



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Εφαρμογές της PCR στην ανάπτυξη βιοδεικτών για τον
ευνουχοάντοχο καρκίνο του προστάτη**

Βασίλειος Παναγόπουλος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΣΟΥΛΤΑΝΑ ΜΑΡΚΟΠΟΥΛΟΥ

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή Βασίλειου Παναγόπουλου που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

**Εφαρμογές της PCR στην ανάπτυξη βιοδεικτών για τον
ευνουχοάντοχο καρκίνο του προστάτη**

Βασίλειος Παναγόπουλος

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
ΣΟΥΛΤΑΝΑ ΜΑΡΚΟΠΟΥΛΟΥ
Μέλος ΣΕΠ, ΕΑΠ

Συν-Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ
Μέλος ΣΕΠ, ΕΑΠ

Πάτρα, Ιούνιος 2024

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας συνέβαλαν κάποιοι άνθρωποι που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δεν θα μπορούσα να φέρω εις πέρας.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια, και τους φίλους μου για την κατανόηση και την στήριξη τους κατά τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσης διπλωματικής εργασίας και ιδιαίτερα την γιαγιά μου που με στηρίζει σε κάθε βήμα εξέλιξης που κάνω στην ζωή μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την Φραντζέσκα μου, που με την πολύτιμη βοήθεια την στήριξη αλλά και τις συμβουλές της συνέβαλε θετικά στην συγγραφή της εργασίας μου.

Επιπροσθέτως ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κοπέλα μου Αναστασία για την υπομονή της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Σουλτάνα Μαρκοπούλου για την έγκαιρη προσκόμιση του θέματος και για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής.

Περίληψη

Η εμφάνιση του ανθεκτικού στον ευνουχισμό καρκίνου του προστάτη (CRPC) θέτει σημαντικές κλινικές προκλήσεις, ιδίως στις μεταστατικές περιπτώσεις, όπου η μέση επιβίωση είναι κάτω από δύο έτη. Η παρούσα διατριβή εξετάζει την εφαρμογή των τεχνικών της PCR στον εντοπισμό μοριακών βιοδεικτών που είναι ζωτικής σημασίας για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία του CRPC.

Η ικανότητα της PCR να ενισχύει συγκεκριμένες περιοχές DNA με υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια διευκολύνει την ανίχνευση γενετικών μεταλλάξεων, αλλαγών γονιδιακής έκφρασης και επιγενετικών τροποποιήσεων που σχετίζονται με τον CRPC. Τεχνικές όπως η ψηφιακή PCR (dPCR) και η multiplex PCR εντοπίζουν ενισχύσεις και μεταλλάξεις του γονιδίου *AR*, που χρησιμεύουν ως βιοδείκτες για την πρόγνωση των ασθενών και την αντίσταση στη θεραπεία. Οι αναλύσεις PCR παρέχουν επίσης πληροφορίες σχετικά με τη γονιδιακή έκφραση, τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA και τους γενετικούς πολυμορφισμούς, ενισχύοντας την πρόγνωση και τις στρατηγικές θεραπείας. Οι υποσχόμενοι βιοδείκτες περιλαμβάνουν τα γονίδια *PIM-1*, *SHOX2*, *SEPT9* καθώς και miRNAs όπως τα miR-21, miR-141 και miR-375, τα οποία συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Επιπλέον, γονίδια που εμπλέκονται σε μονοπάτια απόκρισης σε βλάβες του DNA, όπως τα *RNASEH2A* και *RFC2*, αναδεικνύονται ως δυνητικοί βιοδείκτες για τη νόσο.

Οι εξελίξεις στις τεχνολογίες που βασίζονται στην PCR, συμπεριλαμβανομένων των RT-ddPCR και SL-RT PCR, έχουν βελτιώσει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοδεικτών, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Αυτές οι μέθοδοι υπόσχονται κλινική διάγνωση και εξατομικευμένες στρατηγικές θεραπείας στον CRPC, απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες μεγάλης κλίμακας για την καθιέρωση τυποποιημένων πρωτοκόλλων στην κλινική πράξη.

Λέξεις-κλειδιά: Καρκίνος του προστάτη, CRPC, PCR, βιοδείκτες

«Applications of PCR in the development of biomarkers for castration-resistant prostate cancer»

Vasileios Panagopoulos

Abstract

The emergence of castration-resistant prostate cancer (CRPC) poses significant clinical challenges, particularly in metastatic cases, where median survival is less than two years. This thesis reviews the application of PCR techniques to the identification of molecular biomarkers that are crucial for the diagnosis, prognosis and treatment of CRPC.

The ability of PCR to amplify specific DNA regions with high sensitivity and accuracy facilitates the detection of genetic mutations, gene expression changes and epigenetic modifications associated with CRPC. Techniques such as digital PCR (dPCR) and multiplex PCR identify amplifications and mutations in *AR*, which serve as biomarkers for patient prognosis and treatment resistance. PCR analyses also provide information on gene expression, DNA methylation patterns and genetic polymorphisms, enhancing prognosis and treatment strategies. Promising biomarkers include *PIM-1*, *SHOX2*, *SEPT9* and miRNAs such as miR-21, miR-141 and miR-375, which correlate with disease severity and response to therapy. In addition, genes involved in DNA damage response pathways, such as *RNASEH2A* and *RFC2*, are emerging as potential biomarkers.

Advances in PCR-based technologies, including RT-ddPCR and SL-RT PCR, have improved the detection and quantification of biomarkers, offering high sensitivity and specificity. These methods hold promise for clinical diagnosis and personalised treatment strategies in CRPC, but further large-scale studies are needed to establish standardised protocols in clinical practice.

Keywords: Prostate cancer, CRPC, PCR, biomarkers

Περιεχόμενα

Περίληψη	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	vii
Κατάλογος Εικόνων	ix
Κατάλογος Πινάκων	xi
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ο καρκίνος του προστάτη.....	3
1.1 Ορισμός και επιδημιολογία.....	3
1.2 Παράγοντες κινδύνου και συμπτωματολογία	4
1.3 Παθοφυσιολογία.....	6
1.4. Διάγνωση του καρκίνου του προστάτη.....	6
1.4.1. Κλινική εξέταση.....	7
1.4.2. Εργαστηριακός έλεγχος.....	7
1.4.3 Απεικονιστικές μέθοδοι.....	8
1.5. Ταξινόμηση και σταδιοποίηση της νόσου.....	9
1.5.1. Ιστολογική ταξινόμηση όγκων του προστάτη	10
1.5.2. Σταδιοποίηση TNM.....	11
1.5.3. Gleason Score – Βαθμός κακοήθειας.....	12
1.5.4. Κατηγοριοποίηση ασθενών σε ομάδες κινδύνου και κατηγοριοποίηση της νόσου.....	14
1.6. Θεραπεία του τοπικά εντοπισμένου ορμονευαίσθητου καρκίνου του προστάτη	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ευνοχοάντοχος καρκίνος του προστάτη (CRPC)	18
2.1. Ορισμός	18
2.2. Μηχανισμοί μετατροπής σε CRPC.....	20
2.2.1. Υπερέκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων	21
2.2.2. Μεταλλάξεις του γονιδίου AR	21
2.2.3. Μεταβολές στους συμπαράγοντες του AR.....	22
2.2.4. Αυξημένη σύνθεση ενζύμων στεροειδογένεσης.....	23
2.2.5. Μονοπάτια σηματοδότησης που δεν ενεργοποιούνται από ανδρογόνα (outlaw pathways)	23

2.2.6. Διάφοροι μηχανισμοί ανεξάρτητοι από τον AR	24
2.3 Θεραπευτικές επιλογές στον CRPC.....	24
2.3.1 Θεραπεία στον CRPC – M0	25
2.3.2. Θεραπεία μεταστατικού CRPC.....	25
2.4. Διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες στον CRPC	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Ο ρόλος της PCR στην ανάπτυξη βιοδεικτών	31
3.1. Αρχές, πλεονεκτήματα και εφαρμογές της PCR	31
3.2. Παραλλαγές της PCR.....	34
3.2.1. Real – Time PCR	34
3.2.2. Ψηφιακή PCR	39
3.2.3. Allele-Specific PCR	42
3.3. Εφαρμογές της PCR για την ανάπτυξη βιοδεικτών στον καρκίνο	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τις εφαρμογές της PCR στην ανάπτυξη βιοδεικτών για τον CRPC	46
4.1. Μελέτη της ενίσχυσης των υποδοχέων ανδρογόνων (AR).....	46
4.2. Ανίχνευση παραλλαγών του υποδοχέα ανδρογόνων	50
4.3. Γονιδιακή έκφραση του PIM-1.....	60
4.4. Ανίχνευση υπερμεθυλίωσης γονιδίων ως προγνωστικός βιοδείκτης στον CRPC	61
4.5. Προσδιορισμός νέων SNPs που σχετίζονται με την πρόγνωση ασθενών με CRPC	64
4.6. Μελέτες έκφρασης miRNAs στον CRPC.....	67
4.7. Προσδιορισμός άλλων βιοδεικτών για τον CRPC με χρήση PCR.....	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	79
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Αριστερά: Παγκόσμια επίπτωση καρκίνου του προστάτη το έτος 2022. Δεξιά: Επίπτωση καρκίνου του προστάτη το έτος 2022 στην Ευρώπη (IARC, 2022).....	3
Εικόνα 2. Αριστερά: Επίπτωση καρκίνου του προστάτη το 2022 στην Ελλάδα. Δεξιά: Ποσοστά θνησιμότητας λόγω καρκίνου του προστάτη από το 1965-2015 στην Ελλάδα (IARC, 2022).....	4
Εικόνα 3. Α. Ανίχνευση όγκου του προστάτη με TRUS Β. Ανίχνευση του ίδιου όγκου με MRI (Hwang and Lee, 2014)	9
Εικόνα 4. Σταδιοποίηση κατά μέγεθος και έκταση των όγκων του προστάτη (Πουλάκης, n.d.).....	11
Εικόνα 5. Το πρότυπο Gleason (Hammouda et al., 2022).....	13
Εικόνα 6. Ορισμός του CRPC (Morote et al., 2022).....	19
Εικόνα 7. Μοριακοί μηχανισμοί ανάπτυξης CRPC (Le et al., 2023).....	20
Εικόνα 8. Μοριακά εργαλεία στη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη και ιατρική ακριβείας (Alarcón-Zendejas et al., 2022).....	28
Εικόνα 9. Σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα ανδρογόνων (Conteduca et al., 2021).....	29
Εικόνα 10. Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του DNA-στόχου (Smith, 2024).....	31
Εικόνα 11. Καμπύλη ενίσχυσης PCR πραγματικού χρόνου (NCBI, 2017)	35
Εικόνα 12. Καμπύλη HRM ημιμεθυλωμένου γονιδίου σε σχέση.....	38
Εικόνα 13. Στάδια της ddPCR (Kokkoris et al., 2021).....	40
Εικόνα 14. Διάγραμμα ddPCR (biorad.com, n.d.)	41
Εικόνα 15. Σχεδιασμός εκκινήτων στην AS-PCR (You et al., 2008)	43
Εικόνα 16. Η ακρίβεια της αξιολόγησης των CN και των μεταλλάξεων AR μέσω της dPCR (Sumiyoshi et al., 2019).....	47
Εικόνα 17. Η ταυτόχρονη ταυτοποίηση δύο στόχων και δύο ελέγχων μέσω μιας ψηφιακής ανάλυσης πολλαπλής PCR επιτυγχάνεται με τη χρήση συνδυασμών φθοριοφόρων και την προσαρμογή της αναλογίας αραίωσης για το ίδιο φθοριοφόρο. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη δημιουργήθηκαν με τη χρήση του συστήματος QuantStudio 3D Digital PCR (Du et al., 2020).....	48
Εικόνα 18. Γράφημα που αντιπροσωπεύει τα αποτελέσματα μιας multiplex ddPCR που έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης T877A και της μεταβολής του αριθμού αντιγράφων του AR (Young et al., 2022).....	49
Εικόνα 19. Τα κλινικά αποτελέσματα 37 ατόμων που έλαβαν θεραπεία με φάρμακα ταξάνης με βάση την παρουσία CTCs που εκφράζουν την παραλλαγή 7 του υποδοχέα ανδρογόνων (AR-V7) με χρήση qRT-PCR (Antonarakis et al., 2015).....	51
Εικόνα 20. Βελτιστοποίηση θερμοκρασίας υβριδοποίησης για τη δοκιμασία ddPCR (Ma et al., 2016)	53

Εικόνα 21. Ο επιπολασμός της έκφρασης των γονιδίων AR-V7 και PSA στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος των δειγμάτων (Qu et al., 2016).....	56
Εικόνα 22. Διάγραμμα ροής των διαδικασιών στη μελέτη των Nimir et al. (2019).....	56
Εικόνα 23. Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης AR-V1 στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα και της συνολικής επιβίωσης μετά από δύο κύκλους θεραπείας με καμπαζιταξέλη (Sieuwerts et al., 2019)	58
Εικόνα 24. Η ανάλυση Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συνολικής επιβίωσης με βάση την παρουσία AR-V7 στα CTCs (Saylor et al., 2024)	59
Εικόνα 25. Σχεδιάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας στη μελέτη των Markou et al. (2020).....	61
Εικόνα 26. Πρότυπα έκφρασης miRNAs σε φυσιολογικούς ιστούς του προστάτη, πρωτογενείς όγκους και όγκους CRPC που αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας Taq Man qPCR. A. <i>miR-221/-222</i> B. <i>miR-15a/-miR-16-1</i> C. <i>miR-23b/-27b</i> D. <i>miR-203</i> (Sun et al., 2011)	70
Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση της SL-RT PCR (Chen, 2005)	72
Εικόνα 28. Καμπύλες Kaplan–Meier για A. <i>miR-375</i> και B. <i>miR-3687</i> (Benoist et al., 2020)	73
Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση της ανάλυσης της έκφρασης γονιδίων DDR στον καρκίνο του προστάτη (Oshima et al., 2023).....	74
Εικόνα 30. Η θετικότητα της γονιδιακής έκφρασης για κάθε μεμονωμένο ασθενή αναπαρίσταται οπτικά με το κόκκινο χρώμα, που υποδηλώνει την ενεργή έκφραση, ενώ το γκρι χρώμα υποδηλώνει την απουσία έκφρασης (Zavridou et al., 2022).....	77

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Τιμές PSA στο αίμα και η ερμηνεία τους (Πουλάκης, n.d.)	8
Πίνακας 2. Ταξινόμηση των όγκων του προστάτη σύμφωνα με τον WHO (Surin et al., 2022)	10
Πίνακας 3. Σταδιοποίηση κατά TNM των όγκων του προστάτη (Paner et al., 2018)	12
Πίνακας 4. Βαθμός κακοήθειας όγκων προστάτη βάσει του Gleason score (Epstein et al., 2016)	14
Πίνακας 5. Ομάδες κινδύνου για υποτροπή καρκίνου του προστάτη σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση Ουρολογίας (Uroweb, 2024)	14
Πίνακας 6. Σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη (Kandori et al., 2019)	15
Πίνακας 7. Εκκινητές και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία ddPCR των Ma et al. (2016)	54
Πίνακας 8. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές TaqMan για τις γενετικές παραλλαγές rs743572, rs10883783, rs1790834 και rs1790858 (Wu et al., 2020)	66
Πίνακας 9. Σύγκριση μεταξύ RT-ddPCR και RT-qPCR για την ανίχνευση μετάγραφων ARFL, ARV7, PSA και PSMA σε ασθενείς με CRPC (Zavridou et al., 2022).....	78

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ADT	Androgen Deprivation Therapy
AR	Androgen Receptor
ARAT	Androgen Receptor Axis-Targeted
ARMS-PCR	Amplification Refractory Mutation System PCR
ARSI	Androgen Receptor Signaling Inhibitors
AS-PCR	Allele – Specific PCR
CNV	Copy Number Variation
cf DNA	Cell-free DNA
ct DNA	Circulating tumor DNA
CT	Computed Tomography
CRPC	Castrate Resistant Prostate Cancer
DDR	DNA Damage Response
ddPCR	Droplet Digital PCR
DHT	Dihydrotestosterone (Διυδροτεστοστερόνη)
DNA-EC	Extrachromosomal DNA
DNMT	DNA Methyltransferases
EAU	European Association of Urology
EpCAM	Epithelial Cellular Adhesion Molecule
FDA	Food and Drug Administration
GP	Gleason Pattern
GS	Gleason Score
HRM	High Resolution Melting
HRR	Homologous Recombination Repair
HSPC	Hormone Sensitive Prostate Cancer
ICI	Immune Checkpoint Inhibitor
LBD	Ligand Binding Domain
LHRH	Luteinizing hormone-releasing hormone
mCRPC	Metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer

MIAA	miRNA activity analysis
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NGS	Next-Generation Sequencing
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase chain reaction
PCWG	Prostate Cancer Working Group
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PET	Positron Emission Tomography
PSA	Prostate Specific Antigen
PSMA	Prostate Specific Membrane Antigen
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
RLFP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RTK	Receptor Tyrosine Kinases
SBRT	Stereotactic Body Radiation Therapy
SL-RT PCR	Stem – Loop Reverse Transcription PCR
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
QM-MSPCR	Quantitative Multiplex Methylation-Specific PCR
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription PCR
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
TCGA	Cancer Genome Atlas
TNM	Tumor-Node-Metastasis
TRUS	Transrectal Ultrasound
WHO	World Health Organization

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του προστάτη κατατάσσεται ως ο δεύτερος πιο διαδεδομένος καρκίνος στους άνδρες, αποτελώντας περίπου το 15% όλων των διαγνώσεων καρκίνου στον συγκεκριμένο πληθυσμό (IARC, 2022). Αρχικά, καθώς η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του προστάτη εξαρτάται από τη δέσμευση και την ενεργοποίηση του υποδοχέα ανδρογόνων από τα κυκλοφορούντα ανδρογόνα, η θεραπεία στέρησης ανδρογόνων είναι αποτελεσματική για τους περισσότερους ασθενείς. Ωστόσο όμως, η επανενεργοποίηση του υποδοχέα των ανδρογόνων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευνουχοάντοχου καρκίνου του προστάτη (CRPC) και παρά το γεγονός ότι οι πρόσφατες εξελίξεις στη στόχευση της οδού σηματοδότησης του υποδοχέα ανδρογόνων με φάρμακα όπως η οξική αμπιρατερόνη και η ενζαλουταμίδη έχουν επηρεάσει σημαντικά την κλινική φροντίδα και έχουν αυξήσει τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών αυτών, η ανάπτυξη ευνουχοάντοχου καρκίνου του προστάτη αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην κλινική περίθαλψη, ιδιαίτερα σε άτομα με μεταστατική νόσο (mCRPC), τα οποία συνεχίζουν να έχουν μέση συνολική επιβίωση λιγότερο από 2 χρόνια (Le et al., 2023, Wyatt et al., 2016).

Λόγω της εξαιρετικά ετερογενούς φύσης του ευνουχοάντοχου καρκίνου του προστάτη, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να προσδιοριστούν προγνωστικοί μοριακοί βιοδείκτες για τη βελτιστοποίηση της θεραπείας και την εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση σε αυτούς τους ασθενείς, οι οποίοι θα καθοδηγούν τη χρήση θεραπειών που απευθύνονται στους υποδοχείς ανδρογόνων, καθώς και χημειοθεραπευτικών φαρμάκων όπως η δοσεταξέλη και η καμπαζιταξέλη που έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία του μεταστατικού ευνουχοάντοχου καρκίνου του προστάτη (Wyatt and Gleave, 2015). Καθώς οι βιοψίες ιστού, παρά τη χρησιμότητά τους, δεν βρίσκουν συνήθως τακτική κλινική εφαρμογή λόγω της επικράτησης των οστικών μεταστάσεων στον CRPC, διερευνώνται οι δυνατότητες λιγότερο επεμβατικών βιοδεικτών που λαμβάνονται από το αίμα ή τα ούρα (Dijkstra, Mulders and Schalken, 2014). Για παράδειγμα, πρόσφατες μελέτες σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) και DNA ελεύθερο κυττάρων (cfDNA) έχουν εντοπίσει ορισμένες γενετικές μεταβολές στον CRPC, όπως είναι παραλλαγές συρραφής του AR, ενίσχυση του αριθμού αντιγράφων του AR καθώς και σημειακές μεταλλάξεις του AR, οι οποίες σχετίζονται με αντοχή στην αμπιρατερόνη (Azad et al., 2015).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο της μοριακής βιολογίας και της διαγνωστικής και η σημασία της έγκειται στην ικανότητά της να ενισχύει γρήγορα και επιλεκτικά συγκεκριμένες περιοχές του DNA, επιτρέποντας στους ερευνητές να μελετούν γονίδια, γενετικές μεταλλάξεις και μικροβιακά παθογόνα με υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Επιπλέον, η PCR επιτρέπει την ανίχνευση βιοδεικτών καρκίνου, όπως μεταλλάξεις, προφίλ γονιδιακής έκφρασης και επιγενετικές μεταβολές, διευκολύνοντας την έγκαιρη ανίχνευση, την πρόγνωση και τις εξατομικευμένες στρατηγικές θεραπείας (Valones et al., 2009).

Οι τεχνικές που βασίζονται στην PCR είναι απαραίτητες στη μελέτη του CRPC λόγω της ικανότητάς τους να ανιχνεύουν διάφορες μοριακές μεταβολές, όπως για παράδειγμα γονιδιακές μεταλλάξεις κρίσιμες για την εξέλιξη της νόσου (Cotter and Rubin, 2022). Επιπλέον, ο γονότυπος SNP και η ανάλυση της μεταβολής του αριθμού αντιγράφων (CNV) μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης CRPC και την εξέλιξη της νόσου (Jin et al., 2011), ενώ οι δοκιμασίες με βάση την PCR για την ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA διευκολύνουν την ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη γονιδιακή ρύθμιση στον CRPC (Peter et al., 2021).

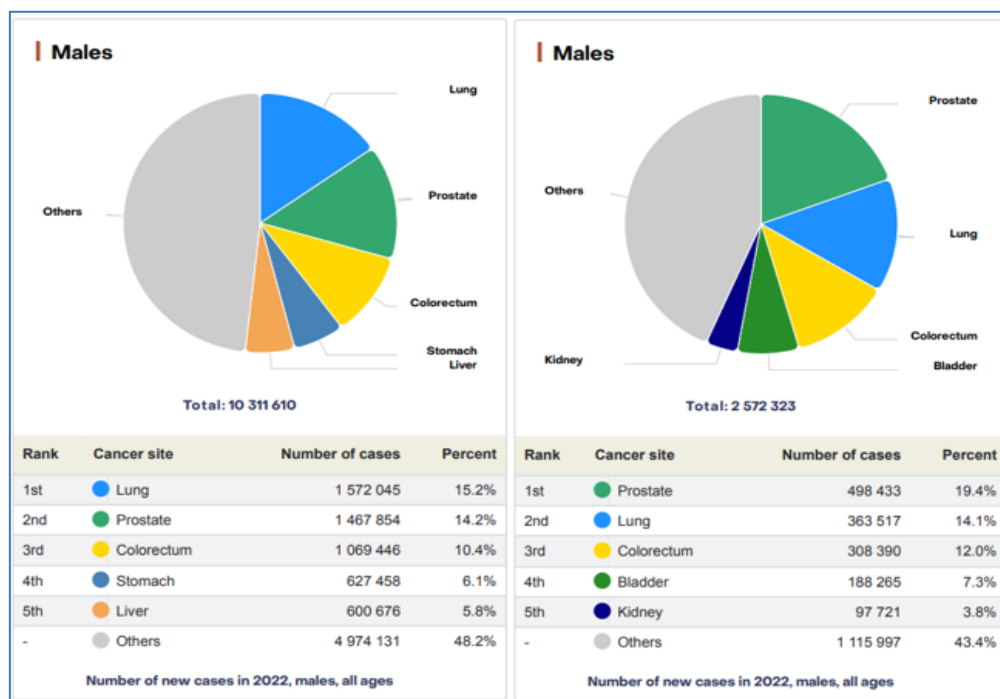
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανασκόπηση της πρόσφατης βιβλιογραφίας σχετικά με την εφαρμογή της τεχνικής PCR στην ανάπτυξη βιοδεικτών για τον ευνοχοάντοχο καρκίνο του προστάτη που δύναται να οδηγήσουν σε στοχευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις στα πλαίσια της ιατρικής ακριβείας. Πιο συγκεκριμένα, στα δύο πρώτα κεφάλαια της εργασίας παρουσιάζονται πληροφορίες για τον καρκίνο του προστάτη και ειδικότερα για τη μετατροπή του σε ευνοχοάντοχο. Στη συνέχεια, στο τρίτο κεφάλαιο πραγματοποιείται η παρουσίαση της τεχνικής PCR, των παραλλαγών της καθώς και των εφαρμογών της στην ανάπτυξη βιοδεικτών. Τέλος, στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιβλιογραφικής ανασκόπησης σχετικά με την εφαρμογή της PCR στην ανάπτυξη βιοδεικτών για τον CRPC, που προέκυψαν μετά από έρευνα στη βάση δεδομένων Pubmed με αναζήτηση άρθρων της τελευταίας δεκαετίας, χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες λέξεις – κλειδιά καθώς και συνδυασμό αυτών : prostate cancer, CRPC, PCR, biomarkers.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ο καρκίνος του προστάτη

1.1 Ορισμός και επιδημιολογία

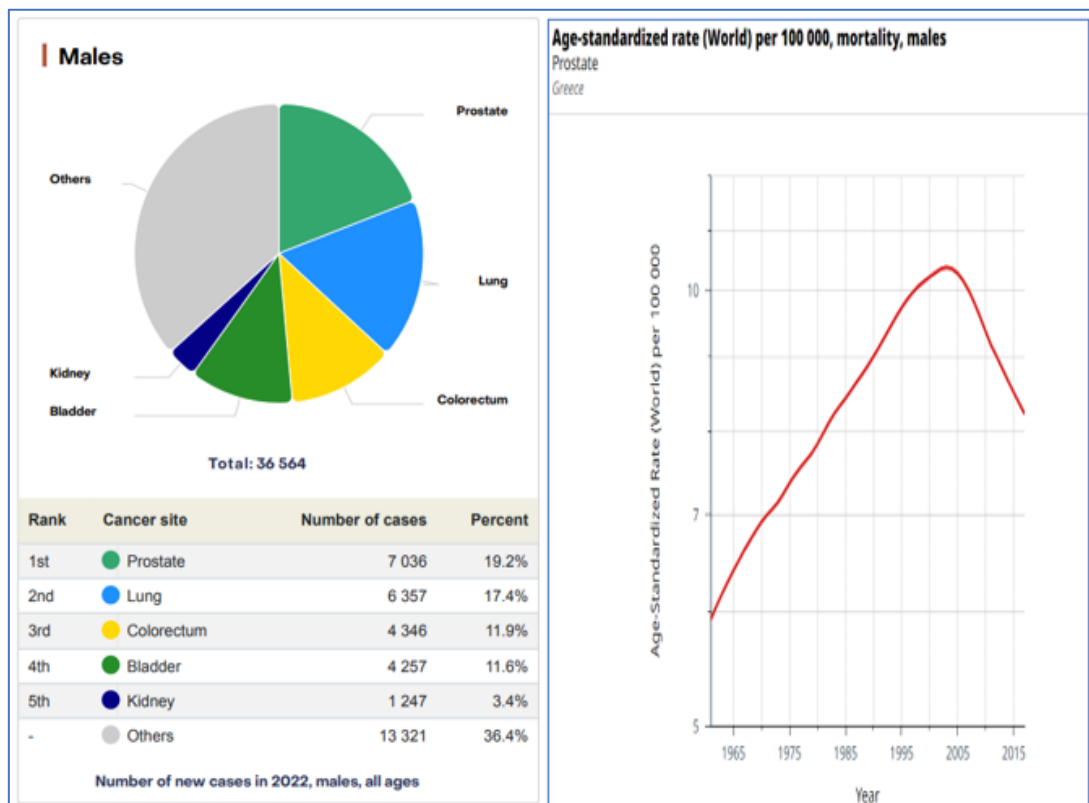
Ο καρκίνος του προστάτη ορίζεται από την κακοήγη μετατροπή κυττάρων εντός των αδενικών ιστών και πρέπει να διαφοροποιείται από την καλοήγη υπερπλασία, η οποία συνεπάγεται τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του προστάτη χωρίς μετάσταση σε απομακρυσμένες θέσεις (ESMO, 2024).

Με βάση τα τελευταία δεδομένα GLOBOCAN για το έτος 2022, ο καρκίνος του προστάτη κατατάσσεται ως ο δεύτερος πιο διαδεδομένος καρκίνος μεταξύ των ανδρών παγκοσμίως και σημειώνεται επίσης ως η πέμπτη πιο κοινή αιτία θνησιμότητας από καρκίνο σε αυτό το δημογραφικό πληθυσμό. Το 2022, υπήρξαν σχεδόν 1,5 εκατομμύριο πρόσφατα διαγνωσθέντα κρούσματα καρκίνου του προστάτη και περίπου 400.000 θάνατοι παγκοσμίως, με τον επιπολασμό της νόσου σε 5 χρόνια να φτάνει σχεδόν τις 5 εκατομμύρια περιπτώσεις. Στην Ευρώπη την ίδια περίοδο, ο καρκίνος του προστάτη εμφανίστηκε ως η πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου, αντιπροσωπεύοντας περίπου μισό εκατομμύριο νέες περιπτώσεις (IARC, 2022).



Εικόνα 1. Αριστερά: Παγκόσμια επίπτωση καρκίνου του προστάτη το έτος 2022. Δεξιά: Επίπτωση καρκίνου του προστάτη το έτος 2022 στην Ευρώπη (IARC, 2022)

Στο πλαίσιο της Ελλάδας, ο καρκίνος του προστάτη αναγνωρίστηκε ως η επικρατούσα μορφή καρκίνου στους άνδρες το έτος 2022, με πάνω από 7000 νεοδιαγνωσμένα περιστατικά. Παρόλα αυτά, έχει σημειωθεί αξιοσημείωτη μείωση των ποσοστών θνησιμότητας που σχετίζονται με αυτή τη νόσο τις τελευταίες δύο δεκαετίες στην Ελλάδα (IARC, 2022).



Εικόνα 2. Αριστερά: Επίπτωση καρκίνου του προστάτη το 2022 στην Ελλάδα. Δεξιά: Ποσοστά θνησιμότητας λόγω καρκίνου του προστάτη από το 1965-2015 στην Ελλάδα (IARC, 2022)

1.2 Παράγοντες κινδύνου και συμπτωματολογία

Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη επηρεάζεται από μια πολύπλευρη αλληλεπίδραση ηλικίας, εθνικότητας, γενετικής προδιάθεσης, βιολογικών στοιχείων, επιλογών τρόπου ζωής και περιβαλλοντικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, η προχωρημένη

ηλικία αναδεικνύεται ως ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του προστάτη, με αξιοσημείωτη αύξηση του επιπολασμού της νόσου που παρατηρείται μετά την ηλικία των 55 ετών (Al-Ghazawi et al., 2023). Επιπλέον, υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά στον επιπολασμό της νόσου μεταξύ διαφορετικών φυλετικών και εθνοτικών πληθυσμών, ιδιαίτερα εμφανής στα αυξημένα ποσοστά επίπτωσης και τη σοβαρότητα των επιθετικών μορφών ασθένειας που παρατηρούνται σε Αφροαμερικανούς άνδρες (Lillard et al., 2022).

Επιπλέον, μια σειρά ορμονικών παραγόντων, κυρίως η τεστοστερόνη και ο μεταβολίτης της διυδροτεστοστερόνης, καθώς και τα οιστρογόνα και η ινσουλίνη, εμπλέκονται στην επέκταση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του προστάτη, επηρεάζοντας δυνητικά την ανάπτυξη κακοήθειας. Επιπρόσθετα, η γενετική προδιάθεση, όπως είναι οι μεταλλάξεις σε γονίδια όπως τα *BRCA1* και *BRCA2*, μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία στην ανάπτυξη της νόσου (Al-Ghazawi et al., 2023). Το ύψος έχει αναγνωριστεί ως πιθανός παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του προστάτη, με τα ψηλότερα άτομα να παρουσιάζουν ελαφρώς υψηλότερο κίνδυνο, ιδιαίτερα για εντοπισμένες μορφές της νόσου (Bjerregaard et al., 2016). Επιπλέον, το μεταβολικό σύνδρομο και το σύνδρομο Lynch έχουν επίσης συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, μαζί με χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η προστατίτιδα. Διάφορες πτυχές της διατροφής και του τρόπου ζωής έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη. Η έρευνα δείχνει ότι η υιοθέτηση υγιεινών συμπεριφορών, όπως η αποχή από το κάπνισμα, η διαχείριση του βάρους και η τακτική σωματική δραστηριότητα, μπορεί ενδεχομένως να μετριάσει την εξέλιξη της νόσου. (Al-Ghazawi et al., 2023).

Ο καρκίνος του προστάτη είναι συχνά ασυμπτωματικός στα αρχικά του στάδια, καθιστώντας την έγκαιρη ανίχνευση δύσκολη. Τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως όταν ο καρκίνος έχει προχωρήσει και ασκεί πίεση στην ουρήθρα ή εξαπλώνεται σε άλλες περιοχές του σώματος. Άνδρες ηλικίας 50 ετών και άνω που παρουσιάζουν προβλήματα όπως ουροποιητικές δυσκολίες, στυτική δυσλειτουργία ή αιματουρία θα πρέπει να είναι προσεκτικοί για τον καρκίνο του προστάτη. Ο προχωρημένος μεταστατικός καρκίνος του προστάτη μπορεί να εκδηλωθεί ως κόπωση, ανεξήγητη απώλεια βάρους, πόνος στα οστά και περαιτέρω επιπλοκές του ουροποιητικού (Al-Ghazawi et al., 2023).

1.3 Παθοφυσιολογία

Ο καρκίνος του προστάτη ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό λίγων κακοήθων κυττάρων εντός του αδένα του προστάτη, τα οποία τελικά σχηματίζουν όγκους ικανούς να εισβάλουν σε παρακείμενους ιστούς ή να εξαπλωθούν σε απομακρυσμένες περιοχές. Το αδενοκαρκίνωμα, η κυρίαρχη μορφή καρκίνου του προστάτη, εμφανίζεται συνήθως στην περιφερική ζώνη του αδένα. Η διαταραχή των επιπέδων ανδρογόνων, τα οποία είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του προστάτη, μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στην έναρξη και την πρόοδο της νόσου. Επιπλέον, η απουσία ψευδαργύρου, ένα κρίσιμο στοιχείο στις τυπικές κυτταρικές μεταβολικές διεργασίες στον προστάτη, θα μπορούσε ενδεχομένως να συμβάλει στον πολλαπλασιασμό των κακοήθων κυττάρων εντός του αδένα. Η έρευνα έχει δείξει ότι τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη συχνά παρουσιάζουν ανεπάρκεια ψευδαργύρου, επιτρέποντάς τους να συγκεντρώσουν πρόσθετη ενέργεια για τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και τη διάδοσή τους (Leslie et al., 2023).

Επιπλέον, η ύπαρξη του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική στην αναστολή της διαδικασίας απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα, προάγοντας έτσι την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη (Leav et al., 2010). Επίσης, ο υποδοχέας ανδρογόνων (AR) έχει υπάρξει το επίκεντρο διαφόρων ερευνητικών προσπαθειών με στόχο την καταπολέμηση της νόσου και πιστεύεται ότι είναι ζωτικής σημασίας για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη (Leslie et al., 2023). Τέλος, ένας επιπλέον παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου του προστάτη είναι το ειδικό για τον προστάτη μεμβρανικό αντιγόνο (PSMA), το οποίο διευκολύνει την εξέλιξη της νόσου ενισχύοντας τα επίπεδα φυλλικού οξέος και παρέχοντας με τον τρόπο αυτό βασικά θρεπτικά συστατικά για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Yao et al., 2009).

1.4. Διάγνωση του καρκίνου του προστάτη

Η διάγνωση του καρκίνου του προστάτη συνήθως ενσωματώνει μια ολοκληρωμένη προσέγγιση, η οποία περιλαμβάνει δακτυλική εξέταση, αξιολόγηση των επιπέδων ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) και ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Επιπλέον, οι μέθοδοι

απεικόνισης όπως το διορθικό υπερηχογράφημα και η μαγνητική τομογραφία (MRI) μπορεί επίσης να παίζουν ρόλο στη διευκόλυνση της διαγνωστικής αξιολόγησης.

1.4.1. Κλινική εξέταση

Η κλινική αξιολόγηση περιλαμβάνει τη δακτυλική εξέταση του προστάτη που πραγματοποιείται από ουρολόγο, η οποία συνήθως συνιστάται για άνδρες ηλικίας 50 ετών και άνω. Αυτή η διαδικασία είναι απλή, ελάχιστα επεμβατική και οικονομικά αποδοτική, χρησιμεύει στον εντοπισμό τυχόν ανωμαλιών στο μέγεθος, την υφή και τα περιθώρια του αδένα, προτρέποντας περαιτέρω διαγνωστικές αξιολογήσεις εάν κριθεί απαραίτητο. Παρά τη χρησιμότητά του, η δοκιμή δείχνει μέτρια ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας περίπου 70%, με μια ιδιαίτερα χαμηλή θετική προγνωστική αξία που δεν ξεπερνά το 50% (Jones et al., 2018).

1.4.2. Εργαστηριακός έλεγχος

Το PSA είναι ένας τύπος γλυκοπρωτεΐνης που εκφράζεται ειδικά στα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που είναι καρκινικά. Η μέτρηση των επιπέδων του PSA γίνεται συνήθως μέσω εξέτασης αίματος και χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης για την αξιολόγηση της κατάστασης του προστάτη. Τα αυξημένα επίπεδα PSA είναι ενδεικτικά της παρουσίας καρκινικών κυττάρων εντός του αδένα του προστάτη, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχή της φυσιολογικής δομής του αδένα και επακόλουθη απελευθέρωση του PSA στην κυκλοφορία του αίματος. Ως αποτέλεσμα, ένα αυξημένο επίπεδο PSA μεγαλύτερο από 10 ng/ml μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία καρκίνου του προστάτη, δεδομένης της υψηλής ευαισθησίας αλλά χαμηλής ειδικότητας του τεστ, καθώς τα αυξημένα επίπεδα PSA μπορούν επίσης να αποδοθούν σε καταστάσεις όπως η προστατίτιδα ή η καλοήγησ υπερπλασία του προστάτη (www.cancer.org). Η ερμηνεία των τιμών PSA που ανιχνεύονται στο αίμα παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Τιμές PSA στο αίμα και η ερμηνεία τους (Πουλάκης, n.d.)

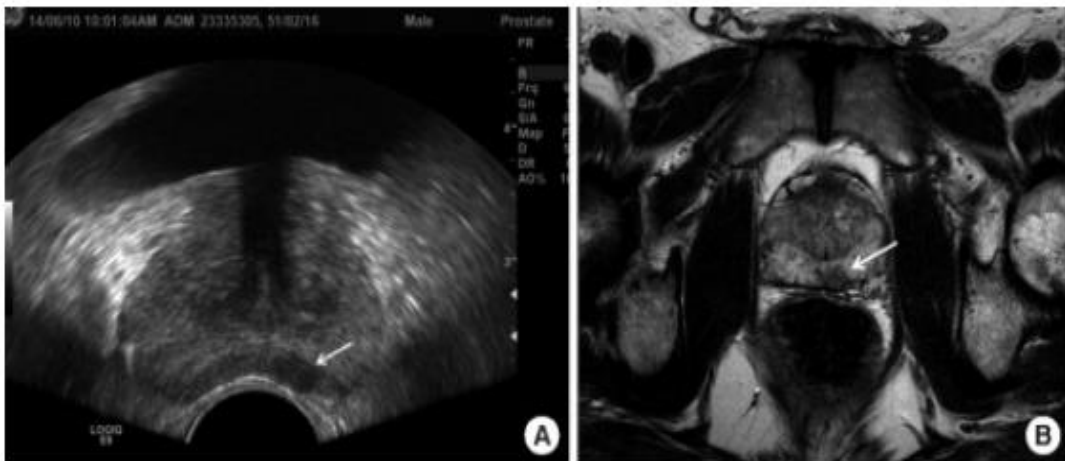
Επίπεδα PSA (ng/mL)	Ερμηνεία
<4	Φυσιολογικά επίπεδα PSA
4-10	20-25% πιθανότητα ύπαρξης καρκίνου. Πιθανώς να διεξαχθεί εξέταση βιοψίας.
>10	>50% πιθανότητα ύπαρξης καρκίνου. Η βιοψία ενδείκνυται συνήθως.
Αύξηση >0,75 ng/mL/έτος	Απαραίτητη η εξέταση από ουρολόγο.

1.4.3 Απεικονιστικές μέθοδοι

Το TRUS (διορθικό υπερηχογράφημα) είναι μια κοινώς χρησιμοποιούμενη διαγνωστική τεχνική για τον εντοπισμό πιθανών καρκινικών αλλοιώσεων στον προστάτη με τον εντοπισμό ύποπτων περιοχών μέσα στον αδένα. Συνήθως διεξάγεται από εκπαιδευμένους ακτινολόγους ή ουρολόγους με εξειδικευμένα μηχανήματα υπερήχων και εκτιμάται για την ικανότητά του να αξιολογεί το μέγεθος και τη διαμόρφωση του προστάτη και πιθανών όγκων. Παρά τη συχνή χρήση του, το TRUS δεν μπορεί να διαφοροποιήσει τους καλοήθεις από τους κακοήθεις όγκους και ως εκ τούτου συχνά ακολουθείται από βιοψία για οριστική διάγνωση (Harvey et al., 2012). Η ορθική βιοψία καθοδηγούμενη με βελόνα είναι μια διαδικασία κατά την οποία ένας εξειδικευμένος ανιχνευτής υπερήχων εισάγεται μέσω του ορθού για τον εντοπισμό του προστάτη. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται μια λεπτή βελόνα που συνδέεται με ένα πιστόλι βιοψίας για την εξαγωγή δειγμάτων ιστού από διάφορες περιοχές του προστάτη, συμπεριλαμβανομένης της βάσης, της μέσης και της κορυφής, καθώς και των δύο πλευρών. Αυτή η διαγνωστική τεχνική αποδίδει συνήθως περίπου 10 έως 13 τομές ιστού για εξέταση από παθολογοανατόμο (Hwang and Lee, 2014).

Η μαγνητική τομογραφία (MRI) έχει γίνει ένα κρίσιμο εργαλείο για την ανίχνευση και τη σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη και η σημασία της στη διαχείριση του καρκίνου του προστάτη αυξάνεται σταθερά, χάρη στην πρόοδο στις λειτουργικές αλληλουχίες MRI και στη χρήση της τεχνητής νοημοσύνης. Αυτές οι εξελίξεις διερευνώνται για τη

δυνατότητά τους να ενισχύσουν την ανίχνευση όγκων του προστάτη, να αξιολογήσουν το επίπεδο επιθετικότητάς τους και να παρέχουν πολύτιμες προγνωστικές πληροφορίες. Η MRI διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ενίσχυση της αξιολόγησης των επιπέδων κινδύνου πριν από τη θεραπεία, βοηθώντας στον εντοπισμό κατάλληλων υποψηφίων για ενεργή επιτήρηση, κατευθύνοντας στοχευμένες διαδικασίες βιοψίας, διευκολύνοντας την ανάπτυξη στρατηγικής θεραπείας και παρακολούθηση τοπικής υποτροπής μετά τη θεραπεία. Επιπλέον, η μαγνητική τομογραφία είναι ολοένα και πιο απαραίτητη για την ανίχνευση και την αξιολόγηση του μεταστατικού καρκίνου του προστάτη, χρησιμοποιώντας προηγμένες τεχνολογίες όπως η μαγνητική τομογραφία ολόκληρου του σώματος και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων για την παροχή ανώτερης διαγνωστικής ακρίβειας (Fernandes et al., 2022).



Εικόνα 3. Α. Ανίχνευση όγκου του προστάτη με TRUS Β. Ανίχνευση του ίδιου όγκου με MRI (Hwang and Lee, 2014)

1.5. Ταξινόμηση και σταδιοποίηση της νόσου

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη περιλαμβάνει την αξιολόγηση διαφόρων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του συγκεκριμένου τύπου καρκινικών κυττάρων που υπάρχουν, του μεγέθους και της εξάπλωσης του όγκου με βάση το σύστημα ταξινόμησης TNM, της βαθμολογίας Gleason που δείχνει την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων

και των επιπέδων PSA. Αυτοί οι παράγοντες βοηθούν συλλογικά τους γιατρούς να καθορίσουν το στάδιο του καρκίνου και να καθοδηγήσουν τις αποφάσεις θεραπείας.

1.5.1. Ιστολογική ταξινόμηση όγκων του προστάτη

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης του ΠΟΥ, από το έτος 2022, οι όγκοι του προστάτη μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες ομάδες: επιθηλιακούς όγκους, οι οποίοι μπορούν περαιτέρω να υποδιαιρεθούν σε αδενικά και πλακώδη νεοπλάσματα και μεσεγχυματικούς όγκους (Surintspanont and Zhou, 2022).

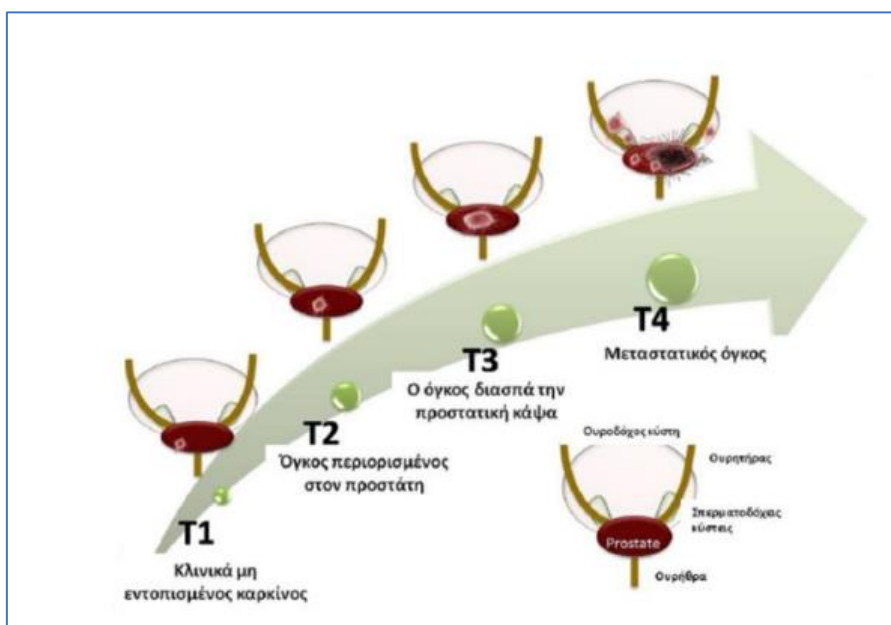
Πίνακας 2. Ταξινόμηση των όγκων του προστάτη σύμφωνα με τον WHO (Surintspanont and Zhou, 2022)

Κατηγορία	Οικογένεια (τάξη)	Τύπος
Επιθηλιακοί όγκοι	Αδενικά νεοπλάσματα	<ul style="list-style-type: none"> • Κυσταδένωμα • Υψηλούβαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία • Ενδοαυλικό καρκίνωμα • Κυψελιδικό Αδενοκαρκίνωμα • Αδενοκαρκίνωμα του προστατικού πόρου • Σχετιζόμενο με τη θεραπεία νευροενδοκρινικό καρκίνωμα
	(Βασικά) πλακώδη νεοπλάσματα	<ul style="list-style-type: none"> • Αδενοσκληρωτικό καρκίνωμα • Καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων • Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα
Μεσεγχυματικοί όγκοι μοναδικοί στον προστάτη	Στρωματοειδείς όγκοι	<ul style="list-style-type: none"> • Προστατικός στρωματικός όγκος αβέβαιου κακοήθους δυναμικού • Σάρκωμα

Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη είναι αδενοκαρκινώματα. Αυτοί οι όγκοι προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα και χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτη απουσία βασικών κυττάρων. Τα αδενοκαρκινώματα μπορούν να εμφανίσουν ένα ευρύ φάσμα εμφανίσεων, που κυμαίνονται από σαφώς καθορισμένες αδενικές δομές έως λιγότερο οργανωμένες, κακώς διαφοροποιημένες μορφές που μπορούν να δημιουργήσουν προκλήσεις όσον αφορά στην αναγνώρισή τους (Testa et al., 2019).

1.5.2. Σταδιοποίηση TNM

Το σύστημα σταδιοποίησης TNM χρησιμεύει ως το χρυσό πρότυπο για την κατηγοριοποίηση των όγκων με βάση διάφορους παράγοντες όπως το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου, η συμμετοχή των κοντινών λεμφαδένων και η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Συγκεκριμένα, η κατηγορία T χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του μεγέθους και της έκτασης του όγκου, με το T1 να υποδηλώνει έναν μικρό όγκο που δεν είναι ανιχνεύσιμο στις σαρώσεις, το T2 να δείχνει όγκο που περιέχεται στον αδένα, το T3 να δείχνει διείσδυση στην κάψα του προστάτη και το T4 που σημαίνει εξάπλωση σε γειτονικά όργανα όπως η ουροδόχος κύστη (Paner et al., 2018).



Εικόνα 4. Σταδιοποίηση κατά μέγεθος και έκταση των όγκων του προστάτη (Πουλάκης, n.d.)

Η κατηγοριοποίηση του καρκίνου ανάλογα με την εξάπλωσή του στους λεμφαδένες προσδιορίζεται από την ταξινόμηση (N), η οποία υποδιαιρείται σε N0 και N1. Το N0 υποδηλώνει την απουσία καρκινικών κυττάρων στους γύρω λεμφαδένες, ενώ το N1 υποδηλώνει την παρουσία καρκινικών κυττάρων σε αυτούς τους κόμβους. Το σύμβολο (M) χρησιμοποιείται για να δηλώσει την ύπαρξη ή μη μεταστάσεων, με το M0 να υποδηλώνει την απουσία μεταστάσεων και το M1 να υποδηλώνει την παρουσία μεταστάσεων.

Πίνακας 3. Σταδιοποίηση κατά TNM των όγκων του προστάτη (Paner et al., 2018)

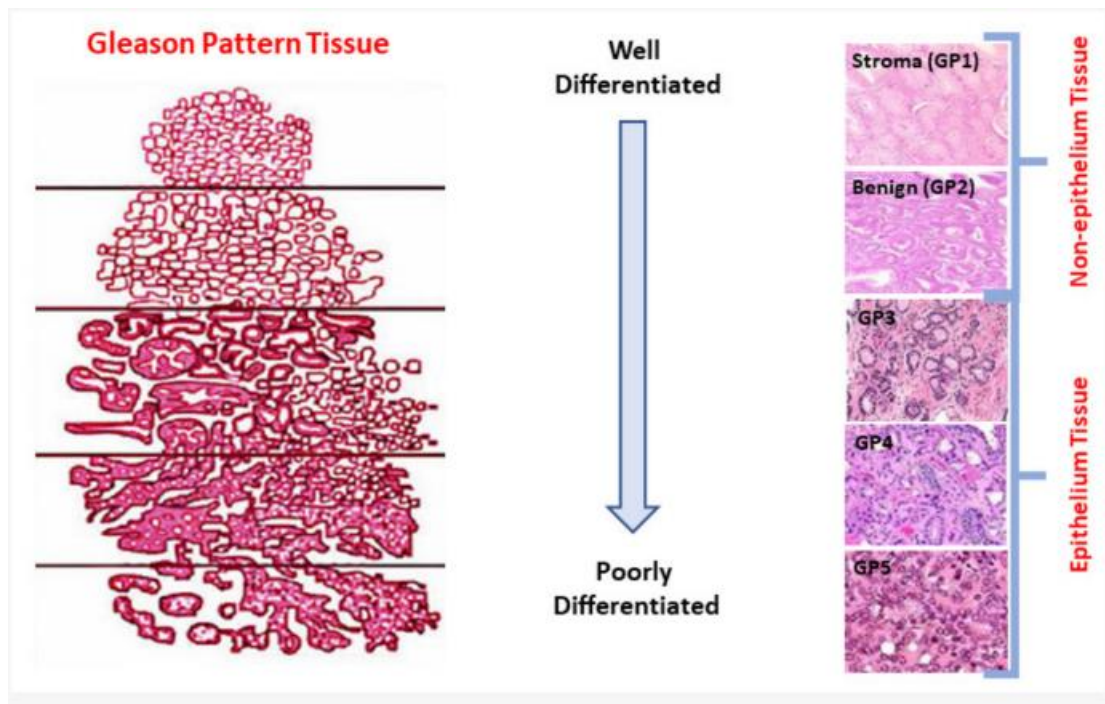
T	Πρωτοπαθής όγκος
TX	Ο πρωτοπαθής όγκος δε δύναται να εκτιμηθεί
T0	Χωρίς ενδείξεις πρωτοπαθούς όγκου
T1	Κλινικά μη εμφανής όγκος, μη ψηλαφητός ή ορατός με απεικονιστικές μεθόδους
T1a	Τυχαίο ιστολογικό εύρημα σε λιγότερο από το 5% του αφαιρεθέντος ιστού
T1b	Τυχαίο ιστολογικό εύρημα σε περισσότερο από το 5% του αφαιρεθέντος ιστού
T1c	Όγκος που ανευρέθηκε με βιοψία προστάτη (π.χ. αυξημένο PSA)
T2	Όγκος εντοπισμένος στον προστάτη ¹
T2a	Ο όγκος καταλαμβάνει το ήμισυ ή λιγότερο του ενός λοβού
T2b	Ο όγκος καταλαμβάνει περισσότερο από το ήμισυ του ενός λοβού, όχι όμως και τους δύο λοβούς
T2c	Ο όγκος καταλαμβάνει και τους δύο λοβούς
T3	Όγκος που επεκτείνεται πέραν της προστατικής κάψας ²
T3a	Εξωκαψική επέκταση (ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη)
T3b	Ο όγκος επεκτείνεται στη σπερματοδόχο κύστη(εις)
T4	Ο όγκος είναι καθηλωμένος ή διηθεί γειτονικές δομές εκτός των σπερματοδόχων κύστεων: έξω σφιγκτήρα, ορθό, ανελκτήρα του πρωκτού και/ή πυελικά τοιχώματα.
N	Επιχώριοι λεμφαδένες³
NX	Μη εκτιμητέοι λεμφαδένες
N0	Απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων
N1	Μετάσταση σε επιχώριους λεμφαδένες
M	Απομακρυσμένες μεταστάσεις⁴
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1a	Σε μη-επιχώριο λεμφαδένα(ες)
M1b	Οστικές μεταστάσεις
M1c	Εντόπιση σε άλλα όργανα (ήπαρ, πνεύμονες κ.α.)

1. Εάν ο όγκος δεν απεικονίζεται αλλά στη βιοψία καταλαμβάνει και στους 2 λοβούς: T1c.
2. Όταν ο όγκος επεκτείνεται στην κορυφή του προστάτη ή εντός της κάψας ταξινομείται ως T2 και όχι T3.
3. Επιχώριοι λεμφαδένες: κάτωθεν του διχασμού της κοινής λαγονίου αρτηρίας.
4. Εάν υπάρχουν >1 μεταστατικές εστίες, για τη σταδιοποίηση χρησιμοποιείται η μετάσταση μεγαλύτερου σταδίου [29].

1.5.3. Gleason Score – Βαθμός κακοήθειας

Λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών του καρκίνου του προστάτη, το επίπεδο διαφοροποίησης προσδιορίζεται με ανάλυση των κυττάρων στους δύο κύριους λοβούς όπου σχηματίζονται τα περισσότερα καρκινώματα. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν

διαφορετικά επίπεδα διαφοροποίησης, τα οποία μπορούν να αξιολογηθούν χρησιμοποιώντας το σύστημα βαθμολόγησης Gleason Pattern (GP), το οποίο κυμαίνεται από 1 έως 5 και αξιολογεί την ομοιότητα μεταξύ καρκινικών κυττάρων και υγιών κυττάρων προστάτη (Hammouda et al., 2022). Τα καρκινικά κύτταρα βαθμού 1 (GP1) παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο διαφοροποίησης και μοιάζουν πολύ με φυσιολογικά κύτταρα, ενώ εκείνα του βαθμού 5 (GP5) είναι ελάχιστα διαφοροποιημένα, εμφανίζουν χαοτικά μοτίβα ανάπτυξης και μοιάζουν ελάχιστα με υγιή ιστό προστάτη. Οι βαθμοί 2, 3 και 4 (GP2, GP3, GP4) εμπίπτουν μεταξύ αυτών των δύο άκρων, παρουσιάζοντας διαφορετικά επίπεδα διαφοροποίησης. (Braunhut et al., 2018).



Εικόνα 5. Το πρότυπο Gleason (Hammouda et al., 2022)

Η βαθμολογία Gleason είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της σοβαρότητας του καρκίνου του προστάτη μέσω της αξιολόγησης της ανωμαλίας των καρκινικών κυττάρων σε δείγματα βιοψίας από κάθε λοβό του προστάτη. Το 2014, η Διεθνής Εταιρεία Ουρολογικής Παθολογίας (ISUP) εισήγαγε ένα νέο σύστημα βαθμολόγησης για το σκορ Gleason, το οποίο κατηγοριοποιεί την κακοήθεια των όγκων του προστάτη σε κλίμακα από το 1 έως το 5 (Epstein et al., 2016).

Πίνακας 4. Βαθμός κακοήθειας όγκων προστάτη βάσει του Gleason score (Epstein et al., 2016)

Gleason score	ISUP grade
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 or 3+5 or 5+3)	4
9-10	5

1.5.4. Κατηγοριοποίηση ασθενών σε ομάδες κινδύνου και κατηγοριοποίηση της νόσου

Σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης Ουρολογίας (EAU), οι ασθενείς με εντοπισμένο ή τοπικά προχωρημένο καρκίνο του προστάτη κατηγοριοποιούνται σε διαφορετικές ομάδες κινδύνου με βάση τον κίνδυνο υποτροπής του καρκίνου (Uroweb, 2024b). Αυτές οι ομάδες τυπικά ταξινομούνται ως χαμηλού κινδύνου, ενδιάμεσου κινδύνου και υψηλού κινδύνου και καθορίζονται από παράγοντες όπως τα επίπεδα ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA), η βαθμολογία Gleason (GS) και το κλινικό στάδιο όγκου (cT), όπως περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα 5:

Πίνακας 5. Ομάδες κινδύνου για υποτροπή καρκίνου του προστάτη σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση Ουρολογίας (Uroweb, 2024)

Χαμηλού κινδύνου (Low-risk)	Ενδιάμεσου κινδύνου (Intermediate-risk)	Υψηλού κινδύνου (High-risk)	Υψηλού κινδύνου (High-risk)
PSA < 10 ng/mL	PSA 10-20 ng/mL	PSA > 20 ng/mL	Any PSA
and GS <7, (ISUP grade 1)	or GS 7 (ISUP grade 2/3)	or GS > 7 (ISUP grade 4/5)	any GS (any ISUP grade)
and cT1- cT2a	or cT2b	or cT2c	cT3-4 or cN+
εντοπισμένη νόσος	εντοπισμένη νόσος	εντοπισμένη νόσος	τοπικά προχωρημένη νόσος

Ο καρκίνος του προστάτη ταξινομείται σε διαφορετικά στάδια, που κυμαίνονται από το στάδιο I έως το στάδιο IV, με ορισμένα στάδια να έχουν περαιτέρω υποδιαιρέσεις όπως IIA,

ΙΙΒ, ΙΙC κ.λπ. Συνήθως, ένας χαμηλότερος αριθμός σταδίου σημαίνει λιγότερο προχωρημένη εξάπλωση του καρκίνου, ενώ όπως το στάδιο IV, υποδηλώνει μια πιο διαδεδομένη παρουσία καρκινικών κυττάρων, ενώ σε ένα συγκεκριμένο στάδιο, ένας χαμηλότερος αλφαριθμητικός προσδιορισμός υποδηλώνει ένα λιγότερο σοβαρό στάδιο. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όγκοι με παρόμοια στάδια τείνουν να έχουν συγκρίσιμες προγνώσεις και συνήθως αντιμετωπίζονται με παρόμοιες ιατρικές παρεμβάσεις (Dess et al., 2020).

Πίνακας 6. Σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη (Kandori et al., 2019)

Stage group	T categories	N categories	M categories	PSA (ng/ml)	Grade Group
I	cT1a-c, T2a	N0	M0	<10	1
I	pT2	N0	M0	<10	1
IIA	cT1a-c, T2a	N0	M0	≥10, <20	1
IIA	cT2b-c	N0	M0	<20	1
ΙΙΒ	T1-2	N0	M0	<20	2
ΙΙC	T1-2	N0	M0	<20	3
ΙΙC	T1-2	N0	M0	<20	4
IIIA	T1-2	N0	M0	≥20	1–4
IIIB	T3-4	N0	M0	Any	1–4
IIIC	AnyT	N0	M0	Any	5
IVA	AnyT	N1	M0	Any	Any
IVB	AnyT	N0	M1	Any	Any

1.6. Θεραπεία του τοπικά εντοπισμένου ορμονευαίσθητου καρκίνου του προστάτη

Ο τοπικά εντοπισμένος ορμονοευαίσθητος καρκίνος του προστάτη, ο οποίος περιορίζεται εντός του προστάτη και δεν έχει κάνει μεταστάσεις, παρουσιάζει διάφορες θεραπευτικές επιλογές, στις οποίες περιλαμβάνονται η ενεργός επιτήρηση, η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία και την ορμονοθεραπεία. Οι παράγοντες λήψης αποφάσεων περιλαμβάνουν

την ηλικία, τη γενική υγεία, την επιθετικότητα του καρκίνου και τις πιθανές παρενέργειες της θεραπείας (Knipper et al., 2021).

Η ενεργός επιτήρηση περιλαμβάνει την τακτική παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου μέσω δοκιμών PSA, βιοψιών και απεικόνισης, με έναρξη θεραπείας εάν είναι απαραίτητο και έχει δείξει ελπιδοφόρα ποσοστά μακροχρόνιας επιβίωσης (Hamdy et al., 2016).

Οι χειρουργικές προσεγγίσεις, κυρίως η ριζική προστατεκτομή, αποσκοπούν στην αφαίρεση ολόκληρου του αδένα του προστάτη και των γύρω ιστών. Οι τεχνικές ανοικτής προστατεκτομής περιλαμβάνουν ριζική οπίσθια και περινεϊκή προσέγγιση (Uroweb, 2024a), ενώ οι λαπαροσκοπικές και ρομποτικά υποβοηθούμενες μέθοδοι προσφέρουν ελάχιστα επεμβατικές εναλλακτικές λύσεις με βελτιωμένα αποτελέσματα (Allan and Ilie, 2015). Ο πυελικός λεμφαδενικός καθαρισμός (PLND) που συχνά εκτελείται παράλληλα με τη ριζική προστατεκτομή, αποσκοπεί στην αφαίρεση λεμφαδένων για τη σταδιοποίηση, αλλά μπορεί να μην βελτιώνει σημαντικά τα αποτελέσματα σε ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου (Fossati et al., 2017). Επιπρόσθετα, η ακτινοθεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της εξωτερικής ακτινοθεραπείας (EBRT) και της βραχυθεραπείας, προσφέρει αποτελεσματικές θεραπευτικές επιλογές, ιδίως για τον καρκίνο του προστάτη χαμηλού κινδύνου (Uroweb, 2024a).

Η έρευνα έχει δείξει εκτενώς την επίδραση των ανδρογόνων στην ανάπτυξη των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων του προστάτη, με σχεδόν το 90% των ασθενών με καρκίνο του προστάτη σε πρώιμο στάδιο να εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων στο αίμα. Εξαιτίας αυτού, η θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (ADT) έχει γίνει η τυπική θεραπεία για τον προχωρημένο καρκίνο του προστάτη, η οποία μπορεί να χορηγηθεί μέσω φαρμακευτικής αγωγής ή χειρουργικής επέμβασης, όπως η αμφοτερόπλευρη ορχεκτομή. Η ADT μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία ή μετά από ριζική προστατεκτομή για ασθενείς μεσαίου ή υψηλού κινδύνου, και είναι επίσης η κύρια θεραπεία για εκείνους με μεταστατική νόσο. Τα κύρια φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (ADT) αποτελούνται από αγωνιστές της ορμόνης απελευθέρωσης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRH), ανταγωνιστές LHRH, αντιανδρογόνα και οιστρογόνα (Varaprasad et al., 2023).

Η θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (ADT) για τον καρκίνο του προστάτη περιλαμβάνει κυρίως αγωνιστές LHRH, οι οποίοι χορηγούνται ως ενέσεις σε διαστήματα που κυμαίνονται

από ένα μήνα έως ένα έτος. Οι αρχικές ενέσεις των αγωνιστών LHRH προκαλούν προσωρινή αύξηση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και της ορμόνης διέγερσης ωοθυλακίων (FSH), οδηγώντας σε σύντομη αύξηση της τεστοστερόνης. Ωστόσο, η παρατεταμένη χρήση οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης των υποδοχέων LHRH, μειώνοντας τελικά τα επίπεδα LH και FSH και επιτυγχάνοντας ευνουχισμό εντός 2 έως 4 εβδομάδων. Στους κοινούς αγωνιστές LHRH περιλαμβάνονται η γκοσερελίνη, η λευπρολίδη, η μπουσερελίνη και η τριπτορελίνη (Uroweb, 2024a).

Οι ανταγωνιστές LHRH, όπως το degarelix και το relugolix, προσφέρουν μια εναλλακτική προσέγγιση. Το degarelix, ένας ενέσιμος ανταγωνιστής, οδηγεί σε ταχεία ευνουχισμό από την τρίτη ημέρα και έχει δείξει ανώτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη του PSA σε σύγκριση με τη λευπρολίνη σε μια δοκιμή φάσης III (Shore, 2013). Το Relugolix, ένας από του στόματος ανταγωνιστής, κατέδειξε επίσης υπεροχή έναντι της λευπρολίδης όσον αφορά την επίτευξη ευνουχισμού και την ασφάλεια σε μια δοκιμή φάσης III (Shore et al., 2020).

Τα αντιανδρογόνα είναι μια άλλη κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τον ορμονοευαίσθητο καρκίνο του προστάτη. Αυτές οι από του στόματος χορηγούμενες ενώσεις, όπως η νιλουταμίδα, η φλουταμίδα και η δικαλουταμίδα, δρουν με δέσμευση στους υποδοχείς ανδρογόνων, εμποδίζοντας την τεστοστερόνη και τη διυδροτεστοστερόνη χωρίς να μειώνουν τα επίπεδα τεστοστερόνης στο αίμα. Τέλος, η χορήγηση οιστρογόνων καταστέλλει τα επίπεδα τεστοστερόνης, αλλά έχει συναφείς παρενέργειες, γεγονός που ωθεί τη συνεχή έρευνα για ασφαλέστερες εναλλακτικές λύσεις (Uroweb, 2024a).

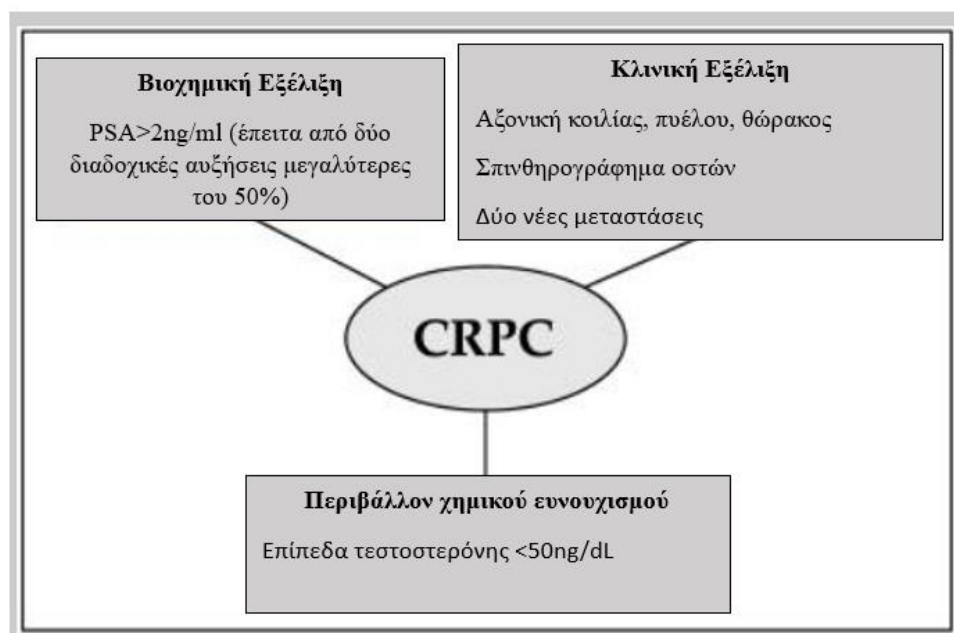
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ευνοχοάντοχος καρκίνος του προστάτη (CRPC)

2.1. Ορισμός

Οι ασθενείς που βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια καρκίνου του προστάτη συνήθως βιώνουν μια ελπιδοφόρα έναρξη της θεραπείας στέρησης ανδρογόνων, καθώς μειώνεται επιτυχώς η παρουσία των ανδρικών ορμονών που οδηγούν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, όσο προχωρά ο χρόνος, αυτή η μέθοδος προάγει ακούσια την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων που έχουν γίνει ανθεκτικά στη στέρηση ανδρογόνων. Ως αποτέλεσμα, αυτό έχει τελικά ως επίπτωση την εμφάνιση του ανθεκτικού στον ευνοχισμό καρκίνου του προστάτη (CRPC), μιας κατάστασης κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα αντιστέκονται στις παραδοσιακές θεραπείες και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ακόμη και απουσία ανδρογόνων. Ειδικότερα, τα άτομα με προχωρημένο μεταστατικό ευνοχοάντοχο καρκίνο του προστάτη (mCRPC) αντιμετωπίζουν δυσμενή πρόγνωση, με μέσο ποσοστό επιβίωσης μικρότερο από δύο χρόνια. Πρόσφατα, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα της θεραπείας του CRPC, με την εισαγωγή πολλαπλών φαρμάκων που έχουν αποδείξει αποτελεσματικότητα στην παράταση της διάρκειας ζωής των ασθενών. Αυτά περιλαμβάνουν φάρμακα που στοχεύουν την οδό σηματοδότησης των υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η οξική αμπιρατερόνη, η ενζαλουταμίδα, η απαλουταμίδα και η δαρολουταμίδα, καθώς και ραδιοφαρμακευτικά όπως το ράδιο-223 και το 177Lu-PSMA-617. Αυτές οι εξελίξεις έχουν φέρει επανάσταση στο τοπίο της θεραπείας για ασθενείς με CRPC, προσφέροντας νέες ελπίδες και βελτιωμένα αποτελέσματα (Le et al., 2023). Οι πρόοδοι στον τομέα της ιατρικής ακριβείας έχουν οδηγήσει σε σημαντικά βήματα ως προς την κατανόηση του καρκίνου του προστάτη, μέσω της ανακάλυψης διαφόρων υποκατηγοριών της νόσου, καθώς και γενετικών παραλλαγών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό των καταλληλότερων θεραπευτικών επιλογών για μεμονωμένους ασθενείς (van Dessel et al., 2019).

Η Ομάδα Εργασίας για τον Καρκίνο του Προστάτη 3 (PCWG 3) έχει καθιερώσει οδηγίες για τον προσδιορισμό της εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη μετά από ευνοχισμό. Αυτές οι κατευθυντήριες οδηγίες δηλώνουν ότι η βιοχημική εξέλιξη συμβαίνει όταν υπάρχει 50%

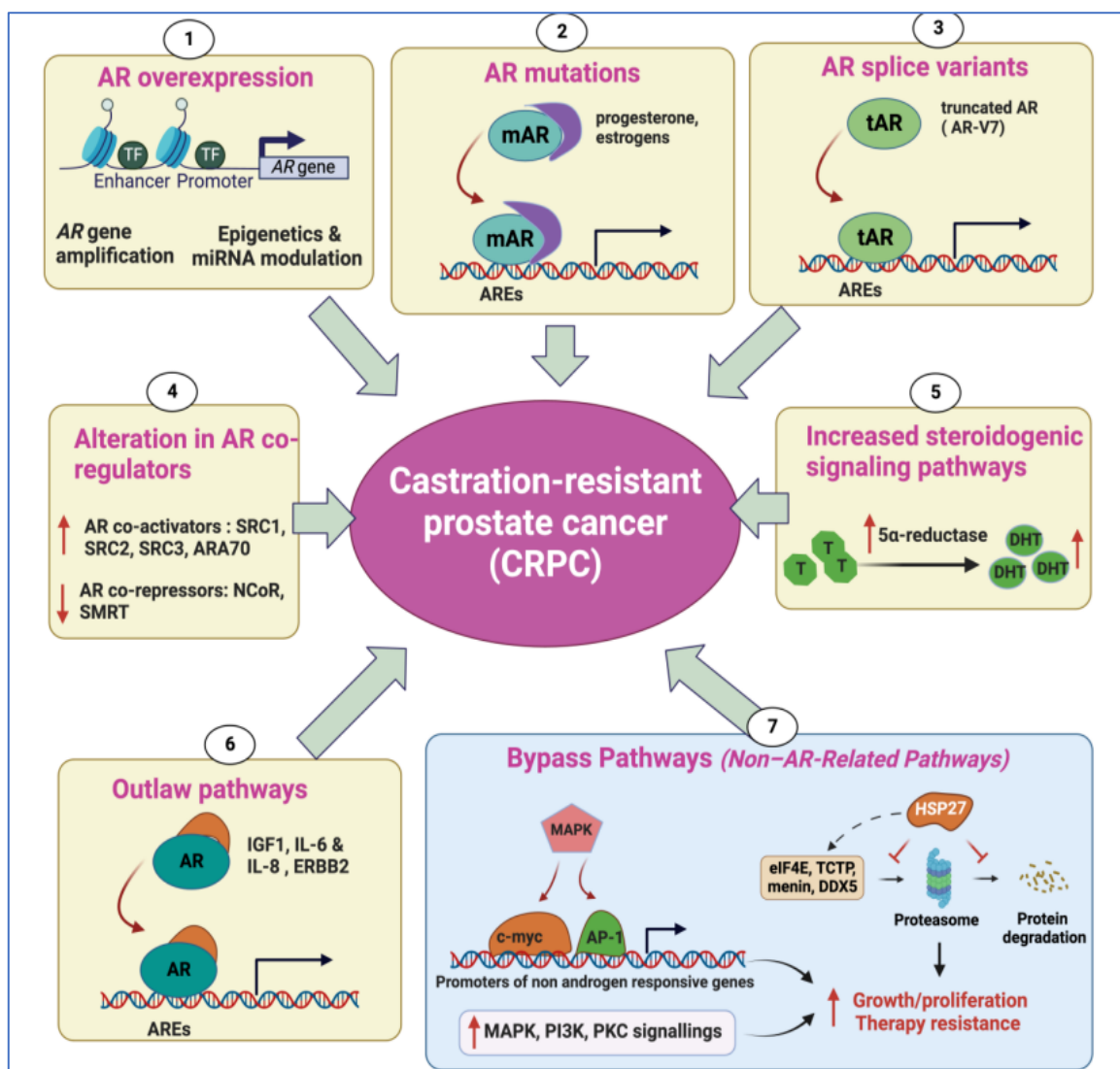
ή μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων αντιγόνου ειδικού προστάτη στον ορό σε δύο διαδοχικές δοκιμές που διεξάγονται με διαφορά τουλάχιστον μίας εβδομάδας, με ελάχιστη αύξηση 2,0 ng/ml από την αρχική βασική μέτρηση. Επιπλέον, ο ρυθμός με τον οποίο τα επίπεδα PSA διπλασιάζονται με την πάροδο του χρόνου χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της σοβαρότητας της εξέλιξης (Scher et al., 2016). Επιπρόσθετα, η αξιολόγηση της εξέλιξης της νόσου περιλαμβάνει τη χρήση διαφόρων απεικονιστικών μεθόδων όπως αξονική τομογραφία, μαγνητική τομογραφία πυέλου, ενδοορθική μαγνητική τομογραφία, υπερηχογράφημα ορθού ή σαρώσεις PET/CT. Όπως περιγράφεται από τις κατευθυντήριες γραμμές RECIST 1.1, όταν υπάρχουν σπλαχνικές μεταστάσεις, ένας λεμφαδένας πρέπει να έχει μετρήσεις τουλάχιστον 2 cm στην αξονική ή μαγνητική τομογραφία για να εντοπιστεί η εξέλιξη της νόσου, ενώ η εξέλιξη στα οστά προσδιορίζεται από την παρουσία δύο ή περισσότερων νέων βλαβών στο σπινθηρογράφημα με τεχνητό Tc-99m, με περαιτέρω επιβεβαίωση μέσω CT ή MRI εάν τα αρχικά αποτελέσματα είναι ασαφή (Schwartz et al., 2016). Η EAU ορίζει τον CRPC ως μια κατάσταση στην οποία υπάρχουν ενδείξεις εξέλιξης της νόσου είτε βιοχημικά είτε κλινικά, όπως περιγράφεται από τα προαναφερθέντα κριτήρια PCWG 2 και RECIST 1.1 και όταν η εξέλιξη αυτή εμφανίζεται σε άτομα με κατασταλμένα επίπεδα τεστοστερόνης, ειδικά σε άτομα με επίπεδα κάτω από 50 ng/dL (Cornford et al., 2017).



Εικόνα 6. Ορισμός του CRPC (Morote et al., 2022)

2.2. Μηχανισμοί μετατροπής σε CRPC

Επί του παρόντος, υπάρχουν πολλές διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές για άτομα με CRPC, αλλά η αποτελεσματικότητά τους είναι συχνά περιορισμένη. Ως εκ τούτου, η απόκτηση βαθύτερης κατανόησης των υποκείμενων μηχανισμών της CRPC θα μπορούσε να είναι ζωτικής σημασίας για τον εντοπισμό καινοτόμων και αποτελεσματικών θεραπειών για αυτήν την πάθηση. Στην εικόνα 7 απεικονίζονται οι μοριακές οδοί που θα μπορούσαν ενδεχομένως να συμβάλουν στην εμφάνιση CRPC.



Εικόνα 7. Μοριακοί μηχανισμοί ανάπτυξης CRPC (Le et al., 2023)

2.2.1. Υπερέκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων

Η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να ευδοκιμούν και να πολλαπλασιάζονται σε περιβάλλοντα χαμηλών ανδρογόνων όταν οι ασθενείς υποβάλλονται σε θεραπεία στέρησης ανδρογόνων. Η έρευνα έχει δείξει ότι τα επίπεδα τόσο του AR mRNA όσο και της πρωτεΐνης είναι συχνά αυξημένα σε περιπτώσεις CRPC, με το 70% των περιπτώσεων CRPC να εμφανίζουν ενίσχυση του γονιδίου AR, οδηγώντας σε αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων AR mRNA (Quigley et al., 2018). Είναι σημαντικό να κατανοηθεί ότι αυτή η αύξηση στην έκφραση του AR παρατηρείται μόνο σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία στέρησης ανδρογόνων, υποδεικνύοντας ότι είναι άμεση συνέπεια της ορμονικής θεραπείας (Saraon, Jarvi and Diamantis, 2011). Επιπλέον, η παρουσία επιγενετικών αλλαγών, όπως αλλοιώσεις στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA, τροποποιήσεις στην ακετυλίωση ιστονών και τροποποίηση της έκφρασης των miRNAs, θα μπορούσε επίσης να παίζει ρόλο στην υπερέκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων στον ευνοχοάντοχο καρκίνο του προστάτη (Le et al., 2023).

2.2.2. Μεταλλάξεις του γονιδίου AR

Μεταλλάξεις στο γονίδιο AR έχουν βρεθεί σε περίπου ένα πέμπτο των περιπτώσεων CRPC, αλλά είναι ασυνήθιστες στον εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις συμβαίνουν στην περιοχή δέσμησης του συνδέτη (LBD) καθώς επίσης και σε περιοχές που εμπλέκονται στη δέσμηση συμπαράγοντα. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να μειώσουν την εξειδίκευση του AR για τον κύριο συνδέτη του, δηλαδή τα ανδρογόνα, ενώ του επιτρέπουν να συνδέεται με άλλες ορμόνες όπως η προγεστερόνη και τα οιστρογόνα. Ως αποτέλεσμα, αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των ανταγωνιστών AR, αναγκάζοντάς τους να δρουν ως αγωνιστές AR και οδηγώντας εν τέλει σε αντίσταση στη θεραπεία (Le et al., 2023).

Η μετάλλαξη H875Y που υπάρχει στα κύτταρα CWR22 έχει ανακαλυφθεί ότι αλλάζει την ειδικότητα του υποδοχέα ανδρογόνου. Αυτό σημαίνει ότι αν και το μεταλλαγμένο AR εξακολουθεί να ανταποκρίνεται στα ανδρογόνα των όρχεων όπως το φυσιολογικό AR, εμφανίζει επίσης αυξημένη ενεργοποίηση από ανδρογόνα των επινεφριδίων όπως η διυδροεπιανδροστερόνη και η υδροξυφλουταμίδη. Επιπλέον, το μεταλλαγμένο AR ενεργοποιείται επίσης από την οιστραδιόλη και την προγεστερόνη. Επιπρόσθετα, εκτός από μεταλλάξεις σε αλληλουχίες κωδικοποίησης AR, υπάρχει υψηλός επιπολασμός

μεταλλάξεων ματίσματος του AR στον CRPC. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαφορετικών παραλλαγών ματίσματος, συμπεριλαμβανομένων των AR3 (AR-V7), AR4 και AR5, οι οποίες δεν έχουν την περιοχή δέσμευσης συνδέτη, έχοντας ως αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση των μονοπατιών AR (Le et al., 2023).

2.2.3. Μεταβολές στους συμπαράγοντες του AR

Ο υποδοχέας ανδρογόνων, ενεργώντας ως παράγοντας μεταγραφής, συνεργάζεται με διάφορες ρυθμιστικές πρωτεΐνες για να δημιουργήσει ένα εξαιρετικά λειτουργικό μεταγραφικό σύμπλεγμα. Αυτοί οι συμπαράγοντες μπορούν είτε να ενισχύσουν είτε να εμποδίσουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα, επηρεάζοντας τελικά την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται από ανδρογόνα. Οι τροποποιήσεις στα επίπεδα αυτών των συμπαράγοντων θα μπορούσαν να δώσουν στα καρκινικά κύτταρα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην προσαρμογή στη θεραπεία στέρησης ανδρογόνων, προάγοντας έτσι την εξέλιξη του ανθεκτικού στον ευνουχισμό καρκίνου του προστάτη (Le et al., 2023).

Ο καρκίνος του προστάτη περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση πολλαπλών ενεργοποιητών όπως SRC1, SRC2, SRC3, ARA70, PIAS1 και Tip60 με τον υποδοχέα ανδρογόνων, με αποτέλεσμα την ενίσχυση των μεταγραφικών του δυνατοτήτων. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα έκφρασης των TIF2 και SRC1 τείνουν να αυξάνονται ταυτόχρονα με την έκφραση του AR καθώς ο καρκίνος του προστάτη εξελίσσεται μετά από θεραπεία στέρησης ανδρογόνων, ενώ επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι αυτές οι πρωτεΐνες συχνά έχουν αυξημένη έκφραση σε δείγματα CRPC (Le et al., 2023). Με πιο συγκεκριμένους όρους, η υπερέκφραση του TIF2 έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την ενεργοποίηση του AR ως απόκριση σε ασθενέστερα στεροειδή όπως είναι για παράδειγμα η ανδροστενεδιόνη και η DHEA, ειδικά σε κυτταρικές σειρές που υπάρχουν μεταλλάξεις AR. Επιπλέον, το SRC3 έχει αναγνωριστεί ως ένας ισχυρός συν-ενεργοποιητής του AR και πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην προώθηση της εξέλιξης του ευνουχοάντοχου καρκίνου του προστάτη. Από την άλλη πλευρά, αναστολείς του AR, όπως είναι τα NCoR και SMRT συνδέονται με το AR μειώνοντας τη μεταγραφική του δραστηριότητα και εν τέλει η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των ενεργοποιητών και των αναστολέων είναι ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο της λειτουργίας του AR και την πρόοδο του CRPC (Le et al., 2023, Tien et al., 2013).

2.2.4. Αυξημένη σύνθεση ενζύμων στεροειδογένεσης

Αρκετές ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη έχουν την ικανότητα να συνεχίσουν να ευδοκιμούν ακόμη και μετά από θεραπεία ευνοχισμού ελέγχοντας την παραγωγή ανδρογόνων στον προστάτη μέσω ορμονικών οδών. Ένα κρίσιμο συστατικό σε αυτόν τον μηχανισμό είναι το ένζυμο 5α-αναγωγή, υπεύθυνο για τη μετατροπή της τεστοστερόνης στην ισχυρότερη DHT (5α-διυδροτεστοστερόνη). Τα αυξημένα επίπεδα αυτού του ενζύμου έχουν συσχετιστεί με μια γενετική παραλλαγή που περιλαμβάνει την υποκατάσταση της βαλίνης με λευκίνη στο κωδικόνιο 89. Κατά τη διάρκεια της στέρησης ανδρογόνων, τα επίπεδα τεστοστερόνης και διυδροτεστοστερόνης στον προστάτη μπορεί να μην μειωθούν τόσο πολύ όσο στο υπόλοιπο σώμα, γεγονός που μπορεί να δημιουργήσει ένα προστατευτικό περιβάλλον για τα καρκινικά κύτταρα, φαινόμενο γνωστό ως ατελής καταστολή των ανδρογόνων εντός του προστάτη κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Le et al., 2023). Η έρευνα έχει επίσης δείξει ότι τα ανθεκτικά στον ευνοχισμό καρκινικά κύτταρα του προστάτη παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ορισμένων ενζύμων που σχετίζονται με την παραγωγή στεροειδών *de novo*, όπως είναι τα FASN, CYP17A1, CYP19A1 και UGT2B17, σε σύγκριση με τα καρκινικά κύτταρα πρώιμου σταδίου του καρκίνου του προστάτη (Montgomery et al., 2008).

2.2.5. Μονοπάτια σηματοδότησης που δεν ενεργοποιούνται από ανδρογόνα (outlaw pathways)

Ο υποδοχέας ανδρογόνων μπορεί να ενεργοποιηθεί όχι μόνο από φυσικά ανδρογόνα αλλά και από άλλα μόρια, όπως αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και κινάσες και αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση του CRPC, όπου η αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα ανδρογόνων και των διαφόρων αυτών μορίων δύναται να συμβάλλει στην εξέλιξη της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, οι αυξητικοί παράγοντες όπως οι IGF-I, KGF και EGF είναι ικανοί να ενισχύουν τη μεταγραφική δραστηριότητα AR ακόμη και απουσία ανδρογόνων βοηθώντας στη μεταφορά του AR στο κύτταρο και ελέγχοντας τη μεταγραφή των γονιδίων που αποκρίνονται στα ανδρογόνα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι κυτοκίνες όπως η IL-6 και η IL-8 έχουν την ικανότητα να προκαλούν σηματοδότηση AR χωρίς την ανάγκη για συνδέτες και επιπρόσθετα, κινάσες υποδοχέα τυροσίνης (RTK), όπως το HER2/ERBB2,

οι οποίες είναι συχνά αυξημένες στο CRPC, μπορούν επίσης να επανενεργοποιήσουν τη σηματοδότηση AR ακόμη και όταν τα επίπεδα ανδρογόνων είναι χαμηλά (Le et al., 2023).

2.2.6. Διάφοροι μηχανισμοί ανεξάρτητοι από τον AR

Έχουν ανακαλυφθεί πολυάριθμες οδοί στην ανάπτυξη της CRPC που δεν εξαρτώνται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα ανδρογόνων. Ένας σημαντικός μηχανισμός είναι ο νευροενδοκρινικός μετασχηματισμός των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, ο οποίος εμποδίζει την ανάπτυξή τους και τα καθιστά πιο ανθεκτικά στη θεραπεία, ενώ επιπλέον, η απελευθέρωση νευροπεπτιδίων όπως η βομβεσίνη και η σεροτονίνη από τα συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα προάγει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους. Αντίσταση στη θεραπεία μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σε περιπτώσεις όπου οι ογκοκατασταλτικοί παράγοντες όπως το PTEN και τα αντι-αποπτωτικά γονίδια όπως το BCL-2 απορρυθμίζονται. Το PTEN είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης σε φυσιολογικά κύτταρα, αλλά οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο στο CRPC μπορούν να προάγουν τη μετάσταση. Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση του BCL-2 στο CRPC μπορεί να αποτρέψει τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη από το να υποστούν κυτταρικό θάνατο (Jamaspishvili et al., 2018, Le et al., 2023).

2.3 Θεραπευτικές επιλογές στον CRPC

Το πρώτο βήμα για την απόφαση για την καλύτερη πορεία θεραπείας για τον ανθεκτικό στον CRPC είναι να προσδιοριστεί εάν η ασθένεια έχει εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του σώματος χρησιμοποιώντας απεικονιστικές μεθόδους. Αυτό βοηθά να χωριστούν οι ασθενείς σε δύο κατηγορίες: σε αυτούς με CRPC αλλά χωρίς ανιχνεύσιμες μεταστάσεις (αναφέρεται ως M0 ανθεκτική στον ευνοχισμό νόσος) και σε αυτούς με CRPC που έχουν τουλάχιστον μία επιβεβαιωμένη μετάσταση (αναφέρεται ως M1 ανθεκτική στον ευνοχισμό νόσος ή μεταστατική mCRPC).

2.3.1 Θεραπεία στον CRPC – M0

Σε περιπτώσεις ασθενών με CRPC-M0, η στρατηγική της κύριας θεραπείας περιλαμβάνει ορμονική χειραγώγηση, με τυπική έναρξη θεραπείας αποκλεισμού ανδρογόνων για μείωση των επιπέδων τεστοστερόνης κάτω από 50 ng/dL. Εάν ο χρόνος διπλασιασμού του PSA υπερβαίνει τους 10 μήνες, οι ασθενείς μπορεί να επιλέξουν προσεκτική παρατήρηση ή να εξετάσουν το ενδεχόμενο να ενσωματώσουν ένα συμβατικό αντι-ανδρογόνο όπως η βικαλουταμίδα. Αντίθετα, εάν ο χρόνος διπλασιασμού του PSA πέσει κάτω από 10 μήνες, η EAU συνιστά τη χρήση σύγχρονων ορμονικών θεραπειών όπως η απαλουταμίδα, η δαρολουταμίδα ή η ενζαλουταμίδα για την καθυστέρηση της εμφάνισης μετάστασης και την ενίσχυση της επιβίωσης χωρίς μεταστάσεις (Uroweb, 2024a).

2.3.2. Θεραπεία μεταστατικού CRPC

Ο μεταστατικός CRPC (mCRPC) παρουσιάζει ένα πολύπλοκο θεραπευτικό τοπίο με διάφορες θεραπευτικές επιλογές που αποσκοπούν στη βελτίωση των αποτελεσμάτων των ασθενών, στις οποίες περιλαμβάνονται η χημειοθεραπεία, οι στοχευμένες θεραπείες για τον άξονα ανδρογόνων-υποδοχέων (ARATs), η ανοσοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και οι αναστολείς PARP.

Η χημειοθεραπεία που περιλαμβάνει φάρμακα ταξάνης όπως η δοσεταξέλη και η καμπαζιταξέλη, καθώς και άλλους παράγοντες όπως η μιτοξαντρόνη και η εστραμουστίνη, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη θεραπεία του mCRPC (Le et al., 2023). Η δοσεταξέλη, ειδικότερα, αποτελεί ένα ημι-συνθετικό παράγωγο ταξάνης που επιδεικνύει ισχυρή ικανότητα πρόκλησης κυτταρικού θανάτου αποτρέποντας τη διάσπαση των μικροσωληνίσκων και αναγκάζοντας τα κύτταρα να σταματήσουν τον κύκλο ανάπτυξής τους σε μια συγκεκριμένη φάση (G(2)M), οδηγώντας εν τέλει σε κυτταρική απόπτωση (Ferretti et al., 2023). Η δοσεταξέλη έχει δείξει σημαντική αποτελεσματικότητα στη βελτίωση της συνολικής επιβίωσης και της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη σε σύγκριση με τη μιτοξαντρόνη σε κλινικές δοκιμές όπως για παράδειγμα η SWOG 99-16 (Petrylak et al., 2004).

Η εξέλιξη και η εξάπλωση του CRPC συνδέεται με υψηλότερα επίπεδα ανδρογόνων εντός του όγκου, τα οποία προκαλούν την ενεργοποίηση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την

παραγωγή ανδρογόνων. Επιπλέον, η υπερέκφραση των AR καθώς και η εμφάνιση μεταλλαγμένων μορφών AR παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου. Ως εκ τούτου, στοχευμένες θεραπείες που εστιάζουν στην AR, όπως η οξική αμπιρατερόνη και η ενζαλουταμίδη, έχουν εγκριθεί για τη διαχείριση του mCRPC. Πιο συγκεκριμένα, η αβιρατερόνη αναστέλλει τη σύνθεση ανδρογόνων αναστέλλοντας τα CYP 11A και CYP17, ενώ η ενζαλουταμίδη δρα ως αναστολέας της σηματοδότησης του υποδοχέα ανδρογόνων καθώς εμφανίζει ισχυρή συγγένεια δέσμευσης για τον συγκεκριμένο υποδοχέα (Ferreti et al., 2023). Κλινικές δοκιμές όπως οι COU-AA-301 και AFFIRM έχουν καταδείξει την αποτελεσματικότητα αυτών των φαρμάκων στη βελτίωση της συνολικής επιβίωσης και στην καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου (Fizazi et al., 2012, Nadal, Taplin and Bellmunt, 2014).

Η ανοσοθεραπεία, τόσο η κυτταρική ανοσοθεραπεία Sipuleucel-T, όσο και οι αναστολείς των σημείων ανοσολογικού ελέγχου (ICIs) όπως η πεμπρολιζουμάμπη και η ντοσταλιμάμπη, παρέχουν μια εναλλακτική θεραπευτική οδό για τους ασθενείς με mCRPC (Le et al., 2023). Αυτά τα φάρμακα, που είναι εγκεκριμένα από τον FDA, στοχεύουν στην οδό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1 (PD-1), ενεργοποιώντας την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού κατά των καρκινικών κυττάρων (Ferreti et al., 2023). Επίσης, στη θεραπεία του mCRPC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακτινοθεραπεία, συμπεριλαμβανομένων του ραδίου-223 και του λουτετίου-177, οι οποίες στοχεύουν τις οστικές μεταστάσεις και τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το PSMA, αντίστοιχα (Ferreti et al., 2023).

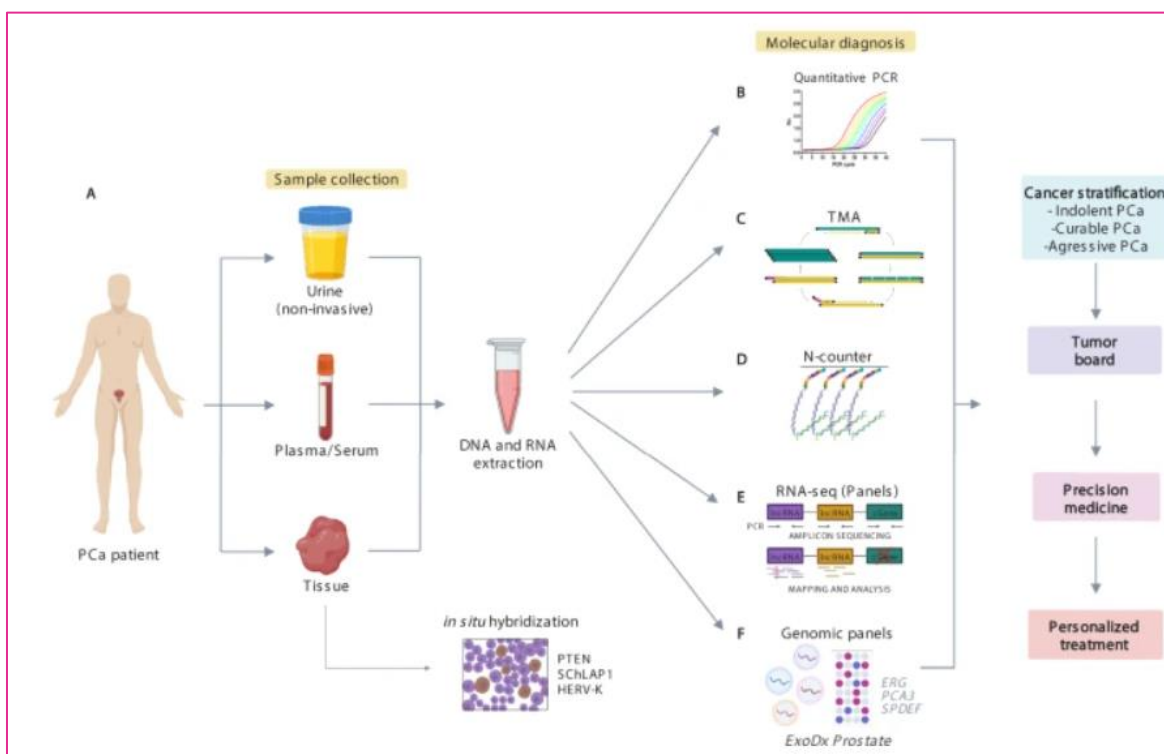
Τέλος, καθώς σε ένα ποσοστό 10-15% των ασθενών με mCRPC έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε γονίδια ομόλογου ανασυνδυασμού για την επιδιόρθωση του DNA (HRR), όπως τα *BRCA2* και *ATM*, οι αναστολείς της PARP (πολυμεράση της πολυ-αδενοδιφωσφορικής ριβόζης) όπως η ολαπαρίμπη και η νιραπαρίμπη, μπορούν να προσφέρουν στοχευμένη θεραπεία για τους ασθενείς αυτούς. Σε μελέτες όπως η PROfound και η MAGNITUDE έχει καταδειχθεί η αποτελεσματικότητα των αναστολέων PARP, είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες όπως η αμπιρατερόνη, στην παράταση της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη και στη βελτίωση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με mCRPC (Ferreti et al., 2023).

Συνολικά, λοιπόν, το θεραπευτικό τοπίο για τη μεταστατική CRPC εξελίσσεται ραγδαία, με έμφαση στη βελτίωση των αποτελεσμάτων επιβίωσης και στην καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου μέσω των συνδυαστικών θεραπειών και των εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων με βάση τα ατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Για το λόγο αυτό, η εύρεση βιοδεικτών για τον CRPC και ειδικά για τη μεταστατική νόσο, είναι εξαιρετικά σημαντική για τη διαχείριση της νόσου.

2.4. Διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες στον CRPC

Ένας βιοδείκτης είναι ένας τύπος βιολογικού μορίου που υπάρχει στο αίμα, στους ιστούς ή στα σωματικά υγρά και μπορεί να μετρηθεί για να υποδείξει την παρουσία μιας φυσιολογικής ή μη φυσιολογικής διαδικασίας, καθώς και μιας ασθένειας (Goossens et al., 2015). Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι μοριακών δεικτών, καθένας από τους οποίους εξυπηρετεί έναν συγκεκριμένο κλινικό σκοπό και σε αυτούς περιλαμβάνονται διαγνωστικοί, προγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες, οι οποίοι βοηθούν τους επαγγελματίες υγείας με διαφορετικούς τρόπους ανάλογα με το πλαίσιο στο οποίο χρησιμοποιούνται (Rubin et al., 2014).

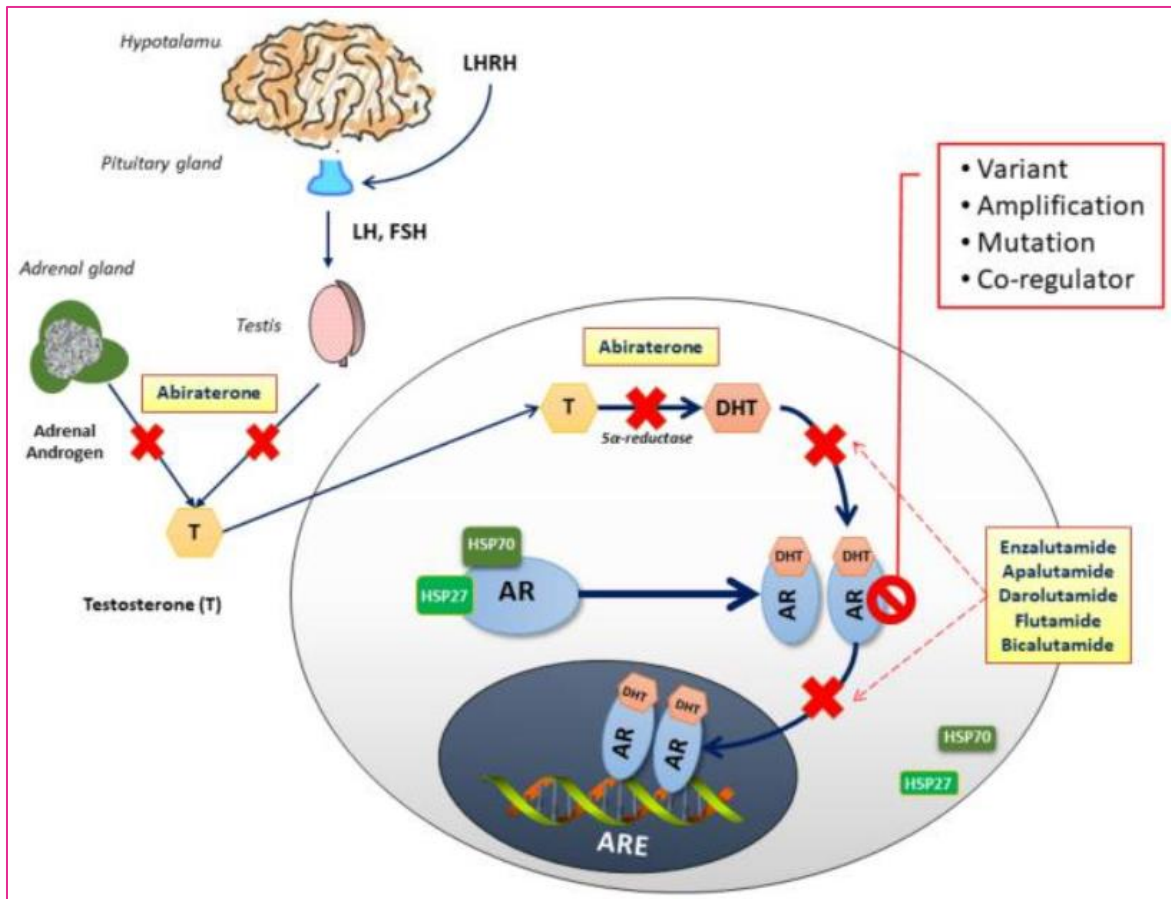
Ένας τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η συλλογή δειγμάτων ιστού, αίματος ή ούρων από τον ασθενή και στη συνέχεια να εξεταστούν για τον βιοδείκτη χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως ο υβριδισμός *in situ* στο δείγμα ιστού ή η εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων και η χρήση μεθόδων όπως η ποσοτική PCR ή η αλληλούχιση RNA για την ανίχνευση του βιοδείκτη (Alarcón-Zendejas et al., 2022). Η υγρή βιοψία είναι μια μη επεμβατική μέθοδος για την ανάλυση του καρκινικού DNA απομονώνοντάς το από το πλάσμα καρκινοπαθών. Έχει βρεθεί ότι οι όγκοι απελευθερώνουν το DNA τους στην κυκλοφορία του αίματος ή σε άλλα σωματικά υγρά, καθιστώντας το κυκλοφορούν DNA ένα αξιόπιστο δείγμα για την ανίχνευση μεταλλάξεων που τυπικά εντοπίζονται σε βιοψίες ιστού. (Cohen et al., 2017).



Εικόνα 8. Μοριακά εργαλεία στη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη και ιατρική ακριβείας (Alarcón-Zendejas et al., 2022)

Όσον αφορά στον mCRPC, η διερεύνηση της κατάστασης των κυκλοφορούντων AR σε δείγματα υγρής βιοψίας ως προγνωστικού βιοδείκτη έχει γίνει κεντρικό σημείο των πρόσφατων ερευνητικών προσπαθειών, καθώς τα ανδρογόνα ασκούν σημαντική επίδραση τόσο στη φυσιολογική ανάπτυξη του προστάτη όσο και στην εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη. Για το λόγο αυτό, οι θεραπευτικές παρεμβάσεις για τον καρκίνο του προστάτη, ιδίως στο στάδιο του ευνοχοάντοχου καρκίνου του προστάτη, βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στην αναστολή της σηματοδότησης των ανδρογόνων μέσω μεθόδων όπως η θεραπεία στέρησης ανδρογόνων ή ο αποκλεισμός της δραστηριότητας του AR, όπως ειπώθηκε και ανωτέρω. Ωστόσο, όμως, παρά την αρχική αποτελεσματικότητα αυτών των θεραπειών, συχνά αναπτύσσεται αντίσταση, η οποία οφείλεται σε διάφορες εκτροπές στην οδό AR. Πιο συγκεκριμένα, σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο AR, όπως οι T878A, W742C και F877L, έχουν αναγνωριστεί ως οδηγοί αντίστασης σε συγκεκριμένα αντιανδρογόνα φάρμακα όπως η φλουταμίδα, η δικαλουταμίδα, η απαλουταμίδα και η ενζαλουταμίδα. Επιπλέον, δευτερογενείς μεταβολές στο μονοπάτι AR, όπως η εμφάνιση παραλλαγών

σύνδεσης AR (π.χ. AR-V7), έχουν συσχετιστεί με αντίσταση στη θεραπεία και χειρότερη έκβαση των ασθενών (Conteduca et al., 2021).



Εικόνα 9. Σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα ανδρογόνων (Conteduca et al., 2021)

Η έλευση των τεχνικών υγρής βιοψίας προσφέρει μια πολλά υποσχόμενη οδό για την ανίχνευση και την ανάλυση αυτών των μεταβολών του μονοπατιού AR. Με την εξέταση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs), οι ερευνητές μπορούν να αξιολογήσουν την κατάσταση του AR-V7, η οποία έχει συνδεθεί με την αντίσταση σε θεραπείες δεύτερης γραμμής, ενώ επιπλέον, οι υγρές βιοψίες επιτρέπουν την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου AR μέσω προηγμένων μοριακών τεχνικών, όπως η αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS) ή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), παρέχοντας ανεκτίμητες πληροφορίες σχετικά με την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση (Nimir et al., 2019).

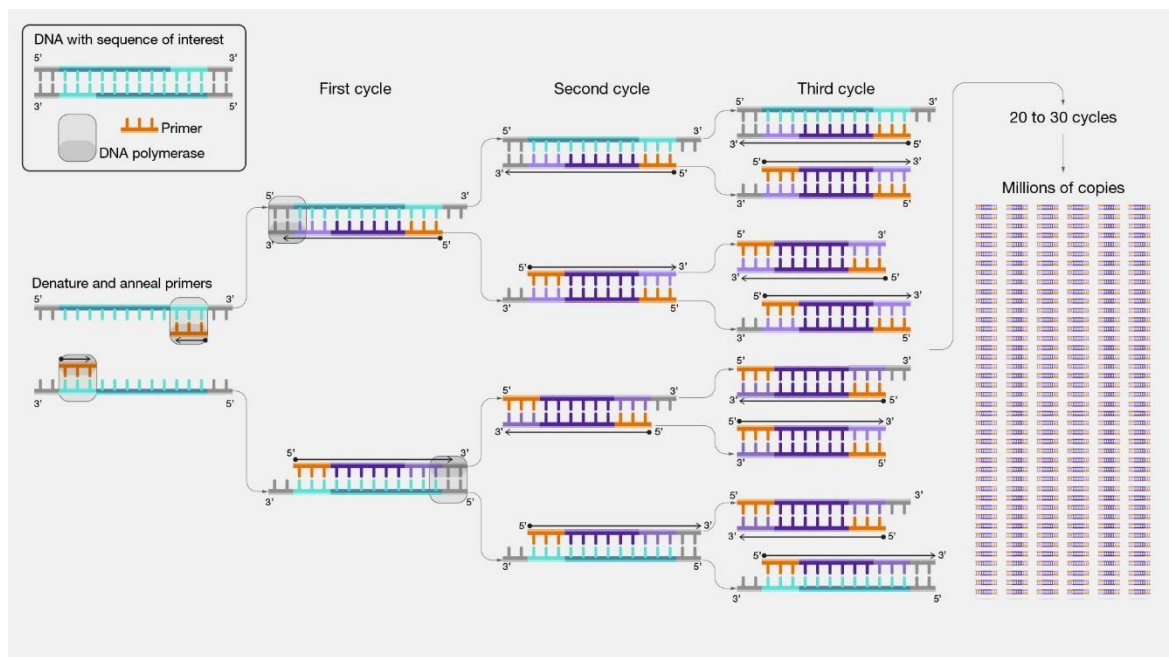
Επιπρόσθετα, εκτός από τα ελαττώματα στο μονοπάτι του AR, ελαττώματα σε άλλα μονοπάτια, όπως το μονοπάτι του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *PTEN*, καθώς και ελαττώματα στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, έχουν αναδειχθεί ως προγνωστικοί βιοδείκτες στον mCRPC. Πιο συγκεκριμένα, η απώλεια της έκφρασης του *PTEN*, οι μεταλλάξεις των *PI3K* και *AKT* και οι ανεπάρκειες σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, όπως τα *BRCA2*, *ATM* και *CDK12*, έχουν ενοχοποιηθεί για την αντίσταση στη θεραπεία και τη δυσμενή έκβαση των ασθενών με μεταστατικό ευνουχοάντοχο καρκίνο του προστάτη (Conteduca et al., 2021).

Ως εκ τούτου, η κατανόηση του μοριακού τοπίου του mCRPC μέσω της αξιολόγησης της κατάστασης AR και άλλων βιοδεικτών με βάση την υγρή βιοψία υπόσχεται πολλά για την προσαρμογή των στρατηγικών θεραπείας και τελικά τη βελτίωση των αποτελεσμάτων των ασθενών. Ωστόσο, η δυσκολία στην ακριβή διάγνωση του mCRPC με τη χρήση των σημερινών βιοδεικτών οδηγεί συχνά σε περιττές επεμβατικές διαδικασίες, υπερδιάγνωση και υπερθεραπεία, καθώς υπάρχει έλλειψη επικυρωμένων προγνωστικών βιοδεικτών που να βοηθούν στην καθοδήγηση της κλινικής λήψης αποφάσεων (Tien et al., 2020). Για το λόγο αυτό, είναι ζωτικής σημασίας να προσδιοριστούν συγκεκριμένοι βιοδείκτες που να μπορούν να βοηθήσουν στον προσδιορισμό της πρόωμης ανταπόκρισης στη θεραπεία και να προσδιορίσουν ποιοι ασθενείς με CRPC θα ωφεληθούν περισσότερο από συγκεκριμένες θεραπείες και στη συνέχεια της παρούσας ανασκόπησης θα εξεταστεί η συμβολή της PCR στην ανακάλυψη των βιοδεικτών αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Ο ρόλος της PCR στην ανάπτυξη βιοδεικτών

3.1. Αρχές, πλεονεκτήματα και εφαρμογές της PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική που αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο της μοριακής βιολογίας που ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis το έτος 1983 και η οποία επιτρέπει την ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Ο μηχανισμός λειτουργίας αυτής της διαδικασίας βασίζεται στην εκθετική ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος εντός της γενετικής αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει, η οποία καθίσταται δυνατή μέσω της χρήσης μιας ανθεκτικής στη θερμότητα πολυμεράσης DNA και δύο μικρών θραυσμάτων DNA που συνδέονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες και στις δύο έλικες του μορίου DNA-στόχου, που ονομάζονται εκκινητές (primers). Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία βασικά βήματα: μετουσίωση του DNA, υβρισμός εκκινητών και επιμήκυνση της αλληλουχίας, τα οποία επαναλαμβάνονται σε κύκλους σε θερμικό κυκλοποιητή ώστε να επιτευχθεί εν τέλει εκθετική ενίσχυση της αλληλουχίας του DNA-στόχου (Masoodi et al., 2021).



Εικόνα 10. Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του DNA-στόχου (Smith, 2024)

Κατά το στάδιο της μετουσίωσης, το δείγμα DNA θερμαίνεται στους 94-98°C, προκαλώντας τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων του δίκλωνου DNA, διαχωρίζοντας έτσι το DNA σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Το βήμα αυτό διαρκεί συνήθως περίπου 20-30 δευτερόλεπτα, αν και η αρχική μετουσίωση στον πρώτο κύκλο μπορεί να παραταθεί για να εξασφαλιστεί ο πλήρης διαχωρισμός των κλώνων του DNA. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται στους 50-65°C κατά το βήμα του υβριδισμού, επιτρέποντας στους εκκινητές να συνδεθούν με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους στις μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Η ακριβής θερμοκρασία εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης των χρησιμοποιούμενων εκκινητών και αυτό το βήμα διαρκεί συνήθως 20-40 δευτερόλεπτα. Η εξειδίκευση της PCR καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από αυτούς τους εκκινητές, οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί ώστε να ταιριάζουν με τις παράπλευρες περιοχές της αλληλουχίας-στόχου, διασφαλίζοντας ότι ενισχύεται μόνο η επιθυμητή περιοχή. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία αυξάνεται σε περίπου 72°C στο στάδιο της επιμήκυνσης, η οποία είναι και η βέλτιστη θερμοκρασία για να δράσει η πολυμεράση Taq. Αυτό το ένζυμο προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο κάθε εκκινητή, συνθέτοντας μια νέα αλυσίδα DNA συμπληρωματική προς την αλυσίδα του προτύπου και η διάρκεια αυτού του βήματος μπορεί να κυμαίνεται από 30 δευτερόλεπτα έως αρκετά λεπτά, ανάλογα με το μήκος του προς ενίσχυση DNA. Κάθε κύκλος έχει ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό της ποσότητας του DNA, οδηγώντας σε εκθετική ανάπτυξη. Τα τρία αυτά βήματα επαναλαμβάνονται για 20-40 κύκλους, συνήθως με τη χρήση θερμοκυκλοποιητών που αλλάζουν αυτόματα τις θερμοκρασίες και μπορούν να επεξεργάζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα (Smith, 2024).

Η PCR προσφέρει πολυάριθμα πλεονεκτήματα που την έχουν καταστήσει θεμελιώδη σε διάφορους επιστημονικούς και ιατρικούς τομείς, μεταξύ των οποίων είναι η ειδικότητά της, καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην PCR έχουν σχεδιαστεί ώστε να ταιριάζουν μόνο με την αλληλουχία του DNA-στόχου, διασφαλίζοντας ότι ενισχύεται μόνο η επιθυμητή περιοχή, ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης μπορούν να βελτιστοποιηθούν για την περαιτέρω ενίσχυση της ειδικότητας, μειώνοντας την πιθανότητα μη ειδικής ενίσχυσης (Valones et al., 2009). Η PCR είναι επίσης εξαιρετικά ευαίσθητη, ικανή να ενισχύει το DNA από πολύ μικρές ποσότητες προτύπου, ακόμη και από ένα μόνο μόριο και αυτή η ευαισθησία είναι ζωτικής σημασίας για εφαρμογές όπου το δείγμα DNA είναι περιορισμένο, όπως τα εγκληματολογικά δείγματα ή η ανίχνευση μολυσματικών ασθενειών

σε πρώιμο στάδιο. Η ικανότητα ενίσχυσης μικρών ποσοτήτων DNA επιτρέπει επίσης την ανίχνευση στόχων χαμηλής αφθονίας, καθιστώντας δυνατή την αναγνώριση σπάνιων γενετικών μεταλλάξεων ή χαμηλών επιπέδων ιικού DNA/RNA (Garibyan and Avashia, 2013). Η ταχύτητα είναι ένα άλλο βασικό πλεονέκτημα της PCR, όπου η παραδοσιακή PCR μπορεί να ολοκληρωθεί σε λίγες ώρες, ενώ η PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) μπορεί να παρέχει ποσοτικά αποτελέσματα ακόμη πιο γρήγορα, συχνά μέσα σε μία μόλις ώρα, ενώ οι εξελίξεις στην τεχνολογία PCR, όπως οι πολυμεράσες Taq με θερμή εκκίνηση και οι ταχύτεροι θερμοκυκλοποιητές, έχουν μειώσει περαιτέρω το χρόνο που απαιτείται για την PCR. Η ταχεία φύση της PCR επιτρέπει λοιπόν τη γρήγορη ανάλυση και διάγνωση, η οποία είναι κρίσιμη σε κλινικές και επείγουσες καταστάσεις (Engstrom-Melnyk et al., 2015).

Η ευελιξία της PCR επιτρέπει τη χρήση της για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, ενισχύοντας DNA από διάφορες πηγές, όπως αίμα, ιστούς και περιβαλλοντικά δείγματα, ενώ οι διάφορες παραλλαγές της PCR, όπως η RT-PCR για ανάλυση RNA, η multiplex PCR για την ενίσχυση πολλαπλών στόχων ταυτόχρονα και η ψηφιακή PCR για ακριβή ποσοτικοποίηση, επεκτείνουν περαιτέρω την ευελιξία αυτή (Smith, 2024). Αυτή η προσαρμοστικότητα καθιστά την PCR κατάλληλη για διάφορους τομείς, όπως η ιατρική διάγνωση, η εγκληματολογία, η γενετική έρευνα, η περιβαλλοντική επιστήμη, η γεωργία και η βιοτεχνολογία. Στην ιατρική διάγνωση, χρησιμοποιείται για τη διάγνωση γενετικών διαταραχών, την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου (Yang and Rothman, 2004), ενώ στην ιατροδικαστική επιστήμη, η PCR χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση αποτυπωμάτων DNA, στον έλεγχο πατρότητας και στην ταυτοποίηση ανθρώπινων λειψάνων, αξιοποιώντας την ικανότητά της να λειτουργεί με υποβαθμισμένα ή μικρά δείγματα DNA (Alaeddini, 2012). Επιπρόσθετα, στη γενετική έρευνα, η PCR είναι απαραίτητη για την κλωνοποίηση, την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, τη μεταλλαξιγένεση και την αλληλούχιση. Οι περιβαλλοντολόγοι χρησιμοποιούν την PCR για την ανίχνευση και την παρακολούθηση μικροβιακών κοινοτήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα, την παρακολούθηση της ρύπανσης και τη μελέτη της βιοποικιλότητας, ενώ στη γεωργία και τη βιοτεχνολογία, η PCR βοηθά στην ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων οργανισμών καθώς και στην ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε καλλιέργειες και ζώα (Shahzad et al., 2020).

3.2. Παραλλαγές της PCR

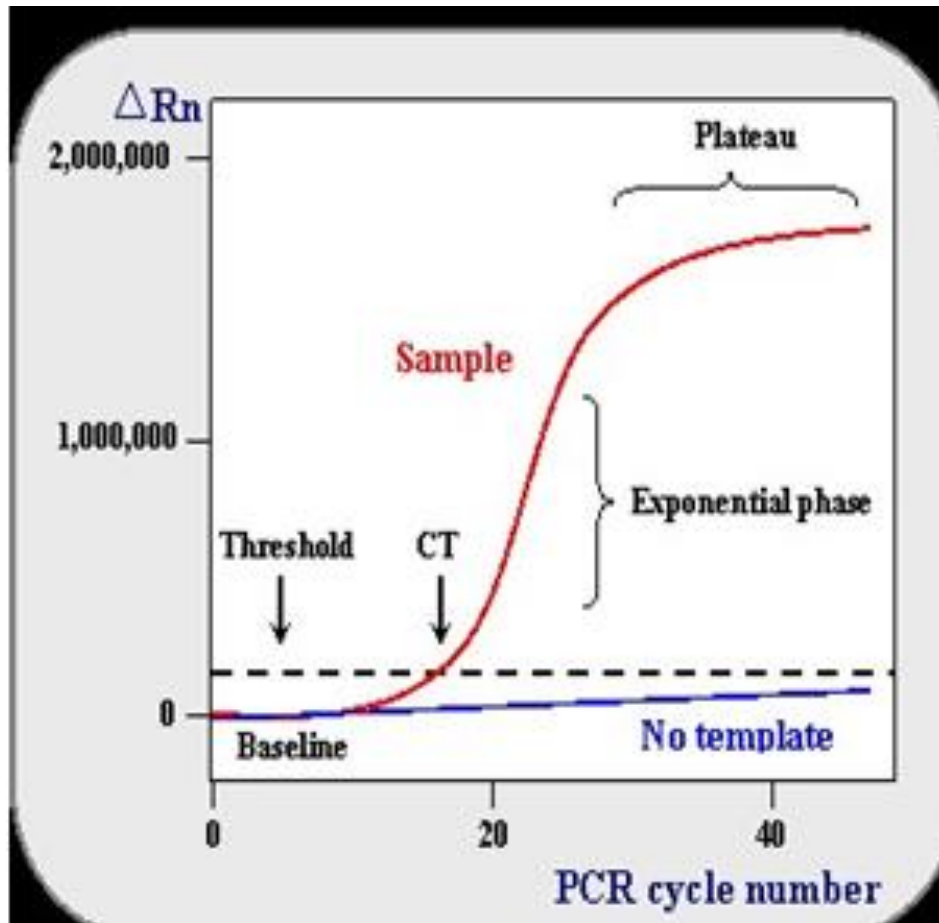
3.2.1. Real – Time PCR

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR) αποτελεί την κυρίαρχη τεχνική ποσοτικής PCR, με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που εκτείνονται από τη μέτρηση και την ταυτοποίηση ιών και μικροοργανισμών μέχρι τον ποσοτικό προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης και τον προσδιορισμό γονότυπου. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στην ανάλυση μεταλλάξεων και μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) και χρησιμεύει ως πολύτιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων. Τα αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα της PCR πραγματικού χρόνου περιλαμβάνουν την αυξημένη ευαισθησία, την αξιοπιστία, την ταχύτητα και την εξάλειψη των σταδίων επεξεργασίας μετά την αντίδραση, όπως η ανάγκη για ηλεκτροφόρηση μετά από παραδοσιακές διαδικασίες PCR (Rocha et al., 2016).

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην παραδοσιακή τεχνική PCR επιτρέποντας τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων (DNA ή cDNA) σε ένα δείγμα χρησιμοποιώντας φθορίζοντα μόρια ενσωματωμένα στο δείγμα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων PCR διεξάγεται στο τέλος κάθε κύκλου και συνεχώς κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρακολουθώντας την αύξηση του φθορισμού που προκύπτει από την παρουσία της φθορίζουσας ουσίας. Αυτή η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα του συντιθέμενου προϊόντος και εκτείνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος DNA. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό μιας καμπύλης ενίσχυσης ή μιας γραφικής παράστασης ενίσχυσης (εικόνα 11) που μπορεί να χωριστεί σε τρεις διακριτές φάσεις - την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού (Rocha et al., 2016).

Στην αρχική φάση της PCR, υπάρχει εκθετική αύξηση του προϊόντος λόγω της αφθονίας των απαραίτητων συστατικών. Ωστόσο, καθώς αυτά τα συστατικά εξαντλούνται, η αντίδραση ενίσχυσης μεταβαίνει σε γραμμική φάση πριν φτάσει σε κορεσμό. Στην PCR πραγματικού χρόνου, τα δεδομένα συλλέγονται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, με την τιμή C_t να χρησιμεύει ως κρίσιμη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση. Η τιμή C_t αντανακλά τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για να ξεπεράσει ο φθορισμός ένα

προκαθορισμένο όριο, το οποίο επηρεάζεται από την αρχική ποσότητα του υποστρώματος DNA (Kaltenboeck and Wang, 2005).



Εικόνα 11. Καμπύλη ενίσχυσης PCR πραγματικού χρόνου (NCBI, 2017)

Οι τεχνικές PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιούν διάφορες μεθόδους για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται τόσο ειδικά όσο και μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης. Τα μη ειδικά συστήματα περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση μιας φθορίζουσας χρωστικής, όπως το CYBR green I, στο dsDNA κατά τη διάρκεια της σύνθεσης PCR. Αυτή η βαφή εκπέμπει φθορισμό όταν διεγείρεται από ένα ορισμένο μήκος κύματος ακτινοβολίας, με την ένταση να συσχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση DNA. Αντίθετα, τα ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιούν ανιχνευτές ειδικούς για τον DNA- στόχο, όπως ανιχνευτές Taqman, Scorpion και μοριακούς φάρους (Valones et al., 2009).

Υπάρχουν πολυάριθμες εφαρμογές στις οποίες ο ποσοτικός προσδιορισμός του γενετικού υλικού με χρήση της τεχνικής της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου είναι απαραίτητος, όπως για παράδειγμα για τον προσδιορισμό της παραλλαγής αριθμού αντιγράφων (CNV) ενός γονιδίου, καθώς οι παραλλαγές του CNV στα γονίδια σημαίνουν αλλαγές στο γονιδιωματικό DNA που μπορούν να επηρεάσουν μεμονωμένα γονίδια, χρωμοσωμικές περιοχές ή ολόκληρα χρωμοσώματα και συχνά συνδέονται με νεοπλασματική εξαλλαγή. Τα CNV ενός γονιδίου προσδιορίζονται με μέτρηση της συγκέντρωσης του γονιδίου στο δείγμα που μελετάται, καθώς και της συγκέντρωσης ενός δεύτερου γονιδίου με γνωστό αριθμό αντιγράφων στο γονιδίωμα (Brik et al., 2020). Επίσης, η μέτρηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης (συγκέντρωση mRNA) που μπορεί να υπολογιστεί με τη χρήση της qRT-PCR είναι κρίσιμη για την κατανόηση του ρόλου ορισμένων γονιδίων στην ανάπτυξη καρκίνου (Alowiri et al., 2019).

Η PCR σε πραγματικό χρόνο κατέστησε επίσης δυνατόν τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των ελεύθερα κυκλοφορούντων miRNAs (cf-miRNAs), τα οποία βρίσκονται συνήθως σε συνδυασμό με σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεϊνών, λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας ή απελευθερώνονται από κύτταρα ως εξωσώματα ή αποπτωτικά σωμάτια και η ανίχνευσή τους στο αίμα ή άλλα σωματικά υγρά έχει συνδεθεί με διάφορους τύπους καρκίνου. Η ακριβής μέτρηση των cf-miRNAs στα σωματικά υγρά είναι δύσκολη λόγω της περιορισμένης παρουσίας και του μικρού μεγέθους τους, ωστόσο η qRT-PCR είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους καθώς απαιτεί μόνο μικρές ποσότητες RNA για ανάλυση. (Bertoli, Cava and Castiglioni, 2015).

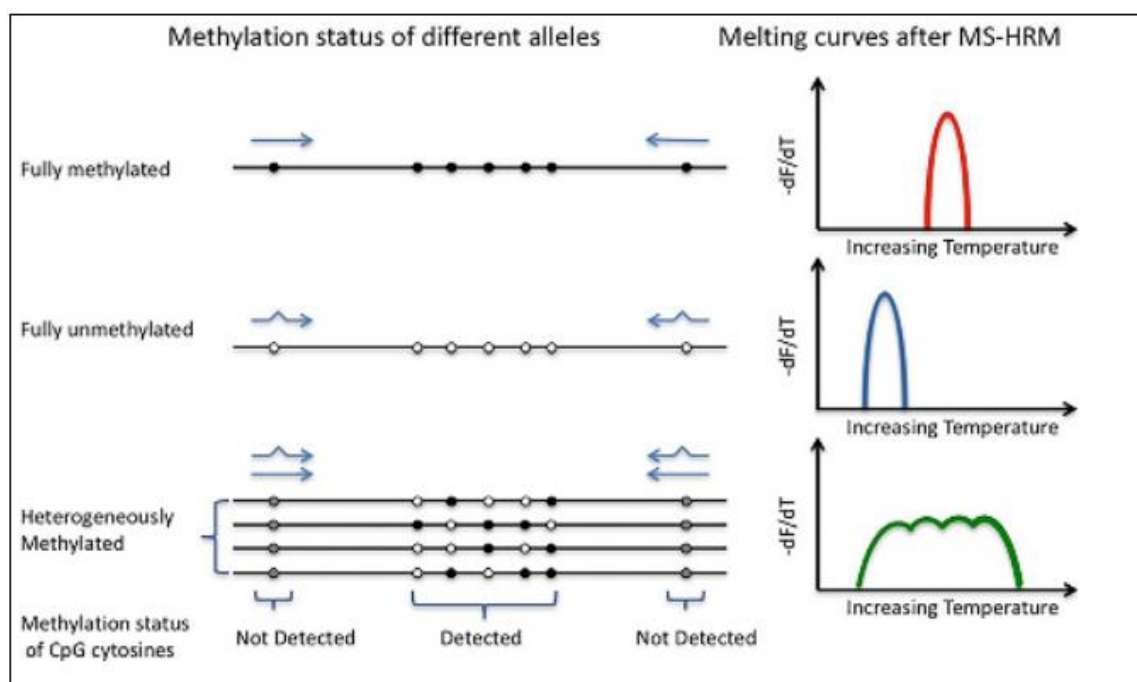
Υπάρχουν πολυάριθμες παραλλαγές της PCR πραγματικού χρόνου, συμπεριλαμβανομένης της RT-qPCR που συνδυάζει την PCR με την αντίστροφη μεταγραφή για να ενισχύσει τις αλληλουχίες RNA. Σε αυτή τη διαδικασία, το RNA μετατρέπεται σε cDNA χρησιμοποιώντας αντίστροφη μεταγραφάση πριν υποβληθεί σε ενίσχυση με PCR πραγματικού χρόνου. Η RT-qPCR ενός σταδίου επιτρέπει την τοποθέτηση όλων των απαραίτητων αντιδραστηρίων στο ίδιο φρεάτιο (Mo, Wang and Zhang, 2012) και ένα παράδειγμα κλινικής εφαρμογής είναι η ανίχνευση του νουκλεϊκού οξέος του ιού Sars-CoV-2 σε δείγματα της αναπνευστικής οδού χρησιμοποιώντας ανιχνευτές taqman (Dharavath et al., 2020).

Η multiplex PCR πραγματικού χρόνου περιλαμβάνει τη χρήση πολλαπλών ζευγών εκκινήτων που στοχεύουν διαφορετικές αλληλουχίες, επιτρέποντας την ενίσχυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων ταυτόχρονα. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για διαγνωστικούς σκοπούς, όπως η ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων σε ένα μόνο δείγμα (Elnifro et al., 2000). Μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή της multiplex PCR σε πραγματικό χρόνο είναι η χρήση της στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης miRNAs στον ορό ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό συγκεκριμένων miRNAs, όπως τα miR-19a, miR-20b και miR-24, που σχετίζονται με τον καρκίνο, καταδεικνύοντας τη χρησιμότητα της real-time PCR στην ανίχνευση βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων των ογκογόνων και των ογκοκατασταλτικών miRNAs, τόσο για διαγνωστικούς όσο και για προγνωστικούς σκοπούς σε ασθενείς με καρκίνο (Moltzahn et al., 2011).

Επιπρόσθετα, η καμπύλη τήξης υψηλής ανάλυσης (HRM) αντιπροσωπεύει μια εξελιγμένη μορφή της PCR σε πραγματικό χρόνο με βελτιωμένες δυνατότητες αναγνώρισης γνωστών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), εξερεύνησης νέων μεταλλάξεων και μελέτης προτύπων μεθυλίωσης του DNA. Η υλοποίησή της απαιτεί εξοπλισμό παρόμοιο με αυτόν που χρησιμοποιείται στην Real Time PCR αλλά με μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και αποτελεσματικότητα, ιδιαίτερα όσον αφορά στην ερμηνεία δεδομένων και τη χρήση φθορίζοντων βαφών (Slomka et al., 2017).

Επίσης, ο προσδιορισμός των ρυθμών μεθυλίωσης του DNA σε ένα δείγμα μπορεί να επιτευχθεί μέσω της HRM. Η μεθυλίωση του DNA είναι η διαδικασία προσθήκης μεθυλομάδων (-CH₃) στο DNA, όπου στα θηλαστικά, οι ομάδες μεθυλίου προστίθενται κυρίως στα νουκλεοτίδια κυτοσίνης ακολουθούμενα από ένα νουκλεοτίδιο γουανίνης στις θέσεις CpG. Στους ανθρώπους, περισσότερο από το 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες έχει βρεθεί ότι έχουν περιοχές υποκινητή γνωστές ως θέσεις CpG, οι οποίες μπορούν να μεθυλιωθούν, αναστέλλοντας δυνητικά τη μεταγραφή των γονιδίων. Έτσι, η σωστή μεθυλίωση του DNA παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης, ενώ η λανθασμένη μεθυλίωση μπορεί να συνδεθεί με την ανάπτυξη πολυάριθμων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών τύπων καρκίνου. Ως αποτέλεσμα, είναι συχνά απαραίτητο να εξετάζεται η κατάσταση μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων σε διάφορα ερευνητικά και κλινικά περιβάλλοντα. Η ενίσχυση PCR από μόνη της δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ μεθυλιωμένου και μη μεθυλιωμένου DNA, επομένως η

προηγούμενη επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο είναι απαραίτητη για την ανάλυση μεθυλίωσης. Η επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο απαμινώνει τις μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες, μετατρέποντάς τις σε ουρακίλες ενώ αφήνει ανεπηρέαστες τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες. Με τον τρόπο αυτό, όταν πραγματοποιείται ενίσχυση με PCR, οι ουρακίλες αντικαθίστανται από θυμίνες, με αποτέλεσμα ο αριθμός των κυτοσινών στο προϊόν της αντίδρασης να αντικατοπτρίζει τον αριθμό των μεθυλιωμένων κυτοσινών που υπάρχουν (Tse et al., 2011). Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης στο δείγμα, το προκύπτον προϊόν PCR θα περιέχει μεγαλύτερη αφθονία κυτοσινών, ενώ αντίθετα, ένα χαμηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης θα οδηγήσει σε ένα προϊόν PCR με λιγότερες κυτοσίνες και περισσότερες θυμίνες. Ως αποτέλεσμα, τα προϊόντα PCR με διάφορα επίπεδα κυτοσινών (ή μεθυλιωμένων αλληλόμορφων) μπορούν να διακριθούν χρησιμοποιώντας HRM, καθώς τα τμήματα DNA με υψηλότερη περιεκτικότητα σε κυτοσίνη θα εμφανίσουν υψηλότερη θερμοκρασία τήξης κατά την ενίσχυση (Hussmann and Hansen, 2018).



Εικόνα 12. Καμπύλη HRM ημιμεθυλιωμένου γονιδίου σε σχέση με την καμπύλη HRM πλήρους μεθυλιωμένης και μη μεθυλιωμένης κατάστασης του γονιδίου (www.creativebiomart.net., n.d.)

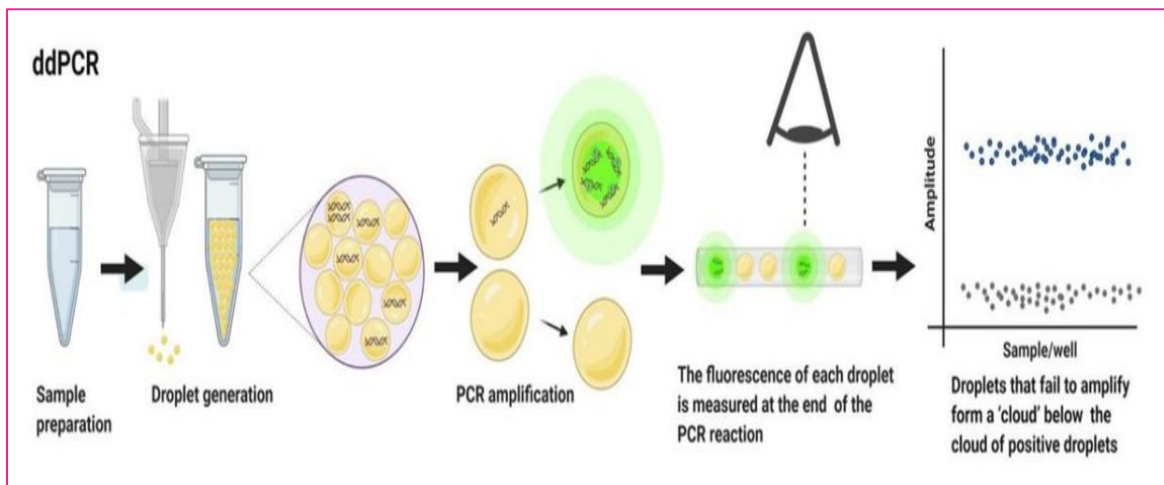
3.2.2. Ψηφιακή PCR

Η ψηφιακή PCR (dPCR) είναι μια τεχνική ποσοτικής ανάλυσης που διαφέρει στη φιλοσοφία από την Real Time PCR, παρά το γεγονός ότι μοιράζεται παρόμοιες αρχές. Στην dPCR, το μίγμα DNA στόχου χωρίζεται σε πολυάριθμα μικροδιαμερίσματα, που κυμαίνονται από 500 έως αρκετά εκατομμύρια ανάλογα με τη συσκευή που χρησιμοποιείται. Η αντίδραση PCR διεξάγεται ταυτόχρονα σε όλα τα μικροδιαμερίσματα και η παρουσία ή η απουσία του DNA στόχου προσδιορίζεται σε καθένα με βάση την ένταση του σήματος φθορισμού. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του αρχικού DNA στόχου στο δείγμα επιτυγχάνεται μέσω στατιστικής ανάλυσης, εξαλείφοντας την ανάγκη για τυπικά δείγματα αναφοράς ή γραφική παράσταση καμπύλης βαθμονόμησης όπως στην PCR πραγματικού χρόνου (Mao et al., 2019).

Μια μέθοδος για τη διαμερισματοποίηση του μίγματος αντίδρασης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) περιλαμβάνει τη δημιουργία απομονωμένων μικροαντιδραστηρίων με το σχηματισμό υδατικών σταγονιδίων σε μη αναμίξιμο έλαιο, γνωστά ως ψηφιακή PCR σταγονιδίων (ddPCR). Η σταθερότητα αυτών των μικροαντιδραστηρίων κατά τη διάρκεια της θερμοκυκλοποίησης επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης ειδικών επιφανειοδραστικών ουσιών και συνθέσεων ελαίων, εξαλείφοντας την ανάγκη για στερεούς διαχωρισμούς. Διάφορες τεχνικές για τη δημιουργία σταγονιδίων έχουν ως αποτέλεσμα έναν μεγάλο αριθμό σταθερών σταγονιδίων που κυμαίνονται σε όγκο από πικόλιτρα έως νανολίτρα, με ορισμένες τεχνικές να είναι ικανές να παράγουν χιλιάδες σταγονίδια ανά δευτερόλεπτο (Kokkoris et al., 2021). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του ddPCR είναι η ικανότητα δημιουργίας μεγάλης ποσότητας σταγονιδίων, όπως το σύστημα RainDrop το οποίο μπορεί να διαμερίσει το μείγμα αντίδρασης PCR σε εκατομμύρια μικροσταγονίδια όγκου περίπου 5 πικολίτρων. Αυτά τα σταγονίδια μπορούν να κατευθυνθούν μέσω δικτύων καναλιών, επιτρέποντας την αποτελεσματική μεταφορά στον θερμοκυκλωτή και την επακόλουθη ανάλυση (Demeke and Dobnik, 2018).

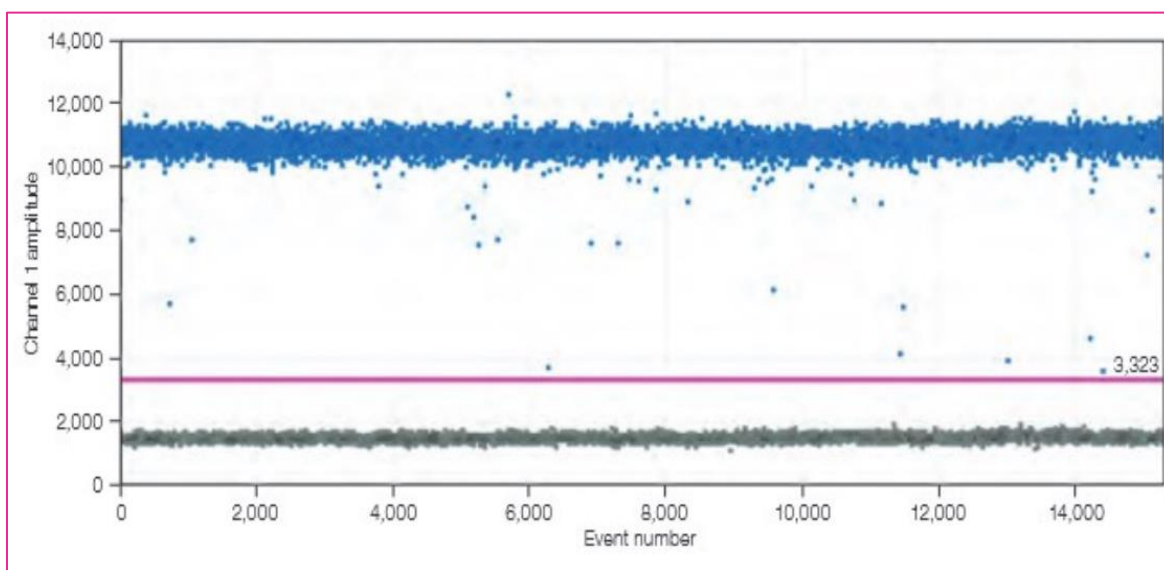
Μετά την ολοκλήρωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), τα μικροσταγονίδια μεταφέρονται στη συσκευή ανάγνωσης για μεμονωμένη ανάλυση. Τα μικροσταγονίδια που εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα φθορισμού, ενδεικτικά της παρουσίας τουλάχιστον ενός τμήματος DNA στόχου, αναγνωρίζονται ως θετικά. Οι διαδοχικές

διαδικασίες της ψηφιακής σταγονιδιακής PCR (ddPCR) περιγράφονται στην εικόνα 13 (Kokkoris et al., 2021).



Εικόνα 13. Στάδια της ddPCR (Kokkoris et al., 2021)

Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων dPCR από μεμονωμένους μικροαντιδραστήρες, τα δεδομένα αξιολογούνται χρησιμοποιώντας λογισμικό υπολογιστή και στη συνέχεια εμφανίζονται στον χρήστη. Ένα διάγραμμα 1-D στο Σχήμα 33 απεικονίζει τη συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των μικροαντιδραστηρίων που μετρήθηκαν και του εκπεμπόμενου φθορισμού κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας ddPCR. Η γραμμή κατωφλίου που απεικονίζεται με κόκκινο σκιαγραφεί το επίπεδο έντασης φθορισμού στο οποίο οι μικροαντιδραστήρες ταξινομούνται ως θετικά δείγματα (υποδεικνύονται με μπλε κουκκίδες), ενώ όσοι πέφτουν κάτω από τη γραμμή κατωφλίου προσδιορίζονται ως αρνητικά δείγματα (που αντιπροσωπεύονται με μαύρες κουκκίδες).



Εικόνα 14. Διάγραμμα ddPCR (biorad.com, n.d.)

Η προετοιμασία του μείγματος για εφαρμογή ψηφιακής PCR (dPCR) είναι παρόμοια με εκείνη της PCR σε πραγματικό χρόνο, αλλά με την κρίσιμη διάκριση ότι η συγκέντρωση του DNA στόχου στο μείγμα θα πρέπει να διατηρείται χαμηλή για να αποτρέπεται η ανίχνευση όλων των μικροδιαμερισμάτων ως θετικές αντιδράσεις PCR. Για να επιτευχθεί αυτό, το μείγμα αραιώνεται έως ότου η αλληλουχία του επιθυμητού DNA στόχου είναι παρούσα σε κάθε μικρο-διαμέρισμα περίπου 0,6 έως 1,6 φορές. Έπειτα από την πραγματοποίηση της αντίδρασης, είναι θεωρητικά δυνατός ο προσδιορισμός της ακριβούς συγκέντρωσης του αρχικού DNA στόχου σε κάθε θετικό δείγμα μέσω της εφαρμογής της θεωρίας κατανομής Poisson. (Sven et al., 2019).

Η dPCR διακρίνεται από άλλες μεθόδους PCR λόγω της ικανότητάς της να αναγνωρίζει και να ποσοτικοποιεί με ακρίβεια διάφορους στόχους DNA ή παραλλαγές ενός στόχου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ανίχνευσης σημάτων φθορισμού διαφορετικών μηκών κύματος και με ανάλυση της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού από το ίδιο μήκος κύματος (Mao et al., 2019).

Υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό δύο στόχων DNA με τη χρήση δύο διαφορετικών χρωστικών σε μια διάταξη dPCR. Για παράδειγμα, η μη ανταγωνιστική διπλή ενίσχυση με δύο ζεύγη εκκινητών περιλαμβάνει την ενίσχυση δύο διαφορετικών στόχων DNA με δύο διαφορετικά σύνολα εκκινητών, όπου κάθε στόχος συνδέεται με μια συγκεκριμένη μη ανταγωνιστική χρωστική. Η προσέγγιση

αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για παράδειγμα, για την ενίσχυση δύο διαφορετικών βακτηριακών στόχων, όπου στο τέλος της dPCR, αναγνωρίζονται τρεις τύποι μικροσωματιδίων: εκείνα χωρίς ενίσχυση, εκείνα με ενίσχυση ενός DNA-στόχου και εκείνα με ενίσχυση και των δύο στόχων. Τα διπλά θετικά δείγματα εμφανίζουν συνήθως αυξημένη ένταση φθορισμού και για τις δύο χρωστικές, αν και ο ανταγωνισμός μεταξύ των ενισχυτικών μπορεί περιστασιακά να μειώσει ένα από τα σήματα φθορισμού. Επίσης, στη μη ανταγωνιστική διπλή ενίσχυση με ένα μόνο ζεύγος εκκινήτων χρησιμοποιούνται μη ανταγωνιστικές χρωστικές, όπου η μία χρωστική ανιχνεύει όλες τις θετικές μικροδιαγραφές, ενώ η άλλη προσδιορίζει ειδικά τον επιθυμητό πολυμορφισμό. Αυτή η μέθοδος οδηγεί σε τρεις τύπους μικροσωματιδίων: αρνητικά, θετικά για μικροδιαλείψεις και θετικά για πολυμορφισμούς. Ο αριθμός των μικροσωματιδίων άγριου τύπου προσδιορίζεται με την αφαίρεση του αριθμού των πολυμορφικών μικροσωματιδίων από τον συνολικό αριθμό των θετικών μικροσωματιδίων (Ganova et al., 2021, Whale et al., 2016).

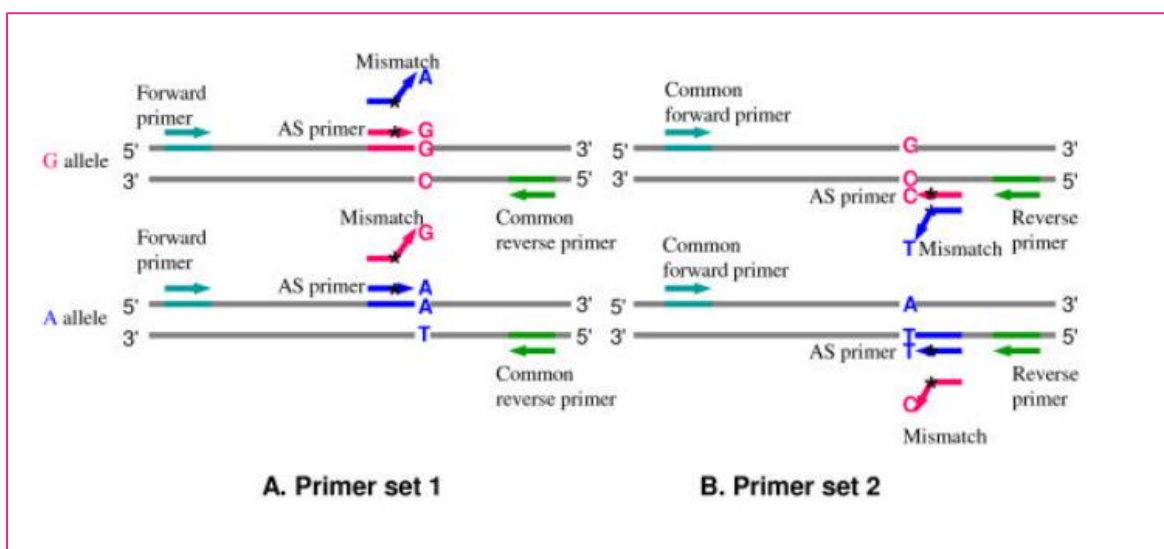
Η ανταγωνιστική διπλή ενίσχυση με ένα μόνο ζεύγος εκκινήτων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (SNPs), όπου το ίδιο ζεύγος εκκινήτων ενισχύει τόσο τη μεταλλαγμένη όσο και την αλληλουχία άγριου τύπου. Η διάκριση μεταξύ των αμπλικονίων προκύπτει από τον ανταγωνισμό υβριδισμού μεταξύ χρωστικών ειδικών για την αλληλουχία άγριου τύπου και την πολυμορφική αλληλουχία. Αυτός ο ανταγωνισμός μπορεί να επηρεάσει τις εντάσεις του σήματος φθορισμού, απαιτώντας προσεκτική ρύθμιση του κατωφλίου για την ακριβή διάκριση μεταξύ θετικών αποτελεσμάτων (Ganova et al., 2021, Whale et al., 2016).

3.2.3. Allele-Specific PCR

Η allele – specific PCR (AS-PCR), επίσης γνωστή ως Amplification Refractory Mutation System PCR (ARMS-PCR), είναι μια ακριβής τεχνική PCR που χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών αλληλόμορφων του ίδιου γονιδίου. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευση απλών νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων και η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μοναδική ιδιότητα της Taq πολυμεράσης να στερείται δραστηριότητας εξωνουκλεάσης 3'-5'. Αυτό σημαίνει ότι εάν ένας εκκινήτης PCR έχει μια αναντιστοιχία στο 3' άκρο του σε σχέση με το DNA-στόχο, η αποτελεσματικότητα της επέκτασης της πολυμεράσης θα μειωθεί σημαντικά και αυτό το χαρακτηριστικό αξιοποιείται για το σχεδιασμό εκκινήτων

που μπορούν να διακρίνουν μεταξύ μεταλλαγμένων και άγριου τύπου αλληλόμορφων (Sanchaisuriya et al., 2004).

Σε ένα τυπικό πρωτόκολλο ARMS-PCR, χρησιμοποιούνται τρεις εκκινητές, με δύο ειδικά σχεδιασμένους για την επιλεκτική ενίσχυση της θέσης μετάλλαξης. Ο ένας εκκινητής ταιριάζει απόλυτα με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, ενώ ο άλλος ταιριάζει απόλυτα με το αλληλόμορφο άγριου τύπου, με την κρίσιμη διαφορά μεταξύ αυτών των δύο εκκινητών να είναι στο 3' άκρο, όπου βρίσκεται η θέση μετάλλαξης, καθώς εάν ο λανθασμένος εκκινητής υβριδοποιηθεί με το DNA-στόχο, η πολυμεράση Taq δεν μπορεί να το επιμηκύνει λόγω της αναντιστοιχίας. Ο τρίτος εκκινητής είναι ένας γενικός εκκινητής που ενισχύει τόσο τα μεταλλαγμένα όσο και τα αλληλόμορφα άγριου τύπου. Αυτός ο στρατηγικός σχεδιασμός διασφαλίζει ότι μόνο ο πλήρως συμπληρωματικός εκκινητής προς την αλληλουχία-στόχο παρατείνεται και ενισχύεται αποτελεσματικά (Alyethodi et al., 2018).



Εικόνα 15. Σχεδιασμός εκκινητών στην AS-PCR (You et al., 2008)

Η ARMS-PCR ξεχωρίζει επειδή τυπικά δεν απαιτεί εκτεταμένο χειρισμό μετά την PCR, σε αντίθεση με άλλες τεχνικές γονοτύπησης. Για παράδειγμα, ο πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP) περιλαμβάνει πέψη των προϊόντων PCR με ένζυμα περιορισμού, ενώ άλλες μέθοδοι μπορεί να απαιτούν πολύπλοκες διαδικασίες υβριδισμού. Ωστόσο, η συμβατική ARMS-PCR απαιτεί δύο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR για την

ενίσχυση των δύο διαφορετικών αλληλόμορφων ενός SNP, με τα αποτελέσματα να αναλύονται συνήθως μέσω ηλεκτροφόρησης (Ye, 2001).

Τα προηγμένα συστήματα όπως η Real-Time PCR μπορούν να ενσωματώσουν την ARMS-PCR για να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα και την εξειδίκευση. Σε τέτοια συστήματα, δύο εκκινητές επισημασμένοι με διαφορετικές χρωστικές (π.χ. εκκινητές Scorpion) επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση και των δύο αλληλόμορφων σε μία μόνο αντίδραση PCR, αν και με υψηλότερο κόστος. Η PCR πραγματικού χρόνου σε συνδυασμό με την ARMS-PCR χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε γνωστές γονιδιωματικές περιοχές λόγω της ειδικότητας και της αξιοπιστίας της (Bates and Taylor, 2001).

Αντίθετα, η PCR-High Resolution Melting (PCR-HRM) είναι μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεταλλάξεων, η οποία παρέχει μια μη ειδική προσέγγιση ικανή να εντοπίσει οποιαδήποτε μετάλλαξη εντός ενός αμπλικονίου. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της PCR-HRM μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο της υπάρχουσας μετάλλαξης και, ενώ μπορεί να ανιχνεύσει άγνωστες μεταλλάξεις, ενδέχεται να μην είναι τόσο ακριβής όσο η ARMS-PCR για συγκεκριμένες γνωστές μεταλλάξεις (Alvarez-Garcia et al., 2018). Για παράδειγμα, κατά την ανάλυση μεταλλάξεων στο γονίδιο PIK3CA, η PCR-HRM μπορεί να ανιχνεύσει τόσο γνωστές όσο και άγνωστες μεταλλάξεις, δίνοντας ενδεχομένως διαφορετικά αποτελέσματα εάν υπάρχουν πολλαπλές μεταλλάξεις. Αντίθετα, η ARMS-PCR είναι ειδικά σχεδιασμένη για την ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλάξεων, γεγονός που την καθιστά πιο αξιόπιστη για τη στοχευμένη ανίχνευση μεταλλάξεων (Harle et al., 2013).

3.3. Εφαρμογές της PCR για την ανάπτυξη βιοδεικτών στον καρκίνο

Τα γονίδια που σχετίζονται με την καρκινογένεση περιλαμβάνουν ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια και γονίδια που επηρεάζουν τη μετάσταση. Επί του παρόντος, η τεχνολογία PCR χρησιμοποιείται κυρίως σε κλινικές εφαρμογές για την ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με όγκους, όπως μετατόπιση χρωμοσωμάτων, ενεργοποιημένα ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια, γονίδια που προάγουν ή αναστέλλουν τη

μετάσταση, ιούς που σχετίζονται με όγκους και γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα φάρμακα. Με τον εντοπισμό μεταλλάξεων και την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, η τεχνολογία αυτή μπορεί να προσφέρει ιατρικές γνώσεις βάσει στοιχείων για την ανάλυση των αιτιών του όγκου, τη διάγνωση και την ταξινόμηση των όγκων, τον καθορισμό των επιλογών χειρουργικής θεραπείας, την επιλογή των βέλτιστων χημειοθεραπευτικών σχημάτων, την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και την πρόγνωση των ασθενών (Wang et al., 2023).

Για παράδειγμα, όσον αφορά στον καρκίνο του προστάτη, οι Cuzick et al. (2011) ανέπτυξαν ένα μοντέλο έκφρασης 46 γονιδίων με χρήση ποσοτικής PCR για την πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη. Αυτό το μοντέλο, που επικυρώθηκε ως δοκιμή Prolaris, αποδείχθηκε ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας βιοχημικής υποτροπής της νόσου καθώς και θνησιμότητας (Sharma et al., 2016). Επίσης, η εξέταση Oncotype DX, η οποία βασίζεται σε ένα πάνελ 17 γονιδίων που προσδιορίζεται μέσω PCR, έχει επίσης επικυρωθεί για την πρόγνωση της κλινικής υποτροπής του καρκίνου του προστάτη, βοηθώντας στη λήψη αποφάσεων για έναρξη άμεσης θεραπείας έναντι ενεργού παρακολούθησης της νόσου (Klein et al., 2014). Τέλος, το τεστ Decipher, που χρησιμοποιεί ένα πάνελ 22 γονιδίων, η έκφραση των οποίων προσδιορίζεται μέσω PCR, επικυρώθηκε για την πρόβλεψη μεταστάσεων και θανάτου σχετιζόμενου με τον καρκίνο του προστάτη και θεωρείται αποτελεσματικό στην καθοδήγηση των αποφάσεων για τη θεραπεία μετά τη χειρουργική επέμβαση, ιδίως για τον εντοπισμό ασθενών που θα επωφελούνταν από επικουρική ακτινοθεραπεία (Sharma et al., 2016). Συμπερασματικά, αυτές οι δοκιμές που βασίζονται στην PCR ενισχύουν συλλογικά την ακρίβεια της πρόγνωσης και του σχεδιασμού της θεραπείας του καρκίνου με την κατάλληλη ενσωμάτωση γενετικών και κλινικών πληροφοριών.

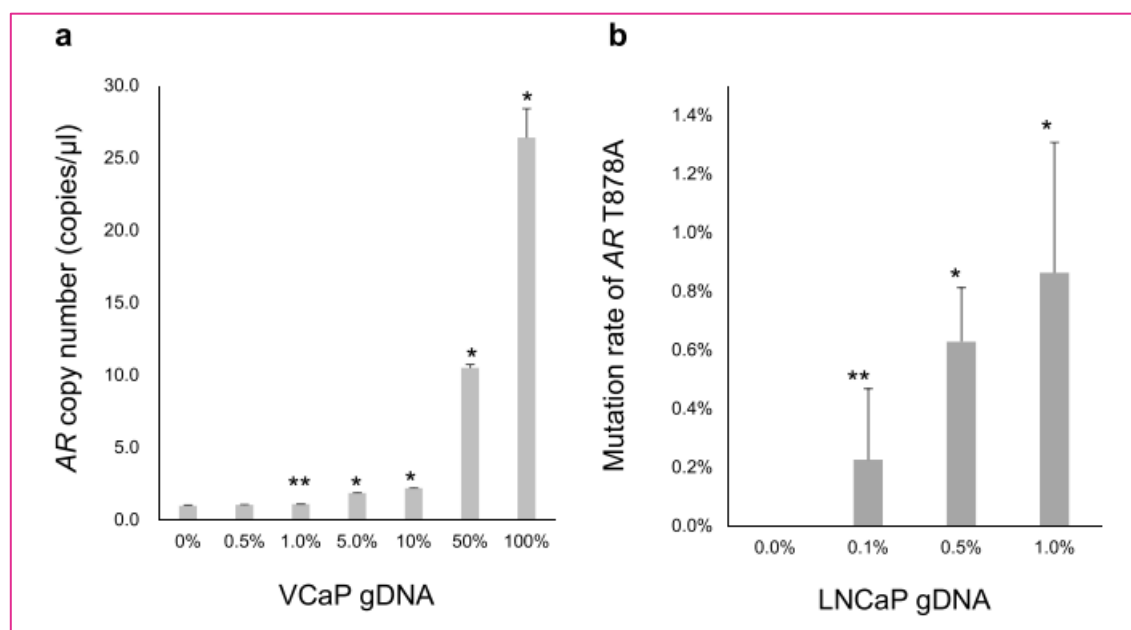
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τις εφαρμογές της PCR στην ανάπτυξη βιοδεικτών για τον CRPC

4.1. Μελέτη της ενίσχυσης των υποδοχέων ανδρογόνων (AR)

Η πλειονότητα των ασθενών με αλλοιώσεις στην οδό του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) παρουσιάζει γονιδιακές ενισχύσεις του AR. Η αποτελεσματικότητα των ανταγωνιστών στην παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του υποδοχέα και του συνδέτη του επηρεάζεται από τα επίπεδα των υποδοχέων, των αγωνιστών και των ανταγωνιστών. Ως εκ τούτου, σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν γονιδιακές ενισχύσεις του AR, οι ανταγωνιστές του AR, όπως η ενζαλουταμίδα, η απαλουταμίδα και η δαρολουταμίδα, ενδέχεται να μην είναι σε θέση να αναστείλουν αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες του AR. Επιπλέον, ο καρκίνος του προστάτη είναι ικανός να παράγει ανδρογόνα ακόμη και όταν τα επίπεδά τους είναι χαμηλά, οδηγώντας σε συνεχή ενεργοποίηση της σηματοδότησης AR. Αυτοί οι μηχανισμοί συμβάλλουν στην αντίσταση στα παραδοσιακά αντιανδρογόνα (Conteduca et al., 2021).

Η ενίσχυση του AR είναι σπάνια στον ορμονοευαίσθητο καρκίνο του προστάτη (HSPC), αλλά αυξάνεται σε 30-50% στον ανθεκτικό στον ενουχισμό καρκίνο του προστάτη (CRPC), με αύξηση του αριθμού αντιγράφων (CN) έως και 56 αντίγραφα (Merson et al., 2014). Η ενίσχυση του AR συσχετίζεται με μικρότερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη, καθιστώντας την προτεινόμενο βιοδείκτη για την αντίσταση στην ανδρογονοστερητική θεραπεία (ADT) (Annala et al., 2018). Ωστόσο, η εξέταση του AR CN σε προχωρημένο καρκίνο του προστάτη (PC) αποτελεί πρόκληση λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας βιοψιών όγκου. Οι υγρές βιοψίες, ιδίως το DNA χωρίς κύτταρα (cfDNA), προσφέρουν μια εναλλακτική λύση για την ανίχνευση του AR CN, η οποία μπορεί να ενσωματωθεί στην παρακολούθηση των ασθενών (Young et al., 2022). Μια συνεχιζόμενη τεχνική πρόκληση παραμένει η ανάλυση του εξαιρετικά κατακερματισμένου και αραιωμένου κυκλοφορούντος ελεύθερου DNA (cfDNA) για την αξιόπιστη ανίχνευση του DNA που προέρχεται από τον όγκο (κυκλοφορούν DNA όγκου - ctDNA), το οποίο συνήθως αποτελεί λιγότερο από το 10% του cfDNA. Στην μελέτη των Sumiyoshi et al. (2019), οι ερευνητές ανέπτυξαν μια αξιόπιστη μέθοδο που χρησιμοποιεί ψηφιακή PCR (dPCR) και αλληλουχία στόχου με βάση την multiplex PCR για την ανάλυση και αξιολόγηση του αριθμού αντιγράφων του υποδοχέα ανδρογόνων και των μεταλλάξεων στο cfDNA πλάσματος ασθενών με CRPC στην

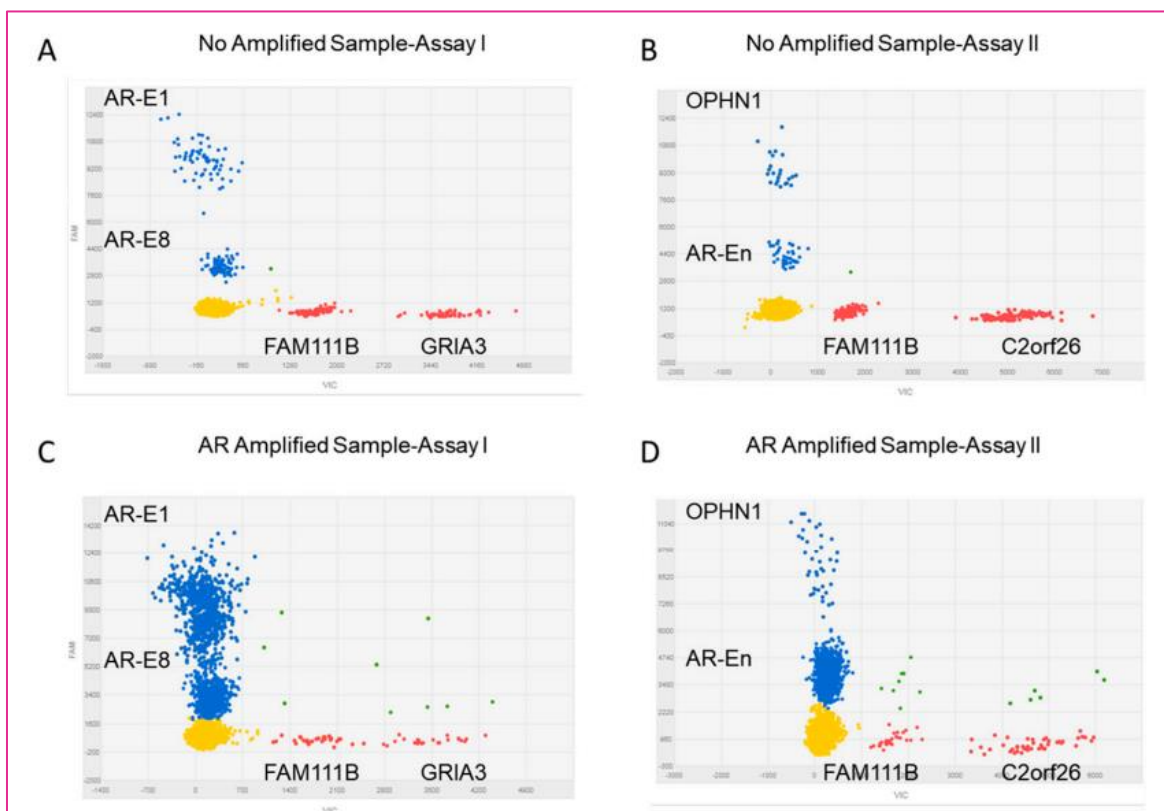
Ιαπωνία, με στόχο τη διερεύνηση των δυνατοτήτων του cfDNA ως νέου βιοδείκτη. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως η ενίσχυση του AR ήταν ανιχνεύσιμη στο γονιδιωματικό DNA της κυτταρικής σειράς VCaP μέσω της dPCR, ενώ οι μεταλλάξεις στο AR ήταν ανιχνεύσιμες στο γονιδιωματικό DNA της κυτταρικής σειράς LNCaP που αραιώθηκε σε 0,1% με χρήση dPCR (εικόνα 16). Πιο συγκεκριμένα, στην εν λόγω μελέτη αναλύθηκε η κατάσταση του γονιδίου AR στο cfDNA από 102 ασθενείς, όπου ενίσχυση του γονιδίου και μεταλλάξεις AR βρέθηκαν σε 47 και 25 ασθενείς, αντίστοιχα. Η παρουσία παρεκκλίσεων του AR στο cfDNA πριν από τη θεραπεία συσχετίστηκε με κακή ανταπόκριση στην αμπιρατερόνη, αλλά όχι στην ενζαλουταμίδη. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν πως η αξιολόγηση του AR στο cfDNA με χρήση dPCR είναι μια εφικτή και κατατοπιστική προσέγγιση για τη διαχείριση ασθενών με CRPC και το cfDNA έχει τη δυνατότητα να χρησιμεύσει ως πολύτιμος βιοδείκτης για την εξατομικευμένη ιατρική στον CRPC (Sumiyoshi et al., 2019).



Εικόνα 16. Η ακρίβεια της αξιολόγησης των CN και των μεταλλάξεων AR μέσω της dPCR (Sumiyoshi et al., 2019)

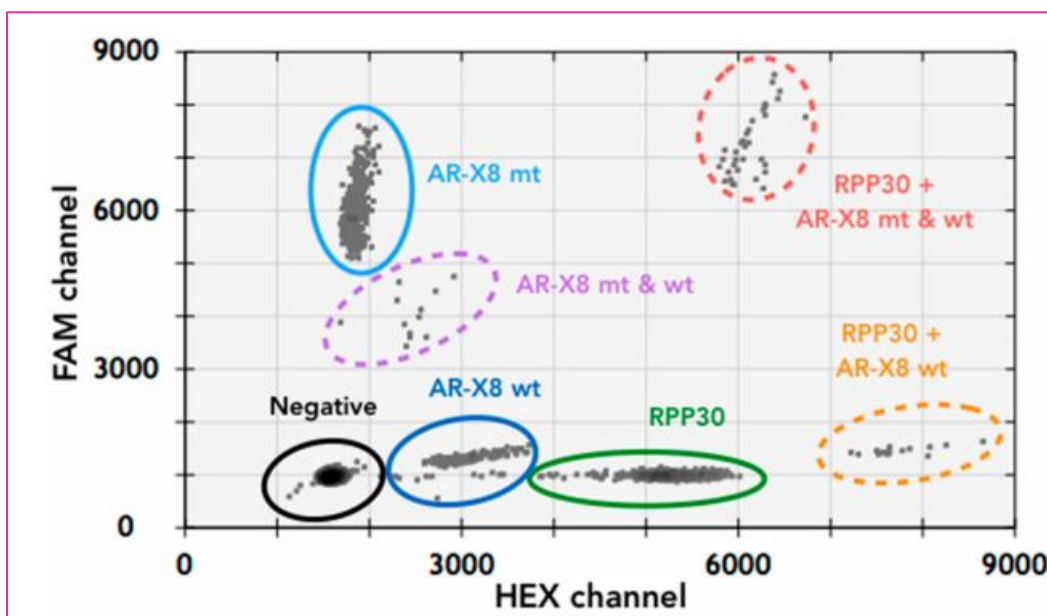
Προκειμένου να αξιολογηθεί η προγνωστική σημασία της ενίσχυσης σε συγκεκριμένους τύπους εντός του γονιδίου AR σε cfDNA, οι Du et al. (2020) ανέπτυξαν μια δοκιμασία

multilex ψηφιακής PCR (dPCR), σχεδιασμένη ώστε να ανιχνεύει αλλοιώσεις στον αριθμό αντιγράφων (CN) σε τέσσερα συγκεκριμένα γονίδια (AR-En, AR-E1, AR-E8 και OPHN1) χρησιμοποιώντας cfDNA που απομονώθηκε από το πλάσμα ασθενών με mCRPC. Μέσω της βελτιστοποίησης των συγκεντρώσεων των εκκινητών και των ανιχνευτών, της επιλογής κατάλληλων φθοριοφόρων και της αξιοποίησης της υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας της dPCR, οι ερευνητές μπόρεσαν να ποσοτικοποιήσουν με ακρίβεια τις αλληλουχίες-στόχους και να ανιχνεύσουν χαμηλά επίπεδα καρκινικού DNA μέσα σε ένα υπόβαθρο άγριου τύπου DNA σε δείγματα cfDNA. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η αύξηση του αριθμού των στόχων ανά δοκιμή σε μια multiplex δοκιμασία dPCR μπορεί να ενισχύσει την κλινική χρησιμότητα μειώνοντας το κόστος και παρέχοντας πιο ολοκληρωμένες πληροφορίες για τις μεταβολές του CN από ένα μόνο δείγμα πλάσματος, υποδηλώνοντας ότι η συγκεκριμένη δοκιμασία έχει τη δυνατότητα να χρησιμεύσει ως πολύτιμος μοριακός βιοδείκτης για τον εντοπισμό γονιδιωματικών μεταβολών σε ασθενείς με mCRPC (Du et al., 2020).



Εικόνα 17. Η ταυτόχρονη ταυτοποίηση δύο στόχων και δύο ελέγχων μέσω μιας ψηφιακής ανάλυσης πολλαπλής PCR επιτυγχάνεται με τη χρήση συνδυασμών φθοριοφόρων και την προσαρμογή της αναλογίας αραίωσης για το ίδιο φθοριοφόρο. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη δημιουργήθηκαν με τη χρήση του συστήματος QuantStudio 3D Digital PCR (Du et al., 2020)

Συνεχίζοντας, οι Young et al. (2022) ανέπτυξαν δύο δοκιμασίες multiplex ddPCR για την ανίχνευση παραλλαγών του αριθμού αντιγράφων του AR καθώς και της βασικής σημειακής μετάλλαξης T877A. Όπως αναφέρουν οι συγγραφείς, αυτές οι δοκιμασίες αντιμετωπίζουν τις προκλήσεις που σχετίζονται με τον προσδιορισμό της ενίσχυσης του γονιδίου σε υγρές βιοψίες, επικυρώνοντας η μία την άλλη, παράγοντας με τον τρόπο αυτό αξιόπιστα δεδομένα σχετικά με την ενίσχυση και τις μεταλλάξεις του AR σε cfDNA πλάσματος από ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του προστάτη. Η ανάλυση μιας ποικιλόμορφης ομάδας ασθενών με καρκίνο του προστάτη, συμπεριλαμβανομένων των ασθενών με CRPC και ασθενών με ορμονοευαίσθητο καρκίνο του προστάτη (HSPC), αποκάλυψε ότι το 19% των ασθενών είχαν ενίσχυση του αριθμού αντιγράφων AR, με μόνο τους ασθενείς με CRPC να εξετάζονται θετικά για αυτή την ενίσχυση, ενώ παραδόξως, η μετάλλαξη T877A ανιχνεύθηκε σε δύο ασθενείς που ταξινομήθηκαν τότε ως HSPC. Στα συμπεράσματά τους, οι συγγραφείς της εν λόγω μελέτης αναφέρουν πως η χρήση της ddPCR για την ανάλυση της ενίσχυσης του AR σε cfDNA είναι οικονομικά αποδοτική, εφικτή και αξιόπιστη, προσφέροντας δυνητικούς βιοδείκτες που μπορούν να βοηθήσουν στον καθορισμό των βέλτιστων στρατηγικών θεραπείας για ασθενείς με CRPC (Young et al., 2022).



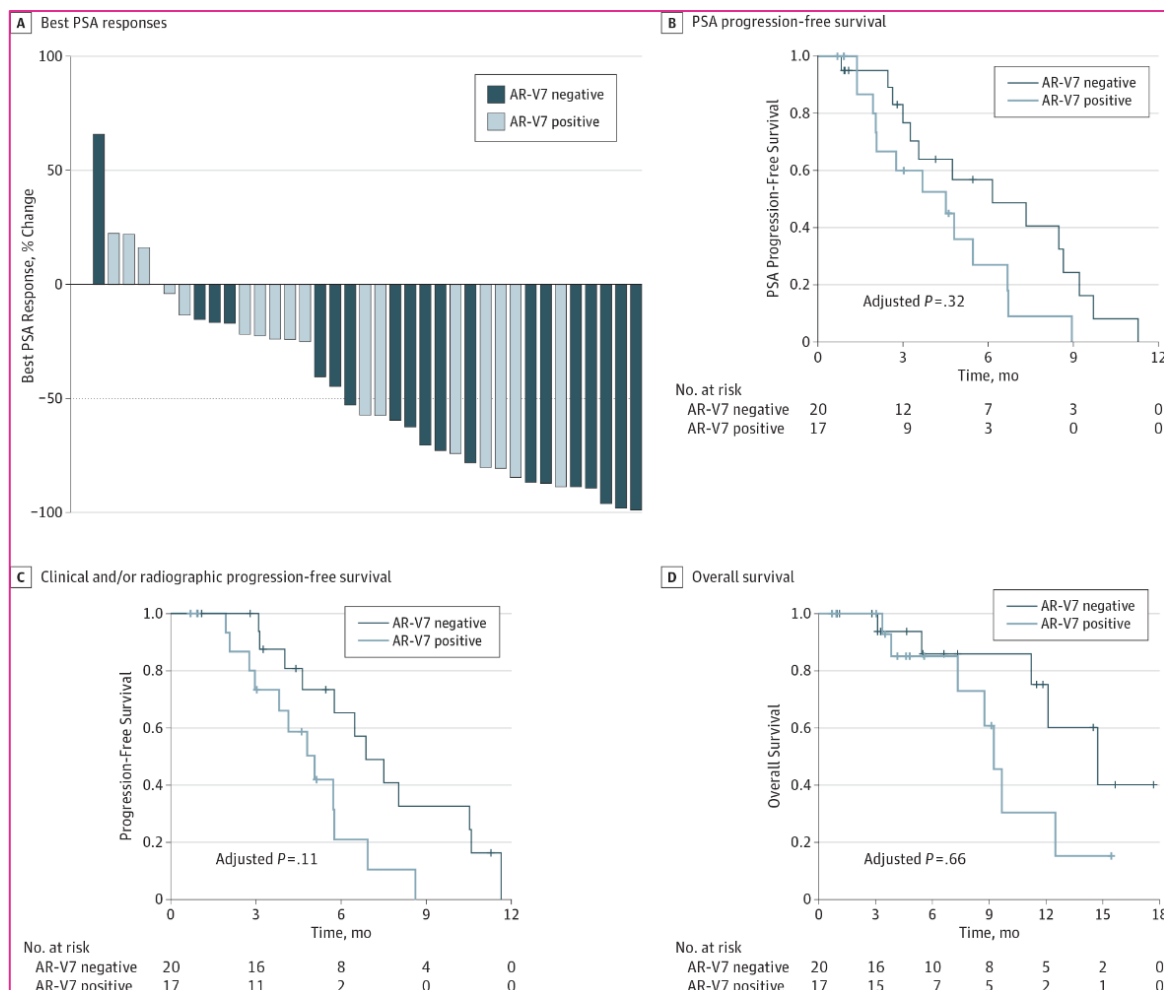
Εικόνα 18. Γράφημα που αντιπροσωπεύει τα αποτελέσματα μιας multiplex ddPCR που έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης T877A και της μεταβολής του αριθμού αντιγράφων του AR (Young et al., 2022)

4.2. Ανίχνευση παραλλαγών του υποδοχέα ανδρογόνων

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι οι εναλλακτικές παραλλαγές μάτισης του υποδοχέα ανδρογόνων, ιδίως η παραλλαγή AR 7 (AR-V7), συνδέονται στενά με την πρωτογενή αντίσταση στη θεραπεία με αμπιρατερόνη και ενζαλουταμίδη σε ασθενείς με ανθεκτικό στον ευνοχισμό καρκίνο του προστάτη. Αυτές οι παραλλαγές του AR στερούνται την C-τελική περιοχή δέσμησης συνδέτη, αλλά διατηρούν την N-τελική περιοχή, με αποτέλεσμα τη μεταγραφική προώθηση των γονιδίων-στόχων (Hu et al., 2012). Σε μια μελέτη των Antonarakis et al. (2014), αναπτύχθηκε μια δοκιμασία ποσοτικής PCR αντίστροφης μεταγραφής με βάση τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα για την αξιολόγηση των επιπέδων AR-V7 σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αβιρατερόνη ή ενζαλουταμίδη, αποκαλύπτοντας ότι η παρουσία της παραλλαγής AR-V7 σχετιζόταν με έλλειψη ανταπόκρισης του PSA και με μικρότερα ποσοστά επιβίωσης χωρίς εξέλιξη καθώς και συνολικής επιβίωσης σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς την παραλλαγή AR-V7. Στην αμέσως επόμενη μελέτη τους, οι Antonarakis et al. (2015) είχαν ως στόχο να καθορίσουν εάν οι AR-V7 θετικοί ασθενείς με mCRPC θα διατηρούσαν την ευαισθησία στη χημειοθεραπεία με ταξάνη και να αξιολογήσουν τη διαφορετική επίδραση της κατάστασης AR-V7 στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας με ταξάνη έναντι της ενζαλουταμίδης ή της αμπιρατερόνης. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια δοκιμασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής για την ανίχνευση του mRNA AR-V7 σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs). Οι βασικές εκβάσεις που μετρήθηκαν περιλάμβαναν τα ποσοστά ανταπόκρισης στο PSA, την επιβίωση χωρίς εξέλιξη και την κλινική/ακτινογραφική επιβίωση χωρίς εξέλιξη. Η μελέτη ενσωμάτωσε επίσης δεδομένα από μια προηγούμενη κοόρτη 62 ασθενών που έλαβαν θεραπεία με ενζαλουταμίδη ή αμπιρατερόνη για την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της κατάστασης AR-V7 και του τύπου θεραπείας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 17 από τους 37 ασθενείς (46%) που έλαβαν θεραπεία με ταξάνη είχαν ανιχνεύσιμο AR-V7 στα CTCs τους. Επίσης, τόσο οι AR-V7-θετικοί όσο και οι AR-V7-αρνητικοί άνδρες πέτυχαν ανταπόκριση στο PSA, ενώ η επιβίωση χωρίς εξέλιξη ήταν παρόμοια ανεξάρτητα από την κατάσταση AR-V7. Στην εν λόγω μελέτη, παρατηρήθηκε επίσης σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της κατάστασης AR-V7 και του τύπου θεραπείας. Πιο συγκεκριμένα, στους AR-V7-θετικούς ασθενείς, οι ταξάνες επέδειξαν

ανώτερα κλινικά αποτελέσματα σε σύγκριση με την ενζαλουταμίδα ή την αμπιρατερόνη, με υψηλότερη ανταπόκριση στο PSA και σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου, ενώ αντίθετα, οι εκβάσεις δεν διέφεραν σημαντικά ανάλογα με τον τύπο θεραπείας στους άνδρες με αρνητικό AR-V7. Συμπερασματικά, η ανίχνευση AR-V7 σε CTCs ανδρών με mCRPC δεν υποδηλώνει πρωτογενή αντίσταση στη χημειοθεραπεία με ταζάνες, οι οποίες είναι πιο αποτελεσματικές από την ενζαλουταμίδα ή την αβιρατερόνη σε AR-V7-θετικούς ασθενείς, ενώ και οι δύο θεραπείες έχουν συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα σε AR-V7-αρνητικούς ασθενείς. Η ανίχνευση, λοιπόν, του AR-V7 στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα των ασθενών θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως πολύτιμος βιοδείκτης για την επιλογή θεραπείας στον mCRPC (Antonarakis et al., 2015).

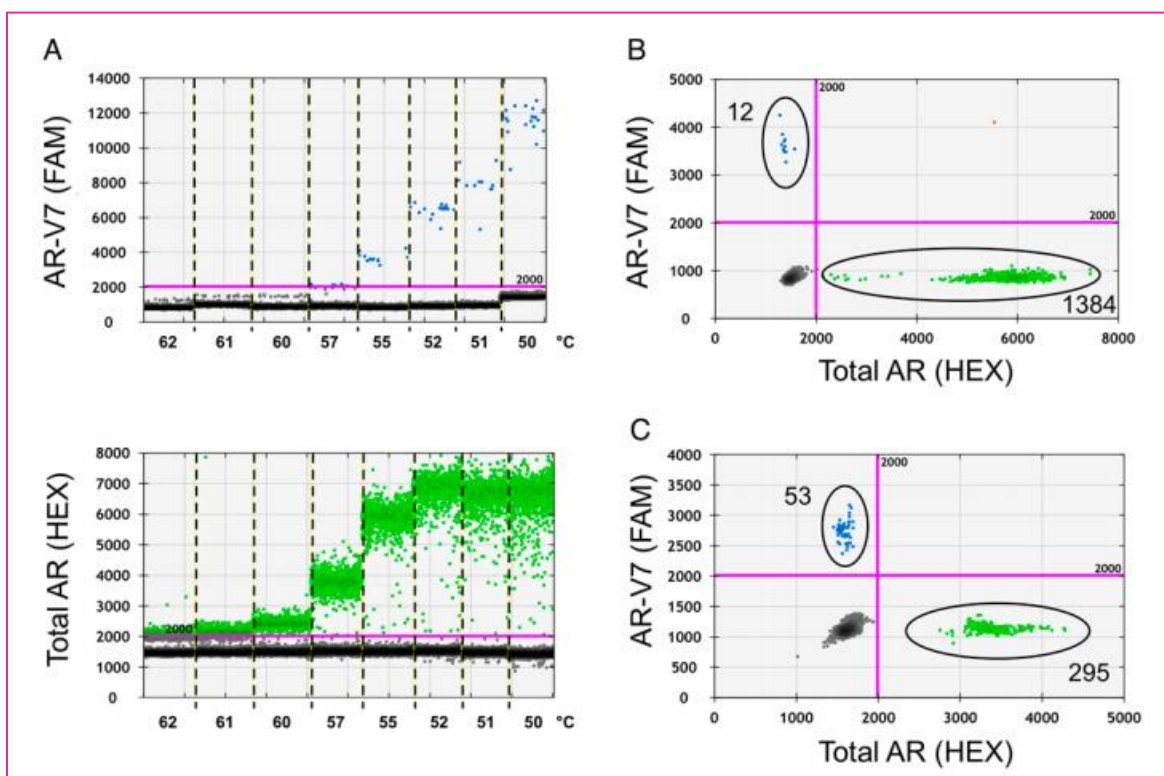


Εικόνα 19. Τα κλινικά αποτελέσματα 37 ατόμων που έλαβαν θεραπεία με φάρμακα ταζάνης με βάση την παρουσία CTCs που εκφράζουν την παραλλαγή 7 του υποδοχέα ανδρογόνων (AR-V7) με χρήση qRT-PCR (Antonarakis et al., 2015)

Συνεχίζοντας, στη μελέτη των Cattrini et al. (2019) χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη δοκιμασία με προσαρμοσμένους εκκινητές για την αξιολόγηση των επιπέδων mRNA AR-FL και AR-V7 σε CTCs μιας ομάδας ασθενών με mCRPC. Αυτή η προσέγγιση είναι παρόμοια με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε από τον Antonarakis et al. (2015) και στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση της προγνωστικής σημασίας των CTC, AR-FL και AR-V7 σε διάφορα στάδια της νόσου. Για την αξιολόγηση των AR-FL και AR-V7 στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, συλλέχθηκαν 5 ml αίματος από τους ασθενείς πριν από την έναρξη νέας θεραπείας, τα οποία επεξεργάστηκαν εντός 2 ωρών με τη χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων. Το mRNA εξήχθη και εν συνεχεία υπέστη αντίστροφη μεταγραφή, ώστε να χρησιμοποιηθεί το cDNA για την ανίχνευση των AR-FL και AR-V7. Η θετικότητα των CTC προσδιορίστηκε μέσω multiplex PCR με ειδικούς εκκινητές και τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση. Οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα αλλά μη ποσοτικά προσδιορίσιμα AR-V7 και AR-FL (κάτω από 10 αντίγραφα/ml) θεωρήθηκαν θετικοί.

Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης αποκάλυψαν ότι τα επίπεδα των AR-FL και AR-V7 ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με mCRPC πριν την έναρξη θεραπείας σε σύγκριση με εκείνους που ξεκινούσαν θεραπείες πρώτης γραμμής. Τα ποσοστά βιοχημικής ανταπόκρισης ήταν χαμηλότερα σε ασθενείς με θετικό AR-V7 σε σύγκριση με ασθενείς με αρνητικό AR-V7, ενώ επίσης κανένας από τους AR-V7-θετικούς ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αναστολείς της σηματοδότησης των υποδοχέων ανδρογόνων (ARSI) δεν παρουσίασε βιοχημική ανταπόκριση. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν υψηλότερα ποσοστά βιοχημικής ανταπόκρισης σε CTC-αρνητικούς σε σύγκριση με CTC-θετικούς ασθενείς και σε AR-FL-αρνητικούς σε σύγκριση με AR-FL-θετικούς ασθενείς. Μεταξύ των ασθενών με περισσότερα από 10 αντίγραφα/ml AR-FL, όλοι όσοι έλαβαν θεραπεία με ταξάνες πέτυχαν μείωση κατά 50% του PSA, σε σύγκριση με έναν στους τρεις που έλαβαν θεραπεία με ARSIs., υποδηλώνοντας μια πιθανή θετική επίδραση των ταξανών σε ασθενείς με ενίσχυση του AR. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή υπογραμμίζει την προγνωστική αξία των επιπέδων mRNA AR-FL και AR-V7 στα CTCs, υποδεικνύοντας ότι η χημειοθεραπεία με ταξάνες μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε ασθενείς με mCRPC που έχουν θετικό AR-V7 και θετικό AR-FL (Cattrini et al., 2019).

Οι Ma et al. (2016) ανέπτυξαν μια ειδική και ευαίσθητη δοκιμασία με βάση την ddPCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης AR-V7 σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα σε ασθενείς με CRPC. Χρησιμοποιώντας ανιχνευτές Taqman, βελτιστοποίησαν αρχικά την ανίχνευση της συνολικής έκφρασης των μεταγράφων του AR και του AR-V7 από ολικό RNA μέσω του προσδιορισμού της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης χρησιμοποιώντας RNA από κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη. Όπως φαίνεται στην εικόνα 20, η βέλτιστη υβριδοποίηση επετεύχθη στους 55°C, όπου οι αντιδράσεις ddPCR για το ολικό AR και την παραλλαγή AR-V7 έδειξαν τον καλύτερο διαχωρισμό των σταγονιδίων που περιείχαν αμπλικόνιο από τη βασική γραμμή, με καλή ενίσχυση PCR.



Εικόνα 20. Βελτιστοποίηση θερμοκρασίας υβριδοποίησης για τη δοκιμασία ddPCR (Ma et al., 2016)

Στην εν λόγω μελέτη, οι εκκινητές και οι ανιχνευτές Taqman σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό εκκινητών NCBI (Πίνακας 7). Τα σταγονίδια δημιουργήθηκαν με 70 μ L ελαίου χρησιμοποιώντας μια γεννήτρια σταγονιδίων QX200, ενώ το πρωτόκολλο ενίσχυσης ήταν 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα και 55°C για 1 λεπτό. Μετά την ενίσχυση, τα σταγονίδια διαβάστηκαν σε συσκευή ανάγνωσης σταγονιδίων QX200 και αναλύθηκαν με τη χρήση του

λογισμικού QuantaSoft. Το λογισμικό υπολόγισε το συνολικό σφάλμα, παρέχοντας διαστήματα εμπιστοσύνης 95% για τα αποτελέσματα (Ma et al., 2016).

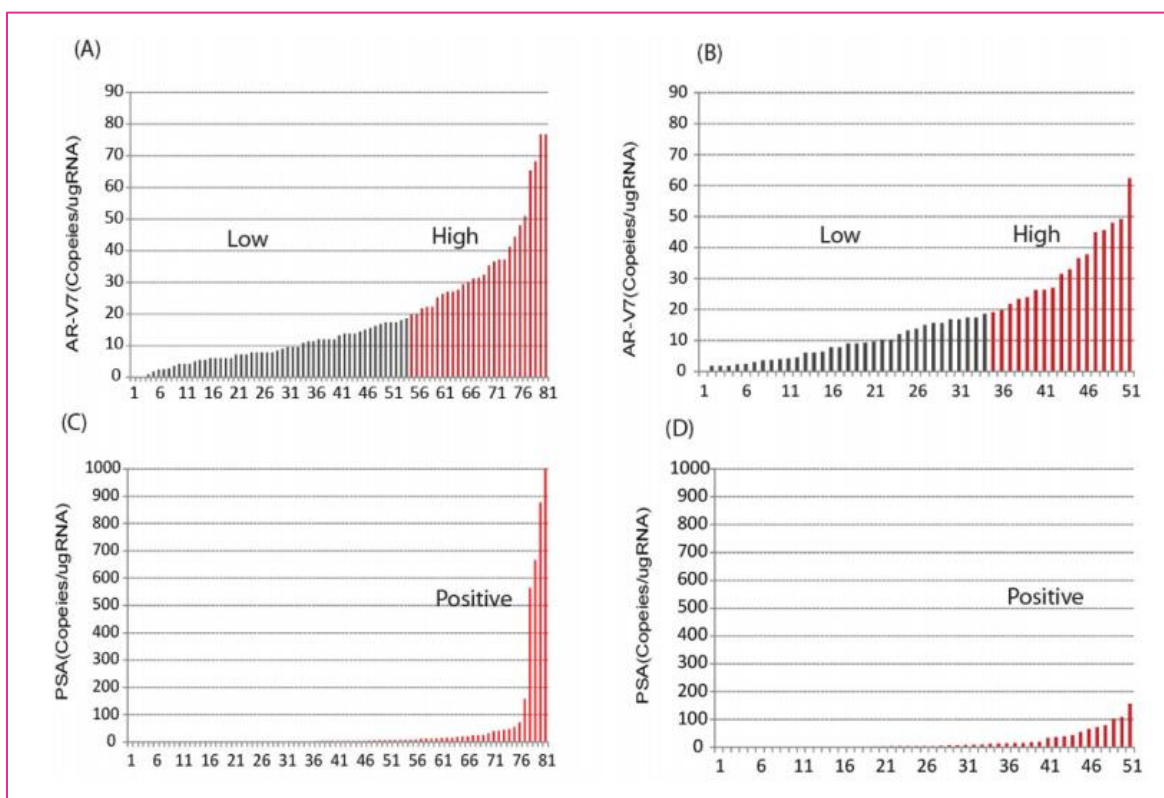
Πίνακας 7. Εκκινητές και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία ddPCR των Ma et al. (2016)

AR-Species	Primers	Probes
Total AR	FP: 5'-GGAATTCCTGTGCATGAAAGC-3' RP: 5'-CGATCGAGTTCCTTGATGTAGTTC-3'	5'-[HEX]CTTCAGCATTATTCCAGTG[BHQ1]-3'
AR-V7	FP: 5'-CGGAAATGTTATGAAGCAGGGATGA-3' RP: 5'-CTGGTCATTTTGAGATGCTTGAAT-3'	5'-[6FAM]CGGAATTTTCTCCCAGA[BHQ1]-3'

Όπως αναφέρουν οι συγγραφείς της μελέτης, αυτή η δοκιμασία ddPCR ανιχνεύει αξιόπιστα την έκφραση του AR-V7, παρέχοντας τόσο τη θετικότητα του AR-V7 όσο και τους πραγματικούς αριθμούς αντιγράφων μεταγραφής και η ανίχνευση του AR-V7 συσχετίζεται σημαντικά με την ανάπτυξη CRPC (Ma et al., 2016).

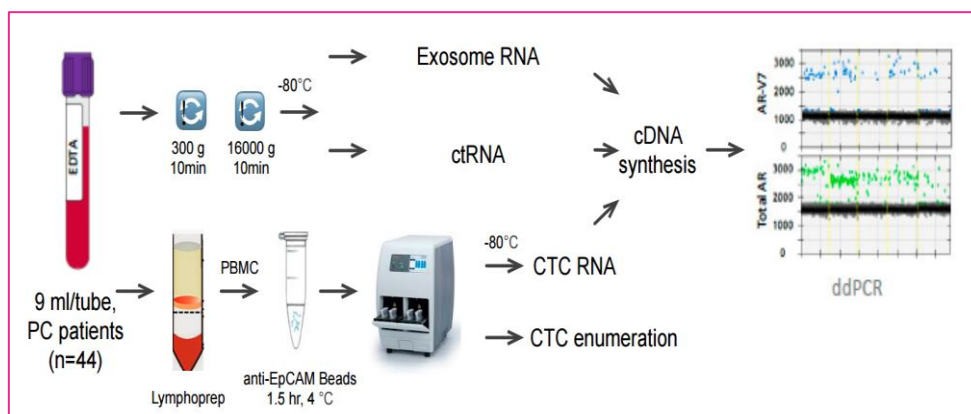
Στη συνέχεια, η μελέτη των Qu et al. (2016) αποσκοπούσε στην αξιολόγηση της δυνητικής χρησιμότητας της μέτρησης των επιπέδων μεταγραφής AR-V7 και PSA στο ολικό αίμα ως προγνωστικών δεικτών για ασθενείς με mCRPC που υποβάλλονται σε θεραπεία με οξική αμπιρατερόνη και ενζαλουταμίδα. Οι ερευνητές διεξήγαγαν ποσοτική ανάλυση των μεταγράφων AR-V7 και PSA σε δείγματα αίματος για να διερευνήσουν τη σχέση τους με τη συνολική επιβίωση. Δεδομένου ότι η έκφραση του AR-V7 και του PSA συνήθως εντοπίζεται σε κύτταρα όγκου του προστάτη, η ανίχνευση αυτών των σημάτων στο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος πιθανότατα υποδεικνύει κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Qu et al., 2016). Για το λόγο αυτό, η μελέτη χρησιμοποίησε την δοκιμασία ddPCR για τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του AR-V7 και του PSA στο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος, χρησιμοποιώντας δείγματα που συλλέχθηκαν πριν από τη θεραπεία με αμπιρατερόνη και/ή ενζαλουταμίδα, από αναδρομικές ομάδες ασθενών. Κάθε μίγμα αντίδρασης μετατράπηκε σε σταγονίδια με τη γεννήτρια σταγονιδίων QX200 (Bio-Rad), ενώ τα δείγματα μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε πλάκα 96-well, σφραγίστηκαν και ανακυκλώθηκαν σε

C1000 Touch (Bio-Rad) σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο κύκλου: 95 °C για 10 λεπτά, και στη συνέχεια από 40 κύκλους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, 60 °C για 60 δευτερόλεπτα και επώαση 10 λεπτών στους 98 °C. Οι πλάκες διαβάστηκαν στη συνέχεια σε έναν αναγνώστη σταγονιδίων Bio-Rad QX200 και τουλάχιστον δύο αρνητικοί έλεγχοι περιλαμβάνονταν σε κάθε εκτέλεση. Οι συγκεντρώσεις του mRNA-στόχου υπολογίστηκαν με τη χρήση στατιστικών Poisson και το υπόβαθρο διορθώθηκε με βάση το δεδομένα του αρνητικού ελέγχου. Τα απόλυτα επίπεδα μεταγραφής παρουσιάστηκαν αρχικά ως αντίγραφα ανά μL και μετατράπηκαν σε αντίγραφα ανά μg RNA με βάση την εισαγόμενη ποσότητα RNA. Στην εν λόγω ανάλυση, παρατηρήθηκε ότι σχεδόν όλα τα δείγματα παρουσίασαν ανιχνεύσιμα επίπεδα AR-V7, ενώ μόνο το 60% περίπου των δειγμάτων παρουσίασαν ανιχνεύσιμα επίπεδα PSA. Είναι ενδιαφέρον ότι ένας μικρός αριθμός ασθενών εμφάνισε υψηλά επίπεδα μεταγράφων AR-V7 χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα μεταγραφών PSA, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία CTCs που εκφράζουν το AR-V7 αλλά όχι το PSA. Ωστόσο, όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις, το AR-V7 μπορεί να προέρχεται από κύτταρα που δεν ανήκουν στον προστάτη (Takeuchi et al., 2016). Συνοψίζοντας, η συγκεκριμένη έρευνα δείχνει ότι η παρουσία των μεταγράφων PSA και AR-V7 στο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος θα μπορούσε να είναι χρήσιμος βιοδείκτης για την πρόβλεψη της συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με οξική αμπιρατερόνη ή ενζαλουταμίδα και εάν επιβεβαιωθεί περαιτέρω μέσω προοπτικών μελετών, η άμεση ανίχνευση των μεταγράφων AR-V7 και PSA με χρήση ddPCR σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος θα μπορούσε να προσφέρει ένα απλό και αποτελεσματικό προγνωστικό εργαλείο, εξαλείφοντας την ανάγκη απομόνωσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Qu et al., 2016).



Εικόνα 21. Ο επιπολασμός της έκφρασης των γονιδίων AR-V7 και PSA στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος των δειγμάτων (Qu et al., 2016)

Συνεχίζοντας, η έρευνα των Nimir et al. (2019) περιελάμβανε την ανάλυση δειγμάτων αίματος που συλλέχθηκαν από 44 άτομα με καρκίνο του προστάτη για την ανίχνευση CTCs, κυκλοφορούντος καρκινικού RNA (ctRNA) και εξωσωμάτων. Η παρουσία του υποδοχέα ανδρογόνων AR και της παραλλαγής 7 του AR (AR-V7) αξιολογήθηκε με τη χρήση της ψηφιακή ddPCR (εικόνα 22).

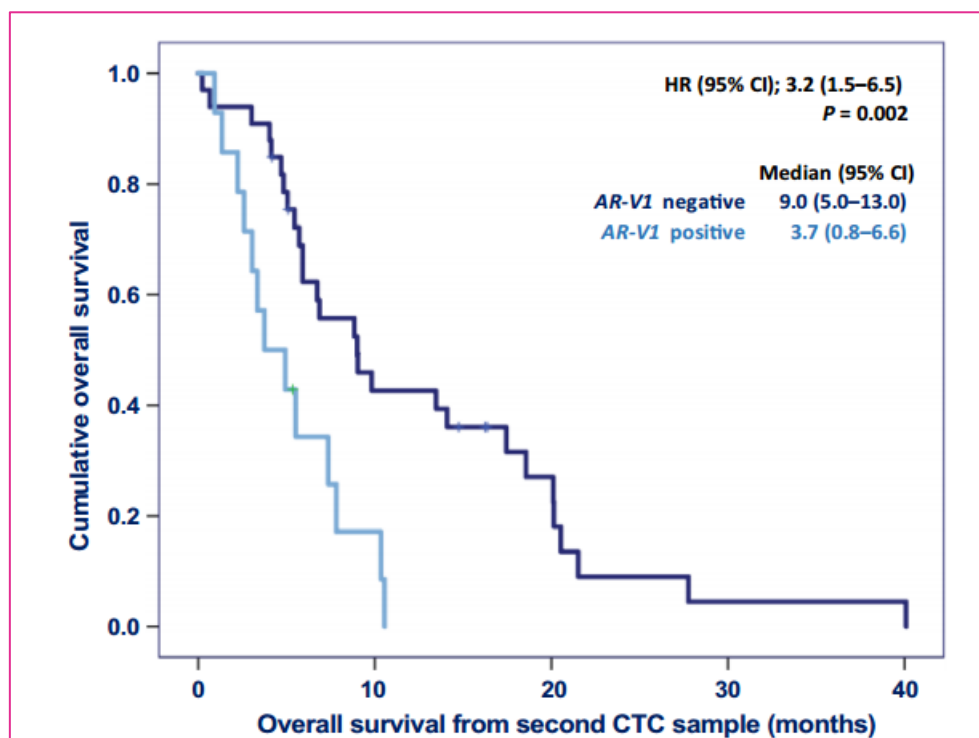


Εικόνα 22. Διάγραμμα ροής των διαδικασιών στη μελέτη των Nimir et al. (2019)

Η συγκεκριμένη μελέτη διαπίστωσε ότι τόσο το AR όσο και το AR-V7 ήταν ανιχνεύσιμα σε δείγματα CTCs, ctRNA και εξωσωμάτων. Ειδικότερα, η ανίχνευση AR-V7 σε CTCs επέδειξε υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα σε σύγκριση με την ανίχνευση από ctRNA και εξωσώματα και δεδομένης της σταθερής παρουσίας των CTCs σε περιπτώσεις προχωρημένου καρκίνου του προστάτη, τα δείγματα CTC συνιστώνται ως η προτιμώμενη υγρή βιοψία για τον εντοπισμό αυτού του κλινικά σημαντικού βιοδείκτη (Nimir et al., 2019).

Επιπρόσθετα, η μελέτη των Sieuwerts et al. (2019) διερεύνησε κατά πόσον συγκεκριμένες παραλλαγές του AR (AR-Vs), συμπεριλαμβανομένων των AR-V3, AR-V7, AR-V1, AR-V9, καθώς και του υποδοχέα ανδρογόνων πλήρους μήκους (AR-FL), που υπάρχουν σε CTCs ασθενών με mCRPC, σχετίζονται με τα αποτελέσματα της θεραπείας μετά τη χορήγηση καμπαζιταξέλης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία του AR-V7 στα CTCs είναι ενδεικτική της αντοχής σε θεραπείες με αντιανδρογόνα, αλλά όχι σε χημειοθεραπεία με βάση την ταξάνη στον mCRPC (Antonarakis et al., 2017, De Laere et al., 2019, Ostenk et al., 2016). Για το λόγο αυτό, δείγματα αίματος ελήφθησαν από 118 ασθενείς με mCRPC πριν και μετά από δύο κύκλους θεραπείας με καμπαζιταξέλη στο πλαίσιο μιας κλινικής δοκιμής φάσης II. Τα CTCs, που εμπλουτίστηκαν με την τεχνολογία CellSearch, ποσοτικοποιήθηκαν και αναλύθηκαν για παραλλαγές του υποδοχέα ανδρογόνων με τη χρήση ποσοτικής PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR). Στόχος της έρευνας ήταν να αξιολογηθεί η σχέση μεταξύ του αριθμού των CTCs και της ανταπόκρισης του PSA στην καμπαζιταξέλη και να διερευνηθούν οι συνδέσεις με τη συνολική επιβίωση. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας έδειξαν πως η παρουσία των AR-Vs παρατηρήθηκε σταθερά σε ποσοστό 31-48% μετά από δύο κύκλους θεραπείας με καμπαζιταξέλη. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με AR-V9-θετικά κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα κατά την έναρξη της θεραπείας είχαν λιγότερες πιθανότητες να έχουν ανταπόκριση στην καμπαζιταξέλη κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ενώ επιπλέον, η ανίχνευση του AR-V1 μετά από δύο κύκλους καμπαζιταξέλης, προσδιορίστηκε ως ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση (εικόνα 23). Ωστόσο, δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των AR-V3 και AR-V7 και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με καμπαζιταξέλη. Όπως αναφέρουν οι συγγραφείς της

μελέτης, τα αποτελέσματα αυτά αναμένεται να βελτιώσουν τις εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις για ασθενείς με mCRPC (Siewerts et al., 2019).

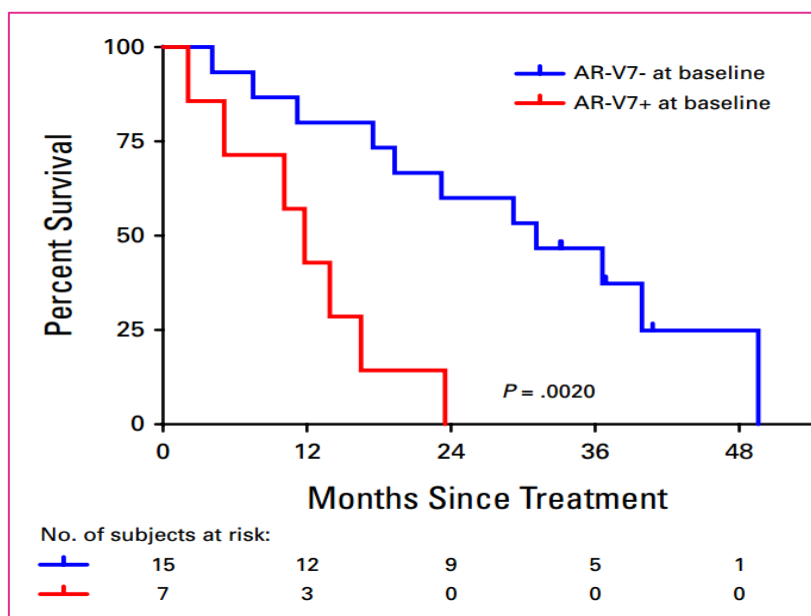


Εικόνα 23. Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης AR-V1 στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα και της συνολικής επιβίωσης μετά από δύο κύκλους θεραπείας με καμπασιταξέλη (Siewerts et al., 2019)

Η μελέτη των Stoopelyte et al. (2020) αποσκοπούσε στην αξιολόγηση της σημασίας των μεταγράφων του AR που κυκλοφορούν σε ολόκληρο το αίμα, συμπεριλαμβανομένων τόσο του πλήρους μήκους (AR-FL) όσο και των παραλλαγών AR-V1, -V3 και -V7, ως δυνητικών βιοδεικτών για τον προσδιορισμό της αντοχής στη θεραπεία με οξική αμπιρατερόνη σε ασθενείς με CRPC. Μετά από αναδρομική εξέταση 112 δειγμάτων προστάτη, τα επίπεδα έκφρασης των AR-FL, -V1, -V3 και -V7 αξιολογήθηκαν σε 185 διαδοχικά δείγματα αίματος που ελήφθησαν από 102 ασθενείς με CRPC πριν και κατά τη διάρκεια της θεραπείας με οξική αμπιρατερόνη με τη χρήση ποσοτικής PCR αντίστροφης μεταγραφής. Στα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης δείχθηκε πως η παρουσία του AR-FL παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα, ενώ οι παραλλαγές AR-V1, AR-V3, AR-V7 εντοπίστηκαν στο 17%, 55%, 65% και 81% αντίστοιχα των δειγμάτων αίματος από τους

ασθενείς. Οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα AR-V1 έτειναν να έχουν συντομότερους χρόνους ανταπόκρισης στη θεραπεία με οξική αμπιρατερόνη, ενώ επιπλέον τα άτομα με αυξημένα επίπεδα AR-FL και/ή AR-V1 παρουσίασαν τα μικρότερα ποσοστά επιβίωσης χωρίς εξέλιξη και συνολικής επιβίωσης. Οι συγγραφείς της μελέτης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα AR-FL ή AR-V1 που κυκλοφορούν στο αίμα έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την ανίχνευση της αρχικής αντοχής στην θεραπεία με οξική αμπιρεταρόνη αλλά και ως μέσο για την παρακολούθηση της εμφάνισης αντοχής κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης θεραπείας (Stuorpelyte et al., 2020).

Τέλος, σε μια πρόσφατη προοπτική μελέτη των Saylor et al. (2024) συμμετείχαν ασθενείς με μεταστατικό CRPC στα οστά, ούτως ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με ράδιο-223. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα συλλέχθηκαν κατά την έναρξη, τον 1 μήνα και τους 2 μήνες της θεραπείας και αναλύθηκαν για την έκφραση RNA ειδικού για τον καρκίνο του προστάτη με τη χρήση ddPCR. Μεταξύ των γονιδίων που εξετάστηκαν, το AR-V7 αναδείχθηκε ως ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας της συνολικής επιβίωσης μετά τη θεραπεία με ράδιο-223. Το εύρημα αυτό, που δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως στο πλαίσιο των ραδιοφαρμάκων, υποδηλώνει ότι το AR-V7 αποτελεί ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό δείκτη σε αυτούς τους ασθενείς, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω επικύρωση σε μεγαλύτερες ομάδες για την επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων (Saylor et al., 2024).



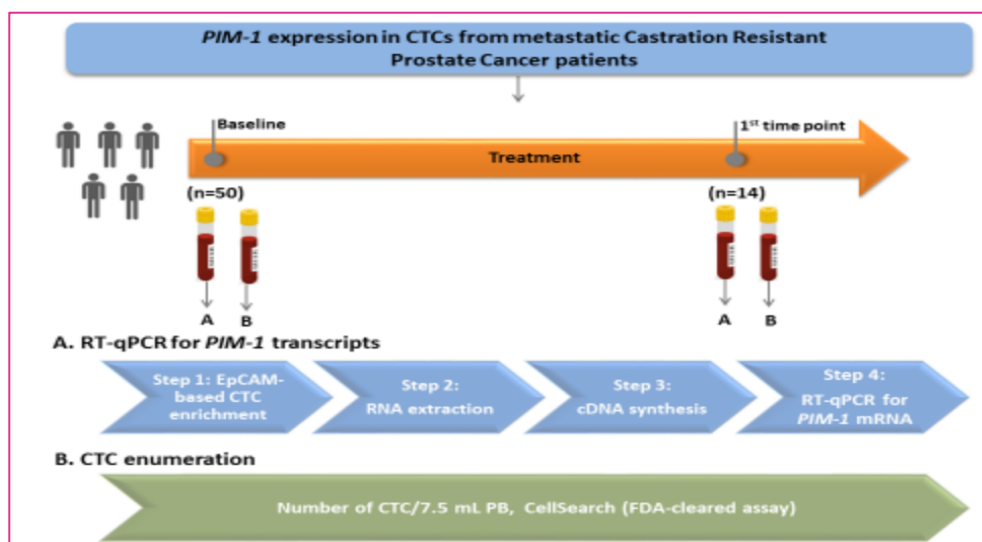
Εικόνα 24. Η ανάλυση Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συνολικής επιβίωσης με βάση την παρουσία AR-V7 στα CTCs (Saylor et al., 2024)

4.3. Γονιδιακή έκφραση του *PIM-1*

Το ογκογονίδιο *PIM-1* διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ενεργοποιείται σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη, καθιστώντας το δυνητικό στόχο για θεραπεία (Warfel and Kraft, 2015). Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του *PIM-1* μπορεί να πυροδοτηθεί από αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως η υποξία, οδηγώντας σε αντίσταση στους αναστολείς της αγγειογένεσης (Casillas et al., 2018), ενώ επίσης εμπλέκεται στη ρύθμιση της πρωτεΐνης 7 της μικρής υπομονάδας των ριβοσωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα φάρμακα που στοχεύουν τα ριβοσώματα μπορεί να είναι αποτελεσματικά έναντι διαφόρων υποτύπων καρκίνου του προστάτη ανθεκτικού στον ευνοχισμό, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που δεν έχουν έκφραση υποδοχέα ανδρογόνων (Lawrence et al., 2018). Επιπλέον, το *PIM-1* πιστεύεται ότι συμβάλλει στην καρκινογένεση αλληλεπιδρώντας με το ογκογονίδιο *c-Myc*, όπως αποδεικνύεται από μελέτες σε ποντίκια που καταδεικνύουν ενισχυμένη καρκινογένεση στον καρκίνο του προστάτη (Wang et al., 2010). Επιπρόσθετα, αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί παλαιότερα με τη χρήση μικροσυστοιχιών ιστού έχουν δείξει ότι το *PIM-1* υπερεκφράζεται περίπου στα μισά δείγματα ανθρώπινου καρκίνου του προστάτη (Dhanasekaran et al., 2001).

Στην μελέτη των Markou et al. (2020), οι ερευνητές ανέπτυξαν αρχικά και εν συνεχεία επιβεβαίωσαν την ακρίβεια μιας εξαιρετικά ευαίσθητης ανάλυσης RT-qPCR για τη μέτρηση των μεταγράφων του *PIM-1* και ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά ότι το *PIM-1* υπερεκφράζεται σε σημαντικό βαθμό σε EpCAM(+) CTCs που λαμβάνονται από ασθενείς με mCRPC. Επιπλέον, οι ερευνητές διερεύνησαν την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του *PIM-1* σε EpCAM(+) CTCs και της έκφρασης του ARV7 στα ίδια δείγματα και ένα αξιοσημείωτο εύρημα ήταν η παρουσία ισχυρής συσχέτισης μεταξύ των αυξημένων επιπέδων του *PIM-1* και/ή της έκφρασης του AR-V7 στο κλάσμα EpCAM(+) πριν από τη θεραπεία και των επακόλουθων κλινικών αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν στην ίδια ομάδα ασθενών. Αυτή η στατιστικά σημαντική συσχέτιση υποδηλώνει μια πιθανή προγνωστική αξία αυτών των βιοδεικτών στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία και της συνολικής έκβασης των ασθενών. Οι ερευνητές καταλήγουν στα συμπεράσματα

τους ότι τα ευρήματα της εν λόγω μελέτης υποδηλώνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα του *PIM-1* στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα μπορούν να χρησιμεύσουν ως ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης για την καθοδήγηση της θεραπείας του καρκίνου του προστάτη σε έναν μεγάλο και καλά χαρακτηρισμένο πληθυσμό ασθενών (Markou et al., 2020).



Εικόνα 25. Σχεδιάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας στη μελέτη των Markou et al. (2020)

4.4. Ανίχνευση υπερμεθυλίωσης γονιδίων ως προγνωστικός βιοδείκτης στον CRPC

Η μεθυλίωση του DNA, που εμφανίζεται κυρίως ως 5-μεθυλοκυτοσίνη (5mC) στα δινοκλεοτίδια CpG, είναι ένας επιγενετικός μηχανισμός που συνήθως οδηγεί σε αποσιώπηση γονιδίων. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA (DNMTs), οι οποίες προσθέτουν μεθυλομάδες, και τα ένζυμα TET, τα οποία τις αφαιρούν. Η DNMT1 διατηρεί τα υπάρχοντα πρότυπα μεθυλίωσης, ενώ οι DNMT3A και DNMT3B είναι υπεύθυνες για τη νέα μεθυλίωση. Τα ένζυμα TET, ιδίως τα TET1, TET2 και TET3, μετατρέπουν την 5mC σε μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη μέσω διαφόρων ενδιάμεσων σταδίων, με την 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (5hmC) να αποτελεί βασικό ενεργό δείκτη. Η δραστηριότητα της TET2 επηρεάζεται από τις IDH1 και IDH2 μέσω της παραγωγής ακετογλουταρικού οξέος. Ενώ οι περισσότερες περιοχές CpG είναι σε μεγάλο βαθμό

μεθυλιωμένες, οι νησίδες CpG κοντά σε ρυθμιστικές περιοχές όπως οι υποκινητές και οι ενισχυτές παρουσιάζουν μεταβλητή μεθυλίωση, επηρεάζοντας τη γονιδιακή έκφραση και συμβάλλοντας στην ανάπτυξη καρκίνου όταν είναι μη φυσιολογικά μεθυλιωμένες. Τα διακριτά μοτίβα μεθυλίωσης στους όγκους, γνωστά ως φαινότυπος CpG (CIMP), μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για διάφορους τύπους καρκίνου (Shin, Hua and Li, 2023).

Είναι ευρέως αναγνωρισμένο ότι τα μη φυσιολογικά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA, ιδίως με τη μορφή CIMP, αποτελούν κοινό χαρακτηριστικό σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ των οποίων ο προχωρημένος καρκίνος του προστάτη και η ειδική για τη μεθυλίωση PCR (MS PCR) χρησιμοποιείται συχνά για την εξέταση των προφίλ μεθυλίωσης του DNA εντός των νησίδων CpG και τη διαπίστωση της παρουσίας φαινοτύπου μεθυλιωτή νησίδα CpG (CIMP) (Aryee et al., 2013, Shin, Hua and Li, 2023).

Στη μελέτη τους, ο Dillinger et al. (2022) χρησιμοποίησαν την ευαίσθητη στη μεθυλίωση τεχνική περιοριστικού ενζύμου-qPCR για να αναλύσουν υγρές βιοψίες από ασθενείς με mCRPC, οι οποίοι είτε ανταποκρίθηκαν είτε όχι σε διάφορες θεραπείες. Παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης σε ορισμένους τόπους σε μη ανταποκρινόμενους ασθενείς τόσο πριν όσο και μετά τη θεραπεία με αμπιρατερόνη. Επιπλέον, οι ερευνητές εντόπισαν 23 συγκεκριμένα γονίδια-δείκτες που παρουσίασαν μοτίβα μεθυλίωσης που σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση για υποτροπή της νόσου, μεταξύ των οποίων είναι τα *HOXA7*, *SERPINB1*, *NKX2-6*, *CRABP2*, *ACSS3*, *DHRS4L2* και *SCGB3A1*. Ειδικότερα, τα εν λόγω επτά γονίδια παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης σε δείγματα όγκου σε σύγκριση με φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς και τα επίπεδα μεθυλίωσης αυτών των γονιδίων παρουσίασαν μια συνεπή αύξηση από τους καλοήθεις όγκους, σε καρκινικούς όγκους έως τους μεταστατικούς όγκους του προστάτη. Επιπρόσθετα, ως αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μελέτης, εντοπίστηκαν τρεις πιθανοί υποψήφιοι βιοδείκτες για τον mCRPC: τα γονίδια *CHST11*, *CUGBP2* και *PCDHGC4*. Αυτοί οι βιοδείκτες βρέθηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στη διάκριση του mCRPC από τον εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη και όπως αναφέρουν οι συγγραφείς της μελέτης, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η παρουσία του mCRPC μπορεί να ανιχνευθεί με υψηλό επίπεδο ακρίβειας εξετάζοντας συγκεκριμένα μοτίβα μεθυλίωσης (Dillinger et al., 2022).

Η μελέτη των Büttner et al. (2023) διερευνά τη χρήση της υγρής βιοψίας, με ιδιαίτερη έμφαση στην ανάλυση των προτύπων μεθυλίωσης στο cfDNA, ως μέσο ανίχνευσης του κυκλοφορούντος DNA όγκου. Αυτή η μη επεμβατική και προσιτή προσέγγιση υπόσχεται τον εντοπισμό βιοδεικτών για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας του CRPC. Συγκεκριμένα, η μελέτη εξετάζει τις δυνατότητες χρήσης των δεικτών μεθυλίωσης SHOX2 και SEPT9 για τον σκοπό αυτό. Συνολικά συλλέχθηκαν δείγματα πλάσματος από 11 ασθενείς με mCRPC που λάμβαναν διαφορετικούς τύπους θεραπειών. Τα επίπεδα του υπερμεθυλιωμένου SHOX2 (mSHOX2) και του SEPT9 (mSEPT9) στο cfDNA αξιολογήθηκαν ποσοτικά με τη χρήση της ειδικής για τη μεθυλίωση PCR πραγματικού χρόνου, ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Jung, Kristiansen and Dietrich (2017).

Οι ερευνητές ανέλυσαν τις πρώιμες και συνολικές αλλαγές στα επίπεδα του PSA, του mSHOX2 και του mSEPT9 και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η mSHOX2 μειώθηκε σημαντικά μετά τη θεραπεία σε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν καλά στη θεραπεία, καθώς και σε εκείνους που έλαβαν πρώιμη θεραπεία. Από την άλλη πλευρά, το mSEPT9 και το PSA δεν παρουσίασαν σημαντική μείωση, υποδηλώνοντας ότι οι mSHOX2 και mSEPT9 μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία στον mCRPC. Στη συνέχεια, οι ερευνητές απέδειξαν την αποτελεσματικότητα αυτών των δεικτών μεθυλίωσης σε μια μελέτη περίπτωσης που αφορούσε έναν 76χρονο άνδρα με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Ο ασθενής, ο οποίος αρχικά υποβλήθηκε σε θεραπεία με ενζαλουταμίδα, παρουσίασε εξέλιξη στις μεταστάσεις των οστών και των λεμφαδένων του και στη συνέχεια ακολούθησε αλλαγή της φαρμακευτικής αγωγής σε δοσεταξέλη. Μετά από τρεις χημειοθεραπευτικούς κύκλους, οι σαρώσεις PSMA-PET/CT έδειξαν βελτίωση στις οστικές μεταστάσεις αλλά πρόοδο στους λεμφαδένες της πυέλου, ενώ η μετάβαση σε καμπαζιταξέλη που ακολούθησε οδήγησε σε σταθερή νόσο. Η ανάλυση των βιοδεικτών αποκάλυψε ότι τα επίπεδα του PSA παρέμειναν σταθερά, ενώ οι δείκτες μεθυλίωσης (mSHOX2 και mSEPT9) έδειξαν πρόοδο της νόσου υπό δοσεταξέλη και θετική ανταπόκριση στην καμπαζιταξέλη. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η συγκεκριμένη μελέτη παρέχει τα θεμέλια για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τη χρησιμότητα αυτών των δεικτών στην παρακολούθηση της θεραπείας του mCRPC, αλλά ωστόσο, απαιτούνται μεγαλύτερες μελέτες για την επιβεβαίωση της κλινικής χρησιμότητάς τους (Büttner et al., 2023)

4.5. Προσδιορισμός νέων SNPs που σχετίζονται με την πρόγνωση ασθενών με CRPC

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ρύθμιση των ενζύμων βιοσύνθεσης ανδρογόνων οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα ανδρογόνων στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με το πλάσμα, εξουδετερώνοντας τις επιδράσεις του συστηματικού χημικού ευνοχισμού και αυτή η ενζυμική δραστηριότητα συνδέεται πιθανώς με την ανταπόκριση του καρκίνου του προστάτη στη θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (ADT) (Srivastava et al., 2011). Κλινικές μελέτες έχουν επίσης υποδείξει ότι γενετικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με τη στεροειδογένεση σχετίζονται με τον κίνδυνο και την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη, αλλά ωστόσο, παραμένει ασαφές εάν αυτές οι γενετικές παραλλαγές επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ADT (D'Amico et al., 2007).

Ο πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNP) είναι μια παραλλαγή στην αλληλουχία του DNA όπου ένα μόνο νουκλεοτίδιο διαφέρει και αυτός ο τύπος γενετικής παραλλαγής είναι εξαιρετικά διαδεδομένος στον ανθρώπινο πληθυσμό. Στη μελέτη τους, οι Binder et al. (2016) διαπίστωσαν ότι η παρουσία του SNP rs26486758 στο γονίδιο *CYP17A1* συνδέεται με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης βιοχημικής ανταπόκρισης και ταχύτερη εξέλιξη σε βιοχημική εξέλιξη σε ασθενείς με CRPC. Ομοίως, οι Wang et al. (2011) ανακάλυψαν ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ των πολυμορφισμών rs619824 και rs2486758 στο *CYP17A1* και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, ενώ σε αντίθεση με αυτά τα ευρήματα, οι Salvi et al. (2016) δεν παρατήρησαν σημαντικές συνδέσεις μεταξύ των πολυμορφισμών rs743572, rs10883783, rs17115100 και rs284849 στο γονίδιο *CYP17A1* και των κλινικών αποτελεσμάτων των ασθενών με CRPC μέσω της μελέτης των πολυμορφισμών αυτών με χρήση PCR.

Σε μια αναδρομική πολυκεντρική μελέτη που διεξήχθη από τον Yamada et al. (2012), οι ερευνητές διερεύνουν τη σχέση μεταξύ των γενετικών παραλλαγών σε γονίδια που σχετίζονται με τη στεροειδογένεση και την πιθανότητα ανάπτυξης CRPC σε Ιάπωνες μετά από θεραπεία στέρησης ανδρογόνων. Στόχος της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση αυτών των γενετικών πολυμορφισμών στην εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη σε CRPC. Για το λόγο αυτό, στην έρευνα συμμετείχαν συνολικά 214 Ιάπωνες που είχαν διαγνωστεί με καρκίνο του προστάτη και υποβάλλονταν σε θεραπεία στέρησης ανδρογόνων και εξετάστηκαν 22 SNPs εντός 8 γονιδίων που σχετίζονται με τη στεροειδογένεση. Οι

SNPs αναλύθηκαν με τη χρήση τεχνικών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και η πρωταρχική εστίαση ήταν η επιλογή SNPs που βρίσκονταν εντός των εξονίων, με πρόσθετη εξέταση των SNPs που βρίσκονταν σε γειτονικά ιντρόνια. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στο γονίδιο *CYP17A1* βρέθηκαν τέσσερις γενετικές παραλλαγές, συγκεκριμένα οι rs743572, rs6162, rs6163 και rs1004467, οι οποίες παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης CRPC, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η γενετική σύνθεση του γονιδίου *CYP17A1* θα μπορούσε ενδεχομένως να επηρεάσει την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη σε CRPC μετά από θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (Yamada et al., 2012).

Συνεχίζοντας, οι Sissung et al. (2016) διεξήγαγαν μια μελέτη για να διερευνήσουν τη σχέση μεταξύ των παραλλαγών στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση, τη διανομή, τον μεταβολισμό και την αποβολή ουσιών στο σώμα, εστιάζοντας συγκεκριμένα σε 49 γονίδια CYP450, 73 μη CYP γονίδια και 47 μεταφορείς που παίζουν ρόλο στον μεταβολισμό φυσικών ενώσεων, εξωτερικών καρκινογόνων ουσιών και φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία. Στόχος της έρευνάς τους ήταν να εξετάσουν πώς αυτές οι γενετικές παραλλαγές θα μπορούσαν να επηρεάσουν την πιθανότητα εμφάνισης CRPC, καθώς και την πρόγνωση των ατόμων που έχουν ήδη διαγνωστεί με τη νόσο. Οι γενετικές παραλλαγές αναλύθηκαν με τη χρήση δοκιμασιών γονοτύπων TAQman της Applied Biosystems και ο γονοτυπικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα Applied Biosystems StepPlus RealTime PCR. Η μελέτη διαπίστωσε ότι τρεις συγκεκριμένες γενετικές παραλλαγές SNPs συνδέονται με την πρόγνωση ατόμων με CRPC. Οι εν λόγω SNPs ταυτοποιήθηκαν ως ABCB11 rs7602171G>A, GSTP1 rs1799811C>T και SLC5A6 rs1395. Επιπλέον, δύο άλλες γενετικές παραλλαγές, ABCB4 rs2302387C>T και ABCC5 rs939339A>G, έδειξαν ελπιδοφόρες τάσεις στη συσχέτισή τους με την πρόγνωση του CRPC μεταξύ καυκάσιων ατόμων. Συνολικά, αυτή η πρωτοποριακή έρευνα υποδηλώνει ότι οι παραλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με τις διαδικασίες απορρόφησης, διανομής, μεταβολισμού και αποβολής μπορεί να παίζουν ρόλο στον καθορισμό της πρόγνωσης της CRPC σε καυκάσιους πληθυσμούς.

Έχει βρεθεί, λοιπόν, πως η παρουσία γενετικών παραλλαγών τόσο στο γονίδιο *CYP17A1* αλλά και στο γονίδιο *CYP5A*, τα οποία παίζουν ρόλο στην παραγωγή ανδρογόνων, μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του προστάτη, την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη και το

πόσο αποτελεσματικά ανταποκρίνεται σε χημειοθεραπείες (Wang et al., 2011). Για το λόγο αυτό, οι Wu et al. (2020) διερεύνησαν τη συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων SNPs, εντός των γονιδίων *CYP17A1* και *CYP5A*, καθώς και το πώς αυτές οι παραλλαγές μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με οξική αμπιρατερόνη σε άτομα που έχουν διαγνωστεί με CRPC. Συγκεντρώθηκαν δεδομένα από συνολικά 58 ασθενείς με CRPC, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με οξική αμπιρατερόνη/πρεδνιζόνη και η μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάλυση των γενετικών παραλλαγών στα SNPs rs743572 και rs10883783 εντός του γονιδίου *CYP17A1*, καθώς και στα SNPs rs1790834 και rs1790858 εντός του γονιδίου *CYP5A*. Τα δείγματα γονιδιωματικού DNA εξήχθησαν από ολικό αίμα χρησιμοποιώντας το κιτ εκχύλισης γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα Biospin και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C. Στη συνέχεια, τα δείγματα DNA ενισχύθηκαν και αναλύθηκαν για την παρουσία των παραλλαγών *CYP17A1* και *CYP5A* χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία TaqMan RT-qPCR (Πίνακας 8). Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε αντίδραση PCR, 25 µL του μείγματος συνδυάστηκαν με 5 µL εκχυλισμένου DNA και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ξεκίνησε με ένα αρχικό βήμα στους 95 °C για 10 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους: μετουσίωση DNA στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 42 °C για 90 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα. Όλα τα δείγματα DNA εξετάστηκαν εις διπλούν με τη χρήση του TaqMan PCR Master Mix σε μηχάνημα PCR πραγματικού χρόνου.

Πίνακας 8. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές TaqMan για τις γενετικές παραλλαγές rs743572, rs10883783, rs1790834 και rs1790858 (Wu et al., 2020)

Genes	Primer Sequences	TaqMan Probes
rs743572	Forward 5'-TTGGGCCAAAACAAATAAGC-3' Reverse 5'-GGGCTCCAGGAGAATCTTTC-3'	5'-CGGTGGAGTAGAAGAG-3'
rs10883783	Forward 5'-CTATGGCAGGATGAGGGTGT-3' Reverse 5'-TGAGTTTGCTGTGGACAAGG-3'	5'-TGGAGCCAAGAGTTT-3'
rs1790834	Forward 5'-ATACGGACTGACCCCATCTG-3' Reverse 5'-CCAGTCCACCAGGACATTCT-3'	5'-TGGAGCCAAGAGTTT-3'
rs1790858	Forward 5'-CGAACTGCTGGACTCAAG-3' Reverse 5'-GATTATCTTCTTGGCTCTGTAG-3'	5'-GAGGGGACCACGCGAGAGA-3'

Στα κυριότερα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης συμπεριλαμβάνεται το γεγονός πωςδείχθηκε ότι η γενετική παραλλαγή rs1790834 στο γονίδιο *CYB5A* βρέθηκε να έχει ισχυρή συσχέτιση με την ανταπόκριση στο PSA σε ασθενείς με CRPC που υποβάλλονται σε θεραπεία με οξική αμπιρατερόνη/πρεδνιζόνη. Ωστόσο, άλλες παραλλαγές όπως οι rs743572, rs10883783 και rs1790858 δεν παρουσίασαν την ίδια συσχέτιση. Επιπλέον, η παραλλαγή rs1790834 συνδέθηκε επίσης με σημαντική μείωση τόσο του ποσοστού επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου όσο και της συνολικής επιβίωσης. Συμπερασματικά, λοιπόν, ο γονότυπος rs1790834 στο *CYB5A* θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμεύσει ως χρήσιμος βιοδείκτης για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία σε ασθενείς με CRPC (Wu et al., 2020).

4.6. Μελέτες έκφρασης miRNAs στον CRPC

Τα microRNAs (miRNAs) είναι ένας τύπος μικρών μορίων RNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης μετά τη μεταγραφή, λειτουργώντας είτε εμποδίζοντας τη διαδικασία μετάφρασης είτε επιταχύνοντας την αποικοδόμηση συγκεκριμένων μορίων mRNA (Vishnoi and Rani, 2017). Περίπου το 30% όλων των γονιδίων ρυθμίζεται από τα miRNAs, γεγονός που τα καθιστά βασικούς παράγοντες στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, της ανάπτυξης, του κυτταρικού θανάτου και της ανάπτυξης όγκων, καθώς όταν τα miRNAs εκφράζονται μη φυσιολογικά, μπορούν να συμβάλουν στην εμφάνιση, την εξέλιξη και την εξάπλωση του καρκίνου (Lin and Gregory, 2015).

Τα miRNAs διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων, δρώντας είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια αναστέλλοντας ογκογονίδια και γονίδια που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη, είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια μπλοκάροντας ογκοκατασταλτικά γονίδια και γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Στον καρκίνο, τα ογκοκατασταλτικά miRNAs συνήθως μειώνονται, ενώ τα oncomiRs αυξάνονται, οδηγώντας στην εξέλιξη του σχηματισμού όγκων. Λόγω της επίδρασής τους στην ανάπτυξη του όγκου, τα miRNAs έχουν αναδειχθεί ως πολύτιμοι βιοδείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση, την πρόγνωση και

την πρόβλεψη των αποτελεσμάτων της θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο, μεταξύ των οποίων και ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (Tavares et al., 2024). Μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη από τον Schitcu et al. (2022) εντόπισε συνολικά 292 δυσρυθμισμένα miRNAs σε μια ομάδα ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

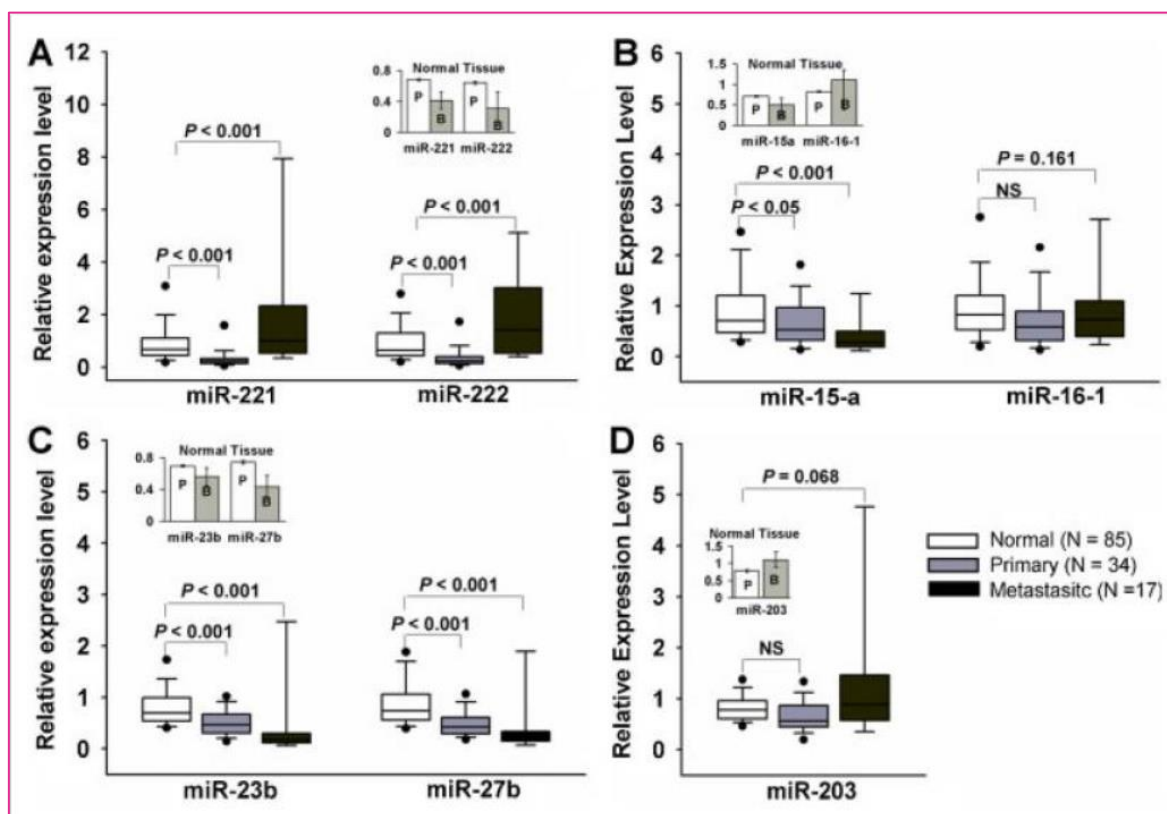
Τα microRNAs στα ούρα έχουν γίνει μια πολλά υποσχόμενη οδός για τον εντοπισμό του καρκίνου του προστάτη, παρέχοντας πολύτιμα εργαλεία για τη διαφοροποίηση μεταξύ κακοήθων και καλοήθων όγκων. Τα αυξημένα επίπεδα των miR-100 και miR-200b στα ούρα έχουν συνδεθεί με προχωρημένο καρκίνο του προστάτη, ενώ τα miR-196a-5p και miR-501-3p βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα στα εξωσώματα των ούρων, παρουσιάζοντας δυνατότητες ως βιοδείκτες για τον καρκίνο του προστάτη. Ειδικότερα, τα miR-21, miR-141 και miR-375 έχει βρεθεί ότι είναι σημαντικά πιο άφθονα στα ούρα ασθενών με καρκίνο του προστάτη σε σύγκριση με υγιή άτομα. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα επίπεδα miR-141 σε ασθενείς με υψηλότερες βαθμολογίες Gleason. Η αυξημένη έκφραση των miR-21-5p, miR-141-3p και miR-205p σε δείγματα ούρων έχει επίσης καταδείξει υψηλότερη ειδικότητα στην ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη σε σύγκριση με την παραδοσιακή εξέταση PSA (Chen et al., 2023).

Η αξιοποίηση των miRNAs ως προγνωστικών βιοδεικτών για την αντίσταση στη θεραπεία και την πρόγνωση σε ασθενείς με CRPC έχει ερευνηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια λόγω των προκλήσεων που αντιμετωπίζονται κατά τη διαχείριση αυτών των ασθενών (Tavares et al., 2024). Μια συστηματική βιβλιογραφική ανασκόπηση που διεξήχθη από τους Thieu et al. (2014) από το 2002 έως το 2013 εντόπισε 16 miRNAs, όπως τα miR-21, miR-141, miR-221, miR-23b, miR-27b, miR-298, miR-375, miR-222, let-7f, miR-19b, miR-22, miR-26b, miR-27a, miR-27b, miR-29a και miR-29b, τα οποία υπόσχονται να χρησιμοποιηθούν ως δυνητικοί βιοδείκτες για τον CRPC όταν αναλύονται σε δείγματα που προέρχονται από τον ορό, τους όγκους ή τους ιστούς ασθενών με CRPC.

Το σύμπλεγμα miR-221/223 έχει αναγνωριστεί ως κρίσιμο στοιχείο στην εξέλιξη του CRPC, αν και ο ρόλος του παραμένει κάπως αμφιλεγόμενος. Οι Goto et al. (2015) έχουν περιγράψει αυτό το σύμπλεγμα ως έναν ογκοκατασταλτικό παράγοντα που υπορυθμίζεται στον CRPC, οδηγώντας ενδεχομένως σε ταχύτερη εξέλιξη της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, ανέπτυξαν έναν συγκεντρωτικό πίνακα microRNAs που σχετίζονται με τον CRPC με τη χρήση τεχνολογίας συστοιχιών με βάση την PCR και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η

εισαγωγή miR-221/222 σε κύτταρα CRPC μειώνει την ικανότητά τους να μεταναστεύουν και να εισβάλλουν στους περιβάλλοντες ιστούς.

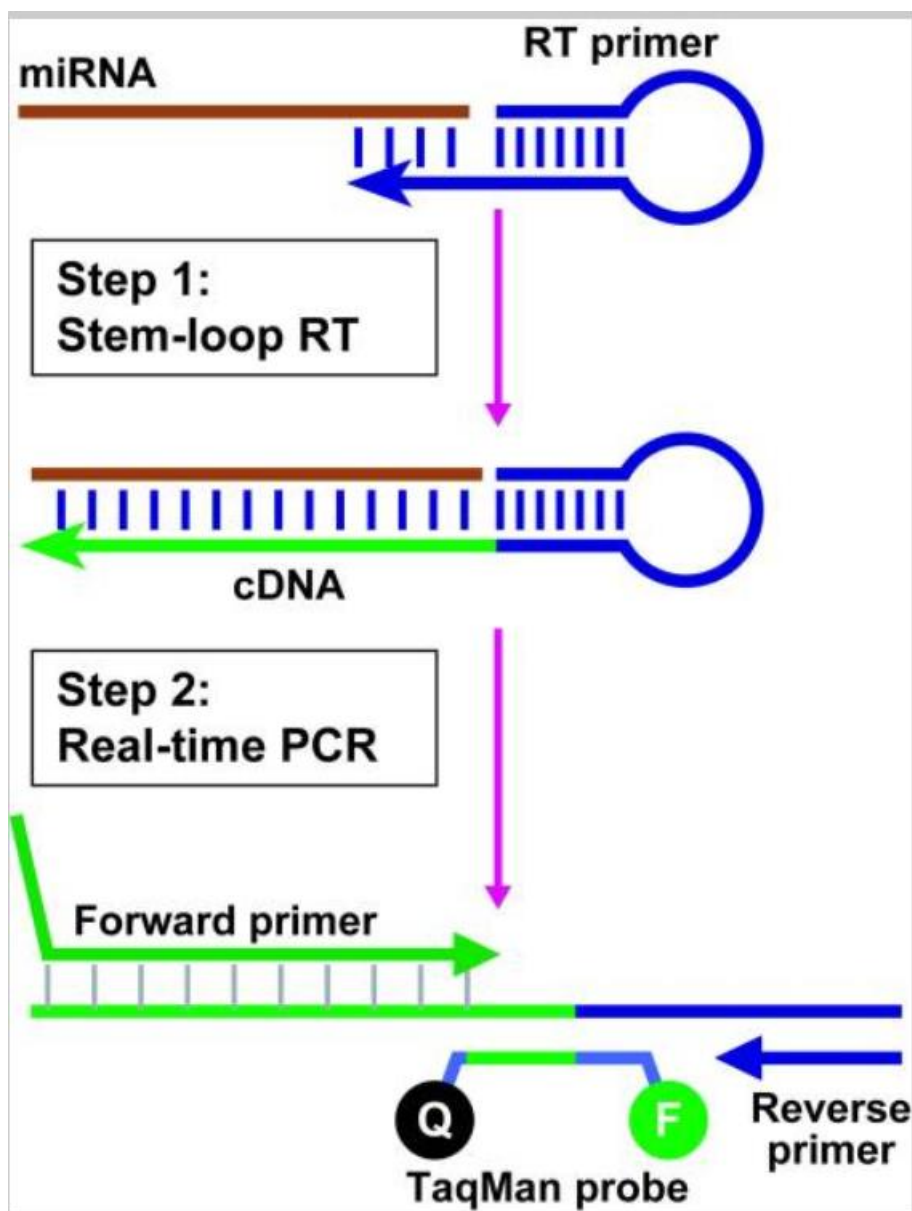
Αντιθέτως, οι Sun et al. (2011) διεξήγαγαν εκτεταμένες έρευνες που δείχνουν ότι το συγκεκριμένο σύμπλεγμα miRNAs υπερεκφράζεται σε κυτταρικές σειρές CRPC, παρουσιάζοντας συσχέτιση με μειωμένα επίπεδα διυδροτεστοστερόνης (DHT) και αυξημένα επίπεδα PSA. Τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs μετρήθηκαν με τη χρήση PCR πραγματικού χρόνου με το mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit της Ambion, και οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός τυπικού πρωτοκόλλου του TaqMan PCR Kit, όπου κάθε σημείο δεδομένων ελέγχθηκε εις τριπλούν ώστε να αυξηθεί η ακρίβεια της μεθόδου. Οι ερευνητές έδειξαν ότι η σταθερή υπερέκφραση του miR-221 σε κύτταρα που εξαρτώνται από ανδρογόνα μπορεί να οδηγήσει σε ανεξάρτητη από ανδρογόνα κυτταρική ανάπτυξη, μειώνοντας τα επίπεδα των HECTD2 και RAB1A. Επιπλέον, η ανάλυσή τους για το σύμπλεγμα miR-221/222, μαζί με το miR-23b/27b, σε προστατικούς ιστούς αποκάλυψε ότι η πλειονότητα των όγκων CRPC παρουσίαζε ρύθμιση του συμπλέγματος miR-221/222 προς τα πάνω και ρύθμιση προς τα κάτω του συμπλέγματος miR-23b/27b. Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μελέτη διαπίστωσε ότι 16 από τους 17 όγκους CRPC παρουσίασαν αυξημένη έκφραση του συμπλέγματος miR-221/222 και μειωμένη έκφραση του miR-23b/27b, γεγονός που υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο αυτών των microRNAs στην εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη (Sun et al., 2011).



Εικόνα 26. Πρότυπα έκφρασης miRNAs σε φυσιολογικούς ιστούς του προστάτη, πρωτογενείς όγκους και όγκους CRPC που αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας Taq Man qPCR. A. miR-221/-222 B. miR-15a/-miR-16-1 C. miR-23b/-27b D. miR-203 (Sun et al., 2011)

Συνεχίζοντας, στη μελέτη των Zhu et al. (2015) χρησιμοποιήθηκε μια νέα τεχνική γνωστή ως ανάλυση δραστηριότητας miRNA (MIAA). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την ενσωμάτωση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης με δεδομένα αλληλεπίδρασης miRNA/mRNA για τον εντοπισμό της δραστηριότητας miRNA που είναι ειδική για ορισμένες συνθήκες, καθώς και για την πρόβλεψη των επιπέδων έκφρασης miRNA και των μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται κατά την ανάπτυξη του CRPC και τα ευρήματα της συγκεκριμένης έρευνας αποκάλυψαν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης αρκετών miRNAs κατά τη σύγκριση των κυτταρικών σειρών CRPC και ASPC. Πιο συγκεκριμένα, η ποσοτική ανάλυση PCR επιβεβαίωσε την παρουσία miRNAs στις κυτταρικές σειρές CRPC, με τα miR-210, miR-218, miR-346, miR-197 και miR-149 να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης, ενώ αντίθετα τα miR-122, miR-145 και let-7b βρέθηκαν να εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα σε αυτές τις κυτταρικές σειρές.

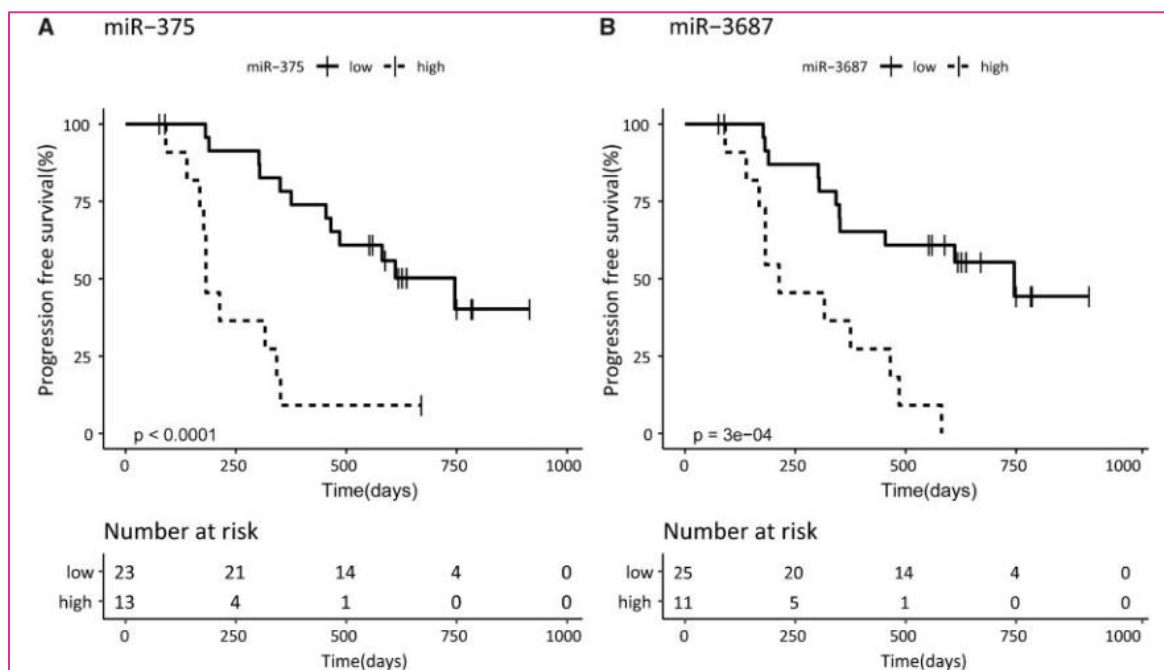
Οι Benoist et al. (2020) διεξήγαγαν μια μελέτη για τη διερεύνηση της χρήσης των miRNAs ως δυνητικών βιοδεικτών σε υγρές βιοψίες ασθενών με mCRPC, οι οποίοι υποβάλλονταν σε θεραπεία με ενζαλουταμίδα. Οι ερευνητές επέλεξαν συγκεκριμένα miRNAs για ανάλυση με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, με έμφαση στα miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200c και miR-375. Τα επίπεδα των miRNAs αξιολογήθηκαν με τη χρήση της δοκιμασίας stem-loop PCR αντίστροφης μεταγραφής (SL-RT PCR), μια τεχνική που τροποποιήθηκε από μια μέθοδο που είχε περιγραφεί προηγουμένως από τον Chen (2005). Κατά την δοκιμασία αυτή, οι εκκινητές αντίστροφης μεταγραφής με έχουν stem-loop έχουν σχεδιαστεί για να συνδέονται με το 3' άκρο των μορίων miRNA και να υφίστανται αντίστροφη μεταγραφή με αντίστροφη μεταγραφάση. Το προκύπτον προϊόν αντίστροφης μεταγραφής ποσοτικοποιείται στη συνέχεια με τη χρήση συμβατικής TaqMan PCR, η οποία περιλαμβάνει τη χρήση ειδικών για το miRNA πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών καθώς και ενός ανιχνευτή TaqMan σημασμένου με χρωστική ουσία. Η συμπερίληψη ενός πρόσθιου εκκινητή με ουρά στο 5' άκρο χρησιμεύει για την ενίσχυση της θερμοκρασίας τήξης του εκκινητή, βελτιώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητά του στη σύνδεση με μόρια miRNAs με διαφορετικές συνθέσεις αλληλουχίας. Η μέθοδος αυτή δεν επηρεάζεται από επιμόλυνση από γονιδιωματικό DNA και επιτρέπει ακριβείς μετρήσεις ακόμη και με πολύ μικρές ποσότητες RNA, όπως από ένα μόνο κύτταρο και διαθέτει ευρύ φάσμα δυνατοτήτων μέτρησης, που εκτείνεται από πολύ χαμηλά έως πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης miRNA. Οι αναλύσεις TaqMan miRNA είναι σε θέση να στοχεύουν συγκεκριμένα ώριμα miRNA και μπορούν να διαφοροποιήσουν μεταξύ πολύ παρόμοιων miRNA που διαφέρουν μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο, επιτρέποντας τη γρήγορη και ακριβή ανάλυση της έκφρασης των miRNAs, η οποία μπορεί να είναι πολύτιμη για τον εντοπισμό και την παρακολούθηση μοναδικών βιοδεικτών σε ιστούς ή ασθένειες (Chen, 2005).



Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση της SL-RT PCR (Chen, 2005)

Στην έρευνα των Benoist et al. (2020) κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία SL-RT PCR χρησιμοποιήθηκαν 2,0 mL ολικού RNA, το οποίο είχε εξαχθεί με τη χρήση του PAXgene Blood miRNA Kit, μαζί με 0,375 pmol ενός ειδικού για miRNA εκκινητή SL-RT. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως τα αυξημένα επίπεδα των miR-375 και miR-3687 συνδέονται με μειωμένο χρόνο μέχρι την εξέλιξη της νόσου, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο miR-3687 μπορεί να χρησιμεύσει ως ένας πολλά υποσχόμενος προγνωστικός δείκτης. Η παρούσα μελέτη, λοιπόν, υποστηρίζει τη χρησιμότητα του miR-375 ως δυνητικού

βιοδείκτη για την πρόβλεψη της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη σε άτομα με mCRPC (Benoist et al., 2020).



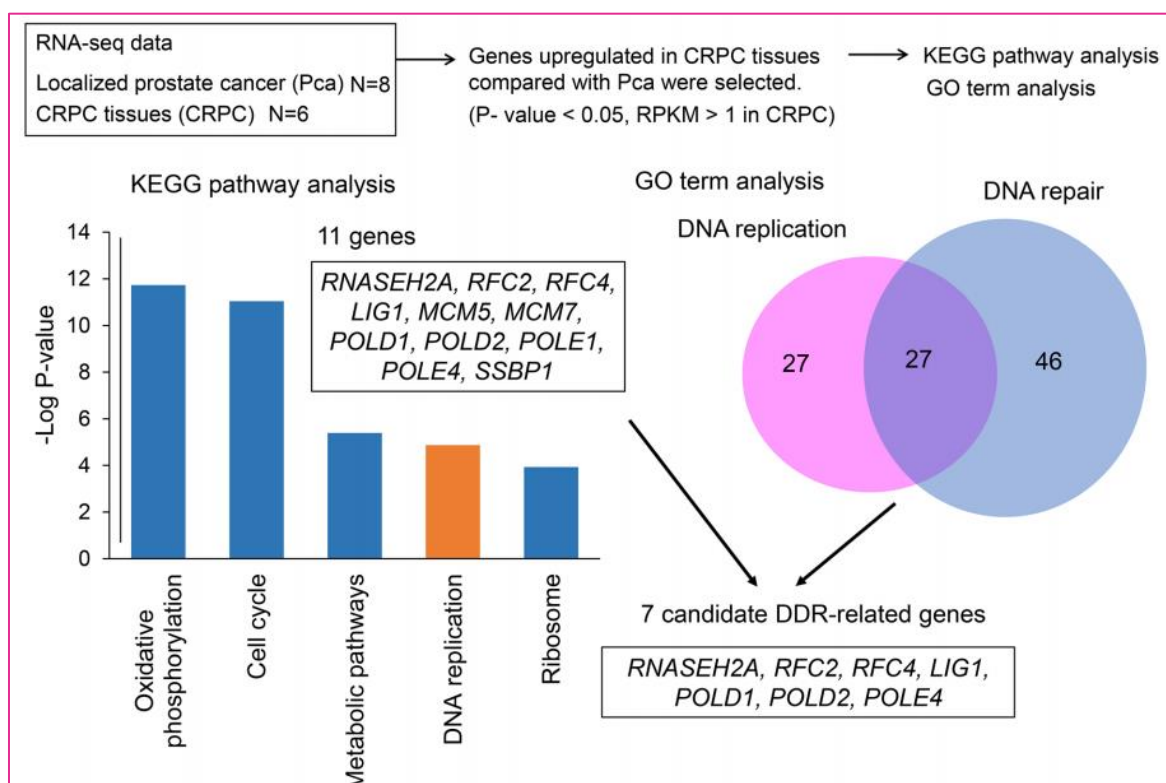
Εικόνα 28. Καμπύλες Kaplan–Meier για A. miR-375 και B. miR-3687 (Benoist et al., 2020)

4.7. Προσδιορισμός άλλων βιοδεικτών για τον CRPC με χρήση PCR

Το μονοπάτι DDR (DNA Damage Response) διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαφύλαξη της ακεραιότητας του γονιδιώματος και η διαταραχή αυτού του μονοπατιού μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιωματική αστάθεια, αυξημένα επίπεδα μεταλλάξεων και αυξημένη ετερογένεια του όγκου, τα οποία συμβάλλουν στην εξέλιξη του καρκίνου (Chae et al., 2016). Πρόσφατα, ένα νέο φάρμακο που στοχεύει στην οδό DDR, γνωστό ως αναστολέας της πολυ (ADP-ριβόζης) πολυμεράσης (PARP), αναπτύχθηκε και αποδείχθηκε ότι έχει θεραπευτικά οφέλη στην καταπολέμηση του CRPC (de Bono et al., 2020).

Στην πρόσφατη μελέτη τους οι Oshima et al. (2023) εξέτασαν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στη βλάβη του DNA σε διάφορες ανθρώπινες κυτταρικές

σειρές του προστάτη (εικόνα 29). Χρησιμοποίησαν qRT-PCR για να αναλύσουν τα επίπεδα mRNA σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές του προστάτη (PrEc και RWPE) και σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη (LNCaP, DU145, PC3 και 22Rv1). Διαπίστωσαν ότι το γονίδιο *RNASEH2A* ήταν σημαντικά πιο ενεργό στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κυτταρικές σειρές, με τα κύτταρα 22Rv1 να εμφανίζουν την υψηλότερη έκφραση. Επιπλέον, τέσσερα άλλα γονίδια (*RFC2*, *RFC4*, *LIG1* και *POLD1*) εμφάνιζαν επίσης υψηλή έκφραση σε καρκινικά κύτταρα CRPC, με τα κύτταρα 22Rv1 να έχουν τα υψηλότερα επίπεδα. Ως εκ τούτου, η εν λόγω έρευνα δείχνει ότι τα γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση στη βλάβη του DNA διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη, υποδηλώνοντας ότι η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου αυτών των γονιδίων που σχετίζονται με την DDR στον CRPC θα μπορούσε να οδηγήσει σε εξελίξεις στη διάγνωση, τη θεραπεία και την πρόγνωση για τα άτομα που πάσχουν από αυτή τη νόσο (Oshima et al., 2023).



Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση της ανάλυσης της έκφρασης γονιδίων DDR στον καρκίνο του προστάτη (Oshima et al., 2023)

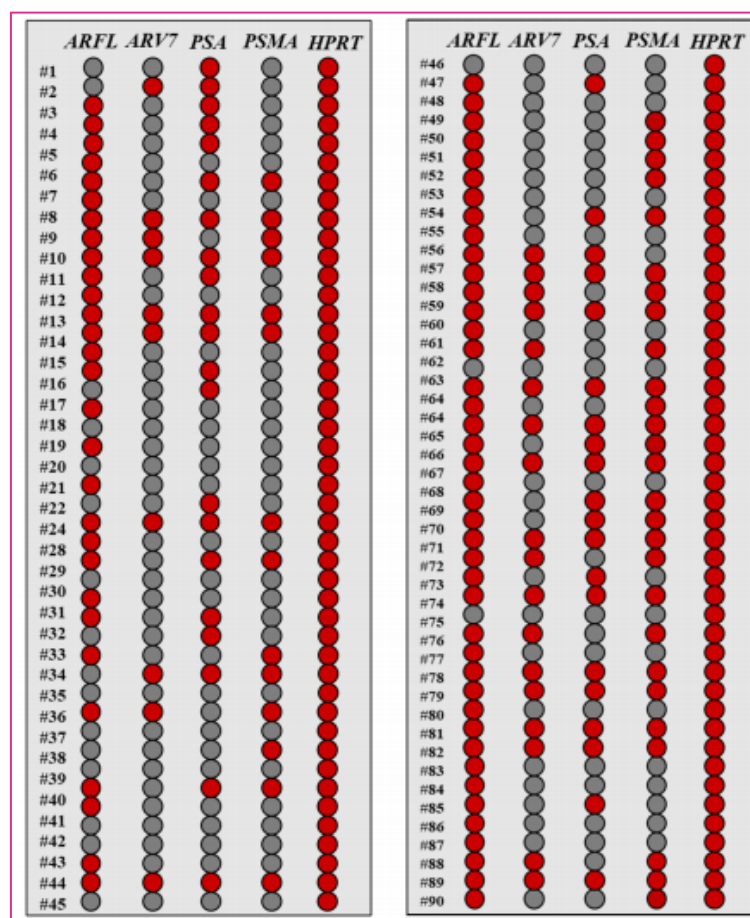
Συνεχίζοντας, στόχος της έρευνας των Tjon-Kon-Fat et al. (2017) ήταν να εξεταστεί εάν τα αιμοπετάλια σε άνδρες με CRPC διατηρούν μετάγραφα που προέρχονται από τον όγκο, ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί προηγουμένως σε άτομα με γλοίωμα και καρκίνο του πνεύμονα (Nilsson et al., 2011). Επιπλέον, εξέτασαν το ενδεχόμενο να διαδραματίζουν αυτά τα μετάγραφα ρόλο στην εξέλιξη του όγκου και στην αντίσταση στις στοχευμένες θεραπείες σε ασθενείς με CRPC, επομένως να χρησιμεύσουν ως πιθανός προγνωστικός παράγοντας για τα αποτελέσματα της θεραπείας μετά από αναστολή της σύνθεσης ανδρογόνων με αβιρατερόνη. Για το λόγο αυτό, συλλέχθηκε ολικό αίμα από ασθενείς με CRPC, από το οποίο απομονώθηκαν τα αιμοπετάλια, ενώ στη συνέχεια εξήχθη το RNA από τα αιμοπετάλια αυτά και υπέστη αντίστροφη μεταγραφή προς cDNA. Στην ανάλυση PCR, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 50 νανογραμμαρίων ενισχυμένου cDNA για κάθε δείγμα και ο απόλυτος αριθμός μεταγράφων προσδιορίστηκε με τη χρήση Droplet Digital PCR (QX-200, Bio-Rad), όπου η κατάσταση των βιοδεικτών αιμοπεταλίων κατηγοριοποιήθηκε ως θετική (τρία ή περισσότερα θετικά σταγονίδια) ή αρνητική (λιγότερα από τρία σταγονίδια). Στα αποτελέσματα της μελέτης δείχθηκε η παρουσία συγκεκριμένων βιοδεικτών - καλλικρεϊνικής πεπτιδάσης-2 και -3 (KLK2, KLK3), φυλλικής υδρολάσης 1 (FOLH1) και νευροπεπτιδίου-Y (NPY) - στα αιμοπετάλια ασθενών με CRPC, οι οποίοι απουσίαζαν από τους υγιείς μάρτυρες. Στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αβιρατερόνη, αυτοί οι βιοδείκτες ήταν ενδεικτικοί των αποτελεσμάτων της θεραπείας, καθώς τα ανιχνεύσιμα επίπεδα των FOLH1, KLK3 και NPY συσχετίστηκαν με βραχύτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου, ενώ οι ασθενείς χωρίς αυτούς τους βιοδείκτες είχαν καλύτερη έκβαση. Οι FOLH1 και NPY προέβλεπαν ανεξάρτητα την επιβίωση χωρίς εξέλιξη σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ενώ επιπλέον, οι KLK2, KLK3 και FOLH1 συσχετίστηκαν με μικρότερη συνολική επιβίωση. Συνολικά, η ανάλυση αυτών των βιοδεικτών στα αιμοπετάλια παρείχε ακριβέστερη πρόβλεψη των αποτελεσμάτων μετά τη θεραπεία με αβιρατερόνη σε σύγκριση με τα βασικά επίπεδα PSA στον ορό ή την ανταπόκριση στο PSA (Tjon-Kon-Fat et al., 2017).

Τέλος, η Zavridou et al. (2022) δημιούργησαν μια νέα δοκιμασία 6-plex (RT-ddPCR για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό τεσσάρων βιοδεικτών καρκίνου του προστάτη (*AR-FL*, *AR-V7*, *PSA* και *PSMA*), ενός γονιδίου αναφοράς (*HPRT*) και ενός συνθετικού εξωτερικού ελέγχου DNA (DNA-EC) σε CTCs από ασθενείς με mCRPC. Η δοκιμασία

χρησιμοποιήθηκε σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το μόριο επιθηλιακής κυτταρικής προσκόλλησης (EpCAM), τα οποία απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα 90 ασθενών με mCRPC και 11 υγιών δοτών.

Οι ερευνητές σχεδίασαν και δημιούργησαν ένα συνθετικό δίκλωνο DNA 144 bp, που δεν υπάρχει στο ανθρώπινο γονιδίωμα (DNA-EC) για να αξιολογηθεί η απόδοση της δοκιμασίας RT-ddPCR, ενώ επιπλέον, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν έξι δίκλωνες συνθετικές αλληλουχίες DNA που αντιστοιχούν στις αλληλουχίες AR-FL, AR-V7, PSA, PSMA, HPRT και DNA-EC. Αυτά τα συνθετικά ολιγόμορφα χρησίμευσαν ως πρότυπα με γνωστές αλληλουχίες και συγκεντρώσεις για την αξιολόγηση της αναλυτικής ευαισθησίας και της ειδικότητας της δοκιμασίας 6-plex RT-ddPCR. Η δοκιμασία 6-plex RT-ddPCR δημιουργήθηκε με τη χρήση εκκινητών και ανιχνευτών που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ταυτοποίηση και μέτρηση των AR-FL, AR-V7, PSA, PSMA, HPRT και DNA-EC σε μια ενιαία αντίδραση, ενώ στη συγκριτική ανάλυση, όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση για τους ίδιους δείκτες με τη χρήση RT-qPCR.

Η νεοσύστατη δοκιμασία 6plex RT-ddPCR χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των θετικών για EpCAM CTCs που ελήφθησαν από το περιφερικό αίμα 90 ασθενών με mCRPC και 11 υγιών ανδρών. Η μελέτη αξιολόγησε τη γονιδιακή έκφραση στα 90 αυτά δείγματα των ασθενών χρησιμοποιώντας RT-ddPCR, ανιχνεύοντας μετάγραφα AR-FL στο 78,9% των δειγμάτων, μετάγραφα AR-V7 στο 31,1%, μετάγραφα PSA στο 45,6% και μετάγραφα PSMA στο 45,6%, ενώ όλα τα δείγματα βρέθηκαν θετικά για το HPRT, επιβεβαιώνοντας την υψηλή ποιότητα του RNA και του cDNA. Η θετικότητα της γονιδιακής έκφρασης ποικίλλει, με το 20% των δειγμάτων να είναι θετικά για όλους τους δείκτες και το 40% αρνητικά για όλους (Εικόνα 30). Στην ομάδα των υγιών δοτών, τα δείγματα ήταν θετικά για AR-FL, HPRT και DNA-EC, αλλά αρνητικά για AR-V7, PSA και PSMA.



Εικόνα 30. Η θετικότητα της γονιδιακής έκφρασης για κάθε μεμονωμένο ασθενή αναπαρίσταται οπτικά με το κόκκινο χρώμα, που υποδηλώνει την ενεργή έκφραση, ενώ το γκρι χρώμα υποδηλώνει την απουσία έκφρασης (Zavridou et al., 2022)

Σε μια άμεση σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων της 6-plex RT-ddPCR και των αποτελεσμάτων της RT-qPCR με τα ίδια κλινικά δείγματα, παρατηρήθηκε ότι τα μετάγραφα AR-V7 και PSMA ανιχνεύονταν συχνότερα στα EpCAM+ CTCs των ασθενών με mCRPC μέσω RT-ddPCR σε σύγκριση με την RT-qPCR. Από την άλλη πλευρά, τα ποσοστά ανίχνευσης για το AR-FL και το PSA ήταν παρόμοια μεταξύ των δύο μεθόδων (Πίνακας 9). Επιπλέον, η νεοαναπτυχθείσα αυτή μέθοδος επιδεικνύει εξαιρετική διαγνωστική εξειδίκευση, καθώς όλα τα δείγματα υγιών ανδρών βρέθηκαν αρνητικά για AR-V7, PSA και PSMA (Zavridou et al., 2022).

Πίνακας 9. Σύγκριση μεταξύ RT-ddPCR και RT-qPCR για την ανίχνευση μεταγράφων ARFL, ARV7, PSA και PSMA σε ασθενείς με CRPC (Zavridou et al., 2022)

RT-qPCR	RT-ddPCR	
	Positive	Negative
ARFL		
Positive	65	8
Negative	6	11
Total	71	19
Concordance	76/90 (80.8%), $P^a < 0.001$, $k = 0.514$	
ARV7		
Positive	13	2
Negative	15	60
Total	28	62
Concordance	73/90 (81.1%), $P^a < 0.001$, $k = 0.495$	
PSA		
Positive	35	9
Negative	6	38
Total	41	47
Concordance	73/88 (83.0%), $P^a < 0.001$, $k = 0.659$	
PSMA		
Positive	28	6
Negative	12	41
Total	40	47
Concordance	69/87 (79.3%), $P^a < 0.001$, $k = 0.579$	

Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη δοκιμασία επιδεικνύει υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και αναπαραγωγικότητα, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση 5 γονιδιακών μεταγράφων σε μικρή ποσότητα cDNA που προέρχεται από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα. Όταν εφαρμόστηκε σε κλινικά δείγματα, η δοκιμασία έδειξε συγκρίσιμες ή ανώτερες επιδόσεις σε σύγκριση με άλλες διαγνωστικές μεθόδους όσον αφορά στη διαγνωστική ευαισθησία και την ειδικότητα και επομένως θα μπορούσε να χρησιμεύσει στην κλινική πράξη ως σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο σε ασθενείς με CRPC.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συζήτηση - Συμπεράσματα

Στο πεδίο της έρευνας για τον καρκίνο του προστάτη, η εφαρμογή της PCR αποτελεί ένα βασικό εργαλείο στην προσπάθεια εντοπισμού ισχυρών μοριακών βιοδεικτών για τον CRPC. Η ικανότητα της PCR να ενισχύει επιλεκτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA με υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια επιτρέπει την ανίχνευση γενετικών μεταλλάξεων, μεταβολών στα προφίλ γονιδιακής έκφρασης και επιγενετικών τροποποιήσεων που είναι κρίσιμες για την κατανόηση της εξέλιξης του CRPC.

Από την παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση προέκυψαν πολλά και σημαντικά συμπεράσματα, όσον αφορά στη συμβολή της PCR στην ανάπτυξη νέων βιοδεικτών για τη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση του CRPC, τα οποία αναλύονται ακολούθως:

- Λόγω των προκλήσεων στη λήψη βιοψιών όγκου, οι υγρές βιοψίες, και συγκεκριμένα η ανάλυση cfDNA, έχουν αναδειχθεί ως πολλά υποσχόμενες μέθοδοι για την ανίχνευση γονιδιακών μεταβολών του AR. Τεχνικές όπως η ψηφιακή PCR (dPCR) και η multiplex PCR με βάση την αλληλουχία στόχου έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στον εντοπισμό των ενισχύσεων και των μεταλλάξεων AR στο cfDNA, παρέχοντας πολύτιμους βιοδείκτες για την αντίσταση στη θεραπεία.
- Η ενίσχυση του γονιδίου AR είναι σπάνια στον ορμονοευαίσθητο καρκίνο του προστάτη, αλλά γίνεται διαδεδομένη στον CRPC, εμφανιζόμενη στο 30-50% των περιπτώσεων. Αυτή η ενίσχυση σχετίζεται με μικρότερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη και αντίσταση στην ADT.
- Η ενίσχυση του AR και η παρουσία παραλλαγών του AR, όπως η AR-V7, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αντίσταση στην ανδρογονοστερητική θεραπεία και στις θεραπείες με αντιανδρογόνα, όπως η ενζαλουταμίδα και η αβιρατερόνη. Ωστόσο, οι ασθενείς με AR-V7-θετικό CRPC μπορεί να εξακολουθούν να ανταποκρίνονται σε χημειοθεραπείες με βάση τις ταξάνες, αναδεικνύοντας το ρόλο της παραλλαγής αυτής στην καθοδήγηση των θεραπευτικών αποφάσεων.
- Η αύξηση του αριθμού αντιγράφων AR που ανιχνεύονται στο cfDNA πριν από τη θεραπεία συσχετίζονται με φτωχή ανταπόκριση σε ορισμένες θεραπείες. Οι

δοκιμασίες multiplex dPCR ενισχύουν την κλινική χρησιμότητα παρέχοντας ολοκληρωμένα δεδομένα σχετικά με τις αλλοιώσεις του αριθμού αντιγράφων από ένα μόνο δείγμα πλάσματος, γεγονός που υποδηλώνει τις δυνατότητές τους ως οικονομικά αποδοτικών και κατατοπιστικών βιοδεικτών.

- Οι δοκιμασίες PCR δίνουν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης της γονιδιακής έκφρασης, των προτύπων μεθυλίωσης του DNA και των γενετικών πολυμορφισμών στην κλινική πρακτική για τη βελτίωση της πρόγνωσης και των στρατηγικών θεραπείας για τον CRPC. Συγκεκριμένα, βιοδείκτες όπως τα γονίδια *PIM-1*, *SHOX2*, *SEPT9* καθώς και ορισμένα SNPs σε γονίδια στεροειδογένεσης προσφέρουν πολλά υποσχόμενους δρόμους για εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις, βελτιώνοντας την κλινική διαχείριση και τα αποτελέσματα για τους ασθενείς με CRPC.
- Τα miRNAs, ιδίως τα miR-21, miR-141 και miR-375, έχουν αναδειχθεί ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για την CRPC. Τα επίπεδα έκφρασής τους στον ορό, τα ούρα και τους ιστούς έχουν δείξει συσχετίσεις με τη σοβαρότητα της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη συνολική πρόγνωση, όπως για παράδειγμα το miR-375 που έχει δείχθει ότι μπορεί να προβλέψει την επιβίωση χωρίς εξέλιξη σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με ενζαλουταμίδη. Τεχνικές με βάση την PCR, όπως οι δοκιμασίες TaqMan miRNA και RT-ddPCR, προσφέρουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση αυτών των βιοδεικτών.
- Τα γονίδια που σχετίζονται με το μονοπάτι απόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR), όπως τα *RNASEH2A*, *RFC2*, *RFC4*, *LIG1* και *POLD1*, έχουν εμπλακεί στην εξέλιξη του CRPC και θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως πρόσθετοι βιοδείκτες για την πρόγνωση της νόσου και τη θεραπευτική στόχευση, ενισχύοντας ενδεχομένως τις εξατομικευμένες στρατηγικές θεραπείας.
- Οι πρόσφατες εξελίξεις στις τεχνολογίες που βασίζονται στην PCR, συμπεριλαμβανομένων των RT-ddPCR και SL-RT PCR, έχουν βελτιώσει σημαντικά την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιοδεικτών στην CRPC. Αυτές οι μέθοδοι προσφέρουν αυξημένη ευαισθησία, ειδικότητα και αναπαραγωγικότητα, καθιστώντας τις πολύτιμα εργαλεία για την κλινική διάγνωση και την έρευνα.

Εν κατακλείδι, αξιοποιώντας δοκιμασίες με βάση την PCR, οι ερευνητές μπορούν να αποκαλύψουν πιθανούς προγνωστικούς δείκτες και εξατομικευμένους θεραπευτικούς στόχους, προωθώντας έτσι την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών στρατηγικών που είναι προσαρμοσμένες στην ετερογενή φύση του CRPC. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες μεγάλης κλίμακας και μελέτες επικύρωσης για τη θέσπιση τυποποιημένων πρωτοκόλλων, ώστε να ενσωματωθούν στην καθημερινή κλινική πράξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), pp.297–305. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.006>.
- ❖ Alarcón-Zendejas, A.P., Scavuzzo, A., Jiménez-Ríos, M.A., Álvarez-Gómez, R.M., Montiel-Manríquez, R., Castro-Hernández, C., Jiménez-Dávila, M.A., Pérez-Montiel, D., González-Barrios, R., Jiménez-Trejo, F., Arriaga-Canon, C. and Herrera, L.A. (2022). The promising role of new molecular biomarkers in prostate cancer: from coding and non-coding genes to artificial intelligence approaches. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, [online] pp.1–13. doi:<https://doi.org/10.1038/s41391-022-00537-2>.
- ❖ Al-Ghazawi, M., Salameh, H., Amo-Afful, S., Khasawneh, S., Ghanem, R., Al-Ghazawi, M., Salameh, H., Amo-Afful, S., Khasawneh, S. and Ghanem, R. (2023). An In-Depth Look Into the Epidemiological and Etiological Aspects of Prostate Cancer: A Literature Review. *Cureus*, [online] 15(11). doi:<https://doi.org/10.7759/cureus.48252>.
- ❖ Allan, C. and Ilic, D. (2015). Laparoscopic versus Robotic-Assisted Radical Prostatectomy for the Treatment of Localised Prostate Cancer: A Systematic Review. *Urologia Internationalis*, 96(4), pp.373–378. doi:<https://doi.org/10.1159/000435861>.
- ❖ Alowiri, N.H., Hanafy, S.M., Haleem, R.A. and Abdellatif, A. (2019). PIK3CA and PTEN Genes Expressions in Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(9), pp.2841–2846. doi:<https://doi.org/10.31557/apjcp.2019.20.9.2841>.
- ❖ Alvarez-Garcia, V., Bartos, C., Keraite, I., Trivedi, U., Brennan, P.M., Kersaudy-Kerhoas, M., Gharbi, K., Oikonomidou, O. and Leslie, N.R. (2018). A simple and robust real-time qPCR method for the detection of PIK3CA mutations. *Scientific Reports*, 8(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22473-9>.
- ❖ Alyethodi, R.R., Singh, U., Kumar, S., Alex, R., Deb, R., Sengar, G.S., Raja, T.V. and Prakash, B. (2018). T-ARMS PCR genotyping of SNP rs445709131 using thermostable strand displacement polymerase. *BMC Research Notes*, [online] 11(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13104-018-3236-6>.

- ❖ Annala, M., Vandekerkhove, G., Khalaf, D., Taavitsainen, S., Beja, K., Warner, E.W., Sunderland, K., Kollmannsberger, C., Eigl, B.J., Finch, D., Oja, C.D., Vergidis, J., Zulfiqar, M., Azad, A.A., Nykter, M., Gleave, M.E., Wyatt, A.W. and Chi, K.N. (2018). Circulating Tumor DNA Genomics Correlate with Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer Discovery*, [online] 8(4), pp.444–457. doi:<https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-17-0937>.
- ❖ Antonarakis, E.S., Lu, C., Lubber, B., Wang, H., Chen, Y., Nakazawa, M., Nadal, R., Paller, C.J., Denmeade, S.R., Carducci, M.A., Eisenberger, M.A. and Luo, J. (2015). Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncology*, 1(5), p.582. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.1341>.
- ❖ Antonarakis, E.S., Lu, C., Lubber, B., Wang, H., Chen, Y., Zhu, Y., Silberstein, J.L., Taylor, M.N., Maughan, B.L., Denmeade, S.R., Pienta, K.J., Paller, C.J., Carducci, M.A., Eisenberger, M.A. and Luo, J. (2017). Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *Journal of Clinical Oncology*, 35(19), pp.2149–2156. doi:<https://doi.org/10.1200/jco.2016.70.1961>.
- ❖ Antonarakis, E.S., Lu, C., Wang, H., Lubber, B., Nakazawa, M., Roeser, J.C., Chen, Y., Mohammad, T.A., Chen, Y., Fedor, H.L., Lotan, T.L., Zheng, Q., De Marzo, A.M., Isaacs, J.T., Isaacs, W.B., Nadal, R., Paller, C.J., Denmeade, S.R., Carducci, M.A. and Eisenberger, M.A. (2014). AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, [online] 371(11), pp.1028–1038. doi:<https://doi.org/10.1056/nejmoa1315815>.
- ❖ Aryee, M.J., Liu, W., Engelmann, J.C., Nuhn, P., Gurel, M., Haffner, M.C., Esopi, D., Irizarry, R.A., Getzenberg, R.H., Nelson, W.G., Luo, J., Xu, J., Isaacs, W.B., Bova, G.S. and Yegnasubramanian, S. (2013). DNA Methylation Alterations Exhibit Intraindividual Stability and Interindividual Heterogeneity in Prostate Cancer Metastases. *Science Translational Medicine*, 5(169), pp.169ra10–169ra10. doi:<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005211>.

- ❖ Azad, A.A., Volik, S.V., Wyatt, A.W., Haegert, A., Le Bihan, S., Bell, R.H., Anderson, S.A., McConeghy, B., Shukin, R., Bazov, J., Youngren, J., Paris, P., Thomas, G., Small, E.J., Wang, Y., Gleave, M.E., Collins, C.C. and Chi, K.N. (2015). Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(10), pp.2315–2324. doi:<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-2666>.
- ❖ Bates, J.A. and Taylor, E.J.A. (2001). Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. *Molecular Plant Pathology*, 2(5), pp.275–280. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00074.x>.
- ❖ Benoist, G.E., Inge, Boerrigter, E., Verhaegh, G.W., Onno van Hooij, Groen, L., Smit, F., Pieter de Mol, Hamberg, P., Dezentjé, V.O., Mehra, N., Gerritsen, W., Somford, D.M., Erp, van and Schalken, J.A. (2020). Prognostic Value of Novel Liquid Biomarkers in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated with Enzalutamide: A Prospective Observational Study. *Clinical chemistry*, 66(6), pp.842–851. doi:<https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa095>.
- ❖ Bertoli, G., Cava, C. and Castiglioni, I. (2015). MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*, 5(10), pp.1122–1143. doi:<https://doi.org/10.7150/thno.11543>.
- ❖ Binder, M., Zhang, B., Hillman, D., Kohli, R., Kohli, T., Lee, A. and Kohli, M. (2016). Common Genetic Variation in CYP17A1 and Response to Abiraterone Acetate in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), p.1097. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms17071097>.
- ❖ Biorad.com (n.d.). Droplet Digital TM PCR Applications Guide. Available at: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf.
- ❖ Bjerregaard, L.G., Aarestrup, J., Gamborg, M., Lange, T., Tjønneland, A. and Baker, J.L. (2016). Childhood height, adult height, and the risk of prostate cancer. *Cancer Causes & Control*, 27(4), pp.561–567. doi:<https://doi.org/10.1007/s10552-016-0731-8>.
- ❖ Brauhut, B.L., Punnen, S. and Kryvenko, O.N. (2018). Updates on Grading and Staging of Prostate Cancer. *Surgical Pathology Clinics*, [online] 11(4), pp.759–774. doi:<https://doi.org/10.1016/j.path.2018.07.003>.

- ❖ Brik, A., Weber, D.G., Swaantje Casjens, Rozynek, P., Meier, S., Behrens, T., Stamatis, G., Darwiche, K., Theegarten, D., Brüning, T. and Georg Johnen (2020). Digital PCR for the Analysis of *MYC* Copy Number Variation in Lung Cancer. *Disease markers*, 2020, pp.1–8. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/4176376>.
- ❖ Büttner, T., Dietrich, D., Romina Zarbl, Niklas Klümper, Ellinger, J., Philipp Krausewitz and Ritter, M. (2024). Feasibility of Monitoring Response to Metastatic Prostate Cancer Treatment with a Methylation-Based Circulating Tumor DNA Approach. *Cancers*, 16(3), pp.482–482. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers16030482>.
- ❖ Casillas, A.L., Toth, R.K., Sainz, A.G., Singh, N., Desai, A.A., Kraft, A.S. and Warfel, N.A. (2018). Hypoxia-Inducible PIM Kinase Expression Promotes Resistance to Antiangiogenic Agents. *Clinical Cancer Research*, 24(1), pp.169–180. doi:<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-1318>.
- ❖ Cattrini, C., Rubagotti, A., Zinoli, L., Cerbone, L., Zanardi, E., Capaia, M., Barboro, P. and Boccardo, F. (2019). Role of Circulating Tumor Cells (CTC), Androgen Receptor Full Length (AR-FL) and Androgen Receptor Splice Variant 7 (AR-V7) in a Prospective Cohort of Castration-Resistant Metastatic Prostate Cancer Patients. *Cancers*, 11(9), p.1365. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers11091365>.
- ❖ D’Amico, F., Biancolella, M., Margiotti, K., Reichardt, J.K. and Novelli, G. (2007). Genomic biomarkers, androgen pathway and prostate cancer. *Pharmacogenomics*, 8(6), pp.645–661. doi:<https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.645>.
- ❖ Chae, Y.K., Anker, J.F., Carneiro, B.A., Chandra, S., Kaplan, J., Kalyan, A., Santa-Maria, C.A., Platanias, L.C. and Giles, F.J. (2016). Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget*, [online] 7(17), pp.23312–23321. doi:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8196>.
- ❖ Chen, C. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), pp.e179–e179. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gni178>.
- ❖ Chen, J.-Y., Wang, P.-Y., Liu, M.-Z., Lyu, F., Ma, M.-W., Ren, X.-Y. and Gao, X.-S. (2023). Biomarkers for Prostate Cancer: From Diagnosis to Treatment. *Diagnostics*, 13(21), pp.3350–3350. doi:<https://doi.org/10.3390/diagnostics13213350>.

- ❖ Cohen, J.D., Javed, A.A., Thoburn, C., Wong, F., Tie, J., Gibbs, P., Schmidt, C.M., Yip-Schneider, M.T., Allen, P.J., Schattner, M., Brand, R.E., Singhi, A.D., Petersen, G.M., Hong, S.-M., Kim, S.C., Falconi, M., Doglioni, C., Weiss, M.J., Ahuja, N. and He, J. (2017). Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [online] 114(38), pp.10202–10207. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1704961114>.
- ❖ Conteduca, V., Mosca, A., Brighi, N., de Giorgi, U. and Rescigno, P. (2021). New Prognostic Biomarkers in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cells*, 10(1), p.193. doi:<https://doi.org/10.3390/cells10010193>.
- ❖ Cornford, P., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., De Santis, M., Gross, T., Henry, A.M., Joniau, S., Lam, T.B., Mason, M.D., van der Poel, H.G., van der Kwast, T.H., Rouvière, O., Wiegel, T. and Mottet, N. (2017). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology*, 71(4), pp.630–642. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.002>.
- ❖ Cotter, K. and Rubin, M.A. (2022). The evolving landscape of prostate cancer somatic mutations. *The Prostate*, 82(S1). doi:<https://doi.org/10.1002/pros.24353>.
- ❖ Cuzick, J., Swanson, G.P., Fisher, G., Brothman, A.R., Berney, D.M., Reid, J.E., Mesher, D., Speights, V., Stankiewicz, E., Foster, C.S., Møller, H., Scardino, P., Warren, J.D., Park, J., Younus, A., Flake, D.D., Wagner, S., Gutin, A., Lanchbury, J.S. and Stone, S. (2011). Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. *The Lancet Oncology*, 12(3), pp.245–255. doi:[https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(10\)70295-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(10)70295-3).
- ❖ de Bono, J., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K.N., Sartor, O., Agarwal, N., Olmos, D., Thiery-Vuillemin, A., Twardowski, P., Mehra, N., Goessl, C., Kang, J., Burgents, J., Wu, W., Kohlmann, A., Adelman, C.A. and Hussain, M. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(22), pp.2091–2102. doi:<https://doi.org/10.1056/nejmoa1911440>.

- ❖ De Laere, B., van Dam, P.-J., Whittington, T., Mayrhofer, M., Diaz, E.H., Van den Eynden, G., Vandebroek, J., Del-Favero, J., Van Laere, S., Dirix, L., Grönberg, H. and Lindberg, J. (2017). Comprehensive Profiling of the Androgen Receptor in Liquid Biopsies from Castration-resistant Prostate Cancer Reveals Novel Intra-AR Structural Variation and Splice Variant Expression Patterns. *European Urology*, 72(2), pp.192–200. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.01.011>.
- ❖ Demeke, T. and Dobnik, D. (2018). Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, [online] 410(17), pp.4039–4050. doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1010-1>.
- ❖ Dess, R.T., Suresh, K., Zelefsky, M.J., Freedland, S.J., Mahal, B.A., Cooperberg, M.R., Davis, B.J., Horwitz, E.M., Terris, M.K., Amling, C.L., Aronson, W.J., Kane, C.J., Jackson, W.F., Jason W.D. Hearn, Deville, C., DeWeese, T.L., Greco, S., McNutt, T., Song, D.Y. and Sun, Y. (2020). Development and Validation of a Clinical Prognostic Stage Group System for Nonmetastatic Prostate Cancer Using Disease-Specific Mortality Results From the International Staging Collaboration for Cancer of the Prostate. *JAMA oncology*, 6(12), pp.1912–1912. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.4922>.
- ❖ Dhanasekaran, S.M., Barrette, T.R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K.J., Rubin, M.A. and Chinnaiyan, A.M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, [online] 412(6849), pp.822–826. doi:<https://doi.org/10.1038/35090585>.
- ❖ Dharavath, B., Yadav, N., Desai, S., Sunder, R., Mishra, R., Ketkar, M., Bhanshe, P., Gupta, A., Redhu, A.K., Patkar, N., Dutt, S., Gupta, S. and Dutt, A. (2020). A one-step, one-tube real-time RT-PCR based assay with an automated analysis for detection of SARS-CoV-2. *Heliyon*, 6(7), p.e04405. doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04405>.
- ❖ Dijkstra, S., Mulders, P.F.A. and Schalken, J.A. (2014). Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: A review. *Clinical Biochemistry*, 47(10-11), pp.889–896. doi:<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.10.023>.
- ❖ Dillinger, T., Sheibani-Tezerji, R., Pulverer, W., Stelzer, I., Hassler, M.R., Scheibelreiter, J., Pérez Malla, C.U., Kuroll, M., Domazet, S., Redl, E., Ely, S., Brezina,

S., Tiefenbacher, A., Rebhan, K., Hübner, N., Grubmüller, B., Mitterhauser, M., Hacker, M., Weinhaeusel, A. and Simon, J. (2022). Identification of tumor tissue-derived DNA methylation biomarkers for the detection and therapy response evaluation of metastatic castration resistant prostate cancer in liquid biopsies. *Molecular Cancer*, 21(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s12943-021-01445-0>.

❖ Du, M., Huang, C.-C., Tan, W., Kohli, M. and Wang, L. (2020). Multiplex Digital PCR to Detect Amplifications of Specific Androgen Receptor Loci in Cell-Free DNA for Prognosis of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers*, 12(8), p.2139. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers12082139>.

❖ Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J. and Klapper, P.E. (2000). Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), pp.559–570. doi:<https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.559>.

❖ Engstrom-Melnyk, J., Rodriguez, P.L., Peraud, O. and Hein, R.C. (2015). Clinical Applications of Quantitative Real-Time PCR in Virology. *Methods in Microbiology*, 42, pp.161–197. doi:<https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.04.005>.

❖ Epstein, J.I., Zelefsky, M.J., Sjoberg, D.D., Nelson, J.B., Egevad, L., Magi-Galluzzi, C., Vickers, A.J., Parwani, A.V., Reuter, V.E., Fine, S.W., Eastham, J.A., Wiklund, P., Han, M., Reddy, C.A., Ciezki, J.P., Nyberg, T. and Klein, E.A. (2016). A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *European Urology*, 69(3), pp.428–435. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.06.046>.

❖ ESMO (2024). *Prostate Cancer: A Guide for Patients*. [online] www.esmo.org. Available at: <https://www.esmo.org/for-patients/patient-guides/prostate-cancer>.

❖ Fernandes, M.C., Onur Yıldırım, Woo, S., Hebert Alberto Vargas and Hedvig Hricak (2022). The role of MRI in prostate cancer: current and future directions. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 35(4), pp.503–521. doi:<https://doi.org/10.1007/s10334-022-01006-6>.

❖ Ferretti, S., Chiara Mercinelli, Marandino, L., Litterio, G., Marchioni, M. and Marchioni, M. (2023). Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Insights on

Current Therapy and Promising Experimental Drugs. *Research and Reports in Urology*, [online] Volume 15, pp.243–259. doi:<https://doi.org/10.2147/rru.s385257>.

- ❖ Fizazi, K., Scher, H.I., Molina, A., Logothetis, C.J., Chi, K.N., Jones, R.J., Staffurth, J.N., North, S., Vogelzang, N.J., Saad, F., Mainwaring, P., Harland, S., Goodman, O.B., Sternberg, C.N., Li, J.H., Kheoh, T., Haqq, C.M. and de Bono, J.S. (2012). Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 13(10), pp.983–992. doi:[https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(12\)70379-0](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(12)70379-0).
- ❖ Fossati, N., Willemse, P.-P.M., Van den Broeck, T., van den Bergh, R.C.N., Yuan, C.Y., Briers, E., Bellmunt, J., Bolla, M., Cornford, P., De Santis, M., MacPepple, E., Henry, A.M., Mason, M.D., Matveev, V.B., van der Poel, H.G., van der Kwast, T.H., Rouvière, O., Schoots, I.G., Wiegel, T. and Lam, T.B. (2017). The Benefits and Harms of Different Extents of Lymph Node Dissection During Radical Prostatectomy for Prostate Cancer: A Systematic Review. *European Urology*, 72(1), pp.84–109. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.12.003>.
- ❖ Gaňová, M., Zhang, H., Zhu, H., Korabečná, M. and Neužil, P. (2021). Multiplexed digital polymerase chain reaction as a powerful diagnostic tool. *Biosensors and Bioelectronics*, 181, p.113155. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113155>.
- ❖ Garibyan, L. and Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), pp.1–4. doi:<https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- ❖ Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X. and Hoshida, Y. (2015). Cancer biomarker discovery and validation. *Translational cancer research*, [online] 4(3), pp.256–269. doi:<https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04>.
- ❖ Goto, Y., Kojima, S., Nishikawa, R., Kurozumi, A., Kato, M., Enokida, H., Matsushita, R., Yamazaki, K., Ishida, Y., Nakagawa, M., Naya, Y., Ichikawa, T. and Seki, N. (2015). MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression

marker. *British Journal of Cancer*, 113(7), pp.1055–1065.

doi:<https://doi.org/10.1038/bjc.2015.300>.

- ❖ Hamdy, F.C., Donovan, J.L., Lane, J.A., Mason, M., Metcalfe, C., Holding, P., Davis, M., Peters, T.J., Turner, E.L., Martin, R.M., Oxley, J., Robinson, M., Staffurth, J., Walsh, E., Bollina, P., Catto, J., Doble, A., Doherty, A., Gillatt, D. and Kockelbergh, R. (2016). 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, [online] 375(15), pp.1415–1424. doi:<https://doi.org/10.1056/nejmoa1606220>.
- ❖ Hammouda, K., Khalifa, F., Alghamdi, N.S., Darwish, H. and El-Baz, A. (2022). Multi-Stage Classification-Based Deep Learning for Gleason System Grading Using Histopathological Images. *Cancers*, [online] 14(23), p.5897. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers14235897>.
- ❖ Harlé, A., Lion, M., Lozano, N., Husson, M., Harter, V., Genin, P. and Merlin, J.-L. (2013). Analysis of PIK3CA exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: Correlation with clinicopathological criteria. *Oncology Reports*, 29(3), pp.1043–1052. doi:<https://doi.org/10.3892/or.2013.2229>.
- ❖ Harvey, C.J., Pilcher, J., Richenberg, J., Patel, U. and Frauscher, F. (2012). Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. *The British Journal of Radiology*, [online] 85(special_issue_1), pp.S3–S17. doi:<https://doi.org/10.1259/bjr/56357549>.
- ❖ Hu, R., Lu, C., Mostaghel, E.A., Yegnasubramanian, S., Gurel, M., Tannahill, C., Edwards, J., Isaacs, W.B., Nelson, P.S., Bluemn, E., Plymate, S.R. and Luo, J. (2012). Distinct Transcriptional Programs Mediated by the Ligand-Dependent Full-Length Androgen Receptor and Its Splice Variants in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Research*, 72(14), pp.3457–3462. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-11-3892>.
- ❖ Hussmann, D. and Hansen, L.L. (2018). Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, [online] 1708, pp.551–571. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7481-8_28.

- ❖ Hwang, S.I. and Lee, H.J. (2014). The future perspectives in transrectal prostate ultrasound guided biopsy. *Prostate International*, 2(4), pp.153–160.
doi:<https://doi.org/10.12954/pi.14062>.
- ❖ IARC (2022). *Global Cancer Observatory*. [online] [gco.iarc.fr](https://gco.iarc.fr/en). Available at: <https://gco.iarc.fr/en>.
- ❖ Jamaspishvili, T., Berman, D.M., Ross, A.E., Scher, H.I., De Marzo, A.M., Squire, J.A. and Lotan, T.L. (2018). Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, [online] 15(4), pp.222–234. doi:<https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.9>.
- ❖ Jin, G., Sun, J., Liu, W., Zhang, Z., Chu, L.W., Seong Tae Kim, Sun, J., Feng, J., Duggan, D., Carpten, J.D., Wiklund, F., Henrik Grönberg, Isaacs, W.B., S. Lilly Zheng and Xu, J. (2011). Genome-wide copy-number variation analysis identifies common genetic variants at 20p13 associated with aggressiveness of prostate cancer. *Carcinogenesis*, 32(7), pp.1057–1062. doi:<https://doi.org/10.1093/carcin/bgr082>.
- ❖ Jones, D., Friend, C., Dreher, A., Allgar, V. and Macleod, U. (2018). The diagnostic test accuracy of rectal examination for prostate cancer diagnosis in symptomatic patients: a systematic review. *BMC Family Practice*, 19(1).
doi:<https://doi.org/10.1186/s12875-018-0765-y>.
- ❖ Jung, M., Kristiansen, G. and Dietrich, D. (2017). DNA Methylation Analysis of Free-Circulating DNA in Body Fluids. *Methods in molecular biology*, 1708, pp.621–641.
doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7481-8_32.
- ❖ Kaltenboeck, B. and Wang, C. (2005). Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics. *Advances in Clinical Chemistry*, [online] 40, pp.219–259. doi:[https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(05\)40006-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(05)40006-2).
- ❖ Kandori, S., Kojima, T. and Nishiyama, H. (2019). The updated points of TNM classification of urological cancers in the 8th edition of AJCC and UICC. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 49(5), pp.421–425. doi:<https://doi.org/10.1093/jjco/hyz017>.
- ❖ Klein, E. and et al (2014). A 17-gene Assay to Predict Prostate Cancer Aggressiveness in the Context of Gleason Grade Heterogeneity, Tumor Multifocality, and Biopsy Undersampling. *European Urology*, [online] 66(3), pp.550–560.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.05.004>.

- ❖ Knipper, S., Ott, S., Schlemmer, H.-P., Grimm, M.-O., Graefen, M. and Wiegel, T. (2021). Options for curative treatment of localized prostate cancer. *Deutsches Arzteblatt Online*, 118, pp.228–236. doi:<https://doi.org/10.3238/arztebl.m2021.0026>.
- ❖ Kokkoris, V., Vukicevich, E., Richards, A., Thomsen, C. and Hart, M.M. (2021). Challenges Using Droplet Digital PCR for Environmental Samples. *Applied Microbiology*, [online] 1(1), pp.74–88. doi:<https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1010007>.
- ❖ Lawrence, M.G., Obinata, D., Sandhu, S., Selth, L.A., Wong, S.Q., Porter, L.H., Lister, N., Pook, D., Pezaro, C.J., Goode, D.L., Rebello, R.J., Clark, A.K., Papargiris, M., Gramberg, J.V., Hanson, A.R., Banks, P., Wang, H., Niranjana, B., Keerthikumar, S. and Hedwards, S. (2018). Patient-derived Models of Abiraterone- and Enzalutamide-resistant Prostate Cancer Reveal Sensitivity to Ribosome-directed Therapy. *European Urology*, [online] 74(5), pp.562–572. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.06.020>.
- ❖ Le, T.K., Duong, Q.H., Baylot, V., Fargette, C., Baboudjian, M., Colleaux, L., Taïeb, D. and Rocchi, P. (2023). Castration-Resistant Prostate Cancer: From Uncovered Resistance Mechanisms to Current Treatments. *Cancers*, [online] 15(20), p.5047. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers15205047>.
- ❖ Leav, I., Plescia, J., Hira Lal Goel, Li, J., Jiang, Z.-P., Cohen, R.C., Languino, L.R. and Altieri, D.C. (2010). Cytoprotective Mitochondrial Chaperone TRAP-1 As a Novel Molecular Target in Localized and Metastatic Prostate Cancer. *The American journal of pathology*, 176(1), pp.393–401. doi:<https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090521>.
- ❖ Leslie, S.W., Soon-Sutton, T.L., Sajjad, H. and Siref, L.E. (2023). *Prostate Cancer*. [online] Nih.gov. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>.
- ❖ Li, Y., Xie, N., Gleave, M.E., Rennie, P.S. and Dong, X. (2015). AR-v7 protein expression is regulated by protein kinase and phosphatase. *Oncotarget*, 6(32), pp.33743–33754. doi:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5608>.
- ❖ Lillard, J.W., Moses, K.A., Mahal, B.A. and George, D.J. (2022). Racial disparities in Black men with prostate cancer: A literature review. *Cancer*, [online] 128(21), pp.3787–3795. doi:<https://doi.org/10.1002/cncr.34433>.

- ❖ Lin, S. and Gregory, R.I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), pp.321–333. doi:<https://doi.org/10.1038/nrc3932>.
- ❖ Ma, Y., Luk, A., Young, F., Lynch, D., Chua, W., Balakrishnar, B., de Souza, P. and Becker, T. (2016). Droplet Digital PCR Based Androgen Receptor Variant 7 (AR-V7) Detection from Prostate Cancer Patient Blood Biopsies. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), p.1264. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms17081264>.
- ❖ Mao, X., Liu, C., Tong, H., Chen, Y. and Liu, K. (2019). Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *American Journal of Translational Research*, [online] 11(12), pp.7209–7222. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6943456/>.
- ❖ Markou, A., Tzanikou, E., Strati, A., Zavridou, M., Mastoraki, S., Bournakis, E. and Lianidou, E. (2020). PIM-1 Is Overexpressed at a High Frequency in Circulating Tumor Cells from Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients. *Cancers*, 12(5), p.1188. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers12051188>.
- ❖ Masoodi, K.Z., Sameena Maqbool Lone and Ravidha Saba Rasool (2021). *Advanced methods in molecular biology and biotechnology : a practical lab manual*. London: Academic Press.
- ❖ Merson, S., Yang, Z., Brewer, D., Olmos, D., Eichholz, A., McCarthy, F., Fisher, G., Gyula Kovács, Berney, D.M., Foster, C.S., Henrik Møller, Scardino, P.T., Cuzick, J., Cooper, C.S. and Clark, J. (2014). Focal amplification of the androgen receptor gene in hormone-naïve human prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 110(6), pp.1655–1662. doi:<https://doi.org/10.1038/bjc.2014.13>.
- ❖ Mo, Y., Wan, R. and Zhang, Q. (2012). Application of Reverse Transcription-PCR and Real-Time PCR in Nanotoxicity Research. *Methods in Molecular Biology*, [online] 926(1), pp.99–112. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_7.
- ❖ Moltzahn, F., Olshen, A.B., Baehner, L., Peek, A.S., Fong, L., Stoppler, H., Simko, J., Hilton, J.F., Carroll, P.R. and Blelloch, R. (2011). Microfluidic-Based Multiplex qRT-PCR Identifies Diagnostic and Prognostic microRNA Signatures in the Sera of Prostate Cancer Patients. *Cancer research*, 71(2), pp.550–560. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-1229>.

- ❖ Montgomery, R.B., Mostaghel, E.A., Vessella, R., Hess, D.L., Kalthorn, T.F., Higano, C.S., True, L.D. and Nelson, P.S. (2008). Maintenance of Intratumoral Androgens in Metastatic Prostate Cancer: A Mechanism for Castration-Resistant Tumor Growth. *Cancer Research*, 68(11), pp.4447–4454. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0249>.
- ❖ Morote, J., Aguilar, A., Planas, J. and Trilla, E. (2022). Definition of Castrate Resistant Prostate Cancer: New Insights. *Biomedicines*, 10(3), p.689. doi:<https://doi.org/10.3390/biomedicines10030689>.
- ❖ Nadal, R., Taplin, M.-E. and Bellmunt, J. (2014). Enzalutamide for the treatment of prostate cancer: results and implications of the AFFIRM trial. *Future Oncology*, 10(3), pp.351–362. doi:<https://doi.org/10.2217/fon.13.275>.
- ❖ NCBI (2017). *Real-Time qRT-PCR*. [online] Nih.gov. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>.
- ❖ Nilsson, J.A., Balaj, L., Hulleman, E., Sjoerd van Rijn, D. Michiel Pegtel, Walraven, M., Widmark, A., Gerritsen, W.R., Henk M.W. Verheul, W. Peter Vandertop, Noske, D.P., Skog, J. and Wurdinger, T. (2011). Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood*, 118(13), pp.3680–3683. doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-344408>.
- ❖ Nimir, M., Ma, Y., Jeffreys, S.A., Opperman, T., Young, F., Khan, T., Ding, P., Chua, W., Balakrishnar, B., Cooper, A., De Souza, P. and Becker, T.M. (2019). Detection of AR-V7 in Liquid Biopsies of Castrate Resistant Prostate Cancer Patients: A Comparison of AR-V7 Analysis in Circulating Tumor Cells, Circulating Tumor RNA and Exosomes. *Cells*, 8(7), p.688. doi:<https://doi.org/10.3390/cells8070688>.
- ❖ Onstenk, W., Willemijn de Klaver, Ronald de Wit, Lolkema, M.P., Foekens, J.A. and Sleijfer, S. (2016). The use of circulating tumor cells in guiding treatment decisions for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 46, pp.42–50. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.04.001>.
- ❖ Oshima, M., Takayama, K., Yamada, Y., Kimura, N., Kume, H., Fujimura, T. and Inoue, S. (2023). Identification of DNA damage response-related genes as biomarkers for

castration-resistant prostate cancer. *Scientific reports*, 13(1).

doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-023-46651-6>.

- ❖ Paner, G.P., Stadler, W.M., Hansel, D.E., Montironi, R., Lin, D.W. and Amin, M.B. (2018). Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. *European Urology*, [online] 73(4), pp.560–569. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.12.018>.
- ❖ Peter, M.R., Bilenky, M., Davies, A., Isserlin, R., Bader, G.D., Fleshner, N.E., Hirst, M., Zoubeydi, A. and Bapat, B. (2021). Distinct DNA methylation patterns associated with treatment resistance in metastatic castration resistant prostate cancer. *Scientific Reports*, 11(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-85812-3>.
- ❖ Petrylak, D.P., Tangen, C.M., Hussain, M.H.A., Lara, P.N., Jones, J.A., Taplin, M.E., Burch, P.A., Berry, D., Moinpour, C., Kohli, M., Benson, M.C., Small, E.J., Raghavan, D. and Crawford, E.D. (2004). Docetaxel and Estramustine Compared with Mitoxantrone and Prednisone for Advanced Refractory Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(15), pp.1513–1520. doi:<https://doi.org/10.1056/nejmoa041318>.
- ❖ Qu, F., Xie, W., Nakabayashi, M., Zhang, H., Jeong, S.H., Wang, X., Komura, K., Sweeney, C.J., Sartor, O., Lee, G.-S.M. and Kantoff, P.W. (2016). Association of AR-V7 and Prostate-Specific Antigen RNA Levels in Blood with Efficacy of Abiraterone Acetate and Enzalutamide Treatment in Men with Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(3), pp.726–734. doi:<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-1070>.
- ❖ Quigley, D.A., Dang, H.X., Zhao, S.G., Lloyd, P., Aggarwal, R., Alumkal, J.J., Foye, A., Kothari, V., Perry, M.D., Bailey, A.M., Playdle, D., Barnard, T.J., Zhang, L., Zhang, J., Youngren, J.F., Cieslik, M.P., Parolia, A., Beer, T.M., Thomas, G. and Chi, K.N. (2018). Genomic Hallmarks and Structural Variation in Metastatic Prostate Cancer. *Cell*, [online] 174(3), pp.758-769.e9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.039>.
- ❖ Rocha, A.J., Miranda, R. de S., Sousa, A.J.S. and da Silva, A.L.C. (2016). Guidelines for Successful Quantitative Gene Expression in Real- Time qPCR Assays. *Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications*. [online] doi:<https://doi.org/10.5772/65850>.

- ❖ Rubin, E.H., Allen, J.D., Nowak, J.A. and Bates, S.E. (2014). Developing Precision Medicine in a Global World. *Clinical Cancer Research*, 20(6), pp.1419–1427. doi:<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-0091>.
- ❖ Salvi, S., Casadio, V., Salvatore Luca Burgio, Conteduca, V., Rossi, L., Menna, C., Carretta, E., Costantini, M., Wainer Zoli and Ugo De Giorgi (2016). CYP17A1 Polymorphisms and Clinical Outcome of Castration-Resistant Prostate Cancer Patients Treated with Abiraterone. *The International Journal of Biological Markers*, 31(3), pp.264–269. doi:<https://doi.org/10.5301/jbm.5000197>.
- ❖ Sanchaisuriya, K., Chunpanich, S., Fucharoen, G. and Fucharoen, S. (2004). Multiplex allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-Punjab and Hb Tak. *Clinica Chimica Acta*, 343(1-2), pp.129–134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.12.029>.
- ❖ Saraon, P., Jarvi, K. and Diamandis, E.P. (2011). Molecular Alterations during Progression of Prostate Cancer to Androgen Independence. *Clinical Chemistry*, [online] 57(10), pp.1366–1375. doi:<https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.165977>.
- ❖ Saylor, P.J., Otani, K., Balza, R., Ukleja, J., Pleskow, H., Fisher, R., Kusaka, E., Otani, Y.S., Priscilla Oluwakemi Badusi, Smith, M.R., Meneely, E., Olivier, K., Lowe, A.C., Toner, M., Shyamala Maheswaran, Haber, D.A., Yeap, B.Y., Lee, R.J. and Miyamoto, D.T. (2024). Circulating and Imaging Biomarkers of Radium-223 Response in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JCO precision oncology*, 8(8). doi:<https://doi.org/10.1200/po.23.00230>.
- ❖ Scher, H.I., Morris, M.J., Stadler, W.M., Higano, C., Basch, E., Fizazi, K., Antonarakis, E.S., Beer, T.M., Carducci, M.A., Chi, K.N., Corn, P.G., de Bono, J.S., Dreicer, R., George, D.J., Heath, E.I., Hussain, M., Kelly, W.K., Liu, G., Logothetis, C. and Nanus, D. (2016). Trial Design and Objectives for Castration-Resistant Prostate Cancer: Updated Recommendations From the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group 3. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, [online] 34(12), pp.1402–1418. doi:<https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.2702>.

- ❖ Schitcu, V.H., Raduly, L., Nutu, A., Zanoaga, O., Ciocan, C., Munteanu, V.C., Cojocneanu, R., Petrut, B., Coman, I., Braicu, C. and Berindan-Neagoe, I. (2022). MicroRNA Dysregulation in Prostate Cancer. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, Volume 15, pp.177–193. doi:<https://doi.org/10.2147/pgpm.s348565>.
- ❖ Schwartz, L.H., Litière, S., de Vries, E., Ford, R., Gwyther, S., Mandrekar, S., Shankar, L., Bogaerts, J., Chen, A., Dancey, J., Hayes, W., Hodi, F.S., Hoekstra, O.S., Huang, E.P., Lin, N., Liu, Y., Therasse, P., Wolchok, J.D. and Seymour, L. (2016). RECIST 1.1—Update and clarification: From the RECIST committee. *European Journal of Cancer*, 62, pp.132–137. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.03.081>.
- ❖ Shahzad, S., Afzal, M., Sikandar, S. and Afzal, I. (2020). Polymerase Chain Reaction. *Genetic Engineering - A Glimpse of Techniques and Applications*. [online] doi:<https://doi.org/10.5772/intechopen.81924>.
- ❖ Sharma, P., Zargar-Shoshtari, K. and Pow-Sang, J.M. (2016). Biomarkers for prostate cancer: present challenges and future opportunities. *Future Science OA*, 2(1). doi:<https://doi.org/10.4155/fso.15.72>.
- ❖ Shin, H.J, Hua, J. and Li, H. (2023). Recent advances in understanding DNA methylation of prostate cancer. *Frontiers in Oncology*, 13. doi:<https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1182727>.
- ❖ Shore, N.D. (2013). Experience with degarelix in the treatment of prostate cancer. *Therapeutic Advances in Urology*, [online] 5(1), pp.11–24. doi:<https://doi.org/10.1177/1756287212461048>.
- ❖ Shore, N.D., Saad, F., Cookson, M.S., George, D.J., Saltzstein, D.R., Tutrone, R., Akaza, H., Bossi, A., van Veenhuyzen, D.F., Selby, B., Fan, X., Kang, V., Walling, J. and Tombal, B. (2020). Oral Relugolix for Androgen-Deprivation Therapy in Advanced Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(23), pp.2187–2196. doi:<https://doi.org/10.1056/nejmoa2004325>.
- ❖ Sieuwerts, A.M., Onstenk, W., Jaco Kraan, Beaufort, C.M., Van, M., Bram De Laere, Luc Dirix, Hamberg, P., Beeker, A., Meulenbeld, H.J., Geert-Jan Creemers, Weerden, van, Guido Jenster, Annemieke J.M. Nieuweboer, Ron H.J. Mathijssen, Ronald de Wit, John W.M. Martens and Sleijfer, S. (2019). AR splice variants in circulating tumor

cells of patients with castration-resistant prostate cancer: relation with outcome to cabazitaxel. *Molecular Oncology*, 13(8), pp.1795–1807. doi:<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12529>.

- ❖ Sissung, T.M., Deeken, J., Leibrand, C.R., Price, D.K., Ehrlich, S., Steinberg, S.M., Liewehr, D.J., Dahut, W. and Figg, W.D. (2016). Identification of novel SNPs associated with risk and prognosis in patients with castration-resistant prostate cancer. *Pharmacogenomics*, 17(18), pp.1979–1986. doi:<https://doi.org/10.2217/pgs-2016-0134>.
- ❖ Słomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Wachulec, M., Bartosz, G. and Strapagiel, D. (2017). High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping—Limitations and Caveats in Practical Case Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 18(11). doi:<https://doi.org/10.3390/ijms18112316>.
- ❖ Smith, M. (2024). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. [online] Genome.gov. Available at: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>.
- ❖ Srivastava, S., Sreenath, T., Dobi, A. and Petrovics, G. (2011). Oncogenic activation of ERG: A predominant mechanism in prostate cancer. *Journal of Carcinogenesis*, 10(1), p.37. doi:<https://doi.org/10.4103/1477-3163.91122>.
- ❖ Stuopelyte, K., Sabaliauskaite, R., Bakavicius, A., Hafliadótir, B.S., Visakorpi, T., Väänänen, R.-M., Patel, C., Danila, D.C., Lilja, H., Lazutka, J.R., Ulys, A., Jankevicius, F. and Jarmalaite, S. (2020). Analysis of AR-FL and AR-V1 in Whole Blood of Patients with Castration Resistant Prostate Cancer as a Tool for Predicting Response to Abiraterone Acetate. *Journal of Urology*, [online] 204(1), pp.71–78. doi:<https://doi.org/10.1097/ju.0000000000000803>.
- ❖ Sun, T., Yang, M., Chen, S., Balk, S., Pomerantz, M., Hsieh, C.-L., Brown, M., Lee, G.-S.M. and Kantoff, P.W. (2011). The altered expression of MiR-221/-222 and MiR-23b/-27b is associated with the development of human castration resistant prostate cancer. *The Prostate*, 72(10), pp.1093–1103. doi:<https://doi.org/10.1002/pros.22456>.
- ❖ Surintranont, J. and Zhou, M. (2023). Prostate Pathology: What is New in the 2022 WHO Classification of Urinary and Male Genital Tumors? *Pathologica*, 115(1), pp.1–16. doi:<https://doi.org/10.32074/1591-951x-822>.

- ❖ Sven P., Gilbert, B., Burns, M., Philippe, C., De Giacomo Marzia, De Loose Marc, Dagand Emilie, David, D., Ronnie, E., Arne, H.-J., Kagkli Dafni Maria, Joachim, K., Antoon, L., Dietrich, M., Marco, M., Paternò Annalisa, Peterseil Verena, Cristian, S., Sovová Tereza and Sowa Slawomir (2019). Overview and recommendations for the application of digital PCR. doi:<https://doi.org/10.2760/192883>.
- ❖ Takayuki Sumiyoshi, Mizuno, K., Yamasaki, T., Miyazaki, Y., Makino, Y., Kosuke Okasho, Li, X., Noriaki Utsunomiya, Goto, T., Kobayashi, T., Terada, N., Inoue, T., Kamba, T., Fujimoto, A., Ogawa, O. and Akamatsu, S. (2019). Clinical utility of androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA as a biomarker for treatment of castration-resistant prostate cancer. *Scientific Reports*, 9(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40719-y>.
- ❖ Takeuchi, T., Okuno, Y., Zaitzu, M., Hattori-Kato, M. and Mikami, K. (2016). Detection of AR-V7 mRNA in whole blood may not predict the effectiveness of novel endocrine drugs for castration-resistant prostate cancer. *Research and Reports in Urology*, 8, p.21. doi:<https://doi.org/10.2147/rru.s98877>.
- ❖ Tavares, I., Morais, M., Dias, F., Medeiros, R. and Ana Luísa Teixeira (2024). Deregulated miRNAs in enzalutamide resistant prostate cancer: A comprehensive review of key molecular alterations and clinical outcomes. *Reviews on cancer*, 1879(2), pp.189067–189067. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189067>.
- ❖ Testa, U., Castelli, G. and Pelosi, E. (2019). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. *Medicines*, 6(3), p.82. doi:<https://doi.org/10.3390/medicines6030082>.
- ❖ Thieu, W., Tilki, D., deVere White, R.W. and Evans, C.P. (2014). The role of microRNA in castration-resistant prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 32(5), pp.517–523. doi:<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.11.004>.
- ❖ Tian, S., Lei, Z., Gong, Z., Sun, Z., Xu, D. and Piao, M. (2020). Clinical implication of prognostic and predictive biomarkers for castration-resistant prostate cancer: a systematic review. *Cancer Cell International*, 20(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s12935-020-01508-0>.

- ❖ Tien, J.C., Liu, Z., Liao, L., Wang, F., Xu, Y., Wu, Y., Zhou, N., Ittmann, M.M. and Xu, J. (2013). The Steroid Receptor Coactivator-3 Is Required for the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer research*, 73(13), pp.3997–4008. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-3929>.
- ❖ Tjon-Kon-Fat, L., Lundholm, M., Schröder, M., Wurdinger, T., Thellenberg-Karlsson, C., Widmark, A., Pernilla Wikström and Jonas, R. (2017). Platelets harbor prostate cancer biomarkers and the ability to predict therapeutic response to abiraterone in castration resistant patients. *The Prostate*, 78(1), pp.48–53. doi:<https://doi.org/10.1002/pros.23443>.
- ❖ Tse, M.Y., Ashbury, J.E., Zwingerman, N., King, W.D., Taylor, S.A. and Pang, S.C. (2011). A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. *BMC Research Notes*, 4(1). doi:<https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-565>.
- ❖ Uroweb - European Association of Urology. (2024a). *EAU Guidelines on Prostate Cancer - TREATMENT - Uroweb*. [online] Available at: <https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer/chapter/treatment>.
- ❖ Uroweb - European Association of Urology. (2024b). *Prostate Cancer - Uroweb*. [online] Available at: <https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer/summary-of-changes/2023>.
- ❖ Valones, M.A.A., Guimarães, R.L., Brandão, L.A.C., Souza, P.R.E. de, Carvalho, A. de A.T. and Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, [online] 40(1), pp.1–11. doi:<https://doi.org/10.1590/s1517-83822009000100001>.
- ❖ van Dessel, L.F., van Riet, J., Smits, M., Zhu, Y., Hamberg, P., van der Heijden, M.S., Bergman, A.M., van Oort, I.M., de Wit, R., Voest, E.E., Steeghs, N., Yamaguchi, T.N., Livingstone, J., Boutros, P.C., Martens, J.W.M., Sleijfer, S., Cuppen, E., Zwart, W., van de Werken, H.J.G. and Mehra, N. (2019). The genomic landscape of metastatic castration-resistant prostate cancers reveals multiple distinct genotypes with potential clinical impact. *Nature Communications*, 10(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13084-7>.

- ❖ Varaprasad, G., Gupta, V.K., Prasad, K.M., Kim, E.-S., Mandava Bhuvan Tej, Mohanty, P., Henu Kumar Verma, Rama, S., Bhaskar Vks Lakkakula and Yun Suk Huh (2023). Recent advances and future perspectives in the therapeutics of prostate cancer. *Experimental Hematology & Oncology*, 12(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s40164-023-00444-9>.
- ❖ Wang, F., Zou, Y.-F., Feng, X.-L., Su, H. and Huang, F. (2011). CYP17 gene polymorphisms and prostate cancer risk: A meta-analysis based on 38 independent studies. *The Prostate*, 71(11), pp.1167–1177. doi:<https://doi.org/10.1002/pros.21332>.
- ❖ Wang, J., Kim, J., Roh, M., Franco, O.E., Hayward, S.W., Wills, M.L. and Abdulkadir, S.A. (2010). Pim1 kinase synergizes with c-MYC to induce advanced prostate carcinoma. *Oncogene*, 29(17), pp.2477–2487. doi:<https://doi.org/10.1038/onc.2010.10>.
- ❖ Wang, M., Cai, J., Chen, J., Liu, J., Geng, X., Yu, X. and Yang, J. (2023). PCR Techniques and Their Clinical Applications. doi:<https://doi.org/10.5772/intechopen.110220>.
- ❖ Warfel, N.A. and Kraft, A.S. (2015). PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors. *Pharmacology & therapeutics*, 151, pp.41–49. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.03.001>.
- ❖ Whale, A.S., Huggett, J.F. and Tzonev, S. (2016). Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*, 10, pp.15–23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.05.002>.
- ❖ Wu, X., Xu, Q.-J., Chen, P.-Z., Yu, C.-B., Ye, L.-F. and Li, T. (2020). Association Between CYP17A1, CYB5A Polymorphisms and Efficacy of Abiraterone Acetate/Prednisone Treatment in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, Volume 13, pp.181–188. doi:<https://doi.org/10.2147/pgpm.s245086>.
- ❖ www.cancer.org. (n.d.). *Prostate Cancer Screening Tests*. [online] Available at: <https://www.cancer.org/cancer/types/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/tests.html>.
- ❖ www.creativebiomart.net. (n.d.). *Targeted Bisulfite Sequencing, Bisulfite Sequencing Service - Epigenetics*. [online] Available at:

<https://www.creativebiomart.net/epigenetics/services/dna-methylation-analysis> [Accessed 27 May 2024].

- ❖ Wyatt, A.W. and Gleave, M.E. (2015). Targeting the adaptive molecular landscape of castration-resistant prostate cancer. *Embo Molecular Medicine*, 7(7), pp.878–894. doi:<https://doi.org/10.15252/emmm.201303701>.
- ❖ Wyatt, A.W., Azad, A.A., Volik, S.V., Annala, M., Beja, K., McConeghy, B., Haegert, A., Warner, E.W., Mo, F., Brahmbhatt, S., Shukin, R., Le Bihan, S., Gleave, M.E., Nykter, M., Collins, C.C. and Chi, K.N. (2016). Genomic Alterations in Cell-Free DNA and Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncology*, 2(12), p.1598. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0494>.
- ❖ Yamada, T., Nakayama, M., Shimizu, T., Nonen, S., Nakai, Y., Nishimura, K., Fujio, Y., Okuyama, A., Azuma, J. and Nonomura, N. (2012). Genetic polymorphisms of CYP17A1 in steroidogenesis pathway are associated with risk of progression to castration-resistant prostate cancer in Japanese men receiving androgen deprivation therapy. *International Journal of Clinical Oncology*, 18(4), pp.711–717. doi:<https://doi.org/10.1007/s10147-012-0430-8>.
- ❖ Yang, S. and Rothman, R.E. (2004). PCR-based Diagnostics for Infectious diseases: uses, limitations, and Future Applications in acute-care Settings. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(6), pp.337–348. doi:[https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(04\)01044-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(04)01044-8).
- ❖ Yao, V., Berkman, C.E., Choi, J.K., O’Keefe, D.S. and Bacich, D.J. (2009). Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid. *The Prostate*, 70(3), pp.305–316. doi:<https://doi.org/10.1002/pros.21065>.
- ❖ Ye, S. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 29(17), pp.88e88. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/29.17.e88>.
- ❖ You, F.M., Huo, N., Gu, Y.Q., Luo, M.-C., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G.R., Dvorak, J. and Anderson, O.D. (2008). BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR

and sequencing primer design. *BMC bioinformatics*, [online] 9, p.253.

doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-253>.

❖ Young, F.P., Becker, T.M., Nimir, M., Opperman, T., Chua, W., Bavanthi Balakrishnar, Paul de Souza and Ma, Y. (2022). Biomarkers of Castrate Resistance in Prostate Cancer: Androgen Receptor Amplification and T877A Mutation Detection by Multiplex Droplet Digital PCR. *Journal of clinical medicine*, 11(1), pp.257–257.

doi:<https://doi.org/10.3390/jcm11010257>.

❖ Zavridou, M., Stavroula Smilkou, Tserpeli, V., Aggeliki Sfika, Evangelos Bournakis, Strati, A. and Evi Lianidou (2022). Development and Analytical Validation of a 6-Plex Reverse Transcription Droplet Digital PCR Assay for the Absolute Quantification of Prostate Cancer Biomarkers in Circulating Tumor Cells of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Chemistry*, 68(10), pp.1323–1335.

doi:<https://doi.org/10.1093/clinchem/hvac125>.

❖ Zhu, J., Wang, S., Zhang, W., Qiu, J., Shan, Y., Yang, D. and Shen, B. (2015). Screening key microRNAs for castration-resistant prostate cancer based on miRNA/mRNA functional synergistic network. *Oncotarget*, 6(41).

doi:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.6102>.

❖ Πουλάκης, Β. (n.d.). *Προληπτικός έλεγχος του καρκίνου του προστάτη*. [online] Βασίλης Πουλάκης - Χειρουργός Ουρολόγος Ανδρολόγος. Available at: <https://poulakis-urology.com/article/pathiseis-prostati-eisagogi/prolhptikos-elegxos-tou-karkinou-tou-prostati/>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.