.
157. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432(7015): 396-401.
158. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351(4): 820-4.

159. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005; 65(13): 5506-11.
160. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 2003; 17(10): 1253-70.
161. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(1): 45-55.
162. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.* 2009; 69(4): 1302-13.
163. Ghebeh H, Sleiman GM, Manogaran PS, et al. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44^{high}/CD24^{low} phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. *BMC Cancer.* 2013; 13: 289.
164. Bao B, Ahmad A, Azmi AS, et al. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. *Curr Protoc Pharmacol.* 2013; Chapter 14: Unit 14.25.
165. Prud'homme GJ. Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(19): 2838-49.
166. Dontu G, Liu S, Wicha MS. Stem cells in mammary development and carcinogenesis: implications for prevention and treatment. *Stem Cell Rev.* 2005; 1(3): 207-13.
167. Ithimakin S, Day KC, Malik F, et al. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. *Cancer Res.* 2013; 73(5): 1635-46.

168. Korkaya H, Paulson A, Iovino F, et al. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*. 2008; 27(47): 6120-30.
169. Rossi DJ, Weissman IL. Pten, tumorigenesis, and stem cell self-renewal. *Cell*. 2006; 125(2): 229-31.
170. Li Y, Bu G. LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis. *Future Oncol*. 2005; 1(5): 673-81.
171. Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, et al. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res*. 2004; 6(6): R605-15.
172. Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res*. 2006; 66(12): 6063-71.
173. Iliopoulos D, Lindahl-Allen M, Polytarchou C, et al. Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Mol Cell*. 2010; 39(5): 761-72.
174. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4): 265-73.
175. Liu H, Patel MR, Prescher JA, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(42): 18115-20.
176. Dieter SM, Ball CR, Hoffmann CM, et al. Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. *Cell Stem Cell*. 2011; 9(4): 357-65.
177. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, et al. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*. 2006; 8(5): R59.

178. Pandit TS, Kennette W, Mackenzie L, et al. Lymphatic metastasis of breast cancer cells is associated with differential gene expression profiles that predict cancer stem cell-like properties and the ability to survive, establish and grow in a foreign environment. *Int J Oncol.* 2009; 35(2): 297-308.
179. Li F, Tiede B, Massagué J, et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 2007; 17(1)3-14.
180. Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(2): 374-90.
181. Croker AK, Goodale D, Chu J, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(8B): 2236-52.
182. Shen R, Ye Y, Chen L, et al. Precancerous stem cells can serve as tumor vasculogenic progenitors. *PLoS One.* 2008; 3(2): e1652.
183. Bussolati B, Grange C, Sapino A, et al. Endothelial cell differentiation of human breast tumour stem/progenitor cells. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(2): 309-319.
184. Croker AK, Allan AL. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH^{hi}CD44⁺ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133(1): 75-87.
185. Domen J, Gandy KL, Weissman IL. Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood.* 1998; 91(7): 2272-82.
186. Peters R, Leyvraz S, Perey L. Apoptotic regulation in primitive hematopoietic precursors. *Blood.* 1998; 92(6): 2041-52.
187. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(26): 15665-70.

188. Miyake K, Mickley L, Litman T, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 1999; 59(1): 8-13.
189. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(39): 14228-33.
190. Kawabata S, Oka M, Soda H, et al. Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(8): 3052-7.
191. Liu R, Wang X, Chen GY, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med.* 2007; 356(3): 217-26.
192. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell.* 2007; 11(3): 259-73.
193. De Wever O, Pauwels P, De Craene B, et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130(3): 481-94.
194. Ahmed S, Nawshad A. Complexity in interpretation of embryonic epithelial-mesenchymal transition in response to transforming growth factor-beta signaling. *Cells Tissues Organs.* 2007; 185(1-3): 131-45.
195. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell.* 2007; 128(3): 445-58.
196. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology.* 4th edition. W. H. Freeman (New York); 2000.
197. Somorjai IM, Martinez-Arias A. Wntless signalling alters the levels, subcellular distribution and dynamics of Armadillo and E-cadherin in third instar larval wing imaginal discs. *PLoS One.* 2008; 3(8): e2893.
198. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, et al. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol.* 2003; 163(4): 847-57.

199. Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, et al. A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *J Biol Chem.* 2008; 283(19): 12691-700.
200. Chetty R, Serra S. Nuclear E-cadherin immunoexpression: from biology to potential applications in diagnostic pathology. *Adv Anat Pathol.* 2008; 15(4): 234-40.
201. Kooy AJ, Tank B, de Jong AA, et al. Expression of E-cadherin, alpha- & beta-catenin, and CD44V6 and the subcellular localization of E-cadherin and CD44V6 in normal epidermis and basal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 1999; 30(11): 1328-35.
202. Pizarro A, Benito N, Navarro P, et al. E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1994; 69(1): 157-62.
203. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays.* 2001; 23(10): 912-23.
204. Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer.* 2003; 107(6): 970-5.
205. Frame MC. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 7): 989-98.
206. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(10): 816-26.
207. Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.* 2003; 83(2): 337-76.
208. Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; 34(3): 255-68.
209. Lozano E, Betson M, Braga VM. Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays.* 2003; 25(5): 452-63.

210. Orsulic S, Huber O, Aberle H, et al. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 8): 1237-45.
211. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15(5): 509-14.
212. Darnell JE Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(10): 740-9.
213. Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, et al. The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. *Dig Dis Sci.* 2005; 50(1): 42-6.
214. Li L, Li W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol Ther.* 2015; 150: 33-46.
215. *Basic Histology: Text and atlas.* Janqueira LC, Carneiro J. 10th edition Mc Graw Hill. 2002.
216. Schober M, Raghavan S, Nikolova M, et al. Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol.* 2007; 176(5): 667-80.
217. Bertolucci CM, Guibao CD, Zheng J. Structural features of the focal adhesion kinase-paxillin complex give insight into the dynamics of focal adhesion assembly. *Protein Sci.* 2005; 14(3): 644-52.
218. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 2006; 172(7): 973-81.
219. Anastasiadis PZ, Reynolds AB. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13(5): 604-10.
220. Gentile A, Comoglio PM. Invasive growth: a genetic program. *Int J Dev Biol.* 2004; 48(5-6): 451-6.

221. Wei J, Xu G, Wu M, et al. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. *Anticancer Res.* 2008; 28(1A): 327-34.
222. Mandal M, Myers JN, Lippman SM, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer.* 2008; 112(9): 2088-100.
223. Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res.* 2006; 66(9): 4549-52.
224. Martin TA, Harrison G, Mansel RE, et al. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003; 46(2): 165-86.
225. Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16(1): 14-23.
226. Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(12): 921-30.
227. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer.* 2000 Aug;36(13 Spec No):1621-30.
228. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene.* 2003; 22(42): 6549-56.
229. Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2002; 62(5): 1315-20.
230. Orlandini M, Semboloni S, Oliviero S. Beta-catenin inversely regulates vascular endothelial growth factor-D mRNA stability. *J Biol Chem.* 2003; 278(45): 44650-6.
231. Eccles SA. Parallels in invasion and angiogenesis provide pivotal points for therapeutic intervention. *Int J Dev Biol.* 2004; 48(5-6): 583-98.

232. Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem.* 2007; 101(4): 816-29.
233. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003; 200(4): 429-47.
234. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001; 411(6835): 375-9.
235. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11(1): 54-9.
236. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004; 432(7015): 332-7.
237. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, et al. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol.* 1999; 277(2 Pt 1): C183-201.
238. Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem.* 2007; 101(4): 830-9.
239. Guaita S, Puig I, Franci C, et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem.* 2002; 277(42): 39209-16.
240. Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol.* 2002; 161(5): 1881-91.
241. De Craene B, van Roy F, Berx G. Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal.* 2005; 17(5): 535-47.
242. Shioiri M, Shida T, Koda K, et al. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer.* 2006; 94(12): 1816-22.

243. Li X, Deng W, Nail CD, et al. Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene*. 2006; 25(4): 609-21.
244. Kasai H, Allen JT, Mason RM, et al. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res*. 2005; 6:56.
245. Kretzschmar M, Massagué J. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8(1): 103-11.
246. Yu L, Hébert MC, Zhang YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J*. 2002; 21(14): 3749-59.
247. Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol*. 2005; 52(2): 329-37.
248. Lee YH, Kayyali US, Sousa AM, et al. Transforming growth factor-beta1 effects on endothelial monolayer permeability involve focal adhesion kinase/Src. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37(4): 485-93.
249. Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, et al. Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(10): 3804-16.
250. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007; 39(3): 305-18.
251. Palacios F, Tushir JS, Fujita Y, et al. Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(1): 389-402.
252. Smalley MJ, Dale TC. Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 1999; 18(2): 215-30.
253. Amin MA, Haas CS, Zhu K, et al. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood*. 2006; 107(6): 2252-61.

254. Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, et al. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol.* 1997; 139(5): 1337-48.
255. Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2003; 22(4): 359-74.
256. Persad S, Dedhar S. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2003; 22(4): 375-84.
257. Doglioni C, Piccinin S, Demontis S, et al. Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol.* 2003; 163(6): 2277-87.
258. Li Y, Yang J, Dai C, et al. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest.* 2003; 112(4): 503-16.
259. Sakai T, Li S, Docheva D, et al. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev.* 2003; 17(7): 926-40.
260. Li F, Zhang Y, Wu C. Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions but not cell-cell adhesion sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats. *J Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 24): 4589-99.
261. Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, et al. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2005; 168(1): 29-33.
262. Oh M, Kim H, Yang I, et al. GSK-3 phosphorylates delta-catenin and negatively regulates its stability via ubiquitination/proteasome-mediated proteolysis. *J Biol Chem.* 2009 Oct 16; 284(42): 28579-89.

263. Zhou BP, Hung MC. Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3beta and beta-Trcp in the regulation of metastasis. *Cell Cycle*. 2005; 4(6): 772-6.
264. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 759-806.
265. Deka J, Wiedemann N, Anderle P, et al. Bcl9/Bcl9l are critical for Wnt-mediated regulation of stem cell traits in colon epithelium and adenocarcinomas. *Cancer Res*. 2010; 70(16): 6619-28.
266. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*. 2008; 452(7187): 650-3.
267. Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci*. 2007; 98(10): 1512-20.
268. Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, et al. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat*. 2008; 11(4-5): 123-51.
269. Neth P, Ries C, Karow M, et al. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev*. 2007; 3(1): 18-29.
270. Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(9): 672-9.
271. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010; 29(34): 4741-51.
272. Creighton CJ, Li X, Landis M, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(33): 13820-5.

273. Robson EJ, Khaled WT, Abell K, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines. *Differentiation*. 2006; 74(5): 254-64.
274. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008; 133(4): 704-15.
275. Morel AP, Lièvre M, Thomas C, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2008; 3(8): e2888.
276. Vesuna F, Lisok A, Kimble B, et al. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*. 2009; 11(12): 1318-28.
277. May CD, Sphyris N, Evans KW, et al. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(1): 202.
278. Ansieau S. EMT in breast cancer stem cell generation. *Cancer Lett*. 2013; 338(1): 63-8.
279. Battula VL, Evans KW, Hollier BG, et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2010; 28(8): 1435-45.
280. Wellner U, Schubert J, Burk UC, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*. 2009; 11(12): 1487-95.
281. Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, et al. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell*. 2012; 148(5): 1015-28.
282. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med*. 2009; 15(9): 1010-2.
283. Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, et al. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol*. 2012; 13(2): e83-9.

284. Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, et al. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell*. 2013; 154(1): 61-74.
285. Jolly MK, Huang B, Lu M, et al. Towards elucidating the connection between epithelial-mesenchymal transitions and stemness. *J R Soc Interface*. 2014; 11(101): 20140962.
286. Ombrato L, Malanchi I. The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation. *Crit Rev Oncog*. 2014; 19(5): 349-61.
287. Liu S, Cong Y, Wang D, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*. 2013; 2(1): 78-91.
288. Shafee N, Smith CR, Wei S, et al. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res*. 2008; 68(9): 3243-50.
289. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(12): 4234-41.
290. Barrière G, Tartary M, Rigaud M. Epithelial mesenchymal transition: a new insight into the detection of circulating tumor cells. *ISRN Oncol*. 2012; 2012: 382010.
291. Aalaoui-Jamali M, Bijian K, Batist G. Emerging drug discovery approaches for selective targeting of "precursor" metastatic breast cancer cells: highlights and perspectives. *Am J Transl Res*. 2011; 3(5): 434-44.
292. Liu H, Zhang HW, Sun XF, et al. Tamoxifen-resistant breast cancer cells possess cancer stem-like cell properties. *Chin Med J (Engl)*. 2013; 126(16): 3030-4.

293. Liu Y, Zhang X, Liu J, et al. Everolimus in combination with letrozole inhibit human breast cancer MCF-7/Aro stem cells via PI3K/mTOR pathway: an experimental study. *Tumour Biol.* 2014; 35(2): 1275-86.
294. Zhang X, Zhang S, Liu Y, et al. Effects of the combination of RAD001 and docetaxel on breast cancer stem cells. *Eur J Cancer.* 2012; 48(10): 1581-92.
295. Zhu Y, Zhang X, Liu Y, et al. Antitumor effect of the mTOR inhibitor everolimus in combination with trastuzumab on human breast cancer stem cells in vitro and in vivo. *Tumour Biol.* 2012; 33(5): 1349-62.
296. Piccart M, Hortobagyi GN, Campone M, et al. Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2†. *Ann Oncol.* 2014; 25(12): 2357-62.
297. Kondratyev M, Kreso A, Hallett RM, et al. Gamma-secretase inhibitors target tumor-initiating cells in a mouse model of ERBB2 breast cancer. *Oncogene.* 2012; 31(1): 93-103.
298. Rasul S, Balasubramanian R, Filipović A, et al. Inhibition of gamma-secretase induces G2/M arrest and triggers apoptosis in breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2009; 100(12): 1879-88.
299. Krop I, Demuth T, Guthrie T, et al. Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2012; 30(19): 2307-13.
300. Ramaswamy B, Lu Y, Teng KY, et al. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. *Cancer Res.* 2012; 72(19): 5048-59.
301. Al-Hussaini H, Subramanyam D, Reedijk M, et al. Notch signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10(1): 9-15.

302. Wang Z, Smith KS, Murphy M, et al. Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature*. 2008; 455(7217): 1205-9.
303. Shimo T, Kurebayashi J, Kanomata N, et al. Antitumor and anticancer stem cell activity of a poly ADP-ribose polymerase inhibitor olaparib in breast cancer cells. *Breast Cancer*. 2014; 21(1): 75-85.
304. Bhat-Nakshatri P, Goswami CP, Badve S, et al. Identification of FDA-approved drugs targeting breast cancer stem cells along with biomarkers of sensitivity. *Sci Rep*. 2013; 3: 2530.
305. Bryan M, Pulte ED, Toomey KC, et al. A pilot phase II trial of all-trans retinoic acid (Vesanoïd) and paclitaxel (Taxol) in patients with recurrent or metastatic breast cancer. *Invest New Drugs*. 2011; 29(6): 1482-7.
306. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. 2009; 138(4): 645-59.
307. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsiçhlis PN, et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res*. 2009; 69(19): 7507-11.
308. Saeki T, Nomizu T, Toi M, et al. Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25(4): 411-7.
309. Zhang Y, Zhang H, Wang X, et al. The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles. *Biomaterials*. 2012; 33(2): 679-91.
310. Bross PF, Beitz J, Chen G, et al. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(6): 1490-6.
311. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006; 12(10): 1167-74.

312. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(1): 31-42.
313. Waldron NN, Kaufman DS, Oh S, et al. Targeting tumor-initiating cancer cells with dCD133KDEL shows impressive tumor reductions in a xenotransplant model of human head and neck cancer. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10(10): 1829-38.
314. Melton C, Judson RL, Belloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 2010; 463(7281): 621-6.
315. Korkaya H, Kim GI, Davis A, et al. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol Cell*. 2012; 47(4): 570-84.
316. Bilancia D, Rosati G, Dinota A, et al. Lapatinib in breast cancer. *Ann Oncol*. 2007; 18 Suppl 6: vi26-30.
317. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest*. 2010; 120(2): 485-97.
318. Singh JK, Farnie G, Bundred NJ, et al. Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(3): 643-56.
319. Chen YL, Lv J, Ye XL, et al. Sorafenib inhibits transforming growth factor β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes. *Hepatology*. 2011; 53(5): 1708-18.
320. Steinestel J, Cronauer MV, Müller J, et al. Overexpression of p16(INK4a) in urothelial carcinoma in situ is a marker for MAPK-mediated epithelial-mesenchymal transition but is not related to human papillomavirus infection. *PLoS One*. 2013; 8(5): e65189.

321. Feldmann G, Fendrich V, McGovern K, et al. An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(9): 2725-35.
322. Peláez-García A, Barderas R, Torres S, et al. FGFR4 role in epithelial-mesenchymal transition and its therapeutic value in colorectal cancer. *PLoS One.* 2013; 8(5): e63695.
323. Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res.* 2008; 68(7): 2391-9.
324. Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, et al. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8(7): 618-26.
325. Park CY, Kim DK, Sheen YY. EW-7203, a novel small molecule inhibitor of transforming growth factor- β (TGF- β) type I receptor/activin receptor-like kinase-5, blocks TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Cancer Sci.* 2011; 102(10): 1889-96.
326. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufí S, et al. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. *Cell Cycle.* 2010; 9(18): 3807-14.
327. Shankar S, Nall D, Tang SN, et al. Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One.* 2011; 6(1): e16530.
328. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(5): 329-40.
329. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aus Med J* 1869; 14: 146-9.

330. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2014; 15(4): 406-14.
331. Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, et al; SUCCESS Study Group. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 106(5).
332. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem.* 2013; 59(1): 110-8.
333. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(6): 448-56.
334. Norton L, Massagué J. Is cancer a disease of self-seeding? *Nat Med.* 2006; 12(8): 875-8.
335. Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, et al. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer.* 2009; 101(4): 589-97.
336. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(4): 1392-400.
337. Schindlbeck C, Andergassen U, Hofmann S, et al. Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013; 139(6): 1055-62.
338. Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(8): 793-802.
339. van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, et al. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res.* 2011; 71(18): 5955-60.

340. Kaiser J. *Medicine*. Cancer's circulation problem. *Science*. 2010; 327(5969): 1072-4.
341. Ignatiadis M, Rothé F, Chaboteaux C, et al. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PLoS One*. 2011; 6(1): e15624.
342. Lianidou ES, Markou A, Strati A. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer: challenges and promises for individualized cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*. 2012; 31(3-4): 663-71.
343. Hoon DS, Ferris R, Tanaka R, et al. Molecular mechanisms of metastasis. *J Surg Oncol*. 2011; 103(6): 508-17.
344. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012; 366(10): 883-92.
345. Fehm T, Müller V, Alix-Panabières C, et al. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. *Breast Cancer Res*. 2008; 10 Suppl 1: S1.
346. Amir E, Clemons M, Purdie CA, et al. Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. *Cancer Treat Rev*. 2012; 38(6): 708-14.
347. Powell AA, Talasz AH, Zhang H, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One*. 2012; 7(5): e33788.
348. Broersen LH, van Pelt GW, Tollenaar RA, et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2014; 37(1): 9-15.
349. Wong NS, Kahn HJ, Zhang L, et al. Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 99(1): 63-9.

350. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res.* 2011; 31(2): 427-41.
351. Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol.* 2000; 156(1): 57-63.
352. Zheng S, Lin H, Liu JQ, et al. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *J Chromatogr A.* 2007; 1162(2): 154-61.
353. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry.* 2002; 49(4): 150-8.
354. Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, et al. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res.* 2003; 162: 149-55.
355. Galanzha EI, Zharov VP. Circulating Tumor Cell Detection and Capture by Photoacoustic Flow Cytometry in Vivo and ex Vivo. *Cancers (Basel).* 2013; 5(4): 1691-738.
356. Zhang Z, Xu J, Hong B, et al. The effects of 3D channel geometry on CTC passing pressure--towards deformability-based cancer cell separation. *Lab Chip.* 2014; 14(14): 2576-84.
357. Moon HS, Kwon K, Kim SI, et al. Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP). *Lab Chip.* 2011; 11(6): 1118-25.
358. Alazzam A, Stiharu I, Bhat R, et al. Interdigitated comb-like electrodes for continuous separation of malignant cells from blood using dielectrophoresis. *Electrophoresis.* 2011; 32(11): 1327-36.
359. Went PT, Lugli A, Meier S, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol.* 2004; 35(1): 122-8.

360. Failli A, Legitimo A, Migheli F, et al. Efficacy and feasibility of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) immunomagnetic cell sorter for studies of DNA methylation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2013; 15(1): 44-57.
361. Iinuma H, Okinaga K, Adachi M, et al. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2000; 89(4): 337-44.
362. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(3): 920-8.
363. Bluemke K, Bilkenroth U, Meye A, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma correlates with prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(8): 2190-4.
364. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, et al. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res.* 2012; 14(1): R15.
365. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007; 450(7173): 1235-9.
366. Naume B, Borgen E, Tøssvik S, et al. Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy.* 2004; 6(3): 244-52.
367. Kroes R, Williams GM, Weisburger JH. Early appearance of serum -fetoprotein during hepatocarcinogenesis as a function of age of rats and extent of treatment with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 1972; 32(7): 1526-32.
368. Shi W, Paproski RJ, Moore R, et al. Detection of circulating tumor cells using targeted surface-enhanced Raman scattering nanoparticles and magnetic enrichment. *J Biomed Opt.* 2014; 19(5): 056014.

369. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(1): 61-6.
370. Lu J, Fan T, Zhao Q, et al. Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2010; 126(3): 669-83.
371. Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nat Protoc.* 2014; 9(3): 694-710.
372. Cristofanilli M. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* 2006; 33(3 Suppl 9): S9-14.
373. Kallergi G, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells. *Mol Med.* 2007; 13(1-2): 79-88.
374. Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukaraki V, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2009; 11(6): R84.
375. Spiliotaki M, Mavroudis D, Kapranou K, et al. Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy. *Breast Cancer Res.* 2014; 16(6): 485.
376. Deng G, Herrler M, Burgess D, et al. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(4): R69.
377. Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, et al. High speed detection of circulating tumor cells. *Biosens Bioelectron.* 2006; 21(10): 1893-9.
378. Balic M, Williams A, Dandachi N, et al. Micrometastasis: detection methods and clinical importance. *Cancer Biomark.* 2010; 9(1-6): 397-419.

379. Gao X, Yang L, Petros JA, et al. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16(1): 63-72.
380. Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43(6): 617-27.
381. Scholtens TM, Schreuder F, Ligthart ST, et al. CellTracks TDI: an image cytometer for cell characterization. *Cytometry A.* 2011; 79(3): 203-13.
382. Wang N, Shi L, Li H, et al. Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry: a valuable tool for diagnosis and prognosis evaluation. *Tumour Biol.* 2012; 33(2): 561-9.
383. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol.* 2012; 41(4): 1241-50.
384. Sequist LV, Nagrath S, Toner M, et al. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *J Thorac Oncol.* 2009; 4(3): 281-3.
385. Horák D, Svobodová Z, Autebert J, et al. Albumin-coated monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with immobilized antibodies: application to the capture of epithelial cancer cells. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101(1): 23-32.
386. Harb W, Fan A, Tran T, et al. Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. *Transl Oncol.* 2013; 6(5): 528-38. eCollection 2013.
387. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(43): 18392-7.

388. Riahi R, Gogoi P, Sepehri S, et al. A novel microchannel-based device to capture and analyze circulating tumor cells (CTCs) of breast cancer. *Int J Oncol.* 2014; 44(6): 1870-8.
389. Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1994; 54(11): 2986-90.
390. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, et al. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med.* 2006; 12(3): 130-9.
391. Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull.* 2010; 94: 49-64.
392. Smith B, Selby P, Southgate J, et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet.* 1991; 338(8777): 1227-9.
393. Agrawal B, Krantz MJ, Parker J, et al. Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation. *Cancer Res.* 1998; 58(18): 4079-81.
394. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(14): 5145-51.
395. Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int J Cancer.* 2006; 119(7): 1654-9.
396. Strati A, Kasimir-Bauer S, Markou A, et al. Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2013; 15(2): R20.
397. Payne RE, Wang F, Su N, et al. Viable circulating tumour cell detection using multiplex RNA in situ hybridisation predicts progression-free survival in metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2012; 106(11): 1790-7.

398. Peeters DJ, De Laere B, Van den Eynden GG, et al. Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *Br J Cancer*. 2013; 108(6): 1358-67.
399. Van der Auwera I, Peeters D, Benoy IH, et al. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 2010; 102(2): 276-84.
400. Müller V, Riethdorf S, Rack B, et al; DETECT study group. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and AdnaTest Breast™ in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. *Breast Cancer Res*. 2012; 14(4): R118.
401. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med*. 2012; 10: 138.
402. Connolly GC, Khorana AA, Kuderer NM, et al. Leukocytosis, thrombosis and early mortality in cancer patients initiating chemotherapy. *Thromb Res*. 2010; 126(2):113-8.
403. Kasuga I, Makino S, Kiyokawa H, et al. Tumor-related leukocytosis is linked with poor prognosis in patients with lung carcinoma. *Cancer*. 2001; 92(9):2399-405.
404. Androulakis N, Agelaki S, Perraki M, et al. Clinical relevance of circulating CK-19mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2012; 106:1917-1925.
405. Xenidis N, Markos V, Apostolaki S, et al. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 18:1623-1631.

406. Zhang L, Riethdorf S, Wu G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18:5701-5710.
407. Liu MC, Shields PG, Warren RD, et al. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5153-5159.
408. Smith BM, Slade MJ, English J, et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 2000; 18:1432-1439.
409. Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol* 2014; 32:3483-3489.
410. Georgoulas V, Bozionelou V, Agelaki S, et al. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. *Ann Oncol* 2012; 23:1744-1750.
411. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013; 59:110-118.
412. Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11:129-144.
413. Muller V, Riethdorf S, Rack B, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System and AdnaTest Breast in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. *Breast Cancer Res* 2012; 14:R118.
414. Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118:277-279.
415. Yoon HJ, Kim TH, Zhang Z, et al. Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets. *Nat Nanotechnol* 2013; 8:735-741.

416. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-52.
417. Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci* 2008; 121:249-253.
418. Lin SY, Xia W, Wang JC, et al. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:4262-4266.
419. Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, et al. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 2001; 20:8109-8115.
420. O'Brate A, Giannakakou P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat* 2003; 6:313-322.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

- Αναρτημένη ανακοίνωση: 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα, 26/04/2012 - 28/04/2012
- Ελεύθερη ανακοίνωση (2^ο βραβείο): 3^ο Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας, Ιωάννινα, 21-23 Απριλίου 2016

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ (αλφαβητικά)

7-AAD	7-aminoactinomycin D
ABC	ATP Binding Cassette
ABC	ATP-binding cassette
ADH	Αλκοολικών Δεϋδρογονασών
AFP	α-Εμβρυϊκή Σφαιρίνη
ALDHs	Αλδεϋδικές Δεϋδρογενάσες
APC	AlloPhycoCyanin
ATRA	All-Tans Retinoic Acid
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Cell Adhesion Matrix
CK	Cytokeratin
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
CSC	Νεοπλασματικά Στελεχιαία Κύτταρα (Cancer Stem Cells)
CTC-M	Meseschymal Transition Phenotype
CTC-MS	Ταυτόχρονη έκφραση των δύο φαινοτύπων
CTC-S	Stem Cell Phenotype
CUP	Carcinoma of Undetermined Primary Origin
dapi	4', 6-doamidino-2-phenylindole
DEP	Dielectrophoresis

EDTA	EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FAST	Fiber-Optic Array Scanning Technology
FBS	Fetal Bovine Serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor
GSK-3	Glucogen Synthase Kinase-3
HGF\SF	Hepatocyte Growth Factor\Scatter Factor
HN	Head & Neck
HSC	Αιμοποιητικά Stem Κύτταρα
ICM	Inner Cell Mass
ILK	Integrin Linked Kinase
ISCT	International Society of Cellular Therapy
ISET	Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells
LRCs	Label – Retaining Cells
LSC	Laser Scanning Cytometer
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MEMS	Micro Electro-Mechanical System
MLCK	Myosin Light-Chain Kinase
MMP	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
MOFF	Multiorifice Flow Fractionation
MRI	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
MSC	Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα

N	Nodal
NaN ₃	Αζίδιο του Νατρίου
NF-κB	Nuclear Factor κB
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Peritoneal Carcinomatosis
PcG	Polycomb Group protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων
PFA	Paraformaldehyde
PKC	Protein Kinase C
PS	Performance Status
RARE™	Rosettesep-Applied imaging Rare Event
R-Smads	Receptor Regulated Smad
RTK	Receptor Tyrosin Kinase
RTKs	Υποδοχείς τυροσινικής κινάσης
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SERS	Surface-Enhanced Raman Scattering
SERS	Surface-Enhanced Raman Scattering
SP	Side Population
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAC	Transit Amplifying Cell

TGF-β	Transforming Growth Factor
TIMP	Αναστολείς των MMP
TSP-1	Θρομβοσποντίνη-1
UPT	Unknown Primary Tumours
V	Visceral
VEGF	Αγγειακός Αυξητικός Παράγοντας του Ενδοθηλίου
α-SMA	α-ακτίνη λείων μυϊκών κυττάρων
β-HCG	Ανθρώπινη Χοριακή Γοναδοτροπίνη
BMP	Bone Marrow Protein
ΔΚΚ	Διεσπαρμένα Καρκινικά Κύτταρα
EMT	Επιθηλιακής-Μεσεγχυματικής Μετατροπής
ΚΑΠΕ	Καρκινώματα Άγνωστης Πρωτοπαθούς Εστίας
ΚΒΚ	Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων
ΚΚΚ	Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
PI3K	Φωσφατιδυλοϊνοσιτολη-3-κινάση