



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ- ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ»
ΤΜΗΜΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΥCΝ ΣΕ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΝΕΥΡΟΒΛΑΣΤΩΜΑ»**

ΚΟΝΤΕΛΕΣ ΒΑΣΙΛΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΗΣ 2018



UNIVERSITY OF
THESSALY

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY
ANTICANCER-ONCOLOGICAL HOSPITAL OF ATHENS "ST. SAVVAS"
DEPARTMENT OF GENETICS

**"DETECTION OF MYCN GENE AMPLIFICATION IN
BIOLOGICAL MATERIALS OF PATIENTS WITH
NEUROBLASTOMA"**

KONTELES VASILIS

LARISA, SEPTEMBER 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας, Παν. Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ ΕΥΘΥΜΙΟΣ

Αναπληρωτής Προϊστάμενος Τμήματος Γενετικής

ΓΑΟΝΑ «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ»

ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ ΑΝΤΩΝΗΣ

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας- Γονιδιωματικής,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Παν. Θεσσαλίας

Πίνακας Περιεχομένων

1.Εισαγωγή	4
1.1 Γενικά για τον καρκίνο	4
1.2.Γενετική του καρκίνου	6
1.2.1.Κατηγορίες γονιδίων που συμβάλλουν στην καρκινογένεση	6
1.3.Ανίχνευση του καρκίνου	9
1.3.1 Ασυμπτωματική περίοδος και κλινική εξέταση	9
1.3.2.Καρκινικοί «βιο-δείκτες».....	10
1.3.3. Βιοψίες και γενετική ανάλυση	12
1.3.4. «Υγρές βιοψίες»	
1.3.4.1 cell-free DNA.....	17
1.4.Παιδιατρική Ογκολογία	19
1.4.1Νευρωβλάστωμα	17
1.4.1.1 Μοριακή διάγνωση.....	20
1.4.1.2 Σταδιοποίηση της νόσου.....	21
1.4.1.3 Θεραπεία.....	22
1.4.1.4 Γενετική βάση Νευροβλαστώματος	23
2. Σκοπός της Εργασίας	30
3. Υλικά και Μέθοδοι	31
3.1. Απομονωση DNA	32
3.2. Κυτταρογενετική	34
3.2.2. Μοριακή Κυτταρογενετική (FISH).....	34
3.2.2.1. Δημιουργία παρασκευασμάτων προς υβριδοποίηση	35
3.2.2.2 Προετοιμασία περιοχής υβριδισμού	35
3.2.2.3.Αποδιάτξη του DNA στόχου και ανιχνευτή	35
3.2.2.4. Έκπλυση μετά την υβριδοποίηση	36
3.2.2.5. Χρώση του DNA με DAPI.....	36
3.2.2.6.Μικροσκοπική παρατήρηση και ανάλυση	37
3.3. Μοριακή Γενετική	38

3.3.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	38
3.2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)	38
3.2.2.1 Real-time PCR-Taq Man	39
3.2.2.2. Πρωτόκολλο για PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR)	40
3.2.3.4.Αλληλουχίες εκκινήτων	41
4. Αποτελέσματα	42
4.1.Συνολικά κυτταρογενετικά /FISH αποτελέσματα.....	43
4.3.Αποτελέσματα Real-time PCR Taq Man.....	48
5. Συμπεράσματα – Συζήτηση	58
6. Περίληψη	61
6.1.Περίληψη	61
6.2. Abstract	62
7. Βιβλιογραφία	63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για τον καρκίνο

Ο καρκίνος είναι ένα από τα πιο συχνά και σοβαρά νοσήματα που αντιμετωπίζει η κλινική ιατρική. Από τη στατιστική προκύπτει ότι ορισμένες μορφές καρκίνου προσβάλλουν περισσότερο από το 1/3 του πληθυσμού και ευθύνονται για περισσότερο από το 20% του συνολικού αριθμού θανάτων στις ανεπτυγμένες χώρες^{1,2}

Ο όρος καρκίνος δεν χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός συγκεκριμένου νοσήματος, αλλά για μια σειρά παθολογικών διαδικασιών με διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (όπως η ηλικία εμφάνισης), που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ο οποίος οδηγεί στον σχηματισμό μιας κυτταρικής μάζας (νεόπλασμα). Για να χαρακτηριστεί όμως μια νεοπλασία ως καρκίνος θα πρέπει απαραίτητα να χαρακτηρίζεται από κακοήθεια, δηλαδή η αύξηση να είναι ανεξέλεγκτη και ο όγκος να μπορεί να εισβάλλει είτε στους γειτονικούς ιστούς είτε να διασπείρεται σε πιο απομακρυσμένες θέσεις, μια διαδικασία που ονομάζεται **μετάσταση**. Οι όγκοι που δεν είναι διηθητικοί ή μεταστατικοί χαρακτηρίζονται ως καλοήθεις νεοπλασίες, παρόλο που το μέγεθος τους αλλά και η θέση τους στο σώμα μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα στον ασθενή².

Ο καρκίνος ταξινομείται σε 3 βασικές κατηγορίες ανάλογα με το είδος του ιστού που προσβάλλει σε :

1. **Σαρκώματα**, στα οποία ο όγκος προέρχεται από τον μεσεγχυματικό ιστό όπως τα οστά οι μύες ,ο συνδετικός και ο νευρικός ιστός.
2. **Καρκινώματα**, που προέρχονται από τον επιθηλιακό ιστό όπως τα κύτταρα που επενδύουν το έντερο, τους βρόγχους κτλ.
3. **Αιμοποιητικές/Λεμφοειδείς κακοήθειες** όπως η λευχαιμία, που διασπείρονται μέσω του μυελού των οστών στο λεμφικό σύστημα και στο περιφερικό αίμα.

Πολλές φορές δεν είναι δυνατό να προσδιορίσουμε την ακριβή αιτία των κακοηθειών. Στις περισσότερες όμως των περιπτώσεων, ξέρουμε ότι μια ποικιλία γενετικών μεταλλάξεων σε συνάρτηση με τον αριθμό τους, την θέση τους στο γονιδίωμα, τον τύπο των κυττάρων και την ιστολογική ταυτότητα τους, την φάση του κυτταρικού κύκλου κτλ, είναι αυτές που οδηγούν στον καρκίνο. Έχει

διαπιστωθεί ότι μόνο το 5% των καρκίνων είναι πιθανό να ακολουθεί οικογενή τύπο κληρονομικότητας, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις η κληρονομικότητα δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο. Εντούτοις, πολλές περιπτώσεις καρκίνου εμφανίζουν κάτι ανάλογο με τις ασθένειες που υπόκεινται σε πολυπαραγοντική κληρονομικότητα, δηλαδή έχουν ένα σημαντικό γενετικό στοιχείο με την έννοια ότι ορισμένοι άνθρωποι εμφανίζουν προδιάθεση στην ανάπτυξη μιας ειδικής κακοήθειας.

Βέβαια οι γενετικές αυτές μεταλλάξεις που θα συμβούν στο κύτταρο δεν εξασφαλίζουν και την επιβίωση του. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, είτε δεν παρατηρούνται φαινοτυπικά αποτελέσματα, είτε προκαλούνται βλάβες στην κυτταρική βιωσιμότητα (και άρα τα κύτταρα «πεθαίνουν»). «Επιτυχής» θεωρείται αυτή η μετάλλαξη που σαν αποτέλεσμα της, έχει την επιβίωση και την αύξηση του πολλαπλασιασμού του κυττάρου που την φέρει, έτσι ώστε να πετύχει τη δημιουργία **κυττάρων-φορέων της μετάλλαξης**. Σε κοινούς συμπαγείς όγκους του παχέος έντερου, του μαστού, του εγκέφαλου ή το παγκρέατος, κατά μέσο όρο 33 με 66 γονίδια εμφανίζουν σωματικές μεταλλάξεις που αναμένεται να αλλοιώσουν τα πρωτεϊνικά τους προϊόντα¹.

Περίπου το 95% αυτών των μεταλλάξεων, είναι υποκαταστάσεις μιας βάσης (όπως C> G), ενώ οι υπόλοιπες είναι ελλείμματα ή ενθέσεις, μίας ή λίγων βάσεων (όπως CTT> CT) (το 1,7% των υποκαταστάσεων βάσεων έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές θέσεων ματίσματος ή αμετάφραστων περιοχών, γειτονικών προς τα κωδικόνια έναρξης και τερματισμο¹). Η σταδιακή συσσώρευση τέτοιων μεταλλάξεων προωθεί τη δημιουργία και την ανάπτυξη των κυττάρων που έχουν διαφύγει από τον ομαλό αναπτυξιακό έλεγχο και τελικά μετατρέπει φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά. Οι όγκοι από τις καλοήθειες έως τις κακοήθειες βλάβες εξελίσσονται με την απόκτηση μιας σειράς μεταλλάξεων με την πάροδο του χρόνου, μιας διαδικασίας που έχει μελετηθεί ιδιαίτερα καλά σε όγκους του παχέος εντέρου .

Η «**πρώτη μετάλλαξη**» (**gatekeeping**) παρέχει ένα πλεονέκτημα επιλεκτικής ανάπτυξης σε ένα φυσιολογικό επιθηλιακό κύτταρο, επιτρέποντάς του να ξεπεράσει τα κύτταρα που το περιβάλλουν και να γίνει ένας μικροσκοπικός κλώνος. Έχει υπολογιστεί ότι κάθε τέτοια μετάλλαξη παρέχει αναλογικά ένα μικρό επιλεκτικό πλεονέκτημα ανάπτυξης στο κύτταρο, περίπου 0,4% διαφορά μεταξύ γέννησης κυττάρων και κυτταρικού θανάτου¹. Ωστόσο, αυτή η ελαφρά αύξηση, **συνυπολογίζεται** μία φορά ή δύο φορές την εβδομάδα, με αποτέλεσμα να μπορεί να οδηγήσει σε μια μεγάλη μάζα που περιέχει δισεκατομμύρια κύτταρα.

Τα καρκινικά κύτταρα λοιπόν, αποκτούν συγκεκριμένες ιδιότητες (επιλεκτικά πλεονεκτήματα ανάπτυξης) όπως:

- Απεριόριστο αντιγραφικό δυναμικό
- Αυτονομία αυξητικών σημάτων
- Μειωμένη ευαισθησία σε αντι-μιτωτικά σήματα
- Αποφυγή της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος)
- Ικανότητα διήθησης στους ιστούς και δημιουργίας μεταστάσεων.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά, τους δίνουν την δυνατότητα να αυξήσουν τον αριθμό τους και να εξαπλωθούν έναντι κυττάρων με φυσιολογικούς ρυθμούς αύξησης και ανάπτυξης.

1.2 Γενετική του καρκίνου

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, γενετικές μεταβολές στο γονιδιωματικό επίπεδο (γονίδια, χρωμοσώματα κτλ) που έχουν σαν αποτέλεσμα την τροποποίηση της φυσιολογικής λειτουργίας του, ευθύνονται για την έναρξη και την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Βλάβες των χρωμοσωμάτων συνήθως χαρακτηρίζονται είτε από αλλαγές στον αριθμό τους-λιγότερα ή περισσότερα από 23 ζεύγη για τον άνθρωπο- με αποτέλεσμα περισσότερα αντίγραφα του συνόλου των γονιδίων αυτών των χρωμοσωμάτων, είτε από παραλλαγές στην δομή τους- θραύσεις τμημάτων, ελλείψεις, προσθήκες κτλ. Η ανάπτυξη όγκων συνδέεται επίσης και με την εμφάνιση γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων και άρα αντίστοιχων αλλαγών στην έκφραση γονιδίων. Έτσι τροποποιούνται οι κανονικές οδοί ελέγχου της ανάπτυξης και της επιβίωσης. Οι μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδιωματικού DNA είναι συχνές σε συμπαγείς όγκους και αναμένεται να συμβάλλουν στην εξέλιξη του όγκου προκαλώντας αλλοιώσεις στην γονιδιακή έκφραση².

1.2.2 Κατηγορίες γονιδίων οι οποίες συμβάλλουν στην καρκινογένεση

Έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα περισσότερα από 350 γονίδια των οποίων οι γενετικές βλάβες /μεταλλάξεις ενέχονται στην καρκινογένεση.

Τα γονίδια αυτά είναι δυνατό να ταξινομηθούν σε δυο βασικές κατηγορίες:

- 1. Ογκογονίδια**
- 2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια**

- **Ογκογονίδια**

Οι γενετικές βλάβες τα καθιστούν **συνεχώς ενεργά** ή ενεργά κάτω από συνθήκες που τα φυσιολογικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια) είναι ανενεργά. Η ενεργοποίηση, μέσω σωματικής μετάλλαξης, του ενός αλληλόμορφου των ογκογονιδίων είναι αρκετή για την επίτευξη της απορύθμισης της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου και από φυσιολογικό να μετατραπεί σε κακοήθες. Άρα τα ογκογονίδια σε κυτταρικό επίπεδο έχουν **επικρατές αποτέλεσμα**.

Το είδος των γενετικών βλαβών που οδηγούν σε απορρυθμισμένη ενεργοποίηση των ογκογονιδίων ποικίλει. Η μετάλλαξη μπορεί να εντοπίζεται είτε εντός της κωδικής περιοχής του γονιδίου (ενισχύει την λειτουργία της αντίστοιχης πρωτεΐνης) είτε εντός της ρυθμιστικής του περιοχής. Μπορεί να είναι χρωμοσωμικές μεταθέσεις, γονιδιακή επέκταση (πχ MYCN) -η οποία κατά κανόνα οδηγεί σε υπερέκφραση ενός πρωτεϊνικού προϊόντος- ή σημειακές μεταλλάξεις. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία ογκογονιδίων τα οποία αποτελούν «στόχο» γενετικών αλλοιώσεων όπως γονίδια αυξητικών παραγόντων (Sis) και των υποδοχέων τους (Ret), τα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά τους μονοπάτια, γονίδια μεταγραφικών παραγόντων (MYC) κ.α.

Οι **χρωμοσωμικές μεταθέσεις** μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα :

α) την μεταβολή των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων και επομένως της έκφρασης ενός γονιδίου.

β) τον σχηματισμό χμαιρικών γονιδίων με εντελώς νέα λειτουργία (πχ EWS-FLY1).

Η **γονιδιακή επέκταση** μπορεί να είναι απόρροια της πολυπλοειδίας, αλλά κυρίως είναι αποτέλεσμα της δημιουργίας πολλαπλών αντιγράφων του ίδιου, οδηγώντας έτσι στην υπερέκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων.

Οι **σημειακές μεταλλάξεις** αλλάζουν την δομή και επομένως την δράση κρίσιμων λειτουργικών τμημάτων του γονιδιακού προϊόντος.

- **Ογκοκατασταλτικά γονίδια**

Όπως περιγράφηκε παραπάνω οι γενετικές βλάβες των ογκογονιδίων τα καθιστούν «υπερλειτουργικά». Στα ογκοκατασταλτικά γονίδια τέτοιες μεταβολές στο γονιδίωμα έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα αφού τα **απενεργοποιούν ή μειώνουν την φυσιολογική δράση τους**, οδηγώντας έτσι στην απώλεια λειτουργίας και των δυο αλληλομόρφων του γονιδίου. Ωστόσο για μια σειρά ογκοκατασταλτικών

γονιδίων έχει διατυπωθεί η άποψη πως η βλάβη στο ένα και μόνο αλληλόμορφο είναι ικανή να επιφέρει σημαντικές μεταβολές στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορούν να ταξινομηθούν σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και ονομάζονται **ογκοκατασταλτικά γονίδια φρουροί (gatekeepers)** και σε γονίδια που εξασφαλίζουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος, γνωστά ως **γονίδια κυτταρικής φροντίδας (caretakers)**.

Η φυσιολογική δράση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων-φρουρών (πχ. *RB*, *P53* και *APC*) είναι να ελέγχουν και να ρυθμίζουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου, μέσω χρονικά καθορισμένων σημείων ελέγχου (τέλος της φάσης G2 (μετάβαση G2/M), στη μίτωση (μετάβαση μετάφασης/ανάφασης) και στη φάση G1 (σημείο περιορισμού), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της απόπτωσης όπου αυτή είναι απαραίτητη. Έτσι εμποδίζεται η υπέρμετρη κυτταρική αύξηση και καλύπτονται μόνο οι απαιτούμενες ανάγκες του οργανισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η απώλεια λειτουργίας των παραπάνω γονιδίων να οδηγεί σε ανεξέλικτη αύξηση του αριθμού των κυττάρων.

Με δεδομένη μια συχνότητα σφαλμάτων της αντιγραφής της τάξης των 10^{-10} ανα βάση, ανά κυτταρική διαίρεση, και με περίπου 10^{15} κυτταρικές διαιρέσεις κατά την διάρκεια της ζωής ενός ενήλικου προκύπτει ότι και μόνο τα λάθη της αντιγραφής είναι ικανά για να δημιουργήσουν πλήθος μεταλλάξεων σε έναν οργανισμό παραπάνω πρόβλημα να αντιμετωπίζεται με την ενεργοποίηση γονιδίων κυτταρικής φροντίδας³.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια κυτταρικής φροντίδας (πχ. *MSH2*, *ATM*, *BRCA1* και *BRCA2*), κατά βάση κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης σφαλμάτων του γονιδιώματος (MMR, BER, NER, NHEJ, HR). Σε κάθε ένα από αυτούς τους μηχανισμούς, συμμετέχουν πολλά γονίδια που σχηματίζουν μονοπάτια αντιδράσεων.

Επίσης κωδικοποιούν παράγοντες απαραίτητους για την φυσιολογική μιτωτική πορεία στις οποίες συμμετέχουν μεγάλα τμήματα χρωμοσωμάτων (μιτωτικός ανασυνδιασμός) ή ολόκληρα τα χρωμοσώματα (χρωμοσωμικός διαχωρισμός), (πχ. *BRCA1*, *ATM*), καθώς και συστατικά του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), παίζοντας βασικό ρόλο στην προστασία της σταθερότητας του γονιδιώματος.

Όπως είναι λοιπόν φανερό, η απενεργοποίησή τους οδηγεί στην αδυναμία επιδιόρθωσης των λαθών που συμβαίνουν στη διάρκεια της αντιγραφής και κατ' αυτόν τον τρόπο επιτρέπουν τη συσσώρευση μεταλλάξεων κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η αναστολή ή μεταβολή της λειτουργίας τους έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων σε ένα μεγάλο

φάσμα γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών, εκκινώντας έτσι διαδικασίες καρκινογένεσης.

Πρέπει να σημειωθεί ότι **ορισμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια ανήκουν και στις δύο κατηγορίες**, όπως για παράδειγμα τα *BRCA1* και *BRCA2*, που λειτουργούν τόσο σαν «caretakers» όσο και σαν «gatekeepers».

Το είδος των γενετικών βλαβών που οδηγούν σε απορρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι συνήθως :

- I. Ελλείψεις ή ενθέσεις (προσθήκες) διαφόρων μεγεθών που έχουν σαν αποτέλεσμα την έλλειψη ολόκληρου ή ενός τμήματος του γονιδίου ή την καταστροφή της δομής του.
- II. Σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν είτε σε "αδρανοποίηση" κρίσιμων λειτουργικών τμημάτων των γονιδιακών προϊόντων είτε σε παραγωγή ελαττωματικών προϊόντων.

1.3 Ανίχνευση του καρκίνου

1.3.1 Ασυμπτωματική περίοδος & Κλινική εξέταση.

Σήμερα, ο καρκίνος μπορεί να αντιμετωπιστεί στις περισσότερες περιπτώσεις. Για να θεραπευτεί όμως, πρέπει η διάγνωση να γίνει σε πρώιμα στάδια της νόσου. Η αρχική περίοδος κατά την οποία «γεννιέται» η νόσος αρκετές φορές χαρακτηρίζεται από την έλλειψη συμπτωμάτων και μπορεί να διαρκέσει μήνες ή χρόνια. Υπάρχει λοιπόν ο κίνδυνος, η διάγνωση της νόσου να γίνει όταν ο όγκος έχει επεκταθεί τοπικά ή ακόμα και να έχει ξεκινήσει να πραγματοποιεί μεταστάσεις. Η αναγνώριση ενός συμπτώματος (π.χ. επίμονος βήχας, αίμα στα κόπρανα) μπορεί να αποτελεί το πρώτο βήμα για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου.

Η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρία έχει καταρτίσει έναν κατάλογο πρώιμων εκδηλώσεων, που θέτουν υποψίες για την ύπαρξη κακοήθειας:

- **Αλλαγές** στην συμπεριφορά του εντέρου ή της κύστης όπως, η μεταβολή στις κενώσεις ή δυσπεπτικά φαινόμενα που επιμένουν.
- **Φλεγμονή** του φάρυγγα που δεν υποχωρεί.
- **Ασυνήθεις αιμορραγίες** που δεν επούλωνονται ή παθολογικό έκκριμα.

- **Ογκίδιο** ή σκληρότητα οπουδήποτε στο δέρμα, όπως η σκλήρυνση ή διόγκωση στον μαστό ή σε άλλο σημείο του σώματος.
- **Δυσπεπτικά** ενοχλήματα ή δυσκολία κατάποσης.
- **Εμφανής αλλαγή σε σπίλο** ή κρεατοελιά, όπως όταν μεγαλώνει ξαφνικά και πολλαπλασιάζεται.
- **Βήχας** που συνεχίζεται για μεγάλο διάστημα ή βράχνιασμα της φωνής.
- **Μεγάλη απώλεια βάρους** σε μικρό διάστημα.

Βέβαια όλα αυτά τα σημεία δεν σημαίνουν πάντα την ύπαρξη καρκίνου. Ωστόσο είναι μερικές από τις εκδηλώσεις του, γι' αυτό και η εμφάνισή τους πρέπει να δημιουργήσει υποψίες.

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη μίας νεοπλασίας μπορεί να προκύψουν κατά την κλινική εξέταση του ασθενούς. Η πλήρης κλινική εξέταση αφορά το σύνολο των συστημάτων του οργανισμού και έχει ως στόχο την αποκάλυψη ενδείξεων μη φυσιολογικής λειτουργίας των οργάνων του σώματος. Θετικά αποτελέσματα ως προς τα ερωτήματα για τη φυσιολογική λειτουργία των διαφόρων τμημάτων του οργανισμού οδηγούν τον ασθενή σε εργαστηριακές εξετάσεις άλλοτε απλές και σε κάποιες περιπτώσεις πιο εξειδικευμένες.

1.3.2 Καρκινικοί δείκτες για την ανίχνευση του καρκίνου

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης μιας κακοήθους νεοπλασίας μπορεί τα κύτταρα τα όποια την απαρτίζουν - ή ολόκληροι οι ιστοί του σώματος- σε απάντηση προς την παρουσία της, να παράγουν ουσίες που είναι δυνατόν ν' ανιχνευθούν στο αίμα, στα ούρα ή στους ιστούς. Οι ουσίες αυτές, διαλυτές στο αίμα, είναι συνήθως γλυκοπρωτεΐνες (όχι πάντα, π.χ. το ασβέστιο του αίματος μπορεί να παίξει έναν τέτοιο ρόλο), οι οποίες ανιχνεύονται συνήθως με μονοκλωνικά αντισώματα και αναγνωρίζονται ως καρκινικοί δείκτες. Κάθε «Βιο-δείκτης» έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά χρησιμότητας, όπως προσδιορισμού διάγνωσης και πρόγνωσης, στάθμισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία και παρακολούθησης της επανεμφάνισης της νόσου.

Οι βασικοί βιοχημικοί **καρκινικοί «Βιο-δείκτες»** παραθέτονται παρακάτω:

1. CEA (καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο): γλυκοπρωτεΐνη 180.000 Da. Ένα εκ των αντιγόνων που παράγονται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (γαστρεντερικής οδός). Μετά τη γέννηση μειώνεται συνεχώς, ώστε σε φυσιολογικό

ενήλικο η τιμή του φτάνει στα 3-5 ng/ml. Οι μέγιστες τιμές παρατηρούνται σε καπνιστές. Παράγεται από τα γονίδια της «οικογένειας CEA». Προσδιορίζει καρκινική εξέλιξη στο έντερο και τους πνεύμονες. Άνω των 100ng σε μεταστάσεις. Πτώση στο φυσιολογικό αναμένεται από επιτυχή κολεκτομή.

2. Άλφα φετοπρωτεΐνη, (AFP): Γλυκοπρωτεΐνη Μ.Β. 70.000Da από το ήπαρ του εμβρύου. Παρουσιάζει αύξηση σε καρκίνο του ήπατος και σε σπερματικούς όγκους (φυσιολογική τιμή 0-6,4 μονάδες). Μετεγχειρητικά, η αύξηση προδικάζει υποτροπή ακόμα και ύστερα από 6 μήνες. Μη καρκινική αύξηση σημειώνεται σε κύηση, όταν το έμβρυο παρουσιάζει ανωμαλίες.

3. Χοριακή γοναδοτροπίνη, hCG β-υποομάδα: Σιαλο-γλυκοπρωτεΐνη Μ.Β. 46.000. Συντίθεται στην έναρξη της εγκυμοσύνης από τα τροφοβλαστικά κύτταρα και αργότερα από τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης του πλακούντα. Κλινικά παρατηρείται κατά την εγκυμοσύνη και σε χρήστες μαριχουάνας. Διάγνωση καρκίνων των τροφοβλαστικών όγκων σε μη έγκυο (100%). Φυσιολογικές τιμές > 31 U/ml.

4. Καρκινικό αντιγόνο 15-3 (CA15-3): Είναι βλεννώδους τύπου αντιγόνο ,μεγάλου μοριακού βάρους και παράγεται από τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού. Αντιδρά με δυο μονοκλωνικά αντισώματα (115D8 και DF3). Φ.Τ.<31 U/ml. Προσδιορίζει τον καρκίνο του μαστού και τις μεταστάσεις του. Και σε νόσους του ήπατος.

5.Υδατανθρακικό αντιγόνο 19-9 (CA19-9): Υδατάνθρακας υψηλού μοριακού βάρους, πλούσιος σε βλεννίνη. Εκκρίνεται από καρκινώματα του ορθού του παχέος εντέρου, σε καρκίνο του παγκρέατος κυρίως, και δευτερευόντως του ΓΕΣ. ΦΤ. <33-60 U/ml. Συγκεντρώσεις άνω του 10.000 πιστοποιούν μεταστάσεις. Πρόδρομός του ο δείκτης CA 50.

6. Καρκινικό αντιγόνο 125 (CA125): Βλεννώδης γλυκοπρωτεΐνη, Μ.Β. 200.000, αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα OC 125. Συναντάται σε παράγωγα του εμβρυϊκού επιθηλίου, του ωθηκικού καρκινώματος και σε ιστούς με αδενοκαρκίνωμα. Φ.Τ. 0-35 U/ml. Αύξηση παρατηρείται και σε ενδομητρίωση, κίρρωση, κύηση κ.α.

7. Ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA): Γλυκοπρωτεΐνη, Μ.Β. 34.000. Ειδικό για τον προστάτη (ως όργανο), αλλά μη ειδικό για τον καρκίνο του προστάτη. Το ποσό και οι μεταβολές του (άνω του 75 ng/ml το χρόνο) οδηγούν στην πρώιμη διάγνωση

καρκίνων και μεταστάσεων προστάτη. Φ.Τ.<4 ng/ml, αναλογως και με την ηλικια. Αναστέλλεται από την αντιαδρογόνο θεραπεία.

1.3.3 Βιοψίες και γενετική ανάλυση

Βιοψία είναι μια ιατρική εξέταση που εκτελείται συνήθως από χειρουργό (άρα απαιτείται επέμβαση) η οποία περιλαμβάνει την εξαγωγή δειγμάτων κυττάρων ή τμήματος ιστού για εξέταση για τον προσδιορισμό της παρουσίας ή έκτασης μιας ασθένειας και οι μέθοδοι με τις οποίες πραγματοποιούνται ποικίλουν. Ο ιστός-κατά βάση τα κύτταρα του- συνήθως εξετάζεται με την χρήση μικροσκοπίου και μετά από επεξεργασία του βιοπτικά απομονωμένου τμήματος ,έτσι ώστε να είναι πιο εύκολα παρατηρούμενο το σημείο που βρίσκεται η προς εξέταση ανωμαλία (καρυότυπος, FISH κτλ).

Η διάγνωση των νεοπλασιών επιχειρείται σήμερα και μέσω της ανίχνευσης των ίδιων των ογκογονιδίων (ACP, DPC4, NF1, NF2, MTS1, rb, p53, K-ras, N-ras, C, N, L-MYC κτλ) και των ογκοκατασταλτικών, καθώς και της μοριακής συμπεριφοράς τους εντός του ενδο-/εξω-κυτταρικού περιβάλλοντος τους (μεταλλάξεις, ενισχύσεις αντιγράφων, συμμετοχή σε σηματοδοτικά μονοπάτια κτλ). Αυτό πραγματοποιείται από μια σειρά μοριακών αναλύσεων.

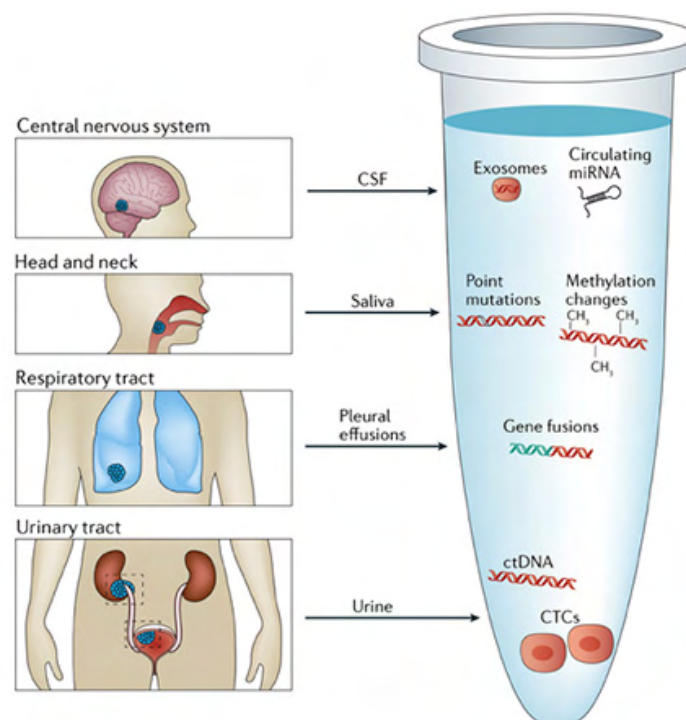
1.3.4 «Υγρές Βιοψίες»

Η ικανότητα μελέτης μη-αιματολογικών κακοηθειών, χωρίς επεμβατική διαδικασία αλλά μέσω δειγματοληψίας αίματος είναι ένας από τους ταχύτερα εξελισσόμενους τομείς της διάγνωσης του καρκίνου⁵. Αυτό έχει οδηγήσει σε σημαντικές τεχνολογικές εξελίξεις, συμπεριλαμβανομένης της απομόνωσης ακέραιων καρκινικών κυττάρων, ελεύθερα κυκλοφορούντων στο αίμα, της ανάλυσης DNA των παραπάνω κύτταρων καθώς και ελεύθερου DNA που βρίσκεται στην κυκλοφορία, όσο και στην αυξανόμενη εφαρμογή μοριακά κατευθυνόμενων θεραπευτικών μεθόδων, οι οποίες βασίζονται σε ακριβείς και έγκαιρες μετρήσεις κρίσιμων «βιο-δεικτών»⁵. Επιπλέον, οι παρενέργειες ισχυρών θεραπειών καρκίνου που οδηγούν σε πρόσθετες γενετικές αλλαγές, καθώς οι όγκοι αποκτούν ανθεκτικότητα στο φάρμακο, απαιτούν επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία καρκινικών κυττάρων για τη ρύθμιση της θεραπείας σε συνάρτηση με την εξέλιξη του όγκου.

Το αίμα περιέχει δύο είδη βιολογικών υλικών, προερχόμενων από νεοπλάσματα, τα οποία είναι ευαίσθητα σε λεπτομερή μοριακή ανάλυση: **«ανέπαφα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα» (Circulating Tumor Cells)** και **«ελεύθερο**

κυκλοφορούν στο αίμα DNA όγκου» (cell-free tumor DNA)⁶. Κύτταρα αποβάλλονται από πρωτογενείς ή μεταστατικούς όγκους και παρόλο που είναι σπάνια, θεωρείται ότι είναι πρόδρομα μεταστάσεων. Το αίμα επίσης διαθέτει μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνικών βιο-δεικτών που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως καρκινο-εμβρυονικό αντιγόνο (CEA) ή ειδικό αντιγόνο του προστάτη (PSA), καθώς και θραύσματα κυκλοφορούντων κυττάρων όπως εξωσώματα (exosomes). Ωστόσο, μεταξύ των κυττάρων, εκτός των παραπάνω βασικών βιοδεικτών, βρίσκεται και το ctDNA που προσφέρει τη μεγαλύτερη ευκαιρία για την εφαρμογή λεπτομερών μοριακών τεχνικών^{4,6}.

Παρόλο που το απαλλαγμένο από κύτταρα DNA (cfDNA) στην κυκλοφορία περιγράφηκε αρχικά το 1948⁸, παρατηρήθηκαν ανωμαλίες σε ασθενείς με καρκίνο δεκαετίες αργότερα. Το ctDNA θεωρείται ότι προέρχεται από μάζες κυτταρικών όγκων και CTC που έχουν υποστεί λύση. Ως εκ τούτου, αν και η απομόνωσή του είναι πολύ απλούστερη από τα CTCs, η μέχρι σήμερα συνεισφορά του προερχόμενου από όγκο ctDNA σε σχέση με την τυπικά πολύ μεγαλύτερη ποσότητα cfDNA που αποβάλλεται από φυσιολογικά κύτταρα, έχει περιορισμένες αναλύσεις.



Εικόνα 1: CTCs cfDNA που περιέχονται σε διάφορα βιολογικά υγρά. *Nature Reviews. Clinical Oncology 2013*

Μέχρι σήμερα η εφαρμογή πρωτεϊνικών δεικτών του αίματος στην ανίχνευση αλλά και την ποσοτικοποίηση της ανταπόκρισης του όγκου στη θεραπεία είναι καλά εδραιωμένη στην κλινική πρακτική, ειδικά σε περιπτώσεις όπου ο ίδιος ο καρκίνος δεν είναι άμεσα μετρήσιμος.

Ειδικά στον τομέα της επιλογής κατάλληλης θεραπείας σε περιπτώσεις όπου ο καρκίνος δεν παρουσιάζει ταχείες ακτινογραφικές μεταβολές μετά από ορμονική θεραπεία, τα επίπεδα PSA ορού χρησιμοποιούνται συνήθως ως υποκατάστατο δείκτη απόκρισης φαρμάκου. Σε επιλεγμένες περιπτώσεις που μελετήθηκαν μέχρι σήμερα^{4,6}, και οι μετρήσεις CTCs και ctDNA δείχνουν ταχείες αποκρίσεις μετά τη χορήγηση αποτελεσματικής θεραπείας. Τέτοιοι αιματολογικοί βιο-δείκτες, μπορεί να αποδειχθούν ιδιαίτερα χρήσιμοι καθώς θα αυξήσουν δυνητικά την επιτυχία επιλογής κατάλληλων θεραπειών. Η απομόνωση του cfDNA είναι γενικά μια εύκολη διαδικασία (βλέπε ενότητα 3.1.1) με την μόνη ιδιαιτερότητα να εντοπίζεται στον τρόπο διαχείρισης του προς εξέταση δείγματος (ορός ή πλάσμα αίματος) καθώς το cfDNA έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής λόγω της παρουσίας διαφόρων ενζύμων στο αίμα όπως η DNάση⁹. Αφού γίνει η απομόνωση cfDNA υπάρχει μια σειρά τεχνικών οι οποίες μπορούν να ανιχνεύσουν ποικιλία γενετικών τροποποιήσεων ανάλογα με την μεθοδολογία που ακολουθούν όπως περιγράφεται και στην παρακάτω εικόνα.

Table 2. Technologies for detection and characterization of ctDNA

Underlying technology	Mutation detection approach	Type of alteration	Example alterations	Selected references
Real-time or end-point PCR	ARMS-Scorpion PCR	Known point mutations	<i>KRAS</i> , <i>EGFR</i> hotspot changes	74
	PCR-SSCP			73
	Mutant allele-specific PCR			75
	Mass spectrometry			68
	Bi-PAP amplification			76
Digital PCR	BEAMing	Known point mutations	<i>KRAS</i> , <i>EGFR</i> hotspot changes	78
	Droplet-based digital PCR			80
	Digital droplet PCR			79
Gene sequencing	SafeSeqs	Point mutations in gene regions	<i>PIK3CA</i> , <i>EGFR</i> , <i>TP53</i> coding mutations	81
	OnTarget			83
	TamSeq			82
Whole-genome sequencing	Digital karyotyping	Genome-wide copy-number changes	Personalized amplifications	87, 88, 108, 115
Whole-genome sequencing	PARE	Genome-wide rearrangements	Personalized rearrangements	85, 86, 88
Targeted sequencing	Digital karyotyping/PARE	Structural alterations in gene regions	<i>MET</i> , <i>ERBB2</i> amplification	88, 98, 108

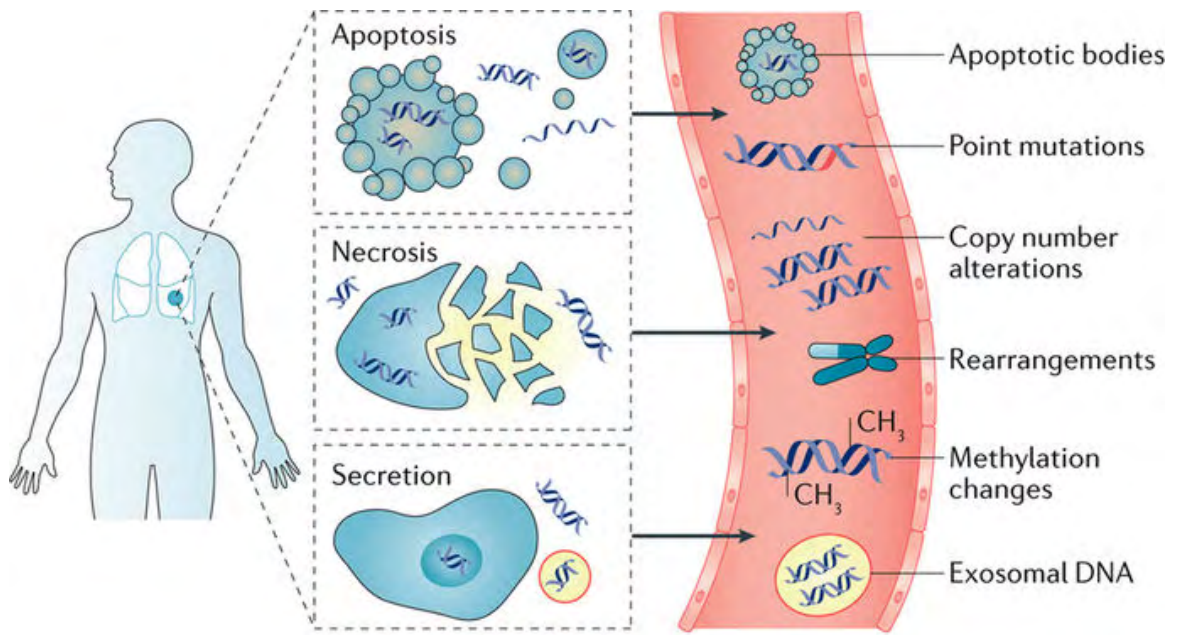
Abbreviations: SSCP, single-strand conformational polymorphism; BEAM, Beads, Emulsions, Amplification, and Magnetics; PARE, Personalized Analysis of Rearranged Ends.

Εικόνα2: Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA *Daniel A. Haber and Victor E. Velculescu*

1.3.4.1 Cell-free DNA

Η παρουσία του cfDNA στην κυκλοφορία, είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο. Τα θραύσματα του DNA εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος από τα κύτταρα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια **κυτταρικής απόπτωσης** ή άλλων μορφών κυτταρικού θανάτου. Κανονικά, τα **αποπτωτικά ή νεκρωτικά κύτταρα** απομακρύνονται και τα επίπεδα του cfDNA είναι σχετικά χαμηλά. Αρκετές χιλιάδες ισοδύναμα γονιδιώματικού DNA υπάρχουν τυπικά σε 1 mL κυκλοφορούντος πλάσματος, με περισσότερο από το 90% των υγιών ατόμων να έχουν λιγότερα από 25 ng cfDNA ανά mL^{4,10,11}. Σε ορισμένες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής λύσης, της άσκησης ή της βλάβης των ιστών, τα επίπεδα cfDNA μπορεί να είναι σημαντικά υψηλότερα. Πρόσφατες αναλύσεις⁴ έχουν δείξει ότι τα επίπεδα μπορεί να αυξηθούν περισσότερο από μια τάξη μεγέθους κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Τα **επίπεδα cfDNA σε ασθενείς με καρκίνο είναι κατά κανόνα αρκετές φορές υψηλότερα από αυτά υγιών ατόμων**. Το cfDNA τυπικά κατακερματίζεται σε μήκος 160 έως 180 bp¹², που αντιστοιχεί σε προστατευμένο από νουκλεοσώματα DNA που παρατηρείται στα αποπτωτικά κύτταρα. Σε ασθενείς με καρκίνο, ένα κλάσμα cfDNA που προέρχεται από όγκο ονομάζεται ctDNA. Θραύσματα που προέρχονται από νεκρωτικά κύτταρα έχουν μέγεθος γύρω στις 10.000 βάσεις και έτσι εύκολα καθορίζεται η προέλευση τους σε σχέση με το αποπτωτικό cfDNA. Ένα βασικό επιχείρημα σύμφωνα με το οποίο **η διαδικασία της απόπτωσης αποτελεί το κύριο μονοπάτι έκλυσης cfDNA** είναι ότι τα επίπεδα cfDNA μειώνονται κατά 90% περίπου μετά από ακτινοθεραπεία. Αν η νέκρωση ήταν η βασική αιτία του παραπάνω φαινομένου θα έπρεπε να παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του cfDNA^{8,12}.

Επιπρόσθετα με τα δυο αυτά γνωστά κυτταρικά φαινόμενα, πολλές μελέτες δείχνουν ότι **ένα σημαντικό κλάσμα του cfDNA προέρχεται από ενεργές κυτταρικές εκκρίσεις**, στις οποίες το πρόσφατα συντιθέμενο DNA σε συνδυασμό με ένα σύμπλοκο λιπιδίου-πρωτεΐνης απελευθερώνεται στην κυκλοφορία^{4,6,11}. Το 2010, αυτό το σύμπλεγμα πρωτεϊνών παίρνει το όνομα «virgosome». Από τότε, άλλα «κινητά» σύμπλοκα πρωτεϊνών όπως η Argonaute 2 και η λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL) φαίνεται ότι συνδέονται με νουκλεϊνικά οξέα και εντοπίζονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα απελευθερώνουν εξωκυτταρικά κυστίδια, όπως εξωσώματα (exosomes) και προστασώματα (prostasomes), τα οποία περιέχουν υψηλή συγκέντρωση σε νουκλεϊκά οξέα που συχνά σχετίζονται με το κύτταρο από το οποίο προέρχονται τα παραπάνω κυστίδια.



Nature Reviews | **Cancer**

Εικόνα 3: Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Jonathan C. M. Wan, Charles Massie, Javier Garcia-Corbacho, Florent Mouliere, James D. Brenton, Carlos Caldas, Simon Pacey, Richard Baird & Nitzan Rosenfeld Review Article | Published: 24 February 2017*

1.4 Παιδιατρική Ογκολογία^{13,14}

Οι κακοήθειες στην παιδική ηλικία αποτελούν τη δεύτερη αιτία θανάτου, μετά τα ατυχήματα, έχοντας επίπτωση 168 περιπτώσεις ανά 1.000.000 γενικού πληθυσμού¹⁴.

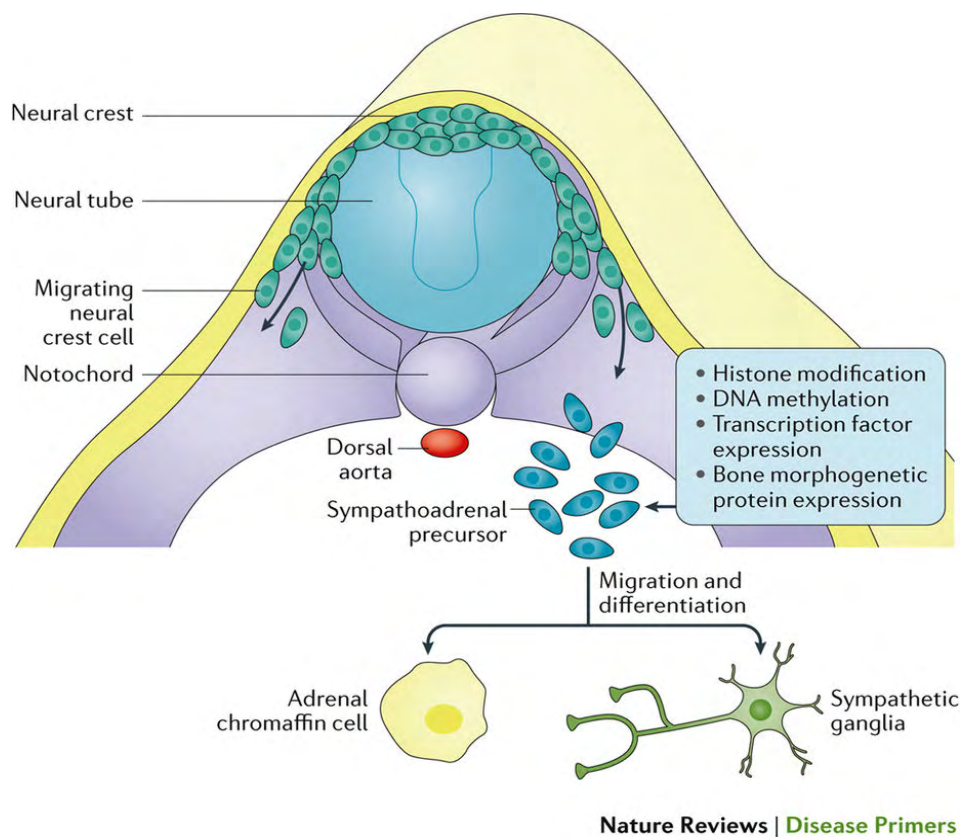
Η σειρά συχνότητας των μορφών κακοήθειας στα παιδιά έχει ως ακολούθως:

1. Λευχαιμία (36%)
2. Όγκοι κεντρικού νευρικού συστήματος (20%)
3. Λεμφώματα (15%)
4. Νεφροβλάστωμα (7%, ιδιαίτερα συχνό στις μικρές ηλικίες)
5. Νευροβλάστωμα (7%)
6. Ραβδομυοσάρκωμα (7%)
7. Σάρκωμα Ewing
8. Τεράτωμα (5%)
9. Όγκοι ήπατος (0,2-2,8%)
10. Ιστιοκυττάρωση (3%)
11. Όγκοι γεννητικών οργάνων (1,5%, αγόρια, κορίτσια)

1.4.1 Νευροβλάστωμα

Το **Νευροβλάστωμα**, το **γάγγλιο-νευροβλάστωμα** και το **γαγγλιο-νεύρωμα**, αποτελούν την ομάδα των περιφερικών νευροβλαστικών όγκων (peripheral neuroblastic tumours-**pNTs**). Πρώτο-περιγράφηκαν το 1910 από τον παθολογοανατόμο J.H. Wright σαν όγκος της παιδικής ηλικίας νευρικής προέλευσης¹⁵.

Φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή ζωή, τα πρωτογενή συμπαθητικά κύτταρα της αρχέγονης νευρικής ακρολοφίας, μεταναστεύουν στα γάγγλια του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και στο μυελό των επινεφριδίων. Εκεί οι άωρες μορφές των κυττάρων, αφού εξελιχτούν σε δύο διαδοχικά στάδια, της **συμπαθητικογονίας** και του **συμπαθητικοβλάστη** μετατρέπονται σε ώριμα γαγγλιακά κύτταρα. Το νευροβλάστωμα προέρχεται από τις **άωρες μορφές κυττάρων**, και ανάλογα από την μορφή που επικρατεί, αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί ως συμπαθητικογονίωμα, συμπαθητικοβλάστωμα ή και μεικτό νευροβλαστωμα. Αντίθετα, τα γαγγλιο-νευρώματα προέρχονται από ώριμα γαγγλιακά κύτταρα και ανήκουν στην κατηγορία των καλοηθών όγκων.



Εικόνα 4: Neuroblastoma Katherine K. Matthay, John M. Maris, Gudrun Schleiermacher, Akira Nakagawara, Crystal L. Mackall Lisa Diller, William A. Weiss. *Nature Reviews Disease Primers* volume2, Article number: 16078 (2016)

Το νευροβλάστωμα αποτελεί το 7%-10% των παιδιατρικών κακοηθειών, ενώ είναι ο συχνότερος εξωκρανιακός όγκος της παιδικής ηλικίας. Η συχνότητα του υπολογίζεται σε 10.2 περιστατικά ανά 1.000.000 παιδιών κάτω των 15 ετών. Ευθύνεται για το 15% των θανάτων από καρκίνο στην παιδική ηλικία και η μέση ηλικία διάγνωσης είναι οι 17-22μήνες. Σε ηλικία >1 έτους ο όγκος είναι μεταστατικός κατά την διάγνωση, στο 60%-70% των περιπτώσεων.

Οι όγκοι μπορούν να προέλθουν από οποιοδήποτε σημείο του οργανισμού διαθέτει συμπαθητικό νευρικό σύστημα αλλά συχνότερα η αρχική τους εντόπιση παρατηρείται στον **μυελό των επινεφριδίων**(48%) και στο **οπισθοπεριτόναιο** (25%) με την εμφάνιση ψηλαφητής μάζας στην αριστερή πλάγια κοιλιακή χώρα, η οποία είναι συμπαγής με ανώμαλη υβώδη επιφάνεια. Επίσης παρατηρείται και στον θώρακα (15%) καταλαμβάνοντας το οπίσθιο μεσοπνευμόνιο προκαλώντας αναπνευστική δυσχέρεια. Σε περίπτωση που επεκτείνεται σε μεσοσπονδύλιο τμήμα, ασκεί πίεση στη σκληρά μήνιγγα και εκδηλώνεται με νευρολογική σημειολογία (π.χ. παραπληγία, διαταραχές κινητικότητας άνω ή κάτω άκρων). Επίσης, διήθηση του αστεροειδούς γαγγλίου προκαλεί σύνδρομο Horner (μύση, ενόφθαλμο, πτώση άνω βλεφάρου). Σε ποσοστό 2% των παιδιών με νευροβλάστωμα, εκδηλώνονται μυοκλονική αταξία και νυσταγμός. Στον τράχηλο εντοπίζεται, σε ποσοστό 3%, με την εμφάνιση συμπαγους μάζας. Στην πύελο βρίσκεται, σε ποσοστό 5%, προκαλώντας δυσκοιλιότητα και διαταραχές στην ούρηση.

Σε μεγάλο ποσοστό (70-80%), οι ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 18 μηνών, έχουν **μεταστάσεις**. Οι μεταστάσεις γίνονται μέσω των λεμφαγγείων και των αιμοφόρων αγγείων, κατά συνέχεια των ιστών, σε παρακείμενους ιστούς καθώς και σε όργανα άλλων ανατομικών περιοχών, όπως οι επιχώριοι λεμφαδένες, το ήπαρ, τα οστά, οι πνεύμονες, ο υποδόριος ιστός και ο εγκέφαλος.

Στη νεογνική και τη βρεφική ηλικία, οι μεταστάσεις κατά το πλείστον γίνονται στο ήπαρ. Σε παιδιά >2 χρόνων, οι μεταστάσεις αφορούν, κυρίως, τα οστά και, συνήθως, είναι αμφοτερόπλευρες.

Τα συμπτώματα σχετίζονται με το στάδιο της νόσου (περιγράφεται παρακάτω) και κυρίως οφείλονται σε φαινόμενα ανάλογα με την θέση του όγκου, όπως κοιλιακή διόγκωση ή εντερική απόφραξη αλλά και ανάλογα με την μεταστατική του ικανότητα. Σπανιότερες εκδηλώσεις είναι το οίδημα και οι εκχυμώσεις των οφθαλμικών κόγχων, οι δερματικές μεταστάσεις ή και παρανεοπλασματικά σύνδρομα όπως αυτό του μυόκλωνου/οψόκλωνου το οποίο σχετίζεται με μη εμφανές νευροβλάστωμα έως και στο 43% των περιπτώσεων.

Το νευροβλάστωμα παρουσιάζει ιδιαίτερη βιολογική συμπεριφορά. Για παράδειγμα έχουν καταγράψει περιπτώσεις, κατά τις οποίες τα άωρα κύτταρα από τα οποία και προέρχεται, **ωριμάζουν από μόνα τους** με αποτέλεσμα την αιφνίδια ίαση, καθώς ο όγκος από κακοήθη μορφή μεταπίπτει σε καλοήθη. Σε γενικές γραμμές όμως, οι γενετικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται συχνά στο νευροβλάστωμα και σχετίζονται και με την συμπεριφορά του όγκου είναι:

1. Ανευπλοειδία- διπλοειδία ή τριπλοειδία
2. Επέκταση του ογκογονιδίου MYCN (20%-25%)
3. Απώλεια του χρωμοσωμικού τμήματος 1p36
4. Πρόσθκη του χρωμοσωμικού τμήματος 17q
5. Απώλεια του τμήματος 11q23

Η βιοχημική ταυτότητα του όγκου χαρακτηρίζεται από **παράγωγή κατεχολαμινών**, των οποίων τα προϊόντα του μεταβολισμού τους ανιχνεύονται με τη συλλογή και την εξέταση ούρων 24ώρου. Τα κύρια προϊόντα μεταβολισμού των κατεχολαμινών που ανιχνεύονται είναι:

- Το βανιλλυλομανδελικό οξύ (VMA–Vanillyl Mandelic Acid)
- Το ομοβανιλλικό οξύ (HVA–HomoVanillic Acid)

1.4.1.1 Μοριακή Διάγνωση

Η κλινική ετερογένεια των ασθενών με νευροβλάστωμα σχετίζεται με μια ποικιλία βιολογικών χαρακτηριστικών της ίδιας της ασθένειας. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η επέκταση του γονιδίου MYCN, δηλαδή η δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων, η οποία αποτελεί έναν **αρνητικό δείκτη της ταχείας εξέλιξης της νόσου**¹⁶. Η ενίσχυση του γονιδίου ανιχνεύεται στο 4% των ασθενών στις πρώιμες φάσεις του νευροβλαστώματος, στο 8% των ασθενών στο στάδιο 4S και στο 30% περίπου των ασθενών σε προχωρημένα στάδια. Η αξιολόγηση, λοιπόν, της κατάστασης του MYCN είναι ουσιώδης για την σταδιοποίηση της ασθένειας και τον προσδιορισμό της θεραπείας. Η διαγραφή της περιοχής p36 του χρωμοσώματος 1 είναι ένας άλλος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας ο οποίος συχνά απαντάται σε συνδυασμό με την ενίσχυση του MYCN, αν και δεν χρησιμοποιείται σήμερα ως καθοριστικός παράγοντας της θεραπείας¹⁸.

Πριν από μερικά χρόνια, η κυτταρογενετική μέθοδος (FISH) αντικατέστησε το Southern blotting (δεν μας επιτρέπει τον έλεγχο της διαγραφής του 1p36) στην πρωτοκαθεδρία των μεθόδων για τον προσδιορισμό και την αξιολόγηση της κατάστασης του MYCN. Χρησιμοποιώντας την FISH, ο χρόνος εξαγωγής των αποτελεσμάτων μειώθηκε από εβδομάδες σε μέρες, καθιστώντας τη χρήση του σε κλινικές δοκιμές, ρεαλιστική. Βέβαια και οι δυο παραπάνω διαδικασίες απαιτούν μεγάλη ποσότητα DNA, η οποία δεν είναι πάντα εύκολα διαθέσιμη από «στερεή» βιοψία (solid biopsy) η οποία συνήθως χρησιμοποιείται για την συλλογή του παθολογικού ιστού. Η FISH τις περισσότερες φορές οδηγεί σε σαφή αποτελέσματα, αλλά παραμένει ένα ποσοστό περιπτώσεων στις οποίες υπάρχει οριακή ενίσχυση του γονιδίου-στόχου και η ακριβής μέτρηση των σημάτων είναι δυσχερής.

Έτσι λοιπόν, τον τελευταίο καιρό η ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του γονιδίου MYCN γίνεται με την τεχνική της **αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου(real-time PCR)**^{9,17,18}, μειώνοντας έτσι τον χρόνο εξαγωγής των αποτελεσμάτων σε λίγες μόνο ώρες ξεπερνώντας ταυτόχρονα και βασικά προβλήματα που έχουν οι μορφές βιολογικής παρατήρησης και αξιολόγησης που βασίζονται στο μικροσκόπιο. Βεβαία γεννήθηκαν -ή διατηρήθηκαν- άλλα προβλήματα, αφού το κοινό χαρακτηριστικό όλων των μορφών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι η **στοχαστικότητα** τους, κάνοντας έτσι δύσκολο τον καθορισμό ενός αριθμητικού ορίου αντιγράφων του γονιδίου, πάνω από το οποίο ένα δείγμα θα χαρακτηρίζεται ως παθολογικό¹⁸. Το σημαντικότερο όμως δεδομένο είναι ότι με την real-time PCR δίνεται πλέον η ευκαιρία, και για το νευροβλάστωμα, να τεθούν σε εφαρμογή (πειραματική και μετέπειτα κλινική) και οι **«υγρές βιοψίες»(liquid biopsy)** με την χρήση αίματος αντί για ιστό και με ανίχνευση το cell-free DNA του όγκου τόσο για την σταδιοποίηση της ασθένειας και τον σχεδιασμό

απαιτούμενης θεραπείας αλλά κατά βάση για την συνεχή παρακολούθηση της βιολογικής εξέλιξης της κακοήθους νεοπλασίας (βλ. ενότητα 1.3.4).

1.4.1.2 Σταδιοποίηση της νόσου

Τα διεθνή κριτήρια για ένα κοινό σύστημα σταδιοποίησης του νευροβλαστώματος περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1988 και στη συνέχεια αναθεωρήθηκαν το 1993. Το **Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης Νευροβλαστώματος (INSS)**¹⁶ είναι ένα χειρουργο-παθολογικό σύστημα ταξινόμησης, που εξαρτάται από:

- την πληρότητα της εκτομής του πρωτεύοντος όγκου
- την αξιολόγηση της ομόπλευρης και της ετερόπλευρης εμπλοκής του στους λεμφαδένες
- τη σχέση του πρωτεύοντος όγκου με τη μέση γραμμή.

	Εντόπιση	Λεμφαδένες	Αφαίρεση Όγκου	Μεταστάσεις
Στάδιο1	Όργανο	-	Ολική	-
Στάδιο2α	Ομόπλευρη	-	Μερική	-
Στάδιο2β	Ομόπλευρη	Σύστοιχη	Ολική η Μερική	-
Στάδιο3	Ή ετερόπλευρη	Σύστοιχη Αντίστοιχη	Μερική	-
Στάδιο 4	Όργανο	-	-	Οστά, Μυελός, Λεμφαδένες, Ήπαρ
Στάδιο4S	-	-	-	Μυελός οστών, Δέρμα, Ήπαρ

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση του νευροβλαστώματος(INSS)

Παρόλο που έχει αποδειχθεί ότι το INSS έχει προγνωστική σημασία, υπήρξαν κάποιες δυσκολίες στην ευρεία χρήση του (η εμπειρογνωμοσύνη και η επιθετικότητα αφαίρεσης του όγκου από τον χειρουργό, επηρεάζουν το στάδιο του όγκου, η δειγματοληψία των λεμφαδένων γίνεται αδρανής και οι ασθενείς που παρατηρούνται απλά χωρίς χειρουργική επέμβαση δεν μπορούν να «σταδιοποιηθούν» σωστά). Ως εκ τούτου, επιδιώχθηκε η δημιουργία ενός συστήματος σταδιοποίησης, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί εύκολα σε

ολόκληρο τον κόσμο. Έτσι προτάθηκε ένα νέο σύστημα σταδιοποίησης το 2009 βασισμένο στην απεικόνιση των όγκων και όχι στην έκταση της χειρουργικής εκτομής. Σε αυτό το σύστημα σταδιοποίησης, εντοπίζονται όγκοι με βάση την απουσία (L1) ή την παρουσία (L2) ενός ή περισσότερων από τους 20 καθορισμένους παραγόντες κινδύνου (IDRF). Οι μεταστατικοί όγκοι ορίζονται ως το στάδιο M. Το στάδιο MS, παρόμοιο με το INSS στάδιο 4S, αναφέρεται σε ασθένειες με μεταστάσεις που περιορίζονται στο δέρμα, το ήπαρ και το μυελό των οστών (λιγότερο από 10%) σε παιδιά ηλικίας κάτω των 18 μηνών. Αυτοί οι νέοι ασθενείς μπορεί να έχουν πρωτογενείς όγκους L1 ή L2.

1.4.1.3 Θεραπεία^{13,16}

Η χειρουργική εκτομή του όγκου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία των ασθενών με νευροβλάστωμα. Η χειρουργική επέμβαση αποσκοπεί σε λήψη βιοψιών για τη διάγνωση, στην όσο το δυνατό μεγαλύτερη εκτομή του όγκου καθώς και στη λήψη δειγμάτων προς βιολογική μελέτη του. Επίσης, χειρουργική επέμβαση επιτελείται, μετά από χημειοθεραπεία, με σκοπό την πλήρη εκτομή του.

Το ακριβές πλάνο της θεραπείας εξαρτάται και από το στάδιο της ασθένειας.

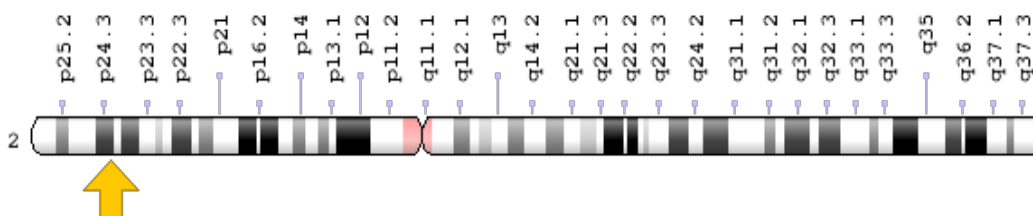
- Ασθενείς που εντάσσονται στην **ομάδα χαμηλού κινδύνου** (ασθενείς με εντοπισμένη νόσο), υπόκεινται σε ολική χειρουργική αφαίρεση του όγκου χωρίς συμπληρωματική χημειοθεραπεία, με μεγάλα ποσοστά ίασης.
- Ασθενείς στα στάδια **2α και 2β κυρίως, χωρίς ενίσχυση του πρωτο-ογκογονιδίου MYCN**, αντιμετωπίζονται με ολική χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Αντίθετα, εάν υπάρχει **επέκταση του MYCN στους ασθενείς αυτούς κατατάσσονται άμεσα σε υψηλού κινδύνου περιστατικά**, ανεξάρτητα από την ηλικία και την ιστολογική εικόνα. Στους περισσότερους ασθενείς με στάδιο 4S (ηλικία <12 μήνες ανευπλοϊδικός καρυότυπος όγκου, μη-επέκταση του MYCN) επέρχεται αυτόματη ίαση.
- Στην **ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου**, κατατάσσονται οι ασθενείς με ηλικία μικρότερη των 18 μηνών, στα στάδια 3 και 4 χωρίς ενίσχυση του MYCN. Στους ασθενείς αυτούς συνιστάται χειρουργική αφαίρεση του όγκου καθώς και χημειοθεραπεία.

- Οι ασθενείς που ανήκουν στην **ομάδα υψηλού κινδύνου** (ηλικία >18 μήνες, στάδιο 3 και 4, δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες) αντιμετωπίζονται αρχικά, με επιθετική χημειοθεραπεία (αλκυλικοί παράγοντες, ανθρακυκλίνες, αναστολείς τοποισομερασών) και ακολούθως, με χειρουργική αφαίρεση του ογκου. Στη συνέχεια απαιτείται μεταμόσχευση μυελού των οστών.

1.4.1.4 Γενετική Βάση Νευροβλαστώματος

- **Ογκογονίδιο MYCN**

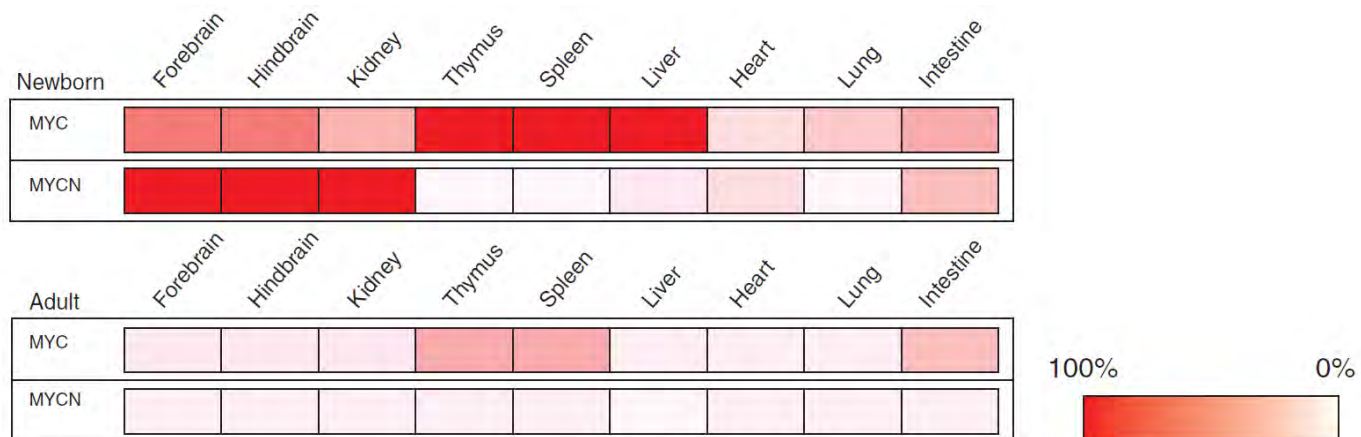
Η πρόγνωση του νευροβλαστώματος ποικίλλει από την αυθόρμητη ίαση έως την επιθετική πρόοδο, ανάλογα με αρκετές γνωστές κλινικές παραμέτρους και γενετικές ανωμαλίες, όπως περιγράφηκε και παραπάνω. Μεταξύ αυτών, η επέκταση του γονιδίου MYCN, που βρέθηκε στο 30-40% των νευροβλαστωμάτων, και αποτελεί τον πρώτο αλλά όχι μοναδικό μοριακό δείκτη (ανίχνευση της διαγραφής του 1p36) που χρησιμοποιείται επί του παρόντος στην κλινική μελέτη, για τη κατηγοριοποίηση των ασθενών^{9,20}. Το ογκογονίδιο MYCN κωδικοποιεί έναν **μεταγραφικό παράγοντα** που ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων MYC και εκφράζεται, κυρίως κατά τη διάρκεια φυσιολογικής αναπτυσσόμενων εμβρύων, στον εγκέφαλο αλλά και κατά την νευρική ανάπτυξη. Οι ασθενείς με ενίσχυση του MYCN ηλικίας άνω του 1 έτους έχουν πιθανότητα επιβίωσης γύρω στο 30%, παρά τις όποιες θεραπείες χρησιμοποιηθούν, όπως χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου MYCN μετά από την επέκταση του αριθμού των αντίγραφων του, θεωρείται ότι είναι κρίσιμα για την επιθετική συμπεριφορά των νευροβλαστωμάτων που την διαθέτουν²¹



Η ενίσχυση και άρα η αυξημένη έκφραση του MYCN έχει επίσης βρεθεί σε ρετινοβλαστώματα και σε καρκινώματα πνευμονικών μικροκυττάρων. Συνεπώς,

αποδειχθηκε ότι η μη-φυσιολογική έκφραση του MYCN μπορεί να παίξει ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη αυτών των όγκων, μια θεωρία που υποστηρίχθηκε περαιτέρω από το εύρημα ότι το MYCN μπορεί να συνεργαστεί με μια μεταλλαγμένη εκδοχή του ογκογονιδίου Ha-Ras για να μετασχηματίσουν φυσιολογικά εμβρυϊκά κύτταρα σε καλλιέργεια²² (βλ. παρακάτω).

Το MYCN διαθέτει αλληλουχίες νουκλεοτιδίων παρόμοιες με το ήδη χαρακτηρισμένο πρωτόγονο γονίδιο C-MYC. Πρόσφατα, το γονίδιο L-MYC βρέθηκε επίσης λόγω της ομοιότητας με το C-MYC. Κάθε ένα από αυτά τα γονίδια (c-myc, N-myc και L-myc) έχει βρεθεί ενισχυμένο στον ίδιο τύπο καρκινώματος μικροκυττάρων του πνεύμονα. Έτσι, η ομαδοποίηση σε οικογένεια των γονιδίων MYC αντανάκλα μια δομική συγγένεια²². Βέβαια όσον αφορά την έκφραση και την λειτουργία τους C-MYC και του MYCN έχουν προφανείς διαφορές. Η έκφραση του MYCN χαρακτηρίζεται από **ιστοειδικότητα** και βρίσκεται σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, ενώ η έκφραση του MYC είναι πιο γενικευμένη. Για παράδειγμα, η έκφραση του MYCN είναι υψηλότερη στον πρόσθιο εγκέφαλο, τους νεφρούς και τον οπίσθιο εγκέφαλο νεογνών, ενώ απουσιάζει από όλους τους «ενηλικούς» ιστούς. Αντίθετα, η έκφραση του MYC ανιχνεύτηκε σε ένα ευρύ φάσμα ιστών τόσο νεογέννητων όσο και ενήλικων πειραματόζων-κατά βάση ποντικών²⁴. Συνεπώς το παραπάνω παράδειγμα υποδεικνύει την ύπαρξη του γονιδίου σε νευροβλαστώματα τα οποία αποτελούν κακοήθειες της νεογνικής και παιδικής ηλικίας. Η έκφραση των γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (όσο πιο έντονο το χρώμα τόσο μεγαλύτερη έκφραση στον ιστό).



Εικόνα 5: Miller Huang and William A. Weiss Departments of Neurology, Pediatrics, and Neurosurgery, University of California, San Francisco, California

Μετά τον προσδιορισμό των ορίων του , περιγράφηκε ένα **γονίδιο μήκους 6435 bp** με **δύο ιντρόνια** των 892 bp και 2629 bp αντίστοιχα. Επίσης μετά από ανάλυση του μεταγραφώματος, προσδιορίστηκε ότι η αλληλουχία των **νουκλεοτιδίων του ώριμου mRNA είναι 2914 βάσεις συν μια πολύ(A)-ουρά**. Εντοπίστηκαν επίσης δύο

περιοχές που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως υποκινητές. Τα πιθανά αυτά «πλαίσια TATA» (TATA boxes) βρέθηκαν στις θέσεις 85 και 408 από το όριο της αλληλουχίας του γονιδίου. Ένα διουκλεοτίδιο AC ουσιαστικά υποδηλώνει τις θέσεις έναρξης για την σύνθεση του mRNA του γονιδίου και βρίσκεται περίπου 30 bp καθοδικά από το κάθε «πλαίσιο». Βασιζόμενη αποκλειστικά στην ακολουθία, καμία περιοχή δεν εμφανίστηκε ως ισχυρός υποψήφιος για το ρόλο του υποκινητή. Χρήσιμες πληροφορίες για την ταυτοποίηση των αλληλουχιών του υποκινητή προήλθαν από την ανάλυση cDNA του MYCN που απομονώθηκε και προσδιορίστηκε η αλληλουχία του. Το 5' άκρο του κλώνου cDNA εκτείνεται αντίστοιχα στη θέση 386 στην αλληλουχία του γονιδιώματος. Η περιοχή αυτή βρίσκεται ανοδικά του δεύτερου «TATA box», γεγονός το οποίο μπορεί και να υποδηλώνει ότι αυτή είναι η αλληλουχία που δρα ως υποκινητής.

Το κωδικό τμήμα του γονιδίου MYCN ταυτοποιήθηκε και μεταφράστηκε σε αμινοξέα, συνθέτοντας μια **πρωτεΐνη 456 αμινοξέων**, με μοριακό βάρος **49.000Da**. Στην κωδική αλληλουχία εντοπίζονται τρία κωδικόνια ATG τα οποία θα μπορούσαν να παίζουν τον ρόλο του κωδικονίου έναρξης. Η ύπαρξη ενός, ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης με μεγάλο μήκος, η αντίστοιχη αλληλουχία αμινοξέων του, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το κωδικόνιο που παίζει τον ρόλο της έναρξης είναι το δεύτερο από τα τρία ATG, τα που απέχουν πολύ μεταξύ τους και βρίσκονται θέσεις 1626, 1650 και 1659 αντίστοιχα. Εάν το πρώτο ή η τρίτο ATG ξεκινήσει τη μετάφραση, το προβλεπόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται θα διαφέρει κατά + 8 ή - 3 αμινοξέα, αντίστοιχα. Το προβλεπόμενο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης οριοθετεί την **έναρξη της μετάφρασης στο δεύτερο εξόνιο** το οποίο ακολουθεί μια **5'αμεταφραστη** περιοχή μήκους 637 νουκλεοτιδίων. Η παρουσία μιας πολύ μακράς ακολουθίας, η οποία εκκινεί ξεκάνει βεβαία από ένα μη κωδικοποιημένο πρώτο εξόνιο, θυμίζει την αλληλουχία του C-MYC. Σε αντίθεση με το C-MYC, το πρώτο μη κωδικοποιημένο εξόνιο του MYCN περιέχει τρεις τριπλέτες ATG (θέσεις 150, 412 και 548. Ωστόσο, φαίνεται απίθανο για οποιαδήποτε από αυτές τις ATG τριπλέτες να αρχίζει τη σύνθεση πρωτεΐνης MYCN, αφού κάθε μία ακολουθείται από κωδικόνιο τερματισμού σε μια απόσταση μικρότερη των 300 νουκλεοτιδίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις παράγονται διαφορετικές πρωτεΐνες λόγω εναλλακτικού ματίσματος. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης των εξονίων 2 και 3 τερματίζεται με ένα **κωδικόνιο λήξης** (TAG) στη θέση 5647, 456 αμινοξέα καθοδικά από την προβλεπόμενη μεθειονίνη έναρξης. Η **3'αμεταφραστη** αλληλουχία που ακολουθεί περιέχει 909 νουκλεοτίδια^{22,23}.

Η καρκινογενετική δράση του ογκογονιδίου MYCN είναι πολύπλοκη και πολυεπίπεδη. Η συμβολή του θα μπορούσε να ταξινομηθεί σύμφωνα με τις κυτταρικές διεργασίες που επηρεάζει όπως^{13,22}:

1. Αγγειογένεση

Στο νευρωβλάστωμα η έντονη αγγειογένεση καθώς και η επέκταση του γονιδίου MYCN, συσχετίζονται με την δυσμενή επιβίωση. Συγκεκριμένα η έκφραση του γονιδίου εμποδίζει την απελευθέρωση αναστολέων της αγγειογένεσης όπως την Ακτιβίνη Α, τον ανασταλτικό παράγοντα λευχαιμίας (LIF) και την ιντερλευκίνη 6 (IL-6) ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιεί παράγοντες όπως η αγγειογενίνη²⁵ και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) μέσω του μονοπατιού (PI3K) / (mTOR). Η παραπάνω συσχέτιση της αγγειογένεσης με την επέκταση του MYCN γεννά μια νέα θεραπευτική ιδέα για ασθενείς με νευρωβλάστωμα, η οποία θα βασίζεται σε αντι-αγγειογενετική στόχευση της θεραπείας.

2. Αυτοανανέωση και κυτταρική πολυδυναμικότητα

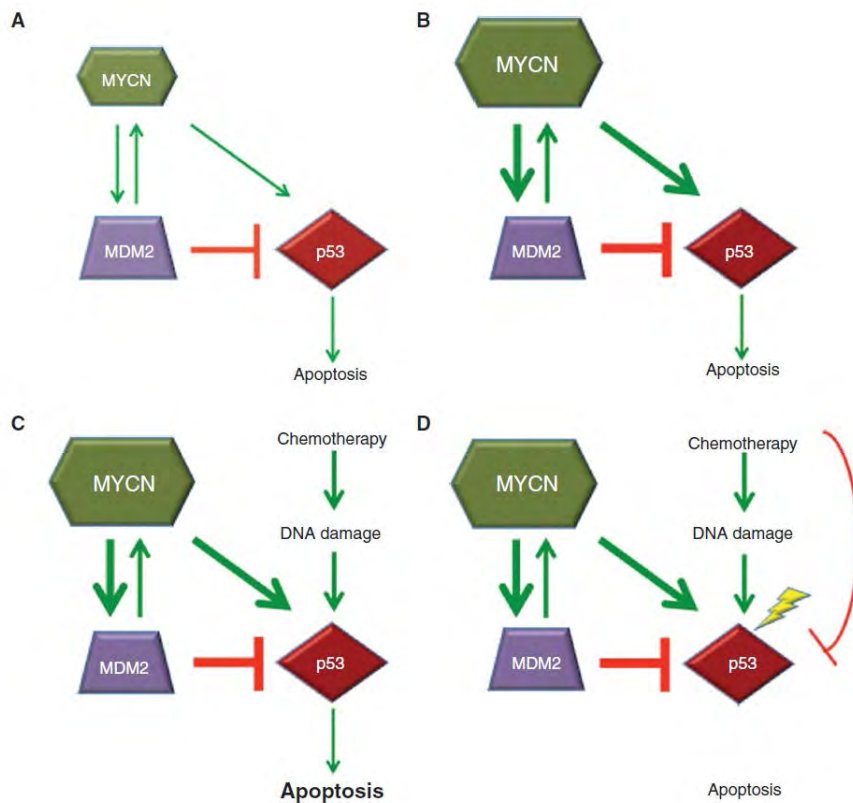
Το MYCN, όσο και το MYC, οδηγούν στον αποκλεισμό μια σειρά οδών κυτταρικής διαφοροποίησης όπως αυτές που συμμετέχουν οι πρωτεΐνες CDKL5 και TG2, ενώ ταυτόχρονα επάγουν την έκφραση των παραγόντων αυτοανανέωσης και κυτταρικής πολυδυναμικότητας όπως τα KLF2, KLF4 και LIN28B. Περαιτέρω υποστήριξη για την αυτοανανέωση, στην οποία οδηγεί το MYCN, παρέχει η άποψη ότι οι κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος που έχουν επέκταση του MYCN τείνουν να υποστούν συμμετρική κυτταρική διαίρεση, ενώ οι μη ενισχυμένες σειρές προτιμούν να διαιρούνται α-συμμετρικά.

3. Ανοσολογική απόκριση

Το MYCN επηρεάζει την ανοσολογική λειτουργία του οργανισμού μέσω της παρεμβολής του στα αντιγόνα των καρκινικών κυττάρων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη MCP-1 / CCL2 που φυσιολογικά επάγει την έλξη των NK κυττάρων. Αν και δεν έχει αποδειχτεί ακόμα ότι τα κύτταρα NK είναι άμεσα αποτελεσματικά έναντι κυττάρων του νευροβλαστώματος, μπορούν να ενεργοποιηθούν κυτταροκίνες οι οποίες θα βοηθήσουν στην στρατολόγηση αντισωμάτων, στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και την παραγωγή T-κύτταρων, τα οποία θα στοχεύσουν τον όγκο

4. Απόπτωση

Το MYCN, όπως και το MYC, επάγει τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και την απόπτωση. Το κατά πόσο η έκφραση του γονιδίου θα οδηγήσει στην έναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εξαρτάται και από την κατάσταση των αντιαποπτωτικών γονιδίων όπως το p53. Είναι ενδιαφέρον ότι οι μεταλλάξεις TP53 είναι σπάνιες κατά τη διάγνωση του νευροβλαστώματος, υποδηλώνοντας ότι το MYCN πιθανώς συνεργάζεται με καταστολείς της σηματοδότησης p53, συμπεριλαμβανομένων των miRNA-380-5p, του ογκογονιδίου CUL7 και του μεταγραφικού παράγοντα και MDM2. Αντίθετα, μεταλλάξεις στα μέλη της οδού TP53 μπορεί να προκύψουν ως απάντηση σε κυτταροτοξική χημειοθεραπεία.



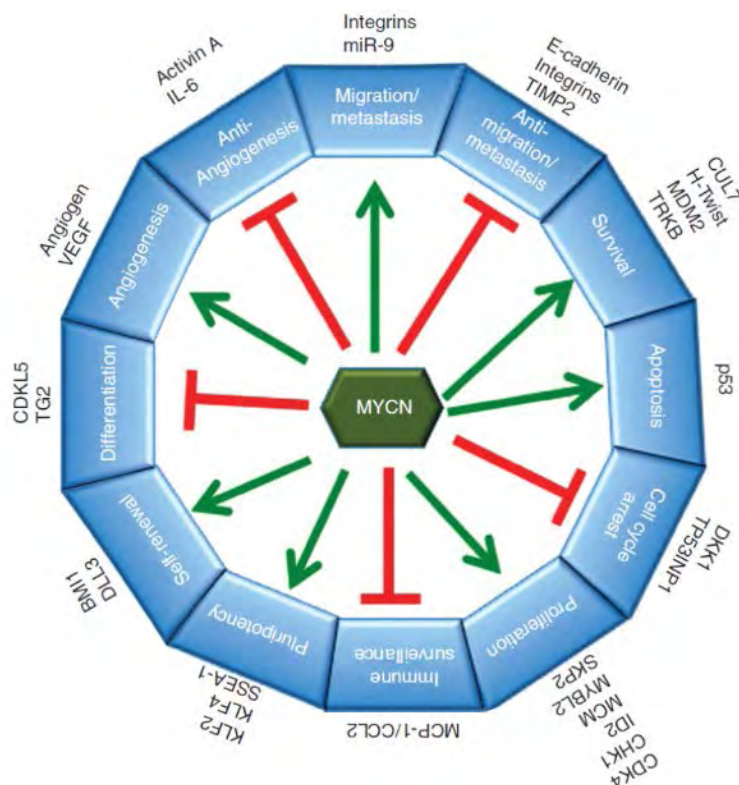
Εικόνα 6: Η επέκταση του MYCN οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή των MDM2 και TP53. Τα υψηλά επίπεδα της p53 επαγουν την απόπτωση στα καρκινικά (C) Ενώ οι ασθενείς ανταποκρίνονται αρχικά θετικά στη χημειοθεραπεία (D) Κατά την υποτροπή, οι όγκοι εμφανίζουν μετάλλαξη p53 με αποτέλεσμα την αντίσταση στη θεραπεία. *Neuroblastoma and MYCN Miller Huang and William A. Weiss Departments of Neurology, Pediatrics, and Neurosurgery, University of California, San Francisco, California*

5. Διαφοροποίηση και κυτταρικός κύκλος

Το καλύτερα χαρακτηρισμένο ογκογόνο αποτέλεσμα του MYCN είναι η προώθηση του πολλαπλασιασμού και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, τα νευροβλαστώματα ,δείχνουν ανικανότητα να σταματήσουν στη φάση G1 μετά από έκθεση σε ακτινοβολία που προκαλεί θραύση DNA, πιθανώς μέσω αρνητικής ρύθμισης της πυρηνικής πρωτεΐνης 1 που προκαλείται από TP53 (TP53INP1) και της ανοδικής ρύθμισης και των δύο CDK4 και SKP2, επιτρέποντας στο CDK2 να διαφύγει Το MYCN καταστέλλει επίσης άμεσα την έκφραση των αντι-πολλαπλασιαστικών πρωτεϊνών όπως το Dickkopf-1, που διαταράσσει την οδό σηματοδότησης WNT / β-κατενίνης και το CDKL5, το οποίο συγκρατεί τα κύτταρα μεταξύ της φάσης G0 / G1

Το MYCN εμπλέκεται και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (συγκεκριμένα στην φάση G₀/G₁) με αλληλεπίδραση με τα συμπλέγματα RAS / CDK4 και κυκλίνης E / CDK2 που φωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν τις πρωτεΐνες Rb, ενεργοποιώντας παράλληλα τον μεταγραφικό E2P για την επαγωγή της φάσης S.

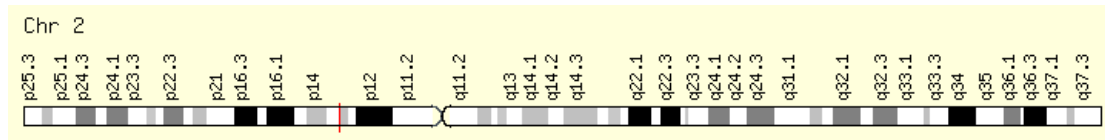
Συνοψίζοντας, το MYCN μπορεί να ενεργοποιήσει την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη μετάσταση, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την πολυπλοκότητα, την αυτοανανέωση και την αγγειογένεση. Επιπρόσθετα, το MYCN μπορεί να καταστείλει την έκφραση γονιδίων που προάγουν τη διαφοροποίηση, τη διακοπή κυτταρικού κύκλου, την ανοσολογική παρακολούθηση και γονίδια που ανταγωνίζονται τη μετάσταση και την αγγειογένεση. Στο παρακάτω σχήμα καταγράφονται όλες οι κυτταρικές λειτουργίες και τα γονίδια τα οποία αποτελούν στόχους του στα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων κατά την ογκογενέση.



Εικόνα 7 : Neuroblastoma and MYCN Miller Huang and William A. Weiss Departments of Neurology, Pediatrics, and Neurosurgery, University of California, San Francisco, California

- **Γονίδιο NAGK**

Το γονίδιο NAGK εντοπίζεται πάνω στο **χρωμόσωμα 2** στη θέση **q13.3** και έχει **μήκος 15.462 βάσεις**. Κωδικοποιεί το ενζυμο κινάση της N-ακετυλγλυκοζαμίνης²³.



Η N-ακετυλογλυκοζαμίνη (**GlcNAc**) είναι ένα από τα βασικά συστατικό των σύνθετων υδατανθράκων. Βρίσκεται σε N-γλυκάνες και O-γλυκάνες καθώς και σε γλυκολιπίδια. Ακόμα εντοπίζεται σε σύμπλοκα με πυρηνικές πρωτεΐνες και συνδέεται ως μονοσακχαρίτης σε υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης οδηγώντας έτσι σε μια παρόμοια διαδικασία με την O-φωσφορυλίωση σε αυτά τα υπολείμματα. Η κινάση της N-ακετυλογλυκοζαμίνης (Nagk) μετατρέπει την ενδογενή GlcNAc που προέρχεται είτε από λυσοσωμική αποικοδόμηση ή από θρεπτικές πηγές σε 6-φωσφορική N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Η 6-P-GlcNAc μπορεί να εισέλθει σε μια καταβολική οδό, η οποία συνδέει τον μεταβολισμό της εξασομίνης με την γλυκολυτική οδό και τελικά οδηγεί στο σχηματισμό 6-φωσφορικής φρουκτόζης ή μπορεί να εισέλθει σε αναβολική οδό που οδηγεί στον σχηματισμό UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης (UDP-GlcNAc). Η UDP-GlcNAc στη συνέχεια χρησιμεύει ως υπόστρωμα των διαφορετικών N-ακετυλογλυκοζαμινυλτρανσφερασών ή μεταβολίζεται περαιτέρω σε N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ (Neu5Ac).

Το NAGK παίζει τον ρόλο του **γονιδίου αναφοράς**^{17,18} (Housekeeping gene) κατά την σχετική ποσοτικοποίηση του γονιδίου MYCN σε κλινικά δείγματα ιστών ή αίματος. Συσχετίζεται δηλαδή η σταθερή ποσότητα των αντίγραφων του NAGK ως προς τον μεταβαλλόμενο αριθμό των αντίγραφων του MYCN. Άρα αυτό που ενδιαφέρει σε τέτοιου είδους πρωτόκολλα ως προς το NAGK, δεν είναι τόσο το αποτέλεσμα της έκφρασης του αλλά η θέση του πάνω στο γονιδίωμα. Το NAGK, λοιπόν, **επιλέχθηκε επειδή είναι στο ίδιο χρωμόσωμα με το MYCN αλλά επαρκώς μακρινό από την περιοχή που καλύπτει το αμπλικόνιο MYCN (2p13 vs 2p24)**. Αυτό σημαίνει ότι μια αριθμητική αλλαγή στο χρωμόσωμα 2 δεν θα επηρέαζε τον λόγο M / N.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η δοκιμή ενός πρωτοκόλλου για την ανίχνευση της επέκτασης του γονιδίου MYCN με την χρήση άλλων μοριακών μεθόδων (PCR ,Real Time PCR) ,εκτός από τις μέχρι τώρα κυτταρογενετικές τεχνικές (FISH) ,σε υλικά βιοψιών ασθενών με νευροβλάστωμα. Επίσης γίνεται αντίστοιχη μελέτη και σε δείγματα ορού-πλάσματος ασθενών με νευροβλάστωμα με εφαρμογή της μεθόδου της «Υγρής Βιοψίας».

3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Απομόνωση DNA

3.1.1 Απομόνωση DNA από παραφίνη (DNA FFPE extraction): Η απομόνωση DNA από δείγματα ιστού, αποθηκευμένα σε πλακίδια παραφίνης και μετά από μικροτόμηση, πραγματοποιήθηκε με το προϊόν «*Purelink genome DNA Mini kit*» της εταιρίας *Invitrogen* και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή:

Δείγμα ιστού σε παραφίνη FFPE
1ml ΞΥΛΟΛΗ 60°C,30 min -Φυγοκέντρηση 3,max speed
1ml ΑΙΘΑΝΟΛΗ 100% Φυγοκέντρηση 3,(X2) -Στέγνωμα 2-3 60°C
180μl Digestion Buffer/20μl Proteinase k μεταφορά σε spin column
480 μl Washing Buffer1 Φυγοκέντρηση 14.000g,1min
480μl WB2 Φυγοκέντρηση 14.000g,1min
30-50μl Elution Buffer -3min-RT
Φυγοκέντρηση 14.000,1min
DNA

Πίνακας 2: *Purelink genome DNA Mini kit*

Αντίστοιχο πρωτόκολλο ακολουθείται και για την απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα.

3.1.2 Απομόνωση cell-free DNA από πλάσμα (cfDNA plasma extraction): Η απομόνωση DNA από δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε, μετά την συλλογή του πλάσματος το δειγμάτων, με το προϊόν «*NucleoSnap DNA plasma*» της εταιρίας *Machery-Nagel* και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή:

ΑΙΜΑ -4.500g,10min-
Συλλογή ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (υπερκείμενο)
2ml plasma/30 µl Proteinase K
Vortex-RT-5min
1ml VL
Vortex-56°C,5min
1ml ΑΙΘΑΝΟΛΗ 100%
Vortex
Τοποθέτηση στήλης στο Vacuum
500µl CC , (0,4-0,6 bar), 30 sec
Φόρτωση δείγματος στην στήλη-0,4 bar,1min
1ml VW1
0,4bar,1min
500l WB
0.4bar,230 sec
Αφαίρεση στήλης από vacuum
Φυγοκέντρηση 16.000g 3min
50µl Elution Buffer
RT 3min
Φυγοκέντρηση 11.000g,1min
Cell-free DNA

Πίνακας 3: *NucleoSnap DNA plasma Machery-Nagel*

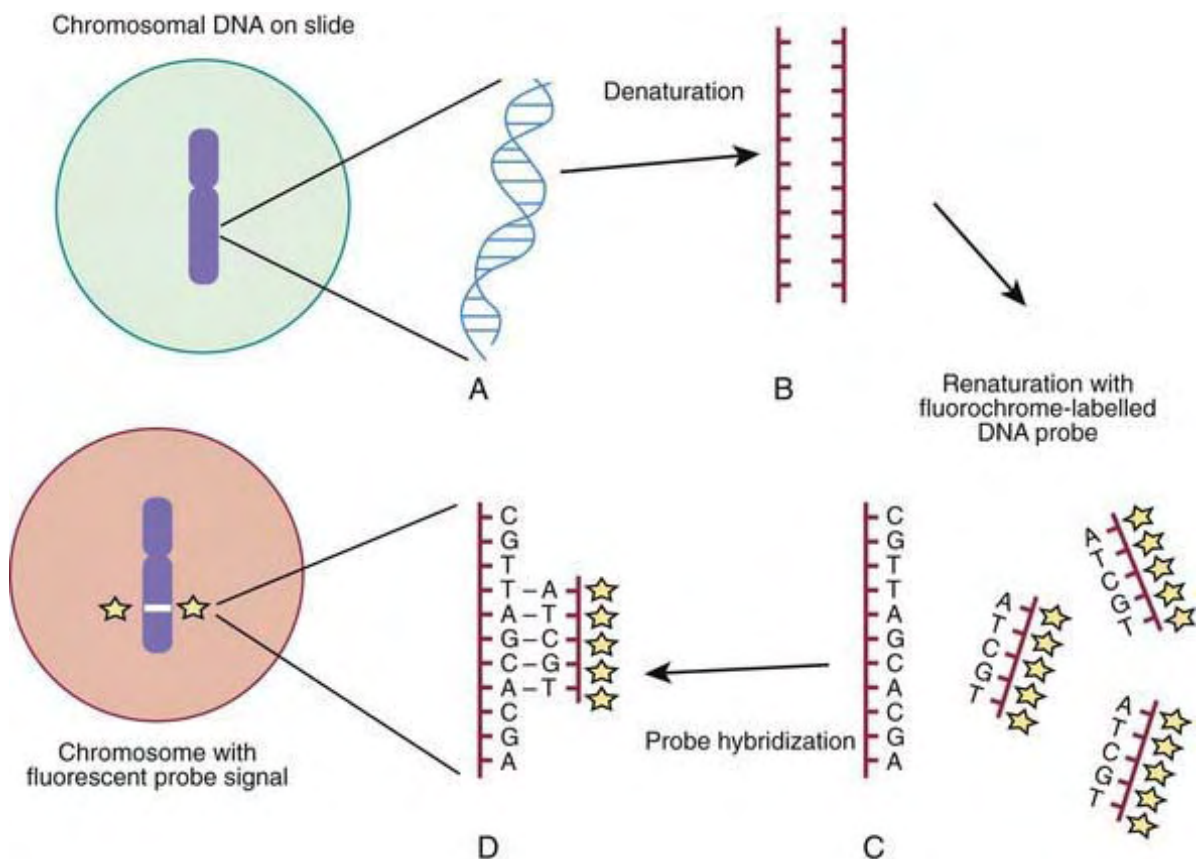
3.1.3 Πριν από την χρήση του παραπάνω πρωτόκολλου το αίμα επεξεργαστηκε ως εξής:

1. Αιμοληψία
2. Τοποθέτηση αίματος σε φιαλίδιο EDTA
3. Ήπια φυγοκέντρηση στα 1500g για 10 min
4. Συλλογή υπερκείμενου πλάσματος
5. 2^η Φυγοκέντρηση στα 4500g για 10 min (αποφυγή τυχόν μόλυνσης του πλάσματος από λευκά αιμοσφαίρια)
6. Πλάσμα έτοιμο για χρήση και απομόνωση cfDNA σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο, η αποθήκευση στους -20°C.

3.2 Μοριακή Κυτταρογενετική

3.2.1 FISH (Fluorescence in Situ Hybridization)

Ανίχνευση ειδικών χρωμοσωμικών και γονιδιακών ανακατατάξεων με τη μέθοδο FISH μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεταφάσεις ή μεσοφασικά κύτταρα. Το μεσοφασικό FISH μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα τα οποία ακόμα και μετά από καλλιέργεια έχουν χαμηλό μιτωτικό δείκτη και συνεπώς μη ικανοποιητικό αριθμό αναλύσιμων μιτώσεων, ή σε δείγματα στα οποία η συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία δεν είναι ορατή σε διαιρούμενα κύτταρα. Η μέθοδος FISH σε μεσοφασικούς πυρήνες, έχει υψηλή αξιοπιστία, είναι απλή και γρήγορη.



Εικόνα 8: Lin RL, Cherry AM, Bangs CD, et al: FISHing for answers: the use of molecular cytogenetic techniques in adolescent medicine practice. In Hyme HE, Greydanus D

3.2.1.1 Δημιουργία παρασκευασμάτων προς υβριδοποίηση

- Η διαδικασία για τη δημιουργία παρασκευασμάτων ακολουθεί τα πρωτόκολλα του εκάστοτε παθολογοανατομικού εργαστηρίου.

3.2.1.2 Προετοιμασία περιοχής υβριδισμού

1. Το παρασκεύασμα ελέγχεται στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (10x) και επιλέγεται η περιοχή υβριδισμού.
2. Επιλέγεται η περιοχή η οποία είναι καθαρότερη και απαλλαγμένη από υπολείμματα κυτταροπλάσματος και δεν πρέπει να είναι ούτε αραιή αλλά ούτε πυκνή για να επιτευχθεί η ομαλά εξάπλωση του ανιχνευτή (probe) και της ουσίας αντιχρώσης (counterstain) στη συνέχεια.
3. Αφού επιλεγεί η περιοχή, σημαδεύονται τα όρια της.
4. Όταν ολοκληρωθεί ο καθορισμός της περιοχής υβριδισμού το πλακάκι αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το παρασκεύασμα σε αυτή τη φάση είναι έτοιμο για υβριδοποίηση, η οποία πρέπει να γίνει ή μετά από 24 ώρες, ή εάν το παρασκεύασμα φυλαχτεί στους -20°C μετά από το πολύ δύο εβδομάδες.

3.2.1.3 Αποδιάταξη του DNA στόχου και ανιχνευτή

1. Προθερμαίνεται το υδατόλουτρο και ο ξηρός κλίβανος στις απαιτούμενες θερμοκρασίες.
2. Ανάλογα με την επιφάνεια της περιοχής - στόχου στο παρασκεύασμα, οι απαιτούμενοι όγκοι του μείγματος ανιχνευτών ποικίλλουν: 7μl για περιοχή που αντιστοιχεί σε καλυπτρίδα 18x18mm² ή 10μl για περιοχή 22x22mm² ή 12μl για περιοχή 24x24mm².
3. Αφού έχει ολοκληρωθεί ο καθορισμός της περιοχής υβριδισμού, και έχει στεγνώσει το πλακάκι μετά από μία μέρα περίπου, γίνεται προσθήκη του ανιχνευτή-probe mixture.
4. Καλύπτεται με κατάλληλου μεγέθους καλυπτρίδα 22x22mm² το πλακάκι και σφραγίζεται με την κατάλληλη κόλλα (rubber cement).
5. Η αποδιάταξη του DNA στόχου και ανιχνευτή επιτελείται με μία ταυτόχρονη διαδικασία και πραγματοποιείται όταν τοποθετούνται πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα στους 75°C (+1/-1⁰ C) για 2 min.
6. Κατόπιν το πλακάκι με το μείγμα ανιχνευτών επωάζεται στον κλίβανο μέσα στο κουτί υβριδισμού, στους 37°C (+1/-1⁰ C) για όλη τη νύχτα.

3.2.1.4 Έκπλυση μετά την υβριδοποίηση

1. Η κόλλα και οι καλυπτρίδες απομακρύνονται προσεκτικά από κάθε παρασκεύασμα.
2. Για την έκπλυση της περίσσειας του ανιχνευτή χρησιμοποιείται το post-Hybridization Wash Buffer .
3. Αρχικά γίνεται έκπλυση της πλάκας μέσα σε 0.4xSSC (pH 7.0 – 7.5) στους 72⁰ C (+1/-1⁰ C) για 2 min.
4. Στην συνέχεια έκπλυση της πλάκας μέσα σε 2xSSC, 0.05% Tween – 20 (pH 7.0) σε θερμοκρασία δωματίου για 30sec.
5. Τέλος γίνεται ξέπλυμα με απιονισμένο νερό για να μην δημιουργηθούν κρύσταλλο και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα.

3.2.1.5 Χρώση του DNA με DAPI

1. Σε κάθε παρασκεύασμα γίνεται προσθήκη προστίθεται 10μl DAPI/antifade και το παρασκεύασμα καλύπτεται με καλυπτρίδα 24x32mm, προσέχοντας να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες.
2. Τα παρασκευάσματα στο στάδιο αυτό μπορούν να παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Αποθηκεύονται στους -20⁰ C και στο σκοτάδι.

3.2.1.6 Μικροσκοπική παρατήρηση και ανάλυση

Η μικροσκοπική παρατήρηση των παρασκευασμάτων έγινε με μικροσκόπιο φθορισμού (Axiohplan, Zeiss) εφοδιασμένο με λάμπα φθορισμού 100 watt υδραργύρου και κατάλληλα φίλτρα για την απεικόνιση των πράσινων και κόκκινων σημάτων υβριδισμού. Η απεικόνιση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με κατάλληλο λογισμικό σύστημα (*Isis*) της εταιρίας *Metasystems*.

Η αξιολόγηση όλων των σημάτων και η ανίχνευση των σημασμένων με φθοριοχρώματα αλληλουχιών DNA για κάθε ζευγάρι ομόλογων χρωμοσωμάτων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου της εταιρίας *Metasystems* και ακολουθώντας τα διεθνώς αποδεκτά κριτήρια τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

Η υβριδοποίηση θεωρείται επιτυχής αν :

α) Όλα τα φθοριοχρώματα και τα ψευδοχρώματα είναι ορατά και έχουν την ίδια φωτεινότητα στη μίτωση.

β) Στο υπόστρωμα (background) των μιτώσεων σε κάθε παρασκεύασμα έχει φθορισμικά σήματα.

Τα στάδια μικροσκοπικής παρατήρησης και ανάλυσης με το σύστημα καρυστύπησης Isis είναι τα εξής:

1. Η εικόνα εστιάζεται στο μικροσκόπιο και φαίνεται στην οθόνη του υπολογιστή.
2. Στην θέση καλύτερης εστίασης επιλέγεται η εντολή Capture.
3. Κατόπιν το σύστημα ξεκινά την αυτόματη σύνθεση της εικόνας εισάγοντας διαδοχικά την ένταση των διαφορετικών φθοριοχρωμάτων.
4. Εάν η μίτωση που αναλύεται καταλαμβάνει περισσότερα από ένα οπτικά πεδία η καταχώρηση της συνεχίζεται στον υπολογιστή με δεξί κλικ στην εντολή Capture και με αριστερό κλικ στην εντολή Additional Capture προσθέτονται τα επιπλέον οπτικά πεδία όπως παραπάνω.
5. Για την αυτόματη διόρθωση της εικόνα επιλέγεται από το πληκτρολόγιο B, U, L (Background, Upper threshold, Lower threshold)
6. Με την εντολή Individual Colors μπορεί η μετάφραση να γίνει ορατή μόνο με ένα από τα τρία φθοριοχρώματα

3.3 Μοριακή Γενετική

3.3.1 PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

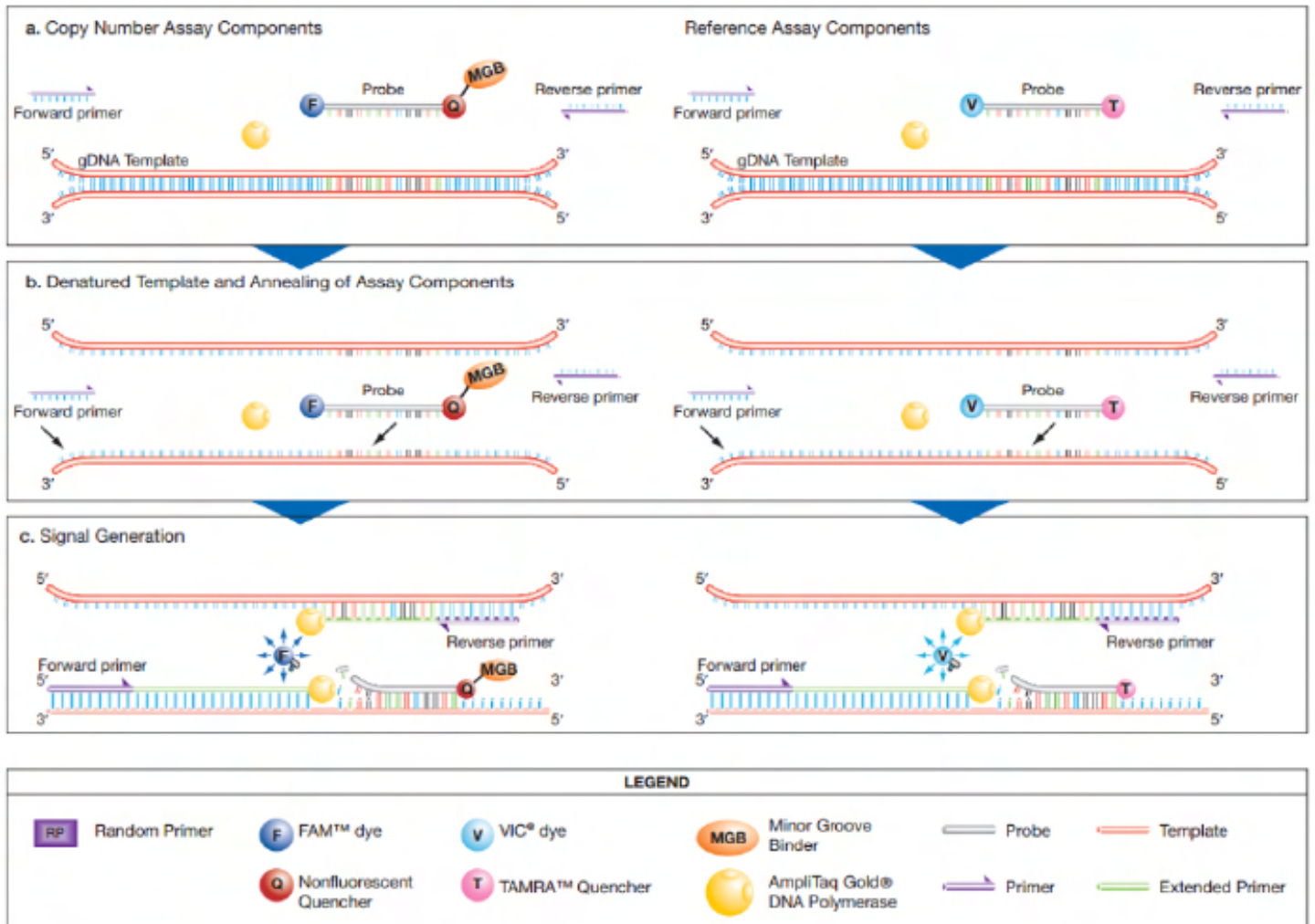
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια τεχνική που βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό των μορίων DNA από μια θερμοσταθερή πολυμεράση (*Thermus Aquaticus*). Κατά την PCR χρησιμοποιείται ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδιακών εκκινήτων καθένας από τους οποίους υβριδοποιείται σε ένα κλώνο ενός δίκλωνου μορίου(dsDNA). Το ζεύγος των εκκινήτων οριοθετεί την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί εκθετικά. Οι υβριδοποιημένοι εκκινήτες λειτουργούν ως υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση τουTaq και έτσι για κάθε αλυσίδα του υποστρώματος δημιουργείται ένα συμπληρωματικός κλώνος DNA μέσω διαδοχικής προσθήκης δεσοξυνουκλεοτιδίων.

3.3.2 Real-Time PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Πραγματικού χρόνου)

Σε μία τυπική αντίδραση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA επαναλαμβάνεται συνήθως 30-40 φορές. Η διαδικασία είναι εκθετική αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα χρησιμοποιούνται ως νέα καλούπια για τον επόμενο κύκλο καταλήγοντας έτσι στο σχηματισμό των περισσότερων από 230 εκατομμυρίων ή 1 δισεκατομμυρίου αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA. Το 1990 αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού DNA/RNA βασιζόμενη στην μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-κινητικής φθορισμού. Αυτή η τεχνική επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο-συγκεκριμένα στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Αντίθετα λοιπόν με τις υπόλοιπες τεχνικές τελικού σημείου η Real-time PCR έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να παρέχει πληροφορίες καθ'όλη την διάρκεια της διαδικασίας.

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία τεχνικών πραγματικού χρόνου που στηρίζονται στην παραπάνω αρχή και διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο κάνουν την ποσοτικοποίηση του στόχου. Υπάρχουν τεχνικές που χρησιμοποιούν ανιχνευτές υδρόλυσης(TaqMan), χρωστικές που παρεμβάλλονται στο DNA (Sybr Green), μοριακοί φάροι (Beacons) κτλ

3.3.2.1 Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της real-time PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (TaqMan).



Εικόνα 9: Applied Biosystems[™] TaqMan[®] real-time PCR assays consist of target-specific primers and one or more probes optimized for specific types of measurements TaqMan[®] Copy Number Assays are run together with a TaqMan[®] Copy Number Reference Assay in a duplex real-time Polymerase Chain Reaction (PCR)

Η τεχνική βασίζεται σε **δύο σημαντικές διεργασίες:**

- Κατασκευή ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών με διπλή σήμανση (φθορίζουσα ομάδα αναφοράς και φθορίζουσα ομάδα απορρόφησης) οι οποίοι εκπέμπουν φθορισμό κατά την διάσπαση τους , σύμφωνα με την αρχή της μεταφοράς ενέργειας φθορισμού μέσω συντονισμού(FRET)
- Η πολυμεράση διαθέτει δραστηριότητα 5' ->3' εξωνουκλεάσης . Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση του ανιχνευτή που έχει σημειωθεί με φθορισμό.

Η εξίσωση η οποία περιγράφει την αρχή της μεθόδου:

$$N_i = N_0 * E^{C_p}$$

N_i: Αριθμός μορίων σε ένα κύκλο *i* (*i*=1,2,3...)

N₀: Αρχικός αριθμός μορίων

E: Απόδοση της αντίδρασης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του μορίου στόχου στηρίζεται στην αρχή που χαρακτηρίζει την αντίδραση δηλαδή ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων στόχων κατά την έναρξη της αντίδρασης τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που απαιτούνται για την παράγωγη ενός συγκεκριμένου αριθμού προϊόντων.

Το **C_p** ορίζεται ως ο **κύκλος ενίσχυσης** στον οποίο ο φθορισμός είναι αισθητά (στα πλαίσια ευαισθησίας της μεθόδου) πάνω από τον φθορισμό υποβάθρου.

Στην παρούσα εργασία για τον σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος συγκριτικού C_p ($\Delta\Delta C_p = \Delta C_p \text{δειγμ.} - \Delta C_p \text{βαθμονομ.}$) με την χρήση ενός δείγματος-μάρτυρα ως βαθμονομητή και ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης έτσι ώστε να κανονικοποιηθεί η τιμή του γονιδίου στόχου.

3.3.2.2 Πρωτόκολλο για Real- time PCR με την μέθοδο TaqMan

	V(μl)
2X Supermix-UDG	12.5
Forward Primer	0.75
Reverse Primer	0.75
Probe	0.5
Rox*	0.5
H₂O	8
	V=25μl

Πίνακας 4: Όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στο παρακάτω πειραματικό πρωτόκολλο

*ROX : Χρωστική που χρησιμοποιείται από το σύστημα

3.3.2.3 Αλληλουχίες εκκινητών

Οι αλληλουχίες των εκκινητών (primers) και ανιχνευτών (probe) που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στη real time PCR είναι οι παρακάτω:

- MYCN

Forward primer (F): 5' – GTGCTCTCCAATTCTCGCCT – 3'

Reverse primer (R): 5' – GATGGCCTAGAGGAGGGCT – 3'

Probe: 5'-FAM-CACTAAAGTTCCTTCCACCCTCTCCT-TAMRA-3'

- NAGK

Forward primer (F): 5' – TGGGCAGACACATXGTAGCA – 3'

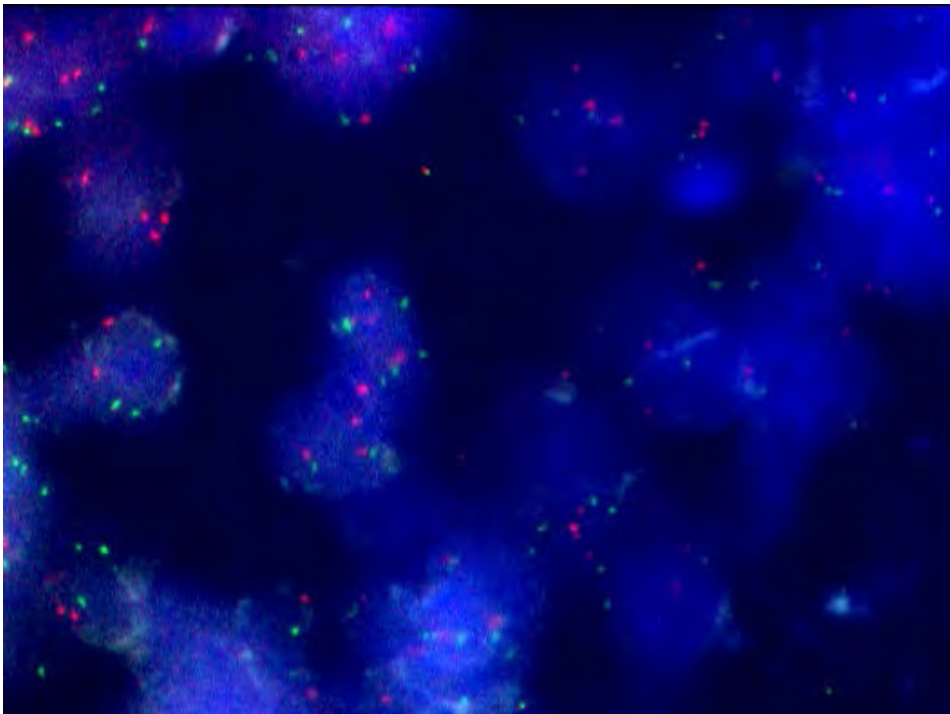
Reverse primer (R): 5' – CACCTTCACTCCCACCTCAAC – 3'

Probe: 5'-FAM-TGTTGCCCGAGATTGACCCGGT-TAMRA-3'

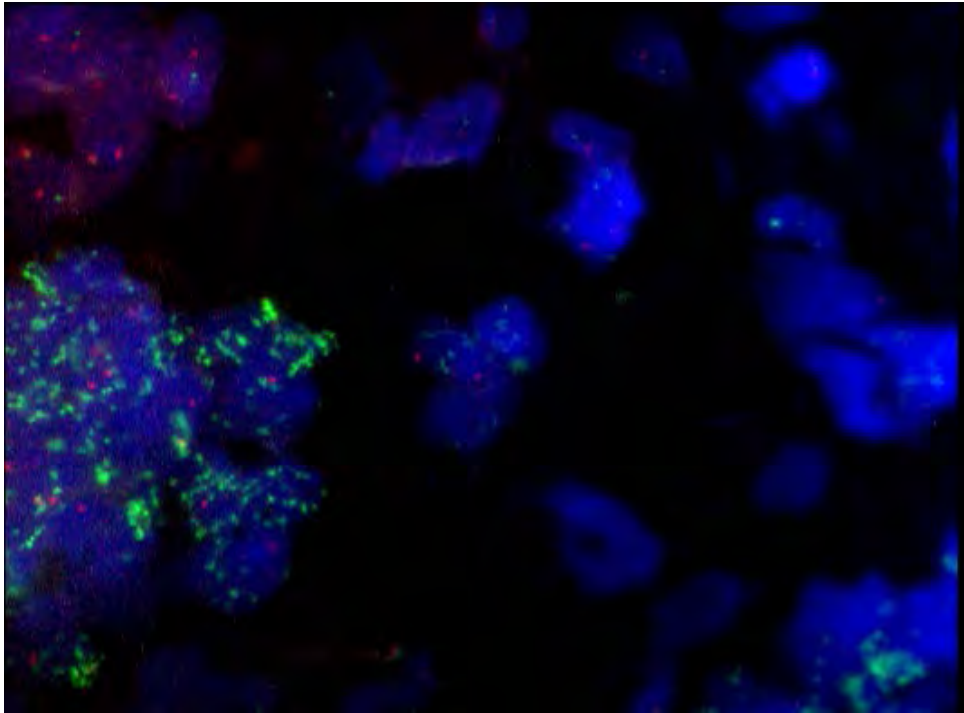
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΑ / FISH ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

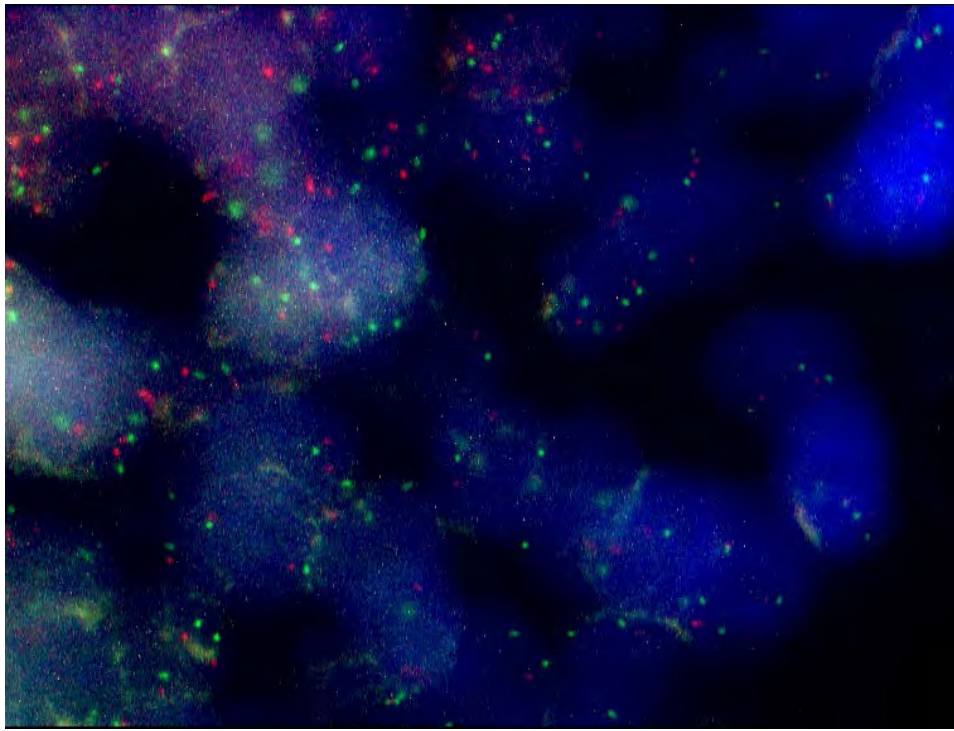
Σε αυτή την ενότητα απεικονίζονται αποτελέσματα της κυτταρογενετικής ανάλυσης όπως περιγράφηκε παραπάνω (ενότητα 3.2). Ειδικότερα στις εικόνες 10,11 και 12 παρατηρείται με κόκκινο χρώμα η θέση του κεντρομεριδίου του χρωμοσώματος 2 και αρα ο αριθμός αλλά και η θέση του μέσα στον πυρήνα και με πράσινο χρώμα το γονίδιο στόχος. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι το MYCN εντοπίζεται μόνο μια φορά πάνω στο χρωμόσωμα 2 στην θέση q24. Ως εκ τούτου η αναλογία κόκκινων και πρασίνων κουκίδων ορίζουν και την σχετική διάφορα στον αριθμό των αντίγραφων του γονιδίου. Έτσι το δείγμα 91/18 της εικόνας 10 είναι αρνητικό για την επέκταση του γονιδίου, το δείγμα 92/18 της εικόνας 11 είναι θετικό για την επέκταση του γονιδίου και το δείγμα 238/18 αρνητικό.



Εικόνα 10 - Αρνητικό δείγμα 91/18 για επέκταση του MYCN: Ο πράσινος φθορισμός υποδεικνύει τα γονίδια και ο κόκκινος το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 2. Ο αριθμός των κόκκινων σημάτων είναι περίπου ίδιος με αυτόν των πρασίνων σημάτων, άρα το βρίσκεται σε 1 αντίγραφο πάνω στο χρωμόσωμα.



Εικόνα 11- Θετικό δείγμα 92/18 για επέκταση MYCN: Σε αυτή την εικόνα ο αριθμός των πράσινων σημάτων είναι εμφανώς μεγαλύτερος από αυτόν των κόκκινων. Αντίστοιχα λοιπόν και ο αριθμός των αντίγραφων του γονιδίου στόχου είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από το φυσιολογικό.



Εικόνα 12- Αρνητικό δείγμα 238/18 για επέκταση MYCN.

Να σημειωθεί ότι για δείγμα 238/18 έγινε ταυτόχρονα μελέτη της επέκτασης του γονιδίου MYCN με σχετική ποσοτικοποίηση (real-time PCR) τόσο με την χρήση νωπού ιστού (κάτι το οποίο πραγματοποιήθηκε και στα υπόλοιπα δείγματα FISH και θα παρουσιαστεί παρακάτω) καθώς και με την μέθοδο της «Υγρής Βιοψίας» σε δείγμα αίματος της ασθενούς.

4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ(Efficiency) **Real-time PCR (MYCN/NAGK)**

4.2.1 Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς (STANDARD CURVE)

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς για κάθε ένα από τα δυο γονίδια στόχους της εργασίας, κατασκευάζεται με βάση τα αποτελέσματα της Real-time PCR για δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων . Συγκεκριμένα δείγμα γνωστής συγκέντρωσης DNA (μετά από μέτρηση με NanoDrop) υπέστη 6 διαδοχικές αραιώσεις ,στο 20% της αμέσως προηγούμενης συγκέντρωσης του σε κάθε αραιώση(1/5).

$$C_0 * V_0 = C * V$$

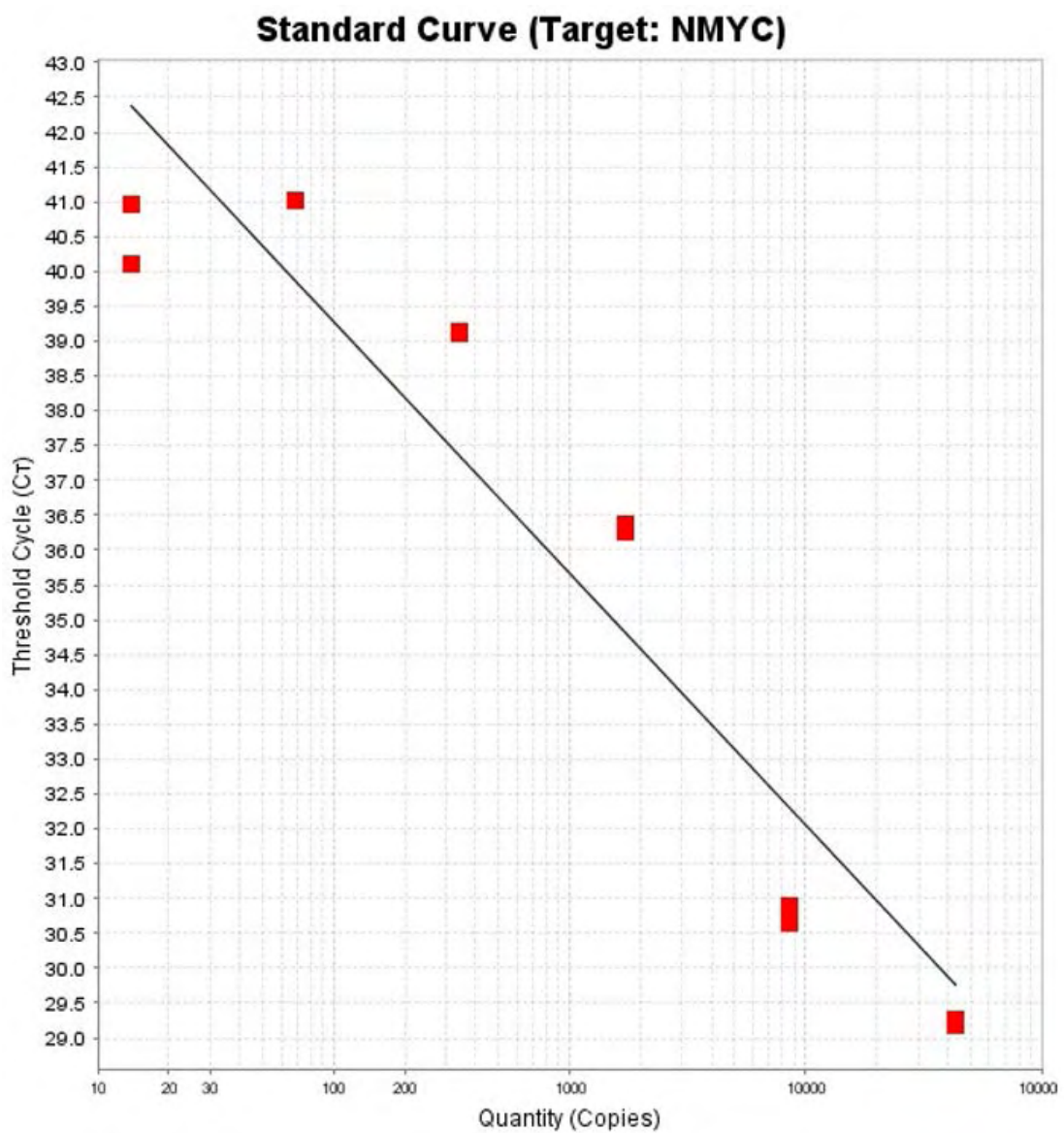
C1=43ng/μl
C2=8.6 ng/μl
C3=1.72 ng/μl
C4=0.344 ng/μl
C5=0.068 ng/μl
C6=0. 0136ng/μl

Πίνακας 3:Αραιώσεις δειγμάτων με αναλογία 20%

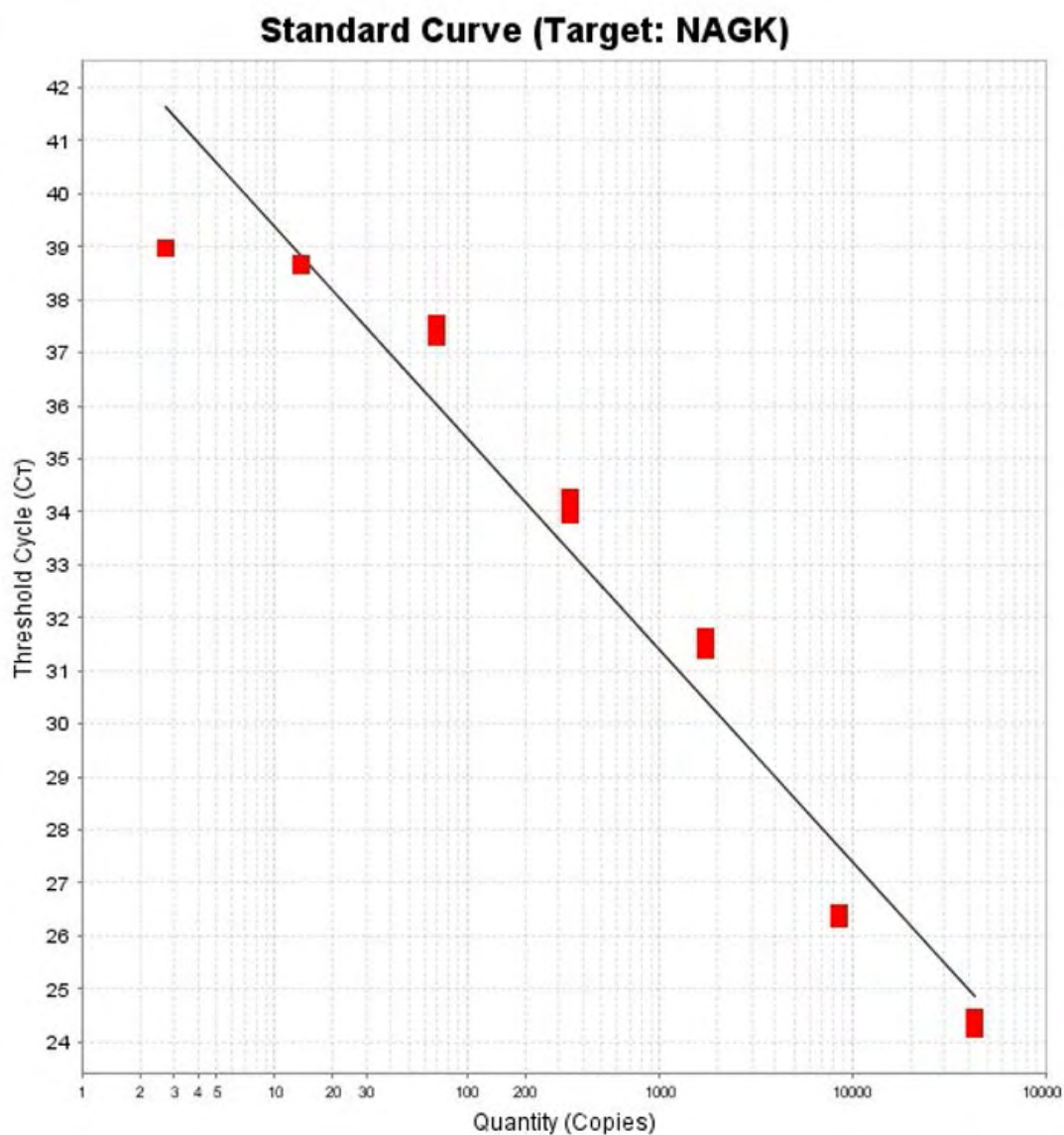
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε με στόχο τον προσδιορισμό της απόδοσης των 2 αντιδράσεων (με Real-time pcr) είναι ίδιο με το πρωτόκολλο για την ανίχνευση της γονιδιακής επέκτασης του γονιδίου MYCN βάση του προσδιορισμού του γονιδίου αναφοράς NAGK.

Βάση των αραιώσεων του Πίνακα 3 παρουσιάζονται παρακάτω οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς για τα δυο γονίδια (διαγράμματα 1 και 2). Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με βάση την θεμελιώδη εξίσωση λειτουργίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερσης $N_i=N_0 \cdot E^{Cp}$:

Concentration = efficiency *average CP (controls) – average CP (samples)*



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το γονίδιο MYCN: Efficiency=66.256%



Διαγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το γονίδιο NAGK: Efficiency=62.586

Τα δύο παραπάνω διαγράμματα απεικονίζουν τις πρότυπες καμπύλες αναφοράς για τα δυο γονίδια που χρησιμοποιούνται στην εργασία. Στον χ άξονα των διαγραμμάτων βρίσκεται ο αριθμός των αντιγράφων των γονιδίων MYCN και NAGK αντίστοιχα και στον ψ άξονα το C_t (βλεπε ενότητα 3.3.2) για κάθε διαφορετική αραιωση του δειγματος αναφοράς σύμφωνα με τον πίνακα 3 - απεικονίζονται με κόκκινες βούλες πάνω στο διάγραμμα-.

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ REAL-TIME PCR

4.3.1 Ταυτοποίηση λειτουργικότητας primers

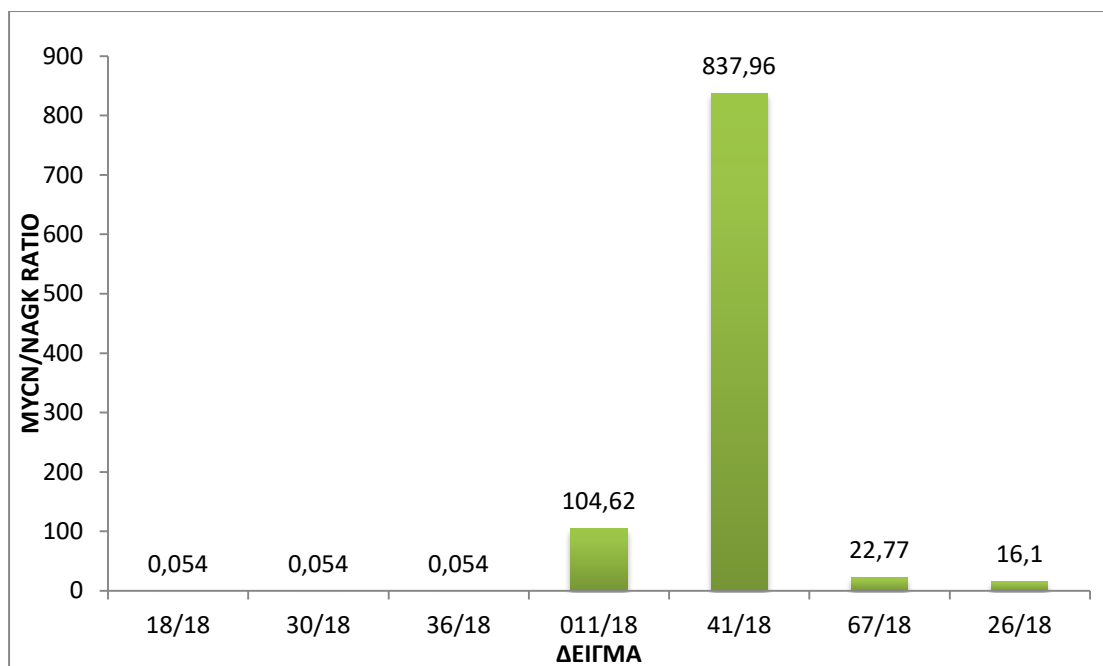
Αρχικά έγινε δοκιμή σε τυχαία δείγματα για να προσδιοριστούν οι συνθήκες της αντίδρασης και να ταυτοποιηθούν οι λειτουργικότητες των primers και του probe.

Δείγμα	C _p MYCN	C _p NAGK	Σχετική Ποσοτικοποίηση
18/18	28,817	24,0823	0,054
30/18	30,6813	26,5223	0,054
36/18	30,3605	26,3879	0,054
11/18	24,7901	27,2515	104,62
41/18	22,8788	28,3175	837,96
67/18	28,7521	29,095	22,77
26/18	29,4159	29,2032	16,1

Πίνακας 4

Οι τιμές των primers είναι εντός των ορίων έτσι ώστε να κριθούν λειτουργικά.

Το αξιοσημείωτο στην παραπάνω διαδικασία (το οποίο δεν επηρεάζει την συνολική εργασία) είναι ότι κατά την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, παρατηρούμε ότι τα δείγματα **11/18, 41/18** (θετικά για καρκίνο του πνεύμονα), **67/18, 26/18** (θετικά για καρκίνο του παχέος εντέρου) τα οποία είναι αρνητικά για νευρωβλάστωμα έχουν αυξημένο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου MYCN στο χρωμόσωμα 2. Στον παρακάτω πίνακα όπου παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα, γίνεται εμφανές ότι ο αριθμός των αντιγράφων είναι πολύ μεγαλύτερος από το σύνηθες-μεταγονιδιακά αντίγραφα των δειγμάτων πνεύμονα να είναι πολύ περισσότερα από αυτά των δειγμάτων παχέος εντέρου το οποίο επηρεάζει και η αύξηση του NAGK (βλέπε ενότητα 5).



Διάγραμμα 3

Μετά από βιβλιογραφική μελέτη εντοπίσαμε ότι έχουν καταγραφεί (σύμφωνα με την βάση δεδομένων COSMIC) περιστατικά κατά τα οποία **σε διαφορετικού τύπου κακοήθεις νεοπλασίες από το νευρωβλάστωμα** (όπως για παράδειγμα ο καρκίνος του πνεύμονα), **παρατηρείται και γονιδιακή επέκταση στο MYCN**, εκτός των άλλων γενετικών μεταβολών που χαρακτηρίζουν την κάθε ασθένεια. Αυτό ενισχύει και την άποψη της γενετικής φύσης του καρκίνου καθώς παρατηρείται μια συνολική γενετική αστάθεια που χαρακτηρίζει τέτοιες νόσους, ανεξάρτητα με το αν αυτοί οι γενετικοί τόποι αποτελούν ή όχι (σήμερα τουλάχιστον), διαγνωστικούς-θεραπευτικούς «βιο-δείκτες».

4.3.2 Αποδοτικότητα αντιδράσεων των γονίδιων

Έπειτα πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της απόδοσης των αντιδράσεων όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα και με τα εξής αποτελέσματα:

Απόδοση MYCN	66.256%
Απόδοση NAGK	62.586%

Πίνακας 6

Ο προσδιορισμός της απόδοσης των αντιδράσεων των δυο γονίδιων, χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, έτσι ώστε να προσαρμόσει τα αριθμητικά δεδομένα τα οποία λαμβάνονται άμεσα σύμφωνα με

τις μεθόδους ποσοτικοποίησης του λογισμικού της real-time PCR, με τις πραγματικές συνθήκες των αντιδράσεων. Πιο συγκεκριμένα κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων το software του θερμοκυκλοποιητή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, βασιζόμενο στην εξίσωση της ενότητας 3.3.2.1 και θεωρώντας ότι η απόδοση της αντίδρασης αγγίζει το 100% (δηλαδή $E_{ff}=2^v$) καταλήγει σε μια σειρά αριθμητικών αποτελεσμάτων.

Με την χρήση του **προγράμματος REST** -ενός προγράμματος βιοστατιστικής ανάλυσης- προσαρμόστηκαν τα αριθμητικά αποτελέσματα της σχετικής ποσοτικοποίησης από «ιδανικές» συνθήκες ($E_{ff}=100\%$), στις πειραματικά καθορισμένες συνθήκες ($E_{ff}<100\%$).

4.3.3 Ανάλυση δειγμάτων για ανίχνευση MYCN

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση με βάση το πρωτόκολλο του Πίνακα 3 χρησιμοποιώντας τα εξής δείγματα:

	ΔΕΙΓΜΑ	ΓΟΝΙΔΙΟ
1	18/18	Αρνητικό JAK2-περιφερικό αίμα
2		
3	46/18	Αρνητικό JAK2-περιφερικό αίμα
4	21/18	Θετικό JAK2-περιφερικό αίμα
5	60/18	Θετικό JAK2-περιφερικό αίμα
6	90/18	MYCN/NAGK
7	91/18	MYCN/NAGK

Πίνακας 5

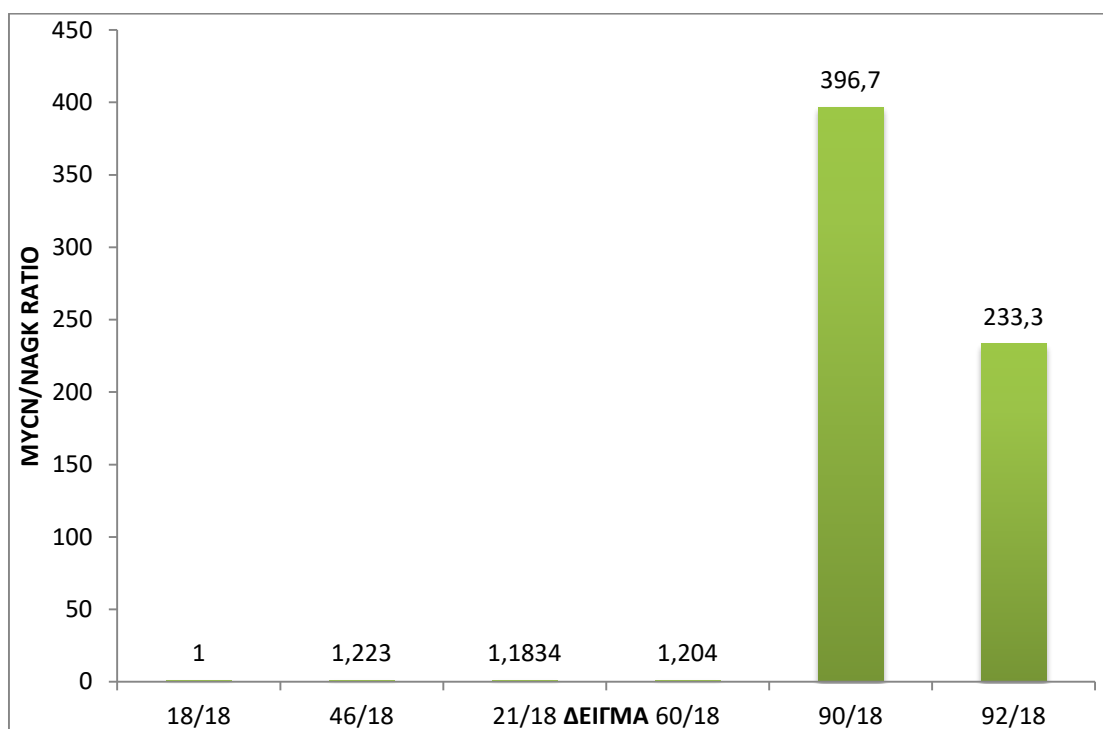
JAK2: Εκφράζει μια πρωτεΐνη που είναι σημαντική στις κυτταρικές διαδικασίες της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Είναι μέλος του μονοπατιού μεταγωγής σήματος JAK/STAT το οποίο μεταφέρει χημικά σήματα από τον εξωκυτταρικό χώρο στο γονιδίωμα του πυρήνα. Παίζει πολύ κομβικό ρόλο στην διαφοροποίηση των πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών ,σε κύτταρα του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια). Σε αυτό το πρωτόκολλο δεν μας ενδιαφέρει τόσο η λειτουργία του, όσο το ότι δεν υπάρχει γονιδιωματική μεταβολή ως προς τα γονίδια MYCN/NAGK , καθώς ο καρκίνος είναι μια παθολογική κατάσταση η οποία έχει μια πολύμορφη γενετική ταυτότητα . Άρα μπορεί να παίξει τον ρόλο του αρνητικού έλεγχου της αντίδρασης κάτι τα οποίο δεν μπορεί να γίνει με δείγματα στερεού ιστού (ενότητα 4.3.1).

Τα δείγματα περιφερικού αίματος χρησιμοποιήθηκαν για τον ρόλο του βαθμονομητή (calibrator) κατά την ποσοτικοποίηση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

Δείγμα	C _p MYCN	C _p NAGK	Σχετική Ποσοτικοποίηση	Σχετική ποσοτικοποίηση (E _{ff} <100%)
18/18	29,0113	24,5198	1	1
46/18	28,3039	24,3642	1,4659	1,223
21/18	26,7382	22,6825	1,3527	1,1834
60/18	30,0594	26,1039	1,4499	1,204
90/18	23,4551	28,7972	901,24	396,7
92/18	22,7763	28,3583	538,7	233,3

Πίνακας 7

Στον παραπάνω πίνακα αποτελεσμάτων παρατηρούμε τα C_p των επιμέρους δειγμάτων και για το γονίδιο στόχο αλλά και για το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιούμε σε αυτή την μελέτη. Η γραφική απεικόνιση του παραπάνω πίνακα αποτυπώνεται και στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 4

Σε πίνακα και διαγράμματα αντίστοιχα, παρατηρούμε ευκρινώς την διαφορά των αντιγράφων των γονιδίων ανάμεσα στο δείγμα 18/18 που παίζει τον ρόλο του βαθμονομητή (άρα ορίζει την «μονάδα»), στα δείγματα 46/18,21/18 και 60/18 που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί δείκτες και στα δείγματα 90/18 και 91/18 που βρίσκονται υπό μελέτη. Συγκεκριμένα τα δείγματα 46/18,21/18 και 60/18 κατά την σχετική τους ποσοτικοποίηση, κινούνται σε τιμές που δεν προσεγγίζουν το όριο πάνω από το οποίο ένα περιστατικό μπορεί να χαρακτηριστεί θετικό για την επέκταση του γονιδίου (>10 αντίγραφα). Αντίθετα τα δείγματα 90/18 και 91/18 παρουσιάζουν μια πολύ μεγάλη αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου MYCN, σε σχέση πάντα με το γονίδιο αναφοράς, και σε σύγκριση με τον βαθμονομητή και τα υπόλοιπα δείγματα.

4.3.3.1. «Υγρή βιοψία» σε δείγματα ορού-πλάσματος.

Ακλουθώντας την ίδια πειρατική μεθοδολογία όσον αφορά την PCR, έγινε μια προσπάθεια να ελεγχθούν δείγματα από τα οποία έχει απομονωθεί το γενετικό τους υλικό, όχι από αρχική ποσότητα νωπού ιστού προερχόμενη από στερεή βιοψία, αλλά από δείγματα αίματος ,με απομόνωση του «ελεύθερα κυκλοφορούντος DNA»(cell-free DNA), διαδικασία που ονομάζεται «υγρή βιοψία»(Liquid biopsy) (ενότητα 1.3.4).

	Δείγμα	Χαρακτηριστικό
1	90/18	Θετικό-MYCN
2	18/18	Θετικό-JAK2
3	162/18	MYCN
4	157/18	Πλάσμα
5	158/18	Πλάσμα
6	159/18	Πλάσμα
7	36/18	Ορός
8	37/18	Ορός

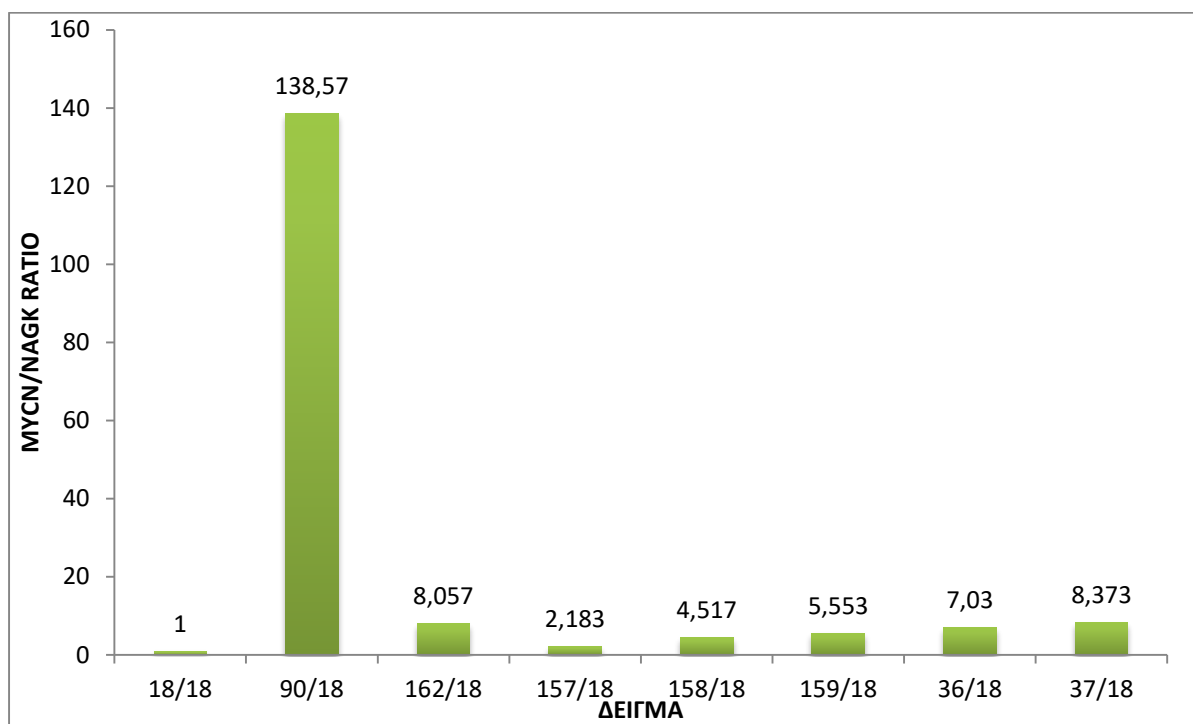
Πίνακας 8

Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος είναι να ελέγξουμε **αν με την μέθοδο απομόνωσης του cell-free DNA που χρησιμοποιήθηκε, έχουμε ανιχνεύσιμα επίπεδα των δυο γονιδίων έτσι ώστε να την χρησιμοποιήσουμε περαιτέρω, στην μελέτη σε παθολογικά δείγματα ασθενών με την μέθοδο της «Υγρής Βιοψίας».**

Δείγμα	C _p MYCN	C _p NAGK	Σχετική ποσοτικοποίηση	Σχετική Ποσοτικοποίηση (E _{ff} <100%)
90/18	24,0558	29,334	769,657	138,57
18/18	30,9866	26,6768	1	1
162/18	23,7302	23,0248	12,1632	8,057
157/18	32,6755	29,4601	3,1352	2,183
158/18	33,9639	32,3097	6,3009	4,517
159/18	33,7381	32,853	10,7386	5,553
36/18	32,0329	31,2576	11,5873	7,03
37/18	27,0451	26,5068	13,6565	8,373

Πίνακας 9

Αντίστοιχα τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα παρατίθενται και στο παρακάτω διάγραμμα έτσι ώστε να γίνεται πιο εύκολα η σύγκριση τους .



Διάγραμμα 5

Τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος δείχνουν ότι η ποσότητα απομόνωσης του cell-free DNA είναι σε ανιχνεύσιμα επίπεδα από τον θερμοκυκλοποιητή της διαδικασίας. Έτσι μπορεί να έχει περαιτέρω εφαρμογή και σε κλινικά δείγματα νευρωβλαστώματος για την ανίχνευση του γονιδίου.

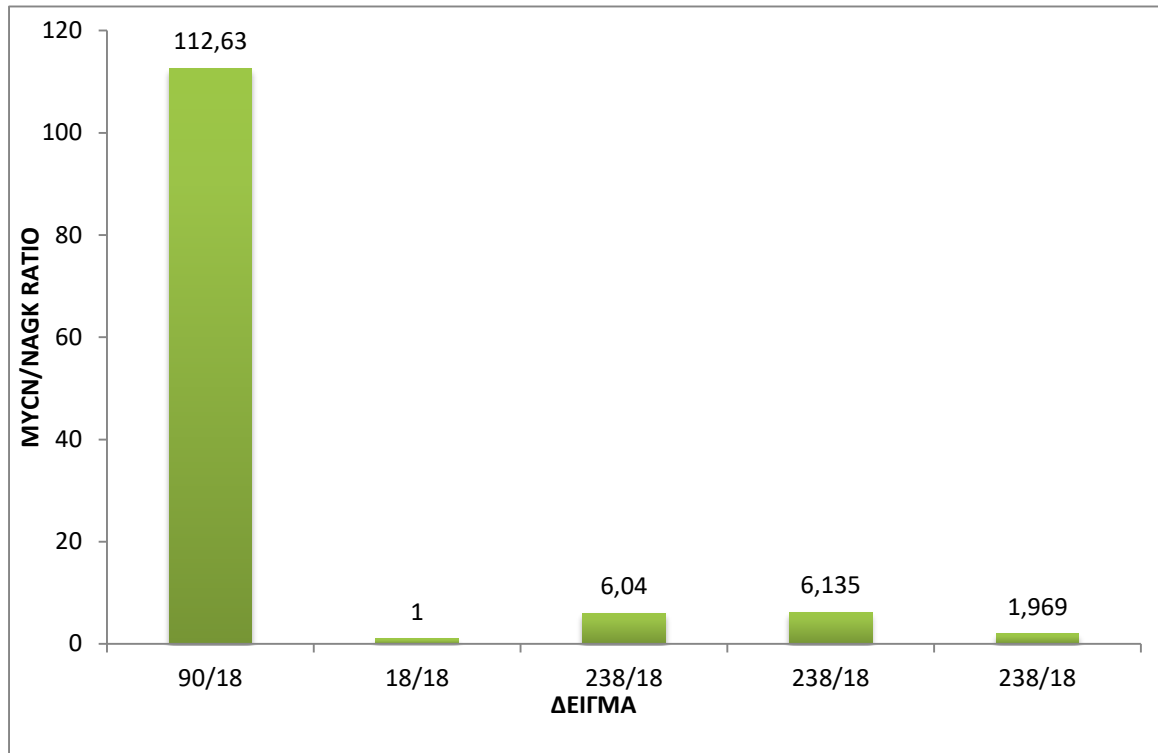
Εν συνεχεία μελετήθηκε το δείγμα **238/18 για επέκταση του γονιδίου MYCN και με του 3 πιθανούς τρόπους** οι οποίοι περιγράφονται παραπάνω, δηλαδή με FISH (ενοτητα4.1 εικόνα 12), με απομόνωση DNA από νωπό ιστό και real-time PCR και με απομόνωση cell-free DNA και real-time PCR (πλάσμα και ορός)

	Δείγμα	Χαρακτηριστικό
1	90/18	Θετικό-MYCN
2	18/18	Θετικό-JAK2
3	238/18	Πλάσμα MYCN
4	238/18	Ορός MYCN
5	238/18	Ιστός MYCN

Πίνακας 10

Δείγμα	C _p MYCN	C _p NAGK	Σχετική ποσοτικοποίηση	Σχετική Ποσοτικοποίηση (E _{ff} <100%)
90/18	23,213	28,2109	874,0928	112,63
18/18	29,0215	24,2477	1	1
238/18	29,4958	28,499	13,7087	6,04
238/18	27,0109	25,995	13,5282	6,135
238/18	23,3427	19,8449	2,4217	1,969

Πίνακας 11



Διάγραμμα 6

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση της επέκτασης, πάνω στο χρωμόσωμα 2, του γονιδίου MYCN το οποίο αποτελεί αρνητικό διαγνωστικό βιοδείκτη του νευροβλαστώματος. Στην προσπάθεια, λοιπόν σύγκρισης διαφορετικών διαγνωστικών μεθόδων και τεχνικών ακολουθηθήκαν τρία εργαστηριακά πρωτόκολλα (FISH, real time PCR, Liquid Biopsy), τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους είτε ως προς την μεθοδολογία της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε, είτε ως προς το βιολογικό υλικό των προς εξέταση δειγμάτων (ιστός – αίμα), όλα βέβαια με στόχο την ανίχνευση του παραπάνω ογκογονιδίου. Μετά το τέλος του πειραματικού πλάνου καταλήξαμε σε κάποιες παρατηρήσεις-συμπεράσματα τα οποία παρατίθενται παρακάτω:

- I. Όσον αφορά τα FISH αποτελέσματα -η FISH αποτελεί την βασική τεχνική που χρησιμοποιείτε στις κλινικές μελέτες για την ανίχνευση της επέκτασης και την σταδιοποίηση της νόσου- παρατηρούμε σε όλες τις εικόνες που έχουμε από το μικροσκόπιο (**ενότητα 4.1, εικόνες 10-11-12, Σελ. 43-44**) ότι μπορεί να γίνει μια ευδιάκριτη και σχετικά ακριβής ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου ως προς τα χρωμοσώματα ενός πυρήνα, έτσι ώστε να αποτελεί **έγκυρη διαγνωστική μέθοδο**.

- II. Εκτός από την FISH βασικός στόχος ήταν να γίνει ανίχνευση του αριθμού των αντιγράφων MYCN (η καλύτερα του κλάσματος M/N) με την μέθοδο **real-time PCR TaqMan**. Η σύγκριση των κυτταρογενετικών αποτελεσμάτων με τα αριθμητικά δεδομένα της σχετικής ποσοτικοποίησης **συγκλίνουν και ταυτίζονται** σε έναν ικανοποιητικό βαθμό έτσι ώστε να μην προκαλεί διαφορές στην ετυμηγορία του κλινικού αποτελέσματος. Αυτό σημαίνει ότι η **ανίχνευση της επέκτασης του γονιδίου- στόχου μπορεί να γίνει και με μοριακές τεχνικές** (πολύ πιο γρήγορα απ' ότι η κυτταρογενετική) και ως εκ τούτου να αποτελέσει πρωτόκολλο προς εφαρμογή στην εργαστηριακή διάγνωση του νευροβλαστώματος.

- III. Βασικό χαρακτηριστικό της μεθοδολογίας της real-time PCR είναι η στοχαστικότητα της με αποτέλεσμα η «ενδεχομενικότητα» να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Όπως αναφέραμε και στην **ενότητα 3.3.2.1** η τεχνική στηρίζεται σε μια μαθηματική εξίσωση – αποτύπωση του φαινομένου της αντιγραφής του DNA. Παρόλα αυτά η εργαστηριακή εφαρμογή της διαφέρει πολύ από αυτό καθ' αυτό το φαινόμενο ,με αποτέλεσμα να παρατηρούμε αποκλίσεις στην απόδοση της αντίδρασης. Στους πίνακες της ενότητας 4 μπορούμε να παρατηρήσουμε αυτή την διαφορά αν συγκρίνουμε τις αποδόσεις των MYCN /NAGK με το

θεωρητικό E=100%. Τα αποτελέσματα της παραπάνω γενικής και γνωστής διαπίστωσης μπορούν να δημιουργήσουν σημαντικές διαφορές στα προς μελέτη αποτελέσματα ενός διαγνωστικού πρωτοκόλλου.

Συγκεκριμένα ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου -στόχου εξαρτάται ευθέως ανάλογα από την απόδοση της εκάστοτε αντίδρασης. Όπως παρατηρούμε και στους **πίνακες 7,9,11**, τιμές βασιζόμενες σε «τέλεια» απόδοση και απόδοση μετά από δημιουργία πρότυπων καμπυλών αναφοράς βλέπουμε ότι διαφέρουν κατά πολύ, ειδικά στις μεγάλες τιμές (**πίνακας 7, δείγμα 90/18, 91/18**). Στην παρούσα εργασία βέβαια είναι τόσο μεγάλα τα αριθμητικά αποτελέσματα των θετικών δειγμάτων και τόσο μικρά των αρνητικών με αποτέλεσμα να μην επηρεάζεται καθόλου το τελικό συμπέρασμα για την σταδιοποίηση της ασθένειας. **Εντούτοις αν υπήρχαν δείγματα τα οποία ήταν «γύρω» από το όριο που έχει τεθεί (αντίγραφα>10) και σύμφωνα με το οποίο ένα δείγμα χαρακτηρίζεται παθολογικό για το νευροβλάστωμα, τότε κάλλιστα θα μπορούσαμε να οδηγηθούμε σε ψευδώς αρνητικά ή ψευδώς θετικά αποτελέσματα αν δε λαμβάναμε υπ' όψη τις επιμέρους αποδόσεις των γονιδίων που συμμετέχουν στο πρωτόκολλο.** Για παράδειγμα αν μια τιμή βρίσκεται μεταξύ 14-18 και εκ πρώτης όψεως κατατάσσονται σε περιστατικά με θετικό δείκτη της επέκτασης του MYCN ενώ για αποδόσεις προσεγγίζουν τιμές γύρω στο 6-8 οι οποίες κάνουν το δείγμα αρνητικό ως προς την επέκταση του γονιδίου στόχου.

- IV. Αξία αναφοράς έχουν τα αποτελέσματα κατά τον έλεγχο της λειτουργικότητας των εκκινητών. Όπως σχολιάστηκε και στο αντίστοιχο κεφάλαιο η μελέτη για την διαπίστωση της λειτουργικότητας των εκκινητών έγινε σε δείγματα καρκινικού ιστού αρνητικά όμως για νευροβλάστωμα. Εντούτοις οι πνευμονικός ιστός και ιστός του παχέος εντέρου παρουσίασαν υπέρμετρο αριθμό αντιγράφων MYCN. Σύμφωνα με την βάση δεδομένων COSMIC έχουν καταγραφεί κλινικά περιστατικά (πολύ λίγα σε αριθμό) με επέκταση του γονιδίου που αποτελεί διαγνωστικό δείκτη του νευροβλαστώματος. **Πρώτον**, το αν και κατά πόσο αυτό το φαινόμενο παίζει κάποιο ρόλο στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα και αν ο αριθμός των καταγεγραμμένων κλινικών περιπτώσεων αυξηθεί προφανώς και θα αποτελέσει πεδίο μελέτης. **Δεύτερον**, αν και τυχαία καταλήξαμε σε αυτά τα αποτελέσματα, αποτελούν ένα παράδειγμα γενετικής αστάθειας του καρκινικού γονιδιώματος δείχνοντας ταυτόχρονα την πολυμορφία αυτής της κατηγορίας παθολογικών καταστάσεων αλλά και την δυσκολία καθορισμού ακριβούς αιτίας γέννησης της. **Τρίτον**, ο βαθμονομητής που χρησιμοποιείται σε τέτοιες μεθοδολογίες όπως η real-time PCR θα πρέπει να ελέγχεται έτσι ώστε να μην επηρεάζει το αποτέλεσμα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα ως βαθμονομητής.

- V. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των «υγρών βιοψιών» το βασικότερο συμπέρασμα είναι ότι η απομόνωση του DNA από δείγματα αίματος (ορό και πλάσμα) ήταν αρκετή ώστε να δώσει **ανιχνεύσιμα επίπεδα** για τις μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακες 8,9,10,11, διαγράμματα 5 &6). **Τα αποτελέσματα κρίνονται ως αρνητικά ως προς την επέκταση του γονιδίου στόχου συμβαδίζοντας έτσι και με τα αποτελέσματα των άλλων δυο μεθοδολογιών όπως περιγράφηκαν παραπάνω.** Παρόλα αυτά δεν μπορούμε να κρίνουμε την λειτουργικότητα και την αξιοπιστία της «υγρής βιοψίας» τόσο λόγω του αριθμού των δειγμάτων καθώς και του γεγονότος ότι μελετήθηκαν μόνο αρνητικά δείγματα άρα δεν υπάρχει η δυνατότητα σύγκρισης.
- VI. Η ανιχνευσιμότητα όμως των παραπάνω επιπέδων cfDNA (παρ όλες τις προβληματικές πλευρές όπως η πηγή από την οποία προέρχεται ,ο μηχανισμός δημιουργίας του κτλ. βλέπε ενότητα 1.3.4.1) μας δίνει την δυνατότητα για μελλοντική και περαιτέρω μελέτη της μεθοδολογίας των «Υγρών βιοψιών». Συγκεκριμένα θα ήταν αρκετά ενδιαφέρουσα η προσπάθεια, σε ένα θετικό για νευρωβλάστωμα ασθενή, να πραγματοποιηθεί συχνή και συνεχής παρακολούθηση (των επιπέδων του cfDNA αλλά κατά βάση της επέκτασης του MYCN) έτσι ώστε να μελετηθεί η δυνατότητα για έναν χρονικό έλεγχο της πορείας της ασθένειας, η ακόμη και της πορείας της θεραπείας. Αυτό θα μας δώσει την δυνατότητα παρακολούθησης της συνολικής εξέλιξης της νόσου και άρα την κατά περίπτωση προσαρμογή θεραπειών κτλ. Έτσι θα υπερβούν τα προβλήματα των συμβατικών μεθόδων διάγνωσης (επεμβατικές) οι οποίες χαρακτηρίζονται από την έλλειψη παρακολούθησης της νόσου σε κοντινά χρονικά διαστήματα μεταξύ τους και άρα της άμεσης εξέλιξης της (πχ δεν μπορούμε να κάνουμε βιοψίες σε έναν ασθενή κάθε μέρα !!). **Άρα η χρονική αποτύπωση της γενετικής εξέλιξης του νευρωβλαστώματος (monitoring), μπορεί να παίζει κομβικό ρόλο στην ταχύτητα διάγνωσης, την ικανότητα πρόληψης, αλλά και την επιτυχία ή όχι της εκάστου θεραπευτικής μεθόδου.**

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή ζωή, τα πρωτογενή συμπαθητικά κύτταρα της αρχέγονης νευρικής ακρολοφίας, μεταναστεύουν στα γάγγλια του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και στο μυελό των επινεφριδίων όπου μετατρέπονται σε ώριμα γαγγλιακά κύτταρα. Η απώλεια της ικανότητας διαφοροποίησης των άωρων μορφών κυττάρων οδηγεί στην εμφάνιση του νευρωβλαστώματος. Οι όγκοι μπορούν να προέλθουν από οποιοδήποτε σημείο του οργανισμού διαθέτει συμπαθητικό νευρικό σύστημα αλλά συχνότερα η αρχική τους εντόπιση παρατηρείται στον μυελό των επινεφριδίων (48%) και στο οπισθοπεριτόναιο. Το νευροβλάστωμα παρουσιάζει ιδιαίτερα βιολογική συμπεριφορά και συγκεκριμένα ανευπλοειδία, επέκταση του ογκογονιδίου MYCN, απώλεια η προσθήκη χρωμοσωμικών τμημάτων (1p36, 11q23, 17q). Η επέκταση του γονιδίου MYCN, δηλαδή η δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων, αποτελεί αρνητικό δείκτη της ταχείας εξέλιξης της νόσου. Η καρκινογενετική δράση του ογκογονιδίου MYCN είναι πολύπλοκη και πολυεπίπεδη. Η συμβολή του θα μπορούσε να ταξινομηθεί σύμφωνα με τις κυτταρικές διεργασίες που επηρεάζει όπως την αγγειογένεση, την αυτοανανέωση και την κυτταρική πολυδυναμικότητα, την ανοσολογική απόκριση, την απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο και την διαφοροποίηση. Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια σύγκρισης των μέχρι τώρα κυτταρογενετικών μεθοδολογιών (FISH) για την ανίχνευση της επέκτασης του MYCN με μεθόδους μοριακής γενετικής (real-time PCR), στοχεύοντας στην βελτίωση της διάγνωσης της νόσου. Βασικό βήμα για την χρήση τεχνικών Μοριακής Γενετικής είναι ο προσδιορισμός της αποδοτικότητας των αντιδράσεων (Efficiency) σύμφωνα με την λειτουργικότητα των εκκινητών καθώς και της ανιχνευσιμότητας των γονιδίων MYCN/NAGK -το NAGK παίζει τον ρόλο του γονιδίου αναφοράς κατά την σχετική ποσοτικοποίηση του γονιδίου MYCN σε κλινικά δείγματα ιστών ή αίματος-. Η σύγκριση των κυτταρογενετικών αποτελεσμάτων με τα αριθμητικά δεδομένα της σχετικής ποσοτικοποίησης συγκλίνουν και ταυτίζονται σε έναν ικανοποιητικό βαθμό έτσι ώστε να μην προκαλεί διαφορές στην ετυμηγορία του κλινικού αποτελέσματος. Αυτό σημαίνει ότι η ανίχνευση της επέκτασης του γονιδίου-στόχου μπορεί να γίνει και με μοριακές τεχνικές (πολύ πιο γρήγορα απ' ό,τι η κυτταρογενετική) και ως εκ τούτου να αποτελέσει πρωτόκολλο προς εφαρμογή στην εργαστηριακή διάγνωση του νευρωβλαστώματος. Ακολουθώντας την ίδια πειρατική μεθοδολογία όσον αφορά τις τεχνικές Μοριακής Γενετικής, μελετήθηκαν δείγματα από τα οποία έχει απομονωθεί το γενετικό τους υλικό, όχι από στερεή βιοψία, αλλά από δείγματα αίματος με απομόνωση του «ελεύθερα κυκλοφορούντος DNA»(cell-free DNA), διαδικασία που ονομάζεται «υγρή βιοψία»(Liquid biopsy). Έτσι γεννιέται η δυνατότητα, τόσο της μη χειρουργικής διάγνωσης της νόσου (δεν απαιτείται επεμβατική βιοψία), όσο και η ικανότητα μελέτης της εξέλιξης της σε βάθος χρόνου (monitoring), συμβάλλοντας έτσι στην εφαρμογή ποιο ικανοποιητικών μεθόδων διάγνωσης πρόγνωσης αλλά και θεραπείας στην κλινική και εργαστηριακή καθημερινότητα.

6.2 ABSTRACT

Normally during fetal life, primitive sympathetic cells of the primitive neural crest migrate to the ganglia of the sympathetic nervous system and to the adrenal medulla where they are transformed into mature ganglion cells. The loss of ability to differentiate the immature cell forms leads to the appearance of Neuroblastoma. Tumors can come from anywhere in the body with a sympathetic nervous system, but more often their initial location is seen in the adrenal medulla (48%) and in the retroperitoneum. Neuroblastoma exhibits particular biological behavior such as aneuploidy, extension of the MYCN oncogene, loss or addition of chromosomal segments (1p36, 11q23, 17q). Amplification of the MYCN gene -the generation of multiple copies of the gene in the nucleus of the cancer cells- is a negative indicator of the rapid disease progression. The carcinogenicity of the MYCN oncogene is complex and multilevel. Its contribution could be classified according to the cellular processes it affects such as angiogenesis, self-renewal and cellular multidimensionality, immune response, apoptosis, cell cycle and differentiation. In the present study, was made an attempt to compare the existing cytogenetic methodologies (FISH) which used for the detection of MYCN amplification, with methods based on molecular genetics (by real-time PCR), aiming at improving the diagnosis of the disease. A basic step of using Molecular Genetics techniques is to determine the efficiency according to primer functionality and traceability of MYCN / NAGK genes - NAGK plays the role of the housekeeping gene in the relative quantification of the MYCN gene in clinical samples of tissues or blood-. The comparison of the cytogenetic results with the relative quantification figures converges and matches to a satisfactory level so as not to cause differences in the outcome of the clinical results. This means that the detection of amplification of the target gene, can also be done with molecular techniques (much faster than cytogenetics) and therefore be a protocol for application in lab diagnosis of Neuroblastoma. Following the same methodology which based on Molecular Genetics techniques, we used samples from which their genetic material has been isolated not by solid biopsy but from blood samples (cell-free DNA isolation), with a method called "liquid biopsy". Thus, the possibility of both non-surgical diagnosis of the disease (no invasive biopsy is required) and the ability to study its development, thereby contributing to the implementation of satisfactory methods of diagnosis, prognosis and treatment in the clinical and laboratory "life".

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu V. S1A_Cancer Genome Landscapes. *Science* (80-). 2013;1546(March). doi:10.1126/science.1235122
2. «Ιατρική Γενετική» Thompson & Thompson Εκδόσεις P.X Pasxalidis.
3. Albertson DG. Gene amplification in cancer. *Trends Genet.* 2006;22(8):447-455. doi:10.1016/j.tig.2006.06.007
4. Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer.* 2016;35(5):1-9. doi:10.1186/s40880-016-0092-4
5. Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov.* 2014;4(6):650-661. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-1014
6. Wyatt AW, Annala M, Aggarwal R, et al. Concordance of Circulating Tumor DNA and Matched Metastatic Tissue Biopsy in Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(12):78-86. doi:10.1093/jnci/djx118
7. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker-A critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21-22):1611-1624. doi:10.1016/j.cca.2010.07.032
8. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2007;635(2-3):105-117. doi:10.1016/j.mrrev.2006.11.002
9. Yagyu S, Iehara T, Tanaka S, et al. Serum-Based quantification of MYCN gene amplification in young patients with neuroblastoma: Potential utility as a surrogate biomarker for neuroblastoma. *PLoS One.* 2016;11(8):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0161039
10. Friel AM, Corcoran C, Crown J, O'Driscoll L. Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(3):613-625. doi:10.1007/s10549-010-0980-2
11. Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Aucamp J, van Dyk E, du Plessis L, Pretorius PJ. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(1):157-165. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.10.022
12. Mouliere F, Robert B, Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One.* 2011;6(9). doi:10.1371/journal.pone.0023418
13. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(10). doi:10.1101/cshperspect.a014415
14. Holcomb III WG, Murphy JP MD editors. Ashcraft's Pediatric Surgery 5th ed. Philadelphia U.S.A: Saunders Elsevier: 2010, p. 872-94..

15. Bao P, Zheng Y, Wang C, Gu K, Jin F, Lu W. Time Trends and Characteristics of Childhood Cancer Among Children Age 0 – 14 in Shanghai. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(December 2008):13-16. doi:10.1002/pbc
16. Davidoff A. Neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg*. 2013;21(1):2-14. doi:10.1053/j.sempedsurg.2011.10.009.Neuroblastoma
17. Raggi CC, Bagnoni ML, Tonini GP, et al. Real-time quantitative PCR for the measurement of MYCN amplification in human neuroblastoma with the TaqMan detection system. *Clin Chem*. 1999;45(11):1918-1924.
18. Boensch M, Oberthuer A, Fischer M, et al. Quantitative real-time PCR for quick simultaneous determination of therapy-stratifying markers MYCN amplification, deletion 1p and 11q. *Diagnostic Mol Pathol*. 2005;14(3):177-182. doi:10.1097/01.pas.0000176767.10800.17
19. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, et al. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5205-5210. doi:10.1200/JCO.2005.02.014
20. Ma Y, Lee JW, Park SJ, et al. Detection of MYCN amplification in serum DNA using conventional polymerase chain reaction. *J Korean Med Sci*. 2016;31(9):1392-1396. doi:10.3346/jkms.2016.31.9.1392
21. Kohl et al., 1984
22. Ruiz-Pérez MV, Henley AB, Arsenian-Henriksson M. The MYCN protein in health and disease. *Genes (Basel)*. 2017;8(4):1-27. doi:10.3390/genes8040113
23. Stanton LW, Schwab M, Bishop JM. Nucleotide sequence of the human N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(6):1772-1776. doi:10.1073/pnas.83.6.1772
24. Zimmerman et al.1986.
25. Dungwa et al., 2012
26. Zindy F, Knoepfler PS, Xie S, Sherr CJ, Eisenman RN, Roussel MF. N-Myc and the cyclin-dependent kinase inhibitors p18Ink4c and p27Kip1 coordinately regulate cerebellar development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(31):11579-11583. doi:10.1073/pnas.0604727103
27. Hinderlich S, Berger M. Molecular cloning and characterization of murine and human N-acetylglucosamine kinase. *Eur J ...*. 2001;3308:3301-3308.
28. Kojima M, Hiyama E, Fukuba I, et al. Detection of MYCN amplification using blood plasma: Noninvasive therapy evaluation and prediction of prognosis in neuroblastoma. *Pediatr Surg Int*. 2013;29(11):1139-1145. doi:10.1007/s00383-013-3374-9
29. Krystal GW, Armstrong BC, Battey JF. N-myc mRNA forms an RNA-RNA duplex with endogenous antisense transcripts. *Mol Cell Biol*. 1990;10(8):4180-4191. doi:10.1128/MCB.10.8.4180

30. Corvi R, Amler LC, Savelyeva L, Gehring M, Schwab M. MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5523-5527. doi:10.1073/pnas.91.12.5523
31. Manohar CF, Short ML, Nguyen A, et al. HuD, a neuronal-specific RNA-binding protein, increases the in vivo stability of MYCN RNA. *J Biol Chem*. 2002;277(3):1967-1973. doi:10.1074/jbc.M106966200
32. Niemas-Teshiba R, Matsuno R, Wang LL, et al. MYC-family protein overexpression and prominent nucleolar formation represent prognostic indicators and potential therapeutic targets for aggressive high-MKI neuroblastomas: A report from the children's oncology group. *Oncotarget*. 2018;9(5):6416-6432. doi:10.18632/oncotarget.23740
33. Stanton LW, Bishop JM. Alternative processing of RNA transcribed from NMYC. *Mol Cell Biol*. 1987;7(12):4266-4272. doi:10.1128/MCB.7.12.4266
34. Schwab M, Ellison J, Busch M, Rosenau W, Varmus HE, Bishop JM. Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci*. 1984;81(15):4940-4944. doi:10.1073/pnas.81.15.4940

