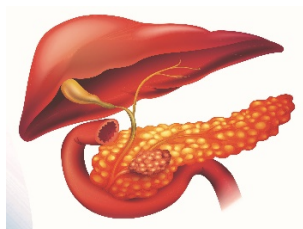




ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ-από το Α ως το Ω»



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**" ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ"**

υπό

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ ΛΑΖΑΡΟΥ

Ειδικευόμενου Παθολογικής Ογκολογίας

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών

«ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ-από το Α ως το Ω»

Λάρισα, 2024

Επιβλέπων:

Αθανάσιος Κωτσάκης, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Αθανάσιος Κωτσάκης, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπων),
2. Δημήτριος Ζαχαρούλης, Καθηγητής Χειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Καλλέργη Γαλάτεια, Επίκουρη Καθηγήτρια Τομέας Γενετικής Βιολογίας
Κυττάρου & Ανάπτυξης, Πανεπιστήμιο Πατρών

Τίτλος εργασίας στα αγγλικά:

***THE PREDICTIVE VALUE OF CIRCULATING CANCER
CELLS AND IMMUNE POPULATIONS IN PANCREATIC
CANCER***

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Την βαθιά ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα Δρ. Αθανάσιο Κωτσάκη καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας, του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, όπου μέσα από τις συμβουλές, την καθοδήγηση και την ηθική παρότρυνση, κατέστη δυνατή η ολοκλήρωση και αυτής της προσπάθειας.

Ένα πολύ μεγάλο, βαθύ και θερμό ευχαριστώ οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους, που χωρίς την αγάπη και τη συμπαράστασή τους, τίποτα από όλα αυτά δε θα ήταν ποτέ δυνατό: τους γονείς μου Αργυρώ και Στέλιο, την σύζυγό μου Εύη αλλά και την μικρή Υρώ.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	6
Abstract.....	7
Κατάλογος Εικόνων.....	8
Κατάλογος Πινάκων.....	10
1.Το πάγκρεας	11
Ιστολογία Παγκρέατος.....	11
1.2 Φυσιολογία του παγκρέατος.....	12
1.3 Ανάπτυξη της παγκρεατικής λειτουργίας.....	12
1.4 Διαταραχές που επηρεάζουν τις λειτουργίες του παγκρέατος.....	14
1.4.1 Φλεγμονώδεις ασθένειες.....	14
1.4.1.1 Χρόνια και οξεία παγκρεατίτιδα	14
1.4.1.2 Κοιλιοκάκη	16
1.4.2 Κληρονομικά Νοσήματα σχετιζόμενα με το πάγκρεας.....	16
1.4.2.1 Κυστική ίνωση	16
1.4.2.2 Διαβήτης	16
1.4.2.3 Σύνδρομο Shwachman-Diamond	17
1.5 Καρκίνος Παγκρέατος	17
1.5.1 Θεραπεία PDAC.....	18
1.5.2 Μοριακό Προφίλ του Καρκίνου του Παγκρέατος.....	18
1.5.3 Το Μικροπεριβάλλον του Όγκου	19
Κεφάλαιο 2	
2.Υγρή βιοψία	21
2.1 Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα	22
2.1.1 Βιολογία των CTC.....	23
2.1.2 Χαρακτηρισμός των CTC.....	24
2.1.3 Κλινική αξία των CTCs.....	24
2.2. Κύτταρα Ανοσοποιητικού Συστήματος στην κυκλοφορία του αίματος	25
2.2.1 T- λεμφοκύτταρα	25
2.2.2 Ρυθμιστικά CD4+ T κύτταρα.....	28
Κεφάλαιο 3	
Μεθοδολογία	
3.1 Στόχος της ανασκόπησης	31
3.2 Κριτήρια ένταξης των ασθενών.....	31
3.3 Μεθοδολογία μελέτης και εξαγωγής δεδομένων	31

3.3.1 Αιμοληψίες / Απομόνωση Κυττάρων αίματος.....	31
3.3.2 Κυτταρομετρία ροής (FACS analysis).....	32
3.3.3 Απομόνωση και χαρακτηρισμός CTCs.....	32
3.4 Στατιστική ανάλυση.....	33

Κεφάλαιο 4

Αποτελέσματα

4.1 Περιγραφή δεδομένων ασθενών.....	34
4.2 Σύνθεση αποτελεσμάτων	36
4.2.1 Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα	36
4.2.2 CD4+ και CD8+ T-λεμφοκύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος.....	39
4.2.3 Εργαστηριακοί βιοδείκτες.....	41
4.2.4 Ανάλυση Συσχέτισης	42
4.2.5 Ανάλυση Επιβίωσης.....	43

Κεφάλαιο 5

Συζήτηση	46
----------------	----

Κεφάλαιο 6

Συμπεράσματα.....	49
Βιβλιογραφία	50

Περίληψη

Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα αποτελεί μια επιθετική νόσο με κακή πρόγνωση και φτωχή επιβίωση. Σήμερα υπάρχει επιτακτική ανάγκη τόσο για εύρεση νέων θεραπειών όσο και νέων βιοδεικτών που θα μπορούν να επιλέγουν καλύτερα τους ασθενείς που θα ανταποκριθούν. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε ανάλυση βιοδεικτών που σχετίζονται με την υγρή βιοψία δίνοντας το πλεονέκτημα πρόβλεψης με ελάχιστα παρεμβατικό τρόπο χωρίς την ανάγκη πολύτιμου καρκινικού ιστού. Στη μελέτη εντάχθηκαν 35 ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Η μελέτη των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων έδειξε την ύπαρξη μη συνηθισμένης μορφολογίας πιθανώς σχετιζόμενη με τη μεγάλη επιθετικότητα της νόσου. Η μελέτη διαφορετικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος, έδειξε τη συσχέτιση των ανώριμων T-λεμφοκυττάρων με την επιβίωση. Επίσης φάνηκε ότι τα υψηλά ποσοστά ρυθμιστικών T κυττάρων σχετίζονται με την αρχική εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας. Συμπερασματικά η υγρή βιοψία φαίνεται να έχει σημαντική θέση στον καρκίνο του παγκρέατος. Η πραγματοποίηση νέων μελετών και η λεπτομερής ανάλυση των εν λόγω δεικτών θα επιφέρει νέα εργαλεία στην θεραπευτική φαρέτρα για την καλύτερη αντιμετώπιση και την αύξηση της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος.

Λέξεις- Κλειδιά: Καρκίνος παγκρέατος, υγρή βιοψία, κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, ανώριμα T-λεμφοκύτταρα, ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα

Abstract

Pancreatic adenocarcinoma is a very aggressive disease with poor prognosis and poor survival. Today there is an urgent need for both new treatments and new biomarkers for selection of responders. In this thesis, an analysis of biomarkers related to liquid biopsy was performed, giving the advantage of prediction in a minimally invasive way without the need for valuable cancer tissue. 35 patients with pancreatic adenocarcinoma were included in the study. The study of the circulating cancer cells showed the existence of an unusual morphology possibly related to the high aggressiveness of the disease. Studying different populations of the immune system, showed the association of immature T cells with survival. It was also shown that high rates of regulatory T cells are associated with the initial location of the primary tumor. In conclusion, liquid biopsy seems to have an important place in pancreatic cancer. The set up of new studies and the detailed analysis of these indicators will bring new tools to the quiver of doctors to better treat and increase the survival of patients with pancreatic cancer.

Key words: PDAC, Liquid biopsy, CTCs, T-naïve, Tregs

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου παγκρέατος ¹

Εικόνα 2. Σωμαικά υγρά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη υγρή βιοψία ²²

Εικόνα 3. Διαδικασία μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων 1) εντοπισμένη εισβολή 2) Ενδοαγγείωση 3) επιβίωση στην κυκλοφορία 4) εξαγγείωση και μετανάστευση 5) διέγερση της αγγειογένεσης. Εκτός από τα μεμονωμένα CTC, συστάδες CTC βρίσκονται επίσης στο αίμα των ασθενών, τα οποία έχουν σημαντικά υψηλότερο μεταστατικό δυναμικό και αυξημένη ικανότητα επιβίωσης. Τα CTC λαμβάνουν βοήθεια από τα αιμοπετάλια καθώς και από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη φάση διαφυγής ²⁷

Εικόνα 4. Η διαφοροποίηση των CD8+ T κυττάρων και των διαφορετικών υποτύπων τους ³³

Εικόνα 5. Διαφορετικοί υπότυποι CD4+ T κυττάρων. Τα διαφορετικά υποσύνολα CD4+ παράγονται από τα ανώριμα T κύτταρα με τη διαμεσολάβηση διαφορετικών κυτοκινών. Κάθε υποσύνολο CD4+ παράγει διαφορετικό τύπο ιντερλευκινών ³³

Εικόνα 6. Επιδράσεις των Tregs στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ³⁴

Εικόνα 7. Χαρακτηριστική φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού που δείχνει καρκινικά κύτταρα της σειράς H1299 τριπλά θετικά για τις πρωτεΐνες CK, CD45 και PD-L1.

Εικόνα 8. Χαρακτηριστική φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού που δείχνει καρκινικά κύτταρα απομονωμένα από ένα ασθενή της μελέτης με καρκίνο του παγκρέατος και τη μη ύπαρξη τριπλά θετικών κυττάρων για τις πρωτεΐνες CK, CD45 και PD-L1.

Εικόνα 9. Χαρακτηριστική φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού που δείχνει καρκινικά κύτταρα απομονωμένα από ένα ασθενή της μελέτης με καρκίνο του παγκρέατος και τη μη ύπαρξη τριπλά θετικών κυττάρων για τις πρωτεΐνες CK, CD45 και PD-L1 αλλά με το φαινότυπο CK⁻ CD45⁻ PD-L1⁺.

Εικόνα 10. Χαρακτηριστική φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού που δείχνει καρκινικά κύτταρα απομονωμένα από ένα ασθενή της μελέτης με καρκίνο του παγκρέατος και τη μη ύπαρξη τριπλά θετικών κυττάρων για τις πρωτεΐνες CK, CD45 και PD-L1 με φυσιολογικούς σε μέγεθος και ένταση πυρήνες.

Εικόνα 11. Ποσοστά και αριθμοί ΚΚΚ για κάθε φαινότυπο που ανιχνεύτηκαν στο σύνολο των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος.

Εικόνα 12. Ποσοστά πληθυσμών CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. HD: healthy donors (N=10); Group I: surgically treated patients (N=15); Group 2: advanced or metastatic patients (N=20); All PDAC: All patients (N=35).

Εικόνα 13. Ποσοστά πληθυσμών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. HD: healthy donors (N=10); Group I: surgically treated patients (N=15); Group 2: advanced or metastatic patients (N=20); All PDAC: All patients (N=35).

Εικόνα 14. Ποσοστά πληθυσμών ρυθμιστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. HD: healthy donors (N=10); Group I: surgically treated patients (N=15); Group 2: advanced or metastatic patients (N=20); All PDAC: All patients (N=35), **** p<0.0001.

Εικόνα 15. Επίπεδα εργαστηριακών τιμών γνωστών προγνωστικών δεικτών χολερυθρίνης (BIL TOT), του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και του καρκινικού αντιγόνου CA 19-9 πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. Group I: surgically treated patients (N=15); Group 2: advanced or metastatic patients (N=20).

Εικόνα 16. Ποσοστά πληθυσμών ρυθμιστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος σε σχέση με την εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου. Head (N=21); Body (N=6); Tail (N=4);* p=0.05.

Εικόνα 17. Σύγκριση της επιβίωσης μεταξύ των ασθενών της ομάδας 1 (N=15) και 2 (N=20). Log-rank *p=0.05; median undefined.

Εικόνα 18. Σύγκριση της επιβίωσης μεταξύ των ασθενών με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα Α) CD8⁺ ανώριμων T-κυττάρων, Β) CD3+CD4⁺ T-κυττάρων και CD4⁺ ανώριμων T-κυττάρων.

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Κλινικά δεδομένα των ασθενών της μελέτης.

Πίνακας 2. Συσχέτιση των επιπέδων των T ρυθμιστικών κυττάρων με κλινικούς παράγοντες

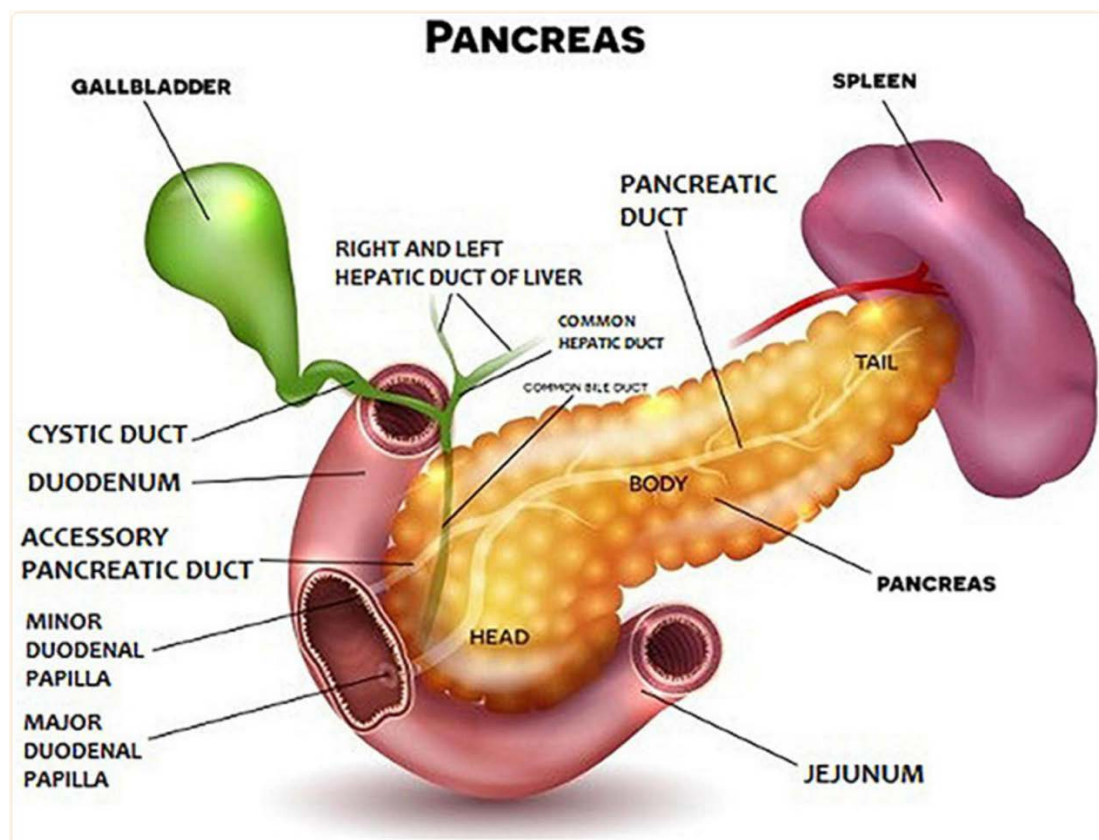
Πίνακας 3. Συσχέτιση των επιπέδων διαφορετικών πληθυσμών ανοσοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με την ολική επιβίωση.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

Το Πάγκρεας

Το πάγκρεας είναι ένας επιμήκης οπισθοπεριτοναϊκός αδένας, μήκους 12 με 15 cm στην άνω κοιλιακή χώρα αποτελούμενο τόσο από εξωκρινή όσο και από ενδοκρινική μοίρα. Το πάγκρεας χωρίζεται σε τρία μέρη: την κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Η κεφαλή βρίσκεται στην αγκύλη του δωδεκαδακτύλου, ενώ το σώμα και η ουρά περνούν μπροστά από την σπονδυλική στήλη και φτάνουν μέχρι την πύλη του σπλήνα. Η παγκρεατική έκκριση αδειάζει μέσω του παγκρεατικού πόρου που συγχωνεύεται με τους κοινούς χοληφόρους πόρους στο δωδεκαδάκτυλο μέσω της αμπούλας του Vater.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου παγκρέατος¹

1.1 Ιστολογία Παγκρέατος

Η εξωκρινής μοίρα του παγκρέατος εμπλέκεται στην πέψη και η ενδοκρινής στην έκκριση ορμονών όπως η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη. Ιστολογικά, η εξωκρινής μοίρα αποτελείται από λοβούς που αποτελούνται από πολυάριθμα ακίνια επενδεδυμένα με

επιθηλιακά κύτταρα που περιέχουν κοκκία ζυμογόνου. Κάθε βλεννογόνος αδένας παροχετεύεται από ένα μικρό πόρο που συνδέεται με μεγαλύτερους πόρους που με τη σειρά τους συνδέονται με τον κύριο παγκρεατικό πόρο. Οι κόκκοι ζυμογόνου είναι εκκριτικά κυστίδια που απελευθερώνουν θρυψινογόνο, χυμοθρυψινογόνο, προκαρβοξυπεπτιδάση, αμυλάση και λιπάση με σκοπό την πέψη των τροφών².

Η ενδοκρινική μοίρα αποτελείται από τις νησίδες Langerhans, οι οποίες είναι διάσπαρτες μεταξύ των αδένων της κυψέλης. Τρεις κύριοι τύποι κυττάρων αναγνωρίζονται σε αυτές τις νησίδες: Τα άλφα κύτταρα που παράγουν γλυκαγόνη, τα β-κύτταρα παράγουν ινσουλίνη και τα γ-κύτταρα παράγουν σωματοστατίνη.

1.2 Φυσιολογία του παγκρέατος

Τα κυψελιδικά κύτταρα εκκρίνουν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση της τροφής, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν τους παγκρεατικούς πόρους παράγουν όξινα ανθρακικά ιόντα όπου καθιστούν το pH του δωδεκαδακτύλου αλκαλικό, παρέχοντας το βέλτιστο περιβάλλον για ενζυματική δραστηριότητα.

Οι εξωκρινείς εκκρίσεις του παγκρέατος βρίσκονται υπό νευρικό και ορμονικό έλεγχο. Η νευρονική φάση διαμεσολαβείται από την διέγερση του πνευμονογαστρικού και έχει ως αποτέλεσμα την κινητοποίηση των ενζύμων από τα κυψελοειδή κύτταρα προς τους πόρους. Η ορμονική φάση πυροδοτείται από τη διέλευση του όξινου γαστρικού περιεχομένου στον αυλό του δωδεκαδακτύλου και έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση σεκρετίνης από τον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου. Η σεκρετίνη διεγείρει την έκκριση όξινων ανθρακικών ιόντων και υγρών. Τα υδρολυτικά προϊόντα πρωτεϊνών και λίπους διεγείρουν την απελευθέρωση της χολοκυστοκινίνης (παγκρεοζυμίνης), της βομβεσίνης και της νευροτενσίνης. Αυτά, με τη σειρά τους, διεγείρουν την απελευθέρωση των παγκρεατικών ενζύμων θρυψινογόνο, χυμοθρυψινογόνο, προκαρβοξυπεπτιδάση, αμυλάση, κολιπάση και λιπάση.

1.3 Ανάπτυξη της παγκρεατικής λειτουργίας

Μελέτες σε ανθρώπινα έμβρυα έχουν δείξει ότι οι κόκκοι ζυμογόνου είναι αρχικά ανιχνεύσιμοι σε μήκος εμβρύου 14 cm. Ο αριθμός και η πυκνότητα ηλεκτρονίων αυτών των κόκκων ζυμογόνου αυξάνονται καθώς το έμβρυο μεγαλώνει σε μήκος. Η

ενζυμική μέτρηση της θρυψίνης, της χυμοθρυψίνης, της λιπάσης και της φωσφολιπάσης ανιχνεύεται περίπου στο ίδιο μήκος, αυξάνοντας αργά έως ότου το έμβρυο φτάσει τα 40 cm σε μήκος. Αυτό ακολουθείται από μια δραματική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η αμυλάση απουσιάζει σε όλα τα έμβρυα.

Σε ανθρώπινα βρέφη ηλικίας μεταξύ μίας ημέρας και ενός μήνα, σημαντικές ποσότητες πρωτεασών βρίσκονται στα υγρά του δωδεκαδακτύλου. Η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β αντιπροσωπεύει το 10-25%, της χυμοθρυψίνης το 50-60% και της θρυψίνης περίπου το 90-100%, αντίστοιχα, των επιπέδων δραστηριότητας που βρίσκονται σε παιδιά ηλικίας 2 ετών και άνω. Οι βασικές συγκεντρώσεις της λιπάσης είναι ελάχιστες ανιχνεύσιμες και αυτές της αμυλάσης είναι εντελώς απύσυχες. Επιπλέον, τα νεογνά δεν ανταποκρίνονται στη διέγερση της παγκρεαιοζυμίνης σε ηλικία 1 μηνός, με ελάχιστη μόνο αύξηση στην παραγωγή χυμοθρυψίνης. Παρομοίως, η ανταπόκριση στη διέγερση της εκκριτίνης είναι ελάχιστη.

Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ξεκάθαρα ότι η πεπτική ικανότητα του βρέφους σε λίπος και άμυλο είναι λιγότερο ώριμη από εκείνη των πρωτεϊνών. Αν και η λιπάση προερχόμενη από την στοματική κοιλότητα και το μητρικό γάλα μπορεί να αντισταθμίσει εν μέρει, τα χαμηλά επίπεδα παγκρεατικής λιπάσης, μπορεί ίσως να εξηγεί ορισμένες από τις παροδικές δυσαπορροφήσεις που αναφέρονται στη βρεφική ηλικία.

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα (θρυψινογόνο, χυμοθρυψινογόνο και προκαρβοξυπεπτιδάση) απελευθερώνονται στην ανενεργή τους μορφή προκειμένου να προστατεύσουν το πάγκρεας από την αυτοπεψία. Η εντεροκινάση, μια ενδοπεπτιδάση, ενεργοποιεί το θρυψινογόνο σε θρυψίνη. Η θρυψίνη, με τη σειρά της, ενεργοποιεί το χυμοθρυψινογόνο σε χυμοθρυψίνη και την προκαρβοξυπεπτιδάση σε καρβοξυπεπτιδάση. Οι ενδοπεπτιδάσες (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και ελαστάση) διασπούν εσωτερικούς δεσμούς εντός των πρωτεϊνικών αλύσεων. Οι εξωπεπτιδάσες (καρβοξυπεπτιδάση Α και Β) διασπούν τον δεσμό δίπλα είτε στο αμινο είτε στο καρβοξυλικό άκρο. Η παγκρεατική λιπάση είναι το κύριο ένζυμο που απαιτείται για την υδρόλυση των διατροφικών τριγλυκεριδίων. Η κολιπάση είναι ένα παγκρεατικό ένζυμο που απαιτείται για την πρόληψη της αδρανοποίησης της λιπάσης από τα χολικά άλατα. Η αμυλάση λειτουργεί για την υδρόλυση των αμύλων σε ολιγομερή γλυκόζης και α-οριακές δεξτρίνες.

1.4 Διαταραχές που επηρεάζουν τις λειτουργίες του παγκρέατος

1.4.1 Φλεγμονώδεις ασθένειες

1.4.1.1 Χρόνια και οξεία παγκρεατίτιδα

Η χρόνια παγκρεατίτιδα (CP) είναι η πιο κοινή διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του παγκρέατος στους ενήλικες και η πιο κοινή παγκρεατική νόσος. Ως αποτέλεσμα της φλεγμονής, τα παγκρεατικά ένζυμα ενεργοποιούνται πρόωγα προκαλώντας βλάβη στο παρέγχυμα. Εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία, η χρόνια παγκρεατίτιδα (CP) μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Από κλινική άποψη, διακρίνονται διαφορετικοί υποτύποι CP που είναι καλά καθορισμένοι στα κλινικά τους πρότυπα και τα μορφολογικά απεικονιστικά χαρακτηριστικά: αυτοάνοση παγκρεατίτιδα, παραδωδεκαδακτυλική παγκρεατίτιδα, παγκρεατίτιδα που σχετίζεται με γονιδιακές μεταλλάξεις^{3,4}.

Διακρίνουμε δύο είδη φλεγμονής: την οξεία και τη χρόνια. Βασικός εκλυτικός παράγοντας είναι η χολολιθίαση και το αλκοολ, όπου ευθύνεται συνολικά για το 80 % των περιπτώσεων. Ένα ποσοστό 10-15% είναι ιδιοπαθής. Το 70% των περιπτώσεων ιδιοπαθούς παγκρεατίτιδας αποδίδεται σε μικρολιθίαση. Μεταβολικά αίτια είναι η υπερλιπιδαιμία και η υπερασβεστιαμία. Τα φάρμακα αποτελούν μικρο ποσοστο στην αιτιολογία της οξείας παγκρεατίτιδας. Πολλοί παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε χρόνια παγκρεατίτιδα. Μερικά από τα πιο σημαντικά είναι: η κατάχρηση αλκοόλ, το κάπνισμα, δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και τα υψηλά λιπίδια του αίματος, ορισμένες αυτοάνοσες διαταραχές και συγγενή αίτια. Όπως συμβαίνει με πολλές νοσολογικές οντότητες, το χρόνιο στρες είναι επίσης μία από τις κύριες αιτίες φλεγμονής. Με τα χρόνια, η φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμες βλάβες στο πάγκρεας, επιδεινώνοντας έτσι τις πεπτικές διαδικασίες και καταστρέφοντας τα κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη, οδηγούν στην εμφάνιση διαβήτη. Εκτός από τις διαταραχές του πεπτικού συστήματος, η CP μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη άλλων επιπλοκών (που προκύπτουν από τον υποσιτισμό) στο καρδιαγγειακό σύστημα, στα οστά και στο ανοσοποιητικό σύστημα⁵.

Η οξεία παγκρεατίτιδα εμφανίζεται απροσδόκητα χωρίς κανένα προηγούμενο σύμπτωμα. Η νόσος είναι πιο συχνή στους άνδρες και εμφανίζεται συνήθως μεταξύ

30 και 40 ετών. Οι ασθενείς συνήθως παραπονούνται για πόνο στο επιγάστριο με αντανάκλαση στην οσφύ, πιθανώς ναυτία, ζάλη και αυξημένη εφίδρωση. Τα συνήθη εργαστηριακά ευρήματα είναι η πτώση του αιματοκρίτη, λευκοκυττάρωση, υπεργλυκαιμία, αύξηση των τρανσαμινασών και υπασβαιστιαίμια. Η διάγνωση της οξείας παγκρεατίτιδας βασίζεται στην κλινική εικόνα και στην μέτρηση της αμυλάσης ορού και ούρων.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ασθένεια προκύπτει από μια κληρονομική διαταραχή του παγκρέατος ή του εντέρου. Οι επαναλαμβανόμενες οξείες προσβολές σε άτομα κάτω των 30 ετών συχνά μετατρέπονται σε χρόνια νόσο. Η κληρονομική νόσος που οδηγεί συχνότερα σε αυτή τη φλεγμονή είναι η κυστική ίνωση. Λίγες μελέτες υπάρχουν για τη μακροπρόθεσμη επιβίωση ασθενών με CP και τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι η πλειονότητα των θανάτων (60-75%) οφείλεται σε εξωπαγκρεατικά επακόλουθα και πιθανώς σε κατάχρηση αλκοόλ και καπνίσματος (π.χ. καρκίνος του πνεύμονα ή του οισοφάγου), κίρρωση του ήπατος και έμφραγμα του μυοκαρδίου⁷. Δημοσιευμένες μελέτες έδειξαν ότι η φυματίωση, οι γαστρεντερικές παθήσεις, τα κακοήγη νεοπλάσματα και οι καρδιαγγειακές παθήσεις ήταν οι πιο συχνά αναφερόμενες αιτίες θανάτου μεταξύ των ασθενών με CP.

1.4.1.2 Κοιλιοκάκη

Η κοιλιοκάκη είναι μια χρόνια ανοσοεπαγόμενη νόσος που προκαλείται από την κατανάλωση γλουτένης σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Η χρόνια φλεγμονή του λεπτού εντέρου (κυρίως της νήστιδος) οδηγεί στην ατροφία των εντερικών λαχνών, στην υπερπλασία των κρυπτών του εντερικού βλεννογόνου και στην διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα. Αν και η εξωκρινής λειτουργία του παγκρέατος είναι φυσιολογική σε αυτή τη νόσο, το μειωμένο επίπεδο απελευθέρωσης χολοκυστοκινίνης (ως αποτέλεσμα της ατροφίας των λαχνών του δωδεκαδακτύλου) συμβάλλει στην εξασθενημένη συστολή της χοληδόχου κύστης και στη μείωση της εξωκρινής έκκρισης της παγκρεατικής λειτουργίας. Έτσι, το πάγκρεας μπορεί να μην εκκρίνει σωστά ένζυμα λόγω φλεγμονής και βλάβης στο έντερο.

1.4.2 Κληρονομικά Νοσήματα σχετιζόμενα με το πάγκρεας

1.4.2.1 Κυστική ίνωση

Η κυστική ίνωση είναι μια κληρονομική νόσος κατά την οποία υπάρχει βλάβη στους παγκρεατικούς πόρους. Είναι επίσης η δεύτερη πιο κοινή αιτία EPI. Σε ασθενείς με κυστική ίνωση, τα κύτταρα του παγκρεατικού αδένου διασπώνται και γίνονται ινωτικά. Η παχύρρευστη βλέννα συσσωρεύεται στην περιοχή των παγκρεατικών πόρων. Ως αποτέλεσμα, εμφανίζεται παγκρεατική εξωκρινής και ενδοκρινική ανεπάρκεια. Η επαρκής διατροφή είναι σημαντική για τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης και της EPI. Σε αυτές τις ασθένειες, τα κύτταρα των πνευμόνων και του πεπτικού συστήματος σχηματίζουν παχιά, κολλώδη βλέννη, η οποία συμβάλλει στην απόφραξη ορισμένων οργάνων⁸. Ως αποτέλεσμα, εμποδίζεται η διέλευση των πεπτικών ενζύμων στον δωδεκαδάκτυλο, με αποτέλεσμα να μην επιτελείται σωστά η διαδικασία της πέψης.

1.4.2.2 Διαβήτης

Επί του παρόντος, ο διαβήτης είναι η τρίτη αιτία θανάτου στον κόσμο μετά την υψηλή αρτηριακή πίεση και το κάπνισμα. Υπολογίζεται ότι επηρεάζει τουλάχιστον το 8,5% περίπου του πληθυσμού και το ποσοστό αυτό αυξάνεται. Προκειμένου το ανθρώπινο σώμα να διατηρήσει το σωστό επίπεδο γλυκόζης (σάκχαρο στο αίμα) σε ένα πολύ στενό εύρος, χρειάζεται δύο ορμόνες: ινσουλίνη και γλυκαγόνη, οι οποίες εκκρίνονται από το πάγκρεας (παγκρεατικές ενδοκρινικές ορμόνες)⁹. Συχνά, η βλάβη από τη χρόνια παγκρεατίτιδα επηρεάζει επίσης τα κύτταρα στο πάγκρεας που παράγουν αυτές τις δύο ορμόνες. Αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου 1 ή τύπου 2 ¹⁰. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 είναι μια αυτοάνοση νόσος που χαρακτηρίζεται από την αδυναμία των παγκρεατικών κυττάρων να εκκρίνουν ινσουλίνη και οδηγεί σε σοβαρή αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, προκαλώντας μακροχρόνιες επιπλοκές. Περίπου το 80% όλων των περιπτώσεων σακχαρώδους διαβήτη είναι τύπου 2 σχετιζόμενος με χρόνια παγκρεατίτιδα ¹¹. Ωστόσο, ορισμένες πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι το ίδιο το EPI μπορεί επίσης να προκαλέσει διαβήτη. Η πορεία της νόσου περιπλέκεται επιπλέον από συννοσηρότητες όπως η κακή πέψη και ο συνοδός ποιοτικός υποσιτισμός.

1.4.2.3 Σύνδρομο Shwachman-Diamond

Είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσος, με βασική παθογένεια μεταλλάξεις που αδρανοποιούν το γονίδιο SBDS (7q11) και χαρακτηρίζεται από παγκρεατική εξωκρινή ανεπάρκεια. Τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Shwachman-Diamond (SDS) περιλαμβάνουν ουδετεροπενία, αναιμία και θρομβοπενία ¹². Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν τάσεις επαναλαμβανόμενης λοιμώξεως δέρματος και πνευμόνων, σκελετικές αλλαγές και αποτυχία της ανάπτυξης. Αυτό το σύνδρομο μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων στο αιμοποιητικό σύστημα..

1.5 Καρκίνος Παγκρέατος

Το Παγκρεατικό Αδενοκαρκίνωμα (PDAC) είναι η τρίτη κύρια αιτία θνησιμότητας από καρκίνο στις ΗΠΑ και η έβδομη κύρια αιτία παγκοσμίως. Η διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση στις ΗΠΑ είναι τα 71 έτη και η PDAC είναι ελαφρώς πιο συχνή στους άνδρες παρά στις γυναίκες (5,5 έναντι 4,0 ανά 100 000 άτομα). Κατά την πδιάγνωση, το 50% των ασθενών έχει μεταστατική νόσο, το 10% έως 15% έχει εντοπισμένη νόσο επιδεκτική χειρουργικής επέμβασης και οι υπόλοιποι (30%–35%) έχουν τοπικά προχωρημένη κυρίως μη εξαιρεσιμη νόσο λόγω της έκτασης της προσβολής όγκου-αγγείων¹³. Τα παγκρεατικά ενδοεπιθηλιακά νεοπλάσματα (PanINs) αναφέρονται σε προκαρκινικές βλάβες, από τις οποίες ένα μικρό κλάσμα μπορεί να εξελιχθεί σε υψηλού βαθμού δυσπλασία και PDAC. Τα χαμηλού βαθμού PanINs είναι κοινά και η δυνατότητα τους να μετατραπούν σε κακοήθεια είναι ασαφής. Σε μια αναδρομική μελέτη 584 ασθενών που υποβλήθηκαν σε παγκρεατεκτομή για μη PDAC (διάμεση ηλικία, 59 έτη), 153 ασθενείς (26%) ταυτοποιήθηκαν με PanINs. Οι περισσότεροι ασθενείς είχαν χαμηλού βαθμού PanIN-1 (50%) ή PanIN-2 (41%) και 13 (8%) είχαν PanIN-3. Κανένας από τους ασθενείς με PanIN-3 δεν ανέπτυξε καρκίνο, ενώ 1 ασθενής με PanIN-1B ανέπτυξε καρκίνο σε 4,4 χρόνια ¹⁴. Τα ενδοπορικά θηλώδη βλεννώδη νεοπλάσματα είναι πιο συχνές προκαρκινικές κυστικές αλλοιώσεις από τα PanINs και μπορούν να εμφανιστούν είτε στον κύριο είτε στον κλάδο του παγκρεατικού πόρου.

1.5.1 Θεραπεία PDAC

Από τα τέλη της δεκαετίας του '90, μελέτες έχουν υπογραμμίσει τα οφέλη μιας πολυεπιστημονικής προσέγγισης στη διαχείριση ασθενών με PDAC όσον αφορά τη διάγνωση, τη θεραπευτική ανταπόκριση, την επιβίωση και την ποιότητα ζωής. Μια ολοκληρωμένη προσέγγιση στο PDAC που περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, χημειοακτινοθεραπεία και υποστηρικτική φροντίδα θα μπορούσε να οδηγήσει σε βελτιωμένα αποτελέσματα για τους ασθενείς. Δεδομένης της προδιάθεσής του για πρόωπη διάδοση, οι ασθενείς συνήθως διαγιγνώσκονται με μεταστατική νόσο και η παρηγορητική χημειοθεραπεία είναι η μόνη προτεινόμενη, ευρέως χρησιμοποιούμενη και εγκεκριμένη θεραπευτική στρατηγική¹⁵. Ωστόσο, τα τελευταία 20 χρόνια υπήρξε μια σαφής έλλειψη σημαντικών ανακαλύψεων στη θεραπεία με PDAC. Έτσι, το PDAC χαρακτηρίζεται ως ένα νεόπλασμα με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές¹⁶. Πράγματι, οι θεραπευτικοί στόχοι στη διαχείριση PDAC δεν έχουν αλλάξει με τα χρόνια και οι τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές έχουν ήδη φτάσει τις δυνατότητές τους. Παρά την αξιοσημείωτη επιμήκυνση της συνολικής επιβίωσης (OS), με νέους συνδυασμούς χημειοθεραπείας (π.χ. FOLFIRINOX, gemcitabine/nab-paclitaxel ή NALIRIFOX) τα ποσοστά ίασης παραμένουν χαμηλά.

1.5.2 Μοριακό Προφίλ του Καρκίνου του Παγκρέατος

Η παθοφυσιολογία του PDAC χαρακτηρίζεται από πολύπλοκες γενετικές αλλοιώσεις πολλαπλών σταδίων. Στην προκαρκινική κατάσταση, τα PanIN αποκτούν συσσωρευτικές γενετικές προσβολές με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ογκογονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έναρξη και τη διατήρηση του PDAC, συμπεριλαμβανομένων των παραλλαγών KRAS, CDKN2A, TP53 και SMAD4.³¹ KRAS που εμφανίζονται ως πρώιμο βήμα στην ανάπτυξη PDAC (χαμηλού βαθμού PanINs) και εντοπίζονται στο 90% έως 92% των ατόμων με PDAC. Καθώς το PanIN εξελίσσεται, αποκτώνται πρόσθετες παραλλαγές γονιδίων σε CDKN2A, TP53 και/ή SMAD4 ¹⁷. Συλλογικά, αυτές οι γονιδιωματικές αλλοιώσεις συμβάλλουν σε πολύπλευρες μεταβολές των ογκοκατασταλτικών μηχανισμών που οδηγούν σε απορρυθμισμένη σηματοδότηση και φλεγμονή, που είναι βασικές πτυχές του PDAC. Επιπλέον, περίπου 10% έως 15% των PDAC αποκτούν παραλλαγές στα γονίδια αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF ¹⁸.

Οι πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή παθολογία και η ταξινόμηση του PDAC έχουν επηρεάσει την κλινική πρακτική. Ένα παράδειγμα είναι ο υποτύπος του PDAC σε «βασικό» ή «κλασικό» τύπο με βάση την έκφραση συγκεκριμένων μορίων RNA. Ο κλασικός υποτύπος του PDAC χαρακτηρίζεται από υψηλότερο επίπεδο διαφοροποίησης, ίνωσης και φλεγμονής, ενώ ο υποτύπος που μοιάζει με βάση σχετίζεται με φτωχότερη κλινική έκβαση και απώλεια διαφοροποίησης. Η αξία της επιλογής θεραπειών με βάση τους υποτύπους PDAC βρίσκεται υπό διερεύνηση σε προοπτικές δοκιμές. Η ανάλυση της δομής ολόκληρου του γονιδιώματος έχει παράσχει πληροφορίες για τη γονιδιωματική αστάθεια και τη σχέση με τα γονίδια συντήρησης του DNA (BRCA1/2 και PALB2). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η θεραπεία με βάση την πλατίνα και οι αναστολείς πολυμεράσης (ADP-ριβόζης) μπορεί να είναι αποτελεσματικοί για ασθενείς με παθογόνες παραλλαγές στο BRCA1/2 και το PALB2. Μια προοπτική δοκιμή που βασίζεται σε αυτές τις παρατηρήσεις οδήγησε στην έγκριση των στοχευμένων παράγοντων όπως το olaparib σε επιλεγμένους ασθενείς με παθογόνες βλαστικές παραλλαγές BRCA1/2 ¹⁹.

1.5.3 Το Μικροπεριβάλλον του Όγκου

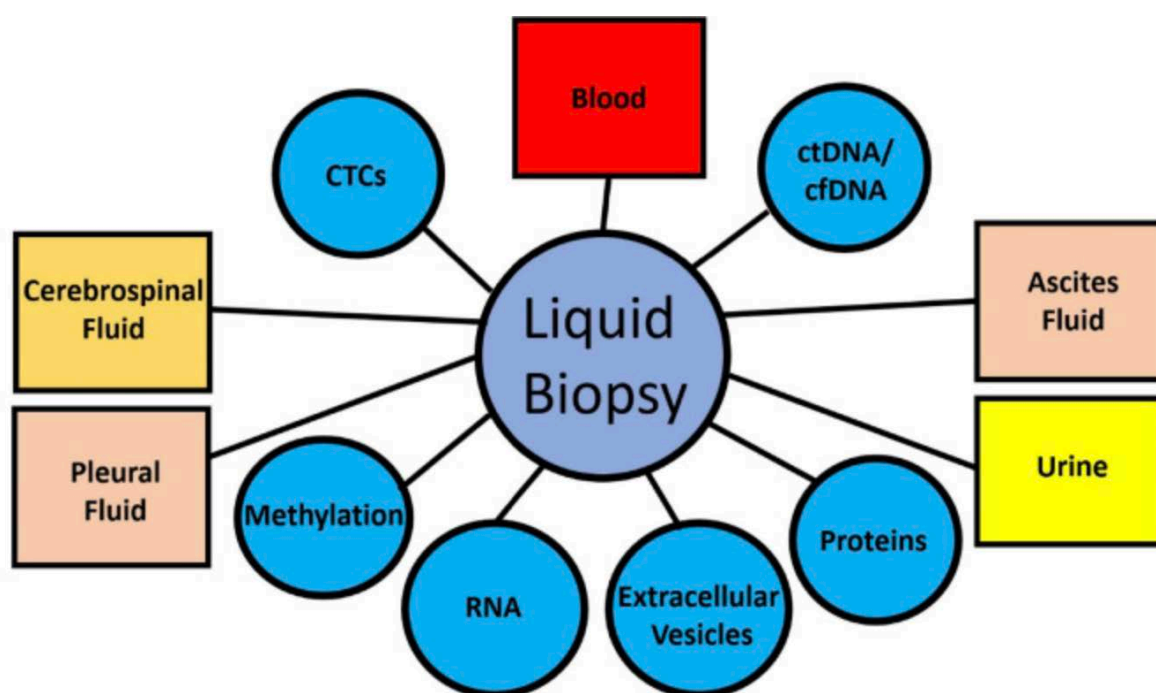
Τα κύτταρα PDAC υπάρχουν σε ένα αδιαπέραστο δίκτυο, γνωστό και ως μικροπεριβάλλον όγκου (TME), το οποίο περιλαμβάνει ανοσοκύτταρα, κυτοκίνες, μεταβολίτες, ινοβλάστες και δεσμοπλαστικό στρώμα πλούσιο σε υαλουρονίνη. Το ανοσοκατασταλτικό TME βοηθά τα κύτταρα PDAC να αποφύγουν την ανοσολογική επιτήρηση του ξενιστή. Μια ισχυρή μνήμη αντικαρκινικών T-κυττάρων ξενιστή έναντι νεοαντιγόνων PDAC έχει εντοπιστεί σε 82 επιλεγμένους μακροχρόνια επιζήσαντες της PDAC που έζησαν περισσότερα από 3 χρόνια μετά την επέμβαση ²⁰. Ωστόσο, στους περισσότερους ασθενείς, το TME καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα και ανταγωνίζεται την αντικαρκινική ανοσία του ξενιστή και προάγει την καρκινογένεση. Το TME του PDAC χαρακτηρίζεται από περιορισμένη διήθηση CD8+ T κυττάρων και αφθονία κατασταλτικών κυττάρων. Επιπλέον, η εξωκυτταρική μήτρα, που χαρακτηρίζεται από διακριτική δεσμοπλασία που προέρχεται από ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο, μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας και υαλουρονάνη, μπορεί να προάγει το ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον του TME. Αυτοί οι παράγοντες είναι υπεύθυνοι , εν μέρει, για την αντοχή στις περισσότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Πολλές κλινικές δοκιμές που βρίσκονται σε εξέλιξη έχουν σχεδιαστεί για να αυξήσουν την ευαισθησία του PDAC στο ανοσοποιητικό

σύστημα με στόχο την υπερνίκηση του ανοσοκατασταλτικού χαρακτηριστικού του TME ²¹.

Κεφάλαιο 2

2.Υγρή βιοψία

Η τεχνολογία υγρής «βιοψίας», η οποία επιτρέπει τη μοριακή εξέταση υγρών δειγμάτων (συνήθως αίματος), έχει προχωρήσει με εκπληκτική ταχύτητα, διευκολύνοντας την κλινική πρακτική σε ασθενείς με καρκίνο και διευρύνοντας γρήγορα τις ερευνητικές δυνατότητες που αποκαλύπτουν τη βάση της κακοήθους ανάπτυξης. Οι υγρές βιοψίες είναι ελάχιστα επεμβατικές και παρέχουν μια μεθοδολογία για τη λήψη πληροφοριών που προέρχονται από όγκους μέσω ανάλυσης σωματικών υγρών. Υπάρχουν πολλά σωματικά υγρά που μπορούν να υποβληθούν σε βιοψία. Ωστόσο, το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο υγρό είναι το αίμα.



Εικόνα 2. Σωματικά υγρά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη υγρή βιοψία ²²

Το κυκλοφορούν DNA (απαλλαγμένο από κύτταρα DNA, cfDNA) και το κυκλοφορούν καρκινικό DNA του όγκου (ctDNA) μπορούν να απομονωθούν από το αίμα. Το cfDNA είναι DNA που κυκλοφορεί ελεύθερα στο αίμα, το οποίο μπορεί να είναι ή όχι προέλευσης όγκου, ενώ το ctDNA προέρχεται από τον όγκο. Τα

κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) μπορούν επίσης να απομονωθούν από το αίμα. Αυτά είναι κύτταρα που εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος από όγκους και συνήθως επιβιώνουν μόνο για 1-2,5 ώρες στην κυκλοφορία πριν από την καταστροφή από το ανοσοποιητικό σύστημα, αλλά ένα μικρό κλάσμα μπορεί να επιβιώσει και να δημιουργήσει μακρινές μεταστατικές θέσεις. Το ctDNA/cfDNA μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας αλληλουχίση επόμενης γενιάς (NGS) ²³. Τα CTCs μπορούν να απομονωθούν με διάφορες τεχνικές και να χαρακτηριστούν τόσο φαινοτυπικά όσο και μοριακά. Ένα επιπλέον οργανίδιο που ανήκει στη υγρή βιοψία και η σημαντική προβλεπτική του αξία στον καρκίνο διαφαίνεται τα τελευταία χρόνια είναι τα εξωσώματα. Τα εξωσώματα είναι εξωκυτταρικά κυστίδια που δημιουργούνται από όλα τα κύτταρα και μεταφέρουν νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια και μεταβολίτες. Είναι μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας και επηρεάζουν διάφορες πτυχές της κυτταρικής βιολογίας ²⁴.

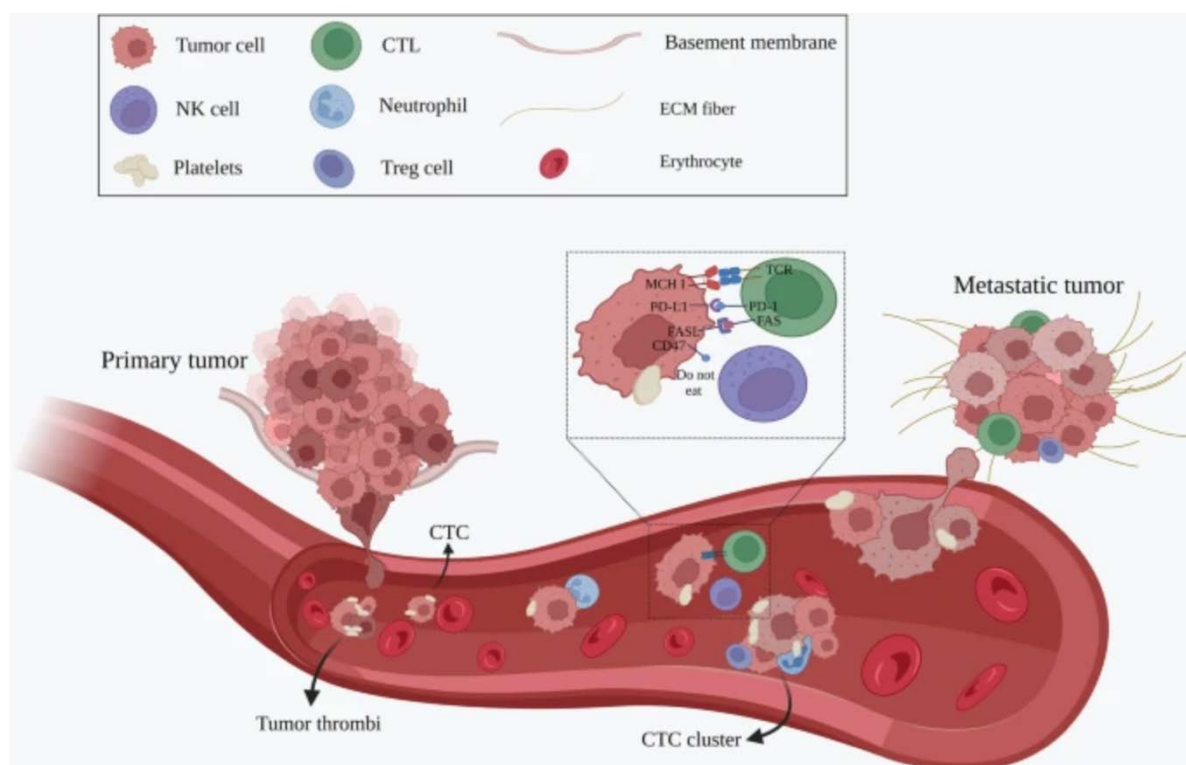
2.1 Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα

Στον καρκίνο, η μετάσταση είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει ενδοαγγείωση, εξαγγείωση, μετανάστευση και αναγέννηση, κατά την οποία καρκινικά κύτταρα από έναν πρωτογενή όγκο αποσπώνται και εισβάλλουν σε απομακρυσμένους ιστούς χρησιμοποιώντας την κυκλοφορία του αίματος ως σύστημα μεταφοράς. Τα κύτταρα που διαχωρίζονται από τον πρωτοπαθή όγκο και ταξιδεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ονομάζονται κυκλοφορούντα κύτταρα όγκου (CTCs) ²⁵. Η κατανόηση του ρόλου τους στη μετάσταση μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη θεραπευτική διαχείριση. Επιπλέον, τα CTC μπορούν να εξαχθούν για την ανίχνευση των βιολογικών χαρακτηριστικών και του μοριακού τύπου των πρωτοπαθών καρκινικών κυττάρων. Τα CTC αναφέρθηκαν για πρώτη φορά ως η παρουσία κυττάρων στο αίμα που είχαν το ίδιο μέγεθος, σχήμα και εμφάνιση με αυτά στους πρωτογενείς όγκους πριν από 150 χρόνια το 1869 από τον Ashworth Thomas Ramsden ²⁶. Έκτοτε, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην εξερεύνηση και την ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνικών ανίχνευσης καθώς τα CTC είναι μη επεμβατικά και προσβάσιμα και θα μπορούσαν να ξεπεράσουν το πρόβλημα της ετερογένειας του όγκου. Σημαντικά άλματα στην ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των CTC έχουν επιτευχθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες με νέες μεθόδους και συσκευές που αναδύονται για την ανάλυση CTC. Ωστόσο, πολλές προκλήσεις σχετίζονται με την απομόνωση, την αποκόλληση και την ανίχνευση των CTC. Πρώτον, τα CTC είναι σπάνια, περίπου 1-100 κύτταρα μαζί με 10⁶-10⁸ ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να

βρεθούν ανά χιλιοστόλιτρο αίματος ²⁷. Δεύτερον, καθώς τα καρκινικά κύτταρα είναι ετερογενή, υπάρχει μια ποικιλία ομάδων CTC με σημαντικές διακυμάνσεις στην έκφραση βιοδεικτών στην επιφάνειά τους. Επομένως, δεν είναι εύκολο να αναγνωρίσουμε διαφορετικούς τύπους CTC με το ίδιο πρότυπο.

2.1.1 Βιολογία των CTC

Τα CTCs θεωρείται ότι αποσπώνται από έναν πρωτοπαθή όγκο και διέρχονται από την κυκλοφορία του αίματος που μπορεί να αντανάκλα μετάσταση, και αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη διαγνωστική και προγνωστική τους σημασία. Μέσω ορισμένων πρόσφατα αναπτυγμένων τεχνολογιών υψηλής απόδοσης, μπορούμε να απομονώσουμε αυτά τα κύτταρα από το αίμα και να διεξάγουμε έρευνα σε επίπεδο ενός κυττάρου. Κατά τη διάρκεια της νόσου ή της θεραπείας, τα CTC μπορούν να παρέχουν μια ακριβή, δυναμική και σχετική με τη θεραπεία μέθοδο για τη θεραπεία του καρκίνου.



Εικόνα 3. Διαδικασία μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων 1) εντοπισμένη εισβολή 2) Ενδοαγγείωση 3) επιβίωση στην κυκλοφορία 4) εξαγγείωση και μετανάστευση 5) διέγερση της αγγειογένεσης. Εκτός από τα μεμονωμένα CTC, συστάδες CTC βρίσκονται επίσης στο αίμα των ασθενών, τα οποία έχουν σημαντικά υψηλότερο μεταστατικό δυναμικό και αυξημένη ικανότητα επιβίωσης. Τα CTC λαμβάνουν βοήθεια

από τα αιμοπετάλια καθώς και από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη φάση διαφυγής ²⁷.

2.1.2 Χαρακτηρισμός των CTC

Η απομόνωση των CTCs επιτρέπει την ανάλυση του μοριακού και λειτουργικού τους χαρακτηρισμού καθώς τα CTC είναι βιοχημικά διαφορετικά από τα κύτταρα του αίματος. Ένα από τα πιο κοινά επιφανειακά μόρια στα CTCs είναι το μόριο προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων (EpCAM), το οποίο προέρχεται από το επιθήλιο. Το EpCAM είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που υπάρχει στο 80% των στερεών καρκίνων (όπως ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη), αλλά απουσιάζει στα περιφερικά αιμοσφαίρια. Εναλλακτικές λύσεις όπως η κερατίνη 19, το ειδικό για τον όγκο αντιγόνο 9 και τα πεπτίδια που απελευθερώνουν προγαστρίνη έχουν επίσης αναφερθεί. Ομοίως, πολλοί ανοσολογικοί δείκτες του όγκου, όπως το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), ο υποδοχέας ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) και ο υποδοχέας του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (EGFR), μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως αντισώματα για την ειδική αναγνώριση των CTCs ²⁷.

2.1.3 Κλινική αξία των CTCs

Τα CTC τα τελευταία χρόνια λαμβάνουν μεγάλη απήχηση για τα πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα που μπορεί να έχουν ως βιοδείκτες στον καρκίνο. Οι υψηλότεροι αριθμοί CTC στο περιφερικό αίμα των ασθενών έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με κακή πρόγνωση σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου, του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου του πνεύμονα ²⁸. Έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία ≥ 3 CTC ανά 7,5 mL περιφερικού αίματος είναι ισχυρός προγνωστικός παράγοντας μείωσης της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη (PFS), ενώ η ανίχνευση < 3 CTCs ανά 7,5 mL υποδεικνύει καλύτερη συνολική επιβίωση (OS) ²⁹. Οι αρχικοί αριθμοί CTC καθώς και οι πρώιμες αλλαγές μετά την έναρξη της θεραπείας σχετίζονται στενά με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου, τον αριθμό των μεταστάσεων και τη μείωση του PFS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού³⁰. Οι αριθμοί των CTCs αυξάνονται επίσης με την εξέλιξη του όγκου και την ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων .

Η ανίχνευση των CTCs είναι μια πιθανή νέα προσέγγιση για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας. Πράγματι, τα αποτελέσματα μελετών που δημοσιεύθηκαν τα τελευταία 5 χρόνια, στις οποίες

συμμετείχαν χιλιάδες ασθενείς με καρκίνο του μαστού, έδειξαν ότι οι μετρήσεις CTC πριν και μετά τη νεοεπικουρική θεραπεία είναι προγνωστικές για τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου ³¹. Οι ασθενείς με ≥ 4 CTC ήταν πιο πιθανό να είναι ανθεκτικοί στη χημειοθεραπεία από εκείνους με < 4 CTC, υποδεικνύοντας ότι ο αριθμός CTC είναι ένας πολλά υποσχόμενος δείκτης στην αξιολόγηση των βιολογικών δραστηριοτήτων και της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνωμα (GC). Συμπερασματικά, τα CTCs παίζουν σημαντικό ρόλο στην έγκαιρη ανίχνευση, τη δυναμική παρακολούθηση, την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και την κρίση της πρόγνωσης.

2.2. Κύτταρα Ανοσοποιητικού Συστήματος στην κυκλοφορία του αίματος

Το ανοσοποιητικό σύστημα προστατεύει το σώμα από παθογόνα και ξένες ουσίες και περιλαμβάνει ένα πολύπλοκο δίκτυο κυττάρων, ιστών και οργάνων. Η κατανομή των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος μέσα στο σώμα είναι βασικός καθοριστικός παράγοντας για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού και τη συνολική υγεία. Διαφορετικά κύτταρα έχουν διαφορετικούς ρόλους και πρέπει να υπάρχουν σε κατάλληλους αριθμούς για να υπάρξει αποτελεσματική απόκριση. Ωστόσο, η κατανομή είναι δύσκολο να χαρακτηριστεί ολιστικά λόγω της ετερογένειας των πληθυσμών ανοσοκυττάρων και της πολύπλοκης οργάνωσης των ιστών και οργάνων του ανοσοποιητικού.

Η ομάδα των τύπων ανθρώπινων ανοσοκυττάρων είναι διαφορετική ωστόσο δύο από τις πιο βασικές κατηγορίες είναι τα λεμφοειδή και μυελοειδή.

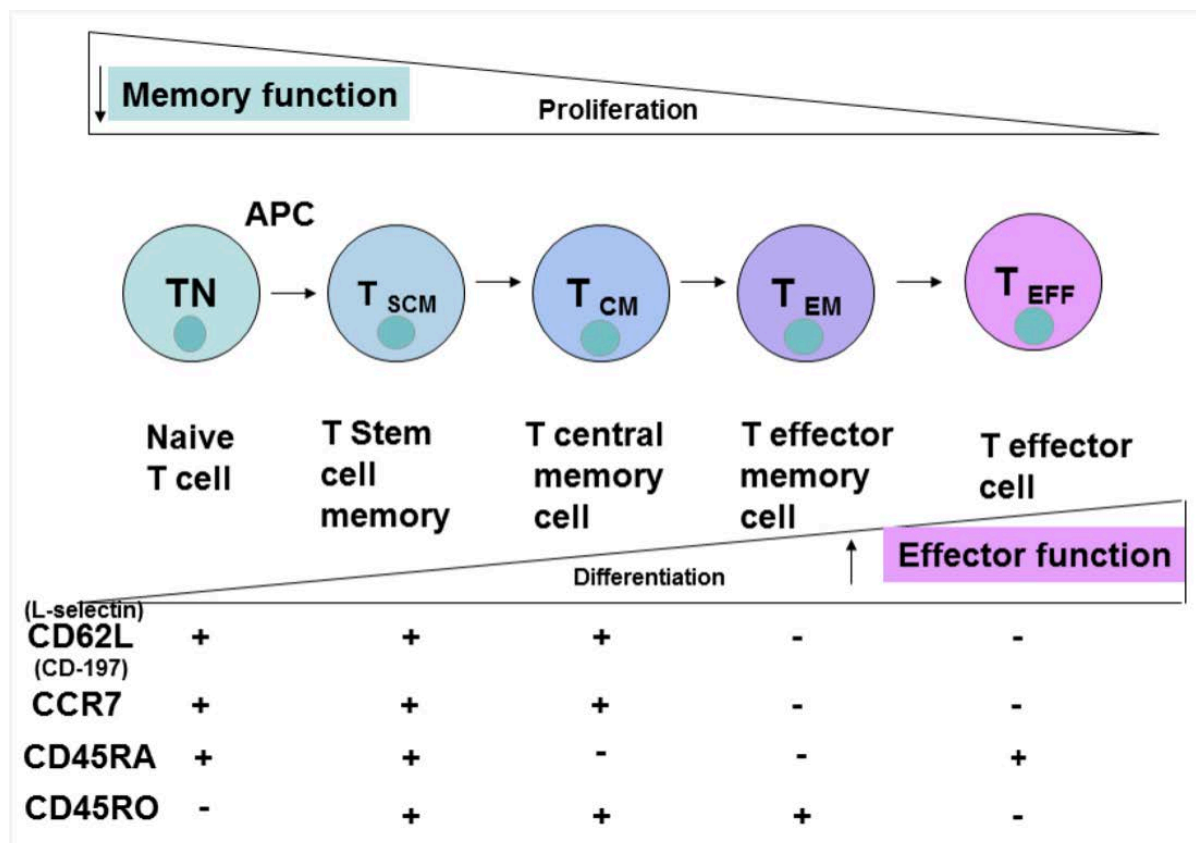
Θεωρούμε τέσσερις κύριους τύπους λεμφοκυττάρων: T κύτταρα, B κύτταρα, NK κύτταρα και πλασματοκύτταρα.

2.2.1 T- λεμφοκύτταρα

Τα T λεμφοκύτταρα είναι οι κύριοι τελεστές του ανοσοποιητικού συστήματος. Μετακινούνται αποτελεσματικά μέσω του λεμφατικού συστήματος και σαρώνουν σχεδόν όλα τα μέρη του σώματος για ανεπιθύμητο ή ξένο υλικό. Τα ανώριμα (naïve) και τα T κύτταρα τελεστές (effectors) είναι συνεπώς μετανάστες υψηλής εξειδίκευσης με κεντρικό ρόλο στην επιτήρηση του ανοσοποιητικού και στην ανάπτυξη προσαρμοστικής ανοσίας έναντι λοιμώξεων και καρκίνου. Οι μεταγραφικοί

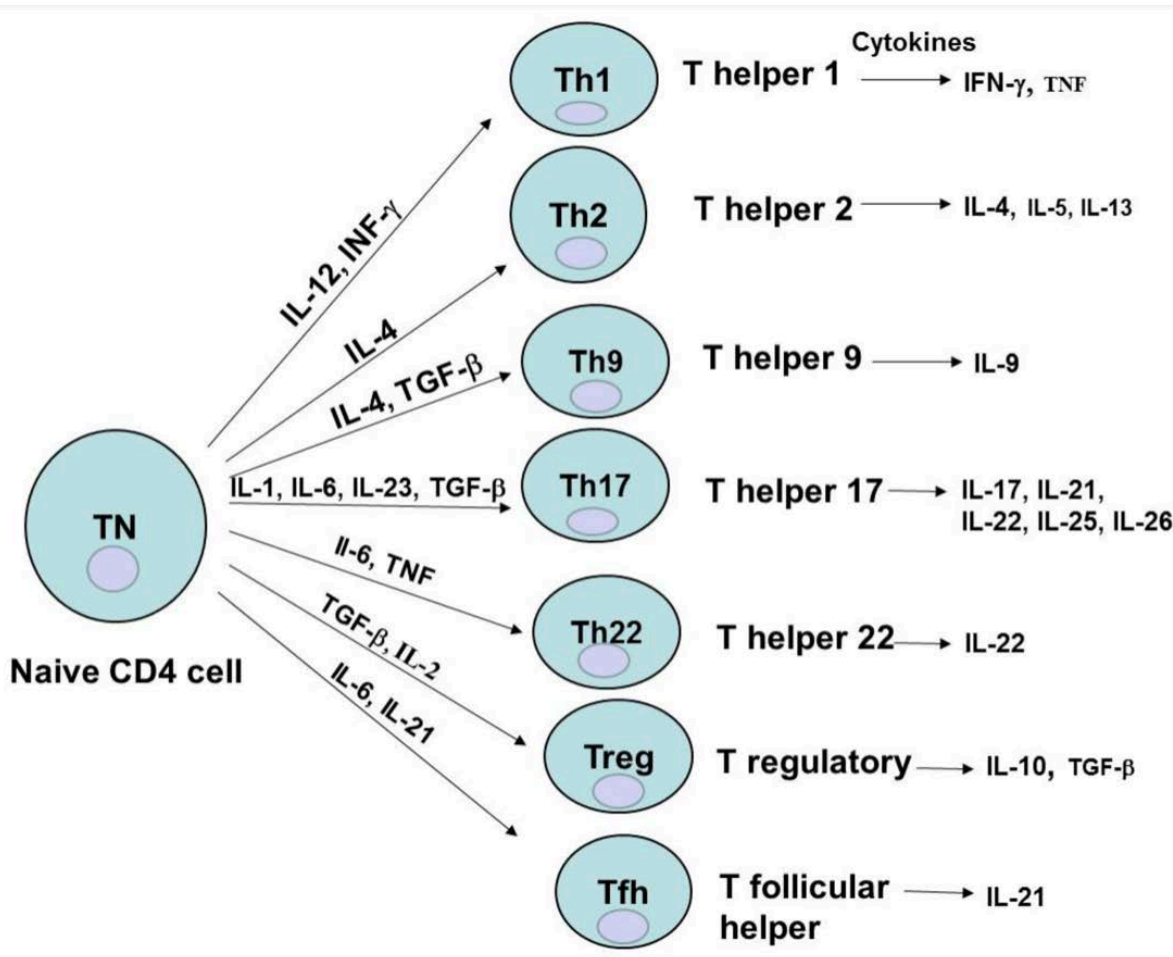
παράγοντες, οι κυτοκίνες, οι χημειοκίνες, οι ιντεγκρίνες και τα μεταβολικά σήματα ρυθμίζουν αυστηρά τη διαφοροποίηση και τους φαινότυπους των T κυττάρων και οι γενεαλογίες T-κυττάρων θεωρούνται σταθερές και αλληλοαποκλειόμενες. Τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T κύτταρα είναι κύριοι δολοφόνοι παθογόνων και νεοπλασματικών κυττάρων, με τα CD4⁺ T κύτταρα να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της απόκρισης των CD8⁺ καθώς και στην πρόληψη της εξάντλησής τους. Με σκοπό την ενεργοποίησή τους, τα CD8⁺ T κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα κύρια μόρια του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC class I) στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) και των κυττάρων-στόχων, τα οποία εμφανίζουν τμήματα αντιγονικών πεπτιδίων που παράγονται από πρωτεασωμική αποικοδόμηση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που συνδέονται στις αντίστοιχες αύλακες σύνδεσης πεπτιδίων. Τα σύμπλοκα MHC-αντιγόνου-πεπτιδίου αναγνωρίζονται από κύτταρα CD8⁺, τα οποία, κατά την εμπλοκή ενός APC ή ενός κυττάρου στόχου, προσκολλώνται σε αυτό και σαρώνουν την επιφάνειά του. Η άμεση επαφή και οι κινήσεις των κυττάρων μετατρέπουν τη μηχανική ενέργεια σε βιολογικά σήματα που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του συμπλέγματος των υποδοχέων T-κυττάρων CD8⁺ (TCR). Τα κύτταρα σχηματίζουν ανοσολογικές συνάψεις οι οποίες είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Για να επιβεβαιώσουν τη φύση του στόχου, ο TCR και το CD8, ενεργώντας ως συν-υποδοχέας, εμπλέκονται με το πεπτίδιο που παρουσιάζεται και την υπομονάδα MHC-α, αντίστοιχα. Μετά τη μεταγωγή του σήματος ενεργοποίησης στον TCR, πρέπει να ληφθεί ένα συνδιεγερτικό σήμα από τον συν-υποδοχέα CD28 προτού ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός κυτταροτοξικότητας ³².

Υπάρχουν διαφορετικοί υπό τύποι CD8⁺ T κυττάρων οι οποίοι προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των ανώριμων T κυττάρων (naïve) στο θύμο αδένα (Εικόνα 4). Τα διαφορετικά υποσύνολα των CD8⁺ T κυττάρων φαίνονται στο Σχήμα 4. Κατά την ενεργοποίηση των ανώριμων T κυττάρων, μόλις αναγνωρίσουν αντιγόνα στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων προκύπτουν διαφορετικοί υπό τύποι κυττάρων μνήμης (T memory) καθώς και εκτελεστικών κυττάρων (T effectors). Οι υπότυποι αυτοί διαφέρουν ως προς τις κυτταροκίνες που εκκρίνουν, το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους, την έκφραση διαφορετικών υποδοχέων στην επιφάνειά τους και φυσικά την κυτταροτοξική τους ικανότητα ³³.



Εικόνα 4. Η διαφοροποίηση των CD8+ T κυττάρων και των διαφορετικών υποτύπων τους ³³

Ομοίως με τα CD8+ T κύτταρα, τα CD4+ T κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους τη CD4 γλυκοπρωτεΐνη και ονομάζονται CD4 κύτταρα (βοηθητικά T κύτταρα). Τα κύτταρα CD4+ διαφοροποιούνται επίσης σε διαφορετικούς υπότυπους. : Th (T helper)1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg (ρυθμιστικά T κύτταρα) και Tfh (θυλακιώδη βοηθητικά T κύτταρα), τα οποία χαρακτηρίζονται από διαφορετικά προφίλ κυτοκίνης (Εικόνα 5). Αυτοί οι διαφορετικοί υπότυποι των CD4+ T κυττάρων παίζουν κρίσιμο ρόλο στις λειτουργίες ανοσολογικής απόκρισης και τελεστικής απόκρισης των T κυττάρων.



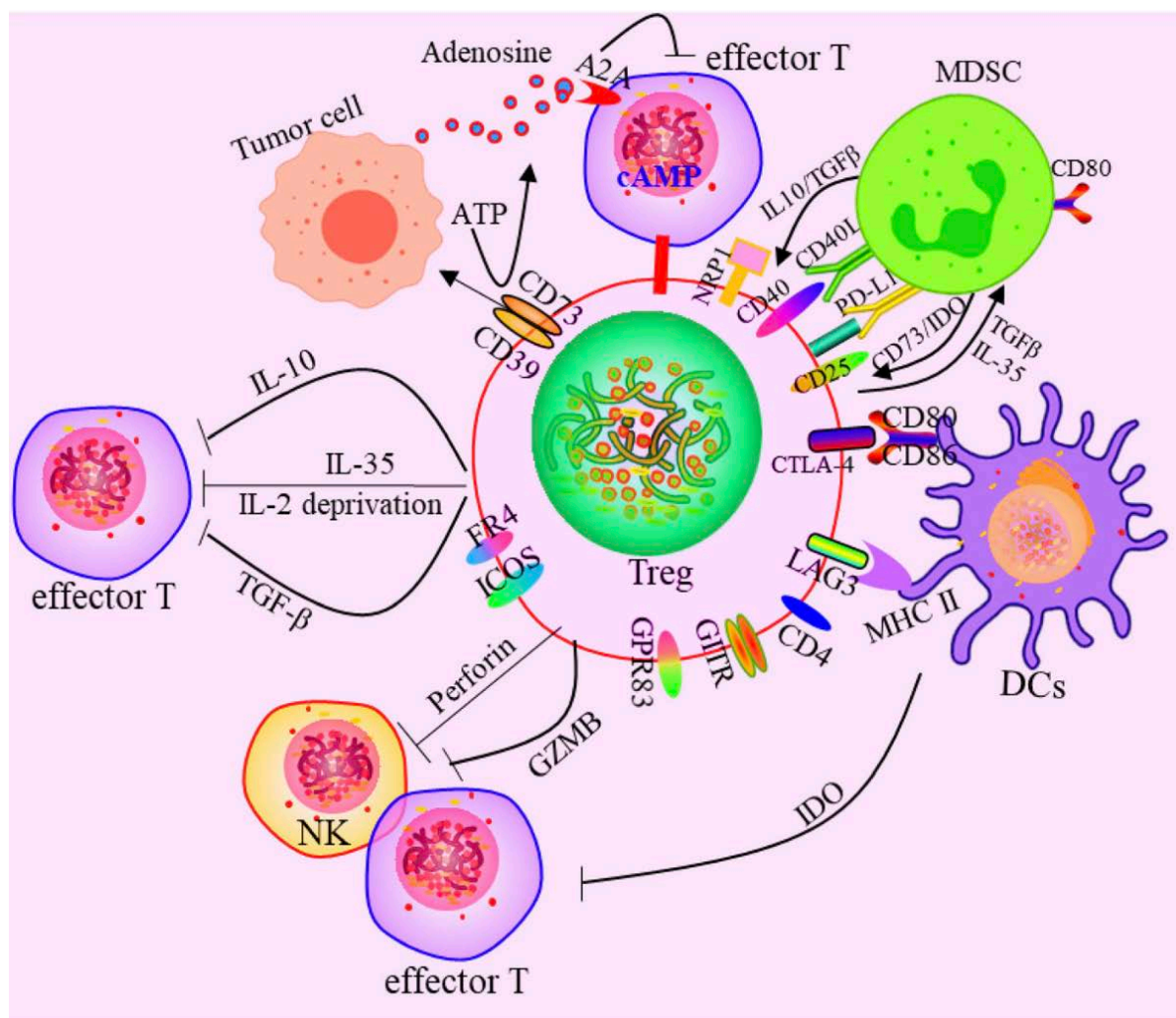
Εικόνα 5. Διαφορετικοί υπότυποι $CD4^+$ T κυττάρων. Τα διαφορετικά υποσύνολα $CD4^+$ παράγονται από τα ανώριμα T κύτταρα με τη διαμεσολάβηση διαφορετικών κυτοκινών. Κάθε υποσύνολο $CD4^+$ παράγει διαφορετικό τύπο ιντερλευκινών (Πηγή: Golubovskaya et al 2016).

2.2.2 Ρυθμιστικά $CD4^+$ T κύτταρα

Μια σημαντική κατηγορία των $CD4^+$ T κυττάρων είναι τα ρυθμιστικά $CD4^+$ T κύτταρα (Tregs) καθώς έχουν ανοσοκατασταλτική δράση. Φυσιολογικά, αποτελούν σημαντικό μηχανισμό για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος και της ανοσολογικής ανοχής του οργανισμού, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της ανοσίας του όγκου και αποτελούν ένα τρέχον ερευνητικό hotspot στο πεδίο, κυρίως ως δυνητικοί στόχοι που μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των $CD4^+$ βοηθητικών T κυττάρων και των $CD8^+$ κυτταροτοξικών T κυττάρων. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου (TME), τα Tregs μπορούν να παραχθούν και να διαφοροποιηθούν από τα παραδοσιακά T κύτταρα, και δύναται να αναστείλουν την αντικαρκινική ανοσία και προάγουν την εμφάνιση και την ανάπτυξη όγκων. Τα Tregs μπορούν επίσης να καταστείλουν τη

λειτουργία των ανοσοεπαγωγικών κυττάρων μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών και είναι βασικοί παράγοντες για την ανοσολογική διαφυγή του όγκου ³⁴.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1970, η έννοια των κατασταλτικών T κυττάρων προτάθηκε σαφώς και το 1975, ορισμένοι ερευνητές υπέθεσαν ότι τα κατασταλτικά T κύτταρα μπορεί να σχετίζονται στενά με την εμφάνιση και την ανάπτυξη όγκων. Μόλις το 1980 οι ερευνητές επιβεβαίωσαν την παρουσία κατασταλτικών T κυττάρων σε μια σειρά μελετών. Το 1990, η κλωνοποίηση κατασταλτικών T κυττάρων πραγματοποιήθηκε με επιτυχία για πρώτη φορά, η οποία επιβεβαίωσε την ύπαρξη κατασταλτικών T κυττάρων έναντι της ανοσίας του όγκου *in vivo* ³⁵. Το 1995, οι Sakaguchi et al. βρήκε ότι η αλυσίδα σύνδεσης του υποδοχέα IL-2, δηλαδή το μόριο CD25, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επιφανειακός δείκτης των κατασταλτικών T κυττάρων και η έννοια του Tregs προτάθηκε ξεκάθαρα (Sakaguchi et al 2007). Ωστόσο, αργότερα, οι Shimon Sakaguchi et al. διαπίστωσε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας (Foxp3) εκφραζόταν συγκεκριμένα στο Tregs και το CD4+CD25+Foxp3+ θεωρείται επί του παρόντος ως ένας κλασικός συνδυασμένος δείκτης των Tregs ³⁶. Στην πραγματικότητα, εκτός από την ικανότητά του να επισημαίνει Tregs, το Foxp3 ελέγχει κυρίως τη λειτουργία Tregs και μόνο η συνεχής έκφρασή του εγγυάται τη διατήρηση της πλήρους κατασταλτικής ικανότητας Tregs. Αν και το Foxp3 είναι ένας παράγοντας μεταγραφής, η ακριβής λειτουργία του παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Έχει προταθεί ότι το Foxp3 μπορεί να λειτουργήσει ως καταστολέας της μεταγραφής κατά την ενεργοποίηση. Έχει επίσης προταθεί ότι όλα τα ανθρώπινα CD4+ και CD8+ T κύτταρα μπορεί να ρυθμίζουν προς τα πάνω το Foxp3 και να αποκτούν κατασταλτικές ιδιότητες κατά την ενεργοποίηση. Διαπιστώθηκε επίσης ότι ο αριθμός των Tregs στους όγκους σχετιζόταν στενά με την εξέλιξη και την πρόγνωση των όγκων και βρέθηκε ότι ήταν ένας καλός δείκτης αναφοράς για την πρόγνωση του όγκου ³⁷. Η ειδική εξάλειψη των Tregs *in vivo* μπορεί να διεγείρει αποτελεσματικά την αντινεοπλασματική ανοσοαπόκριση ασθενών με όγκο. Από το 2006, ο ρόλος των Tregs στην ανοσία του όγκου και οι μηχανισμοί τους έχουν μελετηθεί περαιτέρω. Στη διαδικασία της ανοσολογικής διαφυγής του όγκου, τα Tregs μπορεί να εκκρίνουν TGF-β, IL-10 και IL-35 που ρυθμίζουν προς τα κάτω την αντινεοπλασματική ανοσία, καταστέλλουν την παρουσίαση αντιγόνου από τα DCs. Άλλες λειτουργίες των Tregs περιλαμβάνουν την άμεση καταστροφή άλλων κυττάρων με την έκκριση περφορίνης και γρανζύμου και τη σύνθεση και απελευθέρωση κυκλικής φωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) για παρεμβολή στο μεταβολισμό άλλων κυττάρων.



Εικόνα 6. Επιδράσεις των *Tregs* στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ³⁴

3.1 Στόχος ανασκόπησης

Στόχο της παρούσας μελέτης, αποτέλεσε η διερεύνηση της προβλεπτικής ικανότητας δεικτών υγρής βιοψίας και κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην κυκλοφορία για ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. Πιο συγκεκριμένα CTCs και T λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από το αίμα ασθενών με PDAC πριν τη χορήγηση θεραπείας. Κύριος στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση της ικανότητας πρόβλεψης της επιβίωσης και της απάντησης των ασθενών στην θεραπεία με ελάχιστα παρεμβατικό τρόπο.

3.2 Κριτήρια ένταξης ασθενών και κριτήρια αποκλεισμού

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν συνολικά 35 ασθενείς με PDAC από το Παν/κό Γενικό Νοσ/μείο Λάρισας (Παν/κή Ογκολογική Κλινική).

Τα κριτήρια ένταξης των ασθενών ήταν :

1) Ηλικία >18 ετών, 2) ιστολογικά επιβεβαιωμένη διάγνωση PDAC, 3) κλινικό στάδιο I ή II ή III χειρουργήσιμο (ομάδα 1) ή στάδιο III ή IV ανεγχείρητο (ομάδα 2) , 4) ο ασθενείς να μην έχει λάβει προηγούμενη θεραπεία για τη νόσο, 5) γενική κατάσταση (Performance Status κατά ECOG) 0-2, και 6) έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς.

Τα κριτήρια αποκλεισμού των ασθενών ήταν : 1) Ηλικία <18 ετών, 2) μη ιστολογικά επιβεβαιωμένη διάγνωση PDAC, 3) ο ασθενείς να έχει λάβει προηγούμενη θεραπεία για τη νόσο, 5) γενική κατάσταση (Performance Status κατά ECOG) >2 και 6) χωρίς έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς.

3.3 Μεθοδολογία μελέτης και εξαγωγής δεδομένων

3.3.1 Αιμοληψίες / Απομόνωση Κυττάρων αίματος

20 ml περιφερικού αίματος λήφθηκαν από όλους τους ασθενείς πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας (baseline). Από αυτά τα 10 ml χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) ενώ τα υπόλοιπα 10 ml για την απομόνωση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.

Η απομόνωση των PBMCs πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος φικόλης πυκνότητας 1,077g/ml. Πιο συγκεκριμένα 10 ml ολικού περιφερικού αίματος

αραιώθηκαν με διάλυμα PBS (Phosphate buffered saline) σε αναλογία 1:1 και στη συνέχεια το αραιωμένο αίμα προστέθηκε στην επιφάνεια διαλύματος *φικόλης*. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 350 g σε RT για 20 λεπτά και έπειτα τα PBMCs αφαιρέθηκαν από το διάλυμα. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις των κυττάρων με διάλυμα PBS έτσι ώστε να απομακρυνθούν πλήρως τα υπολείμματα *φικόλης* και τα κύτταρα παγώθηκαν σε διάλυμα 10% DMSO και αποθηκεύτηκαν στους -80 για μετέπειτα ανάλυση.

3.3.2 Κυτταρομετρία ροής (FACS analysis)

Με σκοπό τον χαρακτηρισμό και την καταμέτρηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην κυκλοφορία των ασθενών πραγματοποιήθηκε χρώση με χαρακτηριστικά αντισώματα έναντι γνωστών δεικτών για κάθε πληθυσμό κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα για τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα αντισώματα έναντι των : CD3, CD8, CD45RA, CD45RO, CCR7, PD-1, για τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα: CD3, CD4, CD45RA, CD45RO, PD-1 και για τα Tregs: CD3, CD4, CD25, CD127, FOXP3, CTLA4. Οι χρώσεις πραγματοποιήθηκαν με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις των αντισωμάτων σε διάλυμα κυτταρομετρίας 1% PBS-BSA, για 30 min στον πάγο στο σκοτάδι. Επιπλέον για τον μεταγραφικό παράγοντα FOXP3 η ενδοκυττάρια χρώση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το kit BD transcription buffer set, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάλυση των υποπληθυσμών πραγματοποιήθηκε στο κυτταρόμετρο του εργαστηρίου Ογκολογίας Melody (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

3.3.3 Απομόνωση και χαρακτηρισμός CTCs

Η απομόνωση και ανάλυση των CTCs πραγματοποιήθηκε μέσω διαφορικής φυγοκέντρησης Ficoll-Hypaque. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τριπλού φθορισμού για τους δείκτες CK/PD-L1/CD45, στα δείγματα των ασθενών, χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα αντισώματα. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο τεχνολογίας VyCAP όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Xagara et al 2024).

Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκε μία αντικειμενοφόρος πλάκα από κάθε ασθενή για την ταυτοποίηση των CTC και την αξιολόγηση της έκφρασης του PD-L1. Τα κύτταρα του κάθε ασθενή σταθεροποιήθηκαν και έγιναν διαπερατά με παγωμένη ακετόνη:μεθανόλη 9:1 (v/v) για 15 λεπτά. Η μη ειδική δέσμευση αποφεύχθηκε με αποκλεισμό με 5% FBS σε PBS στους 4 °C και επώαση όλη τη νύχτα. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα επώαστηκαν για 1 ώρα με το αντίσωμα ποντικού αντι-CD45

συζευγμένο με Alexa 647 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Το CD45 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός δείκτης για CTC. Οι αντικειμενοφόροι επωάστηκαν περαιτέρω με αντι-PD-L1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) για 1 ώρα, ακολουθούμενα από δευτερεύον αντίσωμα Alexa 488 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) για 45 λεπτά. Το αντίσωμα ποντικού A45-B/B3 χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των κυτοκερατινών (CKs) 8/18/19 (Amgen, Southern Oaks, CA, USA), το Alexa 555 anti-mouse χρησιμοποιήθηκε ως δευτερεύον αντίσωμα (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) για 45 λεπτά. Τα δείγματα τελικά τοποθετήθηκαν σε μέσο διατήρησης του φθορισμού (Prolong) που περιέχει DAPI για την πυρηνική απεικόνιση. Τα χρωματισμένα κύτταρα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα μικροσκοπίας VyCAP έκδοση 1.5.1 (VyCAP B.V., Enschede, The Netherlands). Εκτός από τη χρώση με CK, κυτταρομορφολογικά κριτήρια που περιγράφονται από τους Meng et al., 2004, (όπως υψηλή αναλογία πυρηνικού/κυτταροπλασματικού και μεγαλύτερα κύτταρα από τα λευκά αιμοσφαίρια), συνεκτιμήθηκαν προκειμένου να χαρακτηριστεί ένα κύτταρο ως CTC.

3.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism έκδοση 6.0 (GraphPad Institute Inc., San Diego, CA, USA). Η συνολική επιβίωση (OS) ορίστηκε ως ο χρόνος από την εγγραφή στη μελέτη μέχρι το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία ή μέχρι την τελευταία παρακολούθηση που ο ασθενής αναφέρθηκε ζωντανός. Η επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) ορίστηκε ως ο χρόνος μεταξύ της εγγραφής στη μελέτη και της υποτροπής της νόσου ή του θανάτου, ό,τι και αν συνέβη πρώτο. Η ανάλυση Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για να συσχετίσει τους φαινοτύπους των ανοσοκυττάρων με τα κλινικά αποτελέσματα των ασθενών, με τις ομάδες να συγκρίνονται χρησιμοποιώντας τη δοκιμή log-rank. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney U. Οι δοκιμές συσχέτισης του Spearman χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ των επιπέδων των ελεγχμένων τύπων ανοσοκυττάρων. Για την ανάλυση PFS και OS, τα ποσοστά των ανοσοκυττάρων χωρίστηκαν σε χαμηλά και υψηλά χρησιμοποιώντας τα όρια που ορίστηκαν από τις καμπύλες χαρακτηριστικών λειτουργιών του δέκτη (ROC). Η ανάλυση παλινδρόμησης Cox χρησιμοποιήθηκε για να συσχετίσει διαφορετικές κλινικές παραμέτρους με την επιβίωση. Οι διαφορές και οι συσχετίσεις θεωρήθηκαν σημαντικές όταν $p < 0,05$. Όλες οι τιμές p ήταν διπλής όψης.

Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα

4.1 Περιγραφή δεδομένων ασθενών

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 35 ασθενείς με PDAC οι οποίοι επισκέφτηκαν την Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ). Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ομάδες ως εξής: Ομάδα 1 (Group 1), 15 ασθενείς με εξαιρεσιμή νόσο αρχικού σταδίου (στάδιο I,II,III) οι οποίοι μετά το χειρουργείο έλαβαν επικουρική χημειοθεραπεία με Folfirinox ή Gemcitabine/ Capecitabine και Ομάδα 2 (Group 2), 20 ασθενείς με τοπικά εκτεταμένη ή μεταστατική νόσο (στάδιο III,IV) οι οποίοι έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με Folfirinox ή Gemcitabine/ Abraxane (Πίνακας 1).

***Πίνακας 1.** Κλινικά δεδομένα των ασθενών της μελέτης.*

	% of patients		
	Total (N=35)	Group 1 (N=15)	Group 2 (N=20)
Age			
Median (range)	72 (44-86)	63 (44-82)	75,5 (44-86)
<65	34.2% (12 / 35)	60% (9 / 15)	15% (3 / 20)
>65	65.8% (23 / 35)	40 % (6 / 15)	85% (17 / 20)
Location			
Head	60% (21/35)	66.6% (10/15)	55% (11/20)
Body	20% (7/35)	20% (3/15)	20% (4/20)
Tail	11.5% (4/35)	0% (0/15)	20% (4/20)
N/A	8.5% (3/35)	13.4%(2/15)	5% (1/20)
Gender			
Male	45.7% (16/35)	60% (9/15)	35% (7/20)
Female	54.3% (19/35)	40% (6/15)	65% (13/20)
Laboratory Tests			
Median BIL Tot (range)	0.83 (0.2 to 7.1)	0.8 (0.2 to 3)	0.83 (0.3 to 7.1)
Median CEA (range)	4.1 (1.1 to 45019)	2.28 (1.1 to 45019)	9 (1.4 to 411)
Median CA 19-9 (range)	278 (1 to 47619)	29.5 (1 to 45022)	1000 (2 to 47619)

Από όλους (N=35) τους ασθενείς της μελέτης η μέση ηλικία ήταν τα 72 έτη με εύρος από 44 έως 86 έτη. Το 34.2% των ασθενών (12/35) είχε ηλικία μικρότερη των 65 ετών ενώ το 65.8% των ασθενών είχε ηλικία μεγαλύτερη των 65 ετών. Η ανάλυση της εντόπισης του όγκου στο όργανο του παγκρέατος έδειξε ότι στο μεγαλύτερο ποσοστό αυτών 60% ο όγκος εντοπιζόταν στην κεφαλή, στο 20% στο σώμα και στο

11.5% στην ουρά του παγκρέατος. Σχετικά με το φύλο, το 45.7% των ασθενών ήταν άνδρες ενώ το 54.3% γυναίκες. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ανάλυση κάποιων εργαστηριακών τιμών με προγνωστική αξία πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας. Η μέση τιμή της χολερυθρίνης βρέθηκε να είναι 0.83 με ένα εύρος τιμής από 0.2 έως 7.1). Η μέση τιμή του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) βρέθηκε στο 4.1 με εύρος από 1.1 έως 45019 ενώ η μέση τιμή του καρκινικού αντιγόνου CA 19-9 υπολογίστηκε στο 278 με εύρος από 1 έως 47619 (Πίνακας 1).

Για τους ασθενείς της ομάδας 1 (ασθενείς με εξαιρετική νόσο) (N=15) η μέση ηλικία ήταν τα 63 έτη με εύρος από 44 έως 82 έτη. Το 60% των ασθενών (9/15) είχε ηλικία μικρότερη των 65 ετών ενώ το 40% των ασθενών είχε ηλικία μεγαλύτερη των 65 ετών. Η ανάλυση της εντόπισης του όγκου στο όργανο του παγκρέατος έδειξε ότι στο μεγαλύτερο ποσοστό αυτών 66.6% ο όγκος εντοπιζόταν στην κεφαλή και στο 20% στο σώμα του παγκρέατος ενώ για 2 ασθενείς δεν υπήρχε η πληροφορία. Σχετικά με το φύλο, το 60% των ασθενών ήταν άνδρες ενώ το 40% γυναίκες. Επιπλέον η μέση τιμή της χολερυθρίνης βρέθηκε να είναι 0.8 με ένα εύρος τιμής από 0.2 έως 3). Η μέση τιμή του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) βρέθηκε στο 2.28 με εύρος από 1.1 έως 45019 ενώ η μέση τιμή του καρκινικού αντιγόνου CA 19-9 υπολογίστηκε στο 29.5 με εύρος από 1 έως 45022 (Πίνακας 1).

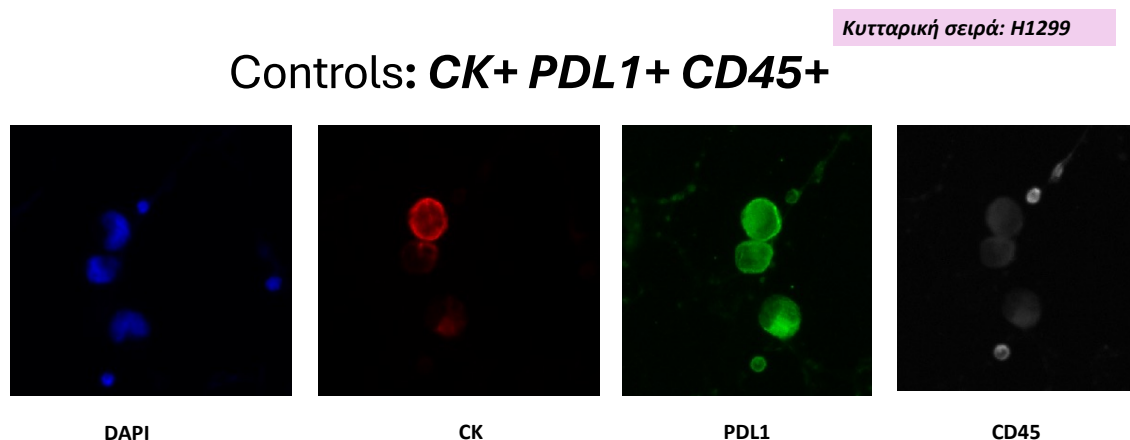
Για τους ασθενείς της ομάδας 2 (ασθενείς με τοπικά εκτεταμένη ή μεταστατική νόσο) (N=20) η μέση ηλικία ήταν τα 75.5 έτη με εύρος από 44 έως 86 έτη. Το 15% των ασθενών (3/20) είχε ηλικία μικρότερη των 65 ετών ενώ το 85% αυτών είχε ηλικία μεγαλύτερη των 65 ετών. Η ανάλυση της εντόπισης του όγκου στο όργανο του παγκρέατος έδειξε ότι στο μεγαλύτερο ποσοστό αυτών 55% ο όγκος εντοπιζόταν στην κεφαλή, στο 20% στο σώμα, στο 20% στην ουρά του παγκρέατος. Σχετικά με το φύλο, το 35% των ασθενών ήταν άνδρες ενώ το 65% γυναίκες. Η μέση τιμή της χολερυθρίνης βρέθηκε να είναι 0.83 με ένα εύρος τιμής από 0.3 έως 7.1). Η μέση τιμή του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) βρέθηκε στο 9 με εύρος από 1.4 έως 411 ενώ η μέση τιμή του καρκινικού αντιγόνου CA 19-9 υπολογίστηκε στο 1000 με εύρος από 2 έως 47619 (Πίνακας 1).

4.2 Σύνθεση αποτελεσμάτων

4.2.1 Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα

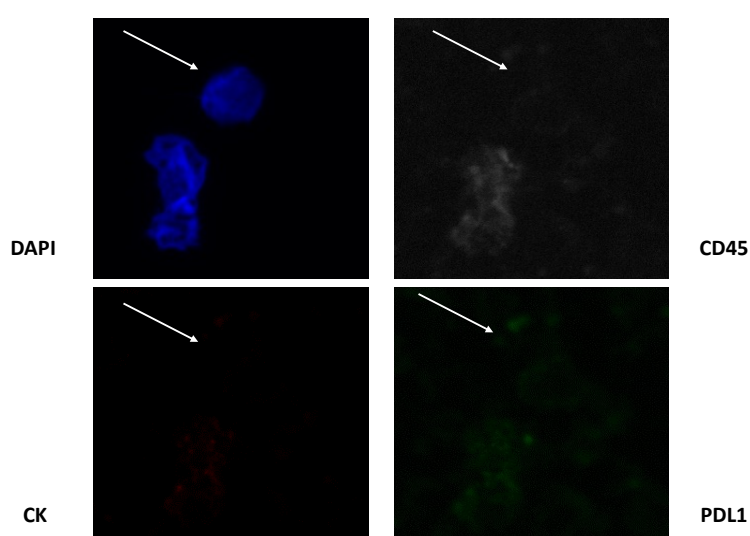
Με σκοπό την εύρεση των κατάλληλων εργαστηριακών τεχνικών για τη σωστή χρώση και χαρακτηρισμό των ΚΚΚ, αρχικά πραγματοποιήθηκε χρώση σε κύτταρα της καρκινικής σειράς H1299. Η καρκινική σειρά H1299 έχει δημιουργηθεί από καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα ενός άνδρα ασθενή 43 ετών. Είναι ένα πολύ καλό μοντέλο για την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών χρώσης των ως προς μελέτη αντισωμάτων (θετικός μάρτυρας) καθώς εκφράζει τις πρωτεΐνες CK, CD45 και PD-L1 σε υψηλά επίπεδα. Η πρωτεΐνη της κυταροκερατίνης CK ανήκει στην οικογένεια των ενδιάμεσων ινιδίων και θεωρείται σημαντικό συστατικό του κυτταροσκελετού του επιθηλίου. Πιο σημαντικά αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς δείκτες των ΚΚΚ καθώς εκφράζεται σε αυτά. Το CD45 είναι ένα μόριο που εκφράζεται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων και χρησιμοποιείται στην ανάλυση των ΚΚΚ για τον διαχωρισμό τους από τα κύτταρα του αίματος. Επιπρόσθετος η χρωστική DAPI προσδένεται στο DNA των κυττάρων και κατ' επέκταση χρησιμοποιείται στην μικροσκοπία φθορισμού για την απεικόνιση των πυρήνων. Τέλος η πρωτεΐνη PD-L1 αποτελεί τον κύριο υποδοχέα του προσδέτη PD-1, μονοπάτι που οδηγεί στην καταστολή της κυτταροτοξικής ικανότητας των T-κυττάρων και κύριος στόχος της ανοσοθεραπείας με αναστολείς των σημείων ελέγχου.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, εντοπίζονται κύτταρα τα οποία είναι θετικά και για τις 3 πρωτεΐνες.



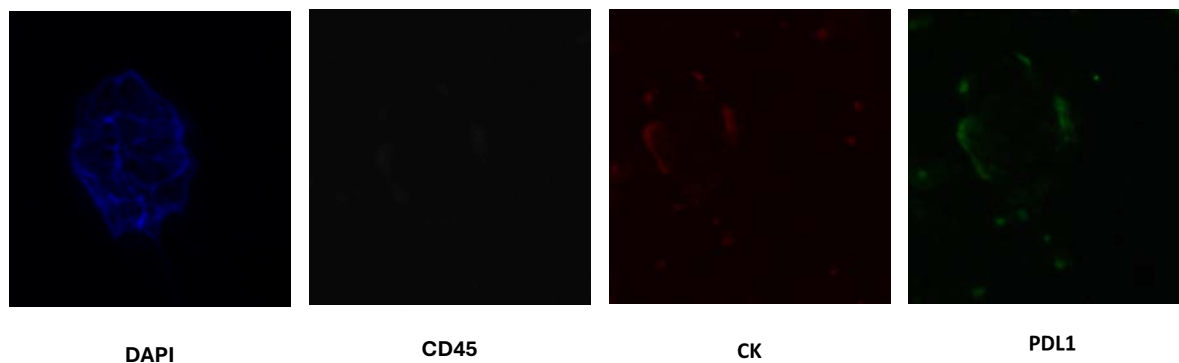
***Εικόνα 7.** Χαρακτηριστική φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού που δείχνει καρκινικά κύτταρα της σειράς H1299 τριπλά θετικά για τις πρωτεΐνες CK, CD45 και PD-L1.*

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε χρώση των ΚΚΚ που απομονώθηκαν από τους ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε αρχικά ότι εντοπίζονται αρκετά κύτταρα με αραιοχρωματικούς μεγάλου μεγέθους πυρήνες. Η συγκεκριμένη μορφολογία των πυρήνων έχει συσχετιστεί από πολλές μελέτες με καρκινικά κύτταρα τα οποία είναι πιο επιθετικά. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα αυτά δεν εξέφραζαν τις πρωτεΐνες CK και CD45 ενώ τα επίπεδα φθορισμού του PD-L1 ήταν αρκετά χαμηλά (φαινότυπος CK⁻ CD45⁻ PD-L1^{low}) (Εικόνα 8).



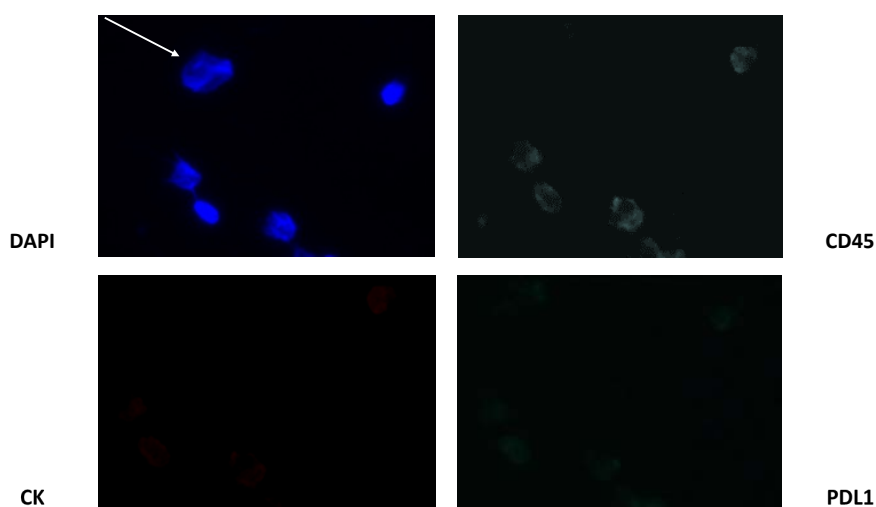
Εικόνα 8. Χαρακτηριστική φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού που δείχνει καρκινικά κύτταρα απομονωμένα από ένα ασθενή της μελέτης με καρκίνο του παγκρέατος και τη μη ύπαρξη τριπλά θετικών κυττάρων για τις πρωτεΐνες CK, CD45 και PD-L1.

Επίσης, παρατηρήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν εξέφραζαν τις πρωτεΐνες CK και CD45 ενώ τα επίπεδα φθορισμού του PD-L1 ήταν υψηλά/φυσιολογικά (φαινότυπος CK⁻ CD45⁻ PD-L1⁺) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Χαρακτηριστική φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού που δείχνει καρκινικά κύτταρα απομονωμένα από ένα ασθενή της μελέτης με καρκίνο του παγκρέατος και τη μη ύπαρξη τριπλά θετικών κυττάρων για τις πρωτεΐνες CK, CD45 και PD-L1 αλλά με το φαινότυπο CK⁻ CD45⁻ PD-L1⁺.

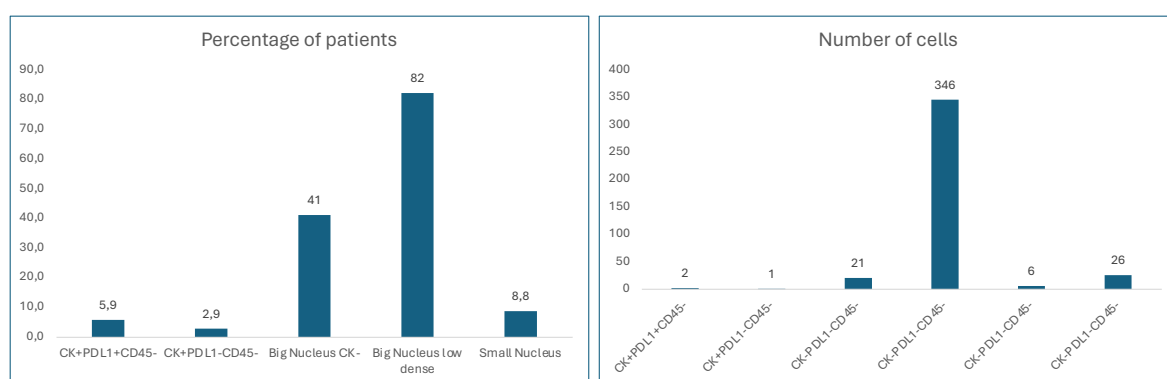
Σε άλλους ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος παρατηρήθηκε και μια επιπλέον μορφολογία των κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα είχαν φυσιολογικούς σε μέγεθος και ένταση της χρωστικής DAPI πυρήνες, χωρίς ωστόσο να εκφράζουν κάποιο από τους δείκτες που μελετήθηκαν (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Χαρακτηριστική φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού που δείχνει καρκινικά κύτταρα απομονωμένα από ένα ασθενή της μελέτης με καρκίνο του παγκρέατος και τη μη ύπαρξη τριπλά θετικών κυττάρων για τις πρωτεΐνες CK, CD45 και PD-L1 με φυσιολογικούς σε μέγεθος και ένταση πυρήνες.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης και των 35 ασθενών της μελέτης φαίνονται στην Εικόνα 11. Πιο συγκεκριμένα από το σύνολο των ΚΚΚ στα δείγματα όλων των

ασθενών παρατηρήθηκε ότι ανιχνεύονται σε μεγαλύτερο ποσοστό 82% κύτταρα με πυρήνα μεγάλου μεγέθους και χαμηλής πυκνότητας (αραιοχρωματική). Επιπλέον, το 41% των κυττάρων είχε μεγάλο φυσιολογικό πυρήνα και δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη CK. Σε πολύ μικρότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν κύτταρα με μικρό πυρήνα (8.8%). Πιο σημαντικά, τα ποσοστά των κυττάρων με φαινότυπο KKK δηλαδή CK^+CD45^- , φαινότυπος που αντιπροσωπεύει τα KKK σε άλλα νεοπλάσματα όπως καρκίνος του πνεύμονα του μαστού κ.α εντοπίστηκε για το σύνολο των ασθενών στο σύνολο των πλακιδίων σε ποσοστό 5,9% (PD-L1+) και 2,9%(PD-L1-). Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα υποδεικνύει τη ιδιαιτερότητα του καρκίνου του παγκρέατος και την ανάγκη για έρευνα σχετικά με τους δείκτες των KKK που μπορούν να τα χαρακτηρίσουν.



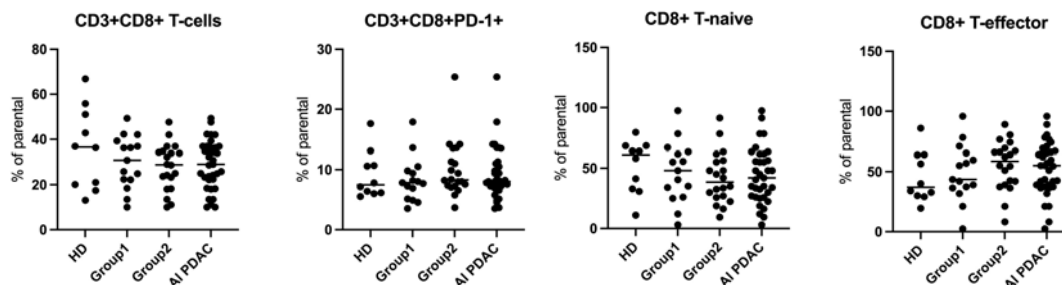
Εικόνα 11. Ποσοστά και αριθμοί KKK για κάθε φαινότυπο που ανιχνεύτηκαν στο σύνολο των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος.

4.2.2 $CD4^+$ και $CD8^+$ T-λεμφοκύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος

Με σκοπό την ανάλυση των ποσοστών και του φαινοτύπου των επαγωγικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στους 35 ασθενείς της μελέτης πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής σε κύτταρα PBMCs των ασθενών πριν τη χορήγηση θεραπείας (baseline). Ταυτόχρονα αναλύθηκαν κύτταρα από 10 υγιής δότες (HD) της μονάδας αιμοδοσίας του ΠΓΝΛ.

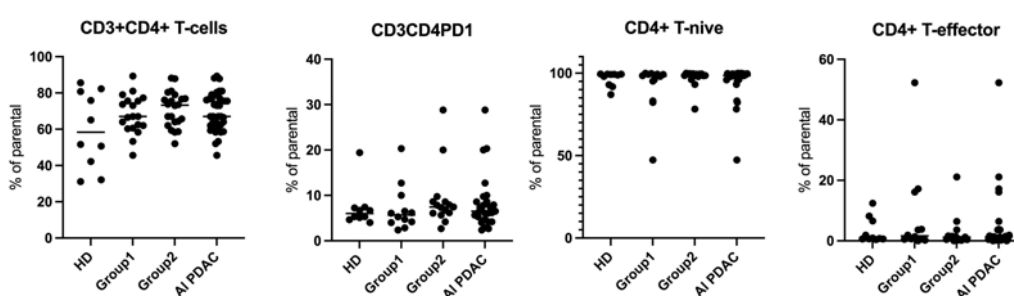
Λεπτομερής σύγκριση του ποσοστού διαφορετικών υποπληθυσμών των $CD8^+$ T-λεμφοκυττάρων μεταξύ υγιών δοτών, ασθενών με εξαιρεσίμη νόσο, ασθενών με

εκτεταμένη ή μεταστατική μη εξαιρεσίμη νόσο και όλων των ασθενών της μελέτης με καρκίνο του παγκρέατος δεν έδειξε καμία διαφορά (t-test non-significant, $p>0.05$) (Εικόνα 12).



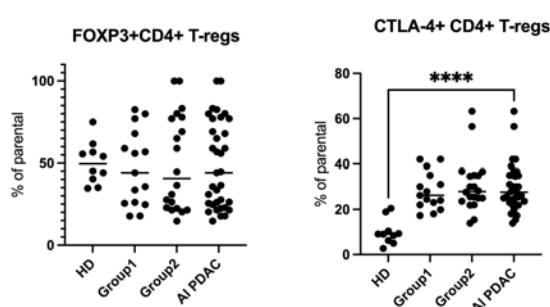
Εικόνα 12. Ποσοστά πληθυσμών CD8+ T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. HD: healthy donors (N=10); Group 1: surgically treated patients (N=15); Group 2: advanced or metastatic patients (N=20); All PDAC: All patients (N=35).

Επιπλέον, συγκρίθηκαν τα ποσοστά διαφορετικών υποπληθυσμών των CD4+ T-λεμφοκυττάρων μεταξύ υγιών δοτών, ασθενών με εξαιρεσίμη νόσο, ασθενών με εκτεταμένη ή μεταστατική μη εξαιρεσίμη νόσο και όλων των ασθενών της μελέτης με καρκίνο του παγκρέατος δεν έδειξε καμία διαφορά (t-test non-significant, $p>0.05$) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Ποσοστά πληθυσμών CD4+ T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. HD: healthy donors (N=10); Group 1: surgically treated patients (N=15); Group 2: advanced or metastatic patients (N=20); All PDAC: All patients (N=35).

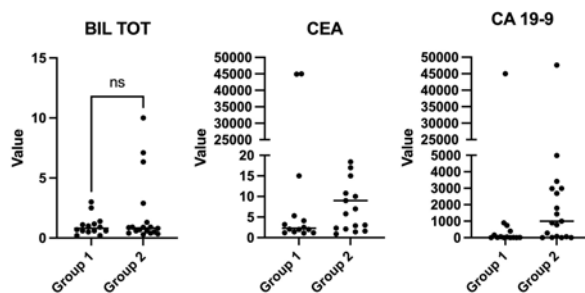
Ακολούθως, αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν τα ποσοστά των ρυθμιστικών CD4⁺ T-κυττάρων (Tregs) τα οποία έχουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Οι συγκρίσεις μεταξύ υγιών δοτών, ασθενών με εξαιρεσιμη νόσο, ασθενών με εκτεταμένη ή μεταστατική μη εξαιρεσιμη νόσο και όλων των ασθενών της μελέτης με καρκίνο του παγκρέατος δεν έδειξε καμία σημαντική διαφορά των κυττάρων που εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα FOXP3 (t-test non-significant, $p>0.05$) (Εικόνα 14). Πιο σημαντικά η ανάλυση των CTLA-4⁺ Treg κυττάρων υπέδειξε σημαντικά αυξημένα ποσοστά στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες (t-test, **** $p<0.0001$), χωρίς να υπάρχει διαφορά στα ποσοστά μεταξύ των ασθενών των 2 ομάδων (Group 1 vs Group 2 t-test non-significant, $p>0.05$) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Ποσοστά πληθυσμών ρυθμιστικών CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. HD: healthy donors (N=10); Group 1: surgically treated patients (N=15); Group 2: advanced or metastatic patients (N=20); All PDAC: All patients (N=35), **** $p<0.0001$.

4.2.3 Εργαστηριακοί βιοδείκτες

Η σύγκριση των επιπέδων εργαστηριακών τιμών με προγνωστική αξία πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας όπως της χολερυθρίνης (BIL TOT), του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και του καρκινικού αντιγόνου CA 19-9 μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Επίπεδα εργαστηριακών τιμών γνωστών προγνωστικών δεικτών χολερυθρίνης (BIL TOT), του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και του καρκινικού αντιγόνου CA 19-9 πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. Group 1: surgically treated patients (N=15); Group 2: advanced or metastatic patients (N=20).

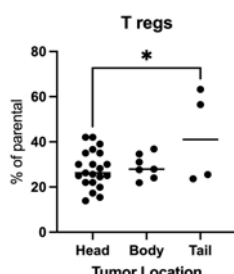
4.2.4 Ανάλυση Συσχέτισης

Καθώς τα ποσοστά των CTLA-4+ Treg κυττάρων βρέθηκε να είναι σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των ποσοστών των κυττάρων και των εργαστηριακών βιοδεικτών. Από την ανάλυση συσχέτισης δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων που αναλύθηκαν (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Συσχέτιση των επιπέδων των T ρυθμιστικών κυττάρων με κλινικούς παράγοντες

		CTLA4+ Tregs
BIL TOT	Spewrman r	-0,07398
	p- value	0,6874
	95% CI	-0,4209 to 0,2919
CEA	Spewrman r	-0,01764
	p- value	0,9224
	95% CI	-0,3680 to 0,3371
CA 19-9	Spewrman r	0,07683
	p- value	0,6708
	95% CI	-0,2835 to 0,4181
Age	Spewrman r	-0,09152
	p- value	0,6011
	95% CI	-0,4207 to 0,2589

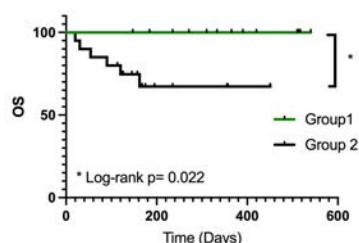
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των ποσοστών των T ρυθμιστικών κυττάρων σε σχέση με την αρχική εντόπιση του όγκου. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά Tregs στους ασθενείς στους οποίους ο όγκος εντοπίζεται στην ουρά του παγκρέατος (N=4) σε σχέση με την κεφαλή (N=21) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Ποσοστά πληθυσμών ρυθμιστικών $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος σε σχέση με την εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου. Head (N=21); Body (N=6); Tail (N=4); * $p=0.05$.

4.2.5 Ανάλυση Επιβίωσης

Με σκοπό την εύρεση πιθανών νέων παραγόντων που σχετίζονται με την επιβίωση των ασθενών πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις επιβίωσης. Αρχικά οι ασθενείς χωρίστηκαν στις 2 ομάδες και δημιουργήθηκαν καμπύλες Kaplan–Meier. Από την ανάλυση φάνηκε, όπως αναμενόταν, ότι ασθενείς της ομάδας 1 (Group1, N=15, ασθενείς με πρώιμη νόσο που αντιμετωπίστηκαν χειρουργικά και στη συνέχεια έλαβαν χημειοθεραπεία) επιβιώνουν σημαντικά περισσότερο από τους ασθενείς της ομάδας 2 (Group2, N=20, ασθενείς με τοπικά εκτεταμένη ή μεταστατική νόσο που έλαβαν χημειοθεραπεία) (Εικόνα 17).



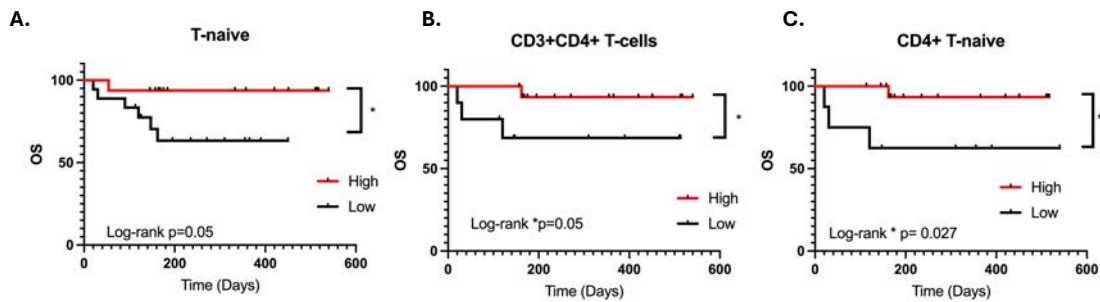
Εικόνα 17. Σύγκριση της επιβίωσης μεταξύ των ασθενών της ομάδας 1 (N=15) και 2 (N=20). Log-rank * $p=0.05$; median undefined.

Επίσης, διερευνήθηκε εάν τα υψηλά ή χαμηλά ποσοστά κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο περιφερικό αίμα των ασθενών πριν από την έναρξη της θεραπείας σχετίζονται με διαφορά στην επιβίωση των ασθενών. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ROC χρησιμοποιώντας τα ποσοστά κυττάρων των υγιών δοτών. Από την συγκεκριμένη ανάλυση προέκυψαν τα κατώφλια κάθε πληθυσμού κυττάρων τα οποία διαχωρίζουν τους ασθενείς σε αυτούς που έχουν χαμηλά και υψηλά επίπεδα (Πίνακας 3).

Από την ανάλυση επιβίωσης όλων των πληθυσμών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που αναφέρθηκαν προέκυψε ότι α) ασθενείς με υψηλά επίπεδα ανώριμων CD8+ T-λεμφοκυττάρων (CD8+ T-naïve) στην κυκλοφορία έχουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα (Πίνακας 3, Εικόνα 18 Α), β) ασθενείς με υψηλά ποσοστά CD3+CD4+ T-κυττάρων στην κυκλοφορία έχουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα (Πίνακας 3, Εικόνα 18 Β) και γ) ασθενείς με υψηλά επίπεδα ανώριμων CD4+ T-λεμφοκυττάρων (CD4+ T-naïve) στην κυκλοφορία έχουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα (Πίνακας 3, Εικόνα 18 Γ).

Πίνακας 3. Συσχέτιση των επιπέδων διαφορετικών πληθυσμών ανοσοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με την ολική επιβίωση.

T-cell populations	ROC cut off		Overall Survival		
			Median (days)	95% CI	p value
CD3+CD8+	36	High	Und	0.076 to 2.368	0.419
		Low	Und		
CD3+CD8+PD-1	7,8	High	Und	0.2870 to 7.342	0,6647
		Low	Und		
CD8+ Tnaïve	48	High	Und	0.03613 to 0.7001	0.05
		Low	Und		
CD8+ Teff	43	High	Und	0.7718 to 19.45	0.181
		Low	Und		
CD3+CD4+	65	High	Und	0.01857 to 1.264	0.043
		Low	Und		
CD3+CD4+PD-1	5,4	High	Und	0.1234 to 10.13	0.922
		Low	Und		
CD4+ Tnaïve	98	High	Und	0.01302 to 1.107	0.027
		Low	Und		
CD4+ Teff	1	High	Und	0.4406 to 22.23	0.295
		Low	Und		
FOXP3+ Tregs	44	High	Und	0.04649 to 1.151	0.147
		Low	Und		
CTLA-4+FOXP3+Tregs	21	High	Und	0.5229 to 24.90	0.192
		Low	Und		



Εικόνα 18. Σύγκριση της επιβίωσης μεταξύ των ασθενών με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα A) $CD8^+$ ανώριμων T-κυττάρων, B) $CD3+CD4^+$ T-κυττάρων και $CD4^+$ ανώριμων T-κυττάρων.

Κεφάλαιο 5 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη αφορούσε την εύρεση πιθανών νέων ελάχιστα παρεμβατικών προβλεπτικών βιοδεικτών σε ασθενείς με PDAC. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε λεπτομερής ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός στην κυκλοφορία του αίματος πριν τη χορήγηση ανοσοθεραπείας καθώς και ανάλυση των ΚΚΚ.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι στους ασθενείς με PDAC ανιχνεύονται σε μεγάλο ποσοστό κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα με ιδιαίτερη μορφολογία έχοντας μεγάλους σε μέγεθος αραιοχρωματικούς πυρήνες υποδηλώνοντας διαφορετική πυρηνική αρχιτεκτονική. Η αρχιτεκτονική του πυρήνα, η χωρική διάταξη των χρωμοσωμάτων και άλλων πυρηνικών συστατικών, παρέχει ένα πλαίσιο για την οργάνωση και τη ρύθμιση των ποικίλων λειτουργικών διεργασιών εντός του πυρήνα. Υπάρχουν χαρακτηριστικές διαφορές στις πυρηνικές αρχιτεκτονικές των καρκινικών κυττάρων, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα, και ορισμένες αντικαρκινικές θεραπείες αποκαθιστούν την κανονική πυρηνική δομή και λειτουργία. Είναι γνωστό ότι χαρακτηριστικές αλλαγές στο σχήμα του πυρήνα και στην υφή της χρωματίνης μπορούν να προκληθούν σε φυσιολογικά κύτταρα *in vitro* με ενεργοποίηση ογκογονιδίου χωρίς ωστόσο να είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι οι μηχανισμοί εμφάνισης του φαινομένου³⁸. Επιπροσθέτως, μελέτες με ζωικά μοντέλα και κλινικά δείγματα έχουν δείξει ότι οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι περιέχουν ένα μικρό ποσοστό γιγαντιαίων κυττάρων με πολύ μεγάλο πυρήνα ή πολλαπλούς πυρήνες. Τα κύτταρα αυτά συχνά παύουν να πολλαπλασιάζονται, συνδέονται με μετάσταση και παρουσιάζουν αντίσταση στην αντικαρκινική θεραπεία. Το ποσοστό των γιγαντιαίων

κυττάρων μπορεί να αυξηθεί σημαντικά ως απόκριση στο στρες. Τέτοια κύτταρα εισέρχονται σε μια κατάσταση λήθαργου (διακοπή πολλαπλασιασμού), κατά τη διάρκεια της οποίας υφίστανται αποπολυπλοειδοποίηση ή/και πυρηνική εκβλάστηση και δημιουργούν απογόνους που μοιάζουν με βλαστοκύτταρα που επαναπληθίζουν τον όγκο ³⁹. Σήμερα, δεν υπάρχουν μελέτες που να αφορούν την εύρεση τέτοιας μορφολογίας ΚΚΚ στην κυκλοφορία ασθενών με διάφορα νεοπλάσματα ενώ οι μελέτες των ΚΚΚ σε ασθενείς με PDAC είναι ελάχιστες. Η μορφολογία αυτή ενισχύει την άποψη της υψηλής επιθετικότητας των κυττάρων του παγκρεατικού καρκίνου.

Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι τα ΚΚΚ των ασθενών αυτών δεν εκφράζουν τους γνωστούς μέχρι σήμερα δείκτες που χαρακτηρίζουν τα ΚΚΚ. Πολλαπλές μελέτες του εργαστηρίου μας και άλλων έχουν δείξει ότι τα ΚΚΚ διαφορετικών νεοπλασμάτων, μπορούν να ταυτοποιηθούν και να διαχωριστούν στην κυκλοφορία του αίματος με βάση την έκφραση του CK και την μη έκφραση του CD45^{28,40}. Ωστόσο, οι δείκτες αυτοί φάνηκε ότι δεν έχουν προβλεπτική αξία και ότι εντοπίζονται σε πολύ μικρό ποσοστό στους ασθενείς με PDAC, εύρημα που αναφέρεται για πρώτη φορά και υποδηλώνει ανάγκη για περισσότερες μελέτες.

Σχετικά με τους διάφορους πληθυσμούς επαγωγικών T-κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος, βρέθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά τους στους ασθενείς με PDAC και στους υγιείς δότες. Επίσης δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν σε αρχικού και προχωρημένου σταδίου. Ωστόσο οι αναλύσεις επιβίωσης έδειξαν ότι οι ασθενείς με PDAC που φέρουν στην κυκλοφορία τους, πριν τη θεραπεία, υψηλά ποσοστά ανώριμων CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων επιβιώνουν στατιστικά σημαντικά περισσότερο σε σχέση με αυτούς που φέρουν χαμηλά ποσοστά. Το εύρημα αυτό, έχει αναφερθεί στο παρελθόν και για άλλα νεοπλάσματα όπως στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ⁴¹, στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου ⁴² ενώ για τον καρκίνο του παγκρέατος δεν είναι γνωστό. Καθώς τα ανώριμα T-κύτταρα αποτελούν βασικό συστατικό της προσαρμοστικής ανοσίας και είναι υπεύθυνα για την δημιουργία των ειδικών εκτελεστικών κυττάρων και των κυττάρων μνήμης το εύρημα αυτό πιθανώς σχετίζεται με την καλύτερη ανοσογονικότητα των ασθενών που τα φέρουν σε μεγάλα ποσοστά και κατ' επέκταση την καλύτερη «κατάσταση» του ανοσοποιητικού συστήματος ⁴³.

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν επίσης τα ποσοστά των ρυθμιστικών T-κυττάρων τα οποία έχουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Φάνηκε ότι οι ασθενείς έχουν

στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά σε σχέση με τους υγιείς ενώ δε βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών. Ωστόσο διαχωρίζοντας τους ασθενείς σε αυτούς που φέρουν υψηλά και σε αυτούς που έχουν χαμηλά επίπεδα, δεν βρέθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση με την επιβίωση. Πιο σημαντικά φάνηκε ότι οι ασθενείς των οποίων ο πρωτοπαθής όγκος εντοπίζεται στην ουρά του παγκρέατος, φέρουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά Tregs κυττάρων σε σχέση με εκείνους που η πρωτοπαθής εστία εντοπίζεται στην κεφαλή του παγκρέατος. Σήμερα είναι γνωστό ότι η εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου στον καρκίνο του παγκρέατος αποτελεί προγνωστικό παράγοντα. Όντως, μελέτες υποδεικνύουν ότι η εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου στην κεφαλή του παγκρέατος τη στιγμή της διάγνωσης αποτελεί προγνωστικό παράγοντα καλύτερης επιβίωσης ⁴⁴. Καθώς δεν υπάρχουν μελέτες που να συσχετίζουν την αρχική εντόπιση του όγκου με τα ποσοστά των Tregs σε ασθενείς με PDAC θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να πραγματοποιηθούν στο μέλλον μελέτες συσχέτισης καθώς και εύρεση του μηχανισμού της συσχέτισης.

Διερευνήθηκε επίσης η συσχέτιση των τιμών γνωστών εργαστηριακών προγνωστικών δεικτών τόσο με το στάδιο της νόσου (ασθενείς αρχικού σταδίου με εξαιρεσιμη νόσο σε σχέση με ασθενείς με εκτεταμένη ή μεταστατική νόσο), και με τα επίπεδα των κυττάρων Treg στην κυκλοφορία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς με εκτεταμένη νόσο έχουν σημαντικά υψηλότερες τιμές του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και του καρκινικού αντιγόνου CA 19-9 πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας σε σχέση με τους ασθενείς με πρώιμη νόσο. Σχετικά με τα ποσοστά των Treg, δε βρέθηκε να σχετίζονται με τους εν λόγω γνωστούς εργαστηριακούς δείκτες.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθούν οι περιορισμοί της μελέτης οι οποίοι αφορούν κυρίως τον αριθμό των ασθενών που μελετήθηκαν καθώς και το γεωγραφικό περιορισμό αυτών. Περισσότερες μελέτες είναι αναγκαίες έτσι ώστε να εξαχθούν σημαντικά συμπεράσματα για τον παγκρεατικό καρκίνο.

Κεφάλαιο 6 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στη παρούσα μελέτη φάνηκε ότι η ανάλυση βιοδεικτών με ελάχιστα παρεμβατικό τρόπο μπορούν να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμοι στην βελτίωση της ποιότητας και του προσδόκιμου επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος. Αναδείχθηκε η πιθανή προβλεπτική αξία των ΚΚΚ καθώς επιβεβαιώθηκε ότι αυτά μπορούν να ανιχνευτούν. Πιο σημαντικά φάνηκε ότι σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος, τα χαρακτηριστικά και η μορφολογία των ΚΚΚ είναι πολύ διαφορετικά σε σχέση με άλλα νεοπλάσματα. Το εύρημα αυτό πιθανώς σχετίζεται με την επιθετικότητα της νόσου και ανοίγει νέες οδούς ως προς το χαρακτηρισμό και τη μελέτη του ρόλου των κυττάρων αυτών στον καρκίνο του παγκρέατος.

Επιπλέον η ανάλυση διαφόρων άνοσο-επαγωγικών και άνοσο-κατασταλτικών πληθυσμών στην κυκλοφορία του αίματος υπέδειξε το σημαντικό ρόλο των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στον καρκίνο του παγκρέατος. Φάνηκε ότι συγκεκριμένοι πληθυσμοί ανοσοκυττάρων έχουν προβλεπτική αξία. Ακόμη τόνισε την ανάγκη για περισσότερες μελέτες που αφορούν την ανοσοθεραπεία στον καρκίνο του παγκρέατος. Τέλος βρέθηκε μια σημαντική σχέση κατασταλτικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και της εντόπισης του πρωτοπαθούς όγκου, εύρημα που ίσως φέρει στο προσκήνιο σημαντικούς βιοδείκτες στο μέλλον.

Βιβλιογραφία

1. **Karpińska M, Czauderna M.** «Pancreas-Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism» *Front Physiol.* 2022 Mar 30;13:807632. doi: 10.3389/fphys.2022.807632.
2. **Yamada T., Hasler W. L., Inadomi J. M.** “Structural anomalies and hereditary diseases of the pancreas,” in *Gastroenter-ology*, (2005).ed. Yamada Y. (Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins;), 80–90.
3. **Rebours V., Levy P., Vullierme M. P., Couvelard A., O’Toole D., Aubert A., et al.** (2007). Clinical and morphological features of duodenal cystic dystrophy in heterotopic pancreas. *Am. J. Gastroenterol.* 102 871–879.
4. **Frulloni L., Castellani C., Bovo P., Vaona B., Calore B., Liani C., et al.** (2003). Natural history of pancreatitis associated with cystic fibrosis gene mutations. *Dig. Liver Dis.* 35 179–185.
5. **Lohr J. M., Dominguez-Munoz E., Rosendahl J., Besselink M., Mayerle J., Lerch M. M., et al.** (2017). United European Gastroen-terology evidence- based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis (HaPanEU).*United Eur. Gastroenterol. J.* 5 153–199.
6. **Kuno A., Yamada T., Masuda K., Ogawa K., Sogawa M., Nakamura S., et al.** (2003). Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. *Gastroenterology*124 1010–1019.
7. **Levy P., Dominguez-Munoz J. E., Imrie C., Lohr J. M., Maisonneuve P.** (2014). Epidemiology of chronic pancreatitis: burden of the disease and consequences. *United Eur. Gastroenterol. J.* 2345–354.
8. **Mayo Clinic** (2021). Cystic Fibrosis. Available online at: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cystic-fibrosis/symptoms-causes/syc-20353700>
9. **Al-Husseina A.-B. A., Tahira F. R., Pham V. T.** (2021). Fixed-time synergetic control for chaos suppression in endocrine glucose–insulin regulatory system. *Control Eng. Pract.*108:104723. 10.1016/j.conengprac.2020.104723
10. **Wei Q., Qi L., Lin H., Liu D., Zhu X., Dai Y., et al.** (2020). Pathological mechanisms in diabetes of the exocrine pancreas: what’s known and what’s to know. *Front. Physiol.* 11:570276. 10.3389/fphys.2020.570276

11. Ewald N., Hardt P. D. (2013). Diagnosis and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 19 7276–7281. 10.3748/wjg.v19.i42.7276
12. Gokce M., Tuncer M., Cetin M., Gumruk F. (2013). Molecular diagnosis of Shwachmann Diamond syndrome presenting with pancytopenia at an early age: the first report from Turkey. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 29 161–163. 10.1007
13. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors. *World J Oncol.* 2019;10(1):10–27. doi: 10.14740/wjon1166
14. Konstantinidis IT, Vinuela EF, Tang LH, et al. Incidentally discovered pancreatic intraepithelial neoplasia: what is its clinical significance? *Ann Surg Oncol.* 2013;20(11):3643–3647. doi: 10.1245/s10434-013-3042-2
15. Jiang Y, Sohal DPS. Pancreatic Adenocarcinoma Management. *JCO Oncol Pract.* 2023 Jan;19(1):19-32 doi: 10.1200/OP.22.00328 Epub 2022. PMID: 36137253.)
16. Teicher BA. **Perspective:** Opportunities in recalcitrant, rare and neglected tumors. *Oncol Rep.* 2013 Sep;30(3):1030-4.
17. Kanda M, Matthaei H, Wu J, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology.* 2012; 142(4):730–733.e9.
18. Waddell N, Pajic M, Patch AM, et al.; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature.* 2015;518(7540):495–501.
19. Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(4):508–518.
20. Balachandran VP, Łuksza M, Zhao JN, et al.; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative; Garvan Institute of Medical Research; Prince of Wales Hospital; Royal North Shore Hospital; University of Glasgow; St Vincent’s Hospital; QIMR Berghofer Medical Research Institute; University of Melbourne, Centre for Cancer Research; University of Queensland, Institute for Molecular Bioscience; Bankstown Hospital; Liverpool Hospital; Royal Prince Alfred Hospital, Chris O’Brien Lifehouse; Westmead Hospital; Fremantle Hospital; St John of God Healthcare; Royal Adelaide Hospital; Flinders Medical Centre; Envoi Pathology; Princess Alexandra Hospital; Austin Hospital; Johns Hopkins Medical Institutes; ARC-Net Centre for Applied

Research on Cancer. Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. *Nature*. 2017;551(7681):512–516. doi: 10.1038/nature24462

21. Nevala-Plagemann C, Hidalgo M, Garrido-Laguna I. From state-of-the-art treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(2):108–123. doi: 10.1038/s41571-019-0281-6

22. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 2022 Sep 12;15(1):131.

23. Adashek JJ, Janku F, Kurzrock R. Signed in blood: circulating tumor dna in cancer diagnosis, treatment and screening. *Cancers*. 2021

24. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977.

25. Lara O, Tong X, Zborowski M, Chalmers JJ. Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation. *Exp Hematol*. 2004;32(10):891–904.

26. Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897–904.

27. Kulasinghe A, Kenny L, Perry C, et al. Impact of label-free technologies in head and neck cancer circulating tumour cells. *Oncotarget*. 2016;7(44):71223–34.

28. Roumeliotou A, Pantazaka E, Xagara A, et al. Phenotypic Characterization of Circulating Tumor Cells Isolated from Non-Small and Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 28;15(1):171.

29. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3213–21.

30. Lucci A, Hall CS, Patel SP, et al. Circulating tumor cells and early relapse in node-positive melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2020;26(8):1886–95.

31. Radovich M, Jiang G, Hancock BA, et al. Association of Circulating Tumor DNA and circulating tumor cells after Neoadjuvant chemotherapy with disease recurrence in patients with triple-negative breast Cancer: preplanned secondary analysis of the BRE12-158 randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(9):1410–5.

32. Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J.P. et al. Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 124, 359–367 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>
33. Golubovskaya, V.; Wu, L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* 2016, 8, 36.
34. Li, C., Jiang, P., Wei, S. et al. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Mol Cancer* 19, 116 (2020).
35. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389:737–42.
36. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol*. 2007;37(Suppl 1):S116–23.
37. Colombo MP, Piconese S. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:880–7.
38. Zink, D., Fischer, A. & Nickerson, J. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 4, 677–687 (2004).
39. Mirzayans, R.; Andrais, B.; Murray, D. Roles of Polyploid/Multinucleated Giant Cancer Cells in Metastasis and Disease Relapse Following Anticancer Treatment. *Cancers* 2018, 10, 118.
40. Xagara A, Roumeliotou A, Kokkalis A, et al. ES-SCLC Patients with PD-L1⁺ CTCs and High Percentages of CD8⁺PD-1⁺T Cells in Circulation Benefit from Front-Line Immunotherapy Treatment. *Biomedicines*. 2024 Jan 10;12(1):146.
41. Zhang G, Liu A, Yang Y, et al. Clinical predictive value of naïve and memory T cells in advanced NSCLC. *Front Immunol*. 2022 Sep 2;13:996348.
42. Takahashi H, Sakakura K, Ida S, et al. Circulating naïve and effector memory T cells correlate with prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2022 Jan;113(1):53-64.
43. Van den Broek, T., Borghans, J.A.M. & van Wijk, F. The full spectrum of human naïve T cells. *Nat Rev Immunol* 18, 363–373 (2018).
44. Gianluca Tomasello, Michele Ghidini, Antonio Costanzo et al. Outcome of head compared to body and tail pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of 93 studies. *JGO*. Vol 10/No2. 2019