



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ**

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΑΡΙΑ ΤΣΕΚΡΕΚΟΥ (1399)

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

*Αφιερώνεται
σε όσους σκίρτησαν αλλά συνέχισαν*

Πρόλογος

Η μετάσταση θεωρείται ανίατη ασθένεια και αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου στον Δυτικό κόσμο. Κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, τα οποία αποκολλώνται από την πρωτογενή εστία του όγκου και ανιχνεύονται στην κυκλοφορία του αίματος, ενοχοποιούνται για την εγκαθίδρυση μεταστάσεων και καταβάλλεται έντονη ερευνητική προσπάθεια για την απομόνωσή τους και τον χαρακτηρισμό τους. Απώτερος στόχος είναι αφενός η διαλεύκανση της βιολογίας της μετάστασης αφετέρου η ανάπτυξη νέων μεθόδων παρακολούθησης της νόσου καθώς και νέων φαρμάκων.

Η εργασία με θέμα

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μεταγονιδιωματικών Εφαρμογών του IMBB-ITE και μου ανατέθηκε από τον Ερευνητή Α' Δ. Καφετζόπουλο με την συνεπίβλεψη του Καθηγητή Ι. Παπαμαθθαϊάκη στα πλαίσια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Στην εργασία αυτή πραγματοποιείται σύγκριση πέντε επιλεγμένων μεθόδων απομόνωσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων ως προς την απόδοση, την καθαρότητα και την βιωσιμότητα των ανακτώμενων κυττάρων.

Απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση και συγγραφή αυτής της εργασίας. Κατ'αρχάς, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον ερευνητή Δρ. Δημήτρη Καφετζόπουλο για την στήριξή του καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας αλλά και των σπουδών μου και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Σε όσους εθελοντικά έδωσαν αίμα για τις πειραματικές ανάγκες της εργασίας. Στην Χαρά Βλαττά, υπεύθυνη του κυτταρομέτρου ροής, για την ευελιξία της και την ικανότητά της να δημιουργεί χώρο στο πιεσμένο της πρόγραμμα για τις αναλύσεις μου. Στην Δέσποινα Βάσσου, μέλος του εργαστηρίου Μεταγονιδιωματικών Εφαρμογών, για τις συμβουλές της και την φιλία της. Στον σύντροφό μου Γοργία Καλαϊτζάκη, για την συντακτική επιμέλεια του κειμένου και τις εύστοχες παρατηρήσεις του. Τέλος, στην οικογένειά μου για την πολύτιμη ηθική και οικονομική στήριξη κατά την διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

Μαρία Τσεκρέκου
Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2012

Περίληψη

Κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών αυξάνονται συνεχώς τα στοιχεία, τα οποία συνδέουν τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) με την εμφάνιση μεταστατικής νόσου, της κύριας αιτίας θανάτου από καρκίνο. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν καταδείξει την πιθανή προγνωστική και διαγνωστική αξία των CTCs, ιδιαίτερα στον καρκίνο του μαστού. Κατά συνέπεια, ο μοριακός και γενετικός χαρακτηρισμός των CTCs καθίσταται απαραίτητος για την κατανόηση της βιολογίας της μετάστασης αλλά και για την ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων κλινικών μεθόδων. Βασικός περιορισμός στην ανάλυση των CTCs είναι ο μικρός αριθμός τους στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Επί του παρόντος, ανιχνεύονται συνδυάζοντας δύο βήματα: την απομόνωση/εμπλουτισμό και την ανίχνευση. Στην βιβλιογραφία, έχουν περιγραφεί πληθώρα μεθόδων εμπλουτισμού, πολλές από τις οποίες χρησιμοποιούνται χωρίς να έχει πραγματοποιηθεί συστηματική αξιολόγησή τους. Επιπλέον, οι τεχνικές αυτές αξιοποιούν διαφορετικές κυτταρικές ιδιότητες για τον διαχωρισμό των κυττάρων, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν πολύ διαφορετικά αποτελέσματα. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η συγκριτική αξιολόγηση πέντε μεθόδων απομόνωσης ως προς την απόδοση, την καθαρότητα και την βιωσιμότητα των ανακτώμενων κυττάρων. Επιλέχθηκαν οι (α) διήθηση, (β) φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας, (γ) σχηματισμός ανοσοροζεττών (δύο πρωτόκολλα), (δ) θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια και (ε) αρνητική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια. Οι δύο πρώτες διαχωρίζουν τα κύτταρα με βάση φυσικές ιδιότητες (μέγεθος και πυκνότητα αντιστοιχώς), ενώ οι υπόλοιπες αξιοποιούν την έκφραση επιφανειακών δεικτών για την θετική ή την αρνητική επιλογή των κυττάρων στόχων. Η επαναληψιμότητα των πειραμάτων εξασφαλίζεται με την χρήση τεχνητών δειγμάτων, δηλαδή δειγμάτων αίματος υγιών ατόμων, στα οποία προστίθεται καθορισμένος αριθμός σημασμένων με πράσινη φθορίζουσα χρωστική καρκινικών κυττάρων MCF-7 (κυτταρική σειρά καρκίνου τού μαστού). Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις συγκεντρώσεις 1000, 100 και 10 MCF-7/mL αίματος. Ακολουθεί ο εμπλουτισμός με μία από τις επιλεγμένες μεθόδους κάθε φορά. Τα προϊόντα εμπλουτισμού υφίστανται δοκιμασία βιωσιμότητας, με αποτέλεσμα τα ζώντα κύτταρα να αποκτούν μπλε φθορισμό. Η απόδοση, ο βαθμός εμπλουτισμού και η βιωσιμότητα των ανακτώμενων κυττάρων αξιολογούνται με κυτταρομετρία ροής και χρήση εσωτερικού δείγματος ελέγχου για τον προσδιορισμό απόλυτων αριθμών κυττάρων. Η διήθηση παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις λόγω τεχνικών προβλημάτων και κρίνεται ότι χρίζει περαιτέρω διερεύνησης. Από τις υπόλοιπες μεθόδους, η θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια παρουσίασε την υψηλότερη καθαρότητα και μέτρια απόδοση, ενώ η αρνητική επιλογή την υψηλότερη απόδοση και χαμηλή καθαρότητα.

Βραχυγραφίες

bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CK	Cytokeratin
CSCs	Cancer Stem Cells
CTCs	Circulating Tumour Cells
CTM	Circulating Tumour Microemboli
CTSCs	Circulating Tumour Stem Cells
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole (4',6-διαμιννο-2-φαινολ-ινδόλιο)
DCIS	Ductal Carcinoma <i>in situ</i>
DFS	Disease Free Survival
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DTCs	Disseminated Tumour Cells
ECM	ExtraCellular Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMT	Epithelial-to-Menchymal Transition
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER α	Estrogen Receptor α
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAST	Fibre-optic Array Scanning Technology
FBS	Fetal Bovine Serum
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridisation
FSC	Forward-Scattered light
GFP	Green Fluorescent Protein
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HSV	Herpes Simplex Virus
IF	ImmunoFluorescence
IHC	ImmunoHistoChemistry
ISET	Isolation by Size of Epithelial Tumour cells
LCIS	Lobular Carcinoma <i>in situ</i>
LOX	Lysyl Oxidase, Οξειδάση της λυσίνης
LSC	Laser Scanning Cytometer
MET	Mesenchymal-to-Epithelial Transition
MIC	Multiphoton Intravital flow Cytometry
mRT-PCR	multiplex RT-PCR
NOS	Nitric Oxide Synthase
OS	Overall Survival
PAFC	PhotoAcoustic Flow Cytometry
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
PE	Phycoerythrin
PFS	Progression Free Survival

PR	Progesterone Receptor
qPCR	quantitative PCR (ποσοτική PCR)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Room Temperature (θερμοκρασία δωματίου)
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR (Αντίστροφη μεταγραφή και PCR)
SSC	Side-Scattered Light
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
VEGF A	Vesicular Endothelial Growth Factor α

Περιεχόμενα

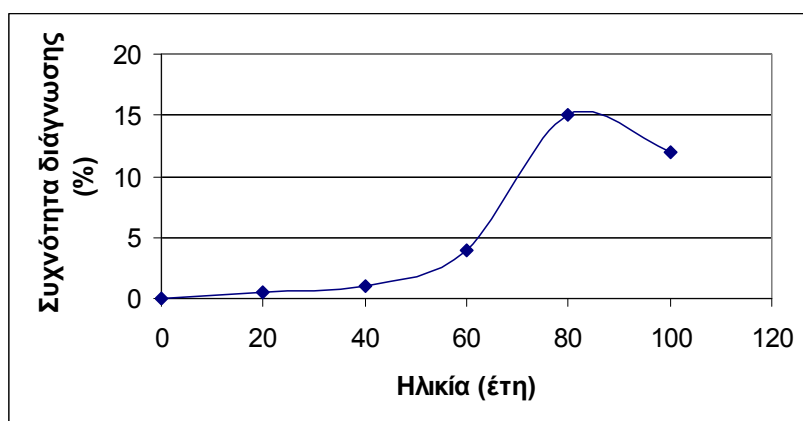
Πρόλογος	3
Περίληψη	4
Βραχυγραφίες.....	5
1. Επισκόπηση της Βιβλιογραφίας.....	9
1.1. Εισαγωγή	10
1.2. Μοριακός μηχανισμός τής διήθησης και EMT.....	13
1.3. Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα.....	16
1.4. Ο καρκίνος τού μαστού	16
1.5. Δείκτες ορού αίματος για τον καρκίνο του μαστού	19
1.6. Κλινική Συσχέτιση των CTCs	20
1.7. Ετερογένεια και Δείκτες των CTCs	22
1.8. Απομόνωση και ανίχνευση των CTCs	28
1.8.1. Παράμετροι αξιολόγησης των μεθόδων απομόνωσης και ανίχνευσης	28
1.8.2. Μέθοδοι απομόνωσης/εμπλουτισμού	29
1.8.2.1. Φυσικές μέθοδοι.....	30
ISET	31
Απλή διήθηση	32
Διαχωρισμός Διαβάθμισης Πυκνότητας.....	32
Διηλεκτροφόρηση.....	33
Διήθηση υπό πίεση	34
1.8.2.2. Ανοσολογικές μέθοδοι.....	35
Μαγνητικά σφαιρίδια	36
Θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια.....	37
Αρνητική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια	38
Αρνητική επιλογή με σχηματισμό ανοσοροζεττών	38
Θετική επιλογή με το CTC Chip.....	39
1.8.2.3. Άλλες μέθοδοι εμπλουτισμού	41
Δοκιμασία CAM	41
1.8.3. Μέθοδοι ανίχνευσης.....	43
1.8.3.1. Κυτταρομετρικές μικροσκοπικές τεχνικές	44
Τεχνολογίες απεικόνισης.....	44
1.8.3.2. Κυτταρομετρία ροής.....	44
1.8.3.3. Μοριακές τεχνικές.....	48
1.8.3.4. Πρωτεϊνικές τεχνικές	49
1.8.4. Συνδυαστικές μέθοδοι.....	49
1.8.4.1. CellSearch.....	49
1.8.4.2. AdnaTest	50
1.8.5. Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης.....	51
Ανίχνευση μέσω αδενοϊκών φορέων	51
In vivo Φωτοχημική Κυτταρομετρία Ροής.....	52
Πολυφωτονική in vivo κυτταρομετρία ροής.....	53
1.9. Σκοπός της εργασίας.....	55
2. Πειραματικό μέρος	57
2.1. Υλικά και Μέθοδοι	58
2.1.1. Μέθοδος αξιολόγησης.....	58

2.1.2.	Κυτταρικές σειρές	60
2.1.3.	Φθορίζουσες χρώσεις	61
	Γενική χρώση	61
	Χρώση με φθορίζον αντίσωμα anti-EpCAM	62
2.1.4.	Δοκιμασία βιωσιμότητας	63
2.1.5.	Ερυθρόλυση με χλωριούχο αμμώνιο	64
2.1.6.	Μέθοδοι απομόνωσης	65
2.1.6.1.	Διήθηση	65
2.1.6.2.	Φυγοκέντρωση Διαβάθμισης Πυκνότητας.....	66
2.1.6.3.	Εμπλουτισμός με σχηματισμό ανοσοροζεττών	66
2.1.6.4.	Θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια	67
2.1.6.5.	Αρνητική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια	68
2.1.7.	Αποτελέσματα	70
2.1.7.1.	Εμπλουτισμός με Διήθηση	70
2.1.7.2.	Εμπλουτισμός με Φυγοκέντρωση Διαβάθμισης Πυκνότητας.....	71
2.1.7.3.	Εμπλουτισμός με το RosetteSep Tumour Epithelial Enrich.....	72
2.1.7.4.	Εμπλουτισμός με το RosetteSep CD45 Depletion.....	74
2.1.7.5.	Εμπλουτισμός με το Dynabeads CELlection.....	75
2.1.7.6.	Εμπλουτισμός με το Dynabeads CD45.....	76
2.2.	Σύνοψη αποτελεσμάτων-Συμπεράσματα	78
3.	Συζήτηση	82
4.	Βιβλιογραφία.....	86

1. Επισκόπηση της Βιβλιογραφίας

1.1. Εισαγωγή

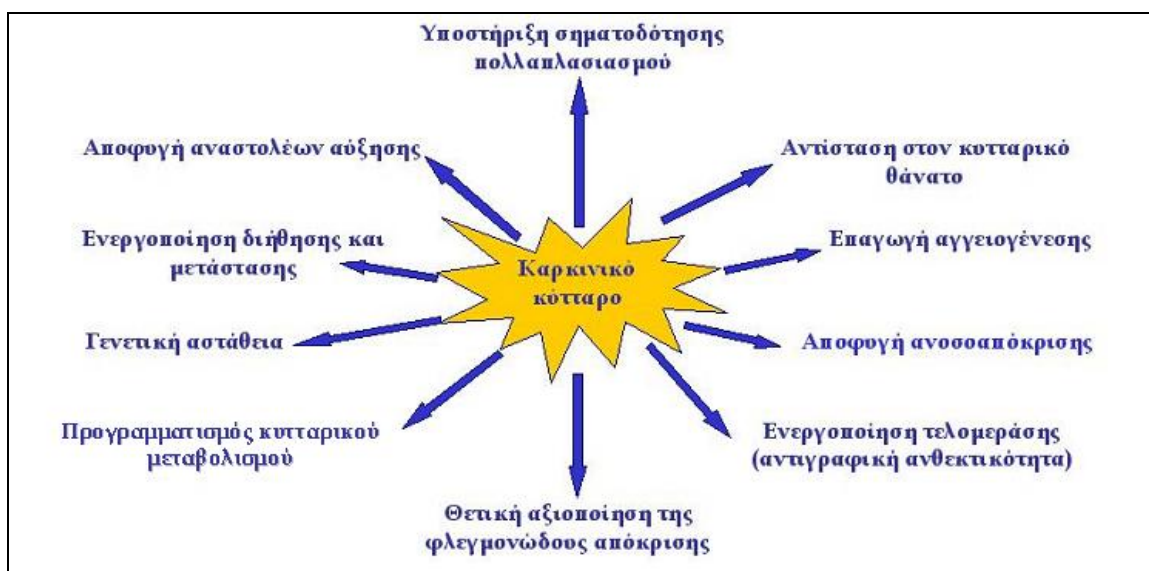
Στα όργανα και τους ιστούς των ώριμων ζώων επικρατεί ισορροπία μεταξύ της κυτταρικής ανανέωσης και του κυτταρικού θανάτου. Κάθε τύπος ώριμου κυττάρου χαρακτηρίζεται από ορισμένη διάρκεια ζωής. Καθώς κύτταρα πεθαίνουν με απόπτωση αντικαθίστανται από νέα κύτταρα του ίδιου τύπου μέσω πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων. Στους ιστούς, υπό φυσιολογικές συνθήκες, διατηρείται ισορροπία μεταξύ των αποπτωτικών κυττάρων και των κυττάρων, τα οποία τα αντικαθιστούν κατά συνέπεια ο πληθυσμός των κυττάρων του ιστού παραμένει σταθερός. Υπάρχουν, ωστόσο, περιπτώσεις κατά τις οποίες κάποιος κυτταρικός πληθυσμός δεν ανταποκρίνεται στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της κυτταρικής ανάπτυξης, με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα σχηματίζοντας όγκο ή νεόπλασμα. Οι όγκοι ταξινομούνται ως καλοήθεις, όταν δεν αναπτύσσονται απεριόριστα και δεν διηθούν τους περιβάλλοντες ιστούς, και ως κακοήθεις, όταν αυξάνονται διαρκώς, καθίστανται προοδευτικά διηθητικοί και εμφανίζουν μεταστάσεις. Ο όρος καρκίνος αναφέρεται ειδικά στους κακοήθεις όγκους. Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να αναπτύσσονται εκτοπικά μπορεί να προκαλέσει ακόμα και τον θάνατο του οργανισμού, στον οποίο εμφανίζονται.



Εικόνα 1 | Η συχνότητα της διάγνωσης νέων περιπτώσεων σε συνάρτηση με την ηλικία.

Η συχνότητα διάγνωσης νέων περιπτώσεων καρκίνου αυξάνεται σημαντικά σε συνάρτηση με την ηλικία και συγκεκριμένα εκθετικά από τα 40 έως τα 80 έτη οπότε και σταθεροποιείται (Εικ.1). Αυτό υποδεικνύει, ότι η κακοήθης εξαλλαγή είναι το αποτέλεσμα σειράς ανεξάρτητων γεγονότων. Η καρκινογένεση δηλαδή συνιστά πολυσταδιακή διεργασία, η οποία περιλαμβάνει (α) ένα αρχικό μεταλλαξιγόνο συμβάν σε φυσιολογικά κύτταρα, ικανό να προάγει την ογκογένεση, (β) επιπρόσθετες αλλαγές, οι οποίες ενισχύουν το ογκογόνο υπόβαθρο, (γ) επιλογή των καρκινικών κυττάρων με το επιθετικότερο δυναμικό και (δ) εξέλιξη του όγκου.

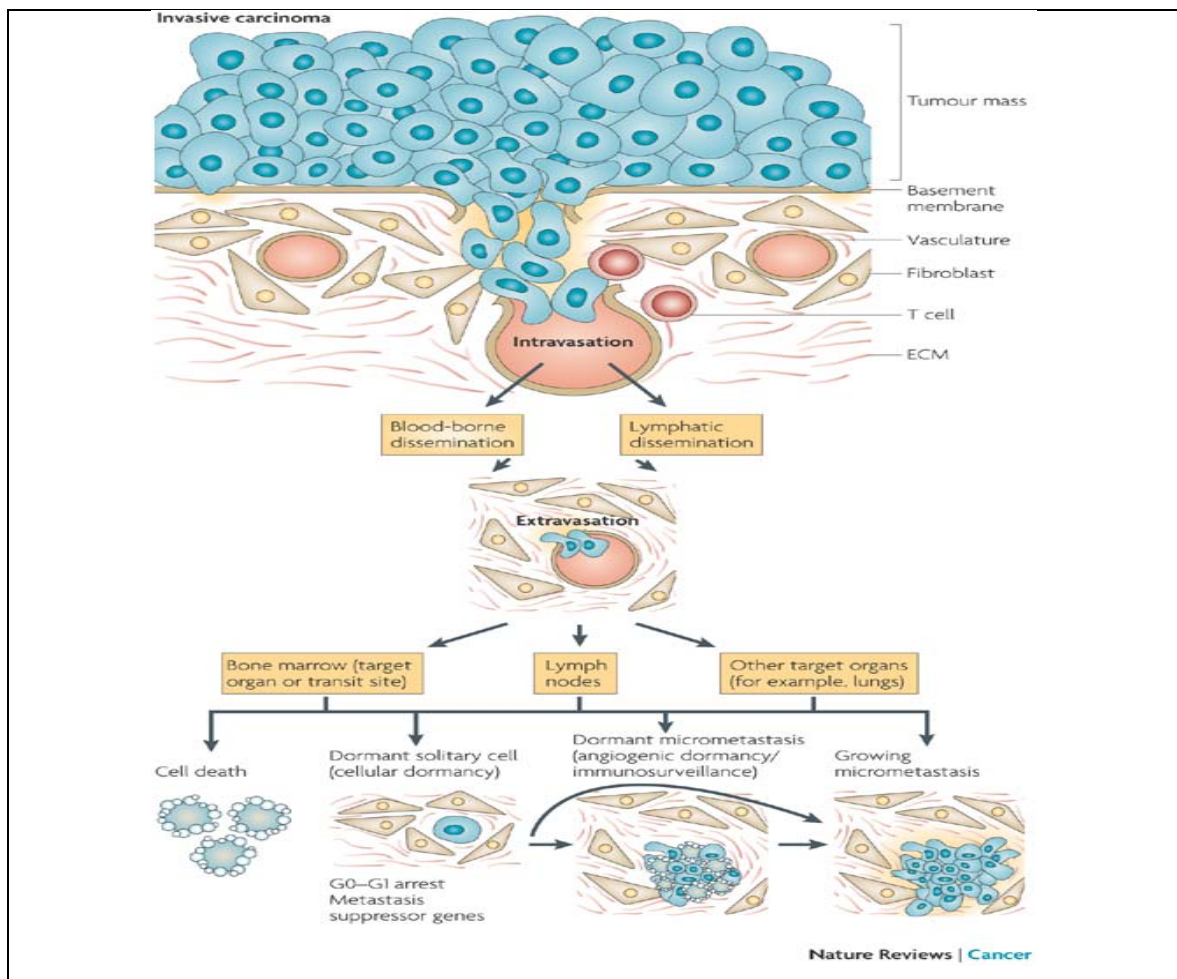
Οι όγκοι δεν είναι μόνο μάζα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Συνιστούν στην πραγματικότητα ιστό αποτελούμενο από διακριτούς κυτταρικούς τύπους: καρκινικά κύτταρα, κύττατα στρώματος και αγγείωση. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν ετερογένεια ως προς την μορφολογία, την ικανότητα πολλαπλασιασμού, τις γενετικές αλλοιώσεις και την ανταπόκριση στην θεραπεία. Ανεξάρτητα από την ετερογένειά τους τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν χαρακτηριστικά (Εικ.2), τα οποία τους παρέχουν την δυνατότητα της ανάπτυξης του όγκου και της μεταστατικής διασποράς [1]: (α) υποστηρίζουν την σηματοδότηση πολλαπλασιασμού, (β) αντιστέκονται στον κυτταρικό θάνατο, (γ) επάγουν την αγγειογένεση, (δ) διαθέτουν αντιγραφική ανθεκτικότητα, (ε) αποφεύγουν αποτελεσματικά τους αναστολείς της αύξησης, (στ) ενεργοποιούν την διήθηση και την μετάσταση, (ζ) επαναπρογραμματίζουν τον ενεργειακό μεταβολισμό, (η) αποφεύγουν αποτελεσματικά την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος, (θ) εμφανίζουν γενετική αστάθεια και (ι) εκμεταλλεύονται προς όφελός τους την φλεγμονώδη απόκριση, η οποία παρουσιάζεται συχνά στην εστία του όγκου.



Εικόνα 2 | Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων

Όσο αξιόλογη είναι η πρόοδος στο πεδίο της έγκαιρης διάγνωσης και της ανάπτυξης νέων θεραπευτικών αγωγών, τόσο αξιοσημείωτη είναι η υψηλή θνησιμότητα, την οποία προκαλεί η κακοήθης νεοπλασία. Αν και οι επικουρικές θεραπείες εξελίσσονται με ταχείς ρυθμούς, πάσχοντες ευρισκόμενοι στα πρώιμα στάδια της νόσου, έχουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μετάσταση. Η μεταστατική ακολουθία έχει μελετηθεί εκτεταμένα για την περίπτωση των καρκινωμάτων (καρκίνοι επιθηλιακής προέλευσης), οι οποίοι συνιστούν σχεδόν το 80% των συμπαγών όγκων· παραμένουν ωστόσο αρκετά ερωτήματα. Η παρούσα εργασία αναφέρεται κατά κύριο λόγο σε επιθηλιακούς όγκους.

Το κλινικό αποτέλεσμα της σύνθετης πολυσταδιακής διαδικασίας, η οποία χαρακτηρίζεται από την διακίνηση νεοπλαστικών κυττάρων από την αρχική εστία και την εξάπλωση τους σε άλλους ιστούς ή όργανα του σώματος, ορίζεται μετάσταση. Τα επιμέρους στάδια (Εικ.3) περιλαμβάνουν την (1) αποδόμηση της υποκείμενης βασικής μεμβράνης και ακόλουθη εισβολή στο στρώμα, (2) είσοδο στα λεμφαγγεία και στα αιμαγγεία, (3) κυκλοφορία, (4) εξαγγείωση και (5) μετανάστευση (αποικισμός) σε απομακρυσμένη, σε σχέση με τον πρωτογενή εστία, θέση. Στο νέο περιβάλλον, τα διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα (Disseminated Tumour Cells, DTCs) αρχικά σχηματίζουν μικρομεταστάσεις, οι οποίες δεν είναι μακροσκοπικά ανιχνεύσιμες, και στην συνέχεια, εάν οι συνθήκες επιτρέπουν, πολλαπλασιάζονται περαιτέρω με αποτέλεσμα την συγκρότηση των μακρομεταστάσεων.



Εικόνα 3 | Μηχανισμός διασποράς καρκινικών κυττάρων από την πρωτογενή εστία
 Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια: (α) την αποδόμηση του βασικού υμένα, (β) την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και την ενδοαγγείωση και (γ) την εξαγγείωση και εγκατάσταση στην δευτερογενή εστία.

Με εξαίρεση τις μικρο- και μάκρο- μεταστάσεις, τα υπόλοιπα στάδια απαιτούν *κινητικότητα, διηθητική ικανότητα και ανθεκτικότητα σε αποπτωτικά ερεθίσματα*, ιδιότητες

τις οποίες δεν διαθέτουν τα επιθηλιακά κύτταρα. Υπό ορισμένες συνθήκες επιθηλιακά κύτταρα αποκρίνονται σε κυτταρικό πρόγραμμα, το οποίο ενεργοποιείται κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού και κατά την επούλωση τραυμάτων: *την μετάπτωση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα* (Epithelial-to-Menchymal Transition, EMT) [2]. Κατά την EMT τα επιθηλιακά φύλλα χάνουν την πολικότητά τους και την διακυτταρική συνάφεια και υφίστανται σημαντική αναδιάταξη του κυτταροσκελετού τους· αυτές οι μεταβολές τους επιτρέπουν να επιβιώσουν ανεξάρτητα από την προσκόλλησή τους στο υπόστρωμα και προάγουν την μετανάστευσή τους.

Είναι γνωστό, ότι οι μεταστάσεις εμφανίζονται επιλεκτικά σε κάποια όργανα, όπως πνεύμονες, ήπαρ, εγκέφαλος και οστά, και ότι κάθε τύπος καρκίνου εμφανίζει ξεχωριστές «προτιμήσεις»: ο καρκίνος του μαστού εμφανίζει μεταστάσεις στα μακρά οστά, τον πνεύμονα, τον εγκέφαλο και το ήπαρ, ενώ ο καρκίνος του προστάτη συνήθως στα μακρά οστά και του παχέος εντέρου στο ήπαρ [3]. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση, ότι το περιβάλλον υποδοχής των μικρομεταστατικών κυττάρων συμβάλλει σημαντικά στην εγκατάστασή τους και τον πολλαπλασιασμό τους προς μετάσταση.

Πρέπει ωστόσο να τονισθεί, ότι η μετάσταση θεωρείται ιδιαίτερα αναποτελεσματική διεργασία [4], διότι μόνο πολύ μικρό κλάσμα των DTCs επιτυγχάνει αποικισμό στις νέες θέσεις [5]. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει, ότι ένα στα 40 DTCs θα δώσει μικρομετάσταση, ενώ μόνο 0,01% θα καταφέρει να σχηματίσει μακρομετάσταση [6]. Αρκετά καρκινικά κύτταρα θα παραμείνουν αδρανή [7], ενώ άλλα δεν θα καταφέρουν να επάγουν αγγειογένεση, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του όγκου [8]. Η έκβαση της μεταστατικής διαδικασίας καθορίζεται, τελικά, από πλήθος αλληλεπιδράσεων των μεταστατικών κυττάρων με το μικροπεριβάλλον στον προσβαλλόμενο ιστό ή όργανο.

1.2. Μοριακός μηχανισμός τής διήθησης και EMT

Η διαδικασία, η οποία ελέγχει την ογκογένεση και την μετάσταση, περιλαμβάνει την ενεργό αλληλεπίδραση με το καρκινικό μικροπεριβάλλον, την συμμετοχή ογκοσχετιζόμενων πρωτεϊνών, όπως το ινωδογόνο, και πολύπλοκη σηματοδότηση, όπως Akt/PKB, η οποία ρυθμίζει την διήθηση και την απόπτωση. Περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αγγειογένεση, αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων, EMT, κινητικότητα, ενδοαγγείωση, επιβίωση στα αγγεία, πιθανή εξαγγείωση, μεσεγχυματική προς επιθηλιακή μετάπτωση (Mesenchymal-to-Epithelial Transision, MET), σχηματισμό μικρομετάστασης και αύξηση προς μακρομετάσταση.

Στα αρχικά στάδια τής ογκογένεσης, οι αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις εξαντλούν σύντομα τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο. Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF είναι η απάντηση των νεοπλαστικών κυττάρων στην υποξία, ο οποίος προάγει ισχυρά την ανάπτυξη και την διήθηση του όγκου και, επάγοντας την έκφραση δύο βασικών αγγειογενετικών παραγόντων, VEGF A

και αγγειοποιητίνη 2, ελέγχει την αγγειογένεση. Όλοι αυτοί οι παράγοντες ρυθμίζουν το pH, τις αποφάσεις για νέκρωση ή κυτταρική επιβίωση και την κυτταρική μετανάστευση.

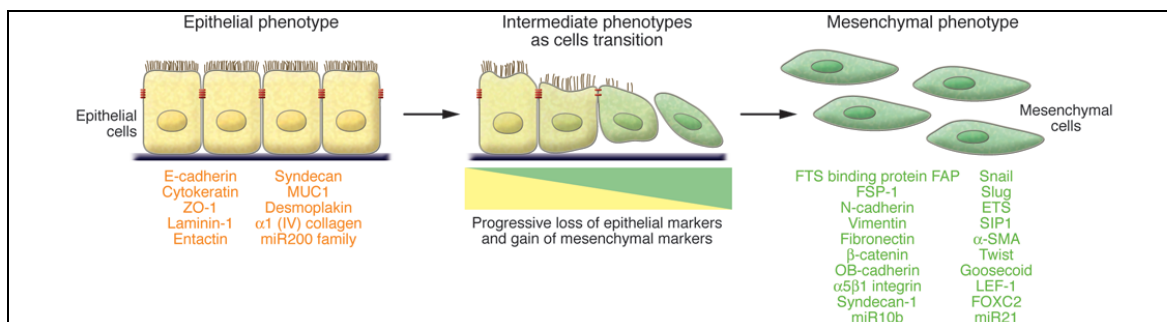
Η νέκρωση κυττάρων προκαλεί αυξημένη συγκέντρωση των χημικών μεσολαβητών της φλεγμονώδους αντίδρασης, όπως κυτοκίνες και χημειοκίνες, οι οποίες προσελκύουν ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Τα χημειοτακτικώς αποκρινόμενα λευκοκύτταρα προάγουν την αγγειογένεση, την αποικοδόμηση της θεμέλιας ουσίας (εξωκυτταρικής μήτρας) (ExtraCellular Matrix, ECM), την κινητικότητα του όγκου και την παραγωγή της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS). Το παραγόμενο μονοξείδιο του αζώτου NO προκαλεί τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, οι οποίες εμφανίζουν ισχυρή μεταλλαξιγόνο και κυτταροτοξική δράση. Επιπλέον, η σύνθεση αυξητικών παραγόντων, του βασικού των ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor, bFGF), της επιδερμίδας (Epidermal Growth Factor, EGF), των ηπατοκυττάρων (Hepatocyte Growth Factor, HGF) και του μετασχηματισμού-β (Transforming Growth Factor beta, TGF-β), ελέγχει αφενός την ισορροπία ανάμεσα στην κυτταρική επιβίωση και την απόπτωση αφετέρου την αρνητική ρύθμιση (downregulation) της καδερίνης-E (E-cadherin), με αποτέλεσμα να μειώνεται η κυτταρική προσκόλληση και να αυξάνεται η διηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων.

Όταν ολοκληρωθεί η αγγειογένεση, τα νεοπλαστικά κύτταρα, εάν διαθέτουν τα κατάλληλα χαρακτηριστικά, είναι δυνατόν να αποκολληθούν και να εισέλθουν στα αιμοφόρα αγγεία. Πειραματικά μοντέλα μυών, έχουν δείξει, ότι η υποξία αυξάνει το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων. Σε ανθρώπινους όγκους, η υποξία σε συνδυασμό με την ενεργότητα της NOS έχει συσχετισθεί με αυξημένη διηθητικότητα, πυκνότητα αιμοφόρων αγγείων και συγκρότηση μετάστασης. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν, ότι η υποξία, μέσω της ενεργοποίησης της οξειδάσης της λυσίνης (Lysyl Oxidase, LOX) και του μεταγραφικού παράγοντα Snail, καταλήγει στην καταστολή της καδερίνης-E [9], η οποία καταστολή αποτελεί χαρακτηριστικό της EMT.

Όπως προαναφέρθηκε, η EMT αποτελεί αρκετά καλή υπόθεση, για να εξηγηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από πολικότητα και εκτενή συνάφεια τόσο μεταξύ τους όσο και με το υπόστρωμα, χάνουν την πολικότητά τους, αποκτούν κινητικότητα και ικανότητα να επιβιώνουν απουσία σημάτων συναφείας, ιδιότητες οι οποίες χαρακτηρίζουν τα μεσεγχυματικά κύτταρα (Εικ.4). Η EMT επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα Twist και βασικά σημεία της είναι:

- η μείωση των διακυτταρικών συνδέσμων,
- η μείωση της έκφρασης της καδερίνης-E
- η μείωση των επιθηλιακών (όπως η κυτοκερατίνη) με παράλληλη αύξηση των μεσεγχυματικών δεικτών (όπως η βιμεντίνη).

Σχετικές μελέτες προτείνουν, ότι ο Twist πιθανόν να ενεργοποιεί αντι-αποπτωτικά κυτταρικά προγράμματα, ώστε να αποφευχθεί η επαγόμενη από την έλλειψη σημάτων συναφείας απόπτωση κατά την μετάβαση από την επιθηλιακή στην μεσεγγυματική κατάσταση. Τα νεοπλαστικά κύτταρα, πλέον, μοιάζουν με μεσεγγυματικά, εμφανίζουν ιδιαίτερη κινητικότητα και είναι ικανά να διέλθουν μέσω αγγείων (ενδο- και εξω- αγγείωση), και να διασχίσουν την βασική μεμβράνη, τους ενδιάμεσους χώρους και τα ενδοθήλια.



Εικόνα 4 | Μετάπτωση επιθηλίου προς μεσέγγυμα (EMT).

Η EMT μετατρέπει τα πολωμένα και ακίνητα επιθηλιακά κύτταρα σε ευκίνητα μεσεγγυματικά κύτταρα. Στην εικόνα φαίνονται οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες για τους δύο κυτταρικούς τύπους. (από [10])

Επιπλέον, είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι κύτταρα, τα οποία έχουν υποστεί EMT, αποκτούν πολλά από τα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων, όπως την αυτοανανέωση, την πολυδυναμικότητα και την κατάσταση ηρεμίας, η οποία συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα σε χημικά μέσα και ακτινοβολία [11], [12]. Η εκτοπική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, επαγωγέων της EMT, σε αθανατοποιημένα ανθρώπινα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα κατέληξε στην παραγωγή μεσεγγυματικών κυττάρων με φαινότυπο μαστικών βλαστικών κυττάρων ($CD44^+$, $CD24^{low}$) [12]. Επιπλέον, η EMT δυνατόν να επάγει τον σχηματισμό καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Cancer Stem Cells, CSCs) από καρκινικά κύτταρα χωρίς βλαστικά χαρακτηριστικά [13]. Συνεπώς, η EMT φαίνεται να εμπλέκεται όχι μόνο στον σχηματισμό των CTCs αλλά και στον εφοδιασμό τους με χαρακτηριστικά, τα οποία ενισχύουν την μεταστατική τους ικανότητα.

Επιπροσθέτως, έχει γίνει η υπόθεση ότι η EMT στον πρωτογενή όγκο διευκολύνει την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, με αποτέλεσμα να διευκολύνει την διήθηση σε γειτονικούς ιστούς και την διασπορά τόσο των EMT-καρκινικών κυττάρων όσο και των καρκινικών κυττάρων που δεν βρίσκονται σε EMT. Σε αυτήν την περίπτωση, η μετάσταση σχηματίζεται από την συνεργασία αυτών των δύο τύπων κυττάρων.

Τα CTCs, πριν εγκατασταθούν στο όργανο, το οποίο προσεγγίζουν, πρέπει εκ νέου να υποστούν μετάπτωση αλλά αντίστροφη της EMT, δηλαδή μετάπτωση μεσεγγύματος προς επιθήλιο (Mesenchymal to Epithelial Transition, MET). Η EMT, στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, δεν φαίνεται να είναι διαδικασία του τύπου "όλα ή τίποτα". Στην πραγματικότητα, εμφανίζεται ευρύ

φάσμα φαινοτύπων με επιθηλιακούς και μεσεγχυματικούς δείκτες να συνυπάρχουν σε ποικίλο βαθμό. Η αναλογία των φαινοτυπικών χαρακτήρων ίσως επηρεάζει την ανθεκτικότητα των CTCs στα φαρμακευτικά μέσα και την ακτινοβολία και την δυνατότητά τους να σχηματίζουν μεταστάσεις.

1.3. Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα

Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα (Circulating Tumour Cells, CTCs) ορίζονται όσα εντοπίζονται στο περιφερικό αίμα ασθενών και προέρχονται είτε από την πρωτογενή είτε από την δευτερογενή εστία [14]. Η υπόθεση, ότι τα CTCs αποτελούν προαπαιτούμενο για την μετάσταση, προτάθηκε για πρώτη φορά το 1869 από τον Thomas Ashworth, Αυστραλό παθολόγο, ο οποίος παρατήρησε μικροσκοπικά CTCs στο αίμα ασθενούς με μεταστατική νόσο και θεώρησε, ότι μπορεί να ευθύνονται για την ταυτόχρονη ύπαρξη πολλών όγκων στο ίδιο άτομο [15]. Σήμερα, έχει πλέον επιβεβαιωθεί ο σημαντικός ρόλος των CTCs στην εξάπλωση των καρκινωμάτων [16].

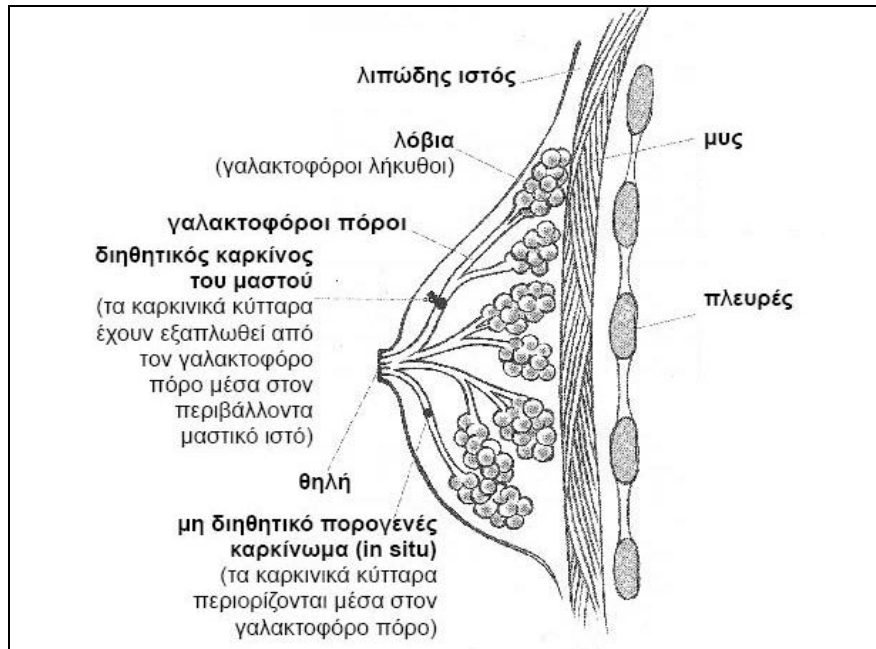
Τα CTCs είναι δυνατόν να κυκλοφορούν κατά ομάδες (Circulating Tumour Microemboli, CTM) [17], τα οποία θεωρείται ότι, λόγω διακυτταρικών σημάτων επιβίωσης, διαθέτουν πλεονέκτημα έναντι των μεμονωμένων CTCs και συνεπώς περιλαμβάνουν εκείνη την μειοψηφία καρκινικών κυττάρων την υπεύθυνη για την εμφάνιση μετάστασης. Από μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχει φανεί, ότι περίπου το 85% του συνόλου των CTCs πεθαίνουν εντός περίπου 5min από την στιγμή της ενδοαγγείωσής τους λόγω απόπτωσης ([18], [6]), μεσολαβούμενης από την απουσία διακυτταρικών σημάτων συνάφειας. Τα CTM, επιπλέον, είναι ικανά να σχηματίζουν μετάσταση χωρίς να απαιτείται εξαγγείωση: προσκολλώνται στα τοιχώματα των μικρών αρτηριών και τριχοειδών αγγείων, πολλαπλασιάζονται μέσα στο αγγείο και τελικά διαρρηγνύουν το αγγειακό τοίχωμα και εγκαθίστανται στον παρακείμενο ιστό [19]. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό, ότι η παρουσία CTM στην κυκλοφορία είναι δείκτης υψηλού μεταστατικού δυναμικού ([20], [19]).

1.4. Ο καρκίνος τού μαστού

Ο καρκίνος τού μαστού έχει μελετηθεί περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη κακοήθεια. Προσβάλλει περίπου μία στις δέκα γυναίκες στις υγειονομικά ανεπτυγμένες χώρες και έχει τεκμαρτή πενταετή επιβίωση που πλησιάζει το 70%. Αν και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, η μέση ηλικία των γυναικών, οι οποίες διαγιγνώσκονται με καρκίνο τού μαστού είναι 64 ετών. Το ένα τέταρτο περίπου των γυναικών αυτών είναι νεώτερες από 50 ετών. Ο καρκίνος τού μαστού αναπτύσσεται σπανίως σε άνδρες.

Η ανατομία τού μαστού φαίνεται στην Εικ.5. Ο καρκίνος τού μαστού είναι αδενοκαρκίνωμα, το οποίο εντοπίζεται είτε στους γαλακτοφόρους πόρους (πόροι με τους οποίους μεταφέρεται το γάλα στην θηλή) είτε στα λοβία (χώρος παραγωγής τού γάλακτος). Διακρίνονται δύο βασικοί ιστολογικοί τύποι καρκίνου τού μαστού, οι οποίοι ευθύνονται για το 90% των περιπτώσεων: το πορογενές και

το λοβιακό καρκίνωμα του μαστού. Άλλοι πιο σπάνιοι τύποι είναι το καρκίνωμα Paget, ο φλεγμονώδης καρκίνος, ο αμφοτερόπλευρος καρκίνος του μαστού , το σάρκωμα κ.α.



Εικόνα 5 | Ανατομία του μαστού και διηθητικό και *in situ* καρκίνωμα

Ανάλογα με τον ύπαρξη διήθησης, τα καρκινώματα διακρίνονται επιπλέον σε μη διηθητικά (*in situ*) και σε διηθητικά. Τα μη διηθητικά καρκινώματα δεν έχουν διηθήσει την βασική μεμβράνη, ενώ τα διηθητικά έχουν εξαπλωθεί στον περιβάλλοντα ιστό. Το μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (Ductal Carcinoma *in situ*, DCIS), εάν αφαιρεθεί σωστά, θεωρείται πλήρως ιάσιμο. Σε πολλές περιπτώσεις ο καρκίνος εκκινεί ως DCIS και με την πάροδο του χρόνου εξαλλάσσεται σε διηθητικό πορογενές. Αναφέρονται ωστόσο περιπτώσεις, κατά τις οποίες παραμένει επί πολλά έτη σε μορφή *in situ* χωρίς να εξαλλάσσεται προς διηθητικό. Το μη διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Lobular Carcinoma *in situ*, LCIS) θεωρείται προκαρκινική κατάσταση.

Με βάση τον βαθμό διήθησης οι διηθητικοί καρκίνοι του μαστού διακρίνονται σε πρώιμο, τοπικά προχωρημένο και μεταστατικό. Πρώιμος ορίζεται ο καρκίνος, ο οποίος έχει εξαπλωθεί έξω από την εστία αλλά παραμένει μέσα στον μαστικό ιστό, ακόμη και αν εντοπίζεται στους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Τοπικά προχωρημένος ορίζεται ο καρκίνος, ο οποίος έχει επεκταθεί σε μέρη κοντά στον μαστό, όπως το δέρμα, οι μύες και τα οστά του θώρακα, αλλά δεν εντοπίζεται σε άλλα σημεία του σώματος. Μεταστατικός ορίζεται ο καρκίνος, ο οποίος εντοπίζεται εκτός του μαστού και σε άλλες περιοχές του σώματος, όπως οι πνεύμονες και τα οστά. Στον Πιν.1 αναφέρεται η κατηγοριοποίηση της νόσου σε στάδια ανάλογα με τα εγχειριτικά και διαγνωστικά ευρήματα.

Πίνακας 1 | Στάδια του καρκίνου του μαστού

Στάδιο	Περιγραφή
I	Διάμετρος Όγκου < 2cm, χωρίς μεταστατικές διηθήσεις στους μασχάλιους λεμφαδένες και χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
II	Διάμετρος Όγκου < 5cm, χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
III	Διάμετρος Όγκου > 5cm, χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
IV	Απομακρυσμένες μεταστάσεις (ήπαρ, πνεύμονες, οστά)

Στην ερευνητική πρακτική, ωστόσο, ο καρκίνος του μαστού κατηγοριοποιείται με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του, τα οποία φαίνονται για κάθε κατηγορία αναλυτικά στον Πιν.2. Η κύρια διάκριση γίνεται με βάση τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα των οιστρογόνων άλφα (Estrogen Receptor α, ERα). Η πρώτη υποκατηγορία εκφράζει τον ERα και γονίδια, τα οποία εκφράζονται στα αδενικά κύτταρα του μαστού, και ονομάζεται αδενική (luminal). Διακρίνονται τρεις υποομάδες (A, B και C) με κριτήριο τα επίπεδα έκφρασης και το ποσοστό μεταλλαγών στο γονίδιο p53. Η δεύτερη υποκατηγορία χαρακτηρίζεται από χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα έκφρασης του ERα, εκφράζει γονίδια, τα οποία απαντούν σε μεγάλο βαθμό στα μυοεπιθηλιακά ή βασικά κύτταρα, και ονομάζεται βασική (basal). Η κατηγορία αυτή υποδιαιρείται περαιτέρω σε τρεις ομάδες: (α) τους ομοιάζοντες με την βασική στοιβάδα καρκίνους (basal-like), (β) τους θετικούς για τον δείκτη HER2 (HER2⁺) και (γ) τους ομοιάζοντες με φυσιολογικό μαζικό ιστό (normal-like). Σε γενικές γραμμές οι κατηγορίες luminal C, basal-like και HER2⁺ έχουν την δυσμενέστερη πρόγνωση.

Πίνακας 2 | Κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού με βάση μοριακά χαρακτηριστικά

	Κατηγορία	Χαρακτηριστικά
	Αδενικός A (Luminal A)	ERα (υψηλότερη από όλες τις κατηγορίες), GATA3, XBP1, TFF3, HNF3A, LIV-1 TP53 κατά 13% μεταλλαγμένο
ER ⁺	Αδενικός B (Luminal B)	Χαμηλή έως μέτρια έκφραση των γονιδίων της luminal A TP53 κατά 80% μεταλλαγμένο
	Αδενικός C (Luminal C)	Χαμηλή έως μέτρια έκφραση των γονιδίων της luminal A TP53 κατά 40% μεταλλαγμένο
	Basal-like	CK5/17, Laminin, FABP7, MMPs, HGF, TGFBR2
ER ⁻	HER2 ⁺	HER2, TOPO II, ACBC1, S100, FBX09, RAL-B, SDC1, FN1
	Normal-like	Άλλα γονίδια γειτνιάζοντα με το HER2 CK5/17, Laminin

1.5. Δείκτες ορού αίματος για τον καρκίνο του μαστού

Ο μεταστατικός καρκίνος του μαστού θεωρείται μέχρι στιγμής ανίατη ασθένεια και οι ασθενείς χωρίς ίχνη μετάστασης υφίστανται αγωγή μέχρι να εξελιχθεί η νόσος ή έως ότου υπάρξουν τοξικές παρενέργειες από την θεραπεία. Η αξιολόγηση της εξέλιξης της νόσου είναι, συνεπώς, πολύ σημαντική, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η αναποτελεσματική θεραπευτική αγωγή και να αποφευχθεί η χορήγηση τοξικών φαρμάκων, όταν δεν είναι απαραίτητο. Καθίσταται προφανής η ανάγκη χρήσης ευαίσθητων μεθόδων για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. Μέχρι στιγμής η συνήθης πρακτική είναι η χρήση απεικονιστικών μεθόδων, όπως η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron Emission Tomography, PET), υπολογιστική τομογραφία (Computed Tomography, CT) και η μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging, MRI). Καμία από αυτές τις τεχνικές, ωστόσο, δεν μπορεί να ανιχνεύσει μεταστατική νόσο, εάν αυτή δεν αποκτήσει μέγεθος λίγων χιλιοστών [21].

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά ευαίσθητα τεστ, τα οποία στηρίζονται στην ανίχνευση καρκινικών δεικτών στον ορό του αίματος. Έχει φανεί, ότι η μέτρηση των δεικτών αυτών ανά τακτά διαστήματα παρέχει ενδείξεις για την εξέλιξη της μετάστασης, αν και δεν έχει τεκμηριωθεί η κλινική σημασία της [22]. Οι ακόλουθοι δείκτες χρησιμοποιούνται συνήθως στην κλινική πρακτική για την παρακολούθηση ασθενών μετά την θεραπεία για πρωτογενή καρκίνο του μαστού: (α) δείκτες Mucin 1 (Muc1) και (β) Carcinoembryonic antigen (CEA).

Υπάρχει πληθώρα δοκιμασιών Muc1 αλλά οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες είναι οι CA15.3 και CA27.29, οι οποίες εμφανίζουν στενή συσχέτιση ως προς τα αποτελέσματά τους [23]. Αμφότερες ανιχνεύουν το προϊόν του γονιδίου Muc1, το οποίο κωδικοποιεί πολύ ετερογενή και μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη (300-400kd), εκφραζόμενη στην πλειοψηφία των αδενικών επιθηλιακών κυττάρων [24]. Οι όγκοι σε αδενικά όργανα, όπως είναι ο μαστός, υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη, η περίσσεια της οποίας εισρέει στην κυκλοφορία, επιτρέποντας την μέτρησή της [25]. Αυξημένα επίπεδα του αντιγόνου ανιχνεύονται περίπου στο 80% των μεταστατικών ασθενών [26]. Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Εταιρία Κλινικής Ογκολογίας (American Society of Clinical Oncology, ASCO) η κατά πέντε έως δέκα φορές υπέρβαση του φυσιολογικού ορίου των επιπέδων του CA15.3, πρέπει να αποτελέσει σήμα για πιθανή ανάπτυξη μετάστασης. Η ανίχνευση, ωστόσο, των επιπέδων Muc1 δεν διακρίνεται για την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητά της δεδομένου, ότι αυξημένα επίπεδα του αντιγόνου προσδιορίζονται και σε υγιή άτομα [27].

Η δοκιμασία CEA ανιχνεύει το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο, υψηλού βαθμού γλυκοζυλιωμένη επιφανειακή πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται φυσιολογικά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και χαρακτηρίζει πληθώρα καρκίνων. Παρ'όλα αυτά το τεστ CEA είναι λιγότερο ευαίσθητο από τα CA15.3 και CA27.29, διότι ανιχνεύεται σε υψηλότερα του φυσιολογικού επίπεδα στο 60% των ασθενών [26].

1.6. Κλινική Συσχέτιση των CTCs

Η μελέτη των CTCs, πέρα από την συμβολή της στην κατανόηση της μετάστασης, είναι δυνατόν να προσφέρει δυναμικό εργαλείο κλινικής εφαρμογής. Ανεξάρτητα από τα τεχνικά προβλήματα για την απομόνωση και την ανίχνευσή τους, μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα, πληθώρα μελετών έχει διεξαχθεί προκειμένου να αξιολογηθεί η πιθανή συσχέτιση των CTCs με την κλινική εικόνα του ασθενούς. Στον Πιν.3 ενδεικτικά αναφέρονται κάποιες μελέτες και τα συμπεράσματά τους. Η αξιολόγηση αφορά ποικιλία νεοπλασιών αλλά η πλειοψηφία των δεδομένων προέρχεται από μελέτες στον καρκίνο του μαστού, οι οποίες δείχνουν, ότι η παρακολούθηση των CTCs χρησιμεύει στην πρόγνωση αλλά και τον έλεγχο της απόκρισης στην θεραπεία.

Πίνακας 3 | Κλινική συσχέτιση των CTCs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού

Στάδιο της νόσου	Μέθοδος	Αριθμός ασθενών	Σοχνότητα ανίχνευσης CTCs (%)	Κλινικό αποτέλεσμα	Αναφορά
Μεταστατικό	CellSearch	177	49	CTCs \geq 7.5mL: μειωμένο PFS και OS	[28]
Πρόσφατη διάγνωση μετάστασης	CellSearch	83	52	CTCs \geq 7.5mL κατά την διάγνωση και πριν την έναρξη θεραπείας: μειωμένο PFS και OS	[29]
Μεταστατικό	CellSearch	58	53,4 (BL) 27,6 (FU)	Η μεταβολή των CTCs κατά την διάρκεια της χημειοθεραπείας συσχετίστηκε με την απόκριση στην θεραπεία και με το OS	[30]
Πρωτογενής (στάδια I-III)	CellSearch	1500	9	CTCs $>$ 1/22,5mL συσχετίστηκε με μειωμένο DFS και OS	[31]
Πρωτογενής (στάδια I-III)	RT-PCR (CK19)	444	40,8	Μειωμένο DFS και OS	[32]
Πρωτογενής (στάδια I-III)	RT-qPCR	90	Στάδιο I: 29 Στάδιο II: 45 Στάδιο III: 77	Η ανίχνευση CTCs συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου	[33]
Πρωτογενής (στάδια I-III)	RT-PCR (CK19)	437	32,7	Μειωμένο DFS και OS	[34]

BL: BaseLine (πριν την έναρξη χημειοθεραπείας), FU: Follow Up (κατά την διάρκεια χημειοθεραπείας)

Όσον αφορά στην προγνωστική ισχύ των CTCs, πειραματικά και κλινικά δεδομένα συσχετίζουν την παρουσία τους με δυσμενή πρόγνωση. Θα πρέπει ωστόσο, η εξαγωγή συμπερασμάτων να γίνεται με φειδώ, αν λάβουμε υπόψιν τις διαφορές στις εφαρμοζόμενες τεχνικές, τα κριτήρια αναγνώρισης των CTCs, τους διαφορετικούς κλινικούς πληθυσμούς, τον περιορισμένο αριθμό ασθενών και τα διαφορετικά στάδια της νόσου, τα οποία μελετώνται κάθε φορά. Αξίζει να αναφερθεί, ότι η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών διαπιστώνει συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των CTCs και της κλινικής έκβασης της νόσου. Το κλινικό

αποτέλεσμα περιγράφεται συνήθως με τρεις παραμέτρους: (α) το διάστημα απουσία νόσου (Disease Free Survival, DFS), δηλαδή το διάστημα ανάμεσα στο τέλος της θεραπείας και της υποτροπής της νόσου, (β) το διάστημα απουσία εξέλιξης της νόσου (Progression Free Survival, PFS), δηλαδή το διάστημα μεταξύ του τέλους της θεραπείας και της εμφάνισης μετάστασης, και (γ) η συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS), δηλαδή το διάστημα ανάμεσα στο τέλος της θεραπείας και τον ενδεχόμενο θάνατο.

Αρκετές ανεξάρτητες μελέτες έχουν καταδείξει την προγνωστική αξία των CTCs σε περιστατικά με κακοήγη νεοπλασία του μαστού. Από τις πρώτες δημοσιεύσεις, οι οποίες μελέτησαν την πιθανή προγνωστική συσχέτιση των CTCs είναι των Cristofanilli και συνεργατών, στην οποία η παρουσία CTCs συσχετίστηκε με δυσμενή πρόγνωση. Πιο αναλυτικά, η κρίσιμη τιμή, πάνω από την οποία θεωρούνται υψηλά τα επίπεδα CTCs, καθορίστηκε στα 5 CTCs/7,5mL αίματος. Υψηλά επίπεδα CTCs πριν την έναρξη της θεραπείας συσχετίστηκαν με εξαιρετικά μικρό PFS και OS (2,7 και 10 μήνες αντιστοίχως), σε αντίθεση με την απουσία ή τα χαμηλά επίπεδα CTCs (7 και πάνω από 18 μήνες αντιστοίχως). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και μετά τον πρώτο κύκλο θεραπείας.

Η προγνωστική αξία σε ασθενείς σε πρώιμα στάδια της νόσου βρίσκεται ακόμα υπό αξιολόγηση. Όσον αφορά τον χειρουργήσιμο πρώιμο καρκίνο του μαστού, φαίνεται, ότι η ανίχνευση κυττάρων, τα οποία εκφράζουν κυτοκερατίνες (CK⁺) (εντοπισμός με RT-PCR), αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα τόσο στους ασθενείς με θετικά ευρήματα όσο και σε εκείνους χωρίς ευρήματα στους λεμφαδένες [35], [36]. Υπάρχουν αρκετά δεδομένα, τα οποία υποστηρίζουν, ότι η καταμέτρηση των CTCs παρέχει περισσότερες πληροφορίες και είναι πιο ευαίσθητη συγκρινόμενη με άλλες απεικονιστικές μεθόδους, οι οποίες εφαρμόζονται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής αγωγής και της παρακολούθησης των ασθενών μετά το τέλος της [37], [29], [38], [39], [40]. Πρόσφατη μελέτη [40] επιβεβαίωσε, ότι η καταμέτρηση των CTCs σε ασθενείς με κακοήγη νεοπλασία του μαστού συσχετίζεται ισχυρά με ακτινολογικά ευρήματα εξέλιξης της νόσου, ακόμα και όταν η μέτρηση αυτή είχε πραγματοποιηθεί 7-9 εβδομάδες πριν την απεικόνιση. Επιπλέον, μεγάλης κλίμακας μελέτη, η οποία βρίσκεται υπό εξέλιξη (SWOG 0500, American South West Oncology Group, [41]) αποσκοπεί στην παροχή οριστικών αποδείξεων για την σημασία της μέτρησης CTCs και την διαχείριση των ασθενών με νεοπλασία του μαστού σε προχωρημένο στάδιο. Ειδικότερα, ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση μετάστασης, οι οποίες υπόκεινται σε χημειοθεραπεία, ελέγχονται για την παρουσία CTCs πριν και τρεις εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας. Από εκείνες, οι οποίες εμφανίζουν υψηλά επίπεδα και στις δύο περιπτώσεις, τυχαία κάποιες θα συνεχίσουν την ίδια θεραπεία, ενώ κάποιες θα αλλάξουν. Καταληκτικό σημείο της μελέτης θα είναι η σύγκριση των DFS και OS μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών, για να διαπιστωθεί, εάν η αλλαγή της θεραπείας, η οποία κατευθύνεται από τον αριθμό των CTCs, βελτιώνει το κλινικό αποτέλεσμα.

Ο φαινοτυπικός και μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs, εκτός από τις γνώσεις για την βιολογία τους, θα επιτρέψει εξίσου ενδιαφέρουσα εφαρμογή: αυτή της υγρής βιοψίας σε πραγματικό χρόνο. Είναι πιθανό, ότι τα CTCs αντιπροσωπεύουν καλύτερα την γενετική των δευτερογενών όγκων σε σχέση με τους πρωτογενείς. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει, ότι η έκφραση δεικτών (ER, PR, HER2), σχετικών με την κλινική κατηγοριοποίηση των όγκων, συχνά διαφέρουν μεταξύ του πρωτογενούς όγκου και της μετάστασης [41], [42], [43], [44]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα [45] αποτελούν 24 ασθενείς με πρωτογενή όγκο HER2-, οι οποίες παρουσίασαν υποτροπή. Οι εννέα εμφάνισαν επέκταση του γονιδίου HER2 στα CTCs. Τέσσερις από αυτές ακολούθησαν θεραπεία με Trastuzumab (μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του HER2), εκ των οποίων η μία παρουσίασε πλήρη απόκριση στην θεραπεία, ενώ άλλες δύο μερική. Ασφαλή συμπεράσματα δεν μπορούν να εξαχθούν σε σχέση με την καταλληλότητα της θεραπείας λόγω του πολύ μικρού δείγματος, όμως σε συνδυασμό με άλλες μελέτες [37], [46] αποτελεί ένδειξη για την χρησιμότητα των CTCs στην κατεύθυνση της θεραπευτικής αγωγής.

1.7. Ετερογένεια και Δείκτες των CTCs

Παρά την χρησιμότητα των CTCs στην παρακολούθηση της νόσου, ούτε όλοι οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα CTCs θα υποτροπιάζουν ούτε όλοι οι ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα CTCs θα διαφύγουν της μετάστασης. Αυτό υποδηλώνει, ότι ο σχηματισμός δευτερογενούς όγκου μπορεί να καθορίζεται με στοχαστικό τρόπο (μεταλλάξεις) ή από συγκεκριμένες συνθήκες ή από υποπληθυσμούς των CTCs ή ακόμα και συνδυασμό τους. Τα βιολογικά χαρακτηριστικά των μεταστατικών κυττάρων δεν είναι πλήρως κατανοητά και έχει διαπιστωθεί, ότι διαφέρουν από τον πρωτογενή όγκο και συνιστούν ετερογενή πληθυσμό ακόμα και στον ίδιο ασθενή [47]. Επιπλέον, ελάχιστες μελέτες έχουν αναλύσει την γονιδιακή έκφραση και τον γονότυπο των CTCs ([47], [48], [49], [48], [49])· συνεπώς, είναι αδύνατον να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τα μοριακά τους χαρακτηριστικά.

Το μόνο βέβαιο είναι, ότι τα CTCs συνιστούν ετερογενή πληθυσμό [50] ως προς την έκφραση αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους, μορίων προσκόλλησης, πρωτεασών και των επαγωγέων τους, σηματοδοτικές κινάσες, ενεργότητα της τελομεράσης κ.α. Επίσης, ποικίλες γονιδιωματικές μεταβολές, χαρακτηριστικές των καρκινικών κυττάρων, έχουν καταγραφεί σε CTCs αλλά σπανίως αυτές οι μεταβολές είναι όμοιες και επαναλαμβανόμενες. Επιπλέον, τα CTCs παρουσιάζουν γονιδιωματική αστάθεια και, όπως προαναφέρθηκε, διαφέρουν συχνά από τον πρωτογενή όγκο. Προσφάτως, αναγνωρίστηκε υποπληθυσμός με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων (Circulating Tumour Stem Cells, CTSCs), τα οποία πιθανώς αποτελούν τα πλέον ικανά από τα CTCs να επιβιώσουν στην κυκλοφορία του αίματος, να εμφανίσουν ανθεκτικότητα στην κυτταροτοξική θεραπεία και να δημιουργήσουν τελικά μετάσταση.

Η ετερογένεια των CTCs καθιστά δύσκολο τον καθορισμό δεικτών, οι οποίοι θα επιτρέπουν τον ασφαλή χαρακτηρισμό ενός κυττάρου ως CTC. Ο ιδανικός δείκτης

χαρακτηρίζεται από τρεις βασικές ιδιότητες. Πρώτον, πρέπει να εκφράζεται μόνο και σε όλα τα CTCs, έστω συγκεκριμένου καρκινικού τύπου (π.χ. καρκίνο του μαστού). Δεύτερον, να ανιχνεύεται εύκολα με μικρή διακύμανση και τρίτον να έχει κλινική σημασία. Επειδή μέχρι στιγμής κανένας δείκτης δεν πληροί αυτά τα κριτήρια, οι προσπάθειες προσανατολίζονται προς την χρήση πολλαπλών δεικτών. Ο κύριος στόχος είναι να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, δηλαδή να θεωρηθούν νεοπλαστικά, κύτταρα φυσιολογικά. Εξίσου σημαντικός είναι ο αποκλεισμός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, δηλαδή η αδυναμία εντοπισμού καρκινικών κυττάρων, ενώ αυτά είναι παρόντα.

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα σχετικά με την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των CTCs είναι ο καθορισμός δεικτών, ειδικών για αυτήν την κατηγορία κυττάρων. Στον Πιν.4 αναφέρονται οι κυρίως χρησιμοποιούμενοι δείκτες για την ανίχνευση CTCs και κάποιοι, οι οποίοι αναδύθηκαν πρόσφατα με βάση τις μελέτες για την EMT και τον πιθανό βλαστικό χαρακτήρα των CTCs.

Οι πιο δημοφιλείς είναι οι επιθηλιακοί και οι ιστοειδικοί δείκτες με δεδομένο, ότι φυσιολογικά απουσιάζουν από την κυκλοφορία κύτταρα, στα οποία εκφράζονται. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι επιθηλιακοί δείκτες είναι οι EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), CK19 (Cytokeratin 19), MUC1 (Mucin 1). Όσον αφορά τους επιθηλιακούς δείκτες, παρουσιάζουν το μειονέκτημα, ότι επιθηλιακά κύτταρα συχνά κυκλοφορούν στο αίμα μετεγχειρητικών ασθενών ή σε περιπτώσεις φλεγμονής ή ακόμα επιθηλιακά επιδερμικά κύτταρα πιθανώς επιμολύνουν το δείγμα κατά την αιμοληψία. Το τελευταίο αντιμετωπίζεται με απόρριψη των πρώτων mL της αιμοληψίας. Επιπλέον, η έκφραση αυτών των δεικτών μπορεί να επαχθεί ή να υπάρχει σε χαμηλά επίπεδα στα αιμοκύτταρα ([48], [51], [52], [53], [54]). Επιπρόσθετο ζήτημα είναι η EMT, στην οποία βρίσκονται ή έχουν ολοκληρώσει τα CTCs, με αποτέλεσμα να μειώνονται ή και να εκμηδενίζονται τα επίπεδα έκφρασης επιθηλιακών αντιγόνων.

Το σύνολο των ιστοειδικών δεικτών είναι εκτεταμένο και συνεχώς προστίθενται νέοι δείκτες. Εμφανίζουν το πλεονέκτημα της υψηλής ειδικότητας αλλά σπανίως χαρακτηρίζουν όλα τα κύτταρα του ιστού με συγκεκριμένη παθολογία. Λόγω της ετερογένειας των όγκων, ωστόσο, δεν είναι γνωστοί μέχρι στιγμής δείκτες, οι οποίοι εκφράζονται καθολικά από όλα τα κύτταρα συγκεκριμένου καρκινικού τύπου όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών ασθενών αλλά και στον ίδιο τον ασθενή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η HER2, η οποία εκφράζεται μόνο στο 20-30% των καρκίνων του μαστού, ενώ και σε εκείνους στους οποίους υπερεκφράζεται εμφανίζει σημαντικό εύρος επιπέδων έκφρασης. Ένας από τους κυριότερους δείκτες είναι η πρωτεΐνη mammaglobin (SCGB2A2), η οποία ανήκει στην υπερικογένεια των σεκρετογλοβινών και απαντά στον μαζικό αδένα αλλά και στο θηλυκό γεννητικό σύστημα τόσο στην υγιά όσο και στην καρκινική κατάσταση. Επιπλέον, οι ιστοειδικοί δείκτες κάποιες φορές εκφράζονται και σε φυσιολογικά κύτταρα, όπως τα λευκοκύτταρα, αν και σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Η ανίχνευση των CTCs συνεπώς με εξαιρετικά ευαίσθητες μεθόδους, όπως

η RT-PCR, πιθανόν να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Στην πραγματικότητα, οι αληθείς ογκοειδικοί δείκτες είναι οι γενετικές ανωμαλίες, όπως η επέκταση του γονιδίου HER2 στους καρκίνους του μαστού και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο p53. Αυτές οι γενετικές μεταβολές μπορούν να ανιχνευθούν με FISH ή με PCR. Άλλο χαρακτηριστικό των νεοπλασιών αποτελούν οι επιγενετικές μεταβολές, οι οποίες δεν έχουν ακόμα αξιοποιηθεί για την ανίχνευση CTCs.

Νεοαναδυόμενοι είναι οι δείκτες, οι οποίοι σχετίζονται με την EMT καθώς και εκείνοι των βλαστικών κυττάρων δεδομένου, ότι φαίνεται πολύ πιθανό να τους εκφράζουν τουλάχιστον οι πιο επιθετικοί τύποι των CTCs. Η χρήση τους ωστόσο, δεν έχει εδραιωθεί, διότι αρκετοί από αυτούς εκφράζονται φυσιολογικά και από τα αιματοκύτταρα (π.χ. μεσεγχυματικοί δείκτες).

Πίνακας 4 | Δείκτες με εκτεταμένη χρήση στην ανίχνευση CTCs

Ειδικότητα	Όνομασία [Συνώνυμο]	Λειτουργία	Μέθοδος ανίχνευσης	Συσχετισμός με CTCs
ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΙ	Cytokeratin (CK) 7/8/18/19/20	Συγκροτεί τα ενδιάμεσα ινίδια του κυτταροσκελετού των επιθηλιακών κυττάρων	IF RT-PCR RT-qPCR mRT-PCR	[55], [56], [57], [58], [59], [60], [61], [62], [63], [64], [65], [66],[67], [68]
	Mucin-1 (Muc-1)	Αποτελεί συστατικό τού γλυκοκάλυκα, στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων	RT-PCR RT-qPCR mRT-PCR	[61], [62], [55], [64], [67]
	Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpcAM) [Tumour-associated calcium signal transducer 1, (TACSTD1)]	Είναι ομοφιλικό ασβεστοανεξάρτητο μόριο κυτταρικής προσκόλλησης, το οποίο εκφράζεται στην βασιπλευρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Θεωρείται ότι υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα.	IF RT-PCR	[61], [55], [58], [59], [63]
ΟΓΚΟΕΙΔΙΚΟΙ	HER2 (ErbB2)	Ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Θεωρείται ορφανός υποδοχέας, καθώς δεν έχει γνωστό προσδέτη. Συμμετέχει, ωστόσο, στον διμερισμό των υπόλοιπων EGFRs κατά την δέσμευση προσδέτη. Γονιδιακή επέκταση και υπερέκφραση συνδέεται με ορισμένους τύπους καρκίνου του μαστού.	IF RT-PCR RT-qPCR mRT-PCR	[69], [70], [43]
	Carcino-embryonic antigen related cell adhesion molecule 5 (CEACAM5)	Εκτεταμένα γλυκοζυλιωμένη γλυκοπρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στην διακυτταρική συνάφεια. Παράγεται φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά η παραγωγή της αναστέλλεται πριν την γέννηση. Ανεβασμένα επίπεδα στον ορό τού αίματος έχουν συσχετισθεί με ορισμένα καρκινώματα.	RT-PCR RT-qPCR mRT-PCR	[61], [62], [58]

IF ανοσοφθορισμός, RT-PCR Reverse Transcription PCR, q quantitative, m multiplex

Πίνακας 2 | Δείκτες με εκτεταμένη χρήση στην ανίχνευση CTCs (συνέχεια)

Ειδικότητα	Όνομασία [Συνώνυμο]	Λειτουργία	Μέθοδος ανίχνευσης	Συσχετισμός με CTCs
ΟΓΚΟΕΙΔΙΚΟΙ	Mammaglobin (SCGB2A1)	Ανήκει στην οικογένεια των σεκρετογλοβινών και εκκρίνεται στον μαζικό αδέν. Μέχρι σήμερα δεν έχει προσδιοριστεί η λειτουργία της.	RT-PCR RT-qPCR mRT-PCR	[55], [56], [57], [58], [59], [60], [61], [62], [63], [64], [65], [67], [68]
	Melanoma antigen family A 3 (MAGEA3)	Ανήκει στην οικογένεια MAGEA. Δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα η λειτουργία της.		[61], [55]
	Twist1	Κεντρικός μεταγραφικός παράγοντας της EMT	RT-PCR RT-qPCR mRT-PCR	[71], [72]
	Protein kinase Akt-2 (Akt-2) [Protein kinase B (PKB)]	Είναι κινάση σερίνης/θρεονίνης με κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, της ινσουκτινοεξαρτώμενης σηματοδότησης, της αγγεογένεσης και της ογκογένεσης. Είναι καθοδικός μεσολαβητής του μονοπατιού PI3-K	RT-PCR RT-qPCR mRT-PCR	[71] Cheng et al. (2008)
	Phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1 (PI3KAP1)	Εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της PI3-K στα Β-λεμφοκύτταρα και στα φυσικά φονικά κύτταρα	RT-PCR RT-qPCR mRT-PCR	[71]
EMT	Vimentin	Συγκροτεί τα ενδιάμεσα ινίδια του κυτταροσκελετού των μεσεγχυματικών κυττάρων	IF RT-PCR RT-qPCR	[72], [73]
	N-cadherin	Ασβεστοεξαρτώμενο μόριο κυτταρικής προσκόλλησης, το οποίο εκφράζεται κατά την γαστρίδιωση, στις συνάψεις του ΚΝΣ και στα καρκινικά κύτταρα στα οποία παρέχει μηχανισμό για την μετανάστευση μέσω ενδοθηλίων	IF	[74]

*ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Πίνακας 2 | Δείκτες με εκτεταμένη χρήση στην ανίχνευση CTCs (συνέχεια)

Ειδικότητα	Ονομασία [Συνώνυμο]	Λειτουργία	Μέθοδος ανίχνευσης	Συσχετισμός με CTCs
ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)	Ανήκει στην οικογένεια ALDH, οι οποίες καταλύουν την οξείδωση αλειφατικών και αρωματικών αλδεϋδών προς καρβοξυλικά οξέα. Εμπλέκεται στην οξείδωση της ρετινόλης προς ρετινοϊκό οξύ, το οποίο είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την επιβίωση των βλαστικών κυττάρων.	RT-PCR	[71], [73]
	Antigen CD44 (CD44)	Μόριο συναφείας με πολλαπλούς ρόλους στην σηματοδότηση, την μετανάστευση και την εγκατάσταση κυττάρων.	IF RT-PCR	[61]
	Chemokine CXC motif receptor 4 (CXC4)	Ανήκει στους CXC υποδοχείς χημειοκινών. Προσδέτης του είναι ο παράγοντας SDF-1. Εμπλέκεται στην είσοδο του HIV στα κύτταρα και υπερεκφράζεται στα μαζικά μεταστατικά κύτταρα	ELISPOT	[75]

1.8. Απομόνωση και ανίχνευση των CTCs

Τα CTCs δύνανται, όπως προαναφέρθηκε, να χρησιμεύσουν στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και την ανταπόκριση του ασθενούς στην θεραπεία. Μικρή πρόδος υπήρξε στην μελέτη των CTCs μέχρι πρόσφατα, κυρίως λόγω τεχνολογικών περιορισμών και της σπανιότητας των CTCs στο περιφερικό αίμα. Εφόσον τα CTCs είναι πολύ σπάνια γεγονότα (1 CTCs/10⁶-10⁷ λευκοκύτταρα), στις περισσότερες περιπτώσεις ανιχνεύονται συνδυάζοντας δύο βήματα: (α) απομόνωση/εμπλουτισμό και (β) ανίχνευση.

1.8.1. Παράμετροι αξιολόγησης των μεθόδων απομόνωσης και ανίχνευσης

Έχουν οριστεί τρία βασικά αντικειμενικά κριτήρια, η ευαισθησία, η ειδικότητα και η επαναληψιμότητα, με βάση τα οποία πραγματοποιείται η αξιολόγηση μεθόδων απομόνωσης ή ανίχνευσης. Αν και είναι κοινά αυτά τα κριτήρια, διαφοροποιούνται εννοιολογικά ανάλογα με τον στόχο της μεθόδου (απομόνωση ή ανίχνευση).

Όσον αφορά τις μεθόδους ανίχνευσης, η ευαισθησία και η ειδικότητα ακολουθούν τον κλασικό ορισμό. Ευαισθησία είναι η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, δηλαδή η πιθανότητα αδυναμίας ανίχνευσης της νόσου, ενώ είναι παρούσα. Στο πλαίσιο μελέτης των CTCs η ευαισθησία αναφέρεται στην αδυναμία ανίχνευσης των CTCs, όταν αυτά υπάρχουν στο δείγμα. Ειδικότητα είναι η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, δηλαδή η ανίχνευση της νόσου αν και το υπό εξέταση άτομο είναι υγιές. Η ειδικότητα δηλαδή αναφέρεται στην ανίχνευση CTCs, όταν αυτά κανονικά δεν υπάρχουν.

Η αξιολόγηση των μεθόδων εμπλουτισμού περιλαμβάνει πάντα ανίχνευση, με συνέπεια να επηρεάζεται από την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου ανίχνευσης. Είναι δυνατόν τα κριτήρια αυτά να τροποποιηθούν, ώστε να ανταποκρίνονται στην απομόνωση. Η ευαισθησία στην συγκεκριμένη περίπτωση αξιολογείται από την απόδοση της μεθόδου, δηλαδή το ποσοστό ανάκτησης CTCs από ένα δείγμα. Μέθοδος εμπλουτισμού χαμηλής ευαισθησίας θα έχει μικρή απόδοση, ώστε, ακόμα και αν η μέθοδος ανίχνευσης είναι άριστη, να υπάρχει ο κίνδυνος αδυναμίας εντοπισμού CTCs, εάν αυτά είναι παρόντα στο υπό εξέταση δείγμα. Εάν λάβουμε υπόψιν, ότι τα CTCs υπάρχουν σε πολύ μικρούς αριθμούς σε δείγματα αίματος ασθενών, η απόδοση αποτελεί κατάλληλο μέτρο της ευαισθησίας.

Όσον αφορά στην ειδικότητα, αξιολογείται από τον βαθμό εμπλουτισμού, τον οποίο επιτυγχάνει η μέθοδος απομόνωσης. Η ειδικότητα στην περίπτωση αυτή σχετίζεται με την ικανότητα της μεθόδου να επιλέγει τα κύτταρα-στόχους, με

συνέπεια όσο μεγαλύτερη η ειδικότητα τόσο πιο καθαρό το προϊόν του εμπλουτισμού.

Τέλος, οποιαδήποτε μέθοδος, ανεξάρτητα από την χρήση της, πρέπει να είναι επαναλήψιμη, δηλαδή να δίνει πάντοτε τα ίδια αποτελέσματα για δείγμα όμοιας σύστασης.

1.8.2. Μέθοδοι απομόνωσης/εμπλουτισμού

Το φυσικό περιβάλλον των CTCs είναι το περιφερικό αίμα, τα έμμορφα συστατικά του οποίου είναι αιμοπετάλια $10^9/\text{mL}$, λευκοκύτταρα $5-10 \cdot 10^6/\text{mL}$ και ερυθροκύτταρα $5-10 \cdot 10^9/\text{mL}$. Με δεδομένο, ότι τα CTCs συνήθως ανευρίσκονται σε πολύ χαμηλούς αριθμούς, της τάξης των 10 CTCs/mL ή και λιγότερο, και ότι δεν υπάρχει τεχνική τόσο ευαίσθητη, ώστε να μπορεί να ανιχνεύσει 1 κύτταρο ανάμεσα σε 10^9 κύτταρα, καθίσταται προφανές, ότι είναι απαραίτητη η απομόνωσή τους πριν την μέτρησή τους. Επειδή η πλήρης απομάκρυνση των υπόλοιπων αιμοκυττάρων είναι πρακτικά ανέφικτη, είναι ορθό να γίνεται αναφορά σε μεθόδους εμπλουτισμού παρά απομόνωσης, μολονότι και οι δύο όροι χρησιμοποιούνται εξίσου.

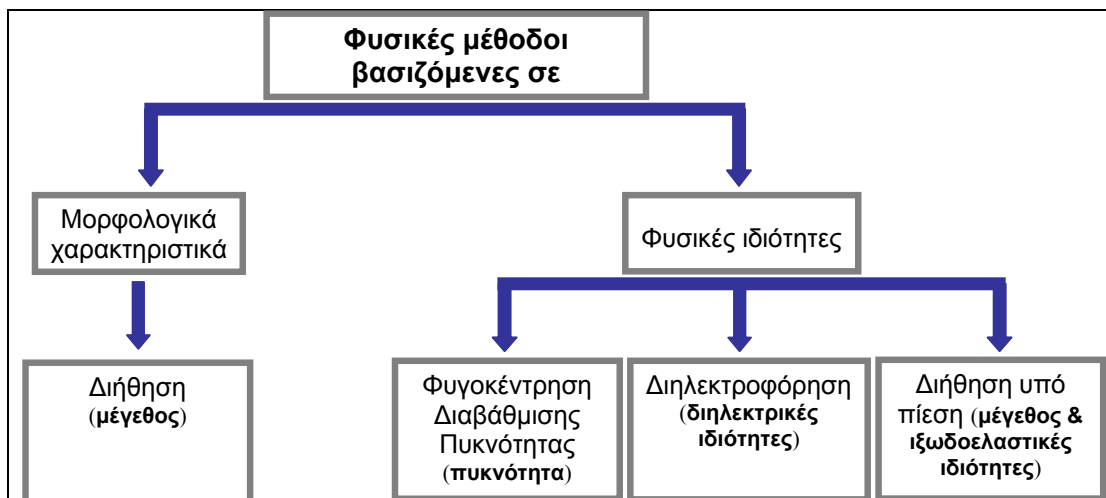
Έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές, οι οποίες αξιοποιούν διαφορετικά χαρακτηριστικά των CTCs για να τα απομονώσουν. Οι φυσικές μέθοδοι στηρίζονται σε φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, όπως η πυκνότητα και το μέγεθος, ενώ οι ανοσολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούν αντισώματα έναντι επιφανειακών αντιγόνων είτε για να επιλέξουν τα CTCs (θετική επιλογή) είτε για να απομακρύνουν τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος (αρνητική επιλογή). Στον Πιν.5 συνοψίζονται οι μέθοδοι εμπλουτισμού, οι οποίες χρησιμοποιούνται συχνότερα στην βιβλιογραφία.

Πίνακας 5 | Σύνοψη των κυρίων μεθόδων εμπλουτισμού

Μέθοδος	Όριο ευαισθησίας (κύτταρο ανά όγκο αίματος)	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας	1 CTC/ 4,6μL	Εύκολη, μικρού κόστους Κατάλληλη και για EpCAM ⁺ CTCs Απομόνωση ζώντων κυττάρων	Χαμηλή ειδικότητα Μικρή καθαρότητα Απώλεια CTCs με μεγαλύτερη πυκνότητα
Διήθηση	1 CTC/ 1mL	Εύκολη, σύντομη Δεν αλλοιώνει την μορφολογία των κυττάρων Ελάχιστη απώλεια κυττάρων Κατάλληλη και για EpCAM ⁺ CTCs Απομόνωση ζώντων κυττάρων	Χαμηλή ειδικότητα Μικρή καθαρότητα Απώλεια CTCs με διάμετρο μικρότερη των 8μm
Ανοσοροζέττες (RosetteSep)		Εύκολη Κατάλληλη και για EpCAM ⁺ CTCs Απομόνωση ζώντων κυττάρων	Χαμηλή ειδικότητα Απώλεια CTCs με μεγαλύτερη πυκνότητα
Θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια (MACS, Dynal Magnetic Beads)	1 CTC/ 0,3mL	Απομόνωση ζώντων κυττάρων Υψηλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια	Ψευδώς θετικά αποτελέσματα (έκφραση αντιγόνου σε φυσιολογικά κύτταρα) Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (απώλεια έκφρασης αντιγόνων στα CTCs)
Αρνητική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια (MACS, Dynal Magnetic Beads)		Απομόνωση ζώντων κυττάρων Υψηλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια	Μικρή καθαρότητα του προϊόντος Πιθανή απώλεια κυττάρων
CTC chip	1CTC/ 10 ⁹ αιματοκύτταρα	Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα Υψηλή ανάκτηση κυττάρων Υψηλή βιωσιμότητα των κυττάρων (98%) Μηδαμινή προεπεξεργασία του αίματος Δυνατότητα περαιτέρω ανάλυσης	Μόνο τα EpCAM ⁺ CTCs μπορούν να ανιχνευθούν Ψευδώς θετικά αποτελέσματα (έκφραση αντιγόνου σε φυσιολογικά κύτταρα) Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (απώλεια έκφρασης αντιγόνων στα CTCs)
Δοκιμασία CAM	1CTC/0,1mL	Απομόνωση ζώντων κυττάρων (99,9% βιωσιμότητα) Ανιχνεύει CTCs με διηθητικό φαινότυπο Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα	Απαιτεί 12ωρη καλλιέργεια Δεν έχει πραγματοποιηθεί μεγάλη κλίμακας κλινική αξιολόγηση

1.8.2.1. Φυσικές μέθοδοι

Στις φυσικές μεθόδους συγκαταλέγονται η διήθηση, ο διαχωρισμός διαβάθμισης πυκνότητας, η διηλεκτροφόρηση και η διήθηση υπό πίεση (Εικ.6).



Εικόνα 6 | Φυσικές μέθοδοι επιλογής CTCs

Διήθηση

Η διήθηση διαχωρίζει σωματίδια με κριτήριο την διαφορά μεγέθους. Η διάμετρος των πόρων του ηθμού καθορίζει το μέγεθος των διερχομένων σωματιδίων. Για να εφαρμοστεί αυτή η τεχνική για τον εμπλουτισμό CTCs από αίμα, έχει θεωρηθεί, ότι τα CTCs είναι διαμέτρου μεγαλύτερης των 8μm, όπως και τα περισσότερα μονοκύτταρα και πολυμορφοπύρρηνα (ουδετερόφιλα, βασεόφιλα και ηωσινόφιλα). Κατά συνέπεια, χρησιμοποιώντας διηθητική μεμβράνη με διάμετρο πόρων 8μm, απομακρύνονται στο διήθημα τα ερυθροκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα αιμοπετάλια, ενώ στην μεμβράνη θα κατακρατηθούν τα CTCs, τα μονοκύτταρα και τα πολυμορφοπύρρηνα. Ο εμπλουτισμός, ο οποίος θεωρητικά επιτυγχάνεται, είναι τρεις τάξεις μεγέθους, παρόμοιος δηλαδή με της διαχωριστικής φυγοκέντρησης. Η μέθοδος, αν και είναι απλή στην εφαρμογή και χαμηλού κόστους, χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία και εξειδίκευση. Πρέπει επιπλέον να αναφερθεί, ότι δεν έχει αποδειχθεί, ότι όλα τα CTCs έχουν διάμετρο μεγαλύτερη των 8μm. Κατά συνέπεια υπάρχει πιθανότητα CTCs μικρότερης διαμέτρου να χάνονται στο διήθημα.

ISET

Έχουν περιγραφεί διάφορες παραλλαγές της μεθόδου. Οι Vona και συνεργάτες [76], ανέπτυξαν την μέθοδο ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumour cells), η οποία καθιστά δυνατό τον μορφολογικό, αντιγονικό και γενετικό χαρακτηρισμό διακριτών CTCs. Χρησιμοποιείται συσκευή διήθησης υπό κενό με 12 βοθρία (Biocom Company, France), η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση 12 δειγμάτων του 1mL. Η μεμβράνη διήθησης είναι τεχνολογίας Track-Etch με ομοιόμορφους κυλινδρικούς πόρους των 8μm και συνολική επιφάνεια διαμέτρου 0,6cm. Το δείγμα περιφερικού αίματος (1mL) αραιώνεται 1:10 με διάλυμα, το οποίο περιέχει παραφολμαδεύδη για την μονιμοποίηση των κυττάρων και ήπιο απορρυπαντικό (σαπωνίνη) για την διαπερατοποίησή τους. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και έκπλυση. Η μεμβράνη αφήνεται να αφυγρανθεί στον αέρα και

ακολουθεί χρώση με Ηωσίνη-Αιματοξυλίνη (H&A) ή με May-Grumwald-Giemsa για την μορφομετρική ανάλυση των παγιδευμένων στην μεμβράνη κυττάρων. Είναι δυνατόν να ακολουθήσει περαιτέρω η χρώση με αντισώματα για μικροσκοπική παρατήρηση (ανοσοϊστοχημεία ή ανοσοφθορισμός) ή η μικροεκτομή με την βοήθεια laser και μοριακή ανάλυση με PCR για την χαρτογράφηση καθορισμένων γονιδίων (π.χ. *p53*) ή η καρυοτυπική ανάλυση με FISH. Η μέθοδος εμφανίζει υψηλή ευαισθησία (1 CTC/mL αίματος) και παρέχει την δυνατότητα χαρακτηρισμού με ποικιλία τεχνικών. Επιπλέον, είναι δυνατή η απομόνωση συσσωματωμάτων CTCs (Εικ.7). Η ειδικότητά της όμως, είναι χαμηλή και δεν επιτρέπει την παραλαβή ζώντων κυττάρων.



Εικόνα 7 | Η μέθοδος ISET.

Το αίμα διηθείται σε κατάλληλη συσκευή και ακολουθεί χρώση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση εφαρμόστηκε χρώση H&A. Με την μέθοδο είναι δυνατή η απομόνωση κυκλοφορούντων CTC συσσωματωμάτων (CTM), όπως φαίνεται στην τελευταία φωτογραφία.

Απλή διήθηση

Σε άλλη παραλλαγή [77] το αίμα (9mL) αραιώνεται με ισοτονικό διάλυμα και διηθείται υπό την επίδραση της βαρύτητας, μέσω πολυκαρβονικής μεμβράνης τύπου Track-Etch (Genetic Research Instrumentation Ltd, UK) διαμέτρου πόρων 8μm, η οποία τοποθετείται σε συνήθη συσκευή διήθησης. Μετά την έκπλυσή της, η μεμβράνη μεταφέρεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και ακολουθεί εντοπισμός με ανοσοφθορισμό ή ανοσοκυτταροχημεία. Τα κύτταρα δεν μονιμοποιούνται πριν την διήθηση, με συνέπεια να ανακτώνται ζώντα κύτταρα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν με άλλο τρόπο από αυτόν, τον οποίον προτείνουν οι συγγραφείς (π.χ. καλλιέργεια).

Διαχωρισμός Διαβάθμισης Πυκνότητας

Η τεχνική τού διαχωρισμού διαβάθμισης πυκνότητας (Density Gradient Separation, DGS) διαχωρίζει σωματίδια με βάση την διαφορά της πυκνότητάς τους. Αιώρημα ετερογενούς κυτταρικού πληθυσμού υπερτίθεται μέσου κατάλληλης πυκνότητας, συνήθως πολυμερούς, και φυγοκεντρείται. Με το πέρας της φυγοκέντρησης σχηματίζονται φάσεις διαφορετικής πυκνότητας [78].

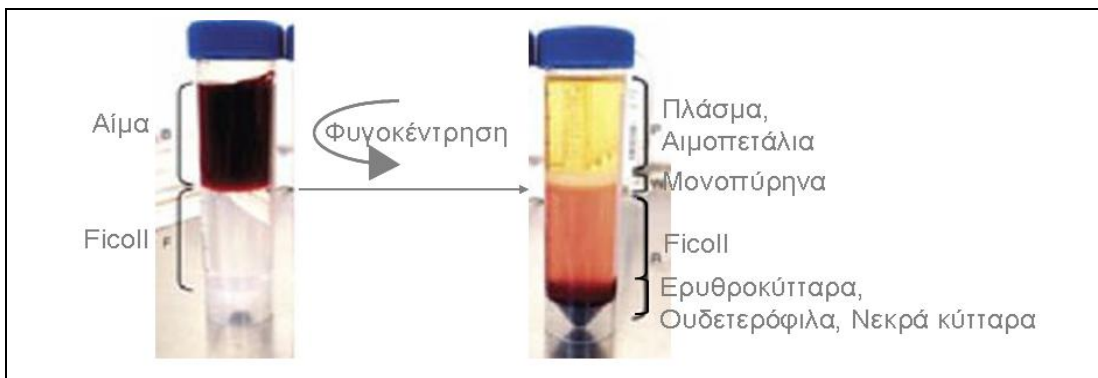
Οι διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί τού αίματος διαφέρουν ως προς την πυκνότητα: τα ερυθροκύτταρα και τα ουδετερόφιλα έχουν >1,077g/mL και τα

μονοπύρηννα (B και T λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) $<1,077\text{g/mL}$. Όταν αίμα τοποθετηθεί πάνω από μέσο πυκνότητας $1,077\text{g/mL}$ και στην συνέχεια φυγοκεντρηθεί, θα διαχωριστεί σε επιμέρους φάσεις διαφορετικής πυκνότητας (Εικ.8), οι οποίες από τον πυθμένα προς την επιφάνεια είναι:

1. Των ερυθροκυττάρων, των ουδετερόφιλων και των ηωσινόφιλων
2. Της φικόλλης
3. Των μονοπύρηνων (B και T λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα) και βασεόφιλων
4. Του πλάσματος

Τα CTCs θεωρείται, ότι έχουν πυκνότητα μικρότερη της τιμής $1,077\text{g/mL}$, με αποτέλεσμα σε φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας να μεταναστεύουν μαζί με τα μονοπύρηννα στην μεσόφαση. Ο θεωρητικός εμπλουτισμός είναι περίπου τρεις τάξεις μεγέθους. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλλέγονται η απλότητα, το χαμηλό κόστος και η παραλαβή ζώντων κυττάρων, ενώ στα μειονεκτήματα είναι η χαμηλή εξειδίκευση και ευαισθησία και η δυσκολία χειρισμού. Είναι σημαντικό να τονισθεί, ότι δεν έχει αποδειχθεί, ότι όλα τα CTCs έχουν πυκνότητα χαμηλότερη της τιμής $1,077\text{g/mL}$, το οποίο συμβάλλει στην χαμηλή της απόδοση.

Το μέσο πυκνότητας $1,077\text{g/mL}$, το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως, είναι η φικόλλη, η οποία είναι εμπορικά διαθέσιμη με πληθώρα ετικετών (Histopaque-Sigma, Lymphoprep κα). Επιπλέον, κυκλοφορεί προϊόν, το οποίο αποτρέπει την ανάμειξη του αίματος με την φικόλλη μέχρι την έναρξη της φυγοκέντρησης, με την παρεμβολή φράγματος μεταξύ δείγματος και πολυμερούς (Oncoquick), αυξάνοντας την απόδοση της μεθόδου.

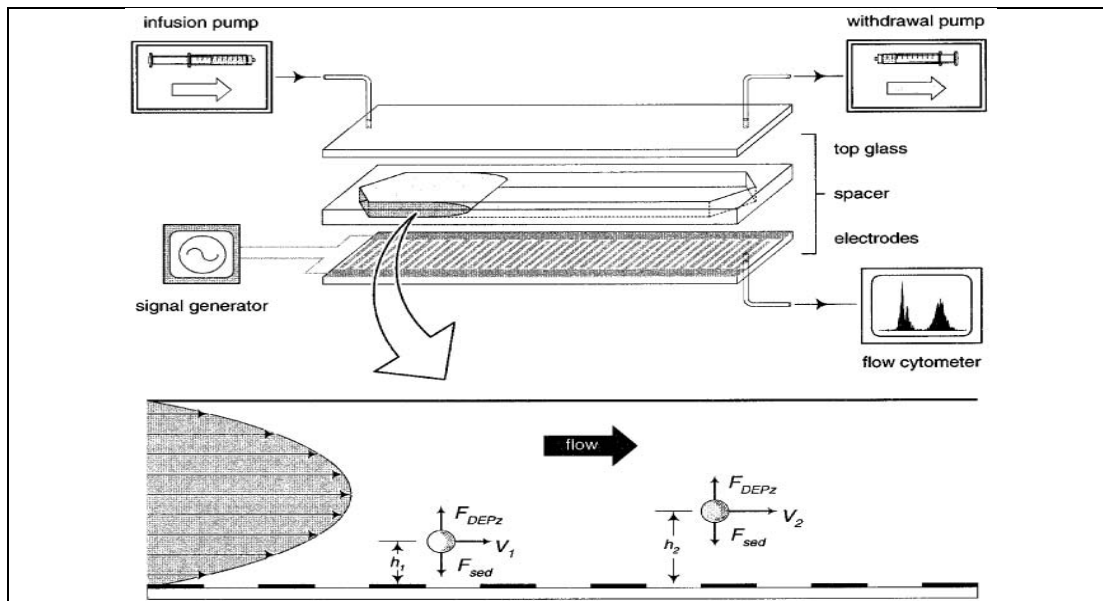


Εικόνα 8 | Διαχωρισμός με Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας

Διηλεκτροφόρηση

Διηλεκτροφόρηση ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ασκείται δύναμη πάνω σε ένα διηλεκτρικό σωματίδιο, όταν αυτό βρίσκεται σε ανομοιόμορφο ηλεκτρικό πεδίο. Το μέτρο της δύναμης εξαρτάται από τις ηλεκτρικές ιδιότητες του σωματιδίου, το σχήμα και το μέγεθος του σωματιδίου, την συχνότητα του ηλεκτρικού πεδίου και το μέσον, εντός του οποίου βρίσκεται το σωματίδιο. Η διηλεκτρική δύναμη αξιοποιείται σε σωματίδια διαμέτρου $1-1000\mu\text{m}$. Το φαινόμενο αυτό χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό κυττάρων (Εικ.9) με

διαφορετικές πυκνότητες και διηλεκτρικές ιδιότητες [79]. Σε αυτές τις διαφορές οφείλεται η διαφορετική ροή των διακριτών κυτταρικών πληθυσμών, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται με βάση τον χρόνο, ο οποίος είναι απαραίτητος, για να διέλθουν μέσω κατάλληλου αγωγού. Η διηλεκτροφορητική απομόνωση πρόσφατα έχει αξιοποιηθεί εμπορικά αλλά ακόμα δεν έχει αξιολογηθεί εκτεταμένα για την χρησιμότητά της στον εμπλουτισμό των CTCs.



Εικόνα 9 | Διαχωρισμός κυττάρων με διηλεκτροφόρηση.

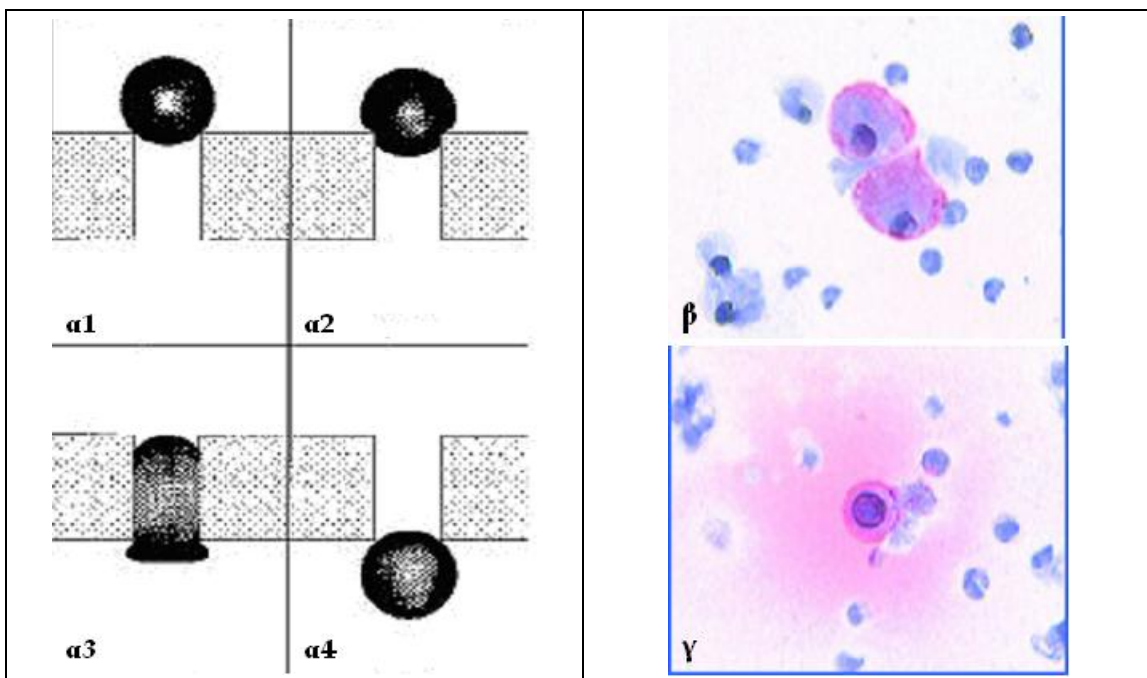
Κύτταρα διαφορετικών πυκνοτήτων και διηλεκτρικών ιδιοτήτων ρέουν σε διαφορετικές θέσεις (ύψη) της παραβολοειδούς κατανομής ταχυτήτων, ώστε η διηλεκτρική δύναμη (F_{dep}) να εξουδετερώνεται από την βαρυντική δύναμη (F_{sed}). Κατά συνέπεια διαφορετικά κύτταρα εξέρχονται από την διάταξη σε διαφορετικούς χρόνους.

Διήθηση υπό πίεση

Η διήθηση υπό πίεση είναι εμπορικά διαθέσιμη από την Canopus Bioscience Ltd. (Canada) και για τον διαχωρισμό των κυττάρων λαμβάνονται υπ'όψιν οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες τους [80]. Οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες των κυττάρων καθορίζουν τον βαθμό παραμόρφωσής τους κατά την εφαρμογή μηχανικής δύναμης και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες του κυτταροσκελετού. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές για τον προσδιορισμό των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων αρκετών κυτταρικών τύπων. Με βάση αυτά τα δεδομένα τα λευκοκύτταρα εμφανίζουν υψηλή ιξωδοελαστικότητα λόγω της αναδιπλούμενης κυτταροπλασματικής μεμβράνης τους, σε αντίθεση με τα CTCs, τα οποία αναμένεται να έχουν μικρότερη ανεκτικότητα σε παραμορφώσεις.

Για τον διαχωρισμό δύο κυτταρικών πληθυσμών με διαφορετικές ιξωδοελαστικές ιδιότητες εφαρμόζεται διήθηση. Οι πόροι της μεμβράνης έχουν μέγεθος μικρότερο της διαμέτρου και των δύο κυτταρικών τύπων αλλά με την βοήθεια της ασκούμενης πίεσης τα ελαστικά κύτταρα θα διέλθουν μέσω του πόρου (Εικ.10). Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων τόσο μεγαλύτερη πρέπει να είναι η

διαφορά πίεσης εκατέρωθεν της μεμβράνης, ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός εμπλουτισμός των δύο πληθυσμών. Για τον διαχωρισμό των CTCs χρησιμοποιούνται υδρόφοβες πολυκαρβονικές μεμβράνες με διάμετρο πόρων από 3-15 μm (κατά προτίμηση 6-9 μm) και πιέσεις από 20-190kPa (κατά προτίμηση 45-55kPa). Μετά τον διαχωρισμό τα CTCs είτε μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα για μικροσκοπική παρατήρηση με ανοσοϊστοχημεία (Εικ.8β-γ) ή ανοσοφθορισμό είτε καλλιεργούνται. Πλεονέκτημα της μεθόδου έναντι της ISET αποτελεί η ανάκτηση ζώντων κυττάρων και ο μεγαλύτερος εμπλουτισμός, διότι απομακρύνεται μεγαλύτερος αριθμός λευκοκυττάρων.

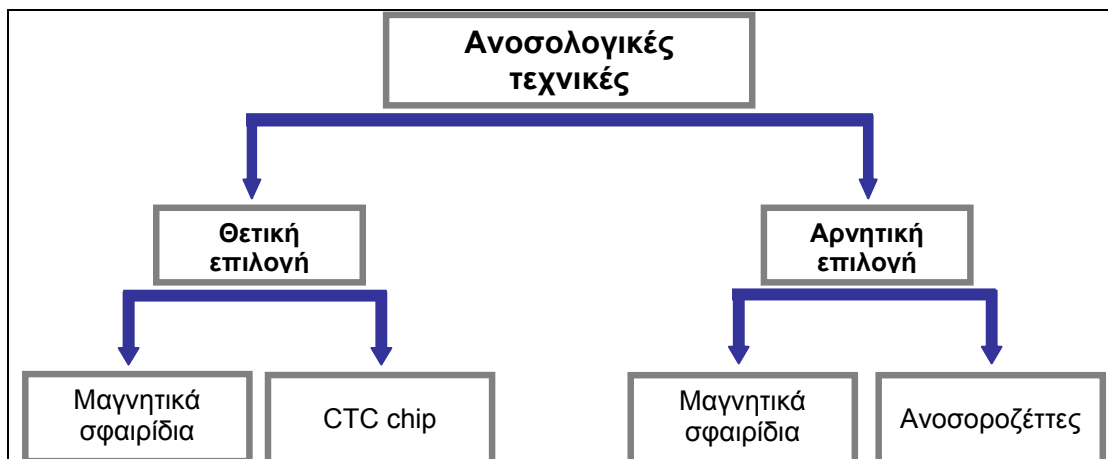


Εικόνα 10 | Διαχωρισμός κυττάρων με βάση τις ιζωδοελαστικές ιδιότητες τους.

(α1) Το κύτταρο παρασύρεται από την ροή σε έναν πόρο (υψηλή πίεση πάνω από την μεμβράνη), (α2) Η διαφορά πίεσης αρχίζει να παραμορφώνει το κύτταρο και το αναγκάζει να εισέλθει στον πόρο, (α3) Το κύτταρο διέρχεται μέσω του πόρου, (α4) Το κύτταρο παρασύρεται μακριά από τον πόρο λόγω της ροής, (β) Κύτταρα μετά τον εμπλουτισμό με διήθηση υπό πίεση και χρώση με H&A.

1.8.2.2. Ανοσολογικές μέθοδοι

Με ανοσολογικές τεχνικές αντισώματα δεσμεύουν επιφανειακά αντιγόνα κυττάρων, τα οποία προορίζονται να επιλεγούν ή να απομακρυνθούν. Οι κυριότερες τεχνολογικές εφαρμογές (Εικ.11) στον τομέα αυτό είναι τα μαγνητικά σφαιρίδια, οι ανοσοροζέτες και το CTC chip.

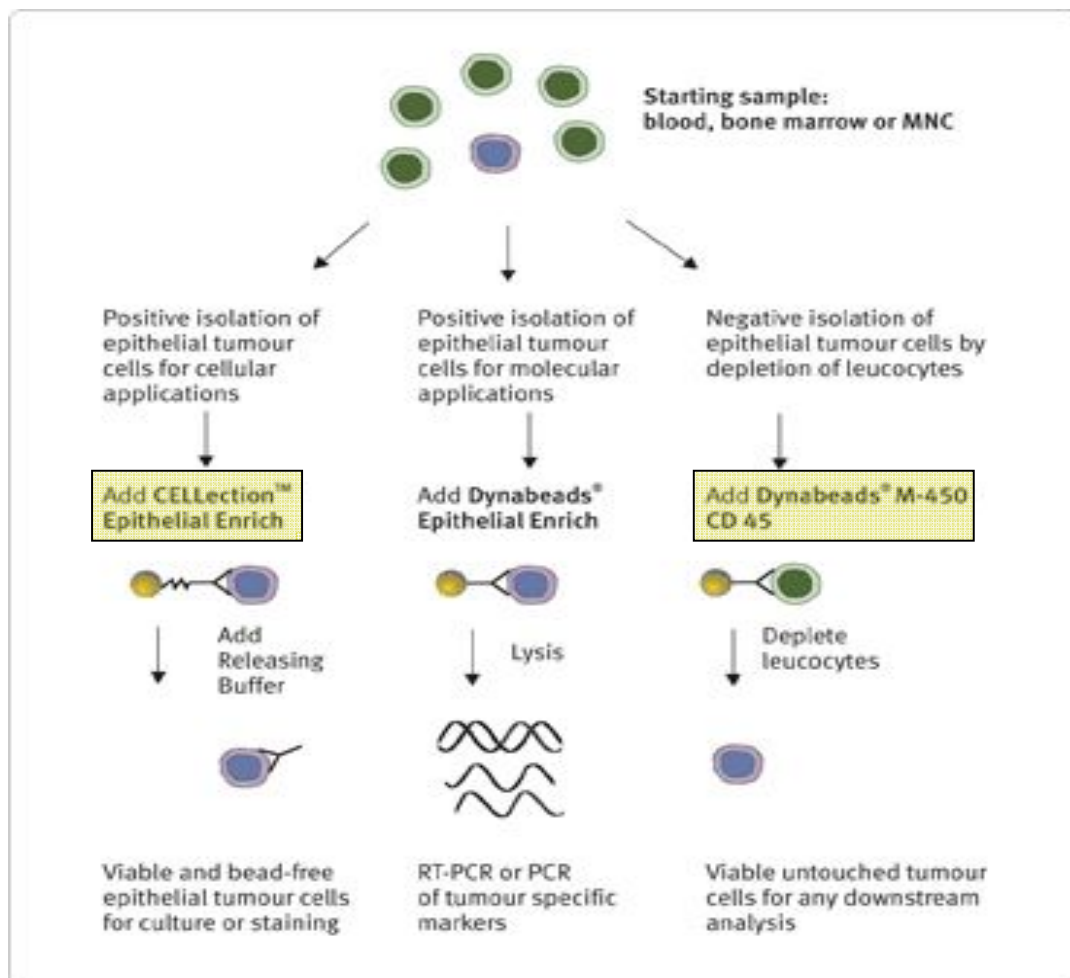


Εικόνα 11 | Ανοσολογικές τεχνικές διαχωρισμού των CTCs

Μαγνητικά σφαιρίδια

Τα μαγνητικά σφαιρίδια συνίστανται από μαγνητικό πυρήνα, επικαλυπτόμενο με κάποιο αδρανές πολυμερές. Στην επιφάνεια του σφαιριδίου προσδένονται τα μόρια του αντισώματος. Εμπορικά διαθέσιμα είναι τα Dynabeads (Dyna-Invitrogen, [81]) και τα MACS (Miltenyi, [82]). Σε όλες τις περιπτώσεις η αρχή λειτουργίας είναι η ίδια: τα σφαιρίδια αναμειγνύονται με το κυτταρικό αιώρημα και δεσμεύουν κύτταρα, τα οποία φέρουν επιφανειακό αντιγόνο, έναντι του οποίου έχει παραχθεί το αντίσωμα. Εάν το αντίσωμα δεσμεύει τα κύτταρα-στόχους τότε γίνεται λόγος για θετική επιλογή, ενώ εάν δεσμεύει κύτταρα των οποίων η απομάκρυνση είναι επιθυμητή τότε αναφερόμαστε σε αρνητική επιλογή (Εικ.12). Η εφαρμογή μαγνήτη προσελκύει τα σφαιρίδια και τα διαχωρίζει από το υγρό.

Οι δύο εταιρείες διαφέρουν ως προς την μεθοδολογία. Η Dynal-Invitrogen χρησιμοποιεί υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια διαμέτρου 4,5μm, απλούς δοκιμαστικούς σωλήνες για την επώαση του δείγματος με τα σφαιρίδια και μαγνήτες, στους οποίους τοποθετούνται οι σωλήνες για τον διαχωρισμό. Η Miltenyi από την άλλη χρησιμοποιεί βιοαποικοδομήσιμα υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια διαμέτρου 50nm, τα οποία φέρουν το επιθυμητό αντίσωμα. Η απομάκρυνσή τους δεν είναι απαραίτητη, διότι είναι βιοαποικοδομήσιμα και δεν φαίνεται να επηρεάζουν τις ακόλουθες διεργασίες. Μετά την επώαση με τα σφαιρίδια το κυτταρικό αιώρημα διοχετεύεται σε κατάλληλες στήλες (MACS columns), οι οποίες τοποθετούνται σε μαγνητικό διαχωριστή (MACS separator). Κύτταρα, τα οποία δεν έχουν σημανθεί, διέρχονται την στήλη και συλλέγονται, ενώ εκείνα, τα οποία έχουν σημανθεί, απελευθερώνονται από την στήλη μετά την απομάκρυνσή της από τον διαχωριστή. Ανεξαρτήτως εταιρείας, η χρήση εξειδικευμένου εξοπλισμού και αντιδραστηρίων ανεβάζει το κόστος της μεθόδου σε σύγκριση με άλλες.



Εικόνα 12 | Θετική και Αρνητική Επιλογή των CTCs με μαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads

Θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια

Κατά την θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια επιλέγονται τα κύτταρα-στόχοι από ετερογενές μείγμα κυτταρικών τύπων. Η κυριότερη δυσκολία της μεθόδου συνίσταται στην επιλογή του επιφανειακού δείκτη, έναντι του οποίου θα παραχθεί το αντίσωμα. Όπως προαναφέρθηκε, δεν έχει βρεθεί κάποιο μόριο, το οποίο αποτελεί γενικό δείκτη των CTCs. Η κοινή τακτική έχει ορίσει το μόριο EpCAM ως τέτοιο, αν και αμφισβητείται η γενικότητά του κυρίως λόγω της EMT, στην οποία υποτίθεται, ότι βρίσκονται τα CTCs, με επακόλουθο την μειωμένη έκφραση του EpCAM. Κλάσμα, ωστόσο, των CTCs εξακολουθεί να εκφράζει το συγκεκριμένο μόριο, όπως τουλάχιστον έχει φανεί από την ανάλυση δειγμάτων ασθενών. Πρέπει να αναφερθεί, τέλος, ότι το αντίσωμα μπορεί να είναι έναντι οποιουδήποτε αντιγόνου και όχι απαραίτητα του EpCAM (άλλοι επιφανειακοί δείκτες).

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση, ενώ η ευαισθησία εξαρτάται από το επίπεδο έκφρασης του αντιγονικού δείκτη, ο οποίος επιλέγεται κάθε φορά.

Η μέθοδος, επιπλέον, αποδίδει ζώντα κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούνται περαιτέρω σε άλλες εφαρμογές.

Αρνητική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια

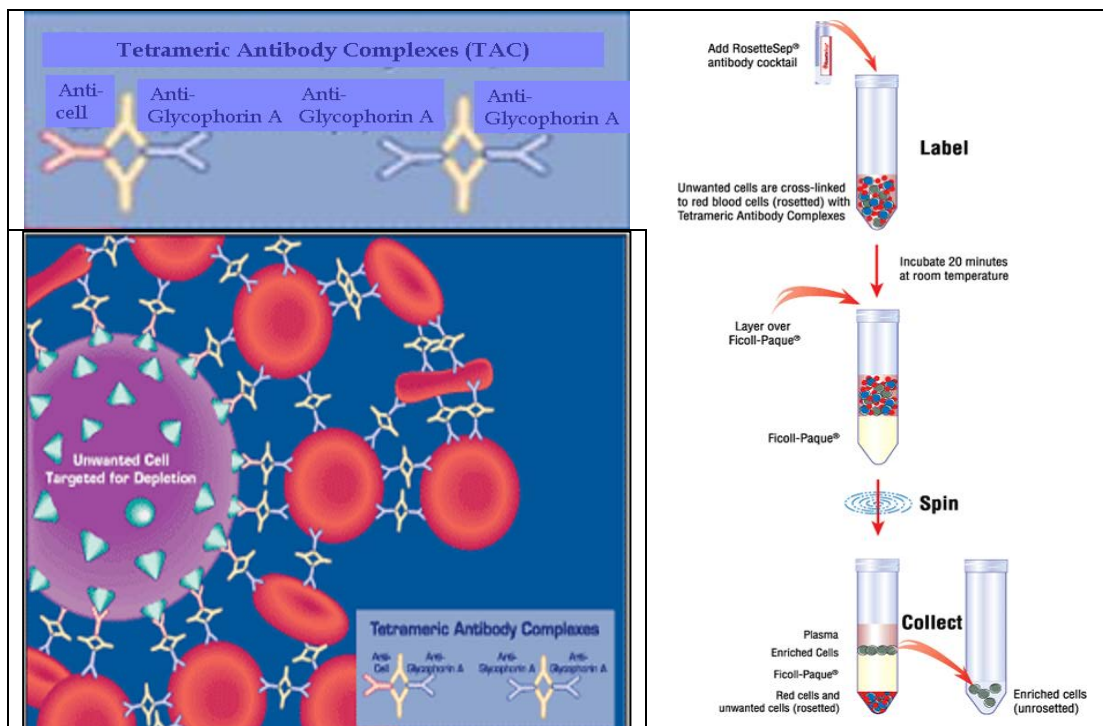
Κατά την αρνητική επιλογή με δέσμευση του πανλευκοκυτταρικού δείκτη CD45 από το κατάλληλο αντίσωμα απομακρύνονται τα λευκοκύτταρα, για να αυξηθεί η καθαρότητα του επιθυμητού κυτταρικού υποπληθυσμού. Η εφαρμογή λοιπόν μαγνητικών σφαιριδίων, επικαλυμμένων με anti-hCD45, σε δείγμα αίματος από το οποίο έχουν απομακρυνθεί τα ερυθροκύτταρα (με ερυθρόλυση ή με διαχωριστική φυγοκέντρηση), καταλήγει στην παραλαβή δείγματος εμπλουτισμένου με CTCs.

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από χαμηλή εξειδίκευση, ενώ η ευαισθησία μπορεί να είναι υψηλή. Η μέθοδος, επιπλέον, αποδίδει ζώντα κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούνται περαιτέρω σε άλλες εφαρμογές.

Αρνητική επιλογή με σχηματισμό ανοσοροζεττών

Με την τεχνική αυτή, η οποία αναπτύχθηκε και διατίθεται από την εταιρεία Stem Cell Technologies [83], συνδυάζεται η αρνητική επιλογή μέσω αντισωμάτων με την φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας (Εικ.13). Ειδικότερα, το RosetteSep συνίσταται από μείγμα διλειτουργικών αντισωμάτων, τα οποία αφενός δεσμεύονται σε κάποιο επιλεγμένο επιφανειακό αντιγόνο αφετέρου έχουν ειδικότητα για την γλυκοφορίνη A των ερυθροκυττάρων. Επιπλέον περιέχει διλειτουργικά αντισώματα έναντι μόνο της γλυκοφορίνης A. Όταν αυτό το μείγμα προστεθεί σε ολικό αίμα, τα αντισώματα διασυνδέουν τα ανεπιθύμητα κύτταρα με πολλαπλά ερυθροκύτταρα, με συνέπεια να αυξάνεται η φαινόμενη πυκνότητά τους πάνω από την τιμή 1,077g/mL. Η ακόλουθη φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας τελικά απομακρύνει μαζί με τα ερυθροκύτταρα και τα ανεπιθύμητα κύτταρα, αφήνοντας τα κύτταρα στόχους στην μεσόφαση μεταξύ πλάσματος και φικόλλης [84].

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η υψηλή καθαρότητα και ανάκτηση ζώντων κυττάρων, η απλότητα και η απουσία εξειδικευμένου εξοπλισμού. Επειδή όμως συνδυάζεται με φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας, παραμένουν τα μειονεκτήματα της δυσκολίας χειρισμού και της πιθανής απομάκρυνσης CTCs με πυκνότητα μεγαλύτερη της τιμής 1,077g/mL.



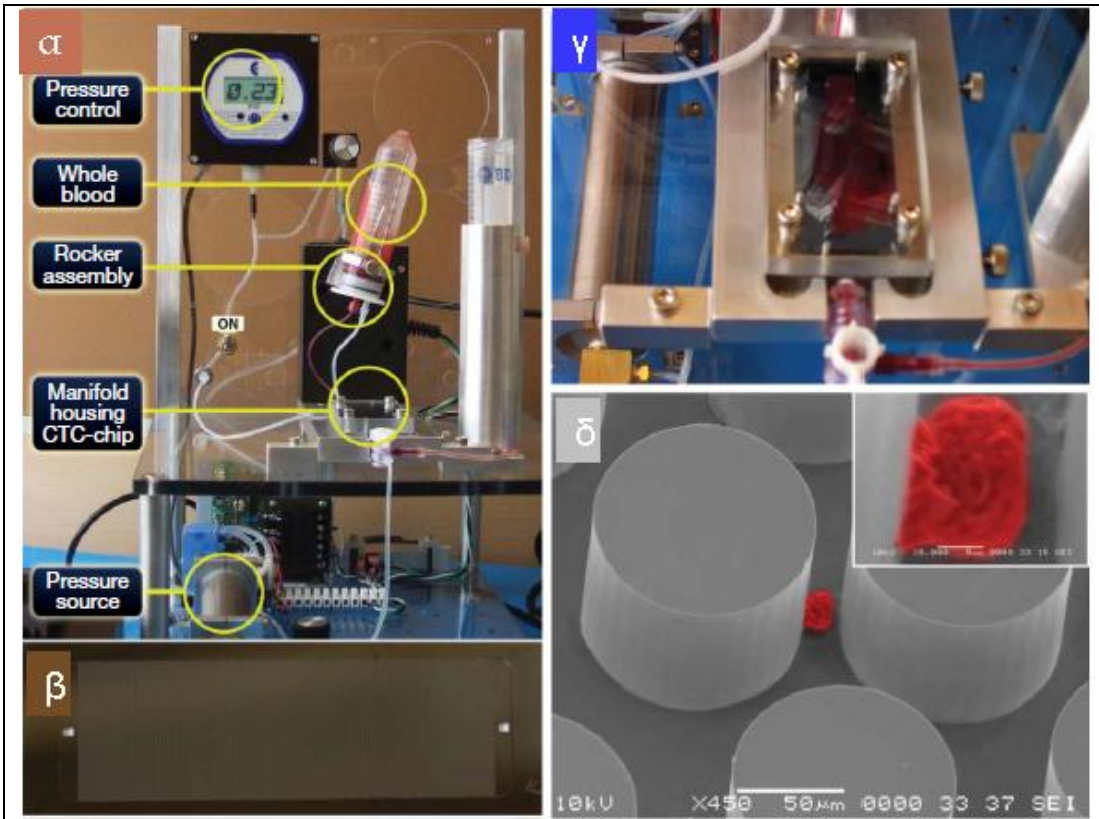
Εικόνα 13 | Διαχωρισμός μέσω σχηματισμού ανοσοροζεττών (α) Τετραμερή σύμπλοκα αντισωμάτων (TAC) (β) Σχηματισμός ανοσοροζεττών μέσω TAC (γ) Μεθοδολογία εμπλουτισμού με ανοσοροζέτες

Θετική επιλογή με το CTC Chip

Το CTC Chip (Εικ.14) συνιστά πρόσφατη τεχνολογία απομόνωσης CTCs, η οποία στηρίζεται στις μικρορροϊκές συσκευές (microfluidic devices) [85]. Η συσκευή, μεγάλους αντικειμενοφόρου πλάκας, αποτελείται από μεγάλο αριθμό μικροσκοπικών στηλών, πάνω στις οποίες έχει ακινητοποιηθεί αντίσωμα anti-hErCAM. Το ολικό αίμα αντλείται και ρέει μέσω του chip, με αποτέλεσμα να παγιδεύονται επλεκτικά κύτταρα φέροντα το αντιγόνο ErCAM. Μέχρι σήμερα, τα απομονωμένα κύτταρα ανιχνεύονται απευθείας πάνω στο chip με ανοσοφθορισμό, με αποτέλεσμα DAPI⁺CK⁺ κύτταρα να αναγνωρίζονται ως CTCs και DAPI⁺CD45⁺ κύτταρα ως αιμοτοκύτταρα.

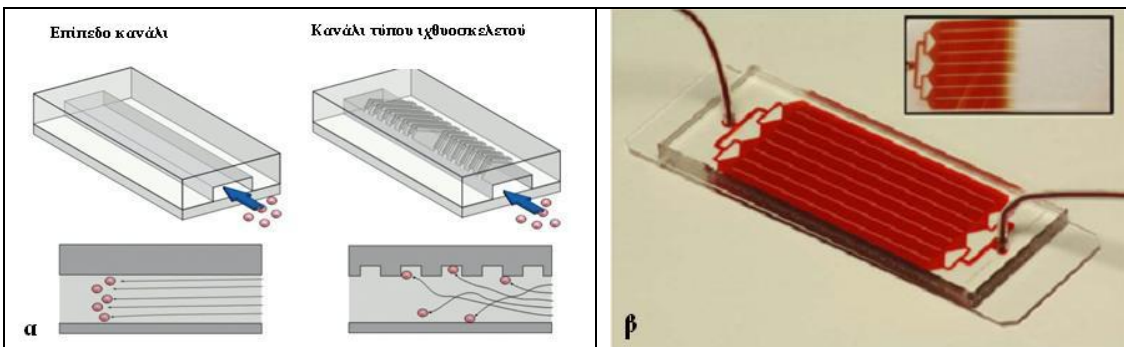
Πρόσφατα, ανακοινώθηκε νέα έκδοση του chip, το οποίο πλέον συνίσταται από στήλες σε διάταξη «ιχθυοσκελετού» (herringbone-chip) [86] (Εικ.15). Η μορφή αυτή επιτυγχάνει τον σχηματισμό μικροδινών, οι οποίες αυξάνουν την απόδοση, την καθαρότητα και την ποσότητα αίματος, το οποίο μπορεί να αναλυθεί.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία (99,1%) και ειδικότητα (100%) καθώς και η απομόνωση CTCs από ολικό αίμα χωρίς να απαιτείται προεργασία. Επίσης, αν και μέχρι σήμερα δεν έχει χρησιμοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατή η απομόνωση ζώντων CTCs με την έκλουσή τους από την διάταξη.



Εικόνα 14 | Απομόνωση CTCs από ολικό αίμα με χρήση του CTC Chip

(α) Η διάταξη για τον διαχωρισμό CTCs. Το αίμα αναδύεται συνεχώς και διοχετεύεται μέσω πνευματικής αντλίας στο chip, (β) Το CTC Chip, (γ) Αίμα διερχόμενο μέσω του chip, (δ) Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης ενός κυττάρου καρκίνου του πνεύμονα της σειράς NCI-1650 (κόκκινο ψευδόχρωμα). Στο πλαίσιο το κύτταρο φαίνεται σε μεγέθυνση.



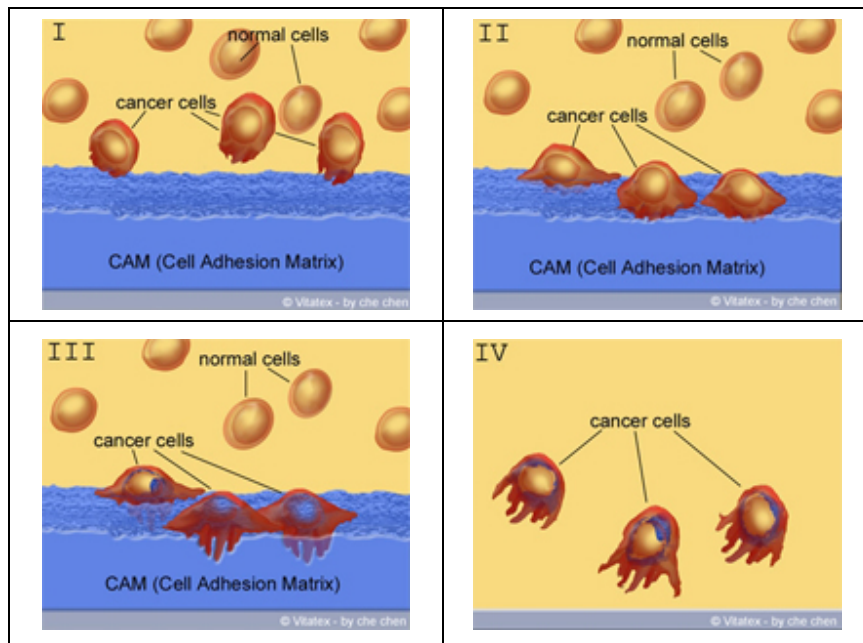
Εικόνα 15 | Το CTC chip με διάταξη ιχθυοσκελετού (H-B chip).

(α) Διαφορά στην ροή μεταξύ συμβατικού (επίπεδου) και τύπου ιχθυοσκελετού καναλιών, (β) Το H-B chip

1.8.2.3. Άλλες μέθοδοι εμπλουτισμού

Δοκιμασία CAM

Από το σύνολο των CTCs, εκείνα με τον πιο επιθετικό φαινότυπο (απώλεια επιθηλιακών δεικτών, ικανότητα διήθησης) θεωρούνται, ότι είναι πιθανότερο να καταφέρουν να εγκατασταθούν σε νέα εστία και να σχηματίσουν μετάσταση. Με δεδομένο, ότι η ικανότητα του καρκινικού κυττάρου να διηθεί την εξωκυττάρια ουσία συνιστά χαρακτηριστικό τής μετάστασης (τόσο για την διασπορά όσο και για την εγκατάσταση σε νέα θέση), υποθέτουμε, ότι τα CTCs, τα οποία προσκολλώνται και διηθούν τέτοιες μήτρες θα έχουν την τάση να σχηματίζουν μεταστάσεις. Οι Chen και συνεργάτες [87] ανέπτυξαν την δοκιμασία CAM (Collagen/Cell Adhesion Matrix), στην οποία χρησιμοποιείται μήτρα κολλαγόνου για τον εμπλουτισμό των CTCs. Η μέθοδος είναι διαθέσιμη από την Vitatex (USA) και είναι δυνατός ο εμπλουτισμός σε ένα βήμα, χρησιμοποιώντας ολικό αίμα (WB-Vita-Cap, Vitatex, USA), ή σε δύο βήματα, όπου προηγείται φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας (MNC-1 Vita-Assay, Vitatex, USA). Τα κύτταρα δείγματος αίματος επιστρώνονται σε βοθρίο επικαλυμένο με ερυθρά φθορίζουσα CAM και καλλιεργούνται. Τα CTCs, τα οποία προσκολλώνται στην μήτρα, επιπλέον απορροφούν θραύσματα CAM (CAM⁺) με αποτέλεσμα να σημαίνονται με φθορισμό (Εικ.16). Το τελευταίο αποτελεί κριτήριο της κακοήθειας των κυττάρων, διότι μόνο τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυτήν την ιδιότητα (τα αιματοκύτταρα μπορεί να προσκολλώνται αλλά δεν ενδοκυττώνουν CAM⁺). Τα κύτταρα αναλύονται μικροσκοπικά ή με μοριακές τεχνικές ή με κυτταρομετρία ροής ή καλλιεργούνται.



Εικόνα 16 | Η δοκιμασία CAM

(I) Τα CTCs διακρίνονται από τα φυσιολογικά αιματοκύτταρα λόγω του διηθητικού χαρακτήρα τους, (II) Μόνο τα ζώντα CTCs μπορούν να προσκολληθούν στην μήτρα κολλαγόνου. Μέρος των αιματοκυττάρων θα παραμείνει στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο, (III) Μόνο τα επιθετικά καρκινικά κύτταρα ενδοκυτώνουν φθορίζοντα θραύσματα CAM⁺, (IV) Η αποδόμηση της CAM καταλήγει σε σημασμένα CTCs.

1.8.3. Μέθοδοι ανίχνευσης

Οι μέθοδοι ανίχνευσης και χαρακτηρισμού (Πιν.6) των CTCs περιλαμβάνουν (α) κυτταρομετρικές μικροσκοπικές τεχνικές, (β) κυτταρομετρία ροής, (γ) μοριακές τεχνικές ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων και (δ) πρωτεϊνικές τεχνικές.

Πίνακας 6 | Σύνοψη των κυρίων μεθόδων ανίχνευσης

Μέθοδος	Όριο ευαισθησίας (κύτταρο ανά όγκο αίματος)	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
FAST	N/A*	Ανάλυση μεγάλων όγκων δείγματος Ταχεία (μέχρι 3·10 ⁵ κύτταρα/s)	Δεν έχει αξιολογηθεί σε κλινικά δείγματα
LSC	N/A	Ταχεία Υψηλή ειδικότητα	Χαμηλή ευαισθησία
RT-PCR, RT-qPCR	N/A	Υψηλή ειδικότητα Σχετική ποσοτικοποίηση με RT-qPCR	Ευαισθησία RNA Ψευδώς θετικά αποτελέσματα (μη ειδικός πολλαπλασιασμός, ψευδογονίδια, επιμολύνσεις) Δεν γίνεται διάκριση μεταξύ ζώντων και νεκρών κυττάρων Τα κύτταρα δεν απεικονίζονται Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης)
Κυτταρομετρία ροής	1CTC/10 ⁴ κύτταρα	Υψηλή ειδικότητα Πολυπαραμετρική	Χαμηλή ευαισθησία
CellSearch	1 CTC/ 0,5mL	Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα Ημιαυτοματοποιημένη Υψηλή επαναληψιμότητα Εμπορικά διαθέσιμη Εγκεκριμένη από τον FDA	Ανίχνευση μόνο των EpCAM ⁺ CTCs Ψευδώς θετικά αποτελέσματα (έκφραση αντιγόνου σε φυσιολογικά κύτταρα) Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (απώλεια έκφρασης αντιγόνων στα CTCs) Δεν είναι δυνατή η περαιτέρω μελέτη των κυττάρων Υποκειμενική ερμηνεία των αποτελεσμάτων
EPISPOT	N/A	Ανάλυση μόνο ζώντων κυττάρων Υψηλή ευαισθησία	Αδύνατη η απομόνωση των CTCs (ανέφικτη η περαιτέρω ανάλυση) Απαραίτητη η έκκριση πρωτεϊνών
Adnatest	1CTC/2,5mL	Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα Αναγνώριση ογκοειδικών δεικτών (EpCAM, MUC1) Δυνατότητα περαιτέρω γονιδιακής ανάλυσης (HER2, GA73.3-2) Δυνατότητα χαρακτηρισμού για δείκτες EMT και βλαστικούς	Ψευδώς θετικά αποτελέσματα (έκφραση αντιγόνου σε φυσιολογικά κύτταρα) Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (απώλεια έκφρασης αντιγόνων στα CTCs)
Συστήματα αδενοϊών (NV1066, Telomescan)	100 CTCs/ 5·10 ⁷ αιματοκύτταρα	Εύκολη, ταχεία	Ψευδώς θετικά αποτελέσματα (φαγοκύτωση του ιού από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος) Πιθανή αλλαγή του προφίλ έκφρασης των CTCs μετά μακρόχρονη επίωση με τον ιό

*N/A: δεν υπάρχουν στοιχεία

1.8.3.1. Κυτταρομετρικές μικροσκοπικές τεχνικές

Οι μέθοδοι αυτές απαιτούν ανοσοχρώση, για να αναγνωρίσουν και να χαρακτηρίσουν τα CTCs. Αφού προηγηθεί εμπλουτισμός των δειγμάτων, ακολουθεί η εξέτασή του με ανοσοϊστοχημεία (ImmunoHistoChemistry, IHC) ή με ανοσοφθορισμό (ImmunoFluorescence, IF). Πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η άμεση απεικόνιση των κυττάρων, η οποία επιτρέπει την αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Επιπροσθέτως, είναι δυνατή η ακόλουθη ανάλυσή τους με φθορίζουσα υβριδοποίηση *in situ* (Fluorescent *in situ* Hybridisation, FISH) ή με RT-PCR, συνδυασμός ο οποίος αυξάνει σημαντικά την ειδικότητα. Η ανίχνευση των CTCs με κλασική ανοσοϊστοχημεία ή ανοσοφθορισμό είναι χρονοβόρα δεδομένου, ότι τα CTCs ταυτοποιούνται με μικροσκοπική παρατήρηση. Περιοριστικό παράγοντα αποτελεί η πιθανή απώλεια κυττάρων κατά την χρώση και η πιθανότητα παράβλεψης ή διπλής καταμέτρησης. Προς την κατεύθυνση επίλυσης αυτών των προβλημάτων (κυρίως του χρόνου και της αβεβαιότητας στην καταμέτρηση), πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί πλήθος αυτοματοποιημένων μικροσκοπιών σάρωσης για τον εντοπισμό και την απεικόνιση κυττάρων με ανοσοφθορισμό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα συστήματα FAST, LSC και Ariol, τα οποία περιγράφονται στην συνέχεια. Πρόσθετος περιοριστικός παράγοντας των μικροσκοπικών μεθόδων είναι η επιλογή των δεικτών, οι οποίοι είναι συνήθως επιθηλιακοί ή καρκινικοί, διότι δεν έχει εντοπισθεί δείκτης ή συνδυασμός δεικτών ειδικών για τα CTCs. Κατά συνέπεια πιθανόν να καταμετρηθούν ψευδώς θετικά κύτταρα.

Τεχνολογίες απεικόνισης

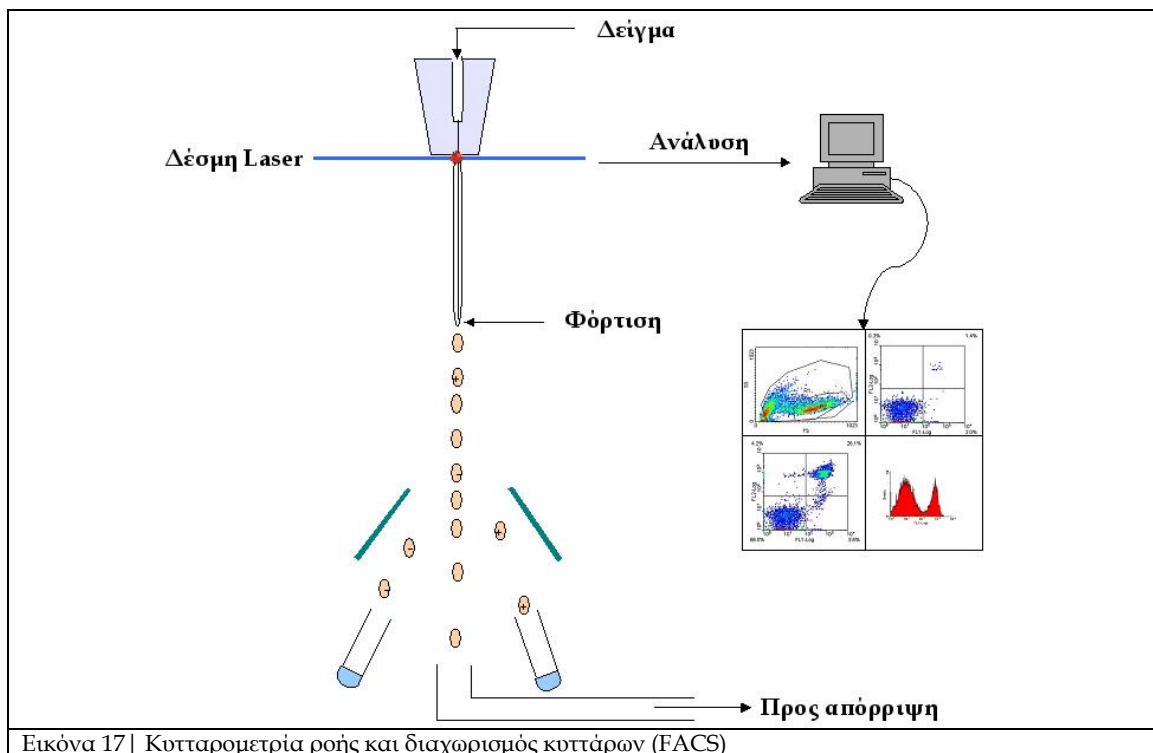
Η τεχνολογία FAST (Fibre-optic Array Scanning Technology) [88] αποτελεί αυτοματοποιημένο σύστημα ψηφιακής μικροσκοπίας. Χαρακτηρίζεται από υψηλής ταχύτητας σάρωση - της τάξης των $3 \cdot 10^5$ κυττάρων/s - η οποία σε συνδυασμό με το μεγάλο οπτικό πεδίο (50mm) καθιστά εφικτή την ανάλυση μεγάλων όγκων δείγματος, χωρίς να απαιτείται προηγούμενος εμπλουτισμός του. Έχει αναφερθεί έως και 98% ευαισθησία στην περίπτωση ανίχνευσης CTCs μετά την αιμόλυση [89] αλλά δεν έχει αξιολογηθεί στο κλινικό επίπεδο [90].

Άλλα συστήματα αυτόματης και ταχείας σάρωσης και εντοπισμού κυττάρων, ανοσοσημασμένων για πολλαπλούς δείκτες, είναι τα LSC (Laser Scanning Cytometer, Compucyte Corporation, Cambridge MA) ([91], [92]), ACIS (Automated Cellular Imaging System, DAKO, Denmark) και ARIOL (Applied Imaging Corporation San Jose, CA) ([93], [94], [95]).

1.8.3.2. Κυτταρομετρία ροής

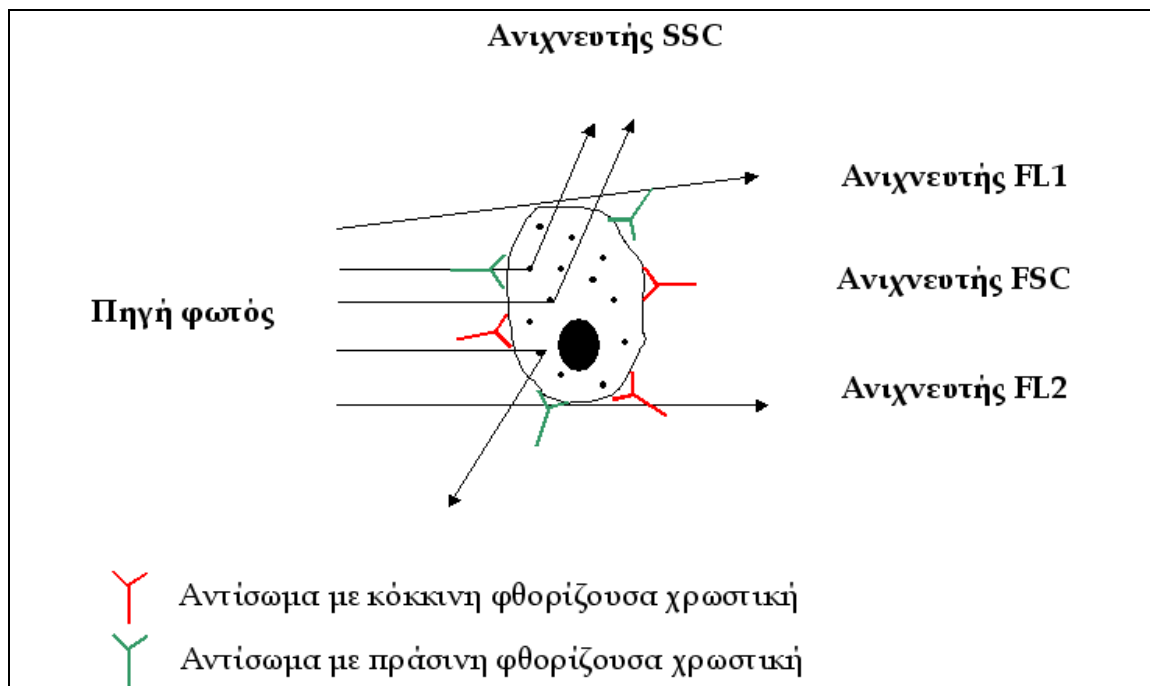
Η κυτταρομετρία ροής [96], αν και δεν χρησιμοποιείται στην κλινική πρακτική, αναφέρεται, διότι προτιμάται αρκετά από ερευνητικές ομάδες και είναι μέθοδος επιλογής στην παρούσα εργασία. Με την κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι δυνατή η ταυτόχρονη μέτρηση και ανάλυση φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων σωματιδίων, συνήθως κυττάρων, καθώς ρέουν

μέσω δέσμης φωτός (Εικ.17). Οι μετρούμενες ιδιότητες περιλαμβάνουν το σχετικό μέγεθος, την εσωτερική πολυπλοκότητα και την σχετική ένταση φθορισμού. Ο κυτταρομετρητής ροής χρησιμοποιεί δέσμη laser και ανιχνευτή φωτός, για να μετρά διακριτά άθικτα κύτταρα σε εναιώρημα. Όταν το κύτταρο διέλθει από την δέσμη laser, σκεδάζει το φως με πρότυπο, το οποίο εξαρτάται από τις φυσικές ιδιότητες του και καταγράφεται. Κύτταρα, τα οποία έχουν δεσμευμένα φθορίζοντα αντισώματα ή κάποιο φθοριοχρώμα, διεγείρονται από το laser και εκπέμπουν φως, το οποίο επίσης καταγράφεται από δεύτερο σύστημα ανίχνευσης. Όλο το σύστημα είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή, ο οποίος αποθηκεύει τις πληροφορίες. Εξελιγμένες εκδόσεις τού οργάνου επιτρέπουν την κατανομή κυτταρικών πληθυσμών σε διαφορετικές θέσεις ανάλογα με το πρότυπο φθορισμού τους (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS).



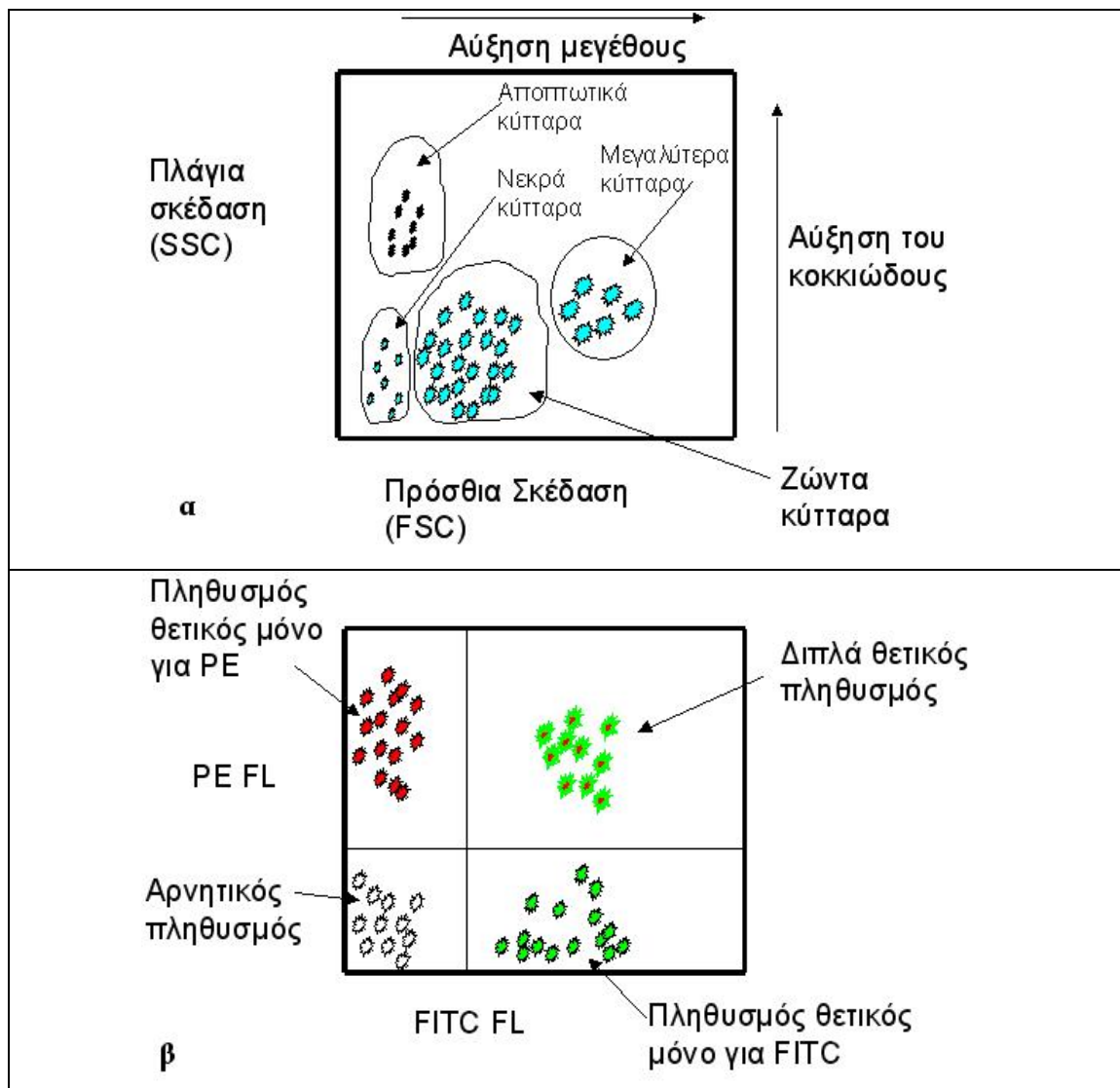
Εικόνα 17 | Κυτταρομετρία ροής και διαχωρισμός κυττάρων (FACS)

Οι μετρήσεις, οι οποίες λαμβάνονται με το κυτταρομέτρο ροής, είναι η πρόσθια σκέδαση (Forward-Scattered light, FSC), η πλάγια σκέδαση (Side-Scattered light, SSC) και η σχετική ένταση φθορισμού (FL) (Εικ.18). Τα σύγχρονα κυτταρομέτρα διαθέτουν μέχρι και οκτώ κανάλια ανίχνευσης εκπομπής, οπότε είναι δυνατή η χρήση πολλαπλών φθοριοχρωμάτων. Ο φθορισμός σχετίζεται πάντοτε με την σήμανση των κυττάρων, ενώ οι άλλες δύο παράμετροι με τα φυσικά χαρακτηριστικά. Η πρόσθια σκέδαση (FSC) είναι ανάλογη του κυτταρικού μεγέθους, ενώ η πλάγια σκέδαση (SSC) με την ενδοκυτταρική πολυπλοκότητα (π.χ. παρουσία κοκκίων).



Εικόνα 18 | Σκέδαση φωτός και φθορισμός κατά την κυτταρομετρία ροής. (FL1 πράσινος φθορισμός, FL2 κόκκινος φθορισμός)

Οι πληροφορίες και κατ'επέκταση οι υπό εξέταση υποπληθυσμοί είναι δυνατόν να απεικονιστούν με αρκετούς διαφορετικούς τρόπους. Μία παράμετρος μπορεί να αναπαρασταθεί ως μονοπαραμετρικό ιστόγραμμα, όπου ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει την τιμή της παραμέτρου και ο κάθετος άξονας τον αριθμό των γεγονότων (πρακτικά τον αριθμό των κυττάρων). Επίσης, είναι δυνατή η αναπαράσταση δύο παραμέτρων σε διπαραμετρικό διάγραμμα (Εικ.19), όπου η μία παράμετρος φαίνεται στον άξονα x και η άλλη στον y. Προφανώς είναι δυνατός ο συνδυασμός δύο οποιωνδήποτε παραμέτρων, αν και οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι συνδυασμοί είναι οι FSC-SSC και FL1-FL2. Αρκετά λογισμικά πακέτα ανάλυσης των κυτταρομετρικών δεδομένων παρέχουν την δυνατότητα τρισδιάστατων διαγραμμάτων, στα οποία συνδυάζονται τρεις παράμετροι.



Εικόνα 19 | Διπαμετρικά διαγράμματα των κυτταρικών πληθυσμών.
 (α) Διάγραμμα πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης, (β) Διάγραμμα σχετικής έντασης φθορισμού δύο φθοριοχρωμάτων (φυκοερυθρίνης-PE και ισοθεοκυανικής φλουοροσκεΐνης- FITC)

Η κυτταρομετρία ροής τυγχάνει πληθώρας εφαρμογών με τον κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό, όπως την μέτρηση του περιεχομένου DNA και RNA και της αναλογίας βάσεων DNA, τον προσδιορισμό τού κυτταροπλασματικού ασβεστίου, της σύνθεσης DNA, του ποσοστού αποπτωτικών κυττάρων και άλλων (Πιν.7).

Χωρίς την απαίτηση αντιδραστηρίων ή ανιχνευτών	Κυτταρικό μέγεθος (FSC)
	Κυτταρικό κοκκιώδες (SSC) Φωτοσυνθετικές χρωστικές
Με χρήση ειδικών αντιδραστηρίων ή ανιχνευτών	Περιεχόμενο DNA
	Περιεχόμενο RNA
	Αναλογία βάσεων στο DNA
	Επιφανειακοί και ενδοκυτταρικοί υποδοχείς
	Σύνθεση DNA
	Απόπτωση
	Κυτταροπλασματικό Ca ²⁺ Γονιδιακή έκφραση

1.8.3.3. Μοριακές τεχνικές

Η ύπαρξη CTCs διαπιστώνεται μέσω του εντοπισμού γενετικών ή/και επιγενετικών αλλαγών (μελέτη του DNA) ή των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων (μελέτη του RNA), τα οποία χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα. Αλλαγές στο DNA, όπως μεταλλαγές σε πρωτο-ογκογονίδια/ογκοκατασταλτικά γονίδια, μικροδορυφορική αστάθεια και αλληλουχίες ογκογόνων ιών μπορούν να εντοπιστούν. Παρ' όλα αυτά στην πράξη η ανίχνευση CTCs μέσω DNA παρουσιάζει δυσκολίες, διότι μεταβολές του γενετικού υλικού σημειώνονται ακόμη και σε περιπτώσεις ήπιων δυσπλασιών.

Από τις μοριακές μεθόδους έχει ευρέως καθιερωθεί η μελέτη του μεταγραφώματος με τεχνικές αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription) σε συνδυασμό με αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Πιο αναλυτικά, ολικό RNA απομονώνεται από ζώντα CTCs και με RT-PCR πολλαπλασιάζονται/ενισχύονται μετάγραφα γονιδίων, τα οποία είτε εκφράζονται είτε εμφανίζονται μεταλλαγμένα, ανάλογα με τον τύπο καρκίνου. Οι τεχνικές αυτές είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές και επιπλέον παρουσιάζουν ευκολία χειρισμών. Εφαρμογή ποσοτικής RT-PCR (quantitative, qRT-PCR) επιτρέπει σχετική ποσοτικοποίηση αλλά είναι ανέφικτος ο προσδιορισμός ακριβούς αριθμού κυττάρων. Είναι προφανές, ότι η RT-PCR δεν επιτρέπει την άμεση παρατήρηση και μέτρηση των CTCs και σε συνδυασμό με την έλλειψη δείκτη ειδικού για τα CTCs μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Το πρόβλημα επιλύεται με την πολυπλεκτική (multiplex) RT-PCR, όπου ανιχνεύονται ταυτόχρονα περισσότερα του ενός είδους μετάγραφα (περισσότεροι του ενός δείκτες). Αν και λίγοι δείκτες παρέχουν ικανοποιητική ευαισθησία εξεταζόμενοι

ανεξάρτητα, ο συνδυασμός τους μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία για την ανίχνευση CTCs ([97], [50], [68]).

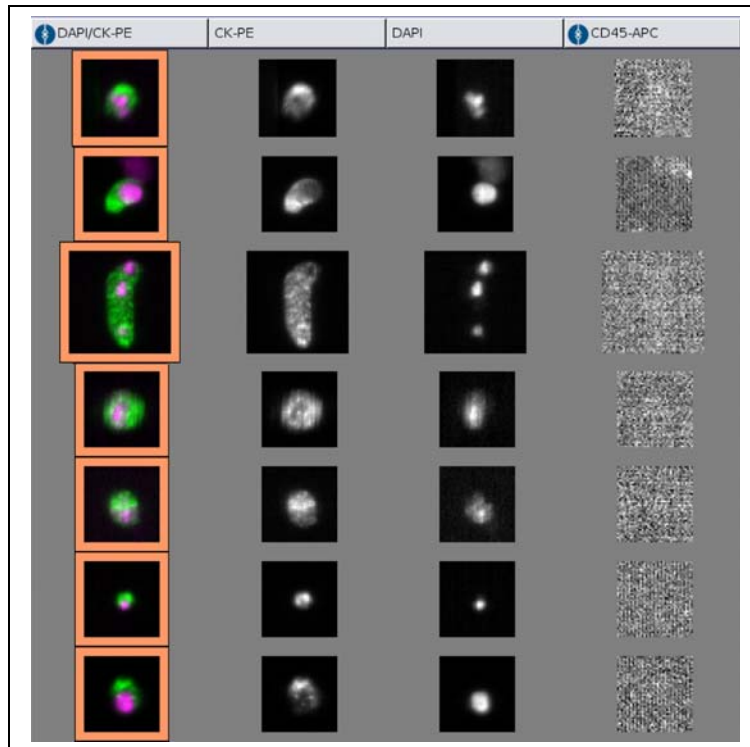
1.8.3.4. Πρωτεϊνικές τεχνικές

Η μέθοδος EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT) είναι ανοσολογική τεχνική, η οποία στηρίζεται στην ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική δοκιμασία (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay- ELISA) [98]. Με την EPISPOT είναι δυνατή η αναγνώριση και μέτρηση μόνο ζώντων κυττάρων, αποκλείοντας τα αποπτωτικά. Στηρίζεται στην ταυτοποίηση κυττάρων ικανών να εκκρίνουν πρωτεΐνες, όπως MUC1 ή CK19, σε βραχυχρόνιες καλλιέργειες. Αυτή η πληροφορία, η οποία δεν είναι διαθέσιμη από τις απεικονιστικές και τις μοριακές μεθόδους, είναι πολύ σημαντική, διότι μόνο ζώντα κύτταρα σχηματίζουν δευτερογενείς όγκους. Επιπροσθέτως, επιτρέπει την ανίχνευση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης σε επίπεδο ενός κυττάρου [99]. Έχει επιδείξει αξιόλογη ευαισθησία και ειδικότητα, ωστόσο, δεν έχει αξιολογηθεί ως προς την κλινική συσχέτιση των αποτελεσμάτων.

1.8.4. Συνδυαστικές μέθοδοι

1.8.4.1. CellSearch

Το σύστημα CellSearch (Veridex, USA) αποτελεί αυτοματοποιημένη μέθοδο εμπλουτισμού, χρώσης και σάρωσης των δειγμάτων. Το πρώτο βήμα είναι η θετική επιλογή για τα EpCAM⁺ κύτταρα μέσω ανοσομαγνητικού διαχωρισμού. Ακολουθεί η χρώση του προϊόντος απομόνωσης με αντισώματα συζευγμένα με φυκοερυθρίνη έναντι των CK18/19, χαρακτηριστικά των επιθηλιακών, με αντισώματα συζευγμένα με αλλοφυκοκυανίνη έναντι του λευκοκυτταρικού δείκτη CD45 και με την χρωστική DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole, 4',6-διαμινο-2-φαινυλ-ινδόλιο), η οποία δεσμεύεται σε νουκλεϊκά οξέα και συγκεκριμένα στον πυρήνα. Ακολουθεί παρατήρηση και μέτρηση σε ημιαυτόματο μικροσκόπιο φθορισμού τεσσάρων χρωμάτων (CellSpotter analyzer, Veridex, USA). Τα CK⁺/DAPI⁺/CD45⁻ κύτταρα χαρακτηρίζονται και μετρώνται ως CTCs (Εικ.20), ενώ τα CK⁻/DAPI⁺/CD45⁺ ως λευκοκύτταρα. Το σύστημα έχει ευαισθησία ανίχνευσης περίπου 5 CTCs/7.5 ml ολικού αίματος. Επί του παρόντος, το σύστημα CellSearch είναι η μοναδική μέθοδος εγκεκριμένη από τον Οργανισμό Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α (Food and Drug Administration, FDA) για την παρακολούθηση ασθενών με προχωρημένο καρκίνο τού μαστού ([37], [29], [100], [101], [46]), του προστάτη [102] και του παχέος εντέρου [103]. Η διαπερατοποίηση των κυττάρων, η οποία είναι απαραίτητη για την χρώση έναντι της CK, δεν επιτρέπει περαιτέρω χρήση των CTCs. Στην περίπτωση, κατά την οποία είναι επιθυμητή η παραλαβή ζώντων κυττάρων, η Veridex διαθέτει το προϊόν, το Cell Profile kit, το οποίο συλλέγει τα κύτταρα μετά τον εμπλουτισμό αλλά πριν το στάδιο της διαπερατοποίησης.



Εικόνα 20 | Αναγνώριση CTCs με το σύστημα CellSearch.

Μετά την σάρωση με αυτόματοποιημένο μικροσκόπιο φθορισμού το λογισμικό παρουσιάζει στην οθόνη του υπολογιστή εικόνες, οι οποίες απαιτούν ερμηνεία: Τα CK-PE+DAPI+CD45- αναγνωρίζονται ως CTCs.

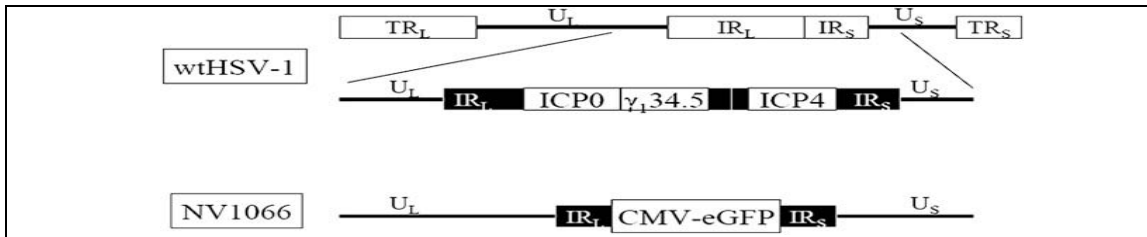
1.8.4.2. AdnaTest

Το AdnaTest (AdnaGen, Germany, [104]) συνδυάζει την μαγνητική θετική επιλογή με ακόλουθη ανίχνευση μέσω RT-qPCR [105]. Λειτουργεί με συνδυασμό αντισωμάτων, ενός έναντι του επιθηλιακού δείκτη EpCAM και ενός έναντι ογκοειδικού δείκτη, όπως το MUC1, τα οποία είναι δεσμευμένα σε μαγνητικά σφαιρίδια. Μετά τον εμπλουτισμό ακολουθεί λύση των κυττάρων, απομόνωση του mRNA και ανάλυση RT-qPCR για τους δείκτες MUC1, HER2 και την επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη GA73.3-2. Με δεδομένο, ότι δεν εκφράζουν όλα τα CTCs και τα δύο αντιγόνα στον ίδιο βαθμό, η χρήση δύο αντισωμάτων για την επιλογή αυξάνει σημαντικά την απόδοση. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ευαισθησία της τάξης των 2 κυττάρων/mL ολικού αίματος και ειδικότητα πάνω από 90% [106]. Τελευταία η AdnaGen κυκλοφόρησε δύο επιπλέον προϊόντα για την ανίχνευση δεικτών EMT (AdnaTest EMT) και δεικτών βλαστικών κυττάρων (AdnaTest TumorStemCell). Μετά τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό με αντισώματα anti-EpCAM και anti-MUC1, με το AdnaTest EMT ανιχνεύεται με mPCR η έκφραση των Twist, PI3Kα, Akt2 και της Actin (γονίδιο ελέγχου) και με το AdnaTest TumorStemCell η έκφραση της ALDH1.

1.8.5. Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης

Ανίχνευση μέσω αδenoϊικών φορέων

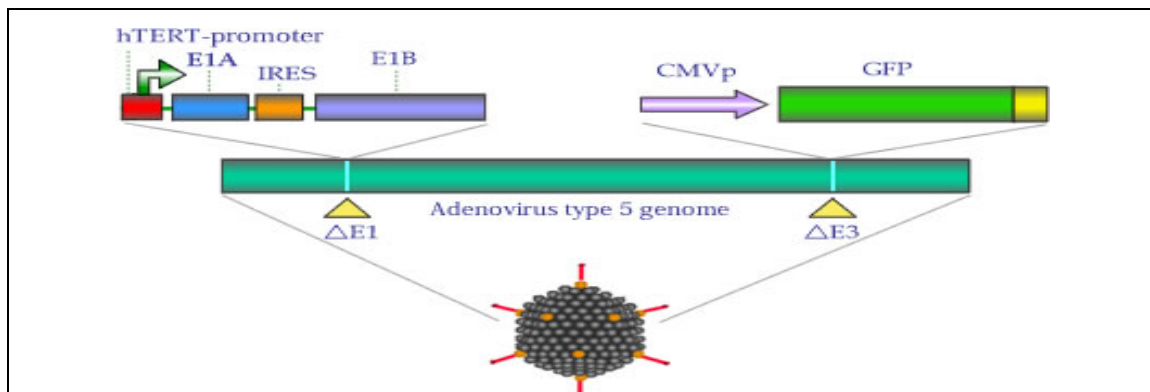
Στην φύση υπάρχουν ιοί με τάση να προσβάλλουν και να καταστρέφουν όγκους [107]. Έχουν υπάρξει αρκετές αναφορές για περιπτώσεις κατά τις οποίες ο καρκίνος εξαφανίστηκε μετά την ιϊκή μόλυνση είτε φυσιολογικά είτε με αγωγή με ιϊκά εμβόλια [108]. Κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών η γενετική μηχανική έχει επιτρέψει την κατασκευή ιών με ακόμα μεγαλύτερη ειδικότητα για τα καρκινικά κύτταρα. Έχουν παρασκευασθεί ιοί, οι οποίοι μολύνουν, αντιγράφονται σε και θανατώνουν αποκλειστικά καρκινικά κύτταρα, και αρκετοί βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές. Από τις πιο ελπιδοφόρες ομάδες τέτοιων ιών είναι οι ερπητοϊοί HSV (Herpes Simplex Virus), οι οποίοι έχουν τροποποιηθεί εκτεταμένα, ώστε να καταστεί ασφαλέστερη η χρήση τους, και επί του παρόντος ελέγχονται σε ανθρώπους για την θεραπεία καρκίνων τού εγκεφάλου [109] και του ήπατος [110]. Παράδειγμα τέτοιου ιού αποτελεί το στέλεχος NV1020, το οποίο βρίσκεται στην φάση των κλινικών δοκιμών για την αξιολόγησή του ως θεραπευτικό μέσο. Ο ιός προέκυψε από τον HSV-1 με απαλοιφή των ιϊκών γονιδίων ICP-4, ICP-0 και g134.5, τα οποία είναι απαραίτητα για την αντιγραφή τού ιού σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα ο ιός να καθίσταται ικανός να αντιγραφεί μόνο σε καρκινικά κύτταρα. Με βάση τον ιό NV1020 κατασκευάστηκε εξασθενημένο και ικανό για αντιγραφή στέλεχος (Εικ.21), το NV1066, το οποίο περιλαμβάνει το γονίδιο της ενισχυμένης GFP (enhanced GFP, eGFP) υπό τον έλεγχο του ιδιοστατικού υποκινητή CMV (CytoMegalovirus), με αποτέλεσμα να παράγονται υψηλά επίπεδα GFP μέσα σε λίγες ώρες από την μόλυνση. Η επώαση αιματοκυττάρων με τον ιό NV1066 μπορεί να φανεί χρήσιμη στην ανίχνευση CTCs. Όπως έδειξαν οι S.Fong και οι συνεργάτες της [111], ο ιός μπορεί να μολύνει κυκλοφορούντα στο αίμα καρκινικά κύτταρα και να τα καταστήσει ανιχνεύσιμα λόγω της παραγόμενης GFP. Τα CTCs μπορούν ακολούθως να απομονωθούν με κυτταρομετρία ροής και να αναλυθούν περαιτέρω [111]. Η επώαση με τον ιό γίνεται σε παρασκευάσματα μονοπύρηνων κυττάρων από διαχωριστική φυγοκέντρωση. Η μέθοδος αξιολογήθηκε με πληθώρα καρκινικών κυτταρικών σειρών και παρουσίασε 100% ειδικότητα και ευαισθησία τής τάξης των 10 CTCs/10mL αίματος. Σημανικός περιορισμός τής μεθόδου είναι η αλλαγή τού προφίλ έκφρασης, η οποία πιθανώς προκαλείται από την μόλυνση, και επιπλέον η πιθανή φαγοκύτωση των ιϊκών σωματίων από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία επιφέρει ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 21 | Η δομή του ιού NV1066.

Η γενική δομή του αγρίου τύπου ερπητοϊού HSV-1 (wtHSV-1) φαίνεται επάνω. Το γονιδίωμα του ιού περιλαμβάνει τις ακόλουθες αλληλουχίες: μεγάλη μοναδιαία αλληλουχία (Unique Long, UL), μικρή μοναδιαία αλληλουχία (Unique Short, US), μεγάλη τερματική επανάληψη (Terminal Repeat Long, TRL), μεγάλη εσωτερική επανάληψη (Internal Repeat Long, IRL), μικρή εσωτερική επανάληψη (Internal Repeat Short, IRS) και μικρή τερματική επανάληψη (Terminal Repeat Short, TRS). Στον ιό NV1066 τα γονίδια ICP0, g134.5 και ICP4, έχουν απαλοιφθεί και την θέση τους καταλαμβάνει ο υποκινητής CMV, ο οποίος ελέγχει το γονίδιο της eGFP.

Ανάλογη προσέγγιση έχει γίνει και στην περίπτωση του προϊόντος Telomescan (Oncolys Biopharma, [112]), το οποίο κατασκευάστηκε με βάση τον αδενοϊό OBP-301 (Telomelysin, Oncolys Biopharma) και προορίζεται για την ανίχνευση των CTCs (Εικ.22). Ο ιός Telomelysin παρασκευάστηκε με αντικατάσταση του ρυθμιστικού στοιχείου E1 του αδενοϊού τύπου 5 με τον υποκινητή της ανθρώπινης τελομεράσης (human TELOmerase Reverse Transcriptase, hTERT) και προορίζεται για κλινική χρήση. Στο Telomescan έχει προστεθεί το γονίδιο της GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV σε θέση καθοδική του υποκινητή της hTERT, με αποτέλεσμα τα φθορίζοντα προσβεβλημένα κύτταρα, τα οποία εκφράζουν την τελομεράση, να ανιχνεύονται είτε με κυτταρομετρία ροής ή με μικροσκοπία φθορισμού [113]. Η προσέγγιση μειονεκτεί, διότι ανιχνεύει μόνο κύτταρα, τα οποία εκφράζουν την τελομεράση, με αποτέλεσμα να μην φαίνεται αρκετά αποτελεσματικό στην ανίχνευση των CTCs, εφόσον αυτά δεν πολλαπλασιάζονται κατά την κυκλοφορία τους και συνεπώς δεν εκφράζουν την τελομεράση.



Εικόνα 22 | Ο ιός Telomescan

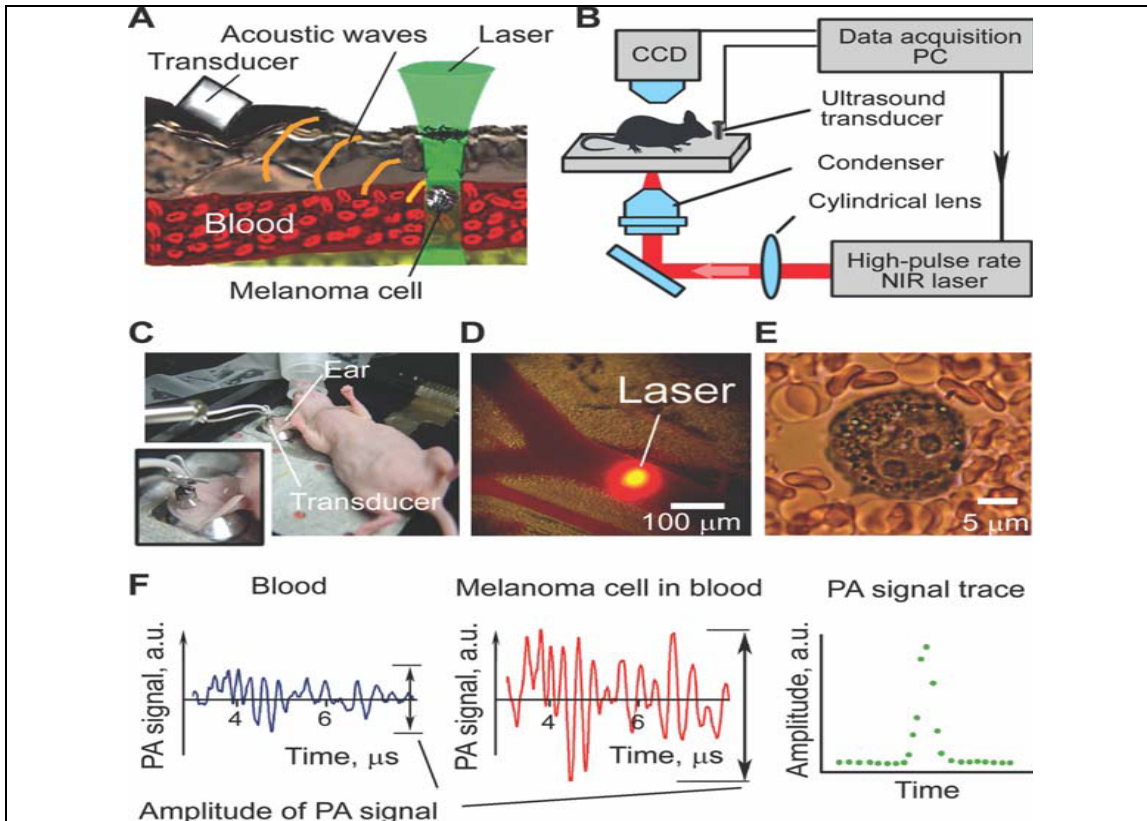
Ο ιός Telomescan κατασκευάστηκε από τον αδενοϊό τύπου 5 με αντικατάσταση των ρυθμιστικών στοιχείων E1 και E3 με τον υποκινητή της hTERT και τον CMV αντίστοιχα. Ο CMV ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της GFP, το οποίο έχει επίσης εισαχθεί στο γονιδίωμα του ιού. Κύτταρα, τα οποία εκφράζουν τελομεράση, θα ενεργοποιήσουν τον υποκινητή hTERT, ο οποίος με την σειρά του θα ενεργοποιήσει τον CMV και συνεπώς την παραγωγή GFP.

***In vivo* Φωτοχημική Κυτταρομετρία Ροής**

Η ευαισθησία των *ex vivo* μεθόδων περιορίζεται από τον όγκο αίματος, ο οποίος είναι της τάξης των λίγων mL. Επιπρόσθετα, δεν υπάρχει η δυνατότητα αιμοληψίας επαρκούς όγκου από κλινικά σχετιζόμενες θέσεις, όπως είναι ο πρωτογενής όγκος, οι λεμφαδένες ή τα οστά. Τα προβλήματα αυτά επιλύονται με την εφαρμογή των αρχών της κυτταρομετρίας ροής με φωτοθερμική (PhotoThermal, PT), φωτοηχητική (Photoacoustic, PA) ή φθορίζουσα ανίχνευση. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την παρακολούθηση μεγαλύτερων όγκων αίματος και ενδεχομένως ολόκληρου του όγκου αίματος σε 1-2 ώρες. Η σήμανση των CTCs με φθοριοχρώματα περιορίζεται από την τοξικότητά τους αλλά η εφαρμογή των άλλων δύο μεθόδων δεν παρουσιάζει αυτό τον περιορισμό. Οι μέθοδοι PT και PA στηρίζονται στην μη ακτινοβολούσα εκτόνωση ακτινών laser προς θερμότητα και ηχητικά φαινόμενα αντίστοιχα. Αυτές οι μέθοδοι προσφέρουν πολύ υψηλό συντελεστή απορρόφησης σε κυτταρικό επίπεδο και καθιστούν δυνατή την ανίχνευση νανοσωματιδίων, χρωστικών και βιομορίων με όριο ανίχνευσης αντίστοιχο του φθορισμού. Καθώς η ασφάλεια της χρήσης PA έχει τεκμηριωθεί κλινικά και η ένταση του laser (5–20 mJ/cm²) βρίσκεται εντός των ορίων ασφαλείας (~30–100mJ/cm²), οι Zharov και συνεργάτες [114] ανέπτυξαν την μέθοδο της φωτοηχητικής κυτταρομετρίας ροής (PhotoAcoustic Flow Cytometry, PAFC) για την *in vivo* ανίχνευση των CTCs (Εικ.23). Η σήμανση των κυττάρων-στόχων γίνεται με νανοσφαιρίδια φέροντα αντισώματα για τον επιθυμητό κυτταρικό τύπο. Η διέγερση από την ακτίνα laser παράγει υποήχους, οι οποίοι ανιχνεύονται από μετασχηματιστή. Η μέθοδος έχει μέχρι σήμερα εφαρμοστεί με σχετική επιτυχία μόνο σε ποντίκια.

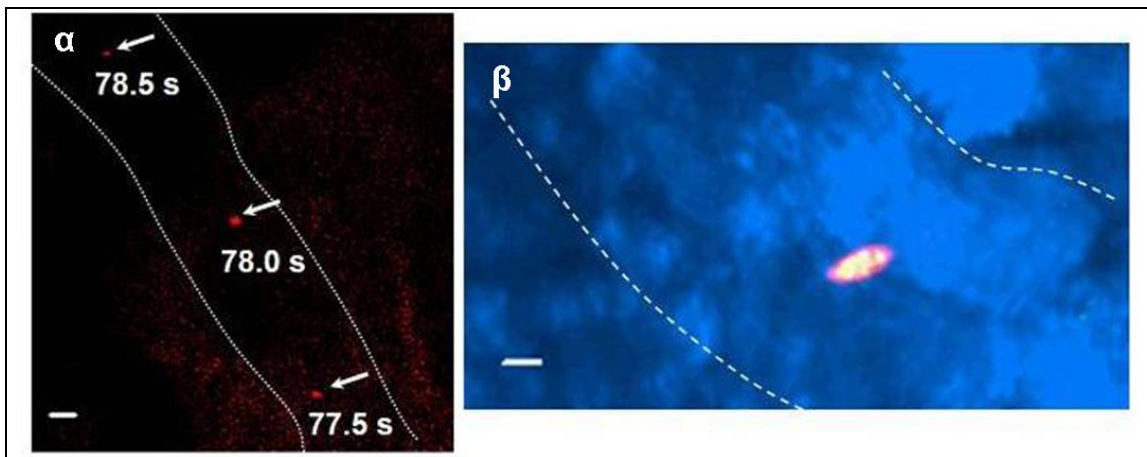
Πολυφωτονική *in vivo* κυτταρομετρία ροής

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, η ανίχνευση στην πολυφωτονική κυτταρομετρία ροής (Multiphoton Intravital flow Cytometry, MIC) πραγματοποιείται *in vivo* [115]. Ενδοφλέβια χορήγηση κατάλληλου μη τοξικού φθοριοχρώματος προσδένεται με ειδικό τρόπο στα κύτταρα-στόχους και ακολουθεί σάρωση με μικροσκόπιο φθορισμού (IX70/FV300, Olympus, Japan) για την απεικόνιση των επιφανειακών αιμοφόρων αγγείων και την καταμέτρηση των CTCs (Εικ.24). Το μικροσκόπιο σάρωσης έχει τροποποιηθεί, ώστε να επιτρέπει την ταχεία μετατροπή του σε συνεστιακό, απλό και TPEF (Two-Photon Excitation Fluorescence). Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί μέχρι σήμερα μόνο σε ζωικά μοντέλα. Η επιλογή του φθορισμού είναι αρκετά απαιτητική, διότι είναι αδύνατη η χρήση αντισωμάτων (προκαλούν την απομάκρυνση των CTCs μέσω ανοσολογικής απόκρισης) και επιπλέον πολλές από τις φθορίζουσες χρωστικές είναι τοξικές.



Εικόνα 23 | *In vivo* Φωτοακουστική κυτταρομετρία ροής (PAFC).

(A) Η αρχή της μεθόδου για την ανίχνευση κυκλοφορούντων κυττάρων μελανώματος, (B) Διάγραμμα της πειραματικής διάταξης, (C) Αναισθητοποιημένο ποντίκι σε μικροσκόπιο και ο μετασχηματιστής υπερήχων, Ένθεμα: μεγέθυνση του μετασχηματιστή και του ωτός, (D) Ακτίνα laser σε αιμαγγείο, (E) Παλμός PA από το αίμα (αριστερά), από κύτταρο μελανώματος της σειράς BF16F10 σε αίμα (μέσον), ίχνος σήματος PA από την παρουσία κυττάρου μελανώματος (δεξιά).



Εικόνα 24 | *In vivo* ανίχνευση κυκλοφορούντων φθορίζοντων κυττάρων με MIC.

(α) Υπέρθυση τριών εικόνων, οι οποίες ελήφθησαν με διαφορά 1s, όπου φαίνεται *in vivo* καρκινικό κύτταρο L1210A σημασμένο με φολικό-ροδαμίνη να κινείται σε αιμοφόρο αγγείο, (β) *in vivo* σημασμένο L1210A κύτταρο με φολικό-FITC (πράσινος φθορισμός) και DiD (κόκκινος φθορισμός)

1.9. Σκοπός της εργασίας

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την μελέτη των CTCs και την εφαρμογή τους στην κλινική πρακτική. Η ετερογένεια των CTCs ως προς την έκφραση αντιγόνων και πιθανώς ως προς τα φυσικά τους χαρακτηριστικά εμφανίζεται τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και στον ίδιο ασθενή. Καθίσταται προφανές, ότι η απομόνωσή τους και ο ακόλουθος μοριακός χαρακτηρισμός τους είναι απαραίτητα για την κατανόηση της βιολογίας των CTCs αλλά και για τον καθορισμό σαφέστερων κριτηρίων αναγνώρισης, προκειμένου να βρουν κλινική εφαρμογή. Οι περιγραφείσες τεχνικές απομόνωσης είναι ετερογενείς ως προς την αρχή, την οποία χρησιμοποιούν, διότι εκμεταλλεύονται διαφορετικές ιδιότητες των CTCs, για να τα επιλέξουν. Επί του παρόντος, δεν έχει υπάρξει συστηματική μελέτη, η οποία συγκρίνει αυτές τις μεθόδους, τουλάχιστον, ως προς την απόδοση και την καθαρότητα του προϊόντος. Αρκετές από αυτές, ωστόσο, χρησιμοποιούνται συχνά για την απομόνωση των CTCs.

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η αξιολόγηση πέντε μεθόδων απομόνωσης ως προς την απόδοση, τον βαθμό εμπλουτισμού και την βιωσιμότητα των ανακτώμενων κυττάρων. Επιλέχθηκαν οι (α) διήθηση, (β) φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας, (γ) σχηματισμός ανοσοροζεττών (δύο πρωτόκολλα), (δ) θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια και (ε) αρνητική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια. Οι δύο πρώτες διαχωρίζουν τα κύτταρα με βάση φυσικές ιδιότητες (μέγεθος και πυκνότητα αντιστοιχώς), ενώ οι υπόλοιπες αξιοποιούν την έκφραση επιφανειακών δεικτών για την θετική ή την αρνητική επιλογή των κυττάρων στόχων. Κατά τον αρχικό σχεδιασμό της συγκριτικής αξιολόγησης και βελτιστοποίησης των μεθόδων απομόνωσης των ΚΚΚ, είχαν επιλεγεί επίσης η διηλεκτροφόρηση και το CTC chip. Η διηλεκτροφόρηση είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμη, αλλά το κόστος απόκτησης ξεπερνά τον σκοπό αυτής της εργασίας, ενώ η αναπαραγωγή της με ίδια μέσα κρίθηκε χρονοβόρα. Επιπλέον, το CTC chip, το οποίο δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο, αναπαρήχθηκε, ωστόσο η βελτιστοποίησή του προκειμένου να αξιολογηθεί ξεπερνούσε τα χρονικά όρια αυτής της εργασίας.

Η απόδοση (Εξ.1) των μεθόδων ορίζεται ως το ποσοστό των ανακτώμενων CTCs, δηλαδή το ποσοστό των κυττάρων, τα οποία παραλαμβάνονται μετά τον εμπλουτισμό, προς τα κύτταρα, τα οποία είχαν αρχικά εισαχθεί στο δείγμα αίματος.

$$A = \frac{[CTCs]_{\text{enriched}}}{[CTCs]_i} \cdot 100\% \quad (1)$$

όπου A η εκατοστιαία απόδοση της διεργασίας εμπλουτισμού, $[CTCs]_{\text{enriched}}$ ο αριθμός των ανακτώμενων CTCs και $[CTCs]_i$ ο αρχικός αριθμός CTCs στο δείγμα αίματος.

Ο βαθμός εμπλουτισμού ορίζεται με δύο τρόπους: αφενός την καθαρότητα του προϊόντος εμπλουτισμού (Εξ.2), δηλαδή τον αριθμό των CTCs προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων, αφετέρου από τον συντελεστή εμπλουτισμού (Εξ.3), ο οποίος περιγράφει πόσες φορές καθαρότερος είναι ο πληθυσμός των CTCs, και μπορεί να δίνεται και σε λογαριθμική μορφή (Εξ.4) (π.χ. εμπλουτισμός 3log σημαίνει ότι το προϊόν του εμπλουτισμού είναι 10^3 φορές καθαρότερο του αρχικού δείγματος). Επιπλέον, επειδή η εκατοστιαία καθαρότητα είναι αρκετά μικρός αριθμός μετατρέπεται στον λόγο συχνότητας εύρεσης 1 CTC/αριθμό αιματοκυττάρων (με απλή αναγωγή). Και οι δύο τρόποι έκφρασης της καθαρότητας του προϊόντος παρατίθενται στα αποτελέσματα.

$$P = \frac{[CTCs]}{[TC]} \cdot 100\% \quad (2)$$

$$CE = \frac{P_{en}}{P_i} \quad (3)$$

$$CE^{log} = \log\left(\frac{P_{en}}{P_i}\right) \quad (4)$$

όπου P η εκατοστιαία καθαρότητα ενός δείγματος, [CTCs] ο αριθμός CTCs στο δείγμα, TC ο συνολικός αριθμός κυττάρων, CE ο συντελεστής εμπλουτισμού, CE^{log} ο λογαριθμικός συντελεστής εμπλουτισμού, P_{en} και P_i οι καθαρότητες του εμπλουτισμένου και του αρχικού δείγματος αντίστοιχα.

Τέλος, η βιωσιμότητα των CTCs θεωρήθηκε αναγκαία παράμετρος, διότι είναι απαραίτητη η ανάκτηση ζώντων CTCs, προκειμένου να αξιολογηθούν οι λειτουργικές τους ιδιότητες αλλά και η ογκογενετική τους δυνατότητα. Στην παρούσα εργασία, ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των ανακτώμενων κυττάρων γίνεται με βάση την μεταβολική ενεργότητα τους και ορίζεται ως το ποσοστό των ανακτώμενων κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν ενεργότητα μη ειδικών εστερασών (Εξ.4).

$$V = \frac{[CTCs]_v}{[CTCs]_T} \cdot 100\% \quad (5)$$

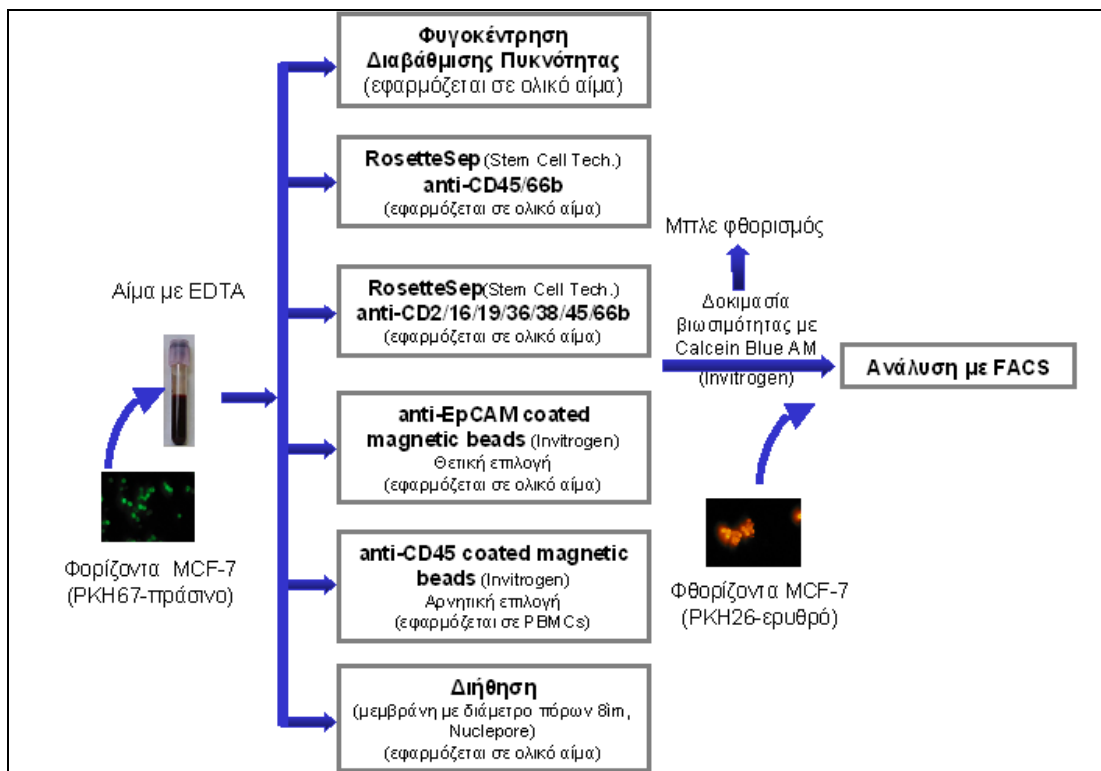
όπου V η εκατοστιαία βιωσιμότητα, $[CTCs]_v$ τα ζώντα ανακτηθέντα CTCs και $[CTCs]_T$ ο συνολικός αριθμός ανακτηθέντων CTCs.

2. Πειραματικό μέρος

2.1. Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1. Μέθοδος αξιολόγησης

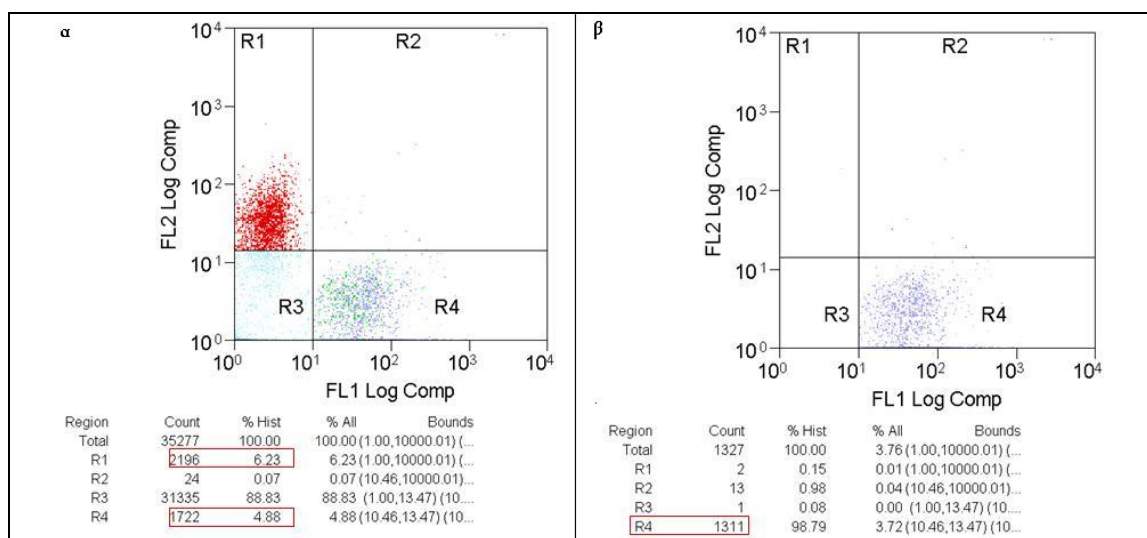
Η ανάγκη αξιολόγησης των μεθόδων απομόνωσης των CTCs προκύπτει από την υψηλή ετερογένεια όσον αφορά την βασική αρχή λειτουργίας τους, η οποία καταλήγει σε διαφορετική απόδοση, ειδικότητα και ευαισθησία για κάθε μέθοδο. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα των δοκιμών, χρησιμοποιούνται τεχνητά δείγματα, τα οποία συνίστανται από αίμα υγιών δοτών, στο οποίο προστίθεται ορισμένος αριθμός κυττάρων της καρκινωματικής σειράς MCF-7. Η αξιολόγηση της απόδοσης, του βαθμού εμπλουτισμού, της καθαρότητας και της βιωσιμότητας του παρασκευάσματος επιτελείται με κυτταρομετρία ροής.



Εικόνα 25 | Μεθοδολογία αξιολόγησης των επιλεγμένων μεθόδων εμπλουτισμού

Αναλυτικότερα (Εικ.25), κύτταρα MCF-7 αποκολλώνται από το δοχείο καλλιέργειας και σημαίνονται με πράσινη φθορίζουσα χρωστική (PKH67, Sigma). Καθορισμένος αριθμός χρωσμένων κυττάρων MCF-7 εισάγονται σε δείγμα αίματος υγιούς δότη και ακολουθεί απομόνωση των καρκινικών κυττάρων με μία από τις περιγραφείσες τεχνικές. Στην συνέχεια, το παρασκεύασμα επωάζεται με την χρωστική Calcein Blue AM και τελικά αναλύεται με κυτταρομετρία ροής. Επειδή η μέθοδος αυτή αδυνατεί να προσδιορίσει τον απόλυτο αριθμό κυττάρων

του δείγματος, ακριβώς πριν την ανάλυση με FACS, στο δείγμα εισάγεται γνωστός αριθμός κυττάρων MCF-7, τα οποία έχουν ήδη χρωστεί με φθορίζον αντίσωμα άλλου χρώματος (ερυθρό). Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται το ποσοστό των “ερυθρών” κυττάρων, τα οποία μετρήθηκαν από το κυτταρόμετρο σε σχέση με τον συνολικό αριθμό τους στο δείγμα· το ποσοστό αυτό είναι το ίδιο για τα “πράσινα” κύτταρα και συνεπώς υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός τους στο προϊόν του εμπλουτισμού. Χρησιμοποιείται ο ίδιος τύπος κυττάρων, ώστε να εξασφαλιστούν όμοια ρεολογικά χαρακτηριστικά με τα προς προσδιορισμό κύτταρα.



Εικόνα 26 | Αξιοποίηση διπαραμετρικών διαγραμμάτων FACS για την εξαγωγή αποτελεσμάτων. (α) Οι περιοχές R1 και R2 αντιστοιχούν στα $[MCF-7]_{FACS}^R$ και $[MCF-7]_{FACS}^G$ αντιστοίχως, (β) το διάγραμμα αυτό προκύπτει αν απαιτηθεί από το λογισμικό να επιλέξει στο διάγραμμα FL1-FL2 τα κύτταρα με μπλε φθορισμό, δηλαδή όσα είναι μεταβολικώς ενεργά σύμφωνα με την δοκιμασία Calcein Blue AM. Στην περιοχή R4 αντιστοιχεί τώρα ο αριθμός των $[MCF-7]_{FACS}^{G+B}$.

Η διαδικασία υπολογισμού των παραμέτρων εμπλουτισμού φαίνεται στον Πιν.8. Κατά την ανάλυση FACS, λαμβάνονται μετρήσεις για τις παραμέτρους FSC, SSC, FL1 (πράσινη εκπομπή), FL2 (ερυθρή εκπομπή) και FL7 (μπλε εκπομπή). Όλες οι τιμές λαμβάνονται από τα ακόλουθα διπαραμετρικά διαγράμματα της κυτταρομετρίας ροής: FSC-SSC, FL1-FL2, FL1-FL7 και FL2-FL7. Αρχικά, υπολογίζεται ο συντελεστής ανάκτησης (F) MCF-7 κυττάρων με βάση τον αριθμό των “ερυθρών” MCF-7 ($[MCF-7]_{FACS}^R$), τα οποία ανιχνεύονται από το κυτταρόμετρο ροής στο διάγραμμα FL1-FL2, και τον αρχικό αριθμό “ερυθρών” MCF-7 κυττάρων ($[MCF-7]^R$), τα οποία εισήχθησαν στο δείγμα πριν την ανάλυση FACS (Εξ.6). Στην συνέχεια, προσδιορίζεται ο συνολικός αριθμός των ζώντων ανακτηθέντων “πράσινων” MCF-7 ($[MCF-7]_{enr}^G$) πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό MCF-7, τα οποία είναι ταυτόχρονα “πράσινα” και “μπλε” ($[MCF-7]_{FACS}^{G+B}$) με τον συντελεστή ανάκτησης F (Εξ.6). Ο πληθυσμός $[MCF-7]_{FACS}^{G+B}$ προσδιορίζεται από το διάγραμμα FL1-FL2, εάν ζητηθεί η επιλογή εμφάνισης μόνο των γεγονότων (gating), τα οποία ανιχνεύονται ταυτόχρονα από το κανάλι FL1 και FL7 (Εικ.26β).

Εφαρμόζοντας τις εξισώσεις (1-5) για τα δεδομένα της ανάλυσης FACS (Εξ.6-10) λαμβάνονται οι παράμετροι εμπλουτισμού κάθε μεθόδου. Στον Πιν.8 φαίνονται οι αναλυτικοί υπολογισμοί και στην Εικ.26 οι κυτταρικοί πληθυσμοί, οι οποίοι λαμβάνονται κάθε φορά υπόψιν.

Πίνακας 8 | Υπολογισμοί των παραμέτρων εμπλουτισμού από τα δεδομένα FACS

Παράμετρος	Εξίσωση	Επεξήγηση συμβόλων
Συντελεστής Ανάκτησης MCF-7 (F)	$F = \frac{[MCF - 7]_i^R}{[MCF - 7]_{FACS}^R} \quad (6)$	$[MCF - 7]_i^R$ ο αριθμός των εισαχθέντων στο δείγμα "ερυθρών" MCF-7 $[MCF - 7]_{FACS}^R$ ο αριθμός των "ερυθρών" MCF-7, τα οποία ανιχνεύθηκαν με FACS
Ανακτηθέντα 'πράσινα' MCF-7 ($[MCF - 7]_{enr}^G$)	$[MCF - 7]_{enr}^G = [MCF - 7]_{FACS}^{G+B} \cdot F \quad (7)$	$[MCF - 7]_{FACS}^{G+B}$ ο αριθμός των MCF-7 τα οποία είναι "πράσινα" και "μπλε" ταυτόχρονα, όπως ανιχνεύονται από το FACS
Απόδοση (A)	$A = \frac{[MCF - 7]_{enr}^G}{[MCF - 7]_i^G} \cdot 100\% \quad (8)$	$[MCF - 7]_i^G$ ο αριθμός των εισαχθέντων στο δείγμα "πράσινων" κυττάρων
Καθαρότητα (P)	$P = \frac{[MCF - 7]_{FACS}^G}{TC_{FACS}} \cdot 100\% \quad (9)$	TC_{FACS} ο συνολικός αριθμός κυττάρων, τα οποία ανιχνεύθηκαν με FACS
Συντελεστής εμπλουτισμού (CE)	$CE = \frac{P_{en}}{P_i} \quad (10)$	P_i και P_{en} η καθαρότητα πριν και μετά τον εμπλουτισμό αντίστοιχα
Λογαριθμικός Συντελεστής εμπλουτισμού (CE^{log})	$CE^{log} = \log\left(\frac{P_{en}}{P_i}\right) \quad (9)$	
Βιωσιμότητα (V)	$V = \frac{[MCF - 7]_{FACS}^{G+B}}{[MCF - 7]_{FACS}^G} \cdot 100\% \quad (10)$	$[MCF - 7]_{FACS}^G$ ο αριθμός των "πράσινων" κυττάρων, τα οποία ανιχνεύονται από το FACS

2.1.2. Κυτταρικές σειρές

Η κυτταρική σειρά MCF-7 απομονώθηκε το 1970 από το πλευρικό εξίδρωμα γυναίκας 69 ετών, πάσχουσας από μεταστατική νεοπλασία του μαστού (μετά από ακτινο-, ορμονο- θεραπεία). Τα αρχικά MCF-7 αποτελούν ακρωνύμιο του ινστιτούτου Michigan Cancer Foundation-7, όπου καθιερώθηκε η κυτταρική σειρά το 1973 από τον Herbert Soule και συνεργάτες [116]. Τα κύτταρα αναφέρονται ως θετικά για κυτταροπλασματικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ER⁺) και προγεστερόνης (PR⁺) σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις και για υπερέκφραση ErCAM, HER2 και CK19. Ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι περίπου 16-24 ώρες ανάλογα με την πυκνότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα MCF-7 καλλιεργούνται σε μονοστιβάδα σε θρεπτικό διάλυμα DMEM, παρουσία ορού εμβρύου βοός (FBS) σε

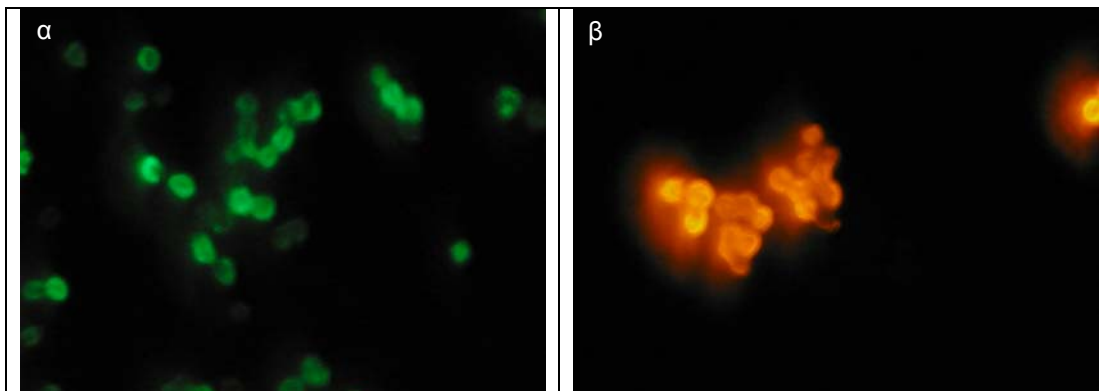
συγκέντρωση 10%, ινσουλίνης σε συγκέντρωση 50μg/mL και αντιβιοτικού γενταμυκίνης σε συγκέντρωση 1%. Οι συνθήκες καλλιέργειας είναι : 37°C, 5% CO₂, κεκορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα.

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε δοχεία καλλιέργειας σε αρχική συγκέντρωση 1,2-2,5 ·10⁴ κύτταρα/cm². Ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται ανά 3-4 μέρες με λόγο αραιώσης της καλλιέργειας 1/3 έως 1/5. Η αποκόλληση των κυττάρων από τα δοχεία καλλιέργειας γίνεται με επώαση επί 3-10min με 0,2% θρυψίνη/EDTA, απουσία Mg²⁺ και Ca²⁺, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ αναστολή της ενζυμικής αντίδρασης επιτυγχάνεται με την προσθήκη ορού, διαλυμένου σε θρεπτικό μέσο σε συγκέντρωση 10%. Πριν την έναρξη κάθε πειράματος απομόνωσης τα κύτταρα επώάζονται επί 16-24h με θρεπτικό μέσο απουσία FBS, για να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ομοιομορφία μεγέθους. Οι χειρισμοί των κυττάρων σε όλες τις ακόλουθες πειραματικές διεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγό νηματικής ροής. Οι συγκεντρώσεις των κυτταρικών αιωρημάτων πραγματοποιούνται με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και με χρήση πλακών κυτταρομετρίας Countess Slides (Invitrogen) σε συνδυασμό με το λογισμικό Image J.

2.1.3. Φθορίζουσες χρώσεις

Γενική χρώση

Οι γενικές χρωστικές PKH67/PKH26 Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich, [117]) συνίστανται από πράσινη (PKH67) ή ερυθρή (PKH26) φθορίζουσα ένωση (Εικ.27), η οποία φέρει μεγάλη αλειφατική ουρά. Με την χρήση κατάλληλου διαλύματος, το οποίο διατίθεται μαζί με την χρωστική (διαλύτης C), οι χρωστικές εισάγονται με μη ειδικό τρόπο στην κυτταρική μεμβράνη, μέσω και μόνο υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η εμφάνιση των σημασμένων κυττάρων κυμαίνεται από λαμπρή και ομοιόμορφη έως ανομοιόμορφη ή με την μορφή σιγμάτων, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και την έκταση ενδοκύττωσης της μεμβράνης μετά την σήμανση. Η ένταση φθορισμού είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση FACS, διότι δεν επηρεάζεται από την κατανομή της χρωστικής.



Εικόνα 27 | Γενική κυτταρική χρώση.

(α) MCF-7 κύτταρα χρωσμένα με PKH67, (β) MCF-7 κύτταρα χρωσμένα με PKH26

Υλικά

- PKH67/PKH26 Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich), περιέχει την χρωστική και τον Διαλύτη C
- Ισοτονικό διάλυμα PBS, pH 7,4
- FBS
- Θρεπτικό μέσο DMEM, 10% FBS, 1% γενταμικίνη
- Μονοκυτταρικό αιώρημα κυττάρων

Διαδικασία (για $2 \cdot 10^6$ κύτταρα)

Το αιώρημα $2 \cdot 10^6$ κυττάρων εκπλένεται με PBS και φυγοκέντρηση στα 400xg επί 5min (RT). Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100μL διαλύτη C και προστίθεται η χρωστική (0,6μL) αραιωμένη σε 100μL διαλύτη C. Ακολουθεί επώαση επί 2-5min με περιοδική ανάδευση και τελικά προσθήκη ίσου όγκου (200μL) FBS για να σταματήσει η αντίδραση. Μετά 1min τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 400xg επί 10min στους 25°C και ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με DMEM, 10%FBS, 1% γενταμικίνη και φυγοκέντρηση στα 400xg επί 5min στους 25°C.

Χρώση με φθορίζον αντίσωμα anti-EpCAM

Η ταυτόχρονη χρήση των δύο προηγούμενων χρωστικών για ανάλυση FACS δεν ενδείκνυται, διότι παρουσιάζουν αλληλεπικάλυψη στην εκπομπή και απαιτείται σε μεγάλο βαθμό αντιστάθμιση των σημάτων. Η χρήση ειδικής χρώσης για τα κύτταρα, τα οποία χρησιμεύουν ως δείγμα ελέγχου για τον προσδιορισμό απόλυτων αριθμών, κρίθηκε απαραίτητη. Για αυτόν τον σκοπό επιλέχθηκε αντίσωμα έναντι EpCAM συζευγμένο με φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin, PE), η οποία εκπέμπει στο ερυθρό φάσμα και δεν έχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη στο φάσμα εκπομπής με το πράσινο.

Υλικά

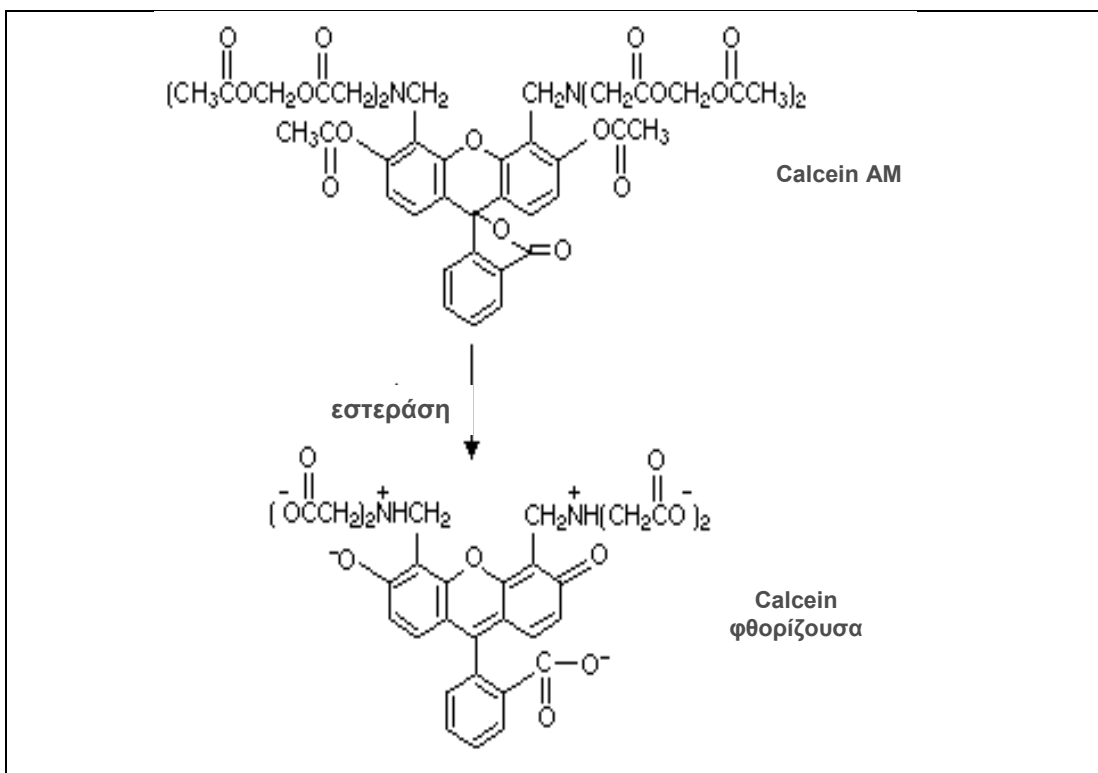
- Φθορίζον αντίσωμα anti-EpCAM-PE* (BD)
- Διάλυμα PBS, 10% FBS στους 4°C
- Διάλυμα PBS, 3% FBS στους 4°C
- Μονοκυτταρικό αιώρημα κυττάρων συγκέντρωσης $2 \cdot 10^7$ κύτταρα/mL σε διάλυμα PBS, 10% FBS

Διαδικασία

Στο αιώρημα κυττάρων, το οποίο δεν πρέπει να βρίσκεται σε όγκο μικρότερο των 200μL, προστίθενται 20μL αντισώματος και αφήνεται επί 40min, στους 4°C και σε σκοτεινό χώρο. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με 1mL PBS, 10%FBS (4°C) και ενδιάμεση φυγοκέντρηση στα 400xg επί 5min. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο PBS (1mL).

2.1.4. Δοκιμασία βιωσιμότητας

Ένα από τα βασικά κριτήρια αξιολόγησης των μεθόδων, όπως αυτά ορίστηκαν, είναι η παραλαβή ζώντων κυττάρων. Υπάρχει πληθώρα δοκιμασιών βιωσιμότητας, κάθε μία από τις οποίες χρησιμοποιεί διαφορετική ιδιότητα των ζώντων κυττάρων. Μία από τις ευρέως εφαρμοζόμενες δοκιμασίες είναι ο αποκλεισμός της χρωστικής Trypan Blue από τα ζώντα κύτταρα. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ικανότητα της πλασματικής μεμβράνης των ζώντων κυττάρων να αποτρέπει την είσοδο στο κυτταρόπλασμα μη ηλεκτρολυτικών ουσιών, όπως η Trypan Blue, χωρίς, ωστόσο, να είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η καλή υγεία των κυττάρων. Εναλλακτική και ακριβέστερη μέθοδος αποτελεί η μέτρηση της μεταβολικής ενεργότητας με την ενζυμική μετατροπή κάποιας ένωσης, ικανής να διαπεράσει την πλασματική μεμβράνη, σε προϊόν, το οποίο λόγω χρώματος ή φθορισμού μπορεί να παρατηρηθεί. Τέτοια ουσία είναι η Calcein Blue AM (Invitrogen), παράγωγο εστεροποίησης της φθορίζουσας καλοεΐνης με μία ακετο-μέθυλ-ομάδα (AM). Η Calcein Blue AM είναι αφόρτιστο μόριο, άχρωμο και με μικρό φθορισμό μέχρι να υδρολυθεί. Όταν εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, μη ειδικές εστεράσες απομακρύνουν τις λιπόφιλες ομάδες, μετατρέποντάς το σε φορτισμένο προϊόν, φθορίζον στο μπλε τού φάσματος (Ex/Em), το οποίο συγκρατείται στο εσωτερικό τού κυττάρου (Εικ.28). Κατά συνέπεια τα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα θα φθορίζουν έντονα στο μπλε.



Εικόνα 28 | Μηχανισμός δοκιμασίας βιωσιμότητας με Calcein Blue AM

Υλικά

- Calcein Blue AM (Invitrogen), διάλυμα συγκέντρωσης 0,6mg/mL σε άνυδρο DMSO
- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640, 5%FBS

Διαδικασία (για 6 δείγματα του 1mL)

Ετοιμάζονται κυτταρικά αιωρήματα συγκέντρωσης $0.1-5 \cdot 10^6$ κυττάρων/mL και όγκου 1mL σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640, 5%FBS. Παράλληλα ετοιμάζεται το διάλυμα της χρωστικής με προσθήκη 2,5μL διαλύματος συγκέντρωσης 0,6mg/mL σε 83,5μL θρεπτικού. Από αυτό το διάλυμα προστίθενται από 15μL σε κάθε 1mL κυττάρων, τα οποία αφήνονται επί 40min, στους 4°C και σε σκοτεινό χώρο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και προσθήκη PBS για την ανάλυση με FACS.

2.1.5. Ερυθρόλυση με χλωριούχο αμμώνιο

Η ερυθρόλυση με ισοτονικό διάλυμα χλωριούχου αμμώνιου (NH_4Cl) στηρίζεται στην ωσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων, η οποία αφήνει πρακτικά ανεπηρέαστα τα λευκοκύτταρα. Τα ερυθροκύτταρα είναι διαπερατά από το NH_4Cl , με αποτέλεσμα η επακόλουθη ωσμωτική ανισορροπία να επιφέρει την λύση τους. Τα εμπύρνα κύτταρα έχουν μηχανισμούς ρύθμισης της ωσμωτικής πίεσης και παραμένουν ακέραια κατά την συγκεκριμένη διάρκεια έκθεσης στο NH_4Cl .

Υλικά

- Ισοτονικό διάλυμα ερυθρόλυσης: 155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM EDTA, pH 7,2
- Διάλυμα εκπλύσεων PEB: PBS, 0,1mM EDTA, 0,5% BSA fraction V, pH 7,4
- Δείγμα αίματος, το οποίο περιέχει οποιοδήποτε από τα συνήθη αντιπηκτικά (χρησιμοποιήθηκε το EDTA)

Διαδικασία

Σε δείγμα αίματος προστίθενται τέσσερις όγκοι ισοτονικού διαλύματος ερυθρόλυσης και αφήνεται επί 5min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 500xg επί 5min, αιώρηση σε 7mL PEB και φυγοκέντρηση στα 300xg επί 5min. Το στάδιο της ευθροκυτταρικής λύσης, εάν είναι απαραίτητο, επαναλαμβάνεται. Όλες οι διαδικασίες διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature, RT).

2.1.6. Μέθοδοι απομόνωσης

Δεδομένου τού πλήθους των μεθόδων εμπλουτισμού των CTCs, κρίθηκε απαραίτητη η επιλογή μίας τεχνικής από κάθε κατηγορία, η περιγραφή των οποίων ακολουθεί.

2.1.6.1. Διήθηση

Με απώτερο στόχο την απομόνωση ζώντων CTCs, επιλέχθηκε η διήθηση χωρίς μονιμοποίηση των αιματοκυττάρων και υπό την επίδραση μόνο της βαρύτητας. Η συσκευή Millipore 1225 Sample Manifold (Millipore), η οποία επιλέχθηκε, επιτρέπει τον ταυτόχρονο χειρισμό 12 δειγμάτων. Η διηθητική μεμβράνη παράγεται από την Nuclepore και είναι τεχνολογίας Track-Etch, η οποία επιτρέπει τον σχηματισμό ομοιόμορφων πόρων. Η διάμετρος των πόρων για την συγκεκριμένη εφαρμογή ορίστηκε στα 8μm και εκείνη της μεμβράνης στα 12mm, ώστε να ταιριάζει ακριβώς στις θέσεις τού διηθητικού εξοπλισμού.

Υλικά

- Millipore 1225 Sample Manifold (Millipore)
- Nuclepore Track-Edged Membrane- 8μm pore size (Whatman)
- Ισοτονικό διάλυμα PBS, 1%EDTA
- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640, 5% FBS
- Δείγμα αίματος, το οποίο περιέχει οποιοδήποτε από τα συνήθη αντιπηκτικά (χρησιμοποιήθηκε το EDTA)

Διαδικασία

Το αίμα αραιώνεται σε αναλογία 1:1 με PBS, 1%EDTA. Το αραιωμένο αίμα διηθείται υπό την επίδραση της βαρύτητας και έως ότου διέλθει όλο το δείγμα από τον ηθμό. Στην συνέχεια, ο ηθμός εκπλένεται δύο φορές με ίσο όγκο PBS, 1%EDTA. Τέλος, η μεμβράνη βυθίζεται σε τρυβλίο περιέχον πλήρες θρεπτικό υλικό και με ήπια απόξεση απομακρύνονται τα κύτταρα.

2.1.6.2. Φυγοκέντρωση Διαβάθμισης Πυκνότητας

Όλες οι φυγοκεντρώσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου σε φυγόκεντρο αιωρούμενου στροφέα. Ως μέσο διαχωρισμού επιλέχθηκε το προϊόν Histopaque 1077 (Sigma) με πυκνότητα 1,077g/mL.

Υλικά

- Φυγόκεντρος με δυνατότητα απεμπλοκής τού φρένου
- Histopaque 1077 (Sigma)
- Ισοτονικό διάλυμα PBS, pH 7,4
- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640, 5% FBS
- Δείγμα αίματος, το οποίο περιέχει οποιοδήποτε από τα συνήθη αντιπηκτικά (χρησιμοποιήθηκε το EDTA)

Διαδικασία

Το αίμα αναμειγνύεται 1:1 με ισοτονικό διάλυμα PBS, pH 7,4. Σε κατάλληλο φυγοκεντρικό σωλήνα (15 ή 50mL) τοποθετείται Histopaque-1077 και υπερτίθεται προσεκτικά το μείγμα αίματος-PBS, σε αναλογία

$$\frac{\text{Histopaque} - 1077}{\text{αραιωμένοαίμα}} = \frac{1}{2}$$

Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 400xg επί 30min στους 20°C, απουσία φρένου. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης η θολή μεσόφαση, η οποία περιέχει τα μονοπύρνα και τα καρκινικά κύτταρα, μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα, όπου αραιώνεται με PBS, pH 7,4 και φυγοκεντρείται στα 250xg επί 15min στους 20°C (με φρένο). Το κυτταρικό ίζημα εκπλένεται εκ νέου με PBS και επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό μέσο.

2.1.6.3. Εμπλουτισμός με σχηματισμό ανοσοροζεττών

Χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά διαθέσιμα Human CD45 Depletion Cocktail και Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail (και τα δύο από την Stem Cell Technologies), τα οποία διαφέρουν στην αντισωματική σύσταση. Ειδικότερα, ενώ το Human CD45 Depletion Cocktail περιέχει δύο αντισώματα έναντι των λευκοκυττάρων (CD45, CD66b), το Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail είναι πιο εξειδικευμένο και περιέχει αντισώματα έναντι αρκετών υποπληθυσμών λευκοκυττάρων, ώστε να θεωρείται, ότι επιτυγχάνει καλύτερο εμπλουτισμό. Στους Πιν.9 και Πιν.10 φαίνεται η αντισωματική σύστασή τους και το κύτταρο στόχος για κάθε αντίσωμα.

Πίνακας 9| Σύσταση του Human CD45 Depletion Cocktail

Αντιγόνο-στόχος	Κύτταρο-στόχος
CD45	Λευκοκύτταρα (εκτός των Πλασματοκυττάρων)
CD66b	Κοκκιοκύτταρα
Γλυκοφορίνη Α	Ερυθροκύτταρα

Πίνακας 10 | Σύνθεση του Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail

Αντιγόνο-στόχος	Κύτταρο-στόχος
CD2	T-λεμφοκύτταρα
CD16	Φυσικά Φονικά κύτταρα, Ουδετερόφιλα, Μονοκύτταρα, Μακροφάγα
CD19	B-λεμφοκύτταρα
CD36	Αιμοπετάλια, Ερυθροκύτταρα, Μονοκύτταρα
CD38	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , B-λεμφοκύτταρα, Φυσικά Φονικά κύτταρα
CD45	Λευκοκύτταρα (εκτός των Πλασματοκυττάρων)
CD66b	Κοκκιοκύτταρα
Γλυκοφορίνη A	Ερυθροκύτταρα

Υλικά

- Εμπορικό kit Human CD45 Depletion Cocktail ή Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail
- Φυγόκεντρος με δυνατότητα απεμπλοκής τού φρένου
- Histopaque 1077 (Sigma)
- Ισοτονικό διάλυμα PBS, 2% FBS, pH 7,4
- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640, 5% FBS
- Δείγμα αίματος, το οποίο περιέχει οποιοδήποτε από τα συνήθη αντιπηκτικά (χρησιμοποιήθηκε το EDTA)

Διαδικασία

Το μείγμα αντισωμάτων Human CD45 Depletion Cocktail ή Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail προστίθεται σε αναλογία 50μL ανά mL αίματος και το δείγμα επωάζεται επί 20min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το αίμα αραιώνεται με ίσο όγκο PBS, 2% FBS και ακολουθεί φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, με μόνη διαφοροποίηση, ότι η διαχωριστική φυγοκέντρηση πραγματοποιείται στα 1200xg επί 20min.

2.1.6.4. Θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια

Επιλέχθηκε το προϊόν CELLlection™ Epithelial Enrich (Dyna-Invitrogen), το οποίο συνίσταται από ομοιόμορφα υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια διαμέτρου 4,5μm φέροντα συνδεδεμένο το αντίσωμα anti-EpCAM. Το αντίσωμα συνδέεται με το σφαιρίδιο μέσω γέφυρας DNA. Η επιλογή τού συγκεκριμένου προϊόντος έγινε κυρίως με βάση την δυνατότητα απελευθέρωσης των κυττάρων από τα σφαιρίδια, μετά την πέψη τού συνδέτη DNA από την νουκλεάση DNAase I. Στην περίπτωση τής θετικής επιλογής τα κύτταρα-στόχοι βρίσκονται στο κλάσμα των σφαιριδίων.

Υλικά

- Εμπορικό kit CELLlection™ Epithelial Enrich (DynaL-Invitrogen), το οποίο περιλαμβάνει μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με anti-EpCAM και διάλυμα έκλουσης (DNAase I)
- Ειδικά διαμορφωμένοι μαγνήτες για δοκιμαστικούς σωλήνες των 2mL και των 15mL
- Ισοτονικό διάλυμα PBS, 0.1% BSA, pH 7,4
- Ισοτονικό διάλυμα PBS, 0.1% BSA, 2mM EDTA, pH 7,4 σε θερμοκρασία 2-8°C
- Θρεπτικό μέσο RPMI 1640, 1% FBS, 5mM MgCl₂, pH 7,0-7,4
- Δείγμα αίματος, το οποίο περιέχει οποιοδήποτε από τα συνήθη αντιπηκτικά (χρησιμοποιήθηκε το EDTA)

Διαδικασία (για 5mL αίμα)

1. Έκπλυση των Dynabeads

Όγκος 250μL Dynabeads μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναμειγνύεται με 250μL PBS, 0.1% BSA. Ο σωλήνας τοποθετείται σε μαγνήτη επί 1min και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Τέλος, τα σφαιρίδια επαναιωρούνται σε 250μL PBS, 0.1% BSA.

2. Προετοιμασία τού δείγματος

Το αίμα αραιώνεται με ίσο όγκο PBS, 0.1% BSA, 2mM EDTA και φυγοκεντρείται στα 600xg επί 10min σε RT. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, η ανώτατη φάση (πλάσμα) απορρίπτεται και το απομένον επαναιωρείται έως τον αρχικό όγκο (5mL) με PBS, 0.1% BSA, 2mM EDTA (2-8°C).

3. Εμπλουτισμός των CTCs

Στο δείγμα προστίθενται τα σφαιρίδια και ακολουθεί επώαση επί 30min στους 2-8°C αναδεύοντας ήπια. Στην συνέχεια τοποθετείται στον μαγνήτη, απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα σφαιρίδια εκπλένονται τρεις φορές με PBS, 0.1% BSA (έως τα 5mL) και διαχωρίζονται με τον μαγνήτη. Τελικά, τα σφαιρίδια επαναιωρούνται σε 200μL θερμό (37°C) RPMI 1640, 1% FBS, 5mM MgCl₂.

4. Έκλυση των CTCs

Προστίθενται 4μL διάλυμα έκλουσης (DNAase I) και το δείγμα επωάζεται επί 15min σε RT αναδεύοντας ήπια. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με μικροπιπέττα των 100μL τουλάχιστον 5-10 φορές και το δείγμα τοποθετείται στον μαγνήτη. Το υπερκείμενο (αποδεσμευμένα κύτταρα) μεταφέρεται σε προεπιχρισμένο με FBS δοκιμαστικό σωλήνα. Τα σφαιρίδια εκπλένονται με 200μL RPMI 1640, 1% FBS, 5mM MgCl₂ και το υπερκείμενο προστίθεται στο προηγούμενο.

2.1.6.5. Αρνητική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια

Το προϊόν Dynabeads CD45 (DynaL-Invitrogen) συνίσταται από ομοιόμορφα υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια διαμέτρου 4,5μm, τα οποία φέρουν αντίσωμα anti-hCD45. Σε αυτήν την περίπτωση, τα κύτταρα στόχοι εντοπίζονται στο

υπερκείμενο, ενώ το κλάσμα των σφαιριδίων περιέχει προσδεμένα λευκοκύτταρα. Κατά συνέπεια, δεν υπάρχει ανάγκη απελευθέρωσης των κυττάρων από τα σφαιρίδια. Ο προσδιορισμός του όγκου των μαγνητικών σφαιριδίων, ο οποίος πρέπει να προστεθεί σε παρασκεύασμα λευκοκυττάρων, υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη, ότι για κάθε mL δείγματος, συγκέντρωσης $2 \cdot 10^7$ κύτταρα/mL, απαιτούνται 250μL Dynabeads.

Υλικά

- Εμπορικό kit Dynabeads CD45 (DynaL-Invitrogen), το οποίο περιλαμβάνει μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με anti-hCD45
- Ειδικά διαμορφωμένοι μαγνήτες για δοκιμαστικούς σωλήνες των 2mL και των 15mL
- Ισοτονικό διάλυμα PBS, 0.1% BSA, 2mM EDTA, pH 7,4 σε θερμοκρασία 2-8°C
- Θρεπτικό μέσο RPMI 1640, 1% FBS, 4mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, pH 7,0-7,4
- Δείγμα αίματος, το οποίο περιέχει οποιοδήποτε από τα συνήθη αντιπηκτικά (χρησιμοποιήθηκε το EDTA)

Διαδικασία

1. Έκπλυση των Dynabeads

Ο επιθυμητός όγκος Dynabeads μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναμειγνύεται με ίσο όγκο PBS, 0.1% BSA, 2mM EDTA. Ο σωλήνας τοποθετείται σε μαγνήτη επί 1min και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Τέλος, τα σφαιρίδια επαναιωρούνται σε όγκο ίσο με τον αρχικό με PBS, 0.1% BSA.

2. Προετοιμασία του δείγματος

Τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται με ερυθρόλυση με NH₄Cl και στην συνέχεια προσδιορίζεται ο αριθμός των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο (τύπου Neubauer). Τα λευκοκύτταρα επαναιωρούνται με PBS, 0.1% BSA, 2mM EDTA σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^7$ κύτταρα/mL.

3. Εμπλουτισμός των καρκινικών κυττάρων

Τα εκπλυμένα σφαιρίδια προστίθενται στα λευκοκύτταρα και το δείγμα επωάζεται επί 30min στους 2-8°C, αναδεύοντας ήπια. Στην συνέχεια, το δείγμα αραιώνεται 40 φορές με PBS, 0.1% BSA, 2mM EDTA και τοποθετείται στον μαγνήτη, όπου παραμένει επί 10min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο προεπιχρισμένο με FBS σωλήνα, φέρεται μέχρι όγκου 50mL με PBS, 0.1% BSA, 2mM EDTA και φυγοκεντρείται στα 600xg επί 15min στους 2-8°C. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο RPMI 1640, 1% FBS, 4mM MgCl₂, 1mM CaCl₂.

2.1.7. Αποτελέσματα

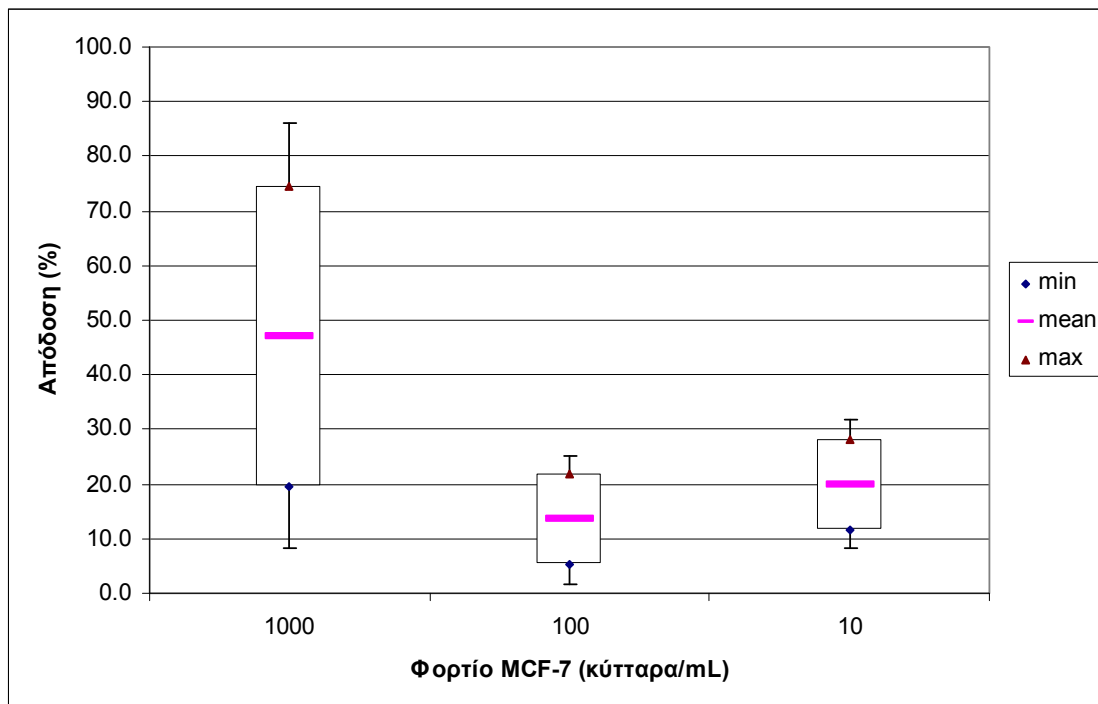
Δείγματα αίματος υγιών δοτών, των 5mL έκαστο, με αντιπηκτικό EDTA, αναμειχθηκαν με 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 και 10 χρωσμένα με PKH67 MCF-7/mL αίματος. Ακολούθησε ο εμπλουτισμός τους με κάθε μέθοδο και τέλος αξιολογήθηκαν οι παράμετροι αποδοτικότητας, όπως αυτές ορίστηκαν προηγουμένως. Έμφαση δόθηκε στις συγκεντρώσεις των 10^2 και 10 MCF-7/mL αίματος, οι οποίες ανταποκρίνονται περισσότερο στις πραγματικές συνθήκες. Η απόδοση κάθε μεθόδου δίνεται ως η μέση τιμή των δοκιμών με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση, σε όποιες περιπτώσεις αυτό είναι εφικτό. Η καθαρότητα των παρασκευασμάτων δίνεται με τον αριθμό αιματοκυττάρων, στον οποίο εντοπίζεται ένα MCF-7 κύτταρο και με τους συντελεστές εμπλουτισμού, απλό και λογαριθμικό (Ενότητα 2.1.1). Εφαρμόστηκε η πειραματική διαδικασία καθεμίας μεθόδου από μία φορά με αρνητικό δείγμα ελέγχου, για να διαπιστωθεί η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Σε καμία από τις αναλύσεις δεν παρατηρήθηκε ανάκτηση ζώντων ή νεκρών MCF-7 κυττάρων με πράσινο φθορισμό.

2.1.7.1. Εμπλουτισμός με Διήθηση

Στον Πιν.11 φαίνονται τα αποτελέσματα για την διήθηση και στο Σχ.1 η διακύμανση της απόδοσης (ελάχιστη, μέγιστη και μέση τιμή και τυπική απόκλιση). Η αξιολόγηση της διήθησης παρουσίασε τεχνικά προβλήματα, διότι η παραλαβή των κυττάρων από την μεμβράνη διήθησης με απόξεση δεν ήταν αρκετή για την πλήρη ανάκτηση των κυττάρων. Είναι επίσης πιθανή η απώλεια λόγω τραυματισμού κυττάρων. Ως εκ τούτου, η απόδοση είναι είτε μικρή σε σχέση με την αναμενόμενη ή παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση. Ανάλογη διακύμανση παρατηρείται και στις άλλες δύο παραμέτρους, πιθανώς για τους ίδιους λόγους.

Πίνακας 11 | Αποτελέσματα απομόνωσης με Διήθηση

Φορτίο MCF-7 (cells/mL)	Απόδοση (mean% \pm STDEV) (Εύρος)	Καθαρότητα (1 MCF-7 σε πλήθος αιματοκυττάρων)	Συντελεστής εμπλουτισμού (mean \pm STDEV) (CE ^{log})	Βιωσιμότητα (%)
10^5	60,0	1/152	$1,3 \cdot 10^2$ (2,1)	100
10^3	$47,2 \pm 39,0$ (19,7-74,6)	$1/2 \cdot 10^4$ -1/60	$1,2 \cdot 10^4 \pm 2,1 \cdot 10^4$ (3,1 \pm 1,3)	96-100
10^2	$13,6 \pm 11,7$ (5,3-21,9)	$1/10^6$ -1/670	$1,1 \cdot 10^4 \pm 1,7 \cdot 10^4$ (2,9 \pm 2,2)	14-81
10	$19,9 \pm 11,7$ (11,6-28,2)	$1/2,5 \cdot 10^4$ -1/3300	$3,4 \cdot 10^4 \pm 3,7 \cdot 10^4$ (4,3 \pm 0,6)	20-75



Σχήμα 1 | Ανάκτηση MCF-7 κυττάρων με Διήθηση

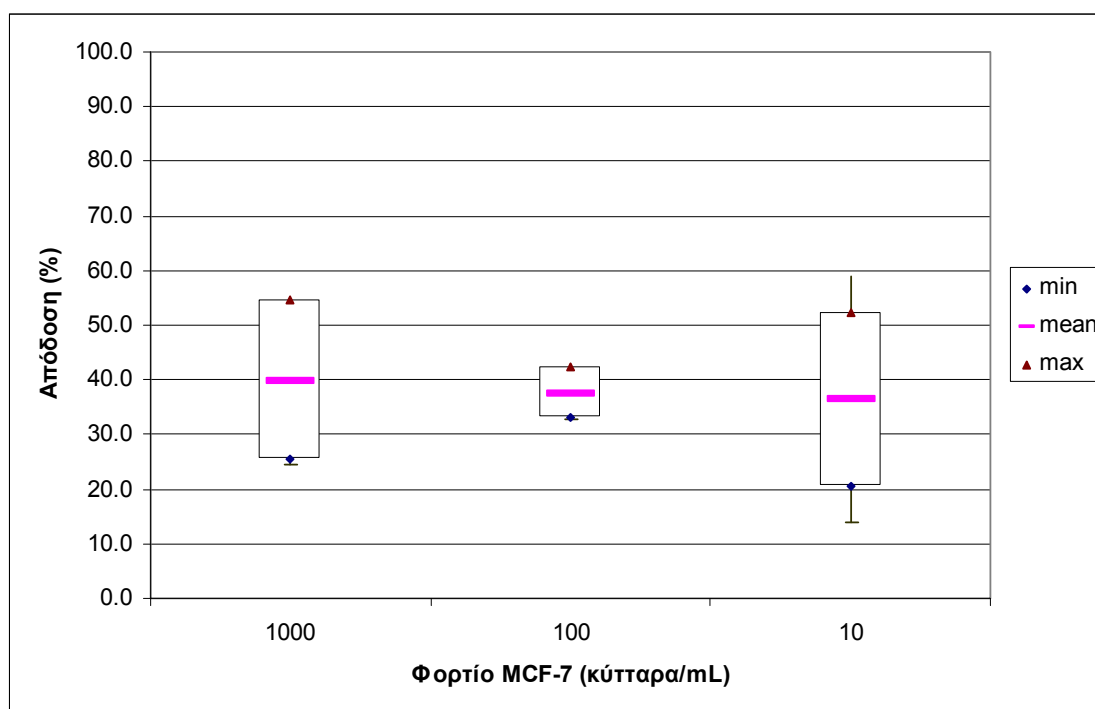
2.1.7.2. Εμπλουτισμός με Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας

Για όλες τις συγκεντρώσεις καρκινικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο δοκιμές. Οι πρώτες απόπειρες πραγματοποιήθηκαν για συγκεντρώσεις 10^5 , 10^4 , 10^3 και 10^2 MCF-7/mL αίματος και οι επόμενες για συγκεντρώσεις 10^3 , 10^2 και 10 MCF-7/mL αίματος, στις οποίες μετά την διαχωριστική φυγοκέντρηση ακολούθησε αιμόλυση στο πλαίσιο των εκπλύσεων. Η αιμόλυση αυξάνει κατά μία τάξη μεγέθους την καθαρότητα του δείγματος. Στον Πιν.12 συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τις τρεις παραμέτρους και στο Σχ.2 αναπαρίσταται γραφικά η διακύμανση της απόδοσης (ελάχιστη, μέγιστη και μέση τιμή και τυπική απόκλιση). Η απόδοση της μεθόδου πρακτικά δεν υπερβαίνει το 50%, με επακόλουθο την σημαντική απώλεια κυττάρων-στόχων ιδιαίτερα στις χαμηλές συγκεντρώσεις MCF-7. Η βιωσιμότητα των κυττάρων δεν φαίνεται να επηρεάζεται αρνητικά από την μέθοδο. Το μικρότερο ποσοστό βιωσιμότητας ήταν 60%, το οποίο όμως είναι πιθανότερο να οφείλεται σε αστοχία της δοκιμασίας βιωσιμότητας (π.χ. λόγω μεγαλύτερης από την προβλεπόμενη συγκέντρωσης κυττάρων) παρά να αντανάκλα μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα, δεδομένου, ότι εμφανίστηκε μόνο μία φορά.

Πίνακας 12 | Αποτελέσματα απομόνωσης με Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας

Φορτίο MCF-7 (cells/mL)	Απόδοση (mean% ± STDEV) (Εύρος)	Εύρος Καθαρότητας* (1 MCF-7 σε πλήθος αιματοκυττάρων)	Συντελεστής εμπλουτισμού (mean ± STDEV) (CE ^{log})	Βιωσιμότητα (%)
10 ⁵	53,8 ± 7,9 (48,2-59,4)	1/370 - 1/150	9,3·10 ¹ ± 5,5·10 ¹ (1,9 ± 0,3)	60-100
10 ⁴	42,8 ± 7,3 (38,7-49,0)	1/10000 - 1/5000	3,0·10 ¹ ± 1,4·10 ¹ (1,5 ± 0,2)	
10 ³	39,6 ± 15,0 (25,5-54,5)	1/33000 - 1/5000	2,2·10 ² ± 1,8·10 ² (2,2 ± 0,5)	
10 ²	37,5 ± 4,7 (33,0-42,4)	1/330000 - 1/27000	4,7·10 ² ± 3,6·10 ² (2,5 ± 0,6)	
10	36,5 ± 22,56 (20,5-52,4)	1/198000 - 1/158000	1,1·10 ³ ± 1,7·10 ² (3,1 ± 0,1)	

*Υψηλότερες τιμές καθαρότητας αντιστοιχούν σε έκπλυση με αιμόλυση



Σχήμα 2 | Ανάκτηση κυττάρων με Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας

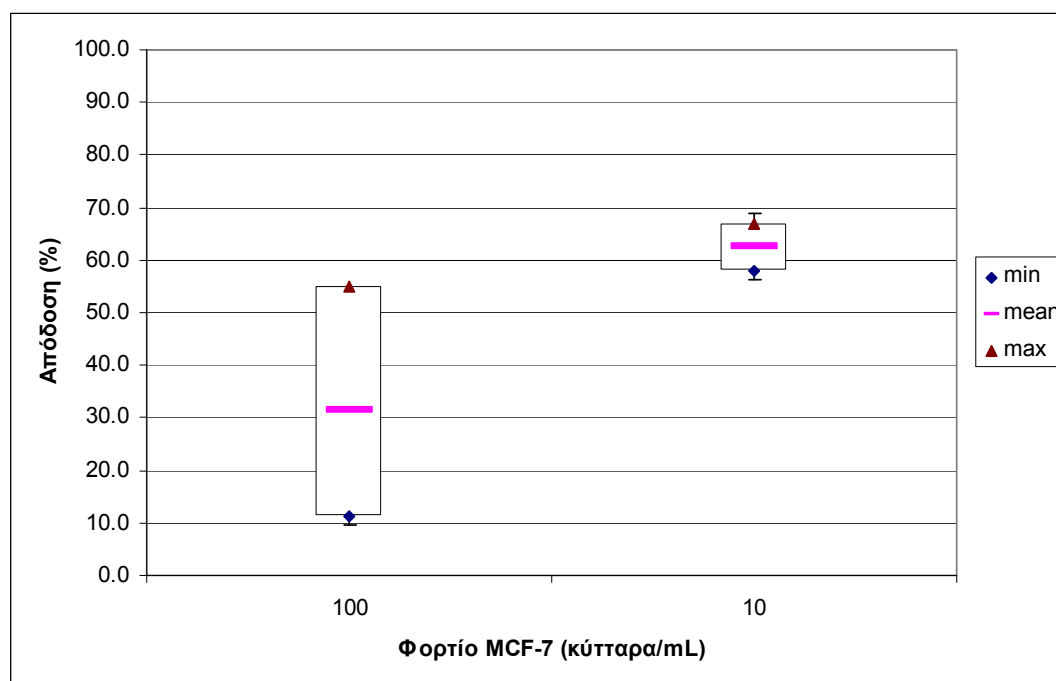
2.1.7.3. Εμπλουτισμός με το RosetteSep Tumour Epithelial Enrich

Οι πειραματικές δοκιμές για τις συγκεντρώσεις κυττάρων MCF-7 των 10⁵, 10⁴ και 10³ κυττάρων/mL αίματος πραγματοποιήθηκαν μία φορά, ενώ των 10² και 10 MCF-7/mL αίματος τουλάχιστον δύο φορές. Τα αποτελέσματα για τις παραμέτρους εμπλουτισμού φαίνονται στον Πιν.13, ενώ στο Σχ.3 αναπαρίσταται η απόδοση της μεθόδου (ελάχιστη, μέγιστη και μέση τιμή και τυπική απόκλιση). Με

δεδομένο, ότι ο εμπλουτισμός ανασοροζεττών χρησιμοποιεί φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας για να απομακρύνει ανεπιθύμητα κύτταρα, καθίσταται προφανές, ότι η απόδοσή του επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την μέθοδο αυτή. Αναλυτικότερα, ενώ αυξάνεται σημαντικά η καθαρότητα των MCF-7 σε σχέση με την απλή διαχωριστική φυγοκέντρηση, η απόδοση παραμένει σε χαμηλά επίπεδα κάτω του 50%. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση της χαμηλότερης συγκέντρωσης MCF-7 στο αίμα (10 MCF-7/mL), η οποία αποδίδει το ~60% των MCF-7, ωστόσο κρίνεται, ότι απαιτούνται περισσότερες επαναλήψεις για την ισχυροποίηση αυτού του αποτελέσματος. Τέλος, η βιωσιμότητα των κυττάρων κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με την απλή διαχωριστική φυγοκέντρηση.

Πίνακας 13 | Αποτελέσματα απομόνωσης με RosetteSep Tumour Cell Enrich

Φορτίο MCF-7 (cells/mL)	Απόδοση (mean% ± STDEV) (Εύρος)	Καθαρότητα (1 MCF-7 σε πλήθος αιματοκυττάρων)	Συντελεστής εμπλουτισμού (mean ± STDEV) (CE ^{log})	Βιωσιμότητα (%)
10 ⁵	46,0	1/5	4,2·10 ³ (3,6)	70-100
10 ⁴	43,0	1/17	1,1·10 ⁴ (4,1)	
10 ³	47,0	1/130	1,5·10 ⁴ (4,2)	
10 ²	31,6 ± 22,0 (11,2-55,0)	1/1670 - 1/270	3,9·10 ⁴ ± 3,2·10 ⁴ (4,5 ± 0,4)	
10	62,4 ± 6,4 (58,0-67,0)	1/3000 - 1/1000	1,3·10 ⁵ ± 9,9·10 ⁴ (5,0 ± 0,4)	



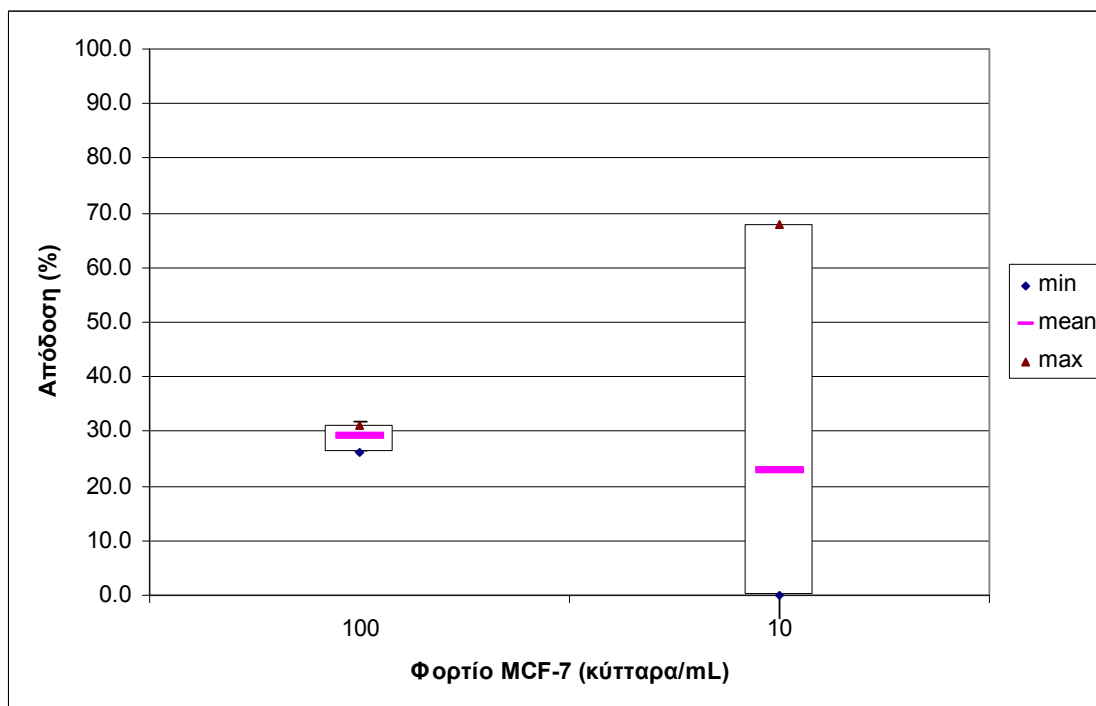
Σχήμα 3 | Ανάκτηση κυττάρων με RosetteSep Tumour Cell Enrich

2.1.7.4. Εμπλουτισμός με το RosetteSep CD45 Depletion

Οι πειραματικές δοκιμές για τις συγκεντρώσεις κυττάρων MCF-7 των 10^5 , 10^4 και 10^3 κυττάρων/mL αίματος πραγματοποιήθηκαν μία φορά, ενώ των 10^2 και 10 MCF-7/mL αίματος τουλάχιστον δύο φορές. Στον Πιν.14 συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τις παραμέτρους εμπλουτισμού της μεθόδου και στο Σχ.4 αναπαρίσταται γραφικά η διακύμανση της απόδοσης (ελάχιστη, μέγιστη και μέση τιμή και τυπική απόκλιση). Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, η εφαρμογή φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την απόδοση της τεχνικής. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις MCF-7 η απόδοση πάλι κυμαίνεται κάτω του 50%, ενώ για μικρότερο φορτίο καρκινικών κυττάρων μειώνεται κάτω του 30%. Αντιφατικά αποτελέσματα προέκυψαν στην συγκέντρωση των 10 MCF-7/mL αίματος, κατά την οποία δύο φορές παρατηρήθηκε μηδενική απόδοση και μία φορά ανάκτηση κυττάρων κατά 68%. Η καθαρότητα είναι υψηλότερη από την διαχωριστική φυγοκέντρηση και μικρότερη αλλά της ίδιας τάξης μεγέθους από το RosetteSep Epithelial Enrich. Τέλος, τα ανακτώμενα κύτταρα διατηρούν μεταβολική ενεργότητα στα ίδια επίπεδα όπως προηγουμένως.

Πίνακας 14 | Αποτελέσματα απομόνωσης με RosetteSep CD45 Depletion kit

Φορτίο MCF-7 (cells/mL)	Απόδοση (mean% ± STDEV) (Εύρος)	Καθαρότητα (1 MCF-7 σε πλήθος αιματοκυττάρων)	Συντελεστής εμπλουτισμού (mean± STDEV) (CE^{log})	Βιωσιμότητα (%)
10^5	47,0	1/69	$2,9 \cdot 10^2$ (2,5)	70-100
10^4	62,0	1/330	$6,0 \cdot 10^2$ (2,8)	
10^3	30,0	1/6250	$3,2 \cdot 10^2$ (2,5)	
10^2	$29,1 \pm 2,6$ (26,2-31,0)	1/90000 -1/323	$3,8 \cdot 10^4 \pm 3,3 \cdot 10^4$ (4,6 ± 1,4)	
10	$22,7 \pm 39,2$ (0,0-68,0)	1/3300	$6,0 \cdot 10^4$ (4,8)	



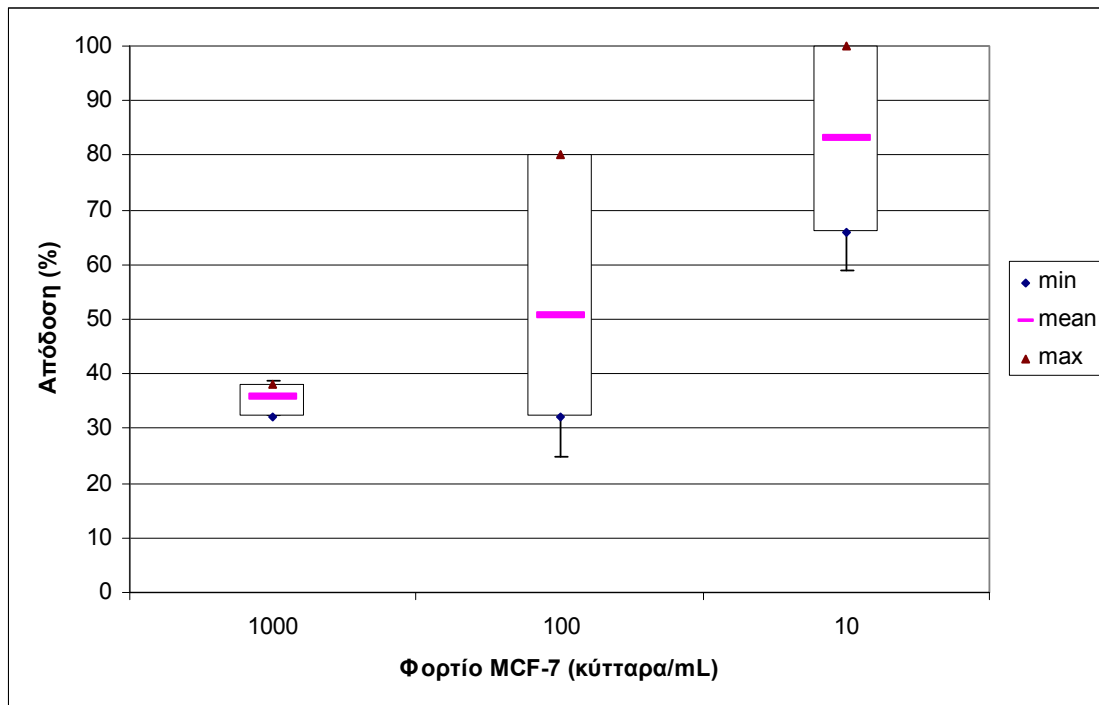
Σχήμα 4 | Ανάκτηση κυττάρων με RosetteSep CD45 Depletion kit

2.1.7.5. Εμπλουτισμός με το Dynabeads CELlection

Στον Πιν.15 φαίνονται τα αποτελέσματα του θετικού ανοσομαγνητικού διαχωρισμού και στο Σχ.5 αναπαρίσταται η διακύμανση της απόδοσης (ελάχιστη, μέγιστη και μέση τιμή και τυπική απόκλιση). Η θετική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια των MCF-7 πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου, το οποίο ορίζει την ποσότητα σφαιριδίων ανάλογα με την ποσότητα αίματος και όχι με την συγκέντρωση καρκινικών κυττάρων στο αίμα. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια, η απόδοση στα υψηλά φορτία MCF-7 να είναι χαμηλή αλλά να αυξάνεται σημαντικά στις πιο ρεαλιστικές συγκεντρώσεις. Επιπροσθέτως, η απόδοση στις χαμηλές συγκεντρώσεις παρουσίασε μεγάλη διακύμανση, η οποία οφείλεται κυρίως στην ανεπαρκή έκλυση των κυττάρων από τα σφαιρίδια και όχι στην αναποτελεσματική δέσμευση. Τέλος, επιτυγχάνεται υψηλότερη καθαρότητα, η οποία ακόμα και στις χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις MCF-7 είναι υψηλή (1 MCF-7/50 αιματοκύτταρα). Η βιωσιμότητα εμφανίζεται χαμηλή δύο φορές, ωστόσο αυτό μάλλον σχετίζεται με πειραματική αστοχία, εφόσον όλες τις υπόλοιπες φορές είναι της τάξης του 90%.

Πίνακας 15 | Αποτελέσματα απομόνωσης με Dynabeads CELLection

Φορτίο MCF-7 (cells/mL)	Απόδοση (mean% ± STDEV) (Εύρος)	Καθαρότητα (1 MCF-7 σε πλήθος αιματοκυττάρων)	Συντελεστής εμπλουτισμού (mean± STDEV) (CE ^{log})	Βιωσιμότητα (%)
10 ⁵	13,0	1/2	1,3·10 ⁴ (4,1)	54
10 ⁴	40,0	1/3	8,0·10 ⁴ (4,9)	61
10 ³	35,7 ± 3,2 (32,0-38,0)	1/60 - 1/12	9,4·10 ⁴ ± 7,1·10 ⁴ (4,9 ± 0,4)	98
10 ²	50,7 ± 25,7 (32,0-80,0)	1/50 - 1/290	1,8·10 ⁵ ± 1,9·10 ⁵ (5,1 ± 0,4)	90
10	66,0 ± 24,0 (66,0-100)	1/270 -1/100	1,3·10 ⁶ ± 8,2·10 ⁵ (6,1 ± 0,3)	90



Σχήμα 5 | Ανάκτηση κυττάρων με Dynabeads CELLection Epithelial Enrich

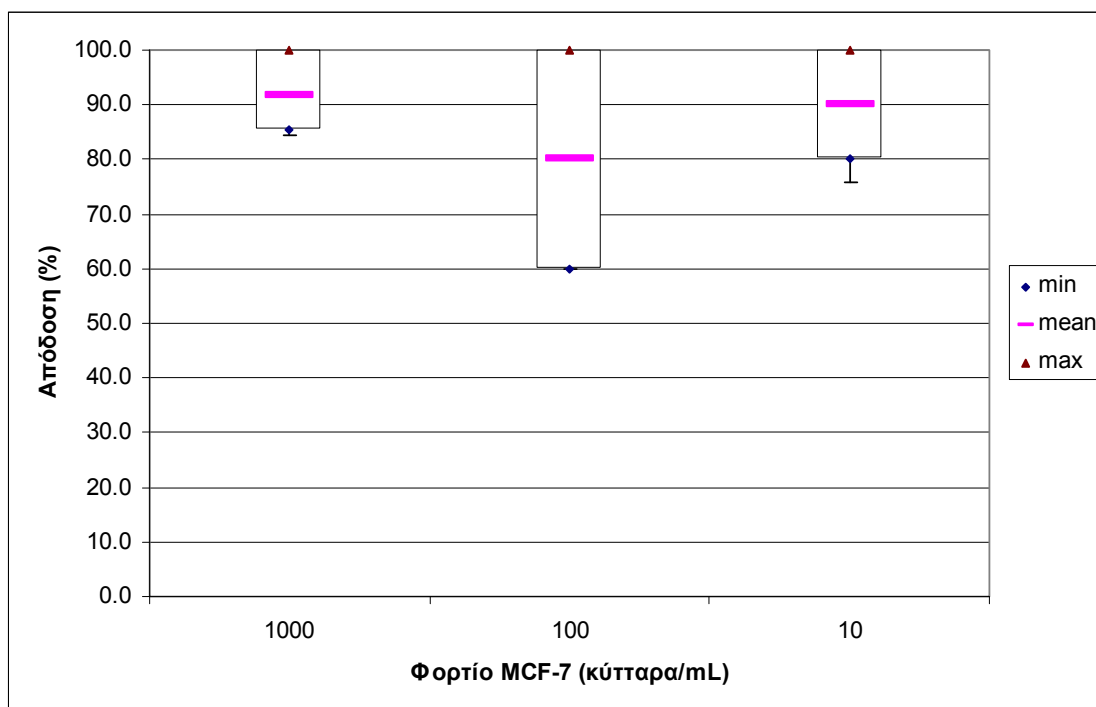
2.1.7.6. Εμπλουτισμός με το Dynabeads CD45

Στον Πιν.16 φαίνονται τα αποτελέσματα της αρνητικής επιλογής με μαγνητικά σφαιρίδια και στο Σχ.6 η διακύμανση της απόδοσης (ελάχιστη, μέγιστη και μέση τιμή και τυπική απόκλιση). Η αρνητική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια παρουσίασε την υψηλότερη επαναληψιμότητα όσον αφορά σε όλες τις παραμέτρους εμπλουτισμού, δεδομένου, ότι παρατηρήθηκαν οι μικρότερες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών δοκιμών. Η απόδοση χαρακτηρίζεται σταθερά υψηλή, άνω του 70%, και ανεξάρτητη του αρχικού φορτίου MCF-7. Σε ορισμένες περιπτώσεις η απόδοση υπερέβη το 100%, το οποίο κατά πάσα πιθανότητα σχετίζεται με την εισαγωγή κυτταρικών συσσωματωμάτων.

Η καθαρότητα βρίσκεται στα αντίστοιχα επίπεδα της διαχωριστικής φυγοκέντρησης. Τέλος, η βιωσιμότητα εμφανίζεται επίσης σταθερά στο 80-100%.

Πίνακας 16 | Αποτελέσματα απομόνωσης με Dynabeads CD45

Φορτίο MCF-7 (cells/mL)	Απόδοση (mean% ± STDEV) (Εύρος)	Καθαρότητα (1 MCF-7 σε πλήθος αιματοκυττάρων)	Συντελεστής εμπλουτισμού (mean± STDEV) (CE ^{log})	Βιωσιμότητα (%)
10 ⁵	67	1/5	5,8·10 ³ (3,8)	80-100
10 ³	91,8 ± 7,5 (85,3-100)	1/400 - 1/115	4,2·10 ³ ± 2,2·10 ³ (3,6 ± 0,3)	
10 ²	80,0 ± 20,0 (60-100)	1/5000 - 1/3700	2,3·10 ³ ± 2,4·10 ³ (3,2 ± 0,6)	
10	90,0 ± 14,1 (80-100)	1/29400 - 1/26300	3,8·10 ³ ± 4,3·10 ³ (3,4 ± 0,7)	



Σχήμα 6 | Ανάκτηση κυττάρων με Dynabeads CD45

2.2. Σύνοψη αποτελεσμάτων-Συμπεράσματα

Τα δεδομένα από την εξέταση κλινικών δειγμάτων έχουν δείξει, ότι η συγκέντρωση των CTCs κυμαίνεται συνήθως μεταξύ των 10-100 CTCs/mL αίματος και πολύ σπάνια είναι της τάξης των 1000 CTCs/mL. Κατά συνέπεια, η αξιολόγηση των μεθόδων εστιάζεται σε αυτά τα φορτία κυττάρων MCF-7. Στον Πιν.17 αναφέρονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των υπό εξέταση μεθόδων για τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις καρκινικών κυττάρων.

Πίνακας 17 | Σύγκριση μεθόδων εμπλουτισμού

Φορτίο MCF-7 (κύτταρα/mL)	Απόδοση (%) (mean± STDEV)			Λογαριθμικός Συντελεστής εμπλουτισμού (mean± STDEV)			Βιωσιμότητα (%)		
	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹
Διήθηση	47,2 ± 39,0	13,6 ± 11,7	19,9 ± 11,7	3,1 ± 1,3	2,9 ± 2,2	4,3 ± 0,6	20-100		
Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας	39,6 ± 15,0	37,5 ± 4,7	36,5 ± 22,56	2,2 ± 0,5	2,5 ± 0,6	3,1 ± 0,1	60-100		
RosetteSep Tumour Cell Enrichment	47,0	31,6 ± 22,0	62,4 ± 6,4	5,1	4,5 ± 0,4	5,0 ± 0,4	70-100		
RosetteSep CD45 Depletion	30,0	29,1 ± 2,6	22,7 ± 39,2	2,5	4,0 ± 1,4	4,8	70-100		
Dynabeads CELLlection	35,7 ± 3,2	50,7 ± 25,7	66,0 ± 24,0	4,9 ± 0,4	5,1 ± 0,4	6,1 ± 0,3	90-100		
Dynabeads CD45	91,8 ± 7,5	80,0 ± 20,0	90,0 ± 14,1	3,6 ± 0,3	3,2 ± 0,6	3,4 ± 0,7	80-100		

Συνοψίζοντας, μπορούν να αναφερθούν τα ακόλουθα για τις υπό εξέταση μεθόδους:

- Έχει ήδη αναφερθεί, ότι η *διήθηση* παρουσιάζοντας πρόβλημα στην απομάκρυνση των κυττάρων από την μεμβράνη δυσχεραίνει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Παραμένουν συνεπώς αμφιβολίες για την αποδοτικότητά της και η οριστική της αξιολόγηση απαιτεί μεγαλύτερη διερεύνηση. Πρέπει να αναφερθεί, ωστόσο, ότι όλες οι περιγραφείσες στην βιβλιογραφία τεχνικές διήθησης αποσκοπούν στην ανίχνευση των κυττάρων πάνω στον ηθμό με ανοσοφθορισμό και δεν χρησιμοποιούν κάποια τεχνική για την απομάκρυνση των κυττάρων από την μεμβράνη.
- Η *Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας* εμφανίζει συστηματικά χαμηλή απόδοση, της τάξης του ~35%, και επιτυγχάνει εμπλουτισμό των καρκινικών κυττάρων κατά 2-3 τάξεις μεγέθους. Η βιωσιμότητα των ανακτώμενων κυττάρων είναι υψηλή, ανερχόμενη κατά μέσο όρο στο 80%.
- Ο *εμπλουτισμός με χρήση ανασοροζετών*, ενώ αυξάνει αρκετά την καθαρότητα του προϊόντος, εμφανίζει χαμηλές αποδόσεις λόγω του συνδυασμού του με

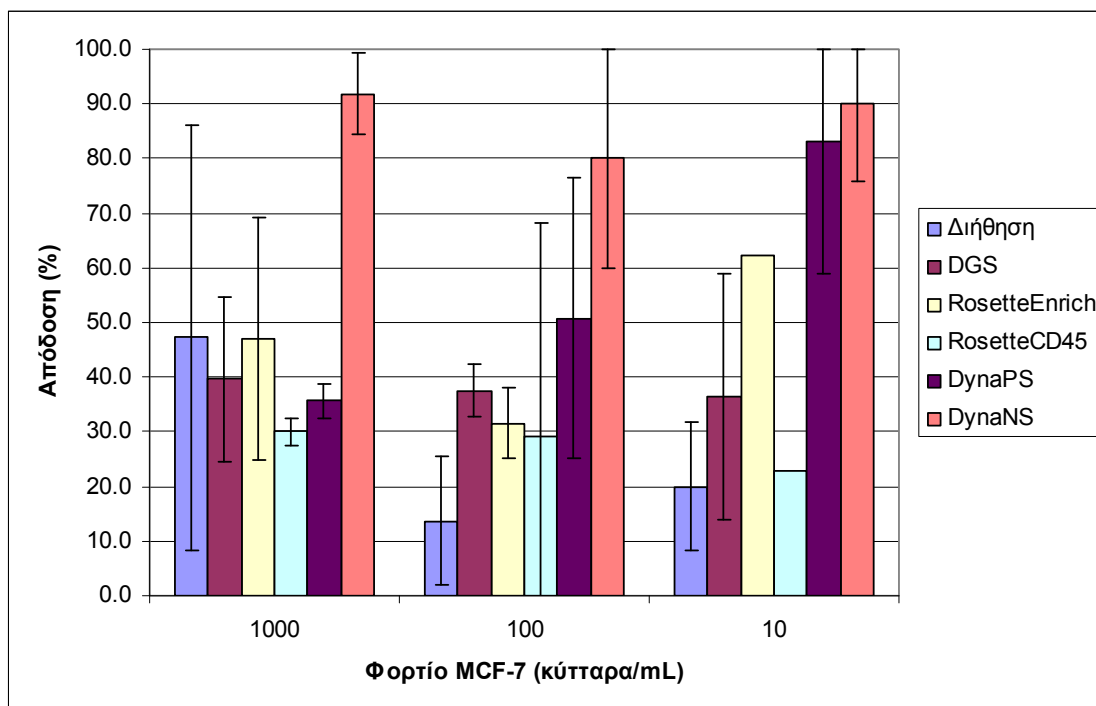
φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας. Η χρήση πολλαπλών αντισωμάτων έναντι των διαφόρων ειδών λευκοκυττάρων αποδίδει ελαφρώς καθαρότερο πληθυσμό καρκινικών κυττάρων (4-5 τάξεις μεγέθους έναντι 3-4 τάξεων μεγέθους του απλού kit απομάκρυνσης λευκοκυττάρων). Η βιωσιμότητα, ανεξάρτητα από τον συνδυασμό αντισωμάτων, είναι επίσης υψηλή, ανερχόμενη κατά μέσο όρο στο 85%.

- Η χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με *anti-hErCAM* επιτυγχάνει σταθερά την υψηλότερη καθαρότητα και σε σχέση με όλες τις προηγούμενες καλύτερη απόδοση για συγκέντρωση MCF-7 10 και 100 κύτταρα/mL. Η αύξηση της ποσότητας σφαιριδίων πιθανώς να αυξήσει την απόδοση στα υψηλότερα φορτία MCF-7. Η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι επίσης υψηλή (~95%).
- Η αρνητική επιλογή με μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με *anti-hCD45* επιτυγχάνει συστηματικά την υψηλότερη απόδοση (80-90%), εις βάρος, όμως, της καθαρότητας του προϊόντος, η οποία βρίσκεται στα επίπεδα της διαχωριστικής φυγοκέντρησης. Αύξηση της καθαρότητας είναι ίσως δυνατόν να επιτευχθεί με αύξηση της ποσότητας των σφαιριδίων. Η βιωσιμότητα είναι επίσης υψηλή (~90%).

Κρίνοντας συνολικά, καμία μέθοδος δεν εμφανίζει υψηλή επαναληψιμότητα. Όσον αφορά στις αποδόσεις, καμία μέθοδος δεν εμφάνισε συστηματικά παρόμοιο ποσοστό ανάκτησης κυττάρων. Από την άλλη, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι τιμές αυτές κινούνται σταθερά στο εύρος των χαμηλών ή των υψηλών αποδόσεων. Επιπλέον, η επαναληψιμότητα επηρεάζεται από το δείγμα, τον χειριστή, το διάστημα, το οποίο μεσολάβησε από την αιμοληψία μέχρι την ανάλυση, το στάδιο καλλιέργειας των κυττάρων και την προηγούμενη επεξεργασία των κυττάρων. Κατεβλήθη προσπάθεια να τηρούνται πάντα οι ίδιες συνθήκες καλλιέργειας και να χρησιμοποιούνται κύτταρα, τα οποία δεν ανακαλλιιεργήθηκαν περισσότερο από 10 φορές. Επιπλέον, το χρονικό διάστημα από την αιμοληψία μέχρι την διαδικασία απομόνωσης δεν υπερέβη σε καμία περίπτωση τις δύο ώρες και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από τον ίδιο χειριστή. Δεν ήταν, ωστόσο, εφικτό τα δείγματα αίματος να λαμβάνονται από το ίδιο άτομο ούτε να αξιολογηθούν όλες οι μέθοδοι εμπλουτισμού από το ίδιο δείγμα. Η επανάληψη των πειραματικών δοκιμών μπορεί να συμβάλλει στην βελτίωση της επαναληψιμότητας και κατ'επέκταση στην μεγαλύτερη αξιοπιστία των συμπερασμάτων.

Παρά τα όποια τεχνικά προβλήματα γενικά συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν. Παρουσιάζονται στο Σχ.7 η μέση τιμή της απόδοσης κάθε μεθόδου για τις συγκεντρώσεις ενδιαφέροντος (10^3 , 10^2 και 10^1 MCF-7/mL αίματος) και στο Σχ.8 η μέση τιμή του λογαριθμικού συντελεστή εμπλουτισμού για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Είναι φανερό, ότι ο αρνητικός μαγνητικός ανοσοδιαχωρισμός επιτυγχάνει την μεγαλύτερη ανάκτηση κυττάρων στόχων, η οποία όμως δεν συνδυάζεται με υψηλή καθαρότητα. Από την άλλη, η θετική επιλογή αυξάνει

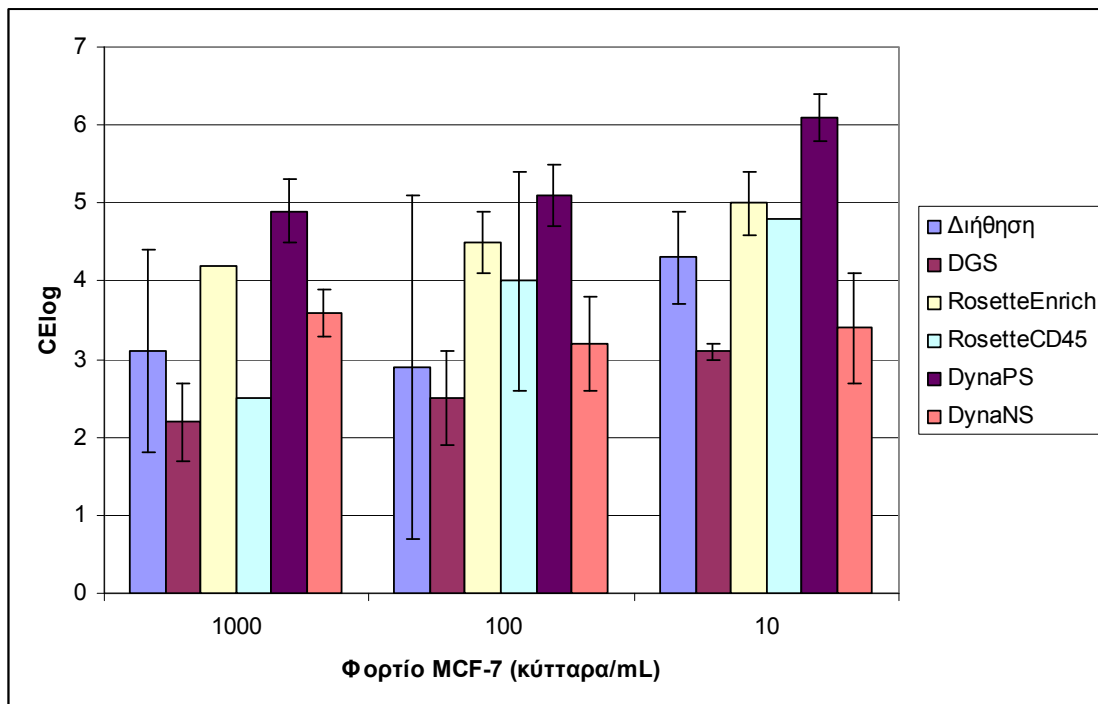
σημαντικά την καθαρότητα του προϊόντος αλλά έχει μέτρια απόδοση. Η δυνατότητα βελτιστοποίησης των πρωτοκόλλων, με παρεμβάσεις στην ποσότητα σφαιριδίων και στην βελτίωση της έκλουσης (για την θετική επιλογή), καθιστά τις δύο μεθόδους προτιμητέες σε σχέση με τις υπόλοιπες. Η επιλογή τής μεθόδου από εκεί και πέρα σχετίζεται με τα κριτήρια, τα οποία τίθενται κάθε φορά, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.



Σχήμα 7 | Σύγκριση απόδοσης των μεθόδων εμπλουτισμού .

Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση ανάκτησης κυττάρων για κάθε μέθοδο.

DGS: Φυγοκέντρωση Διαβάθμισης Πυκνότητας, DynaPS: θετική επιλογή με Dynabeads CELLction, DynaNS: αρνητική επιλογή με Dynabeads CD45



Σχήμα 8 | Σύγκριση συντελεστών εμπλουτισμού των μεθόδων απομόνωσης.

Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση ανάκτησης κυττάρων για κάθε μέθοδο.

*CElog: ο λογαριθμικός συντελεστής εμπλουτισμού, DGS: Φυγοκέντρωση Διαβάθμισης Πυκνότητας, DynaPS: θετική επιλογή με Dynabeads CELlection, DynaNS: αρνητική επιλογή με DYNabeads CD45.

3. Συζήτηση

Παρά τις σημαντικές εξελίξεις στην έγκαιρη διάγνωση και την θεραπεία, μεταστάσεις εμφανίζονται σε μεγάλο αριθμό πασχόντων από καρκίνο τού μαστού και παραμένουν η κύρια αιτιολογία θανάτου. Κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών έχει καταστεί φανερό, ότι η αποτίμηση των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών μπορεί να φανεί χρήσιμη στην αποτελεσματικότερη διαχείριση των ασθενών και τον καθορισμό αποδοτικότερων θεραπειών. Εντούτοις, η ποικιλία των εφαρμοζόμενων μεθόδων εμπλουτισμού και ανίχνευσης, οι διαφορές των εργαστηρίων ως προς την ποσότητα αίματος, τις προσεγγίσεις ποιοτικής αξιολόγησης των μεθόδων και τον αριθμό ασθενών έναντι υγιών ατόμων και η υποκειμενική ερμηνεία των δεδομένων δεν έχουν επιτρέψει την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων για την σημασία της αποτίμησης των CTCs στην πρόγνωση και την παρακολούθηση των ασθενών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύγκριση πέντε μεθόδων εμπλουτισμού, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά στην βιβλιογραφία για την απομόνωση και ακόλουθη ανίχνευση των CTCs, και συγκεκριμένα: (1) η *Διήθηση*, η οποία στηρίζεται στην διαφορά μεγέθους των κυττάρων, (2) η *φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας*, η οποία αξιοποιεί διαφορές στην πυκνότητα των κυττάρων, (3) ο *σχηματισμός ανοσοροζεττών* για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων κυττάρων μέσω της σύνδεσής τους με ερυθροκύτταρα, (4) η θετική επιλογή των EpCAM⁺ κυττάρων με *μαγνητικά σφαιρίδια φέροντα anti-hEpCAM* και (5) η αρνητική επιλογή των CD45-κυττάρων με *μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με anti-hCD45*. Η αξιολόγησή τους έγινε με βάση (α) την ανάκτηση των κυττάρων-στόχων (απόδοση-ευαισθησία), (β) την καθαρότητα των παρασκευασμάτων και τον συντελεστή εμπλουτισμού (ειδικότητα) και τέλος (γ) την βιωσιμότητα των ανακτηθέντων κυττάρων-στόχων.

Με εξαίρεση την διήθηση, τα αποτελέσματα για τις υπόλοιπες μεθόδους συμφωνούν με αντίστοιχα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας (Πιν. 18), παρ'ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η αξιολόγηση της απόδοσης και της καθαρότητας έχει πραγματοποιηθεί με ανοσοκυτταροχημεία, ενώ η βιωσιμότητα δεν εκτιμήθηκε. Ειδικότερα, η φυγοκέντρηση διαβάθμισης συγκέντρωσης έχει παρουσιάσει αποδόσεις μεταξύ 17 και 46% ([118], [119]), αποτελέσματα συγκρίσιμα με το εύρος 20,5-54,5% που προέκυψε στην παρούσα εργασία. Επιπλέον, η απόδοση του RosetteSep Epithelial Enrich έχει αναφερθεί μεταξύ 30 και 77% ([118], [119]), τα οποία επίσης είναι συγκρίσιμα, αν και με μικρότερη διακύμανση, σε σχέση με το 11-67%. Ο θετικός μαγνητικός ανοσοδιαχωρισμός έχει αναφερθεί ότι αποδίδει κατά μέσο όρο το 74% των CTCs [120] και 55-79% (απομόνωση με MACS, [119]). Τα αποτελέσματά μας, ωστόσο, παρουσίασαν μέση τιμή 66% και μεγάλο εύρος (32-100%), το οποίο αποδόθηκε κυρίως στην ελλιπή έκλυση των κυττάρων από τα σφαιρίδια. Τέλος, ο αρνητικός μαγνητικός ανοσοδιαχωρισμός έχει

αναφερθεί ότι αποδίδει κατά μέσο όρο 65% [120], ενώ τα αποτελέσματά μας είναι ελαφρώς καλύτερα με μέση τιμή 80% και εύρος 60-100%.

Πίνακας 18 | Σύγκριση αποτελεσμάτων με την βιβλιογραφία

Μέθοδος εμπλουτισμού	Απόδοση (%)	Αναφερόμενη απόδοση* (%)
Διήθηση	5,3-74,6	~100
Φυγοκέντρωση Διαβάθμισης Πυκνότητας	20,5-54,5	17,0-43,0 [118] 5,0-46,0 [119]
RosetteSep Epithelial Enrich	11,0-67,0	30,0-62,0 [118] 40,0-77,0 [119]
CELLlection	32,0-100,0	74,0 [120] 55,0-79,0 [119]
Dynabeads CD45	60,0-100,0	65,0 [120]

*Η απόδοση σε όλες τις αναφερόμενες δημοσιεύσεις έχει εκτιμηθεί με ανοσοκυτταροχημεία

Τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν κατά την αξιολόγηση της διήθησης μπορούν πιθανώς να βελτιωθούν σημαντικά με την ανίχνευση με μικροσκοπία φθορισμού απευθείας πάνω στην μεμβράνη διήθησης. Αυτή η προσέγγιση θα είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την εκτίμηση της απόδοσης και της καθαρότητας, ενώ η βιωσιμότητα αποτιμάται δυσκολότερα με μικροσκοπικές μεθόδους. Επιπλέον, η αύξηση της ποσότητας των σφαιριδίων, τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό μαγνητικό ανοσοδιαχωρισμό, μπορεί να επιφέρει βελτιωμένα αποτελέσματα όσον αφορά την ανάκτηση και την καθαρότητα αντιστοίχως. Ειδικότερα, στον εμπλουτισμό με μαγνητικά σφαιρίδια φέροντα anti-hEpCAM, η αύξηση της ποσότητας των σφαιριδίων αναμένεται να αυξήσει την απόδοση της μεθόδου. Αντιστοίχα, για την αρνητική επιλογή, η αύξηση της ποσότητας των σφαιριδίων αναμένεται να καταλήξει σε υψηλότερης καθαρότητας παρασκευάσματα, καθώς θα απομακρύνει μεγαλύτερη ποσότητα λευκοκυττάρων. Επιπροσθέτως, ο συνδυασμός των δύο μεθόδων μαγνητικού ανοσοδιαχωρισμού καθώς και η χρήση περισσότερων αντισωμάτων έναντι επιφανειακών δεικτών στην θετική επιλογή, πιθανώς μπορεί να δώσει βελτιωμένα αποτελέσματα.

Τα CTCs συνιστούν ετερογενή πληθυσμό με χαρακτηριστικά συχνά διαφορετικά από εκείνα του πρωτογενή όγκου. Έχουν αναφερθεί αποπτωτικοί υποπληθυσμοί αλλά και κύτταρα με χαρακτηριστικά EMT ή βλαστικών κυττάρων. Η ετερογένεια των μικρομεταστατικών κυττάρων καθιστά απαραίτητη την επιλογή μεθόδων απομόνωσης και χαρακτηρισμού, οι οποίες θα λαμβάνουν υπόψη αυτά τα χαρακτηριστικά. Η ιδανική μέθοδος εμπλουτισμού των CTCs είναι επιθυμητό να συνδυάζει την όσο δυνατόν μεγαλύτερη ανάκτηση κυττάρων με την αυξημένη καθαρότητα απαιτείται, δηλαδή, ο συνδυασμός της υψηλής ευαισθησίας με την υψηλή ειδικότητα. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα αλλά και τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, μέχρι στιγμής δεν έχει παρουσιαστεί μέθοδος, η οποία συνδυάζει αυτά τα δύο χαρακτηριστικά. Η διήθηση έχει πολλές προοπτικές εξέλιξης: έχουν ήδη αναπτυχθεί παραλλαγές (διήθηση υπό κενό, υπό πίεση), οι οποίες αυξάνουν αρκετά την ειδικότητα, με αποτέλεσμα να παράγεται πληθυσμός υψηλότερης καθαρότητας σε σύγκριση με την κλασική διήθηση. Οι

μέθοδοι διαχωριστικής φυγοκέντρησης (φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας, σχηματισμός ανοσοροζεττών) φαίνεται ότι είναι ακατάλληλες για τον εμπλουτισμό των CTCs, εφόσον καταλήγουν σε απώλεια πλέον του 50% των κυττάρων-στόχων. Επιπλέον, στην αναζήτηση της καταλληλότερης τεχνικής πρέπει να ληφθεί υπόψιν, ότι δεν έχει προσδιοριστεί δείκτης απόλυτα εξειδικευμένος για τα CTCs και ότι τα μικρομεταστατικά κύτταρα παρουσιάζουν φαινοτυπική ποικιλομορφία λόγω των διαφορετικών τύπων καρκίνου αλλά και της EMT. Αυτές οι παρατηρήσεις ευνοούν την προτίμηση των μεθόδων αρνητικής επιλογής, οι οποίες εξασφαλίζουν, ότι δεν αποκλείονται κυτταρικοί τύποι με μειωμένη έκφραση δεδομένων δεικτών. Αντίθετα, η συχνά εφαρμοζόμενη θετική επιλογή με χρήση αντισώματος έναντι του επιφανειακού αντιγόνου EpCAM (CellSearch, CTCchip, μαγνητικά σφαιρίδια) απομονώνει αποτελεσματικά τα EpCAM⁺ CTCs αλλά εύκολα απορρίπτει CTCs με σημαντικά μειωμένη ή και μηδενική έκφραση του αντιγόνου. Ο ισχυρισμός αυτός θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο πρόσθετων πειραμάτων με κυτταρικές σειρές καρκίνου τού μαστού, οι οποίες είναι μεσεγχυματικής φύσης, όπως η HS578T. Επιπλέον, είναι πιθανή η επιλογή επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία δεν είναι καρκινικής προέλευσης αλλά κυκλοφορούν στο αίμα. Η θετική επιλογή, ωστόσο, παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα, με αποτέλεσμα να αυξάνει σημαντικά την καθαρότητα του κυτταρικού πληθυσμού-στόχου.

Από τις περιγραφείσες στην βιβλιογραφία μεθόδους εμπλουτισμού ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τεχνικές, οι οποίες απομονώνουν τα κύτταρα-στόχους με βάση λειτουργικά χαρακτηριστικά των CTCs (δοκιμασία CAM, EPISPOT). Ιδιαίτερα η δοκιμασία CAM εμπλουτίζει εκείνο το κλάσμα των CTCs, το οποίο αναμένεται να έχει επιθετικό φαινότυπο.

Όσον αφορά στην ανίχνευση, η πολυπλεκτική RT-PCR μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία εντοπισμού των CTCs. Επιπλέον, η καθιέρωση της ποσοτικής προσέγγισης της PCR επιτρέπει την σχετική ποσοτικοποίηση και τον ορισμό τιμών κατωφλίων. Ωστόσο, ο πλήρης χαρακτηρισμός των CTCs απαιτεί και τον μορφολογικό χαρακτηρισμό. Προς αυτή την κατεύθυνση αναπτύσσονται συνεχώς πιο δυναμικά απεικονιστικά συστήματα, ενώ γίνονται προσπάθειες από ερευνητικές ομάδες για την ανάπτυξη συστημάτων μικροσκοπίας με ικανότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης περισσότερων των τεσσάρων χρωμάτων.

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των διαφόρων υποπληθυσμών των CTCs θα μας εφοδιάσει με τα απαραίτητα δεδομένα για την ανάπτυξη τεχνικών απομόνωσης και ανίχνευσης εξειδικευμένων για αυτά τα κύτταρα. Μέχρι τότε η απομόνωση και η αναγνώριση των CTCs πρέπει να στηρίζεται σε όσο το δυνατόν λιγότερο μεροληπτικές μεθόδους. Όλες οι μέθοδοι που στηρίζονται στο αντιγόνο EpCAM μεροληπτούν υπέρ του πληθυσμού εκείνου που εκφράζει το αντιγόνο, ενώ αγνοούν τα κύτταρα τα οποία δεν το εκφράζουν. Η συνολική αποδοτικότητα των μεθόδων θετικής επιλογής θα μπορούσε να αυξηθεί σημαντικά με την χρήση περισσότερων του ενός δεικτών επιλογής. Αυτή η προσέγγιση έχει βελτιώσει

σημαντικά την ευαισθησία και την ειδικότητα της ανίχνευσης CTCs με RT-PCR. Από την άλλη, η ανάπτυξη μεθόδων αρνητικής επιλογής φαίνεται ότι είναι καταλληλότερη μέχρι την ολοκλήρωση του χαρακτηρισμού των CTCs και τον καθορισμό εξειδικευμένων δεικτών. Στα πλαίσια αυτά η διήθηση υπό κενό ή υπό πίεση και ο αρνητικός μαγνητικός ανοσοδιαχωρισμός παρουσιάζουν δυνατότητες και απομένει η κλινική αξιολόγησή τους.

4. Βιβλιογραφία

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. Ackland, M.L., et al., *Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells*. Lab Invest, 2003. **83**(3): p. 435-48.
3. Adams, G.B., et al., *Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor*. Nature, 2006. **439**(7076): p. 599-603.
4. Brabletz, T., et al., *Migrating cancer stem cells [mdash] an integrated concept of malignant tumour progression*. Nature Rev. Cancer, 2005. **5**: p. 744-749.
5. Visvader, J.E. and G.J. Lindeman, *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions*. Nature Rev. Cancer, 2008. **8**: p. 755-768.
6. Luzzi, K.J., et al., *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 865-73.
7. Kang, Y., *A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone*. Cancer Cell, 2003. **3**: p. 537-549.
8. Quintana, E., *Efficient tumour formation by single human melanoma cells*. Nature, 2008. **456**: p. 593-598.
9. Pouyssegur, J., F. Dayan, and N.M. Mazure, *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 437-43.
10. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
11. Zavadil, J., et al., *Epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9574-7.
12. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol, 2006. **172**(7): p. 973-81.
13. Klymkowsky, M.W. and P. Savagner, *Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe*. Am J Pathol, 2009. **174**(5): p. 1588-93.
14. Friel, A.M., et al., *Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(3): p. 613-25.
15. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
16. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
17. Krebs, M.G., et al., *Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes*. Ther Adv Med Oncol, 2010. **2**(6): p. 351-65.
18. Berezovskaya, O., et al., *Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2378-86.
19. Al-Mehdi, A.B., et al., *Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis*. Nat Med, 2000. **6**(1): p. 100-2.
20. Christiansen, J.J. and A.K. Rajasekaran, *Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8319-26.

21. Saad, A. and J. Abraham, *Role of tumor markers and circulating tumors cells in the management of breast cancer*. *Oncology (Williston Park)*, 2008. **22**(7): p. 726-31; discussion 734, 739, 743-4.
22. Duffy, M.J., *Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value?* *Clin Chem*, 2006. **52**(3): p. 345-51.
23. Klee, G.G. and W.E. Schreiber, *MUC1 gene-derived glycoprotein assays for monitoring breast cancer (CA 15-3, CA 27.29, BR): are they measuring the same antigen?* *Arch Pathol Lab Med*, 2004. **128**(10): p. 1131-5.
24. Price, M.R., et al., *Immunological and structural features of the protein core of human polymorphic epithelial mucin*. *Mol Immunol*, 1990. **27**(8): p. 795-802.
25. Briggs, S., M.R. Price, and S.J. Tendler, *Immune recognition of linear epitopes in peptide fragments of epithelial mucins*. *Immunology*, 1991. **73**(4): p. 505-7.
26. Veronesi, A., et al., *Carcinoembryonic antigen (CEA) in the follow-up of disease-free breast cancer patients*. *Tumori*, 1982. **68**(6): p. 477-80.
27. *Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology*. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(10): p. 2843-77.
28. Andreopoulou, E. and M. Cristofanilli, *Circulating tumor cells as prognostic marker in metastatic breast cancer*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010. **10**(2): p. 171-7.
29. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(7): p. 1420-30.
30. Hartkopf, A.D., et al., *Changing levels of circulating tumor cells in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer*. *Anticancer Res*, 2011. **31**(3): p. 979-84.
31. Rack, B., Schindlbeck, C., Schneeweiss, A., Hilfrich, J., Lorenz, R., Beckmann, M.W., Pante, K. I, Lichtenegger, W., Sommer, H.L., Janni, W.J., *Prognostic relevance of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy: The German SUCCESS-Trial*. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2008. **26**(abstract 503).
32. Ignatiadis, M., et al., *Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(33): p. 5194-202.
33. Nakagawa, T., et al., *Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(14): p. 4105-10.
34. Xenidis, N., et al., *Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(23): p. 3756-62.
35. Stathopoulou, A., et al., *Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(16): p. 3404-12.
36. Xenidis, N., et al., *Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(13): p. 2177-84.
37. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(8): p. 781-91.
38. Budd, G.T., et al., *Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(21): p. 6403-9.
39. De Giorgi, U., et al., *Circulating tumor cells and bone metastases as detected by FDG-PET/CT in patients with metastatic breast cancer*. *Ann Oncol*, 2010. **21**(1): p. 33-9.

40. Liu, M.C., et al., *Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(31): p. 5153-9.
41. <http://www.swog.org/>.
42. Tewes, M., et al., *Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **115**(3): p. 581-90.
43. Fehm, T., et al., *Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(5): p. R74.
44. Nole, F., et al., *Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications*. Ann Oncol, 2008. **19**(5): p. 891-7.
45. Meng, S., et al., *HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9393-8.
46. Pierga, J.Y., et al., *Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 7004-10.
47. LaBarge, M.A., *The difficulty of targeting cancer stem cell niches*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(12): p. 3121-9.
48. Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague, *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 274-84.
49. Patanaphan, V., O.M. Salazar, and R. Risco, *Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis*. Southern medical journal, 1988. **81**(9): p. 1109-12.
50. Xi, L., et al., *Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers*. Clin Chem, 2007. **53**(7): p. 1206-15.
51. de Graaf, H., et al., *Ectopic expression of target genes may represent an inherent limitation of RT-PCR assays used for micrometastasis detection: studies on the epithelial glycoprotein gene EGP-2*. Int J Cancer, 1997. **72**(1): p. 191-6.
52. Bostick, P.J., et al., *Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients*. J Clin Oncol, 1998. **16**(8): p. 2632-40.
53. Zhong, X.Y., et al., *Evaluating GA733-2 mRNA as a marker for the detection of micrometastatic breast cancer in peripheral blood and bone marrow*. Arch Gynecol Obstet, 1999. **263**(1-2): p. 2-6.
54. Zieglschmid, V., C. Hollmann, and O. Bocher, *Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2005. **42**(2): p. 155-96.
55. Ring, A., I.E. Smith, and M. Dowsett, *Circulating tumour cells in breast cancer*. Lancet Oncol, 2004. **5**(2): p. 79-88.
56. Masuda, T.A., et al., *Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients*. Int J Oncol, 2005. **26**(3): p. 721-30.
57. Ouellette, R.J., D. Richard, and E. Maicas, *RT-PCR for mammaglobin genes, MGB1 and MGB2, identifies breast cancer micrometastases in sentinel lymph nodes*. Am J Clin Pathol, 2004. **121**(5): p. 637-43.
58. Mikhitarian, K., et al., *Molecular analysis improves sensitivity of breast sentinel lymph node biopsy: results of a multi-institutional prospective cohort study*. Surgery, 2005. **138**(3): p. 474-81.

59. Smirnov, D.A., et al., *Global gene expression profiling of circulating tumor cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(12): p. 4993-7.
60. Manhani, A.R., et al., *CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of breast cancer patients correlates with response to chemotherapy*. *Breast Cancer Res Treat*, 2001. **66**(3): p. 249-54.
61. Gilbey, A.M., et al., *The detection of circulating breast cancer cells in blood*. *J Clin Pathol*, 2004. **57**(9): p. 903-11.
62. Gillanders, W.E., et al., *Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis: an interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study*. *Ann Surg*, 2004. **239**(6): p. 828-37; discussion 837-40.
63. Weigelt, B., et al., *Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers*. *Br J Cancer*, 2004. **90**(8): p. 1531-7.
64. Backus, J., et al., *Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis*. *J Mol Diagn*, 2005. **7**(3): p. 327-36.
65. Brown, N.M., et al., *Evaluation of expression based markers for the detection of breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. **97**(1): p. 41-7.
66. Nissan, A., et al., *Multimarker RT-PCR assay for the detection of minimal residual disease in sentinel lymph nodes of breast cancer patients*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(5): p. 681-5.
67. Zach, O. and D. Lutz, *Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow*. *Curr Opin Oncol*, 2006. **18**(1): p. 48-56.
68. Ignatiadis, M., et al., *Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(9): p. 2593-600.
69. Ignatiadis, M., et al., *HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e15624.
70. Wulfing, P., et al., *HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(6): p. 1715-20.
71. Aktas, B., et al., *Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients*. *Breast Cancer Res*, 2009. **11**(4): p. R46.
72. Kallergi, G., et al., *Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(3): p. R59.
73. Raimondi, C., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **130**(2): p. 449-55.
74. Armstrong, A.J., et al., *Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers*. *Mol Cancer Res*, 2011. **9**(8): p. 997-1007.
75. Alix-Panabieres, C., et al., *Characterization and enumeration of cells secreting tumor markers in the peripheral blood of breast cancer patients*. *J Immunol Methods*, 2005. **299**(1-2): p. 177-88.
76. Vona, G., 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): p. 57-63.

77. Zabaglo, L., et al., *Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells*. Cytometry A, 2003. **55**(2): p. 102-8.
78. Davidson, W.F. and C.R. Parish, *A procedure for removing red cells and dead cells from lymphoid cell suspensions*. J Immunol Methods, 1975. **7**(2-3): p. 291-300.
79. Gascoyne, P.R., et al., *Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis*. Electrophoresis, 2009. **30**(8): p. 1388-98.
80. Raz, R.S., *Method for the separation and sorting of different biological objects utilizing differences in their viscoelastic properties*. 2010, Canopus Biosciences Limited (CA).
81. www.invitrogen.com.
82. www.miltenyibiotec.com/.
83. www.stemcell.com.
84. Parish, C.R. and I.F. McKenzie, *A sensitive rosetting method for detecting subpopulations of lymphocytes which react with alloantisera*. J Immunol Methods, 1978. **20**: p. 173-83.
85. Nagrath, S., et al., *Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology*. Nature, 2007. **450**(7173): p. 1235-9.
86. Stott, S.L., et al., *Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(43): p. 18392-7.
87. Lu, J., et al., *Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients*. Int J Cancer, 2010. **126**(3): p. 669-83.
88. Epstein, J.R. and D.R. Walt, *Fluorescence-based fibre optic arrays: a universal platform for sensing*. Chem Soc Rev, 2003. **32**(4): p. 203-14.
89. Krivacic, R.T., et al., *A rare-cell detector for cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10501-4.
90. Alunni-Fabbroni, M. and M.T. Sandri, *Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization*. Methods, 2010. **50**(4): p. 289-97.
91. Pachmann, K., et al., *Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer*. Clin Chem Lab Med, 2005. **43**(6): p. 617-27.
92. Pachmann, K., et al., *An increase in cell number at completion of therapy may develop as an indicator of early relapse: quantification of circulating epithelial tumor cells (CETC) for monitoring of adjuvant therapy in breast cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008. **134**(1): p. 59-65.
93. Kraeft, S.K., et al., *Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(2): p. 434-42.
94. Mansi, J.L., et al., *Automated screening for micrometastases in bone marrow smears*. J Immunol Methods, 1988. **112**(1): p. 105-111.
95. Mesker, W.E., et al., *Detection of immunocytochemically stained rare events using image analysis*. Cytometry, 1994. **17**(3): p. 209-15.
96. Macey, M.G., *Flow Cytometry: Principles and Applications*. Humana Press, 2007.
97. Van der Auwera, I., 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): p. 276-84.
98. Alix-Panabieres, C., et al., *Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients*. Clin Chem, 2007. **53**(3): p. 537-9.
99. Czerkinsky, C., et al., *A novel two colour ELISPOT assay. I. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells*. J Immunol Methods, 1988. **115**(1): p. 31-7.
100. Cristofanilli, M., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. Semin Oncol, 2006. **33**(3 Suppl 9): p. S9-14.

101. Riethdorf, S., 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): p. 920-8.
102. Danila, D.C., et al., *Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(23): p. 7053-8.
103. Cohen, S.J., et al., *Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(19): p. 3213-21.
104. <http://www.adnagen.com>.
105. Lankiewicz, S., B.G. Rivero, and O. Bocher, *Quantitative real-time RT-PCR of disseminated tumor cells in combination with immunomagnetic cell enrichment*. Mol Biotechnol, 2006. **34**(1): p. 15-27.
106. Gerges, N., J. Rak, and N. Jabado, *New technologies for the detection of circulating tumour cells*. Br Med Bull, 2010. **94**: p. 49-64.
107. Hawkins, L.K., N.R. Lemoine, and D. Kirn, *Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform*. Lancet Oncol, 2002. **3**(1): p. 17-26.
108. Adusumilli, P.S., et al., *Virally-directed fluorescent imaging (VFI) can facilitate endoscopic staging*. Surg Endosc, 2006. **20**(4): p. 628-35.
109. Adusumilli, P.S., et al., *Virally directed fluorescent imaging improves diagnostic sensitivity in the detection of minimal residual disease after potentially curative cytoreductive surgery*. J Gastrointest Surg, 2005. **9**(8): p. 1138-46; discussion 1146-7.
110. Stiles, B.M., et al., *Minimally invasive localization of oncolytic herpes simplex viral therapy of metastatic pleural cancer*. Cancer Gene Ther, 2006. **13**(1): p. 53-64.
111. Fong, S.M., et al., *Fluorescence-expressing viruses allow rapid identification and separation of rare tumor cells in spiked samples of human whole blood*. Surgery, 2009. **146**(3): p. 498-505.
112. www.oncolys.com.
113. Kojima, T., et al., *A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(10): p. 3172-81.
114. Zharov, V.P., et al., *In vivo photoacoustic flow cytometry for monitoring of circulating single cancer cells and contrast agents*. Opt Lett, 2006. **31**(24): p. 3623-5.
115. He, W., et al., *In vivo quantitation of rare circulating tumor cells by multiphoton intravital flow cytometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(28): p. 11760-5.
116. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
117. <http://www.sigmaaldrich.com>.
118. Naume, B., et al., *Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method*. Cytotherapy, 2004. **6**(3): p. 244-52.
119. Konigsberg, R., et al., *Circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer: efficacy and feasibility of different enrichment methods*. Cancer Lett, 2010. **293**(1): p. 117-23.
120. Naume, B., et al., *Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood*. J Hematother, 1997. **6**(2): p. 103-14.