



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΥΓΕΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



Διδακτορική Διατριβή

**Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός ξενομοσχευμάτων καρκίνου
παγκρέατος από ασθενείς (patient-derived xenografts, PDX)
σαν παρακλινικά μοντέλα για τον καρκίνο του παγκρέατος**

υπό

Δημητρίου Μαγουλιώτη
Ιατρού

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Νικόλαος Σακελλαρίδης, Καθηγητής Φαρμακολογίας (Επιβλέπων)
- Δημήτριος Ζαχαρούλης, Καθηγητής Χειρουργικής
- Κωνσταντίνος Δήμας, Αν. Καθηγητής Φαρμακολογίας

Διδακτορική Διατριβή υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση του Διδακτορικού
Διπλώματος

Λάρισα, Μάρτιος 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



PhD Thesis

**Development and characterization of patient-derived
xenografts (PDX) as preclinical models for pancreatic cancer**

By
Dimitrios Magouliotis
M.D., M.Sc.

Advisory committee:

- Nikolaos Sakellaridis, Professor of Phamacology (Supervisor)
- Dimitrios Zacharoulis, Professor of Surgery
- Konstantinos Dimas, Associate Professor of Pharmacology

PhD Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of
Thessaly in fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree

Larissa, March, 2023

© 2023 ΜΑΓΟΥΛΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (7η/22-02-2023 ΓΣΕΣ):

1^{ος} Εξεταστής Νικόλαος Σακελλαρίδης

(Επιβλέπων)

Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής Δημήτριος Ζαχαρούλης

Καθηγητής Χειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής Κωνσταντίνος Δήμας

Αν. Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής Γεώργιος Βασιλόπουλος

Καθηγητής Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής Μαρία Ιωάννου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής Γεώργιος Λεονταρίτης

Επ. Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής Γεώργιος Νταλέκος

Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ – ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2022

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΑΓΟΥΛΙΩΤΗΣ

Ημερομηνία γέννησης:

Τόπος γέννησης:

Υπηκοότητα:

Διεύθυνση οικίας:

Τηλέφωνο οικίας:

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο:

Αφαίρεση προσωπικών δεδομένων
(Υπηρεσία Βιβλιοθήκης &
Πληροφόρησης Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας)

2. ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ

Ειδικευόμενος Καρδιο-Θωρακοχειρουργός, Καρδιο-Θωρακοχειρουργική Κλινική,
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (11/2020-Παρόν).

3. ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΘΕΣΕΙΣ

3.1. **EACTS/FFF Fellowship** in Clinical Outcomes in Cardio-thoracic
Surgery, MSTCVS-QC, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA
(18/5/2022-31/8/2022)

Supervisor: Prof. **Richard L. Prager**

3.2. Ειδικευόμενος Ιατρός, Χειρουργική Κλινική, ΠΓΝΛ (10/02/2017-
16/11/2020)

3.3. **Fellowship in Hepato-pancreato-biliary Surgery:** Centre Hépto-
Biliaire Paul Brousse, Paris, France, 29/04/2019-28/06/2019.

Supervisor: Prof. **René Adam**

3.4. **Internship in General Surgery:** Unit of Laparoscopic Surgery,
Department of Surgery, Bnai Zion Medical Center, Haifa, Israel. 01-
29/08/2016.

Supervisors: Prof. **Ibrahim Matter** and Dr. **Gideon Sroka**

4. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

4.1. ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Ιατρική Σχολή: Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα, 10/2010-7/2016.

Βαθμός: Λίαν Καλώς

4.2. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- **ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»** - Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 10/2016-11/2017.
Βαθμός: Άριστα
- **M.Sc. in «Perioperative Medicine»:** University College London, Division of Surgery & Interventional Science, London, UK 24/09/2018 – 01/12/2020.
- **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ** – Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Έναρξη 31/5/2017.

5. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

5.1. ΑΡΘΡΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (72)

1. **Magouliotis DE**, et al. Meta-analysis of survival after extrapleural pneumonectomy (EPP) versus pleurectomy/decortication (P/D) for malignant pleural mesothelioma in the context of macroscopic complete resection (MCR). Updates Surg. 2022 Sep 3. doi: 10.1007/s13304-022-01369-4.
2. **Magouliotis DE**, et al. Meta-analysis of robot-assisted versus video-assisted McKeown esophagectomy for esophageal cancer. Updates Surg. 2022 Oct;74(5):1501-1510. doi: 10.1007/s13304-022-01343-0.
3. Balakrishnan A, et al.; EAHPBA Scientific and Research Committee and the OMEGA study collaborators. Heterogeneity of management practices surrounding operable gallbladder cancer - results of the OMEGA-S international HPB surgical survey. HPB (Oxford). 2022 Jul 9:S1365-182X(22)01514-3. doi: 10.1016/j.hpb.2022.06.014.

4. Naruka V, Arjomandi Rad A, Subbiah Ponniah H, Francis J, Vardanyan R, Tasoudis P, **Magouliotis DE**, et al. Machine learning and artificial intelligence in cardiac transplantation: A systematic review. *Artif Organs*. 2022 Sep;46(9):1741-1753. doi: 10.1111/aor.14334.
5. **Magouliotis DE**, Zacharoulis D. Radiomics Represent a New Opportunity for Bariatric Surgery When Implemented in a Quality Improvement Context. *Obes Surg*. 2022 Sep;32(9):3179-3180. doi: 10.1007/s11695-022-06160-3.
6. Bos S, Ricciardi S, Caruana EJ, Acet Öztürk NA, **Magouliotis D**, et al. ERS International Congress 2021: highlights from the Thoracic Surgery and Lung Transplantation Assembly. *ERJ Open Res*. 2022 May 23;8(2):00649-2021.
7. **Magouliotis DE**, Zotos PA, Zacharoulis D. Implementation of Routine Computed Tomography (CT) Following Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: New Evidence Brings New Challenges. *Obes Surg*. 2022 Jul;32(7):2477-2478.
8. **Magouliotis DE**, Lafazanis K, Koutsougianni F, Sakellaridis N, Ioannou M, Zacharoulis D, Dimas K. Establishment of Patient-derived Orthotopic Xenografts (PDX) as Models for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *In Vivo*. 2022 May-Jun;36(3):1114-1119.
9. Tasoudis PT, **Magouliotis DE**, et al. Proximal versus extensive repair in acute type A aortic dissection: an updated systematic review and meta-analysis. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2022 Feb 26. doi: 10.1007/s11748-022-01792-9.
10. Christodoulidis G, **Magouliotis D**, et al. The surgical challenge of oligometastatic pancreatic cancer: A systemic review of the literature. *J BUON*. 2021 Sep-Oct;26(5):1742-1746.
11. Fergadi MP, **Magouliotis DE**, et al. A meta-analysis evaluating the role of high-intensity focused ultrasound (HIFU) as a fourth treatment modality for patients with locally advanced pancreatic cancer. *Abdom Radiol (NY)*. 2022 Jan;47(1):254-264.
12. Diamantis A, Samara AA, Tzovaras G, **Magouliotis D**, et al. Use of preoperative EORTC quality-of-life questionnaires to predict postoperative complications after colorectal cancer surgery. *Br J Surg*. 2021 Dec 1;108(12):e402-e403. doi: 10.1093/bjs/znab343. PMID: 34601565.
13. **Magouliotis D**, et al. Differences in surgical oncology practice in Greece and Cyprus between the first and second COVID-19 pandemic waves: Lessons from a paradigm shift. *J BUON*. 2021 Jul-Aug;26(4):1679-1682.

14. Diamantis A, Tzovaras G, Samara A, **Magouliotis D**, et al. Quality of life deterioration and colorectal cancer staging in elderly patients. Which comes first? *J BUON*. 2021 Jul-Aug;26(4):1266-1270.
15. COVIDSurg Collaborative; GlobalSurg Collaborative. SARS-CoV-2 infection and venous thromboembolism after surgery: an international prospective cohort study. *Anaesthesia*. 2022 Jan;77(1):28-39. doi: 10.1111/anae.15563. Epub 2021 Aug 24.
16. COVIDSurg Collaborative; GlobalSurg Collaborative. Effects of pre-operative isolation on postoperative pulmonary complications after elective surgery: an international prospective cohort study. *Anaesthesia*. 2021 Aug 9. doi: 10.1111/anae.15560. Epub ahead of print.
17. Whittaker G, Salmasi MY, Aydin A, **Magouliotis D**, et al. Recommendations for the use of coronary and valve simulators in cardiac surgical training: a systematic review. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2021 Jul 31;ezab350. doi: 10.1093/ejcts/ezab350. Epub ahead of print.
18. **Magouliotis DE**, et al. In-depth bioinformatic study of the cadherin 5 interactome in patients with thoracic aortic aneurysm unveils 8 novel biomarkers. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2021 Jul 19;ezab338. doi: 10.1093/ejcts/ezab338. Epub ahead of print.
19. Spiliopoulos K, Anyfantakis ZA, Diminikos I, Xanthopoulos A, **Magouliotis DE**, Skoularigis J, Triposkiadis F. Acute myocardial infarction not attributed to coronary artery disease: A seldom initial presentation of a left ventricular myxoma. *Clin Case Rep*. 2021 May 4;9(5):e04029. doi: 10.1002/ccr3.4029.
20. Fergadi MP, **Magouliotis DE**, et al. A meta-analysis evaluating contrast-enhanced intraoperative ultrasound (CE-IOUS) in the context of surgery for colorectal liver metastases. *Abdom Radiol (NY)*. 2021 Sep;46(9):4178-4188. doi: 10.1007/s00261-021-03096-7. Epub 2021 May 9.
21. Arjomandi Rad A, Naruka V, Vardanyan R, Viviano A, Salmasi MY, **Magouliotis D**, Kendall S, Casula R, Athanasiou T. Mitral and tricuspid annuloplasty ring dehiscence: a systematic review with pooled analysis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2021 Apr 21;ezab178. doi: 10.1093/ejcts/ezab178. Epub ahead of print.
22. COVIDSurg Collaborative, GlobalSurg Collaborative. SARS-CoV-2 vaccination modelling for safe surgery to save lives: data from an international

- prospective cohort study. *Br J Surg*. 2021 Sep 27;108(9):1056-1063. doi: 10.1093/bjs/znab101.
23. **Magouliotis DE**, Fergadi MP, Zacharoulis D. Comment on: Randomized clinical trial on closure versus non-closure of mesenteric defects during laparoscopic gastric bypass surgery. *Br J Surg*. 2021 Jul 23;108(7):e254. doi: 10.1093/bjs/znab100.
 24. **Magouliotis DE**, et al. Laparoscopic Versus Open Right Colectomy for Cancer in the Era of Complete Mesocolic Excision with Central Vascular Ligation: Pathology and Short-Term Outcomes. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2021 Mar 12. doi: 10.1089/lap.2020.0508. Epub ahead of print.
 25. COVIDSurg Collaborative; GlobalSurg Collaborative. Timing of surgery following SARS-CoV-2 infection: an international prospective cohort study. *Anaesthesia*. 2021 Jun;76(6):748-758. doi: 10.1111/anae.15458. Epub 2021 Mar 9.
 26. **Magouliotis DE**, et al. Validation of the Surgical Outcome Risk Tool (SORT) for Predicting Postoperative Mortality in Colorectal Cancer Patients Undergoing Surgery and Subgroup Analysis. *World J Surg*. 2021 Feb 18.
 27. **Magouliotis DE**, et al. Validation of the Surgical Outcome Risk Tool (SORT) in patients with pancreatic cancer undergoing surgery. *Brazilian Journal of Anesthesiology* 18 February 2021
 28. Esendagli D, Shah U, Batihan G, **Magouliotis D**, Meloni F, Vos R, Elia S, Hellemons M. ERS International Congress 2020: Highlights from the Thoracic Surgery and Transplantation Assembly. *ERJ Open Research* Jan 2021, 00743-2020; DOI: 10.1183/23120541.00743-2020
 29. Christodoulidis G, Samara AA, Perivoliotis K, Floros T, Volakakis G, **Magouliotis DE**, Papamichali R, Tepetes K. Leiomyosarcoma of the spermatic cord presenting as an incarcerated inguinal hernia: a rare presentation of a rare condition, *Journal of Surgical Case Reports*. 2021, Issue 2, February 2021, rjaa589, <https://doi.org/10.1093/jscr/rjaa589>
 30. **Magouliotis DE**, Fergadi MP, Zacharoulis D. The Significant Hormonal Traits of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy Are Further Supported Using Three-Dimensional MDCT Gastrography. *Obes Surg*. 2021 Jan 4. doi: 10.1007/s11695-020-05140-9.

31. **Magouliotis DE**, et al. Uniportal Versus Multiportal Video-Assisted Thoracoscopic Lobectomy for Lung Cancer: An Updated Meta-analysis. *Lung*. 2021 Jan 2. doi: 10.1007/s00408-020-00411-9.
32. Athanassiadi K, Samiotis I, Chatzimichali E, Katsandri A, Stavrinou N, Benakis S, **Magouliotis D**, Tegos T, Vaslamatzis M. De novo angiosarcoma of the thoracic outlet: a rare entity. *Surgical Case Reports*. 2020; 3(11): 2-3. doi: 10.31487/j.SCR.2020.11.14
33. Athanassiadi K, Alevizakis I, Katsandri A, Chatzimichali E, Papadopoulou E, Elefteriou K, Tegos T, Stavrinou N, **Magouliotis D**. Pericardiodesis in Massive Pericardial Effusions. *Clin Cardiol*. 2020; 2(2): 1019.
34. Spiliopoulos K, **Magouliotis D**, Angelis I, Gansera B. Bilateral internal thoracic artery grafting: time to reconsider our strategy? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2020 Oct 17;ezaa338. doi: 10.1093/ejcts/ezaa338. Epub ahead of print.
35. Spiliopoulos K, Tsantsaridou A, **Magouliotis DE**, Charisi E, Kimpouri K, Salemis NS. Spontaneous Pneumomediastinum in a Teenager After Physical Exercise: a Benign and Rare, but Sometimes Challenging, Entity. *Med Arch*. 2020 Aug;74(4):315-317. doi: 10.5455/medarh.2020.74.315-317.
36. Spiliopoulos K, **Magouliotis DE**, et al. Facing a dilemma in the treatment of an internal mammary artery mycotic pseudoaneurysm: coil embolization or surgery? A case report and brief literature review. *J Surg Case Rep*. 2020 Aug 26;2020(8):rjaa271. doi: 10.1093/jscr/rjaa271.
37. **Magouliotis DE**, et al. Novel Candidate Genes of the Bcl-2 Interactome as Mediators of Apoptosis in Lung Transplant Recipients With Primary Graft Dysfunction [published online ahead of print, 2020 Apr 2]. *Prog Transplant*. 2020; 1526924820913517. doi: 10.1177/1526924820913517
38. **Magouliotis DE**, Sakellaridis N, Dimas K, et al. *In Silico* Transcriptomic Analysis of the Chloride Intracellular Channels (CLIC) Interactome Identifies a Molecular Panel of Seven Prognostic Markers in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Current Genomics*, Volume 21, Issue 2, 2020. doi: 10.2174/1389202921666200316115631
39. Symeonidis D, Diamantis A, **Magouliotis DE**, Tepetes K. Lymph node harvesting in gastric cancer: the crucial role of t stage. *J BUON*. 2020;25(1):319-323.

40. Diamantis A, Baloyiannis I, **Magouliotis DE**, et al. Perioperative radiotherapy versus surgery alone for retroperitoneal sarcomas: a systematic review and meta-analysis. *Radiol Oncol.* 2020;54(1):14-21. Published 2020 Feb 29. doi: 10.2478/raon-2020-0012
41. Christodoulidis G, Perivoliotis K, Manolakis A, Diamantis A, Koffas A, **Magouliotis D**, et al. Ulcerative Colitis in Hematological Malignancies: Paraneoplastic Manifestation or Coincidental Bystander?. *Case Rep Gastrointest Med.* 2020;2020:6135425. Published 2020 Mar 23. doi:10.1155/2020/6135425
42. **Magouliotis DE**, Christodoulidis G, Zacharoulis D. The Necessity for Routine Administration of Ursodeoxycholic Acid After Bariatric Surgery [published online ahead of print, 2020 Mar 12]. *Obes Surg.* 2020;10.1007/s11695-020-04535-y. doi: 10.1007/s11695-020-04535-y
43. **Magouliotis DE**, et al. A meta-analysis of liver-first versus classical strategy for synchronous colorectal liver metastases [published online ahead of print, 2020 Jan 18]. *Int J Colorectal Dis.* 2020;10.1007/s00384-020-03503-3.
44. **Magouliotis DE**, et al. Closure of Mesenteric Defects in Laparoscopic Gastric Bypass: a Meta-Analysis [published online ahead of print, 2020 Jan 18]. *Obes Surg.* 2020;10.1007/s11695-020-04418-2.
45. Spiliopoulos K, **Magouliotis D**, Skoularigis J, Triposkiadis F. Comments on "Treatment of Pericardial Effusion Through Subxiphoid Tube Pericardiostomy and Computerized Tomography - Or Echocardiography - Guided Percutaneous Catheter Drainage Methods". *Braz J Cardiovasc Surg.* 2019 Dec 1;34(5):642.
46. **Magouliotis DE**, et al. Transcriptomic analysis of the aquaporin gene family and associated interactors in rectal cancer. *Microna.* 2019 Sep 17.
47. **Magouliotis DE**, Christodoulidis G, Zacharoulis D. Letter to the Editor Concerning: Clinical Outcomes of Sleeve Gastrectomy Versus Roux-En-Y Gastric Bypass After Failed Adjustable Gastric Banding. *Obes Surg.* 2019 Sep 6.
48. **Magouliotis DE**, Tzovaras G. Unveiling the malabsorptive nature of one anastomosis gastric bypass: a closer look. *Surgery for Obesity and Related Diseases* 2019

49. **Magouliotis DE**, Tasiopoulou VS, Tzovaras G. One Anastomosis Gastric Bypass Versus Roux-en-Y Gastric Bypass for Morbid Obesity: an Updated Meta-Analysis. *Obes Surg*. 2019 Jun 6.
50. Katsogridaki G, Tzovaras G, Sioka E, Perivoliotis K, Zachari E, **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Zacharoulis D. Hyperuricemia and acute gout after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Clinical Obesity* 2019 Apr;9(2):e12296.
51. **Magouliotis DE**, et al. Transcriptomic analysis of the Aquaporin (AQP) gene family interactome identifies a molecular panel of four prognostic markers in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 2019 Apr;19(3):436-442
52. **Magouliotis DE**, Tasiopoulou VS, Athanassiadi K. Updated meta-analysis of survival after extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/decortication in mesothelioma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2018 Oct 29.
53. **Magouliotis DE**, Tasiopoulou VS, Zacharoulis D. Single-stage conversions from failed gastric band to sleeve gastrectomy versus Roux-en-Y gastric bypass: A closer look. *Surg Obes Relat Dis*. 2018 Nov;14(11):1788.
54. **Magouliotis DE**, et al. Banded vs. non-banded Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity: a systematic review and meta-analysis. *Clin Obes*. 2018 Dec;8(6):424-433.
55. Katsogridaki G, Tzovaras G, Sioka E, Perivoliotis K, Zachari E, **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Chatedaki C, Zacharoulis D. Hair Loss After Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. *Obes Surg*. 2018 Dec;28(12):3929-3934.
56. Zacharoulis D, Tasiopoulou VS, Svokos KA, Svokos AA, Christodoulidis G, Mamaloudis I, Sioka E, **Magouliotis DE**. A meta-analysis of laparoscopic versus open left lateral hepatic sectionectomy. *HPB (Oxford)*. 2018 Jul 23. pii: S1365-182X(18)32675-3.
57. Kahn N, Tomos I, Andrianopoulos V, Arikan H, van der Does A, Almendros I, Bonvivi S, Morgan A, Nenna R, Magouliotis D, et al. Early Career Members at the ERS International Congress 2017: highlights from the Assemblies. *Breathe* Dec 2017, 13 (4) e121-e129; DOI: 10.1183/20734735.017617
58. **Magouliotis DE**, et al. Tumor-treating fields as a fourth treating modality for glioblastoma: A meta-analysis. *Acta Neurochirurgica*. 2018
59. Sioka E, Tzovaras G, Perivoliotis K, Bakalis V, Zachari E, **Magouliotis D**, et al. Impact of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy on Gastrointestinal Motility.

60. **Magouliotis DE**, Tasiopoulou VS, Tzovaras G. One anastomosis gastric bypass versus Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity: a meta-analysis. *Clin Obes*. 2018 Mar 24. doi: 10.1111/cob.12246.
61. Sereti E, Karagianellou T, Kotsoni I, **Magouliotis D**, et al. Patient Derived Xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer? *J Proteomics*. 2018 Feb 1. pii: S1874-3919(18)30043-5. doi: 10.1016/j.jprot.2018.01.012
62. **Magouliotis DE**, et al. Single Incision Versus Conventional Laparoscopic Sleeve Gastrectomy for Morbid Obesity: A Meta-Analysis. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2018 Feb 1. doi: 10.1089/lap.2017.0245
63. **Magouliotis DE**, et al. Extracorporeal membrane oxygenation versus cardiopulmonary bypass during lung transplantation: a meta-analysis. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2018 Jan;66(1):38-47. doi: 10.1007/s11748-017-0836-3.
64. Tasiopoulou VS, Svokos AA, Svokos KA, Zacharoulis D, **Magouliotis DE**. Robotic versus laparoscopic sleeve gastrectomy: a review of the current evidence. *Minerva Chir*. 2017 Dec 14. doi: 10.23736/S0026-4733.17.07583-6.
65. Zacharoulis D, Bakalis V, Zachari E, Sioka E, Tsimpida D, **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Chatedaki C, Tzovaras G. Current knowledge and perception of bariatric surgery among Greek doctors living in Thessaly. *Asian J Endosc Surg*. 2017 Nov 3. doi: 10.1111/ases.12436.
66. **Magouliotis DE**, et al. Ursodeoxycholic Acid in the Prevention of Gallstone Formation After Bariatric Surgery: an Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Obes Surg*. 2017 Nov;27(11):3021-3030. doi: 10.1007/s11695-017-2924-y.
67. **Magouliotis DE**, et al. One-Anastomosis Gastric Bypass Versus Sleeve Gastrectomy for Morbid Obesity: a Systematic Review and Meta-analysis. *Obes Surg*. 2017 Sep;27(9):2479-2487. doi: 10.1007/s11695-017-2807-2.
68. **Magouliotis DE**, et al. Roux-En-Y Gastric Bypass versus Sleeve Gastrectomy as Revisional Procedure after Adjustable Gastric Band: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Surg*. 2017 Mar 16.

69. **Magouliotis DE**, et al. Impact of Bariatric Surgery on Metabolic and Gut Microbiota Profile: a Systematic Review and Meta-analysis. *Obes Surg*. 2017 Mar 6. doi: 10.1007/s11695-017-2595-8.
70. **Magouliotis DE**, et al. Robotic versus Laparoscopic Sleeve Gastrectomy for Morbid Obesity: a Systematic Review and Meta-analysis. *Obes Surg*. 2017 Jan;27(1):245-253. doi: 10.1007/s11695-016-2444-1
71. Tasiopoulou V, **Magouliotis D**, et al. Transcriptional over-expression of chloride intracellular channels 3 and 4 in malignant pleural mesothelioma. *Comput Biol Chem*. 2015 Sep 28;59(Pt A):111-116.
72. **Magouliotis DE**, et al. Airways microbiota: Hidden Trojan horses in asbestos exposed individuals? *Medical Hypotheses* 83 (2014) 537–540

«Ἴδοὺ καιρὸς ἔφθασεν ὃν ἰδεῖν ἐπόθησα...»

Ρωμανὸς Μελωδὸς

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	18
Περίληψη	22
Abstract	24
Γενικό Μέρος	26
1. Εισαγωγή	27
1.1. Πάγκρεας	27
1.2.1. Καρκίνος παγκρέατος	29
1.2.2. Επιδημιολογία	30
1.2.3. Ιστολογία, σταδιοποίηση, θεραπεία	31
1.3. Μοντέλα ξενομοσχευμάτων καρκίνου παγκρέατος (PDX – Patient-derived xenografts)	33
1.3.1. Εισαγωγή στη μέθοδο και το πλαίσιο ανάπτυξης των PDX	33
1.3.2. PDX ως προκλινικά μοντέλα όγκου	37
1.3.3. Ο ρόλος των PDX στην ανάπτυξη φαρμάκων για τον παγκρεατικό καρκίνο	39
1.3.4. Ο ρόλος των PDX στην εποχή της ιατρικής ακριβείας	46
1.3.5. Πλεονεκτήματα των PDX	49
1.3.6. Περιορισμοί στη χρήση των PDX	51
1.4.1. Τα χαρακτηριστικά και ο ρόλος των Ακουαπορινών (AQPs)	54
1.4.2. Ο ρόλος των AQPs σε καρκίνους του γαστρεντερικού	58
1.4.3. Μελλοντικές προοπτικές στη χρήση των Ακουαπορινών (AQPs)	62
1.5. Άλλοι πιθανοί βιοδείκτες	62
Ειδικό Μέρος	64
2.1. Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής	65
2.2. Υλικά και Μέθοδος	66
2.2.1. Στρατηγική υλοποίησης της διατριβής	66
2.2.2. Ανάπτυξη βιοτράπεζας καρκίνου παγκρέατος	67
2.2.3. Ανάπτυξη και τυποποίηση ορθοτοπικού μοντέλου PDX.	67
2.2.3.1. Εξαίρεση του όγκου και χειρισμός των κυττάρων	68
2.2.3.2. Ορθοτοπική εμφύτευση των κυττάρων του όγκου	69

2.4. Αναζήτηση βιοδεικτών	71
2.4.1. Επιλογή των προς εξέταση οικογενειών γονιδίων και κατασκευή των δικτύων τους	71
2.4.2. <i>In silico</i> μεταγραφωμική ανάλυση των δικτύων γονιδίων που αναπτύχθηκαν	72
2.4.3. Εξέταση πιθανών προγνωστικών δεικτών σχετιζόμενων με την επιβίωση από την ομάδα των διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ)	73
2.4.4. Ανάλυση γονιδιακού λειτουργικού εμπλουτισμού (Gene set enrichment analysis – GSEA)	73
2.4.5. Στατιστική ανάλυση	74
3. Αποτελέσματα	75
3.1. Ανάπτυξη βιοτράπεζας καρκίνου παγκρέατος	75
3.2. Ανάπτυξη ορθοτοπικού μοντέλου PDX	77
3.3. Αναζήτηση βιοδεικτών	91
3.3.1. Κατασκευή των δικτύων γονιδίων	91
3.3.2. <i>In silico</i> μεταγραφωμική ανάλυση των δικτύων γονιδίων που αναπτύχθηκαν	97
3.4. Ανάλυση γονιδιακού λειτουργικού εμπλουτισμού (Gene set enrichment analysis – GSEA)	120
4. Συζήτηση	122
5. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές	128
Βιβλιογραφία	129
Παράρτημα	153

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Εκατομμύρια ασθενείς παγκοσμίως πάσχουν από κάποια μορφή καρκίνου, ενώ σχεδόν κάθε οικογένεια διαθέτει ένα μέλος της, συγγενή ή φίλο που ταλαιπωρείται στο παρόν ή ταλαιπωρήθηκε στο παρελθόν από τη νόσο. Προσωπικά και οικογενειακά δράματα που συνδυάζονται με τεράστιο κόστος για τα Εθνικά Συστήματα Υγείας αλλά και τις κοινωνίες εν συνόλω. Σε αυτό το πλαίσιο, κάθε προσπάθεια που συμβάλλει στη βελτίωση των θεραπευτικών επιλογών έναντι των διαφορετικών μορφών καρκίνου είναι πολύτιμη.

Παράλληλα, ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί μία από τις πλέον επιθετικές μορφές καρκίνου, συνδεδεμένος με πτωχή πρόγνωση και συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση. Παρά τις τεράστιες ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη βελτιωμένων φαρμακευτικών παραγόντων, μικρή πρόοδος έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα. Γιατί όμως συμβαίνει αυτό; Και πώς συμβάλλει η παρούσα διατριβή σε αυτή την προσπάθεια.

Για να απαντήσουμε στο πρώτο ερώτημα πρέπει να ανατρέξουμε σε κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του παγκρεατικού καρκίνου. Πρώτον, πρόκειται για καρκίνο που χαρακτηρίζεται από μεγάλη κλωνική ετερογένεια. Δηλαδή, τα κύτταρα του όγκου διαφέρουν ως προς τη μορφολογία και τη βιολογία όχι απλώς μεταξύ των διαφορετικών ασθενών, αλλά ακόμη και στον ίδιο ασθενή, καθώς αναπτύσσονται κλώνοι καρκινικών κυττάρων εντός του ίδιου όγκου που υπερ-/υποεκφράζουν διαφορετικά μόρια και ρυθμίζονται από διαφορετικά μονοπάτια. Επίσης, οι κλώνοι που αναπτύσσονται επηρεάζονται από το μικροπεριβάλλον του όγκου.

Πώς μπορούμε προκλινικά να αποδώσουμε αυτή την ιδιαίτερη βιολογία;

Ενώ, τα παραδοσιακά προκλινικά μοντέλα βασίζονταν σε κυτταροκαλλιέργειες, σήμερα όλο και περισσότερα εργαστήρια αρχίζουν να υιοθετούν την τεχνική της χρήσης ξενομοσχευμάτων καρκίνου από ασθενείς (patient derived xenografts – PDX) που εμφυτεύονται σε ζωικά μοντέλα. Το βασικό πλεονέκτημα είναι ότι τα μοντέλα PDX προσφέρουν ένα μικροπεριβάλλον όγκου όσο το δυνατόν πιο όμοιο σε αυτό του ασθενούς. Κατά την έναρξη της διατριβής, στη βιβλιογραφία υπήρχαν περιορισμένες αναφορές

ως προς τη χρήση PDX με εμφύτευση στον υποδόριο ιστό των ζώων. Η μεγάλη καινοτομία της παρούσας διατριβής έγκειται στο ότι τυποποίησε ένα ορθοτοπικό μοντέλο PDX με εμφύτευση απευθείας στο παγκρεατικό παρέγχυμα. Ποιο το όφελος; Όπως και στην αγορά ακινήτων, η αξία της πιστότητας του προκλινικού μοντέλου επηρεάζεται από το ρητό “Location! Location! Location!”. Όσο πιο κοντά είναι το PDX στον ιστό που αναπτύχθηκε αρχικά στον ασθενή, τόσο μεγαλύτερη η ακρίβεια του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και συνολικά η ακρίβεια του μοντέλου.

Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό του παγκρεατικού καρκίνου είναι πως καθυστερεί να δώσει συμπτώματα. Συχνά, τη στιγμή της διάγνωσης η νόσος είναι ήδη προχωρημένη. Συνεπώς, απαιτούνται ακριβείς βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση και επιλογή θεραπευτικής στρατηγικής. Απαντώντας και σε αυτή την πρόκληση, η παρούσα διατριβή προσδιόρισε και πρότεινε ένα πάνελ 11 γονιδίων που λειτουργούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες για το συγκεκριμένο καρκίνο.

Πού οδηγούν όμως αυτά και άλλα αποτελέσματα της διατριβής και ποια μονοπάτια ανοίγονται για το μέλλον; Με την τυποποίηση ενός ορθοτοπικού μοντέλου PDX ανοίγει ο δρόμος για τη δοκιμή διαφορετικών προτεινόμενων φαρμακευτικών σχημάτων εξατομικευμένα για κάθε ασθενή σε PDX που αναπτύχθηκαν από κύτταρα του δικού του όγκου και παροχή εξατομικευμένης θεραπείας στο πλαίσιο της ιατρικής ακριβείας (precision medicine). Τα οφέλη για την έγκαιρη διάγνωση και τα θεραπευτικά αποτελέσματα είναι προφανή.

Και κάπου εδώ, σε αυτό το εναρκτήριο τμήμα της διατριβής, οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνετέλεσαν με κάθε τρόπο στην ολοκλήρωσή της.

Αρχικά, την ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Νικόλαο Σακελλαρίδη για τη συνεχή στήριξη και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής, τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις, καθώς και την τελική διαμόρφωση του κειμένου. Εξίσου εποικοδομητικές ήταν και οι συζητήσεις που είχαμε σε κάθε νέο κεφάλαιο της καριέρας μου με τις συμβουλές που μου παρείχε. Και επειδή πολλές φορές είναι οι μικρές λεπτομέρειες που καταδεικνύουν την ποιότητα ενός ανθρώπου, παραμένει πάντα χαραγμένη η ανάμνηση της πρώτης μας

συνάντησης στο γραφείο του, όταν διαβάζοντας το βιογραφικό μου σημείωμα στάθηκε και σχολίασε την ενασχόλησή μου με τη μουσική και το πιάνο, αντί των λοιπών τυπικών ακαδημαϊκών προσόντων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κύριο Δημήτριο Ζαχαρούλη για την αδιάκοπη υποστήριξή του, από την πρώτη ημέρα σύλληψης της ιδέας εκπόνησης της παρούσας διατριβής, καθώς και για τη συνολική αδιάκοπη πνευματική και ακαδημαϊκή καθοδήγηση και υποστήριξη που παρείχε. Σίγουρα, αποτέλεσε για εμένα ένα μοναδικό μέντορα, πρότυπο και σταθερό σύμμαχο, διδάσκοντάς με να αντιμετωπίζω όλα τα θέματα στη ζωή με αρετή, σφυρηλατώντας μέσα στα χρόνια μία σχέση, τολμώ να πω, «πνευματικού πατέρα-υιού», και δικαιώνοντας την αρχαία ρήση «εις μεν τον πατέρα μου οφείλω το ζην, εις δε τον διδάσκαλό μου το ευ ζην».

Ακόμη, τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω προς τον καθηγητή κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, που αποτέλεσε την ψυχή της παρούσας διατριβής με το συνεχές ενδιαφέρον του και την καθοδήγησή του στο εργαστήριο και στα πειράματα. Πάντα εκεί, να με κατευθύνει και να με βοηθήσει στη δουλειά «στον πάγκο» που για τους χειρουργούς δεν αποτελεί ιδιαίτερα οικείο έδαφος. Αλλά, και πάντα εκεί όταν αντιμετωπίζαμε εμπόδια στην εξέλιξη της διατριβής.

Αναμφίβολα, δίχως τη συνεχή υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου προσέφεραν και οι τρεις προαναφερθέντες καθηγητές μου, η εκπόνηση της παρούσας διατριβής θα ήταν ανέφικτη. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κωνσταντίνο Λαφαζάνη, τη Φανή Κουτσουγιάννη και την Ευαγγελία Σερέτη για την υποστήριξή τους στις πειραματικές εργασίες.

Ίσως το σημαντικότερο, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Μαρία και Εμμανουήλ για όλα τα εφόδια με τα οποία με προίκισαν μέσα από τους άοκνους αγώνες τους. Διότι το να μοχθεί κάποιος για εσένα, στερούμενος ενίοτε απολαύσεων και ευκολιών που θα μπορούσε να έχει, δεν είναι δεδομένο. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη θεία μου Ευαγγελία για τις συμβουλές και την υποστήριξή της, τις ξαδέρφες μου Konstantina και Alexis για την ενεργό και έμπρακτη υποστήριξη, καθώς και όλους τους συγγενείς, φίλους και συναδέλφους μου για τη συμπαράστασή τους

σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Οφείλουμε να θυμόμαστε από πού ξεκινήσαμε και χωρίς τη στήριξη όλων των προαναφερθέντων ανθρώπων τίποτε δε θα ήταν το ίδιο σήμερα.

Ακόμη, ευχαριστώ το **Θεό** για την **Πρόνοιά** του σε δύσκολες στιγμές. Τέλος, εκφράζω ευγνωμοσύνη προς τον εαυτό μου που είχε το θάρρος και έμαθε να μην υποχωρεί μπροστά στις δυσκολίες, να προσαρμόζεται μετατρέποντας τις κρίσεις σε ευκαιρίες, να εργάζεται σκληρά, να αναγνωρίζει τα λάθη του διδασκόμενος από αυτά, να απολογείται όταν αντιλαμβάνεται ότι αδίκησε, να συγχωρεί όταν αδικείται, να ευεργετεί όσους τον ευεργέτησαν, να βαδίζει πάντα κοιτώντας προς το μέλλον, αλλά και ενθυμούμενος το παρελθόν, σε μία εγελιανή ροή της προσωπικής του ιστορίας.

Και παρότι στη ζωή δεν υπάρχει εύκολος δρόμος να βαδίσεις, όπως θα γράψει και ο ποιητής «...ο δρόμος ο πιο μακρινός είναι ο πιο κοντινός στην καρδιά του Θεού...», και είναι εκεί που εν τέλει κρύβεται το νόημα.

Λάρισα, Φεβρουάριος 2023

Δημήτριος Μαγουλιώτης

Περίληψη

Ο καρκίνος του παγκρέατος (ΚΠ) χαρακτηρίζεται από αυξημένη επίπτωση και εξαιρετικά πτωχή πρόγνωση. Συνεπώς, η ανάγκη αναγνώρισης νέων βιοδεικτών και ανάπτυξης εξατομικευμένης θεραπείας είναι μεγάλη. Σε αυτό το πλαίσιο, τα ξενομοσχεύματα προερχόμενα από ασθενή (Patient Derived Xenografts - PDX) αποτελούν ένα νέο και πολλά υποσχόμενο προκλινικό μοντέλο καρκίνου. Τα PDX βασίζονται στην εμφύτευση κυττάρων προερχόμενων από τον πρωτοπαθή όγκο του ασθενούς σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Με την ικανότητα που προσφέρουν να προσομοιάζουν πιστά στο μικροπεριβάλλον του πρωτοπαθούς όγκου και να αναδεικνύουν την κλωνική ετερογένεια, αναδεικνύονται σε μία καινοτόμο προκλινική πλατφόρμα για τη μελέτη της βιολογίας του καρκίνου, την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών και την εξατομικευμένη δοκιμή της αποτελεσματικότητας χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

Οι Ακουαπορίνες (Aquaporins – AQP) αποτελούν μία οικογένεια πρωτεϊνών με λειτουργία διαύλων, που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και διευκολύνουν τη μετακίνηση ύδατος. Ένα σύνολο 13 πρωτεϊνών (AQP1-12A, B) συμπεριλαμβάνονται στην οικογένεια AQP. Οι AQP έχουν διερευνηθεί για το ρόλο τους στην παθογένεση διαφόρων τύπων καρκίνου, αλλά η μελέτη του ρόλου τους στον καρκίνο του παγκρέατος παραμένει περιορισμένη.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύξαμε ένα ορθοτοπικό μοντέλο PDX καρκίνου παγκρέατος σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Τα στελέχη ποντικών που χρησιμοποιήσαμε ήταν τα NOD/SCID, NSG, RAG-1, με διαφορετικό επίπεδο ανοσοκαταστολής ανά στέλεχος. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το ποσοστό επιτυχούς εμφύτευσης εξαρτάται από το επίπεδο ανοσοανεπάρκειας. Τα ποντίκια NSG που χαρακτηρίζονται από έλλειψη T, B, και κυττάρων φυσικών φονέων (NK cells) (τριπλή ανεπάρκεια) ήταν τα πλέον ανοσοανεπαρκή από τα τρία είδη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της διατριβής. Αυτά τα ευρήματα αναδεικνύουν το σημαίνοντα ρόλο της ανοσολογικής επιτήρησης έναντι των καρκινικών κυττάρων, που αντιπροσωπεύει και έναν από τους πυλώνες του καρκίνου.

Παράλληλα, η παρούσα διατριβή ανέδειξε για πρώτη φορά μία μοναδική γενετική υπογραφή 11 γονιδίων με διαφοροποιημένη έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος, που αποτελούν ταυτόχρονα προγνωστικούς δείκτες σχετιζόμενους με την επιβίωση των ασθενών. Επίσης, αναδείξαμε τις σχετικές μοριακές λειτουργίες και ρυθμιστικές οικογένειες miRNA. Αυτό το γονιδιακό πάνελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τα υπάρχοντα συστήματα σταδιοποίησης ώστε να διαθέτουμε βελτιωμένες προγνωστικές πληροφορίες. Τα συγκεκριμένα δεδομένα χρήζουν περαιτέρω έρευνας και δοκιμής σε μοντέλα PDX ώστε να αποκαλυφθεί πλήρως η εμπλοκή τους στον καρκίνο του παγκρέατος.

Καθώς η έρευνα για νέα θεραπευτικά σχήματα και ανοσοθεραπείες προχωράει, τα ορθοτοπικά μοντέλα PDX που παρουσιάζουμε στην παρούσα διατριβή επιτρέπουν μία σε βάθος εκτίμηση των νέων φαρμάκων σε ένα μικροπεριβάλλον όγκου που ομοιάζει με του ασθενούς. Περαιτέρω μελέτες για τη βελτίωση αυτών των μοντέλων βρίσκονται ήδη σε στάδιο ανάπτυξης στο εργαστήριο μας. Παράλληλα, ο εντοπισμός προγνωστικών δεικτών με *in silico* τεχνικές επιτρέπει την περαιτέρω στοχευμένη μελέτη τους σε μοντέλα PDX, σε μία πιο αποδοτική ως προς το κόστος, το χρόνο και τους διαθέσιμους πόρους ερευνητική προσέγγιση. Τέλος, η ανάδειξη του προγνωστικού του ρόλου της AQP7 στον καρκίνο του παγκρέατος από την ομάδα μας αποτελεί την πρώτη και μοναδική μέχρι σήμερα καταγραφή στη διεθνή βιβλιογραφία.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος παγκρέατος, ξενομοσχεύματα, patient-derived xenografts, PDX, βιοδείκτες

Abstract

Pancreatic cancer (PC) is characterized by an increased incidence and extremely poor prognosis. Therefore, there is a great necessity to identify new biomarkers and develop personalized therapy. In this context, the Patient-Derived Xenografts (PDX) represent a novel and promising preclinical cancer model. PDXs are based on the implantation of cells from the patient's primary tumor into immunocompromised mice. With their ability to mimic the primary tumor microenvironment and highlight clonal heterogeneity, they are emerging as an innovative preclinical platform for studying cancer biology, discovering new biomarkers, and personalized testing of chemotherapeutic drug efficacy.

Aquaporins (AQPs) represent a family of proteins with important channel functions, located in the cell membrane, and facilitating the translocation of water. A total of 13 proteins (AQP1-12A, B) are included in the AQP family. AQPs have been investigated for their role in the pathogenesis of various types of cancer, but the study of their role in pancreatic cancer remains limited.

In the present Ph.D. thesis, we developed and standardized an orthotopic PDX model of pancreatic cancer in immunocompromised mice. The mouse strains we used were NOD/SCID, NSG, RAG-1, with different levels of immunosuppression per strain. Our results showed that the rate of successful implantation depends on the level of immunodeficiency. NSG mice, characterized by a lack of T, B, and NK cells (triple deficiency), were the most immunodeficient of the three species used in the thesis experiments. These findings highlight the important role of immune surveillance against cancer cells, which represents one of the pillars of cancer.

At the same time, this thesis highlighted for the first time a unique genetic signature of 11 genes with differential expression in pancreatic cancer, which are simultaneously prognostic indicators related to patient survival. We also demonstrated the relevant molecular functions and regulatory families of miRNAs. This gene panel can be used in conjunction with existing staging systems to provide improved prognostic information. These data need further investigation and testing in PDX models to fully reveal their involvement in pancreatic cancer.

As research into new therapeutic regimens and immunotherapies progresses, the orthotopic PDX models we present in this thesis allow an in-depth evaluation of new drugs in a tumor microenvironment that resembles the patient. Further studies to improve these models are already under development in our laboratory. At the same time, the identification of prognostic markers using *in silico* techniques allows for their further targeted study in PDX models, in a more cost-effective research approach in terms of time and resources. Finally, the identification of the prognostic role of Aquaporin 7 (AQP7) in pancreatic cancer by our group is the first and only to date recorded in the international literature.

Keywords: pancreatic cancer; pancreatic adenocarcinoma; patient-derived xenografts; pdx; biomarkers

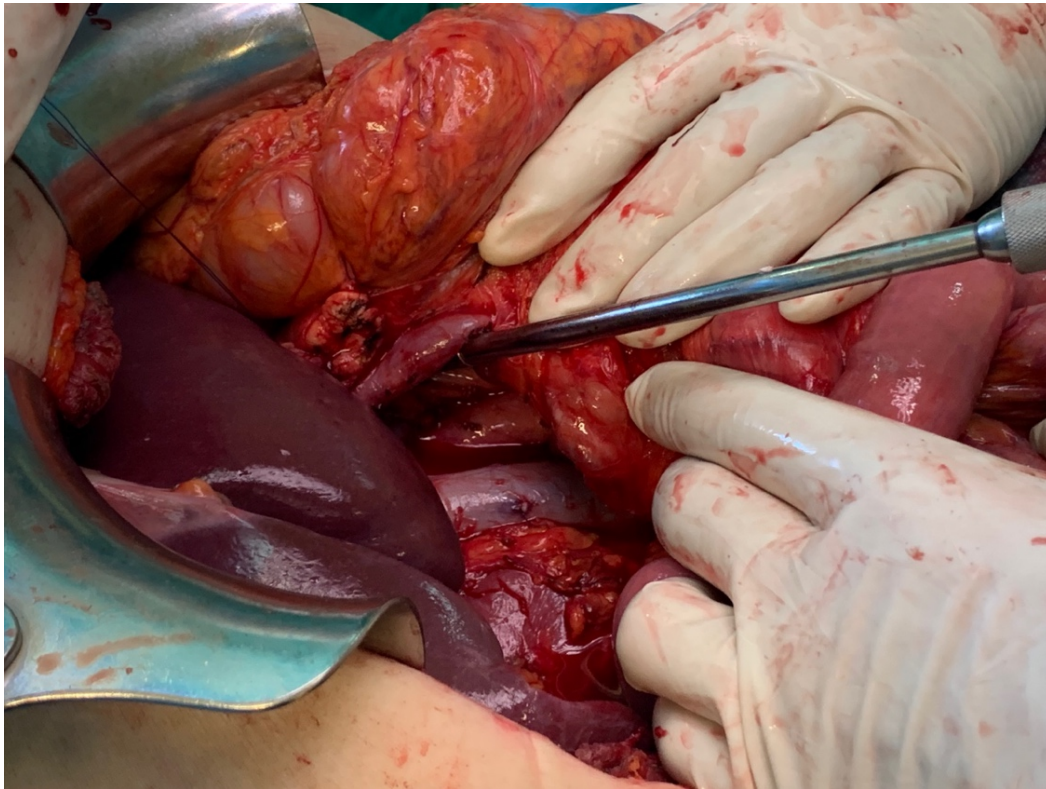
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

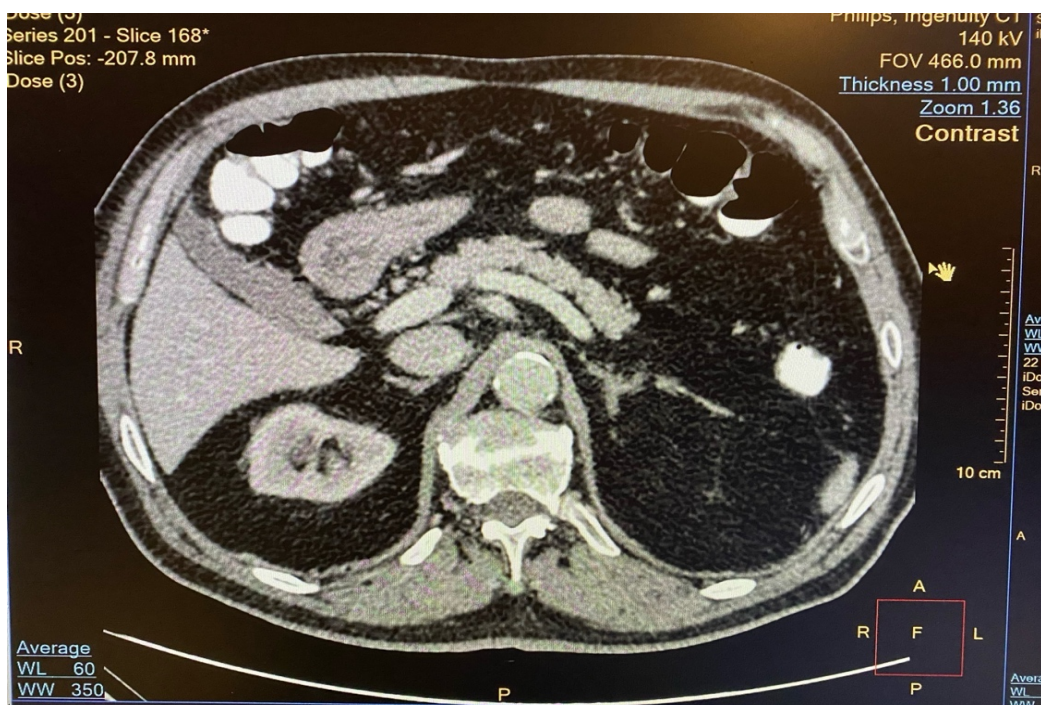
1.1. Πάγκρεας

Το **πάγκρεας** αποτελεί αδένα του πεπτικού συστήματος των σπονδυλωτών. Ετυμολογικά προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις “πᾶν” και “κρέας”. Στον άνθρωπο ανατομικά εντοπίζεται στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, στο επίπεδο του Ο1-Ο2 σπονδύλου και εκτείνεται σχεδόν οριζοντίως από το δωδεκαδάκτυλο μέχρι την πύλη του σπλήνα (*Εικόνα 1*). Το πάγκρεας βρίσκεται στο οπίσθιο τοίχωμα του επιπλοϊκού θυλάκου, με την πρόσθια επιφάνειά του να καλύπτεται από τοιχωματικό περιτόναιο, ενώ η κεφαλή περιβάλλεται από το δωδεκαδάκτυλο. Διαιρείται σε τρεις μοίρες: α) την κεφαλή με την αγκιστροειδή απόφυση, β) το σώμα και γ) την ουρά του παγκρέατος. Κατά μήκος του οργάνου διατρέχει ο παγκρεατικός πόρος, διαμέτρου περίπου 2 χιλιοστών, ο οποίος μαζί με τον κοινό χοληδόχο πόρο εκβάλλει στο φύμα του Vater. Η κεφαλή του παγκρέατος αιματώνεται από την πρόσθια και την οπίσθια άνω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία, που αποτελούν κλάδους της γαστροδωδεκαδακτυλικής αρτηρίας, ενώ η ουρά από τους παγκρεατικούς κλάδους που εκφύονται από τη σπληνική αρτηρία [1].

Λειτουργικά το πάγκρεας είναι ένας μικτός αδένας, με ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα, ο οποίος παράγει πλήθος σημαντικών ορμονών με κυριότερες την ινσουλίνη, το γλουκαγόνο, τη σωματοστατίνη και άλλα παγκρεατικά πολυπεπίδια. Το εξωκρινές πάγκρεας παράγει ένα έκκριμα που περιέχει λιπάση, που διασπά τα λίπη, αμυλάση που διασπά τους υδατάνθρακες και πρόδρομες ουσίες πρωτεασών που διασπούν τις πρωτεΐνες. Ο κύριος ρόλος του στο πεπτικό σύστημα είναι η έκκριση του παγκρεατικού χυμού που περιέχει ένζυμα απαραίτητα για τη λειτουργία της πέψης [1].



Εικόνα 1. Διεγχειρητική προσπέλαση προς παρασκευή των αγγειακών δομών που περιβάλλουν το πάγκρεας. (Εικόνα αρχείου Χειρ/κής Κλινικής, Π.Γ.Ν.Λ.)



Εικόνα 2. Απεικόνιση του παγκρέατος σε Αξονική Τομογραφία Άνω – Κάτω Κοιλίας και Οπισθοπεριτοναίου (Εικόνα Αρχείου Χειρ/κής Κλινικής, ΠΓΝΛ)

1.2.1. Καρκίνος παγκρέατος

Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί την όγδοη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο για τους άντρες και την ένατη συχνότερη αιτία θανάτου για τις γυναίκες παγκοσμίως [2]. Η επίπτωση όλων των τύπων καρκίνου του παγκρέατος αθροιστικά (85% εκ των οποίων ιστολογικά είναι αδενοκαρκίνωμα) κυμαίνεται από 1 έως 10 ασθενείς ανά 100.000 ανθρώπων, ενώ είναι αυξημένη στα ανεπτυγμένα κράτη και στους άντρες [3]. Εξαιτίας της αυξημένης επίπτωσης και της έλλειψης επαρκούς αντιμετώπισης προβλέπεται ότι μέχρι το 2030 το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος θα αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο μετά τον καρκίνο του πνεύμονα [4].

Παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος αποτελούν το κάπνισμα [5], ο σακχαρώδης διαβήτης [6], η μη κληρονομική και η χρόνια παγκρεατίτιδα [7], η παχυσαρκία [8] και γενετικοί παράγοντες [9, 10, 11, 12]. Μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS ανευρίσκονται στην πλειονότητα των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος (>90%) [13]. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια CDKN2A, TP53 and SMAD4 αλληλεπιδρούν με το γονίδιο KRAS επιταχύνοντας την πρόοδο του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος [14]. Πρόσφατες γενωμικές προσεγγίσεις έχουν χαρτογραφήσει το γονιδίωμα του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος ανθρώπου προσθέτοντας νέες πληροφορίες αναφορικά με δίκτυα γονιδίων και μονοπάτια που συνδέονται με την παθογένεσή του [15, 16]. Παρότι σήμερα διαθέτουμε περισσότερη γνώση για τον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το παρελθόν, η αξιοποίησή της προς όφελος των ασθενών παραμένει εξαιρετικά αργή. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε ανεπάρκεια των χρησιμοποιούμενων προκλινικών μοντέλων ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος παγκρέατος.

1.2.2. Επιδημιολογία

Σύμφωνα με την Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία, περίπου 56.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του παγκρέατος διαγνώστηκαν στις ΗΠΑ το 2019 με εκτιμώμενους 45.000 θανάτους, καταλαμβάνοντας έτσι την τρίτη θέση ως προς τη συχνότητα μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και τον καρκίνο του παχέος εντέρου [17]. Επιπλέον, ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί την έβδομη κύρια αιτία θανάτου σχετιζόμενου με καρκίνο παγκοσμίως, αντιπροσωπεύοντας περίπου 459.000 νέες περιπτώσεις και 432.000 θανάτους ετησίως σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του GLOBOCAN 2018 [18]. Υπολογίζεται ότι ο καρκίνος του παγκρέατος σύντομα θα ξεπεράσει τον καρκίνο του μαστού ως την τρίτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση [18]. Η πλειονότητα των ασθενών διαγιγνώσκονται σε μεγάλη ηλικία με διάμεση ηλικία τα 71 έτη κατά τη διάγνωση και μόνο το 20% των διαγνώσεων εμφανίζονται πριν από την ηλικία του 60 [19].

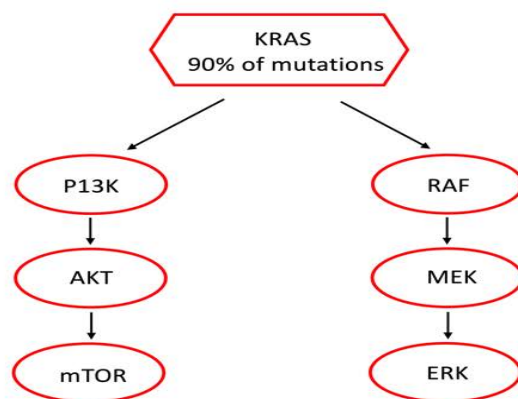
Οι τροποποιησιμοι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του παγκρέατος περιλαμβάνουν την παχυσαρκία, τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και το κάπνισμα [20]. Η λιπώδης διήθηση του παγκρέατος έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη παγκρεατικών ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών, πρόδρομων μορφών ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος. Ο διαβήτης έχει συσχετιστεί εδώ και πολύ καιρό με την ανάπτυξη καρκίνου του παγκρέατος, αν και ο καρκίνος του παγκρέατος θεωρείται επίσης παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη διαβήτη [21]. Παράλληλα, περίπου το 1% των ασθενών ηλικίας άνω των 50 ετών με νέα εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη αναπτύσσουν διαβήτη λόγω ταυτόχρονου καρκίνου του παγκρέατος [22]. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο νεοεμφανιζόμενος διαβήτης μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου και θέτει ισχυρή υπόνοια για καρκίνο παγκρέατος.

Το 5–10% όλων των περιπτώσεων καρκίνου παγκρέατος εκτιμάται ότι αποδίδεται σε κληρονομικούς παράγοντες κινδύνου [23]. Έχουν εντοπιστεί αρκετά κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παγκρέατος. Χαρακτηριστικό είναι το σύνδρομο Peutz-Jeghers, που οφείλεται σε μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου STK11 (επίσης γνωστού ως LKB1), το οποίο οδηγεί σε 35% αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παγκρέατος [23]. Επίσης, μεταλλάξεις στα

γονίδια BRCA1 ή BRCA2, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αυτού του τύπου καρκίνου [24]. Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν τη σημασία του γενετικού υποβάθρου στην πρόωρη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο παγκρέατος.

1.2.3. Ιστολογία, σταδιοποίηση, θεραπεία

Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου παγκρέατος χαρακτηρίζονται ως πορογενή αδеноκαρκινώματα και επομένως αποτελούν κακοήθεια της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, ενώ μια μειοψηφία αντιπροσωπεύει τους νευροενδοκρινείς όγκους. Τα περισσότερα αδеноκαρκινώματα του παγκρεατικού πόρου προκύπτουν από πρόδρομες βλάβες, που ονομάζονται παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες, οι οποίες εξελίσσονται μέσω μίας σταδιακής διαδικασίας γενετικών αλλοιώσεων σε πορογενές αδеноκαρκίνωμα του παγκρέατος. Το αδеноκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου προκύπτει από κυστικά νεοπλάσματα όπως το ενδοπορικό θηλώδες βλεννώδες νεόπλασμα του παγκρέατος (IPMN). Παρότι, τα IPMN συχνά βρίσκονται να γειτνιάζουν με αδеноκαρκινώματα, παρουσιάζουν μια ξεχωριστή γενετική υπογραφή που υποδηλώνει αποκλίνουσα ανάπτυξη [25]. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των γονιδιακών μεταλλάξεων κατά την εξέλιξη από παγκρεατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία βαθμού 1 και 2 σε αδеноκαρκίνωμα του παγκρέατος έχει περιγραφεί ευρέως στη βιβλιογραφία. Κυρίως οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν το ογκογονίδιο KRAS (βρίσκεται περίπου στο 90% των ασθενών με πορογενές αδеноκαρκίνωμα του παγκρέατος), ιδιαίτερα εντός του κωδικονίου 12 (Εικόνα 3). Ακόμη, η βράχυνση των τελομερών αποτελεί ένα επιπρόσθετο χαρακτηριστικό γνώρισμα του παγκρεατικού καρκίνου που προκύπτει μέσω χρωμοσωμικής αστάθειας [26]. Γενωμικές έρευνες έχουν επιτρέψει την περαιτέρω ταξινόμηση του παγκρεατικού καρκίνου με βάση τη γονιδιακή υπογραφή. Ωστόσο, πρόσθετα δεδομένα είναι απαραίτητα για την πλήρη κατανόηση της βιολογίας του παγκρεατικού καρκίνου και τον καλύτερο σχεδιασμό του θεραπευτικού πλάνου. Στην παρούσα διατριβή έχουμε μελετήσει συγκεκριμένες γονδιακές υπογραφές που θα αναλυθούν παρακάτω.



Εικόνα 3. Η αλληλουχία των μεταλλάξεων που έχουν συσχετισθεί με το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος

Ο παγκρεατικός καρκίνος διακρίνεται σε τέσσερα στάδια ως προς την έκταση της νόσου και τη θεραπευτική προσέγγιση. Η σταδιοποίηση παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1**.

Σταδιοποίηση	Θεραπευτική προσέγγιση
Εξαιρέσιμος (Resectable)	(νεοεπικουρική ΧΜΘ +/-) Χειρουργική εξαίρεση + επικουρική ΧΜΘ +/- ΑΚΘ
Οριακά εξαιρέσιμος (Borderline resectable)	(νεοεπικουρική ΧΜΘ +/-) Χειρουργική εξαίρεση + επικουρική ΧΜΘ +/- ΑΚΘ
Τοπικά προχωρημένος (Locally advanced)	Συστηματική ΧΜΘ +/- χειρουργική εξαίρεση σε υποσταδιοποιημένους ασθενείς
Μεταστατικός (Metastatic)	Συστηματική ΧΜΘ

Πίνακας 1. Σταδιοποίηση καρκίνου παγκρέατος και θεραπευτική προσέγγιση σύμφωνα με το American Joint Committee on Cancer (AJCC) – ΧΜΘ: Χημειοθεραπεία / ΑΚΘ: Ακτινοθεραπεία

Ο ρόλος και το μίγμα της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας (ΧΜΘ) δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ακόμη, παρότι υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι αυξάνει την επιβίωση στον εξαιρεσίμο καρκίνο παγκρέατος και το ποσοστό της R0 εκτομής στον οριακά εξαιρεσίμο καρκίνο παγκρέατος [27, 28]. Σε αυτό το πλαίσιο, υπάρχει μεγάλο έλλειμμα ως προς τη δυνατότητα παροχής εξατομικευμένης θεραπείας στους ασθενείς με βάση την κλωνική ετερογένεια και το μικροπεριβάλλον του όγκου. Στο συγκεκριμένο πεδίο στοχεύει η παρούσα διατριβή, δηλαδή η ανάπτυξη ενός προκλινικού μοντέλου όγκου όσο το δυνατόν πιο όμοιο ως προς τον ασθενή.

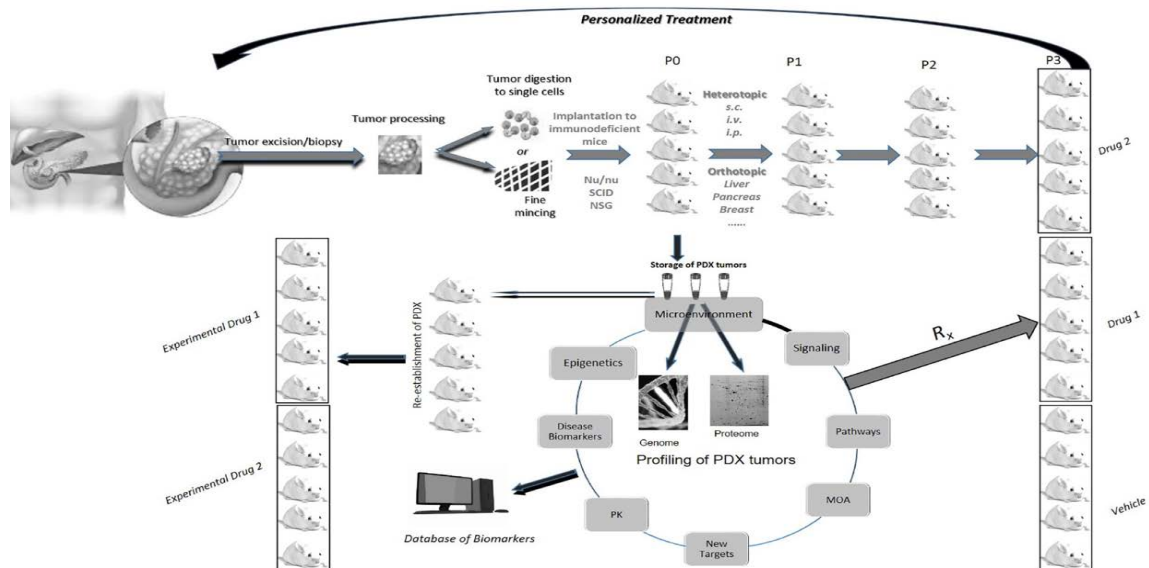
1.3. Μοντέλα ξενομοσχευμάτων καρκίνου παγκρέατος (PDX – Patient-derived xenografts)

1.3.1. Εισαγωγή στη μέθοδο και το πλαίσιο ανάπτυξης των PDX

Παρότι σήμερα διαθέτουμε ευρύτερη γνώση για τον καρκίνο του παγκρέατος, η πρόοδος στην έρευνα για τη θεραπεία του παραμένει αργή. Αυτό οφείλεται κυρίως 1) στην έντονη κλωνική ετερογένεια που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου, 2) στη μακρά υποκλινική περίοδο που παρουσιάζει ο καρκίνος του παγκρέατος, ιδιαίτερα όταν εντοπίζεται στην ουρά και 3) στην ανεπάρκεια των υπαρχόντων προκλινικών μοντέλων καρκίνου παγκρέατος. Στο τρίτο αίτιο καλούνται να δώσουν λύση τα μοντέλα PDX. Συγκεκριμένα, μοντέλα ξενομοσχευμάτων καρκίνου έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως από ερευνητές στον τομέα της ογκολογίας [29]. Πράγματι, καρκινικά κύτταρα κυτταρικών σειρών εγχέονται σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια ορθοτοπικά ή υποδορίως, με αποτέλεσμα τα νεοπλασματικά κύτταρα να αναπτύσσουν μία τρισδιάστατη αρχιτεκτονική μέσα σε στρωματικό μικροπεριβάλλον που προσομοιάζει καλύτερα σε αυτό του ανθρώπινου οργανισμού. Στόχος αυτής της μεθόδου είναι να παρέχει καλύτερη *in vivo* αναπαράσταση της βιολογίας του καρκίνου και της ανταπόκρισης των διαφορετικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων, ώστε να ιεραρχείται η κατεύθυνση της έρευνας [30].

Σημαντική εξέλιξη στο παραδοσιακό μοντέλο των ξενομοσχευμάτων αποτελεί η ανάπτυξη μοντέλων ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς

(patient derived tumour xenografts - PDX). Πιο ειδικά, τμήματα όγκων που έχουν εξαιρεθεί από ασθενείς εμφυτεύονται ορθοτοπικά ή εκτοπικά σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια [31, 32]. Σύμφωνα με αναδρομικές μελέτες η αντίδραση στη θεραπεία των μοντέλων PDX προσεγγίζει περισσότερο αυτή του ανθρώπινου οργανισμού συγκριτικά με τα παραδοσιακά ξеноμοσχέματα [33].



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων για την εγκαθίδρυση ενός μοντέλου PDX (Ανατύπωση από Sereti et al. [34]).

Τα μοντέλα PDXs παρουσιάζουν σχεδόν απεριόριστες δυνατότητες συγκριτικά με τα παραδοσιακά προκλινικά μοντέλου καρκίνου. Χαρακτηριστική είναι η σύγκριση με τις κυτταροκαλλιέργειες, οι οποίες αδυνατούν να αποδώσουν το μικροπεριβάλλον του όγκου, την κλωνική ετερογένεια, ενώ συγκεκριμένα γενωμικά χαρακτηριστικά είναι πιθανό να χαθούν κατά την *in vitro* καλλιέργεια [34]. Σε αυτούς τους περιορισμούς καλούνται να δώσουν απάντηση τα μοντέλα PDX.

Μέχρι σήμερα, διάφορα μοντέλα παγκρεατικού καρκίνου από κυτταρικές σειρές έχουν αναπτυχθεί *in vitro* και *in vivo*. Η υποδόρια εμφύτευση είναι η πιο συνήθης προσέγγιση, ωστόσο υπολείπεται των ορθοτοπικών μοντέλων ως προς την ομοιότητα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου [34]. Ακόμη, έχει προταθεί είτε η χρήση κυτταρικών σειρών όγκου είτε πρωτοπαθή καρκινικά κύτταρα του

ασθενούς [34]. Έχει δειχθεί ότι οι κυτταρικές σειρές δεν αποδίδουν πιστά την ετερογένεια μεταξύ των όγκων διαφορετικών ασθενών, ενώ διαφοροποιούνται από τον αρχικό όγκο γενωμικά μετά από αριθμό περασμάτων [34]. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά επηρεάζουν χαρακτηριστικά του όγκου, όπως είναι η ανάπτυξη, η μετάσταση και η ανταπόκριση σε διαφορετικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, περιορίζοντας καθ' αυτόν τον τρόπο την αξία τους στο πλαίσιο της ιατρικής ακριβείας (precision medicine). Παρά τη σημαντική πρόοδο όμως στον τομέα αυτό, κατά την έναρξη εκπόνησης της διατριβής δεν είχαν περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία παρά ελάχιστα μοντέλα ορθοτοπικών PDX για τον καρκίνο του παγκρέατος με σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και αφήνοντας σημαντικά ερωτήματα αναπάντητα.

Η ανάπτυξη PDX σε ποντικούς από ανθρώπινους όγκους, πρωτοπαθείς ή μεταστατικούς έχει περιγραφεί ευρέως στη βιβλιογραφία [15,17,18]. Παρότι κάποιες ομάδες έχουν αναπτύξει συγκεκριμένες μεθοδολογικές στρατηγικές, η βασική μεθοδολογία είναι κοινή. Συνοπτικά, κομμάτια φρέσκου ιστού συλλέγονται είτε χειρουργικά είτε μέσω βιοψίας [19,20]. Τα κύτταρα του όγκου στη συνέχεια εμφυτεύονται στα ποντίκια είτε ως μικρά κομμάτια όγκου [21] είτε ως κύτταρα μεμονωμένα ή αναμεμιγμένα σε Matrigel® [17,22], ανθρώπινους ινοβλάστες [23] ή μεσεγχυματικά πολυδύναμα κύτταρα [24].

Μία ποικιλία ανοσοκατεσταλμένων ποντικών έχει χρησιμοποιηθεί για εμφύτευση PDX, φέροντας το καθένα ιδιαίτερα ανοσολογικά χαρακτηριστικά. Τα είδη ποντικών που έχουν προτιμηθεί από πολλές ομάδες είναι τα πλέον ανοσοκατεσταλμένα, όπως τα NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdcscid/J) ή τα NOD/SCID/IL2g-receptor null (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, πιο ευρέως γνωστά ως NSG), ποντίκια τα οποία είναι περισσότερο κατάλληλα για παραγωγή PDX χάρη σε υψηλότερο ρυθμό εμφύτευσης [25].

Για την ανάπτυξη των PDX, η εμφύτευση μπορεί να είναι είτε υποδόρια, είτε ορθοτοπική στο όργανο ενδιαφέροντος. Παρότι τα υποδόρια μοντέλα PDX είναι πιο εύκολο να αναπτυχθούν, και πιο δημοφιλή, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ορθοτοπική εμφύτευση πιθανώς να οδηγεί σε ζωικά μοντέλα όγκου περισσότερο ομοιάζοντα στην πραγματική κλινική εικόνα του ασθενούς. Για παράδειγμα, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ορθοτοπικά μοντέλα καρκίνου παγκρέατος είχαν περισσότερο όμοια ανταπόκριση στη γεμισιταμίνη ως προς τον ασθενή, συγκριτικά με το υποδόριο μοντέλο [26]. Επιπρόσθετα, μία άλλη

σύγχρονη μελέτη έδειξε ότι το υποδόριο μοντέλο PDX παγκρεατικού καρκίνου δεν ήταν σύμφωνο ως προς τη μετάσταση και τη μυϊκή καχεξία με τον ασθενή σε αντίθεση με το ορθοτοπικό μοντέλο [27]. Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι η ορθοτοπική εμφύτευση προσφέρει το πλεονέκτημα ότι ο όγκος αναπτύσσεται στο ίδιο μικροπεριβάλλον και έτσι διατηρεί σημαντικά χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου όπως το δεσμοπλαστικό μικροπεριβάλλον, τη μεταστατική διασπορά και την καχεξία σχετιζόμενη με καρκίνο [28,29]. Προς επίρρωσιν αυτών των διαφορών ως προς τη θέση εμφύτευσης και την ανάπτυξη των PDX, οι Hoover και συνεργάτες παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στο προφίλ βιοδεικτών και γονιδίων μεταξύ ορθοτοπικού και υποδόριου μοντέλου PDX [30]. Παρόλ' αυτά, αναφέρουν την επιτυχή ανάπτυξη ενός μόνο PDX, ενώ τα υπόλοιπα μοντέλα προέρχονταν από εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές. Οι συγγραφείς επίσης παρατήρησαν ότι η έκφραση του PEAK1 μειώνεται ενώ του MST1R αυξάνεται στο ορθοτοπικό μοντέλο συγκριτικά με το υποδόριο.

Μετά την επιτυχή ανάπτυξη τα ξενομοσχεύματα εμφυτεύονται σε πολυάριθμα ποντίκια και αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί σημαντικός πληθυσμός με επιτυχώς εμφυτευμένα PDX. Οι όγκοι από τα πρωτογενή ξενομοσχεύματα επίσης χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών. Σε μία πρόσφατη μελέτη από τους Noll et al. Που συνέκριναν τα πρωτογενή ξενομοσχεύματα με τις σχετιζόμενες κυτταρικές σειρές ανέδειξαν τη διατήρηση των ιστομορφολογικών χαρακτηριστικών και της έκφρασης του RNA [9]. Ανάλογα με τον καρκινικό τύπο, ο ρυθμός εμφύτευσης των ξενομοσχευμάτων παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία και ετερογένεια, σχετιζόμενος άμεσα με τον ιστολογικό τύπο, την επιθετικότητα του όγκου, το μέγεθος και τον αριθμό των κυττάρων του όγκου που εμφυτεύονται, καθώς και του ανατομικού χώρου εμφύτευσης [30]. Ωστόσο, τα δεδομένα που παρέχει η παρούσα βιβλιογραφία είναι περιορισμένα όσον αφορά το ρυθμό επιτυχούς εμφύτευσης, με αποτέλεσμα επιπρόσθετες μελέτες να είναι απαραίτητες ώστε να αναπτυχθούν κατάλληλες μέθοδοι που να επιτρέπουν την ομογενοποίηση του ρυθμού ανάπτυξης, καθώς και την ανάπτυξη μοντέλων PDX από κύτταρα όγκων που δύσκολα μεθίστανται. Μόνον έτσι θα αξιοποιηθούν τα μοντέλα PDX επιτυχώς στο πλαίσιο της εξατομικευμένης ιατρικής.

1.3.2. PDX ως προκλινικά μοντέλα όγκου

Οι βιοδείκτες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έρευνα και την κλινική διαχείριση του καρκίνου, καθώς μπορούν να βοηθήσουν σε πολλούς διαφορετικούς τομείς όπως η έγκαιρη διάγνωση, η πρόγνωση, η παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και η εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής, καθώς και η αξιολόγηση της φαρμακοδυναμικής, της φαρμακοκινητικής, αλλά επιτρέπει και την ανάπτυξη στόχων φαρμάκων. Ωστόσο, μέχρι σήμερα η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του παγκρέατος παραμένει εξαιρετικά δύσκολη. Δεδομένου ότι οι ασθενείς όπως προαναφέραμε συνήθως παρουσιάζουν μη ειδικά συμπτώματα και κατά τη στιγμή της διάγνωσης το 80% από αυτούς έχουν ήδη προχωρημένη νόσο [17]. Ακόμη και τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από απεικονιστικές τεχνικές ή από την κυτταρολογική ή ιστολογική εξέταση μπορεί να μην είναι πειστικά και συχνά έχουν διαφορούμενη σημασία [24]. Λαμβάνοντας υπόψη την πτωχή πρόγνωση του παγκρεατικού καρκίνου, καθώς και του γεγονότος ότι δεν υπάρχει εγκεκριμένη μέθοδος προσυμπτωματικού ελέγχου, υπάρχει υψηλή αναγκαιότητα να εντοπιστούν και τυποποιηθούν νέοι, ευαίσθητοι βιοδείκτες για τον έλεγχο ασθενών υψηλού κινδύνου, την επιβεβαίωση της διαφορικής διάγνωσης και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία και της εξέλιξης της νόσου.

Ένας αριθμός μελετών αναφέρει τη χρήση των PDX για την ανάπτυξη τέτοιων πιο αξιόπιστων βιοδεικτών για τον καρκίνο του παγκρέατος. Στο πλαίσιο της ανάπτυξης μίας μεθόδου για βελτίωση της πρόγνωσης της ασθένειας σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε μία κλινική μελέτη χρησιμοποιώντας PDX από την ομάδα του Hidalgo [25] το 2011. Στη συγκεκριμένη μελέτη συμπεριελήφθησαν συνολικά 94 ασθενείς με καρκίνο παγκρέατος που υπεβλήθησαν σε χειρουργική εκτομή του όγκου, εκ των οποίων 69 όγκοι εμφυτεύθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Οι ασθενείς των οποίων οι όγκοι εμφυτεύθηκαν παρουσίαζαν πτωχότερη επιβίωση συγκριτικά με το συνολικό πληθυσμό. Χρησιμοποιώντας τεχνικές ανάλυσης έκφρασης μικροσυστοιχιών RNA γενετικού εμπλουτισμού (gene expression and gene set enrichment analysis - GSEA) οι συγγραφείς ανέλυσαν περαιτέρω την παρουσία μίας ανεξάρτητης γονιδιακής υπογραφής σχετιζόμενης με μεταστατική

δραστηριότητα μέσω της επεξεργασίας επιτυχώς εμφυτευμένων PDX [25]. Παράλληλα, παρατηρήθηκε πως στη δεύτερη γενιά επανεμφυτευμένων ξενομοσχευμάτων σημειώθηκε σημαντική ομοιογένεια και ομοιότητα με την πρώτη γενιά, παρότι δεν ήταν πανομοιότυπα [25]. Επιπλέον, παρατήρησαν ότι η συχνότητα απώλειας της έκφρασης της πρωτεΐνης SMAD4, μίας πρωτεΐνης που έχει προηγουμένως συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση και υψηλότερη δυναμική μετάστασης, ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με επιτυχή εμφύτευση PDX. Όλα αυτά τα δεδομένα συνηγορούν στο ότι η επιτυχία καθώς και ο ρυθμός της εμφύτευσης ίσως αποτελεί προγνωστικό δείκτη.

Στο ίδιο πλαίσιο της ανάπτυξης ενός βελτιωμένου εργαλείου κατηγοριοποίησης των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος, ο Bian και οι συνεργάτες του [26] ανέπτυξαν μία στρατηγική βασισμένη στην έκφραση του c-MYC μέσω της μοριακής συσχέτισης και χαρακτηρισμού των PDX χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες. Η συγκεκριμένη ομάδα ανέπτυξε επιτυχώς 55 PDX και ανέλυσε το μεταγράφομα αυτών των ξενομοσχευμάτων (η ομάδα εκμάθησης) ενώ χρησιμοποίησαν 16 επιπλέον ξενομοσχεύματα για να επιβεβαιώσουν περαιτέρω τα ευρήματα της ομάδας εκμάθησης. Στη βάση αυτής της ανάλυσης καθόρισαν μία μοναδική γενετική υπογραφή 16 γονιδίων που επέτρεψε την επιλογή διακριτών υποτύπων αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος με βάση την υψηλή ή χαμηλή έκφραση του c-MYC. Κατέληξαν στο ότι η χρήση αυτής της γονιδιακής υπογραφής επέτρεπε την αναγνώριση των επιθετικών όγκων παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος με χαμηλή διαφοροποίηση και πτωχή πρόγνωση [26]. Επίσης απέδειξαν ότι τα κύτταρα από ασθενείς με υψηλή έκφραση του γονιδίου MYC είναι πιο ευαίσθητα στη θεραπεία με τον αναστολέα JQ1 BET, προτείνοντας έτσι ότι η στρατηγική αυτή θα ήταν δυνατό να επιτρέψει την επιλογή, μέσω της χρήσης λιγότερων αλλά σημαντικών δεικτών, μίας συγκεκριμένης υποομάδας ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο, ταξινομώντας αντίστοιχα και τις ανάλογες θεραπευτικές προσεγγίσεις [26].

Μία πρόσθετη μελέτη (και πιθανώς η μοναδική στο συγκεκριμένο τομέα) πραγματοποιήθηκε από τους Antonio Jimeno και Hidalgo [27] κατευθύνθηκε στην ανακάλυψη βιοδεικτών που θα μπορούσαν να προβλέψουν το αποτέλεσμα της θεραπείας. Σε αυτή τη μελέτη, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μία σειρά από 11 ξενομοσχεύματα αδενοκαρκινώματος παγκρέατος με γνωστή ετερογένεια

ως προς την ευαισθησία στη γεμισιταμπίνη με στόχο την ανεύρεση δεικτών αντοχής στο συγκεκριμένο χημειοθεραπευτικό φάρμακο. Μέσω της πραγματοποίησης πειραμάτων *ex vivo*, χρησιμοποιώντας τεχνικές αναρρόφησης διά λεπτής βελόνης αναγνώρισαν το γονίδιο polo-like kinase 1 (Plk1) ως έναν προγνωστικό δείκτη διαφοροποιημένης ευαισθησίας αυτών των όγκων στη γεμισιταμπίνη, δηλαδή ως υποέκφραση του PLK1 σχετιζόμενη με αυξημένη ευαισθησία στη γεμισιταμπίνη. Επιπλέον, πρότειναν ότι όσο μεγαλύτερη είναι η αντίσταση του όγκου στη γεμισιταμπίνη, τόσο πιο αποτελεσματικός ήταν ο συνδυασμός [27].

Παρότι μη ευθυγραμμιζόμενα με την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, τα ξενομοσχεύματα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της βιολογίας του όγκου. Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκε μία μελέτη από μία μεγάλη ομάδα ερευνητών υπό την επίβλεψη του Allesandro Carugo αναπτύσσοντας μία *in vivo* πλατφόρμα (Patient-Based In Vivo Lethality to Optimize Treatment - PILOT platform) που επιτρέπει την ανάδειξη των απαραίτητων ογκογονιδίων για την ανάπτυξη και διατήρηση PDX [28]. Χρησιμοποιώντας τεχνικές GSEA αναγνώρισαν γονίδια εμπλεκόμενα στον έλεγχο της αντιγραφής του DNA, καθώς και της προόδου του κυτταρικού κύκλου [28]. Επιπλέον, αναφέρουν ότι το γονίδιο WDR5 (σημαντικό μέλος του συμπλόκου COMPASS histone H3 Lys4 methyltransferase complex που ρυθμίζει την αντιγραφή του DNA επιτρέπει την αναγνώριση των αναστολέων WDR5 και ATR (DNA damage response (DDR) Ataxia telangiectasia-mutated (ATM); ATM- and Rad3-related kinase) στην κλινική διαχείριση του παγκρεατικού καρκίνου.

1.3.3. Ο ρόλος των PDX στην ανάπτυξη φαρμάκων για τον παγκρεατικό καρκίνο

Μία ποικιλία φαρμάκων έχουν εγκριθεί και χρησιμοποιούνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής για τον παγκρεατικό καρκίνο, συμπεριλαμβανομένης της γεμισιταμπίνης, του nab-paclitaxel (Abraxane®), του συνδυασμού λευκοβορίνης, 5-φλουοροουρακίλης, ιρινοτεκάνης, οξαλοπλατίνης (FOLFIRINOX) και του erlotinib (Tarceva®) [29]. Ο πολύ χαμηλός ρυθμός ανταπόκρισης [29] σε συνδυασμό με τον αυξημένη επίπτωση θανάτου από αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος καταδεικνύει ότι η παρούσες

θεραπευτικές επιλογές υπολείπονται του επιδιωκόμενου στόχου. Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων ή και αποτελεσματικότερων συνδυασμών φαρμακευτικών παραγόντων για τον καρκίνο του παγκρέατος εξακολουθεί να αποτελεί μία αδήριτη ανάγκη, καθώς και μία περίπλοκη διαδικασία με χαμηλό ποσοστό επιτυχίας [30, 31]. Σε αυτό το πλαίσιο, το μοντέλο PDX έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες για να δοκιμαστούν ποικίλοι φαρμακευτικοί παράγοντες, κυρίως με βάση ήδη δοκιμασμένα φάρμακα, για τη θεραπεία του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος. Σε μία από τις πρώτες μελέτες που αξιολόγησαν τα PDX ως μοντέλα για την ανακάλυψη και ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων, οι Rubio-Viqueira και συνεργάτες κατόρθωσαν να εγκαθιδρύσουν ένα μοντέλο PDX ως πλατφόρμα για τη δοκιμή φαρμάκων [32]. Η συγκεκριμένη ομάδα χρησιμοποίησε όγκους παγκρέατος από 14 ασθενείς τους οποίους εμφύτευσε σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια [32]. Συγκεκριμένα, ανέπτυξαν ομάδες από ποντίκια φέροντα όγκους προερχόμενους από ασθενείς, κατάλληλες για δοκιμή φαρμάκων, ως ένα προκλινικό εργαλείο που έχει τη δυνατότητα να προσομοιώνει πρώιμες κλινικές μελέτες. Επίσης, οι συγγραφείς παρουσίασαν τη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων EGFR και phospho-EGFR με την ανταπόκριση σε κάποια από τα φάρμακα προτείνοντας έτσι την αξιοποίηση αυτής της συσχέτισης ως προγνωστικού δείκτη για την ανταπόκριση σε φαρμακευτικούς παράγοντες.

Μία άλλη φερέλπιδα στρατηγική είναι η αναστολή του γονιδίου MEK σε ορθοτοπικό μοντέλο PDX που αναπτύχθηκε σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Οι Kawaguchi και συνεργάτες [33] δοκίμασαν την αποτελεσματικότητα 10 φαρμάκων σε αυτό το ορθοτοπικό μοντέλο. Από όλους τους φαρμακευτικούς παράγοντες οι δύο αναστολείς MEK, το trametinib και το cobimetinib, προκάλεσε υποχώρηση του όγκου επιδεικνύοντας την πιθανή τους αποτελεσματικότητα στη θεραπεία του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος και του ρόλου που τα PDX θα μπορούσαν να διαδραματίσουν στην πιθανή τους αποτελεσματικότητα στην εξατομικευμένη θεραπεία [33]. Στην ίδια γραμμή οι Smith και συνεργάτες [34] χρησιμοποίησαν PDX από την αποκαλούμενη βιβλιοθήκη Freiburg (μία βιβλιοθήκη αποτελούμενη από περίπου 400 μοντέλα ανθρώπινου όγκου ανεπτυγμένα υποδορίως σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια). Πραγματοποιώντας ανάλυση μικροσυστοιχιών από 150 δείγματα ξενομοσχευμάτων, εμβλαπτισμένων με παραφίνη και φορμαλίνη, επέλεξαν δύο

μοντέλα ξενομοσχευμάτων παγκρεατικού καρκίνου με υψηλή και χαμηλή έκφραση VEGF και αγγειακή πυκνότητα που αξιοποίησαν περαιτέρω για να δοκιμαστεί η αποτελεσματικότητα του GEM ως μίας πειραματικής θεραπείας χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-VEGF (HuMV833, ένα μονοκλωνικό IgG4k αντίσωμα έναντι του VEGF). Τα αποτελέσματά τους αποκάλυψαν ότι τα PDX με αυξημένη έκφραση VEGF και υψηλότερη πυκνότητα αγγείων ανταποκρίνονταν καλύτερα σε όλες τις θεραπείες, ενώ ο συνδυασμός των δύο παραγόντων συνετέλεσε σε παροδική υποχώρηση του όγκου. Παρομοίως, οι Yarr και συνεργάτες [35] χρησιμοποίησαν ορθοτοπικά μοντέλα PDX για να μελετήσουν την επίδραση του DC101 (ενός μονοκλωνικού αντισώματος anti-VEGFR-2) συγκρινόμενου με το GEM (met-GEM). Οι όγκοι από PDX που έλαβαν το met-GEM παρουσίασαν 10 φορές μικρότερη ανάπτυξη από την ομάδα ελέγχου, με αυξημένη αγγειακή πυκνότητα, παροδικά βελτιούμενη ιστική παροχή και μειωμένη υποξεία προτείνοντας έτσι μία θεραπευτική ευκαιρία για τη χορήγηση ενός δεύτερου κυτταροτοξικού φαρμάκου ή την εφαρμογή ακτινοθεραπείας. Το DC101 συμπεριέλαβε ομάδες, από την άλλη μεριά, που επέδειξαν αυξημένη απόπτωση, μειωμένο μεταβολισμό και κυτταρική ανάπτυξη.

Η οικογένεια γονιδίων PLKs μοιάζουν να αποτελούν ιδανικούς στόχους για την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών για την αντιμετώπιση του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος [36]. Συγκεκριμένα οι Lohse et al. [43] ανέπτυξαν μία ομάδα από έξι παγκρεατικά PDX, επιλεγμένα ώστε να εκπροσωπούν όλο το εύρος των χαρακτηριστικών ανάπτυξης, γενετικών χαρακτηριστικών και την υποξία που ανευρίσκονται σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο. Έπειτα, δοκίμασαν την ευαισθησία τους έναντι του αναστολέα PLK4 CFI-400945 (επί του παρόντος χρησιμοποιείται μόνο σε κλινικές μελέτες τύπου I) που όχι μόνο οδήγησε σε σημαντική μείωση της καρκινικής ανάπτυξης και σε αυξημένη επιβίωση σε τέσσερα από τα έξι μοντέλα όγκου, αλλά και σε μία σημαντική μείωση των αρχέγονων κυττάρων του όγκου. Η συγκεκριμένη ομάδα ερευνητών χρησιμοποίησε εκτεταμένα παγκρεατικά PDX για να δοκιμάσει ποικίλες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Σε μία άλλη μελέτη παρουσίασαν την ανάπτυξη 11 PDX που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή του θεραπευτικού παράγοντα TH-302 που θεωρείται ως επιλεκτικά τοξικός έναντι υποξικών κυττάρων του όγκου, είτε μόνος είτε σε

συνδυασμό με ιονίζουσα ακτινοβολία. Τα αποτελέσματά τους προτείνουν πως παρότι ο θεραπευτικός παράγων από μόνος του μπορεί να μην οδηγεί σε σημαντικά αποτελέσματα, παρόλ' αυτά ο συνδυασμός με την ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να καθυστερήσει την καρκινική ανάπτυξη σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων με μέτρια προς ταχεία κυτταρική ανάπτυξη και εντόνως υποξικά, όπως χαρακτηριστικά είναι ο καρκίνος του παγκρέατος. Ακόμη πιο σημαντικά κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν επετεύχθη επανεμφύτευση του όγκου [37]. Σε μία άλλη μελέτη, αναδείχθηκε ότι η χορήγηση του παράγοντα olaparib (AXD-2281), ενός αναστολέα PARP σε μία προσπάθεια να καταστούν οι όγκοι πιο ευαίσθητοι σε ιονίζουσα [38]. Παρατήρησαν ότι σε όγκους με κατεσταλμένο το ογκογονίδιο BRCA2 δεν υπήρξε ακτινοευαισθησία, ένα αποτέλεσμα που αντιτίθεται με προηγούμενα αποτελέσματα μελετών άλλων ερευνητών [39]. Σε αυτή τη βάση των συγκεκριμένων παρατηρήσεων οι συγγραφείς πρότειναν περαιτέρω ότι συνδυάζοντας την αναστολή του γονιδίου PARP και η ακτινοθεραπεία μπορεί να μην είναι ιδιαίτερα ωφέλιμη σε παγκρεατικό καρκίνο θετικό για το ογκογονίδιο BRCA2. Σε μία προηγούμενη μελέτη που εκπονήθηκε από την ίδια ομάδα το 2015, οι ερευνητές προσπάθησαν να απαντήσουν στο ερώτημα της επίδρασης του GEM και του cisplatin σε όγκους θετικούς για το ογκογονίδιο BRCA1, καθώς και την ευαισθησία των παγκρεατικών όγκων με τη χρήση PDX [40]. Με βάση τα αποτελέσματά τους κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα ξενομοσχεύματα με κατεσταλμένα γονίδια BRCA1 και BRCA2 ήταν σημαντικά πιο ευαίσθητα στη χορήγηση του cisplatin εν συγκρίσει με τα μη κατεσταλμένα PDX. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατήρησαν ακόμη πως η ευαισθησία στη χορηγούμενη θεραπεία σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων σχετίζεται άμεσα με την αντίστοιχη ευαισθησία στους ασθενείς εκ των οποίων ελήφθησαν.

Τα πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα αποτελούν έναν υποπληθυσμό κυττάρων που μπορούν να εξελιχθούν σε καρκινικά κύτταρα και δείχνουν ιδιότητες αυτο-ανανέωσης, δίνοντας ώθηση στην ανάπτυξη διαφοροποιημένων πρόγονων κυττάρων και αύξηση της έκφρασης σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με το μόριο sonic hedgehog [41]. Περισσότερα από τα κύτταρα αυτά, 75–100%, εκφράζουν τον υποδοχέα death receptor 5 (DR5), ενώ μόνο το 25% από τα κύτταρα του όγκου εκφράζουν αυτό τον υποδοχέα. Σε μία μελέτη που συμπεριέλαβε PDX, χρησιμοποιήθηκε το drozitumab, ένα αντίσωμα έναντι

αυτού του υποδοχέα, βρήκαν ότι έπληττε περισσότερα πολυδύναμα κύτταρα έναντι διαφοροποιημένων κυττάρων του όγκου. Η αποτελεσματικότητα αυτού του αντισώματος μελετήθηκε σε 3 PDX, εκ των οποίων δύο χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα και ένα ως ανθεκτικό στο γονίδιο Aro2L/TRAIL, μέλος της οικογένειας tumor necrosis factor (TNF) [42]. Ωστόσο, όλα τα PDX βρέθηκαν να απαντούν στη χορήγηση του drozitumab οδηγώντας σε υποχώρηση των όγκων [43]. Στο ίδιο πλαίσιο και χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά AZD7762, δοκιμάστηκε ένας αναστολέας της κινάσης checkpoint kinase 1 (Chk1), ενός βασικού συστατικού της απάντησης του κυττάρου στην επιδιόρθωση του DNA, σε δύο μοντέλα PDX παγκρεατικού καρκίνου ώστε να διερευνηθεί η ικανότητά του να στοχεύει ειδικά πολυδύναμα κύτταρα [44]. Το συστατικό, σε συνδυασμό με το GEM, βρέθηκε να μειώνει τον αριθμό των πολυδύναμων κυττάρων, όπως αντικατοπτρίζεται από την αλλαγή στα επίπεδα των βιοδεικτών των κυττάρων αυτών που αναλύθηκαν (CD24, CD44, και ESA). Επίσης, αποδείχθηκε ότι η έναρξη των δευτερογενών καρκινικών διεργασιών σχετιζομένων με την ανάπτυξη όταν τα πρωτοπαθή καρκινικά κύτταρα είχαν προηγουμένως αντιμετωπιστεί με γεμισιταμπίνη και AZD7762, ήταν κατεσταλμένη στα ποντίκια φορείς των ξενομοσχευμάτων. Σε αυτή τη βάση των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων οι συγγραφείς πρότειναν ότι η αναστολή του γονιδίου Chk1 ίσως αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο για τη θεραπευτική προσέγγιση του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος [44].

Το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος χαρακτηρίζεται από έντονη ανάπτυξη ινώδους ιστού (δεσμοπλασία) που προωθεί την επιθετική φύση της νόσου και την ανθεκτικότητά της στη θεραπεία. Συνεπώς, θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν στο μικροπεριβάλλον το όγκου και το κυτταρικό στρώμα ίσως αποτελούν το κλειδί για τη βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος. Σε αυτό το πλαίσιο, σε μία πρόσθετη μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2011 [45], τμήματα ιστού παγκρεατικού καρκίνου που ελήφθησαν απευθείας από το χειρουργείο από 11 ασθενείς που είχαν λάβει προηγουμένως νεοεπικουρική χημειοθεραπεία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων υποδορίως σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Με αυτό τον τρόπο αναπτύχθηκε μία πλατφόρμα παρασκευασμάτων (αποκαλούμενη από τους ερευνητές PancXenoBank) η οποία στη συνέχεια αξιοποιήθηκε για την εκτίμηση της

καρκινικής ανάπτυξης, των πιθανών αλλαγών στη φυσιολογία του παγκρεατικού μικροπεριβάλλοντος και της διάχυσης των θεραπευτικών παραγόντων στο διακυττάριο χώρο. Είναι χαρακτηριστικό ότι η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μία από τις λίγες που συνδυάζουν δεδομένα κλινικών μελετών (φάσης I/II) με μοντέλα PDX. Τα μοντέλα PDX έλαβαν είτε GEM, nab-paclitaxel μόνο ή συνδυαζόμενα. Η μονοθεραπεία συνετέλεσε σε υποχώρηση της νόσου σε δύο και τέσσερις από τους 11 ασθενείς που έλαβαν GEM και nab-paclitaxel, αντίστοιχα. Ωστόσο, συνδυασμένα συνετέλεσαν σε υποχώρηση της νόσου σε σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (7 από τους 11 ασθενείς). Περαιτέρω ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος όγκων ανθεκτικών σε γεμισιταμπίνη αποκάλυψε ότι το nab-paclitaxel θα μπορούσε να επηρεάσει το δεσμοπλαστικό στρώμα, μειώνοντας τον όγκο του σε σημαντικό βαθμό κάτι που είναι σύμφωνο με αποτελέσματα μελετών φάσης I/II. Επιπρόσθετα, αυτό συνοδεύτηκε από αυξημένη αγγείωση των όγκων που ήταν ιδιαίτερα έντονη σε όσους έλαβαν συνδυασμένη χημειοθεραπεία.

Το Ibrutinib ή PCI-32765 είναι ένας αναστολέας της τυροσινικής κινάσης BTK (Bruton's tyrosine kinase) που έχει λάβει έγκριση για τη θεραπεία της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (ΧΛΛ) [46]. Το φάρμακο επίσης είναι γνωστό για την αναστολή των μαστοκυττάρων και την υποέκφραση των βασεόφιλων κυττάρων [47], ενός κύριου παράγοντα σχετιζόμενου με την ινώδη-φλεγμονώδη απόκριση στον παγκρεατικό καρκίνο. Ο συγκεκριμένος αναστολέας επίσης δοκιμάστηκε από τους Masso-Valles και συνεργάτες [48] σε ένα μοντέλο PDX που αναπτύχθηκε σε ποντίκια NOD/SCID προερχόμενο από δείγμα ιστού του όγκου ασθενούς που υπεβλήθη σε παγκρεατοδωδεκαδακτυλεκτομή. Η από του στόματος χορήγηση του φαρμάκου μείωσε την ίνωση, αύξησε την επιβίωση και βελτίωσε την απόκριση των PDX στο GEM.

Οι αλλαγές στο μεταβολισμό φαίνονται να αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι του των μονοπατιών που ρυθμίζονται από το ογκογονίδιο KRAS, ένα κρίσιμο ογκογονίδιο που υπεισέρχεται στην ανάπτυξη του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος, με αποτέλεσμα οι αναστολές του μεταβολισμού αποτελούν μία άλλη ελκυστική προσέγγιση για την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος. Σε αυτό το πλαίσιο, η ομάδα του Rajeshkumar ανέπτυξαν και χρησιμοποίησαν PDX για να

δοκιμάσουν ένα αριθμό μεταβολικών αναστολέων σε ένα πάνελ 12 PDX εμφυτευμένων σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια [49].

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η φενφορμίνη παρουσιάζει σημαντική αναστολή της καρκινικής ανάπτυξης σε 5 από τα 12 PDX [49, 50]. Η μετφορμίνη και ο αναστολέας της πυροσταφυλικής δευδρογονάσης (pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor dichloroacetate - DCA) παρουσίασαν παρόμοια αποτελεσματικότητα, αλλά κατώτερη από τη φενφορμίνη. Η φενφορμίνη βρέθηκε να προκαλεί μία σημαντική μείωση στα αμινοξέα και αύξηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης, ενώ η απόκριση στη θεραπεία δε φάνηκε να σχετίζεται με την έκφραση κάποιου από τα γονίδια KRAS, TP53, SMAD4 ή PTEN. Το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος έχει φανεί πως συχνά χάνει το αλληλότιμο p16ink4a οδηγώντας έτσι σε υποέκφραση του CDK4/6. Συγκεκριμένα οι Wietkiewicz και συνεργάτες [50] ανέπτυξαν τρία μοντέλα PDX στα οποία εμφυτεύθηκαν τμήματα όγκου ασθενών σε ποντίκια NSG για να μελετηθεί περαιτέρω ένας αναστολέας CDK4/6, με την κωδική ονομασία PD-0332991 (palbociclib). Αυτός ο παράγοντας βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός έναντι των PDX (σε αντίθεση με το GEM) οδηγώντας σε ακόμη και πλήρη καταστολή την ανάπτυξης του αδενοκαρκινώματος και προτείνοντας με αυτό τον τρόπο την ευαισθησία του στους αναστολείς CDK4/6.

Η πρωτεΐνη heat shock protein 90 σχετίζεται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση [51] και που όταν ενεργοποιούνται συντελούν στην ενεργοποίηση πάνω από 200 πρωτεϊνών στα κύτταρα των θηλαστικών [52]. Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη από την ομάδα του Bobron μελετήθηκε η αναστολή του HSP90 για τη θεραπεία του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος σε πέντε PDX [53]. Οι ερευνητές μελέτησαν το STA-12-8666, ένα χημειοθεραπευτικό παράγοντα έναντι των PDX, αποτελούμενο από τον ειδικό αναστολέα HSP90 συνδεδεμένο με τον αναστολέα της τοποϊσομεράσης Ι SN-38 μέσω ενός χημικού δεσμού εστεράσης. Όπως σημειώνουν οι ερευνητές, το STA-12-8666 ανέδειξε ανώτερη αποτελεσματικότητα συγκρινόμενο με ισόποσες δόσεις ιρινοτεκάνης έναντι των ξеноμοσχευμάτων αυξάνοντας το διάστημα υποτροπής της νόσου.

1.3.4. Ο ρόλος των PDX στην εποχή της ιατρικής ακριβείας

Είναι προφανές από τα όσα έχουν περιγραφεί προηγουμένως ότι τα ζωικά μοντέλα PDX έχουν αναδειχθεί ως σημαντικές προκλινικές πλατφόρμες για τη μελέτη της βιολογίας του αδενοκαρκινώματος παγκρέατος, για τη δοκιμή της αποτελεσματικότητας φαρμάκων και την αποκάλυψη νέων θεραπειών και βιοδεικτών στην ογκολογία. Συνεπώς, αρκετοί ερευνητές έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην αποτελεσματική ανάπτυξη των PDX, ως μοντέλων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τους ασθενείς [54, 55]. Σε αυτή τη βάση, τα μοντέλα PDX έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη εξατομικευμένης ογκολογικής θεραπείας. Μετά την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων, στα ποντίκια χορηγούνται διαφορετικοί αντικαρκινικοί παράγοντες και συνδυασμοί χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ώστε να επιλεγεί ο πιο αποδοτικός παράγοντας για τη χορήγηση εξατομικευμένης θεραπείας [54]. Αυτή η στρατηγική αποτελεί μία εξαιρετική εναλλακτική για την εξατομικευμένη θεραπεία. Δυστυχώς, στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα υπάρχει μόνο ένας μικρός αριθμός προκλινικών μελετών που χρησιμοποιούν PDX για να παρέχουν θεραπεία κατευθυνόμενη από PDX. Κάποιες μελέτες συσχετίζουν τις φαρμακολογικές επιδράσεις στα PDX με τα αποτελέσματα στο κλινικό αποτέλεσμα των ασθενών. Για παράδειγμα, τα PDX που αναπτύχθηκαν από 85 ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο και αντιμετωπίστηκαν με τον παράγοντα cetuximab είχαν παρόμοια απόκριση και κλινικό αποτέλεσμα με τους ασθενείς [45]. Σε μία πιλοτική κλινική μελέτη, οι Hidalgo [25] και συνεργάτες ανέπτυξαν ξενομοσχεύματα από 14 ασθενείς με προχωρημένους καρκίνους. Στα ποντίκια με τα ξενομοσχεύματα χορηγήθηκαν και δοκιμάστηκαν συνολικά 63 φαρμακευτικοί παράγοντες σε 232 σχήματα. Εν τέλει αναδείχθηκε ένα αποτελεσματικό σχήμα για 12 ασθενείς. Ισχυρή συσχέτιση φάνηκε μεταξύ της δραστηριότητας των δοκιμασμένων φαρμάκων στα μοντέλα PDX και της ανταπόκρισης των ασθενών στα αντίστοιχα φάρμακα [25]. Σε μία πιο πρόσφατη ερευνητική εργασία, όγκοι από ασθενείς με σάρκωμα εμφυτεύθηκαν σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια και παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων στα ξενομοσχεύματα και του κλινικού αποτελέσματος σε 13 από τους 16 ασθενείς που συμμετείχαν (81%) [54]. Από αυτούς τους 13 ασθενείς, 6 είχαν άμεσο κλινικό όφελος από την υπό PDX κατευθυνόμενη

θεραπεία. Επίσης, κανένας από τους ασθενείς δεν παρουσίασε πρόοδο της νόσου [54].

Όσον αφορά τον παγκρεατικό καρκίνο συγκεκριμένα, έχει δημοσιευτεί ένα κλινικό περιστατικό ασθενούς με παγκρεατικό καρκίνο ανθεκτικό στη γεμισιταμίνη [56]. Τα ξενομοσχεύματα που αναπτύχθηκαν από τμήματα του όγκου του ασθενούς που εξαιρέθηκε φάνηκε να είναι ευαίσθητα σε παράγοντες βλάβης του DNA (όπως η μιτομυκίνη C και το cisplatin). Στη βάση αυτού του προκλινικού αποτελέσματος, η θεραπεία του ασθενούς με αυτούς τους παράγοντες οδήγησε σε σημαντική ανταπόκριση. Εν αντιθέσει με την αναμενόμενη επιβίωση των 3 μηνών που προβλέπεται για ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο και υποτροπή έπειτα από θεραπεία με γεμισιταμίνη ο συγκεκριμένος ασθενής παρουσίασε επιβίωση ελεύθερη νόσου 3 μηνών έπειτα από την υποτροπή που εμφάνισε ακολούθως της θεραπείας με την πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας. Οι Hidalgo και συνεργάτες ανέπτυξαν 4 μοντέλα PDX από ασθενείς με πρωτοπαθή παγκρεατικό καρκίνο και στα οποία χορήγησαν αντικαρκινικούς παράγοντες [25]. Με βάση προηγούμενα δεδομένα από ξενομοσχεύματα, ένα από αυτά αντιμετωπίστηκε με μιτομυκίνη C και cisplatin και οδήγησε σε μερική ανταπόκριση, ενώ δύο από τα μοντέλα αντιμετωπίστηκαν gemcitabine και παρουσίασαν σταθεροποίηση της νόσου [25]. Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, ελήφθησαν δείγματα από 62 ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο τα οποία εμφυτεύθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, εκ των οποίων 42 εμφυτεύθηκαν επιτυχώς και ανέπτυξαν μοντέλα PDX [57]. Στη συνέχεια οι ερευνητές εξέτασαν τα επιτυχώς εμφυτευμένα ξενομοσχεύματα παγκρεατικού καρκίνου ως προς την απάντησή τους σε θεραπείες που χορηγήθηκαν στους ασθενείς προέλευσής τους και βρήκαν ότι παρουσίασαν ανταπόκριση ακριβώς αντίστοιχη με αυτήν των ασθενών [57]. Σε μία άλλη μελέτη, ερευνητές προσπάθησαν να καθορίσουν το ρόλο της αναστολής του υποδοχέα mTOR σε προκλινικά μοντέλα και ασθενείς με καρκίνο παγκρέατος. Το temsirolimus, ένας mTOR αναστολέας, ανέστειλε την καρκινική ανάπτυξη σε 4 από τα 17 ξενομοσχεύματα, σε αντίθεση με sirolimus που δεν οδήγησε σε κλινικά σημαντικό αποτέλεσμα [58]. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ακόμη αρκετές μελέτες σχετικά με τη χρήση των PDX στην έρευνα του καρκίνου, χρησιμοποιώντας δεδομένα PDX από τη βιοτράπεζα

PancXenoBank του Johns Hopkins University. Στη μελέτη τους οι Laheru και συνεργάτες χρησιμοποίησαν δεδομένα δεκατεσσάρων PDX από τη βάση δεδομένων PancXenoBank και έδειξαν ότι ο παράγοντας salirasib σε συνδυασμό με τη γεμισιταμίνη οδήγησε αναστολή της καρκινικής ανάπτυξης σε 2/2 PDXs [59]. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη 19 ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με αυτό το συνδυασμό δεν αντιμετώπισαν κάποια σοβαρή παρενέργεια [59]. Όλα αυτά τα δεδομένα παρουσιάζονται αναλυτικότερα στον Πίνακα 2.

Αναφορά	Πλήθος PDX που μελετήθηκαν	Προηγούμενη θεραπεία	Θεραπεία που χορηγήθηκε στα PDX	Αποτέλεσμα στα PDX	Συσχέτιση με κλινικά αποτελέσματα
67	1 2 1	Gemcitabine - -	Mitomycin C + Gemcitabine Gemcitabine Gemcitabine	Ποσοστό αναστολής της καρκινικής ανάπτυξης >80%	Μερική ανταπόκριση
37	1	Gemcitabine	Mitomycin C + Cisplatin	Σταθεροποίηση της νόσου	Παρόμοια ανταπόκριση
38	16	-	Mitomycin C + Gemcitabine +Nab-paclitaxel	Σταθεροποίηση νόσου	Παρόμοια ανταπόκριση (14/16)
39	17	-	Temsirolimus	Υποχώρηση της νόσου (4/17)	Καμία αποτελεσματικότητα
40	14 (PancXenoBank)	-	Salirasib + Gemcitabine	Αναστολή της καρκινικής ανάπτυξης (2/14)	Σημαντική αποτελεσματικότητα

Πίνακας 2. Σύνοψη κυριότερων μελετών που χρησιμοποίησαν μοντέλα

ξеноμοσχευμάτων καρκίνου παγκρέατος

1.3.5. Πλεονεκτήματα των PDX

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα από τη χρήση μοντέλων ξеноμοσχευμάτων που προέρχονται από ασθενείς είναι ότι το PDX διατηρεί την κλωνική ετερογένεια που αντανάκλα την ακριβή ποικιλομορφία του αρχικού όγκου. Αντίθετα, τα ξеноμοσχεύματα που βασίζονται σε κυτταρική σειρά χαρακτηρίζονται από εξελικτική επιλογή και παρουσιάζουν περιορισμένη ετερογένεια που αυξάνει την απόσταση από τα χαρακτηριστικά του αρχικού όγκου [60]. Τα PDX αντιπροσωπεύουν τη βιολογική κατάσταση του γονικού

όγκου και διατηρούν τα βασικά χαρακτηριστικά του όγκου του ασθενούς, όπως η ιστολογική κατάσταση, το προφίλ μετάλλαξης, η δυναμική έκφρασης γονιδίων, η έκφραση πρωτεΐνης και οι βιοδείκτες όγκου. Επιπλέον, το PDX παραμένει βιολογικά σταθερό κατά τη διαδοχική διέλευση [61, 62]. Από αυτή την άποψη, αρκετές μελέτες καταδεικνύουν ότι τα μοντέλα PDX έχουν την ικανότητα να μιμούνται τη βιολογία του ανθρώπινου καρκίνου, να προβλέπουν την ανταπόκριση του ασθενούς στις θεραπείες και επομένως να προσφέρουν προοπτικές για εξατομικευμένη θεραπεία [63,64].

Οι όγκοι δεν αποτελούνται μόνο από καρκινικά κύτταρα. Είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πολλών άλλων παραγόντων και κυττάρων του οργάνου. Σύμφωνα με το λεξικό των όρων του καρκίνου του NCI, το μικροπεριβάλλον αποτελεί «τα φυσιολογικά κύτταρα, τα μόρια και τα αιμοφόρα αγγεία που περιβάλλουν και τροφοδοτούν ένα κύτταρο όγκου. Ένας όγκος μπορεί να αλλάξει το μικροπεριβάλλον του και το μικροπεριβάλλον μπορεί να επηρεάσει τον τρόπο με τον οποίο αναπτύσσεται και εξαπλώνεται ένας όγκος». [65]. Στον καρκίνο του παγκρέατος, το μικροπεριβάλλον αποτελείται κυρίως από ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, εξωκυτταρική μήτρα και πολλά άλλα δευτερεύοντα στοιχεία [66, 67]. Στο PDAC η πυκνή στρωματική ίνωση αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στη θεραπευτική παρέμβαση [68]. Σε αυτό το πλαίσιο, ένα σημαντικό βασικό πλεονέκτημα των PDX είναι ότι διατηρούν, σε κάποιο βαθμό, το μικροπεριβάλλον του ανθρώπινου όγκου, ειδικά για εμφυτεύματα στις πρώτες διόδους [69]. Μετά από επόμενα περάσματα, το ανθρώπινο στρώμα αντικαθίσταται τελικά από ποντικό, ωστόσο, ο ακριβής χρόνος που συμβαίνει αυτό πρέπει να διευκρινιστεί [70].

Ένα άλλο θεμελιώδες όφελος είναι ότι τα PDX έχουν χρησιμοποιηθεί για την προκλινική δοκιμή φαρμάκων, ώστε να ελεγχθούν τα βασικά χαρακτηριστικά των φαρμάκων, οι φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες, καθώς και η ασφάλεια, η αποτελεσματικότητα και η κατάλληλη δοσολογία για διαφορετικούς τύπους καρκίνου [71,72] προωθώντας με τον τρόπο αυτό την ανάπτυξη μίας ογκολογικής προσέγγισης βασισμένης στα PDX. Σε αυτό το πλαίσιο μεγάλη συσχέτιση έχει αναδειχθεί μεταξύ της φαρμακευτικής ανταπόκρισης στα μοντέλα και της κλινικής ανταπόκρισης στους ασθενείς, υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα ξενομοσχευμάτων αντικατοπτρίζουν το προφίλ

φαρμακευτικής ευαισθησίας του όγκου και διαθέτουν υψηλή προγνωστική αξία όσον αφορά την ανεύρεση αντικαρκινικών παραγόντων [73]. Επιπλέον, τα μοντέλα PDX είναι χρήσιμα εργαλεία για την αναγνώριση μηχανισμών ανθεκτικότητας έναντι των αντικαρκινικών θεραπειών [74]. Οι ασθενείς που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων θεραπειών συνήθως έχουν πολλαπλές μεταστατικές εστίες με κλωνική ετερογένεια και συνεπώς σχετίζονται με ενεργοποίηση διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Ερευνητές αποκάλυψαν ότι οι μηχανισμοί αντοχής στα PDX είναι όμοιοι με των ανθρώπινων δειγμάτων [75] και πως οι κλινικά ανθεκτικοί όγκοι παρουσίαζαν παρόμοια αντοχή όταν αναπτύσσονταν σε PDX [76]. Συνεπώς, τα μοντέλα PDX μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ανιχνευθούν ασθενείς ανθεκτικοί στη χημειοθεραπεία [77] και προεκτείνοντας το συλλογισμό, να προσδιοριστεί η συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας σε φάρμακα και γενετικές μεταλλάξεις.

Ένα πρόσθετο όφελος αποτελεί ότι όλοι οι ερευνητές χρειάζονται βιολογικά δείγματα σε υψηλές ποσότητες και τα μοντέλα PDX μπορούν να αποτελέσουν μία ανεξάντλητη πηγή καρκινικών κυττάρων για *in vivo* και *ex vivo* αξιολόγηση αντικαρκινικών φαρμάκων [78]. Τέλος, όσον αφορά τους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο, τα PDX μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη και μελέτη τους. Παρότι η υποδόρια εμφύτευση πιθανώς να αποτύχει να αποδώσει μεταστάσεις όμοιες με των ασθενών, τα ορθοτοπικά μοντέλα φαίνεται πως επιτρέπουν κάτι τέτοιο [79].

1.3.6. Περιορισμοί στη χρήση των PDX

Παρά τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν πιο πάνω τα μοντέλα PDX έχουν συγκεκριμένα μειονεκτήματα. Ένας βασικός περιορισμός είναι η ενδογενής δυσκολία ποσοτικοποίησης των μετρήσεων ως προς το ποσό του όγκου που εμφυτεύεται καθώς και η αξιολόγηση της κλωνικής ετερογένειας. Ένας άλλος περιορισμός είναι η μεγάλη ποικιλία ως προς τη μεθοδολογία και τα υλικά που χρησιμοποιούνται μεταξύ των διαφορετικών εργαστηρίων και ιδρυμάτων. Οι τεχνικές εμφύτευσης (υποδόρια και ορθοτοπική εμφύτευση) και τα διαφορετικά είδη ανοσοκατεσταλμένων ποντικών επηρεάζει σαφώς τα αποτελέσματα. Πράγματι, σύμφωνα με τον Brown και συνεργάτες [80], ο ρυθμός εμφύτευσης διέφερε σημαντικά μεταξύ των στελεχών ποντικών NOD/SCID και

nu/nu. Στις μελέτες που συμπεριλήφθηκαν τρεις διαφορετικές κατηγορίες ανοσοκατεσταλμένων ποντικών χρησιμοποιήθηκαν, τα nu/nu, NOD/SCID και NSG με αποτέλεσμα την αύξηση της μεθοδολογικής ετερογένειας, θέτοντας έτσι συγκεκριμένους περιορισμούς στα αποτελέσματα.

Η επιτυχής εμφύτευση των PDX δεν είναι πάντοτε δεδομένη και το ποσοστό αποτυχίας παραμένει υψηλό για κάποιους ιστολογικούς τύπους καρκίνου. Το ποσοστό εμφύτευσης για τα υποδόρια PDX είναι συνήθως χαμηλότερος από 20%, γεγονός που καταδεικνύει την αναγκαιότητα βελτίωσης των τεχνικών ώστε το ποσοστό επιτυχίας να ανέλθει στο 60–70% που αποτελεί το ελάχιστο όριο ώστε να μπορούν να εφαρμοστούν εξατομικευμένες θεραπευτικές στρατηγικές [81]. Άλλο σημαντικό θέμα που θα πρέπει να αξιολογηθεί είναι ο χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξη των PDX που κυμαίνεται συνήθως από 4 έως 8 μήνες, διάστημα απαγορευτικό για την εφαρμογή εξατομικευμένης θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο παγκρέατος [82]. Επιπλέον, η αντικατάσταση του ανθρώπινου καρκινικού μικροπεριβάλλοντος με εκείνο του ποντικού αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα, καθώς η δυναμική των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων που δοκιμάζονται πιθανώς να επηρεάζεται [83].

Η ανάπτυξη των PDX απαιτεί ένα μικρό ποσό βιολογικού υλικού και αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την υποαντιπροσώπευση της κλωνικής ετερογένειας του όγκου στο PDX. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μέσα στον πρωτοπαθή όγκο συνυπάρχουν πολυάριθμοι κλώνοι και συνεπώς η εξαίρεση ορισμένων στο PDX πιθανώς να οδηγεί σε μη ορθή απόδοση του γενετικού αποτυπώματος του πρωτοπαθούς όγκου. Για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός, δείγματα από διαφορετικά σημεία του πρωτοπαθούς όγκου μπορούν να αναμειχθούν πριν την έγχυση τους στο ζώο [84]. Ένα πλεονέκτημα των PDX όπως προαναφέρθηκε είναι ότι διατηρούν τη χημειοευαισθησία του πρωτοπαθούς όγκου, ωστόσο PDX προερχόμενα από όγκου χημειοανθεκτικούς δύναται να απωλέσουν την ανθεκτικότητά τους και να ξαναγίνουν χημειοευαίσθητα [85]. Αυτό το φαινόμενο στη διεθνή βιβλιογραφία αποκαλείται «drug holiday», φαινόμενο κατά το οποίο προκειμένου να επιτευχθεί η εμφύτευση, διακόπτεται η χορήγηση θεραπείας αμέσως μετά την έγχυση των καρκινικών κυττάρων στο ζώο. Κατά την απουσία της χορήγησης φαρμάκων κάποιοι μηχανισμοί ανοχής είναι αναστρέψιμοι, όπως στο μελάνωμα [86] και το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα [87]. Για το λόγο αυτό, στην περίπτωση

ανθεκτικών στη θεραπεία PDX, η θεραπεία θα πρέπει να άρχεται άμεσα μετά την εμφύτευση.

Ένας άλλος βασικός περιορισμός στη χρήση των μοντέλων PDX σχετίζεται με την ανάγκη της χρήσης ανοσοκατεσταλμένων ποντικών για την επιτυχή εμφύτευση και ανάπτυξη των όγκων. Τα συγκεκριμένα ποντίκια δε διαθέτουν εξειδικευμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία θα επέτρεπαν να απορριφθεί το ξενομόσχευμα καρκινικών κυττάρων. Ο ίδιος όμως μηχανισμός όμως έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορούν να δοκιμαστούν ανοσοθεραπευτικά φάρμακα που αξιοποιούν τα εν λόγω κύτταρα και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν [88, 89]. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην καρκινική ανάπτυξη και θεραπεία καταδεικνύεται από πολλές σύγχρονες μελέτες σχετιζόμενες με τη θέση της ανοσοθεραπείας στην αντικαρκινική θεραπεία [90]. Σε αυτό το πλαίσιο, τα μοντέλα PDX αδυνατούν να αποδώσουν τις πολύπλοκες διασυνδέσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, του στρώματος και του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος [91]. Για τον ίδιο λόγο, τα μοντέλα PDX που διαθέτουν στοιχεία του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος (αποκαλούμενα στη διεθνή βιβλιογραφία ως “humanized”) πρέπει να αναπτυχθούν ώστε να προχωρήσει περαιτέρω η προκλινική αξιολόγηση των αντικαρκινικών θεραπειών [87].

Μία στρατηγική για την παραγωγή τέτοιων ποντικών περιλαμβάνει τη μεταμόσχευση συγκεκριμένων κυττάρων του αίματος, των αποκαλούμενων total peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) από υγιείς ανθρώπινους δότες ή ασθενείς ή μέσω διάχυσης λεμφοκυττάρων διηθητικών στον καρκίνο (tumor-infiltrating lymphocytes; TILs) σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια. Μία δεύτερη τεχνική για την παραγωγή τέτοιου είδους ποντικών είναι μέσω της εμφύτευσης κυττάρων huCD34+ ληφθέντων από το μυελό των οστών, το ήπαρ ή το θύμο αδένά του δότη (αποκαλούμενο και ως μοντέλο NOD/SCID-hu BLT) [92]. Ωστόσο, αμφότερες οι μέθοδοι προκαλούν αντίδραση έναντι του ξενομοσχεύματος, αποκαλούμενη διεθνώς ως graft versus-host disease (GvHD), περιορίζοντας έτσι την αξία αυτών των μελετών [93, 94]. Εναλλακτικά, μία πρόσθετη μέθοδος περιλαμβάνει τη μεταμόσχευση CD34-θετικών ανθρώπινων αιμοποιητικών πολυδύναμων κυττάρων ή βλαστοκυττάρων [95].

Πλεονεκτήματα των PDX	Περιορισμοί των PDX
Διατήρηση των χαρακτηριστικών του πρωτοπαθούς όγκου και της κλωνικής ετερογένειας	Απουσία τυποποιημένων μεθόδων εμφύτευσης, λόγω της χρήσης ποικίλων τεχνικών και στελεχών ζωικών μοντέλων
Διατήρηση γενετικών και ιστολογικών χαρακτηριστικών του ασθενούς	Χαμηλά ποσοστά επιτυχούς εμφύτευσης σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία
Η ορθοτοπική μεταμόσχευση συντελεί σε τοπική ανάπτυξη όγκων και μεταστάσεων παρόμοιων με το μεταστατικό δυναμικό του ασθενούς	Αργή ανάπτυξη του όγκου σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (4-8 μήνες)
Εισαγωγή ανθρώπινου στρώματος του όγκου στα μοντέλα PDX	Αρνητική επίδραση στην ισχύ των φαρμάκων που στοχεύουν το στρώμα και τον όγκο, λόγω του ότι το ανθρώπινο στρώμα αντικαθίσταται από στρώμα ποντικού μετά από διαδοχικά περάσματα.
Συσχέτιση της απόκρισης στα PDX μοντέλα με την κλινική εικόνα των ασθενών, δίνοντας τη δυνατότητα για εξατομικευμένη θεραπεία	PDX προερχόμενα από ανθεκτικούς όγκους δύναται να απολέσουν την ανθεκτικότητα και να γίνουν εκ νέου χημειοευαίσθητοι
Απόδοση του προφίλ ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας του όγκου στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες εξατομικευμένα	Μικρό δείγμα όγκου πιθανώς να μην αποδίδει πλήρως την κλωνική ετερογένεια του όγκου
Απαιτείται μικρό δείγμα ιστού	Λόγω της απουσίας λειτουργικού ανοσοποιητικού συστήματος περιορίζεται ο αριθμός των θεραπευτικών παραγόντων που μπορούν να δοκιμαστούν

Πίνακας 3. Σύνοψη των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων χρήσης των PDX (Patient-derived xenografts) ως προκλινικών μοντέλων στην έρευνα για τη θεραπεία του καρκίνου

1.4.1. Τα χαρακτηριστικά και ο ρόλος των Ακουαπορινών

Οι Ακουαπορίνες (Aquaporins – AQP) αποτελούν μία οικογένεια πρωτεϊνών με λειτουργία διαύλων, που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και διευκολύνουν τη μετακίνηση ύδατος [96-98]. Ένα σύνολο 13 πρωτεϊνών (AQP1-12A, B) συμπεριλαμβάνονται στην οικογένεια AQP στο *homo sapiens* [96] [Πίνακας 3]. Παρότι η πλειοψηφία των AQP επιτρέπουν τη μετακίνηση ύδατος, συγκεκριμένες πρωτεΐνες (AQP3, AQP7, AQP9) επίσης διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη μεταφορά γλυκερόλης, οπότε καλούνται ακουαγλυκεροπορίνες [99]. Στο ίδιο πλαίσιο, όλες οι AQP έχουν συσχετιστεί με πρόσθετα χαρακτηριστικά και ιδιότητες. Για παράδειγμα, κάποιες διευκολύνουν τη δίοδο ιόντων, πέραν της μεταφοράς ύδατος [99].

Δομικά οι AQP αποτελούνται από έξι α-έλικες εμβυθισμένες στην κυτταρική μεμβράνη ως ομοτετραμερή [100] [Εικόνα 5]. Κάθε ένα από αυτά τα τέσσερα μονομερή περιέχει ένα μοναδικό πόρο, που λειτουργεί ως διάυλος

ύδατος [100], με τις αμινο- και καρβοξυ-τελικές περιοχές να στρέφονται προς την εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης [101,102]. Υπάρχουν πέντε βιοχημικές περιοχές (Α – Ε) που τοποθετούνται μεταξύ των α-ελίκων και ελίσσονται δια μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Δύο από αυτές τις περιοχές (Β, Ε) είναι υδρόφοβες, περιέχοντας ένα διακριτό μοριακό μοτίβο ασπαραγίνης-προλίνης-αλανίνης ("NPA motif") [103]. Αυτή η σύνθετη βιοχημική δομή επιτρέπει στις AQPs να αυξάνουν τη διαπερατότητα του ύδατος δια μέσω της κυτταρικής μεμβράνης [103].

Σύμβολο γονιδίου	Περιγραφή γονιδίου
AQP1	Aquaporin 1
AQP2	Aquaporin 2
AQP3	Aquaporin 3
AQP4	Aquaporin 4
AQP5	Aquaporin 5
AQP6	Aquaporin 6
AQP7	Aquaporin 7
AQP8	Aquaporin 8
AQP9	Aquaporin 9
AQP10	Aquaporin 10
AQP11	Aquaporin 11
AQP12A	Aquaporin 12A
AQP12B	Aquaporin 12B

Πίνακας 4. Σύνοψη των μελών της γονιδιακής οικογένειας των Ακουαπορινών (AQPs)

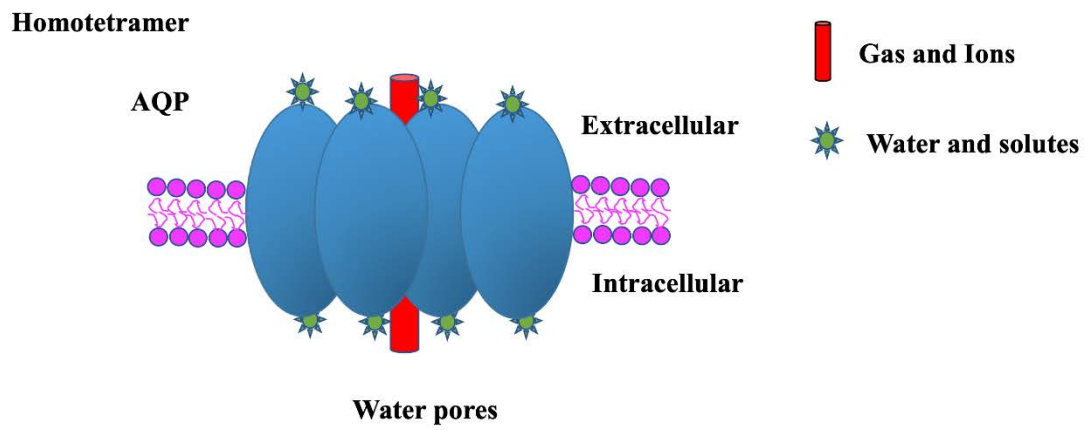
Η αποκάλυψη της πιθανής ύπαρξης των AQPs ξεκίνησε με την παρατήρηση της λειτουργικότητας της κυτταρικής μεμβράνης ως οσμωτικού φίλτρου που επιτρέπει τη μεταφορά ύδατος [104], το οποίο ήταν ευαίσθητο σε οργανικά στοιχεία, υποδηλώνοντας έτσι ότι η μετατόπιση του νερού επηρεαζόταν από την παρουσία ειδικού διαύλου [105]. Με βάση αυτά τα ευρήματα, νεότερες μελέτες έδειξαν πως συγκεκριμένες πρωτεΐνες με χαρακτηριστικά διαύλων 28 kilodaltons αγκυρωμένες στην κυτταρική μεμβράνη [106] αύξαναν την οσμωτικά καθοδηγούμενη μεταφορά νερού διαμέσω των κυτταρικών μεμβρανών [107]. Σε αυτό το πλαίσιο, η οικογένεια των πρωτεϊνών με λειτουργία διαύλου ύδατος θεωρήθηκε ότι διαδραματίζει μείζονα βιολογικό ρόλο και οι πρωτεΐνες έλαβαν το όνομα ακουαπορίνες (AQPs). Όλα τα μέλη της οικογένειας AQP μοιράζονται ομολογία με την οικογένεια εγγενών πρωτεϊνών της μεμβράνης (MIP), εφαρμόζοντας έτσι τον όρο Aquaporin και για τις πρωτεΐνες MIP [108]. Επί του παρόντος, έχουν αναγνωριστεί δεκατρείς AQP, οι οποίες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**. Όλες οι AQPs μοιράζονται ένα διακριτό αμινοξικό πρότυπο που παράγεται από μία αλληλουχία ασπαραγίνης-προλίνης-αλανίνης, που αναφέρεται ως μοτίβο NPA [109].

Με βάση την ικανότητά τους να διευκολύνουν τη μεταφορά γλυκερίνης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, οι AQPs διακρίνονται σε ακουαπορίνες (AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP8), υδατογλυκερο-πορίνες (AQP3, AQP6, AQP7, AQP9, AQP10) και υπερ-ακουαπορίνες (AQP11, AQP12) [110-117]. Οι AQP11 και AQP12 αποτελούν τη διακριτή ομάδα των υπερ-ακουαπορινών λόγω της χαμηλής ομολογίας τους με τις άλλες δύο ομάδες [118]. Η πλειοψηφία των AQPs (AQP1, AQP2, AQP3, AQP5, AQP7, AQP8, AQP9, AQP10, AQP11) είναι ευαίσθητες στο HgCl₂ [119,120]. Από την άλλη πλευρά, η μόνη AQP που είναι μη ευαίσθητη στον υδράργυρο είναι η AQP4 [121].

Δομικά οι AQPs αποτελούνται από έξι διαμεμβρανικές υπομονάδες με κυτοσολικές αμινοτελικές και καρβοξυτελικές περιοχές. Η πρώτη ομάδα NPA βρίσκεται στην περιοχή του ενδοκυτταρικού βρόχου (B-βρόχος) μεταξύ των τμημάτων 2 και 3, ενώ η δεύτερη περιοχή NPA βρίσκεται εντός του εξωκυτταρικού βρόχου (E-loop) μεταξύ των τμημάτων 5 και 6. Η αλληλεπίδραση αυτών των δύο βρόχων (βρόχοι B και E) συντελεί στο

σχηματισμό μίας μονομερούς μονάδας με έναν ενσωματωμένο υδατοδιαπερατό πόρο [122]. Κάθε AQP αποτελείται από τέσσερα τέτοια μονομερή, δημιουργώντας έτσι ένα ομοτετραμερές [123, 124] (**Εικόνα 5**). Η ικανότητα των AQPs να λειτουργούν ως διάυλοι ύδατος ρυθμίζεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [125, 126]. Τέλος, εκτός από τον έλεγχο μέσω της ρύθμισης του δυναμικού των διαύλων, η ρύθμιση της αφθονίας των διαύλων στην πλασμοκυτταρική μεμβράνη αποτελεί έναν πρόσθετο ρυθμιστικό μηχανισμό [127].

Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τις ιδιότητες διαύλου των AQPs και τη συμμετοχή τους στην κυτταρική ομοιόσταση, καθώς προάγουν τη μετατόπιση πρόσθετων διαλυμένων ουσιών εκτός από το νερό. Σε αυτό το πλαίσιο, οι υδατογλυκεροπορίνες μεσολαβούν στη μετατόπιση της γλυκερίνης, ρυθμίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τον μεταβολισμό. Αυτά τα χαρακτηριστικά καταδεικνύουν τον πιθανό θεραπευτικό ρόλο της υποοικογένειας υδατογλυκεροπορινών στον καρκίνο και σε άλλες καταστάσεις [128]. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι AQPs μεσολαβούν στη μετατόπιση της γλυκερίνης, εμπλέκονται επίσης στην ισορροπία των λιπιδίων και στις μεταβολικές ασθένειες [129]. Επιπρόσθετα, η αναγνώριση των AQPs σε εξωσώματα του σιέλου και των ούρων παρέχει στοιχεία για την πιθανή χρήση τους ως βιοδεικτών για τη διάγνωση νεφρικής και στοματικής νόσου. Παρά τα ευρήματα που υποδηλώνουν τον πιθανό θεραπευτικό ρόλο των AQPs, υπάρχουν ακόμη πολλές προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν [130].



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της μοριακής δομής των Ακουαπορινών (AQPs) στην κυτταρική μεμβράνη. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [70]

1.4.2. Ο ρόλος των AQPs σε καρκίνους του γαστρεντερικού

Τα τελευταία χρόνια, η διεθνής βιβλιογραφία προσφέρει ολοένα αυξανόμενα δεδομένα σχετικά με το ρόλο των AQPs στην παθοβιολογία διαφόρων κακοηθειών του γαστρεντερικού. Εδώ, θα συνοψίσουμε τον ρόλο τους στη βιολογία κακοηθειών του οισοφάγου, του στομάχου, του παχέος εντέρου, του ήπατος και του παγκρέατος.

Καρκίνος οισοφάγου

Ο καρκίνος οισοφάγου (ΚΟ) σχετίζεται με κακή πρόγνωση και περίπου 15.590 θανάτους ετησίως [131]. Εκτιμάται ότι ο επιπολασμός του ΚΟ αυξάνεται σταθερά παγκοσμίως, με τον μεγαλύτερο επιπολασμό να αναφέρεται στην Ανατολική Αφρική και την Ανατολική Ασία [132]. Η ύπαρξη ιστορικού γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης του ασθενούς (ΓΟΠΝ) συσχετίζεται ισχυρά με τον οισοφάγο Barrett και τέλος με τον ΚΟ [133]. Ο ρόλος των AQPs στον ΚΟ είναι ακόμα υπό έρευνα. Ωστόσο, φαίνεται ότι οι AQP3 και AQP5 εμπλέκονται στη βιολογία του ΚΟ [134, 135].

Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία, το επίπεδο έκφρασης της AQP3 είναι υψηλότερο στον ΚΟ σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό [134]. Στο ίδιο πλαίσιο, έχει αποδειχθεί ότι η αυξημένη έκφραση της AQP3 μεσολαβεί στην κυτταρική ανάπτυξη και στην κυτταρική προσκόλληση του ΚΟ μέσω της οδού σηματοδότησης Focal adhesion kinase - Mitogen-activated protein kinase (FAK-MAPK) [134]. Το γονίδιο AQP5 βρέθηκε επίσης υπερέκφρασμένο σε δείγματα ιστού ΚΟ σε σύγκριση με φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς [133]. Η αναστολή του γονιδίου AQP5 (χρησιμοποιώντας siRNA) ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ενίσχυσε τη διακοπή και την απόπτωση σταδίου G1-S του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [135], που υποδεικνύεται από σημαντική αύξηση στο p21, με ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης mRNA του CCND1. Η υπερέκφραση των AQP3 και AQP5 συσχετίστηκε με μεγαλύτερη κυτταρική εισβολή, μετάσταση, μαζί με υψηλότερο ποσοστό θετικών λεμφαδένων [133]. Τέλος, οι AQP3 και AQP5 έχουν συσχετιστεί με τη συνολική επιβίωση (OS) και την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS), επομένως προτείνονται ως προγνωστικοί παράγοντες [64]. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι AQP3 και AQP5 μπορεί να είναι πιθανοί βιοδείκτες ή/και στόχοι φαρμάκων για ασθενείς με ΚΟ.

Καρκίνος στομάχου

Ο καρκίνος στομάχου (ΚΣ) είναι μία από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας που σχετίζεται με τον καρκίνο παγκοσμίως [136]. Επί του παρόντος, υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία που αξιολογούν τον ρόλο των AQPs στην παθογένεση του ΚΣ. Χρησιμοποιώντας τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), οι Shen et al. [136] αξιολόγησαν το προφίλ έκφρασης της οικογένειας AQP σε ΚΣ και φυσιολογικό γαστρικό ιστό. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους, οι AQP3, AQP4 και AQP5 εκφράστηκαν διαφορετικά σε ΚΣ σε σύγκριση με τον φυσιολογικό γαστρικό ιστό [136]. Επιπλέον, η AQP3 βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε μη διαφοροποιημένους ιστολογικά τύπους ΚΣ σε σύγκριση με καλά διαφοροποιημένους και συσχετίστηκε θετικά με την κυτταρική ανάπτυξη, εισβολή, εξέλιξη και μετάσταση μέσω της επαγωγής της οδού σηματοδότησης του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) [136, 137, 138]. Σε επίπεδο μετάφρασης, η AQP3 αλληλεπιδρά με το microRNA miRNA-874 [139]. Το miRNA-874 ρυθμίζει το επίπεδο έκφρασης της AQP3 και συγκεκριμένα, μειώνει την AQP3 στο ΚΣ σε σύγκριση με τον υγιή παρακείμενο γαστρικό ιστό [139]. Μέσω αυτής της καθοδικής ρύθμισης, το miRNA-874 καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, σχηματισμό, εισβολή και μετανάστευση από την υποέκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP) -1, -2 και -9, πιθανώς μέσω της οδού σηματοδότησης PI3K/AKT [140]. Το MiRNA-874 ρυθμίζει επίσης την αποπτωτική οδό του Beclin-2 (Bcl-2) [140].

Επιπρόσθετα, η AQP3 εμπλέκεται στη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ΚΣ μέσω της οδού c-Met [141]. Επιπλέον, η AQP3 σχετίζεται με την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) στον ΚΣ, καταστέλλοντας την έκφραση της Cadherin-1 (CDH1 ή E-cadherin) [142]. Στην πραγματικότητα, η έκφραση της AQP3 ρυθμίζεται από το μονοπάτι της κινάσης ERK που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων [143]. Αυτό το εύρημα προτείνει ότι η AQP3 εμπλέκεται στην ανάπτυξη και τη μετάσταση του ΚΣ [143]. Η τυροσινό-πρωτεϊνική κινάση Met (c-Met) ρυθμίζει το επίπεδο έκφρασης της AQP3 στον ΚΣ μέσω της οδού σηματοδότησης ERK ενώ προάγει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του ΚΣ [143].

Ένα άλλο μέλος της οικογένειας AQP που έχει συσχετιστεί με την παθογένεση του ΚΣ είναι η AQP5. Σύμφωνα με μια μελέτη [144], η ανοδική

ρύθμιση της AQP5 εμπλέκεται στην ανάπτυξη, τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση των κυττάρων του ΚΣ [144]. Η υπερέκφραση της AQP5 σε ΚΣ σε σύγκριση με υγιή γαστρικό ιστό επικυρώθηκε με πειράματα χρησιμοποιώντας και τις δύο κυτταρικές σειρές (MKN45, MKN28 και AGS) [144], μαζί με τον καρκινικό ιστό που αφαιρέθηκε από ασθενείς [145]. Αυτά τα χαρακτηριστικά των AQP3 και AQP5 υποδηλώνουν τον πιθανό ρόλο τους ως βιοδεικτών για ΚΣ. Περαιτέρω μελέτες που αξιολογούν τη συσχέτισή τους με την επιβίωση των ασθενών θα αποκαλύψουν περαιτέρω την πιθανή προγνωστική τους σημασία στον ΚΣ.

Καρκίνος παχέος εντέρου

Ο κολο-ορθικός καρκίνος (CRC) είναι μια συχνή κακοήθεια και μια από τις πιο κοινές αιτίες θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο παγκοσμίως [146]. Πολλοί παράγοντες έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη κολο-ορθικού καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών απορρυθμίσεων και της χρόνιας φλεγμονής [147, 148, 149]. Παρά την πρόοδο στη θεραπεία, η νόσος εξακολουθεί να σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση [150, 151]. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αξιολογήσει την επίπτωση των AQP στη βιολογία και εξέλιξη του CRC.

Παρά την έκφραση των AQP1, AQP3, AQP5 και AQP8 σε φυσιολογικό ορθοκολικό ιστό, το προφίλ έκφρασής τους είναι εν πολλοίς ανεπαρκώς μελετημένο και νέες ερευνητικές προσπάθειες απαιτούνται. Οι AQP1 και AQP3 υπερεκφράζονται στο CRC [152, 153, 154], ενώ οι AQP6 και AQP9 υπερεκφράζονται στον καρκίνο του ορθού (RC) ειδικά [155]. Σύμφωνα με αποτελέσματα από μελέτες *in vitro*, η AQP1 έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη των κυττάρων CRC, τη μετανάστευση και την εξέλιξη του καρκίνου [156]. Με βάση αυτή την παρατήρηση έχουν προταθεί ορισμένες θεραπείες που στοχεύουν ειδικά το δίαυλο AQP1. Τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σχετικά με τη χρήση ακεταζολαμίδης [157]. Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για την αξιολόγηση της πιθανής θεραπευτικής αξίας της στόχευσης της AQP1 στον περιορισμό της ανάπτυξης του κολο-ορθικού καρκίνου.

Η AQP3 έχει επίσης βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στο CRC και συσχετίζεται ισχυρά με την κυτταρική ανάπτυξη και μετανάστευση μέσω της

οδού PI3K/Akt που ρυθμίζεται με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) [153]. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην αξιολόγηση της πιθανής χρήσης του CuSO₄, ενός αναστολέα της AQP3, στη στρατηγική θεραπείας του CRC. Αν και το CuSO₄ ανέστειλε τη μετανάστευση του CRC ενεργοποιώντας την οδό EGF, η επίδρασή του στην έκφραση του AQP3 στο CRC δεν ήταν σημαντική [153]. Επιπλέον, η υπερέκφραση της AQP3 συσχετίστηκε με υψηλότερο ποσοστό θετικών λεμφαδένων σε συνδυασμό με μεγαλύτερη διαφοροποίηση [153]. Μια άλλη μελέτη [155] έδειξε ότι η έκφραση της AQP3 ήταν χαμηλότερη στον ιστό CRC μετά από ακτινοθεραπεία. Έχουν αναφερθεί πρόσθετα στοιχεία σχετικά με τον χαμηλότερο βαθμό διαφοροποίησης και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις που σχετίζονται με αυξημένο επίπεδο έκφρασης της AQP3 [153].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η AQP5 βρέθηκε υπερεκφρασμένη σε CRC [158]. Αυτή η ανοδική ρύθμιση της AQP5 έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη των κυττάρων CRC, τη μετανάστευση, τη μετάσταση και τη διαφοροποίηση [158]. Επιπλέον, η AQP5 σχετίζεται με την φαρμακευτική αντοχή των κυττάρων CRC μέσω της αναστολής της οδού MAPK AQP5-p38 [159]. Όπως μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα, η αποσιώπηση της AQP5 μπορεί να είναι ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος για τη διαχείριση της αντοχής στα φάρμακα σε ασθενείς με CRC.

Παγκρεατικός καρκίνος

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις για τη συμμετοχή των AQPs στον καρκίνο του παγκρέατος. Αρχικά, οι AQP1 και AQP5 εκφράζονται φυσιολογικά στους πόρους του φυσιολογικού παγκρέατος, με αποτέλεσμα να εμπλέκονται στη συγκέντρωση των παγκρεατικών εκκρίσεων στο εγγύς τμήμα του παγκρεατικού πόρου [160]. Δεδομένα από ανοσοϊστοχημεία προτείνουν ότι οι AQP1 και AQP5 γειτνιάζουν με τον CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) που επίσης εμπλέκεται καθοριστικά στην εκκριτική λειτουργία του παγκρέατος [160]. Ακόμη, σύμφωνα με άλλα *in vitro* πειράματα, η AQP1 υποεκφράζεται σε κυτταρικές σειρές καρκίνου παγκρέατος [160]. Παρά τη σημασία τους ωστόσο οι AQPs μέχρι την έναρξη της διατριβής δεν είχαν μελετηθεί σε βάθος ως προς την εμπλοκή τους στο καρκίνο του παγκρέατος.

1.4.3. Μελλοντικές προοπτικές στη χρήση των Ακουαπορινών (AQPs)

Λαμβάνοντας τα πιο άνω αναφερθέντα υπόψιν, οι AQP διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στην ασθένεια. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός πίσω από τη μεταφορά του διαμεμβρανικού υγρού, μαζί με τις ενδοκυτταρικές συνδέσεις, προκειμένου να κατανοηθεί πλήρως ο βιολογικός τους ρόλος σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Τα στοιχεία που συνοψίστηκαν και παρουσιάστηκαν στο παρόν κεφάλαιο αποκάλυψαν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης ορισμένων AQP ως βιοδεικτών ή προγνωστικών δεικτών σε διάφορες ασθένειες. Παρόλα αυτά, παρείχε επίσης την προοπτική πιθανών θεραπειών στόχευσης AQP, όπως αναστολείς στόχευσης AQP, μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για AQP, ακόμη και μεταφορά γονιδίου AQP [161]. Η αποκάλυψη των λειτουργιών AQP και των ιδιοτήτων πύλης είναι εξαιρετικά σημαντική προκειμένου να εντοπιστεί η συμβολή των AQP στην κυτταρική ομοιόσταση και την παθολογική απορρύθμιση, αποκαλύπτοντας έτσι νέους πιθανούς βιοδείκτες και θεραπείες ενάντια σε μερικές από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της δημόσιας υγείας μας, όπως ο καρκίνος του παγκρέατος.

1.5. Άλλοι πιθανοί βιοδείκτες

Είναι γνωστό ότι η καρκινική ανάπτυξη, διήθηση και μετάσταση βασίζονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου και τον κυτταρικό μεταβολισμό [162]. Οι Διακυττάριοι Διάλυτοι Χλωρίου (Chloride intracellular channels - CLICs) αποτελούν μία οικογένεια από διαύλους ιόντων που παρουσιάζουν υπερέκφραση σε διάφορες μορφές καρκίνου [163,164] [Πίνακας 3]. Παρότι υπήρχε μεγάλο έλλειμμα δεδομένων για το ρόλο τους στον καρκίνο του παγκρέατος στην έναρξη της διατριβής, είχε φανεί ότι συγκεκριμένα οι CLIC1, CLIC3 και CLIC4 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο και συγκεκριμένα στην ανάπτυξη και την επιθετικότητα του όγκου, καθώς και στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση [165]. Αυτά τα δεδομένα μας ώθησαν να μελετήσουμε αυτή την οικογένεια γονιδίων.

**Σύμβολο
γονιδίου**

Περιγραφή γονιδίου

CLIC1	Chloride Intracellular Channel 1
CLIC2	Chloride Intracellular Channel 2
CLIC3	Chloride Intracellular Channel 3
CLIC4	Chloride Intracellular Channel 4
CLIC5	Chloride Intracellular Channel 5
CLIC6	Chloride Intracellular Channel 6

Πίνακας 5. Σύνοψη των μελών της γονιδιακής οικογένειας των Διακυττάριων Διαύλων Χλωρίου (CLICs)

Από την άλλη μεριά, η οικογένεια γονιδίων BCL-2 μεταφράζει πρωτεΐνες που είναι χαρακτηριστικές για την εμπλοκή τους στη διαδικασία της απόπτωσης [166,167]. Τα γονίδια BAX και BAK αποτελούν τα δύο κύρια προ-αποπτωτικά μέλη που απαιτούνται για τα μονοπάτια της απόπτωσης [166], ενώ οι BCL2, BCL-xL (gene/transcript name BCL2L1), MCL1, BCL2A1 και BCL-W σχετίζονται με αντι-αποπτωτικές και προ-αποπτωτικές διεργασίες προωθώντας την κυτταρική επιβίωση [168]. Η ισορροπία μεταξύ της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών και προ-αποπτωτικών μελών τελικά καθορίζει αν ένα κύτταρο επιβιώνει ή πεθαίνει. Αυτά τα χαρακτηριστικά, καθιστούν τα μέλη αυτής της γονιδιακής οικογένειας σημαντικά για τη βιολογία του καρκίνου. Παρά τη σημασία τους όμως, υπήρχαν και σε αυτή την περίπτωση ελάχιστα δεδομένα στην έναρξη της διατριβής, για τον ρόλο τους στον καρκίνο του παγκρέατος.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Έχει προταθεί πως τα μοντέλα PDX μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών. Ωστόσο, η συντριπτική πλειοψηφία των διαθέσιμων δεδομένων στη διεθνή βιβλιογραφία κατά την έναρξη εκπόνησης της διατριβής αφορούσε υπόδορια μοντέλα PDX για τον καρκίνο του παγκρέατος και όχι ορθοτοπικά που προσφέρουν σαφώς μεγαλύτερη ομοιότητα με το μικροπεριβάλλον όγκου του ασθενούς. Συνεπώς, κρίθηκε απαραίτητο να αναπτυχθεί ένα ορθοτοπικό μοντέλο PDX που να αντιμετωπίζει τους περιορισμούς του υποδόριου μοντέλου και να επιτρέπει όσο το δυνατόν πιο πιστή απόδοση του όγκου του ασθενούς στο πλαίσιο της ιατρικής ακριβείας (precision medicine).

Οι στόχοι της παρούσας διατριβής που τέθηκαν κατά την έναρξη εκπόνησής της ήταν οι ακόλουθοι:

1. Δημιουργία βιοτράπεζας καρκίνου παγκρέατος
2. Ανάπτυξη και τυποποίηση ορθοτοπικού μοντέλου PDX καρκίνου παγκρέατος
3. Εντοπισμός νέων βιοδεικτών για τον καρκίνο του παγκρέατος
4. Διερεύνηση του πιθανού ρόλου των Ακουαπορινών στην παθολογία του καρκίνου του παγκρέατος και δοκιμή τους σε μοντέλο PDX.

2.2. Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1. Στρατηγική υλοποίησης της διατριβής

Η παρούσα διατριβή αφορά ένα πεδίο, το οποίο κατά την έναρξη εκπόνησής της ήταν εν πολλοίς παρθένο. Συνεπώς, βασιστήκαμε για την εκπόνησή της σε ένα μοντέλο PDSA (Plan – Do – Study – Act) [Εικόνα 6]. Συγκεκριμένα, αρχικά σε κάθε στάδιο προηγείται ο σχεδιασμός των πειραμάτων και έπειτα η πραγματοποίησή τους, η μελέτη των αποτελεσμάτων και τέλος η αξιοποίησή τους για να προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα. Για την εκπόνηση της διατριβής ελήφθη άδεια από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Π.Γ.Ν.Λάρισας (Αριθμός πρωτοκόλλου: 20053/26-4-17). Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν ζωικά μοντέλα, συγκεκριμένα ποντίκια. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την ελληνική και ευρωπαϊκή Νομοθεσία περί των πειραμάτων με ζώα και οι απαραίτητες εγκρίσεις ελήφθησαν από τον οργανισμό IACUC και τις ελληνικές αρχές (Αριθμός άδειας 5542/228006).



Εικόνα 6. Διάγραμμα πλάνου εκπόνησης διατριβής PDSA.

2.2.2. Ανάπτυξη βιοτράπεζας καρκίνου παγκρέατος

Δείγματα συνελέγησαν το διάστημα 2017-2019 από τη Χειρουργική Κλινική του Π.Γ.Ν. Λάρισας. Συγκεκριμένα, συμπεριλήφθηκαν ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργείο παγκρέατος για καρκίνο από την ομάδα του Καθηγητή κυρίου Δ. Ζαχαρούλη. Μόλις πραγματοποιούνταν η εξαίρεση του παρασκευάσματος στο χειρουργείο, αυτό μεταφερόταν νωπό στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, όπου εξειδικευμένο προσωπικό αφαιρούσε τμήμα του όγκου και τμήμα φυσιολογικού παγκρεατικού ιστού υπό στείρες συνθήκες. Οι συγκεκριμένοι ιστοί στη συνέχεια μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, όπου ένα τμήμα του όγκου αποθηκευόταν σε φορμαλίνη, ένα τμήμα σε κρυοσυντήρηση στους -80C και ένα τμήμα υφίστατο απευθείας κατεργασία για ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών.

2.2.3. Ανάπτυξη και τυποποίηση ορθοτοπικού μοντέλου PDX

Αρσενικά nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) (NOD.Cg-Prkdc^{scid}/J, JAX stock #001303), NOD/SCIDgamma (NSG, NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, JAX stock #005557) και RAG-1 deficient (RAG, B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J, JAX stock #002216) ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα. Αυτά τα τρία μοντέλα ζώων χαρακτηρίζονται από διαφορετικά επίπεδα ανοσοανεπάρκειας, με τα NSG να θεωρούνται ως τα ποντίκια με το μεγαλύτερο βαθμό ανοσοανεπάρκειας. Συγκεκριμένα, τα ποντίκια NOD/SCID είναι ομόζυγα για τη μετάλλαξη Prkdc^{scid} και χαρακτηρίζονται από απουσία λειτουργικών T και B κυττάρων, καθώς και ορισμένων λειτουργιών των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killers – NK) [169].

Το στέλεχος ποντικών NSG αναπτύχθηκε από τη διασταύρωση θηλυκών ποντικών NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J με αρσενικά ποντίκια φέροντα το αλληλίο X-linked B6.129S4-Il2rg^{tm1Wjl}/J, και συνεπώς φέροντας δύο μεταλλάξεις στο NOD/ShiLtJ γενετικό τους υπόβαθρο, συντελώντας σε σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (severe combined immune deficiency-scid) και μία πλήρη απουσία του υποδοχέα IL2 (IL2 receptor common gamma chain - IL2rgnull). Η μετάλλαξη scid εντοπίζεται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο επιδιόρθωσης του DNA Prkdc και καθιστά τα ποντίκια ανεπαρκή σε B και T λεμφοκύτταρα. Η

μετάλλαξη IL2rgnull αποτρέπει τη σηματοδότηση των κυτοκινών της οικογένειας των gamma common chain ιντερλευκινών (IL2, IL15, IL17, IL21, κ.α.), οδηγώντας σε ανεπάρκεια λειτουργικών κυττάρων NK [170]. Τέλος, το στέλεχος ποντικών RAG-1 είναι ομόζυγο για τη μετάλλαξη Rag1tm1Mom και δεν παράγει ώριμα T και B κύτταρα, αλλά έχει πλήρως λειτουργικά NK, λόγω της αδυναμίας να γίνει ανασυνδυασμός V(D)J [171].

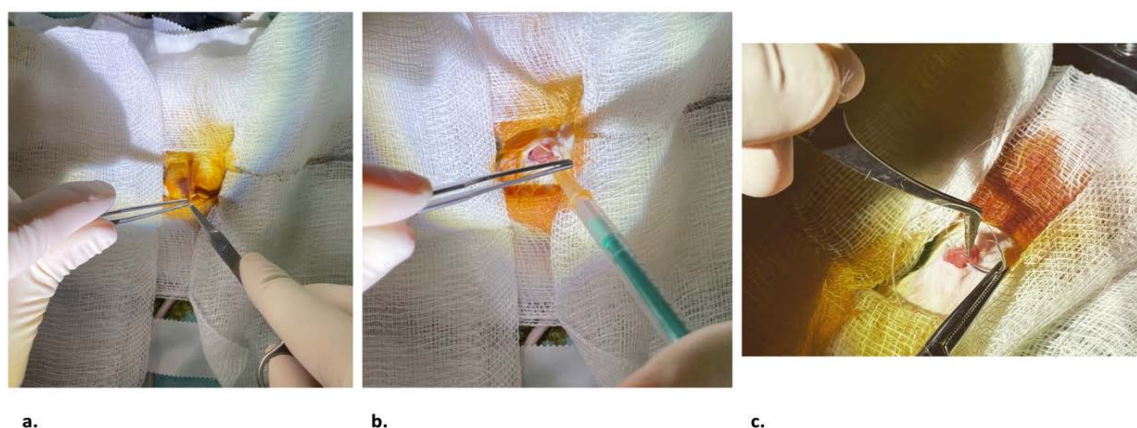
Όλα τα ποντίκια ήταν ηλικίας 6-8 εβδομάδων, φιλοξενούνταν σε περιβάλλον ελεύθερο παθογόνων υπό ρυθμιζόμενες συνθήκες φωτός (κύκλοι 12 ωρών), υγρασίας (~50-60%) και θερμοκρασίας (20-22°C), ενώ η τροφή και το νερό παρέχονταν *ad libitum*. Ο χειρισμός και η πραγματοποίηση των πειραμάτων στα ζώα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία (ΠΔ 56/2013 και Circular 2215/117550/2013), καθώς και σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2013/63/EU) υπό την αιγίδα πρωτοκόλλου εγκεκριμένου από τον οργανισμό IACUC και τις ελληνικές αρχές (Αριθμός άδειας 5542/228006).

2.2.3.1. Εξαίρεση του όγκου και χειρισμός των κυττάρων

Οι χειρουργικά εξαιρεσιμοι όγκοι που ελήφθησαν από το Παθολογοανατομικό εργαστήριο μεταφέρονταν σε τριβλία petri 60 mm, υφίσταντο λουτρό με PBS 1X και τεμαχίζονταν με τη χρήση αποστειρωμένων νυστεριών για τη λήψη τεμαχίων μεγέθους ~1-3 mm³. Τα τεμάχια του όγκου υφίσταντο περαιτέρω ενζυματική κατεργασία σε διάλυμα ενζυματικής λύσης (tissue dissociation solution - TDS) που περιέχει ένα μίγμα από Υαλουρονιδάση, Κολλαγονάση IV και DNAάση I σε HBSS με 10% FBS. Τα δείγματα παρέμεναν στους 37°C για 20-30 λεπτά (1 ml/100 g ιστού). Για να διασφαλιστεί ότι ένα ισοδύναμος αριθμός κυττάρων εγχύονταν σε κάθε ποντίκι και να ελαχιστοποιηθεί η ετερογένεια ως προς το μέγεθος του όγκου, τα δείγματα του όγκου είτε διαλύονταν και φιλτράρονταν με τη χρήση ενός 100 μm κυτταρικού strainer ή ωθούνταν να περάσουν μέσω μίας βελόνας σύριγγας διαμέτρου 16G. Τα κύτταρα στη συνέχεια υφίσταντο φυγοκέντρωση (1,400 στροφές/λεπτό, 10 λεπτά), ξεπλένονταν με PBS 1X, επαναφυγοκεντρούνταν σε διάλυμα RPMI, αναμιγνύονταν με Matrigel[®] Matrix και τελικά εγχύονταν ορθοτοπικά στο πάγκρεας των ποντικών.

2.2.3.2. Ορθοτοπική εμφύτευση των κυττάρων του όγκου

Για την ανάπτυξη των ορθοτοπικών ξενομοσχευμάτων, τα ποντίκια υποβάλλονταν σε γενική αναισθησία εισπνέοντας 2% ισοφλουράνιο σε μίγμα οξυγόνου 100%. Πριν την έναρξη της επέμβασης, πραγματοποιούνταν δοκιμασία των ποντικών ως προς το επίπεδο της αναισθησίας. Έπειτα, πραγματοποιούνταν αριστερή πλάγια τομή (1 cm) και έπειτα διάνοιξη της κοιλίας σε στρώματα (δέρμα, υποδόριο, περιτόναιο). Το πάγκρεας εντοπιζόταν και κινητοποιούνταν [Εικόνα 7]. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν έγχυση 10 μl διαλύματος Matrigel όπου περιλαμβάνονταν τεμάχια καρκινικού ιστού οβελιαία στο πάγκρεας με κατεύθυνση από την ουρά προς την κεφαλή [Εικόνα 7]. Ακολουθεί κλείσιμο της κοιλίας σε στρώματα (περιτόναιο, δέρμα). Η συρραφή του περιτοναίου πραγματοποιούνταν με τη χρήση συνεχών ραμμάτων 4-0 polyglycolic acid rapid, ενώ η σύγκλιση του δέρματος πραγματοποιούνταν με clips δέρματος. Τέλος, χορηγούνταν υποδορίως 10 μl αναλγησίας. Στη



Εικόνα 7. Συνοπτικά τα στάδια της εμφύτευσης των ξενομοσχευμάτων. **a.** Διάνοιξη περιτοναίου, **b.** ορθοτοπική έγχυση των PDX στο πάγκρεας, αφού προηγουμένως έχει κινητοποιηθεί, **c.** συρραφή περιτοναίου. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [71]

συνέχεια, τα ποντίκια τοποθετούνταν σε θερμικούς θαλάμους για αναζωογόνηση προτού μεταφερθούν πίσω στις εγκαταστάσεις των ζώων. Μόλις τα ζώα ανάρρωναν, μεταφέρονταν στις ζωικές εγκαταστάσεις και παρακολουθούνταν καθημερινά για σημεία πόνου ή δυσφορίας. Προς μείωση του μετεγχειρητικού πόνου χορηγούνταν meloxicam υποδορίως. Επίσης, τα ζώα παρακολουθούνταν καθημερινά ψηλαφητικά για τον εντοπισμό πιθανών αναπτυγμένων μεταστάσεων στην αριστερά πλάγια κοιλία. Εφόσον, ψηλαφούνταν όγκοι τα ζώα οδηγούνταν σε ευθανασία και οι όγκοι εξαιρούνταν, μετρούνταν σε διαστάσεις και ζυγίζονταν.

2.3. Στατιστική ανάλυση

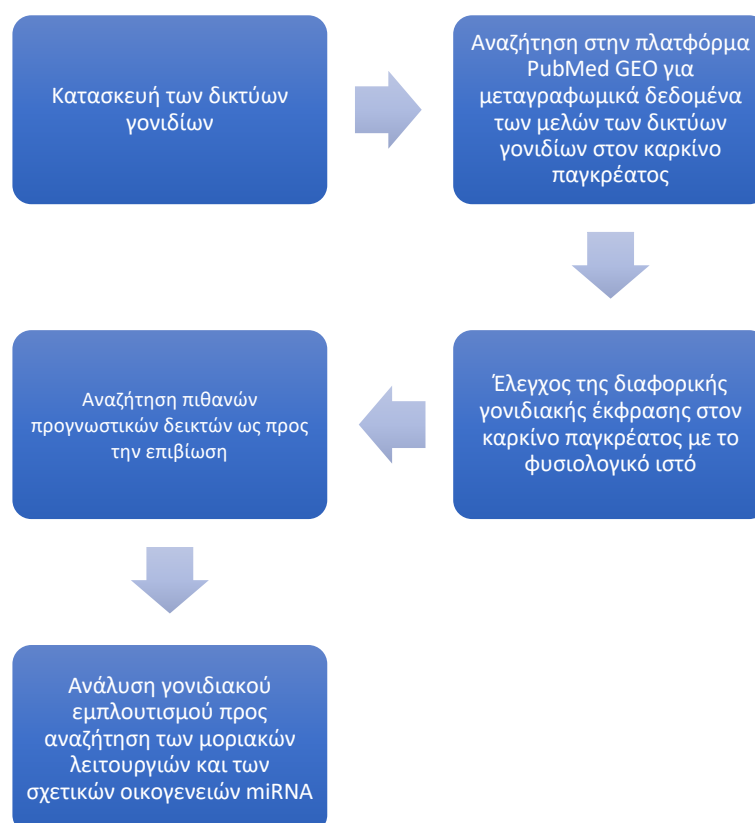
Για τη σύγκριση των κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 . Η σύγκριση των συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία two-tailed unpaired t-test και Mann-Whitney U-test για τα μη παραμετρικά δεδομένα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kruskal-Wallis για μη παραμετρική σύγκριση των αποτελεσμάτων σχετικά με τα ποντίκια NOD/SCID, NSG και RAG. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν $p \leq 0.05$. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση το λογισμικού Prism Graphpad 9.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.4. Αναζήτηση βιοδεικτών

Η αναζήτηση βιοδεικτών βασίστηκε σε *in silico* μεθόδους που θα περιγραφούν παρακάτω.

2.4.1. Επιλογή των προς εξέταση οικογενειών γονιδίων και κατασκευή των δικτύων τους

Επιλέξαμε προς εξέταση τρεις οικογένειες γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου, αλλά δεν έχουν διερευνηθεί ιδιαίτερα στον καρκίνο του παγκρέατος: 1) Aquaporins (AQPs), 2) Chloride Intracellular Channels (CLICs), 2) B-cell lymphoma 2 (BCL-2). Στην Εικόνα 8 παρουσιάζονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν στο συγκεκριμένο στάδιο της διατριβής.



Εικόνα 8. Διάγραμμα ροής που παρουσιάζει τα βήματα που ακολουθήθηκαν προς αναζήτηση βιοδεικτών για τον καρκίνο του παγκρέατος

Για κάθε οικογένεια γονιδίων σχηματίστηκαν τα δίκτυα σχετιζόμενων γονιδίων (interactomes) που εμπλέκονται στον καρκίνο του παγκρέατος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι πλατφόρμες GeneMANIA (<http://genemania.org/>) [172] και ConsensusPathDB (<http://cpdb.molgen.mpg.de/>) [173]. Το GeneMANIA αποτελεί ένα λογισμικό ικανό να προβλέπει τη λειτουργία ενός ή περισσότερων γονιδίων και να οικοδομεί ένα δίκτυο γονιδιακών σχέσεων, βασισμένο σε έναν αλγόριθμο που χρησιμοποιεί γονιδιακές οντολογίες. Από την άλλη μεριά το ConsensusPathDB επελέχθη διότι αποτελεί μία πλατφόρμα που ενσωματώνει 32 διαφορετικές δημόσια προσβάσιμες βάσεις δεδομένων, με αποτέλεσμα να παρέχει υψηλής ποιότητας δεδομένα. Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τα γονίδια που απομονώθηκαν ανευρέθησαν στην πλατφόρμα GeneCards (<http://www.genecards.org/>), μία πλατφόρμα που παρέχει συστηματικές πληροφορίες σχετικά με το ανθρώπινο γονιδίωμα.

2.4.2. *In silico* μεταγραφωμική ανάλυση των δικτύων γονιδίων που αναπτύχθηκαν

Χρησιμοποιήσαμε την πλατφόρμα PubMed Gene Expression Omnibus (GEO) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) για να αξιολογήσουμε το προφίλ έκφρασης των γονιδιακών δικτύων των οικογενειών AQP, CLIC, BCL-2 σε παγκρεατικό καρκίνο και φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό. Το PubMed GEO αποτελεί αποθετήριο δημόσια προσβάσιμων δεδομένων γονιδιακής έκφρασης και μικροσυστοιχιών miRNA, μαζί με τα δεδομένα των ασθενών. Χρησιμοποιήθηκαν τρία πακέτα δεδομένων μικροσυστοιχιών (GSE16515, GSE15471, GSE32676), συμπεριλαμβάνοντας 173 δείγματα ($36+36+42=114$ δείγματα πρωτοπαθούς καρκίνου παγκρέατος και $16+36+7=59$ δείγματα φυσιολογικού παγκρεατικού ιστού). Τα δείγματα καρκίνου παγκρέατος εξαιρέθηκαν χειρουργικά από τον πρωτοπαθή όγκο, ενώ τα δείγματα φυσιολογικού ιστού από τον γειτονικό παγκρεατικό ιστό. Και τα τρία πακέτα δεδομένων παρήχθησαν χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Τα δεδομένα της γονιδιακής έκφρασης λογαριθμήθηκαν. Θεωρήθηκε ότι τα γονίδια ήταν διαφορεικά

εκφραζόμενα (ΔΕΓ), δηλαδή υπερεκφράζονταν ή υποεκφράζονταν όταν η τιμή $p < 0.05$.

2.4.3. Εξέταση πιθανών προγνωστικών δεικτών σχετιζόμενων με την επιβίωση από την ομάδα των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ)

Κατασκευάστηκαν καμπύλες επιβίωσης, χρησιμοποιώντας τα ελεύθερα προσβάσιμα δεδομένα από το The Cancer Genome Atlas (TCGA), για να αξιολογηθεί η πιθανή προγνωστική αξία των ΔΕΓ. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PROGeneV2 Prognostic Database portal (Indiana University) [174,175] και υπολογίστηκε η διάμεση τιμή της γονιδιακής έκφρασης ώστε οι ασθενείς να καταταχθούν στην ομάδα είτε υψηλής (πάνω από τη διάμεση) είτε χαμηλής έκφρασης (κάτω από τη διάμεση τιμή) για κάθε ΔΕΓ.

2.4.4. Ανάλυση γονιδιακού λειτουργικού εμπλουτισμού (Gene set enrichment analysis – GSEA)

Πραγματοποιήσαμε την ανάλυση GSEA χρησιμοποιώντας τα λογισμικά David Bioinformatics Resources 6.7 [176,177] και GeneMania για να αποκτήσουμε περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα βιολογικά μονοπάτια που επηρεάζονται από τους προγνωστικούς δείκτες που αναγνωρίστηκαν και εμπλέκονται στην παθογένεση του παγκρεατικού καρκίνου.

2.4.5. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό GraphPad Prism 9.3 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA). Πραγματοποιήθηκε κανονική κατανομή των δεδομένων με τη χρήση των δοκιμασιών D'Agostino και Pearson Omnibus. Οι συγκρίσεις μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των δοκιμασιών two-tailed unpaired t-test για παραμετρικά δεδομένα και Mann-Whitney U-test για μη παραμετρικά δεδομένα. Οι τιμές p υπέστησαν διόρθωση για πολλαπλές συγκρίσεις

υπολογίζοντας το Q statistic (Benjamini-Hochberg). Οι διαφορές που παρουσίαζαν τιμές $Q < 0.05$ θεωρήθηκαν σημαντικές. Οι συσχετίσεις ελέγχθησαν με τον υπολογισμό του Pearson (r) ή του Spearman's rank (ρ) για παραμετρικά και μη παραμετρικά δεδομένα, αντίστοιχα. Η ανάλυση deming regression πραγματοποιήθηκε για να αξιολογηθούν οι σχέσεις αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ των ΔΕΓ. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier παρήχθησαν από το λογισμικό PROGgeneV2 Prognostic Database (Indiana University). Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν $p \leq 0.05$.

3. Αποτελέσματα

3.1 Ανάπτυξη βιοτράπεζας καρκίνου παγκρέατος

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής συμπεριλήφθηκαν 35 συνεχόμενοι ασθενείς με καρκίνο παγκρέατος που υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση στη Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, το διάστημα 5/2017 με 5/2020. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Όλοι οι ασθενείς παρείχαν έγγραφη δήλωση συγκατάθεσης. Μετά τη χειρουργική εξαίρεση του παγκρεατικού καρκίνου, είτε με παγκρεατοδωδεκαδακτυλεκτομή (επέμβαση Whipple) ή περιφερική παγκρεατεκτομή, τα ιστοτεμάχια λαμβάνονταν από το παρασκεύασμα στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Π.Γ.Ν.Λ. από έμπειρους παθολογοανατόμους. Αντίθετα σε περιπτώσεις με μη εξαιρέσιμους όγκους, βιοψίες λαμβάνονταν από τις πλέον εύκολα προσβάσιμες μεταστατικές εστίες. Τέτοιες εστίες κυρίως ήταν περιτοναϊκές εμφυτεύσεις ή μεταστατικές εστίες στο ήπαρ. Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν μετεγχειρητικά (postoperative follow-up) για διάμεσο διάστημα 9 μηνών. Το ποσοστό της αδυναμίας μετεγχειρητικής ιχνηλάτησης των ασθενών (drop-out rate) ήταν 6% (n=2).

Χαρακτηριστικά ασθενών	Πληθυσμός ασθενών, n=35
Θηλυκό γένος, n (%)	10 (28.6)
Διάμεση ηλικία, έτη (εύρος)	68 (53-85)
Σταδιοποίηση, n (%)	
Εξαιρέσιμος	8 (22.9)
Οριακά εξαιρέσιμος	23 (65.7)
Μη εξαιρέσιμος	4 (11.4)
Ανατομική θέση, n (%)	
Κεφαλή/ανχένας	29 (82.9)
Σώμα	2 (5.7)
Ουρά	4 (11.4)
Διάμεση τιμή CA19-9 U/ml (εύρος)	326 (56-1717)
Αδενοκαρκίνωμα, n (%)	35 (100)
Τκτερος, n (%)	28 (80)
Προεγχειρητική ERCP, n (%)	24 (68.6)
Χρόνος μέχρι την υποτροπή, μήνες (εύρος)	14 (13.5)
Διάμεση επιβίωση, μήνες (εύρος)	15 (3-27)

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στη διατριβή

3.2. Ανάπτυξη ορθοτοπικού μοντέλου PDX

Η ανάπτυξη του ορθοτοπικού μοντέλου πραγματοποιήθηκε σταδιακά, σύμφωνα με το μοντέλο PDSA (Plan-Do-Study-Act), προκειμένου να διασφαλιστεί υψηλή ποιότητα στην τεχνική εμφύτευσης του όγκου και υψηλή βιωσιμότητα των ζωικών μοντέλων (ποντικοί NOD/SCID). Αρχικά (**στάδιο 1**), πραγματοποιήθηκε δοκιμή της τεχνικής ώστε να σχεδιαστεί η βέλτιστη προσπέλαση και κινητοποίηση του παγκρέατος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πέντε (n=5) ποντίκια που είχαν υποβληθεί προηγουμένως σε προγραμματισμένη ευθανασία. Συγκεκριμένα, έπειτα από την ευθανασία, κάθε ποντίκι τοποθετούνταν σε δεξιά πλάγια θέση. Αριστερή πλάγια τομή πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικό ύψος σε κάθε ζώο ώστε να αναγνωριστεί η βέλτιστη θέση πραγματοποίησης της τομής του δέρματος. Ο προσδιορισμός της βέλτιστης θέσης βασίστηκε στη δυνατότητα η τομή να προσφέρει τη μέγιστη δυνατή έκθεση του παγκρέατος με το μικρότερο δυνατό μήκος.

Στη συνέχεια (**στάδιο 2**), πραγματοποιήθηκε πιστοποίηση της τεχνικής που σχεδιάστηκε στο στάδιο 1 σε ζωντανά ζωικά μοντέλα, ώστε να διαπιστωθεί η ανοχή των ζώων στην επέμβαση, κρινόμενη από την περιεγχειρητική επιβίωση, και να τιτλοποιηθούν οι δοσολογίες αναισθητικών και αναλγητικών παραγόντων που χορηγήθηκαν. Συνολικά, πέντε ποντικοί NOD/SCID (n=5) χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το στάδιο. Στο πρώτο ζώο, για τη διεγχειρητική αναισθησία χρησιμοποιήθηκαν 12μl Ketamine και 20μl Xylazine διαλυμένα σε 0.2ml διαλύματος PBS το καθένα και εγχυόμενα στο υποδόριο του κοιλιακού τοιχώματος του ζώου. Κατά τη διάρκεια της επέμβασης το ζώο παρουσίασε σημεία αφύπνισης και εγχύθηκαν εκ νέου οι ίδιες δόσεις από Ketamine και Xylazine. Στα υπόλοιπα τέσσερα ζώα εγχύθηκαν άπαξ 18μl Ketamine και 30μl Xylazine διαλυμένα σε 0.2ml PBS το καθένα και εγχυόμενα ενδοπεριτοναϊκά.

Έπειτα από τη διαπίστωση της επιτυχημένης καταστολής του ζώου, τοποθετήθηκε σε δεξιά πλάγια θέση και πραγματοποιήθηκε αριστερή πλάγια τομή και διάνοιξη της κοιλιάς σε στρώματα (δέρμα, υποδόριο, περιτόναιο). Το πάγκρεας εντοπίστηκε και κινητοποιήθηκε ως κατά τη φάση της εμφύτευσης χωρίς όμως να πραγματοποιηθεί έγχυση κυττάρων καρκινικών σειρών. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε κλείσιμο της κοιλιάς σε δύο στρώματα με απορροφήσιμα

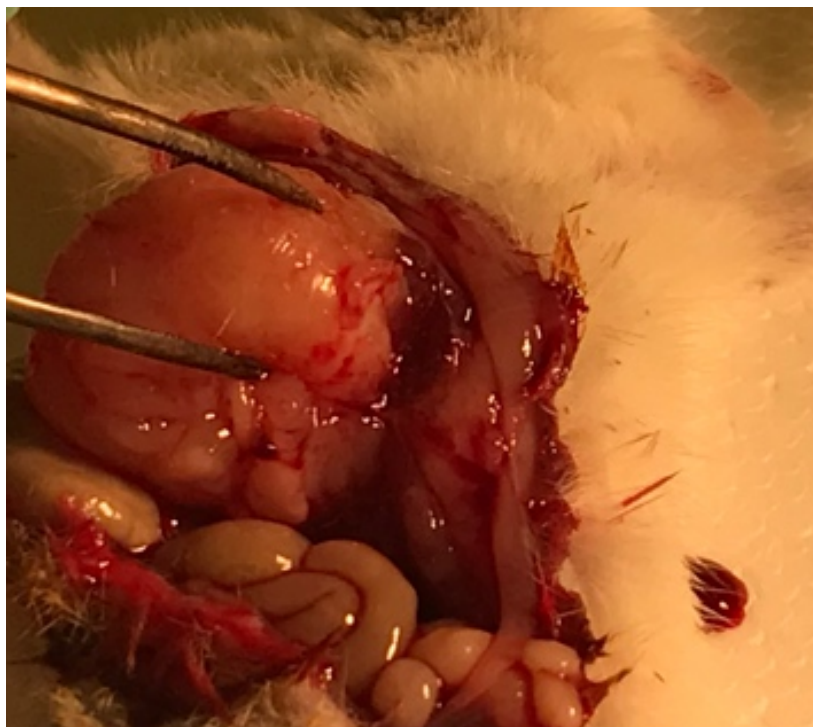
ράμματα 4-0 και έγχυση παυσίπονου στο υποδόριο της κοιλιάς του ζώου. Τα πέντε (n=5) ζώα παρακολουθήθηκαν κατά την μετεγχειρητική τους πορεία για τον εντοπισμό και καταγραφή πιθανών μετεγχειρητικών επιπλοκών. Ένα ζώο (n=1; 20%) πέθανε 32 ημέρες μετά την επέμβαση, διάστημα ευρύ για να αποδοθεί σε μετεγχειρητική επιπλοκή. Τα υπόλοιπα τέσσερα ζώα (n=4; 80%) παρουσίασαν ομαλή μετεγχειρητική πορεία και υπεβλήθησαν σε ευθανασία έπειτα από 6 μήνες λόγω προχωρημένης ηλικίας.

Στο στάδιο 3, επιχειρήσαμε δοκιμή εκ νέου της τεχνικής, ωστόσο με έγχυση κυττάρων παγκρεατικού καρκίνου ανθρώπου (PDX παγκρεατικού καρκίνου) στο πάγκρεας των ζώων (ορθοτοπικά), ώστε να διαπιστωθεί η δυνατότητα ορθοτοπικής ανάπτυξης όγκου. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν πέντε ποντικοί NOD/SCID (n=5). Από το σύνολο των ζώων, είχαμε 1 περιστατικό διεγχειρητικού θανάτου οφειλόμενου στην τεχνική της αναισθησίας, κατά την έναρξη της επέμβασης. Συγκεκριμένα, ο θάνατος αποδόθηκε σε μη σωστό υπολογισμό της δοσολογίας κεταμίνης ως προς το βάρος του ζώου. Άλλο ένα ζώο πέθανε μία ημέρα μετά την επέμβαση. Τα υπόλοιπα τρία ζώα (n=3) υποβλήθηκαν σε ευθανασία για την ανεύρεση πιθανού όγκου, έπειτα από διάστημα 4 μηνών.

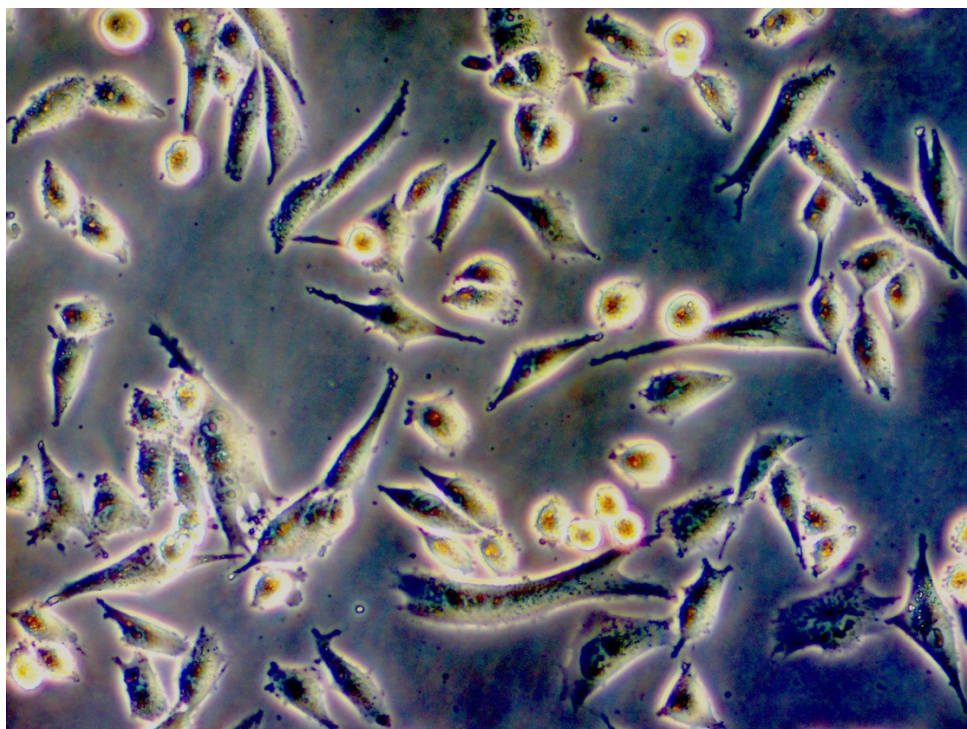
Το πρώτο ζώο [Εικόνες 9, 10] παρουσίασε ασκτική συλλογή με κακοήγη χαρακτηριστικά. Ο ασκίτης παρακεντήθηκε και καλλιεργήθηκε. Κύτταρα με χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων παγκρέατος αναπτύχθηκαν στην καλλιέργεια του ασκτικού υγρού [Εικόνα 11]. Ο όγκος αφαιρέθηκε και ένα τμήμα του καλλιεργήθηκε ενώ άλλο ένα τμήμα αποθηκεύτηκε σε φορμαλίνη για πιθανή μεταγενέστερη χρήση. Μία ύποπτη βλάβη εντοπίστηκε στο ήπαρ, οπότε και εξαιρέθηκε ώστε να εξεταστεί αν επρόκειτο για μετάσταση, γεγονός που δεν επιβεβαιώθηκε από την ιστολογική εξέταση. Δεν εντοπίστηκαν μεταστατικές εστίες σε πνεύμονες.



Εικόνα 9. Παρακέντηση ασκτικής συλλογής από ποντικό NOD/SCID όπου αναπτύχθηκε ορθοτοπικό PDX από κύτταρα παγκρεατικού καρκίνου ανθρώπου



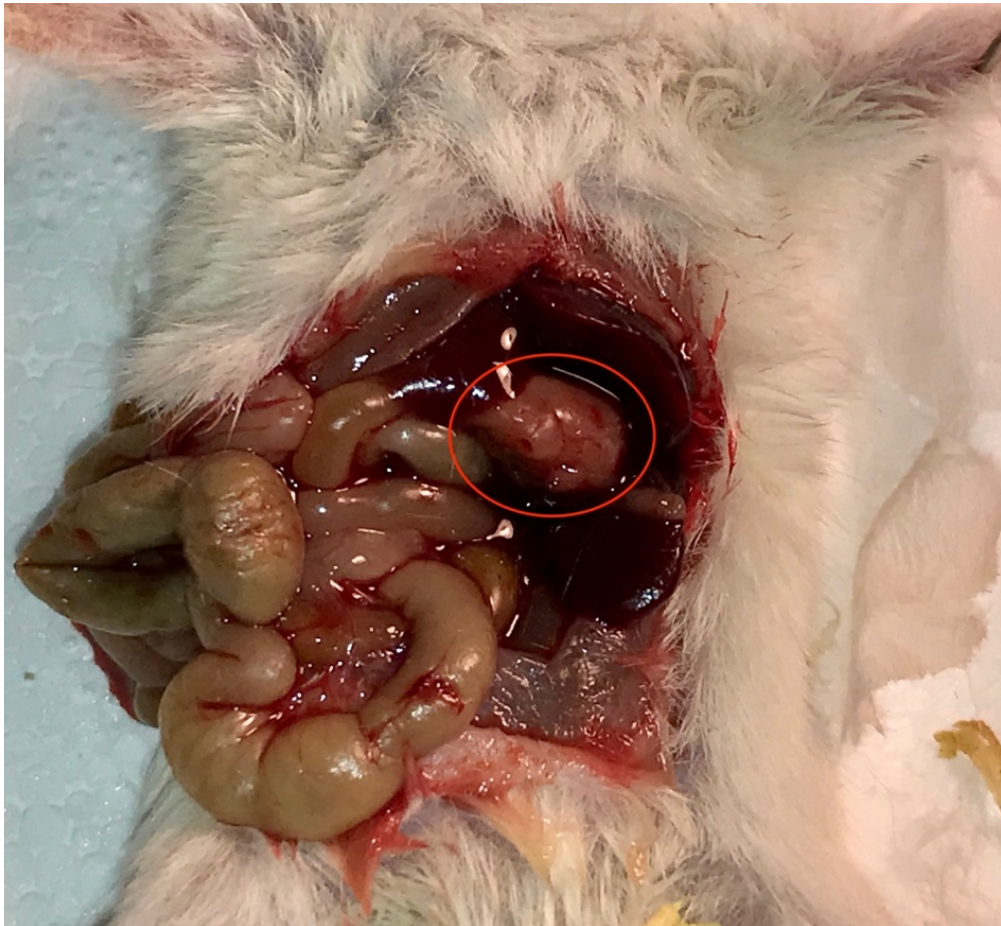
Εικόνα 10. Ανάπτυξη ορθοτοπικού PDX σε ποντικό NOD/SCID από κύτταρα παγκρεατικού καρκίνου ανθρώπου που εξορμάται από την ανατομική θέση του παγκρέατος χωρίς να διηθεί τις γειτονικές δομές.



Εικόνα 11. Κύτταρα καρκίνου παγκρέατος που αναπτύχθηκαν από την ασκτική συλλογή που παρακεντήθηκε από ποντικό όπου εμφυτεύθηκαν ορθοτοπικά PDX.

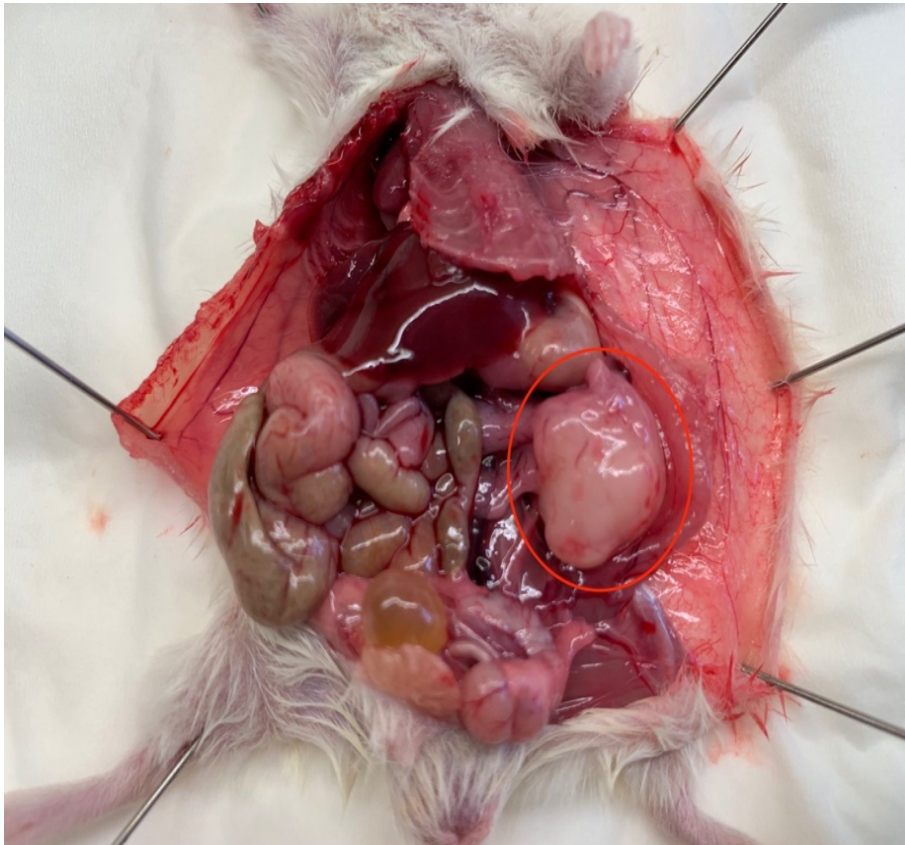
Το δεύτερο ζώο παρουσίασε επίσης ασκτική συλλογή ορώδους χροιάς. Ο ασκίτης και σε αυτή την περίπτωση παρακεντήθηκε και καλλιεργήθηκε. Στην καλλιέργεια δεν αναπτύχθηκαν καρκινικά κύτταρα. Στην ανατομική θέση του παγκρέατος εντοπίστηκε όγκος ο οποίος εξαιρέθηκε και καλλιεργήθηκε [Εικόνα 12]. Δεν εντοπίστηκαν μεταστατικές εστίες σε ήπαρ, πνεύμονες.

Το τρίτο ζώο δεν ανέπτυξε όγκο.



Εικόνα 12. Ανάπτυξη ορθοτοπικού PDX σε ποντικό NOD/SCID από κύτταρα παγκρεατικού καρκίνου ανθρώπου που εξορμάται από την ανατομική θέση του παγκρέατος χωρίς να διηθεί τις γύρω δομές.

Στο **στάδιο 4** ακολούθησε δοκιμή ορθοτοπικής εμφύτευσης PDX σε μικρό αριθμό (n=3) ποντικών NSG, με μέθοδο όμοια με την προηγούμενη. Το συγκεκριμένο είδος ποντικών χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή ανοσοανεπάρκεια, με απουσία κυττάρων B, T και NK. Από τα 3 ζώα, το ένα πέθανε διεγχειρητικά, ενώ τα υπόλοιπα δύο απέδωσαν όγκους μεσαίου-μεγάλου μεγέθους, χωρίς ασκитικό υγρό, χωρίς μεταστάσεις, σε διάμεσο διάστημα 45 ημερών [Εικόνες 13,14]. Από κάθε όγκο απομονώθηκαν: 1) τμήμα όγκου που αποθηκεύθηκε στους -80C°, 2) τμήμα όγκου σε φορμαλίνη, 3) κύτταρα, εκ των οποίων τα μισά καλλιεργήθηκαν και τα μισά κρυοσυντηρήθηκαν.



Εικόνα 13. Ανάπτυξη ορθοτοπικού PDX σε ποντικό NSG (ποντικός ν.1) από κύτταρα παγκρεατικού καρκίνου ανθρώπου που εξορμάται από την ανατομική θέση του παγκρέατος χωρίς να διηθεί τις γύρω δομές.



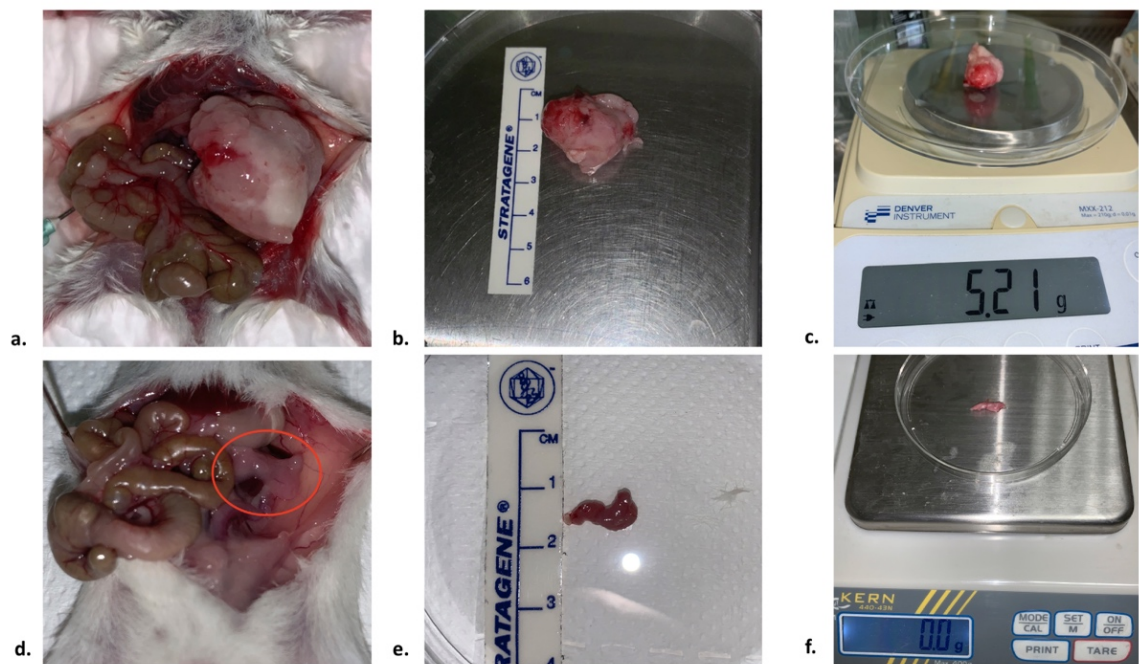
Εικόνα 14. Ανάπτυξη ορθοτοπικού PDX σε ποντικό NSG (ποντικός ν.2) από κύτταρα παγκρεατικού καρκίνου ανθρώπου που εξορμάται από την ανατομική θέση του παγκρέατος, ασκώντας πιεστικά φαινόμενα στις γύρω δομές.

Με βάση τα συμπεράσματα από τα προηγούμενα στάδια, στο στάδιο 5 τροποποιήσαμε την τεχνική της αναισθησίας. Συγκεκριμένα, τα ποντίκια υποβάλλονταν σε γενική αναισθησία εισπνέοντας ισοφλουράνιο 2% σε μίγμα οξυγόνου 100%. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκαν συνολικά 40 ορθοτοπικές εμφυτεύσεις PDX παγκρεατικού καρκίνου σε ποντίκια NSG, 10 σε ποντίκια NOD/SCID και 6 σε ποντίκια RAG [Πίνακας 5].

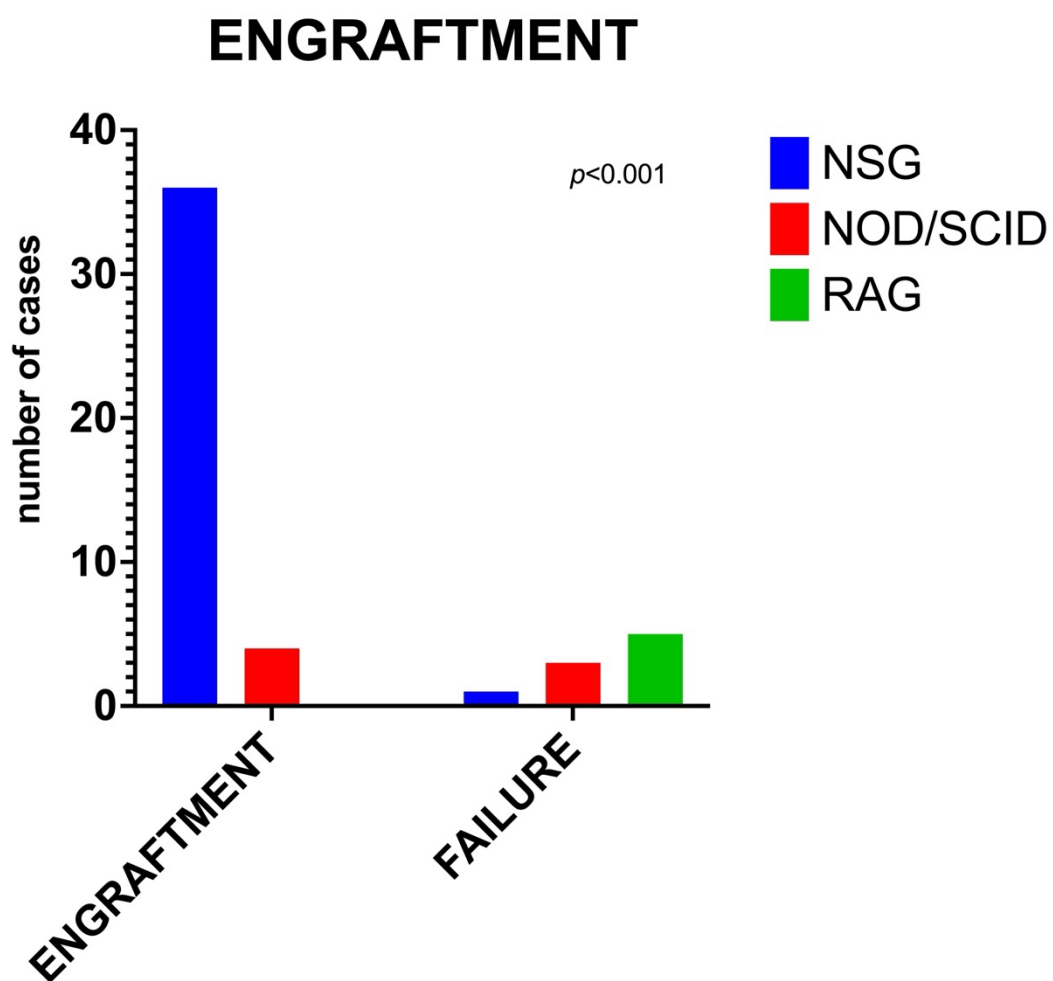
Μεταβλητές	NSG, <i>n</i> =40	NOD/SCID, <i>n</i> =10	RAG, <i>n</i> =6	<i>p</i> -values
Επιβίωση, <i>n</i> (%)	37 (93)	7 (70)	5 (83)	0.15
Επιτυχής εμφύτευση, <i>n</i> (%)	36 (97)	4 (57)	0 (0)	<0.001
Μέσο χρονικό διάστημα από την εμφύτευση μέχρι την εκτομή, ημέρες (SD)	45.8 (3)	56.4 (5.2)	60 (0)	<0.001
Μέσο βάρος του όγκου, g	1.7 (1.4)	0.7 (0.3)	-	0.03
Μέσο μέγεθος όγκου εκφραζόμενο ως μέση διάμετρος, cm	5.5 (1)	3.8 (0.6)	-	<0.001
Μεταστάσεις, <i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-

Πίνακας 7. Αποτελέσματα των πειραμάτων του σταδίου 5 εμφύτευσης ορθοτοπικών PDX καρκίνου παγκρέατος σε ποντίκια NSG, NOD/SCID και RAG. SD: Standard Deviation; *n*=number

Στην **Εικόνα 15** παρουσιάζουμε τις διαφορές στον παγκρεατικό ιστό μεταξύ ενός επιτυχώς εμφυτευμένου ορθοτοπικού μοντέλου PDX και ενός φυσιολογικού ποντικίου. Δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη μετεγχειρητική επιβίωση μεταξύ των διαφορετικών ειδών ποντικών [**Πίνακας 5**]. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς το ποσοστό επιτυχούς εμφύτευσης [**Πίνακας 5, Εικόνα 16**]. Πράγματι, το ποσοστό επιτυχούς εμφύτευσης ήταν υψηλότερο σε ποντίκια NSG (97.3%) συγκριτικά με ποντίκια NOD/SCID (57.1%) και RAG (0%) ($p<0.01$). Στο ίδιο πλαίσιο, τα ποντίκια NSG παρουσίασαν επίσης τη συντομότερη περίοδο από την εμφύτευση μέχρι την εκτομή του όγκου ($p<0.01$) [**Πίνακας 5, Εικόνα 16**]. Επιπρόσθετα, το μέσο βάρος και μέγεθος του όγκου ήταν χαμηλότερο στα ποντίκια NOD/SCID σε σχέση με τα ποντίκια NSG [**Πίνακας 5, Εικόνα 16**]. Απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν ανευρέθηκαν. Η ιστολογική εξέταση και σύγκριση των PDX με τους πρωτοπαθείς όγκους των ασθενών ανέδειξε υψηλό βαθμό ομοιότητας [**Εικόνα 17**].

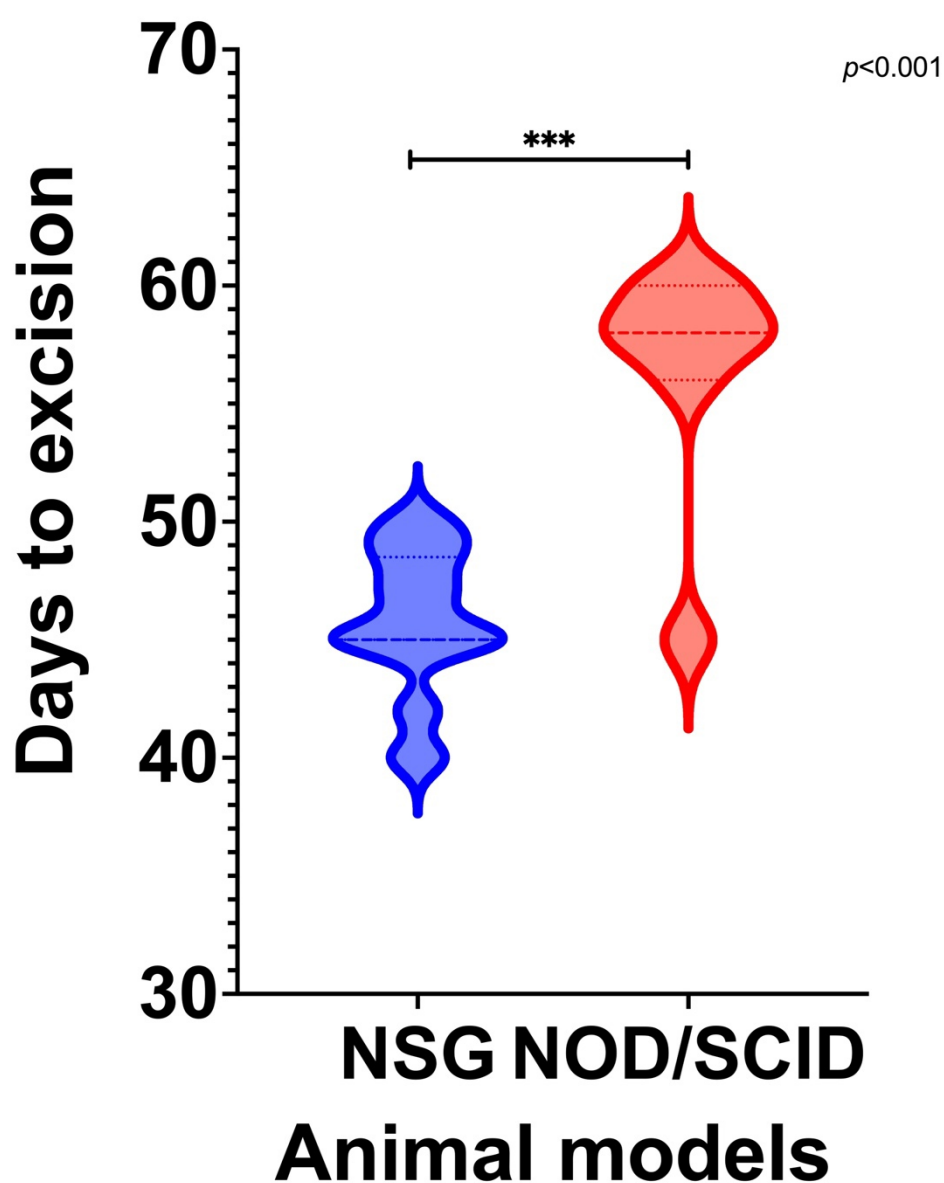


Εικόνα 15. Ανάπτυξη ορθοτοπικού PDX σε ποντικό NSG από κύτταρα παγκρεατικού καρκίνου ανθρώπου (a, b, c) και σύγκριση με φυσιολογικό ποντικό NSG (d, e, f). Ανατύπωση από Magouliotis et al. [71]



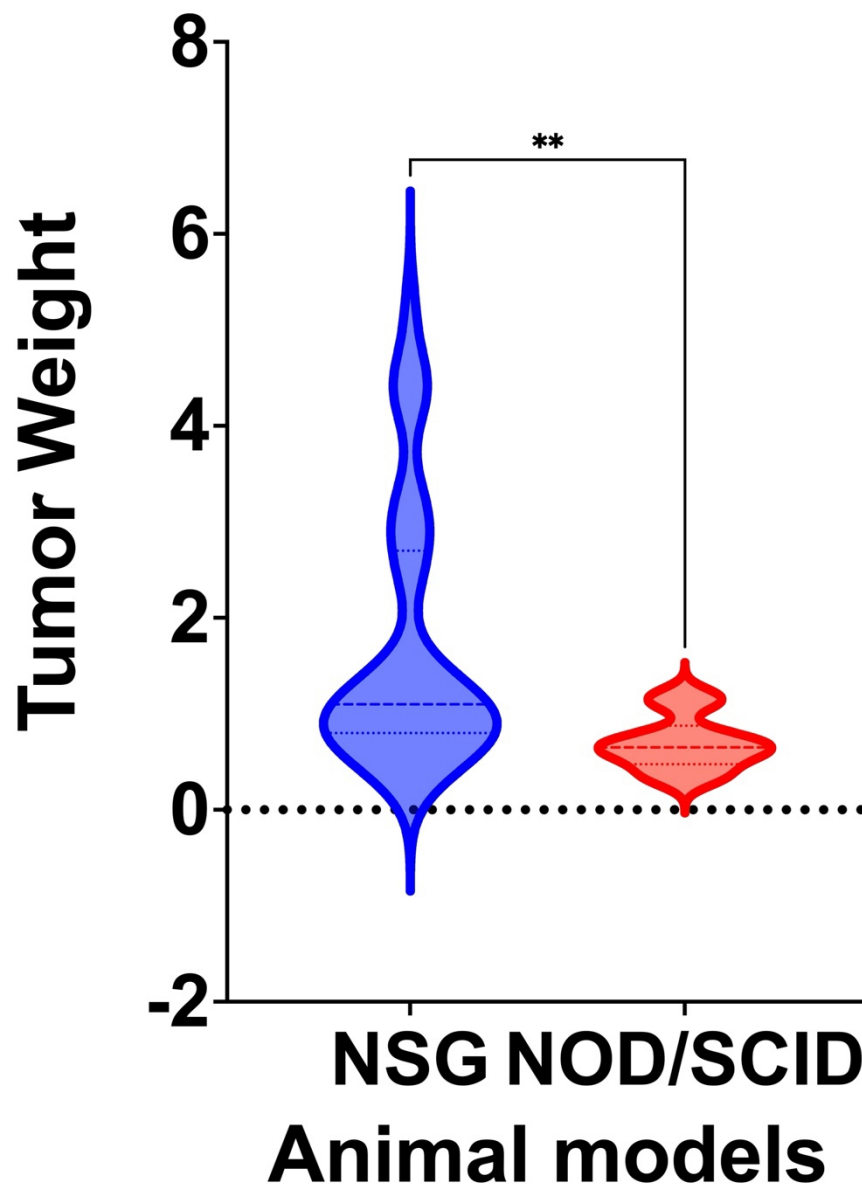
Εικόνα 16. Διαφορές μεταξύ των τριών στελεχών ποντικών NSG, NOD/SCID και RAG ως προς το ποσοστό επιτυχούς εμφύτευσης. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [71]

DAYS TO EXCISION



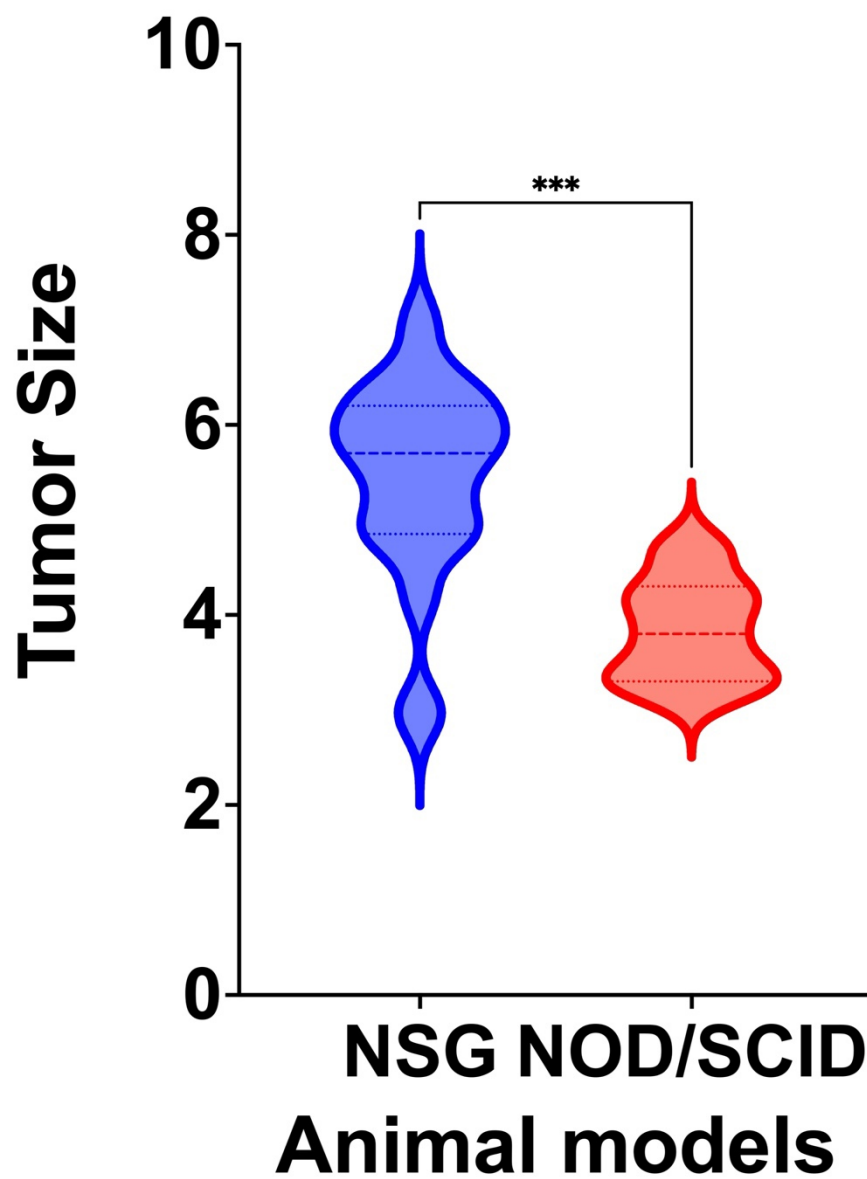
Εικόνα 17. Διαφορές μεταξύ των τριών στελεχών ποντικών NSG, NOD/SCID και RAG ως προς το χρονικό διάστημα μέχρι την εκτομή. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [71]

TUMOR WEIGHT

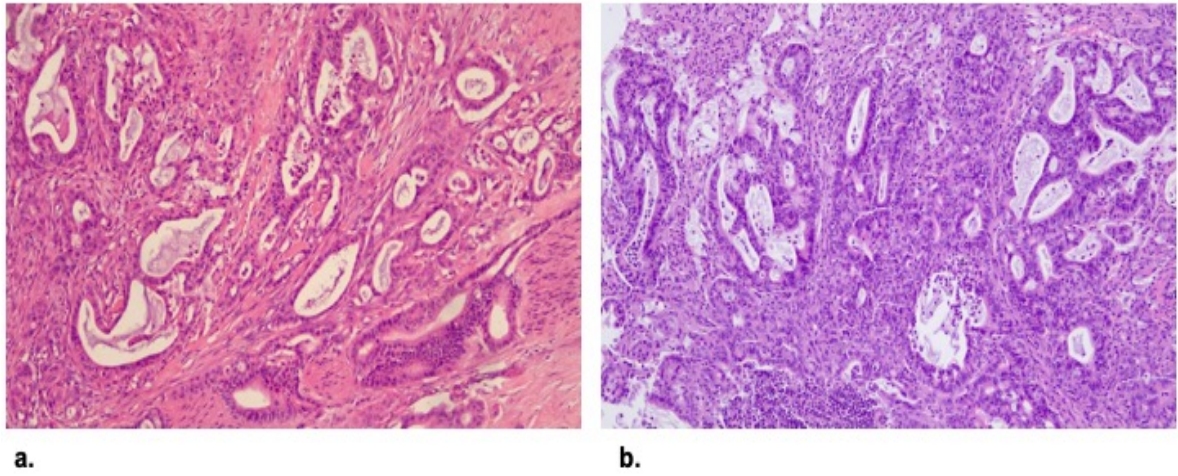


Εικόνα 18. Διαφορές μεταξύ των τριών στελεχών ποντικών NSG, NOD/SCID και RAG ως προς το μέσο βάρος του όγκου. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [71]

TUMOR SIZE



Εικόνα 19. Διαφορές μεταξύ των τριών στελεχών ποντικών NSG, NOD/SCID και RAG ως προς το μέσο μέγεθος του όγκου. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [71]



Εικόνα 20. Ιστολογική σύγκριση μεταξύ των όγκων a. του ασθενούς και b. του PDX. Τα δείγματα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [71]

3.3. Αναζήτηση βιοδεικτών

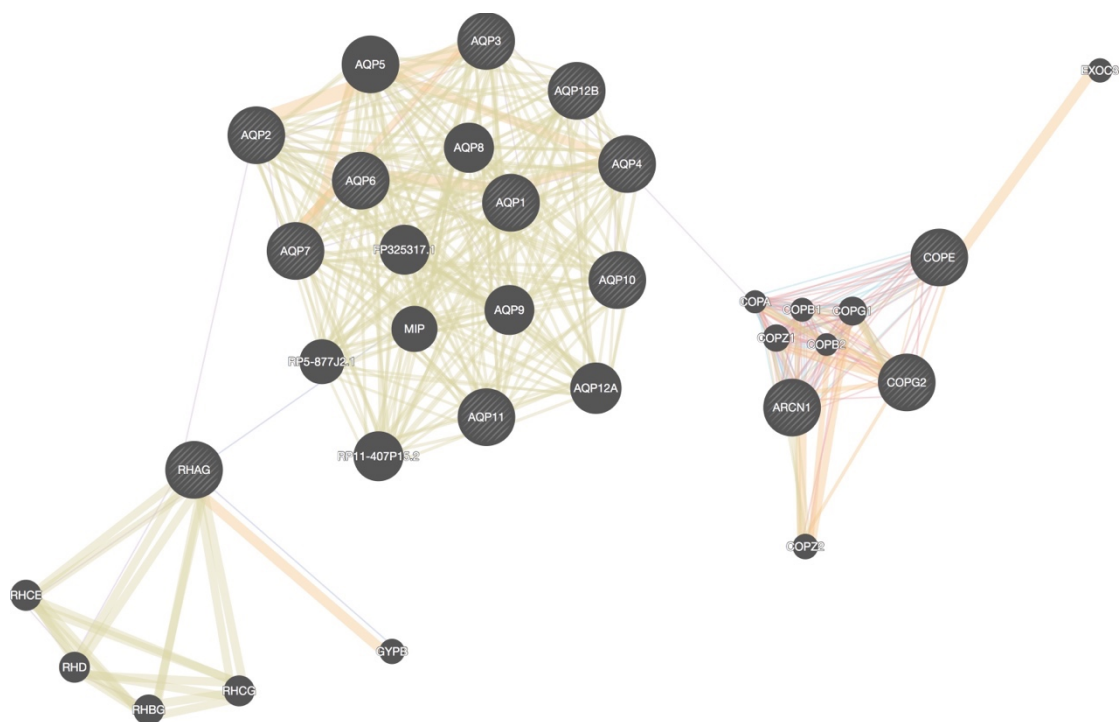
3.3.1. Κατασκευή των δικτύων γονιδίων

Για κάθε μία από τις τρεις οικογένειες γονιδίων (AQPs, CLICs, BCL-2) κατασκευάστηκαν τα δίκτυα συνδεδεμένων γονιδίων. Αυτά παρουσιάζονται στους Πίνακες 6-8 και στις Εικόνες 21-23.

Σύμβολο γονιδίου	Περιγραφή γονιδίου
AQP1	Aquaporin 1
AQP2	Aquaporin 2
AQP3	Aquaporin 3
AQP4	Aquaporin 4
AQP5	Aquaporin 5
AQP6	Aquaporin 6
AQP7	Aquaporin 7
AQP8	Aquaporin 8
AQP9	Aquaporin 9
AQP10	Aquaporin 10
AQP11	Aquaporin 11
AQP12A	Aquaporin 12A
AQP12B	Aquaporin 12B
RRM2B	Ribonucleotide Reductase Regulatory TP53 Inducible Subunit M2B
SLC5A1	Solute Carrier Family 5 Member 1
ARCN1	Archain 1
COPA	Coatomer Protein Complex Subunit Alpha
COPB1	Coatomer Protein Complex Subunit Beta 1

COPB2	Coatomer Protein Complex Subunit Beta 2
COPE	Coatomer Protein Complex Subunit Epsilon
COPG1	Coatomer Protein Complex Subunit Gamma 1
COPG2	Coatomer Protein Complex Subunit Gamma 2
RHAG	Rh Associated Glycoprotein

Πίνακας 8. Δίκτυο συνδεδεμένων γονιδίων οικογένειας Ακουαπορινών



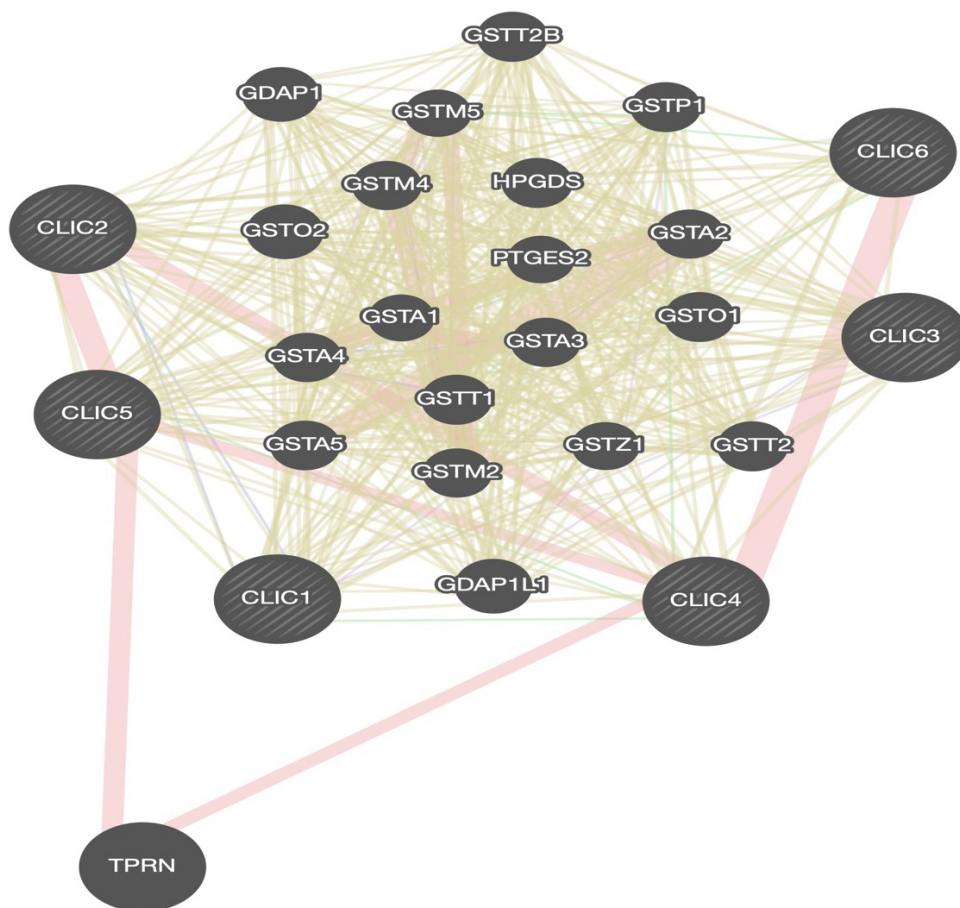
Εικόνα 21. Δίκτυο συνδεδεμένων γονιδίων με την οικογένεια των Ακουαπορινών.

Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]

Σύμβολο γονιδίου	Περιγραφή γονιδίου
CLIC1	Chloride Intracellular Channel 1
CLIC2	Chloride Intracellular Channel 2

CLIC3	Chloride Intracellular Channel 3
CLIC4	Chloride Intracellular Channel 4
CLIC5	Chloride Intracellular Channel 5
CLIC6	Chloride Intracellular Channel 6
GDAP1	Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1
GDAP1L1	Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1 Like 1
GSTA1	Glutathione S-Transferase Alpha 1
GSTA2	Glutathione S-Transferase Alpha 2
GSTA3	Glutathione S-Transferase Alpha 3
GSTA4	Glutathione S-Transferase Alpha 4
GSTA5	Glutathione S-Transferase Alpha 5
GSTM2	Glutathione S-Transferase Mu 2
GSTM4	Glutathione S-Transferase Mu 4
GSTM5	Glutathione S-Transferase Mu 5
GSTO1	Glutathione S-Transferase Omega 1
GSTO2	Glutathione S-Transferase Omega 2
GSTP1	Glutathione S-Transferase Pi 1
GSTT1	Glutathione S-Transferase Theta 1
GSTT2	Glutathione S-Transferase Theta 2
GSTT2B	Glutathione S-Transferase Theta 2B
GSTZ1	Glutathione S-Transferase Zeta 1
HPGDS	Hematopoietic Prostaglandin D Synthase
PTGES2	Prostaglandin E Synthase 2
TPRN	Taperin

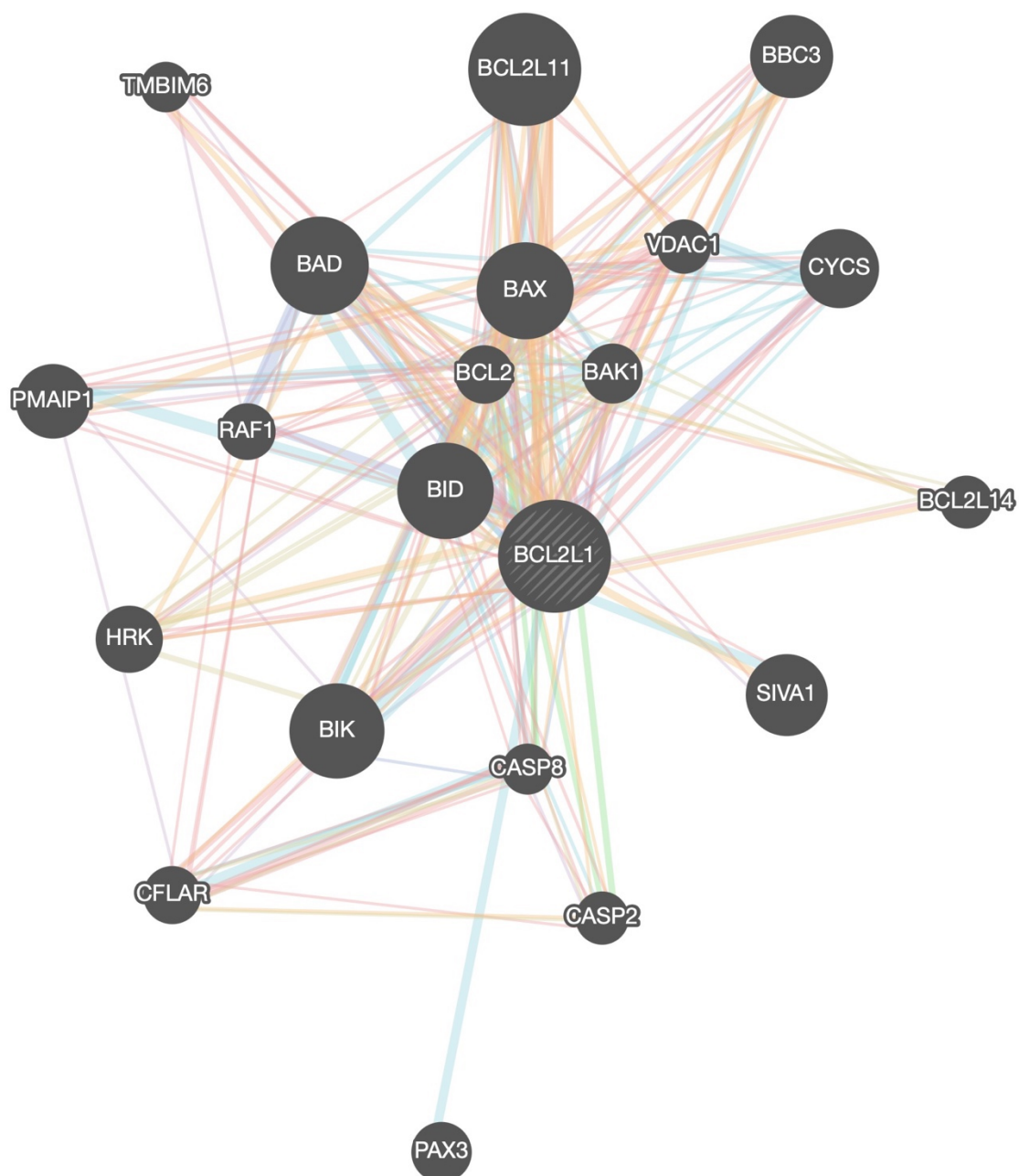
Πίνακας 9. Δίκτυο συνδεδεμένων γονιδίων οικογένειας Ενδοκυττάριων διαύλων χλωρίου (CLICs)



Εικόνα 22. Δίκτυο συνδεδεμένων γονιδίων με την οικογένεια των Ενδοκυττάρων διαύλων χλωρίου (CLICs). Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]

Σύμβολο Γονιδίου	Περιγραφή γονιδίου
BCL2L1	BCL2 Like 1
BCL2	BCL2 Apoptosis Regulator
BID	BH3 Interacting Domain Death Agonist
BAK1	BCL2 Antagonist/Killer 1
BAX	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
BAD	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death
RAF1	Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
BCL2L11	BCL2 Like 11
BIK	BCL2 Interacting Killer
CASP8	Caspase 8
CASP2	Caspase 2
PAX3	Paired Box 3
CFLAR	CASP8 And FADD Like Apoptosis Regulator
HRK	Harakiri, BCL2 Interacting Protein
PMAIP1	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
TMBIM6	Transmembrane BAX Inhibitor Motif Containing 6
BBC3	BCL2 Binding Component 3
VDAC1	Voltage Dependent Anion Channel 1
CYCS	Cytochrome C, Somatic
SIVA1	SIVA1 Apoptosis Inducing Factor
BCL2L14	BCL2 Like 14

Πίνακας 10. Δίκτυο συνδεδεμένων γονιδίων οικογένειας BCL-2



Εικόνα 23. Δίκτυο συνδεδεμένων γονιδίων με την οικογένεια γονιδίων του BCL-2.

Ανατύπωση από Magouliotis et al. [214]

3.3.2. *In silico* μεταγραφομική ανάλυση των δικτύων γονιδίων που αναπτύχθηκαν

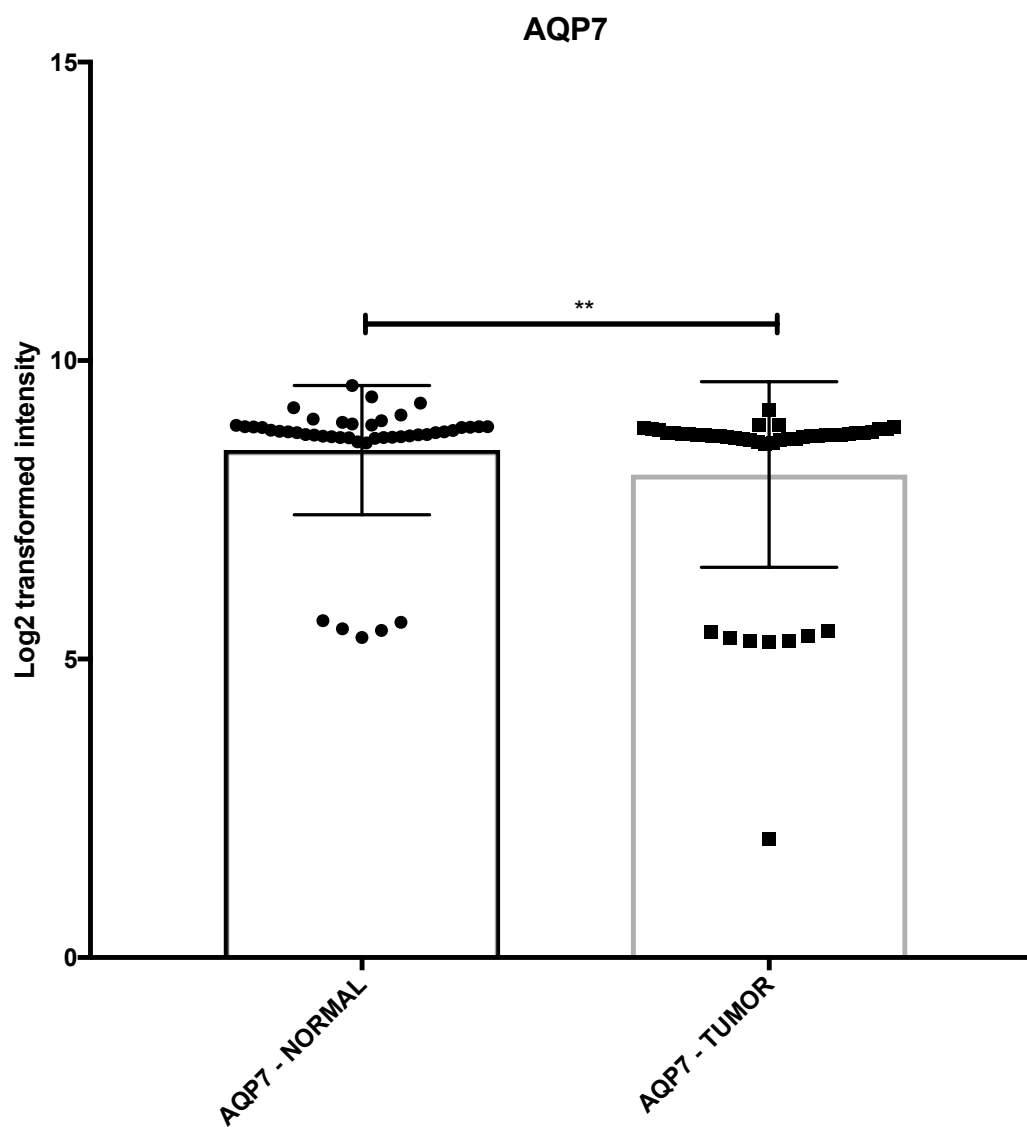
Η ανάλυσή μας ανέδειξε 34 διαφορεικά εκφραζόμενα γονίδια (ΔΕΓ). Αυτά παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**. Τα σημαντικότερα ΔΕΓ παρουσιάζονται στις **Εικόνες 24-32**.

Σύμβολο γονιδίου	Fold Changes (Actual)	Fold Changes (Hodges- Lehmann)	<i>P</i> values	<i>Q</i> values
<i>Υπερ-εκφραζόμενα</i>				
ARCN1	0.3066	0.1780	0.0024	0.0026
CLIC1	1.640	1.375	< 0.0001	2.8636e-005
CLIC3	NA	NA	< 0.0001	2.8636e-005
CLIC4	0.5384	0.4133	0.0400	0.0065
CLIC6	0.3288	0.2223	0.0137	0.0027
GSTO1	0.7311	0.6437	< 0.0001	2.8636e-005
GSTP1	NA	NA	< 0.0001	2.8636e-005
HPGDS	0.8110	0.7026	0.0013	0.0003
TPRN	NA	NA	0.0013	0.0003
<i>Υπο-εκφραζόμενα</i>				
AQP1	-0.4921	-0.2992	0.0029	0.0026
AQP2	-3.125	-0.4418	<0.0001	0.0002
AQP3	-0.2692	-0.2209	0.0003	0.0005
AQP4	-0.6839	-0.1053	0.0001	0.0002
AQP6	- 2.531e+014	-0.3844	<0.0001	0.0002
AQP7	-0.1454	-0.2429	<0.0001	0.0002
AQP10	-0.1194	-0.2083	0.0030	0.0026
AQP11	-0.2923	-0.4005	0.0035	0.0029

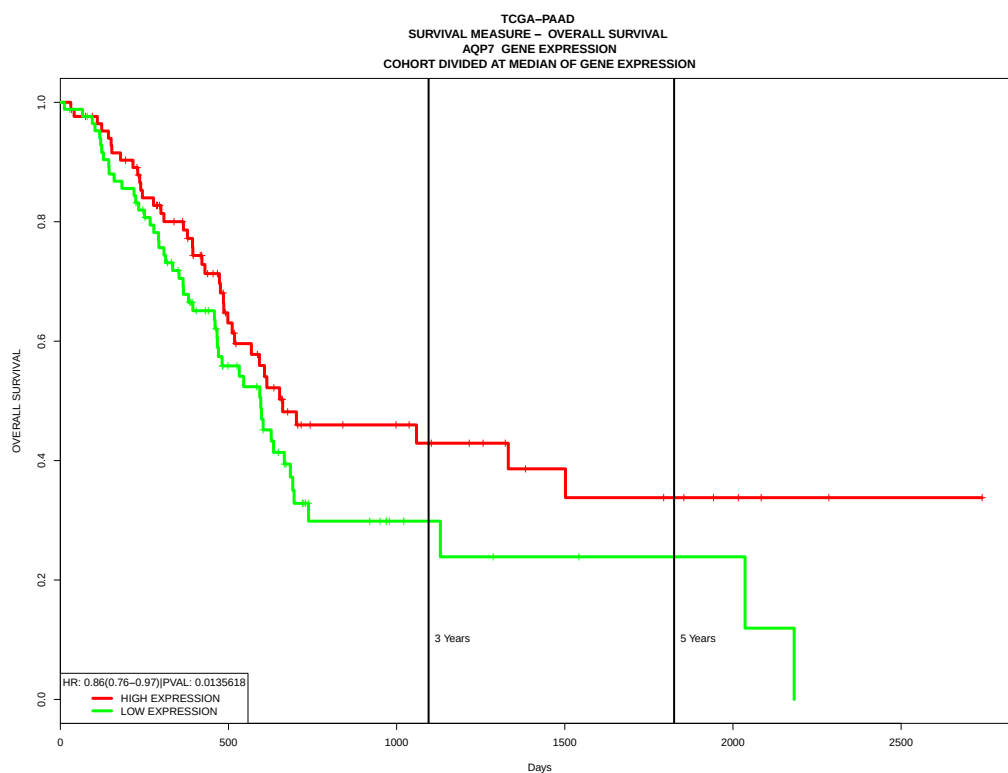
AQP12B	-0.1307	-0.3651	<0.0001	0.0002
COPE	-0.0448	-0.0749	0.0465	0.0302
COPG2	-3.0250	-0.5018	0.0004	0.0006
RHAG	-0.1744	-0.3741	<0.0001	0.0002
RHCE	-0.0618	-0.0779	0.0029	0.0026
RHD	-0.0617	-0.0857	0.0252	0.0170
RHBG	-0.1306	-0.3010	<0.0001	0.0002
GYPB	-1.083	-0.2160	<0.0001	0.0002
MIP	-2.945	-0.5095	<0.0001	0.0002
COPZ2	-0.2350	-0.1918	0.0040	0.0032
EXOC3	-0.6242	-0.1700	0.0014	0.0017
CLIC5	-0.4764	-0.2068	0.0153	0.0027
GDAP1	-0.4695	-0.4457	0.0124	0.0026
GDAP1L1	-2.278	-0.9061	< 0.0001	2.8636e-005
GSTA1	-3.436	-2.010	< 0.0001	2.8636e-005
GSTA3	-3.106	-1.994	< 0.0001	2.8636e-005
GSTM2	NA	NA	< 0.0001	2.8636e-005
GSTM4	-0.2976	-0.2804	0.0157	0.0027
GSTM5	-1.353	-0.9681	< 0.0001	2.8636e-005
GSTT1	-0.6718	-0.4820	0.0413	0.0065
GSTT2	-0.9199	-0.7902	0.0004	0.0001
GSTZ1	-0.7449	-0.6223	< 0.0001	2.8636e-005
PTGES2	-0.5889	-0.4797	< 0.0001	2.8636e-005
<i>Χωρίς σημαντική διαφορά</i>				
AQP5	-0.9547	-0.1499	0.8178	0.3717
AQP8	-0.4774	-0.1957	0.1807	0.0995
AQP9	0.1226	0.4840	0.6306	0.3098
RRM2B	-0.0950	-0.0593	0.2684	0.3717

SLC5A1	-0.1073	0.005936	0.9368	0.4154
COPA	-0.08528	0,008088	0,9035	0.2484
COPB1	-0.1669	-0.06236	0.3251	0.1689
COPB2	1.064	0.1058	0.1370	0.0781
COPG1	-0.01181	0.0296	0.2741	0.1466
RHCG	-0.02837	-0.1438	0.0742	0.0465
COPZ1	-0.03610	-0.04561	0.1374	0.0781
CLIC2	0.4399	0.2214	0.3191	0.0437
GSTA4	-0.02907	-0.1858	0.2420	0.0347
GSTO2	-0.3611	-0.3582	0.0770	0.0116

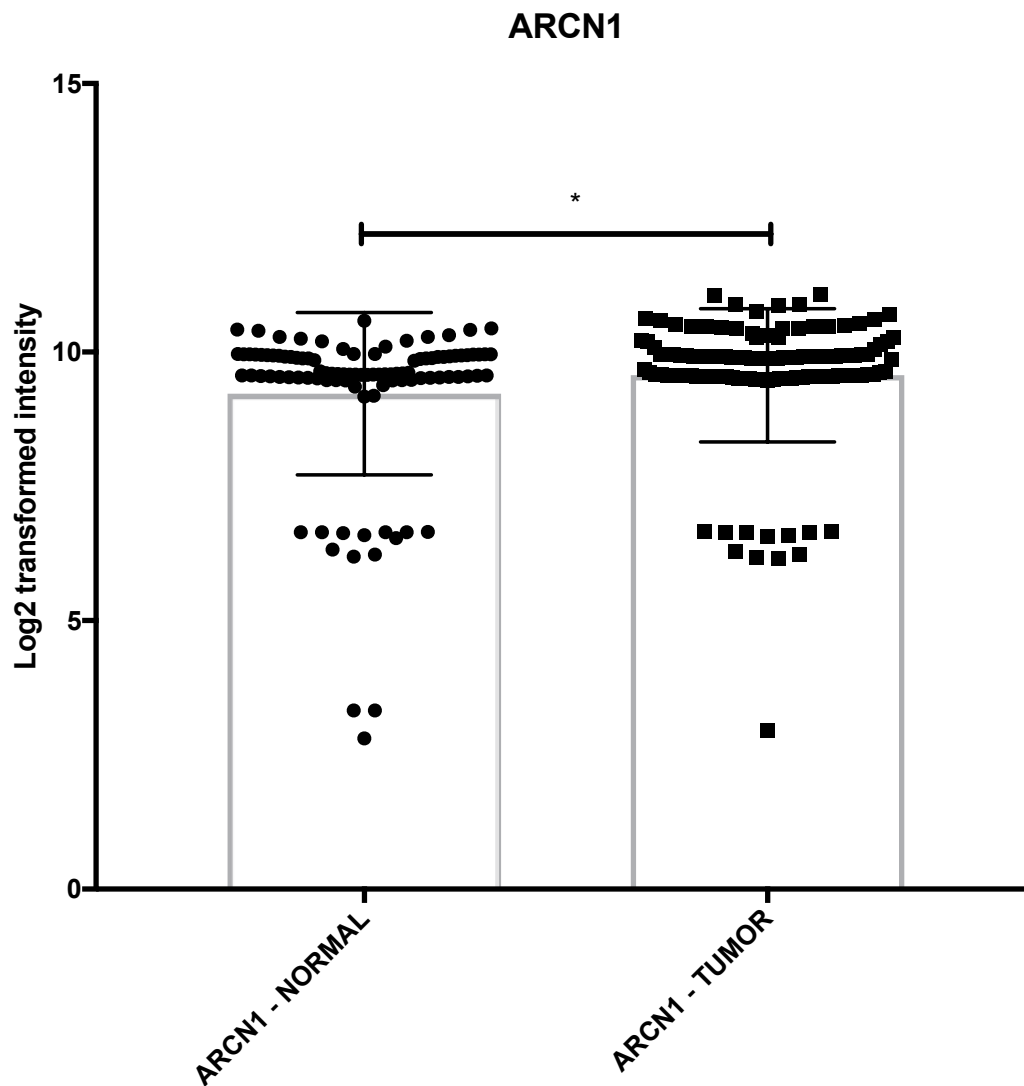
Πίνακας 11. Σύνοψη διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ)



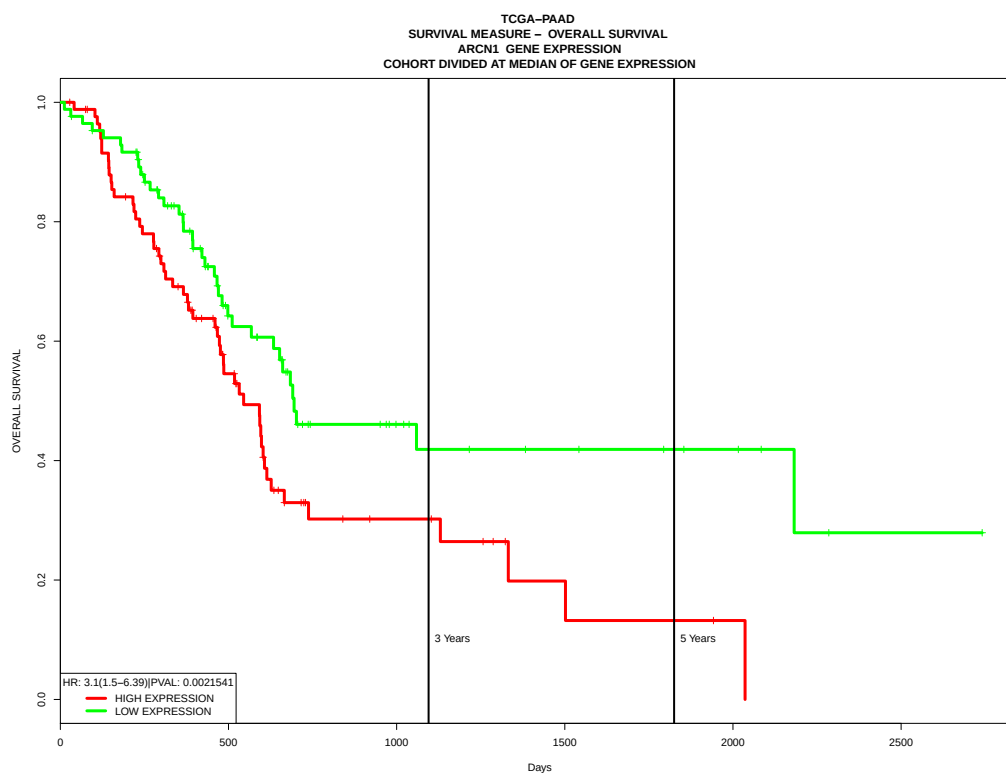
Εικόνα 24. Διαφορική έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό των γονιδίου AQP7. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]



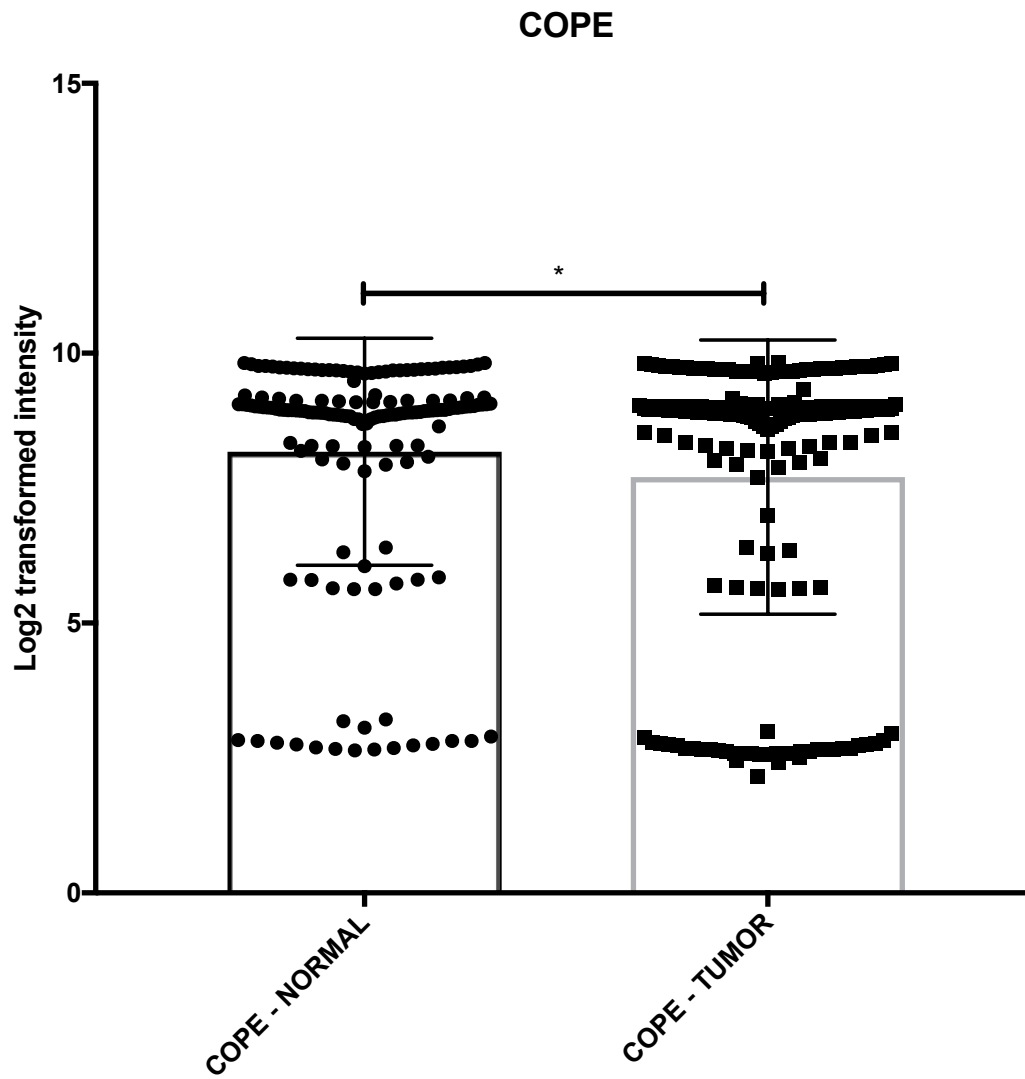
Εικόνα 25. Διαφορική έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό του γονιδίου AQP7. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]



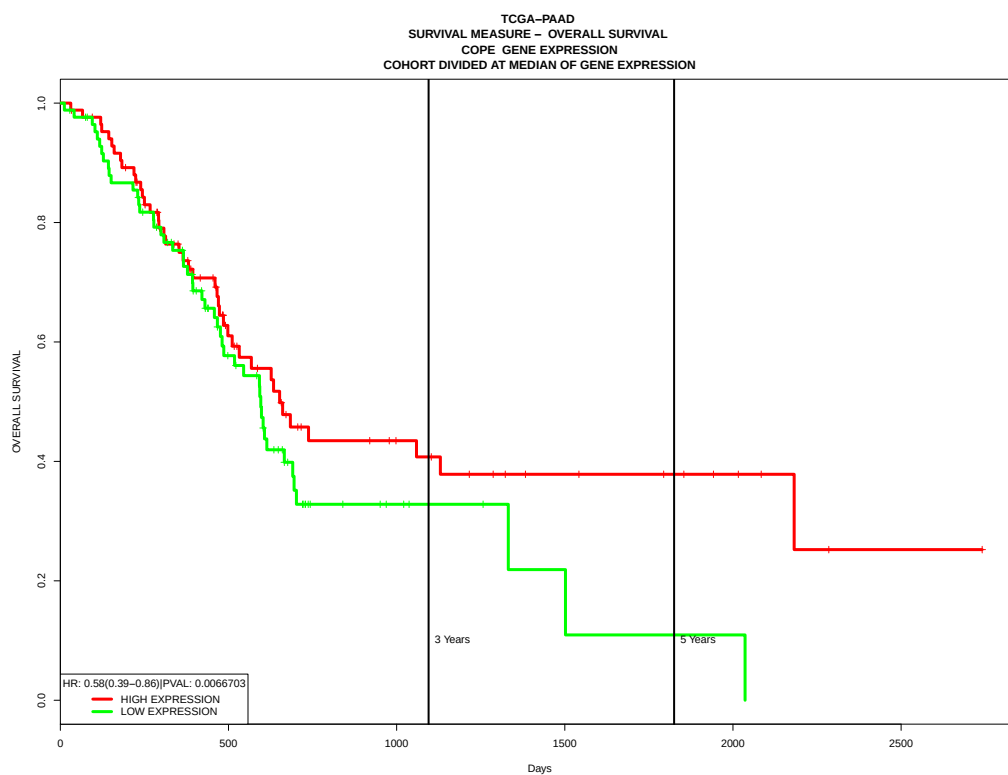
Εικόνα 26. Διαφορική έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό του γονιδίου ARCNI. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]



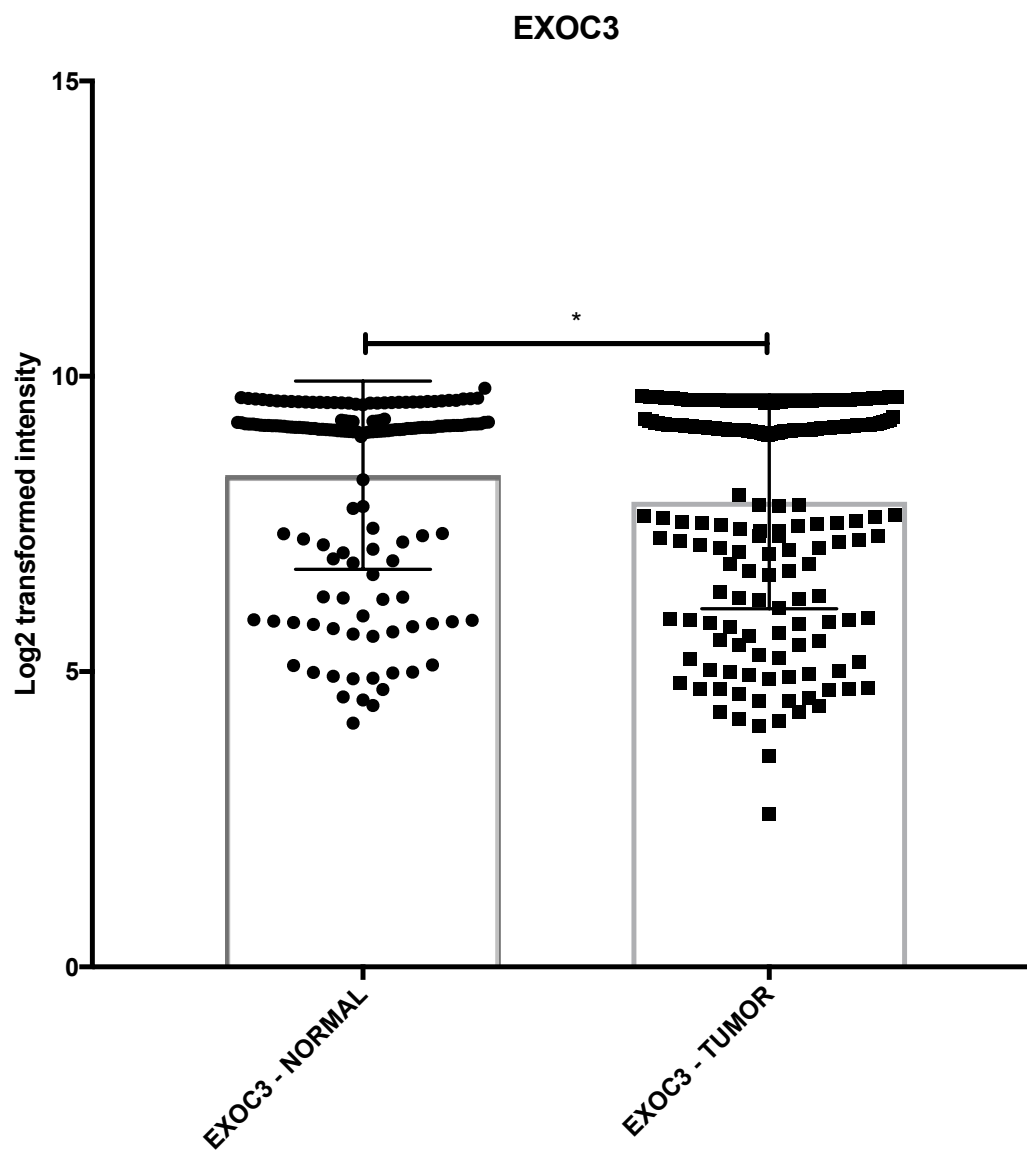
Εικόνα 27. Διαφορική έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό του γονιδίου ARC1, Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]



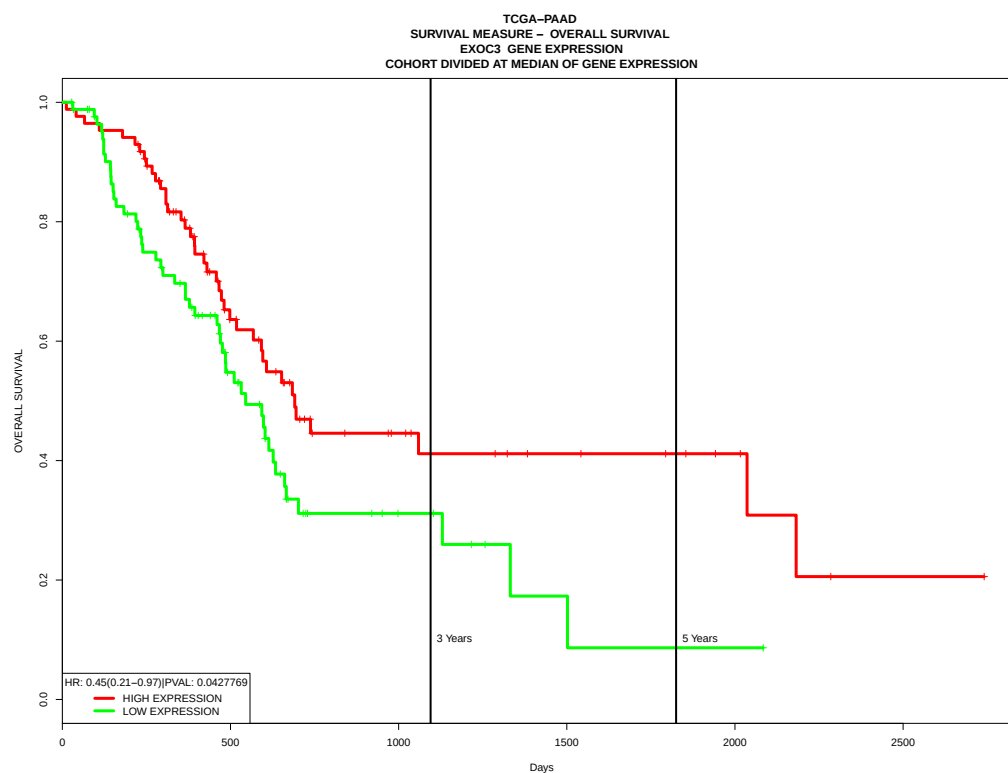
Εικόνα 28. Διαφορική έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό του γονιδίου COPE. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]



Εικόνα 29. Διαφορική έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό του γονιδίου COPE. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]

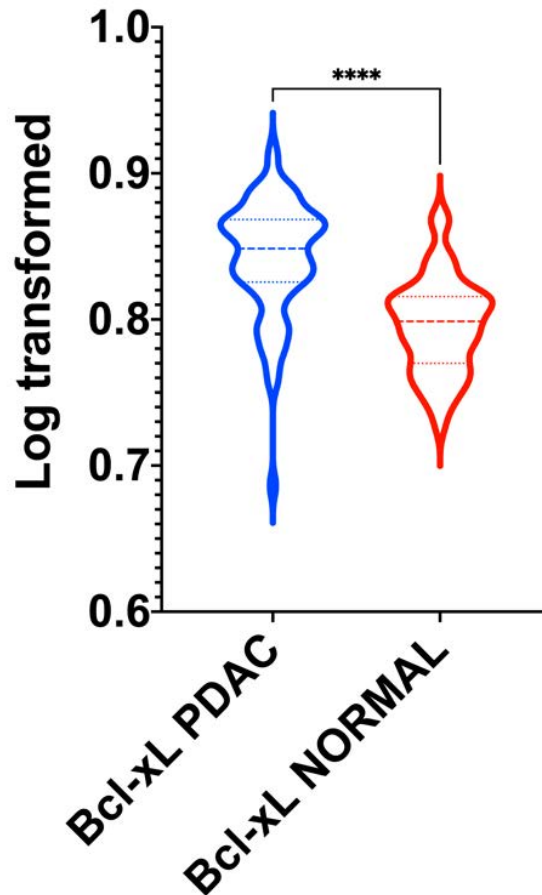


Εικόνα 30. Διαφορική έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό του γονιδίου EXOC3. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]



Εικόνα 31. Διαφορική έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό του γονιδίου EXOC3. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]

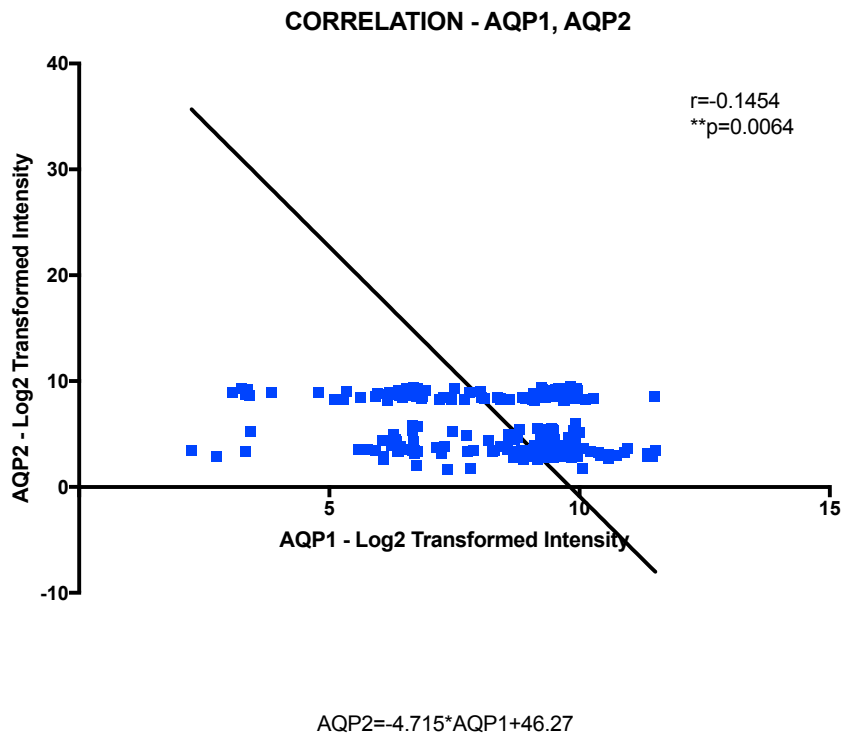
Comparative expression



Εικόνα 32. Διαφορική υπερ-έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος συγκριτικά με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό του γονιδίου Bcl-xL. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [214]

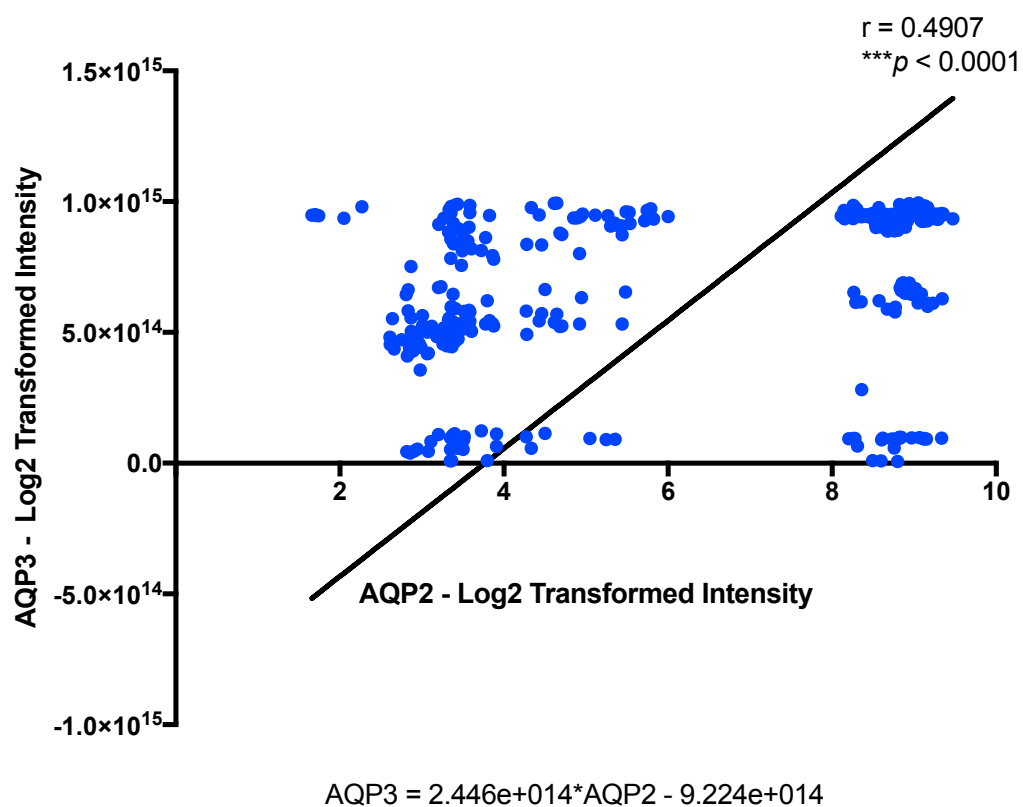
Παράλληλα, διαπιστώθηκαν ορισμένες σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ συγκεκριμένων ΔΕΓ ως προς την έκφρασή τους. Συγκεκριμένα η έκφραση του AQP2 συσχετίστηκε με την έκφραση των AQP1 ($p=0.0064$ και Spearman's $r=-0.1454$), AQP3 ($p < 0.0001$ και Spearman's $r=0.4907$) και AQP6 ($p < 0.0001$ και Spearman's $r=0.3376$). Επιπρόσθετα, η έκφραση του CLIC1 είχε θετική συσχέτιση με το CLIC3 ($p < 0.0001$ και Spearman's $r=0.5319$), ενώ του CLIC5 με το CLIC4 ($p < 0.0001$ και Spearman's $r=0.4015$) και CLIC6 ($p < 0.0001$ και Spearman's $r=0.2808$). Από την ανάλυση deming regression αναδείχθηκαν οι εξισώσεις που καθορίζουν αυτές τις συσχετίσεις: $AQP2 = -4.715 \cdot AQP1 + 46.27$

/ $AQP3=2.446e+014*AQP2-9.224e+014$ / $AQP6=1.007e+015*AQP2-5.662e+015$ / $CLIC3=2.044*CLIC1-16.22$ / $CLIC5=2.044*CLIC4-16.22$ / $CLIC6=0.4278*CLIC5+2.883$ [Εικόνες 33-38].



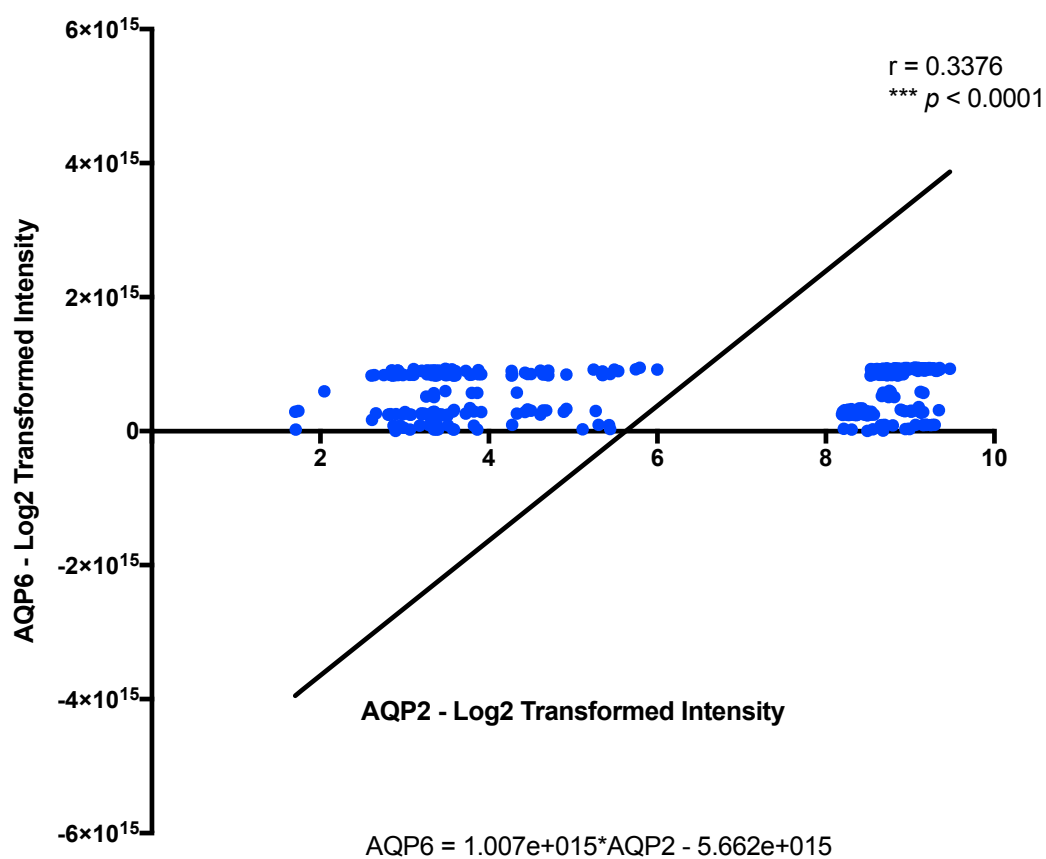
Εικόνα 33. Συσχέτιση έκφρασης μεταξύ AQP1-AQP2. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]

CORRELATION - AQP2, AQP3



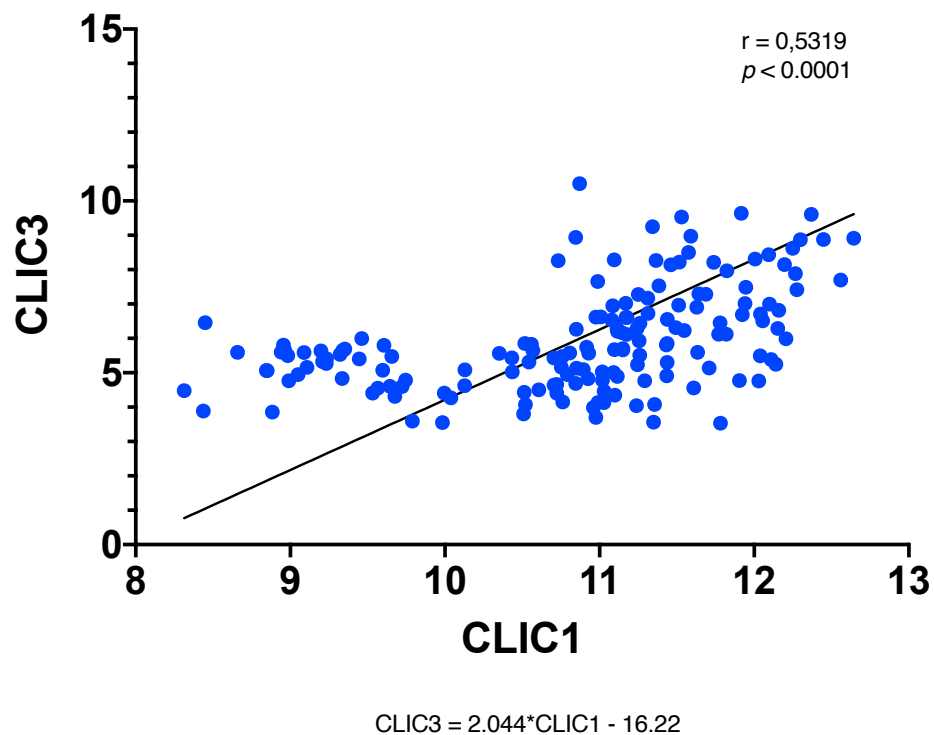
Εικόνα 34. Συσχέτιση έκφρασης μεταξύ AQP2-AQP3. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]

CORRELATION AQP2, AQP6

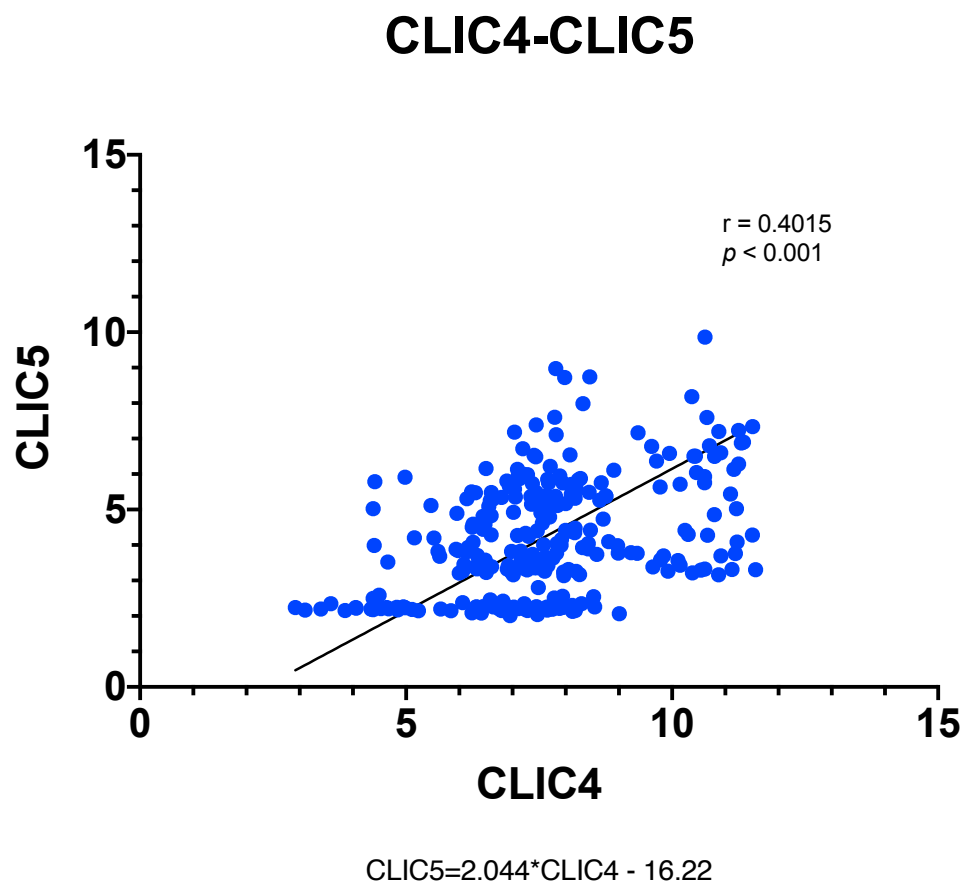


Εικόνα 35. Συσχέτιση έκφρασης μεταξύ AQP2-AQP6. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [213]

CLIC1-CLIC3

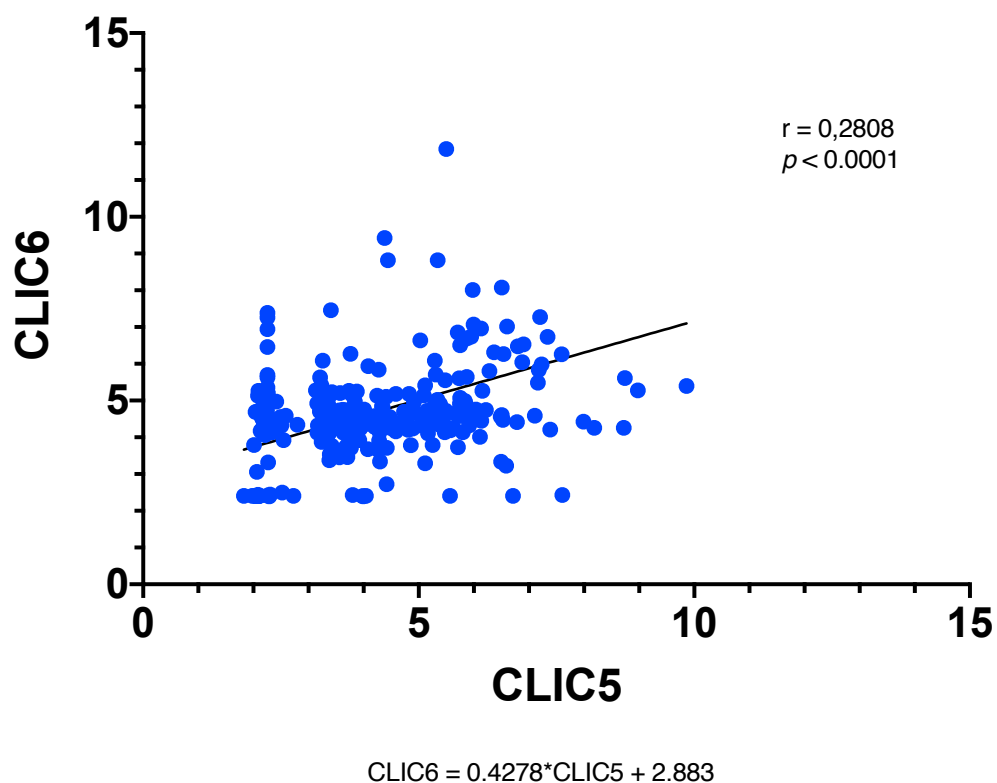


Εικόνα 36. Συσχέτιση έκφρασης μεταξύ CLIC1-CLIC3. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]



Εικόνα 37. Συσχέτιση έκφρασης μεταξύ CLIC4-CLIC5. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]

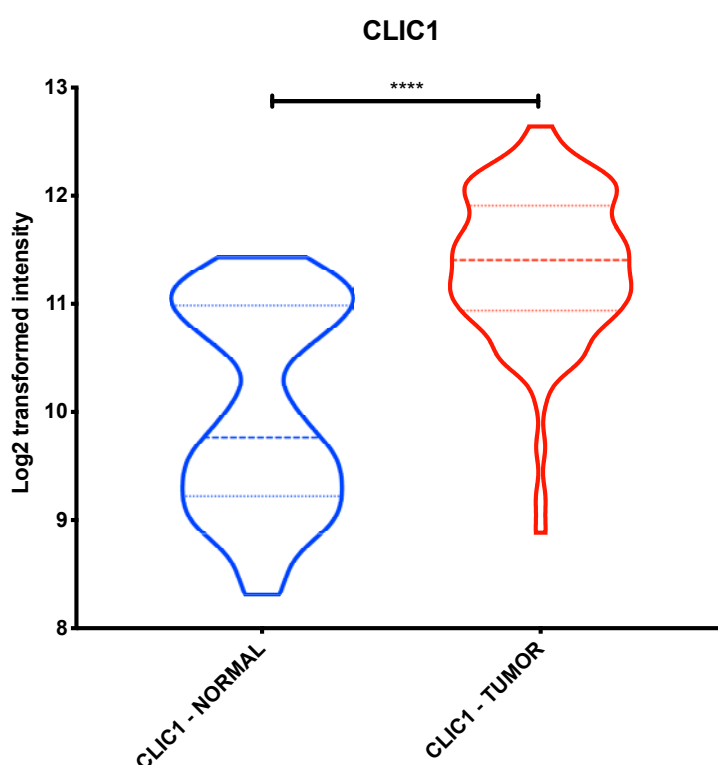
CLIC5-CLIC6



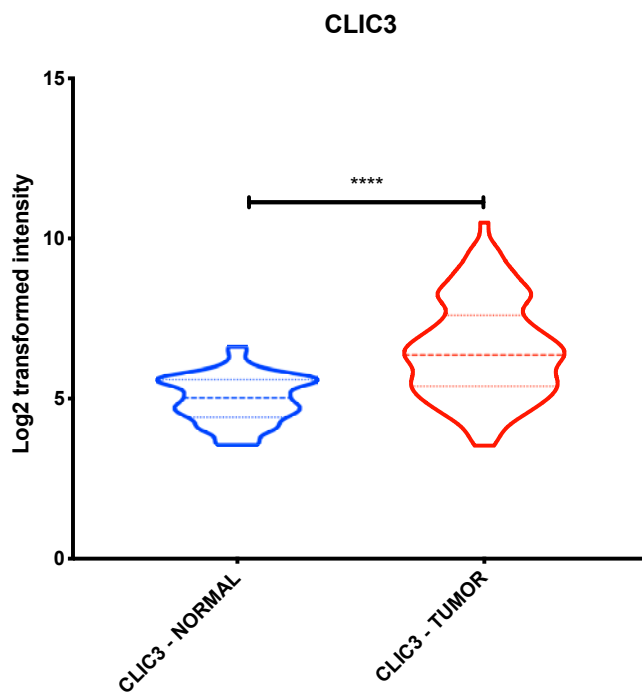
Εικόνα 38. Συσχέτιση έκφρασης μεταξύ CLIC5-CLIC6. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]

2.3.1. Εξέταση πιθανών προγνωστικών δεικτών σχετιζόμενων με την επιβίωση από την ομάδα των διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων (ΔΕΓ)

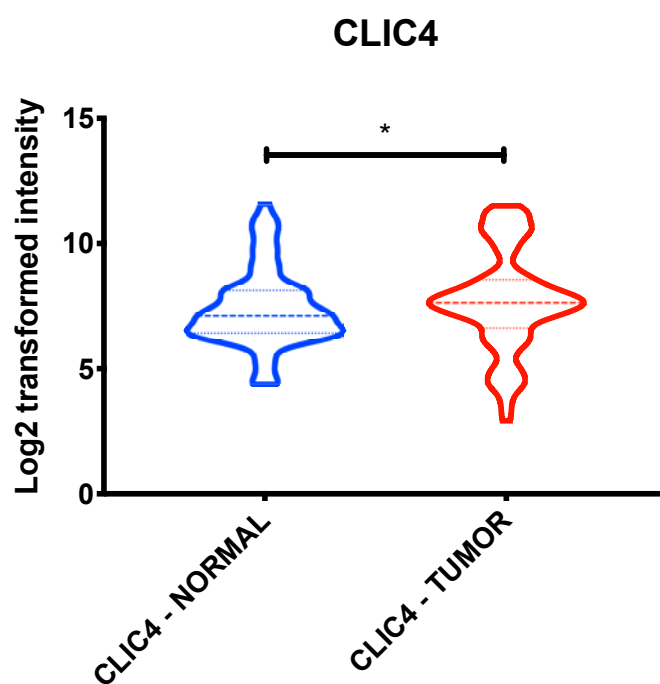
Για την αναζήτηση πιθανών προγνωστικών δεικτών σχετιζόμενων με την επιβίωση ασθενών με καρκίνο παγκρέατος κατασκευάστηκαν καμπύλες Kaplan-Meier για όλα τα ΔΕΓ που αναγνωρίστηκαν προηγουμένως. Μέσω αυτών των αναλύσεων αναγνωρίστηκαν συνολικά 11 προγνωστικοί δείκτες [**ARCN1** (HR: 3.1 [95% CI: 1.5-6.39]; $p=0.00215$), **AQP7** (HR: 0.86 [95% CI: 0.76-0.97]; $p=0.0135$), **COPE** (HR: 0.58 [95% CI: 0.39-0.86]; $p=0.00667$), **EXOC3** (HR: 0.45 [95% CI: 0.21-0.97]; $p=0.0428$), **CLIC1** (HR: 1.56 [95% CI: 1.16-2.1]; $p=0.003$), **CLIC3** (HR: 1.16 [95% CI: 1.05-1.28]; $p=0.0037$), **CLIC4** (HR: 1.44 [95% CI: 1.12, 1.85]; $p=0.005$), **GSTP1** (HR: 1.41 [95% CI: 1.12, 1.78]; $p=0.004$), **GDAP1** (HR: 0.71 [95% CI: 0.57-0.90]; $p=0.004$), **GDAP1L1** (HR: 0.95 [95% CI: 0.92, 0.98]; $p=0.003$), **PTGES2** (HR: 0.6 [95% CI: 0.42, 0.87]; $p=0.007$)]. Στις Εικόνες 25, 27, 29, 31, 42-45 φαίνονται οι προγνωστικοί παράγοντες.



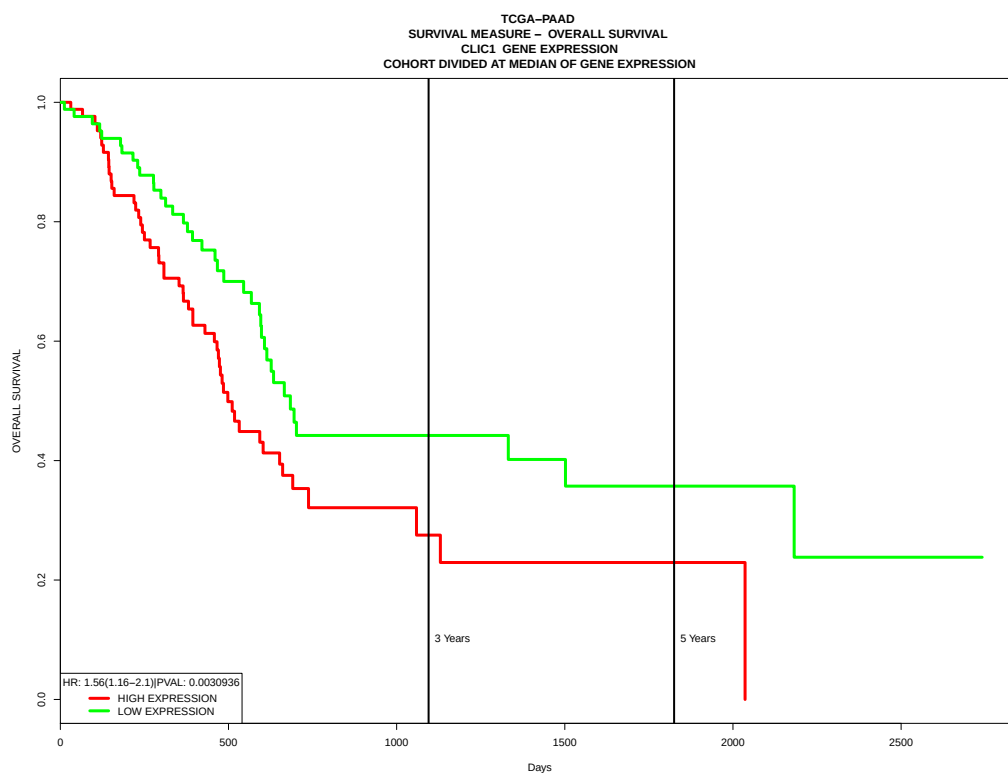
Εικόνα 39. Διαφορική έκφραση του CLIC1 σε φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό και παγκρεατικό καρκίνο. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]



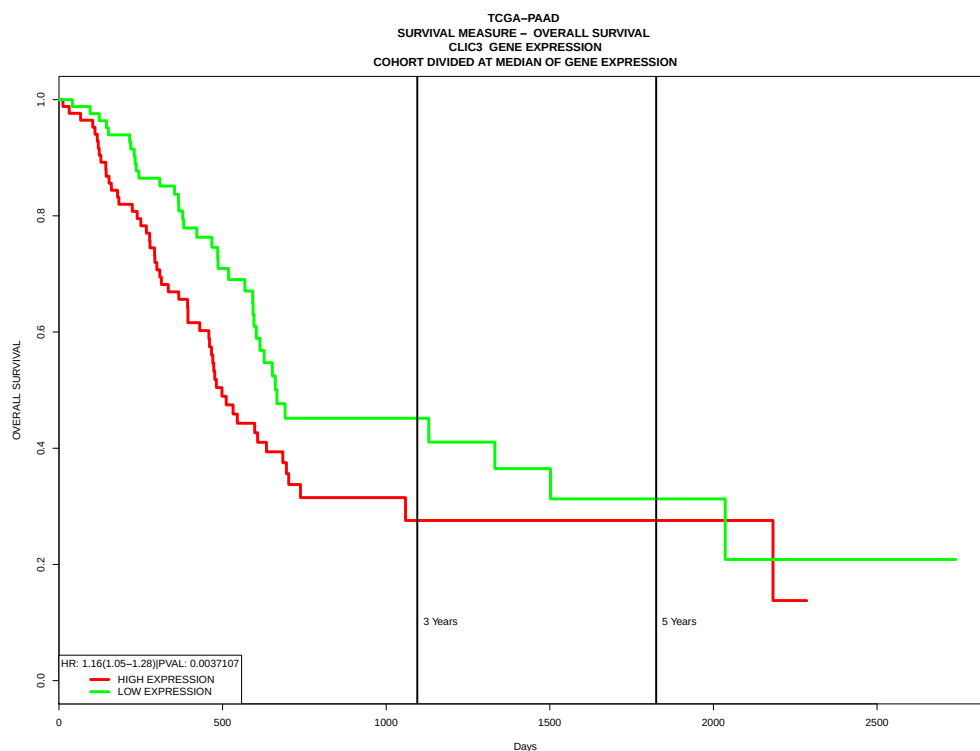
Εικόνα 40. Διαφορική έκφραση του CLIC3 σε φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό και παγκρεατικό καρκίνο. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]



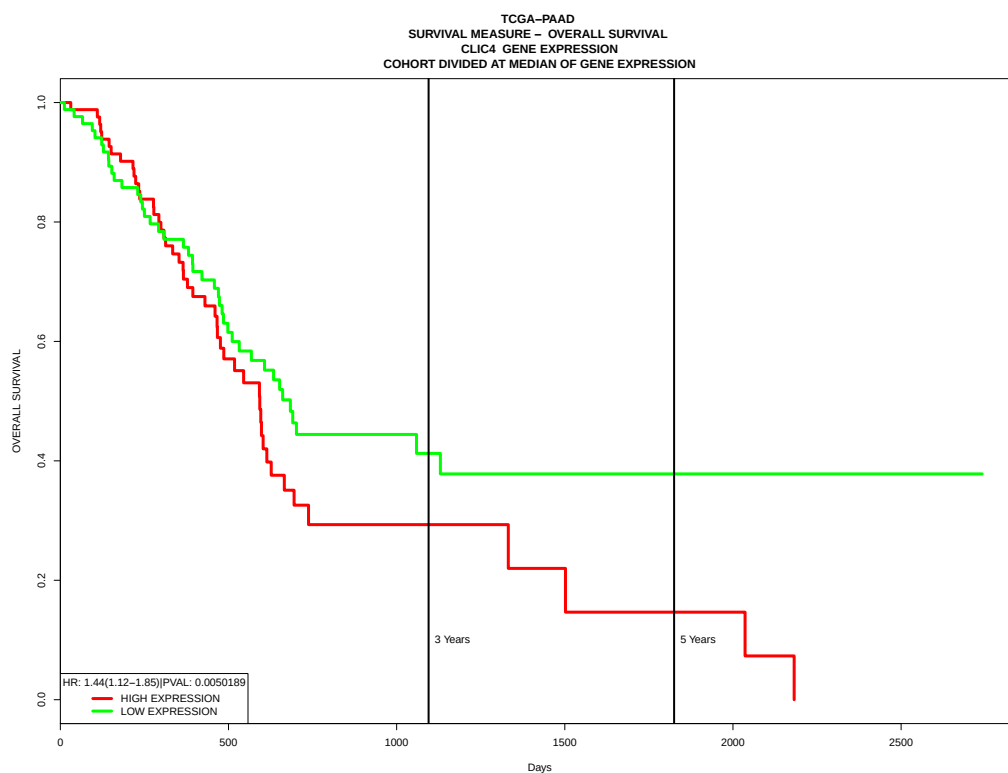
Εικόνα 41. Διαφορική έκφραση του CLIC4 σε φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό και παγκρεατικό καρκίνο. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]



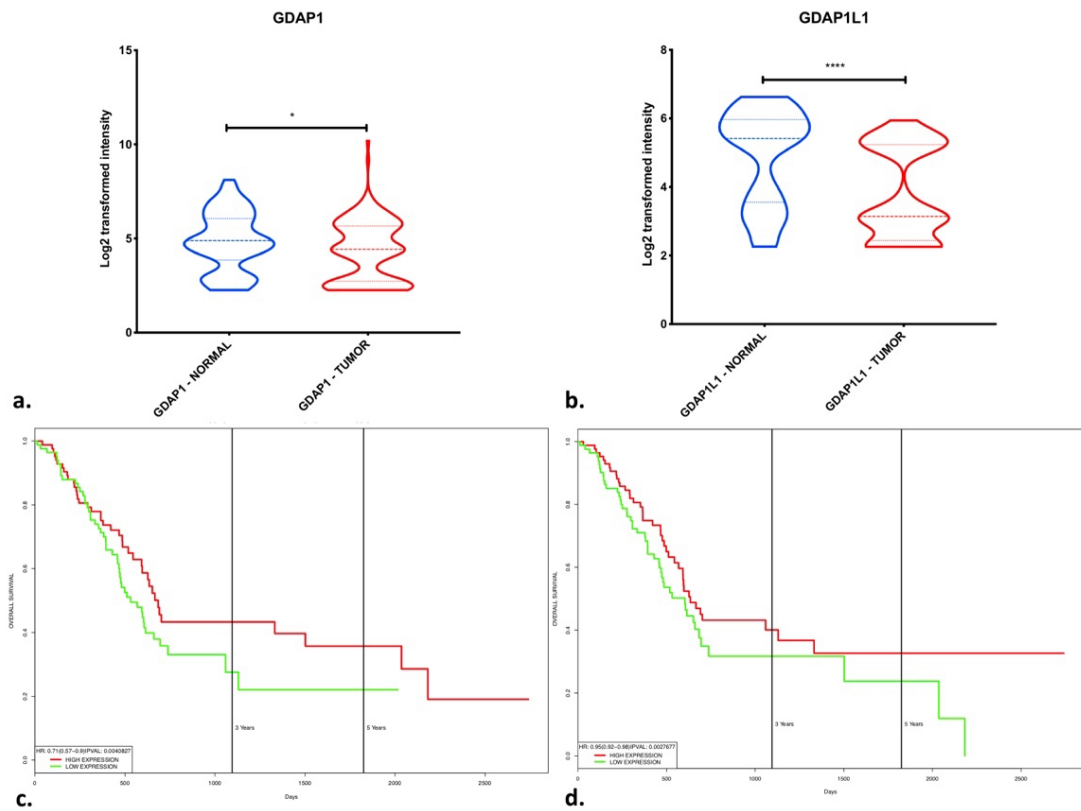
Εικόνα 42. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier σε ασθενείς με υψηλή και χαμηλή έκφραση του CLIC1. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]



Εικόνα 43. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier σε ασθενείς με υψηλή και χαμηλή έκφραση του CLIC3. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]



Εικόνα 44. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier σε ασθενείς με υψηλή και χαμηλή έκφραση του CLIC4. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]



Εικόνα 45. Συσχέτιση μεταξύ διαφορεικής έκφρασης και επιβίωσης σχετικά με a-c. GDAP1, b-e. GDAP1L1. Ανατύπωση από Magouliotis et al. [212]

3.4. Ανάλυση γονιδιακού λειτουργικού εμπλουτισμού (Gene Set Enrichment Analysis – GSEA)

Με την ανάλυση GSEA εντοπίσαμε τις κυριότερες μοριακές λειτουργίες και τα ρυθμιστικά miRNAs που σχετίζονται με τους προγνωστικούς δείκτες που αναγνωρίσαμε [Πίνακας 10].

	ID	Όνομα	Πηγή	p-Value	FDR B&H	FDR B&Y	Bonferroni
1	GO:0051434	BH3 domain binding	ToppFun	2.598e-4	4.832e-3	1.946e-2	8.053e-3
2	GO:0097371	MDM2/MDM4 family protein binding	ToppFun	4.676e-4	4.832e-3	1.946e-2	1.450e-2
3	GO:0070513	death domain binding	ToppFun	5.195e-4	4.832e-3	1.946e-2	1.611e-2
4	GO:0051400	BH domain binding	ToppFun	6.234e-4	4.832e-3	1.946e-2	1.933e-2
5	GO:0043027	cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process	ToppFun	1.351e-3	8.375e-3	3.373e-2	4.187e-2
6	GO:0004364	glutathione transferase activity	-	1.604e-16	7.380e-15	3.260e-14	7.380e-15
7	GO:0016765	transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	-	8.095e-15	1.862e-13	8.223e-13	3.723e-13
8	GO:0005254	chloride channel activity	-	2.723e-6	3.803e-5	1.680e-4	1.253e-4
9	GO:0015108	chloride transmembrane transporter activity	-	4.001e-6	3.803e-5	1.680e-4	1.841e-4
10	GO:0005253	anion channel activity	-	4.134e-6	3.803e-5	1.680e-4	1.902e-4
Ρυθμιστικές miRNA Οικογένειες							
	Όνομα		Πηγή	p-Value	FDR B&H	FDR B&Y	Bonferroni
1	hsa-miR-4804-5p		miRTarBase	2.076e-4	9.614e-3	6.412e-2	9.177e-2

2	hsa-miR-6770-3p	miRTarBase	2.768e-4	9.614e-3	6.412e-2	1.224e-1
3	hsa-miR-3619-3p	miRTarBase	4.291e-4	9.614e-3	6.412e-2	1.897e-1
4	hsa-miR-4776-5p	miRTarBase	4.706e-4	9.614e-3	6.412e-2	2.080e-1
5	hsa-miR-7152-3p	miRTarBase	4.845e-4	9.614e-3	6.412e-2	2.141e-1
6	hsa-miR-122:mirSVR conserved highEffect-0.5	MicroRNA.org	2.015e-5	7.938e-3	5.753e-2	1.588e-2
7	hsa-miR-618:mirSVR nonconserved highEffect-0.5	MicroRNA.org	1.124e-4	2.210e-2	1.602e-1	8.859e-2
8	hsa-miR-425*:mirSVR nonconserved highEffect-0.5	MicroRNA.org	1.403e-4	2.210e-2	1.602e-1	1.105e-1
9	hsa-miR-518f:mirSVR nonconserved highEffect-0.5	MicroRNA.org	2.264e-4	2.739e-2	1.985e-1	1.784e-1
1 0	hsa-miR-518c:mirSVR nonconserved highEffect-0.5	MicroRNA.org	2.994e-4	2.949e-2	2.137e-1	2.359e-1

Πίνακας 12. Μοριακές λειτουργίες και ρυθμιστικές οικογένειες miRNA σχετιζόμενες με τους προγνωστικούς δείκτες που αναγνωρίσαμε. FDR= False Discovery Rate

4. Συζήτηση

Η επιτυχής ανάπτυξη των ορθοτοπικών PDX έχει περιγραφεί ήδη από τη δεκαετία του '90 σε εργασία δημοσιευμένη από τους Furukawa et al. που περιγράφουν την ανάπτυξη κλινικά σχετικού ορθοτοπικού μοντέλου από κύτταρα ανθρώπινου γαστρικού καρκίνου τα οποία εμφυτεύονταν σε ποντίκια [178]. Από τότε διαφορετικά μοντέλα PDX έχουν δοκιμαστεί ως προκλινικά μοντέλα για διαφορετικούς τύπους καρκίνου [179-182]. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποδεικνύουν ότι τα ορθοτοπικά μοντέλα PDX παγκρεατικού καρκίνου είναι αποτελεσματικά.

Έχει υποστηριχθεί ότι τα ορθοτοπικά μοντέλα PDX παρουσιάζουν βελτιωμένη ομοιότητα ως προς το μικροπεριβάλλον και την κλωνική ετερογένεια των όγκων συγκριτικά με τα υποδόρια μοντέλα PDX [183], ενώ είναι και πιο αποτελεσματικά για τη δοκιμή θεραπευτικών παραγόντων. Παρόλ' αυτά, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το ποσοστό επιτυχούς εμφύτευσης εξαρτάται από το επίπεδο ανοσοκαταστολής των ζώων στα οποία εμφυτεύονται οι καρκινικοί όγκοι. Παρότι προηγούμενες μελέτες ανέδειξαν τον αντίκτυπο διαφορετικών χειρουργικών τεχνικών, πρωτοκόλλων επεξεργασίας των PDX, καθώς και παραγόντων που σχετικά με τη βιολογία του ίδιου του όγκου στην επιτυχή εμφύτευση των ορθοτοπικών PDX [184], στην παρούσα διατριβή διαπιστώθηκε η σημασία του επιπέδου της ανοσοκαταστολής στην επιτυχία της εμφύτευσης. Τα ποντίκια NSG που χαρακτηρίζονται από έλλειψη T, B, και NK λεμφοκυττάρων (τριπλή ανεπάρκεια) [185], ήταν τα πλέον ανοσοκατεσταλμένα από τα τρία στελέχη ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της διατριβής. Σε αυτό το πλαίσιο, αποδείχθηκε ότι τα ορθοτοπικά PDX σε NSG ποντίκια σχετίζονταν με το υψηλότερο ποσοστό επιτυχούς εμφύτευσης και καρκινικής ανάπτυξης. Τα NOD/SCID θεωρούνται λιγότερο ανοσοκατεσταλμένα συγκρινόμενα με τα ποντίκια NSG, λόγω της παρουσίας μερικώς λειτουργικών κυττάρων NK [186], και αυτός πιθανώς είναι ο λόγος του χαμηλότερου ποσοστού επιτυχούς εμφύτευσης και του χαμηλότερου ρυθμού ανάπτυξης των όγκων. Τέλος, τα ποντίκια RAG-1 που χαρακτηρίζονταν από το μικρότερο βαθμό ανοσοανεπάρκειας, με την απουσία μόνο ώριμων B και T λεμφοκυττάρων, δεν ανέπτυξαν παγκρεατικούς όγκους.

Αυτά τα ευρήματα αναδεικνύουν το σημαίνοντα ρόλο της ανοσολογικής επιτήρησης έναντι των καρκινικών κυττάρων, η καταστρατήγηση της οποίας αντιπροσωπεύει και έναν από τους βασικούς πυλώνες για την ανάπτυξη καρκίνου [187]. Στα πλαίσια αυτά, τα ευρήματα της παρούσας διατριβής αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η ανεπάρκεια των κυττάρων φυσικών φονέων (NK) στην καρκινική ανάπτυξη και πιθανά και στη μετάσταση τουλάχιστον στην περίπτωση του παγκρεατικού καρκίνου. Προηγούμενες μελέτες έχουν εμπλέξει τη δυσλειτουργία και υπο-έκφραση των κυττάρων NK, προτείνοντας τη πιθανή αξία της παρέμβασης στο στάδιο της τοπικά περιορισμένης νόσου [188]. Σε αυτή τη βάση, συγκεκριμένες θεραπευτικές στρατηγικές με NK κύτταρα έχουν προταθεί για τον καρκίνο του παγκρέατος, περιλαμβάνοντας ενεργοποίηση τους και *ex vivo* επέκταση των κυττάρων NK, μαζί με τον ανασυνδυασμένο χιμαιρικό αντιγονικό υποδοχέα chimeric antigen receptor-transduced NK (CAR-NK) [188]. Επιπρόσθετα, αναστολείς σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν τη δραστηριότητα των κυττάρων NK έχουν αναπτυχθεί ως πιθανοί παράγοντες στο πλαίσιο της αντικαρκινικής θεραπείας, όπως το Lirilumab (IPH2102/BMS-986015). Ωστόσο, η αξία τους ως προς την επιβίωση ακόμη δεν έχει αποδειχθεί σε μελέτες με ανθρώπους [189].

Ένα από τα μειονεκτήματα των προτύπων που δημιουργήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής είναι ότι δυστυχώς, δεν παρατηρήσαμε μεταστάσεις σε κάποιο από τα ορθοτοπικά μοντέλα PDX, κάτι που ωστόσο είναι σε συμφωνία με την έρευνα από τους Pham et al. [190]. Εδώ, αξίζει να σημειωθεί ότι ένας πιθανός παράγοντας που μπορεί να επηρέασε αυτό το αποτέλεσμα, είναι ότι δε εμφυτεύσαμε απευθείας τεμάχια του πρωτοπαθούς όγκου, αλλά κύτταρα κάτι που πιθανώς οδήγησε σε χαμηλότερης ποιότητας ορθοτοπικά PDX με χαμηλότερη ικανότητα να δίνουν μεταστάσεις [191]. Είναι αξιοσημείωτο ότι μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να διατηρήσει, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των PDX, την ακριβή αρχιτεκτονική του όγκου καθώς και το μικροπεριβάλλον προσφέροντας ένα περισσότερο κλινικά σχετικό ορθοτοπικό μοντέλο PDX [191]. Λαμβάνοντας υπόψιν το σημαντικό ρόλο των σχετιζόμενων με τον καρκίνο ινοβλαστών (CAFs), ειδικά στον καρκίνο του παγκρέατος [192,193] θα ήταν εξαιρετικής σημασίας να

διατηρήσουμε την αρχιτεκτονική του όγκου όσο το δυνατόν πιο ακέραια για την ανάπτυξη ρεαλιστικών και πιο χρήσιμων μοντέλων PDX.

Παράλληλα με την ανάπτυξη PDX για περαιτέρω εφαρμογές και μελέτες, η παρούσα διατριβή ανέδειξε για πρώτη φορά μία μοναδική γενετική υπογραφή 11 γονιδίων με διαφοροποιημένη έκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος, που αποτελούν ταυτόχρονα προγνωστικούς δείκτες σχετιζόμενους με την επιβίωση των ασθενών. Επίσης, αναδείξαμε τις σχετικές με το συγκεκριμένο πάνελ γονιδίων μοριακές λειτουργίες και ρυθμιστικές οικογένειες miRNA. Αυτό το γονιδιακό πάνελ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τα υπάρχοντα συστήματα σταδιοποίησης ώστε να εξαχθούν βελτιωμένες προγνωστικές πληροφορίες. Τα δεδομένα αυτά χρήζουν περαιτέρω έρευνας και δοκιμής σε μοντέλα PDX ώστε να αποκαλυφθεί πλήρως η εμπλοκή τους στον καρκίνο του παγκρέατος.

Η ανάλυσή μας έδειξε ότι το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργίες στη μεταφορά ύδατος και αλκοόλης, μεταφορά στο Golgi και των συνδεδεμένων με αυτές τις λειτουργίες σηματοδοτικών μονοπατιών. Τέσσερις από τους ταυτοποιημένους βιοδείκτες (AQP7, ARCN1, COPE, EXOC3) εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες, οι οποίες ρυθμίζονται κυρίως από το γονίδιο COPI. Η AQP7 εμπλέκεται στην μεταφορά του ύδατος, της γλυκερίνης και της ουρίας διαμέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Έχει επίσης εμπλακεί στην παθογένεση του ανθρώπινου ουροθηλιακού και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος [194, 195]. Στην πραγματικότητα, η AQP7 βρέθηκε υποεκφρασμένη στο ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό σύμφωνα με μια μελέτη [195]. Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, την υποέκφραση της AQP7 και στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Αυτή η υποέκφραση μπορεί να αποδοθεί σε μεταγραφική αναστολή, δεδομένων των σταθερά μειωμένων επιπέδων έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης της AQP7. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται αυτή η απορρύθμιση απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

Το ARCNI είναι μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη η οποία γενωμικά ανευρίσκεται σε μια γενετική περιοχή όπου παρατηρούνται πολλαπλές μετατοπίσεις χρωμοσωμάτων σχετιζόμενες με ποικίλες ασθένειες [196-198]. Η αλληλουχία του ARCNI είναι καλά συντηρημένη και αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να διαδραματίσει θεμελιώδη ρόλο στη βιολογία των ευκαρυωτικών κυττάρων [196-198]. Επιπλέον, παρουσιάζει ομοιότητες με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ και τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την κλαθρίνη, ενώ μπορεί να εμπλέκεται στη δομή ή τη διακίνηση κυστιδίων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το ARCNI υπερεκφράζεται στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το αυξημένο επίπεδο έκφρασης του ARCNI βρέθηκε ότι συσχετίζεται και με μειωμένη επιβίωση.

Το COPE είναι μια υπομονάδα ενός συμπλόκου πρωτεϊνών, το οποίο αποτελεί αναγκαίο συστατικό της διαδικασίας εκβλάστησης από το οργανίδιο Golgi και είναι απαραίτητο για την ανάδρομη μεταφορά από το οργανίδιο Golgi στο ενδοπλασματικό δίκτυο πρωτεϊνών [197, 198]. Το σύμπλοκο αποτελείται τουλάχιστον από τις υπομονάδες άλφα, βήτα, γάμμα, δέλτα, έψιλον και ζήτα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το COPE ήταν υπο-εκφρασμένο στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον, οι ασθενείς με χαμηλό επίπεδο έκφρασης COPE παρουσίασαν χαμηλότερη επιβίωση σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής έκφρασης.

Το EXOC3 είναι ένα συστατικό του συμπλέγματος εξωκύστεων που είναι απαραίτητο για την πρόσδεση εξωκυτταρικών κυστιδίων στοχευμένα σε συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη [199, 200]. Τουλάχιστον οκτώ συστατικά του συμπλέγματος εξωκύστεων, συμπεριλαμβανομένης της EXOC3 πρωτεΐνης, βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με τον μηχανισμό κυτταροσκελετικής αναδιαμόρφωσης και μεταφοράς κυστιδίων ακτίνης [199, 200]. Το σύμπλεγμα είναι επίσης απαραίτητο για τη βιογένεση της πολικότητας της επιφάνειας των επιθηλιακών κυττάρων [199, 200]. Στην παρούσα μελέτη, το επίπεδο έκφρασης του EXOC3 μειώθηκε στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος σε σύγκριση με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό. Οι ασθενείς που παρουσίαζαν χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης του EXOC3 συσχετίστηκαν με μειωμένη επιβίωση, προτείνοντας το εν λόγω γονίδιο ως προγνωστικό δείκτη.

Η ανάλυσή μας έδειξε επίσης ότι το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος χαρακτηρίζεται από απορρύθμιση της μεταφοράς χλωρίου, της μεταβολικής διαδικασίας παραγωγής γλουταθειόνης και της ρύθμισης της δραστηριότητας του διαύλου ανιόντων. Η CLIC1 είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στον κυτταρικό πυρήνα. Έχει εμπλακεί στην παθογένεση διαφορετικών τύπων καρκίνου, ενώ έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του γαστρικού, του παχέος εντέρου και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου [201, 202]. Τα ευρήματά μας σχετικά με την υπερέκφραση της CLIC1 στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος και την προγνωστική του σημασία είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μίας προηγούμενης μελέτης από τους Jia et al [203]. Η πρωτεΐνη CLIC3 εντοπίζεται επίσης στη μεμβράνη του κυτταρικού πυρήνα και έχει συσχετιστεί με διαφορετικές μεταστατικές διεργασίες [204]. Έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη CLIC3 διευκολύνει τη μετατόπιση της ιντεγκρίνης $\alpha 5 \beta 1$ από τα όψιμα ενδοσώματα/λυσosώματα στην κυτταρική επιφάνεια, προάγοντας έτσι την κινητικότητα των κυττάρων [205]. Στο ίδιο πλαίσιο, το υψηλό επίπεδο έκφρασης της CLIC3 συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση και υψηλότερο ποσοστό μετάστασης [205]. Στην παρούσα μελέτη, η πρωτεΐνη CLIC3 υπερεκφραζόταν σε PDAC και συσχετίστηκε με κακή επιβίωση. Επιπλέον, το επίπεδο έκφρασης της CLIC4 ήταν υψηλότερο στο PDAC σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα, ενώ το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης του CLIC4 συσχετίστηκε με φτωχότερη επιβίωση. Αυτά τα ευρήματα ήταν σύμφωνα με τη μοναδική προηγούμενη μελέτη [206] που αξιολογούσε το προφίλ έκφρασης της CLIC4 στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος, το οποίο επίσης έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης CLIC4 σχετίζεται με πτωχή επιβίωση. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν θετική συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου έκφρασης των CLIC1-CLIC3, CLIC4-CLIC5 και CLIC5-CLIC6 που περιγράφονται από συγκεκριμένες εξισώσεις.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η πρωτεΐνη GSTP1 διευκολύνει τον ξενοβιοτικό μεταβολισμό και την ογκογένεση [207, 208]. Ο μεταβολισμός του φαρμάκων μέσω του κυτοχρώματος P450 περιλαμβάνεται επίσης στις σχετικές οδούς που επηρεάζονται από την πρωτεΐνη GSTP1. Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώσαμε ότι η GSTP1 υπερεκφράζεται σε δείγματα ιστού

αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της GSTP1 συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση. Τα GDAP1 και GDAP1L1 είναι παράλογα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ρυθμίζουν το μιτοχονδριακό δίκτυο προάγοντας τη μιτοχονδριακή σχάση [209]. Τόσο το GDAP1 όσο και το GDAP1L1 υπερεκφράζονται στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος, ενώ συσχετίστηκαν με υψηλότερη επιβίωση. Ακόμη, το γονίδιο που μεταφράζεται στην πρωτεΐνη PTGES2 έχει εμπλακεί στην παθογένεση διαφορετικών τύπων καρκίνου [210, 211]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ, το PTGES2 ήταν ένας θετικός προγνωστικός δείκτης όσον αφορά τη διάμεση επιβίωση σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος. Η παρούσα μελέτη παρείχε τα πρώτα, διεθνώς, στοιχεία, εξ όσων γνωρίζουμε, που υποστηρίζουν τη σημαντική προγνωστική αξία των COPE, ARCN1, AQP7, EXOC3, GSTP1, GDAP1, GDAP1L1 και PTGES2 σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος.

Τέλος, οι μοριακές λειτουργίες που διαμεσολαβούνται από τους προγνωστικούς δείκτες που αναγνωρίστηκαν, όπως αποκαλύπτεται από την ανάλυση GSEA, συσχετίστηκαν με την τransφεράση της γλουταθειόνης, τη δραστικότητα τransφεράσης (μεταφορά αλκυλ- ή αρυλ- ομάδων), το κανάλι χλωρίου, τον διαμεμβρανικό μεταφορέα χλωρίου και τη δραστηριότητα του καναλιού ανιόντων. Επιπλέον, η ανάλυση GSEA προέβλεψε ότι οι προγνωστικοί δείκτες μπορεί να είναι στόχοι των μελών των οικογενειών miRNA hsa-miR-122, hsa-miR-618, hsa-miR-425, hsa-miR-518, hsa-miR-4804-5p, hsa-miR-6770-3p, hsa-miR-3619-3p και hsa-miR-7152-3p. Όπως πλέον είναι γνωστό τα microRNAs έχουν προταθεί ως σημαντικοί παράγοντες που εμπλέκονται στη βιολογία του PDAC, ενώ η βασισμένη σε miRNA θεραπεία του PDAC έχει προταθεί ως νέος και ελπιδοφόρος τομέας έρευνας [24]. Συνολικά, η παρούσα μελέτη καταδεικνύει για πρώτη φορά, τον πιθανό ρόλο αυτών των οικογενειών miRNA στη βιολογία PDAC.

5. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Καθώς η έρευνα για νέα θεραπευτικά σχήματα και ανοσοθεραπείες προχωράει, τα ορθοτοπικά μοντέλα PDX που παρουσιάζουμε στην παρούσα διατριβή επιτρέπουν μία σε βάθος εκτίμηση των νέων φαρμάκων σε ένα μικροπεριβάλλον όγκου που ομοιάζει με του ασθενούς. Με τον τρόπο αυτό επιταχύνεται η καρκινική έρευνα και διευκολύνεται η ανάπτυξη και δοκιμή περισσότερων νέων και καινοτόμων θεραπευτικών στρατηγικών. Περαιτέρω μελέτες για τη βελτίωση αυτών των μοντέλων βρίσκονται ήδη σε στάδιο ανάπτυξης στο εργαστήριο μας. Παράλληλα, ο εντοπισμός προγνωστικών δεικτών με *in silico* τεχνικές επιτρέπει την περαιτέρω στοχευμένη μελέτη τους σε μοντέλα PDX, σε μία πιο οικονομική ως προς το χρόνο και τους πόρους ερευνητική προσέγγιση. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής εντοπίσαμε ένα πάνελ 11 προγνωστικών βιοδεικτών που σχετίζονται με την επιβίωση ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος (ARCN1, AQP7, COPE, EXOC3, CLIC1, CLIC3, CLIC4, GSTP1, GDAP1, GDAP1L1, PTGES2). Από αυτά 4 υπερεκφράζονται (CLIC1, CLIC3, CLIC4, ARCN1), ενώ 7 (AQP7, COPE, EXOC3, GSTP1, GDAP1, GDAP1L1, PTGES2) υποεκφράζονται στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος. Επόμενη σχεδιαζόμενη ενέργειά μας είναι η μελέτη της έκφρασης των συγκεκριμένων προγνωστικών βιοδεικτών σε μοντέλα PDX. Ειδικά, όσον αφορά το AQP7, η μελέτη της έκφρασής του σε μοντέλα PDX θα έχει ακόμη μεγαλύτερη αξία, δεδομένου ότι η ανάδειξη του προγνωστικού του ρόλου στον καρκίνο του παγκρέατος από την ομάδα μας αποτελεί την πρώτη και μοναδική μέχρι σήμερα καταγραφή στη βιβλιογραφία. Τέλος, μεγάλη αξία θα έχει η περαιτέρω επιβεβαίωση των ευρημάτων μέσω κλινικών μελετών με ικανό αριθμό ασθενών.

Βιβλιογραφία

1. Bockman D.E. Anatomy of the Pancreas. Chapter 1. In: *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease* (2nd Ed). Edited by Go VLW, et al. Raven Press Ltd., New York, pp. 1-8, 1993.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64:9-29.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90. [Erratum, *CA Cancer J Clin* 2011;61:134.]
4. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014; 74: 2913–2921.
5. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol* 2012;23:1880-8. [Erratum, *Ann Oncol* 2012;23:2773.]
6. Ben Q, Xu M, Ning X, et al. Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer* 2011;47:1928-37.
7. Duell EJ, Lucenteforte E, Olson SH, et al. Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol* 2012;23:2964-70.
8. Aune D, Greenwood DC, Chan DS, et al. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol* 2012;23:843-52.
9. Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series. *Am J Gastroenterol* 2008;103:111-9.
10. Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, van Der Velden PA, Hille ET, Bergman W. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer* 2000;87:809-11.
11. Iqbal J, Ragone A, Lubinski J, et al. The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer* 2012;107:2005-9.

12. Jones S, Hruban RH, Kamiyama M, et al. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 2009;324:217.
13. Kanda M, Matthaei H, Wu J, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 2012; 142: 730–733 e739.
14. Morris JP IV, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 683–695.
15. Waddell N, Pajic M, Patch A-M, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015; 518: 495–501.
16. Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 2012; 491: 399–405.
17. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; 70: 7–30.
18. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394–424.
19. McWilliams RR, Maisonneuve P, Bamlet WR, et al. Risk factors for early-onset and very-early-onset pancreatic adenocarcinoma: a pancreatic cancer case-control consortium (PanC4) analysis. *Pancreas* 2016; 45: 311–16.
20. Stolzenberg-Solomon RZ, Schairer C, Moore S, Hollenbeck A, Silverman DT. Lifetime adiposity and risk of pancreatic cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. *Am J Clin Nutr* 2013;98: 1057–65.
21. Andersen DK, Korc M, Petersen GM, et al. Diabetes, pancreatogenic diabetes, and pancreatic cancer. *Diabetes* 2017; 66: 1103–10.
22. Pereira SP, Oldfield L, Ney A, et al. Early detection of pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; published online March 2. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30416-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30416-9).
23. Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC. Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer J* 2012; 18: 485–91.
24. Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1365–72.

25. Scarpa A, Real FX, Luchini C. Genetic unrelatedness of co-occurring pancreatic adenocarcinomas and IPMNs challenges current views of clinical management. *Gut* 2018; 67: 1561–63.
26. van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2002; 161: 1541–47.
27. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 2395–406.
28. Versteijne E, Suker M, Groothuis K, et al. Preoperative chemoradiotherapy versus immediate surgery for resectable and borderline resectable pancreatic cancer: results of the Dutch randomized phase III PREOPANC Trial. *J Clin Oncol* 2020; published online Feb 27. DOI:10.1200/JCO.19.02274.
29. Clohessy JG, Pandolfi PP. Mouse hospital and co-clinical trial project – from bench to bedside. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12: 491–498.
30. Sharpless NE, DePinho RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 741–754.
31. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 338–350.
32. Toolan HW. Growth of human tumors in cortisone-treated laboratory animals: the possibility of obtaining permanently transplantable human tumors. *Cancer Res* 1953; 13: 389–394.
33. Garber K. From human to mouse and back: 'tumorgraft' models surge in popularity. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 6–8.
34. Sereti E, Karagianellou T, Kotsoni I, Magouliotis D, Kamposioras K, Ulukaya E, et al. Patient derived xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer? *J Proteomics* 2018;188:107–118. doi: 10.1016/j.jprot.2018.01.012.
35. M.I. Canto, F. Harinck, R.H. Hruban, G.J. Offerhaus, J.W. Poley, I. Kamel, Y. Nio, R.S. Schulick, C. Bassi, I. Kluijdt, M.J. Levy, A. Chak, P. Fockens, M. Goggins, M. Bruno, International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer, *Gut* 62 (3) (2013) 339–347.
36. M. Hidalgo, E. Bruckheimer, N.V. Rajeshkumar, I. Garrido-Laguna, E. De Oliveira, Rubio-Viqueira, S. Strawn, M.J. Wick, J. Martell, D. Sidransky, A

- pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer, *Mol. Cancer Ther.* 10 (8) (2011) 1311–1316.
37. B. Bian, M. Bigonnet, O. Gayet, C. Loncle, A. Maignan, M. Gilabert, V. Moutardier, S. Garcia, O. Turrini, J.R. Delpero, M. Giovannini, P. Grandval, M. Gasmi, M. Ouaiissi, V. Secq, F. Poizat, R. Nicolle, Y. Blum, L. Marisa, M. Rubis, J.L. Raoul, J.E. Bradner, J. Qi, G. Lomberk, R. Urrutia, A. Saul, N. Dusetti, J. Iovanna, Gene expression profiling of patient-derived pancreatic cancer xenografts predicts sensitivity to the BET bromodomain inhibitor JQ1: implications for individualized medicine efforts, *EMBO Mol. Med.* 9 (4) (2017) 482–497.
 38. A. Jimeno, B. Rubio-Viqueira, N.V. Rajeshkumar, A. Chan, A. Solomon, M. Hidalgo, A fine-needle aspirate-based vulnerability assay identifies polo-like kinase 1 as a mediator of gemcitabine resistance in pancreatic cancer, *Mol. Cancer Ther.* 9 (2) (2010) 311–318.
 39. A. Carugo, G. Genovese, S. Seth, L. Nezi, J.L. Rose, D. Bossi, A. Cicalese, P.K. Shah, A. Viale, P.F. Pettazoni, K.C. Akdemir, C.A. Bristow, F.S. Robinson, J. Tepper, N. Sanchez, S. Gupta, M.R. Estecio, V. Giuliani, G.I. Dellino, L. Riva, W. Yao, M.E. Di Francesco, T. Green, C. D'Alesio, D. Corti, Y. Kang, P. Jones, H. Wang, J.B. Fleming, A. Maitra, P.G. Pelicci, L. Chin, R.A. DePinho, L. Lanfrancone, T.P. Heffernan, G.F. Draetta, In vivo functional platform targeting patient-derived xenografts identifies WDR5-Myc association as a critical determinant of pancreatic cancer, *Cell Rep.* 16 (1) (2016) 133–147.
 40. K. Kawaguchi, K. Igarashi, T. Murakami, T. Kiyuna, T.M. Lwin, H.K. Hwang, J.C. Delong, B.M. Clary, M. Bouvet, M. Unno, R.M. Hoffman, MEK inhibitors cobimetinib and trametinib, regressed a gemcitabine-resistant pancreatic-cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX), *Oncotarget* 8 (29) (2017) 47490–47496.
 41. H.S. Lee, M.J. Chung, J.Y. Park, S. Bang, S.W. Park, H.G. Kim, M.H. Noh, S.H. Lee, Y.T. Kim, H.J. Kim, C.D. Kim, D.K. Lee, K.B. Cho, C.M. Cho, J.H. Moon, D.U. Kim, D.H. Kang, Y.K. Cheon, H.S. Choi, T.H. Kim, J.K. Kim, J. Moon, H.J. Shin, S.Y. Song, A randomized, multicenter, phase III study of gemcitabine combined with capecitabine versus gemcitabine alone as first-line chemotherapy for advanced pancreatic cancer in South Korea, *Medicine* 96 (1) (2017) e5702.

42. M. Ueno, C.P. Li, M. Ikeda, H. Ishii, N. Mizuno, T. Yamaguchi, T. Ioka, D.Y. Oh, W. Ichikawa, T. Okusaka, Y. Matsuyama, D. Arai, L.T. Chen, Y.S. Park, J. Furuse, A randomized phase II study of gemcitabine plus Z-360, a CCK2 receptor-selective antagonist, in patients with metastatic pancreatic cancer as compared with gemcitabine plus placebo, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 80 (2) (2017) 307–315.
43. B. Rubio-Viqueira, A. Jimeno, G. Cusatis, X. Zhang, C. Iacobuzio-Donahue, C. Karikari, C. Shi, K. Danenberg, P.V. Danenberg, H. Kuramochi, K. Tanaka, S. Singh, H. Salimi-Moosavi, N. Bouraoud, M.L. Amador, S. Altiok, P. Kulesza, C. Yeo, W. Messersmith, J. Eshleman, R.H. Hruban, A. Maitra, M. Hidalgo, An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer, *Clin. Cancer Res.* 12 (15) (2006) 4652–4661.
44. K. Kawaguchi, K. Igarashi, T. Murakami, T. Kiyuna, T.M. Lwin, H.K. Hwang, J.C. Delong, B.M. Clary, M. Bouvet, M. Unno, R.M. Hoffman, MEK inhibitors cobimetinib and trametinib, regressed a gemcitabine-resistant pancreatic-cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX), *Oncotarget* 8 (29) (2017) 47490–47496.
45. V. Smith, G.J. Wirth, H.H. Fiebig, A.M. Burger, Tissue microarrays of human tumor xenografts: characterization of proteins involved in migration and angiogenesis for applications in the development of targeted anticancer agents, *Cancer Genomics Proteomics* 5 (5) (2008) 263–273.
46. D.T. Yapp, M.Q. Wong, A.H. Kyle, S.M. Valdez, J. Tso, A. Yung, P. Kozlowski, D.A. Owen, A.K. Buczkowski, S.W. Chung, C.H. Scudamore, A.I. Minchinton, S.S. Ng, The differential effects of metronomic gemcitabine and antiangiogenic treatment in patient-derived xenografts of pancreatic cancer: treatment effects on metabolism, vascular function, cell proliferation, and tumor growth, *Angiogenesis* 19 (2) (2016) 229–244.
47. I. Lohse, J. Rasowski, P. Cao, M. Pintilie, T. Do, M.S. Tsao, R.P. Hill, D.W. Hedley, Targeting hypoxic microenvironment of pancreatic xenografts with the hypoxiaactivated prodrug TH-302, *Oncotarget* 7 (23) (2016) 33571–33580.
48. I. Lohse, R. Kumareswaran, P. Cao, B. Pitcher, S. Gallinger, R.G. Bristow, D.W. Hedley, Effects of combined treatment with ionizing radiation and the PARP inhibitor olaparib in BRCA mutant and wild type patient-derived pancreatic cancer xenografts, *PLoS One* 11 (12) (2016) e0167272.

49. C. Gani, C. Coackley, R. Kumareswaran, C. Schutze, M. Krause, G. Zafarana, R.G. Bristow, In vivo studies of the PARP inhibitor, AZD-2281, in combination with fractionated radiotherapy: an exploration of the therapeutic ratio, *Radiother. Oncol.* 116 (3) (2015) 486–494.
50. I. Lohse, A. Borgida, P. Cao, M. Cheung, M. Pintilie, T. Bianco, S. Holter, E. Ibrahimov, R. Kumareswaran, R.G. Bristow, M.S. Tsao, S. Gallinger, D.W. Hedley, BRCA1 and BRCA2 mutations sensitize to chemotherapy in patientderived pancreatic cancer xenografts, *Br. J. Cancer* 113 (3) (2015) 425–432.
51. C. Li, D.G. Heidt, P. Dalerba, C.F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M.F. Clarke, D.M. Simeone, Identification of pancreatic cancer stem cells, *Cancer Res.* 67 (3) (2007) 1030–1037.
52. G. Pan, K. O'Rourke, A.M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, V.M. Dixit, The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *Science (New York, N.Y.)* 276 (5309) (1997) 111–113.
53. J.W. Eng, T.A. Mace, R. Sharma, D.Y.F. Twum, P. Peng, J.F. Gibbs, R. Pitoniak, C.B. Reed, S.I. Abrams, E.A. Repasky, B.L. Hylander, Pancreatic cancer stem cells in patient pancreatic xenografts are sensitive to drozitumab, an agonistic antibody against DR5, *J. Immunother. Cancer* 4 (2016) 33.
54. V.A. Venkatesha, L.A. Parsels, J.D. Parsels, L. Zhao, S.D. Zabloudoff, D.M. Simeone, Maybaum, T.S. Lawrence, M.A. Morgan, Sensitization of pancreatic cancer stem cells to gemcitabine by Chk1 inhibition, *Neoplasia (New York, N.Y.)* 14 (6) (2012) 519–525.
55. D.D. Von Hoff, R.K. Ramanathan, M.J. Borad, D.A. Laheru, L.S. Smith, T.E. Wood, R.L. Korn, N. Desai, V. Trieu, J.L. Iglesias, H. Zhang, P. Soon-Shiong, T. Shi, N.V. Rajeshkumar, A. Maitra, M. Hidalgo, Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial, *J. Clin. Oncol.* 29 (34) (2011) 4548–4554.
56. J.C. Byrd, R.R. Furman, S.E. Coutre, I.W. Flinn, J.A. Burger, K.A. Blum, B. Grant, J.P. Sharman, M. Coleman, W.G. Wierda, J.A. Jones, W. Zhao, N.A. Heerema, A.J. Johnson, J. Sukbuntherng, B.Y. Chang, F. Clow, E. Hedrick, J.J. Buggy, D.F. James, S. O'Brien, Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia, *N. Engl. J. Med.* 369 (1) (2013) 32–42.

57. B.Y. Chang, M.M. Huang, M. Francesco, J. Chen, J. Sokolove, P. Magadala, W.H. Robinson, J.J. Buggy, The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells, *Arthritis Res. Ther.* 13 (4) (2011) R115.
58. D. Masso-Valles, T. Jauset, E. Serrano, N.M. Sodik, K. Pedersen, N.I. Affara, J.R. Whitfield, M.E. Beaulieu, G.I. Evan, L. Elias, J. Arribas, L. Soucek, Ibrutinib exerts potent antifibrotic and antitumor activities in mouse models of pancreatic adenocarcinoma, *Cancer Res.* 75 (8) (2015) 1675–1681.
59. N.V. Rajeshkumar, S. Yabuuchi, S. Pai, E. De Oliveira, J.J. Kamphorst, J.D. Rabinowitz, H. Tejero, F. Al-Shahrour, M. Hidalgo, A. Maitra, C.V. Dang, Treatment of pancreatic cancer patient-derived xenograft panel with metabolic inhibitors reveals efficacy of phenformin, *Clin. Cancer Res.* 23 (18) (2017) 5639–5647.
60. A.K. Witkiewicz, N.A. Borja, J. Franco, J.R. Brody, C.J. Yeo, J. Mansour, M.A. Choti, P. McCue, E.S. Knudsen, Selective impact of CDK4/6 suppression on patient-derived models of pancreatic cancer, *Oncotarget* 6 (18) (2015) 15788–15801.
61. J. Sang, J. Acquaviva, J.C. Friedland, D.L. Smith, M. Sequeira, C. Zhang, Q. Jiang, L. Xue, C.M. Lovly, J.P. Jimenez, A.T. Shaw, R.C. Doebele, S. He, R.C. Bates, D.R. Camidge, S.W. Morris, I. El-Hariry, D.A. Proia, Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer, *Cancer Discov.* 3 (4) (2013) 430–443.
62. T. Makhnevych, W.A. Houry, The role of Hsp90 in protein complex assembly, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (3) (2012) 674–682.
63. E. Bobrov, N. Skobeleva, D. Restifo, N. Beglyarova, K.Q. Cai, E. Handorf, K. Campbell, D.A. Proia, V. Khazak, E.A. Golemis, I. Astsaturov, Targeted delivery of chemotherapy using HSP90 inhibitor drug conjugates is highly active against pancreatic cancer models, *Oncotarget* 8 (3) (2017) 4399–4409.
64. J. Stebbing, K. Paz, G.K. Schwartz, L.H. Wexler, R. Maki, R.E. Pollock, R. Morris, R. Cohen, A. Shankar, G. Blackman, V. Harding, D. Vasquez, J. Krell, S. Zacharoulis, D. Ciznadija, A. Katz, D. Sidransky, Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma, *Cancer* 120 (13) (2014) 2006–2015.

65. M.C. Villarroel, N.V. Rajeshkumar, I. Garrido-Laguna, A. De Jesus-Acosta, S. Jones, A. Maitra, R.H. Hruban, J.R. Eshleman, A. Klein, D. Laheru, R. Donehower, M. Hidalgo, Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer, *Mol. Cancer Ther.* 10 (1) (2011) 3–8.
66. E. Izumchenko, K. Paz, D. Ciznadija, I. Sloma, A. Katz, D. Vasquez-Dunddel, I. Ben-Zvi, J. Stebbing, W. McGuire, W. Harris, R. Maki, A. Gaya, A. Bedi, S. Zacharoulis, R. Ravi, L.H. Wexler, M.O. Hoque, C. Rodriguez-Galindo, H. Pass, N. Peled, A. Davies, R. Morris, M. Hidalgo, D. Sidransky, Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors, *Ann. Oncol.* 28 (10) (2017) 2595–2605.
67. Garrido-Laguna, A.C. Tan, M. Uson, M. Angenendt, W.W. Ma, M.C. Villarroel, M. Zhao, N.V. Rajeshkumar, A. Jimeno, R. Donehower, C. Iacobuzio-Donahue, M. Barrett, M.A. Rudek, B. Rubio-Viqueira, D. Laheru, M. Hidalgo, Integrated preclinical and clinical development of mTOR inhibitors in pancreatic cancer, *Br. J. Cancer* 103 (5) (2010) 649–655.
68. D. Laheru, P. Shah, N.V. Rajeshkumar, F. McAllister, G. Taylor, H. Goldsweig, D.T. Le, R. Donehower, A. Jimeno, S. Linden, M. Zhao, D. Song, M.A. Rudek, Hidalgo, Integrated preclinical and clinical development of S-trans, trans-Farnesylthiosalicylic Acid (FTS, Salirasib) in pancreatic cancer, *Investig. New Drugs* 30 (6) (2012) 2391–2399.
69. S. Kopetz, R. Lemos, G. Powis, The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men, *Clin. Cancer Res.* 18 (19) (2012) 5160–5162.
70. Magouliotis DE, Tasiopoulou VS, Svokos AA, Svokos KA. Aquaporins in health and disease. *Adv Clin Chem.* 2020;98:149-171. doi: 10.1016/bs.acc.2020.02.005. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32564785.
71. Magouliotis DE, Lafazanis K, Koutsogianni F, Sakellaridis N, Ioannou M, Zacharoulis D, Dimas K. Establishment of Patient-derived Orthotopic Xenografts (PDX) as Models for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *In Vivo.* 2022 May-Jun;36(3):1114-1119. doi: 10.21873/invivo.12809.
72. Fichtner, J. Rolff, R. Soong, J. Hoffmann, S. Hammer, A. Sommer, M. Becker, J. Merk, Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer

- xenografts as models for the identification of predictive biomarkers, *Clin. Cancer Res.* 14 (20) (2008) 6456–6468.
73. K.F. Schmidt, M. Ziu, N.O. Schmidt, P. Vaghasia, T.G. Cargioli, S. Doshi, M.S. Albert, P.M. Black, R.S. Carroll, Y. Sun, Volume reconstruction techniques improve the correlation between histological and in vivo tumor volume measurements in mouse models of human gliomas, *J. Neuro-Oncol.* 68 (3) (2004) 207–215.
 74. S. Julien, A. Merino-Trigo, L. Lacroix, M. Pocard, D. Goere, P. Mariani, S. Landron, L. Bigot, F. Nemati, P. Dartigues, L.B. Weiswald, D. Lantuas, L. Morgand, E. Pham, P. Gonin, V. Dangles-Marie, B. Job, P. Dessen, A. Bruno, A. Pierre, H. De The, H. Soliman, M. Nunes, G. Lardier, L. Calvet, B. Demers, G. Prevost, P. Vrignaud, S. Roman-Roman, O. Duchamp, C. Berthet, Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.* 18 (19) (2012) 5314–5328.
 75. D.M. Walters, J.B. Stokes, S.J. Adair, E.B. Stelow, C.A. Borgman, B.T. Lowrey, W. Xin, E.M. Blais, J.K. Lee, J.A. Papin, J.T. Parsons, T.W. Bauer, Clinical, molecular and genetic validation of a murine orthotopic xenograft model of pancreatic adenocarcinoma using fresh human specimens, *PLoS One* 8 (10) (2013) e77065.
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=561725>.
 76. P. Dauer, A. Nomura, A. Saluja, S. Banerjee, Microenvironment in determining chemo-resistance in pancreatic cancer: neighborhood matters, *Pancreatology* 17 (1) (2017) 7–12.
 77. L.G. Melstrom, M.D. Salazar, D.J. Diamond, The pancreatic cancer microenvironment: a true double agent, *J. Surg. Oncol.* 116 (1) (2017) 7–15.
 78. Neesse, P. Michl, K.K. Frese, C. Feig, N. Cook, M.A. Jacobetz, M.P. Lolkema, M. Buchholz, K.P. Olive, T.M. Gress, D.A. Tuveson, Stromal biology and therapy in pancreatic cancer, *Gut* 60 (6) (2011) 861–868.
 79. L. Sanz, A.M. Cuesta, C. Salas, C. Corbacho, C. Bellas, L. Alvarez-Vallina. Differential transplantability of human endothelial cells in colorectal cancer and renal cell carcinoma primary xenografts, *Lab. Investig.* 89 (1) (2009) 91–97.

80. H.H. Fiebig, J. Schuler, N. Bausch, M. Hofmann, T. Metz, A. Korrat, Gene signatures developed from patient tumor explants grown in nude mice to predict tumor response to 11 cytotoxic drugs, *Cancer Genomics Proteomics* 4 (3) (2007) 197–209.
81. K. Jin, G. Li, B. Cui, J. Zhang, H. Lan, N. Han, B. Xie, F. Cao, K. He, H. Wang, Z. Xu, L. Teng, T. Zhu, Assessment of a novel VEGF targeted agent using patient-derived tumor tissue xenograft models of colon carcinoma with lymphatic and hepatic metastases, *PLoS One* 6 (12) (2011) e28384.
82. Y. Lai, X. Wei, S. Lin, L. Qin, L. Cheng, P. Li, Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research, *J. Hematol. Oncol.* 10 (1) (2017) 106.
83. P. Cottu, I. Bieche, F. Assayag, R. El Botty, S. Chateau-Joubert, A. Thuleau, T. Bagarre, B. Albaud, A. Rapinat, D. Gentien, P. de la Grange, V. Sibut, S. Vacher, R. Hatem, J.L. Servely, J.J. Fontaine, D. Decaudin, J.Y. Pierga, S. Roman-Roman, E. Marangoni, Acquired resistance to endocrine treatments is associated with tumor-specific molecular changes in patient-derived luminal breast cancer xenografts, *Clin. Cancer Res.* 20 (16) (2014) 4314–4325.
84. K. Kemper, O. Krijgsman, P. Cornelissen-Steijger, A. Shahrabi, F. Weeber, J.Y. Song, T. Kuilman, D.J. Vis, L.F. Wessels, E.E. Voest, T.N. Schumacher, C.U. Blank, D.J. Adams, J.B. Haanen, D.S. Peeper, Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts, *EMBO Mol. Med.* 7 (9) (2015) 1104–1118.
85. K. Kemper, O. Krijgsman, X. Kong, P. Cornelissen-Steijger, A. Shahrabi, F. Weeber, D.L. van der Velden, O.B. Bleijerveld, T. Kuilman, R.J.C. Kluin, C. Sun, E.E. Voest, Y.S. Ju, T.N.M. Schumacher, A.F.M. Altelaar, U. McDermott, D.J. Adams, C.U. Blank, J.B. Haanen, D.S. Peeper, BRAF(V600E) kinase domain duplication identified in therapy-refractory melanoma patient-derived xenografts, *Cell Rep.* 16 (1) (2016) 263–277.
86. Z.C. Dobbin, A.A. Katre, A.D. Steg, B.K. Erickson, M.M. Shah, R.D. Alvarez, M.G. Conner, D. Schneider, D. Chen, C.N. Landen, Using heterogeneity of the patient-derived xenograft model to identify the chemoresistant population in ovarian cancer, *Oncotarget* 5 (18) (2014) 8750–8764.

87. S. Sugimoto, H. Komatsu, Y. Morohoshi, T. Kanai, Recognition of and recent issues in hereditary diffuse gastric cancer, *J. Gastroenterol.* 50 (8) (2015) 831–843.
88. Q. Du, L. Jiang, X.Q. Wang, W. Pan, F.F. She, Y.L. Chen, Establishment of and comparison between orthotopic xenograft and subcutaneous xenograft models of gallbladder carcinoma, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15 (8) (2014) 3747–3752.
89. K.M. Brown, A. Xue, A. Mittal, J.S. Samra, R. Smith, T.J. Hugh, Patient-derived xenograft models of colorectal cancer in pre-clinical research: a systematic review, *Oncotarget* 7 (40) (2016) 66212–66225.
90. A.T. Byrne, D.G. Alferez, F. Amant, D. Annibali, J. Arribas, A.V. Biankin, A. Bruna, E. Budinska, C. Caldas, D.K. Chang, R.B. Clarke, H. Clevers, G. Coukos, V. Dangles-Marie, S.G. Eckhardt, E. Gonzalez-Suarez, E. Hermans, M. Hidalgo, M.A. Jarzabek, S. de Jong, J. Jonkers, K. Kemper, L. Lanfrancone, G.M. Maelandsmo, E. Marangoni, J.C. Marine, E. Medico, J.H. Norum, H.G. Palmer, D.S. Peeper, P.G. Pelicci, A. Piris-Gimenez, S. Roman-Roman, O.M. Rueda, J. Seoane, V. Serra, L. Soucek, D. Vanhecke, A. Villanueva, E. Vinolo, A. Bertotti, L. Trusolino, Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts, *Nat. Rev. Cancer* 17 (4) (2017) 254–268.
91. P.A. Konstantinopoulos, U.A. Matulonis, Current status and evolution of preclinical drug development models of epithelial ovarian cancer, *Front. Oncol.* 3 (2013) 296.
92. P. Eirew, A. Steif, J. Khattra, G. Ha, D. Yap, H. Farahani, K. Gelmon, S. Chia, C. Mar, A. Wan, E. Laks, J. Biele, K. Shumansky, J. Rosner, A. McPherson, C. Nielsen, A.J. Roth, C. Lefebvre, A. Bashashati, C. de Souza, C. Siu, R. Aniba, J. Brimhall, A. Oloumi, T. Osako, A. Bruna, J.L. Sandoval, T. Algara, W. Greenwood, K. Leung, H. Cheng, H. Xue, Y. Wang, D. Lin, A.J. Mungall, R. Moore, Y. Zhao, J. Lorette, L. Nguyen, D. Huntsman, C.J. Eaves, C. Hansen, M.A. Marra, C. Caldas, S.P. Shah, S. Aparicio, Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution, *Nature* 518 (7539) (2015) 422–426.
93. E. Marangoni, A. Vincent-Salomon, N. Auger, A. Degeorges, F. Assayag, P. De Cremoux, L. de Plater, C. Guyader, G. De Pinieux, J.G. Judde, M. Rebucci,

- C. Tran-Perennou, X. Sastre-Garau, B. Sigal-Zafrani, O. Delattre, V. Dieras, M.F. Poupon, A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays, *Clin. Cancer Res.* 13 (13) (2007) 3989–3998.
94. C. Sun, L. Wang, S. Huang, G.J. Heynen, A. Prahallad, C. Robert, J. Haanen, C. Blank, J. Wesseling, S.M. Willems, D. Zecchin, S. Hobor, P.K. Bajpe, C. Liefstink, C. Mateus, S. Vagner, W. Grernrum, I. Hofland, A. Schlicker, L.F. Wessels, R.L. Beijersbergen, A. Bardelli, F. Di Nicolantonio, A.M. Eggermont, R. Bernards, Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma, *Nature* 508 (7494) (2014) 118–122.
 95. E.L. Stewart, S.Z. Tan, G. Liu, M.-S. Tsao, Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations—a review, *Transl. Lung Cancer Res.* 4 (1) (2015) 67–81.
 96. T. Hylander, L. Latif, U. Petersson-Westin, L.O. Cardell, Intralymphatic allergenspecific immunotherapy: an effective and safe alternative treatment route for pollen-induced allergic rhinitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2) (2013) 412–420.
 97. R.D. Schreiber, L.J. Old, M.J. Smyth, Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion, *Science* 331 (6024) (2011) 1565–1570.
 98. N. Bhardwaj, Harnessing the immune system to treat cancer, *J. Clin. Investig.* 117 (5) (2007) 1130–1136.
 99. M. Ishikawa, K. Yoshida, Y. Yamashita, J. Ota, S. Takada, H. Kisanuki, K. Koinuma, Y.L. Choi, R. Kaneda, T. Iwao, K. Tamada, K. Sugano, H. Mano, Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells, *Cancer Sci.* 96 (7) (2005) 387–393.
 100. M.W. Melkus, J.D. Estes, A. Padgett-Thomas, J. Gatlin, P.W. Denton, F.A. Othieno, A.K. Wege, A.T. Haase, J.V. Garcia, Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1, *Nat. Med.* 12 (11) (2006) 1316–1322.
 101. B.M. Holzapfel, F. Wagner, L. Thibaudeau, J.P. Levesque, D.W. Hutmacher, Concise review: humanized models of tumor immunology in the 21st century: convergence of cancer research and tissue engineering, *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 33 (6) (2015) 1696–1704.

102. M.A. King, L. Covassin, M.A. Brehm, W. Racki, T. Pearson, J. Leif, J. Laning, W. Fodor, O. Foreman, L. Burzenski, T.H. Chase, B. Gott, A.A. Rossini, R. Bortell, L.D. Shultz, D.L. Greiner, Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex, *Clin. Exp. Immunol.* 157 (1) (2009) 104–118.
103. A.C. Drake, Q. Chen, J. Chen, Engineering humanized mice for improved hematopoietic reconstitution, *Cell. Mol. Immunol.* 9 (3) (2012) 215–224.
104. A.S. Verkman, Aquaporins in clinical medicine, *Annu. Rev. Med.* 63 (2012) 303–316.
105. A.S. Verkman, M. Hara-Chikuma, M.C. Papadopoulos, Aquaporins—new players in cancer biology, *J Mol Med (Berl)*. (2008) 86:523–529.
106. M.C. Papadopoulos, S. Saadoun, Key roles of aquaporins in tumor biology, *Biochim Biophys Acta*. (2015) 1848:2576–2583.
107. Rojek, J. Praetorius, J. Frokiaer, S. Nielsen, R.A. Fenton, A current view of the mammalian aquaglyceroporins, *Annu. Rev. Physiol.* 70 (2008) 301–327.
108. T. Walz, Y. Fujiyoshi, A. Engel, The AQP structure and functional implications, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2009) 31–56.
109. T. Gonen, T. Walz, The structure of aquaporins. *Q. Rev. Biophys.* (2006) 39 (4): 361–96. doi:10.1017/S003358350600445
110. D. Fu, M. Lu, The structural basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins, *Mol. Membr. Biol.* (2007) 24 (5–6): 366–74. doi: 10.1080/09687680701446965
111. P. Agre, D. Kozono, Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases, *FEBS Lett.* (2003) 555 (1): 72–8. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01083-4
112. R.I. Macey, D.M. Karan, R.E. Farmer, Properties of waterchannels in human red cells, *Biomembranes* (1972) 3:331–340
113. E.P. Carter, B.P. Ölveczky, M.A. Matthay, A.S. Verkman, High microvascular endothelial water permeability in mouse lung measured by a pleural surface fluorescence method, *Biophys J* (1998) 74:2121–2128
114. G.M. Preston, P. Agre, Isolation of the cDNA for erythrocyte integral

- membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family, *Proc Natl Acad Sci* (1991) 88:11110–11114
115. G.M. Preston, T.P. Carroll, W.B. Guggino, P. Agre, Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP 28 protein, *Science* (1992) 256:385–387. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.265.3.F461>
 116. G. Benga, On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives), *Mol AspMed* (2012) 33:514–517
 117. K. Ishibashi, S. Koike, S. Kondo, S. Hara, Y. Tanaka, The role of a group III AQP, AQP11 in intracellular organelle homeostasis, *J Med Invest* (2009) 56:312–317
 118. L. Abrami, V. Berthoud, G. Rousselet, F. Tacnet, P. Ripoché, P.M.T. Deen, Glycerol permeability of mutant aquaporin 1 and other AQP-MIP proteins: inhibition studies, *Pflügers Arch Eur J Physiol* (1996) 431:408–414
 119. M. Echevarría, E.E. Windhager, G. Frindt, Selectivity of the renal collecting duct water channel aquaporin-3, *J Biol Chem* (1996) 271:25079–25082
 120. H. Hasegawa, T. Ma, W. Skach, M.A. Matthay, A.S. Verkman, Molecular cloning of a mercurial insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues, *J Biol Chem* (1994) 269:5497–5500
 121. M.D. Lee, K.Y. Bhakta, S. Raina, et al. The human aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization. *J Biol Chem* (1996) 271:8599–8604
 122. B. Yang, A.S. Verkman, Water and Glycerol Permeabilities of Aquaporins 1–5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *xenopus* oocytes, *J Biol Chem* (1997) 272:16140–16146
 123. N. Koyama, K. Ishibashi, M. Kuwahara, et al. Cloning and functional expression of human aquaporin 8 cDNA and analysis of its gene. *Genomics* (1998) 54:169–172
 124. K. Ishibashi, M. Kuwahara, Y. Kageyama, A. Tohsaka, F. Marumo, S. Sasaki, Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis, *Biochem Biophys Res Commun* (1997) 237:714–718
 125. K. Liu, H. Nagase, C.G. Huang, G. Calamita, P. Agre, Purification and functional characterization of aquaporin-8, *Biol Cell* (2006) 98:153–161
 126. K. Ishibashi, Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes, *Biochim*

- Biophys Acta (2006) 1758:989–993
127. S.M. Mulders, J.P. Rijss, A. Hartog, R.J. Bindels, C.H. van Os, P.M. Deen, Importance of the mercury-sensitive cysteine on function and routing of AQP1 and AQP2 in oocytes, *Am J Phys* (1997) 273:F451–F456
 128. K. Yakata, K. Tani, Y. Fujiyoshi, Water permeability and characterization of aquaporin-11, *J Struct Biol* (2011) 174:315–320
 129. J.S. Jung, R.V. Bhat, G.M. Preston, W.B. Guggino, J.M. Baraban, P. Agre, Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance, *Proc Natl Acad Sci* (1994) 91:13052–13056
 130. D. Warde-Farley, S.L. Donaldson, O. Comes, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 2010;38: W214–220.
 131. M. Kuwahara, Y. Gu, K. Ishibashi, F. Marumo, S. Sasaki, Mercury-sensitive residues and pore site in AQP3 water channel, *Biochemistry* (1997) 36:13973–13978
 132. P. Kitchen, M.T. Conner, R.M. Bill, A.C. Conner, Structural determinants of oligomerization of the aquaporin-4 channel, *J Biol Chem* (2016) 291:6858–6871
 133. T. Walz, B.L. Smith, P. Agre, A. Engel, The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP, *EMBO J* (1994) 13:2985–2993
 134. I. Johansson, M. Karlsson, V.K. Shukla, M.J. Chrispeels, C. Larsson, P. Kjellbom, Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation, *Plant Cell* (1998) 10:451–459
 135. M. Zelenina, S. Zelenin, A.A. Bondar, H. Brismar, A. Aperia, Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine, *Am J Physiol Ren Physiol* (2002) 283:F309–F318
 136. O.H. Wittekindt, P. Diet, Aquaporins in the lung, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* (2019) 471:519–532
<https://doi.org/10.1007/s00424-018-2232-y>
 137. A. Madeira, T.F. Moura, G. Soveral, Detecting Aquaporin Function and Regulation, *Front Chem.* (2016) 4:3.
 138. R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.* (2015) 65 5–29.

139. A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 69–90.
140. L.S. Engel, W.H. Chow, T.L. Vaughan, M.D. Gammon, H.A. Risch, J.L. Stanford, et al. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers, *J. Natl Cancer Inst.* (2003) 95 1404–1413.
141. S. Liu, S. Zhang, H. Jiang, Y. Yang, Y. Jiang, Co-expression of AQP3 and AQP5 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with aggressive tumor progression and poor prognosis, *Med. Oncol.* 30 (2013) 1–8.
142. M. Kusayama, K. Wada, M. Nagata, S. Ishimoto, H. Takahashi, M. Yoneda, et al., Critical role of aquaporin 3 on growth of human esophageal and oral squamous cell carcinoma, *Cancer Sci.* (2011) 102 1128–1136.
143. H. Shimizu, A. Shiozaki, D. Ichikawa, et al. The expression and role of Aquaporin 5 in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Gastroenterol.* (2014) 49 655–666.
144. L. Shen, Z. Zhu, Y. Huang, Y. Shu, M. Sun, H. Xu, et al., Expression profile of multiple aquaporins in human gastric carcinoma and its clinical significance, *Biomed. Pharmacother.* (2010) 64 313–318.
145. T. Yoshida, S. Hojo, S. Sekine, S. Sawada, T. Okumura, T. Nagata, et al., Expression of aquaporin-1 is a poor prognostic factor for stage II and III colon cancer, *Mol. Clin. Oncol.* (2013) 1 953–958.
146. Y. Huang, Z. Zhu, M. Sun, J. Wang, R. Guo, L. Shen, et al., Critical role of aquaporin-3 in the human epidermal growth factor-induced migration and proliferation in the human gastric adenocarcinoma cells, *Cancer Biol. Ther.* (2010) 9 1000–1007.
147. B. Jiang, Z. Li, W. Zhang, H. Wang, X. Zhi, J. Feng, et al. miR-874 Inhibits cell proliferation, migration and invasion through targeting aquaporin-3 in gastric cancer, *J. Gastroenterol.* (2014) 49 1011–1025.
148. T.J. Huang, J.Y. Wang, S.R. Lin, S.T. Lian, J.S. Hsieh, Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma-correlation to clinical features, *Acta Oncol. (Madr)* 40 (2001) 638–643.
149. W. Wang, Q. Li, T. Yang, G. Bai, D. Li, Q. Li, et al. Expression of AQP5 and AQP8 in human colorectal carcinoma and their clinical significance, *World J. Surg. Oncol.* 10 (2012) 10–1186.
150. J. Wang, Z. Gui, L. Deng, M. Sun, R. Guo, W. Zhang, et al. c-Met

- upregulates aquaporin 3 expression in human gastric carcinoma cells via the ERK signaling pathway. *Cancer Lett.* 319 (2012) 109–117.
151. Y.H. Huang, X.Y. Zhou, H.M. Wang, H. Xu, J. Chen, N.H. Lv, Aquaporin 5 promotes the proliferation and migration of human gastric carcinoma cells, *Tumor Biol.* 34 (2013) 1743–1751.
 152. T. Watanabe, T. Fujii, T. Oya, N. Horikawa, Y. Tabuchi, Y. Takahashi, et al. Involvement of aquaporin-5 in differentiation of human gastric cancer cells, *J. Physiol. Sci.* 59 (2009) 113–122.
 153. L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* (2015) 65:87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
 154. M. Cereda, G. Gambardella, L. Benedetti, F. Iannelli, D. Patel, G. Basso, R.F. Guerra, T.P. Mourikis, I. Puccio, S. Sinha, L. Laghi, J. Spencer, M. Rodriguez-Justo, F.D. Ciccarelli, Patients with genetically heterogeneous synchronous colorectal cancer carry rare damaging germline mutations in immune-related genes, *Nat Commun* (2016) 7:12072. <https://doi.org/10.1038/ncomms12072>
 155. Y.M. Jo, T.I. Park, H.Y. Lee, J.Y. Jeong, W.K. Lee, Prognostic significance of aquaporin 5 expression in non-small cell lung cancer, *J Pathol Transl Med* (2016) 50:122–128. <https://doi.org/10.4132/jptm.2015.10.31>
 156. G. Rogler, Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer, *Cancer Lett* (2014) 345:235–241. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.032>
 157. H. Brenner, M. Kloor, C.P. Pox, Colorectal cancer, *Lancet* (2014) 383:1490–1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9)
 158. C. Moon, J.C. Soria, S.J. Jang, J. Lee, M.O. Hoque, M. Sibony, et al., Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis, *Oncogene* 22 (2003) 6699–6703.
 159. T. Yoshida, S. Hojo, S. Sekine, S. Sawada, T. Okumura, T. Nagata, et al., Expression of aquaporin-1 is a poor prognostic factor for stage II and III colon cancer, *Mol. Clin. Oncol.* 1 (2013) 953–958.
 160. A. Li, D. Lu, Y. Zhang, J. Li, Y. Fang, F. Li, et al., Critical role of aquaporin-3 in epidermal growth factor-induced migration of colorectal carcinoma cells and its clinical significance, *Oncol. Rep.* 29 (2013) 535–540.

161. B. Burghardt, M. Elkjaer, T. Kwon, G. Racz, G. Varga, M. Steward, et al., Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas, *Gut* (2003) 52 1008–1016.
162. J. Wang, L. Feng, Z. Zhu, M. Zheng, D. Wang, Z. Chen, H. Sun, Aquaporins as diagnostic and therapeutic targets in cancer: how far we are? *J Transl Med.* 2015; 13:96.
163. Videira M, Reis RL, Brito MA. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846:312–325.
164. Tasiopoulou V, Magouliotis D, Solenov EI, et al. Transcriptional over-expression of chloride intracellular channels 3 and 4 in malignant pleural mesothelioma. *Comput Biol Chem.* 2015 Dec;59 Pt A:111-6.
165. Peretti M, Angelini M, Savalli N, et al. Chloride channels in cancer: focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as a novel therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 2015
166. Jia N, Dong S, Zhao G, et al. CLIC1 overexpression is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J Cancer Res Ther.* 2016 Apr-Jun;12(2):892-6.
167. Wei, M. C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730 (2001).
168. Opferman, J. T. & Kothari, A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ.* 25, 37–45 (2018).
169. Hudson WA, Li Q, Le C and Kersey JH: Xenotransplantation of human lymphoid malignancies is optimized in mice with multiple immunologic defects. *Leukemia* 12(12): 2029-2033, 1998. PMID: 9844934. DOI: 10.1038/sj.leu.2401236
170. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL and Handgretinger R: Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174(10): 6477-6489, 2005. PMID: 15879151. DOI:10.4049/jimmunol.174.10.6477

171. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S and Papaioannou VE: RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68(5): 869-877, 1992. PMID: 1547488. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90030-g
172. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* 38: W214–220, 2010.
173. Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, Herwig R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41: D793–800.
174. Goswami CP, Nakshatri H. PROGgene: gene expression based survival analysis web application for multiple cancers. *Journal of Clinical Bioinformatics.* 2013;3:22. Doi:10.1186/2043-9113-3-22.
175. Goswami CP, Nakshatri H. PROGgeneV2: enhancements on the existing database. *BMC Cancer* 2014 14:970.
176. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009;4(1):44-57.
177. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):1-13.
178. Furukawa T, Fu X, Kubota T, Watanabe M, Kitajima M and Hoffman RM: Nude mouse metastatic models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue. *Cancer Res* 53(5): 1204-1208, 1993. PMID: 8439965.
179. Astoul P, Wang X, Colt H, Boutin C and Hoffman R: A patientlike human malignant pleural mesothelioma nude-mouse model. *Oncol Rep* 3(3): 483-487, 1996. PMID: 21594397.
180. Wang X, Fu X and Hoffman RM: A new patient-like metastatic model of human lung cancer constructed orthotopically with intact tissue via thoracotomy in immunodeficient mice. *Int J Cancer* 51(6): 992-995, 1992. PMID: 1639545. DOI: 10.1002/ijc.2910510626
181. Fu X, Le P and Hoffman RM: A metastatic orthotopic-transplant nude-mouse model of human patient breast cancer. *Anticancer Res* 13(4): 901-904, 1993. PMID: 8352558.

182. Wu NF, Wu J, Yamamoto J, Aoki Y, Hozumi C, Bouvet M and Hoffman RM: The first mouse model of primary osteosarcoma of the breast. *In Vivo* 35(4): 1979-1983, 2021. PMID: 34182472. DOI: 10.21873/invivo.12466
183. Hoffman RM: Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nat Rev Cancer* 15(8): 451-452, 2015. PMID: 26422835. DOI: 10.1038/nrc3972
184. Jun E, Jung J, Jeong SY, Choi EK, Kim MB, Lee JS, Hong SM, Seol HS, Hwang C, Hoffman RM, Shim IK, Chang S and Kim SC: Surgical and oncological factors affecting the successful engraftment of patient-derived xenografts in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 36(2): 517-521, 2016. PMID: 26851005.
185. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL and Handgretinger R: Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174(10): 6477-6489, 2005. PMID: 15879151. DOI:10.4049/jimmunol.174.10.6477
186. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV and Greiner DL: Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154(1): 180-191, 1995. PMID: 7995938
187. Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674, 2011. PMID: 21376230. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013
188. Heumann T and Azad N: Next-generation immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma: navigating pathways of immune resistance. *Cancer Metastasis Rev* 40(3): 837-862, 2021. PMID: 34591243. DOI: 10.1007/s10555-021-09981-3
189. Wainberg Z, Diamond J, Curigliano G, Deva S, Bendell J, Han S, Kalyan A, Naidoo J, Kim R, Patel S, Kourtesis P, Li X, Ascierto M, Song X, Das M and Segal N: First-line durvalumab + monalizumab, mFOLFOX6, and bevacizumab or cetuximab for metastatic microsatellite-stable colorectal cancer (MSSCRC). *Journal of Clinical Oncology* 38(4_suppl): 128-128, 2020. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.4_suppl.128

190. Pham NA, Radulovich N, Ibrahimov E, Martins-Filho SN, Li Q, Pintilie M, Weiss J, Raghavan V, Cabanero M, Denroche RE, Wilson JM, Metran-Nascente C, Borgida A, Hutchinson S, Dodd A, Begora M, Chadwick D, Serra S, Knox JJ, Gallinger S, Hedley DW, Muthuswamy L and Tsao MS: Patient-derived tumor xenograft and organoid models established from resected pancreatic, duodenal and biliary cancers. *Sci Rep* 11(1): 10619, 2021. PMID: 34011980. DOI: 10.1038/s41598-021-90049-1
191. Fu X, Guadagni F and Hoffman RM: A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89(12): 5645-5649, 1992. PMID: 1608975. DOI: 10.1073/pnas.89.12.5645
192. Delinassios JG and Hoffman RM: The cancer-inhibitory effects of proliferating tumor-residing fibroblasts. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1877(1): 188673, 2022. PMID: 34953931. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188673
193. Cannon A, Thompson C, Hall BR, Jain M, Kumar S and Batra SK: Desmoplasia in pancreatic ductal adenocarcinoma: insight into pathological function and therapeutic potential. *Genes Cancer* 9(3-4): 78-86, 2018. PMID: 30108679. DOI: 10.18632/genesandcancer.171
194. Rubenwolf PC, Otto W, Denzinger S, Hofstädter F, Wieland W, Georgopoulos NT. Expression of aquaporin water channels in human urothelial carcinoma: Correlation of AQP3 expression with tumour grade and stage. *World J Urol.* 2014;32:991–997.
195. Chen X, Li C, Lü L, Mei Z. Expression and clinical significance of aquaglyceroporins in human hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 13, 5283-5289. 2016. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5184>
196. Izumi K, Brett M, Nishi E. ARCN1 Mutations Cause a Recognizable Craniofacial Syndrome Due to COPI-Mediated Transport Defects. *Am J Hum Genet.* 2016;68(Pt 7):829-31. doi: 10.1107/S1744309112022798.

197. Deng K, Gao F, Zheng P, Gong W, Sun Z. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the C-terminal domain of [delta]-COP, a medium-sized subunit of the COPI complex involved in membrane trafficking *Acta Cryst.* 2012;F68, 829-831.
198. Tunnacliffe A, van de Vrugt H, Pensotti V, Radice P. The coatomer protein delta-COP, encoded by the archain gene, is conserved across diverse eukaryotes. *Mamm Genome*, 1996; Oct;7(10):784-6.
199. de La Vega LA, Stockert RJ. The cytoplasmic coatomer protein COPI. A potential translational regulator. *J Biol Chem.* 1999; Oct 29;274(44):31135-8.
200. Shima DT, Scales SJ, Kreis TE, Pepperkok R. Segregation of COPI-rich and anterograde-cargo-rich domains in endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport complexes. *Curr Biol.* 1999; Jul 29-Aug 12;9(15):821-4.
201. Peretti M, Angelini M, Savalli N, et al. Chloride channels in cancer: focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as a novel therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 2015
202. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, Volume 16, Issue 3, 2010, Pages 107-121
203. Jia N, Dong S, Zhao G, et al. CLIC1 overexpression is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J Cancer Res Ther.* 2016 Apr-Jun;12(2):892-6.
204. Macpherson IR, Rainero E, Mitchell LE, et al. CLIC3 controls recycling of late endosomal MT1-MMP and dictates invasion and metastasis in breast cancer. *J. Cell Sci.* 2014; 127, 3893–3901.

205. Dozynkiewicz MA, Jamieson NB, Macpherson I, et al. Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. *Dev. Cell* 2012; 22, 131–145.
206. Zou Q, Yang Z, Li D, et al. Association of chloride intracellular channel 4 and Indian hedgehog proteins with survival of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Exp Pathol.* 2016 Dec;97(6):422-429. doi: 10.1111/iep.12213.
207. Chen YC, Tzeng CH, Chen PM, et al. Influence of GSTP1 I105V polymorphism on cumulative neuropathy and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 2010 Feb;101(2):530-5. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01418.x.
208. Chen YL, Tseng HS, Kuo WH, et al. Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) gene polymorphism increases age-related susceptibility to hepatocellular carcinoma. *BMC Med Genet.* 2010 Mar 24;11:46. doi: 10.1186/1471-2350-11-46.
209. Shield AJ, Murray TP, Board PG. Functional characterization of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Sep 8;347(4):859-66. Epub 2006 Jul 20.
210. Ke J, Shen Z, Li M, et al. Prostaglandin E2 triggers cytochrome P450 17 α hydroxylase overexpression via signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation and promotes invasion in endometrial cancer. *Oncol Lett.* 2018 Oct;16(4):4577-4585. doi: 10.3892/ol.2018.9165.

211. Camacho M, León X, Fernández-Figueras MT, et al. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2008 Sep;30(9):1175-81. doi: 10.1002/hed.20850.
212. Magouliotis DE, Sakellaridis N, Dimas K, et al. In Silico Transcriptomic Analysis of the Chloride Intracellular Channels (CLIC) Interactome Identifies a Molecular Panel of Seven Prognostic Markers in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Current Genomics*, Volume 21, Issue 2, 2020. doi: 10.2174/1389202921666200316115631
213. Magouliotis DE, Tasiopoulou VS, Dimas K, Sakellaridis N, Svokos KA, Svokos AA, Zacharoulis D. Transcriptomic analysis of the Aquaporin (AQP) gene family interactome identifies a molecular panel of four prognostic markers in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology*. 2019 Apr;19(3):436-442. doi: 10.1016/j.pan.2019.02.006.
214. Magouliotis DE, Karamolegkou AP, Zotos PA, Tatsios E, Samara AA, Alexopoulou D, Koutsougianni F, Sakellaridis N, Zacharoulis D, Dimas K. Bioinformatic Analysis of the BCL-xL/BCL2L1 Interactome in Patients with Pancreatic Cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Nov 17;58(11):1663. doi: 10.3390/medicina58111663.

Παράρτημα

Δημοσιεύσεις, παρουσιάσεις, βραβεύσεις στο πλαίσιο της διατριβής

Αριθμός δημοσιευμένων άρθρων: 5

1. **Magouliotis DE**, Karamolegkou AP, Zotos PA, Tatsios E, Samara AA, Alexopoulou D, Koutsougianni F, Sakellaridis N, Zacharoulis D, Dimas K. Bioinformatic Analysis of the BCL-xL/BCL2L1 Interactome in Patients with Pancreatic Cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Nov 17;58(11):1663. doi: 10.3390/medicina58111663.
I.F.: 2.95
2. **Magouliotis DE**, Lafazanis K, Koutsougianni F, Sakellaridis N, Ioannou M, Zacharoulis D, Dimas K. Establishment of Patient-derived Orthotopic Xenografts (PDX) as Models for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *In Vivo*. 2022 May-Jun;36(3):1114-1119. doi: 10.21873/invivo.12809.
I.F. = 2.16
3. **Magouliotis DE**, Sakellaridis N, Dimas K, et al. In Silico Transcriptomic Analysis of the Chloride Intracellular Channels (CLIC) Interactome Identifies a Molecular Panel of Seven Prognostic Markers in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Current Genomics*, Volume 21, Issue 2, 2020. doi: 10.2174/1389202921666200316115631
I.F. = 2.63

4. **Magouliotis DE**, Tasiopoulou VS, Dimas K, Sakellaridis N, Svokos KA, Svokos AA, Zacharoulis D. Transcriptomic analysis of the Aquaporin (AQP) gene family interactome identifies a molecular panel of four prognostic markers in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology*. 2019 Apr;19(3):436-442. doi: 10.1016/j.pan.2019.02.006.
I.F. = 3.99
5. Sereti E, Karagianellou T, Kotsoni I, **Magouliotis D**, et al. Patient Derived Xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer? *J Proteomics*. 2018 Feb 1. pii: S1874-3919(18)30043-5. doi: 10.1016/j.jprot.2018.01.012
I.F. = 4.04

Αριθμός δημοσιευμένων περιλήψεων: 10

1. **Magouliotis D**, Lafazanis K, Koutsogianni F, Sakellaridis N, Ioannou M, Zacharouli K, Zacharoulis D, Dimas K. Early outcomes of the establishment of an orthotopic patient-derived xenografts (PDX) model for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Clin Pharmacol* 78 (Suppl 1), 1–163 (2022).
<https://doi.org/10.1007/s00228-022-03333-y> I.F. = 3.06
2. **Magouliotis D**, Fergadi M, Athanasiou T, Tatsios E, Symeonidis D, Zacharoulis D. In-depth bioinformatic study of the Bcl-xL/Bcl2L1 gene in patients with pancreatic cancer. *HPB*, Volume 23, S810 I.F. = 3.05
3. **Magouliotis D**, Fergadi M, Sakellaridis N, Dimas K, Tatsios E, Zacharoulis D. Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Patient Derived

- Xenografts and Characterization of Aquaporin 7 Expression. HPB, Volume 23, S886 I.F. = 3.05
4. **Magouliotis D**, Dimas K, Sakellaridis N, Fergadi M, Symeonidis D, Zacharoulis. In silico investigation and functional enrichment analysis of the human major intrinsic proteins and voltage-gated chloride channel proteins reveal eleven prognostic biomarkers for pancreatic cancer. HPB, Volume 23, S242 I.F. = 3.05
 5. **Magouliotis D**, Christodoulidis G, Tasiopoulou V, Sakellaridis N, Dimas K, Zacharoulis D. Expression profile of the Cadherins (CDHs) gene family in patients with pancreatic cancer. European Journal of Surgical Oncology 45 (2019) e25ee158 I.F. = 3.38
 6. Sereti E, **Magouliotis D**, Karagianellou T, Sakellaridis N, Zacharoulis D, Dimas K. Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Patient Derived Xenografts as Platforms for Novel Therapeutic Approaches. HPB, Vol. 20, (2018) S572 I.F. = 3.05
 7. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Transcriptomic Analysis of the Claudin (CLDN) Gene Family in Pancreatic Cancer. HPB, Vol. 20, (2018) S563 I.F. = 3.05
 8. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Differential Gene Expression Profile of the Aquaporin (AQP) Gene Family Components in Pancreatic Cancer. HPB, Vol. 20, (2018) S563 I.F. = 3.05
 9. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Gene Expression Profile of Sigma-1 (s1R) and Sigma-2 (s2R) Receptors in Pancreatic Cancer. HPB, Vol. 20, (2018) S564 I.F. = 3.05

10. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Over-expression of Chloride Intracellular Channels (CLICs) 1 and 3 in Pancreatic Cancer. HPB, Vol. 20, (2018) S323–S324 I.F. = 3.05

Συμμετοχή σε επιστημονικά συνέδρια

Αριθμός ανακοινώσεων σε παγκόσμια/πανευρωπαϊκά συνέδρια: 11

1. **Magouliotis D**, Lafazanis K, Koutsougianni F, Sakellaridis N, Ioannou M, Zacharouli K, Zacharoulis D, Dimas K. Early outcomes of the establishment of an orthotopic patient-derived xenografts (PDX) model for pancreatic ductal adenocarcinoma. EACPT Hybrid Meeting, Athens, 25-28/6/2022
2. **Magouliotis D**, Sakellaridis N, Dimas K, Ioannou M, Zacharouli K, Tatsios E, Zacharoulis D. Development of an Orthotopic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Patient-Derived Xenografts (PDX) Preclinical Model and Characterization of Aquaporin 7 (AQP7) Expression. 15th IHPBA World Congress, New York, 30/3-2/4/2022
3. **Magouliotis D**, Fergadi M, Athanasiou T, Tatsios E, Symeonidis D, Zacharoulis D. In-depth bioinformatic study of the Bcl-xL/Bcl2L1 gene in patients with pancreatic cancer. 14th E-AHPBA Congress, Bilbao, 15-17/9/2021
4. **Magouliotis D**, Fergadi M, Sakellaridis N, Dimas K, Tatsios E, Zacharoulis D. Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Patient Derived Xenografts and Characterization of Aquaporin 7 Expression. 14th E-AHPBA Congress, Bilbao, 15-17/9/2021

5. **Magouliotis D**, Dimas K, Sakellaridis N, Fergadi M, Symeonidis D, Zacharoulis. In silico investigation and functional enrichment analysis of the human major intrinsic proteins and voltage-gated chloride channel proteins reveal eleven prognostic biomarkers for pancreatic cancer. 14th E-AHPBA Congress, Bilbao, 15-17/9/2021
6. **Magouliotis D**, Christodoulidis G, Tasiopoulou V, Sakellaridis N, Dimas K, Zacharoulis D. Expression profile of the Cadherins (CDHs) gene family in patients with pancreatic cancer. 38th Congress of the European Society of Surgical Oncology, 10-12/10/2018, Budapest, Hungary.
7. Sereti E, **Magouliotis D**, Karagianellou T, Sakellaridis N, Zacharoulis D, Dimas K. Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Patient Derived Xenografts as Platforms for Novel Therapeutic Approaches. 13th IHPBA World Congress, Geneva, 4-7/9/2018
8. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Transcriptomic Analysis of the Claudin (CLDN) Gene Family in Pancreatic Cancer. 13th IHPBA World Congress, Geneva, 4-7/9/2018
9. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Differential Gene Expression Profile of the Aquaporin (AQP) Gene Family Components in Pancreatic Cancer. 13th IHPBA World Congress, Geneva, 4-7/9/2018
10. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Gene Expression Profile of Sigma-1 (s1R) and Sigma-2 (s2R) Receptors in Pancreatic Cancer. 13th IHPBA World Congress, Geneva, 4-7/9/2018

11. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Over-expression of Chloride Intracellular Channels (CLICs) 1 and 3 in Pancreatic Cancer. 13th IHPBA World Congress, Geneva, 4-7/9/2018

Αριθμός ανακοινώσεων σε ελληνικά συνέδρια: 7

1. **Magouliotis D**, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Progress of the development of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patient derived xenografts (PDX) as novel platforms for translational research. 32nd Panhellenic Congress of Surgery and Surgery Forum 2021, Thessaloniki, June 9-12.
2. Sereti E, **Magouliotis D**, Karagianellou T, Sakellaridis N, Zacharoulis D, Dimas K. Development of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patient derived xenografts as platforms for novel therapeutic approaches. 31ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2018, Αθήνα, 21-24 Νοεμβρίου.
3. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Transcriptional over-expression of chloride intracellular channels (CLICs) 1 and 3 in pancreatic cancer. 31ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2018, Αθήνα, 21-24 Νοεμβρίου.
4. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Symeonidis D, Zacharoulis D. Unveiling the transcriptional expression and prognostic role of Aquaporin (AQP) gene family members in patients with pancreatic cancer: an in-silico analysis. 31ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2018, Αθήνα, 21-24 Νοεμβρίου.

5. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Symeonidis D, Doudakmanis C, Zacharoulis D. Differential expression of the Claudin (CLDN) gene family in pancreatic cancer: an in-silico analysis. 31ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2018, Αθήνα, 21-24 Νοεμβρίου.
6. **Magouliotis D**, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Symeonidis D, Zacharoulis D. Transcriptomic analysis of sigma-1 (S1R) and sigma-2 (S2R) receptors in pancreatic cancer. 31ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2018, Αθήνα, 21-24 Νοεμβρίου.
7. **Magouliotis D**, Christodoulidis G, Tasiopoulou V, Dimas K, Sakellaridis N, Zacharoulis D. Transcriptional expression profile of the cadherins (CDHs) in patients with pancreatic cancer. 31ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2018, Αθήνα, 21-24 Νοεμβρίου.

Βραβεύσεις στο πλαίσιο της διατριβής: 2

1. Υποτροφία Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας 2020
2. 1ο Βραβείο Καλύτερης Πειραματικής Έρευνας στο πλαίσιο του 31ου Πανελλήνιου Συνεδρίου Χειρουργικής και Διεθνούς Χειρουργικού Φόρουμ 2018 για την εργασία με τίτλο «Development of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patient derived xenografts as platforms for novel therapeutic approaches.»

Μετεκπαίδευση στο πλαίσιο της διατριβής

Κλινική και ερευνητική μετεκπαίδευση στο Κέντρο Ήπατος-Παγκρέατος-Χοληφόρων CHB Paul Brousse, Παρίσι, Γαλλία (Επιβλέπων: Prof. René Adam) για το διάστημα 29/04/2019-28/06/2019 με ενεργό συμμετοχή στο μηνιαίο πρόγραμμα εφημεριών για τις μεταμοσχεύσεις ήπατος-παγκρέατος