



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**“Μελέτη μεταλλάξεων και πολυμορφισμών του TERT γονιδίου
σε κυτταρολογικό υλικό ασθενών
με ουροθηλιακό καρκίνο”**

Ανδρέας Χριστοδουλόπουλος του Βασιλείου

Λάρισα, 2024

[1]

Διπλωματική Εργασία

**“Μελέτη μεταλλάξεων και πολυμορφισμών του *TERT* γονιδίου
σε κυτταρολογικό υλικό ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο”**

**“Study of mutations and polymorphisms of *TERT* gene
in cytological samples of patients with urothelial cancer”**

Τριμελής Επιτροπή

κ. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

κ. Αντώνιος Γιακουντής, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

κ. Ελένη Θώδου, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους στάθηκαν στο πλευρό μου κατά την υλοποίηση αυτής της προσπάθειας. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας, κυρία Μαρία Σαμαρά, Επίκουρο Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία. Οι πολύτιμες συμβουλές, η συμπαράσταση και η καθοδήγησή της σε κάθε βήμα συνέβαλαν στην επιτυχή εκπόνηση αυτής της πτυχιακής εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον κύριο Αντώνιο Γιακουντή και την κυρία Ελένη Θώδου για την αποδοχή τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, για την άριστη συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο και για την προθυμία τους να λύσουν οποιαδήποτε απορία μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αμέριστη υποστήριξη και συμπαράστασή τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. Το ουροποιητικό σύστημα	8
1.1 Ουροδόχος κύστη	9
2. Ο ουροθηλιακός καρκίνος	11
2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία	11
2.2 Ιστολογική ταξινόμηση νεοπλασμάτων	13
2.2.1 Σταδιοποίηση (Staging)	13
2.2.2 Βαθμός διαφοροποίησης ή βαθμός κακοηθείας (Grading)	16
2.2.3 Ιστολογικοί Υπότυποι	18
2.2.4 Μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκίνου	21
3. Διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης	25
3.1. Διάγνωση	25
3.1.1 Κυστεοσκόπηση	26
3.1.2 Κυτταρολογία ούρων	27
3.2 Βιοδείκτες	28
3.3 Θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης	33
4. Η τελομεράση TERT	33
4.1 Τα τελομερή	34
4.2 Δομή και λειτουργία της τελομεράσης	35
4.2.1 Μεταλλάξεις στον υποκινητή του hTERT γονιδίου	37
4.2.2 Ο MNS16A πολυμορφισμός του hTERT γονιδίου	38
ΣΚΟΠΟΣ	40
5. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
5.1 Υλικό μελέτης	41
5.2 Μεθοδολογία	41
5.2.1 Συλλογή ούρων και κυτταρολογική εξέταση	41
5.2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα ούρα	42

5.2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του γονιδιωματικού DNA	43
5.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	43
5.2.5 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης	49
5.2.6 Ηλεκτροφόρηση	51
5.2.7 Καθαρισμός των ενισχυμένων PCR προϊόντων	54
5.2.8 Αλληλούχηση κατά Sanger	55
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι ο συχνότερος τύπος καρκίνου του ουροποιητικού συστήματος. Το 90% των καρκίνων της ουροδόχου κύστης αφορούν τον ουροθηλιακό καρκίνο. Εμφανίζεται τέσσερις φορές συχνότερα στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες και καταλαμβάνει παγκοσμίως την 9^η θέση σε συχνότητα και την 13^η σε θνησιμότητα. Υψηλή επίπτωση παρατηρείται στην Ευρώπη, την Ασία και την Βόρεια Αμερική. Ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου είναι το κάπνισμα και ευθύνεται για περισσότερο από το 50% των περιπτώσεων με καρκίνο ουροδόχου κύστης. Σημαντικός επίσης παράγοντας κινδύνου είναι η έκθεση σε χημικές, καρκινογόνες ουσίες. Ο ουροθηλιακός καρκίνος αποτελεί μία ετερογενή νόσο και διακρίνεται σε μη μυοδιηθητικά και μυοδιηθητικά νεοπλάσματα. Η διάγνωση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου γίνεται με την κυστεοσκόπηση σε συνδυασμό με την κυτταρολογική εξέταση ούρων. Η θεραπευτική προσπέλαση που ακολουθείται είναι η διουρηθρική εκτομή του όγκου σε συνδυασμό με την χημειοθεραπεία και η ριζική κυστεκτομή για τους μη μυοδιηθητικούς και μυοδιηθητικούς όγκους. Ωστόσο, το υψηλό ποσοστό υποτροπών που παρατηρείται καθιστά επιτακτική την αναζήτηση νέων βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση και παρακολούθηση της νόσου. Η πρόληψη είναι απαραίτητη και στα πλαίσια αυτά αναζητούνται γενετικοί δείκτες που θα μπορούσαν να συμβάλουν προς αυτή την κατεύθυνση. Το MNS16A είναι ένας δορυφόρος που περιλαμβάνει μικρές, διαδοχικές επαναλήψεις μίας αλληλουχίας. Απαντάται καθοδικά του εξονίου 16 του *hTERT* γονιδίου και φαίνεται να επιδρά στην ενεργότητα του υποκινητή σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Στην παρούσα μελέτη, ελέγξαμε κύριες μεταλλάξεις στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου και τις διαφορετικές παραλλαγές του MNS16A πολυμορφισμού σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο και υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου). Πραγματοποιήθηκε συσχέτιση με τις κλινικο-ιστολογικές παραμέτρους των ασθενών της μελέτης. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των παραλλαγών του MNS16A πολυμορφισμού με τις μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή, την ηλικία, το φύλο ή ιστολογικά/κυτταρολογικά στοιχεία. Ωστόσο, στους ασθενείς παρατηρήσαμε μειωμένη συχνότητα της S (short) παραλλαγής συγκριτικά με τα υγιή άτομα, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.002$). Η S παραλλαγή θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι έχει έναν προστατευτικό ρόλο όσον αφορά στον κίνδυνο εμφάνισης του ουροθηλιακού καρκίνου. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα, τα οποία καταδεικνύουν γεωγραφική ετερογένεια, αλλά και διαφορετική ενδεχομένως επίπτωση του MNS16A πολυμορφισμού σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Στην παρούσα μελέτη, ο αριθμός των ασθενών και των υγιών ατόμων που συμπεριλήφθηκαν ήταν μικρός. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει ανάλογη μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό χρήζει περαιτέρω ανάλυση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ώστε να προκύψουν στατιστικώς ασφαλή συμπεράσματα.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος της ουροδόχου κύστης, TERT, μεταλλάξεις, MNS16A πολυμορφισμός, Μεταβλητός Αριθμός διαδοχικών Επαναλήψεων (Variable Number Tandem Repeats, VNTRs)

ABSTRACT

Bladder cancer is the most common type of urinary tract cancer. Urothelial cancers account for 90% of bladder cancers. Bladder cancer occurs four times more often in men than in women and ranks 9th in frequency and 13th in mortality worldwide. A high incidence is observed in Europe, Asia and North America. The main risk factor is smoking which accounts for more than 50% of bladder cancer cases. Another important risk factor is exposure to chemical, carcinogenic substances. Urothelial cancer is a heterogeneous disease and is distinguished into non-muscle invasive and muscle invasive neoplasms. The diagnosis of this specific type of cancer is made by cystoscopy in combination with urine cytology. The therapeutic approach followed is transurethral resection of the tumor combined with chemotherapy and radical cystectomy for non-muscle invasive and muscle-invasive tumors. However, the high recurrence rates observed make searching for new biomarkers, for early diagnosis and disease monitoring, imperative. Prevention is essential, and genetic markers are being sought that could contribute to this direction. MNS16A is a satellite comprising small, tandem repeats of a sequence. It is located downstream of exon 16 of the hTERT gene and appears to affect promoter activity in several types of cancer. In the present study, we tested major mutations in the hTERT gene promoter and different variants of the MNS16A polymorphism in urothelial cancer patients and healthy subjects (control group). A correlation was made with the clinic-histological parameters of the study patients. No statistically significant associations between variants of the MNS16A polymorphism with mutations in the promoter region, age, sex, or histological/cytological features emerged. However, in patients, we observed a reduced frequency of the S (short) variant compared to healthy individuals, which was statistically significant ($p=0.002$). The S variant could be considered to have a protective role regarding the risk of urothelial cancer. However, there are conflicting findings in the literature, which demonstrate geographic heterogeneity, but also a possibly different impact of the MNS16A polymorphism in different types of cancer. In the present study, the number of patients and healthy subjects included was small. Since there is no similar study in the Greek population, further analysis is needed in a larger number of samples, so that statistically safe conclusions can be drawn.

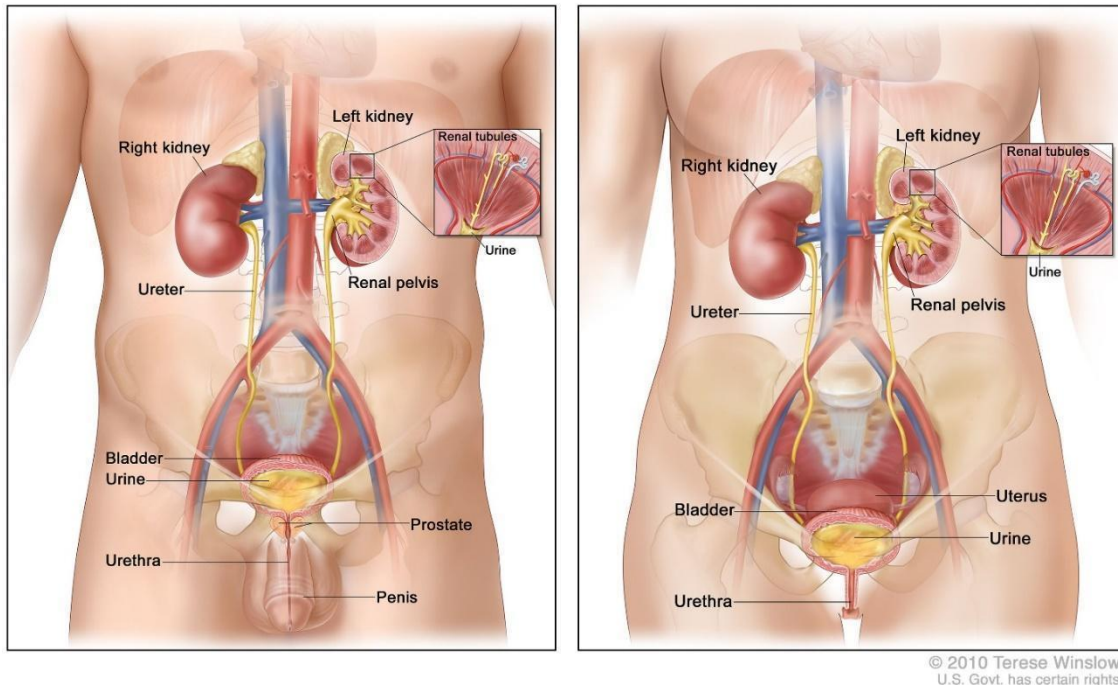
Keywords: Bladder cancer, TERT, mutations, MNS16A polymorphism, Variable Number Tandem Repeats (VNTRs)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Το ουροποιητικό σύστημα

Το ουροποιητικό σύστημα αποτελείται από ένα σύνολο κοίλων οργάνων που εξυπηρετούν κυρίως τη συλλογή, τη μεταφορά, το φιλτράρισμα και την αποβολή των ούρων από το σώμα. Απαρτίζεται από τους νεφρούς, τους ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη και την ουρήθρα. Κάθε επιμέρους όργανο έχει διακριτή μορφολογία και επιτελεί συγκεκριμένη λειτουργία. Τα όργανα που συγκροτούν το ουροποιητικό σύστημα εντοπίζονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο και στην ελάσσονα πύελο. Οι νεφροί αποτελούν τα κύρια όργανα του ουροποιητικού συστήματος. Έχουν νεφροειδές σχήμα, περιβάλλονται από ινώδη κάψα και βρίσκονται εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης, στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο. Ιστολογικά, σε εγκάρσια διατομή αναγνωρίζονται δύο στιβάδες, ο φλοιός εξωτερικά και ο μυελός εσωτερικά. Στον φλοιό συναντάμε τα σπειράματα και τμήματα των νεφρικών σωληναρίων, ενώ στον μυελό, εσωτερικά, απαντώνται τμήματα της αγκύλης Henle και τα τελικά αθροιστικά σωληνάκια. Στον μυελό πραγματοποιείται η συμπύκνωση και η αραίωση των ούρων, ενώ στον φλοιό, εξωτερικά, πραγματοποιείται το φιλτράρισμα, η επαναρρόφηση και η απέκκριση. Παράλληλα στους νεφρούς παράγονται ορμόνες που συμβάλουν στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και στην ανανέωση του αίματος (Hickling et al. 2015).

Οι ουρητήρες είναι επίσης δύο μυώδεις σωλήνες με στενό αυλό. Βρίσκονται κάτω από τις νεφρικές πυέλους και η λειτουργία τους είναι η μεταφορά των ούρων από τους νεφρούς στην ουροδόχο κύστη. Τα ούρα, μέσω των ουρητήρων καταλήγουν στην ουροδόχο κύστη, ένα κοίλο όργανο τριγωνικού σχήματος, που βρίσκεται στο κάτω μέρος της κοιλιακής χώρας. Συγκρατείται από συνδέσμους που τη συγκρατούν στη θέση της και τη συνδέουν με τα οστά της λεκάνης και τα γύρω όργανα. Τα ούρα αδειάζουν από την ουροδόχο κύστη στην ουρήθρα. Πρόκειται για έναν σωλήνα με μέγεθος που διαφέρει αναλόγως του φύλου, που περιβάλλεται από μυώδη στρώματα τα οποία μέσω περισταλτικών κινήσεων προωθούν τα ούρα προς την έξοδο της ουρήθρας. Με εξαίρεση τους νεφρούς, τα υπόλοιπα όργανα ουσιαστικά εξυπηρετούν την αποβολή των ούρων και καλούνται αποχετευτικά όργανα του ουροποιητικού συστήματος (Rasouly et al. 2013).



Εικόνα 1. Ανατομία του ουροποιητικού συστήματος άρρενος (αριστερά) και θήλεος ατόμου (δεξιά). Απεικονίζονται οι νεφροί, οι ουρητήρες, η ουροδόχος κύστη, και η ουρήθρα. (<https://www.cancer.gov/types/bladder>)

1.1 Ουροδόχος κύστη

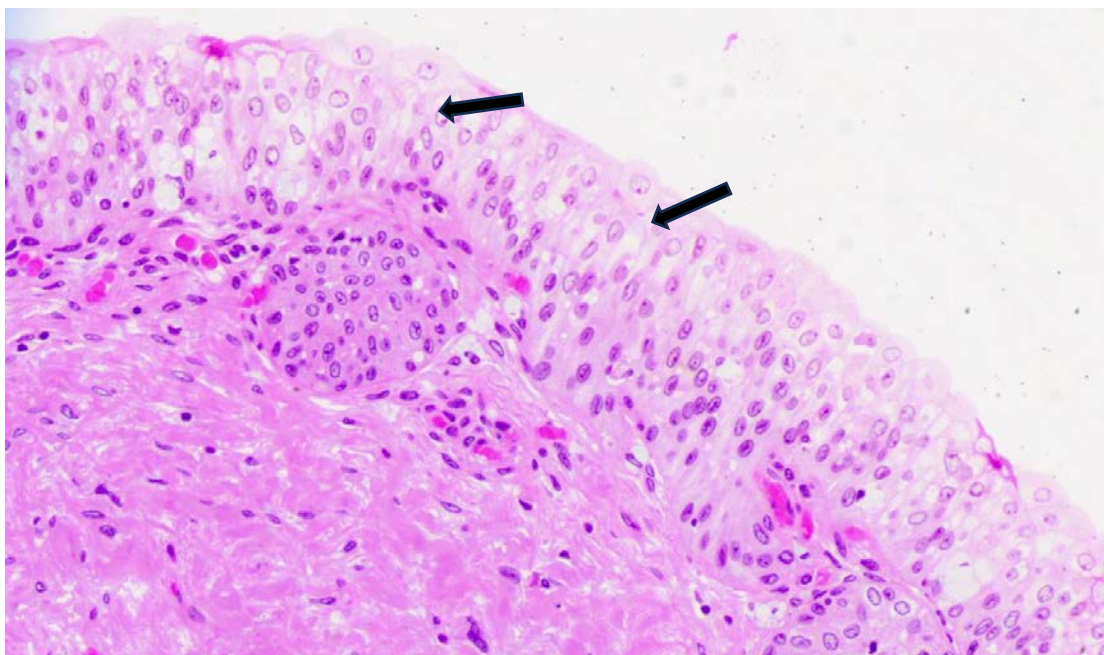
Η ουροδόχος κύστη είναι ένα κοίλο, μυώδες όργανο το οποίο βρίσκεται στη βάση της πυέλου και λειτουργεί ως χώρος αποθήκευσης των ούρων. Το σχήμα της καθορίζεται από την πληρότητα της κύστης. Όταν η κύστη είναι άδεια βρίσκεται πίσω από την ηβική σύμφυση, ενώ κατά την πλήρωση εκτείνεται πίσω από το κατώτερο κοιλιακό τοίχωμα. Η επιθυμία για ούρηση εμφανίζεται στα 350-750 ml για τους άνδρες και στα 250-550 ml για τις γυναίκες. Η μέγιστη χωρητικότητά της εξαρτάται από το μέγεθος του σώματος. Στους άνδρες η κύστη βρίσκεται μεταξύ του ορθού και της ηβικής σύμφυσης και στις γυναίκες μεταξύ του ορθού και της μήτρας. Εσωτερικά διακρίνεται στο άνω τμήμα, που καλείται θόλος και στην κάτω τριγωνική περιοχή που καλείται κυστικό τρίγωνο (Hickling et al. 2015).

Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης φέρει εξωτερικά έναν λεπτό, ινώδη, ορογόνο χιτώνα από συνδετικό ιστό. Εσωτερικά αυτού βρίσκεται ο μυϊκός χιτώνας ο οποίος φέρει λείες μυϊκές ίνες. Ο μυϊκός χιτώνας εξασφαλίζει τη διαστολή και συστολή της ουροδόχου κύστης που οδηγεί στη συλλογή ή την εξώθηση των περιεχόμενων ούρων αντίστοιχα. Η εσωτερική επιφάνεια της ουροδόχου κύστης επενδύεται από τον βλεννογόνο που καλύπτεται από μεταβατικού τύπου επιθήλιο, που καλείται ουροθήλιο.

Το ουροθήλιο είναι πολύστιβο και φέρει 5-7 στιβάδες επιθηλιακών κυττάρων. Η τελευταία στιβάδα επικάθεται στη βασική μεμβράνη. Το πάχος του βλεννογόνου μεταβάλλεται ανάλογα με την πληρότητα της κύστης. Όταν η κύστη είναι άδεια το ουροθήλιο είναι παχύ, ενώ όταν η κύστη διατείνεται, λόγω της πλήρωσης με ούρα, το ουροθήλιο αποπλατύνεται και παρατηρούνται λίγες στιβάδες ουροθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα που απαντούν στις κατώτερες στιβάδες του ουροθηλίου είναι μικρά και φέρουν έναν πυρήνα. Αντιθέτως, τα επιπολής κύτταρα του ουροθηλίου καλούνται “ομπρελωτά” και είναι μεγάλα, θολωτά κύτταρα, με διάμετρο από 25 έως 250μm, μονοπύρηνα και ενίοτε διπύρηνα. Τα επιπολής θολωτά κύτταρα είναι διαφοροποιημένα, πολωμένα κύτταρα και πακετάρονται στενά το ένα δίπλα στο άλλο. Συγκρατούνται με ισχυρές συνδέσεις και συμβάλλουν στη δημιουργία του ουροθηλιακού φραγμού (Εικόνα 2) (Chromek et al. 2008).

Τα κύτταρα της ενδιάμεσης στιβάδας είναι μονοπύρηνα, με διάμετρο από 10 έως 15μm. Συνδέονται μεταξύ τους και με τα “ομπρελωτά” κύτταρα με δεσμοσώματα. Το πάχος της ενδιάμεσης στιβάδας διαφέρει ανάλογα με την πληρότητα της ουροδόχου κύστης. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας είναι επίσης μονοπύρηνα και έχουν διάμετρο περίπου 10 μm. Συνδέονται με δεσμοσώματα με τα κύτταρα της ενδιάμεσης στιβάδας και επικάθονται στη βασική μεμβράνη με τη βοήθεια των ημιδεσμοσωμάτων, που αποτελούν συνδέσεις αγκυροβολιάς (Dalghi et al. 2020).

Ο κύριος ρόλος του ουροθηλίου είναι ο φραγμός μεταξύ της κυκλοφορίας του αίματος και των ούρων, ώστε να αποτραπεί η μεταφορά ουσιών μεταξύ τους. Παράλληλα, έχει και ρόλο αισθητηρίου οργάνου, καθώς δύναται να ενισχύει και να μεταδίδει τις πληροφορίες που λαμβάνει από το εξωτερικό περιβάλλον. Τα ουροθηλιακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται αλλαγές στο εξωκυττάριο περιβάλλον και να απαντούν σε χημικά και μηχανικά ερεθίσματα, καθώς και σε μεταβολές της θερμοκρασίας, απελευθερώνοντας ενδοκυττάριους παράγοντες, όπως το ATP και η ακετυλοχολίνη (Khandelwal et al. 2009).



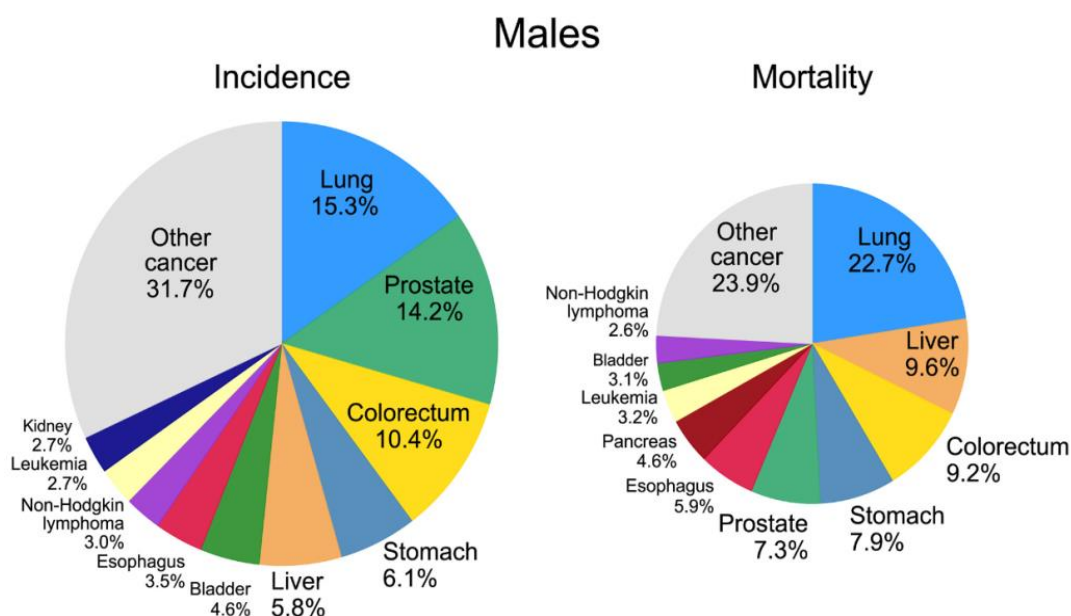
Εικόνα 2. Φυσιολογικό ουροθήλιο. Διακρίνονται τα επιπολής θολωτά κύτταρα (βέλη) (Εικόνα εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

2. Ο ουροθηλιακός καρκίνος

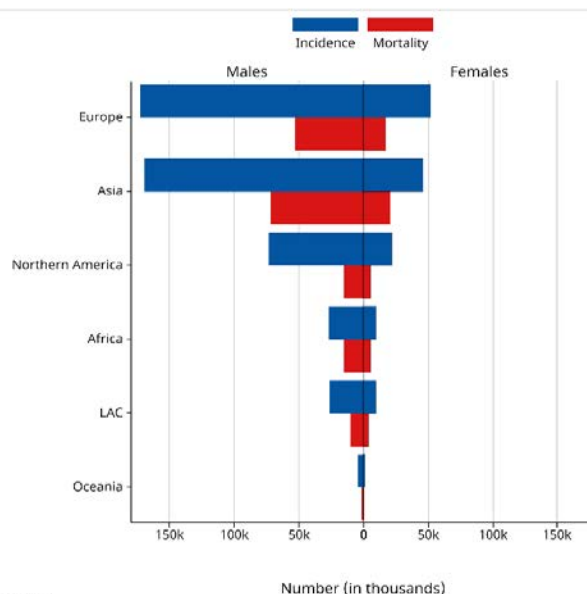
2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης (Bladder Cancer, BC) είναι ο συχνότερος ουροθηλιακός καρκίνος και αντιστοιχεί σε ποσοστό της τάξης του 90% του συνόλου των κακοηθειών στην ουροδόχο κύστη. Απαντάται τέσσερις φορές συχνότερα στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες. Το 2020 κατείχε παγκοσμίως τη 10^η θέση σε συχνότητα στα δύο φύλα και την 6^η θέση στους άνδρες, ενώ αποτελεί την 9^η αιτία θανάτου από καρκίνο (Εικόνα 3) (Lobo et al. 2022). Η υψηλότερη επίπτωση καταγράφεται στις αναπτυγμένες χώρες, κυρίως στην Ευρώπη, την Ασία και την Βόρεια Αμερική και σε χαμηλότερο βαθμό στην Αφρική, τη Λατινική Αμερική και την Ωκεανία (Εικόνα 4). Μικρό ποσοστό του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου παρουσιάζει γενετική προδιάθεση και έχει κληρονομικό υπόβαθρο. Οι κύριοι παράγοντες κινδύνου είναι περιβαλλοντικοί και σχετίζονται με τον τρόπο ζωής των ατόμων. Ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου, που ενοχοποιείται για τον κίνδυνο εμφάνισης του ουροθηλιακού καρκίνου είναι το κάπνισμα, σε ένα ποσοστό της τάξης του 50% των περιπτώσεων. Ο καπνός αποτελεί πηγή γνωστών καρκινογόνων ενώσεων όπως οι αρωματικές αμίνες. Αυτές οι ενώσεις οδηγούν σε βλάβες στο DNA με τη μορφή δίκλωνων θραυσμάτων και τροποποιήσεων βάσεων. Οι καπνιστές θεωρείται ότι έχουν 2,5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης

σε σχέση με τους μη καπνιστές (Antoni et al. 2017). Δυσμενής περιβαλλοντικό παράγοντα κινδύνου αποτελεί επίσης και η επαγγελματική έκθεση σε χημικές, καρκινογόνες ουσίες και ειδικότερα η έκθεση σε μέταλλα, λάστιχα και παράγωγα πετρελαίου. Υψηλός κίνδυνος καταγράφεται επίσης και σε επαγγέλματα όπως οι πυροσβέστες, οι οποίοι εκτίθενται σε παράγωγα καύσης του κάρβουνου. Ένας ακόμη παράγοντας που εντοπίζεται κυρίως σε περιοχές της Αφρικής είναι και η λοίμωξη από το παράσιτο *Schistosoma haematobium* (Lobo et al. 2022). Οι περισσότεροι ασθενείς, σε ποσοστό περίπου 75% εμφανίζουν μη-μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Non-Muscle Invasive Bladder Cancer, NMIBC), ενώ το 25% μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Muscle-Invasive Bladder Cancer, MIBC) (Jubber et al. 2023; Dobruch et al. 2021).



Εικόνα 3. Επίπτωση και θνητότητα στους άνδρες (2022).



Εικόνα 4. Αριθμός νέων περιστατικών και θανάτων από καρκίνο της ουροδόχου κύστης ανά ήπειρο και φύλο (Globocan 2022 Cancer Today).

Τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης του ουροθηλιακού καρκίνου παρατηρούνται στη Νότια και Δυτική Ευρώπη, ενώ χαμηλότερα ποσοστά καταγράφονται στην Ασία και στην Αφρική. Το γεγονός αυτό, εκτός από τη γεωγραφική ετερογένεια καταδεικνύει επίσης διαφορές μεταξύ των χωρών ως προς την πρόσβαση σε ιατρικές υπηρεσίες και την πολιτική που ακολουθούν τα διαφορετικά κράτη σχετικά με την πρόληψη και την έγκαιρη διάγνωση. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι η Ελλάδα κατέχει παγκοσμίως το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης στους άνδρες. Το υψηλό αυτό ποσοστό συνδέεται ισχυρά με το κάπνισμα, καθώς η χώρας μας συγκαταλέγεται μεταξύ των δέκα ευρωπαϊκών χωρών με τα υψηλότερα ποσοστά καπνίσματος (Sung et al. 2021).

2.2 Ιστολογική ταξινόμηση νεοπλασμάτων

2.2.1 Σταδιοποίηση (Staging)

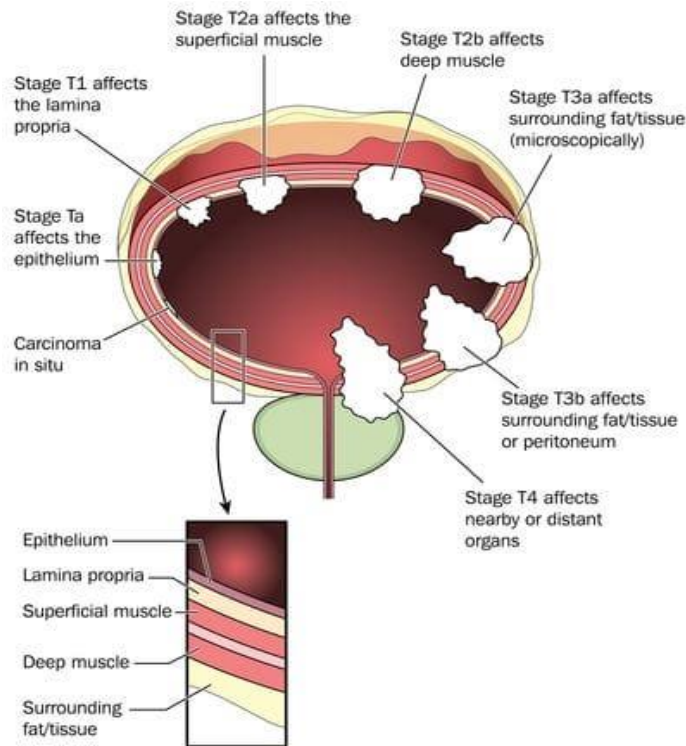
Όλα τα νεοπλάσματα ταξινομούνται με βάση τη μορφολογία τους και συγκεκριμένα το μέγεθος του όγκου, την έκταση της βλάβης, τη μορφολογία των κυττάρων και την αρχιτεκτονική των ιστών. Έχουν υπάρξει ποικίλα συστήματα ταξινόμησης, ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, το σύστημα

ταξινόμησης που έχει καθιερωθεί είναι το σύστημα TNM (Tumor-Node-Metastasis). Το συγκεκριμένο σύστημα ταξινομεί τους όγκους με βάση τρεις παραμέτρους: το μέγεθος του όγκου (T, Tumor), την παρουσία ή απουσία διήθησης στους λεμφαδένες (N, Nodes) και την παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M, Metastasis). Το σύστημα TNM δημιουργήθηκε μεταξύ του 1943 και 1952 από τον Γάλλο Pierre Denoix. Η τελευταία ενημέρωση έγινε το 2017 και αποτελεί την 8^η έκδοση της Αμερικανικής Επιτροπής για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer) (Babjuk et al. 2022) (Πίνακας 1) (Εικόνα 5).

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση με το σύστημα TNM 2017 (Babjuk et al. 2022).

Tx	Ο όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Δεν υπάρχουν ενδείξεις πρωτοπαθούς όγκου
Ta	Μη-διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα
Tis	Το καρκίνωμα in situ: «επίπεδος όγκος»
T1	Ο όγκος διηθεί τον υποεπιθηλιακό συνδετικό ιστό
T2	Ο όγκος διηθεί τους μυς • T2a Ο όγκος διηθεί τους επιφανειακούς μυς (εσωτερικό μισό) • T2b Ο όγκος διηθεί τους βαθιούς μυς (εξωτερικό μισό)
T3	Ο όγκος διηθεί τον περικυστικό ιστό • T3a Μικροσκοπικά

	• T3b Μακροσκοπικά (εξωκυστική μάζα)
T4	Ο όγκος διηθεί οποιοδήποτε από τα ακόλουθα: στρώμα του προστάτη, σπερματοδόχο κύστη, μήτρα, κόλπο, πυελικό τοίχωμα, κοιλιακό τοίχωμα • T4a Ο όγκος διηθεί το στρώμα του προστάτη, σπερματοδόχο κύστη, μήτρα, κόλπο • T4b Ο όγκος διηθεί το πυελικό τοίχωμα ή κοιλιακό τοίχωμα
Nx	Επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0	Δεν υπάρχει μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε έναν μόνο πυελικό λεμφαδένα
N2	Μετάσταση σε πολλαπλούς πυελικούς λεμφαδένες
N3	Μετάσταση σε ένα ή περισσότερους κοινούς λαγόνιους λεμφαδένες
M0	Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	• M1a Μη επιχώριοι λεμφαδένες • M1b Άλλες απομακρυσμένες μεταστάσεις



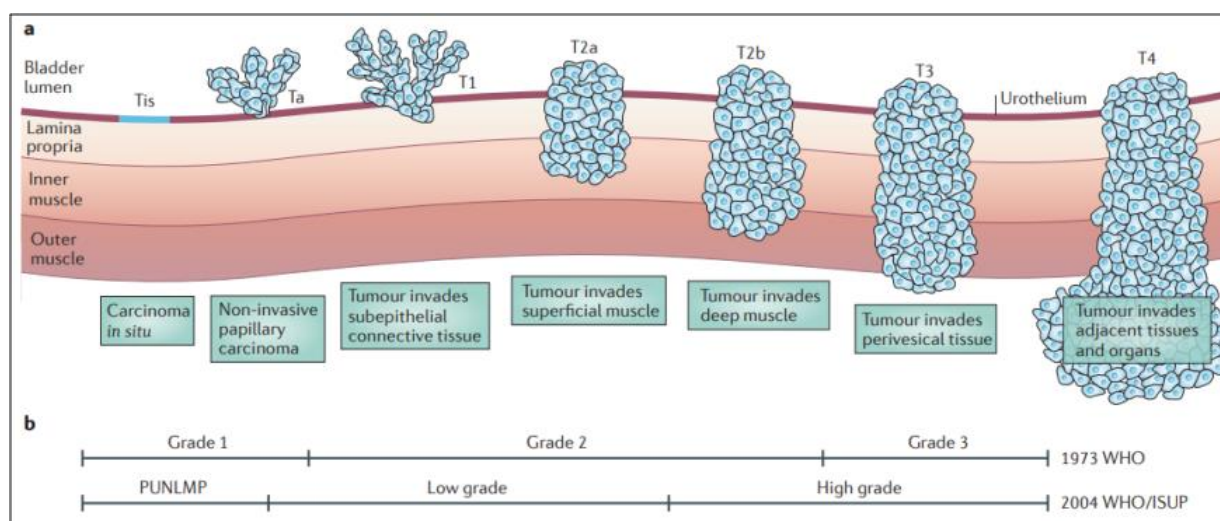
Εικόνα 5. Σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. <https://bladdercancersupport.org/bladder-cancer-101/bladder-cancer-staging-and-grading-pathology/>

2.2.2 Βαθμός διαφοροποίησης ή βαθμός κακοηθείας (Grading)

Η 4^η έκδοση ταξινόμησης των όγκων του ουροθηλίου, που εκδόθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), παρέχει μια σύγχρονη ανασκόπηση της μορφολογίας των ουροθηλιακών νεοπλασμάτων, τα οποία χαρακτηρίζονται από έντονη διαφοροποίηση, πολλαπλές μορφολογικές αλλαγές και ένα σύνθετο μοριακό προφίλ. Το μεγαλύτερο ποσοστό (95%) των διηθητικών νεοπλασμάτων χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου, επομένως η διαφοροποίηση των ουροθηλιακών νεοπλασμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντική στα μη διηθητικά και κυρίως στα θηλώδη νεοπλάσματα. Τα μη διηθητικά νεοπλάσματα χωρίζονται σε 2 κατηγορίες στα θηλώδη και τα επίπεδα. Το καρκίνωμα in situ (Carcinoma in situ, CIS) είναι υψηλού κινδύνου. Οι επίπεδοι μη διηθητικοί, αλλά και οι θηλώδεις όγκοι ενδέχεται να εμφανίσουν ένα ευρύ φάσμα ατυπίας, από καλοήθεις έως κακοήθεις όγκους υψηλού βαθμού (Πίνακας 2) (Εικόνα 6) (Humphrey et al. 2016; Wang & McKenney 2018).

Πίνακας 2. Διαφοροποίηση κατά ΠΟΥ για θηλωματώδη νεοπλάσματα (Wang & McKenney 2018).

Ταξινόμηση ΠΟΥ 1973	Ταξινόμηση ΠΟΥ 2016
Grade 1: όγκοι υψηλού βαθμού διαφοροποίησης	Θηλώδης ουροθηλιακή νεοπλασία χαμηλού δυναμικού κακοήθειας (Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential, PUNLMP)
Grade 2: όγκοι μετρίου βαθμού διαφοροποίησης	Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (Low Grade Urothelial Cancer, LGUC)
Grade 3: όγκοι χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης	Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας (High Grade Urothelial Cancer, HGUC)



Εικόνα 6 α) Σταδιοποίηση καρκίνου ουροδόχου κύστης σύμφωνα με το πρότυπο TNM. β) Ταξινόμηση σύμφωνα με τον ΠΟΥ 1973 και 2004 (Knowles & Hurst 2014).

2.2.3 Ιστολογικοί Υπότυποι

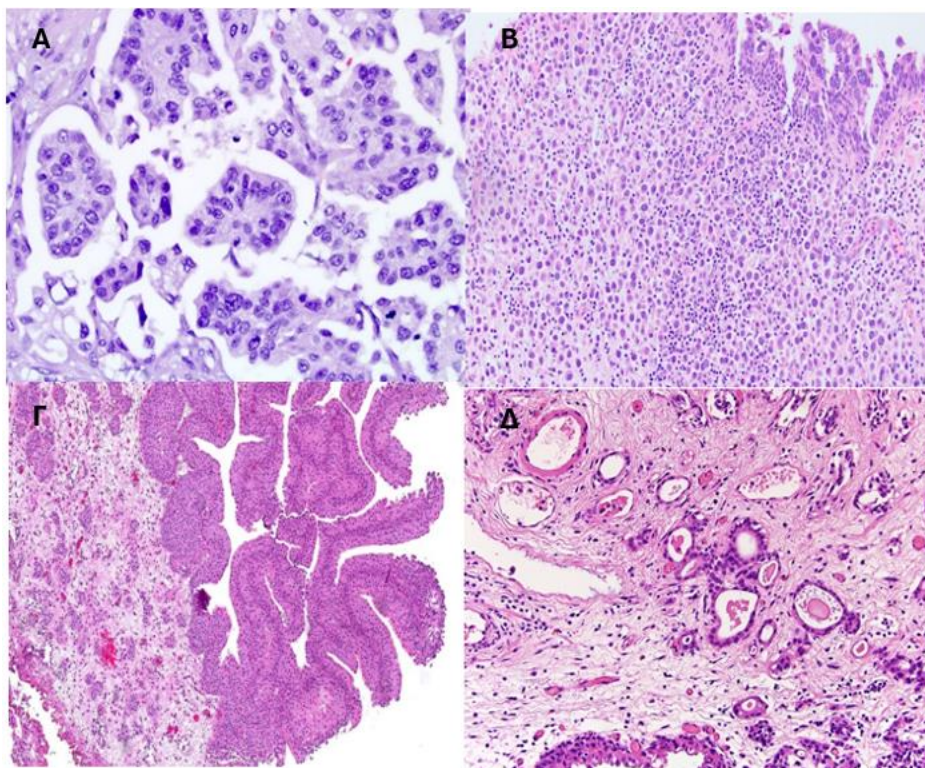
Ο κύριος ιστολογικός τύπος καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι το ουροθηλιακό καρκίνωμα, το οποίο αναπτύσσεται στα ουροθηλιακά κύτταρα που επενδύουν εσωτερικά την ουροδόχο κύστη. Τα ουροθηλιακά κύτταρα επενδύουν επίσης το τμήμα του νεφρού που συνδέεται με τον ουρητήρα, τους ουρητήρες και την ουρήθρα. Άλλοι ιστολογικοί υπότυποι, λιγότερο συνήθεις είναι οι ακόλουθοι: το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Squamous Cell Carcinoma), το αδenoκαρκίνωμα, το μικροκυτταρικό καρκίνωμα και τα σαρκώματα.

Οι ιστολογικές παραλλαγές του ουροθηλιακού καρκινώματος περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων το μικροθηλώδες, το μικροκυστικό, το ένθετο, όμοιο με λεμφοεπιθηλίωμα, το πλασμακυτταροειδές, το σαρκωματοειδές, το γιγαντοκυτταρικό, το πλούσιο σε λιπίδια και το διαυγές ουροθηλιακό καρκίνωμα. Το μικροθηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα έχει περιγραφεί, μορφολογικά, ως καρκινικά κύτταρα διατεταγμένα σε πολλαπλές μικρές φωλιές χωρίς ινοαγγειακούς άξονες. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία πολλαπλών μικρών φωλεών στον ίδιο χώρο. Το πλασμακυτταροειδές, είναι μία από τις πιο επιθετικές παραλλαγές, που εμφανίζεται συχνά ως τοπικά προχωρημένη νόσος κατά τη διάγνωση. Αυτοί οι όγκοι αποτελούνται από κύτταρα με έκκεντρους πυρήνες και άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα ενδέχεται να φέρουν κυτταροπλασματικά κενοτόπια τα οποία τους προσδίδουν μορφολογία δίκην σφραγιστήρος (signet ring). Το ένθετο καρκίνωμα αποτελεί μορφολογική παραλλαγή του ουροθηλιακού καρκινώματος και χαρακτηρίζεται από ασυνήθιστα ήπιο, ένθετο μοτίβο εισβολής, αλλά με κλινική έκβαση ανάλογη του συμβατικού διηθητικού καρκινώματος υψηλού βαθμού κακοηθείας. Το μικροκυστικό καρκίνωμα έχει μία εσφαλμένα καλοήγη ιστολογική εικόνα, με μικροκύστες, μακροκύστες ή σωληνοειδείς δομές, οι οποίες μπορεί να είναι κενές ή να περιέχουν νεκρωτικά υπολείμματα (Πίνακας 3) (Εικόνα 7) (Pathology Outlines).

Πίνακας 3. Ιστολογική ταξινόμηση των νεοπλασμάτων του ουροποιητικού συστήματος (Ταξινόμηση WHO 2022)

Ουροθηλιακοί όγκοι	
Μη διηθητικά ουροθηλιακά νεοπλάσματα	
Ουροθηλιακό θήλωμα	Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα χαμηλού βαθμού με ανεστραμμένο πρότυπο ανάπτυξης
Ουροθηλιακό θήλωμα, ανεστραμμένο	Μη διηθητικό θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα, υψηλού βαθμού
Θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού	Μη διηθητικό υψηλού βαθμού θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα με ανεστραμμένο πρότυπο ανάπτυξης
Ανεστραμμένο θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού	
Μη διηθητικό θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα, χαμηλού βαθμού	Ουροθηλιακό καρκίνωμα in situ
Διηθητικά ουροθηλιακά νεοπλάσματα	
Διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα	Μικροθηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα
Συμβατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα	Ουροθηλιακό καρκίνωμα που προσομοιάζει με λεμφοεπιθηλίωμα
Ουροθηλιακό καρκίνωμα με πλακώδη διαφοροποίηση	Πλασμακυτταροειδές ουροθηλιακό καρκίνωμα
Ουροθηλιακό καρκίνωμα με αδενική διαφοροποίηση	Γιγαντοκυτταρικό ουροθηλιακό καρκίνωμα
Ουροθηλιακό καρκίνωμα με τροφοβλαστική διαφοροποίηση	Πλούσιο σε λιπίδια ουροθηλιακό καρκίνωμα
Ουροθηλιακό καρκίνωμα με πρότυπο ανάπτυξης τύπου φωλεών	Ουροθηλιακό καρκίνωμα εκ διαυγών κυττάρων (πλούσιο σε γλυκογόνο)
Ουροθηλιακό καρκίνωμα με πρότυπο ανάπτυξης τύπου μεγάλων φωλεών	Σαρκωματοειδές ουροθηλιακό καρκίνωμα
Σωληνώδες-μικροθηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα	Ουροθηλιακό καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης

Ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα του ουροποιητικού συστήματος	
Θήλωμα εκ πλακωδών κυττάρων	Ακροχορδονώδες καρκίνωμα
Αμιγές πλακώδες καρκίνωμα της ουροθηλιακής οδού	
Αδενικά νεοπλάσματα	
<i>Αδενώματα</i>	<i>Αδενοκαρκινώματα</i>
Λαχνωτό αδένωμα	Αδενοκαρκίνωμα, NOS
Σωληναριακό αδένωμα	Αδενοκαρκίνωμα εντερικού τύπου
Σωληνώδες αδένωμα	Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα
	Αδενοκαρκίνωμα τύπου signet ring
	Αδενοκαρκίνωμα in situ
Νεοπλάσματα από υπολείμματα ουραχού και αναπτυσσόμενα σε εκκοπλώματα	
Καρκίνωμα από υπολείμματα ουραχού	Διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα
Καρκινώματα επικουρικών αδένων ουρήθρας	
Καρκίνωμα αδένων Littre	Καρκίνωμα αδένων Cowper
Καρκίνωμα αδένων Skene	
Όγκοι τύπου Mullerian	
Διαυγές καρκίνωμα	Ενδομητριοειδές καρκίνωμα



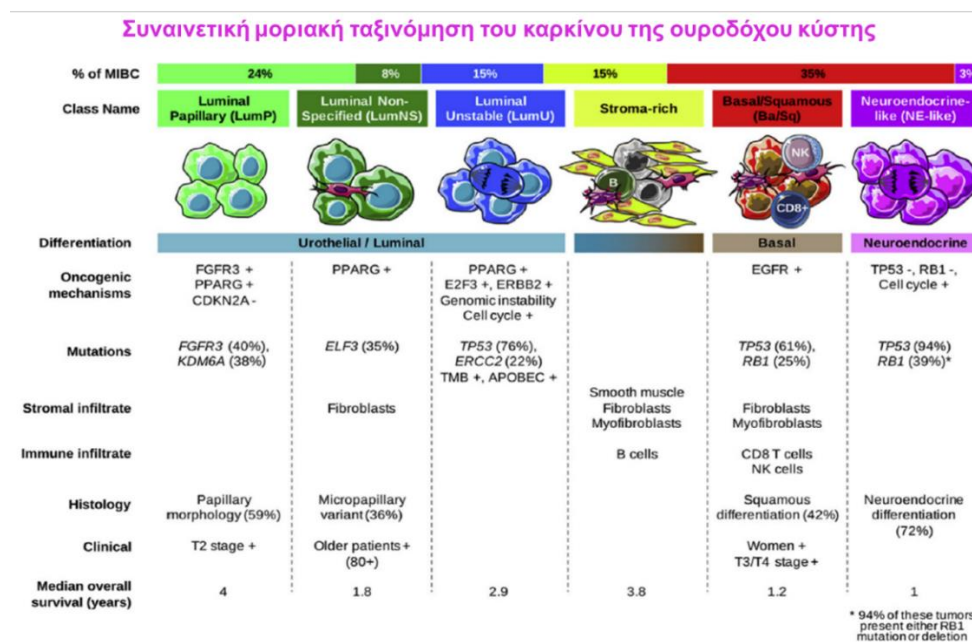
Εικόνα 7. Ιστολογικές εικόνες από Α) μικροθηλώδες, Β) πλασμακυτταροειδές, Γ) ένθετο και Δ) μικροκυστικό ουροθηλιακό καρκίνωμα.
(Pathology Outlines (<https://www.pathologyoutlines.com/bladder.html>))

2.2.4 Μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκίνου

Ο ουροθηλιακός καρκίνος αποτελεί μία ετερογενή νόσο με ποικίλη βιολογική συμπεριφορά, η οποία δεν αντιπροσωπεύεται από την ιστολογική ταξινόμηση. Οι τεχνολογικές εξελίξεις έχουν ανοίξει το δρόμο για τον μοριακό χαρακτηρισμό των νεοπλασμάτων και την αξιοποίηση του γονιδιωματικού και πρωτεομικού τους προφίλ σε συνδυασμό με χαρακτηριστικά στοιχεία του μεταγραφώματός τους. Τα τελευταία χρόνια τα συστήματα ταξινόμησης στοχεύουν σε μία μορφομοριακή ταξινόμηση, η οποία συνδυάζει τις γενετικές αλλαγές (γονότυπος) με τα μορφολογικά στοιχεία (φαινότυπος) του όγκου και επιπρόσθετα προσπαθεί να ερμηνεύσει και να ενσωματώσει τις επιγενετικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα. Η μοριακή ταξινόμηση είναι πολλά υποσχόμενη καθώς θα επιτρέψει την ορθότερη τυποποίηση των όγκων, θα συμβάλει στην ανάδειξη νέων βιοδεικτών και θα ωθήσει την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών επιλογών. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας, δεν έχει ενσωματωθεί στην κλινική πράξη (Schwarzova et al 2023).

Περίπου το 80% των περιπτώσεων με καρκίνο ουροδόχου κύστης είναι μη μυοδιηθητικοί όγκοι (Non-muscle invasive Bladder Cancer, NMIBC) και μόλις το 20% είναι μυοδιηθητικοί (Muscle invasive Bladder Cancer, MIBC). Ωστόσο, σημαντικό ποσοστό των NMIBC μπορεί να εξελιχθεί σε MIBC, που είναι χειρότεροι όγκοι με επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Το 2014, η ομάδα του TCGA (The Cancer Genome Atlas) συνεκτιμώντας σημειακές μεταλλάξεις, αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων των γονιδίων και αναδιατάξεις, έδειξε ότι οι μυοδιηθητικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από υψηλό φορτίο μεταλλάξεων, ανάλογο με αυτό του πνεύμονα και του μελανώματος. Προηγούμενες μελέτες υποδείκνυαν την ύπαρξη δύο μοριακών υποτύπων: αυλικός (luminal) και βασικός (basal).

Το 2017, οι Robertson και συνεργάτες λαμβάνοντας υπόψη το προφίλ του μεταγραφώματος υπέδειξαν πέντε διακριτούς μοριακούς υποτύπους για τα MIBC καρκινώματα: αυλικός (Luminal), αυλικός-θηλώδης (Luminal-papillary), αυλικός-διηθητικός (Luminal-infiltrated), βασικός-πλακώδης (Basal-squamous) και νευρωνικός (Neuronal) υπότυπος. (Robertson et al 2017) Εκτός από αυτή την ταξινόμηση είχαν προταθεί και άλλες από διάφορες επιστημονικές ομάδες ανά τον κόσμο. Σχετικά πρόσφατα το 2020, οι Kamoun και συνεργάτες συγκέντρωσαν και ανέλυσαν τις διαφορετικές προτεινόμενες ταξινομήσεις και κατέληξαν σε μία συναινετική ταξινόμηση, η οποία περιλαμβάνει έξι συνολικά μοριακούς υποτύπους: Αυλικός-Θηλώδης (Luminal Papillary - LumP), Αυλικός μη καθοριζόμενος (Luminal Non-Specified - LumNS), Αυλικός ασταθής (Luminal Unstable - LumU), Πλούσιος σε στρώμα (Stroma-rich) και Βασικός /Πλακώδης (Basal/Squamous - Ba/Sq) και Νευροενδοκρινικού τύπου υπότυπος (Neuroendocrine-Like - Ne-like) (Εικόνα 8) (Kamoun et al 2020).



Εικόνα 8. Συναινετική μοριακή ταξινόμηση των MIBC καρκινωμάτων ουροδόχου κύστης (Kamoun et al, 2020).

Όλοι οι αυλικοί υπότυποι παρουσιάζουν θηλώδη μορφολογία, εκφράζουν ουροπλακίνες, που αποτελούν δείκτες τελικής διαφοροποίησης και υπερεκφράζουν δείκτες FOXA1, GATA3 και PPARG, οι οποίοι σχετίζονται με τη διαφοροποίηση του ουροθηλίου. Παράλληλα, διαθέτουν διαφορετικές μεταλλάξεις και μηχανισμούς ογκογένεσης.

Ο Αυλικός Θηλώδης υπότυπος (LumP) χαρακτηρίζεται από υψηλή FGFR3 δραστηριότητα (συντήξεις, μεταλλάξεις, ενίσχυση). Πρόκειται για χαμηλού βαθμού όγκους με θηλώδη μορφολογία και καλή πρόγνωση. Περίπου το 1/3 αυτών φέρει ομόζυγες μεταλλάξεις στο CDKN2A γονίδιο. Στην ομάδα αυτή υπάρχει μία μικρή ομάδα που μοιάζουν με TP53 όγκους και παρουσιάζουν αντοχή στη θεραπεία.

Ο Αυλικός ασταθής υπότυπος (LumU) είναι γενωμικά ασταθής όγκος. Πρόκειται για όγκους με υψηλή γονιδιωματική αστάθεια και συχνές μεταλλάξεις στα TP53 και ERCC2 γονίδια. Παρουσιάζουν επίσης υψηλή δραστηριότητα του κυτταρικού κύκλου. Ο συγκεκριμένος υπότυπος έχει κακή πρόγνωση.

Ο Αυλικός μη καθοριζόμενος υπότυπος (LumNS) παρουσιάζει αυξημένη διήθηση του στρώματος, μέτρια διήθηση των ανοσοκυττάρων και μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τους ELF3, PPARG ρυθμιστικούς παράγοντες.

Ο πλούσιος σε στρώμα υπότυπος (Stroma-rich) παρουσιάζει υψηλή διήθηση από κύτταρα του στρώματος και ανοσοκύτταρα και σχετίζονται με υπογραφές γονιδιακής έκφρασης λειών μυών, ενδοθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών. Έχει ενδιαμέση πρόγνωση.

Ο Βασικός/ Πλακώδης υπότυπος (Ba/Sq): παρουσιάζει βασικοπλακώδη διαφοροποίηση. Είναι ο συχνότερος υπότυπος (35%) και εκφράζει δείκτες βασικής διαφοροποίησης CK5/6, CK14, CD44. Φέρει υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων στα γονίδια TP53 (61%), και RB1 (25%). Οι όγκοι με TP53 μεταλλάξεις παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο να εξελιχθούν σε T2+ όγκους. Σε ένα ποσοστό περιπτώσεων της τάξης του 14% οι όγκοι φέρουν ταυτόχρονες μεταλλάξεις στα TP53 και RB1 γονίδια. Οι όγκοι αυτοί έχουν τη χειρότερη ολική επιβίωση και ένα υποσύνολο αυτών, που εκφράζουν χαμηλά επίπεδα claudin (claudin-low) υπερεκφράζουν δείκτες EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), έχουν υψηλή διήθηση ανοσοκυττάρων και απαντούν διαφορετικά στη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία.

Τέλος, ο νευροενδοκρινικού τύπου υπότυπος εκφράζει δείκτες νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης (συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη A, NSE ή CD56). Παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα κυτταρικού κύκλου και συνήθως ανευρίσκονται ταυτόχρονες μεταλλάξεις ή ελλείψεις των TP53 και RB1 γονιδίων. Πρόκειται για σπάνιους όγκους με άγνωστη βιολογική συμπεριφορά και εξέλιξη και έχουν τη χειρότερη πρόγνωση. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται το μικροκυτταρικό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (SCCB) και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (LCCB). Οι θεραπευτική προσπάθεια ακολουθεί τις θεραπείες που προτείνονται για το μικροκυτταρικό καρκίνωμα (SCC) του πνεύμονα, συμπεριλαμβανομένης της χειρουργικής επέμβασης, της χημειοθεραπείας και της ακτινοβολίας.

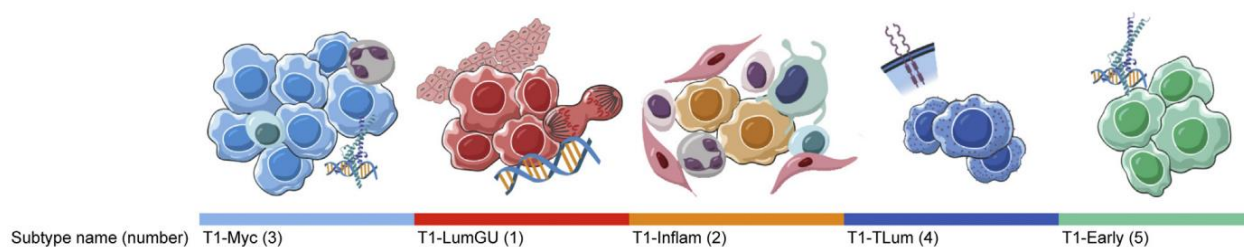
Εκτός από τη μοριακή ταξινόμηση των MIBC καρκινωμάτων, έγιναν ανάλογες προσπάθειες μοριακής ταξινόμησης των NMIBC καρκίνων της ουροδόχου κύστης. Οι Hedegaard και

συνεργάτες (2016) μελέτησαν τα επίπεδα έκφρασης >8.074 γονιδίων, που κωδικοποιούν κερατίνες, ουροπλακίνες, πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, ελέγχου, διαφοροποίησης και επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής και ταξινόμησαν τους ασθενείς με NMIBC σε τρεις διακριτές ομάδες: Η ομάδα 1 χαρακτηριζόταν από υψηλή έκφραση των ουροπλακινών UPK1A, UPK2 και των γονιδίων που εκφράζονται νωρίς στον κυτταρικό κύκλο, έφεραν *FGFR3* μεταλλάξεις και είχαν λιγότερο επιθετική συμπεριφορά. Η ομάδα 2 παρουσίαζε επίσης υψηλή έκφραση ουροπλακινών, αλλά και γονιδίων που εκφράζονται αργότερα στον κυτταρικό κύκλο *CDK1/2/4*, *CDC20*, *CCNB1/2*, *FOXM1*, *MYBL2* και *PLK*. Εξέφραζαν μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την ενεργοποίηση επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT), όπως είναι οι *SOX 9*, *FOXF1* και *TWIST1*, και εξέφραζαν επίσης δείκτες της βλαστικής σειράς (stem-cell). Παρουσίαζαν μικρή ολική επιβίωση. Η ομάδα 3 περιλάμβανε όγκους με έντονη παρουσία βλαστικών κυττάρων, που εξέφραζαν βασικοκυτταρικούς δείκτες *CD44*, κερατίνες *KRT5* και *KRT15* και είχαν μικρή συνολική επιβίωση (Εικόνα 9) (Hedegaard et al 2016).

NMIBC (80% of diagnosed bladder cancer)		
Subtype	Signatures	Mutations
Class 1 (20%, 97/476)	• PPARG⁺ • UPK⁺ • Early cell cycle genes	<i>FGFR3</i>
Class 2 (52%, 249/476)	• Luminal-like differentiation • PPARG⁺ • UPK⁺ • KRT14⁺ • CIS positive • EMT transcription factors • Cancer stem cell activity • Late cell cycle genes • APOBEC⁺ signature	• <i>TP53</i> • <i>ERCC2</i>
Class 3 (27%, 130/476)	• Basal-like undifferentiation • PPARG⁻ • GATA3⁺ • KRT5⁺ • KRT14⁺ • KRT15⁺ • CD44⁺ • RNA-editing signature	<i>FGFR3</i>

Εικόνα 9. Μοριακή ταξινόμηση των NMIBC καρκινωμάτων ουροδόχου κύστης (Hedegaard J, et al, 2016).

Τα υψηλού βαθμού κακοηθείας T1 καρκινώματα της ουροδόχου κύστης παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής και εξέλιξης της νόσου και εκτιμάται ότι αφορούν περίπου το 25% έως 43% όλων των NMIBC καρκινωμάτων. Οι συγκεκριμένοι όγκοι έχουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά αλλά παρουσιάζουν διαφορετική κλινική συμπεριφορά. Η αξιολόγηση των T1 υποτύπων μπορεί να συμβάλλει στη διαστρωμάτωση του κινδύνου των T1 όγκων και στην εύρεση νέων θεραπευτικών στόχων. Το 2020, οι Robertson και συνεργάτες πρότειναν μία μοριακή ταξινόμηση των T1 όγκων σε T1-LumGU (T1 luminal Genomically unstable, αυλικός γενωμικά ασταθής τύπος), T1-Inflam (T1 φλεγμονώδης υπότυπος) με υψηλού βαθμού διήθηση από ανοσοκύτταρα, T1-TLum (T1 αυλικός υπότυπος) με έκφραση του FGFR3 υποδοχέα, χωρίς υποτροπές, T1-Myc υπότυπος, με σημαντικά χειρότερη επιβίωση και τον υψηλότερο αριθμό υποτροπών και T1-πρώιμος υπότυπος, ένας εξαιρετικά υποτροπιάζων όγκος μετά από θεραπεία με BCG, που εκφράζει ιντερφερόνες IFN-α και IFN-γ και παρουσιάζει χαρακτηριστικά φλεγμονής (Εικόνα 10) (Robertson et al 2020).



Εικόνα 10. Μοριακή ταξινόμηση των T1 NMIBC καρκινωμάτων ουροδόχου κύστης (Robertson et al 2020).

3. Διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

3.1. Διάγνωση

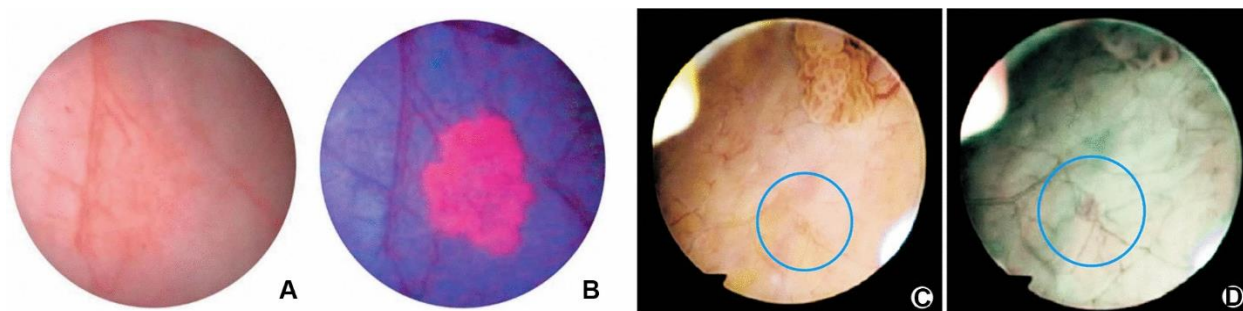
Η έγκαιρη ανίχνευση των όγκων, πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων, είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς θα συμβάλει στην καλύτερη διαχείριση του ασθενούς και στην αντιμετώπιση της νόσου. Επιπρόσθετα, θα εξασφαλίσει την έγκαιρη χορήγηση θεραπείας συμβάλλοντας στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών, καθώς θα επιτρέψει την αντιμετώπιση του όγκου ενδεχομένως πριν αυτός δώσει μεταστάσεις. Το κύριο σύμπτωμα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι η αιματουρία, η οποία μπορεί να είναι μικρο- ή μακροσκοπική. Σε ορισμένες περιπτώσεις γίνεται αντιληπτή με μία απλή γενική εξέταση ούρων. Σπανιότερα μπορεί να παρατηρηθεί πόνος στη μέση ή κατά την ούρηση, ενώ μπορεί να συνοδεύεται από συχνουρία. Σε κάθε περίπτωση, χρειάζεται να γίνει έλεγχος προληπτικά, ώστε να γίνει έγκαιρη διάγνωση της νόσου.

Η διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης πραγματοποιείται με την κυστεοσκόπηση και την κυτταρολογική εξέταση ούρων, σε συνδυασμό με τη χρήση απεικονιστικών μεθόδων, όπως είναι η αξονική και η μαγνητική τομογραφία και το υπερηχογράφημα (Wolfs et al. 2021; Yadong et al. 2021). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας (European association of urology, EAU) η διάγνωση των ασθενών με συμπτώματα καρκίνου της ουροδόχου κύστης πραγματοποιείται με αξονική ουρογραφία ή υπερηχογράφημα νεφρών και ουροδόχου κύστης, με κυστεοσκόπηση και κυτταρολογική εξέταση ούρων. Η τελευταία εξέταση λειτουργεί συμπληρωματικά ως προς την κυστεοσκόπηση.

3.1.1 Κυστεοσκόπηση

Η κυστεοσκόπηση είναι μία επεμβατική ενδοσκοπική μέθοδος, εύκολη στην εκτέλεση, αλλά προκαλεί συνήθως άγχος και δυσφορία στους ασθενείς. Ο ουρολόγος εισάγει μέσω της ουρήθρας μία εύκαμπτη κάμερα στην ουροδόχο κύστη, ώστε να γίνει έλεγχος για τυχόν ύποπτες βλάβες και να ληφθεί υλικό για βιοψία. Υπάρχουν διάφορα είδη κυστεοσκόπησης που διαφέρουν ως προς την ποιότητα απεικόνισης των όγκων: η κυστεοσκόπηση λευκού φωτός (white light cystoscopy), η φθορίζουσα (blue light cystoscopy) και η απεικόνιση στενού φάσματος (narrow band imaging) (Εικόνα 11). Η κλασσική κυστεοσκόπηση λευκού φωτός παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία σε μικρούς όγκους ή επίπεδες βλάβες, επομένως η χρήση των δύο άλλων τεχνικών είναι απαραίτητη (Ahmadi et al. 2021).

Στη φθορίζουσα κυστεοσκόπηση χρησιμοποιούνται φωτοδραστικοί παράγοντες όπως το 5-αμινολεβουλινικό οξύ (5-ALA) και το εξαμινολεβουλινικό (HAL), ουσίες οι οποίες εγχύονται στην ουροδόχο κύστη πριν τη διαδικασία της ενδοσκόπησης. Η ουσία ALA μεταβολίζεται σε φθορίζουσες πορφυρίνες, οι οποίες αθροίζονται στα μιτοχόνδρια των ταχέως αναπτυσσόμενων κυττάρων (π.χ. νεοπλασματικά). Ως εκ τούτου, τα καρκινικά κύτταρα, όταν διεγείρονται από το ιώδες φως, απορροφούν αυτούς τους παράγοντες και εκπέμπουν κόκκινο φθορισμό, ενώ το φυσιολογικό ουροθήλιο παραμένει μπλε. Η κυστεοσκόπηση απεικόνισης στενού φάσματος, σε αντίθεση με την κυστεοσκόπηση λευκού φωτός που χρησιμοποιεί φως στο πλήρες ορατό φάσμα (400-700nm), αξιοποιεί δύο συγκεκριμένα μήκη κύματος στα 415nm (μπλε) και 540nm (πράσινο), τα οποία συμπίπτουν με την απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης. Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύονται καλύτερα οι ιστοί που παρουσιάζουν υψηλή αγγείωση (Daneshmand et al. 2018 ; O'Sullivan et al. 2022).

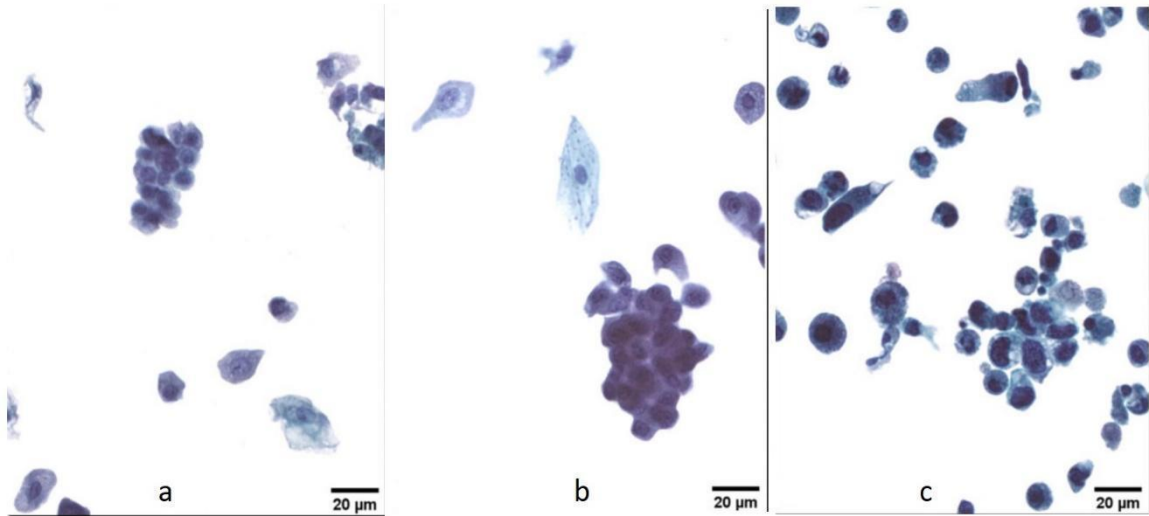


Εικόνα 11. Σύγκριση κυστεοσκόπησης λευκού φωτός (Α, C), με φθορίζουσα (Β) και στενού φάσματος (D) (O’Sullivan et al. 2022).

3.1.2 Κυτταρολογία ούρων

Η κυτταρολογία ούρων χρησιμοποιείται συμπληρωματικά με την κυστεοσκόπηση. Πρόκειται για μία μη επεμβατική εξέταση σε δείγμα ούρων, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα τους όγκους με υψηλό βαθμό κακοηθείας. Ωστόσο, για όγκους χαμηλού βαθμού κακοηθείας η ευαισθησία είναι χαμηλή και απαιτείται σε κάθε περίπτωση επιβεβαίωση με ιστολογική εξέταση βιοπτικού υλικού. Επιπλέον, η αξιολόγηση των δειγμάτων βασίζεται στην εμπειρία και εξειδίκευση του κυτταρολόγου, ώστε να αναγνωρίσει τα νεοπλασματικά κύτταρα σε χαμηλού βαθμού κακοηθείας όγκους, γεγονός που προσδίδει μία υποκειμενική διάσταση στην εξέταση (Alsibai et al. 2020). Τα νεοπλασματικά κύτταρα αποπίπτουν στα ούρα. Μπορεί να προέρχονται από ούρα ελεύθερης ούρησης ή να προέρχονται από έκπλυμα της κύστης.

Το 2016 εκδόθηκε για την κυτταρολογία ούρων το σύστημα των Παρισίων (The Paris System, TPS), ένα τυποποιημένο σύστημα κοινής ονοματολογίας, με στόχο τη διευκόλυνση της επικοινωνίας μεταξύ των ιατρών. Καθορίζει συγκεκριμένα μορφολογικά κριτήρια με βάση τα οποία οι κυτταρολόγοι μπορούν να αξιολογούν τα δείγματα. Το σύστημα περιλαμβάνει 7 διαγνωστικές κατηγορίες: α) μη διαγνωστικό, β) αρνητικό για υψηλού βαθμού ουροθηλιακό καρκίνωμα (negative for high-grade urothelial carcinoma, NHGUC), γ) άτυπα ουροθηλιακά κύτταρα (atypical urothelial cells, AUC), δ) ύποπτο για υψηλού βαθμού ουροθηλιακό καρκίνωμα (suspicious for high-grade urothelial carcinoma, SHGUC), ε) υψηλού βαθμού ουροθηλιακό καρκίνωμα (high-grade urothelial carcinoma, HGUC), ζ) χαμηλού βαθμού ουροθηλιακό νεόπλασμα (low-grade urothelial neoplasm, LGUN) και η) άλλη κακοήθεια (Εικόνα 12) (Nikas et al. 2022; Richardson et al. 2020).



Εικόνα 12. a) Φυσιολογικά ουροθηλιακά κύτταρα, b) χαμηλού βαθμού ουροθηλιακό νεόπλασμα, c) υψηλού βαθμού ουροθηλιακό καρκίνωμα (Alsibai et al. 2020).

3.2 Βιοδείκτες

Ένας καλός βιοδείκτης πρέπει να είναι αξιόπιστος, να έχει καλή ευαισθησία και ειδικότητα και να είναι επαναλήψιμος, ώστε να εξασφαλίζει έγκυρα αποτελέσματα στην κλινική πράξη. Στον καρκίνο, οι βιοδείκτες εξυπηρετούν τη διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη της νόσου. Ένας διαγνωστικός βιοδείκτης πρέπει να οδηγεί σε μικρό ποσοστό ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, γεγονός που διαφορετικά ενδέχεται να οδηγήσει σε λανθασμένη εκτίμηση και συνεπώς και διαχείριση του ασθενούς. Στα πλαίσια παρακολούθησης της πορείας ενός ογκολογικού ασθενούς, ο κατάλληλος βιοδείκτης πρέπει να έχει υψηλή ευαισθησία και υψηλή αρνητική προγνωστική αξία, ώστε να συμβάλλει στον περιορισμό των άσκοπων, επεμβατικών και δυσάρεστων για τον ασθενή κυστεοσκοπήσεων. Ένας τέτοιος δείκτης μπορεί να είναι χρήσιμος σε ασθενείς που παρουσιάζουν μικροσκοπική και μακροχρόνια αιματουρία (Wolfs et al. 2021; Pessoa et al. 2020).

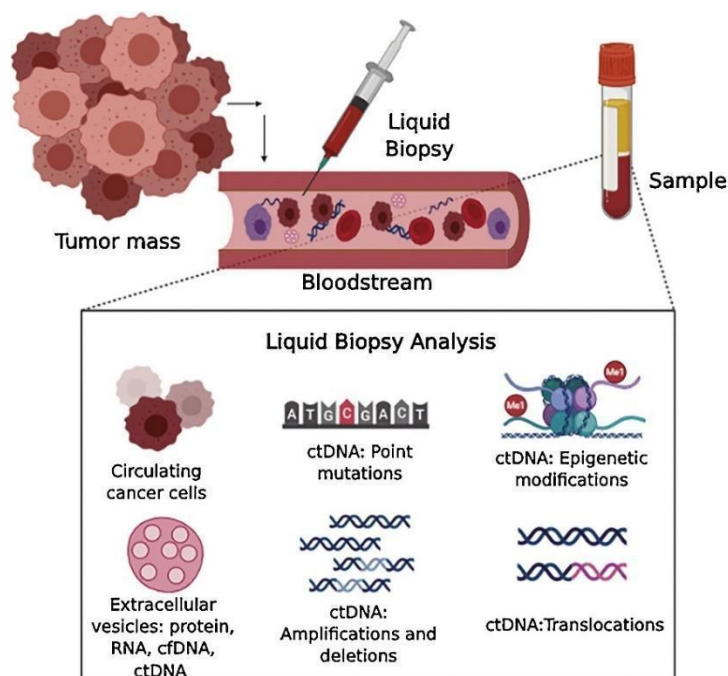
Τα τελευταία χρόνια, οι τεχνολογικές εξελίξεις έχουν επιτρέψει την ανάπτυξη υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας μεθοδολογιών, καθώς και τη χρήση ολοένα και περισσότερων μη επεμβατικών τεχνικών για τη διάγνωση και την παρακολούθηση των ογκολογικών ασθενών. Στα πλαίσια αυτά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτά η υγρή βιοψία και η αναζήτηση σε αυτή βιοδεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη επεμβατικά και να μας δώσουν πληροφορίες για τον όγκο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτούν τα σωματικά υγρά, όπως το περιφερικό αίμα, το σάλιο, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, διάφορα εκπλύματα, στα οποία ανευρίσκονται νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, κυστίδια, τα οποία προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα (Εικόνα 13). Κατά ανάλογο τρόπο, στα ούρα αποπύπτουν νεοπλασματικά κύτταρα που μπορεί να προέρχονται από έναν όγκο

στην ουροδόχο κύστη, γεγονός που καθιστά τα ούρα ως ένα πολλά υποσχόμενο υλικό, που αξίζει να διερευνηθεί για την αναζήτηση νέων βιοδεικτών (Kwong et al. 2021).

Η παρουσία ελεύθερα κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων (cell-free DNA, cfDNA), μέσω των διεργασιών της απόπτωσης και της νέκρωσης των κυττάρων, έχει αναδείξει τη διαγνωστική αξία της υγρής βιοψίας. Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν επίσης νουκλεϊκά οξέα (circulating tumor DNA, ctDNA) στην κυκλοφορία, ενώ επίσης μπορεί και τα ίδια να βρεθούν σε αυτή. Οι περισσότεροι βιοδείκτες αφορούν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphism, SNP), σημειακές μεταλλάξεις, ή παραλλαγές μικρού αριθμού νουκλεοτιδίων, (ελλείψεις, ενθέσεις). Επιπρόσθετα, ενδέχεται να αφορούν αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων των γονιδίων, απώλεια ετεροζυγωτίας, δομικές και αριθμητικές χρωμοσωμικές διαταραχές ή επιγενετικές τροποποιήσεις που επιδρούν στην έκφραση κρίσιμων γονιδίων. Τελευταία, έχει αναδειχθεί επίσης ο ρόλος των μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (microRNAs, long non-coding RNAs, circular RNAs) και πρωτεϊνικών μορίων που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως διαγνωστικοί/προγνωστικοί ή προβλεπτικοί βιοδείκτες (Chen et al. 2019; Pessoa et al. 2020).

Η ανίχνευση και εκτίμηση των μοριακών καρκινικών βιοδεικτών διασφαλίζεται από μία πληθώρα σύγχρονων και παλαιότερων τεχνικών. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και οι παραλλαγές της (πχ. Real-Time PCR, Digital PCR). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν PCR προσφέρουν πολύ καλή ευαισθησία και είναι οικονομικές, αλλά αφορούν κυρίως τον έλεγχο γνωστών γενετικών παραλλαγών. Η εις βάθος ανίχνευση νέων μεταλλάξεων, που απαντούν ακόμη και σε μικρούς κλωνικούς πληθυσμούς, προϋποθέτει σύγχρονες μεθοδολογίες με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, όπως είναι η νέας γενιάς αλληλούχηση (Next Generation Sequencing, NGS), η οποία επιτρέπει ακόμη και την ανάλυση ολόκληρου του ανθρωπίνου γονιδιώματος.

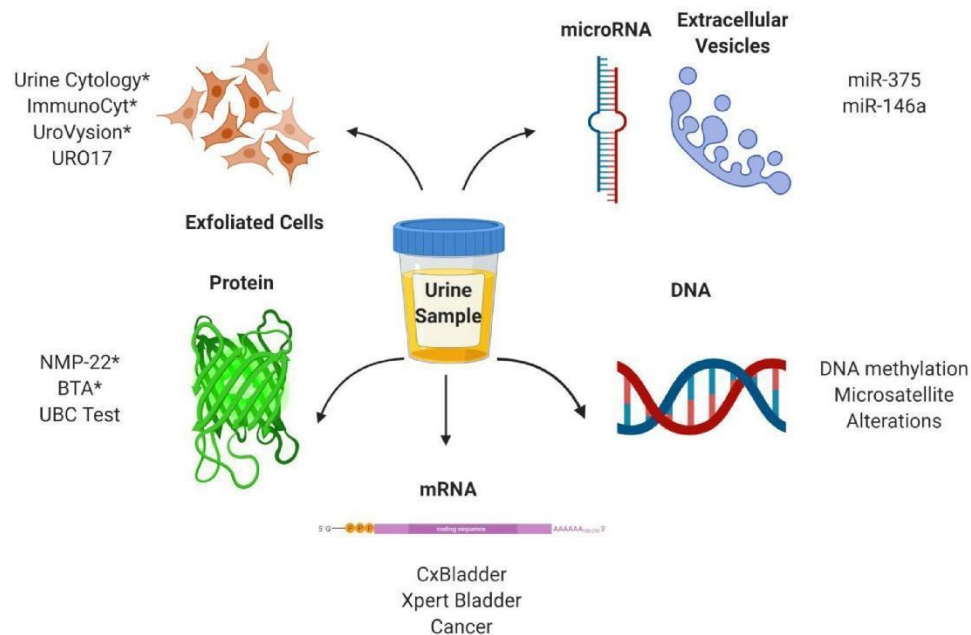
Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές πλατφόρμες αλληλούχησης που βασίζονται σε διαφορετικές μεθοδολογίες. Παράλληλα, έχει αναπτυχθεί ένα ευρύ φάσμα ομάδων γονιδίων, τόσο στοχευμένων όσο και ευρύτερων, που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση αυτών σε ένα πολύ μικρό αρχικό δείγμα. Τα εμπορικά διαθέσιμα πάνελ που χρησιμοποιούνται σήμερα σε συμπαγείς όγκους και αιματολογικές κακοήθειες περιλαμβάνουν τόσο την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων, ενθέσεων και ελλείψεων μικρού αριθμού νουκλεοτιδίων, όσο και την ανίχνευση αναδιατάξεων, συντήξεων και αλλαγών του αριθμού των γονιδιακών αντιγράφων. Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται επίσης με εφαρμογές στην ογκολογία είναι ο *in situ* υβριδισμός με φθορίζουσες ουσίες (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) ή χρωμογόνα (Chromogen In Situ Hybridization, CISH) που χρησιμοποιεί σημειωμένους ανιχνευτές, η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry), η ELISA και άλλες (Sarhadi et al. 2022; Kenrick et al. 2021; Pessoa et al. 2020).



Εικόνα 13. Υγρή βιοψία χρησιμοποιώντας πλάσμα (Pessoa et al. 2020).

Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, η συλλογή των ούρων για κυτταρολογική εξέταση και ανάλυση βιοδεικτών είναι μία μη επεμβατική, πολλά υποσχόμενη διαδικασία, ανώδυνη για τον ασθενή, γεγονός που διευκολύνει την παρακολούθησή του. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι τα δείγματα ούρων επιδεικνύουν έντονη διακύμανση, τόσο κατά τη διάρκεια της ημέρας στο ίδιο το άτομο, όσο και μεταξύ διαφορετικών ατόμων και διαφορετικών δειγμάτων του ίδιου ατόμου. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε βιολογικούς παράγοντες, όπως η μεταβλητή σύσταση των ούρων λόγω διατροφής, υγείας, ηλικίας, είτε η πρωτεόλυση λόγω της παραμονής των ούρων στη ουροδόχο κύστη.

Διαφορές παρατηρούνται επίσης και στα πλαίσια συλλογής του δείγματος. Τα ούρα μπορεί να είναι 24ωρης συλλογής, τα πρώτα πρωϊνά ούρα ή τυχαία ούρηση κατά τη διάρκεια της ημέρας. Το κάθε δείγμα ούρων παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, τα πρώτα πρωϊνά ούρα παρουσιάζουν την μικρότερη διακύμανση στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, αλλά είναι πιο έντονη η πρωτεόλυση καθώς παραμένουν σημαντικό χρόνο στην ουροδόχο κύστη. Η τυχαία συλλογή ούρων, οποιαδήποτε στιγμή της ημέρας, δεν παρουσιάζει έντονη πρωτεόλυση, έχει ωστόσο μεγαλύτερη διακύμανση. Τα ούρα 24ωρης συλλογής είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά, αλλά υπάρχει υψηλός κίνδυνος επιμόλυνσης κατά τη συλλογή και την αποθήκευσή τους. Επομένως, για τη σωστή ανάλυση και επεξεργασία των δειγμάτων πρέπει να δίνονται σαφείς οδηγίες στους ασθενείς σχετικά με την ορθή συλλογή και αποθήκευση των δειγμάτων ούρων, αναλόγως πάντοτε με τον τύπο της ανάλυσης που θα ακολουθήσει (Kenrick et al. 2021).



Εικόνα 14. Πιθανά διαγνωστικά τεστ με χρήση βιοδεικτών από υγρή βιοψία ούρων (Kenrick et al. 2021).

Υπάρχει ένας αριθμός βιοδεικτών στα ούρα, που είναι εγκεκριμένοι από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) για την διάγνωση και παρακολούθηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Εικόνα 14). Αυτοί οι βιοδείκτες έχουν μελετηθεί εκτενέστατα για να προσδιοριστεί η κλινική τους χρησιμότητα. Ωστόσο, λόγω της χαμηλής ευαισθησίας οδηγούν συχνά σε λανθασμένη διάγνωση.

NMP-22

Οι πρωτεΐνες πυρηνικού πλέγματος (Nuclear matrix proteins, NMPs) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών με καίριο ρόλο στη λειτουργία και στη δομή του πυρήνα. Σε περιπτώσεις με ουροθηλιακό όγκο οι πρωτεΐνες αυτές υπερεκφράζονται και απελευθερώνονται στα ούρα μέσω της απόπτωσης των νεοπλασματικών κυττάρων. Η πιο μελετημένη είναι η NMP22, η οποία χρησιμοποιείται στη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο. Υπάρχουν δύο είδη εξέτασης, ένα ποσοτικό, το οποίο χρησιμοποιεί την τεχνική της ELISA και ένα ποιοτικό NMP22 BladderCheck τύπου point of care (POC). Ο συγκεκριμένος βιοδείκτης παρόλο που είναι από τους πιο καλά μελετημένους έχει αρκετά μικρή ευαισθησία στους όγκους χαμηλού βαθμού κακοηθείας και μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα όταν συνυπάρχει φλεγμονή (Flores et al. 2023).

Bladder Tumor Antigen (BTA)

Η BTA είναι μια ανοσολογική εξέταση, η οποία ανιχνεύει την παρουσία της πρωτεΐνης που σχετίζεται με τον παράγοντα H του ανθρώπινου συμπληρώματος (human complement factor H-related protein) στα ούρα ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο. Αντίστοιχα με τον βιοδείκτη NMP22 παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων κυρίως σε ασθενείς με φλεγμονή στο ουροποιητικό, ενώ έχει καλύτερη ευαισθησία από την κυτταρολογία. Υπάρχουν κι εδώ ένα ποσοτικό και ένα ποιοτικό είδος εξέτασης (Ng et al.2021).

UroVysion

Το UroVysion είναι μία εξέταση φθορίζοντος in situ υβριδισμού που ανιχνεύει ανευπλοειδίες στα χρωμοσώματα 3,7 και 17 ή την έλλειψη του p16 γονιδίου, το οποίο εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 9q21. Η εν λόγω εξέταση χρησιμοποιείται στη διάγνωση και στην παρακολούθηση του ουροθηλιακού καρκίνου και παρουσιάζει υψηλή ειδικότητα που φτάνει έως και το 96% και υψηλή ευαισθησία για όγκους υψηλού βαθμού κακοηθείας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την κυτταρολογία, καθώς διατηρεί την υψηλή ειδικότητα και ταυτόχρονα αυξάνει την ευαισθησία. Η ειδικότητά του δεν επηρεάζεται από τη φλεγμονή ή την παρουσία αιματουρίας (Flores et al. 2023).

ImmunoCyt test (uCyt+)

Η εξέταση ImmunoCyt εξετάζει τρία μονοκλωνικά αντισώματα επισημασμένα με φθορισμό, που ανιχνεύουν το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο και γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στα νεοπλασματικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης. Στις διάφορες μελέτες σχετικά με την συγκεκριμένη εξέταση τα ποσοστά ειδικότητας και ευαισθησίας ποικίλλουν, ενώ φαίνεται πως τα αποτελέσματα επηρεάζονται και από λοιμώξεις του ουροποιητικού. Το ImmunoCyt έχει πάρει έγκριση μόνο για την παρακολούθηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Οι προαναφερόμενοι περιορισμοί που παρουσιάζουν οι εγκεκριμένοι βιοδείκτες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον στην αναζήτηση νέων μοριακών βιοδεικτών. Στα πλαίσια αυτά έχουν αναπτυχθεί και αναπτύσσονται βιοδείκτες που εστιάζουν στην ανίχνευση επιγενετικών αλλαγών, όπως η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών σε συγκεκριμένα γονίδια που έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με καρκίνο του ουροθηλίου. Συγκεκριμένα, αναφέρονται οι δοκιμασίες Bladder EpiCheck και Assure MDx που εξετάζουν 15 γονίδια με τη χρήση RT-PCR και την ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων *FGFR3*, *TERT* και *HRAS* σε συνδυασμό με τη μεθυλίωση των *OTX1*, *ONECUT2*, και *TWIST* γονιδίων αντίστοιχα.

Μία άλλη κατηγορία βιοδεικτών αφορά τον έλεγχο γενετικών αλλαγών και κυρίως μεταλλάξεων συγκεκριμένων καίριων γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση της ουροδόχου κύστης. Ειδικότερα, δοκιμασίες όπως είναι το Uromonitor και το UroMuTERT, ανιχνεύουν μεταλλάξεις σε γονίδια όπως το *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase) και το *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) με σχετικά καλή ευαισθησία (>73%) και υψηλή ειδικότητα (>90%). Επιπρόσθετα, η δοκιμασία Uroseek ανιχνεύει με υψηλή ευαισθησία και

ειδικότητα μεταλλάξεις σε 11 γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση της ουροδόχου κύστης, με NGS αλληλούχηση. Πρόσφατα, εξετάζονται βιοδείκτες που εστιάζουν στα επίπεδα έκφρασης ποικίλων mRNA μορίων (CxBladder, mRNA γονιδίων IGFBP5, HOXA13, MDK, CDK1 και CXCR2) και XpertBC (mRNA γονιδίων UPK1B, IGF2, CRH, ANXA10, ABL), ωστόσο η ευαισθησία και η ειδικότητα των δοκιμασιών αυτών χρήζουν βελτίωσης (Wolfs et al. 2021; Kenrick et al. 2021; Ferro et al. 2021).

Λόγω των περιορισμών που παρουσιάζουν οι εγκεκριμένοι βιοδείκτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αναζήτηση αξιόπιστων μοριακών βιοδεικτών. Εστιάζουν κυρίως στις επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών σε συγκεκριμένα γονίδια που έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με καρκίνο του ουροθηλίου. Επίσης, ως πιθανοί μοριακοί βιοδείκτες είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης όπως στον υποκινητή του TERT (telomerase reverse transcriptase) και στον FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3). Άλλοι πιθανοί μοριακοί βιοδείκτες είναι οι μικροδορυφόροι, microRNAs και mRNAs (Wolfs et al. 2021; Kenrick et al. 2021).

3.3 Θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

Η επιλογή θεραπείας εξαρτάται από το εάν ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι μη μυοδιηθητικός ή μυοδιηθητικός. Στην πρώτη περίπτωση εφαρμόζεται συνήθως διουρηθρική εκτομή του όγκου (Trans Urethral Resection of Bladder Tumour, TURBT) σε συνδυασμό με ενδοκυστική θεραπεία με *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). Στην περίπτωση που ο όγκος έχει διηθήσει τον μυϊκό χιτώνα, επιλέγεται η ριζική κυστεκτομή σε συνδυασμό με την ακτινοβολία και ενδεχομένως και η ανοσοθεραπεία. Τα τελευταία χρόνια, η ανακάλυψη βιοδεικτών έχει επιτρέψει την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών που προσφέρουν καλύτερη πορεία και ποιότητα ζωής στους ασθενείς (Dobrich et al. 2021).

4. Η τελομεράση TERT

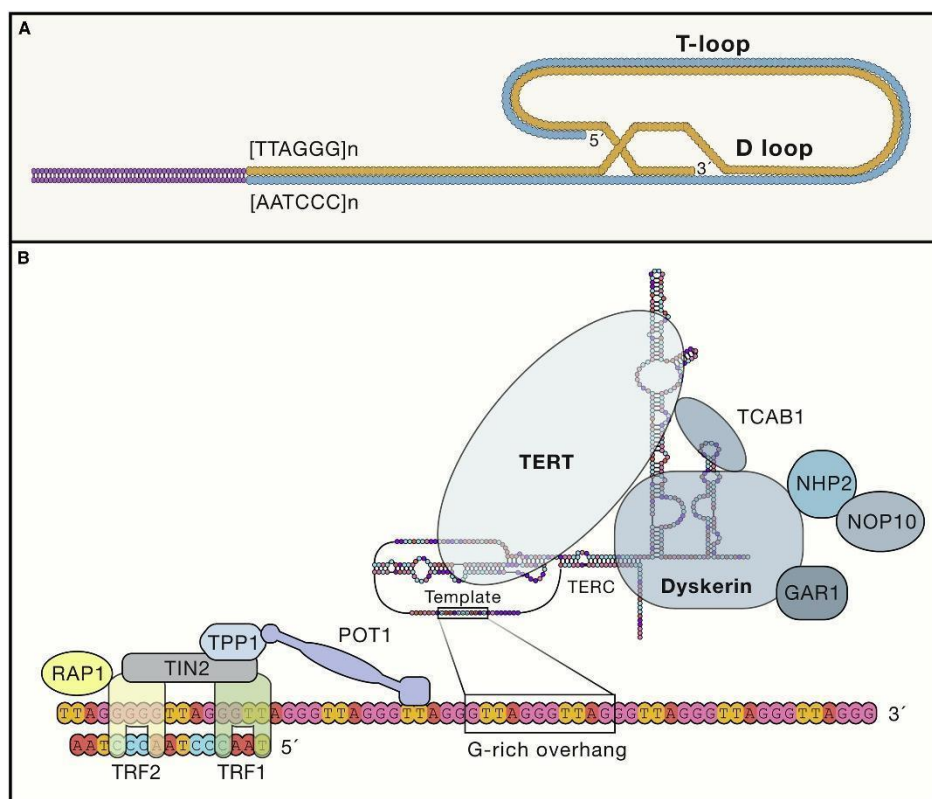
Η τελομεράση ανιχνεύεται σε εξαιρετικά υψηλό ποσοστό σε διάφορους τύπους καρκίνου, καθώς θεωρείται πως σχετίζεται με την αθανатоποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων. Η υπερέκφρασή της φαίνεται να συμβάλει στην αθανатоποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω της διατήρησης του μήκους των τελομερών των χρωμοσωμάτων τους.

4.1 Τα τελομερή

Τα τελομερή είναι συγκεκριμένες αλληλουχίες στα άκρα των χρωμοσωμάτων, τα οποία συνεισφέρουν στη δομική ακεραιότητα των τελευταίων προστατεύοντας το DNA από την φθορά που υφίσταται κατά τις επαναλαμβανόμενες κυτταρικές διαιρέσεις. Πρόκειται για διαδοχικές, μονόκλωνες, TTAGGG νουκλεοτιδικές επαναλήψεις, πλούσιες σε γουανίνη, οι οποίες προεξέχουν στα 3' άκρα. Οι προεξοχές αναδιπλώνουν σχηματίζοντας τον βρόγχο T. Τα τελομερή καλύπτονται από ένα σύμπλεγμα σελτερίνης, το οποίο αποτελείται από τις έξι πρωτεΐνες TRF1, TRF2, TPP1, POT1, TIN2 και RAP1 (Εικόνα 15). Η συγκεκριμένη δομή εμποδίζει την επιδιόρθωση του DNA από τα άκρα, μέσω ανασυνδυασμού ή μη ομόλογης σύνδεσης και αναστέλλει τη σηματοδότηση βλάβης του DNA από τα άκρα των τελομερών.

Το σύμπλεγμα σελτερίνης - τελομερούς ενδέχεται να διασπαστεί λόγω μεταλλάξεων στα προαναφερθέντα μέρη, οδηγώντας σε πρόωμη γήρανση. Ενδεικτικά, η βράχυνση των τελομερών προκαλείται από την υπερέκφραση της TRF1 ή τη μειорύθμιση της POT1 πρωτεΐνης, λόγω της εξασθενημένης σύνδεσης της τελομεράσης στα άκρα των τελομερών. Αντίθετα, η απώλεια της TRF1 πρωτεΐνης προκαλεί τη δημιουργία συχνών, εύθραυστων θέσεων στο DNA, λόγω της αδυναμίας να προσελκύσει την ελικάση Bloom (BLM), η οποία πραγματοποιεί επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων (Chakravarti et al. 2021).

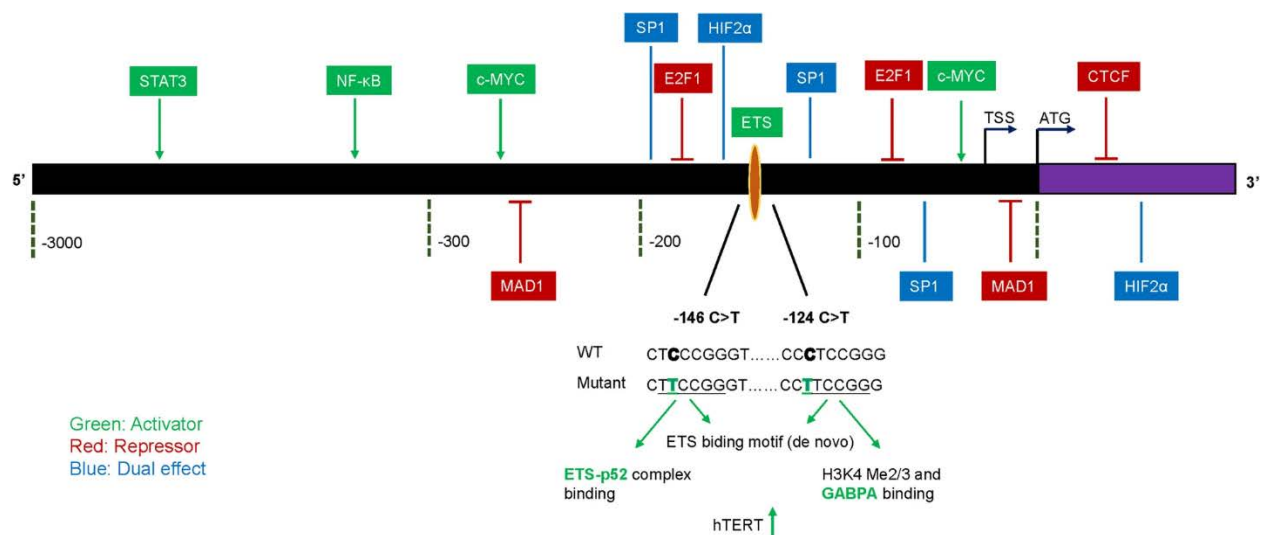
Η δομή των τελομερών είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι συγκεκριμένες περιοχές δεν περιέχουν κωδικοποιητικές πληροφορίες για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και καταστρέφονται σε κάθε κυτταρική διαίρεση. Σε κάθε κύτταρο, το μήκος των τελομερών μειώνεται σταδιακά και όταν καταλήξουν, μετά από ένα αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων να έχουν το ελάχιστο δυνατό μήκος, εισέρχονται στο στάδιο της γήρανσης και σταματούν να διαιρούνται περαιτέρω. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο μέγιστος αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων πριν τη γήρανση είναι 60-70 και το ανώτατο όριο είναι γνωστό ως Hayflick Limit (Colebatch et al. 2019).



Εικόνα 15. Α) Δομή του βρόγχου T και D στο άκρο του τελομερούς, Β) Δομή της τελομεράσης και του συμπλόκου σελτερίνης με το τελομερές (Chakravarti et al. 2021).

4.2 Δομή και λειτουργία της τελομεράσης

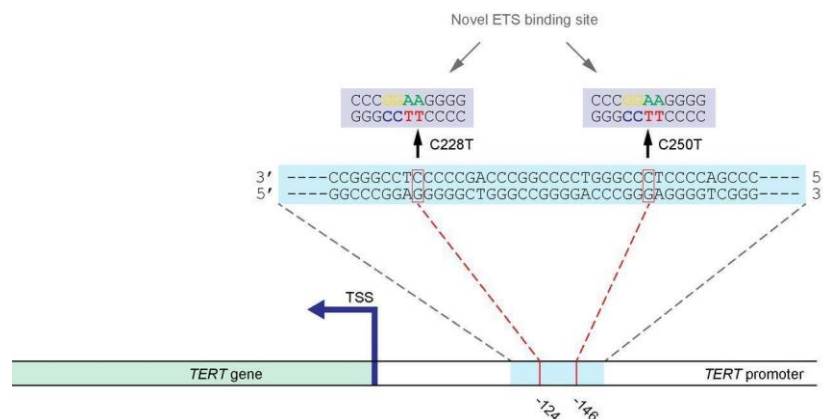
Το γονίδιο που κωδικοποιεί την αντίστροφη μεταγραφάση της ανθρώπινης τελομεράσης (human Telomerase Reverse Transcriptase gene, *hTERT*) εδράζεται στην περιοχή 5p15.33 και αποτελείται από 16 εξώνια με μήκος 42kb. Το ένζυμο τελομεράση, που παράγεται από την μετάφραση του συγκεκριμένου γονιδίου, είναι μία ριβονουκλεοπρωτεΐνη, η οποία αυξάνει το μήκος των τελομερών. Αναφορικά με τη δομή, το ένζυμο αποτελείται από ένα καταλυτικό κέντρο *hTERT* και το “εκμαγείο” RNA *hTERC* (human telomerase RNA component). Στον ανθρώπινο οργανισμό εκφράζεται κατά την ανάπτυξη των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, ενώ σταματά να εκφράζεται στα ώριμα σωματικά κύτταρα. Μεταλλάξεις που συμβαίνουν στην περιοχή του υποκινητή του *hTERT* γονιδίου επηρεάζουν την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων και κατ’ επέκταση την ενεργότητα και τη δράση της τελομεράσης. Οι αλλαγές στην έκφραση της τελομεράσης έχουν συνδεθεί με διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο, μεταξύ αυτών και ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης. Εκτιμάται ότι οι συχνότερες μεταλλάξεις, σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 55.6-82.8%, παρατηρούνται στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου (Cheng et al. 2023).



Εικόνα 16. Μεταγραφικοί παράγοντες και μεταλλάξεις στον υποκινητή που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου hTERT (Jie et al. 2019).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή. Στους θετικούς ρυθμιστές συγκαταλέγονται οι μεταγραφικοί παράγοντες c-MYC, NF-κB, και STAT3. Ο μεταγραφικός παράγοντας c-MYC προσδένεται στην περιοχή E-box του υποκινητή και ενεργοποιεί το γονίδιο. Μαζί με την SP1 πρωτεΐνη (specificity protein 1) ρυθμίζουν θετικά τη μεταγραφή του *hTERT* γονιδίου μέσω της πρόσδεσής τους σε κατάλληλες θέσεις τους στον υποκινητή του γονιδίου. Ο NF-κB επιδρά στη μεταγραφή του γονιδίου *hTERT* άμεσα, μέσω της πρόσδεσής του στον υποκινητή, είτε έμμεσα ρυθμίζοντας άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ανοδικά του *hTERT* γονιδίου.

Στον υποκινητή του γονιδίου προσδένονται επίσης και αρνητικοί ρυθμιστές, όπως οι E2F1 και MAD1, οι οποίοι οδηγούν στην αποσιώπηση του *hTERT* γονιδίου, ενώ ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν διττή δράση. Πιο συγκεκριμένα, ο SP1 μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιεί την μεταγραφή του *hTERT* γονιδίου μέσω της πρόσδεσης σε GC μοτίβα στον υποκινητή σε βλαστικά κύτταρα, ενώ στα σωματικά κύτταρα, ο ίδιος παράγοντας στρατολογεί αποακετυλάσες ιστονών, οι οποίες προσδένονται στις ίδιες θέσεις καταστέλλοντας την έκφραση του *hTERT* γονιδίου. Μεταγραφικοί παράγοντες με ανάλογη δράση είναι η ενεργοποιητική πρωτεΐνη 1 (Activating Protein 1, AP-1) και ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 2α (Hypoxia-Inducible Factor 2-alpha, HIF2α). Επιπρόσθετα, η μεταγραφή του *hTERT* γονιδίου ρυθμίζεται από μεταλλάξεις και επιγενετικές τροποποιήσεις (Jie et al. 2019) (Εικόνα 16).



Εικόνα 17. Οι πιο κοινές μεταλλάξεις στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου (Colebatch et al. 2019).

4.2.1 Μεταλλάξεις στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου

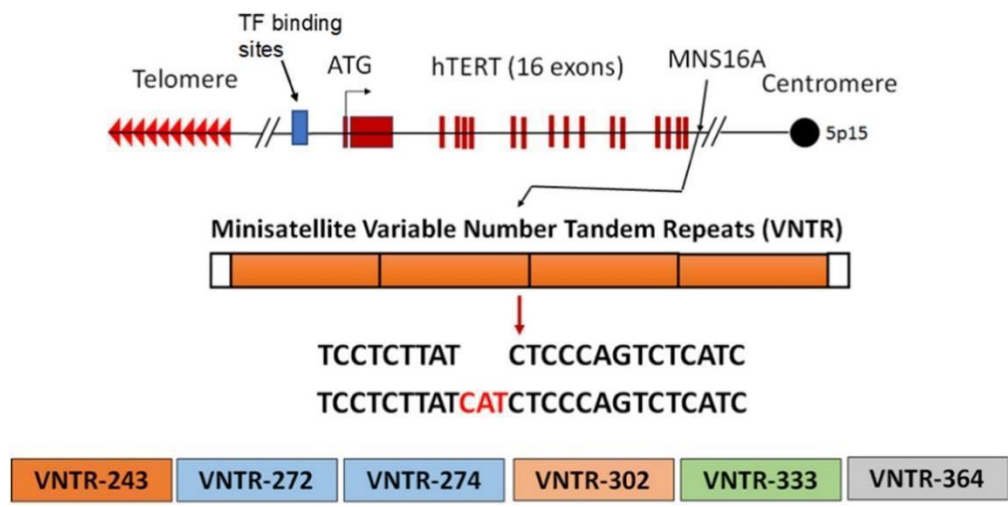
Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου είναι συχνές και οδηγούν σε υπερέκφραση του γονιδίου μέσω της δημιουργίας θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα διπλάσια έως και τετραπλάσια έκφραση του υποκινητή και η παρουσία τους συνδέεται με την ενεργοποίηση του ενζύμου της τελομεράσης. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, όπως και στην πλειοψηφία των καρκίνων, δύο σημειακές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε ποσοστό που φτάνει το 90% και ανιχνεύονται σε όλα τα στάδια του όγκου. Ανιχνεύονται σε παρόμοια συχνότητα σε περιπτώσεις χαμηλού βαθμού μη μυοδινηθικού καρκίνου της ουροδόχου (NMIBC), σε υψηλού βαθμού μη μυοδινηθικού καρκίνου (NMIBC) και σε δινηθικού καρκίνου (MIBC). Πρόκειται για τις μεταλλάξεις στις θέσεις -124 C>T (C228T) και -146C>T (C250T), σε μία περιοχή πλούσια σε GC (Εικόνα 17). Οι μεταλλάξεις αυτές δημιουργούν το μοτίβο TTCCGG, που αποτελεί θέση δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα E-26. Η πρόσδεση του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του *hTERT* γονιδίου και ενεργοποίηση του ενζύμου της τελομεράσης.

Μία σχετικά πρόσφατη μελέτη των Zvereva και συνεργατών (2020), βρέθηκε ότι οι ασθενείς με μικρότερη επιβίωση είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης mRNA μεταγράφων του *hTERT* γονιδίου. Το εύρημα αυτό συσχετίστηκε με την παρουσία των προαναφερόμενων μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου *hTERT*, και καταδεικνύει ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή αυξάνουν τη μεταγραφή του *hTERT* γονιδίου, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης και τελικά διατήρηση του μήκους των τελομερών (Zvereva et al. 2020).

4.2.2 Ο MNS16A πολυμορφισμός του hTERT γονιδίου

Οι πολυμορφικοί μικροδορυφόροι παρουσιάζουν ποικίλο αριθμό επαναλήψεων, διάσπαρτων σε ολόκληρο το γονιδίωμα (Variable Number of Tandem Repeat, VNTRs). Ο αριθμός των επαναλήψεων συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών μοτίβων διαφέρει μεταξύ των ατόμων και λαμβάνοντας υπόψη ότι οι περιοχές αυτές κληρονομούνται, οι διακυμάνσεις που παρουσιάζουν ως προς το μήκος τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις ταυτοποίησης με βάση το γενετικό προφίλ του ατόμου. Οι VNTRs, γνωστοί και ως μίνι-δορυφόροι, είναι διαδοχικές επαναλήψεις που πλαισιώνονται από τμήματα μη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Μπορούν εύκολα να αναλυθούν με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένη αλληλουχία και να διαφοροποιηθούν εύκολα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Μία τέτοια περίπτωση είναι ο πολυμορφικός μικροδορυφόρος MNS16A που εντοπίζεται καθοδικά στο *hTERT* γονίδιο. Εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Ο MNS16A μικροδορυφόρος βρίσκεται καθοδικά του εξωνίου 16 του *hTERT* γονιδίου και ανοδικά στην περιοχή του υποκινητή ενός μη νοηματικού (antisense) TERT μεταγράφου (Εικόνα 18) (Hofer et al. 2017). Έχει δύο επαναλαμβανόμενα στοιχεία που σχηματίζουν μια αλληλουχία 23 bp ή 26 bp με την ένθεση τριών νουκλεοτιδίων CAT, που αποτελεί μία θέση δέσμευσης του παράγοντα GATA-1. Ο διαφορετικός αριθμός ενθέσεων των CAT νουκλεοτιδίων δημιουργεί δύο διαφορετικά VNTRs, τα οποία ονομάστηκαν ως VNTR-302 και VNTR-243. Σπανιότερα, σε άλλες καρκινικές σειρές, έχουν αναφερθεί δύο ακόμη αλληλόμορφα, τα VNTR-272 και VNTR-333. Τα μικρότερου μήκους VNTR-243 και VNTR-272 έχουν χαρακτηριστεί από τους Wang και συνεργάτες (2003) ως βραχεία (S) αλληλόμορφα, ενώ τα VNTR-302 και VNTR-333 ως μακρά (L) αλληλόμορφα, για λόγους στατιστικής ανάλυσης (Wang et al. 2003). Ο MNS16A VNTR μικροδορυφόρος έχει διερευνηθεί σε όγκους όπως το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του προστάτη, ενώ υπάρχουν κάποιες μελέτες και για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Anwar et al. 2021). Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα που υποδηλώνουν μεγάλη γεωγραφική ετερογένεια, αλλά και διαφορετική επίπτωση των VNTR παραλλαγών μεταξύ των διαφορετικών τύπων καρκίνου.



Εικόνα 18. Η θέση του MNS16A στην περιοχή του υποκινητή (Huda et al. 2021).

ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάσαμε τις μεταλλάξεις και ορισμένους πολυμορφισμούς του *hTERT* γονιδίου σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο. Η παρουσία μεταλλάξεων στον υποκινητή και ο MNS16A μικροδορυφόρος του *hTERT* γονιδίου έχουν περιγραφεί να επηρεάζουν τη μεταγραφή του γονιδίου και επομένως την ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης σε ποικίλους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν υπάρχει ανάλογη μελέτη στον Ελληνικό πληθυσμό και στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα, στόχος ήταν να εξετάσουμε την κατανομή των μεταλλάξεων και του μικροδορυφόρου MNS16A σε Έλληνες ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης και να εκτιμήσουμε τις πιθανές συσχετίσεις μεταξύ τους αλλά και με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους των ασθενών.

5. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Υλικό μελέτης

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 52 ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο και 53 υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Στους 52 ασθενείς, 46 ήταν άνδρες (88,46 %) και 6 γυναίκες (11,54 %) με μέση ηλικία τα 74,38 έτη. Στην ομάδα των υγιών ατόμων 34 (64,15 %) ήταν άνδρες και 19 (35,85 %) ήταν γυναίκες. Οι ασθενείς είχαν προσέλθει για έλεγχο στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας, καθώς είχαν παρουσιάσει πρόσφατα ή στο παρελθόν συμπτώματα ύποπτα για καρκίνο ουροδόχου κύστης.

5.2 Μεθοδολογία

5.2.1 Συλλογή ούρων και κυτταρολογική εξέταση

Για κάθε ασθενή συλλέχθηκαν συνολικά τρία δείγματα ούρων σε διάστημα τριών διαδοχικών ημερών. Τα ούρα προέρχονταν από τη δεύτερη πρωινή ούρηση και λαμβάνονταν πριν οι ασθενείς υποβληθούν σε TURBT ή κυστεοσκόπηση. Σε ασθενείς με διάγνωση NMIBC που ήταν υπό παρακολούθηση, η συλλογή των ούρων γινόταν σε διάστημα τουλάχιστον δύο μήνες μετά τη λήψη BCG ανοσοθεραπείας. Απαραίτητη προϋπόθεση κατά τη συλλογή των δειγμάτων ήταν να παραλαμβάνονται στο εργαστήριο σε διάστημα εντός δύο ωρών το πολύ, ώστε να αποφευχθεί ο εκφυλισμός των κυττάρων. Η επεξεργασία των δειγμάτων των ούρων ήταν η ακόλουθη:

- Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά
- Συλλογή του ιζήματος σε κάθε δείγμα ούρων και τοποθέτηση σε φιαλίδιο ThinPrep που περιέχει μονιμοποιητικό διάλυμα
- Δημιουργία κυτταρολογικών επιχρισμάτων μονοεπίπεδης επίστρωσης σε μηχανήμα ThinPrep.
- Χρώση των κυτταρολογικών επιχρισμάτων κατά Παπανικολάου
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο για κυτταρολογική εξέταση και διάγνωση σύμφωνα με το TPS σύστημα
- Το εναπομείναν ίζημα για κάθε ασθενή διατηρήθηκε στους 4°C (ψυγείο) για περαιτέρω επεξεργασία.

Τα ανωτέρω πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο από τεχνολόγο του εργαστηρίου και η κυτταρολογική εξέταση έγινε από την Κυτταρολόγο του εργαστηρίου. Το εναπομείναν ίζημα που

ήταν τοποθετημένο σε φιαλίδιο ThinPrep χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία.

5.2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα ούρα

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από δείγματα ούρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) με μικρές τροποποιήσεις του προτεινόμενου πειραματικού πρωτοκόλλου. Πριν την έναρξη της διαδικασίας έγινε η προετοιμασία ορισμένων διαλυμάτων, ώστε να καταστούν έτοιμα προς χρήση σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

1. Διάλυμα του ενζύμου πρωτεΐνωση K: Προσθήκη στο φιαλίδιο 4,5 ml δις απεσταγμένο νερό και μοίρασμα σε μικρότερες ποσότητες.
2. Διάλυμα απομάκρυνσης αναστολέων: Προσθήκη 20 ml απόλυτης αιθανόλης (>99%).
3. Διάλυμα πλύσης: Προσθήκη 80 ml απόλυτης αιθανόλης (>99%).

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Μεταφορά 200 μl ιζήματος δείγματος ούρων από φιαλίδιο ThinPrep σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης των 1,5 ml, προσθήκη 200 μl διαλύματος πρόσδεσης και 40 μl διάλυμα πρωτεΐνωσης K. Έντονη ανάδευση του δείγματος (Vortex) και επώαση στους 70°C για 10 λεπτά.
2. Προσθήκη 100 μl ισοπροπανόλης, έντονη ανάδευση και φόρτωση στη στήλη (High Pure filter tube).
3. Φυγοκέντρωση στις 8.000 στροφές (rcf) για 2 λεπτά. Απόρριψη του διαλύματος έκλουσης και τοποθέτηση της στήλης σε νέο φιαλίδιο.
4. Προσθήκη 500 μl διαλύματος απομάκρυνσης αναστολέων και φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 8.000 (rcf). Μεταφορά της στήλης σε νέο φιαλίδιο και απόρριψη του σωληναρίου έκλουσης.
5. Προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης και φυγοκέντρωση στα 11.000 (rcf) για 2 λεπτά. Εκ νέου μεταφορά της στήλης σε νέο φιαλίδιο έκλουσης.
6. Επανάληψη του βήματος 5 και διατήρηση του ιδίου σωληναρίου έκλουσης.
7. Φυγοκέντρωση στα 11.000 (rcf) για 2 λεπτά, ώστε να στεγνώσει η στήλη και να εξατμιστεί η αιθανόλη που μπορεί να δράσει ανασταλτικά.
8. Μεταφορά της στήλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 ml.
9. Προσθήκη 100 μl διαλύματος έκλουσης, το οποίο είχε προθερμαθεί στους 70°C πριν την χρήση.

10. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στα 8.000 (rcf) για 2 λεπτά.
11. Συλλογή του εκλούμενου διαλύματος και επανατοποθέτηση στη στήλη.
12. Επανάληψη του βήματος 10.
13. Συλλογή του εκλούμενου διαλύματος που περιέχει το γονιδιωματικό DNA σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 ml και αποθήκευση στους 4°C (ψυγείο) έως περαιτέρω χρήση.

5.2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του γονιδιωματικού DNA

Η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA υπολογίστηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου και την απορρόφηση στο υπεριώδες φως. Χρησιμοποιήθηκε το NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific). Ελέγχθηκε επίσης η καθαρότητα των DNA δειγμάτων υπολογίζοντας τον λόγο της απορρόφησης OD_{260nm}/OD_{280nm} , ο οποίος πρέπει να είναι μεταξύ 1,7 και 1,9. Τιμές μικρότερες από 1,7 ή μεγαλύτερες από 1,9 υποδηλώνουν προσμίξεις από φαινόλη ή άλλα μακρομόρια αντίστοιχα.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA (ng/μl) γίνεται με βάση τον τύπο:

$$C_{DNA}(ng/\mu l) = \text{τιμή } OD_{260} \times 50 \times \text{συντελεστής αραίωσης}$$

- OD_{260} είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm.
- Ο παράγοντας 50 προέρχεται από το γεγονός ότι 1 μονάδα OD ισοδυναμεί με 50 ng/μl DNA

Σε κάθε δείγμα έγιναν τρεις μετρήσεις και λήφθηκε ο μέσος όρος αυτών.

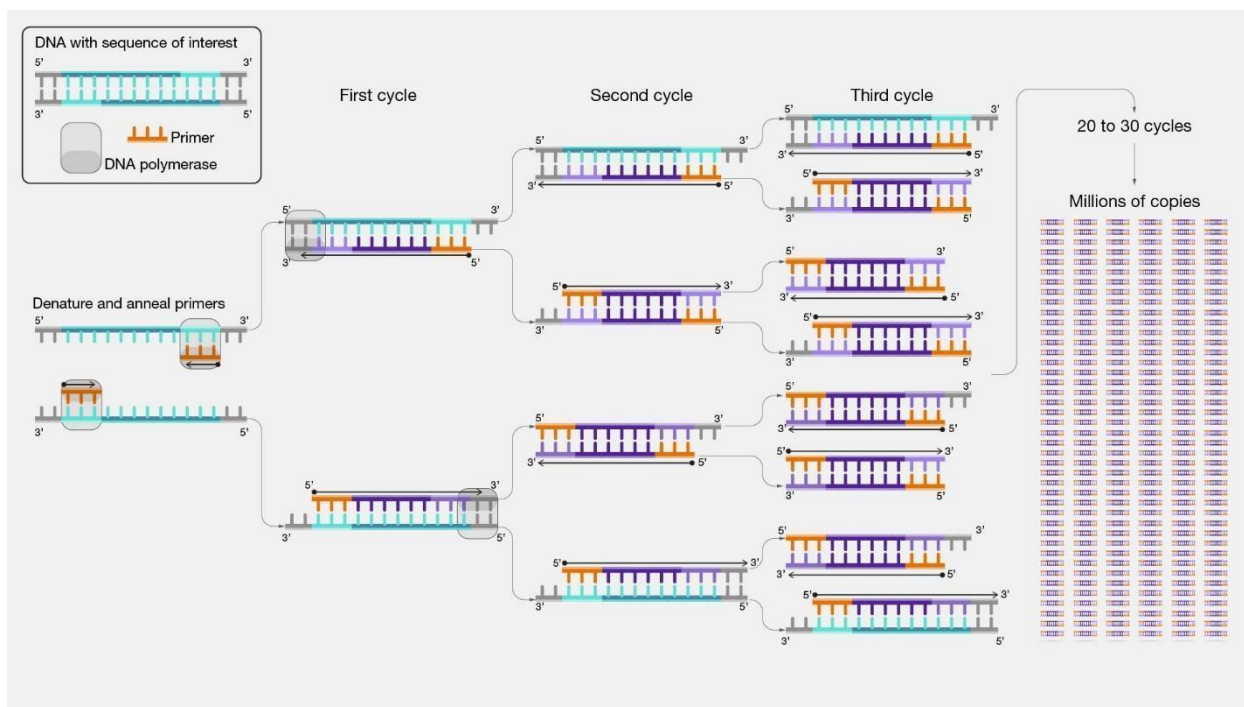
5.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η PCR είναι μία γρήγορη και ειδική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την επιλεκτική ενίσχυση μικρών τμημάτων DNA, ώστε να αναλυθούν περαιτέρω για τυχόν μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς. Ο Kary Mullis, που βραβεύτηκε με Νόμπελ το 1993, είναι ο εφευρέτης της τεχνικής αυτής. Αναπαριστά in vitro τη διαδικασία της αντιγραφής που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα, χρησιμοποιεί μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση και περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σύνθεσης DNA. Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι επιτρέπουν την εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων που έχουν παραχθεί με τη βοήθεια δύο μονονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), μήκους 18-24 νουκλεοτιδίων, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί ως προς τις ακραίες αλληλουχίες του γονιδίου στόχου που εξετάζουμε κάθε φορά. Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση συνθέτει τις νέες αλυσίδες του DNA χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλυσίδα ως εκμαγείο.

Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών σταδίων:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation): Διαχωρισμός των αλυσίδων του αρχικού DNA μορίου με θέρμανση στους 94-95°C.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών (annealing): Οι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των άκρων του αποδιαταγμένου DNA, σε θερμοκρασία συνήθως μεταξύ 55-65°C για 1 λεπτό. Η θερμοκρασία που επιλέγεται στο συγκεκριμένο στάδιο εξαρτάται από τα σημεία τήξης των εκκινητών και επιλέγεται συνήθως κατά 5°C χαμηλότερη. Χρειάζεται ωστόσο προσοχή γιατί η επιλογή χαμηλής θερμοκρασίας επιτρέπει την ενίσχυση και μη ειδικών προϊόντων.
3. Επιμήκυνση (extension): Στο στάδιο αυτό γίνεται από την πολυμεράση η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων σε θερμοκρασία περίπου 72°C.

Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων κύκλων της αντίδρασης κυμαίνεται μεταξύ 30 και 40. Τα παραγόμενα προϊόντα παράγονται με εκθετικό ρυθμό και η επαναλαμβανόμενους κύκλους παράγονται 2ⁿ προϊόντα (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων μας PCR. (<https://www.genome.gov>)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της KAPA Taq HotStart PCR kit (KAPA Biosystems). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την περιοχή του υποκινητή και τον MNS16A μικροδορυφόρο του *hTERT* γονιδίου προήλθαν από την εταιρία Eurofins genomics και οι αλληλουχίες τους απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4):

Πίνακας 4. Οι 5' → 3' αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	T _m
MNS16A πρόσθιος	AGGATTCTGATCTCTGAAGGGTG	60.7°C
MNS16A ανάστροφος	TCTGCCTGAGGAAGGACGTATG	62.1°C
pTERT πρόσθιος	CACCCGTCCTGCCCCTTCACCTT	60.0°C
pTERT ανάστροφος	GGCCGCGGAAAGGAAG	60.0°C

Σε κάθε PCR αντίδραση ο τελικός όγκος ήταν 50 μl, και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων ανά αντίδραση ήταν οι ακόλουθες (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση για την ενίσχυση τμήματος DNA που φέρει ο πολυμορφισμός.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
KAPA Taq ρυθμιστικό διάλυμα (5X)	10 μl (1X)
MgCl ₂ (25 mM)	5 μl (2,5 mM)
dNTPs (40 mM)	3 μl (2,4 mM)
Πρόσθιος εκκινητής (10 pM)	4 μl (10 pM)
Ανάστροφος εκκινητής (10 pM)	4 μl (10 pM)
KAPA Taq (5U/μl)	0,4 μl (2U)
ddH ₂ O	16,6 μl
Δείγμα DNA	7 μl

Η PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης για τον MNS16A πολυμορφισμό, στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	15 λεπτά	1
Αποδιάταξη DNA	95°C	30 δευτερόλεπτα	40
Υβριδοποίηση	54°C	45 δευτερόλεπτα	40
Επιμήκυνση	72°C	1 λεπτό	40
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	1
Συντήρηση	4°C	∞	-

Τμήμα του υποκινητή του *hTERT* γονιδίου ενισχύθηκε επιλεκτικά για την ανίχνευση των μεταλλάξεων -124 C>T (C228T) και -146C>T (C250T). Για την ενίσχυση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της KAPA Taq HotStart PCR kit (KAPA Biosystems). Σε κάθε PCR αντίδραση ο τελικός όγκος ήταν 50 μl, και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων ανά αντίδραση απεικονίζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση για την ενίσχυση τμήματος DNA που φέρει ο υποκινητής.

Αντιδραστήριο	Όγκος μl
KAPA Taq Buffer (5X)	10 μl (1X)
MgCl ₂ (25 mM)	2 μl (1 mM)
dNTPs (40 mM)	2 μl (1,6 mM)
Πρόσθιος εκκινητής (10 pM)	1 μl (10 pM)
Ανάστροφος εκκινητής (10 pM)	1 μl (10 pM)
KAPA Taq (5U/ μl)	1 μl (5U)
ddH ₂ O	23 μl
Δείγμα DNA	10 μl

Η PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση τμήματος του υποκινητή του hTERT γονιδίου, στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 λεπτά	1
Αποδιάταξη DNA	95°C	1 λεπτό	30
Υβριδοποίηση	60°C	1 λεπτό	30
Επιμήκυνση	72°C	1 λεπτό	30
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	1
Συντήρηση	4°C	∞	-

Για κάθε PCR που πραγματοποιήσαμε, εκτός από τα δείγματα, προστέθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας (Non-Template Control, NTC) προκειμένου να ελέγξουμε για πιθανή επιμόλυνση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήσαμε.

5.2.5 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Ο έλεγχος των PCR προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η σύσταση της πηκτής αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος των PCR προϊόντων που θέλουμε να ηλεκτροφορήσουμε. Όταν έχουμε μεγάλου μεγέθους τμήματα κατασκευάζουμε πηκτή μικρής

συγκέντρωσης (0,8%-1% w/v), ώστε να διευκολύνεται η διέλευση των προϊόντων από τους πόρους της αгарόζης κατά την ηλεκτροφόρηση. Αντιθέτως για ηλεκτροφόρηση τμημάτων με μήκος που δεν ξεπερνά τις 300 bp επιλέγεται μεγαλύτερης συγκέντρωσης πηκτή αгарόζης (2%-4% w/v).

Υλικά: Tris Boric EDTA ρυθμιστικό διάλυμα 10X, Αγαρόζη, βρωμιούχο αιθίδιο.

Για το εκμαγείο που χρησιμοποιούμε χρειαζόμαστε 300 ml TBE ρυθμιστικού διαλύματος συγκέντρωσης 1X. Το φτιάχνουμε από το TBE συγκέντρωσης 10X με αραίωση 1 προς 10 με δις απεσταγμένο νερό.

Παρασκευή πηκτής αгарόζης:

1. Για την πηκτή αгарόζης 3% w/v ζυγίστηκαν 9 γραμμάρια αгарόζης και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη που περιέχει 300 ml TBE 1X.
2. Θέρμανση της κωνικής φιάλης μέχρι την πλήρη διάλυση της αгарόζης σε φούρνο μικροκυμάτων.
3. Προσθήκη 20μl βρωμιούχου αιθιδίου και καλή ανάδευση για την ομογενοποίησή του σε απαγωγό, καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο είναι εισπνεόμενη καρκινογόνος ουσία.
4. Μεταφορά σε εκμαγείο στο οποίο έχουν τοποθετηθεί ειδικά χτενάκια που θα δημιουργήσουν με την αφαίρεσή τους τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων (πηγαδάκια).
5. Μετά από 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου η αгарόζη έχει σταθεροποιηθεί.
6. Αφαιρούνται προσεκτικά τα χτενάκια και η πηκτή αгарόζης τοποθετείται σε μεμβράνη για να μην αφυδατωθεί και στη συνέχεια τυλίγεται σε αλουμινόχαρτο, καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φωτοευαίσθητο και φυλάσσεται στους 4°C μέχρι την χρησιμοποίησή του.

Σημειώνεται ότι το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται στην πηκτή αгарόζης, καθώς έχει την ιδιότητα να εισχωρεί μεταξύ των βάσεων του DNA και να προσκολλάται. Όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) φθορίζει επιτρέποντας την οπτικοποίηση και επομένως τον έλεγχο των προϊόντων που ενισχύθηκαν με την PCR αντίδραση.

5.2.6 Ηλεκτροφόρηση

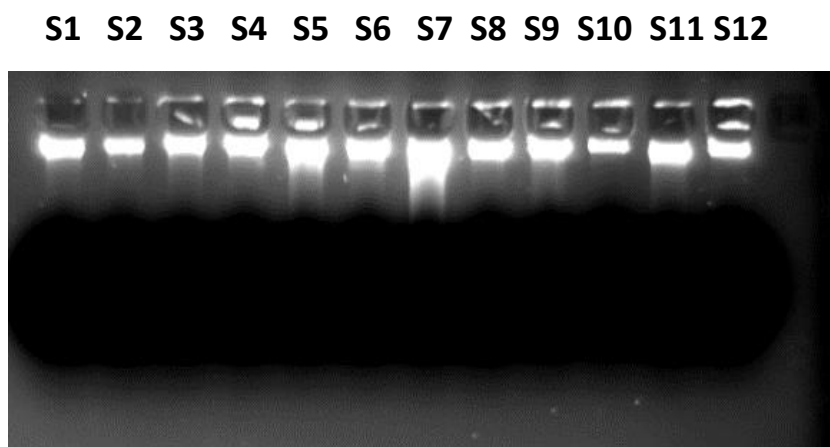
Κατά την ηλεκτροφόρηση, το αρνητικά φορτισμένο τμήμα DNA μετακινείται προς τον θετικό πόλο εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα της ηλεκτροφόρησης είναι ανάλογη του ηλεκτρικού φορτίου που εφαρμόζεται και της μάζας του δείγματος. Τα μικρού μήκους τμήματα κινούνται ταχύτερα συγκριτικά με τα μεγαλύτερου μήκους τμήματα. Για την ηλεκτροφόρηση χρειαζόμαστε μία συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης συνδεδεμένη με ένα τροφοδοτικό σύστημα για την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Τα τμήματα του DNA που έχουν ενισχυθεί κατά την PCR αντίδραση έχουν αρνητικό φορτίο και κινούνται προς τον θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η οπτικοποίηση των PCR προϊόντων διασφαλίζεται με τη χρήση κατάλληλης χρωστικής η οποία περιέχει συνήθως γλυκερόλη. Η τελευταία αποτρέπει τη διάχυση των PCR προϊόντων κατά την τοποθέτησή τους στις θέσεις φορτώματος (πηγαδάκια). Παράλληλα, λόγω της χρωστικής μπλε του μεθυλενίου έχει μπλε χρώμα και επιτρέπει να παρακολουθούμε την κίνηση των προϊόντων κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, η οπτικοποίηση των PCR προϊόντων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Το επιθυμητό μέγεθος των ηλεκτροφορούμενων PCR προϊόντων επιβεβαιώνεται με την παράλληλη ηλεκτροφόρηση, στην ίδια πηκτή αгарόζης, κατάλληλου μάρτυρα γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους.

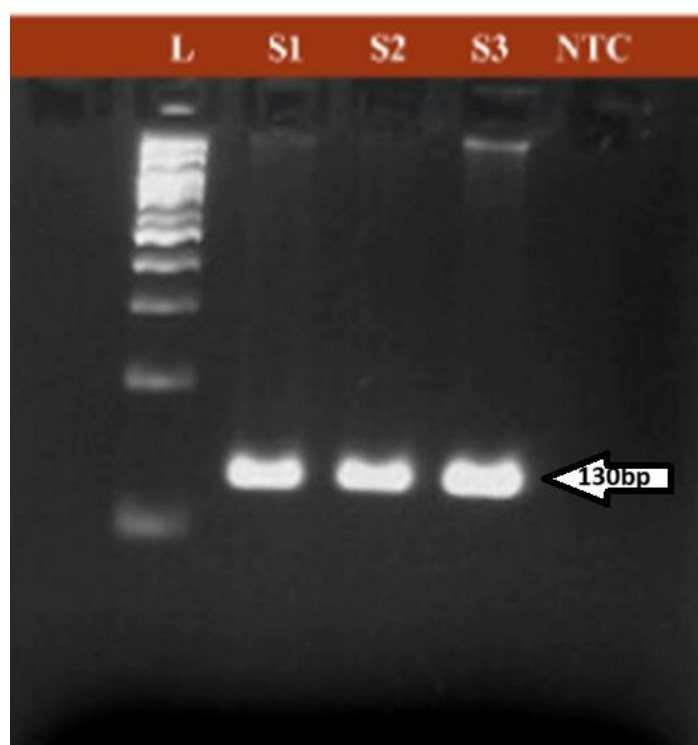
Υλικά: Πηκτή αгарόζης, χρωστική ηλεκτροφόρησης, μάρτυρας 100bp (Nippon Genetics), μάρτυρας 25 bp (Promega).

Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων είναι η ακόλουθη:

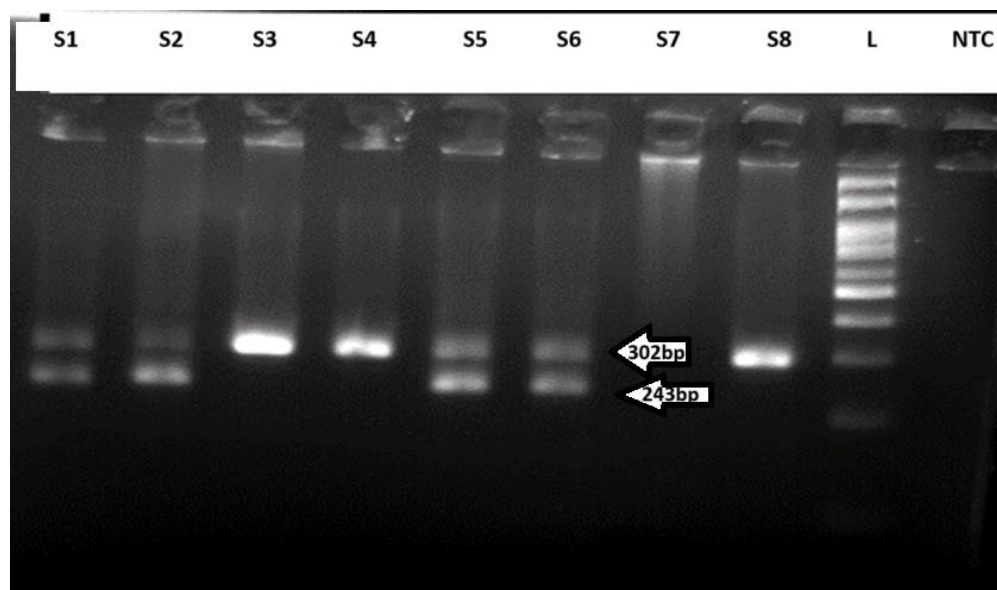
1. Τοποθέτηση της πηκτής στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία πρώτα έχουμε προσθέσει ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X.
2. Ανάμιξη 10μl του PCR προϊόντος με 5μl χρωστικής ηλεκτροφόρησης και φόρτωμα στα πηγαδάκια.
3. Αντίστοιχα φορτώνονται σε διπλάνες θέσεις οι μάρτυρες γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την επιτυχή ενίσχυση των DNA τμημάτων.
4. Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (περίπου 90V) για συνολική διάρκεια 30-45 λεπτά.
5. Μεταφορά της πηκτής αгарόζης σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) (DNR Bio-Imaging Systems MiniBis Pro) και παρατήρηση των προτύπων ηλεκτροφόρησης.
6. Αποθήκευση της εικόνας σε υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το σύστημα UV.



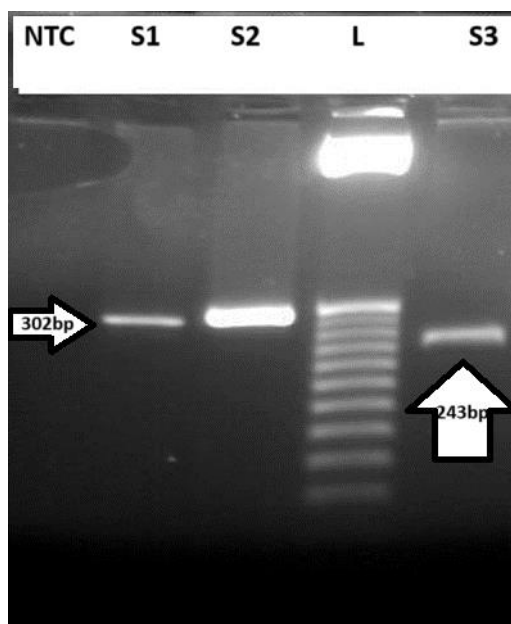
Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων γονιδιωματικού DNA που απομονώθηκαν από τα ούρα σε πηκτή αгарόζης 2% w/v.



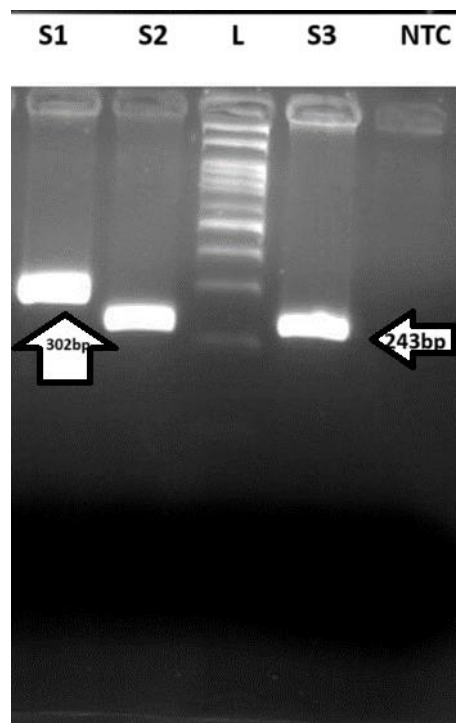
Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων της περιοχής του υποκινητή του hTERT γονιδίου σε πηκτή αгарόζης 3% w/v. S1-S3 PCR προϊόντα μήκους 130 bp, NTC: Non-Template control (Αρνητικός μάρτυρας), L: μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους 100 bp (Nippon Genetics).



Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για τον MNS16A μικροδορυφόρο του hTERT γονιδίου σε πηκτική αгарόζης 3% w/v. L=302bp, S=243bp. Ομόζυγα γονότυπος LL ή SS. Ετερόζυγα γονότυπος LS. S1-S2 γονότυπος LS, S3-S4 γονότυπος LL, S5-S6 γονότυπος LS, S8 γονότυπος LL. NTC: Non-Template control (Αρνητικός μάρτυρας), L: μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους 100 bp (Nippon Genetics).



Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για τον MNS16A μικροδορυφόρο του hTERT γονιδίου σε πηκτική αгарόζης 3% w/v. L=302bp, S=243bp. Ομόζυγα γονότυπος LL ή SS Ετερόζυγα γονότυπος LS. S1-S2 γονότυπος LL, S3 γονότυπος SS. NTC: Non-Template control (Αρνητικός μάρτυρας), L: μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους 25 bp (Promega).



Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για τον MNS16A μικροδορυφόρο του *hTERT* γονιδίου σε πηκτή αγαρόζης 3% w/v. L=302bp, S=243bp. Ομόζυγα γονότυπος LL S1. Γονότυπος SS: S2, S3. NTC: Non-Template control (Αρνητικός μάρτυρας), L: μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους 100 bp (Nippon Genetics).

5.2.7 Καθαρισμός των ενισχυμένων PCR προϊόντων

Ο προσδιορισμός των μεταλλάξεων στην περιοχή του υποκινητή του *hTERT* γονιδίου, προϋποθέτει την αλληλούχηση των PCR προϊόντων μετά από την επιτυχή ενίσχυσή τους. Απαραίτητο βήμα πριν την αλληλούχηση είναι ο καθαρισμός των δειγμάτων, ώστε να απομακρυνθούν διμερή, εκκινητές και άλλες προσμίξεις, η παραμονή των οποίων αυξάνει το «θόρυβο» στο χρωματογράφημα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το PureLink PCR Purification kit (Invitrogen), το οποίο επιτρέπει τον καθαρισμό PCR προϊόντων μεγέθους από 100 bp έως 12 kb.

Στο συγκεκριμένο kit γίνεται χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης, ώστε να δεσμευτεί πιο εύκολα το PCR προϊόν στη μεμβράνη των φίλτρων των στηλών που χρησιμοποιούνται. Το διάλυμα πλύσης που χρησιμοποιείται, διατηρεί το δεσμευμένο επιθυμητό PCR προϊόν στη μεμβράνη του φίλτρου, ενώ επιτρέπει την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων υπολειμμάτων της αντίδρασης. Η αποδέσμευση του PCR προϊόντος από τη μεμβράνη της στήλης επιτυγχάνεται με έκλουση του PCR προϊόντος έπειτα από την προσθήκη δις απεσταγμένου νερού.

Η διαδικασία του καθαρισμού είναι η ακόλουθη:

1. Προσθήκη τετραπλάσιου όγκου (4X) του PCR προϊόντος του ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης B2, στο σωληνάριο της PCR.
2. Μεταφορά του συνολικού διαλύματος μετά από ανάδευση σε στήλη συλλογής FT/CT.
3. Φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
4. Αφαίρεση του εκλούόμενου υγρού και τοποθέτηση της στήλης στο ίδιο σωληνάριο συλλογής.
5. Προσθήκη 650 μl του διαλύματος πλύσης W1 στη στήλη.
6. Φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
7. Επανάληψη του βήματος 4.
8. Φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
9. Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml.
10. Προσθήκη 25 μl δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O) στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης.
11. Επώαση σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C για 5 λεπτά.
12. Φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
13. Συλλογή του εκλούόμενου υγρού και πέρασμα ξανά από το φίλτρο της στήλης.
14. Επανάληψη των βημάτων 11 και 12.
15. Απόρριψη της στήλης και συλλογή του καθαρισμένου PCR προϊόντος σε σωληνάριο τύπου Eppendorf χωρητικότητας 0.5 ml.

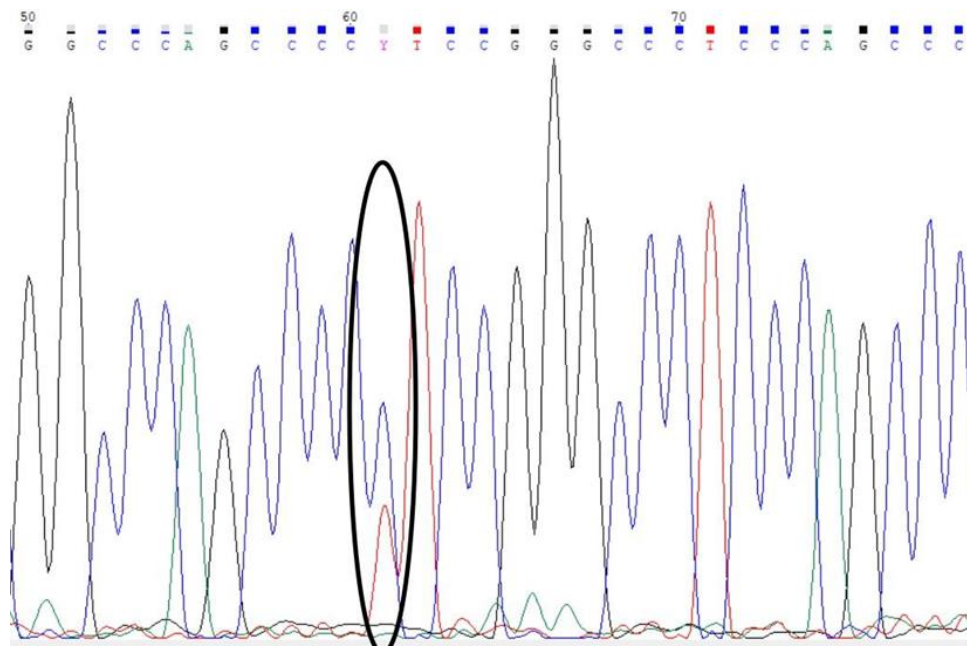
Τα καθαρισμένα PCR προϊόντα, πριν την αλληλούχηση ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης σύστασης 3%.

5.2.8 Αλληλούχηση κατά Sanger

Η αλληλούχηση των νουκλεϊκών οξέων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο στις γενετικές αναλύσεις. Η αλληλούχηση κατά Sanger αναπτύχθηκε το 1975 από τον Frederick Sanger και έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην κατανόηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Η αρχή της μεθόδου Sanger βασίζεται στην εισαγωγή τροποποιημένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων που ονομάζονται διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTP). Τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια φέρουν στην 3' θέση της δεοξυριβόζης υδρογόνο αντί του υδροξυλίου, το οποίο εμποδίζει τον σχηματισμό του επόμενου φωσφοδιεστερικού δεσμού και η σύνθεση της νουκλεοτιδικής αλυσίδας σταματά. Το τμήμα DNA που εξετάζεται, λειτουργεί ως εκμαγείο με σκοπό τη σύνθεση αντιγράφων ποικίλου μήκους, καθώς η επιμήκυνσή τους σταματά από την τυχαία ενσωμάτωση ενός διδεοξυριβονουκλεοτιδίου.

Ακολουθεί η αποδιάταξη των αναπτυσσόμενων αλυσίδων και στη συνέχεια, με τη χρήση ακτίνας λέιζερ και φωτοπολλαπλασιαστή παράγεται το χρωματογράφημα.

Στην παρούσα εργασία, τα καθαρισμένα PCR προϊόντα αλληλουχήθηκαν και ως προς τις δύο κατευθύνσεις σε γενετικό αναλυτή ABI 3500 (Applied Biosystems, ABI). Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Chromas. Η ανάλυση ολοκληρώθηκε με σύγκριση της αλληλουχίας του κάθε δείγματός μας με την φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου hTERT γονιδίου, NCBI Reference Sequence: NG_009265.1, Ref Seq Gene (LRG_343).

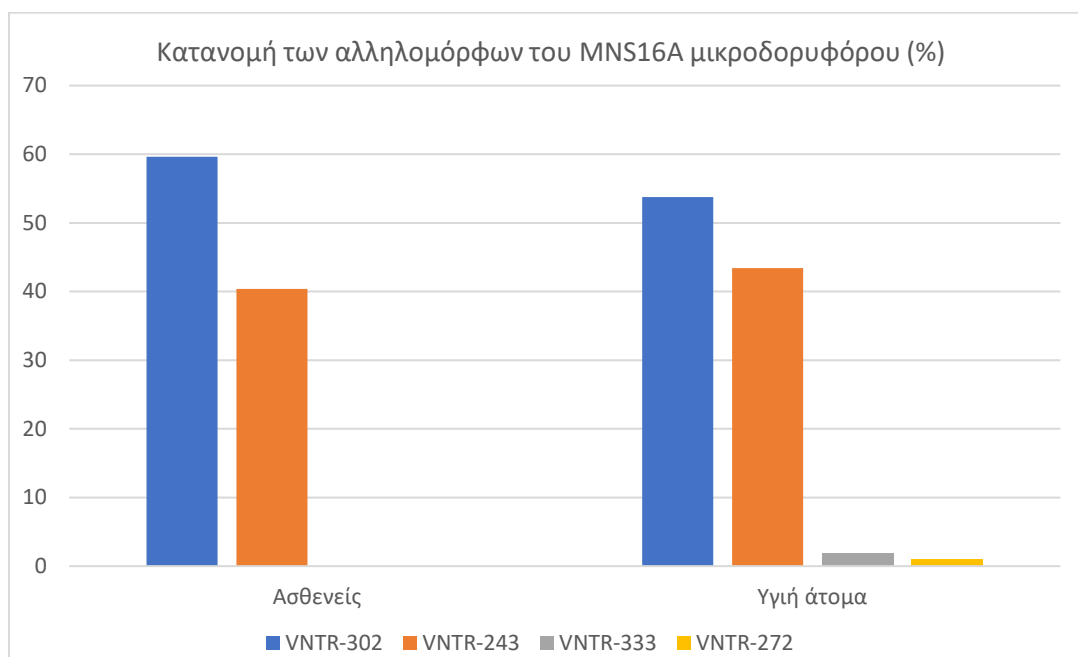


Εικόνα 25. Χρωματογράφημα αλληλούχισης κατά Sanger. Απεικονίζεται δείγμα που φέρει τη νουκλεοτιδική αλλαγή c.1-124C>T (C228T) στον υποκινητή του hTERT γονιδίου (μαύρος κύκλος).

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 105 άτομα, 52 ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστης και 53 υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Εξετάσαμε ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο καρκίνου της ουροδόχου κύστης, αλλά και δείγματα ασθενών που ήταν σε παρακολούθηση και παρουσίασαν υποτροπή της νόσου. Η πλειοψηφία των ασθενών (46/52, 88,5%) ήταν άνδρες και μόλις 6/52 (11,5%) ήταν γυναίκες, κάτι το οποίο ήταν απολύτως αναμενόμενο, καθώς η νόσος προσβάλλει με τετραπλάσια συχνότητα τους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 74,3 έτη με τυπική απόκλιση $SD \pm 9,5$ έτη και ηλικιακό εύρος από 47 έως 92 ετών. Στην ομάδα ελέγχου 34/53 (64,2%) ήταν άνδρες και 19/53 (35,8%) ήταν γυναίκες.

Για λόγους στατιστικής ανάλυσης, όπως άλλωστε προαναφέρθηκε, τα αλληλόμορφα ταξινομούνται σε L και S βάσει του μεγαλύτερου ή μικρότερου μήκους τους αντίστοιχα. Τα αλληλόμορφα του MNS16A πολυμορφισμού που ανιχνεύσαμε στον πληθυσμό των ασθενών και υγιών ατόμων που εξετάστηκαν ήταν τα VNTR-302 (L) και VNTR-243 (S). Τα λιγότερο συχνά αλληλόμορφα VNTR-272 και VNTR-333 δεν αναδείχθηκαν στους ασθενείς της μελέτης, ενώ το VNTR-302 βρέθηκε σε συχνότητα 62/104 (59,62%) ενώ το VNTR-243 42/104 (40,38%). Στα υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου), το VNTR-302 αλληλόμορφο ανιχνεύθηκε σε 57/106 (53,78%) υγιή άτομα, το VNTR-243 σε 46/106 (43,39%), ενώ σε πολύ μικρή συχνότητα ανιχνεύθηκαν και τα λιγότερο συχνά αλληλόμορφα VNTR-333 και VNTR-272 σε 2/106 (1,89%) και 1/106 (0,94%) αντίστοιχα (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1. Κατανομή των αλληλομόρφων του MNS16A μικροδορυφόρου σε ασθενείς και υγιή άτομα.

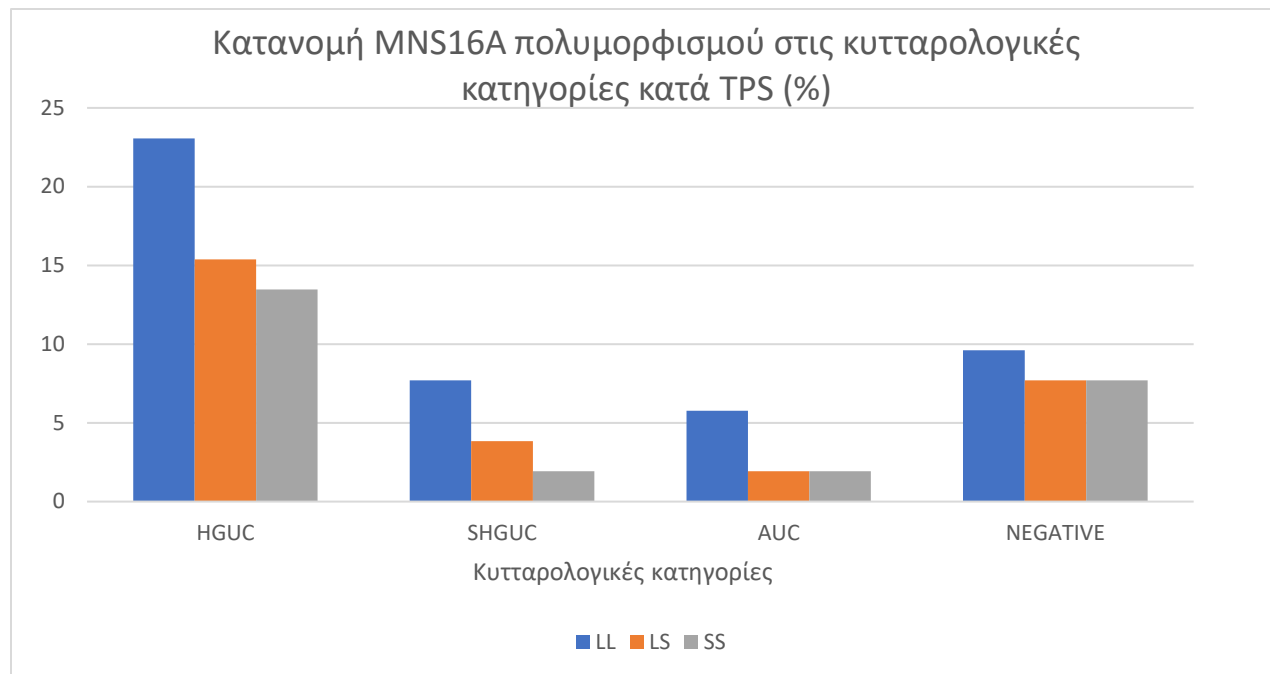
Ο συνδυασμός των αλληλομόρφων του MNS16A πολυμορφισμού έδωσε και τους τρεις γονοτύπους στην ομάδα των ασθενών. Συγκεκριμένα, στους 52 συνολικά ασθενείς, η πλειοψηφία (38/52, 73,1%) έφεραν τα αλληλόμορφα σε ομοζυγωτία. Συγκεκριμένα 24/52 (46,16%) ασθενείς είχαν τον γονότυπο LL, 14/52 (26,92%) ασθενείς είχαν τον γονότυπο SS. 14/52 (26,92%) ασθενείς έφεραν και τα δύο αλληλόμορφα σε ετεροζυγωτία (γονότυπος LS). Στα υγιή άτομα η κατανομή των γονοτύπων ήταν διαφορετική. Πιο συγκεκριμένα, 28/53 υγιή άτομα (52,83%) έφεραν τα αλληλόμορφα L (17 άτομα) ή S (11 άτομα) σε ομοζυγωτία και 25/53 άτομα (47,17%) άτομα είχαν τα αλληλόμορφα σε ετεροζυγωτία (γονότυπος LS). Στα υγιή άτομα, στην ομάδα αυτών που είχαν γονότυπο LL είχαμε 11/17(64,70%) άνδρες και 6/17(35,30%) γυναίκες, ενώ στην ομάδα των 11 υγιών ατόμων που είχαν τον γονότυπο SS η κατανομή του φύλου ήταν 10/11(90,90%) άνδρες και 1/10(9,10%) γυναίκες. Τα υγιή άτομα με γονότυπο LS ήταν 25 συνολικά και σε αυτά κατανεμήθηκαν 13/25(52%) άνδρες και 12/25(48%) γυναίκες.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την πιθανή σύνδεση του MNS16A πολυμορφισμού με την παρουσία ή απουσία μεταλλάξεων στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου, καθώς και πιθανή συσχέτιση με τα κλινικο-ιστολογικά στοιχεία των ασθενών, λαμβάνοντας υπόψη τις κυτταρολογικές και ιστολογικές τους εξετάσεις. Συλλέξαμε τις κυτταρολογικές και ιστολογικές εκθέσεις των ασθενών. Σύμφωνα με τα ευρήματα, 27/52 (51,93%) ασθενείς είχαν θετική κυτταρολογική εξέταση για ουροθηλιακό καρκίνωμα υψηλόβαθμης δυσπλασίας HGUC, 5/52 (9,61%) AUC, 7/52 (13,46%) SHGUC και 13/52 (25%) είχαν αρνητική κυτταρολογική εξέταση, χωρίς στοιχεία κακοήθειας. 39/52 (75%) ασθενείς είχαν θετική κυτταρολογική εξέταση (στοιχεία HGUC, SHGUC, AUC). 15/39 έφεραν τη μετάλλαξη C228T στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου. Στους 15 αυτούς ασθενείς, η ιστολογική εξέταση επιβεβαίωσε την κυτταρολογική και ανέδειξε στοιχεία HGUC σε 14/15 (93,33%) αυτών, ενώ 1/15 (6,67%) ασθενείς είχαν στοιχεία χαμηλού LGUC σύμφωνα με την ιστολογική διάγνωση.

Δύο ασθενείς έφεραν τη μετάλλαξη C250T στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου. Ο ένας εκ των δύο ασθενών είχε στην κυτταρολογική εξέταση άτυπα κύτταρα (AUC κατηγορία), ενώ στον άλλο ασθενή η κυτταρολογική εξέταση ήταν ύποπτη για υψηλού βαθμού κακοήθειας ουροθηλιακό καρκίνωμα (SGUC). Η ιστολογική εξέταση ανέδειξε LGUC όγκους και στους δύο ασθενείς. Σημειώνεται επίσης ότι και οι δύο αυτοί ασθενείς είχαν γονότυπο LS όσον αφορά τον MNS16A πολυμορφισμό, αλλά ο μικρός τους αριθμός δεν επιτρέπει περαιτέρω στατιστική ανάλυση. Η πλειοψηφία των ασθενών (12/13, 92,31%) με αρνητική κυτταρολογική εξέταση δεν έφεραν μεταλλάξεις στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου, με εξαίρεση έναν ασθενή (1/13, 7,69%) που έφερε την C228T μετάλλαξη. Αντιθέτως, στους ασθενείς με θετική κυτταρολογική εξέταση, 16/39 (41,03%) έφεραν μία από τις δύο μεταλλάξεις στον *hTERT* υποκινητή.

Η κατανομή των γονοτύπων του MNS16A πολυμορφισμού στους 39 ασθενείς με θετική κυτταρολογική εξέταση είναι η ακόλουθη: 18/39 (46,15%) ασθενείς είχαν τον γονότυπο LL, οι 11/39 (28,21%) ασθενείς είχαν τον γονότυπο SS και 10/39 (25,64%) ασθενείς είχαν γονότυπο LS. Οι ασθενείς που είχαν αρνητική κυτταρολογική εξέταση είχαν την ακόλουθη κατανομή γονοτύπων: 5/13 (38,46%) είχαν γονότυπο LL. 4/13 (30,77%) είχαν το αλληλόμορφο S σε ομοζυγωτία (γονότυπος SS) και οι υπόλοιποι 4/13 (30,77%) είχαν τον γονότυπο LS. Στην ομάδα

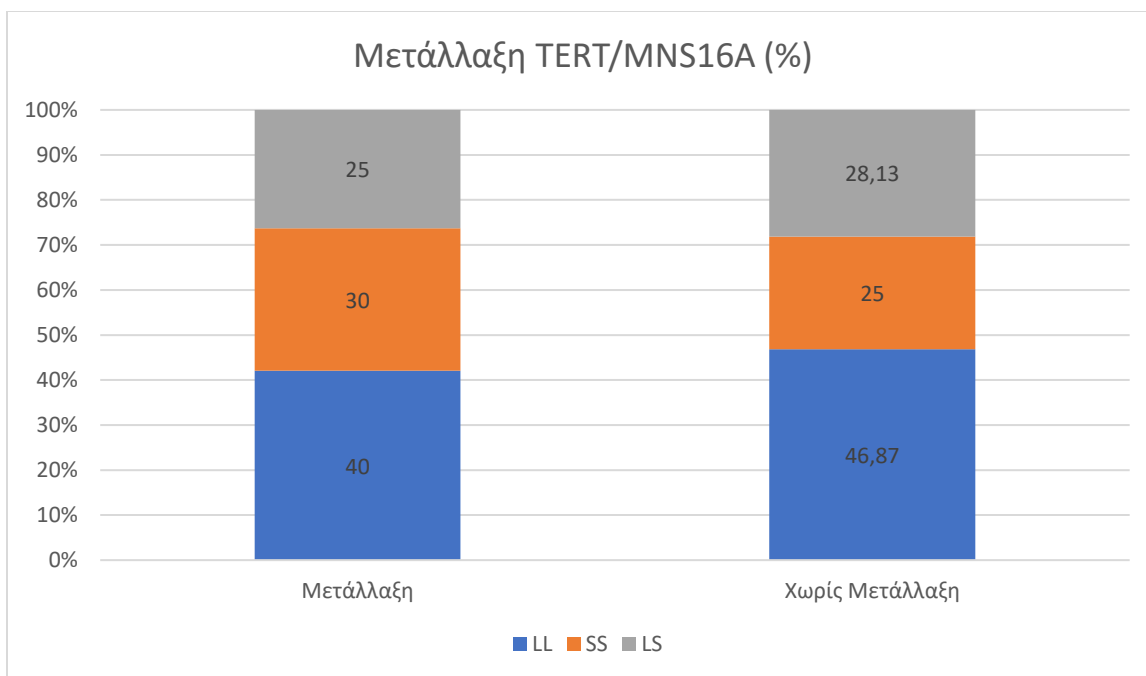
ελέγχου (υγιή άτομα) 16/53 (30,18%) είχαν τον γονότυπο LL, 24/53 (45,28%) είχαν τον γονότυπο LS και 10/53 (18,86%) είχαν τον γονότυπο SS. Σε τρεις ασθενείς εμφανίστηκαν οι γονότυποι 272/243, 333/302, 333/243 (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2. Κατανομή των γονότυπων του MNS16A στις κυτταρολογικές κατηγορίες κατά TPS.

Στη συνέχεια εξετάσαμε την κατανομή του MNS16A πολυμορφισμού σε συνάρτηση με την παρουσία ή απουσία μεταλλάξεων στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου. Αναφορικά τώρα με την σχέση μεταξύ της μετάλλαξης του TERT και τον γονότυπο για το MNS16A, στην ομάδα των ασθενών στους 20/52 (38,46%) βρέθηκε μετάλλαξη για το TERT. Από αυτούς οι 9/20 (45%) είχαν γονότυπο LL, οι 6/20 (30%) είχαν γονότυπο SS και οι υπόλοιποι 5/20 (25%) είχαν τον γονότυπο LS. Από τους ασθενείς οι οποίοι δεν εμφάνισαν κάποια μετάλλαξη, οι 15/32 (46,87%) είχαν γονότυπο LL οι 8/32 (25%) SS και οι υπόλοιποι 9/32 (28,13%) LS (Διάγραμμα 3).

Από τους 16 ασθενείς που εμφάνισαν μεταλλάξεις στον *hTERT* υποκινητή, οι 18/20 (90%) έφεραν τη C228T μετάλλαξη και μόλις 2(10%) ασθενείς έφεραν τη C250T μετάλλαξη. Τα δύο άτομα που έφεραν τη C250T μετάλλαξη είχαν τα L και S αλληλόμορφα σε ετεροζυγωτία (γονότυπος LS). Από τα 18 άτομα με την μετάλλαξη C228T+, οι 9/18 (50%) είχαν γονότυπο LL, οι 3/18 (16,66%) LS και οι 6/18 (33,34%) SS.



Διάγραμμα 3. Κατανομή του MNS16A πολυμορφισμού παρουσία/απουσία μεταλλάξεων στον υποκινητή του hTERT γονιδίου.

Λαμβάνοντας υπόψη τον γονότυπο του MNS16A πολυμορφισμού, 24/52 (46,16%) ασθενείς είχαν τον γονότυπο LL. Από αυτούς, 9/24 (37,5%) έφεραν την C228T μετάλλαξη στον υποκινητή του hTERT γονιδίου και ήταν όλοι άνδρες. Στους ασθενείς με γονότυπο LL και παρουσία μετάλλαξης TERT η κυτταρολογική εξέταση έδειξε 6/9 με HGUC, 2 ασθενείς με άτυπα κύτταρα (AUC κατηγορία) και έναν ασθενή με διάγνωση ύποπτο για ουροθηλιακό καρκίνωμα (SHGUC). Στα άτομα αυτά η ιστολογική εξέταση ανέδειξε 7 ασθενείς με όγκο σταδίου T1, έναν ασθενή με όγκο σταδίου T2 και έναν ασθενή σταδίου Ta. 14/52 ασθενείς είχαν τον γονότυπο SS.

Δεν ανιχνεύθηκε κάποια μετάλλαξη στους υπόλοιπους 14 ασθενείς (26,92%), εκ των οποίων 12 ήταν άνδρες και 3 ήταν γυναίκες. Σε αυτούς η κυτταρολογική εξέταση έδειξε 6/14 με HGUC διάγνωση, 3 με ύποπτα ευρήματα (ShGUC), έναν ασθενή με άτυπα κύτταρα. Σε 4/14 ασθενείς η κυτταρολογική εξέταση ήταν αρνητική και σε μία περίπτωση το υλικό δεν ήταν επαρκές για διάγνωση. Στην ομάδα αυτή, η ιστολογική εξέταση επιβεβαίωσε 11/14 με HGUC όγκο. Στα υπόλοιπα άτομα, η ιστολογική έδειξε σε μία περίπτωση παρουσία φλεγμονής, ενώ στην άλλη περίπτωση το υλικό που λήφθηκε δεν ήταν ικανοποιητικό για διάγνωση. Τέλος, για δύο ασθενείς δεν υπήρξε ιστολογική έκθεση.

Όσον αφορά την ομάδα των ασθενών με γονότυπο SS, συμπεριλήφθηκαν 14 ασθενείς, 12/14 (85,71%) ήταν άνδρες και 2/14 (14,29%) ήταν γυναίκες. 6/14 συνολικά ασθενείς της ομάδας αυτής έφεραν την C228T μετάλλαξη και ήταν όλοι άνδρες. Η κυτταρολογική εξέταση έδειξε HGUC σε 4/6 (66,68%) ασθενείς, για έναν ασθενή (1/6, 16,66 %) έδειξε ευρήματα ύποπτα για HGUC και σε μία περίπτωση (1/6, 16,66 %) ήταν αρνητική. Ιστολογικά, 5/6 (83,33%) περιπτώσεις

επιβεβαίωσαν HGUC όγκο, ενώ η μία περίπτωση ήταν μη διαγνωστική. Οι υπόλοιποι ασθενείς της ομάδας αυτής (8/14, 57,14%) δεν έφεραν μεταλλάξεις. Έξι από αυτούς ήταν άνδρες (6/8, 75 %) και 2/8 (25%) ήταν γυναίκες. Η κυτταρολογική εξέταση έδειξε 4 HGUC και 1 περίπτωση με άτυπα κύτταρα, ενώ σε τρεις περιπτώσεις δεν αναδείχθηκαν στοιχεία κακοήθειας ή άτυπα κύτταρα. Η ιστολογική έκθεση επιβεβαίωσε HGUC σε 5/8 ασθενείς, ενώ σε δύο περιπτώσεις δεν αναδείχθηκαν στοιχεία κακοήθειας, όπως και στην κυτταρολογική έκθεση. Τέλος, για έναν ασθενή η ιστολογική εξέταση δεν ήταν διαγνωστική, καθώς το υλικό δεν κρίθηκε κατάλληλο.

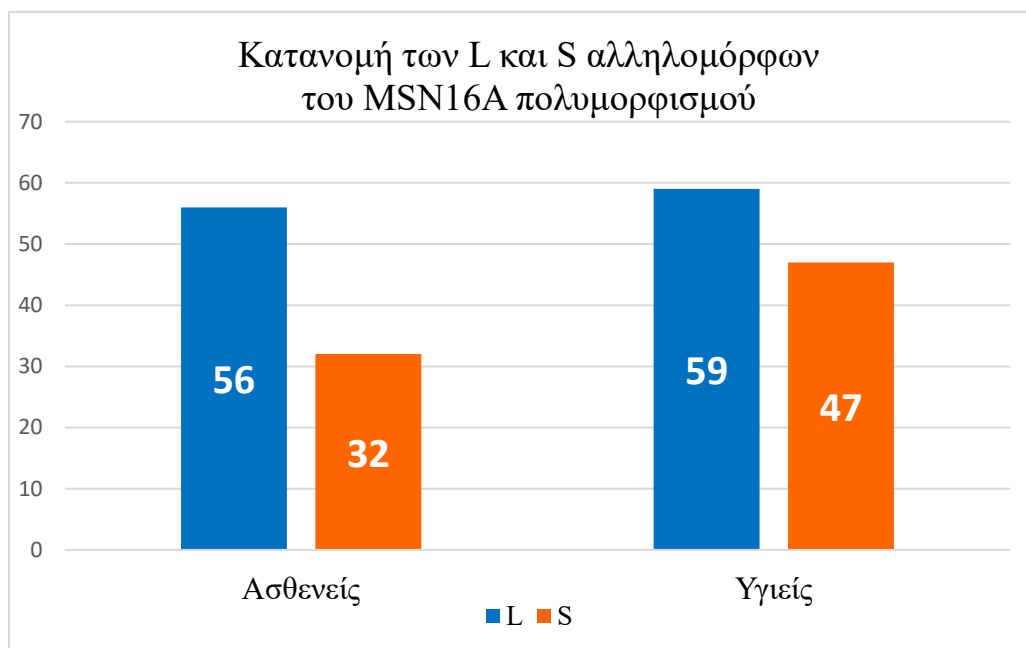
Η τρίτη ομάδα ασθενών περιλαμβάνει εκείνους με γονότυπο LS για τον πολυμορφισμό MNS16A. Στο σύνολο των 14 ατόμων, 13/14 (92,85%) ήταν άνδρες και 1/14 (7,15%) ήταν γυναίκες. 5/14 (35,71%) ασθενείς, άνδρες όλοι, έφεραν μεταλλάξεις στον υποκινητή hTERT. Συγκεκριμένα, 3/5 (60%) ασθενείς έφεραν την C228T μετάλλαξη και 2/5 (40%) ασθενείς είχαν τη C250T μετάλλαξη. Η κυτταρολογική εξέταση έδειξε HGUC όγκους στους τρεις ασθενείς με C228T μετάλλαξη, ενώ στους δύο ασθενείς που έφεραν τις C250T μεταλλάξεις, η κυτταρολογική διάγνωση ήταν άτυπα κύτταρα στην μία περίπτωση και ύποπτα ευρήματα για HGUC (SHGUC) στην άλλη περίπτωση. Ολοκληρώνοντας, 9/14 (64,29%) ασθενείς με γονότυπο LS δεν έφεραν TERT μεταλλάξεις. Η κυτταρολογική εξέταση έδειξε 4/9 (44,44%) περιπτώσεις με HGUC όγκους, μία περίπτωση με ευρήματα ύποπτα (SHGUC), ενώ 4/9 περιπτώσεις είχαν αρνητική κυτταρολογική εξέταση. Ιστολογική εξέταση είχαμε σε 7/9 (77,77%) ασθενείς και από αυτή αναδείχθηκαν 2/7 (28,58%) περιπτώσεις με HGUC όγκο, 1/7 (14,28%) περιπτώσεις με LGUC όγκο και σε 4/7 (57,14%) περιπτώσεις δεν αναδείχθηκαν στοιχεία κακοήθειας.

Παράλληλα προχωρήσαμε σε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας με το σύστημα SPSS. Σημειώνεται εδώ πως κατά την στατιστική ανάλυση εξαιρέσαμε τις περιπτώσεις για τις οποίες δεν υπήρχαν όλες οι κλινικές πληροφορίες. Η προ-επεξεργασία των δεδομένων αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο στην ανάλυση οποιουδήποτε συνόλου δεδομένων, ειδικά στον τομέα της βιοϊατρικής και κλινικής έρευνας, όπου η ποιότητα των δεδομένων επηρεάζει άμεσα την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει μια σειρά από βήματα που αποσκοπούν στη διασφάλιση της ακρίβειας και της πληρότητας των δεδομένων, καθώς και στην εξάλειψη θορύβου ή σφαλμάτων που μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα. Τα δεδομένα που περιέχουν κενές ή ελλιπείς τιμές είναι συχνό φαινόμενο σε κλινικές έρευνες, είτε λόγω τεχνικών σφαλμάτων, είτε λόγω δυσκολιών στη συλλογή δεδομένων από ασθενείς. Στην προκειμένη περίπτωση επιλέξαμε τη διαγραφή των περιπτώσεων εκείνων που τα δείγματα ήταν αμφίβολα ή μη διαγνωστικά λόγω ακαταλληλότητας του εξεταζόμενου υλικού.

Συγκρίνοντας την κατανομή των γονοτύπων του MNS16A πολυμορφισμού εξετάσαμε εάν υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμασία χ^2 για να συγκρίνουμε τις κατανομές των διαφορετικών γονιδιακών εκφάνσεων του πολυμορφισμού (0 = LL, 1 = SS, 2 = LS) στις δύο ομάδες. Από την ανάλυση, η τιμή του χ^2 ήταν 2.77 με ($p = 0.596$), υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο MNS16A πολυμορφισμός δεν αποτελεί παράγοντα διαφοροποίησης μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων – τουλάχιστον στο δείγμα συμμετεχόντων που συλλέξαμε- και ως εκ τούτου, πιθανόν να μην διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της συγκεκριμένης νόσου. Ωστόσο,

εκτενέστερη μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων μπορεί να συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της σύνδεσης του MNS16A πολυμορφισμού με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Η κατανομή των γονοτύπων δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών και των υγιών ατόμων. Ωστόσο, εξετάζοντας προσεκτικά την κατανομή των αλληλομόρφων L και S προκύπτει ότι το μικρού μήκους αλληλόμορφο (S) απαντά σε μεγαλύτερη συχνότητα στα υγιή άτομα συγκριτικά με τους ασθενείς, ενώ δε φαίνεται να ισχύει το ίδιο για το αλληλόμορφο L, το οποίο έχει παρόμοια κατανομή στις δύο ομάδες. Η δοκιμασία χ^2 στην περίπτωση αυτή ανέδειξε μία στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την κατανομή των L και S αλληλομόρφων μεταξύ των δύο ομάδων με τιμή $p=0.002$ ($p<0.05$). Επομένως, αν και δεν απεικονίζεται το εύρημα αυτό όταν εξετάζουμε την κατανομή των γονοτύπων, η κατανομή των αλληλομόρφων δεν είναι ανεξάρτητη μεταξύ των ασθενών και των υγιών ατόμων, γεγονός που υποδεικνύει πιθανή συσχέτιση του συγκεκριμένου αλληλομόρφου με τη νόσο (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4. Κατανομή των αλληλομόρφων L και S του MNS16A πολυμορφισμού του hTERT γονιδίου σε ασθενείς και υγιή άτομα.

Η συσχέτιση της κατανομής του MNS16A πολυμορφισμού με την ηλικία των ασθενών δεν ανέδειξε κάποιο στατιστικώς σημαντικό εύρημα. Ομοίως, δεν προέκυψε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση εξετάζοντας την κατανομή των αλληλομόρφων του MNS16A πολυμορφισμού με τις κυτταρολογικές κατηγορίες κατά TPS ή τις ιστολογικές εκθέσεις. Η δοκιμασία χ^2 που χρησιμοποιήθηκε έδωσε τιμές $p = 0.993$ ($p>0.05$) και $p = 0.298$ ($p>0.05$) αντίστοιχα. Στον πληθυσμό που μελετήσαμε (ασθενείς-υγιή άτομα) δεν αναδείχθηκε επίσης στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του MNS16A πολυμορφισμού, ως προς την κατανομή των αλληλομόρφων και της παρουσίας ή απουσίας μεταλλάξεων στην περιοχή του υποκινητή του

hTERT γονιδίου, υποδεικνύοντας ότι οι μεταλλάξεις και ο MNS16A πολυμορφισμός επιδρούν ανεξάρτητα στη ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι ο συχνότερος ουροθηλιακός καρκίνος και απαντά συχνότερα στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες. Το 2022 καταγράφηκαν 616.000 νέες περιπτώσεις και σημειώθηκαν 221.000 θάνατοι από τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, αναμένεται ότι το 2045 οι νέες περιπτώσεις και οι θάνατοι θα προσεγγίσουν σε αριθμούς το 1 εκατομμύριο και τις 430.000 αντίστοιχα. Είναι προφανές ότι αποτελεί ένα εξαιρετικά σημαντικό θέμα στον τομέα της υγείας και η λήψη μέτρων είναι περισσότερο από αναγκαία. Η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζει μη διηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης κατά τη στιγμή της διάγνωσης και χρήζει άμεσης αντιμετώπισης, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος εξέλιξης της νόσου (Jubber et al. 2023; Dobruch et al. 2021).

Το κάπνισμα και η έκθεση σε χημικές, καρκινογόνες ενώσεις αποτελούν κύριους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση της νόσου καθίστανται υψίστης σημασίας για την αντιμετώπιση της νόσου. Η μικροσκοπική και η μακροσκοπική αιματοουρία αποτελούν κύρια, αλλά όχι ειδικά συμπτώματα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Η νόσος σήμερα αντιμετωπίζεται με το συνδυασμό κυστεοσκόπησης και κυτταρολογικής εξέτασης ούρων. Η κυστεοσκόπηση, αν και αποτελεί το gold standard σήμερα, δεν παύει να είναι μία επεμβατική τεχνική και επομένως δυσάρεστη για όσους υποβάλλονται σε αυτή. Παράλληλα, η κυτταρολογική εξέταση ούρων είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική για όγκους υψηλού βαθμού κακοηθείας, υστερεί όμως σε χαμηλού βαθμού κακοηθείας όγκους, ενώ δεν αποκλείονται οι περιπτώσεις που εντάσσονται στην γκρίζα ζώνη και περιλαμβάνουν άτυπα κύτταρα ή ύποπτα για υψηλόβαθμο ουροθηλιακό καρκίνο. Τα τεστ ούρων που είναι εγκεκριμένα από τον FDA παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και χαμηλή ευαισθησία και ενδέχεται να οδηγήσουν σε λανθασμένη διάγνωση (Wolfs et al. 2021; Yadong et al. 2021).

Οι τεχνολογικές εξελίξεις έχουν επιτρέψει την μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκίνου, ανοίγοντας τον δρόμο για την ανάδειξη βιοδεικτών και την ανάπτυξη νέων, στοχευμένων, θεραπευτικών επιλογών. Τα ούρα, ως ένα είδος υγρής βιοψίας, αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη πηγή νουκλεϊκών οξέων, που μπορεί να αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό του μοριακού προφίλ των ασθενών. Η πλειοψηφία των όγκων κατά τη διάγνωση είναι μη μυοδιηθητικοί όγκοι και ενδέχεται να εξελιχθούν σε μυοδιηθητικούς ή να παρουσιάσουν υποτροπή. Οι μυοδιηθητικοί όγκοι φέρουν υψηλό φορτίο μεταλλάξεων, γεγονός που τους καθιστά

κατάλληλους για μοριακή στόχευση. Επιπλέον, οι μη μυοδιηθητικοί υποτροπιάζουν συχνά, γεγονός που υποδηλώνει ότι παρουσιάζουν αντίσταση και δεν ανταποκρίνονται στην BCG θεραπεία που χορηγείται συνήθως. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη για εύρεση μη επεμβατικών μοριακών βιοδεικτών με διαγνωστική, προγνωστική και προβλεπτική αξία.

Η υψηλή ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου σε διάφορους τύπους καρκίνου. Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει γενετικές παραλλαγές που επιδρούν στην έκφραση ή στη λειτουργία του *hTERT* γονιδίου. Οι μεταλλάξεις TERT -124 C>T (C228T) και TERT -146C>T (C250T), απαντώνται σε μία περιοχή του υποκινητή πλούσια σε GC και δημιουργούν θέσεις πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες. Η παρουσία των μεταλλάξεων αυτών προκαλεί υπερέκφραση του *hTERT* γονιδίου (2x-4x φορές). Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ανιχνεύονται σε παρόμοια συχνότητα στα χαμηλού και υψηλού βαθμού ουροθηλιακά καρκινώματα (Zvereva et al. 2020). Εκτός από τις μεταλλάξεις, πολυμορφικές θέσεις και συγκεκριμένα μικροδορυφόροι που εντοπίζονται σε διάσπαρτες θέσεις, φαίνεται να επιδρούν επίσης στην έκφραση του *hTERT* γονιδίου. Ο MNS16A πολυμορφισμός είναι μία πολυμορφική, δορυφορική, επαναλαμβανόμενη αλληλουχία, που εδράζεται καθοδικά του εξονίου 16 του *hTERT* γονιδίου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάσαμε τις μεταλλάξεις -124 C>T (C228T) και TERT -146C>T (C250T), καθώς και τον MNS16A μικροδορυφόρο του *hTERT* γονιδίου σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο. Η Ελλάδα καταλαμβάνει την πρώτη σε συχνότητα θέση παγκοσμίως, όσον αφορά σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν υπάρχει ανάλογη μελέτη στον Ελληνικό πληθυσμό και υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα στη διεθνή βιβλιογραφία, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσουμε την κατανομή των μεταλλάξεων και του μικροδορυφόρου MNS16A σε Έλληνες ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης και να εκτιμήσουμε τις πιθανές συσχετίσεις με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους των ασθενών.

Συγκεκριμένα, εξετάσαμε 52 ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης και 53 υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα των ασθενών συμπεριλάβαμε άτομα με διάγνωση πρωτοπαθούς όγκου της ουροδόχου κύστης, αλλά και ασθενείς που παρουσίασαν υποτροπή της νόσου κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η πλειοψηφία των ασθενών (88,5%) ήταν άνδρες και μόλις το 11,5% ήταν γυναίκες, κάτι το οποίο ήταν απολύτως αναμενόμενο, καθώς η νόσος προσβάλλει με τετραπλάσια συχνότητα τους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες. Όσον αφορά τις μεταλλάξεις στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου, αυτές ανιχνεύθηκαν κυρίως σε ασθενείς με θετική κυτταρολογική εξέταση ούρων (41,03%). Η κυρίαρχη μετάλλαξη που καταγράφηκε ήταν η C228T, ενώ η μετάλλαξη C250T ανιχνεύθηκε σε δύο μόνο ασθενείς με ιστολογική διάγνωση χαμηλόβαθμου ουροθηλιακού καρκίνου.

Η κατανομή των γονοτύπων του MNS16A πολυμορφισμού δε φάνηκε να διαφέρει στις δύο ομάδες που εξετάσαμε. Ωστόσο, η ανάλυση μεμονωμένα των αλληλομόρφων L και S ανέδειξε την παρουσία του μικρού μήκους αλληλομόρφου S σε μεγαλύτερη συχνότητα στα υγιή άτομα (44,33%) συγκριτικά με τους ασθενείς (36,36%), διαφορά η οποία είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.002$, <0.05). Δεν ισχύει το ίδιο για το αλληλόμορφο L, το φάνηκε να κατανέμεται

ομοιόμορφα μεταξύ των δύο ομάδων. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της κατανομής του MNS16A πολυμορφισμού και της ηλικίας των ασθενών, των κυτταρολογικών κατηγοριών σύμφωνα με το TPS, αλλά και της παρουσίας ή απουσίας των C228T και C250T μεταλλάξεων στον υποκινητή του *hTERT* γονιδίου. Φαίνεται λοιπόν, ότι οι μεταλλάξεις και ο MNS16A πολυμορφισμός επιδρούν ανεξάρτητα στην έκφραση του *hTERT* γονιδίου.

Τα τελευταία χρόνια, σημειώθηκαν αρκετές μελέτες για τον πολυμορφισμό MNS16A, καθώς οι ερευνητές αντιλαμβάνονται τη σημασία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στον καρκίνο. Στη μελέτη των Anwar και συνεργατών (2021) σε 130 ασθενείς και 170 υγιή άτομα, εξετάστηκε η σχέση του πολυμορφισμού MNS16A με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι ασθενείς εμφάνιζαν σε τριπλάσια συχνότητα τον γονότυπο SS (VNTR-243/243) σε σχέση με τα υγιή άτομα, υποστηρίζοντας την παθογόνο δράση του S αλληλομόρφου. Παράλληλα, όσον αφορά την κατανομή των αλληλομόρφων L και S, το αλληλόμορφο L απαντούσε σε συχνότητα στα υγιή άτομα, ενώ το αλληλόμορφο S ήταν συχνότερο στην ομάδα των ασθενών. Στη δική μας μελέτη προκύπτουν αντίθετα ευρήματα, καθώς το αλληλόμορφο S εμφανίζεται συχνότερα στα υγιή άτομα (44,33%) συγκριτικά με τους ασθενείς (36,36%), γεγονός που υποδηλώνει έναν προστατευτικό ρόλο για το αλληλόμορφο S. Τα διαφορετικά ευρήματα μπορούν να αποδοθούν στον μικρό αριθμό των δειγμάτων στη δική μας μελέτη, αλλά και στον διαφορετικό πληθυσμό που εξετάστηκε, καθώς είναι γνωστή η γεωγραφική ετερογένεια που παρατηρείται στην κατανομή των πολυμορφισμών.

Σε μία ανάλογη μελέτη (2020) σε πληθυσμό της Τουρκίας καταγράφονται τα ίδια αλληλόμορφα που ανιχνεύσαμε κι εμείς. Η συχνότητα των αλληλομόρφων συμφωνεί στις δύο μελέτες. Το συχνότερο αλληλόμορφο και στις δύο ομάδες είναι το αλληλόμορφο VNTR-302, ακολουθούμενο από το αλληλόμορφο VNTR-243. Επιπρόσθετα, η κατανομή των γονοτύπων στις δύο ομάδες δεν αναδεικνύει κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση, εύρημα που συμφωνεί και με τα δικά μας αποτελέσματα, υποδηλώνοντας ότι ο MNS16A πολυμορφισμός δε φαίνεται να συνηγορεί στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Diler et al. 2020).

Ο MNS16A πολυμορφισμός έχει μελετηθεί εκτενώς και σε άλλους τύπους καρκίνου. Σε μία μελέτη των Hofer και συνεργατών (2013) εξετάστηκαν 1165 ασθενείς με καρκίνο προστάτη και 674 άτομα με καλοήγη υπερπλασία προστάτη. Η συγκεκριμένη μελέτη ανέδειξε για το αλληλόμορφο S έναν προστατευτικό ρόλο έναντι του καρκίνου του προστάτη, ιδιαίτερα για ασθενείς άνω των 70 ετών (Hofer et al. 2013). Το ίδιο εύρημα υποστηρίζει και η δική μας μελέτη, καθώς το αλληλόμορφο S ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα στα υγιή άτομα συγκριτικά με τους ασθενείς, καταδεικνύοντας ότι και εδώ δρα προστατευτικά.

Παράλληλα, τα αποτελέσματα που αναδεικνύονται στη δική μας μελέτη είναι σε συμφωνία με τη μελέτη των Zhang και συνεργατών (2011), οι οποίοι εξέτασαν τον πολυμορφισμό MNS16A σε Κινέζους ασθενείς με ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα. Στη μελέτη αυτή η κατανομή του αλληλομόρφου L ήταν παρόμοια σε ασθενείς και υγιή άτομα. Παράλληλα, το αλληλόμορφο S εμφανίστηκε συχνότερα στα υγιή άτομα σε σύγκριση με τους ασθενείς. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του *hTERT* γονιδίου έδειξε ότι οι γονότυποι που περιείχαν το

αλληλόμορφο S σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία, παρουσίαζαν μειωμένη έκφραση της TERT, σε αντίθεση με τα άτομα που είχαν τον γονότυπο LL. Ως εκ τούτου, αναδεικνύεται και στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα ο προστατευτικός ρόλος του αλληλομόρφου S, χωρίς ωστόσο να είναι κατανοητός που διέπει την κατανομή του συγκεκριμένου πολυμορφισμού (Zhang et al. 2011).

Σε μία μελέτη του MNS16A πολυμορφισμού στον καρκίνο του πνεύμονα, οι ερευνητές παρατήρησαν μία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0.02$) στην κατανομή του αλληλομόρφου S σε περισσότερα από 1800 άτομα που ελέγχθηκαν (ασθενείς – υγιείς). Το αλληλόμορφο VNTR-243 (S) συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα, αλλά με καλύτερη κλινική έκβαση, γεγονός που υποστηρίζει έναν διπλό, αντικρουόμενο ρόλο του πολυμορφισμού MNS16A στην καρκινογένεση του πνεύμονα (Jin et al. 2011). Η παρουσία του S αλληλομόρφου σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία έδειξε αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο, σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα, σύμφωνα με τα οποία το αλληλόμορφο S φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο.

Ο μηχανισμός με τον οποίο ο MNS16A πολυμορφισμός επηρεάζει την καρκινογένεση δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Οι Wang και συνεργάτες έδειξαν ότι η ενεργότητα του υποκινητή επηρεάζεται αναλόγως του αριθμού των διαδοχικών επαναλήψεων. Το αλληλόμορφο L συσχετίζεται με υψηλότερη ενεργότητα του υποκινητή στον μη νοηματικό κλώνο και ως εκ τούτου αυξημένη έκφραση του μη νοηματικού TERT μεταγράφου, η οποία οδηγεί σε αποσιώπηση του TERT. Αυτό το γεγονός, έχει ως αποτέλεσμα το αλληλόμορφο να S σχετίζεται με υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης, ενώ οι LL ομοζυγώτες παρουσιάζουν μειωμένη δράση του ενζύμου (Dratwa et al. 2020). Αντιθέτως, στη μελέτη των Zhang και συνεργατών (2011) στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, η παρουσία του S αλληλομόρφου συσχετίστηκε με μειωμένη έκφραση του TERT σε σχέση με το αλληλόμορφο L (Zhang et al. 2011).

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αλληλομόρφων του MNS16A πολυμορφισμού και των κυτταρολογικών κατηγοριών κατά TPS ή των ιστολογικών εκθέσεων. Η κατανομή των γονοτύπων του MNS16A δεν διέφερε σημαντικά στις δύο ομάδες. Ωστόσο, η παρουσία του S αλληλομόρφου με μεγαλύτερη συχνότητα στα υγιή άτομα ανέδειξε έναν πιθανό προστατευτικό ρόλο ως προς τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης, στοιχείο που χαρακτηρίζει το S αλληλόμορφο και σε άλλους τύπους καρκίνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των ατόμων (ασθενείς-υγιή άτομα) που εξετάστηκε είναι μικρός και ενδεχομένως δεν οδηγεί σε ασφαλή στατιστικώς συμπεράσματα. Παράλληλα, η γεωγραφική ετερογένεια αιτιολογεί εν μέρει τις διαφορές που απαντώνται σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Συμπερασματικά, χρειάζονται επιπλέον μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων, ώστε να εξάγουμε στατιστικώς ασφαλή συμπεράσματα για την σχέση μεταξύ του MNS16A και του ουροθηλιακού καρκίνου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alsibai KD, Daste G, Ferlicot S, Fabre M, Steenkeste K, Salleron J, Hammoudi Y, Fontaine-Aupart MP, Eschwege P. Fluorescence Emitted by Papanicolaou-Stained Urothelial Cells Improves Sensitivity of Urinary Conventional Cytology for Detection of Urothelial Tumors. *World J Oncol*. 2020 Oct;11(5):204-215. doi: 10.14740/wjon1305. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33117464; PMCID: PMC7575278.

Ahmadi, H., Duddalwar, V., & Daneshmand, S. (2021). Diagnosis and Staging of Bladder Cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 35(3), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.02.004>

Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*. 2017 Jan;71(1):96-108. doi: 10.1016/j.eururo.2016.06.010.

Anwar I, Pandith AA, Wani MS, Mir H, Godha M, Koul A, Shah ZA, Manzoor U, Amin I, Qasim I. Analysis of MNS16A VNTR polymorphic sequence variations of the *TERT* gene and associated risk for development of bladder cancer. *Curr Urol*. 2021 Dec;15(4):225-230. doi: 10.1097/CU9.0000000000000040.

Babjuk, M., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Compérat, E. M., Dominguez Escrig, J. L., Gontero, P., Liedberg, F., Masson-Lecomte, A., Mostafid, A. H., Palou, J., van Rhijn, B. W. G., Rouprêt, M., Shariat, S. F., Seisen, T., Soukup, V., & Sylvester, R. J. (2022). European Association of Urology Guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TA, T1, and carcinoma in situ). *European Urology*, 81(1), 75–94. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.08.010>.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>

Chakravarti, D., LaBella, K. A., & DePinho, R. A. (2021). Telomeres: History, health, and hallmarks of aging. *Cell*, 184(2), 306–322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.028>.

Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics*. 2019 Aug 1;13(1):34. doi: 10.1186/s40246-019-0220-8. PMID: 31370908; PMCID: PMC6669976.

Cheng, L., Zhang, S., Wang, M., & Lopez-Beltran, A. (2023). Biological and clinical perspectives of TERT promoter mutation detection on bladder cancer diagnosis and management. *Human Pathology*, 133, 56–75. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2022.06.005>.

Chromek M, Brauner A. Antimicrobial mechanisms of the urinary tract. *J Mol Med (Berl)*. 2008 Jan;86(1):37-47. doi: 10.1007/s00109-007-0256-4.

Colebatch, A. J., Dobrovic, A., & Cooper, W. A. (2019). TERT gene: Its function and dysregulation in cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 72(4), 281–284. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205653>.

Dalghi MG, Montalbetti N, Carattino MD, Apodaca G. The Urothelium: Life in a Liquid Environment. *Physiol Rev*. 2020 Oct 1;100(4):1621-1705. doi: 10.1152/physrev.00041.2019. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32191559; PMCID: PMC7717127.

Daneshmand, S., Bazargani, S. T., Bivalacqua, T. J., Holzbeierlein, J. M., Willard, B., Taylor, J. M., ... & Konety, B. (2018, August). Blue light cystoscopy for the diagnosis of bladder cancer: Results from the US prospective multicenter registry. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 36, No. 8, pp. 361-e1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.04.013>

Diler SB, Polat F, Bingöl G. The MNS16A VNTR polymorphism of the TERT gene in bladder cancer. *Turk J Urol*. 2019 Nov 29;46(1):44-49. doi: 10.5152/tud.2019.19005. PMID: 31905123; PMCID: PMC6944421.

Dobruch J, Oszczudłowski M. Bladder Cancer: Current Challenges and Future Directions. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Jul 24;57(8):749. doi: 10.3390/medicina57080749. PMID: 34440955; PMCID: PMC8402079.

Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol*. 2020 Nov 19;11:589929. doi: 10.3389/fimmu.2020.589929.

Ferro, M., La Civita, E., Liotti, A., Cennamo, M., Tortora, F., Buonerba, C., ... & Terracciano, D. (2021). Liquid biopsy biomarkers in urine: a route towards molecular diagnosis and personalized medicine of bladder cancer. *Journal of personalized medicine*, 11(3), 237. <https://doi.org/10.3390/jpm11030237>

Flores Monar, G. V., Reynolds, T., Gordon, M., Moon, D., & Moon, C. (2023). Molecular markers for bladder cancer screening: an insight into bladder cancer and FDA-approved biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14374. <https://doi.org/10.3390%2Fijms241814374>

Hickling DR, Sun TT, Wu XR. Anatomy and Physiology of the Urinary Tract: Relation to Host Defense and Microbial Infection. *Microbiol Spectr*. 2015 Aug;3(4):10.1128/microbiolspec.UTI-

0016-2012. doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0016-2012. PMID: 26350322; PMCID: PMC4566164.

Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016). The 2016 WHO classification of tumors of the urinary system and male genital organs—part B: Prostate and bladder tumors. *European Urology*, 70(1), 106–119.

Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell*. 2016;30(1):27-42. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.004).

Hofer P, Zöchmeister C, Behm C, Brezina S, Baierl A, Doriguzzi A, Vanas V, Holzmann K, Sutterlüty-Fall H, Gsur A. MNS16A tandem repeat minisatellite of human telomerase gene: functional studies in colorectal, lung and prostate cancer. *Oncotarget*. 2017 Apr 25;8(17):28021-28027. doi: 10.18632/oncotarget.15884

Hofer P, Zerelles J, Baierl A, Madersbacher S, Schatzl G, Maj-Hes A, Sutterlüty-Fall H, Gsur A. MNS16A tandem repeat minisatellite of human telomerase gene and prostate cancer susceptibility. *Mutagenesis*. 2013 May;28(3):301-6. doi: 10.1093/mutage/get003.

Huda, N., Yasmin, T., & Nabi, A. H. M. N. (2021). MNS16A VNTR polymorphism of the human telomerase gene: Elucidation of a gender-specific potential allele associated with type 2 diabetes in Bangladeshi population. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 35(10), 108018. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2021.108018.

Jie MM, Chang X, Zeng S, Liu C, Liao GB, Wu YR, Liu CH, Hu CJ, Yang SM, Li XZ. Diverse regulatory manners of human telomerase reverse transcriptase. *Cell Commun Signal*. 2019 Jun 11;17(1):63. doi: 10.1186/s12964-019-0372-0.

Jin, G., Yoo, S.S., Cho, S., Jeon, H.-S., Lee, W.-K., Kang, H.-G., Choi, Y.Y., Choi, J.E., Cha, S.-I., Lee, E.B., Kim, C.H., Jung, T.H., Kim, Y.T. and Park, J.Y. (2011), Dual roles of a variable number of tandem repeat polymorphism in the TERT gene in lung cancer. *Cancer Science*, 102: 144-149. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01782.x>

Jubber, I., Ong, S., Bukavina, L., Black, P. C., Compérat, E., Kamat, A. M., Kiemeny, L., Lawrentschuk, N., Lerner, S. P., Meeks, J. J., Moch, H., Necchi, A., Panebianco, V., Sridhar, S. S., Znaor, A., Catto, J. W. F., & Cumberbatch, M. G. (2023). Epidemiology of bladder cancer in 2023: A systematic review of risk factors. *European Urology*, 84(2), 176–190. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2023.03.029>.

Kamoun, A., de Reynies, A., Allory, Y., Sjö Dahl, G., Robertson, A. G., Seiler, R., ... & Weinstein, J. (2020). A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *European urology*, 77(4), 420-433. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.09.006>.

Khandelwal, P., Abraham, S. N., & Apodaca, G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, (2009); 297(6), F1477–F1501. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00327.2009>.

Kwong GA, Ghosh S, Gamboa L, Patriotis C, Srivastava S, Bhatia SN. Synthetic biomarkers: a twenty-first-century path to early cancer detection. *Nat Rev Cancer*. 2021 Oct;21(10):655-668. doi: 10.1038/s41568-021-00389-3.

Laberthonnière C, Magdinier F, Robin JD. Bring It to an End: Does Telomeres Size Matter? *Cells*. 2019; 8(1):30. <https://doi.org/10.3390/cells8010030>.

Lobo, N., Afferi, L., Moschini, M., Mostafid, H., Porten, S., Psutka, S. P., Gupta, S., Smith, A. B., Williams, S. B., & Lotan, Y. (2022). Epidemiology, screening, and Prevention of Bladder Cancer. *European Urology Oncology*, 5(6), 628–639. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2022.10.003>.

Liu L, Wang C, Lu X, Xiao F, Wang H, Yang L, Xu L, Kong Q. The MNS16A polymorphism in the TERT gene in peri-centenarians from the Han Chinese population. *Sci China Life Sci*. 2014 Oct;57(10):1024-7. doi: 10.1007/s11427-014-4723-1.

Luo Wang, Li-E Wang, Li Mao, Margaret R. Spitz, Qingyi Wei; A Functional Variant of Tandem Repeats in Human Telomerase Gene Was Associated with Survival of Patients with Early Stages of Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 15 July 2010; 16 (14): 3779–3785.

Nenclares, P., & Harrington, K. J. (2020). The Biology of Cancer. *Medicine*, 48(2), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.001>.

Ng, K., Stenzl, A., Sharma, A., & Vasdev, N. (2021). Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and Future Directions. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 39(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.08.016>.

Nikas IP, Seide S, Proctor T, Kleinaki Z, Kleinaki M, Reynolds JP. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: A Meta-Analysis. *J Pers Med*. 2022 Jan 27;12(2):170. doi: 10.3390/jpm12020170. PMID: 35207658; PMCID: PMC8874476.

O’Sullivan, S., Janssen, M., Holzinger, A. et al. Explainable artificial intelligence (XAI): closing the gap between image analysis and navigation in complex invasive diagnostic procedures. *World J Urol* 40, 1125–1134 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00345-022-03930-7>.

Pessoa, L. S., Heringer, M., & Ferrer, V. P. (2020). CtDNA as a cancer biomarker: A broad overview. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 155, 103109. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103109>.

Rasouly HM, Lu W. Lower urinary tract development and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2013 May-Jun;5(3):307-42. doi: 10.1002/wsbm.1212.

Richardson, C.J., Pambuccian, S.E. and Barkan, G.A. (2020), Split-sample comparison of urothelial cells in ThinPrep and cytopsin preparations in urinary cytology: Do we need to adjust The Paris System for Reporting Urinary Cytology criteria?. *Cancer Cytopathology*, 128: 119-125. <https://doi.org/10.1002/cncy.22218>.

Robertson, A. G., Kim, J., Al-Ahmadie, H., Bellmunt, J., Guo, G., Cherniack, A. D., Hinoue, T., Laird, P. W., Hoadley, K. A., Akbani, R., Castro, M. A. A., Gibb, E. A., Kanchi, R. S., Gordenin, D. A., Shukla, S. A., Sanchez-Vega, F., Hansel, D. E., Czerniak, B. A., Reuter, V. E., Su, X., ... Lerner, S. P. (2017). Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 171(3), 540–556.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.007>

Robertson AG, Groeneveld CS, Jordan B, et al. Identification of Differential Tumor Subtypes of T1 Bladder Cancer [published correction appears in *Eur Urol*. 2022 Feb;81(2):e53. doi: 10.1016/j.eururo.2021.11.001]. *Eur Urol*. 2020;78(4):533-537. doi:10.1016/j.eururo.2020.06.048).

Sarhadi VK, Armengol G. Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules*. 2022; 12(8):1021. <https://doi.org/10.3390/biom12081021>.

Schwarzova, L., Varchulova Novakova, Z., Danisovic, L., & Ziaran, S. (2023). Molecular classification of urothelial bladder carcinoma. *Molecular Biology Reports*, 50(9), 7867-7877. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08689-7>

Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray. "Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA Cancer J Clin* 71, no. 3 (2021): 209-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Tomiyama, E., Fujita, K., Hashimoto, M., Uemura, H. and Nonomura, N. (2024), Urinary markers for bladder cancer diagnosis: A review of current status and future challenges. *Int. J. Urol.*, 31: 208-219. <https://doi.org/10.1111/iju.15338>

Wang, L., Soria, JC., Chang, YS. et al. Association of a functional tandem repeats in the downstream of human telomerase gene and lung cancer. *Oncogene* 22, 7123–7129 (2003). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206852>

Wang, G., & McKenney, J. K. Urinary Bladder Pathology: World Health Organization Classification and American Joint Committee on Cancer Staging Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, (2018); 143(5), 571–577. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0539-ra>.

Wolfs, J. R., Hermans, T. J., Koldewijn, E. L., & van de Kerkhof, D. (2021). Novel urinary biomarkers ADXBLADDER and bladder EpiCheck for diagnostics of Bladder Cancer: A Review. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 39(3), 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.11.014>.

Xu, Y., Luo, C., Wang, J. et al. Application of nanotechnology in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *J Nanobiotechnol* 19, 393 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01104-y>.

Yuan H, Han Z, Teng Z, Wang Y, Li J, Chang X, Zhang Y. MNS16A polymorphism of the *TERT* gene on cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2023;42(12):1004-1018. doi: 10.1080/15257770.2023.2226691.

Zhang Y, Zhang H, Zhai Y, Wang Z, Ma F, Wang H, Li P, Zhang Y, Yu L, Cui Y, He F, Zhou G. A functional tandem-repeats polymorphism in the downstream of TERT is associated with the risk of nasopharyngeal carcinoma in Chinese population. *BMC Med*. 2011 Sep 20;9:106. doi: 10.1186/1741-7015-9-106.

Zvereva, M.; Pisarev, E.; Hosen, I.; Kisil, O.; Matskeplishvili, S.; Kubareva, E.; Kamalov, D.; Tivtikyan, A.; Manel, A.; Vian, E.; et al. Activating Telomerase TERT Promoter Mutations and Their Application for the Detection of Bladder Cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2020, 21, 6034. <https://doi.org/10.3390/ijms21176034>.